

마늘의 조직 센서를 이용한 L-asparagine의 정량

김성진* · 김기묘 · 배유진 · 이은엽 · 허문희 · 안문규
경성대학교 약학대학

(Received December 17, 1994)

Determination of L-asparagine Using A Garlic Tissue Electrode

Sung Jin Kim*, Gi Myou Kim, You Jin Bae, Eun Yup Lee, Moon Hye Hur and Moon Kyu Ahn
Department of Pharmacy, Kyungsoong University, 110-1, Daeyundong, Namgu, Pusan 608-736, Korea

Abstract—Garlic tissue cells are employed for the conversion of L-asparagine into ammonia. An ammonia gas electrode is used as a detector. The effect of pH, buffer solution, temperature and life time of electrode to have used were investigated in order to optimize the electrode response. The combination of *L-asparaginase* in garlic tissue cells and the gas electrode response linearly to L-asparagine over the concentration range $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-1}$ M with a slope of 72.0 mV/decade and is selective with respect to other L-amino acids.

Keywords □ Garlic tissue electrode, L-asparagine, D(+)-alliin, asparaginase, biosensor

동·식물계에는 소위 리셉터나 효소 등을 이용하여 높은 선택성과 감도를 가지고 그들 자신의 대사관계나 환경의 화학적 변화를 인식하고 적용할 수 있는 능력을 가지고 있다. 리셉터는 structural complexity 때문에 sensing devices로 그대로 사용하기에는 아직까지 많은 제약점이 있어 효소에 관심이 모아졌다. 1962년에 Clark¹⁾은 산소전극에 glucose oxidase (GOD)를 고정화하여 혈당을 측정하는 최초의 바이오센서(biosensor)를 개발하였다. 바이오센서는 생체 기능성 소자를 중심으로 두가지로 분류하며 생촉매 바이오센서로서 효소센서²⁻⁴⁾, 미생물센서⁵⁻⁶⁾, 조직센서⁷⁻⁸⁾, 세포소기간센서⁹⁾가 있으며 선택적 친화성을 가지는 분자 인식막을 이용하는 생체 친화성 바이오센서로서 면역센서¹⁰⁻¹¹⁾, 수용체센서¹²⁾, DNA센서¹³⁾가 여기에 속한다. 효소 전극은 생체 내의 분자를 선택적으로 식별하여 생체 내의 반응을 이용함으로써 특정 화학 물질의 농도를 측정할 수 있는 장점이 있다. 이에 효소의 생체 기능막에 고정화한 여러 물리화학 장치 기능을 이용하여 화학 물질을 식별할 때 이들의 생체 센서의 변환기로 이용되고 있다. 이 때 효소의 촉매

반응에서 생성 혹은 소비되는 특정 물질을 측정하기 위해 전위차계와 전류차계가 대표적으로 사용되고 있다. 마늘 조직에는 다량의 amino acid deaminase와 alliinase라는 효소(Fig. 1)가 존재함이 알려져 왔었다. 저자 등은 마늘의 특이적 효소반응을 이용하여 20종의 아미노산 중에서 선택성을 가진 asparagine 선택성 조직 전극을 제작하고 아울러 crude alliinase를 사용하여 alliin 선택성 전극을 제작하여 이 효소반응에 의해 발생하는 암모니아 기체의 양을 측정함으로써 asparagine과 alliin의 분석에 이용하고자 하였다. 또한 전형효과(modulating effect)에 의해 본래 효소활성 환경이 변하기 때문에 완충액의 pH 변화, 온도의 영향, 금속이온에 대한 영향 및 센서의 안정성을 검토하여 보았다.

