

담체 고정화 효소 반응기를 이용한 Histamine의 전기화학적 측정

지정윤¹ · 전연희¹ · 김미라^{2*}

¹경북대학교 식품영양학과, ²경북대학교 식품영양학과, 장수생활과학연구소

Amperometric Determination of Histamine using Immobilized Enzyme Reactors with Different Carriers

Jung Youn Ji¹, Yeon Hee Jeon¹ and Mee Ra Kim^{2*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Dept. of Food Science and Nutrition, Center for Beautiful Aging, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

Histamine is a kind of primary biogenic amine arising from the decarboxylation of the amino acid L-histidine. The toxicology of histamine and its occurrence and formation in foods are especially emphasized in fermented foods. In this study, the biosensor for detection of histamine with functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) was developed. We also searched for an appropriate insoluble substrate to immobilize the enzyme. The developed biosensor showed a detection limit of 0.1 μ M hydrogen peroxide. The enzyme reactor was prepared with diamine oxidase immobilized on insoluble carriers including CNBr-activated sepharose 4B, calcium alginate, and controlled pore size glass beads. The coupling efficiency of CNBr-activated sepharose 4B, calcium alginate, and controlled pore size glass beads were 48.5%, 40.3%, and 51.0%, respectively. In addition, the response currents on histamine with each immobilized enzyme reactor prepared with CNBr-activated sepharose 4B, calcium alginate, and controlled pore size glass beads were 120 nA, 110 nA, and 140 nA at 100 μ M of histamine concentration, respectively. Therefore, it is suggested that controlled pore size glass beads are the best carriers for immobilizing diamine oxidase to detect histamine in this biosensor.

Key words : Biosensor, MWCNT, histamine, carrier.

서론

식품 중 histamine은 주로 단백질을 함유한 식품의 부패나 발효·숙성 과정에서 탈탄산효소 활성을 가진 미생물에 의해 생성되는 저분자의 질소화합물인 biogenic amine의 가장 대표적인 물질로 알려져 있다. Histamine은 스트레스나 염증, 알레르기 반응 시에 체내에서 합성되는 것 이외에 식품으로부터 체내로 유입될 수 있는데, 인간의 장관에서 흡수의 효율성은 떨어지지만 다량으로 유입되면 독성을 나타낼 수 있다(Ten *et al* 1990). 식품 섭취로 인한 histamine의 독성 증상은 대부분 고등어나 참치, 콩치, 정어리 등의 생선을 섭취하였을 때 나타나며, 발효식품에도 histamine을 포함한 다량의 biogenic amine이 함유되어 있음이 보고되고 있다(Chae *et al* 2005, Eom *et al* 2006, Shalaby AR 1996, Taylor & Eitenmiller 1986).

Histamine 분석에는 gas chromatography와 thin-layer chroma-

tography, capillary electrophoretic method 등의 기기를 이용한 분석법이 자주 이용되고 있으며, 식품공전에 제시된 high performance liquid chromatography가 가장 보편적으로 이용되고 있다. 그러나 기존의 방법들은 복잡한 전처리를 요구하며 분석에 장시간이 소요되므로 간단한 전처리와 신속한 분석이 가능한 방법 개발에 대한 연구들이 수행되고 있으며, 그 일환으로 효소를 이용하여 대상 물질을 측정하는 바이오센서 개발에 대한 연구들이 다수 보고되고 있다(Botre *et al* 1993, Ji & Kim 2011, Karube *et al* 1979, 1980).

대상 물질 측정에 이용되는 효소의 안정화 방법에는 크게 네 가지가 있는데, 저장 혹은 반응 물질에 안정화 물질인 유기용매 혹은 염을 첨가하는 방법, glutaraldehyde로 가교화하여 화학적으로 단백질을 변화시키는 방법, 불용성 담체에 고정화시키는 방법, 그리고 단백질 공학으로 아미노산 배열을 바꾸는 방법 등이 있다. 이 중 불용성 담체에 고정화시키는 방법은 효소의 안정성이 증가되고, 효소의 재사용이 가능할 뿐만 아니라 연속적으로 사용이 가능한 장점을 가지고 있으며, flow injection analysis(FIA) system에 적용하기에도 적합한

* Corresponding author : Mee Ra Kim, Tel: +82-53-950-6233, Fax: +82-53-950-6229, E-mail: meerak@knu.ac.kr

효소안정화 방법이다. 또한 생성물과 효소를 분리하여 사용할 수 있어 생성물의 정제가 간편해 경제성을 높일 수 있다는 이점도 있다(Ahn *et al* 1997, Karchalski-Katzir & Kraemer 2000, Suh *et al* 2000).

