

## 전위차법 효소 바이오센서를 이용한 식품의 구연산 정량분석

권지영 · 김미라\*

경북대학교 식품영양학과

### Quantitative Analysis of Citrate in Foods Using a Potentiometric Enzyme Biosensor

Ji-Young Kwon and Meera Kim\*

Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University

**Abstract** Potentiometric biosensor using flow injection analysis system was developed to determine citrate concentration in foods. Biosensor system consisted of sample injector, peristaltic pump, enzyme reactor, carbonate ion selective solid-state electrode, reference electrode, detector, and recorder. Enzyme reactor was prepared with immobilized citrate lyase and oxaloacetate decarboxylase. Carbonate ions produced through enzyme reactions of citrate were potentiometrically detected by ion selective electrode. Optimum conditions for biosensor system were investigated. Interference effect of major sugars and organic acids was less than 5% on citrate biosensor system. Citrate concentrations in fruit juices were determined by biosensor and gas chromatography. No significant difference was observed between two analytical methods. Results indicate citrate biosensor is useful in determining citrate concentration in foods.

**Key words:** biosensor, citrate, enzyme reactor

### 서 론

식품에 존재하는 유기산은 식품에 맛, 냄새 등의 관능적 특성을 부여하고, 그 양과 종류는 제품의 질을 결정짓는 중요한 요인이 된다. 특히 유기산은 채소나 과일의 향미에 중요한 영향을 미치고 있어, 이들 식품에 존재하는 유기산의 profile과 특정 유기산의 양은 식품품질 평가의 지표로 이용되어지고 있다. 구연산(citric acid)은 딸감, 오렌지 등의 시트러스 과일(citrus fruits)의 주된 유기산으로 대부분의 과일에 함유되어 있어 과일과 과일주스, 과일주 등의 품질에 영향을 주고 있다. 구연산은 전통적으로 가스 크로마토그래피(gas chromatography)나 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography)로 분석되어 왔으나 이들 방법은 시료의 전처리가 복잡하고 오랜 분석시간이 필요하며 고가의 기기가 요구된다. 따라서 최근에는 유기산을 좀 더 신속하고 정확하게 분석하기 위한 바이오센서 개발에 대한 연구가 수행되고 있다.

센서는 측정대상의 물리량이나 화학량을 선택적으로 포착하여 유용한 신호로 변환·출력하는 장치로서 바이오센서는 효소, 미생물, 면역체 등의 bioreceptor를 이용하여 복잡한 시료 전처리 없이 기질 및 기질 analog, 항원, 세포, prosthetic group, inhibitor, cofactor 등과 같이 시료 중에 존재하는 특정성분을 선택적으로 신속히 측정할 수 있는 장치이다(1). 바이오센서는 다른 측정법

에 비해 생체물질이 보이는 높은 반응특이성과 빠른 응답성으로 인해 대상물질을 선택적이고도 신속, 정확하게 측정할 수 있는 특성을 지닌다. 바이오센서의 응답속도, 감도, 수명 등의 특성은 분자식별 기능제료인 효소와 미생물 등을 고정화한 막상 구조와 그것의 제조방법에 의존하므로 고정화 막두께, 고정화량, 기질투과성, 트랜스듀서의 특성 등이 활발하게 연구되고 있다(2).

유기산 분석을 위한 바이오센서에 대한 연구들을 살펴보면 Palleschi 등(3)은 포도주에 함유된 L-lactic acid와 L-malic acid를 측정하고자 L-lactate oxidase와 malic enzyme을 nylon net에 각각 고정화하여 Clark O<sub>2</sub> probe와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> probe를 이용하여 이들 유기산을 측정하였다. 또한 Park 등(4)은 젓당과 젓산을 동시 측정할 수 있는 dual cathode electrode를 이용한 바이오센서를 제작하였는데 β-galactosidase, mutarotase를 nylon net에 asymmetric coupling으로 고정화한 후 한 개의 양극과 두 개의 음극을 지닌 dual cathode electrode에 고정화 효소막을 부착하여 용존 산소가 소모되는 변화량을 측정함으로써 간접적으로 시료성분의 함량을 조사하였다. 구연산을 측정하기 위한 전통적인 효소적 방법으로 citrate lyase(CL), lactate dehydrogenase(LDH), malate dehydrogenase(MDH)를 이용하여 생성된 nicotinamide adenine dinucleotide(NADH)를 340 nm의 흡광도에서 측정한 연구가 보고되었다(5). 센서를 이용한 연구로는 Hikima 등(6)이 CL, oxaloacetate decarboxylase(OD)의 bienzyme solution을 glutaraldehyde를 이용하여 mercury film electrode(MFE)에 가교결합하여 citrate 측정용 amperometric biosensor를 개발하였는데 MFE는 dropping mercury electrode(DME)보다 간편하나 효소의 수명이 mercury의 영향을 받는 것으로 나타났다. 또한 Gajovic 등(7)은 식품시료와 발효배지의 citric acid를 정량하고자 세 종류 효소인 CL, OD, pyruvate oxidase(PO)를 gelatin에 포획한 후 electrode에 부착하여 O<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 측정하였는데 3가지 효소를 사용해야 하는 불편함과 비

\*Corresponding author: Meera Kim, Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Tel: 82-53-950-6233

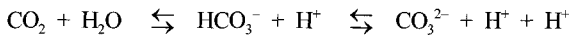
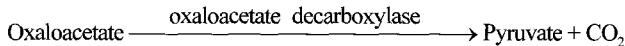
Fax: 82-53-950-6229

E-mail: meerak@mail.knu.ac.kr

Received October 31, 2005; accepted January 9, 2005

경제성의 문제가 나타났다.

