

유기인계 및 카바메이트계 농약을 측정할 수 있는 바이오 센서의 개발

김영미¹ · 김진영¹ · 조문제¹ · 장공만² · 현해남² · 김소미^{3,*}

¹제주대학교 의과대학, ²생명자원과학대학 생물산업학부, ³생명공학부

Acetylcholinesterase-based Biosensor for Detection of Residual Organophosphates and Carbamates Insecticides

Youngmee Kim¹, Jinyoung Kim¹, Moonjae Cho¹, Kongman Chang², Haenam Hyun² and Somi K. Cho^{3,*}

¹Medical School, ²Faculty of Horticultural Life Science,

³Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Received March 6, 2006; Accepted , 2006

Inhibitors of acetylcholinesterase (AChE), such as organophosphates and carbamates, interfere the action of AChE in nerve and may lead to a severe impairment of nerve functions or even death. Therefore, insect AChE is the biological target of predominant insecticides used in agriculture. Biosensors are sensitive and can be used as disposable sensors for environmental control. In recent years, the use of AChEs in biosensor technology has gained enormous attention, in particular with respect to insecticide detection. The principle of biosensors using AChE as a biological recognition element is based on the inhibition the catalytic activity by the agents to be detected. We here present a strip-type biosensor based on AChE inhibition. In this study, acetylcholinesterase and PVA-SbQ (polyvinyl alcohol functionalized with methyl pyridinium methyl sulfate) were co-immobilized on immobilone-P membranes. Immobilization of the enzymes showed a stability in 6 months without activity loss in 4°C storage. Enzymes immobilized on surfaces of membrane responded to organophosphates and carbamate more sensitively than enzyme in solution. Organophosphates and carbamates concentrations could be detected by entrapped and surface immobilized enzymes, in 5 min. For chlorpyrifos, carbofuran, cabaryl, and methidathion, the detection limits of AChE-strip were similar to that of HPLC/GC method.

Key words: acetylcholinesterase, PVA-SbQ, Organophosphates, rapid detection

서 론

바이오센서(biosensor)는 여러 가지 효소, 미생물, 항체와 항원, receptor, 그리고 동·식물의 조직 등을 이용하여 생체관련 물질을 감지하고, 정량하는 소자로서 기초과학, 환경오염물질의 측정, 식품공학 등에 광범위하게 사용되고 있다. 효소의 기질특이성, 작용특이성 및 저 농도 반응특이성 등의 특징을 이용한 효소센서는 고도의 정확성을 요구하는 바이오센서로서 적합한 요건을 갖추고 있다. 특히, 효소센서는 기질 및 작용특이성 등에 의해 여러 가지 측정대상물질이 혼합되어 있는 시료에서도 각각의 측정대상물질의 농도를 동시에 정량화할 수 있는 매우

유용한 측정방법이다. 효소센서의 개념은 Clark와 Lyon¹⁾에 의해 제시되었고, Updike와 Hicks²⁾는 *Aspergillus niger*에서 추출한 glucose oxidase를 고정화하여 효소센서를 제조하였다.

근층으로부터 분리한 AChE를 채소류 등으로부터 추출한 농약추출액과 반응시켜 효소의 활성이 저해되는 정도를 측정함으로써 이들 농약의 잔류여부를 알아낼 수 있다.^{3,4,5,6)} AChE 작용에 의해 생성된 H⁺ 이온으로 인하여 pH전극의 제작이 가능한데 acetylcholine의 농도를 측정하기 위한 목적으로 AChE를 포함하는 젤라틴 용액을 전극표면에 흡착, 고정화시킨 효소전극이 최초로 제작된 바 있다.⁷⁾ 그 후 보다 안정한 효소로서 알려진 butylcholinesterase를 고정화 시킨 효소전극과, quartz-fiber에 형광 표지된 AChE를 고정화시킨 바이오센서가 보고된 바 있다.^{8,9)} 또한 AChE를 기본으로 하여 두 효소의 공동작용에 의해 유기인계를 측정할 수 있는 바이오센서¹⁰⁾와 점 돌연변이생성(site-direct mutation)을 통하여 wild type 유전자의 염기서열을 변화

*Corresponding author
Phone: +82-64-754-3348; Fax: +82-64-756-3351
E-mail: somikim@cheju.ac.kr

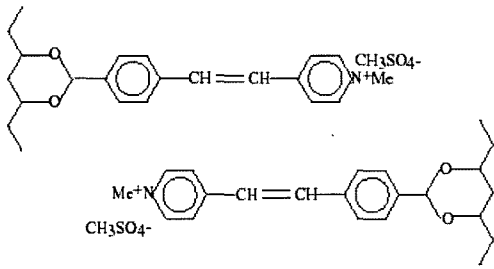


Fig. 1. Structure of Photoactivated-crosslinkable polymer.

시킨 후 유기인계와 카바메이트계의 감수성을 높인 AChE를 감광성 물질로(Fig. 1) 고정시킨 바이오센서가 보고된 바 있다.^{11,12)} 바이오센서의 감지막 물질로는 효소에 대한 독성이 적고 효소를 균일하게 분산시킬 수 있는 수용성 고분자를 사용하는 게 좋다고¹³⁾ 보고되었으며, 감광성기를 도입하여 glucose oxidase를 고정화한 포도당 센서에 대하여 보고된 바가 있다.^{14,15,16,17)}

바이오센서를 이용한 잔류농약 측정법은 잔류농약의 전체량을 농약의 종류와는 무관하게 결정할 수 있으며, 단시간 내에 정량이 가능하다. 특히 저렴한 가격으로 실험실이 아닌 포장이나 집에서도 손쉬운 조작에 의해 잔류농약을 분석할 수 있어서 채소류와 같이 유통기간이 짧은 농산품의 잔류농약 검정용으로 최적이라 하겠다.

