

발간등록번호

11-1543000-002034-01

바이오제닉 아민 산화 및
수산화 효소를 이용한
히스타민 신속 검출 키트 개발
최종보고서

2017. 12. 29.

주관연구기관 / (주)바이오맥스
협동연구기관 / (주)두젠바이오

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “바이오제닉 아민 산화 및 수산화 효소를 이용한 히스타민 신속 검출 키트 개발”(개발기간 : 2015. 10. 22 ~ 2017. 10. 23)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 12. 29.

주관연구기관명 : ㈜바이오맥스 (대표자) 김재훈



참여기관명 : ㈜두젠바이오 (대표자) 박원철



주관연구책임자 : 권찬호

참여기관책임자 : 박원철

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	110513-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.10.22.~ 2017.10.23	단 계 구 분	2단계 / 2단계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	바이오제닉 아민 산화 및 수산화 효소를 이용한 히스타민 신속 검출 키트 개발			
연구책임자	권찬호	해당단계 참 여 연구원 수	총: 9명 내부: 9명 외부: 명	해당단계 연 구 개 발 비	정부:140,000천원 민간: 46670천원 계:186,670천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 9명 내부: 9명 외부: 명	총 연구개발비	정부:280,000천원 민간: 93,340천원 계:373,340천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)바이오맥스 부설연구소			참여기업명: (주)두젠바이오	
위탁연구	건국대학교 생명공학과			연구책임자: 안중훈	
바이오제닉 아민 산화효소와 수산화효소를 비롯하여 검출키트를 위한 발색 또는 형광 염료를 자체적으로 제조하였음. 이를 기반으로 히스타민을 신속 검출 할 수 있는 발색 검출 키트와 형광 검출 키트를 각각 개발하여 제품화하였음. 이러한 연구 개발을 통해 논문 1편, 학술대회 발표 2건과 특허 2건을 등록하였으며 제품화를 통해 제품 매출 성과를 올릴 수 있음. 연구원 채용 1인과 개발한 제품에 대한 서울 경제 신문을 통한 홍보 1건의 성과를 올릴 수 있었음. 또한 효소 재조합 기술 및 안정화 기술과 발색 및 형광 염료 제조 기술을 기반으로 히스타민 이외에도 콜레스테롤과 같은 대사체를 신속 검출할 수 있는 metabolite assay kit를 관련 제품으로 개발하여 제품화하였음.				보고서 면수 : 113 페이지	

〈 요약 문 〉

		코드번호		D-01	
연구의 목적 및 내용	수산물 및 식품의 생산, 제조 및 유통 과정에서 자연 발생하는 유해물질로서 바이오제닉 아민 중에서 현재 식품공전 등으로 규제하고 있는 히스타민을 신속 검출 할 수 있는 효소 기반의 현장형 검출 키트를 개발하고자 함. 이를 위해서 1) 재조합기술을 이용하여 히스타민 신속 검출을 위한 산화 효소와 수산화 효소를 개발하고 2) 화학적 합성 기술을 이용하여 히스타민 신속 검출을 위해 적합한 고감도의 발색 및 형광 염료를 개발하고 3) 개발된 효소와 염료를 이용하여 현장에서 수산물 및 식품으로부터 유해물질로서 히스타민을 신속, 정확하게 검출 및 정량 분석이 가능한 현장형 검출 키트 개발을 목표로 함.				
연구개발성과	바이오제닉 아민 산화효소와 수산화효소를 비롯하여 검출키트를 위한 발색 또는 형광 염료를 자체적으로 제조할 수 있는 재조합 기술 및 합성 기술을 개발하였음. 이를 기반으로 히스타민을 신속 간편 검출 할 수 있는 검출 키트를 개발하기 위해 산화효소와 수산화효소의 활성을 조사하여 다양한 조건에서 효소 활성을 저소하여 히스타민을 신속 검출하기 위한 반응 조건을 최적화하였음. 이러한 최적화를 기반으로 참치 캔과 양념된 참치캔 시료로부터 히스타민을 신속 검출 할 수 있는 발색 검출 키트와 형광 검출 키트를 개발하여 Neogen 사의 Maxsignal histamine ELISA test kit와 Bio scientific 사의 Maxsignal histamine enzymatic assay kit와의 히스타민 검출에 대한 성능 비교테스트를 통해 높은 정확도와 민감도를 가진 발색과 형광 검출이 가능한 Histamine assay kit를 각각 제품화하였음. 이러한 연구 개발을 통해 논문 1편, 학술대회 발표 2건과 특허 2건을 등록하였으며 제품화를 통해 제품 매출 성과를 올릴 수 있음. 연구원 채용 1인과 개발한 제품에 대한 서울 경제 신문을 통한 홍보 1건의 성과를 올릴 수 있었음. 또한 효소 재조합 기술 및 안정화 기술과 발색 및 형광 염료 제조 기술을 기반으로 히스타민 이외에도 콜레스테롤과 같은 대사체를 신속 검출할 수 있는 metabolite assay kit를 관련 제품으로 개발하여 제품화하였음.				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>효소 제조 공정을 위한 재조합 기술을 응용 확대하여 히스타민 이외에도 다양한 대사체에 대한 발색 및 형광 검출을 위한 산화 효소에 적용하므로 미생물 및 세포 그리고 식품 내에 존재하는 특정 바이오마커로써의 대사체의 신속 검출 기술에 응용할 계획임.</p> <p>발색 및 형광 염료의 자체 합성 기술 및 제조 기술을 기반으로 새로운 염료 개발을 위한 추가적인 연구를 진행 중이며 현재 세포 대사의 주요한 바이오마커를 고감도로 검출할 수 있는 새로운 형광 염료를 연구 중에 있음.</p> <p>본 과제를 통해 개발된 효소의 안정화 기술을 통해 효소 기반의 신속 검출 키트 및 기술을 위한 연구에 적용하여 보다 안정적인 신속 검출 키트 개발에 응용할 계획임.</p> <p>개발된 히스타민 발색 검출 키트와 히스타민 형광 검출 키트의 제품화를 통해 현재 매출을 기록하고 있으며 향후 동시에 개발된 다양한 Metabolite assay kit와 함께 홍보 전시를 통해 사업화를 추진 중에 있음.</p> <p>발색 및 형광 염료의 자체 합성 기술 및 제조 공정의 확보를 통해 아이센스, 인포피아 등의 신속 검출 관련 회사에 기존 수입 염료를 대신해서 제공할 계획임.</p>				
중심어 (5개 이내)	바이오제닉 아민	히스타민	히스타민 산화효소	티라민 수산화효소	발색 및 형광 염료

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<p>The histamine detection kit, which is currently detected as food poisoning among biogenic amines was developed for rapidly detecting histamine, which are naturally occurring harmful substances in the production, manufacture and distribution of aquatic products and foods. To do this, we have developed 1) oxidase and hydroxylase for the rapid detection of histamine using recombinant technology, 2) developed colorimetric and fluorometric dyes with high sensitivity suitable for the rapid detection of histamine using chemical synthesis technology, 3) And detection of histamine as a harmful substance from marine products and foods in the field using dyes.</p>				
Results	<p>We have developed recombinant technology and synthesis technology that can produce colorimetric and fluorometric dyes for detection kit. In order to develop a detection kit capable of rapidly detecting histamine based on this, the activity of histamine oxidase and tyramine beta-hydroxylase was investigated to optimize the reaction conditions for the rapid detection of histamine by enzyme activity under various conditions. Based on these optimizations, we developed a colorimetric detection kit and a fluorometric detection kit that can quickly detect histamine from canned tuna and spicy canned tuna. The developed histamine detection kits was compared to commercialized histamine detection kit such as Maxsignal histamine ELISA test kit and Maxsignal histamine enzymatic assay kit to detect histamine at various conditions. The developed histamine assay kits have showed high detection accuracy and sensitivity though selectivity is slightly lower than Maxsignal histamine enzymatic assay kit. we can increase product sales performance through commercialization. The histamine assay kits could be commercialized for histamine detection based on the study and expected increase sales with a metabolite assay kits that can rapidly detect various metabolites.</p>				
Expected Contribution	<p>The application of recombinant technology for enzymatic production process is applied to develop colorimetric and fluorometric detection of various metabolites in addition to histamine, so that it can be applied to the technology for rapid detection of metabolites as specific biomarkers existing in microorganisms, cells and foods. Based on synthetic process and manufacturing technology of colorimetric and fluorescent dyes, novel dyes could be developed as high sensitive detection dyes in further research. Currently, new fluorescent dyes are developed for capable of detecting the major biomarkers of cellular metabolism with high sensitivity.</p>				
Keywords	Biogenic amines	histamine	histamine oxidase	tyramine beta-hydroxylas e	colorimetric/fl uorometric dye

< CONTENTS >

1. Outline of R&D project	8
2. Current status of domestic and foreign technical development ...	25
3. The contents and results of the R&D	28
4. Achievements and contributions of the R&D	95
5. Application plan of the R&D	99
6. Information of abroad scientific technology for conducting project	99
7. Security grade of R&D	100
8. Current status research equipment registered on NTIS	100
9. Safety guideline of laboratory during performing R&D	100
10. Representative achievements of the R&D	101
11. The others	102
12. References	102

<Appendix> Self-evaluated sheet

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	8
2. 국내외 기술개발 현황	25
3. 연구수행 내용 및 결과	28
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	95
5. 연구결과의 활용계획 등	99
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	99
7. 연구개발결과의 보안등급	100
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	100
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	100
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	101
11. 기타사항	102
12. 참고문헌	102

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

- 수산물 및 식품의 생산, 제조 및 유통 과정에서 자연 발생하는 유해물질로서 바이오제닉 아민 중에서 현재 식품공진 등으로 규제하고 있는 히스타민을 신속 검출 할 수 있는 효소 기반의 현장형 검출 키트를 개발하는 것을 목적으로 연구 개발하였다.
- 이를 위해서 1) 재조합기술을 이용하여 히스타민 신속 검출을 위한 산화 효소와 수산화 효소를 개발하고 2) 화학적 합성 기술을 이용하여 히스타민 신속 검출을 위해 적합한 고감도의 발색 및 형광 염료를 개발하고 3) 개발된 효소와 염료를 이용하여 현장에서 수산물 및 식품으로부터 유해물질로서 히스타민을 신속, 정확하게 검출 및 정량 분석이 가능한 현장형 검출 키트 개발을 목적으로 연구 개발하였다.

1-2. 연구개발의 필요성

- 히스타민 신속 검출 키트 개발의 필요성

가. 바이오제닉 아민과 히스타민의 정의 및 생물학적 활성

- 바이오제닉 아민(biogenic amines)이란 일반적으로 동물, 식물 및 미생물에서 아미노산의 효소적 탈탄산 반응에 의해서 형성되는 저분자량의 질소함유의 유독 화합물을 의미하며, 특히 식품 부패 미생물들을 포함하는 탈탄산효소(decarboxylase) 생산성 미생물에 의해서 주로 고단백질성 식품으로부터 생성된다(그림 1).
- 이러한 바이오제닉 아민 특히 히스타민은 체내에서 심각한 건강상의 위험을 초래할 수 있음. 히스타민 등의 바이오제닉 아민은 호흡곤란, 발열 홍조, 발한, 심계항진, 구강작열통, 설사, 흥분, 혈압상승 및 강하, 두드러기 등이 발생할 수 있으며 특히 히스타민은 scombrototoxin 이라는 식중독을 유발하기도 한다.

나. 바이오제닉 아민과 히스타민의 위해 가능성

- 바이오제닉 아민 및 히스타민은 발효 미생물에 의해 자연적으로 발생하는 화학물질이지만 체내에서 생리적 기능을 나타내면서 건강상의 심각한 위해 인자가 될 수 있다(표1).
- 바이오제닉 아민 및 히스타민을 분해하는 효소인 monoamine oxidase(MAO)를 만들지 못하거나 우울증 치료제인 MAO 효소 저해제를 복용하는 환자가 다량의 바이오제닉 아민 및 히스타민이 함유된 식품을 섭취할 경우에는 식중독을 일으키거나 고혈압 또는 심장마비 증상을 비롯한 건강상의 심각한 영향을 줄 수 있다.

표 1. 바이오제닉 아민 및 히스타민의 체내에 미칠 수 있는 생리적인 영향

	Biogenic amine	Toxic effect of biogenic amines
Monoamine	Histamine	발진, 두드러기, 메스꺼움, 구토, 설사, 저혈압, 기관지염, 쇼크
	Tyramine	혈관 수축 및 심장 박동의 증가로 인한 혈압상승 유도(고혈압)
	2-phenylethylamine	교감신경계에서 노르아드레날린 방출 혈압상승 및 편두통
	Tryptamine	혈압상승 및 고혈압
Diamine	Putrescine	발암 물질인 Noitrosamine의 전구물질로 의 전환 가능성 제기
	Cadeverine	
	Spermidine	
	Spermine	

표 2. 미국 및 유럽 선진국 그리고 국내에서의 히스타민 기준 및 규격

기관	관련 식품	함량 규제 기준	관련 규정
미국 FDA	가다랑어 및 참치 통조림	500 ppm	The seafood HACCP Regulation(21CFR123)
Codex	어류 및 가공어육 (고등어, 청어, 꽂치, 미새기과 등)	평균: 100 ppm 최고: 200 ppm	CODEX STAN 190-195 외 8개 식품 기준
EU	고등어, 청어, 멸치, 민새기과	평균: 100 ppm 최고: 200 ppm	ECC 91/490
Food Standards Australia New Zealand	어류 및 가공어육 (특정 어종을 정하지 않음)	200 ppm	Australia New Zealand Food Standards Code
한국 FDA	다랑어류과 생선	200 ppm	「식품공전」 제 6. 수산물에 대한 규격

- 최근 WHO, JECFA, EU 등 국제기구 및 선진국 등에서 바이오제닉 아민 및 히스타민에 대해 식품 위해요소로써 위해성 평가를 반드시 수행하도록 의무화되어 있으며 FDA, CODEX 등에서도 기준 및 규격을 설정하고 엄격하게 관리 감독하고 있다(표 2).

다. 히스타민 신속 검출 키트 개발의 기술적 필요성

- 히스타민 검출법으로 현재 국내에서는 식품공전에 따라 식품 중 히스타민을 염산으로 추출하여 검출 물질인 히스타민은 따로 흡광을 나타내지 않으므로 이를 분석하기 위해서 염화단실(dansyl chloride)로 유도체화 한 후 고속액체크로마토그래프(HPLC)를 이용하여 분석하고 있다.
- 미국공인분석화학법(AOAC; Association of Official Agricultural Chemists)에서는 양이온교환칼럼으로 분리 후 o-프탈알데히드(o-phthalaldehyde)로 유도체화 하여 형광검출기로 분석하는 후칼럼(post-column) 방법을 채택하고 있으며 이외에 전칼럼(pre-column) 방식으로 염화단실(dansyl chloride), 염화벤조일(benzoyl chloride) 등으로 유도체화하여 역상칼럼으로 분석하고 있다.

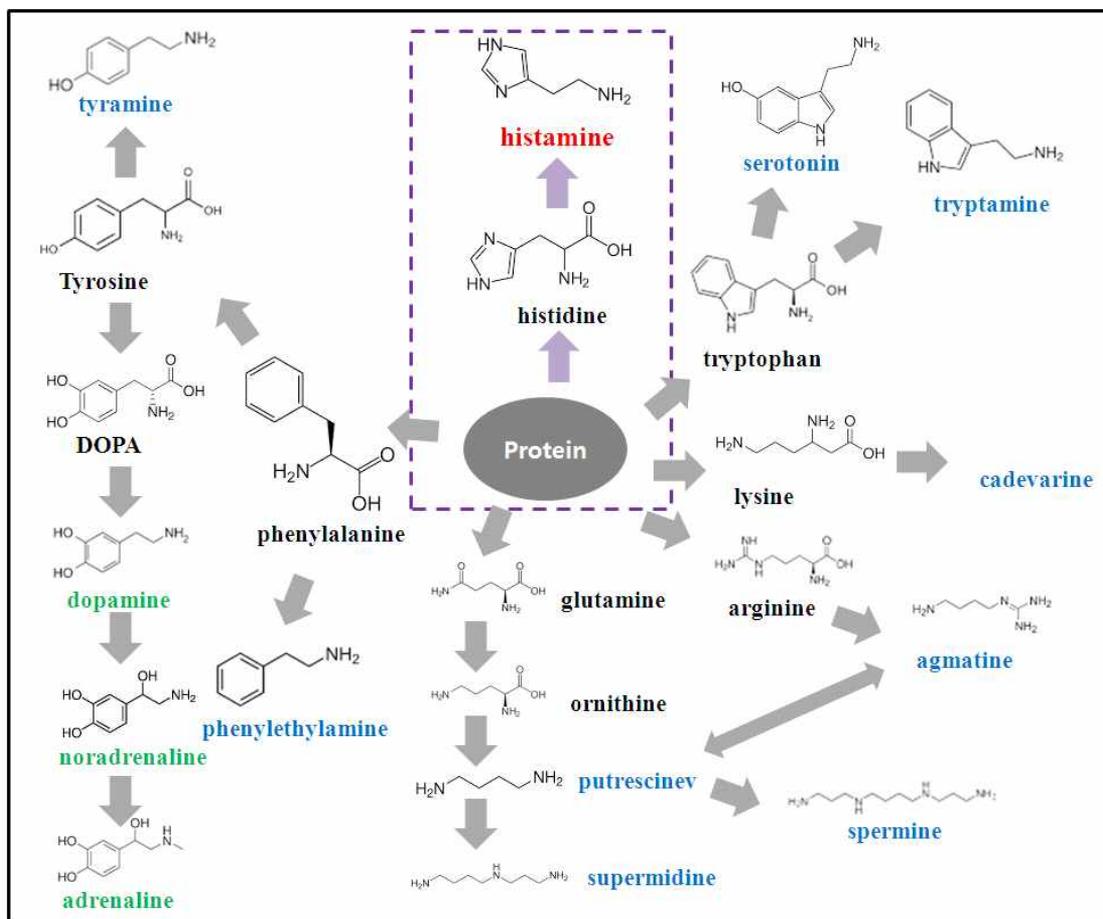


그림 1. 바이오제닉 아민과 히스타민 생성의 생합성 경로

- 기체크로마토그래프(GC)를 이용한 히스타민 검출에서는 식품에서 검출된 시료를 N-Methyl-bis [trifluoroacetamide](MBTFA), N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA), Trimethylchlorosilane(TMCS), N-methyl-N-(tert-butyl dimethylsilyl) trifluoroacetamide 등으로 유도체화 하여 FID 및 MS로 분석하고 있다.

- 이러한 히스타민 검출법은 유도체화를 위한 전처리, 고가의 장비를 필요로 하고 있으며 이러한 검출을 위한 전문적인 지식과 장비 사용을 위한 숙련된 기술이 필요하므로 현장에서 바로 검출할 수 있는 현장형 신속 간편 검출법으로 사용하기에는 기술적인 문제가 있다.
- 현재 히스타민의 신속한 검출을 위해서 히스타민에 대한 항체를 기반으로 하는 경쟁적 효소면역측정(competition ELISA) 방법에 의한 키트 개발되어 판매 중에 있다. 그러나 현장형 신속 검출 키트로 사용하기에는 고가이고 경쟁적 효소면역측정법 자체가 실험 시 많은 각 단계를 거쳐야 하고 이 과정에서 번거로운 피펫팅이 요구되어지므로 식품 위해 요소 검출 현장에서 사용하기에 어려움이 있다.
- 최근 신속 검출법으로 효소면역학적 항체 아닌 효소 기반의 히스타민 검출법이 일부 개발되어 있다. 이는 히스타민 탈수소효소(dehydrogenase)와 발색 염료를 이용하여 생성되는 흡광 정도로 검출하므로 쉽고 빠른 검출이 가능하므로 현장에 사용하기 적합한 방법이다. 그러나 사용되는 발색 염료인 2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H-tetrazolium (WST-8)은 시료인 수산물이나 식품에 존재할 수 있는 다양한 유사 물질들과 비특이적으로 반응이 일어날 수 있다는 문제점을 가지고 있다.

표 3. 히스타민 검출을 위한 검출 방법에 대한 일반적인 특징

	AOAC method	HPLC method	Spectrofluorometric method	ELISA	Colorimetric method
검출시간	1-2h	1-2h	1h	1h	1h
필요한 장비	fluorometer	HPLC	spectrofluorometer	spectrophotometer	spectrophotometer
정량 분석 한계	1-5 mg/kg	1.5-5 mg/kg	1.5 µg/kg	2-5 mg/kg	20 mg/kg
검출범위	1-150 mg/kg	5-2 500 mg/kg	1.5 µg/kg -100 mg/kg	0-500 mg/kg	0.8-300 mg/kg
장점	높은 내구성, 재현성, 정확도와 정밀도	모든 바이오제닉 아민 정량분석 가능, 높은 정확도와 정밀도	높은 정확도와 정밀도, 좋은 회수율, 저렴함	쉽고 빠른 검출 및 키트화 가능, 다중검출가능, 저렴함,	쉽고 빠른 검출 및 키트화 가능, 다중검출가능, 저렴함, 발색 검출로 단순검출 및 반정량분석가능

- 본 과제에서 제안하고자 하는 기술의 신속 검출법은 앞서 개발된 효소 기반의 히스타민 검출법처럼 쉽고 빠른 검출이 가능하면서도 보다 정밀한 검출을 위해 기존의 히스타민 탈수소효소가 아닌 히스타민 산화효소(histamine oxidase; HO)를 검출 키트의 주요한 효소로 사용하려고 한다. 또한, 이때 식품 내에 존재하는 히스타민 외에 티라민 등에 수산기(-OH)를 붙이는 티라민 수산화효소(tyramine β -hydroxylase; TBH)를 이용하여 히스타민 산화효소의 특이성을 높일 수 있는지 조사하고자 한다. 이 두가지 효소를 히스타민 신속 검출 키트로 함께 구성함으로써 히스타민 검출의 특이성을 높이므로 안정적인 검출법으로 활용할 수 있는지 테스트하고자 한다. 이를 위해서 두 가지 효소를 재조합 기술을 이용하여 자체적으로 생산할 계획이다.
- 본 과제에서 제안하고자 하는 기술의 신속 검출법은 앞서 개발된 효소 기반의 히스타민 검출법에서 문제가 되고 있는 발색 염료인 WST-8의 비특이적인 반응의 문제가 없도록 히스타민 신속 검출 키트에 적합한 고감도 발색 염료(DAOS)와 형광 염료(Amplex red)를 자체적으로 합성하려고 한다. 또한 보다 효율적인 키트의 구성과 반응을 위해서 맞춤형 염료로써 발색 및 형광 검출 시 과산화효소(oxidase)가 필요 없는 새로운 염료를 개발하려고 한다. 이를 통해 현장형 신속 검출 키트를 제품화하려고 한다.
- 식품 위해 요소를 검출하기 위한 현장에서는 이를 관리하기 위한 고가의 장비와 고급 전문 인력을 배치하기 어려움이 존재하므로 이를 위한 간편 검출 키트가 필요하나 현재로서는 이를 위한 검출 키트 및 검출 기술이 전무한 상태이다. 이를 위해서 고감도 발색 염료를 이용하여 별도의 장비 없이 발색 반응을 통해 간편하게 검출할 수 있는 히스타민 간편 검출 키트를 제품화하려고 한다.
- 히스타민 신속 간편 검출 키트 개발을 통해 맞춤형 효소의 재조합 기술을 통한 제조 기술과 새로운 발색 및 형광 염료 합성 기술의 개발을 통해 식품위해요소 검출을 위한 원천 기술을 확보할 뿐 아니라 식품이 아닌 진단 및 의료용 검출 센서 개발로 기술의 확대가 가능하므로 진단 및 바이오센서 시장으로의 진출하고자 한다.

라. 히스타민 신속 검출 키트 개발의 경제적 필요성

- 가공식품, 외식, 신선농수산물 등을 포함하는 전체 식품산업은 세계시장 규모가 약 4조 달러로 이는 반도체산업의 약 1.5배에 달하는 거대산업으로 최근 농수산물식품에 대한 안정성 문제 및 품질을 위한 시장은 식품산업의 성장에 따라 지속적으로 성장하여 2019년에는 1조 5천억 달러로 성장할 것으로 예측되고 있다.



그림 2. 연간 농식품 수출액 규모와 수출 지역별 수출 증감율

- FTA에 의한 농수산물식품의 지속적인 수출입 증가에 따라 교역국가간의 이해에 따라 농수산물식품의 품질 규격 문제로 인한 무역 마찰의 문제가 빈번하게 발생하고 있는 상태이다. 이러한 농수산물식품의 품질 유지 및 안전 관리는 대외 수출 경쟁력 강화와 수입 시 자국민의 먹거리 안전뿐 아니라 필요에 따라서 자국의 농수산물식품의 경제적인 보호를 위해서 품질 규제를 통한 합리적인 무역 장벽 구축은 농수산물식품의 무역에 확대에 따라서 매우 필요한 중요한 역할이 예상된다.
- 최근 농수산물식품 전 분야에 있어서 품질제고를 위한 농수산물식품의 위해물질 검출시간을 실시간 수준으로 단축시키기 위해 많은 노력을 기울이고 있으나 전반적으로 국내시장에서는 식품 위해인자 검출 및 추적기술의 산업화가 미비한 상태이다. 바이오제닉 아민, 곰팡이 독소 등과 같은 새로운 식품위해인자의 증가로 새로운 검출법이 요구되고 있으나 국내식품 산업현장에서는 제한된 범위의 식중독균 검출 기술에만 치우쳐 있을 뿐 식품 현장에 적용하기 어려운 기존의 검출 기술에 머물러 있으므로 비효율적인 품질 및 안전관리로 인해 막대한 경제적인 피해를 야기하고 있는 상태이다.
- 국내에서 바이오제닉 아민에 대한 농수산물식품에 대한 규격과 규제가 미비한 상태였으나 지속적인 문제 제기에 따라 바이오제닉 아민 중에서 가장 큰 문제가 되는 히스타민에 대해 2010년 식품공전 개정을 통해 다량어류에 한해 이에 대한 함량을 규제하고 있으나 점점 높아져 가는 식품 품질과 위생 안전에 대한 국내 식품 품질에 대한 인식과 대외 수출 시 바이오제닉 아민 특히 히스타민에 대한 높고 까다로운 규제에 대한 효과적인 신속 간편한 현장형 검출 키트가 필요한 상태이다.
- 국외의 경우에는 바이오제닉 아민에 대한 품질 규제를 명확하게 정하고 이를 관리하고 있으면 특히, 히스타민의 경우는 다량어류 뿐만 아니라 각종 발효 유제품인 치즈와 요거트 뿐만 아니

라 와인까지 매우 다양한 식품에 대해 각각에 별도의 규제 함량을 정하고 매우 철저하게 관리하고 있다. 따라서 식품의 한류 바람에 따라 국내 다양한 발효식품의 수출 시 바이오제닉 아민 특히 히스타민에 대한 효율적인 품질 관리가 필요한 상태이다. 이러한 히스타민 신속 검출 기술의 개발을 통해 국내 식품 특히 발효식품의 수출 경쟁력을 높이므로 막대한 경제적인 이익을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

- 현재 국내의 식품 회사는 수출 기업이라도 영세한 기업이 많고 식품 품질 관리에 특성상 다양한 농수산식품 샘플을 간편하고 편리하게 효율적이고 경제적으로 검출할 수 있는 현장형 검출 키트의 필요성이 매우 높으나 국내에는 이를 전문적으로 연구 개발하고 제품을 보급할 수 있는 기업이 없으므로 고가의 키트를 수입해서 사용하거나 별도의 검출을 대행해주는 식품위해 요소를 검출해주는 대행업체를 이용하고 있는 것이 현실이다. 따라서 이러한 현장형 신속 및 간편 검출 키트의 개발은 국내 식품 회사의 경쟁력 제고에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

마. 히스타민 신속 검출 키트 개발의 사회적 필요성

- 농수산식품에 대한 식품위해요소 중점관리(HACCP)를 통해 안심 먹거리와 국민 건강을 위해 보다 신속하고 정확한 식품위해요소들을 검출하고 관리하므로 농수산식품 관련된 기업들뿐 아니라 소비자에게도 안심할 수 있는 기틀을 마련해 줄 수 있다. 이는 지난 광우병 사태와 중국 멜라민 사태를 통해 그 중요성을 깊이 체감하였듯이 사회적으로 매우 중요한 사항으로 사회적으로 꼭 필요한 기술이다.

HACCP 적용식품 지정 현황

95년 제도 도입 후 7개 식품 단계적 의무적용 추진 (06년~14년)

구분	대상업체	지정 업체 수(종목간수)						
		2008	2009	2010	2011	2012	2013.06	2013.12
전체	25,502 (40,911)	442 (475)	563 (726)	797 (1,153)	1,163 (1,837)	1,809 (3,029)	2,255 (3,723)	3,994 (4,675)
이무 적용	1,752 (2,142)	263 (341)	320 (341)	462 (534)	703 (845)	1,130 (1,448)	1,355 (1,773)	1,543 (1,956)
자율 적용	21,750 (38,769)	193 (203)	299 (385)	429 (619)	618 (992)	1,008 (1,561)	1,237 (1,950)	2,451 (2,719)

HACCP 지정업체는 식품제조가공업소 23,502개소 중 3,994개소 (4,675종목)
 HACCP 적용률: 16.9% (2013.12 기준)
 의무적용 대상업체 1,752개소 중 1,543개소 지정 완료

출처: 식품안전관리원(식품안전정보포럼 (13년 12월 31일))

◇HACCP 의무적용 대상업체 및 지정업체 현황

('11.430. 기준)

구 분	총대상업체수	총적용업체수	지정율(%)
어육가공품	136	58	43
냉동수산식품(어류, 연체류, 조미가공품)	470	229	49
냉동식품(피자류, 만두류, 면류)	379	75	20
빙과류	45	35	78
비가열음료	22	9	41
페로트트식품	46	23	50
배추김치	581	131	23
합 계	1,679	560	33

자료: 식품의약품안전청(2011.5)

그림 3. HACCP 적용식품 지정 현황과 의무적용 대상업체 및 지정업체 현황

- 현재 식품위해요소 중점관리가 필요한 현장인 농수산식품 가공시설, 식품제조시설과 식품유통 업체 등에서 가장 필요로 하는 검출법은 신속 검출과 간편하고 지속적인 모니터링이 가능하며 다양한 샘플을 처리할 수 있는 다중 검출 기술을 요구하고 있음. 본 과제에서 제공하는 검출 기술은 이러한 식품위해요소 중점관리 현장에서 필요한 기술로 식품위해요소 중점관리에 따른 비용과 국민건강증진에 크게 기여할 것으로 기대되는 경제적, 사회적 필요성이 높은 기술이다.

- 본 과제를 통해 개발된 히스타민 신속 또는 간편 검출 기술은 농수산물식품의 식품위해요소 중 에서 각종 식중독과 알레르기 반응 유발하는 히스타민을 신속 간편하게 효율적이고 경제적인 검출을 통해 식품 품질과 안전성을 높이므로 농수산물식품 가공 및 제조 그리고 유통에 있어서 기업의 경쟁력을 높이고 안전 식품에 대한 국민적인 심리적인 안정감을 높이는데 크게 기여할 것이며 이를 통해 식품 유통의 질병으로부터 안정적인 사회 구현을 위해 꼭 필요한 기술이다.
- 본 과제에서 제안하는 신속 간편 검출 기술은 고가의 장비와 전문적인 지식과 기술을 요구하 지 않으므로 농수산물식품 가공, 제조 및 유통에 관련된 회사의 창업 시 이러한 식품위해요소 관리를 위한 비용과 시설, 인력 등에 대한 부담을 낮추므로 식품 관련 중소기업 육성과 이에 따른 일자리 창출 등과 같은 창조경제에 도움을 줄 수 있는 기술이다.

1-3. 연구개발 범위

○ 연구개발의 최종목표 및 주요내용

■ 연구개발의 최종 목표

- 재조합 기술을 이용한 히스타민 산화효소(HO)의 제조 및 생산 기술 확보
- 재조합 기술을 이용한 티라민 수산화효소(TbH)의 제조 및 생산 기술 확보
- 히스타민 신속 검출 키트의 최적화 및 제품화
- 히스타민 신속 검출 키트의 제품화를 위한 고감도 발색 및 형광 염료의 합성
- 히스타민 신속 검출 키트의 맞춤형 발색 및 형광 염료 개발

■ 연구개발의 주요 내용

[제1세부] 재조합 기술을 이용한 산화 효소와 수산화효소 생산 및 히스타민 신속 검출 키트의 최적화 및 제품화

- 재조합 기술을 이용한 히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 제조
재조합 기술을 이용하여 히스타민 산화효소를 대장균에서 발현시켜 대량 생산할 수 있도록 생산 시스템을 구축한다.
- 재조합 기술을 이용한 티라민 수산화효소(Tyramine β -hydroxylase; TbH) 의 제조
재조합 기술을 이용하여 바이오제닉아민 수산화효소를 대장균에서 발현시켜 대량 생산할 수 있도록 생산 시스템을 구축한다.
- 히스타민 신속 검출 키트의 최적화

- 히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 활성 최적화
재조합 기술로 제조된 히스타민 산화효소의 기질 특이성, 민감도 등을 테스트하고 HO의 활성도를 테스트하여 신속 검출 키트 구성을 위한 최적 조건을 조사한다.
- 티라민 수산화 효소(Tyramine β -hydroxylase; T β H)의 활성 최적화
재조합 기술로 제조된 수산화효소의 기질 특이성, 민감도 등을 테스트하고 T β H의 활성도를 테스트하여 신속 검출 키트 구성을 위한 최적 조건을 조사한다.
- 발색 및 형광 염료의 최적화
고감도 발색과 형광 염료 및 맞춤형 염료의 최적 농도, HRP의 최적 농도와 외부 인자에 의한 영향 등을 조사하여 신속 검출을 위한 최적 조건을 조사한다.
- 히스타민 신속 검출 키트의 최적화
키트 구성 성분으로 효소를 최적화하고 고감도 발색과 형광 염료 및 맞춤형 염료를 최적화한다.

- 히스타민 신속 검출 키트의 제품화

- 히스타민 신속 검출 키트의 제품화를 위한 테스트
spike test를 통해 Histamine이 첨가한 참치로부터 실제적인 신속 검출 키트의 성능으로 정밀도(회수율), 특이도, 민감도(검출 한계), 검출 시간, 검출 방법 등에 대해 조사한다. 기존 제품과의 비교 테스트를 통해 개발된 히스타민 신속 검출 키트의 성능을 비교하고 제품의 특성을 조사한다.
- 히스타민 신속 또는 간편 검출 키트의 시제품 테스트
개발된 histamine rapid assay kit와 histamine accurate assay kit 의 시제품을 현장테스트를 통해 제품의 성능 및 품질에 대한 성능을 검증한다.

[제1협동] 고감도 발색 및 형광 염료의 합성과 맞춤형 염료의 개발

- 형광 염료(Amplex red)의 대량 합성을 통한 원재료 확보
형광 염료의 최적화된 합성 반응을 조사하여 이를 기반으로 대량 합성 공정을 구축한다.
- 발색 염료(DAOS)의 대량 합성을 통한 원재료 확보
발색 염료의 최적화된 합성 반응을 조사하여 이를 기반으로 대량 합성 공정을 구축한다.
- 히스타민 신속 검출 키트의 맞춤형 염료 개발
새로운 검출 및 진단 키트 개발이 가능하도록 과산화효소(HRP)가 필요 없는 새로운 맞춤형 형광 및 발색 염료를 개발하고 이를 기반으로 보다 효율적인 히스타민 검출 키트를 구성할 수 있는 원재료를 확보한다.

■ 연구개발 추진 일정표

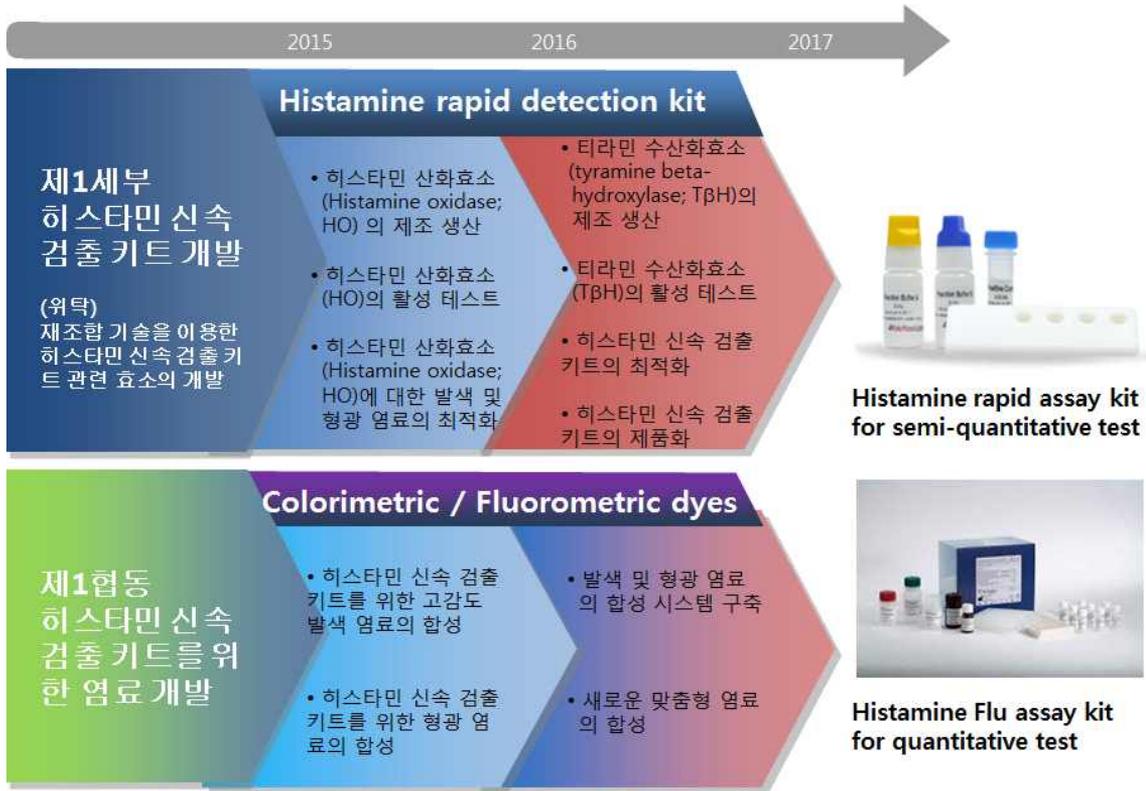


그림 4. 히스타민 신속 검출 키트 개발을 위한 연구개발 추진 일정

○ 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

[제1세부] 제조합 기술을 이용한 산화 효소와 수산화효소 생산 및 히스타민 신속 검출 키트의 최적화 및 제품화 ((주)바이오맥스)

■ 연구개발의 목표

- 제조합 기술을 이용한 히스타민 산화효소(HO)의 제조 및 생산 기술 확보
- 제조합 기술을 이용한 티라민 수산화효소(TβH)의 제조 및 생산 기술 확보
- 히스타민 신속 검출 키트의 최적화 및 제품화

■ 연구개발의 주요 내용

- 제조합 기술을 이용한 히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 제조 (위탁기관 건국대)
 - *Arthrobacter gloformis* 로부터 genomic DNA를 template로 하여 HO의 핵산 서열을 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 증폭하여 그 유전자원을 확보한다.
 - 확보된 염기 서열을 확인한 후에 대장균 발현 벡터인 pGEX 5X-3에 클로닝을 수행하여 유전자원을 확보한다.

- 클로닝 과정으로 얻은 GST Fusion construct를 BL21(DE3) competent cell에 transformation하여 single colony를 얻은 후 Ampicillin이 첨가된 3ml의 LB media에서 배양하여 , IPTG를 첨가하여 HO의 대장균 내에서 발현을 유도한다.
- IPTG induction 후, cell lysates를 lysis 시켜 Glutathione Sepharose 4B slurry를 이용하여 발현된 HO의 정제를 수행한다.
- 대장균으로부터 HO의 발현과 정제 정도를 SDS-PAGE를 통해 확인하고 이에 대한 활성을 측정 한 후 정제도와 활성이 확인되면 히스타민 신속 검출 키트의 개발과 연구 및 상품화를 위해서 제조 단위의 scale-up을 통해 HO를 대량 생산하여 확보한다.



그림 5. 히스타민 산화효소와 티라민 수산화효소의 대량 생산 시스템 구축 방법

■제조합 기술을 이용한 티라민 수산화효소(tyramine β -hydroxylase; T β H)의 제조 (위탁기관 건국대)

- human cDNA를 template로 하여 PCR을 이용하여 증폭하여 그 유전자원을 확보함.
- 증폭된 염기서열을 pGEMT-easy벡터에 클로닝한 후 염기서열을 결정함.
- 확보된 염기서열을 대장균 발현 벡터인 pGEX 5X-3의 EcoRI/NotI site에 subcloning하여 대장균에서 단백질의 발현을 실시한다.
- 클로닝 과정으로 얻은 GST Fusion construct를 BL21(DE3) competent cell에 transformation하여 single colony를 얻은 후 Ampicillin이 첨가된 3ml의 LB media에서 배양하여 , IPTG를 첨가하여 T β H의 대장균에서 발현을 유도한다.
- IPTG induction 후, cell lysates는 lysis 시켜 Glutathione Sepharose 4B slurry를 이용하여 발현된 T β H의 정제를 수행한다.
- 대장균으로부터 T β H의 발현과 정제 정도를 SDS-PAGE를 통해 확인하고 이에 대한 활성을 측정 한 후 정제도와 활성이 확인되면 히스타민 신속 검출 키트의 개발과 연구 및 상품화를 위해서 제조 단위의 scale-up을 통해 T β H를 대량 생산하여 확보한다.

• 히스타민 신속 검출 키트의 최적화

- 히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 활성 최적화

제조합 기술로 제조된 히스타민 산화효소의 기질 특이성, 민감도 등을 테스트하고 HO의 활성도를 테스트하여 신속 검출 키트 구성을 위한 최적 조건을 조사한다.

- HO의 활성에 영향을 pH, 염이온, 온도 등에 대한 외부 인자에 대한 영향을 조사하려고 함.
- Histamine을 비롯해서 다양한 바이오제닉 아민과 아미노산 등에 대해 HO의 기질 특이성 조사함.
- Histamine 의 농도에 따른 HO의 기질 민감도를 조사함.
- HO의 농도에 따른 활성을 조사함.

- 티라민 수산화 효소(Tyramine β -hydroxylase; TbH)의 활성 최적화

제조합 기술로 제조된 수산화효소의 기질 특이성, 민감도 등을 테스트하고 TbH의 활성도를 테스트하여 신속 검출 키트 구성을 위한 최적 조건을 조사한다.

- TbH의 활성에 영향을 pH, 염이온, 온도 등에 대한 외부 인자에 대한 영향을 조사한다.
- Histamine을 비롯해서 다양한 바이오제닉 아민과 아미노산 등에 대해 TbH의 기질 특이성 조사한다.
- TbH의 농도에 따른 활성을 조사한다.

- 발색 및 형광 염료의 최적화

자체적으로 합성한 고감도 발색과 형광 염료 및 맞춤형 염료의 발색 및 형광 검출에 있어서 염료의 최적 농도, HRP의 최적 농도와 외부 인자에 의한 영향 등을 조사하여 신속 검출을 위한 최적 조건을 조사한다.

- 신속 검출을 위한 고감도 발색과 형광 염료 및 맞춤형 염료의 최적의 농도를 조사한다.
- 신속 검출을 위한 HRP의 최적 농도를 조사한다.
- 고감도 발색과 형광 염료 및 맞춤형 염료에 영향을 주는 외부 인자에 대한 영향을 조사한다.

- 히스타민 신속 검출 키트의 최적화

최적화 테스트를 통해 결정된 HO와 TbH의 효소 최적화와 고감도 발색과 형광 염료 및 맞춤형 염료의 최적화에 따라서 신속 검출 키트의 제품화를 위해 키트의 구성 성분의 구성 등을 최적화한다.

- 히스타민 신속 검출 키트의 성분별 구성 성분의 동결 건조에 따른 활성 및 안정성을 조사한다.

■ 히스타민 신속 검출 키트의 구성을 결정하고 이에 대한 검출의 안정성을 테스트한다.

- 히스타민 신속 검출 키트를 위한 샘플 전처리 방법 연구

개발된 히스타민 신속 검출 키트는 참치 캔으로부터의 히스타민 함량을 측정하기 위해 아래 그림 20과 같은 전처리와 사용 방법으로 검출하고자 한다. 그러나 단일물질 매트릭스의 참치 캔이 아닌 복합 양념이 함유되어 있는 샘플에 대한 적용을 위해서 전처리 방법에 대해서도 연구하고자 한다.

