DAEHAN HWAHAK HWOEJEE
(*Journal of the Korean Chemical Society*)
Vol. 32, No. 4, 1988
Printed in the Republic of Korea

요소 정량을 위한 *Proteus vulgaris* 박테리아 전극의 개발과 그 응용

印權植† · 金峯元 · 孫武正 · 金仁卓
계명대학교 자연과학대학 화학과

(1987. 7. 27 접수)

Preparation of the *Proteus vulgaris* Bacterial Electrodes for the Determination of Urea and Their Application

Gwon-Shik Ihn†, Bong-Weon Kim, Moo-Jeong Sohn, and **Ihn-Tak Kim**
Department of Chemistry, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 634, Korea

(Received July 27, 1987)

요 약. 요소는 박테리아가 가지고 있는 urease에 의해 2분자의 NH_3와 1분자의 CO_2기체를 생성한다. *Proteus vulgaris*를 NH_3와 CO_2기체 감응전극에 고정시켜 박테리아 전극을 조립하고, pH, 온도, 완충용액, 박테리아(균)의 양 및 여러가지 방해물질의 영향과 전극의 수명등에 관하여 조사하였다. NH_3-박테리아 전극은 25°C에서 pH7.4인 0.05M phosphate 완충용액을 사용하였을 때 직선범위는 7.0×10^{-4}−3.0×10^{-2}M이었고, 감응 기울기는 116.7mV/decade였다. 한편, CO_2-박테리아 전극은 30°C, pH7.0, 0.1M phosphate 완충용액을 사용하였을 때 7.0×10^{-4}−5.0×10^{-2}M 내에서 감응 기울기는 45.4−45.7mV/decade로 나타났다. 실제 임상적인 응용으로서 요속에 들어 있는 요소를 정량하고 분광광도법과 비교하였다. 결과적으로 이 전극의 경우는 실험과정이 간단하고 편리하여 신속하게 많은 양의 시료 분석이 가능하였다.

ABSTRACT. The bacteria containing urease convert each molecule of urea into two molecules of ammonia and one molecule of carbon dioxide gas. Bacterial electrodes have been constructed by immobilizing the *Proteus vulgaris* on an ammonia and a carbon dioxide gas-sensors, and were investigated for the effects of pH, temperature, buffer solution, bacterial amounts and interferences, and life time. NH_3-bacterial electrode based on ammonia gas-sensor had linearity in the range of 7.0×10^{-4}−3.0×10^{-2}M urea in pH 7.4, 0.05M phosphate buffer at 25°C with a slope of 116.7 mV/decade. While CO_2-bacterial electrode based on carbon dioxide gas-sensor had linearity in the range of 7.0×10^{-4}−5.0×10^{-2}M urea in pH7.0, 0.1M phosphate buffer at 30°C with a slope of 45.4−45.7mV/decade. As the clinical application, urea in urine was determined by these devices and this result was compared with spectrophotometric method. Consequrntly, these electrodes could be used for the analysis of many samples because of simplicity, rapidity and convenience of the experimental procedure.

서 론

최근에 기체감응전극을 개선함으로써 이온이나 단백질의 방해[1]를 받지 않는 더 좋은 효소전극[2-4]의 발전을 가져왔다. 효소를 이용한 요소[5-10], glucose[11,12], 아미노산[13-20] 및 nucleotide[3,21]

전극 등이 보고 되었으며, 그 중에서도 특히 요소에 대한 전극이 가장 많이 개발되었다. Guilbault 등[5,6]에 의해서 최초의 효소전극이 개발되었는데, 이 전극은 urease 를 polyacrylamide gel 에 흡착시켜서 사용하였으며, 이때 전극으로는 1가 양이온전극(monovalent cation electrode)을 사용하였다. 또한, 이들은 polyacrylamide gel 에 얇은 cellophane film[6,7]을 첨가함으로써 수명이 더 긴 요소전극을 개발하였다.

한편, 1가 양이온전극을 사용한 요소전극을 이용하여 Broun 등[8]은 bovine serum albumin(BSA)와 glutaraldehyde 를 urease 와 covalent coupling 시켜 요소를 측정하였다.

이들 1가 양이온 전극을 바탕전극으로 사용하였을 때는 1가 양이온(Na^+, K^+등)에 많은 방해를 받았다. 이러한 방해를 제거하기 위하여 Anfalt 등[9]은 glutaraldehyde 를 사용하여 NH_3 기체감응전극의 기체 투과막에 직접적으로 urease 를 고정시켜 요소를 측정하였다.

또 Mascini 등[10]은 바탕전극으로서 NH_3 기체감응전극을 사용하여 BSA 와 glutaraldehyde 로써 teflon 에 공유결합시킨 urease 를 이용한 전극을 보고 하였다. 그리고 Papastathopoulos 등[2]은 투석막의 표면에 정제된 효소인 urease 를 고정시켜 혈액 중의 요소를 정량하여 좋은 결과를 얻었다. 그렇지만 효소전극은 효소의 추출, 정제 및 농축 등의 문제로 사용상 많은 불편함과 제한성을 갖는다. 따라서 효소대신 박테리아 등을 전극막에 고정시켜 사용하는 bio-sensing electrode 가 개발되었다[22~25]. 이 bio-sensing electrode 는 효소전극이 갖는 효소의 추출과 정제과정이 필요없으며, 또한 효소의 활성감소에 있어서도 추출된 효소 보다는 그 정도가 심하지 않으므로 효소전극 보다는 훨씬 오래 사용할 수 있는 장점을 지니고 있다[25]. 이러한 박테리아 전극은 Rechnitz 등[22]에 의해서 최초로 보고 되었는데, 이들은 *Streptococcus faecium* 을 NH_3 기체 감응 전극에 고정시켜서 L-arginine 을 측정하였다.