본 연구에서는 유전자재조합 AChE 효소의 활성과 민감성을 장시간 유지시키는 strip형 바이오센서를 제작하기 위하여, AChE와 감광성 고분자물질(stilbazolium group)을 수용액에 혼합하고, 광에 의한 가교화 반응(photo cross-linking reaction)에 의해 효소를 막 위에 고정화시켰다. 제작된 AChE-strip sensor를 이용하여 잔류농약 측정 감도 및 안정성 등을 조사하고 기존의 속성 검사법과 비교 하였다.

재료 및 방법

AChE유전자의 증폭 및 AChE bacmid 제작. AChE를 세포 밖으로 발현시키기 위하여 초파리의 AChE의 유전자 서열 중에서 lipid anchor부위를 제거하기 위한 primer를 제작하고 polymerase chain reaction(PCR)을 행하였다. PCR로 증폭시킨 AChE 유전자를 pGEM-T Easy vector(Promega)에 클로닝 한 후 AChE가 들어 있는 plasmid를 추출하고 Bac-to-Bac Baculovirus Expression System(Invitrogen co.)의 pFastBac™ HTb vector(4856 bp)를 이용하여 cloning후 screening하여 재조합된 AChE bacmid DNA(AChE bacmid)를 얻었다. Cloning된 유전자 서열의 확인은 Terminator Big-Dye kit(ABI)를 이용, 3100 genetic analyzer system을 사용하였다.

세포배양. 사용된 곤충세포는 *Spodoptera frugiperda* 유래의 sf9 cell을 사용하였으며, 배양에 사용된 배지는 FBS가 첨가되지 않은 SF 900 II SFM(Gibco BRL)를 기본 배지로 사용하였다. 온도는 27°C를 유지하면서 배양하였으며, 대량배양을 위한 진탕 배양시 27°C, 120 rpm의 조건으로 배양하였다.

Transfection 및 Infection. Lipopectamin(Gibco BRL, co.)을 이용하여 재조합된 bacmid DNA를 sf9에 transfection시킨 4일

후에 원심분리하여 상등액을 회수한 후 infection의 전 시료로 사용하였으며, 세포 배양 후 얻은 상등액은 -70°C에 보관하였다. Sf9의 대량배양 시에는 3×10^6 cells/ml이 되도록 세포를 미리 전배양한 후 subculture하여 1×10^6 cells/ml의 세포가 들어 있는 진탕배양 플라스크에서 미리 하루 동안 감염시킨 세포를 넣고 배양하였다.

AChE 활성측정. 바이러스를 감염시킨 후 하루간격으로 배양액을 채취하여 원심분리기로 세포를 침전시킨 후 96 well plate에서 AChE의 활성을 측정하였다. Ellman 등¹⁸⁾의 방법을 약간 변형시킨 방법으로, 0.1 M 인산나트륨 완충용액(pH 8.0) 220 μ l, 효소용액 10 μ l에 color substrate reagent인 2.7 mM acetylthiocholine iodide(ATCI)와 4.5 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB)를 가한 후 37°C에서 반응시킨 후 cholin과 DTNB가 결합하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate를 ELISA(SUNRISE, TECAN co.)을 이용, 412 nm에서의 흡광도를 측정하여 반응의 초기 속도를 측정함으로써 AChE의 활성도를 구하였다.

AChE-strip sensor제작. AChE와 고정화 물질(Toyogosei, co.)을 섞은 후 UV($\lambda_{max} = 340$ nm)를 쬐어 막에 고정화 시켰다(Fig. 2, Fig. 3)⁹⁾.

AChE의 효소용액과 AChE-sensor에 의한 잔류농약실험. 농약에 대한 저해율을 측정하기위해 Ellmen방법을 변형하여 AChE kinetic방법에 의한 AChE의 저해율을 측정하였다. 먼저, test tube에 methanol 1 ml과 표준농약시료와 bromic succinamide 60 mM를 넣고 5분간 hood에 방치한 후 ascorbic acid 65 mM를 넣어 농약을 추출한 후 추출시료와 완충액을 섞어 농약추출 반응액의 전 시료로 사용하였다. 96 well plate에 효소용액과 농약추출시료를 넣고 혼합한 용액을 반응용액으로 하고, 여기에 기질시료로서 acetylthiocholine과 발색시료로서 DTNB를 넣어 5분간 412 nm에서 측정하였다. 효소활성의 저해율(%)은 다음식에 의해 계산하였다.

$$I(\%) = (i_0 - i_1/i_0) \times 100$$

Inhibition ratio (%) = I, Control의 enzyme activity = i_0 ,
Positive enzyme activity = i_1

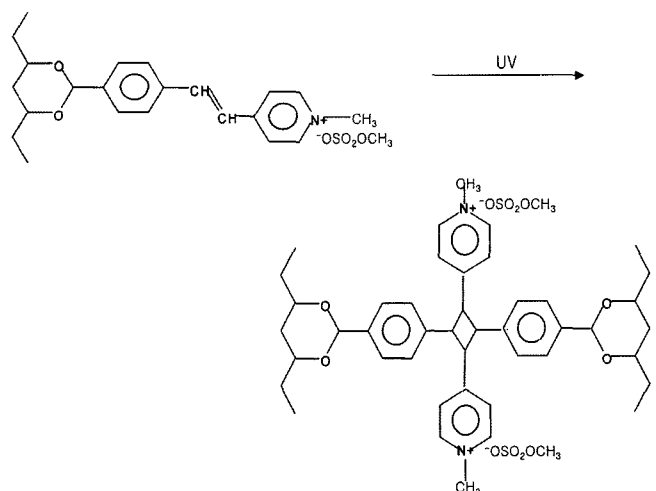


Fig. 2. UV-induced crosslinking of photoreactive polymer.

