

Carbon Nanotube 전극과 효소반응기로 구성된 Amperometric Biosensor를 이용한 Biogenic Amines 검출

김종원 · 전연희 · 김미라^{1†}

경북대학교 식품영양학과, ¹경북대학교 식품영양학과, 장수생활과학연구소

Determination of Biogenic Amines using an Amperometric Biosensor with a Carbon Nanotube Electrode and Enzyme Reactor

Jong Won Kim, Yeon Hee Jeon and Mee Ra Kim^{1†}

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

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

Abstract

Biogenic amines are synthesized by microbial decarboxylation for the putrefaction or fermentation of foods containing protein. Although biogenic amines such as histamine, tyramine, and putrescine are required for many physiological functions in humans and animals, consumption of high amounts of biogenic amines can cause toxicological effects, including serious gastrointestinal, cutaneous, hemodynamic, and neurological symptoms. In this study, a novel amperometric biosensor was developed to detect biogenic amines. The biosensor consisted of a working electrode, a reference electrode, a counter electrode, an enzyme reactor with immobilized diamine oxidase, an injector, a peristaltic pump and a potentiostat. A working electrode was fabricated with a glassy carbon electrode (GCE) by coating functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNT-NH₂) and by electrodepositing Prussian blue (PB) to enhance electrical conductivity. A sensor system with PB/MWCNT-NH₂/GCE showed linearity in the range of 0.5 μ M~100 μ M hydrogen peroxide with a detection limit of 0.5 μ M. The responses for tyramine, 2-phenylethylamine, and tryptamine were 95%, 75%, and 70% compared to that of histamine, respectively. These results imply that the biosensor system can be applied to the quantitative measurement of biogenic amines.

Key words : Biogenic amines, amperometric biosensor, hydrogen peroxide.

서 론

Biogenic amines(BAs)는 동·식물에서 아미노산의 효소적 탈탄산 반응 또는 알데히드나 케톤기 전이 반응에 의해 생성되는 저분자의 질소화합물을 말한다. 각각의 BAs는 아미노산 전구체로부터 전환되고, 그 구조에 따라 지방족 BAs(putrescine, cadaverine, agmatine, spermine, spermidine), 방향족 BAs(tyramine, phenylethylamine), 헤테로고리 BAs(histamine, tryptamine) 등으로 분류할 수 있으며, 지방족 BAs는 단백질 식품의 부패 지표 물질로 이용되고 있다(Halasz *et al* 1994). 식품 중에 존재하는 BAs는 주로 단백질을 함유한 식품의 부패나 발효·숙성 과정에서 탈탄산 효소 활성을 가진 미생물에 의해 생성된다(Ten *et al* 1990). 외국에서는 치즈, 소시지, 와인, 생선 등의 발효 식품에 다량의 BAs가 함유되어 있음이 보고되었고, 국내에서도 된장, 간장, 김치 및 주류 등의 발효

식품에 비발효 식품보다 많은 BAs가 함유되어 있음이 확인되었다(Shalaby AR 1996, Chae *et al* 2005, Eom *et al* 2006). 정상인이 식품으로 섭취하는 일반적인 수준의 BAs는 장내에 존재하는 mono-/di-amine oxidase에 의하여 불활성화되어 인체에 독성을 나타내지 않으나, 다량 섭취시에는 독성을 나타낼 수 있다. 식품 섭취로 인한 histamine 독성 증상의 대부분이 고등어나 참치, 꽂치, 정어리 등의 생선을 섭취하였을 때 발생하였기 때문에 histamine 독성은 'scombrototoxicosis'라고 불리며(Taylor & Eitenmiller 1986), 피부와 장관, 혈류, 신경에 다양한 증상을 나타낸다. Tyramine은 체내로 흡수되어 norepinephrine의 분비를 자극하고 혈압 상승을 유발하는데, 이런 혈류 작용 외에도 편두통과 심박 증가, 눈물, 침흘림, 호흡 증가, 호흡 곤란 등을 일으키며, 고용량의 tyramine은 혈당을 증가시킨다는 연구도 보고되었다(Joosten HMLJ 1988). 따라서 세계 각국은 BAs에 대한 섭취 허용량을 규정하고 있는데, 미국의 FDA는 참치와 고등어 등 관련 어종에 대한 histamine의 섭취 허용량을 50 mg/100 g 이하로 설정해 놓았고,

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

EU에서는 고등어과와 청어과 등 몇 종에 대해 10 mg/100 g 이하로 규제하고 있으며, 뉴질랜드에서는 어류 및 어류 제품에 대해 200 mg/kg 이하로 규정하고 있다. 또한, 일본에서는 식물 발효 식품에 대한 histamine 및 tyramine의 권장 규격을 ‘불검출’로 규정하고 있다. 그러나 우리나라에서는 아직 BAs에 대한 섭취 허용량이 설정되지 않아 섭취 허용량 설정을 위한 여러 가지 자료와 효율적인 BAs 분석 방법 정립이 요구된다.