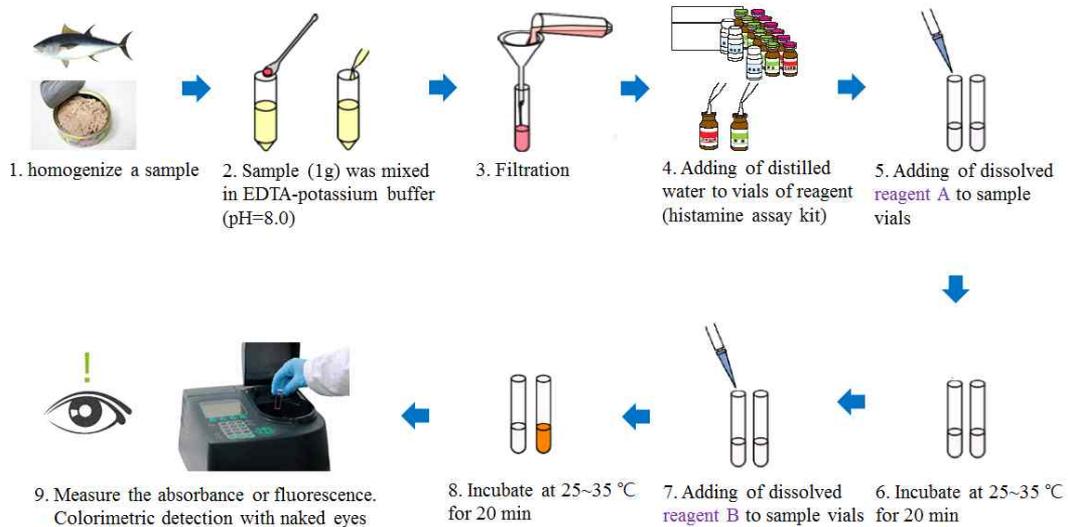


그림 6. Histamine rapid assay kit와 Histamine accurate assay kit의 검출을 위한 전처리 및 사용 방법

■ 단일물질 매트릭스의 참치 캔의 전처리 방법 연구

Histamine을 50mg/Kg 이 되도록 일반 참치 캔에 첨가하여 이를 시료로 하여 EDTA-potassium buffer를 이용하여 전처리하여 시료 중에 있는 Histamine을 그림 20과 같이 검출한다. 이때 사용하는 EDTA의 농도와 사용하는 potassium buffer의 pH 그리고 외부 온도에 따른 검출되는 Histamine의 함량을 조사하여 가장 효과적인 전처리 방법을 테스트한다.

■ 복합양념의 참치 캔의 전처리 방법 연구

Histamine을 50mg/Kg 이 되도록 고추참치와 같은 복합 양념이 첨가된 참치 캔에 첨가하여 이를 시료로 하여 EDTA-potassium buffer를 이용하여 전처리하여 시료 중에 있는 Histamine을 그림 20과 같이 검출한다. 이때 사용하는 EDTA의 농도와 사용하는 potassium buffer의 pH 그리고 외부 온도에 따른 검출되는 Histamine의 함량을 조사하여 가장 효과적인 전처리 방법을 테스트한다.

- 히스타민 신속 검출 키트의 제품화

- 히스타민 신속 검출 키트의 제품화를 위한 테스트

최적화된 히스타민 신속 검출 키트를 spike test를 통해 Histamine이 첨가한 참치 캔으로부터 실제적인 신속 검출 키트의 성능으로 정밀도(회수율), 특이도, 민감도(검출 한계), 검출 시간, 검출 방법 등에 대해 조사하려고 한다. 이때 각각의 성능에 대해서 HPLC에 의한 방법과 기존 제품과의 비교 테스트를 통해 개발된 히스타민 신속 검출 키트의 성능을 비교하고 제품의 특성을 조사한다. 개발하고자하는 히스타민 신속 검출 키트는 빠르게 현장에서 검출할 수 있는 Histamine rapid assay kit와 보다 정확한 정량분석이 가능한 Histamine accurate assay kit 로 나누어 현장의 필요성을 반영하여 개발할 계획이다. 또한, 국제적인 경쟁력을 위해서 다국적 기업인 Bioo Scientific 사 제품인 Maxsingnal histamine ELISA test kit와 Maxsignal histamine enzymatic assay kit에 대해 성능 및 가격 경쟁력 등에 대해 보다 우수한 결과를 갖도록 제품화할 계획이다(표 4).

- 히스타민 신속 검출 키트의 정밀도(회수율) 테스트

Histamine을 50mg/Kg 이 되도록 참치 캔에 첨가하여 이를 시료로 하여 식품 공전에 등재된 방법으로 전처리하고 이를 HPLC를 이용한 검출법과 기존 제품인 Maxsingnal histamine ELISA test kit와 Maxsignal histamine enzymatic assay kit과 개발된 Histamine detection kit와의 비교 테스트를 5회 이상 수행하여 각각의 정밀도(회수율)를 테스트할 것임. 정량적 목표치는 90 % 이상의 회수율을 갖도록 개발할 것이다.

- 히스타민 신속 검출 키트의 특이도 테스트

Histamine을 비롯해서 다른 monoamine과 diamine 각각 3종 이상과 아미노산 3종 이상에 대해 검출의 특이도 테스트를 수행한다. 이때 기존 제품인 Maxsignal histamine ELISA test kit와 Maxsignal histamine enzymatic assay kit과 개발된 Histamine detection kit와의 비교 테스트를 5회 이상 수행하여 각각의 특이도를 테스트할 것이며 정량적 목표치는 기존 제품 대비해서 동일한 특이도를 갖도록 개발할 것이다.

- 히스타민 신속 검출 키트의 민감도 테스트

Histamine을 0.1 ppm에서 2000 ppm 까지 농도별 검출 테스트를 수행하려고 함. 이때 발색뿐만 아니라 형광 검출을 통해 개발된 Histamine rapid assay kit와 Histamine accurate assay kit의 검출 한계를 테스트를 수행할 계획이다. 또한, 기존 제품인 Maxsingnal histamine ELISA test kit와 Maxsignal histamine enzymatic assay kit와의 검출 한계 비교 테스트 수행함. 정량적인 목표치는 Histamine rapid assay kit는

2-200 ppm을 갖도록 Histamine accurate assay kit는 보다 높은 민감도 테스트를 수행할 수 있도록 0.1-100ppm의 검출 범위를 갖도록 개발할 계획이다.

■ 히스타민 신속 검출 키트의 검출 시간 측정

개발된 Histamine rapid assay kit와 Histamine accurate assay kit의 검출 시간을 발색과 형광 검출로 나누어서 검출 시간을 측정하려고 한다. 이때 기존 제품인 Maxsingnal histamine ELISA test kit와 Maxsignal histamine enzymatic assay kit와의 검출 시간을 측정하여 이에 대한 비교 테스트 수행함. 정량적 목표치는 기존 제품 대비해서 60min 이내의 검출 시간을 갖도록 개발할 계획이다.

■ 히스타민 신속 검출 키트의 검출 방법

개발된 Histamine rapid assay kit와 Histamine accurate assay kit의 검출 방법 즉, 발색과 형광 검출에 따른 검출 한계와 검출 시간, 측정 방법 등에 대한 특징을 조사하고 이를 기존 다른 제품과의 비교 테스트를 수행할 계획이다(표 4).

표 4. 기존 제품과의 대비해서 개발하고자 하는 Histamine rapid assay kit와 Histamine accurate assay kit의 목표치

제품명	Maxsingnal histamine ELISA test kit	MaxSignal Histamine Enzymatic Assay Kit	Histamine rapid assay kit	Histamine accurate assay kit
제조 회사	Bioo Scientific	Bioo Scientific	Biomax	Biomax
검출 방법	EIA method	Enzymatic method	Enzymatic method	Enzymatic method
검출 범위	1-100 ppm	20-300 ppm	1-200 ppm	0.1-100 ppm
검출 시간	1-1.5 hr	1hr	1hr	1hr
재현성 (Reproducibility)	Variation may occur	good	Very good	Very good
민감도 (Sensitivity)	Accurate	Quite accurate	Very accurate	Quite accurate
사용편의성 (Procedure)	Somewhat complicated Many steps	Simple	Simple	Simple
가격 (Price)	50 만원	60 만원	30 만원	40 만원

Spike test with canned tuna

Histamine, Tyramine, Phenylethylamine, Tryptamine, Putrescine, Cadevarine, Spermidine, Spermine 등

- 기존 제품 과의 비교 테스트
- 특이도 (selectivity test)
- 민감도 (sensitivity test)
- 회수율 (recovery rate) 분석
- 검출시간 (detection time)
- 정량 분석 (정밀도 테스트) vs. HPLC analysis



그림 7. 히스타민 신속 검출 키트의 제품화를 시제품 개발 및 테스트 방법

[제1협동] 고감도 발색 및 형광 염료의 합성과 맞춤형 염료의 개발((주)두젠 바이오)

■ 연구개발의 목표

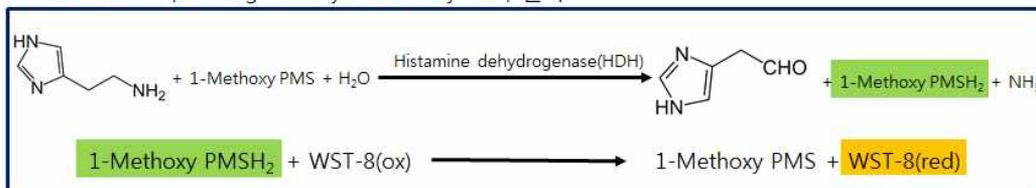
- 히스타민 신속 검출 키트의 제품화를 위한 고감도 발색 및 형광 염료의 합성
- 히스타민 신속 검출 키트의 맞춤형 발색 및 형광 염료 개발

■ 연구개발의 주요 내용

- 형광 염료(Amplex red)의 대량 합성을 통한 원재료 확보
 - 형광 염료 대량 합성 공정 구축
 - 무수 아세트산과 초산 혼합용매에 Resazurin sodium salt와 SnCl₂ 를 넣고 약 1시간 동안 reflux 시켜 triacetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine 화합물(1)을 합성한다.
 - 상기 화합물을 dioxane-물 혼합용매에 녹인 후 sodium sulphite를 첨가 하고 약 1시간 동안 reflux를 수행함. 반응 혼합 용액을 냉각 시키고 아세트산을 이용하여 산성화 시키면 베이지색의 고체가 형성되며 이를 여과하여 최종적으로 Amplex red 화합물을 회수한다.
- 발색 염료(DAOS)의 대량 합성을 통한 원재료 확보
 - 고감도 발색 염료 대량 합성 공정 구축

- 3,5-dimethoxy aniline을 메탄올 용매에 용해시킨 후 아세트알데하이드, NaCNBH3 그리고 아세트산을 순차적으로 첨가한 후 실온에서 약 2시간동안 교반시켜 3,5-dimethoxy-N-ethylaniline을 얻는다.
- 3,5-dimethoxy-N-ethylaniline과 3-chloro-2-hydroxypropanesulfonate을 NaOH 수용액에 용해 시킨 후 3시간 동안 가열 교반시켜 DAOS 화합물을 얻는다.

Bioo scientific의 MaxSignal enzymatic assay kit의 원리



(주)바이오맥스의 Histamine rapid assay kit & histamine accurate detection kit의 원리

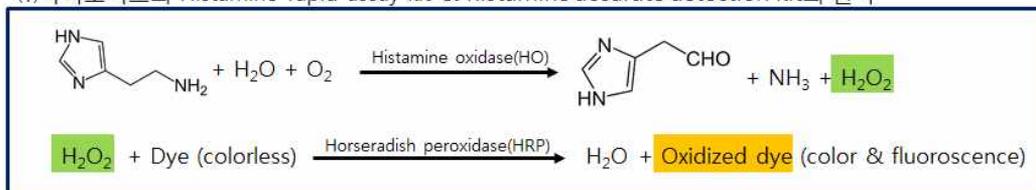


그림 8. 히스타민 신속 검출 키트와 기존 제품과의 차별성

- 히스타민 신속 검출 키트의 맞춤형 염료 개발
 - Amplex Red는 퍼옥시데이즈(HRP)에 의해서 과산화산소(H2O2)가 활성산소(radical oxygen)으로 전환되어 이 전환된 활성산소와 반응하여 발색 및 형광 검출이 가능한 resorufin으로 변형되므로 과산화산소 검출 반응 시 퍼옥시데이즈를 반드시 필요로 한다. 이에 효율적인 검출 반응을 위해서 퍼옥시데이즈 없이 과산화산소와 바로 반응할 수 있는 과산화산소 감지 발색 및 형광 염료(sensing probe)의 개발하려고 한다.
 - PF1의 합성
 - ▷ 3-Iodophenol과 phthalic anhydride를 methanesulfonic acid에 녹인후 135 °C에서 약 48시간 동안 가열 교반시킨 후 실온으로 냉각하고 600mL의 냉각수를 첨가 하여 회색의 고체를 회수한다. crude 생성물을 silica gel 컬럼을 이용해 분리 정제하여 3',6'-Diiodofluoran (1)를 확보하려 한다.
 - ▷ DMF에 Fluoran 1, bis(pinacolato)diboron, potassium acetate, 그리고 Pd(dppf)Cl2를 녹인 후 80 °C에서 약 2시간 동안 가열 교반 시킨다. 반응 혼합용액을 실온으로 냉각시킨 후 냉각수를 첨가 하고 갈색의 고체를 얻는다. crude 생성물을 silica gel 컬럼을 이용해 최종 생성물인 3',6'-Bis(pinacolatoboron)fluoran (Peroxyfluor-1, PF1, 2)를 확보한다.
 - PR1의 합성
 - ▷ 48% HBr를 아세톤에 녹아있는 phenoxazine 용액에 첨가 하고 약 15분간 교반시킴.

포화 NaNO₂ 수용액을 반응 혼합물에 천천히 적가한 후 실온에서 약 15분간 교반 시키면 고체가 형성되며 생성된 고체를 여과 한 후 silica gel 컬럼을 이용해 분리 정제하여 푸른색의 생성물(1)을 확보한다.

▷ DMF에 생성물(1), bis(pinacolato)diboron, potassium acetate, 그리고 Pd(dppf)Cl₂를 녹인 후 80 °C에서 약 2시간 동안 가열 교반시킴. 반응 혼합용액을 실온으로 냉각시킨 후 냉각수를 첨가 하고 갈색의 고체를 회수한다. crude 생성물을 silica gel 컬럼을 이용해 붉은 오렌지색의 최종 생성물(PR1)를 확보한다.

○ 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015	히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 클로닝 (제1위탁 건국대)	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Arthrobacter gloformis</i> 로부터 HO의 핵산 서열을 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 증폭하여 그 유전자원을 확보함. · 확보된 염기 서열을 확인한 후에 대장균 발현 벡터인 pGEX 5X-3에 클로닝을 수행함.
		히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 제조 생산 (제1위탁 건국대)	<ul style="list-style-type: none"> · 클로닝 과정으로 얻은 GST Fusion construct를 BL21(DE3) competent cell에 transformation하여 single colony를 얻은 후 배양하여 HO의 발현을 유도함. · HO의 발현과 정제 정도 그리고 활성을 확인하고 제조 단위의 scale-up을 통해 HO를 대량 생산하여 확보함. - HO의 정제도 90% 되도록 100mg이상 확보
		히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 활성 테스트 (제1세부 (주)바이오맥스)	<ul style="list-style-type: none"> · HO의 활성에 영향을 pH, 염이온, 온도 등에 대한 외부 인자에 대한 영향을 조사함. · Histamine을 비롯해서 다양한 바이오제닉 아민과 아미노산 등 10 여종에 대해 HO의 기질 특이성 조사함 · Histamine 의 농도(0.1-200 ppm)에 따른 HO의 기질 민감도를 조사함. · HO의 농도에 따른 활성을 조사함.
		히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)에 대한 발색 및 형광	<ul style="list-style-type: none"> · 신속 검출을 위한 고감도 발색과 형광 염료 및 맞춤형 염료의 최적의 농

		<p>염료의 최적화 (제1세부 (주)바이오맥스)</p> <p>히스타민 신속 검출 키트를 위한 고감도 발색 염료의 합성 (제1협동 (주)두젠바이오)</p> <p>히스타민 신속 검출 키트를 위한 형광 염료의 합성 (제1협동 (주)두젠바이오)</p>	<p>도를 조사함.</p> <ul style="list-style-type: none"> · 신속 검출을 위한 HRP의 최적 농도 등을 조사함. · 고감도 발색 염료 합성 및 최적화 · 고감도 발색 염료 합성 공정 구축 · 형광 염료 합성 및 최적화 · 형광 합성 공정 구축
구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차년도	2016	<p>티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 클로닝 (제1위탁 건국대)</p>	<ul style="list-style-type: none"> · human cDNA를 template로 하여 PCR을 이용하여 증폭하여 그 유전자원을 확보함. · 확보된 염기 서열을 확인한 후에 대장균 발현 벡터인 pGEX 5X-3에 클로닝을 수행함.
		<p>티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 제조 생산 (제1위탁 건국대)</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 클로닝 과정으로 얻은 GST Fusion construct를 BL21(DE3) competent cell에 transformation하여 single colony를 얻은 후 배양하여 TβH의 발현을 유도함. · TβH의 발현과 정제 정도 그리고 활성을 확인하고 제조 단위의 scale-up을 통해 HO를 대량 생산하여 확보함. · TβH의 정제도 90% 되도록 100mg 이상 확보
		<p>티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 활성 테스트 (제1세부 (주)바이오맥스)</p>	<ul style="list-style-type: none"> · TβH의 활성에 영향을 주는 pH, 염이온, 온도 등에 대한 외부 인자에 대한 영향을 조사함. · Histamine을 비롯해서 다양한 바이오제닉 아민과 아미노산 등 10 여종에 대해 TβH의 기질 특이성 조사함 · TβH의 농도에 따른 활성을 조사함.
		<p>티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 전처리 후 히스타민 산화(HO)로 구성된 히스타민 신속 검출 키트의 최적화 (제1세부 (주)바이오맥스)</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 두 가지 효소의 연속 처리에 따른 히스타민의 신속 검출을 위한 최적의 조건을 조사함

		새로운 맞춤형 염료의 합성 (제1협동 (주)두젠바이오)	<ul style="list-style-type: none"> · 과산화효소(HRP)가 필요 없는 새로운 맞춤형 염료의 합성(1g 이상 확보). · 맞춤형 염료의 합성 공정 구축
		히스타민 신속 검출 키트의 제품화 (제1세부 (주)바이오맥스)	<ul style="list-style-type: none"> · 개발된 히스타민 신속 검출 키트와 기존 제품과의 검출 시간(60min이내), 민감도(0.1-200 ppm), 10여종의 바이오제닉 아민에 대한 특이도를 목표로 기존 제품 제품과 비교 테스트를 수행함. · 히스타민 신속 검출 키트의 시제품 개발하여 현장 평가

○ 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

■ 연구개발의 추진 전략 및 방법

- 히스타민 산화효소와 티라민 수산화효소의 연쇄반응(cascade)을 이용한 키트 개발
 - 본 연구팀의 선행 연구 결과에 따르면 *Arthrobacter glofomis* 로부터 분리한 히스타민 산화효소(histamine oxidase; HO)는 히스타민뿐 아니라 티라민에도 높은 활성을 나타내는 것으로 나타남. 히스타민 신속 검출을 위해서는 HO의 특이도 문제를 해결해야만 한다.
 - HO의 특이도 문제를 해결하기 위해서 HO의 특이도를 높이기 위해 효소공학적으로 개선하는 연구에 집중되어 있음. 하지만 이러한 방법은 많은 노력과 시간이 걸리므로 본 연구팀에서는 티라민 수산화효소(Tyramine β -hydroxylase; T β H)와의 연쇄 반응을 이용하여 HO의 활성을 갖는 티라민의 수산화기를 붙여 구조 변형을 통해 티라민에 대한 HO의 활성을 낮추는 전략으로 히스타민 신속 검출 키트를 개발하고자 한다.
 - 이는 기존 HO의 활성을 변형 없이 최대한 활용이 가능하고 특이도 높은 HO를 개발하는데 걸리는 시간과 노력을 단축할 수 있으며 두 효소의 연쇄 반응으로 키트 구성하여 히스타민 신속 검출 키트를 개발하고자 한다.
 - 안정적인 키트의 구성을 위해서 HO와 T β H를 재조합 기술을 이용해서 제조하려함. 이를 위해서 건국대학교 분자생물학 실험실에서 HO와 T β H를 클로닝하고 안정적인 발현할 수 있는 시스템을 위탁연구개발을 통해 확보하려고 한다. (주)바이오맥스에서는 이를 경제적인 키트의 구성을 위해서 대장균에서 발현하여 대량 생산 할 수 있는 생산 시스템을 갖추고 자체적으로 고순도 분리 정제를 통해 확보하려고 한다.

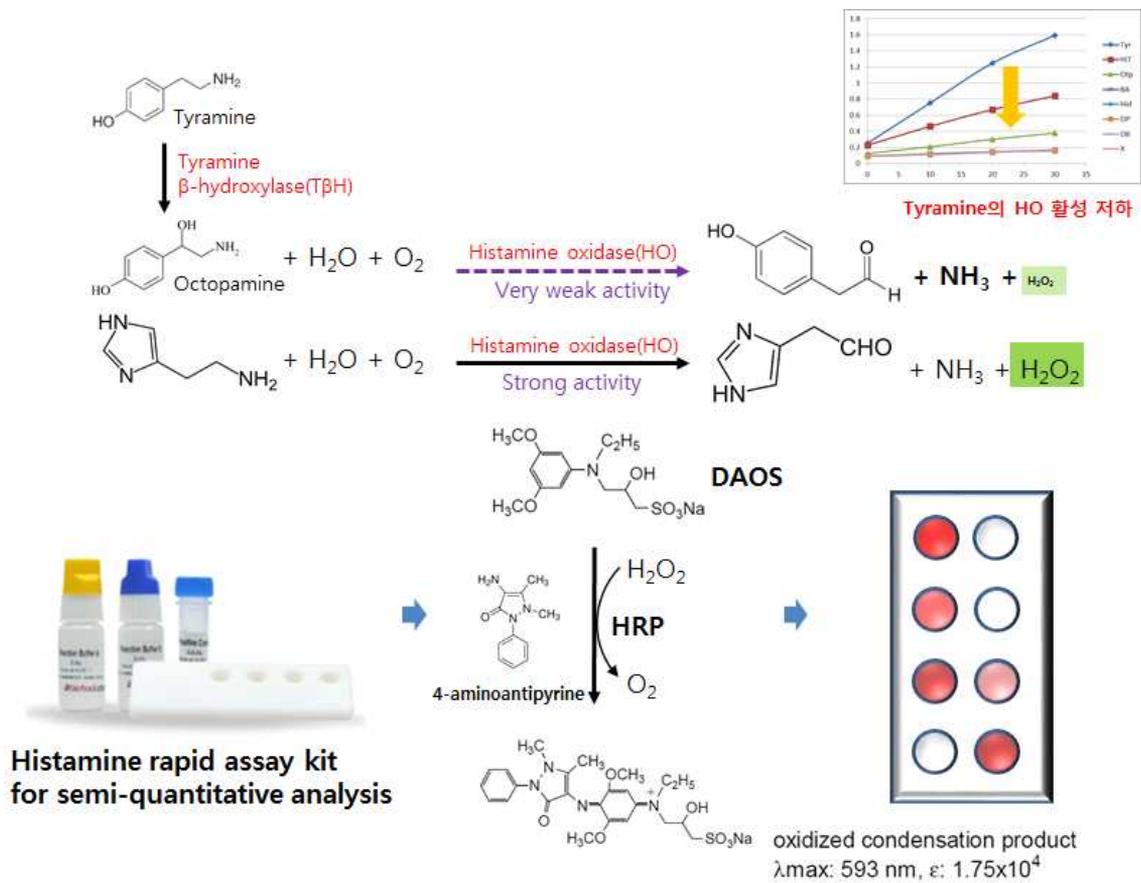


그림 9. 히스타민 산화효소와 티라민 수산화효소의 연쇄반응(cascade)을 이용한 히스타민 정성 분석용 histamine rapid assay kit의 개발과 검출 원리

- 두 효소의 활성과 키트 구성에 따른 최적화 조건을 조사하여 가장 안정적으로 식품 시료에서 히스타민 검출 할 수 있는 pH, 염 농도, 효소 농도 등을 최적화하고 가장 효과적인 전처리 방법을 조사하여 키트로 개발하여서 이를 HPLC 분석 방법과 정밀도에 대한 비교 테스트를 수행하려고 한다.

- 시제품을 만들고 이를 기존 제품과 민감도, 특이도, 검출 시간 등을 비교 분석하려고 한다. 이때 자체적인 spike test 뿐 아니라 동원 F&B 연구소와 같은 실제 검사 현장에서 비교 분석 실험을 수행할 예정이다.

• 현장형 신속 검출에 따른 맞춤형 염료 개발

- 기존 효소 기반의 히스타민 신속 검출 키트는 히스타민 탈수소효소(histamine dehydrogenase; HDH)를 사용하므로 이에 적용되는 WST-8 이라는 염료를 사용하는데 이 염료는 비특이적 반응을 나타낼 수 있다. 그러나 본 연구팀에서 사용하는 HO가 생성하는 과산화수소를 검출할 때 사용되는 염료인 DAOS와 Amplex red 는 HRP 존재 하에서 매우 특이적으로 과산화수소에만 반응하는 안정적인 염료로 이 염료를 사용하여 발색 및 형광

검출하려고 한다.

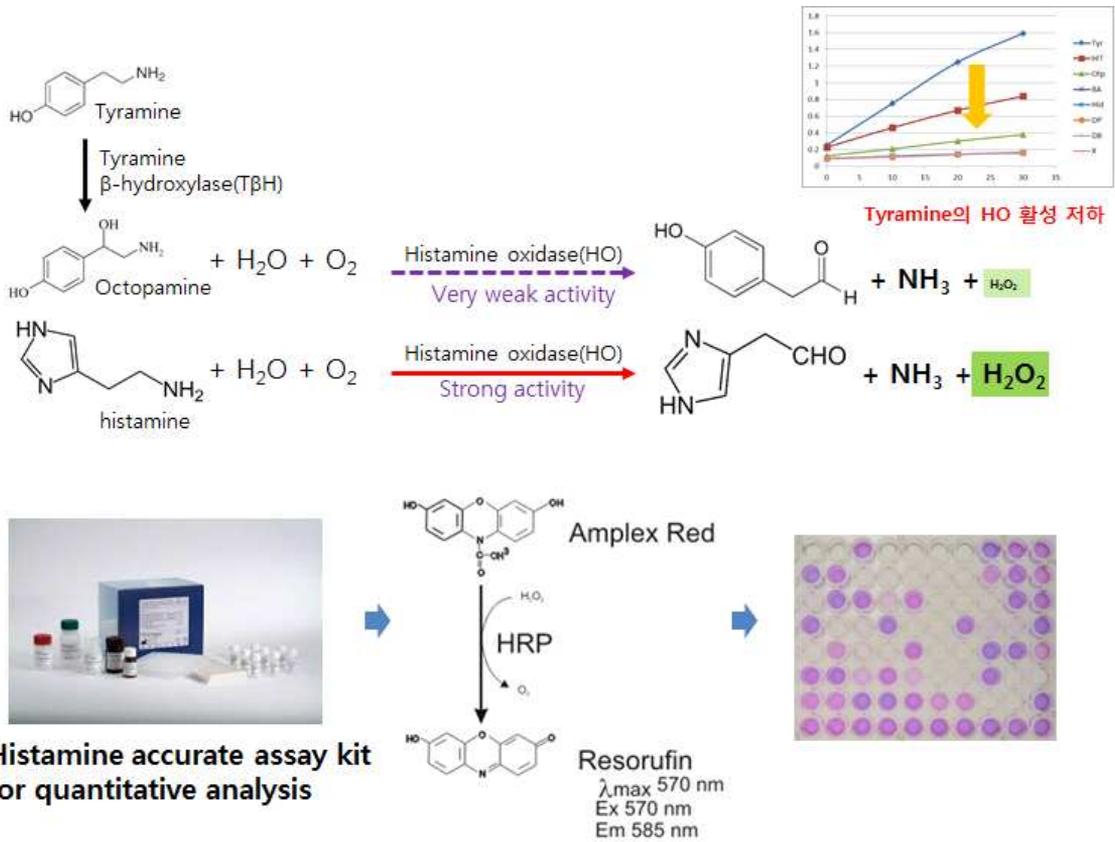


그림 10. 히스타민 산화효소와 티라민 수산화효소의 연쇄반응(cascade)을 이용한 히스타민 정량 분석용 histamine accurate assay kit의 개발과 검출 원리

- 고감도 발색 염료인 DAOS의 경우 고감도 발색 반응이 가능하다. 실제 식품 위해요소 검사 현장에서는 고가의 장비와 전문 인력이 없어서 이를 현장에서 검사하거나 모니터링 검사하기 어려운 식품 제조 회사에서도 경제적인 부담 없이 사용할 수 있는 현장형 히스타민 신속 검출 키트 개발이 가능하므로 HO에 의해서 발생하는 과산화수소를 DAOS를 이용하여 별도의 검출 장비 없이 발색 반응의 정도로 정성 검사를 수행할 수 있는 검출 키트의 개발이 가능하다.
- 형광 염료인 Amplex red의 경우에는 형광에 의해 보다 높은 민감도와 정량적인 분석이 가능하므로 실제 현장에서는 정성 검사 뿐 아니라 비교적 정밀한 정량 검사를 목적으로 하는 경우가 많은 현재 개발된 MaxSinal enzymatic assay kit의 경우 신속 간편 검출 키트로 현장 활용이 좋은 반면 사용하는 염료인 WST-8의 비특이적인 반응에 따라 HPLC와 유사한 정밀한 정량 분석이 어려운 문제점이 있다. 형광 염료인 Amplex red를 이용한다면 형광분석장비를 이용한다면 매우 정밀한 정량 분석이 손쉽게 가능할 것으로 예상된다.

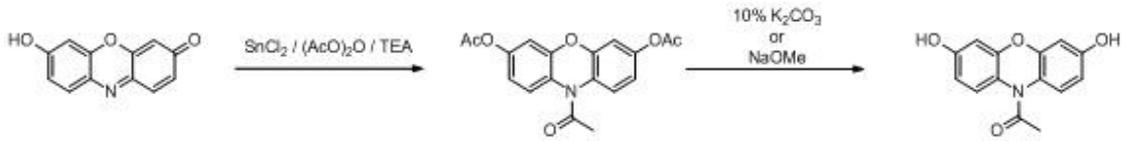


그림 11. 형광 염료인 Amplex Red 합성 방법

- (주)두젠바이오에서는 화학적 합성 기술을 이용하여 경제적이고 안정적인 품질의 히스타민 신속 검출 키트 제품 생산을 위해 안정적인 발색 및 형광 염료의 합성법을 개발하고 안정적인 생산 시스템을 구축하려고 한다.

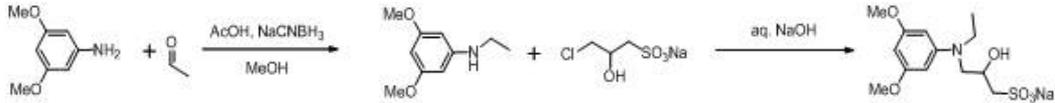


그림 12. 고감도 발색 염료인 DAOS 합성 방법

- 발색 염료인 DAOS와 형광 염료인 Amplex red는 모두 과산화효소(HRP) 존재하에서 과산화수소와 반응하여 특유의 발색 및 형광을 나타내는 염료로 특이도와 반응성이 좋지만 HRP를 요구한다는 점에서 키트의 구성과 센싱으로 기술의 확장에 있어서 문제가 될 수 있다. 이를 개선하기 위해서 (주)두젠바이오에서는 HRP가 없이 바로 과산화수소와 반응하여 특유의 발색 및 형광을 나타낼 수 있는 염료를 아래와 같이 개발하고자 한다.

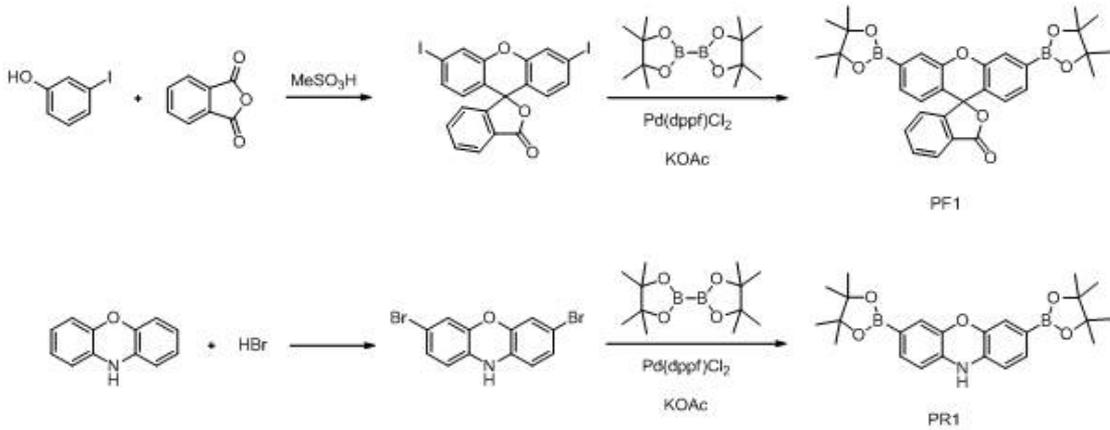
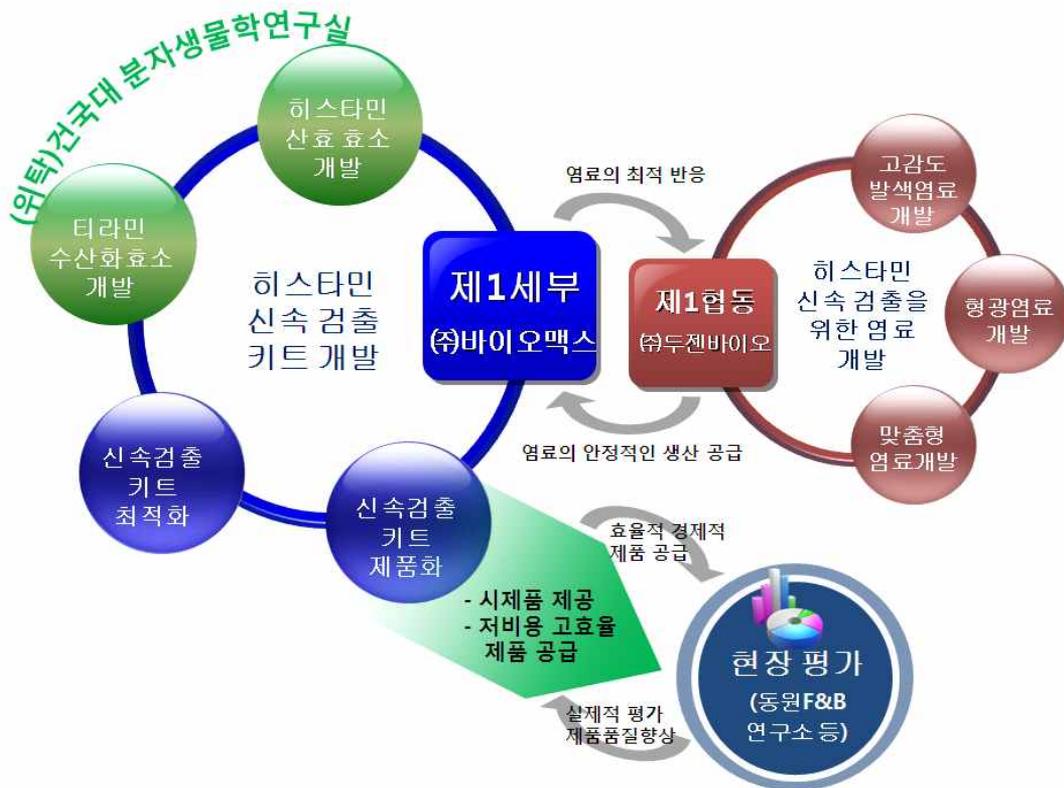


그림 13. HRP-비의존성 형광염료인 PF1과 PR1의 합성 방법

■ 추진체계

- 본 과제는 경제적이고 효율적인 히스타민 신속 검출 키트의 개발이라는 연구 목표를 달성하기 위하여 2개의 중소기업이 협동과제로 그리고 1개의 위탁과제로 구성되었다.
- 본 과제의 목표의 원활한 수행을 위하여 제1세부 (주)바이오맥스에서는 히스타민 신속 검출 키트의 최적화와 상품화를 위해 주요 구성 성분인 히스타민 산화효소와 티라민 수산화효소를 건국대 분자생물학 연구실과 위탁과제를 통해 연구 개발할 것이며 다른 주요 구성 성분인 염료 개발을 위해서 제1협동인 (주)두젠바이오와의 상호보완적 지속적인 연구 개발을 통해 개발하고자 한다.
- (주)바이오맥스는 연구 개발된 히스타민 신속 검출 키트의 효과적인 제품화를 위해서 동원 F&B 연구소 등과 같은 히스타민 신속 검출 키트가 필요한 산업체에서의 실제적인 시제품 현장 평가를 통해 산업 현장에서 필요한 저비용 고효율의 제품을 공급할 수 있도록 자체 사업화를 위해 연구 개발할 계획이다.



2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

○ 히스타민 검출 키트의 국내외 연구 현황

가. 국내 연구 현황

- 국내에서 히스타민 검출과 관련하여 수산물 및 식품 내에 존재하는 바이오제닉 아민에 대한 모니터링이나 저감화 연구에 비해 현장형 신속 검출 기술은 매우 미진한 상태이다.
- 고려대학교 황한준 교수 연구팀은 바이오제닉 아민 생성을 유발하는 탈탄산 반응에 의한 pH 변화를 지시약으로 사용하여 바이오제닉 아민을 검출함으로써 이를 생산하는 생성균주 선발용 배지를 개발하는 연구를 수행하였다.
- 바이오제닉 관련 신속 검출법으로는 서울여대 이인숙 교수 연구팀이 효소 결합 압타머 분석 기술을 이용하여 저분자 활성 바이오제닉 아민 분석법 연구를 추진하고 있다.
- 최근 고려대학교 김영완 연구팀에서는 Monoamine oxidase(MAO)을 이용한 효율적인 바이오제닉아민 신속 분석법 수립 및 국내 유통 중인 식품 중에서 치즈, 된장, 고추장에 대한 바이오제닉 아민 모니터링에 관한 연구를 수행하였음. 이 연구팀은 바이오제닉 아민 중에서 푸트레신(Putrescine)에 대한 특이적인 산화효소 (PUO)와 MAO를 융합하여 식품 내에 존재하는 모노바이오제닉아민과 푸트레신 함량을 통합적으로 측정하는 생물촉매를 개발하였다(그림 4).

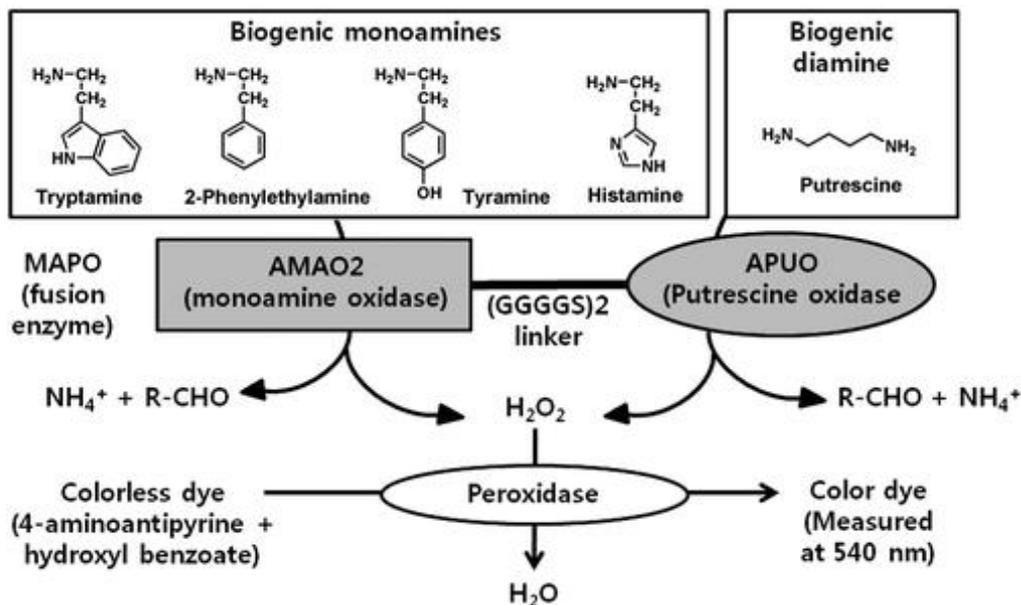


그림 14. 푸트레신(Putrescine)산화효소 (PUO)와 MAO를 융합하여 통합적으로 바이오제닉 아민 검출 방법을 연구 (*J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61, 9118-9124)

- (주)인포피아에서 바이오제닉 아민을 통합해서 분석하는 키트 개발을 진행 중에 있으나, 이는 전체 식품 내에 존재하는 모든 바이오제닉 아민을 분석하기 위한 키트로써 현재 국내에서는 수산물 및 식품 내에서 히스타민 신속 검출 키트 개발은 아직 개발되지 못하고 있다.

나. 국외 연구 현황

- 히스타민 신속 검출 키트는 히스타민을 생선의 신선도 지표로 활용하는 유럽을 중심으로 히스타민 특이 항체를 이용한 경쟁적인 효소면역반응 분석법(ELISA) 기반의 히스타민 검출 키트가 개발되어 현재 판매 중에 있다(그림 5). Neogen 사에서 Alert for histamine 또는 Veratox for histamine 등의 다양한 제품으로 개발되어 현재 국내에서도 수입되어 수산물 및 식품 내에서 히스타민 검출을 위한 신속 검사법으로 사용하고 있다(그림 6).

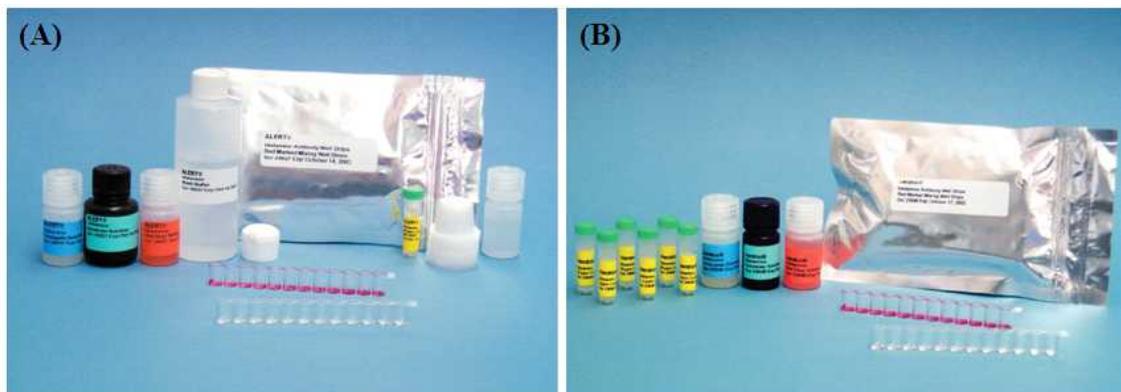


그림 15. 히스타민 특이 항체를 이용한 Neogen 사의 제품들. (A) 정성분석용 히스타민 검출 키트인 Alert for histamine, (B) 정량분석용 히스타민 검출 키트인 Veratox for histamine

- 앞선 효소면역반응분석법이 개발되어 판매 중에 있지만 검사 현장에서 사용하기 복잡한 검사 방법과 다소 낮은 감도의 문제 등으로 인해 효소 기반의 검출을 위한 histamine oxidase(HO)와 histamine dehydrogenase (HDH)를 개발하는 연구가 유럽 및 미국 등의 연구팀들이 관련 연구를 수행 중에 있다.
- 최근 Bioo scientific 사에서는 이러한 관련 효소 중에서 histamine dehydrogenase (HDH)을 기반으로 하여 발색 반응을 일으키는 염료를 이용하여 히스타민을 간편하게 검출 할 수 있는 Bioo scientific 사에 의해서 MaxSignal Histamine Enzymatic Assay Kit로 개발하여 시판 중에 있다. 이 연구에 사용되는 HDH는 일본에서 특허를 가지고 있으며 Bioo scientific 사에 독점 공급하므로 해서 효소 기반의 히스타민 신속 검출 키트로 시판되는 유일한 제품으로 이 제품은 기존 효소 면역학적 분석법 기반의 방법의 복잡하고 다소 낮은 민감도의 문제

를 해결하였지만 사용하는 발색 염료가 비특이적인 반응을 할 수 있으므로 해서 정밀도가 다소 떨어지는 문제점을 가지고 있다.