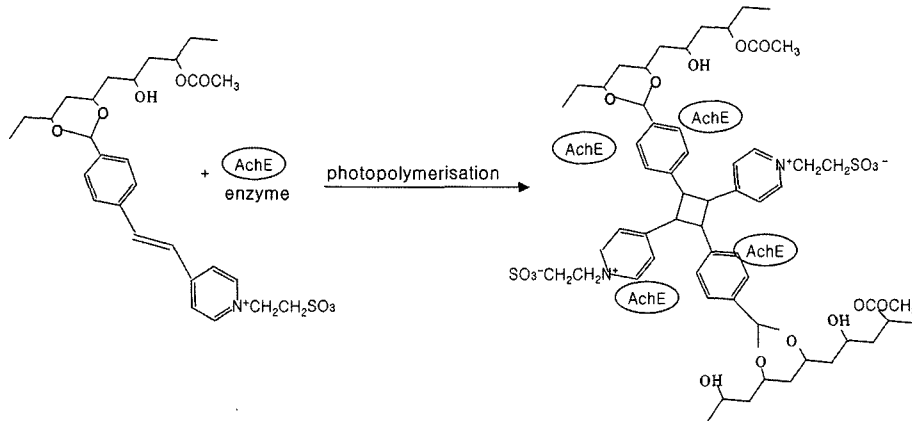


Fig. 3. AChE immobilization scheme using entrapment in photoreactive polymer.

i_0 = 농약이 첨가되지 않아 정상적으로 남아있는 효소 양
 i_1 = 농약이 첨가되어 효소가 불활성화된 후 남아있는 효소 양

한편 AchE-strip sensor에 의한 효소활성의 저해를 실험은 Karnovsky 등²⁰⁾ 방법을 약간 변형시켜 AchE의 발색정도를 측정하였다. 먼저 완충용액과 농약추출시료를 넣은 후 AchE-strip sensor를 넣어 5분간 반응시킨 후 기질용액과 발색용액에 의해 발색시킨 다음 AchE-strip sensor 측정 위해 자체 제작한 센서감지기에 의해 효소활성에 대한 저해율을 측정하였다.

GC/ECD분석. 농약의 정량분석은 농축된 유기층 1 ml을 취하여 2 ml vial에 넣고 냉장보관하면서 시료 주입할 때마다 꺼내어 2 μl를 Gas Chromatography에 주입하여 분석하였다. 주입시 먼저 주입했던 시료의 주입으로 인한 영향을 없애기 위하여 주입 후 microsyringe를 acetone으로 5회 세척하였으며, 주입하기 전에도 5회를 세척하여 용매-시료-용매의 sandwich 모양으로 syringe에 시료를 loading하여 주입하였다. 용액 중의 농약 성분은 Gas Chromatography에 의하여 Rtx-5 또는 Ultra-2 capillary column으로 분리하여 전자포획검출기(ECD)로 검출하였다. 기기 분석 시 온도는 300°C를 유지하였으며, oven의 온도는 농약성분을 분석하기 위해 220°C에서 분리 후 정량분석하였다.

결 과

고정막의 선발. AchE를 고정시킬 막을 선발하기 위해 여러 종류의 막을 가지고 효소 고정화 실험을 수행했다. cellulose membrane에 AchE와 고정화물질을 섞은 후 막 위에 고정시킨 후 광가교화 반응 중에 효소가 먼저 일정 모양을 나타내지 못하여 효소의 균일한 분포를 얻기 어려웠고 이는 저해를 측정시 오차로 연결 되었다. DEAE membrane의 경우에는 AchE와 고정화물질을 막에 고정화 시키는 과정 중에 막의 형태가 변하여 적합하지 않았다. 이외에도 여러 차례의 시도 끝에 immobilon-P(Milipore. co)에 AchE와 고정화물질을 광가교화반응에 의해 고정화시켰을 때 막손상이나 AchE의 이탈이 없고, 고정시킨 후의 효소분포의 균질성과 저장성이 뛰어나 AchE의 고정막으로 가장 적합했다.

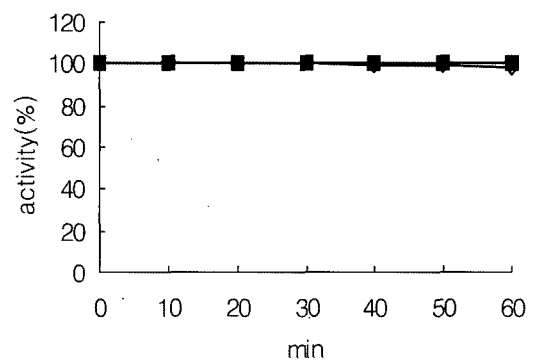


Fig. 4. The measurement of AchE-strip sensor stability. Different amount (0.5 mg/ml (◇), 1.5 mg/ml (■), 2.5 mg/ml (▲)) of enzyme was applied to strip and exposed UV light for indicated time.

