

닌히드린 용액의 저온 건조에 의한 프롤린 검출을 위한 종이 기반 센서의 분해능 개선

김지관¹ · 최영수^{1,+}

Improved Resolution of Paper-based Sensor for Proline Detection by Low-temperature Drying of Ninhydrin Solution

Ji-Kwan Kim¹ and Young-Soo Choi^{1,+}

Abstract

In this study, we describe the improvement of the resolution of a paper-based sensor by fabricating a high-concentration ninhydrin part using a low-temperature drying method to detect proline with high resolution. In the conventional paper-based sensor for detecting proline, the ninhydrin part is fabricated at room temperature, and in this process, the ninhydrin solution spreads around the ninhydrin part. Therefore, the concentration of the ninhydrin part becomes lower than that of the applied solution, lowering the resolution of the sensor. The proposed paper-based sensor better improved the sensitivity of the sensor compared to the existing sensor by fabricating a high-concentration ninhydrin part through drying the ninhydrin solution using a low-temperature drying method. Owing to the experiment, the intensity of the green color of the paper-based sensor with the integrated ninhydrin part fabricated at 10 °C is approximately 20% lower than the paper-based sensor with an integrated ninhydrin part fabricated at room temperature, indicating better sensor resolution. Therefore, the paper-based sensor with an integrated ninhydrin part fabricated at a high concentration could be useful for diagnosing drought.

Keywords: Proline, Low-temperature drying, Proline-ninhydrin reaction, Paper-based sensor

1. 서 론

식물들은 성장과정에서 가뭄에 의한 스트레스에 영향을 받아 성장의 저해 및 생산량 감소 등의 문제가 나타나며 이러한 식물들의 가뭄을 진단하기 위한 바이오 마커로 현재 프롤린(Proline)이라는 아미노산을 주로 사용한다. 프롤린은 이차 아민으로 알파 아미노 그룹을 가진 환형의 아미노산으로 pH는 중성이며, 세포환경과의 높은 친화성을 갖는 화학적 성질을 갖는다[1]. 식물체 내에서 프롤린은 생체 내에서 신호전달분자로 작용하여 미토콘드리아 기능 조절 및 세포 사멸에 영향을 미치는 스트레스로부터 단백질을 보호하여 식물체 내에 내성을 갖게 하는데 중요한 역할을 한다[2-4]. 식물에게 있어서 가뭄은 세포의 분열과

팽창, 잎의 크기, 줄기의 신장 및 뿌리의 증식을 감소시켜 생물의 성장과 생장에 악영향을 끼치며 전 세계 농경지의 약 50%에 해당하는 지역에서 발생하고 있다. 그러므로, 가뭄은 작물의 생산량을 감소시켜 농가의 경제성을 저해시키는 주요 요인이므로 프롤린 검출을 통한 가뭄을 신속히 진단하는 것은 매우 중요하다[5-9].

현재 식물체 내에서 프롤린을 검출하는 방법으로 HPLC 기반 분석 방법, Isatin 종이 분석 방법, colorimetric 분석 방법 등이 있으며 이러한 방법을 사용하여 프롤린을 정량적으로 분석한다[10-13]. HPLC 기반의 분석 방법은 생물학적 샘플 내에 존재하는 다양한 아미노산을 넓은 범위에서 고감도로 측정할 수 있으나, 고가의 시약과 매우 정교한 측정 장비 및 숙련된 장비 사용자가 필수적이다. Isatin 종이 분석 방법은 비교적 쉽게 생물학적 샘플에 존재하는 많은 종류의 아미노산 중에서 프롤린만을 정량화할 수 있으며 많은 수의 샘플에서 프롤린을 함량을 분석하는데 적합하지만 프롤린 측정량의 범위가 제한적이어서 자주 사용하지 않는다. 프롤린-닌히드린(Proline-ninhydrin) 반응에 기반한 colorimetric 분석 방법은 간단하고 측정값의 신뢰도가 높으며 다른 방법에 비해 고가의 시약이 필요하지 않아 많은 실험실에서 주로 사용하는 프롤린 함유량을 결정하기 위한 표준

¹ 광주대학교 융합기계공학과(Department of Mechanical Convergence Engineering, Gwangju University)

Gwangju University, 277 Hyodeok-ro, Nam-gu, Gwangju 61743, Korea

⁺Corresponding author: memschoi@gwangju.ac.kr

(Received: Oct. 28, 2022, Revised: Nov. 7, 2022, Accepted: Nov. 10, 2022)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

방법이다. 그러나, 이 방법은 실험실 내에서 숙련된 인원에 의해서 프롤린 검출이 가능하고 스펙트로미터라는 고가의 장비가 필요하며 현장에서 사용하기가 어렵다는 단점을 가진다.