따라서 본 연구에서는 좀 더 간편하고 효율적으로 구연산을 측정하고자 두 종류의 CL과 OD 효소를 고정화하여 효소 반응기를 제작하고 ion selective electrode를 이용하여 반응에서 생성된 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>를 측정하여 구연산의 농도를 측정하였다. 본 연구에서 개발한 구연산 바이오센서의 기본 원리는 다음 반응에 기초한다.



Citrate는 먼저 CL에 의해 oxaloacetate로 전환되고 생성된 oxaloacetate는 OD에 의해 pyruvate와 CO<sub>2</sub>로 전환된다. 생성된 CO<sub>2</sub>는 용액의 pH에 따라 존재양상이 변화되는데 염기성 buffer에서 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 형태로 전환되어 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>-ion selective electrode에 의해 감지되게 된다. 본 연구에서는 위와 같은 원리에 의해 두 가지 효소를 고정화한 효소 반응기와 Flow injection analysis(FIA) system을 조합하여 전위차법 구연산 측정용 효소 바이오센서 시스템을 구축하였다. 또한 센서의 감도와 선택특성을 높이기 위해 여러 가지 영향 요인을 최적화하여 식품 중에 있는 구연산의 농도를 측정하였다.

### 재료 및 방법

#### 시약 및 재료

효소 반응기에 사용되는 효소는 citrate lyase(CL, EC. 4.1.3.6, from *Enterobacter aerogenes*)와 oxalacetate decarboxylase(OD, EC 4.1.1.3, from *Pseudomonas* sp.)를 사용하였다. 효소 결합에 사용되는 aminopropyl glass(mean pore diameter 500Å, 200-400 mesh controlled pore glass)와 glutaraldehyde(25% v/v)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo, USA)에서 구입하고 Teflon tubing은 Cole-Parmer Instrument Company(Vernon Hills, Illinois, USA)에서 구입하였다.

Carrier buffer에 사용되는 tris[hydroxymethyl]aminomethane (TRIZMA BASE)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였고, 기준전극으로는 single junction reference electrode(Model 90-01, Orion Research Inc., Boston, MA, USA)를 사용하였다. CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>-ion selective membrane 제조에 사용되는 poly(vinylchloride)(PVC), bis(2-ethylhexyl)adipate(DOA), tridodecylmethylammonium chloride (TDMACl), tetrahydrofuran(THF)은 Fluka Chemie(Buchs, Switzerland)에서 구입하고 p-decyl-α,α,α-trifluoroacetophenon(TFADB)는 Trans world Chemicals(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다.

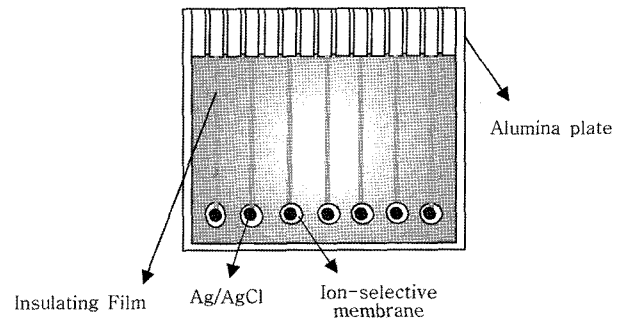


Fig. 1. Schematic diagrams of the solid-state type carbonate ion selective electrode.

#### Solid-state CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>-ion selective electrode의 제조

Solid-state electrode는 알루미늄판 위에 silver electrode를 screen printing하여 제조하였다(Fig. 1). 제조된 Ag전극 부분에 FeCl<sub>3</sub>를 떨어뜨려 10분간 정치한 후 증류수로 세척하였다. 그 후 TFADB 8.3 mg, PVC 66 mg, DOA 100 μL, TDMACl 2 mg, THF 900 μL 혼합액을 Ag/AgCl electrode와 그 주위 비활성 layer위에 소량 떨어뜨린 후 실온에서 12시간 방치하여 건조시켰다(8). CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>-ISM 이 부착된 solid-state electrode를 flow-through cell에 끼운 후 FIA system에 조합하였다.

#### 효소 고정화 및 반응기 제작

CL과 OD를 고정화하기 위해서 Kumaran과 Trans-Minh(9) 방법을 수정하여 사용하였다. 담체인 aminopropyl glass 0.3 g과 2.5% glutaraldehyde 10 mL를 혼합하여 실온에서 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 이를 glass filter로 감압여과하고 증류수와 50 mM phosphate buffer(pH 7.5)로 수회 세척하여 glutaraldehyde를 제거한 다음 phosphate buffer에 담귀 30분간 냉장보관하였다. 여기에 50 mM phosphate buffer로 제조한 CL(10 units)과 OD(60 units)용액을 넣은 뒤 냉장 상태로 하룻밤 방치하였다. 그 후 그 상층액을 취하여 Bradford(10)의 단백질 정량법을 이용하여 enzyme coupling efficiency를 측정하였다. 결합하지 않은 효소를 제거하기 위해 감압여과하면서 증류수와 phosphate buffer로 수회 세척하고 이를 Teflon tubing에 채우고 0.1 M Tris buffer(pH 7.5)로 충전하여 사용할 때까지 냉장보관하였다.

#### FIA system의 구성

본 실험에서 구축한 FIA system은 두 개의 carrier buffer, peristaltic pump, injector, enzyme reactor, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>-selective electrode, pH/mV meter, recorder로 구성되었다(Fig. 2). 효소 반응을 최적으로 하는 pH와 탄산 이온의 감응을 최대로 할 수 있는 pH가 다른 것을 감안하여 carrier buffer는 둘로 나누어 사용하였다(11).

