

농산물 품질계측을 위한 센서 개발

Development of biosensors for evaluation of
the quality of agricultural products

주관연구기관
경북대학교

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산물 품질계측을 위한 센서 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999년 12월 29일

주관연구기관명 : 경북대학교

총괄연구책임자 : 이 혜 성

세부연구책임자 : 최 명 숙

세부연구책임자 : 김 미 라

연 구 원 : 이 용 태

연 구 원 : 차 근 식

연 구 원 : 고 광 락

연 구 원 : 권 인 숙

연 구 원 : 김 유 정

연 구 원 : 조 영 애

연 구 자 문 : 강 신 원

연 구 자 문 : 정 덕 화

요 약 문

I. 제 목 : 농산물 품질계측을 위한 센서 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

21세기에는 인간의 삶의 질과 생활 환경이 크게 개선되리라 예상되며 이에 따라 식생활에서도 고품질의 식품에 대한 요구가 높아질 것으로 예상된다. 고품질의 식품을 생산하기 위해서는 지금까지 사용되어 온 기술보다 진보된 고차원적 기술이 요구되는데 그러한 기술의 하나로서 바이오센서(biosensor)가 큰 관심을 불러일으키고 있다. 바이오센서는 식품의 생산공정 관리와 품질 평가에 이용될 수 있는 첨단 기술로서 그 개발에 관한 연구가 현재 선진국을 중심으로 활발하게 이루어지고 있다. 그러나 우리나라에서는 이에 대한 연구가 극히 미흡한 실정이며 현재 국내에서 생산 가공되는 농산물의 품질관리에 센서가 응용된 바가 거의 없다. 따라서 국내 식품산업이 선진화되어 국제 경쟁력을 갖추기 위해서는 식품분야에 바이오센서를 활용하기 위한 연구가 활성화되어야 할 필요성이 있다.

식품의 안전성, 영양성, 기호성은 식품의 품질평가에서 고려되어지는 주요 요소이다. 이러한 점에서 식품 중의 잔류농약과 필수 아미노산 그리고 유기산의 측정은 농산물의 품질평가에서 필수적인 요소라고 볼 수 있다. 이들 성분들은 현재 주로 기체 크로마토그래피(gas chromatography, GC) 혹은 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 방법에 의해 분석되는데 이 방법들은 감도와 정확도가 높다는 장점을 가지는 반면에 장시간의 전처리 과정과 고가의 기기가 요구된다는 단점

을 가진다. 바이오센서는 이러한 단점을 보완할 수 있으며 선택성이 탁월하고 전처리가 간편하여 단시간에 수많은 시료의 신속한 분석이 가능하다는 장점을 가진다. 그러므로 바이오센서는 장래에 농산물의 품질측정에 활용되어야 하는 적합한 방법이라고 볼 수 있다.

본 연구과제의 목적은 농산물의 안전성, 영양성 및 기호성의 요소들을 측정할 수 있는 바이오센서의 개발이며 구체적인 목적은 다음과 같다.

- 1) 농산물중의 유기인계와 카바메이트계 잔류농약 분석을 위한 효소센서 개발
- 2) 농산물중의 유기인계 농약 fenthion의 면역분석법 및 면역센서 개발
- 3) 농산물의 단백질 질평가를 위한 lysine 측정센서 개발
- 4) 농산물의 단백질 질평가를 위한 phenylalanine 측정센서 개발
- 5) 농산물의 단백질 질평가를 위한 methionine 측정센서 개발
- 6) 농산물의 단백질 질평가를 위한 tryptophane 측정센서 개발
- 7) 농산물에 함유되어 있는 malic acid 측정센서 개발
- 8) 농산물에 함유되어 있는 isocitrate 측정센서 개발

II. 연구개발 내용 및 범위

1. 농산물의 잔류농약 측정 바이오센서의 개발 분야

- 1) 잔류농약 측정용 효소센서의 개발
 - (1) 효소센서 시스템의 수용체 효소 선정을 위한 실험
 - (2) 효소센서 시스템의 구성 및 최적화
 - (3) 센서의 감도를 높이기 위한 유기인계 농약의 산화방법 확립

- (4) 효소센서 시제품의 제작
- (5) 효소센서를 이용한 주요 유기인계 및 카바메이트계 농약의 검출 시험법의 확립
- (6) 효소센서 검출시험과 기존 분석법에 의한 검출시험의 비교
- (7) 효소센서에 의한 식품시료중 농약 검출 시험
- 2) 잔류농약 측정용 효소결합 면역분석법 개발
 - (1) 유기인계 농약 fenthion의 hapten 합성
 - (2) 농약 면역원에 대한 항체 생산
 - (3) Fenthion 검출용 면역분석법(ELISA) 개발
- 3) 잔류농약 측정용 면역센서의 개발
 - (1) 농약 fenthion에 효소 label을 붙인 enzyme tracer 합성
 - (2) 직접 경쟁 ELISA 수립
 - (3) Fenthion 검출용 dipstick형 ELISA 개발
 - (4) Fenthion 검출용 전류법 면역센서 개발
 - (5) 면역센서에 의한 식품중 농약 검출 시험

2. 농산물의 필수아미노산 측정 바이오센서 개발분야

- 1) Lysine 센서의 개발
 - (1) Lysine 센서의 구성요소 선정작업
 - (2) Lysine 센서의 효소 반응기와 막전극 제작
 - (3) Lysine 센서의 검출조건 최적화
 - (4) Phenylalanine 센서의 성능 평가
- 2) Phenylalanine 센서의 개발
 - (1) Phenylalanine 센서 시스템의 구성요소 선정

- (2) Phenylalanine 센서의 최적 검출시스템 설정
- (3) Phenylalanine 센서의 성능 평가
- 3) Tryptophan 센서의 개발
 - (1) Tryptophan 센서 시스템의 구성요소 선정
 - (2) Tryptophan 센서칩 제조 및 처리의 다양화
 - (3) Tryptophan 센서 검출시스템 확립
 - (3) Tryptophan 센서의 성능 평가
- 4) 필수 아미노산 센서 시제품 모델 개발
 - (1) 시제품의 시스템도와 모형 제작
 - (2) 시제품 센서칩의 기질 특이성 확인
 - (3) 시제품 센서의 신호전환 처리

3. 농산물의 유기산 측정 바이오센서 개발분야

- 1) 농산물에 함유되어 있는 malate 측정용 센서 개발
 - (1) Malate 측정을 위한 바이오센서의 원리 및 방법 수립
 - (2) 이온 선택성 막(ISM)의 제조와 성능 실험
 - (3) 이온 선택성 전극(ISE)의 이온 감지도 분석
 - (4) FIA system의 구성 및 시스템의 최적화
 - (5) 센서 시스템의 검출한계 평가
 - (6) 방해물질의 효과 분석
 - (7) Microchip(solid-state electrode)의 제작 및 성능 평가
 - (8) Malate 측정용 센서 시제품의 제작
 - (9) Biosensor와 기존분석법(GC)으로 분석한 식품중 malate 농도 비교
 - (10) 시제품의 성능 평가

2) 농산물에 함유되어 있는 isocitrate 측정용 센서 개발

- (1) Isocitrate 측정을 위한 바이오센서의 원리 및 방법 수립
- (2) 이온 선택성 막(ISM)의 제조와 성능 실험
- (3) 이온 선택성 전극(ISE)의 이온 감지도 분석
- (4) FIA system의 구성 및 시스템의 최적화
- (5) 센서 시스템의 검출한계 평가
- (6) 방해물질의 효과 분석
- (7) Microchip(solid-state electrode)의 제작 및 성능 평가
- (8) Isocitrate 측정용 센서 시제품의 제작
- (9) Biosensor와 기존분석법(GC)으로 분석한 식품중 isocitrate 농도 비교
- (10) 시제품의 성능 평가

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

본 과제는 첨단기술분야인 바이오센서기술을 농산식품의 안전성, 영양성, 기호성의 향상을 위한 품질관리에 활용하기 위한 목적으로 수행되었다. 그 결과 농산물의 안전성과 관련된 잔류농약 측정 센서, 영양성 측정을 위한 필수아미노산 센서, 기호성 관련성분으로서 유기산 측정센서에 대한 기반 기술을 개발하였으며 세부과제별 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 「농산물의 잔류농약 측정 바이오센서의 개발」 과제의 연구결과

- (1) 잔류농약 측정용 효소센서의 개발

Cholinesterase가 유기인계와 카바메이트계 농약에 의해 활성이 저해되

며 저해정도가 농약 농도의 $-\log$ 값에 비례한다는 원리를 이용한 2종의 농약검출용 효소센서를 개발하였다. 그 중 하나는 H^+ -선택성 중합체 막에 butyrylcholinesterase 막을 입힌 비대칭 효소막을 이온선택성 전극에 부착시킨 탐침형(probe type)이었다. 센서 시스템을 구축하여 구성요소를 최적화한 다음 유기인계 농약 paraoxon의 분석에 적용해 보았을 때 $10^5 \sim 10^8$ M에서 검출이 가능하였으므로 본 센서는 paraoxon의 잔류 허용치를 판별하기에 충분할 정도로 성능이 양호하였다. 저해된 효소전극은 pyridine 2-aldoxime으로 완전히 재활성화시켜 사용할 수 있었으므로 센서의 반복적인 사용이 가능하였다.

제2의 효소센서는 acetylcholinesterase를 controlled pore glass에 고정화시킨 반응기와 H^+ -선택성 중합체 막 전극으로 구성된 흐름주입분석형(flow injection analysis type)이었으며 센서 시스템을 최적화한 후 시제품을 제작하였다. 최적화한 센서 시스템은 10종의 유기인계 농약과 9종의 카바메이트계 농약을 10^{-6} M에서 감도 높게 분석할 수 있음을 알았다. 유기인계 농약은 산화시킴으로써 검출의 감도를 높일 수 있다는 것을 확인하였다. 농약의 농도에 따른 센서의 감응을 조사해 본 결과 diazinon(유기인계 농약), carbaryl 및 carbofuran(카바메이트계 농약)은 모두 넓은 범위의 농도 범위($10^{-4} \sim 10^{-11}$ M)에서 검출이 가능하였다. 이것은 지금까지 보고된 농약분석용 센서 중 최고의 감도에 해당한다. 단순한 전처리과정을 거친 농약 첨가 식품시료의 분석에 본 센서를 적용하여 센서의 실용성을 검증하였다. 효소센서에 의한 농약의 저농도 검출한계는 기존의 분석법인 GC나 HPLC보다 더 우수한 것으로 나타났다.

(2) 잔류농약 측정용 효소결합 면역분석법 개발

지금까지 면역분석법의 개발이 보고된 바 없는 유기인계 농약 fenthion의 면역분석법(ELISA)을 개발하기 위하여 7종의 농약 유사체 즉 hapten을

합성하여 단백질에 결합시킴으로써 면역원과 코팅항원을 제조하였으며 면역원을 토끼에 주사하여 항혈청을 얻었다. 항혈청의 항원에 대한 친화력은 1:40000으로 희석시킨 항혈청이 1.00에 가까운 흡광도를 보였으므로 매우 높았다. 항원을 microtiter plate에 코팅시키고 fenthion과 코팅항원을 경쟁시키는 방식의 ELISA를 수립하여 검량곡선을 작성해 본 결과 IC₅₀값은 0.29 ppm이었으며 검량곡선의 직선상의 범위는 10²~10¹ ppm이다. 따라서 본 연구에서 개발한 ELISA는 우리나라에서 설정한 fenthion에 대한 허용기준 (0.1 혹은 0.05 ppm) 초과 여부를 충분히 판단할 수 있는 감도를 가진다.

(3) 잔류농약 측정용 면역센서의 개발

본 연구에서 개발한 2종의 fenthion 분석용 면역센서 중 하나는 항체를 중합체 membrane에 코팅시키고 효소를 붙인 fenthion hapten(enzyme tracer)과 시료 fenthion을 항체에 대해 경쟁적으로 결합시키는 dipstick형이었다. 최적화된 센서로 10²~10⁴ ppb 범위의 fenthion의 검출이 가능함을 확인하였다. 식품시료 중의 fenthion을 추출하여 분석한 경우에도 검출한계가 10~100 ppb정도로 나타나 실제 식품시료 중 fenthion의 검출에 간편한 추출법으로 장비없이 현장에서 이용할 수 있다. 이 분석법은 그 장비를 저렴한 가격으로 제작할 수 있고 육안으로 색변화를 식별하는 간단하고 쉬운 분석과정을 거치므로 농산물 재배자나 소비자가 현장에서 사용할 수 있다.

개발한 제2의 면역센서는 고정화된 항체에 대해 시료 fenthion과 glucose oxidase를 붙인 fenthion hapten을 경쟁시키는 방식을 택하였으며 경쟁의 측정은 glucose가 glucose oxidase에 의해 반응하여 생성된 H₂O₂를 전류법으로 측정함으로써 가능하다는 원리를 이용하였다. 전류법 측정을 위한 일회용 전극은 탄소 paste를 이용하여 스크린 프린팅하여 제작하였다. 이 면역센서를 이용하여 fenthion을 분석한 결과 0.1 ppb~1 ppm 농도의 분석이 가능하였다.

2) 「농산물의 필수아미노산 측정 바이오센서의 개발」 과제의 연구결과

(1) Lysine 센서

기질 특이성이 있는 효소 반응기(enzyme immobilized Sepharose 4B)를 사용하여 lysine의 효소 반응 생성물을 전위차법에 의해 검출·정량하는 lysine sensor는 10^{-1} ~ 10^{-3} M 까지 정량적으로 감응하였다. 시료 buffer 용액중 lysine 시료를 10^{-3} M sodium acetate buffer(pH 5.0)에 용해한 경우 전극 감응도가 가장 우수한 것으로 입증되었다. 또한 기질 lysine과 lysine decarboxylase의 효소반응시 coenzyme 기능을 하는 pyridoxal phosphate (PLP)의 농도변화에 따른 lysine 센서의 감응도는 모든 농도에 걸쳐 우수한 감응도를 나타내었다. Lysine decarboxylase가 고정된 Sepharose 4B slurry의 적정량은 100 μ L 혹은 200 μ L slurry가 50 μ L slurry와 300 μ L slurry 사용시 보다 그 감응도가 나왔고 100 μ L와 200 μ L slurry 간에는 10^{-2} ~ 10^{-4} M 범위에서는 거의 차이가 없는 것으로 확인되었다. 그러나 10^{-1} M lysine 농도에서는 200 μ L slurry의 감응도가 100 μ L slurry보다 6 mV 정도 더 높게 나타났다. Lysine decarboxylase와 lysine의 최적 효소반응 온도는 4°C에서는 그 감응도가 다소 감소되고 또한 반응시간도 지연되었으며, 실온인 25°C와 37°C에서는 반응시간도 30초 이내로 단축되고 감응도도 향상되었다. 따라서 lysine 센서장치는 실온에서도 편리하게 사용될 수 있는 것으로 판단된다. Lysine sensor의 검출한계는 10^{-2} ~ 10^{-4} M 범위에서 가장 정량적으로 관찰되었으므로 높은 농도의 시료는 희석하여 사용하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. Lysine 시료를 사용하여 lysine 센서의 재현성을 시험하였을 때 동일 농도 시료간의 potential 차이는 거의 관찰되지 않아 센서의 재현성은 매우 우수한 것으로 나타났다. 효소가 고정된 Sepharose 4B slurry의 효소 활성은 4°C, pH 8.5에서 1년 이상 안정하게 유지되며, 효소반

응에 사용된 Sepharose 4B는 다시 회수하여 원심분리에 의해 세척되며 30 회 이상 재사용하여도 효소 활성이 원래 상태로 유지되어 그 사용이 매우 실용적이다.

(2) Phenylalanine 센서

Phenylalanine 농도변화에 따른 용액의 유전율 변화를 원리로 한 표면 플라즈몬 공명형 phenylalanine 센서를 구상하고, 이 센서의 시스템 및 센서 칩을 제작하였다. 센서칩은 electron beam evaporation과 thermal evaporation 방법으로 제작된 금박막 센서칩을 사용하였다. 시료인 phenylalanine을 측정해 본 결과, thermal evaporation방법으로 제작된 금박막보다는 electron beam evaporation방법으로 제작한 금박막이 $10^3 \sim 10^5$ M phenylalanine 농도변화에 대해서 직선적인 변화를 보임으로써 그 안정성과 우수성을 나타내었다. 한편 phenylalanine 시료는 tris-buffer나 acetate buffer에 용해시켜 사용한 것보다 순수한 물인 증류수에 용해시켜 사용한 경우가 센서칩의 감응도가 증가되며 그 공명각 변화 또한 phenylalanine 농도변화에 비례하여 변화되었다. 제작된 phenylalanine sensor는 전위차법을 이용한 필수 아미노산 센서에 비해 시료의 검출범위와 감응도가 훨씬 향상되었다.

(3) Tryptophan 센서

Phenylalanine 센서와 비슷한 원리를 사용하되 기질 아미노산과 선택적인 반응성을 지닌 효소를 coating한 sensor chip을 갖춘 tryptophan sensor를 제작한 결과 기질인 필수 아미노산의 검출범위가 10^9 M 까지 확대되고 감응도도 훨씬 우수하였다. 기질 특이성이 있는 효소가 고정되지 않은 bare gold membrane을 사용한 경우 순수증류수에 용해된 tryptophan은 $10^3 \sim 10^5$ M 농도변화에 대해서 직선적인 감응도를 보였으며, tris-buffer(pH 4.0)와 acetate buffer(pH 7.0)에서도 직선적으로 감응하였다. Tryptophan을

순수증류수, tris-buffer(pH 4.0), acetate buffer(pH 7.0)에 용해한 경우 농도가 매 10배 변화할 때, resonance angle shift 변화도는 0.3도로 관찰되었다. 또한 tryptophanase 금박막을 사용하여 tryptophan의 타 필수 아미노산의 농도를 측정된 결과 tryptophan 센서칩은 타 아미노산 기질에 전혀 감응하지 않아 센서칩의 특이성이 높게 평가되었다. 센서칩 표면에 부착된 효소분자들은 전자주사현미경상에서 조밀한 입체적 입자형태로 관찰된 반면 효소를 부착하지 않을 경우의 센서칩 표면은 평평한 형태로 나타났다.

(4) 필수 아미노산 측정용 시제품

제작된 필수 아미노산 센서 시제품은 surface plasmon resonance형 sensor이며, 이 장치는 모든 필수아미노산에 대해서 기질 특이성-효소만 있으면 모든 필수 아미노산 측정에 활용될 수 있음이 확인되었다. 시제품 제작 과정에서는 systematic diagram을 설계하여 센서장치의 각 부품들을 적절한 위치에 배치하였으며, photo diode array를 사용함으로써 각 입사광이 미세한 분해능을 가지면서 측정되도록 하였다. 광검지부에서 검지된 감응도 신호는 증폭단을 거쳐 AD(Analog to Digital)변환기로 입력되며, 디지털화된 신호는 소형 컴퓨터에서 데이터 필터링을 거친 후 화상으로 처리되어 컴퓨터 화면에 나타난다. 본 시제품 형태는 lysine 센서, phenylalanine 센서 및 tryptophan 센서를 개발하는 과정중 최종 단계에서 가장 우수한 성능을 지닌 필수 아미노산 센서로 개발된 것이다.

3) 「농산물의 유기산 측정 바이오센서의 개발」 과제의 연구 결과

본 연구에서는 malate와 isocitrate를 분석할 수 있는 바이오센서 시스템을 제작하였고 이 바이오센서 시스템의 감도와 선택성에 영향을 줄 수 있는 여러 실험 변수들을 최적화하였다. 또한 휴대용 소형 센서 개발의 일환으로

소형 전극인 microchip(solid-state electrode)을 제작하였고 conventional electrode와 microchip을 이용한 시제품을 제작하였다. 최적화된 조건하에서 시제품을 이용하여 실제 식품의 유기산 함량을 정량 분석하였으며, 신뢰성 검증을 위해 분석결과를 기존의 방법인 GC 분석결과와 비교하였다.

(1) Malate sensor system의 개발

Malate 측정용 FIA system의 최적 분석조건을 확립하기 위해 센서 시스템에 영향을 줄 수 있는 여러 변수들을 실험한 결과 CO_3^{2-} -ISE 중 polymer로는 PVC를 사용하는 경우가 최적으로 나타났으며, carrier buffer로는 1 mM phosphate buffer(pH 7.4), 흐름속도는 14.7 mL/min, 효소반응기로부터 감지기까지의 튜빙길이는 15 cm, 시료주입량은 100 μL , 효소 고정화시 loading 양은 20 units인 경우가 가장 최적인 것으로 나타났다. 또한 설정된 최적조건에서 malate 분석시 10^{-4} ~ 10^{-1} M의 넓은 농도범위에서 malate 농도와 전위차간에 직선의 상관관계를 보였다. 카보네이트 선택성 막의 선택성을 높이기 위해 조성을 달리하여 막을 제조한 후 여러 방해요인의 영향력을 조사하였다. TFABB와 TFADB 두 종류의 ionophore로 달리하여 제조한 막의 NADP 영향을 조사한 결과 TFADB-based membrane이 고농도에서도(10^{-1} M) 적은 영향을 받는 것으로 나타났다. 또한 TFADB와 TMT 두 종류의 ionophore로 제조한 CO_3^{2-} -ISM의 pH 영향과 기질인 malate 영향을 조사한 결과 pH 영향 조사에서는 TFADB-based membrane의 경우가 pH 6.0~9.0 사이의 범위에서 pH 변화에 다른 전위차 변화가 거의 없고 더욱 안정적인 것으로 나타났으며, malate 영향력 조사에서는 두 종류의 막 모두 10^{-5} ~ 10^{-3} M 농도범위에서 유의적인 방해효과를 보이지 않았다. 따라서 NADP, pH, malate 세 종류의 방해물질의 영향을 모두 고려할 때 TFADB-based membrane이 본 malate 측정용 센서에 가장 적합한 것으로 나타났다. 휴대용 센서 개발을 위해 소형 전극인 solid-state electrode

를 제작하였고 그 성능을 conventional electrode와 비교한 결과 카보네이트에 대한 감도가 conventional electrode보다 높았으나 표준용액(NaHCO_3)의 농도와 전위차 사이의 상관계수는 다소 떨어졌다. 그러나 linear detection range가 $10^{-4} \sim 10^{-1}$ M로 적용시 넓은 범위에서 이용이 가능하며 또한 하나의 칩에 multiple sensors를 포함할 수 있음을 고려할 때 소형화 전극은 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대되었다. 본 연구의 malate 측정용 바이오센서 시제품의 성능을 검증하기 위해 식품을 바이오센서로 분석한 후 그 결과치를 GC분석 결과치와 비교한 결과 본 연구에서 개발된 바이오센서는 신뢰성 있는 데이터를 제공해주는 것으로 나타났다.

(2) Isocitrate sensor system의 개발

FIA system에서 Isocitrate 측정용 바이오센서의 최적분석 조건을 확립하기 위해 센서 시스템에 영향을 줄 수 있는 여러 변수들을 실험한 결과 carrier buffer 1은 0.1 M Tris- H_2SO_4 (pH 7.5), carrier 2는 0.6 M Tris- H_2SO_4 (pH 11.0)가 가장 최적으로 나타났으며, flow rate는 13.6 mL/hr, 시료주입량은 100 μL , carrier buffer로부터 변환기까지 FIA system으로 연결하는 튜빙내경은 0.89 mm인 경우가 가장 최적인 것으로 나타났다. 설정된 최적 조건에서 isocitrate 분석시 $10^{-4} \sim 10^{-1}$ M의 넓은 농도범위에서 직선의 상관관계를 나타내는 것을 볼 때 식품에 있는 다양한 농도의 isocitrate를 측정할 때 더욱 유용한 시스템으로 판단되었다. 센서 시스템을 이용하여 실제 식품시료를 분석하기 위하여 표준 isocitrate 용액에 glucose, sucrose, fructose 등의 당류와 malate, ascorbate, pyruvate, tartarate, citrate 등의 여러 유기산들을 첨가함으로써 방해정도를 실험한 결과 방해물질의 농도가 식품내 자연적으로 존재하는 양에 비해 과량임에도 불구하고 solid-state electrode로 측정한 malate의 저해를 제외하고는 conventional electrode와 solid-state electrode에서 모두 약 10% 정도의 영향을 보였다.

따라서 실제 식품시료에 적용시에는 이러한 방해정도는 더욱 줄어들 것으로 판단되었다. 본 연구의 isocitrate 측정용 바이오센서 시제품의 성능을 검증하기 위해 식품시료를 바이오센서로 분석한 후 그 결과를 GC분석 결과와 비교한 결과 딸기주스를 제외한 모든 과일주스에서 각 분석방법간의 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 개발한 isocitrate 측정용 센서 시스템은 실제시료의 적용에 있어서 매우 신뢰성있는 데이터를 제공하는 것으로 판단되었다. 또한 본 연구에서 제작한 microchip (solid-state electrode)은 소형 전극으로서 센서 시스템을 소형화하고 낮은 비용으로 대량생산을 가능하게 하며, 하나의 칩에 multiple sensor를 포함할 수 있으므로 동시에 다시료 분석이 가능한 휴대용 센서 개발에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 예상된다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구에서 수행한 식품분석용 센서의 개발 연구는 향후 우리나라 식품분야 센서의 개발을 위한 기반 기술의 축적에 기여할 수 있을 것이다. 이 센서들은 생산과 유통과정의 농산식품의 안전성, 영양성, 기호성의 평가에 적용함으로써 안전한 고품질의 농산물을 생산하고 선별하는데 활용할 수 있을 것이다.

본 과제 의 연구결과를 효율적으로 활용하기 위한 방안은 다음과 같다.

- 1) 연구결과 보고서를 식품 관련기관 및 연구자들에게 배포하여 새로운 기술로서 활용할 수 있도록 한다.
- 2) 관련분야 국내외 학술지 및 학술회의에 연구결과를 게재 발표한다.

- 3) 연구결과의 일부를 특허출원하여 연구개발 결과를 상품화한다.
- 4) 센서개발 기술을 관심있는 관련 업체에 이전하여 상품화를 유도한다.
- 5) 개발된 농약 효소센서는 정부의 농약 검사기관에서 유기인계와 카바메이트계 농약의 존재 여부를 스크린하는 보조적인 농약 검출법으로 활용될 수 있다. 이 분석법은 농약검사에 있어서 상당한 인력과 시간의 절약을 가져올 수 있을 것이다.
- 6) Dipstick형 fenthion ELISA는 현장에서 사용할 수 있는 간단하고 쉬운 분석법이므로 농산물 생산자와 소비자가 현장에서 간편하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.
- 7) 필수 아미노산 센서는 제한 아미노산을 함유한 단백질 식품의 아미노산 강화공정에 활용될 수 있다. (예; 아미노산 강화쌀 제조)
- 9) 필수 아미노산 센서는 고품질 단백질을 함유하는 농산물 재배법 스크린에 이용될 수 있다.
- 10) 필수 아미노산 센서는 아미노산 대사장애 환자들을 위한 특수 단백질 식품 개발에 유용하게 이용될 수 있다.
- 11) Malate 측정용 센서와 isocitrate 측정용 센서는 각종 과일, 과일주스 및 발효주 등 식품에 함유되어 있는 malate와 isocitrate의 농도를 측정하는데 이용되어 식품의 품질 및 과일의 숙성도, 과일주의 발효정도 측정에 이용될 수 있을 것이다.
- 12) Microchip을 이용한 소형화 센서는 batch type으로 현장에서 휴대용 분석기기로 활용할 수 있을 것이다.

3. 현재까지 본과제와 관련된 발표실적

- 1) 국내외 전문학술지

- (1) 1997. 11. Simple lysine sensing system using CO₂ electrode and enzyme immobilized to CNBr-activated sepharose 4B. Journal of the Korean sensors society, 6(6), 8-15
- (2) 1997. 12. Biosensor의 기술과 식품과학에서의 이용. 식품과학과 산업, 30(4), 112-125
- (3) 1998. 3. Potentiometric biosensor for detection of L-malate and D-isocitrate employing CO₃²⁻-selective electrode and enzyme immobilization in flow injection analysis. J. Food Sci. Nutr., 3(1), 36-42
- (4) 1998. 5. Flow Injection Biosensor for the detection of Anti-cholinesterases. J. of Biochemistry and Molecular Biology, 31(3), 296-302
- (5) 1998. 9. Tubular type and probe type flow-through carbonate ion selective electrodes for L-malate determination in flow injection analysis. Food Sci. Biotechnol. 7(3), 181-187
- (6) 1998. 12. 식품안전성 평가를 위한 바이오센서이용. 식품과학과 산업, 31(4), 93-113
- (7) 1999. 2. Fabrication of butyrylcholinesterase sensor using polyurethane-based ion-selective membrane. Biosensors and Bioelectronics, 14(4), 435-438,
- (8) 1999. 3. Potentiometric determination of L-Malate using ion-selective electrode in flow injection analysis system. J. Food Sci. Nutr., 4(1), 79-83
- (9) 1999. 11. Measurement of phenylalanine concentration using surface plasmon resonance phenylalanine sensor with bare gold membrane. Submitted to Journal of Food Science & Nutrition.
- (10) 1999. 11. Surface plasmon resonance tryptophan sensor with tryptophanase-coated gold membrane chip. Submitted to Journal of the Korean Sensors Society.
- (11) 1999. 12. Determination of carbamate pesticides by a cholinesterase-based flow injection biosensor. Submitted

to International Journal of Food Science and Technology.

2) 학술회의 proceeding

- (1) 1997. 6.15. L-malate determination with the CO_3^{2-} -selective electrode in flow injection analysis using immobilized malic enzyme. Proceeding in IFT Annual Meeting, p57, Orlando, U.S.A.
- (2) 1997. 9.27. Simple lysine sensing system using 1997. Simple lysine sensing system using CO_2 electrode and enzyme immobilized to CNBr-activated Sepharose 4B. 제42차 한국식품 영양과학회 추계 학술대회 초록집 및 식품산업과 영양, p67
- (3) 1997. 11. 1. 농약검출용 Butyrylcholinesterase 효소센서의 개발. 한국식품과학회 제59차 학술발표회 논문초록집, p76
- (4) 1997. 11. 1. 농약검출용 Flow Injection Analysis 바이오센서의 개발. 한국식품과학회 제59차 학술발표회 논문초록집, p76
- (5) 1997. 1.22. Determination of L-malate and isocitrate by using CO_3^{2-} -selective electrode in FIA. 한국산업식품공학회 추계학술 발표회
- (6) 1998. 5.30. Comparison of tubular type and probe type flow-through ISEs for a novel L-malate biosensor, 한국식품과학회 60차 학술발표초록집
- (7) 1998. 5.30. Potentiometric biosensor for detection of L-malate and D-isocitrate employing CO_3^{2-} -selective electrode in flow injection analysis, 한국식품영양과학회 춘계학술발표회
- (8) 1998.11. 7. Hapten Synthesis for Organophosphate Pesticides Immunoassay. 한국식품과학회 제61차 학술발표초록집, p400
- (9) 1998.11. 7. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Fenthion. 한국식품과학회 제 61차 학술발표 초록집, p390

- (10) 1998.11. 7. FIA형 Cholinesterse 바이오센서에 의한 잔류농약 분석
한국식품과학회 제61차 학술발표초록집, P389
- (11) 1998.11. 7. Surface plasmon resonance를 이용한 phenylalanine
sensor. 제61차 한국식품과학회 추계학술대회. p399
- (12) 1998.11. 7. H⁺를 이용한 D-isocitrate측정용 바이오센서의 개발.
한국식품과학회 61차 학술발표초록집
- (13) 1998.11.21. Malate determination using CO₂ gas electrode. 한국식품
영양과학회 44차 추계학술발표회
- (14) 1999. 6. 5. Malate 측정용 biosensor 최적화를 위한 CO₃²⁻-selective
membrane 조성 비교, 한국식품과학회 62차 학술발표초록집
p338
- (15) 1999. 6. 4. 표면플라즈몬 공명(SPR) 현상을 이용한 tryptophan 측정.
한국식품관련학회 춘계 연합학술대회 초록집, p339
- (16) 1999.10.30. Fenthion ELISA 개발에 있어서 hapten 구조가 미치는
영향. 한국식품과학회 제63차 학술발표초록집, p378
- (17) 1999.10.30. Fenthion 분석용 direct immunoassay 개발.
한국식품과학회 제63차 학술발표초록집, p378
(식품과학회 우수논문상)
- (18) 1999.10.30. CO₃²⁻-ISE를 이용한 D-isocitrate 측정용 바이오센서.
한국식품과학회 63차 학술발표초록집, p380
- (19) 1999.11.20. 효소반응과 surface plasmon resonance(SPR)을 이용한
tryptophan 바이오센서. 제44차 한국식품영양과학회 추
계학술 대회 초록집, p37

3) 특허

- (1) 1999. 2.12. 카보네이트 이온선택성 전극으로 구성된 L-말레이트
검출용 바이오센서 및 이를 이용한 L-말레이트 검출 방법.
특허 출원번호 : 제99-5076호

SUMMARY

I. **TITLE** : Development of biosensors for evaluation of the quality of agricultural products

II. OBJECTIVES AND NECESSITY

It is expected that, in 21 century, quality of human life and living conditions will continue to be improved and the demand for high quality foods will also increase. In order to produce high quality foods, highly advanced technology is demanded and biosensor is one of emerging technologies that can meet the demands. Biosensor can be used in the production management and quality evaluation of foods and, thus, the research activities to develop biosensor is very active in some advanced countries. But, research in this area has not been satisfactory in Korea and there has been little application of sensor to quality control of agricultural product. Therefore the research for the development and application of biosensor in food science area needs to be activated for advancement and international competitiveness of Korean food industry.

The major factors considered in evaluation of food quality are safety, nutritional status and taste of foods. Accordingly measurements of residual pesticides, essential amino acids and organic acids are the essential parts of the quality evaluation of agricultural products. Presently, these components are generally analyzed by gas

chromatography(GC) or high performance liquid chromatography(HPLC) methods. These conventional analytical methods are highly sensitive and give accurate results, but require time-consuming process of sample preparation and expensive equipments. Biosensors can supplement these problems and are specific, simple and rapid to use. Therefore, biosensor is highly promising analytical technique that can be used for quality evaluation of agricultural products in the future.

The objectives of the present research project, summarized, are as follows.

- 1) Development of enzyme sensors for the detection of organophosphorus and carbamate pesticides
- 2) Development of immunoassays and immunosensors for fenthion, an organophosphorus pesticide
- 3) Development of a lysine sensor for evaluation of the protein quality of agricultural products
- 4) Development of a phenylalanine sensor for evaluation of the protein quality of agricultural products
- 5) Development of a methionine sensor for evaluation of the protein quality of agricultural products
- 6) Development of a tryptophan sensor for evaluation of the protein quality of agricultural products
- 7) Development of a malic acid sensor for taste evaluation of agricultural products
- 8) Development of a isocitrate sensor for taste evaluation of agricultural products

III. SCOPES AND CONTENTS OF THE STUDY

1. Development of biosensors for the determination of pesticide residues in agricultural products

1) Development of enzyme sensors for pesticide residues

- (1) Experiments for selection of receptor enzyme of enzyme sensor system
- (2) Construction and optimization of the enzyme sensor system
- (3) Establishment of oxidation method for organophosphorus pesticides to enhance sensitivity of the sensor
- (4) Construction of a trial product of the enzyme sensor system
- (5) Establishment of detection method for major organophosphorus and carbamate pesticides using the enzyme sensor
- (6) Comparison of the results of the analysis by enzyme sensor and conventional methods
- (7) Application of the enzyme sensor to the analysis of pesticides in food sample

2) Development of enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for pesticide residues

- (1) Synthesis of haptens for organophosphorus pesticide fenthion
- (2) Production of antibody to pesticide immunogen
- (3) Development of ELISAs for the determination of fenthion

3) Development of immunosensors for pesticide residues

- (1) Synthesis of an enzyme tracer, enzyme-labeled fenthion

- (2) Establishment of direct competitive ELISA
- (3) Development of a dipstick format ELISA for fenthion
- (4) Development of an amperometric immunosensor for fenthion
- (5) Application of the immunosensor to the analysis of pesticides in food samples

2. Development of biosensors for the determination of essential amino acids in the agricultural products

1) Development of a lysine sensor

- (1) Selection of components of the lysine sensor device
- (2) Design of enzyme reactor & electrode and their performance test
- (3) Establishment of optimum detection conditions for the lysine sensor
- (4) Evaluation of the lysine sensor

2) Development of a phenylalanine sensor

- (1) Selection of components of the phenylalanine sensor
- (2) Establishment of detection and operation conditions for the phenylalanine sensor
- (3) Evaluation of the phenylalanine sensor

3) Development of a tryptophan sensor

- (1) Selection of components of the tryptophan sensor
- (2) Preparation of the tryptophan sensor chip and its treatment
- (3) Establishment of detection and operation conditions for the tryptophan sensor

- (4) Evaluation of the tryptophan sensor
- 4) Development of a commercial model for essential amino acid biosensor
 - (1) Design of systemic diagrams and preparation of sensor components
 - (2) Testing a substrate specificity of the sensor chip
 - (3) Signal conversion of sensor output to a computer screen
- 3. Development of biosensors for determination of organic acids in the agricultural products
 - 1) Development of biosensor for determination of malate in the agricultural products
 - (1) Establishment of principles and methods for malate biosensor
 - (2) Manufacture and performance test of ion selective membrane(ISM)
 - (3) Analysis of ion sensitivity of ion selective electrode(ISE)
 - (4) Construction and optimization of FIA system
 - (5) Evaluation for detection limit of the sensor system
 - (6) Analysis of interference effect
 - (7) Manufacture and performance test of microchip (solid-state electrode)
 - (8) Manufacture of trial product of malate sensor
 - (9) Comparison of malate concentrations in foods analyzed by biosensor and conventional method(GC)
 - (10) Evaluation for capability of trial product
 - 2) Development of isocitrate sensor for agricultural products

- (1) Establishment of principles and methods for isocitrate biosensor
- (2) Manufacture and performance test of ion selective membrane(ISM)
- (3) Analysis of ion sensitivity of ion selective electrode(ISE)
- (4) Construction and optimization of FIA system
- (5) Evaluation for detection limit of the sensor system
- (6) Analysis of interference effect
- (7) Manufacture and performance test of microchip
(solid-state electrode)
- (8) Manufacture of trial product of isocitrate sensor
- (9) Comparison of isocitrate concentrations in foods analyzed by
biosensor and conventional method(GC)
- (10) Evaluation for capability of trial product

IV. RESULTS AND APPLICATIONS

1. Results of the study

- 1) Results of 「Biosensors for the determination of pesticide residues in agricultural products」

- (1) The development of enzyme sensors for pesticide residues

Two types of enzyme sensors for pesticide detection were developed. The principle of the detection of the pesticide by these enzyme sensors is based on the fact that the activity of cholinesterase is inhibited by organophosphorus and carbamate pesticides, and the degree of inhibition

is proportional to $-\log$ value of pesticide concentration. One of the two enzyme sensors was probe type ISE sensor having an asymmetric enzyme membrane with butyrylcholinesterase coated over an underlying H^+ -selective base membrane. The sensor system fabricated was optimized and applied to the analysis of paraoxon. The detection range for paraoxon was found to be in the range of 10^{-5} to 10^{-8} M. Therefore, this sensor appeared to possess a sensitivity high enough to detect the allowance level of residual paraoxon. Since the inhibited enzyme was fully reactivated by pyridine 2-aldoxime, the sensor electrode is expected to be usable repeatedly.

The other enzyme sensor developed was FIA type which consists of a reactor with acetylcholinesterase immobilized on the controlled pore glass and H^+ -selective polymeric membrane electrode. It was found that optimized FIA sensor system can analyze 10 organophosphorus and 9 carbamate pesticides at the concentration of 10^{-6} M. In case of organophosphorus pesticides, the sensitivity of the sensor system could be remarkably enhanced by converting the pesticides to oxidized form by bromine. When the sensor response was examined at various concentration of pesticides, i. e., diazinon(organophosphorus pesticide), carbaryl and carbofuran(carbamate pesticides), the responsive ranges of concentration were very wide(10^{-4} ~ 10^{-11} M). The sensitivity of this sensor is highest among those sensors developed so far for the analysis of pesticides. This FIA sensor system was successfully applied to the analysis of pesticide residues in food sample after a simple pretreatment procedure.

(2) Development of ELISA for the determination of residual pesticides

In order to develop an ELISA for organophosphorus pesticide fenthion which has not been targeted previously for ELISA development, 7 different haptens, fenthion derivatives, were synthesized and conjugated to proteins to be used as immunogens and coating antigens. Antisera were obtained by the immunization of rabbits using the prepared immunogen. Since the antisera diluted 1:40000 showed optical densities of approximately 1, affinity of the antisera to the antigen appeared to be very high. Using the antisera, an indirect ELISA was established in a format in which the antigen was coated to the microtiter plate and the fenthion competes with coating antigen against antibody. The calibration curve for fenthion yielded an IC_{50} value of 0.29 ppm and a linear working range of 10^{-2} ~ 10^1 ppm. The results showed that the ELISA developed in this study have a sensitivity high enough to detect the allowance limit(0.1 or 0.05 ppm in Korea) of fenthion.

(3) The Development of immunosensor for the detection of residual pesticides

Two types of immunosensors for the determination of fenthion were developed in this study. The first one is a dipstick format ELISA in which antibody is coated to polymer membrane and fenthion competes with enzyme-labeled fenthion(enzyme tracer) against the antibody. The optimized dipstick ELISA was found to be able to detect fenthion in the range of 10^{-2} to 10^4 ppb. The detection limit for fenthion was 10 to 100 ppb when applied to the analysis of fenthion in food samples. This

dipstick ELISA can be fabricated inexpensively and, due to the simple and easy procedure of its use, i. e., semiquantitative measurement of color with naked eye, it is expected to be used in fields by farmers and consumers.

The other immunosensor developed was an amperometric sensor. The principle of this sensor is based on the competition between fenthion and glucose oxidase-labeled fenthion against immobilized antibody and measurement of competition by amperometric determination of H_2O_2 produced from glucose by GOD. The disposable electrode for amperometric detection was fabricated using carbon paste by screen printing technique. The detection range for fenthion with this immunosensor was in the range of 0.1 to 1 ppb.

2) Results of 「Sensors for determination of essential amino acids in the agricultural products」

Biosensors for the determination of essential amino acids were developed using a potentiometric detection system and a surface plasmon resonance system.

(1) Lysine sensor

The lysine sensor with an enzyme reactor(lysine decarboxylase-immobilized Sepharose 4B) and an electrochemical detector(carbon dioxide electrode) was responsive to lysine in the range of $10^{-1} \sim 10^{-3}$ M. The best buffer for sample preparation was 10^{-3} M sodium acetate buffer, pH 5.0. Concentration of pyridoxal phosphate, a coenzyme for the

enzyme, had no significant effect on the response of the lysine sensor. Optimum volume of enzyme slurry and temperature were 100 to 200 μL and 25 to 37°C respectively and the detection range for lysine was 10^{-1} ~ 10^{-3} M. Reproducibility of output of the lysine sensor was excellent, and the enzyme-immobilized Sepharose 4B slurry was stable over 1 year with recycling process.

(2) Phenylalanine sensor

Sensitivity of the phenylalanine sensor based on surface plasmon resonance was very high. Two different sensor chips were prepared by an electron beam evaporator and a thermal evaporator. A gold membrane prepared by electron beam evaporation exhibited better performance than that prepared by thermal evaporation and showed a detection range of 10^{-3} ~ 10^{-5} M phenylalanine. Distilled water was a best sample buffer since it led to a high sensitivity and a good resolution on resonance angle shift that is proportional to the phenylalanine concentration. The detection limit and sensitivity of phenylalanine sensor were evaluated to be better than those of lysine sensor.

(3) Tryptophan sensor

Principle of a tryptophan sensor is similar to phenylalanine sensor except that a sensor chip coated with a substrate specific enzyme was used. Detection limit was proportionately expanded to 10^{-9} M tryptophan by using the tryptophanase-coated sensor chip while that with a bare gold membrane was 10^{-7} M tryptophan. Changes of resonance angle shift

was 0.3°C when the concentration of tryptophan was increased every 10 folds in tris-buffer pH 4.0 and acetate buffer pH 7.0. The substrate specificity of amino acid sensor was highest with tryptophan sensor among 3 amino acid sensors studied. Surface of the enzyme-coated gold membrane was very homogeneous with attached-enzyme molecules when observed with scanning electron microscope, while that of the bare gold membrane was very flat without any attached molecules.

(4) Commercial model for essential amino acid sensor

A model of essential amino acid sensor was developed using a surface plasmon resonance system by designing systematic diagram with various operation compartments. The resolution of light detection was increased by using photo diode array system. It can be operated for analyses of any essential amino acid once substrate specific enzyme is available for the sensor chip preparation. A signal output from the sensor response was fed to analog to digital transducer through an amplifier in the model system. Digitalized signal was processed to screen output thru data filtering in a small computer. This biosensor of essential amino acid is a best final product that was developed through steps for developing lysine sensor, phenylalanine sensor and tryptophan sensor.

3) Results of 「Biosensors for determination of organic acids in the agricultural products」

The biosensor systems for the determination of malate and isocitrate were developed and the parameters influential to the sensitivity and selectivity of the biosensors were optimized in this study. Additionally, a microchip (namely, solid-state electrode) was fabricated to invent a portable sensor and trial products of the biosensors were manufactured using the conventional electrode and microchip (solid-state electrode). The concentrations of the organic acids in the real foods were quantitatively analyzed by the trial products of biosensors under the optimal conditions and then they were compared with those analyzed by GC as a conventional method.

(1) Development of malate sensor system

Several parameters of the malate sensor system were optimized for malate determination. The optimal conditions for the system were as follows: polymer, PVC; carrier buffer, 1 mM phosphate buffer (pH 7.4); flow rate, 14.7 mL/min; tubing length from enzyme reactor to detector, 15 cm; injection volume, 100 μ L; malic enzyme loaded in the reactor, 20 units. The linearity between potential difference and malate concentration was maintained in the range of 10^{-4} ~ 10^{-1} M of malate. The membranes with different compositions were prepared and interference effects of the membrane were investigated to enhance the selectivity in CO_3^{2-} -ISM. The results from interference test suggested that TFADB-based membrane was less affected by the high NADP concentration (10^{-1} M) than TFABB-based membrane. TFABB-based membrane was compared with TMT-based membrane to examine the

effect of pH and malate. TFADB-based membrane was more stable than TMT-based membrane in the range of pH 6.0~9.0 and both of the membranes were rarely influenced in the range of 10^{-5} ~ 10^{-3} M of malate. Therefore, TFADB-based membrane was chosen as the optimal membrane. Solid-state electrode was fabricated to develop a portable type sensor and it was compared with the conventional electrode. As a result of the test, the sensitivity of the solid-state electrode was higher than that of the conventional electrode although the solid state electrode showed lower correlation coefficient than conventional electrode. The solid-state electrode was considered as an available device because of wide range of linearity for malate determination and manufacture of one microchip containing multiple sensors. Malate concentrations of foodstuffs analyzed by biosensor and GC were compared to evaluate the capability of the trial product for malate sensor system and the malate biosensor produced the reliable data.

(2) Development of isocitrate sensor system

The experimental parameters for the FIA type isocitrate biosensor were optimized. The optimal conditions for the sensor system were as follows: 0.1 M Tris- H_2SO_4 (pH 7.5) for carrier buffer 1, 0.6 M Tris- H_2SO_4 (pH 11.0) for carrier buffer 2, 13.6 mL/hr of flow rate, 100 μL of injection volume, 0.89mm of tubing i.d. The linear correlation between potential difference and isocitrate concentration was obtained in the relatively wide range of 10^{-4} ~ 10^{-1} M of isocitrate under the optimal conditions. It could offer advantage to the sensor system when various

isocitrate concentration in the foods would be analyzed. Interference effect on the isocitrate sensor system was investigated by adding sugars and organic acids to the standard isocitrate solution to apply the sensor system to food analysis. All of the sugars and organic acids such as glucose, sucrose, fructose, malic acid, ascorbic acid, and tartaric acid except citric acid did not seriously interfere the sensor system composed of conventional electrode or solid-state electrode. Their interference effects were less than 10% even though they were added in excess. It implied that the interference effect would decrease when the real foods would be analyzed. Isocitrate concentrations analyzed by the isocitrate sensor system were compared with those analyzed by GC to evaluate the capability of the trial product for isocitrate sensor system. There were no significant differences among the analytical methods in all fruit juices except strawberry juice. This result supports that the isocitrate sensor system is a very reliable system for determination of isocitrate in foods. Moreover, the portable and economical sensor could be produced by using microchip(solid-state electrode) because small microchips can be massproduced cheaply. This solid-state electrode would be also useful for simultaneous analysis of many substrates because one microchip could contain multiple sensors.

2. Suggestions for application of the results of this study

The knowledge and techniques acquired from the pursuit of this study on the development of sensors for food analysis can contribute to

building the base technology for the development of food biosensors in Korea. The biosensors developed in this study can be utilized in production and selection of safe and high quality agricultural products by using them in evaluation of the safety, nutritional status and taste of agricultural products during their production and distribution.

Some suggestions for the possible application of the results of this study are as follows:

- 1) The final report of this study will be distributed to the institutions and researchers in food science and technology area in order for them to use as a new technology.
- 2) The results of this study will be published in the scientific journals and presented in the academic conferences.
- 3) Some of the results will be patented and commercialized.
- 4) Some of the know-hows acquired in this study will be transferred to industry sector for their commercialization.
- 5) The enzyme sensors for pesticide detection can be utilized at the government pesticide test center as an auxiliary screening method for organophosphorus and carbamate pesticides that can save human power and time to a large extent.
- 6) Being a simple and easy method usable in fields, the dipstick ELISA for fenthion can be used by producers and consumers of agricultural products in fields and homes.
- 7) The essential amino acid biosensor can be utilized for fortification of amino acids for the agricultural food protein with limiting amino acids (for example, amino acid fortified rice).

- 8) The essential amino acid biosensor can be utilized in screening cultivation of agricultural product with high quality protein.
- 9) The essential amino acid sensors can be utilized in development of special food proteins for patients with inborn-errors in amino acid metabolism.
- 10) The biosensors for organic acids can be utilized in the determination of concentrations of malate and isocitrate in various fruits, fruit juices, and fermented liquor to evaluate their quality, maturity, and degree of fermentation.
- 12) The miniaturized sensor composed of microchip can be used as a portable analysis device in the field.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	54
1-1. Background of the study	54
1-2. Objectives and contents	59
1-3. Methodology and strategy	62
1-4. References	63
Chapter 2. Development of biosensors for determination of residual pesticides in agricultural products	66
2-1. Introduction	66
1. Objectives	66
2. Conventional methods for residual pesticide determination	66
3. Biosensors for residual pesticide determination	67
4. Immunoassay and immunosensor for residual pesticide determination	69
2-2. Development of enzyme sensors for residual pesticides	72
1. Probe type enzyme sensor using polymeric membrane electrode ..	72
1) Materials and methods	73
(1) Reagents and materials	74
(2) Scheme of sensor	74
(3) Fabrication of sensing membrane	76
(4) Optimization of sensing membrane	77
(5) Paraoxon analysis by sensor	79
(6) Stability of enzyme electrode	81
2) Results and discussion	82
(1) Performance of base membrane for pH	82
(2) Optimization of enzyme membrane	82
(3) Effect of buffer pH on the response of enzyme membrane	88
(4) Determination of organophosphorus pesticides using optimized sensor	89

(5) Stability of enzyme electrode	94
3) Conclusions	94
2. FIA type enzyme sensor	96
1) Materials and methods	98
(1) Reagents and apparatus	98
(2) Scheme of FIA system	103
(3) Fabrication of the tube type H ⁺ -selective membrane electrode	
.....	103
(4) Fabrication of the acetylcholinesterase reactor	106
(5) Optimization of sensor performance	107
(6) Stability test of reactor enzyme	109
(7) Manufacture of enzyme sensor trial product	110
(8) Test of sensor performance by paraoxon analysis	110
(9) Oxidation of organophosphorus pesticides by bromine	112
(10) Comparison of the percent inhibition of the sensor enzyme by	
organophosphorus pesticides before and after oxidation	113
(11) Comparison of the percent inhibition of the sensor enzyme by	
carbamatic pesticides	114
(12) Comparison of the percent inhibition of the sensor enzyme at	
various concentrations of the organophosphorus and carbamatic	
pesticides	114
(13) Analysis of carbamatic pesticide in food	115
2) Results and discussion	116
(1) Test of detector performance	116
(2) Response of sensor detector for acetylcholine	117
(3) Optimization of performance of sensor system	118
(4) Stability of reactor enzyme	122
(5) Manufacture of enzyme sensor trial product	124
(6) Varification of possibility of pesticide detection by sensor	124
(7) Oxidation of organophosphorus pesticide by bromine	129
(8) Detection of organophosphorus and carbamatic pesticides by	
enzyme sensor	137

(9) Pesticide analysis by sensor in food	148
3) Conclusions	149
2-3. Development of immunoassay for organophosphorus pesticide fenthion	152
1. Synthesis of fenthion hapten and preparation of immunogen and coating antigen	156
1) Materials and methods	157
(1) Reagents and materials	157
(2) Hapten synthesis	158
(3) Preparation of hapten-protein conjugates	163
2) Results and discussion	165
(1) Hapten synthesis	165
(2) Preparation of hapten-protein conjugates	168
3) Conclusions	171
2. Development of ELISA for organophosphorus pesticide fenthion	171
1) Materials and methods	173
(1) Reagents and materials	173
(2) Immunization	173
(3) Titration of antiserum	174
(4) Two-dimensional screening of antiserum	175
(5) ELISA of fenthion	177
2) Results and discussion	178
(1) Immunization and titration of antiserum	178
(2) Two-dimensional screening of antiserum	180
(3) ELISA of fenthion	183
3) Conclusions	188
2-4. Development of immunosensors for organophosphorus pesticide fenthion	191
1. Dipstick format ELISA	192
1) Materials and methods	192
(1) Reagents and materials	192
(2) Development of direct ELISA	192

(3) Development of dipstick format ELISA for fenthion analysis	196
2) Results and discussion	200
(1) Development of direct ELISA	200
(2) Optimization of dipstick format ELISA	204
(3) Fenthion analysis using dipstick format ELISA	208
(4) Fenthion detection using dipstick format ELISA in food	208
3) Conclusions	210
2. Development of immunostrip sensor for fenthion analysis	211
1) Materials and methods	211
(1) Reagents and apparatus	211
(2) Principle of amperometric strip sensor	212
(3) Scheme of amperometric strip sensor	214
(4) Scheme of immunostrip sensor for fenthion analysis	216
2) Results and discussion	219
(1) Amperometric strip sensor	219
(2) Immunostrip sensor for fenthion analysis	222
3) Conclusions	226
2-5. References	227

Chapter 3. Development of biosensor for measurement of essential amino acids of agricultural products 239

3-1. Introduction	239
1. Types and performance of essential amino acid sensor developed recently	239
2. Backgrounds and theories of biosensors designed in this study ..	240
1) Electrochemical enzyme sensor using potentiometry and carbonate ion or carbon dioxide selective electrode	240
2) Essential amino acid sensor using surface plasmon resonance ..	241
(1) Theory of surface plasmon resonance (SPR)	241
(2) Principle of the essential amino acids detection by SPR amino acid sensor	245

3-2. Materials and methods	247
1. Design of lysine sensor using potentiometric method	247
1) Design of carbonate-selective electrode with flow-injection analysis(FIA) system	247
(1) Continuous potentiometric system with FIA system	248
(2) Preparation of carbonate-selective membrane and ion-selective electrode	249
(3) Preparation of enzyme reactor	250
2) Analysis of lysine using a probe type carbon dioxide electrode	250
(1) Optimum conditions for detecting lysine by a probe type membrane electrode	251
2. Experiment for a design of phenylalanine by surface plasmon resonance(SPR)	253
1) Surface plasmon resonance and its detection system	253
2) Design of a SPR type phenylalanine sensor and its performance	254
(1) Components of phenylalanine sensor	254
(2) Preparation of sensor chip	256
(3) Preparation of phenylalanine solution	257
(4) Measurement of phenylalanine solution using sensor chips made by a thermal beam or an electron beam evaporation method ..	257
3. Experiment for designing SPR type tryptophan sensor and its performance test	258
1) Design of tryptophan sensor and its components	258
2) Preparation of sensor chips coated by substrate specific enzyme	260
(1) Method I	261
(2) Method II	261
(3) Method III	262
3) Preparation of tryptophan solution	262
4) Test of substrate specificity of the tryptophanase-coated sensor	

chip	263
4. Design of tryptophan sensor model equipped with a photo diode array (PDA)	263
1) Model of SPR type tryptophan sensor with PDA as a light source	263
(1) System of tryptophan sensor model	264
(2) Systemic diagram of the sensor model	266
3-3. Results and discussion	269
1. Measurement of lysine concentration using a carbonate-selective electrode and carbon dioxide electrode in FIA system	269
2. Measurement of lysine concentration using a probe type carbon dioxide electrode	271
1) Optimized condition for lysine detection by a probe type CO ₂ electrode	271
(1) Optimized status of decarboxylase-immobilized Sepharose before enzyme reation	271
(2) Response of lysine sensor by different concentration of sodium acetate buffer	272
(3) Effects of pH of sodium acetate buffer on performance of lysine sensor	273
(4) Effects of pyridoxal phosphate concentration in sodium acetate	273
(5) Effects of enzyme slurry volume on performance of the lysine sensor	274
(6) Effects of enzyme reaction temperature on performance of the lysine sensor	274
(7) Detection limit of the lysine sensor tested by a standard solution of NaHCO ₃	275
(8) Reproducibility of the lysine sensor tested by multiple samples	275
(9) Stability of enzyme-immobilized slurry	275
3. Design of SPR type phenylalanine sensor system and its	

performance test	280
1) Comparison of performance of two different sensor chips in air and water	281
2) Characteristics of resonance property of phenylalanine in distilled water	283
3) Response of the sensor chips in acetate or tris-buffer	285
4) Response of the sensor chips in pH changes of buffer	287
5) Overall performance of the phenylalanine sensor	287
4. Design of SPR type tryptophan sensor & its performance test ...	289
1) Response of a sensor chip with a bare gold membrane	289
(1) Measurement of tryptophan in distilled water	289
2) Response of a sensor chip with tryptophanase-coated gold membrane	295
(1) Performance of tryptophanase-coated sensor chips treated by different process	295
(2) Measurement of tryptophan solution prepared by distilled water, tris-buffer or acetate buffer	297
3) Comparison of relative response of the bare gold membrane and tryptophanase-coated membrane	303
4) Substrate specificity of the tryptophan sensor	304
5) Analysis of membrane surface of the tryptophanase-coated sensor chip	305
6) Overall performance of tryptophan sensor	307
5. Commercial biosensor model equipped with PCD and its signal conversion	308
3-4. References	307

**Chapter 4. Development of biosensors for determination of organic
 acids in agricultural products**

4-1. Introduction	316
1. Principles of potentiometry	317
2. Flow-injection analysis(FIA) system	318

3. Enzyme immobilization	319
4. Literature review	320
5. Principles of malate and isocitrate sensor	322
6. Necessity and objectives	323
4-2. Materials and methods	325
1. Malate sensor system	325
1) Reagents and apparatus	325
2) Assembly of FIA system	326
3) Preparation of CO ₃ ²⁻ -ISM(ion-selective membrane) and CO ₃ ²⁻ -ISE	328
4) Enzyme immobilization	328
(1) Covalent bond of aminopropyl glass beads	329
(2) Covalent bond of chitopearl beads	329
(3) Covalent bond of CNBr-activated sepharose	330
(4) Physical adsorption of calcium alginate	330
5) Optimization of malate sensor system	331
(1) Component ratio of CO ₃ ²⁻ -ISM	331
(2) Polymer type in CO ₃ ²⁻ -ISM composition	331
(3) Carrier buffer type	333
(4) Effect of flow-rate	333
(5) Effect of length from enzyme reactor to detector	333
(6) Effect of sample injection volume	333
(7) Effect of malic enzyme units	334
(8) Effect of electrode type	334
6) Analysis of malate using CO ₂ gas electrode	337
(1) Use of probe type CO ₂ gas electrode	337
(2) Use of CO ₂ gas electrode in FIA system	337
7) Fabrication of microelectrode	340
8) Fabrication of microchip	341
9) Construction of the malate sensor system with microchip	342
10) Performance test of conventional electrode and solid-state electrode	342

11) Interference effect test	342
(1) Comparison of performance by membrane composition	342
(2) Analysis of interference effects by sugars and organic acids	343
12) Manufacture of trial product	343
13) Food analysis	346
(1) Analysis by biosensor	346
(2) Analysis by GC	346
2. Isocitrate sensor system	348
1) Reagents and apparatus	348
2) Assembly of FIA system	349
3) Preparation of CO_3^{2-} -ISM and CO_3^{2-} -ISE	350
4) Enzyme immobilization	351
5) Optimization of isocitrate sensor system	351
(1) Response to carrier buffer pH	351
(2) Response to flow-rate	352
(3) Response to sample injection volume	352
(4) Response to tubing i.d.	352
6) Fabrication of microchip	352
7) Construction of the isocitrate sensor system with microchip	353
8) Performance test of conventional electrode and solid-state electrode	353
9) Interference effect test	353
10) Manufacture of trial product	354
11) Food analysis	354
(1) Analysis by biosensor	354
(2) Analysis by GC	354
(3) Statistical analysis	355
4-3. Results and discussion	356
1. Malate sensor system	356
1) Enzyme immobilization	356
2) Optimization of malate sensor system	358
(1) Component ratio of CO_3^{2-} -ISM	358

(2) Polymer type in CO ₃ ²⁻ -ISM composition	359
(3) Carrier buffer type	360
(4) Effect of flow-rate	361
(5) Effect of length from enzyme reactor to detector	362
(6) Effect of sample injection volume	363
(7) Effect of malic enzyme units	364
(8) Effect of electrode type	365
3) Analysis of malate using CO ₂ gas electrode	367
(1) Use of probe type CO ₂ gas electrode	367
(2) Use of CO ₂ gas electrode in FIA system	370
4) Performance test of conventional electrode and solid-state electrode	374
5) Interference effect test	377
(1) Comparison of performance by membrane composition	377
(2) Analysis of interference effects by sugars and organic acids	380
6) Food analysis	380
2. Isocitrate sensor system	384
1) Enzyme immobilization	384
2) Optimization of isocitrate sensor system	385
(1) Effect of carrier buffer pH	385
(2) Effect of flow-rate	386
(3) Effect of sample injection volume	388
(4) Effect of tubing i.d.	389
3) Performance test of conventional electrode and solid-state electrode	390
4) Interference effect test	390
5) Food analysis	392
4-4. Conclusions	395
1. Malate sensor system	395
2. Isocitrate sensor system	396
4-5. References	398

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	19
CONTENTS	35
목 차	45
제 1 장 서 론	54
제1절 연구개발의 배경과 필요성	54
제2절 연구개발 목표 및 내용	59
제3절 추진전략 및 방법	62
제4절 참고문헌	63
제 2 장 농산물의 잔류농약 측정 센서 개발	66
제1절 서론	66
1. 연구의 목적	66
2. 기존의 잔류농약 검출법	66
3. 농약검출을 위한 바이오센서	67
4. 농약 검출을 위한 면역분석법 및 면역센서	69
제2절 잔류농약 분석용 효소센서 개발	72
1. 중합체막 전극을 사용한 탐침형 효소센서	72
가. 실험내용 및 방법	73
1) 시약 및 실험재료	74
2) 센서의 구성	74
3) 감응막의 제작	76
4) 감응막의 최적화 실험	77
5) 센서를 이용한 paraoxon 분석	79
6) 효소전극의 안정성	81
나. 결과 및 고찰	82
1) pH 감응 기본막의 성능	82
2) 효소막의 최적화	82

3) Buffer의 pH에 따른 효소막의 감응성 차이	88
4) 최적화한 센서를 이용한 유기인계 농약의 검출	89
5) 효소전극의 안정성	94
다. 결론	95
2. FIA형 효소센서	96
가. 실험내용 및 방법	98
1) 시약 및 기기	98
2) FIA 시스템의 구성도	103
3) 튜브형 H ⁺ -선택형 막전극 제조	103
4) Acetylcholinesterase 반응기 제작	106
5) 센서 성능의 최적화	107
6) 반응기 효소의 안정성 조사	109
7) 효소센서 시제품 제작	110
8) Paraoxon 분석에 의한 센서의 성능 조사	110
9) 브롬을 사용한 유기인계 농약의 산화	112
10) 유기인계농약의 산화전후의 효소 저해도 비교 조사	113
11) 카바메이트계 농약의 효소 저해도 비교 조사	114
12) 유기인계와 카바메이트계 농약의 농도에 따른 효소 저해도 조사	114
13) 식품중 카바메이트계 농약 분석	115
나. 결과 및 고찰	116
1) 검출기의 성능 조사	116
2) Acetylcholine에 대한 센서 검출기의 감응	117
3) 센서 시스템의 성능의 최적화	118
4) 반응기 효소의 안정성	122
5) 효소센서 시제품 제작	124
6) Paraoxon의 검출에 의한 센서의 농약 검출 가능성 검증	124
7) 브롬을 사용한 유기인계 농약의 산화	129
8) 유기인계 및 카바메이트계 농약의 효소센서에 의한 검출 가능 성 조사	137
9) 효소센서를 이용한 식품중의 농약분석	148
다. 결론	149
제3절 유기인계농약 Fenthion의 면역분석법 개발	152

1. Fenthion의 hapten 합성 및 면역원, 코팅항원 합성	156
가. 실험내용 및 방법	157
1) 시약 및 실험재료	157
2) Hapten 합성	158
3) Hapten-protein conjugate의 합성	163
나. 결과 및 고찰	165
1) Hapten 합성	165
2) Hapten-protein conjugate의 합성	168
다. 결론	171
2. Fenthion의 면역분석법 개발	171
가. 실험내용 및 방법	173
1) 시약 및 실험재료	173
2) 면역화	173
3) 항혈청의 역가 측정	174
4) 2차원적 항혈청 스크린	175
5) Fenthion ELISA 수립	177
나. 결과 및 고찰	178
1) 면역화 및 항혈청의 역가 측정	178
2) 2차원적 항혈청 스크린	180
3) Fenthion ELISA 수립	183
다. 결론	188
제4절 유기인계농약 Fenthion의 면역센서 개발	191
1. Dipstick형 ELISA	192
가. 실험 내용 및 방법	192
1) 시약 및 기기	192
2) 직접 ELISA 개발	192
3) Fenthion 분석용 dipstick형 ELISA의 개발	196
나. 결과 및 고찰	200
1) 직접 ELISA 개발	200
2) Dipstick형 ELISA의 최적화	204
3) Dipstick형 ELISA를 이용한 fenthion의 분석	208
4) Dipstick형 ELISA를 이용한 식품 시료에서의 fenthion 검출	208
다. 결론	210

2. Fenthion 분석용 면역 스트립센서의 개발	211
가. 실험 내용 및 방법	211
1) 시약 및 기기	211
2) 전류법 면역 스트립 센서의 원리	212
3) 전류법 스트립 센서의 구성	214
4) Fenthion 분석용 면역 스트립 센서의 구성	216
나. 결과 및 고찰	219
1) 전류법 스트립 센서	219
2) Fenthion 분석용 면역 스트립 센서	222
다. 결론	226
제5절 참고문헌	227
제 3 장 농산물의 필수아미노산 측정 센서 개발 분야	239
제1절 서론	239
1. 지금까지 개발된 필수 아미노산 센서의 형태와 성능	239
2. 본 세부분야에서 개발된 필수아미노산 측정용 바이오센서의 이론적 배경	240
가. Carbonate 이온선택성 전극을 이용한 전위차법 전기화학 효소센서	240
나. 표면 플라즈몬 공명형(Surface Plasmon Resonance, SPR) 필수 아미노산 센서	241
1) 표면 플라즈몬 공명이론	241
2) 표면 플라즈몬 공명형(Surface Plasmon Resonance, SPR) amino acid sensor의 감응원리	245
제2절 연구방법	247
1. 전위차법을 이용한 필수 아미노산 센서 제작실험	247
가. FIA(flow-injection analysis)형 carbonate-selective electrode 제작	247
1) 연속흐름장치를 이용한 FIA형 potentiometric system	248
2) Carbonate-selective membrane과 ISE 제작	249
3) 효소반응기의 제작	250
나. Probe type carbon dioxide electrode를 이용한 lysine 감응실험 ...	250
1) Probe type lysine 센서의 최적 검출방법 및 모델확립 실험	251

2. SPR형 phenylalanine 센서 제작실험	253
가. 일반적인 SPR형 센서의 감지 작용	253
나. SPR형 phenylalanine 센서 시스템 제작 및 성능시험	254
1) Phenylalanine 센서 시스템 구성	254
2) 센서칩 제조실험	256
3) Phenylalanine 시료 제조	257
4) Thermal evaporation와 Electron beam evaporation으로 제조된 sensor chip 을 이용한 phenylalanine의 농도측정	257
3. SPR형 tryptophan 센서 시스템 제작실험 및 성능시험	258
가. Tryptophan 센서의 시스템 구성 및 설계실험	258
나. 센서칩 제조 (Enzyme coated sensor chip)	260
1) 방법 I	261
2) 방법 II	261
3) 방법 III	262
다. Tryptophan 시료 제조	262
라. Tryptophanase coated sensor chip의 기질 특이성 확인실험	263
4. Photo Diode Array (PDA)를 갖춘 SPR형 tryptophan 센서시스템의 제작(시제품 제작)	263
가. SPR형 tryptophan 센서시스템의 설계	263
1) 시제품 구성시스템 설계	264
2) 시제품의 시스템도	266
제3절 연구결과 및 고찰	269
1. FIA(Flow injection analysis)형 carbonate-selective electrode와 CO ₂ electrode를 사용한 lysine 정량 결과	269
2. Probe type의 carbon dioxide electrode를 이용한 lysine의 감응	271
가. Probe type CO ₂ electrode lysine 측정센서의 최적검출조건 선정 실험	271
1) 효소반응 전 decarboxylase-immobilized Sepharose 4B의 최적상태 설정	271
2) Sodium acetate의 농도 변화에 따른 lysine sensor의 감응도분석 결과	272
3) Sodium acetate buffer 의 pH가 lysine 센서 감응도에 미치는 결과	273

4) Sodium acetate buffer의 PLP 농도가 lysine 센서의 감응변화에 미치는 결과	273
5) Immobilized enzyme slurry의 양이 lysine 센서의 감응도에 미친 결과	274
6) 효소반응 온도가 lysine 센서의 감응도에 미친 결과	274
7) NaHCO ₃ 표준용액을 사용한 lysine 센서의 CO ₂ 검출한계 설정과 최종 성능확인 결과	275
8) Multiple 시료를 사용한 lysine 센서의 재현성확인	275
9) Enzyme-immobilized slurry의 recycle 가능성 여부와 stability 확인	275
3. SPR형 phenylalanine 센서시스템 제작실험 및 성능실험 결과	280
가. 제조방법이 다른 두 가지 센서칩의 공기와 물에 대한 감응도 비교와 제조된 센서칩의 정확도	281
나. 증류수에 용해시킨 Phenylalanine시료의 농도에 따른 공명특성 분석	283
다. Acetate buffer와 Tris-buffer에 대한 센서칩의 감응결과	285
라. Buffer 용액의 pH 변화에 대한 센서칩의 감응변화	287
마. Phenylalanine 센서의 종합적인 성능 판정	287
4. SPR형 tryptophan 센서의 성능시험	289
가. Bare gold membrane을 사용한 경우	289
1) 증류수에 용해된 tryptophan 농도의 감응 및 측정결과	289
나. Tryptophanase가 고정된 gold membrane sensor chip을 사용한 경우	295
1) Tryptophanase gold membrane의 처리 방법에 따른 sensor chip의 성능비교	295
2) 순수증류수, tris-buffer 및 acetate buffer에 용해된 tryptophan 농도의 감응 및 측정결과	297
다. Bare gold membrane과 tryptophanase coated membrane의 상대적인 감응도 비교	303
라. Tryptophan 센서의 기질 특이성 확인 결과	304
마. Tryptophanase-coated gold membrane 표면 분석결과	305
바. Tryptophan 분석의 종합적인 판정	307
5. PDA를 이용한 SPR형 필수아미노산 센서 시제품의 신호 전환	308

제4절. 참고문헌	311
제 4 장. 농산물의 유기산 측정 센서 개발	316
제1절. 서론	316
1. Potentiometry 원리	317
2. Flow-injection analysis(FIA) system	318
3. Enzyme immobilization	319
4. 선행 연구 고찰	320
5. Malate와 isocitrate 센서의 이론적 배경	322
6. 연구의 필요성 및 목적	323
제2절. 재료 및 방법	325
1. Malate sensor system	325
가. 시약 및 기구	325
나. FIA system의 구성	326
다. CO_3^{2-} -ISM(ion-selective membrane) 및 CO_3^{2-} -ISE의 제조	328
라. 효소 고정화	328
1) Aminopropyl glass beads에 공유결합	329
2) Chitopearl beads를 이용한 공유결합	329
3) CNBr-activated sepharose를 이용한 공유결합	330
4) Calcium alginate를 이용한 physical adsorption	330
마. Malate sensor system의 최적화	331
1) CO_3^{2-} -선택성 막의 조성 비율	331
2) CO_3^{2-} -선택성 막 조성 중 polymer의 종류	331
3) Carrier buffer의 종류	333
4) 흐름속도에 따른 영향	333
5) 효소 반응기로부터 감지기까지의 거리에 의한 영향	333
6) 시료 주입량에 따른 영향	333
7) Malic enzyme 양에 따른 영향	334
8) 전극 종류에 따른 영향	334
바. CO_2 gas 전극을 이용한 malate 측정	337
1) Probe type의 CO_2 gas 전극의 사용	337
2) FIA system에서 CO_2 gas 전극의 사용	337
사. Microelectrode 제작	340

아. Microchip 제작	341
자. Microchip을 이용한 system의 제작	342
차. Conventional electrode와 solid-state electrode의 성능 비교	342
카. 방해물질의 영향력 분석	342
1) 막조성에 따른 성능비교	342
2) 당과 유기산의 방해효과 분석	343
타. 시제품 제작	343
파. 식품시료 분석	346
1) Biosensor에 의한 분석	346
2) GC에 의한 분석	346
2. Isocitrate sensor system	348
가. 시약 및 기구	348
나. FIA system의 구성	349
다. CO ₃ ²⁻ -ISM 및 CO ₃ ²⁻ -ISE의 제조	350
라. 효소 고정화	351
마. Isocitrate sensor system의 최적화	351
1) Carrier buffer pH에 따른 감응	351
2) 유속에 따른 감응	352
3) 시료 주입량에 따른 감응	352
4) 튜빙 내경에 따른 감응	352
바. Microchip 제작	352
사. Microchip을 이용한 system의 제작	353
아. Conventional electrode와 solid-state electrode의 성능 비교	353
자. 방해물질의 영향력 분석	353
차. 시제품 제작	354
카. 식품시료 분석	354
1) Biosensor에 의한 분석	354
2) GC에 의한 분석	354
3) 통계처리	355
제3절. 결과 및 고찰	356
1. Malate sensor system	356
가. 효소 고정화	356
나. Malate sensor system의 최적화	358

1) CO_3^{2-} -선택성 막의 조성 비율	358
2) CO_3^{2-} -선택성 막 조성 중 polymer의 종류	359
3) Carrier buffer 의 종류	360
4) 흐름속도(flow-rate)에 따른 영향	361
5) 효소 반응기로부터 감지기까지의 거리에 의한 영향	362
6) 시료 주입량에 따른 영향	363
7) Malic enzyme 양에 따른 영향	364
8) 전극 종류에 따른 영향	365
다. CO_2 gas 전극을 이용한 malate 측정	367
1) Probe type의 CO_2 gas전극 사용	367
2) FIA system에서 CO_2 gas전극의 사용	370
라. Conventional electrode와 solid-state electrode의 성능 비교	374
마. 방해물질의 효과분석	377
1) 막 조성에 따른 성능 비교	377
2) 당과 유기산의 방해효과 분석	380
바. 식품시료 분석	380
2. Isocitrate sensor system	384
가. 효소 고정화	384
나. Isocitrate sensor system의 최적화	385
1) Carrier buffer pH에 따른 영향	385
2) 흐름속도에 따른 영향	386
3) 시료 주입량에 따른 영향	388
4) 튜빙 내경에 따른 영향	389
다. Conventional electrode와 solid-state electrode의 성능 비교	390
라. 방해물질의 효과 분석	390
마. 식품시료 분석	392
제4절. 결론	395
1. Malate sensor system	395
2. Isocitrate sensor system	396
제5절. 참고문헌	398

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 배경과 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

현대에 들어 삶의 질이 전반적으로 높아짐에 따라 식품 생산은 과거의 기본적인 식생활 충족이라는 목적에서 더 나아가 위생상 안전하고 높은 품질의 식품을 개발하는데 그 역점을 두고 있다. 그에 따라 농산 가공 식품의 형태도 동시에 식품의 안전성, 영양성, 및 향미성 등을 향상시키고 현대인의 감각에 맞도록 변화되고 있다. 21세기에는 인간 삶의 질과 생활 환경이 크게 개선되리라 예상되므로 식품분야도 첨단 기술을 이용한 생산가공과 관리가 이루어질 것이고 식품의 품질 평가 또한 첨단 기술에 의존할 것으로 예상되며 식품 품질의 개별적인 측면뿐만 아니라 종합적인 품질 평가의 필요성이 제기될 것으로 예상된다.

고품질의 식품을 생산하기 위해서는 지금까지 사용되어온 기술보다 진보된 고차원적 기술이 요구되는데 이를 위해 최근 식품생산체계와 품질 평가에 바이오센서(biosensor)를 활용하기 위한 연구들이 대두되고 있다 (Wagner, 1994, Luong, 1997, Maines, 1996). 바이오센서는 식품과학 분야의 첨단 기술로서 유럽, 미국, 일본 등 선진국을 중심으로 활발하게 연구가 이루어지고 있다. 그러므로 국내의 식품산업도 고품질 식품을 생산하여 국제 경쟁력을 갖추기 위해서는 앞으로 바이오센서를 이용한 원료의 선정, 가공

공정의 제어, 제품의 점검 등이 필수적일 것으로 예상된다.

식품의 품질 평가 시에는 식품의 안전성, 영양성, 기호성 등이 반드시 고려되어야 한다. 이러한 평가에 있어서는 농산물 중의 잔류농약과 필수 아미노산 그리고 유기산의 측정은 필수적인 요소라고 볼 수 있다. 왜냐하면 식품의 안전성에 관련된 물질 중에서 잔류농약은 국민건강을 위협하는 주요 오염물질로서 안전성 관련 검사에 있어서 가장 중점적으로 다루어지는 물질이며, 식품에 함유되어있는 영양소 중 필수아미노산은 체내에서 합성되지 않거나 합성되어도 체내의 수요량을 충족시키지 못하므로 반드시 식품으로부터 공급되어야 하는 중요한 영양소이고 식품의 기호도를 가장 크게 좌우하는 것은 향미 성분으로서 특히 과일과 채소 등의 농산물에는 유기산이 함유되어 있어 이들이 품질 결정에 주요 요소로 작용하고 있기 때문이다. 현재 국내에서 생산 가공되는 농산물의 품질관리에 있어서 이들 요소들은 거의 고려되지 않고 있다.

현재 식품에서 이러한 성분들을 검출하는 방법은 대개 장시간에 걸친 전처리 과정을 가지며 고가의 기기가 요구된다는 문제점을 가지고 있다. 그러므로 이러한 성분들을 보다 정확하고 신속하며 간편하게 측정할 수 있는 방법이 요구되며 그러한 방법의 하나로 센서를 들 수 있다. 그리하여 선진 외국에서는 식품의 생산과 가공 공정 및 품질 평가에 센서를 도입하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있으므로 센서를 식품성분의 안전성과 영양성 및 기호성의 정량화 및 표준화에 활용할 수 있을 가능성이 점차 높아지고 있다. 농산물 품질 계측 센서는 농산물의 잔류 농약에 의한 오염도를 판별하고 농산물의 숙성도를 간편하게 계측하여 최적 수확 시기를 결정하는데도 사용할 수 있으며, 또한 농산물의 품종 개량시 개량된 농산물의 단백질 영양가를 비교하는 품질관리에도 사용 가능하다. 이외에도 수확한 농산물의 가공 저장에도 센서를 이용함으로써 각 농산물의 특성에 따른 적절한 식품

가공 저장법을 고안하는데 사용되어질 수도 있다. 이와 같이 식품의 품질 평가에 있어서의 센서의 활용 가능성이 매우 높음에도 불구하고 우리나라에서는 이에 대한 연구가 극히 미흡한 실정이며 현재 국내에서 생산 가공되는 농산물의 품질관리에서 센서가 응용된 바가 거의 없다. 따라서 농산물의 품질 평가를 위한 센서의 개발 연구는 농산물 품질관리의 과학화와 선진화를 위해 시급히 활성화되어야 할 필요성이 있다.

나. 경제·산업적 측면

센서에 의한 식품 품질 계측은 식품생산 공정 기술 및 식품 품질 평가기술을 첨단화 할 수 있으므로 식품 품질의 체계적이고 과학적인 관리에 활용 할 수 있다. 즉 식품의 잔류농약 유·무를 신속하게 감지하고, 양질의 단백질 식품을 개발하는데 있어서 식품의 필수아미노산 함량을 용이하고 신속하게 정량 감지할 수 있으며, 농산식품의 유기산 측정을 신속하게 함으로써 소비자의 기호에 맞는 안전한 고품질의 식품을 개발하여 부가가치를 높일 수 있다. 이를 기반으로 우리의 식품산업을 국제 경쟁력 있는 산업으로 발전시킴으로써 수출을 통한 외화 획득에 기여할 수 있을 것이며 수입식품의 소비를 감소시키는 효과를 가져다 줄 것이다. 또한 식품 바이오센서의 활용에 의한 고품질 농수산물의 생산공급은 식생활의 질적 향상을 가져올 뿐만 아니라 외국 농산물의 수입개방 압력에 대처할 수 있는 방안의 하나로서도 기여할 수 있을 것이다.

다. 사회·문화적 측면

식품의 품질과 안전성에 대한 불안과 불신감이 고조되고 있는 현 실정에

서 식품품질 계측 센서의 활용으로 국민들이 안심하고 먹을 수 있는 고품질의 식품을 생산 공급할 필요성이 요구된다. 따라서 센서를 이용한 고품질의 농산 식품이 생산된다면 이는 국민의 보건 향상에 기여할 뿐 만 아니라 우리의 식생활을 더욱 안전하고 풍요롭게 함으로서 현대에 걸맞는 새로운 식문화를 창출하게 될 것이다. 또한 궁극적으로 식품의 품질 계측 센서를 이용한 종합적 농산 식품의 관리 시스템의 이용은 한국 전통 농산물 품질을 표준화시키고, 고급화시킴으로써 한국 식문화의 세계화에 기여할 수 있을 것이다.

2. 국내·외 관련기술의 현황

농산 식품의 잔류농약 검출과 유기산 분석은 주로 기체 크로마토그래피(gas chromatography, GC)를 이용한 방법이 사용되어 왔으며, 아미노산 성분 분석은 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)의 방법에 의존하는데 이 방법들은 감도와 정확도가 높다는 장점을 가지는 반면에 장시간의 전처리 과정과 고가의 기기가 요구된다는 단점을 가진다. 그리하여 이러한 단점을 보완할 수 있는 새로운 분석법을 개발하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며 바이오센서의 개발은 그러한 연구 중에서 큰 비중을 차지하고 있다.

바이오센서는 생체물질을 사용하므로 인해 선택성이 탁월하며 분석에 방해되는 물질을 제거하기 위한 전처리과정이 거의 필요치 않다는 장점을 가진다. 화학분석에 있어서 흔히 방해물질로 인한 분석오차가 큰 문제점이 된다는 점을 고려하면 이 분석법의 높은 특이성은 매우 중요한 장점이 아닐 수 없다. 바이오센서는 이러한 장점 이외에 휴대가 가능하며 현장사용이 가능하며 간편하고 신속한 분석이 가능하다는 장점도 가진다. 이와 같이 바이

오센서는 많은 장점을 가지는 첨단적인 분석수단이므로 최근 들어 많은 연구자들의 관심을 불러일으키고 있다.

농수산물 식품의 품질 측정을 목적으로 개발된 센서로는 단쇄 지방산을 인지, 정량할 수 있는 미생물 센서(Ukeda 1992), 생선육질의 평가를 위한 미생물 센서(Hoshi, 1991), 포도당과 독성물질의 측정을 위한 발광성 박테리아를 사용한 미생물 센서(Lee, 1992) 등 다양하게 개발되어 왔다. 1994년에 일본에서 처음으로 맛 센서가 개발 보고되었는데(Toko, 1994) 이것은 맛을 인식하여 정량적으로 측정하는 세계 최초의 장치로 평가되고 있다. 이 multichannel taste sensor는 금후 식품제조 라인에 장착되어 광범위하게 활용될 가능성이 있는 것으로 전망되고 있다. 이외에도 식품 성분분석과 관련된 센서로서 포도당 센서(Wilson, 1992, Steinkuhl, 1994, Shaw, 1991, Abdel-Hamid, 1994, Mascone, 1993, Matsukura, 1993), 글루타민산 센서(Hu, 1994), 알콜 센서(Swift, 1992, Ozsoz, 1991), 젖산 센서(Kim, 1995, Girotti, 1990) 등의 개발을 위한 연구들이 보고되고 있다. 농산 식품의 안전성 관련 센서로서는 환경오염원인 제초제, 살충제 등 농약 검출센서(Marty, 1993, Fernando, 1993)가 보고되고 있다. 최근 Pharmacia Biocore사 (<http://www.biocore.com>)에서는 고분자 반응측정 바이오센서로서 표면 플라즈몬 공명현상(surface plasmon resonance)을 이용한 개발상품(BIA Core 2000)을 출시하였다.

이와 같이 센서에 관한 연구는 다방면으로 활발하게 이루어지고 있으나 지금까지 이루어진 바이오센서 관련 연구는 대부분 실용성이 미흡한 기초적인 연구이며 극소수의 물질에 대해서만 실용적인 바이오센서가 개발되어 있을 뿐이라는 점 또한 부인할 수 없는 사실이다. 식품분야에 있어서의 센서 역시 극히 기초적이며 제한적인 응용에 그치고 있으며 상품화된 것은 거의 없다. 그러므로 센서에 관한 연구는 이제 실용화에 중점을 두어야 할 단계에 진입했다고 볼 수 있다.

제2절 연구개발 목표 및 내용

본 연구과제는 3개의 세부과제로 구성되어 있으며 각 세부과제명과 최종 목표는 다음과 같다.

가. 농산물의 잔류농약 측정 바이오센서의 개발 (제1세부과제)

- 1) 유기인계와 카바메이트계 잔류농약 분석을 위한 효소센서 개발
- 2) 유기인계 잔류농약 fenthion의 면역분석법 및 면역센서 개발

나. 농산물의 필수아미노산 측정 센서 개발 (제2세부과제)

- 1) 농산 식품의 단백질 질평가를 위한 lysine 측정 센서 개발
- 2) 농산 식품의 단백질 질평가를 위한 phenylalanine 측정 센서 개발
- 3) 농산 식품의 단백질 질평가를 위한 methionine 측정 센서 개발
- 4) 농산 식품의 단백질 질평가를 위한 tryptophan 측정 센서 개발

다. 농산물의 유기산 측정 바이오센서 개발 (제3세부과제)

- 1) 농산물에 함유되어 있는 malic acid 측정 센서 개발
- 2) 농산물에 함유되어 있는 isocitrate 측정 센서 개발

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
제 1차년도 (1996)	<p><제 1 세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> 농산물의 안전성 평가를 위한 센서 개발의 접근 방법 정립 <p><제 2 세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> 농산물 영양성분중 필수 아미노산 측정을 위한 센서 개발 접근 방법의 정립 <p><제 3 세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> 농산식품의 향미센서 개발 접근 방법의 정립 	<ul style="list-style-type: none"> 농산물의 잔류농약 분석을 위한 기존 측정법과 센서 측정법의 장단점 비교 검토 잔류 농약 측정 센서 시스템의 수용체 효소의 선정을 위한 실험(Probe type과 FIA system의 비교) 영양소 센서 개발을 위한 국내외 자료 수집 및 분석 필수아미노산 센서 중 Lysine 센서의 구성요소 선정 작업 Lysine 센서의 효소반응기와 막전극 제작 및 성능 실험 농산물의 향미센서에 대한 문헌 조사 농산물의 품질평가에 이용될 수 있는 향미 성분의 도출 malic acid 측정을 위한 바이오센서의 원리 및 방법 수립 ISM의 제조와 성능 실험 ISE의 형태에 의한 이온 감지도 측정
제 2차년도 (1997)	<p><제 1 세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> 잔류농약 측정용 효소센서 시스템의 최적화 잔류농약 측정용 면역센서의 개발을 위한 면역원의 합성 <p><제 2 세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> Lysine 센서의 성능 검증 및 보완실험 Phenylalanine센서의 구성 요소 도출 <p><제 3 세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> malic acid 센서 시스템의 최적 조건 수립 isocitrate 측정용 효소센서의 원리와 시스템 정립 	<ul style="list-style-type: none"> 효소센서의 수용체와 변환기의 감도 극대화 효소센서에 의한 농약검출의 가능성 시험 유기인계 농약의 산화방법의 확립 유기인계 농약의 hapten 합성 Lysine 센서의 최적 검출방법 및 모델 확립 Phenylalanine 센서 시스템의 구성요소 선정을 위한 예비실험 수행 Phenylalanine 센서 시스템의 효소반응기 및 검출시스템의 정립 FIA system에서 flow rate, 기질농도, 반응 온도, carrier buffer의 pH등 변수의 최적화 센서 system의 recovery와 검출한계의 평가 isocitrate 측정용 센서 개발을 위한 수용기 및 membrane의 결정 electrode 종류에 따른 system의 성능 비교

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
제 3차년도 (1998)	<p><제 1 세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> • 잔류농약 측정용 효소센서 시제품의 제작 및 농약검출 시험법의 정립 • 잔류농약 측정용 면역센서 개발을 위한 면역분석법 정립 <p><제 2 세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> • Phenylalanine센서의 성능 검정 및 보완실험 • Methionine센서의 구성요소 도출 <p><제 3 세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> • isocitrate 센서 시스템의 최적 조건 수립 • malic acid 측정용 센서의 식품에의 이용 	<ul style="list-style-type: none"> • 효소센서 시제품의 제작 • 주요 유기인계 및 카바메이트계 농약의 효소센서에 의한 검출 시험법 확립 • 농약 hapten을 동물에 주입하여 항체 생산 • 농약 측정용 immunoassay의 시험법 정립 • Phenylalanine센서의 최적 검출방법 확립과 모델설정 • Methionine 센서 시스템의 구성요소 선정을 위한 예비실험 • Methionine 센서 시스템의 효소 반응기 및 검출시스템의 정립 • FIA system에서 flow rate, 기질농도, 반응 온도, carrier buffer의 pH 등 변수의 최적화 • System의 recovery와 검출한계의 평가 • 식품에 함유된 malic acid 농도의 측정 • 시료 제조법의 표준화와 가능한 방해인자의 검색
제 4차년도 (1999)	<p><제 1 세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> • 잔류농약 효소센서 시제품의 실용화 확립 • 면역센서 개발의 완료 <p><제 2 세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> • Tryptophan 센서의 성능 검정 및 보완실험 • 필수아미노산센서의 시제품 제작 <p><제 3 세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> • malic acid와 isocitrate 시제품의 제작 및 기능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 효소센서에 의한 식품시료의 잔류농약 검출시험과 GC에 의한 검출시험의 비교 • 예비적 면역센서의 개발 • 최종 선택한 면역센서에 의한 농약 검출 가능성 시험 • Tryptophan 센서의 최적조건 모델정립 • 필수아미노산 측정 센서의 소형화와 시제품 제작 • 식품 재료의 실험적 적용을 통한 센서 기능의 최적화 및 평가 • 센서 연구결과를 종합하여 시제품을 제작 • 시제품의 기능 평가 및 보완

제3절 추진전략 및 방법

본 연구는 농수산물의 고품질화, 고부가 가치화를 달성하기 위해 농산 식품의 안전성 관련 물질인 유기인계와 카바메이트 잔류농약, 영양 성분 중 필수 아미노산, 향미성분 중 유기산들을 정량적으로 측정할 수 있는 바이오 센서 개발을 궁극적 목표로 하고 있다.

