

## 人蔘조직에서 Catalase Activity 측정에 관한 새로운 Method

梁德祚·祭 快\*·尹載垓·李晟鍾·李愛羅

忠北大學校 自然大 生物學科·化學科\*

(1985年 5月 20日 接受)

## A New Method on the Measurement of Catalase Activity of *Panax ginseng* C.A. Meyer Tissues

Deok-Cho Yang, Quae Chae\*, Jae-Jun Yoon, Sung-Jong Lee  
and Ae-Ra Lee

*Department of Biology, Chungbuk National University, Chongju*  
*Department of Chemistry, Chungbuk National University, Chongju*※  
(Received May 20, 1985)

### Abstract

We report a new assay method on the measurement of the catalase activity, whose utilization value is considered to be remarkable in the field of plant biochemistry. We named this method as a *De-Coupling Method*. The essence of de-coupling method is the separation between the enzyme reaction and the indicator reaction. The optimum condition of the enzyme reaction was found to be following: on addition of 1 ml of substrate ( $H_2O_2$ : 20mM) to the mixture of the crude extract of enzyme (volume: 0.2 ml) and the ammonium phosphate buffer (volume: 1.8ml; 0.93 M phosphate, 1.6M  $NH_4$ , 2.5M methanol, pH 7.0). After 30, 60 and 90 seconds of the enzyme reactions are proceeded, the reactions are terminated by 25% of tri-chloro-acetate (final concentration of 5%), respectively. The precipitated materials by tri-chloro-acetate was removed by the centrifugation (2000g, 10minutes). Formaldehyde produced in the enzymatic reaction was reacted with 2ml of acetylacetone (60mM). The indicator reaction (HANTSCH REAKTION) in which lutidine is formed, was proceeded for 60 minutes at 25°C.

### 緒 論

Catalase (Hydrogen-peroxide; Peroxide oxidoreductase, EC. 1. 11. 1. 6)은 1901년에 O. Loew<sup>1)</sup>가 생물계에 널리 분포되어 있음을 발견하였다. 그 후 Warburg<sup>2)</sup>(1923)에 의

하여 catalase가 철( $Fe^{3+}$ ) 이온을 함유하고 있는 효소로 확인되었으며, Summer와 Dounce<sup>3)</sup>(1937)는 처음으로 catalase를 beef liver에서 분리하여 결정체로 정제하였다.

Catalase의 한 효소분자(MW;  $240,000g \cdot M^{-1}$ )는 4개의 ferriprotoporphyrin groups (4 subunit; MW=60,000~65,000)를 지니고 있는데 이것은 1.1% haematin 함량과 0.09% Iron 함량하고 동등하다<sup>4)</sup>. Catalase는 비슷한 구조를 지닌 cytochrome과는 달리 촉매시 valence 교환이 일어나지 않는다. 또한 ( $N^-$ -ion은  $Fe^{3+}$ 과 강하게 결합하여 catalase를 불활성화 시키며, 유사한 inhibitors(acetate, formate, fluoride) 역시 이 효소의 반응속도 저해제로 잘 알려져 있다. 이런 저해작용은 철이온을 함유한 protoporphyrin enzyme의 공통적인 성질이다.

Catalase는 liver나 kidney와 같은 기관조직세포의 mitochondria와 peroxysome에 많이 함유되어 있고, 결합조직(connective tissue)의 세포에는 비교적 적은 양이 존재하고 있다. 또한 인체의 erythrocytes에서는 일반적으로 풍부한 유리형 catalase가 존재하는 반면 오리의 erythrocytes에는 거의 존재하지 않고 있다<sup>5)</sup>.

Catalase는 광포성으로 cytochrome이 존재하는 호기성 세포(Aerobic cells)에서만 찾아 볼 수 있고, 혐기성 세포(Anaerobic cells)에는 없다. 생체내에서 catalase의 생리적 작용에 대해서는 자세히 밝혀져 있지 않은 실정이며, 식물체에서는 catalase에 관한 연구 결과가 전무한 상태에 있다. 단지 동물체에서 catalase가 중요한 생리작용을 전개한다는 보문이 발표된 바 있다.<sup>6,7,8)</sup>

