

## Cytosine 정량을 위한 *Proteus mirabilis* 와 *Citrobacter freundii* 박테리아전극의 개발과 그 비교

印權植<sup>†</sup> · 金峯元

계명대학교 자연과학대학 화학과  
(1987. 11. 12 접수)

## Preparation and Comparison of *Proteus mirabilis* and *Citrobacter freundii* Bacterial Electrodes for the Determination of Cytosine

Gwon Shik Ihn<sup>†</sup> and Bong Weon Kim

Department of Chemistry, College of Natural Science, Keimyung University,  
Daegu 704-230, Korea

(Received November 12, 1987)

**요 약.** Cytosine 에 대한 bio-electrode 는 NH<sub>3</sub> 기체감응기에 *Proteus mirabilis* 와 *Citrobacter freundii* 박테리아를 고정하여 조립하였다. Cytosine deaminase 를 포함하는 박테리아는 cytosine 1 분자를 NH<sub>3</sub> 1 분자로 전환시킨다. *Proteus mirabilis* 박테리아 전극의 감응은 0.2M phosphate 완충용액, pH 8.4 에서  $1.0 \times 10^{-3}$ – $7.0 \times 10^{-3}$ M 직선범위와 45–48mV/decade 의 감응기울기를 가진다.

*Citrobacter freundii* 박테리아 전극의 감응은 0.05M phosphate 완충용액, pH 7.6 에서  $7.0 \times 10^{-5}$ – $7.0 \times 10^{-3}$ M 직선범위와 48mV/decade 의 감응기울기를 가진다. 이 전극을 pH, 온도, 완충용액, 박테리아의 양, 방해물질, 무기염류의 영향과 전극의 수명을 조사하였다.

**ABSTRACT.** The bio-electrode for cytosine has been constructed by immobilizing *Proteus mirabilis* and *Citrobacter freundii* on an ammonia gas-sensor. Bacteria containing cytosine deaminase convert one molecule of cytosine into one molecule of ammonia. The *Proteus mirabilis* bacterial electrode showed linear response to cytosine concentration in the  $1.0 \times 10^{-3}$ – $5.0 \times 10^{-2}$ M with a slope of 45–48mV/decade in 0.2M phosphate buffer solution at pH8.4. The *Citrobacter freundii* bacterial electrode showed linear response to cytosine concentration in the  $7.0 \times 10^{-5}$ – $7.0 \times 10^{-3}$ M with a slope of 48 mV/decade in 0.05M phosphate buffer solution at pH7.6. These electrode were investigated for the effects of pH, temperature, buffer solutions, amounts of bacteria, interferences, inorganic salts and lifetime.

### 서 론

핵산은 단백질의 합성을 지배하고, 유전정보를 전달하는 중요한 생체물질로서 단백질과 같이 분자량이 큰 mononucleotide 를 구성단위로 하는 polymer 로써 우리와는 밀접한 관계가 있다. 특히, DNA 의 RNA 의 구성단위인 pyrimidine 계

의 cytosine 은 탈아미노화하여 uracil 로 전환되며, 유도체인 5-fluorocytosine 은 cytosine deaminase 와 병행될때는 항종양 효과가 인정되었고 발표됨에 따라<sup>1-3</sup> 더욱 cytosine 에 대한 연구가 활발해지고 있다.

Cytosine 정량을 위한 생화학적 방법으로 cytosine deaminase 를 반응시켜 uracil 을 생성하여

spectrophotometric method, 비색법 등에 의한 간접적인 정량법이 보고되어 있다.

한편, Clark<sup>4</sup> 등에 의해 처음 개발된 효소전극은 Katz<sup>5-6</sup>, Hussein<sup>7</sup>, Rechnitz<sup>8</sup> 등에 의해 urea, nitrate, arginine 물질을 정량하는데 이용되었고, Nikolelis<sup>9</sup> 는 사람의 혈청과 소의 인슐린 속에 있는 arginine 을 정량하는데 응용한 바 있으며, 최근에는 enzyme immunosensor 가 개발되었다<sup>10</sup>.

그러나, 이 효소전극의 효소추출과 정제과정 및 보관관리상의 문제점이 지적됨에 따라 효소 대신 박테리아 등을 전극막에 고정시켜 사용하는 bio-sensing electrode 가 개발되었다<sup>11-14</sup>. 이 bio-sensing electrode 는 효소전극이 갖는 효소의 추출과 정제과정이 필요없으며, 또한 효소의 활성감소에 있어서도 추출된 효소보다는 그 정도가 심하지 않으므로 효소전극보다 훨씬 오래 사용할 수 있는 장점을 지니고 있다<sup>14</sup>. 이러한 박테리아 전극은 Rechnitz<sup>11</sup> 등에 의해 최초로 보고되었고, Kobos<sup>12</sup>, Meyerhoff<sup>13</sup>, Riechel<sup>14</sup> 등이 개발한 전극으로 L-aspartate, glutamine, NAD 를 측정하였다. 그러나, 전극을 핵산류에 대해 응용한 예는 드물다. Deng<sup>15</sup> 은 adenosine 선택성 전극을, Rechnitz<sup>16</sup> 는 adenosine 이 inosine 으로 전환됨에 따른 효소전극 감응의 반응속도론적 분석법을 보고하였고, Arnold<sup>17</sup> 는 토끼의 간 조직을 이용한 생체막 전극으로 guanine 을 정량하였으며, 5'-AMP<sup>18</sup> 와 3'-5'-cyclic-AMP<sup>19</sup> 등의 정량법이 보고 되었다.

