

식품 내 바이오제닉아민 신속검출기술 개발 동향

이재익 · 김영완*

고려대학교 식품생명공학과

Rapid Detection Methods for Biogenic Amines in Foods

Jae-Ick Lee and Young-Wan Kim*

Department of Food & Biotechnology, Korea University

Abstract Biogenic amines have been used as chemical indicators to estimate bacterial spoilage of foods, particularly fish and fish products, cheese, and fermented foods. So far many chromatography methods have been developed to detect biogenic amines in foods. Although these instrumental analyses exhibit good sensitivity, they cannot be used as rapid detection methods due to the chemical treatment of the samples and the time-consuming process involved. For the rapid and simple detection of biogenic amines, enzyme linked immunosorbent assay kits are commercially available. In addition, analytical systems with enzyme-based amperometric biosensor detection have been increasingly developed. The biosensors used to detect the biogenic amines are based on the action of either amine oxidases or amine dehydrogenases that catalyzes the oxidative deamination of biogenic amines to the corresponding aldehydes and ammonia. This review mainly focused on the principle, development, and applications of the detection methods for rapid detection of biogenic amines in foods.

Keywords: biogenic amine, enzyme linked immunosorbent assay, biosensor, amine oxidase, amine dehydrogenase

서 론

바이오제닉아민(Biogenic amine, BA)은 아미노산의 탈탄산작용 또는 알데하이드와 케톤의 아미노화와 아미노기 전이반응에 의해 주로 생성되는 질소화합물이다(1). BA는 아민그룹의 개수에 따라 모노아민류(monoamines), 디아민류(diamines) 및 폴리아민류(polyamines)로 분류하며(Fig. 1), 화학적 구조에 의해서는 지방족화합물(putrescine(Put), cadaverine(Cad), spermine(Spm), spermidine(Spd)), 방향족화합물(tyramine(TyrN), 2-phenylethylamine(PheN)) 및 헤테로환상화합물(histamine(HisN), tryptamine(TrpN))로 나눌 수 있다. BA은 세포 내에서 세포증식, 분화 및 성장에 중요한 역할을 수행하며(2), 체내에서 직간접적으로 신경전달물질로서 작용하고, 혈압조절 및 혈류 등의 심혈관계에도 영향을 미친다(3). 이러한 생리적 중요성에도 불구하고 인체에 대한 BA의 유해성이 보고되고 있다. 대표적으로 고등어과 어종의 섭취 시 식중독과 유사한 질환인 scombrototoxicosis의 원인이 유통과정에서 급격하게 증가한 HisN의 과다 섭취 때문인 것으로 밝혀지면서 유럽에서는 HisN의 농도가 어류 제품의 미생물 부패지표로 활용되고 있다(4,5). 이와 더불어 저혈압(HisN, Put, Cad), 고혈압(TyrN), 두통, 구토 유발 등을 유발하며(4), Put, Cad 및 Spm은 발암물질인 나

이트로사민(nitrosamine)의 전구물질로의 전환 가능성이 제기되었다(6,7). 식품을 통해 섭취된 BA은 인체 내 효소적 대사과정을 통해 해독과정을 거치므로 일반적으로 크게 문제가 되지 않는 것으로 알려져 있으나(8), 과량의 BA을 섭취하거나, 선천적으로 대사과정에 필요한 효소의 생산에 문제가 있거나, 우울증 치료제인 phenelzine과 같은 BA 대사과정에 관여하는 효소의 활성 저해제를 복용하는 환자의 경우는 BA 섭취로 인해 인체에 심각한 영향을 줄 수 있다(9,10). BA의 독성은 종류나 식품의 종류에 따라서 다르게 보고되고 있으나 미국 식품의약국에서는 생선 내 HisN의 제한농도는 50-100 mg/kg로 규정하고 있으며(11), Nout 등은 TyrN의 제한농도를 100-800 mg/kg으로 제안하였다(12). 이와 같은 BA의 독성으로 인해 식품 내 BA 분석을 위해 고압액체크로마토그래피(high pressure liquid chromatography, HPLC), 기체체크로마토그래피(gas chromatography) 및 모세관전기영동(capillary electrophoresis) 등을 이용하는 분석법이 연구되었다(5,13,14). 또한 BA 생산 미생물의 분리 동정을 통해 BA 오염경로 및 기작에 대한 연구가 진행되었으며 이를 바탕으로 아민 저감화를 위한 연구가 진행되고 있다(1,15,16). 국내에서도 된장, 고추장, 젓갈 및 막걸리 등 우리나라의 전통 발효농수산식품 내 BA 오염도에 대한 분석연구가 진행된 바 있다(17-20). 현재 BA 분석을 위해 주로 사용되는 HPLC법은 BA의 정량과 정성이 모두 가능하며 민감도가 매우 높다는 장점이 있으나, 고가의 장비를 보유해야 하며 추출, 전처리 및 분석까지의 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다. 따라서 이러한 단점들을 극복하고 전통 발효농수산식품의 생산 현장에서 제품을 항시 모니터링을 위해 간편하고 신속하게 BA를 분석할 수 있는 검출기술의 보급이 필요하다. BA 신속검출 기술은 BA를 생산하는 미생물을 검출하거나 식품 내 BA를 직접 분석하는 기술로 나뉘어 진다. 최근 실시간 유전자증

*Corresponding author: Young-Wan Kim, Department of Food & Biotechnology, Korea University, Yeongi, Chungnam 339-700, Korea

Tel: 82-42-860-1436

Fax: 82-42-865-0220

E-mail: ywankim@korea.ac.kr

Received November 2, 2011; revised December 21, 2011;

accepted December 23, 2011

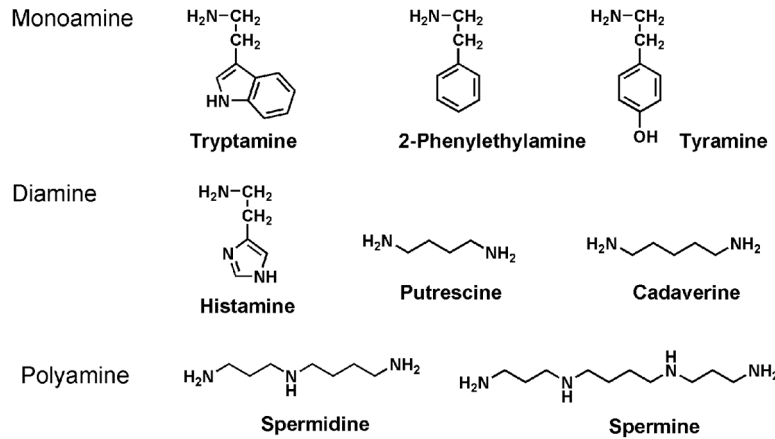


Fig. 1. The structures of biogenic amines found in foods.