이러한 단점을 해결하기 위해서 비숙련자도 사용 가능하며 저가에 쉽고 간단하게 현장에서 적용 가능한 종이 기반 센서를 사용한 colorimetric 분석 방법이 제안되었다[14, 15]. 제안된 종이 기반 센서는 저가로 현장에서 간편하게

적용은 가능하지만 센서의 분해능이 낮다는 단점을 가지며 센서의 분해능이 낮은 이유는 다투드린부에 도포된 다투드린 용액이 다투드린부 주위로 퍼지는 현상이 발생하여 도포한 용액 대비 저농도가 되어 프롤린-다투드린 반응이 최적화되지 않기 때문이다. 그러므로, 종이 기반 센서의 분해능을 개선하기 위해서는 다투드린 용액을 다투드린부에 고농도로 도포할 수 있는 방법에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 프롤린을 고분해능으로 검출하기 위해서 저온 건조 방법을 활용한 고농도 다투드린부 제작에 의한 종이 기반 센서의 분해능 개선 및 특징을 분석하였다. 제안된 종이 기반 센서는 저온건조방법을 활용한 다투드린 용액의 건조를 통해 고농도의 다투드린부를 제작함으로써 기존의 센서 보다 센서의 분해능을 개선하여 기존 센서 보다 더 낮은 농도의 샘플을 분석할 수 있다는 장점을 가진다.

2. 연구 방법

2.1 프롤린 검출을 위한 종이 기반 센서의 설계 및 제작

본 연구에서 사용된 종이 기반 센서는 저자가 2019년에 출판한 논문에서 제안한 센서의 크기와 형태는 같으며 다투드린을 고농도로 도포하기 위해 다투드린을 도포하는 과정만 다르게 하여 센서를 제작하였다[14]. 가뭄을 현장에서 진단하기 위한 종이 기반 센서는 프롤린을 검출하기 위한 센서층과 샘플의 손실을 방지하기 위한 방수층 두 층으로 구성된다. Fig. 1(a)는 종이 기반 센서의 개략도를 보여준다. 기존의 다투드린부 제작시 상온에서 다투드린 용액을 다투드린 부에 도포한 다음 건조하여 제작하였으나 도포과정에서 다투드린 용액이 왁스 층을 뚫고 주위로 퍼지는 현상이 발생하여 도포한 용액 대비 저농도의 다투드린부가 제작되어 센서의 분해능이 감소하는 문제 발생하였다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 다투드린부 제작과정에서 다투드린 용액을 도포한 다음 건조하는 과정을 저온에서 진행하여 다투드린부를 고농도로 제작하여 센서의 분해능을 개선 하였다. 저온에서 다투드린부가 고농도로 제작된 이유는 용액들은 일반적으로 저온 환경에서 구 형태를 유지하려는 성질이 있기 때문에 저온 상태에서 다투드린 용액이 다투드린부에 도포 되었을 때 구 형태로 뭉쳐 있어 다투드린 용액이 주위로 퍼지지 않아 고농도의 다투드린부를 형성할 수 있었다. Fig. 1(b)는 왁스프린

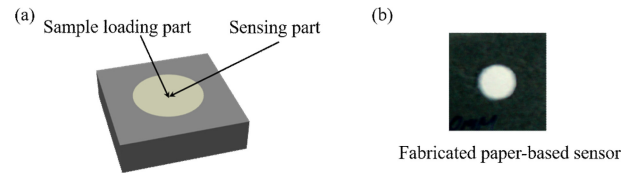


Fig. 1. A paper-based sensor for drought diagnosis: (a) schematic diagram of a paper-based sensor, (b) optical image of the fabricated paper-based sensor.

