

무궁화꽃을 이용한 L-Arginine Sensor 開發에 關한 研究

金宜洛* · 南基再 · 崔誠文
啓明大學校 自然科學大學 化學科
(1992. 1. 21 접수)

The Development of Arginine-Selective Membrane Electrode Using Tissue Slices of the Rose of Sharon

Ui-Rak Kim*, Ki-Jae Nam, and Sung-Moon Choi
Department of Chemistry, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea
(Received January 21, 1992)

요 약. 흰 무궁화꽃의 씨방을 이용하여 Tissue electrode를 제조하고, L-arginine을 정량하기 위한 최적 조건을 조사한 결과 0.1M phosphate 완충용액에서 pH 8.0, 온도 25°C, 조직두께 20 μm 이었을 때이며, 이에 정량 가능한 직선범위는 $5.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-1} \text{M}$ 이었으며, 감응도는 54.0 mV/decade로 나타났고, 감응시간은 7~8분이 소요되었다. K_{m} 값은 $6.4 \times 10^{-6} \text{M}$ 이다.

ABSTRACT. It is shown that receptacle tissue of the rose of sharon can serve as an effective biocatalyst by the construction of a potentiometric membrane electrode with response and selectivity for arginine. Electrodes using this tissue in conjunction with NH_3 gas sensing probes yield good response to arginine in 10^{-1}M to 10^{-3}M range and retain activity for a least 1 weeks. The arginine-selective membrane electrode using tissue slices of the rose of sharon have good selectivity in presence of other amino acids. The optimum conditions are pH 8.0, 25°C and 20 μm thickness of slices in 0.1M phosphate buffer solution and K_{m} values is $6.4 \times 10^{-6} \text{M}$.

서 론

센서(sensor)는 물리센서와 화학센서로 나누어지는데 바이오센서(biosensor)¹⁻³는 화학센서로서, 여러가지 생체관련물질을 검출하는 소자로 관련물질을 인식하는 생체 기능성막과 인식된 결과를 전기신호로 바꾸는 변환기(transducer)로 구성된다.

생체 기능성막을 중심으로 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 하나는 생촉매 바이오센서(biocatalytic biosensor)로서 효소센서^{4,5}, 미생물센서⁶⁻⁸, 조직센서^{9,10}, 오르가넬라센서^{11,12}가 여기에 속하며, 나머지 하나는 선택적 친화성을 가지는 분자인식막을 이용하는 bioaffinity 바이오센서로서 항원항체를 이용하는 면역센서^{9,11,12}, receptor 센서, DNA 센서가 여기에 속한다. 또 변환기는 전극, FET(field-effect transistor)¹³⁻¹⁵, optical fiber^{16,17} 및 thermistor^{18,19} 등이 사용된다. 이러한 바이오센서는 최근 식품공학, 화

학공학, 의료진단, 환경공학, 공정제어 및 소방공학 등에서 그 중요성이 증가해지고 있다.

1960년대에 효소전극이 처음으로 연구된 이래 센서의 용도에 따라 소형화와 다중화를 하기 위하여 연구되고 있으며, 최근에는 효소의 안정화를 증진시키기 위하여 유전자 조작에 의하여 만든 효소를 바이오센서에 응용하는 기술이 보급되고 있다. 분자인식기능 단백질로 효소(enzyme), 항원과 항체를 이용하는 경우에는 선택성이 좋은 반면, 추출, 정제 하는데 어려움이 많고, 정제된 효소나 항원, 항체의 구입가격이 비싸다는 단점이 있다. 한편, 미생물, 조직 그리고 오르가넬라를 이용하는 경우에는 필요한 분자인식물질 이외에 다른 효소도 함께 존재할 수 있으므로 선택성이 좋지 않으나, 분자 인식물질을 분리 정제하지 않고, 보다 안정하며, 제작가격이 싸고, 조작이 간단한 장점이 있다.

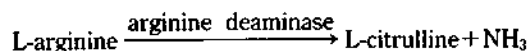
본 연구에서는 동물조직보다 안정하며, 쉽게 구할 수 있는 식물조직센서의 개발을 위하여, 다른 식물보다 장기간 피어있는 무궁화꽃을 이용하여, 그 꽃의 씨방, 꽃잎, 꽃받침을 ammonia gas sensing 전극에 고정화시켜 20가지 아미노산 용액의 감응도를 측정 한 결과, L-arginine이 가장 선택성이 높았으므로 L-arginine을 측정하기 위한 센서를 개발하고 pH, 완충용액, 온도의 영향, 선택성 및 전극의 안정성에 대하여 연구하였다.