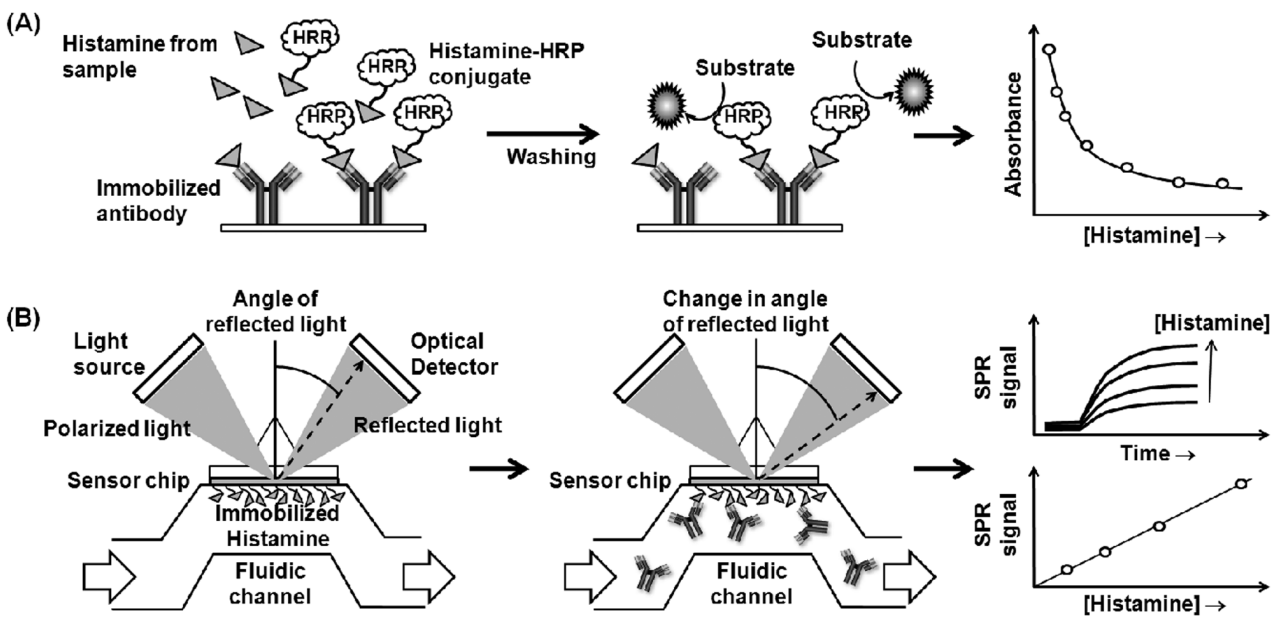


Fig. 2. Detetion methods for biogenic amines using histamine-specific antibody. CD-ELISA kit (A) and Surface plasmon resonance method (B) for measuring histamine content governing antigen-antibody interactions.

폭 정량분석 기술(real-time polymerase chain reaction method)을 적용하여 식품 내 BA 생산 미생물을 분석을 하는 연구가 진행되었다(21,22). 이러한 유전자증폭기술 기반의 검출기술은 HPLC 등에 비해 많은 양의 시료를 신속하게 분석할 수 있는 장점을 가지며, 무엇보다도 비정상적 유통과정을 통한 추가적인 BA생산 위험성을 예측할 수 있다. 하지만 BA를 직접 정량하는 방법이 아니므로 제품 생산현장에서 BA양을 모니터링하기 위한 기술로는 부적합하다. 따라서 본 총설은 항체 또는 효소와 같은 생물소재를 이용하여 식품 내 BA함량을 신속하게 분석할 수 있는 신속검출법 및 바이오센서 연구 동향을 분석하였다.

항체를 이용한 BA 검출기술

효소결합 면역흡착 분석법을 이용한 BA 검출 기술

현재 BA 검출을 위해서 상용화된 신속검출법은 효소면역 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)이 대표적이다. ELISA는 항원 또는 항체에 효소, 주로 고추냉이에서 유래한 퍼옥시데이즈(horseradish peroxidase, HRP)를 중합시킨 후, 효소의

활성을 이용하여 항체와 항원의 결합 정도를 정량적으로 측정하는 방법이다. 지금까지 ELISA 기반으로 BA를 검출하는 상용화된 기술은 HisN에 대한 검출 키트가 유일하다(23). ELISA 기반의 항원검출 방법은 여러 가지 방법들이 있는데, HisN 검출을 위한 상용화된 대부분의 키트는 경쟁적 직접효소면역 측정법(competitive direct enzyme linked immunosorbent assay, CD-ELISA)를 기반으로 하고 있다(Fig. 2A). HisN을 함유한 시료와 일정한 양의 HRP가 결합된 HisN를 섞은 후, 고정화된 항체와의 경쟁적 결합을 유도하여 항체와 결합되어 있는 HRP의 효소활성 측정을 통해 상대적으로 시료 내 HisN의 양을 표준곡선으로부터 구하는 방식으로 시료에 HisN의 농도가 높을수록 항체와 결합한 HRP-결합된 HisN의 양이 줄기 때문에 흡광도 값은 줄어들며, 표준곡선은 지수함수형 감소곡선(exponential decay curve)을 나타낸다(24). CD-ELISA 기반의 HisN 검출 키트는 신속하게 다량의 시료를 분석할 수 있으므로 HisN이 주요 BA인 생선 류에 대한 분석에는 매우 유용하다(25). 그러나 HisN이 주요 오염원이 아닌 식품에 적용하거나 식품 내 총 BA에 대한 정량 및 정성 분석이 불가능하다. 그럼에도 불구하고 HisN은 식품에서 검출되는 가장