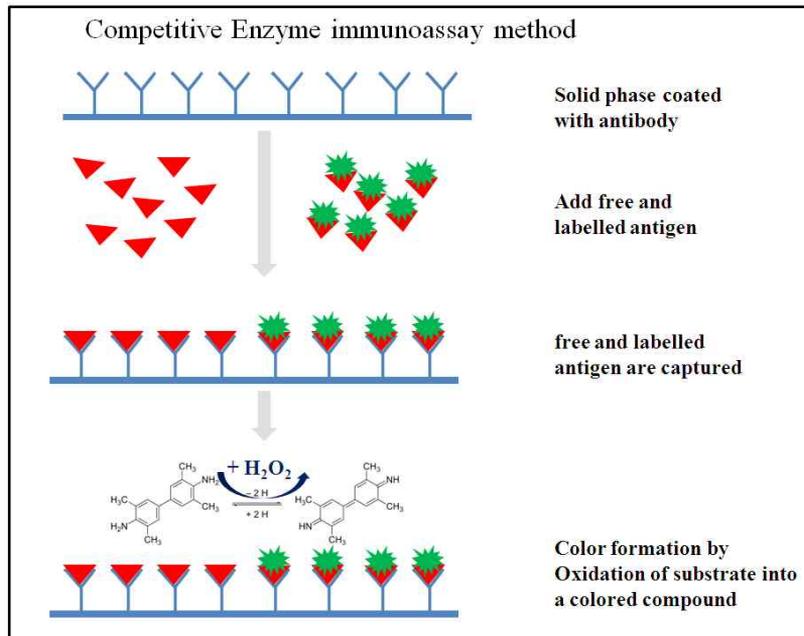


그림 16. 히스타민 특이 항체를 이용한 경쟁적인 효소면역반응분석법(ELISA)의 원리

- 본 과제에서 제안하는 효소 기반의 히스타민 검출 기술은 기존 개발된 MaxSignal Histamine Enzymatic Assay Kit에서 사용하는 HDH가 아닌 HO를 이용하고 있으며 HO가 갖는 히스타민 외에 다른 바이오제닉 아민 특히 티라민에 대한 낮은 특이도 문제를 해결하기 위해서 수산화효소를 함께 이용하므로 해서 기존 효소 기반의 검출 기술과 다른 기술이다. 또한, 발색 염료인 WST-8과는 다른 비특이적 반응 문제가 낮은 형광 염료인 Amplex red와 고감도 발색 염료인 DAOS와 새로운 맞춤형 염료를 사용하므로 새로운 히스타민의 현장 검출을 위한 신속 검출 키트 기술이 될 것으로 기대된다. 이러한 새로운 효소 시스템의 사용과 고감도의 형광 및 발색 염료의 사용은 지적재산권을 획득할 수 있으므로 신속 검출을 위한 원천 기술이 될 것으로 기대된다.

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

○ [과제별(세부·협동) 연구수행 내용 및 결과

[제1세부] 재조합 기술을 이용한 산화 효소와 수산화효소 생산 및 히스타민 신속 검출 키트의 최적화 및 제품화 ((주)바이오맥스)

■ 재조합 기술을 이용한 히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 제조 (위탁기관 건국대)

Histamine oxidase를 *pGEX vector*의 형태로 BL21(DE3) codon plus competent cell에 transformation을 하였다. 여기서 얻은 colony 중 하나를 LB media 3ml에 접종하여 37°C shaking incubator에서 overnight(O/N)으로 키운다.

다음 날 새로운 LB media 300ml에 cell 3ml를 접종하고 37°C에서 180rpm으로 O.D. 600=0.8~1이 되도록 키운 후 IPTG final 0.1mM이 되도록 넣고 18°C에서 180rpm으로 단백질을 발현시킨다. 2일 후에 5분 동안 8000rpm으로 cell down을 한 후 lysis buffer(PBS pH7.5, 1mg/ml lysozyme, 1mM PMSF) 10ml로 cell을 풀어준다.

3분 동안 Sonication(pulse on 5s/off 15s)을 수행한 후 15분 동안 4°C에서 12000rpm으로 centrifugation을 실시하여 soluble protein을 얻는다. 0.45mm의 cellulose acetate membrane으로 filtering후 GSTtrap column과 AKTA purifier(GE Healthcare Life Sciences)를 이용하여 단백질 정제를 실시하였다.

GST binding buffer는 PBS buffer(pH 7.5)를 이용하였고, Elution buffer로는 50mM Tris-HCl (pH 6.5), 20% glycerol, 10mM Glutathione으로 준비하였고, soluble protein은 Elution buffer 30% 에서 용출(elution)하였고 amicon ultra 50K device를 이용하여 5.5mg/ml의 histamine oxidase으로 농축하였다.

NGC(bio-rad)과 Superdex 200 column (26/75)을 이용하여 단백질 정제를 실시하였다. buffer는 PBS buffer, pH 7.4를 이용하여 유속은 0.8 ml/min으로 하였다. Amicon ultra 50K device를 이용하여 농축하였다.

그 결과, 그림 17에서 보는 바와 같이 dimer 형태로 84 kDa로 GST 태깅에 의해서 약 110 kDa의 크기로 발현되어 정제됨을 확인할 수 있었다. 상당한 양의 발현이 E. coli에서 잘 이루어짐을 확인할 수 있었으며 특히 soluble 한 형태로 정제가 가능한 재조합 HO의 발현을 확인할 수 있었다. 이를 GSTtrap column으로 정제할 수 있었다(그림17 line4). 보다 정제도를 높이기 위해서 NGC(bio-rad)과 Superdex 200 column (26/75)을 이용하여 단백질 정제를 실시하였고 그림 18과 같은 gel chromatography를 얻어 각 분획에 대해 정제도를 테스트하였다. 정제도를 높이기 위해 gel chromatography를 이용하였지만 그림 20에서 보는 바와 같이 높은 정도의 HO를 얻지 못했지만 활성 측정 및 안정성 분석 결과 현재의 정제도 결과에서도 제품화

에 이용에 문제없이 안정적인 활성을 보여주었으므로 GST-column과 Superdex 200 column을 이용한 정제 방법을 확립하고 향후 연구 개발 및 제품화를 위한 재조합 HO의 제조 공정으로 확립하였다.

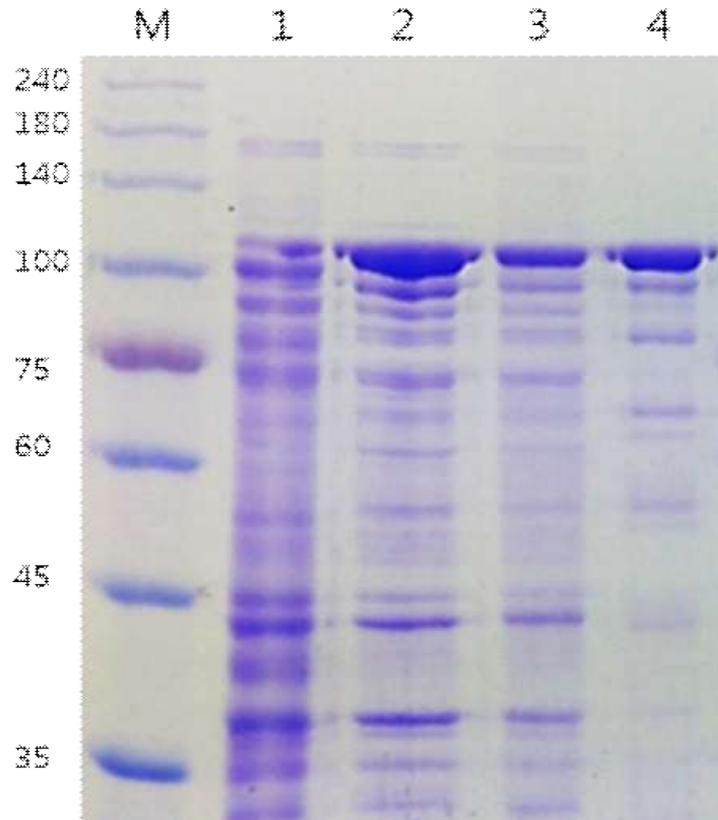


그림 17. 재조합 히스타민 산화효소의 대장균에서 발현 1. IPTG induction 이전 세포 파쇄액; 2. IPTG induction 이후 세포 파쇄액; 3. 세포 파쇄액 중에서 soluble 한 형태의 시료; 4. GST-column으로 정제한 히스타민 산화효소(HO).

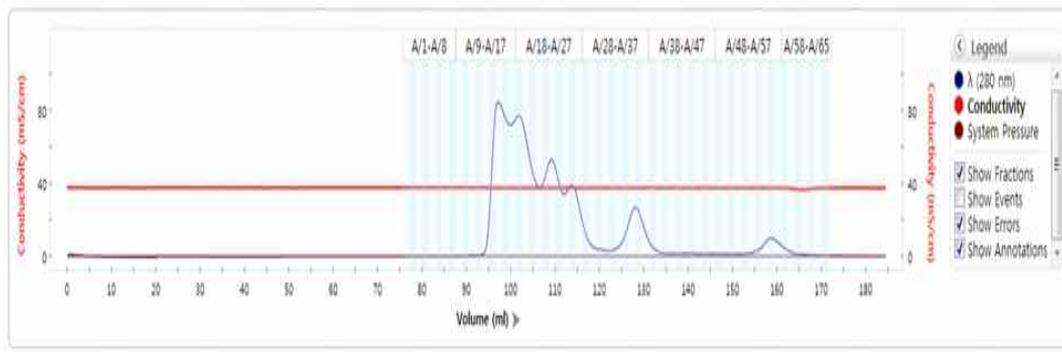


그림 18. Superdex 200 column을 이용한 pGEX HO 분리 정제

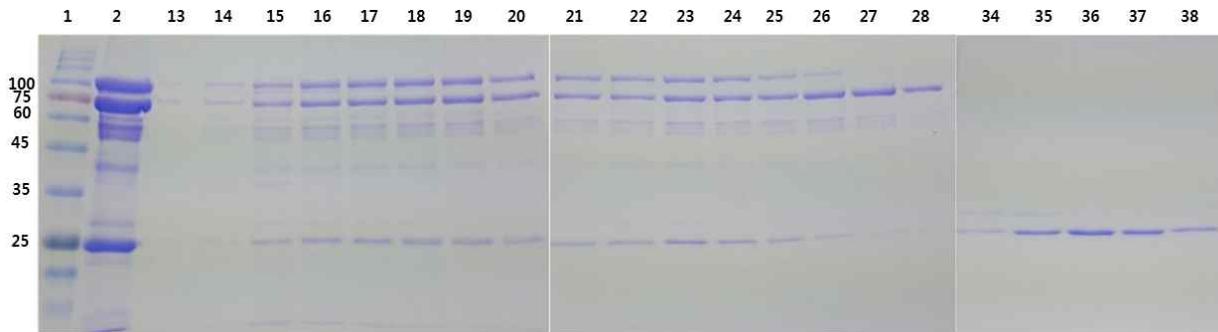


그림 19. Superdex 200 column을 이용한 pGEX HO purification의 SDS-PAGE (12% Tris-Glycine) 1. marker; 2. loading 전 sample; 13-28과 34-28. Superdex 200 column으로 분리한 분획 시료

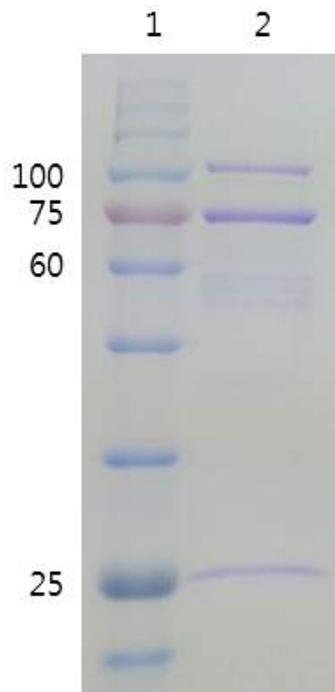


그림 20. Superdex 200 column 분획(13-26)을 농축한 HO의 SDS PAGE 결과

■ 재조합 기술을 이용한 티라민 수산화효소(tyramine β -hydroxylase; T β H) 의 제조 (위탁기관 건국대)

(1) 티라민 수산화효소 클로닝 및 분리 정제

1) BL21(DE3) competent cell을 이용한 pGEX T β H의 분리 정제

Human cDNA로부터 T β H 유전자를 확보하여 이를 재조합하여 대장균에 발현시키기 위하여 시도하였으나 대장균에서 전혀 발현되지 않는 결과를 얻었다. 이는 Human 유래 T β H가 대장균에서는 쉽게 발현되지 못하기 때문인 것으로 보여진다. 기존 상용화된 재조합 T β H는 대장균을 이용한 재조합 단백질이 아닌 Cho 세포에서 발현시켜서 얻고 있음이 조사되었다. 제품화를 위해서는 Cho 세포 발현에서 얻어서는 제품화가 어렵기 때문에 대장균에서 발현시키기 위해 human 이 아닌 *Caenorhabditis elegans* 의 T β H(CeT β H)를 대장균에서 발현시키기 위한 클로닝 및 분리 정제를 다시 시도하였다.

Caenorhabditis elegans T β H(CeT β H) 유전자 (1758bp)를 대장균에서 보다 효과적으로 발현하기 위해 대장균의 codon으로 codon optimization을 한 후 합성하였다. 합성의 CeT β H 유전자를 pGEX vector의 형태로 BL21(DE3) codon plus competent cell에 transformation을 하였다. 여기서 얻은 colony 중 하나를 50 ug/ml ampicillin을 첨가한 LB media 10 ml에 접종하여 37 $^{\circ}$ C shaking incubator에서 overnight(O/N)으로 키운다. 다음 날 150 ml LB medium에 1 % seed cells, 50 ug/ml ampicillin을 첨가 후 37 $^{\circ}$ C에서 180 rpm으로 OD₆₀₀ 0.8-1.0까지 키운 다음 IPTG final 0.5 mM이 되도록 넣고 18 $^{\circ}$ C에서 180 rpm으로 overnight 으로 키운다. 다음 날 4 $^{\circ}$ C에서 15 분 동안 8000 rpm으로 centrifuge를 하였다. cell down된 pellet을 PBS buffer, pH 7.4 10 ml로 풀어준 다음 3 분 동안 sonication(pulse on 5s/off 15s)을 실시한 후 4000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 30 분 동안 centrifugation하여 soluble protein을 얻는다. 0.45 μ m cellulose acetate membrane을 이용하여 filtering 하였다.

그 결과, 그림 21에서 보는 바와 같이 T β H의 68kDa에 GST 태깅에 의해서 93kDa의 재조합단백질의 발현이 확인되었다. 그러나 대부분의 발현된 재조합 T β H의 단백질이 insoluble한 형태로 분리 정제 및 활성 테스트의 문제가 있으므로 이를 해결하기 위해서 competent cell에 soluble하게 할 수 있도록 chaperone을 같이 넣어 발현 및 정제를 시도하였다.

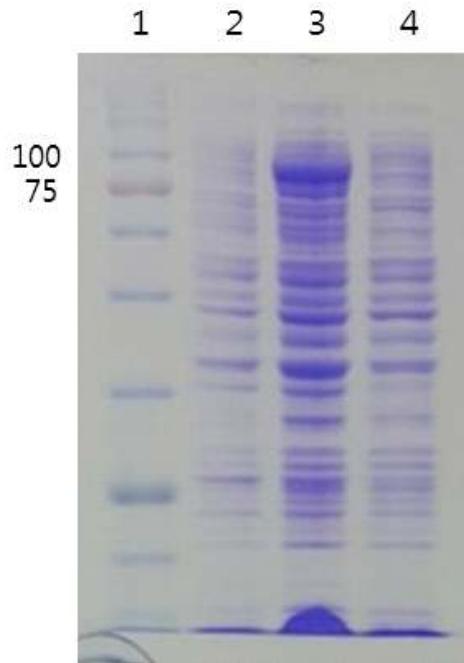


그림 21. pGEX TβH의 induction과 soluble test SDS-PAGE (12% Tris-Glycine) 1. marker; 2, IPTG induction 이전 세포 파쇄액; lane 3, IPTG induction 이후 세포 파쇄액; lane 4, 세포 파쇄액 중에서 soluble 한 형태의 시료

2) Chaperon을 이용한 티라민 수산화효소 분리 정제

가. pTf16/BL21(DE3) competent cell을 이용한 pGEX TβH의 분리 정제

CeTβH를 soluble 형태로 발현하기 위해 chaperon 유전자인 pTf16을 BL21(DE3) codon plus competent cell에 형질전환 후 이 competent cell에 pGEX TβH를 transformation을 하였다. 여기서 얻은 colony 중 하나를 50 ug/ml ampicillin, 0.5 mg/ml L-Arabinose와 20 ug/ml Chloramphenicol을 첨가한 LB media 10 ml에 접종하여 37°C shaking incubator에서 overnight(O/N)으로 키운다. 다음 날 150 ml LB medium에 1 % seed cells, 50 ug/ml ampicillin, 0.5 mg/ml L-Arabinose와 20 ug/ml Chloramphenicol을 첨가 후 37 °C에서 180 rpm으로 OD₆₀₀ 0.8-1.0까지 키운 다음 IPTG final 0.5 mM이 되도록 넣고 18 °C에서 180 rpm으로 overnight으로 키운다. 다음 날 4 °C에서 15 분 동안 8000 rpm으로 centrifuge를 하였다. cell down된 pellet을 PBS buffer, pH 7.4 10 ml로 풀어준 다음 3분 동안 sonication(pulse on 5s/off 15s)을 실시한 후 4000 rpm, 4 °C에서 30 분 동안 centrifugation하여 soluble protein을 얻었다.

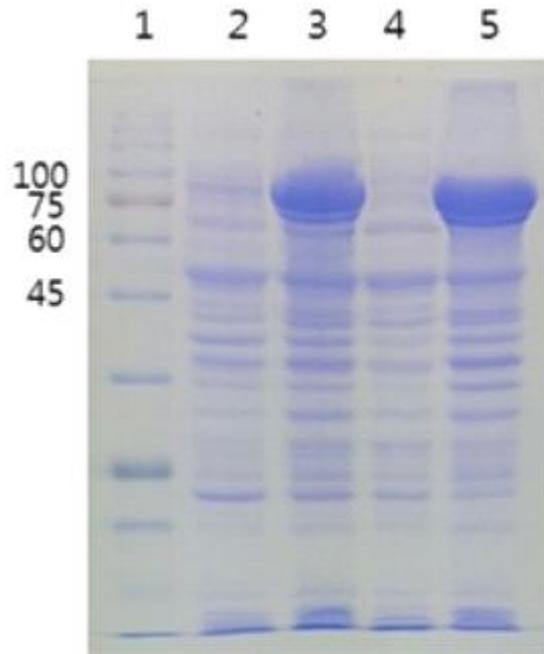


그림 22. pTf16/BL21(DE3) competent cell을 이용한 pGEX TBH의 SDS-PAGE 결과 (12% Tris-Glycine) 1. marker; 2, IPTG induction 이전 세포 파쇄액; lane 3, IPTG induction 이후 세포 파쇄액; lane 4. 세포 파쇄액 중에서 soluble 한 형태의 시료; lane 5. 세포 파쇄액 중에서 insoluble 한 형태의 시료

그 결과는 그림 22에서 보는 바와 같이 chaperon을 같이 넣어 발현시킨 결과 BL21(DE3) competent 대장균을 이용하는 것보다는 발현량이 증가하였으며 insoluble 한 형태의 단백질이 많았지만 그 전보다 soluble 한 형태의 단백질이 증가하는 것으로 보였으므로 이를 0.45 um cellulose acetate membrane을 이용하여 filtering 후 AKTA purifier(GE Healthcare Life Sciences)와 HiTrap TALON crude (5 ml) column 또는 GSTrap FF (5 ml) column을 이용하여 단백질 정제를 실시하였다. GST binding buffer는 PBS buffer(pH 7.4)이고 elution buffer는 50 mM Tris-Cl(pH 6.5), 10 mM Glutathion으로 준비하였다. Soluble protein은 각각의 elution buffer 100 %에서 용출하였고 amicon ultra 30K device를 이용하여 농축하였다. 1000 rpm에서 5 분 동안 centrifuge 후 pellet 을 Induction 조건에서는 (PBS buffer, pH 7.4 + 1 % SDS)로 resuspension 후 sonication을 한 다음 100 °C에서 5 분 동안 incubation 후 SDS-PAGE로 확인하였다.

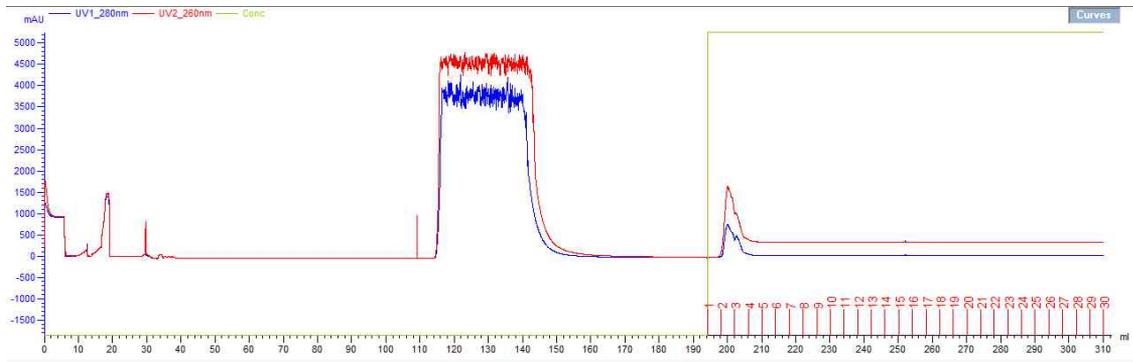


그림 23. GST column을 이용한 pGEX TβH 분리 정제

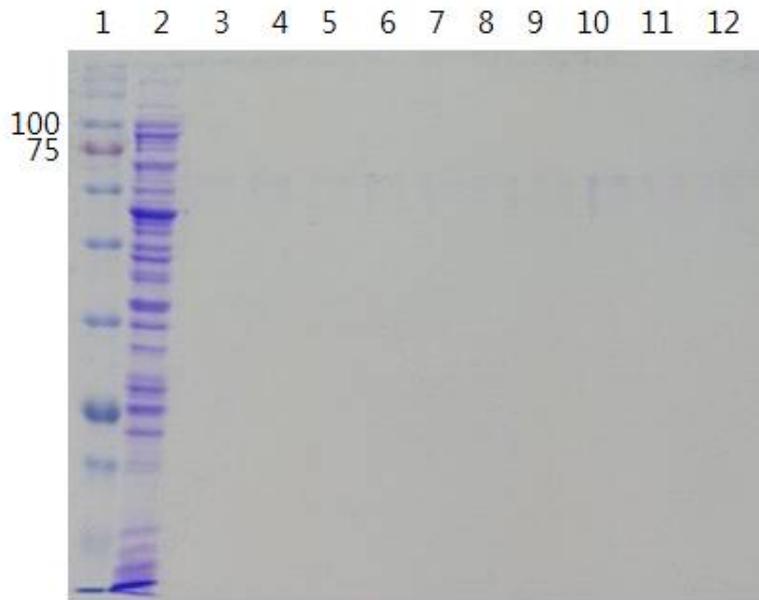


그림 23. GST column을 이용한 pGEX TβH 분리 정제한 SDS-PAGE (12% Tris-Glycine) 1. marker 2. loading 전 sample 3-12. elution buffer 100 %로 용출한 sample

그러나, GST 컬럼으로 정제하였으나 분리 정제되지 않았으므로 pGEX로 TβH를 클로닝하였으나 His 태깅이 역시 되어 있으므로 GST 컬럼이 아닌 His 컬럼으로 HiTrap 컬럼을 이용하여 분리정제를 시도하였다. HiTrap bindig buffer는 20 mM sodium phosphate(pH 7.5), 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole을 이용하였고, elution buffer는 20 mM sodium phosphate(pH 7.5), 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole으로 elution buffer 100 %으로 용출하여 amicon ultra 30K device를 이용하여 농축하였다. 1000 rpm에서 5 분 동안 centrifuge 후 pellet을 Induction 조건에서는 (PBS buffer, pH 7.4 + 1 % SDS)로 resuspension 후 sonication을 한 다음 100 °C에서 5 분 동안 incubation 후 SDS-PAGE 로 확인하였다. Soluble 조건에서는 PBS buffer, pH 7.4로 resuspension 후 sonication

한 다음 1000 rpm에서 5 분 동안 centrifuge 후 상층액을 00 °C에서 5 분 동안 incubation 후 확인한 것이며, 상층액을 제거한 뒤 남은 pellet을 (PBS buffer, pH 7.4 + 1 % SDS)로 resuspension 후 sonication을 한 다음 100 °C에서 5 분 동안 incubation 후 SDS-PAGE로 확인하였다.

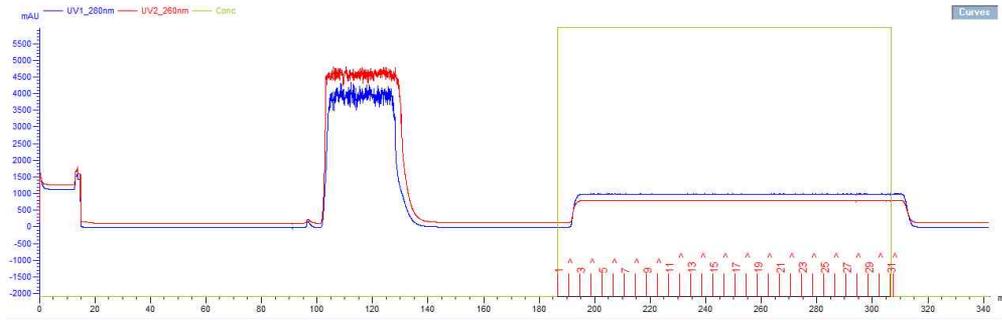


그림 24. His tag를 이용한 pGEX TβH purification

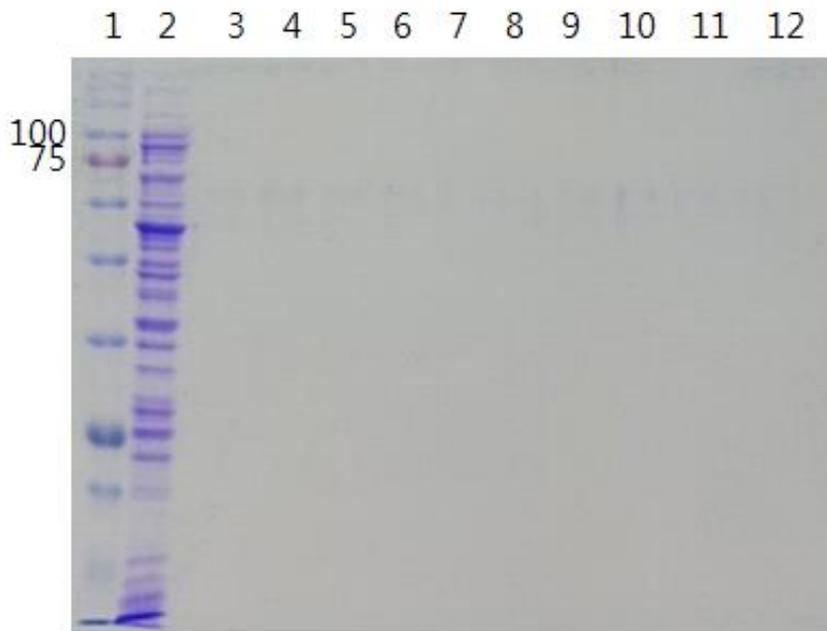


그림 25. His tag를 이용한 pGEX TβH purification의 SDS-PAGE (12% Tris-Glycine) marker 2. loading 전 sample 3-12. elution buffer 100 %로 용출한 sample

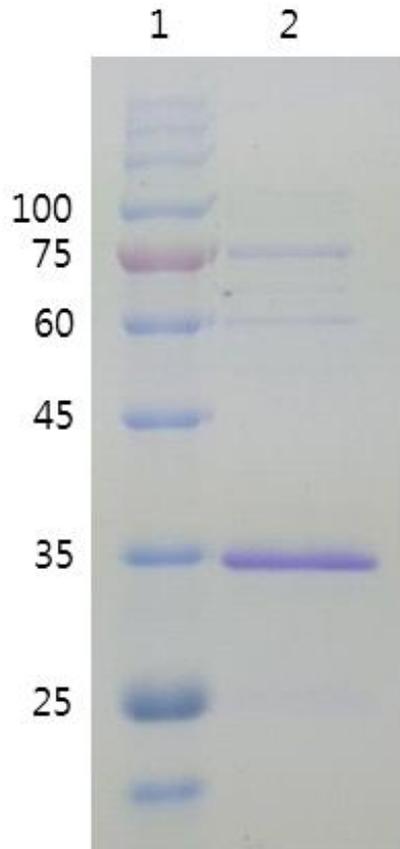


그림 26. elution buffer 100 %로 용출한 sample 40 ml을 농축한 SDS-PAGE (12% Tris-Glycine) 1. marker 2. his tag를 이용하여 용출한 sample 농축 3. GST tag를 이용하여 용출한 sample의 농축액

그 결과, His 컬럼으로 정제되지 않았음을 확인할 수 있었다. 단백질 분리 정제 시 태깅되어 있는 부분이 C-terminal에 있어서 분리정제에 문제가 있을지 모르므로 이에 대해 조사하기 위해 N-terminal에 태깅하기 위해 다시 클로닝하여 TβH의 분리 정제를 수행하였다.

나. pKJE7/BL21(DE3) competent cell을 이용한 pET41b TβH의 분리 정제

C-terminal에 GST tag가 있는 pGEX와 달리 N-terminal에 있는 pET41b vector를 이용하였다. 또한 CeTβH를 soluble 형태로 발현하기 위해 chaperon 유전자인 pKJE7을 BL21(DE3) codon plus competent cell에 형질전환 후 이 competent cell에 pGEX TβH를 transformation을 하였다. 여기서 얻은 colony 중 하나를 50 ug/ml kanamycin, 0.5 mg/ml L-Arabinose와 20 ug/ml Chloramphenicol을 첨가한 LB media 10 ml에 접종하여 37°C shaking incubator에서 overnight(O/N)으로 키운다. 다음 날 150 ml LB medium에 1 % seed cells, 50 ug/ml kanamycin, 0.5 mg/ml L-Arabinose와 20 ug/ml

Chloramphenicol을 첨가 후 37 °C에서 180 rpm으로 OD₆₀₀ 0.8-1.0까지 키운 다음 IPTG final 0.5 mM이 되도록 넣고 18 °C에서 180 rpm으로 overnight으로 키운다. 다음 날 4 °C에서 15 분 동안 8000 rpm으로 centrifuge를 하였다. cell down된 pellet을 PBS buffer, pH 7.4 10 ml로 풀어준 다음 3분 동안 sonication(pulse on 5s/off 15s)을 실시한 후 4000 rpm, 4 °C에서 30 분 동안 centrifugation하여 soluble protein을 얻었다.

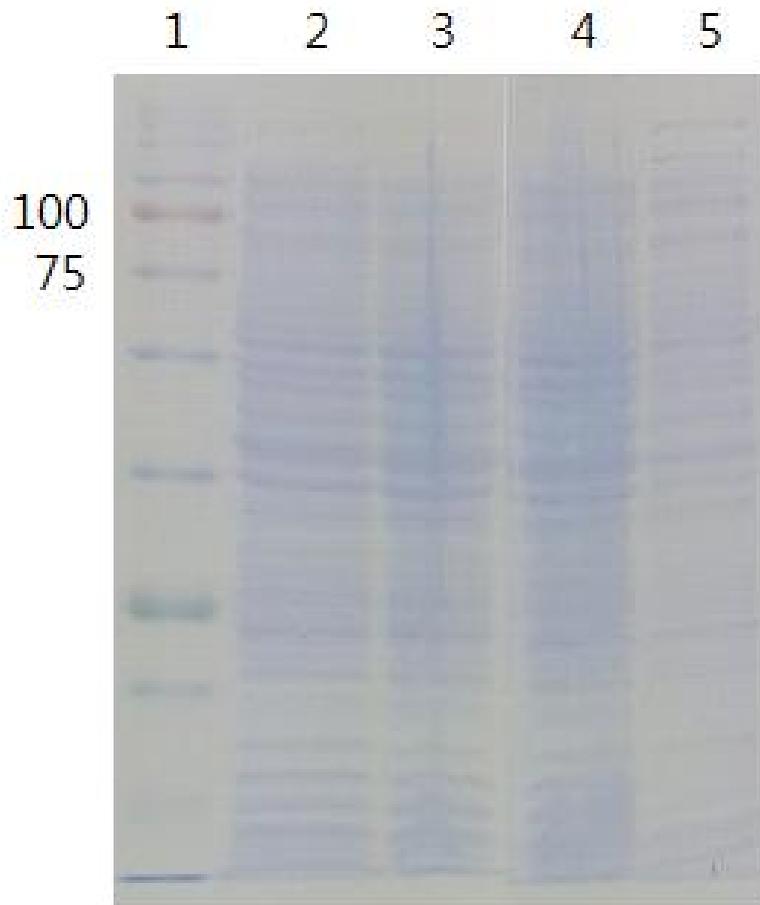


그림 27. pKJE7/BL21(DE3) competent cell을 이용한 pET41b TBH의 SDS-PAGE (12% Tris-Glycine) 1. marker; 2, IPTG induction 이전 세포 파쇄액; lane 3, IPTG induction 이후 세포 파쇄액; lane 4. 세포 파쇄액 중에서 soluble 한 형태의 시료; lane 5. 세포 파쇄액 중에서 insoluble 한 형태의 시료

그 결과는 그림 25에서 보는 바와 같이 chaperon을 같이 넣어 발현시킨 결과 전체적으로 발현량이 감소하였으나 insoluble 한 형태의 단백질과 유사하게 soluble 한 형태의 단백질이 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 0.45 um cellulose acetate membrane을 이용하여 filtering 후 AKTA purifier(GE Healthcare Life Sciences)와 GSTtrap FF (5 ml) column을 이용하여 단백질 정제를 실시하였다. GST binding buffer는 PBS buffer(pH

7.4)이고 elution buffer는 50 mM Tris-Cl(pH 6.5), 10 mM Glutathion으로 준비하였다. Soluble protein은 각각의 elution buffer 100 %에서 용출하였고 amicon ultra 30K device를 이용하여 농축하였다. 1000 rpm에서 5 분 동안 centrifuge 후 pellet을 Induction 조건에서는 (PBS buffer, pH 7.4 + 1 % SDS)로 resuspension 후 sonication을 한 다음 100 °C에서 5 분 동안 incubation 후 SDS-PAGE로 확인하였다.

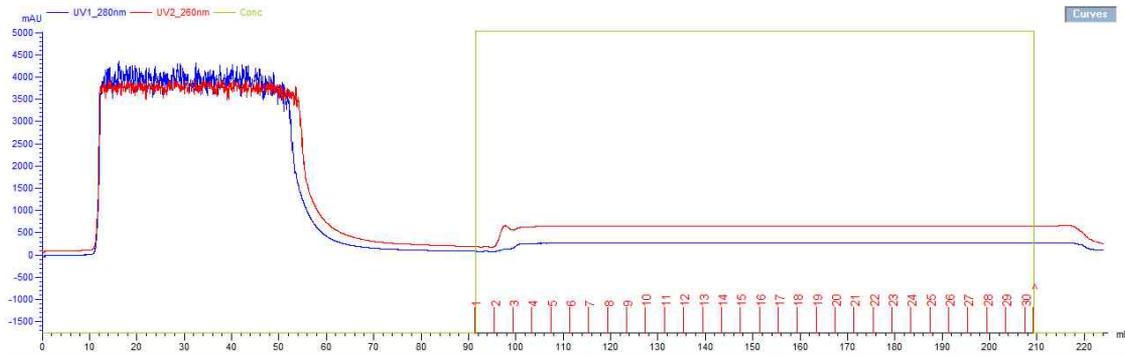


그림 28. GST tag를 이용한 pET41b TβH 분리 정제 결과

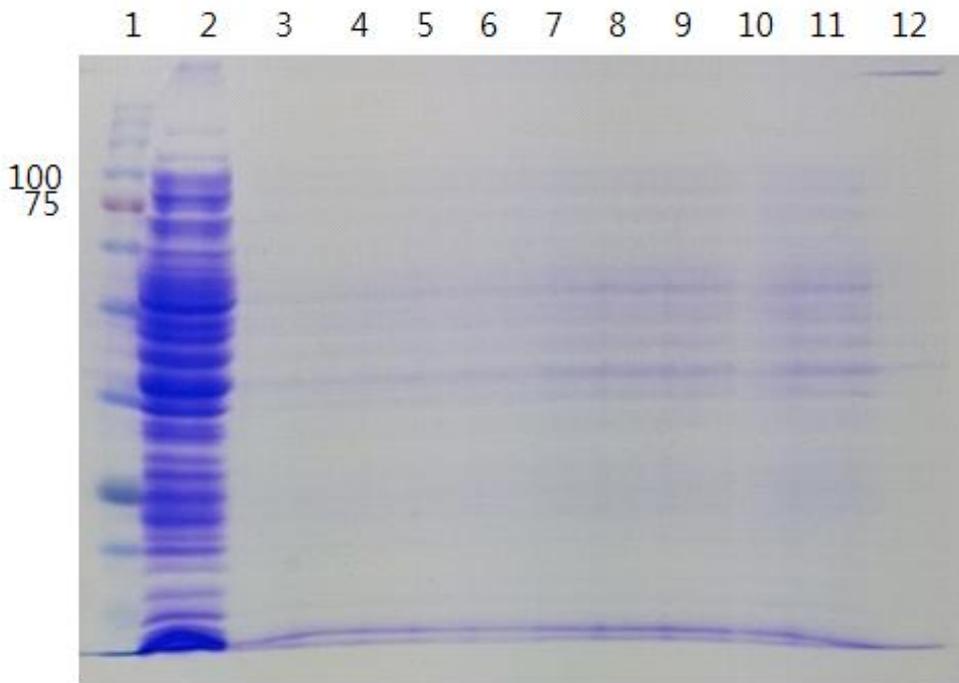


그림 29. GST tag를 이용한 pET41b TβH purification의 SDS-PAGE (12% Tris-Glycine) 1. marker 2. loading 전 sample 3-12. elution buffer 100 %로 용출한 sample

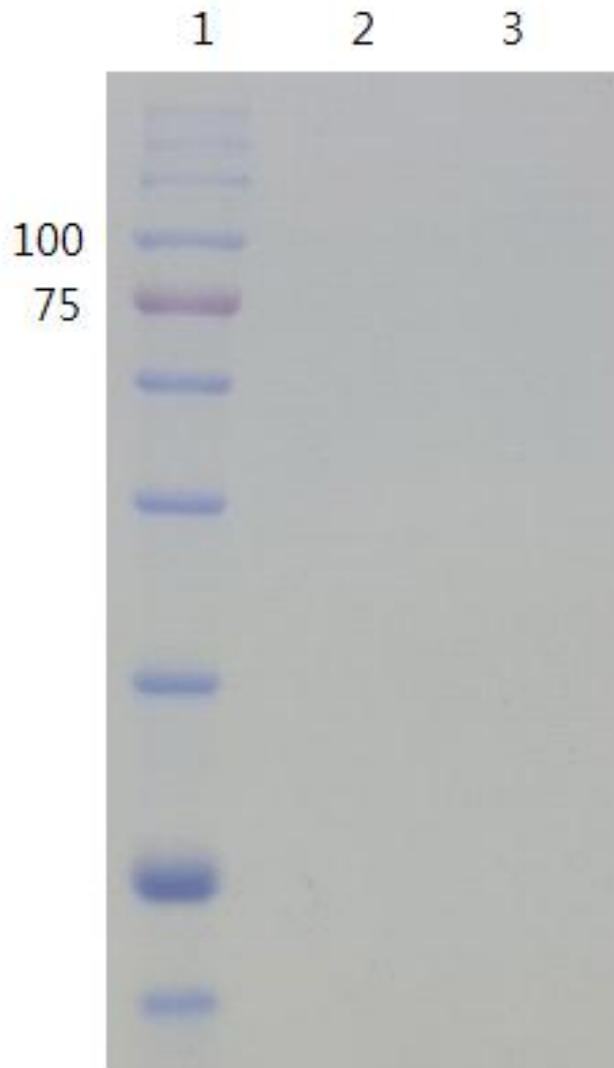


그림 30. elution buffer 100 %로 용출한 sample 40 ml을 농축한 것의 SDS-PAGE (12% Tris-Glycine) 1. marker 2. his tag를 이용하여 용출한 sample 농축 3. GST tag를 이용하여 용출한 sample 농축액

그 결과, 그림 29와 30에서 보는 바와 같이 pKJE7/BL21(DE3) competent cell을 이용하여 발현시킨 pET41b TβH는 발현이 되지 않은 것으로 최종 확인되었다. pTf16/BL21(DE3) competent cell을 이용한 pGEX TβH가 현재까지 시도된 클로닝과 발현 테스트 결과 소량의 soluble 형태가 발현되는 것으로 판단되어 이를 scale up하여 TβH의 분리정제를 시도하였다.

다. pTf16/BL21(DE3) competent cell을 이용한 pGEX TβH의 scale up과 size exclusion chromatography를 이용한 정제

pTf16/BL21(DE3) competent cell을 이용한 pGEX TβH의 분리 정제를 0.6L로 배양하여 분리정제를 시도하였다. pTf16을 BL21(DE3) codon plus competent cell에 형질전환 후 이 competent cell에 pGEX TβH를 transformation을 하였다. 여기서 얻은 colony 중 하나를 50 ug/ml ampicillin, 0.5 mg/ml L-Arabinose와 20 ug/ml Chloramphenicol을 첨가한 LB media 10 ml에 접종하여 37°C shaking incubator에서 overnight(O/N)으로 키운다. 다음 날 1,350 ml(150 ml x 9개 erlenmeyer flask) LB medium에 1 % seed cells, 50 ug/ml ampicillin, 0.5 mg/ml L-Arabinose와 20 ug/ml Chloramphenicol을 첨가 후 37 °C에서 180 rpm으로 OD₆₀₀ 0.8-1.0까지 키운 다음 IPTG final 0.5 mM이 되도록 넣고 18 °C에서 180 rpm으로 overnight으로 키운다. 다음 날 4 °C에서 15 분 동안 8000 rpm으로 centrifuge를 하였다. cell down된 pellet을 PBS buffer, pH 7.4 10 ml로 풀어준 다음 3분 동안 sonication(pulse on 5s/off 15s)을 실시한 후 4000 rpm, 4 °C에서 30 분 동안 centrifugation하여 soluble protein을 얻는다. 0.45 um cellulose acetate membrane을 이용하여 filtering 후 AKTA purifier(GE Healthcare Life Sciences)와 HiTrap TALON crude (5 ml) column을 이용하여 단백질 정제를 실시하였다. HiTrap bindig buffer는 20 mM sodium phosphate(pH 7.5), 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole을 이용하였고, elution buffer는 20 mM sodium phosphate(pH 7.5), 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole으로 준비하였다. Soluble protein은 각각의 elution buffer 100 %에서 용출하였고 amicon ultra 30K device를 이용하여 농축하였다. 농축한 sample을 NGC(bio-rad)과 Superdex 200 column (26/75)을 이용하여 단백질 정제를 실시하였다. buffer는 PBS buffer, pH 7.4를 이용하여, 유속은 0.8 ml/min으로 하였다. Amicon ultra 50K device를 이용하여 농축하였다.