또한, Kobos 등[23]은 *Bacterium cadaveris* 를, Meyerhoff 등[24]은 *Sarcina flava* 를, Riechel 등[25]은 *E. coli* 를 NH_3 기체감응전극에 부착시켜서 L-aspartate, L-glutamine 및 NAD 를 각각 측정하였으며, Jensen 등[26]은 H_2S 기체 감응전극에 *Proteus morganii* 를 고정시켜서 L-cysteine 을 측정하였다.

본 연구에서는 박테리아의 일종인 *Proteus vulgaris* 를 NH_3 와 CO_2 기체 감응전극에 각각 고정시켜서 요소에 대한 pH, 완충용액, 온도, 방해물질의 영향과 전극의 수명 등 최적조건을 찾고자 하며, 실제 임상에 이용하여 그 결과를 다른 방법과 비교하고저 한다.

실 험

기기 및 시약

기기. NH_3 와 CO_2 기체 감응전극은 Orion Research Model 95~10 와 95~12 를 각각 사용하였으며, pH 및 전위측정은 Orion Research #611 Digital pH/millivolt meter 와 #901 Digital microprocessor Ionalyzer 를, 자외선 분광광도계(UV-Vis spectrophotometer)는 Beckman DU-8B 를 각각 사용하였다.

균의 배양과 멸균을 위한 incubator 와 autoclave 는 Hyundai D-27B 와 A-09 를, 원심분리기는 Hitach 70P-72 를 항온을 위한 water bath 는 Forma Scientific Bath and Circulator-2067 을 사용하였다.

시약. 요소는 Wako 제, tris(hydroxymethyl) aminomethane 은 Sigma 제, Na_2HPO_4 와 NaH_2PO_4 는 Fisher 제 특급시약을, 균의 배양과 동정을 위해 사용한 nutrient broth 와 T.S.I(Triple Sugar Iron) agar 는 Difco Laboratory 제품을, A.P.I(Analytical Profile Index) 20E 는 Analytab Product Inc. 를 사용하였다. 기타 시약은 Wako, Sigma, Fisher 제 특급시약을 사용하였으며, 모든 용액의 제조는 탈염된 증류수를 사용하였다.

균. 본 실험에서 사용된 균은 본대학교 의과대학 미생물학교실에서 확인, 동정된 *Proteus vulgaris* 를 분양받아 매 실험시 확인, 동정하여 사용하였다.

실험 균주 배양 및 확인

실험 균주의 배양. Nutrient broth 8g을 증류수 1L에 용해시켜 shaking flask에 0.25L씩 분주해서 고압 멸균기로 15 lb, 121°C에서 15분간 멸균시켰다. *Proteus vulgaris*를 백금이(transfer loop)로 멸균된 용액에 1 loop씩 각각 접종시켜 shaking incubator에서 35°C로 온도를 유지시키면서 균활성이 가장 좋은 18시간 동안 배양시킨 후, 7,000rpm으로 15분간 원심분리시킨다. 원심분리된 균의 불순물을 제거하기 위해 0.85% NaCl로 씻어서 4°C의 냉장고에 보관하며 사용하였다.

실험 균주의 확인. 본 실험에서 사용된 *Proteus vulgaris*의 확인, 동정은 T.S.I agar 및 A.P.I 20E를 사용하였으며, 매 실험마다 배지에 나타난 성상을 확인하였다.

T.S.I agar[27]에 나타난 동정 결과는 A/A H_2S이었으며, A.P.I 20E[28]를 이용한 생물학적 동정 결과는 아래와 같으며, (+)는 해당 물질과의 반응을 나타내고 (−)는 무반응을 나타낸다.

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT
(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
H_2S	URE	TDA	IND	VP
(+)	(+)	(+)	(+)	(−)
GEL	GLU	MAN	INO	SOR
(+)	(+)	(−)	(−)	(−)
RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
(−)	(+)	(−)	(−)	(−)
OX	NO_2			
(−)	(+)			

흡광도의 측정

시료의 제단백. 5ml의 요(urine)를 35ml의 증류수로 희석하고, 10% Na_2WO_4 5ml를 가하여 잘 저어준다. 여기에 $\frac{2}{3}$N H_2SO_4 5ml를 한 방울씩 적가하여 다시 저어주면 단백질이 모두 침전하고 약간의 거품이 생긴다. 이 용액을 실온에서 10분간 방치한 후 빠른 시간 내에 여과하여 제단백된 시료를 얻는다.

착색 시약의 제조. (ㄱ) Urease 시약 ; EDTA-2Na 4g을 증류수에 녹여 NaOH로 pH를 7.0으로 조절한다. 이 용액에 urease 1g을 넣고, 증류수로 500ml가 되도록 한다.

(ㄴ) Phenol 시약 ; Phend 5g과 sodium nitroprusside 0.25g을 증류수에 녹여 500ml가 되도록하고, 갈색시약병에 넣어 냉장고에서 보관시킨다.

(ㄷ) 알칼리성 차아염소산시약 ; NaOH 2.5g을 증류수에 녹이고, NaOCl(유효 염소농도 10%) 3ml를 가한 후, 증류수로 500ml가 되도록하고, 갈색시약병에 넣어 냉장고에서 보관한다.

시료의 착색 및 흡광도. 요소 표준용액(10^{-2} −10^{-4}M)과 제단백된 시료 각각 1 ml에 urease 시약 5 ml를 가하고, 37°C의 incubator에서 15분간 방치한 다음, phenol 시약 10ml를 가하고 잘 흔들어 준다.

