

## 장미조직센서를 이용한 요소의 정량

김봉원<sup>†</sup> · 전영국 · 정진갑  
계명대학교 자연과학대학 화학과  
(1993. 6. 28. 접수)

### Determination of Urea using Rose Tissue Sensor

Bong-Weon Kim, Young-Guk Jeon and Chin-Kap Chung

Department of Chemistry, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu, 704-701, Korea  
(Received Jun. 28, 1993)

**요약 :** *New carina* 장미조직을 전극에 고정시켜 장미조직센서를 조립하였다. 이 센서로 요소를 정량하기 위한 최적 조건을 조사하였다. 또한, 센서의 선택성과 수명도 조사하였다. 그 결과, 이 조직 센서의 최적 조건은 0.20M 인산완충용액에서 pH를 8.0, 온도를 37°C로 하고 조직량은 50mg을 사용하였을 때였다. 이 최적 조건에서 정량 가능한 직선감응범위는  $9.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-3}$  M이며, 감응기울기는 42mV/decade였다. 검출한계는  $7.0 \times 10^{-5}$  M이었으며, 감응시간은 17~19분이었다.

**Abstract :** The rose petal tissue biosensor has been constructed by immobilizing *New carina* rose tissue. Optimum conditions for the determination of urea were investigated using this sensor. Selectivity and life time of this sensor were also obtained. As a result, the biosensor showed the optimum response characteristics in 0.20M phosphate buffer solution at pH 8.0, 37°C and 50mg of tissue amounts. This sensor was linear from  $9.0 \times 10^{-5}$  to  $4.0 \times 10^{-3}$  M urea with a slope of 42mV/decade. The limit of detection and response time are  $7.0 \times 10^{-5}$  M and 17~19 min.

**Key words :** Rose petal biosensor, Urea

#### 1. 서론

요소는 인체 내에서 신진대사에 직접 관여하는 매우 중요한 물질 중의 하나이다. 이 요소의 정량에 미생물 센서를 처음 사용한 것은 1983년 Vincke 등<sup>1</sup>이었다. 이 때에 사용한 미생물은 *Proteus mirabilis* 박테리아였다. 또한 Ihn 등<sup>2</sup>도 NH<sub>3</sub>와 CO<sub>2</sub> 기체감응전극에 박테리아를 고정시켜 요소를 정량한 바 있다. 이 때에 실제 요와 혈액 중의 요소를 정량하여 분광광도법과 비교한 결과, 단백질을 제거과정과 착색과정을 함께 써야 하는 분광광

도법보다도 훨씬 간편하고 빠른 시간 내에 정확한 결과를 얻을 수 있는 장점이 있었다. Arnold 등<sup>3</sup>은 jack bean meal로써 요소를 정량하였는데, urease를 전극에 고정시켰을 때보다도 감응기울기와 검출한계 면에서 좋은 결과를 얻었으며, 특히 수명은 94일로서 60일의 효소센서보다도 월등한 안정성을 나타내었다.<sup>3</sup> 또한, Uchiyama 등<sup>4</sup>은 카네이션꽃을 써서 요소를 정량한 바 있다. 이러한 조직센서는 추출과 정제과정 등의 전처리가 필요하지 않으며, 주위에서 쉽게 구할 수 있고, 효소의 활성이 좋아서 장시간 안정하게 쓸 수 있는 장점이

있었다.

본 실험에서 사용한 조직은 식물조직으로서 동물조직보다도 다루기가 쉽고 편리하며, 효소를 자연상태로 안정하게 장시간 쓸 수 있으며, 저렴한 가격으로 주위에서 쉽게 구할 수 있는 장미이다. 장미조직을 쓴 바이오센서는 글루타민<sup>5</sup>과 시티딘<sup>6</sup>에 이용되었는데, 특히 특정한 아미노산에 대하여 선택성이 탁월하며, 효소나 미생물을 사용할 때처럼 조직에 대한 번거로움이 없었다.

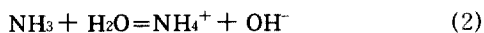
따라서 본 연구에서는 요소의 정량에 장미조직을 써서 장미조직센서를 개발하였다. *New carina* 장미조직을 써서 요소의 정량에 따른 pH, 온도, 완충용액 및 조직량의 최적 실험조건을 찾고, 이에 따른 아미노산 및 핵산에 대한 선택성과 장미조직센서의 수명을 조사하여 정량의 최적 실험조건을 찾아서 그 분석법을 보고하고자 한다.