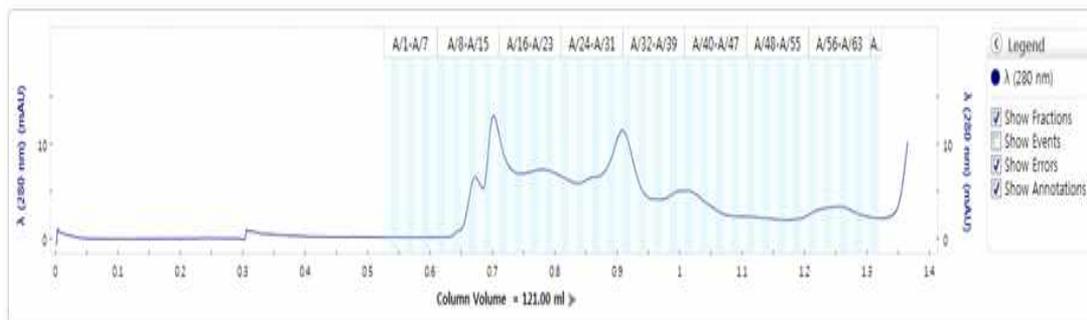


그림 31. Superdex 200 column을 이용한 pGEX TβH 분리 정제 결과

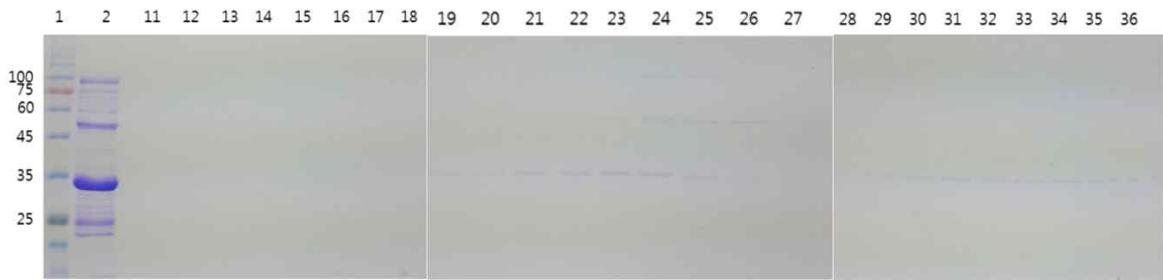


그림 32. Superdex 200 column을 이용한 pGEX TβH purification의 SDS-PAGE (12% Tris-Glycine) 1. marker 2. loading 전 sample 11-36. elution buffer로 용출한 sample

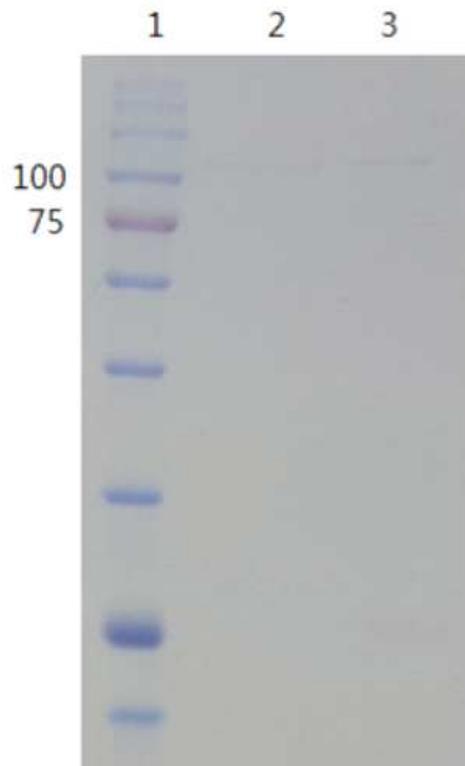


그림 33. Superdex 200 column을 이
 용한 pGEX TβH purification의
 SDS-PAGE (12% Tris-Glycine)
 1. marker 2. 11-28까지 amicon
 50K로 농축한 TβH

그 결과, 그림 33에서 보는 바와 같이 많은 양의 TβH를 얻지 못했지만 활성 측정 및 안정성 분석 결과 활성을 갖고 있는 것으로 확인되었으나 매우 적은 양으로 제품화하기에 현재 제조 공정으로는 어려움이 있다고 판단된다. TβH의 발현 조건 및 대장균 외에 효모와 같은 다른 진핵 세포를 이용한 새로운 시도가 필요하다고 판단되며 현재까지의 결과를 바탕으로 보다 높은 발현량과 안정적인 재조합 단백질의 분리정제 공정을 연구 개발하고자 한다.

■ 히스타민 신속 검출 키트의 최적화

(1) 히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)에 대한 발색 및 형광 염료의 최적화

1) 히스타민 효소 활성 테스트

대장균에 클로닝하여 분리 정제한 히스타민 산화효소의 최적화를 위해서 기본적인 효소 활성을 측정하였다. 히스타민 산화효소 1 unit을 30°C, pH 8.0의 반응 조건에서 기질인 histamine과 반응하여 1 uM/min의 과산화수소를 발생시키는 HO의 양을 1 unit으로 정의하였다. 정의한 HO의 unit을 구하기 위해 100 mM bicine (pH 8.0), 100 uM amplex red, 1 mM histamine, 0.2 U/ml HRP를 혼합한 반응시약과 HO 0.4 ug, 0.8 ug를 kinetic assay로 측정하였다.

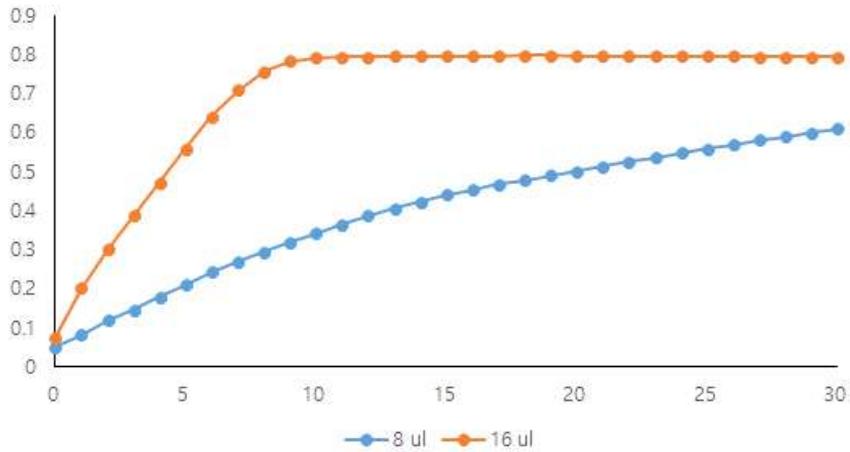


그림 34. 1unit 측정을 위한 히스타민 산화제의 활성 측정. 100 mM Bicine (pH 8.0), 100 uM Amplex Red, 1 mM histamine dihydrochloride, 1/10 dilution histamine oxidase (0.5 mg/ml) of 8 ul or 16 ul at 30°C

그 결과, 측정값을 과산화수소 표준곡선과 비교하여 확인한 결과 5.95 Unit/ug 의 활성을 갖는 것으로 최종 확인할 수 있었다.

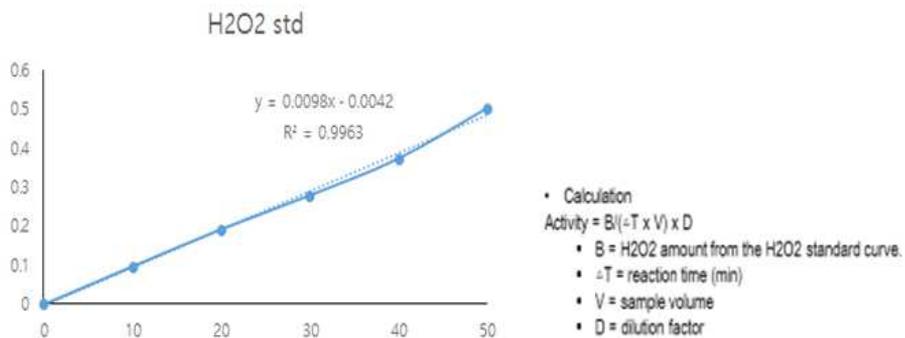


그림 35. 히스타민에 대한 히스타민 산화효소의 과산화수소 생성 커브

이를 기준으로 분리한 히스타민 산화효소 효소 활성에 대해 발색 및 형광 염료의 최적화를 위한 실험을 수행하였다.

2) 효소활성과 온도

다양한 온도에 대해서 히스타민 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Bicine buffer (pH 8.0)에서 기질 1mM의 histamine을 넣고 염료 100 mM의 amplex red, 0.2 Unit/ml의 HRP 조건에서 histamine oxidase의 효소활성을 측정하였다. 18~30°C에서 큰 차이가 없는 안정적인 효소활성을 나타내었으므로 온도에 의한 영향은 30°C 내외에서는 안정적인 효소활성을 나타낼 것으로 기대된다. 따라서 향후 반응 온도는 30°C를 기준으로 하여 최적화하기로 결정하였다.

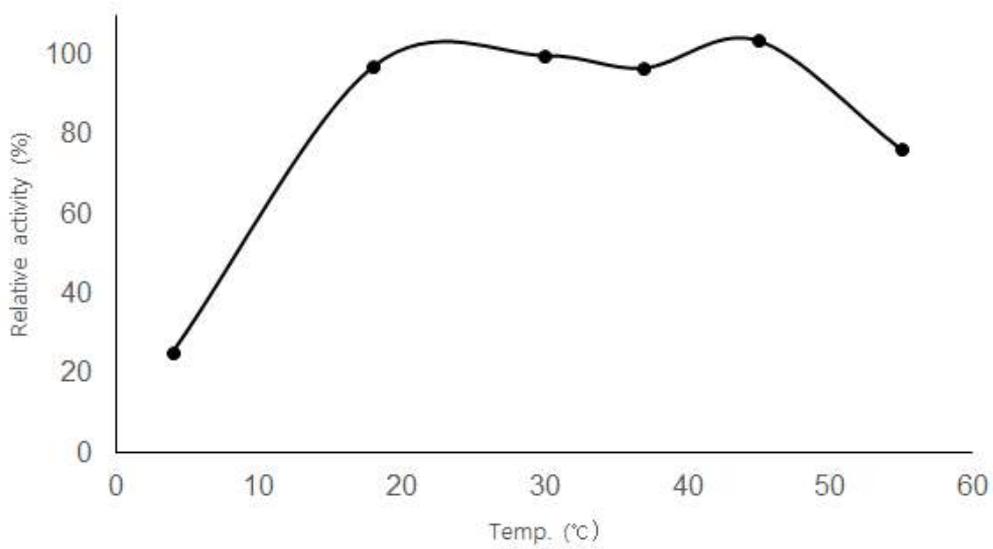


그림 36. 다양한 온도에 대해 히스타민 산화효소의 효소 활성 측정 결과. 1 mM of histamine, 100 μ M of amplex red, 0.2 U/ml of HRP, 2.5 Unit of Histamine oxidase in 100 mM Bicine buffer(pH 8.0) for 30 min.

3) 효소활성과 pH

효소 활성에 미치는 수소이온 농도를 조사하기 위해서 다양한 buffer 조건의 특정 pH에 대해서 히스타민 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해서 acetate buffer로는 pH 4와 5에 대해 PIPES buffer는 pH 6과 7에 대해 Bicine buffer는 pH 8과 9에 대해 조사하였고 마지막으로 carbonate buffer로는 pH 10에 대해서 히스타민 산화효소의 효소 활성을 측정하여 조사하였다. 이를 위하여 기질 1mM의 histamine을 넣고 염료 100 mM의 amplex red, 0.2 Unit/ml의 HRP 조건에서 histamine oxidase의 효소활성을 측정하였다.

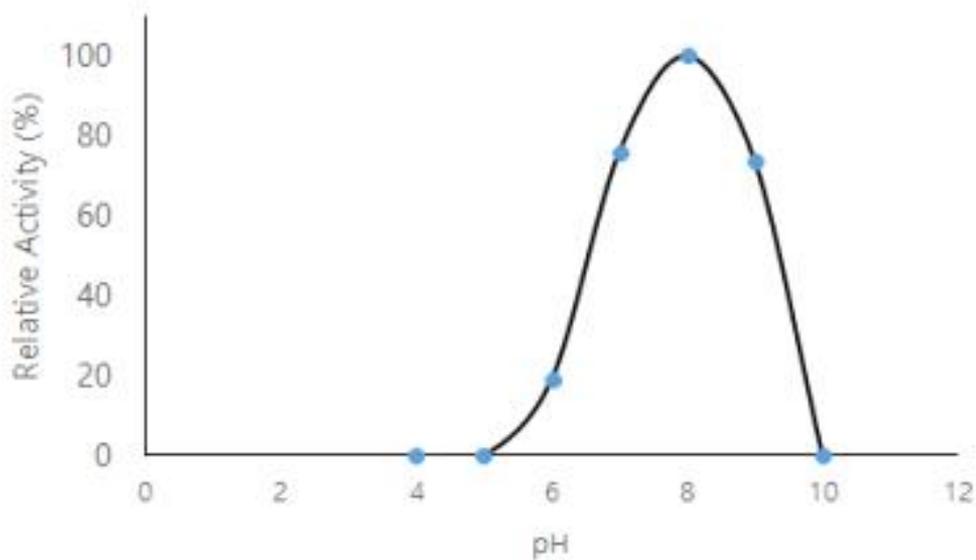


그림 37. 다양한 pH 버퍼에서의 히스타민 산화효소의 활성 측정 결과. 100 mM Acetate (pH 4.0 and 5.0), PIPES buffer (pH 6.0 and 7.0), Bicine buffer (pH 8.0 and 9.0) and carbonate buffer (pH 10.0) for 30 min. 1 mM of histamine, 100 μ M of amplex red, 0.2 U/ml of HRP, 2.5 Unit of Histamine oxidase.

그 결과, 히스타민 산화효소는 pH 7.0이하의 낮은 수소이온농도에서나 9.0이상의 높은 수소이온 농도에서 급격하게 효소활성이 떨어지는 매우 좋은 수소이온농도 활성 범위를 나타내었다. 히스타민 산화효소는 Biocine buffer pH 8.0에서 가장 안정적이고 높은 효소 활성을 나타내었다.

4) 효소활성에 영향을 미치는 다른 인자들

참치 캔 및 다양한 식품 속에 존재하는 히스타민 검출을 위해서는 추출과정에서 계면활성제와 유기용매를 사용하게 되는데 대표적인 것이 계면활성제로는 EDTA이고 용매로는 Methanol이므로 이에 대한 히스타민 산화효소의 효소활성에 대해 조사하였다. 첨가된 EDTA의 농도 10mM 이하에서는 히스타민 검출을 위한 효소 활성화에 어떤 영향도 주지 않았다. 그러나 Methanol의 경우에는 10% 이상에서는 효소 활성을 떨어뜨리는 결과를 얻었다. 그러나 보통 참치 및 식품 전처리 과정 중에서 10%의 Methanol을 전처리 과정에서 사용하고 이중에서 미량을 샘플로써 처리하므로 10%이내의 Methanol을 사용하는 경우에는 안정적인 히스타민 검출이 가능할 것으로 추정된다.

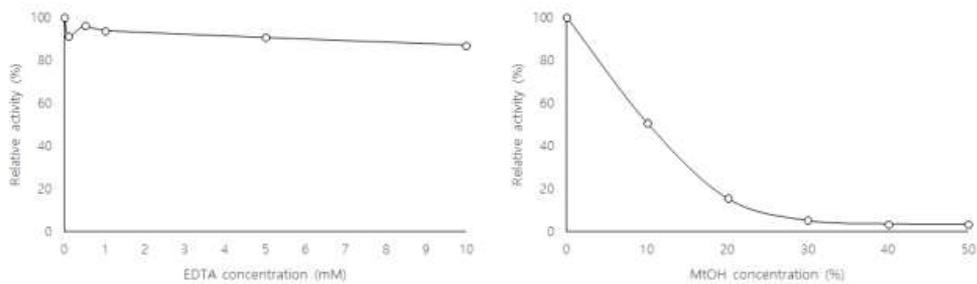


그림 38. 계면활성제와 메탄올 농도에 따른 히스타민 산화효소의 효소 활성 측정 결과. (A) and Methanol at 100 mM Bicine buffer (pH 8.0) for 30 min. 1 mM of histamine, 100 μ M of amplex red, 0.2 U/ml of HRP, 2.5 Unit of Histamine oxidase.

5) 히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)에 대한 고감도 발색 염료에 대한 최적화

고감도 발색 염료인 DAOS를 이용하여 상기에 사용했던 형광 염료를 대신해서 온도, pH, 그리고 계면활성제인 EDTA와 CyDTA 그리고 Methanol의 농도에 따른 히스타민 산화 효소의 최적화 실험을 수행하였다. 다양한 DAOS의 발색 염료의 농도를 조사하였을 때 1mM 일 때 가장 안정적인 효율적인 발색 반응을 나타내었으므로 1mM을 최적 농도로 결정하였다. 10 mM Na-Bicine buffer (pH 8.0)에서 1.0 mM histamine에 대해 0.25 mM 4-aminoantipyrine과 1.0 mM DAOS, horseradish peroxidase (4 units/ml)을 넣고 다양한 온도, pH, 그리고 계면활성제인 EDTA와 CyDTA 그리고 Methanol의 농도에 대해 히스타민 효소 활성을 조사하여 발색염료에 대해 최적화를 조사하였다.

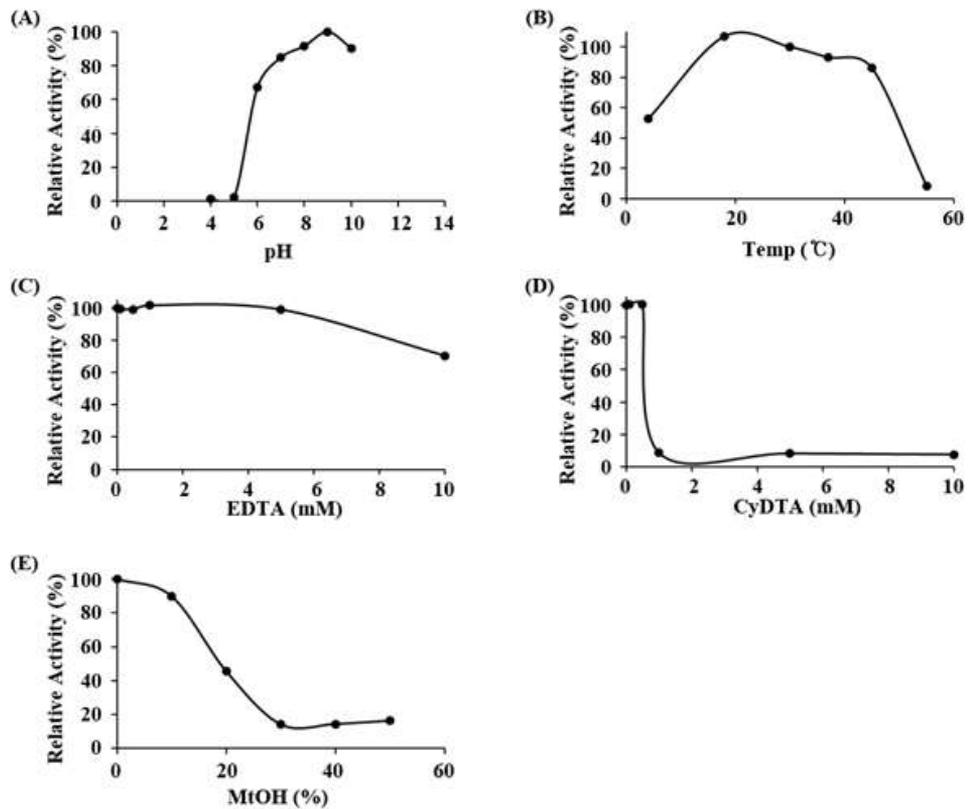


그림 39. 다양한 조건에서의 산화효소의 효소 활성 측정 결과. (A) pH, (B) temperautue, (C) EDTA, (D) CyDTA and (E) methanol at 10 mM Bicine buffer (pH 8.0) for 30 min. 1 mM of histamine, 1mM of DAOS, 4 U/ml of HRP, 2.5 Unit of Histamine oxidase.

그 결과, 형광 염료를 사용하여 최적화 조사를 한 상기 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 수소이온 농도에 대해서는 pH 9.0에서 약간 더 높은 히스타민 효소 활성을 나타내었으나 pH 7.0 ~ 10.0에서 안정적인 효소 활성을 나타내는 결과를 얻었다. 온도에 대해서는 18~30°C에서 안정적인 효소 활성을 나타내었고 18°C 이하와 45°C 이상에서는 급격하게 효소활성이 저하되는 결과를 얻었다. 계면활성제로 EDTA와 CyDTA의 농도에 따라 조사하였을 때 첨가된 EDTA의 농도 5mM 이하에서는 히스타민 검출을 위한 효소 활성에 어떤 영향도 주지 않았고 10mM에서 약간에 효소 활성 저하를 나타내었다. 그러나 CyDTA의 경우에는 2mM 이상에서는 히스타민 검출을 위한 효소 활성을 급격하게 떨어뜨리는 결과를 얻었다. 이런 결과는 향후 전처리 과정에서 적합한 계면활성제를 결정할 때 참고할 예정이다. 전처리과정에서 자주 사용하는 Methanol에 대한 영향을 조사한 결과도 형광 염료에 대해 조사한 결과와 매우 유사한 결과를 얻었다. 즉, 10% 이내에서는 안정적인 효소 활성을 나타내었으나 20% 이상에서는 급격하게 효소 활성의 저하를 나타내었다.

(2) 히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 활성 테스트를 통한 최적화

히스타민 산화 효소의 발색 및 형광 염료에 대해서 최적화한 결과를 바탕으로 다양한 바이오제닉 아민에 대한 기질 특이성을 조사하고 참치 캔 시료에 대해 히스타민 검출을 HPLC 방법과 비교하여 히스타민 산화효소의 효소 활성을 조사하였다.

■ 히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)에 대한 기질 특이성

다양한 바이오제닉 아민에 대한 기질 특이성을 조사하기 위해서 목표 기질인 histamine에 대한 상대적인 효소활성으로 조사하였다. 이때 사용한 기질은 아미노산으로 tryptophan, arginine, phenylalanine, glutamine, tyrosine 을 이용하였고 바이오제닉아민으로는 phenylethylamine, agmatine, hydroxylamine, dopamine, tyramine, tryptamine, putrescine, spermidine, cadaverine spermine 을 이용하였다. 각 반응 조건은 10 mM Na-Bicine buffer (pH 8.0)에서 발색 반응의 경우에는 0.25 mM 4-aminoantipyrine과 1.0 mM DAOS, horseradish peroxidase (4 units/ml)을 형광 반응의 경우에는 100 mM의 amplex red, 0.2 Unit/ml의 HRP 조건에서 각각의 기질의 1mM 농도에 대해서 상대적인 효소 활성을 조사하였다.

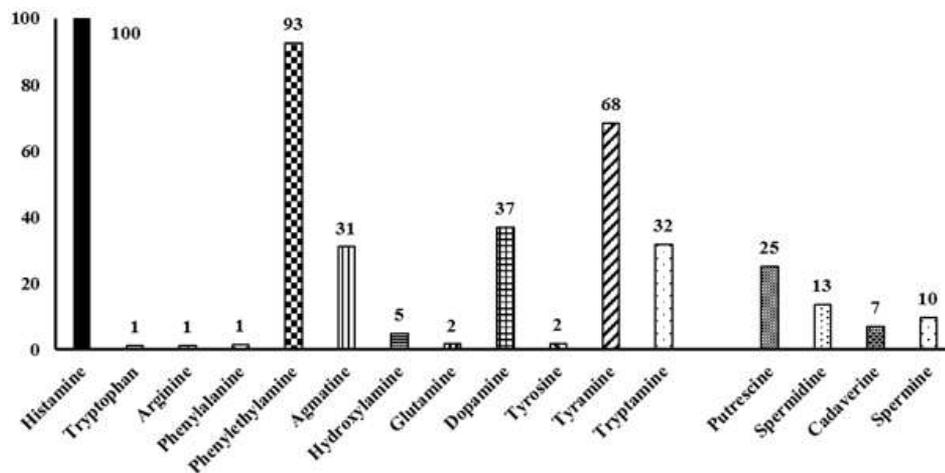


그림 40. 히스타민 산화효소(HO)의 바이오제닉 아민에 대한 효소 활성 측정 결과. Reactions were carried out at 30 °C and pH 9.0 for 30 min. All biogenic amines (1 mM) were used as the substrate. The substrates specificities of HO were measured according to the method of the coupling of HO with a peroxidase/DAOS system for colorimetric enzyme assay method.

그 결과, 히스타민 산화효소의 기질 특이성은 모든 아미노산에 대해서는 매우 낮은 효소 활성을 나타내었으나 바이오제닉 아민에 대해서는 매우 다른 효소 활성을 보여주었다. 바이오제닉 아민 중에서 모노아민인 phenylethylamine, dopamine, tyramine 및 Rypamine에 대해서는 상대적으로 높은 효소 활성을 나타내었으며, 디아민인 putrescine, spermidine, cadaverine, spermine 등에 대해서는 상대적으로 25%이하에 낮은 효소 활성도를 나타내었다. 모노아민

중에서 phenylethylamine 과 tyramine에 대해서 높은 효소 활성을 나타내었다. dopamine과 tryptamine 등에 대해서는 낮은 효소 활성을 나타내었다. 이에 따라 효소 활성의 특이성을 높이기 위해서 효소 활성에 높았던 모노아민인 henylethylamine 과 tyramine에 대해 변형시키는 효소 전처리를 통해 효소의 특이도를 높여 히스타민 검출 키트를 개발하고자 한다.

■ 티라민 수산화 효소(Tyramine β -hydroxylase; T β H)의 활성 최적화

(1) Microplate reader를 이용한 T β H의 activity assay

■ 티라민 수산화효소의 양에 따른 activity assay

티라민 수산화효소는 R&D Systems(Recombinant Human Tyramine β -Hydroxylase; rhT β H)에서 구매하여 activity assay protocol도 참고하여 실험을 진행하였다. Assay buffer는 0.1 M Sodium acetate(pH 5.0), 0.5 uM CuCl₂를 사용하였고, 10 mM Tyramine, 10 mM N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine(DMPD)와 여러 조건의 rhDBH의 양을 첨가하여(total volume 100 ul) absorbance 515 nm에서 kinetic mode로 60 분 동안 activity를 확인하였다.

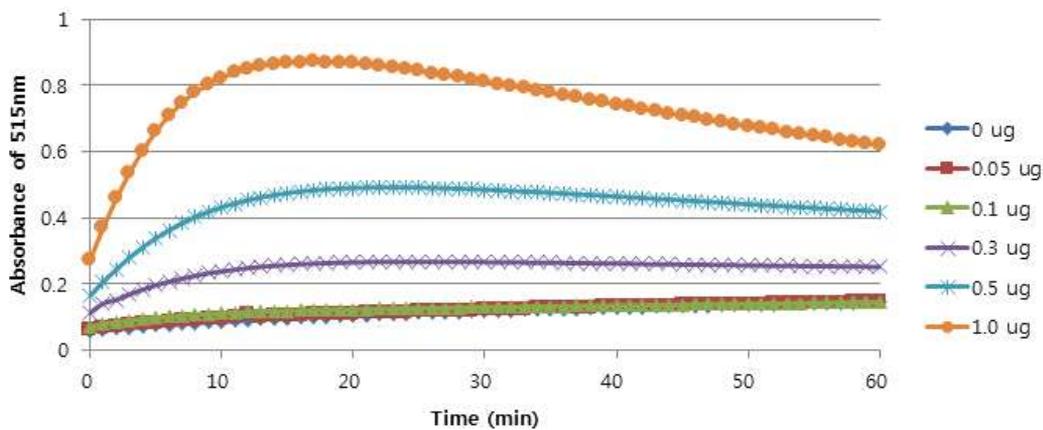


그림 41. rhT β H의 양에 따른 활성 측정 테스트

그 결과, 첨가되는 티라민 수산화효소의 양이 증가함에 따라 효소 반응이 증가함을 확인할 수 있었다. 이 중에서 적절한 티라민 효소 반응 조건을 0.5 ug rhT β H의 첨가할 때 30분이내 반응 시 가장 안정적인 효소 반응을 보여주었으므로 이를 효소 활성 측정에 적절한 티라민 수산화효소의 양으로 결정하였다.

2) pH에 따른 티라민 수산화효소의 activity assay

10 mM Tyramine, 10 mM DMPD과 0.5 ug rhTβH를 첨가하고 assay buffer의 pH 조건을 달리하여 absorbance 515 nm에서 kinetic mode로 60 분 동안 activity를 확인하였다.

Assay buffer 조건

100 mM Sodium acetate, pH 4.0 + 0.5 uM CuCl₂

100 mM Sodium acetate, pH 4.5 + 0.5 uM CuCl₂

100 mM Sodium acetate, pH 5.0 + 0.5 uM CuCl₂

100 mM Sodium acetate, pH 5.5 + 0.5 uM CuCl₂

100 mM MES, pH 6.0 + 0.5 uM CuCl₂

100 mM MES, pH 6.5 + 0.5 uM CuCl₂

100 mM Tris-Cl, pH 7.0 + 0.5 uM CuCl₂

100 mM Tris-Cl, pH 8.0 + 0.5 uM CuCl₂

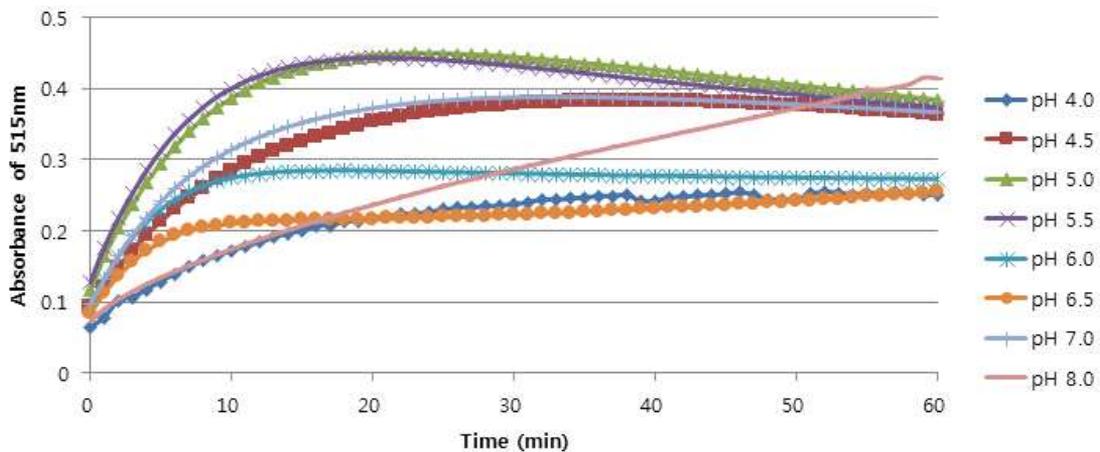


그림 42. pH에 따른 티라민 수산화효소의 활성 측정 테스트

pH buffer에 따른 효소 활성을 측정하여 적절한 pH buffer 조건을 조사한 결과 pH 5.0의 0.1M Sodium acetate를 사용하였을 때 가장 좋은 효소 활성을 보여주었다. 이를 효소 활성 측정에 적절한 pH buffer로 확정하였다.

3) 온도에 따른 티라민 수산화효소의 activity assay

Assay buffer는 0.1 M Sodium acetate(pH 5.0), 0.5 uM CuCl₂를 사용하였고, 0.5 ug rhDβH, 10 mM Tyramine과 10 mM DMPD을 첨가하여(total volume 100 ul) absorbance 515 nm에서 kinetic mode로 60 분 동안 activity를 확인하였다.

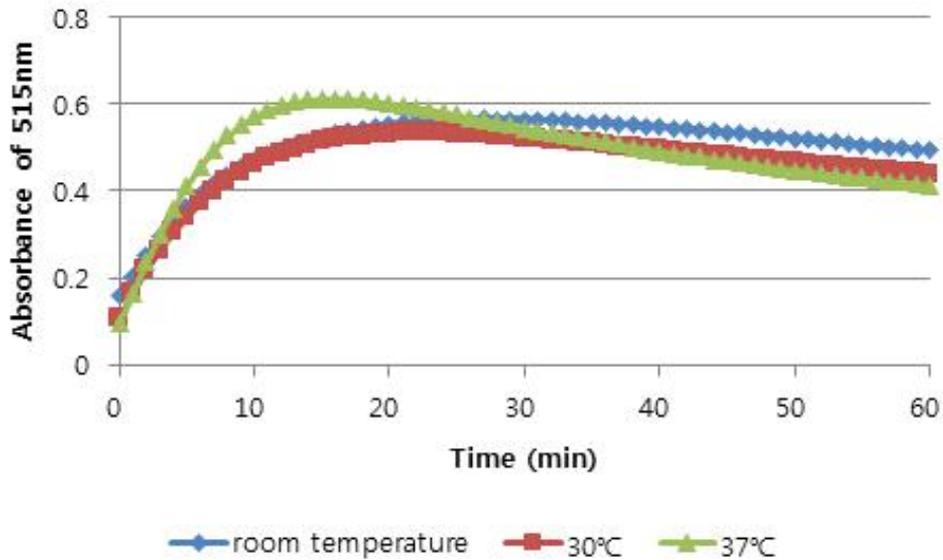


그림 43. 온도에 따른 티라민 수산화효소의 활성 측정 테스트

온도에 따른 효소 활성을 측정하여 적절한 온도 조건을 조사한 결과, 실온의 온도에서 비슷한 효소 활성을 나타내었는데 효소 활성 측정에 적절한 온도로 37 °C로 확정하였다.

4) CuCl₂ 농도에 따른 도파민 수산화효소의 activity assay

Assay buffer는 0.1 M Sodium acetate(pH 5.0)과 여러 농도의 CuCl₂를 첨가하여 사용하였고, 0.5 ug rhDβH, 10 mM Tyramine과 10 mM DMPD를 첨가하여(total volume 100 ul) absorbance 515 nm에서 kinetic mode로 60 분 동안 activity를 확인하였다.

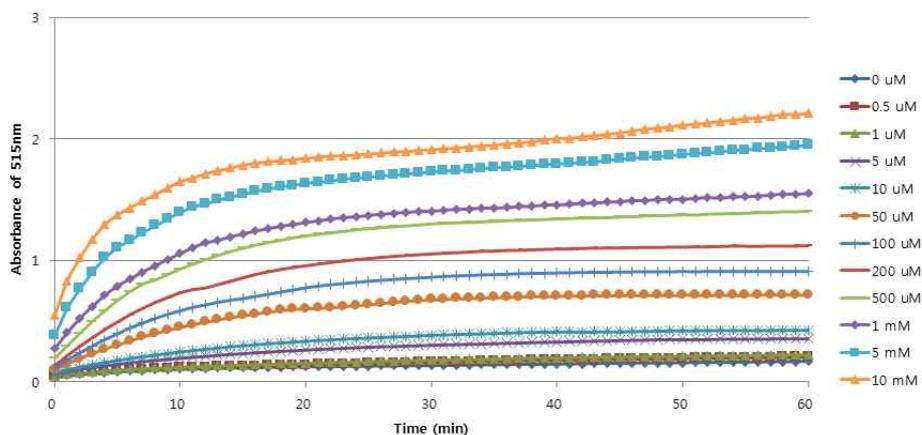


그림 44. CuCl₂ 농도에 따른 티라민 수산화효소의 활성 측정 테스트

그 결과, 티라민 수산화효소의 활성뿐만 아니라 CuCl_2 의 농도가 DMPD의 변환에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있는데 CuCl_2 의 농도 조건을 조사한 결과, CuCl_2 의 농도가 증가할수록 효소 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 티라민 수산화효소의 활성에 의한 것보다도 CuCl_2 의 농도가 DMPD의 변환에 영향을 직접적으로 주는 것으로 판단된다.

5) Tyramine 농도에 따른 티라민 수산화효소의 activity assay

Assay buffer는 0.1 M Sodium acetate(pH 5.0), 0.5 μM CuCl_2 또는 1 mM CuCl_2 를 사용하였고, 0.5 μg rhT β H, 10 mM DMPD와 여러 농도의 tyramine을 첨가하여(total volume 100 μl) absorbance 515 nm에서 kinetic mode로 60 분 동안 activity를 확인하였다.

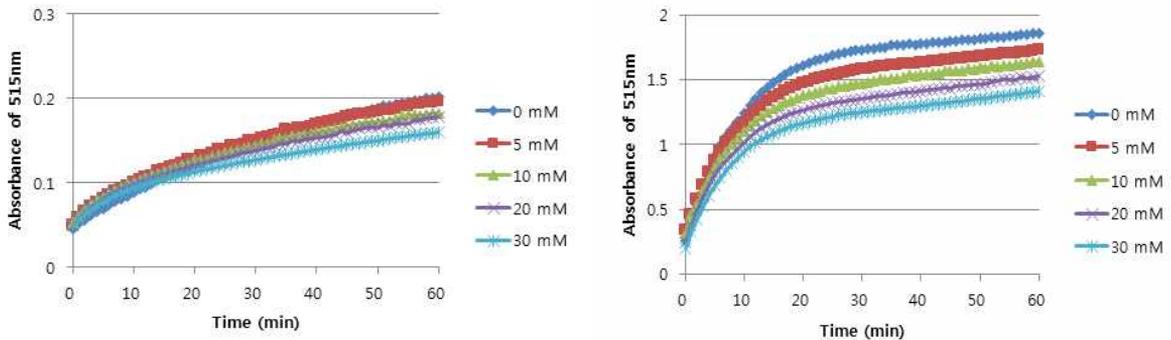


그림 45. tyramine 농도에 따른 티라민 수산화효소의 활성 측정 테스트 왼쪽; Assay buffer : 0.1 M Sodium acetate(pH 5.0), 0.5 μM CuCl_2 , 오른쪽; Assay buffer : 0.1 M Sodium acetate(pH 5.0), 1 mM CuCl_2

6) DMPD 농도에 따른 도파민 수산화효소의 activity assay

Assay buffer는 0.1 M Sodium acetate(pH 5.0), 0.5 μM CuCl_2 또는 1 mM CuCl_2 를 사용하였고, 0.5 μg rhD β H, 10 mM tyramine와 여러 농도의 DMPD를 첨가하여(total volume 100 μl) absorbance 515 nm에서 kinetic mode로 60 분 동안 activity를 확인하였다.

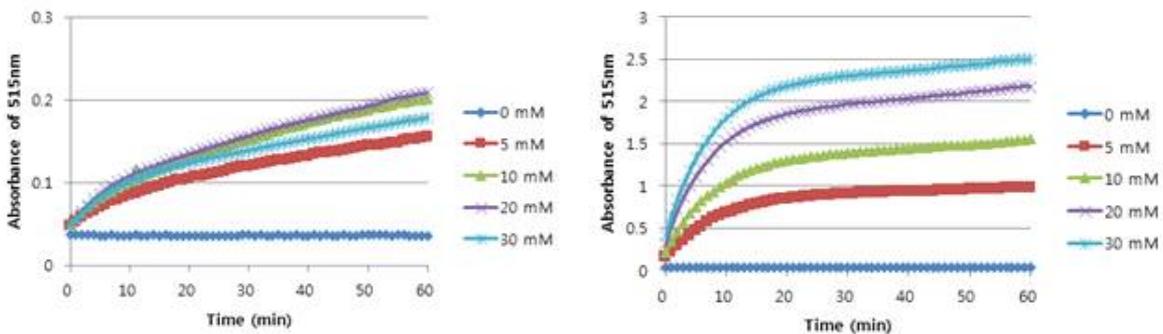


그림 46. DMPD 농도에 따른 티라민 수산화효소의 활성 측정 결과. 왼쪽; Assay buffer : 0.1 M Sodium acetate(pH 5.0), 0.5 μM CuCl_2 , 오른쪽; Assay buffer : 0.1 M Sodium acetate(pH 5.0), 1 mM CuCl_2

그 결과, CuCl₂의 농도가 티라민 농도에 따른 티라민 수산화효소의 효소 활성과 DMPD 농도에 따른 티라민 수산화효소의 효소 활성에 중요하게 작용하는 것으로 관찰되었다. 티라민의 농도와 DMPD 농도가 증가할수록 효소 활성이 증가하였는데 0.5 uM CuCl₂의 농도보다 1 mM CuCl₂의 농도에서 보다 안정적인 효소 활성이 30분 이후에 나타나는 결과를 얻었다. 이에 따라서 1 mM CuCl₂의 농도가 적절한 티라민 수산화효소의 활성을 유지하는데 중요한 것으로 보인다.

7) Cloning하여 분리 정제를 통해 생산한 TβH와 구매한 티라민 수산화효소의 activity assay 비교

Cloning하여 분리 정제를 통해 생산한 TβH와 R&D Systems에서 구매한 rhTβH의 activity assay를 비교하였다. Assay buffer는 0.1 M Sodium acetate(pH 5.0), 0.5 uM CuCl₂를 사용하였고, 10 mM Tyramine, 10 mM N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine(DMPD)와 농축한 TβH 50 ul 또는 0.5 ug의 TβH를 첨가하여(total volume 100 ul) absorbance 515 nm에서 kinetic mode로 60 분 동안 activity를 확인하였다.

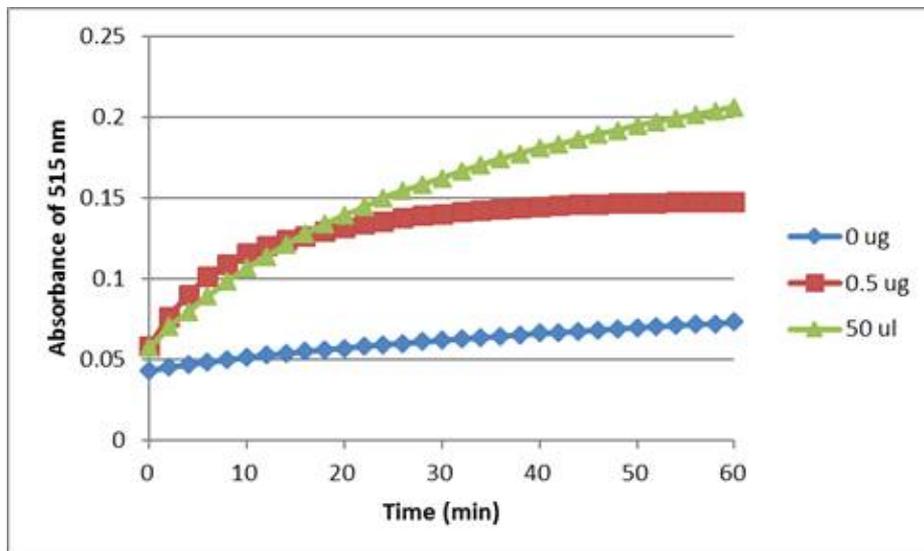


그림 47. cloning 한 TβH(녹색)와 R&D system의 TβH(적색)의 효소 활성 측정 비교

그 결과, Cloning과 분리 정제를 통해 자체적으로 생산한 TβH의 활성을 R&D Systems에서 구매한 rhTβH의 activity assay를 비교한 결과 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었으며 효소의 정확한 활성 unit을 측정한다면 충분히 상용화된 TβH를 대신할 수 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 상용화하기 위해서는 보다 효율적이고 안정적인 발현을 통한 효소 분리 정제 공정을 확립할 필요가 있다.

(2) HPLC를 이용한 DBH의 activity assay

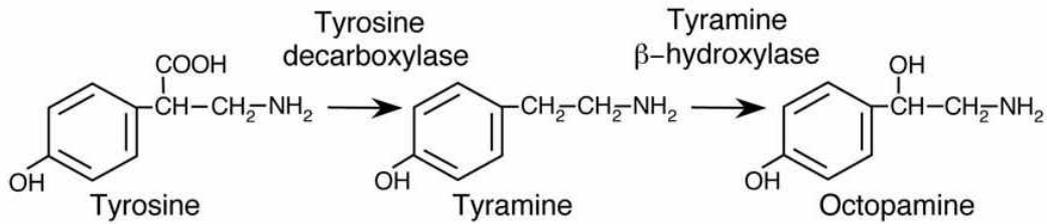


그림 48. 바이오제닉 아민 중에서 tyramine의 생합성과 변형 경로와 관련 효소

분리한 HO가 히스타민 신속 검출에 효과적이지만 다른 monoamine 특히 tyramine에 대한 높은 효소 활성을 가지므로 히스타민만을 검출하는데 사용하기에 적합하지 않다. 따라서 TBH를 이용하여 tyramine을 octopamine으로 변형함으로써 특이도를 높이고자 하는데 이러한 TBH의 효소 활성을 통해 tyramine의 octopamine으로 변형 반응을 HPLC를 통해 분석하였다.

1) HPLC 방법의 검출 방법

0.1 M Sodium acetate(pH 5.0)에 0.5 ug TBH, 2 uM CuSO₄, 10 mM fumarate, 4 mM sodium ascorbate, 1 mM tyramine, 650 unit catalase(total volume 400 ul)를 넣고 37 °C에서 1 시간 동안 shaking하면서 incubation하였다. 100 °C에서 5 분 동안 incubation을 통해 반응을 끝내고 13,000 rpm에서 5 분 동안 centrifugation합니다. 상층액을 HPLC vial로 옮기고 0.1 M Sodium acetate(pH 5.0)을 100 ul를 첨가합니다(total volume 500 ul). 이를 HPLC(Beckman coulter)에 20 ul를 injection합니다. 이때 reversed phase C18 column(shideido, capcell pak C18 MG II S5 / 입자경 5 um, 내경 4.6 mm, 길이 250 mm)으로 254 nm에서 검출하였다. 이동상으로는 solution A : HPLC grade water containing 0.1 % TFA, solution B : Acetonitrile containing 0.1 % TFA를 사용했으며 flow rate 1 ml/min으로 gradient 5 to 100 % in 30 분의 조건으로 분석합니다.

