

최 종
연구보고서

664.07
L2932

GA0056-0985

150

19916633

식품산업에서의 바이오센서 시스템 활용기술 개발 연구

Development of Novel Biosensor Systems for
Food Industry

연구기관

한국식품개발연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식품산업에서의 바이오센서 시스템 활용기술 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998 . 12 . 20 .

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 김 남 수

연 구 원 : 박 인 선

연 구 원 : V. Volotovskiy

연 구 원 : 김 동 정

연 구 원 : 강 은 미

연 구 원 : 지 수 정

연 구 원 : 남 영 중

연 구 원 : 김 동 수

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 조 성 효

협동연구기관명 : 서울여자대학교

협동연구책임자 : 노 봉 수

협동연구기관명 : 신구대학

협동연구책임자 : 최 부 들

요 약 문

I. 제 목

식품산업에서의 바이오센서 시스템 활용기술 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구의 목적은 식품산업에서의 신속계측에 활용가능한 첨단 바이오센서 시스템을 개발하고 이를 통하여 미래식품산업의 기반기술을 제공하는 것이다. 이러한 연구목적을 달성하기 위하여 본 연구개발에서는 어육 및 축육에 대한 신속한 선도계측과 관리를 위한 바이오센서 시스템, 과일성숙도의 신속계측을 위한 바이오센서 시스템, 식품의 품질관리 및 공정을 위한 Multi-biosensor를 개발하고 개발된 바이오센서 시스템의 컴퓨터 접속시스템을 개발하고 개발된 기술의 활용 및 보급을 위한 workshop을 개최하였다.

본 연구의 중요성을 고찰해 보면 다음과 같다. 바이오센서는 식품산업에 유용한 첨단 계측장비 중의 하나이나 국내에서는 지금까지 이 분야에 대한 인식부족으로 관련된 연구개발 및 활용이 미흡한 실정이었으나 바이오센서 개발 시의 필요한 기술사항인 센서용 생물요소 선별, 생물요소 고정화기술, 전극 및 센서 제조기술, 센서성능 최적화기술, 센서의 간편화 및 자동화기술은 우리나라의 과학발전수준을 고려해 볼 때 3~5년 정도의 집중연구 시 세계적 수준에 이를 수 있을 것으로 판단되므로 연구개발의 가시적 성과가 기대되었고 또한 일본, 미국 등에서 개발되었거나 개발 중인 바이오센서 시스템도 여전히 개선의 여지가 있고 전극 및 센서 제조기술 등의 핵심기술은 특허권의 형태

로 보호하거나 비공개화하여 외부에 잘 노출시키지 않아 외국기술 활용은 한계가 있으므로 식품산업에 적용가능한 바이오센서 시스템의 연구개발이 요구되어 왔다.

효소, 미생물, 동·식물조직, receptor 등 생물요소의 특이반응성을 활용하므로 선택적이고 아울러 작동이 간편하며 시료전처리를 생략할 수 있는 장점이 있어 자동화공정에 손쉽게 응용가능한 바이오센서 시스템에 의한 계측을 식품산업에 적용할 수 있는 분야로서는 어육 및 축육의 선도 관리, 과실의 성숙도 평가, 식품 및 식품원료의 저장성 평가, 식품가공 후의 유통관리, 식품공정 조절, 식품가공 폐기물의 환경영향 평가, 인체 감각의 객관화 등이 있을 수 있으나 국내 식품산업 발전과 농어민 소득증대, 수입식품에 대한 소비자보호 측면에서 우선적으로 연구필요성이 제기되는 분야로는 어육 및 축육의 선도관리 센서, UR과 관련하여 국제경쟁력이 있는 국내산 과실의 품질최적화와 수확적기 판정에 사용될 수 있는 과실성숙도 센서, 식품의 품질관리 및 공정센서 개발을 들 수 있다. 수·축산물의 품질은 그 선도에 의하여 가장 크게 좌우되므로 선도분석은 현대도 어육의 품질평가에 있어서 중요한 항목 중의 하나이나 trimethylamine (TMA)과 같은 휘발성염기질소 (volatile basic nitrogen, VBN)를 측정하는 기존의 방법은 전처리가 번거롭고 2~3시간의 분석시간이 소요되는 문제점이 있으므로 선도 측정시간을 수십분이 내로 단축가능하고 현장 품질평가에도 활용가능한 바이오센서를 개발하였고, 과실의 성숙도판정을 선택 등에 대한 경험적 판단에 주로 의존하고 있어 수확적기를 놓치거나 과속에 의한 낙과 등의 문제점이 발생하는 국내의 현실을 고려하여 과실성숙도 센서를 개발하였으며 다양한 형태의 제품이 다양한 공정에 의하여 생산되고 있는 식품산업의 주요한 특징을 고려하여 식품산업에서의 공정관리에 응용가능한 바이오센서 시스템을 개발하였다.

이를 통하여 연간 20조원에 해당하는 국내식품산업의 매출액 및 순이익 증대, UR과 관련한 농어민의 소득보호 및 증대에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대되며 어육 및 축육과 생식용 혹은 가공용 과실의 품질최적화를 통한 부가가치 증대와 각종 식품공정의 자동화, 무인화를 통한 최종제품의 품질최적화와 이에 수반되는 국내 식품산업의 국제경

쟁력 제고가 예상된다. 사회·문화적으로는 고도경제성장에 따른 국민소득 증가에 따라 식품 및 식품원료에 대한 건전성 확보가 국민의 주된 관심사 중의 하나가 되었으며 또한 수입식품 및 어육·축육 등의 식품원료에 대한 손쉽고 과학적인 검사방법 개발과 이의 활용을 통하여 저질의 외국산 물품의 수입을 예방할 수 있는 검색 시스템 정립도 시급하게 요구되고 있다. 따라서, 이러한 목적으로 사용이 간편하고 현장성이 뛰어난 계측 시스템인 바이오센서 시스템의 개발 필요성은 점증하고 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 어육 및 축육 선도의 신속·정확한 계측과 관리를 위한 바이오센서 시스템 개발

가. 어육 및 축육의 초기 선도지표 계측용 바이오센서 제조

- 1) 선도지표 유효성 확인 (ATP 분해산물, 휘발성 염기물질, polyamines 등)
- 2) ATP 분해산물 계측용 바이오센서 제조

나. 후기 선도지표 계측용 바이오센서 제조 및 센서의 특성구명과 성능최적화

- 1) TMA, biogenic amine류 계측용 바이오센서 개발
- 2) 개발된 센서 시스템의 기본성질 및 buffer계 측정조건 확립
- 3) 센서성능 최적화와 다전극효소센서 개발

다. 센서의 다양화, 실제적용 및 실용화를 위한 workshop 개최

- 1) 센서의 다양화 (계측재현성 증진)
- 2) 센서계측용의 간편한 시료처리 방법 정립
- 3) PC화·된 센서시스템의 실제적용 (시판 또는 수입되는 어육 및 축육의 선도분석)

4) 기존방법 (HPLC 등)에 의한 분석치와 비교

5) 개발된 시스템을 활용한 workshop 개최

2. 과실성숙도의 신속계측을 위한 바이오센서 시스템 개발

가. 사과즙 중의 당류 계측용 바이오센서 제조

1) 성숙도와 당류 변화량간의 상관성 조사

2) 당류 분석용 센서 개발

나. 사과즙 중의 아미노산 계측용 바이오센서 제조

1) 성숙도와 아미노산 함량 변화간의 상관성 조사

2) GLU(혹은 ASP), ASN 분석용 센서 개발

다. 사과 및 배에 대한 성숙도 측정시스템 개발

1) 성숙도에 따른 당변화 분석

2) 성숙도에 따른 GLU (혹은 ASP), ASN의 변화 분석

3) 당류 및 아미노산의 성숙에 따른 pattern화

4) 사과 및 배의 성숙도 계측시스템 개발

5) 개발된 시스템을 활용한 workshop 개최

3. 식품의 품질관리 및 공정을 위한 Multi-biosensor의 개발

가. Dual cathode 전극을 이용한 두 가지 성분 분석

1) Dual cathode 산소전극 제조

- 2) Dual cathode 시스템방법의 관계식 정립
- 3) 식혜 제조 중의 성분변화 분석

나. 식품제조 공정 중의 두 가지 성분의 동시 분석

- 1) Dual cathode 산소전극에 의한 두가지 성분 동시 측정 및 전기회로 확립
- 2) 식품제조 중의 성분변화 측정

다. 세 가지 이상 성분의 동시 분석 및 공정 최적화와 workshop 개최

- 1) Multi-cathode 산소전극 제조
- 2) 농산가공음료 중의 유기산 및 당류 동시 측정
- 3) Multi-biosensor를 이용한 농산가공제품의 분석 및 기존방법과의 비교
- 4) Multi-biosensor의 안정성 조사
- 5) 개발된 시스템을 활용한 workshop 개최

4. 바이오센서의 컴퓨터 접속시스템 개발

가. 개발된 바이오센서에 대한 컴퓨터 접속시스템 구성 및 운영 program 개발

- 1) 컴퓨터 접속시스템 개발
- 2) 센서 시스템의 운영 program 구성

나. 컴퓨터 접속시스템의 식품품질 및 실험실 규모의 가공공정 관리에의 적용

- 1) 바이오센서 시스템의 최적조건 설정을 위한 자동화장치 구성
- 2) 공정자동화에 필요한 software 구성
- 3) 컴퓨터 자동계측 및 제어장치 활용에 관한 workshop 개최

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 어육 및 축육 선도의 신속·정확한 측정과 관리를 위한 바이오센서 시스템 개발

어육 및 축육의 화학적 선도지표로서 본 연구에서 바이오센서 개발의 대상인 ATP 분해산물의 상대적 비율로 표시되는 K_i 값, TMA, polyamines의 함량을 어육 20종을 대상으로 하여 측정한 결과 이들이 어육 및 축육의 초기와 후기 선도지표로서 유효함이 확인되었으므로 이에 근거하여 K_i 값, TMA, polyamines를 신속히 측정할 수 있는 바이오센서를 제조하였다.

Diamine oxidase를 고정화하여 제조한 흐름주입분석 (flow injection analysis, FIA) 형의 biogenic amine 센서는 polyamines 중 putrescine에 대하여 가장 높은 반응 감응도를 나타내었으며 cadaverine과 histamine에 대해서도 비교적 높은 감응도를 보여 주었다. Putrescine 0.4 mM 구간까지 검량곡선을 구할 수 있었으며 바이오센서 반응의 최적 온도는 35°C, 최적 pH는 7.2~7.5 였다. 실제시료 중에 존재하는 ATP 분해산물 농도에서 biogenic amine 센서가 putrescine에 대하여 보여주는 반응 감응도는 putrescine 자체에 대한 감응도와 거의 같은 수준이었으며 0.8%의 식염을 첨가하면 약 20%의 감응도 감소가 나타났고 아미노산 첨가에 의해서도 감응도가 약간 증가하였으나 perchloric acid에 의한 시료처리에 의하여 이의 보정이 가능하였다. 기질인 putrescine과 다른 amines를 함께 첨가하여 제조한 모델 시료를 측정하여 본 결과 putrescine만이 존재할 때의 반응성의 19.5% 범위 내에서 측정이 가능하였다.

Batch형 TMA 센서의 생물요소로는 기질에 대한 응답특성과 배양시간을 고려하여 *Pseudomonas* sp. DSM6342를 선정하였고 이를 고정화하여 제조한 TMA 센서는 반복 측정 시 높은 재현성을 보여주었다. 1.5 mM의 TMA 농도까지 준직선상 (quasi-linear)의 검량선을 얻을 수 있었고 바이오센서 반응의 최적 온도와 pH는 각각 30°C와 7.6 이었다. 인산 완충용액의 mole농도를 바꿔가면서 이온세기의 영향을 살펴 본 결과 0.05 M

에서 반응 감응도가 가장 높았으며 식염과 ATP 분해산물은 센서반응에 거의 영향을 미치지 않았다. TMA 센서는 아미노산에 의하여 저해받았으며 biogenic amines에 의해서도 다소 영향을 받았고 고정화미생물 막은 4°C에서 저장 70일까지 초기 감응도의 70% 이상을 나타내었고 사용가능횟수는 400회 정도였다.

K_i값 측정과 관련된 ATP 분해산물인 hypoxanthine (H_x), inosine (H_xR), IMP를 측정할 수 있는 H_x 센서, H_x/H_xR 센서, H_x/H_xR/IMP 센서를 제조하고 각각의 기질에 대한 응답특성을 검토하였다. 바이오센서 반응의 최적 완충용액과 pH는 H_x 센서, H_x/H_xR 센서, H_x/H_xR/IMP 센서의 경우 각각 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5), 0.05 M 탄산 완충용액 (pH 10.0), 0.05 M Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)이었고 최적 온도는 30~40°C 였다. ATP 분해산물을 측정하는 바이오센서는 식염에 의하여 거의 영향을 받지 않은 반면 glucose, L-glutamic acid와 같은 당류와 아미노산에 의하여 약간의 영향을 받았다.

ATP 분해산물 계측을 위한 흐름주입분석형의 바이오센서 시스템을 제작하기 위하여 먼저 효소 고정화방법에 따른 반응 감응도를 측정한 결과 관능기가 결합된 미세 chitosan beads인 Chitopearl을 담체로 사용했을 때 감응도가 가장 높았으며 그 중 bead 직경이 작은 Chitopearl 2501과 3001을 사용했을 때의 반응성이 가장 우수하였다. Chitopearl 3001을 담체로 하여 H_x 센서, H_x/H_xR 센서, H_x/H_xR/IMP 센서를 제조한 후 단일 및 혼합기질에 대한 반응 감응도를 측정하여 검량선을 작성하였으며 4회 연속 측정한 경우 hypoxanthine, inosine, IMP에 대한 연속형 시스템의 반응감도 저하는 1.3~6.2%에 불과하였다. Hypoxanthine, inosine, IMP를 각각 측정하는 효소 reactor를 직렬로 연결하였을 때 H_x, H_xR, IMP 효소 column의 길이를 15-12-7 cm로 하면 개별 column의 특이반응이 독립적으로 일어나 다른 column에서의 측정에 거의 영향을 미치지 않았으며 이와 같은 일련의 반응을 컴퓨터 접속시스템에 의해 PC상에서 처리할 수 있었다. Hypoxanthine, inosine, IMP의 농도가 서로 다른 모델 시료를 H_x, H_xR, IMP 효소 column의 길이가 15-12-7 cm인 흐름주입분석형 ATP 분해산물 계측용 바이오센서 시스템에 주입한 경우 각 성분의 농도에 5.6% 이하의 오차범위를 보여 매우 정확한 분

석이 가능하였다.

냉장 및 냉동어육 20종의 추출액을 분석한 결과 K_i 값은 7.8~43.6% 범위내에서 측정되어 선도지표로서 유효함이 확인되었고 휘발성염기질소와 TMA 함량 간에는 직선의 상관관계 ($r=0.894$)가 존재하였으며 추출액 중 biogenic amines는 측정되지 않았다. 축육 중의 ATP 분해산물을 측정된 결과 저장온도가 낮고 저장기간이 짧을수록 K_i 값이 낮아졌다. 흐름주입분석형의 바이오센서 시스템 작동 시의 최적 조건 (0.05 M 인산 완충용액, pH 7.5, 30°C, column 길이 15-12-7 cm)에서 어육 중의 ATP 분해산물을 측정된 결과 K_i 값은 26.0~67.6% 범위내에 있었다.

한국식품과학회 분석분과위원회 주관하에 “바이오센서의 원리와 식품산업에서의 응용”이란 제목으로 연구개발 결과의 소개와 활용을 위한 바이오센서 워크샵을 강의와 실습을 겸하여 개최하였으며 참가자들로부터 우수한 평가결과를 얻었다.

2. 과실성숙도의 신속계측을 위한 바이오센서 시스템 개발

과실 중의 유리 당과 유리 아미노산은 성숙과정 중 함량이 변화하므로 몇 가지 성분을 택하여 함량변화의 pattern을 구명하면 이들로부터 성숙도를 객관적으로 예측할 수 있다. 국내산 과실 중 중요한 비중을 차지하는 사과와 배를 시료로 하여 유리 당 중에서 glucose와 sucrose, 유리 아미노산 중 aspartic acid와 asparagine을 신속히 측정할 수 있는 바이오센서를 제조하였다.

Glucose oxidase I unit를 bovine serum albumin, polyvinyl alcohol (PVA)과 함께 cellulose acetate 막상에 고정화하고 이를 과산화수소전극에 장착하여 glucose 센서를 제조하였고 invertase, mutarotase, glucose oxidase의 3 가지 효소를 사용하여 동일한 방법으로 sucrose 센서를 제조한 후 0.1 M 인산 완충용액을 사용하여 검량선을 작성하였다. Aspartate 센서는 nonactin을 PVA 막에 고정화하여 암모늄이온전극을 제조하고

여기에 aspartase를 고정화하여 제조하였으며 0.05 M Tris 완충용액 (pH 7.5)을 사용하여 검량선을 구하였다. Asparagine 센서는 암모늄이온전극에 asparaginase를 결합시켜 제조하였다.

사과 품종 중 *Red fuji*와 *Fuji*를 택하여 수확적기 전후 한달간 일주일 간격으로 시료를 취하여 착즙한 후 바이오센서에 의하여 지표성분인 glucose, sucrose, aspartic acid, asparagine의 함량변화를 측정하였고 그 결과를 HPLC에 의한 분석결과와 비교하였으며 배의 경우에도 영산과 신고 2 품종을 택하여 사과의 경우와 동일하게 착즙하여 시료를 제조하고 바이오센서 및 HPLC에 의한 분석을 수행하였다.

사과즙, 배즙 중의 glucose, sucrose, aspartic acid, asparagine 4 가지 성분의 변화량에 상응하는 각각의 센서에 대한 응답신호를 직접 사용하여 SAS 프로그램으로 주성분분석 (principal component analysis, PCA)을 행하여 성숙도를 예측하였다. 사과 및 배에 있어서 pattern분석에 의한 성숙도 예측결과는 경험적 성숙도와 잘 일치하였으며 다년간의 data를 수집하면 보다 과학적이고 객관적인 성숙도 예측이 가능할 것으로 기대되었다.

3. 식품의 품질관리 및 공정을 위한 Multi-biosensor의 개발

식품산업의 각종 공정에 사용될 수 있는 multi-biosensor를 제조하고 이를 사용하여 농산가공식품 중 지표성분의 함량을 측정하고 그 결과를 HPLC, GC 등에 의한 분석결과와 비교하였다.

먼저 한 개의 anode와 두 개의 cathodes로 구성된 dual cathode 산소전극을 제작하였는데 두 cathode 전극간의 전류와 산소분압과의 상관관계는 0.998로 나타났다. β -Galactosidase, mutarotase, glucose oxidase를 asymmetric coupling하여 lactose와 glucose를 동시에 측정할 수 있는 dual cathode 시스템을 제작하였다. 이 시스템의 최적

pH는 6.5~7.5로 수용성 효소의 최적 pH인 5.1보다 높았다. 실제시료 중의 lactose 함량을 정확하게 측정할 수 있는 보정식을 사용하여 가당우유 중의 lactose와 glucose의 동시 측정을 수행하였다. Amyloglucosidase, glucose oxidase를 nylon net에 고정화하여 maltose와 glucose를 동시에 측정할 수 있는 dual cathode 시스템을 제작하였는데 이 시스템의 최적 온도는 35°C, 최적 pH는 5.5 였고 이당류 중 sucrose와 mannose가 바이오센서의 감응도에 약간 영향을 미쳤다. Maltose 측정 시 포도당에 대한 보정을 행한 후 식혜에서의 maltose와 glucose의 동시 측정을 행하였으며 UV-비색법에 의한 측정결과와 비교한 결과 좋은 상관관계를 얻을 수 있었다. Ethanol/glucose dual cathode 시스템의 최적 온도는 35°C, 최적 pH는 7.5로 나타났고 이 시스템을 사용하여 탁주에서의 ethanol과 glucose의 동시 측정을 수행하였으며 분석결과를 UV-비색법과 GC에 의한 분석결과와 비교하였을 때 높은 상관관계 ($r=0.94$)가 나타났다. 한편 초산을 측정하는 미생물센서를 *Trichosporon brassicae*와 산소전극을 생물요소와 변환기로 사용하여 제조하였는데 그 최적 pH는 2~3으로 나타났다.

한 개의 anode와 6 개의 cathodes로 구성된 multi-biosensor를 3 가지 물질을 동시 분석할 수 있는 효소들을 asymmetric coupling에 의하여 고정화하여 제작하고 개별 전극의 응답 pattern을 비교하였다. Glucose/pyruvic acid/ethanol 동시 측정을 위한 triple cathode 시스템의 최적 온도는 35°C로 나타났고 최적 pH는 7.0이었다. 아울러 이온세기 및 lactic acid, succinic acid와 같은 유사구조물질의 영향을 검토하였고 thiamine pyrophosphate 첨가에 의하여 효소센서의 감응도가 증가함을 확인하였다. Triple cathode 시스템에 의한 포도당 측정 시에도 유기산에 의한 영향이 관찰되어 이를 보정하였으며 이로부터 addition 방법에 의하여 모델 시료 중의 glucose, pyruvic acid, ethanol에 대한 동시측정을 수행하고 GC, 분광광도법에 의한 측정결과와 비교하였는데 상관계수가 각각 0.983, 0.954로 나타났다. 이 때 효소센서의 안정성을 살펴 보면 pyruvic acid 센서는 30일 경과 후 초기 감응도의 84%가 유지된 반면 ethanol 센서는 안정성이 비교적 낮았다. Maltose, glucose, fructose를 동시에 측정할 수 있는 triple

cathode 시스템을 제작하고 찹쌀 식혜 및 뭉쌀 식혜 중의 당 분석을 행하여 식혜의 제조공정을 최적화하였다.

4. 바이오센서의 컴퓨터 접속시스템 개발

본 연구에서 바이오센서의 전극으로 이용된 산소전극과 과산화수소전극에서 얻어지는 측정신호를 컴퓨터에 입력하기 위한 접속시스템을 증폭장치, 증폭 및 multiplexer, PC-Lab card, 컴퓨터를 사용하여 구성하였고 구성된 접속장치의 운영을 위하여 Advantech사의 Genie 3.0 program을 source program으로 활용하여 신호의 측정 및 저장, 공정제어와 자료분석을 행하였다. 이를 통하여 바이오센서에서 얻어지는 수 nA의 미세신호가 증폭기를 거쳐 0~5 V의 신호로 전환된 후 1초마다 컴퓨터에 입력 저장되었다. 그 후 산소전극의 안정성 확인과 바이오센서에 의한 계측을 Immobilon cellulose nitrate 막에 고정화된 xanthine oxidase를 사용하여 hypoxanthine의 농도를 PC상에서 측정하여 행하였다. 과산화수소전극의 안정성 확인 및 계측실험도 이와 동일한 방법으로 수행하였다.

개발된 바이오센서 시스템을 공정제어에 활용하고자 glucose 센서를 이용한 포도당 생산공정의 계측제어를 다음과 같이 행하였다. 즉, 옥수수 전분을 호화시킨 후 α -amylase와 glucoamylase를 작용시켜 액화, 당화시키는 일련의 반응을 행하는 반응조를 제작하고 micropump를 작동하여 반응조로부터 일정한 시료가 측정조에 유입되도록 하였다. 이 때 buffer tank에 부착된 solenoid valve가 작동하여 일정 시간마다 0.1 M 인산 완충용액 (pH 7.0)이 일정하게 측정조로 흘러 들어 glucose 센서에 의해 일정 시간 측정이 실행되어 그 값이 컴퓨터에 입력 저장되게 하였다. 측정이 끝난 측정조의 용액은 측정조에 부착된 solenoid valve가 열려 흘러 버리고 난 후 다시 완충용액이 자동으로 흘러 내려 남은 용액을 씻어내게 하였다. 이와같은 과정을 자동적으로 행할 수 있는 장치

를 설계·제작하였다.

본 연구개발 결과 얻어진 어육 및 축육의 선도센서, 과실의 성숙도센서, 식품의 품질 및 공정관련 센서는 성능최적화, PC 시스템화가 이루어졌고 개발기술 보급을 위한 workshop이 개최된 바 있다. 관련기술은 향후 중소기업 등에 전수되어 기업화도 가능할 것으로 사료되며 아울러 연구결과의 학회발표 및 논문게재 등을 통하여 개발기술을 널리 홍보하여야 할 것으로 생각된다. 선도관리 센서 시스템의 경우 수산가공공장 등에서의 원료의 선도관리, 수산물검사소 등에서의 수입어육과 축육에 대한 품질검사에 활용가능하며 수·축산물의 냉장저장 중의 품질열화 예측모델 작성에 활용되어 최적 저장기간 설정에 활용이 기대되며 슈퍼마켓의 진열장에서의 현장 선도관리에 활용 시 제품의 유통기한 설정 및 건전성 확보가 예상되고 어육 및 축육을 소재로 한 햄버거 등의 즉석편의식 제조과정 중의 선도변화 검사에 활용될 수 있을 것으로 예상된다. 과실성숙도 센서 시스템은 과수 재배농가에서 과실 수확적기를 판정할 때와 가공용으로 품질이 균일한 과실원료를 선별하는데 활용이 기대되고 과실성숙도 센서 시스템에 관한 기술축적으로 새로운 형태의 바이오센서 개발이 가능해져 농업용 또는 식품용 종합관리 시스템 구축에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 식품의 품질 및 공정관리 센서 시스템에 활용가능한 multi형 바이오센서를 활용하면 전통주나 김치발효, 요구르트 및 식혜 제조와 같은 발효공정 중 생성·변화되는 여러 성분을 동시에 신속하게 측정할 수 있으므로 산업체 특히 중소기업체의 현장에서의 신속한 품질평가 및 관리에 활용이 기대되며 아울러 적은 비용으로, 숙련되지 않은 실무자라도 손쉽게 이용할 수 있을 것으로 예상된다. 차체에 농협산하 창고나 식품공장에서의 식품 및 식품원료의 품질관리가 원활히 이루어지도록 개발된 바이오센서 시스템을 정부차원에서 저렴하게 생산·공급하여 활용할 것을 건의하고자 한다.

SUMMARY

I. Title

Development of Novel Biosensor Systems for Food Industry

II. Objective and Significance

This study was done to develop novel biosensor systems to provide a fundamental technology needed for food industry. For this purpose, biosensor systems measuring freshness of fish and meats and ripeness of fruits, and multi-biosensors for quality control and food processing were developed, followed by PC interfacing of the developed systems. A workshop for dissemination of the developed systems was also held.

Biosensor systems are efficient in quality evaluation and process control in food industry. Until now, however, research activities and developments on biosensor systems in Korea have been relatively poor owing to the shortage of information on biomonitoring technology. Some key techniques such as selection of biological components, immobilization of biological components, transducer preparation, sensor optimization, and sensor miniaturization and automation needed for biosensor development are well established in Korea. It is expected that good research output will be obtained within 3~5 years after an intense research on biosensor systems.

Moreover, key techniques in biosensor systems developed in Japan or U.S.A. are not easily accessible because they are normally protected as patentship. Therefore, research activities on biosensor systems in Korea should be promoted.

The main advantages of biosensor systems which exploit specific responses of biological components such as enzymes, microorganisms, animal and plant tissues and receptors are rapidity, convenience in operation, possible omission of sample pre-treatment and easy application to process automation. In food industry, there are increasing needs for development and application of biosensor systems in freshness control of fish and meats, maturity evaluation of fruits, determination of shelf-life of foods and food-stuffs, food process control, evaluation of the effects of food wastes on environment and objective determination of human senses. From these, the developments of freshness sensors for fish and meats, maturity sensors for fruits and biosensors for process control are urgently required, considering development of domestic food industry, increase in net income of agricultural and fisheries sectors and improvement in sanitary status of consumers from imported foods and food-stuffs. As fish and meats are primarily evaluated by their freshness, freshness determination is one important criterion in quality evaluation of fish. However, conventional methods such as volatile basic nitrogen (VBN) determination are cumbersome in sample pre-treatment and require 2~3 hr of analytical time. Hence, biosensor systems which measure fish and meat freshness rapidly were developed. Biosensor systems for fruit maturity evaluation were also developed to optimize the picking-up time of apples and pears. Taking into account that various food products are manufactured by unique processes, which are main features of food industry, biosensor systems for food process control were also developed.

It is expected that net increases in market size of food industry, and income of

agricultural and fisheries sectors will be expected by the application of the biosensor systems developed here. The enhancement of the value added by quality evaluation and process optimization for fish, meats and domestic fruits, and the elevation of competing ability in the international food market are also expected. From the social and cultural aspects, the wholesomeness of foods and food-stuffs has become a major concern of the people with the economic growth in Korea, resulting in an increased demand on easy and scientific assay methods on food-stuffs such as fish, meats and fruits, and imported foods. Biosensor technology seems to be a competent choice to meet this necessity.

III. Scope

1. Development of biosensor systems for rapid detection and management of fish and meat freshness
 - 1) Preparation of biosensor systems for early freshness index of fish and meats
 - (1) Confirmation of efficiency of freshness indices (ATP-related compounds, volatile basic nitrogen, polyamines *etc.*)
 - (2) Preparation of biosensors for ATP-related compounds
 - 2) Preparation of biosensor systems for late freshness indices, evaluation of sensor properties and sensor optimization
 - (1) Preparation of biosensors for trimethylamine (TMA) and biogenic amines
 - (2) Confirmation of sensor properties and analytical conditions in buffer systems

(3) Optimization of sensor properties and development of a multi-electrode enzyme sensor for K_i measurement

3) Diversification of biosensors, real sample measurement and workshop on the developed systems

(1) Diversification of biosensors for improvement in reproducibility

(2) Establishment of minimal sample pre-treatment methods

(3) Real sample measurements with the developed biosensor systems

(4) Comparison with the analytical results obtained from conventional methods such as HPLC

(5) Workshop exploiting the developed biosensor systems

2. Development of biosensor systems for measurement of fruit maturity

1) Preparation of biosensor systems for sugar analysis in apple juices

(1) Examination of a correlation between fruit maturity and sugar contents

(2) Development of biosensor systems for sugar analysis

2) Preparation of biosensor systems for amino acid analysis in apple juices

(1) Examination of a correlation between fruit maturity and amino acid contents

(2) Development of biosensor systems for glutamic (or aspartic) acid and asparagine analysis

3) Preparation of the maturity measurement system for apples and pears

(1) Changes in the sugar contents during fruit maturation

- (2) Changes in the amino acid contents during fruit maturation
- (3) Pattern analyses of sugars and amino acids during fruit maturation
- (4) Development of the maturity measurement system for apples and pears
- (5) Workshop exploiting the developed biosensor systems

3. Development of multi-biosensors for quality control and food process

- 1) Two component analysis with the dual cathode oxygen electrode
 - (1) Preparation of the dual cathode oxygen electrode
 - (2) Establishment of the relating equation for the dual cathode system
 - (3) Component analysis during *sikhe* production

- 2) Simultaneous determination of two components during food processing
 - (1) Simultaneous determination of two components with the dual cathode oxygen electrode and construction of electric circuit
 - (2) Determination of component changes during food processing

- 3) Simultaneous determination of three components, process optimization and workshop on the developed systems
 - (1) Preparation of the multi-cathode oxygen electrode
 - (2) Simultaneous determination of organic acids and sugars in the beverages prepared from agricultural products
 - (3) Analysis of the agricultural products with the multi-biosensor
 - (4) Storage stability of the multi-biosensor
 - (5) Workshop on the developed biosensor system

4. Construction of the computer interfacing systems on the developed biosensors

1) Construction of the computer interface and the operating software

(1) Construction of the computer interface

(2) Make-up of the operating software on the biosensor systems

2) Application of the computer interfacing system to the process control in bench scale

(1) Construction of the automation system for biosensor optimization

(2) Make-up of the software for the process optimization

(3) Workshop on the computer control of food process with a developed biosensor system

IV. Results and Opinion for Future Use

1. Development of biosensor systems for rapid detection and management of fish and meat freshness

Based on a preliminary analysis on the samples from various fish and meats, K_i value which is expressed as a relative ratio of ATP-related compounds, and contents of TMA and polyamines were confirmed as efficient chemical freshness indices. Thereafter, biosensors for rapid detection of these indices were prepared.

A flow-injection-analysis (FIA) type biogenic amine sensor which utilizes diamine oxidase as biological component showed the highest response on putrescine,

followed by cadaverine and histamine. A calibration curve was obtained up to 0.4 mM of putrescine, and the optimum temperature and pH of biosensor response were 35°C and 7.2~7.5. ATP-related compounds, such as hypoxanthine (H_x), inosine (H_xR), IMP, did not affect biosensor response, whereas the addition of sodium chloride in 0.8% concentration decreased response by 20%. The presence of amino acids also acted on sensor performance slightly. The effects of sodium chloride and amino acids were avoidable by sample treatment with perchloric acid. Model samples which were prepared by mixing known amounts of putrescine and one other polyamine showed 19.5% increase in response maximally, compared to the sample having putrescine only.

The biological component of a batch type TMA sensor developed in our study was *Pseudomonas* sp. DSM6342 considering cultivation time and sensor response. The sensor which had the optimum temperature and pH of 30°C and 7.6 showed a good reproducibility and a quasi-linear calibration curve was obtained until 1.5 mM TMA. Biosensor response was the most conspicuous at 0.05 M phosphate buffer, and sodium chloride and ATP-related compounds affected response rarely. The sensor was deficient in specificity to amino acids and affected a little by the presence of biogenic amines. The microbial membrane showed responses more than 70% of the original response at 4°C until 70 days of storage and can be used 400 times after cell immobilization.

H_x sensor, H_x/H_xR sensor and $H_x/H_xR/IMP$ sensor which measure hypoxanthine, inosine and IMP separately were prepared and evaluated for sensor response. The optimum buffer solution and pH for H_x sensor, H_x/H_xR sensor and $H_x/H_xR/IMP$ sensor were 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5), 0.05 M carbonate buffer (pH 10.0) and 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), respectively. The optimum temperatures of the

sensors were in the range of 30~40°C. The sensors were not affected nearly with sodium chloride and affected a little by sugars and amino acids.

For maximum sensitivity of the FIA-type biosensor systems for ATP-related compounds, micro-chitosan beads (Chitopearl) which have functional amino groups *et al.* were used as carriers for enzyme immobilization. Out of the types of Chitopearl, Chitopearl 2501 and 3001 gave the best sensor responses. Calibration curves for H_x sensor, H_x/H_xR sensor and H_x/H_xR/IMP sensor which were prepared by immobilizing xanthine oxidase or mixtures of xanthine oxidase, nucleoside phosphorylase and 5'-nucleotidase onto Chitopearl 3001 were plotted against single and mixed substrates. The response decreases of the sensors after 4 consecutive measurements against hypoxanthine, inosine and IMP were in the range of 1.3~6.2%. When the lengths of the enzyme reactors which measure hypoxanthine, inosine and IMP separately were adjusted as 15-12-7 cm in a series connection, no interference owing to another column reactor was found. All reactions occurred from the enzyme reactors measuring ATP-related compounds were interfaced to a personal computer by using a pre-amplifier, PC-Lab card and operating software. The contents of hypoxanthine, inosine and IMP in the model samples were determined with the FIA-type biosensor system having the column lengths of 15-12-7 cm. The maximum error range of individual compound was less than 5.6%.

The K_i values for 20 fish samples of cold storage or freezing were determined as 7.3~43.6%. There was a linear correlation ($r=0.894$) between the contents of VBN and TMA. The biogenic amines were not determined in the same fish samples. The K_i values for meats decreased when the storage temperature was lowered or the storage period was shortened. The K_i values for a different group of fish were measured under the optimum conditions (0.05 M phosphate buffer, pH 7.5, 30°C and

column lengths of 15-12-7 cm) of the biosensor system for the measurement of ATP-related compounds. The K_i values were in the range of 26.0~67.6%.

A workshop on "Principles of Biosensors and Application to Food Industry" was held under the auspices of *Food Analysis Division of Korean Society of Food Science and Technology* for introduction and dissemination of the research output. A good evaluation was given by the workshop participants.

2. Development of biosensor systems for measurement of fruit maturity

As the contents of free sugars and amino acids in fruits change during maturation process, fruit maturity can be objectively predicted by a pattern analysis for several components. Biosensors for rapid detection of free sugars (glucose and sucrose) and free amino acids (aspartic acid and asparagine) in domestic apples and pears were prepared.

One unit of glucose oxidase was immobilized onto the cellulose acetate membrane with bovine serum albumin and polyvinyl alcohol, and the resulting enzyme membrane was put on a hydrogen peroxide electrode to prepare a glucose sensor. In a similar way, a sucrose sensor was prepared by using invertase, mutarotase and glucose oxidase. Calibration curves for glucose and sucrose were drawn in 0.1 M phosphate buffer. An aspartate sensor was prepared by immobilizing aspartase onto a nonactin-modified ammonium ion-sensitive electrode. The reaction buffer for this sensor was 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) and a calibration curve was also made. An asparagine sensor was made by immobilizing asparaginase onto the above ammonium ion-sensitive electrode.

The contents of glucose, sucrose, aspartic acid and asparagine in two apple species *Red fuji* and *Fuji* were measured by the biosensors described above in one week-interval. The results obtained was compared with those by HPLC. The contents of the index components during maturation of two species of pear, *Youngsan* and *Shingo*, were also determined by the above two methods.

Principal component analysis (PCA) for predicting fruit maturation was done by tracing the sensor responses for glucose, sucrose, aspartic acid and asparagine during maturation processes of apples and pears. The data obtained were analyzed with SAS program. The results of PCA analysis suited well to the empirical expectation for fruit maturation. It was expected that more objective and scientific prediction of fruit maturation can be done by collecting and analyzing accumulated data for several years.

3. Development of multi-biosensors for quality control and food process

Multi-biosensors for simultaneous determination of several index components in agricultural products were prepared and the analytical results were compared with those by HPLC, GC, *et al.*

A dual cathode oxygen electrode consisting of one anode and two cathodes was produced. The correlation coefficient between two cathodes was 0.998 with respect to current response and oxygen partial pressure. A dual cathode biosensor system for simultaneous determination of lactose and glucose was prepared by an asymmetric coupling of β -galactosidase, mutarotase and glucose oxidase. The optimum pH of this system was in the range of 6.5~7.5, which was considerably higher than 5.1 of

the free enzyme. A correction equation needed for exact measurement of lactose was used for a simultaneous measurement of lactose and glucose in the milk fortified with sugars. A dual cathode biosensor system for simultaneous determination of maltose and glucose was also prepared by immobilizing amyloglucosidase and glucose oxidase on nylon net. This system had an optimum temperature of 35°C and optimum pH of 5.5. Sucrose and mannose from saccharides tested had a slight effect on biosensor performance. After removing glucose effect in maltose determination, a simultaneous determination of maltose and glucose in *sikhe* was done. The results obtained by the biosensor method was compared with those by an UV-spectrophotometry and a good correlation was obtained. The optimum temperature and pH of an ethanol/glucose dual cathode system were 35°C and 7.5. By exploiting this system, a simultaneous measurement of ethanol and glucose in *takju* was done with comparative studies using the UV-spectrophotometry and GC ($r=0.94$). A microbial sensor which uses *Trichosporon brassicae* and oxygen electrode as biological component and transducer was prepared and had an optimum pH of 2~3.

A multi-cathode oxygen electrode which is composed of one anode and six cathodes was produced, followed by enzyme immobilization by the asymmetric coupling. The optimum temperature and pH of the multi-biosensor for simultaneous determination of glucose/pyruvic acid/ethanol were 35°C and 7.0. The effects of ionic strength, compounds of similar structure such as lactic and succinic acids and thiamine pyrophosphate addition on sensor response were also studied. After correcting organic acid effect on glucose measurement with a suitable equation, a simultaneous determination of glucose, pyruvic acid and ethanol with the triple cathode system was done by the addition method. The results obtained by the biosensor method were well correlated with those by GC ($r=0.983$) and

spectrophotometry ($r=0.954$). The pyruvic acid sensor showed a good storage stability even after 30 days, compared to the ethanol sensor. A triple cathode system for measuring maltose, glucose and fructose simultaneously was prepared for process optimization of *sikhe*.

4. Construction of the computer interfacing system on the developed biosensors

To interface the response signals from the developed biosensors to PC, an interfacing system composed of a current pre-amplifier, multiplexer, PC-Lab card and PC was constructed. The system was operated with a source program (Genie 3.0) from Advantech Co. Minute signals of several nanoampere degrees obtained from the biosensor systems were first amplified to 0~5 V and then stored into PC every one second. The stability of the response signals from an oxygen electrode was determined and hypoxanthine concentration was measured with a xanthine oxidase electrode interfaced to PC. The confirmation of stability and performance of a hydrogen peroxide electrode were also done by the same method.

A process automation of glucose production was done as follows. Gelatinized corn starch was liquefied and saccharified consecutively with α -amylase and glucoamylase treatments. Samples from the process line were added into a measuring device with a micropump. Simultaneously, a pre-determined volume of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) flowed into the measuring device by the action of solenoid valve. The output from a glucose sensor was stored into PC. After measurement, the residual solution in the measuring device was withdrawn by flushing with the same phosphate buffer. A total system for the above processes

was manufactured.

As the output of this research, the biosensor systems for freshness and maturity measurements, and for food process control were developed. The systems developed were interfaced to PC for easy control and analysis of the data. A workshop was held for introduction and dissemination of the research output. It is expected that the biosensor systems of this study have a strong potential of technology transfer to domestic companies. The presentation of the results and paper submission are also required to expedite the utilization and dissemination of the research products. The biosensor systems for freshness measurement seem to find applications in freshness management of raw materials, quality control of imported fish and meats, establishment of prediction model on deteriorative changes during cold storage, on-site freshness management in supermarkets, inspection of instant foods such as hamburger during production, etc.

The biosensor systems for fruit maturation are expected to be utilized in the determination of harvest time and selection of fruits of equal quality during fruit processing. The technology accumulated regarding maturity sensor can do a bridge function for construction of new biosensor systems which will be used in total management in agricultural and food sectors.

Multi-biosensor systems for food quality and process control can be exploited in simultaneous rapid analysis of multi-components in fermentation products such as traditional alcoholic beverages, *kimchi*, yogurt and *sikhe*. These systems can be applied for rapid quality evaluation and management in small or medium-scaled companies without much expenditure and skill. It is strongly recommended that the biosensor systems of our study be used publically.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	31
Chapter 2. Development of biosensors for rapid detection and management of fish and meat freshness	49
Chapter 3. Development of biosensor systems for measurement of fruit maturity	143
Chapter 4. Development of multi-biosensors for quality control and food process	171
Chapter 5. Construction of the computer interfacing system on the developed biosensors	235

여백

목 차

제 출 문	
요 약 문	1
SUMMARY	13
CONTENTS	27
목 차	29
제 1 장 서 론	31
제 1절 연구의 배경	33
제 2절 연구개발의 필요성 및 목표	34
제 3절 참고문헌	39
제 2 장 어육 및 축육선도의 신속·정확한 계측과 관리를 위한 <u>바이오센서</u> <u>시스템</u> 개발	49
제 1절 서 설	51
제 2절 재료 및 방법	55
제 3절 결과 및 고찰	72
제 4절 참고문헌	138
제 3 장 과실성숙도의 신속계측을 위한 바이오센서 시스템 개발	143
제 1절 서 설	145
제 2절 재료 및 방법	146
제 3절 결과 및 고찰	150

제 4절	참고문헌	170
제 4 장	식품의 품질관리 및 공정을 위한 Multi-biosensor의 개발	171
제 1절	서 설	173
제 2절	재료 및 방법	179
제 3절	결과 및 고찰	191
제 4절	참고문헌	231
제 5 장	바이오센서의 컴퓨터 접속시스템 개발	235
제 1절	서 설	237
제 2절	재료 및 방법	238
제 3절	결과 및 고찰	241
제 4절	참고문헌	254

제 1 장 서 론

여 백

제 1절 연구의 배경

생활수준 향상에 따라 신선하고 건전성이 확보된 식품 및 식품원료에 대한 소비자의 욕구가 날로 증가하고 있고 이에 따라 이들에 대한 신속·정확한 평가기술의 개발이 긴급하게 되었다. 바이오센서는 저렴한 가격으로 구입가능하고 사용이 간편한 동시에 측정의 신뢰성이 우수하고 별도의 전처리과정 없이도 직접측정이 가능하며 휴대화, 미소화할 수 있고 자동화가 가능한 첨단 측정장비이므로 식품 및 식품원료의 신속·정확한 품질평가에 적합한 장비이다. 아울러 바이오센서 시장은 현재 급속히 신장 중이며 2,000년대 초에는 전세계적으로 약 50억\$의 시장규모를 형성할 것으로 추산되며 그 중 식품 및 농업용센서의 시장규모가 약 10억\$에 이를 정도로 유망한 분야이므로 향후 국내 농수산업의 고첨단화와 부가가치화를 위해서 기술정립이 필요한 연구개발 분야가 되고 있다.

한편 국내의 사정을 보면 식품산업에서의 식품 및 식품원료의 신속·정확한 품질관리, 과실 성숙도의 객관적 평가, 축육 및 어육의 선도관리, 식품공정 분야 등에 있어 활용가능성이 큰 생물검정 (biomonitoring) 관련기술 개발이 그 중요성에 비추어 매우 낙후되어 있으므로 이와 관련된 기술개발이 선도적으로 이루어져야 할 상황에 있다. 또한 현재 범정부적으로 추진되고 있는 농수산물 유통구조 개선사업을 효율적으로 수행하여 폐기자원을 최소화하는 동시에 환경개선을 도모하기 위해서도 식품원료에 대한 현장품질평가가 이루어져야 하며 이를 위한 최적의 측정장비 중의 하나가 바이오센서 시스템이다.

최근에는 UR에 대한 능동적 대처와 농어민 소득증대를 위하여 국내산 식품 및 식품원료에 대한 객관적이고 신속한 품질관리 기술의 수요가 크게 증대되고 있는 것도 본 연구의 배경이 되고 있으며 또한 수입개방화에 따른 소비자보호 차원에서도 수입식품과 식품원료에 대한 신속·정확하고 간편한 품질평가 기술의 개발이 요청되고 있다.

제 2절 연구개발의 필요성 및 목표

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

바이오센서는 식품산업에 유용한 첨단 계측장비 중의 하나이나 국내에서는 지금까지 이 분야에 대한 인식부족으로 관련된 연구개발 및 활용이 미흡한 실정이었다. 일본의 경우는 1986년에 식품산업에 활용가능한 바이오센서 연구를 추진하는 "식품산업에서의 Sensing System"에 관한 연구협력체가 농림수산성 주관으로 설립되어 산·학·연 공동 연구 체제로 식품 바이오센서 연구를 수행하고 있고 그 중 일부는 산업화되어 있다.

바이오센서 개발 시의 필요한 기술사항인 센서용 생물요소 선발, 생물요소 고정화기술, 전극 및 센서 제조기술, 센서성능 최적화기술, 직접계측 및 센서의 간편화, 자동화기술은 우리나라의 과학발전 수준을 고려해볼 때 향후 5~10년 정도 집중연구 시 세계적 수준에 이를 수 있을 것으로 판단되므로 연구개발의 가시적 성과를 기대할 수 있다. 또한 일본, 미국 등에서 개발되었거나 개발 중인 바이오센서 시스템은 여전히 개선의 여지가 있고 전극 및 센서 제조기술 등의 핵심기술은 특허권의 형태로 보호하거나 비공개화하여 외부에 잘 노출시키지 않으므로 외국기술의 활용은 한계가 있는 실정이다. 따라서 국내에서의 독자적인 연구개발로 기술보호주의를 극복해야 하고 경우에 따라서는 활용가능한 외국기술은 중간진입전략 (mid-term entry strategy) 개념을 활용하여 적극 수용하여 개발기술의 질적향상을 적극 도모해야 한다.

바이오센서에 의한 계측은 효소, 미생물, 동·식물조직, receptor 등의 생물요소의 특이반응성을 활용하므로 신속·정확하고 아울러 작동이 간편하며 시료전처리를 생략할 수 있는 장점이 있고 또한 자동화공정에 손쉽게 응용가능하고 밀집구조로 인하여 사용이 용이하다는 기술적 특징을 지닌다. 바이오센서에 의한 계측 시스템을 식품산업에 응

용할 수 있는 분야로서는 어육 및 축육의 선도 관리, 과실의 성숙도 평가, 식품 및 식품 원료의 저장성 평가, 식품가공 후의 유통관리, 식품공정 조절, 식품가공 폐기물의 환경영향 평가, 인체감각의 객관화 등이 있을 수 있다.

이 중 국내 식품산업 발전과 농어민 소득증대, 수입식품에 대한 소비자보호 측면에서 우선적으로 연구필요성이 제기되는 분야로서는 어육 및 축육의 선도관리 센서, UR과 관련하여 국제경쟁력이 있는 국내산 과실의 품질최적화 및 수확적기 판정에 사용될 수 있는 과실 성숙도 센서, 식품의 품질관리 및 공정센서로 판단되어 진다. 수·축산물의 품질은 그 선도에 의하여 가장 크게 좌우되므로 선도분석은 현재도 어육 등의 품질평가에 있어 가장 중요한 항목이나 trimethylamine (TMA)과 같은 휘발성염기질소 (volatile basic nitrogen, VBN)를 측정하는 기존의 방법은 전처리가 번거롭고 2~3시간의 분석시간이 소요되는 문제점이 있으므로 선도 측정시간을 수분내로 단축가능하고 현장 품질평가에도 활용가능한 바이오센서의 개발이 필요하다. 국내에서는 과실의 성숙도관정을 선택 등에 대한 경험적 판단에 주로 의존하고 있어 과실수확 적기를 놓치거나 과숙에 의한 낙과 등의 문제점이 발생하고 있으며 당산비 등의 이화학적 지표를 측정하는 방법은 시간이 많이 걸리거나 일정한 실험실에서만 가능하여 시료채취 시간과 분석시간과의 상당한 시차가 발생하는 기술적 문제점이 있어 왔다. 식품의 품질지표로서 vitamin C 등을 측정하는 바이오센서는 농수산물의 수확 후 저장성 예측에 필요하며 가공식품의 유통기한 설정 및 유통관리에도 유용하다. 아울러 식품산업의 각종 공정이 자동화되고 있는 추세를 감안해볼 때 공정자동화에 응용가능한 공정센서의 개발도 필요하다.

나. 경제·산업적 측면

어육 및 축육의 선도, 과실 성숙도, 식품의 품질관리 및 공정에 활용가능한 바이오센서 시스템을 개발하고 그 결과를 산업화함으로써 얻어질 수 있는 경제적 부가가치 증대는 매우 클 것으로 예상되고 이에따라 국내식품산업의 매출액 및 순이익 증대, UR과 관련한 농어민의 소득보호 및 증대에 크게 기여할 것으로 사료된다.

수산물 및 육류 1인당 소비량은 1993년 현재 각각 42.1과 24.3 kg이고 해마다 그 소비량이 크게 신장하고 있으므로 이들에 대한 효율적인 품질관리의 필요성이 증가하고 있고 그 중 쇠고기는 소비량의 약 45%에 해당하는 물량을 수입하고 있다. UR 타결 등에 기인하여 수산물 수입이 해마다 급증하고 있어 1993년도의 경우 248,000 M/T (금액 기준 2,900억원)에 이르고 선도저하 등의 이유로 폐기되는 수산물은 이 중 약 1.4%에 해당하는 40억원에 해당하였으며 1994년도에는 폐기되는 수산물이 더욱 증가하여 8월말 현재 약 65억원에 이르고 있다. 어육에 대한 선도센서 개발로 수입수산물 검사에 있어 전문성과 신속성이 크게 제고되므로 부적합한 저질수산물의 수입예방에 기여할 수 있어 폐기 수산물 및 그 처리에 소요되는 외화를 크게 절약할 수 있을 것으로 여겨진다. 아울러 수·축산물의 선도평가를 단시간에 행할 수 있는 선도센서 개발과 이를 통하여 경험적, 관능적 선도를 간단히 수치화하여 컴퓨터에 의하여 선도관리가 가능하게 하므로써 얻어지는 경제적 부가가치 증대는 매우 클 것으로 예상된다.

1인당 과일 소비량은 48 kg (연간 국내소비량 2,160천 M/T)으로 10년전에 비해 2배 이상 증가하였고 이 중 국산과일 생산량은 1,730천 M/T으로 국내소비량의 약 80%를 차지하여 1조 5천억원 규모의 시장을 형성하고 있다. 현재 현장에서 신속히 행할 수 있는 과학적인 성숙도 판정방법이 적절치 않아 많은 경우 주관적 판단에 근거하므로 수확원료의 균일한 품질유지가 곤란하고 가공제품의 경우는 최종제품의 품질열화를 가져와 국산과일의 가격경쟁력을 감소시키는 원인이 되고 있다. 과일 성숙도를 신속·간편히 판정할 수 있는 바이오센서 시스템이 개발되어 생식용 혹은 가공용 과일의 품질최적화가 이루어지면 약 5%의 부가가치 증대가 기대되어 연간 750억원 이상의 과수 재배농가의 소득향상이 예상된다.

현재 국내 식품산업의 규모는 연간 20조원에 해당하고 식품산업의 각종 공정이 자동화, 무인화되고 있는 현실을 감안해볼 때 공정조절용 바이오센서 시스템의 개발 필요성은 날로 증가하고 있고 이를 통하여 on-line의 공정조절이 가능하게 되어 최종산물의 품질최적화가 가능하게 되어 국내 식품산업의 국제경쟁력을 크게 제고시킬 수 있다. 특

히 영세한 중소기업의 경우 공정조절을 위한 별도의 분석실을 가지지 않아도 되므로 생산원가를 크게 낮추고 제품의 가격경쟁력을 제고시킬 수 있는 장점도 기대된다.

바이오센서에 의한 계측의 일반적 특성인 선택적 반응성, 현장성, 신속성 등으로 산업화 전망은 매우 밝다고 볼 수 있으며 세계적으로는 10여개 이상의 회사가 식품과 관련된 상용 바이오센서를 판매하고 있고 일본의 경우도 산소전극 및 과산화수소전극을 중심으로 식품용 바이오센서가 속속 상용화되고 있는 실정이다. 우리나라의 경우는 UR과 관련하여 농어민 소득증대와 소비자 보호의 공익적 측면에서 바이오센서의 필요성이 크고 향후 상용화 전망도 높을 것으로 판단된다.

다. 사회적 측면

고도경제성장에 따른 국민소득 증가에 따라 식품 및 식품원료에 대한 건전성 확보가 주된 관심사 중의 하나가 되고 있으며 UR에 따른 외국산 식품 및 식품원료의 수입량 증가에 대응하여 국내식품산업의 국제경쟁력을 제고하기 위해서는 국내산 식품원료의 생산, 유통, 저장 및 가공 후의 유통관리를 최적화하고 식품가공 공정의 자동화를 추진해야 할 사회적 필요성이 제기되고 있다. 이를 통하여 국내산 농수축산물의 부가가치 증대를 이루어 농어민의 소득증대 및 보호를 행할 수 있고 소비자의 권익향상을 도모할 수 있다. 아울러 수입식품 및 식품원료에 대한 손쉽고 과학적인 검사방법 개발과 이를 통하여 저질의 외국산 물품의 수입을 예방할 수 있는 검색 시스템의 정립 필요성이 증대되고 있다. 따라서 식품산업에 적용 시 식품 및 식품원료에 대한 객관적이고 효율적인 관리가 가능한 계측시스템의 개발이 필요하며 사용이 간편하고 신속·정확하며 현장성이 뛰어난 바이오센서 시스템은 이러한 요구를 충족시켜줄 수 있는 중요한 방법 중의 하나이다.

어육에 대한 선도센서 개발로 국내산 수산물의 과학적 품질관리가 가능하고 불량한 수산물의 수입을 억제할 수 있어 생산자와 소비자를 보호할 수 있다. 한편 육류유통 중의 품질관리를 과학화하고 진공포장 수입냉장육의 판매와 관련 이의 유통기한 설정과

건전성 확보에 기여하는 한 방법으로 축육에 대한 선도센서 개발 필요성이 제기되고 있다. UR과 관련하여 국산과실류의 경쟁력 제고를 위하여 생식용 혹은 가공용 과실의 품질최적화가 필요하며 이를 위하여 적정 수확시기의 결정 필요성이 대두되고 있으며 건강지향적인 소비자의 기호를 충족시키는 동시에 식품산업의 생산원가 감소를 통하여 국산 가공식품의 가격경쟁력 제고를 위하여 식품의 품질 및 공정관련 센서의 개발이 필요하다.