실험 방법

시약 및 기기—L-tryrosine, L-alanine, L-phenylalanine, L-proline, L-arginine, L-glycine, L-cysteine, L-histidine, L-threonine, L-methionine, L-tryptophan, L-isoleucine, L-serine, L-lysine, L-val

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

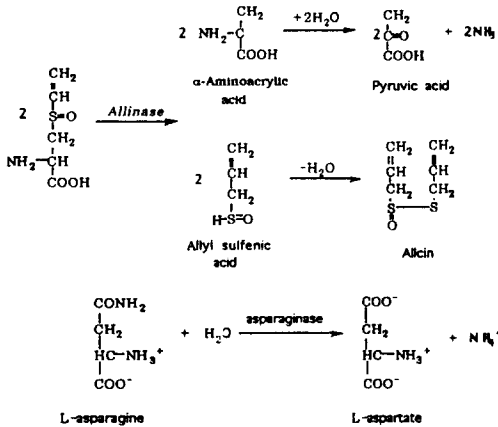


Fig. 1 — Reaction of enzyme in Alliin-selective electrode

line, L-leucine, L-aspartic acid, L-asparagine, L-glutamic acid 및 L-glutamine은 모두 Sigma사제를 사용하였다. cellulose triacetate, 25% glutaraldehyde는 Aldrich제를 Bovine serum albumin(BSA)는 Sigma제를 사용하였고 alliin은 일본 Wakunaga Pharmaceutical Co.로 부터 공급 받았으며 그외의 모든 시약은 분석용 특급 시약을 사용하였다. 기기로써 Orion Expandable Ionanalyzer EA 920 pH meter을 사용하였고 ammonia gas sensing electrode (Model 95-12)와 electrode body ISE (Swiss Philips IS-561) 그리고 Shimadzu-UV 1201를 UV-visible spectrophotometer로 사용하였다. 16th multichannel high impedance amplifier로 electrode에서 발생한 potential의 signal을 digital data로 전환하여 AT-286 computer로 전송하여 Borland사의 Quttro-Pro program ver. 3.0으로 e.m.f.을 계산하였다.

암모니아 전극의 조립—Outer membrane인 0.45 μm의 투석막 위에 마늘 조직을 넣고 10% BSA 10 μl와 2% glutaraldehyde 10 μl를 넣어 4°C 냉장고에서 24시간 동안 조직을 고정화시킨 후 과량의 glutaraldehyde를 제거하기 위해 1% glycine 용액에 5분간 담근 후 다시 4시간 동안 냉장고에서 건조시켜 암모니아 전극의 screw cap 하단부에 부착시킨다. 그 위에 차례로 기체 투과막을 놓은 후 NH₃ 가스 전극의 하단부에 부착하였다(Fig. 2).

L-Asparagine에 대한 감응 원리—L-asparagine의 NH₃ 가스 발생 기구는 내부 용액속의 asparagine이

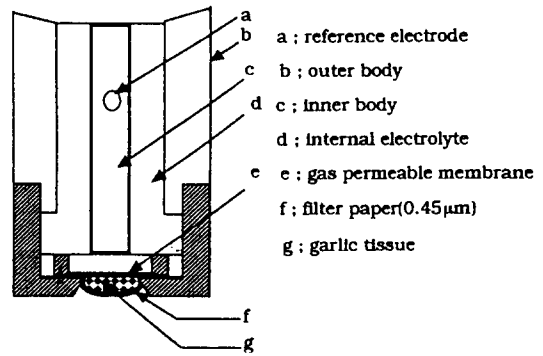
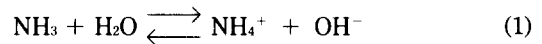


Fig. 2—Schematic diagram of the NH₃ electrode

고정화된 biocatalytic layer와 반응하여 asparaginase의 작용에 의해 NH₃ 가스가 발생된다. NH₃의 정류 상태 농도는 전극 표면에서 NH₃ 가스 생성과 소실의 평형상태에서 이루어지며 따라서 정상 전위값을 측정하여 물질의 농도와의 검량선을 구해 이를 기준으로 미지 농도를 측정한다. 여기서 발생된 NH₃ 가스는 기체 투과성막을 통과하여 내부 충전 용액에서 다음과 같은 반응이 진행된다.



