

Proteus mirabilis 박테리아 전극을 이용한 L-Asparagine의 정량

印權植 · 孫武正

계명대학교 자연과학대학 화학과
(1987. 9. 10. 접수)

Determination of L-Asparagine Using *Proteus mirabilis* Bacterial Electrode

Gwon-Shik Ihn and Moo-Jeong Sohn

Department of Chemistry, College of Natural Science,
Keimyung University, Daegu 704-200, Korea

(Received September 10, 1987)

요 약. 박테리아 *Proteus mirabilis* 를 NH_3 기체감응 전극에 고정시켜 감응도의 재현성이 우수한 L-asparagine 박테리아 전극을 제조하여 pH, 온도, 완충용액, 박테리아의 양, 여러가지 아미노산 및 무기염류 등에 의한 영향과 시간에 따른 전극의 안정성에 관하여 조사하였다. 그 결과, 30°C 에서 pH 7.8인 0.05M phosphate 완충용액을 사용하였을 때 $9.0 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^{-2}\text{M}$ 범위 내에서 직선성을 나타내었고, 감응기울기는 58.9mV/decade 였다. 또한, 이때 사용된 박테리아의 양은 3mg 이었으며, 감응시간은 7~9분이었다. 따라서 본 박테리아 전극은 L-asparagine 의 정량에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

ABSTRACT. The bio-electrode for L-asparagine, excellent in the reproducibility of responsibility, has been constructed by immobilizing the bacterium *Proteus mirabilis* on an ammonia gas-sensor. This electrode was investigated for the effects of pH, temperature, buffer solution, bacterial amounts and interferences, and stability with the lapse of time. The response of the bacterial electrode was linear in the range of $9.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}\text{M}$ L-asparagine with a slope of 58.9mV/decade in pH7.8, 0.05M phosphate buffer solution at 30°C . The bacterial amounts used for this electrode was 3mg and response time was 7~9min. Therefore, this assembly can be used for the determination of L-asparagine.

서 론

최근 효소전극^{1~3}은 효소의 추출 및 정제과정과 같은 문제로 사용상 많은 불편함과 제한성을 갖게되어 효소 대신 박테리아나 생체막을 사용하는 bio-sensing electrode가 개발되었다. 이 bio-sensing electrode는 효소전극이 갖는 효소의 추출과 정제과정이 필요없으며, 또한 효소의 활성(enzyme activity) 감소에 있어서도 정제된

효소 보다는 그 정도가 심하지 않으므로 효소전극 보다는 훨씬 오래 사용할 수 있는 이점을 지니고 있다. 이러한 박테리아 전극은 Rechnitz 등⁴에 의해서 최초로 보고되었는데, 이들은 *Streptococcus faecium* 을 NH_3 기체 감응전극에 부착시켜서 L-arginine 을 측정하였다. 또한, Kobos 와 Rechnitz⁵는 *Bacterium cadaveris* 를, Meyerhoff 등⁶은 *Sarcina flava* 를, Riechel 등⁷은 *E. coli* 를 NH_3 기체감응전극에 부착시켜서 L-aspa-

rtate, L-glutamine 및 NAD를 각각 측정하였다. 그리고 Jensen 등⁸은 H₂S 기체 감응전극에 *Proteus morganii*를 고정시켜서 L-cysteine을 측정하였다.

한편, 생체막 전극으로서는 Mascini와 Rechnitz⁹가 돼지의 신장 조직으로 된 얇은 막을 NH₃ 기체 감응전극에 부착시켜서 glutamine 전극을 보고한 바 있으며, Arnold와 Rechnitz¹⁰는 토끼의 간 조직으로 guanine 전극을 보고하였다.

본 연구에서는 *Proteus mirabilis*를 NH₃ 기체 감응전극에 고정시켜서 L-asparagine에 대한 전극을 개발하고, 그에 대한 pH, 완충용액, 온도, 방해물질 및 무기염류에 의한 영향과 전극의 수명 등 최적 감응조건을 찾고자 한다.

실 험

기기 및 시약. 본 실험에서 사용된 NH₃ 기체 감응전극은 Orion Research Model 95-12이었으며, 투석막(dialysis membrane)은 Whatman cellulose nitrate(pore size 0.22μm)를 사용하였다.