## 2. 장미꽃잎조직 요소 바이오센서의 감응원리

용액 중의 요소가 조직센서의 투석막을 통과하여 장미조직이 있는 층으로 들어오면, 장미조직이 가지고 있는 효소에 의하여 다음과 같이 분해된다.<sup>1,4</sup>



이 반응으로 생성된 암모니아 기체는 기체투과막을 통과하게 되며, 암모니아 기체감응전극의 내부충전용액으로 확산되어 들어간다.<sup>1</sup> 내부충전용액으로 들어온 암모니아 기체는 다음과 같이 반응하므로, 생성된  $[\text{OH}^-]$ 는  $[\text{NH}_3]$ 에 비례하게 된다.



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

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

식 (4)에서  $[\text{NH}_4^+]$ 항은 평형상태에서 내부충전용

액 중에 들어 있는  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 에 의하여 일정하게 유지되므로 일정한 값으로 볼 수 있다. 따라서  $[\text{OH}^-]$ 가  $[\text{NH}_3]$ 에 비례하고,  $[\text{NH}_3]$ 가 요소의 몰농도에 비례한다. 그러므로 지시전극의 전극전위 E는 Nernst식을 써서 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\begin{aligned} E &= E_0 - S \log [\text{OH}^-] = E_0' - S \log [\text{NH}_3] \\ &= E_0'' - S \log [\text{urea}] \end{aligned} \quad (5)$$

## 3. 실험

### 3. 1. 기기 및 시약

#### 3. 1. 1. 기기

암모니아 기체감응전극은 Orion Research Model 95-2( $\phi$  7mm)를, 기전력의 측정에서 Orion Research Model 611 Digital pH/millivolt를, pH의 측정에는 Beckman Model 76 Century SS pH meter를 각각 사용하였다. 항온조는 Forma Scientific Model 2067 water bath를 사용하였다.

#### 3. 1. 2. 시약

요소는 Sigma제 특급시약을, 완충용액의 제조에 사용한  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 와  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 는 Wako제 특급시약을, *tris*(hydroxymethyl)aminomethane은 Sigma제 특급시약을 사용하였다. 조직이 부패되는 것을 막기 위하여 사용한  $\text{NaN}_3$ 는 Aldrich제 특급시약을, 이외의 아미노산 및 핵산류 등은 Sigma제, Wako제, Fluka제 및 Junsei제의 특급시약을 사용하였다. 기타의 시약은 특급시약을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 또한, 투석막으로는 pore size가  $0.3\mu\text{m}$ 인 Millipore 제품을 썼고, 기체 투과막으로는 Orion-951204 gas permeable membrane을 사용하였다.

#### 3. 1. 3. 식물조직

본 실험에서 사용한 장미품종은 *New carina*(*Rosa hybrida Hort*)이다. 이 꽃을 화원에서 구입하여 꽃잎부분을 1mm 크기로 자르고 약 0.5 atm의 압력을 450여 회 가하여 꽃잎의 소수성 부분을 파괴하여 사용하였다

### 3.2. 전극의 조립 및 기전력의 측정

Pore size가  $0.3\mu\text{m}$ 인 투석막과 기체투과막 사이에 장미의 꽃잎부분을 50mg 놓고, 암모니아 기체감응전

극의 하단부에 부착시켜 조직센서를 조립하였다. 이 조직센서를 0.02% NaNO<sub>3</sub>가 포함된 적당한 pH의 완충용액에 3~4시간 동안 저장하여, 조직에 들어 있는 암모니아 기체를 제거한 다음<sup>5,6</sup>, 시료용액 50ml에 담고, 시료용액을 자석젓개로 저어 가면서 기전력을 측정하여 검정곡선을 작성하였다.

4. 결과 및 고찰

위와 같이 조립된 센서를 써서 요소를 정량하기 위해 완충용액의 최적 pH와 농도, 온도 및 조직량을 조사하였다. 또한 최적 실험조건에서 검정곡선을 작성하여 감응특성을 구하고, 이 센서의 선택성과 수명도 살펴보았다.

4. 1. 최적 조건조사

4. 1. 1. pH의 영향

요소 조직센서로써 요소를 정량할 때에 식물조직의 활성도가 가장 좋은 pH를 찾기 위해 다음과 같이 실험하였다. *New carina* 장미조직의 꽃잎을 50mg 취하여 조직센서를 조립하고, 0.20M 인산염 완충용액에 요소의 농도가  $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1}M$  포함되어 있는 시료용액의 온도를 37℃로 유지시키고, pH를 7.6에서 8.

