

Dual Cathode Electrode를 이용한 바이오센서로 탁주 중의 포도당 및 에탄올의 동시 측정

박인선 · 김정호 · 김태진* · 김남수** · 노봉수

서울여자대학교 식품 · 미생물공학과, *수원대학교 화학공학과, **한국식품개발연구원

Simultaneous Determination of Glucose and Ethanol of *Takju* by Biosensor using Dual Cathode Electrode

In-Seon Park, Jung-Ho Kim, Tae-Jin Kim*, Nam-Soo Kim** and Bong-Soo Noh

Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University

*Department of Chemical Engineering, The University of Suwon

**Korea Food Research Institute

Abstract

A biosensor was prepared with dual cathode electrode and immobilized enzyme membrane. A nylon net was used for the immobilization of glucose oxidase and alcohol oxidase. The immobilized enzymes were placed on the surface of the electrode which was prepared with one anode and two cathodes as an oxygen electrode. The determination of components by the biosensor was based on the consumption of dissolved oxygen. The optimum condition of this system was 0.1 M potassium phosphate buffer solution, pH 7.5 at 35°C. Glucose and ethanol in *takju* were simultaneously determined by the biosensor. Comparing with UV-spectrophotometer and gas chromatograph for cross checking, there was a good correlation between the biosensor and the conventional methods. Biosensor with dual cathode electrode required no clarification or pre-treatments. It was used for simultaneous determination of glucose and ethanol during the fermentation of *takju*.

Key words: dual cathode electrode, simultaneous determination, glucose, ethanol, *takju*

서 론

발효식품의 발효산물 또는 중간 생성물의 양을 측정함으로써 발효공정을 조절할 수 있는 분석방법의 하나로서 바이오센서가 이용되기 시작하였다^(1,3). 그러나, 식품의 경우 구성하고 있는 성분이 매우 다양하고 복잡하여 단일성분의 분석만으로는 품질관리나 발효공정을 조절하는데 어려움이 있다. 즉, 여러가지 성분을 측정하기 위해서는 분석방법에 따라 전처리 과정이 각각 다를 뿐만 아니라 그 과정이 매우 복잡하고 어려워 많은 주의가 요구된다. 최근에 개발되어 보급된 gas chromatography는 향기성분이나 알코올과 같은 휘발성 물질뿐만 아니라 당이나 아미노산 등 비휘발성 물질도 분석이 가능하고 여러 물질을 정확하게

분석할 수 있다. 그러나, 여러 개의 칼럼을 사용하거나 여러 단계의 전처리 과정을 거쳐야 하며 기계 장비나 부품이 비싸고 기계를 다루는데 숙련된 기술이 필요하기 때문에 일반분석에는 어려움이 따른다. 따라서, 발효과정을 조절해야 하는 신속한 측정을 요구하는 분석에는 많은 어려움이 있는 실정이다.

바이오센서를 이용하는 경우, 값비싼 장비를 구입하지 않고도 간편하고 정확하고도 신속하게 품질관리를 할 수 있는 장점이 있다. Mandenius 등⁽⁴⁾은 자당센서로서의 효소 thermistor를 이용하여 발효 중 에탄올을 측정하고 발효공정을 조절하였다. 또한, 근래에는 복잡한 구성성분으로 이루어진 식품을 분석하는데 보다 신속한 측정을 위해 한 가지 이상의 성분을 동시에 측정하고자 하는 연구들이 시도되고 있다^(5,6). 그 하나의 방편으로 enzyme reactor를 여러 개 설치하여 시차적으로 검출기를 통과하는 방법으로 동시에 다성분을 측정하고자 하였으나^(7,11), 단일 시스템으로 여러 가지

Corresponding author: Bong-Soo Noh, Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University, Nowon-ku, Seoul 139-774, Korea

성분(당, 알코올, 유기산)을 동시에 측정하기에는 어려운 문제가 남아 있다. Zhang 등⁽¹³⁾은 두 개의 전극을 별도로 사용하여 포도당과 자당을 분석하는 모델시스템을 제시한 바 있으나, 이것은 기존의 바이오센서 두 개를 동시에 사용하는 것에 불과하였다.