이 용액에 알칼리성 차아염소산 시약 10ml를 가하고, 다시 37°C의 incubator에서 20분간 방치하면 시료와 표준용액은 푸른색으로 착색되며, 착색용액의 흡광도를 650nm에서 측정하였다.

전극의 조립

Pore size가 0.22μm인 투석막 위에 4°C에서 보관한 균과 기체투과막을 차례로 놓은후, NH_3

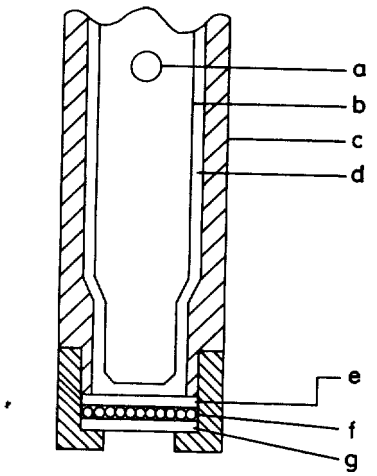

Fig. 1. Schematic diagram of the bacterial electrode for urea: a. Reference element; b. Inner body; c. Outer body; d. Internal filling solution; e. Gas-permeable membrane; f. Bacterial layer; g. Dialysis membrane.

Table 1. The effects of temperature on the bacterial electrodes for urea

Temperature (°C)	Ammonia[a]			Carbon dioxide[b]		
	Linear range(M)	Response (mV/decade)	Response time (mins)	Linear range(M)	Response (mV/decade)	Response time (mins)
20	1.0×10^{-3} -1.0×10^{-2}	99.0	8—15	—	—	—
25	7.0×10^{-4} -3.0×10^{-2}	116.7	5—7	1.0×10^{-3} -5.0×10^{-2}	47.7	7—10
30	1.0×10^{-3} -1.0×10^{-2}	116.2	4—5	7.0×10^{-4} -5.0×10^{-2}	45.7	4—5
35	1.0×10^{-3} -1.0×10^{-2}	113.7	4—5	7.0×10^{-4} -3.0×10^{-2}	43.7	4—5

—be not tested. [a] be tested in pH 7.4, 0.05M phosphate buffer solution. [b]be tested in pH 7.0, 0.1M phosphate buffer solution.

(ϕ 7mm) 및 CO_2기체 감응전극(ϕ 13mm) 하단부에 부착하여 *Fig.* 1과 같이 박테리아 전극을 조립하였다.

결과 및 고찰

요소에 대한 감응도

*Proteus vulgaris*에 의한 요소의 분해과정은 다음과 같다.

$$H_2N\diagdown\!\!\diagup C=O+H_2O \xrightarrow[(\text{urease})]{\textit{Proteus vulgaris}} 2NH_3+CO_2 \qquad (1)$$

(1)식에서 발생되는 NH_3기체는 즉시 전극의 기체 투과막을 통하여 NH_3기체감응 전극의 내부용액으로 확산되므로 NH_3 기체감응 전극을 이용한 박테리아전극(이하 NH_3-박테리아전극이라 칭함)에 대한 NH_3기체의 감응은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$NH_3+H_2O \rightleftharpoons NH_4^+ + OH^- \qquad (2)$$

한편, OH^-에 대한 Nernst식은 (3)식으로 나타낼 수 있으므로

$$E=E_0-0.0591\ \log[OH^-] \qquad (3)$$

전위값은 다음과 같이 NH_3의 농도에 의하여 나타낼 수 있다.

$$E=E_0'-0.0591\ \log[NH_3] \qquad (4)$$

(4)식에서 나타내는 실측 전위값은 요소의 농도에 따라 발생하는 NH_3기체의 농도에 의한 것이므로 요소 농도와 전위값 사이에서 직선범위의 감응 기울기를 갖는 검정선을 작성하여 요소 정량에 이용할 수 있다. 이미 발표된 요소 정량을 위한 감응 기울기 값으로서는 Guilbault 등[29]은 95mV/decade, Papastathopoulos 등[2]은 90.7 mV/decade, 그리고 Anfält 등[9]은 69.5mV/decade의 값을 보고 하였다.

그러나 본 연구에서는 박테리아, *Proteus vulgaris*를 사용하고, 0.05M phosphate 완충용액으로 pH를 7.4로 고정시켜 25°C의 온도에서 균량 3mg일때 기존의 연구결과 보다 훨씬 우수한 감응 기울기인 116.7mV/decade의 값을 얻었으며, 그때 직선범위는 요소의 농도, 7.0×10^{-4}—3.0×10^{-2}M이었고, 감응시간은 5~7분이 소요되었다.

한편, CO_2에 감응하는 CO_2기체 감응전극을 이용한 박테리아 전극(이하 CO_2-박테리아 전극이라 칭함)의 감응전위도 위의 (2)식으로 부터 다음과 같이 쓸 수 있다.

$$E=E_0'+0.0591\ \log[CO_2] \qquad (5)$$

이 경우는 최적조건이 0.1M phosphate, pH 7.0, 30°C, 균량은 10mg일 때이며, 7.0×10^{-4} -5.0×10^{-2}M 요소에서 직선성을 갖게 되었고, 감응 기울기는 45.4mV/decade로 나타났으며, 감응시간은 4~5분이 소요되었다.