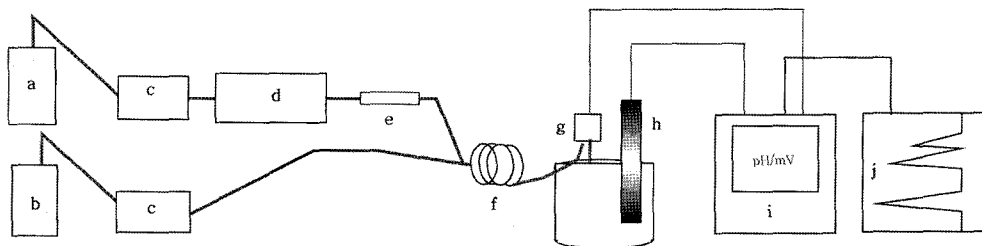


Fig. 2. Scheme of the citrate biosensor with FIA system. a: carrier buffer 1, b: carrier buffer 2, c: peristaltic pump, d: sample injector, e: enzyme reactor, f: mixing coil, g: carbonate ion selective electrode, h: reference electrode, i: detector (pH/mV meter), j: recorder.

즉, carrier buffer 1(0.1 M Tris buffer)은 효소 반응기를 거치게 하였고, carrier buffer 2(0.6 M Tris buffer pH 11.0)는 효소 반응기 뒤에서 buffer 1과 합쳐지도록 하였다.

#### 구연산 측정용 바이오센서의 최적 조건 확립

구연산 측정용 바이오센서의 최적 조건을 확립하기 위해서 효소 고정화 방법, 효소량, 담체량을 달리하여 효소 반응기를 제작하고, carrier buffer pH와 carrier buffer의 흐름 속도를 달리하여 FIA system의 최적화를 시도하였다(3,4,6).

**효소 고정화 방법에 따른 영향:** 두 가지 효소(CL, OD)를 담체에 고정화할 때, 두 가지 효소를 동시에 담체에 고정화하여 반응기를 만드는 방법과 효소의 양에 따라 담체의 양을 비례적으로 나누어 각각 고정화하여 반응기에 채우는 방법을 이용하여 그 감응을 비교하였다.

**효소량에 따른 영향:** 효소 반응을 최대로 할 수 있는 효소량을 결정하기 위해 효소량을 달리하여 반응기를 제조한 후 그 감응 정도를 비교하였다. OD의 양을 60 units로 고정화한 후 CL의 양을 달리하여 실험하여 최대 감응을 보이는 효소의 양을 조사하였다.

**담체량에 따른 영향:** 설정된 효소량에 적합한 담체량을 확립하고자 담체인 aminopropyl glass의 양을 0.25, 0.30, 0.33 g으로 달리하여 고정화한 후 각각의 enzyme coupling efficiency를 측정하고 감응 정도를 분석하였다.

**Carrier buffer pH에 따른 영향:** Carrier buffer 2(0.6 M Tris buffer, pH 11.0)는 고정하고, carrier buffer 1(0.1 M Tris buffer)의 pH를 달리하여 그 감응을 비교하였다. Carrier buffer 1은 효소 반응기를 거치게 되므로 효소 활성의 범위를 고려하여 pH를 7.0, 7.5, 8.0으로 조정하여 두 가지 효소의 반응을 최적으로 하는 pH를 조사하였다.

**흐름 속도에 따른 영향:** Buffer의 유속이 감응에 미치는 영향을 알아보려고 carrier buffer 2의 흐름 속도는 고정하고, carrier buffer 1의 흐름 속도를 조절하여 전체 흐름 속도를 10 mL/hr, 12 mL/hr, 14 mL/hr로 조정한 후 유속에 따른 감응을 조사하였다.

#### 센서 시스템에 영향을 주는 방해물질 조사

식품에는 측정하고자 하는 구연산 이외에 여러 가지 당과 유기산이 함께 존재할 수 있으므로 당과 유기산이 센서에 주는 영향력을 알아보기 위해서 측정시료와 함께 이들 물질을 일정량 첨가하는 additional method를 이용하여 방해 효과를 측정하였다. 이때 첨가되는 당류로는 포도당, 과당, 서당을 사용하였고, 유기산으로 말산, 아스코르브산, 피루브산, 주석산을 5 mM씩 첨가하여 그 영향력을 조사하였다.

#### 식품시료 분석

본 연구에서 구축한 바이오센서를 이용하여 식품에 함유된 구연산의 농도를 측정하였다. 사과 주스, 당근 주스, 토마토 주스, 딸기 주스를 2,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 그 상층액을 취한 후 0.1 M Tris buffer(pH 7.5)로 10배 희석하여 FIA system에 100  $\mu$ L를 주입하였다. 식품 시료 분석은 최적 조건의 센서 시스템에서 구연산 용액의 검량 곡선을 기준으로 구연산의 농도를 정량하였다.