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

식 (2)에서 내부 충전 용액중에 NH₄Cl가 높은 농도로 포함되어 있어 [NH₄⁺]가 일정하게 유지되므로 [NH₄⁺]은 상수로 간주할 수 있고 식 (3)로 나타낼 수 있다.

$$[\text{OH}^-] = \text{constant} \times [\text{NH}_3] \quad (3)$$

즉, 바이오센서의 전위는 Nernst equation에 대입 하므로서 다음과 같은 식 (2)로 나타낼 수 있다.

$$E = E^\circ - S \cdot \log[\text{OH}^-] \quad (4)$$

여기서 S는 감응 기울기 (response slope)이며 [OH⁻]는 식 (3)에서처럼 [NH₃]에 비례하므로 식 (5)으로 나타낼 수 있다.

$$E = E^\circ - S \cdot \log[\text{NH}_3] \quad (5)$$

여기서 E^o는 표준전극 전위이다. 따라서 전체 전위 E는 [NH₃]에 따라 변하게 된다. 이와 같이 NH₃의

Table I—L-asparagine selectivity in amino acid by a electrode with garlic tissue

Amino acid	V _o	V _i	ΔmV	Amino acid	V _o	V _i	ΔmV
Try	259.4	250.1	9.3	Ile	235.0	221.8	13.2
Ala	237.3	245.8	-8.5	Ser	225.8	217.4	8.4
Phe	238.7	248.0	-9.3	Lys	225.5	233.8	-8.3
Pro	241.2	246.9	-5.7	Val	234.1	223.0	11.1
Gly	240.0	253.0	-13.0	Leu	224.3	233.2	-8.9
Cys	268.5	269.1	-0.6	Glu	279.6	280.6	-1.0
His	241.7	245.2	-3.5	Asp	226.5	234.5	-8.0
Thr	238.5	245.5	-7.0	Arg	284.6	265.0	19.6
Met	239.6	246.8	-7.2	Glu	493.2	478.2	15.0
Tyr	231.2	234.6	-3.4	Asn	262.2	206.3	55.9

V_o: initial potential

V_i: final potential

발생은 L-asparagine의 양과 정량적으로 비례하므로 전위값은 L-asparagine 양에 비례하게 된다.

결과 및 고찰

아미노산에 대한 선택성—20가지의 아미노산 표준액(10⁻² M)에서 1 ml씩 취하여 약 1.6×10⁻³~8.45×10⁻³ M 등의 농도로 하여 0.1 M 인산 완충액(pH 7.05)에서 측정한 결과이다(Table I). arginine과 glutamine은 다른 아미노산에 비하여 비교적 높은 반응성을 보였으나 반응 시간이 18~23분으로 L-asparagine보다 반응시간이 3~3.5배 정도 길게 소요되었다.

온도의 영향—온도를 달리한 0.1 M 인산 완충액(pH 7.02)중 10⁻³ M asparagine 1 ml를 넣어 EA 920으로 용액의 전위를 측정하였다. 그 결과 34℃에서 변화량이 53.9 mV/decade로 가장 크게 나타나 이 온도에서 조직 센서의 실험을 진행하였다.

pH에 대한 영향—L-asparagine에 대한 조직 센서의 pH 변화에 따른 영향을 알아보기 위해 0.1 M 인산 완충액의 온도를 34℃로 고정하고 용액의 pH를 6.6, 6.8, 7.0, 7.2 및 7.5로 변화시켜 감응 기울기를 조사하였더니 그 결과 pH 7.0~7.2에서 가장 높게 나타나 본 실험을 pH 7.0에서 진행하였다.

금속 이온의 영향—2가 금속 이온들 중에 Co²⁺는 완충액만을 사용했을 때 보다 25% 정도 효소의 활성을 감소시키고 Mg²⁺, Fe²⁺ 및 Mn²⁺는 11% 정도 감소시켰으나 Ni²⁺, Cd²⁺ 및 Ca²⁺는 약 2% 증가시켰고 Cu²⁺가 7% 증가시켰다(Fig. 3).