본 두 박테리아 전극이 최적조건일 경우의 요소에 대한 감응도 곡선을 *Fig.* 2에 나타내었다.

pH에 의한 영향

요소에 대한 본 박테리아 전극의 pH에 의한

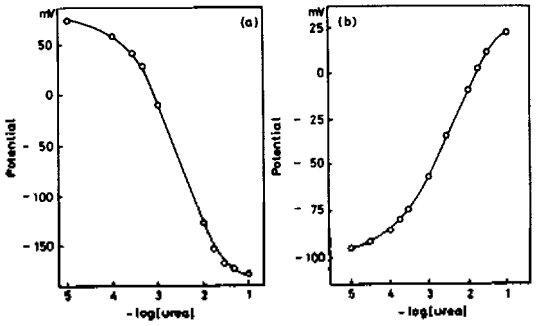

Fig. 2. Calibration curves for urea: (a) Ammonia-bacterial electrode; (b) Carbon dioxide-bacterial electrode.

영향을 *Fig.* 3에 도시하였다.

NH_3-박테리아 전극은 25°C의 온도에서 0.05 M phosphate 완충용액의 pH를 7.0에서 8.0까지 변화시켰다. 그결과, pH7.0에서는 $1.0\times10^{-3}-7.0\times10^{-2}$M 요소의 범위에서 103.9mV/decade의 감응을 보여 비교적 직선범위가 넓었으며, 감응시간은 6~10분이 소요되었다.

pH7.4에서의 직선범위는 $7.0\times10^{-3}-3.0\times10^{-2}$M 요소로 나타났으며, 이 범위에서의 감응 기울기는 116.7mV/decade로서 가장 우수하였다. 이때의 감응시간은 5~7분으로 가장 짧은 시간이 소요되었다. pH7.2와 7.6의 경우에는 $1.0\times10^{-3}-3.0\times10^{-2}$M에서 직선성을 나타내며, 감응 기울기는 114.2, 110.5mV/decade로서 비교적 우수한 값이었고 감응시간은 각각 6~9, 7~10분이었다. 또한, pH7.8과 8.0에서는 $1.0\times10^{-3}-1.0\times10^{-2}$M 내에서 직선성을 보여 직선범위가 비교적 짧았고, 이때의 감응 기울기는 각각 100.1, 92.4mV/decade로서 pH7.4에 비해 조금 떨어지는 값이었으며, 감응시간은 각각 7~11, 8~13분이 소요되었다. 결과적으로 pH 7.0에서는 직선범위가 가장 길었지만 고농도에서 직선성을 보여주었을 뿐만 아니라 감응 기울기도 비교적 저조한 값이었다. 그러나 pH 7.4에서는 7.0보다는 직선범위가 짧지만 비교적 저농도에서 직선성을 나타내었으며, 감응 기울기도 가장 우수한 값이었을 뿐만 아니라 가장 짧은 감응시간이 소요되었다. 따라서 모든 실험은 pH7.4에서 실시하였다.

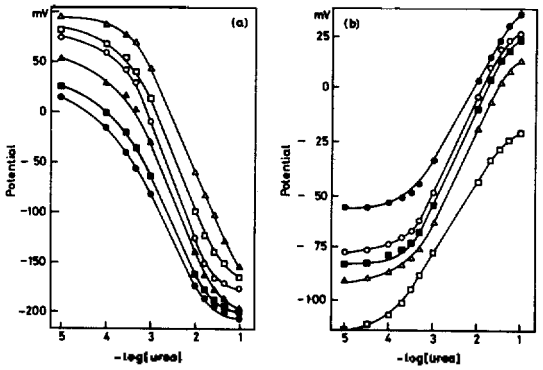

Fig. 3. The effects of pH on the bacterial electrodes for urea. (a) Ammonia-bacterial electrode: 7.0 (△); 7.2(□); 7.4(○); 7.6(▲); 7.8(■); 8.0(●). (b) Carbon dioxide-bacterial electrode; 6.8(●); 7.0(○); 7.2(■); 7.4(△); 8.0(□).

한편, CO_2-박테리아 전극은 0.1M phosphate 완충용액에서 온도를 30°C로 고정시키고 pH를 6.8에서 8.0으로 변화시켜 측정한 결과, pH 6.8에서는 $7.0\times10^{-4}-7.0\times10^{-2}$M 내에서 감응 기울기는 37.5mV/decade로 나타났으며, 감응시간은 3~5분이었다. pH 7.0일 때의 직선범위는 $7.0\times10^{-4}-5.0\times10^{-2}$M이었으며, 이 범위에서 감응 기울기는 45.7mV/decade로 나타났으며, 감응시간은 4~5분이 소요되었다. pH 7.2와 7.4에서는 $7.0\times10^{-4}-5.0\times10^{-2}$M 내에서 감응 기울기와 감응시간은 각각 45.1, 44.5mV/decade 및 4~5, 5~7분이었다. pH8.0에서는 $3.0\times10^{-4}-3.0\times10^{-2}$M 내에서 감응 기울기는 34.6mV/decade로 떨어졌으며, 감응시간은 5~7분이 소요되었다. 따라서 pH7.0이 최적조건이라 판단되어 pH7.0에서 모든 실험을 행하였다.

한편, 일반적으로 CO_2기체는 일정한 온도 하에서 산성이 강할수록 용해도가 적어지며, 박테리아는 중성에가까운 약염기성에서 최적의 활성을 나타낸다. 따라서 이들의 상호 조건이 가장 충족되었을 때 요소는 박테리아에 의해 가장 많은 양의 CO_2기체를 발생시킬 수 있다.

또한, 이때 발생된 CO_2기체는 pH의 변화에 따른 용해도와 확산속도 차이등에 의하여 실제로 발생된 양 보다는 적은 양의 기체가 투과막을 통과할 것으로 추정된다. 그러므로 이와같은

복합적인 요인 때문에 CO_2-박테리아 전극의 감응은 sub-Nernstian slope를 나타낸 것으로 사료된다. 그러나 직선범위와 감응 기울기의 재현성이 양호하므로 그 이용성은 NH_3-박테리아 전극에 못지 않게 우수하다는 것을 알 수 있었다.