4까지 변화시켰다. 이 결과를 Fig.1에 나타내었다. 그 결과, pH 8.0에서 측정한 감응특성이 가장 좋았는데, 요소의 농도가  $9.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-3}M$ 인 직선감응 범위에서 감응기울기는 42mV/decade였다.

한편, 이 pH는 Arnold 등<sup>3</sup>이 jack bean meal의 식물조직으로 요소를 정량할 때의 pH 8.5보다는 낮았으

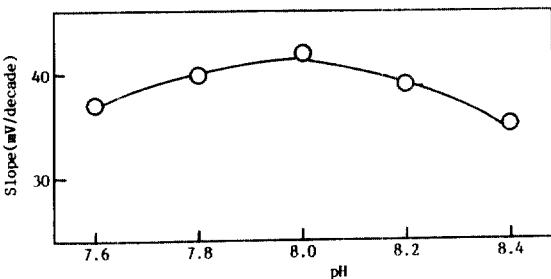


Fig. 1. Effect of pH on the determination of urea in 0.20M phosphate buffer solution at 37℃ with 50mg of rose tissue.

며, Uchiyama 등<sup>4</sup>이 흰 카네이션 꽃잎으로 요소를 정량할 때의 pH 7.4보다는 높았다. 또한, Ihn 등<sup>7</sup>이 *Proteus mirabilis* 박테리아를 써서 요소를 정량한 경우와 비교하면, 암모니아 기체반응전극을 썼을 때 최적 pH 7.4, CO<sub>2</sub> 기체감응전극을 썼을 때 최적 pH 7.0보다도 본 연구에서 사용한 최적 pH가 높았다.

4. 1. 2. 온도의 영향

장미조직센서로 요소를 정량할 때에 요소의 활성도가 가장 좋은 감응을 나타내는 온도를 조사하기 위하여 시료용액의 온도를 변화시켜 가면서 각 센서의 감응특성을 구하였다. *New carina* 장미조직의 꽃잎을 50mg 취하여 조직센서를 조립하고, 0.20M 인산염 완충용액에 요소의 농도가  $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}M$  포함되어 있는 시료용액의 pH를 8.0에 고정시키고, 시료용액의 온도를 33℃에서 40℃까지 변화시켜서 측정할 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 최적감응특성이 37℃에서 나타났으며, 요소의 농도가  $9.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-3}M$ 인 직선감응 범위에서 감응기울기는 42mV/decade이었다.

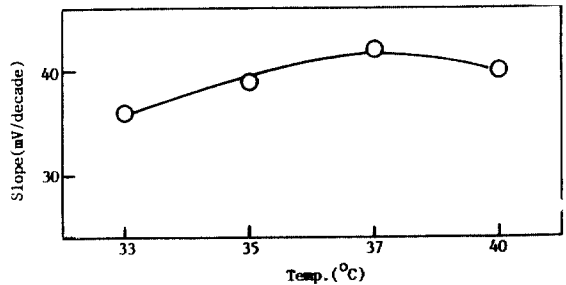


Fig. 2. Effect of temperature on the determination of urea in 0.20M phosphate buffer solution at pH 8.0 with 50mg of rose tissue.

이 최적온도는 박테리아센서로써 요소를 정량할 때<sup>7</sup>의 30℃, jack bean meal로써 요소를 정량할 때<sup>3</sup>의 25℃, 카네이션 꽃잎으로 요소를 정량할 때<sup>4</sup>의 23℃보다 높은 온도이다.

4. 1. 3. 완충용액의 영향

장미조직센서로써 요소를 정량할 때에 최적 감응특성을 나타내는 완충용액의 농도를 찾기 위해 다음과 같이 실험하였다. *New carina* 장미조직의 꽃잎을

50mg 취하여 조직센서를 조립하고, pH가 8.0인 인산염 완충용액의 몰농도를 0.05M, 0.1M 및 0.20M로 변화시키고 아울러 0.20M tris-HCl 완충용액도 변화시켜서 Table 1에 나타내었다. 이 때에 각 시료용액에 0.02% sodium azide를 첨가하여 조직층이 박테리아에 오염되는 것을 막도록 하였다.<sup>8,9</sup> 그 결과, 0.20M 인산염 완충용액에서 측정된 감응특성이 가장 좋게 나타났는데, 요소의 농도가  $9.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 에서 직선감응 범위였고, 감응기울기는  $42 \text{mV/decade}$ 였다.