본 연구에서는 식품 중의 두 가지 성분을 동시에 측정할 수 있는 바이오센서를 개발하여 발효공정을 조절하는데에 이용하고자 하였다. 한 개의 anode와 두 개의 cathode가 반응하여 나타나는 전기화학 반응을 감지할 수 있는 산소전극을 제조하여 바이오센서로 사용하였다.

탁주는 발효과정 중 주로 효소작용으로 생성되는 당분, 아미노산, 유기산 등에 의한 맛 성분과 효모나 절산균 등 미생물의 알코올 발효로 생성되는 휘발성 풍미성분의 조화로 품질이 결정되는데, 탁주의 여러 성분 중 dual cathode electrode를 이용한 바이오센서로 발효과정 중 변화하는 포도당과 에탄올의 양을 동시에 분석하고자 한다.

재료 및 방법

탁주의 제조

탁주 제조용 원료로 쌀은 시중에서 구입하고 누룩은 서울 경동시장에서 구입한 것을 사용하였다. 쌀 100 g을 세척하여 2시간 불린 후 100°C에서 40분간 증자하고 25°C로 냉각시켰으며 누룩은 곱게 잘 빻은 후 사용하였다. 증자한 쌀은 호화되어 밥이 된 것에 물 3 l와 누룩 600 g을 유리병에 넣어 잘 혼합한 후 25°C에서 10일간 발효시켰다⁽¹³⁾.

효소 및 시약

포도당 측정을 위해 *Aspergillus niger*에서 분리된 glucose oxidase (E.C.1.1.3.4., 23,900 units/mg solid)와 에탄올 측정을 위해 *Candida boidinii*에서 분리된 alcohol oxidase (E.C.1.1.3.13., 0.4 units/mg, solid)를 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. 효소 고정화에 사용된 시약으로 50% glutaraldehyde는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였고, dimethyl sulphate는 Shinyo Pure Chemical Co. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 그리고, 효소를 고정화할 때 지지체로서 사용되는 nylon net (150~214 threads/cm, KSK0905, 코오롱 주식회사)은 한국의류시험검사소를 거친 규격을 사용하였다. 그리고, 효소전극의 제조를 위한 dialysis membrane (M.W.C.O. 12,000)과 가스 투과성 teflon membrane (0.001 inch thickness, YSI 5775)

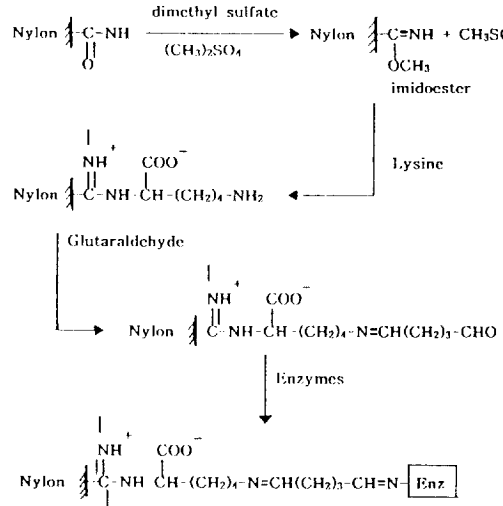


Fig. 1. Chemical reaction schemes for attaching enzymes to a nylon

은 Sigma Chemical Co.와 Yellow Springs Instrument (Ohio, USA)에서 각각 구입하였다.

효소의 고정화

Honby와 Morris⁽¹⁴⁾에 의한 방법을 변형하여 nylon net에 효소를 고정화하였다⁽¹⁵⁾. Nylon net을 산소전극의 크기에 맞도록 직경 10 mm로 잘랐다. 이것을 활성화시키기 위하여 dimethyl sulphate 용액에 담가 5분 동안 수욕조에서 끓이고, 얼음통에 넣어 활성반응을 정지시킨 후, anhydrous methanol에 30~40초씩 두 번을 담갔다. Nylon net이 흰 가루분과 같은 것이 생기면서 우유 빛을 나타내면 lysine (0.5 M, pH 9.0)용액에 2시간 동안 담가 두었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 lysine은 효소분자와 nylon 구조 사이에서 spacer로서 작용하였다. 이것을 0.1 M NaCl로 잘 씻어 유리된 lysine group이 존재하지 않도록 하였다. 이것을 다시 glutaraldehyde 용액(12.5%, 0.1 M borate 완충용액, pH 8.5)에 약 45분 동안 담가 두었다. 하나의 nylon net에는 alcohol oxidase를, 다른 nylon net에는 glucose oxidase를 각각 고정화하였다. Nylon net을 냉각고에서 하룻밤 방치하여 고정화시킨 후 인산 완충용액으로 잘 씻은 다음 완충용액에 담가 4°C에서 보관하였다⁽¹⁶⁾.