온도에 의한 영향

온도를 20°C에서 35°C로 변화시켜 가면서 본 박테리아 전극의 감응기울기 값의 변화를 측정하여 표 1에 나타내었다.

NH_3-박테리아 전극의 경우는 0.05M phosphate 완충용액에서 pH를 7.4로 고정시키고 온도를 변화시킨 결과, 20°C에서는 비교적 좁은 직선범위와 낮은 감응 기울기를 보여주었을 뿐만 아니라 감응시간도 상당히 오랜 시간이 소요되었으며, 25°C 이상에서는 거의 비슷한 감응도를 유지하였다. 이 중에서도 25°C의 경우, 감응시간은 30°와 35°C에 비해 1~2분이 더 걸렸지만 직선범위와 감응 기울기는 각각 7.0×10^{-4}-3.0×10^{-2}M 요소와 116.7mV/decade로 가장 우수한 값이 었으므로 이 온도에서 모든 실험을 실시하였다.

또한, CO_2-박테리아 전극은 0.1M phosphate 완충용액에서 pH를 7.0으로 고정시키고 온도를 변화시킨 결과, 역시 25°C~35°C의 온도 범위에서 거의 일정한 감응도를 나타내었다. 25°C에서는 30°C에 비해서 직선범위는 좁고 감응시간은 길었으나 감응기울기의 값이 비교적 우수하였으며, 35°C에서는 비교적 짧은 감응시간이 소요되었다. 따라서 감응기울기 값은 43.7~47.7mV/decade로서 거의 일정하므로 직선범위가 7.0×10^{-4}-5.0×10^{-2}M 요소농도로서 가장 넓은 30°C에서 모든 실험을 행하였다.

완충용액에 의한 영향

요소에 대한 본 박테리아전극의 완충용액에 따른 영향을 *Table* 2에 나타내었다.

NH_3-박테리아전극은 pH와 온도를 각각 7.4, 25°C로 고정시키고 phosphate와 tris-HCl 완충용액을 몰 농도에 따라 변화시켜 감응기울기와 직선범위를 측정한 결과, 비교적 저농도의 완충용액에서 잘 감응하였으며, 완충용액의 농도가 묽을수록 감응시간이 짧았다. 그리고 phosphate 보다는 tris-HCl을 사용하였을 때가 비교적 더 넓은 직선범위를 가졌다. 본 연구에서는 직선범위가 7.0×10^{-4}-3.0×10^{-2}M로서 가장 넓고, 감응기울기가 116.7mV/decade로서 가장 우수한 감응을 보인 0.05M phosphate 완충용액으로 모든 실험을 실시하였다.

한편, CO_2-박테리아전극은 pH 7.0, 30°C로 고정시키고 0.05, 0.1, 0.2M phosphate와 0.1M tris-HCl 완충용액을 사용한 결과, phosphate 완충용액의 농도 변화에 의한 직선범위는 거의 일정하였으며, tris-HCl 완충용액에서 보다 phosphate의 경우에서 더 넓은 직선범위와 더 우수한 감응기울기를 나타내었다. 따라서 7.0×10^{-4}-5.0×10^{-2}M 내에서 45.5mV/decade의 감응을 나타낸 0.1M phosphate 완충용액을 모든 실험에 사용하였다.

균량에 의한 영향

Fig. 4에는 요소에 대한 본 박테리아 전극의 *Proteus vulgaris* 양에 의한 영향을 나타내었다.

NH_3-박테리아 전극의 경우는 0.05M phosphate 완충용액에서 pH와 온도를 각각 7.4, 25°C로 고정하여 균의 양을 1 mg에서 5 mg까지 변화시켜 감응 기울기에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 1 mg의 균을 사용하였을 때는 직선범위, 1.0×10^{-3}-1.0×10^{-2}M 내에서 감응 기울기는 88.0mV/decade로 나타났으며, 감응시간은 3~4분으로 비교적 짧은 시간이 소요되었

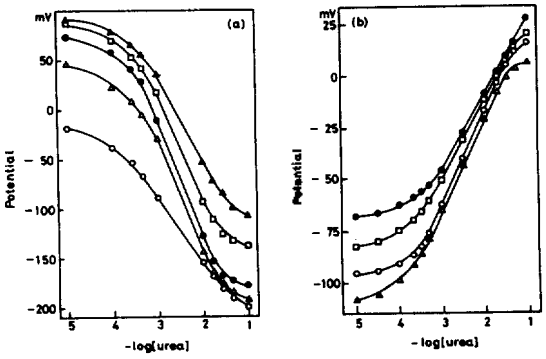

Fig. 4. The effects of bacterial amounts on the bacterial electrodes for urea. (a) Ammonia-bacterial electrode: 1(▲); 2(□); 3(●); 4(△); 5mg(○). (b) Carbon dioxide-bacterial electrode: 5(●); 10(□); 20(○); 30 mg(△).