최근에는 박테리아 내부에 포함하는 cytosine deaminase 에 관한 연구가 많이 진행되고 있으나<sup>20-21</sup>, cytosine 박테리아 전극에 관한 보고가 없으므로 본 연구에서는 장내 세균의 일종인 *Proteus mirabilis* 와 *Citrobacter freundii* 박테리아를 이용하여 두 종류의 박테리아 전극을 개발하여 cytosine 정량에 이용하고자 한다.

두가지 전극으로 cytosine 정량에 따른 pH, 온도, 완충용액, 박테리아의 양, 방해물질 및 무기염류의 영향을 밝히고, 전극의 수명을 비교 검토하여 최적 박테리아 전극을 찾고자 한다.

## 실 험

### 시약 및 기기

시약. Cytosine 은 Fluka 계 특급시약, 완충용액으로 이용한 Tris(hydroxymethyl)amino-methane 과 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 등은 Sigma 계 일급시약, 균배양과 동정을 위해 사용한 Nutrient agar, MacConkey agar 및 TSI agar 는 Difco 계 특급시약, API 20E 는 Analytab(France) 계 품을 사용하였다.

그외 아미노산류와 무기염류들은 Wako 계, Sigma 계, Junsei 계 특급시약을 사용하였으며, 물은 탈염된 증류수를 사용하였다.

균. 본 실험에서는 계명대학교 의과대학 미생물학 교실에서 확인동정한 *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* 균을 분양받아, 매 실험시 TSI agar method 와 API 20E method 를 사용하여 균을 확인 동정하였다.

기기. Ammonia gas-sensor 로는 Orion Research Model 95~12 를, 전위 및 pH 측정은 Orion Research Model 901 Digital microprocessor Ionalyzer 와 Beckman Model 76 Century SS 를 사용하였다. 균 배양과 멸균을 위한 Incubator 와 Autoclave 는 Hyun Dai 와 Dong Yang 제품을, 항온을 위한 Water bath 는 Forma Scientific Model 2067 을 사용하였다. 또한, 투석막은 pore size 0.22 $\mu$ m 인 Millipore (cellulose nitrate, Japan) 제품을 사용하였다.

### 실험 균주 배양 및 확인

실험 균주 배양. *Proteus mirabilis* 균의 배양; 증류수 1L 에 Nutrient agar 23g 을 용해시킨 후, 이 용액을 고압멸균기로 15Lb 에서 15분간 멸균시켜서 고체 배지를 만든다. 여기에 *Proteus mirabilis* 균을 백금이로 1 loop 씩 접종시켜 incubator 에서 균의 활성이 가장 좋은 35°C 로 유지시키면서 18~24 시간 평면 배양 시킨다.

*Citrobacter freundii* 균의 배양; 증류수 1L 에 MacConkey agar 50g 을 용해시킨 후, 이 용액을 15Lb 에서 15분간 멸균시켜서 적색의 고체배지를 만든다. 여기에 *Citrobacter freundii* 균을 백금이로 1 loop 씩 접종시켜 incubator 에

서 평면배양시킨다. *Proteus mirabilis* 보다 균이 빨리 성장하므로 35°C를 유지시키면서 18시간 배양시킨다.

**실험 균주 확인.** *Proteus mirabilis* 균의 확인 및 동정은 TSI agar method 와 A.P.I. 20E method 를 사용하였다. T.S.I. agar 에 나타난 동정 결과는 A/A, H<sub>2</sub>S였고, A.P.I. 20E 를 이용한 생화학적 동정 결과는 아래와 같으며, (+)는 해당물질과의 반응을 나타내고, (-)는 무반응을 나타낸다.

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO
(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX NO <sub>2</sub>
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

*Citrobacter freundii* 균의 확인은 TSI agar 를 사용하였고, 이때 동정결과는 A/A, H<sub>2</sub>S였다.

**전극의 조립 및 전위의측 정결**

*Proteus mirabilis* 균과 *Citrobacter freundii* 균을 투석막과 기체투과막 사이에 놓고, 기존의 NH<sub>3</sub> gas-sensor 에 부착시켜 박테리아 전극을 Fig. 1 과 같이 조립한다.

이렇게 조립된 전극을 sample 용액 50ml 에 담

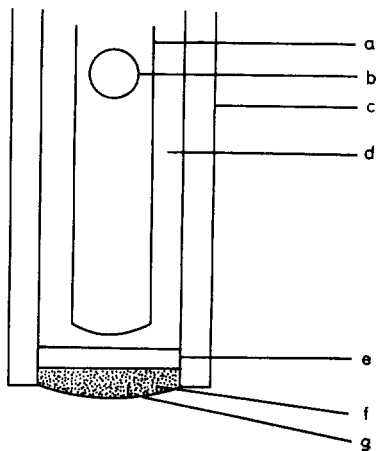


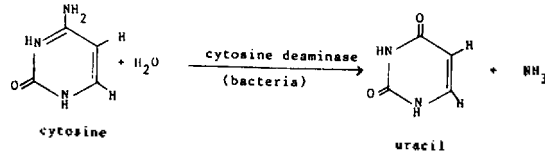
Fig. 1. Schematic diagram of the bacterial electrode for cytosine: a. Inner body; b. Reference element; c. Outer body; d. Internal filling solution; e. Gas-permeable membrane; f. Bacterial layer; g. Dialysis membrane.

