

Chitopearl 효소 Reactor■ 이용한 Biogenic Amines 측정

박인선 · 김동경 · 손동화 · 조용진 · 김남수
한국식품개발연구원

Measurement of Biogenic Amines with a Chitopearl Enzyme Reactor

In-Seon Park, Dong-Kyung Kim, Donghwa Shon, Yong-Jin Cho and Namsoo Kim
Korea Food Research Institute

Abstract

Substrate specificity of a flow-injection-analysis (FIA)-type biogenic amine sensor with enzyme reactor was determined. The enzyme reactor was prepared with a diamine oxidase immobilized on preactivated chitosan porous beads (Chitopearl) by intramolecular cross-linking via glutaraldehyde. The sensor showed a rapid response to putrescine and a quasi-linear calibration curve was obtained up to 15.0 mM. The optimal pH and temperature of the enzyme reactor system were 7.5 and 35°C. Interferences due to ATP-related compounds and trimethylamine, and the effects of NaCl and amino acids were measured. Inhibitory effects owing to these components could be mitigated by sample extraction with perchloric acid. Polyamines except putrescine were determined by a putrescine calibration range within 26.7%. This system was confirmed as rapid and convenient for biogenic amine determination.

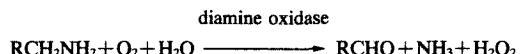
Key words: biogenic amines, FIA-type, enzyme reactor, chitosan porous beads (Chitopearl)

서 론

Biogenic amines(polyamines)은 지방족, 방향족, 이종환식(heterocyclic) 화합물인 유기염기로서⁽¹⁾ tyramine, phenylethylamine, histamine, tryptamine, cadaverine, putrescine, spermidine, spermine 등의 polyamines은 어육이나 축육의 저장과정 중에 오염 및 미생물 대사과정의 결과물로서 자연스럽게 생성되고, 치즈, 와인 및 발효식품의 저장과정 중에 생성되어 혈관 및 신경을 자극하는 물질이다⁽¹⁾. Biogenic amines는 이들 식품 중에 함유된 유리 아미노산의 탈탄산반응에 의하여 주로 형성되어⁽²⁾ 특히, 어육이나 축육의 선도지표로서 활용된다⁽¹⁾. 어육 및 축육의 선도지표 중 ATP 분해산물의 상대적인 비율로 표시되는 K값, 휘발성염기질소(volatile basic nitrogen, VBN), trimethylamine (TMA) 등에 대해서는 많은 연구 및 분석결과가 보고되고 있는 반면^(2,6), 일반적으로 15 mg/100 g 이상 생성되면 어육의 부패를 나타내는 polyamine-류⁽⁷⁾에 대한 분석은 그리 많이 이루어지지 않았으며, 그나마도 어육이나 소시지 중의 biogenic amines의 분석은 주로 HPLC에 의존

하고 있다^(8,9). 그러나, HPLC 분석은 여러 polyamines 성분들을 정량적으로 측정할 수 있다는 장점은 있으나 전처리가 매우 복잡하여 어육 및 축육의 선도를 신속하게 판정하는 데에는 무리가 있다. 그러므로, 선도의 판정을 위해서는 polyamine-류 개별성분의 정량적 측정보다는 식품 중에 부폐 결과물로서 생성된 biogenic amine-류의 함유 유무를 신속하게 판정해내는 것이 사실 더 중요하며, 이에 biogenic amines를 보다 쉽고 간단하게 분석하는 방법이 요구되어진다.

Diamine oxidase (DAO)는 primary amines, diamines 등을 산화시켜 aldehydes, ammonia 및 H₂O₂를 생성해내는 효소로서 이를 고정화한 효소센서를 이용하면 biogenic amines를 보다 간단하게 측정할 수 있다^(10,11).



본 연구에서는 어육의 선도 판정을 보다 신속하게 행하기 위한 방법의 하나로서 diamine oxidase를 고정화한 효소 reactor를 이용하고자 한다. 효소를 고정화하는 담체로서 천연물질 중 갑각류에 많은 chitosan을 원료로 하여 반응성이 높은 관능기를 가지도록 제조한 다공질의 Chitopearl beads를 이용하여 효소 reactor를

제작하고 이를 사용하여 biogenic amines를 보다 간단하게 측정하고자 한다.