Table 2. The effects of buffer solutions on the bacterial electrodes for urea

Buffer solutions	Ammonia[a]			Carbon dioxide[b]		
	Linear range(M)	Response (mV/decade)	Response time (mins)	Linear range(M)	Response (mV/decade)	Response time(mins)
0.05M phosphate	7.0×10^{-4} -3.0×10^{-2}	116.7	5—7	7.0×10^{-4} -3.0×10^{-2}	39.0	4—7
0.1M phosphate	1.0×10^{-3} -5.0×10^{-2}	87.1	6—9	7.0×10^{-4} -5.0×10^{-2}	45.5	4—5
0.2M phosphate	3.0×10^{-3} -1.0×10^{-1}	96.7	10—13	7.0×10^{-4} -5.0×10^{-2}	43.5	4—5
0.05M Tris-HCl	7.0×10^{-4} -1.0×10^{-2}	102.6	7—10	—	—	—
0.1M Tris-HCl	7.0×10^{-4} -3.0×10^{-2}	86.0	8—11	7.0×10^{-4} -3.0×10^{-2}	38.7	5—7
0.2M Tris-HCl	7.0×10^{-4} -3.0×10^{-2}	77.1	9—13	—	—	—

—be not tested. [a] be tested at pH 7.4, 25°C. [b] betested at pH 7.0, 30°C.

다. 2 mg과 4 mg의 경우에는 직선범위, 1.0×10^{-3}—1.0×10^{-2}M 내에서 감응 기울기는 각각 111.0, 115.1mV/decade로 비슷하였으며, 감응시간은 각각 4~5, 7~8분이었다. 3 mg을 사용하였을 때는 직선범위, 7.0×10^{-4}—3.0×10^{-2}M 내에서 116.7mV/decade의 감응 기울기 값을 보여주어 가장 넓은 직선범위와 우수한 감응 기울기로 나타났으며, 감응시간은 5~7분이 소요되었다. 5 mg을 사용하였을 때는 1.0×10^{-3}—3.0×10^{-2}M 내에서 감응 기울기는 65.9mV/decade이었으며, 감응시간은 10~13분으로서 비교적 오랜 시간이 걸렸다.

따라서 모든 실험은 3 mg의 균을 사용하였다.

한편, CO_2-박테리아전극은 0.1M phosphate 완충용액에서 pH와 온도를 각각 7.0, 30°C로 고정시키고 균의 양을 변화시켜 감응 기울기에 미치는 영향을 조사하였다.

5 mg의 균을 사용하였을 때의 직선범위는 7.0×10^{-4}—3.0×10^{-2}M 이었으며, 이 범위에서의 감응 기울기는 43.1mV/decade로 나타났으며, 감응시간은 2~4분이 소요되었다.

이 때는 저농도로부터 직선성을 이룬 반면에 30mg을 사용하였을 때는 직선범위, 1.0×10^{-3}—1.0×10^{-2}M 내에서 36.7mV/decade의 감응을 보여 비교적 고농도에서 직선성이 나타났으며, 감응시간은 7~8분이 소요되었다. 10mg을 사용하였을 때는 직선범위, 7.0×10^{-4}—5.0×10^{-2}M 내에서 45.8mV/decade의 감응을 보여 주었으며, 감응시간은 4~5분이 걸렸다. 또 20mg의 균을 사용하였을 때는 1.0×10^{-3}—7.0×10^{-2}M 내에서 39.3mV/decade의 감응을 나타내어 10 mg의 45.8mV/decade보다 떨어졌으며, 감응시간도 5~7분으로 10mg보다 오랜 시간이 걸렸다. 따라서 균의 양이 많을 수록 감응시간이 길게 소요됨을 알수 있었으며, 실험에는 10mg의 균을 사용하였다.

결과적으로 두 전극에 있어서 균의 양은 비록 3 mg과 10mg으로서 차이가 있지만 실제적으로 전극의 단위 면적당 균의 양은 약 0.08mg으로 일정하였다.

방해물질에 의한 영향

Table 3에는 1.0×10^{-2}M 및 1.0×10^{-3}M 요소에 각종 아미노산을 각각 1.0×10^{-2}M, 1.0×10^{-3}M을 섞었을 때 순수한 요소에 대한 ΔmV 값으로 나타내었다.

NH_3-박테리아 전극은 *Proteus vulgaris*의 특성에 의하여 NH_3기체의 생성이 양호하므로 여러가지 아미노산에 대해서 약간은 감응하는 것

Table 3. The effects of interferences on the bacterial electrodes for urea

Substances	Ammonia[a]		Carbon dioxide[b]	
	Response(mV)	⊿mV	Response	⊿mV
glucose	12.0	0	−19.5	+0.9
arginine	−10.0	−22.0	−20.4	0
asparagine	−16.7	−28.7	—	—
leucine	− 4.3	−16.3	—	—
histidine	—	—	−20.4	0
methionine	1.1	−10.9	−20.4	0
phenylalanine	− 3.0	−15.0	—	—
sucrose	—	—	−19.3	+1.1
lactose	—	—	−20.4	0
glutamine	—	—	−20.4	0
none[c]	12.0	0	−20.4	0

[a] be tested in pH 7.4, 0.05M phosphate buffer solution at 25°C. [b] be tested in pH 7.0, 0.1M phosphate buffer solution at 30°C. [c] pure 1.0×10^{-3}M urea on the ammonia-bacterial electrode and 1.0×10^{-2}M urea on the carbon dioxide-bacterial electrode.

으로 나타났다. 특히 arginine과 asparagine 등이 큰 방해물질로 작용하였으며, glucose는 전혀 방해하지 않았다.

한편, CO_2-박테리아 전극은 glucose와 sucrose에 의해 약간의 방해를 받았지만 다른 물질들은 전혀 영향을 미치지 않았으므로 선택성이 우수한 전극임을 알 수 있다.

따라서 방해물질의 존재하에서 요소를 정량할 때는 CO_2-박테리아 전극을 이용하면 그들의 영향을 최소화할 수 있다.