2. 연구개발의 목표 및 범위

본 연구개발의 최종목표는 식품산업에서의 신속계측에 활용가능한 첨단 바이오센서 시스템을 개발하고 이를 통하여 미래식품산업의 기반기술을 제공하는 것이다.

이를 위하여 본 연구개발에서는 국내산 및 수입 어육·축육에 대한 신속한 선도계측과 관리를 위한 바이오센서 시스템, 과실의 성숙도 계측에 활용할 수 있는 바이오센서 시스템, 식품의 품질관리 및 공정을 위한 Multi-biosensor를 개발하였다. 아울러 개발된 바이오센서 시스템에 대한 자동화 및 이를 이용한 제어 시스템을 개발하고 개발된 기술의 활용 및 보급을 위한 workshop을 개최하였다.

제 3절 참고문헌

- Alatonen, T., Anttalainen, L., Hakala, J. and Pasanen, R. Evaluation of fish freshness by the iron agar method. *Suomen Eläinlääkäerilehti* 98 : 386 (1992)
- Amine, A., Patriarche, G.J., Marrazza, G. and Mascini, M. Amperometric determination of glucose in undiluted food samples. *Anal. Chim. Acta* 242 : 91 (1991)
- Appelqvist, R. and Hansen, E.H. Determination of glucose in fermentation processes by means of an on-line coupled flow injection system using enzyme sensors based on chemically modified electrodes. *Anal. Chim. Acta* 235 : 265 (1990)
- Barassi, C.A., Pecora, R.P., Roldan, H. and Trucco, R.E. Total, non-volatile free fatty acids as a freshness index for hake (*Merluccius hubissi*) stored in ice. *J. Sci. Food Agric.* 38 (4) : 373 (1987)
- Belgith, H., Romette, J-L. and Thomas, D. An enzyme electrode for on-line determination of ethanol and methanol. *Biotechnol. Bioeng.* 30 : 1001 (1987)
- Bergann, T. and Kleemann, J. The Fresh-Tester. A rapid method for determination of freshness or age of meat. *Fleischwirtschaft* 74 (5) : 488 (1994)
- Brooks, S.J., Moore, J.N. and Murphy, J.B. Quantitative and qualitative changes in sugar content of peach genotypes (*Prunus persica* L. Batsch.). *J. Ame. Soc. Horticult. Sci.* 118 (1) : 97 (1993)
- Butov, G. Determination of freshness of meat and meat products by means of luminiscent test. *Myasnaya Industriya SSSR* 40 (3) : 21 (1969)
- Cantoni, C., Bianchi, M.A., Beretta, G. and Aubert, Sd. Preconservation of

- refrigerated pork meat packaged in plastics films. *Industrie Alimentari* 13 (11) : 83 (1974)
- Chemnitzius, G.C., Suzuki, M., Isobe, K., Kimura, J., Karube, I. and Schmid, R.D. Thin-film polyamine biosensor: substrate specificity and application to fish freshness determination. *Anal. Chim. Acta* 263 : 93 (1992)
- D'Costa, E.J. Rapid detection of banana fruit maturation using a glucose biosensor. *Analyst* 113 : 225 (1988)
- Edwards, R.A., Dainty, R.H. and Hibbard, C.M. The relationship of bacterial numbers and types to diamine concentration in fresh and aerobically stored beef, pork and lamb. *J. Food Technol.* 18 : 777 (1983)
- Elias, L. and Krzymien, M.E. Method for testing the freshness of fish. *US Patent* 4 980 294 (1990)
- Galensa, R., Muller, G., Schirmer, A., Hippe, H. and Stadler, H. Bestimmung von Lebensmittelinhaltsstoffen durch HPLC-Enzymreaktor-Kopplung. *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.* 42 : 84 (1988)
- Giaccone, V., Gula, G., Voghera, M. and Ajmerito, P. Changes in pH and post-mortem phenomenon of poultry meat during retailing. Standard parameters of evaluation. *Industrie Alimentari* 24 (225) : 266 (1985)
- Greenway, G.M. and Ongono, P. Determination of L-ascorbic acid in fruit and vegetable juices by flow injection with immobilized ascorbate-oxidase. *Analyst* 115 : 1297 (1990)
- Haginoya, R., Suzuki, M., Tamiya, E. and Karube, I. Development of a needle type biosensor for analysis of sugars in fruits. *Nestle' Meeting on Biosensors*, Nestle' Research Centre, Lausanne, Switzerland, p.70 (1992)
- Havas, J. and Guilbault, G.G. Tyrosine-selective enzyme probe and its application.

- Anal. Chem.* 54 : 1991 (1982)
- Hlavay, J., Haemmerli, S.D. and Guilbault, G.G. 1994. Fibre-optic biosensor for hypoxanthine and xanthine based on a chemiluminescence reaction. *Biosensors Bioelectronics* 9 : 189 (1994)
- Hsu, J.C., Heatherbell, D.A. and Yorgey, B.M. Effects of variety, maturity and processing on pear juice quality and protein stability. *J. Food Sci.* 55 (6) : 1610 (1990)
- Isono, Y. A new colorimetric measurement of fish freshness using nucleoside oxidase. *Agric. Biol. Chem.* 54 (11) : 2827 (1990)
- Ivashov, V.I., Andreenkov, V.A. and Komarov, V.L. Method for ascertaining the degree of freshness of meat. *USSR Patent SU 1 666 949 A1* (1991)
- Kim, J.P., Kim, J.B. and Park, I.W. K-value and nucleotide-degrading enzymes in fish muscles. *J. Kor. Soc. Food Nutrit.* 17 (1) : 33 (1988)
- Kim, N., Nagata, R. and Karube, I. Electrochemical properties of a disposable L-lactate sensor prepared by printing technique. *Foods Biotechnol.* 4 (2) : 85 (1995a)
- Kim, N., Haginoya, R. and Karube, I. Characterization and food application of an amperometric needle-type L-lactate sensor. *J. Food Sci.* 61 (2) : 286 (1995b)
- Knee, M., Hatfield, S.G.S. and Smith, S.M. Evaluation of various indicators of maturity for harvest of apple fruit intended for long-term storage. *J. Horticult. Sci.* 64 (4) : 403 (1989)
- Kress-Rogers, E. and D'Costa, E.J. Biosensors for the food industry. *Analytical Proceedings* 23 (5) : 149 (1986)
- Kress-Rogers, E., D'Costa, E.J., Sollars, J.E., Gibbs, P.A. and Turner, A.P.F. Measurement of meat freshness *in situ* with a biosensor array. *Food Control* 4

- (3) : 149 (1993)
- Kristinsson, B. A method and an apparatus for determining the degree of freshness of fish or other pieces of meat. *European Patent Application EP 0 187 382 A1* (1986)
- Lebron, C.I. Rapid method for detection of muramic acid and cadaverine as indicators of microbial load in fresh meats. *Dissert. Abst. Internat.* 54 (7) : 3412 (1994)
- Lee, Y.C., Singh, R.P. and Haard, N.F. Changes in freshness of chilipepper rockfish (*Sebastes goodei*) during storage as measured by chemical sensors and biosensors. *J. Food Biochem.* 16 (2) : 119 (1992)
- Li, N., Endo, H., Hayashi, T., Fujii, T., Takai, R. and Watanabe, E. Development of a trimethylamine gas biosensor system. *Biosensors Bioelectronics* 9 : 593 (1994)
- Luong, J.H.T. and Male, K.B. Development of a new biosensor system for the determination of the hypoxanthine ratio, an indicator of fish freshness. *Enzyme Microbe Technol.* 14 (2) : 125 (1992)
- Luong, J.H.T., Male, K.B. and Huynh, M.D. Applications of polarography for assessment of fish freshness. *J. Food Sci.* 56 (2) : 335 (1991a)
- Luong, J.H.T., Mulchandani, A. and Male, K.B. Development of a substrate recycle amplification system for L-glutamic acid assay. *Enzyme Microb. Technol.* 13 : 116 (1991b)
- Luong, J.H.T., Male, K.B., Masson, C. and Nguyen, A.L. Hypoxanthine ratio determination in fish extract using capillary electrophoresis and immobilized enzymes. *J. Food Sci.* 57 (1) : 77 (1992)
- Macholan, L. and Chmelikova, B. Plant tissue-based membrane biosensor for

- L-ascorbic acid. *Anal. Chim. Acta* 185 : 187 (1986)
- Malle, P. and Poumeyrol, M. A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). *J. Food Protect.* 52 (6) : 419 (1989)
- Malle, P. and Pezennec, I. Rapid determination of fish freshness by evaluation of ATP degradation reflected in K value. *Sciences des Aliments* 12 (2) : 257 (1992)
- Mann, S.S. and Singh, B. Some aspects of developmental physiology of Patharnakh pear. *Acta Horticult.* No. 218, 175 (1988)
- Masahiko, K. Meat freshness measuring apparatus. *European Patent Application EP 0416 658 A1* (1991)
- Mason, M. Ethanol determination in wine with an immobilized enzyme electrode. *Am. J. Enol. Vitic.* 34 : 173 (1983a)
- Mason, M. Ethanol determination via immobilized enzyme. *ASBC J.* 41 : 89 (1983b)
- Matsui, T. and Kitagawa, H. Maturity evaluation of kiwifruit determined on the basis of starch and pectin contents and related enzyme activities. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 37 (3) : 224 (1990)
- Matsumoto, K., Yamada, K. and Osajima, Y. Ascorbate electrode for determination of L-ascorbic acid in food. *Anal. Chem.* 53 : 1974 (1981)
- Matuzewski, W. and Trojanowicz, M. Graphite paste-based enzymatic glucose electrode for flow injection analysis. *Analyst* 113 : 735 (1988)
- Mehlschau, J.J., Chen, P., Claypool, L.L. and Friedley, R.B. A deformeter for non-destructive maturity detection of pears. *Transact. ASAE* 24 (5) : 1368 (1982)

- Mitsutani, F. and Asai, M. Simultaneous determination of glucose and sucrose by a glucose-sensing enzyme electrode combined with an invertase-attached cell. *Anal. Chim. Acta* 236 : 245 (1990)
- Mitsutani, F., Yabuki, S. and Asai, M. L-Malate sensing electrode based on malate dehydrogenase and NADH oxidase. *Anal. Chim. Acta* 245 : 145 (1991)
- Nakatani, Y., Fujita, T., Sawa, S., Otani, T., Hori, Y. and Takagahara, I. Changes in ATP-related compounds of beef and rabbit muscles and a new index of freshness of muscle. *Agric. Biol. Chem.* 50 (7) : 1751 (1986)
- Ng., C.S., Chin, Y.N., Lim, P.Y., Tan, C.E., Yeap, S.E., Nikkuni, S. and Bito, M. Changes in quality of white pomfret, Chinese pomfret and grouper during ice-storage. *Bullet. Jpn. Soc. Scient. Fisher.* 49 (5) : 769 (1983)
- Nomoto, M. and Ohno, T. Evaluation of a freshness sensor and its application for estimating the K value of fish meat being put in market. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 34 (9) : 598 (1987)
- Ohashi, E. and Karube, I. 1993. Sensors for the food industry. *Food Control* 4 (4) : 183 (1993)
- Ohashi, E., Takao, Y., Fujita, T., Shimizu, Y. and Egashira, M. Semiconductive trimethylamine gas sensor for detecting fish freshness. *J. Food Sci.* 56 (5) : 1275 (1991)
- Park, I-S., Kang, S-J., Kim, J-H. and Noh, B-S. L-Lactate oxidase electrode and dissolved oxygen meter for specific determination of L(+)-lactic acid in Kimchi during fermentation. *Foods Biotechnol.* 2 (1) : 39 (1993)
- Queiroz, M.I., Treptow, R.O. and Queiroz, E.G. Sensory scale for evaluation of freshness of fish stored in ice. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos* 11 (2) : 91 (1993)

- Sakaguchi, M. and Koike, A. Freshness assessment of fish fillets using the Torrymeyer and K-value. In *Quality Assurance in the Fish Industry*, p. 338 (1992)
- Savran, E., Chomor, K., Stroeve, L.V. and Bulgakova, L.V. Changes in quality of rabbit meat during storage. *Trudy Vsesoyuznyi Nauchno issledovatel'skii Institut Myasnoi Promyshlennosti* 20 : 51 (1976)
- Sayem El Daher, N., Simard, R.E., Fillion, J. and Roberge, A.G. Extraction and determination of biogenic amine in ground beef and their relation to microbial quality. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie* 17 (1) : 20 (1984)
- Schmidt, H.L. and Kittsteiner-Eberle, R. Biosensoren. *Naturwissenschaften* 73 : 314 (1986)
- Scott, A. and Robertson, A. Biosensors- a novel technique for quality control. *Food* 7 : 35 (1985)
- Shahidi, F., Xin, C. and Dunajski, E. Freshness quality of harp seal (*Phoca groenlandica*) meat. *J. Agric. Food Chem.* 42 (4) : 868 (1994)
- Skogberg, D.J. An L-lysine enzyme electrode for analysis of food and feed (Dissertation), Univ. Wisconsin-Madison, Order No. 8011399 (1979)
- Stevanato, R., Avigliano, L., Finazzi-Agro, A. and Rigo, A. Determination of ascorbic acid with immobilized green zucchini ascorbate oxidase. *Anal. Biochem.* 149 : 537 (1985)
- Swindlehurst, C.A. and Nieman, T.A. Flow-injection determination of sugars with immobilized enzyme reactors and chemiluminescence detection. *Anal. Chim Acta* 205 : 195 (1988)
- Uchiyama, H. and Kakudi, K. A simple and rapid method for measuring K value, a fish freshness index. *Bullet. Jpn. Soc. Scient. Fisher.* 50 (2) : 263 (1984)

- Udagawa, M., Ishikawa, S., Nakamura, K., Kariyama, M. and Kudo, S. The change in K value during processing and storage of fish and fish products. *Bulletin Tokai Regional Fisheries Research Laboratory* No. 127, 89 (1989)
- Usui, K. Changes of ATP derivatives in quail meat during storage. *Bullet. Facult. Agric.* No. 45, 53 (1979)
- Wagner, G. and Guilbault, G.G. In *Food Biosensor Analysis*, Marcel Dekker, p. 234 (1994)
- Watanabe, E. Freshness measurement of foods. Quality evaluation of fish and meat. *New Food Industry* 30 (10) : 1 (1988)
- Watanabe, E., Endo, H., Takeuchi, N., Hayashi, T, and Toyama, K. Determination of fish freshness with a multielectrode enzyme sensor system. *Bullet. Jpn. Soc. Scient. Fisher.* 52 (3) : 489 (1986)
- Watanabe, E., Nagumo, A., Hoshi, M., Konagaya, S. and Tanaka, M. Microbial sensors for the detection of fish freshness. *J. Food Sci.* 52 (3) : 592.
- Watanabe, E., Toyama, K., Karube, I., Matsuoka, H. and Suzuki, S. Multifunctional biosensor for the determination of fish meat freshness. *Ann. N.Y. Aca. Sci.* 434 : 529 (1984a)
- Watanabe, E., Toyama, K., Karube, I., Matsuoka, H. and Suzuki, S. Enzyme sensor for hypoxanthine and inosine determination in edible fish. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19 (1) : 18 (1984b)
- Wong, K., Bartlett, F. and Gill, T.A. A diagnostic test strip for the semiquantitative determination of trimethylamine in fish. *J. Food Sci.* 53 (6) : 1653 (1988)
- Yamanaka, H. Polyamines as potential indexes for freshness of fish and squid. *Food Rev. Internat.* 6 (4) : 591 (1990)

- Yao, T., Kobayashi, N. and Wasa, T. Flow-injection analysis for L-glutamate using immobilized L-glutamate oxidase: comparison of an enzyme reactor and enzyme electrode. *Anal. Chim. Acta* 231 : 121 (1990)
- Yao, T., Matsumoto, Y. and Wasa, T. Bio-FIA system for estimation of fish freshness. *Bunseki Kagaku* 37 (5) : 236 (1988)
- 김병삼, 김동철, 이세은, 남궁배, 최문정, 정문철. 진공예냉처리에 의한 양상치의 선도 연장. *한국농화학회지* 38 (3) : 239 (1995)
- 김의락, 박창규. 요소정량을 위한 biosensor의 개발. *계명대학교 기초과학연구소 연구논문집* 10 (1) : 55 (1991)
- 박홍섭, 임형택, 박윤문. 냉장저장과 유통과정 중에 Tsugaru 품종 사과 품질에 미치는 과실성숙도의 영향. *한국원예학회지* 35 (6) : 593 (1994)
- 이옥경, 김태진, 노봉수. Alcohol oxidase 효소센서를 이용한 알코올 음료 중의 에탄올 정량. *한국식품과학회지* 27 (2) : 266 (1995)
- 인권식, 김인탁, 유광식. Glucose 정량을 위한 yeast 및 그의 orgalle 바이오센서에 관한 연구. *분석화학* 3 : 179 (1993)
- 조성효. CTA membrane을 이용한 asparagine과 adenosine 및 creatine biosensor의 개발. *한국화학공학회 추계논문초록* p.118 (1990)
- 조성효, 박행례, 박혜령. Glucose oxidase를 고정화한 효소전극에 의한 glucose의 분석. *한국공업화학회 추계논문초록* (1992)
- 吉岡俊彦, 南海史朗. 일회용 바이오센서에 의한 식품분석. *食品工業* 37 : 29 (1994)
- 大熊廣一. Reactor형 바이오센서에 의한 식품분석. *食品工業* 37 : 35 (1994)
- 田邊正行. 사과 polyphenol의 특성과 이용. *食品と科學* 37 (1) : 100 (1995)

여백

제 2 장

어육 및 축육 선도의 신속·정확한 계측과

관리를 위한 바이오센서 시스템 개발

(한국식품개발연구원)

여 백

제 1절 서 설

국외에서는 어육 및 축육의 선도관리 필요성을 일찍부터 인정하여 관능적, 화학적, 물리적 선도평가 기술개발에 관한 많은 연구가 이루어져 왔고 그 내용을 요약하면 다음과 같다.

Queiroz 등 (1993)은 얼음에 냉동 중인 어류의 선도평가를 위한 12점 평가법을 총휘발성염기물질 (total volatile basic nitrogen, TVBN), pH, 내부 및 외부상태, 눈, 지느러미 상태 등을 고려하여 제안하였으며 Sakaguchi와 Koike (1992)는 어육 fillet의 선도지표로서 Torrymeter에 의한 유전특성 (dielectric properties)과 핵산관련물질의 변화를 나타내는 K값을 제시하였다. Alatonen 등 (1992)은 iron agar와 trimethylamine oxide (TMAO) agar에서 H₂S를 형성하고 TMAO를 환원시키는 능력이 있는 *Pseudomonas*와 *Aeromonas*와 같은 부패성 bacteria 수의 측정을 통한 선도판정 기법을 개발하였고 Malle과 Pezennec (1992)는 test-strip 방법에 의해 K값을 측정하고 TMA, TVBN, 중은성균수, 관능특성 결과와 비교한 후 저지방 어류의 경우는 K값과 TVBN이, 고지방 어류의 경우에는 K값이 좋은 선도지표라고 보고하였다.

Elias와 Krzymien (1990)은 어육의 선도지표로서 headspace TMA 농도를 GC로 분석하고 관능검사 결과와 비교 시 좋은 상관성을 얻었으며 Isono (1990)는 nucleoside phosphorylase와 alkaline phosphatase 반응을 이용하는 비색법에 의하여 K_i값을 측정하고 이를 선도지표로서 활용하였다. Yamanaka (1990)는 선도지표로서 polyamine류를 검출하고 cadaverine과 agmatine이 각각 어류 및 오징어의 유용한 선도지표임을 밝혔으며 Udagawa 등 (1989)은 냉동어육의 해동 및 유통과정 중의 진열 시에 선도지표로서 K값의 변화를 조사한 후 48시간내에 K값의 증가가 40% 가까이 이루어 짐을 보고하였다. Malle과 Poumeyrol (1989)은 TMA와 TVBN을 총 169종의 해수어에 대하여 저장기간에 따라 분석하고 TMA에 대한 TVBN의 비율로 표시되는 P값이 선도의 유용지표임을 구

명하였으며 TMA dehydrogenase와 발색제인 3-(N-morpholino)propane sulfonic acid가 고정화된 strip을 어육추출액에 침지시켰을 때 생성되는 색을 육안관찰하여 TMAO 등의 관련물질과 NH₃에 의한 저해현상 없이 선도지표인 TMA를 확인하는 방법 (Wong 등, 1988)도 알려지고 있다. Barassi 등 (1987)은 총 비휘발성지방산 (total non-volatile free fatty acid) 함량과 어육선도의 관능평점 간에는 밀접한 관계가 있음을 보고하였으며 Ng 등 (1983)은 병어와 참바리의 경우 K값과 TMA 함량이 어육선도의 유용지표인 반면 최종 pH와 bacteria 수는 선도지표로서 효과적이지 않음을 보고하였고 Uchiyama와 Kakuda (1984)는 이온교환수지에서 용출되는 inosine (H_xR), hypoxanthine (H_x) 등의 ATP 분해산물을 분리한 후 250 nm에서의 흡광도를 측정하는 방법에 의하여 어육선도 지표 K값을 구하였다.

Shahidi 등 (1994)은 사후저장 중인 물개육에서 nucleotides 및 그 분해산물을 HPLC에 의하여 분석하고 선도지표로서 K, K₁, K₂, P값을 측정한 결과 저장기간 중 이들 값이 직선적으로 증가함을 확인하였으며 Bergann과 Kleemann (1994)은 별도의 strip을 사용하여 H_xR+H_x과 AMP+IMP를 각각 측정한 후 도표로부터 K값을 구하여 선도지표로 하고 이를 돼지고기 및 쇠고기에 적용시켜 양호한 결과를 얻었다. Lebron (1994)은 신선육에서 미생물 오염의 지표로서 muramic acid와 cadaverine을 검토했던 바 돈육, 우육, 칠면조육 모두에서 cadaverine이 좋은 지표였음을 확인하였으며 Sayem El Daher 등 (1984)도 우육에 있어서의 선도지표로 여러종류의 amine을 검토했던 결과 putrescine, cadaverine, spermidine과 총 균수 사이에는 유의적 상관관계가 존재함을 밝혔다. Nakatani 등 (1986)은 우육 및 토끼육의 경우 ATP 분해산물의 함량으로부터 선도지표로서 K₀값을 제안하고 이 값이 다른 종류의 축육, 어육, 무척추동물 및 갑각류의 선도결정에도 유용함을 보고하였다. Usui (1979)는 어육 선도지표인 K값을 메추라기육에 적용하고 VBN 측정, 관능검사를 병행한 후 이들 값 사이에 상관성이 있고 K값이 60%를 넘으면 1단계 부패상태라고 보고하였으며 Savran 등 (1976)은 토끼육의 선도를 관능적으로 측정하고 생리적 지표에 대한 측정결과와 비교하여 NH₃ 및 휘발성지방산 함량이 선

도 측정의 유용 지표라고 보고하였다. Cantoni 등 (1974)은 화학적 선도판정법을 관능평가 및 미생물시험 결과와 비교하고 free -SH : free tyrosine 비율, TVN이 축육의 선도지표로서 가장 적절하다고 보고하였다.

한편 Ivashov 등 (1991)은 일정한 변형력으로 압착 후 회복력에 있어서의 차이로 축육의 선도를 판정하는 기술을 개발하였고 Masahiko (1991)는 축육에 광을 조사 시 발생하는 빛의 스펙트럼을 분석하여 색소침착 정도를 계산하고 이로부터 선도를 결정하는 방법에 대하여 보고하였다. 한편 시료조직이 내는 임피던스의 phase angle을 측정하여 선도를 결정하는 방법 (Kristinsson, 1986), 가금류에 있어서 눈의 상태와 pH 변화로 측정하는 방법 (Giaccone 등, 1985), UV ray에 대한 형광반응강도 및 착색정도로부터 육 및 육제품의 선도를 판정하는 방법 (Butov, 1969)도 보고되고 있다.

어육 및 축육의 선도관리를 과학화, 객관화하기 위해 K값과 TMA 등의 유용한 화학적 선도지표를 신속하고 정확하게 측정하기 위하여 바이오센서 시스템을 활용하는 연구가 국외에서 행하여지고 있으며 이를 요약하면 다음과 같다.

Li 등 (1994)은 고정화 mould인 *Penicillium decumbens*를 사용하는 흐름주입분석 (flow injection analysis, FIA)형의 TMA 센서를 개발하고 개발된 바이오센서에 의한 측정결과를 GC에 의한 분석결과와 비교하여 좋은 상관성을 얻었으며 Lee 등 (1992)은 chilipepper rockfish에 있어 어육 선도의 후기 지표로서 TMA와 NH₃ 함량변화를 바이오센서 기법으로 측정하였고 Luong 등 (1991; 1992)과 Luong과 Male (1992)은 연어, 대구, 송어, 청어 등을 대상으로 모세관 전기영동과 amperometric probe를 사용하는 고정화 효소법에 의하여 선도지표 H값을 구하고 이 값이 기존의 K값과 잘 일치하며 이들 수치는 얼음에서 저장 중인 모든 어종에서 저장기간에 따라 증가하고 있다고 보고하였다. Chemnitius 등 (1992)은 탁막형의 polyamine 센서를 개발하고 센서의 기질특이성을 검토한 후 실제시료에 적용하여 그 결과를 HPLC 분석결과와 비교하였으며 Yao 등 (1988)은 고정화 alkaline phosphatase column과 purine nucleoside phosphorylase/xanthine oxidase column을 이용한 FIA형 바이오센서 시스템에 의하여 어육 선도를 분석하였다.

Ohashi 등 (1991)은 TMA gas 센서에 대한 연구에서 센서반응이 대구, 정어리 등의 어육 중 TMA 농도와 직선적으로 비례함을 확인하였다.

Nomoto와 Ohno (1987)는 일본에서 시판 중인 고등어, 정어리, 청어 등의 유통과정 중의 선도지표 K값의 변화를 바이오센서를 사용하여 측정하였고 Watanabe 등 (1984a; 1986; 1987)은 미생물센서, 다기능효소센서 등을 사용하여 어육의 선도지표인 K₁값을 측정하고 아울러 선도변화와 관련된 효소반응에 대한 전체적인 분석을 행하였다. 한편 Hlavay 등 (1994)은 화학발광을 이용하여 inosine과 hypoxanthine을 측정할 수 있는 fiber-optic 센서 시스템을 구성하였고 Watanabe 등 (1984b)도 inosine과 hypoxanthine을 동시에 측정할 수 있는 효소센서를 제조하고 이를 고등어 등의 시판어류에 대하여 적용 시 센서의 재사용성이 매우 양호하고 분석시간도 10분이내로 1~2시간 걸리는 기존 방법에 비해 크게 단축됨을 보고하였다.

Kress-Rogers와 D'Costa (1986)는 냉장육의 선도계측에 활용될 수 있는 glucose 센서를 개발하였고 Kress-Rogers 등 (1993)은 이를 발전시켜서 육표면으로부터 2~4 mm 부위의 glucose 함량을 측정하여 축육의 선도를 신속히 측정할 수 있는 바이오센서 array를 제조하고 이를 미생물에 의한 부패, 산패 등을 망라하는, 축육의 상태를 시장에서 신속히 검증할 수 있는 장치의 하나로 제안하였다. 한편 우육을 포함하는 축육에서 선도지표로서 putrescine, cadaverine과 같은 diamine과 ATP 분해산물인 inosine과 hypoxanthine을 신속히 측정할 수 있는 바이오센서 시스템에 관한 연구도 보고되고 있다 (Edwards 등, 1983; Ohashi와 Karube, 1993; Watanabe, 1988).

한편 산업화단계에 있는 선도 센서로는 일본의 경우 K값을 측정하는 column형 선도 센서가 Bio-Fresh란 이름으로 개발되어 있고 (大熊, 1994) Oriental Yeast사도 전기 화학적 원리에 의하여 작동하는 어육 및 축육에 대한 선도 센서를 산업화하고 있다 (Wagner와 Guilbault, 1994). DKK 상사와 Toyo Jozo사도 축육 및 축육가공품에 대한 선도 및 bacteria 센서를 개발하고 있다 (Ohashi와 Karube, 1993).

제 2절 재료 및 방법

1. Biogenic amine 센서

가. 바이오센서 시스템 구성

본 연구에서 어육 및 축육의 후기 선도지표의 하나로 biogenic amines (polyamines)을 바이오센서에 의하여 측정하고자 하였으며 그 계측시스템으로 ATP 분해산물 측정에 사용된 바와 같은 galvanic형의 산소전극 (Model BO-G, ABLE사, Japan)을 사용하는 FIA형 시스템을 활용하였다.

나. 고정화 효소 reactor 및 계측 시스템 제작

어육 및 축육의 선도지표의 하나인 biogenic amines을 측정하기 위한 바이오센서를 다음과 같이 제작하였다. Chitopearl bead (Fujibo, 富士紡績株式會社, Japan) 4 mL를 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5)에 넣고 세척하였다. 세척한 bead를 2.5% glutaraldehyde 용액에 가하고 30°C에서 2시간동안 교반하면서 반응시켰다. 이 후, 증류수와 동일한 완충용액으로 충분히 씻어준 후 diamine oxidase 5 units/mg을 4 mL의 인산 완충용액에 용해시켜 효소용액을 제조하고, glutaraldehyde에 활성화된 bead와 함께 30°C에서 2시간, 4°C에서 24시간 교반하며 반응시켰다. 고정화 효소 bead를 충전하기 위하여 직경 3 mm의 glass tube를 microcolumn으로 사용하였다. 연속형 계측 시스템의 구성도는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 일정 속도의 유속으로 완충용액 및 기질용액을 연속적으로 흘려 주기 위하여 Gilson사 (France)의 Miniplus 3 pump를 이용하고 Rheodyne injector는 Supelco사 (USA)에서 구입한 것을 사용하였다. Pump를 injector와 연결하고 고정화 효소 bead를 충전한 column을 차례로 연결하였다. 이 때, 연속형 시스템의 각 부분의 연결은 직경 0.8 mm인 capillary tubing (19-0041-01, Pharmacia, Sweden)을 사용하였다.

Flow cell에 산소전극을 넣고, microsyringe를 이용하여 20~100 μ L의 시료용액을 injector에 주입하였다. 효소와 기질과의 반응에서 소모되는 산소량은 산소전극 adaptor (ABLE사, Japan)에 의하여 polyrecorder (TOA사, Japan)에 기록가능한 신호로 변환시켰다. 이 때, 나타난 반응 peak는 높이 또는 면적을 계산하여 data로 이용하였다.

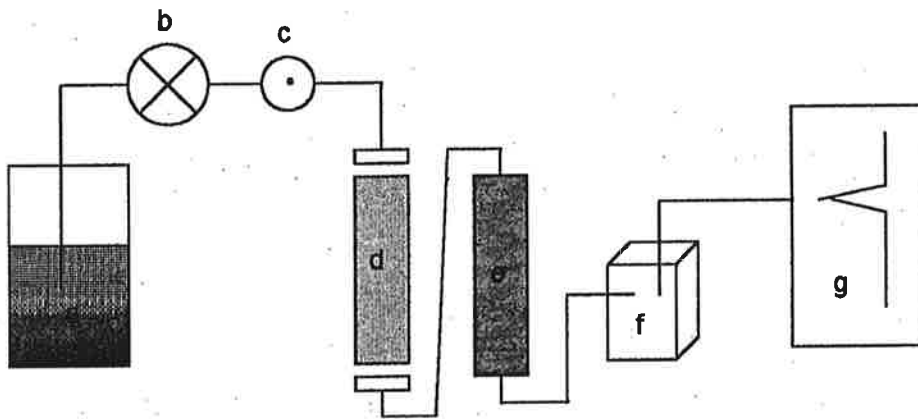


Fig. 1. Schematic diagram of the FIA system with immobilized enzyme reactor. a: buffer solution, b: peristaltic pump, c: injector, d: immobilized enzyme reactor, e: oxygen electrode adaptor, f: DO converter, g: recorder.

다. 연속형 효소 reactor 시스템의 최적조건

pH 4.0~8.5까지 인산, 초산, Tris-HCl, carbonate 완충용액을 이용하여 pH를 각각 달리하면서 효소센서의 감응도를 측정 비교하고, 순환 수욕조의 온도를 15℃에서 40℃까지 5℃ 간격으로 조절하고 연속적으로 인산 완충용액을 흘려 주면서 효소반응의 적정 온도를 조사하였다.

라. 유사물질 및 저해제의 영향

냉장어육 및 축육에 존재가능한 hypoxanthine, inosine, inosine 5'-monophosphate (IMP), adenosine 5'-monophosphate (AMP), adenosine 5'-diphosphate (ADP), adenosine 5'-triphosphate (ATP)와 같은 ATP 분해산물, TMA, 아미노산 및 염에 대한 영향을 각각 농도를 달리하여 기질인 putrescine과 함께 첨가하면서 효소센서가 나타내는 반응 감응도를 측정 비교하였다.

마. Polyamines의 검량곡선 및 센서분석을 위한 모델시료 측정

Diamine oxidase와 polyamine류가 반응하여 나타내는 각각의 polyamine류의 검량곡선을 구하였다. 이 때 기질로는 어육이나 축육의 변패과정 중 생성가능한 polyamines 중 putrescine, cadaverine, histamine, tryptamine, spermidine, spermine을 어육 및 축육의 초기 선도지표물질 중의 하나인 hypoxanthine 0.2%에 해당하는 mole농도인 14.7 mM이 되도록 만들어 사용하였으며, 이들의 농도를 각각 달리하여 반응감응도를 구하였다. 또한, putrescine 일정농도에 cadaverine, histamine, serotonin, tryptamin, tyramin, spermine, spermidine의 농도를 각각 0.05, 0.1, 0.2%로 달리하여 첨가한 후 putrescine 감응도와 비교하였다. 각각의 polyamines류가 섞인 모델시료가 putrescine 검량곡선을 이용하여 측정할 수 있는지를 살펴 보았다.

2. TMA 계측용 바이오센서

가. 바이오센서 시스템 구성

TMA를 선택적으로 이용할 수 있는 미생물을 생물요소로 하고 galvanic형 산소전극을 변환기로 하는 batch형 시스템을 활용하여 TMA 계측용 바이오센서 시스템을 구성하였다.

나. TMA 균주배양

TMA 분해균주로서 *Pseudomonas* sp. DSM6342와 *Penicillium decumbens* IAM 7275를 사용하였다. *Pseudomonas* sp. DSM6342의 배양용 배지는 1.36 g KH_2PO_4 , 2.13 g Na_2HPO_4 , 0.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 g MgSO_4 , 6 mg CaCl_2 , 3 mg FeSO_4 , 1 mg MnSO_4 , 1.5 mg Na_2MoO_4 , 3.38 g methylamine · HCl, 0.1 g yeast extract를 증류수 1 L에 용해시킨 후 1 M NaOH를 사용하여 pH 7.4로 조정한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 제조하였다. Agar slant 혹은 액체배지에 보존 중인 균체를 소량의 액체배지에서 종배양한 후 그 배양액을 2%의 부피비로 멸균된 액체배지에 접종하고 30°C에서 진탕배양하였다.

P. decumbens IAM7275의 배양용 배지는 0.01% TMA · HCl, 0.1% KCl, 0.05% MgSO_4 , 0.05% K_2HPO_4 , 0.001% FeSO_4 , 3% glucose를 증류수 1 L에 용해시킨 후 pH 6.0으로 조정한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 제조하였다. *Pseudomonas* sp. DSM6342의 경우와 마찬가지로 종배양을 거쳐 액체배지에서 진탕배양하였고 이 때 배양온도는 20°C였다.

다. 미생물고정화막의 제조 및 기질에 대한 응답특성

P. decumbens IAM 7275의 경우에는 4일, *Pseudomonas* sp. DSM6342의 경우에는 2일간 배양한 균체배양액을 적정량 취하여 직경 47 mm의 Immobilon cellulose nitrate 막이 장착된 Millipore사의 진공여과장치를 통하여 흡인여과하여 미생물을 흡착시키고 0.05 M 인산완충용액 (pH 7.6)으로 씻어 주었다. 미생물고정화막을 적절한 크기 (직경 6 mm)로 잘라 Teflon 막과 투석막 사이에 놓고 O-ring을 이용하여 산소전극에 고정하여 미생물센서를 제조하고 4°C에서 냉장보관하면서 사용하였다. 사용하고 남은 미생물고정화막은 과습상태에서 냉장보존하여 건조하지 않도록 하였다. 이 때, 기질인 TMA는 어육 및 축육의 초기 선도지표물질 중의 하나인 hypoxanthine 0.2%에 해당하는 mole농도인 14.7 mM이 되도록 만들어 사용하였다.

Pseudomonas sp. DSM6342의 경우에는 균체배양액 10, 15, 20 mL를, *P. decumbens* IAM7275의 경우에는 균체배양액 5, 10, 15 mL를 진공여과하여 제조한 미생물고정화막을 사용하여 제조한 TMA 센서가 기질농도의 증가에 따라 보여주는 응답특성을 측정하였다.

라. 완충용액 및 온도의 영향

TMA 계측용 바이오센서의 pH에 따른 감응도를 알아보기 위하여 *Pseudomonas* sp. DSM6342의 균체배양액 15 mL를 진공여과하여 미생물센서를 제조한 후 pH 6~8 범위의 0.05 M 인산 완충용액에서의 응답특성과 항온수조의 온도를 25℃에서 40℃까지 5℃간격으로 조절하면서 각 온도에서 미생물센서에 의한 산소량 감소에 따른 전류치 변화를 측정하였다.

마. 이온세기에 의한 영향

미생물센서인 TMA 센서가 완충용액의 이온세기에 의한 영향을 받는지 알아보기 위하여 인산 완충용액의 mole농도를 0.02~0.2 M로 달리하면서 반응 감응도를 비교하였다.

바. NaCl에 의한 영향

어육 중에는 식염이 상당량 존재하기 때문에 염농도에 의해 센서반응이 영향을 받을 것으로 추정되었다. 일반적으로 생리 식염수에 해당하는 염농도인 0.85% 이상까지 NaCl의 농도를 달리하면서 센서의 반응 감응도를 측정하였다.

사. ATP 분해산물에 의한 영향

냉장어육 및 축육에 존재가능한 hypoxanthine, inosine, IMP, AMP, ADP, ATP와 같은 ATP 분해산물에 의한 영향을 살펴 보기 위하여 이들 화합물을 실제시료 중에 최

대로 존재가능한 양의 4배 농도 (0.284%)가 되도록 제조한 후 기질인 14.7 mM TMA 용액과 함께 반응 cell에 가하여 TMA 센서의 감응도에 미치는 영향을 알아보았다. 또한, hypoxanthine, inosine, IMP, AMP를 섞은 혼합용액을 제조하여 TMA와 함께 주입한 후에 TMA만을 주입하였을 때의 감응도와 비교하였다.

아. 아미노산의 영향

어육 중에서 질소 함유물질은 대부분 단백질 형태로 존재하며 일반적으로 어육 중에 단백질은 가식부 100 g당 10.9~23.3% 정도가 함유되어 있는 것으로 보고되고 있으므로 TMA 측정 시 아미노산이 미생물센서에 미치는 영향을 알아 보았다. 여러종류의 아미노산 0.1%의 일정 농도만을 반응 cell내에 주입한 경우와 측정기질인 TMA 14.7 mM과 함께 주입한 경우를 살펴 보았다.

자. Biogenic amines에 의한 영향

어육 및 축육의 변패과정 중 생성가능한 polyamines에 의한 영향을 받는지 알아보 고자 이들의 농도를 0.001%와 0.01%로 각각 제조한 후 이것만을 반응 cell내에 주입한 경우와 측정기질인 TMA 14.7 mM과 함께 주입한 경우를 살펴 보았다.

차. 저장기간에 따른 TMA 센서의 안정성

Pseudomonas sp. DSM6342를 2일간 배양한 균체배양액을 Immobilon cellulose nitrate 막에 고정화한 TMA 센서의 분석가능횟수를 알아보기 위하여 4°C에서 0.1 M 인산 완충용액에 냉장보관하면서 센서의 감응도의 변화를 관찰하였다.

3. ATP 분해산물 계측용 바이오센서

가. 센서 시스템 구성

본 연구에서는 batch형과 flow cell을 사용하는 연속형의 바이오센서 시스템을 구성하였는데 이 때 사용된 batch형의 바이오센서와 flow cell을 사용하는 FIA형 시스템의 구성은 아래와 같이 하였다.

1) Batch type

효소 고정화막 : dialysis membrane
enzyme membrane
Teflon membrane

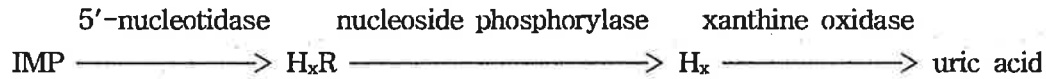
산소전극 : platinum cathode
lead anode
O-ring
1% NaOH, 1% NaCl (전해질)

2) FIA type

buffer solution - peristaltic pump - Rheodyne injector -
enzyme electrode — recorder - waste solution
flow cell
enzyme membrane

나. 효소반응기작 및 효소고정화막 제조

ATP 분해산물 중 냉장어육 및 축육에 주로 존재하는 IMP, inosine, hypoxanthine의 생성경로는 다음과 같다. 따라서, 아래의 3가지 효소를 단독 혹은 복합적으로 고정화한 효소고정화막을 사용하면 이들의 농도를 측정할 수 있다.



ATP 분해산물 측정에 사용된 효소제제로 xanthine oxidase (EC 1.1.3.22, 50 units/mg solid, XOD), nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1, 500 units/mg solid, NP), 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, 250 units/mg solid, 5'-NT)를 Sigma사 (MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

H_x 센서에 사용된 효소고정화막은 XOD를 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5) 125 μL에 용해시킨 후 Immobilon cellulose nitrate 막을 가하여 24시간 동안 4°C 냉장고에 정치하여 고정화한 후 이를 냉장보관하면서 사용하였다. H_x/H_xR 센서 제조에 사용된 효소고정화막은 XOD와 NP를 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5) 200 μL에 함께 용해시킨 후 여기에 cellulose nitrate 막을 가하여 XOD 고정화의 경우와 동일하게 고정화하였다. H_x/H_xR/IMP 센서에 사용된 효소고정화막은 XOD, NP와 5'-NT를 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5) 200 μL에 함께 용해시킨 후 이 효소용액에 cellulose nitrate 막을 가하여 XOD 고정화의 경우와 동일하게 처리하였다.

이와 같이 제조한 각각의 효소고정화막을 Teflon막과 투석막 사이에서 O-ring으로 산소전극에 고정하여 효소센서를 제조하고 4°C에서 냉장보관하면서 사용하였다. 이 때, ATP 분해산물 계측용 바이오센서의 응답특성은 반응 cell안에 완충용액 7 mL를 넣고 측정하고자 하는 ATP 분해산물 (0.2% hypoxanthine에 해당하는 14.7 mM 농도)의 표준용액 20 μL를 가했을 때, 효소반응에 의하여 야기되는 산소량 감소에 따른 전류치의 감소를 측정하였다. 이 때 H_x 센서의 기질로는 14.7 mM의 hypoxanthine을 사용하였고, H_x/H_xR 센서의 기질로 각각 14.7 mM의 hypoxanthine, inosine과 두 기질의 혼합용액을 사용하였다. H_x/H_xR/IMP 센서의 경우 각각 14.7 mM의 hypoxanthine, inosine, IMP와 세 가지 기질의 혼합용액을 사용하였다.

다. H_x 센서 제조와 응답특성

Immobilon cellulose nitrate 막을 사용하여 XOD를 고정화하여 H_x 센서를 제조하여 시스템을 구성하였다. 이렇게 제조한 H_x 센서의 H_x 에 대한 응답특성을 batch 시스템에서 검토하였다.

라. H_x/H_{xR} 센서 제조와 응답특성

XOD와 NP를 Immobilon cellulose nitrate 막에 동시에 고정화하여 H_x/H_{xR} 센서를 제조하였다. 제조된 고정화막을 H_x 센서와 같이 galvanic형 산소전극에 장착한 후 H_x/H_{xR} 센서의 전기화학적 특성을 batch 시스템에서 검토하였다.

마. $H_x/H_{xR}/IMP$ 센서 제조와 응답특성

$H_x/H_{xR}/IMP$ 센서의 제조는 다음과 같이 행하였다. XOD, NP와 5'-NT를 동시에 고정화하여 $H_x/H_{xR}/IMP$ 센서를 제조한 후 전기화학적 특성을 batch 시스템에서 검토하였다.

바. 완충용액, pH 및 온도의 최적화

pH 및 완충용액의 종류에 따른 효소센서의 감응도를 알아보기 위하여 0.05 M 인산 완충용액으로 pH 6~8까지, 0.05 M 초산 완충용액으로 pH 4~6까지, 0.05 M Tris-HCl 완충용액으로 pH 8~9까지, 0.05 M 탄산 완충용액으로는 pH 9~10까지 조절한 후 각 효소센서의 전류반응을 비교하였다.

항온수조의 온도를 15°C에서 45°C까지 5°C 간격으로 조절하면서 각 온도에서 효소센서에 의한 산소량 감소에 따른 전류치의 감소를 측정하였다.

사. NaCl에 의한 영향

어육 중에는 식염이 상당량 존재하기 때문에 염농도에 의해 센서반응이 영향을 받

을 것으로 추정되었다. ATP 분해산물 측정센서도 염에 의해 영향을 받는지 알아보기 위하여 H_x 센서의 경우에서 0~2.0%까지 NaCl의 농도를 달리하면서 센서의 반응 감응도를 측정하였다.

아. 당류 및 아미노산의 영향

ATP 분해산물 측정 시 당류 및 아미노산을 첨가하여 이들이 효소센서의 전류반응에 미치는 영향을 알아보았다. 측정기질로는 hypoxanthine을 사용하였으며 addition method로 여러 종류의 당류와 아미노산을 첨가하여 감응도의 차이를 측정하였다. 이 때, 첨가한 당류로는 D-glucose, D-fructose, D-sucrose, D-maltose, D-sorbitol, D-mannitol이 있었으며, 첨가수준은 어육 중의 당함량이 0.3~6.5 g/100 g인 점을 고려하여 실제시료 중의 각 당류의 농도를 약 2%로 추정하였고, 7.9%의 당 용액을 각각 제조하여 이 용액 100 μ L와 기질인 2.9 mM hypoxanthine 용액 100 μ L를 6.9 mL의 인산 완충 용액에 첨가하여 최종적으로 첨가된 당류의 농도가 반응 cell내에서 추정치의 4배가 되도록 하였다. 아미노산으로는 L-형의 alanine, aspartic acid, arginine, glycine, glutamic acid, histidine, lysine · HCl, proline, serine, threonine, tryptophan, valine을 사용하였는데, 아미노산의 경우 어육 중 단백질 함량이 가식부 100 g당 10.9~23.3%인 점을 고려하여 실제시료 중의 각 아미노산의 농도를 약 1%로 추정하였고, 4%의 아미노산 용액을 각각 제조하여 이 용액 100 μ L와 기질인 2.9 mM hypoxanthine 용액 100 μ L를 6.9 mL의 인산 완충용액에 첨가하여 최종적으로 첨가된 아미노산의 농도가 반응 cell내에서 추정치의 4배가 되도록 하였다.

4. ATP 분해산물 측정을 위한 연속형 바이오센서 시스템 개발

가. 연속형 바이오센서 시스템 제작

연속형 바이오센서 시스템의 개발을 위하여 사용한 pump는 Gilson사 (France)의 Miniplus 3과 Cole-Parmer사 (USA)의 model 7618-30이었으며, Rheodyne injector는 Supelco사 (USA)에서 구입한 것을 사용하였다. Pump를 이용하여 일정 속도의 유속으로 완충용액 및 기질용액을 연속적으로 흘려 보내줄 수 있도록 하였다. Pump를 injector와 연결하고 microsyringe를 이용하여 20~100 μL 의 시료용액을 injector에 주입하였다. 고정화효소 column을 이용하는 경우에는 injector와 column을 연결하여 주었으며, 고정화효소막을 이용하는 경우에는 산소전극에 O-ring으로 효소막을 고정하였다. 이 때, 연속형 시스템의 각 부분의 연결은 직경 0.8 mm인 capillary tubing (19-0041-01, Pharmacia, Sweden)을 사용하였고 시스템의 총 길이는 45 cm였다. Flow cell에 산소전극을 넣고 효소와 기질과의 반응에서 소모되는 산소량은 산소전극 adaptor (ABLE사, Japan)에 의하여 polyrecorder (TOA사, Japan)에 기록가능한 신호로 변환하였다. 이 때, 나타난 반응peak는 높이, 무게 또는 면적을 계산하여 data로 이용하였다.

나. 효소의 고정화방법 검토

1) Cellulose nitrate 막을 이용한 고정화법

XOD를 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5) 125 μL 에 용해시킨 효소용액에 산소전극의 크기에 맞게 자른 cellulose nitrate 막을 담가 4°C에서 24시간 정치 후 고정화하였다.

2) Nylon 막을 이용한 고정화법

Nylon 막 (150~214 threads/cm)을 산소전극의 크기에 맞도록 직경 5 mm로 잘라 유리 slide에 고정시킨 후, 이를 활성화시키기 위하여 dimethyl sulfate 용액에 담가 수욕조에서 5분간 반응시키고 얼음조에서 반응을 정지시킨 후 anhydrous methanol에 30초 동안 2번 담가 꺼냈다. 유리 slide에서 nylon 막을 떼내어 L-lysine (0.5 M, pH 9.0) 용액에 2시간동안 담근 후 12.5%의 glutaraldehyde (pH 8.5, borate 완충용액에 용해)에 45

분간 담가 꺼내어 완충용액으로 세척하였다. XOD를 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5) 125 μ L에 용해시켜 효소용액을 만들고 여기에 활성화시킨 nylon 막을 담가 4°C에서 24 시간 정치시킨 후 보관하면서 사용하였다.

3) Chitoparl beads를 이용한 고정화법

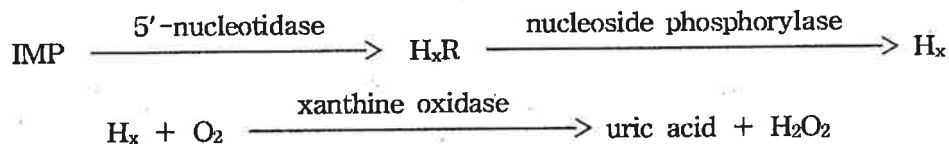
Chitoparl beads (Fujibo, 富士紡績株式會社, Japan) 4 mL를 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5)에 넣고 세척하였다. 세척한 beads를 희석 glutaraldehyde 용액에 가하고 30°C에서 2시간동안 교반하면서 반응시켰다. 그 직후 증류수와 동일한 완충용액으로 충분히 씻어준 후 XOD를 4 mL의 인산 완충용액에 용해시킨 효소용액에 넣어 30°C에서 2시간, 4°C에서 24시간 진탕하며 반응시켰다. 고정화 효소 beads를 충전하기 위하여 직경 3 mm의 glass tube를 길이를 달리하여 제작한 것을 micro-column으로 사용하였다.

4) Aminopropyl-glass를 이용한 고정화법

Aminopropyl-glass (80~120 mesh, Sigma사) 0.2 g을 취하여 인산 완충용액 (0.05 M, pH 7.5)에 담가 4°C에서 하룻 밤동안 정치시킨 후, Chitoparl beads를 이용한 고정화 방법과 같은 방법으로 효소를 고정화하였다.

다. 연속형의 ATP 분해산물 계측을 위한 다전극 효소센서 개발

ATP 분해산물 중 어육 및 축육에 주로 존재하는 IMP, inosine, hypoxanthine의 생성경로에 따라 효소를 단일 또는 복합으로 고정화하여 효소 reactor를 제조하고 연속형의 센서 시스템을 구성하였다.



센서제작에 사용된 효소는 XOD, NP, 5'-NT이었다. Chitopearl 3001 5 mL를 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5) 12 mL에 넣고 4°C에서 하룻밤 정치시킨 후 2.5% glutaraldehyde 용액을 넣고 30°C에서 2시간 처리한 후 증류수와 완충용액으로 씻어 주었다. Hypoxanthine 측정을 위한 효소 reactor는 XOD를 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5) 2.3 mL에 녹여 효소용액을 만든 후 여기에 glutaraldehyde로 처리한 Chitopearl beads 2.5 mL를 넣고 30°C에서 2시간, 4°C에서 24시간 반응시킨 다음 microcolumn에 충전하여 제조하였다. Inosine 측정을 위한 효소 reactor 제조는 XOD 와 NP를 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5) 2.3 mL에 함께 녹이고, IMP측정을 위한 효소 reactor를 위해서는 XOD와 NP를 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5) 2.3 mL에 녹이고 5'-NT를 녹인 효소용액 100 μ L를 첨가하여 섞은 후 각각의 효소용액에 glutaraldehyde로 처리한 Chitopearl beads 2.5 mL를 넣고 XOD 효소 고정화와 같은 방법으로 처리하였다.

연속형 바이오센서 시스템의 구성은 먼저 일정 유속으로 완충용액이 흐를 수 있도록 flow line에 peristaltic pump를 연결하였고 시료주입을 위해 injector를 연결하였다. 여기에 H_x reactor와 산소전극을 연결하고 H_xR reactor와 산소전극, IMP reactor와 산소전극을 각각 직렬로 연결하였다 (Fig. 2). 각각의 산소전극에서 나온 미세전류를 DO converter를 통하여 전압치로 바꾸고 multirecorder에 연결하였다.

라. 효소 reactor의 column 길이에 따른 영향

ATP 분해산물 측정을 위한 FIA형 다전극 효소센서 시스템의 최적화를 위하여 각 효소 reactor의 column 길이에 따른 영향을 구명하였다.

마. PC화된 센서 시스템의 적용

바이오센서로부터 얻어지는 측정신호를 컴퓨터에 입력하기 위한 시스템을 구성하였다. 바이오센서에서 생물요소와 기질과의 반응으로부터 소모되어지는 산소량에 따라 발생하는 미세전류를 pre-amplifier (model 5182, EG&G사, USA)를 통하여 증폭시키고

multiplexer를 거치게한 후 접속 card (model 818 HG, 영화정밀)를 사용하여 입력된 채널로부터 얻어진 analog 신호를 digital 신호로 변환하여 컴퓨터에 나타나도록 하였다. 이렇게 하여 얻은 data는 Excel 프로그램으로 전송받아 분석하였다.

바. 바이오센서 시스템에 의한 모델 시료의 분석

효소 reactor를 3개를 연결하여 제작한 ATP 분해산물 측정을 위한 다전극 효소센서의 계측 신뢰성을 확인하기 위하여 ATP 관련물질인 hypoxanthine, inosine 및 IMP가 임의로 들어있는 모델 시료를 제조하여 측정한 후 실제 알고 있는 기질의 농도값과 비교하였다. Model 시료는 상기의 세 성분 중 두가지 성분은 임의의 농도로 고정하고 한가지 성분만을 농도를 증가시켜 제조하였다.

5. 시료처리 방법의 정립 및 시료분석

바이오센서에 의한 측정치와 비교하기 위한 비교분석법을 먼저 정립하였다. 그 후 바이오센서에 의한 시료처리를 행하고 시료분석을 행하였다.

