

## ATPase 센서를 이용한 어류근육 단백질의 $K^+$ -, $Ca^{2+}$ - 및 $Mg^{2+}$ -ATPase 활성의 측정

†천 병 수 · \*김 회 경 · \*이 응 호 · 와다나베 에쓰오  
동경수산대학 식품생산학과, \*부산수산대학 공과대학 식품공학과

### Determination of $K^+$ -, $Ca^{2+}$ - and $Mg^{2+}$ -ATPase activities in Fish Muscle Protein by ATPase Biosensor

Byung-Su Cheun<sup>†</sup>, Hee-Kyung Kim\*, Eung-Ho Lee\*, and Etsuo Watanabe

Dept. of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, Tokyo 108, Japan

\*Dept. of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

#### ABSTRACT

The sensor to determine ATPase activities was consisted of an immobilized enzyme membrane (purine nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase) and an oxygen electrode. The proposed sensor was used for the determination of  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ -ATPase activities in several fish muscle proteins such as *Thunnus albacares* (Yellowfin tuna), *Tetrapturus audax* (Striped marlin), *Prognichthys ago* (Japanese flyingfish), and *Cyprinus carpio* (Carp).  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ -ATPase activities measured by the proposed sensor system were in good agreement with the results obtained by a conventional colorimetric assay. One cycle of assay could be completed within 3minutes.

#### 서 론

어류는 한대에서 열대까지 넓은 온도 범위에서 분포하고, 수온, 염도 등의 여러 가지 환경조건에 적응하면서 살아간다. 이러한 적응의 기작중에서 ATPase 활성은 근육단백질의 열 안정성 등의 적응도를 조사할 때 유용한 지표가 된다.

미오신은 ATPase 활성 및 ATP 분해 능력을 가지고 있지만, 미오신의 ATPase 활성 표현에는  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  및  $Mg^{2+}$ 의 각 이온이 필요로 하고, 그 이온의 종류에 의해서 활성 표현이 크게 틀린 특수의 성질을 표현하게 된다. 예를 들어, pH, 온도 그리고 액

틴 등의 영향을 받게 된다(1). 본 연구에서는 이렇게 활성표현이 크게 틀린 특수한 성질을 가짐에도 불구하고 지금까지  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  및  $Mg^{2+}$ -ATPase 측정을 하는데는 비싼 기계의 사용으로 인한 NMR 측정법, 또 전처리를 필요로 하고 고가의 분석 기계를 필요로 한 비색측정법 등이 이용되고 있지만, 이러한 복잡한 과정을 극복하기 위해서 많은 바이오 센서에 관해서 학자들이 ATPase 센서의 개발에 중점을 두고 많은 연구가 진행되고 있다. 본 연구자들이 개발한 이 센서는 혈액, 어류근육 등의 ATPase 양을 효과적으로 측정할수 있는 것으로 평가되고 있다. 따라서, 그 이온의 특수성에 따른 KCl 농도의 변화를 이용하여 간단, 신속, 경제적인 관점에서 발표자들이 개발한 ATPase 센서를 사용하여 어류근육중의  $K^+$ ,

† Corresponding Author

Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>-ATPase를 측정했다.

Ca<sup>2+</sup>-ATPase의 활성은 Ca<sup>2+</sup>-ATPase의 활성을 측정하기 위해서는 Ca<sup>2+</sup> 수 mM이 필요하며 ATP의 친화력에는 그다지 영향을 주지 않으므로, KCl 농도에 의한 활성의 측정이 가능하나, Ca<sup>2+</sup>-ATPase 활성에는 액틴의 영향은 받지 않는다. 또 K<sup>+</sup>-ATPase의 활성은 고농도의 K<sup>+</sup> 이온 0.5M가 필요하게 되므로, 일반적으로 EDTA를 첨가해서 측정할 수 있으므로 이것을 EDTA-ATPase라고 하며, 이것은 액틴에 의해 활성이 크게 저해된다.

