

살균제 Iprovalicarb 잔류물의 신속한 검출을 위한 바이오센서

조한근 김운호 경기성 이은영

A Biosensor for the Rapid Detection of the Fungicide Iprovalicarb Residues

H. K. Cho E. H. Kim K. S. Kyung E. Y. Lee

Abstract

In this study, a biosensor was developed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to rapidly measure the fungicide iprovalicarb residues in agricultural products. The biosensor was designed to include micro-pumps and solenoid valves for fluid transport, a spectrophotometer cuvet as a reaction chamber, a photodiode with a light-emitting diode for optical density measurement, and a control microcomputer to implement assay. The rate of change in optical density of the cuvet was read as final signal output.

Micro-pumps were evaluated to investigate their delivery capability, the highest values of the error and the coefficient of variation were 4.3% and 4.6% respectively. As the incubation period was reduced from 15 minutes to 11 minutes to shorten the total processing time, the sensor sensitivity was decreased as the antibody dilution ratio was reduced to a half. The maximum usable period of the coated cuvet was found to be two days with 1% error limit. To predict the concentration of the iprovalicarb residue in agricultural products, a linear calibration model was obtained with r-square values of 0.992 for potato and 0.985 for onion. In validation test for the samples of potatoes and onions against the high performance liquid chromatography, very high correlation values were obtained as 0.996 and 0.993 respectively. Using the cuvet immobilized with antigen, it took 21-minutes for the biosensor to complete the measuring process of the iprovalicarb residues.

Keywords : Biosensor, ELISA, Antibody, Antigen, Iprovalicarb, Fungicide residues

1. 서론

2004년 칠레와의 FTA 발효를 시작으로 우리나라는 미국, 유럽연합 등 많은 나라들과 자유무역협정의 체결을 시도하고 있어, 이제 국내에서도 외국산 수입 농산물의 소비가 급증할 것으로 예상된다. 국민 건강을 위해 안전한 농산물을 공급하는 문제는 절대적으로 중요한 과제이므로, 잔류 농약의 관리 및 규제 강화가 절실히 요구된다. 이를 해결하기 위해서는 무엇보다도 잔류농약의 정확하고 신속한 검출이 중요하다. 신속한 측정을 위한 다양한 형태의 장치들이 개발되어 시판되고 있으나 정확도가 높지 않아 대부분 스크리닝 목적으로 사

용되고 있는 실정이다.

작물의 보호, 치료 및 박멸 효과를 갖춘 침투성 살균제인 이프로발리카브는, 양파, 오이, 포도 및 참외의 노균병, 토마토와 감자의 역병, 수박과 고추의 탄저병 방제에 많이 사용된다(Tomlin, 2003). 이 농약의 최대잔류 허용한계는 감자와 양파에서 각각 0.5 ppm, 오이와 토마토에서 각각 1.0 ppm 이다. 최근에 식품원료, 가공식품 및 공정에 잔류하는 농약, 항생제, 및 중금속 등의 고감도 검출에 효소면역분석법이 많이 활용되고 있다. 이 분석법은 관행적인 대형기기 분석법에 비해 사용이 간편하고 비용이 저렴하고 신속한 장점이 있다. 그러나 실험실까지 시료를 이동해야 하며, 최소 2시간 이상의 분석시

This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2006. The article was submitted for publication in November 2007, reviewed and approved for publication by the editorial board of KSAM in December 2007. The authors are Han-keun Cho, KSAM member, Professor, Woon Ho Kim, Graduate Student, Dept. of Biosystems Engineering, Kee Sung Kyung, Associate Professor, and Eun Young Lee, Graduate Assistant, Dept of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University. Corresponding author: H. K. Cho, Professor, Major in Biosystems Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea; E-mail: <hkcho@cbu.ac.kr>.

간이 요구되어, 현장에서의 신속한 검출을 위해서는 바이오센서와 같은 측정 장비가 필요하다.

Cho 등(2006)은 실험실용으로 개발된 효소면역분석법(Lee 등, 2004)을 변형하여 바이오센서용 분석법을 개발하여 측정 감도는 실험실용 효소면역분석법에 비해 다소 낮게 나타났으나, 검출에 소요되는 시간을 20분 내로 단축하여 신속한 측정이 가능하도록 하였다. Lim과 Cho(2005)는 바이오센서용 분석법을 기초로 하여 잔류 살충제 이미다클로플리드를 신속히 검출할 수 있는 바이오센서를 개발하였다. 최소측정한계는 0.05 ug/mL 이하로 측정 소요시간은 19분으로 보고하였다.

본 연구는 농산물에 잔류하는 살균제 이프로발리카브의 신속한 검출을 위한 효소면역법 연구(Cho 등, 2006)에서 개발된 분석법을 활용하여 휴대형 바이오센서 시스템을 개발하고 측정 성능을 평가하기 위한 목적으로 수행되었다.