AchE 부착법 개발 (고정화물질의 적정비). AchE를 막에 고정화하기 위한 효소액과 고정액의 최적비율을 알아내기 위하여 효소액과 고정액의 비율을 변화시키면서 막에 고정화시키는 실험을 하였다. 실험결과 효소액과 고정액의 섞임 비율은 2:1(v/v)이 가장 적합하였다. 이 결과를 바탕으로 효소액과 고정액을 섞은 뒤 막에 고정화시키기 위한 가교화 반응을 위해 UV 노출시간에 따른 AchE활성의 안정성을 측정하였다. UV에 노출시켜 10분 간격으로 AchE의 활성을 측정한 결과 UV에 대한 노출시간이 1시간까지는 효소의 활성에 변화가 없었다(Fig. 4).

민감도 향상을 위한 효소의 최적농도 측정. AchE-strip sensor가 발색에 의해 저해정도를 측정 비교하는 방법을 이용하는 경우, 상대적인 발색정도가 감수성을 나타낸다. 즉, 전체 중 농약에 의해 저해된 효소의 양이 많을수록 저해도의 측정이 쉽다. 하지만 소량의 효소는 발색시간에 영향을 미치므로 strip에 고정시키는 효소의 적정량을 찾아내는 것이 무엇보다 중요하다. 이를 위하여 카바메이트계와 유기인계 농약 중 몇 가지를 선택하여 농도별로 실험한 결과, 효소의 농도가 너무 높은 경우(2.5 mg/ml)와 낮은 경우(0.5 mg/ml) 모두 상대적인 발색이 저조했다(Fig. 5). 결과적으로 잔류농약에 대한 상대적인 검출능이 가장 뛰어난 효소농도는 1.5 mg/ml 정도가 적합함을 알 수 있었다. 이때 사용한 효소는 순수분리 상태가 아닌 부분 정제된 효소를 이용하였다.

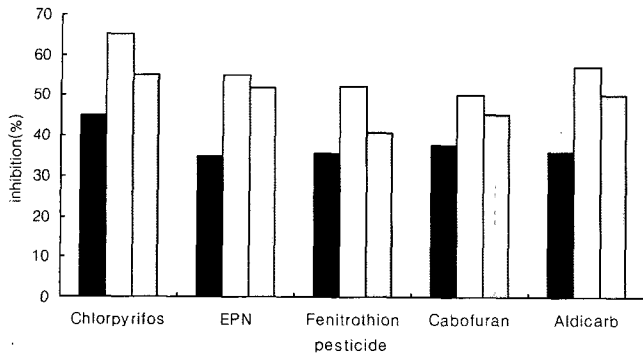


Fig. 5. The inhibition ratio of acetylcholinesterase activity at various enzyme concentration. Fifteen μ l of enzyme solution with different concentration (0.5 mg/ml (■), 1.5 mg/ml (□), 2.5 mg/ml (▨)) were applied to supporter membrane and solidified. Baendicarb (1.5 ppm) was applied to strip and measured AChE activity as described in material and method.

발색법의 결정. Karnovsky방법과 Ellman방법 모두 AChE의 활성을 측정하는 발색법이다. AChE를 인산완충용액에 녹인 후 10분간 발색시키면서 각 파장별 흡광도를 알아보았다. Karnovsky 방법에서는 처음에는 420 nm의 파장에서 높은 값을 보였지만, AChE와 반응하여 색이 진해질수록 470 nm의 파장에서 높은 값을 나타내었다. Ellman방법 역시 AChE를 10분간 발색시약과 반응 시키면서 각 파장별 흡광도를 조사해 본 결과 AChE와 반응할수록 250 nm에서 값이 높아졌다. 이 값은 AChE-strip sensor를 개발하는 기본 정보로 이용되었다. 또한 AChE의 농도를 달리하여 AChE-strip sensor를 만든 후 발색시켜본 결과 두 방법 모두 농도별로 민감한 발색을 보였다. 그러나 Ellman 방법으로 발색이 된 AChE-strip sensor에서는 반응정지액을 처리하였음에도 불구하고 시간이 경과함에 따라 발색 후 색의 변화가 관찰되었으나 Karnovsky방법에 의해 AChE-strip sensor를 발색시켰을 때는 발색 후에도 변화가 없어 발색법으로 Karnovsky방법이 적합함을 알 수 있었다(결과 미제시).