Mg<sup>2+</sup>-ATPase 활성은 단독으로는 미량의 활성만 측정 가능하고, Ca<sup>2+</sup>-ATPase의 1/100 정도의 활성치를 보이지만, 0.1M KCl 이하의 조건에서는 액틴에 의해서 활성화 되며, Ca<sup>2+</sup>-ATPase에서 보여 주는 그 이상의 활성을 보인다.

생체내에서는 mM 단위의 미량 Mg<sup>2+</sup> 이온이 존재하지만, 미오신은 그 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 형태로 작용하고, 액틴에 의해서 활성화 되며 근수축에 필요한 에너지를 생산한다. 즉, 3종류의 ATPase 활성을 잘 조합해서 어류근육 단백질의 변성을 해석한 예로는 액토 미오신의 염 변성이 있다(2-4). 또한, 3종류의 ATPase 활성을 측정함으로써 각 어류근육 단백질의 변화를 알 수 있으며, 근육안에 존재한 액토 미오신에서 발생할 수 있는 단백질 변성의 모양과 정도 등을 예측할 수가 있다(5-6).

본 연구는 기존에 발표된 건강관리를 목적으로 개발한 ATPase 활성 측정용 센서를 이용해서 어근육 단백질의 K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 활성 측정을 식품관리의 관점에 적용하고자 하는 목적에서 실험하였다.

## 재료 및 방법

### 재료의 선정

본 실험의 재료로서 *Thunnus albacares*(Yellowfin tuna), *Tetrapturus audax*(Striped marlin), *Prognichthys agoo*(Japanese flyingfish) 그리고 *Cyprinus carpio*(Carp)를 이용하였으며, 전부 시장에서 구입한 재료를 -30℃에서 냉동 보존한 것을 이용하였다.

본 실험에 사용된 시약으로 purine nucleoside phosphoryrase(NP)와 xanthine oxidase(XOD)는 Boehringer Mannheim제를 사용하였고, inosine, ATP, ATPase, EDTA는 Sigma 제품을 사용하였으며, 50% glutaraldehyde, triacetyl cellulose, 1.8

-diamino-4-aminomethyloctane 등은 동경화성(일본), CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl 등은 국산화(일본)제품을 본 실험에 사용하였다.

### ATPase 활성 측정용 재료의 조제

10g의 어육을 가지고 약 2배가량의 5mM EDTA를 첨가해서 믹서로 잘게 분절한 뒤, 원심분리(3,000 rpm, 15분)후, 그 침전 물질에 0.65M KCl 120mL를 첨가하여 원심관에 옮기고, 증류수를 150mL까지 첨가한 후 다시 잘게 분절한 뒤, 다시 동일하게 원심분리를 하고, 그 상등액을 Ca<sup>2+</sup>-ATPase, Mg<sup>2+</sup>-ATPase 활성 측정용 재료로 사용하였다. 그러나, K<sup>+</sup>-ATPase 활성 측정용 재료 조제에는 먼저 2M KCl에 10℃에서 5분간 방치한 재료를 이용했다.

### Triacetyl Cellulose막을 함유한 1.8-diamino-4-aminomethyloctane(Triamine막) 조제

Triacetyl cellulose 250mg을 10mL의 dichloromethane에 용해한 후, 50% glutaraldehyde 200mL를 첨가해서 혼합시켰다. 균일하게 된 것을 확인한 후, triamine을 서서히 가하면서 잘저었다. 이것을 그라스 판위에서 균일하게 넓게 펼쳐서 48시간이상 20℃의 암냉소에 방치 건조하였다. 건조 후, 약 0.7cm × 0.7cm 크기로 절단한 뒤 물을 가해서 그라스 위의 막을 탈리시켰다. 이 막은 잘 씻은 뒤, 증류수에 넣어서 5℃로 보존하였다.

### 효소의 고정법

Triamine 막을 pH 7.8, 0.05M 인산 완충액으로 잘 씻은 뒤, 0.15% glutaraldehyde 용액(0.05M Tris-HCl; pH 8.4, 30mL) 중에서 4~5장을 30℃로 2시간 동안 침적시켰다. 그 후, 수회에 걸쳐 0.05M 인산 완충액으로 잘 세척하였다. 다음에 triamine 막만을 바이엘 병에 옮겨서 purine nucleoside phosphoryrase(NP) 50 unit, xanthine oxidase(XOD)100 unit를 함유시킨 뒤, 0.05M 인산 완충액(pH 7.8) 3mL에 30분간 실온에 침적시켰다. 이 효소 고정막은 그대로 5℃로 보존하였다.