본 연구의 추진 과정은 제1 단계에서 우선 농산물의 품질을 좌우하는 식품의 안전성, 영양성분 및 향미성분에 관련된 요소들을 선정하고 이들 요소들이 센서에 의해 인지될 수 있는지 검토해 보았으며 이들 요소들을 측정할 수 있는 센서의 개발을 위한 기술 정보를 수집하고 센서 개발의 접근방법을 정립하였다. 이에 따라 유기인계 및 카바메이트계 농약센서, 필수 아미노산 센서, 향미성분중 유기산 센서 시스템을 고안하였다, 제2 단계에서는 센서의 구성요소들을 제작하여 parameter를 달리하면서 센서의 감응을 조사하여 센서 시스템을 최적화하였으며 검출 대상 물질들의 농도를 달리하면서 센서의 감응을 조사하여 검출한계와 감도를 측정 조사하였다. 제3 단계에서는 최적화한 센서의 구조를 개선하여 시제품의 제작을 시도하였으며 제4 단계에서는 센서 시제품을 실제 식품 시료의 분석에 적용하여 실용 가능성을 검증하고자 하였다. 본 과제의 연구결과에 의하면 센서 시스템의 성능은 만족스럽다고 볼 수 있으며 기술적인 문제점은 거의 해결되었다고 볼 수 있다. 그러나 각 세부분야에서 개발한 센서장치를 현장 사용이 가능한 소규모 장치로 축소화하는 과제가 앞으로 남아 있다고 본다.

센서의 개발과정에서 센서기술 관련 전문가를 공동 연구원으로 영입하여 활용하였으며 전문기관(경북대학교 센서기술연구소)의 자문을 얻고 각 세부 과제의 분기별 연구결과에 대한 토의 및 평가를 통하여 상호 협조체계를 강화하면서 연구를 수행하였다.

제4절 참고문헌

- Abdel-Hamid, I., Atanasov, P. and Wilkins, E. : Development of a needle type glucose biosensor, *Analytical Letter*, 27, 1453-1473 (1994)
- Fernando, J.C., Rogers, K.R., Anis, N.A., Valdes, J.J., Thompson, R.G., Eldefrawi, A.T., and Eldefrawi, M.E. : Rapid detection of anticholinesterase insecticides by a reusable light addressable potentiometric biosensor, *J of Agricultural & Food Chemistry*, 41(3), 511-516 (1993)
- Girotti, S. and Grigolo, B. : Bioluminescent flow sensor for the determination of L-lactate, *Analyst*, 115(7), 889-894 (1990)
- Hoshi, M., Sasamoto, Y., Nonaka, M., Toyama, K. and Watanabe, E. : Microbial sensor system for nondestructive evaluation of fish meat quality, *Biosensor & Bioelectronics*, 6(1), 15-20 (1991)
- Hu, Y. and Mitchell, K.M. : Direct measurement of glutamic release in the brain using a dual enzyme-based electrochemical sensor, *Brain Res*, 659, 117-125 (1994)
- Kim, N.S., Ryohei, N. and Karube, I. : Electrochemical properties of a disposable L-lactate sensor prepared by printing technique, *Food & Biotechnology*, 4(2), 85-88 (1995)
- Lee, S.K., Sode, K., Nakanish, K., Marty, J.L., Tamiya, E. and Karube, I. : A novel microbial sensor using luminous bacteria, *Biosensor & Bioelectronics*, 7(4), 273-777 (1992)
- Luong, J.H.T., Bouvrette, P. and Male, K.B. : Developments and applications of biosensors in food analysis, *Trends Biotechnol.*, 15,

369 (1997)

Maines, A., Ashworth, D. and Vadgama, P. : Enzyme electrodes for food analysis, *Food Technol. Biotechnol.*, 34, 31 (1996)

Marty, J.L., Mionetto, N., Noger, T., Ortega, F. and Roux, C. : Enzyme sensors for the detection of pesticides, *Biosensors & Bioelectronics*, 8(6) 271-280 (1993)

Mascone, d., Yamanaka, H. and Mascini, M. : Biosensors for glucose needle-shaped for in vivo monitoring, *Russian Journal of Electrochemistry*, 29, 1522-1526 (1993)

Matsukura, R., Aleixo, L.M., Godinho, W.E.S. and Neto, G. : Determination of glucose in instant coffee with an enzyme electrode, *Analytica Chimica Acta*, 280, 49-52 (1993)

Ozsoz, M. and Wang, J. : Tomato seed-based amperometric sensor for the determination of alcohols, *Electroanalysis*, 3, 655-658 (1991)

Shaw, G.W., Claremont, D.J. and Pickup, J.C. : In vitro testing of simply constructed, highly stable glucose sensor suitable for implantation in diabetic patients, *Biosensor & Bioelectronics*, 6(5), 401-406 (1991)

Steinkuhl, R. and Hinkers, H. : Glucose sensor in containment technology, *Horm-Metab-Res*, 26(11), 531-533 (1994)

Swift, R.M. and Martin, C.S. : Studies on a wearable, electronics, transdermal alcohol sensor, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 16(4), 721-725 (1992)

Toko, K. and Matsuno, T. : Multichannel taste sensor using electric potential changes in lipid membranes, *Biosensor & Bioelectronics*, 9,

359-364 (1994)

Ukeda, H. and Wagner, G. : Application of a microbial sensor for determination of short-chain fatty acids in raw milk samples, *Z-Lebensm-Unters-Forsch*, 195(1), 1-2 (1992)

Wagner, G. and Guilbault, G.G. (Ed.) : Food biosensor analysis, Marcel Dekker, New York (1994)

Wilson, G.S. and Zhang, Y. : Progress toward the development of an implantable sensor for glucose, *Clin. Chem.*, 38(9), 1613-1617 (1992)

제2장 농산물의 잔류농약 측정 센서 개발

제1절 서론

1. 연구의 목적

제1세부 연구과제의 궁극적 목적은 농산물 식품의 안전성에 관련된 물질 중 잔류농약을 인지하는 바이오센서의 개발에 있다. 잔류농약은 국민건강을 크게 위협하는 주요 식품오염 물질이며 안전성 관련 검사에 있어서 가장 중점적으로 다루어지는 물질이다. 본 연구의 분석대상 농약의 범위는 유기인계 및 카바메이트계로 한정하였으며 구체적인 목표는 이들 잔류농약의 존재 여부를 스크린할 수 있는 효소센서와 유기인계 농약 fenthion의 측정을 위한 면역분석법 및 면역센서를 개발하는 것이다.

2. 기존의 잔류농약 검출법

농산물 중의 잔류농약 검출은 현재 주로 기체 크로마토그래피(gas chromatography, GC)나 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 방법에 의존하는데(Keith, 1991; Cunniff, 1995a) 이 방법들은 감도와 정확도가 높다는 장점을 가지는 반면에 장시간의 전처리 과정과 고가의 기기가 요구된다는 단점을 가진다. 또한 GC의 경우 열에 불안정한 물질은 검출이 불가능하며 HPLC의 경우 발색단이 없는 물질은 검출이 어렵다는 단점을 가진다(Hammock, 1980; Grob, 1982). 그리하여 이러한 단점을 보완할 수 있는 새로운 방법을 개발하기 위한 연구가

활발하게 이루어지고 있으며 바이오센서의 개발은 그러한 연구 중에서 큰 비중을 차지하고 있다(Tran-Minh, 1993). 바이오센서는 생체물질을 사용하므로 선택성이 탁월하며 분석에 방해되는 물질을 제거하기 위한 전처리과정 이 거의 필요치 않다는 장점을 가진다. 화학분석에 있어서 흔히 방해물질로 인한 분석오차가 큰 문제점이 된다는 점을 고려하면 이 분석법의 높은 선택성은 매우 중요한 장점이 아닐 수 없다. 바이오센서는 이러한 장점 이외에 휴대가 가능하여 현장사용이 가능한 경우가 많으며 간편하고 신속하다는 장점도 가진다. 이와 같이 바이오센서는 많은 장점을 가지는 첨단적인 분석수단이므로 최근 들어 많은 연구자들의 관심을 불러일으키고 있다.

3. 농약 검출을 위한 바이오센서

Acetylcholinesterase(AChE)와 butyrylcholinesterase(BChE) 등의 효소는 총괄적으로 cholinesterase(ChE)라 불리우는데 이들은 유기인계와 카바메이트계 농약에 의해 활성이 저해되며 저해정도와 농약의 농도 사이에 상관관계가 있다는 것이 알려져 있다(Guilbault, 1970; Argauer, 1994). 그러므로 농약이 포함된 시료에 효소와 기질을 가하여 그 활성을 측정하고 그것을 농약이 없을 경우의 활성과 비교함으로써, 즉 저해정도를 측정함으로써 농약을 검출할 수 있다. 이 원리를 이용한 농약 검출용 효소분석법이 60년대에 들어서부터 개발되어 왔다.(Mendoza, 1968; Guilbault, 1970; Alfthan, 1989; Argauer, 1994; Evtyugin, 1997)

AChE와 BChE에 의한 반응에서는 산이 생성되므로 이들 효소의 활성을 전기화학적 전극으로 측정할 수 있다. 그러므로 이들 효소를 전극에 고정화시킨 바이오센서로서 효소의 활성을 측정할 수 있으며 그러한 바이오센서의 개발에 관한 연구도 최근에 보고되고 있으며(Tran-Minh, 1990;

Trojanowicz, 1996; Skladal, 1996; Skladal, 1997; Chung, 1998; Martorell, 1997; Nunes, 1998; Cho, 1999) 이들 바이오센서는 효소분석법에 비해 분석 과정이 간편하다는 장점을 가진다.

이상에서 소개한 효소분석법과 센서는 개별 농약의 검출이 불가능하다는 한계를 지닌다. 그러나 농산물에 대해 GC나 HPLC 등의 기존의 검사법을 시행하기 전에 이러한 센서로 시료를 스크린하여 농약의 주종을 이루는 유기인계와 카바메이트계 농약의 잔류여부를 알아낼 수 있다면 분석이 불필요한 많은 시료를 배제할 수 있을 것이다. 농약검사에 있어서 대부분의 농산물은 농약 함량이 허용치에 미달한다는 점을 고려하면 이러한 예비적인 스크린은 식품이나 환경의 잔류농약 검사에 있어서 막대한 시간적 경제적 이득을 가져올 수 있을 것이다.

그러나 효소의 저해에 근거한 센서들은 실제 농약 검출에 이용될 때 한 가지 문제점을 가지는 것으로 판단되는데, ChE는 농약과 공유결합 함으로써 저해를 받으므로 다수의 시료를 계속적으로 분석하기 위해서는 하나의 시료를 분석한 후 효소를 재활성화 시켜야 한다는 것이다. 효소를 활성화시키는 시약들이 있으나 활성의 복구는 한계가 있다. 그러므로 시료를 계속적으로 분석하기 위해서는 몇 개의 시료분석 후 전극에 부착시킨 효소 막을 교체하여야 하는데 새로이 효소 막을 형성시키는데 장시간이 소요되므로 분석과정이 간편하고 신속하다는 센서 고유의 장점을 살리지 못하게 된다. 그리하여 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결할 수 있는 2종의 새로운 ChE 센서를 제작하고자 하였다.

본 연구에서 개발을 시도할 센서 중 하나는 중합체 막으로 이루어진 이온 선택성 전극(ion-selective electrode, ISE)(Cha, 1991; Yim, 1993)을 변환기로 사용하는 탐침(probe)형 센서이다. 이러한 ISE의 중합체 막에 AChE 혹은 BChE를 고정화시킬 수 있다면 이 효소 막을 사용한 센서는 위에서

제기한 문제점을 해결할 수 있을 것으로 기대되는데 그 이유는 그러한 효소 막은 대량 제작이 가능하며 ISE 본체에 쉽게 교체 장착할 수 있기 때문이다. 그리하여 별 어려움 없이 반복적인 시료분석이 가능하게 될 것이다.

개발하고자 하는 제2의 효소센서는 흐름주입분석(flow injection analysis, FIA)형 센서이다(Hansen, 1993). 이 센서 시스템은 수용체 효소를 고정화시킨 반응기와 변환기로 이루어진다. 효소 반응기는 다수 제작하여 수시로 사용할 수 있으며 교체가 용이하므로 이러한 센서시스템은 위에서 제기한 문제점을 해결할 수 있을 것이다. 이것은 또한 탐침형 센서에 비해 더 많은 시료를 분석할 수 있다는 장점을 가진다.

ChE가 저해되는 정도를 측정하여 농약을 분석하는 효소센서는 효소의 저해정도가 클수록 감도가 높다. 유기인계 농약의 주종인 thiophosphate $((RO)_2P(=S)-)$ 는 phosphate $((RO)_2P(=O)-)$ 로 산화시킬 수가 있는데 산화된 농약은 효소와의 반응 즉 저해를 더 빨리 또 더 크게 일으킨다는 것이 알려져 있다(Fallscheer, 1956; Kumaran, 1992). 그러므로 유기인계 농약을 ChE 센서로 분석할 때 분석 이전에 농약을 산화시킴으로써 분석의 감도를 높일 수 있다. 본 연구에서 개발할 센서에 있어서 그것의 가능여부를 알아보하고자 하며 이를 위하여 유기인계 농약의 산화방법을 확립하고자 한다.

4. 농약 검출을 위한 면역분석법 및 면역센서

효소는 특이성(specificity)과 효율성(efficiency)이 매우 높은 촉매이므로 효소분석법과 효소센서의 감도와 선택성은 매우 높지만 분석 대상이 될 수 있는 물질은 효소에 의해 반응이 일어나거나 효소의 활성을 저해하는 물질 뿐이다. 분석대상 물질의 범위가 제한적이라는 이 단점을 극복하기 위하여 또 다른 하나의 생체물질인 항체의 이용 가능성에 대한 관심이 고조되고

있으며 그 중에서도 면역분석법(immunoassay)의 개발에 관한 연구가 최근 들어 활발하게 시도되고 있다(Wild, 1994; Diamandis, 1996). 이 분석법은 생체물질(항체)의 높은 특이성을 분석화학에 접목시킨 것으로서 물질분석의 새로운 지평을 열었다고 평가된다. 면역분석법 중에서도 항원(antigen) 혹은 항체(antibody)를 고체 지지체(support) 표면에 고정시키고 항원-항체 반응을 효소반응으로 측정하여 물질을 정량하는 효소결합 면역흡착제 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)은 생체관련 물질의 분석에 널리 이용되어 왔으며 80년대에 들어 농약, dioxin, aflatoxin 등의 환경오염 물질의 분석에도 이용되고 있다(Rittenburg, 1990; Vanderlaan, 1991,a). 이 분석법은 크로마토그래피 분석법이 가지는 단점을 가지지 않으며 감도가 매우 높고 간편하며 비용이 적게 들고 다수의 시료를 동시에 분석할 수 있다는 장점을 가지므로(Vanderlaan, 1991,b) 현대적인 물질분석에서 차지하는 비중이 급속도로 높아지고 있다. 농약분석을 위한 ELISA의 개발은 특히 매우 활발하며 지금까지 약 50여종의 농약에 대해 개발이 보고되어 있고 그 중 일부는 이미 상품화되어 있다(Hennion, 1998). 그러나 우리 나라에서는 아직 이 방법이 이용단계에 있을 뿐 개발에 있어서는 초보 단계에 있으므로 ELISA 개발에 관한 연구가 조속히 활성화되어야 할 필요성이 있다.

최근에는 항체를 이용하는 센서 즉 면역센서(immunosensor)에 관한 연구도 매우 활발하게 이루어지고 있다(Kooyman, 1997; Wortberg, 1997). 면역센서는 ELISA의 원리에 따라 구성할 수 있으므로 ELISA를 먼저 개발한 후 그것을 토대로 하여 면역센서를 개발하는 것이 보통이다.

본 연구에서 개발하고자 하는 ELISA와 면역센서의 분석대상 농약으로 fenthion을 선정하였다. 이 농약의 면역분석법과 면역센서는 지금까지 개발된 바가 없으므로 먼저 fenthion의 ELISA를 개발하고 이를 토대로 하여 면역센서를 개발하고자 한다.

본 연구에서 개발을 시도하는 면역센서들 중의 하나는 dipstick형 ELISA이다. ELISA의 장점 중의 하나는 기기(ELISA reader)의 휴대가 가능하므로 현장분석이 가능하다는 것이다. 그러나 농촌 현장에서 농업종사자가 직접 ELISA를 사용하기에는 경제적 및 기술적인 문제점이 있다. 그리하여 기기가 필요치 않으며 어디에서나 사용이 가능한 dipstick형 ELISA가 개발되기 시작하고 있다(Giersch, 1993; Schneider, 1994). 이 분석법은 효소 반응의 결과(색)를 전기화학적 혹은 광학적 검출기가 아닌 육안으로 식별하므로 일반적인 센서와 다르지만 육안은 일종의 광학적 검출기임으로 넓은 의미에서 센서라고 볼 수 있다. 이러한 형태의 ELISA는 reader를 사용하는 일반적인 ELISA에 비해 정확도가 낮다는 단점이 있지만 농약의 잔류허용치 초과 여부는 쉽게 판단할 수 있으며 일반 농가에서도 사용이 가능하다는 이점이 있다. 그러므로 dipstick형 ELISA는 장래에 널리 보급될 것으로 예상되며 제품화하면 시장성이 클 것이므로 본 연구에서 개발하고자 한다.

본 연구에서 개발하고자 하는 제2의 면역센서는 전류법 면역센서이다. 이것은 면역분석법에 전기화학적 검출법을 접목시킨 것으로서 임상 및 환경시료를 감도 높게 분석할 수 있음이 알려지고 있다(Ghindilis, 1998). 본 연구에서는 플라스틱에 소형의 전극을 screen-printing 기법으로 입힌 1회용의 센서(Cagnini, 1995; Palchetti, 1997)를 제작하고자 한다. 이러한 센서는 전극을 적은 비용으로 대량 제작할 수 있으므로 경제적이라는 장점을 가진다.

제2절 잔류농약 분석용 효소센서 개발

AChE와 BChE는 기질인 acetylcholine(ACh) 혹은 butyrylcholine(BCh)을 가수분해시켜 초산 혹은 부티르산을 생성시키므로 pH 변화를 측정하여 그 활성을 알 수 있다. 그러므로 AChE와 BChE가 유기인계와 카바메이트계 농약에 의해 활성이 저해되며 저해정도가 농약 농도의 $-\log$ 값에 비례한다는 원리에 의거한 바이오센서의 변환기로서 전기화학적 전극을 쓸 수 있다. 이러한 전위차법 센서는 필요한 기기가 휴대 가능한 pH 미터와 strip chart recorder 뿐이므로 전류법(amperometry)이나 광학적 센서와 달리 현장사용이 가능하다는 장점을 가진다. 또한 다른 종류의 센서에 비해 제작비용이 적게 들고 안정성과 재현성이 높다는 장점을 가진다. 그러므로 이 방법은 실용적인 농약분석 센서의 개발이라는 본 연구의 목적을 달성할 수 있는 좋은 방법으로 판단된다.

본 연구에서 개발하고자 하는 농약분석용 센서는 다수의 시료를 계속적으로 분석하는데 유리한 중합체 막 ISE를 사용한 탐침형 센서와 FIA형 센서이다. 이들 센서의 원리와 개발을 위한 실험과정 및 결과는 다음과 같다.

1. 중합체막 전극을 사용한 탐침형 효소센서

최근 들어 종래의 유리 전극 대신에 중합체 막을 사용한 이온 선택성 전극(ion-selective electrode, ISE)이 이온과 기체 측정에 많이 이용되고 있다(Yim, 1993). 예를 들어 tridodecylamine(TDDA)과 같은 H^+ ionophore와 dioctylphthalate(DOP)와 같은 plasticizer를 PVC에 혼합한 중합체 막은 pH 측정에 이용된다(Moody, 1979; Thomas, 1986; Zhang, 1990; Christie, 1992). 이러한 ISE에 AChE 혹은 BChE를 고정화시킬 수 있다면 이 효소막을 사

용한 센서는 효소막을 대량으로 제작하여 수시로 교체장착할 수 있으므로 지속적인 시료분석이 가능할 것으로 기대된다. AChE 대신 BChE를 수용체로 사용할 경우에는 이온 선택성 막으로 H⁺ 선택성 막 이외에 BCh 선택성 막을 사용할 수 있다.

본 연구에서는 이러한 이온 선택성 막에 BChE를 고정화시킨 탐침형 센서의 제작을 시도하였다. BChE를 수용체로 한 중합체 막 ISE의 중합체 matrix 물질로 cellulose triacetate(Cha, 1989), methacrylamide-acrylamide copolymer(Tor, 1986; Tran-Minh, 1990) 및 polyurethane(PU)(Cha, 1991; Liu, 1993; Meyerhoff, 1993; Espadas-Torre, 1995; Yun, 1997)를 시험해보았다. 앞의 두 물질은 BChE를 고정화시키기에 부적당하다는 것을 발견하였으나 PU의 경우에는 매우 희망적인 결과를 얻었다. PU의 경우에 H⁺-선택성 중합체막 base membrane에 친수성(hydrophilic) PU (HPU)와 polylysine 및 효소를 섞은 액을 도포 건조시켜 효소막을 구축하였다.

센서 시스템의 구성요소들을 최적화하여 감도를 극대화하기 위해 a) HPU의 종류, b) HPU와 효소의 조성비 및 c) polylysine의 함량을 달리한 효소막을 구성하여 센서의 감응을 알아보고 d) buffer의 pH를 달리하여 그 감응을 알아보았다.

개발한 센서를 유기인계와 카바메이트계 농약의 검출에 이용할 수 있는지 알아보기 위하여 유기인계 농약의 일종인 paraoxon(parathion의 산화물)에 의한 센서 효소의 저해정도를 측정하였다. Paraoxon의 농도를 달리하여 검량곡선을 얻고 검출 한계를 알아보았다. 또한 센서 효소막의 반복 사용 가능성을 알아보기 위해 pyridine-2-aldoxime methiodide(2-PAM)를 효소활성 복구시약으로 사용하여 효소 재활성화의 정도를 알아보았다.

가. 실험 내용 및 방법

1) 시약 및 실험 재료

모든 시약은 analytical-reagent grade을 사용하였다.

기본막(base membrane) 즉 pH 감응막에서 막 지지체로 작용하는 tecoflex polyurethane은 Thermedics Inc.사로부터, PVC는 Fluka, 중성 운반체인 tridodecylamine(TDDA)은 Aldrich사로부터 구입하였다. 전위차적 감응을 향상시키기 위한 potassium tetrakis (p-chlorophenyl) borate (KTpCIPB), 가스제로 사용한 bis(2-ethylhexyl)sebacate(DOS), 그리고 용매로 사용한 tetrahydrofuran(THF)은 Fluka사로부터 구입하였다.

상막(upper membrane) 즉 효소막의 matrix인 친수성 polyurethane (HPU)은 조성이 다른 7종을 광운대 화학과에서 기부 받았고 수용체 효소로 사용한 butyrylcholinesterase(EC3.1.1.8, from horse serum)와 효소 기질인 butyrylcholine, 효소고정화를 위한 첨가제 polylysine은 Sigma사로부터 구입하였다.

완충제 N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'[2-ethane sulfonic acid] (HEPES)와 효소의 안정화를 위해 사용된 gelatin은 Sigma사로부터 구입하였다. 유기인계 농약 paraoxon은 Dr. Ehrenstorfer GmbH사로부터, 효소 재활성화 시약인 2-PAM은 Sigma사로부터 구입하였다.

pH meter는 Metter-Toledo사의 Mettler delta 340을, 기준전극은 Orion사의 Model 90-02 double junction reference electrode를, recorder는 Kipp & Zonen사의 BD 111 flatbed recorder를 사용하였다.

2) 센서의 구성

본 연구에서 구성한 센서의 개략도는 Fig. 2-1과 같다. 감응이 일어나는

지시전극과 기준전극 사이의 전위차는 전위차계(pH 미터)에 의해 감지되어 그 값이 recorder에 기록된다.

센서의 효소막은 pH에 감응하는 PU 중합체 기본막(base membrane)에 BChE를 함유하는 HPU를 도포하여 형성하였다.

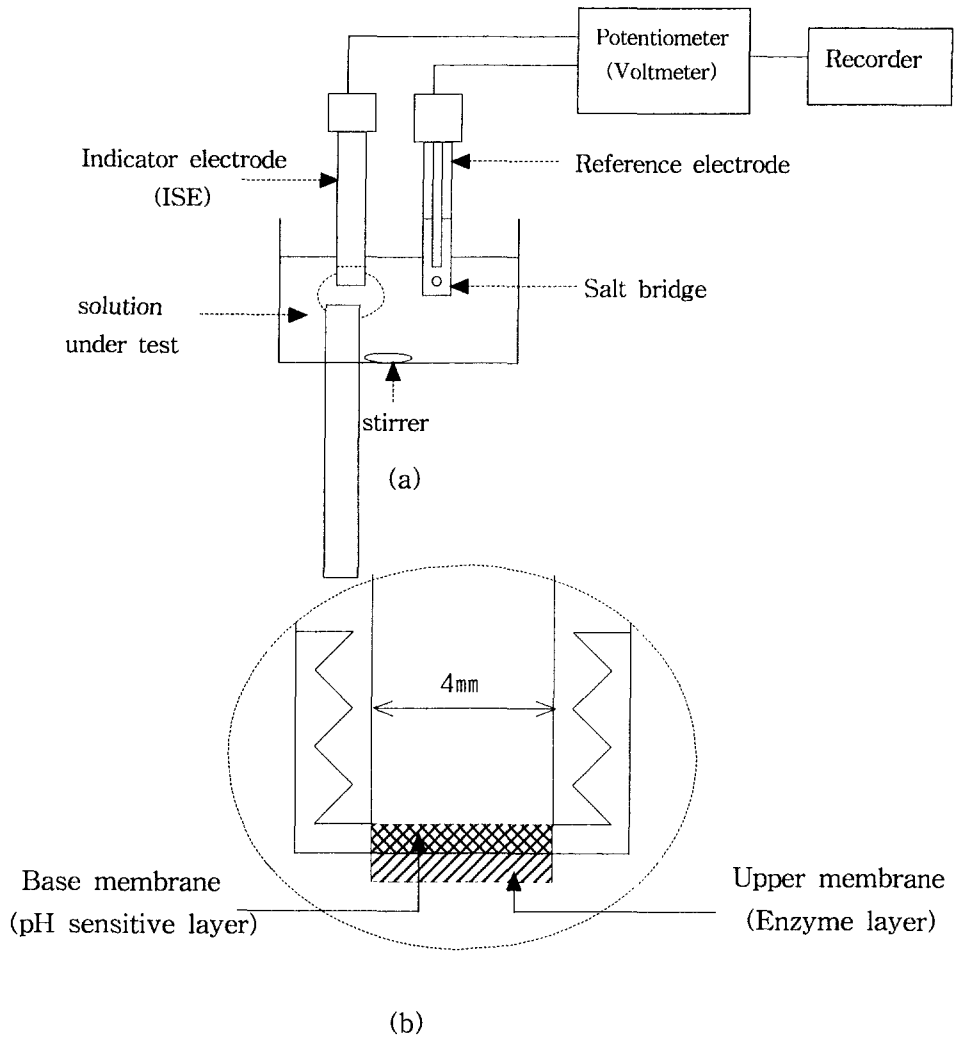


Fig. 2-1. Schematic diagram of BChE sensor system.

pH에 감응하는 기본막은 다음의 과정으로 형성하였다. Tecoflex polyurethane 52.8 mg, PVC 13.2 mg, TDDA 4.0 mg, KTpClPB 2.0 mg과 DOS 144.0 μ L를 THF 1000 μ L에 섞은 혼합물을 teflon plate 위에 놓여 있는 직경 22 mm glass ring 위에 부어 하루 정도 건조시켜 막을 형성하였다. 형성된 pH 감응막을 직경 약 6 mm로 잘라 낸 후 ISE body에 부착시키고 ISE body에 내부용액(0.02 M NaH_2PO_4 , 0.03 M Na_2HPO_4 , 0.015 M NaCl)을 넣어 주었다. 이 때 ISE body에 부착된 막은 가능한 한 평평하도록 해주었다.

3) 감응막의 제작

효소를 함유하는 상막 주조용액(casting solution)의 제조과정은 아래와 같다.

- (1) BChE 300 unit와 HPU 0.5 mg을 100 μ L의 THF에 녹이고, 녹지 않은 고체상태의 BChE는 sonicator로 분쇄시켜 균일하게 용액 중에 분산시켜 준다(용액 1).
- (2) Polylysine 2 mg을 0.05 M phosphate buffer(pH 7.0) 20 μ L에 녹인다(용액 2).
- (3) 용액 1에 용액 2를 1.6 μ L 넣어 준 후 이 용액을 다시 sonicator로 분쇄시켜 준다.

제조한 용액(3)을 모두 기본막의 표면에 도포하여 하루 정도 건조시킨 후 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.55, 20 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 0.01% gelatin(w/v)에 담귀 사용할 때까지 4°C에 냉장 보관한다. 지금부터 이 buffer를 2.5 mM HEPES buffer라고 지칭한다.

4) 감응막의 최적화 실험

본 센서의 감응막은 pH 감지막과 효소막으로 이루어져 있다. 따라서 전체막의 감응성을 측정하기 위해 앞서 기본막의 pH 감응성을 측정하였으며 그 후 효소막의 최적화를 시도하였다.

가) 기본막의 pH 감응 측정

pH 감응 기본막의 성능을 알아보기 위하여 먼저 ISE body에 pH 감응막만을 부착하여 pH에 따른 감응도를 조사하였다. 먼저 Fig. 2-1의 장치를 꾸미고 전극을 10^{-3} M NaOH 30 mL에 넣어 충분히 평형이 이루어지게 한 다음 pH meter를 연결하여 pH와 전위를 측정한다. 이 용액에 pH 7 혹은 pH 4의 표준용액을 가하여 pH를 낮추면서 pH와 전위차를 동시에 측정한다.

나) BChE 센서의 BCh에 대한 감응 측정

pH 감응막 위에 효소막을 장착한 BChE 센서의 기질(BCh)의 농도에 따른 전위차 측정은 2.5 mM HEPES buffer에서 행하였다. Fig. 2-1과 같은 장치를 꾸미고 센서를 30 mL HEPES buffer에 넣은 다음 자기 교반기로 용액을 저어주면서 평형이 이루어지게 한다. Baseline이 안정화된 후 BCh의 최종농도가 각각 10^{-4} , 3.16×10^{-4} , 10^{-3} , 3.16×10^{-3} 그리고 10^{-2} M (2.5 mM HEPES)이 되도록 하여 정상전위를 기록한 후 검량곡선(calibration curve)을 작성한다. 모든 반응과 측정은 실온(20-25°C)에서 실시하였고 전위차 값은 반응시간 8분에서의 데이터를 취하였다.

다) 효소막 주조용액(casting solution)의 최적화

효소를 함유하는 상막의 구성을 최적화하기 위해 HPU의 종류와 양, 효소의 양, polylysine의 양 및 효소막의 두께를 달리하면서 센서의 감응을 조사하였다. 센서의 감응은 위의 나)절에서 기술한 과정으로 측정하였다.

(1) HPU의 종류에 따른 감응성

효소막의 HPU는 soft segment인 polyethylene glycol 및 polypropylene glycol의 함량을 달리한, 따라서 흡수량(water uptake)이 다른 네 가지 종류 즉 HPU A(흡수량 40%), HPU B(100%), HPU C(210%), HPU D(270%)와 HPU A와 조성이 비슷하나 중합 반응의 시간을 달리한 HPU 45(30%), HPU 90(30%), HPU 45S(31%)의 세 종류 등 모두 7종을 사용하였다.

HPU 각각을 사용하고 위의 2)와 3)절에서 기술한 바에 따라 센서를 제작하여 4)의 나)에서 기술한 과정으로 감응성을 알아보았다. 7종의 HPU 중에서 HPU B가 가장 우수한 것으로 판단되었으므로 이하의 실험들은 HPU B를 사용하여 실험하였다. HPU B를 사용하여 3)에서 기술한 것처럼 막을 형성하였을 경우에(BChE 300 unit, HPU 0.5 mg, polylysine 0.16 mg) 그 조성을 지금부터 기본조성이라 지칭한다.

(2) HPU 양에 따른 감응성

HPU B와 효소의 함량비에 따른 감응성을 알아보았다. HPU B 이외 성분은 기본조성으로 고정시키고 효소 300 unit에 대해 HPU B의 함량을 0.2, 0.45 및 0.9 mg의 세 가지로 달리하여 효소막을 구축하고 그 감응을 측정 비교하였다.

(3) 효소양에 따른 감응성

BChE 이외 성분물질의 조성은 기본조성으로 고정시키고 BChE의 함량이 각각 150, 300 및 600 unit인 효소막을 구축하여 그 감응을 측정하였다.

(4) Polylysine 양에 따른 감응성

Polylysine 이외의 물질의 조성은 기본조성으로 고정시키고 HPU에 대한 polylysine의 양만을 각각 0, 32 및 64 wt%로 달리하여 효소막을 구축하고 그 감응을 비교하였다.

(5) 효소막 두께에 따른 감응성

효소막의 두께에 따른 감응의 차이를 알아보기 위해 막의 조성을 기본조성 양들의 70%(BChE 210 unit, HPU 0.35 mg, polylysine 1.12 μ L)와 40%(BChE 120 unit, HPU 0.2 mg, polylysine 0.64 μ L)로 하여 막을 제작하고 그 감응을 측정하여 기본조성일 때의 감응과 비교하였다.

라) Buffer의 pH에 따른 차이 비교

BChE 센서를 제작하여 HEPES buffer의 pH를 달리하면서 3.16 mM BCh에 대한 전극의 감응을 알아보았다. 시험해 본 buffer의 pH는 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 그리고 10.0이었다.

5) 센서를 이용한 paraoxon 분석

유기인계 농약 분석을 위한 센서 효소의 저해도 측정은 먼저 센서의 BCh에 대한 감응을 측정하고, 센서를 농약 함유 용액에 일정시간 incubate

한 다음 BCh에 대한 감응을 측정하여 두 값을 비교함으로써 수행하였다. 저해율은 다음 식으로부터 구하였다.

$$I = \frac{E_0 - E_1}{E_0} \times 100 \quad (1)$$

이 식에서 E_0 는 저해 전 센서의 BCh에 의한 전위차이고 E_1 은 저해 후의 전위차이다. 센서의 막 조성은 기본조성이었으며 농약으로 paraoxon을 사용하였다. 효소 기질 BCh의 농도는 3.16 mM이었으며 용매는 HEPES buffer이었다. 농약 검출의 감도를 극대화하기 위해 센서의 incubation 시간에 따른 저해정도를 알아보았으며 paraoxon의 농도를 달리하면서 저해도를 조사하여 검량곡선을 얻었다. Paraoxon은 물에 대한 용해도가 매우 낮으므로 stock solution(10^{-3} M)은 무수 에탄올로 제조하였다.

가) 효소전극의 incubation 시간에 따른 저해정도

전극의 적절한 incubation 시간을 알아보기 위해 incubation 시간에 따른 효소의 저해정도를 알아보았다. 먼저 저해 전의 BCh에 의한 전위차를 측정하고 10^{-6} M paraoxon 용액에서 30, 45, 60, 75 및 90분간 incubate시킨 다음 HEPES buffer로 세척하여 전위차를 측정하였다.

나) Paraoxon 농도에 따른 효소의 저해도 측정

먼저 효소를 저해시키기 전의 BCh에 의한 전위차를 측정한 다음 paraoxon의 농도를 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M(HEPES buffer)로 하여 실온에서 1시간 동안 전극을 incubate시키고 이어 전극을 HEPES buffer로 충분히 씻어 준 다음 전위차를 측정하였다. 저해 전후의 정상상태의 전위차로부터 센

서의 저해율을 계산하였다.

다) 효소막 중의 polylysine 유무에 따른 저해도 측정

기본조성으로 효소막을 형성하되 polylysine을 넣은 것과 넣지 않은 BChE 센서를 제작하여 paraoxon의 농도를 달리하면서 효소의 저해도를 비교하였다.

라) 활성 복구제와의 incubation 시간에 따른 재활성화 정도

전극을 10^{-5} M paraoxon 용액에서 1시간 동안 incubate시킨 후 1 mM 2-PAM 용액(2.5 mM HEPES buffer)에 담구어 저어주면서 재활성화시켜 효소활성 복구의 정도를 알아보았다. 적절한 incubation 시간을 알아보기 위하여 1, 2, 3 및 4 시간 동안 1 mM 2-PAM 용액에서 incubate시킨 후 그에 따른 재활성화 정도를 조사하였다. 재활성화율은 다음의 방법으로 계산하였다.

$$R = \frac{E_1}{E_0} \times 100 \quad (2)$$

이 식에서 R은 재활성화율, E_0 는 저해 전의 BCh에 의한 전위차, E_1 은 저해시켜 재활성화한 후의 전위차를 나타낸다.

6) 효소전극의 안정성

기본조성으로 효소막을 구축한 전극을 4°C의 HEPES buffer에 냉장보관하면서 1주일 간격으로 감응성을 조사하여 5주 동안 효소전극의 안정성을

측정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) pH 감응 기본막의 성능

pH 감응막의 pH에 따른 감응은 약 50 mV/pH이었으며 pH 5~10에서 직선성을 나타내었다(Fig. 2-2). 감응 전위가 25°C에서 이론값인 59.1 mV/pH에 가까우며 비교적 넓은 pH 범위에서 직선성을 나타내므로 pH 감응막의 성능은 매우 우수한 것으로 보인다. 중합체 matrix로서 PU 이외에 PVC를 첨가해준 것은 PU만으로 형성한 막의 반응 기율기와 선택성은 PVC matrix만을 사용한 막에 비해 떨어진다고 알려져 있기 때문이다(Cha, 1991). pH 감응막의 성분의 하나로 첨가한 lipophilic additive(KTpCIPB)는 PU 기본막의 음이온 부위를 보강해주기 위해서였는데 적절한 양을 첨가해 주면 막과 물의 접촉면에서 이온교환반응을 촉진할 뿐 아니라 막에서 중성 운반체의 용해를 돕는다는 것이 알려져 있다(Yun et al 1997).

2) 효소막의 최적화

HPU 비대칭막을 사용한 바이오센서의 성능은 생체물질 고정화의 지지체인 바깥층의 친수성 matrix의 특성에 좌우된다. 이러한 바이오센서에서 전위차적 이온반응은 바깥층과 기본 감지막의 접촉면에서 일어나므로 바깥층 물질은 기본 감지막에서 바깥층으로 유기 가소제나 ionophore의 확산이 적어야 하고 첨가된 효소를 보유해야 하며 바깥층 친수성 필름과 기본막 사이에 접착이 강하여 반응이 빨리 일어나고 수명이 길어야 한다. 이러한 조

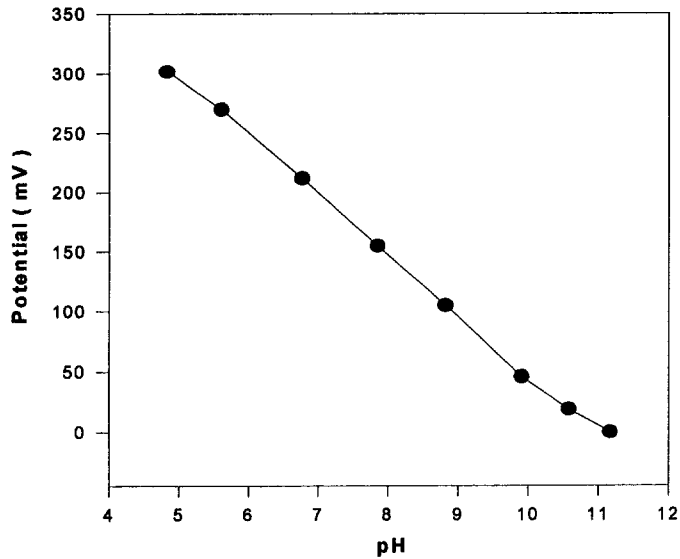


Fig. 2-2. Responses of PU-based H⁺-selective base membrane at different pHs.

건을 만족시키는 효소막으로 cellulose triacetate(CTA)와 PU를 사용한 중합체 막 시스템이 개발되었으며 그 구조는 이온 감응막과 효소막을 별도로 제조하여 결합시킨 비대칭적인 것이었다(Cha, 1989; Liu, 1993). 본 연구의 결과는 PU가 BChE를 고정화시킬 효소막 matrix로서 적합함을 말해준다.

pH 감응막 위에 형성할 효소막의 구성을 최적화하는 실험에 있어서 효소막의 감응은 $10^{-2} \sim 10^{-4}$ M BCh에 대한 전극의 감응으로 알아보았다. 이 농도범위는 효소막을 기본조성(BChE 300 unit, HPU B 0.5 mg, polylysine 0.16 mg)으로 형성하였을 때의 대략적인 검출범위이다. 효소막의 조성을 달리 하였을 때의 결과는 아래와 같았다.

가) HPU 종류에 따른 효소막의 감응

Fig. 2-3에서 볼 수 있는 것처럼 사용한 7가지 HPU 중에서 HPU B와 HPU D는 다른 것들에 비해 훨씬 더 좋은 감응을 나타내었다. 둘 중에서 HPU B는 더 좋은 직선성을 나타내므로 최적의 것으로 볼 수 있다. Fig. 2-4는 시간에 따른 HPU B의 실제 측정 데이터(dynamic response)를 나타낸다.

나) HPU 양에 따른 효소막의 감응

효소 300 unit에 대해 HPU B의 함량이 0.2, 0.45 및 0.9 mg인 효소막을 제작하여 감응을 알아보았다. 전극 제작 직후에는 세 경우가 비슷하게 양호한 감응(ca. $100 \text{ mV}/10^{-3} \rightarrow 10^{-2} \text{ M}$)을 나타내었으나 3일 후에는 1.5 및 3 mg인 경우에는 감응의 변화가 없었으나 0.7 mg 함량의 경우에 거의 감응을 나타내지 않았다(Fig. 2-5). 그러므로 HPU B의 양은 1.5 mg/(1000 unit 효소) 이하가 되어서는 안된다는 것을 알 수 있다. HPU의 함량이 적을 때 감응이 낮아지는 것은 효소 지지능력이 낮아지기 때문일 것이다.

다) 효소양에 따른 효소막의 감응

다른 성분물질들의 조성은 기본조성과 같게 하고 효소의 양을 기본조성으로 한 것과 기본조성의 50%(BChE 150 unit) 및 200%(BChE 600 unit)로 하였을 때의 결과가 Fig. 2-6에 나타나 있다. 2일 후의 감응은 효소의 양이 300 unit와 600 unit인 경우에는 거의 변화가 없었으나 150 unit인 경우에는 크게 낮아졌다. 또한 600 unit를 사용한 경우도 300 unit를 사용한 경우보다

감응성이 떨어지므로 효소의 양이 지나치게 많아도 감응성이 떨어짐을 알 수 있다. 그러므로 효소의 양이 300 unit인 경우가 최적인 것으로 판단된다. 효소전극의 정상상태의 전위는 고정화 효소의 양에 의해 영향을 받는다 (Kobos, 1980; Guilbault, 1976; Carr, 1990). Eppelsheim 등(1995)은 효소의 양이 1%(wt/wt) 미만 뿐 아니라 4%(wt/wt) 이상일 때도 오히려 감응성이 저하된다는 보고를 한 바 있다.

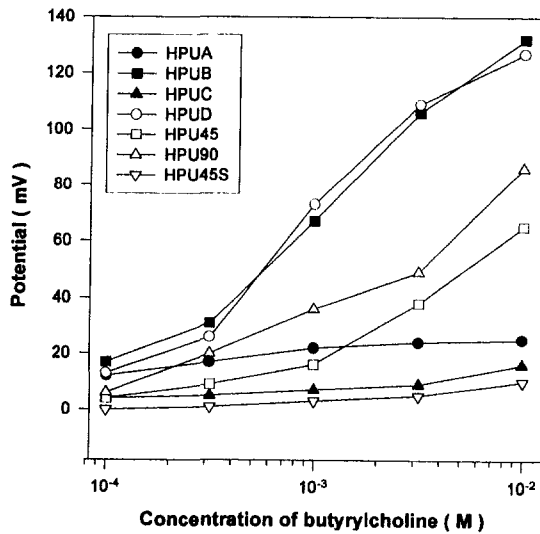


Fig. 2-3. Responses of PU-based BChE electrodes fabricated with HPUs with different soft segment content.

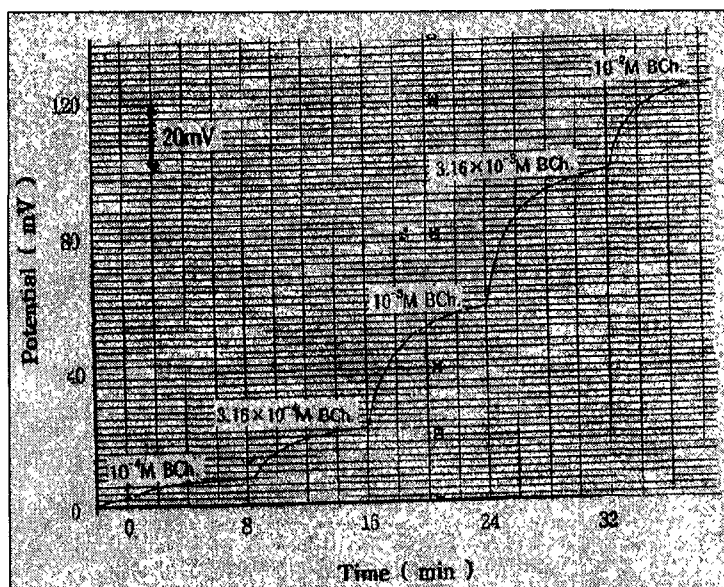


Fig. 2-4. Response of PU-based BChE electrode fabricated with HPU B.

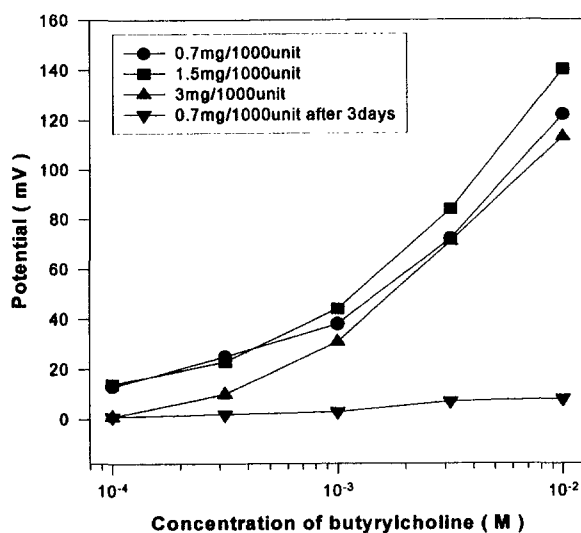


Fig. 2-5. Responses of PU-based BChE electrodes fabricated with different composition of HPU.

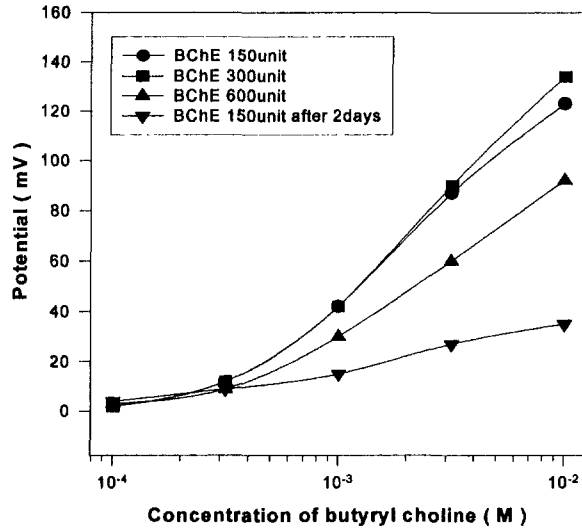


Fig. 2-6. Responses of PU-based BChE electrodes fabricated with different composition of BChE.

라) Polylysine 함량에 따른 효소막의 감응

HPU B에 대해 polylysine을 0, 32, 64 wt%(HPU B 0.5 mg에 대해 0, 0.16, 0.32 mg)를 사용하였을 때 전자의 두 경우의 감응은 양호하였으나(ca. 100 mV/10⁻³→10⁻² M) 후자의 경우에는 감응을 전혀 나타내지 않았다(Fig. 2-7). HPU와 polylysine을 함유하는 중합체 matrix로 구성된 ISE에 있어서 polylysine의 아미노기는 효소의 고정화에 영향을 주지만 이온반응은 별로 방해하지 않는다는 보고가 있으나(Ma, 1988; Yim, 1993) 본 실험의 결과는 polylysine의 사용이 BChE 센서의 성능을 크게 향상시키지 못할 뿐만 아니라 많은 양을 사용하면 오히려 성능을 크게 떨어뜨린다는 것을 말해준다.

마) 효소막의 두께에 따른 효소막의 감응

본 연구에서 제작한 BChE 센서의 단점은 감응시간이 길다는 것이다. 감응시간을 줄이기 위해 각 성분의 조성비는 동일하게 하되 효소막의 두께를 얇게 하여 비교해 본 결과 막의 두께가 얇을수록 감응성은 떨어졌으나 감응시간의 유의적인 감소는 관찰되지 않았다.

전극의 감응시간을 결정하는 주요 요소는 효소막의 두께와 기질의 확산계수이다. 일반적으로 막의 두께를 증가시키면 전극의 감응 기울기는 높아지고 감응시간은 늦어지는 서로 상반되는 효과를 나타낸다. 기질확산 속도가 빠를수록 감응시간이 짧아지므로 시료용액을 저어주면 감응시간이 단축된다. 이는 균질 농도의 용액이 되는데 걸리는 시간도 전극 자체의 감응시간에 포함되기 때문이다. 실제로 시료용액을 저어줌으로써 감응시간이 상당히 단축된다는 것을 알 수 있었다.

3) Buffer의 pH에 따른 효소막의 감응성 차이

HEPES buffer의 pH를 달리하면서 3.16 mM BCh에 대한 전극의 감응을 조사한 결과가 Fig. 2-8에 나타나 있다. pH 6.5에서부터 pH가 증가함에 따라 센서의 감도가 증가하는 것처럼 보이나 이는 pH가 높아짐에 따라 기질인 BCh가 가수분해되는 속도가 빨라지는데 기인하는 바가 큰 것으로 추정된다. 따라서 본 실험에서의 pH는 가수분해 속도가 그다지 크지 않으며 감응이 상당히 높은 7.5 정도가 적합한 것으로 판단된다. 센서 반응의 pH 의존성은 BChE 활성의 pH 의존성에 기인한다(Tran-Minh et al 1990; Marty 1993). 사용한 BChE의 활성은 pH 8에서 최고이지만 paraoxon이 염기성에서 가수분해된다는 점을 감안해야 할 것이다.

4) 최적화된 센서를 이용한 유기인계 농약의 검출

가) 효소의 저해시간에 따른 저해정도 측정

유기인계 농약과 같은 비가역적 저해제는 효소를 저해하는데 상당한 시간의 preincubation이 요구된다. 전극을 10^{-6} M paraoxon 용액 중에서 시간을 달리하여 incubate시킨 후 저해율을 측정된 결과가 Fig. 2-9에 나와있다. Incubation 시간이 길어지면 저농도의 저해제를 더 정확하게 측정할 수 있지만 이로 인해 분석에 장시간이 소비되므로 이들을 절충한 적절한 시간을 선택해야 할 것이다.

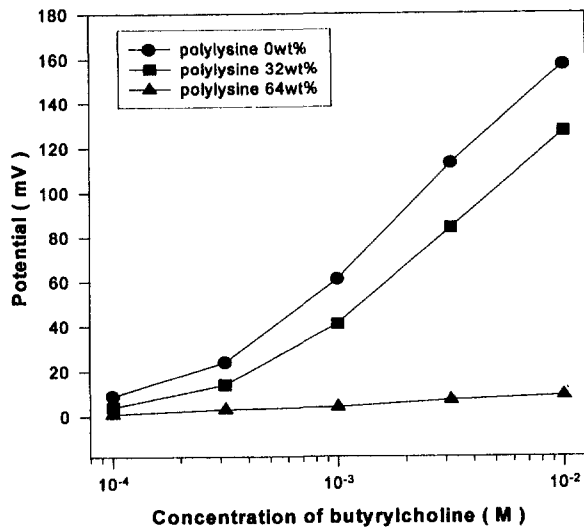


Fig. 2-7. Responses of PU-based BChE electrodes fabricated with different composition of polylysine.

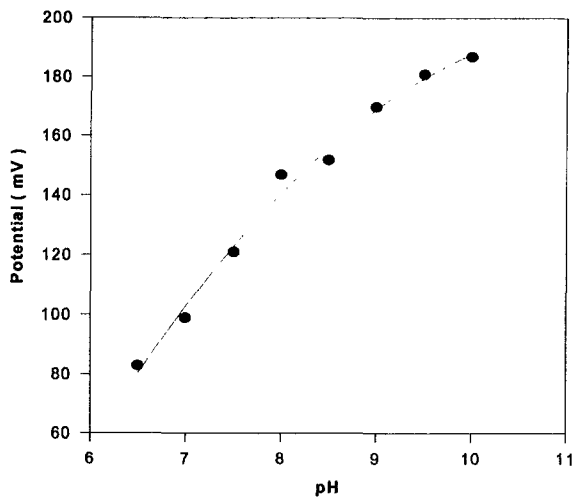


Fig. 2-8. Effect of pH on the response of the BChE electrode at 3.16 mM BCh in 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.55).

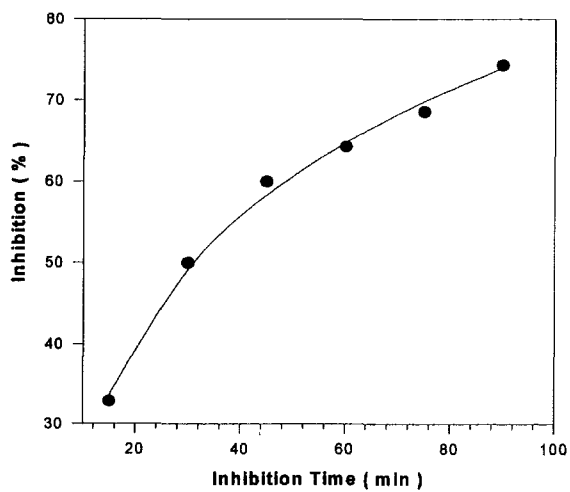


Fig. 2-9. Influence of enzyme-insecticide contact time on percentage inhibition of enzyme activity at 3.16 mM BCh in 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.55) .

나) Paraoxon의 농도에 따른 BChE 센서의 저해 측정

Paraoxon 농도를 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ M 범위에서 달리하면서 전극을 1시간 동안 incubate시키고 저해율을 측정한 결과는 Fig. 2-10과 같다. 저해시간을 1시간으로 하여 기본조성으로 구축한 센서를 $10^{-9} \sim 10^{-5}$ M의 paraoxon(2.5 mM HEPES buffer)으로 저해시켜 1, 3.16 및 10 mM의 BCh를 넣어 감응을 측정함으로써 효소의 저해율을 알아본 결과 paraoxon의 농도와 센서의 감응은 뚜렷하게 상관관계를 나타내었다. Fig. 2-10을 보면 기질농도가 1 mM인 경우에는 저해정도가 저해제의 농도와 무관하게 나타났으므로 실험을 위한 기질의 농도로는 적합하지 못함을 알 수 있다. Takruni 등(1993)의 보고에 의하면 paraoxon의 경우 기질농도의 증가에 따라 저해 정도가 증가하였으나, 본 실험에서는 기질농도에 따른 저해정도의 차이가 나타나지 않았다.

측정 대상 이온종의 농도가 묽어지면 농도의 대수값과 전지의 기전력 사이의 관계는 이온강도가 일정한 용액에서도 직선으로부터 벗어나게 된다. 이런 비선형성으로 인해 매우 묽은 농도에서는 이 전극을 이용해 정량할 수 없는 검출한계가 존재하는데 이는 전극의 감도를 나타내는 척도가 된다. 일반적으로 ISE에 거의 감응을 하지 않는 매우 묽은 농도 범위의 직선과 비교적 농도가 진한 부분에서의 직선이 서로 만나는 지점의 농도를 검출한계로 규정한다(IUPAC 1976). 본 실험에서 최적화한 바이오센서의 검출한계는 이 정의에 따라 10%의 저해를 나타내는 10^{-8} M이라고 볼 수 있다.

Polylysine을 배제한 효소막을 사용하여 paraoxon을 분석해 본 결과가 Fig. 2-11에 나타나 있다. Polylysine은 과다하게 사용하면 도리어 전극의 감도에 부정적인 영향을 준다는 것을 알 수 있다.

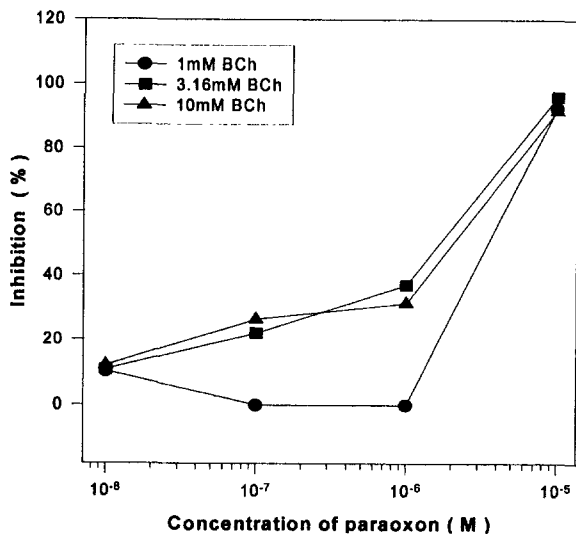


Fig. 2-10. Determination of paraoxon with the BChE sensor : 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.55), temperature 25°C and incubation time 1 h.

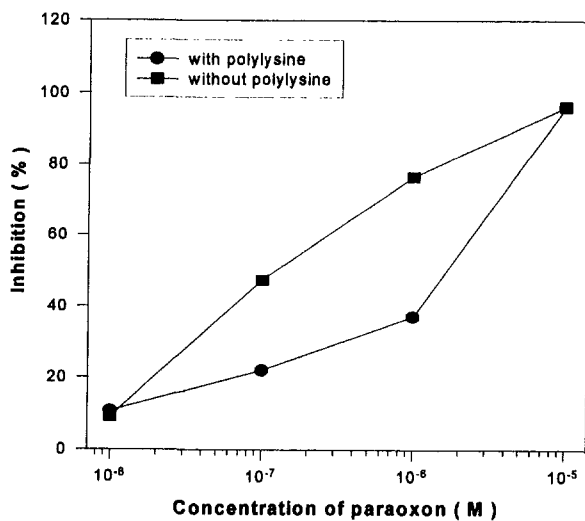


Fig. 2-11. Determination of paraoxon with the BChE sensor with and without polylysine : 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.55), temperature 25°C, incubation time 1 h and 3.16 mM BCh as substrate.

다) 효소의 재활성화 시간에 따른 효소활성의 복구 측정

효소 저해 반응에 의해 형성된 효소-인 결합은 쉽게 가수분해되지 않으므로 2-PAM과 같은 강한 친핵성 시약을 써야만 저해된 효소를 복구할 수 있다(Takruni, 1993; Tran-Minh, Kumaran, 1992). 효소전극을 10^{-5} M paraoxon에서 1시간 동안 incubate시키고 난 뒤 1 mM 2-PAM으로 시간을 달리하여 incubate시킨 후 전극의 감응을 측정하여 재활성의 정도를 알아본 결과가 Fig. 2-12에 나와있다. 시간이 충분하면 효소활성이 거의 100%까지 복구된다는 것을 알 수 있다. Fig. 2-13은 효소전극 저해 전과 후, 그리고 2-PAM에 의해 효소가 재활성화된 후의 센서의 dynamic response이다.

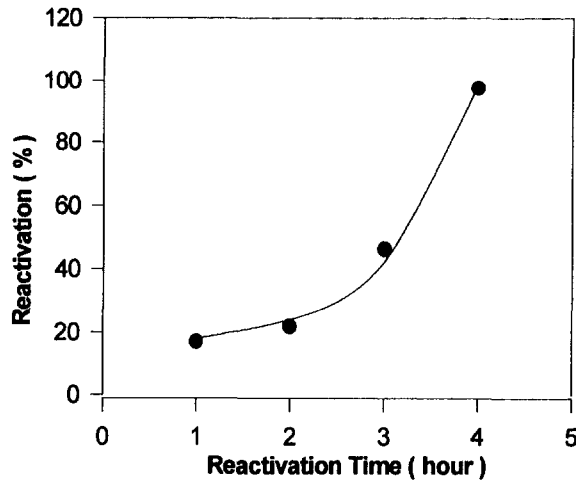


Fig. 2-12. Influence of reactivation time with 1 mM 2-PAM at 3.16 mM Bch in 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.55)

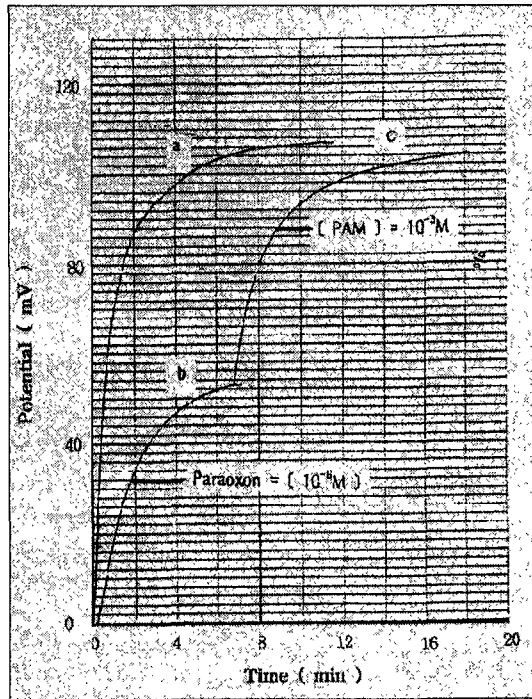


Fig. 2-13. A typical response of the BChE with and without the irreversible inhibitor(paraoxon) in 2.5 mM HEPES buffer (pH 7.55) at 3.16 mM BCh. a) in the absence of the inhibitor, b) after incubating the sensor with the inhibitor for 1 h, c) after incubating the sensor with the reactivating reagent for 4 h.

5) 효소전극의 안정성

전극의 반복사용 가능성을 알아보기 위하여 기본조성으로 효소막을 구성한 전극을 4°C에서 냉장 보관하면서 5주 동안 1, 3.16 그리고 10 mM BCh에 대한 감응을 알아보았다. Fig. 2-14에 나타나 있듯이 전극의 감응은 1주째까지는 변화가 없었으나 그 후부터 감도가 서서히 낮아지기 시작하였다.

효소의 저해율은 저해 전후의 효소활성의 비로부터 결정하며 효소의 활성이 낮아지더라도 그 비는 크게 달라지지 않는다. 그러므로 농약을 검출하기 위한 BChE 센서의 내구기간은 적어도 한 달 이상이라고 볼 수 있다.

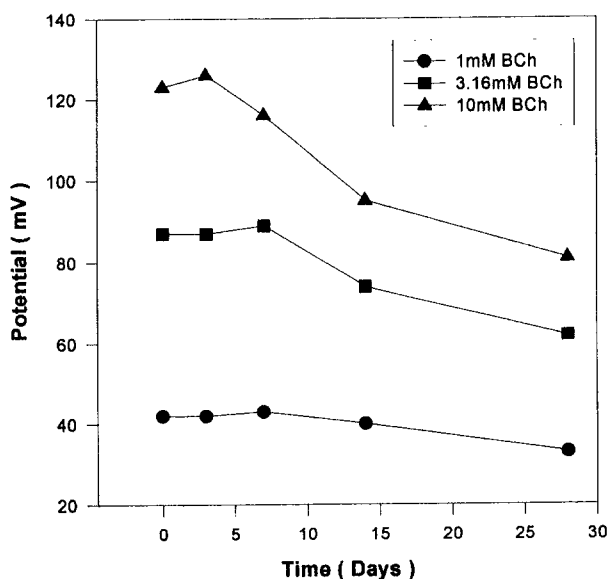


Fig. 2-14. Operational (working) stability of the BChE electrode. The responsive measurement was carried out using one enzyme electrode in 2.5 mM HEPES(pH 7.55) containing different BCh concentrations. During the respective assay, the used electrode was washed with the same buffer for next use.

다. 결론

본 연구에서는 cholinesterase가 유기인계와 카바메이트계 농약에 의해 활성이 저해되며 저해정도가 농약 농도의 $-\log$ 값에 비례한다는 사실을 이용한 농약검출용 효소센서를 개발하였다. 검출기는 PU를 PVC, TDDA 및 가소제에 섞어 만든 H^+ -선택성 중합체 막에 BChE와 HPU의 혼합물을 가

한 비대칭 효소막을 ISE에 부착시킴으로써 구성하였다.

효소막의 조성을 최적화한 실험과 최적화한 센서를 paraoxon의 분석에 적용한 실험으로부터 센서의 성능에 관한 다음의 결론을 얻었다.

(1) 효소막의 조성으로 HPU B 0.5 mg, BChE 300 unit 그리고 HPU B에 대해 32 wt%까지의 polylysine을 사용한 경우의 감도가 가장 높음을 확인하였다. 이 전극은 buffer의 pH가 증가할수록 기질에 대한 감응성이 증가하였으나 기질의 가수분해를 고려하면 시료 buffer의 pH는 7.5가 적당하다.

(2) BChE 센서를 유기인제의 일종인 paraoxon의 분석에 적용해 보았을 때 센서의 감응과 paraoxon의 농도는 $10^5 \sim 10^8$ M 범위에서 상관관계를 나타내었으며 최저 검출한계는 10^8 M이었으므로 paraoxon의 잔류 허용치를 판별하기에 충분할 정도로 높다. 저해된 효소전극은 1 mM 2-PAM으로 완전히 재활성화시켜 사용할 수 있었으므로 BChE 센서는 지속적인 시료분석이 가능하다.

(3) 본 연구에서 사용한 효소막은 대량제작이 가능하고 ISE 본체에 쉽게 교체장착할 수 있으므로 BChE 센서는 지속적인 시료분석이 가능하며 현장 이용성과 편리성을 갖추고 있다고 본다.

2. FIA형 효소센서

FIA형 센서 시스템은 acetylcholinesterase(AChE)를 반응기(reactor) 효소로, pH 감응 ISE를 검출기(detector)로 사용하여 구축하였다. AChE은 glutaraldehyde로서 aminopropyl glass beads에 고정화시켰으며 검출기 ISE는 H^+ -ionophore/plasticizer/PVC/THF에 의한 튜브형 중합체막 전극이었다. 효소 고정화의 조건과 반응기의 구성을 최적화하기 위해 a) glass beads 크기 b) 반응기의 길이 c) flow rate d) 기질의 농도 e) 완충용액의 농도 f)

완충용액의 pH에 따른 센서 시스템의 감응성을 조사하였다.

개발한 센서를 유기인계와 카바메이트계 농약의 검출에 이용할 수 있는지를 보기 위하여 유기인계 농약 parathion의 산화물인 paraoxon에 의한 수용체 효소의 저해정도를 측정하였다. 농약의 농도를 달리하여 검량곡선을 얻고 검출한계를 알아보았다.

개발한 검출법을 유기인계와 카바메이트계 농약 일반에 적용할 수 있는지 검증하기 위하여 분석대상 농약의 범위를 확대하여 10종의 유기인계 농약과 9종의 카바메이트계 농약에 의한 센서 효소의 저해를 확인하고 이들 중 몇 가지를 선정하여 저해 %와 농도간의 상관관계를 알아보았다.

유기인계 농약은 P=S기를 P=O기로 산화시키면 AChE에 대한 저해성을 높여 분석의 감도를 향상시킬 수 있는 것으로 보고된 바 있다.(Fallsheer, 1956; Kumaran, 1992) 이것을 확인하기 위하여 10종의 유기인계 농약에 대해 산화 전과 산화 후의 저해 %를 측정하여 그 값을 비교해 보고자 하였다. 이를 위하여 브롬에 의한 유기인계 농약의 산화 방법을 수립하였다.

센서 효소막의 반복 사용 가능성을 알아보기 위해 pyridine-2-aldoxime methiodide(PAM)를 효소활성 복구시약으로 사용하여 산화 전후의 유기인계 농약과 카바메이트계 농약에 의해 저해된 효소의 재활성화의 정도를 측정하였다.

개발한 FIA형 효소센서의 농약검출법의 실용성을 검증하기 위하여 식품 시료에 첨가한 카바메이트계 농약 carbaryl의 분석에 본 검출법을 적용해 보았다. 농약 잔류 허용치에 가까운 농도 근처의 몇 가지 농도에 대해 검량곡선을 수립하였다.

가. 실험 내용 및 방법

1) 시약 및 기기

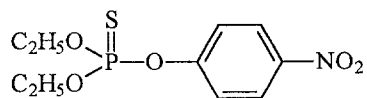
FIA형 센서의 검출기인 H^+ -selective electrode의 중합체 막 제작에 사용되는 시약인 PVC(고분자량), hydrogen ionophore인 tridodecylamine (TDDA), tetrahydrofuran(THF)은 Fluka사, dioctyl phthalate(DOP)는 Aldrich사, sodium tetraphenylborate는 Sigma사로부터 구입하였다.

FIA계의 고정화 효소인 acetylcholinesterase(E.C.3.1.1.7)는 electric eel로부터 얻은 V-S type이며 Sigma사에서 구입하였다.

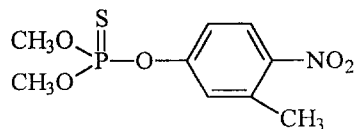
AChE 반응기의 지지체인 glass beads(controlled pore glass)는 aminopropyl glass를 사용하였으며, average pore size, beads의 크기, amine content가 각각 a) 700\AA , 80~120 mesh, $77\ \mu\text{mole/g}$, b) 500\AA , 200~400 mesh, $70\ \mu\text{mole/g}$, c) 75\AA , 200~400 mesh, $152\ \mu\text{mole/g}$ 인 것을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. Glass beads와 AChE을 가교결합시키는 시약인 glutaraldehyde(25% 수용액)와 AChE의 기질인 acetylcholine chloride는 Sigma사에서 구입하였다.

분석대상 유기인계 농약인 parathion, fenthion, fenitrothion, diazinon, EPN, chlorpyrifos, dichlofenthion, parathion-methyl과 카바메이트계 농약인 carbaryl, carbofuran, aldicarb, bendiocarb, methomyl, mercaptodimethur, isoprocarb, dioxocarb, propoxur는 Dr. Ehrenstorfer GmbH사에서 구입하였다. 이들의 구조가 Fig. 2-15와 2-16에 실려있다. 유기인계 농약의 산화시약으로 사용한 브롬은 Junsei Chemical사의 것을 사용하였고, 산화 반응의 확인을 위한 analytical TLC plate(silica gel F254, fluorescent, $20 \times 20\text{ cm}$)와 생성물의 분리를 위한 preparative TLC plate(silica gel 60, fluorescent,

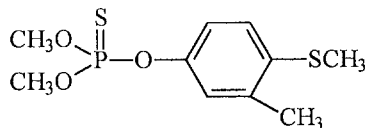
1) Parathion-ethyl



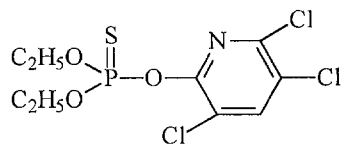
2) Fenitrothion



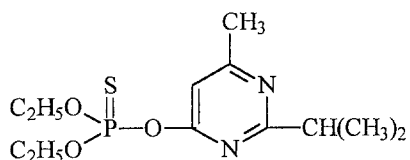
3) Fenthion



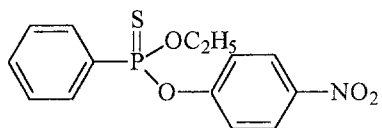
4) Chlorpyrifos



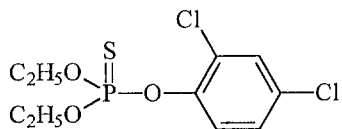
5) Diazinon



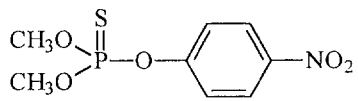
6) EPN



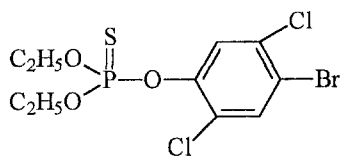
7) Dichlofenthion



8) Parathion-methyl



9) Bromophos-ethyl



10) Bromophos-methyl

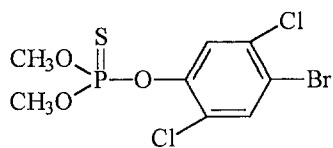
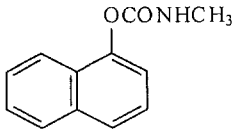
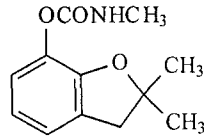


Fig. 2-15. Structures of the organophosphorus pesticides used in this study.

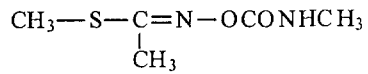
1) Carbaryl



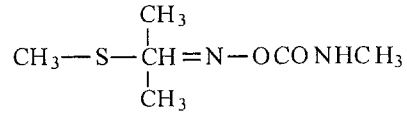
2) Carbofuran



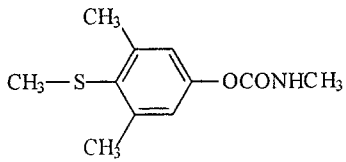
3) Aldicarb



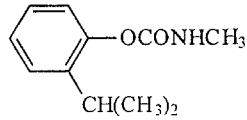
4) Bendiocarb



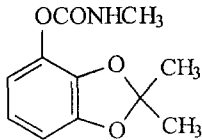
5) Methomyl



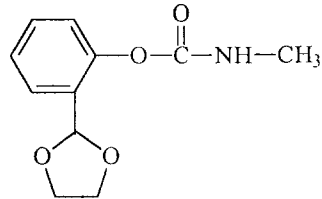
6) Mercaptodimethur



7) Isoprocarb



8) Dioxocarb



9) Propoxur

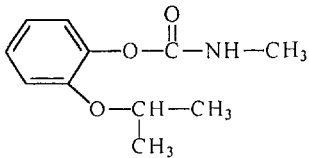


Fig. 2-16. Structures of the carbamate pesticides used in this study

1mm, 20×20 cm)는 Merck사 제품을 사용하였다. 식품시료 추출시의 용매인 methanol은 Fisher Scientific사, acetone은 Kanto Chemical사, dichloromethane, acetonitrile과 물은 Mallinckrodt사, petroleum ether는 Showa사, acetophenone은 Junsei Chemical사에서 구입하였다. 저해된 AChE의 활성을 복구하기 위한 시약 pyridine-2-aldoxime methiodide (PAM)와 carrier buffer인 HEPES 즉 (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid])는 Sigma사에서 구입하였다.

GC/MS의 GC 기기는 Hewlett-Packard 5890 Series II를 HP 5971 mass spectrometric detector에 연결한 것이었으며, column은 HP-1 capillary column(25m x 0.2mm i.d. x 0.11µm film thickness), carrier 기체는 25 psi의 He이었다. Oven 온도는 2분간 100°C를 유지하다가 그후 10°C/min 속도로 250°C까지 올렸고 시료주입은 split mode(1/100)로 하였다. ¹H-NMR은 Bruker ARX spectrometer(300 MHz)을 사용하였다.

GC를 사용한 diazinon 표준용액의 분석시 기기는 Hewlett-Packard 6890을 사용하였으며 검출기는 nitrogen-phosphorus detector (NPD)를 사용하였다. Column은 HP-5 capillary column(5% phenyl methyl polysiloxane, 30 m, diameter 250 µm, film thickness 0.25 µm), carrier 기체는 He, 유속은 28 cm/min이었다. Oven 온도는 2분간 100°C를 유지하다가 10°C/min 속도로 280°C까지 상승시켰다. 시료용액은 아세톤-헥산(1:1)으로 만들었으며 inlet은 splitless mode로 하였고 온도는 250°C이었다. 시료주입은 HP 7673 automated sampler를 사용하여 1 µL를 주입하였다. NPD의 온도는 280°C, 수소, 공기, makeup gas(질소)의 유속은 각각 3 mL/min, 60 mL/min, 30 mL/min이었다.

HPLC를 사용한 carbaryl과 carbofuran의 분석시 기기는 Thermo Separation Products(TSP)사 제품을 사용하였으며 검출기는 TSP사의

fluorescence detector를 사용하였다. Carbamate계 농약의 검출은 column에서 분리되어 나오는 농약을 염기로 가수분해시켜 methyl amine 혹은 dimethylamine을 생성시키고 이것을 0-phthalaldehyde와 2-mercaptoethanol과 반응시켜 형광성 유도체로 전환하여 형광 검출기로 검출하는 방법(post-column derivatization)(Krause)을 사용하였다. Column은 역상 C-18형이었으며 길이는 15 cm, 직경은 4.6 mm, 입자 직경은 5 μm 이었다. 이동상은 물-메탄올이었으며 18% 메탄올로부터 20분에 걸쳐 80% 메탄올로 gradient 변화를 하였고 유속은 1 mL/min이었다. 시료용액은 메탄올로 만들었으며 시료주입은 TSP사의 AS3000 autosampler를 사용하여 하였으며 10 혹은 30 μL 를 주입하였다. 형광 검출기의 excitation wavelength는 330 nm, emission wavelength는 466 nm이었다.

FIA system의 pump는 Ismatec사의 IPC multi-channel peristaltic pump를 사용하였고, injector는 Rheodyne사의 rotary injection valve(100 μL)를, pH meter는 Metter-Toledo사의 model 340 pH meter를, recorder는 Kipp & Zonen사의 BD111을, 기준전극은 Orion사의 90-02 double junction형을 사용하였다.

2) FIA system의 구성도

AChE 반응기(reactor)와 튜브형 H⁺-선택형 검출기를 연결한 AChE 농약 분석용 FIA system을 Fig. 2-17에 나타내었다.

Carrier 액은 20 mM MgCl₂, 100 mM NaCl를 포함하는 2.5 mM HEPES buffer인데, peristaltic pump에 의해 system을 통해 이동된다. MgCl₂와 NaCl을 넣어준 것은 효소를 안정화시켜 주기 위해서이다. Injector는 100 µL injection loop를 가진 rotary injection valve형이므로 정확하게 100 µL의 기질 용액을 주입할 수 있다. 반응기는 AChE를 고정화시킨 glass beads를 Tygon tubing(내경 2.06 mm)에 삽입시켜 제작하였다. 검출기로는 H⁺-선택형 중합체막 전극을 사용하였다. 이들 각각의 장치들은 Tygon tubing(내경 0.89 mm)으로 연결된다. 검출기에서 나오는 용액은 double junction 기준전극(reference electrode)이 담긴 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.8)로 흐르도록 한다. ISE와 기준전극을 pH-mV meter에 연결하여 전위를 측정하고 이 전위는 strip chart recorder에서 기록된다. 반응기와 검출기(H⁺-선택형 막전극)의 제작방법은 다음과 같다.

3) 튜브형 H⁺-선택형 막 전극 제조

검출기로 사용한 튜브 모양의(tubular) H⁺-선택형 막 전극(H⁺-selective membrane electrode)은 Meyerhoff(1983)등이 고안한 방법에 따라 제조하였다(Fig. 2-18).

전극막 주조 용액은 neutral carrier인 tridodecylamine 20 mg, 가소제 dioctylphthalate 132 mg, 소수성 첨가제 sodium tetraphenylborate 1.4 mg, 중합체 matrix인 PVC 51 mg을 THF 1 mL에 용해시켜 제조하였다. 튜브

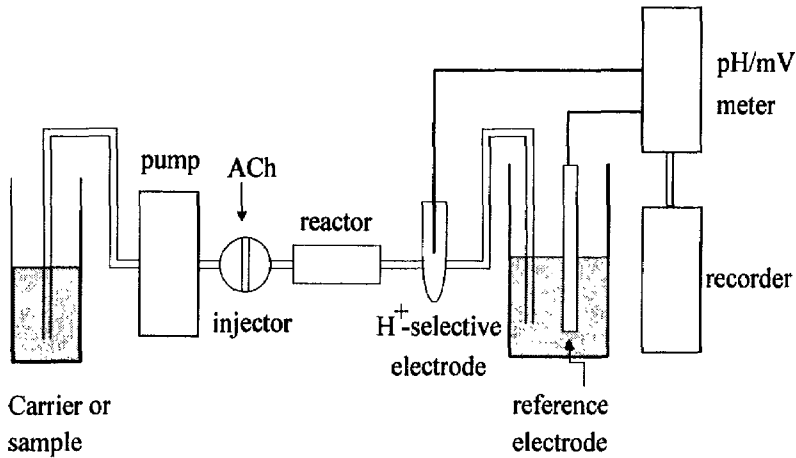


Fig. 2-17. Schematic diagram of AChE-based flow injection biosensor.

모양의 H⁺-ISE를 만들기 위해서는 먼저 끝을 둥글게 갈아 놓은 18 gauge 주사기 바늘(syringe needle)(30 mm 길이)를 Tygon tubing(내경 0.64 mm, 길이 45 mm) 속으로 삽입하고, tubing의 중간정도에서 tubing의 반을 약 5 mm정도 길이로 면도날로 오려낸다(Fig. 2-18). 바늘을 그대로 둔 채 오려낸 부위에 전극막 주조 용액을 천천히 6방울을 떨어뜨린다. 한 방울 떨어뜨릴 때마다 THF를 다 휘발시킨 다음 다시 방울을 떨어뜨린다.

전극막 주조용액을 바른 tubing을 하루밤 방치하여 완전히 마르게 한 뒤 tubing으로 부터 주사기 바늘을 빼낸다. plastic centrifuge tube의 중간에 전극 tubing의 외벽보다 약간 더 큰 구멍을 뚫고 여기에 tubing을 이온 감응막이 아래로 향하게 삽입한 후(Fig. 2-19) 구멍 주변을 cyclohexanone-PVC paste(1 mL : 1 mg)나 rubber cement를 사용해서 밀봉한다. 완전히 말린 뒤 plastic jacket의 내부에 0.5 M citrate buffer와 internal solution으로서 10⁻² M KCl 두 방울을 넣은 뒤 도금한 은선을 삽입

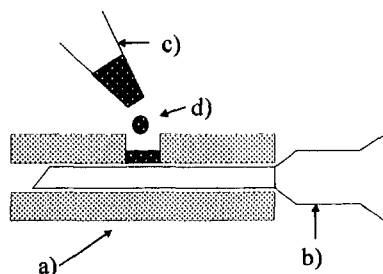


Fig. 2-18. Method used to prepare tubular H⁺-selective flow-through electrode; a) Tygon tubing(0.64 mm) with upper wall removed ; b) 18 gauge syringe needle; c) pasteur pipet; d) electrode membrane casting solution.

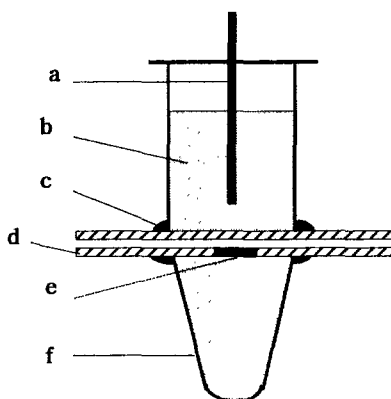


Fig. 2-19. Schematic diagram of the detector of the AChE-based biosensor, H⁺-selective electrode; a) Ag/AgCl wire; b) internal solution, 0.5 M citrate buffer, pH 4.5 and 10⁻² M KCl; c) sealant; d) Tygon tubing(i.d. 0.64mm); e) tridodecylamine-PVC membrane; f) 1.5 mL centrifuge tube (outer jacket).

하여 검출기를 완성시킨다.

Detector에 들어갈 electrode는 은선을 도금시켜 만든다. 2 cm로 자른 두 개의 은선을 사포로 끝을 갈아 둥글게 만든 뒤, 불순물을 제거하기 위해 1 N 암모니아 용액에 담근다. 두 개의 은선 중 도금할 은선은 그 끝을 1.5 V 전지의 -극에, 다른 은선은 +극에 각각 집게로 집어 연결한 뒤 0.1 M HCl 용액에 담구어 교반해준다. 5분간 전류를 흘려주면 -극에서 공기 방울이 발생하면서 도금할 은선 속의 불순물이 제거된다. 5분 후 양극의 은선을 교환하여 0.1 M HCl 용액에 담근 뒤 교반하면서 낮은 전류에서 높은 전류로 점차 증가시키면서 30분간 도금시킨다. +극에서는 은선이 점차 검게 변하면서 도금이 이루어진다.

4) AChE 반응기 제작: Glass beads에 효소 고정화

Reactor의 효소 고정화 방법은 Kumaran(1992)등이 single bead string reactor에 AChE를 고정화시킬 때 사용한 방법을 택하였다. 이 방법은 glutaraldehyde로서 glass beads의 amino기와 효소의 amino기 사이에 결합이 이루어지게 하는 것이다.



(Glass beads) (Glutaraldehyde) (Glutaraldehyde결합 glass beads)



(Glutaraldehyde (AChE) (AChE 결합 glass beads)
결합 glass beads)

실험과정은 다음과 같다. Glass beads (aminopropyl) 1 g에 0.05 M pH

7 phosphate buffer(PB)로 만든 2.5%(m/v) glutaraldehyde 3.3 mL를 넣는다. 실온에서 1시간 동안 약 80 rpm에서 shaker로 흔들어준 다음 깔대기로 여과하여 3차 증류수로 여러 번 씻어줌으로써 반응하지 않은 glutaraldehyde를 제거하고 다시 0.05 M pH 7 PB로 여러 번 더 씻어준 다음 2.7 mL의 buffer에 냉장 보관해 둔다. Glass beads가 담긴 PB에 0.05 M pH 7 PB에서 제조된 AChE solution(약 330 unit) 0.7 mL를 넣은 뒤 4°C에서 하룻밤 방치한다. 결합하지 않은 효소를 제거하기 위해 깔때기를 이용한 감압 여과방법을 사용해 3차 증류수로 여러 번 씻은 뒤, 1 M KCl로 여러 번 씻는다. 다시 3차 증류수로 여러 번 씻고 2.5 mM pH 7.5 HEPES buffer로 씻는다. 효소가 고정화된 beads에 2.5 mM HEPES, pH 7.5를 넣어 사용할 때까지 4°C에서 보관한다.

5) 센서 성능의 최적화

센서의 성능을 최적화하기 위하여 반응기에 사용한 glass beads의 크기, 반응기의 길이, 유속, 기질 ACh의 농도, 시료주입 부피 및 carrier의 pH와 농도를 달리하면서 센서의 감응을 알아보았다. Carrier 액은 20 mM MgCl₂, 100 mM NaCl를 포함하는 2.5 mM HEPES buffer이었는데 지금부터 이 용액을 HEPES buffer라 지칭한다.

가) 검출기의 성능 조사

검출기의 pH 변화에 대한 감응을 알아보기 위하여 반응기가 연결되지 않은 FIA system에 2.5 mM HEPES(pH 7.5)를 1 mL/min 유속으로 흘려주면서 pH 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 표준용액을 차례로 2번씩 주입하여 전위차를

측정하였다. 측정은 실온에서 시행하였다.

나) 반응기의 glass beads의 크기에 따른 감응

AChE 반응기에 사용할 glass beads로서 크기가 다른 3종류를 사용하여 효소를 고정화시킨 다음 센서 감응의 차이를 비교해 보았다. 사이즈가 1) 80~120(pore size 700 Å), 2) 200~400(500 Å), 3) 200~400(75 Å) mesh인 glass beads를 사용하였으며 반응기의 길이를 7 cm(내경 2.06 mm), carrier를 2.5 mM pH 7.5 HEPES buffer, flow rate를 1 mL/min, ACh 농도를 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} M로 하여 감응을 측정하였다. Injection loop는 50 µL 용량의 것을 사용하였다.

다) 반응기의 길이에 따른 감응

감응성이 좋은 것으로 드러난 80~120(700 Å)과 200~400(500 Å) mesh의 glass beads를 사용하고 반응기 tubing의 길이를 4, 7, 10 cm(내경 2.06 mm)의 3가지로 제작하여 센서의 감응을 비교하였다. Carrier는 2.5 mM pH 7.5 HEPES buffer, 유속 1 mL/min, injection loop 50 µL, ACh 농도 10^{-3} , 3.16×10^{-3} , 10^{-2} , 3.16×10^{-2} , 10^{-1} M로 하여 센서의 감응을 측정하였다.

라) 유속에 따른 감응

Peak height에 미치는 유속의 영향을 알아보기 위해 감응성이 좋은 2종의 beads를 사용한 7 cm 길이의 반응기로 유속을 0.4, 0.7, 1.0, 1.3 mL/min로 달리했을 때의 센서의 감응을 측정하였으며 측정 조건은 다)와 같았다.

마) ACh 농도와 시료주입 부피에 따른 감응

ACh의 농도를 (10^{-4} , 4×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} , 4×10^{-3} , 7×10^{-3} , 10^{-2} , 3.16×10^{-2} , 10^{-1} M)로 하고 50 μ L와 100 μ L의 injector를 사용하여 센서의 감응을 측정하였다. 반응기는 200~400(500Å) mesh의 glass beads를 사용한 7 cm의 길이의 것으로, carrier는 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.5), 유속 0.7 mL/min로 하여 실험하였다.

바) Carrier buffer의 농도에 따른 감응

Carrier인 HEPES(pH 7.5)의 농도를 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 5 mM로 달리하여 센서의 감응을 알아보았다. 반응기는 200~400(500Å) mesh의 glass beads로 만든 7 cm 길이의 것, flow rate 0.7 mL/min, injector loop 100 μ L, ACh 농도를 10^{-2} M로 하여 측정하였다.

