

농약 검출을 위한 바이오센서 시스템 연구 및 그 응용

박태정¹ · 양민호¹ · 이상엽^{1,2*} · 김수현³

한국과학기술원 ¹생물공정연구센터, 시스템 및 합성생명공학연구센터, 바이오융합연구소, ²생명화학공학과 (BK21 프로그램), 바이오 및 뇌공학과, 생명과학과, 생물정보연구센터, ³기계공학과

Biosensor System for the Detection of Agrichemicals and Its Applications

Tae Jung Park¹, Min Ho Yang¹, Sang Yup Lee^{1,2*}, and Soo Hyun Kim³

¹BioProcess Engineering Research Center, Center for Systems & Synthetic Biotechnology, and Institute for the BioCentury, ²Department of Chemical & Biomolecular Engineering (BK21 program), Department of Bio & Brain Engineering, Department of Biological Sciences, and Bioinformatics Research Center, ³Department of Mechanical Engineering, KAIST, 335 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea.

Abstract In the recent years, some organic toxic chemicals were used for obtaining high-yield productivity in agriculture. The undegraded pesticides may remain in the agricultural foods through atmosphere, water, and soil and cause public health problems to environmental resources and human beings even at very low concentrations. Small amounts of pesticides can affect a central nervous system, resulting in immunogenic diseases, infertility problems, respiratory diseases and born marrow diseases, which can lead even to death. Monitoring of the environmental pesticide is one of the important issues for the human well-being. Several kinds of biosensors have been successfully applied to the detection of agrichemical toxicity. Also, few platforms for biocide detection have been definitely developed for the degradation and reaction of pesticides. Biochip and electrochemistry experiments involve immobilizing a receptor molecule on a solid substrate surface, and monitoring its interaction with an analyte in a sample solution. Furthermore, nanotechnology can be applied to make high-throughput analyses that are smaller, faster and sensitive than conventional assays. Some nanomaterials or nanofabricated surfaces can be coupled to biomolecules and used in antibody-based assays and enzymatic methods for pesticide residues. The operation procedure has become more convenient as it does not require labeling procedure. In this paper, we review the recent advances in agrichemical detection research and also describe the label-free biosensor for pesticides using various useful detection methods.

Keywords: agrichemical biosensor, pesticide detection, biomolecular interaction

서 론

농작물 수확에 있어서 농부들은 병충해를 방지하고 최대한 많은 양을 수확하기 위해 살균제, 제초제, 살충제와 같은 여러 가지 유기 독성 화합물들을 일정한 틀 없이 무작위로 사용하는 경우가 많다. '농약'이라 함은 수목 및 농림산물을 포함한 모든 농작물을 해하는 벌레, 균류, 세균, 바이러스, 잡초, 선충류, 설치류를 비롯하여 여러 해충으로 인한 피해

를 방지하기 위하여 사용되는 화학물질, 합성물질 또는 천연 물질로서 살균제, 제초제, 살충제와 농작물의 생리기능을 증진 또는 억제하는데 사용되는 생장조절제 및 약효를 증진시키는 성분을 가리키는 용어이다(1). 전 세계적으로 1,200가지 이상의 화학물질이 농약으로 등록되어 있고 매년 대략 250 만 톤이 살포되고 있으며, 땅 속의 잔류농약은 공기, 물, 그리고 토양을 통해 먹이사슬에 들어갈 것이다. 그리고 이것은 생태계, 조류, 포유류 뿐 만아니라 인류에게도 여러 건강상의 문제를 일으키는 원인이 된다. 농약은 만성적으로 암이나 유전병을 유발할 수 있으며, 골수병, 불임, 정신 분열, 면역질환, 호흡기 질환을 발생시킬 수도 있다. 또한, 다량 노출될 경우 동공축소, 구토, 근육강직, 현기증, 경련, 혼수

*Corresponding author

Tel: +82-42-350-3930, Fax: +82-42-350-8800

e-mail: leesy@kaist.ac.kr

등과 더 심한 경우 사망에 이를 수도 있다. 미국과 유럽의 경우, 이러한 문제에 대처하기 위해 새로운 법령을 적용하고 있다. 이 법령의 시행은 인간의 건강과 생태계에 좋지 않은 영향을 주는 물질의 존재를 감시하기 위한 확실한 환경 모니터링이 반드시 수반되어야 한다. 인간에게 물속에 존재하는 다른 여러 종류의 농약에 대한 허용치는 농작물의 종류에 따라 다소 차이가 있긴 하지만 0.01 ~ 50.0 ppm이다(2). 농약은 화학구조 또는 용도에 따라 몇 가지 종류로 분류할 수 있으며 이들의 화학적 특성은 곧 건강영향의 특성과 관련되어 있다. 지난 20년간 유기염소계 살충제 (aldrin, DDT, lindane 등)들은 환경에서 지속성이 낮게 영향을 주는 유기인계화합물 (malation, paraoxon, parathion 등)과 카바메이트계 (aldicarb, carbaryl 등) 살충제들로 교체되어 왔지만 이들은 높은 독성 때문에 심각한 위험성을 보이며 특히 농약 살포시 주변 토양 및 수질에 영향을 미쳐서 주변환경의 오염이 더욱 심각한 것으로 나타났다(3).

농약의 분석을 위해 일반적으로 기체크로마토그래피 (GC), 고압액체크로마토그래피 (HPLC), 또는 GC/MS, LC/MS와 ELISA 방법 등이 있다(4, 5). 이들은 고감도의 신뢰성이 있는 정확한 분석 방법이지만 고가의 장비와 전문적인 인력이 필요하다는 단점을 가지고 있다. 또한 시간이 오래 걸리고 복잡한 과정을 거치는 분석방법이기 때문에 현장 측정에 적합하지 않다. 그래서 농약의 분석을 위해 간단하고 편리한 대안으로 바이오센서 시스템을 사용하고자 하는 것이다. 바이오센서는 측정 가능한 신호를 얻기 위해 생물학적 성분 (효소, 전세포, 항체 등)과 전기적인 요소가 접목되어 있어서 강력한 크로마토그래피 분석방법들과 필적하지 않더라도, 이들은 빠르고 신뢰할 수 있는 분석을 제공할 수 있다. 이 장치들은 고가 장비를 사용하기 전에 사전 스크리닝에 아주 유용하게 이용될 수 있다. 지난 약 30년 간, 효소, 전세포, 항체 등을 사용하여 여러 가지 저렴하고 신속하게 농약검출이 가능한 바이오센서가 개발되어 왔다. 본 총설에서는 농약검출용 바이오센서의 다양한 양상을 살펴보고 주요 특징들을 서술하고자 한다.

가장 많은 연구가 진행된 효소로서 acetylcholinesterase (AChE)는 대부분의 살충농약 검출용 바이오센서로 사용되어져 왔다. 1950년대 초반에 농약 검출을 위해서 전위차계 검출방법이 채택되었고, 1980년대 중반에는 AChE의 저해작용에 기반한 농약 검출용 바이오센서의 구조가 처음으로 사용되었다. 이후 과학 기술의 급격한 변화는 유전자 조작이 이루어진 새로운 AChE를 도입하게 되었고 다른 효소들 또한 바이오센서의 개발에 사용되었다. AChE 반응에서 발생하는 전류측정 방식 바이오센서의 주요 결점은 높은 전압을 필요로 한다는 것이다. 이것은 효소에 의한 생성물, choline의 산화반응, 그리고 바이오센서의 안정성을 감소시키는 원인이 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 tetracyanoquinodimethane(6)와 같은 mediator 및 탄소 전극(7) 혹은 탄소나노튜브 (carbon nanotube; CNT)(8)와 같은 높은 전도성을 갖는 물질이 사용되어 졌다. 효소의 정제과정

을 피하고 비용을 줄이기 위해서 전세포가 변환기 (transducer) 표면에 직접 결합되기도 했다. 효소에 대한 저해작용을 기반으로 한 농약 측정의 주요한 한계는 비선택성이다. 살충농약 검출 바이오센서의 선택성을 개선하기 위하여, 항체가 인식 수용체 역할을 하는 immunosensor가 도입되었다. 바이오센서의 분석 효율을 개선하기 위해 potentiometry, amperometry, differential pulse voltammetry, piezoelectry, chemiluminescence, fluorescence, surface plasmon resonance (SPR) 등과 같은 여러 검출 방법들이 바이오센서 및 immunosensor와 결합되어졌다(9, 10). 바이오센서로서의 선택성과 생축매로서의 안정성은 주로 생축매를 변환기의 표면에 결합시키는 고정화 방법에 의해 제어되었다. 공유 결합 및 흡착과 같은 여러 고정화 방법들이 발전되어 왔으며, microfabrication 기술의 진보적 발전은 실제 샘플에서 농약 모니터링을 위하여 휴대가 간편하며, 조작이 쉽고, 값이 저렴한 환경 친화적인 바이오센서 칩과 스트립의 설계를 가능하게 했다. 살충농약 검출 바이오센서 기술이 극적으로 발전해 감에도 불구하고, 이것의 상품화는 아직도 걸음마 단계이며 이를 위해 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

