

<총 설>

## 화학발광 (Chemiluminescence)법을 이용한 식품 오염 미생물의 측정

김윤미 · 이해련 · 정신교\*

경북대학교 농업생명과학대학 식품공학과

### The Determination of Food-borne Microorganism using Chemiluminescence Method

Yun-Mi Kim, Hye-Ryun, Lee and Shin-Kyo Chung\*

*Department of Food Science and Technology, College of Agricultural and Life Science, Kyungpook National University*

#### Abstract

Ultraweak photons could be emitted from the chemical reaction without any electromagnetic radient. These chemiluminescence could be detected by highly sensible photomultiplier recently. We will introduce the principal of chemiluminescence generation reaction, and the application studies in the determination of food-borne microorganisms in field. The counts of surface contaminated microorganism in mackeral and chicken for cold storage determined by ATP-chemiluminescence method had good correlation with the counts by standard agar plate method. However, there was little correlation between 2 methods in ginseng powder whose microbial counts were lower than 10,000 CFU.

**Key words** : chemiluminescence, food-borne microorganism, ATP

#### 서 론

산업이 고도화되고 정밀화됨에 따라 생체시료, 환경시료, 반도체분야에서 극미량 존재하는 무기물질, 유기물질 그리고 신체대사에서 발생하는 생화학적 성분의 정확하고 신속한 분석의 중요성이 증대되고 있다. 현재 이러한 정밀 분석분야에 사용되고 있는 기기는 대부분이 고가이며 따라서 전문지식을 가지고 있는 숙련된 관리자를 필요로 한다. 그러므로 분석 비용과 관리 차원에서 많은 어려움을 해결하기 위하

여 새로운 분석법의 개발과 이에 따른 각종 기기의 개발이 요구된다. 이러한 조건들을 만족시킬 수 있는 분석법의 한가지로 화학 발광법 (chemiluminescence method)이 있다. 화학발광 (chemiluminescence)이란 화학반응에 의하여 전자적으로 들뜬 화학종이 생성되고, 이것이 바닥상태로 되돌아가면서 빛을 방출하는 것을 말한다. 반딧불, 박테리아, 해양 생물 등의 생명체에서의 화학발광은 기원전부터 알려졌지만 합성 유기화합물로부터 화학발광이 관찰된 것은 1800년대 말경이다. 1887년 Radziszewski는 lophine (2,4,5-

triphenylimidazole)이 염기성에서 산소와 반응하여 녹색의 빛을 방출하는 것을 발견하였으며, 이는 최초의 유기합성물질을 이용한 화학발광이었다. 화학발광의 분석화학적 응용은 1970년 대에 기체 상의 화학 발광에서 비롯되어 1980년대에 들어서부터 수용액상의 화학발광 응용이 매우 활발히 진행되고 있다.

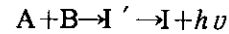
화학발광법은 발광을 내는 화학종의 수가 적기 때문에 비교적 적은 수의 화학종에만 이용되는 제한이 있지만 선택성이 좋고, 들뜨는 데에 필요한 에너지를 광원을 사용하지 않고 화학반응을 통해서 얻기 때문에 광원의 산란에 기인한 background signal이 적어짐으로 신호 대 잡음비 (S/N ratio)가 낮아져서 낮은 검출 한계를 얻을 수 있고<sup>2,4</sup> 검출범위 (dynamic range)가 넓은 장점이 있다. 또한 광원과 단색화장치 (monochromator)가 필요하지 않기 때문에 매우 간단하게 분석이 가능하다는 장점도 있다. 화학발광법에서 많이 사용하고 있는 화학발광 시약으로는 luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione), lucigenin, acridinium esters, aryl oxalate, peroxyoxalates, dioxetanes, tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium(II) 등<sup>5-7</sup>이 있다. 일반적으로 전자적 들뜬 상태로 만들기 위해 필요한 에너지는 화학반응으로부터 얻어지는데 가시광선의 파장을 갖는 빛을 생성하기 위해서는 최소 40~70kcal/mol의 에너지를 발생시킬 수 있는 화학반응이어야 한다. 이들 화학반응은 산화/환원반응으로서 화학결합의 해리나 전자전달반응 등이 포함된다. 최근 화학발광의 검출에 필요한 고감도의 소자와 관련 모듈의 개발에 따라 더욱 다양한 분야에서 생체의 미량성분의 정량과 이의 변화의 예측이 가능하게 되었다. 본고에서는 특히 식품 산업 분야에 있어서 필요한 식품의 부패 정도를 판정할 수 있는 오염 미생물 측정에 관련된 화학발광의 원리와 적용 사례를 소개하고자 한다.