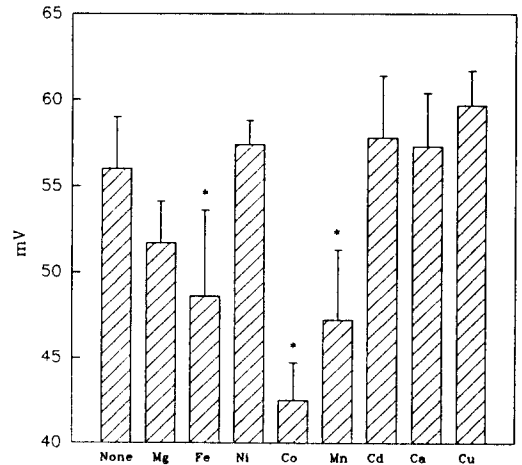


Fig. 3—Effect of metal ions on enzyme activity. Each value represents mean+S.D.(n=4). *, significantly different from None (p<0.05)

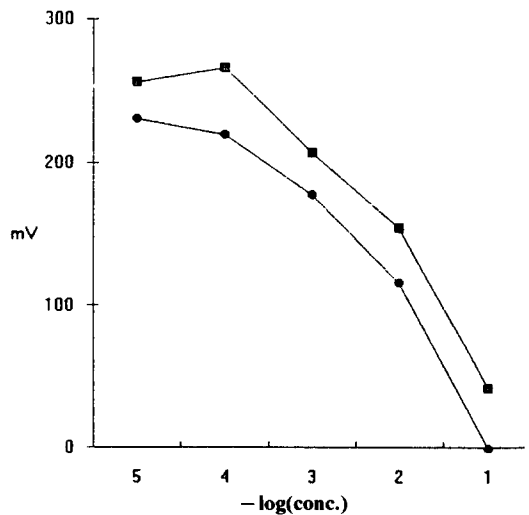


Fig. 4—Calibration curve for L-asparagine using inner parts of garlic tissue(■) and outer parts of garlic tissue (●) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0); ■=72.3 mV/decade (r²=0.9473), ●=72.65 mV/decade (r²=0.9673).

조직 센서 전극의 검량선—0.1 M 인산 완충액(pH 7.0)의 온도를 34℃로 고정하여 L-asparagine의 농도를 10⁻⁵~10⁻¹ M으로 변화시키면서 전위를 측정하는 결과는 Fig. 4와 같이 나타났으며 중국산 마늘의 바깥쪽과 안쪽의 조직을 분리하여 실험한 결과 거의 유사한 감응 기울기를 나타내었다. 감응시간은 5~6분 정도 소요되었고 마늘 조직 중의 시료 채취 부위에

Table II—Compare garlic tissue electrode with separated crude *Alliinase* electrode

Alliin standard soln.	Electrode 1	Electrode 2
50 μ l	Δ 5.5 mV	Δ 31.7 mV
100 μ l	Δ 5.8 mV	Δ 31.1 mV
500 μ l	Δ 7.0 mV	Δ 48.4 mV
1000 μ l	Δ 10.0 mV	Δ 82.6 mV

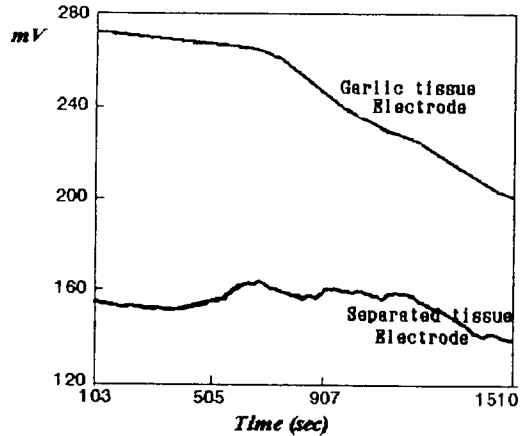
Response time is 7~9 min. Added alliin solution is 10 mg/ml. The electrode 1 is a rare garlic tissue electrode and electrode 2 is a separated crude enzyme electrode being abundant in alliinase.