모든 전위와 pH의 측정은 Orion Research 901 Digital microprocessor Ionalyzer와 #611 Digital pH/millivolt meter를 각각 사용하였다. 그리고 Forma Scientific 제 Bath and Circulator-2067을 이용하여 온도를 변화시켰으며, Hyundai Scientific Co.제 incubator에서 균을 배양시켰다.

L-asparagine 등 본 실험에서 사용한 대부분의 시약은 Sigma 제 특급시약이었으며, Na₂HPO₄와 NaH₂PO₄는 Fisher 제 일급시약을 사용하였다. 그리고 모든 용액은 탈염된 증류수로 제조하였으며, 제조된 용액은 polyethylene 용기에 보관하면서 사용하였다.

균주의 배양 및 확인. 본 실험에서 사용된 *Proteus mirabilis*는 본 대학교의 의과대학 미생물학교실에서 확인 동정된 것을 분양 받았으며, 이를 Nutrient agar(Difco Lab., 23g/1L H₂O) plate 상에서 18시간 동안 배양시킨 후 4°C 이하의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 본 실험에서 사용된 *Proteus mirabilis*는 T.S.I (Triple Sugar Iron) agar(Difco Lab.)¹⁵ 및 A.

P.I(Analytical Profile Index) 20E(Alytaby Product Inc.)¹⁶를 이용하여 매실험마다 확인, 동정하여 사용하였다. T.S.I agar에 나타난 동정 결과는 A/A H₂S이었으며, A.P.I 20E에 나타난 생화학적 동정 결과는 아래와 같으며 (+)는 해당 물질과의 반응을 나타내고 (-)는 무반응을 나타낸다.

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

전극의 조립 및 전위 측정. 4°C 이하의 냉장고에 보관된 일정 양의 박테리아를 투석막에 얇게 바른 후, 기체투과막으로 덮어서 NH₃ 기체 감응전극의 하단부에 부착시키고 filling solution을 채워 전극을 조립한다. 이렇게 조립된 전극을 시료 용액 30ml에 담고, 그 용액을 자석젓개로 저으면서 10⁻⁵~10⁻²M L-asparagine에 대한 안정된 전위를 기록하였다.

전극의 구조는 Fig.1에 나타내었다.

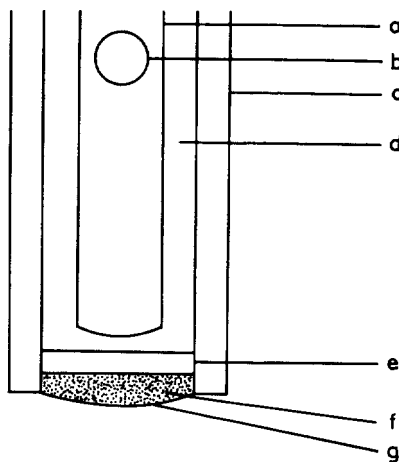
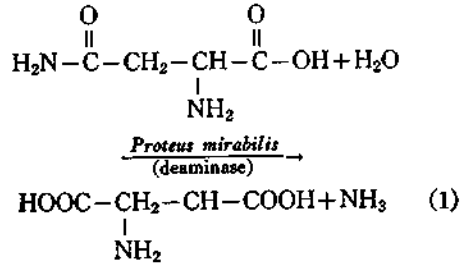


Fig.1. The assembled bacterial electrode for L-asparagine; (a) inner body; (b) reference element; (c) outer body of the sensor to which the gas-permeable and dialysis membrane are fixed with a bottom cap; (d) internal filling solution; (e) gas-permeable membrane; (f) bacterial layer; (g) dialysis membrane.

결과 및 고찰

L-Asparagine 에 대한 감응도

Proteus mirabilis 에 의하여 L-asparagine 은



와 같이 분해되어 aspartic acid 와 NH_3 기체를 생성한다^{11,12}. (1)식에서 생성된 NH_3 는 전극 내부로 들어가서 (2)식과 같이 전극 내부의 pH 를 변화시켜 전위로 나타난다.



즉, (2)식에서 생기는 OH^- 가 전극 내부의 pH 를 결정하므로 NH_3 의 농도에 따라가 변하게 된다.