## 1. 화학발광의 원리와 반응

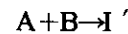
### 1.1. 화학발광의 원리

화학발광은 발광기술의 한가지로 두 가지의 일반적인 식으로 나타낼 수 있다.<sup>8</sup> 첫 번째로 두 화학종 사이의 반응이 들뜬 상태에서 바닥상태로 가면서 광자가

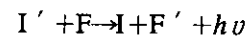
방출이 되는 경우이다. 즉,



두 번째 경우는 두 화학종의 반응이 들뜬 상태의 중간체를 형성하는 단계를 거친다. 중간단계의 물질이 가지고 있는 에너지를 형광 발색단에 옮겨주면서 형광단이 광자를 방출하는 방법이다.



및



모든 발광검출 체계에서와 마찬가지로 화학발광 검출법에서 요구되는 사항으로 분석 성분이 화학발광 물질이거나 형광 발색단이며, 이들은 에너지를 받아 들뜬 상태로 되어야 한다. 이러한 이유로 형광 검출법과 마찬가지로 검출법의 응용에서 많은 제약을 받고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 시도되는 방법은 비 화학발광 물질의 분석성분을 화학발광종으로 바꾸는 것이다. 또 화학발광의 효율을 감소시키거나 시약 또는 촉매의 농도를 감소시키는 분석 성분은 감소된 화학발광 검출신호로 간접적으로 검출된다. 한편 화학발광 검출은 화학적으로 들뜬 분석 성분의 농도에 의존하며 외부 광원이 필요하지 않기 때문에 분석 대상물의 검출에 대한 신호를 분석하는 광학적인 구성이 아주 간단하게 이루어질 수 있다.

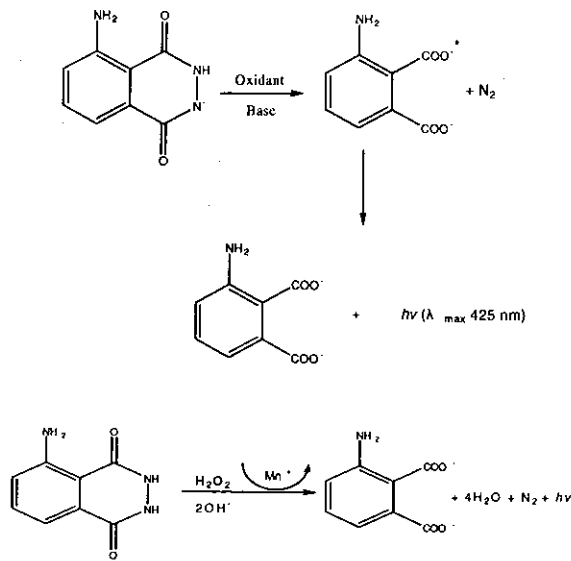
### 1.2. 화학발광의 반응과 시약

지금까지 알려진 많은 종류의 화학발광 반응을 다음과 같이 발색단의 종류에 따라 분류하여 보았다..