실 험

기기 및 시약. 본 실험에 사용된 기기로서 ammonia gas sensing electrode는 Orion Model 9512 BN을, pH Meter는 Orion Expandable Ionanalyser EA 920을 이용하였으며, 항온장치는 LKB 제품인 Bromma 2209의 Multi-Temp를 냉동절단기는 Bright사의 Cryostat/microtome, Model FS/FAS/212를 사용하였으며, K_m 값을 구하기 위하여 UV-VIS spectrophotometer는 Beckmann DU-8B를 이용하였다.

L-arginine과 완충용액을 제조하기 위한 시약은 Junsei Chemical Co. 제품을 그외의 아미노산은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였으며, 모든 실험은 탈염된 2차 증류수를 사용하였다.

L-Arginine에 대한 감응. L-arginine의 ammonia gas 발생 기구는 두 가지 형태로 진행되고 있다는 것이 알려져 있다. 첫번째는 arginine deaminase의 작용으로 citrulline과 ammonia gas가 생성되는 것²⁰, 두번째로 L-arginine에 arginase와 urease가 작용하여 ammonia gas를 발생시키는 과정이다²¹. 생성된 citrulline은 세포벽을 통과할 수 없으므로 다른 아미노산과 arginine 사이의 선택성에 기여한다고도 할 수 있다.



여기에서 발생된 ammonia gas를 ammonia gas sensing 전극으로 측정하며 감응도는 arginine 농도변화에 대한 potential 값으로 주어지며, Nernst 방정식 $E = E_0 + 0.0591/n \log[\text{arginine}]$ 에 의하여 얻어지는 이론치인 $\pm 59.1 \text{ mV/decade}$ 에 가장 가까운 값을 최적 조건으로 두었다.

Table 1. Arginine selectivity^a among amino acid by the NH₃ enzyme electrode to receptacle tissue^b of the rose of Sharon

	Solvent(H ₂ O) (mV)	Amino acid(10 ⁻² M) (mV)	ΔmV
Asparagine	57.0	59.4	-2.4
Proline	66.7	70.6	-3.9
Arginine	70.7	-35.9	106.6
Glycine	63.4	68.9	-5.5
Isoleucine	66.9	68.1	-1.2
Tryptophan	80.7	85.2	-4.5
Cysteine	83.2	86.7	-3.5
Threonine	84.4	80.4	4.0
Glutamine	87.8	73.2	14.6
Histidine	76.1	78.3	-2.2
Valine	80.3	80.2	0.1
Glutamic acid	79.8	79.4	0.4
Lysine	83.7	81.7	2.0
Methionine	91.0	89.6	1.4
Aspartic acid	89.3	84.7	4.6
Leucine	82.1	86.0	-3.9
Phenylalanine	89.6	90.4	-0.8
Serine	83.3	84.4	-1.1
Alanine	85.9	86.2	-0.3

^aMeasurement temperature; 25°C. ^bTissue thickness; 20 μm.

흰 무궁화꽃을 이용한 막의 제조. 흰 무궁화꽃을 따서 씨방, 꽃잎, 꽃받침을 분리하여, 냉동 절단기를 이용하여 10 μm, 20 μm 및 30 μm 크기로 잘라서 ammonia gas 전극위에 기체 투과성막과 투석막 사이에 장착하여 사용하였으며 사용한 후 전극은 4°C의 냉장고에 보관하였다.

흰 무궁화꽃을 이용한 아미노산의 선택성. 제조된 막을 이용하여 20가지 아미노산에 감응도를 측정한 결과 Table 1~3과 같이 각 부위중 씨방 조직에서 arginine에 대한 전위차값이 106.6 mV로 나타나므로 선택성이 가장 좋음을 확인하였다.