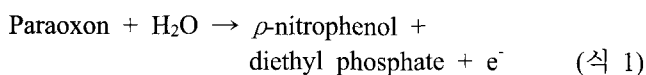
살충농약 검출 바이오센서는 농업, 식품산업, 의료분야에서도 아주 유용하다고 할 수 있다. 식품의 수출입업무에서, 빠른 응답을 갖는 휴대용 바이오센서나 키트는 신속한 검출에 상당히 편리하게 활용될 수 있고, 만약 바이오센서가 임상용 샘플 안에 존재하는 농약이나 독성물질을 선택적으로 검출할 수 있는 능력을 가지고 있다면, 의료 분야에서 진단과 치료를 위해 상당히 큰 이점을 가지고 활용될 것이다. 소형화된 센서 스트립이나 키트는 상당히 편리하게 적용될 수 있을 것이며, 특히, 생산단계에서의 품질 모니터링, 유통단계에서의 유통관리 및 판매자의 홍보, 그리고 일반 가정에서 매일 사용하는 수질 및 농수산물 식품의 확인을 위한 수단으로 적용이 가능할 것이다. 또한 잔류농약 검출을 관찰하는 정부기관 및 유통센터에서의 간단한 현장 검사에도 활용될 수 있을 것이다.

농약 검출용 바이오센서에 사용되어지는 효소와 그 특성

바이오센서의 선택성과 민감도는 생축매에 의해서 조절된다. 일반적으로 바이오센서에 사용되어지는 생축매는 효소(11, 12), 항체(9, 13), whole cell(14), 그리고 분자적으로 디자인된 고분자(15)와 같은 인공 수용체가 이용되어 지고 있다.

전기화학적 살충농약 검출 바이오센서에서는 주로 효소 반응의 저해 및 농약에 대한 가수분해를 이용한 두 가지 방법이 이용되어 왔다. 이들 접근방법 중에서 간소함과 사용가능한 효소가 많다는 장점 때문에 효소반응에 대한 저해작용에 기반을 둔 바이오센서가 널리 사용되어지고 있다. 하지만, 효소반응의 억제에 비해서 촉매 반응이 우수

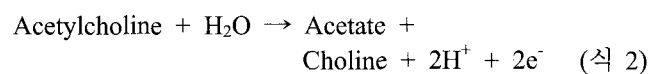
하고 빠르기 때문에 농약을 직접 가수분해하는 효소에 의한 방법 또한 바이오센서를 구현하기 위해 크게 각광 받고 있다(16). 살충농약 검출 바이오센서의 대부분은 효소 반응의 저해작용에 기반을 두고 설계되어 있다. AChE와 butyrylcholinesterase (BChE)는 살충농약 검출 바이오센서의 개발에 널리 사용되어진다(17). 효소반응의 저해작용은 활성의 감소를 나타나게 하는데 이는 샘플 안에 존재하는 저해제나 농약의 양에 반비례한다. 더 높은 감도를 가능하게 해주는 유기인산화합물 (OP) 농약에 대한 강한 효소 저해작용 때문에 대부분의 AChE에 기반한 바이오센서가 이용되어진다. 살충농약 검출 바이오센서에 사용되는 다른 효소로는 acetolactate synthase(18), acid phosphatase(19), alkaline phosphatase(20), ascorbate oxidase(14), choline oxidase (ChOx; 21), organophosphorus acid anhydrolase (OPAA; 22), tyrosinase(23) 등이 있다. 유기인계화합물 가수분해 효소 (organophosphorus hydrolase; OPH)는 OP의 분자를 가수분해하는데, 가수분해된 산물은 분광학적으로나 전기화학적으로 모니터링 될 수 있기 때문에 AChE 등의 대안으로 사용되어져 왔다(식 1). 유기인산 화합물은 OPH의 효소반응을 위한 기질로 직접 작용할 수 있기 때문에 신호 발생 속도가 OP의 농도에 정비례하여 농약 검출에 직접적으로 이용된다(12, 16, 24). OPAA는 유기인산화합물을 기질로서 직접 가수분해하는 효소로서 OPH의 반응과 유사하며 발색 및 형광, 그리고 전기화학적 검출에 이용된다(22). 지금까지 언급한 효소들은 단독으로 사용되어 지지만, 때때로 AChE와 ChOx와 같이 bienzyme이 사용되기도 했는데, 이 시스템의 경우 단일 효소 시스템보다 더 복잡하기 때문에 각 측정변수를 최적화시킬 필요가 있다(25-27). 또한, 농약은 bioluminescence 반응에서 주요한 효소인 luciferase의 활성을 억제할 수 있다. 반딧불이로부터 유래된 luciferase의 luminescence를 농약의 농도에 따라 처리하여 측정했는데, 농약의 농도는 bioluminescence에 반비례하여 나타났으며 24 ppb의 농도까지 민감도를 가지는 저해작용을 통해 농약이 검출될 수 있음을 확인하였다(28).



저해작용 기반의 바이오센서

OP와 카바메이트계 농약은 AChE와 BChE의 강력한 저해제로서, 효소 활성의 저해작용은 기질의 가수분해 반응을 매우 느리게 만드는 phosphoryl-enzyme complex와 같은 안정한 공유결합 중간체의 형성을 유도하는데, catalytic center에서 serine 잔기의 acetylation이 phosphorylation과 carbamylation과 유사하기 때문에 유기인산화합물과 카바메이트계 농약은 같은 방식으로 AChE 및 BChE와 반응할 수 있다(11, 17, 29). AChE 기반의 바이오센서에서 일반

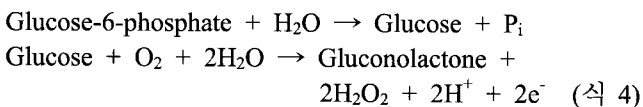
적으로 acetylthiocholine이 기질로 사용되어 진다. 촉매반응이 일어나는 동안 만들어진 thiocholine은 분광학적(30), 전류차적(31), 또는 전위차적 분석방법을 사용하여 모니터링 될 수 있다(식 2). 효소 활성은 농약의 농도에 반비례하게 나타나며, 농약 검출을 위한 cholinesterase sensor의 효소 기질로서 4-aminophenyl acetate를 사용할 수도 있다(32). 이 시스템은 전형적인 thiocholine보다 효소에 의해 만들어진 4-aminophenol의 산화반응을 통해 esterase의 활성을 측정하도록 했다. Sulfonyl urea는 acetolactate synthase (ALS)의 가역적 저해제이다. 이 저해반응에 대한 메커니즘을 이용하여 sulfometuron methyl (제초제) 검출을 위한 amperometric 바이오센서를 만들기 위해서 ALS는 styrylpyridinium 기를 가지는 polyvinyl alcohol의 광경화 고분자 안에 entrap되어 진다(18, 33). 고정화 된 ALS는 원래의 효소보다 더 안정하면서 저해작용이 고정화되지 않은 효소보다 더 높게 나타난다. Tyrosinase는 atrazin, diazinon, dichlorovs 등에 의해서 비가역적으로 억제 되어질 수 있는데, 카바메이트 농약 검출을 위하여 electropolymerized pyrrole/tyrosinase 코팅을 사용하여 chloroisopropylphenyl 카바메이트계 성분을 측정 한계 2 μM 까지 검출하였다(34). 또한, tyrosinase 전극이 graphite disc 전극의 표면에 효소를 직접 흡착시켜 만들어지기도 했는데, 세 종류의 카바메이트계 농약 (ziram, diram, zinc diethyldithiocarbamate)이 tyrosinase의 활성을 저해하여 amperometric 바이오센서의 측정 한계가 각각 0.074, 1.3, 그리고 1.7 μM 까지 검출되었다(35). 이후 점차 단일 효소기반의 바이오센서의 안정성과 민감도를 개선하기 위해서 *Drosophila melanogaster* AChE 단백질의 구조체를 분석한 후 돌연변이를 유도하여 본래의 성능이 개량된 효소가 사용되었다(36).