**Table 1. Operating conditions of gas chromatography for determination of citrate**

Instrumental conditions	
Instrument	DS 6200 Gas chromatography
Column	Glass column Packing materials (Chrom-M-AQW)
Detector	Flame Ionization Detector
Injection volume	2 $\mu$ L
Temperature	Column; 15 min at 100°C Programmed rate, 1.5°C/min 30 min at 240°C Injector; 240°C Detector; 260°C
Carrier gas	N <sub>2</sub> gas, 30 mL/min
Chart speed	0.3 cm/min
Range	2
Attenuation	3

#### GC에 의한 구연산 측정

본 연구에서 개발된 구연산 측정용 바이오센서의 신뢰성을 확인하기 위해 구연산 정량에 일반적으로 많이 사용되고 있는 GC 분석법을 이용하여 같은 시료로 실험한 후 그 결과를 비교하였다. 구연산 농도의 측정 조건은 Table 1에 제시된 것과 같으며 시료의 전처리법은 다음과 같이 하였다(12). 먼저 2,000 rpm에서 원심분리한 과일 주스 용액의 상층액 10 g에 95% ethanol을 첨가하여 50 mL로 정용하고 1시간 방치한 후 여과지로 여과하였다. 여과한 시료 5 mL에 1% glutarate 1 mL, 16% lead acetate 0.5 mL와 85% ethanol 15 mL를 첨가하여 혼합하고, 45분간 정치시킨 후 1,500 rpm에서 7분간 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 85% ethanol 10 mL를 넣고 혼합한 후 다시 원심분리하는 것을 2회 반복하였다. Ethyl ether 5 mL를 첨가하여 2,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 버린 다음 65°C 항온수조에서 30분간 가온하여 ether를 휘발시키고, 45°C 진공 건조기에서 10분간 건조하였다. 여기에 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(anhydrous) 0.1 g과 silylating reagent (anhydrous pyridine : hexamethyl disilazine : trimethyl chlorosilane = 9 : 3 : 1) 1.5 mL를 첨가하여 45초간 vortex에서 혼합한 후 45°C 항온수조에서 15분간 반응시켰다. 이를 2,000 rpm에서 15분간 원심분리시킨 후 상층액을 GC로 분석하였다.

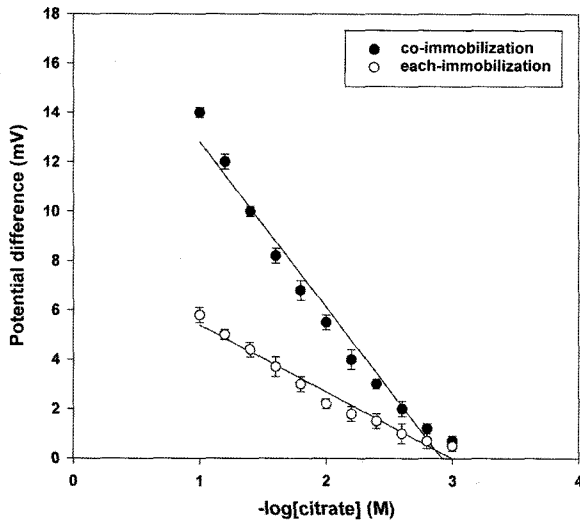
## 결과 및 고찰

#### 구연산 측정용 바이오센서의 최적 조건 설정

구연산 측정용 바이오센서를 최적화하기 위해 고정화 방법, 효소량, 담체량과 carrier buffer의 pH, carrier의 흐름 속도에 따른 감응도를 측정하였으며 그 결과는 다음과 같다.

**고정화 방법에 따른 영향:** 실험에 사용한 두 가지 효소 즉 CL (10 units)과 OD(60 units)는 각각 phosphate buffer에 녹여서 사용하였는데 일정량의 glass beads에 두 가지 효소를 함께 결합시키는 방법과 glass beads의 양을 효소의 양에 따라 비례적으로 나누어 각각 고정화시키는 방법을 시도하여 그 감응 정도를 조사하였다.

실험 결과 각각 고정화한 방법을 이용한 경우의 결정계수 ( $r^2=0.97$ )와 동시 고정화한 경우의 결정계수( $r^2=0.97$ )는 같은 값을 보였으나 감응도는 동시에 고정화한 경우가 높았다(Fig. 3). 효

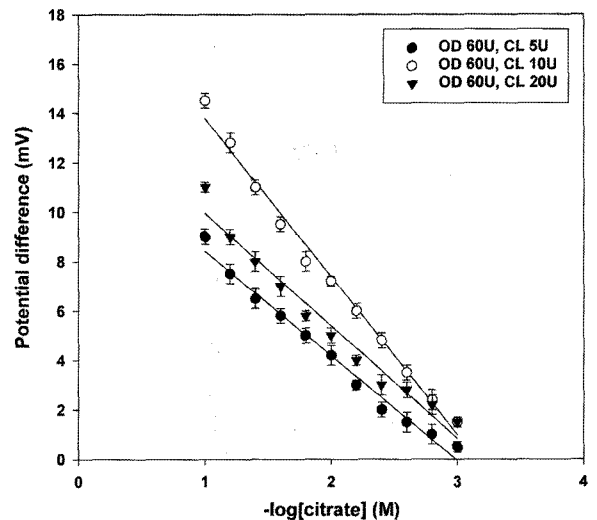


**Fig. 3.** Effect of the enzyme immobilization methods on the citrate biosensor. Each point is a mean for four replicates. Carrier buffer 1: 0.1 M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7.5), Carrier buffer 2: 0.6 M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 11.0), CL: 10 units, OD: 60 units, glass beads (0.3 g), flow rate: 12 mL/hr.