Dual cathode electrode를 이용한 바이오센서의 제작 두 가지 성분을 동시에 측정할 수 있는 dual cathode system은 하나의 전극 몸체에 한 개의 anode와 두 개의 cathode를 가지고 있다. 용액 중의 두 가지

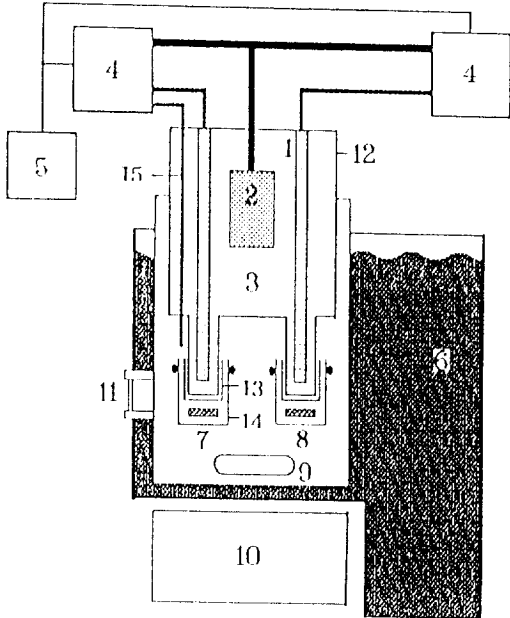


Fig. 2. Schematic diagram of apparatus for the determination of various food components by biosensor with using dual cathode electrode 1. Dual cathode 2. Anode 3. Electrolyte 4. Electrical circuit 5. Computer 6. Water bath 7. Glucose electrode 8. Ethanol electrode 9. Stirrer bar 10. Magnetic stirrer 11. Injection septor 12. Reservoir 13. Teflon membrane 14. Dialysis membrane 15. Thermistor

성분을 동시에 측정하기 위해서 Fig. 2에서 보는 바와 같이 전극에 0.5 N NaHCO₃와 KCl로 구성된 전해질을 넣고 고정화 효소막을 양쪽 음극의 teflon membrane과 dialysis membrane 사이에 놓이게 한 후 O-ring을 이용하여 고정시켰다. 효소막이 부착되어 있는 dual cathode electrode는 저소비전력형 CMOS dual OP-AMP TLC 272를 이용하여, +5V 단일 전원으로 구동되는 센서 인터페이스 회로에 연결하고 이⁽¹⁷⁾의 방법에 따라 Clark 전극간에 흐르는 전류는 수μA 정도로 미소하기 때문에 전류-전압 변환회로를 이용하여 측정하였다. 그리고 측정된 값은 ProComm 소프트웨어에 의해 용존산소의 양으로 수집하였다.

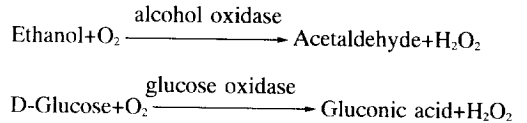
바이오센서의 최적 조건 확립

순환 수욕조를 이용하여 수욕조의 온도를 5°C에서 40°C까지 5°C 간격으로 조절하고, pH에 의한 바이오센서의 감응도의 차이를 알아보기 위하여 효소활성이 가장 최적인 온도에서 0.1 M 인산 완충용액으로 pH 5.5~8.5의 범위에서 각각 달리하면서 용존산소 소비량의 변화를 각 온도별, pH별로 측정 비교하였다.

