理學碩士 學位論文

황소개구리(*Rana catesbeiana* Shaw) 간으로부터 catalase의 분리·정제 및 특성

2002年 2月

釜慶大學校大學院

化學科

張民靖

理學碩士 學位論文

황소개구리(*Rana catesbeiana* Shaw) 간으로부터 catalase의 분리·정제 및 특성

指導敎授 金 世 權

이 論文을 理學碩士 學位論文으로 提出함

2002年 2月

釜慶大學校大學院

化 學 科

張 民 靖

張民靖의 理學碩士 學位論文으로 認准함

2001년 12月 26日

主　審　醫學博士　文 聖 勳 (印)

委　員　理學博士　孫 炳 華 (印)

委　員　工學博士　金 世 權 (印)

목 차

Abstract 1

서 론 3

재료 및 방법 7

1. 재료 7

2. 방법 7

2-1. **조효소의 추출** 7

2-2. Catalase**의 정제** 8

2-3. Catalase **활성측정** 10

2-4. **단백질 정량** 11

2-5. Catalase**의 동정** 11

2-5-1. **전기이동 분석** 11

2-5-2. **겔여과에 의한 분석** 12

2-6. **정제** Catalase**의 특성** 12

2-6-1. pH **안정성** 12

2-6-2. **열 안정성** 13

2-6-3. **기질농도에 의한 영향** 13

2-6-4. **흡광 스펙트럼** 13

2-6-5. **화학약제에 의한 영향** 14

결과 및 고찰 15

1. Catalase의 분리 정제 15

2. Catalase의 동정 및 분자량 22

3. 정제 Catalase의 특성 25

  3-1. pH 안정성 25

  3-2. 열 안정성 27

  3-3. 기질 농도에 의한 영향 27

  3-4. 흡광 스펙트럼 31

  3-5. 화학약제에 의한 영향 31

요 약 35

참고문헌 36

감사의 글 41

Purification and characterization of catalase from liver of bullfrog, *Rana catesbeiana* Shaw

Min-Jung Jang

Department of Chemistry, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Catalase is a characteristic enzyme of peroxisomes, where this enzyme is the most abundant protein. This enzyme is widely distributed in a variety of life forms, including animal, plants, and microprobes and usually only absent from stictly anaerobic organism. Catalase plays an important role in removing toxic hydrogen peroxide in the cell. In this study catalase was isolated from liver of bullfrog, *Rana catesbianan* Shaw, and enzymatic properties were investigated. The catalase was purified by ammonium sulfate precipitation, anion

exchange chromatography (DEAE-Sephadex A-50, DEAE-Sephcel) and gel filtration (Sephadex G-150, Sephacryl S-300)column chromatography. The molecular weight of the purified catalase as estimated by gel chromatography on the Sephadex G-150 was approximately 186 kDa. However, the estimated molecular weight of catalase on SDS-PAGE was 47.7 kDa. Then, it is supposed to be a tetramer composed of four identical subunits. The purified enzyme was stable in the pH range of 6.0 to 10.0 and the enzyme was stable up to 50℃ but rapidly became inactive at temperatures over 60℃. The enzyme showed its maximum absorption at 408 nm. The activity was markedly inhibited by KCN, NaN_3 and Hydroxyamine.

서 론

Catalase는 생체내 필수 효소로, 세계 분류체계에서 catalase의 명칭은 hydrogen peroxide oxidoreductase로 통용되며 분류번호는 EC 1.11.1.6이다. Catalase는 혐기적 조건하에서 생육하는 세균을 제외하곤 대개의 동물, 식물, 미생물 등에 널리 존재하며 생체내 필수 효소로서 과산화수소를 산화해서 두 분자의 물과 한 분자의 산소를 생성하는 것을 촉매하고($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) 과산화수소 존재하에 알코올이나 포름산(formic acid)등의 산화도 촉매한다(H_2O_2 +. $AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$). Catalase 1분자는 1분에 500만 분자의 과산화수소를 분해하며 그 속도는 효소반응 중 최대이다. 이런 사실에서 catalase는 생체내 호흡의 유해산물인 과산화수소를 빨리 제거하기 위한 효소라고 생각되었는데, 최근에는 퍼옥시다아제(peroxidase)와 마찬가지로 생체내 산화에 직접 관여하고 널리 생리적 기능을 발휘하고 있는 사실이 인정되고 있다.