#### 1.2.1. Luminol

Luminol(5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazide-dione)과 관계된 화학발광 시스템은 luminol 또는 luminol의 유도체가 촉매 존재 하에서 과산화수소와 같은 산화제와 반응하여 화학발광을 내는 것에 기초를 두고 있다.<sup>9,13</sup> 산화제와 염기가 존재할 때, 산화제로 과산화수소와 금속이온 촉매가 존재할 때의 반응식은 Fig. 1.과 같다.<sup>14</sup>

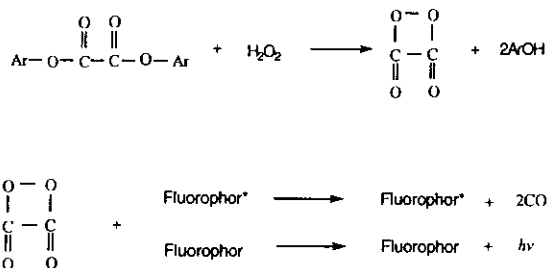
## 화학발광 (Chemiluminescence)법을 이용한 식품 오염 미생물의 측정



들뜬 상태의 3-amino phthalate분자는 425nm 영역에서 발광하며 luminol을 이용한 화학발광 반응의 발광 세기는 luminol의 농도, 사용되는 산화제의 농도 및 촉매에 의해서 조절된다. 그러므로 세 가지 화학종의 어느 것도 정량이 가능하다.<sup>15-24</sup>

### 1.2.2. Peroxyoxalate

Peroxyoxalate 화학발광은 감광된 화학발광 시스템이며 이 시스템에서는 우선 화학적으로 개시된 전자 교환 발광메커니즘에 의해서 높은 에너지의 중간체를 들뜨게 한다. 이 반응에서 diaryloxalate ester는 과산화수소의 존재 하에서 산화되어 dioxetane의 중간체로 되었다가 에너지를 형광 발색단에 내어준다.<sup>25</sup> 이와 같은 내용을 일반적인 반응식으로 나타내면 Fig. 2와 같다.<sup>26</sup>



위의 반응에서 여러 가지 종류의 aryl oxalate esters는 과산화수소와 반응하여 1,2-dioxetandione을 중간체

로 형성되어 형광 발색단을 들뜬 상태로 만든다. 들뜬 상태의 형광 발색단은 바닥 상태로 내려가면서 화학 발광을 하는데 이때 화학 발광세기는 형광 발색단의 농도에 의존한다. 이러한 peroxyoxalate화학발광 시스템은 화학적으로 들뜬 형광 발색단이 되며 50내지 108Kcal 범위에서 단일 상태의 들뜬 에너지를 이용할 수 있다. 이것은 대략적으로 265-570nm 영역에서 광학적으로 들뜬 상태와 대략적으로 비슷한 에너지이다. Peroxyoxalate 화학발광 시스템은 응용성이 많으며 직접적으로 형광 발색단 분석에 이용할 수도 있다. 또 이 시스템에서 반응의 촉매로 작용하는 다른 분석 성분에도 응용이 가능하다.

### 1.2.3. Acridinium

Acridinium을 베이스로한 화학발광 검출법은 과산화수소에 의한 acridinium ester의 산화반응을 이용한다. 이 반응은 acridinium의 유도체인 들뜬 상태를 만들며 빛을 방출하게 된다. Acridinium system을 이용한 화학발광신호는 과산화수소와 acridinium 농도에 의해서 조절되며 470nm영역에서 빛을 발광한다. 발광되는 빛의 세기는 과산화물의 농도에 영향을 주는 물질이나 acridinium 단위체에 영향을 주는 종들과 pH에 의해서 영향을 많이 받는다.<sup>27-30</sup> 따라서 이 시스템은 분석 대상물에 있는 acridinium이나 acridinium과 혼합되어 감소되거나 생성되는 물질 또는 과산화수소에 의해서 쉽게 산화되어 과산화수소의 농도를 감소시키는 물질을 간접적으로 분석할 수 있는 아주 유용한 도구로 이용된다.<sup>31,32</sup>