따라서 본 연구에서는 diamine oxidase를 여러 종류의 불용성 담체에 고정화한 효소반응기를 이용하여 기질인 histamine이 분해되며, 생성되는 과산화수소를 전기화학적 방법으로 측정함으로써 histamine 함량을 측정하고자 하였으며 (Fig. 1), 이때 multi-walled carbon nanotubes(MWCNT)를 기능화하여 이용한 전극 및 diamine oxidase 고정화에 적합한 불용성 담체에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기구

과산화수소 측정용 전극을 제조하기 위하여 MWCNT(C-tube 100)는 CNT Co. LTD(Incheon, Korea)에서 구입하였고, glassy carbon electrode(GCE, CHI 104)는 CH Instruments (Austin, USA)로부터 구입하였으며, Ag/AgCl reference electrode(K0260)는 Princeton Applied Research(Oak Ridge, USA)에서 구입하였다. Diamine oxidase(EC 1.4.3.6, from porcine kidney)와 histamine, bovine serum albumin(BSA)는 Sigma(St Louis, USA)로부터 구입하였다. 효소 고정화를 위하여 glutaraldehyde, CNBr-activated sepharose 4B, calcium alginate, aminopropyl glass beads(500Å, 200-400 mesh average pore size)은 Sigma로부터 구입하였다. 전기화학반응을 측정하기 위해서 Potentiostat/galvanostat(model 273A, EG&G, USA)를 이용하였다.

2. MWCNT의 기능화

MWCNT를 기능화하기 위해 Santhosh *et al*(2006)와 Kim *et al*(2010)의 방법을 수정하여 아민화하였다. MWCNT 5 g

을 60% nitric acid 100 mL와 혼합하여 초음파 처리하고 65°C에서 24시간 환류시킨 후 polycarbonate membrane으로 여과하였다. 이를 증류수로 세척하고 60°C에서 15시간 동안 건조시킨 후 thionyl chloride와 혼합하였다. 65°C에서 24시간 동안 환류한 후 tetrahydrofuran(THF)로 여러 차례 세척한 후 건조시켰다. THF에 poly(ethylene glycol)bis(3-aminopropyl)를 용해시킨 다음 앞에서 건조시킨 MWCNT를 첨가하여 60°C에서 24시간 동안 환류하고, 여과, 분리하여 진공건조기에서 건조하였다.

3. 과산화수소 측정용 전극의 제작

Glassy carbon electrode(GCE)의 표면에 앞서 기능화한 MWCNT를 분사하여 고르게 부착시키고 Prussian blue film을 접착시켜 과산화수소 측정용 전극을 제작하였다(Karyakin *et al* 1994, Kim *et al* 2010). 기능화한 MWCNT 200 mg과 dimethylformamide 5 mL를 혼합하여 1시간 동안 초음파 처리한 후 5시간 정도 유발에서 저어 분산시킨 다음 GCE 표면에 분사하여 12시간 이상 건조하였다. 여기에 2 mM potassium ferricyanide와 2 mM iron chloride, 0.1 M potassium chloride를 1 mM hydrochloric acid에 용해한 용액을 -0.1~1.0 V, scan rate 50 mV로 30회 cyclic voltammetry 처리한 전기적 중합법을 이용하여 Prussian blue film을 전극에 입힌 후 실온에서 12시간 이상 건조하였다.

4. 효소고정화 및 효소반응기 제작

Diamine oxidase는 다음 3가지 방법을 이용하여 고정하였다(Ji & Kim 2011). 먼저 CNBr-activated sepharose 4B를 이용하여 효소를 고정화하였다. 즉, glass filter에 CNBr-activated sepharose 4B 0.2 g을 넣은 후 1 mM HCl 1 L를 사용하여 CNBr-activated sepharose 4B를 서서히 swelling시키면서 세척하였다. Diamine oxidase 15 units와 1 mL coupling buffer (pH 8.5)를 실온에서 1시간 동안 혼합한 후 4°C에서 12시간 교반시켰다. 효소가 고정화된 beads는 0.1 M Tris-HCl(pH 8.0)로 세척하고, 여과되지 않은 beads는 0.1 M Tris-HCl buffer와 혼합하여 2시간 동안 정치시켰다. 이를 0.1 M acetate buffer (pH 4.0)와 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 세척하였다.

또한 calcium alginate를 이용하여 효소를 고정화하였다. 즉, 4% calcium alginate solution 0.5 mL에 diamine oxidase 15 units를 첨가하여 10분간 혼합한 후 10분간 정치하였다. 이를 0.2 M CaCl₂ solution 35 mL에 소량씩 떨어뜨려, 생성된 투명 beads를 CaCl₂ 용액에서 30분간 경화시켰다. 생성된 효소 beads를 glass filter로 여과하여 증류수로 세척한 후 건조시켰다. 이를 0.25% poly-L-lysine solution(pH 7.0) 20 mL에 넣어 10분간 부유시키고 증류수로 다시 세척하여 건조시켰다.