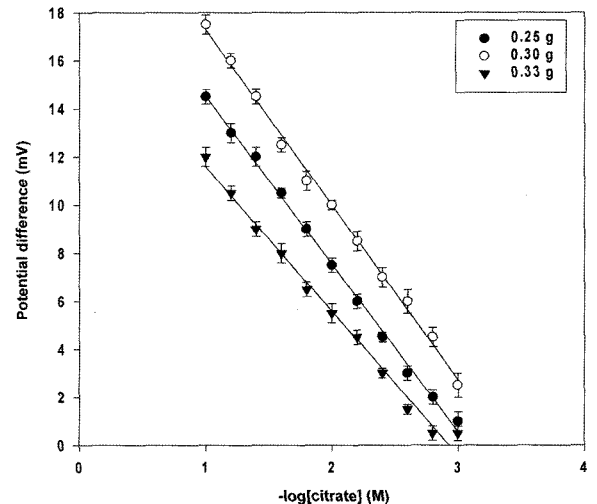
소를 각각 고정화하였을 경우 감응도가 낮아지는 이유는 효소 반응 결과 생성된 과잉의 enolic 형태의 oxaloacetate가 축적되고 이로 인해 CL의 활성이 저해되어 반응의 연속적인 진행이 느려졌기 때문으로 사료된다(13). 한편 CL과 OD를 함께 고정화시켰을 경우에는 CL에 의해 생성된 oxaloacetate가 OD에 의해 신속하게 pyruvate로 전환되어 citrate의 연속적인 반응이 신속하게 진행될 수 있어(14) 반응의 감응도가 높게 나타난 것으로 보인다. 따라서 본 실험에서는 CL과 OD를 동시 고정화하는 방법을 이용하여 효소 반응기를 제조함으로써 조작의 간편성과 반응의 감응도를 높였다.

**효소량에 따른 영향:** 고정화에 사용된 CL과 OD의 적절한 양을 결정하기 위해 효소의 units를 달리하여 고정화를 시도하였다. 실제로 적정량 이상의 효소를 사용하더라도 반응에 좋은 결과를 주지 못하기 때문에(7), 적절한 양의 효소를 사용함으로써 경제적이고 효율적인 시스템을 구축하는 것이 필요하다. 또한 두 종류 이상의 효소가 사용될 때에는 반응의 효율성을 높이기 위해서 효소의 비율도 고려되어야 한다. 본 실험에서는 OD의 양을 60 units로 고정한 상태에서 CL의 양을 5, 10, 20 units로 변화시켜 감응도를 측정된 결과 Fig. 4에서 보듯이 결정계수는 각각 0.98, 0.99, 0.97이었고, OD 60 units, CL 10 units에서 최대의 감응도를 나타냈다. 5 Units의 CL를 사용했을 경우에는 감응도가 낮아 CL 효소량이 반응을 수행하는데 부족한 것으로 보여졌다. 또한 CL을 20 units를 사용했을 경우에도 10 units를 사용했을 때보다 오히려 감응도가 낮아졌는데 이는 반응이 효율적으로 수행되기 위해서는 두 효소의 비율도 고려되어야 함을 보여주고 있다. 즉, CL의 양이 증가하더라도 OD의 양이 이에 비례하여 증가하지 않으면 반응은 효율적으로 수행되지 않아 감응도가 오히려 낮아질 수 있음을 보여주었다. 따라서 최적의 효소량으로 CL 10 units, OD 60 units를 결정하여 효소 반응기 제작에 사용하였다.

**담체량에 따른 영향:** 본 실험에서 사용한 고정화 방법은 가교 시약에 의한 담체 결합법으로 가교 시약과 담체로서 glutaraldehyde



**Fig. 4.** Effect of the amount of enzymes on the citrate biosensor. Each point is a mean for four replicates. Carrier buffer 1: 0.1 M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7.5), Carrier buffer 2: 0.6 M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 11.0), glass beads (0.3 g), flow rate: 12 mL/hr.



**Fig. 5.** Effect of the amount of glass beads used for the enzyme immobilization on the citrate biosensor. Each point is a mean for four replicates. Carrier buffer 1: 0.1 M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7.5), Carrier buffer 2: 0.6 M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 11.0), CL: 10 units, OD: 60 units, flow rate: 12 mL/hr.

와 glass beads를 이용하여 담체의 아미노기와 효소 단백질 중의 아미노기 사이에 schiff 염기를 형성시킴으로써 효소를 고정화하였다. 담체를 이용하여 효소를 고정화시킬 때는 효소를 고정화시키는 데 충분한 양의 담체를 사용하여야 한다. 담체의 양이 적을 경우 효소결합율이 낮아 감응도가 저하되며, 담체가 많을 경우에는 담체가 carrier buffer의 흐름을 방해하여 반응이 효율적이지 못하게 된다. 고정화 효소 반응기 사용에 있어서 효소를 경제적으로 사용하기 위해서는 반응기의 최적화가 필수적이며 최적화 요소로서 효소의 활성과 반응력을 지속적으로 유지하기 위한 효소량에 적절한 담체 양이 조사되어야 한다(15).

담체량을 달리하여 실험한 결과, 0.25 g의 담체 사용시에는 효소결합율이 85%에 불과하였고 0.30 g과 0.33 g을 사용한 경우에는 효소결합율이 98%에 달하였다. 담체량에 따른 감응도는 Fig.

5와 같은데 담체량이 0.25 g이었을 때는 감응도도 매우 낮게 나타났다. 이는 효소결합을 결과에서 볼 수 있듯이 낮은 효소결합으로 인해 반응 자체가 충분히 일어나지 못했기 때문인 것으로 생각되었다. 또한 담체량이 0.33 g인 경우에도 감응도가 0.30 g보다 낮게 나타났는데 이는 담체의 양이 많아짐으로써 기질의 확산에 대한 저항이 작용하여 효소의 반응 효율이 낮아졌기 때문으로 사료되었다(16). 따라서 실험에 사용된 효소량에 적절한 담체량은 높은 효소결합율과 감응도를 나타낸 0.30 g으로 결정하였다.