재료 및 방법

효소 및 시약

Diamine oxidase (EC 1.4.3.6, 5 g, from porcine kidney) 및 2.5% glutaraldehyde, 각종 biogenic amine류, hypoxanthine (H_x), inosine (H_xR), inosine 5'-monophosphate (IMP) 등의 ATP 분해산물 및 아미노산 등은 reagent grade로서 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

고정화 효소 reactor 및 계측 시스템 제작

Chitopearl beads (Fujibo, Japan) 4 mL를 0.05 M 인산 완충용액(pH 7.5)에 넣고 세척하였다. 세척한 beads를 2.5% glutaraldehyde 용액에 가하고 30°C에서 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다⁽¹²⁾. 이 후, 중류수와 위의 완충용액으로 충분히 씻어준 후 diamine oxidase 5 units를 4 mL의 인산 완충용액에 용해시켜 효소용액을 제조하고, glutaraldehyde에 활성화된 beads와 함께 30°C에서 2시간, 4°C에서 24시간 교반하여 반응시켰다. 효소가 고정화된 beads를 충진하기 위하여 직경 3 mm의 유리관을 microcolumn으로 사용하였다. 흐름주입분석(flow injection analysis, FIA)형 계측 시스템의 구성도는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. Gilson사(France)의 Miniplus 3 pump를 Supelco사(USA)의 Rheodyne injector와 연결한 후 여기에 고정화 효소 beads를 충진한 column을 연결하였다. 이 때, 연속형 시스템의 각 부분 연결은 직경 0.8 mm인 capillary tubing (Pharmacia 사, Sweden)을 사용하였다. Flow cell에 산소전극(model BO-G, ABLE사, Japan)을 넣고, microsyringe를 이용하여 20~100 μL 의 시료용액을 injector에 주입

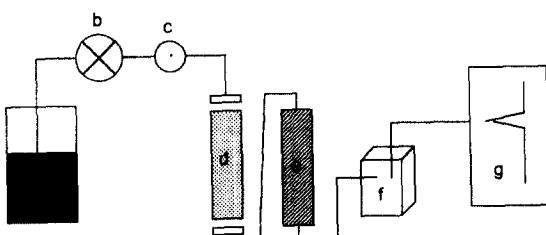


Fig. 1. Schematic diagram of the FIA-type biogenic amine sensor with enzyme reactor. a: buffer solution; b: peristaltic pump; c: injector; d: Chitopearl enzyme reactor; e: oxygen electrode; f: DO converter; g: recorder.

하였다. 효소와 기질과의 반응에서 소모되는 산소량은 DO converter (ABLE사)에 의하여 polyrecorder (TOA 사, Japan)에 기록가능한 신호로 변환시켰다. 이 때, 나타난 반응 peak는 높이를 계산하여 data로 이용하였다.

연속형 효소 reactor 시스템의 최적조건 확립

pH 4.0~10.0까지 0.05 M의 초산, 인산, Tris-HCl, 탄산 완충용액을 이용하여 pH를 각각 달리하면서 효소 센서의 감응도를 측정 비교하였고, 순환 수욕조의 온도를 25°C에서 45°C까지 5°C 간격으로 조절하고 연속적으로 완충용액을 흘려 주면서 효소반응의 적정 온도를 조사하였다.

유사물질 및 저해제에 대한 영향

냉장어육 및 축육에 존재가능한 ATP 분해산물, TMA, 식염 및 아미노산에 대한 영향은 이들의 농도를 각각 달리하여 기질인 putrescine과 함께 첨가하면서 효소 reactor가 나타내는 반응 감응도를 측정 비교하였다.

모델시료 분석

Diamine oxidase에 대하여 가장 반응성이 큰 기질인 putrescine의 검량곡선을 이용하여 putrescine 일정농도에 cadaverine, histamine, serotonin, tyramine, tryptamine, spermine, spermidine의 농도를 각각 0.05, 0.1, 0.2%로 달리 첨가하여 제조한 모델시료를 분석하였다.