흰 무궁화꽃의 씨방을 이용한 L-arginine sensor 개발. Fig. 1a 및 1b는 본 연구에서 이용한 전극의 구조를 나타내었으며, 0.1M phosphate buffer를 사용하였고, 28°C에서 씨방 조직을 10 μm, 20 μm, 30 μm 두께로 잘라 사용하였다. 그 결과, 10 μm 두께를 사용하였을 때 감응도는 30.5 mV/decade, 감응시간은 6~7분이었고, 30 μm 두께를 사용하였을

Table 2. Amino acid selectivity^a by the NH₃ enzyme electrode to petal tissue^b of the rose of Sharon

	Solvent(H ₂ O) (mV)	Amino acid(10 ⁻² M) (mV)	ΔmV
Asparagine	99.4	93.0	-6.4
Proline	95.8	93.7	2.1
Arginine	91.0	93.5	-3.6
Glycine	70.8	74.5	-3.7
Isoleucine	77.4	82.3	-4.9
Tryptophan	87.2	89.5	-2.3
Cysteine	58.8	65.6	-6.8
Threonine	86.6	94.3	-7.7
Glutamine	69.6	63.6	6.0
Histidine	87.8	83.7	4.1
Valine	69.1	71.5	-2.4
Glutamic acid	87.2	85.1	2.1
Lysine	70.0	71.3	-1.3
Methionine	90.9	93.5	-2.6
Aspartic acid	77.7	84.6	-6.9
Leucine	84.7	84.3	0.4
Phenylalanine	64.6	67.7	-3.1
Serine	70.5	73.0	-2.5
Alanine	82.4	86.0	-3.6

^aMeasurement temperature; 25°C. ^bTissue thickness; 20 μm.

때는 40.1 mV/decade로 비교적 감응이 좋았으나, 감응시간이 15~16분 소요되었다. 20 μm 두께를 사용하였을 때는 43 mV/decade로 감응도도 좋았으며 감응시간도 8~10분 정도로 짧았다. 조직 두께가 감응시간에 큰 영향을 미치므로 감응도와 감응시간을 고려하여 조직 두께를 20 μm로 고정시켜 실행하였으며, 아미노산을 정량하기 위한 최적 조건을 얻기 위하여 완충용액의 종류 및 농도, pH의 영향, 온도의 영향, 선택성 확인 및 전극의 안정성 등을 측정하였다.

결과 및 고찰

L-Arginine 정량에서의 pH의 영향. Fig. 2는 20 μm의 흰 무궁화꽃의 세방 조직을 이용하여 22°C에서 0.1 M phosphate 완충용액의 pH를 6.0, 7.0, 8.0으로 변화시켜 가면서 pH에 의한 영향을 조사한 결과이다.

그 결과 pH 6.0에서는 $5.0 \times 10^{-2} \sim 5.0 \times 10^{-1}$ M의

Table 3. Amino acid selectivity^a by the NH₃ enzyme electrode sepal tissue^b of the rose of Sharon

	Solvent(H ₂ O) (mV)	Amino acid(10 ⁻² M) (mV)	ΔmV
Asparagine	86.8	81.5	5.3
Proline	83.1	84.2	-1.1
Arginine	85.9	90.7	-4.8
Glycine	89.5	91.5	-2.0
Isoleucine	94.7	94.5	0.2
Tryptophan	77.6	76.0	1.6
Cysteine	79.9	92.7	-12.8
Threonine	67.6	65.9	2.6
Glutamine	73.9	72.1	1.8
Histidine	78.7	79.7	-1.0
Valine	75.5	80.9	-5.4
Glutamic acid	62.5	71.4	-8.9
Lysine	80.1	84.2	-4.1
Methionine	82.7	83.3	-0.5
Aspartic acid	85.3	89.0	-3.7
Leucine	76.3	78.2	-1.9
Phenylalanine	94.1	95.4	-1.3
Serine	64.4	69.2	-4.8
Alanine	77.1	76.7	0.4

^aMeasurement temperature; 25°C. ^bTissue thickness; 20 μm.

직선구간(linear range)을 얻었으며, 이 직선구간에서의 감응도는 30.0 mV/decade, 감응시간은 7분 정도 소요되었다. 또한 pH 7.0에서는 $2.0 \times 10^{-2} \sim 2.0 \times 10^{-1}$ M의 직선구간에서 7분 정도의 감응시간, 35.2 mV/decade를 pH 8.0에서는 $2.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-1}$ M의 직선구간에서 44.2 mV/decade의 감응도를 나타내며 감응시간은 7~8분이 소요되었다. 또한, 0.1 M Tris-HCl 완충용액을 이용하여 pH를 6.0, 7.0, 8.0으로 변화시키면서 그 영향을 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

