

옥수수잎의 유관속초세포내에 들어 있는
Malate Dehydrogenase(Decarboxylating)을 이용한
Malate 측정용 조직바이오센서에 관한 연구

김 의 락 · *노 광 수 · **하 영 득 · 홍 영 석 · ***박 영 숙

계명대학교 자연과학대학 화학과, *생물학과, **식품가공학과
***대구대학교 가정대학 식품영양학과

The Studies for the Malate Tissue Biosensor Using
Malate Dehydrogenase(Decarboxylating) in the Bundle
Sheath Cell of the Corn Leaf

Ui Rak Kim, *Kwang Soo Roh, **Young Duck Ha
Young Seuk Hong and ***Young Sook Park

The Department of Chemistry, *Biology and **Food Science and Technology
College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

***The Department of Nutrition College of Home Economics, Taegu University, Taegu 705-033, Korea

ABSTRACT

A biosensor for the measurement of malate has been constructed by the sodium-alginate immobilized bundle sheath cell tissue of corn leaf containing malate dehydrogenase(decarboxylating)(EC 1. 1. 1. 40) on the CO₂ gas-sensing electrode. The proposed tissue sensor had the linear in the range of malate concentration $5.6 \times 10^{-5} \text{M} \sim 2.5 \times 10^{-2} \text{M}$ with a slope of 53.5 mV/decade in 0.02M Tris-HCl buffer solution at optimum pH 8.0, and 25°C. A response time was 16~18min. The present L-malate sensing tissue sensor is stable for more than one week. At pH 7.4, Km value was $0.6 \times 10^{-5} \text{M}$. The various kinds of salt did not effect the signal of malate tissue biosensor as the inhibitor. We can measure the malate by the CO₂ electrode at the pH=8.0. Thus, the proposed tissue sensor will be useful for the measurement of malate.

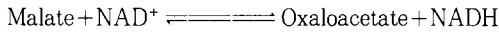
서 론

바이오센서(biosensor)는 효소와 효소를 포함하고 있는 조직과 항원과 항체 등을 이용하여 생물체내에 존재하는 특정 물질을 선택적이면서도, 고감도로 화

학성분을 인식할 수 있게 만든 것으로, 특정물질을 분리하지 않고, 직접 측정할 수 있다는 장점(1-3)과 효소와 기질간에 선택적이면서 특이적으로 결합하기 때문에 측정시 별로 시약이 필요하지 않다는 장점을 가지고 있다. 따라서 생체 관련물질을 연구하는 기

초과확분야 뿐만 아니라 환경오염물질 측정, 의료진단, 생명공학, 식품공정, 안전방재 등에 있어서 특정 물질의 측정과 자동화 공정에서 매우 중요한 역할을 한다(4-10).

모든 과일 속에 포함되어 있는 malate는 과일주스나 wine 등의 향기와 맛에 영향을 주기 때문에 그 양을 빠르고, 정확하게, 그리고 선택적으로 측정하는 것은 식품공업에서 중요하다. 지금까지 malate 측정용 바이오센서 연구는 두 가지 방법에 의하여 수행되어 왔다. 첫번째 방법은 다음과 같은

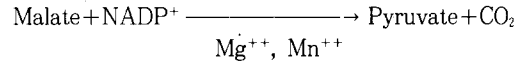
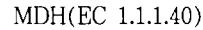


반응에서 보조효소 NAD^+ 를 사용하고, malate의 탈수소화를 촉매하는 malate dehydrogenase(MDH)(EC 1.1.1.37)를 고정화하여 제작한 효소 바이오센서(11-15)가 발표되었다. 그러나 이들 효소바이오센서는 pH 11.5와 같은 높은 pH에서만 측정 가능하였다(11-13). 두번째 방법은 NADH를 산화하여 NAD^+ 를 재생시키는 방법으로 Blaedel과 Engstrom(14)는 NADH를 산화하여 pH 8.8에서 10^{-5} M까지 malate를 측정 하였지만 NADH의 산화전위값이 +0.8V(Ag/AgCl 기준전극에 대하여)로서 Ascorbate와 같은 다른 기질들도 같은 전위값에서 산화되기 때문에 선택성이 좋지 않았다(11-12). 선택성이 좋고, 중성 및 낮은 pH에서 측정하기 위하여 Mizutani 등(15)은 malate dehydrogenase와 NADH oxidase를 동시에 고정화하여, pH 8.0에서 malate의 농도를 5 μ M~1.5mM 범위까지 측정하였다. 지금까지 모든 결과는 NAD^+ 보조효소 존재하에 malate를 malate dehydrogenase(EC 1.1.1.37)의 작용으로 oxaloacetate로의 변환을 감지하는 효소 바이오센서가 연구되었다.