농약 검출을 위한 또다른 안정하고 다양한 방법으로서 multienzyme 기반의 바이오센서가 이용되었는데, 과산화수소의 생산 또는 산소의 소비를 측정하기 위해서 ChOx와 함께 AChE를 사용하였다. ChOx는 choline을 betaine과 과산화수소로 산화시킨다(식 3). 이 방법은 AChE와 함께 농약에 의해서 반응이 억제되는 첫 번째 효소반응 산물이 기질로서 사용된다. 살균제의 검출을 위한 또다른 bienzymatic amperometric 바이오센서가 보고되었다(37-39). Aldehyde dehydrogenase와 diaphorase는 PVA-SbQ layer에 coimmobilize되어 졌다. 그리고 carbon paste가 sputting된 Pt와 함께 screen-printed electrode (SPE) 위에 올려 졌다. Nabam과 zineb을 위한 bienzymatic amperometric 바이오센서의 검출한계는 각각 8, 9 ng/mL이었다(37, 38). AChE와 tyrosinase의 bienzymatic assay를 통해 paraoxon과 chlorpyrifos를 각각 5.2 ng/mL과 0.56 ng/mL까지 검출하였다(39).



OP와 카바메이트 농약은 또한 acid phosphatase (AP)의 촉매 활성을 가역적으로 억제할 수 있다. 그래서 AP는 buffer로 세척하여 다시 사용되어 질 수 있지만, AP 저해작용의 amperometric 검출은 bienzymatic system을 필요로 한다(식 4). Mazzei 등(19)은 AP와 GlcOx를 separate dialytic membrane 위에 고정하고, "O" ring을 사용하여 Pt 전극위에 놓여진 후 20분간 저해반응을 통해 malathion, parathion methyl, paraoxon의 측정 한계를 각각 3, 0.5, 5 ng/mL까지 검출하였다. 보통 저해반응을 이용한 바이오센서는 연속적인 측정이 제한되기 때문에 효소 활성이 쇠퇴하는 한계를 극복하고 농약을 보다 빠르고 적은 비용으로 측정하기 위해서 일회용 센서가 개발되고 있다(40, 41). Screen-printed 전극은 생촉매로서 AChE를 사용하고 carbon 및 Pt 등의 paste 안에 CNT를 사용하여 일회용 센서의 설계에 널리 사용되어 지고 있다(40). 이는 전가되는 전압을 감소시킴에 의해서 발생하는 electroactive impurity의 방해 효과를 피하고 작동 전압을 감소시키기 위함이다. Thick film technology를 사용하여 만들어진 바이오센서 strip이 보고되었다. 스트립 타입의 센서칩은 photolithographic conducting copper의 intergating, graphite-epoxy composite의 screen printing, 그리고 bifunctional reagent glutaraldehyde를 cross-linking하여 고정된 효소에 의해 만들어 졌다. paraoxon과 carbofuran을 위한 일회용 바이오센서의 측정 한계는 $10^{-9} \sim 10^{-11}$ 까지였다(42). 최근에 bienzymatic system (AChE/ChOx)을 사용한 일회용 CNT 기반의 screen-printed 바이오센서가 보고되었다(41). Methyl parathion에 의한 저해작용 후에 0.05 μM 의 측정 한계를 보여주었는데, 이는 그들의 기질과 CNT의 넓은 표면에서 일어나는 AChE/ChOx 촉매 반응으로부터 생산되어지는 과산화수소의 산화환원 반응을 촉진시키기 위한 CNT의 촉매 활성때문이라고 여겨진다.



미세유체채널을 이용하여 손쉽고 빠르게 자동화하여 측정할 수 있는 시스템이 도입되기도 한다. 예를 들어, flow injection analysis (FIA)는 빠른 측정을 위한 매우 편리하고 자동화된 방법이다. 넓은 선형 측정 범위를 갖는 효소 기반의 바이오센서를 사용하였다. Kindervator 등(43)은 glutaraldehyde를 사용하여 자성이 있는 입자에 AChE와 ChOx를 고정화 시키는 것에 의한 exchangeable enzyme 반응기를 제안했다. 자기장 하에서 자성이 있는 입자가 반응기 안에서 쉽고 완벽하게 활성이 없어진 효소와 교환되어 질 수 있다. Paraoxon의 검출을 위해서 고분자 안에 AChE를 고정시키고 연속적인 flow system을 결합한 FIA 바이오센서는 1.0 nM (0.3 ng/mL)의 측정 한계를 나타냈

다(inhibition % = 10%). 1.0 mM의 2-pyridinealdoxime methiodide를 사용하여 저해작용을 재활성화시키는 것을 포함하여 샘플당 분석 시간은 1시간이었다(32). 최근에는 multi-walled CNT (MWNT)를 이용하고 균일한 구조와 MWNT의 분산을 통해 AChE를 glutaraldehyde로 chitosan에 공유결합 시킴에 의해 OP계 살충제를 검출하였다(44). 키토산의 생체 친화성과 MWNT의 고유한 전기 전도성은 10%의 저해작용에서 1 nM의 측정한계를 가지고 1.5%에서 80 nM의 살충제를 검출할 수 있었다. Bucur 등(45)은 flow injection analysis를 사용하여 농약 검출을 하기 위해서 wild type *D. melanogaster* 유래의 AChE와 돌연변이 E69W의 AChE를 사용했다(36). 돌연변이 AChE는 omethoate 검출에서 wild type (1×10^{-6} M)보다 낮은 측정한계를 보여줬다(1×10^{-7} M). 즉, 민감도가 약 10배 향상된 것이다.

한편, luciferase는 제초제, 살충제, 살균제에 의해서 활성이 억제되어지는 또 다른 효소로서 bioluminescent cyanobacteria 내에 존재한다. 생물체내의 발광물질인 luciferin이 발광세포 내에서 ATP에 의해 활성화되어 산화 luciferin이 되면서 luciferase에 의해 발광에너지 (luminescence)로 전환시키게 된다. 살충농약 검출 저해작용에 luminescence를 측정하여 atrazine, propazine, simazine, paraquat, 그리고 glyphosate의 검출에 이용되어 진다(46).

가수분해 기반의 농약 검출용 바이오센서

저해작용 기반의 바이오센서가 민감함에도 불구하고, 그들은 선택성이 낮고 초기 효소의 활성 측정, 저해제 처리, 잔류효소의 활성 측정, 그리고 세척 등과 같은 여러 단계의 반응을 거치기 때문에 분석이 느리고 그 과정이 번거롭다. 직접 농약을 기질로 사용하여 가수분해하는 바이오센서는 더 간편하게 이용할 수 있다. OPH는 대부분의 유기인산화합물 농약 (paraoxon, parathion, coumaphos, diazinon 등)과 화학적 작용제 안의 에스테르를 가수분해 한다(47). 예를 들어, paraoxon이나 parathion 등은 OPH에 의해 anodic oxidation에 의해서 측정될 수 있는 *p*-nitrophenol로 가수분해 된다. Rainina 등(48)은 OP의 직접 검출을 위한 미생물 바이오센서를 발전시키기 위해서 pH전극에 고정화된 OPH에 발현하는 재조합 대장균을 사용했다. Mulchandani 등(7)은 OPH를 재조합 대장균에서 정제하여 반응시 proton 방출에 의해 OP 농약의 가수분해를 촉진하는 전위차계 바이오센서를 개발하기 위해서 pH전극에 고정화했다. 이때 발생하는 proton 및 전자의 발생량은 가수분해된 기질의 양에 비례하기 때문에 pH 전극 뿐만 아니라, 전기화학센서로도 쉽게 이용할 수 있다. 특히, OPH의 기질 특이성을 바꾸거나(49) 활성을 증가시킨 돌연변이(50, 51)를 이용하여 OP계 화합물을 분해하는 보고가 있었으므로 이를 활용한다면 전기화학 바이오센서로서의 응용에서 민감도 향상, 기질 특이적 반응 유도, 그리고 반응시간 단축 등의 효과를 얻을 수 있을 것이다.

이와는 별개로, 가수분해 효소인 OPH 외에도 OP계 화합물 탈수분해효소(OPAA) 역시 OP계 화합물의 검출을 위한 효소 반응에 이용하기 위해 기질 특이성이나 활성을 높인 돌연변이를 이용하여 활용된 예가 보고된 바 있다(52, 53).