AChE-strip sensor stability. AChE-strip sensor 제품을 만든 후 보관조건, 즉 온도가 strip에 줄 수 있는 영향에 대해 실험했다. AChE-strip sensor를 4, 20, 30°C에 각각 보관하면서 5일 간격으로 활성을 측정하여 대조구와 비교하여 남아있는 효소의 양을 %나타내었다. 그 결과 4°C에서는 효소활성이 일정한 값을 유지하였으며, 20°C에서는 4°C에 비해서 20일 후부터 활성이 조금씩 줄어드는 것을 알 수 있었다. 그리고 30°C에서 남아있는 효소활성이 10일 후부터 서서히 줄어들어, AChE-strip sensor의 보관은 4°C에서 가장 안정적임을 알 수 있었다(Fig. 6). Figure 7은 AChE-strip sensor가 4°C에서 얼마동안 안정적인가를 측정한 결과로 4°C에 보관하면서 30일 간격으로 활성을 측정하였다. 효소활성 측정결과 6개월 동안 활성에 변화가 없음을 알 수 있었다. 기존의 kinetic방법으로 효소활성을 측정하기 위해서는 용액상태의 효소가 필요하였으며 효소가 불안정하여 보관할수록 효소활성도가 떨어져 실험에 따른 오차가 생겼다. 이에 비해 AChE-strip sensor는 비교적 장기간 효소활성이 변하지 않아 잔류농약 측정 시 실험의 오차 값을 줄일 수 있다고 사료된다.

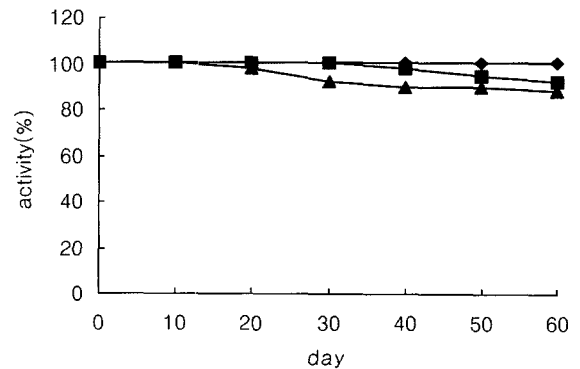


Fig. 6. Stability of immobilized AChE-strip sensor stored in different temperature conditions. Strips were stored at 4°C (◆), 20°C (■), 30°C (▲) for indicated time then remaining acetylcholinesterase activity was measured as in Fig. 5.

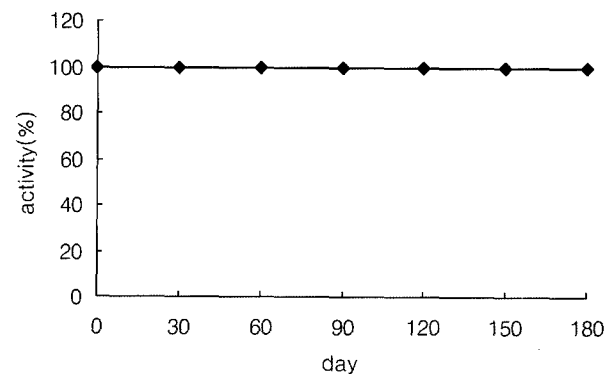


Fig. 7. Long term Stability of immobilized AChE-strip sensor. The strip was stored at 4°C for indicated time then remaining acetylcholinesterase activity was measured as in Fig. 5.

카바메이트계와 유기인계에 대한 감수성 측정. Table 2는 AChE를 이용한 기존의 간이속성 검사법인 용액법과 새로운 strip-sensor를 이용한 방법간의 농약에 대한 감수성(저해율)을 비교한 것이다.

이때 효소원으로는 기존제품인 PAChE와 본 연구팀이 개발한 AChE를 이용 하였다.용액 형태의 AChE를 이용하여 AChE의 농약에 대한 저해율 측정 시에 AChE를 20, 50% 저해시키는 농약 농도(Table 1)에 근거하여 용액법을 이용한 각 농약에 대한 효소 저해도를 측정하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 본 연구팀이 개발한 AChE가 여러 살충제에 대하여 비교적 고르게 저해율을 나타냈으며 살충제에 대한 감수성도 평균적으로 높은 것을 알 수 있었다.

두 종류의 strip sensor(AChE-strip sensor와 PAChE-strip sensor) 모두 용액법에 비하여 다양한 종류의 농약에 대해 고른 저해율을 나타냈으며 두 종류의 효소 간에 차이는 크지 않았으나 본 연구팀이 개발한 AChE가 다소 더 저해율이 높은 것으로 판단되었다(Table 2). 특히적으로 chlorfevinphos, EPN, pirimiphosmethyl, omethoate에서는 PAChE보다는 AChE가 농약에 대해 민감한 반응을 보였다. 특히 omethoate와 dimethoate에서는 kinetic방법보다는 strip방법으로 측정했을 때 농약에 대해 더 민감하게 나타났(Table 2).

Table 1. Standard pesticide detection limit concentration

Pesticide	Detection limit (20%, ppm)	Detection limit (50%, ppm)
Propoxur	0.200	1.500
Bendiocarb	0.200	1.500
Cabaryl : NAC	0.250	1.500
Carbofuran	0.040	0.350
Oxamyl	0.300	2.000
Isoprocarb (MIPC)	0.300	4.000
Azinphos-methyl	0.035	0.150
Chlorfenvin-phos	0.025	0.095
Chlorpyrifos	<0.008	0.010
EPN	0.090	0.280
Ethion	0.150	0.800
Fenitrothion : MEP	1.200	4.000
Malathion	0.250	1.500
Phenthoate : PAP	0.025	0.100
Parathion	0.300	2.500
Phosalone	0.100	0.500
Phosmet(PMP) : Imidan	0.150	0.600
Pirimiphos-methyl	0.035	0.150
Fenthion : MPP	>10	
Omethoate	6.000	
Carbopheno-thion	0.600	0.700
Dimethoate	>10	