가. ATP 분해산물 측정을 위한 비교분석법 : HPLC 방법

어육 10 g을 냉장 보존된 10% HClO₄와 함께 분쇄한 후 30분 방냉한 것을 원심분리하여 상등액을 취하고 잔류물을 동일하게 처리하여 상등액에 합하였다. 이를 냉장 보존된 5 M KOH용액으로 pH 6.5로 맞춘 후 10% HClO₄용액으로 100 mL로 정용하였다. 30분 방치 후 여지를 사용하여 여과한 후 여액을 0.45 μL syringe filter를 통과시켜 K₂ 값 분석용 시료를 제조하였으며 시료 주입량은 10 μL였다. 분석에 사용된 HPLC는 Waters 501 (Waters사, MA, USA)이고 검출기는 484 Tunable Absorbance Detector (Waters사)였으며, 이 때 254 nm에서의 흡광도변화를 측정하였고 흡광도범위 (AUFs)는

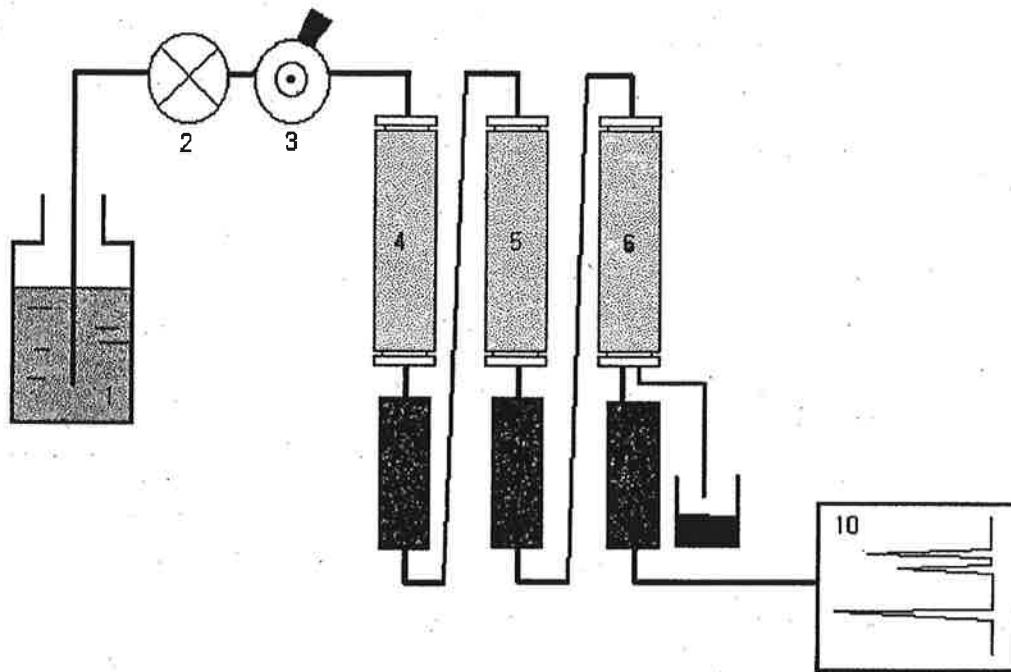


Fig. 2. Schematic diagram of apparatus for the ATP-related compounds using an FIA system with immobilized enzyme reactors.

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| ① Buffer solution | ⑥ Enzyme reactor 3 (XOD+NP+5'-NT) |
| ② Pump | ⑦ Oxygen electrode 1 |
| ③ Injector | ⑧ Oxygen electrode 2 |
| ④ Enzyme reactor 1 (XOD) | ⑨ Oxygen electrode 3 |
| ⑤ Enzyme reactor 2 (XOD+NP) | ⑩ Multirecorder |

0.5로 하였다. 칼럼은 μ Bondapak C₁₈ (3.9 mm i.d.×300 mm, Waters사)을 사용하였고 분석시 40℃로 유지하였다. 유속은 분당 2.0 mL로 하였고 이동상으로는 1% triethylamine (H₃PO₄로 pH 6.5 조절)을 사용하였다.

나. Biogenic amines 측정을 위한 비교분석법 : HPLC 방법

어육 2 g을 0.4 M HClO₄ 10 mL에 넣어 균질화시킨 후 3,000 ×g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 잔류물을 동일하게 처리한 후 상등액을 모으고 0.4 M HClO₄ 용액으로 25 mL로 정용하였다. Biogenic amine류의 표준품으로 β -phenyl-ethylamine, histamine, serotonin, cadaverine, spermine, spermidine, putrescine, tryptamine, tyramine을 각각 70, 80, 60, 90, 130, 120, 90, 60, 60 mg씩 취하여 증류수에 단독 혹은 혼합하여 용해시켰다. 각각의 시료 및 표준품 1 mL에 2 M NaOH 200 μ L와 포화 sodium bicarbonate 300 μ L씩 가한 후 acetone에 1% 농도로 용해된 dansyl chloride 용액을 2 mL 첨가하였다. 40℃에서 45분간 유도화 반응을 진행시킨 후, 100 μ L의 ammonia 용액을 가하여 30분간 정치시켰다. Acetonitrile 5 mL를 첨가하고 2,500 ×g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취하고 이것을 HPLC 분석용 시료로 하였다. Biogenic amines의 측정에 사용된 검출기와 칼럼, 분석온도는 K_i 분석 시와 동일하였다. 0.1 M ammonium acetate와 acetonitrile 혼합용매를 사용하여 용매조성을 바꿔가며 실험한 결과, 0.1 M ammonium acetate와 acetonitrile이 40 : 60 (v/v)의 비율일 때 분리능이 가장 양호하여 이를 이동상으로 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min 였으며 시료 및 표준품의 주입량은 10 μ L 였고, 254 nm에서의 흡광도변화를 측정하였다.

다. TMA 측정을 위한 비교분석법 : Conway micro-diffusion 방법

각각의 어육 5 g을 취하여 4% trichloroacetic acid (TCA) 20 mL를 넣어 homogenizer로 약 30초간 균질화한 후 30분간 4℃에서 방치하였다. 이 후 filter membrane (Whatman No. 1)로 여과하고 받은 것을 시료액으로 하였다. Conway unit의

내실에는 1/150 N HCl 1 mL를 넣고 외실에는 포화 K₂CO₃와 formaldehyde를 각각 1 mL씩 넣었다. 시료액 중 1 mL를 취하여 conway unit의 외실에 넣고 37℃에서 90분 간 방치하였다. 이 후 1/70 N Ba(OH)₂로 적정하였다. 이 때, 적정된 mL로부터 환산되는 TMA의 농도는 다음과 같이 구하였다.

$$\text{TMA (mg\%)} = \frac{B - A}{B} \times F \times \frac{14(4a + aW)}{150a} \times 100$$

B : Blank의 적정량 (mL)

F : N/70 Ba(OH)₂의 factor : 1

150 : HCl의 농도

a : Sample의 양

14 : N의 당량

4 : 회석배수

W : Sample의 수분함량

휘발성 염기질소의 분석 시는 외실에 포화 K₂CO₃만 가하고 TMA의 경우와 동일한 과정을 거쳐 분석하며 계산식도 위의 경우와 동일하다.

라. 센서분석을 위한 시료처리 및 분석

바이오센서에 의한 시료처리 과정은 비교분석법에 비하여 아주 간편하다. 즉, 어육 5 g을 취하여 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5) 20 mL를 넣고 homogenizer로 약 30초간 균질화시킨 후 여지로 여과한 액을 microsyringe (0.45 μm)로 여과하여 받은 것을 센서 분석용 시료액으로 하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. Biogenic amine 센서

가. 기질에 대한 응답특성

Diamine oxidase의 효소 반응은 어떤 특정 기질에 대하여만 반응하는 절대적 특성을 갖는 것이 아니라 일반적으로 polyamine류에 대하여 반응성을 나타내고 있다. 그러나, diamine oxidase는 여러 amines 중에서도 특히 putrescine 1 μ mole을 산화시킬 때 1 unit이라고 정의되고 있다. Diamine oxidase의 기질농도에 대한 응답특성을 알아보기 위하여 putrescine 용액을 20 μ L씩 연속첨가하여 검량선을 작성한 결과, putrescine 0.4 mM 구간까지 검량곡선을 구할 수 있었다 (Fig. 3). 또한, 어육이나 축육의 변패과정 중 생성가능한 polyamines 중 putrescine 이외에 cadaverine, histamine, tryptamine, spermidine, spermine을 어육 및 축육의 초기 선도지표물질 중의 하나인 hypoxanthine 0.2%에 해당하는 mole농도인 14.7 mM 농도로 주입한 후, putrescine의 감응도를 100%로 하였을 때와 비교하여 상대적 감응도를 측정하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 cadaverine과 histamine이 69% 이상의 높은 반응 감응도를 나타내었다.

나. 완충용액, pH 및 온도의 영향

Diamine oxidase를 고정화한 효소 reactor를 이용한 계측 시스템의 완충용액, pH 및 온도에 따른 감응도 변화를 측정하였다 (Fig. 4). Putrescine을 기질로 하였을 때, pH 7.2와 7.5의 인산 완충용액을 사용한 경우 감응도가 높게 나타났다. 각각의 온도에서 효소센서의 산소량 감소에 따른 반응 감응도를 측정한 결과 최적온도는 35 $^{\circ}$ C임을 알 수 있었다 (Fig. 4).

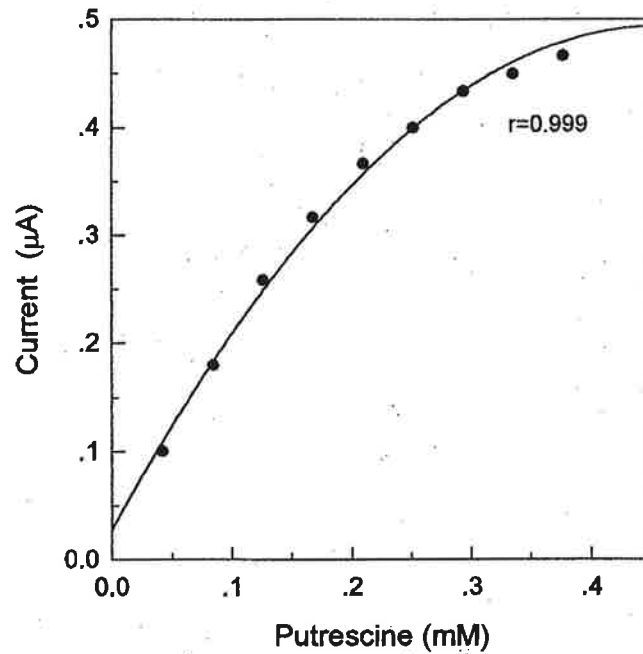


Fig. 3. Calibration curve of putrescine by the polyamine sensor. The enzyme electrode was immersed into the water-jacketed glass vessel ($25\pm 1^\circ\text{C}$) filled with 7 mL of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2). Magnetic stirring ensured homogeneity of the solution. A successive 20 μL addition of 14.7 mM putrescine was done and the steady-state current responses were measured. Recorder sensitivity and chart speed were 5 mV and 60 mm/hr, respectively.

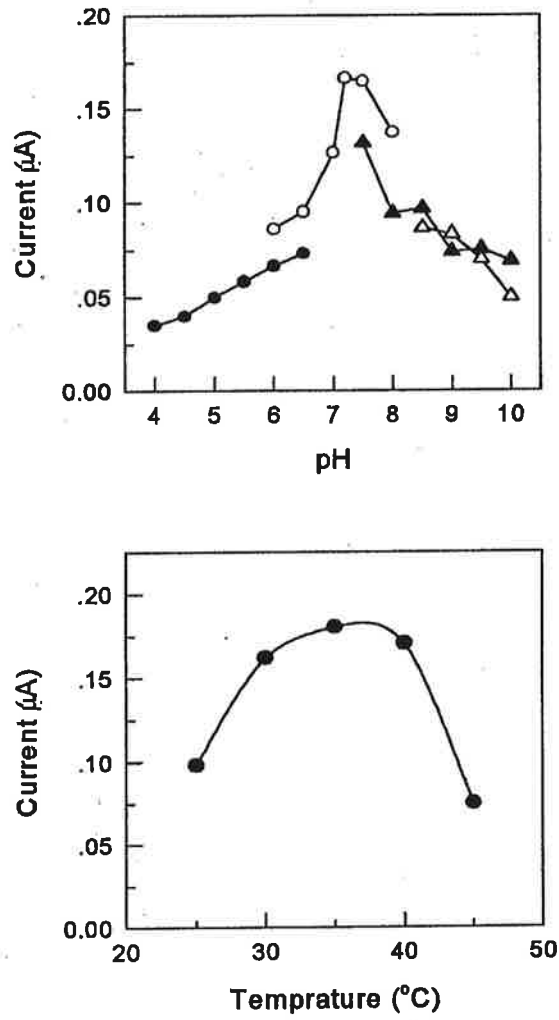


Fig. 4. Effect of pH and temperature on the current responses of the polyamine sensor with immobilized diamine oxidase (●: acetate buffer, ○: phosphate buffer, ▲: Tris-HCl buffer, △: carbonate buffer).

Table 1. Selectivity of the biogenic amine sensor against the response on putrescine. The added concentration of biogenic amines was 14.7 mM

Compound	Relative response (%) ^a
Putrescine	100
Cadaverine	87.2±3.5
Histamine	69.2±0.1
Tryptamine	14.0±0.4
Spermidine	18.6±0.0
Spermine	11.6±0.4

^a Mean ± SD.

다. ATP 분해산물 및 TMA의 영향

사후 24시간 안팎에서 유통되는 냉장어육 및 축육 중에 주로 존재하는 hypoxanthine, inosine, IMP, AMP, ADP, ATP 같은 ATP 분해산물과 TMA에 대한 영향을 살펴보기 위하여 이들 화합물을 실제시료 중에 최대로 존재가능한 양의 4배 농도 (0.284%)로 제조한 후 100 μ L를 가하였다. 이 때, 기결로 putrescine 용액 (14.7 mM) 100 μ L를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 biogenic amine 센서가 위의 성분들에 대하여 보여 주는 감응도를 비교 측정하였다. Table 2에서 나타난 것처럼 ATP 분해산물과 TMA는 단독으로 존재할 때 putrescine에 대한 전류반응의 10.0~78.1%를 나타냈으며, putrescine과 공존할 때에는 7.9~37.5%의 추가적인 전류반응을 보여 주었다. 이와같

은 현상은 실제 존재하는 ATP 분해산물과 TMA의 농도보다 현저하게 높은 농도로 실험하였던데 그 원인이 있는 것으로 보인다. ATP 분해산물의 영향을 보다 정확하게 구명하기 위하여 각각의 ATP 분해산물을 실제시료 중에 존재가능한 범위의 최소 및 최대 농도의 그 중간값에 해당하는 농도로 ATP 분해산물의 혼합용액을 제조하고, 기질로 사용된 putrescine과 함께 각각 주입한 후의 효소센서의 감응도를 putrescine만을 첨가한 경우와 비교하였다 (Table 2). 이 때, 실제시료 중에 존재하는 ATP 분해산물 농도에서 biogenic amine 센서가 putrescine에 대하여 보여주는 감응도는 putrescine 자체에 대한 감응도와 거의 같은 수준임을 알 수 있었다. 그러므로, 실제시료 측정 시 ATP 분해산물이 biogenic amine 센서의 기질 응답성에 거의 영향을 끼치지 않음을 보여 주었다.

라. 염, 아미노산에 대한 영향

어육 중에는 식염이 상당량 존재하기 때문에 염농도에 의한 센서반응을 고려해야 할 것으로 생각한다. 그리하여, NaCl의 농도를 달리하면서 센서의 감응도를 측정한 결과, 생리 식염수에 해당하는 염농도인 0.8~0.85%까지 첨가한 경우 20%의 감응도 감소를 나타내었고, 1.0% 이상 첨가한 경우 반응 감응도가 매우 떨어짐을 알 수 있었다 (Table 3). 어육 중에서 질소함유물질은 대부분 단백질의 형태로 존재하는데 일반적으로 어육 중에 단백질은 가식부 100 g당 10.9~23.3% 정도가 함유되어 있는 것으로 보고되고 있으므로 여러 종류의 아미노산 일정 농도 (0.1%)를 측정기질인 putrescine (14.7 mM)과 함께 주입한 경우의 반응 감응도를 살펴 보았다 (Table 4). Polyamines 중 적색 어육의 저장과정 중에서 가장 품질에 영향을 주는 대표적인 성분인 histamine은 histidine의 탈탄산반응에 의하여 생성되는데, histidine에 의한 센서 감응도 영향은 1.8% 이내로 나타나, 그의 영향이 비교적 작음을 보여 주었다. 염이나 아미노산에 의한 영향을 해결하기 위한 방법으로서 실제시료 측정 시에는 간단한 전처리 과정을 거쳐야 할 것으로 생각된다.

Table 2. Effects of ATP-related compounds and TMA on the current responses of the biogenic amine sensor. The added concentration of biogenic amines was 14.7 mM

Compound	Relative response (%) ^a	
	Putrescine not added	Putrescine added
Control ^b	100	100
H _x	38.5±0.1	137.5±0.6
H _x R	21.4±0.0	131.8±1.6
IMP	10.0±0.0	113.8±0.7
AMP	26.3±0.1	123.8±0.8
ADP	78.1±0.1	116.9±0.4
ATP	48.1±0.0	107.9±2.7
TMA	14.9±0.1	- ^c
ATP-related compound mixture		
0.0036%	- ^c	96.0±0.3
0.0374%	- ^c	103.0±0.5
0.0711%	- ^c	103.6±1.4

^a Mean±SD.

^b Putrescine was used as the control.

^c Not determined.

Table 3. Effect of NaCl concentrations on the current responses of the biogenic amine sensor

Added NaCl concentration (%)	Relative response (%)
0.2 M Putrescine	100.0
0.2	84.4±4.4
0.5	85.0±7.1
0.8	80.0±0.0
1.0	58.7±9.2
1.5	45.7±9.2
2.0	30.4±0.0

Table 4. Effects of various amino acids on the current responses of biogenic amine sensor. The added concentration of amino acids was 0.1%

Compound	Relative response (%) ^a
Control (putrescine)	100
Alanine	18.8±1.4
Arginine	3.6±1.0
Aspartic acid	7.0±2.6
Glutamic acid	5.4±3.6
Glycine	12.3±0.4
Histidine	1.8±0.9
Proline	7.1±3.6
Serine	9.8±3.0
Threonine	4.3±1.9
Tryptophan	1.8±2.5
Valine	6.8±2.6

^a Mean ± SD.

마. 모델 시료 분석

Biogenic amine류는 신선육의 저장시작 후부터 일반적으로 서서히 증가하기 시작하는데, 시판되는 냉장 및 냉동어육 추출액에 대하여 HPLC에 의한 분석을 행한 결과, biogenic amine류는 측정되지 않았으므로 이들 어육의 신선도가 매우 양호함을 보여 주었기에 이 후에 효소 reactor 시스템을 이용하는 경우 저장온도를 달리하여 어육의 선도 지표로서 biogenic amine의 함량 변화를 측정해 보고자 한다. 그리하여, 본 실험에서는 실제 제작한 효소 reactor 시스템으로 biogenic amines의 함유유무를 측정하기 위하여 기질인 putrescine과 다른 amine을 함께 첨가한 것을 시료로 제조하고 이들이 보여 주는 반응 감응도를 측정하였다. Diamine oxidase는 putrescine 기질에 대하여 가장 크게 반응성을 나타내므로 여러 amine에 대하여 반응성을 나타내더라도 putrescine에 비하여 상대적으로 작기 때문에 모델 시료에 대한 측정을 putrescine의 검량곡선에 비교하여 측정하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 여러 종류의 polyamine이 첨가된 모델 시료를 diamine oxidase를 고정화한 효소 reactor 시스템에 의하여 측정하여 본 결과, putrescine만이 존재할 때의 반응성의 19.5% 범위 내에서 측정이 가능하다는 것을 알 수 있었다.

Table 5. Determinations of polyamines by a biogenic amine sensor with diamine oxidase

Added polyamine concentration (%)	Relative response (%) ^a		
	putrescine concentration (%)		
	0.10	0.25	0.50
Cadaverine	0.05	103.3	100.0
	0.10	113.3	103.3
	0.20	126.7	112.2
Histamine	0.05	81.1	80.0
	0.10	83.8	75.9
	0.20	83.8	72.0
Serotonin	0.05	104.0	97.5
	0.10	108.0	97.8
	0.20	120.0	104.3
Tyramine	0.05	94.1	98.2
	0.10	94.1	99.1
	0.20	97.1	100.0
Tryptamine	0.05	100.0	98.1
	0.10	103.3	98.8
	0.20	110.0	99.4
Supermine	0.05	102.4	104.3
	0.10	119.5	104.3
	0.20	119.5	107.1
Supermidine	0.05	106.0	102.0
	0.10	112.0	104.7
	0.20	118.0	106.6

^a Arbitrarily taken as 100% when putrescine was only added into the reaction mixture.

2. TMA 계측용 바이오센서

가. 기질에 대한 응답특성

P. decumbens IAM 7275의 경우에는 4일, *Pseudomonas* sp. DSM6342의 경우에는 2일간 배양한 균체배양액으로 효소센서를 제조한 후 *Pseudomonas* sp. DSM6342의 경우에는 균체배양액 10, 15, 20 mL를, *P. decumbens* IAM7275의 경우에는 균체배양액 5, 10, 15 mL를 진공여과하여 제조한 미생물고정화막을 사용하여 제조한 TMA 바이오센서가 기질농도의 증가에 따라 보여주는 응답특성은 Fig. 5와 같다. *P. decumbens* IAM7275의 배양균체를 생물요소로 사용한 경우 TMA에 대한 효소전극의 감응도는 *Pseudomonas* sp. DSM6342의 배양균체를 생물요소로 사용한 경우보다 현저히 높게 나타났지만 *P. decumbens* IAM7275 균주는 배양에 걸리는 시간이 길고 포자를 형성하여 진공여과 시 cellulose nitrate 막에 균일하게 여과되지 않는 문제점이 있어 이후의 실험에서는 *Pseudomonas* sp. DSM6342 균주를 사용하였다.

Table 6는 TMA 계측용 미생물센서의 반복측정 시의 재현성을 보여준다. Table 6에 표시되어 있는 것처럼 미생물고정화막 제조에 배양균체를 많이 사용하면 반복측정 시의 재현성이 높아짐을 알 수 있었으며 특히 10~15 mL 이상의 배양균체를 사용한 경우 변이계수가 5% 이하로 나타나, 본 연구의 TMA 바이오센서가 정확성을 지닌 신속계측수단으로 활용가능할 것으로 사료되었다.

Pseudomonas sp. DSM6342의 균체배양액 15 mL를 진공여과하여 제조한 미생물고정화막이 장착된 TMA 바이오센서가 기질인 TMA의 농도증가에 따라 보여주는 감응도의 변화는 Fig. 6과 같으며 1.5 mM의 TMA 농도까지 준직선적 (quasi-linear)인 검량선을 보여주었다.

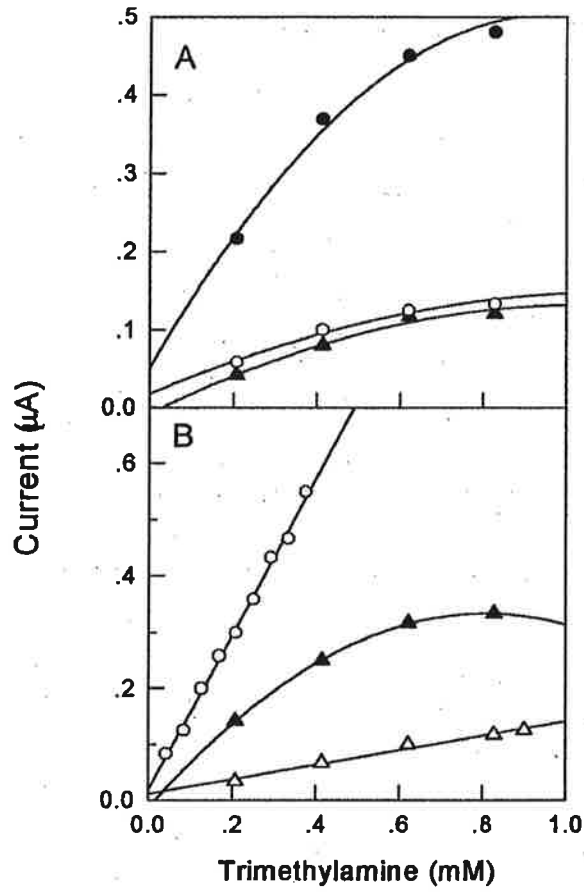


Fig. 5. Calibration curves of trimethylamine by the microbial sensors. A. *Pseudomonas* sp. DSM6342. B. *P. decumbens* IAM7275. (△: 5 mL, ▲: 10 mL, ○: 15 mL, ●: 20 mL).

Table 6. Reproducibilities of the trimethylamine microbial sensors

	Addition of microbes (mL)	Response (μA) ^a	CV (%) ^b
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM6342	10	0.1361 ± 0.0096	7.1
	15	0.2750 ± 0.0117	4.3
	20	0.3584 ± 0.0118	3.3
<i>Penicillium decumbens</i> IAM7275	5	0.0506 ± 0.0042	8.3
	10	0.2611 ± 0.0096	3.7
	15	0.3250 ± 0.0117	3.6

^a Measurement was done in triplicate.

^b Coefficient of variability (SD/mean \times 100, %).

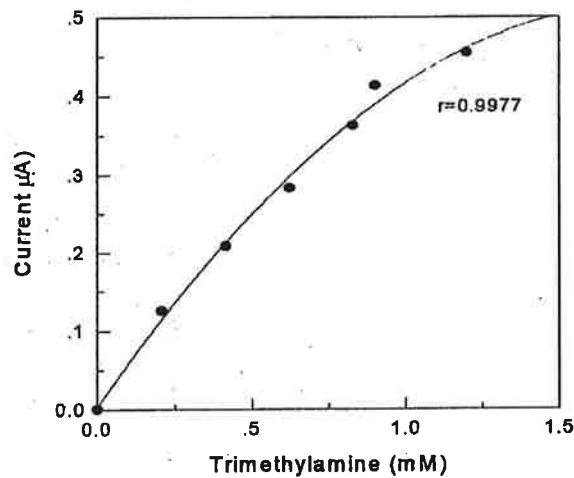


Fig. 6. Calibration curve of trimethylamine by the microbial sensor with *Pseudomonas* sp. DSM6342.

나. pH 및 온도의 영향

TMA 계측용 바이오센서의 pH에 따른 감응도를 알아보기 위하여 *Pseudomonas* sp. DSM6342의 균체배양액 15 mL를 진공여과하여 미생물센서를 제조한 후 pH 6~8 범위의 0.05 M 인산 완충용액에서의 응답특성을 측정하였다 (Fig. 7). 그 결과 pH 7.5~7.6에서 가장 감응도가 높은 것으로 나타났다.

항온수조의 온도를 25°C에서 40°C까지 5°C 간격으로 조절하면서 각 온도에서 미생물센서가 보여주는 전류반응을 측정한 결과 최적온도는 *Pseudomonas* sp. DSM6342의 배양온도인 30°C인 것으로 나타났다 (Fig. 7).

다. 이온세기에 의한 영향

미생물센서인 TMA 센서가 완충용액의 이온세기에 의한 영향을 받는지 알아보기 위하여 인산 완충용액의 mole농도를 0.02~0.2 M로 달리하면서 반응 감응도를 비교하였다. 0.05 M의 완충용액 농도에서 반응 감응도는 가장 큰 값을 나타내었으며 0.2 M까지 거의 일정한 감응성을 보여 주었다 (Fig. 8).

라. NaCl에 의한 영향

어육 중에는 식염이 상당량 존재하기 때문에 염농도에 의해 센서반응이 영향을 받을 것으로 추정되었다. 일반적으로 생리 식염수에 해당하는 염농도인 0.85% 이상까지 NaCl의 농도를 달리하면서 센서의 반응 감응도를 측정한 결과 NaCl이 첨가되지 않은 경우와 6.6% 정도의 반응 감응도 차이를 보여 NaCl은 센서반응에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Table 7).

마. ATP 분해산물에 의한 영향

냉장어육 및 축육에 존재가능한 hypoxanthine, inosine, IMP, AMP, ADP, ATP와 같은 ATP 분해산물에 의한 영향을 살펴 보기 위하여 이들 화합물을 실제시료 중에 최대

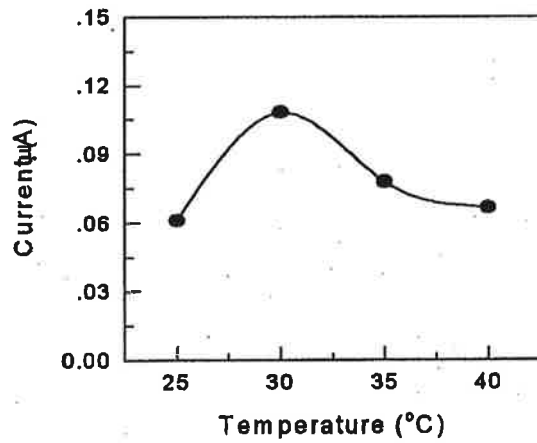
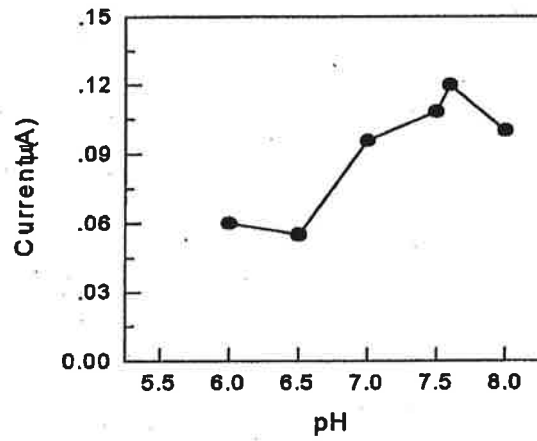


Fig. 7. Effects of pH and temperature on the current responses of the trimethylamine sensor with *Pseudomonas* sp. DSM6342.

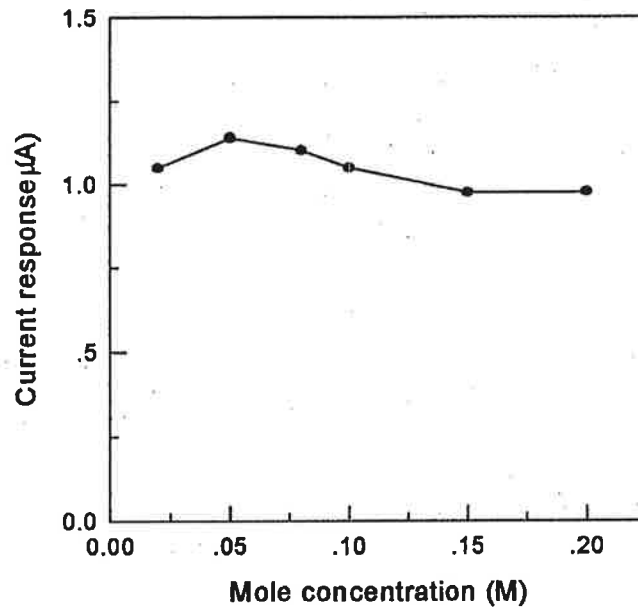


Fig. 8. Effects of molar concentrations of the phosphate buffer solution on the trimethylamine sensor.

로 존재가능한 양의 4배농도 (0.284%)가 되도록 제조한 후 기질인 14.7 mM TMA 용액과 함께 반응 cell에 가하였다. 이들 화합물에 의한 영향은 3.8% 이내로 나타나 TMA 센서의 감응도에 미치는 영향은 극히 적음을 알 수 있었다 (Table 8). 또한, hypoxanthine, inosine, IMP, AMP를 섞은 혼합용액을 제조하여 TMA와 함께 주입한 후에 TMA만을 주입하였을 때의 감응도와 비교하였다. 사용된 ATP 분해산물의 혼합물 농도에서 미생물 센서의 감응도는 TMA 자체에 대한 감응도와 거의 같은 수준임을 알 수 있었다 (Table 9).

Table 7. Effects of salt concentrations on the current responses of the TMA sensor. Relative responses against the control were measured

Sodium chloride (%)	Relative response (%) ^a
0.00	100
0.02	85.4±3.0
0.05	96.6±5.7
0.08	93.4±1.3
0.10	100.5±4.1
0.15	102.3±1.1
0.20	102.7±0.4
0.50	101.2±3.8
0.80	102.5±0.6
1.00	102.8±3.8
1.50	102.6±1.9
2.00	101.9±4.8

^a Mean±SD.

Table 8. Effects of ATP-related compounds on the current responses of the TMA sensor. Relative responses against the control were measured. Each ATP-related compound was respectively added as 0.284% in the TMA substrate solution

Compound	Relative response (%) ^a
Control ^b	100
H _x	103.8±1.8
H _x R	101.3±2.1
IMP	101.8±2.5
AMP	103.0±0.1
ADP	101.1±0.3
ATP	102.0±1.0

^a Mean±SD.

^b TMA was used as the control.

Table 9. Effects of various ATP-related compound mixtures on the current responses of the TMA sensor. Relative responses against the control were measured

ATP-related compound mixture (%)	Relative response (%) ^a
Control ^b	100
0.0036	104.3±1.7
0.0374	109.2±2.1
0.0711	118.5±0.3

^a Mean±SD.

^b TMA was used as the control.

바. 아미노산의 영향

어육 중에서 질소함유물질은 대부분 단백질의 형태로 존재하며 일반적으로 어육 중에 단백질은 가식부 100 g당 10.9~23.3% 정도가 함유되어 있는 것으로 보고되고 있으므로 TMA 측정 시 아미노산이 미생물센서에 미치는 영향을 알아 보았다. 여러 종류의 아미노산 0.1%의 일정 농도만을 반응 cell내에 주입한 경우와 측정기질인 TMA 14.7 mM과 함께 주입한 경우를 살펴 보았다 (Table 10). 아미노산만을 주입하여도 센서반응이 TMA 14.7 mM을 주입하여 나타난 반응 감응도 이상의 값을 나타내는 경우도 있었으며, TMA를 함께 주입한 경우 96.4%까지 상승된 감응도 값을 보여 주었다. 이는 일반적으로 미생물센서는 효소센서에 비하여 선택적 특이성이 다소 떨어지는 것을 보여주는 결과이며, 미생물센서는 고정화된 미생물의 대사작용 및 호흡작용에 의해 분해되어 소모되는 산소의 양이 결과적으로 측정되는 것이기 때문에, 아미노산이 TMA와 같은 일종의 기질로서 인지되어 고정화된 미생물의 대사작용에 일부 이용되면서 미생물센서에 의한 TMA 측정 감응도 값에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

사. Biogenic amines에 의한 영향

어육 및 축육의 변패과정 중 생성가능한 polyamines에 의한 영향을 받는지 알아보 고자 이들의 농도를 0.001%와 0.01%로 각각 제조한 후 이것만을 반응 cell내에 주입한 경우와 측정기질인 TMA 14.7 mM과 함께 주입한 경우를 살펴 보았다 (Table 11). Putrescine만을 주입한 경우에도 약 33.4%까지 상승된 감응도 값을 보여 주었고, histamine과 TMA 기질을 함께 첨가한 경우는 31.2%까지 센서반응이 증가하였다. 이는 biogenic amines에 의해서도 TMA 센서는 영향을 다소 받는 것을 의미하나 그 정도는 아미노산의 경우에 비해 현저하게 낮았다.

Table 10. Effects of various amino acids on the current responses of the TMA sensor. Each amino acid was added as 0.1% in the TMA substrate solution

Compound	Relative response (%) ^a	
	added	not added
Control ^b	100	100
Alanine	182.0±1.9	131.0±5.6
Aspartic acid	182.7±3.2	123.9±1.7
Arginine	150.8±5.2	73.2±3.8
Glycine	149.2±4.9	114.6±4.9
Glutamic acid	196.4±5.9	135.3±7.8
Histidine	172.0±4.5	75.6±6.1
Lysine-HCl	117.9±2.9	63.9±0.5
Proline	162.5±5.1	98.4±5.4
Serine	175.7±2.3	129.2±1.2
Threonine	172.8±0.4	121.7±0.5
Tryptophan	131.5±4.5	57.7±3.1
Valine	154.4±6.1	123.3±8.1

^a Mean±SD.

^b TMA was used as the control.

Table 11. Effects of various biogenic amines on the current responses of the TMA sensor

Biogenic amine (%)	Relative response (%) ^a		
	not added	added	
0.001	Control ^b	100	100
	Putrescine	17.4±0.4	108.8±4.2
	Cadaverine	22.9±3.1	126.3±7.8
	Histamine	23.0±0.5	125.3±9.8
	Tryptamine	9.0±1.5	102.2±1.6
	Spermidine	7.6±0.1	114.8±2.0
	Spermine	5.9±1.6	117.7±3.7
0.01	Control	100	100
	Putrescine	33.4±2.3	127.5±6.6
	Cadaverine	23.1±4.0	131.0±5.3
	Histamine	26.2±0.6	131.2±8.2
	Tryptamine	14.9±2.5	105.0±2.4
	Spermidine	22.8±0.4	125.9±3.4
	Spermine	18.0±2.8	122.2±1.0

^a Mean ±SD.

^b TMA was used as the control.

아. 저장기간에 따른 TMA 센서의 안정성

Pseudomonas sp. DSM6342를 2일간 배양한 균체배양액을 Immobilon cellulose nitrate 막에 고정화한 TMA 센서의 분석가능횟수를 알아보기 위하여 4℃에서 0.1 M 인산 완충용액에 냉장보관하면서 센서의 감응도의 변화를 관찰하였다. 처음 고정화막을 제조한 후 20일경까지 센서의 반응 감응도가 초기보다 33.3% 정도 증가하는 경향을 보였으나 그 후로는 비교적 안정된 감응도 값을 보여 주었다. 이는 고정화한 이후에 미생물의 대사활성이 일정기간까지 점차 활발해지는 것을 의미한다. 한번 고정화한 미생물막의 안정성은 70일째까지 센서반응이 초기의 70%이상 유지되는 것으로 미루어 매우 좋은 것으로 보이며 이 때 사용가능횟수는 400회 정도였다 (Fig. 9).

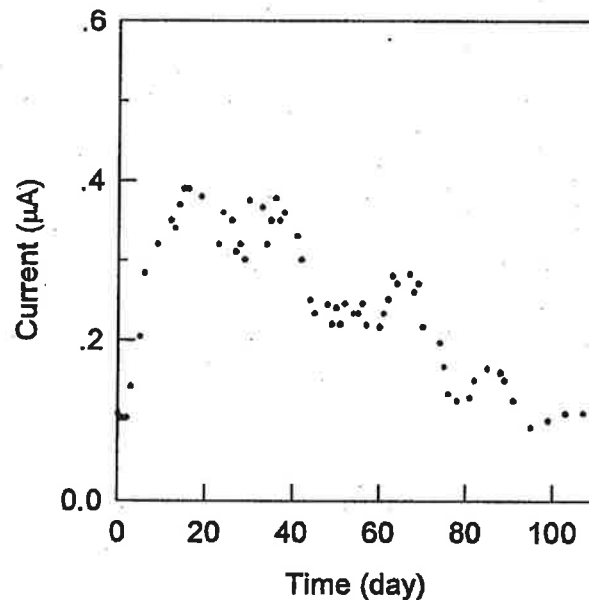


Fig. 9. Storage stability of the trimethylamine sensor.

3. ATP 분해산물 계측용 바이오센서

가. H_x 센서 제조와 응답특성

Immobilon cellulose nitrate 막을 사용하여 XOD를 고정화하여 제조한 H_x 센서의 응답특성을 검토하였다 (Fig. 10). 검량선에서 볼 수 있는 것처럼 366 μ M이하의 기질농도에서는 H_x 센서의 전류반응은 직선적이었고 기질농도의 증가에 따른 전류반응의 상관도 높은 것으로 나타났다. 어육이나 축육 중에 존재하는 각각의 ATP 분해산물의 농도가 수 μ mol/g sample 이하임으로 시료의 과도한 희석을 행하지 않고도 센서에 의한 계측을 행할 수 있다. H_x 센서의 감응성은 높은 반면 정상상태 (steady-state)에 이르는 데 소요되는 시간은 10~20분 정도로서 batch 시스템보다 flow cell을 사용하는 FIA 시스템을 도입할 경우 계측시간을 단축시킬 수 있다. H_x 센서에 의한 계측 시의 분석치에 대한 변이계수는 2.7%로 나타나 높은 재현성을 보여주었다.

나. H_x/H_xR 센서 제조와 응답특성

XOD와 NP를 Immobilon cellulose nitrate 막에 동시에 고정화하여 H_x/H_xR 센서를 제조하여 전기화학적 특성을 batch 시스템에서 검토하였다 (Fig. 11). H_x/H_xR 센서는 두 종류의 효소를 고정화하였기 때문에 hypoxanthine과 inosine에 대하여 동시에 전류반응을 나타내었다. 전류반응의 정도를 보면 기질로서 hypoxanthine을 사용한 경우와, 같은 mole농도의 hypoxanthine과 inosine의 mixture를 사용한 경우에는 각각의 기질농도에서 거의 같은 전류반응을 나타내었다. 336 μ M 기질농도까지 hypoxanthine에 대한 전류반응을 100으로 표시할 때 hypoxanthine과 inosine의 mixture에 대한 전류반응은 97~103%의 범위내에 있었으나 inosine에 대한 바이오센서의 전류반응은 hypoxanthine에 대한 전류반응의 60~67% 수준에 머물고 있었다. H_x/H_xR 센서로 hypoxanthine, inosine 및 hypoxanthine과 inosine의 mixture를 계측할 경우 분석치에 대한 변이계수는 각각 4.6, 7.0, 5.4%로 나타나 재현성이 높은 것으로 평가되었다.

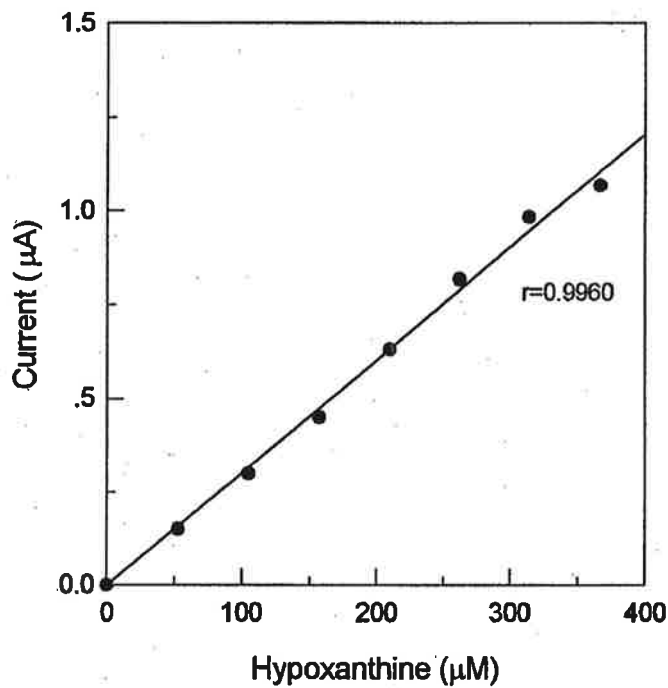


Fig. 10. Calibration curve of hypoxanthine by the H_x sensor. The enzyme electrode was immersed into the water-jacketed glass vessel ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) filled with 7 mL of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5). Magnetic stirring ensured homogeneity of the solution. A successive 20 μL addition of 14.7 mM putrescine was done and the steady-state current responses were measured. Recorder sensitivity and chart speed were 5 mV and 60 mm/hr, respectively.

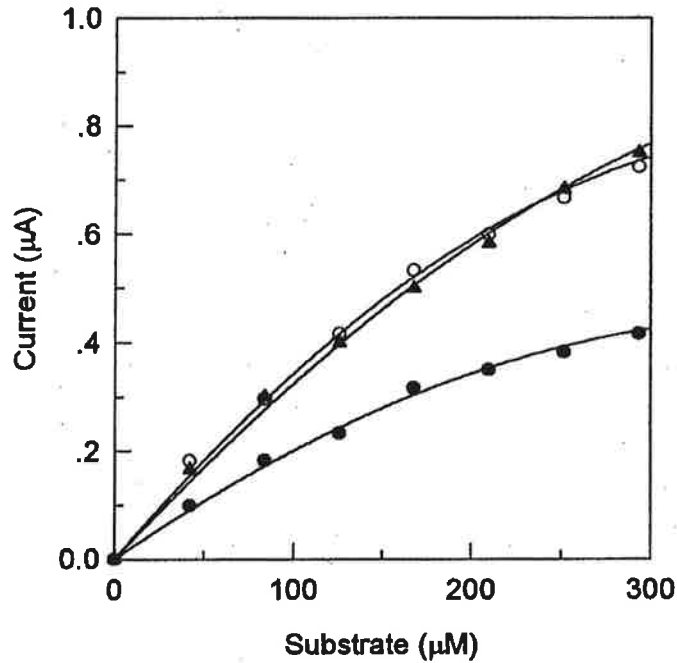


Fig. 11. Calibration curves of the H_x/H_xR sensor.

(○: H_x, ●: H_xR, ▲: H_x+H_xR).

다. H_x/H_xR/IMP 센서 제조와 응답특성

XOD, NP, 5'-NT를 동시에 고정화하여 H_x/H_xR/IMP 센서를 제조한 후 전기화학적 특성을 batch 시스템에서 검토하였다 (Fig. 12). H_x/H_xR/IMP 센서는 세 종류의 효소를 고정화하여 hypoxanthine, inosine, IMP에 대하여 동시에 전류반응을 나타낼 수 있다. 전류반응의 정도는 기질로서 hypoxanthine과 inosine, 같은 mole농도의 hypoxanthine,

inosine, IMP의 mixture를 사용한 경우에는 각각의 기질농도에서 비슷한 전류반응을 나타내었다. 기질농도가 293 μM 까지 증가할 때 hypoxanthine에 대한 전류반응을 100%로 표시하면 inosine에 대한 전류반응은 85~115%, hypoxanthine, inosine, IMP의 mixture에 대한 전류반응은 85~96%의 범위내에 있었다. 이와는 대조적으로 IMP에 대한 바이오센서의 전류반응은 hypoxanthine에 대한 전류반응의 32~40% 수준에 머물고 있었다. 검량선의 각각의 기질농도에 따른 전류반응의 상관성은 사용된 기질의 종류와는 무관하게 매우 높은 것으로 나타났다 ($r > 0.998$).

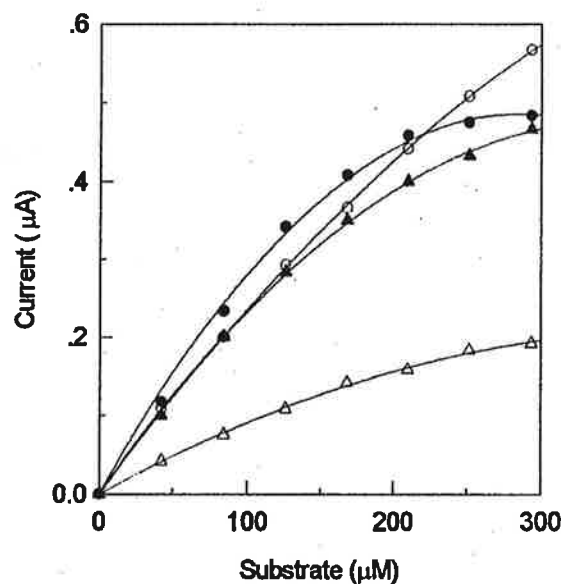


Fig. 12. Calibration curves of the H_x/H_xR/IMP sensor.

(●: H_x, ○: H_xR, △: IMP, ▲: H_x+H_xR+IMP).

라. 완충용액, pH 및 온도의 최적화

pH 및 완충용액의 종류에 따른 효소센서의 감응도를 알아보기 위하여 0.05 M 인산 완충용액으로 pH 6~8까지, 0.05 M 초산 완충용액으로 pH 4~6까지, 0.05 M Tris-HCl 완충용액으로 pH 8~9까지, 0.05 M 탄산 완충용액으로는 pH 9~10까지 조절한 후 각 효소센서의 전류반응을 비교하였다 (Fig. 13).

Fig. 13에서 보는 바와 같이 H_x 센서의 경우 인산 완충용액, pH 7.5일 때 가장 감응도가 좋았다. H_x/H_{xR} 센서의 경우에는 탄산 완충용액, pH 10에서 가장 큰 감응도를 얻을 수 있었다. 한편 유리상태의 XOD, NP, 5'-NT의 최적 pH는 각각 7.5, 7.4, 9.0인데, 이들 세 효소를 함께 고정화한 $H_x/H_{xR}/IMP$ 센서의 경우 Tris-HCl 완충용액, pH 8.0에서 가장 큰 감응도를 나타내었다.

항온수조의 온도를 15°C에서 45°C까지 5°C 간격으로 조절하면서 각 온도에서 효소센서에 의한 산소량 감소에 따른 전류치의 감소를 측정하였다 (Fig. 14). 일반적으로 온도가 상승함에 따라 효소반응속도는 증가하다 감소하는데, 효소가 고정화된 상태인 효소센서의 경우에도 감응도의 온도의존성이 관찰되어 H_x 센서의 경우 최적온도는 35°C로 나타났다. H_x/H_{xR} 센서에 있어서는 hypoxanthine을 기질로 사용한 경우에는 35°C에서, inosine을 기질로 사용한 경우에는 40°C에서 가장 큰 감응도를 보여주었다. $H_x/H_{xR}/IMP$ 센서는 hypoxanthine과 inosine을 각각 기질로 사용하였을 때 35°C에서 가장 큰 감응도를 나타낸 반면 IMP를 기질로 사용하였을 때에는 30°C에서 감응도가 가장 높았다.

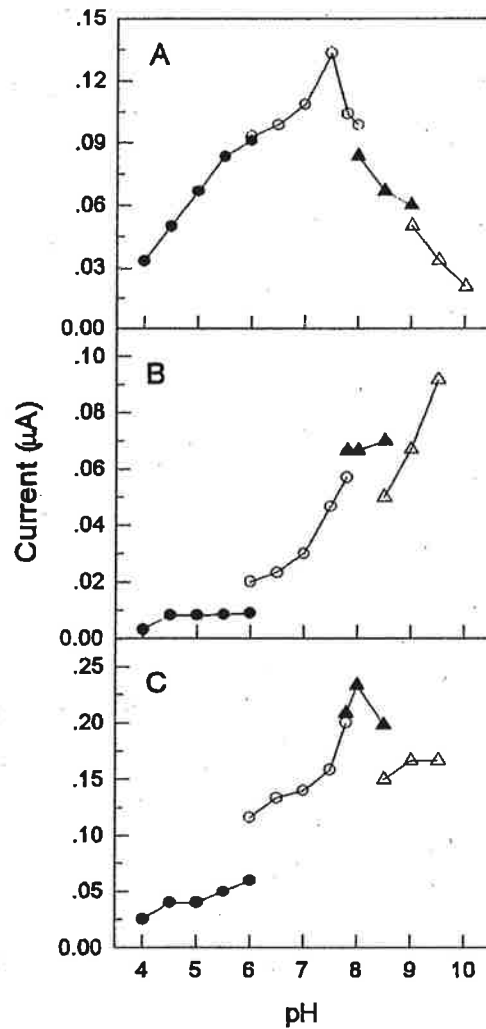


Fig. 13. Effects of pH on the current responses of the biosensors measuring ATP-related compounds. A. H_x sensor. B. H_x/H_xR sensor. C. H_x/H_xR/IMP sensor. (●; acetate buffer, ○; phosphate buffer, ▲; Tris-HCl buffer, △; carbonate buffer).

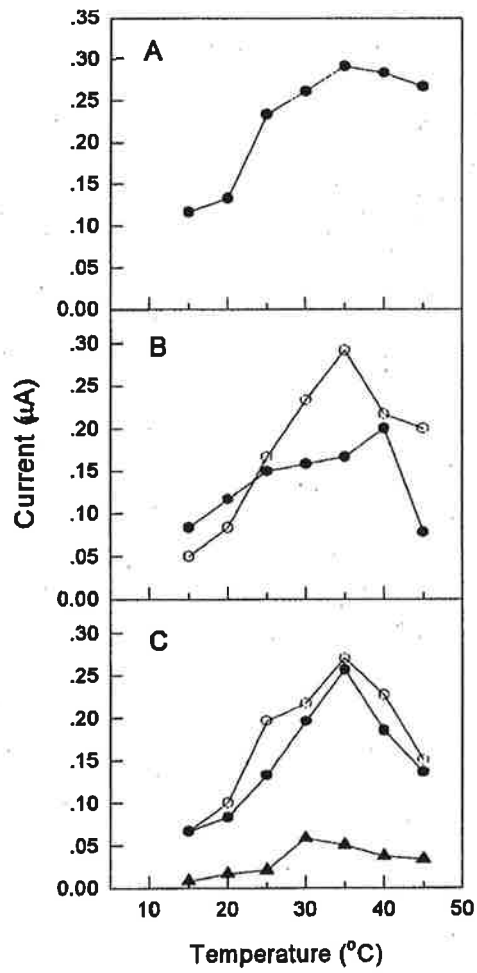


Fig. 14. Effects of temperature on the current responses of the biosensors measuring ATP-related compounds. A. H_x sensor. ●; H_x . B. H_x/H_xR sensor. ●; H_x , ○; H_xR . C. $H_x/H_xR/IMP$ sensor. ●; H_x , ○; H_xR , ▲; IMP .

H_x 센서와 유리상태의 XOD의 최적 pH와 온도를 비교한 결과, 두 경우 모두 35°C, 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5)일 때 가장 큰 전류반응을 나타내었다. 이 때, 효소반응의 정도는 고정화하지 않은 경우보다 큰 것으로 나타났다. 이 현상은 유리상태의 효소를 사용한 실험의 경우 산소전극의 감응도를 높여주기 위해 효소량을 많이 사용하였던데 기인하는 것으로 여겨진다.

마. NaCl에 의한 영향

ATP 분해산물 측정용 바이오센서도 식염에 의해 영향을 받는지 알아 보기 위하여 H_x 센서의 경우 NaCl의 농도를 달리하면서 센서의 반응 감응도를 비교하였다. NaCl 농도를 0~2.0%까지 증가시켜 본 결과, 센서반응이 다소 영향을 받았으나 생리 식염수 농도 이하에서는 감응도 감소가 거의 없었다 (Table 12).

바. 당류 및 아미노산의 영향

ATP 분해산물 측정 시 당류 및 아미노산을 첨가하여 이들이 효소센서의 전류반응에 미치는 영향을 알아보았다. 측정기질로는 hypoxanthine을 사용하였으며 addition method로 여러 종류의 당류와 아미노산을 첨가하여 감응도의 차이를 측정하였다. 이 때, 첨가한 당류로는 D-glucose, D-fructose, D-sucrose, D-maltose, D-sorbitol, D-mannitol이 있었으며, 첨가수준은 어육 중의 당함량이 0.3~6.5 g/100 g인 점을 고려하여 실제시료 중의 각 당류의 농도를 약 2%로 추정하였고, 7.9%의 당 용액을 각각 제조하여 이 용액 100 µL와 기질인 2.9 mM hypoxanthine 용액 100 µL를 6.9 mL의 인산완충용액에 첨가하여 최종적으로 첨가된 당류의 농도가 반응 cell내에서 추정치의 4배가 되도록 하였다. 아미노산으로는 L-형의 alanine, aspartic acid, arginine, glycine, glutamic acid, histidine, lysine · HCl, proline, serine, threonine, tryptophan, valine을 사용하였는데, 아미노산의 경우 어육 중 단백질 함량이 가식부 100 g당 10.9~23.3%인 점을 고려하여 실제시료 중의 각 아미노산의 농도를 약 1%로 추정하였고, 4%의 아미노산 용액을 각각

Table 12. Effects of salt concentrations on the current responses of the H_x sensor. Relative responses against the control were measured

Sodium chloride (%)	Relative response (%) ^a
0.00	100
0.20	97.9±2.2
0.50	95.8±1.5
0.80	94.0±3.7
0.85	92.9±1.0
0.90	95.7±1.9
1.00	92.4±4.4
1.50	88.6±2.9
2.00	86.2±0.5

^a Mean ± SD.

제조하여 이 용액 100 µL와 기질인 2.9 mM hypoxanthine 용액 100 µL를 6.9 mL의 인산 완충용액에 첨가하여 최종적으로 첨가된 아미노산의 농도가 반응 cell내에서 추정치의 4배가 되도록 하였다.

당류와 아미노산의 영향은 Table 13와 Table 14에 표시된 바와 같이 당류 중에서는 glucose, sorbitol, sucrose 등이 H_x 센서의 전류반응에 영향을 끼쳤으며 생물요소로 butter milk와 미생물 유래의 XOD를 비교한 결과도 당류에 의한 영향의 정도는 거의 비슷하였다. 본 연구에서 당류의 첨가수준을 어육 중에 존재가능한 최대농도의 4배로 첨

Table 13. Effects of various sugars and sugar alcohols on the current responses of the H_x sensor

Compound	Relative response (%) ^a	
	Xanthine from butter milk	oxidase from microorganism
Control ^b	100	100
Glucose	146.7±0.7	144.4±1.1
Fructose	130.8±1.4	125.6±1.1
Sucrose	139.3±0.5	118.3±2.1
Maltose	108.3±0.8	110.0±0.2
Mannitol	114.3±1.1	114.3±1.1
Sorbitol	144.0±0.1	140.0±0.2

^a Mean ± SD.

^b Hypoxanthine was used as the control.

가한 점을 고려해 볼 때, 실제 어육 중에 존재하는 당류의 농도에서 이들 당류가 H_x 센서의 전류반응에 미치는 영향은 이보다 훨씬 낮을 것으로 예상되므로 실제계측 시 당류의 영향은 매우 낮을 것으로 보여진다. 아미노산 중에서는 L-glutamic acid의 영향이 가장 높아 H_x 센서의 전류반응에 약 37%의 영향을 미쳤으나 기타 아미노산의 경우 영향의 정도는 20% 미만이었다. 어육 중에서 질소함유물질은 대부분 단백질의 형태로 존재하는 점과 유리 아미노산의 첨가수준을 단백질 기준으로 어육 중에 존재가능한 농도의 4배로 첨가한 점을 고려해 볼 때, 실제 어육 중에 존재하는 유리 아미노산의 농도에서 이들이 H_x 센서의 전류반응에 미치는 영향은 5% 이하의 수준일 것으로 여겨진다.