Table 1. Effect of buffer on the activity of rose tissue for the determination of urea\*.

Buffer	Linear range (M)	Response slope (mV/decade)
0.05M phosphate	$9.0 \times 10^{-5}$ $-2.0 \times 10^{-3}$	34
0.10M phosphate	$9.0 \times 10^{-5}$ $-3.0 \times 10^{-3}$	38
0.20M phosphate	$9.0 \times 10^{-5}$ $-4.0 \times 10^{-3}$	42
0.20M tris-HCl	$9.0 \times 10^{-5}$ $-4.0 \times 10^{-3}$	38

\* tested at pH 8.0 and 37°C with 50mg of tissue amounts.

한편, jack bean meal과 카네이션 꽃잎으로 요소를 정량할 때에는 같은 0.20M tris-HCl 완충용액에서 측정하였으나<sup>3,4</sup>, 본 장미조직센서는 0.20M 인산염 완충용액에서 감응특성이 더 좋았다.

#### 4.1.4. 조직량의 영향

장미조직센서로써 요소를 정량할 때에 최적 감응특성을 나타내는 조직의 양을 찾기 위해 다음과 같이 실험하였다. *New carina* 장미조직의 꽃잎을 취하여 조직센서를 조립하고, pH가 8.0인 0.20M 인산염 완충용액에 요소의 농도가  $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1} \text{M}$  포함되어 있는 시료용액의 온도를 37°C로 유지하고, 조직량을 30mg에서 60mg으로 변화시켰다.

Fig. 3으로부터 알 수 있는 바와 같이, 조직을 50mg 사용하였을 때에 최적 감응특성이 나타났는데, 이때의 직선감응 범위는 요소의 농도가  $9.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 이었으며, 감응기울기는  $42 \text{mV/decade}$ 였다. 따라서 이 실험에서 조직의 물질 분해능력과 발생된 암모니아 기체의 내부용액으로 확산되는 속도 등의 상호작용으로 조직의 양을 50mg 사용하였을 때가 최적임을 알 수 있었다.

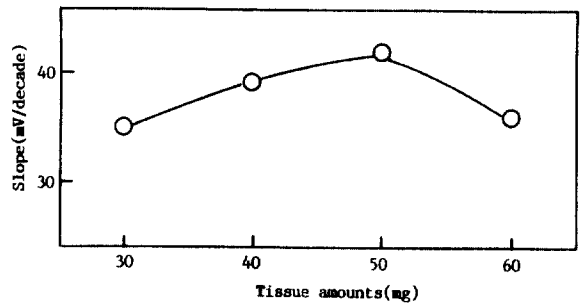


Fig. 3. Effect of tissue amounts on the determination of urea in 0.20M phosphate buffer solution at pH 8.0 and 37°C with rose tissue.

이 조직량은 jack bean meal로써 요소를 정량할 때의 7mg보다는 많은 양이었으나<sup>3</sup>, 흰 카네이션으로 요소를 정량할 때의 50mg과는 같은 양이었다.<sup>4</sup>

## 4. 2. 검정곡선

*New carina* 장미조직센서로써 요소를 정량할 때, 최적 실험조건은 pH가 8.0의 0.20M 인산염 완충용액에서 온도를 37°C로 하고 조직량은 50mg을 사용하였을 때였다. 이 최적 실험조건에서 구한 검정곡선을 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에서처럼, 요소의 농도가  $9.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-3} \text{M}$  범위에서 검정곡선이 직선감응 범위였고, 감응기울기는  $42 \text{mV/decade}$ 였다. 감응시간은 17~19분이 소요되었다. 이 검정곡선은  $7.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 의 검출한계와 3.4%(6회)의 상대표준편차를 가진다.

