

유기인화합물 측정용 광바이오센서 개발

†최 정 우 · ¹김 영 기 · 김 종 민 · 이 원 흥
서강대학교 화학공학과, ¹한경대학교 화학공학과
(접수 : 2002. 2. 18., 게재승인 : 2002. 3. 30.)

Development of Prototype Biosensor for The Detection of Organophosphorus Compounds

Jeong-Woo Choi†, Young-Kee Kim¹, Jong Min Kim, and Won Hong Lee
Department of Chemical Engineering, Sogang University, Shinsu-dong 1, Mapo-gu, Seoul 121-742, Korea
¹Department of Chemical Engineering, Hankyong National University, Sukjung-dong 67, Ansong, Kyonggi 456-749, Korea
(Received : 2002. 2. 18., Accepted : 2002. 3. 30.)

In this study, a prototype fiber-optic biosensor was fabricated using the inhibition of enzyme reaction by organophosphorus compounds to detect organophosphorus compounds, which is nervous toxic material and is used as chemical weapon and pesticide. Enzyme, substrate, and inhibitor for enzyme reaction were acetylcholinesterase (key enzyme in nervous cell), acetylthiocholine iodide, and paraoxon (a kind of organophosphorus compounds), respectively. The detection principle of sensor is the detection of enzyme reaction inhibited by organophosphorus compounds by the quantitative measurement of acetic acid, which was achieved by absorbance measurement using litmus solution that maximum absorbance band is changed by pH. To fabricate prototype fiber-optic biosensor, high bright LED and photodiode was used as light source and light intensity detector, respectively. From the experimental results using a prototype biosensor, the linear change of sensor signal was obtained in a range of 0-2 ppm inhibitor concentrations. From these results, it was verified that the quantitative measurement of organophosphorus compounds could be achieved fast (within 2 minutes) and accurately by a prototype fiber-optic biosensor.

Key Words : fiber-optic biosensor, prototype, organophosphorus compounds, paraoxon, acetylcholinesterase

서 론

심각해지는 환경오염으로부터 자연환경을 보전하기 위하여 환경오염물질을 간편하고 경제적으로 측정할 수 있는 바이오센서에 대한 필요성이 높아지고 있다. 이런 요구를 충족시키기 위해서는 적은 양의 오염물질도 정확하고, 신속하게 측정할 수 있으며, 이동과 보관이 용이한 소형측정장비가 필요하다(1). 이러한 조건들은 생물소재를 이용한 광섬유 바이오센서에 의해 충족될 수 있다. 기존의 기체 크로마토그래피(gas chromatography)나 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography)를 이용하여 환경오염물질을 측정하는 방법은 장비의 가격이 비싸고, 크기가 크며, 주변환경의 영향을 많이 받는 단점이 있다(2). 반면에 광섬유를 이용

한 바이오센서는 광신호가 자기장, 이온, 전기장의 간섭을 받지 않으므로 전극을 이용한 바이오센서에서 발생할 수 있는 전기적 간섭이 발생하지 않을 뿐만 아니라, 광학 특성을 이용함으로써 극미량의 성분을 측정할 수 있고 소형화가 용이한 장점이 있다(3-6).

유기인화합물은 사람의 신경세포내의 필수효소인 acetylcholinesterase (AChE)를 저해하는 강한 신경독성물질로 알려져 있다. 이러한 유기인화합물은 농업 및 군사용 생화학무기로 사용되며, 특히 농약 및 살충제에 다량포함 되어 있어 환경오염을 유발할 수 있다. 따라서 유기인화합물을 측정하기 위한 센서에 대한 연구가 수행되어 보고되어 있다(7-10). 이들 센서의 측정원리는 AChE에 의한 효소반응이 유기인화합물에 의해 저해되는 것을 이용한 것으로 Clark electrode를 이용하거나 quartz crystal microbalance를 이용한 바이오센서에 대한 것이다. 이런 센서들은 전기적 신호처리장치를 이용한 바이오센서에 대한 연구로 신호간섭 등의 문제가 있어 문제해결을 위하여 AChE 효소반응이 유기인화합물에 의해 저해되는 반응을 광학적으로 측정하는 센서시스템에 대한 연구

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Sogang University, Shinsu-dong 1, Mapo-gu, Seoul 121-742, Korea
Tel : +82-2-705-8480, Fax : +82-2-711-0439
E-mail : jwchoi@ccs.sogang.ac.kr

가 이루어졌다(4,11-12). 그러나 전기적 신호전달장치를 이용한 바이오센서가 상용화되어 시판되고 있는 것이 다수 있는데 비하여 아직까지 광신호전달장치를 이용한 바이오센서시스템의 상용화는 이루어지지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 유기인화합물을 분석할 수 있는 광바이오센서시스템의 상용화를 위한 시제품 제작에 대한 연구를 수행하였다.

