히스타민 효소반응 분석키트

히스타민 효소반응 분석키트(Histamine bioassay kit™)를 이용한 다중 정량 분석법

바이오제닉 아민(biogenic amines)이란 일반적으로 동물, 식물 및 미생물에서 아미노산의 효소적 탈탄산 반응에 의해서 형성되는 저분자량의 질소함유의 유독 화합물을 의미하며, 특히 식품 부패 미생물들을 포함하는 탈탄산효소(decarboxylase) 생산성 미생물에 의해서 주로 고단백질성 식품으로부터 생성된다(그림1). 이러한 바이오제닉 아민 특히 히스타민은 체내에서 심각한 건강상의 위해를 초래할 수 있다. 히스타민 등의 바이오제닉 아민은 호흡곤란, 발열 홍조, 발한, 심계항진, 구강작열통, 설사, 홍반, 혈압상승 및 강하, 두드러기 등이 발생할 수 있으며 특히 히스타민은 scombrotoxin이라는 식중독을 유발하기도 한다.

바이오제닉 아민 및 히스타민은 발효 미생물에 의해 자연적으로 발생하는 화학물질이지만 체내에서 생리적 기능을 나타내면서 건강상의 심각한 위해 인자가 될 수 있다. 바이오제닉 아민 및 히스타민을 분해하는 효소인 monoamine oxidase(MAO)를 만들지 못하거나 우울증 치료제인 MAO 효소 저해제를 복용하는 환자가 다량의 바이오제닉 아민 및 히스타민이 함유된 식품을 섭취할 경우에는 식중독을 일으키거나 고혈압 또는 심장마비 증상을 비롯한 건강상의 심각한 영향을 줄 수 있다.

최근 WHO, JECFA, EU 등 국제기구 및 선진국 등에서 바이오제닉 아민 및 히스타민에 대해 식품 위해요소로써 위해성 평가를 반드시 수행하도록 의무화되어 있으며 FDA, CODEX 등에서도 기준 및 규격을 설정하고 엄격하게 관리 감독하고 있다.

본 기고에서는 바이오제닉 아민 중에서 히스타민을 신속하고 간편하게 검출하기 위해 개발된 히스타민 효소반응 분석키트(Histamine bioassay kit™)와 기존 검출키트와의 비교한 특징에 대해서 소개하고자 한다.

전통적인 히스타민 검출법

현재 히스타민 검출법은 국내에서는 식품공전에 따라 식품 중 히스타민을 염산으로 추출하여 검출 물질인 히스타민은 따로 흡광을 나타내지 않으므로 이를 분석하기 위해서 염화단실(dansyl chloride)로 유도체화 한 후 고속액체크로마토그래프(HPLC)를 이용하여 분석하고 있다. 미국공인분석화학법(AOAC; Association of Official Agricultural Chemists)에서는 양이온교환칼럼으로 분리한 후 o-프탈알데히드(o-phthalaldehyde)로 유도체화 하여 형광검출기로 분석하는 후칼럼(post-column) 방법을 채택하고 있으며 이외에 전칼럼(pre-column) 방식으로 염화단실(dansyl chloride), 염화벤조일(benzoyl chloride) 등으로 유도체화하여 역상칼럼으로 분석하고 있다. 이외의 방법으로 기체크로마토그래프(GC)를 이용한 히스티민 검출에서는 식품에서 검출된 시료를 N-Methyl-