2. 재료 및 방법

가. 바이오센서용 효소면역분석법

선행 연구에서는 Lee 등(2004)이 개발한 경합적 간접 효소면역분석법을 기본으로 하여 바이오센서용 효소면역법을 개발하였다(Cho 등, 2006). 일반적인 경합적 간접 효소면역 분석법은 그림 1에서 보는 바와 같이 항원을 큐벳에 고정시킨 후 항체와 분석시료 이프로발리카브를 농도별로 첨가한다. 이때 코팅항원과 분석시료는 서로 경쟁하면서 항체와 결합하게 된다. 결합을 위해 충분히 반응시킨 후, 반응되지 않은 항체와 분석물을 세척한 다음 효소가 표지된 이차 항체를 추가한다. 그리고 기질 버퍼를 가하면 효소에 의해 산화가 촉진되어 청색으로 발색된다. 발색은 분석물의 농도에 따라 변하게 되고 흡광도 값을 읽어 시료의 농도를 판단한다. 이때 시료의 농도는 광 변화에 반비례하게 된다.

살균제 이프로발리카브 잔류물의 검출에 소요되는 분석시간을 단축하기 위해 배양시간을 최소화하고 항체농도를 높였다. 개발될 바이오센서용 효소면역분석에 관한 절차는 표 1에 요약되어 있다. 센서 반응조인 큐벳의 항원 고정화 작업은 수작업으로 처리하고, 시약 주입에서 흡광도 표시까지의 체반 분석과정을 바이오센서로 처리하도록 설계하였다.

나. 시약 및 실험재료

이프로발리카브와 p-methylphenylethylamine는 Bayer AG (Leverkusen, Germany)에서 분석등급으로 공급받았다. 충북대학교 농화학과 농약학 실험실에서 제조된 haptent-I-BSA와 haptent-II-KLH conjugate를 각각 코팅 항원(1 ug/mL)과 면역원으로 하여 토기 E에서 생산된 항혈청(희석비 1:4,000)을 사

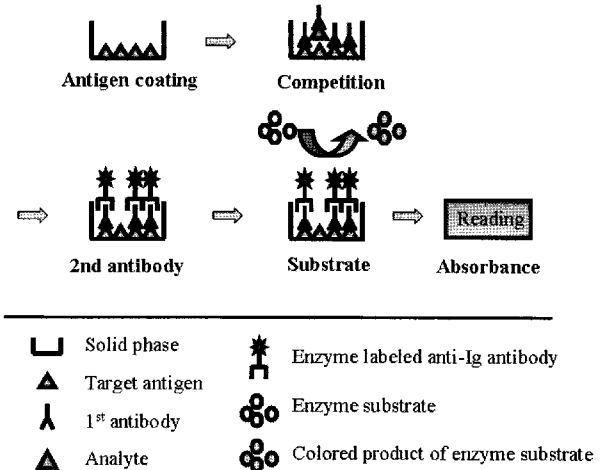


Fig. 1 Scheme of competitive indirect ELISA.

Table 1 Protocol for the ELISA used in the biosensor

Immobilization of Antigen (By hand)	
1.	Immobilize antigen on cuvet (1 mL, 0.1 ug/mL, 12 hr, 4°C)
2.	Washing cuvet (1xPBS + 0.05% Tween20, 5 times)
3.	Blocking cuvet (2 mL, 1xPBS + 3% skim milk, 1 hr, 37°C)
4.	Washing cuvet (1xPBS + 0.05% Tween20, 5 times)
Binding (By the biosensor)	
5.	Add 500 uL of sample (5000, 200, 8, 0.32, 0.0128 ng/mL)
6.	Add 500 uL of the 1st-antibody (1:4,000)
7.	Incubate for 5 or 3 minutes at 24°C
8.	Washing cuvet (1xPBS + 0.05% Tween20, 5 times)
9.	Add 1 mL of the 2nd-antibody (1:1,000)
10.	Incubate for 5 or 3 minutes at 24°C
11.	Washing cuvet (1xPBS + 0.05% Tween20, 5 times)
Development (By the biosensor)	
12.	Add 1 mL of substrate buffer (citrate buffer, 0.6% TMB, 1% H2O2)
13.	Incubate for 5 minutes at 24°C
14.	Read optical density

용하였다. 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG(희석비 1:1,000)와 기질인 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine(TMB)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO., U.S.A.)로부터 구입하였다. 바이오센서의 성능평가를 위해 HPLC(HP 1100 series, Agilent Technologies Korea, Young-In Scientific, Korea)를 사용하였고, 완충액은 EPA Guideline (Lee 등 2004)에 따라 제조하였다.

다. 바이오센서 설계

1) 반응조

바이오센서에 사용된 반응조는 분광광도계용 큐벳(Q-VETTES macro, Ratiolab, Dreieich, De)으로, 흡착성이 좋고 적용파장의 범위는 340-900 nm, 용량은 4.0 mL, 크기는 10x10x40 mm이다.

