

나노-효소 복합체 기반 휴대용 잔류농약 검출용 바이오 센서 개발에 관한 연구 A Study on nano-enzyme complex based portable bio-sensor for agricultural chemical residues

*권원식, 류성윤, 이형철, #김수현

*W. S. Kwon, S. Y. Lyu, H. C. Lee, #S. H. Kim(soohyun@kaist.ac.kr)

한국과학기술원 기계공학과

Key words : fluorescence measurement, total internal reflection (TIR), agricultural chemical residues

1. 서론

최근 환경오염으로 인해 많은 수자원의 수질이 저하 되고, 대부분의 국민들이 수돗물에 대한 불신이 증가함에 따라, 국민의 삶의 질과 밀접한 관련이 있는 수질 오염 분석에 대한 요구가 증가하고 있다. 특히, 농작물에 대한 농약 사용으로 인한 잔류농약이 인체에 해를 끼치는 수질 오염원의 하나로 파악되며, 수질 환경기준 선진화에 따른 신규장비 및 현재의 미량 현장 검출 기술의 검출 한계를 극복할 수 있는 장비 보급이 필요한 실정이다.

농약은 병해충을 방제하는 데에 사용되는 화학물로서, 대부분의 농약은 사람에게 만성적으로 암이나 유전병을 유발할 수 있으며, 일부 농약은 독성이 매우 강하여 소량에 노출될지라도 인체에 큰 영향을 미칠 수 있다. 따라서 수질 측정 시 잔류농약 측정이 대단히 중요한 문제로 부상하고 있다.

기존의 잔류농약 분석 장치(GC, HPLC, GC-MS)는 여러 개의 단위 기기 및 장치로 구성되어 있으며, 대개의 경우 기기의 부피가 크고 중량이 무거워 이동이 쉽지 않기 때문에 실험실 내에서만 전문가에 의해 사용되고 있다. 이러한 고가의 수입 장비 이용에도 불구하고, 시료 전처리 과정과 결과를 분석하는데 많은 시간이 소요되고, 다양한 유해물질에 대해 개별적인 분석을 수행하기 때문에 많은 농약 성분을 신속하고 고감도로 검출 및 분석하는데 한계가 있다.

극미량의 잔류 농약을 정밀하게 측정하기 위해서는 나노미터 (nm) 영역의 계면에서 일어나는 현상을 고감도로 감지해야 한다.

형광법을 이용한 센서는 고민감도의 잔류 농약 검출을 가능하게 한다. 나노-효소 복합체(nano-enzyme complex)가 잔류농약 성분과 반응함에 따라 형광량이 변화하게 되는데, 이때 형광량의 변화를 통해 잔류농약의 농도를 알 수 있다.

형광법의 경우 외부 환경의 요인 보다는 형광 자체의 특성에 따라 그 성능이 좌우 되며, 극미량의 샘플에 대해서도 측정이 가능하다는 장점이 있다. 또한 형광을 이용하는 경우, 여러 성분의 다중 측정이 가능하며, 개발된 효소에 대해 다른 형광 물질 부착도 가능하여 향후 시스템 유연성이 높다. 하지만 다량의 샘플이 요구되며, 분석물인 형광 물질이 투입되어야 하므로 다소 복잡한 과정이 존재한다. 또한 극소량의 형광 변화를 측정하기 위해서는 여기광과 형광을 완전히 분리할 수 있는 시스템이 요구된다. 일반적으로 여기광과 형광을 분리하기 위해 이색거울이나 대역통과(bandpass) 필터를 이용하지만, 여기광을 완전히 차단할 수 없다는 문제점이 있다.

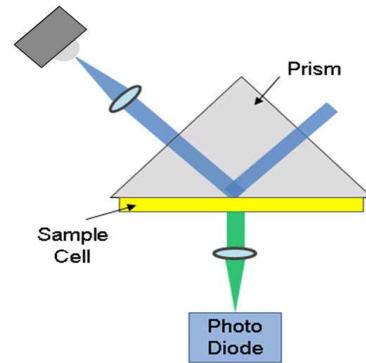


Fig. 1 Total internal reflection(Top), Schematic diagram of the fluorescence measuring system using TIR(Bottom).

본 연구에서는 프리즘의 내부전반사를 이용한 형광 측정 시스템을 설계함으로써 고민감도의 휴대용 잔류농약 검출 시스템을 개발 하였고, 다양한 농도의 농약에 대하여 검출 실험을 수행하였다.

2. 형광 측정 시스템 제작

그림 1은 전반사를 이용한 형광 검출 장치의 개념도를 나타낸다. LED 광원으로부터 프리즘에 입사된 여기광은 프리즘과 샘플의 계면에서 반사광과 굴절광을 발생시킨다. 이 때 여기광이 입계각보다 큰 각으로 계면에 입사할 경우 프리즘 내에서 내부 전반사(total internal reflection)가 발생하게 되고 샘플에는 굴절광 대신 에바네스цент파가 진행을 하게 된다. 에바네스цент파는 깊이 방향에 대하여 지수 함수적으로 감쇠를 하기 때문에 매질 계면 근처 수 백 nm 이내에 존재하게 되어, 샘플면에도 도포된 형광물질을 효과적으로 여기시킬 수 있다.