검출된 시료액 속에 octopamine의 양은 HPLC를 이용해서 분석한 octopamine standard curve에 대해 정량 분석하여 시료액 속에 octopamine 양을 정량 분석하였다.

2) HPLC 방법을 이용한 octopamine 정량 분석 결과

상기의 방법을 이용하여 분석하였고, 기준 농도에서 각 성분의 농도를 바꾸어 실험을 진행하였다(기준 농도 : 0.5 ug DBH, 2 uM CuSO₄, 10 mM fumarate, 4 mM sodium ascorbate, 1 mM tyramine, 650 unit catalase). 기준 농도에서의 octopamine에 대한 적분값을 standard curve를 이용하여 농도를 구한 후 그 값을 100 %로 기준으로 하여 계산하였다.

표 5. 각 조성의 농도에 대한 HPLC 기반의 octopamine 정량 분석

Compound	Concentration	% Activity
TβH	0.05 ug	3.2
	0.1 ug	7.0
	0.3 ug	25.5
	0.5 ug	100
	1.0 ug	39.5
Tyramine	0 uM	3.6
	100 uM	4.9
	500 uM	12.4
	1 mM	100
	2 mM	19.6
Sodium ascorbate	0 uM	4.7
	100 uM	13.6
	1 mM	40.7
	4 mM	100
	8 mM	26.6
	12 mM	23.0
Fumarate	0 uM	58.9
	100 uM	58.2
	1 mM	65.2
	5 mM	59.4
	10 mM	100
	15 mM	27.3
copper(II) sulfate	0 uM	5.9
	0.5 uM	5.4
	1 uM	9.0
	2 uM	100
	3 uM	37.0
	5 uM	66.8
Catalase	0 unit	4.6
	100 unit	4.2
	300 unit	42.4
	650 unit	100
	800 unit	15.5

이러한 다양한 조건에서 tyramine 에서 octopamine 으로의 변환에 대한 TβH의 효소 활성의 최적 반응 조건을 조사한 결과, 0.5 ug TβH, 4 mM sodium ascorbate, 10 mM fumarate, 2 uM Copper(II)sulfate, 650unit catalase 조건에서 가장 안정적인 효소 활성을 나타내는 것으로 관찰되었다.

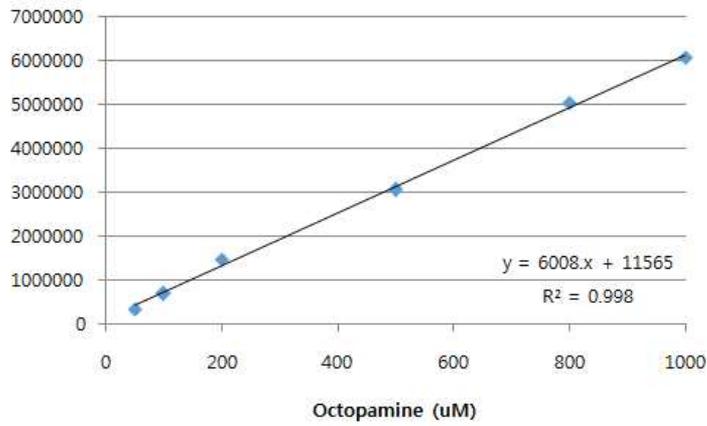


그림 49. HPLC 방법을 이용한 octopamine standard curve

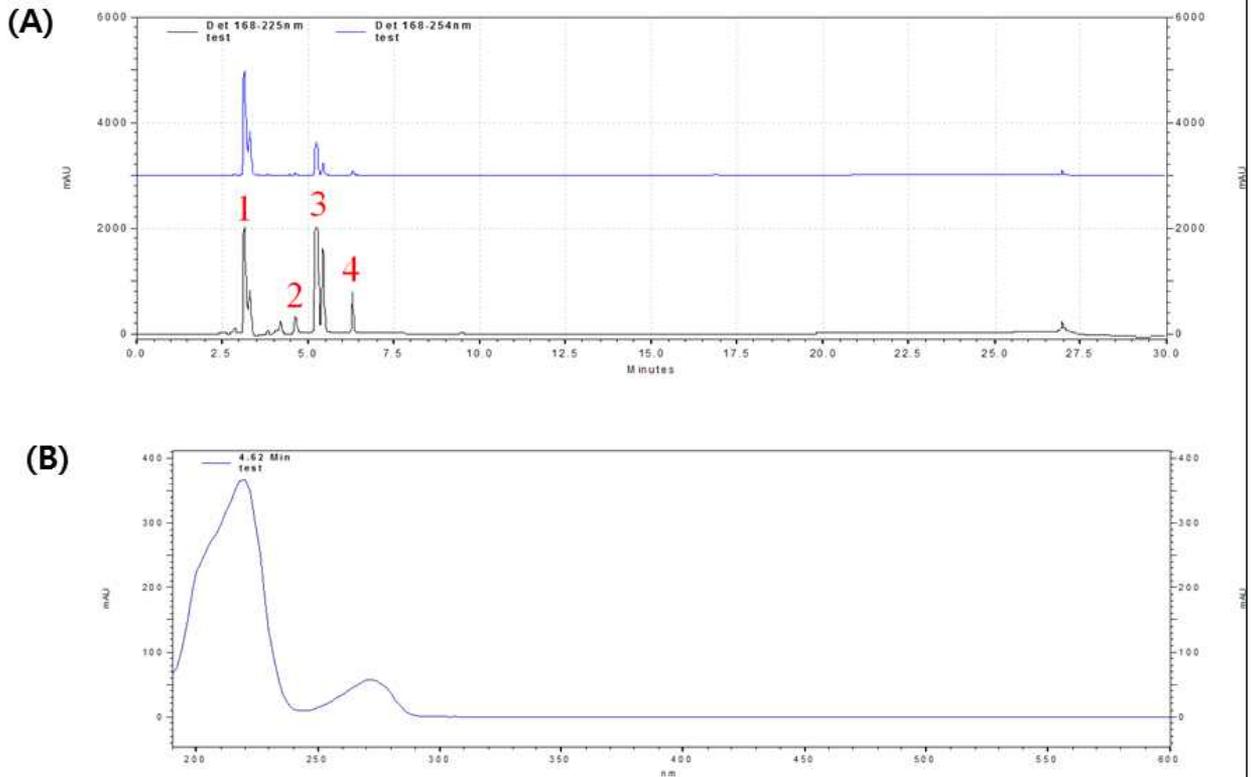


그림 50. HPLC assay의 기준 농도에 대한 HPLC spectrum (A) HPLC spectrum / 1. sodium ascorbate 2. octopamine 3. fumarate 4. tyramine (B) octopamine의 UV spectrum

■ 히스타민 신속 검출 키트를 위한 샘플 전처리 방법 연구

■ 참치 캔과 양념 참치 캔 시료에서의 샘플 전처리 방법 연구

참치 캔 5g 시료 중에서 존재하는 히스타민 검출에 대해 히스타민 산화효소 기반의 효소 기반 검출 방법과 HPLC 검출 방법을 spiked test 방법을 통해 비교 테스트하였다.

참치 캔과 양념 참치 캔 5g을 각각을 무게를 재어 이를 원심분리용 용기에 옮겨 넣은 후 10ml의 0.2 M perchloric acid를 넣은 후에 이를 hand-held homogenizer로 2분간 파쇄하였다. 이 파쇄한 샘플에 100mg/kg의 히스타민을 첨가한 후에 잘 섞어 주었다. 이 샘플 용액을 EDTA-potassium buffer에서 20분간 끓인 후에 식힌 후에 13,000 rpm으로 10분간 원심 분리시킨 후 이를 Whatman No. 1 filter로 걸러 고체 덩어리를 완전히 제거하여 용액만을 회수하였다. 이를 3번 반복하여 각각의 시료액을 HPLC 방법으로 히스타민 검출을 통해 샘플 전처리 시에 참치 캔과 양념 참치 캔 시료에서의 히스타민 검출을 차이를 비교하였다.

표 6. 참치 캔과 양념 참치 캔 시료에서의 샘플 전처리 비교

	EDTA Concentration (mM)	Mean concentration (ppm)	Spike recovery (%)
canned tuna	10	96.75 (±0.6)	94.61
	20	112.45 (±0.32)	112.75
	50	109.5 (±0.54)	108.13
spicy canned tuna	10	95.43 (±3.4)	93.91
	20	113.51 (±3.23)	111.72
	50	129.82 (±1.71)	138.32

그 결과, 일반 참치 캔과 양념된 참치 캔에 대해서 EDTA의 첨가 농도가 20 mM 인 EDTA-potassium buffer로 열수 추출하였을 때 가장 안정적인 회수율을 보여 주었다. 따라서 향후 히스타민 전처리 시에는 20mM EDTA가 첨가된 EDTA-potassium buffer를 전처리를 위한 버퍼로 선정하여 연구개발을 수행하였다. 보다 편리한 전처리를 위한 버퍼로써 EDTA-potassium buffer 제공을 위해 이에 대한 향후 업그레이드 연구를 수행할 계획에 있다.

■ 히스타민 신속 검출 키트의 제품화

(1) 참치 캔 시료에서의 히스타민 검출의 효소 기반 방법과 HPLC 방법의 비교 테스트

참치 캔 5g 시료 중에서 존재하는 히스타민 검출에 대해 히스타민 산화효소 기반의 효소 기반 검출 방법과 HPLC 검출 방법을 spiked test 방법을 통해 비교 테스트하였다.

참치 캔 5g을 무게를 재어 이를 원심분리용 용기에 옮겨 넣은 후 10ml의 0.2 M perchloric acid를 넣은 후에 이를 hand-held homogenizer로 2분간 파쇄하였다. 이 파쇄한 샘플에 100mg/kg의 히스타민을 첨가한 후에 잘 섞어 주었다. 이 샘플 용액을 20분간 끓인 후에 식힌 후에 13,000 rpm으로 10분간 원심 분리시킨 후 이를 Whatman No. 1 filter로 걸러 고체 덩어리를 완전히 제거하여 용액만을 회수하였다. 이를 2번 반복하여 이 시료액을 효소 기반 방법과 HPLC 방법으로 히스타민 검출 시에 사용하였다.

1) 효소 기반 검출 방법

50 ml의 시료액에 10 mM Na-Bicine buffer (pH 8.0)에서 1.0 mM histamine에 대해 0.25 mM 4-aminoantipyrine과 1.0 mM DAOS, horseradish peroxidase (4 units/ml)을 넣고 15 unit의 histamine oxidase를 첨가한 반응액 250 ml을 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시키면서 그 변화된 흡광도를 595nm 에서 microplate reader를 이용하여 분석하였다. 최종 흡광도를 histamine standard curve 에 대해 정량을 분석하여 시료액 속에 히스타민 양을 정량 분석하였다.

형광분석을 이용한 경우에는 50 ml의 시료액에 10 mM Na-Bicine buffer (pH 8.0)에서 1.0 mM histamine에 대해 0.25 mM 100 mM의 amplex red, 0.2 Unit/ml의 HRP 을 넣고 15 unit의 histamine oxidase를 첨가한 반응액 250 ml을 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시키면서 그 변화된 형광도를 350nm/450nm (Ex/Em)에서 microplate reader를 이용하여 분석하였다. 역시 최종 형광도를 histamine standard curve 에 대해 정량을 분석하여 시료액 속에 히스타민 양을 정량 분석하였다.

2) HPLC 방법의 검출 방법

시료액에 존재하는 histamine의 아미노그룹에 dansyl기를 붙여 검출하였다. 이를 위해서 100 ml의 시료액에 200 ml의 포화된 sodium carbonate를 넣어 중화시킨 후 400 ml의 dansyl chloride 용액(10 mg/ml in acetone)을 넣어 섞은 후 30°C에서 30분간 암실에 두어 반응시킨다. 반응 후 남은 dansyl chloride를 제거하기 위하여 100 ml의 L-proline (100 mg/ml in D.W.)을 첨가한 후 15분간 상온에서 반응시킨다. 이 반응 용액에 toluene 용액을 첨가하여 섞은 후에 argon 가스로 후드 안에서 모든 용매를 제거한다. 남은 잔존하는 pellet을 acetonitrile로 다시 녹여서 dansyl화 된 시료액을 만들고 이를 HPLC를 이용하여 분석하였다. 이때 reversed phase C18 column(Jupiter 5m C18 250 x 4.6 mm,

Phenomenex, UK)에서 254nm에서 검출하였다. 이동상으로 water : acetonitrile = 4 : 6 으로 하여 flow rate 1ml/min으로 하여 분석하였다.

검출된 시료액 속에 histamine의 양은 HPLC를 이용해서 분석한 histamine standard curve 에 대해 정량 분석하여 시료액 속에 히스타민 양을 정량 분석하였다.

3) 효소 기반과 HPLC 방법의 히스타민 검출 비교 결과

발색 및 형광 반응을 이용한 효소기반 히스타민 검출 방법과 HPLC 기반의 히스타민 검출 방법을 상기의 방법을 이용하여 분석한 결과는 아래와 같다.

표 7. 참치를 이용한 히스타민 검출에 대한 HPLC를 이용한 방법과 효소 활성 비교 테스트 결과.

	Method	Mean concentration		Spike recovery (%)
		(ppm)		
Unspiked sample	HPLC	2.9	(±0.5)	
	Colorimetric assay	0.99	(±0.15)	
	Fluorometric assay	1.4	(±0.02)	
Spiked sample	HPLC	96.81	(±4.4)	93.91 %
	Colorimetric assay	123.41	(±2.38)	122.42 %
	Fluorometric assay	139.72	(±1.81)	138.32 %

히스타민을 스파이크하지 않은 시료에 대해서 매우 낮지만 검출 반응이 나타났는데 이는 미량의 히스타민 또는 바이오제닉 아민에 의해서 검출된 것으로 보여지나 모든 검출 방법에서 매우 안정적으로 낮게 검출됨을 확인하였다. 히스타민을 스파이크한 참치의 경우에는 HPLC에 의한 방법이 보다 스파이크한 양인 100 ppm에 비해 낮게 나왔지만 효소기반의 검출방법은 발색 반응 및 형광 반응 방법 모두 높게 나타났지만 비교적 안정적이고 유의적인 값을 나타내었고 안정적인 회수율을 보여주었다. 그러므로 향후 복잡하고 고가의 HPLC를 사용하는 방법을 대체할 수 있는 현장형 효소기반의 히스타민 검출 키트의 개발이 가능할 수 있다고 보여진다. 이러한 결과를 기반으로 보다 안정적이고 특이도를 높인 발색 및 형광 반응을 갖는 현장형 효소 기반의 히스타민 검출 키트 개발을 시도하였다.

(2) T β H와 HO의 연속 반응(double enzyme reaction)에 의한 검출 시스템 연구 개발

1) 발색 염료(DAOS)를 이용한 double enzyme reaction

0.1 M sodium acetate(pH 5.0)에 0.5 ug DBH, 2 uM CuSO₄, 10 mM fumarate, 4 mM sodium ascorbate, 100 ppm tyramine, 650 unit catalase(total volume 100 ul)를 넣고 37 °C에서 1 시간 동안 shaking하면서 반응시켰다. 100 °C에서 5 분 동안 반응시켜 효소 반응을 중지시킨 후에 13,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리기로 원심 분리를 수행하였다. 상층액 100 ul를 96-well plate에 옮기고 10 mM bicine(pH 9.0)에 1 mM DAOS, 0.25 mM 4-Aminoantipyrine(4-AA), 4 U/ml HRP와 15 U/ml HO를 첨가하여(total volume 300 ul) 30 °C에서 absorbance 600 nm로 kinetic mode에서 60 분 동안 발색 반응을 측정하였다. 그 결과 발색 반응이 그림 44와 같이 억제되는 현상을 나타내었다. 각 효소 반응의 성분 중에서 어떤 성분이 억제를 하는 것인지 알아보기 위해 각각의 성분을 따로 넣어 각각의 반응을 다시 확인한 결과, 그 결과 그림 45와 같이 10 mM fumarate 또는 4 mM sodium ascorbate이 억제현상을 보였다. 이에 각 농도마다 어느 정도의 억제를 보이는지를 조사하기 위해 다시 fumarate와 sodium ascorbate의 각각의 농도마다 발색 반응의 억제 여부를 조사 확인하였다. 그 결과 sodium ascorbate가 double enzyme reaction에서의 주요 성분임에도 불구하고 100 uM sodium ascorbate가 첨가될 때 발색 염료인 DAOS와의 반응에서 발색 반응의 억제 현상이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 히스타민과 티라민에 대해 티라민의 특이도를 낮추고 히스타민의 특이도를 높이기 위한 double enzyme reaction에 DAOS를 이용할 수 없다고 판단하였고 형광 염료로 주로 사용되지만 Amplex red는 분홍색의 발색 반응을 위한 염료로도 사용이 가능하므로 Amplex red를 이용한 발색 염료로 double enzyme reaction 시에 적용할 수 있는지를 조사하였다.

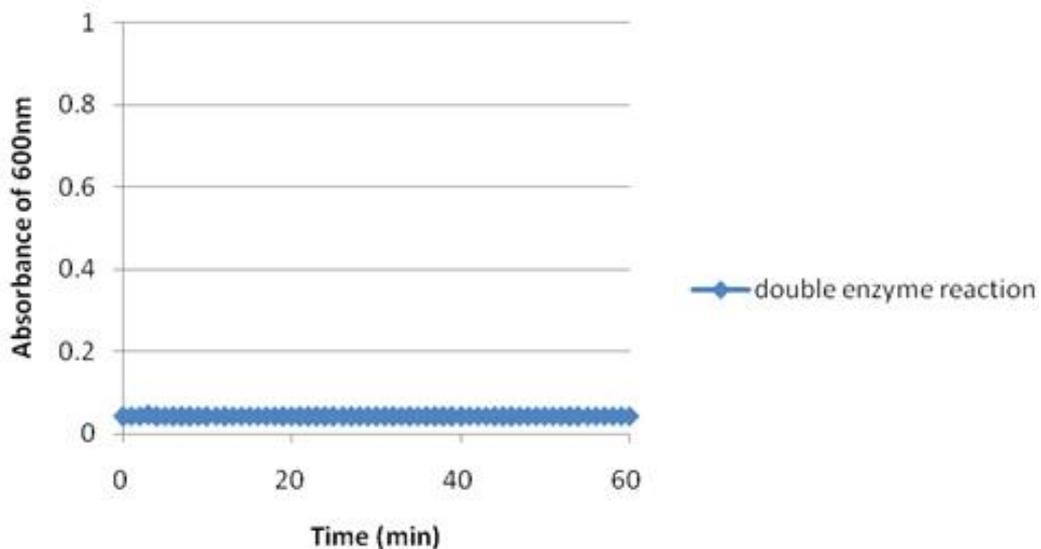


그림 51. DAOS 염료를 이용한 double enzyme reaction 적용한 히스타민 검출 결과

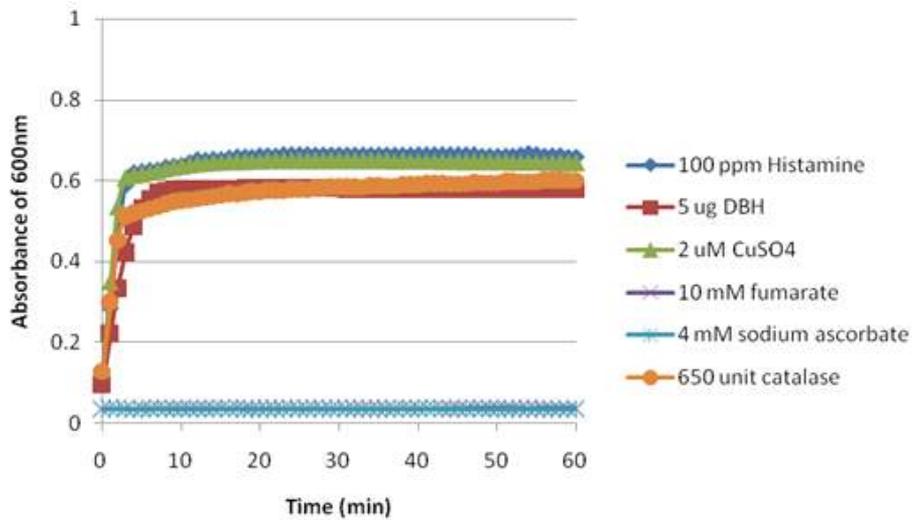


그림 52. DAOS 이용한 발색 반응에 대한 double enzyme reaction의 각 주요 성분에 대한 영향 테스트

2) 형광 염료(Amplex red)를 이용한 double enzyme reaction

0.1 M sodium acetate(pH 5.0)에 0.5 ug DBH, 2 uM CuSO₄, 10 mM fumarate, 4 mM sodium ascorbate, 100 ppm tyramine, 650 unit catalase(total volume 100 ul)를 넣고 37 °C에서 1 시간 동안 흔들어서 섞어서 반응시켰다. 100 °C에서 5 분 동안 반응시켜 효소 반응을 중지시킨 후에 13,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리기로 원심 분리를 수행하였다. 상층액 100 ul를 96-well plate에 옮기고 10 mM bicine(pH 9.0)에 100 uM Amplex red, 4 U/ml HRP와 15 U/ml HO를 첨가하여(total volume 300 ul) 30 °C에서 absorbance 570 nm로 kinetic mode에서 60 분 동안 측정된 결과 발색 반응에 있어서 억제된 반응 결과를 나타내었다. 어떤 성분이 억제를 하는 것인지 알아보기 위해 각각의 성분을 따로 넣어 상기의 반응 조건에서 반응시켜 확인하였다. 그 결과 10 mM fumarate 또는 4 mM sodium ascorbate이 발색 반응을 억제하는 것이 관찰되었고 이에 대한 각각의 농도에 대한 발색 반응에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, Fumarate에 비해 sodium ascorbate가 발색 반응에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 그러나, ascorbate는 1차 반응인 TβH의 효소 반응에 있어서 주요한 성분이므로 비교적 발색 반응을 최소한으로 억제하는 4 mM의 농도로 첨가하는 것으로 결정하였고 fumarate는 거의 억제 반응이 보이지 않는 조건인 1 mM로 double enzyme reaction 조건으로 결정하였다.

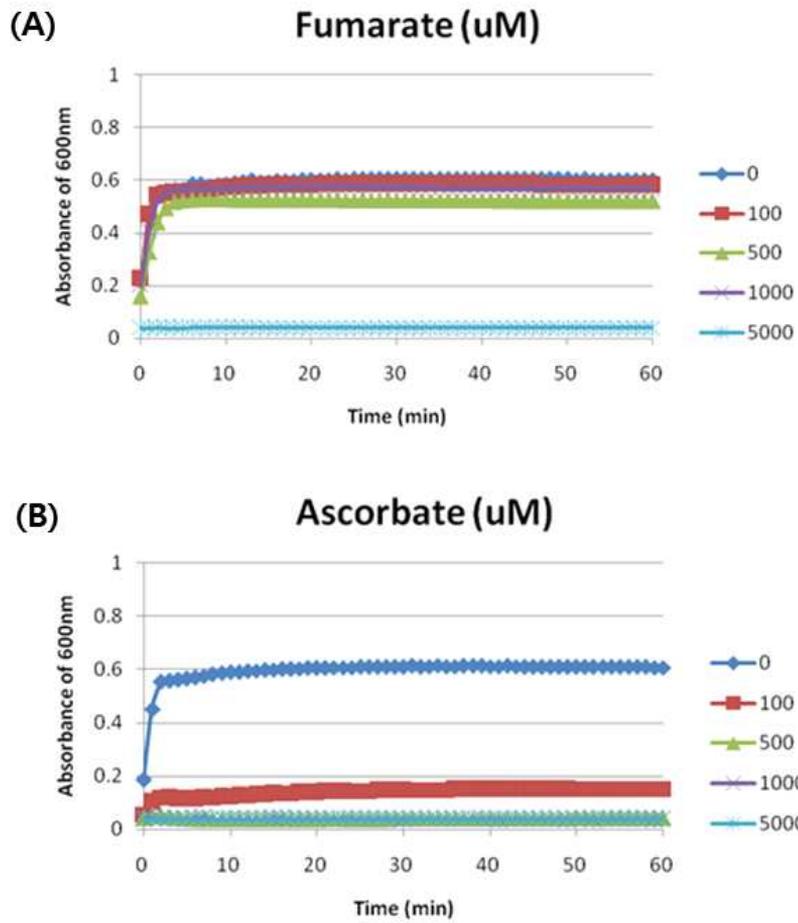


그림 53. Amplex red를 이용한 발색 반응에 대한 (A) fumarate 농도와 (B) sodium ascorbate 농도에 따른 발색 반응 테스트

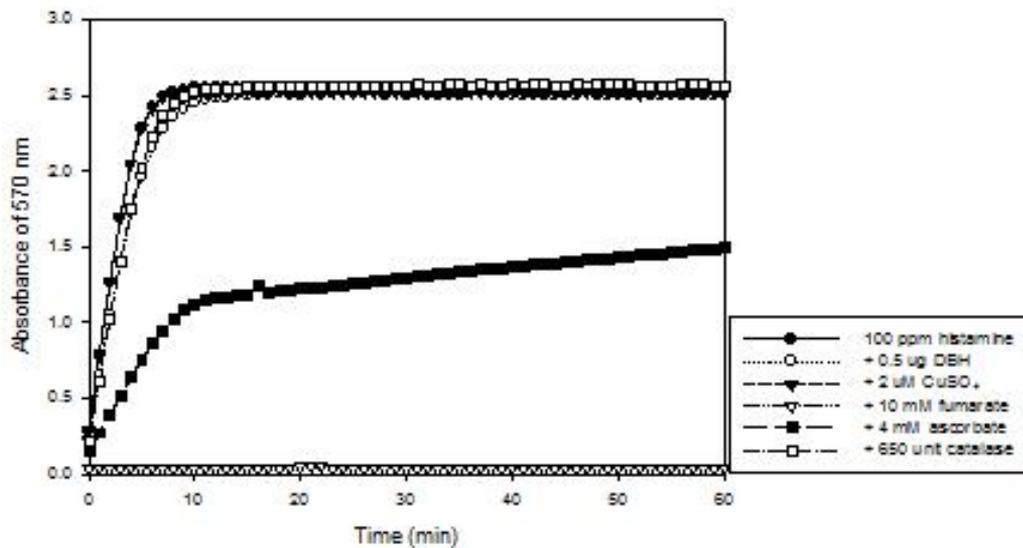


그림 54. Amplex red를 이용한 발색 반응에 대한 double enzyme reaction의 각 주요 성분에 대한 영향 테스트

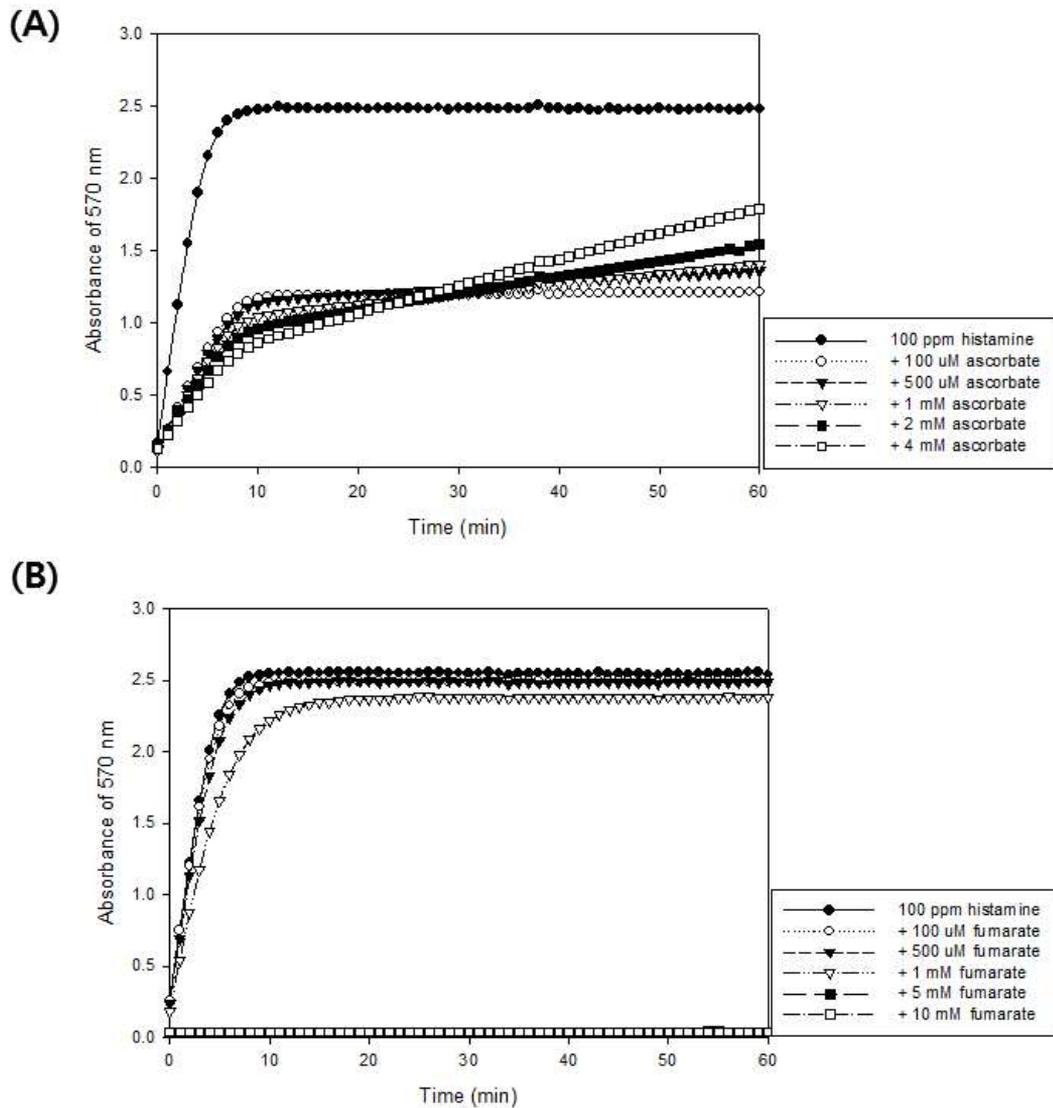


그림 55. Amplex red를 이용한 발색 반응에 대한 (A) sodium ascorbate 농도와 (B) fumarate 농도에 따른 발색 반응 테스트

3) Double enzyme reaction 최종 조건

0.1 M sodium acetate(pH 5.0)에 0.5 ug TβH, 2 uM CuSO₄, 1 mM fumarate, 4 mM sodium ascorbate, 100 unit catalase와 50 ul 100 ppm tyramine 또는 50 ul 100 ppm histamine(total volume 100 ul)을 넣고 37 °C에서 1 시간 동안 섞어주면서 반응시켰다. 100 °C에서 5 분 동안 반응시켜 효소 반응을 중지시킨 후에 13,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리기로 원심 분리를 수행하였다. 상층액 100 ul를 96-well plate에 옮기고 100 mM bicine(pH 9.5)에 50 uM Amplex red, 4 U/ml HRP와 15 U/ml HO를 첨가하여(total volume 300 ul) 30 °C에서 absorbance 570 nm로 kinetic mode에서 60 분 동안 발색 반응을 측정하였다.

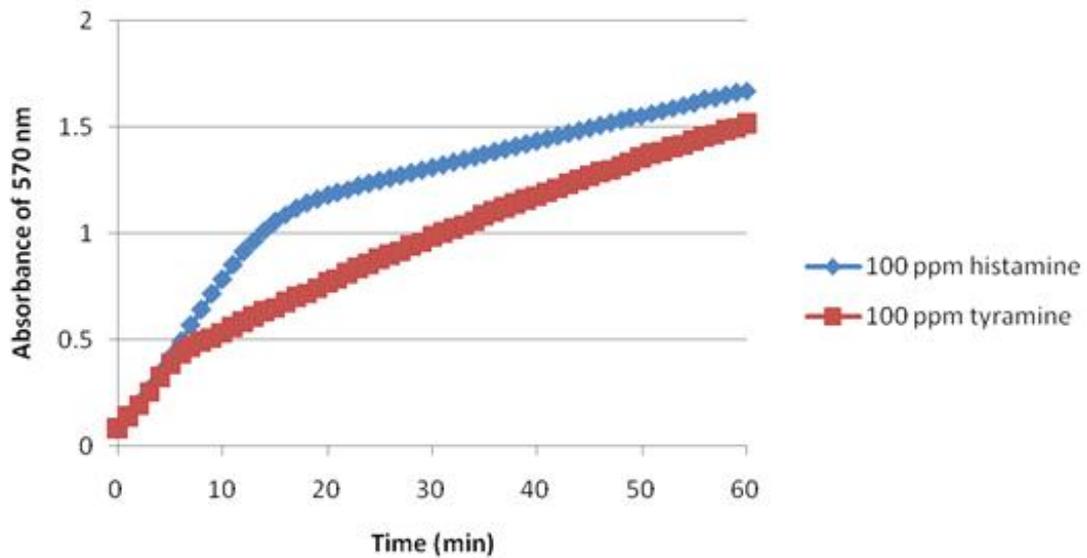


그림 56. Amplex red를 이용한 히스타민 발색 검출 시 Double enzyme reaction을 이용한 검출 결과

그 결과 그림 56과 같이 히스타민에 비해 티라민에 대한 HO의 발색 반응에 대한 특이도를 약간은 낮추는 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 30분 이후에도 반응이 포화되지 않고 계속 증가되므로 효소 기반 검출 키트로 적합하지 않는 문제점이 있으나 반응 시간을 30분으로 확정하여 이때의 히스타민과 티라민에 대한 반응성의 차이를 이용하여 히스타민 검출 키트를 개발하고자 하여 double enzyme reaction을 적용하여 시제품을 구성하여 그 성능을 테스트하였다.

(3) 참치 샘플을 이용한 히스타민 신속 또는 간편 검출 키트의 시제품 비교 테스트

참치 캔과 양념 참치 캔 5 g을 무게를 재서 원심분리용 용기에 옮겨 넣은 후 hand-held homogenizer로 균질화 하였다. 균질화 된 참치 100 mg을 EDTA-potassium buffer 1 ml (Biomax : 10 mM bicine(pH 9.0), Bioo Scientific : 1x sample extraction buffer, Neogen : PBS buffer(pH 7.4))을 넣고 vortexing을 한 다음 12,000 x g에서 10 분 동안 centrifugation하였다. 상층액을 0.45 um cellulose acetate membrane을 이용하여 filtering 하였다. 농도에 맞게 histamine, tyramine, dopamine, tryptamine과 hydroxylamine을 넣어주었다.

1) double enzyme reaction을 이용한 Histamine Assay Kit의 시제품 테스트

0.1 M sodium acetate(pH 5.0)에 2 uM CuSO₄, 1 mM fumarate, 4 mM sodium ascorbate, 100 unit catalase, 각 농도의 histamine, 100 mM bicine(pH 9.5)에 50 uM Amplex red, 4 U/ml HRP와 15 U/ml HO를 첨가하여 30 °C에서 10 분 동안 반응시킨 후 absorbance 570 nm로 측정하여 histamine standard curve를 얻었다. 참치 샘플의 농도가 10 ppm이 되도록 희석한 후, 0.1 M sodium acetate(pH 5.0)에 0.5 ug DBH, 2 uM CuSO₄, 1 mM fumarate, 4 mM sodium ascorbate, 100 unit catalase와 50 ul 참치 샘플 (total volume 100 ul)을 넣고 37 °C에서 1 시간 동안 섞어주면서 반응시켰다. 100 °C에서 5 분 동안 반응시켜 효소 반응을 중지시킨 후에 13,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리로 원심 분리를 수행하였다. 상층액 100 ul를 96-well plate에 옮기고 100 mM bicine(pH 9.5)에 50 uM Amplex red, 4 U/ml HRP와 15 U/ml HO를 첨가하여(total volume 300 ul) 30 °C에서 10 분 동안 반응시킨 후 absorbance 570 nm에서 측정하였다. 세 번 반복 실험을 진행하였으며 각 실험값에서 control값을 빼준 값을 평균을 내서 오차범위를 구하였다.

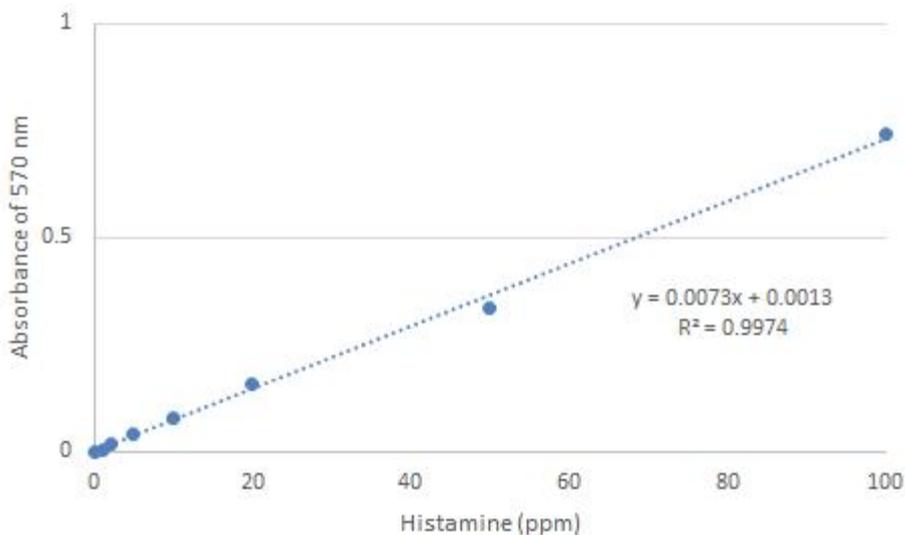


그림 57. double enzyme reaction을 이용한 Histamine assay kit 시제품을 이용한 histamine standard curve.

표 8. double enzyme reaction을 이용한 Histamine assay kit 시제품을 이용한 참치 샘플 측정 결과.

	control	100 ppm histamine	100 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	0.3254	0.7681	0.5153	0.2983
	0.3231	0.8855	0.6754	0.3286
	0.3178	0.9327	0.5385	0.3173
spicy canned tuna	0.4391	0.9734	0.5783	0.3341
	0.4175	0.9019	0.6754	0.347
	0.4697	0.9804	0.7416	0.3696

10 ppm histamine; 10 ppm tyramine; 10 ppm dopamine + 10 ppm tryptamine + 10 ppm hydroxylamine

표 9. double enzyme reaction을 이용한 Histamine assay kit 시제품을 이용한 참치 샘플 측정 결과 정리.

	100 ppm histamine	100 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	76 ppm ±12	35 ppm ±10	-1.2 ppm ±2
spicy canned tuna	70 ppm ±3	30 ppm ±8	-13 ppm ±2

Biomax의 Histamine Assay Kit는 티라민의 검출 시 선택도를 낮추기 위해 double enzyme reaction을 도입하였지만 실제적으로 티라민의 선택도를 낮추고 히스타민의 선택도를 높이는 효과를 일부 얻을 수 있었다. 그러나 전체적인 히스타민 검출의 정확도가 떨어지는 검출 결과를 얻었다. 이는 double enzyme reaction 도입에 의해서 TβH의 효소 활성을 유지하기 위해서 첨가되는 ascorbate와 fumarate와 같은 성분들이 2차 효소 반응인 HO의 효소 발색 반응에 상당한 영향을 미치기 때문인 것으로 보인다. 이러한 시제품 성능 테스트 결과 double enzyme reaction으로 제품화 시에는 원래 계획과는 다르게 히스타민의 발색 및 형광 반응에 상당한 검출 감도의 감소를 주므로 제품화시에 히스타민의 선택도 보다는 정확도와 민감도를 위해서 배제하기로 결정하였다. 이에 double enzyme reaction 보다는 HO만을 이용하여 제품화하는 것이 사업화에 보다 적절하다고 판단하여 이와 같이 결정하였다. 자체 제작한 발색염료인 DAOS와 발색 및 형광 염료인 Amplex red를 이용하여 히스타민을 발색 및 형광 검출할 수 있는 시제품을 만들어 현재 상용화되어 사용 중인 제품과의 정확도, 민감도, 선택도를 비교 테스트하였다.

(3) 타사 제품과 시제품의 성능 비교 테스트

1) Neogen 사 제품 : Maxsignal histamine ELISA test kit

각 농도의 histamine standard 50 ul(또는 참치 샘플 5 ul와 PBS buffer(pH 7.4) 45 ul), enzyme conjugate 50 ul를 neogen 사에서 제공하는 96-well plate에 넣고 상온에서 45 분 동안 반응 시킨다. 1x wash buffer 300 ul를 가볍게 다시 현탁하여 준다. 상기 과정을 세 번 반복해준 후 휴지 위에 plat를 뒤집어 남은 용액을 제거해주고 wash 과정을 3 번에서 5 번 반복 합니다. Substrate를 150 ul를 넣은 후 상온에서 30 분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 absorbance 650 nm에서 측정하였다.

Standard curve

0 standard absorbance = B_0 = 1.0651 (blank 값)

각 standard absorbance = B

$\%B/B_0$ = standard curve의 y축

Logit = $\ln(\%B/B_0 / (100-\%B/B_0))$

$\%B/B_0$ 값을 y축으로 하고 그래프를 그려 x축은 로그 눈금 간격을 해주었고 추세선 또한 로그 값을 적용하여 얻었다.

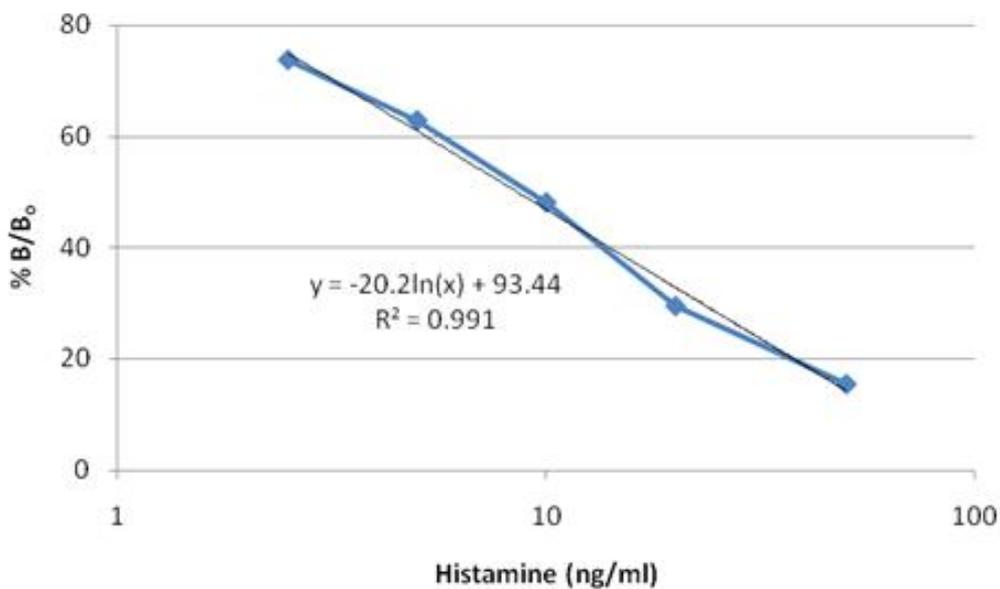


그림 58. Neogen사의 Maxsignal histamine ELISA test kit 제품을 이용한 histamine standard curve

표 10. Neogen사의 Maxsignal histamine ELISA test kit 제품을 이용한 no spike sample의 측정 결과.

	control	10 ppm histamine	10 ppm tyramine	+ 3 species of amines
no spike	0.9327	0.5972	0.8404	0.9478
	0.8233	0.5582	0.8341	0.8285
%B/B ₀	100	64.0	90.1	101.2
	100	67.8	101.3	100.6
concentration		4.0 ±0.35	1.0 ±0.25	0.7 ±0

10 ppm histamine; 10 ppm tyramine; 10 ppm dopamine + 10 ppm tryptamine + 10 ppm hydroxylamine

표 11. Neogen사의 Maxsignal histamine ELISA test kit 제품을 이용한 참치 샘플에서 검출한 결과.

	control	10 ppm histamine	10 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	0.4595	0.424	0.4727	0.4623
	0.502	0.402	0.498	0.4761
	0.5401	0.4581	0.4477	0.451
spicy canned tuna	0.4408	0.3218	0.3993	0.4083
	0.4075	0.4281	0.326	0.4955
	0.3999	0.3591	0.5055	0.4461

0 standard absorbance = B₀

각 샘플의 absorbance = B

각 샘플의 %B/B₀를 구해준다.

표 12. Neogen사의 Maxsignal histamine ELISA test kit 제품을 이용한 참치 샘플에서 측정 결과에 따른 %B/B₀의 값.

	control	10 ppm histamine	10 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	100	92.3	103.9	100.6
	100	80.1	99.2	94.8
	100	84.8	82.9	83.5
spicy canned tuna	100	73.0	90.6	92.6
	100	105.1	80.0	121.6
	100	89.8	126.4	111.6

표 13. Neogen사의 Maxsignal histamine ELISA test kit 제품을 이용한 참치 샘플에서 검출 결과 정리.