2) 시료이송 및 혼합

시료, 1차항체, 기질 및 세척액을 주입하기 위한 시약(reagent) 펌프와 2차항체를 주입하기 위한 이차항체(2nd-Ab)펌프(Fig. 2)는 용량이 50 μ L이고 토출오차가 3%인 솔레노이드 펌프 (LPLA520350L, The Lee Co., Westbrook, CT, USA)가 사용되었다. 시약선택을 위해서 양방향밸브(LFAA1201710H, The Lee Co.)가 사용되었고, 시료의 급격한 주입을 방지하기 위해 세방향밸브(LFAA1201410H, The Lee Co.)가 사용되었다. 펌프, 이송배관 및 밸브의 오염을 최소화하기 위해 별도의 펌프와 이송배관이 사용되었다. 반응조의 배수와 혼합을 위한 Drain pump와 Mix pump로는 이송오차가 10%인 솔레노이드 펌프(LPLA520050LL, The Lee Co., Westbrook, CT, USA)가 사용되었다. 반응조 내로의 시료 이송을 위해 스테인레스강 튜브(1.47 mm OD, 1.07 mm ID)를 사용했고, 나머지 이송관은 내경이 1.6 mm인 바이톤 튜브를 사용하였다. 펌프 속도가 지나치게 빠른 경우 운반이 정량적으로 되지 않을 수 있으며(권장 작동 주파수 2 Hz 이하), 반대로 지나치게 느린 경우 검출 소요 시간이 지연된다. 예비실험을 통해 이를 만족하는 펌프의 작동주파수로 1.92 Hz를 선택하였다. 펌프의 10회 스트로크로 500 μ L의 증류수가 반응조로 이동되고, 20회의 스트로크로 증류수 1,000 μ L이 운반된다. 이송관의 길이에 따른 이송시간과 시료사용량을 절약하기 위해 이송관의 길이는 가능한 짧게 되도록 펌프, 밸브 및 반응조의 위치를

결정하였다. 바이오센서의 시료 이송 및 혼합에 관련된 상세한 배관도는 그림 2에 표시되어 있다.

3) 신호검출

기질의 흡광도를 측정하기 위해 645 nm 발광다이오드 (HLMP-4101, Hewlett Packard, San Jose, CA, USA)와 포토다이오드(BPX61, Siemens Components, Inc., Cupertino, CA, USA)를 사용하여 잔류농약의 농도에 따른 발색 정도에 따라 출력전압을 측정하였다. 발광다이오드(LED)를 반응조 블록 벽에 설치하고 발광다이오드에서 나오는 빛이 반응조 큐벳을 투과하도록 블록 벽에 작은 구멍을 만들고, 반대편에 위치한 포토다이오드 면과 수직을 유지하도록 정렬하였다 (Fig. 2). 이때 포토다이오드는 투과된 빛의 강도에 비례하여 광전류를 발생하게 된다.

4) 신호처리

포토다이오드의 출력신호는 10^6 V/A의 이득을 갖는 광전압 증폭기에 입력된다. 증폭기에서 출력된 전압 신호는 차단 주파수가 10 Hz인 4차 버터워스(4th-Butterworth) 저역통과 필터에 의해 고주파 성분이 제거된다. 전기적 표류 현상을 최소화하기 위해 증폭기에는 정전압 안정전원을 공급하였으며 1% 오차 금속파막 저항을 사용하였다. 마지막 단계로 이득이 10이며 출력 오프셋(offset) 조절이 가능한 인버터를 사용하여

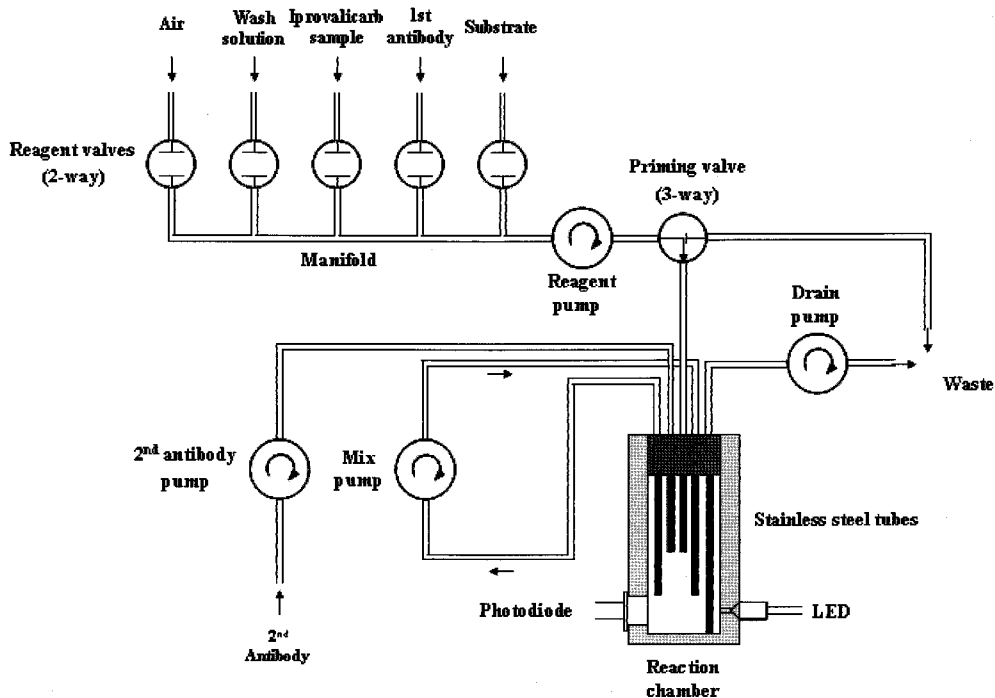


Fig. 2 Fluid handling system for the biosensor.