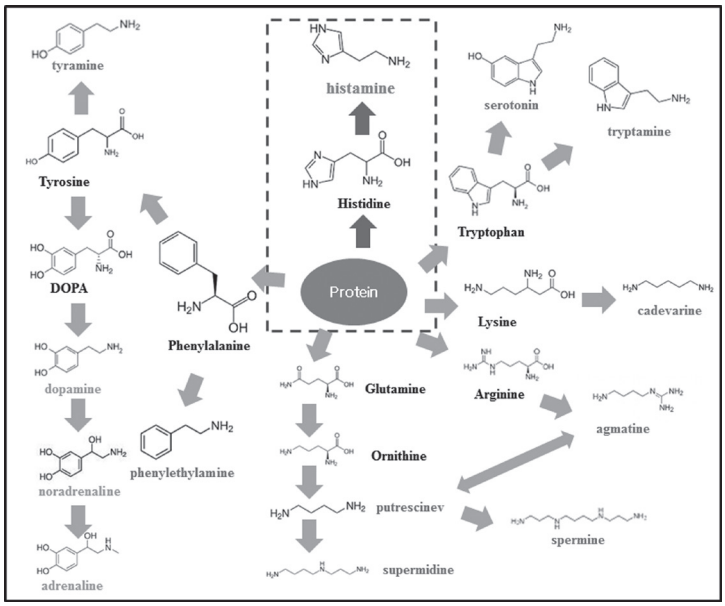

그림 1. 바이오제닉 아민과 히스타민 생성의 생합성 경로

bis [trifluoroacetamide](MBTFA), N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacrtamide (BSTFA), Trimethylchlorosilane(TMCS), N-methyl-N-(tert-buthyl dimethylsilyl) trifluoroacrtamide 등으로 유도체화 하여 FID 및 MS로 분석하고 있다. 이러한 히스타민 검출법은 유도체화를 위한 전처리, 고가의 장비를 필요로 하고 있으며 이러한 검출을 위한 전문적인 지식과 장비 사용을 위한 숙련된 기술이 필요하므로 신속 간편 검출법으로 사용하기에는 기술적인 문제가 있다.

신속간편 분석을 위한 새로운 히스타민 검출법

현재 히스타민의 신속한 검출을 위해서 히스타민에 대한 항체를 기반으로 하는 경쟁적 효소면역측정(competition ELISA) 방법에 의한 키트 개발되어 판매 중에 있다. 그러나 신속 검출 키트로 사용하기에는 고가이고 경쟁적 효소면역측정법 자체가 실험 시 많은 각 단계를 거쳐야 하고 이 과정에서 번거로운 피펫팅이 요구되어지므로 식품 위해 요소 검출 현장에서 사용하기에 어려움이 있다. 최근 신속 검출법으로 효소면역학적 항체 아닌 효소 기반의 히스타민 검출법이 일부 개발되어 있다. 이는 히스타민 탈수소효소(dehydrogenase)와 발색 염료를 이용하여 생성되는 흡광 정도로 검출하므로 쉽고 빠른 검출이 가능하므로 현장에 사용하기 적합한 방법이다. 그러나 사용되는 발색 염료인 2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H-tetrazolium (WST-8)은 시료인 수산물이나 식품에 존재할 수 있는 다양한 유사 물질들과 비특이적으로 반응이 일어날 수 있다는 문제점을 가지고 있다.

여기에서 소개하고자 하는 효소기반 새로운 히스타민 신속 검출법은 앞서 개발된 히스타민 탈수소효소(dehydrogenase) 기반의 히스타민 검출법처럼 쉽고 빠른 검출이 가능하면서도 보다 안정적인 검출을 위해

기존의 히스타민 탈수소효소가 아닌 히스타민 산화효소(histamine oxidase; HO)를 검출 키트의 주요한 효소로 사용하였다. 이를 통해 식품 위해 요소를 검출하기 위한 현장에서는 이를 관리하기 위한 고가의 장비와 고급 전문 인력을 배치하기 어려움이 존재하므로 이를 위해서 고감도 발색 염료를 이용하여 별도의 장비 없이 발색 반응을 통해 간편하게 검출할 수 있다.

기존 신속간편 히스타민 검출법과의 비교

기존 신속간편 히스타민 검출법과의 비교를 위해서 미국 Bioo Scientific사에서 개발한 Maxsignal histamine ELISA test kit와 Maxsignal histamine ELISA test kit에 대해 양념되지 않은 참치캔과 양념된 참치캔에 스파이크하여 비교 실험을 진행하였다. 이때 히스타민 이외에도 특이도 비교를 위해서 티라민을 이용하였고 또한 다른 바이오제닉 아민이 존재할 때에 특이도 비교를 위해서 도파민, 트립타민과 하이드록시아민을 각각 10 ppm 씩 히스타민과 함께 첨가하여 검출도를 비교 실험하였다. 그 결과 아래 표와 같은 실험 결과를 얻을 수 있었다.