Table 1. List of biogenic amine-degrading enzymes

Type ^a	Source	Cofactors ^b	Substrate specificity ^c	Ref.
CuAOx	<i>Escherichia coli</i>	TPQ, Cu ²⁺	TyrN > PheN > TrpN >> HisN	(30)
	<i>Arthrobacter</i> sp.	TPQ, Cu ²⁺	PheN > TyrN >> HisN	(31)
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	TPQ, Cu ²⁺	HisN > PheN > TyrN > TrpN > Put	(32)
	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	TPQ, Cu ²⁺	HisN > PheN > TyrN > TrpN	(33)
	<i>Lathyrus sativus</i> (Pea)	TPQ, Cu ²⁺	Cad > Put > Spd > HisN ^a Spm	(34)
	Soybean seeding	TPQ, Cu ²⁺	Cad > Put > Spm	(35)
AmDH	<i>Rhizobium</i> . sp	FMN	HisN	(37)
	<i>Norcardioides simplex</i>	FMN	HisN >> Put	(38)
	<i>Panacoccus denitrificans</i>	TTQ, Cu ²⁺	Methylamine >> TyrN >> HisN	(39)
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	TTQ, Cu ²⁺	n.a. ^d	(40)

^aType: CuAOx, copper containing amine oxidase; AmDH, amine dehydrogenase

^bCofactors: TPQ, 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone; FMN, flavin mononucleotide; TTQ, tryptophan tryptophylquinone

^cSubstrate: HisN, histamine; TyrN, tyramine; Cad, cadaverine; Put, putrescine; Spm, spermine; Spd, spermidine

^dnot available

주된 BA 오염원들 중 하나이므로, HisN의 양으로부터 식품 내 BA 오염 정도를 예측할 수 있는 것으로 보인다. Kim 등은 HPLC를 이용하여 측정된 된장 및 고추장 시료 내 BA의 총 함량이 ELISA 키트를 이용하여 측정된 HisN의 함량과 선형적인 상관관계가 있음을 보고하였다(24). 이러한 경향은 와인 및 치즈 제품에 대한 분석에서도 동일한 경향이 보고되었으므로(26,27), 식품의 BA 오염도 모니터링을 위한 일차적인 신속검출법으로서 HisN 측정용 ELISA 키트를 활용할 수 있을 것으로 예상하며, 보다 많은 식품군에 대한 분석연구를 통해 적용 가능한 식품군을 선정해야 할 것으로 판단된다.

표면 플라즈몬 공명 면역센싱법을 이용한 BA 검출 기술

ELISA 이외에 항원항체간의 상호결합반응을 분석하는 방법으로 금속 박막의 표면에서 일어나는 표면플라즈몬공명(surface plasmon resonance, SPR) 현상을 이용하는 면역센싱(immunosensing) 기술이 있다. 이는 단백질 또는 리간드를 금속막이 증착된 센서칩에 고정화하고, 결합하는 단백질을 칩 표면 위로 흘려주면 두 분자간의 결합에 의해 생기는 표면 플라즈몬 공명에 의해 센서칩 표면에 입사한 광의 반사도가 급격하게 감소하게 된다. 이때 변화된 각도(표면플라즈몬공명각, surface plasmon resonance angle)를 측정함으로써 두 생체분자간의 결합을 관찰하는 방법이다(Fig. 2B). Li 등은 histamine을 센서칩에 고정화하고, HisN 특이 다가항체(polyclonal antibody)를 흘려주면서 분석한 결과 3 ppb의 검출한계를 얻었으며 10 mM HCl을 이용한 센서칩의 재생을 통해 반복사용이 가능하다고 보고하였다(28). ELISA를 통해 얻어지는 검출한계가 1-10 ppm 수준임을 감안하면 약 1,000배 가량의 검출한계 향상을 이루었으나, 고가의 SPR 장비를 요구하며, 시료를 센서칩에 고정화해야 하므로 많은 양의 식품 시료에 대한 신속검출 기술로는 부적합하다.

BA 분해효소를 이용한 BA 검출 기술

BA 분해효소

많은 미생물을 비롯하여 동식물들은 산화적 탈아미노반응을 통해서 BA를 분해하여 탄소원이나 질소원으로 사용한다(29). 이러한 BA 분해효소의 반응산물 분석을 통해 기질로 사용된 BA를 정량 분석하는 연구가 진행되었다. BA 분해효소들은 작용 메커

니즘에 따라 두 개의 그룹으로 나뉜다(Table 1). 한 그룹은 기질을 산화시키면서 얻어진 전자의 수용체로서 산소를 이용하는 아민산화효소(amine oxidase)이다. 아민산화효소는 tyrosine 잔기의 결사슬이 생합성 후 단백질수식과정을 거치면서 형성된 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone(TPQ)를 보조인자로 이용하는 구리이온 함유 아민산화효소(copper-containing amine oxidase, CuAOx)가 대부분이며(30-35), Cu²⁺은 TPQ 형성을 위한 단백질수식과정과 촉매반응에 중요한 기능을 수행한다(36). 미생물에서 유래한 CuAOx는 TyrN 및 PheN과 같은 monoamine에 특이성을 보이는 monoamine oxidase (MAO)(30,31)와 상대적으로 HisN에 대한 활성이 강한 histamine oxidase (HOx)가 있으며(32,33), 식물체에는 유래한 효소는 Cad이나 Put과 같은 diamine에 대해 활성을 보이는 diamine oxidase (DAO)가 대부분이다(34,35). 다른 그룹으로는 산소를 전자수용체로 사용하지 않는 아민탈수소효소(amine dehydrogenase, AmDH)로서 Cys 잔기에 공유결합된 플라빈모노뉴클로타이드(flavin mononucleotide, FMN)을 보조인자로 이용하는 계열(37,38)과 두 개의 tryptophan 잔기가 수식과정을 거쳐 형성된 tryptophan tryptophyl quinone(TTQ)를 보조인자로 이용하는 계열의 효소(39-41)가 여기에 포함된다. CuAOx와 AmDH 모두 산화형 탈아미노반응을 촉매하며 1차 아민을 알데하이드와 암모니아로 분해한다. CuAOx는 산소를 전자수용체로 이용하여 과산화수소(H₂O₂)를 추가산물로 생성하나(Scheme 1-a), AmDH는 산소를 이용하지 못하므로 H₂O₂를 생성하지 못하며 효소 내 공유결합되어 있는 보조인자(FMN 또는 TTQ)가 보유하는 전자가 다른 전자수용체로 전달되어야 비로소 활성형으로 전환된다(Scheme 1-b).