따라서 NH_3 기체 감응전극을 이용한 L-asparagine 박테리아 전극(이하 L-asparagine 박테리아 전극)은 pH 7.8인 0.05M phosphate 완충용액내에서 온도가 30°C, 박테리아의 양이 3mg 일 때 최적감응조건임을 알았으며, 이때 L-asparagine 의 농도, $9.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ L-asparagine 내에서 직선성을 이루며, 이 범위에서 감응 기울기는 58.9mV/decade 로 나타났으며, 감응시간은 7~9분이 소요되었다.

pH 의 영향. Fig.2는 3mg 의 *Proteus mirabilis* 를 이용하여 30°C 의 온도에서 0.05M phosphate 완충용액의 pH 를 7.0에서 8.0으로 변화시켜 가면서 본 박테리아 전극의 pH 에 의한 영향을 조사한 결과이다.

pH 7.0에서는 $1.0 \times 10^{-4} \sim 7.0 \times 10^{-3} \text{M}$ L-asparagine 내에서 직선성이 나타났으며, 이 범위에서 감응 기울기는 53.7mV/decade 로 나타났고, 감응시간은 10~12분이 소요되었다. pH 7.2 와 7.4에서는 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 내에서 54.5와 54.9mV/decade 의 감응을 각각 보였으며,

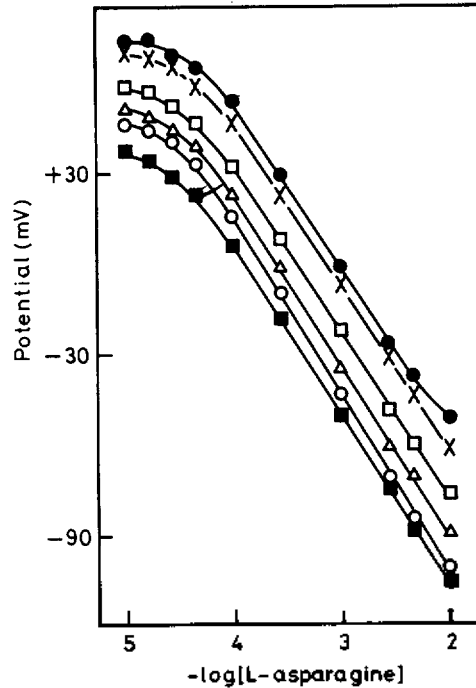


Fig.2. The effects of pH on the bacterial electrode for L-asparagine in 0.05M phosphate-buffer solution at 30°C: 7.0(●); 7.2(×); 7.4(□); 7.6(△); 7.8(○); 8.0(■).

10~12, 7~9분의 감응시간이 각각 소요되었다. 또 pH 7.6에서 8.0 사이에서는 직선범위, $9.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 내에서 57.2, 58.9, 58.7mV/decade 의 감응을 각각 나타내어 거의 비슷한 값이었다. 이때 감응시간은 7~9, 7~9, 10~12분이 각각 소요되었다.

따라서 본 박테리아 전극은 pH 7.0에서 8.0 사이에서 pH 를 변화시킴에 따라 감응기울기와 직선범위에 있어서 근소한 차이를 보여주었다. 그 중에서 pH 7.8일 때가 Nernst 기울기에 가장 근접하는 값인 58.9mV/decade 를 나타내었으므로 모든 실험은 pH 를 7.8로 고정하여 실시하였다.

완충용액의 영향. L-asparagine 박테리아 전극의 완충용액에 의한 영향은 Fig.3에서 보는 바와 같이 phosphate 의 경우가 Tris-HCl 완충용액의 경우보다 감응이 좋았음을 알 수 있다.

0.05M phosphate 완충용액의 경우는 직선범위, $9.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 사이에서 58.9mV/

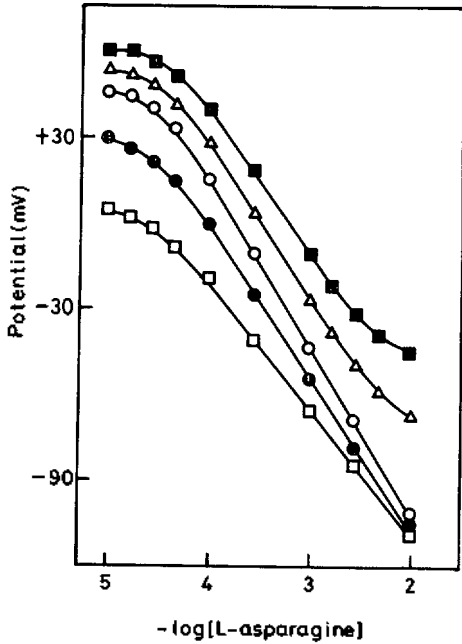


Fig. 3. The effects of temperature on the bacterial electrode for L-asparagine in pH 7.8, 0.05M phosphate buffer solution: 25(■); 28(△); 30(○); 32(●); 35°C(□).

