

## 효소 바이오센서를 이용한 식품의 곰팡이 오염 지표물질인 Ergosterol 정량분석

김미경 · 김종원 · 김미라<sup>1\*</sup>

경북대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>경북대학교 식품영양학과, 장수생활과학연구소

### Quantitative Analysis of Ergosterol as a Biomarker of Mold-contaminated Foods Using the Enzyme Biosensor

Mi Kyeong Kim, Jong Won Kim and Mee Ra Kim<sup>1\*</sup>

Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Center for Beautiful Aging, Kyungpook National University

#### Abstract

Ergosterol is the significant component of the cell wall of fungi. Its presence is regarded as evidence of fungi contamination in grain and other foods. Many studies on ergosterol detection have been carried out using chemical methods, but those methods required complicated pre-treatments and long analysis times. In this study, an amperometric biosensor was developed for fast and precise ergosterol detection. The biosensor system used the electron transfer of hydrogen peroxide produced from the reaction of ergosterol with cholesterol oxidase. The biosensor system consisted of a peristaltic pump, a syringe loading sample injector, an enzyme reactor, a fabricated flow-through cell containing a working electrode, a reference electrode and a counter electrode, and a potentiostat/recorder. The working electrode was prepared by coating modified multi-wall carbon nanotube (MWNT) on glassy carbon electrode. The MWNT-NH<sub>2</sub> coated glassy carbon electrode linearly responded to hydrogen peroxide in the range of  $1 \times 10^{-5} \sim 8 \times 10^{-5}$  M with a detection limit of  $10^{-7}$  M in the basic performance test. The currents produced from the ergosterol biosensor showed the linearity in a range from  $1.0 \times 10^{-6}$  M to  $1.0 \times 10^{-5}$  M ergosterol.

**Key words:** amperometric biosensor, ergosterol, MWNT-NH<sub>2</sub>, hydrogen peroxide

## 1. 서론

1993년 우루과이라운드 협상, 1995년 세계무역기구(WTO) 출범에 따른 무역 자유화 등으로 우리나라의 농산물 수입은 급속도로 증가하고 있다. 이러한 가운데 수입 식품의 안전성에 대한 국민적 관심은 매우 높은 실정이다. 수입되는 식품의 양이 엄청난 규모이기 때문에 수입식품의 검역 시 식품의 변질, 오염 여부를 빠르고 정확하게 검사하는 것은 매우 중요한 일이다.

많은 농산물은 다량의 전분을 함유하고 있으며 특히 곡류는 유통, 저장 중 수분함량이 16% 이상이면 곰팡이와 같은 미생물의 번식이 쉽게 일어나 변질될 수 있다.

특히, 곰팡이에 의해 곡류가 오염될 경우 식품의 품질을 저하시킬 뿐만 아니라 곰팡이에 의해 생성되는 독소로 인해 식중독이 유발될 수 있다. 그러나 곰팡이를 육안으로 확인할 수 있을 정도가 되면 부패가 심한 상태이므로 식품으로서의 가치를 이미 상실하고 안전성 문제를 야기한다.

*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* 속의 곰팡이는 곡류의 주된 오염 미생물로서 aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A, patulin, deoxynivalenol (DON), zearalenone 등의 매우 유독한 독소를 생성하여(Hwang JH 등 2004) 이를 섭취할 경우 간장장애, 신장장애, 호흡곤란, 생식기의 이상 같은 치명적인 식중독 증상을 일으킨다(Kim MR 2004). 특히 이들 독소는 내열성이 매우 강해 가열처리 시에도 독소의 활성이 쉽게 없어지지 않고 잔존하여 인체에 위해를 일으킬 수 있다(Kim MR 2004).

수입식품에서 오염된 곰팡이로 인해 곰팡이 독소인 mycotoxin의 검출이 종종 보도되는데 식품의 안전성을 확

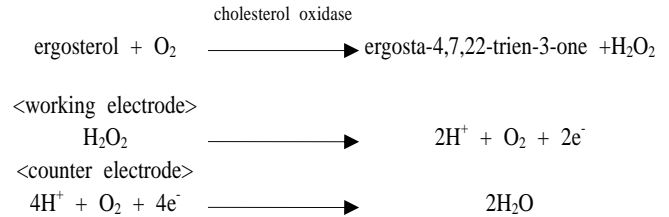
\*Corresponding author: Mee Ra Kim, Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University  
Tel: 053-950-6233  
Fax: 053-950-6229  
E-mail: meerak@knu.ac.kr