그 결과 pH 8.0에서 좋은 값이 얻어진 것을 확인할 수 있다. 즉, $5.0 \times 10^{-3} \sim 5.0 \times 10^{-2}$ M의 직선구간에서 43.0 mV/decade의 감응도와 7~8분의 감응시간을 얻었다. 여기에서, 앞에서 얻은 0.1 M phosphate 완충용액 pH 8.0과 0.1 M Tris-HCl의 완충용액 pH 8.0을 비교하면 0.1 M phosphate 완충용액의 감응도 44.2 mV/decade와 감응직선구간 $2.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-1}$ M이 0.1 M Tris-HCl 완충용액보다 더 좋은 감응을 얻을 수 있었다. 앞으로의 모든 실험을 0.1 M

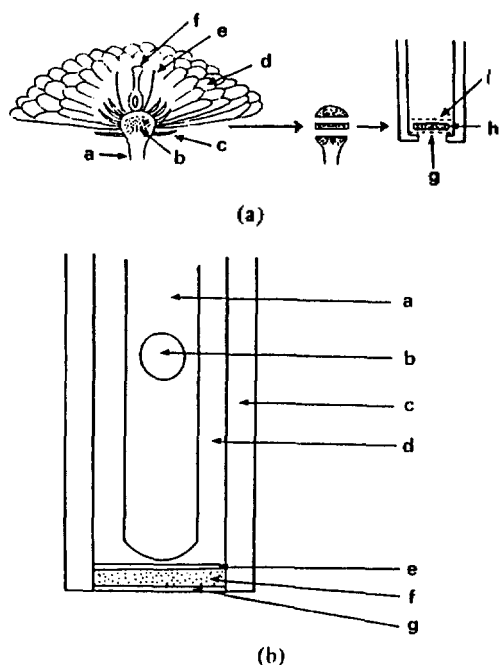


Fig. 1 (a) Construction of receptacle electrode. a, stem; b, receptacle; c, sepal; d, petal; e, anther; f, stigma; g, dialysis membrane; h, receptacle tissue slice; i, ammonia gas sensing membrane. (b) Schematic diagram of the tissue electrode. a, inner body; b, reference element; c, outer body; d, internal filling solution; e, gas permeable membrane; f, tissue layer; g, dialysis membrane.

phosphate 완충용액 pH 8.0에서 실행하였다.

L-arginine 정량에서 buffer 용액의 영향. L-arginine에 대한 완충용액의 영향을 Fig. 4에 나타내었다. pH 8.0, 온도 28°C를 고정시키고 phosphate 완충용액의 농도를 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M로 변화시키면서 감응도를 조사하였다.

그 결과 0.1 M phosphate 완충용액의 경우 직선 범위가 $5.0 \times 10^{-4} \sim 2.0 \times 10^{-2} M$ 이며, 감응도는 46.6 mV/decade, 감응시간은 7~8분 정도로 가장 좋았으며, 그러나, 0.05 M, 0.01 M 및 0.15 M의 경우는 감응도가 45.0 mV/decade, 40.0 mV/decade, 42.0 mV/decade로 0.1 M보다 떨어짐을 알 수 있었다.

L-Arginine 정량에서의 온도의 영향. Fig. 5에서 pH 8.0의 0.1 M phosphate 완충용액을 사용하여 온도 변화에 따른 L-arginine의 감응도를 나타낸 것으로 효소의 활동이 가장 활발한 22°C, 25°C, 31°C, 35

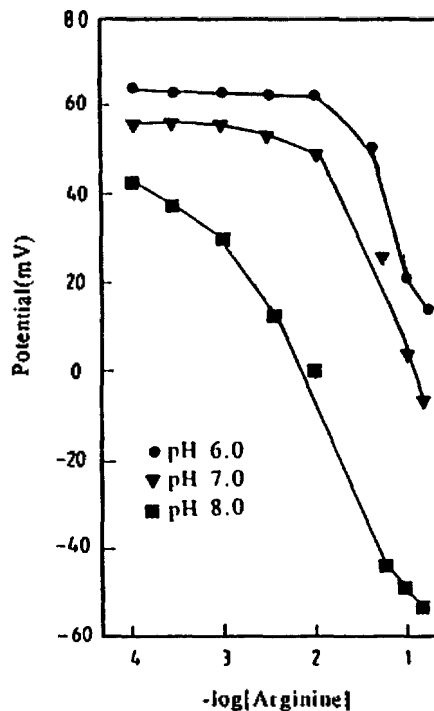


Fig. 2. The effect of pH on the L-arginine response curves at 22°C in the 0.1 M phosphate buffer solution.

