

Glutamate Oxidase를 이용한 Glutamate 측정용 Biosensor의 개발

이영춘 · 이상현*

중앙대학교 식품공학과, *장안전문대학 식품영양학과

A Glutamate Oxidase-based Biosensor for the Determination of Glutamate

Young Chun Lee and Sang Hyun Lee*

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

*Department of Food and Nutrition, Jang-An Junior College

Abstract

The objective of this research was to develop a glutamate enzyme sensor for rapid determinations of glutamate in samples. Glutamate oxidase was immobilized onto activated nylon, chitosan and other membranes. The enzymic and nonactin membranes were attached to an ammonia electrode to detect ammonia generated by the reaction between glutamate oxidase and glutamate. The enzyme immobilized on activated nylon membrane was stable for 2 months, and was able to perform about 250 glutamate determinations without losing activities. The enzyme immobilized on chitosan membrane had higher enzyme activity, but was not as much stable as that immobilized on nylon. The glutamate biosensor was able to accurately determine 0.1~5 mM of glutamate in samples.

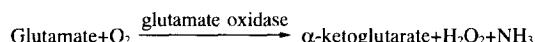
Key words: glutamate oxidase biosensor, glutamate determination

서 론

식품분야에서 biosensor는 식품의 성분을 간편하게 단시간에 분석하거나, 식품의 품질평가 또는 공정관리에 활용 가능하므로 개발과 이용에 있어 관심의 대상이 되고 있다. 여러가지 biosensor중에서 특히 효소 sensor가 가장 유망하며, 식품의 단일성분 분석에 효소 sensor가 실제로 활용되는 대표적인 예로 포도당과 에틸알콜 sensors를 들 수 있다^(1,2).

아미노산은 중요한 식품성분일 뿐만 아니라 동물세포 배양에 필수적이며, 발효방법에 의하여 공업적으로 생산되고 있다. 아미노산은 보통 아미노산 분석기 또는 HPLC 등을 이용하여 분석되는데, 이를 위하여 시료를 장시간 처리해야 하며 고가의 장비와 훈련된 인력이 필요하다. 반면에 효소 sensor를 사용하면 복잡한 전처리 과정을 거치지 않고 저렴한 장비로 단시간에 아미노산을 측정할 수 있는 장점이 있다. 지금까지 보고된 효소 sensor를 이용한 아미노산 분석은 lysine, tyrosine, glutamate에 한정되어 있는 실정이다^(4,5). Glu-

tamate는 glutamate oxidase에 의하여 다음과 같은 기작으로 분해될 수 있다.



따라서, 이 반응의 결과로 생성되는 H_2O_2 나 NH_3 를 biosensor로 측정하여 glutamate 함량을 측정할 수 있다.

본 연구에서는 암모니움 이온을 측정할 수 있는 암모니움 전극에 glutamate oxidase를 고정화하여 만든 효소 membrane을 부착하여, glutamate oxidase가 glutamate와 반응할 때 생성되는 암모니아의 양을 측정하여, glutamate 함량을 측정할 수 있는 효소 sensor를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 *Streptomyces sp.* 균원의 L-glutamate oxidase와 nonactin은 Sigma Chemical Co. (U.S.A.) 제품이었다. 효소의 고정화에 사용한 membranes 으로는 acetyl cellulose, chitosan, gelatin, cellulose triacetate 및 preactivated nylon (Pall Biosupport Division,

Glen Clove, NY)이었다. 그리고 효소의 고정 및 glutamate 분석에 사용한 시약은 분석용을 구입하여 사용하였다.

Enzyme membranes의 제조

Glutamate oxidase를 membranes에 고정화하여 enzyme membranes을 만드는데 Mulchandani 등⁽⁸⁾의 방법을 사용하였다. 선정된 membrane을 1.5 cm × 1.5 cm의 크기로 절단하여 직경 1 cm의 프라스틱 관의 끝에 팽팽하게 O-ring으로 고정시켰다. Glutamate oxidase와 bovine serum albumin (BSA, fraction V)의 혼합물과 glutaraldehyde (GA, 0.1~3% 용액)를 가하여 다리결합을 시작하고, 그 혼합용액을 절단한 membrane의 표면에 가하여 황색의 단단한 젤이 형성될 때 까지 실온에서 다리결합이 진행되도록 하였다. 이와 같이 얻은 enzyme membrane은 Tris-HCl buffer (50 mM, pH 8.5)로 세척하여 과잉으로 존재하는 GA를 제거하였다. 이것을 전극의 크기에 맞도록 둥글게 절단하여 Tris-HCl buffer (50 mM, pH 8.5)에 담가 4°C에서 저장하였다.