Paraoxon, parathion 등의 유기인화합물들은 신경전달물질인 acetylcholine을 acetate와 choline으로 가수분해시키는 효소인 AChE의 반응을 저해하는 물질이다(13,14). 본 연구에서는 유기인화합물로 paraoxon(diethyl p-nitrophenyl phosphate)을 사용하여 AChE가 기질인 acetylthiocholine iodide와 반응할 때 paraoxon이 효소-기질 반응을 저해하는 정도를 측정하였다. 이 반응의 저해 정도를 광학적으로 측정하기 위해 효소-기질 반응의 부산물인 아세트산에 민감하게 반응하는 지시약인 litmus를 사용하여 아세트산의 생성량을 광학적으로 측정하였다. 아세트산의 최대 흡수파장대는 204 nm의 근자외선 영역이며, 이 파장대 영역은 저가의 광학적 장치로는 측정이 어렵다. 따라서 본 연구에서는 아세트산에 의하여 최대 흡수파장대의 변화가 일어나는 지시약인 litmus의 흡광도를 측정하여 유기인화합물에 의한 효소-기질 반응의 저해정도를 간접적으로 측정하였다. 구체적으로는 유기인화합물인 paraoxon이 저해제로 작용하여 AChE와 기질의 반응을 저해하면 생성물 아세트산의 양이 감소하며, 이에 따른 litmus의 흡광도 변화를 측정하여 저해정도를 분석하였다. 흡광도의 차이는 광검출을 통하여 광 다이오드에 의해 전기적 신호로 변환되었다.

재료 및 방법

재료 및 시약

효소로는 acetylcholinesterase(EC 3.1.1.7:V-S, from electric eel), 기질로는 acetylthiocholine iodide, 그리고 저해제로는 diethyl-p-nitrophenyl phosphate(95%, paraoxon)를 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. 아세트산 생성량을 측정하기 위한 지시약인 litmus도 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였으며, litmus의 반응 pH 범위는 AChE 반응의 최적 pH인 중성영역에 속하며 최대 흡수 파장대는 580 nm로 측정이 용이하여 저가의 측정장비로 측정 가능한 장점이 있다.

측정원리 및 실험방법

Thiocholine과 acetic acid의 ester화합물인 acetylthiocholine iodide는 AChE를 만나면 choline의 암모늄은 anionic site에, 아세트산의 탄소는 esteratic site에 결합한다. 그리고 serine의 수산화기로부터 수소원자가 histidine의 질소로 옮겨가고, serine의 산소는 아세트산의 탄소와 공유결합을 이룬다. 마지막으로, AChE의 ester bond가 끊어지면서 AChE의 histidine으로부터 수소원자를 얻은 choline이 독립된 분자로 떨어져 나간다(6,8,15). 이때 생성된 아세트산으로 인해 sample의 pH가 변화하므로 litmus 고유 흡수파장의 흡광도 변화가 발생한다.

AChE

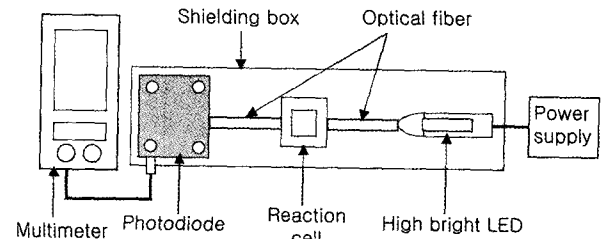
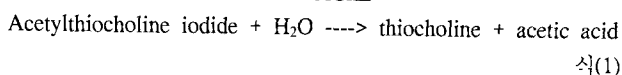


Figure 1. Configuration of prototype fiber-optic biosensor for the detection of organophosphorus compounds.

pH 변화에 의한 흡광도 변화를 측정하는 실험이기 때문에 실험에 사용된 시료 및 모든 시약은 pH 7.0으로 조절하여 사용하였고 AChE의 최적반응온도인 25°C에서 실험을 수행하였다(13). 1 mM acetylthiocholine iodide : litmus용액 : AChE (20 unit)의 비율은 1:1:1로 하여 paraoxon농도 0, 0.5, 1, 1.5, 2 ppm에 대하여 2분의 반응시간 후 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 UV-visible spectroscopy (V300, JASCO, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

광바이오센서 제작

Litmus의 최대 흡수파장은 pH 4.5~8.3의 범위에서 580 nm이며 이 파장에서의 흡광도를 측정하기 위한 광원으로는 585 nm에서 최대광세기를 가지는 고휘도 발광다이오드를 사용하였다. 흡광도를 측정하기 위한 장치로는 저전압, 초소형 실리콘 PIN형 광다이오드(Model 818-BB-40, Newport, USA)를 사용하였다. 광다이오드에 의해 변환된 전기적 신호는 소형 Multimeter (Fluke 189, Everett, WA, USA)를 사용하여 정량화하였다. 본 연구에서 제작된 유기인화합물 측정을 위한 광바이오센서의 개략도를 Figure 1에 나타내었다.