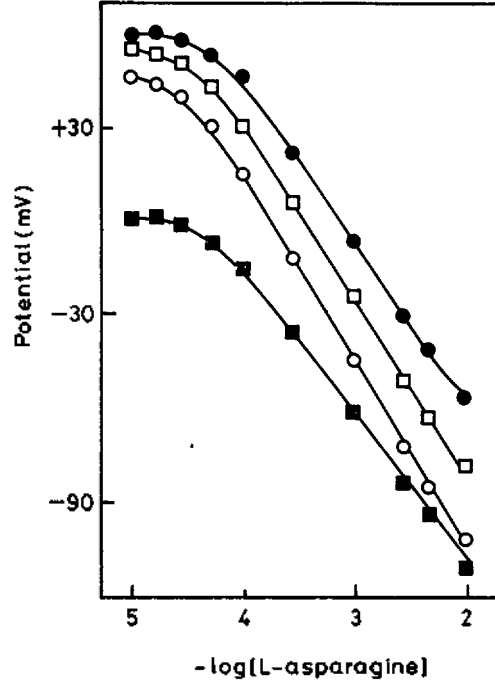


Fig. 4. The effects of buffer solutions on the bacterial electrode for L-asparagine at pH 7.8, 30°C: 0.2 M phosphate(●); 0.1M phosphate(□); 0.05M phosphate(○); 0.1M Tris-HCl(■).

decade의 감응을 나타내어 0.1M phosphate의 $1.0 \times 10^{-4} \sim 9.0 \times 10^{-3}M$, 54.7mV/decade 보다 우수한 값을 나타내었으며, 감응시간도 0.1M phosphate의 9~10분 보다 짧았다. 그리고 0.2 M phosphate와 0.1M Tris-HCl 완충용액은 직선범위가 각각 $3.0 \times 10^{-4} \sim 7.0 \times 10^{-3}M$, $3.0 \times 10^{-4} \sim 9.0 \times 10^{-3}M$ 로 나타났으며, 감응 기울기도 49.8, 49.4mV/decade로서 비슷한 값을 보여주었다. 또한 0.2M phosphate의 경우는 감응시간이 12~17분으로서 0.05M phosphate의 7~9분 보다 상당히 길었으며, 0.1M Tris-HCl 완충용액의 경우는 0.1M phosphate와 비슷한 10~12분이었다.

따라서 직선범위가 넓고 감응 기울기가 가장 크며, 감응시간이 짧은 0.05M phosphate 완충용액을 사용하였다.

온도의 영향. Fig. 4는 pH 7.8인 0.05M phosphate 완충용액 속에서 온도를 25~35°C로 변화시켜 가면서 본 박테리아전극의 감응도를 측정할 결과이다. 25와 28°C일 때 이 전극은 비

교적 좁은 직선범위를 나타내었으며, 최적인 30°C의 경우 보다 감응기울기도 5~8mV/decade 정도 떨어지는 값을 나타내었다. 또한, 25°C의 경우에만 감응시간이 다른 온도에서 보다는 2분이 더 소요되었으나 전체적으로 감응시간은 7~9분으로서 일정하였다. 감응기울기는 25°C에서 32°C까지는 51.2~58.9mV/decade로서 큰 변화가 없었으나 35°C에서는 44.4mV/decade로서 현저히 떨어지는 값을 나타내었다.

따라서 가장 넓은 직선범위인 $9.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}M$ 내에서 58.9mV/decade의 감응기울기를 나타낸 30°C의 온도에서 모든 실험을 행하였다.

박테리아의 양에 의한 영향. 박테리아의 양이 L-asparagine의 감응에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 5에 도시하였다.