이 요소를 정량할 때의 직선감응 범위는 장미조직센서로 글루타민, 시티딘을 정량할 때의 직선범위보다 저농도에서 나타났으며<sup>5,6</sup>, 감응기울기는 저조하였다. 다른 연구결과를 살펴보면, 흰 카네이션 꽃잎<sup>4</sup>으로 요

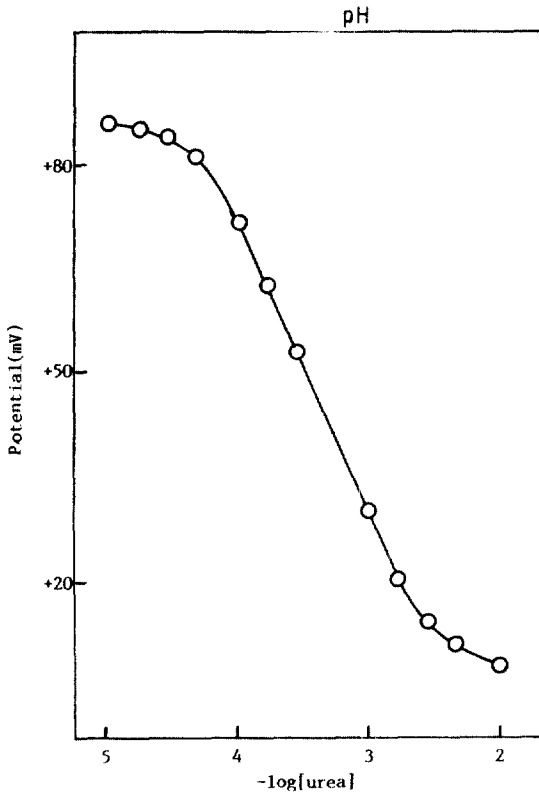


Fig. 4. Calibration curve for the determination of urea in 0.20M phosphate buffer solution at pH 8.0 and 37°C with 50mg of *New carina rose* tissue.

소를 정량할 때 요소의 농도가  $2.0 \times 10^{-5} \sim 3.0 \times 10^{-4} M$ 에서 직선감응 범위여서, 본 연구와 직선감응 범위가 비슷하였다. 또한 감응시간도 20분이 소요되어 본 연구의 감응시간과 비슷하였다. 또한 jack bean meal<sup>3</sup>로써 요소를 정량할 때에는 요소의 농도가  $3.4 \times 10^{-5} \sim 1.5 \times 10^{-3} M$ 에서 직선감응 범위여서 본 연구의 결과와 비슷하였으나, 감응시간이 1~5분이 소요되어 본 연구의 감응시간이 훨씬 길었다.

4. 3. 아미노산과 핵산에 대한 선택성

장미조직센서로써 요소를 정량할 때, 이 센서의 감응에 방해하는 방해물질을 찾기 위해 아미노산 및 핵산이 기전력에 미치는 영향을 조사하였다.  $1.0 \times 10^{-3} M$ 의 요소 수용액에 각 종의 아미노산과 핵산을 같은 농도가 되도록 첨가하였을 때, 방해를 하는 기전

력의 변화를 선택계수로 표현하여 Table 2에 나타내었다. 측정조건은 요소를 정량할 때의 최적 실험조건인 0.20M 인산염 완충용액, pH 8.0, 온도 37°C, 조직량 50mg이었다. 그 결과 Table 2에 나타낸 것처럼, 아미노산 중에는 글루타민이 방해를 하였고, 핵산 중에는 시티딘과 2'-데옥시시티딘이 방해를 하였다.

Table 2. Selectivity coefficients of amino acid and nucleic acids for urea tissue sensor\*.

Substance	$K_{ij}^{pot}$
glutamine	0.07
cytidine	0.19
2'-deoxycytidine	0.26
glycine, tryptophane, lysine, arginine, valine, serine, tyrosine, cysteine, alanine, isoleucine, asparagine, leucine, methionine, phenylalanine, histidine, proline, threonine, adenine, adenosine, cytosine, guanosine, uracil, 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxyguanosine.	no response

\* tested in 0.20M phosphate buffer solution at pH 8.0, 37°C.

한편, *Proteus vulgaris* 박테리아를 암모니아 기체감응전극에 고정시키고, 요소를 정량할 때에는 아르기닌, 아스파라긴 등이 방해를 하였고<sup>7</sup>, CO<sub>2</sub> 기체감응전극에 고정시켰을 때에는 글루코스와 수크로스가 방해를 하였다.<sup>7</sup> 반면, Arnold 등<sup>3</sup>과 Uchiyama 등<sup>4</sup>이 식물조직을 써서 요소를 정량할 때에는 거의 방해가 없었다.

따라서 미생물을 사용한 방법보다도 식물조직을 사용한 방법에서 선택성이 좋아졌음을 알 수 있으며, 본 장미조직센서에서도 위 세 가지 화합물 외에는 거의 방해를 받지 않았다.