세포에서 활성산소의 생성 메카니즘과 이로 인한 세포손상으로 유발되는 질병 및 그 방어 메카니즘에 대한 catalase의 기능을 살펴보면 다음과 같다. 생리적 조건하에서 우리가 섭취한 산소의 95%는 미토콘드리아의 호흡사슬(respiratory chain)을 거쳐 전달된 네 개의 전자를 받아 물(H_2O)로 된다. 그러나 일부의 산소(미토콘드리아에서 사용되는 산소의 3 5%)는 활성산소로 변한다. 이와 같이 미토콘드리아에서 산소라디칼이 생성되는 것은 세포가 에너지를 생성되는 과정에서 필연적으로 수반되는 현상이며, 이것이 산소라디칼 생성의 대표적인 예 라고 할 수 있다. 이 밖에도 여러 가지 기전에 의해 산소라디칼이 생성되는데 ferredoxins 또는 hemeproteins와 같은 단백질들이 산소 분자에 하나의 전자를

전달해 줌으로써 superoxide radical($O_2^{\cdot -}$)이 생성되고 다시 전자와 수소를 받아 과산화수소(hydrogen peroxides, H_2O_2)가 생성된다($O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). 이렇게 생성된 H_2O_2는 체내의 철이온 혹은 구리이온 등과 반응하여 산소 라디칼 중 가장 강력한 hydroxyl radical($HO\cdot$)을 생성시킨다($H_2O_2 + Fe(\mathrm{II}) \rightarrow HO^- + HO\cdot + Fe(\mathrm{III})$). 생체 내에 생성된 활성산소종(hydrogen peroxide species, ROS)인 superoxide radical과 hydroxyl radical들은 생체내의 지질, 단백질 및 핵산 등을 손상시켜 세포의 기능을 억제시키며(Halliwell 등, 1989), 더 나아가서는 체내의 항상성(homeotasis)에 불균형화 현상을 초래한다(Jakoby 등, 1980 ; Oleinik, Sunderman, 1996 ; Nelson, 1995). 즉 활성이 큰 산소종이 DNA에 작용하여 돌연변이 및 암을 유발하게 하며(Hamilton-Koch 등, 1986 ; Oleinik 등, 1987), 동맥경화를 비롯한 혈관장해, 신장장해 및 당뇨병 등 많은 질병을 유발하는 것으로 추측되고 있다(Kator, 1996 ; Schwarz, 1996). 그러나 정상적이 생체 내에서는 체내의 항상성을 유지하기 위한 많은 효소들이 존재하여 반응성이 큰 활성산소종을 제거시키는데, 그 예로 간과 혈액에 존재하는 SOD는 생성된 $O_2^{\cdot -}$를 H_2O_2로 전환하는 것을 촉매한다(McCord 등, 1969 ; Fridovich, 1975). 이렇게 생성된 H_2O_2 는 cytochrome system을 함유한 모든 호기성 세포에 존재하며 heme을 갖고 있는 intracellular catalase에 의해서 물과 산소분자로 분해되어(Schonbaum 등, 1976) 자유라디칼의 축척에 의한 세포 손상을 억제하게 된다.

1948년에 catalase를 가지지 않은 사람이 발견되었는데(Takahara 등, 1948), 이런 사람은 보통 사람과 마찬가지로 건강하지만 어릴 때에 입 속이 잘 허는 경향이 있고, 상처에 과산화수소를 묻혀도 거품이 나지 않으며 상처의 혈액이 흑갈색으로 변색한다. 이것을 acatalasemia(무카탈라아제증)이라고 하며 열성 유전을 하

는 것으로 알려져 있으며 이 질병의 발생빈도는 보통 0.001% 이하이다. 또, 암환자는 간에서 catalase 활성이 정상인에 비해 떨어지는데, 그 이유는 아직까지 알려져 있지 않다.

Catalase는 1910년에 Wolff와 Stoecklin에 의해서 적혈구로부터 최초로 순수분리되어졌고, 높은 순도로 분리되어진 최초의 효소중의 하나이다. 간으로부터 분리되어진 catalase는 1937년에 이미 결정화 되었으며(Sumner 등, 1937), 순수분리의 방법이 Sumner(1941)에 의해서 재정리되어 졌다. 그 이후로 소(Sumner 등, 1937), 말(Agner 등, 1943), 사람의 간이나 혈구(Herbert 등, 1948), 양(Dounce 등, 1942), 쥐, 돼지의 간, 식물의 엽록체(Nicholls 등, 1963), 기타 균류(Jacob 등 1979)에서도 catalase가 정제되어 결정화 되었다. Catalase에 대한 연구는 과거 80년대부터 현미경 기술의 발달과 분자생물학적 기술의 도입으로 활발히 진행되었으며, 현재는 mutant를 이용한 유전자 조작의 연구도 행해지고 있다.

대부분의 catalase는 아미노산의 조성 성분에서는 차이를 나타내고 있지만, 물리적인 특징은 거의 유사하다. 이 효소의 일반적인 특징은 약 200,000 300,000 daltons의 분자량을 갖고 있고 4개의 동일한 subunits로 구성되어 있는데, subunits 각각의 분자량은 대략 55,000 68,000 daltons 정도이다. 또한 이 subunit들은 ferric form으로 존재하는 하나의 protoheme IX group을 갖고 있는데 이를 ‘heme catalase’라 하며 대부분의 catalase가 이에 속한다. 일부 박테리아 및 몇몇 생명체 세포는 활성부위에 heme대신 망간(manganase) 이온을 가지는데 이를 ‘Mn catalase’고 한다.