박테리아의 양을 1, 2, 3, 5 및 10mg으로 변화시켜 감응기울기와 직선범위를 조사한 결과, 박테리아의 양이 적을 때가 감응시간이 짧게 나타

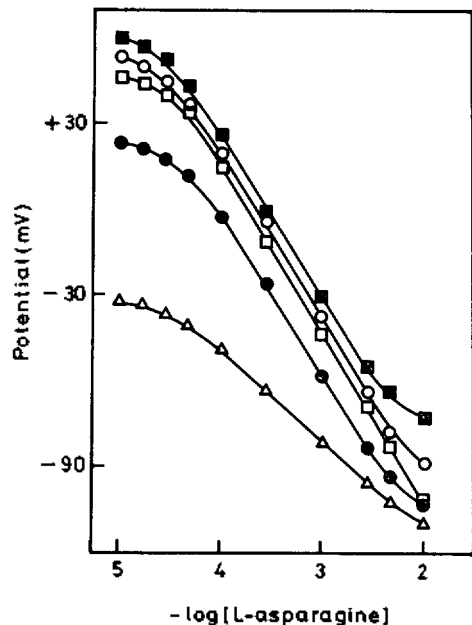


Fig. 5. The effects of bacterial amounts on the bacterial electrode for L-asparagine in pH 7.8, 0.05M phosphate buffer solution at 30°C; 1(■); 2(○); 3(□); 5(●); 10mg(△).

났다. 즉, 박테리아의 총이 많을수록 NH_3 기체의 확산속도는 그만큼 빨라지게 될 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 1~5mg의 박테리아를 사용했을 때는 55.6~58.9mV/decade로 비슷한 감응기울기가 값을 나타내었으나 10mg의 박테리아를 사용했을 경우에는 감응기울기가 31.7mV/decade로 상당히 크게 떨어졌다. 또한, 적선 범위는 저농도에서는 변화가 없었으나 고농도쪽에서 약간의 변화를 나타내었다.

따라서 $9.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 내에서 58.9 mV/decade의 감응기울기 값을 나타낸 3mg의 박테리아를 모든 실험에 사용하였다.

방해물질의 영향. Table 1은 pH가 7.8인 0.05M phosphate 완충용액 내에서 여러가지 아미노산이 L-asparagine의 감응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 L-asparagine과 같은 몰량의 아미노산들을 섞어서 전위차, ΔmV 를 측정하는 것이다. 그 결과로부터 L-arginine과 DL-alanine은 큰 방해물질로 작용하며, L-proline, L-leucine 및 DL-methionine도 약간 방해함을 알

Table 1. The effects of amino acids on the bacterial electrode for L-asparagine

Amino acids ^a	Response (mV)	ΔmV
DL-phenylalanine	-48.0	0
L-proline	-52.2	-4.2
L-lysine	-48.0	0
L-leucine	-49.1	-1.1
L-arginine	-63.5	-15.5
DL-alanine	-56.3	-8.3
L-histidine	-48.0	0
DL-methionine	-49.2	-1.2
none ^b	-48.0	0

^a add $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ amino acids to $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ L-asparagine. ^b pure $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ L-asparagine.

Table 2. The effects of inorganic salts on the bacterial electrode for L-asparagine

Inorganic salts ^a	Response (mV)	ΔmV
CuCl_2	-48.0	+4.0
MnCl_2	-48.9	+3.1
FeCl_3	-46.3	+5.7
$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	-49.2	+2.8
$\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	-45.8	+6.2
NaSO_4	-47.9	+4.1
MgCl_2	-48.2	+3.8
none ^b	-52.0	0

^a add $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ inorganic salts to $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ L-asparagine. ^b pure $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ L-asparagine.

았다. 그러나 NH_3 기체감응 전극을 이용한 다른 박테리아 전극^{13,14} 보다는 그 방해의 정도가 심하지 않아서 그들에 비하면 비교적 선택성이 좋은 전극이다.

무기염류의 영향. L-asparagine에 대한 본 박테리아 전극의 각종 무기염류에 의한 영향을 Table 2에 나타내었다. $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ L-asparagine 용액에 같은 몰량의 무기염류를 섞어서 전위차를 측정하는 결과 대부분의 무기염류들은 감응 억제물질로 작용하였다.