정상적으로 활동하는 세포의 물질대사 교차점에서 생성되는 산화력이 강한 과산화수소(Hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ )는 catalase에 의해 빨리 분해되기 때문에 갑작스런  $H_2O_2$ 의 축적이나, Oxidative damage가 일어나지 않는다. 적혈구의 catalase(Soluble state)는 glutathione peroxidase처럼, haemoglobin(Hb)과 SH-protein의 보호작용을 한다. 따라서 catalase의 활성도가 적혈구에서 작으면 작을수록 methaemoglobin(Hb) 형성을 촉진 시킨다.<sup>9)</sup>

생체 내에서 catalase activity test는 일반적인 효소의 정교한 화학반응 촉매를 이용하여  $H_2O_2$ -분해정도나 유리된  $O_2$ -함량을 검출하므로써 측정할 수 있다. 현재 생화학 또는 Hematology에 주로 사용하고 있는 Ultra-Violet Spectrophotometry는 substrate  $H_2O_2$ 가 UV-광선을 흡수하는 원리를 이용하여  $\lambda_{max}$  240nm에서 extinction의 감소를 측정하여 catalase activity ( $\Delta E_{240}/min$ ;  $\epsilon_{240}=0.040cm^2/\mu M$ )를 산출하는데<sup>5)</sup>, catalase의 initial reaction이 매우 빨리 일어나기 때문에 ( $k \sim 10^4 sec^{-1} \cdot M^{-1}$ ), 비교적 낮은  $H_2O_2$ -농도(0.01M)에서 반응을 시켜야 한다는 단점이 있다. 그러나 식물조직에는 UV를 강하게 흡수하는 물질과 색소가 많이 함유되어 있어 그 탁도 때문에 UV-test는 실제적으로 이용되지 않고 있다. Titration methods는 뇌조직, 종양, 우유 그리고 토양 미생물 등에서 널리 이용되고 있다<sup>10)</sup>. 그러나 이 방법 역시 효소단백질이 permanganate( $KMnO_4$ )와 반응하여, titration end point가 선명하지 못하기 때문에  $KMnO_4$ 의 과다량 처리나, Trichloroacetic acid(TCA)를 처리하여야 하는 결점을 지니고 있다. 그밖의 catalase activity 측정에 이용되고 있는 Fluorimetry<sup>11)</sup>(Scopoletin; Diacetyldichloro-fluorescin),  $O_2$ -production<sup>12)</sup>(Polarograph; Oxygen electrode; Manometry),

Immunoprecipitation<sup>13)</sup>(with Anticatalase) 및 Measurement of thermal efficiency 방법 등의 크고 작은 결점 때문에 식물조직내에서는 실제적으로 이용되지 않고 있는 실정이다.

본 논문에서는 인삼식물 조직의 광산화 작용(Photo oxidation)에 대한 연구의 일환으로 수행되어진, catalase activity 측정에 관한 또다른 하나의 새로운 test method를 정립하였기에 보고하는 바이다.

본 연구를 수행하는데 협조하여준 한국 산학협동 재단에 감사드립니다.

## 材料 및 實驗方法

### 1. Plant materials

본 실험에 사용된 시료는 2년생 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)과 감자(*Solanum tuberosum* L.)로써 공히 충북대학교 자연과학대학 식물 생리학 연구실내 growth chamber에서 재식된 것을 사용하였다.

### 2. Chemicals

Di-ammonium hydrogen phosphate,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$

Methanol, 96%

Acetylacetone,  $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3$

Phosphoric acid, 85% (W/V).

Trichloroacetic acid(TCA), 25%

Catalase(EC. 1. 11. 1. 6), from bovine liver.

시약은 guaranteed reagent로 사용하였으며, catalase는 sigma사의 제품을 사용하였다.

### 3. Reagent solution

① Buffer(0.93M Phosphate, 1.6M  $\text{NH}_4^+$ , 2.5M methanol); 20g di-ammonium hydrogen phosphate를 140ml 증류수에 녹여 1.5ml phosphoric acid(85%)로 pH 7.0을 맞춘 후, 19ml methanol을 더하고 증류수로 190ml을 맞추었다.

② Acetylacetone solution(acetylacetone 60mM); 0.74ml acetylacetone 과 1.4ml methanol을 넣어 증류수로 120ml을 맞추었다.

③ TCA solution(25% (W/V))

④  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution(20mM)

### 4. Crude enzyme extraction

효소용액은 시료 1g을 증류수로 세척한 다음 10ml ammonium phosphate buffer(pH 7.0)에 5분간 마쇄한 후 16겹의 gauze로 여과시켜 2,000×g에서 15분간 원심분리하여 그 상등액을 이용하였다.