**Carrier buffer pH에 따른 영향:** 바이오센서의 가장 중요한 요소는 분석 대상물질에 대한 선택특성(specificity)과 감도(sensitivity)로서 대상 시료에 대한 선택특성은 바이오센서 내 핵심이 되는 감응소자의 생화학적 특성에 의해 결정된다. 감도 또한 감응소자의 인식특성과 센서의 신호감지 및 변환장치의 성능에 의해 결정되므로 본 연구의 감응소자로 사용된 효소의 특성을 최적으로 유지하는 것과 신호감지 장치로 사용된  $\text{CO}_3^{2-}$ -ion selective electrode의 성능을 최적으로 조절하는 것이 센서의 근본적인 요소가 된다. OD의 최적 pH는 7.5-8.0이고 CL의 최적 pH는 6.8-7.5로 알려져 있어서(17) 가능한 최적 pH 범위는 6.8-8.0에 속하였다. 또한 carbonate ion 생성에 적합한 pH는 8.4-8.8로서(18) 효소 반응의 최적 pH와는 다소 차이를 나타낸다. 따라서 효소 반응과 탄산이온의 생성을 최적으로 하기 위해서 본 실험에서는 carrier buffer를 둘로 나누어 사용하였다. 즉 carrier buffer 1은 효소의 최적 pH로 조정하여 효소 반응기를 통과하게 하고 carrier buffer 2는 효소 반응기 뒤에서 carrier buffer 1과 혼합되어 carbonate ion 생성에 최적 pH가 되도록 조절하였다. 따라서 본 실험에서는 carrier buffer 2를 0.6 M Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$ (pH 11.0)로 고정하고 carrier buffer 1(0.1 M Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$ )의 pH를 7.0, 7.5, 8.0으로 조정하여 실험하였다.

실험 결과 Fig. 6에서 보듯이 pH 7.0, 7.5, 8.0에서 상관계수는 각각 0.99, 0.99, 0.98로 pH 7.0과 7.5일 때 상관관계가 높았다. 감응도는 pH 7.5일 때 가장 높았고 pH 8.0일 때 가장 낮았다. 이는 carrier buffer의 pH가 효소활성에 영향을 미치는 것을 보여주는 것으로 두 가지 효소에 공통적으로 적합한 pH가 7.5인 것으로

나타났다. 한편 효소 반응기를 거친 carrier buffer 1과 carrier buffer 2가 혼합되었을 때 혼합 buffer의 pH를 측정해 본 결과 pH가 8.6으로 나타나 carbonate ion 생성에 적합한 pH를 가지고 있었음을 확인할 수 있었다.

**흐름 속도에 따른 영향:** FIA에 주입된 시료는 연속적으로 흐르는 carrier buffer를 따라 감지 부위에 이를 때까지 작은 관을 통하게 되므로 시료의 분산 정도는 센서 시스템의 성능을 결정하는 중요한 요소가 된다. 분산 정도는 튜브의 내경, carrier solution의 유속 및 flow-through cell에 영향을 받는다. Carrier buffer 2의 속도를 일정하게 고정하고 carrier buffer 1의 속도를 변화시켜 감응을 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. 유속이 10 mL/hr, 12 mL/hr일 때는 상관관계( $r^2=0.99$ )가 높았으나 유속이 14 mL/hr로 증가하였을 때는 상관관계( $r^2=0.98$ )가 낮아졌다. 감응도에서도 유속이 12 mL/hr일 때 가장 전위차가 높게 나타났으며, 유속이 10 mL/hr일 때 가장 낮은 전위차를 보였다. 유속이 느린 경우에는 감응도가 낮을 뿐만 아니라 반응이 나타나기까지 걸리는 시간도 유속이 빠른 경우보다 많이 걸렸다. 이는 유속이 너무 느린 경우 분산 정도가 커서 시료가 buffer에 의해 많이 희석되기 때문에 감응도가 낮아지고 느린 유속으로 인해 반응결과가 나타나는데 시간이 많이 걸렸기 때문인 것으로 보인다(16). 이와 반대로 유속이 너무 빠른 경우에는 분산 정도가 낮아 carrier buffer와 시료의 혼합이 잘 되지 않고 기질과 효소와의 접촉 시간이 짧아 생성물의 양이 감소되어 감응도가 낮아지게 된다. 따라서 효소와 시료간의 반응시간과 시료의 희석율을 고려하여 유속을 결정하여야 한다. 본 실험에서는 높은 감응도와 신속한 시료 감응시간(sample output time)을 보이는 12 mL/hr을 최적의 유속으로 결정하였다.

구연산 센서의 조건을 최적화하기 위한 위의 실험들을 통해 결정된 최적 조건에서 표준검량곡선을 얻었으며 그 결과는 Fig. 8과 같다. 최적 조건하에서 구연산의 농도와 전위차간의 직선관계는  $y = -7.668x + 23.77$ 이었으며 결정계수( $r^2$ )는 0.9986으로 시료 중 구연산의 농도를 정확히 측정할 수 있을 것으로 보여졌다.

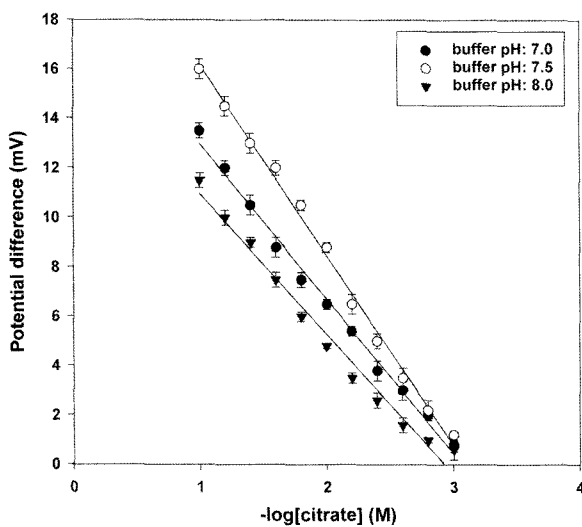


Fig. 6. Effect of the pH of carrier buffer 1 on the citrate biosensor. Each point is a mean for four replicates. Carrier buffer 2: 0.6 M Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 11.0), CL: 10 units, OD: 60 units, glass beads (0.3 g), flow rate: 12 mL/hr.