### 산소전극의 제작 및 측정 장치

전극은 carbony 전지식 침적형 산소 전극을 이용했다. 전극 선단부에 purine nucleoside phosphoryrase(NP)로 xanthine oxidase(XOD)고정화 효소막을 부착시킨 뒤, 그 위에 투석막을 씌우고 ATPase 활성 측정용 효소 전극을 제작 했다. 측정장치로서

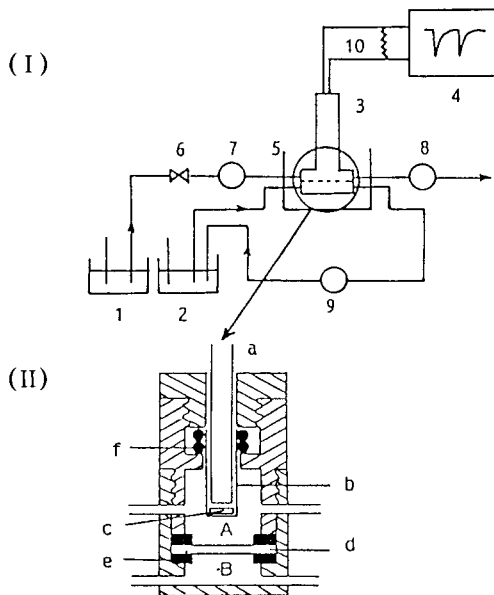


Fig. 1. Schematic diagram of the enzyme sensor system for the determination of  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{K}^{+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activities. (I) Sensor system, 1. Tris-HCl Buffer (pH 7.0), 2. Substrate tank; ATP (0.04mg/mL),  $\text{Ca}^{2+}$  5mM, KCl 0.1M for  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity; ATP (0.04mg/mL),  $\text{K}^{+}$  0.5M KCl 0.6M for  $\text{K}^{+}$ -ATPase activity; ATP (0.04mg/mL),  $\text{Mg}^{2+}$  2mM, KCl 25mM for  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity; 3. Oxygen electrode; 4. Recorder, 5. Thermostatically controlled bath, 6. injection port, 7-9. Peristaltic pump, 10. Resistance (2K $\Omega$ ). Flow rate conditions were 0.4mL/min (8) and 0.6mL/min (9), respectively. (II) Magnification of the flow cell, a. Oxygen Electrode, B. Triacetyl cellulose membrane, c. Enzyme, d. Dialysis membrane filter, e. Teflon rubber, f. Rubber ring. The interior of the flow cell is separated into A and B portions by the membrane.

는 Fig. 1과 같이 제작한 ATPase 활성 측정용 센서를 이용했다. 측정조건 또한 동일한 조건으로 설정하였다.

#### 측정방법

본 연구에서는 페리스타 펌프 (Peristaltic Pump) 를 이용해서 0.1M Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)과 기질을 flow cellulose 안에 이송시켜, 센서의 출력치가

안정된 상태에서 먼저 조절된 시료를 주입, 출력 전류 감소치로부터 ATPase 활성을 측정하였다.

종래에 사용되어온 비색 측정법은, 원심 분리시켜서 얻어진 어근육 상등액 1mL에 ATP 1mL와 물 1mL를 첨가시켜 25 $^{\circ}\text{C}$ 로 5분간 잘 섞어서 10% trichloroacetic acid 1mL를 첨가해 반응을 정지시키고, 여기로부터 1mL를 시험관에 옮긴 뒤, 물 2.5mL를 다시 첨가한 후, 발색액 elon시약 0.5mL, lactic molybdenum 1mL를 첨가, 640nm의 흡광도를 물을 사용하여 대조 측정하였다. 반면, 시료 1mL에 10% trichloroacetic acid 1mL를 첨가해 반응을 정지시킨 후, 동시에 ATP 1mL를 넣어 상기와 동등하게 물 1mL를 첨가, 25 $^{\circ}\text{C}$ 로 5분간 잘 섞은 뒤, 여기서 1mL를 가지고 발색시켜 640nm에 흡광도 측정을 하였다.