고등식물의 광합성 작용은 식물체에 따라 이에 관계하는 효소들의 작용이 서로 다르다. 즉 C_4 식물의 탄소고정은 PEPCase(phosphoenolpyruvate carboxylase)에 의하여 촉매되고, 여기에서 생긴 oxaloacetate와 malate 등을 탈카르복시화하여 CO_2 를 생산하고, CO_2 가 RuBPCase(Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase)와 반응하는 과정이며(16), C_3 식물은 RuBPCase만이 탄소 고정을 촉매한다(17). 대부분 C_4 식물의 잎은 유관속초세포(bundle sheath cell)를 엽육세포(mesophyll cell)가 방사형으로 싸고 있는 Kranz형으로서(18) 식물체 외부로부터 기공을 통하여 들어온 CO_2 는 엽육세포

에서 phosphoenol pyruvate에 고정화되어 oxaloacetate가 생성되고, 이 산물은 malate로 전환된 후 malate dehydrogenase(decarboxylating)(EC 1.1.1.40)가 탈카르복시화작용에 의하여 pyruvate와 CO_2 를 생성시킨다.

C_4 탈탄산과정의 중간대사 물질인 malate가 식물체내에서 보조효소 NADP^+ 와 함께 다음과 같은 반응이 진행된다.



C_4 식물인 옥수수잎에서 추출한 유관속초세포는 malate dehydrogenase(decarboxylating)(EC 1.1.1.40)를 포함하고 있으므로, 본 연구에서는 이를 sodium alginate로 고정화하여 CO_2 전극에 부착한 후 보조효소 NADP^+ 존재하에서 malate를 기질로 하여 작용시킨 후 생성된 CO_2 의 양을 측정함으로써, malate의 양을 정량할 수 있는 조직바이오센서(tissue biosensor)를 제작, 이용하고자 한다.

재료 및 방법

식물의 성장

옥수수(Zea mays L., Suwon 19)의 종자를 20% sodium hypochloride용액에서 20분간 살균시키고, 증류수로 2~3회 세척한 후, 8시간 동안 침윤시켰다. 침윤 후 vermiculite에 파종하여 30°C 정온하에서, 16시간의 광주기로 광합성을 시키면서, 약 3주 자란 잎을 본 실험에 사용하였다.

유관속초세포와 엽육체의 분리

옥수수잎을 0.1mm 크기로 잘라 0.2g을 취하여 비이커에 넣고, 5mM MgCl_2 , 0.6M sorbital, 2% cellulase를 포함한 20mM MES 완충용액 20ml를 가하여, 1 N KOH로 용액의 pH가 5.5가 되도록 조정된 후, 22°C에서 1분간 60stroke의 속도로 cellulase가 옥수수 잎 표피에 있는 cellulose와 쉽게 작용할 수 있도록 2시간 진탕시킨다. 이렇게 작용시킨 후, 비이커 내의 상등액을 다른 비이커에 모으고, 남아 있는 잎에 다시 5mM MgCl_2 , 0.6M sorbital, 2% cellulase를 포함한 20mM MES 완충용액 20ml를 가하여, 1N KOH로 용액의 pH가 5.5가 되도록 재 조정된 후, 22°C에서 1분간 60stroke의 속도로 1시간 진탕하여 미반응의 잎과 cellulase가 반

응하도록 한다. 이렇게 하여 나온 상등액은 앞에서 얻은 상등액과 모우고, 다시 미반응의 앞에 cellulase를 작용시켜 한번 더 반복하여 상등액을 모은 후, 0.6 M sorbitol 10ml로 비이커 안을 두 번 씻어서 표면에 부착되어 있는 유관속초 세포를 모운다. 지금까지 모은 상등액을 3분간 400×g로 원심 분리하여 침전물을 모우면 그 속에 유관속초세포와 염록체가 대량 포함되어 있다.