그고, 저농도에서 고농도로 용액을 자서 것개로 저어가면서 안정된 전위값을 기록하였다.

**결과 및 고찰**

**Cytosine 에 대한 감응도**

Cytosine 에 대한 박테리아에 의한 분해과정은 다음과 같다.



본 실험에 이용된 박테리아는 *Proteus mirabilis* 와 *Citrobacter freundii* 이며, scheme 에서 발생한 NH<sub>3</sub> 기체는 내부 용액에서 다음과 같이 반응이 진행된다.

$$\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \quad (1)$$

$$\frac{[\text{NH}_4^+][\text{OH}^-]}{[\text{NH}_3]} = K \quad (2)$$

$$[\text{NH}_4^+][\text{OH}^-] = K \cdot [\text{NH}_3] \quad (3)$$

(3)식에서 [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] 함은 내부용액 NH<sub>4</sub>Cl 에 의하여 일정하게 유지되므로, 상수로 간주할 수 있다. 따라서

$$[\text{OH}^-] = \frac{K}{[\text{NH}_4^+]} [\text{NH}_3] = K' [\text{NH}_3] \quad (4)$$

또, cytosine 의 전위는 네른스트 식에 의해 [OH<sup>-</sup>]와 관계되어 (5)식을 나타낸다.

$$E = S_0 - S \log [\text{OH}^-] \quad (5)$$

여기서 S 는 전극의 감응기울기이다. (5)식은 다음 (6)식으로 나타낼 수 있다.

$$E = E_0' - S \log [\text{NH}_3] \quad (6)$$

따라서 본 전극 전위는 NH<sub>3</sub> 농도에 비례한다.

Cytosine 에 대한 *Proteus mirabilis* 균을 이용한 박테리아 전극의 경우, 0.2M phosphate 완충 용액 에서 pH8.4, 30°C, 균량 3mg 일 때 최적 감응조건이었으며, 이때 cytosine 의 농도 1.0 × 10<sup>-3</sup> - 5.0 × 10<sup>-2</sup>M 내에서 직선성을 보여주었고, 이범위에서 감응기울기는 45~48mV/decade 로 나타났으며, 감응시간은 15~18 분이 소요 되었다.

한편, *Citrobacter freundii* 박테리아를 이용할 경우, cytosine 에 대한 최적조건은 0.05M pho-

sphate, pH 7.6, 30°C, 균량이 3mg 일 때이며,  $7.0 \times 10^{-5}$ – $7.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 직선성을 갖게 되었고, 감응기울기가 48mV/decade 감응시간은 10~12 분이 소요되었다.

본 두 종류 박테리아 전극의 최적일 경우의 cytosine에 대한 감응곡선을 Fig. 2에 나타내었다.

#### pH의 영향

Cytosine에 대한 *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* 박테리아 전극의 pH의 영향을 Fig. 3에 나타내었다.

*Proteus mirabilis* 박테리아 전극은 30°C의 온도에서 0.2M phosphate 완충용액의 pH를 7.8에서 8.8까지 변화시켜본 결과, pH 7.8에서는  $7.0 \times 10^{-3}$ – $1.0 \times 10^{-2}$ M 직선 범위에서 37mV/decade의 감응을 보여주었고, pH 8.0과 pH 8.2에서는  $5.0 \times 10^{-3}$ – $1.0 \times 10^{-2}$ M과  $3.0 \times 10^{-3}$ – $3.0 \times 10^{-2}$ M 내에서 42, 43mV/decade의 감응을 보여주었다. 한편, pH 8.4에서는  $1.0 \times 10^{-3}$ – $5.0 \times 10^{-2}$ M 내에서 47mV/decade였으며, 감응시간은 15~18 분이 소요되었다. pH 8.6과 pH 8.8에서는 직선범위가 고농도로 이동되었고, 감응기울기도 44, 41mV/decade로 떨어졌다. 따라서 가장 긴 직선범위와 감응기울기값이 우수한 pH 8.4에서 모든 실험을 실시하였다.

*Citrobacter freundii* 박테리아 전극은 30°C에서 0.05M phosphate 완충용액의 pH를 7.2에서

8.0까지 변화시켰다. 그 결과, pH 7.6에서  $7.0 \times 10^{-5}$ – $7.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 48mV/decade의 감응을 나타내었고, 감응시간은 10~12 분이였다. pH 7.4일 때는  $1.0 \times 10^{-4}$ – $5.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 감응기울기는 41mV/decade였고, pH 7.2일 때는  $3.0 \times 10^{-4}$ – $3.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 34mV/decade로 나타났고, 감응시간은 10~12 분이 소요 되었다. 또한, pH 7.8에서는  $1.0 \times 10^{-4}$ – $5.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 직선을 나타내었고, 감응기울기는 44 mV/decade, 감응시간은 11~13 분 이었다. pH 8.0에서는 감응기울기와 직선범위가 38mV/decade와  $3.0 \times 10^{-4}$ – $3.0 \times 10^{-3}$ M로서 다른 값보다 떨어진 결과를 얻었다. 따라서 pH 7.6이 최적으로 판단되어 pH 7.6에서 모든 실험을 행하였다.