따른 ASNase의 분포를 확인하기 위해 마늘 조직의 안쪽과 바깥쪽의 부위를 나눠 전극으로 만들어 실험한 결과 안과 밖의 ASNase 분포는 거의 동일함을 알 수 있었고 L-asparagine에 대한 linear range는 $0.1 \sim 1.0 \times 10^{-4}$ M이며 detection limit는 안쪽의 경우 5.0×10^{-5} M로 나타났다. 한국산 마늘의 경우는 감응 기울기가 $50 \sim 55$ mV/decade로 중국산과 한국산 마늘의 효소 분포에는 약간의 차이가 있음을 알 수 있었다.

Tsuno 방법¹⁴⁾에 의해 마늘 조직으로부터 alliinase 분리—10 g의 마늘을 완전히 분쇄한 후 4°C에서 10분 동안 $3000 \times g$ 으로 원심분리한 후 상등액을 H_3PO_4 로 pH 4.0로 조정 한 후에 5분동안 $12000 \times g$ 에서 원심분리한 후 상등액을 버리고 다시 침전물에 물을 넣고 H_3PO_4 로 pH 4.0으로 조정 한 후 5분동안 $12000 \times g$ 에서 원심분리하여 상등액을 버리고 pH 6.4의 인산 완충액에서 냉동 보관하여 사용하였다. 전극 1은 마늘 조직을 단순히 고정화시켜 사용하였고 전극 2는 Tsuno 방법에 의해 만든 crude alliinase를 다량 함유한 조직을 전극 1과 같은 방법으로 고정화하여 비교하였다.

Tsuno 방법에 의해 분리된 crude alliinase의 확인—crude alliinase 1 ml와 인산 완충액 2 ml의 혼합액에 1.88×10^{-2} M의 alliin과 L-asparagine을 첨가하여 30~35°C에서 10분간 incubation시킨 후 흡광도를 측정하였다. 이 때 alliin을 첨가한 시험관에서는 240 nm에서 흡광도가 0.349 A를 나타내었고 반면에 L-asparagine의 경우에는 나타나지 않았다.

마늘 조직 전극과 정제된 조직 전극의 비교—UV 확인에서 나타난 바와 같이 마늘 조직을 그대로 사용한 경우와 Tsuno 방법에 의해 crude alliinase를

**Fig. 5**—Compare garlic tissue electrode with separated garlic tissue electrode on response

다량 함유하고 다른 효소는 거의 제거된 조직을 비교한 결과는 Fig. 5에서 보듯이 200초마다 L-asparagine을 $10^{-6} \sim 10^{-2}$ M로 첨가시 마늘 조직 전극에서만 반응이 일어났다.

조직 센서의 안정성

10^{-3} M의 L-asparagine용액에 대하여 2일마다 그 전위값을 측정하여 경시 변화를 본 결과 8일간은 안정한 값을 가졌으나 10일 이후부터 급격한 전위값의 감소를 나타내었다. 이는 조직의 부패에 의한 조직내 효소의 불안정성으로 생각되며 NaN_3 인 방부제를 사용하면 그 조직전극의 안정성은 향상되었으나 감응 기울기가 심하게 감소하여 분석용으로 사용하기에는 문제가 있었으며 효소전극을 사용할 경우에 전극의 수명을 향상시키며 선택성이 높은 효소전극의 사용을 고려 중에 있다.(Fig. 6)

결론

Garlic tissue electrode는 20여종의 아미노산 중에서 선택적으로 asparagine에 감응하며 그 감응 기울기는 72 mV/decade를 나타내었고 정량 가능한 직선 범위는 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-1}$ M, 반응 시간은 5~10분이며 온도는 34°C, 0.1 M 인산완충액(pH 7.0)에서 가장 적합하였으며 조직센서의 안정성은 8일간 이었다. 한편 순수한 마늘만을 사용한 조직은 아미노산 중의 asparagine 정량에 이용 가능성이 있