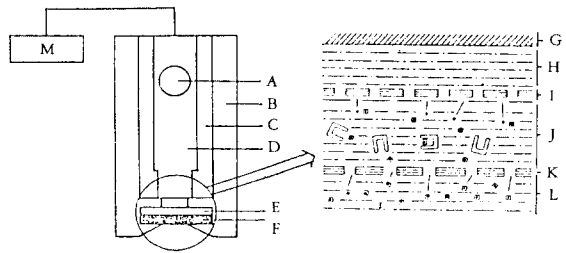


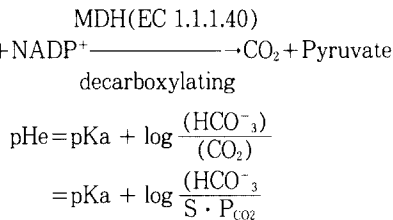
Fig 1. Schematic diagram of the electrode and response processes.

- A: Response element
- B: Outer body
- C, H: Internal filling solution
- D: Inner body
- E, I: Cellulose acetate CO₂ gas permeable membrane
- F, J: Immobilized enzyme membrane
- G: Internal CO₂ electrode
- K: Polyvinyl acetate Porous membrane Substrate solution
- L: Ion analyzer
- M:
- (E): Enzyme (□): Malate (•): CO₂

전극의 제작

Orion Research 회사제품 model 95-02 CO₂ 전극 위에 cellulose acetate CO₂ gas permeable membrane를 놓고 유관속초세포와 염록체가 섞여 있는 추출물을 2% sodium alginate와의 무게비가 4대 6의 비율이 되도록 섞은 후, vortex mixer로 균일하게 혼합하고, 그 용액을 syringer로 10% 염화칼슘 용액에 일정한 속도로 떨어뜨렸을 때 생긴 bead를 모아서 Tris-HCl buffer로 두 번 세척하였다. 여과지로 표면에 묻어 있는 물기를 닦은 다음, 1g을 취하여 CO₂ gas permeable membrane 위에 놓고, 그 위에 polyvinyl acetate porous membrane를 놓은 후, 전극의 cap를 달아 만든 malate 감지 전극을 Orion Research 회사 제품인 Ion analyzer-901에 연결하여, 기질인 malate 용액 속에 전극을 담구어 생성되는 CO₂의 양을 정량함으로써 malate의 양을 측정하였다. 이때 전극의 구조는 Fig. 1과 같다.

CO₂전극을 이용하여, malate 정량을 위한 조직센서의 원리는 malate에 대하여 malate dehydrogenase(EC 1.1.1.40)의 반응이 아래와 같이 진행되어 CO₂가 생성된다.



여기서 pHe는 thin electrolyte layer의 pH이고 pKa는 H₂CO₃(HCO₃⁻)의 일차 해리상수로서 내부전해질 bicarbonate의 농도이며, S는 CO₂의 용해도이고, P_{CO₂}는 CO₂의 부분압력으로 다음과 같이 변형시킬 수 있다.

$$\begin{aligned}
 \text{pHe} &= \text{const} - \log(\text{CO}_2) \\
 &= \text{const} - \log(\text{L-malate})
 \end{aligned}$$

Table 1. The effect of inorganic salts in 0.02M Tris-HCl buffer at pH7.4 and 22°C.

Inorganic salt	Response(mV)	ΔmV
none	+22	0
Na ₂ SO ₄	+24	+2
NaNO ₃	+20	-2
KCl	+22	0
K ₂ Fe(CN) ₆	+23	+1
NaWO ₄	+25	+3
CuCl ₂ · 2H ₂ O	+21	-1
Zn(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	+24	+2
Cd(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	+23	+1
Ni(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	+26	+4
Fe ₂ Cl ₃ · 6H ₂ O	+24	+2
Fe ₂ (NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	+23	+1

$$\begin{aligned}
 \log(\text{Pco}_2) &= \text{const} + \log(\text{CO}_2) \\
 &= \text{const} - \log(\text{L-malate})
 \end{aligned}$$