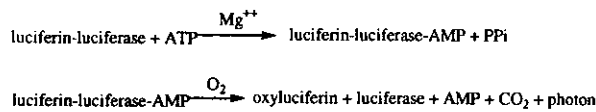
### 1.2.4. Luciferin

Luciferin은 adenosin 5'-triphosphate(ATP)와 반응하여 adenylluciferin을 형성한다. 다음 단계에서 oxyluciferin으로 산화하여 빛을 내게 된다 Luciferin을 이용한 반응은 직접적으로 ATP를 정량하는데 이용하며 또한 다른 효소시스템과 결합하여 ATP를 정량할 수 있다.<sup>33,34</sup>

## 2. 화학발광법에 의한 식품 오염 미생물의 측정

Chemiluminescence방법을 이용하여 미생물 내에

존재하는 ATP 량을 정량분석함으로써 미생물 수를 측정하는 방법이 최근 여러 분야에서 실제로 폭넓게 응용되고 있으며<sup>35,36</sup> 또한 식품산업에 있어서도 chemiluminescence 방법에 의해 미생물의 수를 신속하게 측정하는 연구가 활발하게 진행되고 있다 실제 연구결과에 의하면 우유, 과일, 크립 등의 식품에 있어서 측정된 미생물수와 ATP 함량은 높은 상관관계를 보여주고 있다.<sup>37,39</sup> Chemiluminescence 방법에는 크게 반딧불계 (firefly system)와 세균계 (bacterial system)로 나눌 수 있는데 특히 반딧불계는 빛을 발함에 있어서 효소인 luciferase와 기질인 luciferin, Mg<sup>++</sup> 그리고 ATP를 필요로 한다.<sup>40</sup> 그 반응기전을 요약하면 다음과 같다.



오늘날 미생물 검사에 널리 쓰이고 있는 전형적인 분석 방법은 agar plate count이다. 이 방법은 적어도 2일 이상 배양 후 결과를 볼 수 있다. 그러나 특정 배지에서 특정 미생물만 검출되는 고전적인 이 방법에 비교하여 ATP chemiluminescence 방법은 단일 생물체의 세포 수준까지 측정 가능하며, 즉시 결과를 도출하며, 낮은 비용과 별도의 sample 처리가 필요하지 않다는 장점을 갖고 있다. ATP chemiluminescence 방법의 주된 특징을 정리하면 다음과 같다.<sup>41</sup>

- 빛에 대한 높은 민감도 (high sensitivity)
- 운반하기 쉽다 (portability)
- 에너지 효율이 좋다 (low energy)
- 저가 (low cost)
- 고 안전성 (high stability)
- 위생성 및 청결성 (hygiene)
- 실험결과 도출의 신속성 (real time data)

### 2.1. 고등어 표면의 미생물 오염도 측정

고등어를 1°C에 저장하면서 표피를 swabbing 방법에 의해 미생물을 분리하여 총균수의 변화와 ATP chemiluminescence assay에 의한 RLU 값을 측정하여 상관관계를 측정하여 본 결과 0.90 이상의 상관계수를

나타내어 유의적인 관계가 있음을 알 수 있다. 따라서 ATP chemiluminescence assay는 고등어 표피 오염 미생물의 신속 측정 방법으로 적합함을 알 수 있었으며 이 방법을 사용하였을 경우 기존의 48시간 이상 소요되는 전통적인 plate count 방법에 비하여 전처리를 포함하여 30분 이내에 결과를 알 수 있는 매우 신속하고 정확한 측정방법임을 알 수 있었다.<sup>42</sup>

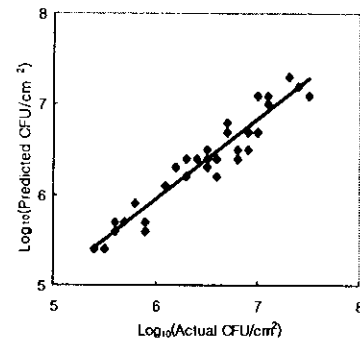


Fig. 1. Linear relationship between predicted CFUs and conventional CFUs for 32 mackerals.