효소반응을 전기화학적으로 이용한 바이오센서

전기화학적 방법으로 농약을 검출하기 위해 주로 사용되는 방법은 금속 및 탄소 혹은 CNT를 기반으로 전극이 있는 칩이나 스트립을 만들고 AChE나 OPH와 같은 효소를 고정화시켜서 이용하게 된다. AChE 및 OPH 효소의 반응은 아래 수식과 같이 전기신호의 발생이 저해 혹은 증가되는 결과를 나타낸다. 저해반응의 경우, 전자발생이 감소(반비례)하고 가수분해반응의 경우 전자발생이 증가(비례)하는 반응으로 잔류농약의 함량을 모니터링할 수 있다. 즉, 전자의 발생량에 대한 측정이 가능하기 때문에 우리가 눈으로 확인할 수 있는 수치로의 전환이 용이하다. 예를 들어 혈당측정기와 같은 전기화학센서 시스템의 소형화와 휴대화에 대한 도약적 발전으로 인해 일반 사용자도 쉽게 눈으로 확인이 가능한 시스템으로의 도입이 가능하게 되었다.

Amperometric FIA 바이오센서는 aminopropyl control pore glass 비드위에 OPH를 고정화 시키는 것에 의해서 amperometric 응답을 통해 paraoxon과 methyl-parathion을 측정한계 20 nM까지 검출하였다(16). Enzymatic membrane 이 코팅된 screen-printed 전극으로 구성된 electrochemical cell과 flow cell 및 potentiostat이 결합되어 민감하고, 빠르고 작고 저렴한 amperometric microflow injection electrochemical 바이오센서가 보고되었다(54). 전해질로서 potassium hexacyanoferrate(III)는 뚜렷하고 빠르고 재연성이 있는 전기적 신호를 생성하기 위해 사용되어 졌다. 이외에도 살충농약 검출 바이오센서의 다른 보고서들은 리뷰에서 찾아볼 수 있다(12, 17, 55).

CNT의 경우에는 반도체적 전기특성을 가지고 있기 때문에, 트랜지스터 소자칩에 적용할 수 있는 바이오센서 시스템이 가능함을 보여주는 보고들이 계속 나오고 있다(56, 57). CNT 기반의 방법중에서도 특히, 이온성 액체를 이용하여 CNT에 OPH를 고정화시킴으로서 금 전극을 통해 전기화학적 신호를 검출하여 paraoxon을 2 μ M까지 검출한 보고가 있었다(8). 여러 가지 이온성 액체를 이용하여 각각의 경우 다른 민감도를 나타내는 소자가 만들어졌으며 다른 CNT 소자에 비해 재현성이 높게 나타나는 특징을 가지고 있다.

살충농약 검출 immunosensors

항체는 구조적으로 유사하거나 동족의 화합물이 존재하더라도 특정한 항원을 인식할 수 있다. 다양한 물질의 확인이 가능하고 정량적으로 나타낼 수 있으므로 연구용이나 진단용으로 응용가능성이 높은 물질이라고 할 수 있다. 그래서 항체는 대부분의 immunoassay와 immunosensor

에서 사용되고 있다. 필요에 따라서 polyclonal antibody와 monoclonal antibody가 사용되며, 특히 polyclonal antibody의 경우 높은 친화도를 기대할 수 있다. 하지만, 이들의 단점 중의 하나는 샘플의 채취에서부터 결과를 도출하기까지 오랜 반응시간이 필요하다는 것이다. Immunosensor에서는 부분적으로 이들의 결점을 피할 수 있는 장치로서 고안하여 활용되어 진다.

Immunosensor는 보통 센서 표면에 고정화된 항체와 immunochemical 반응이 일어났을 때 물리적 신호를 발생할 수 있는 transducer 시스템으로 구성되어져 있다(58). 일반적인 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법이 항체나 항원의 단일층 고정화 방법에 의한 immunosensor로 발전하였다(59). 경제적이면서 assay 단계가 줄어들었고 고정화되어진 agent의 손실 없이 분석이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 향후 immunosensor의 발전에서 고려되어야 할 또 다른 주요 쟁점은 샘플의 고정화를 위한 방법을 어떻게 진행하느냐에 달려 있다고 해도 과언이 아니다. Immunosensor에서 ng/mL 수준의 분석대상에 대한 전처리 과정 (filtration, extraction, cleanup, preconcentration 등)이 요구되어지는데 보통 유기 용매를 사용하거나 SPE와 결합시켜 이루어진다(60). 많은 경우에 바이오센서는 유기 용매 안에서 수행하게 되는데 이 때 샘플에 안정적이어야 하며 flow immunosystem내에서의 항원-항체 결합이 고농도의 유기용매 안에서 샘플의 안정성과 용해성이 입증되어 졌다(61, 62). 항체는 촉매작용으로 활성화 되지 않기 때문에 항원-항체 반응의 직접적인 검출은 충분한 감도를 제공하지 못한다. 항원 혹은 항체의 labeling을 통해 immunosensor의 감도를 개선시키기 위해 일반적으로 효소 (horseradish peroxidase, glucose oxidase, alkaline phosphatase 등), 형광 물질 혹은 전기화학적으로 활성을 갖는 물질이 사용되어 진다. Immunosensor는 electrochemical analysis, fluorescence assay, enzyme reaction, piezoelectric detection, SPR analysis 등과 같이 다양한 검출 시스템과 함께 조화를 이루면서 사용되고 있다.

광학적 immunosensors

광학적 immunosensor는 항원-항체 반응에 의해서 유도된 빛의 흡수 또는 방출을 순간적인 wave transducer를 통해 측정하는 것에 기초를 둔다. 제초제인 atrazine을 측정 한계 0.05 ng/mL까지 검출하기 위해 Biacore AB (스웨덴)에서 제조한 상업용 SPR 장치인 BIAcore[®]를 사용했다(63). 제초제인 trifluralin의 검출을 위한 optical waveguide lightmode spectroscopy를 사용하는 label-free immunosensor가 보고되었는데(64), $2 \times 10^{-7} \sim 3 \times 10^{-5}$ ng/mL의 농도 범위 안에서의 검출되었다. Avidin-biotin conjugation의 방법으로 각각의 항체를 칩 표면 위에 고정화시키고 atrazine, simazine, 그리고 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)를 검출한 예도 있다(65). 또한, micro-cantilever 역시 농약 검출을 위해 사용

되어 졌다. DDT-bovine serum albumin (BSA) conjugate는 thiol 기를 갖는 self-assembled monolayer (SAM) 방법을 통해 cantilever 옆면에 코팅된 금 표면에 고정화되고 indirect competitive immunoassay를 통해 일어난 cantilever deflection (shift of the resonant frequency)은 DDT의 농도를 정량적으로 나타냈다(66).

빠른 검출과 자동화 및 휴대화 기능성의 관점에서 several flow injection analysis 바이오센서가 보고되어 졌다. Gonzalez-Martinez 등은 assay sensitivity에 특별한 주의를 요하는 carbaryl 검출을 위한 FIA immunosensor와 sensor 재생 특성을 보고했다(67). mouse monoclonal anti-carbaryl 항체를 사용하여 효소 conjugation과 형광을 통해 검출되었다. 칩 표면에서의 direct immunoassay를 사용하여 검출한계 26 pg/mL과 반응시간 11분의 민감하고 빠른 측정치를 얻어냈다. 반면 용액내에서는 측정한계 284 pg/mL, 응답시간은 17분이었다.

3개의 서로 다른 analyte (atrazine, alachlor, pentachlorophenol, 그리고 2,4-D, simazine, isoproturon 등) 두 세트가 각각 성공적으로 측정되어 졌다. 그리고 측정한계 또한 단일 analyte immunoassay와 비슷했다(68). 또 다른 연구에서는, 실제 시료에 존재하는 3가지의 다른 오염물 (atrazine, isoproturon, estrone)을 동시에 측정하였다. Atrazine, isoproturon, 그리고 estrone의 측정한계는 각각 0.155, 0.046, 그리고 0.084 ng/mL이었고, 물속에 존재하는 제초제인 propanil은 어떠한 preconcentration 없이 나노그램이하의 수준 (0.6 pg/mL) 까지 검출되었다(69).

전기화학적 immunosensor

전기화학적 immunosensor 중에서 piezoelectric immunosensor가 있는데 센서 표면은 보통 항체나 항원으로 고정화되어 항원의 농도에 의해 측정치 결과가 좌우되는 경우가 많다. 농약에 관한 초기 연구 동안에 piezoelectric immunosensor 응답은 센서 표면을 염색하여 모니터링되었다(70). 이후 살충농약 검출을 위한 리간드는 센서의 표면에 고정화되고 항원-항체 반응이 유도된 후에 competitive assay를 이용하여 분자량이 큰 항체를 최종적으로 사용하여 행해졌다(58). Horacek와 Skladal은 piezoelectric crystal은 gold 표면위에 thiol 기를 이용한 SAM을 사용하였고 flow-through cell에 놓여진 후 바이오센서로 이용되었다(71). 그리고 piezoelectric crystal위에서 단일클론 항체의 binding affinity가 확인되었는데 측정한계 0.24 ng/mL을 25분내에 측정 완료하였다. 또 다른 piezoelectric immunosensor에서 BSA-atrazine을 silan으로 기능화된 piezoelectric crystal 위에 공유결합을 통해 고정화시키고 flow cell안에 놓여진 후 competitive immunoassay를 통해 바이오센서로 이용되었다(72). 이때, atrazine의 측정한계는 0.025와 1.5 ng/mL이었고 측정시간은 indirect와 direct immunoassay에서는 각각 10분, 25분 이하였다(73).