보하고 오염된 식품을 효율적으로 검출하기 위해서는 식품 위해 물질을 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 기술이 요구된다(Yoon MH 등 1998). 곰팡이 검사법 중 미생물학적 곰팡이 검사법은 일반 세균검사법에 비하여 복잡하고 다루기가 어려우며 검사 kit도 잘 개발되어 있지 않아 검사시간이 오래 걸린다. 식품에서 곰팡이 오염 여부를 검사하는 방법으로는 크게 Howard mold count, direct plating, dilution plate count 등의 전통적인 미생물학적 방법(Battilani P 등 1996, Gourama H와 Bullerman LB 1995a)과 곰팡이의 구성성분이나 대사산물인 ergosterol, 유리지방산, chitin을 측정하는 화학적 및 생화학적 방법 등이 있다(Gourama H와 Bullerman LB 1995b, Ryu D와 Bullerman LB 1999, Weber N 등 2001). 또한 ergosterol의 분석법으로는 일반적으로 사용되는 HPLC 법(Ravelet C 등 2001, de Sio F 등 2000) 및 HPLC-MS 및 MS법(Lamper C 등 2000, Toh TH 등 2001) 등이 있으며 면역분석법(Morgan MRA 등 1992)을 이용한 분석방법도 보고되었다. 이들 방법 중 기기분석법의 경우는 분석결과의 정확성은 높으나 고가의 장비와 연구시설이 필요하고 분석시간이 길며, 면역분석법의 경우는 발색단과 표지효소를 사용해야 한다. 이런 측면에서 바이오센서는 분석시간을 줄이고 선택적으로 물질을 확인할 수 있는 장점을 지니고 있어 곰팡이 검출법으로 활용할 수 있는 새로운 기술이라고 할 수 있다.

바이오센서는 미생물, 효소, 항체, 동·식물의 조직, 동물 세포 등 기질 선택성과 반응특이성을 가진 생체관련 물질을 이용하여 복잡한 시료 전처리 없이 기질 및 항원, 세포 등과 같이 시료 중에 존재하는 특정성분을 선택적으로 신속하게 측정할 수 있는 장치이다(Sethi RS 1994). 전류 측정식 바이오센서는 검출하고자 하는 성분과의 반응에 의해 생성된 전자를 전극을 통해 측정하는 방식으로, 측정방법이 간단하며 감도가 높고 빠른 반응결과를 얻을 수는 장점을 지닌다.

한편 ergosterol은 곰팡이의 세포벽 성분으로서 곰팡이 증식과 비례하며 plate count에 의하여 잘 확인되지 않는 곰팡이 초기증식단계에서 곰팡이를 검출하는데 사용될 수 있어 식품의 곰팡이 오염 초기지표로서 매우 유용한 물질이다(Ravelet C 등 2001, Abramson D 등 1998). 따라서 본 연구에서는 식품의 곰팡이 오염지표 물질로 유용한 ergosterol을 전기화학적으로 분석하기 위하여 아래와 같은 반응식을 이용한 전기화학적 ergosterol 검출 원리를 정하였다.

즉, ergosterol과 cholesterol oxidase 반응에 의해 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 일정한 전위차가 있는 두 전극 사이에서 비가역적으로 산화반응을 일으키게 되는데, 이때 적용된 전위차에서 양극 산화(anodic oxidation)시 발생하는 확산전류는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도에 비례하게 된다(Shin MC와 Kim HS



1993). 따라서 전류의 변화를 측정하여 기질인 ergosterol의 농도를 측정할 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 cholesterol oxidase 효소 고정화를 통해 효소반응기를 제작하였으며 생성물질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 고감도로 측정할 수 있는 전극을 제조하였고 flow injection analysis (FIA) 시스템을 도입하여 시료의 연속적인 분석이 가능하도록 ergosterol 센서 시스템을 구축하고 곰팡이의 세포벽 성분인 ergosterol 정량분석 성능을 평가하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기구

Multi-walled carbon nanotubes (MWNTs)는 c-tube 100 (CNT CO. LTD, Incheon, Korea)을 구입하여 사용하였다. 유리탄소전극(CHI 104)은 CH Instruments (U.S.A.)에서 구입하였고, glutaraldehyde, aminopropyl glass beads (500 Å, 200-400 mesh average pore size), cholesterol oxidase (EC 1.1.3.6), bovine serum albumin은 Sigma (St. Louis, Mo. USA)에서 구입하였다. Peristaltic pump (IPC-N-8)는 Ismatec Co. (Glatbrugg-Zürich, Switzerland)로부터 구입하였고 기준전극으로는 Ag/AgCl electrode (K0260, Princeton Applied Research, U.S.A.)를 사용하였으며, 상대전극으로는 platinum wire를 사용하였다. Teflon tubing은 Cole-Parmer Instrument Company (Vernon Hills, Illinois, U.S.A.)로부터 구입하였으며, 전기화학반응을 측정하기 위해서 Potentiostat/galvanostat (model 273A, EG&G, U.S.A.)를 이용하였다.

### 2. Ergosterol 표준용액의 조제

Ergosterol은 chloroform이나 hexane과 같은 유기용매에 대한 용해도는 높은 반면 수용액에 대한 용해도가 매우 낮다. 따라서 실험 시 효소활성 및 전극 반응에 영향을 주지 않으면서도 ergosterol을 용해시킬 수 있는 용매를 제조하는 것이 필요하였다. 본 실험에서는 Masoom M과 Townsend A(1985)의 연구에서 보고되었던 cholesterol 용액 제조방법을 수정하여 ergosterol 용액을 제조하였다. 즉, 1.0×10<sup>-4</sup> M ergosterol 시료용액을 제조하기 위하여 ergosterol 4 mg을 1 mL의 isopropanol에 넣고 교반한 다음 TritonX-100 0.8 mL를 넣고 0.1 M potassium phosphate

buffer (PB) (pH 7.0) 1 mL를 첨가한 후 3차 증류수로 전체양이 20 mL가 되도록 하였다. 이를 용매로 연속적으로 희석하여 ergosterol 표준용액을 제조하였다.