결과 및 고찰

고정화 효소 reactor 제작

Chitopearl은 갑각류에 많이 존재하는 chitosan을 담체로 활용할 수 있도록 amino기와 같은 관능기를 도입한 후 다공질의 beads 형태로 사출하여 제조한 것으로서 효소 뿐만 아니라 미생물, 조직세포 등을 고정화하는데 사용할 수 있는 우수한 생체조직 지지체이다. Fig. 2에서 보는 것처럼 glutaraldehyde에 의하여 Chitopearl beads에 공유적으로 결합된 diamine oxidase는 기질과 복합체를 형성하여 반응하게 된다. 유속을 0.25 mL/min으로 일정하게 유지하면서 기질용액을 주입하면 4-aminobutyl 등을 함유하는 biogenic amines는 diamine oxidase의 기질로 작용하여^(10,11) 소수성 결합부위, anionic 부위 및 산화 촉매부위 등이 diamine oxidase의 활성부위와 결합하게 된다^(10,11). 이와같은 효소·기질 특이적 반응에 의해 약 4분 경과 후 효소반응에 의한 감응peak가 나타났으며 반응이 완료되는 데에는 약

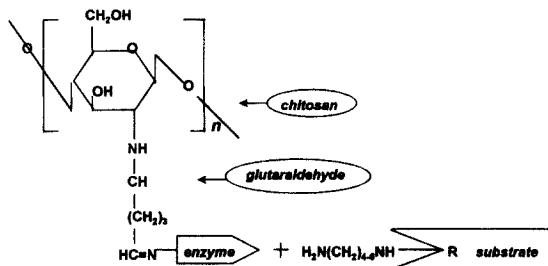


Fig. 2. Structure of the complex between Chitopearl beads and diamine oxidase coupled by glutaraldehyde solution, and the resulting enzymatic reaction with the immobilized diamine oxidase.

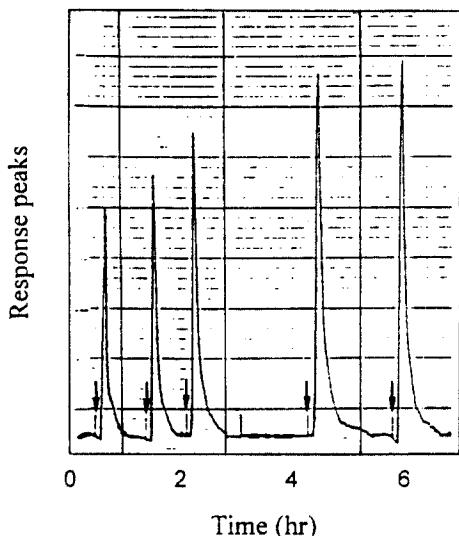


Fig. 3. Response peaks of putrescine by the biogenic amine sensor. Arrows indicate the injection points of varying concentrations of putrescine.

30분 정도가 소요되었다(Fig. 3).

기질에 대한 응답특성

Diamine oxidase는 polyamine류에 대하여 기질 특이성이 넓으나 putrescine에 대한 반응성이 가장 좋아 putrescine 1 μmole을 산화시키는 효소의 양을 일반적으로 1 unit으로 정의하고 있다. Diamine oxidase가 고정화된 흐름주입분석형의 biogenic amine 센서가 기질 농도에 대하여 보여 주는 응답특성을 알아보기 위하여 농도가 다른 putrescine 용액을 20 μL씩 주입하여 얻어지는 peak 높이로부터 검량선을 작성한 결과, putrescine 15.0 mM 구간까지 준직선상(quasi-linear)의 검량곡선을 구할 수 있었다(Fig. 4). 또한, 어육이나 촉육의 변폐과정 중 생성가능한 각각의 polyamine을