측정하고자 하는 각 성분의 표준용액을 0.2 ml를 취하여 cell 내에 주입하고, 주입된 각 성분을 기질로 하여 효소반응으로 소비되는 용존산소량을 측정하였다. Lotus 1-2-3 program을 이용하여 시간당 용존산소 소비량이 최대인 구간의 기울기(ΔO₂/Δt)를 구하여 표준용액 농도와와의 관계로부터 표준곡선을 구하였다.

바이오센서에 의한 식품성분의 측정

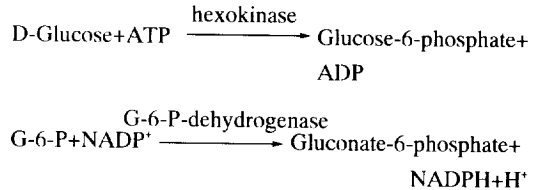
임의의 농도를 갖는 시료 0.2 ml를 cell 내에 주입하여 각각의 cathode에 고정화 효소막에서 일어나는 효소반응에 의해 소비되는 용존산소 소비변화량을 동시에 측정하였다. 바이오센서에 이용되는 효소에 의한 반응식은 아래와 같다.



이것을 표준곡선으로부터 각 성분의 농도로 환산하여 시료 중에 함유한 성분의 양을 측정하였다.

기존 분석방법에 의한 분석

포도당의 측정을 위해 시료용액 0.1 ml 내의 포도당 농도가 5~100 mg이 되도록 하고 아래 반응에서 소모되는 NADP⁺의 변화량을 340 nm에서 분광광도계 (diode array, Hewlett Packard HP8452)를 이용하여 흡광도를 측정한 후 각 시료의 당 농도를 구하였다(18).



에탄올은 GC (gas chromatography)를 이용하여 측정 비교하였다. 에탄올 0.5 g을 취하고 탈이온수를 10 ml 넣어 조제한 것을 표준물질로 하였다. 이것을 diethyl ether 10 ml로 추출한 후 추출액의 0.2 ml를 GC에 주입하여 크로마토그램을 구하였다. 시료 10 ml에 n-butyl alcohol 0.02 g을 내부 표준물질로 가한 후 diethyl ether 10 ml로 추출한 후 추출액의 0.2 ml를 GC에 주입하여 크로마토그램을 구하여 internal standard법으로 정량하였다. GC의 작동조건은 이 등⁽¹³⁾의 방법에 따랐다.

결과 및 고찰

Dual cathode electrode의 제작

한 개의 anode와 두 개의 cathode를 가진 원통형의 dual cathode electrode에 두 개의 thermistor를 부착하고 6°C에서 43°C까지 전류의 저항값을 측정된 결과 저항값은 탁월한 선형성을 나타내어 우수한 전극으로서의 가능성을 제시한 바 있으며⁽¹⁹⁾ 산소전극(음극)에서 일어나는 화학반응 정도는 전류로서 나타낼 수 있는데, 이 때 발생한 전류(i)는 아래 식에서 보는 바와 같이 산소의 분압(pO_2)에 비례한다.

$$O_2 + 2 H_2O + 4 e \longrightarrow 4 OH$$

$$i = n \cdot F \cdot A \cdot pO_2 \cdot \frac{P_m}{\omega}$$

i : 전류

n : 반응에 참여한 전자 수

F : Faraday 상수

A : 음극의 면적

pO_2 : 산소분압

P_m : 용액에서의 산소 투과도

ω : 산소 투과성 막의 두께

산소 농도별로 두 전극(A, B)에서 각각의 전류값과 기존의 상업용 용존산소분석기(YSI 59 model)로 나타난 산소농도와 비교한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 0.998 이상의 상관계수를 보여 주었다. 이 때, 두 개의