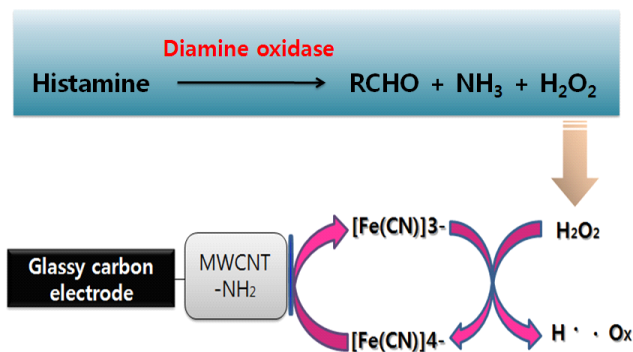


Fig. 1. The reaction of histamine with diamine oxidase in biosensor system.

또한 aminopropyl glass beads를 이용하여 효소를 고정화 하였는데, 먼저 0.1 M phosphate buffer solution(PBS, pH 7.0)으로 5% glutaraldehyde를 제조한 다음 aminopropyl glass beads 0.5 g과 혼합하여 상온에서 12시간 동안 교반하였다. 이를 증류수로 여러 번 세척하고 PBS로 세척한 후 5 mL PBS에 담가 30분 동안 냉장고에 정치시켰다. Diamine oxidase 15 units를 glass beads에 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 교반하면서 반응시킨 다음 PBS(pH 7.0)로 여러 번 세척하였다.

효소를 고정화 한 담체는 tubing에 채우고 0.1 M PBS(pH 7.0)로 충진한 후 tubing의 양끝을 다공성 종이와 nipple로 막아 효소반응기를 제작하였다. 효소반응기는 사용하기 전까지 4°C 냉장 보관하였다.

5. 효소의 Coupling Efficiency 측정

효소의 담체고정화 시 얻은 상층액을 취하여 coupling efficiency를 구하였다(Bradford MM, 1976). Coomassie Blue G 100 mg을 methanol 50 mL에 용해한 후 85% phosphoric acid 100 mL를 가하고 200 mL 증류수로 희석하여 stock solution을 제조하였다. Bradford 시약은 stock solution과 증류수를 1:4 비율로 희석한 다음 사용하였다. 표준시약인 BSA를 일정 비율로 희석한 다음 희석된 BSA에 Bradford reagent를 반응시켜 발색한 후 spectrophotometer(DU 800, Beckman, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 값으로 검량곡선을 구하고, 상층액 시료도 위와 같은 방법으로 반응시켜 흡광도를 측정하여 coupling efficiency를 구하였다.

6. 바이오센서의 구성

Histamine 검출을 위해 과산화수소 측정용 전극, 표준 전극(Ag/AgCl), 대조 전극(Pt wire)으로 구성된 flow-through cell을 제작하였다. FIA system은 injector, peristaltic pump, flow-through cell, 효소 반응기, potentiostat로 구성되었다. 반응 데이터는 Model 270/250 research electrochemistry software 4.30 program을 이용하여 얻었다.

7. 과산화수소 측정용 전극의 H₂O₂에 대한 감응 전류 측정

Histamine이 diamine oxidase와의 반응을 통해 생성되는 과산화수소를 측정하기 위해서 본 연구에서 제작된 과산화수소 측정용 전극의 H₂O₂에 대한 감응도 측정하였다. H₂O₂를 농도별로 주입하여 감응 전류를 측정하였으며, 검량곡선을 구하여 과산화수소 측정용 전극의 성능을 평가하였다.

8. Histamine에 대한 감응 전류 측정

Histamine은 diamine oxidase와 반응하여 과산화수소를 생성하므로, 생성된 과산화수소를 측정하기 위해서 과산화수

소 측정용 전극을 이용하였고, CNBr-activated sepharose 4B, calcium alginate, controlled pore size glass beads의 각 담체에 고정하여 제작한 효소반응기를 이용하여 -0.1 V의 전압에서 2.0 mL/min의 유속으로 주입한 histamine에 대한 전류 감응도를 측정하였으며, carrier buffer로는 0.1 M PBS(pH 7.0)를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 과산화수소 측정용 전극의 Cyclovoltammetry