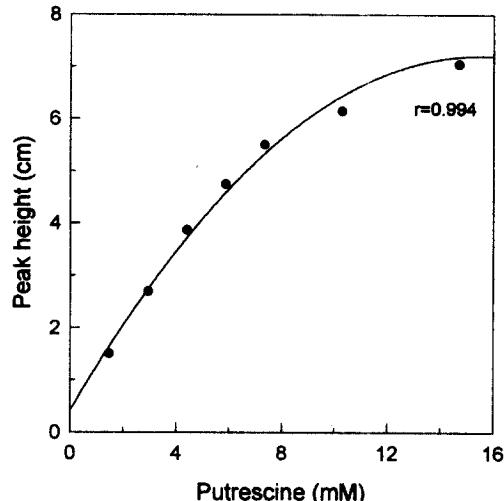


Fig. 4. Calibration curve for putrescine substrate obtained with the biogenic amine sensor.

Table 1. Relative responses of the biogenic amine sensor on various polyamines

Compound	Relative response (%) ¹⁾
Putrescine	100
Cadaverine	87.2±3.5 ²⁾
Histamine	69.2±0.1
Tryptamine	14.0±0.4
Spermidine	18.6±0.0
Spermine	11.6±0.4

¹⁾Response against putrescine was arbitrarily taken as 100%.

²⁾Mean±SD (n=3).

14.7 mM 농도로 주입한 후, putrescine의 감응도를 100%로 하였을 때와 비교하여 상대적 감응도를 측정하여 보았다. Table 1에서 보는 바와 같이 cadaverine과 histamine이 69.2% 이상의 높은 반응 감응도를 나타내었다.

완충용액, pH 및 온도의 영향

Diamine oxidase를 고정화한 효소 reactor를 이용한 계측 시스템의 완충용액, pH 및 온도에 따른 감응도 변화를 putrescine을 기질로 하여 측정하였다. Fig. 5에서 알 수 있는 것처럼 pH 7.2와 7.5의 인산 완충용액을 사용한 경우 반응 감응도가 높게 나타났으며, 각각의 온도에서 효소센서의 산소량 감소에 따른 감응도를 측정한 결과 최적온도는 35°C였다.

ATP 분해산물 및 TMA의 영향

사후 24시간 안팎에서 유통되는 냉장어육 및 촉육 중

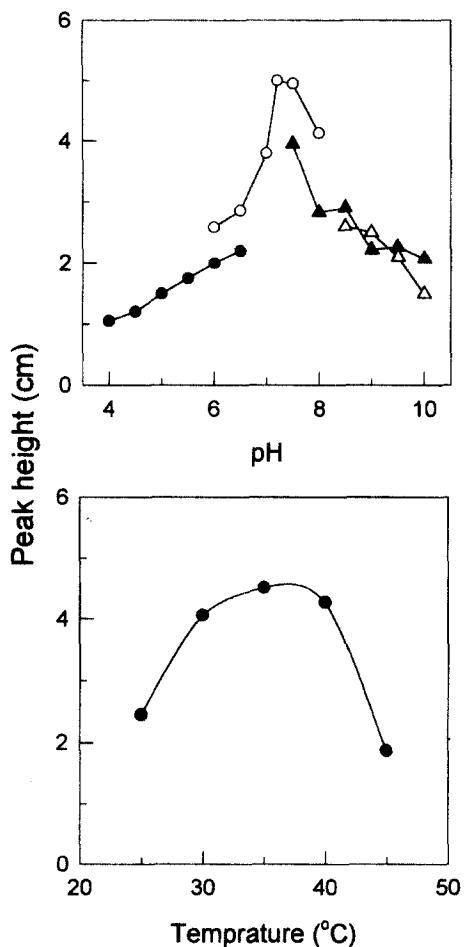


Fig. 5. Effects of pH and temperature on response of the biogenic amine sensor. The symbols (●—●), (○—○), (▲—▲) and (△—△) in the pH profile represent 0.05 M acetate, 0.05 M phosphate, 0.05 M Tris-HCl and 0.05 M carbonate buffer, respectively. The temperature profile was determined making use of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2).