전극의 안정성. L-asparagine 박테리아 전극의 시간의 경과에 따른 안정성을 알아보기 위하여 15일 동안 4°C의 냉장고에 보관하면서 감응도를 측정하여 Fig. 6서 도시하였다. 그 결과, 1~

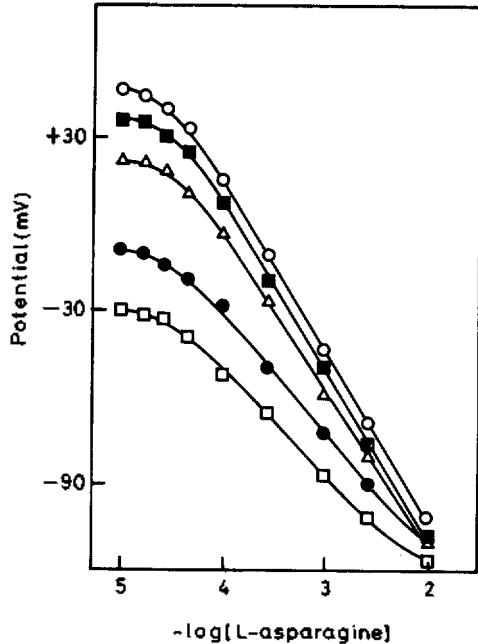


Fig. 6. Stability of the bacterial electrode for L-asparagine: 1st(○); 3rd(■); 5th(△); 10th(●); 15th day(□).

3일 동안은 직선범위가 $9.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 로서 변화가 없었으며, 감응기울기도 58.9, 58.0 mV/decade로 각각 나타나 거의 비슷한 값을 유지하였다.

또한, 이때의 감응시간도 7~9분으로서 일정하였다. 5일째에는 직선범위, $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 내에서 56.5mV/decade의 감응기울기와 7~9분의 감응시간이 소요되어 처음에 비해 큰 변화가 없었다. 10일째는 직선범위가 $3.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-3} M$ 로서 처음 보다는 비교적 좁아졌고 감응기울기도 45.7mV/decade로 현저히 떨어졌다. 그리고 이때 감응시간은 10~13분으로서 처음에 비해 3~4분이 더 소요되었다. 또한, 15일째는 감응기울기와 직선범위가 37.3 mV/decade 및 $3.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-3} M$ 로 각각 나타나 매우 저조한 값들이었고, 감응시간도 12~17분으로 상당히 오랜 시간이 소요되었다.

본 전극의 감응도는 10일 이후부터 현저히 감소하였으나, 그 이후에도 재현성 있는 직선범위와 감응기울기를 보여주므로 실제로 그 직선범

위 내에서 L-asparagine의 정량이 가능할 것이다.

끝으로 본 연구는 1986년도 문교부 연구비 지원으로 이루어진 것이며, 이에 대해 감사를 드리는 바이다.

인용문헌

1. D. S. Papatathopoulos and G. A. Rechnitz, *Anal. Chim. Acta*, **79**, 17 (1975).
2. *Idem*, *Anal. Chem.*, **48**, 862 (1976).
3. M. E. Meyerhoff and G. A. Rechnitz, *Anal. Chim. Acta*, **85**, 277 (1976).
4. G. A. Rechnitz, R. K. Kobos, S. J. Riechel, and C. R. Gebauer, *ibid*, **94**, 357 (1977).
5. R. K. Kobos and G. A. Rechnitz, *Anal. Lett.*, **10**, 751 (1978).
6. G. A. Rechnitz, T. L. Riechel, R. K. Kobos, and M. E. Meyerhoff, *Science*, **199**, 440 (1978).
7. T. L. Riechel and G. A. Rechnitz, *J. Membr. Sci.*, **4**, 243 (1978).
8. M. A. Jensen and G. A. Rechnitz, *Anal. Chim. Acta*, **101**, 125 (1978).
9. M. Mascini and G. A. Rechnitz, *ibid*, **116**, 169 (1980).
10. M. A. Arnold and G. A. Rechnitz, *Anal. Chem.*, **54**, 777 (1982).
11. 福井三郎, 齋藤日向, "バイオテクノロジー事典" p. 749, シーエムシー, 東京, 日本, 1980.
12. 日本生化学會, "生化学データブックⅡ別冊, 代謝マップ, 経路と調節", p. 39, 東京化学同人, 東京, 日本, 1979.
13. G. S. Ihn and Y. A. Ra, *J. of Institute of Natural Science, Keimyung University*, **5**, 121 (1986).
14. G. S. Ihn and I. T. Kim, *ibid*, **6**, 157 (1987).
15. Mac Faddin, J. F., "Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria", p. 108, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U. S. A., 1976.
16. "Analytical Profile Index for Same Day Identification of Enterobacteriaceae", Analytab Product Inc., Paris, France, 1970.