결과적으로 cytosine을 정량하기 위해서는 *Citrobacter freundii* 박테리아가 시간이 *Proteus mirabilis* 박테리아 시간보다 좀더 긴 직선범위와 저농도에서 가능하며, 감응시간면에서도 우수함으로 더 정확한 결과를 얻을 수 있음을 알았다.

#### 온도의 영향

Cytosine을 정량하기 위한 *Proteus mirabilis* 박테리아 전극과 *Citrobacter freundii* 박테리아 전극에 대한 온도의 영향을 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다.

*Proteus mirabilis* 박테리아 전극의 경우는 0.2 M phosphate 완충용액에서 pH를 8.4로 고정시키고 온도를 변화시킨 결과, 25°C에서는 직선 범위  $3.0 \times 10^{-3}$ – $1.0 \times 10^{-2}$ M에서 40mV/decade의 감응기울기로 나타났고, 감응시간은 20~25 분으로 많은 시간이 요구되었다. 28°C에서는 25°C에서와 같은 직선범위에서 42mV/decade의 감응기울기를 나타냈고, 감응시간은 약간 단축되었다. 30°C에서는  $1.0 \times 10^{-3}$ – $5.0 \times 10^{-2}$ M 내에서 45mV/decade의 감응을 보였고, 시간은 15~18 분이 소요되었다. 32°C와 35°C에서는  $1.0 \times 10^{-3}$ – $3.0 \times 10^{-2}$ M, 43, 42mV/decade의 감응을 보여주었고, 온도가 높아질수록 감응시간이 짧아지나 감응기울기는 떨어지는 것을 알 수 있다. 따라서 직선범위와 감응기울기면에서 가장 좋은 결과를 보여준 30°C에서 모든 실험을 실

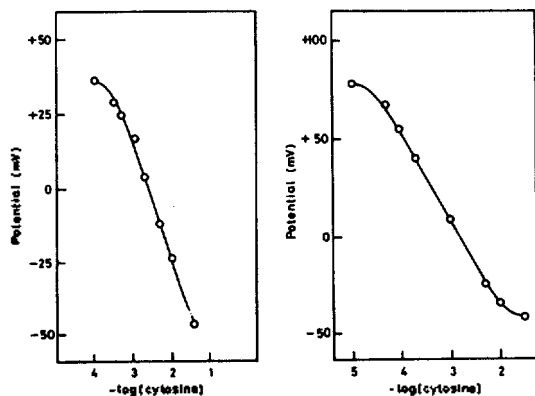


Fig. 2. Response curves for cytosine. (a) *Proteus mirabilis* bacterial electrode; (b) *Citrobacter freundii* bacterial electrode:

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

Temperature (°C)	<i>Proteus mirabilis</i> <sup>a</sup>			<i>Citrobacter freundii</i> <sup>b</sup>		
	linear range(M/L)	response (mV/decade)	response time(mins)	linear range(M/L)	response (mV/decade)	response time(mins)
25	$3.0 \times 10^{-3}$ $-1.0 \times 10^{-2}$	40	20-25	$3.0 \times 10^{-4}$ $-5.0 \times 10^{-3}$	38	12-15
28	$3.0 \times 10^{-3}$ $-1.0 \times 10^{-2}$	42	18-20	$1.0 \times 10^{-4}$ $-7.0 \times 10^{-3}$	41	10-12
30	$1.0 \times 10^{-3}$ $-5.0 \times 10^{-2}$	45	15-18	$7.0 \times 10^{-5}$ $-7.0 \times 10^{-3}$	48	10-12
32	$1.0 \times 10^{-3}$ $-3.0 \times 10^{-2}$	43	15-18	$3.0 \times 10^{-4}$ $-1.0 \times 10^{-2}$	45	9-11
35	$1.0 \times 10^{-3}$ $-3.0 \times 10^{-2}$	42	12-15	$3.0 \times 10^{-4}$ $-1.0 \times 10^{-2}$	43	9-10

<sup>a</sup> Tested in pH 8.4, 0.2M phosphate buffer solution. <sup>b</sup> Tested in pH 7.6, 0.05M phosphate buffer solution.

시하였다.

*Citrobacter freundii* 박테리아 전극의 경우는 0.05M phosphate 완충용액에서 pH를 7.6으로 고정시키고 온도의 영향을 살펴본 결과, 25°C에서는 직선범위  $3.0 \times 10^{-4}$ – $5.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 감응기울기는 38mV/decade로 나타났으므로, 감응 시간은 12~15 분이 요구되었다. 28°C에서는  $1.0 \times 10^{-4}$ – $7.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 41mV/decade의 감응기울기를 보여 주었다. 30°C에서는  $7.0 \times 10^{-5}$ – $7.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 48mV/decade의 감응기울기를 나타내었고, 감응시간은 10~12 분이였다. 32°C와 35°C에서는  $3.0 \times 10^{-4}$ – $1.0 \times 10^{-2}$ M 내에서 45, 43mV/decade로 나타내었다. 이때의 감응시간은 9~11, 9~10 분이였다. 따라서 *Citrobacter freundii* 전극의 경우도 *Proteus mirabilis* 전극을 이용할 때와 같이 30°C일 경우를 최적으로 정하고, 모든 실험을 실시하였다.