에 주로 존재하는 hypoxanthine, inosine, IMP, adenosine 5'-monophosphate (AMP), adenosine 5'-diphosphate (ADP)와 같은 ATP 분해산물과 TMA의 영향을 살펴보기 위하여 이들 화합물을 실제시료 중에 최대로 존재 가능한 양의 4배 농도(0.284%)로 제조한 후 100 μL를 가하였다. 이 때, 기질로 putrescine 용액(14.7 mM) 100 μL를 함께 주입한 경우와 그렇지 않은 경우로 나누어 biogenic amine 센서가 위의 성분들에 대하여 보여 주는 감응도를 비교 측정하였다. Table 2에서 나타난 것처럼 ATP 분해산물과 TMA는 단독으로 존재할 때 putrescine에 대한 반응 감응도의 10.0~78.1%를 나타냈으며, putrescine과 공존할 때에는 7.9~37.5%

Table 2. Effects of ATP-related compounds and TMA on response of the biogenic amine sensor

Compound	Relative response (%) ¹⁾	
	Putrescine not added	Putrescine added
Putrescine	100	100
Hx	38.5±0.1 ²⁾	137.5±0.6
HxR	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	- ³⁾
ATP-related compound mixture		
0.0036% (0.27+0.13+0.09+0.10) ⁴⁾	-	96.0±0.3
0.0374% (2.75+1.39+0.95+1.08)	-	103.0±0.5
0.0711% (5.22+2.65+1.81+2.05)	-	103.6±1.4

¹⁾Response against putrescine was arbitrarily taken as 100%.

²⁾Mean ± SD (n=3).

³⁾Not determined.

⁴⁾Millimolar concentrations of Hx, HxR, IMP and AMP, respectively.

의 추가적인 감응도 증가를 보여 주었다. 이와 같은 현상은 실제 존재하는 ATP 분해산물과 TMA의 농도보다 현저하게 높은 농도로 실험하였던 그 원인이 있는 것으로 보인다. 그리하여, ATP 분해산물의 영향을 보다 정확하게 구명하기 위하여 각각의 ATP 분해산물을 실제 시료 중에 존재 가능한 범위의 최소 및 최대농도의 중간 값에 해당하는 농도로 가하여 ATP 분해산물의 혼합용액을 제조하고, 기질로 사용된 putrescine과 함께 주입한 후의 효소센서의 감응도를 putrescine만을 가한 경우와 비교하였다(Table 2). 이 때, 실제 시료 중에 존재하는 ATP 분해산물 농도에서 biogenic amine 센서가 putrescine에 대하여 보여 주는 감응도는 putrescine 자체에 대한 감응도와 거의 같은 수준이어서 이로부터 시료계측 시 ATP 분해산물이 biogenic amine 센서의 기질 응답성에 거의 영향을 끼치지 않을 것임을 알 수 있었다.

염, 아미노산에 의한 영향

어육 중에는 염이 상당량 존재하기 때문에 염농도에 의한 센서반응을 고려해야 할 것으로 생각된다. 따라서, NaCl의 농도를 달리하면서 센서의 감응도를 측정한 결과, 생리 식염수에 해당하는 식염농도인 0.8% 까지 첨가한 경우 19.2%의 감응도 감소를 나타내었고, 1.0% 이상 첨가한 경우 반응 감응도가 매우 떨어짐을 알 수 있었다(Table 3). 어육 중의 질소함유물질은 대부분 단백질의 형태로 존재하며 일반적으로 가

Table 3. Effects of sodium chloride concentrations on response of the biogenic amine sensor

Sodium chloride (%)	Relative response (%) ¹⁾
Buffer solution	Putrescine (14.7 mM) 100.0
0.2	84.4±4.4 ²⁾
0.5	85.0±7.1
0.8	80.8±0.0
1.0	58.7±9.2
1.5	45.7±9.2
2.0	30.4±0.0
Perchloric acid-treated	Putrescine (14.7 mM) 100.0
0.2	84.2±2.5
0.5	70.0±5.7
0.8	77.8±1.4
1.0	82.4±7.8
1.5	71.4±6.1
2.0	75.0±0.8

¹⁾Response against putrescine was arbitrarily taken as 100%.²⁾Mean ± SD(n=3).