출력전압을 얻는다. 이 출력은 마이크로컴퓨터에 내장된 10 비트 분해능을 갖는 A/D 변환 기능을 통해 디지털 신호로 바뀌어 처리된다(Lim과 Cho, 2005).

5) 상대흡광도 표시

기질용액이 반응조에 공급되어 색 발현이 시작되기 직전의 출력전압 $V_{out}(0)$ 과 색 발현이 종료되었을 때의 출력전압 $V_{out}(t)$ 으로 식 (1)에 의해 상대 흡광도 A가 계산되어 최종적으로 액정표시장치(LCD)에 표시된다.

$$A = \log\left(\frac{V_{out}(0)}{V_{out}(t)}\right) \quad (1)$$

6) 제어

면역반응과 시료운반에 필요한 펌프와 밸브의 작동, 면역 반응이 끝난 후 반응조의 발색정도 측정에 필요한 발광 다이오드의 작동, 포토 다이오드와 신호처리 회로에서 출력된 전압신호의 아나로그-디지털 변환과정을 거친 후 최종적인 상대흡광도를 액정표시장치에 표시하는 모든 공정은 마이크로 컴퓨터(AVR, ATmega 8535, ATMEL corp., CA, USA)로 제어되었다(Lim과 Cho, 2005). 펌프와 밸브가 작동할 때 많은 전류가 흐르고 집적회로(IC)에 역전류의 흐름을 방지하기 위해 달링턴 드라이버를 사용하였다. 제어용 프로그램은 C 언어로 작성되어 실행 프로그램으로 변환된 후 AVR에 다운

로드 되었고, 제어 알고리즘은 표 2에 요약되어 있다.

7) 바이오센서 제작

본 연구에서 제작된 바이오센서의 최종 모형은 그림 3과 같다. 상단부 중앙에는 전자회로판이 2단으로 설치되어 있고, 아래 층 회로판(1)에는 마이크로컴퓨터, 신호처리 및 제어회로 부분이 포함되어 있고, 윗 층 회로판(2)에는 분석결과 값을 표시하는 액정표시장치와 제어 스위치가 포함되어 있다. 박스 중앙 슬레노이드밸브(3)와 마이크로펌프(4)가 설치되어 있고, 박스 하단부 왼쪽에는 시약류의 용기(5)가 설치되어 있고, 오른쪽에는 흡광도 측정부를 포함하는 반응조(6)가 설치되어 있다.

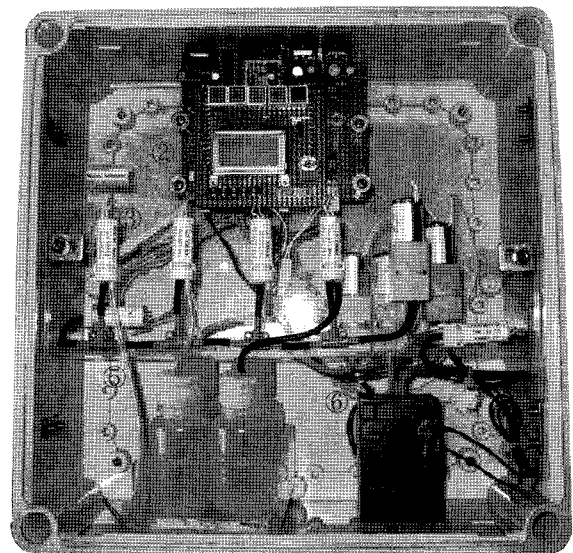


Fig. 3 The prototype of the biosensor developed.

Table 2 Control sequence for the biosensor

Binding cycle
<ul style="list-style-type: none"> • Sample valve (500 μL), Reagent pump (10 strokes) • 1st antibody valve (500 μL), Reagent pump (10 strokes) • Mix pump (28 strokes) • Incubate 5 or 3 min. (24$^{\circ}$C)
Washing cycle \times 5
<ul style="list-style-type: none"> • Drain cuvet • Washing valve (1.2 mL), Reagent pump (26 strokes) • Mix pump (28 strokes)
Labeling cycle
<ul style="list-style-type: none"> • 2nd antibody pump (19 strokes) • Incubate 5 or 3 min. (24$^{\circ}$C)
Washing cycle \times 5
Development cycle
<ul style="list-style-type: none"> • Substrate valve (1 mL), Reagent pump (17 strokes) • Incubate 5 min. (24$^{\circ}$C) • Calculate OD rate (10 s)
Cleaning cycle
<ul style="list-style-type: none"> • Clear sample valve • Clear substrate valve • Add washing solution

라. 실험 방법

1) 시료 이송성능 평가

배관이 연결된 상태에서 정확한 양의 시료와 시약이 반응조 큐벳에 이송되는 것은 바이오센서의 성능을 좌우하는 중요한 요인이다. 따라서 각 마이크로펌프 및 밸브를 통하여 큐벳으로 또는 큐벳에서 밖으로 이송된 양을 전자저울을 이용하여 10회 반복 측정하였다. 이를 위해 평가용 프로그램을 작성하여 이송성능을 평가하였다.