Prussian blue는 potassium iron(III)hexacyanoferrate(II)의 수화물로서 다결정형이다. 여러 연구에 의하여 Prussian blue는 과산화수소의 분해를 촉진하는 물질로서 알려져 artificial peroxidase로 불려지고 있다(Karyakin *et al* 1994, Moscone *et al* 2001). Prussian blue film은 전하의 이동을 쉽게 해주어 glassy carbon, graphite, gold electrode 등과 같은 여러 전극에 도입되었을 때 전극의 성능을 향상시켰다고 보고되었다(Li *et al* 2003, Mattos *et al* 2003, Ricci *et al* 2003). 따라서 본 연구에서는 histamine과 diamine oxidase의 반응을 통해 생성되는 과산화수소를 효과적으로 측정하기 위하여 작업전극에 전기전도도가 높은 MWCNT를 사용하였고, 여기에 Prussian blue film을 입혀 사용하였다. 제작된 작업전극의 전기화학적 특성을 확인하기 위하여 GCE 전극과 GCE에 MWCNT-NH₂를 부착한 전극, GCE에 MWCNT-NH₂와 Prussian blue를 부착한 전극의 cyclic voltammogram을 측정하였다(Fig. 2). 처리하지 않은 GCE(a)는 전기화학적인 반응을 거의 나타내지 않은 반면, MWCNT-NH₂와 Prussian blue 부착된 GCE(c)는 0.3 V 근처에서 cathodic peak를 보였고, 0.3 V와 -0.2 V에서 두 개의 anodic peak를 나타내었다. 이는 Prussian blue가 Prussian green으로의 산화반응 뿐만 아니라 Prussian white로의 환원반응이 가역적으로 나타나 redox peak가 뚜렷이 나타난 것으로(Moscone *et al* 2001, Ricci *et al* 2003), 이러한 결과는 MWCNT와 Prussian blue의 도입 시 과산화수소에 대해 높은 전기적 촉매 활성을 보인 Zhai *et al*(2009)의 연구 결과와 유사하였다. MWCNT-NH₂만을 부착한 GCE는 아무 처리하지 않은 GCE보다 전류 감응도는 크게 나타났으나, Prussian blue와 MWCNT-NH₂를 도입한 전극보다는 뚜렷한 산화환원 반응을 나타내지 않았다. 위의 결과들을 볼 때, 기능화된 MWCNT와 Prussian blue 모두를 작업전극에 도입한 경우 작업전극의 과산화수소에 대한 감응도가 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

2. 과산화수소 측정용 전극의 감응도 분석

제작된 작업전극의 과산화수소 용액에 대한 감응도를 측정하기 위해 농도가 다른 과산화수소를 첨가하여 감응 전류

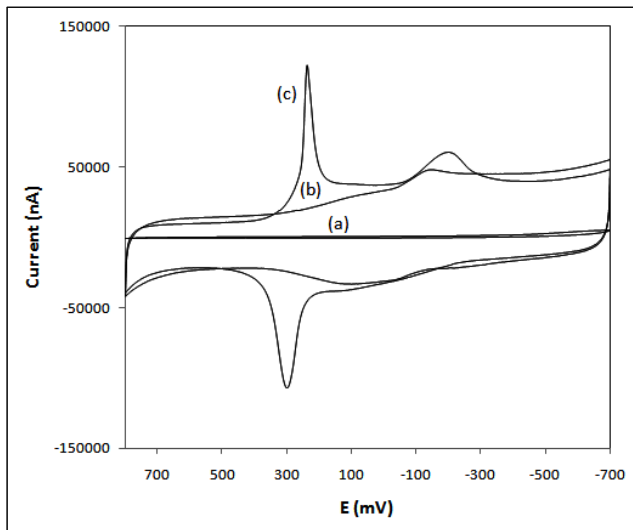


Fig. 2. Cyclic voltammograms of the working electrodes with different coating materials at injection of 0.1 mM hydrogen peroxide.

(a) bare GCE, (b) GCE with MWCNT-NH₂, (c) GCE with MWCNT-NH₂ and Prussian blue. Experimental conditions: applied potential range, $-0.7 \sim 0.8$ V; background electrolyte, 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0); injection volume, 200 μ L; scan rate, 20 mVs^{-1} .

의 peak를 측정하였다. Fig. 3은 과산화수소 측정용 전극이 기질 농도에 따라 나타내는 전형적인 전류 감응도를 보여주고 있다. 또한 과산화수소 용액의 농도와 측정된 전류사이의 검량곡선은 Fig. 4와 같이 나타났다. 0.1~1,000 μM 의 과산화수소 용액을 차례로 주입하여 감응 전류를 측정 한 결과, 농도 증가에 비례하여 감응 전류가 증가하여 R²의 값이 0.993으로 높은 선형관계를 나타내었고, 검출 한계는 0.1 μM 으로 나타났다. 이와 같이 특정 기질의 분석을 위해 유용한 분석 도구로 여겨지는 바이오센서 시스템은 도입된 전극의 성능을 향상시킴으로써 분석의 정확성과 정밀성, 신속성을 보다