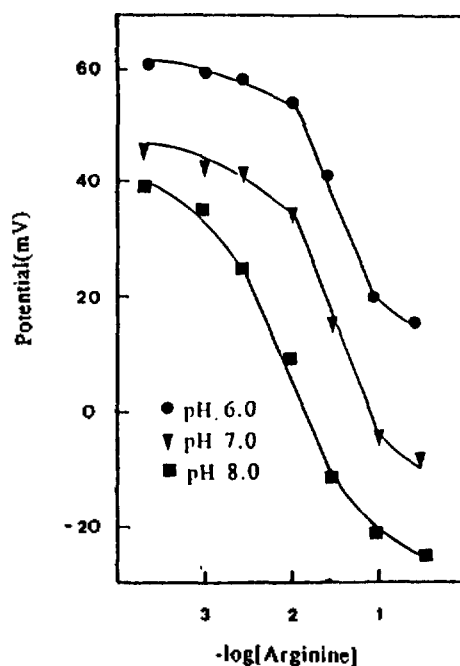


Fig. 3. The effect of pH on the L-arginine response curves at 22°C in the 0.1 M Tris-HCl buffer solution.

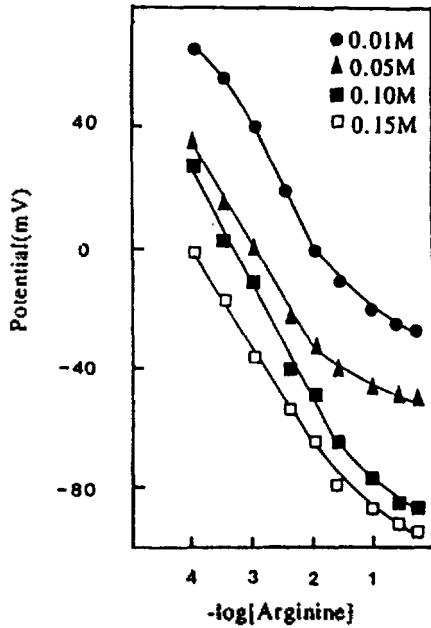


Fig. 4. The effect concentration on the L-arginine response curves at pH 8.0 and 28°C in the phosphate buffer solution.

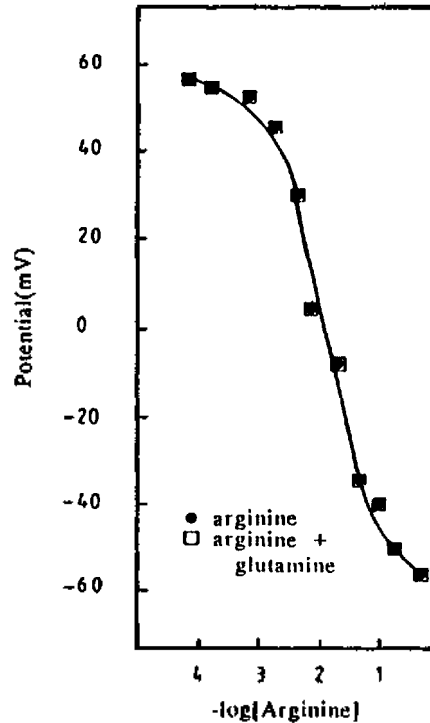


Fig. 6. Response for L-arginine at pH 8.0 and 25°C in the 0.1M phosphate buffer solution.

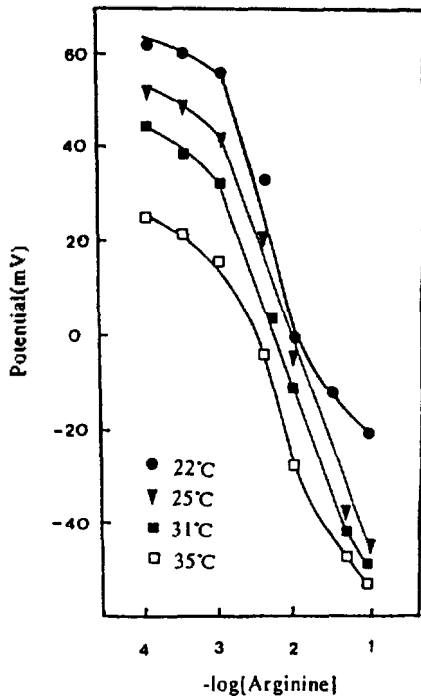


Fig. 5. The effect temperature on the L-arginine response curves at pH 8.0 in the 0.1M phosphate buffer solution.