2) 바이오센서 성능평가

설계된 바이오센서에 적용하기 전의 준비과정으로 이프로 발리카브의 농도별 용액에 대하여 수작업을 통해 큐벳에 항원을 코팅시켰다. 코팅된 큐벳은 냉동고(-20 $^{\circ}$ C)에 보관하여 사용하였다. 준비과정이 완료되면 큐벳의 빛이 투과되는 면

에 이물질이 묻지 않도록 주의하며 큐벳을 ब्ल럭에 삽입하고, 표 1에 설명된 순서로 펌프 및 밸브를 작동하여 효소면역법 순서에 따라 시약을 운반 하고 반응시켰다. 최종 단계로 각 농도에 대한 상대 흡광도가 액정표시장치(LCD)에 표시된다.

일차항체의 농도는 1:4,000으로 하고 이차항체의 농도는 1:1,000으로 하였으며, 배양시간은 binding, labelling, developing 을 각 5분씩 총15분으로 하여 실험하였다. 희석된 항체는 변질을 최소화하기 위해 냉장고(4℃)에 보관하여 사용하였다. 이프로발리카브 표준용액의 농도는 0.0128, 0.32, 8, 200, 5000 ng/mL로 희석하여 사용하였다. 항체의 농도를 2배, binding과 labeling에 필요한 배양시간을 5분에서 3분으로 단축하여 분석시간의 추가단축 가능성을 조사하는 실험을 하였다. 항원 코팅된 규벳의 사용가능 기간을 조사하기 위해 표준용액의 농도 0.0128 ng/mL에서 하루 간격으로 10일간 측정하였다. 모든 측정은 항체의 농도별 2수준, 배양시간 별 2 수준, 농도 별 5 수준에서 임의로 순서로 해당 수준에서 3회 반복 실시하였다.

3) 농산물 분석

바이오센서를 이용하여 이프로발리카브의 회수율 시험을 농산물 시료를 대상으로 하여 분석하였다. 농산물 시료로는 감자와 양파를 선택하였고, 시료전처리는 Lee 등(2004)의 방법에 따라 실시하였다.

감자와 양파 시료를 5 g씩 준비하여 각 시료에 CH₃CN 50 mL을 추가하여 초음파로 20분간 분쇄한 후 슬러리에 celite 545를 넣고 갈때기로 여과한 후 CH₃CN 20 mL로 씻어 주었다. 이 여액을 60℃에서 회전식 증발기로 농축하였다. 양파의 경우 위와 같이 농축한 후 NH₄Cl을 포함한 응고액을 이용하여 정제시킨 후 다시 celite 545를 넣고 여과한 후 농축하였다. 이 농축액을 1×PBS 버퍼를 이용하여 10배 희석액 상태로 만들었다. 이 희석액을 솜을 채운 컬럼에 옮겨 간이 여과한 후 다시 주사기 필터로 여과한 후 각 단계별로 희석액 (×10, ×20, ×50, ×100)을 만들어 가장 낮은 매트릭스 효과를 보이는 희석배수를 정하였다.

농산물 잔류 농약의 측정에 사용될 보정모형은 농산물에 따라 다르므로, 대상 농산물별로 최적의 희석배수를 구해 그에 따른 보정곡선을 구하여야 한다. 감자와 양파의 측정에 사용될 보정모형을 구하기 위한 희석배수는 Cho 등(2006)의 연구결과에 따라 가장 높은 감도를 보이는 값으로, 감자는 10배 양파는 20배로 하였다. 감자는 1.0, 2.0와 3.0 ng/mL, 양파는 2.0, 4.0와 6.0 ng/mL 처리를 하여 비교하였다. 이 희석배수에 따라 구한 모델을 이용하여 분석한 결과값은 HPLC에 의한 결과와의 상관관계를 분석하였다. 측정은 농산물 2 수준, 농도 3 수준, 각 수준 별로 3회 반복 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 바이오센서 성능