BAs 분석에는 gas chromatography와 thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography, capillary electrophoretic method 등 다양한 방법이 이용되고 있고, AOAC 법에서는 양이온 교환 칼럼으로 분리한 다음 *o*-phthalaldehyde로 유도체화 하여 형광검출기로 분석하는 후-칼럼(post column) 방법이 사용되고 있다. 그러나 chromatography는 분석 결과가 정확한 반면 시료의 전처리가 복잡하고 긴 분석시간이 소요되기 때문에 근래에는 간단한 전처리로 신속하게 분석할 수 있는 방법을 개발하기 위한 연구가 수행되고 있다. Histamine의 신속 검출을 위한 단일 항체 클론을 이용한 ELISA 법이 연구되었으며(Guesdon *et al* 1986), monoamine oxidase, phospholipase D, choline oxidase 등의 효소나 식물 조직을 이용하여 BAs를 단시간에 검출하기 위한 바이오센서 개발에 대한 연구들이 보고되었다(Karube *et al* 1979, Karube *et al* 1980, Botre *et al* 1993).

본 연구에서는 diamine oxidase에 의해 알데히드와 암모니아, 과산화수소로 분해되는 BAs를 보다 신속하고 정확하게 검출하기 위해 전기적 전도성이 우수한 것으로 알려진 carbon nanotubes(CNTs)(Frank *et al* 1998)을 이용하여 작업전극을 제작하였으며, 전극의 성능을 더욱 향상시키기 위해 CNTs를 기능화하여 이용하였다. 또한, diamine oxidase를 고정화하여 효소반응기를 제작하였고, 전극과 효소반응기, 전기 검출기를 이용한 바이오센서 시스템을 구축하여 BAs가 분해될 때 생성되는 과산화수소의 농도를 전기적으로 측정함으로써 BAs의 농도를 분석하기 위한 바이오센서의 원리와 시스템을 구축하였으며(Fig. 1), 이를 이용하여 방향족 BAs인 tyramine, phenylethylamine과 헤테로고리 BAs인 histamine, tryptamine의 농도를 측정하였다.

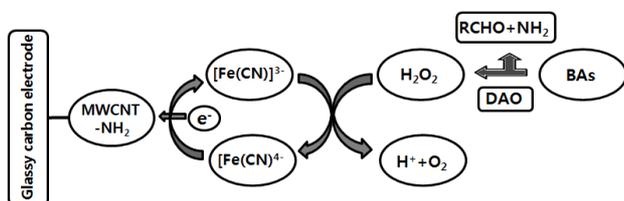


Fig. 1. The reaction of BAs in biosensor system.
(BAs : Biogenic amines, DAO : Diamine oxidase)

재료 및 방법

1. 시약 및 기구

실험에 사용된 MWCNTs(multi-walled carbon nanotubes, C-tube 100)는 CNT Co. LTD(Incheon, Korea)에서 구입하였고, 작업 전극으로 이용된 glassy carbon electrode(GCE, CHI 104)는 CH Instruments (USA)로부터 구입하였으며, Ag/AgCl reference electrode(K0260)는 Princeton Applied Research(U.S.A.)에서 구입하였다. Histamine, tyramine, phenylethylamine, tryptamine, diamine oxidase(EC 1.4.3.6, from porcine kidney), glutaraldehyde, glass aminopropyl(500 Å, 200~400 mesh average pore size), bovine serum albumin은 Sigma(St. Louis, Mo. USA)에서 구입하였다. FIA system 구성을 위한 peristaltic pump(IPC-N-8)와 tygon tubing은 Ismatec Co.(Glattbrugg-Zürich, Switzerland)에서 구입하였으며, 전기 화학 반응을 측정하기 위해서 Potentiostat/galvanostat(model 273A, EG&G, USA)를 이용하였다.

2. MWCNTs의 기능화 및 FT-IR 측정

MWCNTs의 성질을 향상시키기 위하여 MWCNTs를 기능화하여 이용하였다. MWCNTs의 기능화는 Santhosh *et al*(2006)와 Kim *et al*(2009)의 방법을 수정하여 세 단계에 걸쳐 실시하였다. 첫 단계에서는 5.0 g의 MWCNTs를 100 mL의 60% nitric acid와 혼합하고 1시간 동안 초음파 처리하여 분산시킨 다음 60°C(± 3°C)에서 24시간 환류한 후 상온으로 냉각하고 polycarbonate membrane(0.2 μm pore size)으로 여과하였다. 잔사를 증류수로 pH가 중성이 될 때까지 세척하고, 진공 건조기에서 60°C로 15시간 동안 건조시켰다. 두 번째 단계로 건조된 MWCNTs 1.2 g을 thionyl chloride 20 mL와 혼합하고 1단계와 마찬가지로 환류, 여과한 다음 tetrahydrofuran (THF)으로 여러 차례 세척한 후 건조하였다. 마지막 단계로 0.14 g의 poly(ethylene glycol)bis(3-aminopropyl)을 THF 30 mL에 용해하고, 여기에 이전 단계에서 건조된 MWCNTs 0.5 g을 첨가하여 60°C에서 24시간 동안 환류한 다음 여과, 분리하여 진공 건조기에서 건조하였다. MWCNTs의 기능화를 확인하기 위하여 FT-IR(Spectrum GX & AutoImage, Perkin-Elmer, USA)을 이용해 각 단계에서 기능기 수종의 변화를 측정하였다.