Ammonium selective nonactin-PVC membrane의 제조

암모니움 이온을 선택적으로 통과시키는 nonactin-PVC membrane은 Brown 등⁽⁹⁾의 방법에 의하여 만들었다. 즉, PVC 66 mg, adipic acid bis (2-methoxyethyl) ester 142 μL와 tetrahydrofuran 1 mL를 충분히 혼합한 후 직경 22 mm의 glass ring에 부어 성형하였다.

고정화 glutamate oxidase의 활성측정

Membrane에 고정화된 glutamate oxidase의 활성은 Cardenas 등⁽¹⁰⁾의 방법에 따라, glutamate oxidase가 glutamate와 반응할 때 생기는 H₂O₂의 농도는 다음과 같이 발색시키고 흡광도를 437 nm에서 측정하였다. 즉, 0.15 mM o-dianisidine, 0.5 mM glutamate, 0.38 unit의 horseradish peroxidase를 50 mM Tris-HCl buffer에 용해시키고, 여기에 enzyme membrane을 넣고 37°C에서 2분동안 20초마다 잘 혼합해 주었다. 반응은 enzyme membrane을 용액에서 제거하여 정지시켰고, 반응 후 얻은 용액을 cuvette에 옮겨 흡광도를 측정하였다.

Glutamate oxidase sensor의 조립 및 검정

Glutamate oxidase sensor의 구성은 Fig. 1과 같았다. 여기서 사용한 전극은 Orion sleeve type Ag/AgCl (Model 90-02)이었으며, 전극의 충전액은 0.1 M NH₄Cl 이

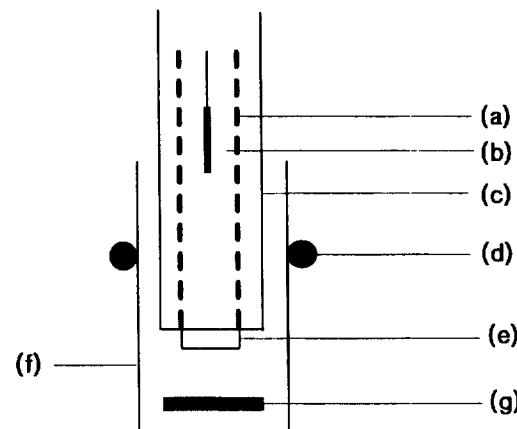


Fig. 1. Schematic diagram of enzyme electrode. (a) inner jacket; (b) 0.1 M NH₄Cl; (c) outer jacket; (d) O-ring; (e) nonactin-PV membrane; (f) cellulose membrane; (g) glutamate oxidase immobilized on nylon membrane.

었다. Ag/AgCl 전극에 nonactin-PVC membrane (e)을 밀착시키고, 그 외부에 enzyme membrane (g)을 정열한 다음, 가장 외부에 cellulose membrane (f)을 대고 O-ring으로 전극에 고정시켰다. Glutamate oxidase sensor를 pH-meter에 연결하고, 표준 암모니움용액에 대한 steady state response를 실온에서 millivolt (mV) 값으로 측정하였다. 암모니움 이온의 검량선은 암모니움 농도 10⁻⁵ ~ 10⁻¹ M의 회석 표준용액을 사용하여 작성하였다.

효소 sensor 및 HPLC 방법에 의한 glutamate 측정

Tris-HCl 200 mL (50 mM, pH 6.5)에 용해한 10⁻⁵ ~ 10⁻² M의 L-glutamic acid 용액에 효소 sensor를 담그고, 교반하면서 실온에서 2분 반응 후 mV를 측정하여 L-glutamate 농도의 검량선으로부터 L-glutamic acid 농도를 계산하였다. L-glutamate의 HPLC에 의한 측정은 reverse phase HPLC 방법⁽⁶⁾으로, Waters의 WISP 710B sample processor, C₁₈ column, gradient controller model 720, model 6000A solvent delivery system과 model 420 AC fluorescence detector를 사용하여 실시하였다.