결과 및 고찰

Malate dehydrogenase은 NAD⁺나 NADP⁺ 보

조효소의 존재하에서 malate에 작용하여 탈수소나 탈탄산 작용에 관여하는 효소들로서 malate dehydrogenase(EC 1.1.1.37), D-malate dehydrogenase(EC 1.1.1.83), malate dehydrogenase(decarboxylating)(EC 1.1.1.39), malate dehydrogenase(NADP⁺)(EC 1.1.1.40), malate dehydrogenase(NADP⁺)(EC 1.1.1.82), malate dehydrogenase(decarboxylating)(EC 1.1.1.38) 등이 알려져 있다(19). C₄ 식물에 속하는 옥수수의 잎 속에는 malate dehydrogenase(EC 1.1.1.40)가 들어 있는데 이 효소는 pH 8.4에서 1분당, 단백질 1mg에 대하여 101uM의 malate를 탈탄산시키는 비활성도를 가지고 있으며, sucrose용액 속에서 침강계수는 9.7S이고, 분자량이 2.26×10^5 이다. 또한 이 효소의 반응 속도 특성은 Km 치가 malate 기질에 대하여 0.4mM, NADP⁺ 보조효소에 대하여서는 17.6uM, Mg⁺⁺에 대해서는 0.11mM이고, 활성화에너지는 9500cal/mol 그리고 NADP⁺에 대하여 특이성을 가진다(20). 옥수수의 잎외에도 malate dehydrogenase(EC 1.1.1.40)는 pigeon liver(21), chickpea의 pod walls(22), D. *Labrax* liver(23), *Clostridium thermocellum*(24) 으로부터 정제된 것이 보고되어 있다.

옥수수의 잎 속에 들어 있는 malate dehydrogenase(EC 1.1.1.40)가 가지는 malate의 탈탄산화 작용으로 생성된 CO₂양을 CO₂전극으로 측정하기 위하여 3주간 길러서 채취한 옥수수잎을 분쇄하여 malate dehydrogenase(EC 1.1.1.40)를 포함하는 유관속초세포와 엽록체를 분리한 후 sodium-alginate로 고정화하여 전극을 만들었다. malate dehydrogenase는 불활성이지만 보조효소인 NADP⁺와 2가 금속이온인 Mg⁺⁺나 Mn⁺⁺과 결합하여 효소-Mg(Mn)-NADP⁺와 같은 복합체를 형성할 때(20), malate를 pyruvate로 변화시키면서 CO₂를 발생하게 된다. 그러므로 추출한 유관속초세포와 엽록체를 Fig. 1처럼 cellulose acetate CO₂ 투과성막과 polyvinyl acetate 다공성막 사이에 고정시킬 때 분리한 상태로 사용하면 효소의 활성도도 쉽게 떨어질 뿐만 아니라, 측정할 때 전극의 연결틈 사이로 새어나오게 되므로, 2% sodium-alginate용액과 혼합한 후, 10% 염화칼슘용액으로 고정화시켰다. 0.5mM β-mercaptoethanol, 0.1mM MgCl₂, 0.5mM NADP⁺를 포함하는 pH 7.4, 0.02M Tris-HCl 완충용액 내에서 malate 농도를 변화시켜 가면서 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 이때 Michaelis-Menton식을

변형한 Lineweaver-Buck reciprocal plot를 한 결과, Km치가 0.6×10^{-5} M임을 알 수 있었다. 이는 정제된 효소에 의한 Km치가 0.4mM(20)임에 비하여 적은 값이다. 활성화에너지를 구하지 않았지만, 정제하지 않고 조직을 사용하였을 때 고정화효소의 구조변화나 internal diffusion limitation의 변화가 크지 않는 것으로 생각된다. Malate에 대한 조직센서의 pH 변화에 따른 안정성을 조사하기 위하여 0.02M Tris-HCl 완충용액 내에서 온도를 25℃로

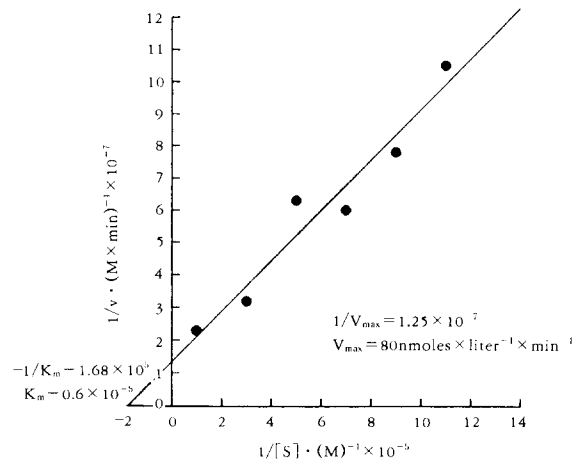


Fig. 2. Malate dehydrogenase(EC 1.1.1.40) reaction vs malate in 0.02M Tris-HCl buffer solution at pH 7.4 and 25°C.