### 3. Carrier 용액 제조

센서 시스템의 carrier 용액은 ergosterol 표준용액 제조 시 사용한 용매와 유사하게 제조하되 계면활성제가 효소의 활성 및 전극반응에 영향을 줄 수 있으므로 TritonX-100의 양을 carrier 용액의 1%가 되도록 제조하였다(Shin MC와 Kim HS 1993). 즉, isopropanol 25 mL, TritonX-100 5 mL를 혼합한 후 0.1 M PB (pH 7.0) 10 mL를 넣은 다음 3차 증류수를 넣어 총 부피가 500 mL가 되도록 하였고 carrier용액의 pH는 7.0이었다.

### 4. 효소반응기 제작 및 coupling efficiency 분석

Kim MR과 Kim MJ(2003)의 방법을 수정하여 cholesterol oxidase 효소를 고정화하고 효소반응기를 제작하였다. 즉, 0.1 M PB (pH 7.0)를 이용하여 2.5% glutaraldehyde를 제조한 다음 이를 aminopropyl glass beads 0.25 g과 혼합하여 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 잔류하는 glutaraldehyde를 제거하기 위하여 증류수로 수차례 세척하고 다시 PB로 세척한 후 2 mL PB에 담가 30분 동안 냉장고에서 정치시켰다. Cholesterol oxidase 10 units (4.16 mg)를 glass beads가 담겨 있는 PB에 첨가하여 4°C에서 12시간 반응시켜 효소를 고정화하였다. 고정화 후 상층액은 효소의 coupling efficiency를 확인하는데 이용하였으며, 효소가 고정화된 glass beads는 3차 증류수로 수차례 세척하고 다시 PB로 세척하였다. 세척한 glass beads는 tubing에 채우고 0.1 M PB (pH 7.0)로 충진한 후 tubing의 양끝을 다공성 종이와 nipple로 막아 효소반응기를 제작하였다. 효소반응기는 사용하기 전까지 4°C 냉장 보관하였다.

효소의 coupling efficiency는 Bradford assay를 이용하여 구하였다(Bradford MM 1976). 즉, bovine serum albumin으로 단백질 정량에 필요한 표준용액을 만들어 Bradford reagent로 염색한 후 spectrophotometer (DU 800, Beckman, U.S.A)를 이용하여 595 nm에서 측정한 후 검량곡선을 얻었으며, 효소 고정화 시 얻은 상층액을 반응시켜 흡광도를 측정하여 coupling efficiency를 구하였다.

### 5. MWNT의 기능화 및 FT-IR 측정

Santhosh P 등(2006a)과 Santhosh P 등(2006b)의 방법을 수정하여 MWNT의 amine 기능화를 실시하였다. 즉, 5.0 g의 MWNT를 60% 질산용액 100 mL와 혼합하여 30분 동안 초음파기에서 처리한 다음 60~65°C에서 24시간 동안 환류하였다. 잔류물을 상온에서 냉각한 후 polycarbo-

nate membrane (0.2 µm pore size)으로 여과한 다음 증류수로 pH가 중성이 되도록 수차례 세척하고 진공건조기에서 60°C로 15시간 동안 건조하였다. 건조된 MWNT 1.2 g에 thionyl chloride 20 mL를 첨가하고 60~65°C에서 24시간 동안 환류하였다. 이를 여과하여 tetrahydrofuran (THF)로 세척한 후 20°C의 진공건조기에서 건조시켰다. 이를 다시 poly(ethylene glycol)bis(3-aminopropyl) 0.14 g을 30 mL THF에 용해시킨 용액으로 60°C에서 24시간 동안 환류시키고 여과, 분리하여 진공건조하였다.

MWNT의 기능화를 확인하기 위하여 800~2000 nm에서 FT-IR (Spectrum GX & AutoImage, Perkin-Elmer, U.S.A.)을 측정하였다.

### 6. 작업전극과 flow-through cell 제작 및 FIA 시스템 구성

작업전극을 제작하기 위하여 일정량의 amine 기능화된 MWNT (MWNT-NH<sub>2</sub>)와 dimethylformamide (DMF)를 혼합하여 약 2시간 정도 저어준 다음 이 중 10 µL를 유리탄소전극의 유리면에 떨어뜨려 24시간 동안 상온에서 건조시켜 사용하였다.

또한 FIA 시스템에 사용하기 위하여 작업전극, 상대전극(Pt), 기준전극(Ag/AgCl)이 들어갈 수 있는 flow-through cell을 제작하였다. Flow-through cell의 바닥 부분에 carrier가 흐를 수 있도록 양쪽으로 구멍을 만든 후 tubing을 끼웠으며 세 개의 전극 사이에 일정한 간격을 유지시키기 위해 cell 윗부분에 덮개를 만들어 전극 너비에 맞는 구멍을 만들고 각각의 전극을 끼워 넣었다. 또한 일정한 부피(약 2.5 mL)의 carrier 용액이 유지될 수 있도록 cell의 높이도 조정하였다.