본 연구에서는,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 활성 측정에는 ATP와  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 5mM, KCl 농도를 0.1M로 조절해서 측정했으며,  $\text{K}^{+}$ -ATPase 활성 측정에는 똑같은 방법으로  $\text{K}^{+}$  농도를 0.5M, KCl 농도를 0.6M로 하고,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 활성 측정에는  $\text{Mg}^{2+}$  농도 2mM, KCl 농도 25~50mM로 각기 기질측에 조절을 해서 Tris-HCl을 이송시켜 시료를 주입하여 측정을 하였다. 이 센서 시스템은 Fig. 1과 같이 제작하였다.

#### 센서 측정조건

효소 센서는 사용하는 용도에 따라서 그 최적 조건하고, 또 영향을 미치는 요인으로는, 완충액의 pH, 온도, 유속, 기질의 온도 등을 설정할 필요가 있지만, 이번 실험에서는 기존 발표한 조건과 그다지 유의한 차이를 나타내지 않았으므로 똑같이 설정하여 실험에 적용하였다.

즉, 완충액 0.1M Tris-HCl을 사용해서, pH 7.0, 온도는 32 $^{\circ}\text{C}$ , 이송액 주입구 유속으로는 0.4mL/m, 출구 유속은 0.6mL/m, ATP 농도는 0.04mg/mL 등은 똑같이 설정하였고, 다만, 0.5mM  $\text{K}^{+}$ -0.06M KCl, 5mM  $\text{Ca}^{2+}$ -0.1M KCl, 그리고 2mM  $\text{Mg}^{2+}$ -25mM KCl을 각기 첨가해서 어근 단백질 중의  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase,  $\text{K}^{+}$ -ATPase 및  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 활성을 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 센서의 응답성

시료는 flow cellulose 안에서 기질의 ATP하고

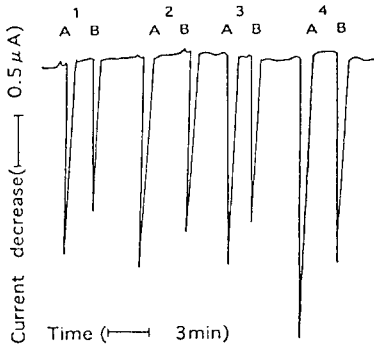


Fig. 2. Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. 1. Carp, 2. Japanese flyingfish, 3. Yellowfin tuna, 4. Striped marlin A: No treatment, B: Treatment with 10% TCA.

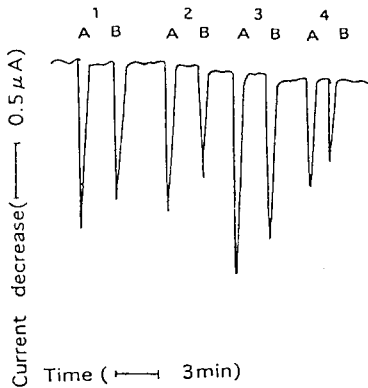


Fig. 3. K<sup>+</sup>-ATPase activity. 1. Striped marlin, 2. Yellowfin tuna, 3. Japanese flyingfish, 4. Carp A: No treatment, B: Treatment with 10% TCA.

혼합시 인산을 방출한다. 반면, 그 인산은 전극 선단부의 purine nucleoside phosphoryrase(NP)의 활성을 표현하고, inosine을 hypoxanthine으로 변환시킨다. hypoxanthine은 전극 선단부의 xanthine oxidase(XOD)에 의해서 요산으로 산화시켜 산소를 소비한다. 그때, 그 산소의 소비량을 산소 전극에 의해서 측정되고 전류 감소치로 기록계에 기록된다. 그때의 산소 소비량인 인산의 양이 ATPase 활성에 해당된다.