식품중의 유리 L-glutamate 함량을 HPLC 와 glutamate sensor로 분석하여 glutamate sensor의 정확성을 평가하기 위하여 채더 치즈를 시료로 선택하였다. 냉동건조한 치즈를 bowl mill로 분쇄한 다음, 300 mg을 2 mL의 인산염 완충액(0.05 M, pH 8.0)에 혼합-용해한 후 0.45 μm membrane (Millipore)에 여과하였다. 여액을 인산염 완충용액 (pH 6.5)으로 회석하여 원하는 범위의 glutamate 함량이 되도록 회석하여 분석용시료로

사용하였다.

결과 및 고찰

효소 membrane의 최적 제조조건 선정

담체와 효소를 연결하는 가교제로 GA를 선정하여 glutamate oxidase를 여러가지 membranes에 고정화 하였으며, 이 때 BSA를 함께 사용하였다. 선정한 membranes에 사용할 GA의 최적 농도를 결정하기 위하여 0.1~3.0%까지 GA의 농도를 달리하면서 20~22°C에서 25분간 반응시킨 결과는 Fig. 2와 같았다. 즉, GA 0.25%에서 5종류의 membranes 모두 최고의 효소활성을 나타냈으며, 농도의 증가에 따라 효소활성이 급격히 감소하였다. 다섯가지 membranes 중에서 chitosan membrane이 가장 높은 활성을 나타냈으며, 그 외 것들의 효소활성은 cellulose acetate, gelatin, nylon, cellulose triacetate 순이었다. 이 결과를 기초로하여 최적 GA농도를 0.25%로 정하였다. Cattaneo 등⁽⁶⁾도 glutamate oxidase와 glutaminase를 동시에 고정화 시키는데 GA농도가 1%이상 증가하면 고정화 효소의 활성이 현저히 감소한다고 보고한바 있어, 이 연구의 결과와 일치하였다.

BSA를 0.2~2.0 mg 까지 변화시키면서 활성 2 units

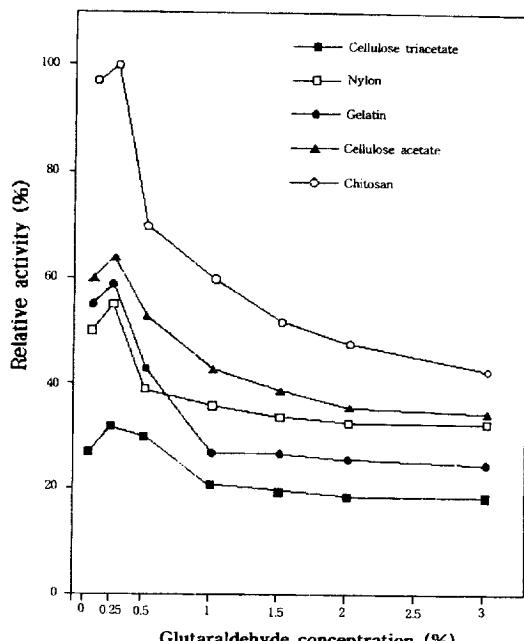


Fig. 2. Effect of glutaraldehyde concentration on the immobilization of glutamate oxidase.

에 상당하는 glutamate oxidase를 고정화하고(Table 1), 고정화 효소의 활성을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 즉, BSA 농도가 증가하면 고정화 효소의 활성이 증가하였다. 그런데 BSA 농도가 0.8 mg 이상이 되면 고정화 효소의 활성은 높았으나, BSA가 또 다른 막을 형성하여 투과성에 문제가 생겨 반응시간이 길어짐을 관찰할 수 있었다. 이를 고려하여 고정화 효소 활성도 비교적 높고, 투과성도 좋은 BSA 0.3 mg를 적합한 농도로 선정하였다.