Scheme 1. Oxidation reaction of amines catalyzed by CuAOx (a) and AmDH (b)

BA 분해효소활성의 비색분석을 통한 BA 검출

BA 분해효소를 이용한 BA 정량법은 효소반응을 통해 생성되는 환원형 전자수용체, 즉 CuAOx에 의한 H₂O₂ 또는 산화형 AmDH 내 환원형 보조인자의 양을 측정함으로써 시료 내 BA 함량을 정량한다. 이를 위해 산화환원반응을 통해 발생되는 염료의

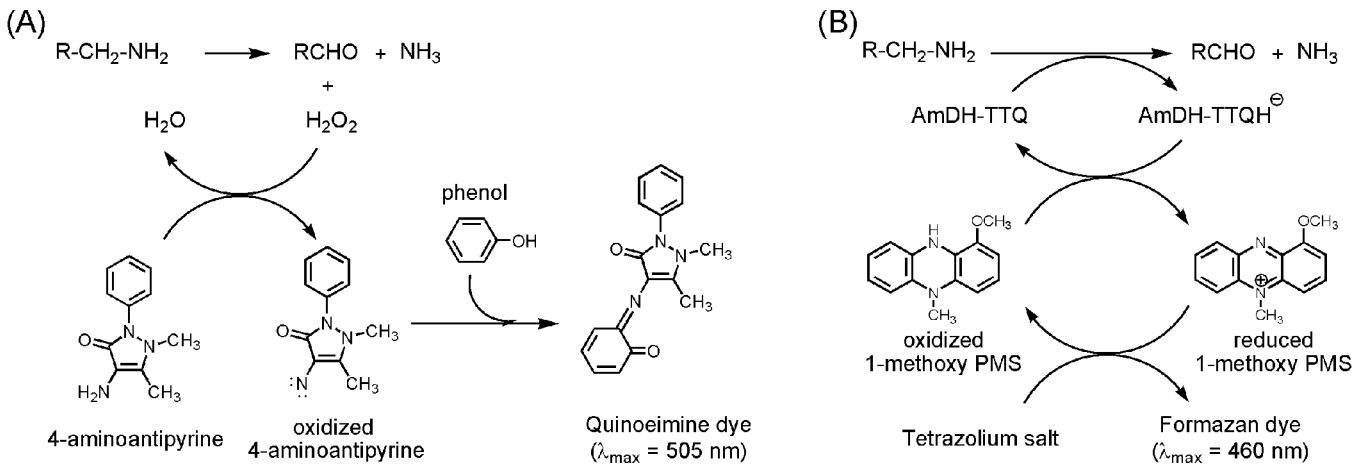


Fig. 3. Assay to determine biogenic amines in food using amine oxidase (A) and amine dehydrogenase (B).

Table 2. Biosensors equipped with biogenic amine-degrading enzymes

Type ^a	Enzyme ^b	Electrode	Potential (vs Ag/AgCl) [mV]	Linear range [mM]	Detection limit [mM]	Analytes ^c	Ref.
DET	AO	Pt	+500	0.5-10	0.2	Put, Cad, Spd, Spm	(46)
	AO	Pt	+200	10-100	2.7	HisN, TyrN, Spd	(50)
	DAO	Pt	+700	0.7-20 ^d	0.2 ^d	Total BA	(34)
	DAO	Pt	+650	1-50	0.5	HisN, Put, Cad, TyrN, Spd	(48)
	PO	Pt	+500	0.5-300	0.5	Put	(47)
MET	AO	Pt	+200	10-200	4.5	HisN	(50)
	MADH	Gold	+250	25-500	25	HisN	(56)
HET	HOx	Graphite	+50	0.1-0.96	0.07	HisN	(49)
	AO	Carbon	0.00	0.1-100	0.1	HisN	(52)
	MAO	Carbon	+250	0.4-2.4	0.4	HisN	(53)
	DAO	Carbon	+250	0.2-1.6	0.18	HisN, Cad, Put, TyrN, Spd, Spm	(53)

^aBiosensor type: DET, direct electron transfer; MET, mediated electron transfer; HET, HRP-mediated electron transfer

^bEnzyme: AO, amine oxidase; MAO, monoamine oxidase; DAO, diamine oxidase; HOx, histamine oxidase; PO, putrescine oxidase; MADH, methylamine dehydrogenase from *P. denitrificans*

^cAnalytes: HisN, histamine; TyrN, tyramine; Cad, cadaverine; Put, putrescine; Spm, spermine; Spd, spermidine

^dUnit for these values is mg/kg (ppm).

산화환원반응과 쌍을 이루어 반응시킴으로써 발생되는 염료를 이용하여 반응액 내 발생정도를 분광광도계로 측정하는 비색분석(colorimetric analysis)을 사용한다(42,43). CuAOx의 경우는 아민으로부터 생성된 H₂O₂의 양을 측정하기 위해 HRP와 쌍을 이루는 활성측정법을 이용하며, HRP 반응에 의해 산화된 4-aminoantipyrine이 페놀물질(phenol, hydroxybenzionate, vanillic acid 등)과의 중합을 통해 형성하는 붉은색의 quinoneimine 물질의 양을 측정한다(Fig. 3A). 반면 AmDH는 H₂O₂를 생산하지 않으므로, 1-methoxy-5-methyl phenaziniummethylsulfate와 같은 중간 전자전달 물질을 이용하여 환원형 효소로부터 최종전자수용체인 tetrazolium salt로 전자를 전달하여 환원된 formazan dye의 양을 측정함으로써 효소활성을 측정한다(Fig. 3B). 효소활성을 이용한 비색분석법은 기기분석에 비해 전처리를 필요로 하지 않고 과정이 비교적 간단하며 96 well plate 또는 384 well plate를 이용하여 많은 수의 시료를 동시에 분석할 수 있는 장점이 있다.