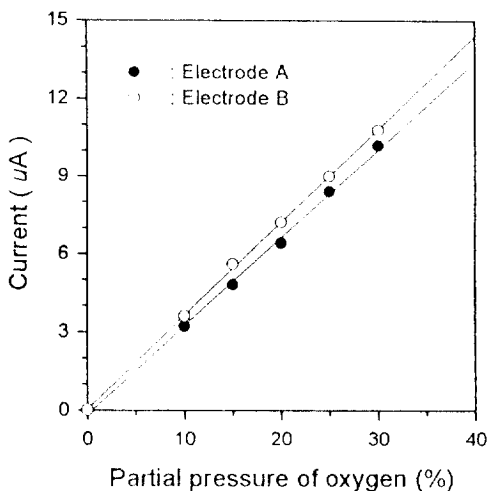


Fig. 3. Sensivity of dual cathode electrode system between current and partial pressure of oxygen

전극의 상관계수 값이 다른 것은 전극을 제작하는 과정에서 A값(음극의 면적)이 조금이나마 차이가 나서 생기는 문제이나 두 전극의 상관계수 값을 비교해 보았을 때 성분 측정에는 큰 무리가 없을 것으로 보인다. 이렇게 하여 제작된 dual cathode electrode를 포도당과 에탄올의 동시 성분분석을 위하여 사용하였다.

포도당/에탄올 바이오센서의 감응도에 미치는 요인

Glucose oxidase와 alcohol oxidase로 구성되어 있는 dual cathode electrode를 이용한 바이오센서가 작용할 수 있는 최적 활성온도를 알아보기 위하여 15°C에서 45°C까지 5°C 간격으로 용존산소 소비변화량을 측정 비교하였다. 일반적으로 온도가 상승함에 따라 효소의 반응 감응도는 증가하였으나 40°C 이후에서는 감소하는 것으로 나타났다. 단일 효소 시스템에서의 alcohol oxidase의 최적 온도는 30°C로 나타났는데⁽²⁰⁾, dual cathode system에서는 약간 높은 35°C로 나타났다(Fig. 4). 이것은 polyacrylamide에 효소를 고정화한데 비하여 본 연구에서는 nylon net에 공유결합으로 고정화하여 최적 활성온도의 차이는 고정화 방법의 차이에서 오는 것으로 판단된다. 또한, glucose oxidase도 35°C에서 최적 활성을 보여 주었다. 따라서, 포도당과 에탄올의 동시 측정을 위한 바이오센서의 최적 온도를 35°C로 결정하였다. 한편, alcohol oxidase는 효소 안정성이 다른 산화효소에 비하여 매우 약하기 때문에 catalase와 함께 고정화하여 alcohol oxidase의 활성을 연장할 수 있다는 보고도 있다⁽²¹⁾. 그러나, 이 경우 catalase가 H₂O₂ 산화환원효소로서 2 mole의 과산화수소를 분해하여 1 mole의 산소를 생성하기 때문에 실제로 시료가 반응하여 소비