## 5. Activity 측정

Catalase activity 측정 및 Lutidine의 흡광도 측정은 Shimadzu UV-Vis Recording Spectrophotometer (UV-240)와 Spectronic 20을 이용하였다.

## 結果 및 考察

### 1. The principle of test method

Hydrogen peroxide( $H_2O_2$ )는 catalase(EC. 1. 11. 1. 6)에 의해 산소와 물로 분해되며 (EC. 1. 11. 1. 6) ( $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$ ), methanol의 존재하에서는 formaldehyde와  $H_2O$ 가 생성된다. 또한 formaldehyde는  $NH_4^+$ -이온 존재하에서 두 분자의 acetylacetone과 반응하여 lutidine으로 전환되는데<sup>14)</sup>, 이 노란 색소는  $\lambda$  405~415nm에서 최고의 흡광도를 나타낸다(Fig.1).

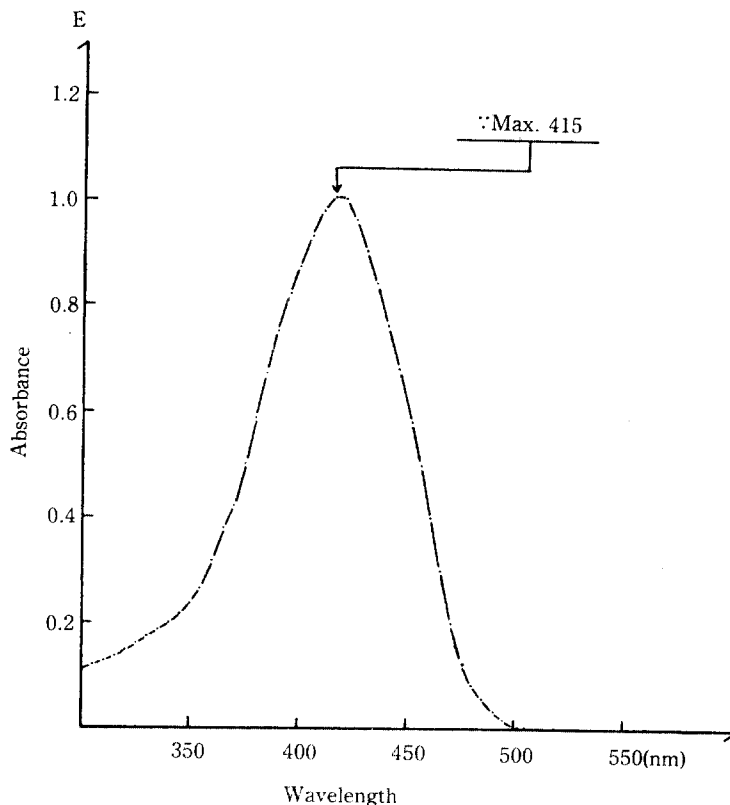


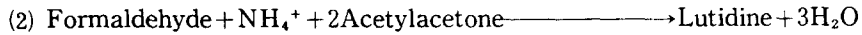
Figure 1. Absorption spectrum of lutidine.

따라서, catalase activity는 formaldehyde의 생성율로 나타낼 수 있다. Formaldehyde의 생성율은 식 (1)과 같이 각각 30, 60, 90초 동안 반응시켜 만들어진 formaldehyde

를 식 (2)와 같이 lutidine으로 전환하여 405mm에서 흡광도를 측정하고, 시간에 대한 흡광도의 직선회귀(상관계수,  $r > 0.95$ )를 구해 slope( $\tan \alpha$ )로 나타낼 수 있다. 이 slope의 값을 catalase activity라 하였다;

$$\text{Catalase activity} = \Delta E_{405} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g} \cdot \text{fr} \cdot \text{wt}^{-1} \text{ 또는 } \Delta E_{405} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgProtein}^{-1}.$$

EC. 1.11.1.6.



## 2. Lutidine 형성

$\text{NH}_4^+$ 이온의 source로 작용하는 ammonium phosphate buffer (pH 7.0)로 2년생 인삼 뿌리에서 추출한 crude extract를 이용하여 lutidine 형성의 최적조건을 조사하였던 바, methanol과 acetylacetone의 최적농도는 각각 2.5M과 0.06M임이 밝혀졌다 (Figs. 2 and 3).