광학적인 방법과 piezoelectric immunosensor system이 살균제, 살충제에 대해서 요구되어지는 측정한계를 얻을 수 있는 능력이 있다고 하더라도 실험적으로 복잡한 과정을 거쳐야 하고 분석장비의 크기가 커서 휴대성을 나타내기에는 아직까지 연구가 많이 진행되어야 한다. 환경오염물질의 검출을 위한 대부분의 전위차계 바이오센서는 proton의 소멸과 발생을 촉진시키기 위한 효소를 사용한다. 그러나 농약 검출을 위한 전위차계 immunosensor에 대한 보고는 그리 많지 않다. 제초제인 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid를 50 ng/mL까지 검출했다고 보고가 있는데(74), 이 방법은 graphite 전극위에 고정된 항체를 이용하여 농약을 검출하였다. 특히, 금 평판 전극에 고정된 항체는 안정하게 고정화되어 있으며 40 mM HCl을 사용하여 쉽게 재사용할 수 있다. 전기화학적 방법들중에서 널리 사용되는 amperometric 측정방법은 전형적으로 효소를 기반으로 행해진다(25). 효소는 촉매적으로 전기화학적으로 non-active analyte를 working 전극에서 산화 또는 환원할 수 있는 물질로 바꿀 수 있다. 발생되어지는 전류는 electroactive species의 농도에 반비례한다. 다시 말해 non-electroactive 효소 기질 농도에 비례한다(65).

비표지식 electrochemical immunosensor는 항체가 표면에 고정화된 금 나노입자를 CNT의 표면에 Nafion으로 고정시켰다(75). Paraoxon과 immunocomplex를 형성한 후에, -0.03 mV의 인가전압에서 직접적으로 정량할 수 있었다. 또한 screen-printed 전극이 일회용 immunosensor에 사용되었다(76, 77). Screen-printed 전극의 표면에 항체를 공유결합을 통해 고정화시킨 후 indirect competitive immunoassay를 통해 2,4-D를 측정한계 0.1 ng/mL까지 검출할 수 있었다(77). 또한나 의 예로서, chlorosulfuron의 선형 측정을 0.01~1 ng/mL 까지 검출한 또 다른 amperometric immunosensor가 보고되었다(78). Screen-printed 전극을 사용한 atrazine immunosensor의 개발을 위해 재조합 단일 사슬 항체 (scFv) fragment가 수용체로서 사용되었다(76).

전세포 및 조직 기반의 살충농약 검출 바이오센서

전세포 (whole cell) 바이오센서에서 효소는 천연의 생물학적 환경에 존재할 때 안정하다는 강점과 효소 정제의 비용을 감소시킬 수 있다는 잇점을 이용한 것이다. 감자내에 풍부한 polyphenol oxidase (PPO)의 활성은 atrazine에 의해서 억제될 수 있다. 그래서 PPO 전세포 바이오센서는 감자 조직의 얇은 slice를 산소전극 표면에 고정화시키고, catechol을 PPO의 기질로 사용하여 측정 한계 10 μM까지 검출하였다(79). 또한, 오이 조직 (tissue)은 산소전극 표면에서 teflon과 nylon membrane 사이에 끼워진 후, ascorbate oxidase의 활성 억제를 기반으로 ethyl paraoxon의 측정을 위한 amperometric 바이오센서로서 설계되었다(14). 측정한계 1 μg/mL와 시료 한 개당 측정시간은 10분이었다. 식물

세포처럼 미생물의 세포 또한 전세포 바이오센서로 사용된다. OP를 가수분해할 수 있는 재조합 대장균 세포는 PVA column안에 가둬두고 pH 전극과 결합되었다(48). OPH에 의해서 OP 농약이 가수분해되고 이로 인해 방출되어지는 proton은 농약의 농도와 비례하게 나타난다. Paraoxon의 선형 측정 범위는 0.25 ~ 2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.001 ~ 1.00 mM)이었다. 그리고 동결건조된 OPH는 4°C, phosphate 버퍼내에서 2달 이상 안정성을 나타냈다.

Luciferase는 제초제에 의해서 활성이 억제되어지는 또 다른 효소이다. 이 효소는 bioluminescent cyanobacteria *Synechosystis* 세포내에 존재한다. 그리고 살충농약 검출 저해작용에 luminescence를 측정하여 atrazine, propazine, simazine, paraquat, 그리고 glyphosate의 검출에 이용되었다(46). 이런 형태의 luminescent cell과 optical transducer의 interfacing은 낮은 비용의 sensor개발을 위해 사용되어진다. 제초제는 가역적으로 광합성 전자 이동 (photosynthetic electron transfer; PET) 사슬을 억제할 수 있다. 두 가지의 photosystem 중 반응의 중심인 photosystem-II의 주요 구성 요소는 제초제의 억제가 일어날 수 있는 D1과 D2 단백질이다. D1 단백질에서 저해작용은 mediator로서 diaminodurene을 사용하는 것에 의해 전달되는 광전류를 통해 모니터링되는 원리를 이용하여 광합성 cyanobacteria 기반의 바이오센서가 개발되어졌으며 atrazine의 측정한계는 1 ng/mL이었다(80).

세포표면발현을 이용한 전세포 바이오센서

대장균을 이용하여 OHP를 과량발현시키고 이를 전세포 바이오센서 및 농약 성분의 독성 제거에 이용하기도 하였다(81-83). W. Chen 그룹의 경우, 효모 및 그람 음성균들의 세포표면에 OPH를 발현시키는 세포표면발현 (cell surface display) 방법을 이용하여 이를 전세포 반응을 통해 OP계 농약을 분해하는 수단으로 활용하였고(82-85), 대장균의 periplasmic space까지 OPH를 분비시키는 방법으로 paraoxon의 생분해 속도를 향상시키는 데 활용된 보고도 있었다(81). 즉, 효소를 세포표면에 발현하고 있는 세포 자체를 OP계 농약 분해에 이용하면서 이를 역으로 바이오센서로도 활용할 수 있다.

적외선 분광법 및 라만 분광법을 이용한 농약의 직접적인 검출

바이오센서와는 달리 이외에도 크로마토그래피 방법을 대체할 만한 기술로서 분광 화학센서 (vibrational chemical sensor)가 이용되기도 한다. 적외선 (infrared; IR) 분광법 (IR spectroscopy)과 라만 분광법 (raman spectroscopy)이 그것인데, 특정 농약은 각각의 wavenumber에 따라 나타나는 peak의 intensity에서 검출 대상의 농도를 알 수 있는 형태로서, 특히, raman spectrum을 이용해서 농약을 정량적으로

검출하는 연구들이 진행되어 왔었다(86-89). 살충농약과 살균제 성분을 검출하기 위한 시도가 1978년에 보고(86)된 이후, 최근에는 특히 FT-Raman spectroscopy를 이용하여 OP계 화합물을 검출한 보고가 잇따르고 있다(87-89). IR과 raman을 동시에 사용하여 신뢰도를 높이는 연구가 진행되기도 했다(90-92). 라만 분광법 중에서도 최근에는 표면 증강 라만 분광법 (surface-enhanced raman spectroscopy; SERS)을 통해 농약의 검출한계를 높이는 시도들이 보고되고 있다(93, 94). 하지만, 전기화학센서 시스템에 비해 휴대성이 떨어지는 관계로 향후 휴대형 소형 분광기의 개발이 필요한 분야이기도 하다.