사) Carrier buffer의 pH에 따른 감응

HEPES buffer(2.5 mM)의 pH를 7.0~8.5 범위에서 pH를 달리하면서 센서의 감응을 알아보았다. 측정조건은 200~400(500Å) mesh의 glass beads를 사용한 7 cm 길이의 반응기, 유속 0.7 mL/min, injector loop 100 μ L, 기질인 ACh 농도를 10^{-2} M로 하였다.

6) 반응기 효소의 안정성 조사

측정조건을 200~400(500Å)의 glass beads로 제작한 7 cm 반응기(내경

2.06 mm), carrier 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.5), 유속 1 mL/min, injector loop 50 μ L, ACh 농도를 10^{-2} , 3.16×10^{-2} M로 하여 반응기를 제작한 날로부터 24주까지 반응기를 4° C에 냉장보관하면서 2주마다 감응도를 측정함으로써 반응기 효소의 안정성을 조사하였다.

7) 효소센서 시제품 제작

개발한 효소센서는 peristaltic 펌프, injector, 반응기, pH-선택성 전극, 기준전극, pH 미터 및 recorder로 구성된다. 반응기와 pH-선택성 전극은 그 성능을 최적화하여(Jung, 1998) 사용하였으며 그외의 부속장치들은 구입하였다. 센서 고유의 장점인 휴대 가능성을 실현하기 위하여 pH 미터는 휴대용을 사용하고 부속장치들을 가능한 한 견고하고 밀집된 형태로 배치하여 시제품을 제작하였다.

8) Paraoxon 분석에 의한 센서의 성능 조사

본 연구의 분석대상 농약들은 대부분 물에 불용성이므로 농약 stock solution들은 무수 에탄올에서 제조하였다. 에탄올이 5%(v/v) 농도 이상일 때는 AChE를 저해한다고 알려져 있으므로(Kumaran, 1992) stock solution을 carrier인 2.5 mM HEPES buffer로 희석시켜 에탄올이 5% 이하가 되도록 하였다. Paraoxon stock solution은 에탄올로 10^3 M 되게 만든 뒤 냉장보관하고 여러 농도의 paraoxon working solution은 10^3 M stock solution을 2.5 mM HEPES buffer(pH7.8)로 희석시켜 사용하였다.

저해%의 측정과정은 다음과 같다. 센서 시스템을 안정화하고 carrier인 2.5 mM HEPES buffer (pH 7.8)를 흘려주면서 3.16×10^3 M 혹은 10^2 M

기질(ACh) 용액 50 혹은 100 μL 를 주입하여 전위차를 측정한다. 농약 working 용액을 검출기를 연결하지 않은 상태에서 일정시간 흘려준 뒤 검출기를 연결하여 2.5 mM HEPES buffer (pH 7.2)를 20 분간 흘려주고 다시 ACh 용액을 주입한 다음 전위차를 측정한다.

효소활성 저해 % (1)와 효소의 재활성화 % (2)는 다음 식에 의해 계산한다.

$$\% \text{ Inhibition} = (E_0 - E_1 / E_0) 100 \dots\dots\dots (1)$$

$$\% \text{ Reactivation} = (E_2 / E_0) 100 \dots\dots\dots (2)$$

여기서 E_0 는 저해제(농약용액)을 흘려주기 전의 전위차, E_1 은 저해제를 흘려주고 난 뒤의 전위차, E_2 는 재활성제를 흘려주고 난 뒤의 전위차를 나타낸다.

가) 효소의 저해 시간에 따른 저해도 조사

Paraoxon 용액을 반응기에 흘리는 시간에 따른 효소의 저해 %를 알아보았다. Paraoxon 용액을 흘려주기 전에 10^2 M ACh에 대한 센서의 감응을 측정 한 후 2.5 mM HEPES working buffer(pH 7.8)로 제조한 10^6 M paraoxon 용액을 5~35분 범위에서 5분씩 증가시켜 가면서 흘려주고 센서의 감응을 측정하였다.

나) Paraoxon의 농도에 따른 효소의 저해도 조사

10^8 , 10^7 , 3.16×10^7 , 10^6 , 3.16×10^6 , 10^5 M paraoxon에 대한 효소의 저해 %를 알아보았다. 반응기는 200~400 mesh, 500 \AA 의 glass beads로 만든 7 cm 길이의 것을, carrier는 2.5 mM HEPES buffer, pH 7.8, 유속은

0.7 mL/min, injector loop는 100 μ L이었다.

다) Paraoxon에 의해 저해된 효소의 재활성화

Paraoxon에 의해 저해된 효소의 활성을 되살리기 위한 재활성시약으로 2-PAM을 선택하였다. 10^6 과 10^5 M paraoxon을 20분간 흘려 효소를 저해시킨 다음 20 μ M 2-PAM 용액을 시간을 달리하여 흘려준 뒤에 효소 재활성화의 정도를 측정하였다.

9) 브롬을 사용한 유기인계 농약의 산화

유기인계 농약을 산화시켜 검출의 감도를 높일 수 있는지를 확인하기 위하여 그 산화방법을 수립하고자 하였다. 유기인계 농약의 공통적인 원자인 thiophosphate(P=S)기가 phosphate(P=O)기로 산화될 수 있다는 것이 알려져 있지만(Fallscheer 1956, Tran-Minh 1990) 모든 유기인계 농약이 모두 그러한 반응성을 가지는지는 확실하지 않다. 연구대상 유기인계 농약으로 parathion, fenthion, fenitrothion, diazinon, EPN, chlorpyrifos, dichlofenthion, parathion-methyl, bromophos-ethyl, bromophos-methyl의 10종을 선정하였고 산화제로 브롬을, 용매로 acetonitrile을 선택하였다. 반응조건은 1) 각 농약을 2 mM 농도로 acetonitrile에 녹이고, 2) 브롬을 20 mM이 되도록 acetonitrile에 녹인 후 3) 두 용액을 같은 부피로 혼합하여 수초 동안 교반하는 것이었다. 반응이 일어났는지 여부는 TLC(silica gel)로 확인하였으며 생성물의 동정은 ^1H NMR과 GC/MS로 하였다. 생성물의 NMR 데이터는 산화반응의 수득율을 NMR로 알아내는 과정에서 얻어졌다.

산화 생성물의 수득율은 반응물질과 standard를 NMR tube 에 넣고 반

응을 일으켜 반응물질과 생성물질의 standard에 대한 상대적인 peak면적을 측정하여 산출하였다. 먼저 각 농약을 deuterated acetonitrile (CD_3CN)에 녹여 standard (DMF 혹은 2,3,5,6,-tetrachloroanisole)와 함께 NMR tube에 넣고 NMR spectrum을 얻은 다음 브롬용액(20 mM, CD_3CN)을 넣고 혼합 교반 하여 NMR spectrum을 얻었다. 그 다음 반응물과 생성물의 몇 가지 peak 면적(standard에 대비한 면적)을 조사하여 수득율을 산출하였다.

10) 유기인계 농약의 산화 전후의 효소 저해도 비교

10종의 유기인계 농약에 대해 브롬으로 산화시키기 전과 후의 효소활성 저해도를 측정 비교하였다. 각 농약의 stock solution은 absolute ethanol에 5×10^{-2} M 농도로 녹여 제조하였으며 $-70^\circ C$ 에서 보관하였다. 에탄올이 5% (v/v) 이상인 농약 용액은 에탄올에 의해 효소가 저해될 수 있으므로 (Kumaran, 1992), working solution은 농약 stock solution을 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2)로 희석하여 2% ethanol-HEPES buffer가 되게 한 다음 2% ethanol-buffer 용액으로 반복 희석함으로써 제조하였다. 최종 용액의 농도는 10^{-6} M 이었다.

농약 용액을 흘려주기 전에 센서 시스템을 안정화하고 carrier인 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2)를 흘려주면서 5×10^{-3} M 기질(ACh) 용액 100 μL 을 주입하여 전위차를 측정하였다. 10^{-6} M의 산화 전 농약 working 용액을 검출기를 연결하지 않은 상태에서 30분 동안 흘려준 뒤 검출기를 연결하여 2.5 mM HEPES buffer (pH 7.2)를 30분간 흘려주었다. 다시 5×10^{-3} M ACh기질용액 100 μL 를 주입한 다음 전위차를 측정하였다.

산화 후 농약에 의한 효소의 저해 %는 산화 전 농약에 의해 저해된 효소를 2-PAM으로 활성화시켜 재사용함으로써 측정하였다. 산화 전 농약에

의해 저해된 효소에 20 μ M 2-PAM 용액(2.5 mM HEPES buffer, pH 7.2)을 20분간 흘려주고 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2)를 20분간 다시 흘려준 다음 기질 용액을 주입하고 전위차를 측정하였다. 이어서 다시 검출기를 연결하지 않은 상태에서 10^6 M의 산화 후 농약 working 용액을 30분간 흘린 후 검출기 연결상태에서 2.5 mM HEPES buffer을 30분간 흘려주고 기질용액을 주입한 후 전위차를 측정하였다.

센서의 측정 조건은 다음과 같았다. Carrier 용액은 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2)이고 기질 주입량은 100 μ L, 반응기의 길이는 4 cm이었으며 glass bead는 200~400 mesh, 500 Å인 것을 사용하였다. Flow rate는 0.7 mL/min 이었으며 기질인 ACh의 농도는 5×10^3 M이었다. 이 후 모든 실험에 있어서 동일한 조건이 사용되었다.

11) 카바메이트계 농약의 효소 저해도 비교

9종의 카바메이트계 농약(carbaryl, carbofuran, aldicarb, bendiocarb, methomyl, mercaptodimethur, isoprocarb, dioxocarb, propoxur)에 대해 위의 유기인계 농약의 경우와 같은 방법으로 AChE 효소저해 정도를 측정하였다. 다만 카바메이트계 농약의 경우 효소 활성 저해도와 재활성도가 유기인계에 비해 낮으므로 효소와의 반응시간과 재활성화시키는 시간을 60분간으로 길게 하였다는 점이 달랐다.

12) 유기인계와 카바메이트계 농약의 농도에 따른 효소 저해도 조사

유기인계 농약 중 diazinon을 선택하고 카바메이트계 농약 중 carbaryl과 carbofuran을 선택하여 농약농도 $10^{11} \sim 10^4$ M의 범위에서 효소의 저해 %

를 측정하였다. Diazinon에 대해서는 산화 전후 물질의 저해정도를 비교하였다. 각 농약의 농도별 working solution은 5×10^{-2} M (absolute ethanol)의 stock 용액을 2% ethanol-2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2)로 희석하여 조제하였다. 효소의 저해% 측정은 위에서 기술한 바와 동일한 과정으로 수행하였다.

13) 식품 중의 카바메이트계 농약분석

가) 식품 중의 carbaryl 추출

개발한 FIA형 효소센서를 식품 중 농약의 분석에 적용할 수 있는지를 검증하기 위해 청정 재배한 케일에 carbaryl을 여러 농도로 첨가(spike)하여 분석해 보았다. 케일 100 g에 0, 0.1, 1, 및 10 ppm 농도로 carbaryl을 첨가하고 다음의 공인된 전처리 방법(AOAC Official Method 975.40)(Cunniff, 1995b)에 따라 carbaryl을 추출하였다. 100 g의 채소시료와 200 mL acetonitrile을 blender에 넣고 여기에 carbaryl을 위에서 언급한 농도로 첨가한 다음, 4가지 시료를 보통속도로 2분 동안 blend한다. 그 다음 rapid paper를 사용하여 감압여과하고 blend 칼날과 jar를 20 mL acetonitrile로 3회 헹구어 함께 여과한다. 총 여과량의 40%(v/v)를 separatory funnel에 옮겨 25 mL의 30% NaCl 용액을 넣은 다음 10초 동안 흔들어서 주고 아래층의 수용액을 빼내서 버린다. NaCl 용액을 재차 가하여 추출과정을 반복한다. 100 mL의 petroleum ether를 넣고 30초 동안 흔든 후 아래의 acetonitrile 층을 1 L separatory funnel에 넣는다. Petroleum ether 층을 50 mL와 20 mL의 acetonitrile로 더 추출하여 1L separatory funnel에 모으고 300 mL H₂O, 25 mL NaCl 용액 및 50 mL methanol을 넣어 흔들어서 준 다음

dichloromethane 100 mL로서 한 번 추출하고 이어 30 mL dichloromethane 으로 2번 반복 추출한다. 2방울의 acetophenone을 첨가한 다음 rotary evaporator로 휘발시킨다.

나) Carbaryl의 농도에 따른 효소 저해도 조사

휘발시킨 추출물을 absolute ethanol (99.9% v/v) 2 mL 에 녹이고 이것 을 2% ethanol-2.5 mM HEPES buffer (pH7.2)로 50 mL 부피가 되게 한 다음 카바메이트계 농약 표준용액의 분석시와 동일한 과정으로 검출하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 검출기의 성능 조사

FIA 센서의 검출기인 H^+ -선택성 중합체 막전극의 성능을 조사하기 위하여 반응기를 배제한 FIA 시스템에 pH 7.5의 2.5 mM HEPES carrier 용액 을 흘려주면서 pH 4~10 표준용액을 주입하여 전위차를 측정 한 결과는 Fig. 2-20과 같다. 검출기의 pH에 대한 감응은 pH 6에서의 감응을 제외하 고는 양호한 직선성을 보여주었고 감응 기울기는 57.5mV/decade로 이론적 인 값에 근사하였다. 따라서 제작한 막 전극은 FIA 센서의 검출기로 적절 함을 알 수 있다.

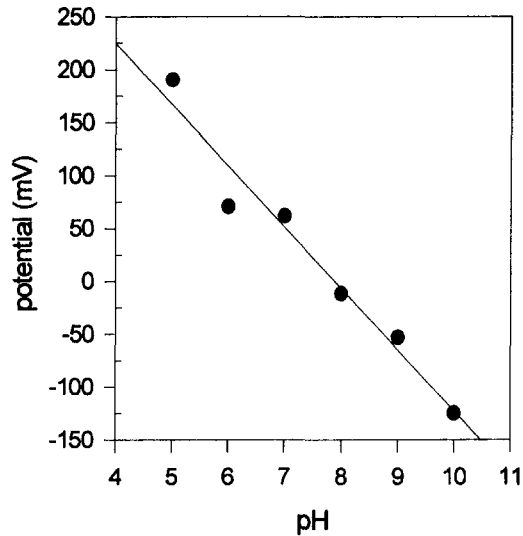


Fig. 2-20. pH responses of FIA detector, H⁺-selective polymeric membrane electrode for injection of pH standard solutions. Carrier, 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.5); flow rate, 1.0 ml/min; injection loop, 50 μ l.

2) ACh에 대한 센서 검출기의 감응

FIA형 센서의 반응기 효소의 기질인 ACh을 주입하였을 때 나타나는 전위차가 AChE 반응에 의한 pH 변화가 아니라 ACh 자체에 기인할 가능성이 있으므로 AChE 반응기를 연결하기 전과 연결한 후에 센서의 ACh에 대한 감응을 비교하였다. 실험 결과 AChE에 의해 가수분해되어 생기는 ACh 농도 범위는 $10^{-4} \sim 10^{-1}$ M이었다. ACh의 농도가 10^{-1} M보다 높을 때 나타나는 전위차는 효소에 의한 가수분해 반응이라기 보다는 자발적 가수분해에 의한 결과이다. 따라서 아래의 실험들은 ACh 농도 10^{-1} M 이하에서 시행하였다.

3) 센서 시스템 성능의 최적화

가) 반응기의 glass beads 사이즈에 따른 감응

반응기의 glass beads로서 1) 80~120(pore size 700 Å), 2) 200~400(500 Å), 3) 200~400(75 Å) mesh인 glass beads 3종류를 사용하였을 경우의 감응이 Fig. 2-21에 나와있다. 1)과 2)의 beads가 3)보다 약 3배의 감응을 나타내었다.

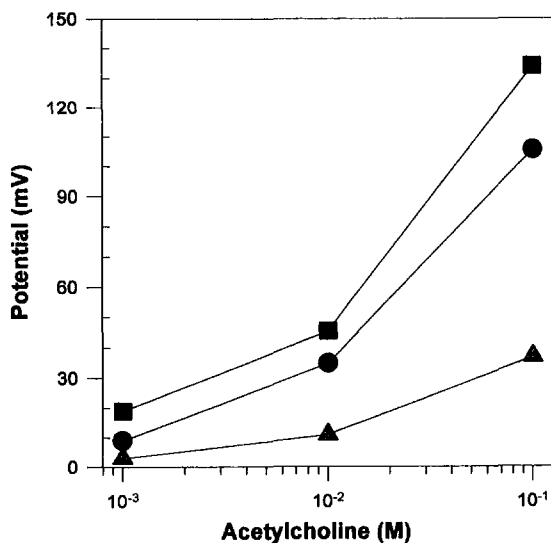


Fig. 2-21. Variation of sensor response for using different CPGs to immobilize the enzyme; a) flow-injection peaks b) response curves. CPGs, (●) 80-120 mesh (pore size 700 Å), (■) 200-400 mesh (500 Å), (▲) 200-400 mesh (75 Å); reactor length, 7 cm; carrier, 2.5 mM HEPES buffer, pH 7.5; flow rate, 1 mL/min; ACh injection size, 50 μ L;

나) 반응기의 길이에 따른 비교

Glass beads는 80~120(700Å)과 200~400(500Å)mesh의 것을 사용하고 반응기 tubing의 길이를 4, 7, 10 cm로 하여 센서의 감응을 비교해 본 결과는 Fig. 2-22와 같다. ACh의 농도가 10^{-2} M 이상일 때는 반응기의 길이가 7 cm인 것이 더 높은 감응을 나타내었지만 10^{-2} M 이하일 때는 오히려 4 cm의 반응기가 더 높은 감응을 나타내었다.

본 연구의 센서는 효소의 저해에 근거한 센서이므로 반응기의 길이가 길다고 해서 반드시 감도가 높은 것이 아니다. 왜냐하면 일정량의 농약에 의해 일어나는 저해%는 효소의 양에 반비례할 것이기 때문이다. 또한 반응기의 길이가 길수록 peak의 모양이 더 broad해져서 감도가 낮아지게 된다. 그러므로 반응기의 최적 길이는 농약에 의한 저해 실험의 결과를 토대로 하여 결정해야 할 것이다.

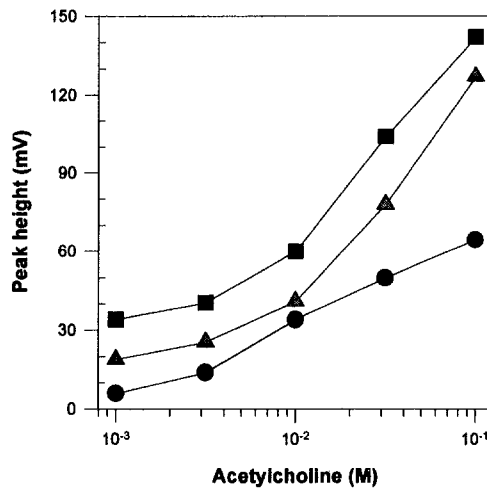


Fig. 2-22. Variation of sensor response for different reactor length. Reactor tube length, (●) 4 cm, (■) 7 cm, (▲) 10 cm; CPG, 200-400 mesh (500 Å); carrier, 2.5 mM HEPES buffer, pH 7.5; flow rate, 1 mL/min; ACh injection size, 50 μ L;

다) 유속(Flow rate)에 따른 비교

가)의 조건에서 유속을 0.4, 0.7, 1.0, 1.3 mL/min로 했을 때의 센서 감응은 Fig. 2-23과 같았다. 유속이 느릴수록 감응이 더 좋으나 peak가 더 broad해짐이 관찰되었다. 감응과 peak 모양이 모두 양호한 0.7 mL/min의 유속이 최적인 것으로 판단되었다.

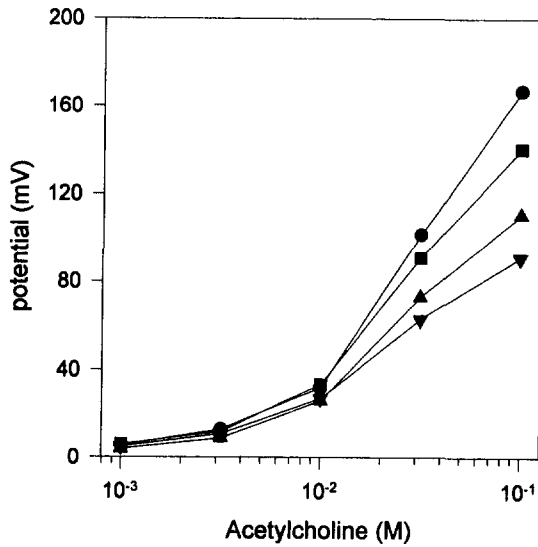


Fig. 2-23. Influence of carrier stream flow rate on the response of AChE-based FIA system peak height at various ACh concentrations. Glass beads size, 200~400 mesh(500 Å); reactor length, 7 cm; injection loop, 50 μ l; carrier, 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.5); flow rates, (●) 0.4 ml/min, (■) 0.7 ml/min, (▲) 1.0 ml/min, (▼) 1.3 ml/min.

라) ACh 농도와 시료주입량에 따른 감응

ACh의 농도를 달리하면서 50 μL 와 100 μL 의 injector를 사용하여 센서의 감응을 측정한 결과가 Fig. 2-24에 나와있다. ACh의 농도가 높아짐에 따라 peak height는 s자 모양의 증가를 나타내었다. 시료 주입량 50 μL 와 100 μL 를 비교해보면 ACh 농도가 10^{-2} M 까지는 감응이 2배 정도 차이가 나지만 더 높은 농도로 갈수록 그 차이가 적다. ACh 농도가 10^{-2} M 이하 일 때는 주입량을 100 μL 로 하는 것이 좋을 것으로 보인다.

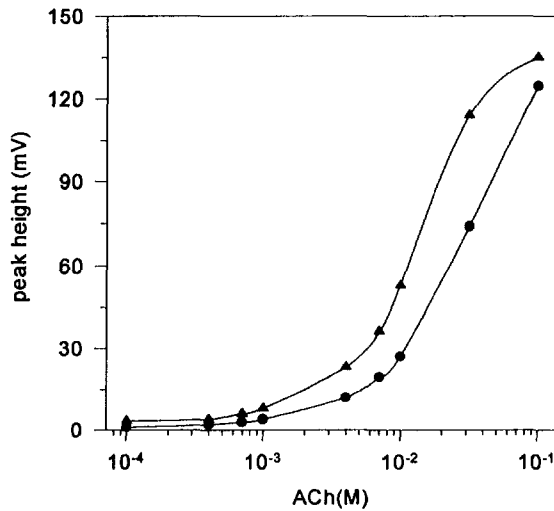


Fig 2-24. Responses for different sample loops of injection valve. Carrier, 2.5 mM Hepes buffer, pH 7.8 ; glass beads size, 200~400(500 \AA)mesh; reactor length, 7 cm ; flow rate, 0.7 mL/min. Sample loop (●) 50 μl , (▲) 100 μl .

마) Carrier buffer의 농도에 따른 감응

Carrier buffer의 농도를 달리하면서 센서의 감응을 알아본 결과는 Fig. 2-25와 같다. Buffer의 농도가 높을수록 감응은 낮아지지만 peak height/width는 더 높다. 적당한 이온세기와 안정된 baseline을 유지하고 drift를 최소화하기 위해서는 2.5 mM HEPES가 적당한 것 같다.

바) Carrier buffer의 pH에 따른 감응

Carrier buffer의 농도를 2.5 mM로 하고 pH를 변화시키면서 센서의 감응을 알아본 결과가 Fig. 2-26에 나타나 있다. Peak height는 pH 7.0에서 7.5까지 감소되다가 pH 7.5 이상부터는 점점 증가하였다. 이 그래프의 최소값은 25°C일 때 HEPES의 pKa인 pH 7.55에 가까운 pH 7.5이다. pH에 따른 peak height/peak width를 보면 pH 7.8에서 최대값을 나타낸다. 따라서 최적 carrier는 pH 7.8의 2.5 mM HEPES buffer라고 볼 수 있다.

4) 반응기 효소의 안정성

개발한 센서의 장기적인 사용 가능성을 알아보기 위하여 반응기를 4°C에서 보관하면서 2주 간격으로 24주까지 ACh에 대한 감응을 알아본 결과 6주까지는 초기의 활성이 거의 그대로 유지되었으나 그 후에 서서히 활성이 떨어졌으며 24주 후의 활성은 초기 활성의 62%이었다. 그러므로 본 센서 효소의 안정성은 매우 높고 센서의 장기적인 반복사용이 가능함을 알 수 있었다.

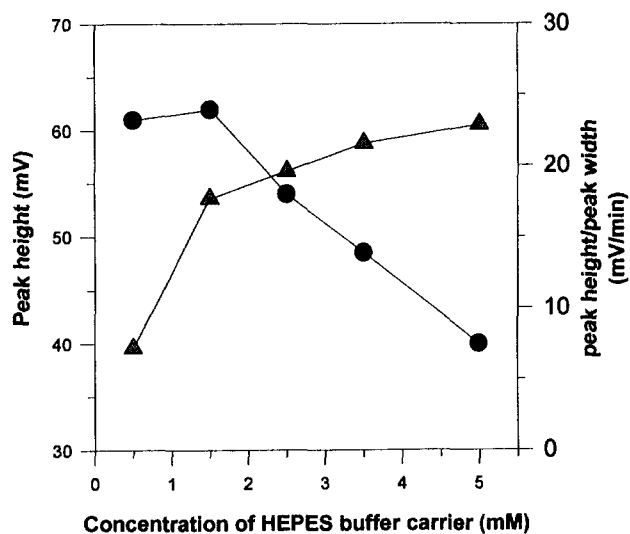


Fig. 2-25. Effect of carrier buffer concentration on peak height(●) and peak height to peak width ratio(▲). Carrier, HEPES buffer, pH 7.5; CPG, 200-400 mesh (500 Å); reactor length, 7 cm; flow rate, 0.7 mL/min; ACh, 10^{-2} M, 100 μ L.

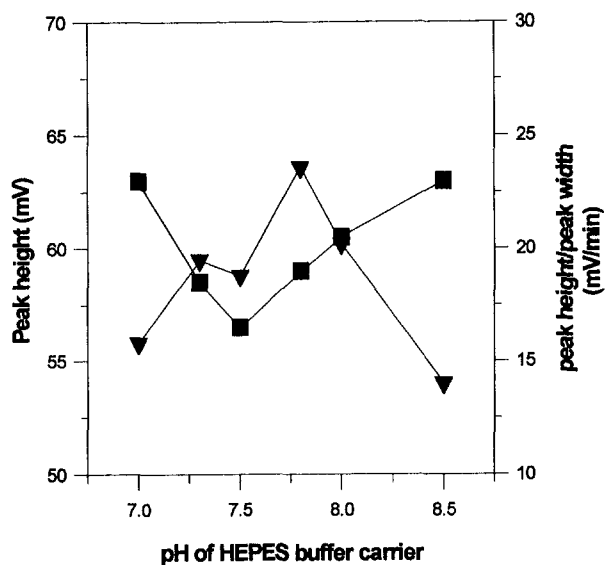


Fig. 2-26. Effect of carrier buffer pH on peak height(■) and peak height to peak width ratio(▼). Carrier, 2.5 mM HEPES buffer; CPG, 200-400 mesh (500 Å); reactor length, 7 cm; flow rate, 0.7 mL/min; ACh, 10^{-2} M, 100 μ L.

5) 효소센서 시제품 제작

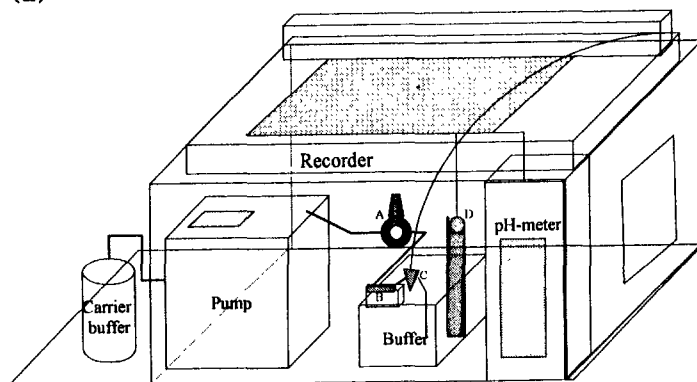
FIA형 AChE 센서 시제품의 구성도는 Fig. 2-27(a)와 같으며 실물의 사진은 Fig. 2-27(b)와 같다. 센서 시제품의 성능을 조사하기 위하여 ACh에 대한 감응을 측정하였는데 이전의 예비적인 센서의 감응과 일치하였다. 센서 시제품은 휴대 가능한 형태로 제작하였으므로 현장에서 사용할 수 있을 것으로 예상된다.

6) Paraoxon의 검출에 의한 센서의 농약 검출 가능성 검증

가) 효소의 저해시간에 따른 저해도

센서의 최적화 실험을 통하여 선택한 최적조건은 반응기의 고체 지지체로 200~400 mesh, 500 Å의 glass beads, 반응기의 길이는 7 cm, carrier는 pH 7.8의 2.5 mM HEPES buffer, 유속은 0.7 mL/min, 기질인 ACh 농도는 10^{-2} M, injector loop는 100 μ L이었다. 이 조건에서 먼저 paraoxon 용액을 흘려주기 전의 센서의 감응을 측정하고, 10^{-6} M paraoxon 용액을 5~35 분 범위에서 시간을 달리하면서 흘려준 다음 센서의 감응을 측정하여 효소의 저해%를 알아본 결과가 Fig. 2-28에 나타나 있다.

(a)



(b)

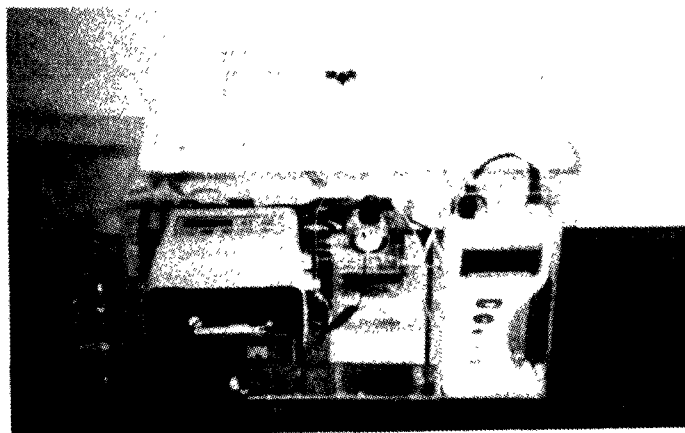


Fig. 2-27. The trial product of FIA type enzyme sensor. (a) illustration of the sensor: A) injector, B) reactor, C) detector, D) reference electrode. (b) photograph.

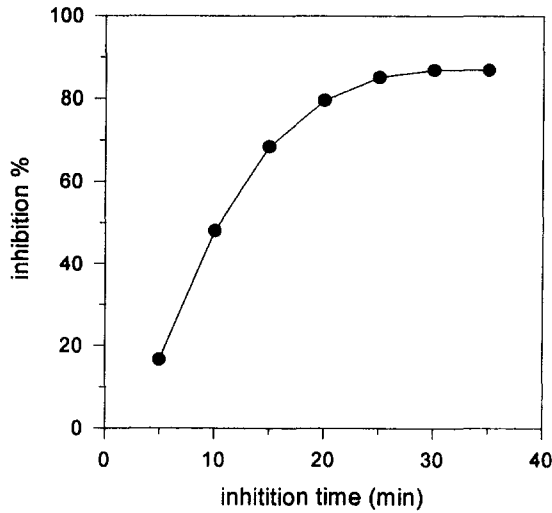


Fig. 2-28. Influence of enzyme-insecticide contact time on percentage inhibition of enzyme activity. Glass beads size, 200~400 mesh(500 Å); reactor length, 7 cm; flow rate, 0.7 ml/min; ACh, 10^2 M; injection loop, 100 μ l; carrier, 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.8); temperature, 25 °C; insecticide, 10^{-6} M paraoxon.

나) paraoxon 농도에 따른 저해도 조사

20분까지는 효소와 paraoxon의 접촉시간이 길수록 저해 %가 크게 증가하였으나 20분부터는 증가가 미미하였다. 그러므로 paraoxon의 통과시간은 20분 정도가 적당한 것으로 판단된다.

최적 조건에서 10^{-8} ~ 10^{-5} M paraoxon에 의한 효소의 저해%를 측정하여 구한 검량곡선은 Fig. 2-29와 같다. Paraoxon의 농도와 효소의 저해%는 10^{-8} M~ 10^{-5} M 범위에서 뚜렷한 상관관계를 보였으며 paraoxon의 저농도 검출한계는 10^{-8} M이었고 고농도 검출한계는 10^{-5} M이상으로 볼 수 있다.

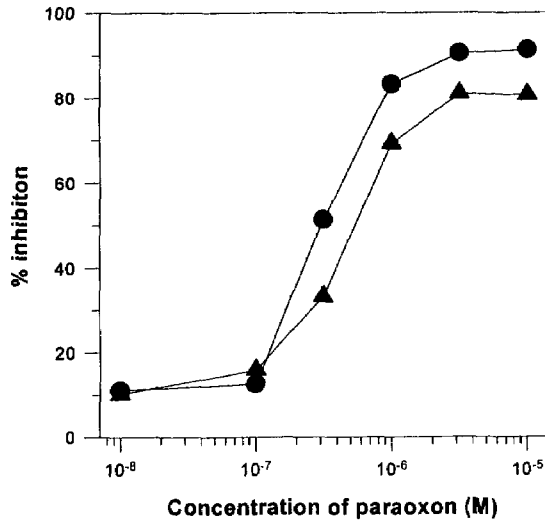
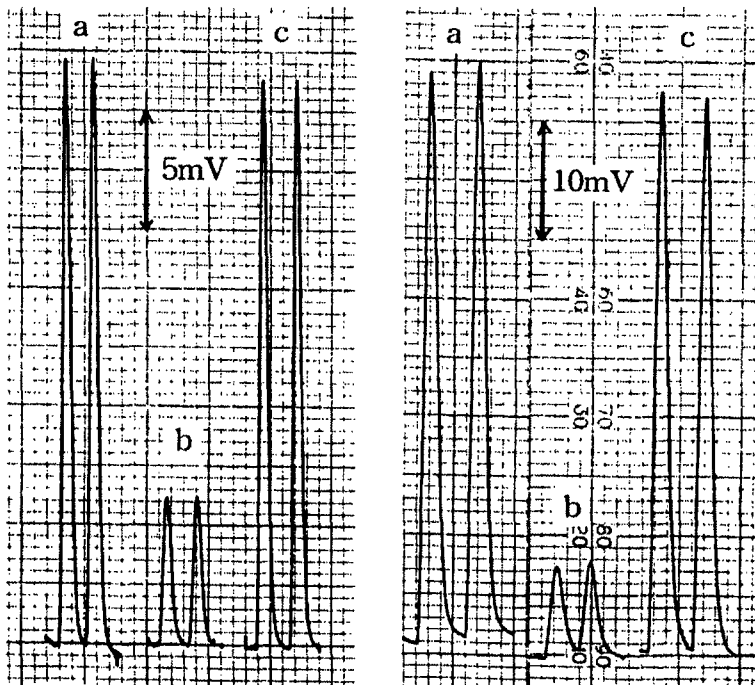


Fig. 2-29. Calibration curves for paraoxon. Incubation time, 20 min; reactor length, (▲) 4 cm and (●) 7 cm; CPG, 200-400 mesh (500 Å); carrier, 2.5 mM HEPES buffer, pH 7.8; flow rate, 0.7 mL/min; ACh, 3.16×10^{-3} M for 4 cm and 10^{-2} M for 7 cm reactor, 100 μ L.

다) 저해된 효소의 재활성화

10^{-6} M과 10^{-5} M의 paraoxon에 의해 저해된 AChE에 대해 2-PAM을 흘려주는 시간에 따른 효소의 재활성화 정도를 알아보려고 20 μ M 2-PAM 용액을 5분씩 증가시켜가며 흘려주었다. 10^{-6} M paraoxon에 의해 79% 저해된 AChE의 경우에 5분내에 99%의 재활성이 이루어졌으며 10^{-5} M paraoxon에 의해 90% 저해된 AChE는 20분내에 94%의 재활성이 일어났다. 그러므로 10^{-5} M 정도의 높은 농도의 paraoxon에 의해 저해된 AChE일지라도 30분 정도의 2-PAM과의 incubation 시간은 효소의 활성을 거의 완전히 회복시키기에 충분하다는 것을 알 수 있다. Fig. 2-30은 저해되기 전(a)과, 10^{-6} M paraoxon에 의해 저해된 후(b), 그리고 효소 재활성화 후(c)의 dynamic response를 보여준다.



1) ACh of 3.16×10^{-3} M and
reactor length of 4 cm

2) ACh of 10^{-2} M and
reactor length of 7 cm

Fig. 2-30. Responses of AChE-based FIA system a) before enzyme inhibition, b) after enzyme inhibition(20 min) by 10^{-6} M paraoxon and c) after enzyme reactivation(20 min) by $20 \mu\text{M}$ PAM.

7) 브롬을 사용한 유기인계 농약의 산화

농약 검출을 위한 AChE 센서는 AChE가 농약에 의해 저해되는 정도가 농약의 농도에 의존한다는 원리에 의거한다. 그러므로 센서효소의 저해 정도가 클수록 센서의 감도는 높아진다. 유기인계 농약의 공통적인 작용기인 thiophosphate기는 산화에 의해 phosphate기로 전환되는데 이것은 더 높은 효소 저해력을 가진다고 알려져 있으므로(Fallscheer, 1956 ; Tran-Minh, 1990) 본 연구에서는 유기인계 농약을 브롬으로 산화시켜 센서의 감도를 향상시키고자 하였다. 이를 위하여 산화반응의 조건을 수립하고자 하였으며 그 조건에서 thiophosphate기를 가지는 유기인계 농약이 예외 없이 산화되는지 확인하고자 하였다. 선택한 반응 조건은 농약 용액(2 mM, acetonitrile)을 10배 몰의 브롬용액(20 mM, acetonitrile)과 같은 부피로 혼합하여 수 초 동안 교반하는 것이었다.

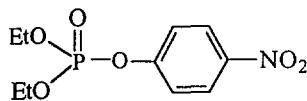
반응이 일어났는지의 여부는 TLC로 확인하였는데 그 결과는 Table 2-1과 같았다. 모든 농약은 반응 후의 TLC에서 완전히 사라졌으므로 산화 반응이 완결되었음을 알 수 있었으며 이것은 단지 수 초 동안의 혼합교반 후에 나타났으므로 산화반응은 순간적으로 일어났음을 알 수 있었다. Fenthion을 제외한 모든 농약에 있어서 반응 후의 TLC 상에서 단일의 반점이 나타났다. 그러므로 fenthion 이외의 농약은 하나의 주생성물을 생성시킨다는 것을 알 수 있었다. Fenthion의 경우에는 R_f 값이 상당히 다른 2개의 반점이 나타났으므로 주생성물이 2개인 것을 알 수 있었다.

생성물의 동정은 GC/MS와 ^1H NMR로 하였는데 preparative TLC로 분리한 생성물의 GC/MS 데이터는 다음과 같았다. t_R 은 retention time을 나타낸다.

Parathion : 81. 99. 109. 149. 275(M⁺) t_R : 11.62 min
 Fenitrothion : 79. 109. 244. 261(M⁺) t_R : 11.54 min
 Fenthion (P=S, SCH₃ 모두 산화): 109. 153. 247. 262(M⁺)
 t_R : 11.67 min
 Fenthion (P=S만 산화): 109. 153. 247. 262(M⁺) t_R : 11.43 min
 Chlorpyrifos : 98. 107. 134. 161. 169. 171. 173. 197. 199. 201.
 333(M⁺). 335(M⁺). 337(M⁺) t_R : 7.75 min
 Diazinon : 81. 137. 151. 247. 262. (M⁺) t_R : 10.02 min
 EPN : 77. 141. 169. 307 (M⁺) t_R : 15.52 min
 Dichlofenthion : 81. 109. 162. 207. 235. 263. 298. 299(M⁺)
 t_R : 10.76 min
 Parathion-methyl : 96. 109. 230. 247. 263(M⁺) t_R : 10.04 min
 Bromophos-ethyl : 81. 109. 242. 287. 315. 343. 378(M⁺)
 t_R : 12.86 min
 Bromophos-methyl : 109. 213. 298. 315. 350(M⁺) t_R : 11.58 min

Parathion의 산화 후 생성물의 GC/MS chromatogram은 Fig. 2-31(a)와 같았으며 t_R 11.62분 peak의 mass spectrum은 Fig. 2-31(b)와 같았다.

각 농약의 산화 생성물의 최고의 m/Z 값은 기대한 바의 생성물의 분자 이온의 m/Z 값과 일치하였다. 예를 들어 parathion의 경우에 생성물의 GC/MS 데이터는 아래의 구조(1)에 부합한다.



1

Table 2-1. TLC data for the reactions¹⁾ of organophosphorus pesticides with bromine

Pesticide	TLC R_f	
	Reactant	Product
Parathion	0.47	0.61
	1:2 Hex-Bz ²⁾	10:1 CHCl ₃ -EA ³⁾
Fenitrothion	0.53	0.48
	1:2 Hex-Bz	10:1 CHCl ₃ -EA
Fenthion ⁴⁾	0.59	0.78
	2:1 Hex-Bz	EA
Fenthion ⁵⁾	0.59	0.14
	2:1 Hex-Bz	EA
Chlorpyrifos	0.57	0.40
	2:1 Hex-Bz	20:1 CHCl ₃ -EA
Diazinon	0.57	0.43
	50:1 CHCl ₃ -EA	2:1 CHCl ₃ -EA
EPN	0.56	0.52
	1:2 Hex-Bz	20:1 CHCl ₃ -EA
Dichlofenthion	0.34	0.34
	1:2 Hex-Bz	5:1 CHCl ₃ -EA
Parathion	0.41	0.54
-methyl	2:1 Hex-Bz	20:1 CHCl ₃ -EA
Bromophos	0.55	0.65
-ethyl	2:1 Hex-Bz	20:1 CHCl ₃ -EA
Bromophos	0.47	0.59
-methyl	2:1 Hex-Bz	20:1 CHCl ₃ -EA

1) Pesticides(2 mM) were reacted with bromine(20 mM) in acetonitrile

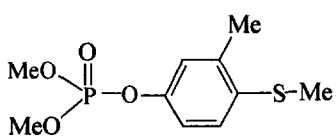
2) Hex-Bz : hexane-benzene

3) EA : ethyl acetate

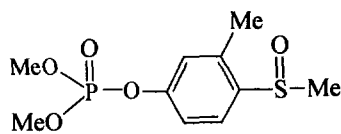
4) One of the two oxidized products ; only P=S group oxidized

5) The other oxidized product ; both P=S and SCH₃ oxidized.

2가지의 fenthion 산화 생성물 중 극성이 더 낮은 것(R_f 0.78)은 분자이온의 m/Z 값(262)이 P=S기만이 산화된 fenthion(2)의 m/Z 값과 일치하였다. 극성이 더 높은 것(R_f 0.14)은 m/Z 값(278)이 P=S기와 SCH_3 기가 모두 산화된 fenthion(3)의 m/Z 값과 일치하였다.



2



3

두 생성물은 모두 P=S기가 P=O기로 산화된 물질이므로 효소의 저해 정도를 높일 수 있을 것이며 따라서 이 산화반응은 센서의 감도를 높일 수 있는 방법으로 사료된다.

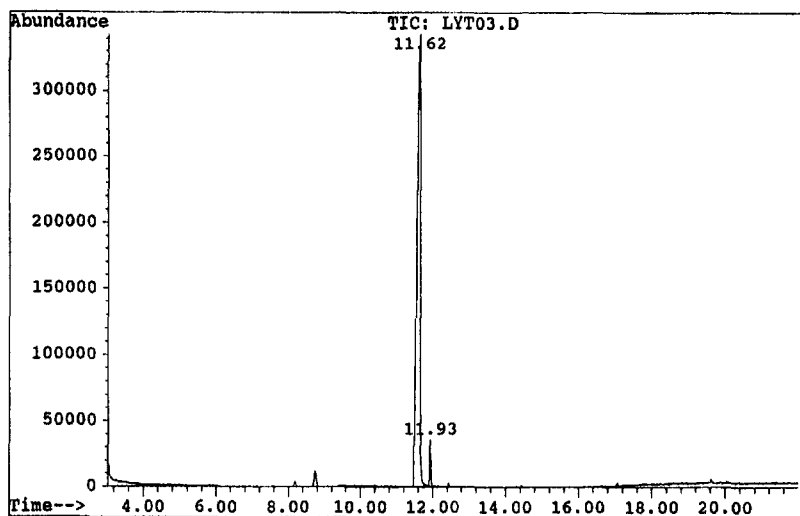
생성물의 NMR 데이터는 산화반응의 수득물을 NMR로 알아내는 과정에서 얻어졌다. 반응 전후의 1H NMR 데이터(300 MHz, CD_3CN)는 다음과 같았다.

Fenitrothion

반응전: 8.03 (1H, d, phenyl, $J=8.6$ Hz), 7.22 (1H, s, phenyl), 7.20 (1H, d, phenyl, $J=8.6$ Hz), 3.90 (6H, d, CH_3O , $J=13.9$ Hz), 2.57 (3H, s, $PhCH_3$)

반응후: 8.04 (1H, d, phenyl, $J=8.8$ Hz), 7.26 (1H, s, phenyl), 7.24 (1H, d, phenyl, $J=8.1$ Hz), 3.86 (6H, d, CH_3O , $J=11.4$ Hz), 2.58 (3H, s, $PhCH_3$)

(a)



(b)

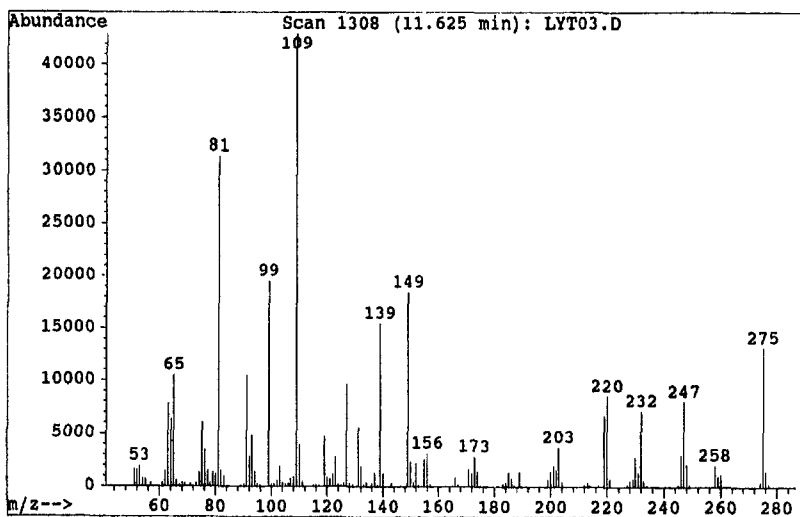


Fig. 2-31. GC/MS data of oxidized parathion. (a) GC/MS chromatogram
(b) mass spectrum

Parathion-methyl

반응전: 8.26 (2H, d, phenyl, $J=8.8$ Hz), 7.38 (2H, d, phenyl, $J=9.1$ Hz), 3.87 (6H, d, CH₃O, $J=13.7$ Hz)

반응후: 8.26 (2H, d, phenyl, $J=8.9$ Hz), 7.42 (2H, d, phenyl, $J=9.2$ Hz), 3.86 (6H, d, CH₃O, $J=11.5$ Hz)

Bromophos-methyl

반응전: 7.87 (1H, s, phenyl), 7.51 (1H, s, phenyl), 3.89 (6H, d, CH₃O, $J=13.9$ Hz)

반응후: 7.87 (1H, s, phenyl), 7.59 (1H, s, phenyl), 3.88 (6H, d, CH₃O, $J=11.0$ Hz)

Fenthion

반응전: 7.20 (1H, d, phenyl, $J=8.4$ Hz), 7.03 (1H, d, phenyl, $J=ca. 9$ Hz, overlapped with 7.00 singlet), 7.00 (1H, s, phenyl), 3.83 (6H, d, CH₃O, $J=13.8$ Hz), 2.46 (3H, s, SCH₃), 2.28 (3H, s, PhCH₃)

반응후: (product with higher R_f value, only thione oxidized)(isolated product, CDCl₃): 7.14 (1H, d, phenyl, $J=8.7$ Hz), 7.05 (1H, d, phenyl, $J=ca. 8$ Hz, overlapped with 7.03 singlet), 7.03 (1H, s, phenyl), 3.86 (6H, d, CH₃O, $J=11.3$ Hz), 2.44 (3H, s, SCH₃), 2.34 (3H, s, PhCH₃)

반응후: (product with lower R_f value, both thione and sulfide oxidized)(isolated product, CDCl₃): 7.94 (1H, d, phenyl, $J=8.6$ Hz), 7.28 (1H, d, phenyl, $J=ca. 8$ Hz, overlapped with 7.26 singlet), 7.26 (1H, s, phenyl), 3.89 (6H, d, CH₃O, $J=11.4$ Hz), 2.68 (3H, s, S(=O)CH₃), 2.38 (3H, s, PhCH₃)

Parathion-ethyl

반응전: 8.25 (2H, d, phenyl, $J=8.9$ Hz), 7.39 (2H, d, phenyl, $J=8.5$ Hz), 4.26 (4H, dxq, CH₂, $J=9.9$ & 7.1 Hz), 1.34 (6H, txd, CH₃, $J=7.0$ & 0.9 Hz)

반응후: 8.25 (2H, d, phenyl, $J=9.1$ Hz), 7.42 (2H, dxq, phenyl, $J=9.2$ & 1.0 Hz), 4.22 (4H, dxq, CH₂, $J=8.3$ & 7.0 Hz), 1.32 (6H, txd, CH₃, $J=7.0$ & 0.9 Hz)

Bromophos-ethyl

반응전: 7.87 (1H, d, phenyl, $J=1.0$ Hz), 7.53 (1H, d, phenyl, $J=1.8$ Hz), 4.27 (4H, dxq, CH₂, $J=9.9$ & 7.1 Hz), 1.34 (6H, txd, CH₃, $J=7.1$ & 0.9 Hz)

반응후: 7.87 (1H, d, phenyl, $J=1.0$ Hz), 7.59 (1H, d, phenyl, $J=1.1$ Hz), 4.26 (4H, dxq, CH₂, $J=8.1$ & 7.1 Hz) 1.32 (6H, txd, CH₃, $J=7.0$ & 1.0 Hz)

Diazinon

반응전: 6.7 (1H, s, phenyl) 4.33, 4.31 (6H, q×d, CH₂O, $J=2.4$ & 5.9 & 7.1 Hz), 3.1 (1H, septet, CH(CH₃)₂, $J=6.0$ Hz), 2.4(3H, s, PhCH₃), 1.35(6 H, t, CH₃CH₂O, $J=7.1$ Hz) 1.27 (6H, d, CH(CH₃)₂, $J=7.0$ Hz)

반응후: 6.3 (1H, s, phenyl), 4.33, 4.31 (6H, q×d, CH₂O, $J=2.4$ & 5.9 & 7.1 Hz), 3.7 (1H, septet, CH(CH₃)₂, $J=7.0$ Hz), 2.1 (3H, s, PhCH₃), 1.47 (6H, t, CH(CH₃)₂, $J=7.0$ Hz), 1.3 (6H, d, CH₃CH₂O, $J=7.0$ Hz)

Chlorpyrifos

반응전: 8.14 (1H, s, phenyl), 4.36 (4H, dxqxd, CH₂, $J=9.6, 7.0$ & 2.7

Hz), 1.38 (6H, txd, CH₃, $J=7.1$ & 0.7 Hz)

반응 후: 8.14 (1H, s, phenyl), 4.34 (4H, dxqxd, CH₂, $J=8.3, 7.1$ & 2.1 Hz), 1.36 (6H, txd, CH₃, $J=7.1$ & 1.1 Hz)

EPN

반응 전: 8.20 (2H, d, nitrophenyl, $J=9.1$ Hz), 8.05-7.56 (5H, m, phenyl), 7.29 (2H, dxq, nitrophenyl, $J=9.1$ & 1.6 Hz), 4.30 (2H, dxqxd, CH₂, $J=10.7, 7.2$ & 0.6 Hz), 1.34 (3H, t, CH₃, $J=7.2$ Hz)

반응 후: 8.20 (2H, d, nitrophenyl, $J=9.1$ Hz), 7.92-7.53 (5H, m, phenyl), 7.38 (2H, dxq, nitrophenyl, $J=9.3$ & 1.1 Hz), ca. 4.3 (2H, dxq, CH₂, $J=8.3$ & 7.1 Hz), 1.33 (3H, t, CH₃, $J=7.2$ Hz)

Dichlofenthion

반응 전: 7.58-7.34 (3H, m, phenyl), 4.27 (4H, dxq, CH₂, $J=9.8$ & 7.1 Hz), 1.35 (6H, txd, CH₃, $J=7.1$ & 0.9 Hz)

반응 후: 7.59-7.33 (3H, m, phenyl), 4.24 (4H, dxq, CH₂, $J=ca. 7$ & 7.1 Hz), 1.33 (6H, txd, CH₃, $J=7.1$ & 1.0 Hz)

Parathion의 경우에 반응 전의 ¹H NMR spectrum은 Fig. 2-32와 같았으며 반응 후의 spectrum은 Fig. 2-33과 같았다.

산화 생성물의 수득률은 반응물질과 standard를 NMR tube에 넣고 반응을 일으켜 반응물질과 생성물질의 standard에 대한 상대적인 peak 면적을 조사하여 산출하였다. 반응물질과 생성물질의 NMR peak 면적으로부터 구한 수득률은 다음과 같았다. 수득률은 82~100%로서 매우 높았다.

Pesticide	Yield	Pesticide	Yield
Parathion	88	EPN	100
Fenitrothion	93	Dichlofenthion	90
Fenthion	41 ¹⁾ , 59 ²⁾	Parathion-methyl	83
Chlorpyrifos	89	Bromophos-ethyl	96
Diazinon	82	Bromophos-methyl	97

Fenthion의 경우 산화 생성물이 2가지임으로 반응 후의 NMR 스펙트럼은 매우 복잡하여 해석이 불가능하였다. 그러므로 각 산화물의 수득률은 두 생성물의 수득률의 합이 100%라고 가정하여 계산하였다. 이상의 모든 분광학적 데이터와 TLC 결과는 유기인계 농약이 브롬에 의해 높은 수득률로 phosphate로 산화된다는 것을 보여준다.

8) 유기인계 및 카바메이트계 농약의 효소센서에 의한 검출 가능성 조사

FIA형 AChE 센서를 이용한 유기인계 농약과 카바메이트계 농약의 검출 가능성을 알아보기 위하여 10종의 유기인계 농약과 9종의 카바메이트계 농약에 의한 센서 효소의 저해 %를 측정하였으며 2-PAM에 의해 저해된 효소의 재활성의 정도도 알아보았다.

가) 유기인계 농약

유기인계 농약과 그들의 산화 생성물에 의한 FIA형 AChE 센서 효소의 저해 %를 측정해 보았다. 10종의 10^{-6} M 유기인계 농약들에 의한 저해 %와 2-PAM에 의한 재활성 %의 결과를 Table 2-2에 나타내었다.

Table 2-2. Comparison of the percent inhibition of the sensor enzyme by organophosphorus pesticides before and after oxidation by bromine

Pesticides	Before oxidation		After oxidation	
	% Inhibition	% Reactivation	% Inhibition	% Reactivation
Parathion	17%	100%	77%	97%
Fenitrothion	7.7%	104%	31%	89%
Fenthion ¹⁾	8.5%	107%	19%	83%
Fenthion ²⁾	7.7%	103%	37%	70%
Chlorpyrifos	3.9%	100%	69%	80%
Diazinon	13%	107%	73%	95%
EPN	5.6%	100%	80%	109%
Dichlofenthion	11%	100%	75%	80%
Parathion-methyl	11%	100%	48%	93%
Bromophos-ethyl	7.4%	93%	12%	92%
Bromophos-methyl	8.7%	92%	20%	88%

1) One of the two oxidized products ; only P=S group oxidized

2) The other oxidized product ; both P=S and SCH₃ oxidized

Note : Glass beads size, 200~400 mesh(500Å); reactor length, 4cm; flow rate, 0.7 mL/min; ACh, 5×10⁻³ M; injection volume 100 μL; pesticide concentration, 10⁻⁶ M; pesticide-enzyme incubation time, 30 min; pesticide-PAM incubation time, 20 min; carrier, 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2); test temperature, 30°C.

Diazinon을 예로서 볼 때 산화 전후 생성물에 대한 전형적인 센서의 감응은 Fig. 2-34와 같았다. Diazinon의 산화 전후 물질의 농도에 따른 (10⁻⁴ ~ 10⁻¹¹ M) 센서 효소의 저해 %와 2-PAM에 의한 재활성%는 Table 2-3과 같으며 산화 전후 물질의 검량곡선은 Fig. 2-35와 같았다. 저농도 검출한계

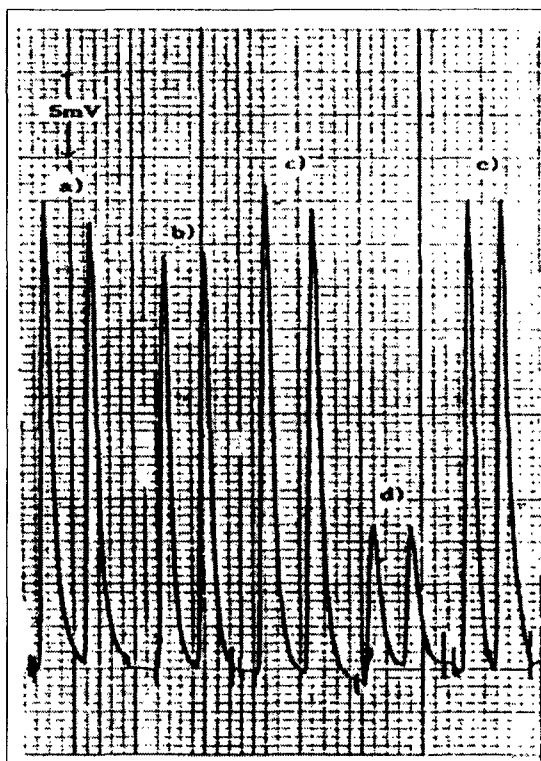


Fig. 2-34. Typical responses of the AChE sensor to 5 mM ACh.

a) in absence of diazinon, b) after passage of 10^6 M diazinon through the reactor for 30 min, c) after passage of $20 \mu\text{M}$ 2-PAM for 20 min, d) after passage of oxidized diazinon for 30 min, e) after repassage of $20 \mu\text{M}$ 2-PAM for 20 min. Glass beads size, 200~400 mesh(500 Å); reactor length, 4 cm; flow rate, 0.7 mL/min; injection volume, $100 \mu\text{L}$; carrier, 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2); test temperature, 30°C .

Table 2-3. Comparison of the percent inhibition percent reactivation of the sensor enzyme at various concentrations of the diazinon before and after oxidation by bromine

Concentration (M)	Diazinon		Diazinon +Br ₂	
	(before oxidation)		(after oxidation)	
	% Inhibition	% Reactivation	% Inhibition	% Reactivation
10 ⁻¹¹ M	0.0%	100%	0.0%	103%
10 ⁻¹⁰ M	0.0%	102%	7%	98%
10 ⁻⁹ M	0.0%	100%	17%	100%
10 ⁻⁸ M	0.0%	100%	35%	109%
10 ⁻⁷ M	11%	96%	55%	89%
10 ⁻⁶ M	12%	102%	64%	91%
10 ⁻⁵ M	13%	94%	78%	87%
10 ⁻⁴ M	17%	90%	84%	83%

Note : Glass beads size, 200~400 mesh(500 Å); reactor length, 4 cm; flow rate, 0.7 mL/min; ACh, 5×10⁻³ M; injection volume, 100 μL; pesticide-enzyme incubation time, 60 min; pesticide-PAM incubation time, 60 min; carrier, 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2); test temperature, 30°C.

는 산화전 물질의 경우 10⁻⁷ M이었고, 산화 후 물질의 경우는 10⁻¹⁰ M이었으므로(10% 저해) 검출한계는 산화에 의해 1000배 향상됨을 볼 수 있었다. 이상의 결과는 AChE 효소센서에 의한 유기인계 농약의 검출에 있어서 브롬에 의한 산화는 센서의 감도를 크게 높일 수 있는 방법이라는 것을 말해 준다.

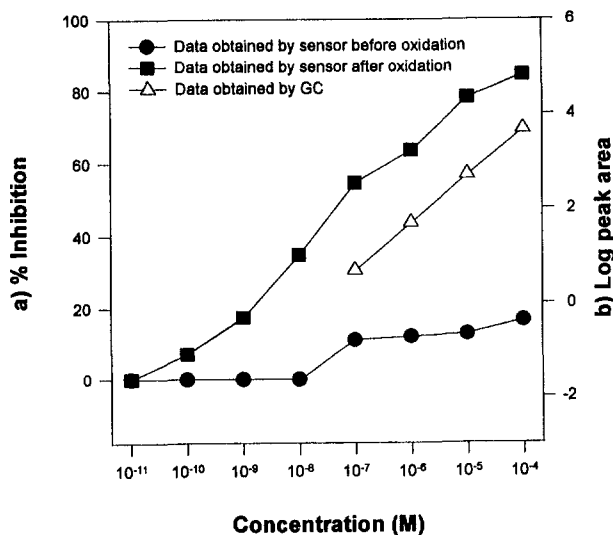


Fig. 2-35. Calibration curves for diazinon before (●) and after (■) oxidation obtained by enzyme sensor and GC/NPD. Enzyme sensor: Glass beads size, 200~400 mesh(500 Å); reactor length, 4 cm; flow rate, 0.7 mL/min; ACh, 5×10^{-3} M; injection volume, 100 μ L; pesticide-enzyme incubation time, 30 min; pesticide-PAM incubation time, 20 min; carrier, 2.5mM HEPES buffer (pH 7.2); test temperature, 30°C. GC conditons: column, HP-5(5% phenyl methyl polysiloxane, 30m, diameter 250 μ m, film thickness 0.25 μ m), carrier gas, N₂; flow rate, 28 cm/min; oven temperature, 100°C for 2 min, ramp at 10°C/min to 280°C; inlet, splitless mode; detector, NPD.

산화된 diazinon의 센서에 의한 검출가능 농도범위는 GC/NPD에 의한 그것($10^{-4} \sim 10^{-7}$ M)보다 훨씬 넓다. 또한 효소센서에 의한 저농도 검출한계는 GC에 의한 그것에 비해 10^3 배 더 낮다. 그러므로 본 센서의 수행능은 기존의 검증된 분석법 중에서 가장 수행능이 높다고 알려진 GC보다 오히려 상당히 더 높다고 볼 수 있다.

산화시키기 전의 유기인계 농약에 의해 저해된 효소는 2-PAM에 의해 거의 완벽하게 재활성화 되었다. 산화시킨 유기인계 농약에 의해 저해된 효소 역시 2-PAM에 의해 크게 재활성화 되었으나 산화전의 경우에 비해 재활성화 정도가 약간 낮았다. 산화 후 물질에 의해 저해된 효소라도 재활성화 시약과의 incubation시간을 증가시키면 100%의 재활성화가 가능할 것으로 보인다.

나) 카바메이트계 농약

9종의 10^{-6} M 카바메이트계 농약에 의한 효소활성의 저해 %와 2-PAM에 의한 효소의 재활성화 %에 관한 결과는 Table 2-4와 같다. 카바메이트 농약 종간의 센서효소의 저해 %는 20~48%로서 작은 차이를 나타내었다. 그러나 카바메이트계 농약에 의해 저해된 효소는 유기인계 농약과 마찬가지로 효소 활성 복구시약 2-PAM에 의해 70%이상 재활성화 되었으므로 센서의 지속적인 사용이 가능함을 알 수 있다.

Table 2-5는 carbaryl의 농도에 따른 저해 %를 나타낸 것이며 Fig. 2-36은 검량곡선이다. Table 2-6는 carbofuran의 농도에 따른 저해 %를 나타낸 것이며 Fig. 2-37은 검량곡선이다. 두 경우 모두 $10^{-4} \sim 10^{-8}$ M에서 농도와 저해%는 뚜렷한 상관관계를 보였다. Carbaryl과 carbofuran 모두 저농도 검출 한계는 10^{-11} M(10% 저해)로 나타났는데 이것은 농약 잔류 허용

Table 2-4. Response of AChE-based FIA system by 10^{-6} M several carbamate pesticides

Pesticide	% Inhibition	% Reactivation
Carbaryl	30%	102%
Carbofuran	35%	92%
Aldicarb	22%	88%
Bendiocarb	43%	91%
Methomyl	20%	76%
Mercaptodimethur	48%	83%
Isoproc carb	27%	96%
Dioxocarb	21%	94%
Propoxur	34%	96%

Note : Glass beads size, 200~400 mesh(500Å); reactor length, 4 cm; flow rate, 0.7 mL/min; ACh, 5×10^{-3} M; injection volume, 100 μ L; pesticide-enzyme incubation time, 30 min; pesticide-PAM incubation time, 20 min; carrier, 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2); test temperature, 30°C.

치의 초과 여부를 판정하기에 충분할 정도로 낮다. 이상의 결과는 개발한 효소센서의 감도가 농약잔류 허용치 초과 여부를 판정하기에 충분할 정도로 높다는 것을 말한다.

효소센서에 의한 carbaryl과 carbofuran의 검출가능 농도범위($10^{-4} \sim 10^{-11}$ M)는 HPLC/fluorescence detector에 의한 그것($10^{-4} \sim 10^{-7}$ M)보다 훨씬 더 넓다. 또한 효소센서에 의한 저농도 검출한계(10^{-10} M)는 GC에 의한 그것(10^{-7} M)에 비해 10^3 배 더 낮다. 그러므로 본 센서의 수행능은 기존의 카바메이트계 농약 분석법 중에서 가장 수행능이 높다고 알려진 HPLC 방법보

Table 2-5. Percent inhibition of the sensor enzyme by carbaryl at various concentrations

Concentration (M)	% Inhibition	% Reactivation
10^{-11} M	6%	100%
10^{-10} M	10%	108%
10^{-9} M	19%	106%
10^{-8} M	26%	102%
10^{-7} M	31%	89%
10^{-6} M	36%	96%
10^{-5} M	46%	104%
10^{-4} M	62%	69%

Note : Glass beads size, 200~400 mesh(500 Å); reactor length, 4 cm; flow rate, 0.7 mL/min; ACh, 5×10^{-3} M; injection volume, 100 μ L; pesticide-enzyme incubation time, 60 min; pesticide-PAM incubation time, 60 min; carrier, 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2); test temperature, 30°C.

Table 2-6. Percent inhibition of the sensor enzyme by carbofuran at various concentration

Concentration (M)	% Inhibition	% Reactivation
10^{-11} M	15%	92%
10^{-10} M	29%	100%
10^{-9} M	42%	88%
10^{-8} M	54%	79%
10^{-7} M	57%	71%
10^{-6} M	65%	81%
10^{-5} M	67%	89%
10^{-4} M	76%	81%

Note : Glass beads size, 200~400 mesh(500 Å); reactor length, 4 cm; flow rate, 0.7 mL/min; ACh, 5×10^{-3} M; injection volume, 100 μ L; pesticide-enzyme incubation time, 60 min; pesticide-PAM incubation time, 60 min; carrier, 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2); test temperature, 30°C.

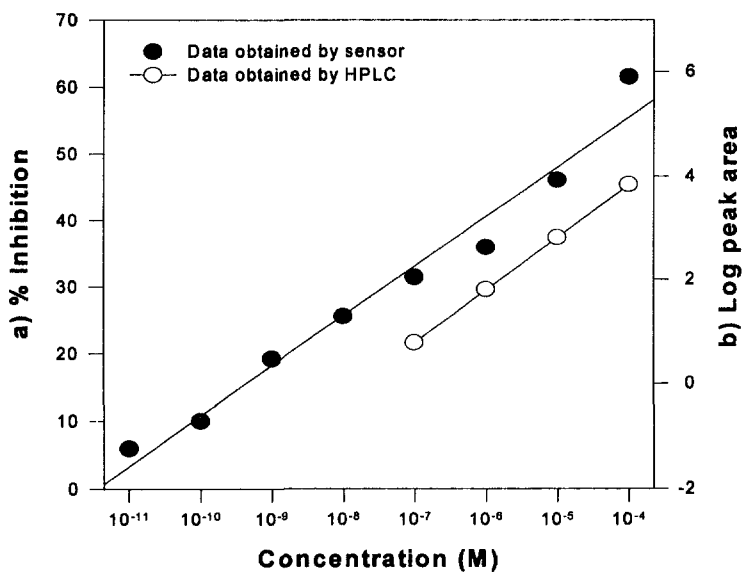


Fig. 2-36. Calibration curves for carbaryl obtained by enzyme sensor and HPLC. Enzyme sensor: Glass beads size, 200~400 mesh(500 Å); reactor length, 4 cm; flow rate, 0.7 mL/min; ACh, 5×10^{-3} M; injection volume, 100 μ L; pesticide-enzyme incubation time, 60 min; pesticide-PAM incubation time, 60 min; carrier, 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2); test temperature, 30°C. HPLC conditions: post-column fluorescence detection after hydrolysis and derivatization with o-phthalaldehyde and 2-mercapto ethanol; column, c-18 reverse phase, 15 cm, particle size 5 μ m; mobile phase, gradient from 18% to 80% methanol-water; flow rate 1mL/min; fluorescence detector, excitation wavelength 330 nm, emission wavelength, 466 nm.

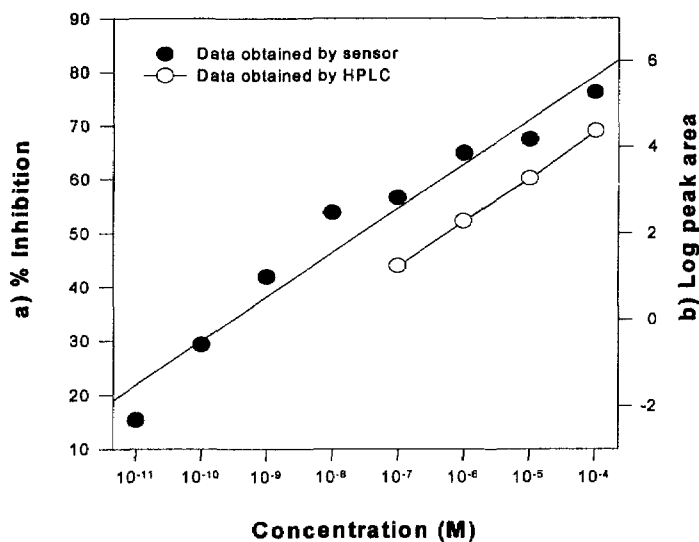


Fig. 2-37. Percent inhibition of the sensor enzyme by carbofuran at various concentrations.

Glass beads size, 200~400 mesh(500 Å); reactor length, 4cm; flow rate, 0.7 mL/min; ACh, 5×10^3 M; injection volume, 100 μ L; pesticide-enzyme incubation time, 60 min; pesticide-PAM incubation time, 60 min; carrier, 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2); test temperature, 30°C.

HPLC conditions: post-column fluorescence detection after hydrolysis and derivatization with *o*-phthalaldehyde and 2-mercaptoethanol; column, c-18 reverse phase, 15 cm, particle size 5 μ m; mobile phase, gradient from 18% to 80% methanol-water; flow rate 1mL/min; fluorescence detector, excitation wavelength 330 nm, emission wavelength, 466 nm.

다 상당히 더 높다고 볼 수 있다. 본 효소센서는 그 수행능이 유기인계(7의 가절에 기술)와 카바메이트계 농약 모두에 대해 기존의 검증된 분석법보다 오히려 더 우수하므로 현재 사용되고 있는 공인된 분석법을 보완할 수 있는 하나의 분석법이 될 수 있을 것으로 전망된다.

9) 효소센서를 이용한 식품 중의 농약 분석

가) 식품 중의 carbaryl 추출물의 효소 저해도 조사

효소센서에 의한 농약검출법의 실용성을 검증하기 위해 무농약 청정 재배한 케일에 카바메이트계 농약인 carbaryl을 0, 0.1, 1.0, 10 ppm 농도로 첨가(spike)하여 개발한 센서로 분석한 결과는 고무적이었다. Fig. 2-38은 케일 추출물에 의한 효소의 저해 %를 나타낸다. 추출 전처리 과정을 최소화하기 위해 AOAC Official Method(975.40) (Cuniff, 1995b)의 전처리 과정의 첫 일부분만 거쳤는데, 무농약 시료의 추출물의 저해 %가 0에 가깝다는 것은 케일 추출물내의 수많은 성분 중에서 효소를 저해하는 물질이 포함되어 있지 않음을 나타낸다. 그러므로 이 간소화된 추출 과정은 본 센서를 실제 식품분석에 이용할 때 방해물질(interferences)에 대한 우려 없이 사용할 수 있는 적절한 추출 방법이라고 볼 수 있다.

식품시료 중의 Carbaryl의 농도와 효소 저해 %는 양호한 상관관계를 나타내었다. 대부분의 농약은 잔류 허용치가 0.1~10 ppm이므로 이러한 결과는 본 센서를 실제 식품의 잔류농약 허용치 초과 여부를 판정하는데 이용할 수 있음을 말해 준다. 그러나 저해 %가 같은 농도의 표준 carbaryl 용액에 비해서는 낮았는데 이것은 추출과정의 비효율성 때문일 것이다. 그러므로

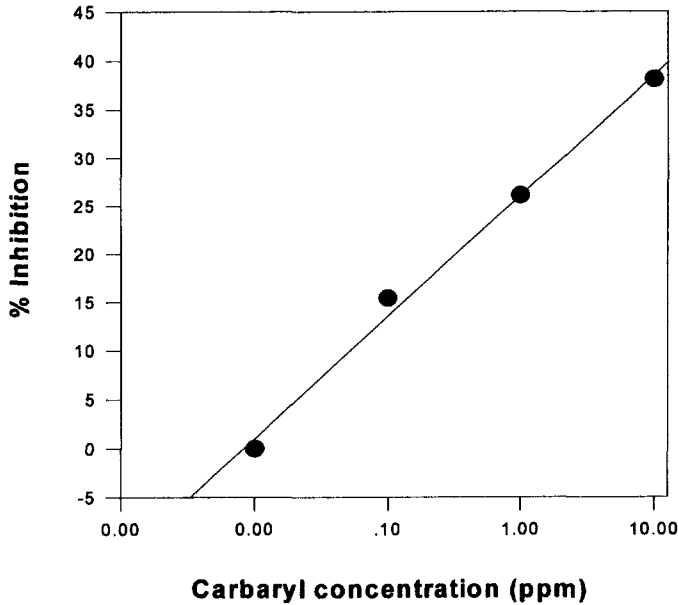


Fig. 2-38. Percent inhibition of the sensor enzyme by kale extracts spiked with various concentrations of carbaryl.

: Glass beads size, 200~400 mesh(500 Å); reactor length, 4cm; flow rate, 0.7 mL/min; ACh, 5×10^3 M; injection volume, 100 μ L; pesticide-enzyme incubation time, 60 min; pesticide-PAM incubation time, 60 min; carrier, 2.5 mM HEPES buffer(pH 7.2); test temperature, 30°C.

다. 결 론

본 연구에서는 cholinesterase가 유기인계 및 카바메이트계 농약에 의해 저해되며 저해정도가 농약의 농도와 상관관계를 가진다는 원리에 근거하여 탐침(probe)형 효소센서와 흐름주입분석(flow injection analysis, FIA)형 효소센서를 개발하였다. 2종의 센서 중 측정시간과 운용 경비면에서 보다 경

제성이 높은 FIA형 센서를 선정하여 그 성능을 최적화하여 시제품을 제작하였으며 최적화한 센서를 농약의 분석에 적용하여 실용성을 검증하였다.

Acetylcholinesterase를 controlled pore glass에 고정화시킨 반응기와 H⁺-선택성 중합체 막 전극으로 구성된 FIA형 센서를 최적화한 실험에서 최적 파라미터들은 다음과 같았다.

Operating parameter	Optimum value
효소 고정화 Glass beads	200~400 mesh (500 Å)
반응기의 길이	4 cm 또는 7 cm
반응기 튜브의 직경	2.06 mm
Carrier stream flow rate	0.7 ml · min ⁻¹
ACh의 농도	3.16 × 10 ⁻³ M (4 cm 반응기) 또는 10 ⁻² M (7 cm 반응기)
HEPES buffer의 농도	2.5 mM
HEPES buffer의 pH	7.2
효소-농약 incubation 시간	20 min (paraoxon 분석)
효소-재활성제 반응시간	20 min (paraoxon 분석)

최적화한 센서를 사용하여 유기인계 및 카바메이트계 농약의 표준용액과 농약첨가 식품시료를 분석해 보았는데 그 결과는 다음과 같았다.

10종의 유기인계 농약과 9종의 카바메이트계 농약은 10⁻⁶ M 농도 수준에서 센서효소를 상당히 저해하였으므로 개발한 센서의 감도는 상당히 높다. 유기인계 농약의 경우 브롬에 의한 산화생성물은 산화전의 농약에 비해 훨씬 더 높은 효소 저해 %를 나타내었으므로, 브롬에 의한 산화는 유기인계 농약 검출의 감도를 크게 높일 수 있는 방법이라고 볼 수 있다.

농도에 따른 센서의 감응을 조사해 본 결과 유기인계와 카바메이트계

농약 모두 넓은 범위의 농도 범위($10^{-4} \sim 10^{-11}$ M)에서 농도-감응 상관관계를 나타내었다. 효소센서의 농약에 대한 저농도 검출한계(10^{-11} 혹은 10^{-10} M)는 농약 잔류 허용치를 판정하기에 충분할 정도로 낮았을 뿐 아니라 기존 분석법인 GC나 HPLC법에 비해 저농도 검출한계가 더 낮았다. 카바메이트계 농약은 유기인계 농약에 비해 효소 저해도가 낮으므로 incubation 시간을 증가시킬 필요가 있다.

최소한의 전처리과정을 거친 농약 첨가 식품시료도 농약 농도와 센서효소의 저해도는 뚜렷한 직선적 상관관계를 나타내었다. 따라서 본 효소센서는 식품시료의 농약검출에 이용될 수 있다고 본다. 그러나 농약의 추출과정에 있어서의 비효율성으로 말미암아 표준 carbaryl 용액에 비해서는 저해%가 낮게 나타났으므로 추출과정의 개선이 필요하다.

본 AChE 효소센서로서 개별 유기인계 및 카바메이트계 농약을 검출하는데는 제약이 있지만 이 두 부류 농약의 존재 여부를 알게 해 준다. 그러므로 GC나 HPLC 등에 의한 개별 농약의 분석에 앞서 본 센서로서 식품시료를 스크린함으로써 분석이 불필요한 많은 시료를 배제할 수 있다. 따라서 본 센서의 이용은 농약 검사에 있어서 막대한 시간적, 경제적인 절감을 가져올 수 있을 것으로 기대된다.

제3절 유기인계 농약 Fenthion의 면역분석법 개발

본 연구의 목적은 유기인계 농약의 일종인 fenthion(*O,O*-dimethyl *O*-4-methylthio-*m*-tolyl phosphorothioate)의 검출을 위한 ELISA를 개발하는 것이다. Fenthion은 우리 나라에서 사용 빈도가 상당히 높고 잔류허용기준(0.05 혹은 0.1 ppm)이 설정되어 있으나 아직 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)의 개발이 보고된 바 없다.

1975년 Langone 등(Langone, 1975)이 개발한 dieldrin과 aldrin을 분석하기 위한 radioimmunoassay(RIA)가 농약 검출용 면역분석의 최초의 사례이다. 방사성 동위원소로 표지된(radiolabelled) 항원 혹은 항체를 사용하여 항원-항체 반응을 방사능으로 측정하는 RIA(Chard, 1978)는 고가의 방사능 측정기기가 필요하며 안전성에 문제가 있으므로 방사능 대신에 효소반응을 이용하는 enzyme immunoassay(EIA)가 개발되기에 이르렀고 이에 따라 농약 분석에도 EIA가 도입되기 시작하였다. EIA의 여러 방식 중 농약 분석에 쓰이는 방식은 주로 ELISA이며 지금까지 약 57종의 농약에 대한 ELISA가 개발되었다(Hennion, 1998).

유기인계 농약의 경우 농약의 주종을 이루고 있음에도 불구하고 초기 10년 동안에 면역분석법이 개발된 것은 parathion(Ercegovich, 1981, Vallejo, 1981)과 paraoxon(Hunter, 1982, Brimfield, 1985) 뿐이었다. 90년대에 들어 다른 유기인계 농약 즉 fenitrothion(McAdam, 1992, Hill, 1992), chlorpyrifos(Manclus, 1994) 및 azinphos-methyl(Mercader, 1995)의 면역분석법이 개발되었다.

ELISA는 다양한 format이 가능한데 저분자 물질(MW<1000)에 대한 ELISA는 경쟁적 방식을 채택하는 것이 보통이다(Larry, 1996). 경쟁적 ELISA는 직접 경쟁(direct competitive) 방식과 간접 경쟁(indirect

competitive) 방식으로 나눌 수 있으며 그 과정과 원리는 다음과 같다.

직접 경쟁 ELISA는 분석물질에 대한 항체를 고체상에 일정량 흡착시키고 분석물질(항원)을 함유하는 시료와 효소로 label된 분석물질을 첨가하여 incubation시킨다(Fig. 2-39). Incubation 동안 항원(분석물질)과 효소로 label된 항원은 항체에 대해서 경쟁적으로 결합하며 항원의 농도가 높을수록 항체에 결합하는 label된 항원의 양이 작아지게 된다. 그러므로 결합한 label된 항원을 정량함으로써 분석물질을 정량할 수 있다. 결합한 label된 항원의 정량은 결합하지 않은 물질을 제거하고 효소에 대해 흡광도의 변화가 큰 기질을 넣어 흡광도를 측정함으로써 할 수 있다. 흡광도의 크기와 분석물질의 양은 반비례 관계에 있게 된다.

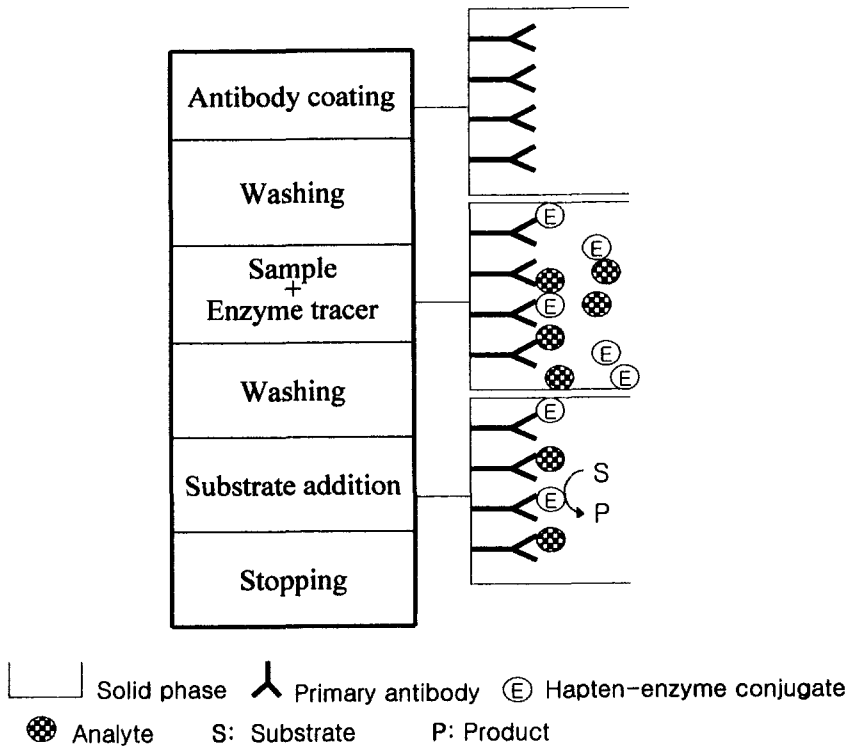


Fig. 2-39. The main steps involved in direct competitive ELISA.

간접 경쟁 ELISA는 고체상에 일정량의 코팅항원을 흡착시킨 후 분석물질과 일정량의 항체를 넣어주면 코팅항원과 분석물질은 항체에 대해서 경쟁적으로 결합한다(Fig. 2-40). 이 때 분석물질의 농도가 높을수록 고정화된 항원에 결합하는 항체의 양은 작아지므로 결합한 항체를 정량함으로써 분석물질을 정량할 수 있다. 코팅항원에 결합하지 않은 물질을 제거한 후 효소가 결합된 immunoglobulin(분석물질의 항체에 대한 항체)을 넣어 항체에 결합시킨 다음 기질을 넣어 흡광도를 측정한다. 흡광도의 크기와 분석물질의 양은 반비례 관계에 있다.

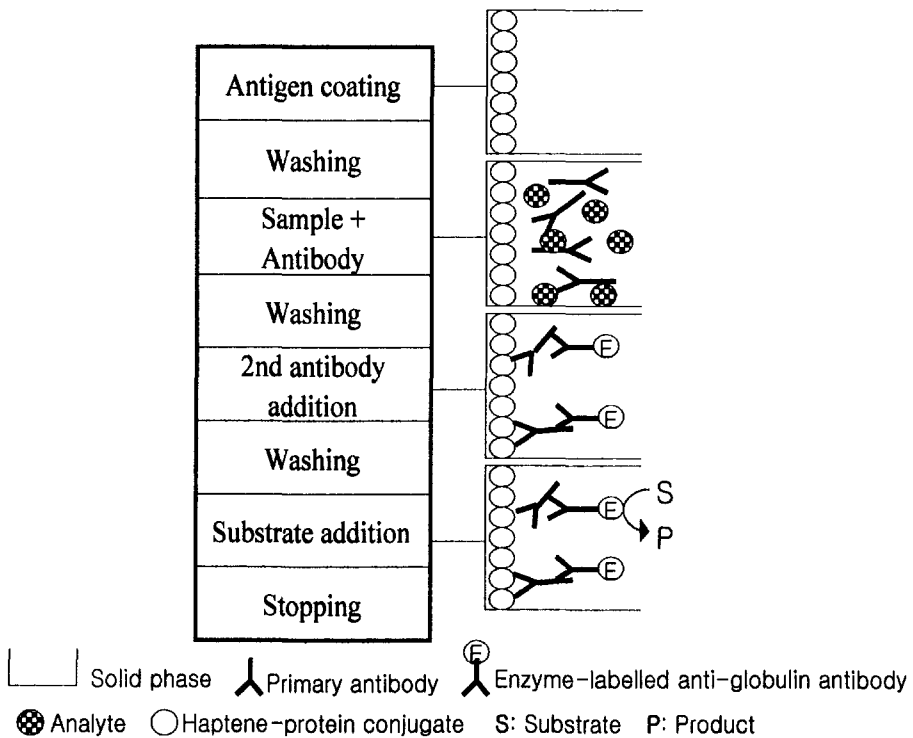


Fig. 2-40. The main steps involved in indirect competitive ELISA.

농약검출을 위한 ELISA의 개발과정을 도식화하면 Fig. 2-41과 같다.

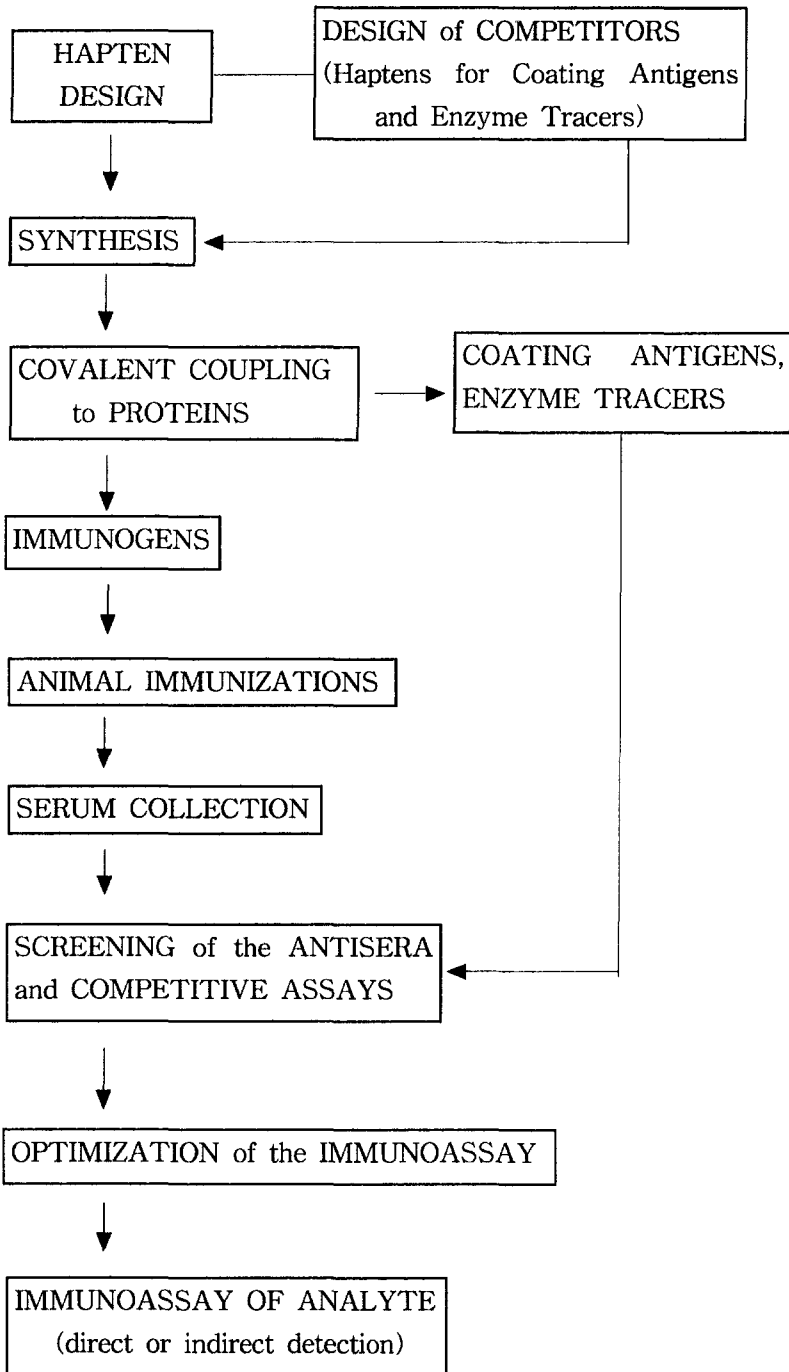


Fig. 2-41. The main steps involved in ELISA development.