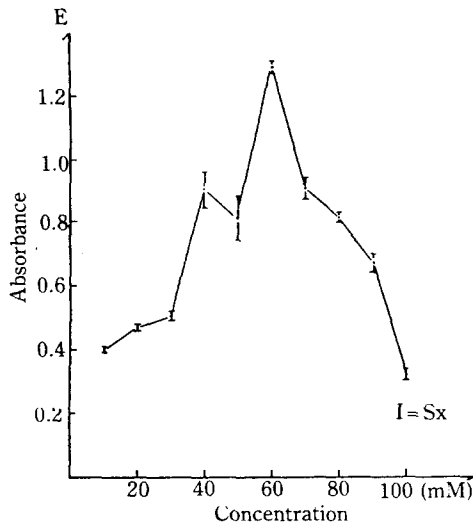


Figure 2. The concentration effect of acetylacetone on the lutidine formation.

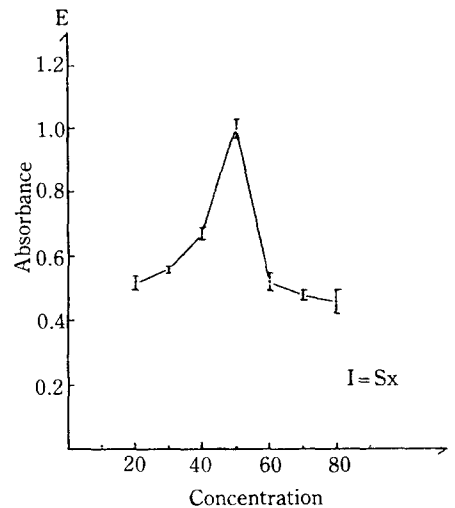


Figure 3. The concentration effect of methanol on the lutidine formation.

0.2ml crude enzyme extract에 1.8ml ammonium phosphate buffer (pH 7.0)를 첨가하여 1ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (20mM)를 넣어 반응시킨 후 시간별 TCA농도에 따른 촉매반응 중단효과를 조사한 결과 5% TCA는 10%나 15%와 다를 바 없는 중단효과를 나타내었다. 따라서 본 실험에서는 catalase activity를 중단시키기 위해서 5% TCA (final conc.)를 사용하는 것으로 결정하였다. 또한, Table 1에서와 같이 반응시스템내에 생체 촉매제 (catalase)가 존재하지 않는 상태에서 lutidine의 형성은 0~30°C 사이의 반응온도에서는 거의 영향을 받지 않으나 40°C 이상에서는 온도와 반응시간의 증가에 따라 lutidine

의 형성율도 현저히 증가하였다. 따라서 catalase활성에 따른 lutidine 형성을 위한 온도 범위는 20~25°C가 최적조건으로 사료된다.

**Table 1.** The effect of incubation temperature on the lutidine formation

Temp.(°C) Time (min.)	0	10	20	30	40	50
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.050
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.060
20	0.000	0.000	0.000	0.002	0.020	0.160
30	0.000	0.002	0.003	0.010	0.028	0.230
40	0.000	0.004	0.005	0.015	0.035	0.340