	10 ppm histamine	10 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	1.51 ng/ml \pm 0.4	1.01 ng/ml \pm 0.5	1.10 ng/ml \pm 0.4
spicy canned tuna	1.5 ng/ml \pm 0.9	1.1 ng/ml \pm 0.7	0.6 ng/ml \pm 0.3

10 ppm histamine; 10 ppm tyramine; 10 ppm dopamine + 10 ppm tryptamine + 10 ppm hydroxylamine

standard curve와 그 수식을 통해 샘플내의 히스타민 등 바이오제닉 아민의 농도를 구하였다. 그 결과, Neogen 사의 Maxsignal histamine ELISA test kit를 이용하여 참치 시료를 사용하지 않고 히스타민과 티라민 그리고 3종류의 바이오제닉아민 (dopamine, tryptamine, hydroxylamine)을 첨가하여 히스타민의 검출 농도를 측정된 결과, 티라민에 비해 히스타민에 대한 선택도가 보다 높게 측정됨을 확인할 수 있었다. 그러나 전체적인 히스타민 검출의 정확도와 민감도가 떨어지는 결과를 얻었다. 참치 시료를 이용한 히스타민 검출 실험에서는 히스타민 이외에 히스타민과 티라민과 함께 3종류의 바이오제닉 아민을 첨가한 시료에 대해 검출의 정확도, 민감도, 선택도를 조사하였다. 그 결과 매우 낮은 히스타민 및 바이오제닉 아민의 검출 농도를 보여주었다. 이와 같이 매우 낮은 정확도와 민감도를 나타내는 것은 Neogen사의 Maxsignal histamine ELISA test kit는 히스타민에 대한 항체를 기반으로 만들어졌으므로 참치 내의 다양한 성분들이 히스타민에 대한 항체의 친화력에 영향을 주어 정확도 및 민감도를 상당히 떨어뜨리기 때문에 상기의 결과를 나타내는 것으로 판단된다.

2) Bioo scientific; Maxsignal histamine enzymatic assay kit

Bioo scientific사의 Maxsignal histamine enzymatic assay kit를 이용하여 히스타민의 1-12 ppm의 histamine 농도로 histamine을 각각 50 ul 씩 넣고 67 % methanol 50 ul, master mix 50 ul와 enzyme mix 50 ul를 넣고 상온에서 10 분 동안 반응시킨 후에 absorbance 450 nm에서 측정하여 histamine standard curve를 얻었다. Bioo scientific사의 Maxsignal histamine enzymatic assay kit를 이용하여 히스타민과 바이오제닉 아민의 검출에 대한 정확도, 민감도, 선택도를 조사하기 위하여 10 ppm 히스타민에 대한 검출 이외에도 히스타민 또는 여기에 각각의 다양한 농도의 바이오제닉 아민을 첨가하여 측정하였다. 바이오제닉 아민으로 dopamine, tryptamine 그리고 hydroxylamine을 첨가하여 측정하였다.

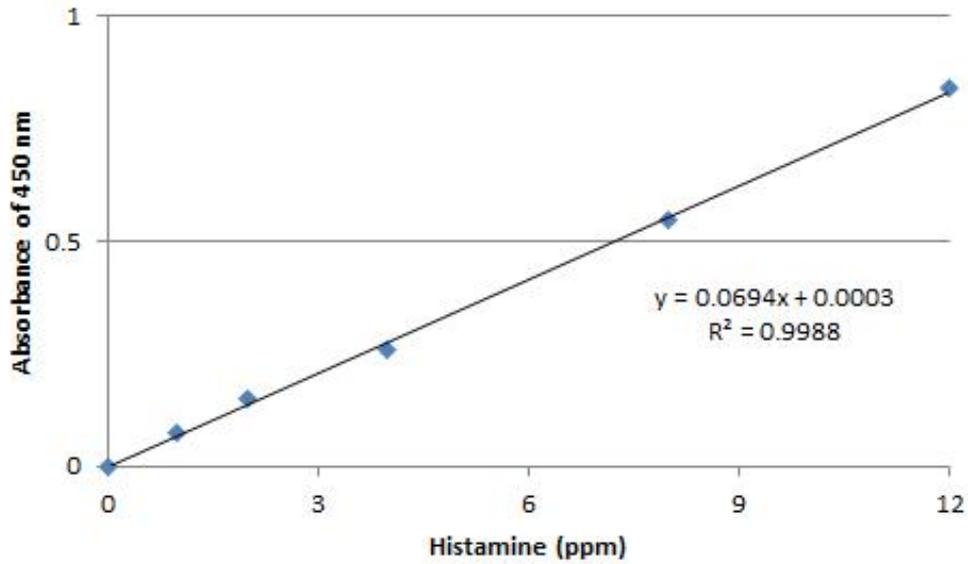


그림 59. Maxsignal histamine enzymatic assay kit를 이용한 histamine standard curve

표 14. Maxsignal histamine enzymatic assay kit를 이용한 3 가지의 바이오제닉 아민을 농도별로 첨가 시 검출 결과.

	10 ppm histamine	+ 10 ppm 3 amines	+ 8 ppm 3 amines	+ 6 ppm 3 amines	+ 4 ppm 3 amines	+ 2 ppm 3 amines	+ 1 ppm 3 amines
no spike	0.5954	0.3619	0.4022	0.4707	0.5529	0.6324	0.6511
	8.6 ppm	5.2 ppm	5.8 ppm	6.8 ppm	8.0 ppm	9.1 ppm	9.4 ppm

표 15. Maxsignal histamine enzymatic assay kit를 이용한 검출 시 바이오제닉 아민 종류가 미치는 영향을 조사한 결과

	10 ppm histamine	+ 10 ppm tyramine	+ 10 ppm tryptamine	+ 10 ppm phenylethylamine	+ 10 ppm hydroxylamine	+ 10 ppm dopamine
no spike	0.528	0.5685	0.5731	0.545	0.5595	0.4465
	7.6 ppm	8.2 ppm	8.3 ppm	7.8 ppm	8.1 ppm	6.4 ppm

Bioo scientific사의 Maxsignal histamine enzymatic assay kit를 이용하여 히스타민과 바이오제닉 아민의 검출에 대한 정확도, 민감도, 선택도를 조사한 결과, 10 ppm의 히스타민에 대해 어느 정도 안정적인 히스타민을 검출하는 것이 나타났으나 첨가된 3종류의 바이오제닉 아민에 대해서 선택도 있는 검출 결과를 보여주지 못했고 다른 바이오제닉 아민의 농

도가 높아질수록 히스타민 검출의 영향을 주는 것으로 나타났다. 이에 첨가한 바이오제닉 아민의 종류에 따른 히스타민 검출의 영향을 조사하였다. 그 결과 도파민의 첨가 시를 제외하고 다른 바이오제닉 아민 첨가 시에 검출 농도가 증가하는 결과를 얻었다. 히스타민 이외에 다른 바이오제닉 아민 첨가 시에 정확도와 선택도에 영향을 주는 것으로 판단된다. 이에 캔 참치와 양념 참치를 이용하여 spiked test를 통해 실제적인 시제품의 성능을 비교하였다. 참치 샘플 10 ul, 1x sample extraction buffer 40 ul, 67 % methanol, master mix 50 ul와 enzyme mix 50 ul를 넣고 상온에서 10 분 동안 반응시킨 뒤 absorbance 450 nm에서 측정하였다. 세 번 반복 실험을 진행하였으며 각 실험값에서 control값을 빼준 값을 평균을 내서 오차범위를 구하였다.

표 16. Maxsignal histamine enzymatic assay kit를 이용한 참치 시료를 이용한 검출 실험 결과.

	control	10 ppm histamine	10 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	0.0651	0.6523	0.0637	0.0756
	0.065	0.6168	0.0662	0.0785
	0.0638	0.6663	0.0649	0.0753
spicy canned tuna	0.068	0.5964	0.0672	0.08
	0.0699	0.6128	0.066	0.0821
	0.0632	0.5413	0.0663	0.0793

10 ppm histamine; 10 ppm tyramine; 10 ppm dopamine + 10 ppm tryptamine + 10 ppm hydroxylamine

표 17. Maxsignal histamine enzymatic assay kit를 이용한 참치 시료를 이용한 검출 실험 결과 정리.

	10 ppm histamine	10 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	8.4 ppm \pm 0.3	0 ppm \pm 0.02	0.17 ppm \pm 0.02
spicy canned tuna	7.4 ppm \pm 0.4	-0.01 ppm \pm 0.04	0.19 ppm \pm 0.03

그 측정 결과, Maxsignal histamine enzymatic assay kit를 이용한 히스타민 및 바이오제닉 검출 결과 히스타민에 대한 선택도는 높게 나타났다. 그러나 전체적인 정확도가 참치 시료로 테스트한 결과 no spike 테스트에 비해 더 떨어졌으며 특히 양념 참치에 경우 정확도가 떨어지는 결과를 얻었다. 이는 참치의 성분 특히 양념 성분이 Maxsignal histamine enzymatic assay kit에 주요한 histamine dehydrogenase 의 활성화에 영향을 주기 때문인 것으로 보인다.

3) Biomax; Histamine Assay Kit 키트 (DAOS 이용 colorimetric detection)

10 mM bicine(pH 9.0)에 30 U/ml HO, 20 U/ml HRP, 2 mM 4-aminoantipyrine 그리고 4 mM DAOS (total volume 100 ul)를 첨가하여 30 °C에서 10 분 동안 반응시킨 후 absorbance 600 nm로 측정하여 histamine standard curve를 구하였다.

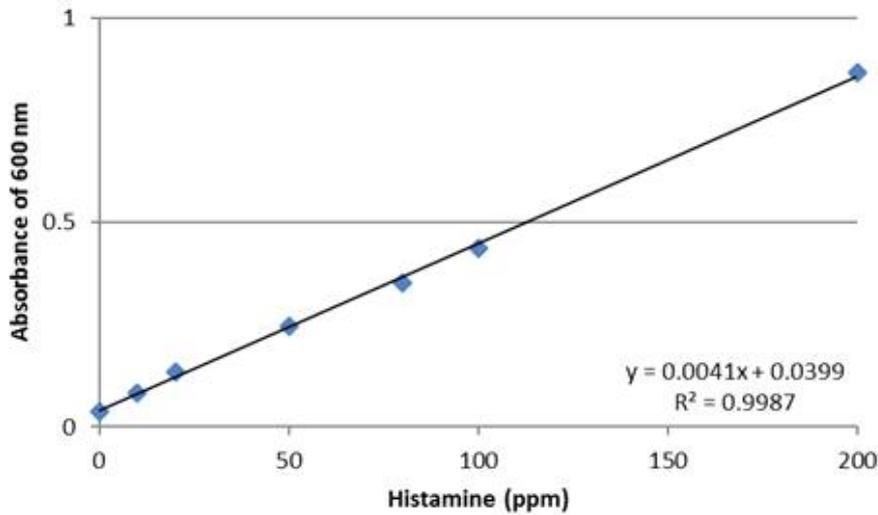


그림 60. DAOS 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 histamine standard curve

본 과제에서 개발한 발색 염료인 DAOS를 이용한 Histamine Assay Kit를 이용하여 히스타민과 바이오제닉 아민의 검출에 대한 정확도, 민감도, 선택도를 조사하기 위하여 10 ppm 히스타민에 대한 검출 이외에도 히스타민에 각각의 다양한 농도의 바이오제닉 아민을 첨가하여 측정하였다. 바이오제닉 아민으로 dopamine, tryptamine 그리고 hydroxylamine을 첨가하여 측정하였다. 10 ppm histamine에 각각의 10 ppm의 바이오아민제닉을 첨가하여 측정하였다.

표 18. DAOS 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 3 가지의 바이오아민제닉을 농도별로 첨가했을 때 발색 검출 결과.

	10 ppm histamine	+ 10 ppm 3 amines	+ 8 ppm 3 amines	+ 6 ppm 3 amines	+ 4 ppm 3 amines	+ 2 ppm 3 amines	+ 1 ppm 3 amines
no spike	0.0825	0.0653	0.0606	0.0557	0.0517	0.0551	0.0571
	10.4 ppm	6.2 ppm	5.0 ppm	3.9 ppm	2.9 ppm	3.7 ppm	4.2 ppm

본 과제에서 개발한 발색 염료인 DAOS를 이용한 Histamine Assay Kit를 이용하여 히스타민과 바이오제닉 아민의 검출에 대한 정확도, 민감도, 선택도를 조사한 결과, 10 ppm의 히스타민에 대해 어느 정도 안정적인 히스타민을 검출하는 것이 나타났으나 첨가된 3종류의 바이오제닉 아민에 대해서 선택도 있는 검출 결과를 보여주지 못했고 다른 바이오제닉

아민의 농도가 높아질수록 히스타민 검출의 감도를 떨어뜨리는 것으로 나타났다. 이에 첨가한 바이오제닉 아민의 종류에 따른 히스타민 검출의 영향을 조사하였다.

표 19. DAOS 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 첨가한 바이오제닉 아민 종류에 따른 발색 검출 결과.

	10 ppm histamine	+ 10 ppm tyramine	+ 10 ppm tryptamine	+ 10 ppm phenylethylamine	+ 10 ppm hydroxylamine	+ 10 ppm dopamine
no spike	0.0838	0.1292	0.1212	0.1323	0.0406	0.0783
	10.7 ppm	21.8 ppm	19.8 ppm	22.5 ppm	0.17 ppm	9.4 ppm

그 결과, 도파민의 첨가 시에는 별다른 선택도에 영향을 주지 않았으나 티라민, 페닐에틸아민과 트립타민 첨가 시 상당한 검출 값이 상승해서 히스타민 산화효소의 발색 검출 반응에 상당한 영향을 주는 결과를 확인할 수 있었다. 다른 바이오제닉 아민과 달리 하이록시아민의 경우는 검출 감도를 상당히 떨어뜨리는 결과를 얻었다. 이와 같이 다른 바이오제닉 아민 첨가 시에 검출 농도가 증가하거나 상당하게 감소하는 등 선택도와 정확도에 영향을 주는 것이 밝혀졌다. 이에 썬 참치와 양념 참치를 이용하여 spiked test를 통해 실제적인 시제품의 성능을 비교하였다. 참치 샘플 10 ul, 1x sample extraction buffer 40 ul, 67 % methanol, master mix 50 ul와 enzyme mix 50 ul를 넣고 상온에서 10 분 동안 반응시킨 뒤 absorbance 450 nm에서 측정하였다. 세 번 반복 실험을 진행하였으며 각 실험값에서 control값을 빼준 값을 평균을 내서 오차범위를 구하였다.

표 20. DAOS 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 참치 시료를 이용한 발색 검출 실험 결과.

	control	10 ppm histamine	10 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	0.0374	0.081	0.1092	0.0404
	0.0368	0.0856	0.1125	0.0398
	0.0366	0.0867	0.1113	0.0395
spicy canned tuna	0.0388	0.0748	10.097	0.0419
	0.0398	0.076	0.1012	0.0419
	0.0383	0.0736	0.0972	0.0421

10 ppm histamine; 10 ppm tyramine; 10 ppm dopamine + 10 ppm tryptamine + 10 ppm hydroxylamine

표 21. DAOS 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 참치 시료를 이용한 발색 검출 실험 결과 정리.

	10 ppm histamine	10 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	10.9 ppm ±0.6	17.3 ppm ±0.33	0 ppm ±0.09
spicy canned tuna	8.5 ppm ±0.23	14.3 ppm ±0.47	0.5 ppm ±0.02

그 측정 결과, 본 과제에서 개발한 발색 염료인 DAOS를 이용한 Histamine Assay Kit를 이용하여 히스타민 및 바이오제닉 검출 시 티라민에 대한 히스타민 산화효소의 효소 활성의 선택도가 높게 나타났다. 이외의 다른 3 종류의 바이오제닉 아민에 대해서는 높은 선택도로 검출 반응을 나타내는 결과를 얻었다. 양념된 참치의 경우 일반 참치 시료에 비해 검출 반응이 약간 낮게 나타났는데 이는 양념된 참치의 성분이 히스타민 산화효소의 효소 활성에 영향을 주기 때문인 것으로 보인다. DAOS를 이용한 Histamine Assay Kit를 이용한 히스타민 검출 테스트 결과 티라민에 대한 높은 선택도를 보이지만 티라민 이외의 다른 3 종류의 바이오제닉 아민에 대해 선택도 있는 검출 반응을 나타냈으므로 히스타민 발색 검출을 위한 Histamine Assay Kit로 제품화를 진행하였다.

4) Biomax; Histamine Assay Kit 키트 (Amplex red 이용 colorimetric detection)

10 mM bicine(pH 9.0)에 30 U/ml HO, 20 U/ml HRP, 2 mM 4-aminoantipyrine 그리고 4 mM DAOS (total volume 100 ul)를 첨가하여 30 °C에서 10 분 동안 반응시킨 후 absorbance 600 nm로 측정하여 histamine standard curve를 구하였다.

표 22. Amplex red 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 3 가지의 바이오제닉 아민 농도별로 첨가했을 때의 발색 검출 결과.

	10 ppm histamine	+ 10 ppm 3 amines	+ 8 ppm 3 amines	+ 6 ppm 3 amines	+ 4 ppm 3 amines	+ 2 ppm 3 amines	+ 1 ppm 3 amines
no spike	0.3583	0.0804	0.0792	0.0808	0.0879	0.1055	0.1407
spike	9.6 ppm	1.13 ppm	1.1 ppm	1.15 ppm	1.36 ppm	1.9 ppm	3.0 ppm

DAOS를 이용한 발색 검출 반응과 마찬가지로 Amplex red를 이용한 발색 검출 반응에서도 도파민의 첨가 시에는 별다른 선택도에 영향을 주지 않았으나 티라민, 페닐에틸아민과

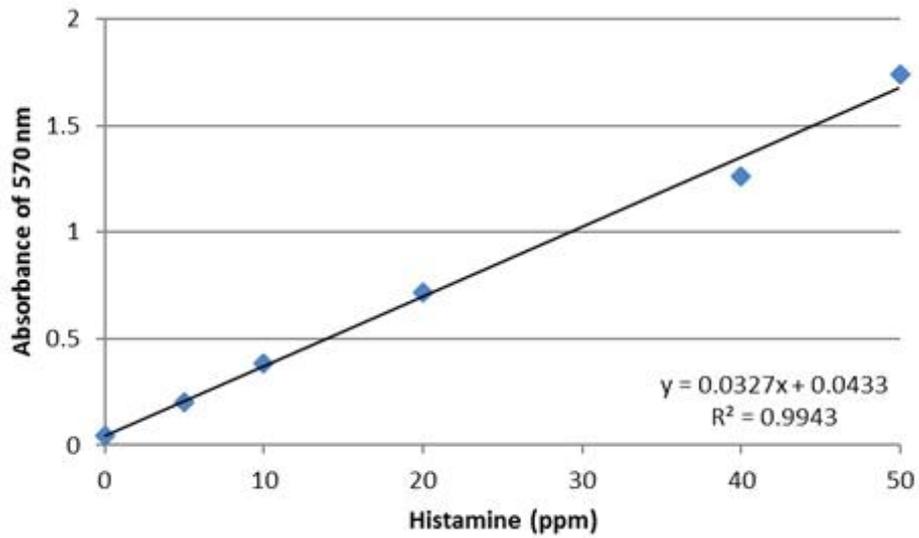


그림 61. Amplex red 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 histamine standard curve

표 23. Amplex red 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 검출 시 바이오제닉 아민 종류가 미치는 영향을 조사한 결과.

	10 ppm histamine	+ 10 ppm tyramine	+ 10 ppm tryptamine	+ 10 ppm phenylethylamine	+ 10 ppm hydroxylamine	+ 10 ppm dopamine
no spike	0.3498	0.7184	0.4959	0.7422	0.074	0.2377
	9.4 ppm	20.6 ppm	13.8 ppm	21.4 ppm	0.94 ppm	5.9 ppm

트립타민 첨가 시 상당한 검출 값이 상승해서 히스타민 산화효소의 선택도와 정확도에 상당한 영향을 주는 결과를 확인할 수 있었다. 히스타민 이외에 다른 바이오제닉 아민의 첨가가 정확도와 선택도에 영향을 주는 것으로 판단된다. 이에 썬 참치와 양념 참치를 이용하여 spiked test를 통해 실제적인 시제품의 성능을 비교하였다. 참치 샘플 10 ul, 1x sample extraction buffer 40 ul, 67 % methanol, master mix 50 ul와 enzyme mix 50 ul를 넣고 상온에서 10 분 동안 반응시킨 뒤 absorbance 450 nm에서 측정하였다. 세 번 반복 실험을 진행하였으며 각 실험값에서 control값을 빼준 값을 평균을 내서 오차범위를 구하였다.

표 24. Amplex red 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 참치 시료를 이용한 발색 검출 실험 결과.

	control	10 ppm histamine	10 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	0.0477	0.3262	0.331	0.0701
	0.0481	0.32	0.331	0.0655
	0.048	0.3174	0.3226	0.0646
spicy canned tuna	0.0564	0.278	0.3243	0.0764
	0.0572	0.284	0.3157	0.0739
	0.058	0.2751	0.3128	0.0753

10 ppm histamine; 10 ppm tyramine; 10 ppm dopamine + 10 ppm tryptamine + 10 ppm hydroxylamine

표 25. Amplex red 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 참치 시료를 이용한 발색 검출 실험 결과 정리.

	10 ppm histamine	10 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	7.2 ppm \pm 0.11	8.7 ppm \pm 0.12	0.7 ppm \pm 0.07
spicy canned tuna	7.2 ppm \pm 0.11	8.4 ppm \pm 0.15	1.0 ppm \pm 0.03

그 측정 결과, 본 과제에서 개발한 Amplex red를 이용한 Histamine Assay Kit를 이용하여 검출 성능 테스트를 수행한 결과 DAOS를 이용한 발색 검출보다는 보다 낮은 정확도를 나타내었으나 히스타민과 티라민에 대한 선택도가 유사하게 검출되었고 이외에 다른 바이오제닉 아민에 대해 낮은 검출 반응을 나타내는 결과를 보였다. 이에 Amplex red를 이용한 Histamine Assay Kit를 형광 검출용으로 개발하였지만 발색 검출 반응으로 히스타민을 검출을 위해 사용하기에도 적합한 것으로 판단된다.

5) Biomax; Histamine Assay Kit 키트 (Amplex red 이용 fulorometric detection)

10 mM bicine(pH 9.0)에 30 U/ml HO, 20 U/ml HRP, 2 mM 4-aminoantipyrine 그리고 4 mM DAOS (total volume 100 ul)를 첨가하여 30 °C에서 10 분 동안 반응시킨 후 absorbance 600 nm로 측정하여 histamine standard curve를 구하였다.

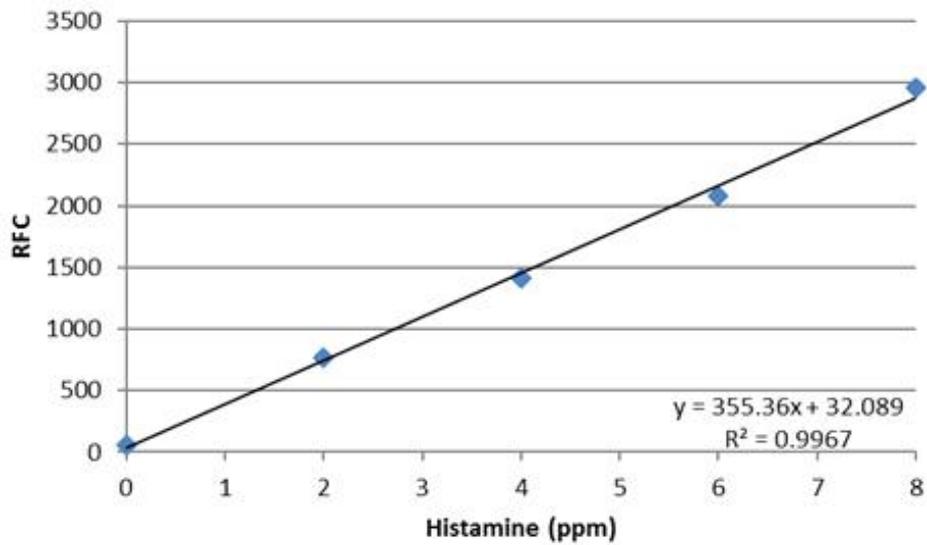


그림 62. Amplex red 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 histamine standard curve

표 26. Amplex red 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 3 가지의 바이오제닉 아민을 농도별로 첨가했을 때의 형광 검출 결과.

	5 ppm histamine	+ 5 ppm 3 amines	+ 4 ppm 3 amines	+ 3 ppm 3 amines	+ 2 ppm 3 amines	+ 1 ppm 3 amines	+ 0.5 ppm 3 amines
no spike	3578	1443	1627	1709	1586	1606	1629
	10 ppm	4.0 ppm	4.5 ppm	4.7 ppm	4.4 ppm	4.4 ppm	4.5 ppm

표 27. Amplex red 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 검출 시 바이오제닉 아민 종류가 미치는 영향을 조사한 결과.

	5 ppm histamine	+ 5 ppm tyramine	+ 5 ppm tryptamine	+ 5 ppm phenylethylamine	+ 5 ppm hydroxylamine	+ 5 ppm dopamine
no spike	3616	6018	5975	6724	1407	2555
	10.1 ppm	16.8 ppm	16.7 ppm	18.8 ppm	3.9 ppm	7.1 ppm

Amplex red를 이용한 형광 검출 테스트 결과, 발색 검출과 유사한 결과를 보였는데 다만

히스타민에 대해서 정확도가 떨어지는 결과를 보였는데 형광 검출로 인해 효소 활성이 민감도 높게 측정되는 결과 때문으로 보인다. 함께 첨가되는 바이오제닉 아민의 농도와 종류에 따라서 히스타민 검출에 영향을 받는 것이 밝혀졌는데 하이드록실아민과 도파민의 첨가 시 검출에 영향을 주지 않았으나 티라민, 페닐에틸아민과 트립타민 첨가 시 상당한 검출 값이 상승해서 히스타민 산화효소의 선택도에 영향을 주는 결과를 확인할 수 있었다. 이에 캔참치와 양념 참치를 이용하여 spiked test를 통해 실제적인 시제품의 성능을 비교하였다. 참치 샘플 10 ul, 1x sample extraction buffer 40 ul, 67 % methanol, master mix 50 ul와 enzyme mix 50 ul를 넣고 상온에서 10 분 동안 반응시킨 뒤 absorbance 450 nm에서 측정하였다. 세 번 반복 실험을 진행하였으며 각 실험값에서 control값을 빼준 값을 평균을 내서 오차범위를 구하였다.

표 28. Amplex red 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 참치 시료를 이용한 형광 검출 실험 결과.

	control	5 ppm histamine	5 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	107.507	1697.235	1782.073	1047.157
	116.949	1671.019	1735.68	1056.964
	116.176	1654.904	1730.391	1015.639
spicy canned tuna	218.031	1737.586	1770.399	1132.056
	212.857	1720.884	1718.362	1124.514
	218.029	1621.044	1672.321	1105.371

10 ppm histamine; 10 ppm tyramine; 10 ppm dopamine + 10 ppm tryptamine + 10 ppm hydroxylamine

표 29. Amplex red 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 참치 시료를 이용한 형광 검출 실험 결과 정리.

	5 ppm histamine	5 ppm tyramine	+ 3 species of amines
canned tuna	4.7 ppm \pm 0.05	4.8 ppm \pm 0.07	2.8 ppm \pm 0.05
spicy canned tuna	4.7 ppm \pm 0.14	4.8 ppm \pm 0.11	3.1 ppm \pm 0.03

그 측정 결과, 본 과제에서 개발한 Amplex red를 이용한 Histamine Assay Kit를 이용하여 검출 성능 테스트를 수행한 결과 DAOS를 이용한 발색 검출보다는 보다는 약간 낮은 정확도를 나타내었으나 히스타민과 티라민에 대한 선택도가 유사하게 검출되었고 이외 다른 바이오제닉 아민에 대해서는 낮은 검출 반응을 나타내는 결과를 보였다. Amplex red를 이용한 히스타민 형광 검출 Histamine Assay Kit 는 발색 검출보다 민감도를 높일 수 있었으나 상대적으로 발색 검출에 비해 낮은 선택도를 보였다.

(4) 참치 캔 이외에 다른 제품(와인)에 대한 성능 테스트

참치 이외에 다른 제품에 대한 개발 제품의 성능을 테스트하기 위해서 참치 캔에 대한 spike 테스트를 와인에 대해서 실시하였다. 와인을 선택한 이유는 현재 KFDA 와 한국 식품공전에 따르면 다랑어과 생선에 대해서만 히스타민 검출을 실시하고 있으나 유럽에 경우에는 치즈와 와인 과 같은 발효 식품에 대해서 히스타민 검출을 규제하고 있기 때문에 참치 이외에 다른 생선 보다는 발효 식품 중에서 와인을 선택해서 와인에 대한 히스타민 검출에 대한 성능 테스트를 수행하였다.

1) Histamine Assay Kit 키트 (DAOS 이용 colorimetric detection)

10 mM bicine(pH 9.0)에 30 U/ml HO, 20 U/ml HRP, 2 mM 4-aminoantipyrine 그리고 4 mM DAOS (total volume 100 ul)를 첨가하여 30 °C에서 10 분 동안 반응시킨 후 absorbance 600 nm로 측정하여 histamine standard curve를 구하였다.

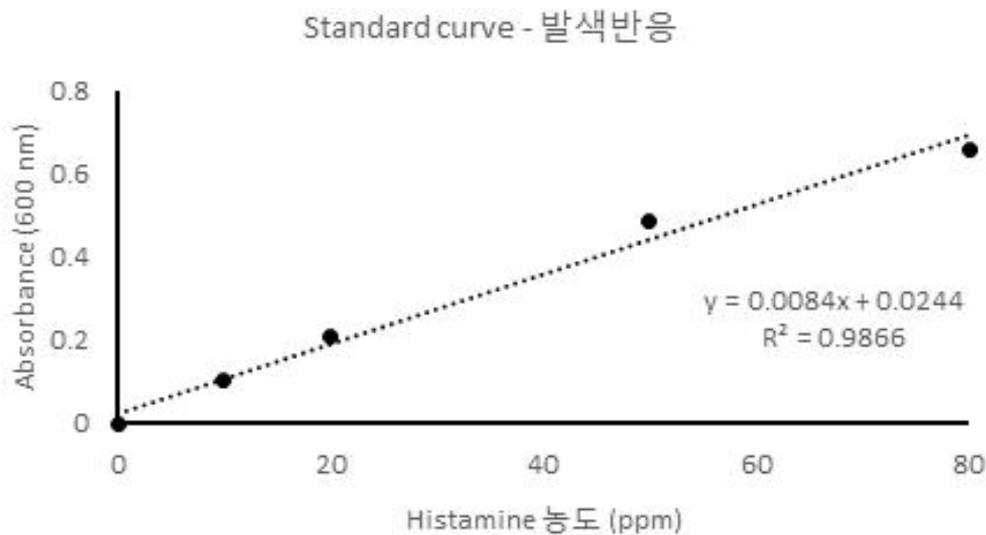


그림 63. DAOS 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 histamine standard curve

와인에 10ppm의 히스타민과 티라민 그리고 다른 바이ोजеник 아민을 각각 첨가하거나 첨가 하지 않은 와인 샘플을 만들어 히스타민 발색 검출 실험을 수행하였다.

표 30. DAOS 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 참치 시료를 이용한 발색 검출 실험 결과 정리.

	10 ppm histamine	10 ppm tyramine	+ 3 species of amines
unspiked wine	2.10 ppm ±0.04	2.2 ppm ± 0.03	0.01 ppm ±0.005
spiked wine	10.9 ppm ±0.21	6.23 ppm ±0.20	2.5 ppm ±0.06

10 ppm histamine; 10 ppm tyramine; 10 ppm dopamine + 10 ppm tryptamine + 10 ppm hydroxylamine

본 과제에서 개발한 발색 염료인 DAOS를 이용한 Histamine Assay Kit를 이용하여 발효 식품인 와인에 대해서 히스타민과 다른 바이오제닉 아민을 첨가하여 검출 테스트를 수행한 결과, 참치 캔에서 수행했던 것과 크게 다른 차이 없이 안정적으로 히스타민 검출 결과를 보여주었다. 향후 다양한 다른 발효 식품에 대해서도 성능의 신뢰도 검증을 위해 테스트를 수행할 계획이다.

2) Histamine Assay Kit 키트 (Amplex red 이용 fluorometric detection)

10 mM bicine(pH 9.0)에 30 U/ml HO, 20 U/ml HRP, 2 mM 4-aminoantipyrine 그리고 4 mM DAOS (total volume 100 ul)를 첨가하여 30 °C에서 10 분 동안 반응시킨 후 absorbance 600 nm로 측정하여 histamine standard curve를 구하였다.

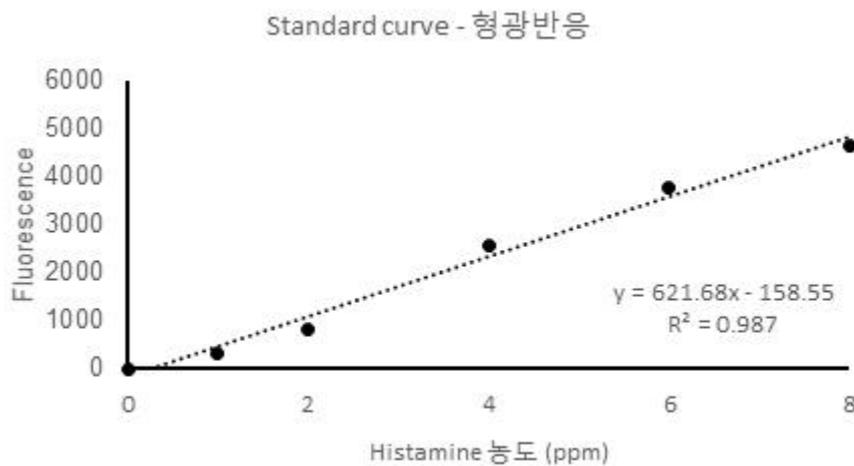


그림 64. Amplex red 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 histamine standard curve

와인에 5ppm의 히스타민과 티라민 그리고 다른 바이오제닉 아민을 각각 첨가하거나 첨가하지 않은 와인 샘플을 만들어 히스타민 형광 검출 실험을 수행하였다.

표 31. Amplex 기반 Histamine Assay Kit를 이용한 참치 시료를 이용한 형광 검출 실험 결과 정리.

	5 ppm histamine	5 ppm tyramine	+ 3 species of amines
unspiked wine	1.05 ppm ±0.010	0.78 ppm ± 0.022	0.12 ppm ±0.002
spiked wine	5.4 ppm ±0.016	3.24 ppm ±0.04	1.53 ppm ±0.008

10 ppm histamine; 10 ppm tyramine; 10 ppm dopamine + 10 ppm tryptamine + 10 ppm hydroxylamine

본 과제에서 개발한 형광 염료인 Amplex red를 이용한 Histamine Assay Kit를 이용하여 발효 식품인 와인에 대해서 히스타민과 다른 바이오제닉 아민을 첨가하여 형광 검출 테스트를 수행한 결과, 참치 캔에서 수행했던 것과 크게 다른 차이 없이 안정적으로 히스타민 검출 결과를 보여주었다. 향후 다양한 다른 발효 식품에 대해서도 성능의 신뢰도 검증을 위해 테스트를 수행할 계획이다.

(5) 제품화에 따른 성능 및 타사 제품과의 비교 정리 요약

본 과제에서 개발한 히스타민 발색 검출과 형광 검출 키트의 타사 제품과의 성능과 가격 등에 대해 비교 정리하면 아래 표와 같다.

표 32. 개발된 제품과 타사 제품과의 성능, 가격 및 다른 스펙 비교

	Maxsignal histamine ELISA test kit	Maxsignal histamine enzymatic assay kit	Histamine colorimetric assay kit	Histamine fluorometric assay kit
Analytical methology	EIA method	Enzymatic method	Enzymatic method	Enzymatic method
Detection range	1-100 ppm	20-300 ppm	1-200 ppm	0.1-100 ppm
Total test time	1-1.5 hr	1hr	1hr	1hr
Reproducibility	Variation may occur	good	Very good	Very good
Sensitivity	Low sensitivity	Quite sensitivity	Quite sensitivity	Very Accurate
Selectivity	Accurate	Very Accurate	Quite accurate	Quite accurate
Price	75 만원 (100 test/kit)	75 만원 (100 test/kit)	40 만원 (100 test/kit)	30 만원 (100 test/kit)

본 과제에서 개발한 히스타민 발색 검출과 형광 검출 키트는 Maxsignal histamine ELISA test kit에 대해서는 재현성, 선택도, 민감도에 대해서 모두 우수한 성능을 보여 주었으며 선택도에 대해서 Maxsignal histamine enzymatic assay kit에 비해 다소 떨어지지만 정확도와 재현성이 높으며 무엇보다도 가격이 40-50% 저렴하게 제품화되었다. 검출 범위와 검출 시간은 기존 제품과 유사하거나 형광 검출의 경우 보다 더 높은 민감도로 검출이 가능하다. 검출 범위라고 함은 일반적으로 샘플을 희석 없이 검출 할 수 있는 범위를 말하는 것으로 검출 범위 이상의 샘플에 대해서는 일반적인 희석 배수법을 사용하여 샘플 안에 검출 대상인 히스타민의 검출 농도를 낮추어서 검출하여 정량 분석이 가능하다. 따라서 본 과제에서 개발한 Histamine colorimetric assay kit와 Histamine fluorometric assay kit의 각각 검출 범위가 1-200ppm 또는 0.1-100 ppm이라고 하더라도 그 이상에 대해서 검출 불가능하거나 재현성 및 선택도에 대해서 달라지는 것이 아니라 제공하는 버퍼와 표준물질(히스타민)으로 적절한 검출 범위의 표준 곡선을 만들고 이에 대해 샘플을 적절하게 희석해서 검출하므로 정성 및 정량 분석이 가능하므로 검출 범위 이상의 샘플에 대해서도 안정적인 정성 및 정량 검출이 가능하다.

■ 히스타민 신속 검출 키트를 위한 고감도 발색 염료의 합성

(1) DAOS 합성 방법

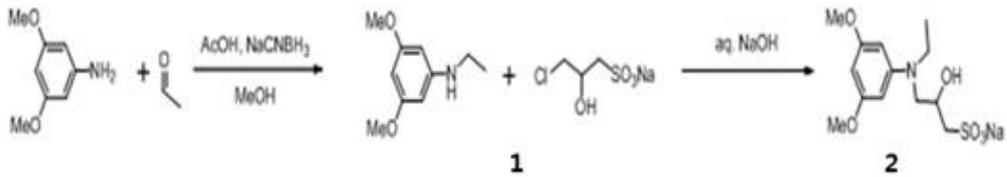


그림 65. DAOS의 화학 합성 과정

1) N-ethyl-3,5-dimethoxyaniline (1) 합성

3,5-dimethoxyaniline (25g, 163mmole)을 메탄올 200mL에 용해 시킨 후 acetaldehyde (10mL, 179.3mmole) 를 첨가하고 교반 시킨다. 이 반응 혼합용액에 아세트산 (9.3mL, 163mmole)과 NaCNBH₃ (15.4g, 244.5mmole)를 천천히 첨가 한 후 실온에서 약 6시간동안 교반 시킨다. 용매를 감압 농축하고 제거 한 후 디클로로메탄을 이용하여 추출하여 MgSO₄에서 건조하고 감압 농축하여 원하는 생성물 (1)을 얻었다. (수득률: 95%, 28g, 흰색 고체)

2) DAOS (2) 합성

sodium 3-chloro-2-hydroxypropanesulfonate (19.6g, 100mmole)을 물 200mL에 녹이고 isopropanol 100mL에 용해되어 있는 N-ethyl-3,5-dimethoxyaniline (18g, 100mmole)을 천천히 첨가 하고 교반 시킨다. 이 반응 혼합용액에 NaOH (4g, 100mmole)를 가하고 3시간 동안 reflux 시킨다. 용매를 감압 농축하여 제거 하고 물 100ml에 다시 녹인 후 Diethyl ether를 이용하여 반응하지 않은 N-ethyl-3,5-dimethoxyaniline 를 제거 한다. 수용액층은 감압농축 시켜 제거 한 후 다시 물 100mL에 녹인 후 4°C에서 재결정하여 원하는 생성물(2)을 얻었다. (수율: 79%, 28g, 흰색 고체)

(2) DAOS 합성 결과

1) 합성한 DAOS 의 NMR 분석 결과

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O): δ 6.09 (s, 2H), 6.01 (s, H), 4.36-4.39 (m, H), 3.81 (s, 6H), 3.56 (d, 2H), 3.41 (q, 2H), 1.22 (t, 3H).

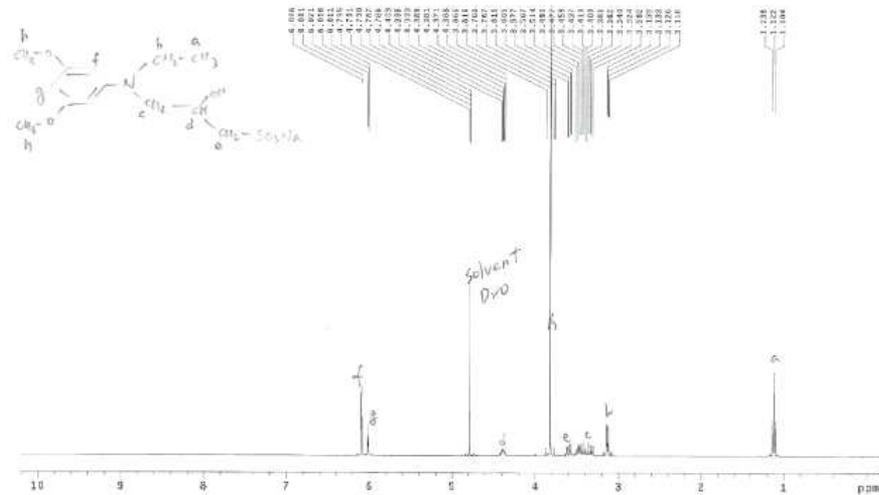


그림 66. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of DAOS

2) 합성한 Amplex Red 의 Mass spectrophotometer 분석 결과

LC/MS (ESI): $m/z = 320.1[\text{M} + 1]^+ / 342.1[\text{M} + 13]^+$

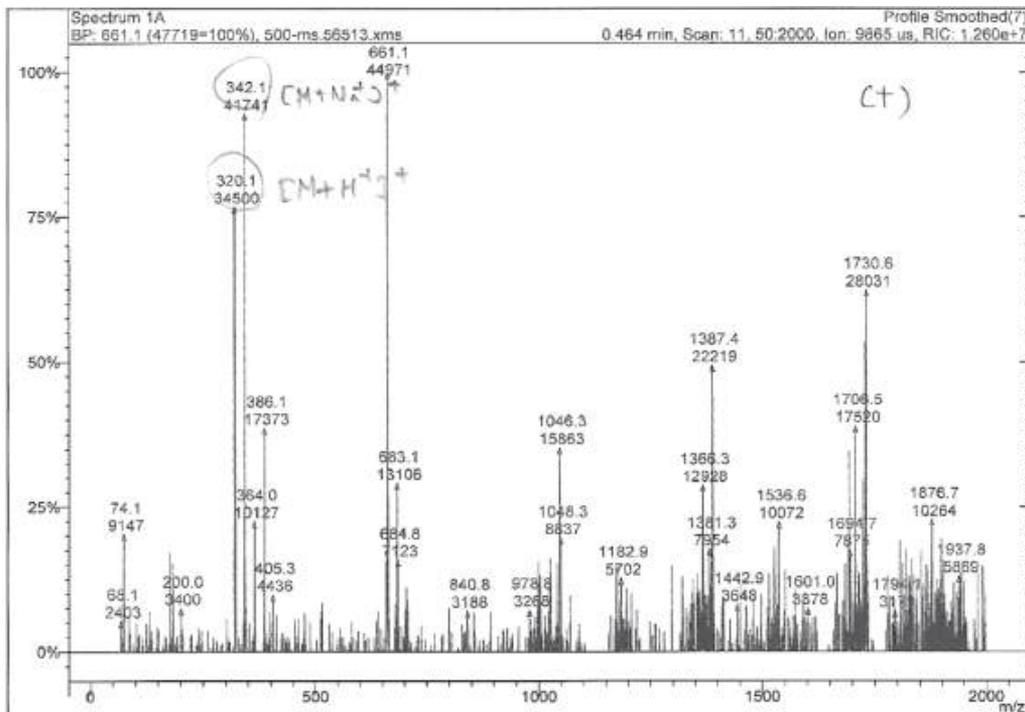


그림 67. Mass spectrophotometric spectrum of DAOS

■ 히스타민 신속 검출 키트를 위한 형광 발색 염료의 합성

(1) 히스타민 신속 검출 키트를 위한 형광 염료의 합성

1) Amplex Red 합성 방법

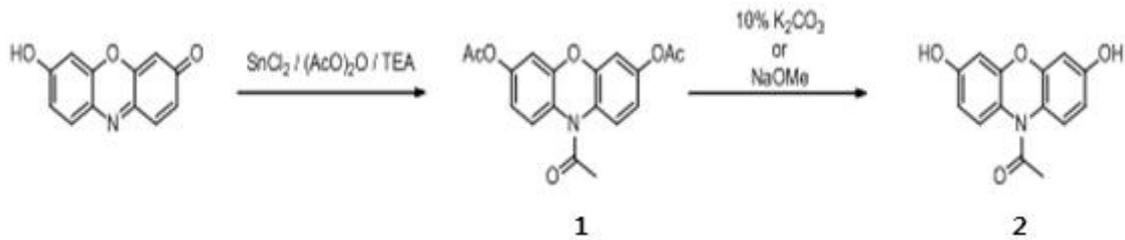


그림 68. Chemical synthetic method of Amplex red

가. Triacetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (1)의 합성

Resazurine (2.5g, 10mmole)과 SnCl_2 (4.17g, 22mmole)를 무수 아세트산 (6.7mL, 72mmole)과 아세트산 (8mL)에 용해 시킨 후 약 1시간 동안 가열 교반 시킨다. 반응 혼합 용액을 냉각 시킨 후 30mL 메탄올을 첨가 하고 0°C에서 약 20시간 동안 방치 시켜 베이지 색의 고체를 얻는다. 생성물을 거른 후 찬 isopropanol과 petroleum ether로 여러번 세척하고 건조 시켜 원하는 생성물 (1)을 얻는다. (수율: 77%, 2.64g)

나. N-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (2)의 합성

Triacetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (2.4g, 7mmole)을 dioxane-물 (1:1 v/v) 70mL에 용해 시킨 후 sodium sulfite(1.9g, 15mmole)를 첨가 하고 질소 분위기 하에서 약 20분 동안 가열 교반 시킨다. 반응 혼합 용액을 냉각 시키고 아세트산 (1.14mL, 20mmole)을 첨가하여 산성화 시킨다. 녹지 않은 불순물들은 거름종이를 이용하여 제거 하고 20mL 정도가 될 때까지 감압 농축 시켜 제거한다. 오일 형태로 생성물에 물 150mL를 첨가하고 0°C에서 수분간 방치 시켜 베이지 색의 고체를 얻는다. 생성물을 거른 후 찬 물로 여러번 세척하고 건조 시켜 원하는 생성물 (2)을 얻는다. (수율: 97%, 1.5g)

2) Amplex Red 합성 결과

가. 합성한 Amplex Red 의 NMR 분석 결과

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, dmsO-d_6): δ 9.72 (s, 2H), 7.34-7.32 (m, 2H), 6.56-6.53 (m, 4H), 2.17 (s, 3H).