Ergosterol 분석용 FIA 시스템은 cholesterol oxidase 효소반응기, 기준전극, 작업전극, 상대전극을 포함한 flow-through cell, peristaltic pump, sample injector, potentiostat로 구성되었다. FIA 시스템의 도식을 Fig. 1에 나타내었

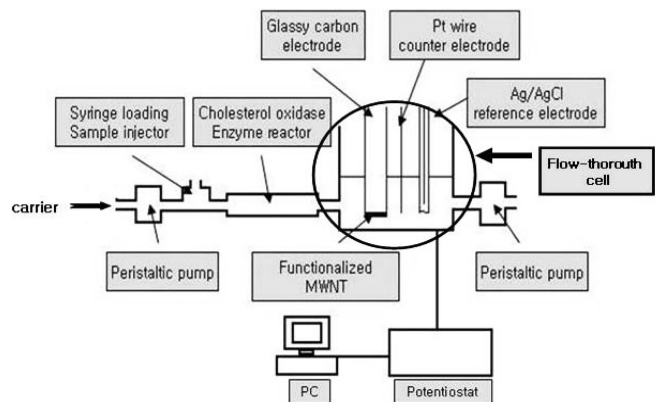


Fig. 1. Schematic diagram of the ergosterol biosensor with flow injection analysis system.

다. FIA 시스템을 통해 전기화학적 반응을 측정하였으며, Modern 270/250 research electrochemistry software 4.30 program을 이용하여 데이터를 얻었다.

### 7. Cyclic voltammetry (CV) 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도에 따른 산화 피크와 환원 피크를 파악하기 위하여 제작한 작업전극의 cyclic voltammetry를 potentiostat를 이용하여 측정하였다. 먼저 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 0, 0.1, 0.5 mM의 농도로 제조한 다음 작업전극을 용액에 담그고 기준전극으로 Ag/AgCl, 상대전극으로 Pt를 사용하여 -0.7~0.5 V에서 scan rate 50 mV/s로 cyclic voltammetry를 적용하였다.

### 8. 작업전극의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 검출능 측정

작업전극의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 검출능을 확인하기 위하여 ergosterol를 용해할 때 사용한 용매를 사용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 1×10<sup>-5</sup>~8×10<sup>-5</sup> M 농도로 제조하여 FIA 시스템을 통해 나타나는 전기화학적 반응을 측정하였다.

### 9. Ergosterol 측정

바이오센서의 ergosterol 정량분석 성능을 확인하기 위하여 ergosterol 용액을 1×10<sup>-6</sup>~10×10<sup>-6</sup> M 농도로 제조하여 FIA 시스템을 통해 나타나는 전기화학적 반응을 측정하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. MWNT의 기능화 및 FT-IR 분석

본 연구에서는 MWNT의 amine functionalization을 위해 3단계의 과정을 거쳤다. 첫 단계는 MWNT를 질산과

혼합하여 초음파 처리한 것으로, 이 과정을 통해 MWNT의 산화와 정제가 이루어진다. 즉, 나노튜브의 팁 부분과 표면이 화학적으로 산화함으로써 -COOH의 산소 함유기능기가 도입되어 carboxylated MWNT (MWNT-COOH)를 얻을 수 있다(Duesberg GS 등 1998, Woo JH 2005). 두 번째 단계에서는 MWNT-COOH를 thionyl chloride와 반응시킴으로써 MWNT-COCl을 얻게 되는데 이 결합은 MWNT 표면상의 카르복실기 사이에서 아미드 결합을 유도하기 위해 거치는 단계이다. 마지막 단계에서는 MWNT-COCl과 poly(ethylene glycol)bis(3-aminopropyl)을 반응시킴으로써 최종적으로 amine 기능화 MWNT (MWNT-NH<sub>2</sub>)를 얻었다.

MWNT에 아민기가 도입된 것을 확인하기 위하여 FT-IR로 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. (a)는 MWNT, (b)는 카르복실기로 개질된 MWNT이고, (c)는 아민그룹이 도입된 MWNT로서 (b)에서는 1,383 cm<sup>-1</sup>에서 카르복실기의 C-O stretching vibration에 의한 피크가 나타났고, (c)에서는 1,103 cm<sup>-1</sup>에서 아민기의 전형적인 C-N stretching vibration에 의한 피크가 나타났다. 이는 개질된 MWNT의 구조 특성을 평가한 Kim KS(2006)의 연구 결과와 유사한 결과로서 본 연구에서 제조한 MWNT에 기능기가 잘 도입된 것을 확인할 수 있었다.

### 2. 효소 고정화에 대한 coupling efficiency

Cholesterol oxidase를 glass beads에 고정화시킨 후 coupling efficiency를 측정한 결과 99%의 coupling efficiency를 나타내 효소가 glass beads에 잘 고정되었음이 확인되었다.