The solid line is the regression including all data points. Sample were stored at 1°C for 4 days.

### 2.2. 계육 표면의 오염 미생물 측정

chemiluminescence 방법에 의하여 세균내에 존재하고 있는 ATP를 추출하여 그 양을 정량분석하므로써 계육표면에 생존하고 있는 세균수를 신속하게 측정하는데 응용할 수 있는 가능성을 조사하였다.<sup>43</sup>

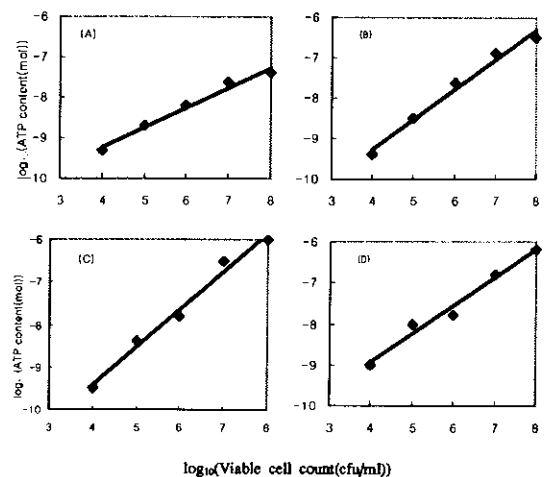


Fig. 2. Dilution curves for the suspension of *E. coli*(A), *H. alvei*(B), *P. putida*(C) and *A. hydrophila*(D) indicating linearity of response between ATP content and viable cell count.

화학발광 (Chemiluminescence)법을 이용한 식품 오염 미생물의 측정

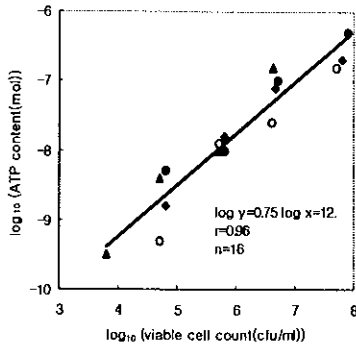


Fig. 3. Effects of various bacteria *E. coli*(◆), *H. alvei*(○), *P. putida*(▲) and *A. hydrophila*(●) isolated from surface of chicken with different numbers on the light production associated with the ATP content.

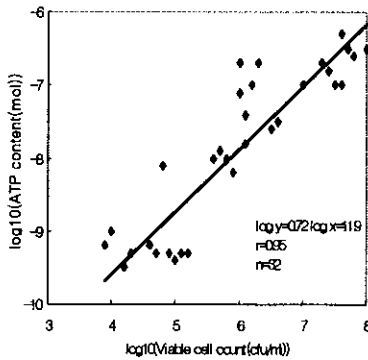


Fig. 4. Relationship between microbial ATP content and viable cell count of raw chicken meat surface

2.3. 인삼분말의 미생물 측정

미생물 오염도 검사방법인 ATP-chemiluminescence 방법을 인삼분말제품에 적용하여 기존의 미생물 검사 방법인 표준한천 배양법 (standard plate count)방법과 비교한 결과 인삼분말에 오염된 세균이 약 10,000 CFU/g (약 45 RLU/g에 해당)이상 있을 경우에는 세균 수가 증가함에 따라 ATP의 양이 증가하여 비례함을 알 수 있었다.