Table 2. Compared analytical features of AchE, and PAChE. Inhibition of enzymatic activity of AChE and PAChE by various pesticides were measured in solution (kinetic) or on strip sensor

Pesticide	PAChE-kinetics	AchE-kinetics	PAChE-strip	AchE-strip
Propoxur	65.1	57.3	45.0	42.3
Bendiocarb	71.4	68.8	66.0	67.7
Cabaryl	50.6	52.1	69.0	70.0
Carbofuran	76.3	67.8	53.0	54.3
Oxamyl	28.9	63.7	46.3	61.7
Isoprocarb (MIPC)	32.9	50.3	54.0	52.0
Azinphos-methyl	86.0	95.4	87.7	97.3
Chlorfenvin-phos	44.1	73.5	54.0	80.1
Chlorpyrifos	25.4	34.7	60.0	63.3
EPN	18.3	63.2	47.3	56.5
Ethion	38.0	77.3	37.3	82.3
Fenitrothion :MEP	63.7	91.1	54.7	59.7
Malathion	26.4	75.7	77.0	89.0
Phenthoate :PAP	48.9	79.3	46.3	50.0
Parathion	41.4	86.1	89.0	96.7
Phosalone5	8.2	82.2	52.7	64.7
Phosmet(PMP)Imidan	86.4	98.3	36.0	52.0
Pirimiphos-methyl	8.0	46.3	73.0	79.0
Fenthion:MPP	14.4	41.2	53.0	80.7
Omethoate	0.0	5.9	50.3	83.3
Carbophenothion	19.9	52.6	46.3	50.0
Dimethoate	4.0	20.0	54.3	42.0

Numbers represent average % inhibition of three independent measurements

Table 3는 표기된 농도의 chlorpyrifos, cabaryl, carbofuran, methidathion을 각 작물에 살포한 후 1g의 작물로부터 메탄올

Table 3. Comparison of pesticides detection by HPLC/GC and by strip-sensor

Sample	Pesticide	Spray concentration (ppm)	GC/ECD analysis	Strip sensor inhibition (%)
Soybean	Chlorpyrifos	0	0.000	0
		0.005	0.000	2
		0.020	0.000	1
Chicory	Carbaryl	10	0.433	7
		30	0.496	15
		40	0.698	33
		0	0.000	0
Chicory	Carbofuran	0.300	0.000	11
		0.600	0.027	18
		2.0	0.058	18
		3.0	0.072	46
		10	2.307	0
		20	2.640	24
		30	3.686	32
Chicory	Methidathion	5.0	0.000	0
		20	0.000	31

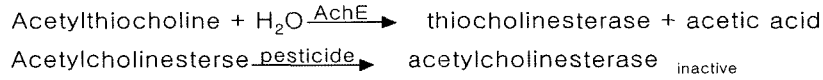
*Inhibition (%); percent of inhibitory activity of pesticides on acetylcholinesterase

을 이용하여 농약성분을 추출한 후 strip sensor의 저해율을 측정한 결과이다. 농약이 처리된 같은 작물 5g에서 추출한 농약 성분은 정밀분석법에 의하여 GC와 ECD를 이용하여 추출된 농약의 농도를 검출하였다(제주보건환경 연구원 의뢰). 본 실험은 작물에 살포된 농약의 추출 효율을 측정할 수 있었으며 더 중요하게는 Table 3에 나타난 바와 같이 정밀분석에서 검출되지 않은 농도에서 strip sensor는 저해를 나타낸다는 것이다. 즉 고독성 농약의 검출에 효과적이라고 할 것이다.

고찰

잔류농약속성검사법은 농약성분 중 유기인계와 카바메이트계 살충제를 검사하는 방법으로서 곤충의 신경전달계 효소인 acetylcholinesterase에 대한 저해특성을 이용한다. 이러한 원리를 이용하여 곤충으로부터 신경전달계 효소인 acetylcholinesterase를 분리하여 채소류 등으로부터 추출한 농약추출액과 반응시켜 효소 저해여부를 측정하여 농약의 잔류여부를 알아낼 수 있다. 즉, 곤충의 정상적인 신경전달계에서는 효소(acetylcholinesterase)와 기질(acetylthiocholin)이 반응한 후 분해된 기질이 효소로부터 떨어져 나와 또다시 다른 기질과 반응할 수 있는 활성화상태로 된다. 그러나 농약을 처리하면 기질대신 농약과 효소가 반응하고 이 반응에서 분해된 농약은 효소로부터 떨어지지 않기 때문에 효소가 불활성화 되어 정상적인 신경전달이 되지 않아 결국은 곤충을 죽이게 되는 것이다(scheme. 1).

이때 AChE의 활성을 측정하기 위하여 생성된 choline을 2차적인 choline oxidase을 이용하여 측정하는 방법, 생성된 thiocholine의 thiol기의 산화를 유도하여 발색에 의한 측정법, 그리고 생성된 acetic acid의 양을 pH(potentiometric) 변화로 측정하는 방법이 사용되고 있다. 바이오 센서분야에서는 potentiometric



Scheme. 1 Reaction scheme of the detection of AChE inhibitors.

transducer를 이용하는 방법이 가장 널리 사용되고 있으나 이 경우 일회용 strip sensor의 가격이 고가임으로 다량의 시료를 분석해야하는 경우 사용이 어렵다. 발색법을 이용한 경우는 정밀한 발색 측정을 위한 분광광도계 형태의 측정기가 필요하다. 하지만 일회용 strip sensor를 사용하게 되면 가격이 저렴함으로 다량의 시료를 신속히 측정하는데 적합하다.