1. Fenthion의 hapten, 면역원 및 코팅항원 합성

농약과 같은 저분자 물질은 그 자체로서 면역원이 될 수 없기 때문에 항체를 생성할 수 없다. 따라서 농약과 구조가 비슷한 물질을 합성하여 단백질에 결합시키고 이것을 면역원으로 하여 항체를 얻어야 한다. Hapten의 디자인과 합성은 저분자 물질의 ELISA 개발에서 가장 중요한 단계라고 볼 수 있는데 그 이유는 hapten의 구조가 생성된 항체의 특이성(specificity)과 반응성을 결정하는 직접적인 인자이기 때문이다(Marco, 1995).

Hapten의 구조는 분석물질의 항원결정인자(antigenic determinant)가 가능한 한 보존되도록 해야 한다. 특히 heteroatom을 포함하는 부위는 항원성이 크므로 보존되도록 하는 것이 좋다. Hapten과 단백질을 연결시키는 부위 즉 bridge의 구조와 길이도 항체 생성에 영향을 미친다(Harrison, 1991, Vallejo, 1982, Schneider, 1992). 일반적으로 bridge의 길이가 길수록 분석물질에 대한 친화도가 더 큰 항체가 생성되는 것으로 보고되어 있는데 그 이유는 hapten의 항원결정인자가 단백질의 3차원적 구조에 의해 가려지지 않고 면역계에 잘 노출되기 때문이다. 그러나 bridge의 길이가 너무 길 경우 (>7 atoms) hapten이 접혀짐으로써(folding) 면역계에 대한 hapten의 노출이 감소될 수 있다(Marco, 1995). 본 연구에서는 면역원과 코팅항원 hapten으로 fenthion의 phenol 부위는 보존시키고 methoxy기 중 하나를 bridge group으로 치환시킨 것을 사용하고자 한다. 이러한 구조에 bridge의 구조와 길이가 다른 7종의 hapten을 합성하여 면역원 혹은 코팅항원 제조에 사용하고자 한다.

Hapten을 단백질에 결합시키는 방법으로서 hapten의 carboxy기와 단백질의 amino기를 축합시키는 방법이 가장 흔히 사용되며, carboxy기를 N-hydroxysuccinimide/DCC로 활성화시키거나(active ester 법) isobutyl

chloroformate로 활성화시켜(mixed anhydride 법) 단백질에 결합시키는 것이 보통이다(Hosoda, 1993). 본 연구에서는 active ester 방법을 사용하여 hapten을 단백질에 결합시키고자 한다.

가. 실험내용 및 방법

1) 시약 및 실험재료

Hapten 합성에 사용한 시약인 β -alanine, 4-aminobutyric acid, 5-aminovaleric acid, 6-aminocaproic acid, 7-aminoheptanoic acid, methyl-3-hydroxy benzoate, methyl-4-hydroxy benzoate, phosphorous thiochloride와 NMR 용매인 chloroform-*d*(99.8%, 0.3% TMS 함유)는 Aldrich사로부터 구입하였다. Analytical TLC plate(silica gel F254, fluorescent, plastic, 20×20 cm)와 preparative TLC plate(silica gel 60, fluorescent, 1 mm, 20×20 cm)는 Merck사 제품을 사용하였다.

Hapten-단백질 conjugate 합성에 필요한 시약인 *N*-hydroxysuccinimide, 4-dimethylaminopyridine, *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide는 Aldrich사에서, conjugate 정제시 사용한 sephadex G25는 Sigma사에서, 투석막(MW cutoff 12,000-14,000)은 Spectra/Por에서 구입하였다.

NMR spectrometer는 Bruker(300 MHz)사의 것을 사용하였으며 GC/MS의 GC 기기는 Hewlett-Packard 5890 Series II를 HP 5971 mass spectrometric detector에 연결한 것이었으며 column은 HP-1 capillary column을 사용하였고 carrier 기체는 25 psi의 He이었다. Oven 온도는 1분간 100℃를 유지하다가 그 후 20℃/min 속도로 250℃까지 올렸고 시료주입은 split mode(1/100)로 하였다.

2) Hapten 합성

본 실험에서 합성한 fenthion hapten의 구조는 Fig. 2-42와 같으며 합성 과정의 도식도는 Fig. 2-43~45와 같다.

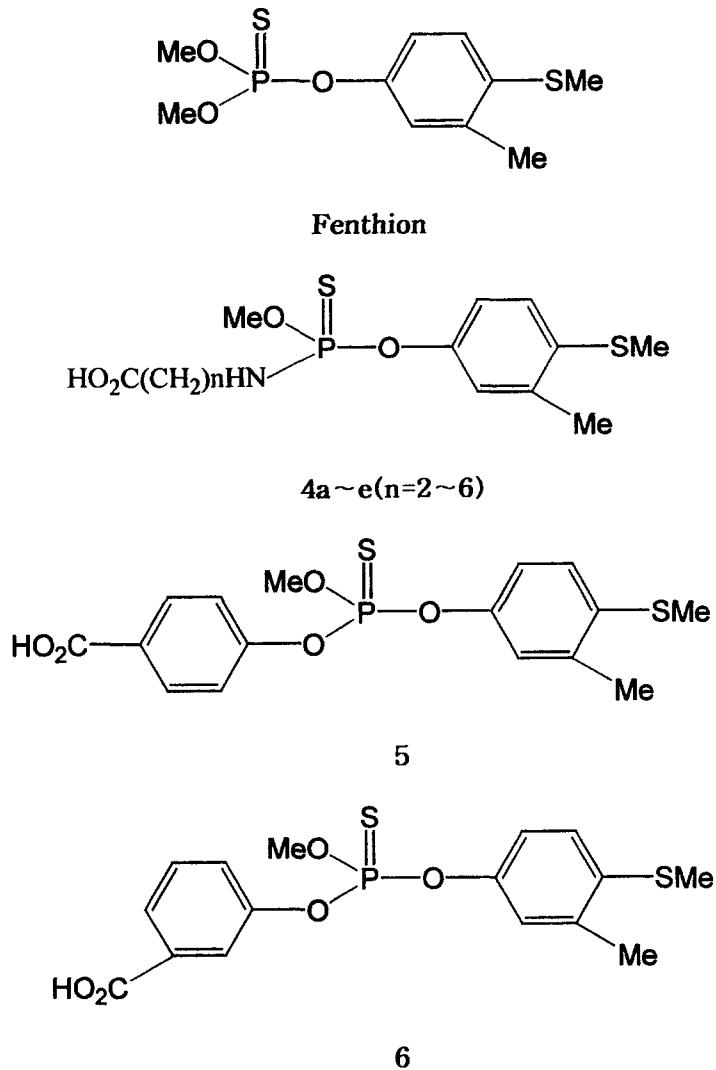


Fig. 2-42. Structures of haptens for fenthion.

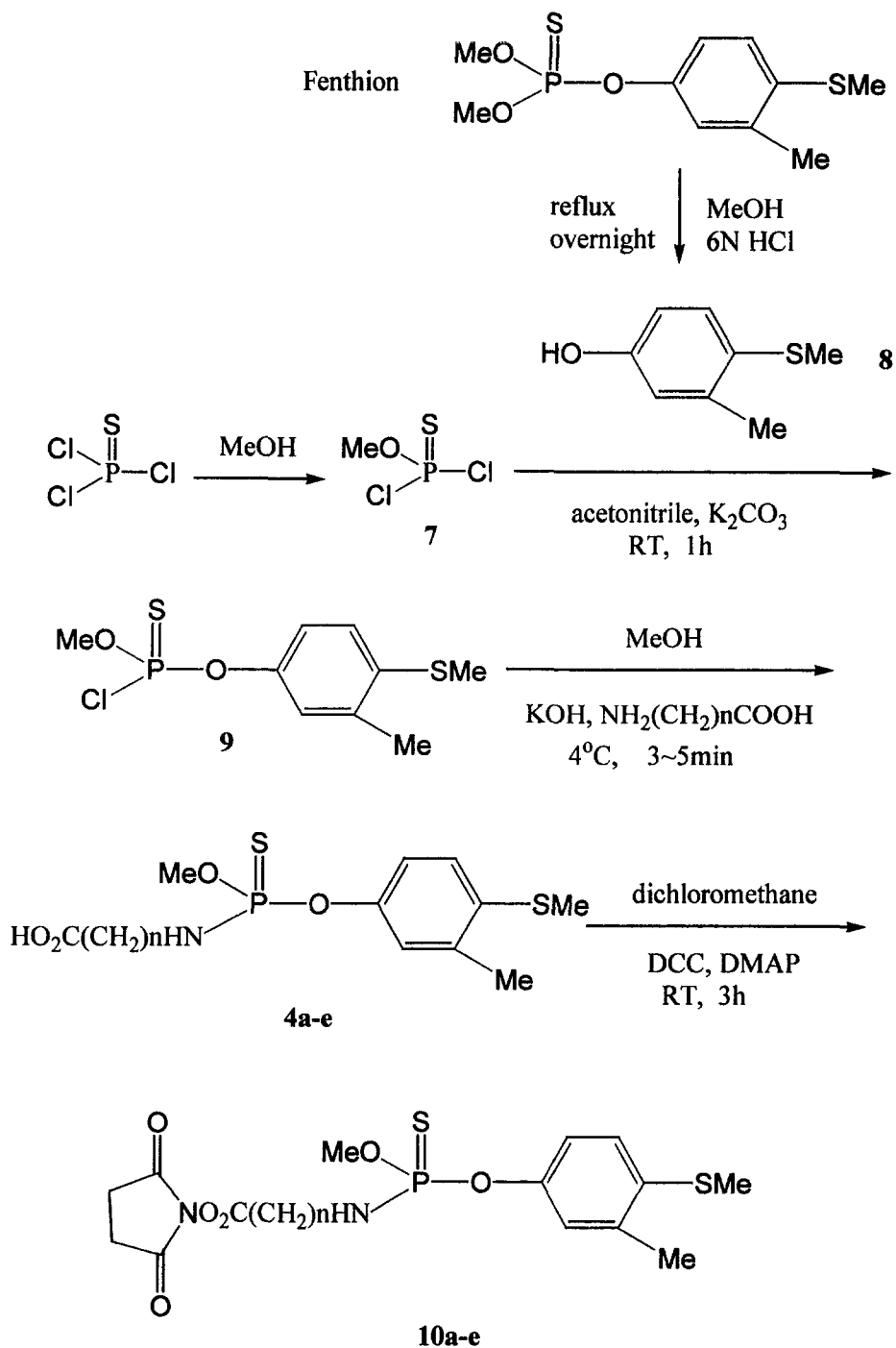


Fig. 2-43. Synthetic routes for hapten **4a~e**.

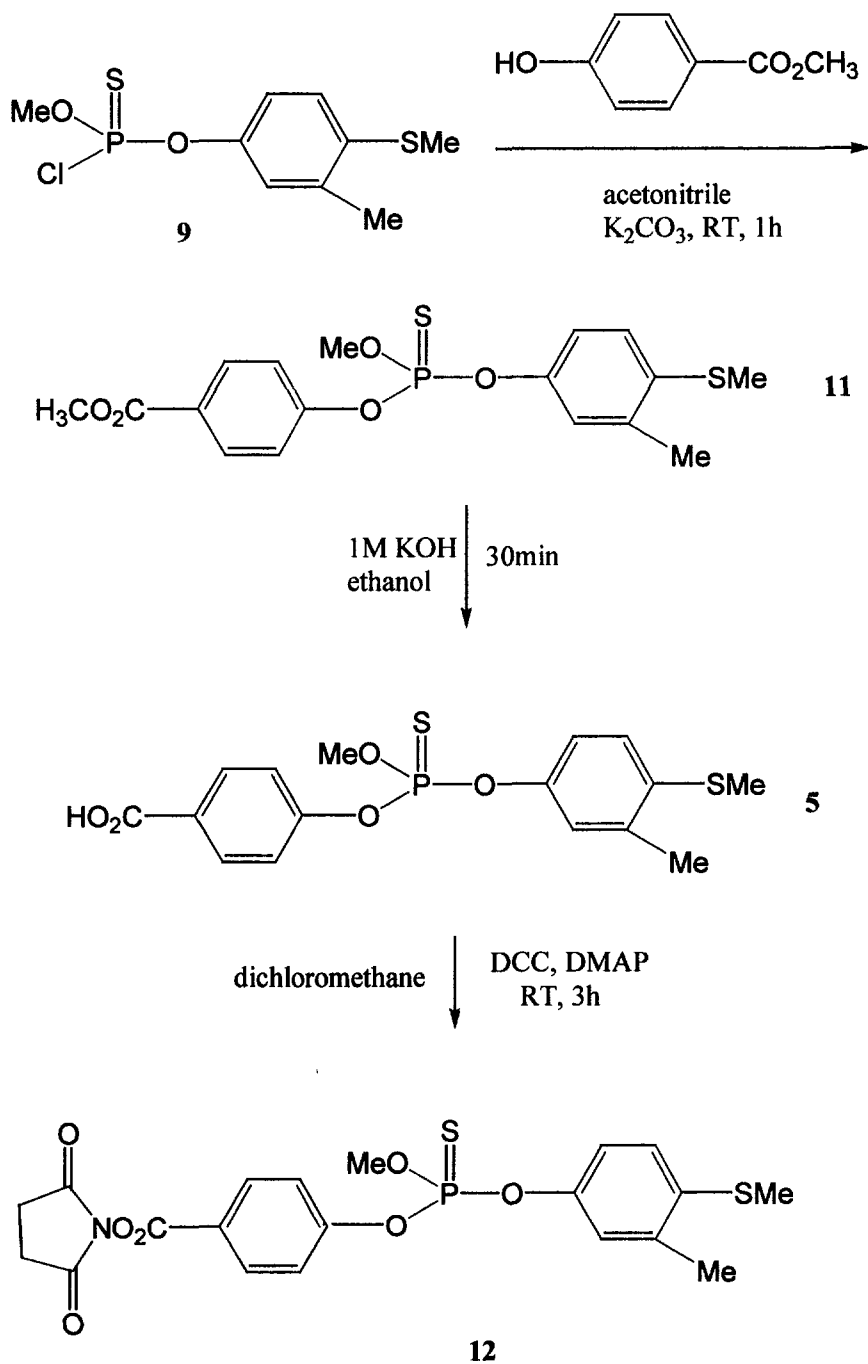


Fig. 2-44. Synthetic routes for hapten 5.

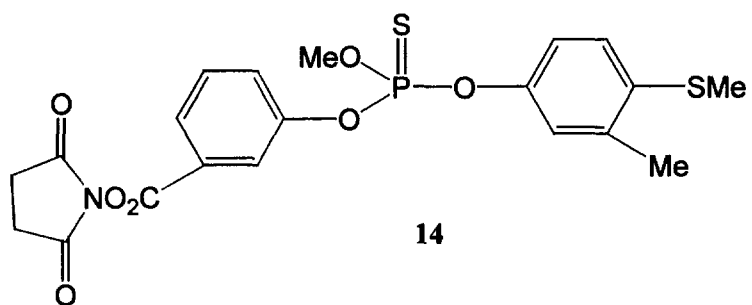
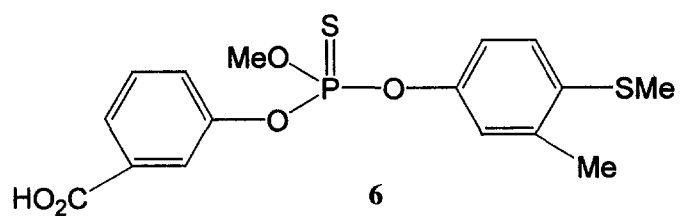
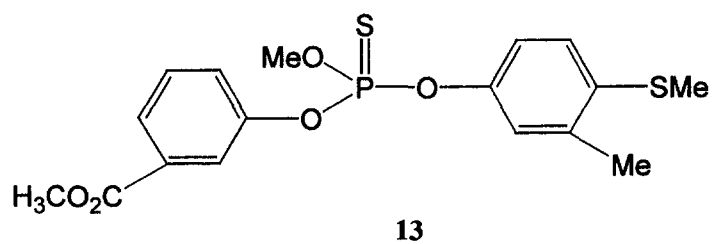


Fig. 2-45. The intermediate and product in the synthesis of hapten 6

각 반응의 종결은 analytical TLC(silica gel)로 확인하였고 생성물의 동정은 ^1H 및 ^{13}C NMR(300MHz)과 GC/MS로 하였다. 합성과정은 아래와 같다.

(7)

Phosphorous thiochloride 14 mL(23.35 g, 0.14 mol)에 10배 몰의 methanol (57 mL)을 8~10°C에서 20분 동안 떨어뜨리면서 교반하고 그 후 10분간 더 교반하였다(Tarbor, E.J., U.S. Patent 3,-005,005). 반응용액에 증류수와 ether를 넣어 생성물을 추출하고 ether층을 증류수로 2번 더 씻어 준 다음 MgSO_4 로 탈수시켰다. Rotary evaporator를 이용해서 용매를 휘발시켜 oil 상태의 생성물 16.47 g을 얻었다. 수득율 72%

(8)

Fenthion 24 g을 methanol(1 L)과 6N HCl(1 L)에서 24시간 동안 reflux시킨 다음 생성물을 benzene으로 추출하였다. 추출액을 증류수로 2번, brine으로 2번 씻은 후 MgSO_4 로 탈수시켰다. 용매를 휘발시키고 column chromatography(silica gel, benzene/ethyl acetate=5:1)로 정제해서 oil 상태의 생성물 6.48 g을 얻었다. 수득율 49%

(9)

7.64 g(46.28 mmol)의 화합물 7을 acetonitrile(30 mL)에 용해시키고 잘게 부순 K_2CO_3 (45 g)와 acetonitrile(30 mL)에 녹인 6.45 g(42.07 mmol)의 화합물 8을 넣은 후 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응용액을 celite를 이용해서 여과하고 여액의 용매를 휘발시킨 후 column chromatography(silica gel, benzene/hexane=1:1)로 분리하여 oil 형태의 생성물 6.47 g을 얻었다. 수득율 55%

(4a)

587 mg(2.1 mmol)의 화합물 9를 methanol(3 mL)에 녹인 용액을 얼음물

(4℃)로 냉각시키면서 KOH(321 mg, 5.72 mmol), β -alanine(232 mg, 2.6 mmol)을 녹인 methanol 용액(1.7 mL)을 떨어뜨리면서 3~5분 동안 교반하였다. 반응용액을 여과시켜 KCl을 제거하고 1 N HCl과 chloroform을 넣어 생성물을 추출한 다음 MgSO₄로 탈수시켰다. 용매를 휘발시키고 column chromatography(silica gel, chloroform/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1)로 정제해서 oil 상태의 생성물을 441 mg 얻었다. 수득율 63%

(4b~4e)

생성물 4b~e의 합성과정은 4a의 그것과 동일하였으며 각각의 수득율은 66, 77, 75, 27%이었다.

(11)

507 mg(1.80 mmol)의 화합물 9와 methyl-4-hydroxybenzoate(274 mg, 1.80 mmol)를 acetonitrile에 녹인 용액(5 mL)에 잘게 부순 K₂CO₃(1.5 g)를 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 여과시켜 KCl을 제거하고 용매를 휘발시켰다. Column chromatography(silica gel, benzene/ethyl acetate=10:1)로 생성물을 분리하여 oil 형태의 생성물을 502 mg 얻었다. 수득율 63%

(5)

184 mg(0.46 mmol)의 화합물 11을 1 M KOH(9 mL), ethanol(23 mL)에서 30분 동안 실온에서 가수분해시킨 후 1 N HCl(11 mL)과 ethyl acetate로 생성물을 추출하였다. 1 N HCl로 2번 씻고 MgSO₄로 탈수시킨 다음 용매를 휘발시키고 생성물 132 mg을 얻었다. 수득율 75%

(13, 6)

화합물 13의 합성과정은 11의 그것과 동일하였고, 화합물 6의 합성과정은 5의 그것과 동일하였다. 13과 6의 수득율은 각각 60, 60%이었다.

3) Hapten-protein conjugate의 합성

Hapten-protein conjugate의 단백질로서 bovine serum albumin(BSA)과 ovalbumin(OVA) 및 giant keyhole limpet의 hemocyanin(KLH)을 사용하였으며 BSA와 KLH conjugate는 면역원으로, OVA conjugate는 코팅항원으로 사용하였다. Conjugation 방법은 각 hapten을 *N*-hydroxysuccinimide와 carbodiimide를 사용하여 반응성이 큰 ester로 만들어 단백질과 결합시키는 active ester 방법을 사용하였다. 각 화합물의 합성과정은 동일하였다.

(10a)

Dichloromethane(15 mL)에 *N*-hydroxysuccinimide(108 mg, 0.94 mmol)를 용해시킨 후 소량의 dichloromethane에 녹인 화합물 **4a**(286 mg, 0.85 mmol), 4-dimethylaminopyridine(DMAP, 10 mg, 0.085 mmol) 그리고 *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide(DCC, 194 mg, 0.94 mmol)를 차례로 첨가하였다. 반응용액을 실온에서 3시간 동안 반응시킨 다음 여과해서 dicyclohexylurea를 제거하였다. 용매를 휘발시킨 후 생성물은 column chromatography(silica gel, benzene/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1)로 분리한 다음 preparative TLC로 다시 한번 정제하여 생성물을 294 mg 얻었다. 수득율 80%

(10b ~ 10e)

10b~e의 합성과정은 10a의 그것과 동일하였다. 각각의 수득율은 49, 58, 55, 81%이었다.

(12)

Dichloromethane(5 mL)에 *N*-hydroxysuccinimide(21.4 mg, 0.186 mmol)를 용해시킨 후 소량의 dichloromethane에 녹인 화합물 **5**(59.5 mg, 0.155 mmol), DMAP(2 mg, 0.016 mmol) 그리고 DCC(38.4 mg, 0.186 mmol)를 차례로 첨가하였다. 이 반응액을 실온에서 3시간 동안 교반한 다음 여과에

의해 dicyclohexylurea를 제거하였다. 용매를 휘발시킨 후 생성물을 preparative TLC(silica gel, benzene/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1)로 분리하여 생성물 34.3 mg을 얻었다. 수득율 46%

(14)

12의 합성과정과 동일하였다. 수득율 54%

Hapten-단백질 conjugates는 모두 17가지를 만들었다.

(4a-BSA)

0.2 M borate buffer(pH 8.7) 5 mL에 BSA 50 mg(0.00075 mmol)을 용해시킨 후 DMF 1 mL를 떨어뜨리면서 세게 교반시켰다. 6a(19.3 mg, 0.045 mmol)를 0.25 mL DMF에 녹인 후 단백질 용액에 20분에 걸쳐 천천히 떨어뜨렸다. 그 후 실온에서 1시간, 4°C에서 하루밤 교반하였다. 다른 conjugates를 만드는 과정도 위와 동일하였다.

단백질에 결합되지 않은 hapten은 PBS(10 mM, pH 7.4)를 eluant로 한 gel(sephadex G25, 2 g) filtration에 의해 제거하였다. Column으로부터 얻은 용액을 UV spectrometer(278 nm)에서 흡광도를 측정해서 0.1이상의 수치를 나타내는 용액에 대해 hapten-단백질 conjugates가 존재하는 것으로 간주하고 이 용액을 투석(증류수, 4°C, 하루밤)한 다음 동결건조시켜 4°C에서 보관하였다.

나. 결과 및 고찰

1) Hapten 합성

Hapten 합성과정의 중간물질과 최종물질의 ^1H 및 ^{13}C NMR(300 MHz),

GC/MS 레이터는 다음과 같다.

(9)

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 7.16(1H, d, $J=8.6$, Ar), 7.11(1H, d, $J=8.9$, Ar), 7.07(1H, s, Ar), 4.01(3H, d, $J=16.3$, CH_3OP), 2.47(3H, s, SCH_3), 2.35(3H, s, PhCH_3),

GC/MS 282(M^+) t_{R} : 7.61min

(4a)

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 7.13(1H, d, $J=8.8$, Ar), 7.05(1H, d, $J=8.8$, Ar), 7.01(1H, s, Ar), 3.78(3H, d, $J=14.4$, CH_3OP), 3.37(2H, sext, $J=6.6$, NCH_2), 2.62(3H, t, $J=5.9$, CH_2CO), 2.44(3H, s, SCH_3), 2.33(3H, s, PhCH_3); $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 178.14(COOH), 148.14, 138.88, 137.49, 126.15, 122.31, 118.83(Ar), 37.29, 35.67(CH_2), 20.99, 20.76, 15.70(CH_3)

(4b)

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 7.12(1H, d, $J=8.7$, Ar), 7.06(1H, d, $J=8.7$, Ar), 7.01(1H, s, Ar), 3.77(3H, d, $J=14.0$, CH_3OP), 3.32(1H, quin, $J=7.3$, NH), 3.18(2H, sext, $J=7.1$, NCH_2), 2.45(2H, t, $J=7.2$, CH_2CO), 2.43(3H, s, SCH_3), 2.33(3H, s, PhCH_3), 1.85($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 2H, quin, $J=6.7$); $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 179.16(COOH), 148.21, 137.47, 133.82, 126.16, 122.32, 118.83(Ar), 41.15, 30.88, 26.14(CH_2), 20.77, 20.05, 15.71(CH_3)

(4c)

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 7.10(1H, d, $J=8.7$, Ar), 7.04(1H, d, $J=8.7$, Ar), 6.99(1H, s, Ar), 3.75(3H, d, $J=14.0$, CH_3OP), 3.15(1H, quin, $J=7.0$, NH), 3.05(2H, sext, $J=6.9$, NCH_2), 2.42(3H, s, SCH_3), 2.36(2H, t, $J=7.1$, CH_2CO), 2.31(3H, s, PhCH_3), 1.66(2H, m, NHCH_2CH_2), 1.55(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 179.43(COOH), 148.28, 137.48, 133.74, 126.20, 122.52, 118.83(Ar), 41.54, 33.38, 30.65, 21.52(CH_2), 20.77, 20.07, 15.74(CH_3)

(4d)

^1H NMR(CDCl_3) δ 7.13(1H, d, $J=8.7$, Ar), 7.06(1H, d, $J=8.7$, Ar), 7.06(1H s, Ar), 3.77(3H, d, $J=14.0$ CH_3OP), 3.23(1H, quin, $J=7.1$, NH), 3.07(2H sext, $J=6.8$, NCH_2), 2.43(3H, s, SCH_3), 2.33(2H, t, $J=7.2$, CH_2CO), 2.33(3H s, PhCH_3), 1.65(2H, quin, $J=7.6$, NHCH_2CH_2), 1.53(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) 1.40(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 179.87(COOH), 148.29 137.43, 133.70, 126.15, 122.25, 118.82(Ar), 41.73, 33.80, 30.98, 25.91 24.09(CH_2), 20.80, 20.06, 15.71(CH_3)

(4e)

^1H NMR(CDCl_3) δ 7.13(1H, d, $J=8.5$, Ar), 7.06(1H, d, $J=10.0$, Ar), 7.02(1H, s, Ar), 3.77(3H, d, $J=14.0$, CH_3OP), 3.16(1H, m, NH), 3.00(2H, sext, $J=6.5$, NCH_2), 2.44(3H, s, SCH_3), 2.36(3H, t, $J=7.4$, CH_2CO), 2.33(3H, s, PhCH_3), 1.63(2H, m, NHCH_2CH_2), 1.54(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.36(4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 179.54 (COOH), 148.34, 137.49, 133.74, 126.22, 122.35, 118.85(Ar), 41.92, 33.81, 31.09, 28.55, 26.19, 24.44(CH_2), 20.11, 15.77(CH_3)

(11)

^1H NMR(CDCl_3) δ 7.96(2H, d, $J=8.8$, $\text{Ar-CO}_2\text{CH}_3$), 7.17(2H, d, $J=7.3$, $\text{Ar-CO}_2\text{CH}_3$) 7.03(1H, d, $J=8.5$, Ar), 6.94(1H, d, $J=8.7$, Ar), 6.90(1H, s, Ar), 3.86(3H, d, $J=14.1$, CH_3OP), 3.81(3H, s, CO_2CH_3), 2.35(3H, s, SCH_3), 2.23(3H, s, PhCH_3)

(5)

^1H NMR(CDCl_3) δ 8.14(2H, d, $J=8.7$, Ar-COOH), 7.32(2H, d, $J=7.3$, Ar-COOH) 7.14(1H, d, $J=8.5$, Ar), 7.05(1H, d, $J=8.8$, Ar), 7.01(1H, s, Ar), 3.97(3H, d, $J=14.2$ CH_3OP), 2.46(3H, s, SCH_3), 2.34(3H, s, PhCH_3)

(13)

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 7.96~7.50(4H, Ar-COOH) 7.14(1H, d, $J=8.5$, Ar), 7.06(1H, d, $J=8.8$, Ar), 7.02(1H, s, Ar), 3.97(3H, d, $J=14.0$, CH_3OP), 2.46(3H, s, SCH_3), 2.34(3H, s, PhCH_3)

(6)

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 7.96~7.50(4H, Ar-COOH) 7.14(1H, d, $J=8.5$, Ar), 7.06(1H, d, $J=8.8$, Ar), 7.02(1H, s, Ar), 3.97(3H, d, $J=14.0$, CH_3OP), 2.46(3H, s, SCH_3), 2.34(3H, s, PhCH_3)

NMR 및 GC/MS 데이터로부터 생성물이 예상한 바의 화합물이라는 것을 확인할 수 있었다. 각 생성물의 R_f 값은 Table 2-7과 같다.

Table 2-7. TLC R_f values of haptens.

Compound	R_f	Solvent system
Fenthion	0.66	benzene
4a	0.49	chloroform/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1
4b	0.50	chloroform/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1
4c	0.51	chloroform/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1
4d	0.52	chloroform/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1
4e	0.53	chloroform/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1
5	0.43	chloroform/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1
6	0.43	chloroform/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1

2) Hapten-protein conjugate의 합성

Active ester 들의 ^1H 및 ^{13}C NMR(300MHz) 데이터는 다음과 같다.

(10a)

^1H NMR(CDCl_3) δ 7.13(1H, d, $J=8.4$, Ar), 7.05(1H, d, $J=8.4$, Ar), 7.01(1H, s, Ar), 3.78(3H, d, $J=14.1$, CH_3OP), 3.52(2H, sext, $J=6.7$, NCH_2), 3.36(1H, quin, $J=6.6$, NH), **2.87(4H, s, succinyl)**, 2.62(2H, t, $J=5.9$, CH_2CO), 2.44(3H, s, SCH_3), 2.33(3H, s, PhCH_3); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 169.25(COO^-), 167.22(C=O), 148.18, 137.47, 133.89, 126.15, 122.30, 118.81(Ar), 33.48, 25.50, 25.28(CH_2), 20.60, 20.01, 15.67(CH_3)

(10b)

^1H NMR(CDCl_3) δ 7.13(1H, d, $J=8.6$, Ar), 7.06(1H, d, $J=8.6$, Ar), 7.01(1H, s, Ar), 3.79(3H, d, $J=14.0$, CH_3OP), 3.36(1H, quin, $J=6.9$, NH), 3.22(2H, sext, $J=6.6$, NCH_2), **2.85(4H, s, succinyl)**, 2.72(2H, t, $J=7.5$, CH_2CO), 2.44(3H, s, SCH_3), 2.33(3H, s, PhCH_3), 1.98(2H, quin, $J=7.0$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 169.28(COO^-), 168.16(C=O), 148.18, 137.37, 133.74, 126.06, 122.25, 118.80(Ar), 40.69, 27.89, 25.89, 25.44(CH_2), 20.63, 19.95, 15.60(CH_3)

(10c)

^1H NMR(CDCl_3) δ 7.13(1H, d, $J=8.7$, Ar), 7.06(1H, d, $J=8.7$, Ar), 7.02(1H, s), 3.78(3H, d, $J=14.0$, CH_3OP), 3.32(1H, quin, $J=7.2$, NH), 3.12(2H, sext, $J=6.7$, NCH_2), **2.85(4H, s, succinyl)**, 2.65(2H, t, $J=7.1$, CH_2CO), 2.44(3H, s, SCH_3), 2.33(3H, s, PhCH_3), 1.82(2H, m, NHCH_2CH_2), 1.65(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 169.16(COO^-), 168.26(C=O), 148.30, 137.44, 133.71, 126.17, 122.25, 118.82(Ar), 41.34, 30.42, 30.25, 25.49, 21.54(CH_2), 20.97, 20.04, 15.71(CH_3)

(10d)

^1H NMR(CDCl_3) δ 7.13(1H, d, $J=8.5$, Ar), 7.06(1H, d, $J=8.5$, Ar), 7.02(1H s, Ar), 3.78(3H, d, $J=14.0$, CH_3OP), 3.24(1H, quin, $J=7.3$, NH), 3.09(2H sext, $J=6.3$, NCH_2), **2.84(4H, s, succinyl)**, 2.62(2H, t, $J=7.2$, CH_2CO) 2.44(3H, s, SCH_3), 2.33(3H, s, PhCH_3), 1.78(2H, quin, $J=7.4$, NHCH_2CH_2) 1.57(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.49(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 169.25(COO^-), 168.42($\text{C}=\text{O}$), 148.34, 137.48, 133.69, 126.21, 122.30 118.80(Ar), 41.65, 33.64, 30.74, 25.54, 25.31, 24.09(CH_2), 20.65, 20.10 15.76(CH_3)

(10e)

^1H NMR(CDCl_3) δ 7.13(1H, d, $J=8.5$, Ar), 7.07(1H, d, $J=8.5$, Ar), 7.02(1H, s, Ar), 3.77(3H, d, $J=14.0$, CH_3OP), 3.19(1H, quin, $J=7.5$, NH), 3.07(2H, sext, $J=6.8$, NCH_2), **2.84(4H, s, succinyl)**, 2.62(2H, t, $J=7.3$, CH_2CO) 2.44(3H, s, SCH_3), 2.33(3H, s, PhCH_3), 1.73(2H, quin, $J=7.4$, NHCH_2CH_2) 1.60(2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.40(4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)

(12)

^1H NMR(CDCl_3) δ 8.17(2H, d, $J=8.8$, Ar-COOH), 7.36(2H, d, $J=7.3$, Ar-COOH) 7.14(1H, d, $J=8.4$, Ar), 7.02(1H, d, $J=13.5$, Ar), 7.00(1H, s, Ar), 3.97(3H, d, $J=14.2$ CH_3OP), **2.92(4H, s, succinyl)** 2.46(3H, s, SCH_3), 2.34(3H, s, PhCH_3)

(14)

^1H NMR(CDCl_3) δ 8.03~7.36(4H, Ar-COOH), 7.16~7.01(3H, Ar), 3.96(3H, d, $J=14.2$ CH_3OP), **2.92(4H, s, succinyl)**, 2.45(3H, s, SCH_3), 2.34(3H, s, PhCH_3)

NMR 데이터로부터 생성물이 예상한 바의 화합물이라는 것을 확인할 수 있었다. 각 생성물의 R_f 값은 Table 2-8과 같다.

Table 2-8. TLC R_f values of active esters of haptten.

Compound	R_f	Solvent system
10a	0.63	benzene/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1
10b	0.65	benzene/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1
10c	0.67	benzene/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1
10d	0.69	benzene/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1
10e	0.71	benzene/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1
12	0.63	benzene/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1
14	0.63	benzene/ethyl acetate/acetic acid=65:35:1

다. 결론

본 연구에서는 fenthion에 대한 면역원과 코팅항원을 제조하기 위하여 haptten을 7가지 합성하였으며 합성 반응의 모든 생성물의 구조 확인은 ^1H 및 ^{13}C NMR(300MHz), GC/MS로 하였다. 데이터는 바라는 바의 생성물의 구조에 부합하였다.

Fenthion haptten의 구조는 대부분의 유기인계 농약에 공통적인 thiophosphoryl group을 bridge로 치환시킨 구조를 가지고 있다. 따라서 본 연구에서 개발한 fenthion haptten 합성법은 fenthion과 구조가 유사한 많은 다른 유기인계 농약의 haptten 합성에도 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

2. Fenthion의 면역분석법 개발

ELISA에 사용되는 고체상(solid phase)과 효소 및 기질에 대해서 살펴 보면 다음과 같다. 항체 또는 항원을 고정화시키는 고체상 물질로서

polystyrene, polyvinyl, nylon, nitrocellulose, polyacrylamide, agarose 등이 많이 사용되고 있다. 고정화는 고정화되는 분자와 고체상 간의 소수성 상호작용을 통해 물리적으로 이루어질 수도 있고 두 물질간의 공유결합에 의해 이루어질 수도 있다. 소수성 상호작용에 의한 고정화는 항체 또는 항원을 높은 pH(일반적으로 pH 9.6)의 완충액에서 수시간 동안 고체상에 접촉시킴으로써 이루어진다.

고체상에 결합한 물질을 결합하지 않은 물질로부터 분리하는 방법은 고체상의 종류에 따라서 달라진다. 고체 support가 polyacrylamide bead와 같은 입자일 때는 원심분리를 하거나 여과를 하며, iron oxide core를 가지는 자성입자인 경우에는 자장을 이용하여 분리할 수 있고 tube, cuvette, microwell plate 등과 같은 고체상을 사용할 경우에는 세척기(washer)를 사용해서 씻어줌으로써 분리가 가능하다.

면역분석에서 label로서 사용되는 효소는 turnover number가 높고, 순도가 높으며, 안정하고, hapten과 쉽게 결합할 수 있어야 하며, 효소반응의 생성물이 측정가능한 시그널을 나타내어야 한다. 이를 만족시키는 효소로서 alkaline phosphatase, horseradish peroxidase가 EIA에서 가장 광범위하게 사용된다.

Label 효소의 기질은 효소 반응에 의해 유색 또는 형광물질로 전환되는 물질을 사용한다. Peroxidase의 기질로서 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TNB), *o*-phenylene diamine(OPD), 2,2' -azino-(3-ethyl)-benzoesulphonic acid(ABTS) 등이 사용되며 alkaline phosphatase의 기질로는 *p*-nitrophenyl phosphate(p-NPP)가 가장 많이 사용된다(Rittenburg, 1990).

본 연구에서 개발하고자 하는 fenthion ELISA는 그 방식으로 간접 경쟁 방식을 택하였다. 항체-항원 반응 장치로 polystyrene 재질의 96-well microtiter plate를 사용하며 반응 측정기구는 흡광을 측정하는 reader를 사

용한다. Label 효소는 alkaline phosphatase와 horseradish peroxidase를 사용한다.

면역분석법 개발 초기에는 polyclonal 항체(pAb)를 사용하였으나 1975년 Köhler와 Milstein에 의해 monoclonal 항체(mAb) 생성이 가능해짐에 따라 1985년경부터 농약 면역분석에 mAb가 사용되었다(Hennoin, 1998). pAb과 mAb의 우열에 관한 데이터는 지금까지 보고된 바가 거의 없다. 본 연구에서는 pAb를 토끼로부터 얻어 사용하고자 한다.

가. 실험내용 및 방법

1) 시약 및 실험재료

BSA, OVA(A-2512), alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG(A-3687), peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG(A-6154), *p*-nitrophenyl phosphate(N-9389)는 Sigma사에서 구입하였고, KLH는 Calbiochem에서, tetramethylbenzidine은 Boehringer mannheim에서 구입하였다. Microtiter plate는 Nunc(maxisorp, 442404)에서 구입하였다.

교차반응에서 사용한 parathion-methyl, parathion-ethyl, fenitrothion, bromophos-methyl, chlorpyrifos, paraoxon, azinphos-methyl은 Dr. Ehrenstorfer GmbH(Augsburg, Germany)로부터 구입하였다. Fenthion은 농약 제조회사로부터 농약 원액을 얻어 사용하였다.

ELISA Reader는 Bio-Rad사 제품(Model 550)을 사용하였으며 washer는 Nunc 제품을 사용하였다.

2) 면역화

면역화는 다음 과정에 의해 진행하였다. 2~2.5 kg의 뉴질랜드산의 흰색 암컷 토끼에게 PBS(0.5 mL)에 녹인 500 μ g의 면역원을 Freund's complete adjuvant와 부피비 1:1로 유화시켜 토끼 등(back)의 여러 부위(20~25 sites)에 피육주사(intradermal injection) 하였다. 그 후 Freund's incomplete adjuvant를 사용하여 같은 방법으로 2, 6, 10, 14주에 boost시켰다. 주사 7~10일 후에 토끼의 귀 동맥으로부터 혈액을 채취하여 4°C에서 12시간 이상 정치시킨 후 원심분리(3000 rpm, 20분)에 의해 항혈청을 분리하였으며 사용시까지 deep freezer(-70°C)에 보관하였다. 항혈청은 5종의 hapten, 2종의 단백질, 각 면역원에 대해 2마리의 토끼를 사용했으므로 총 20종을 얻었다.

3) 항혈청의 역가 측정

항혈청에 대한 역가(titer)는 비경쟁 간접 ELISA에 의해 다음의 과정으로 측정하였다. 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 녹인 코팅항원(1 μ g/well) 100 μ L를 microtiter plate의 well에서 incubation(4°C, 12시간 이상) 시킨 다음 PBSTA(10 mM phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20 + 0.02% NaN₃)로 5회 세척하였다. 1% gelatin용액 200 μ L를 well에 넣어 blocking(37°C, 1시간) 시킨 후 PBSTA로 1:16000, 1:64000, 1:256000, 1:1024000 배수로 희석한 혈청 100 μ L를 well에서 incubation(37°C, 1시간)시켰다. 세척 후 PBSTA로 희석(1:2000)한 alkaline phosphatase가 결합된 goat anti-rabbit IgG 100 μ L를 well에서 incubation(37°C, 1시간)시켰다. 세척 후 10% diethanolamine buffer(pH 9.8)에 녹인 효소 기질 *p*-nitrophenyl phosphate(1 mg/ml) 100 μ L를 가한 다음 37°C에서 30분간 incubation시켰다. 3 N NaOH용액 50 μ L를 첨가하여 반응을 중단시킨 후

405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 2차원적 항혈청 스크린

가) 코팅단백질에 대한 항혈청의 비특이적 결합 측정

최고의 역가를 나타내는 항혈청의 코팅단백질에 대한 비특이적인 결합의 정도를 비경쟁 간접 ELISA법으로 측정하였다. 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 녹인 OVA(1 μ g/well) 100 μ L를 microtiter plate의 well에서 incubation(4 $^{\circ}$ C, 12시간 이상)시킨 후 세척용액으로 4회 세척하였다. PBST로 희석시킨(1:10000) 항혈청 100 μ L를 넣고 1시간 incubation시킨 다음 세척하였다. PBST로 희석된(1:3000) peroxidase가 결합된 goat anti-rabbit IgG 100 μ L를 넣고 1시간 incubation시켰다. 세척한 다음 기질용액(TMB-1% H₂O₂; 6 mg TMB/mL DMSO 용액 400 μ L, 1% H₂O₂ 100 μ L in 25 mL of 0.1 M sodium acetate, pH 5.5) 100 μ L를 넣은 후, 10분간 incubation시켰다. 2 M H₂SO₄용액 50 μ L를 첨가하여 반응을 중단시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

나) 코팅항원에 대한 항혈청의 친화력 측정

최고 역가를 나타낸 항혈청을 bridge 길이가 다른 5가지의 코팅항원에 대해 비경쟁 간접 ELISA법으로 2차원 스크린을 하였다. 즉, 5가지 코팅항원의 농도를 0, 200, 1000, 5000 ng/mL로 하고, 20가지 항혈청을 1:10000, 1:40000, 1:160000으로 희석시켜 모든 가능한 조합에서 2차원 스크린을 하였으며 그 과정은 다음과 같다. 코팅항원을 incubation하는 과정(4 $^{\circ}$ C)을 제외

한 모든 과정은 실온(20~22℃)에서 행해졌으며 세척용액은 PBST(10 mM PBS + 0.05% Tween20)를 사용하였다. 먼저 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 녹인 코팅항원 100 μ L를 microtiter plate의 well에서 incubation(4℃, 12시간 이상)시킨 후 세척용액으로 4회 세척하였다. 10 mM PBS에 녹인 0.2% ovalbumin 용액으로 blocking(200 μ L/well, 1시간) 한 후 PBST로 희석시킨 항혈청 100 μ L를 넣고 1시간 incubation시켰다. 세척 후 PBST로 희석된(1:3000) peroxidase가 결합된 goat anti-rabbit IgG 100 μ L를 넣고 1시간 incubation시켰다. 다시 세척한 다음 기질용액(TMB-1% H₂O₂; 6 mg TMB/mL DMSO 용액 400 μ L, 1% H₂O₂ 100 μ L in 25 mL of 0.1 M sodium acetate, pH 5.5) 100 μ L를 넣은 후 15분간 incubation시켰다. 2 M H₂SO₄용액 50 μ L를 첨가하여 반응을 중단시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다) Fenthion에 대한 항혈청의 특이성 측정

Fenthion에 대한 항혈청의 특이성(specificity)을 살펴보기 위해 20가지 항혈청(1:10000로 희석)과 bridge group의 길이가 다른 5가지 코팅항원(20 ng/well)을 서로 조합해서 경쟁적 간접 ELISA법으로 스크린을 하였다. 코팅항원을 incubation시키는 과정(4℃)을 제외한 모든 과정은 실온에서 행해졌으며 세척용액은 PBST(10 mM PBS + 0.05% Tween20)를 사용하였다. 그리고 fenthion 표준용액은 10 mg/mL MeOH로 stock 용액을 만든 후 PBS로 묽혀 100 ppm(10% MeOH-PBS) 농도의 용액을 만들고 이것을 10% MeOH-PBS로 10배씩 묽혀 낮은 농도의 용액을 만들었다. 먼저 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 녹인 코팅항원 100 μ L를 microtiter plate의 well에서 incubation(4℃, 12시간 이상) 시킨 후, 세척용액

으로 4회 세척하였다. 1% ovalbumin 용액(in 10 mM PBS)으로 blocking(200 μ L/well, 1시간)한 후 세척하였다. Fenthion 표준용액($10^2 \sim 10^{-3}$ μ g/mL) 50 μ L를 첨가한 후 바로 항혈청 50 μ L를 넣고 30분 incubation시켰다. 세척 후, PBST로 희석된(1:5000) peroxidase가 결합된 goat anti-rabbit IgG 100 μ L를 넣고 1시간 incubation시켰다. 세척한 다음 기질용액(TMB-1% H₂O₂; 6 mg TMB/mL DMSO 용액 400 μ L, 1% H₂O₂ 100 μ L in 25 mL of 0.1 M sodium acetate, pH 5.5) 100 μ L를 넣은 후, 10분간 incubation시켰다. 2 M H₂SO₄용액 50 μ L를 첨가하여 반응을 중단시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다

5) Fenthion ELISA 수립

가) 코팅항원의 구조가 ELISA에 미치는 영향

Bridge group의 길이와 구조가 다른 7가지의 코팅항원이 ELISA에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 코팅항원의 양과 항혈청의 희석배수는 2차원 스크린에서 결정하였다. ELISA의 과정은 4)의 다)와 유사한 방법(경쟁시간 1시간, 2차 효소 희석배수 1:3000을 제외한 나머지 방법은 같음)으로 하였다. 검량곡선은 % Control 값으로 나타내었으며 다음 식에 의해서 그 값을 구하였다.

$$\% \text{ Control} = (A - A_{\text{background}} / A_{\text{max}} - A_{\text{background}}) \times 100$$

$A_{\text{background}}$: 항혈청이 없을 경우의 흡광도값

A_{max} : 농약이 없을 경우의 흡광도값

나) 시료용액 용매의 종류 및 함량이 ELISA에 미치는 영향

Fenthion 표준용액 제조시 acetone, acetonitrile, methanol 등을 사용하였으며, 각각의 함량을 5%(5% 유기용매-10mM PBS), 10%, 그리고 30%로 해서 표준용액을 만들었다. ELISA의 과정은 5)의 가)와 동일하였다.

다) 경쟁시간이 ELISA에 미치는 영향

Fenthion과 코팅항원이 항체에 대해 경쟁하는 시간을 30분, 60분 그리고 120분으로 하였으며 ELISA의 과정은 5)의 가)와 동일하게 하였다.

라) 교차반응성에 의한 항혈청의 특이성 조사

개발한 ELISA의 fenthion에 대한 특이성을 알아보기 위하여 fenthion과 유사한 구조의 물질들, 즉 다른 유기인계 농약에 대한 항혈청의 반응성을 조사하였다. 교차반응성은 다음 식에 의해서 %로 나타내었다.

$$\text{Cross-Reactivity(\%)} = (\text{IC}_{50} \text{ of fenthion} / \text{IC}_{50} \text{ of other compound}) \times 100$$

: 50%를 저해시키는 농도

나. 결과 및 고찰

1) 면역화 및 항혈청의 역가 측정

Fenthion에 대한 polyclonal 항체를 생성하기 위해 토끼에게 10종의 면역원(4a~e)을 피육주사(intradermal injection)하고 4주 간격으로 boost를 실시

하여 얻은 항혈청을 비경쟁 간접 ELISA법으로 역가(titer) 측정을 한 결과는 Table 2-9와 같다.

Table 2-9. Titers of antisera to immunogens, 4a~e-protein.

Immunogen	Antiserum (1:256,000)	Control ¹	1st boost ²	2nd boost ²	3rd boost ²	4th boost ²	5th boost
4a-BSA	593	0.178	0.232	1.274	1.223		
	581	0.175	0.004	0.920	1.436	2.778	1.567
4b-BSA	228	0.195	0.035	0.481	1.089	2.607	1.403
	445	0.152	0.173	0.630	1.191	1.735	1.348
4c-BSA	976	0.128	0.027	0.584	0.739	1.202	1.136
	834	0.230	0.150	1.164	1.008		
4d-BSA	657	0.130	0.023	0.566	1.576	1.581	1.455
	334	0.129	0.005	0.131	0.026	0.629	0.776
4e-BSA	799	0.154	0.016	0.378	0.805	1.534	1.138
	325	0.162	-0.028	0.235	0.256	0.430	0.797
4a-KLH	663	0.149	0.024	0.366	1.434	0.139	
	478	0.172	0.025	0.056	0.429	0.247	
4b-KLH	946	0.184	0.081	0.421	1.191	0.530	
	237	0.148	0.068	0.704	1.236	0.479	
4c-KLH	748	0.138	0.046	1.256	1.302		
	314	0.289	0.070	0.508	1.209	0.630	
4d-KLH	582	0.133	0.181	0.865	1.681	0.446	
	821	0.149	0.102	0.301	1.196	0.470	
4e-KLH	795	0.128	0.030	0.372	1.192	0.468	
	122	0.151	0.103	0.272	1.978	0.775	

¹: average A of control sera, ²: A of serum-A of control serum
absorbance at 405 nm

Control 혈청 즉, 면역화하기 전의 혈청은 fenthion에 대한 역가가 거의

없는 것으로 나타났으며 boost가 진행될수록 항혈청의 흡광도값은 증가하였고 면역원 4a~e-BSA에 대해서는 대부분 4차 boost에서 또는 2차, 5차 boost에서, 면역원 4a~e-KLH에 대해서는 3차 boost에서 최대 역가를 보였다.

면역분석에서 항체는 분석의 민감도와 선택성에 큰 영향을 미치므로 면역화 과정에서 분석물질에 대한 질(quality) 높은 항체를 얻는 것은 매우 중요하다. 일반적으로 항체의 질은 실험동물의 면역 system, 면역원, 면역 protocol 등에 의해 영향을 받는데(Marco, 1995) 본 실험에서도 같은 면역원에 대해서 항혈청의 역가가 다르게 나타난 것은 아마도 실험동물의 면역 system 차이에 따른 것으로 생각된다.

2) 2차원적 항혈청 스크린

가) 코팅단백질에 대한 항혈청의 비특이적 결합 측정

코팅단백질에 대한 항혈청의 비특이적인 결합을 측정한 결과는 Table 2-10과 같다. 비특이적인 결합은 거의 없는 것으로 나타났다.

Table 2-10. Non-specific binding of antiserum to coating protein, OVA

Anti-serum	593	581	228	445	976	834	657	334	799	325
O. D.*	0.222	0.115	0.154	0.066	0.061	0.077	0.149	0.059	0.079	0.059
Anti-serum	663	478	946	237	748	314	582	821	795	122
O. D.	0.070	0.078	0.074	0.077	0.060	0.064	0.066	0.075	0.073	0.076

* : absorbance at 450 nm

나) 코팅항원에 대한 항혈청의 친화력

본 연구에서 얻은 20가지 항혈청을 hapten과 단백질 사이의 bridge의 길이가 다른 5가지의 코팅항원에 대해 스크린한 결과는 Table 2-11과 같다.

Table 2-11. Titer values of antisera against 5 different coating antigens.

Immunogen	Antiserum (1:40000)	Recognition for coating antigen(A*)				
		Coating antigen(500 ng)				
		4a-OVA	4b-OVA	4c-OVA	4d-OVA	4e-OVA
4a-BSA	593	1.07	1.02	0.95	0.75	0.62
	581	1.19	1.24	1.16	1.20	1.29
4b-BSA	228	1.12	1.17	1.03	0.72	0.68
	445	0.74	0.83	0.82	0.76	0.80
4c-BSA	976	0.75	0.78	0.78	0.54	0.45
	834	0.85	0.97	1.08	1.01	0.98
4d-BSA	657	0.92	0.94	0.72	0.64	0.60
	334	0.32	0.39	0.40	0.40	0.35
4e-BSA	799	0.81	0.78	0.70	0.58	0.58
	325	0.65	0.79	0.84	0.84	0.80
4a-KLH	663	0.57	0.56	0.53	0.46	0.38
	478	0.59	0.54	0.51	0.47	0.38
4b-KLH	946	0.67	0.73	0.64	0.55	0.52
	237	1.13	1.14	1.03	0.96	0.81
4c-KLH	748	0.74	0.79	0.71	0.58	0.53
	314	0.31	0.30	0.31	0.29	0.23
4d-KLH	582	0.72	0.71	0.59	0.61	0.50
	821	0.86	0.89	0.80	0.84	0.76
4e-KLH	795	0.70	0.70	0.60	0.58	0.55
	122	0.68	0.81	0.77	0.75	0.70

*: absorbance at 450 nm

대부분의 항혈청이 bridge 길이가 다른 5가지의 코팅항원 모두에 대해서 친화력이 큰 것으로 나타났다. 1:40000으로 희석시킨 항혈청이 보통의 스크린 조건에서 1.00에 가까운 흡광도를 나타낸다는 것은 항원에 대한 항체의

친화력이 매우 높다는 것을 나타낸다.

코팅항원의 bridge 길이에 따른 항혈청의 친화력을 살펴보면 homologous한 조합에서 더 큰 친화력을 보이는 경향성을 나타내었다. 즉 항혈청 593, 228, 445 976, 834, 663, 478, 946, 237 등에서는 면역원의 bridge 길이와 같은 bridge 길이를 가진 코팅항원에 대해서 항혈청의 친화력이 더 컸으며 그 길이의 차이가 클수록 친화력은 감소하였다. 이 결과로 볼 때 bidge 길이의 동질성은 항원과 항체의 결합력에 영향을 미침을 알 수 있다. Harrison 등(1991)의 연구에서도 항혈청 스크린에서 17가지의 모든 항혈청이 heterologous한 조합에 비해 homologous한 조합에서 더 큰 역가를 보였다. 그러나 그 차이가 그다지 크지 않는 것으로 보아 bridge group은 중요한 항원결정인자는 아니라고 볼 수 있다.

다) Fenthion에 대한 항혈청의 특이성

Fenthion에 대한 항혈청의 특이성(specificity)을 살펴보기 위해 20가지 항혈청과 5가지 코팅항원을 서로 조합해서 경쟁적 간접 ELISA법으로 스크린해 보았으며 그 결과는 Table 2-12와 같다.

본 실험에서는 대부분의 조합에서 IC_{50} 값이 10 ppm($\mu\text{g}/\text{mL}$)이하로 나타났다. 역가 측정시 큰 역가를 보인 항혈청이라도 homologous함으로 해서 경쟁적 ELISA에서 좋은 결과를 보이지 않는다는 보고가 있다(Harrison, 1991). Harrison 등(1989)의 연구에서도 역가 측정시에는 homologous한 조합에서 항체의 코팅항원에 대한 친화력이 더 컸지만 경쟁적 ELISA에서는 heterologous한 조합에서 IC_{50} 값(0.9 ppm)이 21배 정도 낮게 나타났다. 간접 경쟁 ELISA에서는 코팅항원 뿐만 아니라 분석물질에 대한 항체의 친화력도 중요한데 그 이유는 코팅항원에 대한 항체의 친화력보다 분석물질에 대

한 항체의 친화력이 더 클 경우 민감도가 향상되기 때문이다(Harrison, 1991). 그러나 본 실험의 결과는 bridge 길이의 이질성이 fenthion에 대한 민감도에 별 영향을 미치지 않는다는 것을 말해준다.

Table 2-12. Screening for inhibition for fenthion.

Immunogen	Antiserum (1:10000)	Inhibition for coating antigen(IC ₅₀ , µg/mL)				
		Coating Ag(20 ng/well)				
		4a-OVA	4b-OVA	4c-OVA	4d-OVA	4e-OVA
4a-BSA	593	16	4	-	-	9
	581	3	3	4	3	1
4b-BSA	228	4	4	3	11	72
	445	5	12	3	4	1
4c-BSA	976	2	3	3	39	2
	834	2	-	6	5	3
4d-BSA	657	4	3	10	11	7
	334	7	-	6	9	3
4e-BSA	799	1	4	3	5	-
	325	1	5	-	4	1
4a-KLH	663	6	3	4	5	2
	478	6	9	1	7	0.9
4b-KLH	946	9	5	3	3	2
	237	5	7	6	5	7
4c-KLH	748	4	3	3	4	3
	314	0.6	3	4	4	6
4d-KLH	582	10	6	7	10	19
	821	3	3	6	5	3
4e-KLH	795	0.4	2	2	8	-
	122	2	3	7	7	20

-: higher than 100

3) Fenthion ELISA 수립

가) 코팅항원의 구조가 ELISA에 미치는 영향

코팅항원의 bridge group의 구조와 길이가 ELISA의 민감도에 미치는 영향에 대한 결과는 Fig. 2-46과 같다.

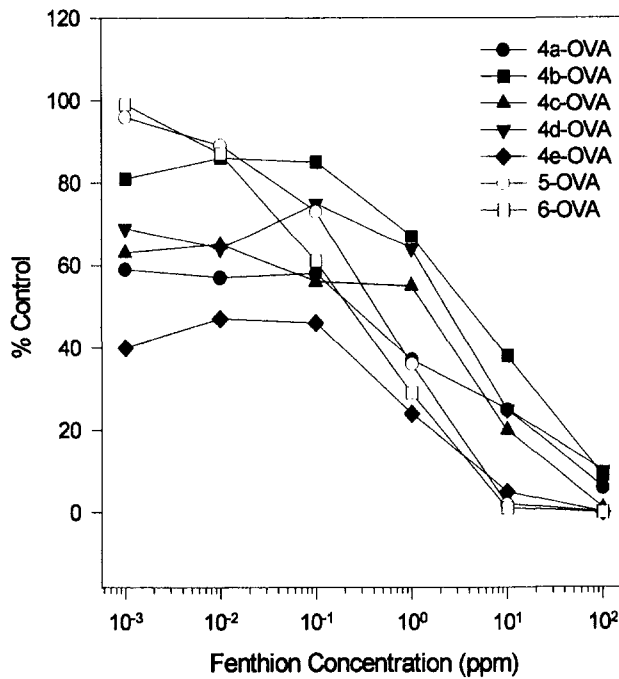


Fig. 2-46. Effect of length and structure of bridge group in coating antigens on the slope and sensitivity of ELISA : antiserum, 4b-KLH, 237, 1:10000 ; coating antigens 4a~e-OVA, 20 ng/well, 5, 6-OVA, 125 ng/well.

면역원과 코팅항원 사이의 bridge group의 길이보다는 구조의 이질성이

민감성 향상에 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이것은 면역원의 bridge group의 구조와 상이한 구조를 가진 코팅항원에 대한 항체의 친화력이 감소함으로 인해 민감도가 향상된 것으로 판단된다. 6-OVA를 코팅항원으로 사용했을 경우 민감성이 가장 좋았고 IC₅₀값도 0.29 ppm으로서 가장 낮았다. 이 표준곡선은 우리나라에서 설정한 fenthion에 대한 허용기준(0.1 혹은 0.05 ppm)을 정량할 수 있음을 나타낸다.

나) 유기용매의 종류 및 함량이 ELISA에 미치는 영향

유기용매의 종류와 함량이 ELISA에 미치는 영향에 대한 결과는 Fig. 2-47~49와 같다.

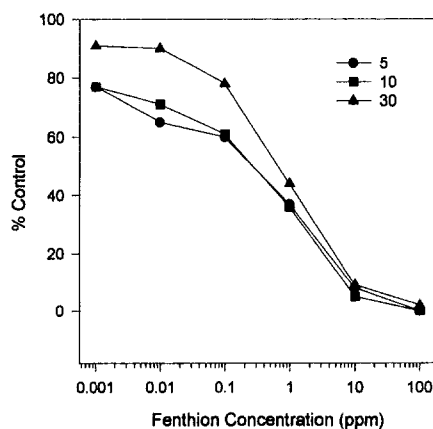


Fig. 2-47. Effect of methanol concentrations(v/v %) in fenthion standard solutions on fenthion ELISA : antiserum, 4b-KLH, 237, 1:10000 ; coating antigen, 6-OVA, 125 ng/well.

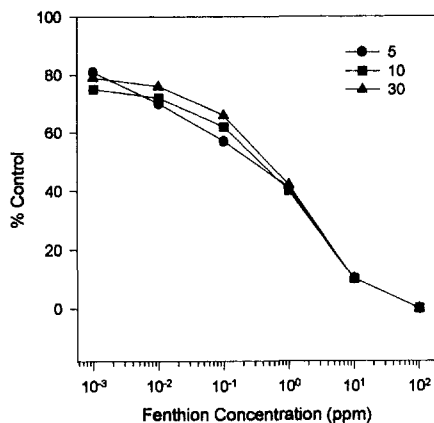


Fig. 2-48. Effect of acetonitrile concentrations(v/v %) in fenthion standard solutions on fenthion ELISA : antiserum, 4b-KLH, 237, 1:10000 ; coating antigen, 6-OVA, 125 ng/well.

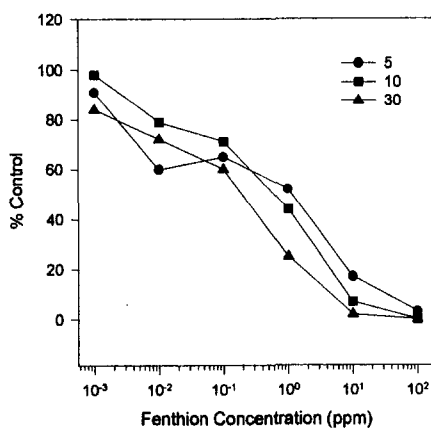


Fig. 2-49. Effect of acetone concentrations(v/v %) in fenthion standard solutions on fenthion ELISA : antiserum, 4b-KLH, 237, 1:10000 ; coating antigen, 6-OVA, 125 ng/well.

Methanol 함량이 5%와 10%의 경우에는 차이가 거의 나타나지 않았으나 30%의 경우에는 IC₅₀값이 조금 높아졌다. Acetonitrile의 경우 30%까지 사용하여도 fenthion에 대한 ELISA의 민감성에는 큰 영향을 미치지 않았다. Methanol, acetonitrile과는 달리 acetone의 경우 30%일 때 IC₅₀값이 가장 낮았다.

다) 경쟁시간이 ELISA에 미치는 영향

코팅항원과 fenthion의 항체에 대한 경쟁시간이 ELISA에 미치는 영향에 대한 결과는 Fig. 2-50과 같다.

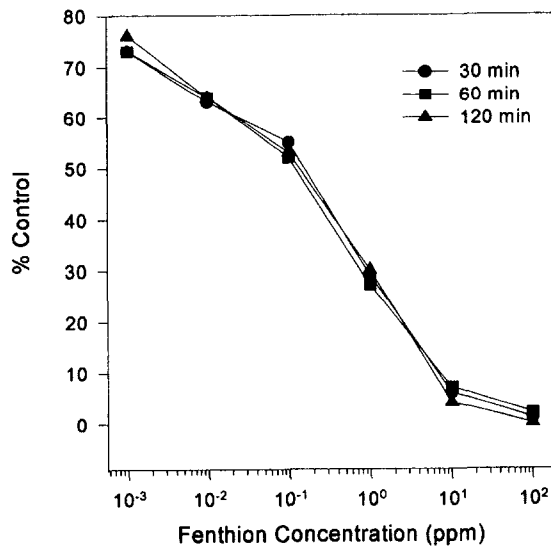


Fig. 2-50. Effect of incubation time on ELISA : antiserum, 4b-KLH 237, 1:10000 ; coating antigen, 6-OVA, 125 ng/well.

경쟁시간을 30분, 60분, 120분으로 했을 때 이것이 ELISA의 민감성에는 큰 영향을 미치지 않았으며 IC_{50} 값도 0.56, 0.43, 0.48로 거의 차이를 보이지 않았다. 위 결과로부터 분석시간을 최소화하기 위해서는 경쟁시간을 한시간 이하로 하는 것이 적당하다고 판단된다.

라) 교차반응성에 의한 항혈청의 특이성 조사

Fenthion에 대한 항혈청의 특이성을 알아보기 위해 fenthion과 유사한 구조를 가진 다른 유기인계 농약들에 대한 교차반응성을 조사하였으며 그 결과는 Table 2-13과 같다.

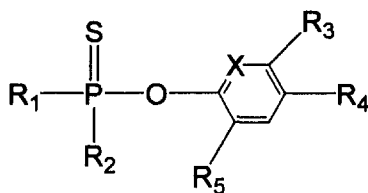
Parathion-ethyl, fenitrothion 그리고 parathion-methyl에 대해서는 낮은 교차반응성을 보였고 다른 농약들에 대해서는 교차반응성을 거의 나타내지 않았다. 따라서 본 연구에서 생성한 항혈청은 fenthion에 대해 특이성이 높다고 할 수 있으며 ELISA에 의한 fenthion의 정량분석은 선택성이 매우 높다고 판단된다.

다. 결론

본 연구에서는 유기인계 농약의 일종인 fenthion에 대한 면역분석법(간접 경쟁 ELISA)을 개발하였다. Bridge group의 길이가 다른 5가지 hapten에 단백질(BSA, KLH)을 결합해서 면역원을 만들고 이것을 토끼에 주사함으로써 fenthion에 대한 polyclonal 항체 20가지를 얻었다. 그리고 bridge group의 길이와 구조가 다른 7가지 hapten에 OVA를 결합시켜서 코팅항원을 만들었다.

간접 ELISA를 이용해서 항혈청의 코팅항원에 대한 친화력과 fenthion에

Table 2-13. Cross-Reactivity of Compounds Structurally Related to Fenthion^a.



Compound	Structure						IC ₅₀ , ppm	CR, ^b %
	R1	R2	X	R3	R4	R5		
Fenthion	MeO	MeO	C	Me	SMe	H	0.29	100
Parathion-ethyl	EtO	EtO	C	H	NO ₂	H	12.33	2.35
Fenitrothion	MeO	MeO	C	Me	NO ₂	H	16.44	1.76
Parathion-methyl	MeO	MeO	C	H	NO ₂	H	18.42	1.57
Bromophos-methyl	MeO	MeO	C	Cl	Br	Cl	224.5	0.13
Chlorpyrifos	EtO	EtO	N	Cl	Cl	Cl	270	0.11
Paraoxon							ni ^c	0
Azinphos-methyl							ni ^c	0

^a antiserum, 4e-KLH, 237, 1:10000 ; coating antigen, 6-OVA, 125 ng/well

^a % cross-reactivity = (IC₅₀ of fenthion/IC₅₀ of other compound) × 100

^c No inhibition.

대한 특이성을 스크린한 결과는 다음과 같았다. 항혈청의 코팅단백질에 대한 비특이적인 결합은 거의 없었으며 1:40000으로 희석시킨 항혈청이 1.00에 가까운 흡광도를 보였으므로 항원에 대한 항체의 친화력은 매우 높았다. 그리고 코팅항원의 bridge 길이에 따른 항혈청의 친화력은 homologous한 조합에서 더 큰 친화력을 보이는 경향성을 나타내었다. 항혈청의 fenthion에 대한 특이성을 살펴보면 대부분의 조합에서 IC₅₀값이 10 ppm($\mu\text{g}/\text{mL}$)이하로 나타났으며 bridge 길이의 heterology는 fenthion에 대한 민감도에 별 영향을 미치지 않았다.

본 실험에서 개발한 fenthion에 대한 간접 경쟁 ELISA의 최적조건은 다음과 같다.

Parameter	Condition
코팅항원	6-OVA(125 ng/well)
항혈청	4b-KLH, 237(1:10000)
Solvent	10 % Methanol PBS
2차 항체	peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (1: 3000)
기질	TMB-1 % H ₂ O ₂
Washing buffer	10 mM PBS(+0.05% Tween 20)로 4회 세척
Incubation 시간	
(코팅항원-well)	하루밤
(경쟁시간)	60 분
(1차Ab-2차Ab)	60 분
(효소-기질)	5~7 분

위의 조건에서 간접 경쟁 ELISA를 한 결과 IC₅₀값은 0.29 ppm이었으며 검량곡선의 직선상의 범위는 10⁻²~10¹ ppm이었다. 따라서 본 연구에서 개발한 ELISA는 우리나라에서 설정한 fenthion에 대한 허용기준(0.1 혹은 0.05 ppm)을 충분히 정량할 수 있는 감도를 가지고 있다.

제4절 잔류농약 분석용 면역센서 개발

최근들어 다양한 광학적, 전기적 변환기의 개발과 이들의 미소제작 (microfabrication) 기술의 발달 그리고 생물학과 생물공학 기술의 발달이 가속화되고 이들 기술의 접목이 이루어짐에 따라 면역센서의 개발은 점차 정교하고 고성능의 형태로 진보되어 왔다. 지금까지는 기초적인 연구에 관심이 집중되어 왔으나 앞으로는 실용적인 측면에서 큰 발전이 이루어질 것으로 전망된다.

본 연구에서는 유기인계 농약의 일종인 fenthion을 분석하기 위한 면역센서를 개발하고자 하였다. 면역센서에 의한 물질분석의 핵심 요소인 항체-항원 반응은 항원 혹은 항체가 고정화된 고체 매트릭스(matrix)의 종류에 따라 여러 가지 다른 방법으로 측정할 수 있는데 전극 혹은 막(membrane)에서는 전위차 혹은 전류, 압전결정(piezoelectric crystal)에서는 진동수, 광측정 장치일 경우에는 광학적 변화로서 측정할 수 있다. 본 연구에서 개발하고자 하는 면역센서는 항체가 결합된 전극에서 이루어지는 면역반응을 전류법으로 측정하는 면역센서와 dipstick형 ELISA이다. 후자의 경우에 면역반응의 결과(효소반응에 의한 색깔 변화)를 전기화학적 혹은 광학적 검출기가 아닌 육안으로 식별하므로 일반적인 센서와 다르지만 육안은 일종의 광학적 검출기임으로 넓은 의미에서 센서라고 볼 수 있다.

면역센서는 면역분석법의 원리를 이용하여 구축할 수 있다. 면역분석법의 다양한 방식 중에서 항체를 고정화시키고 분석물질과 효소 라벨을 붙인 분석물질을 항체에 대해 경쟁시키는 직접 경쟁(direct competitive) 방식의 면역분석법은 면역센서의 구성에 가장 적합한 방식이다. 따라서 먼저 직접 경쟁 방식의 ELISA를 수립하고 이것을 최적화하였으며 그 원리를 dipstick형 ELISA와 전류법 측정 스트립 센서의 개발에 적용하였다.

1. Dipstick형 ELISA

가. 실험 내용 및 방법

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약 및 장치는 다음과 같다. ELISA 개발을 위한 효소 horseradish peroxidase(HRP), protein A(from *S. aureus* cell walls), anti-rabbit IgG(whole molecule)와 blocking을 위한 시약 bovine serum albumin(BSA), casein sodium salt, gelatin은 Sigma사, 발색을 위한 시약 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB)는 Boehringer mannheim사, azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)는 Sigma사로부터 구입하였다. 분석물질인 유기인계 농약 fenthion은 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)로부터 구입하였다. Dialysis membrane은 Spectra/Por사, microplate는 Nunc사의 Maxisorp 제품을, dipstick용 membrane 중 nitrocellulose(0.22 μ m, pore size)와 immoblion(0.45 μ m, pore size)은 Milipore사, biodyne(0.45 μ m, pore size), ultrabind(0.8 μ m, pore size), immunodyne(0.45 μ m, pore size) membrane은 Pall사 제품을 구입하여 사용하였다. 이외 다른 표준물질과 완충용액 등은 특급시약 등급이나 분석시약 등급이었으며, 모든 용액의 제조에는 3차 증류수를 사용하였다.

ELISA 분석을 위한 microplate reader는 Bio-rad model 550을 사용하였으며 세척기는 Nunc사의 immunowasher를 사용하였다.

2) 직접 ELISA 개발

Dipstick형 ELISA는 fenthion의 항체를 고정화시키고 효소 라벨을 붙인 fenthion hapten과 시료 fenthion이 항체에 대해 경쟁적으로 결합하는 직접 경쟁 방식을 채택하였으며 이를 위해서 같은 원리에 근거한 직접 ELISA를 개발하여 dipstick형 ELISA 개발의 기초로 하였다.

가) Hapten-HRP conjugate의 합성

Hapten-라벨 conjugate 합성에 사용한 hapten은 Fig. 2-51에 나타난 화합물들이었으며 conjugation은 active ester 방법을 사용하였다. Conjugate의 라벨로서 HRP를 사용했으며 active ester를 효소에 결합시키는 방법은 다음과 같다. HRP(7.5 mg)를 2.0 mL boric acid buffer(0.2 M, pH 8.0)에 녹인 후 저어주면서 DMF(350 μ L)를 소량씩 떨어뜨렸다. 여기에 50 μ L의 DMF에 녹인 hapten 4c의 active ester(60배 몰수)를 소량씩

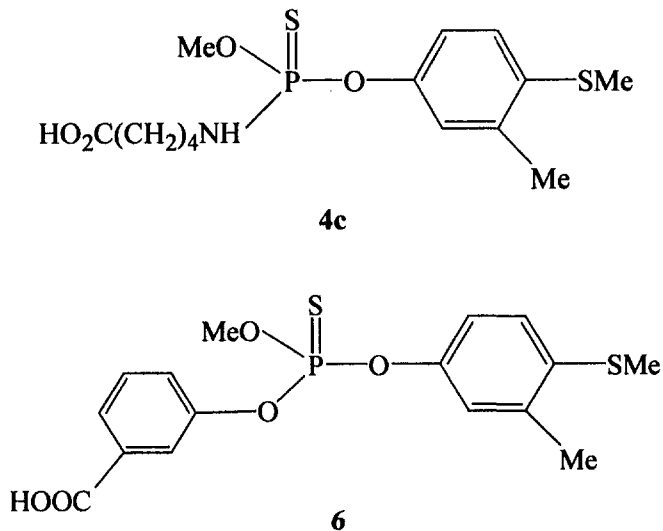


Fig. 2-51. Fenthion derivatives used in enzyme tracer synthesis.

첨가하고 저어주면서 4℃에서 24시간동안 반응시켰다. 3일간에 걸쳐 PBS(10 mM, pH 7.4)와 증류수로 투석하여 결합하지 않은 hapten을 제거한 후 남은 용액은 4℃에서 보관하였다. 6의 active ester의 합성 과정도 이와 동일하였다.

나) 직접 ELISA의 프로토콜 수립

항체와 enzyme tracer(fenthion-HRP conjugate)의 적정 농도를 선택하기 위해 농도를 달리하면서 2차원 적정(two-dimensional titration)을 행하였는데 그 과정은 다음과 같다. 각 well을 적절한 농도의 protein A나 anti-rabbit IgG(0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6에 녹임) 100 μ L로 incubation(4℃, 24시간)시킨 후 PBST(0.01 M PBS + 0.05% tween 20, pH 7.4)로 5회 세척하였다. 1% BSA 용액(PBS)으로 well을 blocking(실온, 2시간)시킨 후 항혈청을 100 μ L씩 넣고 incubation(실온, 1시간)시켰다. 세척 후 enzyme tracer를 100 μ L 넣어 항혈청과 1시간동안 반응시키고 효소 기질 TMB 용액(0.4 mL 0.6% TMB in DMSO, 0.1 mL 1% H₂O₂ in 3° H₂O, 25 mL 0.05 M citrate-acetate buffer, pH 5.5)을 well당 100 μ L씩 넣어 일정시간 동안 발색시키고 2 M H₂SO₄로 반응을 중지시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

적정 결과 본 연구에서 합성한 5종의 fenthion hapten에 대한 항혈청 중 hapten 4c에 대한 항혈청은 희석배수가 1:10000, tracer는 1:1000인 경우가 적합한 것으로 판단되었고, 이 조건에서 다음의 최적화 실험을 행하였다.

다) Fenthion 분석을 위한 직접 ELISA의 최적화

Fenthion 표준용액은 5% 메탄올-PBS를 용매로 하여 제조하였다. Fenthion의 농도를 달리하면서 항체에 대한 경쟁을 측정하였는데 그 과정은 위의 적정시와 같이 하되 100 μ L의 enzyme tracer를 가하는 대신 각 농도의 fenthion 50 μ L를 가한 후 enzyme tracer 50 μ L를 가하였다.

(1) Enzyme tracer에 따른 차이

구조가 다른 두가지 종류의 hapten **4c**, **6**과 HRP를 conjugate시킨 enzyme tracer로 각각 2차원 적정을 행하여 적절한 항혈청과 conjugate의 농도를 정한 후 경쟁반응을 실시하고 그 결과를 비교하였다.

(2) Precoating에 따른 차이

Precoating의 여부와 코팅 재료에 따른 차이를 알아보기 위해 protein A(0.2, 1, 5 μ g/mL) 혹은 anti-rabbit IgG(0.2, 1, 5 μ g/mL)를 well당 100 μ L씩 채우고 각각 4 $^{\circ}$ C에서 하루밤 incubation시킨 후 그 결과를 control(precoating을 하지 않은 것)과 비교하였다. 이하의 실험은 이러한 전처리 과정을 거친 후 시행하였다.

(3) Blocking에 따른 차이

Well을 protein A(5 μ g/mL)로 precoating하고 1% BSA용액으로 blocking하여 blocking하지 않았을 때의 결과와 비교하였다.

(4) Fenthion과 enzyme tracer 첨가의 시간 간격에 따른 차이

Fenthion을 넣은 후 enzyme tracer를 넣기까지의 시간 간격에 따른 차이를 알아보기 위하여 시간 간격을 0, 10, 20, 30 분으로 달리하여 그 결과를 비교하였다.

(5) 경쟁 incubation 시간에 따른 차이

Fenthion과 enzyme tracer간의 경쟁반응에서 incubation 시간에 따른 차이를 알아보기 위해 20, 40, 60, 80 분간 incubation시킨 후 그 결과를 비교하였다.

(6) 항혈청에 따른 차이

사슬길이가 다른 두가지 종류의 hapten **4b**, **4c**를 면역원으로하여 얻은 항혈청을 사용하여 ELISA를 시행한 후 그 결과를 비교하였다. 각 항혈청에 대해 위의 실험들로부터 도출한 최적화 조건에서 항혈청과 tracer의 농도를 달리하면서 2차원 적정을 한 후 경쟁반응을 실시하였다.

3) Fenthion 분석용 dipstick형 ELISA의 개발

위에서 기술한 직접 ELISA 개발의 결과를 기초로 하여 dipstick형 ELISA를 개발하고자 하였다. 항체를 membrane에 고정시켰으며 enzyme tracer의 효소로서 HRP를 사용하였다. 예비적인 프로토콜을 수립한 후 구성요소를 최적화하였다.

가) Dipstick형 ELISA의 예비적 프로토콜 수립

(1) Test strip의 준비

Plastic sheet를 0.5×5 cm로 잘라내어 하단에 membrane(0.5×5 cm)을 부착시키고 적정 농도로 희석한 항혈청을 membrane 중앙에 3 μL씩 점적하였다. 만든 test strip을 30분간 건조시킨 후 2%(w/v) sodium caseinate-PBS에 30분간 담구어 됴으로써 활성자리를 blocking 하였다. PBST buffer

를 사용하여 2회 씻어준 후 건조시켰다. 빛을 차단하여 4°C에서 보관하면서 필요할 때마다 꺼내 사용하였다.

(2) 예비적 프로토콜

200 μ L fenthion 용액과 200 μ L enzyme tracer를 test tube에 넣어 잘 섞고 30분간 test strip을 흔들며 주면서 incubation시킨 후, TMB 용액으로 3~5분간 발색시켰다. Fenthion을 사용하지 않은 경우를 negative control로 하고 6명의 평가자에 의해 negative control과 명백하게 구분할 수 있는 fenthion의 농도를 검출한계(detection limit)로 정하였다. 프로토콜 전과정을 Fig. 2-52에 나타내었다.

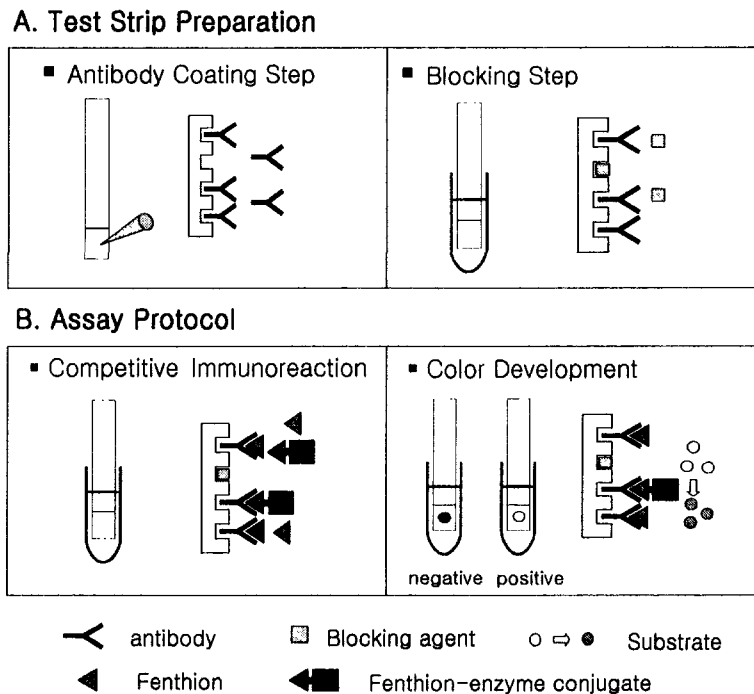


Fig. 2-52. Schematic representation of (A) the test strip preparation and (B) the assay protocol.

나) Dipstick형 ELISA의 최적화

(1) Membrane의 종류에 따른 차이

Membrane의 종류에 따른 차이를 알아보기 위해 nitrocellulose, immobilon, immunodyne, biodyne 및 ultrabind를 포함하는 5종의 membrane을 사용하여 dipstick형 ELISA를 시행하고 그 결과를 비교하였다. 앞의 2종의 경우는 메탄올로 15초, 3차 증류수로 5분, PBS buffer로 20분간 전처리한 후 사용하였고 후자 3종의 경우는 전처리 없이 사용하였다.

(2) 적절한 항혈청 희석배수 결정하기

Membrane에 고정화할 항혈청의 최적 희석배수를 결정하기 위해 항혈청을 PBS buffer(10 mM, pH 7.4)로 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000으로 달리 희석한 후 그 결과를 비교하였다.

(3) Enzyme tracer의 농도에 따른 차이

적절한 enzyme tracer의 농도를 결정하기 위해 enzyme tracer를 PBS buffer(10 mM, pH 7.4)로 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000으로 달리 희석하여 그 결과를 비교하였다.

(4) 기질의 종류에 따른 차이

HRP의 기질로서 ABTS와 TMB 두가지 중 어느 것이 나은지 알아보았다. ABTS의 경우 citrate buffer(0.1 M, pH 4.0) 11 mL, ABTS 용액(3 mg/mL) 1 mL, 30% H₂O₂ 4 μ L를 혼합하여 제조하였다. TMB는 2)의 나)에서와 동일한 방법으로 준비하였다.

(5) Blocking 여부에 따른 차이

Blocking의 여부에 따른 차이를 알아보기 위해 PBS로 제조한 1% BSA, 1% gelatin, 1% casein, 2% casein으로 membrane을 blocking한 후 그 결과를 control(blocking을 하지 않은 것)과 비교하였다.

(6) Incubation 시간에 따른 차이

Fenthion과 enzyme tracer의 경쟁시 감도가 좋으면서 가장 짧은 incubation 시간을 알아보기 위해 5, 10, 20, 30, 60 분으로 incubation 시간을 달리하면서 그 결과를 비교하였다.

다) Dipstick형 ELISA를 이용한 fenthion의 분석

위에서 최적화한 조건을 이용하여 5% 메탄올-PBS로 제조한 fenthion 표준용액과 enzyme tracer를 경쟁 반응을 시킨 후 그 결과를 6명의 평가자에 의해 평가하였다.

라) Dipstick형 ELISA를 이용한 식품 중의 fenthion 검출

식품시료로서 직접 무농약 재배한 케일과 깻잎 그리고 시중에서 구입하여 겉껍질을 최대한 제거한 양파를 무농약 시료로 사용하였으며 농약 함유 시료는 무농약 시료를 잘게 썰어 알려진 양의 농약을 첨가(spike)함으로써 준비하였다. 식품시료 중의 농약은 다음의 방법으로 추출하였다. 식품시료 2 g당 메탄올 10 mL를 넣고 10분간 저어준 다음 1 mL를 취해 PBS buffer를 적당량 가하여 dipstick형 ELISA 분석을 위한 시료로 사용하였다. 메탄올의 함량에 따른 차이를 알아보기 위해 메탄올로 추출한 시료를 PBS buffer로

각각 2, 3, 4, 5, 10 배로 희석하여 메탄올의 함량을 50, 33, 25, 20, 10 %로 달리한 후, ELISA를 시행하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 직접 ELISA 개발

Fenthion 분석을 위한 dipstick형 ELISA는 fenthion의 항체를 고체상에 고정화시키고 라벨을 붙인 fenthion hapten과 fenthion을 항체에 대해 경쟁적으로 결합시키는 방식 즉, 직접 ELISA의 방식을 택하였으므로 먼저 직접 ELISA를 수립하여 dipstick형 ELISA 개발의 기초로 삼고자 하였다.

직접 ELISA의 과정은 well을 precoating한 후 항체를 고정시키고, BSA 용액으로 blocking한 후 5% 메탄올-PBS를 용매로 하여 제조한 fenthion 표준용액과 enzyme tracer를 경쟁시키는 과정을 택하였다.

가) Enzyme tracer에 따른 차이

성능이 우수한 ELISA를 개발하기 위해서는 분석물질에 대해 친화력이 높은 항체와 아울러 효소의 활성이 높고 분석물질과 효과적으로 경쟁하는 enzyme tracer를 사용하여야 한다. 직접 ELISA에서 적절한 enzyme tracer의 선택은 면역분석의 수행능에 상당한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Giersch, 1993). Enzyme tracer의 효소로 HRP와 AP(alkaline phosphatase)를 비교할 때, HRP의 경우가 기질 TMB에 대해 발색반응의 감도가 높아 검출한계를 내리고 incubation 시간을 줄일 수 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 Fig. 2-51에 나타낸 2가지 종류의 hapten과 HRP 효소를 사용

하여 enzyme tracer를 합성하여 ELISA를 시행해 본 결과 hapten(4c)과 enzyme tracer의 hapten(4c)이 동일한 경우가 가장 적합한 것으로 판단되었다. Enzyme tracer를 사용한 형식에서는 homologous system이 heterologous system과 비교하여 분석 감도가 1000배 정도 증가한다는 타연구 보고도 있다(Wittmann & Hock, 1991).

나) Precoating에 따른 차이

Microtiter plate의 well을 precoating함으로써 면역분석의 정확도를 증가시켜 수행능을 높이고 항체를 경제적으로 사용할 수 있다는 것이 알려져 있다(Giersch, 1993). 따라서 precoating의 여부와 코팅 재료에 따른 차이를 알아보기 위해 protein A와 anti-rabbit IgG의 양을 달리하여 well에 코팅시키고 그 결과를 control(precoating을 하지 않은 것)과 비교하였다(Fig. 2-53). 1-5 $\mu\text{g/mL}$ protein A를 사용했을 때 흡광도가 가장 높았으므로 최적의 것으로 판단되었다. Protein A는 항체의 Fc 부분에 특이적으로 결합해서 Fab 부분이 면역반응에 참여할 수 있도록 함으로써 감도를 증가시킨다는 것이 알려져 있다(Schneider & Hammock, 1992).

다) Blocking에 따른 차이

Protein A(5 $\mu\text{g/mL}$)로 well을 precoating 한 후의 blocking 여부에 따른 결과를 비교한 결과(Fig. 2-54), 감도에 차이가 없었고 background 흡광도(≈ 0.03)가 낮았으므로 blocking은 하지 않아도 무방한 것으로 판단되었다. Precoating은 blocking 단계를 불필요하게 한다는 보고가 있다(Schneider & Hammock, 1992).

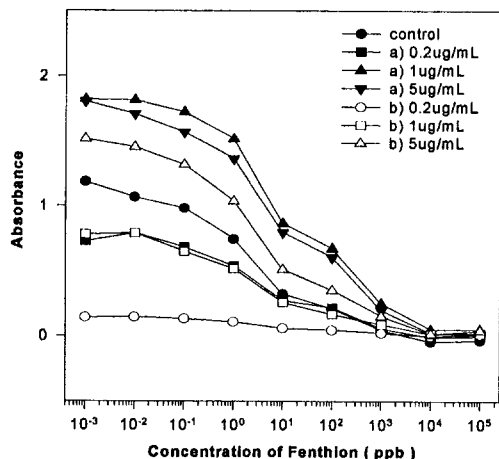


Fig. 2-53. Variation of standard curves for fenthion for different concentrations of pre-coating reagents. ELISA conditions : antiserum to 4c-KLH ; enzyme tracer, 4c-HRP ; a) pre-coating reagent, protein A b) pre-coating reagent, anti-rabbit IgG ; blocking, 1% BSA ; incubation time, 1 hr ; buffer, 10 mM PBS(pH 7.4) ; substrate, TMB ; temperature, RT.

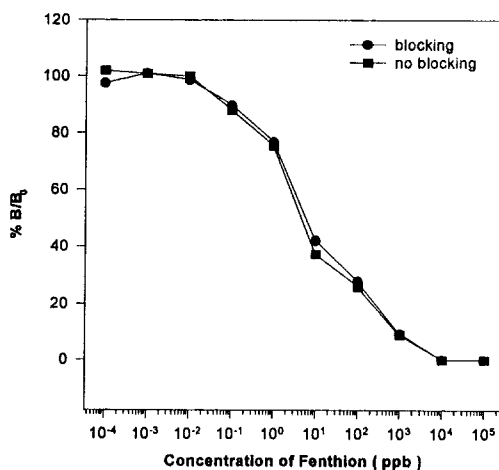


Fig. 2-54. Effect of blocking on standard curves for fenthion. ELISA conditions : pre-coating, 5 μ g/mL protein A. The rest of conditions was the same as those described in the legend of Fig. 2-53.