바이오센서 구현을 위한 시료 전처리 방법

실제 시료는 target analyte와 함께 여러 방해 물질을 포함하고 있는데 이러한 방해작용을 효과적으로 줄이기 위한 대부분의 방법은 (i) 선택적인 추출법과 (ii) 방해 물질을 일정한 농도이하로 희석하는 것이다. 문헌에 따르면, 살충제 뿐만 아니라 중금속이나 hypochloride와 같은 다른 물질에 의해서도 AChE의 활성은 억제되어 진다(95). Cu^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} (96)과 같은 중금속은 non-competitive AChE 저해작용을 일으킬 수 있다. 또한, immunoassay에서 주요 방해 물질은 azide와 같은 음이온과 Ca^{2+} 와 같은 양이온이다. 물속이나 토양 속에 존재하는 부식질 (humic acid)의 경우는 비특이적으로 항체에 결합하여 analyte의 특정한 결합을 방해하게 된다. 또한, 음식물의 색상은 광학 센서에서 방해 요인으로 작용할 수 있으며, 단백질이나 지방 등도 비특이적 결합으로 인해 바이오센서 신호의 방해요인으로 작용할 수 있다(97). 보통 농약은 acetone, ethyl acetate 혹은 methanol과 같은 유기 용매를 사용하여 샘플로부터 추출된다. 하지만, immunoassay의 경우에는 다양한 용매에 대하여 어느 정도까지는 내성을 가지고 있기 때문에 초임계유체 추출을 통해 선택적인 추출이 이루어진다(98, 99).

요 약

현재까지의 농약 검출용 바이오센서는 화학 센서, immunoassay, 화학 테스트 키트와 같은 다른 잘 알려진 분석 방법들과 경쟁적으로 연구되어 지고 있다. 바이오센서가 농약을 증명하는 간단하고 저렴한 방법으로 chromatography 방법들을 대체할 잠재력을 가지고 있음에도 불구하고 정확한 정량적 분석 방법이 아직도 미비하다. 안정하고 강력한 바이오센서의 발전을 위해서 유전자 조작을 이용한 효소 개량을 통해 좀 더 민감하고 반응속도가 빠른 생촉매와 특이성이 높은 항체의 개발이 요구되고 있다. 바이오센서의 안정성 개선과 transducer 표면으로부터의 빠른 신호 전달을 위해 새로운 고정화 방법이 탐구되어야 한다. 비록 약간

의 방법들이 시료의 전처리를 필요로 하지 않을 지라도 센서의 안정성은 또 다른 개념으로 접근해야 한다. 그래서 현장 적용을 위해, 보다 간편한 시료의 전처리과정 혹은 직접적인 분석 방식이 동일시되어 개선되어야 한다. 향상된 fabrication 기술을 이용한 소형화 센서 혹은 일회용 키트의 개발은 개인용 및 산업용, 의약용 등의 여러 분야에서 실시시간으로 분석이 가능하게 할 것이다. 실제 샘플의 빠르고 자동화 및 소형화된 분석 시스템의 구축을 위해 장차 매우 선택적인 다중 검출 바이오센서의 설계에 더 많은 중점을 둘 필요가 있다. 앞으로 잔류농약 검출을 위한 휴대형 바이오센서의 개발과 상용화를 위해서, 무엇보다 현재의 GC, LC (혹은 GC/MS, LC/MS) 분석을 위해 이루어지고 있는 샘플 전처리 방법의 경우, 다량의 샘플로부터 유기용매 등을 이용한 추출방법으로 진행되고 있기 때문에 샘플 전처리를 간소화하고 간단한 측정방법으로 전체의 측정결과를 대변할 수 있는 방안을 구축하고 잔류농약의 법적 허용기준과 적용이 가능한 방법을 찾아내는 노력이 절실히 요구되는 상황이다.

감 사

본 논문은 지식경제부의 IT신성장동력 핵심기술 개발사업 IT융합분야 연구과제와 환경부의 차세대 핵심환경기술 개발사업 측정분석장비·장치분야 연구과제에 의해 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 4월 10일, 게재승인 : 2009년 6월 2일

REFERENCES

- Jiménez, A. M. and M. J. Navas (1997), Chemiluminescent methods in agro-chemical analysis, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **27**, 291-305.
- Kim, J. S. (2005), MRLs for pesticides in foods, *Korea Food & Drug Administration*, Seoul, Korea.
- Lee, Y.-S., B.-H. Lee, and J.-H. Chun (1995), A study on the remaining concentration and toxicity of phosphates and carbamate insecticides by enzyme inhibition reactions in Nonsan, Chungnam, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **37**, 1755-1791.
- Alder, L., K. Greulich, G. Kempe, and B. Vieth (2006), Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS?, *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 838-865.
- Nunes, G. S., I. A. Toscano, and D. Barceló (1998), Analysis of pesticides in food and environmental samples by enzyme-linked immunosorbent assays, *Trends Anal. Chem.* **17**, 79-87.
- Pandey, P. C., R. W. Aston, and H. H. Weetall (1995), Tetracyanoquinodimethane mediated glucose sensor based on a self-assembling alkanethiol/phospholipid bilayer, *Biosens. Bioelectron.* **10**, 669-674.
- Mulchandani, A., P. Mulchandani, and W. Chen (1999), Amperometric thick-film strip electrodes for monitoring organophosphate nerve agents based on immobilized organophosphorus hydrolase, *Anal. Chem.* **71**, 2246-2249.
- Choi, B. G., H. Park, T. J. Park, D. H. Kim, S. Y. Lee, and W. H. Hong (2009), Development of the electrochemical biosensor for organophosphate chemicals using CNT/ ionic liquid bucky gel electrode, *Electrochem. Commun.* **11**, 672-675.
- Hock, B., A. Dankwardt, K. Kramer, and A. Marx (1995), Immunochemical techniques : Antibody production for pesticide analysis. A review, *Anal. Chim. Acta* **311**, 393-405.
- Killard, A. J., L. Micheli, K. Grennan, M. Franek, V. Kolar, D. Moscone, I. Palchetti, and M. R. Smyth (2001), Amperometric separation-free immunosensor for real-time environmental monitoring, *Anal. Chim. Acta* **427**, 173-180.
- Xu, S., A. Wu, H. Chen, Y. Xie, Y. Xu, L. Zhang, J. Li, and D. Zhang (2007), Production of a novel recombinant *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase for detection of organophosphate and carbamate insecticide residues, *Biomol. Eng.* **24**, 253-261.
- Mulchandani, A., W. Chen, P. Mulchandani, J. Wang, and K. R. Rogers (2001), Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides, *Biosens. Bioelectron.* **16**, 225-230.
- Kandimalla, V. K., N. S. Neeta, N. G. Karanth, M. S. Thakur, K. R. Roshini, B. E. A. Rani, A. Pasha, and N. G. K. Karanth (2004), Regeneration of ethyl parathion antibodies for repeated use in immunosensor: a study on dissociation of antigens from antibodies, *Biosens. Bioelectron.* **20**, 903-906.
- Rekha, K., M. D. Gouda, M. S. Thakur, and N. G. Karanth (2000), Ascorbate oxidase based amperometric biosensor for organophosphorous pesticide monitoring, *Biosens. Bioelectron.* **15**, 499-502.
- Jenkins, A. L., R. Yin, and J. L. Jensen (2001), Molecularly imprinted polymer sensors for pesticide and insecticide detection in water, *Analyst* **126**, 798-802.
- Mulchandani, P., W. Chen, and A. Mulchandani (2001), Flow injection amperometric enzyme biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents, *Environ. Sci. Technol.* **35**, 2562-2565.
- Trojanowicz M. (2002), Determination of pesticides using electrochemical enzymatic biosensors, *Electroanalysis* **14**, 1311-1328.