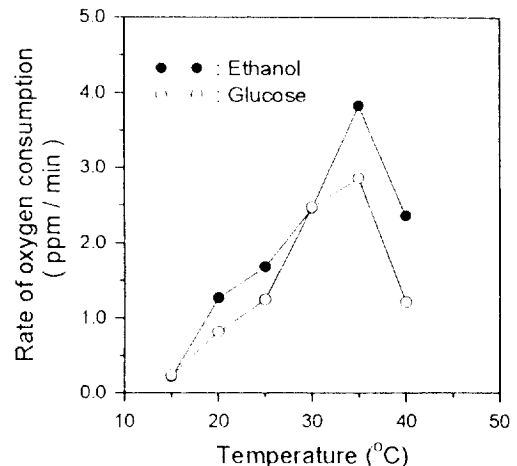


Fig. 4. Effects of temperature on the response of glucose/ethanol biosensor

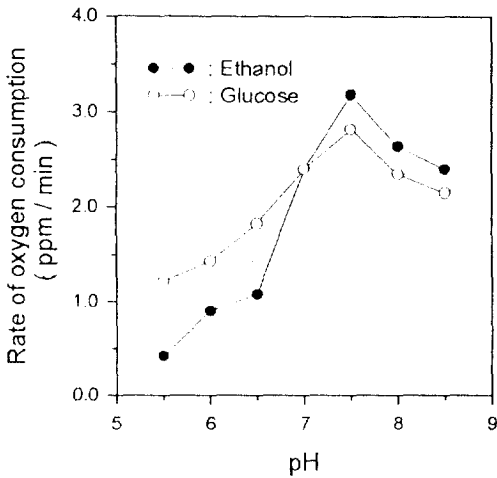


Fig. 5. Effects of pH on the response of glucose/ethanol biosensor

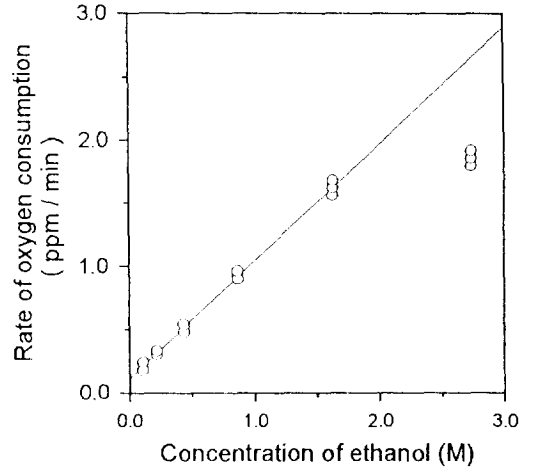


Fig. 6. The standard curve of ethanol by glucose/ethanol biosensor

된 산소 값을 측정하는데 오차를 유발할 수 있어 본 실험에서는 사용하지 않았다.

Nylon net에 고정화시킨 alcohol oxidase는 pH 7.5, 0.1 M 인산 완충용액에서 가장 좋은 활성을 나타내었으며(Fig. 5), glucose oxidase의 최적 pH도 7.5로 나타나, 두 효소에 의한 dual cathode system에서의 최적 pH는 7.5로 결정하였다.

기질농도에 따른 표준곡선의 확립

35 °C가 유지되면서 인산 완충용액(pH 7.5)이 채워져 있는 cell 내에 용존산소를 포화시킨 후, 에탄올의 농도를 달리하면서 주입하였다. 기질이 분해되어 최대 산소 소비변화량을 갖기까지의 반응시간은 약 10초에서 20초 사이였으며, 에탄올 농도가 약 1.8 M 까지 직선적인 관계를 보여 주었다(Fig. 6).

Glucose oxidase가 고정화되어 있는 전극에서 포도당의 농도에 따라 산소 소비량의 차이를 나타내었다. 각 포도당 농도별로 시간당 용존산소 소비 변화량은 Fig. 7에서 보는 바와 같으며, 0.2 M까지 직선관계를 나타내었다.

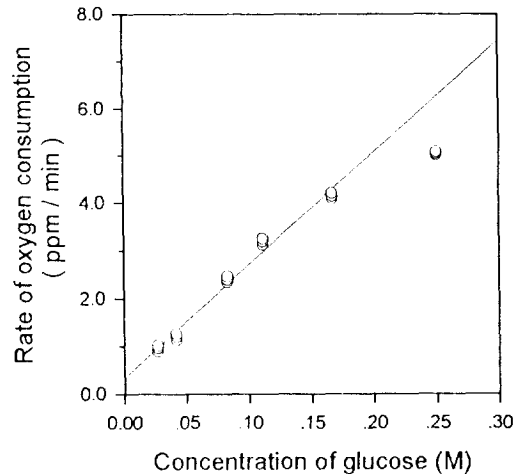


Fig. 7. The standard curve of glucose by glucose/ethanol biosensor

탁주에서의 포도당 및 에탄올 동시 측정

실험실에서 제조한 탁주를 이틀 간격으로 바이오센서를 이용하여 포도당 및 에탄올의 함량을 동시에 측정하였다. 발효 2일과 4일이 지나면서 에탄올의 함량은 3.984 g/100 ml과 7.672 g/100 ml로 급격히 증가하였다(Table 1). 한편, 포도당은 발효 4~6일 사이에 급격한 감소를 보여 주었다. 이것은 누룩에 의한 발효가 진행되면서 탁주 중의 당 함량은 알코올의 발효 기질

로 이용되어 포도당이 소비가 되기 때문인 것으로 생각된다. 주모를 첨가하지 않은 멥쌀로 제조한 탁주의 에탄올 함량이 발효 10일에 8.4%로 나타났다는 보고⁽¹³⁾와 비교해 볼 때 비슷한 양의 에탄올이 생성되었음을 알 수 있었다. 또한, 주모 무첨가한 멥쌀로 제조한 탁주의 경우 발효 2일 만에 환원당량이 2.5%에서 4.0%로 증가하였다고 보고하였는데⁽¹³⁾, 실제로 제조한 탁주 중에서도 포도당의 함량이 증가하다가 발효 4일이 지나면서 급속히 감소하는 것으로 나타났다.