#### 완충용액의 영향

Cytosine을 정량하기 위한 본 박테리아 전극의 완충용액에 따른 영향을 Table 2에 나타내었다.

*Proteus mirabilis* 박테리아 전극은 pH와 온도를 7.6, 30°C로 고정시키고, phosphate와 Tris-HCl 완충용액을 변화시켜 감응을 측정할 결과, 0.2M phosphate일 경우는 직선범위  $1.0$

$\times 10^{-3}$ – $5.0 \times 10^{-2}$ M 내에서 45mV/decade의 감응기울기를 나타내었고, 15~18분의 감응시간이 요구되었다. 0.1M phosphate의 경우는  $1.0 \times 10^{-3}$ – $3.0 \times 10^{-2}$ M 내에서 직선범위를 보여 주었고, 41mV/decade의 감응기울기, 0.05M phosphate의 경우는  $3.0 \times 10^{-4}$ – $1.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 38mV/decade의 감응기울기로 0.2M일 때보다 다소 떨어진 값을 나타내었다. 한편, 0.1M Tris-HCl의 경우는  $3.0 \times 10^{-4}$ – $1.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 28mV/decade의 감응기울기와 22~25분의 감응시간이 요구되거 phosphate보다 저조한 결과를 보여 주었다.

*Citrobacter freundii*의 경우, pH 7.6, 30°C로 고정시키고 0.05M, 0.1M, 0.2M phosphate와 0.1M Tris-HCl 완충용액을 사용한 결과, 0.05M phosphate 완충용액을 사용하였을 경우에  $7.0 \times 10^{-5}$ – $7.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 감응기울기 값이 48mV/decade로 가장 좋은 값을 얻었고, 0.1M phosphate와 0.1M Tris-HCl의 경우에  $1.0 \times 10^{-4}$ – $5.0 \times 10^{-3}$ M의 같은 직선범위를 가지나, 0.1M phosphate일 경우에 45mV/decade로 30mV/decade의 감응기울기를 보여주는 0.1M Tris-HCl보다 좋은 감응을 나타내었다. 0.2M phosphate의 경우는  $1.0 \times 10^{-4}$ – $3.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 40mV/decade의 감응기울기를 나타내었다. 0.05M Tris-HCl과 0.2M Tris-HCl의 경우는 불

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

Buffer solutions	<i>Proteus mirabilis</i> <sup>a</sup>			<i>Citrobacter freundii</i> <sup>b</sup>		
	linear range (M/L)	responses (mV/decade)	response time(mins)	linear range(M/L)	response (mV/decade)	response time(mins)
0.05M phosphate	$3.0 \times 10^{-4}$ $-1.0 \times 10^{-3}$	38	15-18	$7.0 \times 10^{-5}$ $-7.0 \times 10^{-3}$	48	10-12
0.1M phosphate	$1.0 \times 10^{-3}$ $-3.0 \times 10^{-2}$	41	15-18	$1.0 \times 10^{-4}$ $-5.0 \times 10^{-3}$	45	12-15
0.2M phosphate	$1.0 \times 10^{-3}$ $-5.0 \times 10^{-2}$	45	15-18	$1.0 \times 10^{-4}$ $-3.0 \times 10^{-3}$	40	15-18
0.1M Tris-HCl	$3.0 \times 10^{-4}$ $-1.0 \times 10^{-3}$	28	22-25	$1.0 \times 10^{-4}$ $-5.0 \times 10^{-3}$	30	18-20

<sup>a</sup>Tested at pH 8.4, 30°C. <sup>b</sup>Tested at pH 7.6, 30°C.

안정하여 재현성 있는 결과를 얻을 수 없었기에 제외하였다.

따라서, 0.05M phosphate 완충용액이 최적임을 알 수 있었다.

#### 균량의 영향

Fig. 4는 cytosine을 정량하기 위한 박테리아 전극의 균량에 따른 영향을 나타낸 것이다. NH<sub>3</sub> gas-sensor(φ7mm)에 0.2M phosphate 완충용액, pH8.4, 30°C로 고정하여 *Proteus mirabilis* 균량의 영향을 측정하였다. 그결과, 1, 2, 4mg에서는  $3.0 \times 10^{-3}$ – $3.0 \times 10^{-3}$ M의 같은 직선범위가 나타났고, 각각 44, 46, 45mV/decade의 감응기울기를 보여 주었다. 또한 감응시간은 1, 2mg일 때는 8~10분, 12~15분으로 균량이 적음에 따라 감응시간은 짧게 나타났다. 그러나, 3mg일 때는  $1.0 \times 10^{-3}$ – $5.0 \times 10^{-2}$ M 내에서 48mV/decade의 감응기울기와 15~18분의 감응시간이 요구되어 가장 우수한 값을 나타내었다.