L-Glutamate oxidase의 농도에 따른 고정화 효소의 활성을 조사한 결과는 Table 1과 같았다. 효소의 첨가

Table 1. Effect of glutamate oxidase concentration on the activity of immobilized enzyme

Enzyme conc. (unit)	Enzyme activity (A437)				
	Chitosan	Nylon	Gelatin	Cellulose acetate	Cellulose triacetate
0.2	0.034	0.020	0.019	0.018	0.017
0.4	0.048	0.026	0.027	0.021	0.019
0.6	0.070	0.034	0.048	0.036	0.024
0.8	0.084	0.055	0.069	0.069	0.037
1.0	0.093	0.069	0.075	0.088	0.041
1.5	0.117	0.090	0.097	0.101	0.043
2.0	0.153	0.095	0.107	0.113	0.051

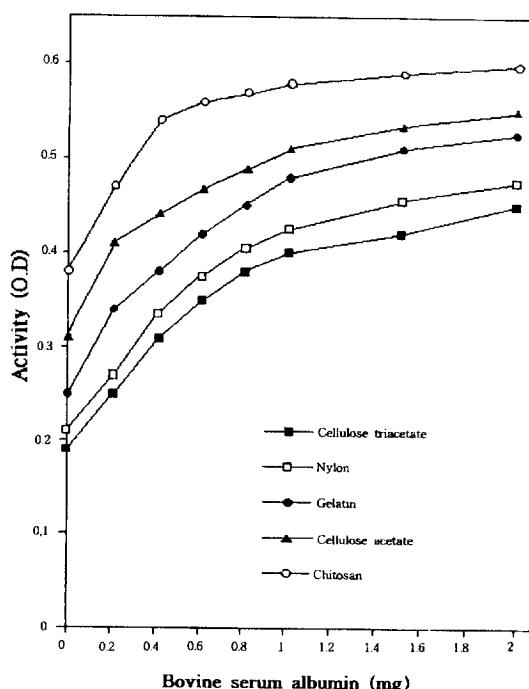


Fig. 3. Effect of BSA concentration on the immobilization of glutamate oxidase.

Table 2. Response time and relative activities of 5 enzyme membranes to 1 mM L-glutamate

Membranes	Chitosan	Nylon	Gelatin	Cellulose acetate	Cellulose triacetate
Response time (min.)	1.5	2.3	2.0	1.9	4.2
Relative activity (%)	100.0	62.0	69.9	73.8	33.3

량이 증가할 수록 5종류 효소 membranes의 활성이 모두 증가하는 경향을 보였다. 반응시간이 짧은 효소 sensor를 만들기 위해서는 활성이 높은 효소 membrane을 사용해야 하나, glutamate oxidase의 값이 비싼 점을 감안하여 최적수준은 아니었으나 2 units를 적정 수준으로 결정하였다. Cattaneo 등⁽⁶⁾도 glutamate oxidase 농도를 증가시키면 고정화 효소의 활성이 증가한다고 보고한바 있으며, 본 연구결과 보다도 3배 이상 높은 효소량을 사용하였다.

이상의 연구에서 선정된 최적 고정화 조건(GA 0.25 %, BSA 0.3 mg, L-glutamate oxidase 2 units)으로 효소 membranes을 만들어 이들의 상대적 활성과 반응시간을 측정한 결과는 Table 2와 같았다. 반응시간은 cellulose triacetate의 경우 약 4분으로 가장 길었고, chitosan membrane은 1.5분으로 가장 짧았고, 기타 membranes는 약 2분으로 별차이가 없었다. 그리고 담체 membrane의 종류별 고정화 효소의 상대적 활성을 보면, 효소활성이 가장 큰 chitosan을 100으로 잡았을 때 cellulose triacetate가 33.3으로 가장 낮았다. 따라서 효소 membranes의 반응시간은 고정화 효소의 활성에 비례함을 알 수 있었다. 이상의 결과로 보아 cellulose triacetate는 membrane으로 상대적 적합성이 낮았고, 짧은 반응시간을 위해서는 효소 사용량을 높혀야 함을 알 수 있었다.

pH와 효소 membranes의 활성

고정화된 glutamate oxidase의 pH 활성곡선은 Fig. 4와 같았다. Membranes의 종류에 상관 없이 최적 pH는 6.5이었다. 고정화 효소의 활성은 chitosan에서 가장 높았고, cellulose triacetate에서 가장 낮아, Table 2의 결과와 같은 경향을 보였다. Fig. 4의 결과는 Chen과 Su⁽¹¹⁾이 보고한 pH 7.0보다 약간 낮은 값이나, 이는 고정화 방법이 본 연구의 방법과 다른 때문인 것으로 사료되었다.