Dual cathode electrode로 만들어진 바이오센서로 측정한 에탄올 및 당의 함량을 기존의 다른 분석방법과 비교해 보기 위하여 포도당은 효소 kit를 이용한 분광광도법을 이용하고 에탄올은 gas chromatography

Table 1. Ethanol and glucose contents of *takju* determined by biosensor, spectrophotometry and GC (Unit : g/100 ml)

Fermentation time (Day)	Glucose		Ethanol	
	Biosensor	Spectrophotometry	Biosensor	GC
0	2.940±0.001	2.847±0.003	0.123±0.035	0.078±0.023
2	6.003±0.005	6.605±0.103	0.502±0.048	0.346±0.004
4	5.404±0.003	5.534±0.048	3.984±0.088	4.002±0.035
6	0.330±0.004	0.292±0.021	7.672±0.303	6.693±0.043
8	0.230±0.012	0.242±0.032	8.901±0.058	8.368±0.028
10	0.280±0.007	0.298±0.023	8.442±0.192	8.113±0.027
12	0.490±0.007	0.491±0.031	7.811±0.194	7.494±0.016

를 이용하여 각각 측정하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 기존의 분석방법에 의한 측정값과 바이오센서를 이용한 분석방법에 의한 결과간에 유사한 값으로 나타났다. 한편, 이 등⁽²⁰⁾에 따르면 alcohol oxidase를 이용한 알코올센서에서 타성분이 미치는 영향 중 에탄올을 제외하고는 거의 없었다고 보고하였다. 그러나, 탁주 중에 메탄올은 극미량이기 때문에 alcohol oxidase를 이용한 바이오센서에 의해 에탄올을 측정하는 경우 타성분에 의한 기질의 저해작용은 미미하여 에탄올 함유시료의 측정에는 무리가 없을 것으로 예상된다. 그러므로, dual cathode electrode로 이루어진 바이오센서를 이용하여 발효과정 중 변화하는 에탄올 및 포도당의 함량을 신속하게 측정함으로써 탁주의 발효공정을 제어하는 데에 이용할 수 있을 것이다.

요 약

멤팔로 탁주를 제조하여 발효과정 중에 변화되는 에탄올 및 포도당의 함량을 동시에 측정할 수 있는 바이오센서를 dual cathode electrode를 이용하여 제작하였다. Alcohol oxidase와 glucose oxidase는 nylon net에 고정화시켜 anode가 한 개이고 cathode가 두 개인 dual cathode electrode에 부착하여 용존산소가 소모되는 변화량을 측정하여 간접적으로 포도당과 에탄올의 농도를 동시에 측정할 수 있도록 하였다. 이 시스템의 최적 조건은 35°C에서 pH 7.5인 0.1 M 인산 완충용액이었다. 바이오센서를 이용하여 측정된 값을 분광광도법과 gas chromatography를 이용한 값과 비교해 본 결과 유사한 것으로 나타났다. Dual cathode electrode를 이용한 바이오센서로 측정할 경우 다른 분석방법과 같은 복잡한 전처리 과정없이 두 가지 성분을 동시에 측정하는 것이 가능함으로써 신속하게 측정할 수 있었으며, 탁주와 같은 발효식품의 발효 중 변화하는 두 가지 성분을 동시에 측정할 수 있었다.

감사의 글

이 연구의 일부는 한국과학재단의 특정연구과제(93-0400-09-3)와 농림수산부의 '95 특정연구과제 "식품산업에서의 바이오센서 시스템 활용기술 개발연구"에 의하여 부분적으로 수행되었음을 깊이 감사드립니다.