Table 14. Effects of various amino acids on the current responses of the H_x sensor

Compound	Relative response (%) ^a
Control ^b	100
Alanine	117.8±1.1
Aspartic acid	113.9±0.4
Arginine	114.3±0.4
Glycine	107.4±0.4
Glutamic acid	137.6±1.1
Histidine	110.8±0.4
Lysine · HCl	105.0±0.2
Proline	109.7±0.1
Serine	119.3±0.7
Threonine	116.6±0.9
Tryptophan	103.6±0.9
Valine	119.1±0.8

^a Mean±SD.

^b Hypoxanthine was used as the control.

4. ATP 분해산물 측정을 위한 연속형 바이오센서 시스템

가. 효소 고정화방법에 따른 연속형 바이오센서 시스템의 반응 감응도

1) 막을 이용한 고정화방법에 따른 감응도

Cellulose nitrate 막 및 nylon 막을 이용하여 XOD를 고정화한 것을 Teflon 막과 투석막 사이에 놓고 O-ring을 끼워 산소전극에 고정하였다. 0.05 M의 인산 완충용액 (pH 7.5)을 0.4 mL/min의 유속으로 흘려주면서 일정 농도의 기질용액을 주입한 후에 나타나는 효소전극의 반응 감응도를 살펴보았다. 일반적으로 기질을 주입하고 약 3분이 경과하면 반응peak가 나타나기 시작하였으며, 한 개의 시료를 분석하는 데에는 약 20분이 소요되었다. 효소반응으로 나타나는 감응도는 cellulose nitrate 막을 이용한 경우가 nylon 막을 이용한 경우보다 peak의 높이가 높고 넓이는 좁게 나타나 peak의 높이로 보다 간편하게 시료분석이 가능하였으며 (Fig. 15), 이 경우 기질농도 1.5 mM까지 검량곡선을 구할 수가 있었다 (Fig. 16). 한편, peak의 넓이나 무게를 이용하면 peak의 높이를 이용하는 경우보다 높은 기질농도까지 검량곡선을 얻을 수가 있어서 nylon 막으로 고정화한 경우 hypoxanthine 3.0 mM 농도까지 직선상의 검량곡선이 나타났다 (Fig. 16).

2) Chitopearl beads를 이용한 고정화방법에 따른 감응도

Chitopearl은 갑각류에 많이 존재하는 chitosan을 담체 (carrier)로 활용할 수 있도록 amino기와 같은 관능기 (functional groups)를 도입한 후 bead형태로 사출하여 제조한 것으로 효소뿐만 아니라 미생물, 조직세포 등을 고정화하는데 사용할 수 있는 우수한 생체조직 지지체이다.

Chitopearl beads로 고정화한 후의 반응감응도를 비교하기 위하여 bead의 직경은 일정하고 표면의 관능기는 각각 다른 Chitopearl 2501, 3001, 3501을 각각 4 mL씩 취하여 효소를 고정화한 후 직경 3 mm, 길이 7 cm의 microcolumn에 충분히 충전하였다. 고정화

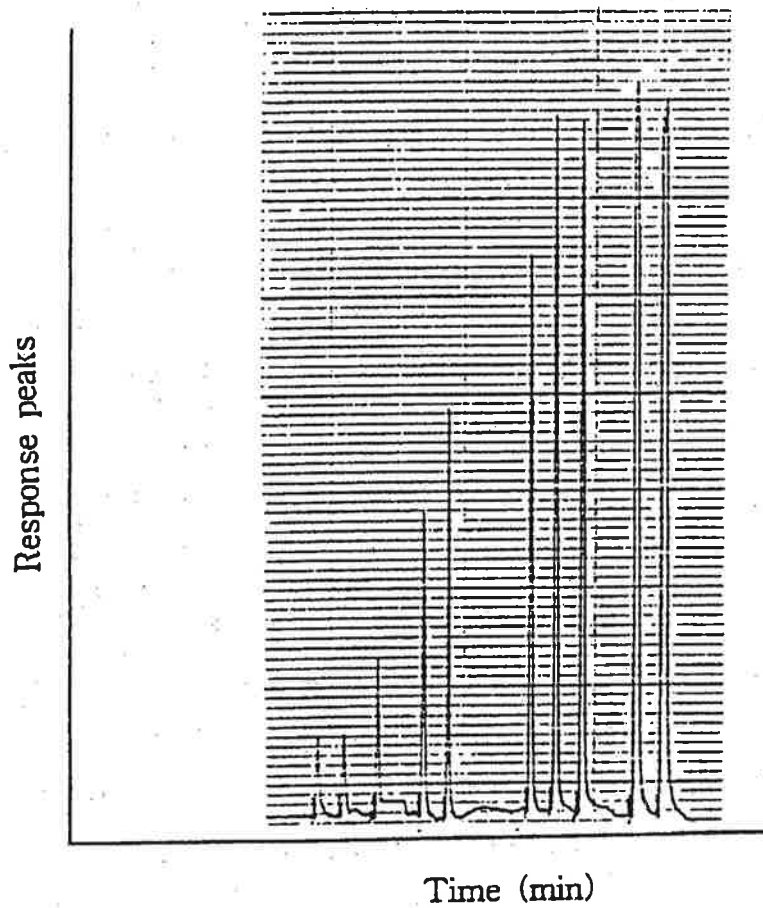


Fig. 15. The current response peaks of hypoxanthine using the H_x FIA sensor system. The enzyme was immobilized on cellulose nitrate membrane. The flow rate was 0.4 mL/min and recorder sensitivity and chart speed were 10 mV and 20 mm/hr, respectively.

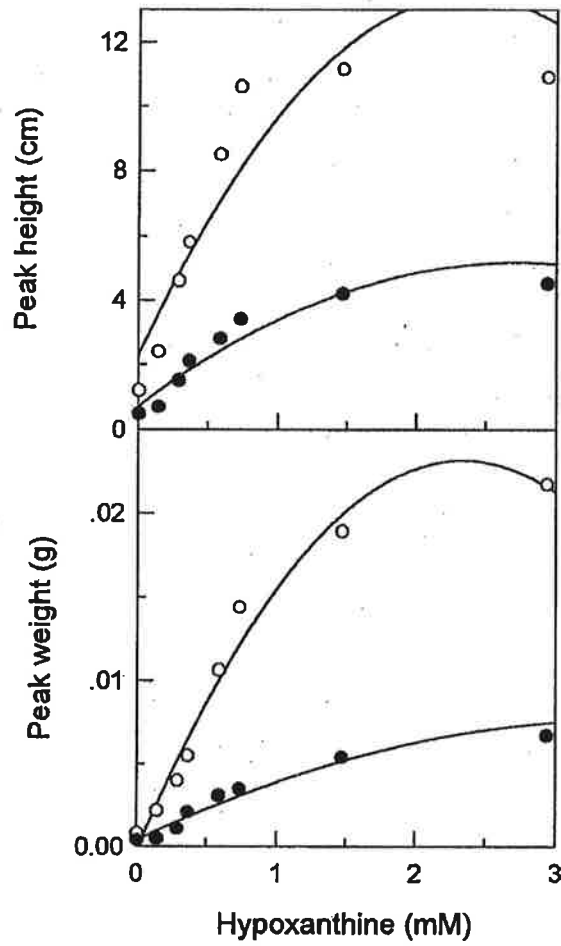


Fig. 16. The responses of hypoxanthine using the FIA system with immobilized enzyme membranes. (○; cellulose nitrate membrane, ●; nylon net).

한 후의 beads의 색은 Chitopearl의 종류에 따라 각각 초록색, 우유색, 옅은 베이지색을 나타내었다. 이 때, 유속은 0.4 mL/min으로 일정하게 유지하였으나, 산소전극 adaptor와 recorder에서의 반응 조건에 따른 전류저항 값은 최적의 반응peak를 얻기 위하여 고정화 효소 column에 따라 각각 달리 조절하여 주었다. 기질 주입 후의 반응시간은 산소전극에 직접 고정화효소막을 고정하여 측정할 경우보다 다소 늦게 나타났는데, 기질용액을 주입하고 약 4분이 경과하면 반응peak가 나타나며 25분이 경과하면 한 개의 시료를 분석할 수 있었다. 소요되는 반응시간 및 반응 감응도는 고정화효소 beads가 충전되어 있는 column의 길이에 영향을 받을 것으로 생각되어 이에 대한 실험은 뒤에서 시행하였다. 일반적으로 hypoxanthine을 기질로 하였을 때 1.5 mM의 농도까지 검량곡선을 작성할 수 있었고, Chitopearl 2501과 3001을 사용한 경우 반응 감응도가 높게 나타났다 (Fig. 17).

한편, bead직경이 각각 다른 Chitopearl을 사용하였을 경우의 고정화효율을 알아보기 위하여 Chitopearl 2501, 2503, 2505 및 3001, 3003, 3005를 각각 4 mL씩 취하여 고정화하였다. 이 경우도 표준곡선은 hypoxanthine 2.0 mM까지 얻을 수 있었고, Chitopearl의 bead직경이 클수록 효소고정화의 효율은 떨어져 Chitopearl 2505나 3005를 사용하였을 때 반응감응도가 가장 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다 (Fig. 18). 가장 반응성이 우수한 것은 Chitopearl 2501과 3001을 사용한 경우였다.

3) Aminopropyl-glass를 이용한 고정화방법에 따른 감응도

Aminopropyl-glass는 glass의 amino기가 반응기로 작용하여 효소를 glass에 고정화시켜 주며, 일반적으로 고정화용 beads 이외에 이용할 수 있는 가장 안정된 고정화 지지체이다. Chitopearl을 이용하여 효소를 고정화하는 방법과 마찬가지로 고정화한 후 microcolumn에 고정화 효소 glass를 충전하였다. 이 때, 나타난 반응 감응도는 Chitopearl 2501이나 3001을 이용하여 고정화한 경우보다 낮았으며, hypoxanthine 2.0 mM까지 검량곡선을 얻을 수 있었다.

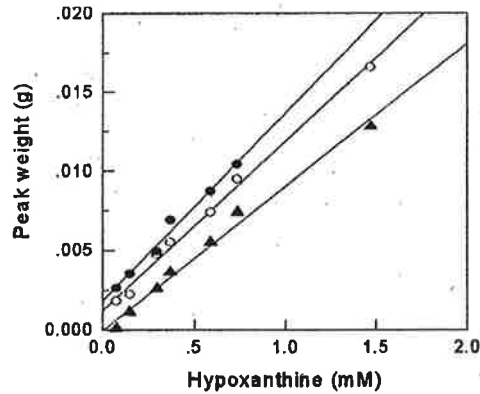


Fig. 17. Responses for hypoxanthine of the FIA systems with immobilized enzyme reactors of various Chitopearl beads (●; Chitopearl 3001, ○; Chitopearl 2501, ▲; Chitopearl 3501).

나. 기질농도에 따른 표준곡선 작성

XOD를 고정화한 H_x 센서의 경우 hypoxanthine의 농도가 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.08%인 기질을 사용하여 표준곡선을 작성하였다 (Fig. 19). 이 때, 반응peak의 높이 및 무게를 data로 이용한 경우 모두 3.0 mM까지 표준곡선을 나타낼 수 있었다.

Hypoxanthine과 inosine의 두 가지 성분을 측정하기 위한 H_x/H_{xR} 센서의 경우 XOD 3 units 혹은 5 units를 취하여 NP와 함께 고정화하였고, inosine은 hypoxanthine과 같은 mole농도로 만들고, 또한 같은 mole농도의 두 기질의 혼합액을 혼합기질로 사용하였다. 이 경우 6 mM 이하의 기질농도에서 기질의 종류에 따라 직선상 또는 준직선상의 검량곡선을 얻을 수 있었으며 XOD의 양을 많이 사용한 경우, 반응 감응도는 inosine을 기질로 사용한 경우에는 차이가 없었으나 hypoxanthine과 혼합기질을 사용한 경우에는 25~60% 범위내에서 높게 나타났다 (Fig. 20).

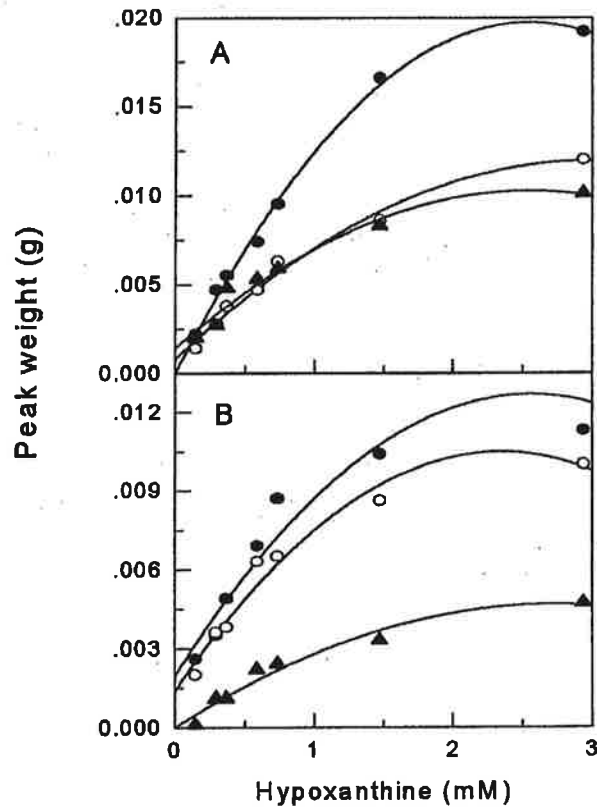


Fig. 18. Responses for hypoxanthine of the FIA systems with immobilized enzyme reactors of various Chitopearl beads with different bead diameters. A. Chitopearl 2500 series, B. Chitopearl 3000 series (●; Chitopearl 2501, 3001, ○; Chitopearl 2503, 3003, ▲; Chitopearl 2505, 3005).

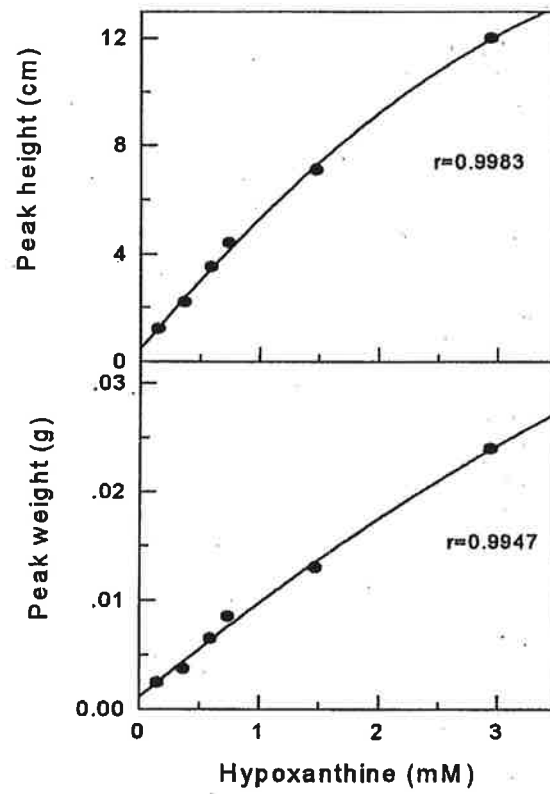


Fig. 19. Responses for hypoxanthine of the H_x FIA sensor systems with immobilized enzyme reactor of Chitopearl 3001.

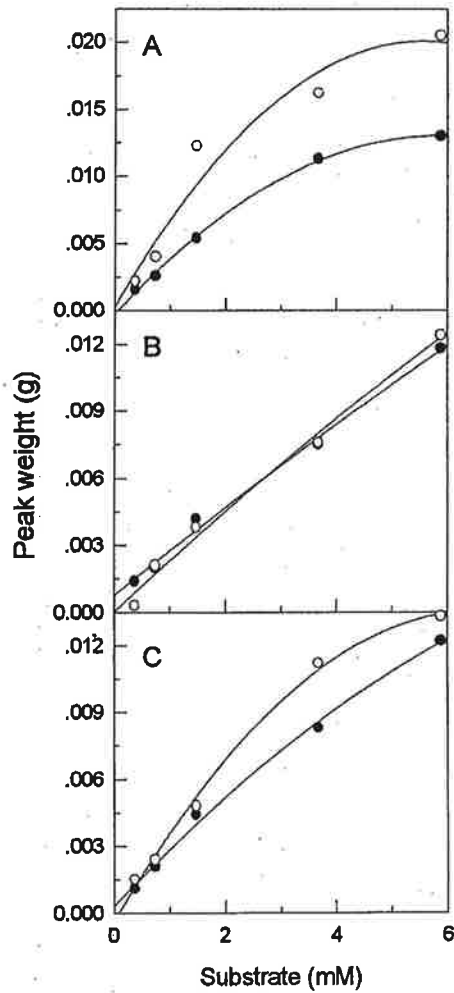


Fig. 20. Calibration curves for hypoxanthine and inosine of the H_x/H_xR FIA sensor system with immobilized enzyme reactor of Chitopearl 3001. A. H_x, B. H_xR, C. H_x/H_xR. The amount of enzyme used for immobilization were XOD 3 units (●) and XOD 5 units (○).

효소고정화 column을 사용한 연속형 시스템의 재현성을 알아 보기 위하여 세 개의 효소가 고정화되어 있는 column을 연결하여 같은 mole농도의 단일기질과 혼합기질을 각각 연속적으로 주입한 후의 반응감응도를 비교하였다. Table 15에서 보는 바와 같이 4회 연속하여 측정할 경우 hypoxanthine, inosine, IMP에 대한 반응감도 저하는 1.3~6.2%로 나타났으며, 5회 측정할 경우 3.2~10.1% 미만의 감도차이를 보여 효소반응기의 활성이 비교적 잘 유지되기 때문에 실제로 어류의 ATP 분해산물과 관련된 성분으로 어류의 신선도와 가장 관련이 깊은 hypoxanthine, inosine, IMP 성분을 연속적으로 측정하는데 무리가 없을 것으로 보인다. 세 효소를 고정화하여 제작한 $H_x/H_xR/IMP$ 센서에 주입하기 위하여 같은 mole농도의 hypoxanthine, inosine, IMP용액과 mole농도의 합이 각각의 기질의 mole농도와 같은 혼합기질을 사용하였다. 이 때, 나타난 반응 peak는 Fig. 21에서 보는 바와 같으며, 각각의 단일기질과 혼합기질을 사용하여 작성한 검량곡선은 Fig. 22에서 보는 바와 같다.

Table 15. Reproducibilities of the current responses of the FIA system. The responses after successive injections of the same ATP-related compounds were analyzed

XOD amount	ATP-related compound	Current response (peak weight, g)					^a Response difference (%)
		Assay number					
		1	2	3	4	5	
3 units	H_x	0.157	0.156	0.156	0.155	0.152	3.18
	H_xR	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.00
	Mixture	0.108	0.106	0.105	0.090	0.083	23.1
5 units	H_x	0.129	0.123	0.122	0.121	0.116	10.1
	H_xR	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.00
	Mixture	0.008	0.008	0.007	0.007	0.007	12.5

^a The values were response differences between responses of 1st assay and 5th assay.

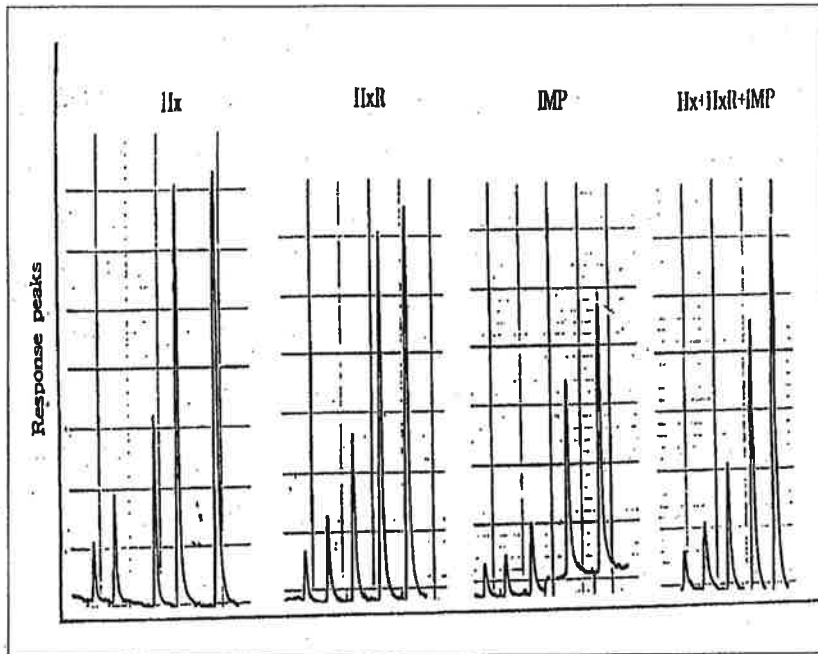


Fig. 21. The current response peaks of H_x, H_xR, IMP by the H_x/H_xR/IMP FIA sensor system. The flow rate was 0.4 mL/min and recorder sensitivity and chart speed were 10 mV and 20 mm/hr, respectively.

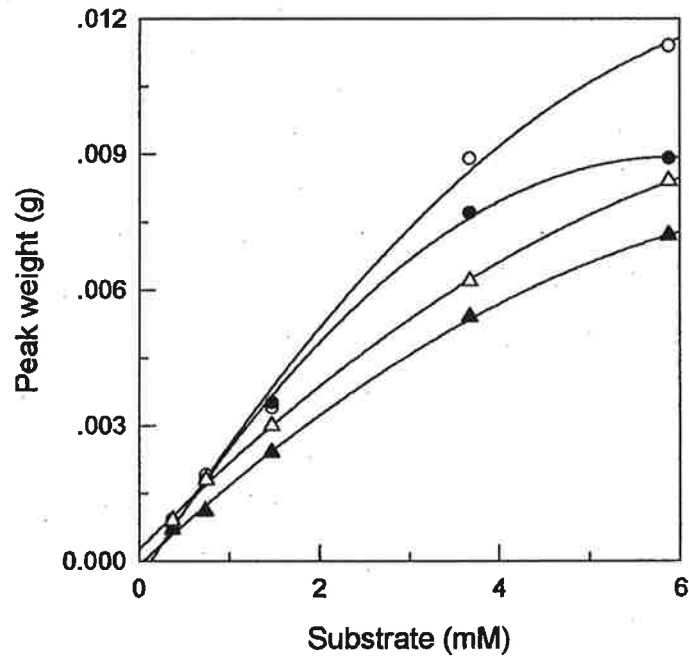


Fig. 22. Calibration curves for ATP-related compounds of the $H_x/H_xR/IMP$ FIA sensor system with immobilized enzyme reactor of Chitopearl 3001: (○: H_x , ●: H_xR , △: IMP, ▲: $H_x/H_xR/IMP$).

다. 효소 reactor의 column길이에 따른 영향

본 연구의 효소 reactor를 사용하는 연속형 바이오센서 시스템은 hypoxanthine, inosine, IMP 함량을 동시에 측정할 수 있다는 장점이 있다. 이 때, 분석의 원리는 기질이 injector에 주입되어 H_x reactor를 통과하면 효소 column에 충전된 고정화 XOD가 hypoxanthine만을 분해하기 때문에 multirecorder에는 시료 중에 존재하는 hypoxanthine peak만이 나타나게 된다. 이 후 시료가 H_xR reactor를 통과하면서 NP와 XOD에 의해 이미 분해된 hypoxanthine을 제외한 inosine이 분해되면서 recorder에는 시간의 차이를 두고 inosine peak가 나타난다. 이 후 시료 중의 hypoxanthine 및 inosine은 이미 분해되었으므로 5'-NT, NP, XOD에 의해서 IMP가 분해되어 IMP peak가 마지막으로 나타난다. 그러므로, 각각의 효소 reactor를 제조할 때 가장 중요한 것은 앞의 효소 reactor에서 고정화 효소에 의한 분해반응이 완전히 일어나야 한다는 점이다. 이를 해결하기 위하여 본 연구에서는 각각의 효소 reactor로 사용된 고정화효소 column의 길이를 달리하여 하나의 기질이 분해되어 나온 후 다른 효소 reactor에서 추가로 반응하는지의 여부를 살펴 보았다. 그리하여, H_x , H_xR , IMP 효소 column의 길이를 각각 10-10-7 cm, 12-10-7 cm, 12-12-7 cm, 15-12-7 cm로 달리하여 단일 혹은 복합 고정화효소를 효소 column에 충전하여 제조하였다. Table 16은 각각의 효소 column의 길이를 달리하였을 때 나타나는 반응 peak로부터 ATP 분해산물의 함량을 측정한 결과이다. H_x 효소 column의 길이가 짧을 때보다 길 때 hypoxanthine의 반응peak 높이는 크게 나타나는 것을 알 수 있었다. 또한, hypoxanthine 반응peak가 나타난 후 H_x 효소 reactor에서 완전히 분해되지 않은 hypoxanthine이 남아 있게 되어 기질이 H_xR 효소 reactor의 XOD에 의해 분해되어 나온 반응peak가 H_xR 효소 reactor의 recorder에 나타나는 것을 보여 주었다. 이 peak 값은 inosine 검량곡선에 의해 환산해 볼 때 0.1 mM에 해당하는 값으로서 이 경우 inosine 농도에 hypoxanthine 농도가 추가된 값이 inosine 농도로 산출될 가능성이 있으므로 이는 정확한 inosine만의 농도라고 보기 어렵다. 그러나, 세 성분 측정을 위한 효소 column의 길이가 15-12-7 cm일 경우 앞의 효소 reactor에서 완전히 분해반응이 일어났

기 때문에 H_xR 효소 reactor에서 여분의 hypoxanthine peak가 거의 나타나지 않으며, inosine 주입 시 IMP 효소 reactor에서도 inosine peak가 거의 나타나지 않는 것을 보여 주었다 (Fig. 23). 그리하여, 세 효소 reactor 제조 시 column의 길이는 H_x-H_xR-IMP reactor의 경우 각각 15-12-7 cm로 하여 고정화 효소를 충전하여 사용하였다.

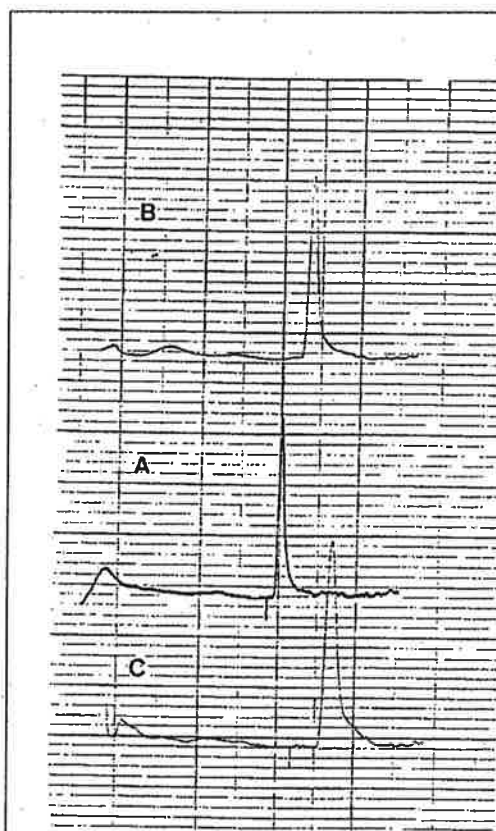


Fig. 23. Response peaks of A; H_x, B; H_xR and C; IMP on the FIA sensor system with three enzyme reactors after injection of substrate mixture.

Table 16. Effects of column length of H_x, H_xR and IMP enzyme reactors on the performance of the FIA biosensor system with three enzyme reactors

Column length (cm)		Peak height (cm)			
		3.674 mM H _x		1.864 mM H _x R	
		Main peak	Tailed peak	Main peak	Tailed peak
H _x	10	8.70 (3.15 ^a)	-	-	-
H _x R	10	-	3.30 (0.58 ^b)	-	-
IMP	7	-	-	-	-
H _x	12	9.90 (3.35 ^a)	-	-	-
H _x R	10	-	0.60 (0.37 ^b)	4.00 (1.62 ^c)	-
IMP	7	-	-	-	0.70 (0.05 ^d)
H _x	12	10.20 (3.57 ^a)	-	-	-
H _x R	12	-	0.40 (0.10 ^b)	5.20 (1.79 ^c)	-
IMP	7	-	-	-	0.30 (0.02 ^d)
H _x	15	11.40 (3.73 ^a)	-	-	-
H _x R	12	-	0.20 (0.00 ^b)	5.05 (1.83 ^c)	-
IMP	7	-	-	-	0.05 (0.00 ^d)

^a Calculated from H_x calibration curve.

^b Calculated from H_x calibration curve.

^c Calculated from H_xR calibration curve.

^d Calculated from H_xR calibration curve.

라. PC화된 센서 시스템의 적용

개발된 바이오센서 시스템의 PC화를 행한 후 센서반응을 컴퓨터상에서 처리하였다. Fig. 24는 ATP 분해산물 중 hypoxanthine을 측정하는 batch형의 바이오센서 시스템의 경우의 센서반응을 PC로 처리한 결과를 보여준다. Hypoxanthine 용액의 농도를 각각 달리하여 반응 cell에 주입하면 PC화된 시스템에 의하여 컴퓨터상에 digital화 되어 산소의 소모량이 전류로 변환되어 입력되고 이를 Excel 프로그램으로 전송받아 분석하였는데 hypoxanthine 농도에 따른 반응전류의 변화를 잘 알 수 있었다.

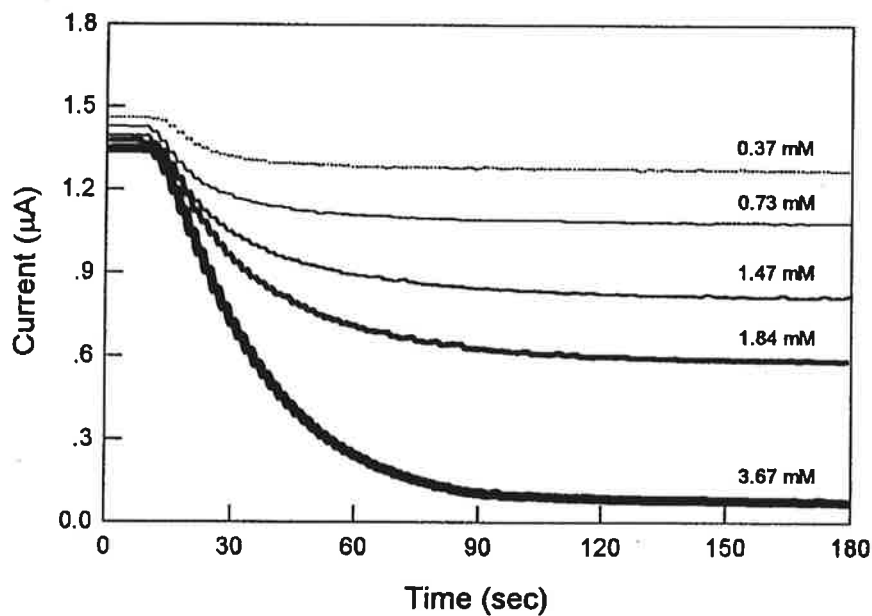


Fig. 24. Current time recording of the responses on the different hypoxanthine concentrations.

마. 바이오센서 시스템에 의한 모델 시료의 분석

XOD로 충전된 H_x reactor, XOD/NP로 충전된 H_xR reactor, XOD/NP/5'-NT로 충전된 IMP reactor를 연결하여 제작한 연속형 다전극 효소센서의 계측 신뢰성을 확인하기 위하여 ATP 분해산물인 hypoxanthine, inosine 및 IMP가 임의로 들어 있는 모델 시료 중의 각 성분의 함량을 측정하였다. 이 때, 각 효소 column의 길이는 12-10-7 cm인 것과 15-12-7 cm인 것을 사용하여 기질 성분 중 두가지 성분은 임의의 농도로 고정하고 한가지 성분만을 농도를 증가시키면서 측정하였다. 효소 column의 길이를 12-10-7 cm로 한 것은 hypoxanthine을 주입하였을 경우 H_x reactor에서 효소반응이 완전히 일어나지 않아 H_xR reactor에서 hypoxanthine의 peak가 일부 나타나기 때문에 임의의 농도의 inosine 측정 시 바이오센서로 측정한 값이 실제로 알고 있는 농도보다 높게 계산되어 짐을 알 수 있었다 (Table 17). 실제로 inosine 농도를 달리하였을 경우 inosine은 85.9%만큼 상승된 값으로 나타났으며, IMP의 농도를 달리하였을 경우 IMP는 38.4%만큼 상승된 값으로 나타났다. 반면, 효소 column의 길이가 15-12-7 cm일 때는 각각의 효소 column에서 효소반응이 완전하게 일어나기 때문에 주입한 각 성분의 농도에 일반적으로 5.6% 이하의 오차범위를 보여 매우 정확한 분석이 가능하였다 (Table 18).

5. 비교분석법 및 바이오센서에 의한 시료분석

가. 어육중의 ATP 분해산물 측정

ATP 분해산물을 분석하는 방법으로 HPLC를 이용하는 경우 Zobax ODS 칼럼을 사용한 방법과 μ Bondapak C_{18} 칼럼을 사용하여 정량하는 방법이 보고되고 있으나, Zobax ODS 칼럼을 사용하는 경우 농도구배를 해야하는 어려움이 있고, μ Bondapak C_{18} 칼럼을 사용하는 방법은 ATP, ADP, AMP가 잘 분리되지 않고 머무름 시간 (retention time)이 긴 단점이 있다. 본 실험에서는 μ Bondapak C_{18} 칼럼을 사용하고 단일

Table 17. Simultaneous determination of H_x , H_{xR} and IMP by the FIA biosensor system with three enzyme reactors. The column lengths of H_x , H_{xR} and IMP enzyme reactors were 12, 10 and 7 cm, respectively

Concentration of ATP-related compound (mM)								
Standard component			FIA biosensor system			Difference (%)		
H_x	H_{xR}	IMP	H_x	H_{xR}	IMP	H_x	H_{xR}	IMP
0.184	0.932	0.637	0.104 ± 0.031	2.460 ± 0.000	2.624 ± 0.110	-43.448 ± 16.738	163.908 ± 0.000	181.530 ± 2.638
0.367	0.932	0.637	0.281 ± 0.044	2.281 ± 0.089	2.538 ± 0.115	-23.406 ± 11.836	147.154 ± 9.166	172.280 ± 12.334
0.735	0.932	0.637	0.850 ± 0.031	2.162 ± 0.103	2.394 ± 0.110	15.575 ± 4.183	131.995 ± 11.055	156.862 ± 11.809
1.837	0.932	0.637	2.066 ± 0.092	2.132 ± 0.052	2.174 ± 0.176	12.439 ± 5.021	128.803 ± 5.528	133.221 ± 18.841
3.674	0.932	0.637	3.410 ± 0.335	2.237 ± 0.189	2.135 ± 0.163	-7.179 ± 9.120	139.973 ± 20.310	129.110 ± 17.443
0.735	0.093	0.637	0.761 ± 0.000	0.136 ± 0.052	1.922 ± 0.085	3.511 ± 0.000	45.928 ± 55.919	201.668 ± 13.344
0.735	0.186	0.637	0.774 ± 0.023	0.347 ± 0.074	1.862 ± 0.170	5.324 ± 3.140	85.962 ± 39.541	185.942 ± 28.826
0.735	0.373	0.637	0.788 ± 0.023	0.685 ± 0.086	1.651 ± 0.228	7.137 ± 3.140	83.783 ± 23.183	141.911 ± 10.895
0.735	0.932	0.637	0.774 ± 0.023	1.520 ± 0.074	1.934 ± 0.066	5.324 ± 3.140	63.104 ± 7.908	198.523 ± 10.895
0.735	1.864	0.637	0.854 ± 0.023	3.025 ± 0.104	1.801 ± 0.085	16.203 ± 3.140	62.265 ± 5.592	182.797 ± 13.344
0.735	0.932	0.064	0.715 ± 0.072	0.924 ± 0.053	0.088 ± 0.023	-2.763 ± 9.849	-0.869 ± 5.674	38.487 ± 36.448
0.735	0.932	0.128	0.786 ± 0.029	0.954 ± 0.000	0.169 ± 0.023	3.987 ± 3.939	2.407 ± 0.000	32.270 ± 18.210
0.735	0.932	0.255	0.789 ± 0.033	0.909 ± 0.000	0.330 ± 0.023	7.335 ± 4.432	-2.507 ± 0.000	29.231 ± 9.106
0.735	0.932	0.637	0.710 ± 0.007	0.985 ± 0.053	0.638 ± 0.046	-3.459 ± 0.985	5.683 ± 5.674	0.127 ± 7.290
0.735	0.932	1.275	0.832 ± 0.022	0.939 ± 0.026	1.187 ± 0.000	13.255 ± 2.955	0.769 ± 2.837	1.055 ± 0.000
0.735	0.932	2.040	0.738 ± 0.091	0.909 ± 0.046	1.650 ± 0.028	0.371 ± 12.311	-2.507 ± 4.914	-19.113 ± 1.394

Table 18. Simultaneous determination of H_x, H_xR and IMP by the FIA biosensor system with three enzyme reactors. The column lengths of H_x, H_xR and IMP enzyme reactors were 15, 12 and 7 cm, respectively

Concentration of ATP-related compound (mM)								
Standard component			FIA biosensor system			Difference (%)		
H _x	H _x R	IMP	H _x	H _x R	IMP	H _x	H _x R	IMP
0.184	0.932	0.637	0.167±0.002	0.933±0.006	0.633±0.017	-9.127±0.881	0.049±0.588	-0.646±2.638
0.367	0.932	0.637	0.354±0.003	0.934±0.007	0.615±0.042	-3.795±0.881	0.188±0.784	-3.444±6.594
0.588	0.932	0.637	0.576±0.007	0.936±0.004	0.647±0.036	-2.100±1.101	0.437±0.431	1.499±5.671
0.735	0.932	0.637	0.754±0.065	0.933±0.016	0.652±0.027	2.581±8.807	0.049±1.764	2.338±4.220
1.837	0.932	0.637	1.848±0.058	0.933±0.007	0.627±0.025	0.596±3.171	0.132±0.706	-1.578±3.957
3.674	0.932	0.637	3.526±0.029	0.949±0.015	0.654±0.046	-4.041±0.793	1.851±1.568	2.618±7.256
0.735	0.093	0.637	0.712±0.025	0.066±0.015	0.615±0.042	-3.148±3.347	-29.637±15.683	-3.444±6.594
0.735	0.186	0.637	0.722±0.019	0.186±0.002	0.621±0.050	-1.778±2.642	-0.361±0.980	-2.511±7.913
0.735	0.298	0.637	0.724±0.023	0.288±0.001	0.631±0.014	-1.467±3.083	-3.351±0.245	-0.926±2.242
0.735	0.373	0.637	0.721±0.018	0.373±0.026	0.637±0.022	-1.903±2.466	0.069±6.861	-0.086±3.429
0.735	0.932	0.637	0.721±0.024	0.923±0.051	0.635±0.014	-1.965±3.259	-0.921±5.489	-0.366±2.242
0.735	1.864	0.637	0.724±0.022	1.838±0.073	0.633±0.017	-1.529±2.994	-1.390±3.921	-0.646±2.638
0.735	2.983	0.637	0.724±0.022	2.916±0.099	0.634±0.032	-1.498±3.039	-2.261±3.307	-0.459±5.012
0.735	0.932	0.064	0.707±0.031	0.895±0.055	0.058±0.008	-3.771±4.227	-3.971±5.881	-9.169±13.188
0.735	0.932	0.128	0.720±0.023	0.911±0.004	0.120±0.014	-2.090±3.963	-2.252±0.471	-5.700±11.201
0.735	0.932	0.204	0.720±0.029	0.907±0.088	0.199±0.042	-2.090±3.963	-2.640±9.488	-2.319±20.594
0.735	0.932	0.255	0.720±0.020	0.903±0.073	0.247±0.025	-2.059±2.686	-3.139±7.841	-3.220±9.885
0.735	0.932	0.637	0.723±0.021	0.903±0.088	0.633±0.017	-1.688±2.862	-3.139±9.410	-0.643±2.638
0.735	0.932	1.275	0.724±0.022	0.911±0.091	1.274±0.034	-1.529±2.994	-2.307±9.802	-0.028±2.636
0.735	0.932	2.040	0.715±0.035	0.911±0.040	1.863±0.126	-2.744±4.800	-2.307±4.313	-8.686±6.178

용매로 비교적 높은 온도인 40℃에서 분리를 행하여 시료 중의 ATP 분해산물을 분석하고 K_i값 및 H_x값을 구하였다. 이 때, K_i값과 H_x값은 다음과 같이 표시된다.

$$K_i \text{ 값 } (\%) = \frac{H_x R + H_x}{\text{IMP} + H_x R + H_x} \times 100$$

$$H_x \text{ 값 } (\%) = \frac{H_x}{\text{IMP} + H_x R + H_x} \times 100$$

Table 19는 실험에 사용된 어류 20종의 추출액을 HPLC로 분석하여 얻은 ATP 관련화합물의 함량과 이들로부터 구하여진 K_i값 및 H_x값을 보여주고 있다. Table 19에서 볼 수 있는 것처럼, ATP 분해산물 중 IMP가 가장 많이 함유되어 있었고, 이것의 분해로 생성되는 inosine과 hypoxanthine의 함량은 각각 0.078~2.500 μmol/g, 0.078~4.883 μmol/g으로 IMP에 비해 낮았다. 이것은 사후 24시간 내의 신선한 시료에서는 IMP가 현저히 증가한다는 기존의 보고와도 일치하고 있다. 활어, 횡감, 일반어육, 가공원료의 경우의 K_i값은 각각 0~10, 10~20, 20~50, 35~60% 범위 내에 있으며, K_i값이 60%를 넘으면 1단계 부패상태라고 보고되고 있다. 본 연구에서 사용된 시료들의 일반적인 K_i값은 7.8~43.6% 범위내에서 측정되었다. 그러나, 오징어나 굴의 경우 IMP 함량이 다른 어종에 비하여 현저히 낮기 때문에 상대적으로 K_i값이 90% 이상으로 높게 측정되었는데, 이러한 결과는 오징어나 굴의 신선도가 떨어지는 것을 의미하는 것이 아니라 이들 어류의 경우 ATP 분해과정의 대사활성이 매우 활발한 것을 의미하며 또한 오징어나 문어와 같은 연체어류는 ATP 분해경로에서 IMP가 거의 축적되지 않는다는 기존의 보고와도 일치하고 있다. 이들의 경우에는 ATP 분해산물 이외의 것으로부터 도출가능한 것을 선도지표로 삼는 것이 타당할 것으로 여겨진다. 또한, 일반적인 ATP 분해과정에서의 분해산물의 생

성경향과는 달리 ATP가 분해되는 동안 특히 inosine이 축적되는 inosine 형성 어종이 있는데, 여기에 속하는 어종에는 대구, 고등어, snapper, skipjack 등이 있다. 따라서, 이런 어종들은 K_i 값보다는 다른 지표로서 신선도를 나타내는 것이 적합하다. H값(%)은 $[H_x/(IMP + H_xR + H_x) \times 100]$ 으로 표시되는데 위의 어종의 경우에서 선도지표로서 활용될 수 있다. 실제로 대구의 K_i 값을 측정한 결과 98.5%로 매우 높게 나타났으나 H값은 23.8%에 불과하였다. 이와 같은 사실은 대구의 inosine mol비가 74.5%이며 다른 어종에 비하여 inosine 함량이 매우 높는데 기인하는 것이다. 굴의 경우도 inosine의 mol비가 63.9%로 다른 어종에 비하여 비교적 inosine 함량이 높은 것으로 나타났다.

나. 어육중의 TMA 및 biogenic amine류 측정

Biogenic amine류는 신선육에서 미생물 오염의 지표로서 활용할 수 있으며, 특히, cadaverine은 돈육, 우육, 칠면조육에서 좋은 지표가 될 수 있다는 보고가 있다. 또한, Sayem El Daher 등은 우육에 있어 선도지표로 여러 종류의 amine류를 검토한 결과 putrescine, cadaverine, spermidine과 총 균수 사이에는 유의적인 상관관계가 존재한다고 보고하였다. 본 연구에서 시료로 사용된 어류의 선도지표로서 biogenic amine류를 측정할 때 HPLC분석을 위해 표준품으로 사용한 것은 tryptamine, β -phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine, serotonin, tyramine, spermidine, spermine이었으며, 이들의 머무름 시간은 각각 7.26, 8.40, 9.40, 10.47, 11.55, 15.64, 19.66, 23.65, 25.73분으로 나타났다. Biogenic amine류는 저장시작 후부터 일반적으로 서서히 증가하기 시작하며 고등어와 정어리와 같은 적색육어류에서 histamine은 20 mg/100 g이면 중독한계수치라고 할 수 있으나, 본 실험에서 사용된 어육 추출액에 대하여 HPLC 분석을 행한 결과 biogenic amine류는 측정되지 않는 것으로 나타났다. 어류 20종에서 측정된 TMA 및 VBN의 함량은 Table 20에서 보는 바와 같다. 일반적으로, VBN 지표가 5~10 mg% 이하이면 아주 신선하고 20 mg%이하에서는 대개의 시료에서 신선하며 50 mg%이상이면 부패가 된 상태라고 보고되고 있다. 본 실험에서 TMA함량은 0.15~6.74 mg% 이었고,

Table 19. Determinations of ATP-related compounds in various fish extracts, and the resulting K_i and H values

Sam-ple	Scientific name	English name	H _x (μ mol/g)	H _{3R} (μ mol/g)	IMP (μ mol/g)	AMP (μ mol/g)	ADP (μ mol/g)	K_i (%)	H (%)
1	<i>Trichiurus lepturus</i>	Hairtail	1.535	0.078	2.794	0.050	-	36.6	34.8
2	<i>Scomber japonicus</i> ^a	Mackerel ^a	0.356	1.780	4.473	-	-	32.3	7.9
3	<i>Scomber japonicus</i> ^b	Mackerel ^b	0.400	2.500	6.900	0.260	0.400	29.6	4.1
4	<i>Limanda herzensteini</i>	Flatfish	0.539	- ^c	6.338	0.057	0.180	7.8	7.8
5	<i>Ostrea denselamellosa</i>	Oyster	0.078	0.345	0.117	0.256	0.160	78.4	14.2
6	<i>Cololabis saira</i>	Pacific saury	0.881	0.862	4.298	0.081	4.298	28.9	14.6
7	<i>Thunnus thynnus</i> ^a	Tuna ^a	0.161	0.529	-	0.172	-	7.8	23.3
8	<i>Thunnus thynnus</i> ^b	Tuna ^b	0.180	0.650	6.900	0.373	0.376	10.7	2.3
9	<i>Gadus macrocephalus</i>	Pacific cod	0.650	2.030	0.045	0.149	0.397	98.5	23.8
10	<i>Pleuronichthys</i>	Prog flounder	1.780	0.186	2.857	0.074	0.220	40.8	36.9
11	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Rock bream	0.653	0.266	6.888	0.135	0.222	11.8	8.4
12	<i>Anago anago</i>	Conger eel	0.240	0.370	2.300	0.231	0.880	20.9	8.2
13	<i>Scomberomorus niphonius</i> ^a	Spanish mackerel ^a	0.324	0.837	3.926	0.079	-	22.7	6.4
14	<i>Scomberomorus niphonius</i> ^b	Spanish mackerel ^b	0.130	0.850	6.200	0.179	0.390	13.6	1.8
15	<i>Nibea albiflora</i>	Yellow drum	4.883	-	0.270	0.044	0.200	94.8	94.8
16	<i>Todarodes pacificus</i> ^a	Common squid ^a	1.729	-	0.168	0.284	-	91.9	91.1
17	<i>Todarodes pacificus</i> ^b	Common squid ^b	2.500	0.220	0.230	0.337	0.360	92.2	84.7
18	<i>Epinephelus tauvina</i>	Black-spotted grouper	1.720	1.935	0.364	0.029	0.138	90.9	42.8 9.3
19	<i>Pagrus major</i>	Red sea-bream	0.220	0.210	1.930	0.196	-	18.2	
20	<i>Larimichthys polyactis</i>	Yellow croaker	0.860	1.770	3.400	0.170	0.530	43.6	14.3

^{a,b} Fish brought from different places.

^c Not detected.

Table 20. Determinations of biogenic amines, TMA and VBN in various fish extracts

Sample	Scientific name	English name	Biogenic amines (μ mol/g)	TMA (mg%)	VBN (mg%)	P ^d (%)
1	<i>Trichiurus lepturus</i>	Hairtail	- ^c	0.82	20.81	3.9
2	<i>Scomber japonicus</i> ^a	Mackerel ^a	-	3.72	24.58	15.1
3	<i>Scomber japonicus</i> ^b	Mackerel ^b	-	1.36	18.71	7.3
4	<i>Limanda herzensteini</i>	Flatfish	-	1.34	30.63	4.4
5	<i>Ostrea denselamellosa</i>	Oyster	-	0.15	4.42	3.4
6	<i>Cololabis saira</i>	Pacific saury	-	1.79	23.34	7.7
7	<i>Thunnus thynnus</i> ^a	Tuna ^a	-	1.38	21.96	6.3
8	<i>Thunnus thynnus</i> ^b	Tuna ^b	-	4.10	21.63	19.0
9	<i>Gadus macrocephalus</i>	Pacific cod	-	4.24	18.41	23.0
10	<i>Pleuronichthys</i>	Frog flounder	-	5.51	27.77	19.8
11	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Rock bream	-	4.03	23.41	17.2
12	<i>Anago anago</i>	Conger eel	-	2.64	6.35	41.6
13	<i>Scomberomorus niphonius</i> ^a	Spanish mackerel ^a	-	3.89	18.29	21.3
14	<i>Scomberomorus niphonius</i> ^b	Spanish mackerel ^b	-	6.74	8.78	76.8
15	<i>Nibea albiflora</i>	Yellow drum	-	5.31	24.36	21.8
16	<i>Todarodes pacificus</i> ^a	Common squid ^a	-	4.02	14.54	27.7
17	<i>Todarodes pacificus</i> ^b	Common squid ^b	-	1.43	15.94	9.0
18	<i>Epinephelus tauvina</i>	Black-spotted grouper	-	6.47	32.00	20.2
19	<i>Pagrus major</i>	Red sea-bream	-	1.47	18.36	8.0
20	<i>Larimichthys polyactis</i>	Yellow croaker	-	2.85	16.43	17.4

^{a,b} Fish brought from different places.

^c Not detected.

^d TMA/TVBN \times 100, %

VBN 함량은 4.42~32.00 mg% 범위로 나타났다. 굴과 붕장어는 TMA, VBN 함량 모두 적은 수치를 나타냈으며, 대개의 시료에서 TMA 함량이 높으면 VBN 함량도 높은 것으로 나타나 두 수치 사이에 일정수준의 상관관계가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 25). 실제로 Malle과 Poumeyrol은 대구, 소대구 (whiting), 고등어와 같은 어종에서 저장기간에 따라 TMA와 TVBN을 측정된 결과 일정한 상관관계가 있어 이들의 상대적 비율 ($TMA/TVBN \times 100, \%$)을 P값으로 정의하고 선도지표 측정에 활용하였다. 이 때, TVBN은 저장초기에는 거의 생성되지 않았으며, 어종에 따라 TVBN의 변화가 뚜렷하지 않은 것이 있는데 이런 어종은 일반적으로 고지질을 함유한 어종이라는 보고가 있다. 또한, 저지방 어류의 경우 TVBN값이 좋은 선도지표라고 보고된 바 있다. 채취한 여러가지 시료에 대하여 저장을 행하지 않으면서 측정된 본 실험에서도 꽂치와 같은 일부 고지질 어류를 제외하면 이들 값간에는 직선의 상관관계 ($r=0.894$)가 존재하였다. 따라서, TMA도 VBN처럼 유효한 선도지표인 것으로 여겨지므로 바이오센서에 의해 TMA를 측정하고 그 결과를 Conway micro-diffusion 방법에 의한 측정결과와 비교하고자 한다. 한편, 시료의 채취시기가 앞의 시료와 다른 10종의 어육을 처리하여 Conway micro-diffusion 방법에 의하여 TMA를 분석하였다 (Table 21). 어종에 따라 다소 차이가 있었는데, 광어 (flat fish)와 게르치 (big-eye)는 TMA가 비교적 낮은 값을 보여 주었으며, 일반적으로 3.26~8.23 mg% 범위였다.

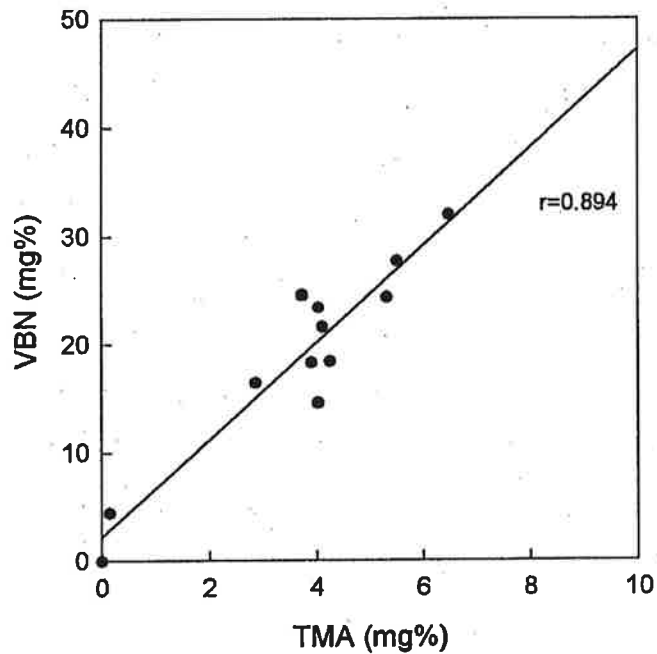


Fig. 25. Correlation between trimethylamine and volatile basic nitrogen contents for various fish.

다. 축육 중의 ATP 분해산물 측정

쇠고기와 닭고기에서 ATP 분해산물인 hypoxanthine, inosine, IMP를 HPLC로 분석하였다. 이 때, 수퍼마켓에서 구입하여 바로 처리한 경우, 구입 후 4℃에서 1주일 저장한 후 처리한 경우, 구입한 후 -20℃에서 1주일 저장한 후 처리한 경우, 구입한 후 -20℃에서 2주일 저장한 후 처리한 경우 등 4가지 경우로 나누어 분석하였다. 수퍼마켓에서 구입한 후 바로 처리한 경우가 K_i 값이 가장 낮게 나타났는데 이는 IMP값이 가장 많이

Table 21. Determination of TMA in various fish extracts

Sample	English name	Scientific name	TMA (mg%)
1	Flatfish	<i>Limanda herzensteini</i>	0.61
2	Big-eye		0.62
3	Seabass		3.26
4	Frog flounder	<i>Pleuronichthys</i>	5.80
5	Rock bream ^a	<i>Oplegnathus fasciatus</i> ^a	7.08
6	Rock bream ^b	<i>Oplegnathus fasciatus</i> ^b	6.62
7	Conger eel	<i>Anago anago</i>	5.98
8	Common squid	<i>Todarodes pacificus</i>	5.40
9	Black-spotted grouper ^a	<i>Epinephelus tauwina</i>	5.29
10	Black-spotted grouper ^b	<i>Epinephelus tauwina</i>	8.23

^{a,b} Fish brought from different places.

존재하고 있음을 의미한다 (Table 22). -20℃에서 저장 후 처리했을 때, 2주일 저장한 경우보다 1주일 저장한 경우가 K₂값 및 H값이 낮게 나타났다 (Table 23, 24). 그리고, 4℃에서 1주일 저장 후 처리하여 분석한 경우 K₂값과 H값이 가장 높게 나타났다 (Table 25). 이는 저장기간 중 ATP 분해경로에 따라 IMP가 inosine 및 hypoxanthine으로 많이 분해되어 상대적으로 이들의 농도가 높아졌음을 보여 준다. 또한, 쇠고기보다 닭고기의 경우 저장방법에 따라 K₂값의 변화가 크게 나타나 축육의 종류에 따라 저장형태에 의해 영향을 받는 정도가 다를 수 있었다.