즉, 세균수가 10,000 CFU/g 이상일 경우 세균수와 ATP 함량과의 관계를 표준곡선으로 도식한 후 그래프 ( $y=3591.1x-146260$ )의 R 값을 계산한 결과  $R=0.98$ 로서 상관성 ( $R \geq 0.95$ )이 있는 것으로 나타났다. 그러나 분말에 함유된 세균의 수가 10,000 CFU/g 이하의 경우에는 세균수와 ATP 함량과의 상관성이 관찰되지 않았다. 따라서 낮은 세균 수와 ATP 함량과의 상관성

이 관찰되지 않았다. 낮은 세균수 ( $\leq 10,000$  CFU/g)에서는 세균 수 증가에 따른 ATP 증가가 비례하지 않는 것으로 관찰되어 인삼분말의 미생물오염도 측정방법으로 ATP 측정방법을 이용하기는 곤란할 것으로 생각된다.<sup>44</sup>

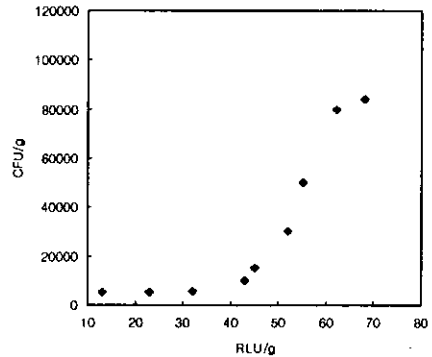


Fig. 5. Comparison of microbiological contamination when measured by ATP-bioluminescence and standard plate method Note: The values are means of three experiments. RLU: relative light units, CFU: colony forming units, When bacterial numbers of ginseng powder are only above 10,000 CFU/g, bacterial number(CFU) and ATP content (RLU) of the powder are correlative with  $R=0.98$

Harrison 등<sup>45</sup>은 양조 공업에 미생물 측정방법을 이용하였을 경우 미생물 오염도가 낮은 경우 즉, ATP의 양이 50 RLU/g인 경우에는 재현성 및 상관성이 없다고 하였다. 인삼분말의 경우에도 10,000 CFU/g에서는 이와 유사한 결과를 나타내었다. 이는 분말제품 자체의 ATP 및 색도 그리고 분말의 미세한 입자등이 방해 인자로 작용하여 이러한 결과를 나타낸 것으로 추론된다. 따라서 인삼분말에 오염된 세균수가 10,000 CFU/g 이하의 경우에는 이 방법의 사용은 재고되어야 할 것으로 생각되나 미생물수가 10,000 CFU/g 이상으로 오염도가 높은 제품에는 신속하고 재현성이 높은 방법으로 생각된다.

결론

빛이 없이도 화학반응의 종류에 따라 아주 미약하게 발생하는 광자를 검출하여 측정 및 분석에 이용하는 화학발광법의 원리와 식품 오염 미생물의 측정에

관한 응용 예를 알아보았다. ATP-chemiluminescence 방법으로 냉장저장 중 고등어와 닭고기 표면의 일반 세균을 측정하여 기존의 배양법과 비교하여 본 결과, 아주 높은 정의 상관성이 있었다. 그러나 인삼분말을 비교 측정하여 보았을 때는 오염된 균수가 10,000 CFU 이하에서는 상관성이 적었다. 따라서 ATP-chemiluminescence 방법은 다량의 균이 식품에 오염된 경우의 미생물 측정에 적합한 방법이라고 할 수 있다.