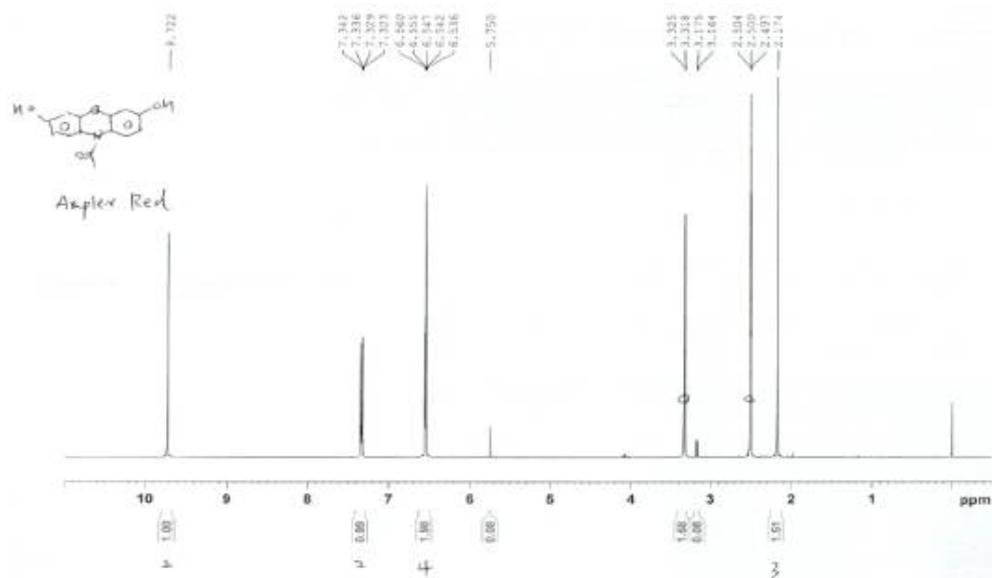


그림 69. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Amplex red

나. 합성한 Amplex Red 의 Mass spectrophotometer 분석 결과

LC/MS (ESI): $m/z = 258.2[M + 1]^+$

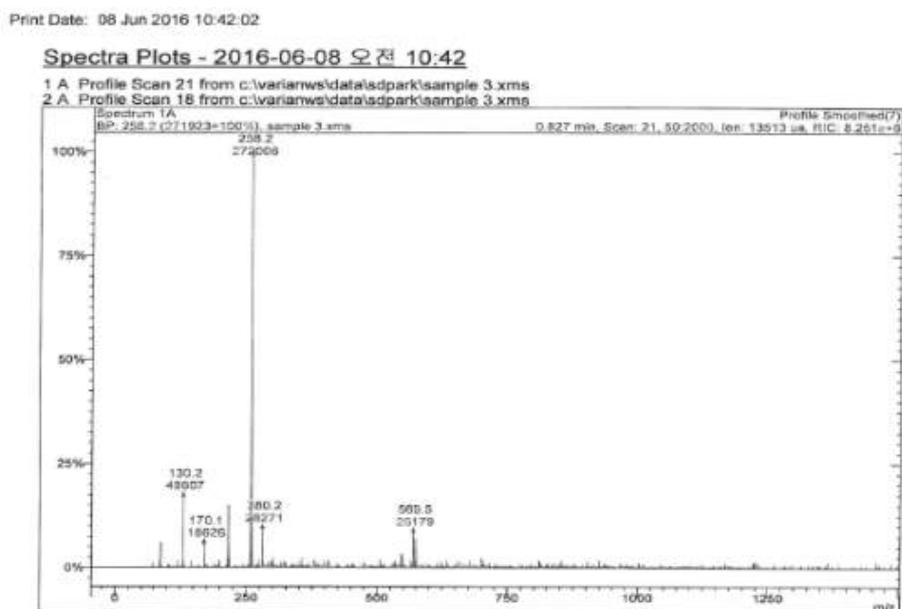


그림 70. Mass spectrophotometric spectrum of Amplex red

■ 히스타민 신속 검출 키트의 맞춤형 염료 개발

(1) 3',6'-Bis(pinacolatoboron)fluoran (Peroxyfluor(PF)-1) 합성

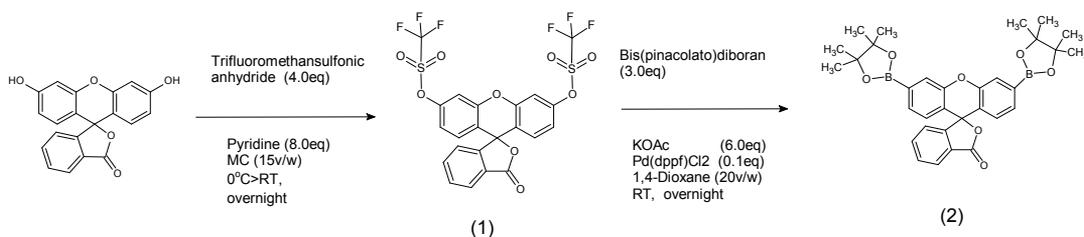


그림 71. 3',6'-Bis(pinacolatoboron)fluoran (Peroxyfluor(PF)-1)의 합성 방법

1) 3',6'-Ditrifluoromethanesulfonic fluoran (1)의 합성

50ml 플라스크에 시작물질 3',6'-Fluoran 525mg (1.58mmole, 1.0eqv)과 MC 7.8ml를 넣어 교반 한다 (붉은색 suspension). Ice bath에서 냉각 한 뒤 Pyridine 1.03ml (12.62mmole, 8.0eqv)을 투입하고, TFMS. Anhydride 1.06ml (6.32mmole, 4.0eqv)를 서서히 dropping 해준다. 투입이 모두 끝나면 Ice bath를 제거 해주고 RT에서 반응 한다. overnight 반응 하여 종결 시킨다. 반응은 TLC로 확인 하며 n-Hex : EA = 2 : 1조건에서 Rf : 0.4 에서 결과물이 나타난다.

반응 종결 후 반응 MC를 모두 Rotary Evaporator로 감압 농축 하고, 소량의 MC로 녹인 뒤 100% MC에서 Shot column chromatography 한다. 회수 된 결과물(1)은 792mg (84%, white solid) 이다.

¹H-NMR Data (500MHz, CDCl₃): δ 8.11(t, 1H), 7.75(q, 2H), 7.33(d, 2H), 7.22(q, 1H), 7.06(t, 2H), 6.99(d, 2H).

2) 3',6'-Bis(pinacolatoboron)fluoran, PF1 (2)의 합성

시작물질 3',6'-Fluoran(1) 88.1mg(0.147mmole, 1.0eqv)과 ~diborane 112.0mg (0.443mmole, 3.0eqv), KOAc 87.0mg (0.886mmole, 6.0eqv), Pd(dppf)Cl₂ 10.8mg (0.014mmole, 0.1eqv)을 25ml 3구 플라스크에 넣고 고진공 펌프에서 건조 시킨다. N₂gas조건에서 1,4-Dioxane 1.8ml을 주입 하고 미리 100°C 로 가온 시킨 Oil bath에서 반응 시킨다. overnight 반응 후 반응 종결시킨다. TLC 확인은 100% MC 에서 Rf : 0.7 혹은 n-Hex : EA = 2:1 조건에서 Rf : 0.6로 결과물이 관찰 된다.

반응이 종결 된 후 반응물을 celite345 padding filter로 여과하고 소량의 MC로 washing 한다. 여과된 반응물을 Rotary Evaporator로 감압 농축 한 뒤 농축된 잔류물을 소량 MC 에 녹인 뒤 H₂O로 2회 세척 한다. 모든 MC층을 MgSO₄ 건조, 여과, 농축한다. 농축 잔류 물을 100% MC 조건에서 Column chromatography 한다. 회수 된 결과물은 58.0mg (71%, white solid) 이다.

¹H-NMR (500MHz,CDCl₃): δ 8.03(q, 1H), 7.73(s, 2H), 7.60(dd, 2H), 7.44(d, 2H), 7.07(d, 1H), 6.86(d, 2H), 1.35(s, 24H). LRMS (ESD): m/z = 575.2[M + Na]⁺

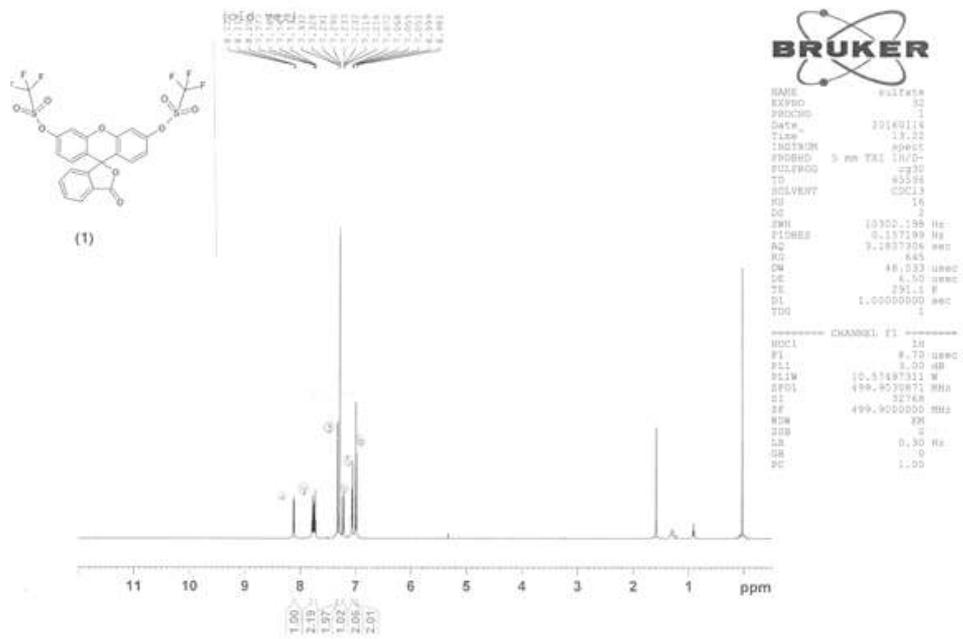


그림 72. 3',6'-Ditrifluoromethanesulfonic fluoran ¹H-NMR 스펙트럼

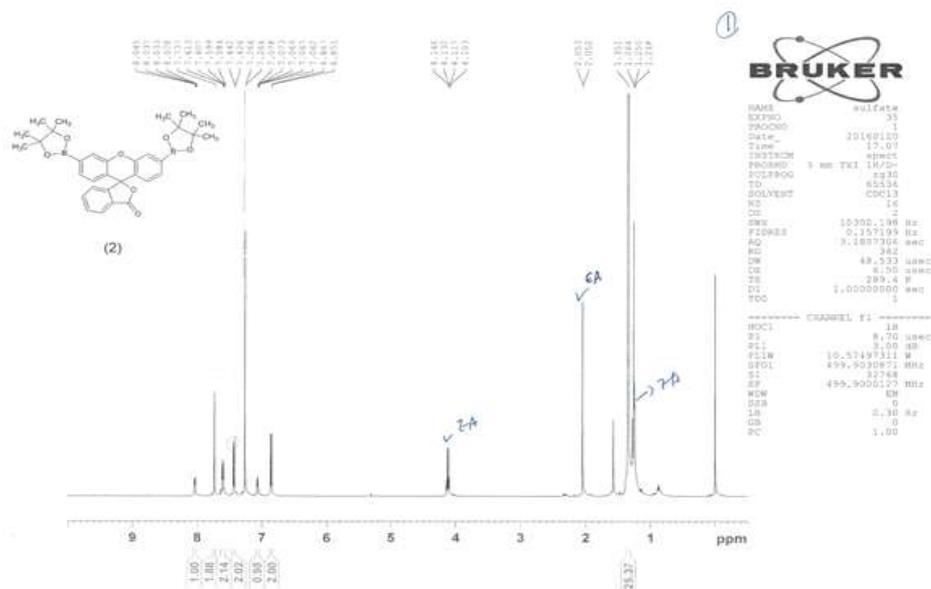


그림 73. 3',6'-Bis(pinacolatoboron)fluoran, PF1 ¹H-NMR 스펙트럼

Spectra Plots - 2016-06-08 오전 10:35

1 A Profile Scan 29 from c:\varianws\data\sdpark\sample 2.xms
 2 A Profile Scan 38 from c:\varianws\data\sdpark\sample 2.xms

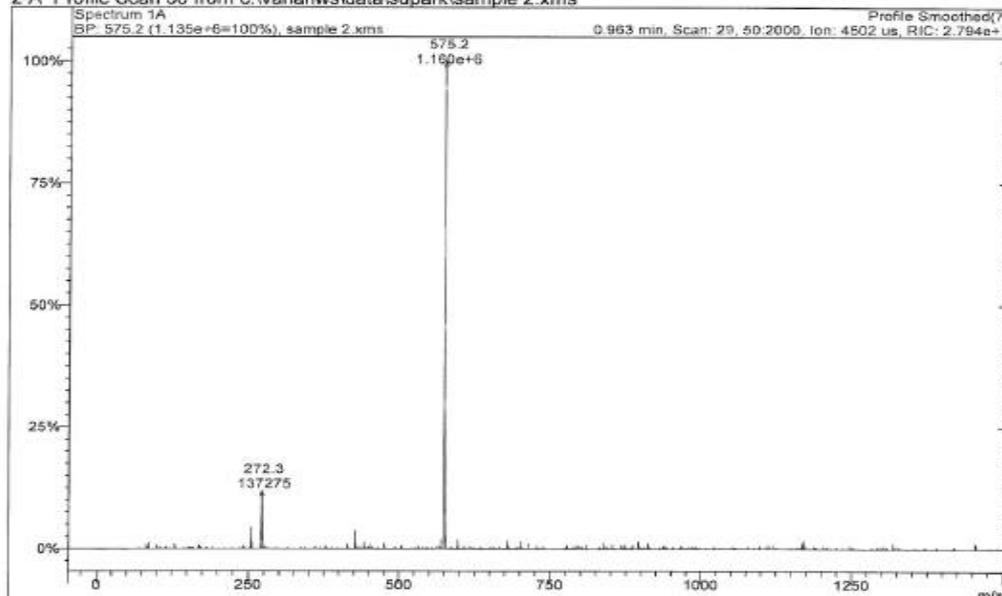


그림 74. 3', 6' -Bis(pinacolatoboron)fluoran, PF1 Mass 스펙트럼

(2) 7-(Pinacolato)boro hydroxy-coumarin 합성

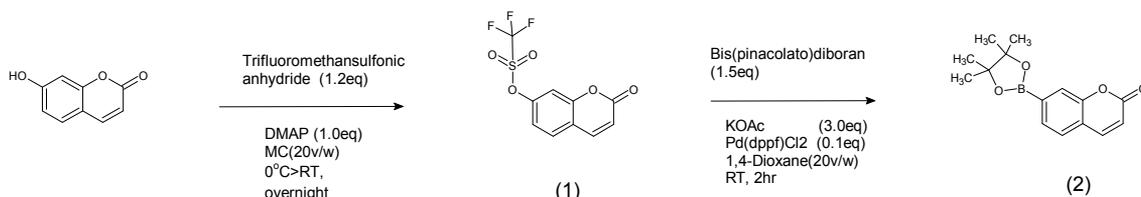


그림 75. 7-(Pinacolato)boro hydroxy-coumarin의 합성 방법과 그 공정도

1) 2-oxo-2H-chromen-7-yltrifluoromethanesulfonate(1)의 합성

25ml 플라스크에 7-OH coumarin 2.0g(12.3mmole, 1.0eqv)을 MC 40ml에 녹인 뒤 Ice bath 에서 냉각 시킨다. DMAP 1.5g(12.3mmole, 1.0eqv)을 투입 하고, 냉각을 유지 하며 TFMS. Anhydride 2.48ml(14.76mmole, 1.2eqv)를 서서히 Dropping 하여 투입한다. 투입 이 모두 끝나면 Ice bath를 제거 하고 RT에서 overnight 반응 시킨다. TLC 확인은 MC:MeOH = 10:1 에서 Rf : 0.9~1.0 혹은 100% MC 에서 Rf : 0.4 로 결과물이 나타난 다 반응이 종결 된 후 반응 MC용액을 sat'd Na₂CO₃ washing 2회, H₂O 1회, Brine 1회 로 세척 한 뒤, MC층을 MgSO₄ 건조, 여과, 농축한다. 농축 잔류물을 1% n-Hex : MC 조 건에서 Column chromatography 한다. 회수된 Product를 Ether / n-Hexane 으로 재농 축하여 결정화 시킨다. 회수 된 결과물(1)은 3.35 g (92.7%, yellowish solid) 이다.

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): δ 7.74(d, 2H), 7.61(d, 1H), 7.31~7.24(m, 2H), 6.51(d, 1H).

2) 7-(Pinacolato)boro hydroxy-coumarin(2) 합성

시작물질 ~coumarine(1) 500mg(1.69mmole, 1.0eqv)과 ~diborane 647.3mg(2.55mmole, 1.5eqv), KOAc 500.2mg(5.09mmole, 3.0eqv), Pd(dppf)Cl₂ 124.3mg(0.169mmole, 0.1eqv)을 100ml 3구 플라스크에 넣고 고진공 pump에서 건조 시킨다. N₂ gas조건에서 1,4-Dioxane 10ml을 주입 하고 미리 100oC로 가온 시킨 Oil bath에서 반응 시킨다. 2시간 반응 후 반응 종결시킨다. TLC 확인은 100%MC 에서 R_f : 0.4 혹은 n-Hex : EA = 2:1 조건에서 R_f : 0.6로 결과물이 관찰 된다

반응이 종결 된 후 반응물을 celite345 padding filter로 여과하고 소량의 MC로 washing 한다. 여과된 반응물을 Rotary Evaporator로 감압 농축 한 뒤 농축된 잔류물을 소량 MC 에 녹인 뒤 H₂O washing 2회 세척 한다. 모든 MC층을 MgSO₄ 건조, 여과, 농축 한다. 농축 잔류물을 n-Hex : EA = 2:1 조건에서 Shot Column chromatography 한다. 회수 된 결과물(2)은 514mg (98%, gray powder) 이다.

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): δ 7.77~7.70(m, 3H), 7.49(d, 1H), 6.47(d, 1H), 6.51(d, 1H), 1.43(s, 12H). LRMS (ESI): m/z = 273.2[M + 1]⁺

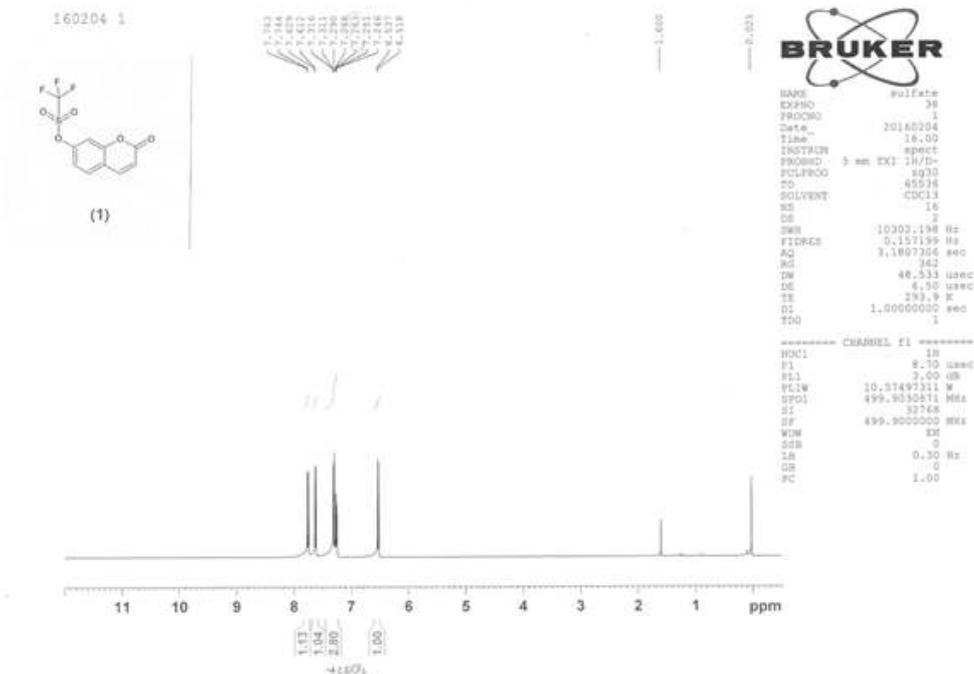


그림 76. 2-oxo-2H-chromen-7-yltrifluoromethanesulfonate의 ¹H-NMR 스펙트럼

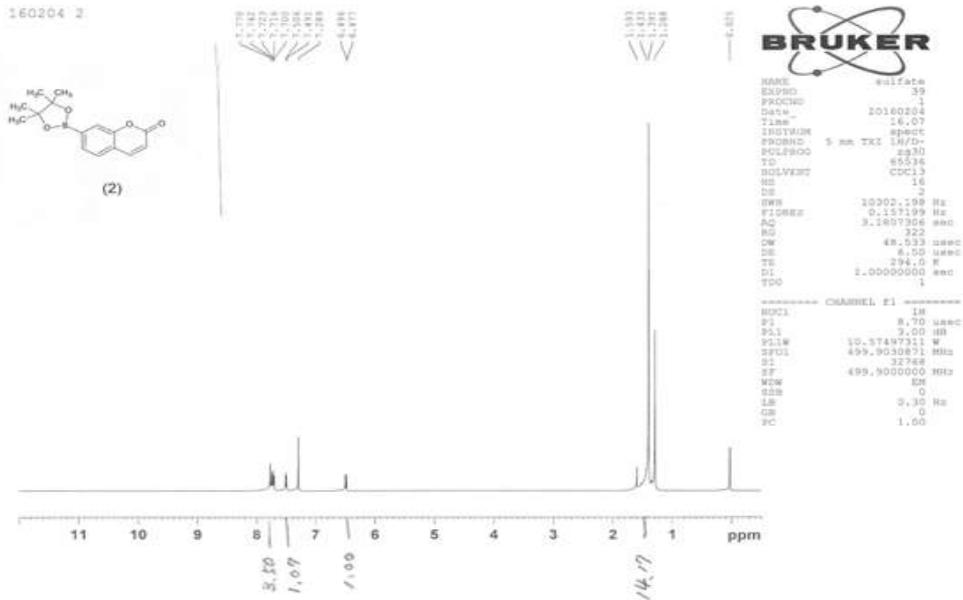


그림 77. 7-(Pinacolato)borohydroxy-coumarin의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼

Print Date: 08 Jun 2016 10:28:34

Spectra Plots - 2016-06-08 오전 10:28

1 A Profile Scan 19 from c:\varianws\data\sdpark\sample 1.xms
 2 A Profile Scan 24 from c:\varianws\data\sdpark\sample 1.xms

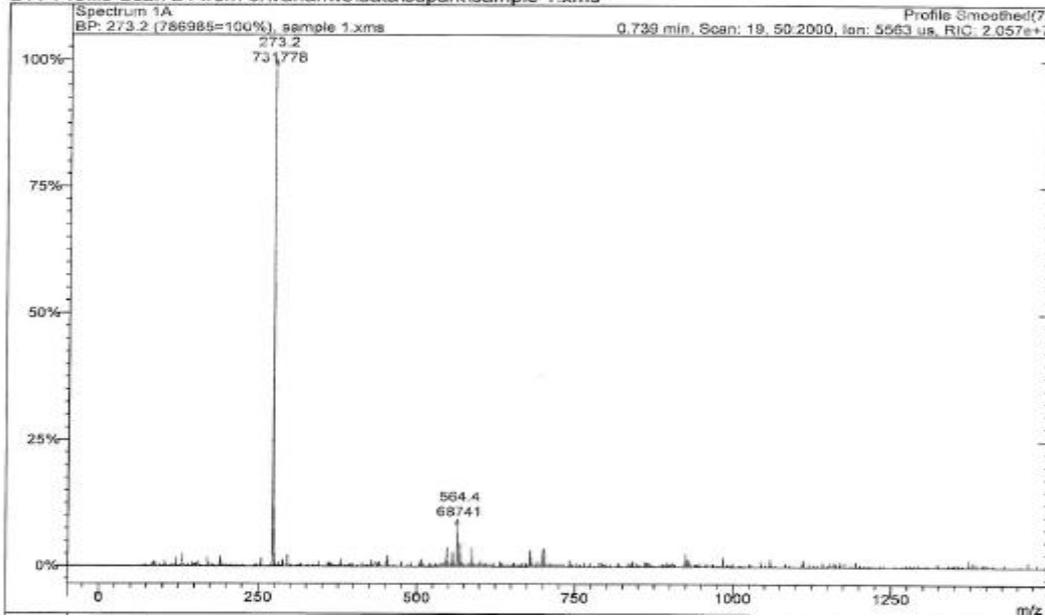


그림 78. 7-(Pinacolato)borohydroxy-coumarin의 Mass 스펙트럼

(3) 과산화수소 감지 발색 및 형광 염료(sensing probe)의 성능 테스트

1) 3',6'-Bis(pinacolatoboron)fluoran(PF1)의 성능테스트

합성한 PF1는 HRP없이 과산화수소에 대해 발색 및 형광 검출이 가능함을 확인하였다. 발색 보다는 형광 검출을 중심으로 과산화수소의 농도에 따른 PF1의 형광 검출 성능 테스트를 수행하였다. 20 mM HEPES (pH 7.0)에서 5 mM PF1와 10 mM 철(Fe(III))을 첨가하고 여기에 다양한 과산화수소 농도(0 to 500 mM)에 대한 형광 검출 정도를 시간별로 테스트하였다. 이때 반응 온도는 37 °C로 SPECTRAMAX Gemini XP, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 30분 간격으로 450nm/510nm (Ex/Em)으로 형광 검출하여 그 성능을 테스트하였다.

그 결과 과산화수소에 대해서도 HRP 없이 형광 검출이 가능하였고 50 mM의 낮은 농도에서도 검출이 가능함을 확인할 수 있었다. 그러나 검출 반응이 느리므로 충분한 시간동안 반응시켜야 함을 확인할 수 있었다.

즉, 3',6'-Bis(pinacolatoboron)fluoran(PF1)는 즉시 과산화수소의 농도를 확인해야 하는 실험 보다는 세포 안이나 동물이나 식물 등의 조직 안에서 in vivo 에서의 과산화수소의 농도를 장기간 감지하는데 더 적합하므로 향후 in vivo 에서의 과산화수소 감지를 위한 테스트를 통해 in vivo 에 적용여부를 추가적으로 확인할 필요가 있으나 개발하고자 하는 신속 검출 키트에는 적용하기 어렵다는 결론을 내렸다.

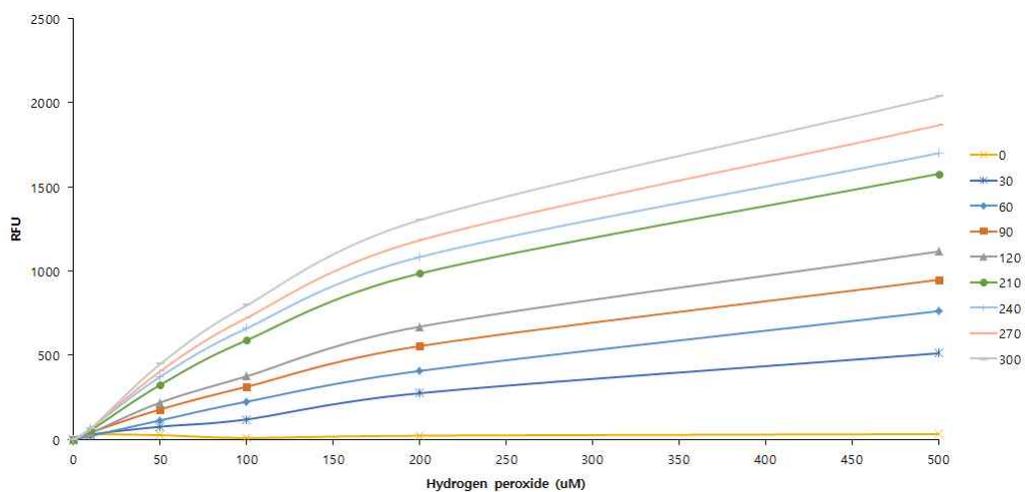


그림 79. 3',6'-Bis(pinacolatoboron)fluoran, PF1 의 H₂O₂의 형광 감지 측정

2) 7-(Pinacolato)boro hydroxy-coumarin(PC)의 성능테스트

합성한 PC는 HRP 없이 과산화수소에 대해 발색 및 형광 검출이 가능함을 확인하였다. 발색 보다는 형광 검출을 중심으로 과산화수소의 농도에 따른 PC의 형광 검출 성능 테스트를 수행하였다. 20 mM HEPES (pH 7.0)에서 5 mM PC를 첨가하고 여기에 다양한 과산화수소 농도(0 to 500 mM)에 대한 형광 검출 정도를 시간별로 테스트하였다. 이때 반응 온도는 37 °C로 SPECTRAMAX Gemini XP, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 30분 간격으로 350nm/450nm (Ex/Em)으로 형광 검출하여 그 성능을 테스트하였다. 그 결과 과산화수소에 대해서도 HRP 없이 형광 검출이 가능하였고 PF1보다는 보다 낮은 과산화수소 농도인 5-50 mM의 낮은 농도에서도 검출이 가능함을 확인할 수 있었다. 그러나 검출 반응은 PF1과 비슷하게 느린 반응 결과를 보여주었다. 7-(Pinacolato)boro hydroxy-coumarin(PC)는 역시 과산화수소의 농도를 확인해야 하는 실험 보다는 세포 안이나 동물이나 식물 등의 조직 안에서 *in vivo* 에서의 과산화수소의 농도를 장기간 감지하는데 적합한 발색 및 형광 염료로 판단되며, 향후 *in vivo* 에서의 과산화수소 감지를 위한 테스트를 통해 *in vivo* 에 적용여부를 추가적으로 확인할 필요가 있으나 개발하고자 하는 신속 검출 키트에는 적용하기 어렵다는 결론을 내렸다.

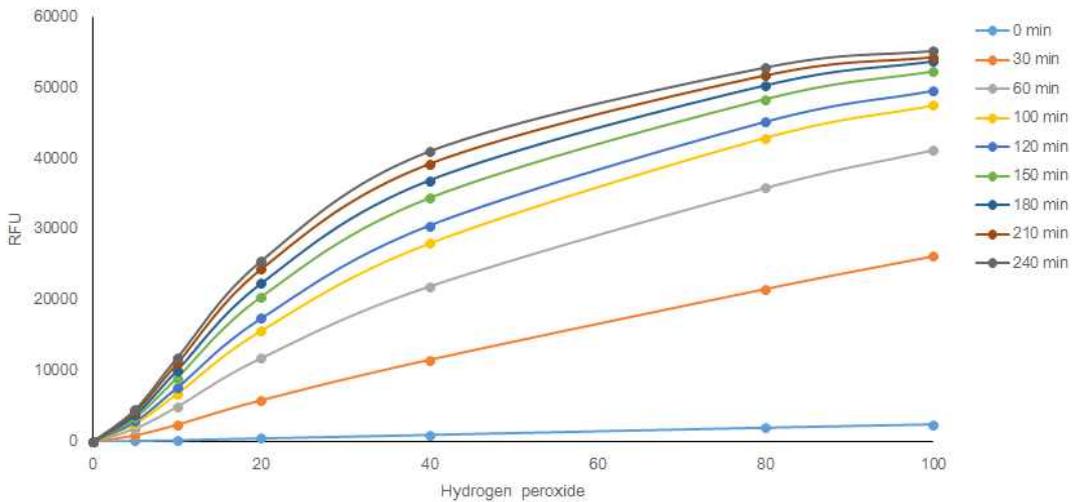


그림 80. 7-(Pinacolato)boro hydroxy-coumarin, PC 의 H₂O₂의 형광 감지 측정

○ 연구수행 성과

- 논문게재 성과

본 과제는 바이오제닉 아민 산화 및 수산화효소의 재조합 기술을 이용한 효소의 제조 공정을 확립하는 과제로 이와 관련된 과제 수행을 통해 SCI 저널인 J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 에 “Engineering of Escherichia coli for the synthesis of N-hydroxycinnamoyl tryptamine and serotonin”을 게재하였다. 이외에 히스타민 검출 키트에 사용되는 효소의 안정화를 위한 효소 안정화 기술에 대한 논문을 한국식품위생안전성학회에 논문을 1편 기고하였다.

- 특허성과

본 과제는 바이오제닉 아민 산화 및 수산화효소를 이용한 히스타민 신속 검출 키트의 개발 과제로 이와 관련된 특허로 “바이오제닉 아민 수산화 효소와 히스타민 산화효소의 연속 반응을 이용한 히스타민 검출방법”(특허번호: 제 10-1780736 호)을 특허 출원 등록하였다.

본 과제는 발색 및 형광 염료를 자체적으로 합성 제조 공정을 개발하는 과제로 이와 관련하여 산화수소 생성을 기반으로 하여 미생물인 마이코플라스마 검출 기술로 이와 관련된 특허로 “염료를 이용한 마이코플라스마 검출방법”(특허번호: 제 10-1789787 호)을 특허 출원 등록하였다.

- 제품화 성과

본 과제를 통해 히스타민을 신속 검출할 수 있는 발색 검출 키트와 형광 검출 할 수 있는 형광 키트를 각각 개발하여 이를 제품화하였다.

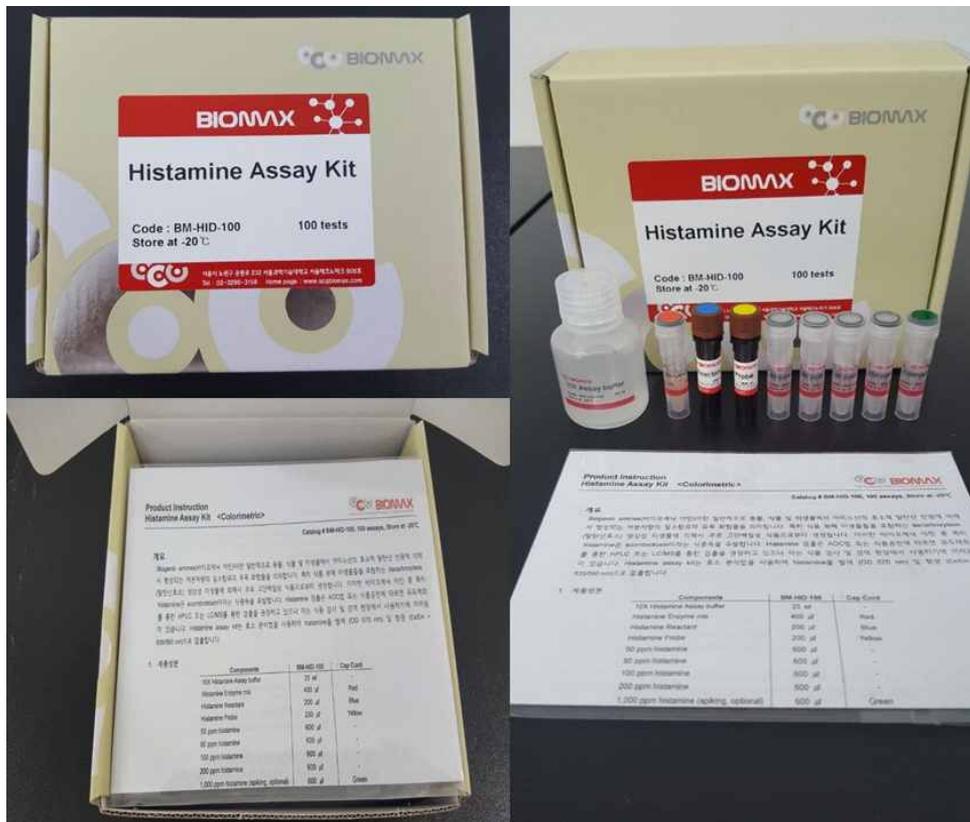


그림 81. 히스타민 발색 검출을 위한 DAOS 염료를 이용한 Histamine assay kit 제품 사진

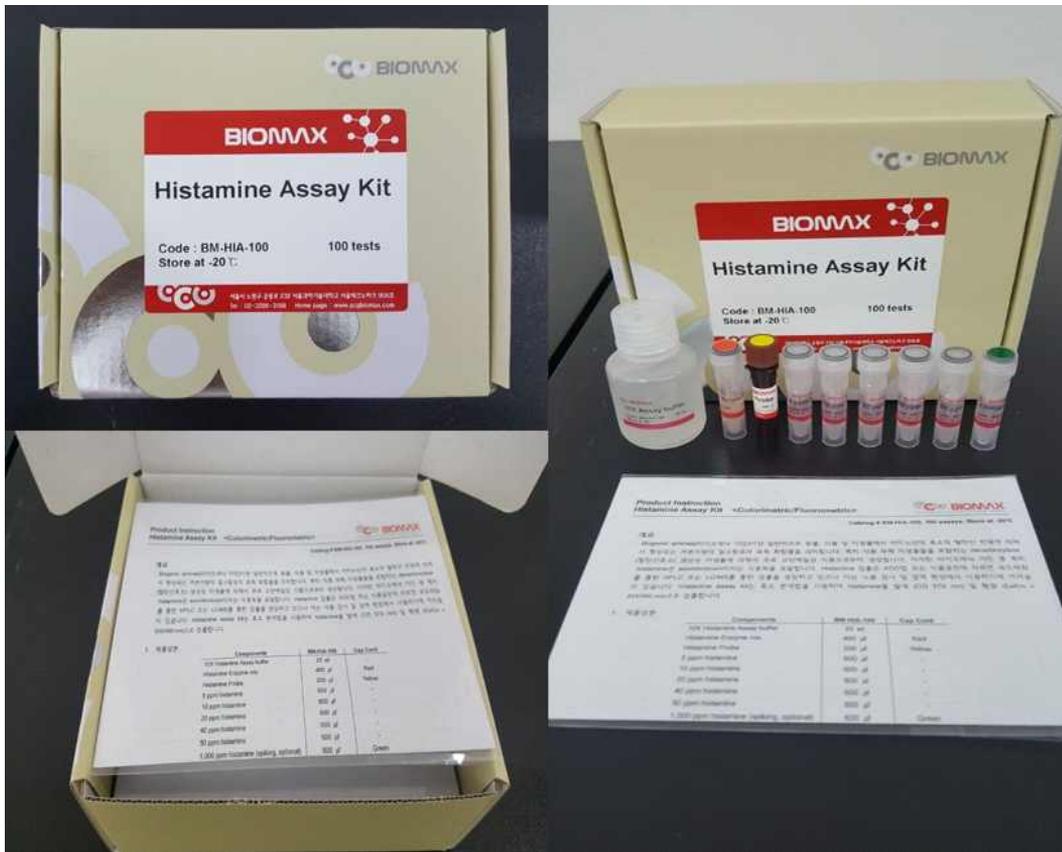


그림 82. 히스타민 형광 검출을 위한 Amplex red 염료를 이용한 Histamine assay kit 제품 사진

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목		성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.02억원
			향후 3년간 매출	1억원
		관련제품	개발후 현재까지	0.2억원
			향후 3년간 매출	5억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.1% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : 0.5%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 1% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 15% 국외 : 2%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		5위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		3위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	5년			
	소요예산(백만원)	200			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.2	5	20	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	1	15	30
국외		0	2	5	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	히스타민 검출 키트 이외에도 미생물 및 세포 대사체 검출 키트 현재 함께 개발하여 10여개의 키트를 개발하 였으며 향후 계속 대사체 관련 키트를 30여개까지 확대 늘려갈 계획임.			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0.2	5	30	
	수 출	0	1	10	

○ 연구 결과

- 기술적 성과

효소 재조합기술을 이용한 히스타민 신속 검출 키트를 위한 히스타민 산화효소와 티라민 수산화효소를 자체적으로 제조할 수 있는 기술을 개발하였으며 또한 신속 검출 키트 구성을 위한 효소 안정화 기술을 개발하여 히스타민 신속 검출 키트의 제품화에 성공하였다. 또한, 발색 및 형광 염료를 자체적으로 합성 제조 공정을 확립하므로 히스타민 신속 검출 키트 이외에도 콜레스테롤을 비롯한 다양한 대사체를 검출 할 수 있는 Metabolite assay kit를 제품화하는데 큰 기술적인 성과를 이루었다. 이러한 재조합 단백질 제조 기술 및 발색 및 형광 염료 제조 기술을 기반으로 SCI 논문 1편과 학술발표대회 2건 등의 학술적인 성과를 도출할 수 있었으며 특히 2건을 등록하는 지적재산권을 확보하는 성과를 도출할 수 있었다. 현재 수입 판매되고 있는 히스타민 검출 키트는 항체 기반의 Neogen 사의 Maxsignal histamine ELISA test kit의 경우 spike 테스트를 통해 참치 성분 에 의한 높은 선택도를 보이지만 민감도와 정확도가 상당히 제한된다는 사실이 밝혀지며 Bioscientific사의 Maxsignal histamine enzymatic assay kit는 높은 선택도와 정확도를 보여주었지만 spike 테스트에서 참치 성분에 의해서 효소 활성에 영향을 받는 사실이 밝혀졌다. 이에 비해 개발된 DAOS를 이용한 발색 검출의 Histamine assay kit(BM-HID-100)는 Bioscientific사의 Maxsignal histamine enzymatic assay kit에 비해 약간 낮은 선택도를 보여주었지만 높은 정확도를 보여주었으며 Amplex red를 이용한 형광 검출의 Histamine assay kit(BM-HIA-100)의 경우에는 보다 높은 정확도와 안정된 선택도와 민감도를 보여주었다.