1) 시료 이송성능

표 3은 바이오센서에 사용된 솔레노이드 마이크로펌프의 배관 연결 작업 후의 시료 이송 성능시험의 결과를 보여준다. 배수(Drain) 펌프는 반응물을 큐벳에서 밖으로 배출하는 성능을 나타내고 나머지 펌프는 큐벳으로의 시료 및 시약의 이송성능을 나타낸다. 표에서 보는 바와 같이 4개의 밸브에 의해 시료(sample), 1차항체(1st-Ab), 기질용액(substrate) 및 세척액(wash)을 이송하는 시약(reagent) 펌프의 경우 이송오차는 2% 정도, 변이계수는 1.5% 정도로 아주 양호한 이송성능을 보였다. 이차항체를 이송하는 2차항체(2nd Ab)펌프의 경우 오차가 3%이고 변이계수는 4.6% 정도로 시약(reagent) 펌프에 비해 다소 높은 값을 보여 주었지만, 2차 항체는 1차 항체와 결합한 항원에만 반응하므로 이 정도의 이송 오차에 따른 영향은 전혀 없을 것으로 판단된다. 반응조의 화합물을 균일하게 해주는 혼합(mixing) 펌프와 과정별 반응이 끝난 후 반응조의 내용물을 배출하는 Drain 펌프의 오차는 각각 1.6%와 3.3%를 보여 주었고, 변이계수는 1.6%와 0.1%를 보였다. 따라서 모든 마이크로 펌프는 실험목적에 잘 부합되는 것으로 확인되었다.

Table 3 Test results of dispensed volume to a cuvette by micro-pumps

Micropump	Reagent				2nd-Ab	Mixing	Drain*1
	Sample	1st-Ab	Substrate	Wash			
Set volume (mL)	500.0	500.0	1,000.0	1,200.0	1,000.0	1,200.0	1,200.0
Average (mL)	510.5	507.8	1,019.2	1,208.2	1,042.7	1,219.6	1,239.8
Error (%)	2.1	1.6	1.9	0.7	4.3	1.6	3.3
CV*2 (%)	0.5	1.5	0.3	0.3	4.6	1.6	0.1

*1: Dispensed volume from a cuvette.

*2: Coefficient of variation

2) 배양시간의 단축에 따른 바이오센서 성능

그림 4와 5는 이프로발리카브의 농도별 표준시료를 본 연구에서 개발된 바이오센서로 측정된 결과를 보여준다. 가로축에는 이프로발리카브 표준시료의 농도(ng/mL)를 상용대수로 표시하였고, 세로축은 상대 흡광도(Optical density)를 나타낸다. 그림 4는 면역반응에 필요한 배양시간의 변화에 따른 바이오센서의 성능을 비교한 결과를 보여준다. 그림 4에 표시된 값은 3회 반복 측정값의 평균이며, 측정값 간의 변이계수(CV)는 4.4% 이하인 것으로 나타났다. 항체의 농도를 1차와 2차를 각각 1:4,000과 1:1,000으로 하고, 총 배양시간을 15분(5-5-5분)에서 11분(3-3-5분)으로 단축하였을 때, 상대흡광도로 잔류농약의 농도를 추정하기 위한 시그모이드 모형의 결정계수는 각각 0.999과 0.997로 나타났다. 시료에 포함된 잔류농약의 농도를 상대흡광도로 예측할 때 시그모이드 모형(Eq. 2)이 가장 적합하며, 각 모형의 계수값은 표 4에 표시되었다.

농약 잔류 허용량의 측정이 가능하고, 배양시간을 단축하면 소요시간을 4분 절약할 수 있게 되어, 시료 투입에서 최종값의 표시까지 21분이 소요되는 것으로 확인되었다.

$$y = \frac{a-b}{1+(x/c)^d} + b \quad (2)$$

where y : Optical density

x : concentration (ng/mL)

a : initial y value

b : final y value

c : center

d : power

Table 4 Parameter values of sigmoidal model for each incubation time

Incubation time, minutes (Bind-label-develop)	Sigmoidal model parameter			
	a	b	c	d
5-5-5	0.202	0.055	18.609	0.311
3-3-5	0.552	-0.349	68.477	0.069

3) 항체의 농도증가에 따른 바이오센서 성능

그림 5는 항체의 농도증가에 따른 바이오센서의 성능을 비교한 결과를 보여준다. 선행연구(Cho 등, 2006)에서 최적화된 항체농도(1차 항체 희석비 1: 4,000, 2차 항체 희석비 1: 1,000)와 2배로 높은 항체농도(1차 항체 희석비 1: 2,000, 2차 항체 희석비 1: 500)에 대한 센서의 성능을 비교한 결과를 보여준다. 그림 5에 표시된 값은 3회 반복 측정값의 평균이며, 측정값 간의 변이계수(CV)는 3.6% 이하인 것으로 나타났다.

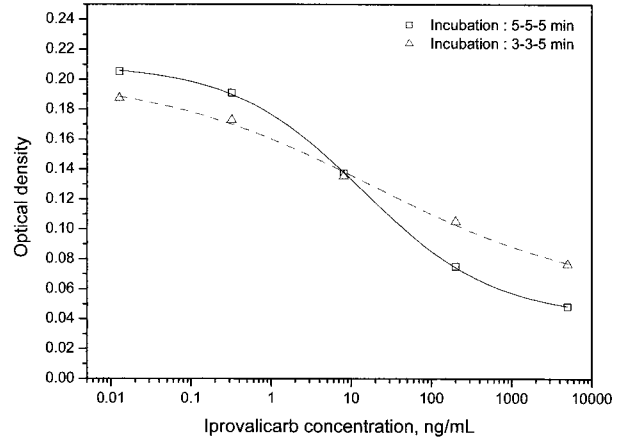


Fig. 4 Calibration curve of the biosensor with the incubation period for 15 and 11 minutes.