4. 4. 센서의 수명

요소조직센서가 어느 기간까지 유용하게 사용할 수 있는지를 찾기 위해, 요소 최적 실험조건에서 25일 동안 4°C로 냉장 보관하면서, 감응특성을 조사하여 Fig. 5에 나타내었다.

이 장미조직센서는 10일 이내에 요소의 농도가  $9.0 \times$

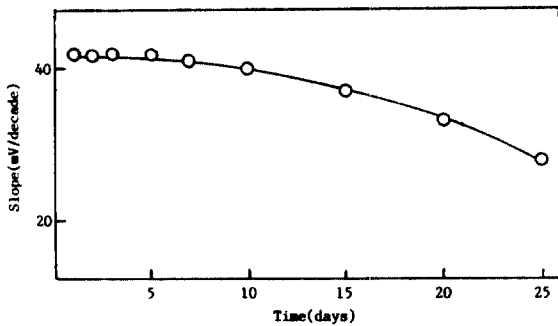


Fig. 5. Lifetime of tissue sensor for the determination of urea.

$10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 에서 직선감응 범위를 유지하고 있었으며, 감응기울기도 거의 차이가 없었다. 그러나 10일 이후에는 직선감응 범위가 약간씩 좁아졌고, 감응기울기도 뚜렷하게 감소하였다. 따라서 직선감응 범위에 거의 변화가 없고, 감응기울기는 약 5%의 오차를 가지는 10일까지를 센서의 수명으로 정하였으므로, 이 기간 동안은 유용하게 사용할 수 있으리라 생각된다.

본 장미조직센서의 수명은 10일로서 카네이션을 써서 요소를 정량할 때의 10일<sup>4</sup>과는 같았으나 jack bean meal을 써서 요소를 정량할 때의 64일<sup>3</sup>보다는 짧았고, 박테리아센서로 요소를 정량할 때의 7일<sup>7</sup>보다는 길었다.

## 5. 결론

본 연구에서는 *New carine* 장미를  $\text{NH}_3$  기체감응전극에 고정시켜 장미조직 바이오센서를 개발하고, 이 센서로 요소를 정량하기 위한 최적 실험조건을 조사하였다. 또한 선택성과 센서의 수명을 조사하였다.

장미조직센서로 요소를 정량할 때의 최적 실험조건은 pH가 8.0인 0.20M 인산염 완충용액에서 온도를

$37^\circ\text{C}$ 로 하고 조직량은 50mg을 썼을 때였다. 이 때에 요소의 농도가  $9.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 에서 직선감응 범위였으며, 감응기울기는 42mV/decade였다. 감응시간은 17~19분, 검출한계는  $7.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 이었다. 이 정량법에서 아미노산 중에서는 글루타민만이 방해하였고, 핵산 중에서는 시티딘 및 2'-데옥시시티딘이 약간 방해를 하였다. 모든 장미조직센서의 수명은 10일이었으며, 이 기간 내에는 직선감응 범위에 변화가 없었다.

결론적으로 본 연구에서는 요소를 정량하기 위한 장미조직센서를 개발하였다. 본 센서는 쉽게 구할 수 있는 장미조직을 이용하였으며, 또한 아미노산에 대한 선택성이 매우 좋은 장점이 있었다. 그러나 감응시간이 긴 단점이 있으므로 이에 대한 연구가 필요하다고 생각한다.

## 참고문헌

1. B. J. Vincke, M. J. Devleeschouwer and G. J. Patriarche, *Anal. Lett.*, **16**(B9), 673(1983).
2. G. S. Ihn, S. T. Woo, M. J. Sohn and R. P. Buck, *Anal. Lett.*, **21**(12), 1(1988).
3. M. A. Arnold and S. A. Glazier, *Biotech. Lett.*, **6**(5), 313(1984).
4. S. Uchiyama and G. A. Rechnitz, *Anal. Lett.*, **20**(3), 451(1987).
5. G. S. Ihn, B. W. Kim and Y. G. Jeon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **34**(6), 622(1990).
6. G. S. Ihn, C. K. Chung, B. W. Kim and Y. G. Jeon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **36**(2), 218(1992).
7. G. S. Ihn, B. W. Kim, M. J. Sohn and I. T. Kim, *J. Kor. Chem. Soc.*, **32**(4), 323(1988).
8. G. A. Rechnitz, M. A. Arnold and M. E. Meyerhoff, *Nature*, **278**, 466(1979).
9. Anthony P. F. Turner, Isao Karube and George S. Wilson "Biosensors", p. 54, Oxford University Press, New York, 1987.