효소 membranes의 저장 안정성

제조한 효소 membranes중에서 가장 응용 가능성이

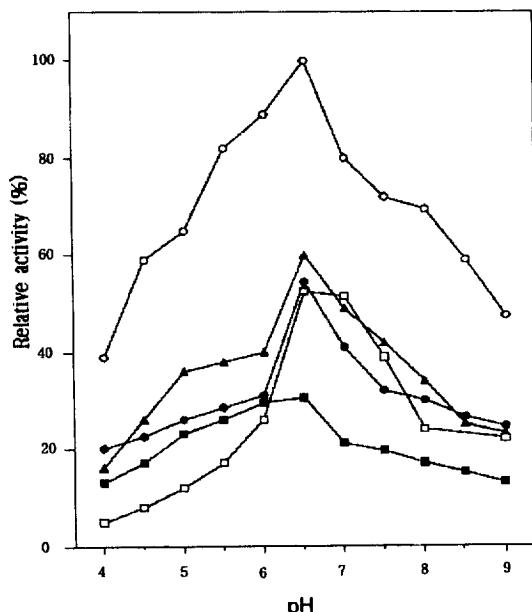


Fig. 4. Effect of pH on the activity of immobilized glutamate oxidase. □—□: Nylon, ■—■: Cellulose triacetate, ▲—▲: Cellulose acetate, ●—●: Gelatin, ○—○: Chitosan.

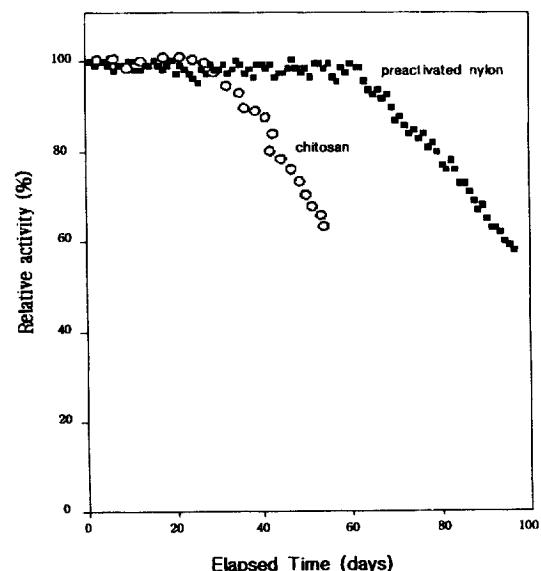


Fig. 5. Stability of glutamate oxidase immobilized on chitosan and activated nylon membranes during storage at 4°C.

있다고 생각되는 chitosan과 preactivated nylon으로 만든 효소 membranes을 선택하여 저장중 안정성을 평가하기 위하여 pH 6.5의 phosphate buffer (50 mM)에 담가 4°C에 저장하면서 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와

같았다. Chitosan membrane을 사용한 경우에는 35일간 90%이상의 효소활성을 유지할 수 있었다. 한편 preactivated nylon을 사용한 경우에는 약 60일간 90% 이상의 효소활성을 유지하였으며, 90일이 지나면 활성의 60%정도가 유지되었다. 이 결과를 기초로하여, chitosan 효소 membrane은 효소활성을 높지만 저장 안정성이 우수하지 못하여 preactivated nylon membrane으로 만든 효소 membrane으로 효소 sensor를 구성하기로 결정하였다.