- 경제적 성과

효소 재조합기술을 이용한 히스타민 신속 검출 키트를 위한 히스타민 산화효소와 티라민 수산화효소를 자체적으로 제조하고 또한, 발색 및 형광 염료를 자체적으로 합성 제조하므로 주요한 성분들을 모두 수입에 의존하지 않고 자체적으로 제조 생산하므로 이에 대한 수입대체 효과의 성과를 도출하였다. 발색 및 형광 염료의 자체 합성 기술 및 제조 공정의 확보를 통해 아이센스, 인포피아 등의 신속 검출 관련 회사에 기존 수입 염료를 대신 제공할 계획이다. 또한 관련 다른 신속 검출

키트를 개발하기 위한 제조 공정을 갖추었으므로 관련 다른 산업을 위한 원재료로 제공이 가능하므로 관련 산업에 대한 경제적인 성과가 기대된다. 국내 최초로 히스타민 검출 키트를 개발하여 이를 서울 경제 신문을 통해 홍보하였으며 본 과제 지원을 통해 연구원 1명을 채용하여 식품안전을 위한 연구 개발 인력을 양성할 수 있었다. 향후 제품화에 따른 제조 생산을 위한 전문 제조 생산 인력을 채용할 계획이며 사업화 및 해외 수출에 따라 인력을 추가적으로 채용할 계획이다. 현재 Histamine assay kit는 제품화 초기 단계라서 판매 매출이 크지 않으나 향후 다른 metabolite assay kit와 함께 홍보 전시 등의 적극적인 마케팅을 통해 제품 개발 3년 이후에는 국내 시장 점유율을 15%로 해외 시장 점유율을 2%로 차츰 넓혀갈 계획이다. 새로운 제품 출시에 따른 매출액 증대가 기대되며 향후 관련 제품과 함께 5년 내에 30억 이상의 매출이 기대된다.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

4-1. 목표달성도

○ 최종목표

- 제조합 기술을 이용한 히스타민 산화효소(HO)의 제조 및 생산 기술 확보
- 제조합 기술을 이용한 티라민 수산화효소(TβH)의 제조 및 생산 기술 확보
- 히스타민 신속 검출 키트의 최적화 및 제품화
- 히스타민 신속 검출 키트의 제품화를 위한 고감도 발색 및 형광 염료의 합성
- 히스타민 신속 검출 키트의 맞춤형 발색 및 형광 염료 개발

○ 연도별 성과 목표, 개발 내용 및 개발 범위, 성과 목표별 가중치와 달성도

- 연도별 성과 목표와 개발내용 및 개발 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2015)	신속 간편 히스타민 검출 키트 개발	히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 클로닝	<i>Arthrobacter gloformis</i> 로 부터 HO의 핵산 서열을 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 유전자원의 확보 · 확보된 염기 서열을 확인한 후에 대장균 발현 벡터인 pGEX 5X-3에 클로닝	HO의 유전자원을 확보하였음. 대장균 발현 벡터로 클로닝 수행함.
		히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 제조 생산	클로닝 과정으로 얻은 GST Fusion construct를 BL21(DE3) competent cell에 transformation하여 single colony를 얻은 후 배양하여 HO의 발현을 유도함. HO의 발현과 정제 정도 그리고 활성을 확인하고 제조 단위의 scale-up을 통해 HO를 대량 생산하여 확보함.	클로닝한 HO의 발현을 확인하였음. HO의 정제도 90%로 150mg 확보하였음.

		히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 활성 테스트	HO의 활성에 영향을 pH, 염이온, 온도 등에 대한 외부 인자에 대한 영향을 조사함. Histamine을 비롯해서 다양한 바이오제닉 아민과 아미노산 등 10 여종에 대해 HO의 기질 특이성 조사함. Histamine 의 농도(0.1-200 ppm)에 따른 HO의 기질 민감도를 조사함. HO의 농도에 따른 활성을 조사함.	pH=8.0에서 37 °C에서 buffer 농도는 10mM에서 안정적인 활성을 보여주었음. EDTA와 CyDTA 그리고 Methanol이 미치는 영향을 조사하였음. 기질특이성을 조사한 결과, 히스타민, 페닐에틸아민, 티라민, 도파민 순의 기질 특이성을 확인하였음. Histamine의 농도에 따른 HO의 민감도 테스트에서 형광염료의 경우에는 0.05 ppm까지 측정이 가능함을 확인하였음. HO의 농도에 따른 활성을 조사하였음.	
		히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)에 대한 발색 및 형광 염료의 최적화	신속 검출을 위한 고감도 발색과 형광 염료의 최적의 농도를 조사함. 신속 검출을 위한 HRP의 최적 농도 등을 조사함.	HO에 대한 고감도 발색 과 형광염료의 최적의 농도를 조사하였음. HRP의 최적 농도를 참치 시료 내의 히스타민에 대해서 조사하였음.	
		신속 간편 히스타민 검출을 위한 염료 개발	히스타민 신속 검출 키트를 위한 고감도 발색 염료의 합성	고감도 발색 염료 합성 및 최적화 고감도 발색 염료 합성 공정 구축	2g의 고감도 발색 염료를 자체적으로 합성하였고 그 공정을 최적화하였음.
			히스타민 신속 검출 키트를 위한 형광 염료의 합성	형광 염료 합성 및 최적화 형광 합성 공정 구축	1.5g의 형광 염료를 자체적으로 합성하였고 그 공정을 최적화하였음.
2차년도 (2016)	신속 간편 히스타민 검출 키트 개발	티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 클로닝	human cDNA를 template로 하여 PCR을 이용하여 증폭하여 그 유전자원을 확보함. 확보된 염기 서열을 확인한 후에 대장균 발현 벡터인 pGEX 5X-3에 클로닝을 수행함.	human cDNA를 template로 시도하였으나 발현 활성의 문제로 C. elegans cDNA를 tepmplate로 하여 유전자원을 확보함. 대장균 발현 벡터로 클로닝 수행함.	
		티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 제조 생산	클로닝 과정으로 얻은 GST Fusion construct를 BL21(DE3) competent cell에 transformation하여 single colony를 얻은 후	다양한 발현 시스템을 이용하여 최적의 발현 조건을 조사한 결과, pTf16을 BL21(DE3) codon plus	

		<p>배양하여 TβH의 발현을 유도함.</p> <p>TβH의 발현과 정제 정도 그리고 활성을 확인하고 제조 단위의 scale-up을 통해 HO를 대량 생산하여 확보함.</p> <p>TβH의 정제도 90% 되도록 100mg이상 확보</p>	<p>competent cell를 이용하여 발현을 확인했음.</p> <p>활성을 확인하였으나 발현율이 매우 낮음.</p> <p>TβH의 발현율이 매우 낮아 1mg이하로 확보함</p>
	<p>티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 활성 테스트</p>	<p>TβH의 활성에 영향을 주는 pH, 염이온, 온도 등에 대한 외부 인자에 대한 영향을 조사함.</p> <p>TβH의 농도에 따른 활성을 조사함.</p>	<p>0.1 M sodium acetate(pH 5.0)에 0.5 ug DBH, 2 uM CuSO₄, 10 mM fumarate, 4 mM sodium ascorbate, 100 ppm tyramine, 650 unit catalase에서 가장 안정적인 활성을 보여주었음.</p> <p>TβH의 농도에 따른 활성을 조사하였음.</p>
	<p>티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 전처리 후 히스타민 산화(HO)로 구성된 히스타민 신속 검출 키트의 최적화</p>	<p>두 가지 효소의 연속 처리에 따른 히스타민의 신속 검출을 위한 최적의 조건을 조사함.</p>	<p>두 가지 효소의 연속 반응(double enzyme reaction)을 통한 최적의 조건 하에서 참치시료에 대한 히스타민 검출을 조사하였음.</p>
	<p>히스타민 신속 검출 키트의 제품화</p>	<p>개발된 히스타민 신속 검출 키트와 기존 제품과의 민감도, 선택도 정확도에 대해 기존 제품 제품과 비교 테스트를 수행함.</p> <p>히스타민 신속 검출 키트의 시제품 개발하여 현장 평가</p>	<p>개발된 히스타민 신속 검출 키트와 민감도, 선택도, 정확도에 대해 기존 제품과의 비교 테스트를 수행하였음.</p> <p>히스타민 발색 검출 키트와 형광 검출 키트를 각각 시제품을 개발하여 이에 대한 성능 테스트를 수행하였음.</p>
<p>신속 간편 히스타민 검출을 위한 염료 개발</p>	<p>새로운 맞춤형 염료의 합성</p>	<p>과산화효소(HRP)가 필요 없는 새로운 맞춤형 염료의 합성(1g 이상 확보).</p> <p>맞춤형 염료의 합성 공정 구축</p>	<p>1g의 맞춤형 염료 2가지 새로운 맞춤형 염료를 자체적으로 합성하였고 그 공정을 최적화하였음.</p>

- 개발 목표와 성과 목표별 가중치와 달성도

연구 개발 목표	가중치	달성도(%)	연구 결과
히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 클로닝	5	100	히스타민 산화효소의 plasmide 확보
히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 제조 생산	5	100	히스타민 산화효소 분리 정제 및 제조 생산 공정 구축
히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 활성 테스트	10	100	히스타민 산화 효소의 효소 활성 테스트
히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)에 대한 발색 및 형광 염료의 최적화	10	100	발색 및 형광 염료를 이용한 히스타민 산화효소의 히스타민 검출을 위한 반응 최적화 완료
히스타민 신속 검출 키트를 위한 고감도 발색 염료의 합성 (제1협동 (주)두젠바이오)	10	100	발색 염료로 DAOS의 자체 합성 및 제조 공정 구축
히스타민 신속 검출 키트를 위한 형광 염료의 합성	10	100	형광 염료로 Amplex red의 자체 합성 및 제조 공정 구축
티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 클로닝 (제1위탁 건국대)	5	100	티라민 수산화효소의 plasmide 확보
티라민 수산화효소(tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 제조 생산 (제1위탁 건국대)	5	100	티라민 수산화효소 분리 정제 및 제조 생산 공정 구축
티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 활성 테스트 (제1세부 (주)바이오맥스)	10	100	티라민 수산화 효소의 효소 활성 테스트
티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 전처리 후 히스타민 산화(HO)로 구성된 히스타민 신속 검출 키트의 최적화	5	100	발색 및 형광 염료를 이용한 티라민 수산화효소와 히스타민 산화 효소의 히스타민 검출을 위한 반응 최적화를 수행함
새로운 맞춤형 염료의 합성	5	100	HRP없이 과산화수소를 검출 할 수 있는 새로운 형광 염료의 합성
히스타민 신속 검출 키트의 제품화	20	100	발색 또는 형광으로 히스타민을 신속 검출할 수 있는 histamine assay kit를 제품화함
합계	100	-	100

4-2. 관련분야 기여도

- 재조합 기술을 이용한 히스타민 산화효소(HO)의 제조 및 생산 기술 확보를 통해 히스타민 산화효소를 원재료로 상용화된 바가 없었으나 이를 국내 최초로 상용화하여 히스타민 산화효소를 상용화하였음.
- 재조합 기술을 이용한 티라민 수산화효소(TβH)의 제조 및 생산 기술 확보의 경우 티라민 수산화효소의 낮은 발현율로 인해 상용화에는 실패하였으나 최초로 대장균 내에서 발현 연구를 통해 관련 연구에 활용할 수 있는 제조 및 생산 기술을 확보하였음. 특히 티라민 수산화효소는 최근 많은 연구가 진행되는 신경세포 관련된 주요한 효소로써 이를 위한 연구를 위한 주요 기술이 될 수 있을 것으로 기대됨.
- 히스타민 신속 검출 키트의 최적화 및 제품화를 통해 발색 및 형광 염료를 이용하여 각각의 히스타민 신속 검출 키트를 제품화하였음. 이는 국내 최초의 제품화로 현재 수입에만 의존했던 관련 키트의 산업 현장에서 보다 쉽게

이용할 수 있는 기회를 보다 많이 제공할 것으로 기대됨. 또한, 히스타민 신속 검출 키트 이외에도 관련 제품으로 다양한 대사체 검출 키트를 함께 제품화함으로써 해서 관련 제품과 함께 국내외 매출 증대가 기대됨.

- 히스타민 신속 검출 키트의 제품화를 위한 고감도 발색 및 형광 염료의 합성 기술 및 제조 공정 확보를 통해 수입에 의존하던 염료를 자체 생산하므로 수입대체 효과가 기대되며 관련 염료를 활용한 다양한 검출 키트의 연구 및 제조 생산 시도를 통해 관련 연구 및 산업화의 성과 도출에 큰 도움이 될 것으로 기대됨.
- 히스타민 신속 검출 키트의 맞춤형 발색 및 형광 염료 개발을 통해 새로운 염료를 합성할 수 있는 원천 기술 확보를 위한 중요한 기초를 확립할 수 있었으며 고감도 형광 염료 등의 향후 연구 개발을 통한 성과 도출이 기대됨.

5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<p>○ 추가 연구의 필요성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 본 과제에서 대장균 재조합 기술을 이용하여 인간 유전자원인 티라민 수산화효소의 제조를 다양한 방법으로 시도하였으나 상용화 수준의 제조 공정을 확립하지 못하였음. 따라서 티라민 수산화효소의 제조 공정을 위해서 대장균이 아닌 효모와 같은 진핵세포를 이용한 제조 공정을 위한 연구 필요함. - HRP 없이 과산화수소를 발색 또는 형광으로 검출할 수 있는 신속 검출 맞춤형 염료를 개발하였으나 신속 검출 키트로 사용하기에 느린 반응 속도로 인해 이를 개선하기 위한 추가 연구가 필요함. 개선 연구를 통해 검출 소요 시간을 단축할 수 있는 제품 개선 연구를 수행할 계획임. - 히스타민 산화효소의 안정성을 보다 높이는 연구를 통하여 신속 검출을 위한 연구로의 활용을 위한 추가 연구가 필요함. <p>○ 타 연구에의 응용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 효소 제조 공정을 위한 재조합 기술을 응용 확대하여 히스타민 이외에도 다양한 대사체에 대한 발색 및 형광 검출을 위한 산화 효소에 적용하므로 미생물 및 세포 그리고 식품 내에 존재하는 특정 바이오파로써의 대사체의 신속 검출 기술에 응용할 계획임. - 발색 및 형광 염료의 자체 합성 기술 및 제조 기술을 기반으로 새로운 염료 개발을 위한 추가적인 연구를 진행 중이며 현재 세포 대사의 주요한 바이오파를 고감도로 검출할 수 있는 새로운 형광 염료를 연구 중에 있음. - 본 과제를 통해 개발된 효소의 안정화 기술을 통해 효소 기반의 신속 검출 키트 및 기술을 위한 연구에 적용하여 보다 안정적인 신속 검출 키트 개발에 응용할 계획임. <p>○ 기업화 추진 방안</p> <ul style="list-style-type: none"> - 개발된 히스타민 발색 검출 키트와 히스타민 형광 검출 키트의 제품화를 통해 현재 매출을 기록하고 있으며 향후 동시에 개발된 다양한 Metabolite assay kit와 함께 홍보 전시를 통해 사업화를 추진 중에 있음. - 발색 및 형광 염료의 자체 합성 기술 및 제조 공정의 확보를 통해 아이센스, 인포피아 등의 신속 검출 관련 회사에 기존 수입 염료를 대신해서 제공할 계획임. 		

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<p>○ 바이오제닉 아민의 신속 추출 및 고감도 검출을 위한 새로운 방법 개발</p> <p>생선으로부터 바이오제닉 아민을 효율적이고 민감도 높은 검출을 위해 신속 추출 및 유도체화 방법을 개발하여 HPLC와 질량 분석법을 기반으로 하여 다중 반응 모니터링 (MRM)과 결합하여 바이오제닉 아민 검출을 위한 새로운 검출 방법을 개발하였음. 5-sulfosalicylic acid를 이용하여 추출 효율을 향상시켰으며 Benzoyl chloride 유도체화를 통해 보다 짧은 반응 시간으로 안전한 바이오제닉 아민 유도체를 얻는 방법을 개발하였다. MRM 검출 모드와 결합함으로써, 바이오제닉 아민을 보다 높은 검출 감도로 검출이 가능하도록 개발하였다. 이 새로운 방법으로 검출 한계와 정량 한계는 더 낮은 pg/mL 수준까지 검출이 가능하도록 개발하였다.</p>		

○ 과민성 알레르기 치료법의 개발

Mast cell은 백혈구 중의 한 종류로, 신체 조직 속에 위치하고 있으며, 히스타민을 분출하거나 혹은 생리 과립제를 포함한 염증 반응을 일으킴으로써 외부 자극에 의한 감염에 저항하는 역할을 한다. 하지만 알레르기를 일으키는 세포인 ‘allergen’ 또한 생리 과립제를 분출하도록 하기 때문에, 위와 같은 반응이 몸 전체를 걸쳐 동시에 일어나면, 호흡 불안, 혈압 감소, 실신 등의 문제를 일으키곤 한다. 이러한 질병을 ‘과민성 알레르기 반응’이라고 부른다. 현재로서는, 이러한 질병에 대한 치료법이 없어, 알레르기 반응을 경감하는 약물을 주사하는 방법뿐이다. allergen이 면역 글로불린 항체에 묶여 mast cell과 함께 활성화되는 경우에, 분출된 생리 과립제는 세포 주변부로 미세소관을 통해 이동하는데, 이 점에 착안한 프랑스의 CNRS팀(Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, Universite Paris Diderot 소속)은 미세소관에서 단백질을 이동시키는 모터 역할을 하는 ‘kinesin-1’을 정밀 분석함으로써 이 질병에 대한 해결책을 찾았다. 연구진들은 흰쥐 실험을 통해, kinesin-1이 결여된 생쥐에게서 과민성 알레르기 반응이 적게 나타나는 것을 발견하였는데 미세소관의 모터 역할을 하는 단백질이 없기 때문에, 이들 생쥐에서는 생리 과립제가 더 이상 주변부로 전달되지 않아, 과민성 알레르기 반응이 상대적으로 덜 일어난다는 사실을 밝혔다. 이를 통해 연구진들은 mast cell 자극 실험을 통해, phosphatidylinositol 3-kinase 엔자임을 통한 신호가 kinesin-1의 생리 과립제 콤플렉스의 이동을 촉진한다는 것을 추가적으로 밝혀냈다. 이를 통해 인공적인 요법을 이용하여 ‘kinesin-1’의 양을 조절한다면, 과민한 알레르기 반응을 보이는 환자들에게 새로운 치료법을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 연구 개발 결과의 보안 등급 해당 없음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>○ 안전점검 아래와 같은 사항을 수행하였음.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 연구 활동 종사자에 대하여 일상점검을 실시하였음. - 전문 업체 위탁하여 실험실 정기 안전 검사를 실시하였음(정기점검 범위: 연구실 일반관리 / 산업 위생 분야 / 전기 분야 / 소방분야 / 화학약품 분야). <p>○ 정밀안전진단을 위해 아래 같은 사항을 수행하였음.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 실험실 정밀 안전진단을 실시하였음(1회/1년, 정밀안전진단 분야: 일반안전관리 / 산업위생 / 전기안전 / 소방안전 / 화공안전 / 가스안전 / 기계안전 / 생물안전) 		

- 안전교육을 아래와 같은 사항으로 수행하였음.
 - EHS 팀 주관으로 실험실 안전교육 실시하였음(전반기 6시간, 후반기 6시간).
 - 연구실 안전정보망 홈페이지 (<http://www.labs.or.kr/>) 통한 온라인 안전교육 실시하였음.
- 상해보험 및 건강보험에 가입하여 아래와 같은 사항으로 수행하였음.
 - 회사 예산을 배정하여 모든 직원을 대상으로 상해 보험 가입하였음.
 - 연구활동 종사자를 대상으로 EHS팀 주관으로 건강검진 시행하였음(1회/1년).
- 기타 수행 내용
 - 위험물 저장 및 위험한 시약을 취급 시 긴급 상황을 대비한 샤워기 및 세안기를 설치하였음.
 - 가연성, 독성가스를 사용 시 긴급 상황을 대비하기 위해 가스 누설 경보기 설치하였음.
 - 안전보호구의 위생적 보관 및 관리를 위한 안전보호구함 제작하였음.

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Engineering of Escherichia coli for the synthesis of N-hydroxy-cinnamoyl tryptamine and serotonin	건국대 학교	교신저 자	J. Ind. Microbiol. Biotechnol. /	2.624	2017.8.17	중복사사	SCI
2	특허	바이오제닉 아민 수산화 효소와 히스타민 산화효소의 연속 반응을 이용한 히스타민 검출방법	(주) 바 이 오맥스		대한민국		2017.6.16	단독사사	
3	특허	염료를 이용한 마이코플라즈마 검출방법	(주) 바 이 오맥스		대한민국		2017.10.18	단독사사	
4	학술 대회 발표	A rapid colorimetric and fluorometric determination of histamine in food by histamine oxidase	(주) 바 이 오맥스		한국응용생 명화학회 정기학술대 회		2016.6.17	단독사사	

5	학술 대회 발표	A New Colorimetric Method for Detection of Histamine using Histamine Oxidase and Tyramine β -hydroxylase	(주) 바 이 오맥스	한국미생물 공학회 정기학술대 회	2017.6.29	단독사사	
---	----------------	---	----------------	----------------------------	-----------	------	--

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당 없음.		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14		
<p>○ Zhai H., Yang X., Li L., Xia G., Cen J., Huang H. and Hao S. 2012. Biogenic amines in commercial fish and fish products sold in southern china. <i>Food Control</i> 25:303-308.</p> <p>○ Zarei M., Najafzadeh H., Enayati A. and Pashmforoush M. 2011. Biogenic amines content of canned tuna fish marketed in Iran. <i>AmericanEurasian Journal Toxicology Scienc.</i> 3: 190-193.</p> <p>○ Mohamed R., Livia S.S., Hassan S., Soher E.S. and Ahmed-Adel E.B. 2009.Changesinfreeamino acids and biogenic amines of Egypt- ian saltedfermented fish (Feseekh) during ripening and storage. <i>Food Chemistry.</i> 115: 635-638.</p> <p>○ Rahimi E., Nayebpour F. and Alian F. 2012. Determination of histamine in canned tuna fish using ELISA method. <i>American Eurasian Journal Toxicology Science.</i> 4(2):64-66.</p> <p>○ Food and Drug Administration. 2001. Scombrototoxin (histamine) formation. In: <i>Fish and fisheries products hazards and controls guidance.</i> Center for Food Safety and applied Nutrition, Office of Seafood, Food and Drug and Administration, Washington, DC, pp 83-102.</p> <p>○ Marino M.M., Maifreni S.M. and Rondinini G. 2000. The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. <i>Letter Applied Microbiology.</i> 31:169-173.</p> <p>○ Bonetta S.E., Carraro J.D., Coisson F. and Arlorio M. 2008. Detection of biogenic amine amines producer bacteria in atypical Italian goat cheese. <i>Journal food Protection.</i> 71 (1): 205-209.</p> <p>○ Rodriguez S.N., Nogues Sagues M.T.V., Mesa A.J.T. and Carou M.C.V. 2002. Influence of starter and non starter on the formation of biogenic amine in goat-cheese during ripening. <i>Journal Dairy Science.</i> 85 (10): 2471-2478.</p> <p>○ Sarikadi L. 2004. Histamine in food. In: <i>Biology and medical aspect.</i> Spring-Medicine Publishing Budapest, Hungary.</p> <p>○ Stratton J. E., Hutkins, R.W. and Taylor S. L. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods – a review. <i>Journal of Food Protection</i> 54: 460-470.</p> <p>○ Ehsani, A., Mahmoudi, R., Khodayari, M. and Zare, P. 2012. Histamine Levels in 3 Types of Iranian Cheese by Ion-Exchange Chromatography. <i>Walailak Journal Scienc</i> Technolgy. 9(3): 281-285.</p> <p>○ Food and Agriculture Organization. 2004. Application of risk assessment In the fish industry. <i>FAO Fisheries Technical Paper 442.</i>Rome: Corporate Document Repository, Fisheries and Aquaculture</p>				

Department.

- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R. and Suzzi, G. 2012. Biogenic amines in raw and processed seafood. *Frontiers in microbiology*, 3: 1-10.
- Bulushi, I.A., Poole, S., Deeth, H.C. and Dykes, G.A. 2009. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation e a review. *Critical Review Food Science Nutrition*. 49:369-377.
- Food and Drug Administration. 2011. *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*, 4th Edn. Washington, DC: Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Kamkar, A., Hosseini, H. and Abuhossein, G. 2003. A study of histamine contents of canned tuna and products sardine of Iran. *Pajouhesh Sazandegi*. 60:44-50.
- Mahmoudi, R. and Norian R. 2014. Occurrence of histamine in canned tuna fish from Iran. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 9 (1):133-136.
- Hosseini, H., Keshavarz, S.A., Pirali, P., Khaksar, R., Abasi, M. and Fekri, M. 2007. Study of histamine content in canned tuna fish produced in Iran by ELISA method. *International Journal Food Science Technology*. 4(2):78-84.
- Onal, A. 2007. A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in food. *Food Chemistry*.103: 1475-1486.
- Csomos, E. and Simon-Sarkadi, L. 2002. Characterisation of tokaj wines based on free amino acids and biogenic amines using Ion exchange chromatography. *Chromatography*. 56: 185-188.
- Watanabe, S., Matsuo, K., Suzuki, Y., Tachibana M., Tani K. and Koizumi, H. 2007. Determination of histamine in fish sauce by photometric flow injection analysis with immobilized histamine oxidase reactor. *Bunseki Kagaku* 56: 1033-1036.
- Kose, S., Koral S., Kaklikkaya, N., Buruk, C.K., Tufan, B. and Aydin, F. 2009. Investigating suitability of commercial histamine test kits for monitoring histamine in traditional fish products. Presented at IFT Conference, Aquatic Food Products Division, 5-10 June 2009, Anaheim, CA.
- Arena, M.E., Landete, J.M., Manca, de Nadra, M.C., Pardo, I. and Ferrer, S. 2008. Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* X1B isolated from wine. *Journal Applied Microbiology*. 105:158-165.
- Mahmoudi, R. 2014. Effects of *Allium ascalonicum* essential oil on histamine formation in feta cheese. *Academia Journal of Food Research*. 2(1): 001-006.
- Mah, J.H. and Hwang, H.J. 2009a. Effects of food additives on biogenic amine formation in MyeolchiJeot, a salted and fermented anchovy (*Engraulis japonicus*). *Food Chemistry*. 114: 168-173.
- Mah, J.H. Hwang, H.J. 2009b. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosum* as a protective culture. *Food Control*. 20: 796-801.
- Phuvasate, S., Su, Y.C. 2010. Effects of electrolyzed oxidizing water and ice treatments on reducing histamine-producing bacteria on fish skin and food contact surface. *Food Control*. 21: 286-291.
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P. and Meerdink, G. 2010. Control of biogenic amines in food -existing and emerging approaches. *Journal Food Science*. 75: 139-150.

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 바이오제닉 아민 산화 및 수산화 효소를 이용한 히스타민 신속 검출 키트 개발 (영문) Development of histamine rapid detection kits using biogenic amine oxidase and hydroxylase					
주관연구기관	(주)바이오맥스		주 관 연 구	(소속) (주)바이오맥스		
참 여 기 업	(주)두젠바이오		책 임 자	(성명) 권 찬호		
총연구개발비 (373,340 천원)	계	373,340	총 연 구 기 간	2015.10.23 ~ 2017.10.22. (2년)		
	정부출연 연구개발비	280,000	총 참 여	총 인 원	9	
	기업부담금	93,340	연 구 원 수	내부인원		9
	연구기관부담금	-		외부인원		-

○ 연구개발 목표 및 성과

본 연구 개발의 목표는 수산물 및 식품의 생산, 제조 및 유통 과정에서 자연 발생하는 유해물질로서 바이오제닉 아민 중에서 현재 식품공전 등으로 규제하고 있는 히스타민을 신속 검출 할 수 있는 효소 기반의 현장형 검출 키트를 개발임. 연구 개발을 통하여 1) 재조합기술을 이용하여 히스타민 신속 검출을 위한 산화 효소와 수산화 효소를 제조 방법을 개발하였고 2) 화학적 합성 기술을 이용하여 히스타민 신속 검출을 위해 적합한 고감도의 발색 및 형광 염료 제조 방법을 개발하였고 3) 개발된 효소와 염료를 이용하여 현장에서 수산물 및 식품으로부터 유해물질로서 히스타민을 신속, 정확하게 검출 및 정량 분석이 가능한 신속 검출 키트 개발하여 제품화함.

○ 연구내용 및 결과

바이오제닉 아민 산화효소와 수산화효소를 비롯하여 검출키트를 위한 발색 또는 형광 염료를 자체적으로 제조할 수 있는 재조합 기술 및 합성 기술을 개발하였음. 이를 기반으로 히스타민을 신속 간편 검출 할 수 있는 검출 키트를 개발하기 위해 산화효소와 수산화효소의 활성을 조사하여 다양한 조건에서 효소 활성을 조사하여 히스타민을 신속 검출하기 위한 반응 조건을 최적화하였음. 이러한 최적화를 기반으로 참치 캔과 양념된 참치캔 시료로부터 히스타민을 신속 검출 할 수 있는 발색 검출 키트와 형광 검출 키트를 개발하여 Neogen 사의 Maxsignal histamine ELISA test kit와 Bioscientific 사의 Maxsignal histamine enzymatic assay kit와의 히스타민 검출에 대한 성능 비교테스트를 통해 높은 정확도와 민감도를 가진 발색과 형광 검출이 가능한 Histamine assay kit를 각각 제품화하였음.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

효소 제조 공정을 위한 재조합 기술을 응용 확대하여 히스타민 이외에도 다양한 대사체에 대한 발색 및 형광 검출을 위한 산화 효소에 적용하므로 미생물 및 세포 그리고 식품 내에 존재하는 특정 바이오마커로써의 대사체의 신속 검출 기술에 응용할 계획임. 발색 및 형광 염료의 자체 합성 기술 및 제조 기술을 기반으로 새로운 염료 개발을 위한 추가적인 연구를 진행 중이며 현재 세포 대사의 주요한 바이오마커를 고감도로 검출할 수 있는 새로운 형광 염료를 연구 중에 있음. 본 과제를 통해 개발된 효소의 안정화 기술을 통해 효소 기반의 신속 검출 키트 및 기술을 위한 연구에 적용하여 보다 안정적인 신속 검출 키트 개발에 응용할 계획임. 개발된 히스타민 발색 검출 키트와 히스타민 형광 검출 키트의 제품화를 통해 현재 매출을 기록하고 있으며 향후 동시에 개발된 다양한 Metabolite assay kit와 함께 홍보 전시를 통해 사업화를 추진 중에 있음. 발색 및 형광 염료의 자체 합성 기술 및 제조 공정의 확보를 통해 아이센스, 인포피아 등의 신속 검출 관련 회사에 기존 수입 염료를 대신해서 제공할 계획임.

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	115013-2	
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야	식품안전			과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	바이오제닉 아민 산화 및 수산화 효소를 이용한 히스타민 신속 검출 키트 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	(주)바이오맥스			연구책임자	권찬호
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2015.10.23.~2016.10.22.	140,000	46,670	186,670
	2차년도	2016.10.23.~2017.10.22.	140,000	46,670	186,670
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계	2015.10.23.~2017.10.22.	280,000	93,340	373,340
참여기업	(주)두젠바이오				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2017. 11. 22.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)바이오맥스	연구소장	권찬호

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약



I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제를 통해 국내 최초로 히스타민 검출 키트를 제품화하였고 특히, 검출 키트의 주요한 구성 성분인 히스타민 산화효소, 발색 및 형광 염료 등을 자체적으로 제조할 수 있도록 생산 제조 공정을 확립하였다는 점에서 연구개발 결과가 우수하다고 판단됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제를 통해 히스타민 산화효소, 티라민 수산화효소의 효소를 자체적으로 제조 생산할 수 있는 기술을 연구 개발함으로써 식품안전과 관련된 효소의 재조합 단백질 제조 기술을 확립하였음. 이를 통해 향후 히스타민 이외에 다양한 식품위생관련 미생물 대사체를 목표로 검출할 수 있는 기술로 확대할 계획임. 또한, 발색 및 형광 염료의 자체 제조 생산 기술을 확보함으로써 관련 기술의 제품화 시에 가격 및 기술 경쟁력을 갖추므로 국산화뿐만 아니라 역수출을 통한 수출 증대 효과도 기대됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제를 통해 확보한 히스타민 산화효소, 티라민 수산화효소와 발색염료인 DAOS와 형광염료인 Amplex Red의 제조 기술을 통해 히스타민 검출 키트의 제품화에 적용하여 상품화하였고 이를 바탕으로 향후 다양한 식품안전위해인자에 대해 신속 검출 키트 개발을 위해 활용할 계획임. 곰팡이독소의 다중 신속 검출을 위한 효소 확보 중에 있음

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제에 있어서 가장 어려웠던 부분은 티라민 수산화효소의 클로닝과 제조 생산이었음. 티라민 수산화효소는 human의 효소를 E. coli에서 발현시키기 위해 다양한 vector에 넣어 발현 및 활성을 가진 효소를 얻기 위해 많은 노력을 기울였고 pKJE7/BL21(DE3) competent cell을 이용하여 발현 및 정제를 통해 재조합 효소를 확보할 수 있었음

5. 공개 발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제를 통해 SCI 논문 1편과 학술대회 발표 2건 그리고 특허 출원 2건 등의 연구개발성과를 이루었음. 특히 특허 출원한 2건 모두 특허 등록되었고 이 중 과제 기여도가 높은 “바이오제닉 아민 수산화효소와 히스타민 산화 효소의 연속 반응을 이용한 히스타민 검출 방법”은 기술 이전 성과를 얻을 수 있었음

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 클로닝	5	100	히스타민 산화효소의 plasmide 확보
히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 제조 생산	5	100	히스타민 산화효소 분리 정제 및 제조 생산 공정 구축
히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 활성 테스트	10	100	히스타민 산화 효소의 효소 활성 테스트
히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)에 대한 발색 및 형광 염료의 최적화	10	100	발색 및 형광 염료를 이용한 히스타민 산화효소의 히스타민 검출을 위한 반응 최적화 완료
히스타민 신속 검출 키트를 위한 고감도 발색 염료의 합성 (제1협동(주)두젠바이오)	10	100	발색 염료로 DAOS의 자체 합성 및 제조 공정 구축
히스타민 신속 검출 키트를 위한 형광 염료의 합성	10	100	형광 염료로 Amplex red의 자체 합성 및 제조 공정 구축
티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TbH)의 클로닝 (제1위탁 건국대)	5	100	티라민 수산화효소의 plasmide 확보
티라민 수산화효소(tyramine beta-hydroxylase; TbH)의 제조 생산 (제1위탁 건국대)	5	100	티라민 수산화효소 분리 정제 및 제조 생산 공정 구축
티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TbH)의 활성 테스트 (제1세부(주)바이오맥스)	10	100	티라민 수산화 효소의 효소 활성 테스트
티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TbH)의 전처리 후 히스타민 산화(HO)로 구성된 히스타민 신속 검출 키트의 최적화	5	100	발색 및 형광 염료를 이용한 티라민 수산화효소와 히스타민 산화 효소의 히스타민 검출을 위한 반응 최적화를 수행함
새로운 맞춤형 염료의 합성	5	100	HRP없이 과산화수소를 검출 할 수 있는 새로운 형광 염료의 합성
히스타민 신속 검출 키트의 제품화	20	100	발색 또는 형광으로 히스타민을 신속 검출할 수 있는 histamine assay kit를 제품화함
합계	100점	-	-

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 과제는 바이오제닉 아민 중의 히스타민을 신속 검출 할 수 있는 히스타민 검출 키트의 개발에 관한 것으로 이를 위해서 1)히스타민 산화효소의 제조 기술을 재조합 기술로 개발하고 2)신속검출 키트의 제품화를 위해 발색 및 형광 염료의 제조 기술을 합성 기술로 개발하고 3)티라민 수산화효소의 제조 기술을 재조합 기술로 개발하고 4)HRP 없이 과산화수소의 검출이 가능한 새로운 염료를 개발하는 연구 과제로 본 과제 기간 동안 상기 4가지 기술을 연구 개발하였고 이를 통해 논문 1편, 특허 2건, 학술대회 발표 2건, 기술이전 1건 등의 연구개발성과를 공개 발표하였음. 또한, 히스타민 검출 키트의 제품화를 통해 제품 매출을 올릴 수 있었으며 향후 전시 홍보 및 마케팅을 통해 매출 증대를 기대하고 있음.

2. 평가 시 고려할 사항 또는 요구사항

본 과제에서 1)재조합 기술로 제조하고자 하였던 티라민 수산화효소의 경우, 뇌 신호전달과 관련된 주요 효소인 도파민 수산화효소와 같은 효소로써 진핵세포에서도 매우 낮은 발현을 나타내는 것으로 조사되었음. 상용화를 위해 대장균에서 재조합 단백질로 발현시키기 위해서 chaperon 단백질 시스템을 도입하는 등 티라민 수산화효소의 제조 생산을 위해 많은 노력을 기울였으나 낮은 발현으로 인해 상용화의 어려움이 있었음. 2)티라민 수산화효소와 히스타민 산화효소의 두 가지 효소의 연속 효소 반응을 통해 히스타민의 산화효소의 티라민에 대한 선택도를 낮추고자 하였으나 티라민 수산화효소의 반응을 위해 첨가되는 ascorbate와 fumarate 등이 히스타민 산화효소의 발색 및 형광 반응에 영향을 크게 주므로 히스타민 산화효소만을 이용하여 제품화하였음. 상용화된 타사 제품과의 비교테스트 결과, 제품의 민감도와 선택도에 대해서 타사 제품들도 낮은 민감도와 히스타민 이외의 바이오제닉 아민이 존재할 때 낮은 선택도를 갖는 등의 문제점이 발견되었으며 개발된 시제품 테스트를 통해 히스타민 산화효소만을 이용한 히스타민 검출 키트도 충분히 제품화가 가능한 것으로 판단되어 제품화하였음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 과제를 통해 확보한 기술인 1)히스타민 산화 효소와 2)발색 및 형광 염료 제조 기술은 현재 histamine assay kit 의 제품화 시에 활용하고 있으며 발색 및 형광 염료 제조 기술은 향후 히스타민 이외의 다양한 미생물 및 세포 대사체 검출을 위한 신속 검출 키트 개발에 활용할 계획임.

본 과제를 통해 확보하였지만 실제적으로 적용의 문제점을 안고 있는 3)티라민 수산화효소의 제조기술은 티라민 수산화효소의 뇌기능 연구 분야에 중요한 효소이므로 이에 대한 관련 연구를 위해 사용될 수 있도록 발현 및 활성 연구를 지속적으로 연구 개발할 계획임. 4)HRP 없이 검출 가능한 염료의 느린 반응성에 대해서는 새로운 염료 디자인을 통해 반응성을 높이기 위한 연구를 추가적인 연구 진행할 계획임.

현재 바이오맥스에서는 식품안전에 관련된 식품위해요소에 대한 신속 검출 키트를 본 과제를 통해 확보한 효소 재조합 기술과 염료 합성 기술을 바탕으로 확대 적용할 계획으로 현재 곰팡이독소의 신속 검출을 위한 효소와 관련 염료의 개발을 진행 중에 있음.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

1. 연구책임자의 의견

해당없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

해당없음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	고부가가치식품기술개발사업
연구과제명	바이오제닉 아민 산화 및 수산화 효소를 이용한 히스타민 신속 검출 키트 개발			
주관연구기관	(주)바이오맥스		주관연구책임자	권찬호
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	240,000,000원	93,340,000원		373,340,000원
연구개발기간	2015. 10. 23 ~ 2017. 10. 22. (2년)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 클로닝 (제1위탁 건국대)	<i>Arthrobacter gloformis</i> 로부터 HO의 핵산 서열을 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 증폭하여 그 유전자원을 확보하고 염기 서열을 확인한 후에 대장균 발현 벡터인 pGEX 5X-3에 클로닝을 수행함
②히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 제조 생산 (제1위탁 건국대)	클로닝 과정으로 얻은 GST Fusion construct를 BL21(DE3) competent cell에 transformation하여 single colony를 얻은 후 배양하여 HO의 발현시키고 이를 GST 친화컬럼을 이용하여 분리 정제함
③히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 활성 테스트 (제1세부 (주)바이오맥스)	히스타민 산화 효소에 의한 외부 다양한 조건에 따른 과산화수소를 생성을 발색 및 형광 염료의 산화 반응에 따른 발색 및 형광 검출을 최적화함.
④히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)에 대한 발색 및 형광 염료의 최적화 (제1세부 (주)바이오맥스)	최적화된 히스타민 산화효소의 참치 캔에서의 히스타민을 발색 및 형광 검출하여 이를 HPLC 방법과 비교 테스트함
⑤히스타민 신속 검출 키트를 위한 고감도 발색 염료의 합성 (제1협동 (주)두젠바이오)	고감도 발색 염료인 DAOS를 유기 합성법으로 합성하고 이를 NMR과 MS를 통해 검증함
⑥히스타민 신속 검출 키트를 위한 형광 염료의 합성 (제1협동 (주)두젠바이오)	고감도 형광 염료인 Amplex Red를 유기 합성법으로 합성하고 이를 NMR과 MS를 통해 검증함
⑦티라민 수산화효소 (tyramine	human cDNA 로부터 TβH의 핵산 서열을

beta-hydroxylase; TβH)의 클로닝 (제1위탁 건국대)	PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 증폭하여 그 유전자원을 확보하고 염기 서열을 확인한 후에 대장균 발현 벡터인 pGEX 5X-3 등에 클로닝을 수행함
⑧티라민 수산화효소(tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 제조 생산 (제1위탁 건국대)	pKJE7/BL21(DE3) competent cell을 이용한 pET41b TβH의 분리 정제를 수행함
⑨티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 활성화 테스트 (제1세부 (주)바이오맥스)	티라민 수산화 효소에 의한 외부 다양한 조건에 따른 효소활성을 DMPD를 이용하여 효소의 활성화 측정을 수행함
⑩티라민 수산화효소 (tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 전처리 후 히스타민 산화(HO)로 구성된 히스타민 신속 검출 키트의 최적화 (제1세부 (주)바이오맥스)	티라민 수산화 효소에의 효소 반응을 HPLC를 이용하여 조효소 및 다양한 반응 조건에 대해서 Tyramine에서 octopamine으로의 효소반응을 측정하여 효소반응을 최적화함
⑪새로운 맞춤형 염료의 합성 (제1협동 (주)두젠바이오)	과산화수소를 생성을 HRP 없이 발색 및 형광 검출할 수 있는 새로운 염료를 합성하여 발색 및 형광 반응을 테스트하였음
⑫히스타민 신속 검출 키트의 제품화 (제1세부 (주)바이오맥스)	히스타민 신속 검출을 위한 키트의 제품화를 위해 시제품 테스트 중이며 이를 위한 제품의 설명서 등을 만들어 제품화 중에 있음

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학·술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표	정책 활용			홍보 진시		
												SCI	비SCI						논문 평균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	20			10		20	10		10				20			5	5			
최종목표	2			1		2	2		1			1	1			1	1			
연구기간 내 달성실적	2			1		2	2		1			1				-	1			
달성율(%)	100			100		100	100		100			100	-		100	-	100			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	히스타민 산화효소(Histamine oxidase; HO)의 제조 생산 기술
②	히스타민 신속 검출 키트를 위한 고감도 발색 및 형광 염료의 합성 기술
③	티라민 수산화효소(tyramine beta-hydroxylase; TβH)의 제조 생산 기술
④	바이오제닉 아민 산화 및 수산화효소를 이용한 히스타민 검출 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술			√				√			
②의 기술			√				√			
③의 기술		√								
④의 기술	√					√				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	histamine assay kit 제조 생산에 활용할 계획이며 제품화에 따른 매출 증대 효과를 기대됨
②의 기술	histamine assay kit 이외에 다양한 발색 및 형광 염료를 이용한 검출 키트 및 기술에 활용할 계획이며 각 적용 기술의 키트 등의 제품화에 따른 매출 증대 효과를 기대됨
③의 기술	티라민 수산화효소의 제조 기술 확보에 따라 관련 연구에 활용할 계획임
④의 기술	특허 출원 등록을 통해 관련 기술의 지적재산권을 확보하였으므로 관련 기술의 제품화 및 기술 연계 개발을 위한 기술 이전을 실시하였음

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	정책활용			홍보전시		
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					

가중치	20			10		20	10		10				20			5	5	
최종목표	2			1		2	2		1				2			1	1	
연구기간내 달성실적	2			1		2	2		1				2			-	1	
연구완료후 성과창출 계획		2					50										1	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ²⁾	바이오제닉 아민 수산화효소와 히스타민 산화 효소의 연속 반응을 이용한 히스타민 검출 방법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	2,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	5개월	실용화예상시기 ³⁾	2018. 3. 20
기술이전 시 선행조건 ⁴⁾	없음		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.