식부 100 g당 10.9~23.3% 정도의 단백질이 함유되어 있으나, biogenic amine 센서의 기질인 polyamines와 구조가 유사하여 효소센서에 대한 계측저해를 일으킬 것으로 예상되는 유리 아미노산은 미량 존재한다⁽¹³⁾. 따라서, 각각의 유리 아미노산이 0.1% 정도 존재하는 것으로 가정하여 주입한 경우와 기질인 putrescine (14.7 mM)과 함께 주입한 경우의 반응 감응도를 살펴 보았다. Alanine과 glycine만을 주입한 경우 putrescine 자체가 보여 주는 반응 감응도의 18.8%와 12.3%의 감응도를 나타내었으며 그 이외의 아미노산만을 주입한 경우에는 감응도가 이보다 낮게 나타났다. 한편, alanine, glycine을 기질인 putrescine과 함께 주입한 경우는 반응 감응도가 각각 18.2, 17.7% 높아졌다. 특히, polyamines 중 적색어육의 저장과정 중 품질에 영향을 주는 대표적 성분인 histamine은 histidine의 탈탄산반응에 의하여 생성되지만, histidine에 의한 센서 감응도의 영향은 1.8% 이내로 나타나 거의 영향을 끼치지 않음을 알 수 있었다(Table 4). Table 3과 4에서 볼 수 있듯이 저해물질의 영향은 식염과 아미노산에 의한 센서의 감응도 영향이 비교적 큰 것으로 나타났는데 이는 diamine oxidase가 고농도의 식염에 의하여 활성화를 가져오거나 기질반응의 선택성이 떨어지는데 기인하는 것으로 여겨진다^(11,12). 이러한 영향을 최소화하기 위하여 0.4 M perchloric acid에 용해시킨 후 고정화효소의 최적 pH인 7.2로 맞춘 기질용액을 주입한 결과⁽¹⁴⁾, 식염 2% 까지 첨가 시 반응 감응도는 25.0% 이내로만 감소하였다(Table 3), 0.05 M 인산 완충용액(pH 7.2)으로 균질화하여 제조한 어육추출시료에 대한 감응도를

Table 4. Effects of various amino acids on response of the biogenic amine sensor

Compound	Relative response (%) ¹⁾	
	Putrescine not added	Putrescine added
Putrescine (14.7 mM)	100	100
Alanine	18.8±1.4 ²⁾	118.2±4.5 ³⁾
Arginine	3.6±1.0	-
Aspartic acid	7.0±2.6	109.1±2.4
Glutamic acid	5.4±3.6	111.1±3.0
Glycine	12.3±0.4	117.7±6.7
Histidine	1.8±0.9	-
Proline	7.1±3.6	-
Serine	9.8±3.0	114.2±3.3
Threonine	4.3±1.9	105.9±4.7
Tryptophan	1.8±2.5	-
Valine	6.8±2.6	-
Sample (fish extract)	Buffer solution Perchloric acid-treated	100 87.5±2.7 ⁴⁾

¹⁾Response against putrescine was arbitrarily taken as 100%.²⁾Mean ± SD (n=3).³⁾Not determined.⁴⁾Response against non-treated sample was taken as 100%.

100%로 하였을 때 0.4 M perchloric acid로 균질화한 후 pH 7.2로 조절하여 제조한 시료의 반응 감응도는 87.5%로 나타나 아미노산 자체에 의한 감응도 상승을 상쇄할 수 있어 시료 중에 존재하는 저해물질의 영향을 보정할 수 있는 것으로 나타났다.

모델시료 분석

Biogenic amine류는 신선육의 저장시작 후부터 일반적으로 서서히 증가하기 시작하는데, 시판되는 냉장 및 냉동어육 추출액 20점에 대하여 HPLC에 의한 분석을 행한 결과⁽¹⁵⁾, biogenic amine류가 검출되지 않았으므로 바이오센서 계측에 의해서도 biogenic amine류가 검출되지 않을 것으로 예상된다. 따라서, 본 실험에서는 효소 reactor 시스템을 이용하여 기질인 putrescine과 다른 amines를 함께 첨가하여 제조한 것을 모델시료로 하여 이들이 보여 주는 반응 감응도를 측정하였다 (Table 5). 이 때, diamine oxidase는 polyamines 중 putrescine 기질에 대하여 가장 크게 반응성을 나타내고 다른 amines에 대하여는 반응성을 나타내더라도 putrescine에 비하여 상대적으로 감응성이 낮아 다른 amines에 대한 검량곡선을 작성하기에는 무리가 있다. 그러므로, putrescine의 검량곡선을 이용하여 여러 종류의 polyamines가 첨가된 모델시료를 diamine oxidase가 고정화된 효소 reactor 시스템에 의하여 측정하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 putrescine을 제