Fig. 2, 3, 4에서 K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase 그리고 Mg<sup>2+</sup>-ATPase의 응답곡선을 각각 표시하였

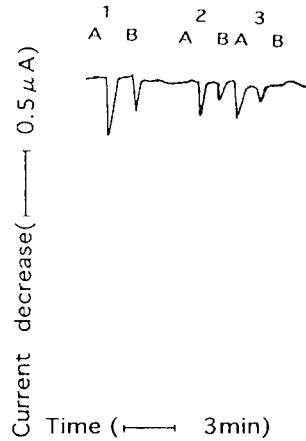


Fig. 4. Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity. 1. Carp, 2. Japanese flyingfish, 3. Striped marlin, A: No treatment, B: Treatment with 10% TCA.

다. 즉, 시료 용액을 주입 시킨 뒤 효소 반응에 의해서 산소를 소비하고 전류 출력치가 감소하게 되며, 기록계에 전류 감소치로 기록하게 된다.

본 연구에서는 trichloroacetic acid를 사용해서 측정된 응답곡선과 사용하지 않은 응답곡선의 높이의 차로 ATPase 활성치를 표현하였고, 여기에서 각기 표시한 센서의 응답성에서 B의 응답곡선의 높이에서 A의 응답곡선의 높이를 뺀 것이 K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase 및 Mg<sup>2+</sup>-ATPase의 활성치를 표시하게 된다.

Ca<sup>2+</sup>-ATPase, K<sup>+</sup>-ATPase 활성은 충분히 측정이 가능하다는 것은 인정하지만, Mg<sup>2+</sup>-ATPase 활성의 응답곡선은 유의하게 적게 나타났다. 그 원인으로서는 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 활성은 통상 아주 적은 양의 KCl 농도를 이용하지만, 액틴에 의해서 점점 활성화되는 것으로 생각할 수 있다. 본 실험에서는 유의한 결과를 얻을 수 없었지만, 적은 양의 KCl 농도에서는 충분히 측정되리라 사료된다. 본 측정에서는 시료 하나를 측정할 수 있는 시간은 각각 약 3분 정도를 필요로 하였다.

#### 센서의 재현성

ATPase 40μL(0.1unit)를 반복해서 주입한 후, 80분간 16회에 걸쳐 측정한 결과 전류 출력으로서, 이 센서는 효소반응을 이용하므로 측정에는 ATPase 표준품을 사용하였기 때문에 효소반응에 의한 재현성을 측정할 필요가 있다. 그리고, 10일간 연속해서

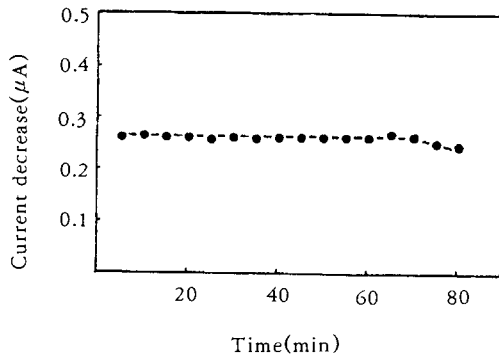


Fig. 5. Reproducibility of the Sensor Experimental Conditions: pH 7.0; Tem. 32°C; Flow rate of Sample Solution, 0.4mL/min; Flow rate of substrate solution, 0.6mL/min; Inosine Conc., 0.2mg/mL; ATP Conc., 0.04mg/mL; ATPase 0.1unit(40 $\mu$ l).

측정하였을때에도 출력에는 유의한 변화는 인정되지 않았으며, 출력의 상대오차는  $\pm 0.25\%$  였다(Fig. 5).

#### 어근육 시료종의 ATPase

본 센서법과 종래(비색측정)법을 이용해서 *Thunnus albacares*(Yellowfin tuna), *Tetrapturus audax*(Striped marlin), *Prognichthys agoo*(Japanese flyingfish) 그리고 *Cyprinus carpio*(Carp)의 어근육 단백질종의  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  및  $Mg^{2+}$ -ATPase 활성을 각기 측정했다.