각종 무기염류에 의한 영향

NH_3-박테리아 전극의 경우는 1.0×10^{-2}M 요소에 1.0×10^{-4}M의 무기염을 섞고, CO_2-박테리아 전극의 경우에는 1.0×10^{-3}M 요소에 1.0×10^{-4}M의 무기염들을 섞어서 감응의 차이, 즉 ⊿mV로 *Table* 4에 나타내었다.

표에서 보는 바와 같이 대부분의 무기염들은 박테리아 전극에 대하여 감응억제물질로 작용하는 것을 알 수 있다.

전극의 수명

본 실험에서 개발한 전극을 어느 정도까지 유용하게 사용할 수 있는지를 알아보기 위하여 가장 최적인 조건에서 20일 동안 4°C로 전극을 보관하면서 감응도를 측정하여 *Table* 5에 나타내었다.

NH_3-박테리아전극의 경우는 3일까지 거의 변화가 없었으나 7일째는 전극시간이 처음 보다 3분정도 더 길어졌다. 10일과 20일째는 직선범위가 줄어들었고, 감응기울기 값도 약 15~30 mV/decade 정도로 현저히 떨어졌다. 따라서 본 전극은 7일까지는 큰 변화가 없었으며, 그 이후에도 직선범위 내에서 실제 사용이 가능함을 보여주었다.

한편, CO_2-박테리아전극의 경우도 3일까지는 감응기울기와 직선범위의 변화는 거의 없었으나 7일째는 감응기울기가 약 5mV/decade 정도 떨어졌으며, 10일째와 20일째는 감응기울기, 직선범위 및 감응시간에 있어서의 변화는 현저하였다. 따라서 CO_2-박테리아 전극도 7일까지는 거의 변화가 없었으며, 그 이후에도 재현성 있는 직선범위와 감응기울기를 보여 주어 실제로 사용이 가능하였다.

요(urine) 중의 요소 정량

본 연구에서 개발한 박테리아 전극을 이용하

Table 4. The effects of inorganic salts on the bacterial electrodes for urea

Inorganic salts	Ammonia[a]		Carbon dioxide[b]	
	Response (mV)	⊿mV	Response (mV)	⊿mV
citric acid	+69.3	+2.5	−28.8	−9.1
oxalic acid	+70.3	+3.5	−23.4	−3.7
$FeCl_3\cdot6H_2O$	+70.6	+3.8	−22.0	−2.3
$MgCl_2\cdot6H_2O$	+68.0	+1.2	−24.5	−4.8
EDTA·2K	+69.7	+2.9	−27.2	−7.5
$ZnCl_2$	+70.4	+3.6	−24.5	−4.8
$CoCl_2\cdot6H_2O$	+70.6	+3.8	−24.2	−4.5
$HgCl_2$	+72.9	+6.1	−20.8	−1.1
$CdCl_2\cdot2\frac{1}{2}H_2O$	+72.1	+5.3	−19.9	−0.2
$MnCl_2\cdot4H_2O$	+67.9	+1.1	−19.8	−0.1
none[c]	+66.8	0	−19.7	0

[a] be tested in pH 7.4, 0.05M phosphate buffer solution. [b] be tested in pH 7.0, 0.1M phosphate buffer solution. [c] pure 1.0×10^{-3}M urea on ammonia-bacterial electrode and 1.0×10^{-2}M urea on carbon dioxide-bacterial electrode.

Table 5. Life time of the bacterial electrodes for urea

Days	Ammonia[a]			Carbon dioxide[b]		
	Linear range(M)	Response (mV/decade)	Response time (mins)	Linear range(M)	Response (mV/decade)	Response time(mins)
1	7.0×10^{-4} -3.0×10^{-2}	116.7	5—7	7.0×10^{-4} -5.0×10^{-2}	45.4	4—5
2	7.0×10^{-4} -3.0×10^{-2}	116.4	5—7	7.0×10^{-4} -5.0×10^{-2}	45.1	4—5
3	7.0×10^{-4} -3.0×10^{-2}	116.0	6—8	7.0×10^{-4} -5.0×10^{-2}	44.7	4—5
7	7.0×10^{-4} -1.0×10^{-2}	114.1	8—10	7.0×10^{-4} -3.0×10^{-2}	40.2	7—8
10	1.0×10^{-3} -1.0×10^{-2}	101.4	13—16	1.0×10^{-3} -3.0×10^{-2}	37.2	9—11
20	1.0×10^{-3} -1.0×10^{-2}	86.2	18—21	7.0×10^{-3} -7.0×10^{-2}	21.0	14—15

[a]be tested in pH 7.4, 0.05M phosphate buffer solution. [b] be tested in pH 7.0, 0.1M phos phate buffer solution.

Table 6. Comparision of spectrophotometric and potentiometric methods in clinical applications for urine (spectrophotometric method was tested at 650 nm).

Sample NO.[a]	Ammonia		Carbon dioxide		Spectrophotometry	
	Response(mV)	Concentration(M)	Response(mV)	Concentration(M)	Absorbance	Concentration(M)
1	−110.0	9.1×10^{-3}	−58.1	9.2×10^{-3}	0.5589	9.3×10^{-4}
2	− 99.7	8.3×10^{-3}	−63.5	8.3×10^{-3}	0.5351	8.3×10^{-4}
3	− 65.1	5.7×10^{-3}	−73.6	6.3×10^{-3}	0.4749	6.5×10^{-4}
4	− 39.8	3.8×10^{-3}	−85.9	3.8×10^{-3}	0.4152	4.3×10^{-4}

[a]1; taking medicine, 2; drinking alcohol, 3 and 4; normal.

여 실제로 사람의 요중에 들어있는 요소를 정량하고 종래의 방법인 분광 광도계에 의하여 정량한 결과를 비교하여 *Fig.* 5와 *Table* 6에 나타내었다.