### 참고문헌

1. McCapra F. Q. Rev. 1996. Chem. Soc, London. 20:485-510.
2. Khan, A. U. and M. J. Kasha. 1963. Chemiluminescence Arising from Simultaneous Transitions in Pairs of Singlet Oxygen Molecules. Chem. Phys. 39:2105.
3. Harvey E. N. 1952. "Bioluminescence", Academic Press. New York. 649p.
4. Papadopoulos, K. Spartalis, S. and Nikokavouras, J. 1998. Chemiluminescence at liquid-liquid interfaces. Enhanced chemiluminescence of lucigenin and long alkyl lucigenins. J. Photochem. Photobiol. Anal. Chem. 4:115-118.
5. He, Z. K., Wu, F. W., Ling, L. S., Luo, Q. Y. and Y. Zeng. 1999. Chemiluminescence determination of thiourea using tris ( 2,2' -bipyridyl ) ruthenium (II)-KMnO<sub>4</sub> system. Anal. Sci. 15:381-383.
6. Han, H. Y., He, Z. K. and Zeng, Y. 1999. Pulse injection analysis with chemiluminescence detection: determination of cinnamic acid using the Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-KMnO<sub>4</sub> system. Anal. Sci. 402: 113-118.
7. Staller, T. D. and M. J. Sepaniak. 1997. Chemiluminescence detection in capillary electrophoresis. Electrophoresis. 18:2291-2296.
8. Staller, T. D. and M. J. Sepaniak. 1997. Chemiluminescence detection in capillary electrophoresis. Electrophoresis. 18:2291-2296.
9. Kulmala, S., Ala-Kleme, A., Kulmala, A., Papkovsky, D. and K. Loikas. 1998. Cathodic Electrogenerated Chemiluminescence of Luminol at Disposable Oxide-Covered Aluminum Electrodes Anal. Chem. 70:1112-1118.
10. Tsukagoshi, K., Fujimura, S. and R. Nakajima. 1997. Anal. Sci. 13:279-281.
11. Dapkevicius, A., Beek, T. A., Niederlander, H. A. G. and A. Groot. 1999. Anal. Chem. 12:736-740.
12. Yoshida, H., Nohta, H., Ohkura, Y. and K. Zaitsu. 1997. Anal. Sci. 13:673-675.
13. Sano, A. and H. Nakamura. 1995. Anal. Chem. 67:4376-4379.
14. Yasuda, M. and S. J. Narita. 1997. Simultaneous determination of phospholipid hydroperoxides and cholesteryl ester hydroperoxides in human plasma by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. J. Chromatography B. 693:211-271.
15. Imdadullah, Fujiwara, T. and T. Kumamaru. 1991. Anal. Chem. 63:2348-2352.
16. Fang, Q., Sun, X. T., Sun, Y. Q. and Z. L. Fang. 1997. A flow injection microdialysis sampling chemiluminescence system for in vivo on-line monitoring of glucose in intravenous and subcutaneous tissue fluid microdialysates. Anal. Chem. 69:3570-3577.
17. Qin, W., Zhang, Z. and H. Liu. 1998. Chemiluminescence Flow-Through Sensor for Copper Based on an Anodic Stripping Voltammetric Flow Cell and an Ion-Exchange Column with Immobilized Reagents. Anal. Chem. 70:3579-3584.
18. Yuan, J. and A. M. Shiller. 1999. Determination of subnanomolar levels of hydrogen peroxide in seawater by reagent-injection chemiluminescence detection. Anal. Chem. 71:1975-1980.
19. Kiba, N., Koemado, H. and M. Furusawa. 1995. Flow-injection method for the simultaneous