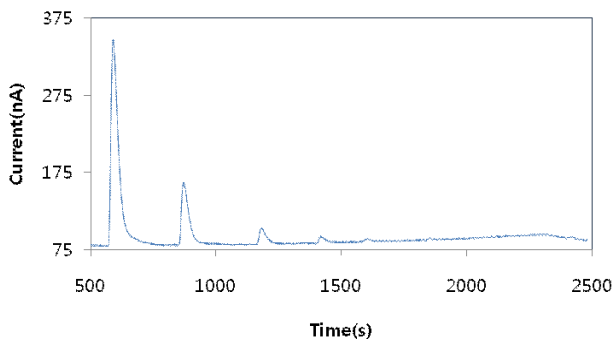


Fig. 3. Typical type of response currents measured with the working electrode according to the addition of hydrogen peroxide.

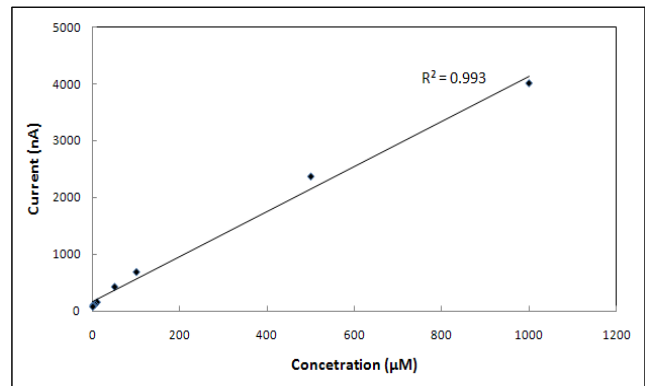


Fig. 4. Calibration curve for hydrogen peroxide measured with the working electrode prepared with MWCNT-NH₂ and Prussian blue.

Experimental condition: applied potential, -0.1 V; flow rate, 2.0 mL/min; background electrolyte, 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

더 높일 수 있다. 다양한 분석물질에 선택적 인지 반응을 하는 calix[4]arene을 GCE에 도입한 Jin *et al*(2009)의 연구에서, modified electrode는 과산화수소에 대해 550~63,000 μM 범위에서 선형성을 나타내었으며, 40 μM 의 검출한계를 보였다. 한편, Wu *et al*(2006)의 연구에서는, GCE에 DNA와 Ag NPs를 도입한 결과, 과산화수소에 대해 2~2,500 μM 의 넓은 범위에서 높은 선형성을 나타내었으며, 검출한계는 0.6 μM 로 나타났다. 그러나 DNA/Ag NPs가 도입된 GCE의 경우, DNA를 사용하기 때문에 제작된 전극을 4 $^{\circ}\text{C}$ 의 보관해야 하며, 시료 측정을 위해 분자 크기를 분할하기 위한 부가 과정을 필요로 하는 등의 번거로움이 있다(Raofa *et al* 2011). 그러나 본 연구에서 개발된 MWCNT-NH₂와 Prussian blue가 도입된 과산화수소 측정용 전극은 실온에서 보관할 수 있을 뿐 아니라, 제작된 이후 시료 측정을 위해 다른 부가 과정을 필요로 하지 않는다. 따라서 본 실험에서 제작한 작업극이 사용하기에 편리하며, 높은 선형성과 우수한 검출 한계를 가지고 있음이 확인되어 histamine을 측정하기 위한 바이오센서의 검출기로 사용하기에 적합한 성능을 가지고 있는 것으로 판단되었다.

3. 효소반응기에 따른 Coupling Efficiency

본 연구에서는 효소고정화를 위해 calcium alginate, CNBr-activated sepharose 4B, controlled pore size glass beads 등의 불용성 담체를 이용하였다. Calcium alginate는 갈조류에서 생산되는 음이온성 고분자 전해질인 alginic acid가 Ca 이온에 의해 수용액에서 팽윤되는 겔을 형성하는 천연고분자로서, 분자그물망 구조에 의해 겔 내부에 수용성 물질의 방출을 제어할 수 있는 성질이 있어 효소고정화에 많이 이용되는