Glutamate oxidase sensor의 구성

Fig. 4에서 본바와 같이 고정화 glutamate oxidase의 반응은 pH 6.5 부근에서 이루어지는 것이 가장 효율적인데, pH 6.5 부근에서는 효소반응 결과로 생기는 암모니아가 모두 암모니움 이온 상태로 존재하므로 암모니움 이온을 측정할 수 있는 sensor의 개발이 요구되었다. 이를 위하여 Fig. 1과 같이 nonactin-pvc membrane이 부착된 암모니움전극과 double junction Ag/AgCl 참조전극을 pH-meter에 연결하여 사용하였다. Fig. 1에서 전극의 가장 외부에 cellulose membrane을 부착한 것은 반응액중의 유기물질이 효소 membrane에 붙어서 감도가 떨어지는 것을 방지하기 위한 보호막이었다. Glutamate 함량측정은 시료 50 mL이상을 100 mL 비커에 넣고, 일정한 속도로 vortex mixing하면서 효소 sensor와 기준전극을 함께 담그고, pH-meter에서 steady state response의 mV를 읽어 표준곡선으로부터 계산하였다.

Glutamate oxidase sensor의 반응특성

Preactivated nylon membrane에 glutamate oxidase를 고정화하여 만든 효소 sensor를 사용하여 25°C, pH 6.5에서 여러 가지 농도의 L-glutamic acid를 첨가하여 검량선을 작성하였다(Fig. 6). 기질농도 0.1~5 mM 범위에서 Nernstian 반응을 보였으며, semilog paper 상에서 직선 비례관계를 나타냈다. 그리고 그 이상 또는 이하에서는 직선 비례관계가 성립되지 않아, 측정농도 범위를 0.1~5 mM로 정했다. 그리고 각 기질농도에서 반응시간을 측정한 결과는 Fig. 7과 같았으며, 2분이내에 반응이 정상상태에 도달하므로 측정시간을 2분으로 결정하였다. 이는 앞에서 설명한 Table 2의 결과와 일치하였다.

Glutamate sensor의 pH 및 온도 의존성을 알아보기 위하여 사용가능한 범위인 pH 4.0~7.0, 온도 10~40°C에서 1 mM 기질용액에 대한 반응시간을 각각 조사한 결과는 Table 3과 같았다. pH 5.0~7.0에서는 반응시간

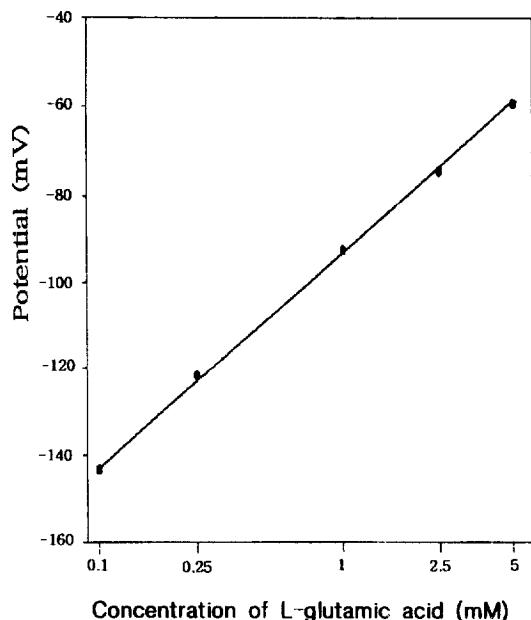


Fig. 6. Calibration curve of glutamic acid by glutamate sensor at pH 6.5, 25°C.

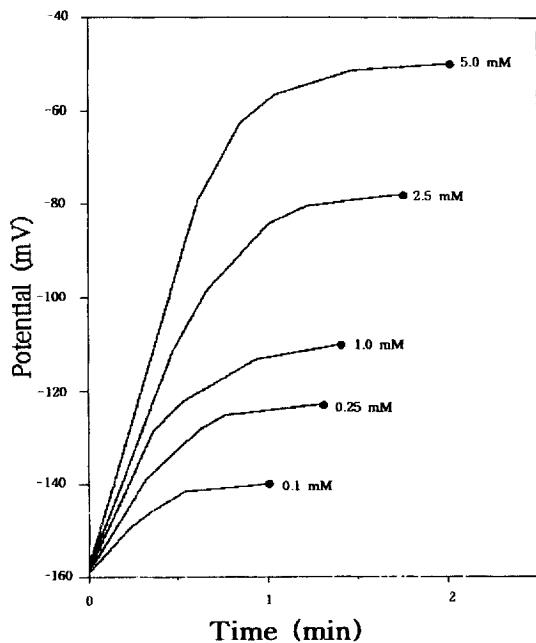


Fig. 7. Response curve of glutamate sensor for glutamic acid.