라) Fenthion과 enzyme tracer 첨가의 시간 간격에 따른 차이

본 연구에서는 fenthion과 enzyme tracer를 동시에 경쟁시키지 않고 fenthion을 먼저 넣어 항체와 결합시킨 후 enzyme tracer를 넣는 방식을 취하였다. 이러한 방식은 분석물질인 fenthion이 plate에 고정화된 항체에 먼저 결합하여 적은 결합 부위만이 남게 되면 그 다음 단계에 라벨된 화합물이 첨가됨으로써 분석물질에 대한 감도 높은 분석이 가능하다(Köhler & Milstein, 1975). Fenthion을 넣은 후 enzyme tracer를 넣기까지의 시간간격에 따른 차이를 알아보기 위하여 시간 간격을 0, 10, 20, 30 분으로 하여 그 결과를 비교하였다. 30분의 경우($IC_{50} \approx 5$ ppb)를 제외한 나머지($IC_{50} \approx 3.5$ ppb)는 최대 흡광도와 감도의 차이가 거의 없었으므로, 시간 간격이 실제 분석에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 보인다.

마) 경쟁 incubation 시간에 따른 차이

경쟁반응의 incubation 시간에 따른 차이를 알아보기 위해 incubation 시간을 20, 40, 60, 80분으로 달리하여 결과를 비교하였는데(Fig. 2-55), 시간이 증가함에 따라 흡광도는 증가하나 40분 이후에는 차이가 적고 감도에는 큰 차이가 없었으므로 40분 정도가 적당한 것으로 보인다.

바) 항혈청에 따른 차이

Enzyme tracer로 4c를 사용하고 hapten이 다른(4b, 4c) 두가지 면역원으로부터 얻은 항혈청을 사용하여 ELISA를 시행하고 그 결과를 비교하였다. 위의 실험들로부터 도출한 최적화 조건에서 항혈청과 tracer의 농도를

달리하면서 2차원 적정을 한 후 ELISA를 실시한 결과는 Fig. 2-56과 같다. 감도의 차이는 나타나지 않았으나 면역원과 tracer에 사용한 hapten의 구조가 동일한 경우가 최대 흡광도가 더 높았다. 두 경우 모두 분석의 감도가 식품 중의 농약잔류 허용치를 판별하기에 충분할 정도로 높았다. Dipstick형 ELISA에 있어서는 감도 뿐 아니라 발색의 정도도 중요하므로 dipstick assay를 위해서는 hapten 4c로부터 얻어진 항혈청을 사용하였다.

2) Dipstick형 ELISA의 최적화

이상의 최적화 실험을 수행한 결과 fenthion을 분석하기 위한 직접 ELISA는 수행능이 우수한 것으로 판단되었으므로 이를 바탕으로 dipstick형 ELISA를 수립하였다. 항체와 tracer는 hapten 4c로부터 얻은 것을 사용하였다.

가) Membrane의 종류에 따른 차이

항체를 membrane에 고정화시키는 dipstick immunoassay에 있어서 membrane의 항체 고정화 능력은 분석법의 수행능에 중대한 영향을 미친다. Membrane의 종류에 따른 수행능의 차이를 알아보기 위해 nitrocellulose, immobilon, immunodyne, biodyne, ultrabind의 5종류의 membrane을 사용하여 ELISA를 시행하고 그 결과를 비교하였다. Nitrocellulose와 immobilon은 처음에는 발색이 뚜렷하나 수 분내에 번지면서 색이 사라졌으며 biodyne과 ultrabind는 색이 지속되긴 하나 색의 변화가 일어났다. 반면, immunodyne은 색깔이 뚜렷하게 나타났고 또한 지속되었으므로 항체 고정화용 membrane으로서 가장 적합한 것으로 판단되었다. 항체를 test strip

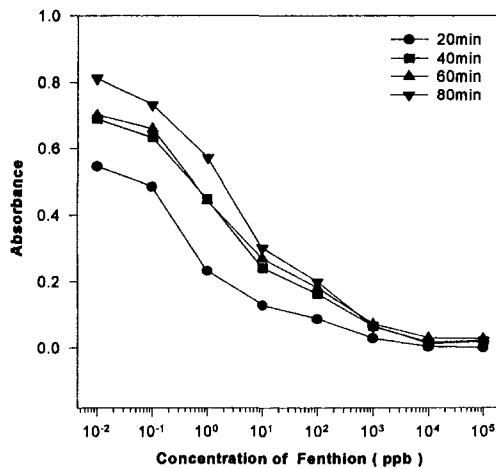


Fig. 2-55. Variation of standard curves for fenthion for different incubation time. ELISA conditions : without blocking. The rest of conditions was the same as those described in the legend of Fig. 2-54.

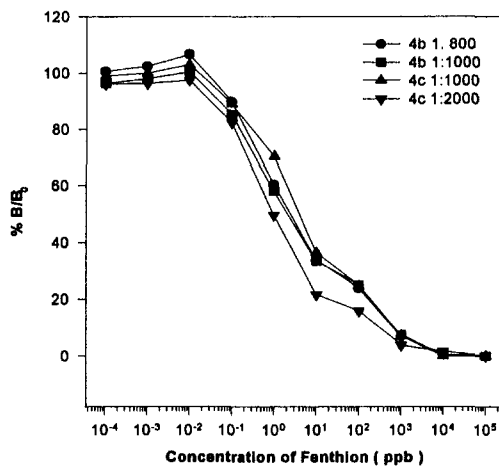


Fig. 2-56. Variation of standard curves for fenthion for antisera to hapten with different hapten spacer length of immunogen, hapten-protein conjugate. ELISA conditions : same as those described in the legend of Fig. 2-55.

membrane에 고정화한 면역분석에 있어서 incubation과 세척 단계에서 항체가 membrane로부터 이탈하면 발색이 약해져서 색변화를 평가하기가 어렵게 되며 따라서 감도와 재현성이 떨어지게 된다. Immunodyne membrane이 양호한 결과를 나타낸 것은 이 membrane은 항체와 같은 단백질이 물리적 흡착이 아닌 공유결합에 의해 membrane과 결합하므로 면역화학적 활성이 잘 보존되고(Schneider, 1995), 또한 membrane의 색깔이 밝은 흰색이기 때문에 발색된 색깔의 구분에 적합한 것으로 보인다(Schneider, 1991, Marlow & Handa, 1987).

나) 적절한 항혈청 희석배수 결정하기

항혈청의 최적 희석배수를 결정하기 위해 항혈청을 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000으로 희석한 후 그 결과를 비교하였는데 후자의 두 경우는 발색이 거의 일어나지 않았고 앞의 3가지 경우 점차적으로 색이 연하게 나타났으므로 항혈청은 1:100으로 희석하여 사용하기로 하였다.

다) Enzyme tracer의 농도에 따른 차이

Enzyme tracer의 적절한 농도를 결정하기 위해 희석배수를 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000으로 달리하여 그 결과를 비교하였는데(Fig. 2-57), 전자의 두 경우에 signal은 뚜렷하였으므로 background도 진하게 나타나 부적절하였고 1:8000의 경우는 signal이 너무 미약하였다. 그러므로 enzyme tracer는 1:2000이나 1:4000으로 희석하여 사용하기로 하였다.

라) 기질의 종류에 따른 차이

면역분석의 검출한계는 enzyme tracer의 회석배수와 관련되므로 회석배수가 클 경우에 대비하여 효소반응에 의한 흡광도 변화가 큰 기질을 사용하는 것이 바람직하다(Giersh, 1993, Young, 1989). Enzyme tracer의 효소로 사용한 HRP의 기질로서 ABTS와 TMB 중 어느 것이 적합한지 알아보았다(Fig. 2-57). TMB는 높은 회석배수의 tracer를 사용해도 그 신호를 background로부터 구별할 수 있었으나, ABTS는 거의 발색이 나타나지 않아 실험에 부적절한 것으로 보인다.

마) Blocking 여부에 따른 차이

Blocking은 비특이적인 단백질의 결합으로 인한 background interference를 감소시켜 분석법의 수행능을 향상시키고 microtiter plate의 소수성 변질을 감소시킨다는 것이 알려져 있다(Morissette, 1991). Blocking의 여부와 blocking 시키는 단백질의 종류에 따른 차이를 알아본 결과 signal/noise의 비는 2% casein > 1% casein > 1% BSA > 1% gelatin > control의 순으로 높게 나타났으므로 2% casein이 가장 적합한 것으로 판단되었다.

바) Incubation 시간에 따른 차이

Fenthion과 enzyme tracer의 경쟁 incubation에서 감도가 좋으면서 가장 짧은 시간을 알아보기 위해 incubation 시간을 달리하면서 그 결과를 비교하였다. 5분과 10분의 경우 발색이 연해 구분이 어려웠으나 20분부터는 동일한 감도를 나타내었다. Dipstick형 ELISA는 색과 fenthion 농도 사이의 반비례 관계를 이용해 물질을 검출하므로 negative control의 절대 색의 강

도가 높을수록 검출한계는 향상된다. 그러므로 30분의 incubation 시간이 가장 적합한 것으로 나타났다. 선행 연구에서도 30분 이상의 경쟁반응시 감도의 증가가 나타나지 않았다는 보고들이 있다(Schneider, 1995).

3) Dipstick형 ELISA를 이용한 fenthion의 분석

위에서 선택한 최적화 조건에서 fenthion의 농도를 달리하면서 경쟁 dipstick형 ELISA를 행하였다(Fig. 2-58). 그 결과 dipstick형 ELISA로 1 ppb 농도의 fenthion까지 검출이 가능한 것으로 나타났으며 이는 microtiter plate상에서 분석된 것과 유사한 감도이다.

개발한 dipstick형 ELISA는 하나의 스트립으로 한가지 농약의 분석만 가능하지만 여러 가지 농약에 대한 항체가 얻어진다면 test 스트립에 여러 항체를 고정화하여 여러 농약의 동시 분석도 가능해질 것이다(Schneider, 1995).

4) Dipstick형 ELISA를 이용한 식품시료에서의 fenthion의 검출

식품시료에 fenthion을 첨가하고 앞에서 수립한 최적화 조건에서 fenthion의 검출 가능성을 시험하였다. 시료 중의 fenthion은 메탄올로 추출한 다음 PBS buffer로 희석시켜 ELISA를 시행하였는데 메탄올 함량에 따라 분석결과가 달라질 것이므로 메탄올 함량에 따른 차이를 조사하였다. 메탄올 함량에 따른 발색정도의 차이는 거의 나타나지 않았으므로 희석배수는 가장 낮은 것(메탄올 함량이 50%인 경우)을 택하였다. 가장 낮은 희석배수를 택한 것은 시료의 희석배수가 작을수록 식품 중의 fenthion 농도가 높으므로 분석의 감도를 높일 수 있기 때문이다. 최종 메탄올 함량은 경쟁시 다

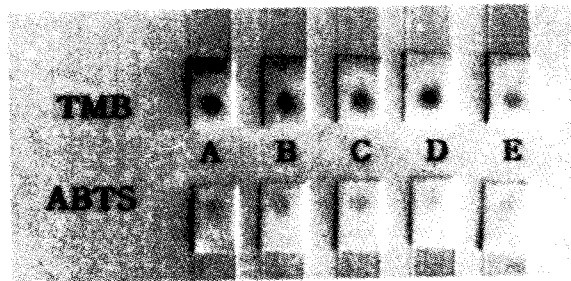


Fig. 2-57. Comparison of the color development with TMB and ABTS as the substrate. antiserum to 4c-KLH ; enzyme tracer, 4c-HRP ; dilution of enzyme tracer, A) 1:500 B) 1:1000 C) 1:2000 D) 1:4000 E) 1:8000 ; membrane, immunodyne ; blocking, 2% casein ; incubation time, 30 min ; buffer, 10 mM PBS(pH 7.4)

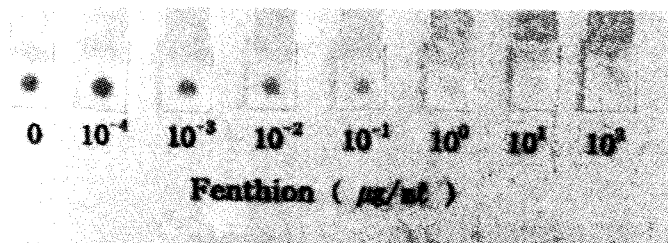


Fig. 2-58. Results of the dipstick ELISA with different fenthion concentrations. : membrane, immunodyne ; blocking, 2% casein ; antiserum, 4c-KLH ; enzyme tracer, 4c-HRP ; substrate, TMB ; incubation time, 30 min ; buffer, 10 mM PBS(pH 7.4)

시 동일 배수의 PBS buffer와 혼합되었으므로 25%가 된다. 분석 결과, 식품시료가 양파와 케일인 경우에 10 ppb, 깻잎은 100 ppb까지 검출이 가능하였다(Table 2-14). 녹색채소의 엽록소가 발색에 미치는 영향에 대해 우려하였는데 다행히도 그 영향은 미미하였다. Fenthion에 대한 국내 허용기준치를 살펴보면, 양파의 경우 100 ppb, 케일과 깻잎은 50 ppb이므로 개발한 dipstick형 ELISA는 허용기준치 수준의 검출이 충분히 가능하다.

Table 2-14. Fenthion detection with dipstick ELISA.

Sample	Fenthion (ppb)						
	0	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
Onion	++	++	+	+	±	±	-
Sesame leaf	++	++	++	+	±	-	-
Kale	++	++	+	±	±	-	-

※ Color development : ++, very strong ; +, strong ; ±, weak ; -, none
 ※ ELISA conditions were the same those described in the legend of Fig. 2-58 except that methanol content.

다. 결론

유기인계 농약 fenthion을 검출하기 위한 직접 경쟁 방식의 ELISA를 개발하였고 이것을 토대로 하여 dipstick형 ELISA를 개발하였다. 두 면역분석법 모두 enzyme tracer의 효소로는 HRP를 사용하였고, hapten은 면역원의 hapten과 동일한 것을 사용했을 때 결과가 가장 양호하였다.

(1) 일반적인 ELISA의 경우 최적화 조건은 1-5 µg/mL protein A로 precoating한 후 1:1000으로 희석한 항체와 1:10000으로 희석한 enzyme tracer를 40분간 경쟁시킨 후 TMB로 발색시키는 것이었다. Fenthion 검출

의 한계는 $10^2 \sim 10^4$ ppb이었다.

(2) Dipstick형 ELISA의 최적화 조건은 1:100으로 희석한 항혈청을 immunodyne membrane에 점적하여 test strip을 만들고 2% casein으로 blocking한 다음 시료용액과 1:4000으로 희석한 enzyme tracer로 incubation 시켜 TMB로 발색시키는 것이었다. 검출의 저농도 한계는 1 ppb이었다. 이 방법을 이용하여 식품시료 중의 fenthion의 검출에 적용하였을 때 저농도 검출한계는 10~100 ppb이었다.

2. Fenthion 분석용 면역 스트립 센서의 개발

가. 실험 내용 및 방법

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약 및 장치는 다음과 같다. Fenthion에 붙인 효소 라벨 glucose oxidase(GOD, from *Aspergillus niger*), 기질 glucose, 항체 정제에 사용한 ammonium sulfate는 Sigma사로부터, peroxide는 Fluka사로부터 구입하였고 분석물질인 유기인계 농약 fenthion은 Dr. Ehrenstorfer GmbH(Augsburg, Germany)로부터 구입하였다. 스트립 전극제작에 필요한 carbon paste(TU-15ST), silver paste(LS-506J)는 Asahi사(Tokyo, 일본)의 제품을, insulator paste(SCR-505G) 및 경화제는 (주)서울화학연구소(안산, 경기도)의 제품을 각각 사용하였다. 스트립 센서의 전처리를 위해 사용한 $FeCl_3$ 는 Kanto사(일본) 제품을 사용하였다.

Dipstick형 스트립 센서의 membrane인 immunodyne($0.45 \mu m$, pore size)은 pall사로부터, immunomigration 방법을 위한 nitrocellulose($8 \mu m$,

pore size)는 Whatman사로부터 구입하였다. 이외 다른 표준물질과 완충용액 등은 특급시약 등급이나 분석시약 등급에 해당하는 시약을 사용하였으며, 모든 용액의 제조에는 3차 증류수를 사용하였다.

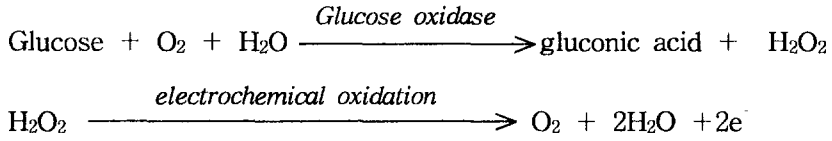
스트립 센서 시그널의 전류법(amperometry)과 순환 전압전류법(cyclic voltammetry) 등의 측정은 Bioanalytical systems사의 제품(Model 100B)을 사용하여 수행하였다. 외부 기준전극으로 Orion double junction Ag/AgCl 전극(Model 90-02)을 사용하였다.

2) 전류법 면역 스트립 센서의 원리

전기화학적 면역센서의 변환기는 면역반응에 의해 야기되는 전자전달(electron transfer) 변화를 측정한다. 이러한 변화는 전류적(amperometric), 전위적(potentiometric), 전도적(conductometric, constant voltage) 및 저항 측정(impedimetric, alternating voltage) 장치로 측정할 수 있다. 그러한 측정은 항체가 부착된 전극의 표면에서 직접 이루어지는 것이 이상적이지만 그것은 기술적인 어려움이 있으므로 라벨을 이용하여 측정이 이루어지는 것이 보통이다. 전기화학적 면역센서는 효소 라벨에 의해 생성된 반응산물들을 전류법으로 검출하는 것들이 주종을 이루고 있다. 이러한 면역센서는 높은 효소활성과 감도 높은 전류법적 측정 그리고 선택성이 높은 면역반응을 조합한 것으로서 가장 활발하게 연구가 이루어지고 있다.

본 연구에서는 라벨 효소로서 glucose oxidase(GOD)를 사용한 전류법 면역센서를 개발하고자 한다. 이 방법은 고정화한 항체에 대해 fenthion과 fenthion-GOD conjugate가 경쟁하고 fenthion의 농도와 결합하는 conjugate의 양 사이는 반비례 관계인 점을 이용하였다. 결합한 conjugate의 양은 glucose를 가하여 H_2O_2 를 생성시킨 다음 이 생성된 H_2O_2 를 정량함으로써

얻을 수 있다. 이 경우에 glucose가 산화되면서 생성되는 H₂O₂를 전기화학적으로 산화시켜 발생한 전자를 측정하게 된다.



전류법은 물질이 전극에서 산화되거나 환원될 때 생성되는 전류를 측정하는 것이다. 측정된 전류는 물질의 농도에 직선적으로 비례하므로 측정된 전류로 시료 중의 전기화학적으로 활성인 종의 농도를 결정할 수 있다. 주어진 물질이 산화되거나 환원되는 전위는 그 물질의 종류에 따라 다르므로 전해전위를 적절히 선택함으로써 선택성을 얻을 수 있다. 전기화학에서 사용되는 전지는 작업전극, 보조전극 그리고 기준전극으로 구성되며 그 구성도를 Fig. 2-59에 나타내었다.

물질의 산화나 환원은 일반적으로 작업전극에 의해 수행되고 이 과정에서 생성된 전자는 외부회로(external circuit)를 통해서 보조전극으로 이동하

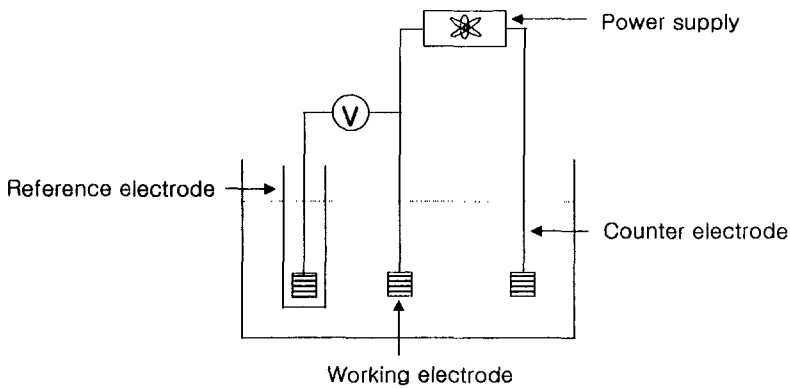


Fig. 2-59. Structure of an electrochemical cell.

여 용액으로 되돌아간다. 만약 작업전극에서 산화가 일어났다면 보조전극에서 환원이 동일한 정도로 일어난다. 작업전극과 기준전극의 회로에는 전류가 흐르지 않도록 한다. 전기 분해시에, 작업전극은 분석물에 따라 양극(anode)이나 음극(cathode)으로 사용될 수 있다(Tran-Minh, 1993).

효소전극 시스템을 구축하는데 스크린 프린팅 기술이 많이 이용되고 있다(Prodenziuati, 1994). 이러한 미소제작 기술은 경제적이며 재현성과 선택성이 우수한 일회용 전극센서를 구축하는데 이용되며 특히 임상진단 시스템의 센서 스트립을 만드는데 많이 사용되고 있다. 이러한 스크린 프린팅은 인쇄시 스퀴지(squeeze)의 움직임에 따라 3단계에 걸쳐 수행되는데 스크린의 개방된 패턴에 대하여 스퀴지를 일정한 힘을 가하면서 이동시킴으로써 특정기질(세라믹, 플라스틱) 위에 잉크 또는 paste 등을 패턴대로 도입할 수 있으므로 원하는 전극을 구성할 수 있다.

3) 전류법 스트립 센서의 구성

가) 스트립 센서의 제작

본 연구에서 개발한 fenthion 분석용 스트립 센서의 스크린 프린팅 기술을 이용한 전극계 형성과정은 다음과 같다. 먼저, polyethylene(PE) 막 위에 연결부와 기준전극(reference electrode) 및 보조 전극(auxiliary electrode)의 모체가 되는 부분을 은 paste로 프린팅한 후, 탄소 paste를 사용하여 작업전극을 프린팅한다. 그 후, 중앙부의 작업전극과 약간 겹쳐지도록 절연막을 프린팅한다. 이 일련의 과정을 Fig. 2-60에 나타내었다. 각 공정에서 형성된 전극은 일정온도(100~150℃)에서 일정시간 열처리를 하여 전극형성 물질들의 구조 치밀화를 기하였다.

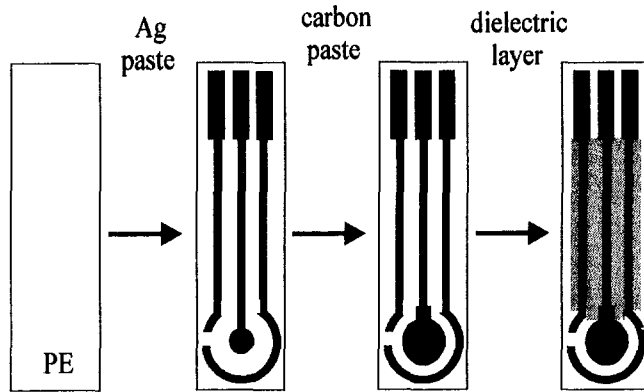


Fig. 2-60. The steps in the fabrication of disposable strip-type sensor based on screen printing technique.

나) 스트립 센서의 전처리

모든 전기화학적 분석은 일정전위기(potentiostat)를 사용하여 행하였고 완충용액으로 140 mM NaCl을 포함하는 0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)를 사용하였다. 위에서 기술한 방법으로 제작한 스트립 센서 전극은 10% FeCl₃ 용액에 약 30~40분간 두어, 기준전극과 보조전극의 은 부분을 Ag/AgCl로 변환시켜 주었다. 그런 다음 스트립 전극의 안정화를 위하여 기준전극으로 Ag/AgCl, 보조전극으로 백금판을 사용하여 carbonate buffer(0.5 M, pH 9.6)에서 기준전극에 대해 1.2 V의 전압을 가하여 전극표면을 미리 산화시켜 주었다. 전극의 전처리 시간에 따른 감응의 차이를 측정하기 위하여 10⁻² M H₂O₂를 전극에 점적한 후, 1 V의 전압을 5, 10, 15, 20, 25, 30 분간 걸어주고 시간에 따른 전류값을 측정하여 그 값을 비교하였다.

다) GOD의 농도에 따른 스트립 센서의 감응

스트립 전극 위에 GOD를 5 μL , 1 M glucose를 20 μL 점적하고, 1분 후에 기준전극에 대해 1 V의 전압을 걸어 전류값의 변화를 측정하였다. 사용한 GOD의 농도는 $10^{-5} \sim 10^1$ mg/mL로 달리하였다.

라) H_2O_2 의 농도에 따른 스트립 센서의 감응

작업전극에 걸어줄 전압을 결정하기 위해 buffer, GOD conjugate, H_2O_2 에 대한 순환 전압전류도를 그려보았다. 스캔은 Ag/AgCl 기준전극에 대해 0~1.1 V에 걸쳐 행하였다. 본 스트립 센서에서는 GOD와 glucose의 반응으로 생성되는 H_2O_2 가 측정되므로, H_2O_2 의 농도를 0~10 mM로 달리하면서 스트립 센서의 전극부를 구성하는 작업전극의 성능을 알아보았다.

4) Fenthion 분석용 면역 스트립 센서의 구성

가) Hapten-GOD conjugate의 합성

Fenthion에 붙일 효소 라벨로서 GOD를 사용했으며 fenthion hapten **4d**의 active ester를 GOD에 결합시켜 fenthion-GOD conjugate를 제조하는 과정은 다음과 같다. GOD(9.2 mg)를 0.45 mL 0.05 M Bis-tris-propane(pH 6.5)에 녹인 후 저어주면서 50 μL 의 DMF에 녹인 ester(10배 몰수)를 소량씩 첨가하고 4°C에서 24시간 동안 교반하였다. 0.05 M Tris buffer(pH 7.4)로 하루동안 투석(2L×2)하고 다시 3차 증류수로 하루동안 투석(2L×2)하였다.

나) 항체의 정제

Ammonium sulfate 방법을 이용하여 항체를 정제하였다(Hebert, 1973) 항체를 2배량의 PBS 용액으로 희석하여 포화 ammonium sulfate 용액을 동량 가하고 30분간 실온에서 정치한 다음 10000 xg로 원심분리를 하여 침전물을 회수하였다. PBS 용액에 침전물을 재용해한 다음 다시 45% ammonium sulfate 용액을 동량 가하여 실온에서 30분간 정치하였다. 다시 10000 xg로 원심분리를 하여 침전물을 회수하였다. 한번 더 45% ammonium sulfate 용액으로 침전시킨 다음 3 L의 PBS용액에서 3일 동안 6회 투석을 반복하였다.

다) Dipstick 방법의 면역 스트립 센서의 구성

면역반응을 전기화학적으로 측정하기 위하여 dipstick 방법과 immunomigration 방법을 사용하였다(Fig. 2-61). 두 방법 모두 membrane에 항체를 고정화시켜 면역반응을 진행시키고 그 생성물을 스트립 센서의 작업전극 부위에서 감지하였다. Dipstick 방법은 dipstick과 센서 스트립을 따로 준비한 후 dipstick membrane에서 fenthion과 conjugate의 경쟁 반응을 시키고 부착된 GOD conjugate에 glucose를 가하여 H_2O_2 를 발생시킨다. 그 다음, dipstick의 membrane 부분과 스트립 센서의 작업전극을 일치하도록 포개어 고정화 후 반응으로 생성된 H_2O_2 를 산화시켜 측정하였다. Immunomigration 방법은 스트립 센서에 membrane을 부착시킨 후 membrane의 적정 부위에 항체를 고정시키고 아래 부위에서 차례로 fenthion, GOD conjugate, glucose를 크로마토그래피적으로 이동시켜 발생한 H_2O_2 를 측정하였다. 이때, membrane에 부착된 GOD의 기질로서 1 M

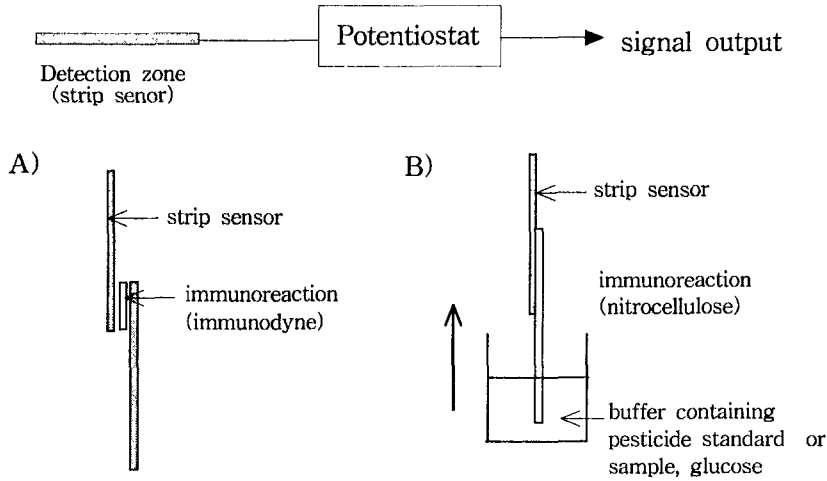


Fig. 2-61. Formats of the amperometric immunosensor with a screen printed electrode. A) dipstick format B) immunomigration format.

glucose를 사용하였고 효소반응에 의해 생성된 H_2O_2 의 전기적 신호를 일정 전위를 사용하여 전류법으로 검출하였다. 2가지 방법 중 dipstick 방법의 경우가 보다 재현성있는 결과를 나타내었으므로 이 방법에 대해서만 최적화를 시도하였다.

Membrane에 고정화할 적절한 항체의 농도를 결정하기 위하여 항혈청 원액과 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500로 희석한 액을 $3 \mu L$ 씩 점적한 후 그 반응을 control(항체를 고정화하지 않은 것)과 비교하였다. 항체의 농도를 고정화한 후, fenthion과 경쟁할 GOD conjugate의 적절한 농도를 결정하기 위하여 GOD conjugate를 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000로 각각 희석하여 그 반응을 control(conjugate가 없는 것)과 비교하였다.

라) 면역 스트립 센서를 이용한 fenthion 검출

Fenthion 농도에 따른 검량곡선은 일정전위기를 이용하여 전극표면에 기준전극에 대하여 일정전위를 걸어주고 시간에 따른 전류변화를 측정된 후 60초의 값을 읽어 작성하였다. Fenthion의 농도는 0~1 ppm으로 하였고, 측정된 signal은 다음의 식을 사용하여 표준화시켰다.

$$\text{normalized signal} = \frac{(S_x - S_0)}{(S_{100} - S_0)} \times 100$$

여기서 S_x 는 특정 농도의 fenthion, S_0 는 과량의 fenthion, S_{100} 은 fenthion을 사용하지 않았을 때의 전류값을 나타낸다.

나. 결과 및 고찰

본 연구에서 개발하고자 하는 면역 스트립 센서의 각 구성요소들을 제작하여 그 기능을 점검해 본 결과는 다음과 같았다.

1) 전류법 스트립 센서

효소를 이용한 전기화학적 바이오센서의 소형화는 주로 thick-film 기술에 의존한다. 예를 들어 혈당을 측정할 수 있는 일회용 효소 스트립은 thick-film screen printing 기술을 이용하여 제작할 수 있다. 이러한 스트립은 세라믹이나 플라스틱 기질의 표면에 전극을 프린팅함으로써 이루어진다. 본 연구에서는 이 기술을 이용하여 스트립 센서를 제작하고자 하였다. 전도성 잉크(conducting ink)는 여러 종류가 있는데 carbon 잉크가 비교적 저렴하고, 낮은 background 전류와 폭넓은 전위, 신속한 전자전달반응을 나타내므로 본 연구에서 사용하였다. 이 잉크는 graphite particle과 polymer

binder 그리고 다른 첨가물로 이루어진 것이었다(Wang, 1996).

가) 스트립 센서의 전처리

전극의 전처리시간에 따른 스트립 센서의 감응의 차이를 측정하기 위하여 전처리 시간을 달리한 후 H_2O_2 를 기준전극에 대하여 1 V의 전압을 걸어 주고 전류값을 측정한 결과는 Fig 2-62와 같았다. 전극을 15분까지 전처리 한 경우는 감응이 크게 증가하였으나, 그 이후에는 거의 일정한 값을 나타내므로, 이후로는 15분간 전극을 전처리하기로 하였다.

나) 스트립 센서의 전극 특성 확인

순환전류법을 scan rate 100 mV/sec로 0~1.1 V에서 phosphate buffer 용액, conjugate, H_2O_2 에 대해 시행한 결과는 Fig. 2-63과 같았다. H_2O_2 의 경우에 Ag/AgCl에 대해 0.7 V 이상이면 산화가 가능하나 signal이 작을 경우 조건에 따라 더 높여주는 것이 가능하다. 추가적인 실험으로 0.9 V와 1 V를 걸어 주었을 때 전류값의 차이가 크게 나타났으므로 이후의 실험에서는 1 V를 걸어주기로 하였다(Fig. 2-64).

다) GOD의 농도에 따른 반응 측정

GOD는 바이오센서의 생물학적 인지요소로 다양하게 사용되어 왔으며 (Wilson & Turner, 1992), 안정성과 기질에 대한 활성이 높고 비교적 저렴하기 때문에 본 연구에서 사용되었다. 본 연구에서 적용한 분석방법에서는 fenthion과의 경쟁반응 후 항체와 결합한 GOD conjugate의 양을 측정해야

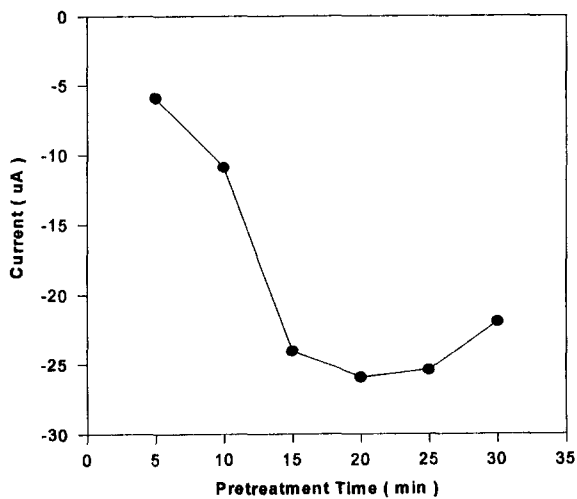


Fig. 2-62. Effect of pretreatment time on the responses of strip sensor. :
 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 ; working potential of 1 V vs
 Ag/AgCl.

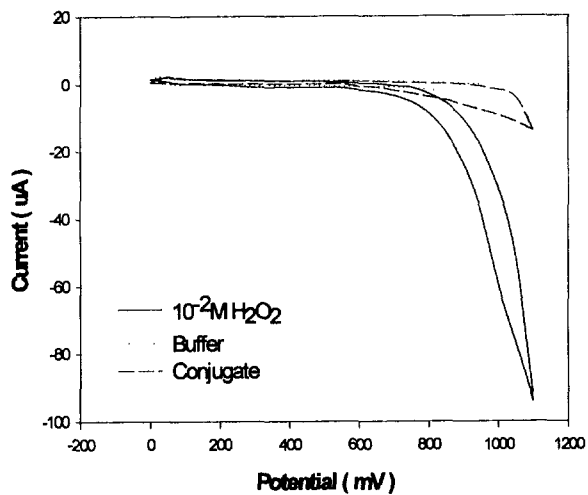


Fig. 2-63. Cyclic voltammograms of single-use strip sensor. : scan rate
 100 mV/sec.

하므로 GOD에 대한 감도가 높을수록 검출한계가 낮아질 것이다. 전류법으로 측정된 결과 10^{-3} mg/mL의 GOD까지 검출이 가능함을 확인할 수 있었다(Fig. 2-65).

라) H₂O₂ 농도에 따른 반응 측정

GOD에 기질 glucose를 첨가해주면 H₂O₂가 발생하는데 스트립 센서에서 최종적으로 검출되어야 할 물질은 H₂O₂이다. 따라서 H₂O₂의 농도에 따른 반응을 측정하였는데 0~10 mM의 농도에서 직선적으로 비례함을 확인할 수 있었으므로(Fig. 2-66), 본 스트립 센서는 연구목적에 적합함을 알 수 있었다.

2) Fenthion 분석용 면역 스트립 센서

면역반응을 전류법으로 측정하는 방법은 여러 가지가 있는데(Bäumer & Schmid, 1998), 본 실험에서는 immunomigration 방법과 dipstick 방법을 이용하였다. Immunomigration을 이용한 방법은 재현성이 매우 낮았으므로 dipstick을 이용한 방법을 먼저 시도해 보기로 하였다.

가) 적정 항체의 농도 결정

적절한 항체의 농도를 결정하기 위하여 희석배수를 달리하여 반응시켜 본 결과는 Table 2-15와 같았다. 1:10까지는 전류값이 변화가 없다가 그 이후에 떨어지는 경향을 나타내므로 희석배수로 1:10을 선택하였다.

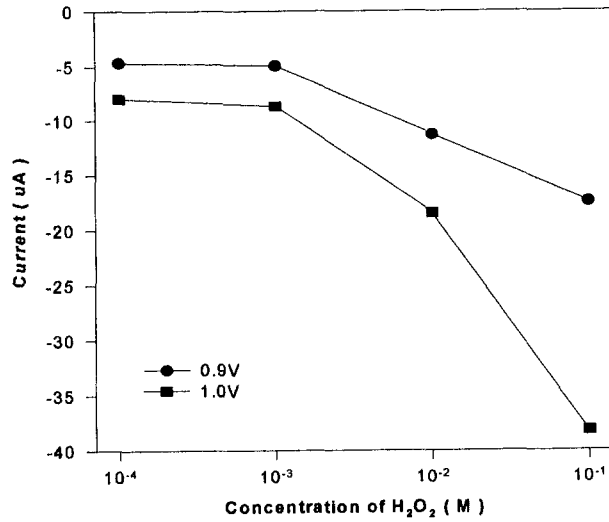


Fig. 2-64. Variation of sensor responses for different potential against Ag/AgCl. : 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4

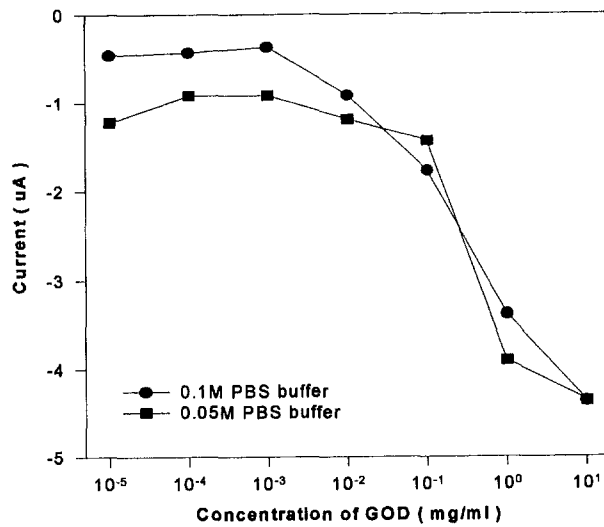


Fig. 2-65. Effect of the GOD concentrations on sensor responses. : 1 M glucose solution was used.

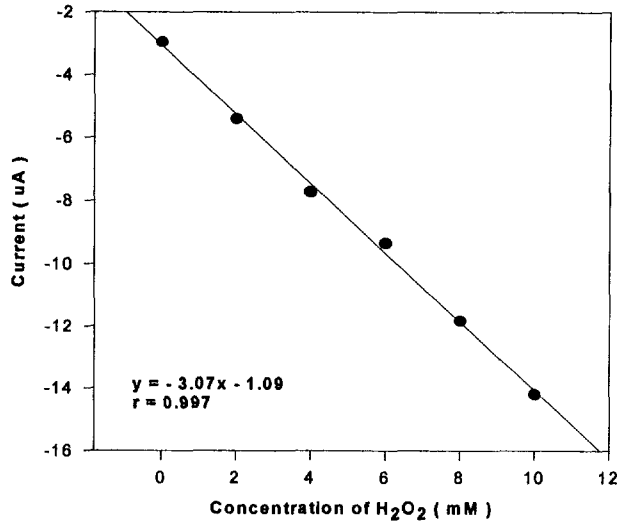


Fig. 2-66. Dependence of strip sensor current on H₂O₂ concentration.
: 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 ; working potential of 1 V vs Ag/AgCl.

나) 적정 conjugate의 농도결정

Conjugate의 적절한 농도를 결정하기 위하여 희석배수를 달리하여 반응시켜본 결과는 Table 2-16과 같았다. 1:100까지는 전류값이 변화가 없다가 그 이후에 떨어지는 경향을 나타내므로 1:100으로 희석하여 사용하기로 하였다.

다) 스트립 센서를 이용한 Fenthion 검출

스트립 센서를 사용하여 GOD conjugate와 fenthion을 경쟁시켜 본 결과 0.1 ppb~1 ppm의 fenthion의 정량이 가능함을 확인하였다(Fig.2-67).

Table 2-15. Dilution titer of Ab by amperometric determination.

Dilution	1	10	20	50	100	200	500
Current(uA) ^a	-2.4721	-2.5941	-0.9461	-0.5188	-0.4883	-0.4883	-0.4578

*^a : measured current - background current

Table 2-16. Dilution titer of GOD conjugate by amperometric determination.

Dilution	5	10	50	100	500	1000
Current(uA) ^a	-2.4721	-2.4721	-1.9532	-1.9532	-0.6714	-0.9766

*^a : measured current - background current

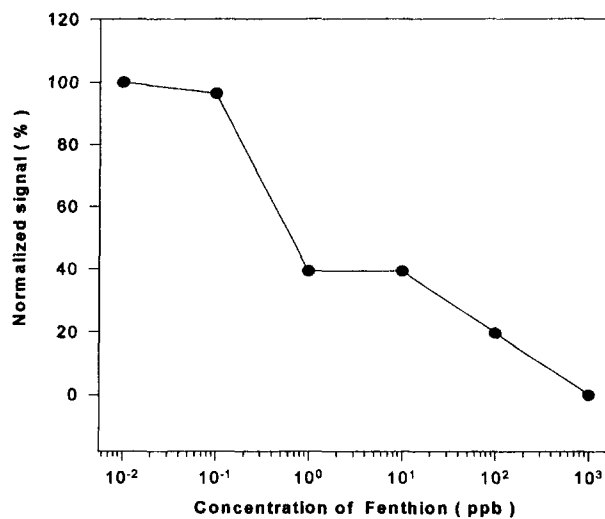


Fig. 2-67. Standard curve for fenthion. : 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 ; working potential of 1 V vs Ag/AgCl.

본 연구에서 개발한 일회용 전류법 면역센서는 fenthion의 정량 분석이 가능하고 30분 정도가 소요된다. 그러나 재현성이 낮으므로 이것을 높이는 것이 본 센서를 실제 시료 분석에 사용할 수 있는지의 관건이 될 것이다. 본 센서는 스트립의 제작에서부터 모든 일련의 실험과정이 수동으로 이루어지는데, 자동화 과정의 도입이 가능하다면 어느 정도까지 이러한 문제를 해결할 수 있을 것이다.

다. 결론

본 연구에서는 fenthion 정량 면역센서를 개발하였다. 고정화한 항체에 대해 fenthion과 fenthion-GOD conjugate를 경쟁시키고 GOD와 glucose가 반응하여 생성되는 H_2O_2 를 전류법으로 측정하는 원리를 이용하였다. H_2O_2 의 산화로 인한 전류는 일정전위기로 Ag/AgCl 기준전극에 대해 1 V의 전압을 걸어 측정하였다.

(1) 탄소 paste를 사용하여 스크린 프린팅 기술로 제작한 일회용 전극은 10^{-3} mg/mL의 GOD를 검출할 수 있으며 0~10 mM의 H_2O_2 농도에 직선적으로 감응하였으므로 연구 목적에 적합함을 확인하였다.

(2) 일회용 전극과 면역 스트립을 결합시킨 dipstick형 스트립 센서에 있어서 항체는 1:10, conjugate는 1:100으로 희석하는 것이 적합하였고 이 조건에서 fenthion을 분석한 결과 0.1 ppb~1 ppm 농도의 분석이 가능하였다.

제5절 참고문헌

한국식품공업협회 식품 중 농약잔류 시험법, 식품공전, p 743-848, 1995.

Abad, A. and Montoya, A. : Production of monoclonal antibodies for carbaryl from a hapten preserving the carbamate group, *J. of Agric. Food Chem.*, 42, 1818-1823 (1994)

Alfthan, K., Kenttämää, H. and Zukale, T. : Characterization and semiquantitative estimation of organophosphorus compounds based on inhibition of cholinesterases, *Anal. Chim. Acta*, 217, 43-51 (1989)

Allen, R.M., Bennetto, H.P., Lewis, I.A.S., Mason, J.P. and Westra A.R. : Low-level electrochemical detection of glucose oxidase and a glucose oxidase conjugate, *Biosensor & Bioelectronics*, 10, 621-631 (1995)

Argauer, R.J. and Brown, R.T. : Detection of carbofuran and other carbamate using cholinesterase inhibition with N-methylindoxyl acetate as substrate, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1920-1924 (1994)

Bäumer, A.J. and Schmid, R.D. : Development of a new immunosensor for pesticide detection : a disposable system with liposome-enhancement and amperometric detection, *Biosensor & Bioelectronics*, 13, 519-529 (1998)

Bekjeit, H.K.M., Lucas, A.D., Szurdoki, F., Gee, S.J. and Hammock, B.D. : An enzyme immuniassay for the environmental monitoring of the herbicide bromacil, *J. Agric Chem.*, 41, 1006-1011 (1993)

Brimfield, A.A., Lenz, D.E., Graham, C. and Hunter, K.W. : Mouse monoclonal antidodies against paraoxon : potential reagents for immunoassay with constant immunochemical characteristics, *J. Agric.*

Food Chem., 33, 1237-1242 (1985)

Cagnini, A., Palchetti, I., Lioni, I., Mascini, M. and Turner, A.P.F. : Disposable ruthenized screen-printed biosensors for pesticides monitoring, *Sensors and Actuators B*, 24-25, 85-89 (1995)

Carr, P.W. and Bowers, L.D. : Analytical and clinical chemistry, Wiley-Interscience, New York (1980)

Cha, G.S., Liu, D., Meyerhoff, M.E., Cantor, H.C., Midgley, A.R., Goldberg, H.D. and Brown, R.B. : Electrochemical performance, biocompatibility and adhesion of new polymer matrices for solid-state ion sensors, *Anal. Chem.*, 63, 1666-1672 (1991)

Cha, G.S. and Meyerhoff, M.E. : Potentiometric ion- and bio-selective electrodes based on asymmetric cellulose acetate membranes, *Talanta*, 36, 271-278 (1989)

Cho, Y.A., Lee, H.S., Cha, G.S. and Lee, Y.T. : Fabrication of butyrylcholinesterase sensor using polyurethane-based ion-selective membranes, *Biosensor & Bioelectronics*, 14, 435-438 (1999)

Christie, I.M., Treloar, P.H. and Vadgama, P. : Plasticized poly(vinyl chloride) as a permselective barrier membrane for high-selectivity amperometric sensors and biosensors, *Anal. Chim. Acta*, 269, 65-73 (1992)

Chung, M.S., Lee, Y.T. and Lee, H.S. : Flow injection biosensor for the detection of anti-cholinesterases, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 31, 296-302 (1998)

Covington, A.K. (Ed.) : Ion-Selective Electrode Methodology, CRC Press,

Boca Raton (1979)

Craggs, A., Moody, G.J. and Thomas, J.D.R. : PVC matrix membrane ion-selective electrodes, *J. Chem. Ed.*, 51, 541-544 (1974)

Cunniff, P.A. : Official methods of analysis of AOAC International, 16th ed., AOAC international, Arlington (1995a)

Cunniff, P.A. : Official methods of analysis of AOAC International, 16th ed., AOAC international, Arlington (1995b)

Curling, J.M. (Ed.) : *Methods of plasma protein fractionation*, Academic press, London (1980)

Diamandis, E.P. and Christopoulos (Ed.) : *Immunoassay*, Academic press, San Diego (1996)

Eppelsheim, C., Aubeck, R. and Hampp, N. : Comparason of potentiometric enzyme sensors for urea and penicillin-G : differential thick-film sensors versus classical electrodes, *Journal of Membrane Science*, 100, 131-137 (1995)

Ercegovich, C.D., Vallejo, R.P., Gettig, R.R., Woods, L., Bogus, E.R. and Mumma, R.O. : Development of a radioimmunoassay for parathion, *J. Agric. Food Chem.*, 29, 559-563 (1981)

Espadas-Torre, C. and Meyerhoff, M.E. : Thrombogenic properties of untreated and poly(ethylene oxide)-modified polymeric matrices useful for preparing intraarterial ion-selective electrodes. *Anal. Chem.*, 67, 3108-3114 (1995)

Evtuyugin, G.A., Stoikova, E.E., Nikol'skaya, E.B. and Budnikov, G.K. :

Effect of metal ions on the colorimetric determination of irreversible cholinesterase inhibitors, *J. Anal. Chem.*, 52, 166-170 (1997)

Fallscheer, H.O. and Cook, J.W. : Report on enzymatic methods for insecticides, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 39, 691 (1956)

Freiser, H. (Ed.) : Ion-selective electrodes in analytical chemistry, Vol. II, Plenum press, New York (1980)

Ghindilis, A.L., Atanasov, P., Wilkins, M. and Wilkins, E. : Immunosensors : electrochemical sensing and other engineering approaches, *Biosensor & Bioelectronics*, 13, 113-131 (1998)

Giersch, T. : A new monoclonal antibody for the sensitive detection of atrazine with immunoassay in microtiter plate and dipstick format, *J. Agric. Chem.*, 41, 2220-2227 (1993)

González-Martínez, M.A., Morais, S., Puchades, R., Maquiera, A., Abad, A. and Montoya, A. : Monoclonal antibody-based flow-through immunosensor for analysis of carbaryl, *Anal. Chem.*, 69, 2812-2818 (1997)

Grob, R.L. and Kaiser, M.A. : Environmental problem solving using gas and liquid chromatography, *J. Chromatogr. Library*, 21 (1982)

Guilbault, G.G. : Handbook of enzymatic methods of analysis, Chap. 5, Dekker, New York (1976)

Guilbault G.G. & Mascini, M. (Ed.) : Uses of immobilized biological compounds (1993)

Guilbault, G.G., Sadar, M.H., Kuan, S.S. and Casey, D. : Trace analysis of various pesticides with insect cholinesterase, *Anal. Chim. Acta*, 52,

75-82 (1970)

Harrison, R.O., Goodrow, M.H., and Hammock, B.D. : Competitive inhibition ELISA for *s*-triazine herbicides : assay optimization and antibody characterization, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 122-128 (1991)

Harvey, J. Jr. and Zweig, G. (Ed.) ; ACS Symposium Series, American chemical society, Washington, DC (1980)

Hart, J.P. and Wring, S.A. : Screen-printed voltammetric and amperometric electrochemical sensors for decentralized testing, *Electroanalysis*, 6, 617-624 (1994)

Hebert, G.A., Pelham, P.L. and Pittman, B. : Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera, *Applied Microbiology*, 25(1), 26-36 (1973)

Hennion, M.C. and Barcelo, D. : Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples, *Analytica Chimica Acta.*, 362, 3-34 (1998)

Hill, A.S., Beasley, H.L., McAdam, D.P. and Skerrit, J.H. : Mono- and polyclonal antibodies to the organophosphate fenitrothion : 2. antibody specificity and assay performance, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1471-1474 (1992)

Hunter, K.W. and Lenz, D.E. : Detection and quantification of the organophosphate insecticide paraoxon by competitive inhibition enzyme immunoassay, *Life Sciences*, 30, 355-361 (1982)

Keith, L.H. (Ed.) : Compilation of E.P.A.'s sampling and analysis methods, Lewis publishers, Boca Raton (1991)

Kido, H., Goodrow, M.H., Griffeth, V., Lucas, A.D., Gee, S.J. and Hammock, B.D. : Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of hydroxytriazines, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 414-424 (1997)

Köhler, G. and Milstein, C. : Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity, *Nature*, 256, 495 (1975)

Kress-Rogers, E. (Ed.) : Handbook of biosensors and electronic noses, CRC press, Boca Raton (1997)

Kumaran, S. and Tran-Minh, C. : Determination of organophosphorus and carbamate insecticides by flow injection analysis, *Anal. Biochem.*, 200, 187-194 (1992)

Langone, J.J. and Van, V.H. : Radioimmunoassay for dieldrin and aldrin, *Res. Comm. Chem. Path. Pharm.*, 10, 163-171 (1975)

Larry, H.S. and Ross, C.B. (Ed.) : Immunoassay for residue analysis, American chemical society, Washington, D.C. (1996)

Lee, M., Durst, R.A. and Wong, R.B. : Comparison of liposome amplification and fluorophor detection in flow-injection immunoanalysis, *Anal. Chim. Acta*, 354, 23-28 (1997)

Liu, D., Meyerhoff, M.E., Goldberg, H.D. and Brown, R.B. : Potentiometric ion- and bioselective electrodes based on asymmetric polyurethane membranes, *Anal. Chim. Acta*, 274, 37-46 (1993)

Ma, S.C., Chaniotakis, N.A. and Meyerhoff, M.E. : Response properties of ion-selective polymeric membrane electrodes prepared with aminated and carboxylated polyvinyl chloride, *Anal. Chem.*, 60, 2293-2299 (1988)

Manclus, J.J., Primo, J. and Montoya, A. : Development of a chlorpyrifos immunoassay using antibodies obtained from a simple hapten design, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1257-1260 (1994)

Marco M.P., Gee, S. and Hammock B.D. : Immunochemical techniques for environmental analysis : II. antibody production and immunoassay development, *Trends in Analytical Chemistry*, 14, 415-425 (1995)

Marlow, S.J. and Handa, A.K. : Immuno slot-blot assay using a membrane which covalently binds protein, *J. Immunological methods*, 101, 133-139 (1987)

Masseyeff, R.F. and Staines, N.A. (Ed.) : Methods of immunological analysis, Vol 2, VCH Publishers Inc., New York (1993)

Matolcsy, G., Nadasky, G. and Andriska, V. : Pesticide chemistry, Elsevier, Amsterdam (1988)

McAdam, D.P., Hill, A.S., Beasley, H.L. and Skerrit, J.H. : Mono- and polyclonal antibodies to the organophosphate fenitrothion : 1. approaches to hapten-protein conjugation, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1466-1470 (1992)

Mendoza, C.E., Wales, P.J., Mcleod, H.A. and McKinley, W.P. : Enzymatic detection of ten organophosphorus pesticides and carbaryl on a thin-layer chromatograms : an evaluation of indoxyl, substituted indoxyl and 1-naphthyl acetate as substrates of esterases, *Analyst*, 93, 34-38 (1968)

Mercader, J.V., Primo, J. and Montoya, J. : Production of high-affinity monoclonal antibodies for azinphos-methyl from a hapten containing only the aromatic moiety of the pesticide, *J. Agric. Food Chem.*, 43,

2789-2793 (1995)

Meyerhoff, M. E. : In vivo blood-gas and electrolyte sensors : progress and challenges, *Trends Anal. Chem.*, 12, 257-266 (1993)

Morissette, C., Goulet, J. and Lamoureux, G. : Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin B in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 836-842 (1991)

Nelson, J.O., Karu, A.E. and Wong, R.B. (Ed.) : ACS Symposium Series 586, American Chemical Society, Washington, DC (1995)

Nunes, G.S., Skladal, P., Yamanake, H. and Barcelo, D. : Determination of carbamate residues in crop samples by cholinesterase-based biosensors and chromatographic techniques, *Anal. Chim. Acta*, 362, 59-68 (1998)

Plapp, B.V., Moore, S. and Stein, W.M. : *J. Biol. Chem.*, 246, 939-945 (1971)

Potter, W.D.U.S. : *Patent*, 4, 534-555 (1985)

Prodenziuati, M. (Ed.) : Thick-film sensors, Elsevier, Amsterdam (1994)

Rittenburg, J.H. (Ed.) : Development and application of immunoassay for food analysis, Elsevier science publishers, London (1990)

Schneider, E., Drietrich, R., Märtbauer, E, Usleber, E. and Terplan, G. : Detection of aflatoxins, trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone by test strip enzyme immunoassay : a rapid method for screening cereals for mycotoxins, *Food & Agricultural Immunology*, 3, 185-193 (1991)

Schneider, E., Usleber, E., Märtbauer, E., Drietrich, R. and Terplan, G. : Multimycotoxin dipstick enzyme immunoassay applied to wheat, *Food Additive & Contaminants*, 12, 387-393 (1995)

Schneider P. and Hammock B.D. : Influence of the ELISA format and the hapten-enzyme conjugate of the sensitivity of an immunoassay for s-triazine herbicides using monoclonal antibodies, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 525-530 (1992)

Schneider, P., Goodrow, M.H., Gee, S.J. and Hammock, B.D. : *J. Agric. Food Chem.*, 42, 413-422 (1994)

Shin, J.H., Yoon, S.Y., Yoon, I.J., Choi, S.H., Lee, S.D., Nam, H. and Cha, G.S. : Potentiometric biosensors using immobilized enzyme layers mixed with hydrophilic polyurethane, *Sens. Actuators B*, in press (1998)

Skladal, P. : Biosensors based on cholinesterase for detection of pesticides, *Food Technol. Biotechnol.*, 34, 43-49 (1996)

Skladal, P., Nunes, G.S., Yamanake, H. and Riberio, M.L. : Detection of carbamate pesticides in vegetable samples using cholinesterase-based biosensors, *Electroanalysis*, 9, 1083-1087 (1997)

Takruni, I.A., Ala'ddin, M. and Almuaided, A.T. : Flow-injection study of inhibition and reactivation of immobilized acetylcholinesterase : determination of the pesticides paraoxon and carbamoylcholine. *Anal. Chim. Acta*, 282, 307-312 (1993)

Thomas, J.D.R. : Solvent polymeric membrane ion-selective electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 180, 289-297 (1986)

Tor, R. and Freeman A. : New enzyme membrane for enzyme electrodes,

Anal. Chem., 58, 1042-1046 (1986)

Trammel A.M., Simmons, J.E. and Borchardt, R.T. : An efficient in vitro assay for acetylcholinesterase reactivators using immobilized enzyme, *Pharm. Res.*, 3, 115-120 (1984)

Tran-Minh, C., Pandey, P.C. and Kumaran, S. : Studies on acetylcholine sensor and its analytical application based on the inhibition of cholinesterase. *Biosensor & Bioelectronics*, 5, 461-471 (1990)

Tran-Minh, C. : Biosensors, Chapman & Hall, London (1993)

Trojanowicz, M. and Hitchman, M. : Determination of pesticides using electrochemical biosensors. *Trends Anal. Chem.*, 15, 38-45 (1996)

Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G.S. : Biosensors, fundamentals and applications, Oxford university press, New York (1989)

Usleber, E., Schneider, E., Märtbauer, E. and Terplan, G. : Two formats of enzyme immunoassay for 15-acetyldeoxynivalenol applied to wheat, *J. Agric Chem.*, 41, 2019-2023 (1993)

Vallejo, R.P., Bogus, E.R. and Mumma, R.O. : Effect of hapten structure and bridging groups on antisera specificity in parathion immunoassay development, *J. Agric. Food Chem.*, 30, 572-581 (1982)

Vanderlaan, M., Stanker, L.H., Watkins, B.E. and Roberts, D.W. (Ed.) : Immunoassays for Trace Chemical Analysis, ACS Symp. Ser., No. 451, American chemical society, Washington, D.C. (1991,a)

Vanderlaan, M., Stanker, L.H., Watkins, B.E. and Roberts, D.W. (Ed.) : American Chemical Society, Washington, D.C. (1991,b)

Wild, D. (Ed.) : Immunoassay Handbook, Stockton press, New York (1994)

Wilson, R. and Turner, A.P.F. : Glucose oxidase, *Biosensor & Bioelectronics*, 7, 165-186 (1992)

Wittmann, C. and Hock, B. : Development of an ELISA for the analysis of atrazine metabolites deethylatrazine and deisopropylatrazine, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1194-1200 (1991)

Wortberg, M., Orban, M., Renneberg, R. and Camman, K. : Handbook of biosensors and electronic noses, CRC press, Boca Raton (1997)

Work, T. S. and Work, E. (Ed.) : Biochemistry and molecular biology, Elsevier, Amsterdam (1978)

Yim, H.S., Kibbey, C.E., Ma, S.C., Kliza, D.M., Liu, D., Park, S.B., Torre, C.E. and Meyerhoff, M.E. : Polymer membrane-based ion-, gas- and bio-selective potentiometric sensors, *Biosensor & Bioelectronics*, 8, 1-38 (1993)

Young, P.R. : An improved method for the detection of peroxidase-conjugated antibodies on immunoblots, *Journal of Virological Methods*, 24, 227-236 (1989)

Yun, S.Y., Hong, Y.K., Oh, B.K., Cha, G.S., Nam, H., Lee, S.B. and Jin, J.I. : Potentiometric properties of ion-selective electrode membranes based on segmented polyether urethane matrices, *Anal. Chem.*, 69, 868-873 (1997)

Zhang, G.H., Imato, T., Asano, Y., Sonoda, T., Kobayashi, H. and Ishibashi, N. : Vitamin B₁ sensitive poly(vinyl chloride) membrane

electrode based on hydrophobic tetraphenylborate derivatives and their application, *Anal. Chem.*, 62, 1644-1648 (1990)

제 3 장 농산물의 필수아미노산 측정센서 개발 분야

제1절 서론

1. 지금까지 개발된 필수 아미노산 센서의 형태와 성능

타 연구자들에 의해 보고된 아미노산 센서의 종류, 사용된 효소, 전극 또는 변환기, 고정화 방법들을 요약하면 다음과 같다. 지금까지 보고된 필수아미노산 센서들은 lysine(Wessbach et al., 1987; Romette et al., 1983 & 1988; Simonian et al., 1991), methionine(Fung et al., 1979), phenylalanine(Guilbault & Nagy, 1973; Hsiung et al., 1977), tryptophan(Linders et al., 1985)이며 아미노산 반응에 사용된 효소들은 decarboxylase, oxidase, lyase 들이 주로 사용되었다. 비필수아미노산 센서들로는 alanine(Paul & Rechintz, 1984), arginine(Valle-vega et al., 1980), asparagine(Nikolelis, 1984), aspartate(Fatibello-Filho, 1989), glutamine(Guibault & Shu, 1971; Arnold & Rechnitz, 1980), glutamate(Yao et al., 1990; Luong et al., 1991), histidine(Walters et al., 1986), tryosine(Havas & Guilbault, 1982; Guilbault & Shu, 1972)이 있으며 반응효소로는 dehydrogenase, arginase, asparaginase, aspartase, glutaminase, oxidase, decarboxylase가 사용되었다. 이들 아미노산의 효소반응 생성물들은 pNH_3 전극, NH_4^+ 전극, H_2O_2 전극, pCO_2 전극들에 의해 감지되어 정량되었으며 효소의 고정화시에는 cross-linking제와 지지체로 glutaraldehyde와 glass beads가 가장 많이 사용되었다.

2. 본 세부분야에서 개발된 필수아미노산 측정용 바이오센서의 이론적배경

바이오센서의 종류는 transducer의 형태에 따라 전기 화학적센서, 반도체센서, 열센서, 압력센서, 광센서 등으로 분류된다. 본 세부분야에서는 전기 화학적 센서와 광센서를 응용한 필수 아미노산 측정용 센서에 대한 개발 연구를 수행하였다. 이들 두 가지 센서와 관련되는 이론적 배경은 다음과 같다.

가. Carbonate 이온선택성 전극을 이용한 전위차법 전기화학 효소센서

전기화학 센서의 일종인 전위차법 (potentiometric method)은 기준전극과 지시전극간의 전위차를 측정하는 것으로써, 전극의 감응전위는 분석물질의 농도와 비례하여 Nernst 법칙에 따른 농도의 log값으로 나타내어진다.

본 실험에서는 연속흐림장치(FIA system, flow injection analysis system)와 탐침형의 carbonate 이온선택성 전극을 제작하여 용액 중 필수아미노산을 측정하였다. 즉, 아미노산 정량시 기질 특이성이 있는 특정효소를 활성화된 beads에 고정시켜 효소 반응기를 만든 다음, 이것을 시료 주입기와 연결시키고 carrier 용액을 FIA system을 통해 연속적으로 흘렸을 때 아미노산 효소반응에 의해 생성된 CO_3^{2-} 로 인해 생기는 전극간 전위차를 측정함으로써 정량이 가능하다. 또한 carbon dioxide electrode를 사용하여 FIA형 대신 probe type 전극을 사용한 경우는 아미노산과 반응하여 CO_2 를 생성하게 하는 amino acid decarboxylase를 Sepharose 4B에 고정시켜 lysine 시료용액과 동시에 시료 투입기를 통해 반응기에 주입하여 그 감응을 분석하였다.

나. 표면 플라즈몬 공명형 (Surface Plasmon Resonance, SPR형) 필수
아미노산 센서

1) 표면 플라즈몬 공명이론

광센서의 일종인 표면 플라즈몬 공명형 필수아미노산 센서의 기본원리는 다음과 같이 요약된다. 플라즈마는 전하밀도가 집단적으로 진동하고, plasma 진동 또는 플라즈마라고 불리는 종파로 전파된다. 표면플라즈마파라는 것은 그 표면파이며, 그 에너지는 플라즈마표면으로부터 내부 또는 외부로 전파되지 않고 표면상을 진행하는 특성을 지닌다. 이는 마치, 전반사각으로 빛이 입사될 때 생기는 소산파와 닮았으며 양자론적으로는 이 파(wave)를 플라즈몬이라고 부른다(Kazuhico & Tsuyoshi 1993, Jose et al, 1996).

외부에서 전자기파를 금속 표면에 입사시키면, 금속 표면에 여기된 하전 입자들의 진동에 따라 표면 플라즈몬파가 형성된다. 입사광에 의해 여기되어 금속 표면에서 진동하는 표면 플라즈몬파는 TM(Transverse magnetic) 편광에 의해 전기적 성분만을 가진 전장성분과 결합하고 그 전장성분은 다음 식과 같이 표현 할 수 있다.

$$E_{z0}(x,z,t) = E_{z0} \exp[i(k_x x - \omega t)] \exp(-|k_{z0}| Z) \quad (Z > 0)$$

$$E_z(x,y,t) = E_{z1} \exp[i(k_x x - \omega t)] \exp(+|k_{z1}| Z) \quad (Z > 0)$$

여기에서, E_{z0} 는 진공 상태에서의 전장성분, E_{z1} 는 금속에서의 전장성분을 나타낸다. 우변의 첫 번째 지수항은 Fig. 3-1의 X방향으로의 플라즈몬파의 전파, 두 번째 지수항은 Z방향으로의 전장의 감소를 나타낸다. 또한 파수 벡터 (k_0)를 표면 플라즈몬의 파수 벡터로 나타내면, $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda} = \frac{\omega}{c}$ 이고, 입사광에 의해 금속표면과 시료 사이에서 여기된 표면 플라즈몬의 파수 벡

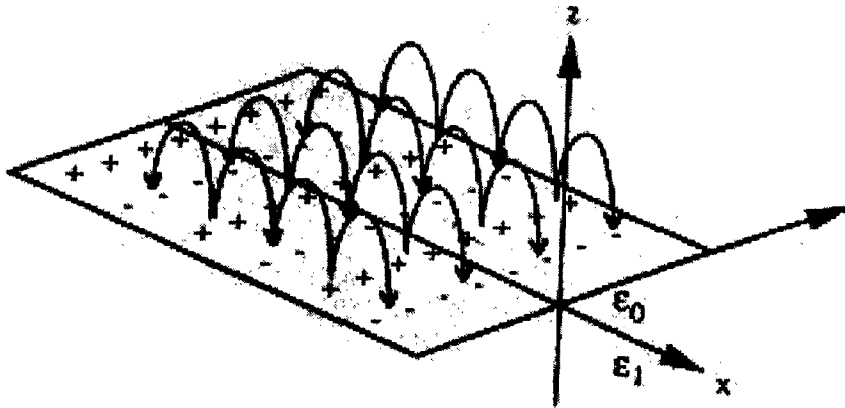


Fig. 3-1. Charge and electric field distributions for a surface plasmon propagating in the x direction in the dielectric space ($z > 0$) above a metallic surface (Jose et al., 1996).

여기 k_{sp} 는 $k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_{mr} \cdot \epsilon_s}{\epsilon_{mr} + \epsilon_s}}$ 이다. ϵ_{mr} 은 금속의 유전율이고, ϵ_s 는

시료의 유전율, c 는 광속, ω 는 주파수를 나타낸다. 그리고, ω 의 주파수로

시료의 내부를 전파하는 입사광의 파수벡터 (k_s)는 $k_s = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_s}$ 와 같다. 금

속의 유전율은 항상 -1보다 작은 유전율을 가지므로 Fig. 3-2의 분산곡선을

얻을 수 있고, 시료 내부를 전파하는 입사광의 파수벡터 (k_s)의 주파수는 항

상 표면 플라즈몬의 주파수 (k_{sp})보다 크며 어떤 지점에서든 교차하지 않는데

이는 표면 플라즈몬과 입사광이 자연적으로는 공명을 이룰 수 없음을 보여

준다.

광파에서 갖는 표면 플라즈몬을 여기할 수 있는 광학계 중 Kretschmann

이 고안한 고굴절률의 프리즘을 사용한 방법이 특히 화학 센서 응용면에서

실용성이 높다. Kretschmann법은 고굴절률의 프리즘의 한 면에 금속 박막을

코팅하고, 이 금속을 시료와 접하도록 하고, 광파를 프리즘 측으로부터 금속

박막에의 전반사각 이상에서 입사시키고 반사광 강도를 측정하는 것이다. 이때, 반사면 경계면에서 생기는 소산파 (evanescent wave)의 파수벡터(k_{ev})와 반사면 표면에서 여기된 플라즈몬파의 파수벡터(k_{sp})의 공명이 이루어지는데, 그 구조는 Fig. 3-3과 같다.

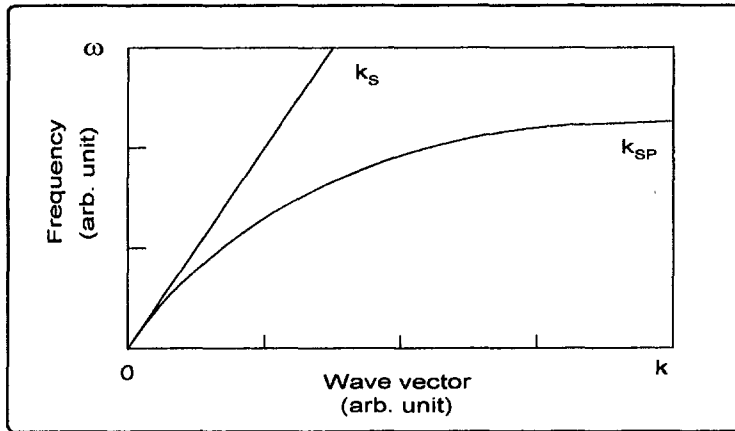


Fig. 3-2. Dispersion curve of the light in sample (k_s) and surface plasmon (k_{sp}).

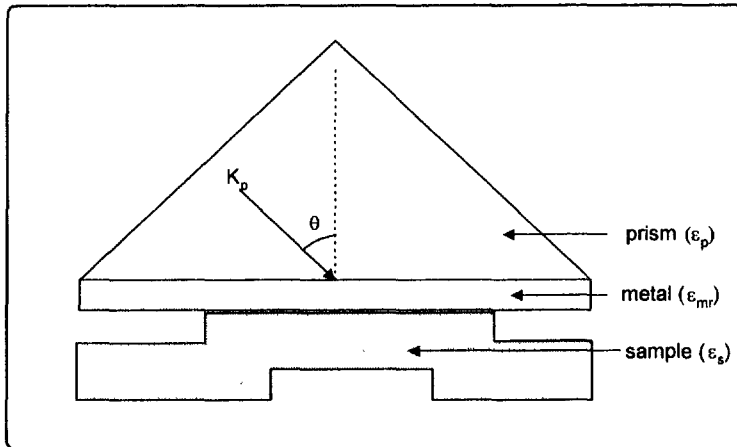


Fig. 3-3. Kretschmann's configuration for observing surface plasmon resonance.

이 구조에서 프리즘에 입사된 광의 파수벡터 k_p 는 $k_p = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_p}$ 이고, 빛이 입사각 θ 로 표면에 입사된다면 프리즘의 빗변에 발생하는 소산파의 파수벡터 k_{ev} 는 $k_{ev} = k_p \sin \theta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_p} \sin \theta$ 이다. 따라서 Fig. 3-3과 같이 소산파의 파수벡터(k_{ev})곡선은 그 기울기가 매질 내에서 입사광의 파수벡터(k_s)보다 $\sin \theta$ 만큼 작아져 표면 플라즈몬의 파수벡터(k_{sp})의 분산곡선과 입사광의 임의의 주파수 ω_0 점에서 두 파수벡터가 교차함을 알 수 있다. 즉 임의의 주파수 ω_0 에서 $k_{ev} = k_s$ 이며, 이것은 입사각이 공명각 θ_{sp} 로 프리즘에 입사될 때, 금속 표면에 여기된 플라즈몬의 파수벡터(k_{sp})와 소산파의 파수벡터(k_{ev})가 ω_0 의 같은 주파수를 가지므로 서로 공명이 일어남을 의미한

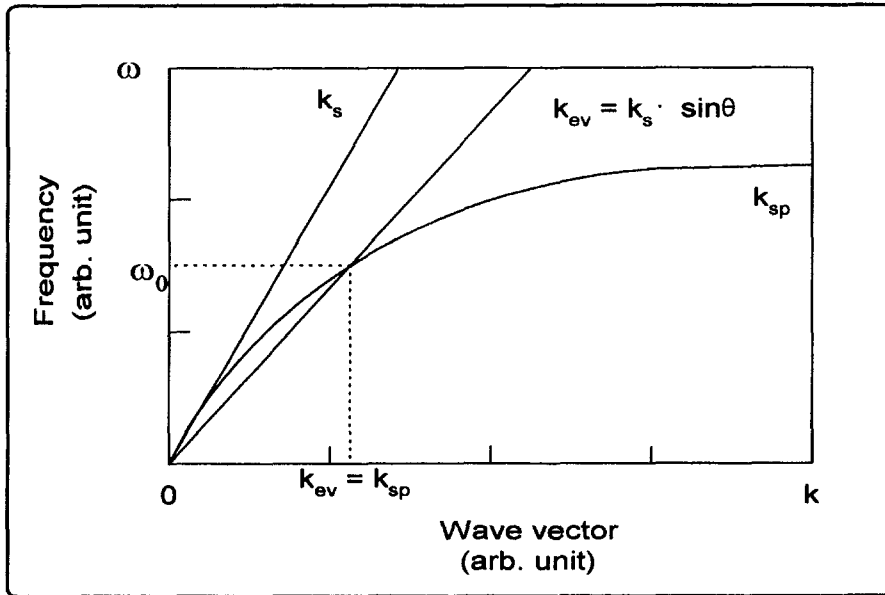


Fig. 3-4. Dispersion curve of evanescent wave vector (k_{ev}) and surface plasmon wave vector (k_{sp}).

다(Fig. 3-4). 이때, 입사각 θ 의 변화에 의한 반사광 강도를 측정하면, 소산파의 특징인 그 파수벡터(k_E)가 프리즘 외측 물질 중을 전파하는 광파의 파수벡터(k_s)보다 큰 조건에서만 광에너지가 표면 플라즈몬으로 이행하고, 그 결과 공명지점에서 광의 반사율이 떨어지는 것을 관찰할 수 있다.

2) 표면 플라즈몬 공명형 (Surface Plasmon Resonance, SPR) amino acid sensor의 감응원리

광센서를 이용한 다양한 계측기는 빠른 감응속도, 고감도 및 높은 정밀도 등의 특성을 가지므로 최근 계측산업분야에서의 이용도가 급격히 증가되고 있다. 광센서 기술 중에서도 특히 SPR 현상을 이용한 센서들은 주로 용액내의 미량물질 감지(Ideta & Tsuyoshi, 1993; Melendez et al., 1996), 가스감지(Nyeon, 1997; Jory et al., 1994; Liedberg et al., 1983), 및 생체물질 감지(Liedberg & Lundstorm, 1993; Kukosz 1991; Millot et al., 1995)에 사용되고 있다. SPR형 바이오 센서는 입사된 레이저 광에 의해 여기된 플라즈몬파와 소산파(evanescent wave)가 임의의 각에서 공명되어 반사도가 급격히 감소되는 현상(공명각)을 이용하며(Douglas & David, 1996), 또한 이 공명각은 센서칩 표면의 질량 변화 등에 따른 유전율 변화에만 기인되므로 picomole 수준의 저농도 시료까지도 감지할 수 있는 높은 감도를 가진다. 이러한 특징을 가지는 표면 플라즈몬 공명현상을 이용한 센서 시스템으로는 회절 격자를 이용한 방법(Jory et al., 1994)과 광도파로를 이용한 방법(Harris & Wilkinson, 1995), 프리즘을 이용한 방법(Liedberg et al., 1995)이 있으며, 프리즘을 이용한 방법은 회절 격자 방법이나 도파로 방법에 비해 구조가 간단하며 센서 시스템화가 쉽고 효율이 좋은 장점을 가진다. 본 세 분야에서는 프리즘 방법의 표면 플라즈몬 공명 현상을 이용한 센서 시스

템을 구성하고, 금박막을 커버 글래스에 진공증착한 센서칩을 제작하여 필수아미노산 농도를 측정하였다.

적정 조건에서 금박막의 반사도는 시료인 필수아미노산 용액의 농도에 대해 선택적으로 변화된다. 이것은 표면 플라즈몬이 경계면 상태에서 sensitive probe로 작용하기 때문이다. 입사각의 파수벡터와 표면 플라즈몬이 일치되는 각에서 입사광의 흡수가 증가되며, 이에 반해 박막의 반사도는 눈에 떨 만큼 감소한다. 반사도가 최소가 되는 각(공명각)은 금속의 광학적 성질, 박막의 두께, 박막면에서 소산파(evanescent wave)거리 내의 필수아미노산과의 상호작용에 의해 결정된다.

제2절 연구방법

1. 전위차법을 이용한 필수 아미노산 센서 제작실험

가. FIA(flow injection analysis)형 carbonate-selective electrode 제작

전기화학적으로 필수아미노산을 정량하는 방법에 대한 문헌조사 결과 전극위에 각 필수아미노산과 특이하게 반응하는 효소와 mediator를 수식한 효소전극을 써서 효소반응을 통해 생성된 물질을 직접 정량하거나, 효소가 고정화된 지지체를 column안에 채워서 효소반응기를 만들고 생성된 물질을 전기화학적으로 정량하는 방법이 있음을 알 수 있었다. 또한 일반적으로 효소등을 이용한 전기화학적 방법은 선택성이 매우 좋으며 다른 방법에 비해서 타성분에 의한 방해효과가 적고, 정확도와 정밀도가 높다. 이러한 효소전극을 쓰는 경우에는 사용이 간편하고 응답시간이 짧은 장점이 있으나, 전극표면과 효소의 부착력이 낮고 계속하여 쓸 경우에 효소의 활성도가 떨어지며 측정값의 재현성이 낮은 단점들이 있다. 따라서 최근에는 안정성이 뛰어나고 재현성이 좋은 효소반응기를 쓴 FIA system에 의한 연구실험(Male et al., 1993; Cooper et al., 1993)이 활발히 시도되고 있다.

본 실험에서는 먼저 potentiometric method로 FIA system을 이용한 carbonate 이온 선택성 전극(ion selective electrode, ISE)센서를 제작하여 필수아미노산중 lysine을 기질로 한 효소반응 생성물인 CO_3^{2-} ion에 대해 정량적으로 감응케 함으로써 시료내 기질양을 측정하는 실험을 시도하였다. 아미노산 센서 중 CO_3^{2-} ion 감응장치는 본 연구에서 처음으로 시도되는 바인데, 첫째, CO_3^{2-} ion에 선택적으로 감응하는 ISE로 carbonate selective 전극을 만들고 둘째, 필수아미노산에 기질 특이성이 있는 essential amino

acid decarboxylase를 활성화된 beads에 고정화시켜 이것을 teflon tube에 채워 효소반응기를 만든 다음, 마지막으로 시료주입기와 연결하여 전위차를 자동기록하게 하는 센서를 제작하였다. 제작된 이 센서장치에서는 carrier 용액이 FIA system을 통해 연속적으로 흐르는 상태에서 아미노산 효소반응에 의해 생성된 CO_3^{2-} 로 인해 ISE 전극과 reference 전극간 전위차가 생성되는데, 이때 생기는 전위차는 시료내의 기질인 특정 필수아미노산 양에 비례하므로 그 정량적 분석이 가능하다.

1) FIA형 potentiometric system

본 실험에서 아미노산 측정을 위해 사용된 FIA system의 개략도는 Fig. 5와 같다.

Fig. 3-5의 FIA 장치 전극은 본 실험실에서 제작한 electrochemical flow-through-cell(Ag/AgCl 전극)이 작동전극으로 사용되었고, 그리고 기준전극은 Sigma제인 Corning reference electrode (Double-junction Ag/AgCl)이다. 전극에 흐르는 전위를 연속적으로 기록하기 위하여 Kipp & Zomen 912756 Strip chart recorder를 사용하였다. 시료를 효소반응기에 주입하기 위하여 Rheodyne 3795 sample injector (100 μL)와 Hamilton Microsyringe를 사용하였으며 carrier 용액을 일정한 유속으로 공급하기 위해서 IsmaTec 756A Peristaltic pump를 이용하였다. 필수아미노산 decarboxylase와 필수아미노산은 Sigma (USA)제를 사용하였다. 이 밖의 모든 시약과 염들은 Fluka (Swiss)제를 사용하였고, 모든 용액의 제조에는 초순수증류, 탈염한 물($\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$)을 사용하였다.

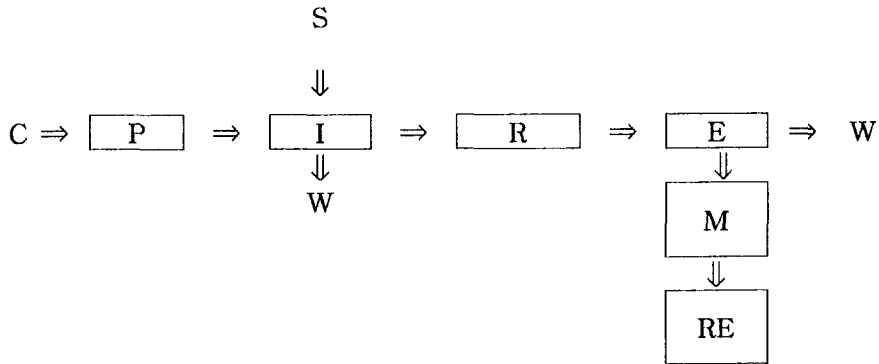


Fig. 3-5. A schematic diagram of the continuous potentiometric system for the determination of essential amino acid using enzyme reactor. C, Carrier solution ; P, Peristaltic pump ; I, injector ; W, waste ; R, essential amino acid decarboxylase reactor ; E, electrochemical flow cell ; M, milivoltmeter ; RE, strip chart recorder ; W, waste.

2) Carbonate-selective membrane과 ISE 제작

Carbonate-selective membrane의 조성은 PVC 35%, dioctyl sebacate 59%, tridodecyl methyl ammonium chloride 2%, carbonate ionophore 4% 로 이루어졌으며 tetrahydrofuran 에 용해시켜 제조하였다. FIA system에 사용되는 carbonate-selective 전극제작은 Meyerhoff(1982)와 Kovach(1983)의 방법을 사용하여 tubular flow-through carbonate selective membrane electrode로 만들었다. 이 tubular ISE 는 PVC tubing (0.89mm i.d.)내부로 20 gauge 주사바늘을 삽입한 후 그 위에 면도칼로 작은 홈을 파내고 소량의 membrane casting 용액을 채워 건조하였으며, 사용전에는 carrier buffer 를 연결하여 membrane을 충분히 수화시킨 후 시료 분석에 사용하였다.

3) 효소반응기의 제작

Lysine decarboxylase 1.6 mg (90~180 units/mg)을 0.5 g의 CNBr-activated Sepharose 4B와 0.2 g의 alkylamine glass에 각각 고정시켰다. Sepharose 4B의 coupling 용액은 0.1 M Na₂CO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.0 을 사용하였으며 18시간동안 4°C에서 bead와 효소를 포함한 고정용액을 반응시키면서 교반시켰다. 그 결과 총효소 단백질중 98%가 지지체 (Sepharose 4B)에 고정된 것으로 계산되었다. 한편 동일효소를 alkylamine glass에 고정시킬때는 2.5% glutaraldehyde 용액 5 ml에 alkylamine glass를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 방치한 후 미반응한 glutaraldehyde를 탈이온화한 증류수로 씻었다. 그 다음 효소 1 mg을 0.10 M phosphate buffer (pH 7.3)에 녹인 용액 5 ml에 activated glass를 첨가하여 4°C에서 2시간 동안 방치하였다. Alkylamine glass beads에 고정된 효소의 coupling efficiency는 65% 로 측정되었다. 이와 같이 효소가 고정된 sepharose bead와 glass bead를 carrier buffer (10⁻³ M sodium acetate, 10⁻³ M pyridoxal phosphate, pH 5.8) 용액으로 세척하여 teflon 관(안지름 2.8 mm, 길이 7 cm)에 각각 채웠다. 이때 carrier buffer 의 pH는 0.01 M acetic acid로 맞추고 사용전 용액 내 CO₂를 제거하였다. 효소반응관의 양끝은 glass wool로 막고 nipple을 끼워 Fig. 3-5 장치의 FIA system에 연결한후 그 성능을 비교하였다.

나. Probe type carbon dioxide electrode를 이용한 lysine 감응실험

앞서 제작된 FIA (flow injection analysis)형 carbonate-selective electrode의 감응도 향상을 위한 실험을 수행한 결과, 효소반응의 최적 pH

조절이 용이하지 않아 탐침형 carbon dioxide electrode를 사용한 새로운 lysine 센서를 개발하여 그 최적조건을 설정하였다.

1) Probe type lysine 센서의 최적 검출방법 및 모델확립 실험

Carbon-dioxide electrode를 probe형태로 사용하되 효소반응이 진행되는 순간 같은 용기내에서 전극감응 반응이 동시에 일어나도록 하는 탐침형 전극장치(Fig. 3-6)를 사용한 실험을 실시하였다. 이 장치에서 NaHCO_3 와 lysine시료에 대한 전극감응도가 신속하고 그리고 정량적으로 감응하는 반응조건을 모색하였다. 이 감응장치를 이용한 lysine 측정 센서의 최적 검출 조건 확립하는 다양한 실험을 다음과 같이 수행하였다.

가) 새로이 고안된 lysine 측정센서의 최적검출조건 설정실험

(1) Lysine decarboxylase의 고정화 반응.

Lysine decarboxylase 1.6 mg(90-180 units/mg)을 전술한 바와 같이 0.5 g의 CNBr-activated Sepharose 4B에 고정시켰다. Sepharose 4B의 coupling 용액은 0.1 M Na_2CO_3 , 0.5 M NaCl, pH 8.5를 사용하였으며, 18시간 동안 4°C에서 Sepharose 4B와 효소를 포함한 reaction mixture를 교반하면서 반응시켰다. 그 결과 단백질 중 98%가 지지체에 고정되었다.

(2) Probe type CO_2 electrode를 사용한 lysine 센서의 측정원리.

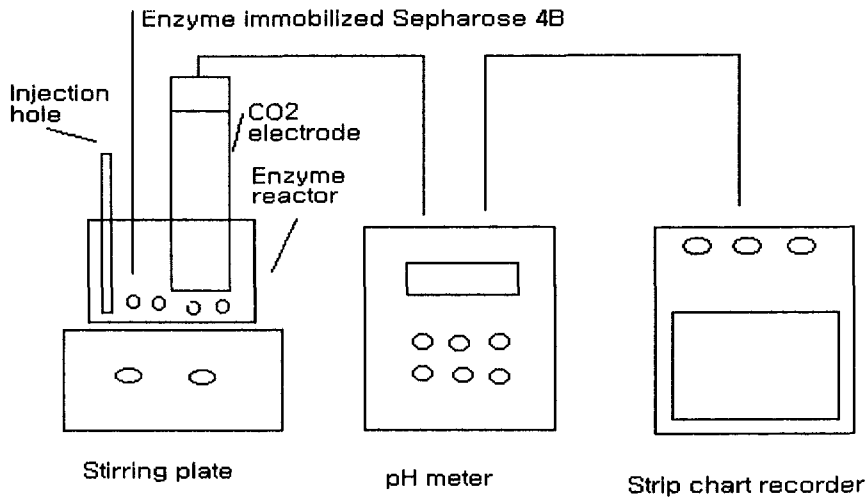
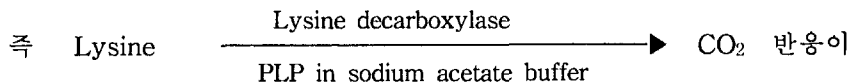


Fig. 3-6. Diagram of lysine sensor.

Fig. 3-6에서와 같이 lysine과 반응하여 CO₂를 생성케하는 lysine decarboxylase는 sepharose 4B에 고정되어 lysine 시료용액과 마찬가지로 시료 투입기를 통해 주입되었으며, 전체 반응용액의 부피는 2.2 mL가 되도록 조절하였다. 이때 반응용액을 교반함과 동시에 전극감응 반응이 즉시 일어나며 그 potential 변화는 30초 이내에 recorder에 기록되었다.



일어나며, 이때 반응용기에 생성된 CO₂는 전극의 carbonate selective membrane으로 선택적으로 diffuse 되며 전극내 internal filling solution 의 H⁺ 농도에 영향을 미친다. 구체적으로 CO₂ + H₂O ↔ H⁺ + HCO₃⁻ 반응이 일어나 internal filling solution의 H⁺ level은 전극 inner body의 pH전극에 감응된다.

(3) Lysine 센서의 최적감응조건 확립을 위한 다양한 실험들

Lysine 센서의 최적감응 조건을 설정하기 위해 다음의 실험들을 수행하였다.

- (가) 효소반응전 decarboxylase-immobilized sepharose의 최적상태설정
- (나) Sodium acetate의 농도 변화에 따른 lysine sensor의 감응도변화
- (다) Sodium acetate buffer의 pH가 lysine센서 감응도에 미치는 영향
- (라) Sodium acetate buffer의 PLP농도가 lysine센서의 감응변화에 미치는 영향
- (마) Immobilized enzyme slurry의 양이 lysine 센서의 감응도에 미치는 영향 .
- (바) 효소반응 온도가 lysine 센서의 감응도에 미치는 영향 측정

위의 (가)~(바) 실험에 사용된 반응조건들은 이해상 편의를 고려하여 보고서의 연구결과편에 함께 서술하였다.