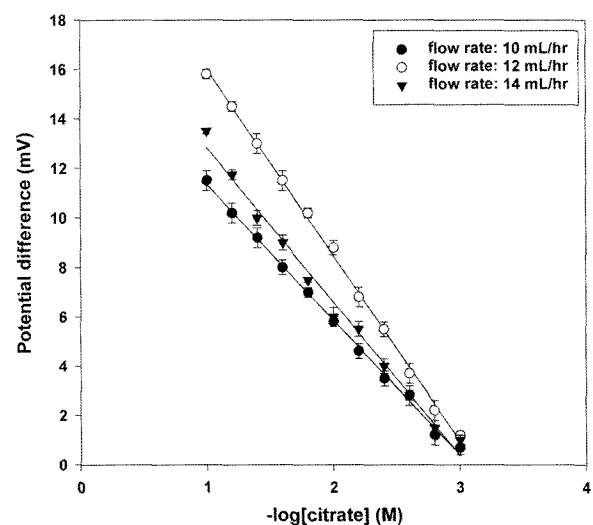
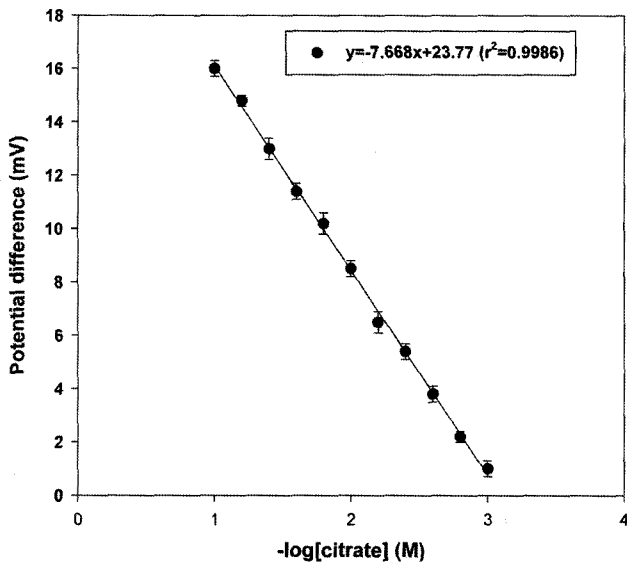


Fig. 7. Effect of the flow rate of carrier buffer 1 on the citrate biosensor. Each point is a mean for four replicates. Carrier buffer 1: 0.1 M Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 7.5), Carrier buffer 2: 0.6 M Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 11.0), CL: 10 units, OD: 60 units, glass beads (0.3 g).



**Fig. 8.** Calibration curve of citrate solution in the citrate biosensor under the optimum conditions. Each point is a mean for four replicates. Carrier buffer 1: 0.1 M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7.5), Carrier buffer 2: 0.6 M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 11.0), CL: 10 units, OD: 60 units, glass beads (0.3 g), flow rate: 18 mL/hr.

**방해물질의 영향**

과일 주스에 구연산과 함께 존재할 수 있는 포도당, 과당, 설탕의 당류와 유기산인 아스코르브산, 말산, 피루브산, 주석산이 구연산 센서에 주는 방해효과를 조사하였다. Additional method를 이용하여 10 mM 구연산 용액에 각 5 mM의 당 또는 유기산을 첨가하여 그 영향력을 조사한 결과가 Table 2에 제시되어 있다. 당류는 감응도에 저해효과를 보이지 않았으나 유기산의 경우 아스코르브산과 주석산에서 일부 저해 효과가 나타났는데 이는 산 첨가에 의한 pH 변화 때문인 것으로 사료된다. 하지만 그 효과가 5% 이내로 크지 않았으며 실험에서 사용한 농도가 과일이나 채소에 존재하는 양보다 과량이므로 실제 시료 적용시 그 영향력은 훨씬 작아질 것으로 예상되었다.

**바이오센서와 GC에 의한 구연산 농도 측정**

본 실험에서 구축한 구연산 바이오센서를 이용하여 최적 조건에서 사과, 당근, 토마토, 딸기 주스의 구연산 농도를 측정된 결과는 Table 3과 같다. 주스에 함유된 구연산의 농도는 1.7 × 10<sup>-2</sup> M-2.2 × 10<sup>-2</sup> M의 범위를 보여 본 센서 시스템의 직선관계 범위인 10<sup>-1</sup> M-10<sup>-3</sup> M에 포함되어 있었다.

**Table 2.** Evaluation of the possible interference of various components in the determination of citrate

Additive	Concentration (mM)	Response (%)
Blank (Citrate)	10	100
Glucose	5	100
Sucrose	5	100
Fructose	5	100
Malic acid	5	109
Ascorbic acid	5	91.0
Pyruvic acid	5	100
Tartaric acid	5	109

**Table 3.** Comparison of biosensor and gas chromatography method for citrate determination of various fruit juices

Juice	Biosensor	GC	Significance
	Citrate concentration (M) <sup>1)</sup>		
Apple	2.1 × 10 <sup>-2</sup> ± 0.0093	1.5 × 10 <sup>-2</sup> ± 0.0001	NS <sup>2)</sup>
Carrot	2.0 × 10 <sup>-2</sup> ± 0.0025	1.9 × 10 <sup>-2</sup> ± 0.0006	NS
Tomato	2.2 × 10 <sup>-2</sup> ± 0.0161	2.0 × 10 <sup>-2</sup> ± 0.0018	NS
Strawberry	1.7 × 10 <sup>-2</sup> ± 0.0003	1.5 × 10 <sup>-2</sup> ± 0.0003	NS

<sup>1)</sup>Means ± SEM (n = 4).