본 실험결과는 검출선 ATPase 활성의 0.01unit부터 0.25unit까지의 측정범위를 이용해서, 본 실험에서 사용된 4종류의 시료를 가지고 측정 방법에서 기술한 바와 같이 종래의 비색측정법으로 얻어진 측정치와 Fig. 2, 3, 4와 같이 얻어진 센서 측정치의 상관치를 계산해서 ATPase 활성치를 비교한 것을 Table 1에 나타냈다. 기질에는 0.04mg/mL의 ATP 이외에 0.5M  $K^+$ -0.6M KCl, 5mM  $Ca^{2+}$ -0.1M KCl, 2mM  $Mg^{2+}$ -25mM KCl로 조정해서 어근육 단백질의  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  및  $Mg^{2+}$ -ATPase 활성을 측정하였다.

$Ca^{2+}$ -ATPase,  $K^+$ -ATPase 활성치는 센서법 하고 종래(비색측정)의 측정법 사이에는 좋은 상관치를 얻었다.  $Mg^{2+}$ -ATPase 측정에서는 어렵기는 하지만 적은 양의 KCl 농도에서 비색측정(종래법)으로 일반적으로 측정이 가능한 것과 비교시, 이것보

Table 1.  $Ca^{2+}$ -,  $K^+$ - and  $Mg^{2+}$ -ATPase Activities of Fish Muscles(unit).

	$Ca^{2+}$ -ATPase	$K^+$ -ATPase	$Mg^{2+}$ -ATPase
<i>Cyprinus carpio</i> (Carp)	0.12(0.11)	0.18(0.18)	trace(0.19)
<i>Tetrapturus audax</i> (Striped marlin)	0.22(0.16)	0.04(0.16)	trace(0.13)
<i>Thunnus albacares</i> (Yellowfin tuna)	0.17(0.14)	0.10(0.11)	trace(0.12)
<i>Prognichthys agoo</i> (Japanese flyingfish)	0.16(0.14)	0.15(0.13)	trace(0.16)

( ): results obtained by colorimetric methods

다 측정감도가 큰 센서로서 측정이 충분히 가능하리라 생각된다.

지금까지 이 연구에서는 purine nucleoside phosphorylase(NP)하고 xanthine oxidase(XOD)를 하나로 고정시킨 효소 고정화막, 산소전극, 두층으로 된 flow cellulose를 조합해서 ATPase 활성 계측용 센서를 구성해서 어 근육단백질종의  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  및  $Mg^{2+}$ -ATPase 활성을 측정했다. 시료 1개(피크 1개)를 측정하는데는 3분의 시간을 필요로 하고 연속해서 측정이 가능했다.

#### 요 약

효소 purine nucleoside phosphorylase(NP)하고 xanthine oxidase(XOD) 두 효소를 하나로 고정화시켜 산소 전극으로부터 ATPase 활성 계측용 바이오 센서를 개발했다. 개발된 ATPase 센서를 이용해서 *Thunnus albacares*(Yellowfin tuna), *Tetrapturus audax*(Striped marlin), *Prognichthys agoo*(Japanese flyingfish) 그리고 *Cyprinus carpio*(Carp) 등의 각 4종의 어근육 단백질종의  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  그리고  $Mg^{2+}$ -ATPase 활성을 측정하였고, 시료 1개를 측정는데 3분의 시간을 필요로 하였다.  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ -ATPase 활성의 경우 본 연구에서 개발한 센서를 이용한 측정 결과와 종래(비색측정)법으로 측정한 결과와의 사이에서 좋은 상관치를 얻었다.

#### References

1. 八木康一(1975), 生化學實驗講座, 15, p. 3. 東京.
2. K. M. Brndle(1986), *J. Biol. Chem.*, 18, 17.

3. 八木康一(1975), 生化学実験講座, 15, p. 190. 東京.
4. 松宮弘幸, 朝倉昌(1975), 筋肉タンパク質のとり方. 2. タンパク質, 核酸酵素, 2(6), 59.
5. S, Ebashi(1965), *J. Biochem.*, **58**, 7.
6. Kosack Maruyama(1965), *Biochem. Biophys. Acta.*, **94**, 208.