18. Marty, J. L., N. Mionetto, T. Noguier, F. Ortega, and C. Roux (1993), Enzyme sensors for the detection of pesticides, *Biosens. Bioelectron.* **8**, 273-280.
19. Mazzei, F., F. Botre, and C. Botre (1996), Acid phosphatase/glucose oxidase-based biosensors for the determination of pesticides, *Anal. Chim. Acta* **336**, 67-75.
20. Ayyagari, M., S. Kametkar, R. Pande, K. A. Marx, J. Akkara, and D. L. Kaplan (1995), Chemiluminescence-based inhibition kinetics of alkaline phosphatase in the development of a pesticide biosensor, *Biotechnol. Prog.* **11**, 699-703.
21. Cremisini, C., A. D. Sario, J. Mela, R. Pilloton, and G. Paleschi (1995), Evaluation of the use of free and immobilised acetylcholinesterase for paraoxon detection with an amperometric choline oxidase based biosensor. *Anal. Chim. Acta* **311**, 273-280.
22. Zheng, J., C. A. Constantine, L. Zhao, V. K. Rastogi, T.-C. Cheng, J. J. DeFrank, and R. M. Leblanc (2005), Molecular interaction between organophosphorus acid anhydrolase and diisopropylfluorophosphate, *Biomacromolecules* **6**, 1555-1560.
23. Everett W. R. and G. A. Rechnitz (1998), Mediated bioelectrocatalytic determination of organophosphorus pesticides with a tyrosinase-based oxygen biosensor, *Anal. Chem.* **70**, 807-810.
24. Dave, K. I., C. E. Miller, and J. R. Wild (1993), Characterization of organophosphorous hydrolases and the genetic manipulation of the phosphotriesterases from *Pseudomonas diminuta*, *Chem. Biol. Interact.* **87**, 55-68.
25. Mitchell, K. M. (2004), Acetylcholine and choline amperometric enzyme sensors characterized *in vitro* and *in vivo*, *Anal. Chem.* **76**, 1098-1106.
26. Kok, F. N. and V. Hasirci (2004), Determination of binary pesticide mixtures by an acetylcholinesterase-cholineoxidase biosensor, *Biosens. Bioelectron.* **19**, 661-665.
27. Montensinos, T., S. P. Munguia, F. Valdez, and J. L. Marty (2001), Disposable cholinesterase biosensor for the detection of pesticides in water-miscible organic solvents, *Anal. Chim. Acta* **431**, 231-237.
28. Trajkovska, S., K. Tosheska, J. J. Aaron, F. Spirovski, and Z. Zdravkovski (2005), Bioluminescence determination of enzyme activity of firefly luciferase in the presence of pesticides, *Luminescence* **20**, 192-196.
29. Lotti, M. (1995), Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation, *Chin. Chem.* **41**, 1814-1818.
30. Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres, J. R., and R. M. Featherstone (1961), A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
31. Jeanty G. and J. L. Marty (1994), Detection of paraoxon by continuous flow system based enzyme sensor, *Biosens. Bioelectron.* **13**, 213-218.
32. la Rosa, C. F. Pariente, L. Hernandez, and E. Lorenzo (1993), Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with an acetylcholinesterase amperometric biosensor using 4-aminophenyl acetate as substrate, *Anal. Chim. Acta* **295**, 273-282.
33. Seki, A., F. Ortega, and J. L. Marty (1996), Enzyme sensor for the detection of herbicides inhibiting acetolactate synthase, *Anal. Lett.* **29**, 1259-1271.
34. Besombes, J., S. Cosnier, P. Labbe, and G. Reverdy (1995), A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides, *Anal. Chim. Acta* **311**, 255-263.
35. Pérez Pita, M. T., A. J. Reviejo, F. J. M. de Villena, and J. M. Pingarron (1997), Amperometric selective biosensing of dimethyl- and diethyldithiocarbamates based on inhibition processes in a medium of reversed micelles, *Anal. Chim. Acta* **340**, 89-97.
36. Boublik, Y., P. Saint-Aguet, A. Lougarre, M. Arnaud, F. Villatte, S. Estrada-Mondaca, and D. Fournier (2002), Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues, *Protein Eng.* **15**, 43-50.
37. Noguier, T., A. Gradinaru, A. Cincu, and J. L. Marty (1999), A new disposable biosensor for the accurate and sensitive detection of ethylenebis (dithiocarbamate) fungicides, *Anal. Lett.* **32**, 1723-1738.
38. Noguier, T., B. Leca, G. Jeanty, and J. L. Marty (1999), Biosensors based on enzyme inhibition : detection of organophosphorus and carbamate insecticides and dithiocarbamate fungicides, *Field Anal. Chem. Tech.* **3**, 171-178.
39. Andreescu, S., A. Avramescu, C. Bala, V. Magearu, and J.-L. Marty (2002), Detection of organophosphorus insecticides with immobilized acetylcholinesterase-comparative study of two enzyme sensors, *Anal. Bioanal. Chem.* **374**, 39-45.
40. Gogol, E. V., G. A. Evtugyn, J. L. Marty, H. C. Budnikov, and V. G. Winter (2000), Amperometric biosensors based on Nafion coated screen-printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors, *Talanta* **53**, 379-389.
41. Lin, Y., F. Lu, and J. Wang (2004), Disposable carbon nanotube modified screen-printed biosensor for amperometric detection of organophosphorus pesticides and nerve agents, *Electroanalysis* **16**, 145-149.
42. Sirvent, M. A., A. Merkoci, and S. Alegret (2001), Pesticide determination in tap water and juice samples using disposable amperometric biosensors made using thick-film technology, *Anal. Chim. Acta* **442**, 35-44.
43. Kindervater, R., W. Künnecke, and R. D. Schimid (1990), Exchangeable immobilized reactor for enzyme

- inhibition tests in flow-injection analysis using a magnetic device. Determination of pesticides in drinking water, *Anal. Chim. Acta* **234**, 113-117.
44. Kandimalla, V. B. and H. X. Ju (2006), Binding of acetylcholinesterase to multiwall carbon nanotube-cross-linked chitosan composite for flow-injection amperometric detection of an organophosphorus insecticide, *Chem. Eur. J.* **12**, 1074-1080.
45. Bucur, B., M. Dondoi, A. Danet, and J. L. Marty (2005), Insecticide identification using a flow injection analysis system with biosensors based on various cholinesterases. *Anal. Chim. Acta* **539**, 195-201.
46. Shao, C. Y., C. J. Howe, A. J. R. Porter, and L. A. Glover (2002), Novel cyanobacterial biosensor for detection of herbicides. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5026-5033.
47. Karns, J. S., M. T. Muldoon, W. W. Mulbury, M. Derbyshire, and P. C. Kearn (1987), Use of microorganisms and microbial systems in the degradation of pesticide, *ACS Symp. Ser.* **334**, 157-170.
48. Rainina, E. I, E. N. Efremenco, S. D. Varfolomeyev, A. L. Simonian, and J. F. Wild (1996), The development of a new biosensor based on recombinant *E. coli* for the direct detection of organophosphorus neurotoxins, *Biosens. Bioelectron.* **11**, 991-1000.
49. Cho, C. M., A. Mulchandani, and W. Chen (2004), Altering the substrate specificity of organophosphorus hydrolase for enhanced hydrolysis of chlorpyrifos, *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4681-4685.
50. Cho, C. M., A. Mulchandani, and W. Chen (2006), Functional analysis of organophosphorus hydrolase variants with high degradation activity towards organophosphate pesticides, *Protein Eng. Des. Sel.* **19**, 99-105.
51. Yang, H., P. D. Carr, S. Y. McLoughlin, J. W. Liu, I. Horne, X. Qiu, C. M. J. Jeffries, R. J. Russell, J. G. Oakeshott, and D. L. Ollis (2003), Evolution of an organophosphate-degrading enzyme: a comparison of natural and directed evolution, *Protein Eng.* **16**, 135-145.
52. Irene Horne, Xinghui Qiu, David L. Ollis, Robyn J. Russell, and John G. Oakeshott (2006), Functional effects of amino acid substitutions within the large binding pocket of the phosphotriesterase OpdA from *Agrobacterium* sp. P230, *FEMS Microbiol. Lett.* **259**, 187-194.
53. Hill, C. M., F. Wu, T.-C. Cheng, J. J. DeFrank, and F. M. Raushel (2000), Substrate and stereochemical specificity of the organophosphorus acid anhydrolase from *Alteromonas* sp. JD6.5 toward *p*-nitrophenyl phosphotriesters, *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* **10**, 1285-1288.
54. Neufeld, T., I. Eshkenazi, E. Cohen, and J. Rishpon (2000), A micro flow injection electrochemical biosensor for organophosphorus pesticides, *Biosens. Bioelectron.* **15**, 323-329.
55. Jaffrezic-Renault, N. (2001), New trends in biosensors for organophosphorus pesticides, *Sensors* **1**, 60-74.
56. Im, H., X.-J. Huang, B. Gu, and Y.-K. Choi (2007), A dielectric-modulated field-effect transistor for biosensing, *Nat. Nanotechnol.* **2**, 430-434.
57. Martinez, M. T., Y.-C. Tseng, N. Ormategui, I. Loinaz, R. Eritja, and J. Bokor (2009), Label-free DNA biosensors based on functionalized carbon nanotube field effect transistors, *Nano Lett.* **9**, 530-536.
58. Meulenberg, E. P., W. H. Mulder, and P. G. Stocks (1995), Immunoassays for pesticides. *Environ. Sci. Tech.* **29**, 553-561.
59. Puchades, R. and A. Maquieira (1996), Recent developments in flow injection immunoanalysis, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **26**, 195-218.
60. Sawyer, L. D., B. M. McMahon, W. M. Newsome, and G. A. Parker (1990), in *Pesticide and Industrial Chemical Residues*, 15th ed., AOAC : Champaign, Illinois.
61. Kröger, S., S. J. Setford, and A. P. F. Turner (1998), Immunosensor for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in aqueous/organic solvent soil extracts, *Anal. Chem.* **70**, 5047-5053.
62. Penalva, J., R. Puchades, and A. Maquieira (1999), Analytical properties of immunosensors working in organic media. *Anal. Chem.* **71**, 3862-3872.
63. Minunni, M., P. Skladal, and M. Mascini (1994), A piezoelectric quartz crystal biosensor for atrazine, *Life. Chem. Rep.* **11**, 391-398.
64. Székács, A., N. Trummerb, N. Adányi, M. Váradí, and I. Szendrő (2003), Development of a non-labeled immunosensor for the herbicide trifluralin via optical waveguide lightmode spectroscopic detection, *Anal. Chim. Acta* **487**, 31-42.
65. Zeravik, J., T. Ruzgas, and M. Fránek (2003), A highly sensitive flow-through amperometric immunosensor based on the peroxidase chip and enzyme-channeling principle, *Biosens. Bioelectron.* **18**, 1321-1327.
66. Alvarez, M., A. Calle, J. Tamayo, L. M. Lechuga, A. Abad, and A. Montoya (2003), Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT, *Biosens. Bioelectron.* **18**, 649-653.
67. González-Martínez, M. A., S. Morais, R. Puchades, A. Maquieira, A. Abad, and A. Montoya (1997), Monoclonal antibody-based flow-through immunosensor for analysis of carbaryl, *Anal. Chem.* **69**, 2812-2818.
68. Barzen, C., A. Grecht, and G. Gauglitz (2002), Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 289-295.
69. Txchmelak, J., G. Proll, and G. Gauglitz (2004),