### 3. Cyclic voltammetry 측정

Cyclic voltammetry는 보통 유기화합물의 산화 환원 특

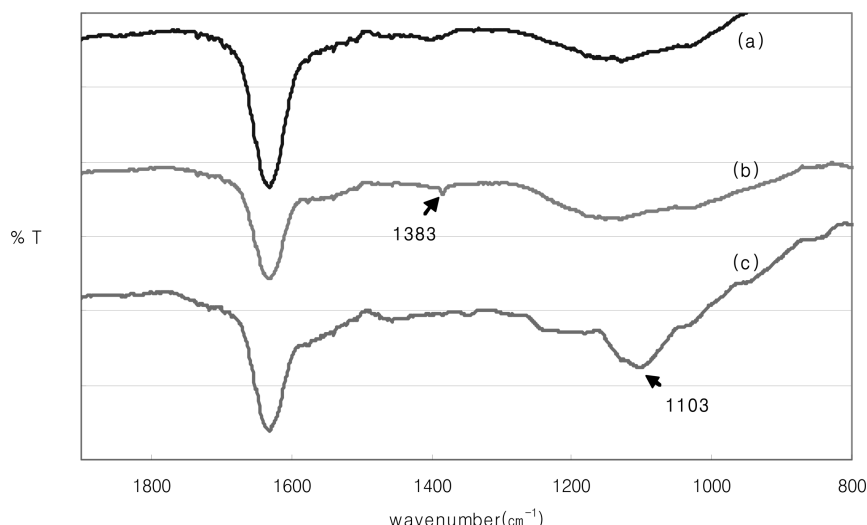
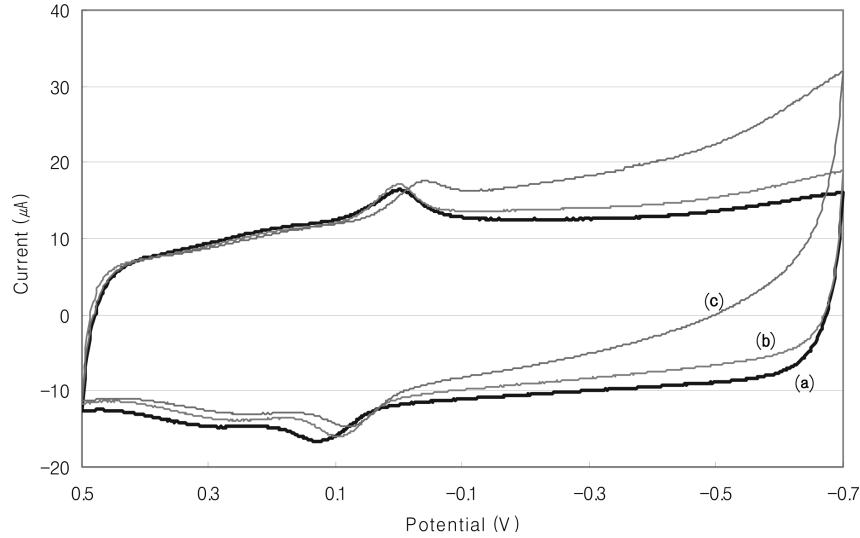


Fig. 2. FT-IR spectra of (a) MWNT, (b) MWNT-COOH and (c) MWNT-NH<sub>2</sub>.

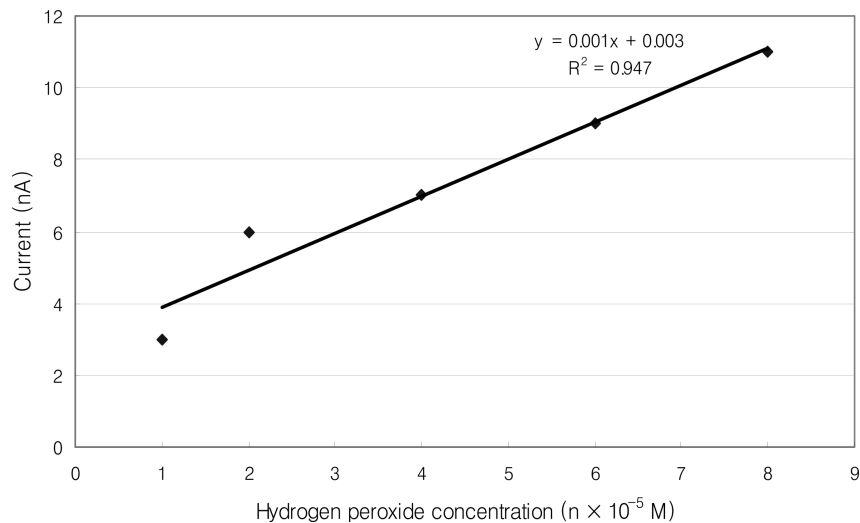


**Fig. 3.** Cyclic voltammogram of modified glassy carbon electrode.  
 (a) absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b) presence of 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (c) presence of 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