터를 사용하여 제작된 종이 기반 센서의 광학적인 이미지를 보여준다.

2.2 종이 기반의 센서의 구동 원리

가뭄을 진단하기 위하여 제작된 종이 기반 센서의 구동원리는 다음과 같다. 30 μ l의 샘플을 센싱부에 로드한 다음 평판가열기를 사용하여 110 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 가열한다. 측정하기 위한 샘플에 프롤린이 있다면 프롤린-다투드린 반응에 의해 센싱부의 색이 하얀색에서 자색으로 변하게 되며 색의 변화를 RGB 분석하여 프롤린의 검출 및 농도를 정량화 하였다.

2.3 시약 및 기구

프롤린을 정량적으로 측정하기 위한 센서를 제작하기 위해 다양한 시약이 사용되었다. 센서의 플랫폼으로 사용되는 Whatman Grade 1 CHR chromatography paper는 GE healthcare 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 ninhydrin reagent는 1.25 % ninhydrin (Sigma)을 포함하는 80 % glacial acetic acid(DUSAN pure chemicals)용액으로 제조하였다. 프롤린 농도의 정량화를 위하여 사용된 L-proline(Sigma)은 3 % aqueous sulfosalicylic acid(Bio BASIC CANADA INC.) 용액을 사용하여 Milli-Q water에 완전히 용해되도록 섞어서 사용하였다.

2.4 이미지 분석

제작된 종이 기반의 센서는 프롤린-다투드린 반응을 통한 센싱부에서 색의 변화를 사진 이미지로 얻어 Image J 프로그램을 사용한 RGB 분석을 통해 프롤린을 정량적으로 검출한다. 센서에서 프롤린을 농도에 따라 정확하게 검출하기 위해서 빛의 밝기가 일정하게 유지된 암실, 종이 센서의 센싱부를 찍기 위한 카메라 및 프롤린-다투드린 반응 동안 일정한 온도를 유지하기 위한 hot plate로 구성된 프롤린 측정시스템을 제작하였다. 제작된 측정 시스템을 사용하여 다양한 프롤린 농도에 대한 센싱부의 이미지를 얻었으며 RGB 분석을 통해 농도에 따른 Green color intensity의 변화를 측정하여 프롤린 농도를 정량화 하였다. 사진 이미지 분석에 있어서 RGB 중 Green color intensity만 분석한 것은 이미지 분석했을 때 세 가지 색 중 Green color intensity 변화가 가장 크므로 프롤린을 농도에 따라 정량화가 쉽기 때문

이다. 측정의 정확성을 위해 동일 샘플에 대한 Green color intensity 분석은 3번 반복을 통해 얻었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 닐히드린 용액의 건조 온도가 센서의 분해능에 미치는 영향 분석

닐히드린 용액의 건조 온도가 센서의 분해능에 미치는 영향을 분석하기 위해서 닐히드린 용액의 건조 온도를 20 °C, 10 °C, 5 °C로 다르게 설정하여 센서들을 제작하였다. 최적의 실험 결과를 얻기 위해 종이센서에서 프롤린-닐히드린 반응을 최적화 필요가 있었으며 저자가 출판한 2019년도 논문을 참고하여 샘플량과 닐히드린량의 비율은 1:2, 프롤린-닐히드린의 반응 온도 및 시간은 110 °C, 3분으로 설정하였다[14].

위의 내용을 바탕으로 실험에서 사용한 샘플의 양은 30 µl, 센서에 미리 도포한 닐히드린 양은 60 µl, 샘플에서 프롤린의 농도는 50 mM로 고정한 상태에서 다양한 닐히드린 용액의 건조 온도에서 제작된 센서를 사용하여 센싱부의 색의 변화를 분석하였다. Fig. 2는 닐히드린 용액의 건조 온도에 따라 제작된 센서의 센싱부에서 Green color intensity를 보여준다. 실험결과, 5 °C 및 10 °C 닐히드린 용액의 건조 온도에서 제작된 종이센서에서 Green color intensity가 오차범위 내에서 비슷하게 가장 많이 감소되었으며 색의 변화가 가장 크므로 센서의 분해능이 우수함을 알 수 있었다. 닐히드린 용액의 건조 온도 20 °C에서 제작된 종이센서는 5 °C, 10 °C에서 제작된 종이센서와 비교하여 Green color intensity 변화가 약 20 % 정도 작게 감소함을 알 수 있었다. 5 °C, 10 °C에서 제작된 종이센서의 분해능이 증가한 이유는 액체가 저온 환경에 있을 때 구 형태를 유지하려는 성질이 있어 닐히드린 용액을 닐히드린부에 도포하고 건조할 때 닐히드린 용액이 주위로 퍼지지 않고 닐히드린부에 그대로 흡