한편, *Citrobacter freundii*의 균량을 변화시킨 결과, 1, 2mg일 때는 저농도에서 더 긴 직선범위를 보여주었고, 감응시간은 짧게 나타났다. 4, 5mg일 때는 동일한  $3.0 \times 10^{-4}$ – $1.0 \times 10^{-2}$ M 내에서 41, 40 mV/decade로 비슷한 결과를 보여 주었고, 균량이 3mg일 때는  $7.0 \times 10^{-5}$ – $7.0 \times 10^{-3}$ M 내에서 48mV/decade, 감응시간은 10~12분으로 가장 좋은 값이었다.

*Proteus mirabilis* 전극과 *Citrobacter freundii* 전극에서 모두 3mg의 균량이 최적임을 알 수 있었다.

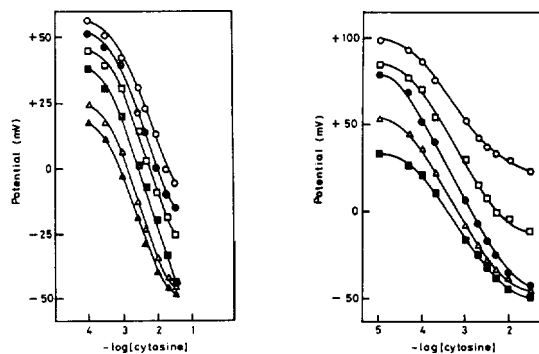


Fig. 3. The effects of pH on the bacterial electrodes for cytosine. (a) *Proteus mirabilis* bacterial electrode: 7.8(○); 8.0(●); 8.2(□); 8.4(■); 8.6(△); 8.8(▲). (b) *Citrobacter freundii* bacterial electrode: 7.2(○); 7.4(□); 7.6(●); 7.8(△); 8.0(■).

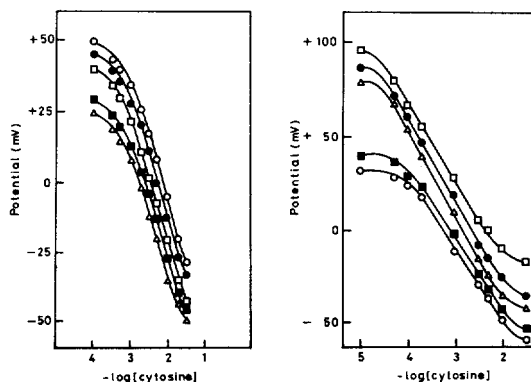


Fig. 4. The effects of bacterial amounts on the bacterial electrodes for cytosine. (a) *Proteus mirabilis* bacterial electrode: 1(○); 2(●); 3(□); 5mg(△). (b) *Citrobacter freundii* bacterial electrode: 1(□); 2(●); 3(△); 4(■); 5mg(○).

## 6. 방해물질과 각종 무기염류의 영향

Table 3에서는  $1.0 \times 10^{-3}M$  cytosine에 각종 아미노산을 동량 첨가시켰을 때 cytosine에 대한  $\Delta mV$  값으로 나타내었다.

*Proteus mirabilis*의 경우는 leucine, glutamine, asparagine이 큰 방해물질로 작용했고, *Citrobacter freundii*는 glutamine, asparagine, alanine 등이 방해하였음을 알 수 있다.

*Citrobacter freundii*를 이용할 경우는 *Proteus mirabilis*에서보다 아미노산의 방해를 줄일 수 있다. 또한 alanine과 asparagine, glutamine을 제거한다면, 선택성이 우수한 전극으로 생각 된다.

Table 4에서는 핵산의 방해를 살펴본 결과, *Proteus mirabilis*의 경우는 대부분 방해를 받았으나, *Citrobacter freundii*는 cytidine, 2'-deoxy-

xyctidine, 2'-deoxyadenosine의 방해를 받았을 뿐이다. 핵산이 공존할 경우, cytosine을 정량할 때에는 *Citrobacter freundii* 박테리아 전극을 이용함이 유용하다.

한편,  $1.0 \times 10^{-3}M$  cytosine에 동량의 무기염들을 섞었을 때, 감응의 차이 즉  $\Delta mV$ 를 측정하여 Table 5에 나타내었다. 표에서 보는바와 같이 대부분의 무기염들은 *Proteus mirabilis* 전극이나 *Citrobacter freundii* 전극에 대하여 모두

Table 4. The effects of the nucleic acids on the bacterial electrodes for cytosine

Nucleic acid	<i>Proteus mirabilis</i> <sup>a</sup>		<i>Citrobacter freundii</i> <sup>b</sup>	
	response (mV)	$\Delta mV$	response (mV)	$\Delta mV$
cytidine	-8	-28	+1	-7
adenine	+3	-17	+8	0
adenosine	+6	-14	+3	-5
guanosine	+7	-13	+8	0
2'-deoxycytidine	-2	-22	-1	-9
2'-deoxyadenosine	+6	-14	-2	-10
2'-deoxyguanosine	+6	-14	+8	0
None <sup>c</sup>	+20	0	+8	0

<sup>a</sup>Tested in pH 8.4, 0.2M phosphate buffer solution at 30°C. <sup>b</sup>Tested in pH 7.6, 0.05M phosphate buffer solution at 30°C. <sup>c</sup>Only  $1.0 \times 10^{-3}M$  cytosine.