먼저 요소 표준용액으로 *Fig.* 5와 같이 검정선을 작성한다. NH_3-박테리아 전극의 경우는 시료를 0.05M phosphate 완충용액으로 100배 희석시켜 전위를 측정하고 CO_2-박테리아 전극의 경우는 시료를 0.1M phosphate 완충용액으로 100배 희석시켜 전위를 측정하여 *Fig.* 5-b, c의 검정선에서 각각의 농도를 정하였다.

한편, 분광 광도법 (spectrophotometric method)에서는 제단백된 시료를 100배 희석시켜 650nm에서 흡광도를 측정하고 *Fig.* 5-a의 검정선에서 이들의 농도를 정하였다.

분광 광도법의 경우는 제단백 과정에서 이미 10배로 희석되었기 때문에 실제는 1,000배로 희석된 결과이다.

결과적으로 박테리아 전극으로 측정한 결과와 분광 광도법으로 측정한 결과는 거의 일치함을 보여 주었으며, 약물을 복용한 시료 1과 2는 정상인 3과 4보다 2~3배 가량 많은 요소를 배설한다는 것을 알 수 있었다.

그러나 분광 광도법은 제단백 과정 및 착색과정과 같은 복잡하고 시간이 많이 걸리는 전처리 단계가 필요하지만 본 연구에서 개발한 박테리

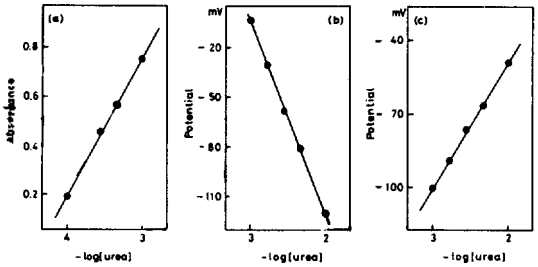

Fig. 5. Calibration curves for determination of urea in urine: (a) Spectrophotometric method; (b) Amm onia-bacterial electrode; (c) Carbon dioxide-bacterial electrode.

아 전극의 경우는 전처리 과정이 필요하지 않으므로 실험 과정이 간단하고 편리하여 빠른 시간에 많은 양의 시료를 분석할 수 있으므로 임상적 응용면에서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

끝으로 본 연구를 위해 재정지원을 하여 준 한국과학재단에 감사를 드리는 바이다.

인 용 문 헌

1. Rechnitz, G.A., *Science*, **190**, 234 (1975).
2. Papastathopoulos, D.S. and Rechnitz, G.A., *Anal. Chim. Acta*, **79**, 17 (1975).
3. *Idem*, *Anal. Chem.*, **48**, 862 (1976).
4. Meyerhoff, M.E. and Rechnitz, G.A., *Anal. Chim. Acta*, **85**, 277 (1976).
5. Guilbault, G.G. and Montalvo, J.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2164 (1969).
6. *Idem*, *ibid*, **92**, 2533 (1970).
7. *Idem*, *Anal. Lett.*, **2**, 283 (1969).
8. Tran-Minh, C., Selegeny, E. and Broun, G., *C.R. Acad. Sci. Paris Ser.* **C 275**, 309 (1972).
9. Anfält, T., Graneli, A. and Janger, D., *Anal. Lett.*, **6**, 969 (1973).
10. Mascini, M. and Guilbault, G.G., *Anal. Chem.*, **49**, 795 (1977).
11. Nagy, G., Von Starp, L.H. and Guilbault, G. G., *Anal. Chim. Acta*, **66**, 442 (1973).
12. Nilson, H., Akerlund, A.C. and Mosbach, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 529 (1973).
13. Guilbault, G.G. and Hrabankova, E., *Anal. Lett.*, **3**, 53 (1970).
14. *Idem*, *Anal. Chim. Acta*, **56**, 285 (1971).
15. Guilbault, G.G. and Shu, F.R., *Anal. Chem.*, **44**, 2161 (1972).
16. *Idem*, *Anal. Chim. Acta*, **56**, 333 (1971).
17. Guilbault, G.G. and Nagy, G., *Anal. Lett.*, **6**, 301 (1973).
18. Wawro, R. and Rechnitz, G.A., *J. Membr. Sci.*, **1**, 143 (1976).
19. Berjonneau, A.M., Thomas, D. and Broun, G., *Pathol. Biol.*, **22**, 497 (1974).
20. Davis, P. and Mosbach, K., *Biochem. Biophys. Acta*, **370**, 329 (1974).
21. Rechnitz, G.A., Papastathopoulos, D.S. and Saffran, M., *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **36**, 687 (1977).
22. Rechnitz, G.A., Kobos, R.K., Riechel, S.J. and Gebauer, C.R., *Aanl. Chim. Acta*, **94**, 35 7 (1977).
23. Kobos, R.K. and Rechnitz, G.A., *Anal. Lett.*, **10**, 751 (1978).
24. Rechnitz, G.A., Riechel, T.L., Kobos, R.K. and Meyerhoff, M.E., *Science*, **199**, 440 (1978).
25. Riechel, T.L. and Rechnitz, G.A., *J. Membr. Sci.*, **4**, 243 (1978).
26. Jesen, M.A. and Rechnitz, G.A., *Anal. Chim. Acta*, **101**, 125 (1978).
27. Mac Faddin, J.F., "Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria", p.108, The Wiams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A., 1976.
28. "Analytical Profile Index for Same Day Identification of Enterobateriaceae", Analytab Product Inc., Paris, France, 1970.
29. Guilbault, G.G. and Tarp. M., *Anal. Chim. Acta*, **73**, 355 (1974).