- determination of D-glucose and 3-hydroxybutyrate with Co-immobilized enzyme reactors and a chemiluminometer. *Anal. Sci.* 11:605-609.
20. Hasabe, T., Nagao, J. and T. Kawashima. 1997. *Anal. Sci.* 13:93-98.
  21. Kyaw, T., Fujiwara, T., Inoue, H., Okamoto, Y. and T. Kumamaru. 1998. Reversed micellar mediated luminol chemiluminescence detection of iron(II, III) combined with on-line solvent extraction using 8-quinolinol. *Anal. Sci.* 14:203-297.
  22. Tsukagoshi, K., Sumiyama, M., Nakajima, R., Nakayama, M. and M. Maeda. 1998. Chemiluminescence Property of the Luminol-Hydrogen Peroxide-Copper(II) System in the Presence of Surface-Carboxylated Microspheres. *Anal. Sci.* 14:409-412.
  23. Ikebukuro, K., Wakamura, H. and I. B. Karube. 1996. Phosphate sensing system using pyruvate oxidase and chemiluminescence detection. *Biosens. Bioelectron.* 11:959-965.
  24. King, D. W., Lounsbury, H. A. and F. J. Millero. 1995. Rates and mechanism of Fe(II) oxidation at nanomolar total iron concentrations. *Environ. Sci. Tech.* 29(3) :818-824.
  25. Hadd, A. G. and J. W. Birks. J. 1996. Kinetics and Mechanism of the Nucleophilic-Substitution Reaction of Imidazole with bis(2,4,6-Trichlorophenyl) Oxalate and bis(2,4-Dinitrophenyl) Oxalate. *Org. Chem.* 61:2657-2663.
  26. Zhou, Y. and G. T. Zhu. 1997. 44:2041-2049.
  27. Matsunaga, T., Kawasaki, M., Yu, X., Tsujimura, N. and N. Nakamura. 1996. Chemiluminescence enzyme immunoassay using bacterial magnetic particles. *Anal. Chem.* 68:3551-3554.
  28. Akhavan-Tafti, H., Desilva, R., Arghavani, Z., Eickholt, R.A., Handley, R.S., Schoenfelner, B.A., Sugioka, K., Sugioka, Y. and A. P. Schaap. 1998. Characterization of Acridancarboxylic Acid Derivatives as Chemiluminescent Peroxidase Substrates. *J. Org. Chem.* 63:930-937.
  29. Arakawa, H., Maeda, M. and A. Tsuji. 1992. *Anal. Sci.* 8:481-485.
  30. Sasamoto, K., Horiguchi, D. and Y. Ohkura. 1992. Chemiluminescence of quinoline derivatives. *Anal. Sci.* 8:709-712.
  31. Ikegami, T., Arakawa, H., Maeda, M. and A. Tsuji. 1994. *Anal. Sci.* 10:831-834.
  32. Sato, N., Shirakawa, K., Kakihara, Y., Mochizuki, H. and T. Kanamori. 1996. Preliminary studies on chemiluminescence immunoassay for human chorionic gonadotropin and thyrotropin using acridinium ester-labeled antibody. *Anal. Sci.* 12:853-858.
  33. Mitani, M., Koinuma, Y. and M. Kosgi. 1994. *Anal. Sci.* 10:267-269.
  34. Mitani, M., Sakaki, S., Koinuma, Y. and Y. Toya. 1994. Chemiluminescent assay of  $\beta$ -D-galactosidase using Cypridina luciferin analogue: 3-( $\beta$ -D-galactopytanosyloxy)-6-(4-methoxy-phenyl)-2-methyl-imidazo[1,2-a]pyrazine. *Anal. Sci.* 10:813-814.
  35. D'eustachio, A. J., Johnson, D. R. and G. V. Levin. 1968. *Bacteriol. Proc.* 21:13.
  36. Klofat, W., Picciolco, G., Chappelle, E. W. and E. Freese. 1969. *J. Biol. Chem.* 244- 270.
  37. Giffiths, M. W., Phillips, J. D. and Muir, D. D. 1984. *J. Soc. Dairy Technol.* 37: 22.
  38. Vossen, J. and H. Vanstaen. 1982. In *Recent Development in Food Analysis*, Balts, W., Czedik-Eysenberg, P. and Pfannhauser, W.(ed). Verlag Chemie, Basel, pp.299.
  39. Waes, G. and R. Bossuyt. 1981. A rapid method to detect post contamination in pasteurized milk. *Milchwissenschaft.* 36:548.
  40. McClory, W. D. and B. L. Strehler. 1949. *Arch. Biochem.* 22:420.
  41. Kim, K. J. and H. S. Kim. 2000. *Institute of Global Environment.* 11:17-22.
  42. Oh, S. W., Jo, J. H. and N. H. Lee. 1999. *Korean. J. Food Sci. Technol.* 31: 1345-1348.

43. Choi, B. K., Kim, J. B., Shin, H. K. and S. B. Lee. 1986. Korean J. Food Sci. Technol. 18.
44. Kwak, Y. S., Kim, C. S., Song, Y. B. and S. R. Ko, 2001. J. Ginseng Res. 25: 127-129.
45. WHO. 1985. Ethylene oxide. Environmental Health Criteria. 55p.