이 2분이내 이었고 그 밖의 pH에서는 반응시간이 늦어짐을 볼 수 있었다. 그리고 반응온도가 높아질수록 반응시간이 짧아졌는데, 이는 화학반응이 온도의 영향을 받는 일반적인 이론과 같다. 그러나 sensor의 사

Table 3. Effects of pH and temperature on the response time of glutamate sensor

pH*	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
Response time (min)	4.5	3.3	2.0	1.6	1.5	1.4	1.3	3.0
Temp. (°C)**	10	15	20	25	30	35	40	
Response time (min)	3.2	2.3	1.8	1.4	1.2	1.0	0.8	

*The reaction temperature was fixed at 20°C.

**pH was maintained at 6.5.

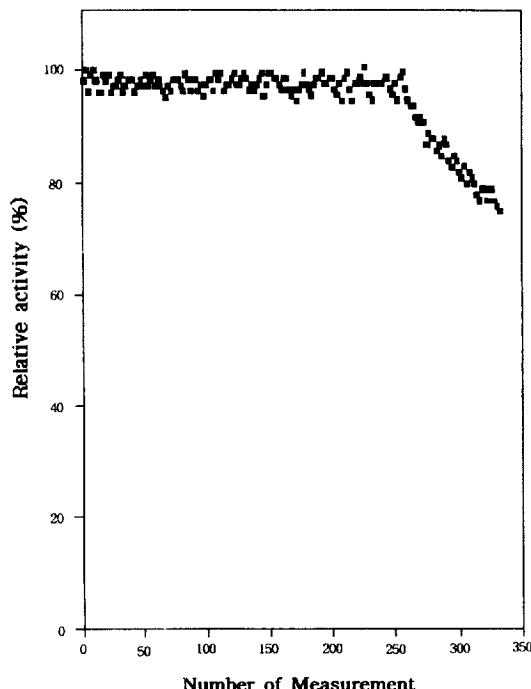


Fig. 8. Stability of glutamate sensor of activate nylon membrane with repeated measurements.

용수명 때문에 높은 온도에서 반응시키는 것은 좋지 않으며, 20°C 부근이 반응온도로 적당한 것으로 평가되었다.

Glutamate sensor의 반복사용에 대한 안정성을 평가하기 위하여 glutamate 측정조건에서 2일 간격으로 매번 5회씩 반복 사용하면서 20일간 안정성을 살펴본 결과는 Fig. 8과 같았다. 즉, 약 250회 측정 까지는 sensor의 효소활성에 별 변화가 없었으며, 측정횟수가 이를 초과하면 활성이 떨어져 반응시간이 길어졌다.

Glutamate 측정

Glutamate sensor의 정확성을 평가하기 위하여 체더 치즈의 L-glutamate 함량을 HPLC 및 glutamate sensor 방법으로 분석한 결과는 Fig. 9과 같다. 즉, 두 방법으로 측정한 값 사이에 유의성 있는 상관관계($r=0.995$)

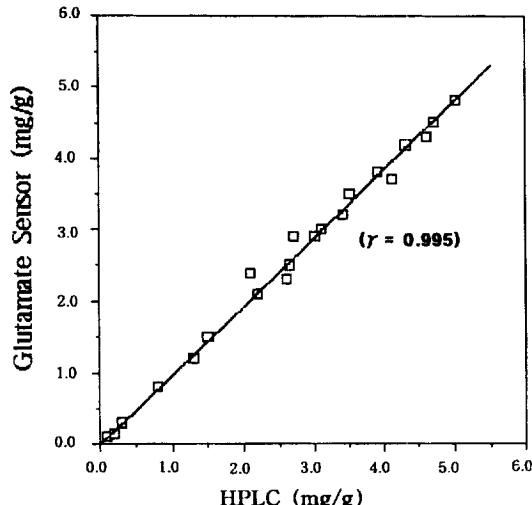


Fig. 9. Correlation of glutamic acid determinations in Cheddar cheese samples by glutamate biosensor and HPLC method.

가 존재함을 알 수 있었다. 따라서 개발된 glutamate sensor는 시료중의 L-glutamate 함량을 단시간에 상당히 정확하게 측정할 수 있다고 평가되었으며, 앞으로 식품중의 L-glutamate 측정이나 품질평가에 이용될 수 있다고 생각된다.