에서 측정하였다.

그 결과, 25°C의 경우 $5.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-1} M$ 의 직선구간에서 54.0 mV/decade의 감응도를 보였으며, 감응시간은 7~8분의 소요됨으로 가장 좋은 값을 구하였다. 22°C의 경우는 $1.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간에서 감응도는 46.6 mV/decade이며, 31°C, 35°C의 경우는 각각 $1.0 \times 10^{-3} \sim 5.0 \times 10^{-2} M$, $3.0 \times 10^{-3} \sim 5.0 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간이며, 감응도는 44.2 mV/decade와 43.0 mV/decade이다. 지금까지 여러 가지 실험결과를 종합해 보면, L-arginine 측정의 최적조건은 20 μm 조직의 두께, 0.1M phosphate 완충용액, 그리고 25°C의 온도와 pH가 8.0임을 알 수가 있었다.

Glutamine의 영향. 제조된 L-arginine sensor의 선택성을 확인하기 위하여 Table 1에서 볼 때 L-arginine의 선택성에 가장 크게 영향을 미칠 가능성이 있는 다른 아미노산은 glutamine이므로, arginine만이 존재할 때와 glutamine과 arginine이 동시에 존재할 때를 측정함으로써 선택성에 어떤 영향을 미

Table 4. Response of the arginine sensor to alone and to arginine in the presence of glutamine

Glutamine (M)	Arginine (mV)	Arginine + Alutamine ^d (mV)	Δ mV
10^{-5}	55.4	55.4	0
10^{-4}	53.8	53.8	0
10^{-3}	50.9	50.8	+0.1

^dThe concentration of arginine is $10^{-4}M$.

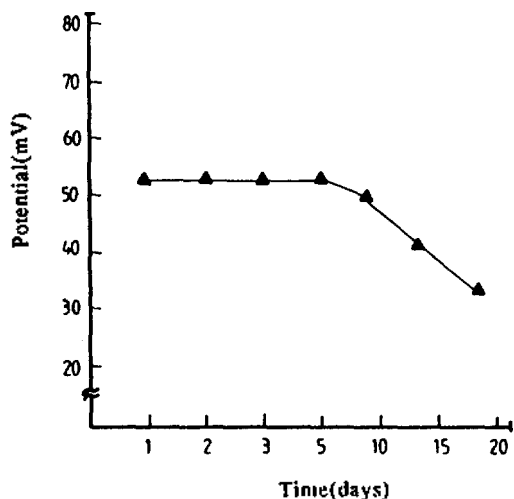


Fig. 7. Stability of the L-arginine sensor.

치는가를 조사하여, 그 결과를 Fig. 6과 Table 4에 나타내었다.

실험 결과, arginine sensor는 glutamine이 존재할 때도 방해받지 않음을 알 수 있었으므로 이 L-arginine sensor는 선택성면에서도 우수하다고 할 수 있다.

전극의 장기 안정성 측정. 본 연구에서 개발한 전극이 시간의 경과에 따른 안정성을 조사하기 위하여 15일 동안 4°C의 냉장고에 보관하면서 감응도를 측정하여 Fig. 7에 나타내었다.

그 결과, 처음 7일 동안은 감응도가 54.0~52.8 mV/decade로서 변화가 거의 없었으나, 8일째는 감응도가 48.0 mV/decade로 떨어졌으며 10일째는 직선범위도 $5.0 \times 10^{-2} \sim 1.0 \times 10^{-1}M$ 으로 다소 줄기 시작하여 15일째는 직선범위가 더욱더 좁아지며 감응도가 41.5 mV/decade로 현저히 떨어졌으며 감응 시간도 처음보다 5~6분 정도 더 소요되었다. 따라서

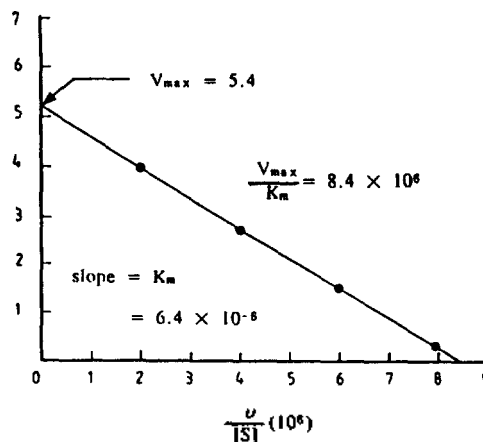


Fig. 8. Measurement of K_m value.