3. 작업전극의 제작

작업전극은 GCE에 기능화한 MWCNTs를 부착시킨 다음 산화·환원 중간 매개체로 prussian blue(PB)를 코팅하여 PB/MWCNTs-NH₂/GCE를 제작하였다. MWCNTs-NH₂/GCE는 건조된 MWCNTs 10 mg과 dimethylformamide 0.25 mL를 혼합

하여 1시간 동안 초음파 처리한 후 유발에서 2시간 정도 강하게 저어 분산시킨 다음 GCE 표면에 고르게 분사하여 12시간 이상 건조·고착시켜 제작하였다. PB 막은 MWCNTs-NH₂/GCE를 2 mM potassium ferricyanide와 2 mM iron chloride, 0.1 M potassium chloride를 10 mM hydrochloric acid에 용해한 용액에 0~1.2 V, scan rate 50 mV로 30회 cyclic voltammetry 처리한 전기적 중합법을 이용하여 전극에 입혔다.

4. 효소반응기의 제작

효소인 diamine oxidase를 공유결합법으로 glass beads에 고정하여 효소반응기를 제작하였다. 0.1 M phosphate buffer solution(PBS)(pH 7.2)를 이용하여 5% glutaraldehyde를 제조한 다음 이를 glass aminopropyl 0.5 g과 혼합하여 상온에서 5시간 동안 교반하였다. 잔류하는 glutaraldehyde를 제거하기 위하여 증류수로 수차례 세척하고, 다시 PBS로 세척한 후 5 mL PBS에 담가 30분 동안 냉장고에 정치시켰다. Diamine oxidase 15 units를 glass beads에 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 효소가 고정화된 glass beads는 3차 증류수로 수차례 세척하고 다시 PBS로 세척하였다. 세척한 glass beads를 tubing에 채우고 0.1 M PBS(pH 7.0)로 충진한 후 tubing의 양 끝을 다공성 종이와 nipple로 막아 효소반응기를 제작하였다. 효소반응기는 사용하기 전까지 4°C 냉장 보관하였다.

5. 바이오센서의 구성

검출을 위한 flow-through cell은 삼전극계로 앞서 제작한 PB/MWCNT-NH₂/GCE를 작업 전극으로 사용하고, Ag/AgCl과 platinum(Pt) wire를 기준 전극과 상대 전극으로 각각 사용하였다. Flow-through cell은 자체 제작하여 세 전극이 고르게 위치할 수 있도록 조정하였으며, cell 내에는 carrier가 3 mL 수준으로 항상 유지되도록 유속을 조절하였다. 시료 분석을 위한 flow through analysis(FIA) system은 syringe roading injector, flow-through cell, diamine oxidase 효소반응기, peristaltic pump, potentiostat(model 273A, EG&G, U.S.A.)로 구성되었으며, Fig. 2와 같이 배치되었다. 반응 데이터는 Model 270/250 research electrochemistry software 4.30 program을 이용하여 얻었다.

6. Hydrogen peroxide와 BAs 시료에 대한 감응 전류 측정

BAs와 diamine oxidase가 반응하여 생성되는 최종 산물인 hydrogen peroxide의 검출능을 확인하기 위하여 hydrogen peroxide를 농도별로 주입하여 작업전극의 성능을 실험하였다. Carrier의 pH에 따른 감응 전류의 크기를 측정하여 최적의 pH를 정하고, BAs 표준 용액을 농도별로 주입하여 이 때 나

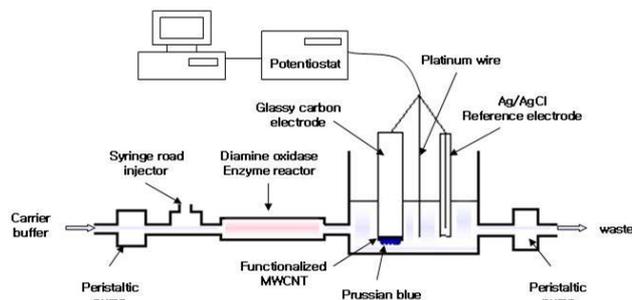


Fig. 2. Schematic diagram of the biogenic amines biosensor with flow injection analysis system.

타나는 전류 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. MWCNTs의 기능화

CNT는 높은 전기전도성, 화학적 안정성, 매우 높은 기계적 강도와 Young's modulus 등 독특한 성질로 인해 주목을 받고 있는 신소재로서 전기, 정보통신, 반도체, 환경 및 의료 등 다양한 산업 분야에 이용되고 있다. 특히 바이오센서 분야에서는 이를 이용하여 센서의 감도와 성능을 향상시키기 위한 연구들이 수행되고 있으며(Guo *et al* 2005, Gooding JJ 2005), CNT를 변형시킨 전극을 이용하여 dopamine, ascorbic acid, uric acid 등 여러 가지 분석물을 검출하기 위한 연구들이 보고되었다.(Zhang *et al* 2005a, Zhang *et al* 2005b, Rubianes & Rivas 2003). 본 연구에서도 전기 전도성이 우수하며 내구성이 좋은 MWCNTs를 소재로 전극을 제작하였으며, MWCNTs의 성능을 더욱 향상시키기 위하여 이를 기능화시켜 사용하였다. MWCNTs의 기능화는 FT-IR 측정을 통하여 확인하였다. 세 단계의 처리 과정을 통해 MWCNTs에 아민기가 도입되는데, 첫 단계에서는 산처리를 통해 MWCNT가 산화·정제 과정을 거치게 된다. 산처리 시 MWCNTs의 표면이 화학적으로 산화되면서 -COOH의 기능이 도입되어 carboxylated MWCNT(MWCNT -COOH)를 얻을 수 있다(Duesberg *et al* 1998). FT-IR 측정을 통해 MWCNT에 산처리 시 1,730 cm⁻¹ 영역에서 흡수 스펙트럼의 피크가 증가되는 것으로 나타나 -COOH 기능이 도입되었음을 알 수 있었으며, 3,400 cm⁻¹ 영역에서도 O-H 결합에 의한 피크의 확연한 증가를 볼 수 있었다(Fig. 3). 두 번째 과정에서는 MWCNT-COOH에 thionyl chloride를 처리하여 카르복실기의 하이드록실기를 -Cl로 치환하는데, 이 과정은 amide 결합을 유도하기 위해 거치는 단계로 MWCNT-COCl이 형성된다. 세 번째 단계에서 MWCNT-COCl에 아민기를 함유한 시약을 처리하면 결사슬에 아민기가 도입되어 amine-functionalized MWCNT(MWCNT-