요약

L-Glutamate를 간편하고 단시간에 측정할 수 있는 glutamate sensor를 개발하기 위하여, glutamate oxidase를 여러 가지 membranes에 고정화 시키는데 적합한 조건과, 그 결과로 얻은 효소 membranes의 특성, 개발한 glutamate sensor의 반응특성 및 glutamate sensor의 정확성을 조사하였다. Glutamate oxidase를 membranes에 고정화하는데 GA 0.25%, BSA 0.3 mg, 효소 사용량 2.0 units이상이 적당하였다. 고정화 효소의 최적 pH는 6.5이었고, chitosan membrane을 사용한 경우 가장 효소활성이 높았다. 그러나 저장 안정성이나 반응시간 등을 고려하여 preactivated nylon에 고정화시킨 효소 membrane을 glutamate sensor 개발에 사용하였다.

Glutamate oxidase를 선택한 membrane에 고정화시켜 효소와 glutamate의 반응산물인 암모니아가 nonactin membrane을 이용한 암모니움이온 전극에 의하여 측정되도록 효소 sensor를 구성하였으며, sensor의 반응시간은 약 2분이었다. Preactivated membrane에 고정화된 효소는 4°C에서 2개월간 저장중 안정한 활성을 보였으며, 이를 사용한 glutamate sensor로 약 250회 측정할 때 까지 활성에 별 변화가 없었다. 개발된 glutamate sensor의 glutamate 측정 농도범위는 0.1~5 mM 이었다. Glutamate sensor를 체더 치즈중의 L-glutamate 측정에 응용한 결과는 HPLC로 분석한 결과와 높은 상관관계가 있어, 정확성이 인정되었다.

감사의 글

이 연구는 1993-95년도 한국과학재단에서 지원한 목적기초 연구의 일부이며, 연구비지원에 감사드립니다.

문 헌

- Karube, I. and Tamiya, E.: Biosensors for food industry. *Food Biotech.*, **1**(2), 147 (1987)
- Liang, D.G.: Biosensors for the food industry. *Food Australia*, 1989 (June), 799 (1987)
- Wagner, G. and Schmid, R.D.: Biosensors for food analysis. *Biotechnology*, **4**(1), 215 (1990)
- Mizutani, S., Ijima, S., Morikawa, M. and Matsubara, K.:

On-line control of glucose concentration using an automatic glucose analyzer. *J. Ferment. Technol.*, **65**, 325 (1987)

- Pfeiffer, D., Risinger, S., Wollenberger U., Johanson, G. and Scheller, F.W.: Amperometric amino acid electrodes. In *Biosensors-Applications in medicine, environmental protection and process control*. GBF Monograph vol.13, p.2 (1991)
- Cattaneo, M.V., Luong, J.H., and Mercille, S.: Monitoring glutamine in mammalian cell culture using an amperometric biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, **7**, 329 (1992)
- Simonian, A.L., Khachatrian, G.E., Tatikia, S.S., Avakian, T.M. and Badalian, I.E.: A flow-through enzyme analyzer for determination of L-lysine concentration. *Biosensors and Bioelectronics*, **6**, 93 (1991)
- Mulchandani, A., Male, K.B. and Luong, J.H.T.: Development of a biosensor for assaying post-mortem nucleotide degradation in fish tissue. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 739 (1990)
- Brown, R.B., Cha, G.S., Liu, D., Meyerhoff, M.E., Cantor, H.C., Midgley, A.R. and Goldberg, H.D.: Electrochemical performance, biocompatibility, and adhesion of new polymer matrices for solid-state ion sensor. *Anal. Chem.*, **63**, 1666 (1991)
- Cardenas, J., Piedras, P., Pineda, M. and Munoz, J.: Purification and characterization of an L-amino acid oxidase from Chlamydomonas reinhardtii. *Planta*, **188**, 13 (1992)
- Chen, C.-Y. and Su, Y.-C.: Amperometric L-glutamate sensor using a novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces platensis*. *Analytica Chimica Acta*, **243**, 9 (1991)

(1997년 3월 11일 접수)