Table 22. Determinations of hypoxanthine, inosine and IMP in various meat extracts. The samples were delivered from a market and treated immediately

Sample	H _x (μ mol/g)	H _x R (μ mol/g)	IMP (μ mol/g)	K _i value (%)	H value (%)
Loin ^a	1.149	0.198	0.994	49.1	57.5
Loin ^b	1.258	0.194	1.158	48.2	55.6
Loin ^c	1.536	0.290	1.306	49.0	58.3
Loin ^d	1.265	0.182	0.573	62.6	71.6
Chicken ^a	1.139	0.473	1.884	32.6	46.1
Chicken ^b	0.718	0.335	1.655	26.6	38.9
Chicken ^c	0.637	0.349	1.882	22.2	34.4
Chicken ^d	0.890	0.368	1.632	30.8	43.5

^{a,b,c,d} Treated from different samples.

Table 23. Determinations of hypoxanthine, inosine and IMP in various meat extracts. The samples were treated after storage for 7 days at -20 °C

Sample	H _x (μ mol/g)	H _x R (μ mol/g)	IMP (μ mol/g)	K _i value (%)	H value (%)
Loin ^a	1.025	0.162	1.153	50.7	43.8
Loin ^b	1.011	0.201	0.811	59.9	50.0
Chicken ^a	0.644	0.541	1.695	41.2	22.4
Chicken ^b	0.851	0.470	1.480	47.2	30.4
Chicken ^c	0.729	0.308	1.240	45.6	32.0
Chicken ^d	0.744	0.574	2.161	37.9	21.4

^{a,b,c,d} Treated from different samples.

Table 24. Determinations of hypoxanthine, inosine and IMP in various meat extracts. The samples were treated after storage for 14 days at -20°C

Sample	H _x (μ mol/g)	H _x R (μ mol/g)	IMP (μ mol/g)	K _i value (%)	H value (%)
Loin ^a	0.899	0.120	0.852	54.5	48.0
Loin ^b	0.674	0.116	0.371	68.1	58.1
Chicken ^a	0.912	0.305	1.038	54.0	40.5
Chicken ^b	1.008	0.407	1.344	51.3	36.6
Chicken ^c	0.772	0.333	1.077	50.6	35.4
Chicken ^d	0.617	0.199	0.590	58.0	43.9

^{a,b,c,d} Treated from different samples.

Table 25. Determinations of hypoxanthine, inosine and IMP in various meat extracts. The samples were treated after storage for 7 days at 4°C

Sample	H _x (μ mol/g)	H _x R (μ mol/g)	IMP (μ mol/g)	K _i value (%)	H value (%)
Loin ^a	2.156	0.222	1.248	65.6	59.5
Loin ^b	2.033	0.210	1.050	68.1	61.7
Loin ^c	1.203	0.134	0.382	77.8	70.0
Loin ^d	2.005	0.225	0.328	87.2	78.4
Chicken ^a	1.308	0.741	1.185	63.4	40.4
Chicken ^b	1.938	0.332	0.570	79.9	68.2
Chicken ^c	3.164	0.480	0.806	81.9	71.1
Chicken ^d	1.980	0.259	0.206	91.6	81.0

^{a,b,c,d} Treated from different samples.

라. 바이오센서에 의한 시료분석

ATP 분해산물 측정을 위한 연속형 바이오센서 시스템의 최적 조건 (0.05 M 인산 완충용액, pH 7.5, 30°C, column 길이 15-12-7 cm)에서 어육 중의 ATP 분해산물을 측정하였다. Hypoxanthine, inosine, IMP 표준곡선에 의하여 산출되어 진 어육 중의 hypoxanthine, inosine, IMP의 농도는 Table 26에서 보는 바와 같다. 어육에 따라 다소 차이는 있으나 일반적으로 hypoxanthine은 22.8~57.6, inosine은 32.1~77.6, IMP는 89.9~189.7 $\mu\text{mol/g}$ 의 농도범위에 있었으며, 이에따른 K_i 값은 26.0~67.6% 이었다.

Table 26. Determinations of hypoxanthine, inosine and IMP for various fish extracts

Sample	English name	Scientific name	H _x ($\mu\text{mol/g}$)	H _x R ($\mu\text{mol/g}$)	IMP ($\mu\text{mol/g}$)	K _i value (%)	H value (%)
1	Flatfish	<i>Limanda herzensteini</i>	22.83	32.18	156.48	26.0	10.80
2	Big-eye		31.99	38.38	113.71	38.2	17.38
3	Seabass		35.66	77.66	94.70	54.5	17.14
4	Frog flounder	<i>Pleuronichthys</i>	52.12	65.25	146.97	44.4	19.72
5	Rock bream ^a	<i>Oplegnathus fasciatus</i> ^a	46.64	38.38	175.49	32.6	17.90
6	Rock bream ^b	<i>Oplegnathus fasciatus</i> ^b	33.82	61.12	189.74	33.4	11.88
7	Conger eel	<i>Anago anago</i>	35.65	67.32	146.97	41.2	14.26
8	Common squid	<i>Todarodes pacificus</i>	57.62	77.66	89.95	60.1	25.58
9	Black-spotted grouper ^a	<i>Epinephelus tauvina</i> ^a	151.00	37.32	104.20	67.7	46.82
10	Black-spotted grouper ^b	<i>Epinephelus tauvina</i> ^b	110.72	59.05	94.70	64.2	41.86

^{a,b} Fish brought from different places.

6. 바이오센서 workshop

본 연구과제인 “식품산업에서의 바이오센서 시스템 활용기술 개발연구”는 한국식품개발연구원, 전남대학교, 서울여자대학교, 신구대학이 공동 참여하여 각각 “어육 및 축육 선도의 신속 정확한 계측과 관리를 위한 바이오센서 시스템 개발”, “과실성숙도의 신속 계측을 위한 바이오센서 시스템 개발”, “식품의 품질관리 및 공정을 위한 Multi-biosensor의 개발”, “바이오센서의 컴퓨터 접속시스템 개발”이란 세부연구과제 아래 1995년 12월부터 현재까지 3년간 연구가 수행되고 있다.

이에 “한국식품과학회 분석분과위원회” 주관하에 각 연구팀에서 개발한 바이오센서를 소개하고 이의 활용을 위하여 바이오센서 workshop을 개최하였다. 개최된 workshop은 강의 및 실습을 겸하여 실시하였으며, 실제 수행하고 있는 바이오센서 연구의 주요 사항들을 소개하였다. 다음은 바이오센서 workshop의 내용이다.

개최 : 바이오센서의 원리와 식품산업에서의 응용

일시 : 1998년 8월 13일 목요일

장소 : 한국식품개발연구원

가. 강의내용

- 바이오센서의 원리와 응용 (전남대, 조성효)
- 식품산업에서 여러 형태의 바이오센서와 사용 예 (서울여대, 노봉수)
- PC를 이용한 바이오센서의 공정 측정 및 제어 system (신구대학, 최부돌)
- 바이오센서의 연구동향과 이를 활용한 새로운 분석기법
(한국식품개발연구원, 김남수)

나. 바이오센서 실습

- FIA형 어육선도 측정 시스템
 - : ATP 분해산물 측정용 센서
 - Biogenic amine 센서

- 과실의 성숙도 측정 시스템
 - : 유리당, 아미노산 계측 센서

- Multiple cathode electrode를 이용한 식품성분의 동시측정
 - : 6 cathode electrode 소개
 - : Glucose, pyruvate, ethanol 동시 측정용 센서

- PC를 이용한 바이오센서의 공정측정 및 제어
 - : Glucose 센서

Workshop에 참가한 인원은 모두 15명이었고 바이오센서의 일반적인 원리와 실제 응용에 관하여 각 세부과제 책임자들이 강의를 진행하였으며, 강의내용은 “바이오센서의 원리와 식품산업에의 응용”이라는 제목의 바이오센서 workshop 논문집으로 발간되었다. 실습과정 중에는 실제 과제수행 중 개발된 바이오센서의 다양한 모습을 소개하였다. 실습에 앞서 각 연구기관에서 개발한 바이오센서의 원리를 소개하였으며, 전체 인원을 4개 조로 나누어 작동 procedure에 따라 실제로 실습하는 시간을 갖도록 한 후 종합 토론을 하였다. 참가한 사람들의 workshop 평가 결과 전체적으로 workshop의 질적수준이 높았으며, workshop 교재의 구성도 충실하였고 강사들의 강의 및 실습요지의 전달이 잘 되었으며, 실습이 매우 충실하였다는 평가를 얻었다. 또한, 바이오센서의 앞으로의 상용화 전망에 대해서는 비교적 가능성이 큰 것으로 기대하였으며, 식품 품질평가 및 공정관리

부분에 대해서도 다루어 진 것으로 평가하였다. 바이오센서 workshop에 참가한 사람들 15명 중 현재 바이오센서 부분에 대하여 연구하고 있는 사람은 5명이었으나 바이오센서에 대하여 매우 적극적인 관심을 가지고 있는 것으로 나타났다. 이에 본 workshop은 전반적으로 바이오센서의 원리에 대한 확실한 이해와 응용방법에 대한 실제적인 경험을 얻을 수 있는 유익한 시간이 되었다는 우수한 평가결과를 얻을 수 있었다.

다음은 workshop 평가에 대한 설문조사내용이다. 참가인원 중 설문조사에 응한 인원은 모두 11명이었으며 이에 대한 결과를 제시하고자 한다.

1. 본 워크샵의 질적수준을 평가하여 주십시오.
 - ㉠ 아주 높다. ----- 3명
 - ㉡ 높은 편이다. ----- 8명
 - ㉢ 보통이다.
 - ㉣ 낮다.

2. 워크샵 Proceeding에 대해서는 어떻게 생각하십니까?
 - ㉠ 아주 충실하다. ----- 4명
 - ㉡ 충실한 편이다. ----- 7명
 - ㉢ 보통이다.
 - ㉣ 부실하다.

3. 워크샵의 구성과 진행에 대한 의견을 제시하여 주십시오.
 - ㉠ 아주 양호하다. ----- 6명
 - ㉡ 양호한 편이다. ----- 5명
 - ㉢ 보통이다.

④ 부실하다.

4. 강사들의 강의 및 실습요지는 잘 전달되었습니까?

① 잘 전달되었다. ----- 8명

② 보통이었다. ----- 3명

③ 잘 전달되지 않았다.

5. 현재 바이오센서 관련연구나 업무를 수행하고 계시는지 언급하여 주십시오.

① 그렇다. ----- 5명

② 그렇지 못하나 관심을 가지고 있다. ----- 6명

③ 그렇지 못하다.

6. 이전에 다른 바이오센서 워크샵에 참가하신 적이 있으신지요?

① 그렇다. ----- 0명

② 그렇지 않다. ----- 11명

7. 본 워크샵에 대한 만족도에 대하여 언급하여 주십시오.

① 아주 만족스럽다. ----- 4명

② 만족스런 편이다. ----- 7명

③ 보통이다.

④ 불만스럽다.

8. 기대했던 성과를 얻을 수 있었습니까?

① 그렇다. ----- 10명

② 보통 정도이다. ----- 1명

㉔ 기대 밖이다.

9. 식품의 품질평가 및 공정관리에 중요한 사항들이 본 바이오센서 워크샵에서 다루어졌다고 보십니까?

㉑ 적절하게 다루어졌다. ----- 7명

㉒ 보통 수준이다. ----- 3명

㉓ 그렇지 못하다. ----- 1명

10. 본 워크샵에서 소개된 바이오센서 시스템의 상용화 전망은?

㉑ 상용화 가능성이 크다. ----- 6명

㉒ 보통 수준이다. ----- 5명

㉓ 상용화 가능성이 낮다.

㉔ 잘 모르겠다.

제 4절 참고문헌

- Alatonen, T., Anttalainen, L., Hakala, J. and Pasanen, R. Evaluation of fish freshness by the iron agar method. *Suomen Elaeinlaeakaerilehti* 98 : 386 (1992)
- Barassi, C.A., Pecora, R.P., Roldan, H. and Trucco, R.E. Total, non-volatile free fatty acids as a freshness index for hake (*Merluccius hubissi*) stored in ice. *J. Sci. Food Agric.* 38 (4) : 373 (1987)
- Bergann, T. and Kleemann, J. The Fresh-Tester. A rapid method for determination of freshness or age of meat. *Fleischwirtschaft* 74 (5) : 488 (1994)
- Butov, G. Determination of freshness of meat and meat products by means of luminiscent test. *Myasnaya Industriya SSSR* 40 (3) : 21 (1969)
- Cantoni, C., Bianchi, M.A., Beretta, G. and Aubert, Sd. Preconservation of refrigerated pork meat packaged in plastics films. *Industrie Alimentari* 13 (11) : 83 (1974)
- Chemnitius, G.C., Suzuki, M., Isobe, K., Kimura, J., Karube, I. and Schmid, R.D. Thin-film polyamine biosensor: substrate specificity and application to fish freshness determination. *Anal. Chim. Acta* 263 : 93 (1992)
- Edwards, R.A., Dainty, R.H. and Hibbard, C.M. The relationship of bacterial numbers and types to diamine concentration in fresh and aerobically stored beef, pork and lamb. *J. Food Technol.* 18 : 777 (1983)
- Elias, L. and Krzymien, M.E. Method for testing the freshness of fish. *US Patent* 4 980 294 (1990)
- Giaccone, V., Gula, G., Voghera, M. and Ajmerito, P. Changes in pH and post-mortem phenomenon of poultry meat during retailing. Standard parameters

- of evaluation. *Industrie Alimentari* 24 (225) : 266 (1985)
- Hlavay, J., Haemmerli, S.D. and Guilbault, G.G. 1994. Fibre-optic biosensor for hypoxanthine and xanthine based on a chemiluminescence reaction. *Biosensors Bioelectronics* 9 : 189 (1994)
- Isono, Y. A new colorimetric measurement of fish freshness using nucleoside oxidase. *Agric. Biol. Chem.* 54 (11) : 2827 (1990)
- Ivashov, V.I., Andreenkov, V.A. and Komarov, V.L. Method for ascertaining the degree of freshness of meat. *USSR Patent SU 1 666 949 A1* (1991)
- Kress-Rogers, E. and D'Costa, E.J. Biosensors for the food industry. *Analytical Proceedings* 23 (5) : 149 (1986)
- Kress-Rogers, E., D'Costa, E.J., Sollars, J.E., Gibbs, P.A. and Turner, A.P.F. Measurement of meat freshness *in situ* with a biosensor array. *Food Control* 4 (3) : 149 (1993)
- Kristinsson, B. A method and an apparatus for determining the degree of freshness of fish or other pieces of meat. *European Patent Application EP 0 187 382 A1* (1986)
- Lebron, C.I. Rapid method for detection of muramic acid and cadaverine as indicators of microbial load in fresh meats. *Dissert. Abst. Internat.* 54 (7) : 3412 (1994)
- Lee, Y.C., Singh, R.P. and Haard, N.F. Changes in freshness of chilipepper rockfish (*Sebastes goodei*) during storage as measured by chemical sensors and biosensors. *J. Food Biochem.* 16 (2) : 119 (1992)
- Li, N., Endo, H., Hayashi, T., Fujii, T., Takai, R. and Watanabe, E. Development of a trimethylamine gas biosensor system. *Biosensors Bioelectronics* 9 : 593 (1994)

- Luong, J.H.T. and Male, K.B. Development of a new biosensor system for the determination of the hypoxanthine ratio, an indicator of fish freshness. *Enzyme Microbe Technol.* **14** (2) : 125 (1992)
- Luong, J.H.T., Male, K.B. and Huynh, M.D. Applications of polarography for assessment of fish freshness. *J. Food Sci.* **56** (2) : 335 (1991)
- Luong, J.H.T., Male, K.B., Masson, C. and Nguyen, A.L. Hypoxanthine ratio determination in fish extract using capillary electrophoresis and immobilized enzymes. *J. Food Sci.* **57** (1) : 77 (1992)
- Malle, P. and Poumeyrol, M. A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). *J. Food Protect.* **52** (6) : 419 (1989)
- Malle, P. and Pezennec, I. Rapid determination of fish freshness by evaluation of ATP degradation reflected in K value. *Sciences des Aliments* **12** (2) : 257 (1992)
- Masahiko, K. Meat freshness measuring apparatus. *European Patent Application EP 0416 658 A1* (1991)
- Nakatani, Y., Fujita, T., Sawa, S., Otani, T., Hori, Y. and Takagahara, I. Changes in ATP-related compounds of beef and rabbit muscles and a new index of freshness of muscle. *Agric. Biol. Chem.* **50** (7) : 1751 (1986)
- Ng., C.S., Chin, Y.N., Lim, P.Y., Tan, C.E., Yeap, S.E., Nikkuni, S. and Bito, M. Changes in quality of white pomfret, Chinese pomfret and grouper during ice-storage. *Bullet. Jpn. Soc. Scient. Fisher.* **49** (5) : 769 (1983)
- Nomoto, M. and Ohno, T. Evaluation of a freshness sensor and its application for estimating the K value of fish meat being put in market. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* **34** (9) : 598 (1987)

- Ohashi, E. and Karube, I. 1993. Sensors for the food industry. *Food Control* 4 (4) : 183 (1993)
- Ohashi, E., Takao, Y., Fujita, T., Shimizu, Y. and Egashira, M. Semiconductive trimethylamine gas sensor for detecting fish freshness. *J. Food Sci.* 56 (5) : 1275 (1991)
- Queiroz, M.I., Treptow, R.O. and Queiroz, E.G. Sensory scale for evaluation of freshness of fish stored in ice. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos* 11 (2) : 91 (1993)
- Sakaguchi, M. and Koike, A. Freshness assessment of fish fillets using the Torrymeyer and K-value. In *Quality Assurance in the Fish Industry*, p. 338 (1992)
- Savran, E., Chomor, K., Stroeva, L.V. and Bulgakova, L.V. Changes in quality of rabbit meat during storage. *Trudy Vsesoyuznyi Nauchno issledovatel'skii Institut Myasnoi Promyshlennosti* 20 : 51 (1976)
- Sayem El Daher, N., Simard, R.E., Fillion, J. and Roberge, A.G. Extraction and determination of biogenic amine in ground beef and their relation to microbial quality. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie* 17 (1) : 20 (1984)
- Shahidi, F., Xin, C. and Dunajski, E. Freshness quality of harp seal (*Phoca groenlandica*) meat. *J. Agric. Food Chem.* 42 (4) : 868 (1994)
- Uchiyama, H. and Kakudi, K. A simple and rapid method for measuring K value, a fish freshness index. *Bullet. Jpn. Soc. Scient. Fisher.* 50 (2) : 263 (1984)
- Udagawa, M., Ishikawa, S., Nakamura, K., Kariyama, M. and Kudo, S. The change in K value during processing and storage of fish and fish products. *Bulletin Tokai Regional Fisheries Research Laboratory* No. 127, 89 (1989)
- Usui, K. Changes of ATP derivatives in quail meat during storage. *Bullet. Facult.*

- Agric. No.* 45, 53 (1979)
- Wagner, G. and Guilbault, G.G. In *Food Biosensor Analysis*, Marcel Dekker, p. 234 (1994)
- Watanabe, E. Freshness measurement of foods. Quality evaluation of fish and meat. *New Food Industry* 30 (10) : 1 (1988)
- Watanabe, E., Endo, H., Takeuchi, N., Hayashi, T, and Toyama, K. Determination of fish freshness with a multielectrode enzyme sensor system. *Bullet. Jpn. Soc. Scient. Fisher.* 52 (3) : 489 (1986)
- Watanabe, E., Nagumo, A., Hoshi, M., Konagaya, S. and Tanaka, M. Microbial sensors for the detection of fish freshness. *J. Food Sci.* 52 (3) : 592.
- Watanabe, E., Toyama, K., Karube, I., Matsuoka, H. and Suzuki, S. Multifunctional biosensor for the determination of fish meat freshness. *Ann. N.Y. Acc. Sci.* 434 : 529 (1984a)
- Watanabe, E., Toyama, K., Karube, I., Matsuoka, H. and Suzuki, S. Enzyme sensor for hypoxanthine and inosine determination in edible fish. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19 (1) : 18 (1984b)
- Wong, K., Bartlett, F. and Gill, T.A. A diagnostic test strip for the semiquantitative determination of trimethylamine in fish. *J. Food Sci.* 53 (6) : 1653 (1988)
- Yamanaka, H. Polyamines as potential indexes for freshness of fish and squid. *Food Rev. Internat.* 6 (4) : 591 (1990)
- Yao, T., Matsumoto, Y. and Wasa, T. Bio-FIA system for estimation of fish freshness. *Bunseki Kagaku* 37 (5) : 236 (1988)
- 大熊廣一. Reactor형 바이오센서에 의한 식품분석. *食品工業* 37 : 35 (1994)

제 3 장
과실성숙도의 신속계측을 위한
바이오센서 시스템 개발
(전남대학교)

여 백

제 1절 서 설

생활이 향상되면서 식품의 품질에 대한 관심이 높아지고, 소비자의 요구도 고급화되고 있다. 따라서, 농민이나 식품가공업자는 신선하며 건전성을 지닌 보다 맛 있는 원료나 가공식품을 공급하지 않을 수 없게 되었다. 특히, 국가간의 무역장벽이 낮아지면서 농산물과 가공식품이 대량으로 수출입되고 있는 상황에서 최선의 품질을 과학적으로 보장할 수 있지 않으면 국제시장경쟁에서 도태될 수 밖에 없으며, 수입하는 경우 품질의 신속한 검사가 이루어져야만 판매가공하는데 편리하다.

국내산 과실 중 수출경쟁력이 있는 것으로는 사과와 배를 들 수 있다. 미국시장의 개방에 따른 농촌의 피해를 최소화하기 위하여, 농민들에게 특용작물의 재배나 부가가치가 높은 가공식품의 개발을 권장하고 있다. 그러나, 농산물을 이용한 가공식품의 개발은 원료의 구매에서부터 과학적이고 조직적인 품질관리가 필요하므로 일반농가에서는 행하기 어렵고, 다만 최고의 품질을 갖는 농산물의 수확이 중요하다. 농산물은 수확시기에 따라 맛과 품질이 크게 차이가 나지만, 농가에서는 수확적기를 경험에 의존할 뿐 과학적으로 예측하지 못하고 있다. 따라서, 가공업자를 포함한 소비자는 최상급 품질의 과실을 공급 받지 못함으로써 가공식품의 품질 또한 열화되는 연쇄고리 현상이 나타난다. 따라서, 과실의 성숙도를 객관적으로 신속 정확하게 예측할 수 있는 평가기술의 개발이 중요하다.

성숙도의 과학적 평가를 위한 기술은, 사용될 기기가 저렴하여 구입이 용이하고 사용이 간편하며, 시료에 대한 별도의 전처리과정이 없이 계측이 가능하고, 휴대할 수 있도록 미소화 되어야 할 것이다. 일반농가에서 이러한 기기의 사용이 가능하다면 고품질의 상태에서 수확이 이루어짐으로써 고수익을 올릴 수 있다. 가공업자의 경우도 객관적으로 고품질의 원료를 사용함으로써 제품의 차별화를 달성할 수 있다.

한편, 이러한 첨단기기의 개발은 기술수출을 기대할 수 있고 국내의 식품산업을 국

제적으로 고급화 시킬 수 있다. 과실의 성숙도를 예측할 수 있는 첨단기기의 개발은 바이오센서의 개발로 가능할 수 있다. 바이오센서는 식품산업 뿐만 아니라, 임상의료공업, 환경산업에도 널리 사용되는 고급기술로서 선진국이 다투어 연구하고 있는 분야이기도 하다. 따라서, 바이오센서 기술의 개발은 그 자체만으로도 유망한 고부가 가치 산업이 될 수 있다. 정부에서 적극 추진하고 있는 농산물 유통구조개선 사업을 효율적으로 수행하고, 폐자원을 최소화하여 환경개선을 도모하기 위해서도 식품원료에 대한 현장품질평가가 이루어질 수 있어야 한다.

사과와 배 등 과실 중에는 유리 당과 아미노산이 다량 함유되어 있고 성숙함에 따라 그 함량이 변화한다. 따라서, 이들 당과 아미노산 중 몇가지 성분을 택하여 성숙에 따른 함량변화를 측정하면 이들 성분의 변화로부터 성숙도를 객관적으로 예측할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 유리 당으로 glucose와 sucrose를, 유리 아미노산 중에서는 aspartic acid와 asparagine 4성분을 택하고, 이를 분석할 수 있는 바이오센서를 개발하였다. 개발한 바이오센서를 이용하여 과실의 성숙도에 따라 이들 4 성분의 함량이 어떻게 변화되는지를 측정하고, 이들의 변화 pattern을 분석하여 성숙도를 예측하고자 한다.

제 2절 재료 및 방법

과실 중에는 유리 당과 유리 아미노산이 다량 함유되어 있어 성숙이 진행됨에 따라 그 함량이 변화한다. 따라서, 몇 가지 성분을 택하여 성숙과정 중의 함량변화를 조사하면 이들 성분의 변화로부터 성숙도를 객관적으로 예측할 수 있게 된다. 사과의 경우 성숙되면서 glucose와 sucrose의 함량이 증가하고 유리 아미노산 중 aspartic acid는 증가하고 asparagine은 감소하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 유리 당 중에서는 glucose와 sucrose를 택하고, 유리아미노산 중에서는 aspartic acid와 asparagine을 택하여 이들을

분석할 수 있는 바이오센서를 만들고, 이들 4 성분이 성숙시기에 따라 어떻게 변화하는가를 조사하고 이를 이용한 pattern분석을 수행하여 성숙도를 예측하고자 한다.

1. 재료

가. 사과

전남 곡성군에 소재한 덕양농장에서 홍부사 (*Red fuji*)와 부사 (*Fuji*) 품종의 두종류의 사과를, 10월 6일 부터 12 월 1일 까지 완숙기 전후 4주동안 1주일 간격으로 7~9개를 각각 수확하였다. 가식부를 분쇄하고 이를 여과하여 시료로 사용하였다.

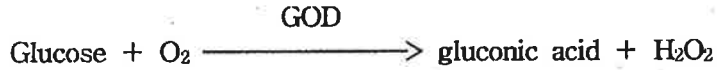
나. 배

전남 순천시 서면 순천대학교 농장에서 신고 (*Shingo*)와 영산 (*Youngsan*) 두 종류의 배를, 9월 1일 부터 11월 24일 까지 배 수확기 전후 4주 동안 1주일 간격으로 7~9개를 수확하였다. 가식부를 분쇄하고 이를 여과하여 시료로 하였다.

2. 실험방법

가. Glucose 센서

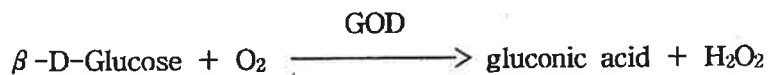
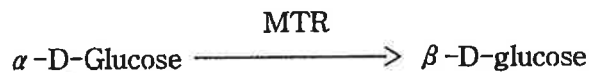
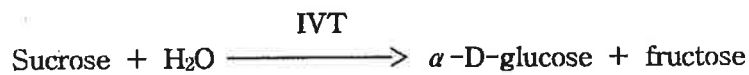
Glucose는 glucose oxidase (GOD)에 의하여 산화되면 gluconic acid와 과산화수소로 된다. 따라서, 전기화학적으로 생성된 과산화수소를 측정하면 glucose 농도를 정량할 수 있다.



Glucose 센서는 백금을 이용한 과산화수소전극 상에 GOD를 고정화함으로써 만들 수 있다. 효소의 고정화는 PVA와 알부민을 소량 녹인 용액에 원하는 단위의 GOD를 넣고 casting한 후 glutaraldehyde 증기로 1시간 처리하여 행하였다.

나. Sucrose 센서

Sucrose는 invertase (IVT)에 의하여 가수분해되어 α -D-glucose로 변환된다. α -D-Glucose는 mutarotase (MTR)에 의하여 β -form으로 전환되며, β -D-glucose는 glucose 센서에서와 같이 GOD 처리에 의하여 과산화수소가 발생한다. 이 과산화수소를 검출하면 sucrose 농도를 알 수 있다.



따라서, 과산화수소전극에 IVT, MTR, GOD 세가지 효소를 동시에 고정화하면 sucrose 센서를 만들 수 있다.

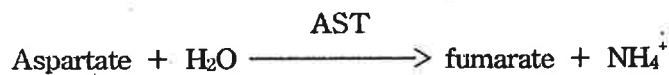
상기의 glucose, sucrose 센서는 amperometric sensor로서 전류의 세기가 농도에 비례한다. 극미량의 glucose와 sucrose를 측정할 수 있는 센서를 만들어 사과즙 속에 들어

있는 유리 당을 측정하는데 사용하였다.

다. Aspartic acid 센서

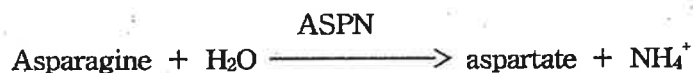
유리 아미노산 중 aspartic acid와 asparagine을 측정할 수 있는 전위형센서 (potentiometric sensor)를 만들고 그 특성을 조사하였다. 아미노산은 deaminase에 의하여 수용액에서 암모늄이온을 유리시키므로 암모늄이온전극에 해당효소를 결합시켜 센서를 만들었다.

Aspartic acid는 aspartase (AST)에 의하여 암모늄이온을 생성한다. Aspartase와 암모늄이온전극을 결합시켜 aspartic acid 센서를 제조하였다.



라. Asparagine 센서

Asparagine은 asparaginase (ASPN)에 의하여 다음과 같이 변환된다.



따라서, asparaginase를 암모늄이온전극 상에 고정화하면 asparagine 센서가 된다. 상기의 두 아미노산 센서에서 측정되는 전위는 대수 (log) 농도에 비례한다.

마. 성숙도 pattern분석

상기에서 개발한 glucose, sucrose, aspartate, asparagine 센서를 이용하여 사과와 배의 성숙기를 전후하여 채집한 과실을 측정하고 측정 속의 4 가지 성분 에 대한 응답

pattern을 얻었다. 성숙에 따라 변해가는 응답 pattern을 이용하여 주성분분석 (principal component analysis, PCA)에 의한 통계처리를 시행함으로써 최적 성숙기를 예측하는 pattern분석을 하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. Glucose 센서의 특성

Glucose oxidase 1 unit를 polyvinyl alcohol (PVA), bovine serum albumin (BSA) 과 함께 cellulose acetate 막에 고정화하고 이를 과산화수소전극에 고정화하여 glucose 센서를 만들었다. 0.1 M 인산 완충용액 (PBS)을 사용하여 작성한 검량곡선은 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

2. Sucrose 센서의 특성

Invertase, mutarotase, glucose oxidase의 3 가지 효소를 glucose 센서 제작의 경우와 같이 동시에 고정화한 막을 과산화수소전극에 고정화하여 Fig. 2의 검량곡선을 얻었다. 실험은 0.1 M 인산 완충용액 (pH 6.5)을 사용하여 30℃에서 행하였다.

3. Aspartic acid 센서의 특성

Aspartate 센서는 aspartic acid로부터 분해 생성되는 암모늄이온을 검출함으로써 aspartic acid를 측정하는 방법을 택하였다. 따라서, 암모늄이온을 검출하는 전극의 특성이 좋아야 하므로 nonactine을 PVC막 중에 고정화하여 암모늄이온전극을 만들었다. 이 전극은 potentiometric형으로 Nernst식을 따르며 그 기울기는 25°C에서 59 mV/decade이다. 이 때, 기울기가 이론치에 가까울수록 좋은 전극인데 본 실험에서 제작한 암모늄이온전극의 기울기는 58 mV로서 좋은 특성을 보였다.

상기의 암모늄이온전극에 aspartase를 고정화하면 aspartic acid 센서가 된다. Aspartase 1 unit를 cellulose acetate 막에 PVA, BSA와 함께 고정화하여 0.05 M Tris 완충용액 (pH 7.5) 중에서 실험한 검량곡선을 Fig. 3에 나타내었다.

4. Asparagine 센서의 특성

Asparagine은 asparaginase에 의하여 분해되어 수용액 중에서 암모늄이온을 유리하므로 암모늄이온전극과 asparaginase을 결합시키면 상용하는 센서가 된다. 센서의 제조 시 asparaginase 1 unit를 cellulose acetate 막에 고정화하고 이를 암모늄이온전극에 상기와 같이 결합시켰다. 0.05 M Tris 완충용액 (pH 7.5)을 사용하여 얻은 검량곡선을 상기 Fig. 3에 동시에 나타내었다.

5. 사과즙의 분석

사과의 성숙도를 예측하기 위하여 수확시기 전후 한달을 택하여 일주일 간격으로 사과를 채집하고 이를 마쇄, 여과하여 과즙을 얻었다. 사용한 사과의 품종은 Red fuji와 Fuji 였다.

0.1 M PBS 20 mL에 상기의 센서를 넣고 안정화시킨 후, 과즙 20 μ L씩 떨어뜨려 그 응답신호를 측정하였다. 매 시료마다 3 번씩 적가하고 그 응답신호를 평균하여 사용하였다. 검량선을 이용하여 구한 각각의 농도는 Fig. 4, 5, 6, 7과 같다. 그러나, 본 연구에서는 사과와 성숙도를 예측하는 것이므로 glucose, sucrose, aspartic acid, asparagine 등의 각 성분의 농도를 환산하여 구하기보다는, 이들 응답신호 자체를 직접 이용하여 주 성분분석을 수행함으로써 성숙도를 예측하는 것이 훨씬 신속하고 간편하여 이 방법을 택하였다.

센서를 이용한 분석과 기존의 방법인 HPLC를 이용하여 *Fuji*와 *Red fuji* 두 종류의 사과에 대한 유리당과 아미노산을 분석하여 Table 1, 2에 각각 나타내었다. Glucose와 sucrose의 성숙과정에 따른 변화경향이 센서를 사용한 것과 HPLC를 이용한 두 방법이 서로 같은 경향을 보이고 있었으나, HPLC 방법에서는 aspartic acid와 asparagine이 column 상에서 분리되지 않으므로 이 두 성분이 합하여진 양으로 분석되었다.

6. 배즙의 분석

배의 경우 *Youngsan*과 *Shingo* 2 종류를 택하여 경험적인 수확적기에 전후한 1개월을 택하고 일주일 간격으로 채집하여 과즙을 얻었다. 과즙은 녹즙기로 착즙하고 여과하여 사용하였다. 사과에서와 마찬가지로 20 mL PBS에 과즙 20 μ L씩 3 번씩 적가하고 평균하여 사용하였다. Glucose, sucrose, aspartic acid 및 asparagine에 대한 배즙의 분석결과를 Fig. 8, 9, 10, 11에 나타내었다. 한편, 센서의 분석정확도를 알아보기 위하여 HPLC를 이용하여 분석한 결과를 Table 3, 4에 나타내었다. 이 경우도 aspartic acid와 asparagine은 구분되지 않아 합한 양으로 분석되었다.

7. Pattern분석에 의한 성숙도 예측

사과즙, 배즙 중의 glucose, sucrose, aspartic acid, asparagine 4 가지 성분의 변화량에 상응하는 각각의 센서에 대한 응답신호를 직접 사용하여 SAS 프로그램으로 주성분분석을 행하여 성숙도를 예측하였다.

가. 사과의 성숙도 예측

사과의 경우 *Fuji*와 *Red fuji* 각각에 대한 PCA 결과를 Fig. 12, 13에 각각 나타내었다. 실제로, 농가에서 적기로 알고 수확하는 시기가 채집시료 #4를 전후하여 있었다. 이를 주성분분석한 결과와 비교하면 #4가 1상한에 위치하여 다른 시료와 구분할 수 있고, 이는 경험적인 성숙도와 잘 일치하고 있다. 따라서, 어느 지역에서 재배하고 있는 사과에 대한 다년간의 data를 수집하면 과학적이고 객관적으로 성숙도를 정확히 예측할 수 있다 하겠다.

나. 배의 성숙도 예측

배의 경우 *Youngsan*과 *Shingo* 2 종류를 택하여 실험하였다. Glucose, sucrose, aspartic acid, asparagine 4 성분에 대한 바이오센서의 응답결과는 사과와 비슷한 pattern을 보이고 있다. 이들 응답신호를 이용한 주성분분석을 수행한 결과는 Fig. 14, 15에 나타내었다. 농가에서는 채집시료 #5, 6 시기에 수확하고 있다. 이를 주성분분석 결과와 비교하면 채집시기 #5, 6만이 독립적으로 1상한에 위치하여 경험적 성숙기를 구분하고 있다. 따라서, 배의 경우도 재배농가의 품종에 대한 다년간의 실험 data를 축적하면 보다 객관적으로 성숙시기를 정확히 예측할 수 있을 것으로 보여 진다. 따라서, 본 연구에 의한 4 성분 분석으로 성숙도를 예측하는 것은 좋은 방법으로 생각되며 계속 연구개발시켜야 한다고 본다. 또, 본 방법에서는 4 가지 성분의 농도도 알 수 있으므로 과실을 이용하는 가공산업에서는 더욱 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 즉, 미숙과의 경

우 성숙도와 차이가 나는 성분의 양을 측정할 수 있으므로 이를 보충하거나 조절할 수 있어서 항상 균등한 품질을 유지할 수 있을 것이다.

Table 1. Changes of glucose and sucrose contents in apples during ripening

Sample picking (date)	<i>Red fuji</i> (%)		<i>Fuji</i> (%)	
	glucose	sucrose	glucose	sucrose
1 (10. 6)	1.29	3.74	0.90	3.62
2 (10.13)	1.24	3.89	1.22	3.96
3 (10.20)	1.40	4.25	1.37	4.31
4 (10.27)	2.94	4.53	2.84	4.33
5 (11. 3)	2.72	4.27	2.87	4.12
6 (11.10)	2.32	4.64	2.65	4.30
7 (11.17)	2.19	4.55	2.34	4.82
8 (11.24)	2.08	4.87	2.48	4.80
9 (12. 1)	1.91	5.27	1.99	4.97

Table 2-1. Changes of free amino acids in *Red fuji* during ripening

		<i>Red fuji</i> (mg%)								
S.No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A.A.		(10. 6)	(10.13)	(10.20)	(10.27)	(11. 3)	(11.10)	(11.17)	(11.24)	(12. 1)
Asp		118.11	121.77	134.69	157.29	164.29	152.98	164.12	167.99	155.23
Thr		53.25	60.58	57.08	61.98	62.90	66.63	70.10	69.33	60.29
Ser		62.52	68.08	65.59	69.90	73.55	78.71	78.23	78.47	77.29
Glu		61.69	57.33	61.42	52.90	48.59	68.08	55.13	53.45	50.72
Pro		10.32	16.45	18.31	21.72	17.74	17.46	12.40	14.88	9.76
Gly		2.50	2.26	1.92	0.79	1.59	3.00	2.80	2.85	2.34
Ala		18.25	16.44	15.88	18.35	23.32	38.75	37.70	32.41	30.58
Cys		1.07	0.97	1.29	0.23	0.75	1.19	1.53	2.69	3.01
Val		9.21	9.76	8.26	8.82	9.00	8.93	8.40	9.99	7.24
Met		12.59	12.83	17.53	12.21	14.72	5.90	5.14	4.59	7.35
Ile		14.38	14.22	15.61	15.09	14.07	18.64	18.83	15.61	13.92
Leu		5.59	4.92	3.50	3.78	4.12	3.75	5.50	5.59	4.27
Tyr		1.32	1.03	1.91	1.09	1.77	1.92	1.41	1.18	2.06
Phe		2.85	1.96	2.77	1.38	1.24	1.39	1.47	1.31	1.11
His		17.78	19.01	24.43	27.09	37.26	45.29	47.26	46.42	42.39
Try		14.60	15	14.27	17.32	17.10	19.28	22.33	20.73	23.24
Lys		6.06	4.28	5.94	4.35	4.24	5.69	6.56	7.63	6.25
Arg		18.04	18.74	20.24	42.51	39.10	45.28	37.12	42.99	39.33
Total amino acid		430.13	445.62	470.64	516.80	535.35	582.86	576.02	578.11	536.38

Table 2-2. Changes of free amino acids in *Fuji* during ripening

		<i>Fuji</i> (mg%)								
S.No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A.A.		(10.6)	(10.13)	(10.20)	(10.27)	(11.3)	(11.10)	(11.17)	(11.24)	(12.1)
Asp		114.92	141	136.79	151.14	146.61	159.98	160.30	170.86	149.87
Thr		51.48	65.09	64.20	65.00	70.10	63.21	70.42	68.22	67.23
Ser		60.45	76.42	78.46	81.54	86.68	84.14	86.58	83.43	80.29
Glu		59.94	66.06	63.77	48.16	51.13	55.59	47.34	51.25	53.79
Pro		9.22	11.78	13.00	23.74	21.08	15.70	24.11	22.15	10.33
Gly		1.99	2.94	2.81	4.53	2.45	2.32	2.68	2.89	2.45
Ala		16.92	17.67	18.88	24.30	24.60	23.55	25.49	24.22	26.97
Cys		0.57	0.95	0.23	1.10	1.06	3.66	3.39	3.15	4.01
Val		8.64	7.51	6.63	7.28	7.53	7.47	8.96	8.31	8.24
Met		10.44	9.91	8.93	9.81	11.47	11.00	10.38	9.77	9.32
Ile		15.42	12.42	11.81	14.62	17.34	16.00	16.92	12.03	17.43
Leu		4.76	2.33	2.77	6.11	3.70	4.16	5.04	2.25	3.75
Tyr		0.31	1.37	1.57	1.56	1.94	0.95	1.40	2.48	0.49
Phe		3.16	2.28	1.48	0.91	0.84	1.24	0.14	1.40	1.93
His		17.12	21.43	20.19	31.16	42.98	43.75	43.41	45.64	39.38
Try		12.76	17.63	21.21	20.62	29.69	21.44	24.07	26.57	17.92
Lys		3.14	3.86	4.29	4.83	3.85	3.91	5.27	5.78	5.04
Arg		14.74	20.59	17.21	34.10	41.16	39.07	42.66	45.61	40.36
Total amino acid		405.98	481.24	474.22	530.51	564.20	557.14	578.55	586.00	538.80

Table 3. Changes of glucose and sucrose contents in pears during ripening

Sample picking (date)	<i>Shingo</i> (%)		<i>Youngsan</i> (%)	
	glucose	sucrose	glucose	sucrose
1 (9. 1)	2.70	1.33	3.21	0.44
2 (9. 8)	2.78	1.79	3.14	0.52
3 (9. 15)	3.40	2.21	3.46	0.63
4 (9. 22)	3.31	2.38	3.30	1.50
5 (9. 29)	3.42	3.24	3.67	1.67
6 (10. 6)	3.25	2.88	2.95	1.77
7 (10.13)	2.49	3.13	2.72	1.75
8 (10.20)	2.20	3.42	2.47	1.78
9 (10.27)	2.02	3.10	2.26	1.71

Table 4-1. Changes of free amino acids in *Shingo* during ripening

		<i>Shingo</i> (mg%)								
S.No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A.A.		(9. 1)	(9. 8)	(9. 15)	(9. 22)	(9. 29)	(10. 6)	(10. 13)	(10. 20)	(10. 27)
Asp		37.95	37.39	41.95	50.12	52.57	66.55	70.14	76.53	91.20
Thr		29.68	28.86	31.75	32.21	36.34	34.34	33.94	38.16	38.12
Ser		34.85	33.88	37.28	37.82	42.65	40.32	39.84	44.80	44.75
Glu		16.09	16.27	12.82	14.43	16.19	17.70	14.15	15.97	16.14
Pro		1.77	1.76	1.54	0.31	0.19	1.25	0.31	1.68	0.63
Gly		1.29	1.00	1.32	1.23	1.59	1.58	1.10	1.08	1.40
Ala		11.32	10.48	10.59	10.44	11.37	9.95	9.55	10.79	10.05
Cys		0.43	0.33	0.37	0.40	0.41	0.30	0.34	0.31	0.25
Val		12.34	11.63	12.17	12.50	14.27	14.02	13.37	13.24	13.36
Met		4.81	4.92	5.26	5.90	6.35	9.09	8.97	9.86	10.91
Ile		4.70	5.03	4.74	5.20	5.71	6.82	7.24	7.98	10.83
Leu		1.15	1.18	1.68	2.55	2.67	2.76	3.03	3.61	5.36
Tyr		0.15	1.33	1.78	1.44	1.28	1.11	1.60	1.54	1.74
Phe		2.04	2.97	1.95	2.09	2.81	2.78	2.02	2.96	3.41
His		17.57	26.35	22.85	25.90	17.52	18.50	22.53	27.57	36.53
Lys		0.58	1.68	1.71	3.43	1.93	1.70	2.61	2.99	5.46
Arg		14.23	13.36	13.92	9.29	13.86	11.74	10.47	13.23	14.65
Total amino acid		190.95	198.42	203.68	215.26	227.71	240.51	241.21	272.30	304.79

Table 4-2. Changes of free amino acids in *Youngsan* during ripening

		<i>Youngsan</i> (mg%)								
S.No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A.A.		(9. 1)	(9. 8)	(9. 15)	(9. 22)	(9. 29)	(10. 6)	(10. 13)	(10. 20)	(10. 27)
Asp		35.00	39.14	44.76	44.57	51.32	53.25	57.61	63.99	65.53
Thr		26.48	25.06	28.37	27.59	30.08	32.77	35.16	41.24	44.84
Ser		31.08	29.41	33.30	33.73	35.31	37.21	41.22	48.42	52.64
Glu		16.72	16.31	17.87	20.47	23.27	21.49	20.60	20.40	19.82
Pro		0.43	2.52	2.71	2.02	2.39	2.01	2.80	2.25	1.44
Gly		1.52	2.37	1.89	2.15	2.47	2.14	1.46	2.30	2.47
Ala		7.90	10.06	11.23	10.56	12.42	11.02	10.24	11.42	11.89
Cys		0.31	0.24	0.39	0.28	0.42	0.53	0.13	0.17	0.31
Val		11.71	13.21	12.37	12.95	13.83	13.29	12.24	13.53	12.83
Met		5.83	5.58	5.70	5.54	6.64	7.95	7.88	7.55	8.09
Ile		5.42	5.71	5.93	6.17	8.03	8.51	8.97	7.31	10.02
Leu		1.63	2.07	2.52	3.10	3.76	3.79	3.57	4.18	5.13
Tyr		0.16	0.20	0.23	0.34	0.30	0.65	1.92	1.02	1.62
Phe		0.59	1.52	0.97	1.16	1.21	1.43	2.48	1.65	1.36
His		16.47	23.02	26.35	29.98	31.07	30.74	31.43	31.73	35.28
Lys		1.37	2.34	1.61	1.56	1.74	2.04	2.75	2.61	3.18
Arg		11.05	13.07	10.19	12.76	13.19	13.42	14.55	15.19	13.61
Total amino acid		173.67	191.83	206.39	214.93	237.45	242.24	255.01	274.96	290.06

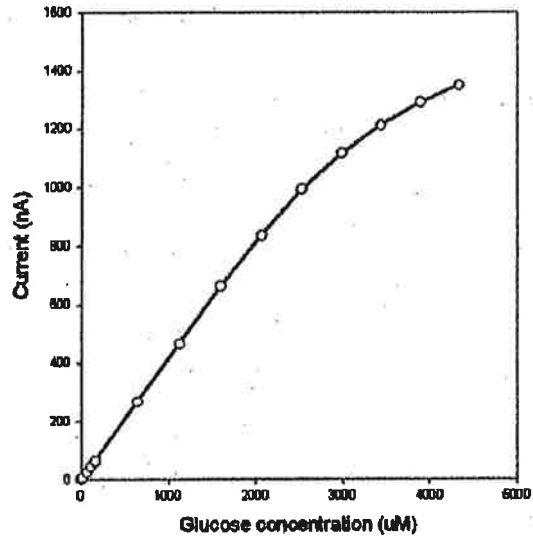


Fig. 1. Glucose sensor의 검량곡선.

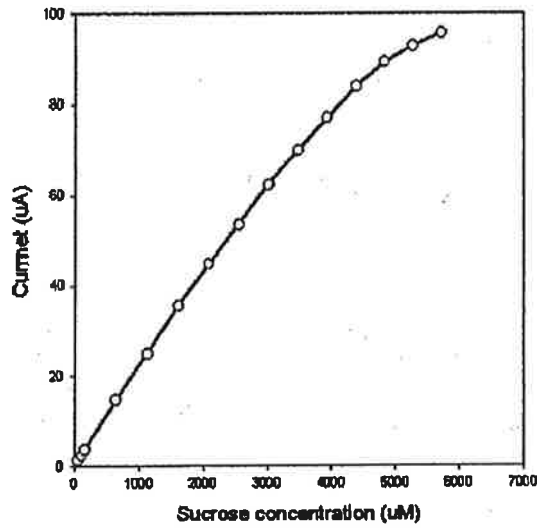


Fig. 2. Sucrose sensor의 검량곡선.

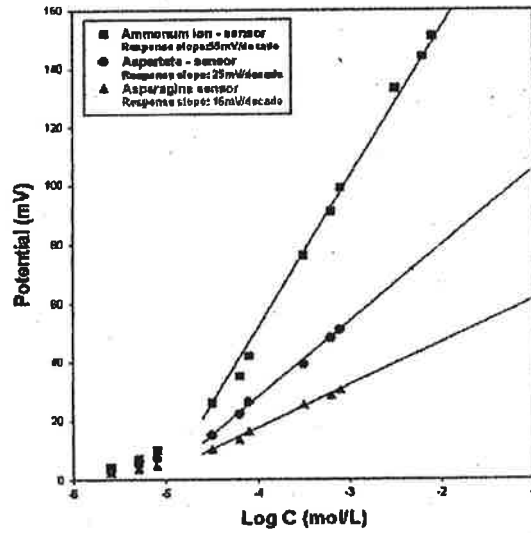


Fig. 3. 암모늄이온, aspartate 및 asparagine sensor의 검량곡선.

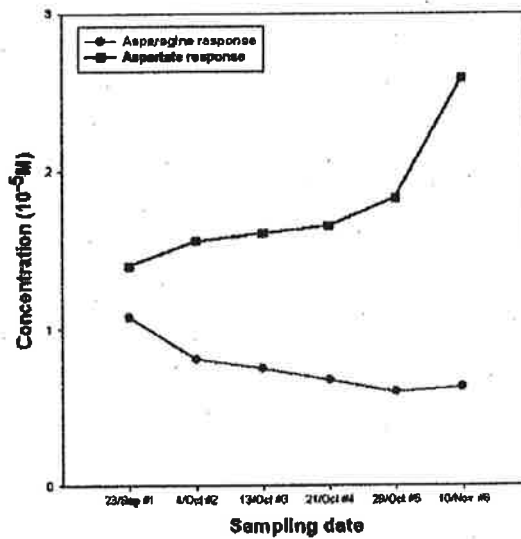


Fig. 4. Fuji 사과의 성숙에 따른 aspartate와 asparagine의 농도변화.

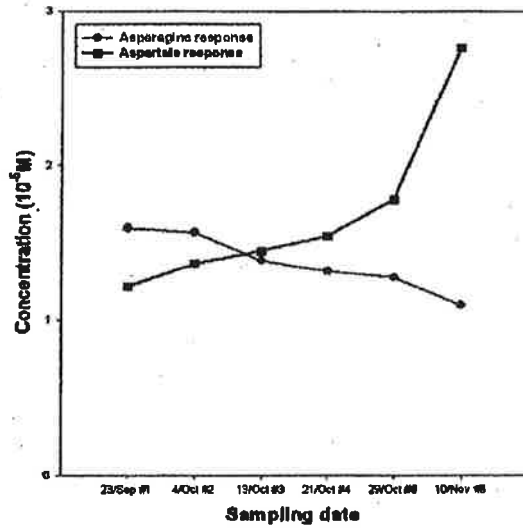


Fig. 5. Red fuji 사과와 성숙에 따른 aspartate와 asparagine의 농도변화.

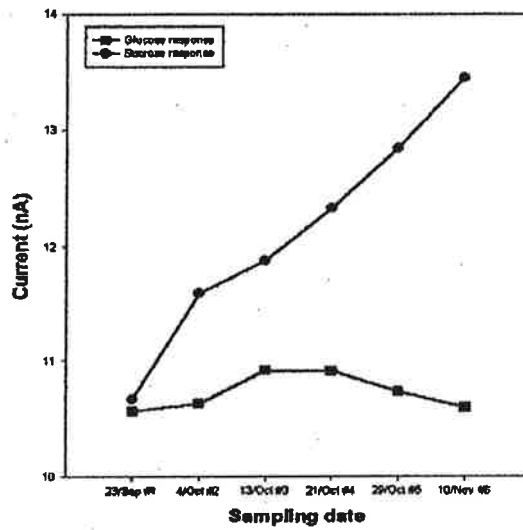


Fig. 6. Fuji 사과와 성숙에 따른 glucose와 sucrose의 농도변화.

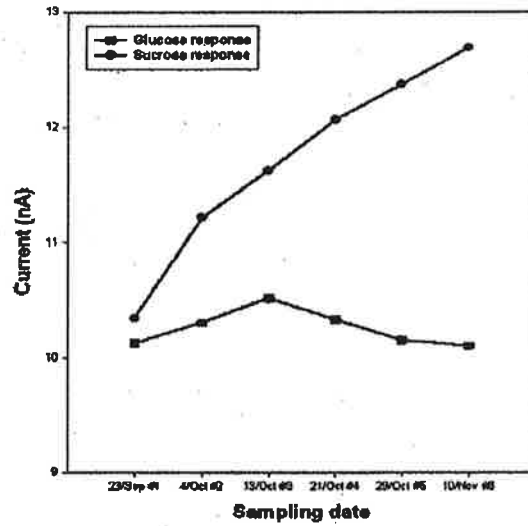


Fig. 7. Red fuji 사과 의 성숙에 따른 glucose와 sucrose의 농도변화.

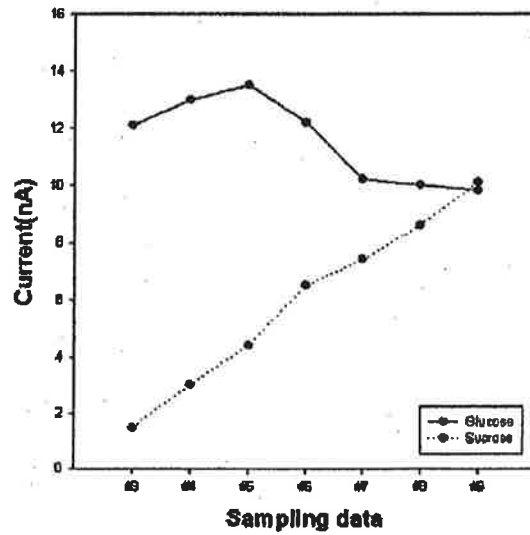


Fig. 8. Youngsan 배의 성숙에 따른 glucose와 sucrose의 농도변화.

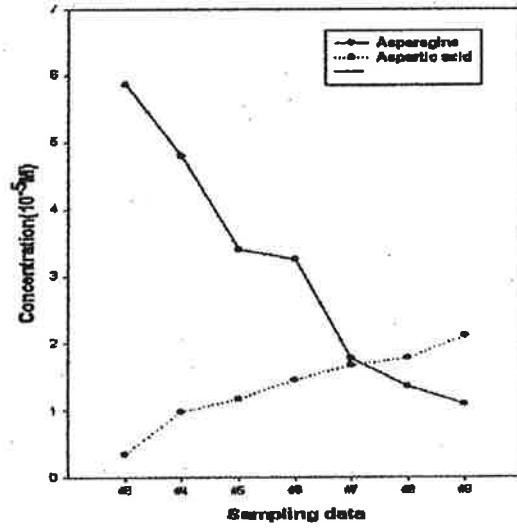


Fig. 9. Youngsan 배의 성숙에 따른 aspartate와 asparagine의 농도변화.

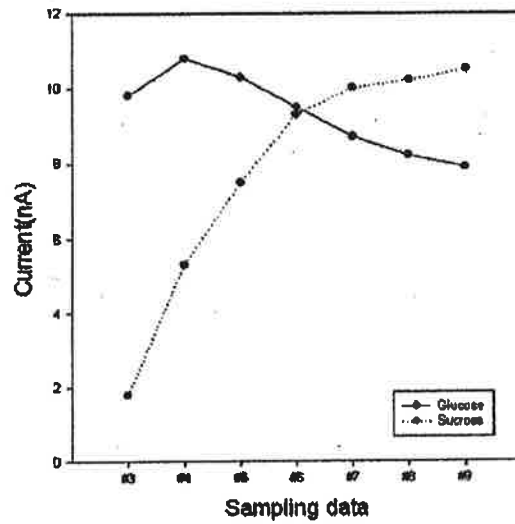


Fig. 10. Shingo 배의 성숙에 따른 glucose와 sucrose의 농도변화.