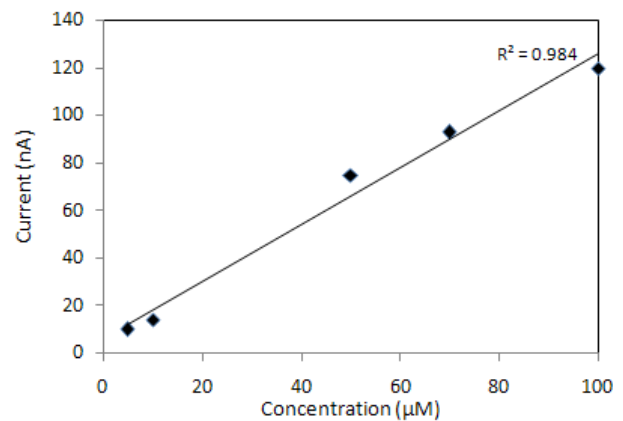
담체로(Shirashi *et al* 1993, Kim *et al* 2007) 내압축성과 내마모성의 장점도 가지고 있다(Bang *et al* 1989, Ji & Kim 2011, Won *et al* 2005). CNBr-activated sepharose 4B는 리간드와 효과적으로 결합하여 생물학적 활성을 유지시켜 주므로 효소고정화에 적합한 지지체로 보고되었다(David *et al* 1974). 또한, controlled pore size glass beads는 내구성이 좋고 재사용이 용이하여 효소고정화를 위한 담체로 자주 이용되며(Bhushan *et al* 2008, Gomez *et al* 2006), amino group을 가진 controlled pore size glass beads는 glutaraldehyde 분자와 이에 결합되는 효소를 가교결합시켜 결합력을 높임으로써 안정적인 효소-담체 결합체를 형성해 준다(Yilmaz *et al* 2011, Ji & Kim 2011).

각 담체에 diamine oxidase(0.72 unit/mg protein)를 반응시킨 후 Bradford 단백질 분석을 통하여 coupling efficiency를 측정된 결과, CNBr-activated sepharose 4B는 48.5%, calcium alginate는 40.3%의 coupling efficiency를 보였고, controlled pore size glass beads에 효소를 공유결합시킨 것은 51%의 coupling efficiency를 나타내어 diamine oxidase의 지지체로서 가장 높은 결합력을 나타내었다(Table 1). 따라서 diamine oxidase를 고정화하기 위한 불용성 담체로 controlled pore size glass beads가 가장 적합한 것으로 보여졌으나, 실제 시료와의 반응 측정 시 전류 감응도도 함께 고려되어야 하므로 각 담체에 고정된 효소반응기를 이용하여 histamine에 대한 전류감응도 측정을 실시하였다.

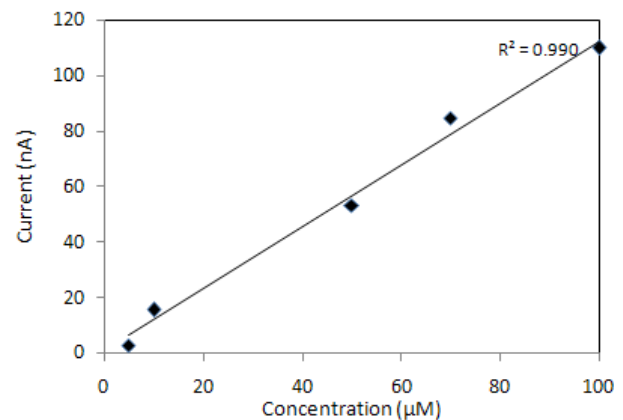
4. Histamine에 대한 전류 감응도

CNBr-activated sepharose 4B, calcium alginate, controlled pore size glass beads 등의 담체에 효소를 고정화하여 제작한 효소반응기를 이용하여 histamine 표준용액에 대한 전류 감응도를 측정하였다(Fig. 5). 100 μ M histamine을 주입하였을 때 감응 전류는 CNBr-activated sepharose 4B, calcium alginate, controlled pore size glass beads에 대해 각각 120 nA, 110 nA, 140 nA로 나타나 controlled pore size glass beads에 고정화시킨 것이 가장 높은 전류 감응도를 나타내었다. 또한 5~100 μ M 농도의 histamine 용액에서 R^2 값은 모든 담체에서 0.9 이상의 높은 선형관계를 보였으나, 그 중에서 controlled pore

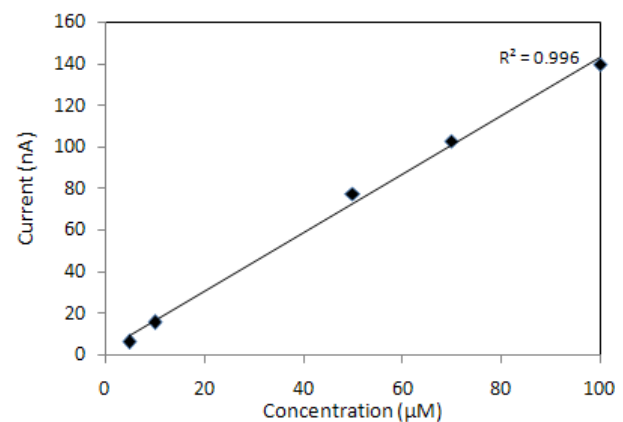
size glass beads의 R^2 값이 0.996으로 가장 높게 나와 전류 감응도 및 선형관계를 고려할 때 controlled pore size glass beads



(a) CNBr-activated sepharose 4B



(b) Calcium alginate



(c) Controlled pore size glass beads

Table 1. Coupling efficiency of diamine oxidase for different carriers

Carrier	Coupling efficiency (%)
CNBr-activated sepharose 4B	48.5
Calcium alginate	40.3
Controlled pore size glass beads	51.0

Fig. 5. Calibration curve for histamine by the biosensor system using enzyme reactors with different carriers.