Table 5. The effects of inorganic salts on the bacterial electrodes for cytosine

Inorganic salts	<i>Proteus mirabilis</i> <sup>a</sup>		<i>Citrobacter freundii</i> <sup>b</sup>	
	response (mV)	$\Delta mV$	response (mV)	$\Delta mV$
NaNO <sub>3</sub>	+21	+1	+9	+1
NaHCO <sub>3</sub>	+21	+1	+9	+1
MgSO <sub>4</sub>	+22	+2	+9	+1
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+22	+2	+9	+1
KCl	+22	+2	+10	+2
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	+22	+2	+10	+2
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	+26	+6	+12	+3
NaHSO <sub>4</sub>	+32	+12	+13	+5
None <sup>c</sup>	+20	0	+8	0

<sup>a</sup>Tested in pH 8.4, 0.2M phosphate buffer solution at 30°C. <sup>b</sup>Tested in pH 7.6, 0.05M phosphate buffer solution at 30°C. <sup>c</sup>Only  $1.0 \times 10^{-3}M$  cytosine.

Table 3. The effects of amino acids on the bacterial electrodes for cytosine

Amino acids	<i>Proteus mirabilis</i> <sup>a</sup>		<i>Citrobacter freundii</i> <sup>b</sup>	
	response (mV)	$\Delta mV$	response (mV)	$\Delta mV$
alanine	+17	-3	-5	-13
arginine	+20	0	—	—
citrulline	+20	0	+8	0
glycine	+20	0	+6	-2
glutamic acid	+18	-2	+8	0
histidine	+20	0	+8	0
lysine	+20	0	+8	0
ornithine	+20	0	+8	0
proline	+20	0	+8	0
threonine	+20	0	+5	-3
valine	+20	0	+8	0
asparagine	-9	-29	-23	-31
phenylalanine	+10	-10	+8	0
methionine	+6	-14	+8	0
leucine	+4	-16	+8	0
glutamine	+2	-18	-10	-18
cysteine	+15	-5	+8	0
isoleucine	+17	-3	+8	0
None <sup>c</sup>	+20	0	+8	0

<sup>a</sup>Tested in pH 8.4, 0.2M phosphate buffer solution at 30°C. <sup>b</sup>Tested in pH 7.6, 0.05M phosphate buffer solution at 30°C. <sup>c</sup>Only  $1.0 \times 10^{-3}M$  cytosine.

Table 6. Lifetime of the bacterial electrodes for cytosine

Days	<i>Proteus mirabilis</i> <sup>a</sup>			<i>Citrobacter freundii</i> <sup>b</sup>		
	linear range(M/L)	response (mV/decade)	response time(mins)	linear range(M/L)	response (mV/decade)	response time(mins)
1	$1.0 \times 10^{-3}$ $-5.0 \times 10^{-2}$	47	15-18	$7.0 \times 10^{-5}$ $-7.0 \times 10^{-3}$	48	10-12
2	$1.0 \times 10^{-3}$ $-5.0 \times 10^{-2}$	45	15-18	$7.0 \times 10^{-5}$ $-7.0 \times 10^{-3}$	47	10-12
5	$1.0 \times 10^{-3}$ $-5.0 \times 10^{-2}$	43	18-20	$7.0 \times 10^{-5}$ $-7.0 \times 10^{-3}$	46	10-12
10	$3.0 \times 10^{-3}$ $-3.0 \times 10^{-2}$	38	20-25	$1.0 \times 10^{-4}$ $-5.0 \times 10^{-3}$	43	12-15
15	$5.0 \times 10^{-3}$ $-1.0 \times 10^{-2}$	32	22-28	$1.0 \times 10^{-4}$ $-5.0 \times 10^{-3}$	40	14-16

<sup>a</sup>Tested in pH 8.4, 0.2M phosphate buffer solution at 30°C. <sup>b</sup>Tested in pH7.6, 0.05M phosphate buffer solution at 30°C.

감응 억제물질로 작용함을 알 수 있다.

#### 전극의 수명

본 연구에서 개발한 전극을 어느 정도까지 유용하게 사용할 수 있는지 알아보기 위해 가장 최적 조건인 상태에서 15일 동안 4°C로 전극을 보관하면서 감응도를 측정하여 Table 6에 나타내었다.

*Proteus mirabilis* 박테리아 전극의 경우, 1일부터 5일까지는  $1.0 \times 10^{-3}$ – $5.0 \times 10^{-2}$ M에서 직선을 나타내고, 이 구간에서 43~47 mV/decade의 감응도를 보여주었고, 감응시간도 큰 변화가 없었다. 10일 이후에는  $3.0 \times 10^{-3}$ – $3.0 \times 10^{-2}$ M의 직선구간으로 짧아졌고, 38mV/decade로 감응기울기가 저하되다가 15일에는  $5.0 \times 10^{-3}$ – $1.0 \times 10^{-2}$ M내에서 32mV/decade로 감응기울기가 떨어졌으며, 감응시간도 18~22분으로 길어졌다.