Table 5. Determination of polyamines by the biogenic amine sensor

Added ployamine concentration (% mM)	Relative response (%) ¹⁾		
	Putrescine concentration (% mM) (6.20)	0.10 (15.50)	0.25 (31.03)
Cadaverine	0.05 (2.85)	103.3	100.0
	0.10 (5.71)	113.3	103.3
	0.20 (11.42)	126.7	112.2
Histamine	0.05 (2.71)	81.1	80.0
	0.10 (5.43)	83.8	75.9
	0.20 (10.86)	83.8	72.0
Serotonin	0.05 (2.35)	104.0	97.5
	0.10 (4.70)	108.0	97.8
	0.20 (9.40)	120.0	104.3
Tyramine	0.05 (2.88)	94.1	98.2
	0.10 (5.76)	94.1	99.1
	0.20 (11.52)	97.1	100.0
Tryptamine	0.05 (2.54)	100.0	98.1
	0.10 (5.08)	103.3	98.8
	0.20 (10.16)	110.0	99.4
Spermine	0.05 (1.26)	102.4	104.3
	0.10 (2.51)	119.5	104.3
	0.20 (5.02)	119.5	107.1
Spermidine	0.05 (1.96)	106.0	102.0
	0.10 (3.92)	112.0	104.7
	0.20 (7.86)	118.0	106.6

¹⁾Response against each concentration of putrescine was arbitrarily taken as 100%.

외하고 polyamines 중 가장 반응성이 큰 cadaverine을 0.2% (11.42 mM)까지 증가시키면서 putrescine 일정 농도에 첨가하여 제조한 기질용액을 주입하였을 때, putrescine 일정 농도에 대하여 최대 26.7%까지 감응도 증가가 나타났으며 cadaverine의 농도를 0.2% 이상 증가시켜도 더 이상의 감응도 증가가 나타나지 않았다. 그리하여, 실제 시료 중에 putrescine 이외의 polyamine 류가 존재하는 경우 putrescine 검량곡선의 26.7% 범위내에서 polyamine-류의 측정이 가능하였다.

HPLC 등을 이용하여 측정해 보면 저장 중의 죽육 및 어육, 통조림가공육에는 개별 polyamine이 0.7~700 mg/kg 정도 존재하는 것으로 알려지고 있다^[2,5,17]. Diamine oxidase를 고정화한 본 연구의 바이오센서 시스템은 2.5~2,500 mg/kg 범위의 polyamine-류를 검출할 수 있을 것으로 여겨지므로 본 방법이 식품 중에서 polyamine-류의 존재여부에 대한 유효한 판별수단이 될 수 있음을 보여 주었다.

요 약

Biogenic amine-류는 어육의 부패과정 중 생성되는 성분으로 이를 간편하게 측정하기 위하여 diamine oxidase를 amino기가 관능기인 다공질의 Chitopearl beads에 고정화한 후 이를 충진한 효소 reactor를 제조하였다. 고정화 효소 reactor를 이용한 biogenic amine 연속계측 시스템을 사용하여 putrescine 기질에 대해 15.0 mM까지 검량곡선을 얻을 수 있었다. 이 때, biogenic amine 센서의 최대 감응도는 35°C, 0.05 M 인산 완충용액(pH 7.2)을 사용한 경우 얻을 수 있었다. Biogenic amine 센서로 측정 시 방해물질로 작용할 수 있는 성분을 조사한 결과, ATP 분해산물 및 TMA 등에는 거의 영향을 받지 않아 측정에 무리가 없음을 보여 주었고, 0.8%까지의 식염에 대해서는 감응도가 19.2% 이하로 감소하였으며 alanine과 glycine을 제외한 아미노산에 대하여 9.8% 이하의 감응도 상승을 나타내었다. 염류 및 아미노산에 의한 감응도 감소 및 증가 현상은 시료를 0.4 M perchloric acid에 의해 전처리하면 해결할 수 있었다. 여러 종류의 polyamines가 공존하는 경우 putrescine 기준으로 하여 putrescine 검량곡선의 26.7% 범위내에서 polyamines의 측정이 가능하였다. Diamine oxidase가 고정화된 Chitopearl 효소 reactor를 이용하는 경우 biogenic amines의 함량 유무를 30분 이내에 측정할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 농림부에서 시행한 농림특정연구사업의 연구결과입니다.