- Ultra-sensitive fully automatied immunoassay for detection of propanil in aqueous samples: steps of progress toward sub-nanogram per liter detection, *Anal. Bioanal. Chem.* **379**, 1004-1012.
70. Guilbault, G. G., B. Hock, and R. Schmid (1992), A piezoelectric immunobiosensor for atrazine in drinking water. *Biosens. Bioelectron.* **7**, 411-419.
 71. Horáček, J. and P. Skládal (1997), Improved direct piezoelectric biosensors operating in liquid solution for the competitive label-free immunoassay of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, *Anal. Chim. Acta* **347**, 43-50.
 72. Steegborn, C. and P. Skládal (1997), Construction and characterization of the direct piezoelectric immunosensor for atrazine operating in solution, *Biosens. Bioelectron.* **12**, 19-27.
 73. Příbyl, J., M. Hepel, J. Halámečka, and P. Skláda (2003), Development of piezoelectric immunosensors for competitive and direct determination of atrazine, *Sens. Actuat. B* **91**, 333-341.
 74. Dzantiev, B. B., A. V. Zherdev, M. F. Yulaev, R. A. Sitdikov, N. M. Dmitrieva, and I. Y. Moreva (1996), Electrochemical immunosensors for determination of the pesticides 2,4-dichlorophenoxyacetic and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acids, *Biosens. Bioelectron.* **11**, 179-185.
 75. Hu, S. Q., J. W. Xie, Q. H. Xu, K. T. Rong, G. L. Shen, and R. Q. Yu (2003), A label-free electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles for detection of paraoxon, *Talanta* **61**, 769-777.
 76. Grennan, K., G. Strachan, A. J. Porter, A. J. Killard, and M. R. Smyth (2003), Atrazine analysis using an amperometric immunosensor based on single-chain antibody fragments and regeneration-free multi-calibrant measurement, *Anal. Chim. Acta* **500**, 287-298.
 77. Kaláb, T. and P. Skládal (1995), A disposable amperometric immnosensor for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, *Anal. Chim. Acta* **304**, 361-368.
 78. Dzantiev, B. B., E. V. Yazynina, A. V. Zherdev, Y. V. Plekhanova, A. N. Reshetiv, S. C. Chang, and C. J. McNeil (2004), Determination of the herbicide chlorsulfuron by amperometric sensor based on separation-free bienzyme immunoassay, *Sens. Actuat. B* **98**, 254-261.
 79. Massei, F., F. Botré, G. Lorenti, G. Simonetti, F. Porcelli, G. Scibona, and C. Botré (1995), Plant tissue electrode for the determination of atrazine, *Anal. Chim. Acta* **316**, 79-82.
 80. Preuss, M. and A. H. Halt (1995), Mediated herbicide inhibition in a PET biosensor, *Anal. Chem.* **67**, 1940-1949.
 81. Choi, S. S., S. H. Seo, D. G. Kang, H. J. Cha, and S. H. Yeom (2006), Enhancement of paraoxon biodegradation rate from recombinant *Escherichia coli* catalyst for bioremediation, *유기물자원화* **14**, 110-116.
 82. Mulchandani, A., P. Mulchandani, I. Kaneva, and W. Chen (1998), Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents using recombinant *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorus hydrolase. 1. Potentiometric microbial electrode, *Anal. Chem.* **70**, 4140-4145.
 83. Richins, R. D., I. Kaneva, A. Mulchandani, and W. Chen (1997), Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase, *Nat. Biotechnol.* **15**, 984-987.
 84. Takayama, K., S. Suye, K. Kuroda, M. Ueda, T. Kitaguchi, K. Tsuchiyama, T. Fukuda, W. Chen, and A. Mulchandani (2006), Surface display of organophosphorus hydrolase on *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Prog.* **22**, 939-943.
 85. Yang, C., N. Cai, M. Dong, H. Jiang, J. Li, C. Qiao, A. Mulchandani, and W. Chen (2007), Surface display of MPH on *Pseudomonas putida* JS444 using ice nucleation protein and its application in detoxification of organophosphates, *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 30-37.
 86. Thibeau, R. J., L. V. Haverbeke, and C. W. Brown (1978), Detection of water pollutants by laser excited resonance Raman spectroscopy; pesticides & fungicides, *Appl. Spectrosc.* **32**, 98-100.
 87. Skoulika, S. G., C. A. Georgiou, and M. G. Polissiou (1999), Quantitative determination of fenthion in pesticide formulations by FT-Raman spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* **53**, 1470-1474.
 88. Skoulika, S. G., C. A. Georgiou, and M. G. Polissiou (2000), Rapid quantitative analysis of organophosphorus pesticide formulations by FT-Raman spectroscopy, *Internet J. Vib. Spec.* **4**, 3.
 89. Quintas, G., S. Garrigues, and M. de la Guardia (2004), FT-Raman spectrometry determination of Malathion in pesticide formulations, *Talanta* **63**, 345-350.
 90. Tanner, P. A. and K.-H. Leung (1996), Spectral interpretation and qualitative analysis of organophosphorus pesticides using FT-Raman & FT-IR spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* **50**, 565-571.
 91. Armenta, S., G. Quintas, S. Garrigues, and M. de la Guardia (2004), Determination of cyromazine in pesticide commercial formulations by vibrational spectrometric procedures, *Anal. Chim. Acta* **524**, 257-264.
 92. Armenta, S., S. Garrigues, and M. de la Guardia (2007), Determination of iprodione in agrochemicals by IR & Raman spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 2887-2894.
 93. Alak, A. M. and T. Vo-Dinh (1987), Surface-enhanced Raman spectrometry of organophosphorus chemical

- agents, *Anal. Chem.* **59**, 2149-2153.
94. Lee, D., S. Lee, G. H. Seong, J. Choo, E. K. Lee, D.-G. Gwon, and S. Lee (2006), Quantitative analysis of methyl parathion pesticides in a polydimethylsiloxane microfluidic channel using confocal surface-enhanced raman spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* **60**, 373-377.
95. Soldatkin, A. P., D. V. Gorchkoh, C. Martelet, and N. Jaffrezi-Renault (1997), New enzyme potentiometric sensor for hypochlorite species detection, *Sens. Actuat. B* **43**, 99-104.
96. Stoycheva, M. (2002), Electrochemical evaluation of the kinetic parameters of a heterogeneous enzyme reaction in presence of metal ions. *Electroanalysis* **14**, 923-927.
97. Nugent, P. (1992), in *Emerging Strategies for Pesticide Analysis* (T. Cairns and J. Sherma, eds), CRC Press, Boca Raton, Florida.
98. Hill, A. S. J. V. Mei, C. Yin, B. S. Ferguson, and J. H. Skerritt (1991), Determination of the insect growth regulator methoprene in wheat grain and milling fractions using an enzyme immunoassay, *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1882-1886.
99. King, J. W. and K. S. Nam (1996), in *Residue Analysis in Food Safety* (R. C. Beier and L. H. Stanker, eds), *ACS Symposium Series* **621**, American Chemical Society, Washington.