시그모이드 보정 모형의 결정계수는 항체 농도별로 각각 0.997과 0.993로 나타났다. 감도(OD-mL/ng)는 항체의 농도를 높일 경우 18.609에서 68.477로 증가하였음을 알 수 있다. 어느 농도의 항체를 사용해도 농약 잔류 허용량의 측정이 가능할 것으로 판단된다.

Table 5 Parameter values of sigmoidal model for each antibody dilution level

Antibody dilution (1st, 2nd)	Sigmoidal model parameter			
	a	b	c	d
1:4,000, 1:1,000	0.202	0.055	18.609	0.311
1:2,000, 1:500	0.552	-0.349	68.477	0.069

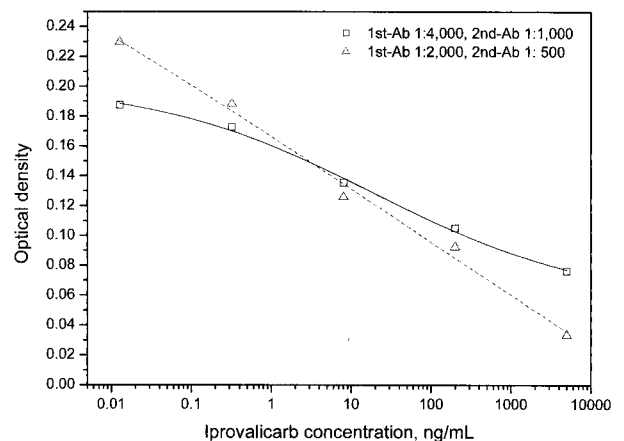


Fig. 5 Calibration curve of the biosensor with dilution of the rabbit D antiserum and the goat anti-rabbit IgG-HRP.

4) 항원 코팅된 큐벳의 사용가능 기간

그림 6은 항원 코팅된 큐벳의 사용가능 기간을 조사하기 위한 실험결과로서 가로축에는 경과된 날 수가 표시되었고,

세로축은 오차를 백분율로 나타낸다. 그림 6에 표시된 값은 3회 반복 측정값의 평균이며, 측정값 간의 변이계수(CV)는 5.5% 이하인 것으로 나타났다. 그림에서 보는 바와 같이 코팅 후 2일이 경과된 경우 1.2%의 오차를 보였고, 6일까지는 5% 정도, 7일 이후에는 10% 이상의 오차가 있었으며, 오차 범위 1% 이하의 사용가능 기간은 코팅 후 2일로 확인되었다.

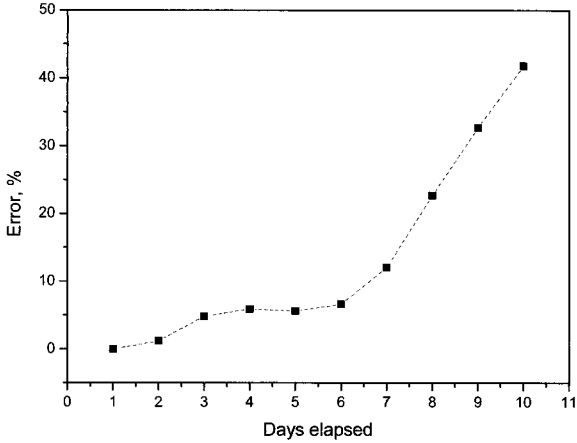


Fig. 6 Error according to the elapsed days of the coated cuvet.

나. 농산물 시료분석

그림 7은 감자와 양파 시료의 희석배수를 각각 100배와 20 배로 했을 때의 측정성능 실험결과이며, 선형 보정 모델식은 그림 7에 표시되어 있다. 결정계수는 감자와 양파 각각 0.992 와 0.985로 나타났다. 감도(OD-mL/ng)는 감자와 양파의 경우 각각 0.025로 0.032로 나타났다. 그림 7에 표시된 값은 3회 반복 측정값의 평균이며, 측정값 간의 변이계수(CV)는 3.3% 이하인 것으로 나타났다.

바이오센서와 보정 모델식을 이용하여 감자와 양파의 시료

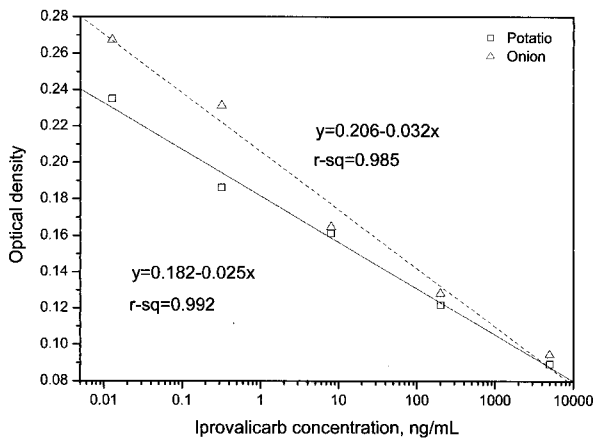


Fig. 7 The calibration curve of the biosensor with the vegetable extract.