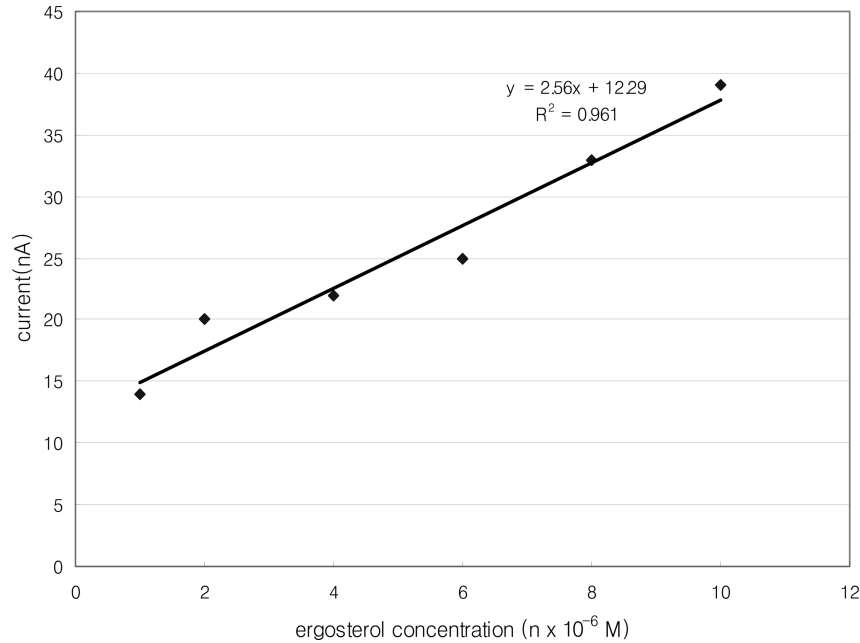
성을 측정하거나 산화 환원 메커니즘을 이해하기 위해 측정하는 방법으로, 작업전극의 전위를 초기 전위로부터 산화(또는 환원), 환원한계전위(혹은 산화한계전위)를 거쳐 원래의 전위로 돌아오는 동안 전류값을 측정한다. 본 실험에서 제조한 작업전극의 cyclic voltammetry를 측정할 결과는 Fig. 3과 같다. Cyclic voltammogram에서 볼 수 있듯이 환원 피크는 -0.006 V, 산화 피크는 0.132 V로 나타났으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 높아질수록 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 산화 정도를 나타내는 양극 전류의 크기는 증가하였고 환원을 나타내는 음극 전류의 크기는 감소하여 본 실험에서 제조한 전극이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 측정하는데 적합한 것을 확인할 수 있었다.

**4. 작업전극의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 검출능**

유리탄소전극에 MWNT-NH<sub>2</sub>를 도포하여 제작한 작업전극의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 검출능을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 1×10<sup>-5</sup>~8×10<sup>-5</sup> M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 200 µL 주입하여 전류의 변화를 측정한 결과 검량곡선의 결정계수(r<sup>2</sup>)가 0.947로 나타나 전류 변화값이 상당히 좋은 선형관계를 보여주었다. 이는 제조한 작업전극이 낮은 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 정량적으로 검출할 수 있는 전극임을 나타낸 것으로 ergosterol의 효소반응으로부터 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>도 효과적으로 검출할 수 있는 성능을 가지고 있음을 보여주었다. 한편 10<sup>-8</sup> M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 이하에서는 피크가 나타나지 않아 작업전극의 검출한계는 10<sup>-7</sup> M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 결정하였다.



**Fig. 4.** Calibration curve of current according to the concentration of hydrogen peroxide.  
 Conditions : carrier, ergosterol solvent (pH 7.0); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injection volume, 200 µL ; flow rate, 1.5 mL/min; initial potential, -0.2 V; working electrode, modified glassy carbon electrode; reference electrode, Ag/AgCl electrode; counter electrode, platinum



**Fig. 5.** Calibration curve of current according to the concentration of ergosterol by the ergosterol biosensor. Conditions : carrier, ergosterol solvent (pH 7.0); injection volume, 200  $\mu$ L; flow rate, 1.0 mL/min; initial potential, -0.2 V; working electrode, modified glassy carbon electrode; reference electrode, Ag/AgCl electrode; counter electrode, platinum

### 5. 센서의 ergosterol 검출능

Ergosterol은 곰팡이의 주요 세포벽 성분으로 식품에 곰팡이가 오염되었을 경우 이를 확인할 수 있는 중요한 지표물질로 이용된다. 따라서 본 실험에서는 ergosterol의 신속 정확한 정량분석을 위해 고정화 효소를 이용한 바이오센서를 개발하였으며 센서를 이용하여 실제 여러 농도의 ergosterol 용액에 대한 전류값을 측정하여 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. 실험결과  $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5}$  M의 낮은 ergosterol 농도에서도 ergosterol에 대한 전류반응을 얻을 수 있었으며, 결정계수도 0.961로 좋은 선형관계를 나타내었다. 따라서 본 바이오센서가  $10^{-6}$  M 수준의 낮은 농도의 ergosterol을 검출할 수 있는 성능을 가지고 있는 것으로 나타나 식품의 곰팡이 오염여부 확인과 ergosterol 정량을 위해 사용될 수 있는 것이 확인되었다.