결과 및 고찰

Acetic acid첨가에 의한 litmus 용액의 흡광도 변화

본 연구에서는 AChE 반응의 부산물로 생성되는 아세트산에 의한 pH 변화를 지시약의 색변화로 측정하여 AChE의 반응도를 분석하는 방법을 사용하였다. 따라서, pH 변화에 따른 litmus 용액의 흡광도 변화를 검증하기 위해 phosphoric acid에 의하여 pH 7로 buffering된 0.1 mM litmus수용액의 흡광도 곡선과 여기에 아세트산 50 mM을 첨가시킨 경우의 흡광도 곡선을 Figure 2에 비교하여 보았다. 0.1 mM litmus수용액의 흡광도 곡선에서 최대흡수파장이 580 nm에 존재함을 관찰하였고, 아세트산에 의해 산성화된 경우 580 nm의 흡광도가 감소하고 최대흡수파장이 500 nm로 이동됨을 확인하였다. 일반적으로 산과 반응하여 산화된 물질은 고유의 흡수파장대가 자외선 영역으로 이동하게 되며, litmus의 경우 아세트산과 반응하여 산화가 진행되면 고유의 흡수파장인 580 nm의 흡광도가 감소하고 500 nm에서 산화된 형태의 흡수파장대가 관찰되는 것을 볼 수 있었다. 본 연구에서는 AChE 효소반응도를 측정하기 위하여 효소반응의 부산물인 아세트산의 생성량을 측정하였으며 아세트산의 생성량은 아세트산에 의한 중성 litmus용액의 고유 흡수파장인 580 nm의 흡광도 감소 측정을 통하여 얻었다.

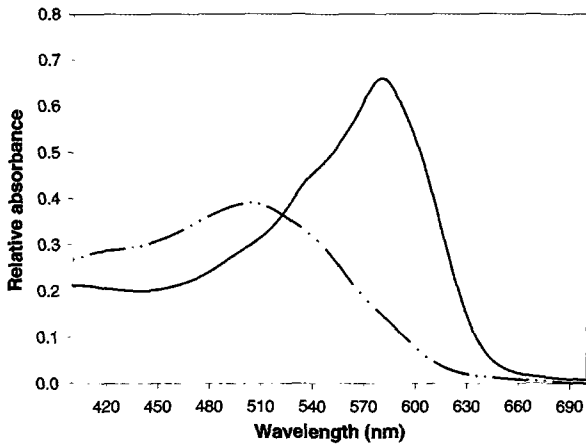


Figure 2. Absorbance spectra of (a) 0.1 mM litmus solution (solid line) and (b) 0.1 mM litmus solution with 50 mM acetic acid (dash-dot-dot line).

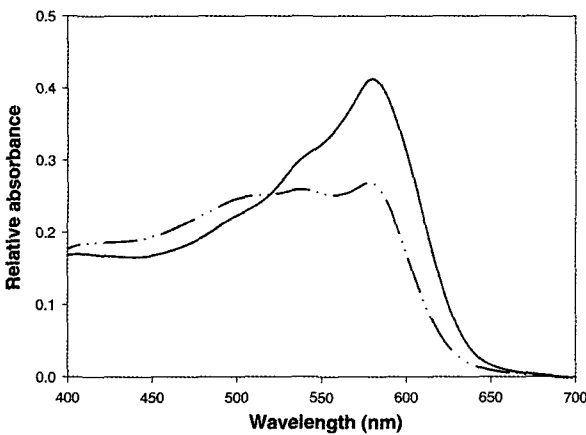


Figure 3. Absorbance spectra of reaction solution. (a) before AChE reaction (solid line), (b) after AChE reaction (dash-dot-dot line).