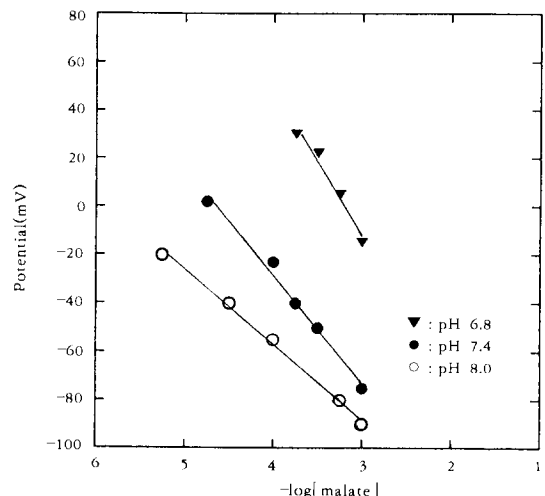


Fig. 3. The effect of pH on the malate response curves in the 0.02M Tris HCl buffer solution at 25°C.

고정시키고, pH를 6.8, 7.4, 8.0으로 각 pH를 고정시킨 다음, 기질농도를 변화시키면서 같은 시간 동안 감응도를 조사하여 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 pH 6.8에서 $6 \times 10^{-4} \sim 1.8 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간을 가지며, 감응도는 48mV/decade, 감응시간은 15~17분 소요되었다. pH 7.4에서는 $4.8 \times 10^{-4} \sim 8.0 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간을 가지며, 감응도는 52.0mV/decade, 감응시간은 12~13분 소요되었고, pH 8.0에서는 $5.6 \times 10^{-5} \sim 2.5 \times 10^{-3} M$ 의 직선구간을 얻었으며, 감응도는 53.7mV/decade이고, 감응시간은 16~18분이다.

이들 결과로부터 pH 8.0에서 일가이온의 Nernst 기울기의 이론치인 59.1 mV/decade에 가까운 감응도를 보이나, 감응시간이 pH 7.4보다 더 걸린다는 것을 알 수 있다. Malate dehydrogenase(EC 1.1.1.40)자체가 pH변화에 따라 가역적으로 해리를 하는데 이것은 효소분자 내의 카르복시기에 액성에 따라 해리도 차이가 생긴다고 보고되어 있고(21), 또한 malate dehydrogenase(EC 1.1.1.40)의 반응차수는 pseudo-1st-order 반응이고, active site는 효소분자 내의 histidine잔기임이 밝혀져 있다(26). 전극의 안정성은 Fig. 4과 같이 일주일 이상 되어도 처음 활성도의 반을 유지하였다. 방해물질로서 염의 영향을 조사하기 위하여, 0.01M의 각종 염을 첨가한 후, 조사하여 본 결과, potential의 변화값이 크

지 않으므로, 크게 영향을 받지 않는다는 것을 알 수 있다(Table 1).

요 약

옥수수잎의 유관속초세포 내에 존재하는 malate dehydrogenase(EC 1.1.1.40)을 이용하여 malate 정량용 biosensor를 제작한 후, 기질인 malate에 대하여 여러 가지 조건하에서 측정된 결과, sodium-alginate로 고정화한 것이 하지 않은 것보다 180시간까지 지나도 40% 이상의 activity를 가지며, 최적 pH는 8.0이었으며 pH 7.4에서 Km치는 $0.6 \times 10^{-5} M$ 이었다. 전극의 안정성은 일주일 이상 측정이 가능하였으며, 정량 가능한 범위는 $5.6 \times 10^{-5} M \sim 2.5 \times 10^{-2} M$ 이며, 감응도는 53.7mV/decade이고, 측정소요시간은 16~18분이 소요되었다. 방해물질로서 각종 염의 영향은 크게 받지 않음을 알았다. 본 연구에서 제작한 조직 biosensor는 효소분리과정을 거치지 않고 조직을 이용하여 malate를 정량하였다는 것과 지금까지 연구된 효소 바이오센서와는 달리 강산성에서 측정하던가, 한 가지 이상의 효소를 사용하지 않고도 중성영역인 pH=8에서 측정이 가능하였으며, malate를 탈수소화하여 정량한 연구는 많았지만, 탈탄산화하여 정량한 연구는 없었다. 본 연구에서 제작한 조직바이오센서는 malate 측정용 sensor로 가능하리라 생각된다.