LED(480 nm)와 PD 및 프리즘을 이용하여 그림 2와 같이 형광 검출용 센서의 프로토타입을 제작하였다. 광원은 앞에서 설명한 바와 같이 일정한 각도를 가지고 샘플 플레이트 아래쪽에 위치하여 에바네스цент파를 유도하도록 장착되었으며, PD는 샘플 플레이트에 거의 밀착되어 위치함으로써 검출에서의 광량의 손실을 최소화 하였다. 또한 샘플 플레이트에 총 8개의 프리즘을 부착 가능하게 설계함으로써, 다양한 샘플에 대해 빠른 측정이 가능하도록 하였다.

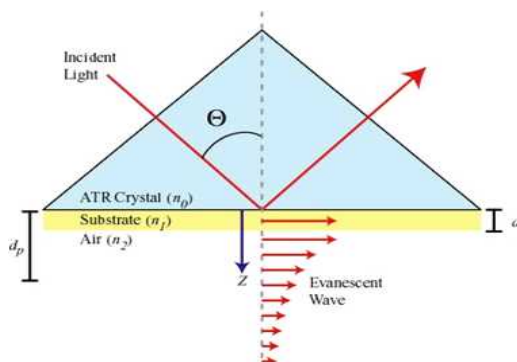


Fig. 2 Prototype of the fluorescence measuring sensor

4. Mathies, R.A., Peck, K. and Stryer, L., "Optimization of high-sensitivity fluorescence detection," *Anal. Chem.*, 62, 1786-1791,1990.

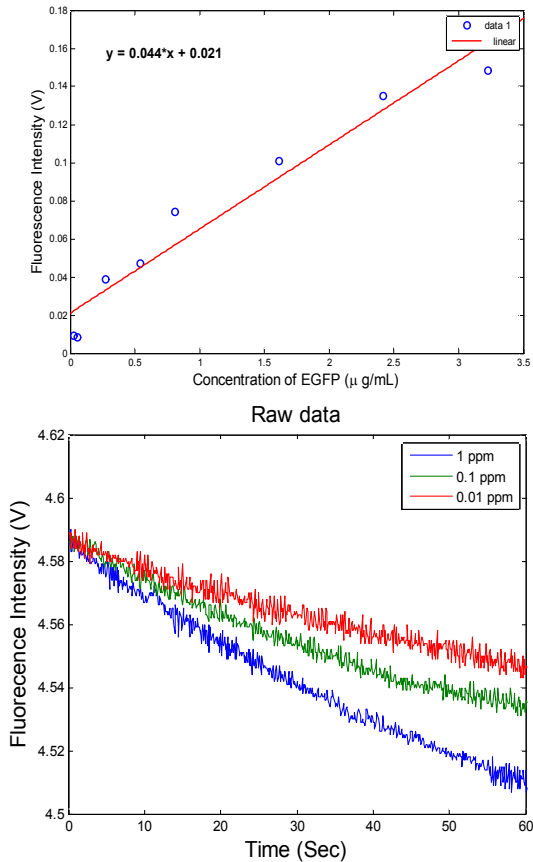


Fig. 3 Measured fluorescence intensity according to concentration of EGFP (Top), Fluorescence intensity change plot at 1 ppm, 0.1 ppm, 0.01 ppm of Diazinon 50 ul (Bottom)

3. 잔류 농약 검출 실험

EGFP는 녹색 형광 단백질로써 파장 465 nm의 빛에 여기 되어 파장 510 nm의 형광을 방출 한다. EGFP는 농약에 의해 AChE 효소 작용이 저해가 되며, 따라서 형광의 세기가 감소하게 된다. 그림3(top) 그래프로부터 형광단백질의 농도에 따라 형광량이 선형적으로 증가한다는 사실을 확인하였다. 그림 3(bottom)은 EGFP에 농약 종류 중 하나인 Diazino의 농도 1 ppm, 0.1 ppm, 0.01 ppm에 따른 형광량 세기 변화를 측정한 그래프이다. 각각의 데이터를 스케일링 하여 시작점을 동일하게 하였으며, 결과로부터 농도가 증가할수록 형광량의 변화량이 커짐을 확인하였다.

4. 결론

본 연구에서는 여기광과 형광을 효과적으로 분리할 수 있도록 프리즘의 전반사 형태의 형광 측정 시스템을 제안 하였으며, 실험을 통하여 잔류 농약(Diazino 50 um) 0.01 ppm 농도까지 형광감소를 측정함으로써 휴대용 잔류농약 검출 센서로서의 가능성을 확인 하였다. 보다 정확한 정량적인 측정을 위해서는 프리즘 면에 형광 단백질을 정확하고, 균일하게 도포하는 기술의 개선이 필요하다.

참고문헌

1. 박태정, 양민호, 이상엽, 김수현 "농약 검출을 위한 바이오센서 시스템 연구 및 그 응용," *KSBB Journal*, 24, 227-238, 2009.
2. L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, and B. Vieth "Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS?," *Mass Spectrometry. Rev.* 25, 838-865, 2006
3. W. E. Moemer and David P. Fromm, "Methods of single molecule fluorescence spectroscopy and microscopy," *Review of Sci. Ins.*, 74, 3597-3619, 2003.