수되어 닐히드린부의 농도가 증가하였기 때문이다.

그러므로, 샘플에서 프롤린의 농도를 고분해능으로 정밀하게 분석하기 위해서는 종이센서 제작시 닐히드린 용액의 건조 온도를 10 °C의 저온에서 진행해야 센서의 분해능이 최적화됨을 알 수 있다.

3.2 샘플량과 닐히드린량의 비율이 종이센서의 분해능에 미치는 영향 분석

저자가 2019년도에 출판한 논문에서 제안했던 종이센서의 닐히드린부에서 닐히드린 함유량과 닐히드린 용액을 저온 건조과정을 통해서 제작했던 닐히드린부의 닐히드린 함유량이 다르므로 샘플량과 닐히드린량의 비율 최적화를 위해 샘플량과 닐히드린량의 비율이 종이센서의 분해능에 미치는 영향에 대해서 실험하였다[14]. 실험에서 사용한 샘플의 양은 30 µl 고정하고 센서에 코팅한 닐히드린 양은 30 µl, 60 µl, 90 µl 세 가지 조건으로 설정하였다. 샘플의 프롤린 농도는 50 mM로 고정한 상태에서 반응온도 110 °C에서 3분 동안 반응시킨 후 센서에서 색의 변화를 측정하였다. Fig. 3은 종이센서의 분해능을 최적화하기 위해서 샘플량과 닐히드린량의 비율에 따른 Green color intensity의 변화를 보여준다. 실험결과 샘플량과 닐히드린량이 1:2의 비율에서 Green color intensity 값이 가장 많이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며 이는 센싱부에서 색의 변화가 가장 크므로 센서의 분해능이 우수함을 알 수 있다. 샘플량과 닐히드린량의 비율이 1:1에서는 닐히드린량이 부족하여 프롤린이 완전히 반응하지 못해서 Green color intensity 값의 감소가 작아서 분해능이 낮다. 또한, 1:3비율에서는 닐히드린량이 많아 센싱부에 프롤린과 반응하지 못한 하얀색 닐히드린이 침전되어 1:2 비율에 비해 센서의 분해능이 감소하고 경제성이 떨어지는 문제점을 가진다.

위의 실험결과로부터 가뭄을 진단하기 위한 종이센서는 샘플량과 닐히드린량이 1:2의 비율에서 센서의 분해능이 가장 우수함을 알 수 있다.

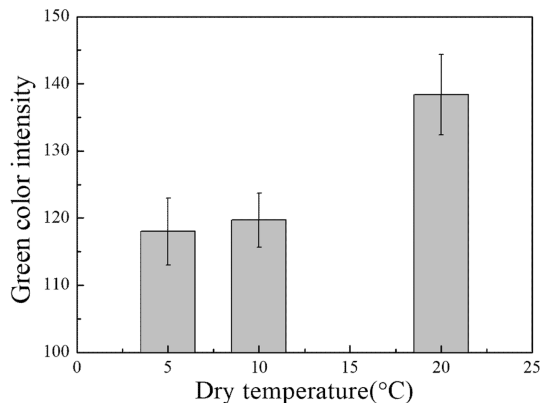


Fig. 2. Green color intensity at the sensing part of the sensor fabricated according to the drying temperature of the ninhydrin solution.