Sato 등은 *Rhizobium* sp.에서 HisN에 대한 특이성이 우수한 histamine dehydrogenase를 분리하고, tetrazolium salt를 이용하는 비색측정법으로 참치 식품 내 HisN의 양을 분석하였다(43). 측정

한도 0.5 mM 이하의 높은 민감도를 나타냈으며, HPLC 및 CD-ELISA 분석결과와 5% 미만의 차이를 나타내었다. 반면 Yeh 등이 DAO를 이용하여 튀김 생선육을 분석한 결과 CD-ELISA kit로 분석된 HisN 함량에 비해 5-12배가 넘는 아민 함량이 검출되었다(44). 이는 HisN이외에 다른 BA에 대해서도 활성을 나타내는 DAO의 넓은 기질 스펙트럼으로 인해 시료 내 다른 아민들의 함량이 분석결과에 영향을 미친 것이다. 따라서 특정 아민에 대한 특이성이 매우 높은 효소는 정확하게 해당 아민을 정량할 수 있으나 다른 아민에 대해서는 검출이 불가능한 단점이 있다. 반면 기질 스펙트럼이 넓은 효소의 경우는 한번의 측정을 통해 식품 내 총 아민 함량에 대한 정보를 얻을 수 있지만, 특정성분에 대한 정량분석은 불가능하다. 따라서 실험의 목적에 맞도록 적절한 효소를 선정하여야 한다. 아직까지 이러한 목적에 적합한 효소의 확보는 상업적으로 매우 제한적이다. 따라서 지속적인 효소개발을 통해 다양한 BA 분해효소의 개발이 요구된다.

아민 분해효소를 이용한 BA 검출용 바이오센서 개발

바이오센서는 특정 대상을 센싱하기 위해 생물학적 요소

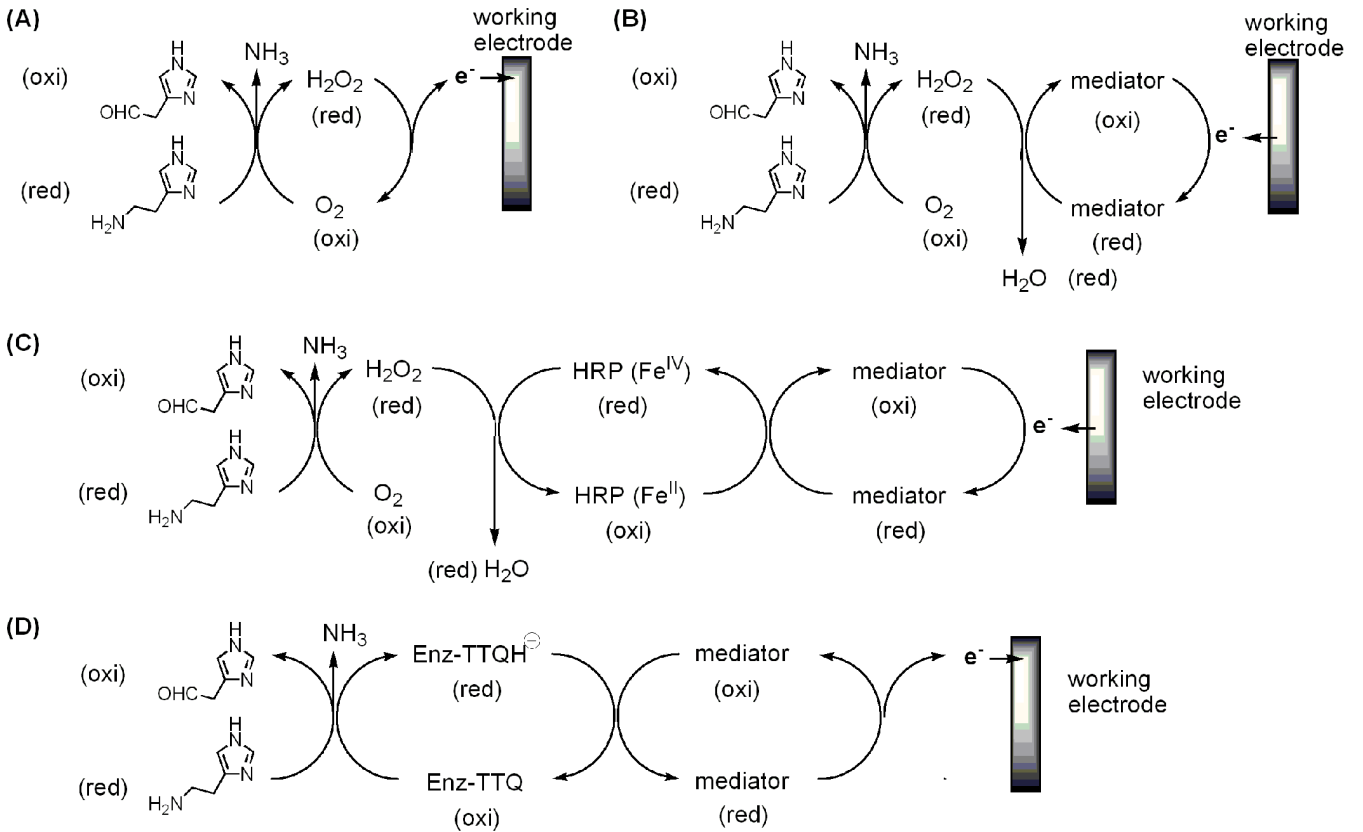


Fig. 4. Schemes of electron flow through biosensors. (A) direct electron transfer mechanism using CuAOx, (B) mediated electron transfer mechanism using CuAOx, (C) HRP-mediated electron transfer mechanism using CuAOx, and (D) mediated electron transfer mechanism using AMDH.