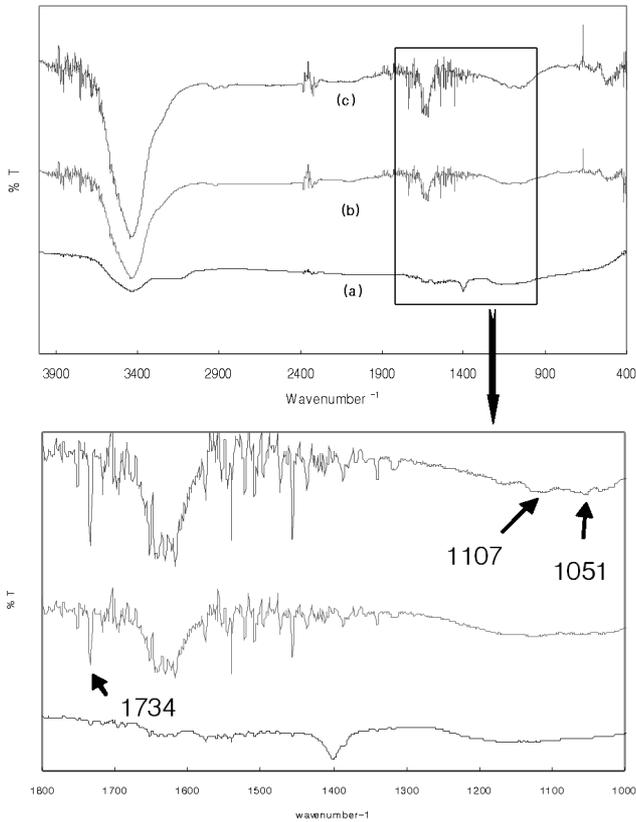


Fig. 3. FT-IR spectra.
 (a) bare MWCNT, (b) MWCNT- COOH, (c) MWCNT-NH₂.

NH₂)를 얻을 수 있다. FT-IR 측정을 통해 MWCNT-COCl에 poly (ethylene glycol)-bis-(3-aminopropyl)를 처리 시 Fig. 3의 (c)에서와 같이 1,107 cm⁻¹과 1,051 cm⁻¹ 영역에서 C-N stretching vibration에 의한 peak가 나타난 것으로 보아 MWCNTs에 아민기가 도입되었음을 확인할 수 있었다.

2. GCE와 MWCNT-NH₂/GCE, PB/MWCNT-NH₂/GCE의 반응 비교

유리탄소 전극(GCE)과 여기에 MWCNT를 붙여 제작한 전극(MWCNT-NH₂/GCE), MWCNT-NH₂와 PB를 모두 입힌 전극(PB/MWCNT-NH₂/GCE)의 cyclic voltammetry 반응을 확인하여 이들 전극의 성능을 비교하였다. PB는 그 독특한 cubic 구조로 인하여 인공적인 peroxidase로 불릴 만큼 효과적으로 과산화수소의 분해를 촉매함으로써 보다 빠른 전류의 변화를 측정하는데 유용하다. Fig. 4의 그래프 내 화살표를 통하여 각 전극의 최대 산화 전류가 나타나는 전압 위치와 0.1 mM의 과산화수소 주입 시 나타나는 전류 변화 정도를 나타내었다. 세 전극의 최대 산화 전류가 나타나는 전압은 각각 다르게 나타났으며, 각각의 전극에 연속적인 0.1 mM의 과산화수소 주입 시, GCE는 낮은 충전 전류와 약 9 nA의 약한 전류