이러한 원리를 이용해서 잔류농약 속성 측정용으로 개발한 AChE-strip sensor는 잔류농약 측정 시 사용되는 kinetic방법과 비교했을 때, 표준농약을 이용하여 추출한 추출액에서는 민감도가 전혀 떨어지지 않았으며, 몇몇 농약에서는 오히려 민감도가 증가함을 알 수 있었다(Table 2). 지금까지 제작된 AChE를 이용한 biosensor의 민감도는 전기발생형 AChE를 이용한 경우 paraoxon에 대해, 0.3 ppm, carbofuran에 0.2 ppm, 초파리 AChE이용한 경우 paraoxon에 대해 0.5 ppm²¹⁾, 소의 AChE이용 diazinon에 대해 0.5 ppm, carbofuran에 0.5 ppm²²⁾ 등이 보고되고 있다. 본 실험에서 개발한 발색법을 이용한 strip은 기존에 개발된 여러 AChE를 이용한 바이오 센서에 비하여 비슷하거나 더 감도가 좋은 것으로 나타나고 있다.

AChE를 이용한 잔류농약 속성검사법은 검사 대상 농약이 유기인계와 카바메이트계 살충제로 한정되어 있다는 점과 농약이 혼합되었을 때 각 농약이 어떠한 농도로 잔류하는지를 알 수 없다는 문제점을 갖고 있다. 그러나 실제로 국내에서 농산물에 잔류하여 기준치를 초과하는 살충제 농약성분의 대부분(60-70%)이 유기인계 및 카바메이트계 살충제로 나타나고 있으며, 독성학적인 측면에서 인체에 위해성이 비교적 크다고 할 수 있는 농약들이 유기인계, 카바메이트계 살충제이므로 농산물의 안정성 측면에서 충분히 그 효과를 볼 수 있을 것으로 사료 된다.

현재 잔류농약에 대한 실험 결과는 Table 4의 판단기준을 기초로 실제 채소류 유통 출하에 이용되고 있다. 현재는 용액 상에서 효소의 저해정도를 enzyme kinetics를 이용 분광광도계로 검사하는 속성법이 사용되고 있다. 하지만 이 방법은 효소의 보관이 어렵고 냉동 건조한 효소를 일단 용액상태로 만들면 모두

소진해야하는 단점이 있다. 농가나 단위 작목반과 같이 소량의 시료를 측정해야하는 경우 부적합하며 고가의 분광광도계를 구비해야하는 단점이 있다.

이번 연구에서 개발된 AChE-strip sensor는 보관기간도 4°C에서 6개월 정도까지 가능하여 기존의 용액형태의 잔류농약측정 키트보다 보존기간이 훨씬 길고 안정적이었다. 농약 종류에 따라 기존의 kinetic법과 동일한 민감도를 보이는 결과도 보였지만, 대부분의 잔류농약에 대해 더 높은 민감도를 나타냈다. 그리고 기존의 잔류농약키트에 대한 AChE의 저해율도 kinetic 방법에서 사용했던 측정시간과 비슷하며, 보관기간동안 효소활성도 전혀 떨어지지 않았다. 이 strip sensor는 실온에 보관하더라도 기존의 용액형태의 키트보다 온도에 대한 민감도가 크지 않아, 앞으로 좀 더 보완하여 현장에서 잔류농약을 직접 측정하기 위한 잔류농약 sensor로서의 기능을 할 수 있을 것으로 사료되며, 짧은 시간 내에 잔류농약의 존재유무를 측정할 수 있기 때문에 잔류농약 측정 속성 키트로서의 기능도 가능할 것이다. 따라서, 농산물 생산지나 유통현장에서도 간단하게 잔류농약을 측정할 수 있는 형태의 키트로 발전시킬 수 있다고 사료된다.

요 약

유기인계나 카바메이트 살충제는 신경전달계 효소인 Acetylcholinesterase(AChE)를 저해하므로 농산물중에서 농약의 잔류여부 확인이 가능하다. 이러한 바이오센서는 환경 관리를 위한 민감한 센서로 사용될 수 있으며, 최근에는 AChE를 이용한 잔류농약을 측정할 수 있는 바이오센서 기술이 주목을 받고 있다. 우리는 최근에 감광성고분자물질인 고정화물질을 이용하여 광기교화반응에 의해 AChE를 막에 고정화시켜 잔류농약을 측정할 수 있는 바이오센서를 개발하였다. 고정화시킨 효소는 4°C에서 6개월 동안 안정하였으며, 유기인계와 카바메이트계의 농약에 대한 반응에서도 기존의 용액형태의 효소보다 민감한 반응을 보였다. 또한 본 연구개발로 제작된 바이오센서에 의한 잔

Table 4. Results of the AChE-strip sensor inhibition ratio detection

Inhibition percent (%)	Estimation	Management subject
30%<	Residual pesticides exist below standard.	
30%~49%	Residual pesticides exist below standard but approaching near to standard. Organic agricultural products shipment is dangerous.	-Shipping of organic agricultural products is prohibited.
50%~69%	Residual pesticides possibly exist above standard. Timing of shipment is appropriate.	-Shipping is allowed after appropriate management (spraying of water) and re-examination. -Reinspection in 2~3 days. -Shipping is prohibited for quite a long time.
70%>	Residual pesticides estimated to exist above standard.	-Shipping is allowed after residual pesticides are checked every other day and below standard (50%).