Experimental condition: applied potential, -0.1 V; flow rate, 2.0 mL/min; background electrolyte, 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

가 가장 적합한 담체인 것으로 판단되었다. 그러므로 본 연구에서 제작한 과산화수소 측정용 전극과 controlled pore size glass beads를 담체로 이용하여 만든 효소반응기는 시료 중 histamine을 감도 높게 측정하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

Histamine은 발효식품, 등푸른 생선 등 단백질이 많이 함유된 식품에서 잘 생성되는 물질로 이들 식품의 부패 시에는 다량의 histamine이 발생되어 이를 섭취하였을 때 독성을 일으킬 수 있기 때문에 histamine은 어육식품의 선도 저하 또는 부패의 지표로서 사용된다. 따라서 본 연구에서는 신속하며 정확한 histamine 검출을 위한 바이오센서 시스템을 구축하기 위하여 기능화된 MWCNT와 Prussian blue를 사용한 전극을 제작하였으며, 여러 불용성 담체에 효소를 고정화시켜 바이오센서 시스템에 적합한 불용성 담체를 확인하기 위한 연구를 수행하였다. MWCNT-NH₂와 Prussian blue가 도입된 전극의 과산화수소에 대한 감응도를 확인한 결과, 검출한계는 0.1 μ M으로 나타났으며, 각 담체의 효소 고정화도를 측정한 결과, CNBr-activated sepharose 4B는 48.5%, calcium alginate는 40.3%, controlled pore size glass beads는 51.0%를 보였다. 또한 CNBr-activated sepharose 4B, calcium alginate, controlled pore size glass beads로 제작된 효소반응기의 100 μ M histamine에 대한 전극 감응도는 각각 120 nA, 110 nA, 140 nA로 나타났다. 따라서 담체의 coupling efficiency, 제작된 효소반응기의 전극 감응도, 선형 관계 등을 고려해 보았을 때 controlled pore size glass beads가 본 연구에서 구축된 바이오센서 시스템에서 가장 적합한 담체인 것으로 확인되었다. 이로써 이들 작업전극과 효소반응기로 구축된 바이오센서는 histamine을 감도 높고 신속하게 측정할 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업 연구(KRF-2008-313-F00115)입니다.

문 헌

- Ahn JW, Park KW, Seo JH (1998) Continuous production of isomaltooligosaccharides by immobilized transglucosidase in a packed-bed reactor. *Kor J Food Sci Technol* 30: 110-117.
- Bang BH, Lee SG, Yang CY (1989) Calcium alginate-entrapped yeast whole-cell invertase (II. Enzymatic properties of the immobilized cells). *Korean J Food & Nutr* 2: 14-20.
- Bhushan I, Parshad R, Qazi GN, Ingavle G, Rajan CR, Ponrathnam S, Gupta VK (2008) Lipase enzyme immobilization on synthetic beaded macroporous copolymers for kinetic resolution of chiral drugs intermediates. *Process Biochem* 43: 321-330.
- Botre F, Botre C, Lorenti G, Mazzei F, Porcelli F, Scibona G (1993) Plant tissue biosensors for the determination of biogenic diamines and of their amino acid precursors: effect of carbonic anhydrase. *Sensor Actuat B Chem* 15: 135-140.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Chae KY, Lee CH, Cho TY, Kang MC, Bahn KN, Son YW, Jang MR, Han GH (2005) Biogenic amine contents in Korean commercial foods. *The Annual Report of KFDA* 9: 115-116.
- David GS, Chino TH, Reisfeld RA (1974) Binding of proteins to CNBr-activated sepharose 4B. *FEBS Letters* 43: 264-266.
- Eom JH, Kim JH, Joo IS, Byun JA, Park YG, Seo DM, Lee EM, Heo OS (2006) Survey of the biogenic amines in commercial fermented alcoholic beverages in Korea. *The Annual Report of KFDA* 10: 187-188.
- Gomez JL, Bodalo A, Gomez E, Bastida J, Hidalgo AM, Gomez M (2006) Immobilization of peroxidases on glass beads: an improved alternative for phenol removal. *Enzyme Microb Technol* 39: 1016-1022.
- Ji JY, Kim MR (2011) Analysis of amperometric response to cholesterol according to enzyme-immobilization methods. *J East Asian Soc Dietary Life* 21: 731-738.
- Jin G, Du S, Hu X (2009) The potentiometric determination of peroxidehydrogen and glucose on the glassyelectrode modified by the calix[4]arene. *Talanta* 80: 858-863.
- Karube I, Hara K, Satoh I, Suzuki S (1979) Amperometric determination of phosphatidyl choline in serum with use of immobilized phospholipase D and choline oxidase. *Anal Chim Acta* 106: 243-250.
- Karube I, Satoh I, Araki Y, Suzuki S (1980) Monoamine oxidase electrode in freshness testing of meat. *Enzyme Microb Technol* 2: 117-120.
- Karyakin AA, Gitelmacher OV, Karyakina EE (1994) A high-sensitive glucose amperometric biosensor based on Prussian blue modified electrodes. *Anal Lett* 27: 2861-2869.