현재까지 ergosterol 센서에 대해 수행된 연구가 거의 없어 본 연구결과를 ergosterol 유사물질인 cholesterol 센서에 대한 연구결과와 비교해 보면, 전류 측정식으로 cholesterol의 농도를 측정한 Shi QC와 Peng TZ(2005)의 연구에서는  $4.6 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-6}$  M cholesterol 범위에서 cholesterol의 정량검출이 가능하였다고 보고하였고, gold 전극 위에 직접 cholesterol oxidase를 흡착시켜 제작한 cholesterol oxidase modified gold electrode를 사용하여 cholesterol 검출을 실시한 Parra A 등(2007)의 연구에서는 chronoamperometry에서  $2.1 \times 10^{-3}$  M에 이르기까지 선형관계를 나타내었고 검출한계는  $6.0 \times 10^{-6}$  M으로서 본 실험에서 제작한 ergosterol 센서시스템의 검출한계와 유사하였

다. 또한 cholesterol oxidase-chitosan/hemoglobin-chitosan으로 유리탄소전극을 제작하여 이를 혈청 cholesterol 검출에 이용한 Zhao C 등(2008)의 연구에서는  $1.0 \times 10^{-5} \sim 6.0 \times 10^{-4}$  M의 cholesterol 검출이 가능하였으며, 검출한계는  $9.5 \times 10^{-6}$  M로 본 연구 센서의 선형관계와 검출한계가 좀 더 우수한 것으로 나타났다. 그러나 cholesterol oxidase, cholesterol esterase 및 horseradish peroxidase의 3가지 효소를 회전 디스크에 함께 고정화하여 회전디스크 바이오센서를 제작하여 cholesterol을 측정된 Salinas E 등(2006)의 연구에서는  $1.2 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-3}$  M cholesterol의 농도에서 선형관계를 나타냈으며 검출한계는  $1.19 \times 10^{-8}$  M으로서 본 연구의 센서보다 높은 검출능을 나타내었다.

한편 본 센서의 ergosterol 검출한계를 현재 ergosterol 분석 시 일반적으로 사용하고 있는 HPLC 방법과 비교해 보면, 탈곡하지 않은 쌀을 solid phase extraction 한 후 HPLC로 ergosterol을 분석한 Srzednicki G 등(2004)의 보고에서는 ergosterol의 검출한계가  $6 \times 10^{-6}$  M이었고, 사과와 사과즙의 부패정도를 평가하기 위해 ergosterol 함유량을 HPLC로 측정된 Kadakal C 등(2005)의 연구에서도 ergosterol의 검출한계가 0.1~1.8 mg/L로서 본 연구에서 개발한 센서의 검출력이 기존의 ergosterol 분석방법인 HPLC법에 비해 낮지 않은 것으로 나타났다.

Ergosterol 분석은 일반적으로 HPLC를 통해 분석되고 있으며 ergosterol 측정을 위한 바이오센서는 현재까지 개발된 것을 찾아보기 어려워 본 연구가 앞으로 식품의 곰팡이 오염을 검출할 수 있는 ergosterol 센서 개발을 위해

유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 이번 연구에서는 ergosterol 센서의 전기화학적 장치 및 센서 시스템 구성, 반응효소 고정화기술 확립, 고감도 전극 제작, 적합한 ergosterol 용매 제조, ergosterol 정량적 검출 등에 중점을 두어 실험을 수행하였고 후속 연구를 통해 센서 시스템의 최적화, 방해물질 영향력 분석, 식품시료의 분석 등이 수행되어야 할 것이다.

#### IV. 요약

본 연구에서는 식품의 곰팡이 초기오염 검출에 사용할 수 있는 ergosterol 분석용 바이오센서를 개발하고자 MWNT-NH<sub>2</sub> 유리탄소전극을 제작하고, cholesterol oxidase의 고정화를 통해 효소반응기를 제작하여, 바이오센서의 전기화학적 ergosterol 검출장치를 구성하였다. FT-IR을 통해 MWNT에 기능기가 잘 도입되었음을 확인하였고, cholesterol oxidase 효소 고정화 시 coupling efficiency는 99%이었다. 제작한 MWNT-NH<sub>2</sub> 유리탄소전극의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 대한 농도별 전류를 분석한 결과  $1 \times 10^{-5} \sim 8 \times 10^{-5}$  M 농도에서 우수한 선형관계를 나타내었고 검출한계는  $10^{-7}$  M이었다. 본 연구에서 제작한 ergosterol 센서를 이용하여 ergosterol에 대한 반응을 측정된 결과  $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5}$  M의 농도에서 좋은 선형관계를 나타내어 고감도로 ergosterol을 정량할 수 있는 것으로 확인되어 식품의 곰팡이 오염을 확인하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 보인다.