### 3. Catalase activity 측정 절차

#### (1) Exzyme reaction(효소반응)

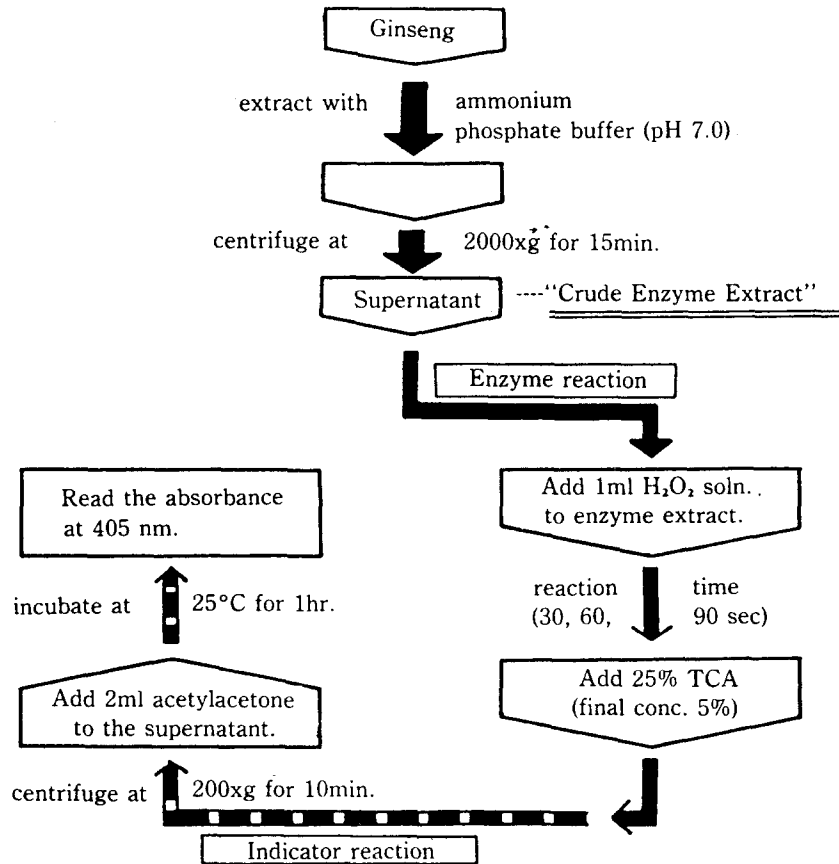
효소반응은 ammonium phosphate buffer(pH 7.0)로 추출한 0.2ml 효소용액에 1.8ml ammonium phosphate를 첨가하여 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20mM)로 반응을 시작하였다. 반응시간은 각각 30, 60, 90초 동안 25°C에서 진행시켰으며 25%(W/V) TCA(final concentration, 5%)를 이용하여 4°C에서 catalase 촉매반응을 중단시켰다. TCA작용으로 침전된 효소단백질은 2,000×g에서 10분간 원심분리하여 제거한 후, 상등액을 Indicator reaction에 이용하였다.

#### (2) Indicator reaction(지시반응)

속계된 지시반응에서는 원심분리하여 얻어진 3 ml 상등액에 2 ml acetylacetone을 첨가하여 25°C에서 60분간 incubation하였다. Incubation 후 형성된 lutidine의 양은 spectrophotometer를 사용하여  $\lambda_{max}$  405nm에서 흡광도로 나타내었다(Fig.4).

### 4. 인삼조직에서의 Catalase activity

De-Coupling Method를 이용하여, 측정된 인삼뿌리 조직에서의 반응 시간별 405nm에서 lutidine의 형성은 Fig.5와 같다. 반응 시간별 lutidine의 흡광도로부터 산출한 catalase activity는 인삼에서 29.5Δ E/min.g.fr.wt.로 감자 구근에서의 14.8Δ E/min.g.fr.wt.보다 50% 높게 나타났다.(Table 2). 인삼잎에서는 반응 시간별 lutidine의 흡광도가 Fig.6과 같이 나타났다. 효소의 활성도는 감자의 잎에서 3.7Δ E/min.g.fr.wt.였으며, 인삼잎에서는 26.85Δ E/min.g.fr.wt.로 감자잎보다 87% 더 높은 catalase activity를 나타



**Figure 4.** Schematic flow chart describing the major steps in the determination of catalase activity by De-Coupling Method.

**Table 2.** Activities of catalase in Korean ginseng and potato tissues.

	Catalase activity ( $\Delta E/\text{min. g. fr. wt.}$ )	
	<i>Panax ginseng</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
ROOT	29.5	14.8
LEAF	26.9	3.7

냈다.

이상의 결과로 미루어 볼때 이제까지 보고된 catalase activity 측정 방법 즉 UV-Spectrometry, Titration method, Fluorimetry Volumetry 그리고 Immunoprecipitation method 등은 주로 혈액 또는 동물조직에서 이용되어 왔는데, 본 연구실에서 개발한

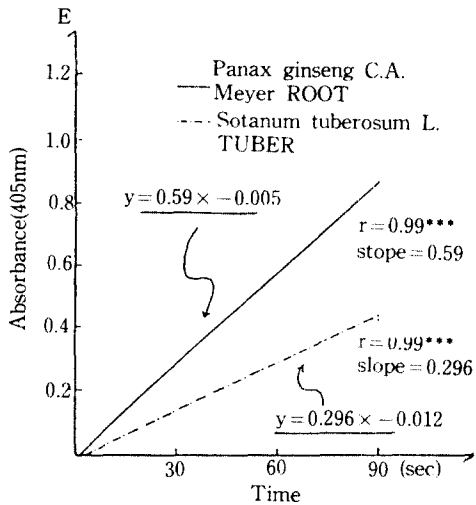


Figure 5. Comparisons of catalase activities in Korean ginseng and potato tissues by De-Coupling Method.