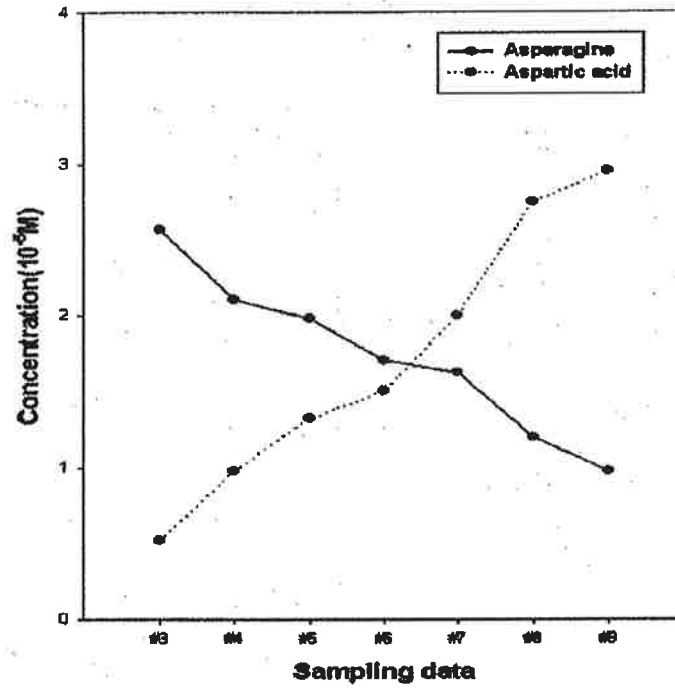


Fig. 11. *Shingo* 배의 성숙에 따른 aspartate와 asparagine의 농도변화.

The SAS System

18:24 Thursday, February 19, 1988 65

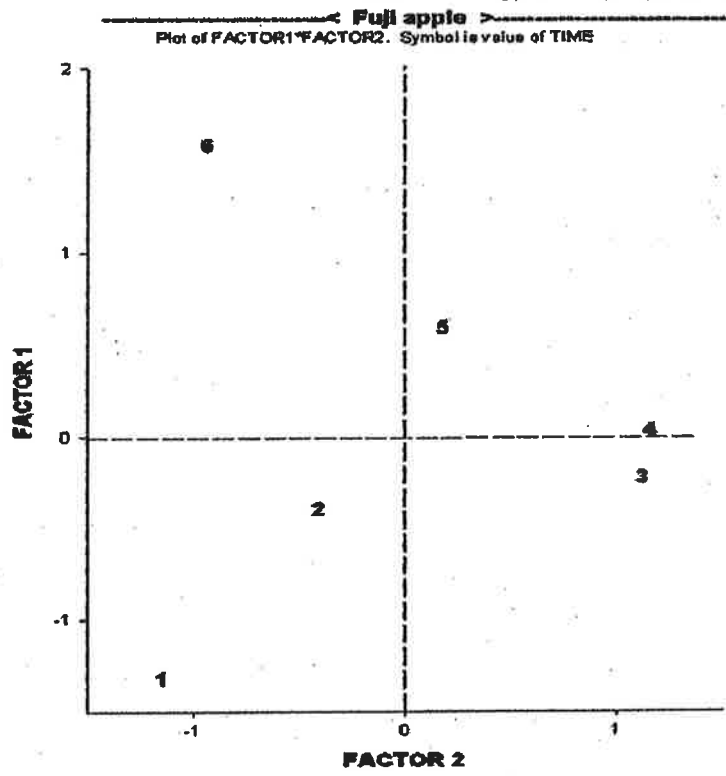


Fig. 12. Fuji 사과의 주성분분석.

The SAS System

18:24 Thursday, February 19, 1998 55

<Red fuji apple>

Plot of FACTOR1*FACTOR2. Symbol is value of TIME

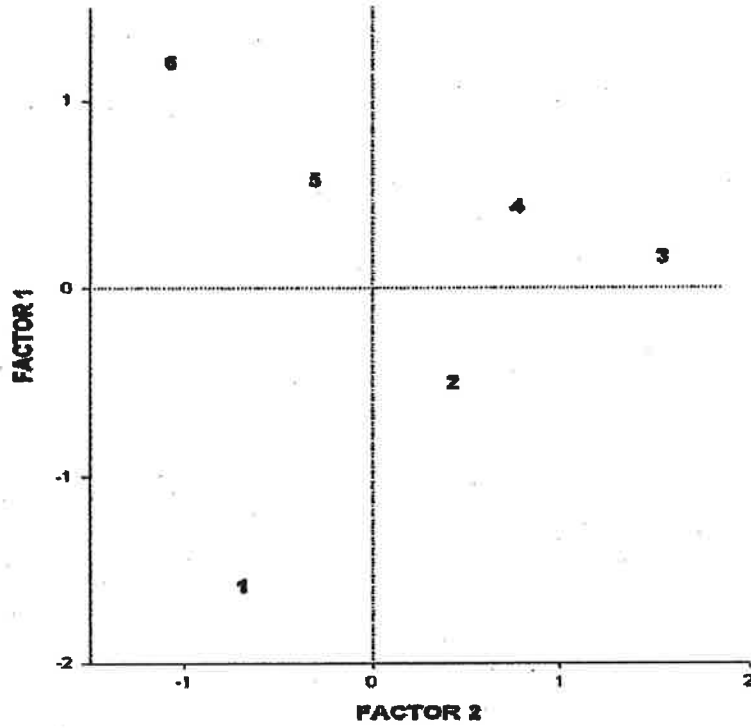


Fig. 13. Red fuji 사과 of 주성분분석.

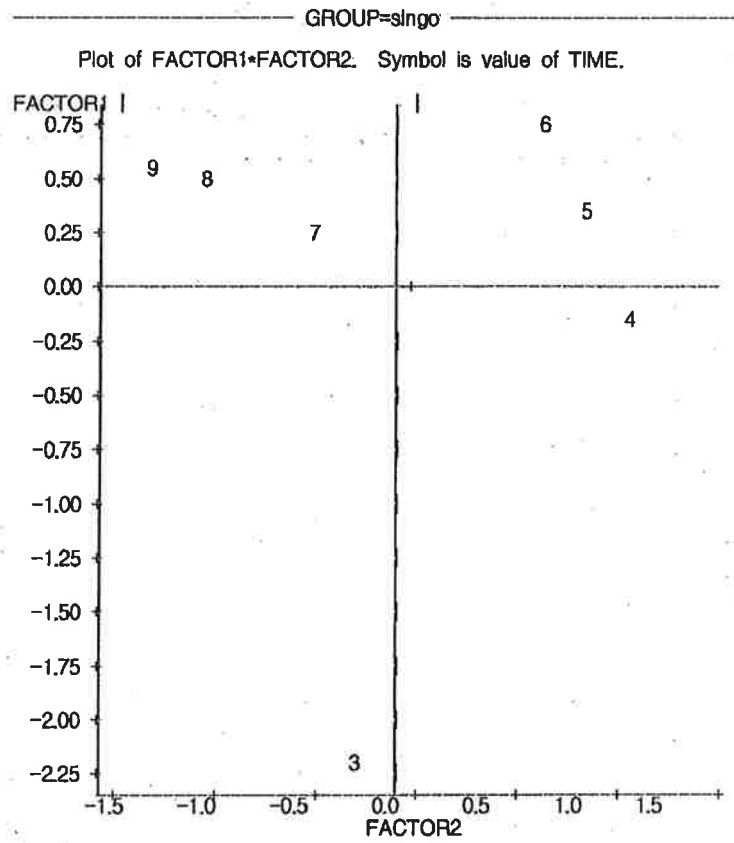


Fig. 14. *Shingo* 배의 주성분분석.

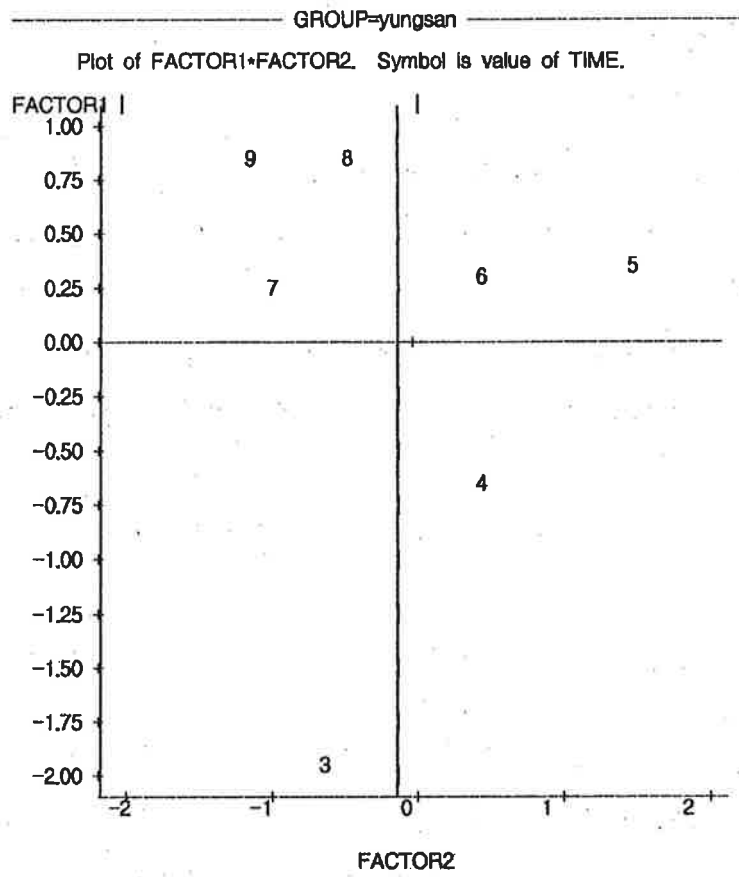


Fig. 15. *Youngsan* 배의 주성분분석.

제 4절 참고문헌

1. Y. Xu and G.G. Guilbault, *Anal. Chem.*, **61**, 782 (1989)
2. E. Watanabe, M. Takagi, S. Takei, M. Hoshi and S. Cao, *Biotechnol. & Bioeng.*, **38**, 99 (1991)
3. F. Scheller and R. Renneberg, *Anal. Chim. Acta*, **152**, 265 (1983)
4. A. Amine, G.J. Partriarche, G. Marrazza, and M. Mascini, *Anal. Chim. Acta*, **242**, 91 (1991)
5. U. Bilitewski, A. Jaeger and W. Weise, *Sensors and Actuators*, **B15-16**, 113 (1993)
6. A. Michalska, A. Ivaska and A. Lewenstam, *Anal. Chem.*, **69**, 4060 (1997)
7. A. Karyakin, O.A. Bobrova, L.V. Lukachova and E.E. Karayakina, *Sensors and Actuators*, **B33**, 34 (1996)
8. C. Locatelli and G. Torsi, *Electrochim. Acta*, **13**, 2011 (1996)
9. M. Hikuma, H. Obana, T. Yasuda, I. Karube and S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, **116**, 61 (1980)
10. S.H. Chough, *et al.*, p. 874, in "Chemical and Biological Sensors and Analytical Electrochemical Methods", A.J. Ricco *et al.*, eds, Electrochemical Society, Inc.(1997)

제 4 장

식품의 품질관리 및 공정을 위한

Multi-biosensor의 개발

(서울여자대학교)

여 백

제 1절 서 설

급속히 발전해가고 있는 현대 문명은 자동화 분야 및 정밀계측 분야에서도 괄목할 만한 진전이 있었으며, 이는 국제 기술경쟁에서 침체화된 기술분야 중의 하나이다. 이러한 분야는 센서 기술의 발달을 요구하고 있으며 식품산업에 있어서도 결코 예외일 수 없다.

신선하고 안전성이 확보된 식품 및 식품원료에 대한 품질관리를 보다 신속하고 간편하며 정확하게 하고, 어육 및 축육의 선도, 과일 성숙도 등을 객관적으로 평가하는 것은 매우 중요하다. 이에 따라 식품 공정분야 등에 활용 가능성이 큰 생물검정 (biomonitoring) 관련 기술의 개발이 선도적으로 이루어져야 할 상황에 있다.

현재 정부가 추진하고 있는 농수산물 유통구조개선 사업의 효율적 수행으로 폐기 자원을 최소화함과 동시에 환경개선 차원에서도 식품원료에 대한 현장 품질평가가 우선 되어야 할 것이다. 또한 우르콕이 라운드에 대한 능동적 대처와 농어민 소득 증대를 위하여 국내산 식품 및 식품원료에 대한 객관적이고 신속한 품질관리 기술의 수요가 크게 증대되고 있는 실정이다. 뿐만 아니라, 식품산업 분야에서 연속공정이나 자동화를 위해 품질관리를 보다 정확하고 신속하게 행할 수 있는 방법이 요망된다.

일반적으로 공정별로 시료를 채취하여 비파괴적인 분석방법들이 이미 널리 사용되고 있는데, 예를 들어, 근적외선 반사방법에 의하여 제품의 수분, 단백질, 지방 등을 동시에 측정할 수 있다 (McFarlane, 1983). 이러한 방법은 시료를 손상시키지 않으며 위생적이기는 하지만 특이성 (specificity)이나 감응도 (sensitivity)가 떨어져 수분을 제외하고는 각 성분마다 특별한 보정이 뒤따라야 한다. 뿐만 아니라, 이미 생산이 완료된 제품도 유통기간이나 저장기간을 통하여 여러가지 화학적 변화들이 일어난다. 따라서, 품질을 변질시키거나 품질에 영향을 주는 성분 (marker chemical)을 정확히 측정하여 유통기한 (shelf life)을 예측하는 일 또한 매우 중요한 일이다. 그러므로, 미량의 특이한 성

분이라 할지라도 정확하고 신속한 on-line monitoring이 가능한 측정방법이 요망되고 있는 실정이다. 이런 문제점들을 해결할 수 있는 방안의 하나로써 물리센서에서는 전혀 생각할 수 없는 대사기능을 이용하는, 화학물질의 감지능력이 우수한 최적의 측정장비 중의 하나로써 바이오센서 시스템을 생각할 수 있다.

바이오센서는 생체 관련물질을 막에 포괄 또는 고정화하여 (Bowers 등, 1980; Kierstan 등, 1985; Woodward 1985) 그것을 전기화학장치에 연결시킨 장치로서 분석하고자 하는 시료를 생체측매에 흡착하여 복합체를 형성한 다음 일어나는 상호화학, 전기화학반응 등에 의하여 형성되는 전자 또는 전류, 가스 (O_2 , CO_2 , NH_3 등), 수소 이온농도, 열 등을 물리적 신호로 전환시킨 다음, 증폭장치를 통해 확대시켜 기록계, 검출기 등에 의하여 정량할 수 있도록 만들어진 장치이다 (Baker 등, 1987; Guilbault, 1982).

바이오센서를 식품산업에 이용할 경우 여러 가지 장점을 기대할 수 있다. 첫째, 바이오센서는 생체 촉매의 특성을 이용하여 감지능력이 뛰어나고 측정대상에 대한 선택이 뚜렷하기 때문에, 신속하게 신선한 제품의 상태로 평가할 수 있다. 특히, 식품의 신선도를 검사함에 있어서 각 식품속에 존재하는 한 성분만을 측정할 수 있다. 즉, 과일 경우 alcohol, 지방의 경우 aldehyde, 축육의 경우 putrescine, cadaverine, 어류의 경우 trimethylamine, hypoxanthine, inosine, 야채 통조림의 경우 젖산, 우유나 유제품의 젖당 등을 각 성분의 품질인자로 이용하여 보다 간단하고 신속하게 신선도를 측정해 낼 수 있다. 둘째, 연속적인 측정이 가능하여 같은 반응조에서 수시로 반복하며 측정해야 하는 경우 측정당 가격이 저렴하고, 효소센서를 이용하는 경우 비싼 효소 가격문제도 해결할 수 있다. 셋째, 숙련되지 않은 사람도 쉽게 분석할 수 있다. 마지막으로 특별한 전처리 과정을 요구하지 않아서 색소가 존재하거나 혼탁한 시료의 경우 특별한 시약을 사용하거나 다른 전처리 과정을 통해 색소 물질이나 혼탁물질을 제거할 필요가 없으므로 신속한 측정이 가능하며, 유동액체의 경우 다양한 시료의 측정이 가능하다.

Clark와 Lyons (1962)에 의해 효소전극이 소개된 후 많은 종류의 효소센서들이 실용화되었다 (Adamowicz 등, 1987; Baker 등, 1987; Kang 등, 1993; Kim 등, 1993; Park

등, 1992). 실제로 효소반응에서 산소가 소모되는 정도나 과산화수소가 생성되는 정도를 기초로 하여 혈액에 함유된 포도당, 젖당, 알코올, 자당, 갈락토오스, uric acid, choline 또는 L-lysine 등의 분석을 위한 바이오센서가 이미 상품화되어 의학, 임상분야에서는 널리 이용되고 있으나 (Turner 등, 1988; 1989) 식품분야에서는 많은 응용이 이루어지지 못한 실정이다. 식품분야에 응용된 경우를 살펴보면, 곡류나 발효식품 중의 lysine과 tyrosine 신속계측을 위한 바이오센서 개발에 관한 연구 (Skogberg, 1979; Havas와 Guilbault, 1982)가 보고되어 있고, 바이오시스템을 이용한 과실의 성숙도 계측은 이미 밝혀져 있거나 추가로 도출 가능한 과실의 성숙도 인자를 측정하는 기술을 보다 신속화하고 객관화하고자 하는데 이와 관련하여 D'Costa (1988)는 glucose 센서를 사용하여 바나나의 성숙현상을 신속하게 예측하는 기술을 개발하였으며 Schmid와 Kittsteiner-Eberle (1986)는 amino acid oxidase와 lactate dehydrogenase를 생물요소로 사용하고 산소전극 등을 신호변환기로 사용하는 아미노산 계측용 바이오 센서를 제조하고 이들이 5개월 이상 안정된 반응을 보여줌을 보고하였다. 바이오센서 시스템에 의한 양념류 등의 L-glutamate를 신속하게 계측한 연구도 발견되고 있으며 (Scott와 Robertson, 1985; Yao 등, 1990; Luong 등, 1991; 이영춘 등, 1997) Haginoya 등 (1992)은 바나나, 키위, 오렌지의 성숙도 계측을 위한 바이오센서 시스템에 대하여 연구한 바 있다. 또한 吉岡俊彦과 南海史朗 (1994)는 과실성숙도 등의 계측에 사용가능한 전자전달체를 사용하는 일회용 자당 및 과당 센서를 개발하고 산업화를 추진하고 있다. 센서의 개발에 국한하지 않고 연속공정에서 활용할 수 있는 방안들이 모색되기 시작하였는데, Appelqvist와 Hansen (1990)은 graphite 전극을 사용하는 FIA형 전극을 제조하고 백포도주 발효공정 중의 포도당 함량변화를 on-line 제어하는데 사용하였고 Mitsutani와 Asai (1990)는 산소전극에 glucose oxidase, mutarotase, invertase 등으로 다효소막을 사용하여 고정화한 후 포도당과 자당 함량을 수분내에 동시측정할 수 있는 안정성이 높은 센서를 개발하였다. Swindlehurst와 Nieman (1988)은 포도당, 자당, 맥아당, 젖당, 과당 등을 화학발광 원리에 의하여 계측하는 FIA형 센서를 개발하고 센서의 측정범위가 0.003~1 mM 범위

내에 있음을 발표한 바 있으며 Schmidt 등 (1986)은 lactate dehydrogenase를 사용하여 식품 중의 L-lactate를 측정하는 amperometric probe를 개발하였고 Mitsutani 등 (1991)은 산소전극을 이용하여 포도주 중의 L-lactate와 L-malate를 동시측정할 수 있는 바이오센서를 제조하고 이 센서의 측정범위가 0.002~0.5 mM 범위내에 있다고 밝혔고 Mason 등 (1983)은 포도주와 맥주 중의 ethanol 함량을 alcohol oxidase로 고정화된 산소전극으로 측정하고 센서의 안정성이 10일 이상 유지됨을 보고하였으며, Belgith 등 (1987)도 alcohol oxidase를 사용하여 포도주, 맥주, cider발효 중의 ethanol과 methanol 생성을 측정할 수 있었으며 이 센서로 500회 이상 사용하여도 안정된 전류반응을 보임을 밝히고 있다.

이와 같이 바이오센서는 식품산업에 유용한 첨단 측정장비 중의 하나이지만 국내에서는 지금까지 이 분야에 대한 인식부족으로 관련된 연구개발 및 활용이 미흡한 실정이다. 김 등 (1991)은 암모니아전극을 이용하여 urease 효소를 고정화한 막을 사용하여 요소센서를 개발하였고, 조 등 (1992)과 인 등 (1993)은 과산화수소전극에 고정화시킨 glucose oxidase에 의해 형성된 과산화수소를 측정하는 방법을 통하여 포도당을 측정할 수 있는 포도당센서를 개발하였으며 이외에도 과산화수소전극을 사용하여 다수의 센서를 개발하였다 (조 등 1990, 1993). 그리고, Park 등 (1995)은 pH meter와 oxidoreductase 효소를 사용하여 만든 바이오센서로 포도당이나 과당을 측정할 수 있었다. 또, 자당센서를 개발하여 연속공정에 적용하는 문제를 연구 보고하였는데, 측정범위를 5~50 g/L, 70 g/L까지 측정할 수 있어 따로 희석하지 않고 바로 실용적으로 측정할 수 있는 범위를 제시하였다. 또한, Kim 등 (1995;1996)은 일회용 L-젖산센서를 인쇄기법을 활용하여 제작한 후 전기화학적 특성을 구명하였으며, 아울러 침상 미세전극형 과산화수소전극을 제조하고 여기에 3-layer membrane의 고정화 효소층을 사용하여 효소전극을 제작하고 이를 식품성분의 신속측정에 활용하였다.

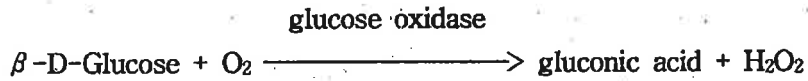
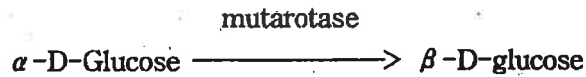
지금까지 개발된 효소전극에 기초한 분석기기들은 대부분 one-parameter device였다. 그러나 전극의 막을 교환하지 않고 한번에 여러 종류의 물질을 동시에 측정하는 것

이 보다 바람직하며 이와 유사한 접근으로 특정한 막에 독립적으로 작동하는 몇가지의 효소를 집적하는 방법도 있다. 또한, 다중센서 chip의 민감 부위에 서로 상이한 효소를 고정화하여 microelectronic element의 대량 생산기술에 응용할 수 있다.

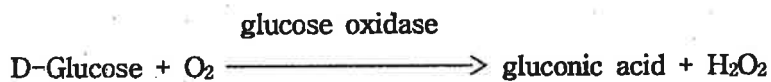
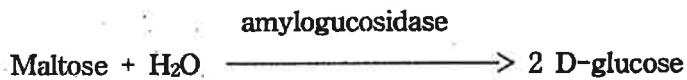
한편, 식품과 같이 그 구성 성분이 다양하고 복잡한 경우 단일 성분의 분석만으로는 품질관리의 욕구를 충족시키기 어려운 점이 있다. 근래에는 한 가지 이상의 성분을 동시에 측정하고자 하는 연구들이 시도되고 있다. 하나의 방법으로는 enzyme reactor를 여러 개 설치하여 시차적으로 검출기를 통과하는 방법으로 다성분을 측정하고자 시도하고 있으나 (Morishita 등, 1986; Matsumoto 등, 1988; Swindlehurst 등, 1988) 단일 시스템으로 여러가지 성분 (당, 유기산)을 동시에 측정하기에는 어려운 문제가 있다. 특히, HPLC의 경우처럼 유기산 column, 유리 당 column 등 물질에 따라 여러 개의 column을 필요로 하는 분석방법과 GC의 경우 목적하는 성분에 따라 각기 다른 column을 필요로 하는 분석방법을 대체할 수 있는 방법은 아직도 국내외적으로 해결해야 할 분야이다. 따라서, 한가지 이상의 성분을 동시에 측정하는 연구들이 진행되고 있는데 Masoom 등 (1988)은 고정화 효소를 이용하여 지용성 물질의 동시 분석을 시도하였으며, Matsumoto 등 (1990)은 고정화 효소 reactor를 사용하여 포도당, 알코올, 젖산을 분석하였다. 또한, Jobst 등 (1995)은 integrated biosensor array를 사용하여 두 가지 이상의 성분을 동시에 측정하는 연구 결과를 발표한 바 있다.

바이오센서의 연구추세에 따라 다기능화된 multi-functional 바이오센서 시스템 개발을 위하여 한가지 이상의 성분을 동시에 측정할 수 있도록 dual cathode system으로 구성된 산소전극을 제조, 이를 사용하여 두가지 성분을 동시에 측정할 수 있게 하고, 아울러 multiple cathode system의 산소전극 시스템을 개발하여 3 가지 이상의 성분을 분석하여 식품공정의 품질관리 및 공정의 최적화를 목적으로 이용할 수 있는 multi-biosensor 시스템을 개발하고자 하였다. 다음은 각각의 효소센서 시스템에서 이루어진 효소반응 과정을 설명한 것이다.

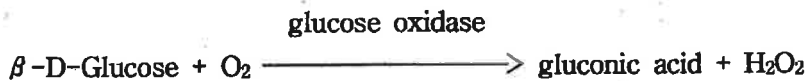
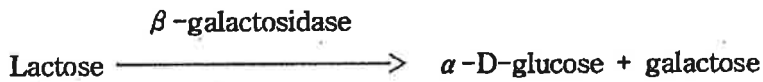
1. 포도당 센서



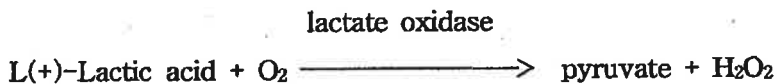
2. 맥아당 센서



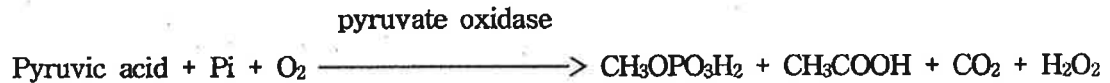
3. 젖당센서



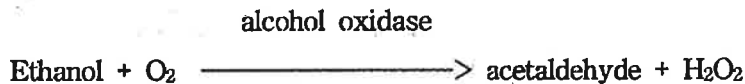
4. 젖산 센서



5. 피르브산 센서



6. 알코올 센서



본 실험에서는 위에서와 같은 효소 반응식을 통해 기질을 각각의 산화효소로 산화시켜 소비되는 각각의 산소의 양을 동시에 측정하여 여러 가지 성분을 동시에 정량하는 것이 가능토록 한 시스템을 개발하였다. 우선 각각의 고정화 효소를 dual 및 multiple cathode system에 부착하여, 여러 가지 성분 측정을 위한 바이오센서의 최적 조건 및 영향인자를 살펴 보고, 아울러 이 방법이 실지 이용되는 기존의 측정 방법 즉, 분광광도법과 HPLC, GC 등에 의한 분석결과와의 상관관계를 살펴보고 실제식품의 분석뿐만 아니라 식혜 공정의 최적화의 가능성을 제시하도록 하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 효소 및 시약

포도당 측정을 위해 사용한 glucose oxidase (EC 1.1.3.4., 23,900 units/mg solid)는 *Aspergillus niger*에서 분리된 것이고, α -glucose를 β -glucose로 전환시키는 목적으로 사용한 mutarotase (EC 5.1.3.3., 3,000 units/mg solid)는 porcine kidney에서 분리된 것

이었다. 젖당 측정 시 젖당을 포도당으로 분해시키기 위하여 *Escherichia coli*에서 분리된 β -galactosidase (EC 3.2.1.23., 1,050 units/mg solid)를 사용하였으며, 맥아당의 측정을 위하여 *A. niger*에서 분리된 amyloglucosidase (EC 3.2.1.3., 51 units/mg solid)를 사용하였다. 유기산 중 젖산 측정을 위해서 lactate oxidase (EC 1.1.3.2., 34 units/mg solid)가 사용되었으며, 피루브산의 측정 시 사용된 효소는 pyruvate oxidase (EC 1.2.3.3., 26 units/mg solid)로 두 개의 효소 모두가 *Pediococcus* sp.로 부터 분리된 것이다. 에탄올 측정을 위해서는 *Candida boidinii*에서 분리된 alcohol oxidase (EC 1.1.3.13., 1.4 units/mg solid)와 *A. niger*에서 분리된 catalase (EC 1.11.1.6., 77,880 units/mL)가 사용되었다. 위에서 언급한 효소는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 효소 고정화에 사용된 50% glutaraldehyde도 Sigma사에서 구입하였고, dimethyl sulfate는 Shinyo Pure Chemical Co. (Osaka, Japan)의 것이었다.

효소를 고정화할 때 지지체로서 사용한 nylon 포 (150-214 threads/cm, 코오롱 주식회사)는 한국의류시험검사소를 거친 규격 KSK 0905 이었다. 포도당을 비롯한 여러가지 당류와 L(+)-젖산, 피루브산을 비롯한 기타 유기산류, 각종 알코올류 및 발효 후에 생성되는 여러 부산물, 그리고 콜레스테롤과 구조적으로 유사한 물질인 ergosterol, β -sitosterol, stigmasterol, β -carotene, squalene 등은 reagent grade로서 Sigma사와 Duksan Pharmaceutcial Co. (Korea), Fisher Scientific Co. (NJ, U.S.A)에서 구입한 것을 사용하였다. 또한, 피루브산 측정을 위한 완충용액 시스템으로 요구되는 TPP (thiamine pyrophosphate), MgSO₄ 및 그외 시약들은 Sigma사에서 구입한 것을 사용하였다. 그리고, 효소전극의 제조를 위한 투석막 (M.W.C.O. 12,000)과 선택투과성 Teflon membrane (0.001 inch thickness, YSI 5775)은 Sigma사와 Yellow Spring Instrument (OH, USA)에서 각각 구입하였다.

2. 효소의 고정화

Hornby와 Morris (1975)에 의한 방법을 변형하여 nylon 포에 효소를 고정화하였다. Nylon 포를 산소전극의 크기에 맞도록 10 mm로 잘라 유리 slide에 고정시켜 이를 활성화시키기 위하여 dimethyl sulfate 용액에 담가 수욕조에서 끓는 상태에서 정확히 5분간 반응시키고 얼음조에서 반응정지시킨 후, anhydrous methanol에 30~40초 정도 두 번 담가 꺼냈다. 이 때, anhydrous methanol 용액이 우유빛을 띠면서 탁해지고, nylon 포에 흰 가루분과 같은 것이 생기는데 이것을 1분간 방치시킨 후 유리 slide에서 떼내어, lysine 용액 (0.5 M, pH 9.0)에 2시간 동안 담가두면 활성기에 lysine이 붙게 된다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 lysine은 효소분자와 nylon구조 사이에 spacer로서 작용하여 고정화를 돕는 역할을 하였다. 이것을 0.1 M NaCl 완충용액으로 충분히 씻어 미결합 상태의 lysine을 제거하였다. Lysine의 유리 amino group이 존재할 경우 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid와 반응하여 주황색을 나타내므로, lysine이 nylon 포에 잘 결합하였는지의 여부를 확인할 수 있었다. 이것을 glutaraldehyde 용액 (12.5%, 0.1 M borate 완충용액, pH 8.5)에 약 45분 동안 담가두었다 다시 꺼내어 인산 완충용액으로 세척하여 건조시켰다. 유리 포도당을 측정하는 경우에는 glucose oxidase 건조분말을 일정량 취하여 (200 units) nylon 포의 한 측면에 닿게한 후 소량 (100 μ L)의 완충용액을 가하여 고정화시킨 후 mutarotase 1000 units 용액 100 μ L를 다른 쪽 면에 떨어뜨려 양쪽에 각기 다른 효소가 고정화되도록 하는 asymmetric coupling 방법으로 고정화시켰다 (Bertrand 등 1981). 젖산과 피르브산의 측정을 위해서는 각각 lactate oxidase, pyruvate oxidase 100 units가 포함된 용액 100 μ L에 nylon 포를 담그어 고정화 시켰고, 에탄올 정량을 위해서는 50 units에 해당하는 양을 취하여 glucose oxidase와 같이 건조분말 상태로 고정화하였다. 효소액에 담그거나 효소를 뿌려 놓은 nylon 포를 냉장고에서 하룻밤 동안 방치시켜 고정화가 완결되면 nylon 포를 각각의 효소 최적 pH의 완충용액으로 잘 씻은 후 최적 완충용액에 담가 4°C에서 보관하였다.

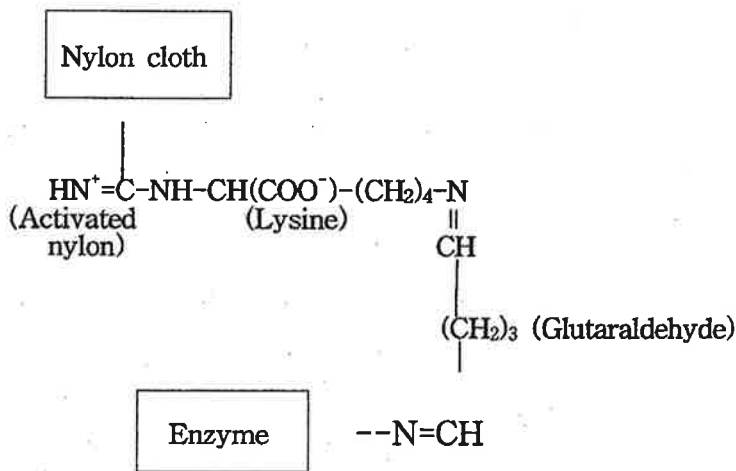


Fig. 1. Immobilization of enzyme by the method of Hornby and Morris (1975).

3. 효소전극의 제작

가. Dual cathode system

두 가지 성분을 동시에 측정할 수 있는 dual cathode system은 하나의 전극 몸체에 양극과 두개의 음극을 가지고 있어, 용액 중의 두 가지 성분을 동시에 측정할 수 있는 system이다. Dual mode에 의한 측정을 위해 0.5 N NaHCO₃와 KCl로 구성된 전해질을 채우고, 고정화한 효소막을 Teflon membrane과 투석막 사이에 놓이게 한 후 O-ring을 이용하여 고정시켰다. 제작된 dual cathode system은 젓당과 포도당, 맥아당과 포도당, 에탄올과 포도당전극으로서 모두 3 가지의 dual cathode system 이었다. 효소막이 부착되어 있는 dual cathode system을 electrical circuit에 각각 연결하고, personal computer (IBM compatible)와 연결하여 각각의 전극에서 반응되어 소비되는 시간당 용존산소의 변화량을 측정하였다.

나. Multiple cathode system

Dual cathode system의 원리를 보다 확장시킨, 6 가지 성분을 동시에 측정할 수 있는 multiple cathode system은 하나의 전극 몸체에 1개의 양극과 6개의 음극을 가지고 있어, 용액 중에 6 가지 성분을 동시에 측정할 수 있다. 이 system의 각 cathode에서 일어나는 효소반응으로부터 소모되는 용존산소의 농도는 한개의 anode와 함께 신호처리되어 동시에 측정된다. Multiple cathode system에 효소를 고정화시킨 nylon 포 효소막을 선택성 산소막인 Teflon membrane과 투석막 사이에 놓이게 한 다음, O-ring을 사용하여 고정시켜 효소센서를 제작하였다.

효소전극은 순환 수욕조 (Jeio Tech. Co. Korea)를 이용하여 수욕조의 온도를 각 효소의 최적온도 ($35\pm 0.1^{\circ}\text{C}$)에서 일정하게 유지하였다. 이 때, cell 내의 완충용액의 부피는 30 mL로 일정하게 유지시켰으며, air bubbling kit를 이용하여 용존산소를 포화시킨 후 사용하였고, 컴퓨터를 통하여 얻어진 polarogram자료를 통하여 본 system이 안정하게 유지되는지 확인한 후 0.2 mL의 시료를 주입하였다. 또한, cell 내에서 주입된 시료의 균일한 확산을 위해 stirring bar의 회전속도를 일정하게 유지하면서 변화되는 전압치를 측정하였는데, 이 때 system 자체가 진동에 매우 민감하므로 stirring bar 대신에 두께 1 mm, 4.1 cm 길이의 바늘을 이용하였다.

다. 미생물 센서의 제작

초산 센서인 미생물센서의 균주로 *Trichosporon brassicae*를 배양한 후 흡착법에 의해 고정화시켜 미생물센서를 제작하였다.

4. 다음극 효소 센서의 최적 조건 확립

가. 온도

순환 수욕조를 이용하여 수욕조의 온도를 5°C에서 45°C까지 5°C간격으로 조정하면서 다음극 효소센서에 고정화된 각 전극의 용존산소 소비량의 변화를 측정하여 최적 온도를 설정하고자 하였다. 이때 간접적으로 전압차의 변화량을 측정하여 각 온도별로 센서의 감응도를 비교하였다.

나. pH

pH 및 완충용액의 종류에 의한 다음극 효소센서의 감응도의 차이를 알아보기 위하여 효소활성이 가장 최적인 온도 조건에서 0.1 M 인산 완충용액으로 pH 5.0~8.5를 제조하였다. 이 범위에서 용존산소 소비변화량을 비교하고자 각 음극에서의 전압차의 변화량을 각각 측정하여 센서의 감응도를 비교하여 적정 pH조건을 구하였다.

다. 이온세기

다음극 효소센서가 이온세기에 의해 영향을 받는 정도를 알아보기 위하여 효소활성이 가장 높았던 최적 온도와 최적 완충용액의 pH를 취하여 완충용액의 이온세기를 달리하면서 전압차의 변화량을 측정하여 이온세기의 영향을 비교하였다.

라. 기질 농도의 정량

측정하고자 하는 각 성분의 표준 용액을 0.2 mL를 취하여 완충용액을 30 mL로 일정하게 유지시킨 cell 내에 주입하고, 주입된 각 성분을 기질로 하여 효소반응에서 소비되는 용존산소량을 전압차에 의해 측정하였다. 표준곡선은 Lotus 1-2-3 program을 이용하여 단위 시간당 전압의 감소량이 최대인 구간의 기울기 ($\Delta V/\Delta t$: mV/sec)를 구하여 표준용액 농도와의 직선 관계로부터 구하였다.

5. 저해제에 의한 영향

유리당과 유기산 측정시 측정하고자 하는 성분과 구조적으로 유사한 유기산 및 유리 당류를 첨가하여 효소센서에 미치는 영향을 알아보았다. Addition method로 측정시료와 함께 여러 종류의 당류 및 유기산류를 일정량씩 첨가하여 단위시간당 전압 변화량을 측정 비교하였다. 이 때 첨가한 유기산으로는 초산, L-아스코르브산, 구연산, DL(+)-젖산, 말산, 수산, 프로피온산, 숙신산, 피루브산을 사용하였으며, 당류로는 포도당, 과당, 젖당, 자당, 맥아당, 갈락토오스를 사용하였다.

마찬가지로 ethanol 측정에 있어서도 addition method로 methanol, *n*-propanol, *iso*-propanol, *iso*-butanol, *iso*-amylalcohol 및 발효 후에 생성되는 여러 부산물인 ethylacetate, diacetyl, acetylacetone을 첨가하였다. 이러한 성분들을 측정성분과 함께 최적 pH의 완충용액에 녹인 후, cell 내에 주입하여 용존산소 변화량을 측정하여 표준성분만을 주입하였을 때의 센서의 감응도와 비교하였다.

6. TPP 처리효과

Pyruvate oxidase의 activator로서 완충용액에 0.2 mM에서 1.0 mM까지 TPP의 농도를 달리하여 증가시키면서 효소센서의 감응도를 비교 분석하여 최대의 감응도를 나타내는 TPP의 농도를 구하였다. 아울러 0.8 mM의 TPP, 5 mM의 MgSO₄를 첨가하여 첨가하지 않았을 때의 효소센서의 감응도와 비교하였다.

7. 효소 센서의 사용횟수에 따른 안정성

각기 고정화한 효소전극을 얼마나 오랫동안 사용할 수 있는지를 알아보기 위하여 4℃에서 0.1 M 인산 완충용액에 30일간 냉장보관하면서 사용횟수에 따른 바이오센서의 안정성을 살펴보고자 감응도의 변화를 측정하였다.

8. 시료측정

가. 식품 성분 측정

Dual cathode system을 이용하여 가당우유 및 식품을 제조하여 우유, 식혜, 탁주를 비롯한 알코올 음료 중에 존재하는 젖당/포도당, 맥아당/포도당, 에탄올/포도당의 성분을 측정하였다.

나. 모델 시스템 시료의 측정

Multiple cathode system을 이용하여 세 가지 성분을 동시 측정하고자 각 성분의 표준곡선 구간에 해당하는 기지의 농도 용액을 제조하였다. 아울러 두 가지 성분은 일정하게 고정시키고 다른 한 성분의 농도만을 달리하면서 addition method에 의해 농도변화에 따른 감응도의 효과를 파악할 수 있도록 하였다.

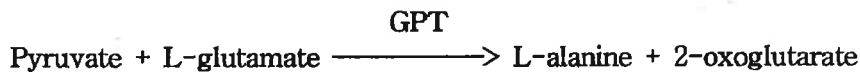
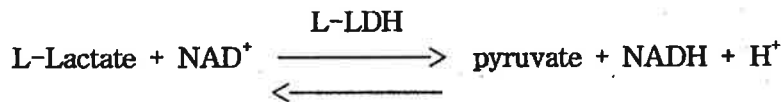
9. 분광 광도법에 의한 측정

바이오센서에 의한 측정방법을 검증하기 위하여 기존의 분석방법과 비교하였다.

가. L(+)-젖산

효소 kit (Boehringer Mannheim GmbH, Germany)에 의한 분광광도법을 이용하는

경우, L(+)-젖산 측정 시 NAD^+ 와 L-lactate dehydrogenase (L-LDH)간의 반응 중 생성된 NADH의 양을 diode array 분광광도계 (Hewlett-Packard 8452A, USA)를 이용하여 340 nm에서 측정하였다 (BM, Cat. No. 139084).



Glycylglycine 완충용액 (pH 10.0, 30 mL)에 L-glutamic acid (440 mg)가 녹아 있는 용액을 1.0 mL, NAD^+ 가 들어있는 용액 (210 mg)을 0.2 mL 취하고 증류수 0.9 mL를 넣었다. 여기에 glutamate-pyruvate transaminase (GPT : 7,700 units/mL)가 용해되어 있는 용액 0.02 mL를 넣고, 시료용액을 0.1 mL 넣어 잘 혼합하였다. 5분 후 제 1차 흡광도 (A_1)를 측정하고, L-lactate dehydrogenase (25,600 units/mL)용액 0.02 mL를 가하여, 20~25°C에서 반응이 완전히 일어난 20분 후에 제 2차 흡광도 (A_2)를 측정하여, 다음식으로부터 L(+)-젖산의 농도를 계산하였다.

$$C(\text{g/L}) = \frac{V \times \text{MW}}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A$$

V : 최종 부피 (mL)

v : 시료 부피 (mL)

MW : 분석 물질의 분자량 (g/mol), (lactate; 90.08 g)

d : light path (cm)

ϵ : 340 nm에서의 NADPH의 흡광계수, 6.3 L/mmol/cm

ΔA : $A_2 - A_1$

이 때, L(+)-젖산 농도를 각각 달리하여 시료용액 1 mL 내의 L(+)-젖산의 농도가 2~35 μ g인 범위가 되도록 표준곡선을 만들었다.

나. 피르브산 (pyruvic acid)

효소 kit (Sigma사)에 의한 분광광도법을 이용하여 피르브산을 측정할 때 NADH와 L-lactate dehydrogenase (L-LDH)간의 반응 시 산화된 NADH의 양을 diode array 분광광도계 (Hewlett-Packard 8452A, USA)를 이용하여 340 nm에서 측정하였다 (Sigma사, Cat. No. 726).



Trizma 염용액 (1.5 mol/L, sodium azide 0.05% 포함) 2.20 mL를 NADH가 1.28 μ M 농도로 들어있는 용기에 부어 잘 혼합하여 전화시킨 액 0.5 mL를 취하여 340 nm에서 초기 흡광도 (A_1)를 측정하고, lactate dehydrogenase (1,000 units/mL)용액 0.05 mL를 신속히 첨가하여, 37°C에서 2~5분 정도 반응시켜 반응이 완결된 후 (반응완결 시 흡광도 변화가 0.001/min) 제 2차 흡광도 (A_2)를 측정하여, 다음식으로부터 피르브산 농도를 계산하였다.

$$C \text{ (mg/dL)} = \Delta A_{340} \times 6.37$$

이 때, 피르브산 농도를 각각 달리하여 시료용액 1 mL 내의 피르브산의 농도가 0.5~3.0 mg/dL인 범위가 되도록 표준곡선을 만들었다.

10. 크로마토그래피 방법에 의한 측정

기존의 분석방법으로 검증하고자 유리당인 포도당, 젓당, 맥아당은 HPLC에 의해, 에탄올은 GC를 이용하여 정량하여 다기능 효소센서로 측정한 결과와 비교 분석하였다.

가. HPLC에 의한 포도당의 측정

유리당인 포도당 측정 시 HPLC의 조건은 Table 1과 같았으며, 측정시료가 표준용액으로 제조한 것이어서 복잡한 전처리과정은 생략하였다.

Table 1. Operating condition of HPLC for determination of free sugars

Contents	Conditions
HPLC pump	LC-9A (Shimadzu)
Column (Waters)	Carbohydrate Analysis Column Size 3.9 mm × 300 mm 10 μ m p/n 84038
Solvent	83% Acetonitrile (CH ₃ CN)
Flow rate	2.0 mL/min
Injection volume	10 μ L
Detector	RI-Detector : RID-6A (Shimadzu)
Integrator	C-R6A integrator (Shimadzu)

나. GC에 의한 에탄올의 측정

에탄올 측정을 위한 GC의 조건은 각각 Table 2와 같았으며, 측정시료가 표준용액으로 제조한 것이라 복잡한 전처리를 하지 않았다. 에탄올의 경우 용매는 diethyl ether를 사용하였으며, 내부 표준 물질로는 *n*-butanol을 사용하였다.

Table 2. Operating condition of GC-FID for determination of ethanol

Contents	Conditions
Instrument	Shimadzu GC-174
Column	Fused silica capillary (CBP 20)
• Length	25 m
• I.D.	0.22 mm
• Film thickness	0.25 μ m
Temperature	
• Injector	210°C
• Detector (FID)	210°C
Oven program	
• Initial temperature	40°C
• Initial time	5.0 min
• Rate	5.0°C/min
• Final temperature	200°C
• Final time	5.0 min
Gas flow rate(N ₂)	1.5 mL/min
• Split ratio	1 : 67

제 3절 결과 및 고찰

1. Dual cathode system 제작

한 개의 anode와 두 개의 cathode로 구성된 상업용 산소전극을 Fig. 2와 같이 제작하여 cathode쪽에 각각 2 가지 물질을 분석할 수 있는 효소들을 asymmetric coupling 방법으로 고정화하여 dual cathode system을 제작하였다. 2 개의 cathode에서 나타나는 전류와 산소의 분압간의 관계를 두 cathode 전극간의 상관관계로 나타낸 결과 0.998로 나타나 (Fig. 3) 동시에 2 가지 성분을 측정하는 것이 가능할 것으로 판단되었다.

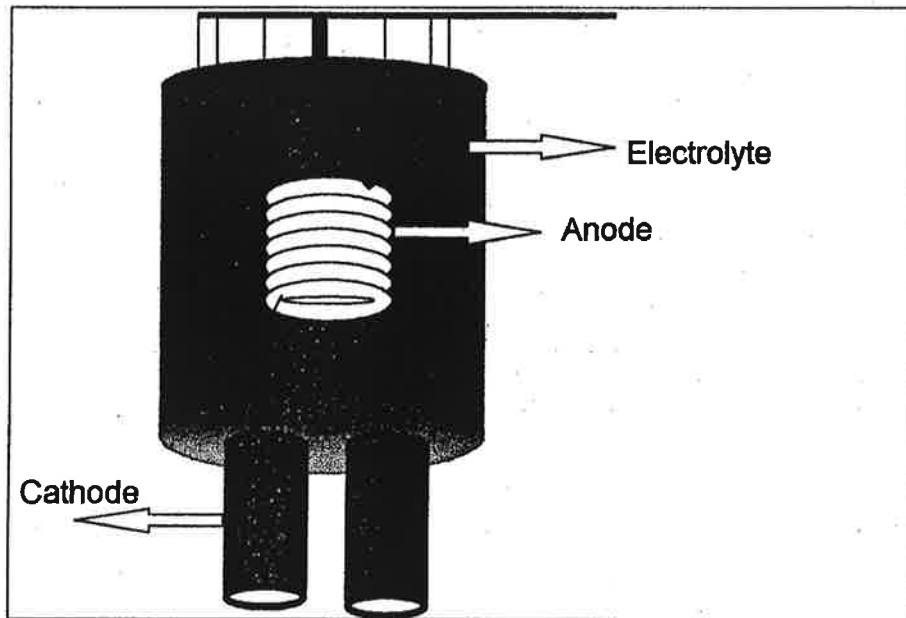


Fig. 2. Schematic diagram of a dual cathode electrode.

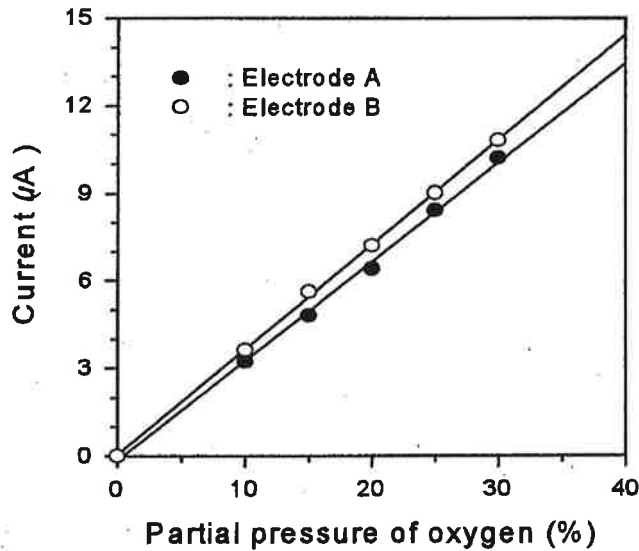


Fig. 3. Sensibility of dual cathode system with lab-made between current and partial oxygen pressure.

2. 젓당/포도당 dual cathode system

가. 온도, pH, 당류가 효소센서의 감응도에 미치는 요인

Asymmetric coupling으로 고정화되어 있는 β -galactosidase, mutarotase, glucose oxidase의 세 효소와 glucose oxidase로 구성되어 젓당과 포도당을 동시에 측정할 수 있는 dual cathode system의 경우 기질과 효소와의 반응 이전에 기질확산에 소요되는 induction period에 해당하는 시간이 다소 차이를 보였다. 이것은 젓당이 기질로 이용되기 위해서는 세 효소가 고정화되어 있는 두 개의 막을 통과하면서 연속적으로 반응을 해야

하기 때문인데, 단일막을 이루고 있는 glucose oxidase가 기질과 반응하는 경우보다 induction period에 해당되는 시간이 약 1.5배 이상 길게 나타나는 것을 보여 주고 있다.

Dual cathode system을 이용하여 젓당 및 포도당을 측정하기 위해서 먼저 각각의 전극 (음극)에 이용된 고정화효소막의 반응 감응도에 완충용액의 종류가 미치는 영향을 살펴 본 결과, glucose oxidase를 순수분리한 수용성 효소상태에서는 최적 pH가 5.1이나 고정화한 효소막은 pH 6.5~7.5로 최적 pH 범위가 옮겨지면서 안정화되는 폭도 넓어졌음을 알 수 있었다. 또, glucose oxidase는 β -galactosidase보다 훨씬 넓은 범위의 pH에서 안정함을 보여 주었다 (Fig. 4).

시판중인 음료나 유제품에는 젓당 뿐만 아니라 포도당, 자당 및 올리고당이 소량 함유되어 있는 경우가 많은데, 가당우유에는 액상과당, 백설탕 및 올리고당이 각각 2~5% 이내로 함유되어 있다. 젓당의 감응도에 가장 영향을 미친 것은 자당으로서 자당의 함량이 0.5~2.0%가 혼합되어 있는 경우 3.33%의 차이를 나타내었다 (Table 3). 올리고당의 경우 올리고당을 조성하는 당류들의 종류 및 함량이 각각 다른데, 이 중 올리고당의 조성에 관여한 포도당 함량에 의해 포도당전극에서 감응도 값이 상승되어 나타났다.

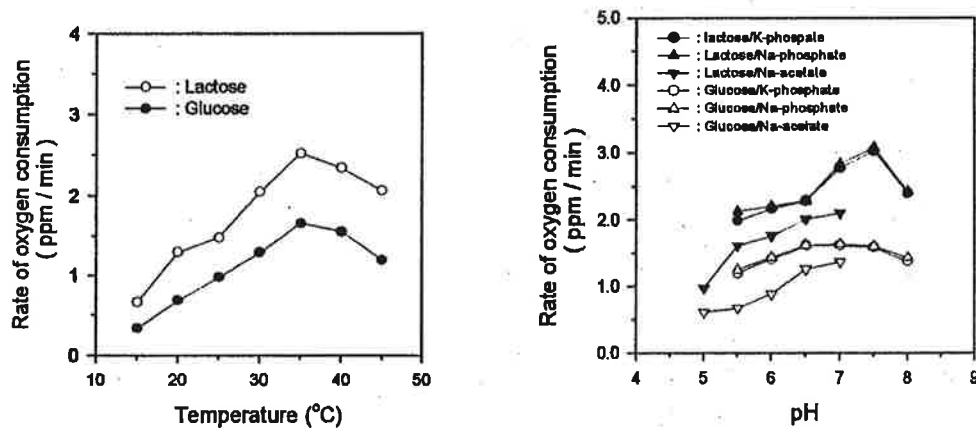


Fig. 4. Effects of temperature and pH on the response of lactose/glucose dual cathode system.

Table 3. Effects of various sugars on the determination of lactose by lactose/glucose dual cathode system

Sugars	Addition of amounts (mM)	Rate of oxygen consumption (ppm/min)	Differences (%)
Control ^a	58.4	1.20	
Fructose	27.7	1.22	1.67
	55.5	1.21	0.83
	111.0	1.21	0.83
Galactose	27.7	1.20	0.00
	55.5	1.19	-0.83
	111.0	1.21	0.83
Sucrose	14.6	1.24	3.33
	29.2	1.24	3.33
	58.4	1.22	1.67
Fructo-oligosaccharides	0.2g/100mL	1.21	0.83
	0.5g/100mL	1.19	-0.83
	1.0g/100mL	1.22	1.67
	2.0g/100mL	1.21	0.83
	4.0g/100mL	1.19	-0.83

^a Control is glucose.

나. 기질농도에 따른 표준곡선의 확립

농도별로 젓당을 주입하여 표준곡선을 구하였다. 젓당/포도당 dual cathode system 을 이용할 경우 젓당전극에서도 포도당의 표준곡선을 구할 수가 있었다. 이것은 젓당전극에 이용되는 세 효소 중 glucose oxidase가 포도당 기질과 반응하여 산소를 소비하기 때문에 포도당의 농도를 간접적으로 측정할 수 있기 때문이다. 젓당전극을 이용하여 포도당을 측정해 본 결과, 포도당전극에서와 마찬가지로 포도당 농도 0.15 M까지 직선의 표준곡선을 구할 수 있었다. 포도당전극과 젓당전극에서 구한 표준곡선의 기울기를 비교해 본 결과, 포도당 농도에 의한 기울기 값이 전극에 따라 차이가 있었는데 젓당전극에서 구한 포도당 감응도의 값이 낮게 나타났다 (Fig. 5).

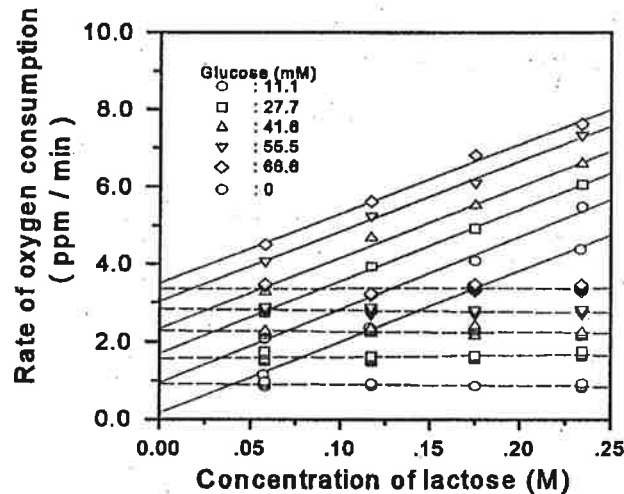


Fig. 5. Effect of concentration of glucose and lactose on response of glucose/lactose dual cathode system.