문 헌

- Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E. and Hirvi, T.: Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *J. AOAC Internat.*, **76**(3), 575-577 (1993)
- Yen, G.-C. and Hsieh, C.-L.: Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. *J. Food Sci.*, **56**(1), 158-160 (1991)
- Malle, P. and Le Penzenec, L.: Rapid determination of fish freshness by evaluation of ATP degradation reflected in K value. *Sciences des Aliments*, **12**, 257-259 (1992)
- Watanabe, E., Endo, H. and Toyama, K.: Determination of inosine 5'-monophosphate in the presence of inosine and hypoxanthine with an enzyme sensor. *Appl. Microb. Biotechnol.*, **29**, 341-345 (1988)
- Gamati, S., Luong, J.H.T. and Mulchandani, A.: A microbial biosensor for trimethylamine using *Pseudomonas aminovorans* cells. *Biosen. Bioelectron.*, **6**, 125-131 (1991)

6. Malle, P. and Poumeyrol, M.: A new chemical criterion for the quality control of fish: Trimethylamine/total volatile basic nitrogen(%). *J. Food Prot.*, **52**(6), 419-423 (1989)
7. Yamanaka, H.: Polyamines as potential indexes for freshness of fish and squid. *Food Rev. Internat.*, **6**(4), 591-602 (1990)
8. Gill, T.A. and Thompson, J.W.: Rapid, automated analysis of amines in seafood by ion-modulated partition HPLC. *J. Food Sci.*, **49**, 603-607 (1984)
9. Ibe, A., Saito, K., Nakazato, M., Kikuchi, Y., Fujnuma, K. and Nishima, T.: Quantitative determination of amines in wine by liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **74**(4), 695-699 (1991)
10. Bouvrette, P., Male, K.B., Luong, J.H.T. and Gibbs, B. F.: Amperometric biosensor for diamine using diamine oxidase purified from porcine kidney. *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 32-38 (1997)
11. Chemnitius, G.C., Suzuki, M., Isobe, K., Kimura, J., Karube, I. and Schimid, R.D.: Thin-film substrate specificity and application to fish freshness determination. *Anal. Chim. Acta*, **263**, 93-100 (1992)
12. Okuma, H., Takahashi, H., Yazawa, S. and Sekimukai, S.: Development of a system with double enzyme reactors for the determination of fish freshness. *Anal. Chim. Acta*, **260**, 93-98 (1992)
13. Rural Nutrition Institute, Rural Development Administration: *Food Composition Table* (in Korean), 3rd ed., p. 53 (1986)
14. Kim, D.-K., Park, I.-S. and Kim, N.: Determination of chemical freshness indices for chilled and frozen fish (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**(5), 993-999 (1998)
15. Shalaby, A.R.: Separation, identification and estimation of biogenic amines in foods by thin-layer chromatography. *Food Chem.*, **49**, 305-310 (1994)
16. Zee, J.A., Simard, R.E. and L'Heureux, L.: Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat. *J. Food Prot.*, **46**(12), 1044-1049 (1983)
17. Krizek, A.R., Smith, J.S. and Phebus, R.K.: Biogenic amine formation in fresh vacuum-packaged beef stored at -2°C and 2°C for 100 days. *J. Food Prot.*, **58**(3), 284-288 (1995)

(1998년 12월 16일 접수)