*Residual pesticides check data (Nonghyup institute for agricultural food technology)

류농약 측정법은 용액형태의 효소에 의한 잔류농약 측정법보다 신속·간편하여 5분 안에 잔류농약에 대한 효소의 억제율을 측정할 수 있었으며, chlorpyrifos, cabaryl, carbofuran, methidathion에 대해 농약의 검출 능력이 정밀분석법에 의한 검출한계에 근접한 것으로 나타났다

Key words: 아세틸콜린에스터라제, 바이오센서, 광기교화 필름

감사의 글

본연구는 농림기술과제 채소류 잔류농약 현장 간이 검사용 스트립형 진단키트 기술개발(202151-2)의 의하여 이루어졌음으로 감사드립니다.

참고문헌

- Clark, L. C. and Lyons, C.(1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **102**, 29.
- Updike, S. J. and Hicks, G. P. (1967) The enzyme electrode. *Nature* **214**, 986.
- Kuhr, R. J. and Dorough, H. W. (1977) Carbamate insecticides; Chemistry, Biochemistry, and Toxicology. CRC Press. Cleveland, OH. 41-142.
- Kim, J. H. and Kim, Y. H. (1998) Inhibition of Acetylcholinesterase Activity on the Organophosphorus and Carbamate Pesticides. *J. Kor. Env.* **7**, 52-56.
- Ivanov, A., Evtugyn, G., Budnikov, H., Ricci, F., Moscone, D. and Palleschi, G. (2003) Cholinesterase sensors based on screen-printed electrodes for detection of organophosphorus and carbamic pesticides. *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 624-631.
- Schulze, H., Scherbaum, E., Anastassiades, M., Vorlova, S., Schmid, R. D. and Bachmann, T. T. (2002) Development, validation, and application of an acetylcholinesterase-biosensor test for the direct detection of insecticide residues in infant food. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 1095-1105.
- Durand, P. David, A. and Thomas, D. (1978) An enzyme electrode for acetylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **10**, 277-281.
- Yamani, H., Tran-Minh, C., Abdul, A. and Chavanne, D. (1988) Automated system for pesticide detection. *Sensor. Act.* **15**, 193-198
- Rogers, K. R., Cao, C. J., Valdes, J. J., Eldefrawi, A. T. and Eldefrawi, M. E. (1991) Acetylcholinesterase fiber-optic biosensor for detection of anticholinesterases. *Fundam. Appl. Toxicol.* **16**, 810-820.
- Andreescu, S., Avramescu, A., Bala, C., Magearu, V. and Marty, J. L. (2002) Detection of organophosphorus insecticides with immobilized acetylcholinesterase-comparative study of two enzyme sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **374**, 39-45.
- Fournier, D., Mutero, A., Pralavorio, M. and Bride, J. M. (1993) Drosophila acetylcholinesterase: mechanisms of resistance to organophosphates. *Chem. Biol. Interact.* **87**, 233-238.
- Boublik, Y., Saint-Aguet, P., Lougarre, A., Arnaud, M., Villatte, F., Estrada-Mondaca, S. and Fournier, D. (2002) Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Eng.* **15**, 43-50.
- Lee, S. P., Han, Y. S. and Kim, B. C. (1996) Structure-Property Relationship of PVA-SbQ Water Soluble Photosynthetic Polymer and its Application to Screening Process of Color Monitor. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **7**, 379-386.
- Bachmann, T. T., Leca, B., Vilatte, F., Marty, J. L., Fournier, D. and Schmid, R. D. (2000) Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensors using recombinant mutants of Drosophila acetylcholinesterase and artificial neural networks. *Biosens. Bioelectron.* **15**, 193-201.
- Choi, J.W., Kim, Y.K., Lee, I. H., Min, J. and Lee, W. H. (2001) Optical organo phosphorus biosensor consisting of acetylcholinesterase/viologen hetero Langmuir-Blodgett film. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 937-943.
- Doretti, L., Ferrara, D., Lora, S., Schiavon, F., and Veronese, F. M.(2000) Acetylcholine biosensor involving entrapment of acetylcholinesterase and poly(ethylene glycol)-modified choline oxidase in a poly(vinyl alcohol) cryogel membrane. *Enzyme. Microbial. Technol.* **27**, 279-285.
- Xavier, M., J.P., Vallejo, B., Marazuela, M. D., Moreno-Bondi, M. C., Baldini, F. and Falai, A. (2000) Fiber optic monitoring of carbamate pesticides using porous glass with covalently bound chlorophenol red. *Biosens. Bioelectron.* **14**, 895-905.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
- Silvana, A., Lise, B. and Jean, L. M. (2002) Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta* **464**, 171-180.
- Karnovsky, M. J. and Roots, L. (1964) A "direct-coloring" Thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 219-221.
- Sotiropoulou S., Fournier, D. and Chaniotakis, NA. (2004) Genetically engineered acetylcholinesterase-based biosensor for attomolar detection of dichlorvos. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 2347-2352.
- Schnitzerling, H. J., Nolan, J. and Davey, P. A. (1982) A comparative study of the reactivity of acetylcholinesterases of the cattle tick *Boophilus microplus* and cattle erythrocytes with organophosphorus and carbamate inhibitors. *Pestic. Biochem. Physiol.* **18**, 216-225.