포도당이 함께 존재하는 경우 젓당전극으로도 포도당의 측정이 가능하기 때문에 포도당과 젓당의 농도를 각각 증가시키면서 살펴 보았다. 포도당전극의 경우 젓당의 농도가 증가하여도 포도당은 이미 함유된 양만큼 일정한 농도 값을 보여 주었으며, 젓당전극으로 젓당을 측정할 결과 y절편에 해당하는 포도당의 농도만큼 감응도가 높게 나타났다 (Fig. 6). 실제로 이들의 기울기를 비교해 본 결과, 최대 1.85% 이내의 차이를 보여 주었는데, 포도당을 주입하지 않고 구한 젓당의 표준곡선의 기울기와 비교해 볼 때 평균값의 기울기와 거의 일치하여 dual cathode system을 이용할 경우 포도당전극으로 포도당의 양을 측정하면 젓당전극으로 측정한 값으로부터 환산될 수 있으므로 포도당 및 젓당의 동시 측정에 무리가 없음을 보여 주었다.

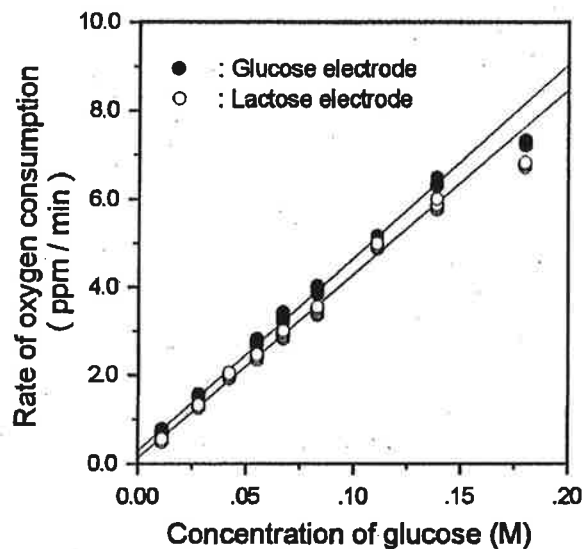


Fig. 6. Standard curve of glucose and lactose.

포도당이 시료에 존재하는 경우 젓당전극에서 구한 젓당의 감응도 (R_t)는 젓당 이외에 포도당의 농도도 함께 포함하고 있으므로 시료에 이미 함유되어 있는 포도당에 의해 나타나는 값을 빼 주어야 실제의 젓당의 농도를 구할 수 있다. 먼저, 포도당전극에서 구한 포도당의 감응도 (R_g')로부터 포도당의 농도를 구한 다음, 이 포도당 농도값 (R_g'/A_g')을 dual cathode system의 젓당전극으로부터 구한 포도당의 표준곡선에서 포도당 감응도 값 ($A_g \times R_g'/A_g'$)으로 환산하여 가감함으로써, 젓당전극에서 시료에 포함된 포도당농도에 의해 나타나는 실제의 포도당 감응도 값을 알 수 있었다. 이 감응도 값을 젓당의 표준곡선에 적용하여 젓당의 농도 (C_L)를 측정할 수 있었다. 이러한 관계를 식으로 정리하면 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$C_L = (R_t - A_g \times \frac{R_g'}{A_g'}) \times \frac{1}{A_L}$$

C_L : 시료의 젓당농도 (mM)

R_t : 젓당전극에서의 감응도 (Δ ppm/ Δ sec)

A_g : 젓당전극에서 포도당 농도의 상관계수 (Δ ppm/ Δ mM)

A_g' : 포도당전극에서 포도당 농도의 상관계수 (Δ ppm/ Δ mM)

R_g' : 포도당전극에서 포도당 감응도 값 (Δ ppm/ Δ sec)

A_L : 젓당전극에서 젓당 농도의 상관계수 (Δ ppm/ Δ mM)

다. 가당우유에서의 젓당 및 포도당 동시 측정

시판되고 있는 가당우유에 함유되어 있는 젓당 및 포도당의 측정을 위해 앞에서 구한 표준곡선 및 관계식으로부터 젓당 및 포도당의 농도를 측정할 수 있다. 시판 중인 가

당우유의 젖당함량은 3.705~4.671 g/100 mL이었으며 포도당 함량은 2.879~3.675 g/100 mL이었다 (Table 4). 여기서 측정된 포도당농도는 가당우유 제조 시 인위적으로 첨가하는 포도당 이외에도 액상과당이나 설탕, 올리고당이 일부 분해됨으로써 포도당이 포함되어 나타난 값으로 보인다. 또, 같은 가당우유를 분광광도계로 검증하여 본 결과, 젖당의 농도가 3.685~4.785 g/100 mL, 포도당의 농도가 2.550~3.830 g/100 mL로 나타났다.

Table 4. Determination of lactose and glucose by lactose/glucose dual cathode system

Milks	Dual cathode system(g/100mL)		Spectrophotometry(g/100mL)	
	Lactose	Glucose	Lactose	Glucose
A	4.162 ± 0.160	3.675 ± 0.038	4.157 ± 0.434	3.058 ± 0.229
B	4.671 ± 0.267	3.647 ± 0.063	4.478 ± 0.225	3.830 ± 0.118
C	4.087 ± 0.276	3.658 ± 0.065	3.986 ± 0.079	3.542 ± 0.158
D	4.237 ± 0.410	3.537 ± 0.096	4.235 ± 0.200	2.673 ± 0.198
E	3.705 ± 0.375	2.879 ± 0.088	3.685 ± 0.376	2.547 ± 0.105

3. 맥아당/포도당 dual cathode system

식혜 제조에 있어서 당화작용은 맥아에 의해서 이루어지는데 이 때 생성되는 주당은 맥아당과 포도당이다. 식혜의 단맛과 품질을 결정하는 맥아당 및 포도당의 측정은 식혜의 발효과정을 조절하는 품질지표로 삼을 수 있다. 일반적으로 맥아당을 측정하는 방법은 DNS (dinitrosalicylic acid 방법)에 의한 분광분석법, HPLC에 의한 측정방법 등이 있으나 맥아당만을 측정하기 위한 간편한 분석방법이 따로 없는 것이 사실이다. 효소반응을 이용하는 것이 선택성이나 감응도 면에서 뛰어나기 때문에 많이 이용되고 있다. 본 실험에서는 amyloglucosidase, glucose oxidase를 nylon net에 고정화한 것과 별도로 glucose oxidase를 고정화하여 맥아당과 포도당을 동시에 측정할 수 있는 효소전극을 이용한 dual cathode system을 제작하고, 성분들을 동시에 측정하기 위한 최적 조건 및 식혜 중의 함량을 측정하였다.

가. 온도, pH, 당류가 효소센서의 감응도에 미치는 요인

Amyloglucosidase는 35°C에서 높은 감응도를 나타내었으며, 이 온도는 glucose oxidase의 최적 활성온도와 일치하였다. Amyloglucosidase는 수용성 효소상태에서 55°C에서 최적 온도이나 고정화가 진행되면서 오히려 최적 온도가 내려간 것으로 나타났다. Amyloglucosidase의 수용성 효소상태에서의 최적 pH는 약 4.5로서 산성인 조건하에서 효소활성이 높은 효소이다. Amyloglucosidase의 경우 초산 완충용액을 사용한 경우가 인산 완충용액을 사용한 경우보다 반응 감응도가 높게 나타났다. 또한, 비교적 산성인 pH 4.5~5.5인 범위에서 효소활성이 높게 나타났으며, pH 5.0에서 가장 좋은 반응 감응도를 보여 주었다. 반면, glucose oxidase는 비교적 산성과 중성의 범위인 넓은 pH 범위에서도 감응도의 차이가 심하지 않은 편이었으나, pH 6.5~7.5인 중성 pH 범위에서 좋은 감응도를 나타내었다 (Fig. 7). 그러나, 맥아당과 포도당을 동시에 측정하기 위한 dual cathode system을 만들기 위해서는 넓은 pH 범위에서도 감응도의 차이를 별로 나타내

지 않는 glucose oxidase보다 산성범위에서 최적 활성도를 나타내는 amyloglucosidase의 반응 감응도를 고려하여 두 효소의 최적 상태를 비교적 동시에 만족하는 pH 5.5를 최적 pH로 선택하였다. 완충용액 또한, 두 효소가 일반적으로 만족하여야만 하므로 인산 완충 용액을 사용하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 이당류에서 비교적 영향을 미치는 당은 자당과 mannose 였는데, 각각 약 2.70~4.73%의 감응도 차이를 나타내었다. 그리고, 말트올리고당은 4.05~5.41% 내외로 맥아당전극의 감응도에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

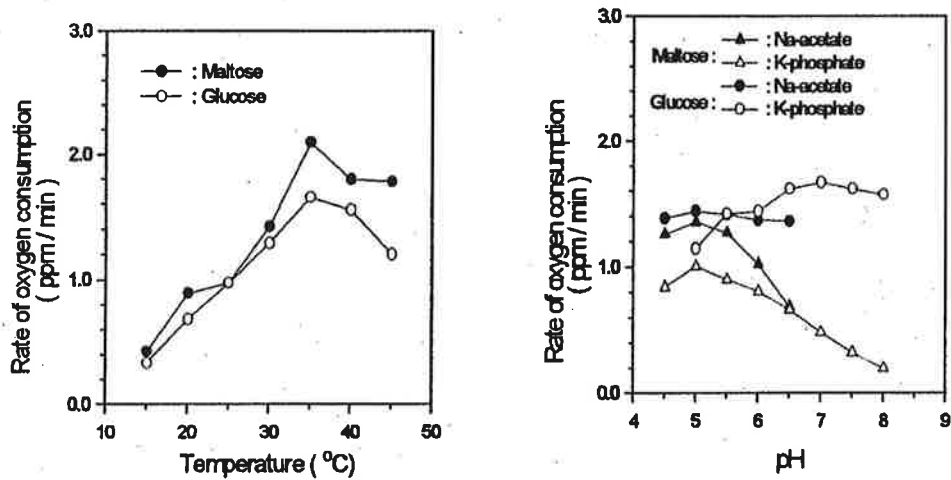


Fig. 7. Effects of temperature and pH on the response of maltose/glucose dual cathode system.

Table 5. Effects of various sugars on the determination of maltose by maltose/glucose dual cathode system

Sugars	Amounts of addition(M)	Rate of oxygen consumption(ppm/min)	Differences (%)
Control ^a	0.029	1.48	
Fructose	0.055	1.50	1.35
	0.111	1.51	2.03
Sucrose	0.029	1.52	2.70
	0.058	1.55	4.73
Arabinose	0.067	1.48	0.00
	0.133	1.48	0.00
Xylose	0.006	1.48	0.00
	0.012	1.49	0.68
Mannose	0.055	1.51	2.03
	0.111	1.51	2.03
Fructooligo-saccharide	1.0g/100mL	1.53	3.38
	2.0g/100mL	1.55	4.73
Maltooligo-saccharide	1.0g/100mL	1.54	4.05
	2.0g/100mL	1.56	5.41

^a Control is maltose.

나. 맥아당 측정 시 포도당의 보정

맥아당과 포도당의 두 전극에서 두가지 당에 의한 영향을 알아보기 위하여 포도당 농도를 각각 증가시키면서 맥아당의 양도 함께 증가시켰을 때 맥아당전극에서 나타나는 감응도는 맥아당 농도변화에 상관없이 포도당 농도에 따른 감응도만큼이었으며, 맥아당 한 농도에서 포도당 농도를 증가시켰을 때는 포도당이 첨가되는 농도만큼 높게 나타났다 (Fig. 8). 실제로 이들의 기울기를 비교해 본 결과, 기울기는 6.2~6.27 $\Delta\text{ppm}/\text{sec}$ 사이로 실제 포도당을 첨가하지 않은 맥아당만의 표준곡선의 기울기와 1.1%의 차이를 나타내어 거의 일치함을 보여 주었다. 젓당과 포도당의 dual cathode system에 적용한 관계식을 여기에서도 적용할 수 있다.

$$C_M = (R_t - A_G \times \frac{R_{G'}}{A_{G'}}) \times \frac{1}{A_M}$$

C_M : 시료의 맥아당농도 (mM)

R_t : 맥아당전극에서의 감응도 ($\Delta\text{ppm}/\Delta\text{sec}$)

A_G : 맥아당전극에서 포도당 농도의 상관계수 ($\Delta\text{ppm}/\Delta\text{mM}$)

$A_{G'}$: 포도당전극에서 포도당 농도의 상관계수 ($\Delta\text{ppm}/\Delta\text{mM}$)

$R_{G'}$: 포도당전극에서 포도당 감응도 값 ($\Delta\text{ppm}/\Delta\text{sec}$)

A_M : 맥아당전극에서 맥아당 농도의 상관계수 ($\Delta\text{ppm}/\Delta\text{mM}$)

다. 식혜에서의 맥아당 및 포도당 동시 측정

시중에서 유통되고 있는 식혜제품 중의 맥아당과 포도당을 측정한 결과 맥아당의 양은 1.301~1.859 g/100 mL 이며, 포도당의 양은 0.477~0.509 g/100 mL 이었다. 한편,

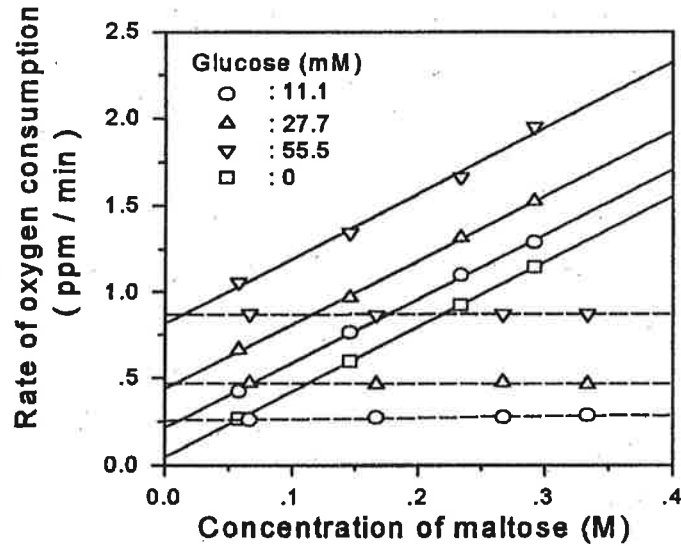


Fig. 8. Effects of concentration of glucose and maltose on the response of glucose/maltose dual cathode system.

분광광도법으로 같은 시료를 취하여 측정 비교하였을 때 dual cathode system으로 측정 한 맥아당과 포도당의 값이 비교적 높게 나타났는데, 이는 맥아당 및 포도당 두 전극에서 일부 다른 당에 의한 산화반응이 일어나 산소가 소모되어 반응 감응도에 의한 농도 측정값이 높게 나타난 것으로 생각된다 (Table 6). 그리고, HPLC에 의하여 같은 시료를 측정해 본 결과, 위의 두 방법보다 다소 적은 값으로 측정되었다 (Table 7). HPLC 분석 결과, 시판 식혜의 경우 당도를 높이기 위하여 첨가된 자당의 함량이 가장 많은 것으로 나타났다.

Table 6. Determinations of maltose and glucose in commercial *sikhes* by maltose/glucose dual cathode system and UV spectrophotometry

(Unit : g/100 mL)

<i>Sikhe</i>	Dual cathode system		Spectrophotometry	
	Maltose	Glucose	Maltose	Glucose
A	1.859 ± 0.091	0.490 ± 0.014	1.834 ± 0.046	0.444 ± 0.008
B	1.301 ± 0.120	0.508 ± 0.018	1.266 ± 0.007	0.410 ± 0.005
C	1.569 ± 0.074	0.477 ± 0.015	1.563 ± 0.005	0.473 ± 0.002
D	1.767 ± 0.112	0.509 ± 0.029	1.731 ± 0.002	0.444 ± 0.002

Table 7. Determinations of maltose and glucose in commercial *sikhes* by HPLC

<i>Sikhe</i>	Free sugars (g/100mL)			
	Maltose	Glucose	Sucrose	Fructose
A	1.733	0.459	9.878	0.529
B	1.240	0.423	10.746	0.389
C	1.587	0.468	7.321	1.414
D	1.750	0.464	10.465	0.443

4. 에탄올/포도당 dual cathode system

가. 온도, pH가 효소센서의 감응도에 미치는 요인

단일 효소 시스템에서의 alcohol oxidase의 최적 온도는 30°C로 나타났는데, dual cathode system에서의 최적 온도는 35°C로 나타났다 (Fig. 9). 또한, glucose oxidase도 35°C에서 최적 활성을 보여 주었다. Nylon net에 고정화시킨 alcohol oxidase는 pH 7.5, 0.1 M 인산 완충용액에서 가장 좋은 활성을 나타내었고 (Fig. 9) glucose oxidase의 최적 pH도 7.5로 나타나 두 효소에 의한 dual cathode system에서의 최적 pH는 7.5로 결정하였다.

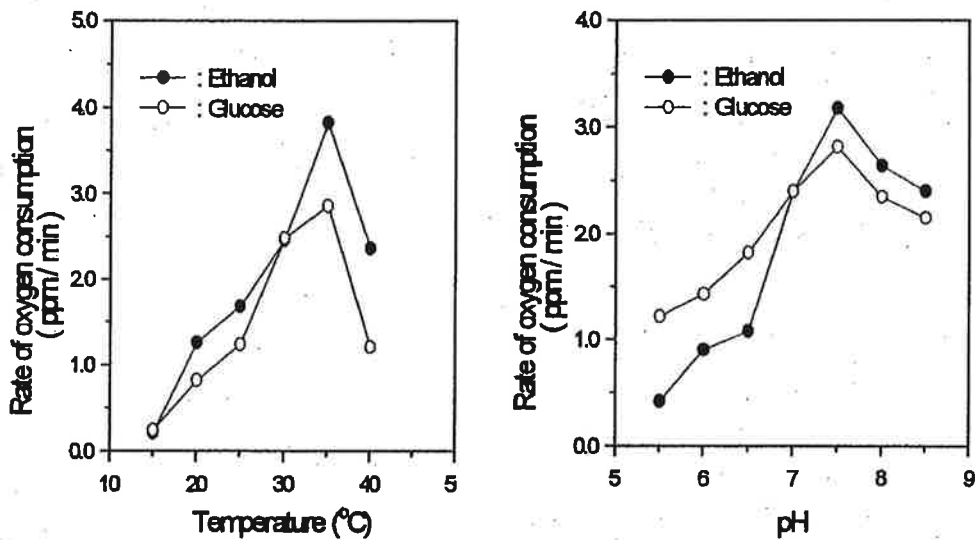


Fig. 9. Effects of temperature and pH on the response of ethanol/glucose dual cathode system.

나. 기질농도에 따른 표준곡선의 확립

Glucose oxidase가 고정화되어 있는 전극에서 포도당의 농도에 따라 산소 소비량의 차이를 나타내었다. 각 포도당 농도별로 시간당 용존산소 소비변화량을 측정하여 표준곡선을 만들었으며 0.2 M까지 직선관계를 나타내었다.

다. 탁주에서의 에탄올 및 포도당 동시 측정

탁주의 제조과정 중 하루 간격으로 시료를 취하여 에탄올 및 포도당의 함량을 측정하였다. 발효 2일이 지나면서 에탄올의 함량은 3.984 g/100 mL로 급격히 증가하였다 (Table 8). 한편, 포도당도 발효 2~6일 사이에 급격한 감소를 보여 주었다. 이것은 누룩에 의한 발효가 진행되면서 탁주 중의 당 함량은 알코올의 발효 기질로 이용되어 포도당이 소비가 되기 때문이다. Dual cathode system으로 측정한 에탄올 및 당의 함량을 기존의 다른 분석방법과 비교해 보기 위하여 에탄올은 GC를 이용하여 측정하고 포도당은 분광광도법을 이용하여 각각 측정하였다. Table 8에서 보는 바와 같이 각각의 방법에서 모두 비슷한 값으로 측정되어 효소센서를 이용한 분석방법에 의한 결과를 확인할 수 있었다. 한편 측정된 알코올 성분은 GC에 의해 분석된 값과 비교하였을 때 Fig. 10에서 보는 바와 같이 높은 상관 관계 ($r = 0.94$)를 나타냈다.

라. 기존의 분석 방법으로 검증

위에서 언급한 최적조건에서 dual cathode system을 이용하여 정량한 값과 기존의 분석방법인 분광광도법으로 측정한 결과를 비교하였다 (Table 9). 시중에 판매되는 식혜 및 가당 요구르트의 성분을 비교한 결과, 아래 표에서 보는 바와 같이 두 방법간에 차이는 5%이내로 나타났다 (Table 10).

Table 8. Determinations of amounts of ethanol and glucose in *takju* by dual cathode system, UV spectrophotometry and GC

(Unit : g/100 mL)

Fermentation Time (Day)	Dual cathode system		Spectrophotometry	GC
	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol
0	7.350 ± 0.001	0.123 ± 0.035	7.505 ± 0.003	0.078 ± 0.023
2	6.003 ± 0.005	0.502 ± 0.048	6.605 ± 0.103	0.346 ± 0.004
4	5.404 ± 0.003	3.984 ± 0.088	5.534 ± 0.048	4.002 ± 0.035
6	0.330 ± 0.004	7.672 ± 0.303	0.292 ± 0.021	6.693 ± 0.043
8	0.230 ± 0.012	8.901 ± 0.058	0.242 ± 0.032	8.368 ± 0.028
10	0.280 ± 0.007	8.442 ± 0.192	0.298 ± 0.023	8.113 ± 0.027
12	0.490 ± 0.007	7.811 ± 0.194	0.491 ± 0.031	7.494 ± 0.016

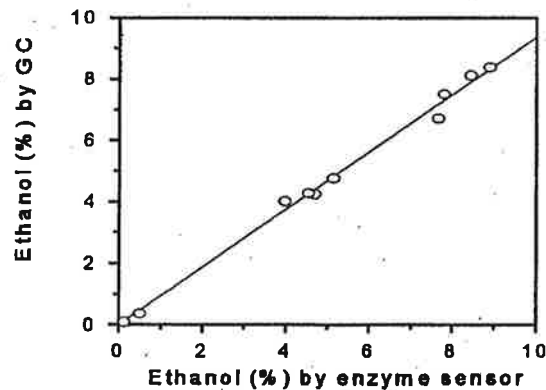


Fig. 10. Correlation of ethanol/glucose dual cathode system and GC.

Table 9. Determinations of maltose and glucose by dual cathode system and spectrophotometry

(Unit : g/100 mL)

Samples ^a	Dual cathode system		Spectrophotometry	
	Maltose	Glucose	Maltose	Glucose
A	1.859 ± 0.091	0.490 ± 0.014	1.834 ± 0.046	0.444 ± 0.008
B	1.301 ± 0.120	0.508 ± 0.018	1.266 ± 0.007	0.410 ± 0.005
C	1.569 ± 0.074	0.477 ± 0.015	1.563 ± 0.005	0.473 ± 0.002
D	1.767 ± 0.112	0.509 ± 0.029	1.731 ± 0.002	0.444 ± 0.002

^a Commercial products : Dusan, Jeiljedang, Hanhwa, LG.

Table 10. Determinations of lactose and glucose by dual cathode system

(Unit : g/100 mL)

Sample ^a	Dual cathode system		Spectrophotometry	
	Lactose	Glucose	Lactose	Glucose
Liquid				
A	4.133 ± 0.195	4.184 ± 0.219	4.138 ± 0.001	4.271 ± 0.002
B	4.026 ± 0.234	4.501 ± 0.170	4.088 ± 0.002	4.618 ± 0.004
C	3.917 ± 0.188	3.933 ± 0.707	3.873 ± 0.008	4.038 ± 0.006
D	3.493 ± 0.169	3.956 ± 0.934	3.494 ± 0.024	3.871 ± 0.007
Semi-solid				
E	3.651 ± 0.081	1.161 ± 0.125	3.605 ± 0.099	1.161 ± 0.299
F	3.915 ± 0.104	1.382 ± 0.010	3.949 ± 0.012	1.382 ± 0.004
G	3.841 ± 0.112	1.008 ± 0.053	3.815 ± 0.001	1.008 ± 0.003
H	4.634 ± 0.192	1.701 ± 0.017	4.595 ± 0.005	1.701 ± 0.044

^a Commercial products : Mail, Pasteur, Dusan, Bingurae.

5. 초산 미생물센서 제조

Trichosporon brassicae (KCCM 50289)를 YM broth에서 배양한 후 약 45~60 cmHg의 진공을 걸어준 상태에서 진공여과법에 의해 미생물을 filter-disc (Millipore MF membrane : GSWP 04700, HAWP 04700, pore size: 0.22 μm , 0.45 μm)에 흡착시켰다. 미생물전극의 제작은 효소센서와 같은 방법으로 미생물이 고정화된 막을 Teflon membrane (0.001 inch thickness, YSI 5775)과 투석막 (M.W.C.O. 12,000) 사이에 O-ring으로 고정하였으며, 완충용액에 담구어 하룻밤 보관한 후 사용하였는데 이는 완충용액이 미생물막내로 침투하도록 하며 함께 포집된 공기를 빼주기 위함이었다. 보관 시에는 멸균 완충용액에서 4°C 냉장보관하였고, 주입된 초산의 농도에 따라 산소의 소모량을 관찰한 결과 표준곡선을 얻을 수 있었으나 다른 성분과 동시 측정 시 최적 pH가 현저히 낮은 2~3의 값에서 높은 감응도를 보이므로 적정 pH 값이 5~7인 다른 효소시스템과 동시에 사용하여 여러 가지 성분을 동시 측정하는 것은 불가능하였다.

6. 식품의 품질관리 및 공정을 위한 multi-biosensor의 개발

가. 효소센서의 제작

한 개의 anode와 6 개의 cathode로 구성된 상업용 산소전극을 Fig. 11과 같이 제작하여 cathode쪽에 각각 3 가지 물질을 분석할 수 있는 효소들을 asymmetric coupling 방법으로 고정화하여 제작된 계측시스템을 이용한 측정 장치는 다음과 같다 (Fig. 12). Multi-biosensor 전극의 응답 pattern은 다음과 같다 (Fig 13). 각 음극에 연결된 저항을 조절하여 초기값이 다르게 나타났으며 시료 주입후 전압치가 떨어지는 현상을 볼 수 있었다.

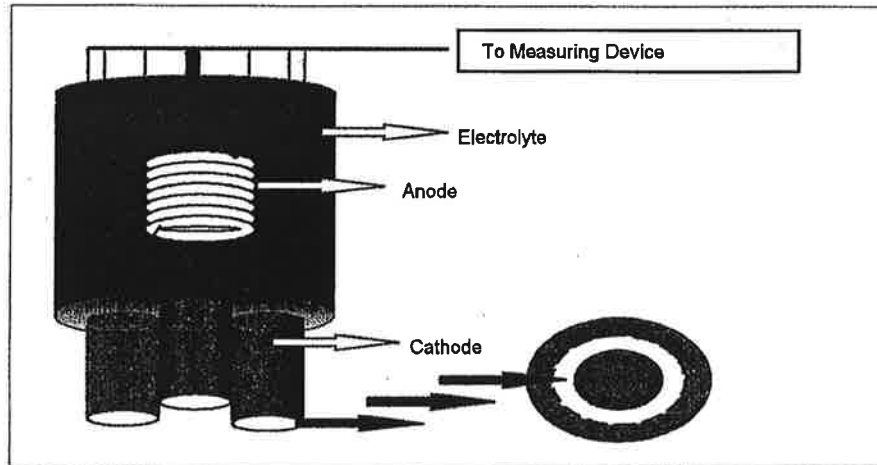


Fig. 11. Schematic diagram of a multiple cathode electrode.

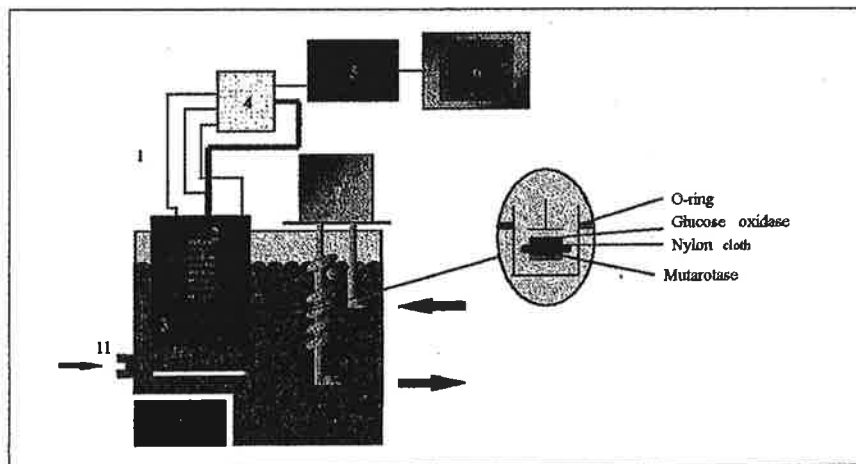


Fig. 12. Schematic diagram of the immobilized multi-enzymes on nylon cloth and the electrode for determination of glucose. 1. Multiple cathode 2. Anode 3. Electrolyte 4. Electrical circuit 5. Micro-controller 6. Computer 7. Circulating system 8. Immobilized enzyme layer 9. Stirring bar 10. Magnetic stirrer 11. Injection septor 12. Water bath.

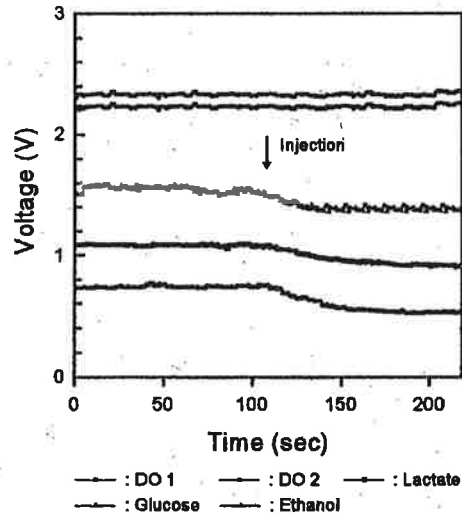


Fig. 13. Determination of multi-components by the oxygen electrode with multiple cathode system.

7. Triple cathode 산소전극을 이용한 3 가지 성분 (포도당/피르브산/알코올)의 동시 분석

가. 포도당/피르브산/알코올 센서의 적정조건

1) 온도의 영향

Glucose oxidase, pyruvate oxidase, alcohol oxidase의 최적 온도를 알아보기 위하여 15℃에서 45℃까지 5℃ 간격으로 측정 비교하였다 (Fig. 14). 일반적으로 온도가 상승

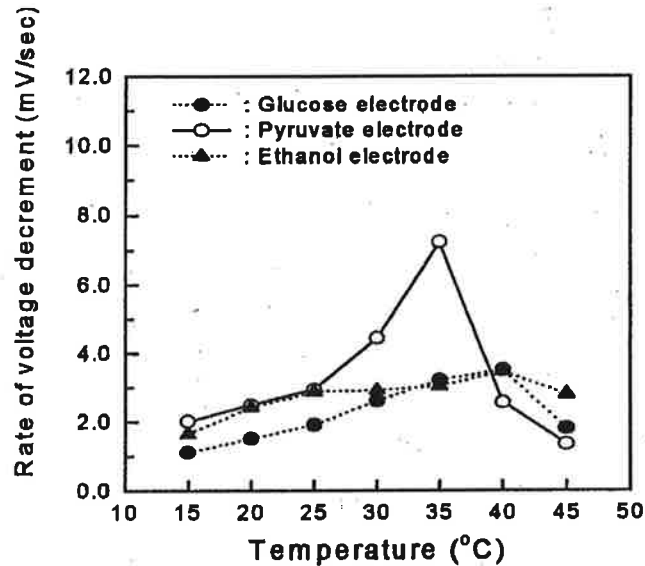


Fig. 14. Effects of temperature on the response of glucose/pyruvate/ethanol sensor with multiple cathode system.

함에 따라 효소센서의 감응도는 증가하는 경향을 보였으며, 피브르산 효소 센서의 경우 온도에 민감한 감응도의 차이를 보였는데, 30°C에서는 15°C의 효소활성에 비하여 1.2배의 감응도가 증가하였고, 35°C에서는 15°C에 비하여 2.6배나 증가하는 것으로 나타나 다른 효소센서에서 비하여 온도차이가 주는 감응도 영향이 큰 것으로 나타났다. 포도당 센서의 경우는 30°C에서 35°C로 조건을 달리 하였을 때 23%, 에탄올의 경우 4.5% 증가하는 정도로 그 감응도에 주는 영향이 피브르산 센서와 비교하였을 때 적었다. 또한 Fig. 14에서 보는 바와 같이 40°C 이후에는 65% 정도의 감응도가 급격히 감소함으로써 포도당, 젖산, 에탄올 센서의 경우 최적 활성온도를 40°C로 볼 수 있지만 포도당, 피브르산, 에탄올 센서의 경우는 35°C가 최적 온도라 할 수 있겠다. Zapata-Bacri 등이 제시한 결과와 비교하였을 때 최적 온도를 35°C로 제시한 것은 일치하나 30°C에서 35°C로의 5°C

온도차이가 주는 감응도의 차이는 그다지 크지 않은 것으로 나타났다. 이러한 차이는 효소를 젤라틴 용액에 녹여 polypropylene film에 고정화시키는 방법을 선택하여 열에 대한 영향을 적게 받음으로써 나타난 것으로 보인다. 어떤 종류의 matrix에 어떠한 방법으로 고정화 하느냐에 따라 효소활성에 차이를 보인다는 여러 연구결과가 이를 뒷받침한다.

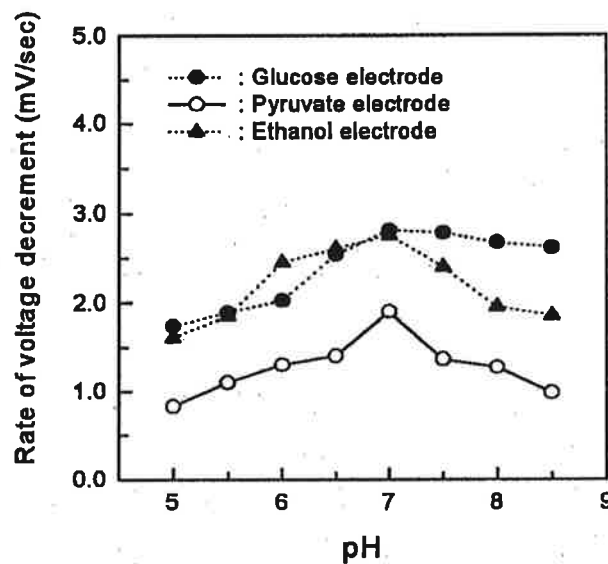


Fig 15. Effects of pH on the response of glucose/pyruvate/ethanol sensor with multiple cathode system.

2) pH의 영향

포도당, 피르브산, 에탄올의 동시 측정을 위해 각각의 전극에 이용된 고정화효소막의 pH에 대한 영향을 살펴 본 결과 피르브산 센서의 경우 중성인 pH 7에서 감응도가

높은 것으로 나타났으며 (Fig. 15), 이는 pH를 0.5 증감시키는 변화에 의해 35% 정도 효소활성의 향상을 보이는 것으로 포도당, 에탄올 센서의 경우보다 13% 큰 값이었다. 포도당, 에탄올 센서에서도 비교적 완만한 경향을 보이지만 pH 7에서 최대 활성을 보이므로 최적 pH는 7로 선정하였다.

3) 이온세기의 영향

효소센서의 감응도에 이온세기가 영향을 미치는지의 여부를 알아보려고 인산 완충용액을 선택하여 이온의 세기를 0.2에서 1.0까지 달리하여 측정하였다 (Fig. 16). 포도당 센서는 0.6, 피르브산 센서는 0.8, 에탄올 센서는 1.0으로 각기 다른 이온세기에서 최대 감응도를 보였다. 그러나, 포도당 센서는 비교적 이온의 세기에 대하여 영향이 적어 0.8까지 올려주어도 12% 정도 변화가 있을 뿐이었고, 피르브산 센서는 0.6에서 보다 무려 43% 정도 감응도가 증가되었고, 에탄올 센서는 27% 상승하였다. 또한, 에탄올 센서는 1.0의 이온세기까지 계속 증가하는 양상에 비해 포도당 센서와 피르브산 센서는 1.0의 이온세기에서 각각 최대 감응도의 80%, 67%의 값을 보였다. 따라서, 3 성분 측정을 위한 효소센서의 최적 이온세기는 피르브산의 경우는 최대 감응도를, 포도당의 경우 최대 감응도의 98.9%, 에탄올 센서의 경우 85%의 값을 가지는 0.8로 하였다.

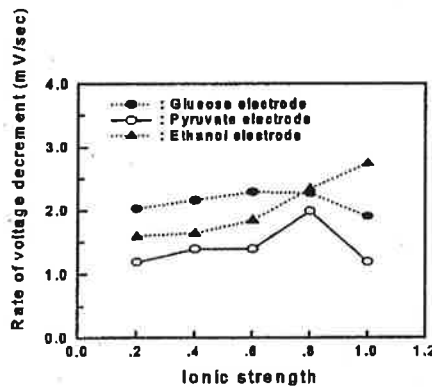


Fig. 16. Effect of ionic strength on the response of glucose/pyruvate/ethanol sensor with multiple cathode system.

4) 유사구조 물질에 대한 영향

앞서 포도당, 에탄올 센서에서 구조적으로 유사한 여러가지 물질 확인에 이어 피르브산 센서에서 유사구조 물질이 감응도에 변화를 주는지의 여부를 살펴 보았다. Table 11의 결과를 살펴보면 피르브산이 함유된 시료에 여러가지 유기산 및 당류를 2배 농도 까지 첨가하였을 때 피르브산 센서의 감응도의 변화는 7% 내외였다. 특히, lactic acid와 succinic acid는 피르브산의 경우와 동일한 부산물인 acetylphosphate를 생성하기 때문에 피르브산 효소센서의 기질 특이성 및 효소활성에 영향을 받는지를 살펴 보았지만, succinic acid가 8%이내의 오차로 저해작용은 미미한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Zapata-Bacri 등이 보고한 바와 일치하며, 또한 포도당 및 다른 단당류의 경우 영향이 거의 없는 것으로 나타나 피르브산 효소센서의 경우 피르브산 측정 시 장애가 없을 것으로 보인다. 그러나 포도당 센서에서의 피르브산의 존재가 영향을 끼치는 것으로 측정된 바, 이들 상호관계를 보정하는 관계식을 이 후에 제시하였다.

5) TPP 첨가에 따른 감응도 변화

Hager와 Lipmann에 의하면 피르브산이 pyruvic acid oxidase의 작용으로 탈탄산화 되려면 TPP, FAD, Mg^{2+} 를 필요로 한다고 알려져 있다. Pyruvate oxidase의 작용으로 산소를 소비해서 acetyl phosphoric acid, 초산, 이산화탄소, 과산화수소를 생성하는 반응을 살펴보면 인산이 필수적으로 요구된다. 이는 기존의 인산 완충용액 시스템 활용으로 따로 첨가하지 않고 제공받을 수도 있으나, TPP를 첨가하면 피르브산의 탈탄산화는 효소작용이 보다 활발하게 진행되어 효소센서의 감응도에 영향을 주게 된다. 따라서, 본 실험에서는 Zapata-Bacri 등이 보고한 0.7~0.8 mM의 TPP와 5 mM $MgSO_4$ 를 첨가하여 이들을 첨가하지 않았을 때의 효소센서의 감응도와 비교하여 보았다. 그 결과, 0.5 g/100 mL의 시료를 기준으로 살펴보았을 때 TPP 첨가시 62%나 향상됨을 알 수 있었다. 따라서, TPP와 Mg^{2+} 가 첨가되는 경우 센서 감응도의 현저한 상승을 보이므로 TPP의 적정 농도를 알아보기 위하여 TPP의 농도를 0.2~1.0 mM까지 0.2 mM 간격으로 달리

Table 11. Effects of various organic acids and sugars on the determination of pyruvic acid by using biosensor with multiple cathode system

Organic acid or sugar	Amounts of addition (mM)	Rate of voltage decrement (mV/sec)	Differences (%)
Control ^a	30.33	2.06	
Acetic acid	30.33	1.99	- 3.39
	60.67	2.02	- 1.94
Ascorbic acid	30.33	2.05	- 0.48
	60.67	2.04	- 0.97
Citric acid	30.33	1.99	- 3.39
	60.67	2.00	- 2.91
Lactic acid	30.33	1.97	- 4.36
	60.67	2.01	- 2.42
Malic acid	30.33	1.98	- 3.88
	60.67	1.92	- 6.79
Oxalic acid	30.33	2.05	- 0.48
	60.67	2.13	3.39
Propionic acid	30.33	2.03	- 1.45
	60.67	2.00	- 2.91
Succinic acid	30.33	2.22	7.76
	60.67	2.12	2.91
Glucose	30.33	2.14	3.88
	60.67	2.10	1.94
Fructose	30.33	2.06	0.00
	60.67	2.02	- 1.94
Galactose	30.33	2.05	- 0.48
	60.67	2.05	- 0.48

^a Pyruvic acid solution was used as a control.

하였을 때의 감응도의 변화를 살펴보았다 (Fig. 17). 그 결과, 0.8 mM에서 최대 활성을 보였으며 이는 0.2 mM 첨가 시 보다 2.5배나 향상되었음을 알 수 있었다. Zapata-Bacri 등의 연구결과에서도 0.7~0.8 mM에서 최대활성을 보였던 것으로 나타나 본 시스템에서는 피브르산 동시 측정 시 TPP를 0.8 mM 첨가하여 측정하였다. 또한, 피브르산과 다른 성분을 동시 측정할 때 TPP와 Mg^{2+} 가 첨가됨에 따라 다른 포도당, 젖산 센서에 영향을 미치는지를 살펴 보았다 (Table 12). 그 결과, 각 효소센서에 커다란 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 피브르산과 함께 동시측정 시 TPP와 Mg^{2+} 가 첨가된 인산 완충용액 시스템을 이용하였다.

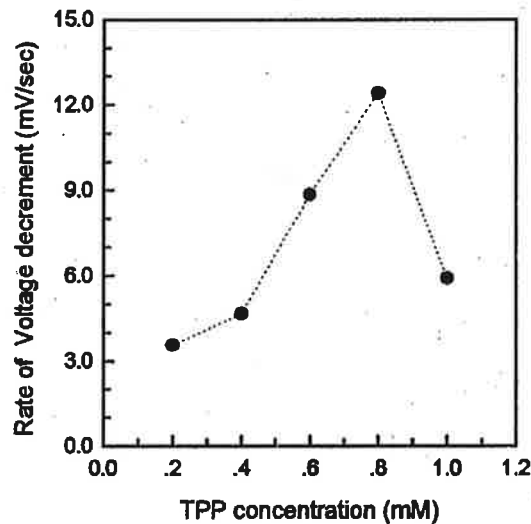


Fig. 17. Effect of TPP concentration on the response of pyruvate sensor part.

Table 12. Effects of TPP and Mg²⁺ on the rate of voltage decrement at ethanol, glucose, and pyruvate sensor part of biosensor with multiple cathode system.

Sample	Rate of voltage decrement (mV/sec)	
	Without TPP and Mg ²⁺	With TPP and Mg ²⁺
Ethanol	6.05±0.11	6.33±0.31
Glucose	5.38±0.21	5.45±0.22

나. 포도당 측정 시 유기산 영향 보정

Fig. 18은 피르브산 농도를 달리하였을 때 각기 포도당 센서와 피르브산 센서의 효소 감응도의 변화를 살펴본 것으로, 포도당이 존재하지 않는 순수 피르브산 시료의 경우, 피르브산 농도변화에 따라 효소센서의 감응도 변화와의 관계가 직선 관계를 보였다. 본 실험 결과 1.7 mV/sec의 기울기를 보여 주었으며 이 때 상관계수는 0.977로 나타났다. 따라서, 피르브산과 포도당이 혼재되어 있는 시료의 경우 순수한 포도당의 측정은 다음과 같은 관계식을 통하여 보정한 값으로 구할 수 있었다.

$$C_G = (R_t - GS_p \times \frac{R_p}{PS_p}) \times \frac{1}{GS_G}$$

- R_t : 포도당전극에서의 감응도 값 (mV/sec)
- R_p : 피르브산전극에서의 젖산 감응도 값 (mV/sec)
- C_G : 시료 중의 순수한 포도당의 농도 (g)
- GS_p : 포도당전극에서의 피르브산 농도별 기울기 (mV/sec/g)
- PS_p : 피르브산전극에서의 피르브산 농도별 기울기 (mV/sec/g)
- GS_G : 포도당전극에서의 포도당 농도별 기울기 (mV/sec/g)

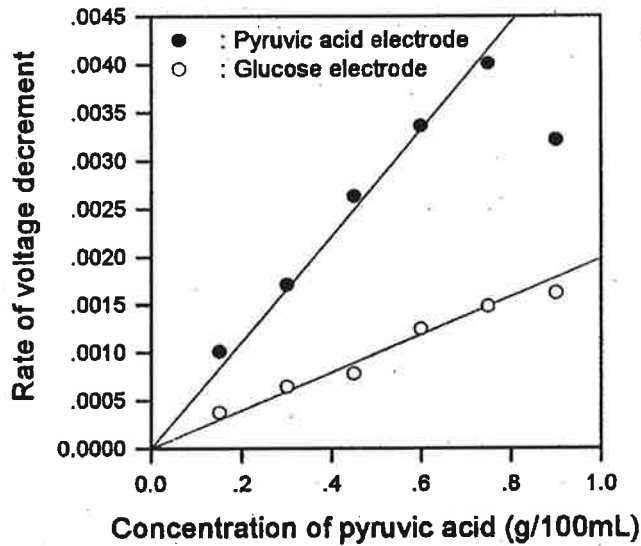


Fig. 18. Standard curves of pyruvate measured by pyruvate/glucose sensor.

다. Addition 방법에 의한 포도당, 피르브산, 에탄올의 동시 측정

Fig. 19는 multiple cathode system으로 이루어진 포도당/피르브산/에탄올 센서에 의하여 측정되는 각 성분의 농도별 표준곡선을 보여준다. 동시 측정하려는 세가지 성분을

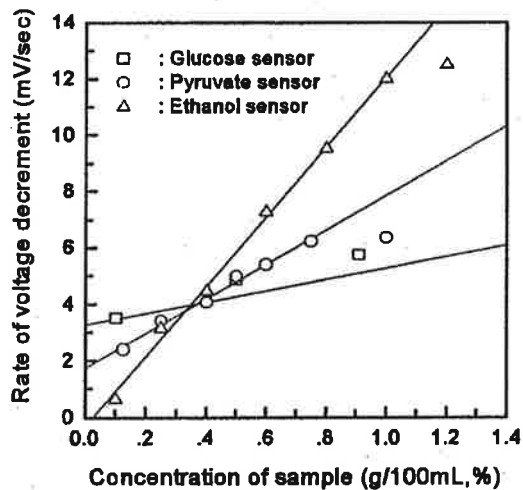


Fig. 19. Standard curves of glucose/pyruvate/ethanol by using glucose/pyruvate/ethanol sensor with multiple cathode system.

끝고루 포함하고 있는 시스템을 인위적으로 제조하여 다성분을 동시 측정하였으며, 이를 위해 두 가지 성분은 일정하게 고정시키고 다른 한 성분의 농도만을 달리하면서 시료를 제조하였다. 측정 성분 중 피르브산을 동시 측정할 경우 완충용액으로는 TPP가 첨가된 인산 완충용액이 사용되었고, 시료로는 포도당, 피르브산, 에탄올을 동시 측정하였다. 포도당은 0.3, 1.0, 5.0 g/100 mL, 피르브산은 0.3, 0.5, 0.75 g/100 mL, 에탄올은 0.2, 0.4, 0.6%의 농도를 선택하여, addition method를 이용하여 두 성분은 같은 농도를 유지하고 나머지 한 성분만 변화시켜 multiple cathode system으로 측정한 결과는 Table 13과 같다. 한편, 포도당 센서에 의한 측정값의 경우 피르브산의 농도를 증가시키면 포도당 센서에 영향을 미치나 여기서 제시된 포도당 값은 피르브산 함량에 따른 보정관계식을 통

하여 보정된 값이다. 피르브산의 농도가 0.3 g/100 mL인 경우 측정값은 0.287 ± 0.035 g/100 mL로 나타났으며 포도당의 농도가 5.0 g/100 mL인 경우 5.225 ± 0.002 g/100 mL로 나타났다. 포도당의 농도가 1.0 g/100 mL인 경우 피르브산과 에탄올을 첨가할 때 나타난 값은 0.969~1.058 g/100 mL 이었다. 또한, 피르브산의 농도를 달리할 때 0.3 g/100 mL인 시료의 측정값이 0.287 ± 0.035 g/100 mL 이었으며, 피르브산을 0.75 g/100 mL 첨가한 경우 0.751 ± 0.066 g/100 mL로 나타났다.

Table 13. Simultaneous determinations of glucose, pyruvic acid and ethanol by biosensor with multiple cathode system

Concentration of component			Multiple cathode system		
Glucose (g/100mL)	Pyruvic acid (g/100mL)	Ethanol (%)	Glucose (g/100mL)	Pyruvic acid (g/100mL)	Ethanol (%)
1	0.5	0.2	1.058 ± 0.037	0.547 ± 0.029	0.216 ± 0.026
1	0.5	0.4	0.969 ± 0.088	0.562 ± 0.004	0.439 ± 0.027
1	0.5	0.6	1.006 ± 0.071	0.512 ± 0.040	0.599 ± 0.046
1	0.3	0.4	1.001 ± 0.112	0.287 ± 0.035	0.389 ± 0.010
1	0.5	0.4	1.003 ± 0.103	0.507 ± 0.007	0.439 ± 0.027
1	0.75	0.4	0.970 ± 0.050	0.751 ± 0.066	0.427 ± 0.028
0.3	0.5	0.4	0.314 ± 0.059	0.507 ± 0.007	0.453 ± 0.010
1	0.5	0.4	1.036 ± 0.090	0.563 ± 0.004	0.439 ± 0.027
5	0.5	0.4	5.225 ± 0.002	0.547 ± 0.049	0.420 ± 0.030

라. 기존의 측정방법과의 상호비교

Multiple cathode system으로 측정한 시료의 값을 기존의 다른 분석방법으로 측정한 값과 비교하였다. 에탄올은 GC, 피브르산은 분광광도법으로 측정한 값들과 비교하였으며 이들의 상관계수는 각각 0.983, 0.954로 나타났다 (Fig. 20).

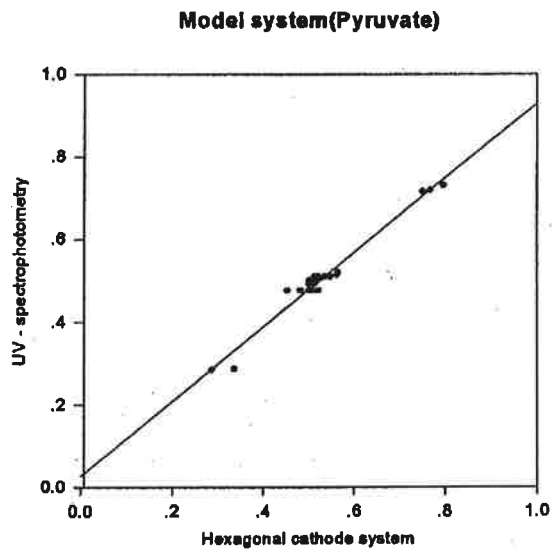


Fig. 20. Correlation of pyruvate multi-cathode system and UV spectrophotometry.

마. 효소센서의 사용횟수에 따른 안정성

Multiple cathode system에 고정화한 효소센서를 얼마동안 사용할 수 있는지를 알아보기 위하여 4°C에서 0.1 M 인산 완충용액에 30일간 냉장보관하면서 사용횟수에 따라

센서의 감응도의 변화를 관찰하였다.

피르브산 센서 : Fig. 21과 같이 효소를 고정화한 처음보다는 8일째 가장 높은 활성을 보이다가 차츰 감소하였으며, 초기의 활성을 오랫동안 유지하여 30일이 지나도 초기 감응도의 84% 정도가 유지되었고, 이 때 사용횟수는 250회 정도였다.

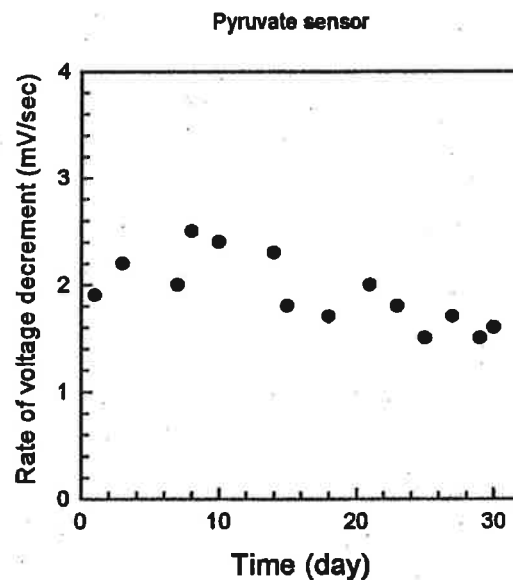


Fig. 21. Stability of pyruvate sensor.

알코올 센서 : Fig. 22와 같이 효소를 고정화한 처음보다는 3일째 가장 높은 활성을 보이다가 7일째부터 감소하는 경향을 나타내었으며, 초기의 활성은 9일째부터 큰 폭으로 떨어져 저장 20일째에는 최대 활성 시의 21%의 감응도만 효소활성을 나타내었고, 이 후 저장 30일째까지는 활성이 더 이상 감소하지 않았으며 사용횟수는 200회 정도였다.

피르브산과 에탄올의 농도는 고정하고 포도당의 농도를 달리하며 측정하였을 때 피르브산의 농도가 0.5 g/100 mL의 경우 0.507~0.563 g/100 mL 사이의 값으로 나타났으며 표준편차도 0.049 이내로 나타나 다른 성분의 첨가가 측정에 큰 변화를 주지 않는 것으로 나타났다. 에탄올 측정의 경우 0.2% 에탄올이 함유된 시료의 경우 $0.216 \pm 0.026\%$ 로 측정되었다. 에탄올의 함량이 0.6%인 경우 $0.599 \pm 0.046\%$ 이었다. 포도당이나 피르브산을 첨가하면서 측정하였을 때 고정농도인 0.4%에 대하여 0.389~0.453% 사이의 값으로 측정되었다.

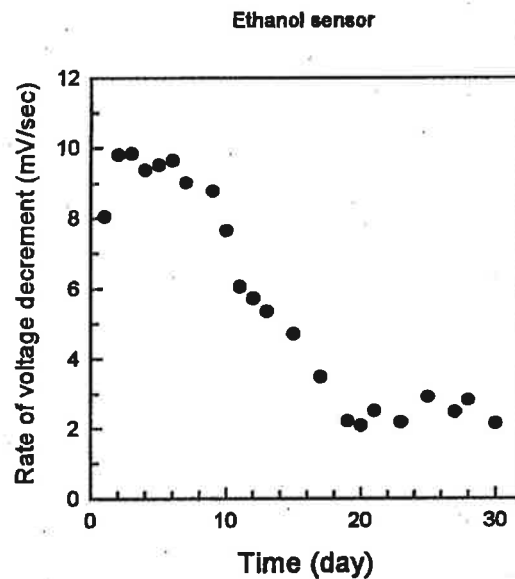


Fig. 22. Stability of ethanol sensor.