본 연구에서 개발한 L-arginine sensor는 7일 이내에서는 유용하게 사용할 수 있다.

K_m 값 측정. 본 연구에서는 Woolf-Augustinssoon-Hofstee법을 이용하여 K_m 값과 V_{max} 값을 구하였다. 그 결과, $K_m = 6.4 \times 10^{-6} (M)$, $V_{max} = 5.4$ 를 얻었으며 Fig. 8에 나타내었다.

K_m 값은 Michaelis 상수로서, 효소의 기질에 대한 친화력의 크기를 나타내는 값이며, 기질과 효소에 따라 서로 다른 값을 나타낸다. 여기에서 K_m 값을 구함으로써 본 실험에 사용된 효소 및 기질에 고유한 값을 부여하게 된다.

결론

본 연구에서는 흰 무궁화꽃 씨방 조직을 이용한 조직센서(tissue sensor)를 제조하여 L-arginine을 정량하는데 최적 조건을 조사하였다. 그 결과, 0.1 M phosphate 완충용액에서 pH 8.0, 온도 25°C, 조직두께 20 μm 이었을 때이며, 이에 정량 가능한 직선범위는 $5.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-1} M$ L-arginine 이었으며, 감응도는 54.0 mV/decade로 나타났고, 감응시간은 7~8분이 소요되었고, K_m 값은 $6.4 \times 10^{-6} (M)$ 이다.

또한, L-arginine에 대한 glutamine의 선택성 측정에서도 sensor에 대하여 아무런 영향을 받지 않았으므로 본 전극은 아주 좋은 선택성을 지녔다고 할 수 있으며, 전극의 안정성에서도 7일까지는 감응이 거의 변화가 없었으므로 L-arginine 정량에 이용한다면 매우 유용하게 사용될 수 있다.

본 연구는 한국과학재단의 ERC 연구계획에 의하여 수행된 것으로 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

1. G. G. Guibault, "Analytical Uses of Immobilized Enzymes", pp. 77~204, Marcel Dekker, Inc. New York, (1984).
2. G. P. Royer, "Fundamentals of Enzymology", pp. 181~204, John Wiley and Sons, Inc. New York (1982).
3. E. Tamiya and I. Karube, *Sensors and Actuators*, **15**, 199 (1988).
4. M. Hikuma, H. Obana, T. Yasuda, I. Karube, and S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, **109**, 33 (1979).
5. T. Matsunaga, I. Karube, and S. Suzuki, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 235 (1980).
6. I. Giaever, *J. Immunology*, **110**, 1424 (1973).
7. N. Yamamoto, Y. Nagasawa, S. Shuto, and M. Sawai, *Chem. Lett.*, **245** (1978).
8. H. H. Weetall and C. C. Detar, *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 295 (1975).
9. G. A. Rechnitz, M. A. Arnold, and M. E. Meyerohoff, *Nature*, **278**, 466 (1979).
10. M. A. Arnold and M. E. Rechnitz, *Anal. Chem.*, **52**, 1170 (1980).
11. M. Aizawa, S. Wada, S. Kato, and S. Suzuki, *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1769 (1980).
12. T. Matsunaga, S. Sogabe, I. Karube, and S. Suzuki, *Anal. Chem.*, submitted.
13. P. Bergveld, *IEEE Trans. on Biomed. Eng.*, **BME-17**, 70 (1970).
14. S. Caras and J. Janata, *Anal. Chem.*, **52**, 1935 (1980).
15. T. Matsuo and M. Esashi, *Sensors and Actuators*, **1**, 77 (1981).
16. T. Kuriyama, J. Kimura, and Y. Kawana, 16th Intl. conf. Solid State Devices Materials LC 12-3 (1984).
17. M. A. Arnold, *Anal. Chem.*, **57**, 565 (1985).
18. B. Danielsson, B. Mattiasson, R. Karlsson, and F. Wingvist, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1749 (1979).
19. S. P. Fulton, C. L. Cooney, and J. C. Weaver, *Anal. Chem.*, **52**, 505 (1980).
20. J. R. Sokatch, "Bacterial Physiology and Metabolism", p. 170, Academic Press, New York (1969).
21. H. Booker and J. Haslem, *Anal. Chem.*, **46**, 1054 (1974).