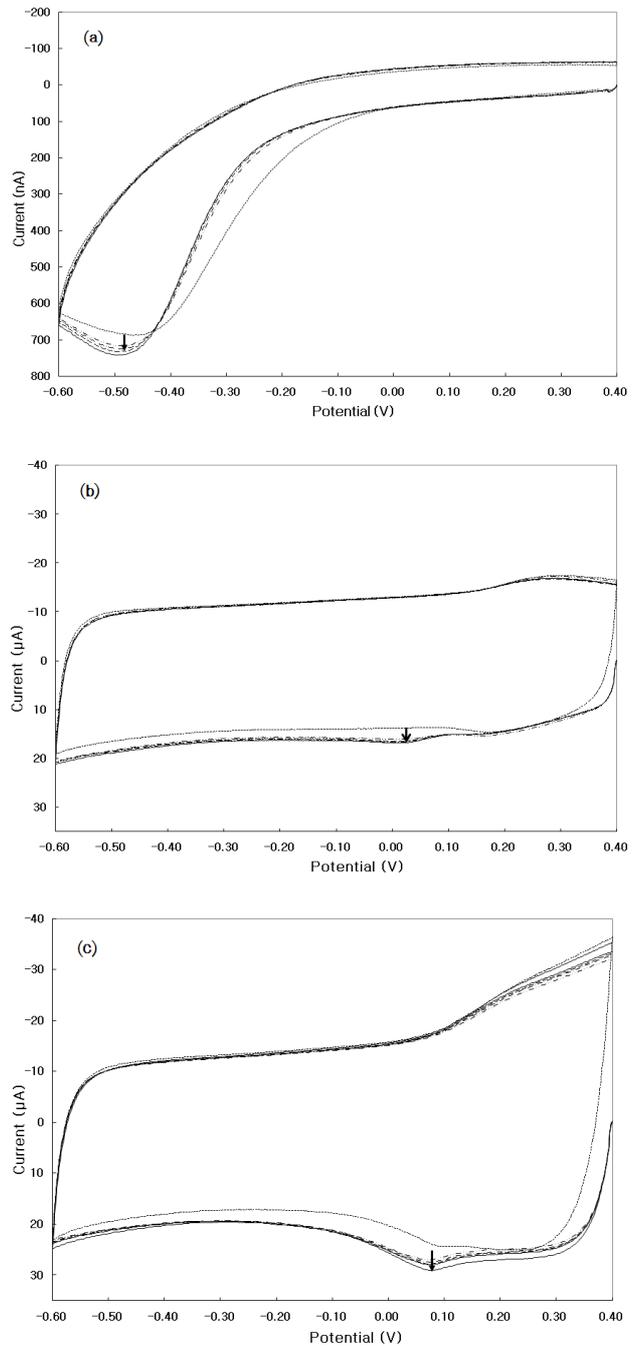


Fig. 4. Cyclic voltammogram with successive addition of 0.1 mM hydrogen peroxide.
 (a) bare GCE, (b)MWCNT-NH₂/GCE, (c) PB/MWCNT-NH₂/GCE.

증가를 나타내었으나, MWCNT-NH₂를 도입한 전극은 평균 약 150 nA의 전류 증가를 보였고, PB 처리를 한 PB/MWCNT-NH₂ 전극은 약 300 nA 수준으로 GCE에 비해 30배 이상 높은 수준의 충전 전류와 강한 산화 반응을 나타내었다. 또한, PB/MWCNT-NH₂ 전극은 전체적인 전류 흐름에서 GCE에 비

해 75배 이상의 전류 감도를 보였다. 따라서 PB/MWCNT-NH₂/GCE 전극이 전류 측정에 가장 적합함을 확인할 수 있었다.

한편, -0.1~0.1 V 부근에서 과산화수소의 최대 산화전류가 나타나 본 실험에서는 -0.1 V의 고정전위를 이용하였다. 과산화수소 측정 시 과산화수소의 산화를 위해 고전위를 적용하게 되는데, 0.6 V 이상의 전위에서는 ascorbic acid 같은 물질이 혼합되어 있으면 동시에 산화가 일어나 전류 측정에 방해가 될 수 있으므로(Karyakin *et al* 1994), 본 실험에서는 산화 전위를 -0.1 V로 낮추어 방해 물질의 산화에 의한 측정 전류의 부정확함을 줄이고자 하였다.

3. 작업전극의 과산화수소에 대한 감응도 분석

BAs 시료에 대한 반응 측정에 앞서 최종 측정 대상 물질인 과산화수소에 대한 전극의 감응성 분석을 통하여 전극의 이용 가능성을 평가하였다. 과산화수소를 농도별로 주입하였을 때 나타난 전극 전류의 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 과산화수소 표준 용액을 농도별로 주입하였을 때 0.5~100 μM에서 약 $r^2=0.99$ 의 높은 상관성을 나타내었으며, 검출 한계는 0.5 μM로 측정되었다. Phthalocyanines을 화학적으로 변화시켜 만든 voltammetric electrode를 기초로 하여 BA를 측정할 Rodríguez-Méndez *et al*(2009)의 연구에서는 실험에 사용한 carbon paste electrode(CPE)와 screen-printed electrode(SPE) electrode의 검출 한계가 각각 4×10^{-4} mol/L와 5×10^{-5} mol/L로 나타나, 본 연구에서 사용한 전극의 검출 한계가 더 우수한 것으로 나타났다. 이 결과에 비추어 볼 때 본 실험에서 제작한 전극은 BA를 측정하기 위한 바이오센서의 검출기로 사용하기에 충분한 것으로 판단되었다.

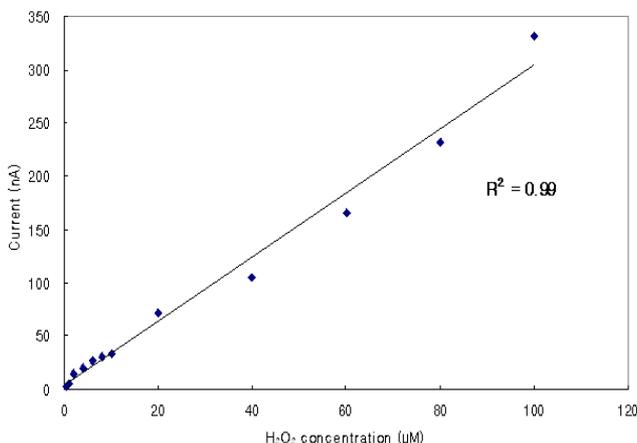


Fig. 5. Response current of hydrogen peroxide to prepared electrode.