2. SPR형 phenylalanine 센서 제작실험

가. 일반적인 SPR형 센서의 감지 작용

최근 고분자간의 특정 반응성을 실시간(real time)으로 측정할 수 있는 바이오센서의 다양한 기법으로 표면 플라즈몬 공명현상을 이용하여 특정 물질과 그 농도를 선택적으로 검출하는 것이 주목받고있다. SPR형 센서에서는 굴절율이 서로 다른 두가지 매질 사이에서 굴절율이 큰 매질로부터 입사되는 광은 부분적으로 반사되고 부분적으로는 굴절이 일어난다. 그러나, 특

정 입사각 이상에서는 굴절되는 광이 없고 전 입사광이 반사되어진다. 이때 입사광이 전반사가 되는 조건에서도 입사광의 일부인 소산파라고 불리는 광의 전자기파 성분은 매우 짧은 거리로 한정되어지나 낮은 굴절율을 갖는 매질 속으로 입사되어진다. 만일 두 매질 사이에 자유전자가 풍부한 매우 얇은 금속박막이 존재하고 입사광의 전기적인 벡터성분이 입사면의 평행인 편광을 사용할 경우, 반사되는 광의 특정한 각도에서 광의 밀도가 최소로 되는 현상이 나타난다. 이것을 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon Resonance, SPR)현상이라 하고 이때 입사각을 SPR공명각도라고 부른다. SPR공명각도는 반대편 매질의 굴절율에 매우 민감하게 반응하며, 반대편 매질에서 질량 변화 등에 의한 굴절율의 변화가 생기면 광밀도의 최소점 위치가 변하게 된다. 이때 SPR공명각도의 변화를 시간별로 그래프로 그릴 수 있는데 이것을 센서그램 (sensogram) 이라하고 SPR각도를 Resonance Unit(RU)로 환산하여 기록한 것을 Resonance signal이라 한다.

나. SPR형 phenylalanine 센서 시스템 제작 및 성능시험

1) Phenylalanine 센서 시스템 구성

본 표면 플라즈몬 공명 센서의 시스템은 Fig. 3-7과 같은 구조로 제작되었다. 광원은 3 mW의 레이저 다이오드 ($\lambda = 670 \text{ nm}$, Imatronic Inc.)를 사용하였고, 이 레이저 다이오드의 구동에 필요한 DC 5 V의 구동 전압과 60 mA의 드레인 전류는 HEWLETT PACKARD사의 전원 공급 장치 (E3616A)를 사용하여 공급하였다. 그리고 이론에서 설명된 바와 같이 입사광에 의해 여기되는 플라즈몬은 전장성분만을 가지므로, 표면 플라즈몬파와 소산파의 공명 조건을 만들어 주기 위해 P 편광기 (SURUGA SEIKI CO.)

를 사용하여 입사광을 TM 편광 시켰다. 편광된 입사광은 핀홀 (pin-hole) 을 통과해 직각 프리즘 ($n = 1.515$, SIGMA, BK7)에 입사되고, 프리즘의 아래에는 센서칩이 놓여진다. 이 과정에서 프리즘과 센서칩 사이는 공기 층에 의한 굴절률 차가 생기므로 이물질 오일 ($n = 1.515 \sim 1.517$, MERCK)을 프리즘과 센서칩 사이에 주입하여 굴절률 차를 최소화할 수 있었다. 그리고, 센서칩 아래에는 테프론으로 제작된 $560 \mu\text{L}$ 의 내부 체적을 갖는 시료 충전셀을 두었으며, 지그 (jig)를 제작하여 프리즘과 시료충전셀 사이를 가압하였다. 이렇게 구성된 감지부는 X-Y- θ stage (SURUGA SEIKI CO.) 위에 고정되고 이 stage를 사용해 프리즘에 입사각의 변화를 주며, 입사각의 변화에 따른 반사광의 강도 변화는 광검출기 (ADVANTEST, TQ8210)를 이용하여 측정하였다. 그리고 광원부와 감지부는 optical rail (NEWPORT)상에 정렬하여 센서 시스템을 완성하였다.

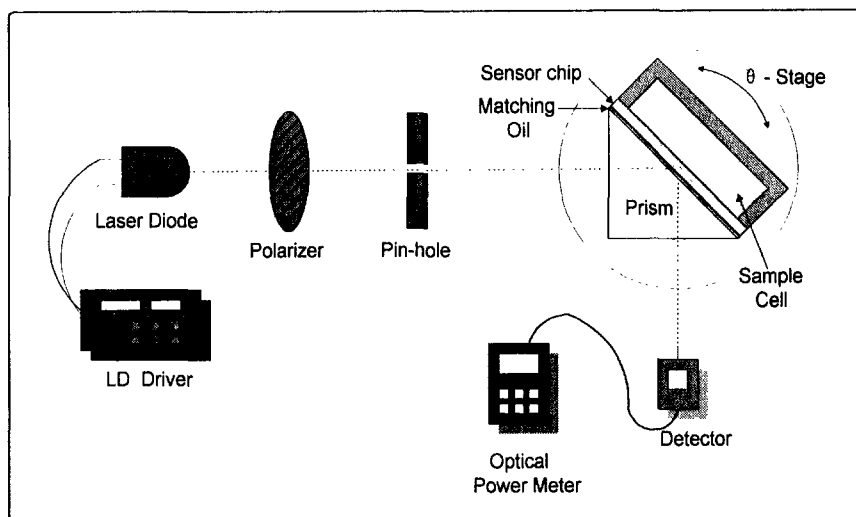


Fig. 3-7. Schematic diagram of the surface plasmon resonance sensor system for measuring phenylalanine.

2) 센서칩 제조실험

SPR형 biosensor에 있어 metal layer는 일반적으로 glass 또는 석영 프리즘에 증착되어 있으며, 빛이 입사될 때 다양한 표면의 변화들은 metal layer의 표면에서 일어난다. 이 실험에서는, 프리즘 ($n = 1.515$)과 굴절률이 거의 없는 얇은 커버글래스 ($n = 1.522$, $18 \times 18 \text{ mm}^2$, $t = 0.13 \text{ mm}$, MATSUNAMI)를 기판으로 사용하고 이 기판 위에 플라즈몬 여기가 쉽고 화학적으로 안정한 금속인 금을 Thermal evaporator (한국Varian(주))와 Electron-beam evaporator (NRC 3115, Varian)로 각각 증착시켜 센서칩을 제작하였으며 각 공명각의 변화를 비교 검토하였다. 그리고, 금의 진공증착 시 발생하는 커버글래스와 금 사이의 접착력 문제는 니켈크롬층을 증착하여 부착층을 형성함으로써 해결하였다. 센서칩은 Table 3-1과 Table 3-2와 같은 진공증착 조건을 사용하여 제조하였다.

Table 3-1. The condition of gold evaporation by thermal evaporator

Deposition parameter	
Vacuum	5×10^{-7} torr
Sample to source distance	33 cm
Boat	tungsten ($t = 0.2 \text{ mm}$)
Ni-Cr	0.001 g
Au	0.19 g (99.7%)

Table 3-2. The condition of gold evaporation by electron beam evaporator

Deposition parameter	
Vacuum	7×10^{-7} torr
Time	1 - 2 hr
HV (high voltage)	4 KV DC
Ni-Cr (thickness)	30 Å
Au (thickness)	500 Å

3) Phenylalanine 시료 제조

L-Phenylalanine(SIGMA)을 용해시킬 때 사용하는 용매를 각각 증류수, 0.1 M Tris buffer, 0.1 M Acetate buffer로 달리하면서 고농도로부터 저농도로 희석하여 $10^{-5} \sim 5 \times 10^{-2}$ M 범위에서 8종류의 서로 다른 농도를 갖는 시료를 제조하였다. 또한 buffer에 용해시킨 경우에는 pH 변화에 따른 선택성을 살펴보기 위해 pH를 각각 4, 7, 10으로 달리하여 시료를 제조하였다.

4) Thermal evaporator와 Electron beam evaporator로 제조된 sensor chip 을 이용한 phenylalanine의 농도측정

Thermal evaporator와 electron beam evaporator에 의해 금이 진공 증착된 센서칩으로 각각 공기와 증류수에 대한 공명특성을 측정하여 이론치와의 비교결과로 증착 상태를 판정하였다. 또한 용매로 증류수와 acetate buffer, tris buffer를 사용하여 phenylalanin 용액을 저농도에서 고농도로 변화시키

면서 농도변화에 따른 공명각 변화를 측정하였으며 금의 증착 방법에 따른 감지특성을 비교하였다.

3. SPR형 tryptophan 센서 시스템 제작실험 및 성능시험

가. Tryptophan 센서의 시스템 구성 및 설계실험

본 표면 플라즈몬 공명 센서시스템은 Fig. 3-7의 phenylalanine 측정장치를 보완하여 Fig. 3-8과 같이 제작하였다. 즉, 광원은 3 mw의 레이저 다이오드 ($\lambda=670$ nm)를 사용하고, 이 레이저 다이오드의 구동에 필요한 DC 5 V의 구동 전압과 60 mA의 드레인 전류는 HEWLETT PACKARD사의 전원 공급 장치를 사용하여 공급하였다. 그리고 입사광에 의해 여기되는 플라즈몬은 진장성분만을 가지므로, 표면 플라즈몬파와 소산파의 공명 조건을 만들어 주기 위해 P 편광기 (SURUGA SEIKI CO.)를 사용하여 입사광을 TM편광 (transverse magnetic polarization)시켰다. 편광된 입사광은 핀홀 (pin-hole)을 통과해 직각 프리즘 ($n = 1.515$, SIGMA, BKT)에 입사되고, 프리즘의 아래에는 센서칩이 놓여진다. 이 과정에서 프리즘과 센서칩 사이는 공기 층에 의한 굴절률차가 생기므로 이멀전 오일 ($n = 1.515-1.517$, MERCK)을 프리즘과 센서칩 사이에 주입하여 굴절률 차를 최소화하였다. 그리고, 센서칩 아래에는 테프론으로 제작된 890 μ l의 내부 체적을 갖는 시료충전셀을 두었으며, 지그(jig)를 제작하여 프리즘과 시료 충전셀 사이를 가압하였다. 이렇게 구성된 감지부는 X-Y- θ stage (SURUGA SEIKI CO.)위에 고정되고 이 stage는 Motorized Rotary Stage Controller와 연결하였다. 이 controller 속도비는 Handy Terminal I D700의 자동조절로 입사각의 변화를 정확하게 0.004° 까지 조절할 수 있다. 입사각의 변화에 따른

반사광의 강도 변화는 Multi Meter를 이용하여 측정하였다. 광원부와 감지부는 optical rail 상의 정렬하여 Fig. 3-8과 같은 센서 시스템을 구성하였으며, 실제 형태는 Fig. 3-9와 같다.

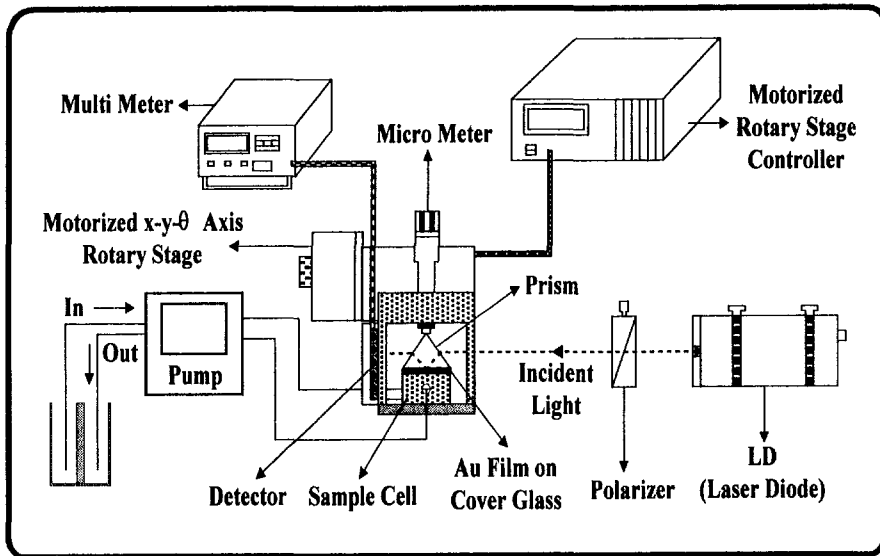


Fig. 3-8. Schematic diagram of the SPR sensor system.

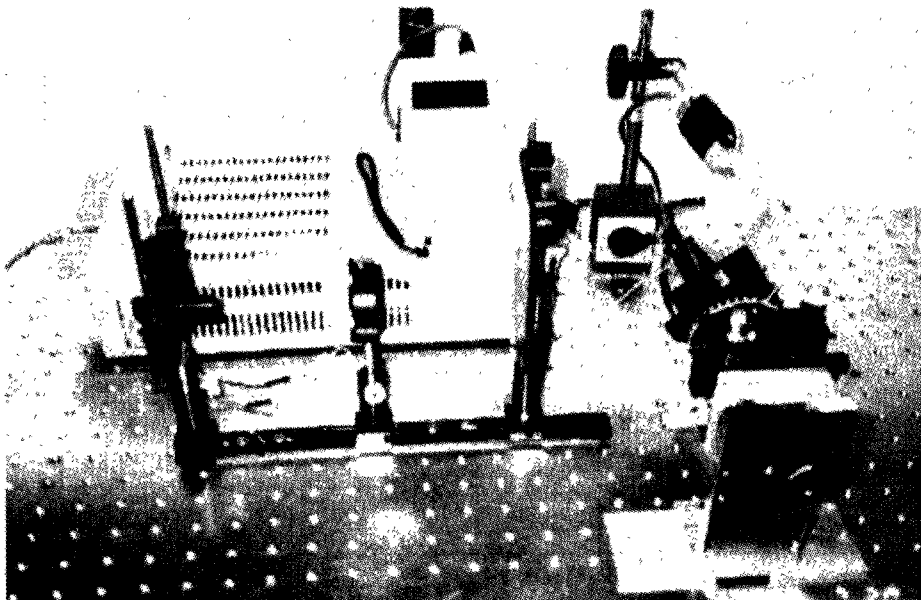


Fig. 3-9. Picture of the SPR sensor for measuring essential amino acid concentrations.

나. 센서칩 제조 (Enzyme coated sensor chip)

본 실험에서는 프리즘 ($n = 1.515$)과 굴절률 차가 거의 없는 얇은 커버글래스 ($n = 1.522$, $18 \times 18\text{mm}^2$, $t = 0.13\text{ mm}$, MATSUNAMI)를 기판으로 사용하여, 이 기판위에 500 \AA Au과 30 \AA Ni-Cr를 Electron beam evaporator (NRC 3115, Varian)로 증착시켰다. Ni-Cr 첨가는 커버글래스와 금사이의 접착력을 향상시킨다.

여러 가지 필수 아미노산들 중 각 아미노산을 선택적으로 구별하기 위하여 아미노산의 기질 특이적 효소 반응을 센서칩 제작에 적용하였다. 이 실험에서는 센서 감응에 대한 정확도를 높이기 위해 효소를 glass위에 화학적 방법으로 고정시킨 enzyme-coated sensor chip과 효소를 고정하지 않은 bare gold membrane sensor chip간의 감응도를 비교하였다. 센서칩에 효소

를 고정하는 방법은 다음과 같이 요약된다. 금박막이 공기와 접촉하므로 그 표면에 OH 기가 형성되는데, OH 기가 있는 금박막을 cystein과 반응시키면 cystein 구조의 -SH기가 금박막의 OH 기와 반응하면서 황분자를 포함한 cystein이 금박막 위에 부착된다(輕部征夫 et al., 1981; Schmitt, et al., 1992). 여기에 glutaldehyde 용액을 반응시켜 금박막에 -CHO기를 부착시킨 후 tryptophanase를 반응시킨다. 그 결과 금박막의 -CHO기와 효소의 -NH₂기가 결합하여 이들간 shiff base 구조인 -CH=N-가 생성됨과 동시에 효소는 안정한 형태의 화학결합에 의해 금박막 위에 고정된다. 이와같이 제조된 금박막을 사용하면 저농도에서도 직선적으로 감응하는 tryptophan 농도의 측정이 가능하다. 그 반응 과정을 도식화하면 Fig. 3-10과 같으며 enzyme-coated sensor chip 제작의 최종 처리단계는 아래와 같은 3가지 방법으로 실시하여 비교함으로써 그 감응결과가 가장 우수한 방법을 선택하였다.

1) 방법 I

- 가) 금박막을 올린 유리판을 아세톤, 증류수 순으로 깨끗이 씻는다.
- 나) 위의 유리판을 1.0×10^{-3} M L-cystein 용액에 3시간 방치한다.
- 다) 유리판을 아세톤, 증류수 순으로 깨끗이 씻은 후 10^{-3} M glutaraldehyde 용액에 2시간 방치한다.
- 라) 유리판을 증류수로 깨끗이 씻은 후 효소용액에 담귀 4°C 냉장고에 방치한다.
- 마) 마지막으로 유리판을 증류수로 깨끗이 씻어 말린다.

2) 방법 II

- 가) 금박막을 올린 유리판을 산화제용액인 piranha 용액(1:3, 30% H₂O₂:

진한 황산)으로 세척하고 증류수로 헹거낸다.

나)~마)는 방법 I 과 동일하게 처리한다.

3) 방법 III;

가)~라)는 방법 I 과 동일하다.

마) 금박막을 초음파에서 세척한다.

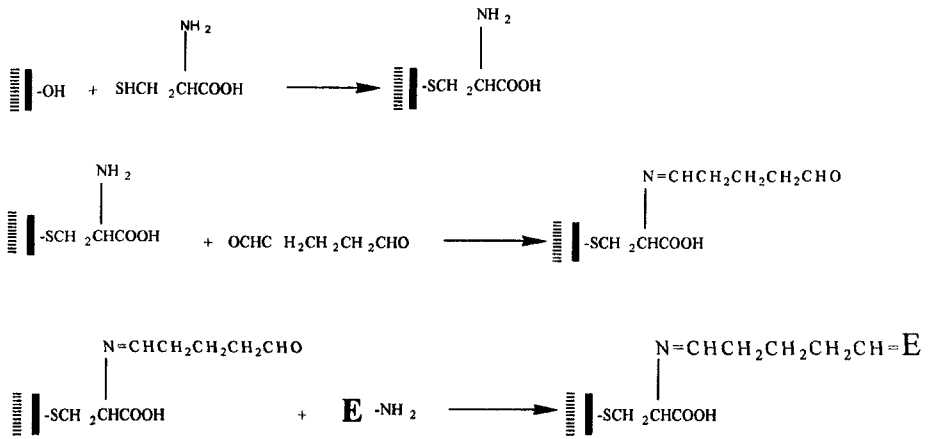


Fig. 3-10. Immobilization of tryptophanase on gold film of a sensor chip (E: Tryptophanase).

다. Tryptophan 시료 제조

L-Tryptophan(SIGMA) 시료는 증류수, 0.1 M tris-buffer, 및 0.1 M acetate buffer를 사용하여 각각 고농도로부터 저농도로 희석함으로써 $10^9 \sim 10^2$ M 범위의 시료를 제조하였다. 또한 완충용액에 용해시킨 tryptophan은 pH 변화에 따른 선택성을 살펴보기 위해 pH를 각각 4.0, 7.0, 10.0 으로 달리하여 시료를 제조하였다. 효소를 사용하지 않을 경우 증류수

에 용해된 tryptophan은 직선적으로 감응하였으므로 이 결과를 기초로 10^{-7} ~ 10^{-9} M 범위의 tryptophan 농도로 회석하였다. 효소센서칩 사용시에는 효소 반응의 최적조건 설정을 위해 tryptophan을 tris-buffer pH 4.0, 6.0, 8.0에 용해한 시료들을 제조하였는데, 이는 tryptophanase 효소반응이 pH 8.0에서 기질과의 반응이 제일 효과적이고, 기질인 tryptophan의 pI(isoelectric point)는 5.89이며, 센서칩에 효소가 고정되지 않았을 때 pH 4.0인 tris-buffer에서 우수한 직선성을 나타낸 결과들을 참고한 것이다.

라. Tryptophanase-coated sensor chip의 기질 특이성 확인실험

제조된 tryptophanase-coated sensor chip이 다른 필수아미노산에 대해서도 감응하는지 여부를 확인하기 위해 leucine 또는 valine 용액의 농도를 tryptophanase가 고정된 sensor chip으로 측정하는 실험을 실시하였다.

4. Photo Diode Array (PDA)를 갖춘 SPR형 tryptophan 센서시제품의 제작

가. SPR형 tryptophan 센서시스템의 설계

시제품 제작시에는 처음에 사용된 간단한 형태의 photo-detector를 2-차원 Photo Diode Array로 대체하였다. 기존의 SPR측정에서는 각의 변화에 따른 선 광원의 광 강도로 공명각을 측정함으로써 이때 걸리는 소요시간과 정확성에 오차가 있었고 또한 시간에 따른 변화양을 포함한 결과를 얻을 수밖에 없었다. 이러한 문제점을 안고 있는 광 검지부의 문제를 해결하기 위하여 선 광원이 아닌 여러 각의 광을 포함한 다발의 광을 입사하고, 이를 동시적으로 측정하고 monitor함으로써 시간에 따른 변화를 동시에 관찰할

수가 있었다. 이러한 다발의 광을 얻기 위하여 Fig. 3-11과 같이 선 광원의 레이저광을 수 개의 렌즈를 이용하여 광을 집광하거나 산광시키는 연속적인 과정을 통하여 넓은 범위의 입사각을 만들 수 있고, 또한 PDA를 사용함으로써 특정 범위의 입사광이 미세한 분해능을 가지고 측정될 수 있도록 하였다. 이러한 array를 사용함으로써 반사된 SPR signal에 대한 prism sensing element의 분해능을 개선시킬 수 있었다.

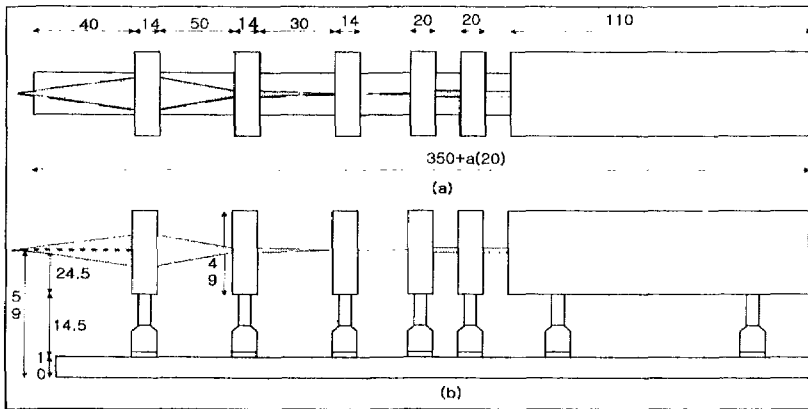


Fig. 3-11. Schematic diagram of light input compartment (unit: mm).

1) 시제품 구성시스템 설계

가) 시스템 구성요소

(1) 레이저 (Laser)

레이저는 9 V, 100 mA에서 동작하는 반도체 레이저로 전체 광강도는 5 mW의 광으로 출력을 나타낸다. 반도체 레이저는 연속적인 신호로 실시간에 측정하기에 알맞은 것으로 670 nm의 파장대를 가지고 있다.

(2) 편광기 (Polarizer)

본 실험에 이용되는 SPR에서는 TM편광 (transverse magnetic polarization)된 광을 이용해야 하는데 이를 위하여 편광기를 사용하였다. 입사 후 편광기를 통과한 광강도는 3.5 mW 가 되도록 하였다.

(3) 핀홀(Pin hole)

핀홀은 레이저광의 광이 중심부를 조금씩 벗어나면서 일어나는 광의 변형 즉 왜곡된 광을 걸러주는 역할을 하여 깨끗한 광을 만들어 주고 전체 광강도의 세기를 약하게 만들어 준다. 입사후 핀홀을 통과한 광강도는 $1\mu\text{W}$ 가 되도록 하였다.

(4) 렌즈(Lens)

이 부분에서는 3개의 렌즈를 조합하여 측정에서 원하는 광의 입사각도를 만들어 준다. 렌즈 조합에 의해 마지막 렌즈에서 프리즘 중심까지의 거리가 50 mm, 입사각도는 10° 가 되도록 만들었다. 입사 후 렌즈를 통과한 광강도는 $1\mu\text{W}$ 이 되도록 하였다.

(5) 프리즘(Prism)

SPR을 발생시키기 위한 광을 gold chip에 coupling 하기 위한 것으로 여기서는 1.515의 굴절률을 갖는 프리즘을 이용한다.

(6) Neural Density(ND) filter

Neural Density Filter는 SPR 발생 후의 광이 detector에 닿기 전에 광을 전체적으로 걸러주는 역할을 한다. 사용된 filter의 투과도는 3%와 13% 이다.

(7) PDA (Photo Diode Array) Detector

실질적으로 측정하고자 하는 출력광을 검출하고 이를 컴퓨터 화면에 뿌려주는 역할을 하는 detector인 PDA는 analog부와 digital부로 나누었다.

2) 시제품의 시스템도

가) 입력광의 광경로에 따른 전체 시스템도

시제품 센서를 각기 다른 측면에서 보았을 때 다음과 같은 형태로 관찰된다.

(1)옆에서 본 시스템도

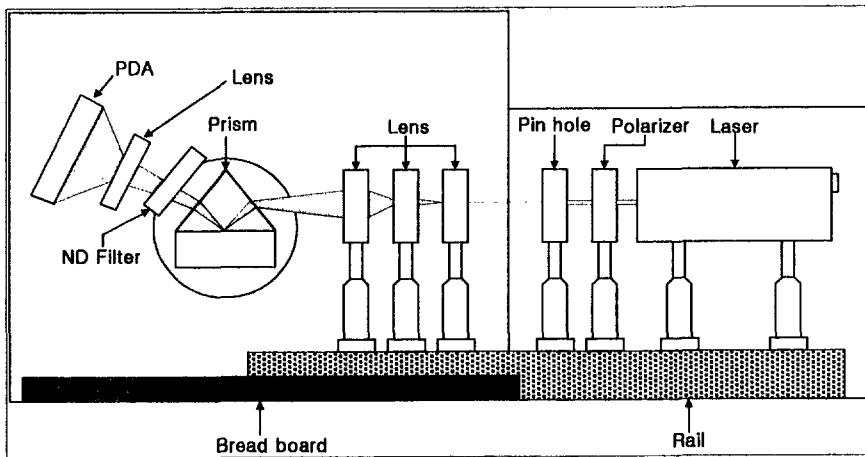


Fig. 3-12. Side view of SPR system.

(2) 위에서 본 시스템도

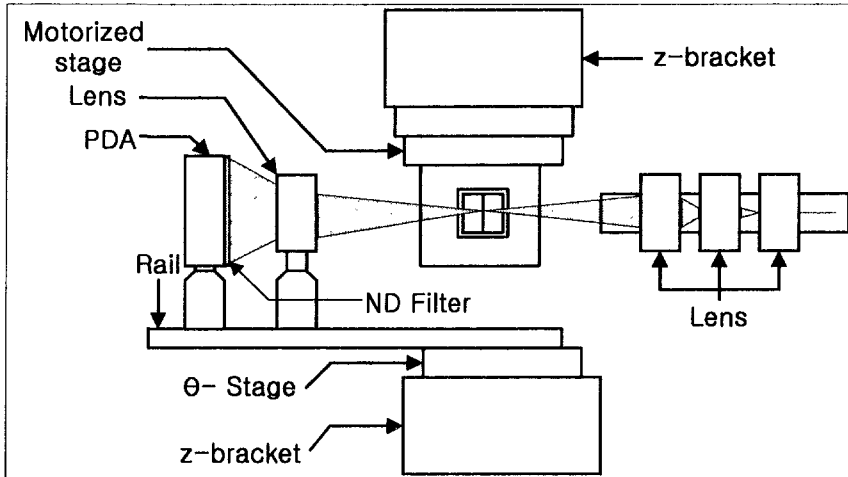


Fig. 3-13. Top view of SPR system.

(3) 광학시스템의 제원

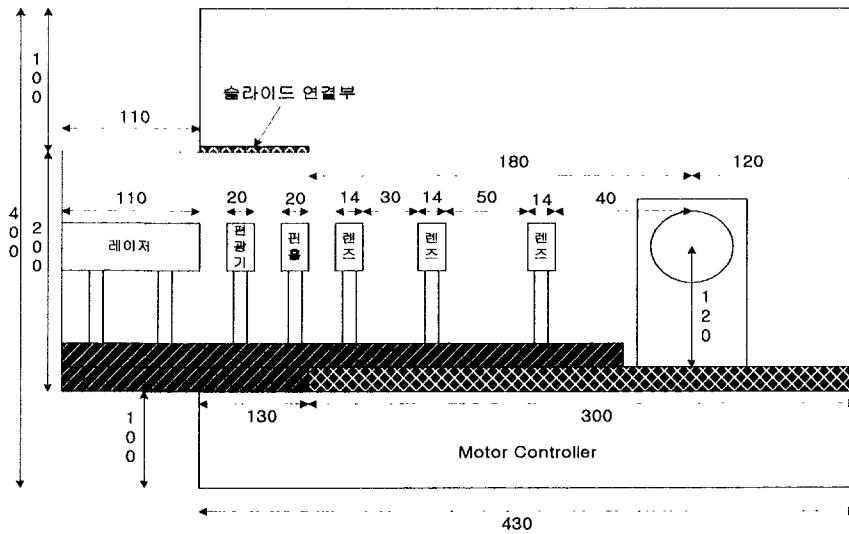


Fig. 3-14. Physical dimension of light input compartment.

(4) SPR 시스템의 실제모양

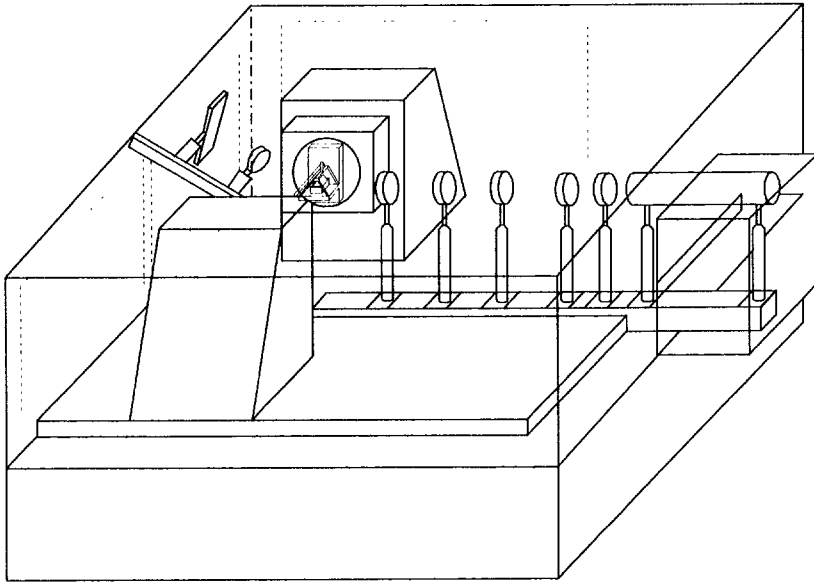
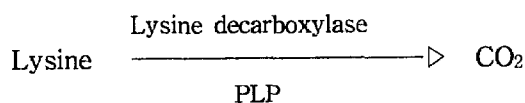


Fig. 3-15. Actual 3-D view of SPR measurement system.

제3절 연구결과 및 고찰

1. FIA형 carbonate-selective electrode와 CO₂ electrode를 사용한 lysine 정량 결과

아미노산의 decarboxylation 반응을 이용하여 아미노산 농도를 전위차법적으로 다음과 같이 정량하였다. Carrier 용액을 연동펌프로써 일정 유속 (0.4 ml/min)으로 일정한 전류가 걸려있는 Fig. 3-5 장치계에 주입하여 두 전극간 전위차를 측정하면, 일정한 바탕선이 recorder에 기록된다. Carbonate ion 선택성 전극과 그 감응성을 시험하기 위해 Fig. 3-5 장치 중 효소반응기를 제거한 system에서 Na₂CO₃ 표준용액 농도에 따른 전위차 변화를 관찰하여 작성한 Na₂CO₃ 검량곡선은 Fig. 3-16과 같다. 그결과 carbonate ion 선택성 전극의 감응성과 작동이 우수한 것으로 판단되었으므로 Sepharose 4B에 효소가 고정된 lysine 효소반응기를 연결하여 기질인 lysine의 농도에 따른 감응변화를 살펴보았다. PLP(pyridoxal phosphate)를 coenzyme으로 하는 lysine 표준시료를 Fig. 3-5의 injector에 주입하면 아미노산 효소반응기를 통과하는 과정에서 lysine은 아래의 반응에 의해 가수분해된다. 이때 coenzyme인 PLP는 carrier buffer에 포함시키는 방법이 아미노산 시료에 직접 혼합하는 것 보다 바탕선을 안정하게 유지시키며, PLP에 의해 유도되는 음이온이 전극에 미치는 영향도 최소화되었다. 효소반응



에서 생성된 CO₂는 CO₃²⁻로 전환되어 CO₃²⁻ ion 선택성 membrane 전극의 negative potential을 증가시킴으로써 막전위차를 유도하며, 이때 생기는 막

전극 전위 변화정도는 recoder의 peak height로 얻어졌다. 그 결과 lysine 농도에 비례한 peak height 변화가 나타났으며 그에 따른 lysine 검량곡선도 정량적으로 관찰되었다(지면상 data 생략). 제작된 FIA 전극형태인 carbonate-selective electrode의 감도를 향상시키기 위해 lysine 시료 농도가 10^{-2} M 이하 범위 내에서 감응도 개선을 시도하였다. 그 결과 제작된 효소반응기는 우수한 성능을 보였으나 반응기에서 생성된다. CO_2 의 일부는 HCO_3^- 형태로 공존하였으므로 carbonate-selective membrane 반응용액의 최적 pH 조절이 용이하지 않았다. 뿐만 아니라 제작된 carbonate-selective membrane은 소량의 타 음이온도 감지하는 것으로 나타났다.

다음은 glass bead에 효소가 고정된 효소반응기를 동일한 방법으로 Fig. 3-5의 장치계에 연결하여 기질인 lysine 농도 변화에 따른 감응정도를 살펴 보았다. 그 결과 peak height가 충분히 크지 않아 기질 정량이 어려웠다 (data 생략). 그에 대한 원인 분석결과로는 첫째, 지지체에 대한 효소의 coupling efficiency가 낮았고 (activation이 미처 되지 않은 alkylamine glass의 $-\text{NH}_2$ 가 activated된 glass의 $-\text{CHO}$ 와 결합을 형성함으로써 효소와 활성화된 glass bead간 결합을 억제함) 둘째, 조효소로 사용된 PLP가 효소 반응기의 glass bead에 강하게 흡착하는 경향을 보여 반응기내 bead의 갈색화를 초래함에 따라 효소와 기질간 반응빈도를 억제하는 것으로 나타났다.

위의 문제점들을 보완하기 위해 전극형태를 탐침형인 probe type carbon dioxide electrode (ORION MODEL 95-02)로 바꾸고 FIA 전극 형태로 개조하였다. 이 실험에 사용된 FIA carbon dioxide electrode는 standard 시료인 Na_2CO_3 용액에 대해서는 다소 정량적으로 감응을 하였으나, lysine을 효소 반응기를 통해 흘러보내면서 CO_2 전극 감응도를 관찰한 결과 Na_2CO_3 용액에 비해 매우 저조한 감응도를 보였다. 이 원인은 효소반응기에서는 CO_2

가 정량적으로 생성되었으나 FIA 회로를 통해 효소반응기로부터 전극 감응기까지 도달하는 과정에서 CO₂가 다른 형태의 이온으로 전환되는 것으로 추측되었다. 이 문제 개선을 위해 다음 실험에서는 전극형태를 FIA에서 probe형태로 바꾸어 실험하였다. FIA system과는 별도로 시도한 probe type membrane electrode는 전자에 비해 감응성이 낮게 나타났다. 그 이유는 probe type 전극사용시 대기중 CO₂ 기체가 센서장치 내 유입되어 아미노산 효소반응으로부터 생성된 CO₂와 구분되지 않은 채 CO₃²⁻ ion으로 전환되었기 때문인 것으로 지적되었다. 그러므로 폐쇄된 회로를 사용하면 센서 측정장치 system에서는 이러한 문제점을 방지할 수 있으리라 추측하여 다음 단계의 실험을 실시하였다. 아울러, 이러한 기본 센서시스템을 응용하여 갈변화 현상이 일어나지 않는 새로운 효소반응 장치와 carbon dioxide electrode가 폐쇄된 시스템내에서 작동하는 lysine 센서를 고안하였다.

2. Probe type의 carbon dioxide electrode를 이용한 lysine의 감응

앞서 제작된 FIA형 carbonate-selective electrode의 감응도 향상 실험에서 나타난 문제들을 개선하기 위해 탐침형 carbon dioxide electrode를 사용한 새로운 lysine 센서를 개발하여 그 최적조건을 설정하였다.

가. Probe type CO₂ electrode lysine 측정센서의 최적검출조건 선정 실험

1) 효소반응전 decarboxylase-immobilized Sepharose 4B의 최적상태 설정

효소 고정반응 (enzyme coupling reaction)이 끝난 sepharose를 장기간 보관할 때 0.1 M Na₂CO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.0 용액에 채워 4°C에 보관하

였다. 효소가 고정된 sepharose 4B slurry를 다음과 같이 처리시켜 그 결과를 분석하였다.

가) Slurry A : Enzyme-immobilized Sepharose 4B를 10^{-3} M sodium acetate pH 5.8에 24시간 동안 presoaking한 후 사용

나) Slurry B : Enzyme-immobilized sepharose 4B를 storage solution 인 0.1 M Na_2CO_3 , 0.5 M NaCl, pH 8.5에 보관한 채로 사용

다) Slurry C : Enzyme-immobilized Sepharose 4B를 10^{-3} M sodium acetate buffer, pH 5.8 용액에 채워 3000 rpm, 4°C 에서 5분간 2차례 세척한 후 사용.

Slurry A, B, C 200 μL 를 10^{-3} M PLP, 10^{-3} M sodium acetate buffer pH 5.0 에서 lysine과 반응시켜 얻은 전극의 감응결과는 Fig. 3-17과 같으며 slurry A가 가장 우수한 감응을 보였다. 그러나 slurry C의 준비과정이 비교적 간단하고 감응도도 좋게 나타나 이 방법도 사용가능한 것으로 사료된다.

2) Sodium acetate의 농도 변화에 따른 lysine sensor의 감응도분석 결과

효소반응 buffer 용액으로 사용되는 sodium acetate의 농도를 아래와 같이 변화시켜 센서 감응도를 살펴보았다.

- 가) Buffer A ; 10^{-4} M Sodium acetate, 10^{-3} M PLP, pH 5.0
- 나) Buffer B ; 10^{-3} M Sodium acetate, 10^{-3} M PLP, pH 5.0
- 다) Buffer C ; 10^{-2} M Sodium acetate, 10^{-3} M PLP, pH 5.0
- 라) Buffer D ; 10^{-1} M Sodium acetate, 10^{-3} M PLP, pH 5.0

Enzyme immobilized Sepharose 4B 200 μ L와 lysine 시료를 위의 4가지 buffer에서 반응시켜 Fig. 3-18과 같은 감응변화를 얻었으며 10^{-3} M sodium acetate를 사용한 전극 감응도가 가장 우수한 것으로 입증되었다.

3) Sodium acetate buffer 의 pH가 lysine 센서 감응도에 미치는 결과

효소반응 buffer 용액으로 사용되는 sodium acetate의 pH를 아래와 같이 변화시켜 lysine sensor 감응도를 살펴보았다.

- 가) Buffer A ; 10^{-3} M Sodium acetate, 10^{-3} M PLP, pH 3.9
- 나) Buffer B ; 10^{-3} M Sodium acetate, 10^{-3} M PLP, pH 5.0
- 다) Buffer C ; 10^{-3} M Sodium acetate, 10^{-3} M PLP, pH 5.8
- 라) Buffer D ; 10^{-3} M Sodium acetate, 10^{-3} M PLP, pH 7.4

Fig. 3-19에서 나타난 결과처럼 pH 3.9 용액에서는 그 감응도가 매우 저조하였고 10^{-2} M과 10^{-1} M 에서는 potential 변화가 "-" 방향으로 계속 drift 되었다. 또한 pH 5.8과 pH 7.4에서는 potential 증가가 역방향으로 일어났으며 pH 5.0에서 potential 변화가 가장 안정된 상태로 나타났다.

4) Sodium acetate buffer의 PLP 농도가 lysine 센서의 감응변화에 미치

는 결과

가) Buffer A ; 10^{-3} M Sodium acetate, 10^{-4} M PLP, pH 5.0

나) Buffer B ; 10^{-3} M Sodium acetate, 10^{-3} M PLP, pH 5.0

다) Buffer C ; 10^{-3} M Sodium acetate, 10^{-2} M PLP, pH 5.0

라) Buffer D ; 10^{-3} M Sodium acetate, 10^{-1} M PLP, pH 5.0

기질인 lysine과 lysine decarboxylase의 효소반응시 coenzyme기능을 하는 pyridoxal phosphate(PLP)의 농도변화에 따른 lysine 센서의 감응도는 Fig. 3-20과 같이 모든 농도에 걸쳐 우수한 감응도를 나타내었다.

5) Immobilized enzyme slurry의 양이 lysine 센서의 감응도에 미친 결과

Lysine decarboxylase가 고정된 Sepharase 4B slurry의 양을 다양하게 변화시키면서 실험 1)~4)에서 얻은 최적조건을 적용하여 lysine 센서의 감응도를 실험한 결과 Fig. 3-21과 같이 50 μ L slurry와 300 μ L slurry는 100 μ L 혹은 200 μ L slurry 사용할 때 보다 감응도가 낮았고 100 μ L와 200 μ L slurry 간에는 10^{-2} ~ 10^{-4} M 범위에서는 거의 차이가 없는 것으로 확인되었다. 그러나 10^{-1} M lysine 농도에서는 200 μ L slurry의 감응도가 100 μ L slurry보다 6 mV정도 더 높게 나타났다.

6) 효소반응 온도가 lysine 센서의 감응도에 미친 결과

Lysine decarboxylase와 lysine의 효소반응 온도를 4 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C로 변화시키면서 실온에서 수행한 실험 1)~5)에서 얻은 최적조건을 적용하여

lysine sensor의 감응도를 관찰하였다. 그결과 Fig. 3-22와 같이 4°C에서는 그 감응도가 다소 감소되고 또한 반응시간도 지연되었으며, 실온인 25°C와 37°C에서는 반응시간도 30초 이내로 단축되고 감응도도 향상되었다. 따라서 lysine 센서장치는 실온에서도 편리하게 사용될 수 있는 것으로 간주된다.

7) NaHCO₃ 표준용액을 사용한 lysine 센서의 CO₂ 검출한계 설정과 최종 성능확인 결과

Lysine 시료를 사용한 lysine 센서의 감응도는 위와 같이 관찰되었으며 센서의 CO₂ 검출한계는 효소반응없이 CO₂가 유리될 수 있는 NaHCO₃ 표준용액을 사용한 결과와 효소가 고정된 Sepharose 4B slurry를 사용한 결과를 비교함으로써 Fig. 3-23과 같이 확인되었다. Lysine sensor의 검출한계는 10²~10⁴ M 범위에서 가장 정량적으로 관찰되었으므로 높은 농도의 시료는 희석하여 사용하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

8) Multiple 시료를 사용한 lysine 센서의 재현성확인

동일농도의 lysine 시료를 사용하여 lysine 센서의 재현성을 실험하여 Fig. 3-24와 같은 결과를 얻었다. 동일 농도 시료들에 의한 potential 변화는 거의 일치되게 관찰되어 센서의 재현성은 매우 우수한 것으로 나타났다.

9) Enzyme-immobilized slurry의 recycle 가능성 여부와 stability 확인

효소가 고정된 Sepharose 4B slurry의 효소 활성은 지금까지 4°C, pH 8.5에서 1년 이상 안정하게 유지되며, 효소반응에 사용된 Sepharose 4B는 다

시 회수하여 원심분리에 의해 세척되며 30회 이상 재사용하여도 효소 활성이 원래 상태로 유지되어 그 사용이 실질적으로 간편용이하며 매우 경제적인 것으로 사료된다.

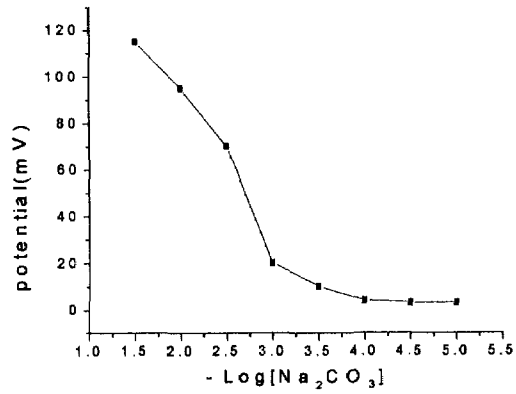


Fig. 3-16. Response of CO₂ electrode in FIA system with different concentrations of Na₂CO₃.

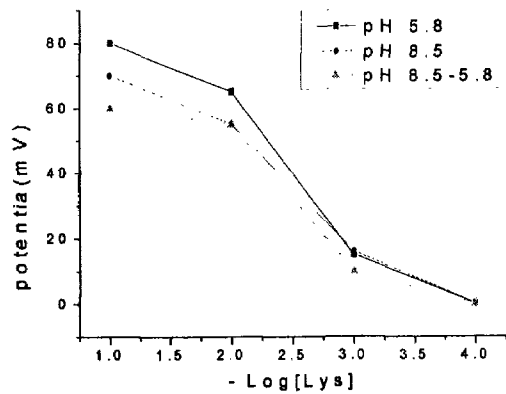


Fig. 3-17. Response of lysine sensor at different pH of decarboxylase-immobilized Sepharose.

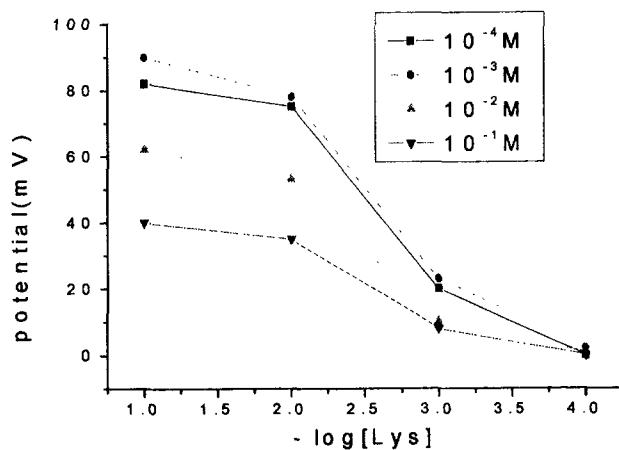


Fig. 3-18. Effect of sodium acetate concentration in reaction buffer on re-sponse of lysine sensor.

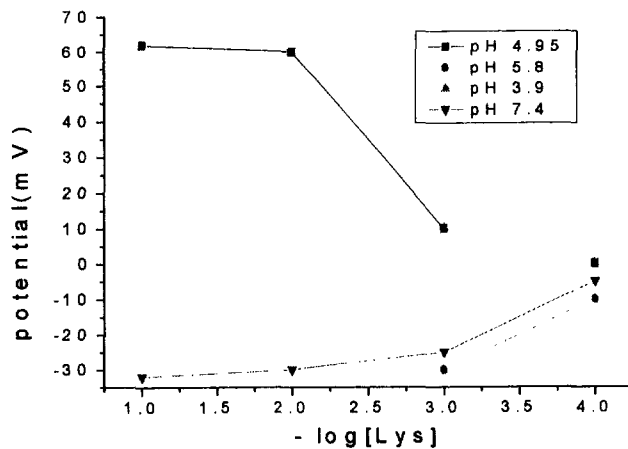


Fig. 3-19. Effect of pH in acetate buffer on response of lysine sensor.

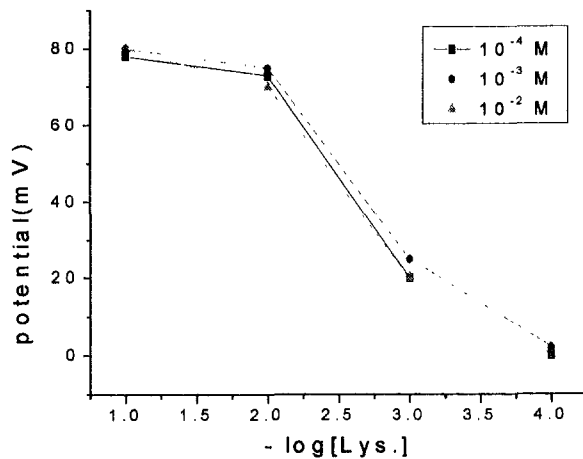


Fig. 3-20. Effect of PLP concentration in reaction buffer on response of lysine sensor.

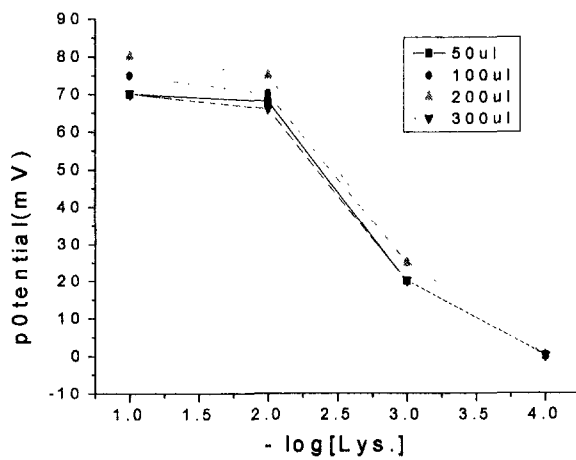


Fig. 3-21. Effect of enzyme slurry volume on response of lysine sensor.

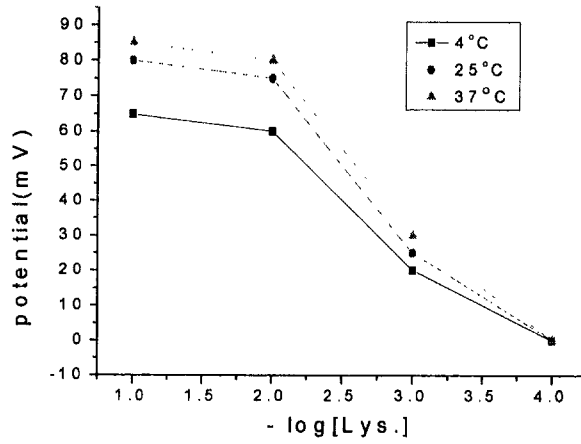


Fig. 3-22. Effect of enzyme reaction temperature on performance of lysine sensor.

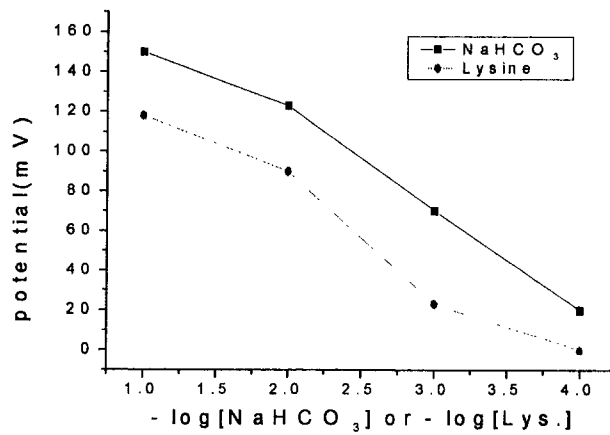


Fig. 3-23. Response of lysine sensor with different concentration of NaHCO₃ and lysine in optimum conditions.

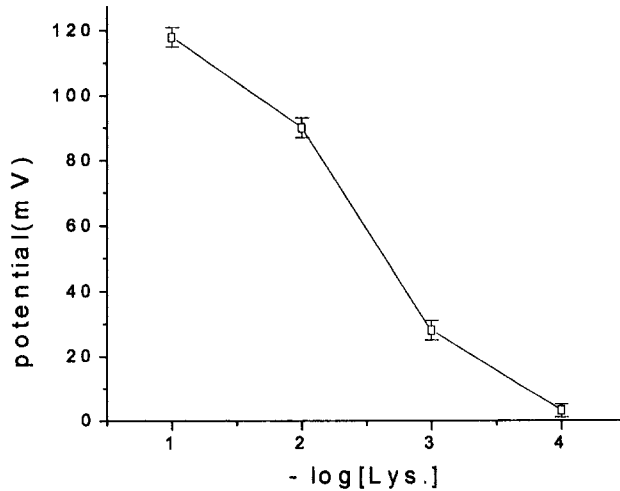


Fig. 3-24. Reproducibility of potential response by lysine sensor (n=10).

3. SPR형 phenylalanine 센서시스템 제작실험 및 성능실험 결과

Crude형태의 phenylalanine decarboxylase는 Sigma 제품(P9957)을 구입하여 dried *Streptococcus faecalis*로부터 추출하였다. 약 1 g의 dried cell로부터 단지 5 unit의 phenylalanine decarboxylase activity를 보여 specific enzyme activity가 매우 낮게 나타났다. 시험관에서 진행시킨 기질 (phenylalanine)과의 반응에서 실온과 37°C에서 다양한 조건(pH 3.0 - pH 9.0)하에 생성물의 수준을 carbonate selective electrode로 측정해본 결과 그 감응이 매우 저조하여 정량적인 결과를 얻을 수 없었다. 순수 phenylalanine decarboxylase의 isoelectric point는 5.48 ($pK_1 = 1.83$, $pK_2 = 9.13$)이지만 이 효소는 *E. coli*의 타효소 및 단백질과 공존하는 형태이므로 효소-기질 반응에 대한 감응도가 매우 낮은 것으로 나타났다. 이러한 문제는 phenylalanine decarboxylase를 정제하여 사용하면 그 결과도 개선되나, 일반 실험실에서

는 이 효소의 정제에 소요되는 시간이 너무 길어 효율면에서는 부적절한 것으로 나타났다. 이러한 문제를 해결하기 위해 다음 단계에서는 감도가 높다고 알려진 광센서를 이용한 phenylalanine sensor 고안에 착수하게 되었다.

가. 제조방법이 다른 두 가지 센서칩의 공기와 물에 대한 감응도 비교와
제조된 센서칩의 정확도

Electron(E) beam evaporator과 thermal evaporator 방법으로 각각 제작한 센서칩의 공기와 물에 대한 감응도를 살펴보았다. 이 실험에서는 센서칩의 환경이 공기에서 증류수로 변할 때 표면 플라즈몬 공명각의 변화를 이론적으로 산출된 공명각과 비교하고, 또한 E-beam evaporation방법으로 제작한 센서칩과 thermal evaporation방법으로 제작한 센서칩의 성능을 서로 비교하였다. 즉, 센서칩을 공기 중에 노출시켜 그 공명각을 측정하고 시료 충전셀에 증류수를 주입하여 측정한 결과, Fig. 3-25 및 Fig. 3-26과 같이 E-beam으로 제작한 센서칩은 공기에서는 43.91° 에서, 증류수에서는 70.97° 에서 플라즈몬 공명이 발생되어 27.06° 의 공명각 변화가 발생함을 알 수 있었다. 그리고 thermal evaporation 방법으로 제작한 센서칩은 Fig. 3-26에 나타난 것처럼 공기에서는 43.81° 에서, 증류수에서는 70.68° 에서 플라즈몬 공명이 발생되어 26.87° 의 공명각 변화가 관찰되었다. 이와 같이 E-beam과 thermal 두 가지 방법으로 제작된 금박막은 비록 플라즈몬 공명이 발생하는 각도는 비슷하나 E-beam으로 제작된 금박막의 공기와 물에 대한 감응도가 thermal evaporation방법으로 제작된 금박막보다 더 높은 것으로 나타났다.

한편, 제조된 센서칩의 정확도를 분석하기 위해 공기와 증류수에 대한 공명각 측정치를 이론적으로 산출한 값과 비교하면 다음과 같다. 증착된

금박막의 복소 굴절률 (N)이 $N=0.1376 + i \cdot 3.5612$ 이므로(Nyeon 1996) 복소 유전율 ϵ_m 은 $\epsilon_m = \epsilon_{mr} + \epsilon_{mi} = -12.663 + i \cdot 0.980$ 이다. 그리고, 공기의 유전율 (ϵ_a)과 증류수의 유전율 (ϵ_w)은, 증류수의 굴절률을 Abbe 굴절계(ATAGO)로 측정한 결과 $n_w = 1.33$ 이므로, $\epsilon_a = n_a^2 = 1$, $\epsilon_w = n_w^2 = 1.7689$ 이다. 따라서, 공기에 대한 플라즈몬 공명각 (θ_{spa})과 증류수에 대한 플라즈몬 공명각 (θ_{spw})은 다음과 같이 산출된다.

1) 공기에 대한 플라즈몬 공명각 (θ_{spa})

$$\theta_{spa} = \sin^{-1} \sqrt{\frac{\epsilon_{mr}\epsilon_a}{\epsilon_p(\epsilon_{mr} + \epsilon_a)}} = \sqrt{\frac{-12.663 \times 1}{2.295 \times (-12.663 + 1)}} = 43.46^\circ$$

2) 증류수에 대한 플라즈몬 공명각 (θ_{spw})

$$\theta_{spw} = \sin^{-1} \sqrt{\frac{\epsilon_{mr}\epsilon_w}{\epsilon_p(\epsilon_{mr} + \epsilon_w)}} = \sqrt{\frac{-12.663 \times 1.7689}{2.295 \times (-12.663 + 1.7689)}} = 71.18^\circ$$

이 계산치와 본 실험의 측정치를 비교하면, E-beam으로 제작한 센서칩은 공기에서는 약 0.5° , 증류수에서는 약 0.2° 의 차이가 생겼고, thermal evaporation방법으로 제작한 센서칩은 공기에서 약 0.4° , 증류수에서는 약 1.5° 의 차이가 생김을 알 수 있다. 따라서 이들 측정치를 이론적인 계산치와 비교해 보았을 때 E-beam 방법으로 제작한 센서칩이 증류수에서 thermal evaporation 방법으로 제작한 센서칩에 비해 그 오차가 더 적으므로 더욱 정밀한 측정이 이루어진 것으로 관찰되었다. 한편 이러한 이론치와 실제 측정치간의 차이는 금의 순도에 따른 유전율 오차와 측정 오차를 감안할 때 이론치에 근사한 결과로 사료된다. 본 실험에서 제작된 금박막 센서칩의 증류수와 공기에 대한 공명각 변화가 이와 같은 근사치로 나타났으므로 이 센서칩은 정확하게 만들어진 것으로 판명되었다.

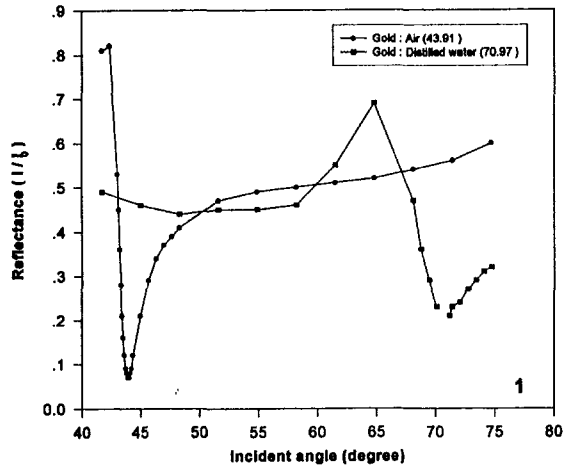


Fig. 3-25. Resonance curve for the E-beam evaporated gold film in air and distilled water.

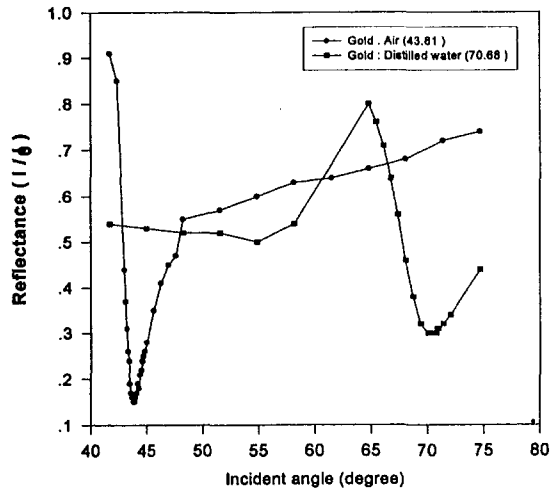
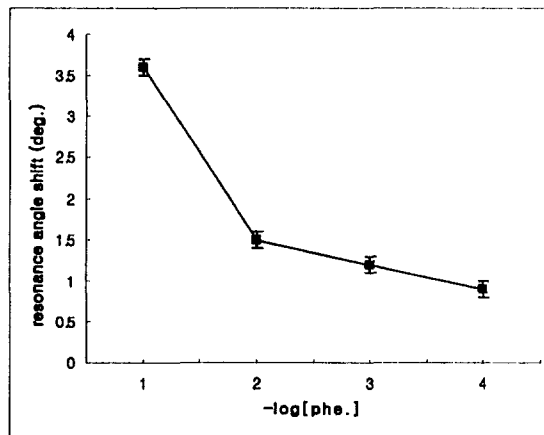


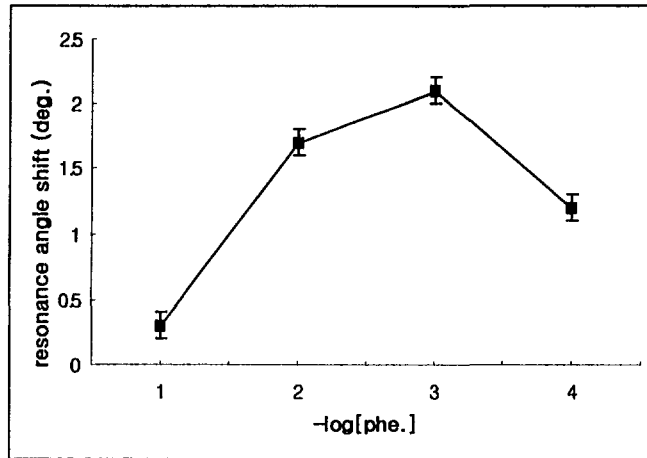
Fig. 3-26. Resonance curve for the thermal evaporated gold film in air and distilled water.

나. 증류수에 용해된 phenylalanine 농도에 따른 공명특성 분석

E-beam과 thermal로 진공 증착된 금박막(bare gold membrane)을 센서 칩으로 사용하여 다양한 농도의 phenylalanine 용액을 시료충전셀에 주입하여 공명각 변화를 측정한 결과 Fig. 3-27과 같은 결과를 얻었다. 이때 phenylalanine용액은 순수 증류수에 용해하여 사용하였고, 용매로 사용된 증류수의 pH는 6.8 이었다. 이 결과는 phenylalanine의 농도변화에 따른 유전율 변화에 기인한 것으로, Fig. 3-27에서 알 수 있듯이 E-beam으로 제작한 센서칩의 감응도는 농도에 따른 직선성을 나타낸 반면 thermal evaporation 방법으로 제작한 센서칩에서는 농도에 따른 일관성 있는 결과가 나타나지 않았다. E-beam으로 제작한 센서칩은 $10^{-2} \sim 10^{-4}$ M 범위에서 우수한 직선성 감응도를 보이며 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ M 범위에서는 "S" 자 모양의 감응도를 나타내었다.



(a)

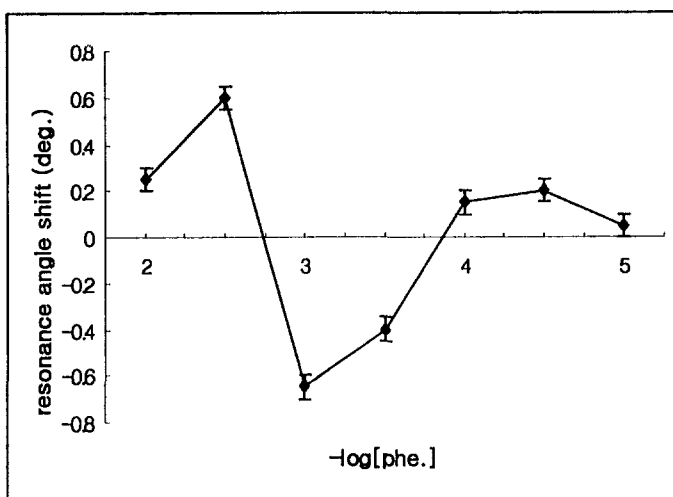


(b)

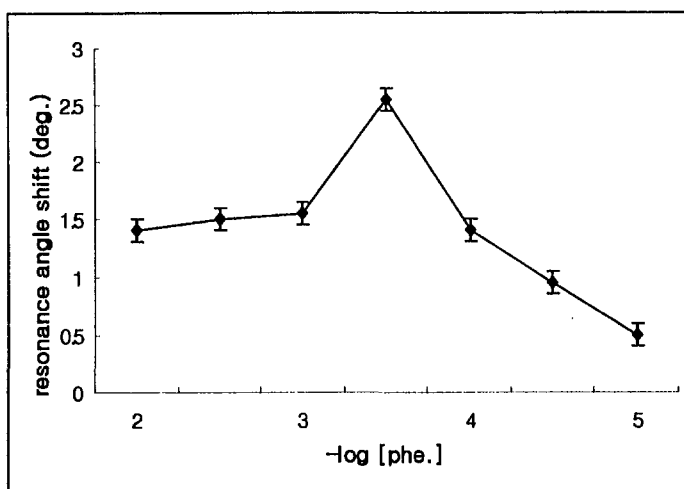
Fig. 3-27. Phenylalanine detection using bare gold membrane which was coated by E-beam(a) and thermal evaporation(b): phenylalanine sample was dissolved and diluted with distilled water.

다. Acetate buffer와 Tris-buffer에 대한 센서칩의 감응결과

Buffer용액에 대한 센서칩의 감응도를 살펴보기 위하여 phenylalanine을 각기 acetate buffer (pH 7.0)와 tris-buffer (pH 7.0)에 용해시켜 E-beam으로 진공증착시킨 금박막 센서칩으로 측정된 결과 Fig. 3-28과 같이 나타났다. Phenylalanine 시료를 순수 증류수에 용해시켜 사용한 결과(Fig. 3-27)가 acetate나 tris-buffer에 용해시켜 사용한 결과(Fig. 3-28)보다 시료 농도에 따른 센서칩 감응도가 더 우수한 것으로 나타났다. 따라서 경제적인 면으로나 결과적인 면에서 phenylalanine을 증류수에 용해시켜 사용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.



(a)



(b)

Fig. 3-28. Phenylalanine detection using gold membrane which was coated by E-beam.: Phenylalanine sample was dissolved and diluted with acetate buffer(a) and tris-buffer(b), pH 7.0.

라. Buffer 용액의 pH 변화에 대한 센서칩의 감응변화

지금까지 phenylalanine시료를 용해시키는데 사용한 증류수, tris-buffer 그리고 acetate buffer는 그 pH가 모두 약 7.0으로서 중성 pH이다. 용매의 pH에 따른 E-beam 진공증착 금박막의 공명각 변화여부를 살펴보기 위하여 acetate buffer pH를 4, 7, 10으로 각기 달리하여 실험하였다. 그 결과 (Fig. 3-29) pH 변화에 따른 공명각 변화는 일관성이 없는 경향으로 나타나 이 센서칩은 pH에 비례적인 변화를 보이지 않는 것으로 나타났다.

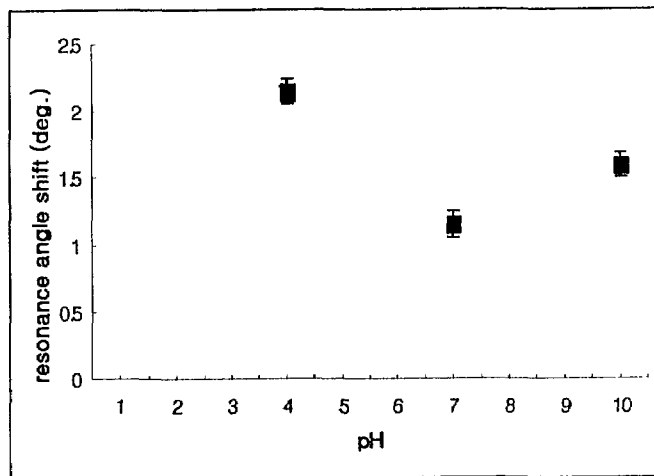


Fig. 3-29. Resonance angle shift according to pH of acetate buffer.

마. Phenylalanine센서의 종합적인 성능판정

필수아미노산 중의 하나인 phenylalanine 농도변화에 따른 용액의 유전

을 변화를 원리로 한 표면 플라즈몬 공명형 phenylalanine 센서를 구상하고, 이 센서의 시스템 및 센서칩을 제작하여 그 특성을 조사한 결과는 다음과 같다. 먼저, 센서칩은 E-beam evaporation과 thermal evaporation방법을 이용하여 금을 유리 glass위에 증착하여 사용하였다. 이 두 가지 방법으로 제작된 금박막 센서칩을 사용하여 phenylalanine을 측정해 본 결과 thermal evaporation방법으로 제작된 금박막보다는 E-beam evaporation방법으로 제작한 금박막이 더욱 안정된 실험결과를 나타내었고, $10^{-3} \sim 10^{-5}$ M phenylalanine 농도변화에 대해서 Fig. 3-30과 같이 직선적인 변화를 보임으로써 그 안정성과 우수성을 나타내었다. Simonian등(1997)의 연구에서는 효소를 이용한 amperometric biosensor를 사용하여 phenylalanine을 측정한 결과 그 농도 범위가 $10^{-2} \sim 5 \times 10^{-2}$ M로 제한적이었고, Cooper등(1993)도 역시 flow injection analysis와 효소반응 방법으로 phenylalanine을 측정한 결과 10^{-4} M 이상에서는 농도에 따른 직선성 대신 plateau현상을 나타내는 경향을 보였다. 이와 같은 연구결과들과 비교해 볼 때, 본 실험에서 SPR을 이용한 측정결과는 다양한 검출 범위에서 phenylalanine 농도에 따른 우수한 직선성을 보였다. 한편 phenylalanine 시료는 tris-buffer나 acetate buffer에 용해시켜 사용한 것보다 순수한 물인 증류수에 용해시켜 사용한 것이 phenylalanine에 대한 센서칩의 감응도가 높다. 또한 그 공명각 변화도 phenylalanine 농도에 비례하여 변하였으므로 지금까지 발표된 여러 아미노산 센서시스템과 비교하여 성능도 탁월하다. 본 표면 플라즈몬 공명형 센서는 기존의 전기화학적 아미노산 분석 센서들이 주로 효소를 사용하여 아미노산 농도를 측정하는 것과 달리 효소를 사용하지 않으며, 금박막 제작에서 발생하는 기술적 오차만 줄이면 실험방법이 간편하고 사용방법이 용이하여 널리 사용될 수 있는 것으로 사료된다.

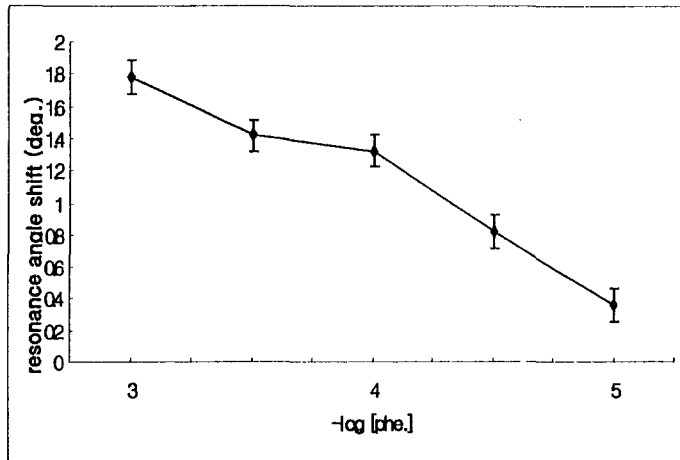


Fig. 3-30. Resonance angle shift for phenylalanine concentration.

4. SPR형 tryptophan 센서의 성능시험

가. Bare gold membrane을 사용한 경우

1) 증류수에 용해된 tryptophan 농도의 감응 및 측정결과

E-beam으로 증착된 금박막 센서칩을 이용하여 tryptophan 용액의 농도를 변화시키면서 시료충전셀에 주입하여 측정한 공명각 변화는 Fig. 3-31 및 Fig. 3-32와 같다. Tryptophan 용액을 순수 증류수 (pH 6.8)에 용해하여 사용한 결과, $10^{-3} \sim 10^{-5}$ M 범위에서 직선적으로 감응하였고 용액 농도가 10배 변할 때 resonance angle shift는 0.3° 의 크기로 변화되었다.

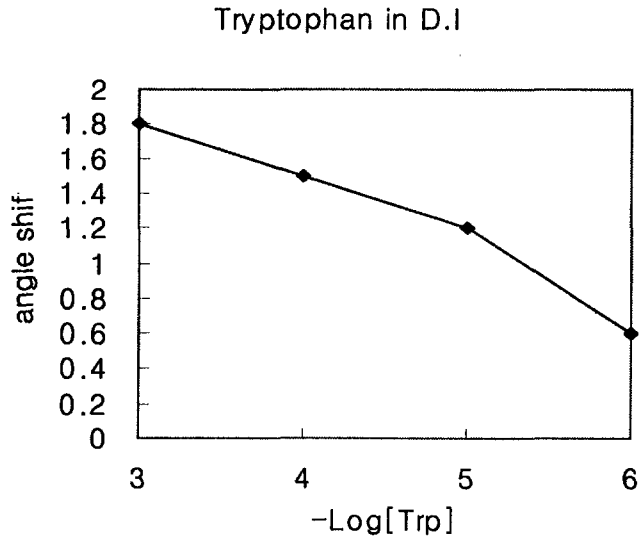


Fig. 3-31. Resonance angle shift for different concentrations of tryptophan prepared in distilled water.

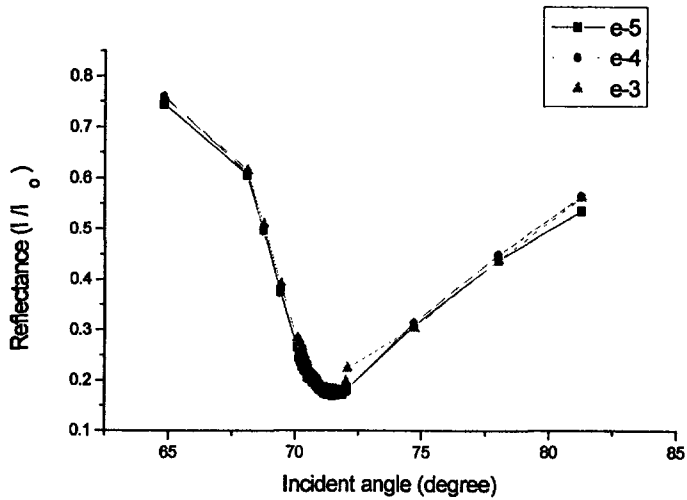
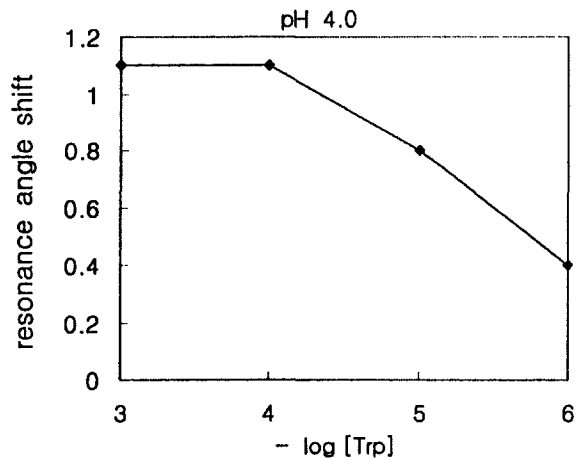


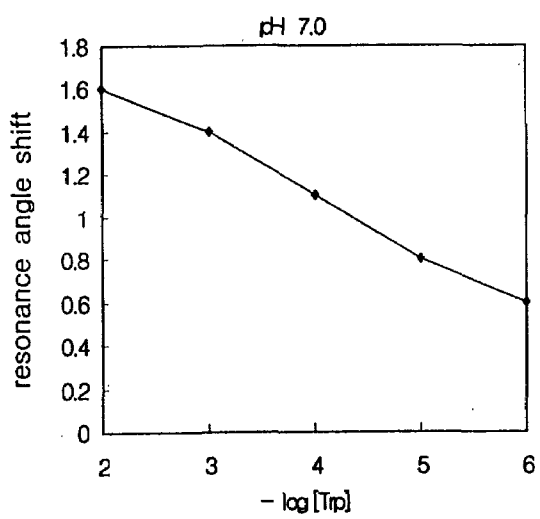
Fig. 3-32. Properties of surface plasmon resonance for different concentrations of tryptophan prepared in distilled water..

2) Tris-HCl buffer와 acetate-HCl buffer에 용해된 tryptophan의 감응결과

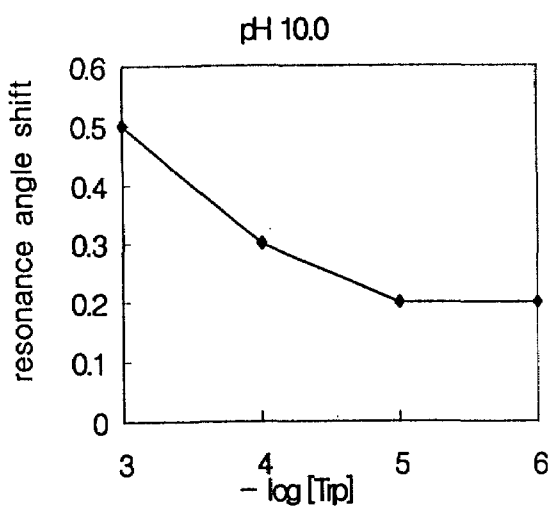
Tryptophan은 tris-buffer의 pH가 4.0일 때 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ M 범위에서 직선적으로 감응하였으며, acetate buffer에서는 pH가 7.0일 때 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ M 범위에서 우수한 직선성을 나타냈다. 두 buffer의 용액농도가 매 10배 변화할 때, resonance angle shift의 변화는 0.3도 이며 그 결과는 Fig. 3-33, Fig. 3-34 및 Fig. 3-35와 같다. Fig. 3-35에 제시된 바와 같이 acetate buffer를 사용할 경우 적정 pH는 7.0이며, tris-buffer에서는 pH 4.0에서 가장 안정된 감응도를 보였다.



(a)

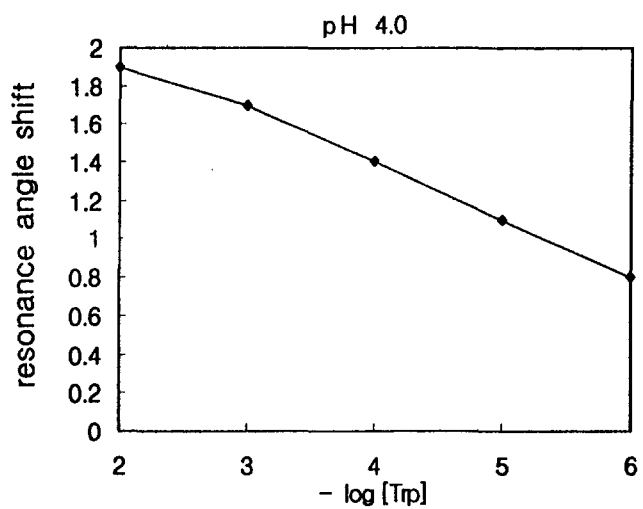


(b)

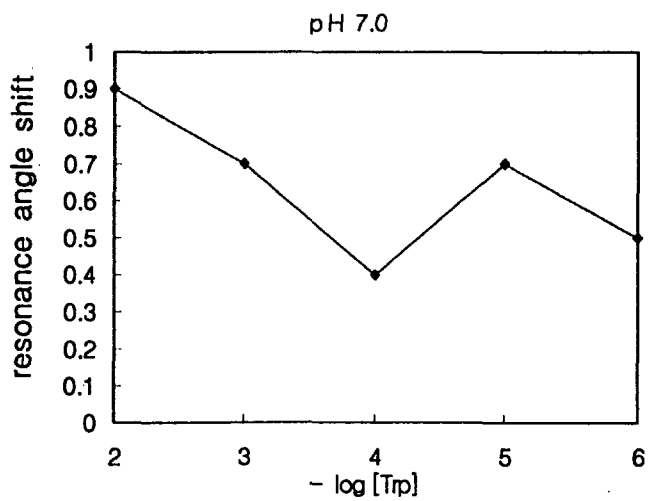


(c)

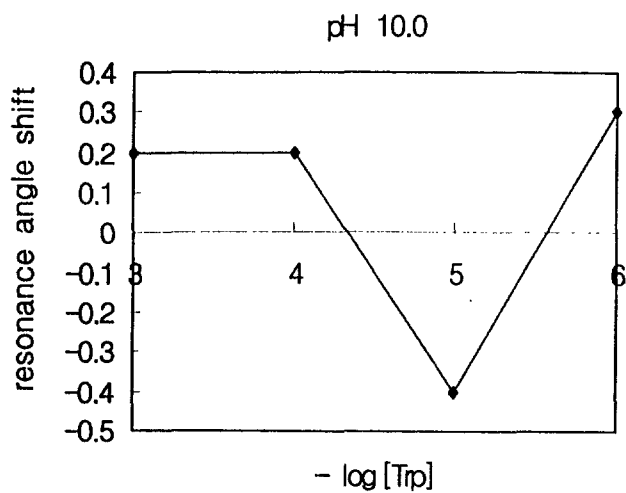
Fig 33. Resonance angle shift for tryptophan dissolved in acetate buffer with various pH, (a) pH 4.0, (b) pH 7.0, (c) pH 10.0.



(a)

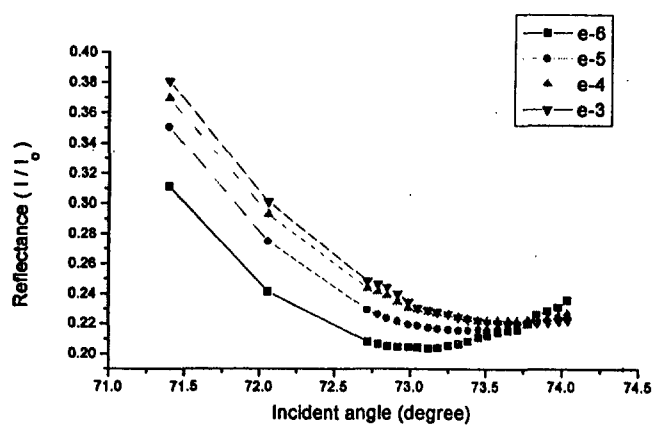


(b)

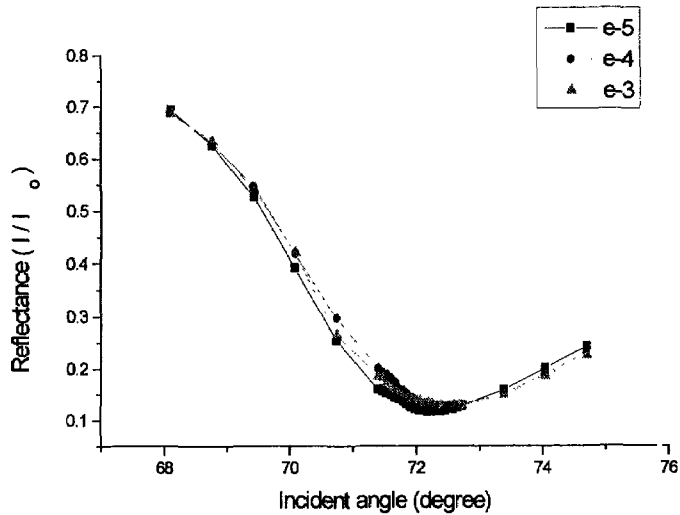


(c)

Fig. 3-34. Resonance angle shift for tryptophan dissolved in tris-buffer with various pH, (a) pH 4.0, (b) pH 7.0, (c) pH 10.0.



(a)



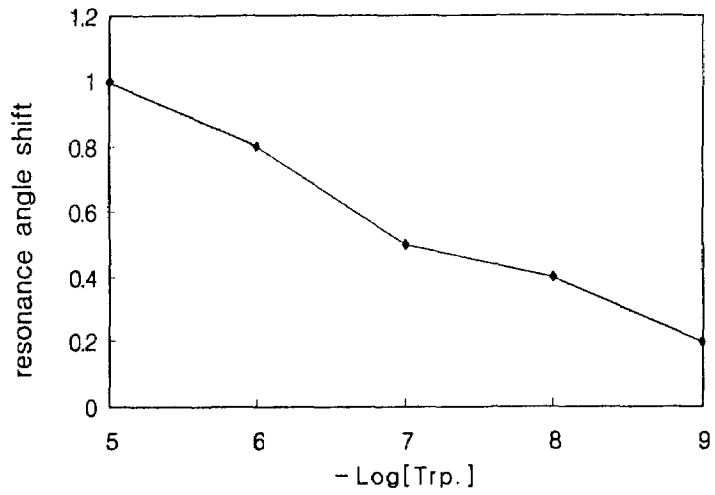
(b)

Fig 3-35. Properties of surface plasmon resonance for tryptophan solutions prepared with (a) tris-buffer (pH 4.0), and (b) acetate buffer(pH 7.0).

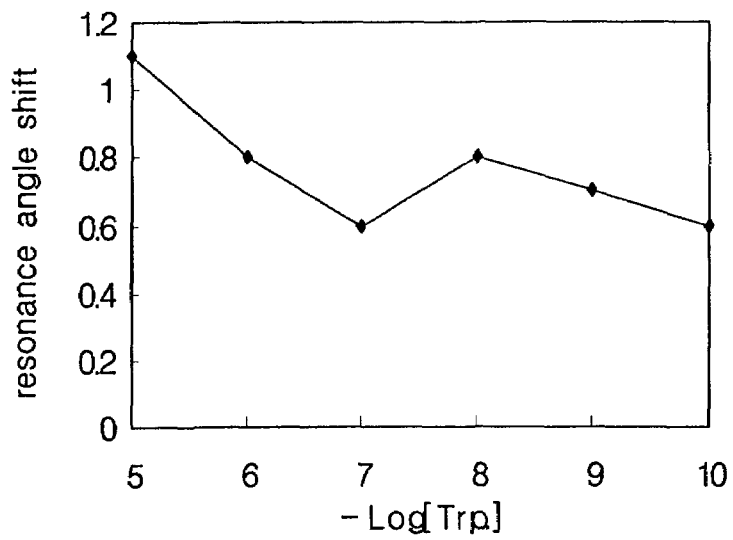
나. Tryptophanase가 고정된 gold membrane sensor chip을 사용한 경우

1) Tryptophanase gold membrane의 처리 방법에 따른 sensor chip의 성능비교

Bare gold 표면의 일반적인 단백질 고정능은 $1 \sim 10 \text{ ng protein/mm}^2$ 이다. 효소를 고정시키는 목적은 센서칩의 기질 특이성에 대한 감도를 높이기 위한 것이다. 이때 bare gold film의 표면은 화학결합 형성에 적합하여야 하며, 결합생성은 신속히 이루어져야 한다. 방법에서 언급한 바와 같이 효소 고정 후 센서칩 표면 처리를 달리하여 이들의 성능을 비교한 결과, Fig. 3-36에



(a)



(b)

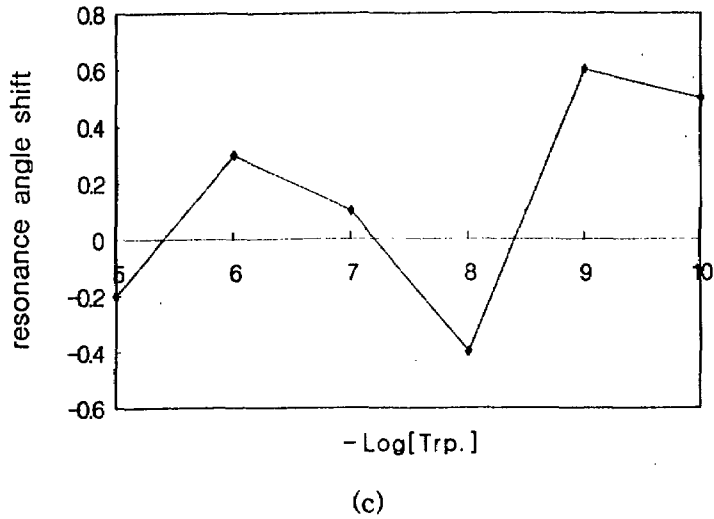


Fig. 3-36. Effects of treatment of the enzyme-coated gold film on measurement of tryptophan concentrations in acetate buffer pH 8.0. The (a), (b) and (c) are results of method I, method II and method III, respectively.

나타낸 것과 같이 방법 I을 사용하여 얻은 감응도가 방법 II 또는 III을 사용한 결과보다 훨씬 우수하였다. 금박막 표면에 효소 반응도를 높이기 위해 유리판을 Piranha 용액으로 세척한 방법 II는 세척과정에서 생긴 기포 형성에 의해 금표면이 산화되어 거울면이 손상된 것으로 나타났다. 효소 고정 후 금박막을 초음파에서 세척한 방법 III은 방법 II보다 그 감응도가 저조하였는데 이는 초음파로 세척하는 과정에서 금박막과 결합한 -N-CH-결합 또는 단백질이 파괴된 결과로 간주된다. 따라서 방법 I에 의해 제조된 sensor chip의 감응도가 가장 우수한 것으로 인정되었다.

2) 순수중류수, tris-buffer 및 acetate buffer에 용해된 tryptophan 농도의 감응 및 측정결과

Tris-buffer와 순수 증류수에 용해한 tryptophan 농도를 tryptophanase가 고정된 금박막 센서칩으로 측정된 결과 Fig. 3-37 및 Fig. 3-38과 같이 나타났으며, 이에 대한 tryptophan 농도와 resonance angle shift의 관계를 Fig. 3-39에 나타내었다. 이 그림으로부터 알 수 있는바와 같이 tryptophan의 농도가 $10^{-7} \sim 10^{-9}$ M 범위일때 우수한 직선성을 나타내었다. Tryptophanase를 고정한 금박막을 사용하여 pH가 각각 4.0, 6.0, 8.0 인 tris-buffer에 용해된 tryptophan 농도를 측정된 결과는 Fig. 3-40과 같다. 비교된 바와 같이 pH 4.0의 tris-buffer에서 가장 우수한 직선성을 보였으며, 또한 pH 6.0과 pH 8.0에서도 여전히 높은 감도를 보인 tryptophan 측정

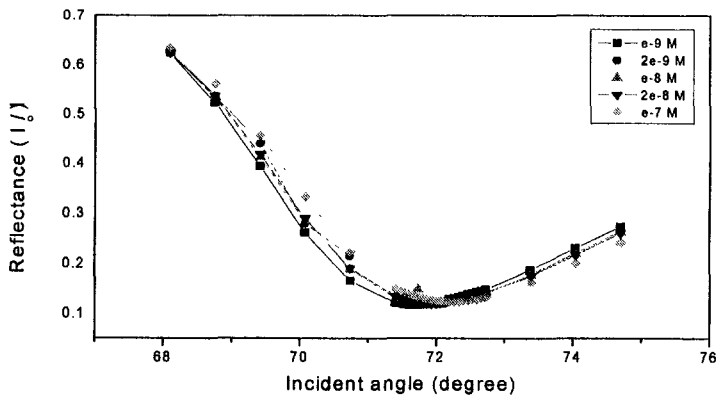


Fig 3-37. Properties of surface plasmon resonance for tryptophan solutions prepared with a tris-buffer (pH 4.0) that measured using a sensor chip with tryptophanase-coated gold film.