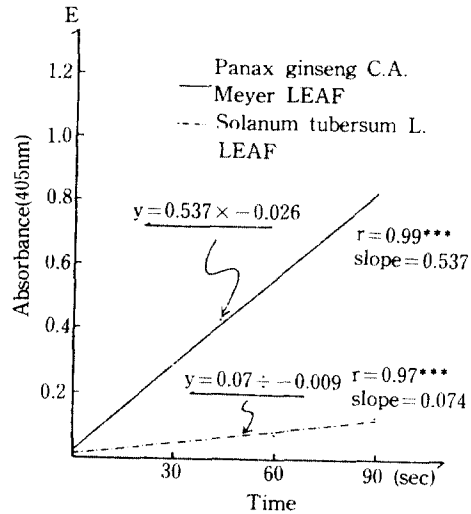


Figure 6. Comparisons of catalase activities in Korean ginseng and potato tissues by De-Coupling Method.

Decoupling Method은 식물조직 특히 *Panax*, *Solanum* 조직에서의 catalase activity 측정에 매우 효과적인 것으로 나타났다.

따라서 이 De-Coupling Method의 결점을 보완하기 위하여 날카로운 Critic을 실은 연구결과가 보고되기를 기대한다.

### 要 約

본 연구에서는 광산화 연구의 일환으로 O<sub>2</sub>-대사에 관여하는 효소의 활성을 근본적으로 재조명 분석하던 중, catalase activity 측정에 관한 De-Coupling Method를 개발하였던 바, 실제적 이용 가치가 식물조직에서 매우 크기에 보고하는 바이다.

De-Coupling Method는 효소반응과 지시반응을 분리하여 진행시켰는데, 효소반응에서는 0.2ml Crude enzyme extract를 1.8ml ammonium phosphate buffer(0.93M phosphate, 1.6M NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 2.5M methanol, pH 7.0)에 혼합한 다음 substrate인 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20mM)를 첨가하여 효소반응을 시작하는 것이 최적 condition으로 나타났다. 효소반응은 각각 30, 60, 90초 동안 진행시킨 후 25% TCA(final conc. 5%)로 반응을 중단시켰다. TCA에 의해 침전된 효소단백질은 2,000×g에서 10분간 원심분리하여 제거한 후 효소반응에서 생성된 formaldehyde를 2 ml acetylacetone(60mM)과 반응시켜 lutidine을 형성하는—“HANTSCH-REAKTION”—지시반응을 25°C에서 60분 동안 진행하는 것이 가장 효과적이었다.



## References

1. Loew, O. : *U.S. Dept. Agr. Report* No. 68, 47 (1901).
2. Warburg, O. : *Biochem. Z.* **136**, 266 (1923).
3. Sumner, J. B. and A. L. Dounce : *J. Biol. Chem.* **121** 417 (1937).
4. Sund, H. : *Europ. J. Biochem.* **1**, 400 (1967).
5. Bergmeyer, H. U. : *Biochem. Z.* **327**, 255 (1955).
6. Neubert, D., A. B. Wojtczak and A. L. Lehninger : *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1651 (1962).
7. de Duve, C. and P. Bandhuin : *Physiol. Rev.* **46**, 323 (1966).
8. Aebi, H., E. Bossi, M. Cantz, S. Matsubara and H. Suter : *V Berliner Symposium über Struktur and Funktion der Erythrocyten*, Humboldt Universität Berlin, DDR (1967).
9. Bonnichsen, R., S. P. Colowick and N. O. Kaplan : *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, pp. 781 (1955).
10. Pilz, W. and J. Johann : *Z. Analyt. Chem.* **210**, 358 (1965).
11. Roth, M. and P. K. Jensen : *Biochem. Biophys. Acta* **139**, 171 (1967).
12. Higash. T., M. Yagi and H. Hirai : *J. Biochem. Tokyo*, **49**, 707 (1961).
13. Nash, T. : *Biochem. J.* **55**, pp. 416 (1953).