를 분석한 결과와 HPLC를 이용한 분석 결과를 그림 8과 그림 9에 각각 표시하였다. 바이오센서를 이용한 분석값과 HPLC를 이용한 분석값과의 상관관계를 비교한 결과, 감자의 경우에는 0.996, 양파의 경우에는 0.993의 높은 상관계수를 얻었다. 따라서 본 연구에서 개발된 바이오센서를 이용할 경우, 농산물 시료에 잔류하는 살균제 이프로발리카브를 대형 분석기 수준으로 측정할 수 있는 것으로 판단된다.

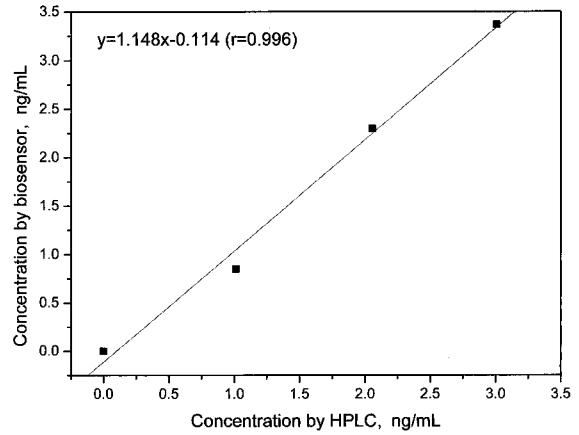


Fig. 8 Correlation between the concentration measured by the biosensor and that by HPLC for potatoes.

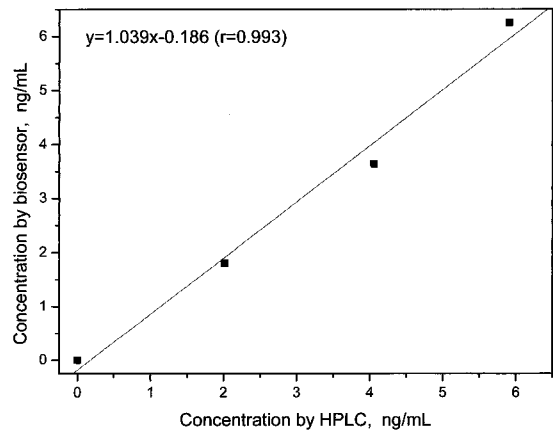


Fig. 9 Correlation between the concentration measured by the biosensor and that by HPLC for onions.

4. 결론

본 연구는 농산물에 잔류하는 살균제 이프로발리카브의 신속하고 정확한 검출이 가능한 바이오센서를 개발하기 위하여 수행되었으며 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

선행연구(Cho 등, 2006)에서 개발된 효소면역분석법을 활용하여 바이오센서를 제작하였고, 바이오센서 시료 이송펌프의 성능은 오차와 변이계수가 각각 4.3%와 4.6% 이하로 나

타났다. 배양시간을 15분에서 11분으로 단축하였을 때 측정 감도는 낮아지는 것으로 확인되었다. 항체의 농도를 2배 증가하였을 때 측정감도는 높아지는 것으로 확인되었다. 코팅 큐벳의 사용가능시간을 조사한 결과 1% 이하의 오차범위에서의 사용 가능기간은 코팅 후 2일로 나타났다.

농산물에 잔류하는 농약의 측정성능을 평가하기 위하여, 감자와 양파에 잔류하는 이프로발리카브의 농도를 측정할 수 있는 선형 보정 모델식을 구하였다. 바이오센서와 HPLC의 측정결과와 비교한 결과 각각 0.996과 0.993의 높은 상관관계를 보인 것으로 확인되었다. 바이오센서의 잔류농약 측정에 소요되는 시간은 큐벳의 항원코팅을 위한 준비와 시료 전처리 과정을 제외하고 21분으로 나타났다.

참고문헌

1. Cho, H. K., K. S. Kyung and E. Y. Lee. 2006. Enzyme immunoassay for rapid detection of the fungicide iprovalicarb residues. *J. of Biosystems Eng.* 31(6):535-540. (in Korean)
2. Lee, J. K. S. H. Park, E. Y. Lee, Y. J. Kim and K. S. Kyung. 2004. Development of an ELISA for the detection of the residues of the fungicide iprovalicarb. *J. Agric. Food Chem.* 52:6680-6686.
3. Lim, J. K. and H. K. Cho. 2005. Development of a biological reaction and measurement control system for rapid detection of the insecticide imidacloprid residues. *J. of Biosystems Eng.* 30(2):114-120. (In Korean)
4. Tomlin, C. D. S. 2003. *A World Compendium : The Pesticide Manual*. 13th ed. British Crop Protection Council Publications. UK. p. 580.