문 헌

- Adamowicz, E. and Burstein, C.: L-Lactate enzyme electrode obtained with immobilized respiratory chain from *Escherichia coli* and oxygen probe for specific determination of L-lactate in yogurt, wine, and blood. *Biosensors*, **3**, 27 (1987)
- Belgith, H., Romette, J.L. and Thomas, D.: An enzyme electrode for on-line determination of ethanol and methanol. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 1001 (1987)
- Miyamoto, S., Murakami, T., Saito, A. and Kimura, J.: Development of an amperometric alcohol sensor based on immobilized alcohol dehydrogenase and entrapped NAD⁺. *Biosen. Bioelectro.*, **6**, 563 (1991)
- Mandenius, C.F., Bulow, L., Danielsson, B. and Mosbach, K.: Modeling and control of enzymic sucrose hydrolysis using on-line biosensors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 135 (1985)
- Matsumoto, K., Kamikado, H. and Osajima, Y.: Simultaneous determination of glucose, fructose and sucrose in mixture by amperometric flow injection analysis with immobilized enzyme reactors. *Anal. Chem.*, **60**, 147 (1988)
- Matsumoto, K., Matsubara, H., Ukeda, H. and Osajima, Y.: Simultaneous determination of glucose, ethanol and lactate in alcoholic beverages and serum by amperometric flow injection analysis with immobilized enzymes. *J. Biotechnol.*, **14**, 115 (1990)
- Mizutani, F. and Asai, M.: Simultaneous determination of glucose and sucrose by a glucose-sensing enzyme electrode combined with an invertase-attached cell. *Anal. Chim. Acta.*, **236**, 245 (1990)
- Qu, H.B., Zhang, X.E. and Zhang, S.Z.: Simultaneous determination of maltose and glucose using a dual electrode flow injection system. *Food Chem.*, **52**, 187 (1995)
- Morishita, F., Nishikawa, Y. and Kojima, T.: Simul-

- aneous determination of three species by flow injection analytical method using enzyme-immobilized open-tubular reactors. *Anal. Sci.*, Tokyo, **2**, 411 (1986)
10. Matsumoto, K., Kamikado, H. and Osajima, Y. : Simultaneous determination of glucose, fructose, and sucrose in mixture by amperometric flow injection analysis with immobilized enzyme reactors. *Anal. Chem.*, **60**, 147 (1988)
 11. Swindlehurst, C.A. and Nieman, T.A.: Flow injection determination of sugars with immobilized enzyme reactors and chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta*, **205**, 195 (1988)
 12. Zhang, H.W., Xiariem, Z., Xing, Z. and Song, H. : Study on multiple enzyme electrode for sucrose determination. *Chinese J. Biotechnol.*, **7**, 293 (1995)
 13. 이주선, 이택수, 박성오, 노봉수 : 원료를 달리하여 담금한 탁주 술덧의 향기성분. 한국식품과학회지, **28**, 316 (1996)
 14. Honby, W.E. and Morris, D.L.: In *Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides*. Weetall, H.H. (Ed.), Dekker, New York (1975)
 15. Park, I.S., Kim, J.H., Kim, T.J. and Noh, B.S.: Determination of lactose in milks by multiple enzyme electrode. *Food Biotechnol.*, **4**, 61 (1995)
 16. 박인선 : 효소 고정화 바이오센서를 이용한 식품성분의 동시 측정. 서울여자대학교 박사학위논문 (1996)
 17. 이동희 : Clark 전극에 의한 DO 농도 측정을 위한 절전형 센서 개발에 관한 연구. 전기전자재료학회지, **8**, 254 (1995)
 18. *Methods of Biochemical and Food Analysis*. Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Germany (1996)
 19. 김태진, 노봉수 : 다성분 동시 측정용 바이오센서. 한국 특허출원 중 (1995)
 20. 이옥경, 김태진, 노봉수 : Alcohol oxidase 효소센서를 이용한 알코올 음료 중의 에탄올 정량. 한국식품과학회지, **27**, 266 (1995)
 21. Guilbault, G. G: Immobilized enzymes as analytical reagents. *Appl. Biotechnol., Biotechnol.*, **7**, 85 (1992)

(1996년 7월 23일 접수)