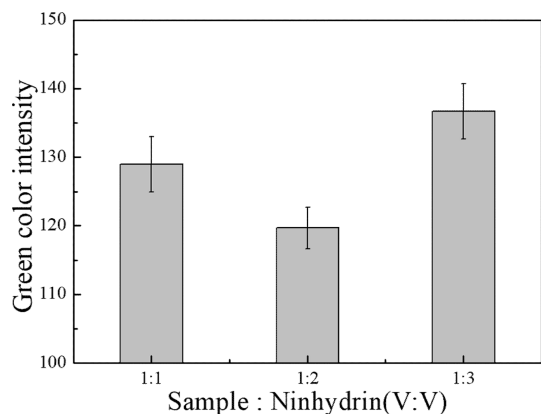


Fig. 3. Change in green color intensity in relation to distinct sample-to-ninhydrin ratio.

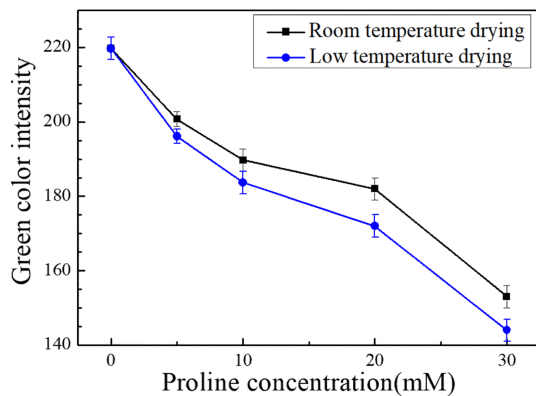


Fig. 4. Changes in green color intensity in the sensor according to various proline concentration loaded into the paper sensor.

3.3 최적화된 종이센서를 사용한 프롤린의 정량적인 분석

위의 실험결과들을 기반으로 최적화된 종이센서를 제작하였으며 이를 사용하여 다양한 농도를 가진 프롤린에 대한 색의 변화를 RGB분석을 통해서 정량화 하였다. 실험에서 사용한 프롤린 농도 범위는 0부터 30 mM까지이며 샘플의 양은 30 μ l, 반응 온도는 110 $^{\circ}$ C, 반응시간은 3분으로 설정하였으며 닐히드린 용액을 상온에서 건조한 센서[14]와 닐히드린 용액을 10 $^{\circ}$ C에서 건조한 센서 두 가지를 사용하여 실험을 하였다. Fig. 4는 종이 센서에 로드한 프롤린 샘플의 농도에 따른 Green color intensity의 변화를 보여준다. 실험결과 프롤린의 농도가 증가할수록 센싱부에 색이 진한 자색으로 변하여 Green color intensity 값이 감소하였으며 두 가지 센서 중에서는 10 $^{\circ}$ C에서 닐히드린 용액을 건조해서 제작된 센서가 분해능이 더욱 우수함을 알 수 있었다. 프롤린 농도가 30 mM일 때 비교 분석해 보면 닐히드린 용액을 상온에서 건조한 종이센서[14]의 Green color intensity의 값은 156 이었으며 닐히드린 용액을 10 $^{\circ}$ C에서 건조한 종이 센서의 Green color intensity 값은 144로 닐히드린 용액을 10 $^{\circ}$ C에서 건조한 종이센서에서 Green color intensity 값이 상온에서 건조된 종이센서[14] 보다 약20 % 감소하는 것을 알 수 있었다.

그러므로, 식물에서 프롤린 분석을 통해 가뭄을 진단할 때 사용되는 종이 센서는 더욱더 정밀하고 고분해능으로 분석하기 위해서는 닐히드린부를 저온 건조를 통해서 제작해야 함을 알 수 있다.

4. 결 론

본 논문에서는 프롤린을 고분해능으로 정밀하게 검출하기 위해서 저온건조 방법을 활용한 고농도 닐히드린부 형성에 의한 종이 기반 센서의 제작 및 분해능 개선에 대해서 나타낸다. 제안된 센서는 왁스프린팅방법 및 닐히드린 용액의 저온 건조 방