<sup>2)</sup>NS: not significant (p > 0.05).

효소 반응기와 FIA system을 이용해 제작한 구연산 측정용 바이오센서의 신뢰성을 검증하기 위해 유기산 정량에 일반적으로 사용되고 있는 GC 분석법을 이용해 측정된 구연산 농도와 비교하였다. 같은 시료를 가지고 GC 분석법으로 얻은 주스의 구연산 농도는 Table 3과 같으며, 두 분석방법간에 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 구축한 구연산 측정용 바이오센서 시스템은 식품에 함유된 구연산 분석시 신뢰성 있는 결과를 신속하고 정확하게 제공할 수 있을 것으로 판단되었다.

**요 약**

Citrate lyase(CL)와 oxaloacetate decarboxylase(OD)를 고정화하여 효소 반응기를 제작하고 효소반응으로 생성된 carbonate ion을 ion selective electrode를 이용한 전위차법 FIA system으로 식품에 함유된 구연산의 농도를 측정하였다. 최적 센서 시스템의 조건은 CL과 OD를 같이 고정화시키는 방법으로 CL과 OD의 양이 각각 10 units, 60 units, 담체량은 0.3 g, carrier buffer 1(0.1 M Tris buffer)은 pH 7.5, carrier buffer의 유속은 12 mL/hr으로 결정되었다. 최적 상태에서의 표준검량곡선은 10<sup>-1</sup> M-10<sup>-3</sup> M 범위에서 직선적인 상관관계(r<sup>2</sup>=0.9986)를 나타내었다. 당류와 유기산류에 대한 센서 시스템에 대한 방해효과를 측정된 결과 당류는 거의 저해효과를 보이지 않았으며 유기산의 경우도 저해 효과가 5% 미만으로 이들 물질에 의해 감응도가 크게 방해받지 않은 것으로 나타났다. 구연산 바이오센서와 GC를 사용하여 식품 시료에 함유된 구연산의 농도를 분석한 결과 두 방법간에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나 본 연구에서 구축한 구연산 바이오센서 시스템은 식품에 함유된 구연산 분석시 신뢰성 있는 결과를 주는 것으로 보여졌다.

**문 헌**

- Sethi RS. Transducer aspects of biosensors. Biosens. Bioelectron. 9: 243-264 (1994)
- Sohn BK. Sensor Engineering. Iljinsa, Seoul, Korea. pp. 185-190 (1996)
- Palleschi G, Volpe G, Compagnone D, La Notta E, Esti M. Bioelectrochemical determination of lactic and malic acid in wine. Talanta 41: 917-923 (1994)
- Park IS, Kim JH, Kim TJ, Noh BS. Simultaneous determination of lactose and lactic acid in yoghurt by biosensor using dual cathode electrode. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 12: 8-16 (1997)
- Moellering H, Gruber W. Determination of citrate with citrate lyase. Anal. Biochem. 17: 369-376 (1996)
- Hikima S, Hasebe K, Taga M. New amperometric biosensor for citrate with mercury film electrode. Electroanalysis 4: 801-803 (1992)

7. Gajovic N, Warsinke A, Scheller FW. A novel multienzyme electrode for the determination of citrate. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 63: 337-344 (1995)
8. Shin JH, Yoon SY, Yoon IJ, Choi SH, Lee SD, Nam H, Cha GS. Potentiometric biosensors using immobilized enzyme layers mixed with hydrophilic polyurethane. *Sens. Actuators B.* 50: 19-26 (1998)
9. Kumaran, S, Tran-Minh C. Determination of organophosphorus and carbamate insecticides by flow injection. *Anal. Biochem.* 200: 187-194 (1992)
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-256 (1976)
11. Evans A, James AM. Potentiometry and ion selective electrodes. Wiley, London, UK. pp. 198-206 (1987)
12. Flores EF, Kline DA, Johnson AR. Fruits and fruit products: GLC determination of organic acids in fruits as their trimethylsilyl derivatives. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 53: 17-20 (1970)
13. Srere PA, Brigitte B, Brooks GC. Citrate lyase: A pantothenate-containing enzyme. *Proc. Natl. Acade. Sci. USA.* 69: 1201-120 (1972)
14. Matsumoto K, Tsukatani T. Simultaneous quantitation of citrate and isocitrate in citrus juice by a flow-injection method based on the use of enzyme reactors. *Anal. Chim. Acta.* 32: 157-164 (1996)
15. Yoon SK, Lee JH, Yoo YJ, Rhee HK. Optimal control policy for multi-bed immobilized enzyme reactor. *Korean Institute of Chemical Engineers. Spring Symposium Proceedings* 208-209 (1988)
16. Bilitewski U, Rohm I. Biosensors for process monitoring. pp. 441-447. In: *Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, food, and the environment.* CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA (1997)
17. Singh M, Srere PA. The inactivation of citrate lyase from *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.* 246: 3847-3850 (1971)
18. Shin JH, Sakong DS, Nam H, Cha, GS. Enhanced serum carbon dioxide measurements with a silicone rubber-based carbonate ion-selective electrode and a high-pH dilution buffer. *Anal. Chem.* 68: 221-225 (1996)