효소반응에 따른 litmus 용액의 흡광도 변화

효소반응을 통하여 생성되는 아세트산에 의해 litmus 수용액의 흡광도가 580 nm에서 감소하고 500 nm에서 litmus 산화물의 흡광도가 증가하는 것을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 효소반응을 위하여 AChE 효소는 20 unit를 사용하였으며 1 mM acetylthiocholine iodide 기질, 0.2 mM litmus 용액을 이용하여 실험을 수행하였다. 실험결과를 나타낸 Figure 3을 보면 AChE를 첨가하여 반응을 시작하기 전의 흡광도 곡선에서 580 nm의 흡광대를 관찰하였으며 효소를 첨가하여 2분이 경과한 후의 흡광도곡선에서는 580 nm의 흡광도가 감소하고 500 nm 파장대의 흡광도가 증가하는 것을 확인하였다. 이로부터 효소 반응정도를 580 nm 파장대의 흡광도를 측정하므로써 예측하는 것이 가능함을 확인할 수 있었다.

최적 효소반응시간 결정

최적의 효소반응시간을 결정하기 위하여 2개의 시료를 이용하여 시간에 따른 광바이오센서의 신호 변화를 관찰하였다. 시료로는 paraoxon의 농도가 0 ppm, 1.5 ppm인 것을 이용하였으며 각각의 시료에서 시간에 따른 센서신호의 변화를 Figure 4에 표시하였다. 제작된 센서의 신호는 0 ppm과 1.5 ppm

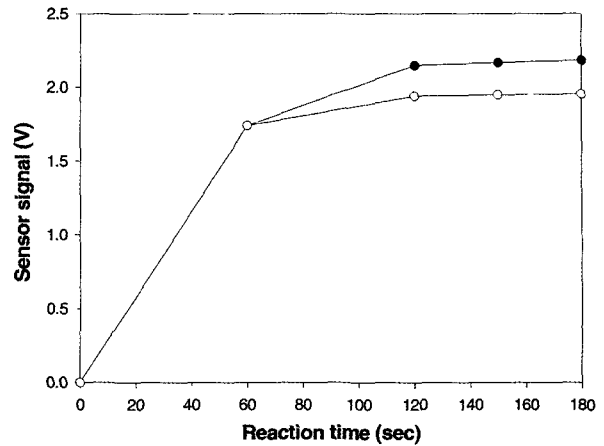


Figure 4. Time course behavior of sensor signal. (a) without paraoxon (●), (b) with 1.5 ppm paraoxon (○).

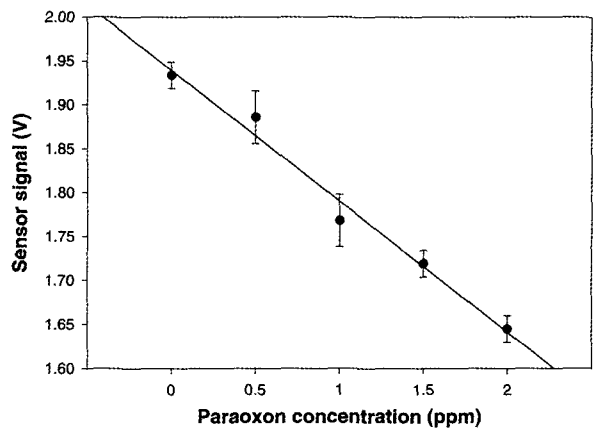


Figure 5. Calibration curve of paraoxon concentration vs. sensor signal. (Bar represents standard error).

의 paraoxon 시료의 경우 모두에서 초기에는 시간의 증가에 따라 급격히 증가하며 120초 이후에는 더 이상 증가하지 않음을 관찰하였다. 실험 결과로부터 센서신호 측정을 위한 최적의 효소반응시간을 120초로 결정하였으며 paraoxon 농도에 따른 센서 신호의 차이도 확인할 수 있었다.

광바이오센서를 이용한 paraoxon 농도 측정

제작된 광바이오센서 시제품을 이용하여 0, 0.5, 1, 1.5, 2 ppm의 paraoxon 농도에서 측정된 센서 신호를 Figure 5에 나타내었다. Paraoxon의 농도가 증가할수록 효소 반응의 저해정도가 증가되고 이에 따라 생산물인 아세트산이 적게 나오므로써 중성의 litmus가 가지는 최대흡수파장인 580 nm의 흡광도가 커서 센서의 신호가 작아지는 것을 확인하였다. 또한 센서 신호가 실험에서 사용된 측정범위인 0 ppm에서 2 ppm 사이에서 농도에 따라 선형적 감소를 보임으로써 제작된 광바이오센서를 사용한 유기인화합물의 정량적 분석이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