- Katchalski-Katzir E, Kraemer DM (2000) Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J Mol Catal B: Enzym* 10: 157-176.
- Kim JW, Jeon YH, Kim MR (2010) Determination of biogenic amines an amperometric biosensor with a carbon nanotube electrode and enzyme reactor. *J East Asian Soc Dietary Life* 20: 735-742.
- Kim KS, Choi HS, Park HJ, Lee JK (2007) Comparison of drug release profile in chitosan-adsorbed bead: Silver sulfadiazine and serum albumin. *J Chitin Chiosan* 12: 81-87.
- Li J, Peng T, Peng Y (2003) A cholesterol biosensor based on entrapment of cholesterol oxidase in a silicic sol-gel matrix at a prussian blue modified electrode. *Electroanal* 15: 1031-1037.
- Mattos IL, Gorton L, Ruzgas T (2003) Sensor and biosensor based on Prussian blue modified gold and platinum screen printed electrodes. *Biosens Bioelectron* 18: 193-200.
- Moscone D, D'ottavi D, Compagnone D, Palleschi G (2001) Construction and analytical characterization of Prussian blue-based carbon paste electrodes and their assembly as oxidase enzyme sensors. *Anal Chem* 73: 2529-2535.
- Raoofa JB, Ojania R, Hasheminejada E, Rashid-Nadimib (2011) Electrochemical synthesis of Ag nanoparticles supported on glassy carbon electrode by means of p-isopropyl calix [6]arene matrix and its application for electrocatalytic reduction of H₂O₂. *Appl Surf Sci* doi:10.1016/j.apsusc.2011.10.133.
- Ricci F, Goncalves C, Amin A, Gorton L, Palleschi G, Moscone D (2003) Electroanalytical study of Prussian blue modified glassy carbon paste electrodes. *Electroanal* 15: 1204-1211.
- Santhosh P, Manesha KM, Gopalan A, Lee KP (2006) Fabrication of a new polyaniline grafted multi-wall carbon nanotube modified electrode and its application for electrochemical detection of hydrogen peroxide. *Analytica Chimica Acta* 575: 32-38.
- Shalaby AR (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res Int* 29: 675-690.
- Shirashi S, Imai T, Otagiri M (1993) Controlled release preparation of indomethacin using calcium alginate gel. *Biol Pharm Bull* 16: 1164-1168.
- Suh CW, Kang KY, Lee HS, Ahn SJ, Lee EK (2000) Fusion protein cleavage by urokinase covalently immobilized to activated sepharose gels. *Korean J Biotechnol Bioeng* 15: 42-48.
- Taylor SL, Eitenmiller RR (1986) Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *CRC Crit Rev Toxicol* 17: 91-128.
- Ten Brink B, Damink C, Joosten HMLJ, Huis in't Veld JHJ (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol* 11: 73-84.
- Won KH, Kim SB, Kim KJ, Park HW, Moon SJ (2005) Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem* 40: 2149-2154.
- Wu S, Zhao H, Ju H, Shi C, Zhao J (2006) Electrodeposition of silver DNA hybrid nanoparticles for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and glucose. *Electrochem* 8: 1197-1203.
- Yilmaz E, Can K, Sezgin M, Yilmaz M (2011) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxin methyl ester. *Bioresour Technol* 102: 499-506.
- Zhai J, Zhai Y, Wen D, Dong S (2009) Prussian blue/multi-walled carbon nanotube hybrids: Synthesis, assembly and electrochemical behavior. *Electroanal* 20: 2207-2212.

접 수: 2011년 12월 22일
 최종수정: 2012년 1월 27일
 채 택: 2012년 2월 24일