법을 사용하여 간단하게 제작하였으며 제작된 센서의 성능 평가는 다양한 농도를 가진 프롤린 샘플을 센싱부에 놓고 프롤린-닐히드린 반응 통해서 나타나는 센싱부의 색 변화를 RGB중 Green color intensity 변화를 분석하여 나타내었다. 또한, 닐히드린 용액의 건조 온도 및 샘플량과 닐히드린량의 비율이 센서의 분해능에 미치는 영향을 분석하였다. 실험결과 10 $^{\circ}$ C에서 제작된 닐히드린부가 집적화된 종이 기반 센서가 상온에서 제작된 닐히드린부가 집적화된 종이 기반 센서보다 Green color intensity 값이 약 20 %가 작았으며 센서의 분해능이 더 우수하다는 것을 알 수 있었다. 그러므로, 저온 건조방법을 활용하여 고농도 제작된 닐히드린부가 집적화된 종이 기반 센서는 고분해능으로 정밀하게 프롤린 검출이 가능하므로 현장에서 가뭄을 진단하는데 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

감사의 글

This research was supported by the National Research Foundation of Korea(NRF)(2021R1F1A1063713).

REFERENCES

- [1] L. Szabados and A. Saviouré, "Proline: a multifunctional amino acid", *Trends plant Sci.*, Vol. 15, No. 2, pp. 89-97, 2010.
- [2] P. B. K. Kishor, P. H. Kumari, M. S. L. Sunita, and N. Sreenivasulu, "Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny", *Front Plant Sci.*, Vol. 6, p. 00544, 2015.
- [3] S. Hayat, Q. Hayat, M. N. Alyemeni, A. S. Wani, J. Pichtel, and A. Ahmad, "Role of proline under changing environments environments", *Plant Signal Behav.*, Vol. 7, No. 11, pp. 1456-1466, 2012.
- [4] P. B. K. Kishor, S. Sangam, R. N. Amrutha, P. S. Laxmi, K. R. Naidu, K. R. S. S. Rao, S. Rao, K. J. Reddy, P. Theriappan, and N. Sreenivasulu, "Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance", *Curr. Sci.*, Vol. 88, No. 3, pp. 424-438, 2005.
- [5] H. M. Akram, A. Ali, A. Sattar, H. S. U. Rehman, and A. Bibi, "Impact of water deficit stress on various physiological and agronomic traits of three basmati rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars", *J. Anim. Plant. Sci.*, Vol. 23, No. 5, pp. 1415-1423, 2013.
- [6] P. Thakur, S. Kumar, J. A. Malik, J. D. Berger, and H. Nayyar, "Cold stress effects on reproductive development in grain crops: An overview", *Environ. Exp. Bot.*, Vol. 67, No. 3, pp. 429-443, 2010.
- [7] S. I. Zandalinas, R. Mittler, D. Balfagón, V. Arbona, and A. Gómez-Cadenas, "Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures", *Physiol. Plantarum.*, Vol.

- 162, No. 1, pp. 2-12, 2018.
- [8] R. Mittler and E. Blumwald, "Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives", *Annu. Rev. Plant. Biol.*, Vol. 61, No. 1, pp. 443-462, 2010.
- [9] J. S. Boyer, "Plant productivity and environment", *Science*, Vol. 218, No. 4571, pp. 443-448, 1982.
- [10] E. Abrahám, C. Hourton-Cabassa, L. Erdei, and L. Szabados, "Methods for determination of proline in plants", *Methods Mol. Biol.*, Vol. 639, pp. 317-331, 2010.
- [11] G. Noctor and C. H. Foyer, "Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione", *Anal. Biochem.*, Vol. 264, No. 1, pp. 98-110, 1998.
- [12] I. Smith, "Colour reactions on paper chromatograms by a dipping technique", *Nat.*, Vol. 171, pp. 43-44, 1953.
- [13] F. P. Chinard, "Photometric estimation of proline and ornithine", *J. Biol. Chem.*, Vol. 199, No. 1, pp. 91-95, 1952.
- [14] Y. S. Choi, M. R. Lee, C. S. Kim, and K. H. Lee, "Detection of proline using a novel paper-based analytical device for on-site diagnosis of drought stress in plants", *Rev. Sci. Instrum.*, Vol. 90, No. 4, p. 045002, 2019.
- [15] Y. S. Choi, M. K. Im, M. R. Lee, C. S. Kim, and K. H. Lee, "Highly sensitive enclosed multilayer paper-based microfluidic sensor for quantifying proline in plants", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 1105, pp.169-177, 2020.