*Citrobacter freundii* 박테리아 전극의 경우는 1일에서 5일까지  $7.0 \times 10^{-5}$ – $7.0 \times 10^{-3}$ M내에서 46~48mV/decade로 거의 변화가 없음을 알 수 있다. 10일에는  $1.0 \times 10^{-4}$ – $5.0 \times 10^{-3}$ M, 40 mV/decade로 조금씩 저하되었다. 그러나 그 이후에도 직선범위 내에서는 실제 사용이 가능하였다.

따라서 *Proteus mirabilis*와 *Citrobacter freundii* 전극을 비교하였을 때, *Citrobacter freundii* 박테리아 전극이 cytosine 정량에 더 장기간 사

용됨을 알 수 있다.

#### 결 론

본 연구에서는 cytosine의 정량에 대해 *Proteus mirabilis* 박테리아 전극과 *Citrobacter freundii* 박테리아 전극을 개발하고, 두 전극을 비교 검토하여 감응도와 재현성이 우수한 박테리아 전극의 최적 조건을 조사하였다.

먼저, *Proteus mirabilis* 박테리아 전극의 경우, 최적 감응조건은 30°C, pH8.4, 0.2M phosphate 완충용액을 사용한 경우이며, 이러한 조건들에서 직선 범위는  $1.0 \times 10^{-3}$ – $5.0 \times 10^{-2}$ M 이었고, 이 범위내에서 45~48mV/decade의 감응기울기로 보여 주었다.

또한, *Citrobacter freundii* 박테리아 전극의 최적조건은 pH 7.6, 0.05M phosphate 완충용액, 30°C, 균량은 3mg이었다. 이 때 직선범위  $7.0 \times 10^{-5}$ – $7.0 \times 10^{-3}$ M에서 48mV/decade의 감응을 보여 주었다.

한편, *Citrobacter freundii* 박테리아 전극의 경우는 *Proteus mirabilis* 박테리아 전극일 경우보다 아미노산이나 핵산의 방해가 적게 나타났다. 대부분의 무기염류는 두 전극에 감응 억제물질로 나타났고, 이들 전극의 감응도는 5일까지는 거의 변화가 없었으며, 그 이후에도 재현성을 유지하므로 cytosine의 측정에는 계속 이용할 수 있다.



따라서, *Proteus mirabilis* 전극과 *Citrobacter freundii* 전극에서 비슷한 45~48mV, 48mV/decade의 감응기울기를 가지나, *Citrobacter freundii* 전극의 경우 저농도에서 감응이 우수하고, 감응시간이 짧으며, 직선범위도 훨씬 길게났으며, 방해도 적기 때문에 더 유용하다고 사료된다.

끝으로 본 연구를 위해 재정지원을 하여 준 한국 학술진흥재단에 감사로 드리는 바이다.

### 인 용 문 헌

1. T. Nishiyama, K. Kawamura, T. Katsuragi and T. Sakai, *Current Chemotherapy and Immunotherapy*, 1269 (1981).
2. T. Nishiyama, K. Kawamura, T. Katsuragi and T. Sakai, *Neurol. Med. Chir.*, **22**, 344 (1982).
3. T. Nishiyama, K. Kawamura, H. Matsumura, T. Katsuragi and T. Sakai, *Cancer Res.*, **45**, 1753 (1985).
4. L.C. Clark and C. Lyons, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962).
5. S.A. Katz, *Anal. Chem.*, **36**, 2500 (1964).
6. S.A. Katz and J.A. Cowans, *Biochim. Biophys. Acta*, **107**, 605 (1965).
7. W.R. Hussein and G.G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta*, **76**, 183 (1975).
8. G.A. Rechnitz, T.A. Neubecker, *Anal. Lett.*, **5(9)**, 653 (1972).
9. D.P. Nikolelis and T.P. Handjiannou, *Anal. Chim. Acta*, **147**, 33 (1983).
10. M. Aizawa, A. Morioka, S. Suzuki and Y. Nagamura, *Anal. Biochem.*, **94**, 22 (1979).
11. G.A. Rechnitz, R.K. Riechel and C.R. Gebauer, *Anal. Chim. Acta*, **94**, 357 (1977).
12. R.K. Kobos and G.A. Rechnitz, *Anal. Lett.*, **10**, 751 (1978).
13. G.A. Rechnitz, T.L. Riechel, R.K. Kobos and M.E. Meyerhoff, *Science*, **199**, 440 (1978).
14. T.L. Riechel, G.A. Rechnitz, *J. Membr. Sci.*, **4**, 243 (1978).
15. I. Deng and C. Enke, *Anal. Chem.*, **52**, 1937 (1980).
16. C.R. Bradley and G.A. Rechnitz, *Anal. Chem.*, **56**, 664 (1985).
17. M.A. Arnold and G.A. Rechnitz, *Anal. Chem.*, **53**, 515 (1981).
18. D.S. Papastathopoulos and G.A. Rechnitz, *Anal. Chem.*, **48**, 862 (1976).
19. G.A. Rechnitz, D.S. Papastathopoulos and M. Saffran *FED. Proc. Fed. Amer. Soc. Biol.*, **36**, 687 (1977).
20. T. Sakai, T.S. Yu and S. Omata, *Agr. Biol. Chem.*, **40(9)**, 1893 (1976).
21. J.M. Kim, Sakayu Shimizu and H. Yamada, *Arch. Microbiol.*, **147**, 58 (1987).