요약

본 연구에서는 화학무기, 농약 등에 사용되는 신경독성물

질인 유기인화합물의 측정을 위하여 유기인화합물의 효소반응 저해작용을 이용한 광바이오센서장치의 시제품을 제작하였다. 효소반응을 위하여 효소로는 신경세포의 필수효소인 acetylcholinesterase, 기질로는 acetylthiocholine iodide을 사용하였으며 효소반응의 저해제인 유기인화합물로는 paraoxon을 사용하였다. 센서의 측정원리는 유기인화합물에 의해 저해된 효소반응정도를 효소반응의 생성물인 아세트산의 정량적 측정으로 분석하였으며, pH에 의하여 최대 흡광파장의 변화가 일어나는 litmus를 사용하여 흡광도 측정으로 아세트산의 정량분석을 수행하였다. 광바이오센서 시제품의 제작은 광원으로 고휘도 LED와 광세기 측정을 위한 photodiode로 구성하였으며, 제작된 센서를 이용한 실험결과로부터 0 ppm에서 2 ppm의 paraoxon 농도에서 구성된 센서시스템의 선형적 신호 변화를 관찰하였다. 이상의 실험결과로부터 광바이오센서 시제품은 2분의 반응시간으로 신속하고 정확한 유기인화합물의 정량분석이 가능함을 확인하였다.

감 사

본 연구는 광주과학기술원 환경모니터링 신기술 연구센터 를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금에 의한 것입니다.

REFERENCES

1. Doong, R. A. and H. C. Tsai (2001), Immobilization and Characterization of Sol-gel-encapsulated Acetylcholinesterase Fiber-optic Biosensor, *Anal. Chim. Acta.* **434**, 239-246.
2. Swadesh, J. K. (2001), HPLC Practical and Industrial Applications, 2nd ed., p90, CRC press, Florida.
3. Eggins, B. R. (1996), Biosensor: an Introduction, pp1-12, Wiley & Teubner, New York.
4. Choi, J. W., Y. K. Kim, I. H. Lee, J. Min, and W. H. Lee (2001), Optical Organophosphorus Biosensor Consisting of Acetylcholinesterase/Viologen Hetero Langmuir-Blodgett Film, *Biosens. Bioelectron.* **16**, 937-943.
5. Campbell, M. (1997), Sensor Systems for Environmental Monitoring, pp1-40, Chapman & Hall, London.
6. Jeanty, G. and J. L. Marty (1998), Detection of Paraoxon by Continuous Flow System Based Enzyme Sensor, *Biosens. Bioelectron.* **13**, 213-218.
7. Abad, J. M., F. Pariente, L. Hernández, H. D. Abruña, and E. Lorenzo (1998), Determination of Organophosphorus and Carbamate Pesticides using a Piezoelectric Biosensor, *Anal. Chem.* **70**, 2848-2855.
8. Fennouh, S., V. Casimiri, and C. Burstein (1997), Increased Paraoxon Detection Solvents using Acetylcholinesterase Inactivation Measured with a Choline Oxidase Biosensor, *Biosens. Bioelectron.* **12**, 97-104.
9. Rehak, M., M. Snejdarkova, and T. Hianik (1997), Acetylcholine Minisensor Based on Metal-supported Lipid Bilayers for Determination of Environmental Pollutants, *Electroanalysis* **9**, 1072-1077.
10. Wittmann, C. and R. D. Schmid (1993), Application of an Automated Quasi-continuous Immuno Flow Injection System to the Analysis of Pesticide Residues in Environmental Water Samples, *Sens. Actuators B* **15-16**, 119-126.
11. Wolfgang, T., R. Franz, Z. Ernst, and S. W. Otto (1993), Fiber-optic Remote Detection of Pesticides and Related Inhibitors of the Enzyme Acetylcholine esterase. *Sens. Actuators B* **11**, 87-93.
12. Choi, J. W., J. Min, and W. H. Lee (1997), Signal Analysis of Fiber-optic Biosensor for the Detection of Organophosphorus Compounds in the Contaminated Water, *Korean J. of Chem. Eng.* **14**, 101-108.
13. Dziri, L., S. Boussaad, N. Tao, and R. M. Leblanc (1998), Acetylcholinesterase Complexation with Acetylthiocholine or Organophosphate at the Air/Aqueous Interface: AFM and UV-Vis studies, *Langmuir* **14**, 4853-4859.
14. Zhang, S., H. Zhao, and R. John (2000), Development of a Quantitative Relationship Between Inhibition Percentage and Both Incubation Time and Inhibitor Concentration for Inhibition Biosensor-theoretical and Practical Considerations, *Biosens. Bioelectron.* **16**, 1119-1126.
15. Trettnak, W., F. Reininger, E. Zinterl, and O. S. Wolfbeis (1993), Fiber-optic Remote Detection of Pesticides and Related Inhibitors of the Enzyme Acetylcholinesterase, *Sens. Actuators B* **11**, 87-90.