#### V. 감사의 글

본 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었으며(KRF-2006-531-F00010) 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

- Abramson D, Gan Z, Clear RM, Gilbert J, Marquardt RR. 1998. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. *Int J Food Microbiol* 45(3):217-224
- Battilani P, Chiusa G, Cervi C, Trevisan M, Ghebbioni C. 1996. Fungal growth and ergosterol content tomato fruits infected by fungi. *Ital J Food Sci* 8(4):283-289
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-256
- de Sio F, Laratta B, Giovane A, Quagliuolo L, Castaldo D, Servillo L. 2000. Analysis of free and esterified ergosterol in tomato products. *J Agric Food Chem* 48(3):780-784
- Duesberg GS, Muster K, Krstic V, Burghard M, Roth S. 1998. Chromatographic size separation of single-wall carbon nanotubes. *Appl Phys A* 67(1):117-119
- Gourama H, Bullerman LB. 1995a. Detection of molds in foods and feeds: potential rapid and selective methods. *J Food Prot* 58(12):1389-1394
- Gourama H, Bullerman LB. 1995b. Relationship between aflatoxin production and mold growth as measured by ergosterol and plate count. *Lebensm Wiss Technol* 28(2):185-189
- Hwang JH, Chun HS, Lee KG. 2004. Aflatoxins in foods-Analytical methods and reduction on toxicity by physico-chemical process-. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47(1):1-16
- Kadakal C, Nas S, Ekinci R. 2005. Ergosterol as a new quality parameter together with patulin in raw apple juice produced from decayed apples. *Food Chem* 90(1-2):95-100
- Kim KS. 2006. Preparation and characterization of novel functionalized multiwall carbon nanotubes-conducting polymer nanocomposite. Master thesis. Kyungpook National University of Korea. pp 36-38
- Kim MR. 2004. Understanding food safety. Shinjeong. Seoul, Korea. pp 88-99
- Kim MR, Kim MJ. 2003. Isocitrate analysis using a potentiometric biosensor with immobilized enzyme in a FIA system. *Food Res Int* 36(3):223-230
- Lamper C, Teren J, Bartok T, Komoroczy R, Mesterhazy A, Sagi F. 2000. Predicting DON contamination in *Fusarium*-infected wheat grains via determination of the ergosterol content. *Cereal Res Commun* 28(3):337-344
- Masoom M, Townsend A. 1985. Determination of cholesterol by flow injection analysis with immobilized cholesterol oxidase. *Anal Chim Acta* 174:293-297
- Morgan MRA, Smith CJ, Williams PA. 1992. Food safety and quality assurance. In *Application of immunoassay systems*. Elsevier Applied Science. pp 207-214
- Parra A, Casero E, Pariente F, Vázquez L, Lorenzo E. 2007. Cholesterol oxidase modified gold electrodes as bioanalytical devices. *Sens Actuators B* 124(1):30-37
- Ravelet C, Grosset C, Alary J. 2001. Quantitation of ergosterol in river sediment by liquid chromatography. *J Chromatogr Sci* 39(6):239-242
- Ryu D, Bullerman LB. 1999. Effect of cycling temperatures on the production of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum* NRRL 5883. *J Food Prot* 62(12):1451-1455
- Salinas E, Rivero V, Torriero AJ, Benuzzi D. 2006. Multienzymatic-rotating biosensor for total cholesterol determination in a FIA system. *Talanta* 70(2):244-250
- Santhosh P, Manesh KM, Gopalan A, Lee KP. 2006a. Fabrication of a new polyaniline grafted multi-wall carbon nanotube modified electrode and its application for electrochemical detection of hydrogen peroxide. *Anal Chim Acta* 575(1):32-38

- Santhosh P, Gopalan A, Lee KP. 2006b. Gold nanoparticles dispersed polyaniline grafted multiwall carbon nanotubes as newer electrocatalysts: Preparation and performances for methanol oxidation. *J Catal* 238(1):177-185
- Sethi RS. 1994. Transducer aspects of biosensors. *Biosens Bioelectron* 9:243-264
- Shi QC, Peng TZ. 2005. A Novel cholesterol oxidase biosensor based on Pt-nanoparticle/carbon nanotube modified electrode. *Chinese Chem Lett* 16(8):1081-1084
- Shin MC, Kim HS. 1993. Development of flow injection analysis system for amperometric determination of cholesterol using immobilized enzyme columns. *Korean J Biotechnol Bioeng* 8(4):328-335
- Szrednicki G, Craske J, Nimmuntavin C, Mantais LG, Wattananon S. 2004. Determination of ergosterol in paddy rice using solid phase extraction. *J Sci Food Agric* 84(15):2041-2046
- Toh TH, Prior BA, van der Merve MJ. 2001. Quantification of plasma membrane ergosterol of *Saccharomyces cerevisiae* by direct-injection atmospheric pressure chemical ionization/tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 288(1):44-51
- Woo JH. 2005. Synthesis and characterization of multi-walled carbon nanotubes and their dispersion with copolymer in water and ethanol. Master thesis. Kyungpook National University of Korea. pp 17-28
- Weber N, Weitkamp P, Mukherjee KD. 2001. Fatty acid steryl, stanyl, and steroid esters by esterification and transesterification in vacuo using *Candida rugosa* lipase as catalyst. *J Agric Food Chem* 49(1):67-71
- Yoon MH, Kim KJ, Kim JH, Cho KH, Kim SJ. 1998. A study on the Aflatoxin B<sub>1</sub> contents in domestic and import foods. *Korean J Sanitation* 13(2):115-1201
- Zhao C, Wan L, Jiang L, Wang Q, Jiao K. 2008. Highly sensitive and selective cholesterol biosensor based on direct electron transfer of hemoglobin. *Anal Biochem* 383(1):25-30

---

2009년 4월 9일 접수; 2009년 4월 15일 심사(수정); 2009년 4월 15일 채택