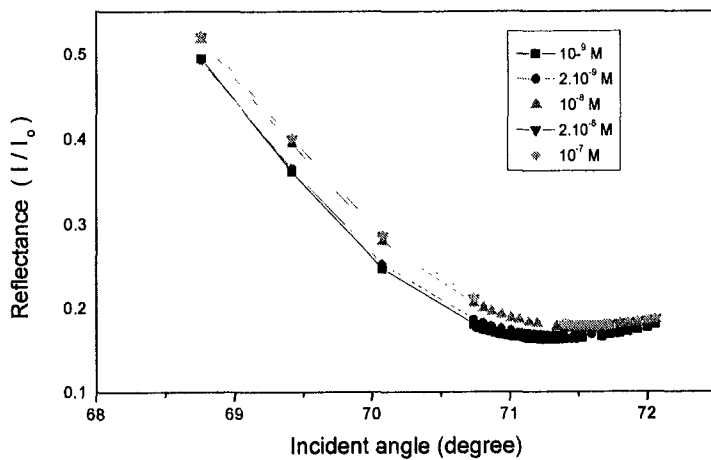
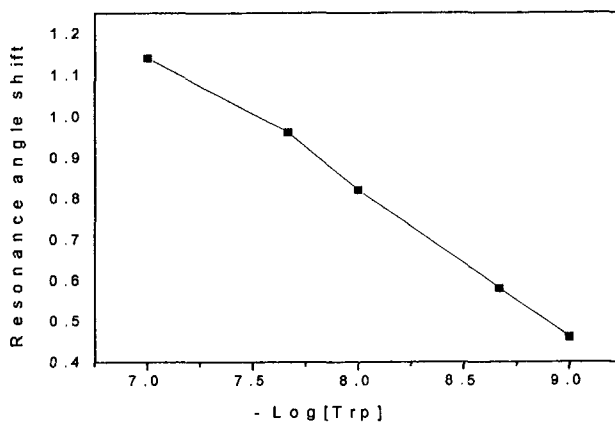
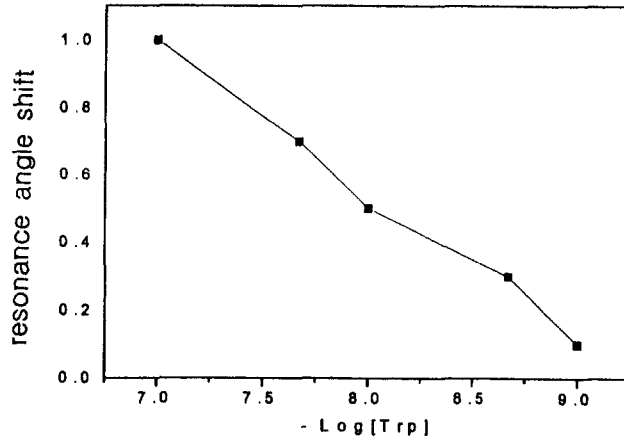


Fig 3-38. Properties of surface plasmon resonance for tryptophan in distilled water using a sensor chip with tryptophanase-cated gold film.

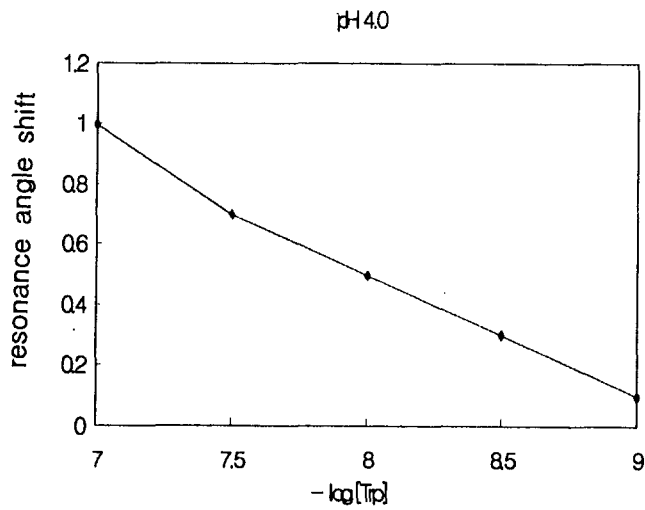


(a)

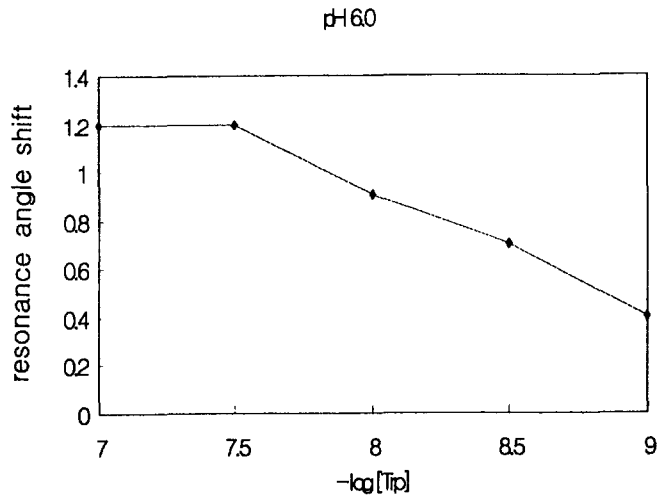


(b)

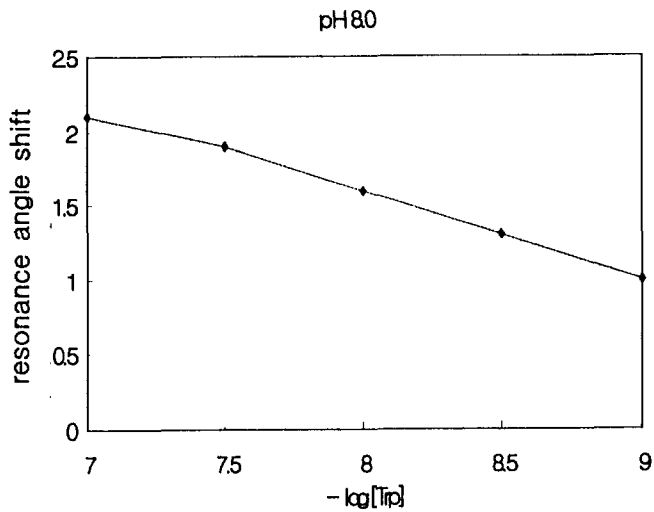
Fig. 3-39. Resonance angle shift for tryptophan dissolved in D.I water(a) and tris-buffer pH 4.0 (b) that measured using a sensor chip with tryptophanase-coated gold film.



(a)

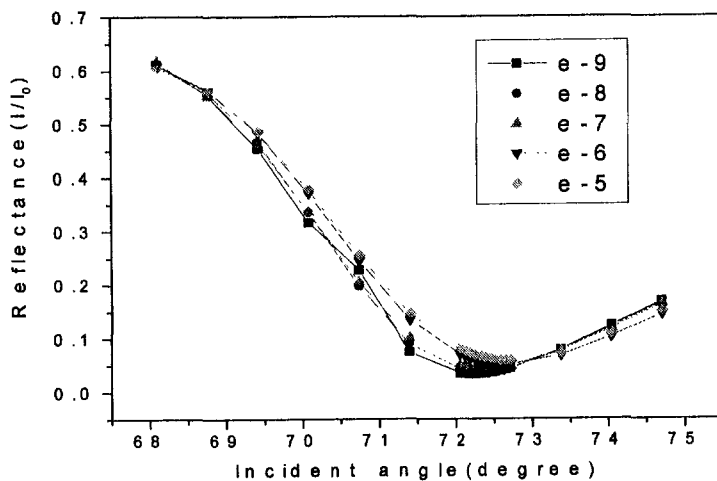


(b)

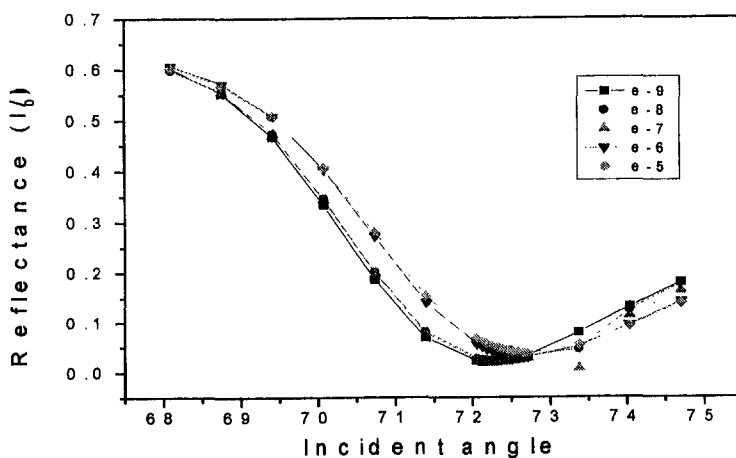


(c)

Fig. 3-40. Comparison of resonance angle shift for tryptophan dissolved in tris-buffer with (a) pH 4.0 (b) pH 6.0 and (c) pH 8.0 that measured using the sensor chip with tryptophanase-coated gold film.



(a)



(b)

Fig. 3-41. Properties of surface plasmon resonance for different concentrations of tryptophan solutions prepared in (a) acetate-buffer pH 8.0 and (b) acetate-buffer pH 6.0 that measured using a sensor chip with tryptophanase-coated gold film.

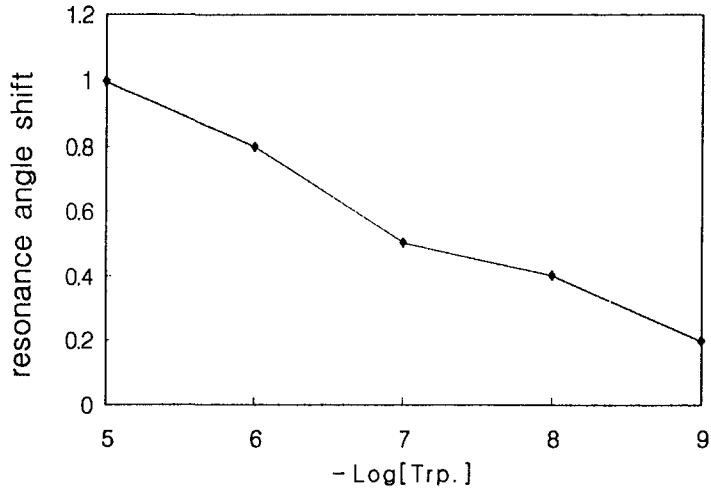


Fig. 3-42. Resonance angle shift for tryptophan dissolved in acetate-buffer pH 8.0 that measured using a sensor chip with tryptophanase-coated gold film.

센서는 다양 한범위의 pH 조건에서 사용가능함이 입증되었다. 동일한 센서 칩으로 acetate buffer에서 측정 한 결과를 Fig. 3-41에 나타내었으며 이에 대한 tryptophan 농도와 resonance angle shift의 관계를 Fig. 3-42에 나타내었다. 이 결과에서 알 수 있는 바와같이 pH 8.0 에서도 비교적 우수한 직선성이 나타났다.

다. Bare gold membrane과 tryptophanase coated membrane의 상대적 인 감응도 비교

Tryptophan sensor의 센서칩 표면에 기질 특이성이 있는 효소가 고정된 경우와 bare gold film을 사용한 결과를 비교한 결과는 Fig. 3-43과 같다. 효소가 고정된 경우는 분석물질인 tryptophan의 농도가 $10^{-5} \sim 10^{-9}$ M일 때

전 범위에 걸쳐 직선성을 보였으나 bare gold membrane 사용 시에는 $10^5 \sim 10^6$ M 범위에서 직선성이 약화되었다.

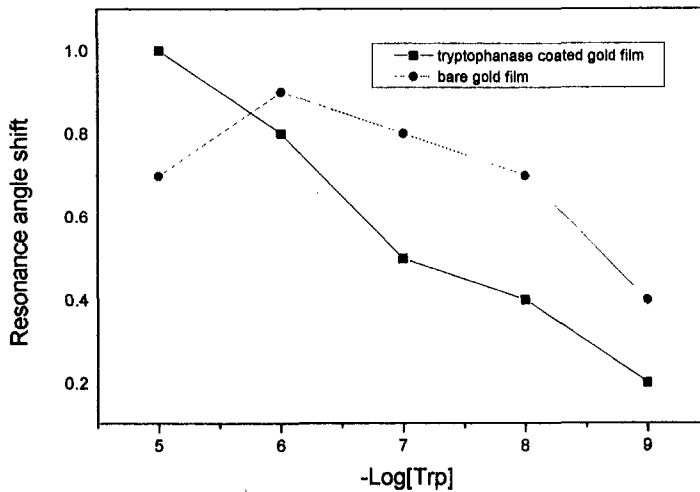


Fig. 3-43. Resonance angle shift for different concentration of tryptophan in tris-HCl buffer pH 8.0 using a sensor chip with tryptophanase-coated gold membrane or bare membrane.

라. Tryptophan 센서의 기질 특이성 확인 결과

Tryptophan 센서의 tryptophanase-coated sensor chip에 대한 기질 특이성을 실험하기 위해 기질인 tryptophan을 leucine 또는 valine으로 대체하여 그 감응도를 측정된 결과 Fig. 3-44와 같이 나타났다. Leucine은 센서칩 표면의 tryptophanase와 반응성이 전혀 없는 것으로 판명되었으며, tryptophanase-coated sensor chip의 기질 특이성이 상당히 높은 것으로 나타났다. 또한 tryptophan 센서칩의 특이성 여부를 시험하기 위해 tryptophanase를 고정된 금박막으로 순수중류수에 용해시킨 valine 을 측정

한 결과 감응변화가 전혀 일어나지 않았다. 이 결과에서도 (data 생략) 금박막에 고정된 효소는 기질 특이성에 의해서 선택적으로 반응하는 것이 확인되었다.

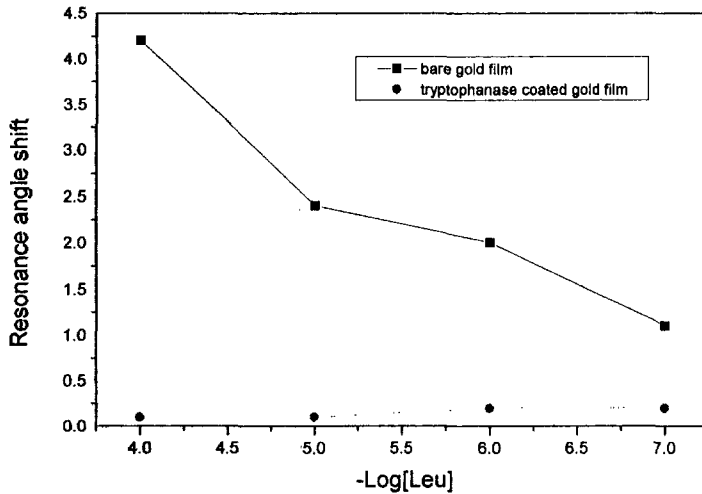
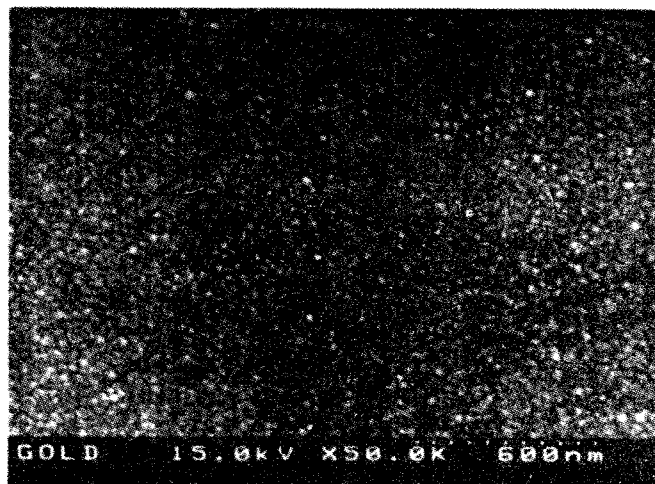


Fig. 3-44. Resonance angle shift for leucine in D.I water using a sensor chip with or without tryptophanase coated gold film.

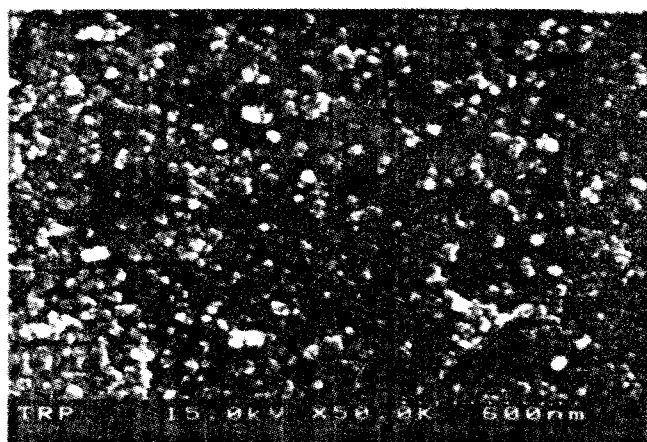
마. Tryptophanase-coated gold membrane 표면 분석결과

Enzyme coated film의 효소 결합상태를 확인하기 위해 전자 주사현미경을 통한 센서칩의 film 표면 형태를 관찰한 결과 Fig. 3-45 와 같이 나타났다. 그림 (a)는 효소를 고정하지 않은 금박막의 표면이고 그림 (b)는 tryptophanase를 고정한 금박막표면이다. 이와 같이 금박막표면을 5만배로 확대하였을 때 효소가 고정된 금박막 표면은 단백질분자가 조밀하게 부착된 입체구조로 나타나 효소가 고정되었음을 확인할 수 있었다. 이와는 대조적인 bare gold membrane의 표면은 평평한 평면상태로 관찰되어 membrane

에 고정된 분자가 전혀 없는 것으로 확인되었다.



(a)



(b)

Fig. 3-45. Surface of (a) bare gold membrane and (b) tryptophanase-coated gold film observed by a scanning electron microscope.

마. Tryptophan 센서성능의 종합적인 판정

필수아미노산 중 tryptophan 농도변화에 따른 용액의 유전을 변화를 원리로 한 표면 플라즈몬 공명형 시제품 센서시스템과 tryptophan 센서칩을 제작하여 그 특성 및 감응도를 분석한 결과 다음과 같이 평가되었다. 센서칩은 E-beam evaporation 방법을 이용하여 금박막을 유리 glass위에 증착하여 사용하였다. Bare gold membrane을 사용한 경우 순수증류수에 용해된 tryptophan은 $10^3 \sim 10^5$ M 농도변화에 대해서 직선적인 감응도를 보였으며, tris-buffer (pH 4.0)와 acetate buffer (pH 7.0)에서도 직선적으로 감응하였다. Tryptophan을 순수증류수, tris-buffer (pH 4.0), acetate buffer (pH 7.0)에 용해한 경우 농도가 매 10배 변화할 때, resonance angle shift 변화도는 0.3도 로 관찰되었다. 또한 Tryptophanase를 화학적 방법으로 금박막 위에 고정시켜 사용한 실험결과는 효소를 고정하지 않는 경우와 비교할 때 효소의 기질특이성과 감응도가 크게 향상되었다. 즉 순수증류수나 tris-buffer (pH 4.0, 6.0, 8.0)에 용해한 tryptophan농도 측정시 $10^5 \sim 10^9$ M 의 저농도범위에서도 직선적으로 감응하였다. 또 tryptophanase 금박막을 사용하여 tryptophan외 타 필수 아미노산의 농도를 측정한 결과 tryptophan 센서칩은 타 아미노산 기질에 전혀 감응하지 않았다. 상기 결과들로 보아 제작된 시제품 센서시스템은 모든 종류의 필수 아미노산에 대해,기질선택성 효소 센서칩을 제작하여 사용할 경우 저농도의 기질에 대해서도 직선적으로 감응할 것으로 판단된다. 즉, 최종 확인된 tryptophan sensor의 분석 결과로 보아 각 필수아미노산에 대해 기질 특이성을 가진 효소를 센서칩의 gold film에 고정할 경우 신속하고 정확도가 높은 감응이 가능하다. 필수아미노산의 기질 특이적 효소의 사용이 용이하지 않을 경우에는 10^5 M 범위까지는 bare

gold film을 갖춘 SPR형 필수아미노산 센서의 사용으로 검출 가능하나, 혼합 아미노산 용액에서는 방해물질에 의한 약간의 오차가 생길 수도 있다. 따라서 혼합 아미노산 용액에서는 기질 특이성을 지닌 센서칩의 사용이 필히 권장된다.

5. PDA를 이용한 SPR형 필수아미노산 센서 시제품의 신호 전환

제작된 SPR형 필수 아미노산센서 시제품의 내부 장치는 Fig. 3-46과 같다. PDA광검지부에서 검지된 감응도 신호는 증폭단을 거쳐 AD(Analog-to Digital)변환기로 입력되었다. 이때 PDA를 통해 입력된 신호는 PDA 콘트롤러용 프로세서에 일시적으로 저장된 후 PC에서 PDA신호에 대한 요구가 있을 때에 즉각적으로 parallel port방식을 이용한 데이터전송을 통해 14bit의 분해능을 가지고 PC로 전송됨이 확인되었다.

또한 디지털화된 신호는 소형 컴퓨터에서 데이터 필터링을 거친 후 화상으로 처리되어 Fig. 3-47과 같이 최종적으로 화면에 나타났다. 신호처리소프트웨어는 Visual C를 이용하여 Fig. 3-48과 같이 제작되었으며 serial port를 통해 D80 motorized stage 콘트롤러와 parallel port를 통한 PDA 콘트롤러용 프로세서와의 통신이 가능하도록 하였다. 실시간으로 얻어진 PDA의 신호는 연속적으로 화면에 출력되었으며 그 변화는 정확하게 관측되었다. 필요시에는 특정한 신호를 자동으로 정지시킬 수 있으며 이때 얻어진 데이터는 텍스트 파일로 저장되었다.

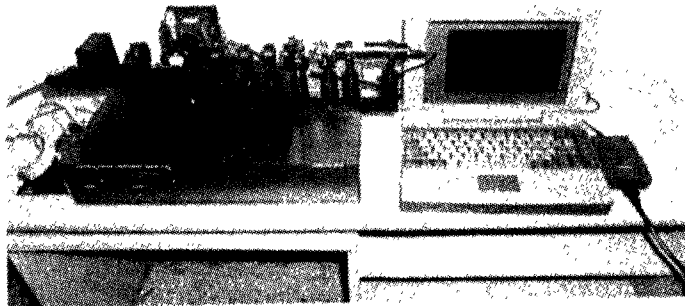


Fig. 3-46. Photograph of actual SPR measurement system in a trial product of the essential amino acid sensor.

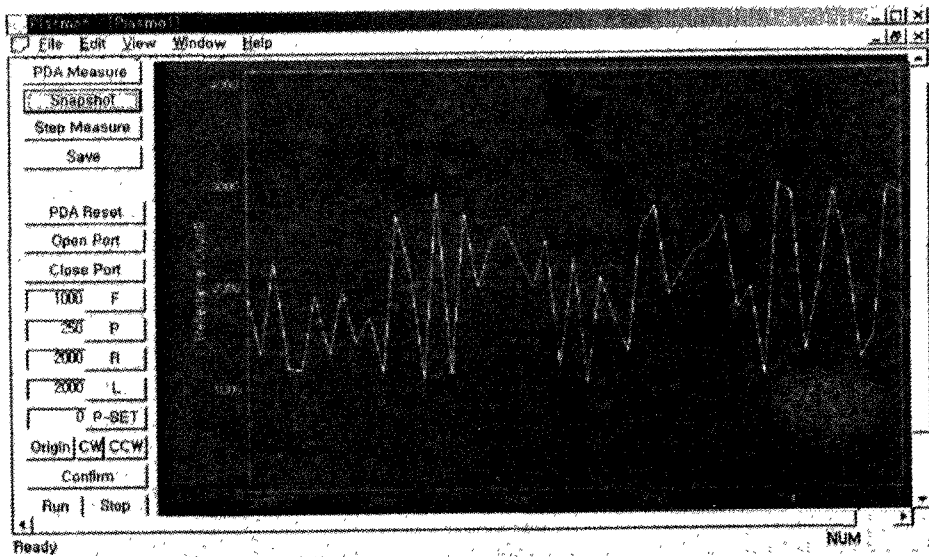


Fig. 3-47. Screen snapshot of SPR measurement software that is a part of a trial product of the essential amino acid sensor.

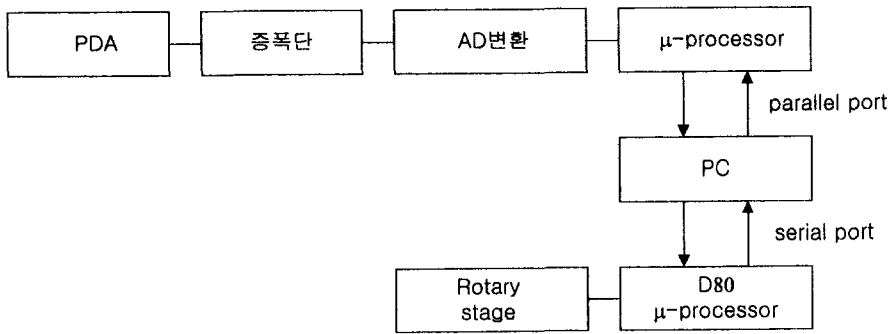


Fig. 3-48. Block diagram of SPR signal processing system in a trial product of the essential amino acid sensor.

제4절 참고문헌

Arnold M.A. and Rechnitz G.A. : Comparison of bacterial, mitochondrial, tissue and enzyme biocatalysts for glutamine selective membrane electrodes, *Anal. Chem.*, 52, 1170-1174 (1980).

Bradford M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*, Vol.72, 248-256 (1976).

Douglas C. & David F. : "Modeling SPR sensors with the finite-difference time - domain method " *Biosensors & Bioelectronics*, 6/7, 677-684 (1996).

Cooper J. C., Hammerle M., Schuhmann W. & Schmidt H.-L. : "Selectivity of conducting polymer electrodes and their application in flow injection analysis of amino acids" *Biosensors & Bioelectronics*, 8, 65-74 (1993).

Cooper, J.C., Hammerle M., Schuhman W., Schmidt, H.L. : Selectivity of Conducting polymer electrodes and their application in flow injection analysis of amino acids, *Biosensors and Bioelectronics*, 8:65-74 (1993).

Erwin Krechmann, : "Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durchngen", *Z. Physic*, vol. 241, pp. 313~324 (1971).

Faibello-Filho, O., Suleiman, A., and Guibault, G. G. : Enzyme electrode for the determination of aspartate, *Biosensors*, 4: 313 (1993).

Fung, K. W., Kuan, S. S., Sung, H. Y., and Guibault, G. G. : Enzyme electrode, *Anal. Chem.*, 51: 2319 (1989).

Guilbault, G. G., and Nagy, G. : Enzyme electrode for the determination of L-phenylalanine, *Anal. Lett.*, 6: 301 (1973).

Guilbault G.G. and Shu F.R. : Enzyme electrodes based on the use of a carbon dioxide sensor. Urea and L-Tyrosine electrodes. *Anal. Chem.*, 44, 2161-2165 (1972).

Harris R. D. , Wilkinson J.S., : "Waveguide surface plasmon resonance sensors", *Sensors and Actuators B*, vol. 29, pp. 261~267 (1995).

Hsiung C.P., Kuan S.S. and Guilbault G.G. : A specific enzyme electrode for L-phenylalanine, *Anal. Chem. Acta*, 90, 45-49 (1977).

Havas J, Guilbault G. : Tyrosine-selective enzyme probe and its application, *Anal. Chem*, Vol. 54, 1991-1997 (1982).

Ideta Kazuhico and Tsuyoshi Arakawa, : "Surface plasmon resonance study for the detection of some chemical species", *Sensors and Actuators B*, vol. 13, pp. 384~386 (1993).

Jory M. J., P.S. Vukusic and J.R. Sambles, : "Development of a prototype gas sensor using surface plasmon resonance gratings", *Sensors and Actuators B*, vol. 17, pp. 203~209 (1994).

Kukosz W., : "Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 6, pp. 215~225 (1991).

Liedberg Bo , Claes N. and ngemar L., : "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing", *Sensors and Actuators B*, vol. 4, pp. 299~304 (1983).

Liedberg B. and Lundstorm I., : "Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance", *Sensors and Actuators B*, vol. 11, pp. 63~72 (1993).

Liedberg B. , Nylander C., and Lundstorm I., : "Biosensing with surface plasmon resonance - how it all started", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 10, pp. i - iv (1995).

Linders C. Vincke R., Devleeschouwer B. J., M. J. and Patriarche, G. J., : Determination of tryptophane a laide delectrodes bacteriennes et enzymatiques, *J. Pharm. Belg.*, 40: 19 (1985).

Luong, J.H.T., Mulchandani, A., and Male, K. B., : Development of a substrate recycle amplification system for L-glutamic acid assay, *Enzyme Microb. Technol.*, 13: 116-122 (1991).

Melendez J., Richard C., Dwight U. Bartholomew, Kari K., and Jerry E., : " A commertial solution for surface plasmon sensing", *Sensors and Actuators B*, vol. 35, pp. 212~216 (1996).

Millot M. C. , F. Martin, D. Bousquet, B. Sebille, and Y. Levy, : "A reactive macromolecular matrix for protein immobilization on a gold surface. Application in sulface plasmon resonance", *Sensors and Actuators B*, vol. 29, pp. 268~273 (1995).

Nikolelis, D. P., : Construction of an immobilized asparaginas sensor and determination of asparagine in human blood, *Anal. Chim. Acta*, 161: 343 (1984).

Romette, J. L., : Electrochemical biosensors in clinical analysis. In *Electrochemical Detection Techniques in the Applied Biosciences* (G. A. Junter, Ed), *Ellis Horwood Ltd., Chichester*, Vol. 1, p. 103 (1988).

Romette J.L., Yang J.S., Kasukabe H. and Thomas D., : Enzyme electrode for specific determination of L-lysine, *Biotech. Bioeng.*, 25, 2557-2566 (1983).

Schmitt F. J., Haussling L., Ringsdorf H., and Knoll W., : Surface plasmon stydied of specific recognition reacions at self-assembled monolayers on gold, *Thin Solid Films*, 201-211, 815-817 (1992).

Schwedt, G. and Stein K., : Immobilized enzymes as tools in food analysis *Z, Lebensm Unters Forsch* 199:171-182 (1994).

Scott, A., and Robertson, A., : Biosensors—a novel technique for quality control, *Food*, 7: 35–37 (1985).

Simonian A. L. , E. I. Rainina, P. F. Fitzpatrick & J. R. Wild, : "A tryptophan-2-monooxygenase based amperometric biosensor for L-tryptophan determination : use of a competitive inhibitor as a tool for selectivity increase", *Biosensors & Bioelectronics* 12(5), 363–371 (1997).

Valle-vega, P., Young, C. T., and Swaisgood, H. E., : Arginase-urease electrode for determination of arginine and peanut maturity, *J. Food. Sci.*, 45: 1027 (1980).

Vincke, B. J., Vire, J.-C. and Patriarche, G. J., : Potentiometric determinations of amino acids using enzyme and bacterial electrodes. In: Electrochemistry, *Sensors and Analysis* (M. R. Smyth and J. G. Vos, Eds), Elsevier, Amsterdam, p. 147 (1986).

Walters R.R., Johnson P.A. and Buck R.P., : Histidine ammonia-lyase enzyme electrode for determination of L-Histidine. *Anal. Chem.*, 52, 1684–1690 (1986).

Weissbach, F., Schindler, W., Huber, J., and Kreibich, G., : Enzymelektrode zur Bestimmung von L-Lysin in Aminosaugemischen, *Acta Biotechnol.*, 7: 377–385 (1987).

White W. C., Guilbault G. C., : Lysine specific enzyme electrode for determination of lysine in grains and foodstuffs. *Anal. Chem.*, Vol. 50, 1481–1486 (1972).

Whitney, Hamilton, Understanding Nutrition 4E, (1988).

Yao, T., Kobayashi, N., and Wasa, T., : Flow-injection analysis for L-glutamate using immobilized L-glutamate oxidase: comparison of an enzyme reactor and enzyme electrode, *Anal. Chim. Acta*, 231: 121–124

(1990).

Yeatman Eric M., : "Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing", *Biosensors & Bioelectronics* 6/7 635-649 (1996).

Zhou R., Schmeisser D., Gopel W., : Mass sensitive detection of carbon dioxide by amino group-functionalized polymers. *Sensors and Actuators B*, Vol. 33, 188-193 (1996).

엄 년식, : "表面 플라즈몬 共鳴形 포도당 센서의 製作 및 特性." 경북대학교 대학원 센서공학과 석사 학위 논문 (1997).

河田總, : "表面 フラスモン センサ " *O Plus E*, 112 (1989).

輕部征夫 et al., : "Enzyme immobilization methods", *ぶんせき* 7 464-471 (1981).

제 4 장 농산물의 유기산 측정 센서 개발

제1절 서론

센서란 측정대상의 물리량이나 화학량을 선택적으로 포착하여 유용한 신호로 변환·출력하는 장치로서 급속히 발전하는 현대사회에서 정밀계측 및 자동화 분야의 핵심으로 관심이 집중되고 있다. 이러한 센서 중에서도 시료 물질 분자를 인식하는 요소로 효소와 미생물 또는 면역체 등의 bioreceptor를 이용하는 바이오센서의 적용은 의료, 식품, 환경 등 다양한 분야에서 잠재력이 큰 연구분야라고 할 수 있다(손병기, 1996).

센서는 측정대상에 따라 역학센서, 전자기센서, 광센서, 음향센서, 열학센서, 화학센서, 생물센서 등으로 분류할 수 있다. 이러한 분류 가운데 본 연구에서 이용되는 바이오센서는 변환기능에 생물학적 현상을 이용하는 화학센서로서 화학변화를 전극을 통해 전기신호로 변환시키는 원리를 기본으로 한다. 바이오센서는 1906년 Cremer에 의한 수소이온 측정용 유리전극 개발을 시작으로 하여 반도체, 세라믹, 금속 유기물 및 고분자 재료 등을 이용하여 이온 선택성 전극, 습도센서, 가스센서 등 다양하게 발전해왔다. 그 후로 1962년 Clark 등은 효소의 특이성에 착안하여 효소를 전극과 결부시켜 효소의 기질을 계측하는 원리를 제안하였고, 1967년 Updike 등이 고정화 효소를 적용함으로써 바이오센서는 새로운 단계에 접어들게 되었으며 점차 다양한 효소를 써서 복합적 분자식별소자로 발전하게 되었다(Updike, 1967; Turner, 1987).

식품의 품질 평가시에는 식품의 영양가와 안전성뿐만 아니라 기호성 또한 식품의 품질을 좌우하는 매우 중요한 요인으로 작용한다. 단지 생명유지

에 필요한 영양소를 섭취하던 과거의 식생활과는 달리 현대의 식생활에서는 식품에 대한 기호도가 큰 비중을 차지하고 있다. 기호도에는 식품의 색과 향기, 맛 등이 관련되어 있으며 그 중 향기와 맛에 해당하는 향미는 미각과 후각에 의해 주로 느껴지는 감각이다. 식품의 향미는 단일량이라기 보다는 여러 가지 요인들의 종합적인 값이라고 볼 수 있어서 이들을 정량적으로 평가하는 것은 매우 어려운 일이다. 또한 어떤 향미성분의 경우에는 인간이 인지할 수 있는 농도는 매우 낮는데 비해 기계적으로 검출할 수 있는 농도는 이에 미치지 못하는 경우도 많다. 향미계측을 위한 biosensor의 개발은 그 역사가 짧고 초기단계에 있다고 볼 수 있으나 미래의 식품과학분야에서는 향미계측용 biosensor의 응용이 필수적일 것으로 예상된다. 향미센서는 인간이 느끼는 주관적인 감각을 향미센서 시스템을 통해 객관적인 값으로 나타내 주므로 이를 식품의 질적 평가나 식품공정과 저장가공 분야에 유용하게 쓸 수 있다. 식품에 맛과 향미를 주는 성분들에는 당, 산, 알코올, 케톤, 에스테르, 알데히드 등이 있으며 현재까지 이들을 측정하는 대부분의 방법들은 시간과 노력, 비용이 많이 들고 낮은 농도를 감지할 수 없는 단점을 가지고 있다. 따라서 이런 단점들을 보완할 수 있는 보다 빠르고, 간편하고 정확도가 높은 향미 측정방법의 개발이 요구되며 이러한 첨단 기술을 식품과학분야에서 응용함으로써 식품의 고품질화를 이룩할 수 있게 될 것이다. 그러므로 본 과제에서는 식품의 기호도에 크게 영향을 주며 농산물의 품질 평가에 이용될 수 있는 유기산 성분을 정량적으로 측정할 수 있는 sensor를 개발하고자 하였다.

1. Potentiometry 원리

바이오센서를 transducer의 종류에 따라 분류하면 전기화학적 센서, 반

도체 센서, 열센서, 압전센서, 광센서 등으로 나눌수 있으며 이 중 전기화학적 센서의 일종인 전위차법(potentiometry)은 기준전극(reference electrode)과 지시전극(working electrode) 사이의 전위차를 측정하는 것으로 전극의 감응전위는 analyte의 농도와 관계되며 signal은 Nernst 법칙에 따라 농도의 log값에 비례 또는 반비례한다. 전극전위에 대한 농도의 영향은 아래 Nernst 방정식에 따라 계산된다.

$$E = E_0 - \frac{2.303RT}{nF} \log Q$$

E_0 는 표준전극전위, R 은 기체상수(8.314 J/mol K), T 는 절대온도, n 은 반응에서 이동되는 전자수, F 는 faraday 상수로 96,487 coulombs/mol, Q 는 반응비를 나타낸다. 이러한 Nernst 법칙은 매우 묽은 용액에서만 타당한 결과를 보이는데, 이는 이온의 농도가 증가할수록 이상적 열역학 상태로부터 멀어지기 때문이다. 즉, 전극의 전위차는 분석물의 농도보다 활동도에 더욱 관계되므로 농도 C 는 활동도 a 로 대치되어야만 한다.

$$a = \gamma C \quad (\gamma: \text{활동도 계수})$$

이용될 수 있는 potentiometric transducers은 pH나 1가 이온 측정을 위한 유리전극, 음이온이나 양이온 등에 민감한 특수전극들, pCO_2 또는 pNH_3 electrode와 같은 기체전극 등으로 매우 다양하다(Canh, 1993).

2. Flow-injection analysis(FIA) system

FIA는 자동화된 liquid handling의 한 방법으로 1975년 Ruzicka와 Hansen에 의해 도입되어진 것으로 액체시료를 연속되고 분리되지 않는 적합한 액체 carrier stream안으로 주입하는 것을 기본으로 한다. 주입된 시료는 zone을 형성하며 이것이 검출기를 향해서 이동되어지고 그것의 계속적

인 변화로서 absorbance, electrode potential, 다른 물리적 parameters를 계속해서 기록하게 한다. FIA 분석은 analytes와 biosensors간의 짧은 접촉시간, 다수의 시료처리능, 적은 시료주입량 뿐 아니라 시료의 전처리 과정이 필요없는 장점을 가진다. 또한 재현성이 매우 높으며 calibration 수행과 자동화가 용이하므로 FIA는 bioprocess monitoring을 위한 바이오센서의 적용 대상으로서 그 관심이 증가하고 있다(Bilitewski & Rohm, 1997).

이 분석 시스템에서 signal의 전형적인 형태는 peak로서 peak height는 analyte의 농도에 비례하여 변화하는데 이러한 peak height는 시료가 carrier stream내에서 이동할 때 확산과 대류과정을 통해 일어나는 분산(dispersion)에 의해 변형될 수 있다. 분산은 주입된 시료량, 튜브길이, pumping rate에 의해 조절이 가능하며 이때 지나치게 낮은 확산은 carrier stream과 sample zone의 불충분한 혼합을 초래하여 화학반응이 일어나지 않을 수 있으므로 주의가 요구된다(Bilitewski & Rohm, 1997).

3. Enzyme immobilization

FIA 장치는 고정화된 reagents 또는 catalysts로 채워진 reaction coils이나 columns를 포함함으로써 그것의 적용범위를 확장할 수 있으며 특히 고정화된 효소는 그것의 특이성 때문에 FIA-type biosensor에서 유리하게 이용될 수 있다. 고정화된 효소를 사용함으로써 반복사용이 가능하여 비용이 절감되며, 조작의 용이하므로 매우 효율적인 system이 된다. 또한 고정화로 인해 효소의 안정성을 증가시킬 수 있는데 이는 효소변성의 기회를 줄임으로써 효소구조내 강도가 증가되기 때문이다. 그리고 효소들이 서로서로 가까운 위치에 고정됨으로써 이들이 촉매로서 순서대로 참여하여 multistep reaction pathway의 효율성을 증가시킬 수 있기 때문이다(White & Turner,

1997).

효소 고정화 방법으로는 첫째, 불용성 gel matrix나 microcapsule안에 효소를 고정화하는 physical entrapment(물리적 포획) 둘째, 공유결합이나 multifunctional reagent를 이용하여 효소를 지지체에 고정화하는 chemical entrapment(화학적 포획) 셋째, 단백질을 용해하기 위해서 친수성 medium을 사용하여 표면으로 직접 효소를 흡착시키는 방법인 adsorption(지지체에 흡착) 등이 있는데 이러한 방법의 선택은 많은 요인들에 의해 결정된다. 흡착법은 고정화 절차가 용이하지만 안정성이 가장 낮고, bifunctional agents를 사용하는 cross-linking법은 낮은 효소활성을 초래하고 결합력이 약하다는 단점을 가진다. 공유결합의 경우 사용동안 지지체로부터 효소의 방출이 거의 일어나지 않으나 결합조건이 까다로운 단점이 있고, 물리적 포획은 그들의 3차원 격자구조가 기질과 생성물의 이동에 barrier로서 작용하며, 일부 pore size는 효소의 이탈을 유발하는 약점을 가진다(Barker, 1987).

고정화된 효소는 FIA에 적용하기 위한 방법으로서 다음 두 가지 효소반응기로 만들어서 분석에 적용될 수 있다. CPG(controlled pore glass)와 같은 압력에 저항적인 지지체로 채워진 작은 column인 packed-bed reactor와 관의 벽에 얇은 층으로 효소를 고정화하는 open tubular reactor이다. Open tubular type은 analyte의 분산이 적은 장점을 가지나 packed-bed reactors는 signals이 더욱 높고 실험조건의 변화에도 덜 민감하므로 많이 이용된다(Bilitewski & Rohm, 1997).

4. 선행 연구 고찰

최근에 일본, 미국, 유럽 등에서 식품에 이용될 수 있는 biosensor의 개발이 활발한데 일본에서는 chemilunescence 감지에 기초한 생선 신선도 측

정용 biosensor, glucose와 sucrose 측정을 위한 needle-type의 biosensor (Takeuchi & Karube, 1994) 등이 개발되었다. 그 외 육제품에 함유된 니코틴산 측정을 위한 효소적 방법(Hamano 등, 1995)과 carbon felt layer와 오이즙을 이용해서 산소의 이동율을 측정하여 L-Ascorbic acid를 측정한 sensor의 개발(Uchiyama & Umetsu, 1991) 등이 보고되어 있으며, 맛 센서로서는 multichannel taste sensor(Toko & Yamafuji, 1994), lipid-modified monolayer membrane을 이용한 taste sensor(Hayashi 등, 1995), lipid membrane을 이용하여 제조한 sensor로 astringency와 pungency를 측정한 보고(Iiyama 등, 1995)가 있다.

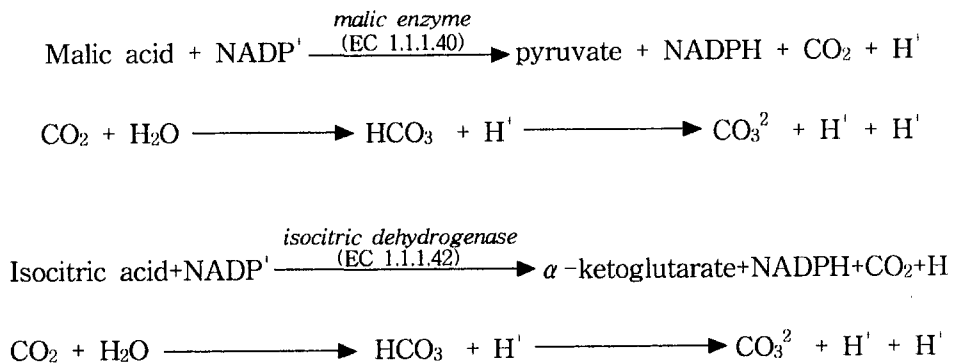
유럽에서는 시트러스 과일(citrus fruit)의 질을 결정하는 유기화합물 중의 하나인 acetaldehyde에 대한 biosensor의 개발(Cowell 등, 1994), 옥살산을 감지하기 위한 enzyme electrode(Reddy 등, 1994)의 개발, 돼지육의 신선도 감별을 위한 젖산 감별장치(Shu 등, 1993), micro planar thin-film hydrogen peroxide electrode를 이용한 생선 신선도 판별 biosensor (Chemitius 등, 1992) 등이 보고되었다. 후각 neuron의 생체내 배양에 의한 냄새 감지 biosensor와 식물성 기름의 peroxide 수준을 측정하는 enzyme biosensor의 개발(Mannino 등, 1994)도 보고되었다. 식품산업에 있어서 multi array polymer sensor의 응용기술이 영국에서 시도되었으며 (Pisanelli 등, 1994) 임상 목적으로 glucose의 농도를 측정하는 needle-type의 biosensor에 관한 연구결과는 많이 보고되어 있다 (Mascone 등, 1993 ; Abdel-Hamid 등, 1994). 그 외 ethanol, galactose, sucrose, fructose 등 당의 농도와 lactate, urate 등의 농도를 측정하는 장치도 임상학적인 목적으로 연구되었지만 식품과학 분야에서의 직접적인 연구는 거의 없는 실정이다. 기타 토마토 씨의 alcohol dehydrogenase를 이용한 alcohol 측정 sensor와(Ozsoz & Wang, 1991) 포도주와 기타 음료수, 혈중의 alcohol 계통 물질

과 glycerol의 농도를 측정하는 sensor의 개발은 어느 정도 연구되어 있는 편이다.

미국과 캐나다에서는 주로 임상학적 목적으로 혈액중의 glucose(Shaw 등, 1991), alcohol, 뇨 중의 urate, 기타 glutamate, 젖산 등을 측정하는 sensor들이 많이 개발되어 있다. Galactose와 lactose 측정을 위한 enzyme electrode의 개발(Garcia 등, 1991), 인스턴트 커피 중의 포도당 측정을 위한 enzyme electrode의 개발(Matsukura 등, 1993), 생선 조직에서 nucleotide 분해를 측정하기 위한 biosensor의 개발(Mulchandani 등, 1990), 음료수, 주스, 꿀, 시럽, 설탕대체식품, 케이크 등의 포도당 측정 biosensor개발(Wei 등, 1995), 오렌지 껍질 중의 pectin 함량을 계측하는 enzyme biosensor의 개발(Horie & Rechnitz, 1995) 등이 보고되어 있다. 그렇지만 국제적으로 볼 때에도 실용적인 농산물 품질 계측을 위한 biosensor에 관한 연구보고는 매우 미진한 형편이다.

5. Malate와 isocitrate 센서의 이론적 배경

고정화된 효소를 사용하는 malate, isocitrate 측정용 FIA-type biosensor 시스템은 다음과 같은 효소반응에 의해 이루어진다.



이와 같이 고정화된 효소의 촉매작용에 의해 형성된 CO_2 는 pH에 따라 존재형태가 달라지므로 염기성 buffer로서 탄산이온(CO_3^{2-})형태로 만든 후 카보네이트 이온선택성 막전극을 이용하여 감지하고 이를 통해 malate, isocitrate 농도를 측정하는 것이 본 센서의 원리이다.

6. 연구의 필요성 및 목적

대부분의 과일, 야채들은 여러 종류의 유기산들을 함유하고 있어 특유의 맛과 향기를 가지는데 이러한 유기산들(citric acid, isocitric acid, malic acid, oxalic acid, tartaric acid) 중 L-malic acid와 isocitric acid는 사과, 오렌지, 포도, 토마토, 레몬, 살구, 사과, 딸기, 시금치, 양배추 등에 있어 가장 주된 산성분일 뿐만 아니라 metabolic cycle내에서도 중요한 역할을 한다. 또한 malic acid는 포도주, 모과주, 매실주 등의 발효주의 향미에도 관여한다. 이러한 중요성과 함께 malate, isocitrate는 각종 농산물의 숙성도의 지표 또는 식품과 음료산업에서의 food control의 지표로서 정성·정량의 필요성이 대두되고 있다(Gary, 1992; Matsumoto, 1996; Gajovic, 1997). 지금까지 malate, isocitrate 측정은 gas chromatography(GC), high performance liquid chromatography(HPLC) 등의 크로마토그래피법 또는 효소를 이용한 chemical method 등에 의해 수행되어 왔다. 그러나 크로마토그래피 법들은 유기산을 분석하는 과정에서 다양한 column을 이용해야 하거나 복잡한 전처리가 요구되고 분석시간이 긴 단점이 있고, 효소적 방법의 경우 높은 특이성을 가지는 반면 'off-line'으로 수행되며 적용될 수 있는 analyte가 극소수이고 매우 까다로운 작업조건을 요구하는 단점이 있다. 그러므로 이러한 기존 방법을 대체할 수 있는 신속하고 정확하며 신뢰성 있는 바이오센서 개발은 매우 바람직하다(Gajovic, 1997). 또한 본 연구에서 개발한 바이오센서

는 FIA와 고정화 효소를 함께 적용함으로써 더욱 경제적이고, analyte에 대해서는 더욱 선택적인 시스템을 구축할 수 있을 것으로 사료된다 (Matsumoto, 1996).

따라서 본 연구에서는 malate, isocitrate 측정용 바이오센서의 감도와 선택성을 높이기 위해 분석에 영향을 줄 수 있는 여러 실험적 변수들을 최적화하고 실제 시료내에서 이들 유기산의 농도를 측정한 후 이를 conventional method인 GC와 비교하여 신뢰성을 검증받고자 하였다. 또한 다시료 분석과 현장에서의 적용을 용이하게 하기 위한 휴대용 센서의 개발을 위한 일환으로 전극의 소형화 제작이 가능한 solid-state electrode를 제작하고, 이것의 적용 가능성을 검토하기 위해 conventional electrode를 사용한 실험 결과와 비교 분석하였다.

제2절. 재료 및 방법

1. Malate sensor system

가. 시약 및 기구

탄산이온 선택성 중합체막 제조를 위해서 trifluoroacetyl-p-butylbenzene (TFABB)를 Fluka Chemie(Buchs, Switzerland)에서, p-Decyl- α, α, α -trifluoroacetophenon(TFADB)를 Trans world Chemicals (Rocksville, MD)에서 구입하였고, Poly(vinylchloride)(PVC), bis (2-ethylhexyl)sebacate(DOA), tridodecylmethylammonium chloride (TDMACl), tetrahydrofuran (THF)을 Fluka Chemie(Buchs, Switzerland)로부터 구입하였다. Carrier buffer에 사용되는 시약인 Tris[hydroxymethyl]aminomethane (TRIZMA BASE)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 phosphate(di-potassium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate)는 Fluka Chemie(Buchs, Switzerland)로부터 구입하였다. 효소 반응기 제작을 위해서 chicken liver로부터 분리된 malic enzyme(EC 1.1.1.40)을 사용하였으며, 효소결합에 이용되는 glutaraldehyde, aminopropyl glass(75 Å & 500 Å, 200-400 mesh controlled pore glass)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 기질로 사용되는 L-malic acid(L-hydroxybutanedioic acid)와 cofactor인 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(β -NADP)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 기타 실험에 사용된 모든 시약들은 analytical-reagent grade를 사용하였고, 완충용액이나 표준용액 제조에는 3차 증류수(저항 18M Ω)를 사용하였다.

Kipp and Zonen(Delft, Netherlands)으로부터 chart recorder를 구입하였

고, 전위차 판독기인 pH/mV meter는 Mettler사(Delta 350, England)로부터, peristaltic pump(IPC-N-8-IV 34)는 Ismatec Co.(Glattbrugg-Zurich, Switzerland)로부터 구입하였다. FIA system을 구성하기 위해서 injector (Model 7725I)를 Rheodyne사(Cotati, CA, USA)로부터 구입하여 sample injector loop(Rheodyne, Cotati, CA, USA)를 장착하였다. 실험에 사용되는 전극들은 지시전극으로는 Philips electrode body(IS-561, Glasblaserei Moler, Switzerland)와 CO₂ electrode body(model 95-62, Orion Research Inc., Boston, USA)를 사용하였고, 기준전극으로는 single junction reference electrode(Model 90-01, Orion Research Inc., Boston, MA, USA)를 사용하였다.

나. FIA system의 구성

Malate 측정용 CO₃²⁻-selective FIA-biosensor의 구성은 Fig. 4-1에 나타나 있다. 이 시스템은 carrier buffer, peristaltic pump, syringe loading sample injector, CO₃²⁻-ISE, single junction reference electrode, pH/mV meter, recorder로 조합되었다.

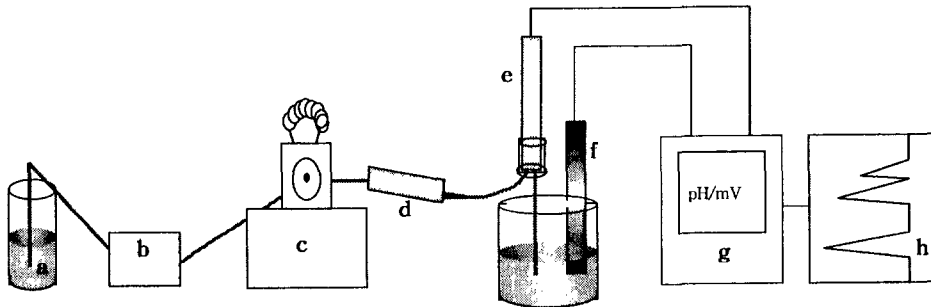
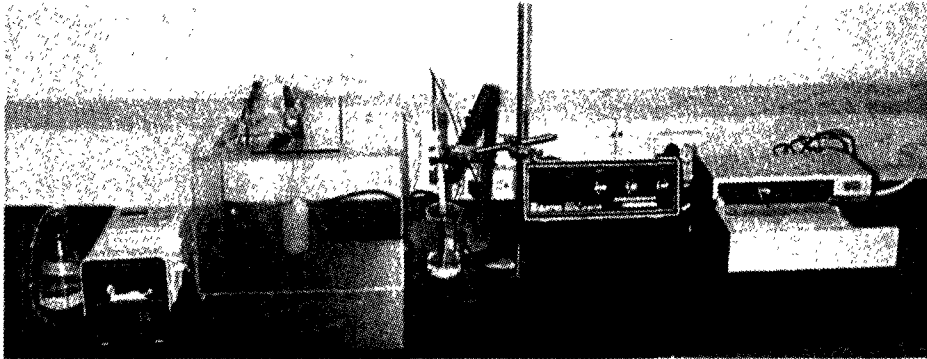


Fig. 4-1. Scheme of CO_3^{2-} -selective FIA-system for determination of malate.

a. Carrier buffer, b. Peristaltic pump, c. Injector loading a sample injector loop, d. Immobilized malic enzyme reactor, e. CO_3^{2-} -selective electrode, f. Single junction reference electrode, g. Detector(pH/mV meter), h. Recorder

다. CO_3^{2-} -ISM(ion-selective membrane) 및 CO_3^{2-} -ISE의 제조

CO_3^{2-} -ISM을 만들기 위해서 TFABB(ionophore) 6.3 mg, PVC (polymeric matrix) 35 mg, DOS(plasticizer) 92.6 mg, TDMACI(lipophilic additive) 3.1 mg을 2 mL THF에 용해하였다. 그 혼합액을 활성이 없는 유리판 위에 놓여진 glass ring(i.d. 22mm)에 부은 후 실온에서 12시간 방치하여 THF를 증발시켰다. 생성된 투명한 막을 내경 7 mm 정도의 작은 disc로 자른 후 지시전극인 Philips electrode body에 부착시켰고, 내부 기준용액으로 0.1M NaH_2PO_4 , 0.1M Na_2HPO_4 그리고 0.01M NaCl 혼합액을 사용하였다. 제조된 탄산이온 선택성 전극의 sensing part를 FIA system에 적용하기 위해서 flow-through jacket으로 씌웠다.

라. 효소 고정화

효소는 바이오센서의 감도, 특이성, 감응속도, 안정성, 재현성, 수명 등의 특성에 매우 중요한 요소이다. 따라서 본 연구에서는 기질인 malate가 생성물인 pyruvate와 CO_3^{2-} 로 전환되도록 촉매작용을 하는 malic enzyme(EC 1.1.1.40)을 고정화함으로써 센서의 shelf-life를 연장함과 동시에 감도를 높이고자 효소고정화 방법을 도입하였다. 효소 고정화 방법에는 흡착이나 포획의 물리적 방법과 지지체와 효소간의 공유결합, bifunctional reagents에 의한 교차결합 등의 화학적 방법이 있다. 이에 본 연구에서는 다음과 같은 여러 고정화 방법을 시도함으로써 malic enzyme의 활성은 최대한으로 보유하도록 하였고, FIA-sensor system에 효율적으로 이용될 수 있는 최적의 고정화방법을 고안하고자 하였다. 또한 설정된 최적의 고정화 방법을 이용하여 효소를 고정시킨 후 15일 간격으로 안정성 조사를 하였다. 이때 효소의

activity는 UV-spectrophotometer를 이용하여 370 nm에서 생성물 NADPH의 흡광도를 측정함으로써 조사되었다.

1) Aminopropyl glass beads에 공유결합

효소고정화를 위해 aminopropyl glass(500 Å, 200-400 mesh) 0.25 g을 50mM phosphate buffer(PB)로 제조한 2.5 % glutaraldehyde 10 mL와 혼합한 후 실온에서 2시간 동안 흔들면서 반응시켰다. 그 후 glass beads를 3차 증류수로 여러차례 세척하여 반응하지 않은 glutaraldehyde를 제거하고 이를 다시 PB로 세척한 후 1.7 mL PB에 담귀 30분간 냉장보관하였다. 전처리된 glass beads와 PB에 용해시킨 효소용액 0.7 mL를 혼합하여 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 결합하지 않은 효소를 제거하기 위해 증류수로 세척 후 PB로 여러차례 씻고 여과하였다. 이를 사용 전까지 0.1 M Tris buffer에 넣어 4°C에서 보관하였다.

2) Chitopearl beads를 이용한 공유결합

0.6 g chitopearl beads를 50 mM phosphate buffer(pH 7.5) 500 mL로 세척하고(280 nm에서 여액의 흡광도가 0.01 이하가 될 때까지 세척함) 세척한 beads를 PB에 용해시킨 2.5% glutaraldehyde 용액 10 mL와 혼합한 후 30°C에서 2시간 교반하였다. 이를 증류수로 여러 번 세척한 후 다시 위의 buffer 용액으로 여러차례 세척하였다. 효소용액(4 mL phosphate buffer로 제조)과 함께 활성화된 chitopearl beads를 섞은 후 30°C에서 2시간동안 교반하였다. 그 후 4°C에서 24시간 교반하면서 반응시키고 PB로 세척한 후 여과하였고, 고정화된 enzyme beads는 사용하기 전까지 4°C에서 0.05 M

phosphate buffer(pH 7.5)에 보관하였다.

3) CNBr-activated sepharose를 이용한 공유결합

CNBr-activated sepharose 4B 0.2 g을 glass filter에 넣은 후 1 mM HCl 1 L를 사용하여 30분간 서서히 swelling시키면서 세척하였다. 1 mL coupling buffer(0.1 M NaHCO₃ & 0.5 M NaCl 혼합액, pH 8.5)와 효소를 실온에서 1시간 동안 혼합한 후 4°C에서 하룻밤 교반시켰다. 이를 glass filter에 붓고 고정화된 효소 beads를 0.1 M Tris-HCl(0.5 M NaCl 포함, pH 8.0)로 세척하면서 여과시켰다(여과액은 총량 5 mL가 넘지 않도록 함). 여과되지 않은 beads는 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0)와 혼합한 후 2시간 정치하였고 그 후 고정화된 효소 beads를 0.1 M acetate buffer(0.5 M NaCl 포함, pH 4.0), 0.1M Tris-HCl buffer(0.5 M NaCl 포함, pH 8.0)로 계속 세척하였다. 효소 고정화된 beads는 0.1 M Tris buffer(pH 7.5)에 담귀 4% azide 용액을 1-2 방울을 떨어뜨린 후 사용 전까지 4°C에서 보관하였다.

4) Calcium alginate를 이용한 physical adsorption

효소용액을 4% sodium alginate solution 0.5 mL에 첨가하여 10분간 혼합한 후 10분간 정치하여 평형에 도달하도록 하였다. 혼합물을 0.2 M CaCl₂ solution 35 mL에 천천히 소량씩 떨어뜨리며 첨가한 후 생성된 투명 beads(2.8 mm × 3.1 mm diameter)를 CaCl₂ 용액에서 30분간 경화시켰다. 생성된 효소 beads를 glass filter로 여과한 후 증류수로 세척하고 건조시킨 후 0.25% poly-L-lysine solution(pH 7.0) 20 mL에 넣어 10분간 부유시키고

증류수로 세척하여 건조하였다. 제조한 효소 beads는 사용 전까지 4℃에서 냉장보관하였다.

마. Malate sensor system의 최적화

Malic enzyme이 고정화된 효소 반응기를 부착한 CO_3^{2-} -selective FIA system을 보다 감도 높고 정확한 시스템으로 최적화하기 위하여 conventional electrode를 사용한 malate 센서의 sensitivity, selectivity에 영향을 줄 수 있는 여러 실험변수들을 최적화하였다. 즉, CO_3^{2-} -ISM의 조성 비율, CO_3^{2-} -ISM 조성 중 polymer의 종류, carrier buffer의 종류, flow rate, 효소 반응기로부터 감지기까지의 거리, 시료 주입량, malic enzyme 양을 이용하여 각 요인 변화에 따른 감응도를 비교하였다.

1) CO_3^{2-} -선택성 막의 조성 비율

TDMACI(liphophilic additive)은 막 저항을 감소시키고, 시료내 지용성 counter ions의 방해를 감소시키며, 이온 선택성 막의 selectivity를 개선하는 작용을 한다(Hong, 1997). 따라서 CO_3^{2-} 에 대한 감응을 높이고 시스템의 효율을 개선하기 위해 기존의 표준막 성분 중 TDMACI(Tridodecyl methylammonium chloride)의 성분과 carbonate ionophore인 TFABB(Trifluoroacetyl-p-butylbenzene)의 비율을 변화시켜 감응의 정도를 비교하였다(Table 4-1).

2) CO_3^{2-} -선택성 막 조성 중 polymer의 종류

CO₃²⁻-선택성 막 성분 중 polymeric matrix는 flow 또는 수압의 변동에 의한 기계적 변형에 저항적이고 적절한 물리적 강도를 가지는 안정한 막을 형성하는 기능을 가진다. 또한 막 조성 물질들을 효과적으로 결합하도록 한다(Scott, 1986). 따라서 TFABB 6.3 mg, DOA 92.6 mg, TDMACl 3.1 mg, THF 2 mL의 동일한 막조성에 polymer 성분만을 두가지로{poly(vinyl chloride), polyurethane} 달리하여 제작한 후(Table 4-1) 감응의 정도를 비교하였다.

Table 4-1. Modified composition of CO₃²⁻ ion selective membrane

component ^a	standard	modified(I)	modified(II)	modified(III)	modified(IV)
TFABB	4 %	9 %	7 %	-	8 %
TDMACl	2 %	1 %	3 %	8 %	-
DOS (plasticizer)	59 %	54 %	55 %	55 %	55 %
PVC (polymer)	35 %	36 %	35 %	37 %	37 %
THF	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL

^aTFABB; trifluoroacetyl-para-butylbenzene. CO₃²⁻ ionophore.

TDMACl; lipophilic additive, tridodecylammonium chloride.

DOS; dioctyl sebacate.

PVC; polyvinyl chloride.

THF; tetrahydrofuran.

3) Carrier buffer의 종류

Carrier buffer는 CO_3^{2-} 생성과 효소의 촉매적 작용에 영향을 주므로 1 mM phosphate buffer(pH 7.4), 1 mM Tris/HCl buffer(pH 7.4), 1 mM Tris/ H_2SO_4 buffer(pH 8.7)를 이용하여 CO_3^{2-} -ISE에서 발생하는 전위차를 비교하였다.

4) 흐름속도에 따른 영향

Carrier buffer의 흐름속도에 의한 영향을 조사하기 위하여 pump의 speed를 20(14.7 mL/min), 40(26.4 mL/min), 60(32.6 mL/min)으로 조절하여 센서 감응을 비교하였다.

5) 효소 반응기로부터 감지기까지의 거리에 의한 영향

Malic enzyme reactor에서 반응 후 생성된 CO_3^{2-} 는 detector인 CO_3^{2-} -선택성 전극까지 가는 거리에 의해 영향을 받을 수 있다. 따라서 효소 반응기로부터 이온선택성 전극까지를 연결하는 튜빙의 길이를 25 cm, 15 cm, 5 cm로 달리하여 실험하였다.

6) 시료 주입량에 따른 영향

시료 주입량에 따른 CO_3^{2-} 이온 선택성 전극의 감응의 정도를 알아보기 위하여 injector에 장착된 sample loop를 변화시켜 시료량을 50 μL , 100 μL , 200 μL 의 세 가지로 달리하여 조사하였다.

7) Malic enzyme 양에 따른 영향

동일한 양의 glass beads에 malic enzyme loading을 20, 40, 60 units로 달리한 후 효소의 양에 따른 센서 감응의 변화를 조사하였다.

8) 전극 종류에 따른 영향

본 malate 센서 시스템은 FIA system으로서 다양한 종류의 변환기(transducer)를 결합시킬 수 있다. 따라서 probe type과 tubular type의 카보네이트 이온 선택성 전극을 제조하였으며, 제조된 전극의 CO_3^{2-} 감응도의 차이를 조사하였다.

가) Probe type-ISE 제조

TFABB 6.3 mg, TDMACl 3.1 mg, DOS 92.6 mg, PVC 55 mg을 2 mL THF에 용해하였다. 그 cocktail solution을 glass ring에 부어 건조시켰다. 제조된 카보네이트 선택성 막은 약 7 mm 정도의 disc로 잘라 philips electrode body에 부착시켰다(Fig 4-2).

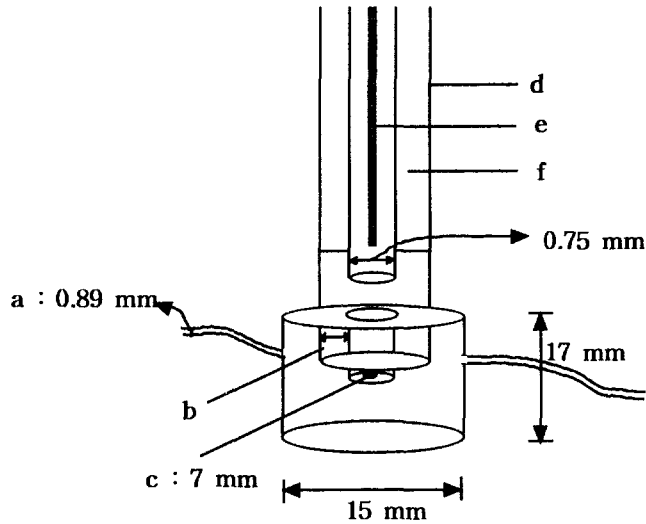


Fig. 4-2. Structure of the probe type flow-through carbonate ion selective electrode.

a, Tygon tubing; b, flow-through cell jacket; c, carbonate selective membrane; d, electrode body; e, Ag/AgCl reference electrode; f, 10^{-2} M KCl solution

나) Tubular type-ISE 제조

Mayerhoff와 Kovach(1983)의 방법을 수정하여 제조하였으며, 카보네이트 막 조성은 앞의 probe type-ISE 제조와 동일한 성분으로 구성되었다. 제조를 위해 먼저 주사기 바늘(18 gauge)을 0.89 mm 내경의 tygon tubing 안으로 삽입하였다. 튜빙의 가운데 부위의 한쪽을 칼로 도려낸 후 카보네이트 막 제조를 위해 위의 cocktail solution을 칼로 도려낸 부위가 채워질 때까지 한 방울씩 서서히 떨어뜨렸다. 그 후 실온에서 12시간 가량 건조시켰고 주사기 바늘을 뺀 후 양옆으로 두 개의 구멍을 뚫은 plastic tip에 막이 부착

된 tubing을 끼워 넣어 고정시켰다. 이때 카보네이트 막이 고정된 sensing part가 위로 가도록 고정하였으며 튜빙과 plastic tip사이의 연결부위는 PVC와 cyclohexanone 혼합액으로 밀봉하였다. Plastic tip안은 내부기준 용액인 10^{-2} M KCl 용액으로 채웠고 그 안에 Ag/AgCl wire를 삽입하였다(Fig 4-3).

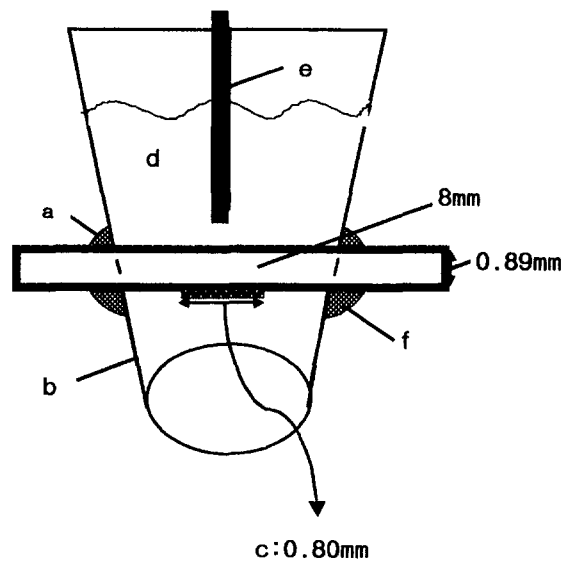


Fig. 4-3. Structure of the tubular type flow-through carbonate ion selective electrode.

a, Tygon tube tip; c, carbonate selective membrane ; d, 10^{-2} M KCl solution; e, Ag/AgCl wire; f, sealant

다) Probe type과 tubular type의 성능 평가

제조된 두 종류의 전극의 카보네이트 이온 선택성을 조사하기 위해서 Na_2CO_3 표준용액을 사용하여 카보네이트 이온 감지 능력을 평가하였으며, $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-1} \text{ M}$ L-malate 용액을 이용하여 malate 선택성 정도를 비교하였다.

바. CO_2 gas 전극을 이용한 malate 측정

조효소 NADP가 CO_3^{2-} 에 대한 감지력에 영향을 미치므로 malic enzyme 적정 반응 pH인 7.4에서 생성된 CO_3^{2-} 를 pH 4.3으로 조절하여 CO_2 로 전환시켜 이를 CO_2 gas 전극으로 측정하는 방법을 추가로 고안하였다. CO_2 측정은 고정상과 FIA system에서 각각 실시되었다.

1) Probe type의 CO_2 gas 전극의 사용

고정상의 probe type은 일정량의 buffer용액 속에 CO_2 gas 전극을 담가 반응으로부터 생성되는 CO_2 의 양을 정량하는 형태이다. CO_2 gas 전극의 성능에 영향을 줄 수 있는 요인들인 stirring 정도, buffer 종류, buffer 양 등에 대하여 실험하였다.

2) FIA system에서 CO_2 gas 전극의 사용

Well-jet과 flow-thru type의 CO_2 gas 전극을 각각 제조하여(Fig. 4-4, Fig. 4-5) FIA system에 연결하고 CO_2 gas 전극이 반응에서 생성된 CO_2 양

에 정량적으로 반응하여 malate를 측정할 수 있는지를 실험하였다(Fig. 4-6). CO₂ gas전극의 감지도를 높이기 위해 시료 주입량, NADP 농도, malic enzyme 양, 효소 반응기의 형태, 효소 반응기 제조시 polymer 종류 및 MgCl₂ 등을 변화시켜 실험하였고, enzyme coupling efficiency도 측정하였다.

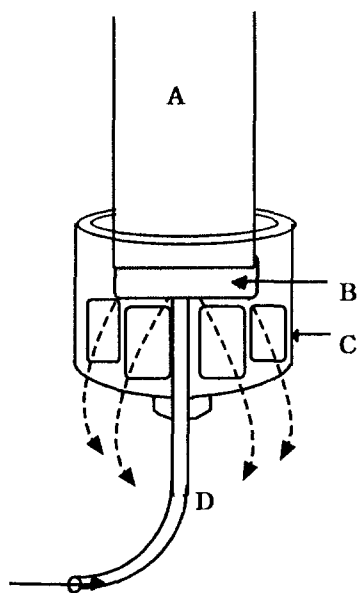


Fig. 4-4. CO₂ gas electrode with well-jet.

- A : CO₂ gas electrode
- B : CO₂ gas sensing membrane
- C : Well-jet
- D : Tubing

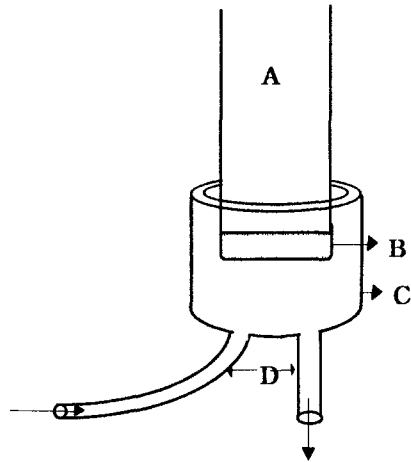


Fig. 4-5. CO₂ gas electrode with flow-through cap.

- A : CO₂ gas electrode
- B : CO₂ gas sensing membrane
- C : Flow-through cap
- D : Tubing

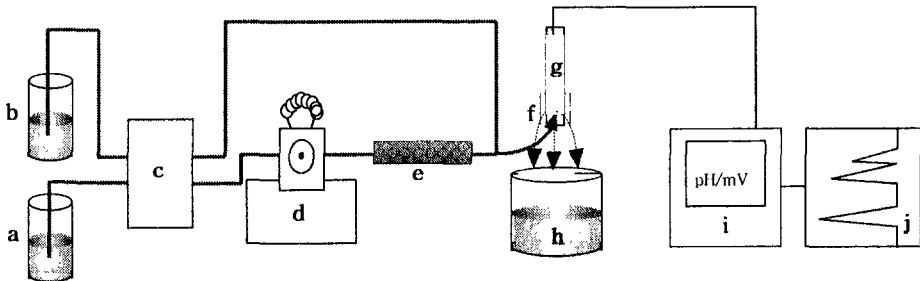


Fig. 4-6. Scheme of the FIA system with CO₂ electrode equipped with the well-jet to measure the malate.

- a. Carrier buffer, 1mM phosphate buffer(pH 7.4), b. CO₂ electrode buffer, c. peristaltic pump, d. Injector loading a sample injector loop, e. Immobilized malic enzyme reactor, f. well-jet, g. CO₂ gas electrode with well-jet, h. buffer solution, i. Detector(pH/mV meter), j. Recorder

사. Microelectrode 제작

소형화 센서 개발의 일환으로 microelectrode를 제작하였고 제작방법은 다음과 같다. 먼저 PVC tube를 5 cm로 자른 후 아랫부분에 CO_3^{2-} -ISM을 고정시켰고 이때 고정화 접착제로는 PVC와 cyclohexanone 혼합액을 사용하였다. 충분히 건조시킨 후 내부를 기준용액 즉, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.1 M Na_2HPO_4 , 0.01 M NaCl 혼합액으로 채운 후 은선 도금한 cable을 끼우고 그 연결부위를 parafilm으로 감싸면서 단단하게 고정시켰다(Fig. 4-7). 또한 제작한 microelectrode의 성능을 평가하기 위해서 표준용액(NaHCO_3)을 사용하여 농도에 따른 감응의 상관성을 조사하였다.

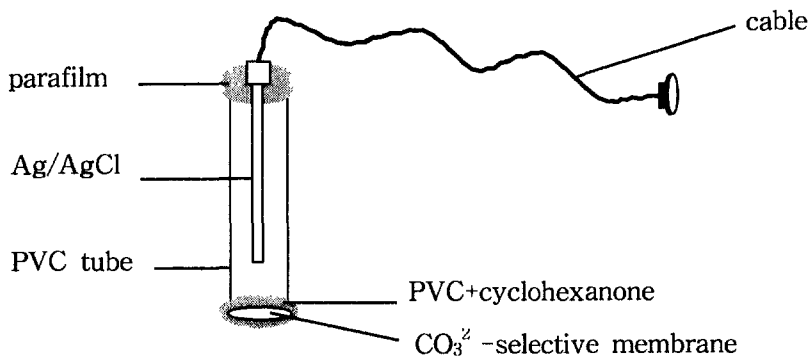


Fig. 4-7. Scheme of microelectrode.

아. Microchip 제작

다시료 분석과 현장에서의 적용을 용이하게 하기 위한 휴대용 센서의 개발을 위한 일환으로 전극의 소형화 제작이 가능한 microchip(solid-state electrode)을 제작하여 실험하였으며(Fig. 4-8), 적용가능성을 검토하기 위해 그 성능을 conventional electrode와 비교 분석하였다. Solid-state electrode의 제조는 알루미나판 위에 silver electrode(Ca. 0.8 mm^2)를 screen printing 함으로써 이루어졌다. TFADB 8.3 mg, PVC 66 mg, DOA $100 \mu\text{L}$, TDMACl 2 mg 그리고 $900 \mu\text{L}$ THF의 혼합액을 silver electrode와 그 주위 비활성 layer위에 소량(약 $10 \mu\text{L}$) 떨어뜨린 후 실온에서 12시간 방치하여 건조시켰다(Shin 등, 1998). 이 새로운 전극은 내부 기준용액을 필요로 하지 않는 장점을 가지고 있다.

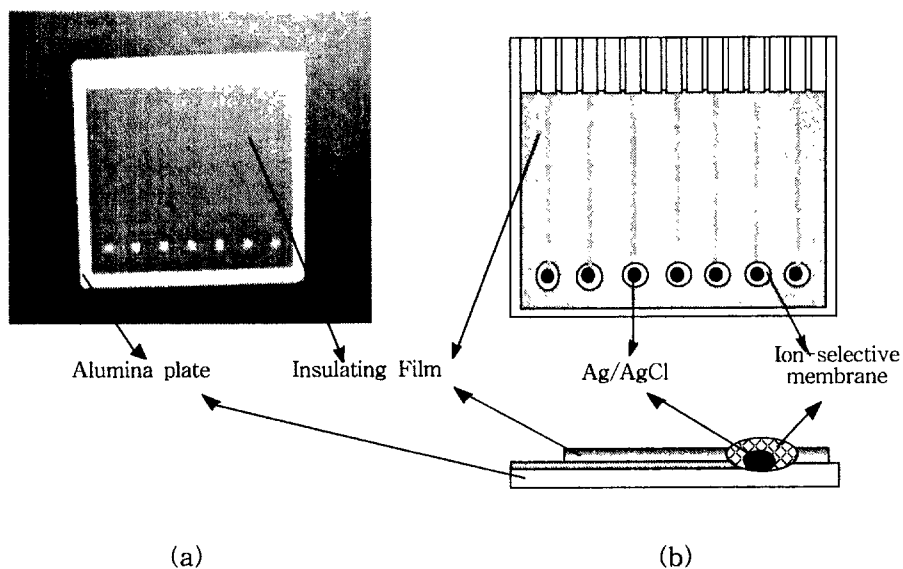


Fig. 4-8. Photograph(a) and schematic diagram(b) of the solid-state type ion selective electrode.

자. Microchip을 이용한 system의 제작

Solid-state electrode를 이용한 시스템은 conventional electrode를 이용한 시스템과 같이 carrier buffer, peristaltic pump, syringe loading sample injector, CO_3^{2-} -selective solid-state electrode 그리고 single junction reference electrode, pH/mV meter, recorder로 조합하였다.

차. Conventional electrode와 solid-state electrode의 성능 비교

FIA-system 내에서 CO_3^{2-} -선택성 전극의 기본적인 반응특성을 비교하기 위해서 실험적 변수들(e.g., carrier buffer pH, 흐름속도, 시료주입량, 튜빙굵기, 온도)은 최적조건으로 고정시킨 채 NaHCO_3 표준용액을 주입하여 carbonate performance를 실험하였다.

카. 방해물질의 영향력 분석

1) 막조성에 따른 성능비교

연구 초반에 수행한 malate 측정용 바이오센서의 최적조건 확립과정에서 cofactor로 사용되는 NADP가 CO_3^{2-} -ISE의 방해물질로서 작용하였다. 이를 최소화하기 위해 막 조성을 달리한 카보네이트 선택성 막을 제조하여 비교하였고, 본 바이오센서의 선택성과 감도를 높이기 위해 막의 pH effect 그리고 기질인 malate의 방해작용을 조사하였다.

첫째, TFABB(trifluoroacetyl-p-butylbenzene), TFADB(trifluoroacetyl-p-decylbenzene) 두 가지의 carbonate ionophore를 이용하여 제조한

CO_3^{2-} -ISM의 NADP interference를 조사하였다. 둘째, 본 연구에서 사용된 polymeric membrane은 검출하고자 하는 이온물질의 첨가 없이도 막 자체가 pH에 대한 전위차 반응을 나타내기도 하므로, 이러한 방해물질의 영향력을 최소화하기 위해 조성을 달리하여 제조한 막(TFADB-based & TMT-based membrane)의 pH effect를 조사하였다. 이 때 Universal buffer(boric acid 11.4 mM, citric acid 6.7 mM, NaH_2PO_4 10 mM)에 NaOH를 소량씩 첨가함으로써 pH 2.0~12.0 범위에서 pH 영향력을 실험하였다. 셋째, 막의 카보네이트 감지과정에서 기질인 malate가 방해물질로서 작용할 수 있으므로 조성을 달리하여 제조한 TFADB-based membrane과 TMT-based membrane의 malate interference를 조사하였다. 주입한 malate의 농도범위는 $10^5 \text{ M} \sim 10^2 \text{ M}$ 이었고 막조성은 ionophore를 제외하고 PVC, DOS, TDMACl, THF 모두 동일하였다.

2) 당과 유기산의 방해효과 분석

대부분의 식품들은 다수의 당과 유기산을 포함하므로 본 센서를 식품에 직접 적용할 때 이러한 방해물질이 센서감응에 미치는 영향을 고려하기 위해 10^2 M 농도의 당과 유기산을 주입하여 방해물질의 영향력을 조사하였다. 주입한 당류로 glucose, sucrose, fructose를 사용하였고, 유기산으로 malic acid, ascorbic acid, pyruvic acid, tartaric acid, citric acid를 사용하였다.

타. 시제품 제작

현장에서 적용이 용이한 휴대용 센서 개발을 위한 일환으로 센서 시스템

을 소형화한 시제품을 제작하였으며, 그 구성은 carrier buffer, peristaltic pump, injector, carbonate-ISE, reference electrode, detector(pH/mV meter), recorder로 이루어졌다. Conventional electrode를 이용한 시제품은 Fig. 4-9와 Fig. 4-10에 나타나 있고, solid-state electrode를 이용한 시제품은 Fig. 4-11과 Fig. 4-12에 나타나 있다.

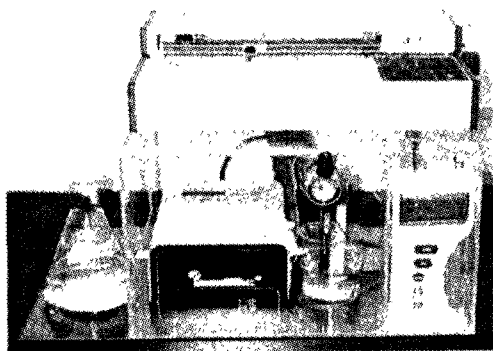


Fig. 4-9. Photograph of a trial product of FIA sensor system using the conventional electrode for determination of malate.

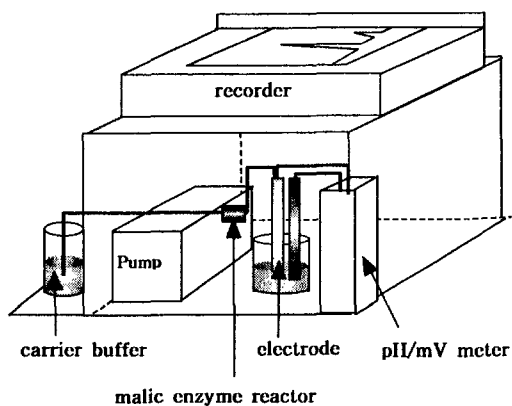


Fig. 4-10. Illustration of the photograph of FIA sensor system using the conventional electrode in Fig. 4-9.

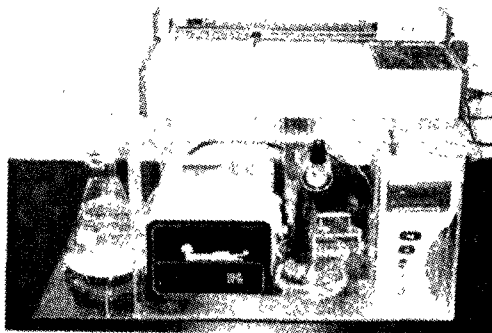


Fig. 4-11. Photograph of a trial product of FIA sensor system using the solid-state electrode for determination of malate.

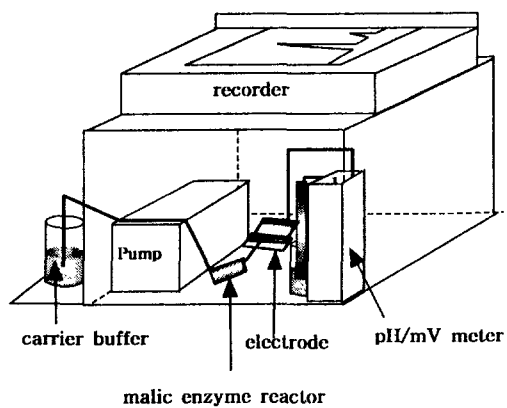


Fig. 4-12. Illustration of the photograph of FIA sensor system using the solid-state electrode in Fig. 4-11.

파. 식품시료 분석

1) Biosensor에 의한 분석

Conventional electrode와 solid-state electrode를 이용하여 식품시료에의 적용 가능성을 비교 검토하였다. 식품 시료를 원심분리한 후(2000 rpm, 15 min) 10배 희석하여 설정된 최적조건의 센서 시스템에서 표준 검량곡선에 기준하여 시료에 함유된 malate를 정량하였다.

2) GC에 의한 분석

본 연구에서 개발한 malate 측정용 바이오센서의 신뢰성을 검증하고자 GC를 이용하여 malate를 정량하였고 그 결과를 CO_3^{2-} -selective FIA system으로 측정한 결과와 비교 분석하였다.

malate를 측정하기 위한 GC의 조건은 Table 4-2에 나타나 있으며, 시료 전처리는 다음과 같이 행해졌다(Flores 등, 1970). 주스용액 100 g에 95% ethanol를 첨가하여 500 mL로 정용한 후 1시간 동안 방치하고 whatman No. 42로 여과하였다. 여과된 시료 5 mL를 취해 0.1 g celite 545, 1% glutaric acid(95% ethanol로 제조한 standard solution) 1 mL, 3차 증류수로 제조한 16% lead acetate 0.5 mL, 85% ethanol 15 mL를 첨가하여 완전히 섞고 45분간 정치하였다. 이를 1500 rpm에서 7분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 85% ethanol 10 mL를 첨가하여 위와 같은 조건에서 다시 원심분리하였다(2회 반복). Ethyl ether 5 mL를 넣어 2000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 버린 다음 65°C 항온수조에서 30분간 ether를 날려버리고 45°C 회전 진공건조기에 넣어 10분간 건조하였다. 수분제거를 위해

anhydrous Na₂SO₄ 0.1 g을 첨가한 후 silyating reagent(anhydrous pyridine : hexamethyl disilazine : trimethyl chlorosilane = 9 : 3 : 1)를 1.5 mL 첨가하였다. 45초간 완전히 섞어준 후 45℃ 항온수조에서 15분간 반응시키고, 2000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 그 상층액 0.5 μL를 주입하여 GC분석을 행하였다. 분석 후 malate의 양은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{mg malic acid}/100 \text{ g sample} = (H_a/H_g) \times G \times 100 \times (MW_a/MW_g)$$

H_a와 H_g는 각각 malate와 glutaric acid의 면적이고 G는 시료내 첨가한 glutaric acid의 mg수, MW_a와 MW_g는 malate와 glutaric acid의 분자량이다.

Table 4-2. Operating conditions of gas chromatography for determination of isocitric acid

Part name	Instrumental condition
Instrument	DS 6200 Gas chromatography
Column	Glass column (length : 1.82m, i.d. : 6.35mm) Packing materials (10% SE-30 on Chrom-M-AQw)
Detector	Flame Ionization Detector
Temperature	Column ; 5min at 100℃ programmed rate, 1℃/min 60min at 240℃ Injector ; 240℃ Detector ; 260℃
Carrier gas	N ₂ gas, 30 mL/min
Chart speed	0.3 cm/min
Range(on GC)	2
Attenuation(on recorder)	3

2. Isocitrate sensor system

가. 시약 및 기구

탄산이온 선택성 증합체막 제조를 위해서 p-Decyl- α, α, α -trifluoroacetophenon(TFADB)를 Trans world Chemicals(Rocksville, MD)에서 구입하였고, Poly(vinylchloride)(PVC), bis(2-ethylhexyl) adipate (DOA), tridodecylmethylammonium chloride(TDMACl), tetrahydrofuran(THF)을 Fluka Chemie(Buchs, Switzerland)로부터 구입하였다. Carrier buffer에 사용되는 시약인 Tris[hydroxymethyl]aminomethane(TRIZMA BASE)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 H₂SO₄로 pH를 조정하였다. 효소반응기 제작을 위해서 porcine heart로부터 분리된 NADP-dependent isocitric dehydrogenase(EC 1.1.1.42.)를 사용하였으며, 효소결합에 이용되는 glutaraldehyde, aminopropyl glass(500 Å, 200-400 mesh controlled pore glass)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 기질로 사용되는 D-isocitric acid(DS-(+)-threo-Isocitric monopotassium salt)는 Fluka사(Switzerland)로부터, cofactor인 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(β -NADP)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 기타 실험에 사용된 모든 시약들은 analytical-reagent grade를 사용하였고, 완충용액이나 표준용액 제조에는 3차 증류수(저항 18 M Ω)를 사용하였다.