감 사

본 연구는 학술진흥재단 대학부설연구소 연구비로 수행하였으며 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. C. R. Gebauer and G. A. Rechnitz(1982), *Anal. Biochem.*, **124**, 141.
2. M. E. Meyerhoff and R. H. Robins(1980), *Anal. Chem.*, **52**, 2383.
3. D. Beer and J. C. Van Den Heuvel(1988), *Anal. Chim. Acta.*, **213**, 259.
4. J. Anzai, S. Tezuka, T. Osa, H. Nakajima and Y. Matsuo(1986), *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4373.
5. T. D. Rhines and M. A. Arnold(1990), *Anal. Chim. Acta.*, **231**, 231.

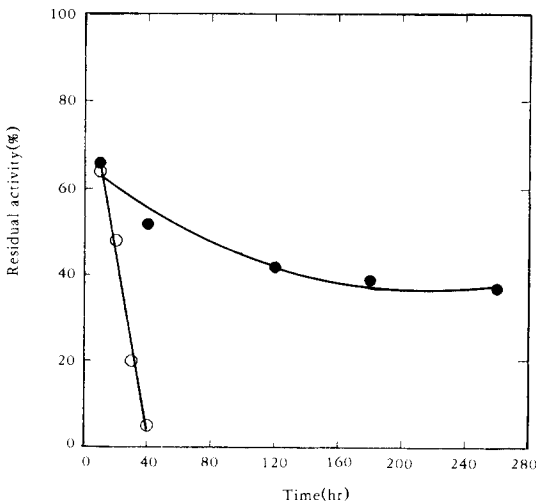


Fig. 4. Residual activity vs time at 22°C.
 ○ : tissue which was separated from corn leaf
 ● : tissue immobilized in sodium alginate

6. Y. Ma and L. Cleemann(1988), *Anal. Biochem.*, **174**, 666.
7. H. J. Moynihan(1987), *Biotech. Prog.*, **3**, 90.
8. N. P. Carey and B. R. Kowalski(1988), *Anal. Chem.*, **60**, 541.
9. J. N. Ngwainbi, P. H. Foley and S. S. Guilbault(1986), *J. Amer. Chem. Soc.*, **108**, 5444.
10. H. M. Mizioroko and G.H. Lorimer(1983), *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 507.
11. A. M. Almuiabed and A. Townshed(1989), *Anal. Chim. Acta.*, **221**, 337
12. G. C. Chemnitius and R. D. Schmid(1989), *Anal. Lett.*, **22**, 2987.
13. W. Dietmer, S. Florian and S. Freider(1987), *Ger(East). DD.*, 264, 709.
14. W. J. Blaedel and R. C. Engstrom(1980), *Anal. Chem.*, **52**, 1691.
15. F. Mizutani, S. Yabuki and M. Asai(1991), *Anal. Chim. Acta.*, **245**, 145.
16. M. Kluge(1983), *Physiol. Veg.*, **21**, 817.
17. M. Eva and M. H. O'Leary(1987), *Plant Physiol.*, **84**, 58.
18. W. V. Brown and M. Torrey(1977), *Bot. Club.*, **23**, 1.
19. M. Dixon and E. C. Webb(1979), "Enzymes" 3rd ed. Longman Group Ltd.
20. A. Sumio, I. Kazuaki, M. Keiji, M. Akira and T. Akazawa(1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **194**, 503.
21. C. G. Gang, H. T. Mei and W. J. An(1985), *Proc. Natl. Sci. Council., Repub. China. Part B: Life Sci.*, **9**, 56.
22. D. Suchita, D. R. Sood, S. K. Sawhney and S. Randhir(1986), *Physiol Plant*, **68**, 308.
23. M. G. Intesta, M. J. Cano and A. Garride-Pertierra(1985), *Comp. Biochem. Physiol., B: Comp. Biochem.*, **80B**, 35.
24. R. Lamed and J. G. Zeikus(1981), *Biochim. Biophys. Acta.*, **660**, 251.
25. C. G. Gang, H. T. Mei and C. T. Chung (1988), *Biochem. J.*, **254**, 123.
26. J. Narendra and A. S. Bhagwat(1987), *Phytochemistry*, **26**, 1859.