(biological elements)를 이용하여 색, 형광, 전기적 신호 등과 같이 인식 가능한 신호로 변환시켜주는 시스템을 일컫는다(45). 바이오센서에 이용되는 신호변환 방법은 여러 가지가 있지만, BA 측정용 바이오센서에 적용되는 방법으로는 BA분해효소가 촉매하는 산화환원반응을 통해 발생하는 전자의 흐름을 측정하는 전류측정법(amperometry)이 주를 이룬다(34,46-53). 전류측정식 바이오센서는 효소가 고정화되어 있어서 발생한 전류를 발생하는 작업전극(working electrode), 전위차를 측정하기 위한 기준전극(reference electrode) 및 작업전극에서 발생하는 전류측정을 위한 상대전극(counter electrode)으로 구성된다. 전극 소재로는 금, 백금, 은(Ag/AgCl)을 주로 사용하며 최근에는 그래파이트(graphite) 또는 탄소나노튜브 등도 사용한다(45). 바이오센서의 타입은 전자전달 방식에 따라 직접 전자전달방식(direct electron transfer mechanism), 매개체이용 전자전달방식(mediated electron transfer mechanism) 및 HRP 매개 전자전달방식(HRP-mediated electron transfer mechanism)으로 나뉜다(Table 2).

직접 전자전달방식의 바이오센서의 경우, CuAOx가 고정되어 있는 막으로 코팅되어 있는 작업전극에 시료를 접촉시키면 효소 반응에 의해 H_2O_2 가 생성되고, 작업전극과 상대전극 사이에 걸린 500-700 mV 전압으로 인해 H_2O_2 가 O_2 로 산화되면서 전자가 발생된다. 작업전극은 발생한 전자를 즉시 받아들이면서 전류를 측정하는 방식이며(Fig. 4A), 가장 보편적으로 적용되고 있는 방법이다(34,46-48,50,51). 주로 식물체에서 분리한 DAO를 이용하여 HisN, Put, Cad 등을 검출하는데 이용되었으며, 문헌에 따라 검출영역에는 차이를 보이지만, 수 mM에서 수백 mM 수준까지

BA의 검출이 가능하며, 검출한도는 0.5-3 mM 수준이었다(Table 2). 앞서 고찰한 바와 같이 CuAOx의 경우 여러 BA에 대한 활성을 나타내기도 하지만, 특정 아민은 분해하지 못한다. 따라서 검출값이 실제 양보다 적게 측정될 수 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 Lange와 Wittman은 서로 다른 기질특이성을 보이는 세 종류의 CuAOx를 자기 다른 전극에 고정화한 후, 세 개의 전극을 동시에 사용하여 보다 정확하게 총 BA 함량을 측정하는 enzyme sensor array를 개발하고 치즈, 소시지, 생선 류 내 BA 분석에 적용하였다(51). 최근 Di Fusco 등은 대부분의 BA에 대해서 유사한 활성을 보이는 *Lathyrus sativus*(콩과 식물) 유래의 DAO를 이용하여 0.7-20 mg/kg의 검출범위와 0.2 ppm의 검출한도를 가지는 바이오센서를 제작하였으며, 이를 이용한 맥주나 와인 내 총 아민 함량의 분석결과와 GC-MS를 이용한 총 아민함량 분석결과가 거의 일치함을 보고하였다(34).

그러나 이러한 직접 전자전달메커니즘의 경우 시료 내에 아스코브산(ascorbic acid), 빌리루빈(bilirubin) 및 요산(uric acid)과 같이 산화되기 쉬운 물질이 존재하면 측정결과에 간섭을 주게 된다. 실제로 아질산염의 착색기능 강화와 발암물질인 nitrosamine의 생성 저해를 위해 아스코브산을 최대 500 mg/kg까지 첨가할 수 있는 소시지의 경우 아민산화효소 기반 바이오센서에서 BA 이상검출이 보고된 바 있다(51). 이러한 문제점은 매개체(mediator)를 사용하여 상대적으로 낮은 전압차에서 H_2O_2 를 물로 환원시키는 방식으로 해결할 수 있다. 매개체로는 ferrocene유도체, prussian blue, ferrocyanides 및 phenoxaines 등을 사용되며(45,54,55), 환원형의 매개체는 H_2O_2 를 물 분자로 환원시키면서 산화된 후, 전극

으로부터 전자를 받으면서 다시 환원 형으로 돌아오게 되고, 이때 발생하는 전류량을 측정하여 BA 함량을 측정한다(Fig. 4B). 매개체를 이용하는 바이오센서의 경우 요구되는 전위차가 직접전달 방식에 비해 낮으므로 시료 내 존재하는 물질의 산화에 의한 BA 검출값의 간섭효과를 줄일 수 있다(54). 이와 더불어서 아민산화효소로부터 생성된 H₂O₂를 기질로 사용하는 HRP와 쌍을 이루는 이중효소시스템 또한 직접전달방식의 바이오센서 요구되는 상대전극과 작업전극 사이의 전압차를 50 mV 이하로 낮출 수 있다(49). H₂O₂의 환원을 촉매한 산화형 HRP는 매개체의 의해 환원형으로 전환되고, 매개체는 전극으로부터 전자를 받아들이면서 전류를 발생시킨다(Fig. 4C).

AmdH의 경우 H₂O₂를 생성하지 않으므로, BA의 산화반응을 촉매한 환원형 효소를 산화형 효소로 전환하기 위해 전자수용체로 산화형 매개체를 사용하며, 환원된 매개체가 재산화되는 과정에서 전자가 전극으로 전달되면서 전류를 형성한다(Fig. 4D). AmdH의 적용 예는 *Paracoccus denitrificans* 유래의 methylamine dehydrogenase(MADH)가 유일하며, 산화형 매개체인 ferrocyanide를 사용한 바이오센서를 통해 histamine 양을 측정하였다(56). 그러나 MADH의 HisN에 대한 높은 K_M 값(1.6 mM)으로 인해 다른 바이오센서들에 비해 높은 농도에서 검출범위를 나타내었으며, 이로 인해 실제 식품 내 HisN 검출에 적용하기에는 한계가 있었다. 이러한 단점을 극복하기 위해 HisN에 대한 K_M 값이 400배 이하로 낮아진 변이체 효소를 개발하고(57) 이를 바이오센서에 적용하여 기존 MADH 적용센서에 비해 약 3배 가량의 검출한도 감소를 도출하였다(58).