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

4. Carrier의 pH에 따른 감응 전류 비교

PBS가 diamine oxidase류에 가장 적합하다고 보고한 선행 연구(Padiglia *et al*, 1991)에 따라, 본 실험에서는 carrier 용액으로 0.1 M의 PBS를 사용하였고, 최적의 pH를 찾기 위하여 PBS의 pH를 변화시키며 실험하였다. pH가 다른 PBS에 각각 5 μM의 histamine을 주입하였을 때 나타나는 전류를 기준으로 하여 tyramine, phenylethylamine, tryptamine을 주입하였을 때 감지되는 상대적인 전류의 크기를 비교하였다(Fig. 6). 상업용 diamine oxidase에서 pH 7.2, 37°C에서 1 μM putrescine을 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정의하고 있듯이 diamine oxidase의 최적 pH는 중성에 가깝다. 그러나 PB를 기초로 한 전극은 대부분 중성보다 낮은 pH에서 안정성이 우수하게 나타나고 있어(Li *et al* 2007, O'Halloran *et al* 2001), 효소의 최적 pH와 전극의 최적 pH를 함께 고려하여 반응에 사용하는 carrier의 pH를 결정하여야 한다. 본 실험에서는 시료 5 μM histamine에 대한 전극의 반응은 pH 7.0에서 약 24 nA로 측정되었고, pH 6.6에서는 pH인 7.2와 유사한 수준인 약 19 nA로 나타났으며, pH가 더 낮아지거나 높아질수록 반응의 강도는 낮아졌다. 이 결과는 diamine oxidase를 이용한 바이오센서의 연구에서 Botre *et al*(1993)이 보고한 최적 pH인 6.0~7.0과 Wimmerova와 Macholan(1999)이 보고한 최적 pH인 7.0~8.0과 유사하였으나, Yano *et al*(1996)에 의해 보고된 최적 pH인 9.0과 약간의 차이를 나타내었는데, 이는 전극의 제작에 이용된 물질이나 시료 등에 따른 차이 때문인 것으로 사료되며, 본 연구에서는 효소 및 전극의 안정성을 함께 고려하여 pH 7.0의 0.1 M PBS를 carrier로 사용하기로 결정하였다.

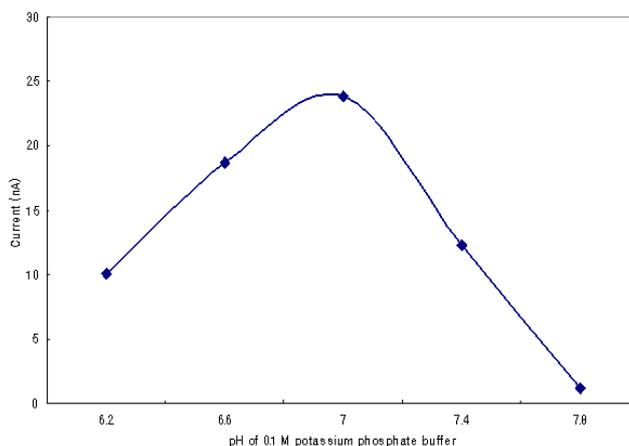


Fig. 6. Response current according to pH of background electrolyte (0.1 M potassium phosphate buffer) with injection of 5 μM histamine standard solution.

Experimental condition: applied potential, -0.1 V; flow rate, 2.0 mL/min.

5. BAs 시료에 대한 전극의 감응 전류

FIA system에 제작한 효소반응기를 장치하고 시료인 histamine을 주입하였을 때 측정된 전류를 Fig. 7에 나타내었다. BAs에 대한 전극의 반응은 BAs의 농도뿐만 아니라 고정화된 효소와 기질과의 반응 시간, 효소의 효율, 흐름 과정 중 생성된 과산화수소의 희석 정도에 영향을 받기 때문에 일반적으로 과산화수소를 독립적으로 주입하였을 때보다 낮은 수준의 반응을 보이는데, 본 실험에서도 기질에 대한 반응은 과산화수소에 대한 반응보다 낮게 나타났다. MWCNTs를 이용한

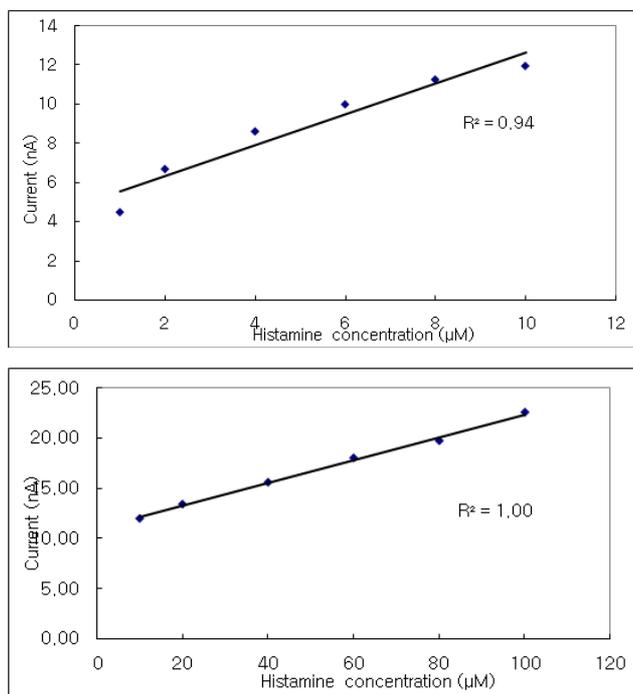


Fig. 7. Response current of histamine measured with the working electrode.