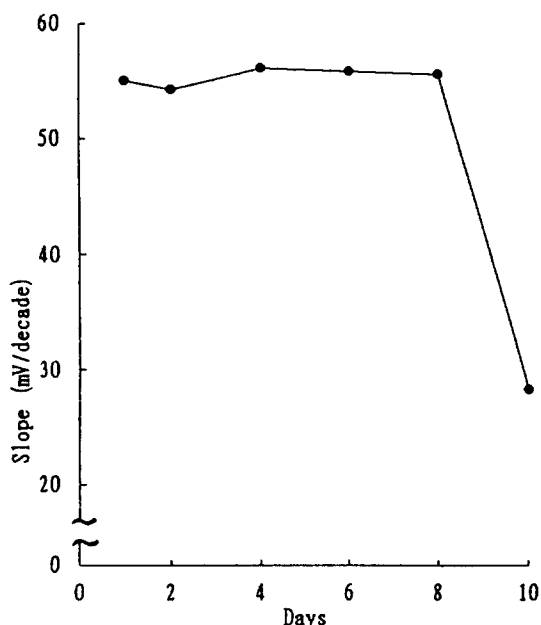


Fig. 6—Determination of life time of garlic tissue electrode

으며, alliin이나 alliin의 분석에는 alliinase 효소를 이용한 효소전극을 사용하든지 조잡한 alliinase 마늘 조직을 사용하면 가능하리라 본다.

문 헌

1) Clark, L. C., Jr. and Lyons, C. : Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad. Sci.* **102**, 29-45 (1962).
 2) Cass, A. E. G., Davis, G., Francis, G. D., Hill, H. A. O., Aston, W. J., Higgins, I. J., Plotkin, E. V., Scott, L. D. L. and Tuner, A. P. F. : Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.* **56**, 667-71 (1984).
 3) Johnson, J. M., Halsall, H. B. and Heineman, W. R. : Galactose oxidase enzyme electrode with internal

solutions potential control. *Anal. Chem.* **54**, 1394 (1982).
 4) Hopkin, T. R. : A multipurpose enzyme sensor based on alcohol oxidase. *Am. Biotechnol. Lab.*, **13** (1985).
 5) Karube, I. : Microbial sensor for screening mutagens. *Trends in Anal. Chem.* **3**, 40 (1984).
 6) Okada, T., Karube, I. and Suzuki, S. : NO₂ sensor which use immobilized nitrite oxidizing bacteria. *Biotechno. Bioeng.*, **25**, 1641 (1983).
 7) Arnold, M. A. : Optimization of a tissue-based membrane electrode for guanine. *Anal. Chem.* **54**, 777 (1982).
 8) Arnold, M. A. : Selectivity enhancement of a tissue-based adenosine sensing membrane electrode. *Anal. Chem.* **53**, 515 (1981).
 9) Bae, J. H., Choi, S. H., Lim, D. J., and Kim, U. R. : The biosensors for L-glutamine using tissue slices of Wistar rat. *J. Kor. Chem. Soc.* **38**, 3 (1994).
 10) Doyle, M. J., Halsall, H. B. and heineman, W. R. : Heterogenous immunoassay for serum proteins by differential pulse anodic stripping voltammetry. *Anal. Chem.* **54**, 2318 (1982).
 11) Keating, M. Y. and Rechnitz, G. A. : Potentiometric digoxin antibody measurements with antigen ionophores based membrane electrode. *Anal. Chem.* **56**, 801 (1984).
 12) Buch R. M. and Rechnitz, G. A. : Neuronal Bioensors (review). *Anal. Chem.* **8**, 553A 539A (1989).
 13) Duine, J. A., Frank, J. and Van der Meer, R. : Different forms of quinoprotein aldolase -(glucose) dehydrogenase. *Archives of Microbiology* **31**, 27~31 (1982).
 14) Emiko M., Akira N., Yoshimi K. and Koichi S. : Liquid chromatographic determination of alliin in garlic and garlic products. *J. Chromatogr.* **455**, 271 (1988).