Kipp and Zonen(Delft, Netherlands)으로부터 chart recorder를 구입하였고, 전위차 판독기인 pH/mV meter는 Mettler사(Delta 350, England)로부터, peristaltic pump(IPC-N-8-IV 34, Glattbrugg-Zurich, Switzerland)는 Ismatec Co.으로부터 구입하였다. FIA system을 구성하기 위해서

injector(Model 7725I, Cotati, CA, USA)를 Rheodyne사로부터 구입하여 sample injector loop(Rheodyne, Cotati, CA, USA)를 장착하였다. 실험에 사용되는 전극들은 지시전극으로는 Philips electrode body(IS-561, Glasblaserei Moler, Switzerland)를 사용하였고, 기준전극으로는 single junction reference electrode(Model 90-01, Orion Research Inc., Boston, MA, USA)를 사용하였다.

나. FIA system의 구성

본 연구의 isocitrate 측정용 CO_3^{2-} -selective FIA-biosensor의 구성은 Fig. 4-13에 나타나있다. 이 시스템은 두 개의 carrier buffer와, peristaltic pump, syringe loading sample injector, CO_3^{2-} -ion selective electrode, reference electrode, pH/mV meter, recorder로 조합되었다. Carrier buffer는 detector내의 반응 즉 CO_3^{2-} 생성의 최적 pH와 효소반응을 위한 최적 pH가 다른 것을 감안하여 두 부분으로 나누어 이동되었다(Evans, 1987). Carrier 1은 0.1 M Tris- H_2SO_4 (pH 7.5)로 고정되어 효소반응기로 이동되었고, Carrier 2는 0.6 M Tris- H_2SO_4 (variable pH)로서 carrier 1과 함께 mixing coil에서 혼합되어져 detector로 이동되었다.

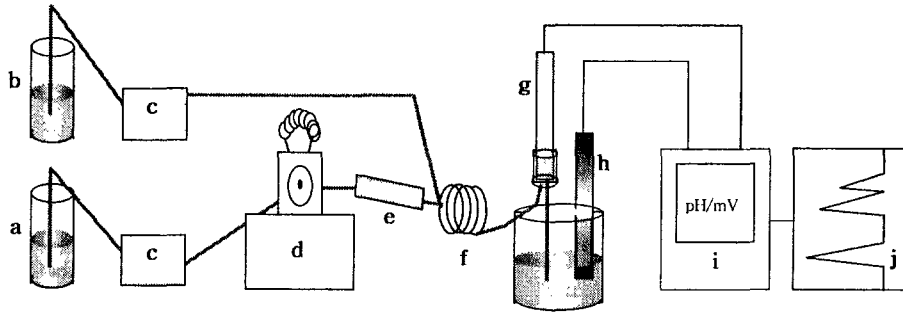


Fig. 4-13. Scheme of CO_3^{2-} -selective for determination of isocitrate.
 a. Carrier buffer 1, b. Carrer buffer 2, c. Peristaltic pump,
 d. Injector loading a sample injector loop, e. Immobilized
 isocitric dehydrogenase reactor, f. mixing coil, g.
 CO_3^{2-} -selective electrode, h. Single junction reference
 electrode, i. Detector(pH/mV meter), j. Recorder

다. CO_3^{2-} -ISM 및 CO_3^{2-} -ISE의 제조

탄산이온 선택성막을 만들기 위해서 TFADB(ionophore) 8.3 mg, PVC (polymeric matrix) 66 mg, DOA(plasticizer) 100 μL , TDMACI (lipophilic additive) 2 mg을 900 μL THF에 용해시켰다. 그 혼합액을 활성이 없는 유리판 위에 놓여진 glass ring(i.d. 22 mm)에 부은 후 실온에서 12 시간 방치하여 THF를 증발시켰다. 생성된 투명한 막을 내경 7 mm 정도의 작은 disc로 자른 후 지시전극인 Philips electrode body에 부착시키고, 내부 기준용액으로 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.1 M Na_2HPO_4 그리고 0.01 M NaCl 혼합액을 사용하였다. FIA를 위해서 제조된 탄산이온 선택성 전극의 sensing part를 flow-through jacket으로 씌웠다.

라. 효소 고정화

Isocitric dehydrogenase를 고정화하기 위해서 Kumaran와 Trans(1992) 방법을 수정하여 사용하였다. 효소고정화를 위해 aminopropyl glass(500 Å, 200-400 mesh) 0.25 g을 50 mM phosphate buffer(PB)로 제조한 2.5% glutaraldehyde 10 mL와 혼합한 후 실온에서 2시간 동안 흔들면서 반응시켰다. 그 후 glass beads를 3차 증류수로 여러 차례 세척하여 반응하지 않은 glutaraldehyde를 제거하고 이를 다시 PB로 세척한 후 1.7 mL PB에 담가 30분간 냉장보관하였다. 전처리된 glass beads와 PB에 용해된 isocitric dehydrogenase(60 units) solution 0.7 mL를 혼합하여 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 결합하지 않은 효소를 제거하기 위해 증류수로 세척 후 PB로 여러 차례 씻었다. 그런 다음 고정화된 효소 beads를 효소반응기 제조를 위해 Teflon tubing(i.d. 2.4 mm, 15 cm)안에 채워넣고 0.1 M Tris-H₂SO₄(pH 7.5)로 그 안을 충진하였다. 그 후 다공성 종이와 nipple로 튜빙의 양끝을 막았다. 제조된 효소반응기는 사용전까지 냉장보관하였다(Bradford, 1976).

마. Isocitrate sensor system의 최적화

바이오센서의 감도와 선택성에 영향을 줄 수 있는 여러 실험변수들 즉, carrier buffer pH, 흐름속도, 시료 주입량, 튜빙내경 등을 달리하여 isocitrate 측정용 FIA system을 최적화하였다.

1) Carrier buffer pH에 따른 감응

Carrier buffer 1(0.1 M Tris-H₂SO₄, pH 7.5)를 고정하여 흘려보내고, Carrier buffer 2(0.6 M Tris-H₂SO₄)의 pH를 9.0, 10.0, 11.0으로 달리하여 CO₃²⁻-ISE에서 발생하는 전위차를 측정하였다.

2) 유속에 따른 감응

Peristaltic pump의 속도를 조절하여 carrier buffer의 이동속도를 6.5 mL/hr, 10.4 mL/hr, 13.6 mL/hr로 달리하여 실험함으로써 유속에 따른 감응의 정도를 분석하였다.

3) 시료 주입량에 따른 감응

Injector에 장착된 sample loop를 변화시켜 시료주입량을 50 μ L, 100 μ L로 달리하여 실험하고 그에 따른 전위차 변화를 분석하였다.

4) 튜빙 내경에 따른 감응

Carrier buffer로부터 변환기인 CO₃²⁻-ISE까지 flow-through type으로 연결하는 튜빙의 내경을 0.89 mm, 1.02 mm로 달리하여 비교함으로써 튜빙 내경에 따른 전위차의 변화를 분석하였다.

바. Microchip 제작

소형화 센서 개발의 일환으로 앞의 malate sensor system에서와 동일한 방법으로 isocitrate 분석을 위한 microchip(solid-state electrode)을 제작하

였다.

사. Microchip을 이용한 system의 제작

Solid-state electrode를 이용한 시스템은 conventional electrode를 이용한 시스템과 같이 두 개의 carrier buffer, peristaltic pump, syringe loading sample injector, CO_3^{2-} -selective solid-state electrode 그리고 single junction reference electrode, pH/mV meter, recorder로 조합된 FIA system으로 구성되었다.

아. Conventional electrode와 solid-state electrode의 성능 비교

FIA-system 내에서 CO_3^{2-} -선택성 전극의 기본적인 반응특성을 비교하기 위해서 실험적 변수들(e.g., carrier buffer pH, 흐름속도, 시료주입량, 튜빙굵기)은 최적조건으로 고정한 후 NaHCO_3 표준용액을 주입하여 carbonate performance를 실험하였다.

자. 방해물질의 영향력 분석

대부분의 식품들은 다수의 당과 유기산을 포함하므로 이것들이 센서감응에 미치는 영향을 검토하기 위해 addition method 즉, 측정시료와 함께 여러 종류의 당과 유기산을 일정농도, 일정량으로 첨가하는 방법을 이용하여 interference effect를 조사하였다. 이때 첨가하는 당류로 glucose, sucrose, fructose를 사용하였고, 유기산으로 malic acid, ascorbic acid, pyruvic acid, tartaric acid, citric acid를 사용하였다.

차. 시제품 제작

현장에서의 분석이 용이한 소형화 제작을 위하여 센서 시스템을 소형화한 시제품을 제작하였으며 그 구성은 carrier buffer, peristaltic pump, injector, carbonate-ISE, reference electrode, detector (pH/mV meter), recorder로 malate 센서 시제품과 동일하게 제작하였다.

카. 식품시료 분석

1) Biosensor에 의한 분석

Conventional electrode와 solid-state electrode를 이용하여 식품시료에의 적용 가능성을 비교 검토하였다. 각 과일주스(사과, 포도, 당근, 토마토 주스)를 원심분리(2000 rpm, 15 min) 후 isocitrate를 10배 희석하여 설정된 최적조건인 센서 시스템에서 표준 검량곡선에 기준하여 과일 주스에 함유된 isocitrate를 정량하였다.

2) GC에 의한 분석

본 연구에서 개발한 isocitrate 측정용 바이오센서의 신뢰성을 검증하고자 GC를 이용하여 isocitrate를 정량하였고 그 결과를 CO_3^{2-} -selective FIA system으로 측정한 결과와 비교 분석하였다.

Isocitrate를 측정하기 위한 GC의 조건은 Table 4-3에 나타나 있으며, 시료전처리하는 앞의 malate 측정을 위한 GC의 시료전처리 방법과 동일하였다(Flores 등, 1970). 분석 후 isocitrate의 양은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{mg isocitric acid}/100 \text{ g sample} = (H_a/H_g) \times G \times 100 \times (MW_a/MW_g)$$

H_a 와 H_g 는 각각 isocitrate와 glutaric acid의 면적이고 G 는 시료내 첨가한 glutaric acid의 mg수, MW_a 와 MW_g 는 isocitrate와 glutaric acid의 분자량이다.

Table 4-3. Operating conditions of gas chromatography for determination of isocitric acid

Part name	Instrumental condition
Instrument	DS 6200 Gas chromatography
Column	Glass column (length : 1.82m, i.d. : 6.35mm) Packing materials (10% SE-30 on Chrom-M-AQw)
Detector	Flame Ionization Detector
Temperature	Column ; 15min at 100°C programmed rate, 5°C/min 30min at 240°C Injector ; 240°C Detector ; 260°C
Carrier gas	N ₂ gas, 30 mL/min
Chart speed	0.3 cm/min
Range(on GC)	2
Attenuation(on recorder)	3

3) 통계처리

식품시료의 GC분석 결과와 본 센서 시작품의 분석 결과와의 비교는 SAS Package Program을 사용하였으며, 각 군간의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test를 이용하였다(SAS Institute Inc. 1985).

제3절. 결과 및 고찰

1. Malate sensor system

가. 효소 고정화

Aminopropyl glass beads, chitopearl beads, CNBr-activated sepharose 에 공유결합, calcium alginate를 이용한 physical adsorption 등의 다양한 방법을 이용하여 효소를 고정화시킨 결과 enzyme loading이 달라 약간의 차이가 있지만, CNBr-activated sepharose나 chitopearl beads를 이용한 공유결합의 경우 aminopropyl glass beads에 공유결합시킨 경우나 calcium alginate를 이용한 physical adsorption의 경우보다 enzyme activity 손실이 훨씬 컸다(Fig. 4-14). 따라서 본 연구에서는 calcium alginate와 aminopropyl glass beads를 이용하여 제조한 enzyme reactor를 FIA-sensor system에 부착하여 실험하였다. 그러나 alginate는 실험수행동안 buffer 용액으로 인한 alginate의 부피 팽창으로 인해 carrier buffer의 flow를 방해하여 본 센서 시스템에 적용이 어려웠고, 또한 실험동안 enzyme binding이 약화되어 센서수명이 감소되었다. 따라서 센서 시스템에의 적용, 사용 수명, enzyme activity 손실 등을 고려할 때 glass beads에 공유결합 시키는 것이 본 센서 시스템에서는 가장 적합하다고 판단되었다. 최적의 고정화 방법인 aminopropyl glass beads에 고정화되었을 때 enzyme activity는 2주 후 측정시 초기 활성과 유의적 차이가 없었으며, 30일 후에도 어느 정도의 활성을 보이므로 본 바이오센서의 안정성 및 효율성을 향상시킬 수 있을 것이라 생각되었다(Fig. 4-15).

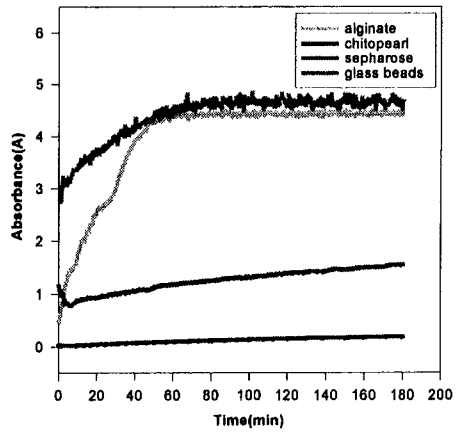


Fig. 4-14. Enzyme activity by different enzyme immobilization methods.

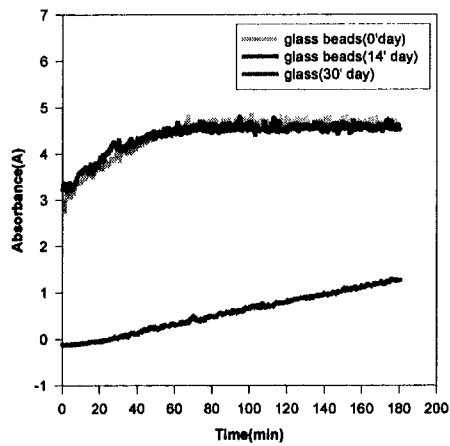


Fig. 4-15. Stability test of immobilized malic enzyme during the storage period.

나. Malate sensor system의 최적화

1) CO_3^{2-} -선택성 막의 조성 비율

기존의 표준막 성분 중 TDMACl과 TFABB의 비율을 변화시켜 감응의 정도를 비교한 결과 7% TFABB-based modified(II) membrane과 TFABB를 전혀 넣지 않은 조성(III), TDMACl를 전혀 넣지 않은 조성(IV)에서는 이온 선택성 막이 불투명하고 작은 수적이 형성되어 실험에 적합하지 않은 것으로 나타났으며, Fig. 4-16에 나타난 것과 같이 4% TFABB-based 표준막 조성과 9% TFABB-based modified(I) 표준막 조성에서는 높은 감응을 보여 본 연구에서 적합한 카보네이트 선택성 막조성으로 고려되었다.

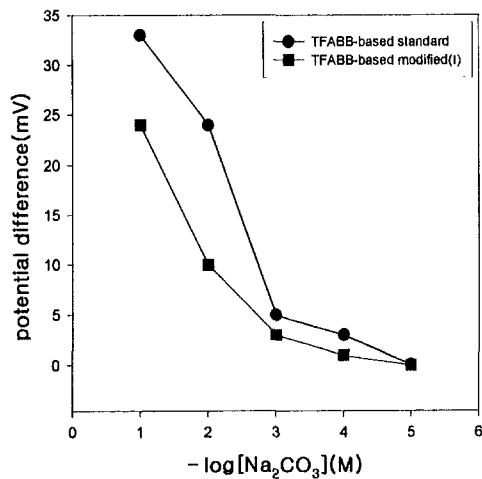


Fig. 4-16. Effect of the different composition in ISM on the CO_3^{2-} -ISE-FIA system.

2) CO_3^{2-} -선택성 막 조성 중 polymer의 종류

Poly(vinyl chloride), polyurethane 두 가지의 polymeric matrix를 이용하여 막을 제조한 후 감응의 정도를 비교한 결과 CO_3^{2-} 이온 선택성 막 성능은 두 종류의 polymer사이에서 큰 차이점을 보이지 않았다(Fig. 4-17). 그러나 polyurethane으로 제조한 막의 경우 PVC로 만든 막보다 더 뾰뾰한 성질을 나타내므로 PVC로 제조한 막을 최적 조성으로 설정하였다.

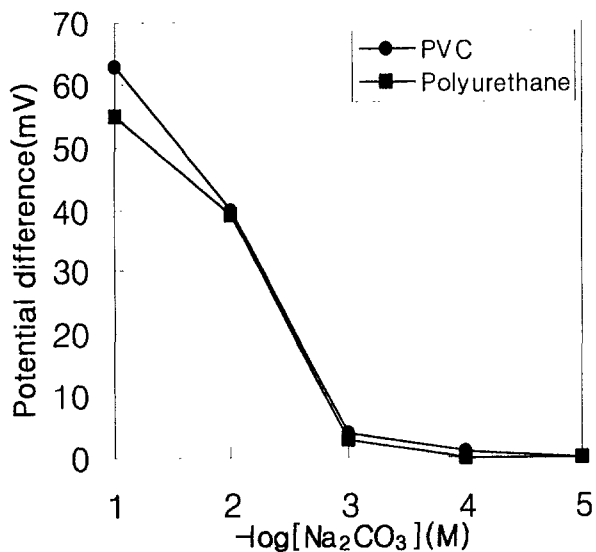


Fig. 4-17. Effect of the different polymer in ISM on the CO_3^{2-} -ISE-FIA system.

Conditions: carrier buffer, 1 mM phosphate, pH 7.4; flow rate, 26.4 mL/hr; injection volume, 100 μL ; at 22°C

3) Carrier buffer 의 종류

1 mM phosphate buffer(pH 7.4), 1 mM Tris/HCl buffer(pH 7.4), 1 mM Tris/H₂SO₄ buffer(pH 8.7)를 이용하여 carrier buffer에 따른 감응의 정도를 조사한 결과 1 mM phosphate buffer(pH 7.4)가 baseline이 가장 안정하며 감도가 우수한 최적의 carrier buffer로 선택되었다(Fig. 4-18).

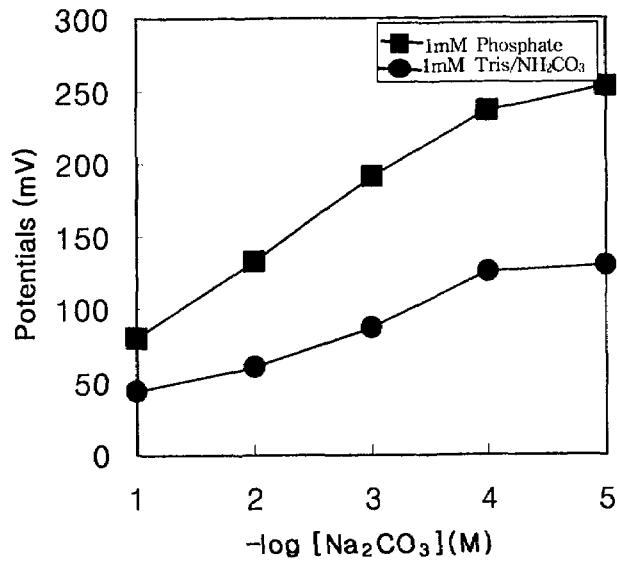


Fig. 4-18. Effect of the different buffer solution on the CO_3^{2-} -ISE-FIA system.

Conditions: stirring rate, 100 rpm; at 22°C.

4) 흐름속도(flow-rate)에 따른 영향

Carrier buffer의 흐름속도를 14.7 mL/min, 26.4 mL/min, 32.6 mL/min 세가지로 달리함으로써 흐름속도에 의한 영향을 조사한 결과 CO_3^{2-} 이온 선택성 전극 성능은 세 가지 다른 flow rate중에서 14.7 mL/min 흐름속도의 경우에 CO_3^{2-} 에 대한 가장 높은 감응도를 나타내었다. 이는 flow rate가 증가할수록 기질과 효소와의 접촉시간이 줄어들어 생기는 효소 반응 생성물의 양 감소로 설명될 수 있다(Bilitewski & Rohm, 1997). 또한 32.6 mL/min 흐름속도의 경우 효소반응기내의 저항으로 인한 buffer leaking이 생겨 실험을 방해하므로 14.7 mL/min 흐름속도를 최적으로 설정하였다(Fig. 4-19).

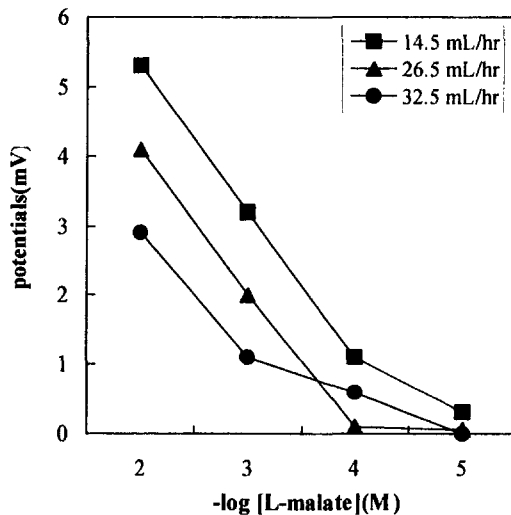


Fig. 4-19. Effect of the different flow rates on the CO_3^{2-} -ISE-FIA for L-malate measurement.

Conditions: carrier buffer, 1 mM phosphate, pH 7.4; injection volume, 100 mL; malic enzyme units in the enzyme reactor, 20 units; length of the enzyme reactor, 7 cm; room temperature.

5) 효소 반응기로부터 감지기까지의 거리에 의한 영향

튜브 길이 25 cm, 15 cm, 5 cm를 사용하여 튜브길이에 따른 감응의 영향을 조사한 결과 튜브길이 15 cm인 경우가 상관계수가 0.93으로 가장 높은 상관성을 보였다. 이것은 튜브의 길이가 너무 길면 생성된 CO_3^{2-} 의 분산이 커짐으로써 peak height가 낮아지고 반면 튜브의 길이가 너무 짧으면 효소 반응 후 생성된 CO_2 가 CO_3^{2-} 로 충분히 변하지 못하기 때문으로 사료되었다(Bilitewski & Rohm, 1997)(Fig. 4-20).

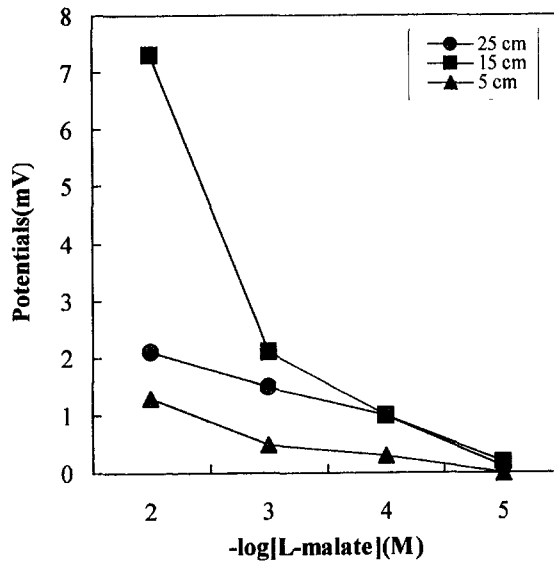


Fig. 4-20. Effect of the different tubing lengths on the CO_3^{2-} -ISE-FIA for L-malate measurement.

Conditions: carrier buffer, 1 mM phosphate, pH 7.4; flow rate, 14.5 mL/hr; injection volume, 100 μL ; malic enzyme units in the enzyme reactor, 20 units; length of the enzyme reactor, 7 cm; room temperature.

6) 시료 주입량에 따른 영향

시료 주입량에 따른 CO_3^{2-} 이온 선택성 전극의 감응의 정도를 알아보기 위하여 시료량을 50 μL , 100 μL , 200 μL 의 세 가지로 달리하여 주입한 결과 CO_3^{2-} 이온 선택성 전극의 감응은 시료의 주입량이 많아질수록 높아졌다. 이는 시료 주입량을 증가시킴으로써 carrier buffer와 시료의 혼합이 적게되어 분산의 감소가 초래되었으며 기질의 양이 많아짐으로써 효소반응에서 생성되는 생성물인 CO_2 의 양이 증가하였기 때문이라고 사료되었다 (Bilitewski & Rohm, 1997). 한편 200 μL 주입시 상관계수가 0.971로서 다른 두 시료 주입량인 100 μL ($r=0.946$), 50 μL ($r=0.877$)보다 높은 상관성을 보였다. 그러나 시료 주입량이 100 μL 인 경우에도 이온 선택성 전극의 감응정도는 양호하였으므로 시료의 경제성을 고려할 때 시료 주입량 100 μL 가 가장 최적인 것으로 판단되었다(Fig. 4-21).

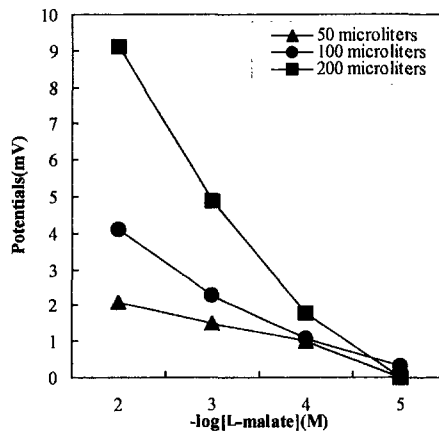


Fig. 4-21. Effect of the different injection volumes on the CO_3^{2-} -ISE-FIA for L-malate measurement.

Conditions: carrier buffer, 1 mM phosphate, pH 7.4; flow rate, 14.5 mL/hr; malic enzyme units in the enzyme reactor, 20 units; length of the enzyme reactor, 7 cm; room temperature.

7) Malic enzyme 양에 따른 영향

효소의 양에 따른 센서 감응의 변화를 조사하기 위하여 효소를 20 units, 40 units, 60 units로 달리하여 loading한 결과 세 가지 다른 malic enzyme units 중에서 20 units의 경우에 상관계수가 0.996으로 가장 높은 상관성을 보였다. 한편 40 units, 60 units enzyme loading의 경우 감응의 정도는 20 units의 경우보다 높았으나 전체 농도범위에서 낮은 상관성을 보였다. 농도가 높으면 높은 감도와 높은 상관성을 보일 것이라는 예상과 달리 이러한 결과가 나타난 이유는 malic enzyme와 결합하는 glass beads의 양의 비율이 적절하지 않았거나 효소양이 증가됨으로써 효소 반응기내에 밀도가 높아져 buffer의 흐름을 방해하였기 때문이라고 생각되었다(Fig. 4-22).

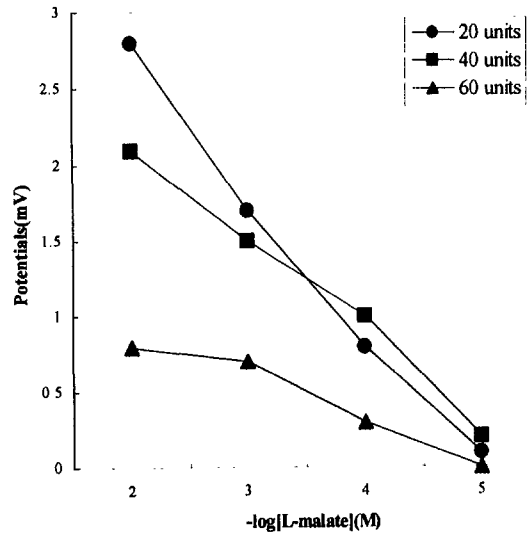


Fig. 4-22. Effect of the different amount of enzyme loading on the CO_3^{2-} -ISE-FIA for L-malate measurement. Conditions: carrier buffer, 1 mM phosphate, pH 7.4; injection volume, 100 μL ; flow rate, 14.5 mL/hr; length of the enzyme reactor, 7 cm; room temperature.

8) 전극 종류에 따른 영향

Probe type과 tubular type의 카보네이트 이온 선택성 전극을 제조한 후 표준용액(Na_2CO_3)을 이용하여 두 전극의 CO_3^{2-} 감응도의 차이를 조사한 결과 tubular type 전극의 경우($r=0.97$)가 probe type 전극의 경우($r=0.90$)보다 더욱 상관관계가 높은 것으로 나타났다(Fig. 4-23, Fig. 4-24). 또한 L-malate 용액을 이용하여 malate 선택성을 조사한 결과 probe type($r=0.91$)과 tubular type($r=0.90$) 두 전극 모두 높은 상관성을 보임으로써 두 전극 모두 malate 측정용 FIA system에서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이라 판단되었다(Fig. 4-25, Fig. 4-26).

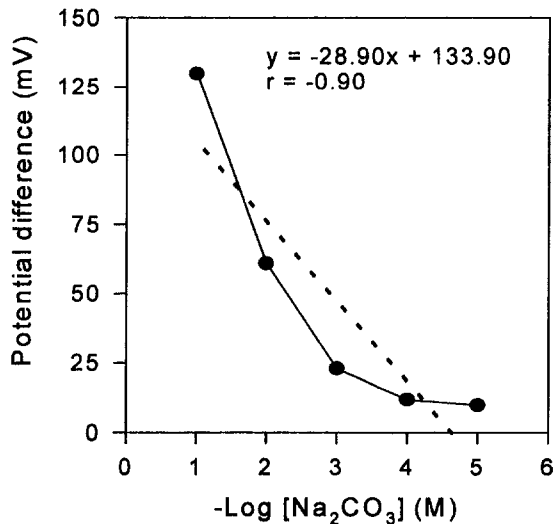


Fig. 4-23. Carbonate performance test of the probe type ion selective electrode.

Conditions: carrier, 1 mM phosphate buffer; flow rate, 15.9 mL/hr; injection volume, 100 μL .

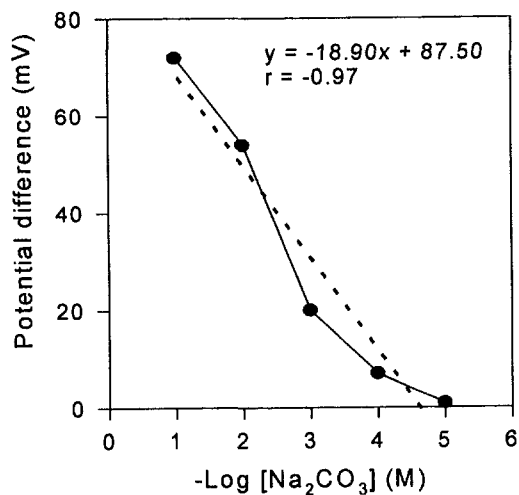


Fig. 4-24. Carbonate performance test of the tubular type electrode.

Conditions: carrier, 1 mM phosphate buffer; flow rate, 15.9 mL/hr; injection volume, 100 μL .

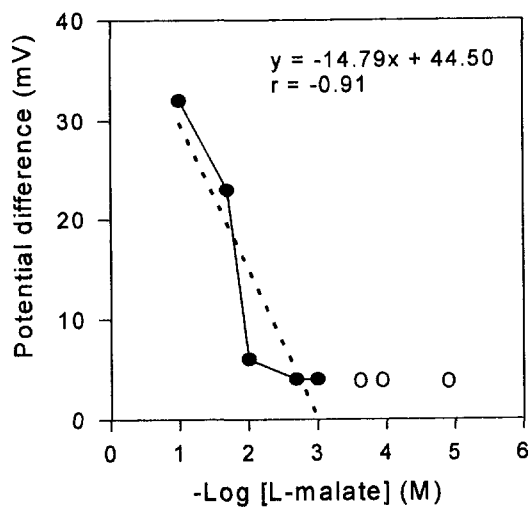


Fig. 4-25. Calibration curve of the probe type electrode.

Conditions: carrier, 1 mM phosphate buffer; flow rate, 15.9 mL/hr; injection volume, 100 μL .

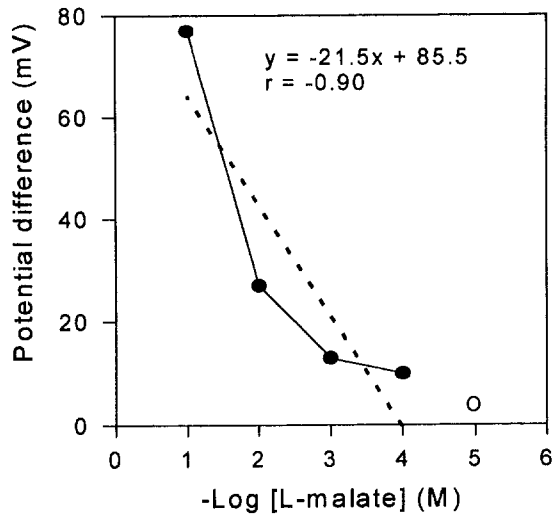


Fig. 4-26. Calibration curve of the tubular type electrode.

Conditions: carrier, 1 mM phosphate buffer; flow rate, 15.9 mL/hr; injection volume, 100 μ L.

다. CO₂ gas 전극을 이용한 malate 측정

조효소인 NADP가 카보네이트 이온 선택성막의 CO₃²⁻의 감지력에 다소 영향을 미치는 것으로 나타나 이를 해결하기 위한 방법으로 CO₂ gas 전극을 이용한 방법을 시도하였다.

1) Probe type의 CO₂ gas 전극 사용

Probe type의 CO₂ Gas 전극은 10⁻⁵ M ~ 10⁻² M의 NaHCO₃와 Na₂CO₃ 표준용액에서 각각 93.2 mV와 134.3 mV의 충전위차를 나타냄으로써 고정상

에서 양호한 CO₂ 정량 성능을 보여주었다(Table 4-4, Table 4-5). 최적상태에서 probe type의 CO₂ gas 전극을 사용하기 위한 여러 변수의 실험결과는 다음과 같았다.

Table 4-4. Potential obtained by the probe-type CO₂ gas electrode with CO₂ standard solution(0.1 M NaHCO₃)^{a,b}

Concentration	Obtained mV	ΔmV
10 ⁻⁶ M NaHCO ₃	-52.5	-
10 ⁻⁵ M NaHCO ₃	-52.5	-
10 ⁻⁴ M NaHCO ₃	-43.0	+10.3
10 ⁻³ M NaHCO ₃	-5.1	+38.1
10 ⁻² M NaHCO ₃	+10.3	+46.8
		Total ΔmV +93.2 mV

^aThe initial potential was -52.5 mV. Obtained potential(ΔmV) was measured by the addition of the each concentration of the standard solution(1M Na₂CO₃).

^bThe buffer was made mixing of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4(90 mL) and CO₂ buffer(10 mL) which gave the level of pH, 4.8-5.2.

Table 4-5. Potential obtained by the probe-type CO₂ gas electrode with CO₂ standard solution(0.1 M Na₂CO₃)^{a,b}

Concentration	Obtained mV	ΔmV
10 ⁻⁹ M NaHCO ₃	-43.5	+0.5
10 ⁻⁴ M NaHCO ₃	-33.7	+9.8
10 ⁻³ M NaHCO ₃	+0.8	+34.5
10 ⁻² M NaHCO ₃	+50.3	+49.5
10 ⁻¹ M NaHCO ₃	+90.3	+40.0
Total ΔmV		+134.3 mV

^aThe initial potential was -44.0 mV. Obtained potential(ΔmV) was measured by the addition of the each concentration of the standard solution(1 M Na₂CO₃).

^bThe buffer was made mixing of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4(90 mL) and CO₂ buffer(10 mL) which gave the level of pH, 4.8-5.2.

가) Stirring 정도에 따른 CO₂ 정량 성능에 관한 실험

Stirring 속도를 각각 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5로 달리한 실험에서 stirring rate 4.5의 경우에 가장 CO₂ 감지도가 높았다.

나) Buffer 종류에 따른 CO₂ 정량 성능에 관한 실험

세 가지 다른 종류의 buffer(pH 7.4), 즉 1 mM phosphate buffer, 1N HCl로 조정된 1 mM Tris buffer, 1N NaOH로 조정된 1 mM Tris/HCl buffer를 사용하여 CO₂를 정량한 결과 buffer간에 큰 차이가 나타나지 않았

다.

다) Buffer 부피에 따른 CO₂ 정량 성능에 관한 실험

생성된 CO₂ 양이 사용한 buffer양에 영향을 받는지 알아보았다. 세 가지 다른 부피의 buffer(50 mL, 100 mL, 200 mL)를 사용하여 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1}$ M Na₂CO₃ 구간에서 전위차를 측정된 결과 전체의 전위차는 각각 109.6 mV, 108.4 mV, 111.4 mV로서 생성된 CO₂는 사용한 buffer부피에 의해 영향을 받지 않고 buffer 용액 중에 있는 모든 CO₂를 감지하고 있음을 보여주었다.

2) FIA system에서 CO₂ gas전극의 사용

가) Well-jet type과 Flow-thru type CO₂ gas 전극의 정량 성능 실험

CO₂ gas전극이 FIA system에서도 정량적으로 반응하는지 확인하기 위한 실험을 실시하였다(Table 4-6). 두 형태의 전극이 모두 양호한 CO₂ 감지도를 나타냈으며, well-jet type이 flow-thru type보다 약간 높은 감지도를 보여 주어 이후 실험은 well-jet type를 사용하여 실험하였다.

Table 4-6. Potential difference obtained by the well-jet type and flow-thru type CO₂ gas electrode with CO₂ standard solution(0.1 M Na₂CO₃)^{a,b}

Concentration	Well-jet type CO ₂ electrode(mV)	Flow-thru type CO ₂ electrode(mV)
10 ⁰ M NaHCO ₃	-	-
10 ¹ M NaHCO ₃	-	-
10 ⁴ M NaHCO ₃	+8.6	+11.3
10 ³ M NaHCO ₃	+51.8	+39.5
10 ² M NaHCO ₃	+101.1	+72.1
Total ΔmV	+101.0 mV	+134.3 mV

^aAcquired potential(ΔmV) was the potential difference from the potential of the baseline to the peak potential produced by the each concentration of CO₂ standard solution.

^bThe conditions for the CO₂ measurement in FIA were followed: flow rate, 80 level on peristaltic(65 mL/hr); injection volume, 500 μL; chart speed, 2 mm/min; chart record variance, 1×200 mV; 0.1M phosphate carrier buffer, pH 7.4 and CO₂ buffer.

나) Sample loop size에 따른 CO₂ gas전극의 정량 성능 실험

최적 시료 주입량을 결정하기 위하여 10¹ M NaHCO₃을 사용하여 sample loop size를 200 μL, 500 μL, 1 mL로 바꾸어 실험한 결과 well-jet type CO₂ gas전극에서는 sample loop size에 관계없이 비슷한 전위차를 나타냈다.

다) Well-jet type CO₂ gas전극을 사용한 malate 농도 측정 실험

Well-jet type의 CO₂ gas전극과 malic enzyme reactor가 장치된 FIA system에서 malate 정량 분석을 한 결과 malate로부터 생성된 CO₂에 대한 CO₂ Gas전극의 감지도는 저농도(10^{-5} - 10^{-3} M malate)에서 매우 낮게 나타났다(Fig. 4-27). 따라서 CO₂ gas전극 감지도를 높이기 위한 보완실험을 실시하였으며 그 결과는 다음과 같았다.

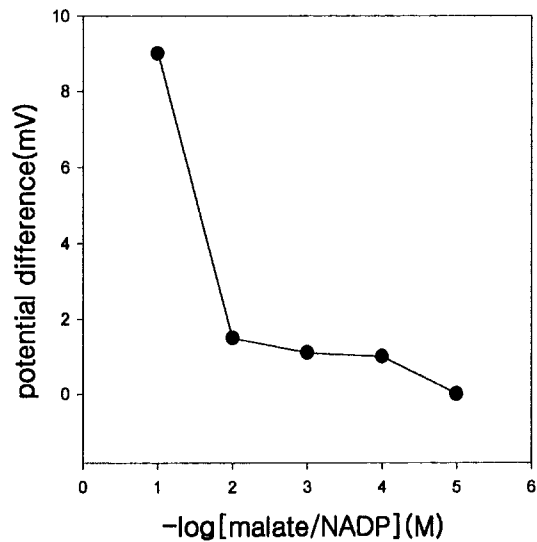


Fig. 4-27. Calibration curve between the potential difference and L-malate concentration using the well-jet type CO₂ gas electrode in flow injection analysis.

(1) NADP의 농도 변화

NADP양을 기질의 양과 동량 첨가하는 경우와 NADP양을 일정하게 고정하여 첨가한 경우의 실험을 실시한 결과 두 경우 모두 비슷한 반응을 보임으로써 NADP를 기질의 농도 이상으로 넣어 줄 필요가 없음을 확인하였다.

(2) Malic enzyme의 함량 변화

Enzyme의 양을 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 6 mg로 변화하여 효소 반응기를 제조하고 이를 FIA system에 연결해서 CO₂에 대한 감지도 측정을 해보았으나 이들 사이에 별다른 차이점이 나타나지 않았다.

(3) 효소 반응기 모양 변화

낮은 CO₂ 감지도를 보완하기 위해 enzyme reactor tubing의 내경을 증가시키고 길이를 줄인 집약형으로 만들어 실험하였으나 CO₂ 감지도가 증가되지 않았다.

(4) 효소 고정화에 사용된 carrier의 변화

효소를 glass beads(N-(2-aminoethyl)-3-amino-propyl glass)와 CNBr-activated sepharose 4B에 각각 고정화하여 CO₂에 대한 감지도를 측정하였으나 이들 사이에 큰 차이점은 없었다.

(5) 효소 고정화시 enzyme coupling efficiency의 조사

효소 고정화 전후에 효소와 carrier의 slurry에서 protein 농도를 측정할 결과 enzyme coupling efficiency는 91%로 계산되어 enzyme의 coupling에는 문제가 없는 것으로 나타났다.

(6) $MgCl_2$ 첨가의 영향

Malic enzyme를 이용한 malate의 반응에서는 Mg나 Mn같은 금속이 촉매로 작용하므로 본 실험에서 0.1 mM $MgCl_2$ 를 기질인 malate와 조효소인 NADP에 대해 추가로 첨가하여 실험하였으나 $MgCl_2$ 를 첨가하지 않은 반응과 별다른 차이를 나타내지 않았는데, 이는 시판하는 malic enzyme에 반응에 필요한 $MgCl_2$ 가 이미 함유되어 있기 때문으로 사료된다.

(7) FIA system에서 반응에서 생성된 pyruvate의 농도 측정

기질인 malate가 효소 반응기에서 반응이 원활히 이루어지는지 확인하기 위하여 반응 후 생성물인 pyruvate의 농도를 측정한 결과 pyruvate는 malate 농도에 비례하여 생성되었음을 확인하였다.

이상과 같이 CO_2 gas전극을 사용하여 수행한 위의 실험결과들을 볼 때 CO_2 gas전극은 Na_2CO_3 와 같은 표준물질을 정량할 때는 우수한 성능을 보인 반면 기질인 malate를 측정할 때는 감지도가 이온 선택성 전극을 사용할 때보다 많이 떨어지는 것으로 나타났다. 따라서 CO_2 gas전극의 사용은 NADP의 영향을 배제할 수 있는 장점을 가지고는 있으나 낮은 감지능력 때문에 malate 측정용 센서의 감지기로 사용하기는 부적합한 것으로 판단되어 본 연구에서는 CO_3^{2-} -ISE를 이용한 실험을 수행하였다.

라. Conventional electrode와 solid-state electrode의 성능 비교

다시료 분석과 현장에서의 적용을 용이하게 하기 위한 휴대용 센서의 개발을 위한 일환으로 소형화 제작이 가능한 solid-state electrode를 제작하였

고 이것의 적용가능성을 검토하기 위해 그 성능을 conventional electrode의 carbonate performance와 비교한 결과 conventional electrode($r=0.8649$)의 경우 solid-state electrode($r=0.9187$)에서 보다 carbonate에 대한 감도는 높았으나 상관계수는 다소 떨어졌다(Fig. 4-28, Fig. 4-29, Fig. 4-30). 또한 isocitrate 표준용액을 주입하여 실험한 결과 두 전극 모두 detection linear range가 $10^1 \text{ M} \sim 10^4 \text{ M}$ 로 다양한 범위의 적용 가능성을 제시하였다.

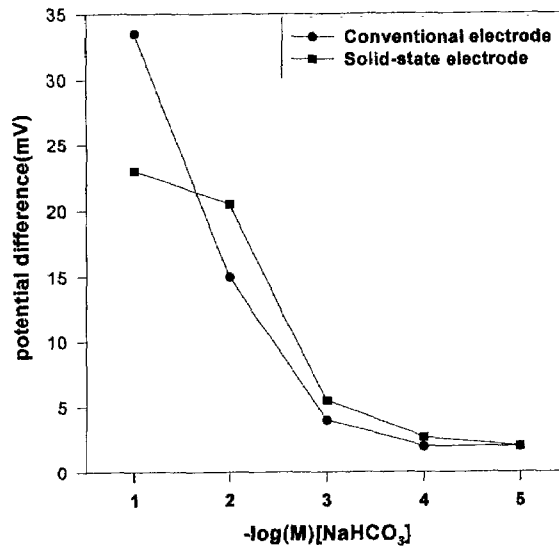


Fig. 4-28. Carbonate performance test of conventional electrode and solid-state electrode.

Conditions: carrier buffer 1, 0.1 M Tris- H_2SO_4 , pH 7.5; carrier buffer 2, 0.6 M Tris- H_2SO_4 , pH 11.0; flow rate, 13.6 mL/hr; injection volume, 100 μL ; enzyme reactor length, 15 cm; tubing size, i.d. 0.89 mm; room temperature.

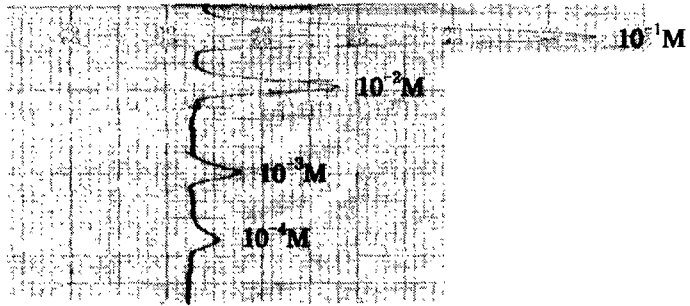


Fig. 4-29. The response peaks to standard NaHCO_3 solution in the sensor system using the conventional electrode.

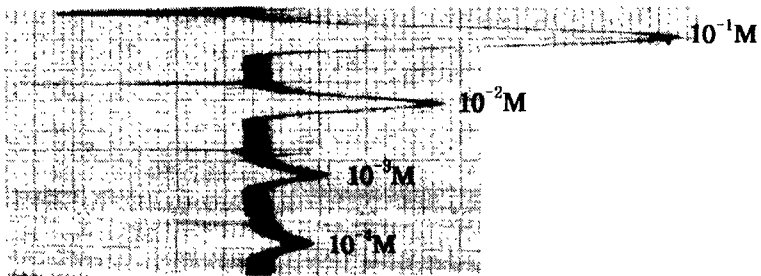


Fig. 4-30. The response peaks to standard NaHCO_3 solution in the sensor system using the solid-state electrode.

마. 방해물질의 효과분석

1) 막 조성에 따른 성능 비교

첫째, TFABB와 TFADB 두 가지의 carbonate ionophore를 이용하여 제조한 CO_3^{2-} -ISM의 NADP 영향력을 0.1 M Tris(pH 8.6) buffer에서 비교 실험한 결과 TFADB-based membrane의 경우 TFABB-based membrane보다 NADP의 영향을 적게 받는 것으로 나타났다. TFADB-based membrane은 10^{-3} M~ 10^2 M 농도범위에서는 NADP의 영향을 거의 받지 않고 단지 고농도(10^1 M)에서만 (-)2.3 mV 전위차를 보였으므로 실제 시료내 malate 검출범위를 고려할 때 본 연구의 센서 시스템에 가장 적합한 이온 선택성 막으로 판단되었다(data is not shown).

둘째, CO_3^{2-} -선택성 막의 pH 영향력을 조사한 결과 pH 2.0~12.0의 조사 범위에서 TFADB-based membrane이 TMT-based membrane보다 더욱 안정하였으며 TFADB-based membrane의 경우 pH 6.0~9.0 사이의 범위에서 pH 변화에 따른 전위차 변화가 거의 없었다. 따라서 본 malate 측정용 바이오센서의 경우 실험이 pH 6~9 범위에서 행해짐으로써 더욱 선택적이고 효율적인 시스템을 구축할 수 있으리라 사료되었다(Fig. 4-31).

셋째, 기질인 malate의 방해효과를 조사한 결과 TFADB-based membrane과 TMT-based membrane 모두 10^5 M~ 10^3 M 농도범위에서는 유의적인 방해효과를 보이지는 않았다(Fig. 4-32). 그러나 10^2 M malate의 경우 TFADB-based membrane의 경우에는 positive interference를 보였고 TMT-based membrane의 경우에는 negative interference를 보였다. 이와같이 다른 조성의 막을 제조하여 막의 선택성에 영향을 줄 수 있는 NADP(cofactor), pH, malate(substrate)의 방해정도를 조사한 결과

TFADB-based membrane이 본 malate 측정용 바이오센서에 가장 적합한 막으로 사료되었다.

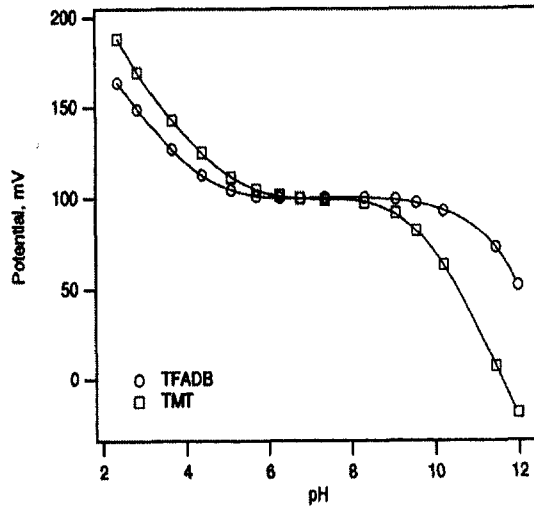


Fig. 4-31. The pH effect on TFADB- and TMT-based membrane.

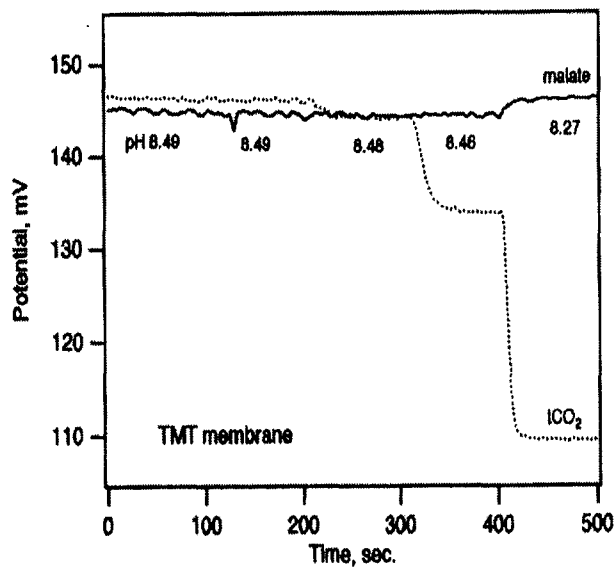
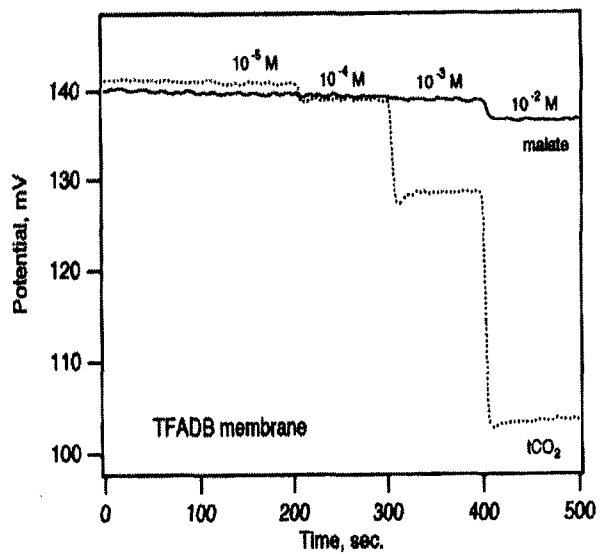


Fig. 4-32. The malate interference effect on TFADB- and TMT-based membrane.

2) 당과 유기산의 방해효과 분석

방해물질이 센서감응에 미치는 영향을 고려하기 위해 10^{-2} M 농도의 당과 유기산을 주입하여 방해물질의 영향력을 조사한 결과는 Table 4-7과 같다. 그 결과 주입한 시료의 양이 10^{-2} M로 자연에 존재하는 양에 비해 고농도임에도 불구하고 (-)2.5 mV 내외의 전위차 변화를 보임으로 본 센서를 실제 식품에 적용시 이러한 방해물질에 의한 영향을 매우 적을 것으로 사료되었다.

Table 4-7. Evaluation of the possible interference of various compounds in malate sensor system

Additive(10mM)	Conventional electrode	Solid-state electrode
	potential difference(mV)	potential difference(mV)
Glucose	2	2.5
Sucrose	0	2
Fructose	2.5	3
Malic acid	0	0
Ascorbic acid	2	2.5
Pyruvic acid	0	0
Tartaric acid	0	0
Citric acid	0.5	1

바. 식품시료 분석

먼저 본 연구에서 실시한 두 종류의 분석방법을 비교해 보면 다음과 같이 요약할 수 있다.

Table 4-8. Comparison of characteristics between biosensor and GC on sample analysis

	Biosensor	GC
전처리	거의 없음 -원심분리	여러 단계의 복잡한 전처리 과정을 거침 -silylating reagent의 제조, 시약처리, 여과, 원심분리, 건조 등
전처리 소요시간	15분	5시간
분석시간	5분 이내	2시간 이상
편리성	간단한 조작으로 가능함	숙달된 기술을 요함
필요한 기구 및 비용	Sensor system (600만원 정도)	Gas chromatography (2000만원 정도)
검출한계	10^{-4} M	10^{-3} M
기질 특이성	특이성이 높음(효소반응)	특이성이 낮음

표에서 볼 수 있듯이 biosensor는 기존의 유기산 측정 방법인 GC보다 전처리 과정이나 분석시간, 편리성, 경제성, 정확도 면에서 모두 우수하여 앞으로 농산물의 유기산 농도 측정에 많이 활용될 수 있으리라 기대된다.

본 연구의 malate 측정용 바이오센서의 신뢰성을 검증하기 위해 실제 시료를 바이오센서로 분석한 결과와 GC 분석과 비교한 결과는 Table 4-9와 같다. GC 분석결과 표준 용액인 glutaric acid와 malic acid의 retention time은 각각 17분, 37분이었고 gas chromatogram은 Fig. 4-33과 같이 나타났다. 바이오센서를 이용한 분석은 malate 표준 검량곡선에 기준하여 수행하였다(Fig. 4-34). GC와 바이오센서를 이용한 분석치들을 비교한 결과 식

품시료 모두에서 malate 농도 사이에 약간의 차이는 있었으나 유의적인 차이가 나타나지 않아 본 연구에서 개발된 malate 측정용 바이오센서가 식품 시료의 분석에 유용하게 사용될 수 있음을 보여 주었다.

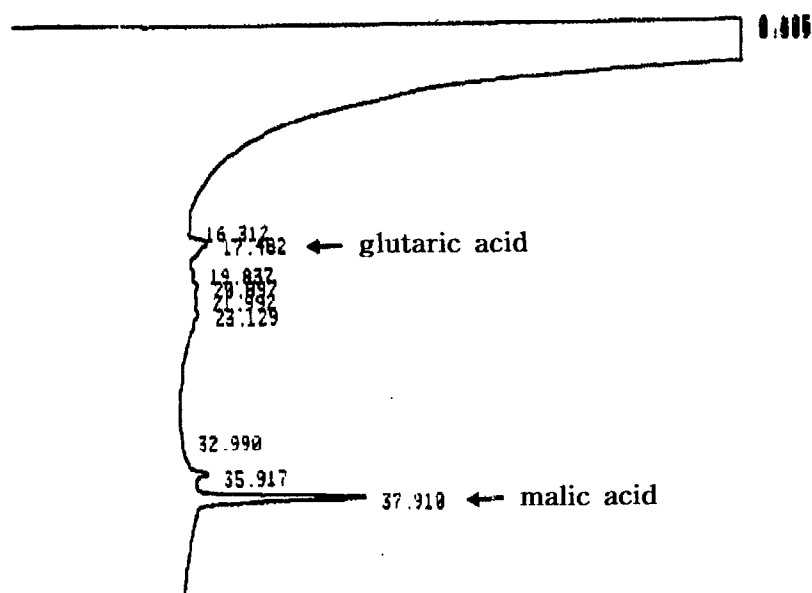


Fig. 4-33. GC chromatogram of trisilyl derivatives of malic acid contained in fruit juice.

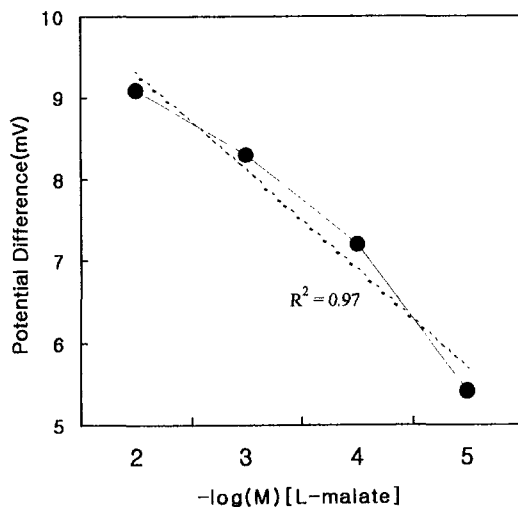


Fig. 4-34. Standard curve between the potential difference and malate concentration using the conventional electrode in the optimized FIA system.

Table 4-9. Comparison of conventional electrode system, solid-state electrode system, and gas chromatography method in malate determination of fruit juices and red wine

sample	content of isocitric acid(mg/100 mL)		
	Conventional electrode	Solid-state electrode	Gas chromatography
apple juice	0.84	0.88	0.90
orange juice	1.08	1.28	1.35
red wine	0.71	0.79	0.80

2. Isocitrate sensor system

가. 효소 고정화

Kumaran과 Trans(1992) 방법을 수정한 isocitric dehydrogenase를 고정화는 bifunctional reagents인 glutaraldehyde를 이용하여 aminopropyl glass와 효소의 amino group 사이에 결합을 형성하는 원리를 기초로 하였다(Fig. 4-35). 고정화 절차 후 효소의 coupling efficiency를 Bradford(1976) 방법에 의해 계산한 결과 99.96%였다.

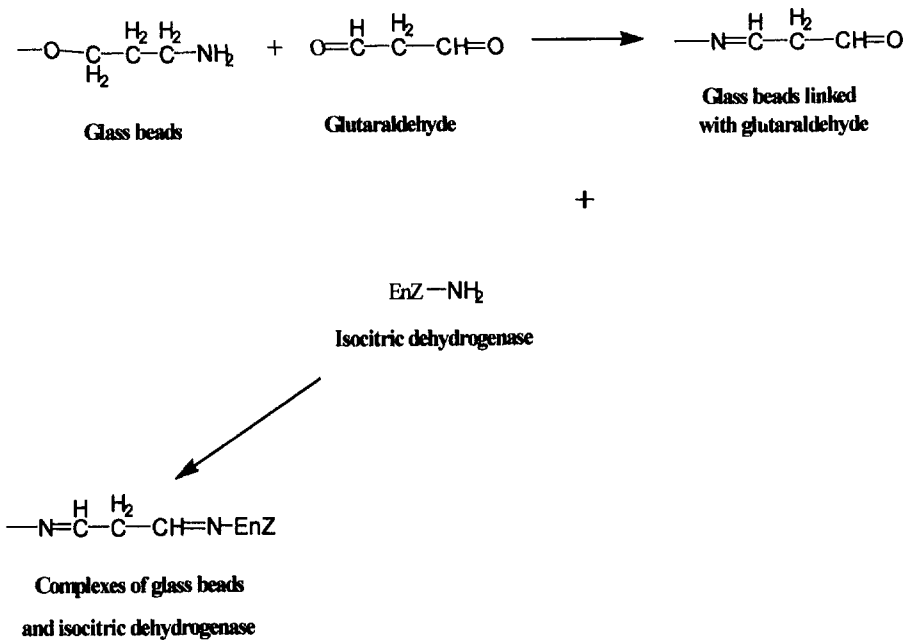
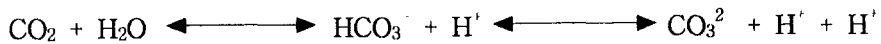


Fig. 4-35. The mechanism of isocitric dehydrogenase immobilization.

나. Isocitrate sensor system의 최적화

1) Carrier buffer pH에 따른 영향

본 실험에서 제작한 isocitrate sensor system을 최적화 시키기 위하여 먼저 carrier buffer의 pH를 달리하여 반응의 감응도를 살펴보았다. Isocitrate enzyme reactor을 통과하는 carrier buffer 1은 효소가 반응하는 최적 pH로 고정시켜 놓고, carrier buffer 2(0.6 M Tris-H₂SO₄)의 pH를 9.0, 10.0, 11.0 세 가지로 변화시켜 실험한 결과 pH 10.0과 pH 11.0이 사용된 경우 상관계수가 각각 0.9156, 0.9044로 pH 9.0의 경우보다 높은 상관성을 보였다. 예상과 같이 pH가 증가할수록 carbonate감응도 증가하였는데 이는 CO₂종류들(CO₂, HCO₃⁻, CO₃²⁻)이 용액의 pH에 따라 존재양상이 달라지는 것으로 설명할 수 있다.



즉 carrier buffer pH가 증가함에 따라 감지하고자 하는 물질인 carbonate 이온의 생성이 증가되었기 때문이다. pH 10.0의 경우 pH 11.0에서보다 감도와 상관성은 훨씬 좋았으나 baseline fluctuation이 크게 나타나 측정을 방해하므로 본 연구에서는 pH 11.0을 최적 pH로 설정하였다(Fig. 4-36).

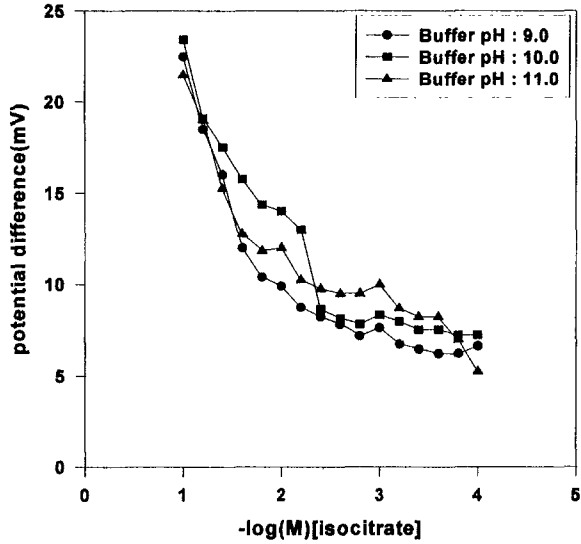


Fig. 4-36. Effect of the different carrier buffer pHs on the CO_3^{2-} -ISE-FIA for isocitrate measurement.

Conditions: carrier buffer 1, 0.1 M Tris- H_2SO_4 , pH 7.5; carrier buffer 2, 0.6 M Tris- H_2SO_4 , variable pH; flow rate, 10.4 mL/hr; injection volume, 100 μL ; temperature, ca. 25 $^\circ\text{C}$; enzyme reactor length, 15 cm; tubing size, i.d. 0.89 mm.

2) 흐름속도에 따른 영향

Carrier buffer의 흐름속도에 의한 감응의 변화를 조사하기 위해 carrier buffer 1의 흐름속도를 6.5 mL/hr, 10.4 mL/hr, 13.6 mL/hr로 달리하여 실험한 결과 셋 중에서 flow rate 13.6 mL/hr의 경우가 상관계수가 0.9288로 상관성이 가장 높았으며 감도 또한 가장 높았다(Fig. 4-37). 이것은 시료의 분

산에 의해 설명되어질 수 있는데, 이러한 분산의 정도는 피크의 높이, 피크의 넓이로부터 알 수 있다. 즉 흐름속도가 증가할수록 분산의 정도는 감소되므로 flow rate 13.6 mL/hr의 경우 감도와 상관성이 더욱 높았던 것으로 사료된다. 그러나 매우 낮은 분산은 carrier buffer와 시료의 혼합이 잘 되지 않아 화학반응이 일어나지 않을 수 있으며 또한 기질과 효소와의 접촉시간이 줄어들어 생성물의 양이 감소될 수 있으므로 흐름속도를 더욱 빠르게 하는 것은 바람직하지 않은 것으로 판단된다(Bilitewski & Rohm, 1997).

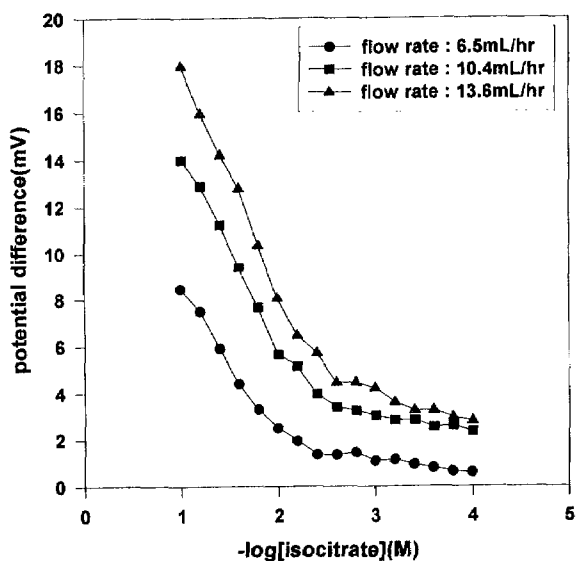


Fig. 4-37. Effect of the different flow rates on the CO_3^{2-} -ISE-FIA for isocitrate measurement.

Conditions: carrier buffer 1, 0.1 M Tris- H_2SO_4 , pH 7.5; carrier buffer 2, 0.6 M Tris- H_2SO_4 , pH 11.0; injection volume, 100 μL ; temperature, ca. 25°C; enzyme reactor length, 15 cm; tubing size, i.d. 0.89 mm.

3) 시료 주입량에 따른 영향

시료 주입량에 따른 센서감응의 변화를 알아보기 위하여 시료량을 50 μ L, 100 μ L의 두 가지로 달리하여 조사한 결과 100 μ L 주입한 경우 ($r=0.9288$)에서 50 μ L 주입한 경우($r=0.8212$)보다 상관관계 뿐 아니라 감도에 있어서도 현저히 높은 값을 보였다(Fig. 4-38). 이것은 시료 주입량을 증가시킴으로써 carrier buffer와 시료의 혼합이 적게되어 분산의 감소가 초래되었기 때문이다(Bilitewski & Rohm, 1997). 그리고 기질의 양이 많아짐으로써 효소반응에서 생성되는 생성물인 CO_2 의 양이 증가하였기 때문이라고 사료되었다.

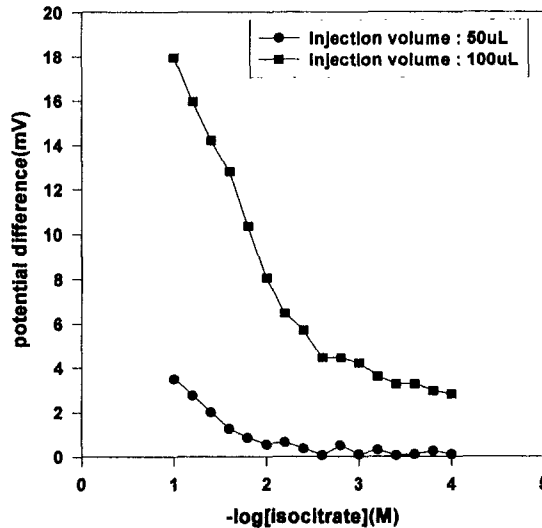


Fig. 4-38. Effect of the different injection volumes on the CO_3^{2-} -ISE-FIA for isocitrate measurement.

Conditions: carrier buffer 1, 0.1 M Tris- H_2SO_4 , pH 7.5; carrier buffer 2, 0.6 M Tris- H_2SO_4 , pH 11.0; flow rate, 13.6 mL/hr; temperature, ca. 25°C; enzyme reactor length, 15 cm; tubing size, i.d. 0.89 mm.

4) 튜빙 내경에 따른 영향

튜빙 내경에 따른 감응의 변화를 조사하기 위해 튜빙의 내경을 0.89 mm, 1.02 mm로 달리하여 비교한 결과 두 조건의 상관계수가 각각 0.9477, 0.9540으로 유의적인 차이가 없었다(Fig. 4-39). 그러나 튜빙 내경이 굵어질 수록 carrier buffer의 소비량도 증가되므로 경제적인 면을 고려하여 내경 0.89 mm인 튜빙을 최적으로 설정하였다.

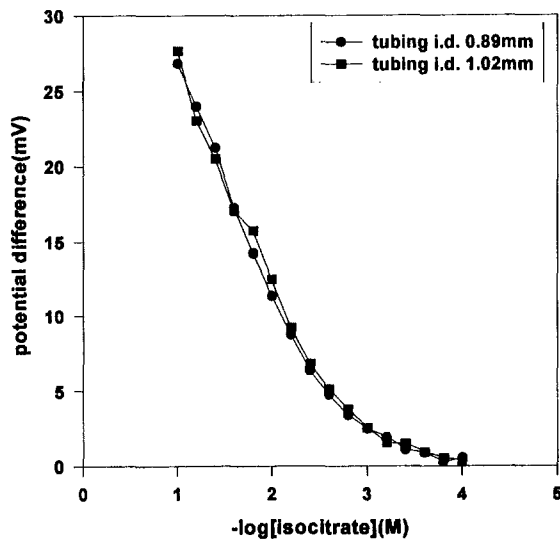


Fig. 4-39. Effect of the different tubing sizes on the CO_3^{2-} -ISE-FIA for isocitrate measurement.

Conditions: carrier buffer 1, 0.1 M Tris- H_2SO_4 , pH 7.5; carrier buffer 2, 0.6 M Tris- H_2SO_4 , pH 11.0; flow rate, 13.6 mL/hr; injection volume, 100 μL ; temperature, ca. 25°C; enzyme reactor length, 15 cm.

다. Conventional electrode와 solid-state electrode의 성능 비교

소형화 전극인 solid-state electrode의 성능을 평가하기 위해 NaHCO_3 표준용액을 주입함으로써 carbonate performance를 실험한 결과는 앞의 malate 센서 시스템에서의 결과와 동일하였다.

라. 방해물질의 효과 분석

식품내 당과 유기산이 센서 성능에 미치는 영향력을 검토하기 위해 interference effect를 조사한 결과 첨가한 방해물질의 농도(10 mM)가 식품내에 자연적으로 존재하는 양에 비해 과량임에도 불구하고 solid-state electrode로 측정된 malic acid의 저해를 제외하고 conventional electrode와 solid-state electrode 모두 약 10% 정도의 영향을 보이는 것으로 나타났다 (Table 4-10, Table 4-11). 따라서 식품 중에 존재하는 방해물질의 농도는 이보다 낮기 때문에 실제 식품 시료에서 isocitrate 농도를 측정할 때는 이들의 방해효과는 매우 적을 것으로 생각되었다.

또한 glucose, sucrose, fructose 등의 당류와 malate, ascorbate, pyruvate, tartarate, citrate 등의 유기산을 비교했을 때 유기산류의 저해정도가 다소 높은 것으로 나타났는데 이는 유기산의 첨가로 인한 pH 변화 때문으로 사료된다.

Table 4-10. Evaluation of the possible interference of various components in the quantiation of isocitrate in conventional electrode system

Additive	Concentration	Potential difference(mV)	Response (%)
Blank(Isocitrate)	10 mM	12.0	100
Glucose	10 mM	11.5	95.83
Sucrose	10 mM	11.5	95.83
Fructose	10 mM	10.5	87.50
Malic acid	10 mM	11.5	95.83
Ascorbic acid	10 mM	11.5	95.83
Pyruvic acid	10 mM	10.5	87.50
Tartaric acid	10 mM	11.0	91.67
Citric acid	10 mM	11.5	95.83

Table 4-11. Evaluation of the possible interference of various components in the quantiation of isocitrate in solid-state electrode system

Additive	Concentration	Potential difference(mV)	Response (%)
Blank(Isocitrate)	10 mM	8.0	100
Glucose	10 mM	7.3	91.25
Sucrose	10 mM	7.5	93.75
Fructose	10 mM	7.5	93.75
Malic acid	10 mM	6.0	75.0
Ascorbic acid	10 mM	7.0	87.5
Pyruvic acid	10 mM	7.8	97.5
Tartaric acid	10 mM	7.0	87.5
Citric acid	10 mM	9.0	112.5

마. 식품시료 분석

본 연구의 isocitrate 측정용 바이오센서의 신뢰성을 검증하기 위해 실제 식품시료를 바이오센서로 분석한 결과와 GC 분석과 비교한 결과는 Table 4-12와 같다(Table 4-12). GC 분석결과 표준 용액인 glutaric acid와 isocitric acid의 retention time은 각각 18분, 33분이었고(Fig. 4-40) 바이오센서 분석시 conventional electrode와 solid-state electrode의 표준 검량곡선은 Fig. 4-41과 Fig. 4-42에 나타나 있다. 그리고 GC 분석결과와 비교했을 때 conventional electrode로 측정한 isocitric acid 함량이 solid-state electrode로 측정한 함량보다 더욱 높은 상관성이 있는 것으로 나타났다. 이는 Table 4-10와 Table 4-11에서 보듯이 solid-state electrode의 경우 방해 물질의 영향을 좀더 많이 받기 때문으로 사료되어진다. 또한 딸기주스를 제외한 세 가지 과일주스(사과, 포도, 토마토) 내 isocitrate 함량이 각 분석 방법내에서 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 사용된 isocitric acid 측정용 바이오센서는 실제 식품의 적용에 있어서 신뢰성 있는 데이터를 제시할 것으로 판단되었다.

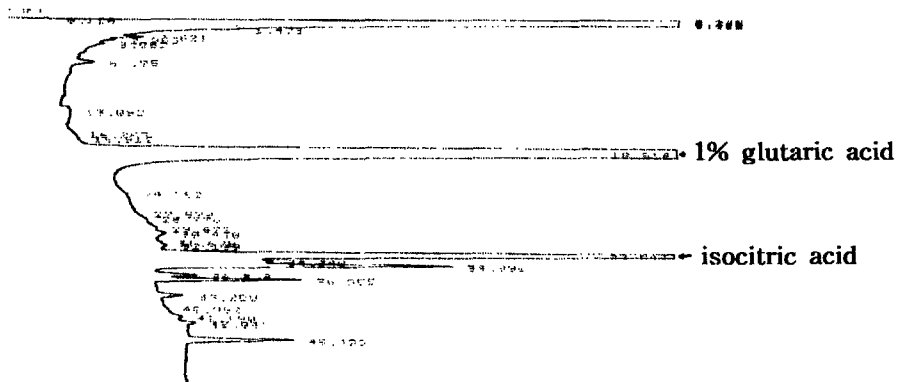


Fig. 4-40. GC chromatogram of trisilyl derivatives of isocitric acid contained in fruit juice.

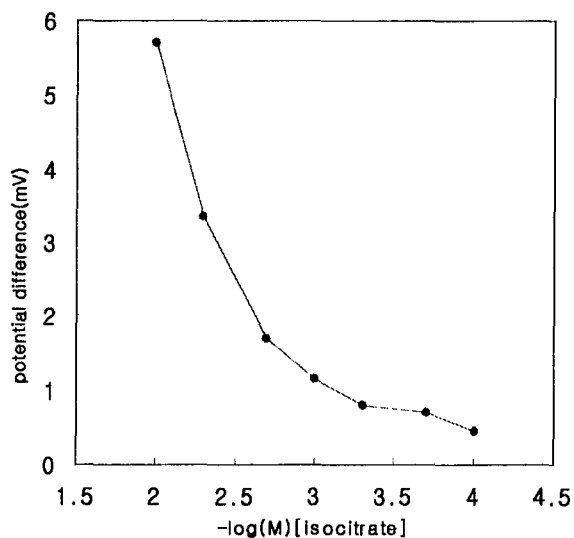


Fig. 4-41. Standard curve between the potential difference and isocitrate concentration using the conventional electrode under the optimized FIA system.

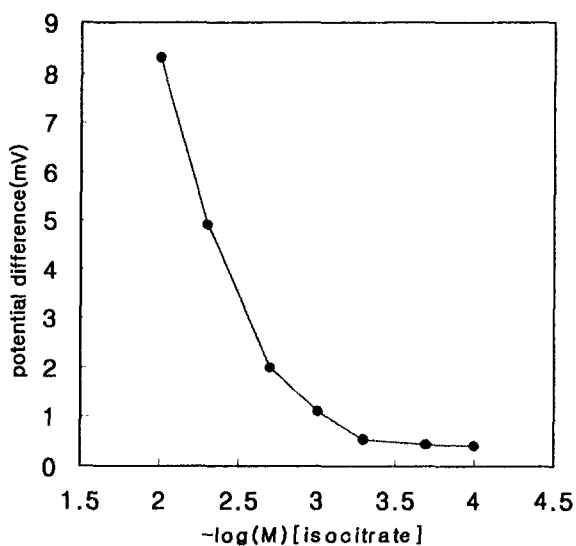


Fig. 4-42. Standard curve between the potential difference and isocitrate concentration using the solid-state electrode under the optimized FIA system.

Table 4-12. Comparison of conventional electrode system, solid-state electrode system, and gas chromatography method in isocitrate determination of fruit juice

sample	content of isocitric acid(mg/100 mL) ¹		
	Conventional electrode	Solid-state electrode	Gas chromatography
apple juice	0.403 ± 0.093	0.521 ± 0.006	0.359 ± 0.021
grape juice	0.355 ± 0.005	0.354 ± 0.007	0.329 ± 0.044
strawberry juice	0.356 ± 0.006 ^b	0.335 ± 0.001 ^b	0.452 ± 0.013 ^a
tomato juice	0.375 ± 0.006	0.356 ± 0.021	0.272 ± 0.04

¹Means ± SEM

Means with different superscript are significantly different(p <0.05)

a-b : Duncan's multiple range test for analytical method(row)

제4절. 결론

식품에 있는 유기산인 malate, isocitrate를 측정할 수 있는 바이오센서를 개발하고자 고정화된 효소 반응기를 사용하여 FIA system을 제작하였고, 최적분석 조건을 확립하기 위해 시스템의 감도와 선택성에 영향을 줄 수 있는 여러 실험적 변수들을 최적화하였다. 최적화된 조건하에서 식품내 malate와 isocitrate 함량을 정량 분석하였으며, 분석 결과의 신뢰성 검증을 위해 GC 분석 결과와 비교하였다. 또한 휴대용 센서개발을 위해 소형화 전극인 solid-state electrode를 제작하였고 이를 기존의 전극인 conventional electrode와 비교하였다.

1. Malate sensor system

Malate 측정용 FIA system의 최적 분석조건을 확립하기 위한 여러 변수들의 최적화 결과 CO_3^{2-} -ISE 중 polymer로 PVC, carrier buffer로는 1mM phosphate buffer(pH 7.4), 흐름속도는 14.7 mL/min, 효소반응기로부터 감지기까지의 튜빙길이는 15cm, 시료주입량은 100 μL , 효소 고정화시 loading 양은 20 units인 경우가 가장 최적으로 나타났다.

또한 카보네이트 선택성 막의 선택성을 높이기 위해 조성을 달리한 막을 제조한 후 여러 방해요인의 영향력을 조사한 결과 TFABB와 TFADB-based membrane 가운데 TFADB-based membrane이 고농도(10^{-1} M)의 NADP에서도 적은 영향을 받는 것으로 나타났다. 또한 TFADB와 TMT-based membrane 두 종류의 막에 있어서 pH 영향과 기질인 malate 영향을 조사한 결과 pH 영향 조사에서는 TFADB-based membrane의 경우가 pH 6.0~9.0 사이의 범위에서 pH 변화에 다른 전위차 변화가 거의 없고

더욱 안정적인 것으로 나타났으며, malate 영향조사에서는 두 종류의 막 모두 $10^{-5} \sim 10^{-3}$ M 농도범위에서 유의적인 방해효과를 보이지 않았다. 따라서 NADP, pH, malate 세 종류의 방해물질의 영향을 모두 고려할 때 TFADB-based membrane이 본 malate 측정용 센서에 있어서 최적의 막조성으로 사료되었다.

한편 휴대용 센서 개발을 위해 소형 전극인 solid-state electrode를 제작하였고 그 성능을 conventional electrode와 비교하였다. 그 결과 표준용액 (NaHCO_3)의 농도와 전위차 사이의 상관계수는 다소 떨어졌으나 카보네이트에 대한 감도가 conventional electrode보다 높았고 linear detection range가 10^{-4} M \sim 10^{-1} M로 적용시 넓은 범위에서 이용이 가능함을 고려할 때 본 연구의 solid-state electrode는 현장에서 적용시 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료되었다.

본 연구에서 제작한 malate 측정용 바이오센서 시제품의 성능을 검증하기 위해 식품을 바이오센서로 분석한 후 그 결과치를 GC분석 결과치와 비교한 결과 본 연구에서 개발된 바이오센서는 신뢰성 있는 데이터를 제공해주는 것으로 나타났다.

2. Isocitrate sensor system

Isocitrate 측정용 FIA system의 최적분석 조건을 확립하기 위해 센서 시스템에 영향을 줄 수 있는 여러 변수들을 최적화하였다. 고정화된 효소의 최적 pH와 sensing site의 활성화에 대한 최적 pH가 다름을 고려하여 carrier buffer는 0.1M Tris- H_2SO_4 (pH 7.5)와 0.6M Tris- H_2SO_4 (pH 11.0)로 분할하였고, 흐름속도는 13.6 mL/hr로 설정하였다. 시료주입량은 100 μL , carrier buffer로부터 변환기까지 FIA system으로 연결하는 튜빙내경은 0.89mm인

경우가 가장 최적인 것으로 나타났으며 이러한 최적 조건에서 isocitrate 분석시 10^{-4} M~ 10^{-1} M의 넓은 농도범위에서 직선적인 상관관계를 나타내는 것을 볼 때 다른 유기산 분석용 센서 시스템에 비해 더욱 유용한 시스템으로 판단되었다.

그리고 본 연구의 센서 시스템을 실제식품에 적용하기 위해 glucose, sucrose, fructose 등의 당류와 malate, ascorbate, pyruvate, tartarate, citrate 등의 여러 유기산들을 첨가하여 방해효과를 실험한 결과 방해물질의 농도가 식품내 자연적으로 존재하는 양에 비해 과량임에도 불구하고 solid-state electrode로 측정된 malate의 저해를 제외하고는 conventional electrode와 solid-state electrode에서 모두 약 10% 정도의 영향을 보였다. 따라서 실제 식품시료에 적용시에는 이러한 방해정도는 더욱 줄어들 것으로 판단되었다.

또한 isocitrate 측정용 바이오센서의 신뢰성을 검증하기 위해 식품시료를 바이오센서로 분석한 후 그 결과치를 GC분석 결과치와 비교한 결과 딸기주스를 제외한 모든 과일 주스에서 각 분석방법간의 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 개발한 isocitrate 측정용 센서 시스템은 실제시료의 적용에 있어서 매우 신뢰성있는 데이터를 제공하는 것으로 판단되었다. 또한 본 연구에서 제작한 solid-state electrode는 소형화 전극으로서 센서 시스템을 소형화하고 낮은 비용으로 대량생산을 가능하게 하며 하나의 칩에 multiple sensor를 포함할 수 있으므로 다시료 분석이 가능한 휴대용 센서 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

따라서 본 연구에서 개발된 malate와 isocitrate 측정용 바이오센서는 빠르고, 간편하며, 신뢰성 있는 결과를 제시해 주는 새로운 분석기기로서 앞으로 연구실과 현장에서 이들 유기산 농도를 측정하는데 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

제5절. 참고문헌

손병기 : 센서공학, 일진사, 13-47:185-190 (1996)

Abdel-Hamid, I., Atanasov, P. and Wilkins, E. : Development of a needle type glucose biosensor, *Analytical Letter*, 27, 1453-1473 (1994)

Barker, S. A. : Immobilization of the biological component of biosensors, In Biosensors fundamentals and applications, Turner, A. P. F., Karube I., Wilson, G. S.(Ed.), Oxford University Press (1987)

Bilitewski, U. and Rohm, I. : Biosensors for process monitoring, In Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and the environment, Rogers, E. K.(Ed.), 441-447 (1997)

Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 48 (1976)

Canh, T. M. : Biosensors, Chapman & Hall, London (1993)

Chemnitius, G. C., Suzuki, M., Isobe, K., Kimura, J., Karube, I. and Schmid, R. D. : Thin-film polyamine biosensor: substrate specificity and application to fish freshness determination, *Analytica Chimica Acta*, 263, 93-100 (1992)

Cowell, D. C., Ewen, R. J., Flynn, C. E., Goldie, B., Hart, J. P., Hawkins, S. J., Hitch, T. J. A. R., Honeybourne, C. L., McCalley, D. V. and Ratcliffe, N. M. : Sensors for citrus fruit quality. *Life Chem.*, 11, 333-338 (1994)

Evans A. : Potentiometry and Ion selective electrodes, 198-206 (1987)

Flores, E. F., Kline, D. A., Johnson, A. R. : Fruits and fruit products : GLC determination of organic acids in fruits as their Trimethylsilyl Derivatives, *Journal Of The AOAC*, 53(1), 17-20 (1970)

Gajovic, N., Warsinke, A. and Scheller, F.W. : Comparison of two enzyme sequences for a novel L-Malate biosensor, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 68, 31-36 (1997)

Garcia, J. L., Lopez-Munguia, A. and Galindo, E. : Modeling the non-steady-state response of an enzyme electrode for lactose, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 672-675 (1991)

Gary, R. (Ed.) : Source book of flavors. Chapman and Hall, New York (1992)

Hamano, T., Mitsuhashi, Y., Kojima, N. and Aoki, N. : Enzymic method for the amperometric determination of nicotinic acid in meat products, *Analyst*, 120, 135-138 (1995)

Hayashi, K., Toko, K., Yamanaka, M., Yoshihar, H., Yanafuji, K., Ikezaki, H., Toukubo, R., Sato, K. : Electric characteristics of lipid-modified monolayer membrane for taste sensors, *Sensors and Actuators B*, 23, 55-61 (1995)

Hong, Y. K., Yoon, W. J., Oh, H. J., Jun, Y. M., Pyun, H. J., Cha, G. S., Nam, H. : Effect of varying quaternary ammonium salt concentration on the potentiometric properties of some trifluoroacetophenone derivative-based solvent-polymeric membranes, *Electroanalysis*, 9(11), 865-868 (1997)

Horie, H. and Rechnitz, G. A. : Hybrid tissue/enzyme biosensor for pectin, *Analytica Chimica Acta*, 306, 123-127 (1995)

Iiyama, S., Ezaki, S., Toko, K., Matsuno, T., and Yamafuji, K. : Study of astringency and pungency with multichannel taste sensor made of lipid membranes, *Sensors and Actuators B*, 24-25:75-79, (1995)

Kumaran, S. and Tran-Minh, C. : Determination of organophosphorus and carbamate insecticides by flow injection, *Anal. Biochem*, 200, 187-194 (1992)

Mannino, S., Cosio, M. S. and Wang, J. : Determination of peroxide value in vegetable oils by an organic-phase enzyme electrode (1994)

Mascone, d., Yamanaka, H. and Mascini, M. : Biosensors for glucose needle-shaped for in vivo monitoring, *Russian Journal of Electrochemistry*, 29, 1522-1526 (1993)

Matsukura, R., aleixo, L. M., Godinho, W. E. S. and Neto, G. : Determination of glucose in instant coffee with an enzyme electrode, *Analytica Chimica Acta*, 280, 49-52 (1993)

Matsumoto, K. and Tsukatani, T. : Simultaneous quantitation of citrate and isocitrate in citrus juice by a flow-injection method based on the use of enzyme reactors, *Anal. Chimica Acta*, 321, 157-164 (1996)

Matsumoto, K., Higuchi, S. and Tsukatani, T. : Measurement of L-Malate using Immobilized Enzyme reactors: Comparison of results obtained with four different Enzymatic systems, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(5), 847-851 (1996)

Mayerhoff, M.E. and Kovach, P.M. : An ion-selective electrode/flow-injection analysis experiment, *J. Chem. Edu.*, 60, 766 (1983)

Mulchandani, A., Male, K. B. and Luong, J. H. T. : Development of a biosensor for assaying postmortem nucleotide degradation in fish tissues, *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 639-645 (1990)

Ozsoz, M. and Wang, J. : Tomato seed-based amperometric sensor for the determination of alcohols, *Electroanalysis*, 3, 655-658 (1991)

Pisanelli, A. M., Qutob, A. A., Travers, P., Szyszko, S. and Persaud, K. C. : Applications of multi array polymer sensors to food industries, *Life Chem.*, 11, 303-308 (1994)

Reddy, S. M., Higson, S. P. J., Christie, I. M. and Vadgama, P. M. : Selective membranes for the construction and optimization of an amperometric oxalate enzyme electrode, *Analyst*, 119, 949-952 (1994)

SAS Institute Inc. (Ed.) : SAS user's guide, SAS Institute Inc. NC., (1985)

Scott, W. J., Chapoteau, E., Kumar, A. : Ion-selective membrane electrode for rapid automated determination of total carbon dioxide, *Clin. Chem.*, 32(1), 137-141 (1986)

Shin, J. H., Sakong, D. S., Nam, H., Cha, G. S. : Enhanced serum carbon dioxide measurements with a silicone rubber-based carbonate ion-selective electrode and a high pH dilution buffer, *Analytical Chemistry*, 68(1), 221-225 (1996)

Shaw, G. W., Claremont, D. J. and Pickup, J. C. : In vitro testing of simply constructed, highly stable glucose sensor suitable for implantation in diabetic patients, *Biosensors & Bioelectronics*, 6, 401-406 (1991)

Shu, H. C., Hakanson, H. and Mattiasson, B. : D-lactate acid in pork as a freshness indicator monitored by immobilized D-lactate dehydrogenase using sequential infection analysis, *Analytica Chimica Acta*, 283, 727-737 (1993)

Takeuchi, T. and Karube : Biosensor for food analysis, *Life Chem.*, 11, 279-282 (1994)

Toko, K., Matsuno, T. and Yamafuji, K. : Multichannel taste sensor using electric potential changes in lipid membranes, *Biosensors & Bioelectronics*, 9, 359-364 (1994)

Turner, A. P. F., Karube, I. and Wilson, G. S. (Ed.) : Biosensors : Fundamentals and applications. Oxford University Press, Oxford, UK., 85-99 (1987)

Uchiyama, S. and Umetsu, Y. : Concentration-step amperometric sensor of L-Ascorbic acid using cucumber juice, *Analytica Chimica Acta*, 255, 53-57 (1991)

Updike, S. J., Hicks, G. p. : The enzyme electrode, *Nature*, 214, 986-988 (1967)

White, S. F., and Turner, A. P. F. : Enzymes, cofactors, and mediators, In Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and the environment, Rogers, E. K.(ed.), 43-52 (1997)

Wei, D., Lubrano, G. J. and Guibanlt, G. G. : Dextrose sensor in food analysis, *Analytical Letters*, 28, 1173-1180 (1995)