요 약

BA은 치즈, 와인, 젓갈, 소시지, 된장 등 미생물에 의한 발효 과정을 거치는 식품뿐만 아니라 채소류, 과일, 육류와 같은 비발효 식품군에서도 발견된다. 식품 내 BA 오염에 대한 관리를 목적으로 제조공정 및 유통과정에서 신속하게 다량의 시료를 분석하고 제품에 대한 항시 모니터링 기술이 요구된다. 이를 위해 BA 특이항체 및 BA 분해효소를 이용하는 BA 검출 및 센싱 기술이 개발되고 있다. HisN 특이 항체를 이용한 ELISA 키트는 상용화되었으며 다양한 식품에 적용되고 있다. 산화적 탈아미노반응을 촉매하는 아민산화효소는 항체기반의 ELISA 방식에 비해 다양한 BA 분석에 사용되고 있으며, 효소반응에 의해 생성되는 H₂O₂의 산화환원반응에 의해 발생하는 전류를 측정함으로써 BA의 함량을 정량할 수 있는 전류측정식 바이오센서 개발에 적용되고 있다. BA 신속검출을 위한 바이오센서의 개발 연구 동향에 발맞추어 국내 전통발효식품에 적합한 기술개발이 요구되며, 산업현장 적용 연구를 거쳐 국내 전통발효식품의 안전성을 확보해야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Halasz A. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Tech.* 5: 42-49 (1994)
- Gerner EW, Meyskens FL Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer* 4: 781-792 (2004)
- Igarashi K, Ito K, Kashiwagi K. Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 152: 271-278 (2001)
- Taylor SL. Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects. *Crit. Rev. Toxicol.* 17: 91-128 (1986)
- Silla Santos MH. Biogenic amines: Their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 213-231 (1996)
- Bills DD, Hildrum KI, Scanlan RA, Libbey LM. Potential precursors of N-nitrosopyrrolidine in bacon and other fried foods. *J. Agr. Food Chem.* 21: 876-877 (1973)
- Ochiai M, Wakabayashi K, Nagao M, Sugimura T. Tyramine is a major mutagen precursor in soy sauce, being convertible to a mutagen by nitrite. *Gann* 75: 1-3 (1984)
- Lehane L, Olley J. Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* 58: 1-37 (2000)
- Bodmer S, Imark C, Kneubuhl M. Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflamm. Res.* 48: 296-300 (1999)
- Caston JC, Eaton CL, Gheorghui BP, Ware LL. Tyramine induced hypertensive episodes, panic attacks in hereditary deficient monoamine oxidase patients: Case reports. *J. S. C. Med. Assoc.* 98: 187-192 (2002)
- Food and Drug Administration. Decomposition and histamine-raw frozen tuna and mahi-mahi; canned tuna; and related species; availability of revised compliance policy guide. *Federal Registration* 149: 39754-39756 (1995)
- Nout MJR. Fermented foods and food safety. *Food Res. Int.* 27: 291-298 (1994)
- Önal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* 103: 1475-1486 (2007)
- Spano G, Russo P, Lonvaud-Funel A, Lucas P, Alexandre H, Grandvalet C, Coton E, Coton M, Barnavon L, Bach B, Rattray F, Bunte A, Magni C, Ladero V, Alvarez M, Fernandez M, Lopez P, de Palencia PF, Corbi A, Trip H, Lolkema JS. Biogenic amines in fermented foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64: S95-S100 (2010)
- Mah JH, Chang YH, Hwang HJ. *Paenibacillus tyraminigenes* sp. nov. isolated from *Myeolchi-jeotgal*, a traditional Korean salted and fermented anchovy. *Int. J. Food Microbiol.* 127: 209-214 (2008)
- Naila A, Flint S, Fletcher G, Bremer P, Meerdink G. Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *J. Food Sci.* 75: R139-R150 (2010)
- Cho TY, Han GH, Bahn KN, Son YW, Jang MR, Lee CH, Kim SH, Kim DB, Kim SB. Evaluation of biogenic amines in Korean commercial fermented foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 730-737 (2006)
- Kim HH, Ahn HJ, Yook HS, Park HJ, Byun MW. Biogenic amines content in commercial Korean traditional fermented soybean paste. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 682-685 (2001)
- Lee TH, Kim JH, Lee SS. Analysis of microbiological contamination and biogenic amines content in traditional and commercial *doenjang*. *J. Fd. Hyg. Safety* 24: 102-109 (2009)
- Mah JH, Han HK, Oh YJ, Kim MG, Hwang HJ. Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products. *Food Chem.* 79: 239-243 (2002)
- Fernandez M, del Ro B, Linares DM, Martin MC, Alvarez MA. Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production. *J. Dairy Sci.* 89: 3763-3769 (2006)
- Bjornsdottir-Butler K, Jones JL, Benner R, Burkhardt W. Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish. *Food Microbiol.* 28: 356-363 (2011)
- Rogers PL, Staruszkiewicz WF. Histamine test kit comparison. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 9: 5-17 (2000)
- Kim TK, Lee JJ, Kim JH, Mah JH, Hwang HJ, Kim YW. Comparison of ELISA and HPLC methods for the determination of biogenic amines in commercial *doenjang* and *gochujang*. *Food Sci. Biotechnol.* 20: 1747-1750 (2011)
- Lupo A, Mozola M. Validation study of a rapid ELISA for detection of histamine in tuna. *J. AOAC Int.* 94: 886-899 (2011)