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

BAs 검출용 바이오센서에 대한 선행 연구가 거의 없어 결과를 비교하기 어렵고, 전극이나 사용된 효소 등의 조건이 달라 절대적인 비교는 불가능하지만 Carelli *et al*(2007)의 연구에서는 FIA system에서 histamine을 100 μ M로 주입하였을 때 약 14 nA 수준의 반응이 나타났다고 보고되어 본 실험에서 제작된 바이오센서의 감응도(약 22 nA)가 좀 더 높은 것으로 나타났다. 선형 관계가 나타나는 농도 범위를 보면 저농도인 $1\sim 10$ μ M과 상대적으로 고농도인 $10\sim 1000$ μ M에서 상관계수가 각각 0.94 와 1.00 으로 나타났다. Horseradish peroxidase를 고정화하고 saturated calomel electrode(SCE)와 Pt 전극을 이용하여 BAs를 측정하는 Castilho *et al*(2005)의 연구에서는 40 to 470 ng/mL에서 선형관계를 얻었으며, 검출 한계는 17 ng/mL로 나타나, 본 연구에서 사용한 전극의 선형관계가 더 넓은 범위에서 나타났고 검출한계도 우수한 것으로 보여졌다.

BAs 물질 중 tyramine과 phenylethylamine, tryptamine은 histamine보다 상대적으로 낮은 수준의 감응도를 나타내었다 (Table 1). Tyramine이 histamine 반응의 약 95% 정도로 가장 높게 측정되었으며, BAs의 농도에 따라 다소 차이를 보였다. Phenylethylamine은 histamine에 비해 $67.9\sim 88.6\%$ 의 상대적인 감응도를 보였고, tryptamine은 $65.6\sim 83.1\%$ 의 상대적인 감응도를 보였다. 산소 전극과 chitopearl에 diamine oxidase를 고정화한 효소반응기를 이용하여 BAs를 측정하는 Park *et al*(1999)의 연구에서도 histamine이 putrescine의 약 70% , tryptamine이 putrescine에 비해 약 14% 수준의 반응이 나타나 본 연구에서와 같이 BAs의 각 기질에 따라 감응도에 차이가 있음을 보고하였다. 전체적으로 볼 때 본 연구에서 제작한 전극과 이를 이용하여 구성된 바이오센서 시스템이 낮은 검출 한계와 높은 수준의 반응 감도를 나타내어 신속하고 편리하게 BAs를 검출하는데 이용될 수 있을 것으로 기대되었다. 본 연구에서는 BAs를 측정하기 위해 전기전도성이 우수한 MWCNT에 아민기를 도입하여 개질하고 PB 막을 입혀 작업 전극을

Table 1. Response current of histamine and current and relative response of other BAs (tyramine, phenylethylamine, and tryptamine) to histamine

Standard solution concentration (μ M)	Current for histamine (nA)	Tyramine		Phenylethylamine		Tryptamine	
		Current (nA)	Relative response to histamine (%)	Current (nA)	Relative response to histamine (%)	Current (nA)	Relative response to histamine (%)
4	8.62	8.49	98.5	5.92	68.7	5.37	62.3
8	11.27	10.55	93.6	7.96	70.7	8.89	78.9
20	13.38	13.01	97.3	11.85	88.6	11.12	83.1
60	18.00	16.99	94.4	13.79	76.6	12.77	70.9
100	22.56	21.51	95.3	15.33	67.9	14.81	65.6

제조하였으며, 효소를 고정화하여 효소반응기를 제작함으로써 바이오센서의 원리와 시스템을 구축하였고, 시스템의 기본적인 성능이 우수함을 검증하였다. 향후 후속 연구를 통해 변수 조절을 통한 시스템의 최적화 및 식품 중 BAs의 농도 측정 등이 수행될 것이다.

요 약

식품 중 잠재적 위험 물질로 작용할 수 있는 BAs의 신속 검출을 위하여 전기전도성이 우수하다고 알려진 MWCNTs의 개질, 작업 전극의 제작, 효소반응기 제작을 통해 바이오센서 시스템을 구성하고 hydrogen peroxide와 주요 BAs 물질에 대한 감응도를 측정하였다. MWCNTs의 성질을 향상시키기 위해 아민기를 도입하였고, 이를 FT-IR 스펙트럼을 통해 확인하였다. 아민기를 도입한 MWCNTs를 GCE에 고착시키고 PB 막을 입힌 후 cyclic voltammetry 반응을 비교한 결과, PB/MWCNT-NH₂/GCE 전극이 GCE에 비해 산화 전류는 8배 이상, 전체 전류는 25배 이상의 높은 전류 흐름을 보였으며, 미세한 전류 흐름의 측정도 용이해진 것으로 나타났다. 또한, carrier buffer의 pH를 달리하여 제작된 전극의 감응 전류를 비교한 결과, pH 7.0에서 전류의 감응도가 가장 높게 측정되었다. 과산화수소를 주입하여 전극의 성능의 검증한 결과, 0.5 μM~100 μM 범위에서 선형관계를 보였으며, 검출 한계는 0.5 μM로 측정되었다. Histamine 표준 용액 주입 시 1 μM~100 μM 범위에서 선형 관계를 나타내었고, tyramine은 histamine에 비해 약 95%, 2-phenylethylamine과 tryptamine은 histamine에 비해 각각 75%, 70% 수준의 감응도를 나타내었다. 전체적으로 볼 때 본 연구에서 개발된 전극과 이를 이용하여 구성된 바이오센서 시스템이 낮은 검출 한계와 높은 수준의 반응 감도를 나타내어 BAs를 측정하는데 좋은 장치임이 확인되었다.