8. 식혜의 최적화

식혜 제조공정의 최적화를 행하기 위하여 바이오센서를 활용하였다. 일반적인 성분의 분석은 기존의 방법을 활용하였고 포도당과 맥아당이 주요 인자로서 당 분석 시 두 가지 성분의 동시 분석을 위하여 활용되었다

가. 물의 온도

엿기름 추출 시 물의 온도는 40℃, 50℃ 중 β -amylase의 활성이 높은 40℃로 정하였다 (Fig. 23)

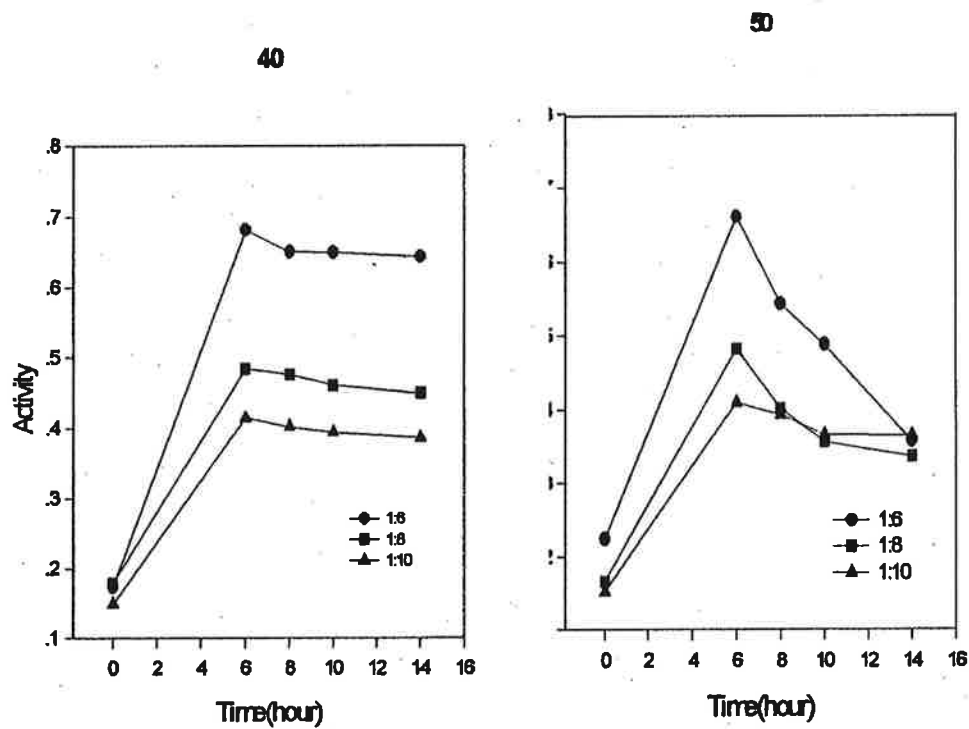


Fig. 23. β -Amylase activity of sikhe.

나. 추출시간, 엿기름과 물의 비율

추출시간은 엿기름과 물의 비율이 1:6, 1:8, 1:10일때 모두 β -amylase 활성이 더 이상 증가하지 않는 4시간으로 정하였다. 그리고, 1:6의 비율인 경우 효소활성이 가장 높았기에 엿기름과 물의 비율은 1:6으로 결정하였다 (Fig. 24).

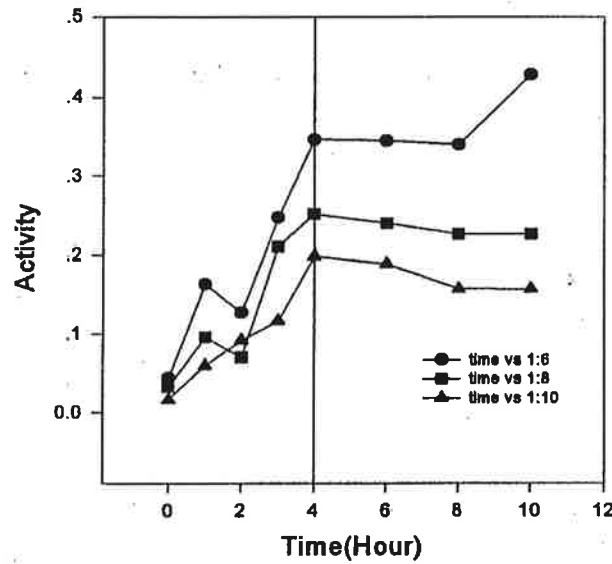


Fig. 24. β -Amylase activity of sikhe.

다. 쌀의 종류

참쌀과 멥쌀 중에서 당도계로 측정했을 때 참쌀의 당도가 높았다 (Table 14).

Table 14. Brix of *sikhe*

물: 밥의 양	당도 (Brix)	
	참쌀	멥쌀
1: 0.65	20.0	17.5
1: 0.50	17.5	16.1
1: 0.40	17.6	14.0
1: 0.30	13.8	13.7
1: 0.25	11.9	10.1
1: 0.20	11.6	8.7

라. 밥의 양

1) 당도

당도는 식혜물과 밥의 비율이 높아짐에 따라 증가하는 경향을 보여서 참쌀, 멥쌀 식혜 모두 1:0.65 비율의 식혜가 당도가 가장 높았다.

2) 탁도

탁도 역시 당도와 마찬가지로 밥의 비율이 높아짐에 따라 탁도가 높아졌는데 참쌀 1:0.3 비율의 식혜가 다른 것에 비해 값이 현저히 낮았고 멥쌀 식혜는 참쌀 식혜에 비해 모두 탁도가 낮은 것으로 나타났다. 1:0.2 비율의 멥쌀 식혜만이 같은 비율의 참쌀 식혜와 비슷한 탁도를 보였다 (Table 15).

Table 15. Turbidity of *sikhe* at various ratio of water and cooled rice

탁도 (NTU)		
식혜물:밥의양	참쌀	멥쌀
1:0.65	174	101
1:0.50	117	95
1:0.30 1:0.40	30 96	27 30
1:0.25	82	24
1:0.2	65	56

3) pH

pH는 앞의 일반 성분의 결과와 같이 식혜물과 밥의 양의 비율에 따라 점차 증가하는 것과는 약간 다른 경향을 보였다 (Table 16). 참쌀 식혜에서는 밥의 양과 상관없이 대부분 비슷한 pH를 보였고 단지 1:0.4의 비율에서만 약간 높았으나 1:0.65 비율의 식혜가 pH가 가장 높았다. 멥쌀 식혜에서는 1:0.25, 1:0.4 비율의 식혜가 다른 비율보다 약간 높았으나 참쌀 식혜에서와 마찬가지로 1:0.65 비율의 식혜의 pH가 가장 높았다.

4) 색도

색도는 참쌀 식혜와 멥쌀 식혜가 비슷한 경향을 보였다 (Table 17). 먼저 L (명도)은 멥쌀 식혜의 1:0.4 비율이 약간 높은 것을 제외하고는 비슷했고 a (적색도)는 참쌀 식혜의 경우엔 밥의 양이 많은 것이 색도가 높았지만 멥쌀 식혜의 경우엔 그렇지 않았다. 1:0.5 비율만이 다른 것보다 a값이 높았고 나머지는 -값으로 초록색에 가까운 것으로 나타났다. b (황색도)

Table 16. pH of *sikhe* at various ratio of water and cooled rice

식혜물:밥의양	pH	
	참쌀	멥쌀
1:0.65	4.17	4.53
1:0.50	3.98	4.09
1:0.40	4.07	4.37
1:0.30	3.95	3.93
1:0.25	3.99	4.27
1:0.20	3.95	3.94

Table 17. Color of *sikhe* at various ratio of water and cooled rice

식혜물: 밥의 양	참쌀			멥쌀		
	L	a	b	L	a	b
1:0.65	26.75	+0.08	+0.36	27.57	-0.06	+0.58
1:0.5	27.16	+0.05	+0.24	26.46	+0.03	+0.42
1:0.4	28.04	-0.03	+0.17	30.20	-0.17	-0.07
1:0.3	31.56	0.00	-0.97	30.94	-0.10	-0.65
1:0.25	28.90	+0.02	+0.32	27.47	-0.01	+0.89
1:0.2	31.20	-0.10	+0.02	30.84	-0.16	-0.74

는 멍쌀 식혜가 찹쌀 식혜보다 높았고 1:0.3 비율의 식혜에서는 양쪽 식혜 모두 -값으로 청색쪽에 가까웠다. 그리고, 1:0.2 비율의 식혜에서도 찹쌀 식혜는 +값, 멍쌀 식혜는 -값으로 나타나 같은 비율로 식혜를 담아도 색 차이가 있음을 알 수 있었다.

마. 바이오센서에 의한 당분석

1) 찹쌀 식혜

Maltose는 0.36~6.68%로 다른 당에 비해 비교적 높았다. 그리고, 밥의 양이 가장 많은 1:0.65 비율의 식혜에서 가장 높은 6.68%를 나타냈다. Glucose는 각 비율에 따라 0.26~1.081%의 함유율을 보였는데 1:0.25 비율의 식혜가 1.081로 다른 것에 비해 높았을 뿐 나머지는 큰 차이가 없었다. Fructose는 0.06~0.33%가 함유된 것으로 나타났고 1:0.25 비율의 식혜에서만 0.33%로 가장 높은 비율을 보였는데 이것은 멍쌀 식혜에서도 동일했다.

2) 멍쌀 식혜

Maltose는 2.17~10.4%를 나타냈는데 이는 찹쌀 식혜의 최고 %인 1:0.65에서 보여준 6.68%보다 훨씬 높은 값이었다. 찹쌀과 마찬가지로 10.4%는 밥의 양이 가장 많은 1:0.65인 식혜에서 나타났다. 이로 인해 찹쌀과 멍쌀 모두 밥의 양이 가장 많은 비율의 식혜가 맥아당 함량이 높은 것을 보면 밥의 양과 맥아당 생성이 긴밀한 관계가 있음을 알 수 있었다. Glucose는 0.46~0.89%로 1:0.25 비율에서 0.89%로 많은 차이는 아니지만 다른 것과의 차이를 나타냈다. Fructose는 찹쌀 식혜와 비슷한 0.11~0.35%의 함량을 보였고 찹쌀 식혜에서의 경향과 같이 1:0.25에서의 함량이 0.35%로 가장 높았다.

결론적으로 식혜의 최적화는 1:6의 엿기름과 물의 추출 비율에서 40℃의 물로 4시간 동안 엿기름을 추출한 후 찹쌀을 이용하고 식혜물과 밥의 양을 1:0.65 비율로 하여 식혜

를 만들었을 때가 최적조건이었으며 이를 바이오센서를 이용하여 측정할 수 있었다. 추 후 본 실험에서 얻어진 결과를 토대로 response surface methodology에 의한 분석을 시도할 예정이다.

제 4절 참고문헌

- Adamowicz, E. and Burstein, C. : L-Lactate enzyme electrode obtained with immobilized respiratory chain from *Escherichia coli* and oxygen probe for specific determination of L-lactate in yogurt, wine and blood, *Biosensors*, 3, 27 (1987)
- Appelqvist, R. and Hansen, E.H. Determination of glucose in fermentation processes by means of an on-line coupled flow injection system using enzyme sensors based on chemically modified electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 235, 265 (1990)
- Barker, S.A. and Somers, P.J. : Enzyme electrodes and enzyme based sensors, In *Topic on Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Weiseman, A. (Ed.), Vol. 2, Ellis Horwood Limited, New York, p.120 (1987)
- Bowers, L.D. and Carr, P.W. : Immobilized enzyme in analytical chemistry, *Adv. Biochem. Eng.*, 15, 89 (1980)
- Clark, L. and Lyon, C. : Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 102, 29 (1962)
- D'Costa, E.J. : Rapid prediction of banana first maturation using a glucose biosensor, *Analyst*, 113, 225 (1988)
- Guilbault, G.G. : Immobilized enzymes as analytical reagents, *Appl. Biochem., Biotechnol.*, 7, 85 (1982)

- Haginoya, R., Suzuki, M., Tamiya, E. and Karube, I. Development of a needle type biosensor for analysis of sugars in fruits. Nestle' Meeting on Biosensor, Nestle' Research Centre, Lausanne, Swizerland, 70 (1992)
- Jobst, G., Moser, I., Svasek, P., Varahram, M. and Urban, G. : Application of miniaturized liquid handling system with integrated biosensor array for milk analysis, *Proceeding of the 8th International Conference on Solid State Sensor and Actuators*, Euro sensor IX, p.473 Stockholm, Sweden, Jun. 25 (1995)
- Kang, S.J., Kim, J.H., Park, I.S. and Noh, B.S. : Determination of L-ascorbate in foods with plant tissue based membrane electrode, *Food Biotechnol.*, 2, 146 (1993)
- Kierstan, M.P.J. and Coughlan, M.P. : Immobilization of cells and enzymes by gel entrapment, In *Immobilized Cells and Enzymes : A Practical Approach* (Woodward, J., Ed.) p.39, IRI Press, Oxford (1985)
- Kim, J.H., Kang, S.J., Park, I.S., Park, S.O., and Noh, B.S. : Application of L-ascorbate oxidase electrode and dissolved oxygen meter for specific determination of L-ascorbate in food sample, *센서기술 학술대회논문집*, 4, 231 (1993)
- Kim, N., Hahinoya, R. and Karube, I. : Characterization and food application of an amperometric needle-type L-lactate sensor, *J. Food Sci*, 6, 286 (1996)
- Lee, Y.C. and Lee, S.H. : A Glutamate oxidase-based Biosensor for the Determination of Glutamate, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29, 6 (1997)
- Luong, J.H.T., Mulchandani, A. and Male, K.B. Development of a substrate recycle amplification system for L-glutamic acid assay. *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 116 (1991)
- Mason, M. : Ethanol determination in wine with an immobilized enzyme electrode, *Am. J. Enol. Vitic.*, 34, 173 (1983a)
- Mason, M. : Ethanol determination via immobilized enzyme , *ASBC J.*, 41, 89 (1983b)

- Masoom, M. : Immobilized enzymes in clinical and biochemical analysis. Application to the simultaneous determination of acetylcholine and choline and to determination of lipids, *Anal. Chim. Acta*, 214, 173(1988)
- Matsumoto, K., Kamikado, H. and Osajima, Y. : Simultaneous determination of glucose, fructose, and sucrose in mixtures by amperometric flow injection analysis with immobilized enzyme reactors, *Anal. Chem.*, 60, 147 (1988)
- Matsumoto, K., Matsubara, H., Ukeda, H. and Osajima, Y. : Simultaneous determination of glucose, ethanol and lactate in alcoholic beverages and serum by amperometric flow injection analysis with immobilized enzyme, *J. Biotechnol.*, 14, 115 (1990)
- McFarlane, I. : In *Automatic Control of food Manufacturing Process*, Applied Science Publishers, London (1983)
- Morishita, F., Nishikawa, Y. and Kojima, T. : Simultaneous determination of three species by flow injection analytical method using enzyme immobilized open-tubular reactors, *Anal. Sci.*, Tokyo, 2, 411 (1986)
- Park, I.S., Kim, J.H., Kim, T.J., and Noh, B.S. : Determination of lactose in milks by multiple enzyme electrode, *Food Biotechnol.*, 4, 61 (1995)
- Park, I.S., Kim, J.H. Kim, S.J. and Noh, B.S. : Determination of L-lactic acid in foods with enzyme electrode, *Food Biotechnol.*, 1, 12 (1992)
- Schmidt, H.L. and Kittsteiner-Eberle, R. : Biosensoren, *Naturwissenschaften*, 73, 314 (1986)
- Scott, A.O. and Robertson, A. : Biosensors—a novel technique for quality control, *Laborat. Pract.*, 7, 35 (1985)
- Swindlehurst, C.A. and Nieman, T.A. : Flow injection determination of sugars with immobilized enzyme reactors and chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta*,

205, 195 (1988)

Woodward, J. (Ed.) : In *Immobilized Cells and Enzymes : A Practical Approach*
(Woodward, J., Ed.), IRL Press, Oxford (1985)

Yao, T., Kobayashi, N. and Wasa, T. Flow-injection analysis for L-glutamate using
immobilized L-glutamate oxidase : Comparison of an enzyme reactor and enzyme
electrode. *Anal. Chim. Acta*, **231**, 121 (1990)

김의락, 박창규 : 요소정량을 위한 biosensor의 개발, *계명대학교 기초과학연구소 연구논문집*
이영춘, 吉岡俊彦과 南海史朗. 일회용 바이오센서에 의한 식품분석, *食品工業*, **37**, 29 (1994)

인권식, 김인탁, 유광식 : Glucose 정량을 위한 yeast 및 그의 organelles 바이오센서에 관한
연구, *분석화학*, **3**, 179 (1993)

조성효 : CTA membrane을 이용한 asparagine과 adenosine 및 creatine biosensor의 개발,
한국화학공학회 추계논문 초록, p.118 (1990)

조성효, 김혜정, 장동호, 박세영, 정애련 : Sinigrin biosensor의 개발, *한국식품과학회 춘계
학술발표회 초록*, p.2, 한림대학교, 5월22일 (1993)

조성효, 박행례, 박혜령 : Glucose oxidase를 고정화한 효소전극에 의한 glucose의 분석,
한국공업화학회 추계 논문초록 (1992)

제 5 장

바이오센서의 컴퓨터 접속시스템 개발

(신구대학)

여 백

제 1절 서 설

식품가공 공정은 원료의 전처리, 가공 공정이 대부분 회분식으로 이루어지는 특징을 갖고 있다. 즉, 가공장치에 원료가 투입되고 반응이 진행되어 일정시간 경과 후에 제품화된다. 제품은 하나의 단위 공정에서 이루어 질 수도 있지만 대부분 여러 공정을 거쳐 제품화되며 생산성과 품질은 각 공정의 상태에 따라서 결정된다.

일반적으로 공정의 관리는 각종 sensor로써 측정된 자료를 바탕으로 공정의 진행을 monitoring하고 그 결과에 따라 valve의 개폐 등 제어를 통하여 이루어진다. 따라서 식품공정의 자동화는 공정의 측정과 제어기술이 식품가공기술과 결합될 때 그 효력을 발휘할 수 있다. 식품 산업은 원료비가 높고, 노동력이 크게 요구되며, 기능직 기술자의 필요성이 큰 것은 자동화의 필요성을 대변하는 것이며, 식품 제조공정에 관여하는 변수와 인자가 많아 자동화 방식에서 고도의 자동화기술이 필요하다⁽¹⁾.

바이오센서는 사용이 간편한 동시에 측정의 신뢰성이 우수하고 별도의 시료처리과정 없이 직접측정이 가능한 장치로서 휴대화, 미소화할 수 있으며, 개발된 바이오센서에 컴퓨터를 접속하여 자료의 수집, 분석, 검정 작업과 식품가공 공정제어에 활용하여 식품 및 식품원료의 신속정확한 품질평가와 이를 가공하는 식품공정의 최적화를 달성할 수 있다.

바이오센서는 기질 특이성에 따른 특정성분만의 분석이 용이하고 기존의 기기분석에서의 방법보다는 분석시간이 짧아 생산공정 중에 시료의 변화를 빨리 측정할 수 있다는 이점이 있다^(2,3). 따라서 센서자체의 개발과 더불어 센서에서 얻어진 신호를 컴퓨터에 접속하여 자료의 수집과 분석을 자동화하는 것이 필수적이며, 수집된 자료에 따른 공정 자동화는 중요성이 클 것으로 사료된다.

바이오센서 개발 시의 필요한 기술사항들 중에서 센서성능 최적화기술, 센서의 공정 자동화에 활용 등은 PC 시스템화가 필수적이다. 바이오센서는 측정환경 요소인 온도와

pH 등에 민감하게 영향을 받는다. 따라서 이들 요소를 컴퓨터로 자동제어함으로 정확한 측정값을 얻을 수 있다. 바이오센서의 측정치는 측정농도와 직선적인 상관관계를 보이지 않는 경우가 많은데, 이를 보정할 수 있는 선형 근사화식을 도입하면 측정과 동시에 측정 농도를 검정할 수 있게 된다. 필요한 공정제어 변수의 목표치를 설정해두면 공정의 되먹임 제어가 가능하여 공정을 자동화 할 수 있다. 공정 진행과정을 monitor를 통하여 계속적인 관찰이 가능하게된다⁽⁴⁾.

제 2절 재료 및 방법

개발된 각종 바이오센서를 컴퓨터에 접속하여 자료의 수집, 분석 및 검정 시스템을 구축하고 이를 식품선별 및 실험실 규모의 식품 가공공정에 적용하여 공정 자동화를 달성하도록 필요한 hardware적 요소와 software를 개발하였다.

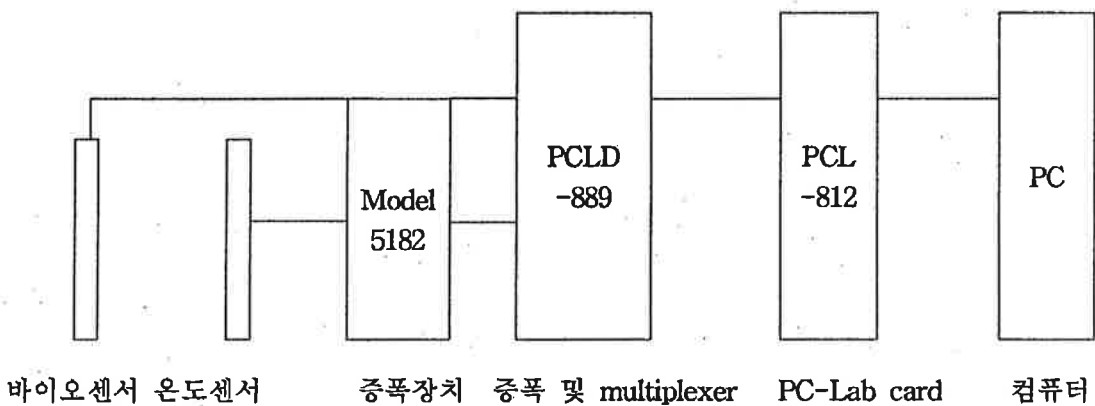
바이오센서의 전극으로 활용되는 산소전극과 과산화수소전극을 이용한 식품의 품질 평가 및 생산공정에서의 활용에 필요한 개발된 전극을 측정조건에서 측정된 신호를 컴퓨터에 접속한다. 접속장치를 통해 얻어진 자료를 컴퓨터에 저장하고 분석하여 식품의 품질평가에 활용하도록 한다. 또한 식품 공정제어에 활용할 수 있도록 측정값에 따른 조 작단을 작동하여 공정의 자동제어에 활용하도록 system을 구축하며 이를 작동하기 위해 필요한 일련의 program을 작성한다.

본 연구에서는 특히 바이오센서에서 얻어지는 미세한 전류신호를 증폭하여 컴퓨터에서 처리 가능한 수준의 신호로 변환하여 안정된 측정값을 얻을 수 있도록 장치를 구성하여야 한다. 또한 공정의 여러 요소의 설정된 목표치를 유지하기 위한 외부장치의 작동이 필요하다. 이와 같은 일련의 장치의 구성을 시도하였다.

1. 바이오 센서의 컴퓨터 접속 시스템 구성

가. 컴퓨터 접속 시스템의 Hardware적 구성

바이오센서의 전극으로 활용되는 산소전극과 과산화수소전극을 이용한 식품의 품질 평가 등에 활용가능하도록 개발된 전극의 측정조건에서 얻어지는 측정신호를 컴퓨터에 입력하기 위한 시스템을 다음 그림과 같이 구성하였다.



바이오센서에서 얻어지는 신호는 수 nA의 아주 미세한 전류 수준이다⁽⁶⁾. 이 전류값은 컴퓨터에 직접 입력시킬 수 없는 신호로 증폭이 필요하다. 미소전류는 noise 등에 영향을 받기 쉽고 신호의 안전성이 문제가 된다.

따라서 본 연구의 신호 증폭장치는 EG & G Instruments사의 Model 5182 preamplifier를 구입하였다. 이 증폭장치의 최대 이득은 10^{-8} A/V로 10 nA를 1 V로 전환할 수 있는 능력이 있으며, 신호의 noise를 제거할 수 있고, 5 가지의 선택 스위치가 있다 (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} A/V). PCLD-889인 증폭 및 multiplexer는 조작이 가능한 8 단계의 증폭 (0.5, 1, 2, 10, 50, 100, 200, 1000)이 가능하고, 16 개의 측정신호를 입력할 수 있는 analog 입력 port가 있다. 또한 냉점 보상회로가 있어, 5 종류의 thermocouple (T, J, E, K, R, S)을 직접 연결하여 software적으로 처리하여 온도를 측정할 수 있다.

본 연구에서는 T type의 thermocouple을 이용하였다.

다음으로 증폭된 신호는 컴퓨터에 입력하기 위하여 analog 신호를 digital 신호로 전환하고, 입력된 측정값과 제어하려고 하는 컴퓨터에서 설정치에 맞추어 주기 위하여 컴퓨터에서 신호를 내어 보내어 relay나 motor를 구동할 수 있는 접속장치가 필요하다⁽⁶⁾. 본 실험에서는 Advantech사에서 구입한 접속 card (model PCL-812)를 사용하였다. 이 접속 card는 12bit A/D 전환기 (HADC 574Z), 16개의 analog 입력 채널과 analog 출력으로 사용 가능한 2개의 채널이 있고, 16개의 digital 입력 채널과 16개의 digital 출력 채널이 갖추어져 있다⁽⁷⁾.

나. 컴퓨터 접속시스템 운영 program

앞에서 구성된 접속장치를 활용하기 위해서는 이를 운영할 program이 필요하다. Advantech사의 Genie 3.0 program을 구입하여 신호의 측정 및 저장, 공정제어와 자료분석이 가능한 source program으로 사용하였다⁽⁸⁾. Genie 3.0 Das program을 활용하여 바이오센서에서 얻어진 수 nA의 신호가 증폭기를 거쳐 0~5 V의 신호로 전환되고, 증폭 및 multiplexer를 통하여 각 채널에 산소전극을 이용한 바이오센서의 반응기간 동안 반응조의 온도를 측정하고, 1초 마다 측정 신호를 컴퓨터에 입력 저장할 수 있도록 하고, 저장된 data를 Excel program으로 자료를 그래프로 출력하였다.

2. Glucose 바이오센서 시스템을 활용한 실험실 규모의 포도당 생산공정 자동화

실험실 규모의 포도당 생산공정의 자동화 시스템을 개발하기 위해 전분을 분해하는 반응조를 설치하여 옥수수 전분을 호화시켜 α -amylase (Brewers Diase, Gist-Brocades 사 제품)로 분해하였다. 일정시간 간격으로 일정량의 분해산물과 7 mL의 0.1 M 인산 완충용액을 혼합하여 측정조에서 glucose 농도를 측정하였다. 이때 glucose 바이오센서

는 galvanic형인 산소전극 (ABLE사, BO-G type)을 사용하였다. Sigma사 (MO, USA)의 glucose oxidase (180 units/mg solid)를 Immobilon cellulose nitrate 막 (pore size, 0.4 μ m)에 흡착시킨 후, 산소전극의 작용극인 platinum cathode에 밀착시켜 제작하였다⁹⁾.

Glucose 바이오센서에서 측정된 포도당 농도는 일정한 시간간격으로 컴퓨터에 의해 자동으로 측정값이 컴퓨터에 입력되고, 실시간으로 컴퓨터 화면에 숫자와 그래프로 나타나게 하고, 측정조, 반응조의 조작변수와 측정변수가 컴퓨터에 자동기록되게 Adventech사의 Genie 3.0을 source program으로 하여 응용 program을 만들었다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 바이오센서의 컴퓨터 접속시스템 구성

가. 컴퓨터 접속시스템의 hardware적 구성

바이오센서의 전극으로 활용되는 산소전극과 과산화수소전극을 이용한 식품의 품질 평가 등에 활용가능하도록 개발된 전극의 측정조건에서 얻어지는 측정신호를 컴퓨터에 입력하기 위한 시스템을 구성하였다.

바이오센서에서 얻어지는 신호는 nA 수준의 아주 미세한 전류이다. 이 전류 값은 컴퓨터에 직접 입력시킬 수 없는 신호이므로 증폭이 필요하다. 미소전류는 noise 등에 영향을 받기 쉽고 신호의 안정성이 문제가 된다. 따라서, 본 연구에서는 신호 증폭장치로 안정성이 우수한 EG&G사 (NJ, USA)의 model 5182 pre-amplifier를 사용하였다. 이 증폭장치의 최대 이득은 10^{-8} A/V로 10 nA를 1 V로 전환할 수 있는 능력이 있으며, 신호의 noise를 제거할 수 있고 5가지의 선택 스위치가 있다 (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} A/V).

PCLD-889인 증폭 및 multiplexer는 8단계의 증폭 (0.5, 1, 2, 10, 50, 100, 200, 1000)

이 가능하고, 16개의 측정신호를 입력할 수 있는 analog 입력 port가 있다. 또한, 냉점 보상회로가 있어 6 종류의 thermocouple (T, J, E, K, R, S)을 직접 연결하여 software 적으로 처리하여 온도를 측정할 수 있다. 본 연구에서는 T type thermocouple을 이용하였다.

다음으로 증폭된 신호는 컴퓨터에 입력하기 위하여 analog 신호를 digital 신호로 전환하고, 입력된 측정값과 제어하려고 하는 컴퓨터에서 설정치에 맞추어 주기 위하여 컴퓨터에서 신호를 내어 보내어 relay나 motor 등을 구동할 수 있는 접속장치가 필요하다. 본 실험에서는 Advantech사 (Taiwan)에서 구입한 접속 card (model PCL-812)를 사용하였다. 이 접속 card는 12bit A/D 전환기 (HADC 574Z), 16개의 analog 입력 채널과 analog 출력으로 사용가능한 2개의 채널이 있고, 16개의 digital 입력 채널과 16개의 digital 출력 채널이 갖추어져 있다.

나. 컴퓨터 접속 시스템 운영 program

앞에서 구성한 접속장치를 활용하기 위해서는 이를 운영할 program이 필요하다. Advantech사의 Genie 3.0 program을 구입하여 신호의 측정 및 저장, 공정제어와 자료분석이 가능한 source program으로 사용하였다. Genie 3.0 Das program을 활용하여 바이오센서에서 얻어진 수 nA의 신호가 증폭기를 거쳐 0~5 V의 신호로 전환되고, 증폭 및 multiplexer를 통하여 각 채널에 산소전극을 이용한 바이오센서의 반응기간 동안 반응조의 온도를 측정하고, 1초 마다 측정 신호를 컴퓨터에 입력 저장하고, 저장 data를 Excel program을 사용하여 그래프로 출력하였다.

다. 산소전극의 안정성 확인 및 측정시험

1차년도 실험으로부터 정립된 Immobilon cellulose nitrate 막 (Sigma사)을 사용하여 흡착법에 의하여 효소를 고정화한 후 산소전극에 효소고정화막을 장착하여 바이오센서 시스템을 구성하였다. 즉, Sigma사의 xanthine oxidase (0.066 units/mg solid) 5 units를

150 μl 의 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5)에 용해시킨 후 Immobilon cellulose nitrate 막을 가하여 효소 고정화를 행하였다. 효소가 고정화된 막을 gas 투과성 Teflon 막에 밀착시키고 그 위에 투석막을 씌운 후 전체를 O-ring으로 고정시켜 hypoxanthine 센서를 제조하였다. 이렇게 하여 제조한 바이오센서의 hypoxanthine에 대한 응답치를 batch 시스템에서 1초에 한 번씩 컴퓨터 기억장치에 저장시켰다. 저장된 실험 자료는 표의 형태로 출력할 수 있고 또한 그래프로도 작성할 수 있다. Fig. 1은 hypoxanthine 센서에 30°C에서 120.8, 195.9, 267.2, 301.4 μM 농도의 hypoxanthine을 첨가하였을 때 7분 동안의 반응결과를 그래프로 나타낸 것이며 이 때 반응의 80%는 3분내에 일어났다. 따라서, hypoxanthine 센서는 감응성이 높고 정상상태 (steady-state)에 도달하는 시간이 짧아 컴퓨터 접속시스템을 활용하면 실시간 시료의 분석이 가능하다는 결론을 얻었다. Hypoxanthine 센서에 의한 계측 시의 분석치에 대한 변이계수가 아주 낮게 나타나 높은 재현성을 보여 주었으며 Fig. 1에서 보는 바와 같이 각각의 농도에서 초기 반응속도의 기울기는 농도에 따라 차이를 보여 주었다. Fig. 2는 hypoxanthine 센서를 30°C에서 2.94 μM 용액 100 μl 씩을 7 mL 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5) 반응조에 일정한 시간 간격으로 첨가했을 때의 전류감소현상을 컴퓨터에 입력하여 저장하고 이를 Excel program을 이용하여 그래프로 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 기질 첨가에 따른 전류 감소현상은 0.2 μA 까지는 거의 등간격 감소를 보여 xanthine oxidase의 작용으로 소비되는 용존산소의 양은 기질의 양에 직선적으로 비례함을 볼 수 있어 실제의 어육 및 축육의 선도를 측정하는 좋은 지표로 활용할 수 있음을 알 수 있었다.

Fig.1. Current-time recording of the responses of the Hypoxanthine Oxidase Biosensor on the different Hypoxanthine concentrations

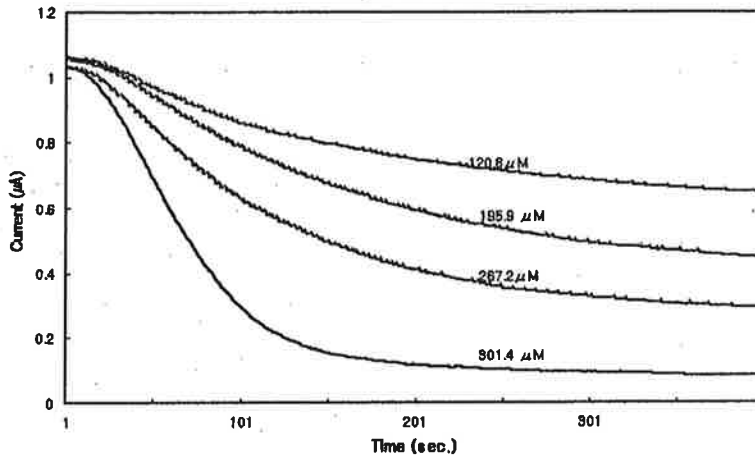
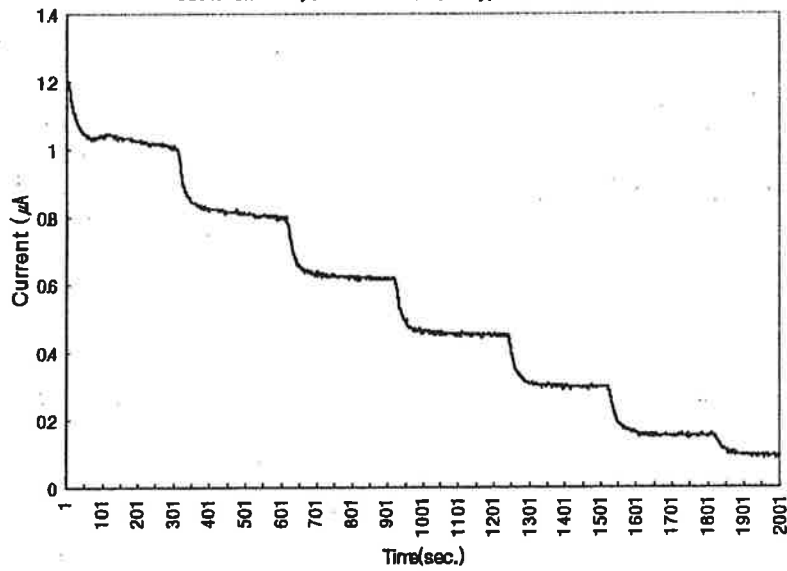


Fig2 Current response of Hypoxanthine Biosensor. The enzyme electrode was immersed into the water-jacketed glass vessel (30 ± °C) filled with 7ml of 0.05 M phosphate buffer. A successive 100 μl addition of 294 μM hypoxanthine was done



라. 바이오센서 반응의 온도의존성

Hypoxanthine 센서의 온도에 따른 반응특성을 살펴보기 위하여 10, 20, 30, 40℃ 등의 온도에서 응답특성을 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5)을 사용하여 측정하였다 (Fig. 3). 온도가 높을수록 초기 전류 값이 높게 나타났는데 이는 산소전극에 적용한 효소의 반응온도에 대한 특성으로 여겨진다. Fig. 4는 각각 다른 온도에서 일정시간 (5분)동안 hypoxanthine을 첨가하였을 때 나타나는 전류감소현상을 컴퓨터 접속시스템을 활용하여 측정한 실험결과이다. 이 때, 7.34 mM 농도의 hypoxanthine 40 μ l씩 첨가하였다. 40℃의 경우 초기전류는 높게 나타났으나 기질 첨가에 따른 전류 감소값은 0.1 μ A 정도의 값을 보였으며, 30℃에서는 0.14 μ A였고, 20℃에서는 0.11 μ A, 10℃에서는 0.05 μ A로 나타나 30℃ 부근에서 반응이 가장 활발함을 알 수 있었다.

Fig. 3. Effects of the temperature on the response of the Hypoxanthine Biosensor.

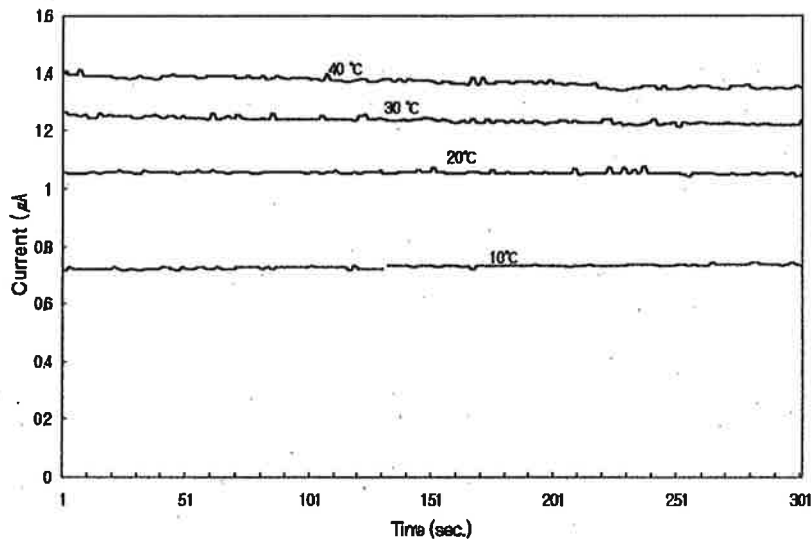
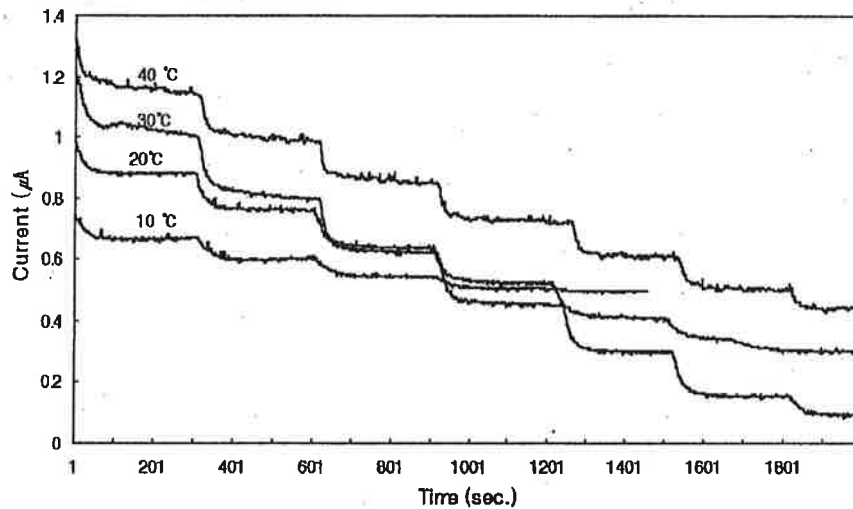


Fig.4. Effect of temperature on the response of the Hypoxanthine Biosensor. The enzyme electrode was immersed into the water-jacketed glass vessel filled with 7ml of 0.05 M phosphate buffer . A successive 40 μ l addition of 7.34mM hypoxanthine was done



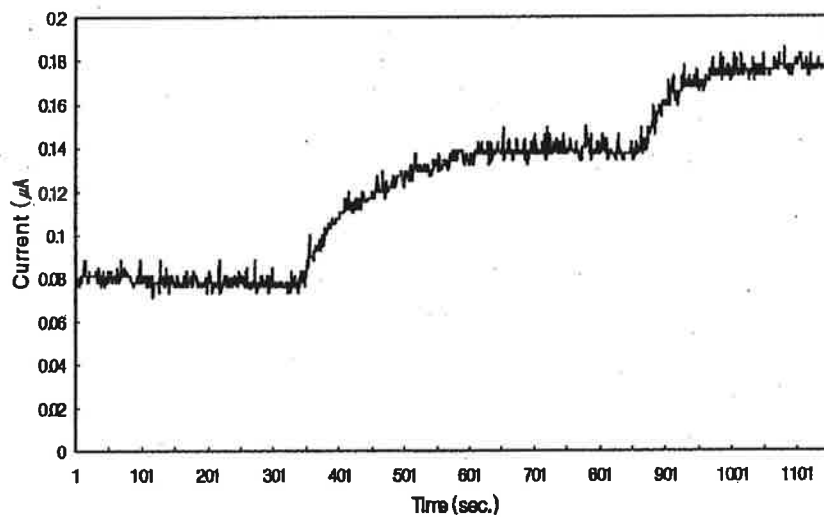
마. 과산화수소전극의 안정성 확인 및 측정시험

Immobilon cellulose nitrate 막을 사용하여 흡착법에 의하여 효소를 고정화하여 바이오센서 시스템을 구성하였다. 즉, Sigma사의 xanthine oxidase (0.666 units/mg solid) 5 units를 150 μ l의 0.05 M 인산 완충용액 (pH 7.5)에 용해시킨 후 Immobilon cellulose nitrate 막을 가하여 효소고정화를 행하였다.

효소가 고정화된 막은 과산화수소전극에 밀착시키고 그 위에 투석막을 씌운 후 전체를 O-ring으로 고정시켜 hypoxanthine 센서를 제조하였다. 제조된 센서에 초기 전압을 650 mV로 걸어 주고 7.34 mM의 hypoxanthine 40 μ l를 0.05 M 인산 완충용액 7 mL가 채워져 있는 반응조에 첨가하면서 일어나는 전류를 컴퓨터 접속시스템으로 자료 수집 후 기억장치에 저장하였고 Excel program으로 그래프로 작성하여 Fig. 5와 같은

결과를 얻었다. 기질을 첨가하지 않는 상태에서 $0.06 \mu\text{A}$ 의 전류값을 보였고 기질을 첨가하면 약 $0.03 \mu\text{A}$ 정도의 전류치 증가를 나타내었다.

Fig.5. Current response of the Hydrogen Peroxide Biosensor on the successive injection of Hypoxanthine (7.34mM , $40\mu\text{l}$)



2. Glucose 센서를 이용한 포도당 생산공정의 자동화

가. 실험실 규모의 컴퓨터 공정제어 시스템의 hardware적 구성

포도당 생산공정의 자동화를 위해 전분의 분해과정 중에 생성되는 포도당의 농도를 자동측정하기 위하여 옥수수 전분을 호화시킨 후 α -amylase를 작용시켜 액화시키고 glucoamylase를 작용시켜 포도당을 생성하는 일련의 반응을 행하는 반응조를 만들고 micropump를 작동하게 하여 반응조로부터 일정한 시료가 측정조에 유입되도록 하였다. 이 때, buffer tank에 부착된 solenoid valve가 작동하여 일정 시간마다 0.1 M 인산 완충 용액 (pH 7)가 일정하게 측정조로 흘러들어 glucose 센서에 의해 일정한 시간동안 측정이 실행되어 그 값이 컴퓨터에 입력 저장되게 하였다. 측정이 끝난 측정조의 용액은 측정조에 부착된 solenoid valve가 열려 흘러 버리고 난 후 다시 완충용액이 자동으로 흘러 내려 남은 용액을 씻어내게 하였다. 위의 과정이 반복적으로 일어나 포도당의 농도변화를 자동적으로 측정할 수 있는 장치를 Fig. 6과 같이 설계·제작하였고 Fig. 7은 이에 대한 실물사진이다.

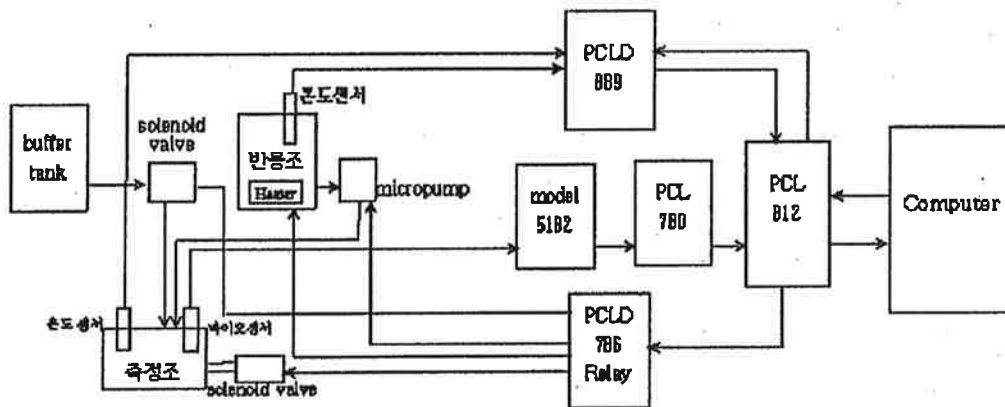


Fig.6. Schematic diagram of the computer-aided autocontrol for the process of the glucose production

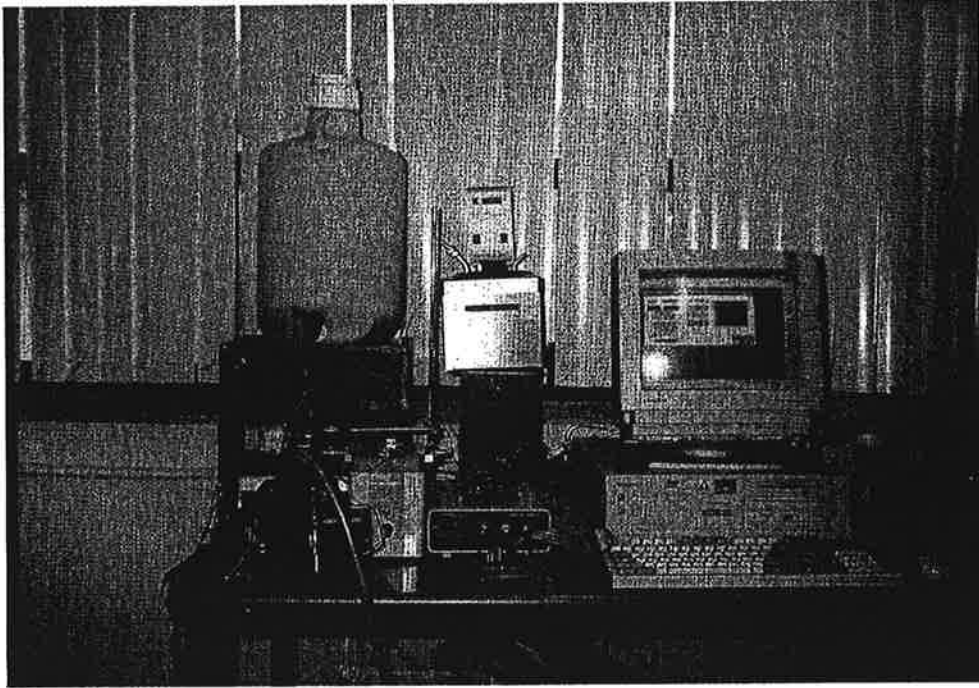


Fig. 7. Photograph of the computer-aided autocontrol for the process of the glucose production

나. Glucose 생산공정의 컴퓨터 공정제어 시스템의 운영 program

앞에서 구성한 컴퓨터 공정제어 시스템을 작동하기 위해 이를 운영할 program이 필요하다. Adventech사에서 Genie 3.0 program을 구입하여 Task Designer로 flow chart를 작성한 것은 Fig. 8과 같다. Visual basic 언어로 되어 있어 tool box에서 필요한 icon을 끌어와 icon끼리 서로 연결하여 필요한 조작이 일어나게 하였다. ET₁은 초단위로 경과 시간을 알려주는 icon이며, PRG₁은 경과시간에 따라 필요한 조작을 할 수 있게 다음과 같이 C 언어로 program을 작성하였다.

t=ET1:

y=t%600:

If ((y>=15) && (y<=20))

{a=1 : output (#1,a) : }

else

{a=0 : output (#1,a) : } //당액

If ((y>=0)&&(y<=9))

{b=0 : output (#2,b) : }

If ((y>=10)&&(y<=12))

{b=1 : output (#2,b) : }

If ((y>=13)&&(y<=550))

{b=0 : output (#2,b) : } //완충용액

If ((y>=550)&&(y<=553))

{b=1 : output (#2.b) : }

If ((y>=554)&&(y<=599))

{b=0 : output (#2,b) : }

If ((y>=1)&&(y<=545))

{c=0 : output (#3,c) : } //vent


```
If ( ( y>=546)&&(y<=549) )
```

```
{c=1 : output (#3,c) : }
```

```
If ( ( y>=549)&&(y<=560) )
```

```
{c=0 : output (#3,c) : }
```

```
If ( ( y>=561)&&(y<=565) )
```

```
{c=1 : output (#3,c) : }
```

위 program은 10분마다 5초간 ONF₂에 작용하여 PCLD 786에 있는 relay를 on하면 buffer tank에 있는 완충용액의 일정량이 측정조에 자동으로 유입되었다. 그 후, ONF₃에 on 신호가 전달되고 일정한 시간 solenoid valve가 작동되어 일정량의 시료를 계속적으로 흘러 보내고 있는 micropump의 배출구에서 반응조의 일정량 시료가 측정조에 자동으로 주입되었다. 이 때, 측정조에 삽입되어 있는 glucose 센서에 의해 증폭장치인 model 5182 증폭기를 통하여 전류 변화량이 10⁶배 증폭되고 이 신호는 PCL 780을 거쳐 PCL-812로 전달되어 digital 값으로 읽혀져 computer의 hard disk에 신호값이 저장되었다. 일정한 시간 측정 후 측정조에 있는 용액은 측정조에 부착된 solenoid valve가 on으로 작동되어 버려지게 되며 측정조를 씻어내기 위해 다시 buffer tank에 붙어 있는 solenoid valve가 on으로 가동되면 측정조에 완충용액이 흘러들어 용기를 씻은 후 측정조의 solenoid valve가 열리면서 씻은 액을 버리도록 하였다. 또한, 반응조의 온도측정은 TMP₁에서 읽혀지며 그 값이 PCL 812를 거쳐 hard disk에 저장되고 ONF₁의 설정 온도 조건에 따라 PCLD 786의 relay가 on-off 작동되므로 일정한 목표온도 값이 유지되게 하였다. 반응조의 pH도 일정한 시간 간격으로 측정하였다. TS₁은 측정시점의 경과시간을 알려주며 온도나 바이오센서의 측정값과 동시에 Genie 3.0의 source program에 존재

하는 display designer로 화면에 측정값을 수치로 나타내거나 그래픽 display를 할 수 있게 program을 작성하였다. 또한, 모든 변수는 hard disk에 저장되어 측정값의 분석 시에 공정 경과 시간에 따른 변화량을 알아볼 수 있었다. 위의 모든 과정은 10분간 일어나는 공정 자동화장치의 작동과정을 기술한 것이며 10분마다 반복적으로 전분의 분해가 진행되는 동안 계속적으로 공정의 자료를 수집할 수 있게 된다. 수집 저장된 자료는 Exel program으로 분석하게 된다.

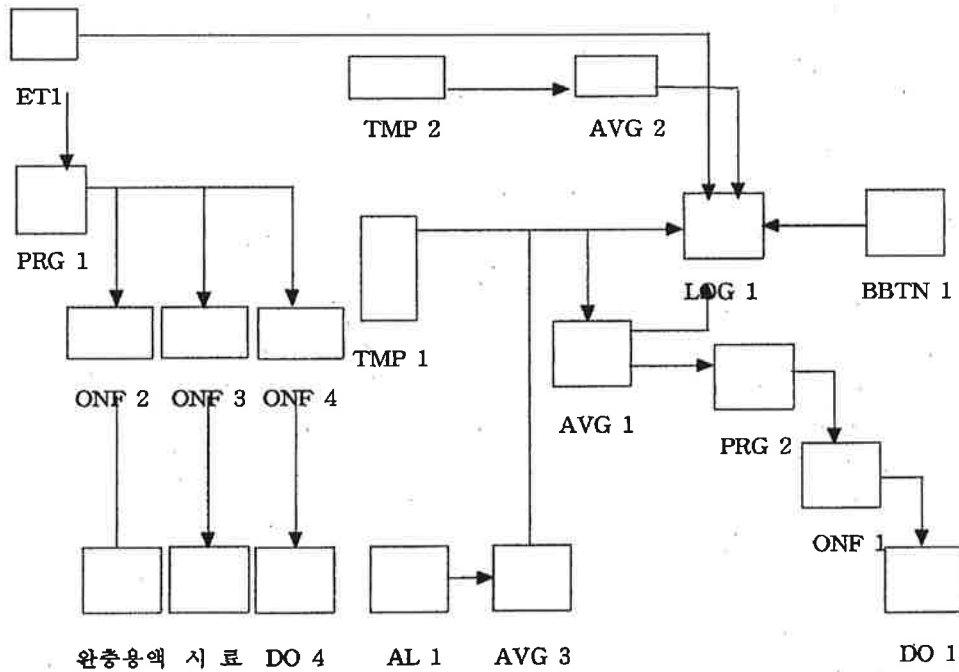
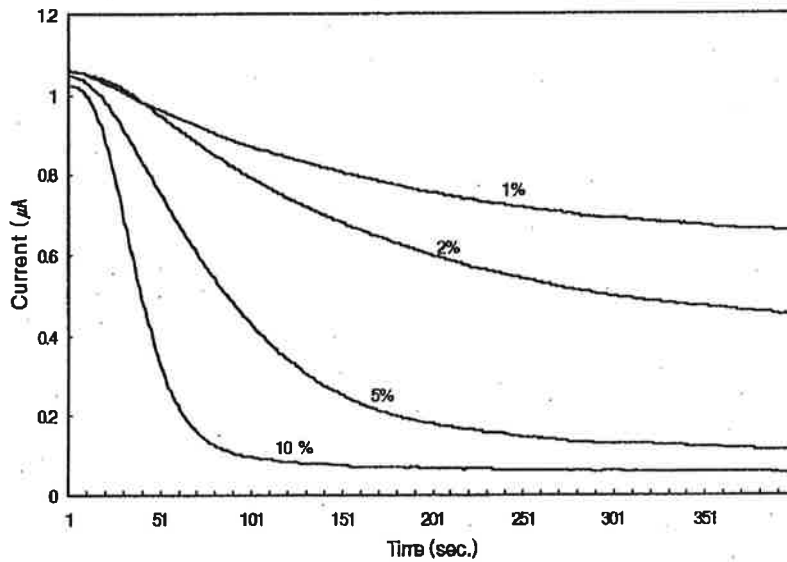


Fig. 8. Flow chart of the computer-aided autocontrol for the process of glucose production.

다. 실험실 규모의 컴퓨터 공정제어 시스템의 운영시험

제작된 공정제어 시스템을 활용하여 일정 농도의 포도당시료를 주입하여 농도변화에 따른 측정치를 분석한 결과 Fig. 9와 같은 결과를 얻었다. 이 때, 반응조건은 7 mL의 0.1 M 인산 완충용액 (pH 7.0)에 농도가 다른 (1, 2, 5, 10%) glucose 용액의 주입에 따른 glucose 센서의 반응특성을 살펴본 것이다. 농도가 높을수록 초기반응에서 급격한 전류강화가 일어남을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 기울기 변화를 측정하거나 최종적인 전류 감소를 측정하여 표준곡선을 얻어 시험 중에 얻어진 자료를 외삽하여 전분 분해 과정 중에 포도당 농도변화를 계측할 수 있을 것이다.

Fig.9 . Current response of the glucose sensor at the different glucose concentration.(10 μ l)



제 4절 참고문헌

1. MacFarlane, I., Automatic control of food manufacturing processes, Applied Science Pub., NY (1983)
2. Ohashi, E. and Karube, I, Sensors for the food industry, *Food Control* 4(4) : 183 (1993)
3. 황규성 편저, *센서 활용 기술*, 기전연구소(1985)
4. Jiang, T.S. , Intelligent computing environment for scientific and engineering applications ; *Mathematics and Computer in Simulation*, 31(6) 1989
5. Kress-Rogers, E. and D'Costa, E.J. Biosensors for the food industry, *Analytical Proceedings* 23(5) : 149 (1986)
6. Beard, *Final Control Elements*, Chiton philadelphia (1969)
7. Sheingold, D.H., In *Transducer Interfacing Handbook*, Analog Devices, Inc. Norwood (1980)
8. Advantech, *PC-based industrial Automation Solution Guide*, Vol. 71
9. 한국식품개발연구원, *식품산업에서의 바이오센서 시스템 활용기술 연구개발 1996년도 1차 보고서*(1996)

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.