26. Aygn O, Schneider E, Scheuer R, Usleber E, Gareis M, Mrtlbauer E. Comparison of ELISA and HPLC for the determination of histamine in cheese. *J. Agr. Food Chem.* 47: 1961-1964 (1999)
27. Marcobal A, Polo MC, Martn-Alvarez PJ, Moreno-Arribas MV. Biogenic amine content of red Spanish wines: Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Res. Int.* 38: 387-394 (2005)
28. Li Y, Kobayashi M, Furui K, Soh N, Nakano K, Imato T. Surface plasmon resonance immunosensor for histamine based on an indirect competitive immunoreaction. *Anal. Chim. Acta* 576: 77-83 (2006)
29. Hacisalihoglu A, Jongejan JA, Duine JA. Distribution of amine oxidases and amine dehydrogenases in bacteria grown on primary amines and characterization of the amine oxidase from *Klebsiella oxytoca*. *Microbiol.* 143: 505-512 (1997)
30. Roh JH, Suzuki H, Azakami H, Yamashita M, Murooka Y, Kumagai H. Purification, characterization, and crystallization of monoamine oxidase from *Escherichia coli* K-12. *Biosci. Biotech. Bioch.* 58: 1652-1656 (1994)
31. Ota H, Tamezane H, Sasano Y, Hokazono E, Yasuda Y, Sakasegawa S, Imamura S, Tamura T, Osawa S. Enzymatic characterization of an amine oxidase from *Arthrobacter* sp. used to measure phosphatidylethanolamine. *Biosci. Biotech. Bioch.* 72: 2732-2738 (2008)
32. Choi YH, Matsuzaki R, Fukui T, Shimizu E, Yorifuji T, Sato H, Ozaki Y, Tanizawa K. Copper/topa quinone-containing histamine oxidase from *Arthrobacter globiformis*. Molecular cloning and sequencing, overproduction of precursor enzyme, and generation of topa quinone cofactor. *J. Biol. Chem.* 270: 4712-4720 (1995)
33. Sekiguchi Y, Makita H, Yamamura A, Matsumoto K. A thermostable histamine oxidase from *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007. *J. Biosci. Bioeng.* 97: 104-110 (2004)
34. Di Fusco M, Federico R, Boffi A, Macone A, Favero G, Mazzei F. Characterization and application of a diamine oxidase from *Lathyrus sativus* as component of an electrochemical biosensor for the determination of biogenic amines in wine and beer. *Anal. Bioanal. Chem.* 401: 707-716 (2011)
35. Vianello F, Di Paolo ML, Stevanato R, Gasparini R, Rigo A. Purification and characterization of amine oxidase from soybean seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 35-39 (1993)
36. Kim M, Okajima T, Kishishita S, Yoshimura M, Kawamori A, Tanizawa K, Yamaguchi H. X-ray snapshots of quinone cofactor biogenesis in bacterial copper amine oxidase. *Nat. Struct. Biol.* 9: 591-596 (2002)
37. Bakke M, Sato T, Ichikawa K, Nishimura I. Histamine dehydrogenase from *Rhizobium* sp.: Gene cloning, expression in *Escherichia coli*, characterization and application to histamine determination. *J. Biotechnol.* 119: 260-271 (2005)
38. Limburg J, Mure M, Klinman JP. Cloning and characterization of histamine dehydrogenase from *Nocardioides simplex*. *Arch. Biochem. Biophys.* 436: 8-22 (2005)
39. Chen L, Doi M, Durlley RC, Chistoserdov AY, Lidstrom ME, Davidson VL, Mathews FS. Refined crystal structure of methylamine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans* at 1.75 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 276: 131-149 (1998)
40. Sukumar N, Chen ZW, Ferrari D, Merli A, Rossi GL, Bellamy HD, Chistoserdov A, Davidson VL, Mathews FS. Crystal structure of an electron transfer complex between aromatic amine dehydrogenase and azurin from *Alcaligenes faecalis*. *Biochemistry* 45: 13500-13510 (2006)
41. Wilmot CM, Davidson VL. Uncovering novel biochemistry in the mechanism of tryptophan tryptophylquinone cofactor biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13: 469-474 (2009)
42. Holt A, Palcic MM. A peroxidase-coupled continuous absorbance plate-reader assay for flavin monoamine oxidases, copper-containing amine oxidases and related enzymes. *Nat. Protoc.* 1: 2498-2505 (2006)
43. Sato T, Horiuchi T, Nishimura I. Simple and rapid determination of histamine in food using a new histamine dehydrogenase from *Rhizobium* sp. *Anal. Biochem.* 346: 320-326 (2005)
44. Yeh CY, Lin SJ, Hwang DF. Biogenic amines, histamine and label of dressed fried fish meat products in Taiwan. *Food Control* 17: 423-428 (2006)
45. Barthelmebs L, Calas-Blanchard C, Istamboulie G, Marty JL, Noguer T. Biosensors as analytical tools in food fermentation industry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 698: 293-307 (2010)
46. Yano Y, Yokoyama K, Tamiya E, Karube I. Direct evaluation of meat spoilage and the progress of aging using biosensors. *Anal. Chim. Acta* 320: 269-276 (1996)
47. Xu CX, Marzouk SA, Cosofret VV, Buck RP, Neuman MR, Sprinkle RH. Development of a diamine biosensor. *Talanta* 44: 1625-1632 (1997)
48. Draisci R, Volpe G, Lucentini L, Cecilia A, Federico R, Palleschi G. Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies. *Food Chem.* 62: 225-232 (1998)
49. Hibi T, Senda M. Enzyme assay of histamine by amperometric detection H₂O₂ with a peroxidase-base sensor. *Biosci. Biotech. Bioch.* 64: 1963-1966 (2000)
50. Niculescu M, Frbort I, Pec PPG, Mattiasson B, Csregi E. Amine oxidase based amperometric biosensors for histamine detection. *Electroanal.* 12: 369-375 (2000)
51. Lange J, Wittmann C. Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 371: 276-283 (2002)
52. Iwaki S, Ogasawara M, Kurita R, Niwa O, Tanizawa K, Ohashi Y, Maeyama K. Real-time monitoring of histamine released from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells with a histamine microsensor using recombinant histamine oxidase. *Anal. Biochem.* 304: 236-243 (2002)
53. Alonso-Lomillo MA, Domnguez-Renedo O, Matos P, Arcos-Martnez MJ. Disposable biosensors for determination of biogenic amines. *Anal. Chim. Acta* 665: 26-31 (2010)
54. Habermüller K, Mosbach M, Schuhmann W. Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366: 560-568 (2000)
55. Ricci F, Palleschi G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 21: 389-407 (2005)
56. Zeng K, Tachikawa H, Zhu Z, Davidson VL. Amperometric detection of histamine with a methylamine dehydrogenase polypyrrole-based sensor. *Anal. Chem.* 72: 2211-2215 (2000)
57. Zhu Z, Sun D, Davidson VL. Conversion of methylamine dehydrogenase to a long-chain amine dehydrogenase by mutagenesis of a single residue. *Biochemistry* 39: 11184-11186 (2000)
58. Bao L, Sun D, Tachikawa H, Davidson VL. Improved sensitivity of a histamine sensor using an engineered methylamine dehydrogenase. *Anal. Chem.* 74: 1144-1148 (2002)