효소기반 새로운 히스타민 신속 검출키트의 경우 미국 Bioo Scientific사에서 개발한 Maxsignal histamine ELISA test kit에 대한 비교 실험에서 Histamine에 대한 특이도가 우수하고 정확도와 재현성이 높은 결과를 얻을 수 있었다. 다른 제품인 Histamine dehydrogenase 기반의 Maxsignal histamine enzymatic assay kit는 매우 높게 Histamine에 대한 특이도를 갖는 검출 결과를 보여주었지만 다른 바이오제닉 아민 존재 하에서는 검출 성능이 크게 저해 받는 결과를 나타내었다. 이는 효소적인

표 1. 참치 캔에 대한 히스타민과 바이오제닉 아민에 대한 히스타민 신속간편 검출 키트의 검출 성능 테스트

	Sample(Histamine spiked conc.)	Histamine	Tyramine	+ 3 species of amine
Maxsignal histamine ELISA test kit	canned tuna (10 ppm)	15.1 ppm±0.4	10.1 ppm±0.5	11.0 ppm±0.4
	spicy canned tuna (10 ppm)	15.0 ppm±0.9	11.1 ppm±0.7	6.0 ppm±0.3
Maxsignal histamine enzymatic assay kit	canned tuna (10 ppm)	8.4 ppm ±0.3	0 ppm ±0.02	0.17 ppm ±0.02
	spicy canned tuna (10 ppm)	7.4 ppm ±0.4	−0.01ppm±0.04	0.19 ppm ±0.03
Histamine Bioassay Kit	canned tuna (10 ppm)	9.4 ppm±0.05	4.8 ppm ±0.07	5.6 ppm ±0.05
	spicy canned tuna (10 ppm)	9.4 ppm ±0.14	4.8 ppm ±0.11	6.2 ppm ±0.03

표 2. 기존 신속간편 검출 키트와 Histamine bioassay kit와의 성능 및 제품의 특징 비교

	Maxsignal histamine ELISA test kit	Maxsignal histamine enzymatic assay kit	Histamine bioassay kit
Analytical methology	EIA method	Enzymatic method	Enzymatic method
Detection range	1–100 ppm	20–300 ppm	1–200 ppm
Total test time	1–1.5 hr	1hr	1hr
Reproducibility	Variation may occur	good	Very good
Sensitivity	Low sensitivity	Quite sensitivity	Quite sensitivity
Selectivity	Accurate	Very Accurate	Quite accurate
Price	750,000 won (100 test/kit)	750,000 won (100 test/kit)	300,000 won (100 test/kit)

특징에 의해서 histamine과 tyramine과는 달리 다른 바이오제닉 아민에 의해서 효소 활성에 저해를 받는 것으로 추측된다. 따라서 새로운 히스타민 신속 검출키트인 Biomax 사에서 개발한 Histamine bioassay kit의 경우는 tyramine에 대해서는 Maxsignal histamine enzymatic assay kit보다는 낮은 특이도를 갖지만 다른 바이오제닉 아민 존재 하에서도 안정적인 검출도를 나타내는 결과를 보여주므로 기존 신속간편 검출키트에 비해 안정적인 재현성과 검출 성능을 갖고 있는 것으로 판단된다.

새로운 효소기반 히스타민 신속간편 검출키트는 기존 히스타민 신속간편 검트로 개발된 Maxsignal histamine ELISA test kit에 대해서는 재현성, 선택도, 민감도에 대해서 모두 우수한 성능을 보여 주었다. 선택도에 대해서는 Maxsignal histamine enzymatic assay kit에 비해 다소 떨어지지만 정확도와 재현성이 높으며 무엇보다도 가격이 40–50% 저렴하게 제품화되었다.

현재 히스타민을 비롯한 바이오제닉 아민의 식품 내 안정성에 대한 요구에 따라 이에 대한 검출을 위한 보다 신속하면서 안정적이고 높은 정확도를 갖으며 비교적 저렴하고 다중 검출이 가능한 검출법에 대한 요구는 꾸준하게 요구되고 있다. 따라서 신속 간편하면서도 정확하고 안정적이고 한 번에 여러 시료를 검출할 수 있는 검출법에 대한 연구는 계속될 것이다.

권찬호
biomax