감사의 글

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

문 헌

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. *Sensors and Actuator B* 15-16: 135-140.

Carelli D, Centonze D, Palermo C, Quinto M, Rotunno T (2007)

An interference free amperometric biosensor for the detection of biogenic amines in food products. *Biosens Bioelectron* 23: 640-647.

Castilho TJ, Sotomayor MPT, Kubota LT (2005) Amperometric biosensor based on horseradish peroxidase for biogenic amine determinations in biological samples. *J Pharm Biomed Anal* 37(4): 785-791.

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.

Duesberg GS, Muster J, Krstic V, Burghard M, Roth S (1998) Chromatographic size separation of single-wall carbon nanotubes. *Applied Physics A* 67: 117-119.

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.

Frank S, Poncharal P, Wang ZL, Deheer WA (1998) Carbon nanotube quantum resistors. *Science* 280: 1744-1746.

Gooding JJ (2005) Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing *Electrochim Acta* 50: 3049-3060.

Guesdon JL, Chevrier D, Mazié JC, David B, Avrameas S (1986) Monoclonal anti-histamine antibody: preparation, characterization and application to enzyme immunoassay of histamine. *Journal of Immunological Methods* 87: 69-78.

Guo M, Chen J, Li J, Tao B, Yao S (2005) Fabrication of polyaniline/carbon nanotube composite modified electrode and its electrocatalytic property to the reduction of nitrite. *Anal Chim Acta* 532: 71-77.

Halasz A, Barath A, Simon-Sarkadi L, Holzapfel W (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol* 51: 42-49.

Joosten HMLJ (1988) The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance. *Neth Milk Dairy J* 42: 25-42.

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.
- Kim MK, Kim JW, Kim MR (2009) Quantitative analysis of ergosterol as a biomarker of mold-contaminated foods using the enzyme biosensor. *Korean J Food Cookery Sci* 25: 252-259.
- Li Z, Chen J, Li W, Chen K, Nie L, Yao S (2007) Improved electrochemical properties of Prussian blue by multi-walled carbon nanotubes. *J Electroanal Chem* 603: 59-66.
- O'Halloran MP, Pravda M, Guilbault GG (2001) Prussian blue bulk modified screen-printed electrodes for H₂O₂ detection and for biosensors. *Talanta* 55: 605-611.
- Padiglia A, Cogoni A, Florss G (1991) Characterization of amine oxidase from Pisum, Lens, Lathyrus and Cicer. *Phytochemistry* 30: 3895-3897.
- Park IS, Kim DK, Shon DH, Cho YJ, Kim NS (1999) Measurement of biogenic amines with a chitopearl enzyme reactor. *Korean J Food Sci Technol* 31: 593-599.
- Rodríguez-Méndez ML, Gay M, Apetrei C, De Saja JA (2009) Biogenic amines and fish freshness assessment using a multisensor system based on voltammetric electrodes. Comparison between CPE and screen-printed electrodes. *Electrochim Acta* 54: 7033-7041.
- Rubianes MD, Rivas GA (2003) Carbon nanotubes paste electrode. *Electrochem Commun* 5:689-694.
- Santhosh P, Manesh 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 *Anal Chim Acta* 575: 32-38.
- Shalaby AR (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Research International* 29: 675-690.
- Taylor SL, Eitenmiller RR (1986) Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit Rev Toxicol* 17: 91-128.
- Ten BB, Damink C, Joosten HMLJ, Huis In't VJHJ (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol* 11: 73-84.
- Wimmerova M, Macholan L (1999) Sensitive amperometric biosensor for the determination of biogenic and synthetic amines using pea seedlings amine oxidase: A novel approach for enzyme immobilisation. *Biosens Bioelectron* 14: 695-702.
- Yano Y, Miyaguchi N, Watanabe M, Nakamura T, Youdou T, Miyai J, Numata M, Asano Y (1996) Monitoring of beef aging using a two-line flow injection analysis biosensor consisting of putrescine and xanthine electrodes. *Food Research International* 28: 611-617.
- Zhang M, Gong K, Zhang H, Mao L (2005a) Layer-by-layer assembled carbon nanotubes for selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid. *Biosens Bioelectron* 20: 1270-1276.
- Zhang P, Wu F, Zhao G, Wei X (2005b) Selective response of dopamine in the presence of ascorbic acid at multi-walled carbon nanotube modified gold electrode. *Bioelectrochem* 67: 109-114.

접 수: 2010년 9월 1일
 최종수정: 2010년 9월 30일
 채 택: 2010년 10월 5일