Catalase는 glucose oxidase, galactosidase, xanthine osidase의 효소 활성을 결

정할 때 사용되어 지고 다양한 가공식품 제조시 glucose oxidase와 함께 O_2제거 및 변색방지, 부패억제, 기타 살균시에 첨가된 H_2O_2 분해에도 널리 사용된다. 또 미생물관련 실험재료로도 이용되는데, 미생물 분류상에서 생화학적 분류시 catalase활성 능력 테스트에 이용되며, 상업적으로 응용되기 전의 실험단계에서 효소활성능력 테스트에 널리 이용된다. Catalase의 단백질 침투 기술을 이용한 노화예방 기능성 제품개발도 현재 진행중이다. 이와 같이 이용범위가 확대되는 추세에 맞추어 현재 순수 결정화된 catalase를 공급하는 곳도 많이 생겨나고 있으며 따라서 catalase는 여러 다방면에 효소공학에서 앞으로 널리 이용되리라고 본다.

지금까지 포유동물, 미생물, 식물 등에서의 catalase에 관한 연구는 많이 이루어졌다. 그러나 양서류에 있어서 catalase의 관련연구로는 양서류 적혈구 catalase와 H_2O_2해독에 관한 연구(Paniker 등, 1965)를 비롯하여 개구리 부갑상선 세포에서 catalase연구(Lange 등, 1974), 양서류의 catalase활성과 전기영동 패턴 비교(Alonso-Bedate 등, 1985)등 양서류에서의 catalase의 분리와 정제에 관한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 양서류인 황소개구리(Rana Catesbeiana Shaw)의 간으로부터 catalase를 분리 · 정제하여 그 생화학적 특성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 개구리(*Rana catesbeiana* shaw)는 부산에 위치한 부전시장에서 구입하여 빙장상태로 저온실(0±4℃)에 운반한 후 수돗물로 씻고, 간을 채취하여 시료로 사용하였다.

분리·정제시 사용한 수지는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-150, Sephacryl S-300과 Amersham Pharmacia Biotech Ltd. (Little Chalfont, Buckes, UK)에서 구입한 DEAE-Sephacel이며, 질소압력농축기와 한외여과막(Molecular weight cut off, MWCO 10,000)은 Sartorious Co. (Goettingen, Germany) 제품을 사용하였다. 최종 순도 확인은 Bio-Rad Co. (Hercules, CA, USA)의 miniprotanⅡ® gel electrophoresis system을 사용하였다. 겔 여과용 marker protein, SDS 전기 이동용 marker protein, sodium dodecyl sulfate(SDS), bovine serum albumin은 Sigma chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 그 외 다른 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. 방법

2-1. 조효소의 추출

황소개구리 간 400g에 5 mM $CaCl_2$를 포함한 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)을 1600 ml 넣고 균질기(ACE homogenizer AM-6)로 13,000 rpm에서 2분간 2회 균질화 하였다. 이 용액을 냉각원심분리기(Hanil Mega 17R)로 4℃에서 7,690 ×g로 10분간 원심분리하여 상층액을 취하고, 지질을 제거하기 위해 반응액의 20%(V/V)가 되게 CCl_4를 가하여 4℃ 저온실에서 30분간 교반한 후, 다시 원심분리(7,690 ×g, 10 min)하여, 그 상층액을 catalase의 조효소(crude enzyme)로 사용하였다.

2-2. Catalase의 정제

추출된 조효소액의 정제는 Fig. 1과 같은 방법으로 실행하였다. 즉, 추출된 조효소액을 20 80% ammonium sulfate로 염석하였고, 원심분리(7,690 ×g, 15 min)하여 침전물을 모아 최소량의 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0, 이하 A완충용액이라 명명함)에 녹여 동일 완충액으로 24시간 투석(Semi-permeable membrane : M.W. 12,000 14,000 cut-off)하였다.

이 조효소 액을 미리 A완충용액으로 충진하여 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50 컬럼(ø3.8×40 ㎝)에 흡착시키고 동일 완충액을 충분히 흘려 비흡착 부분을 제거한 후, A완충액에 NaCl을 가해 농도가 0에서 1.0 M이 되도록 선형상 농도구배법으로 분별용출(유속 : 0.8 ml/min, 분획량 : 4.8 ml)시켰다. 여기서 얻어진 각 획분마다 단백질 및 catalase 활성도를 측정하고, 효소활성이 있는 획분을 포집하여 질소압력으로 농축하고 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0, 이하 B완충액이라 명명함)에 대하여 투석하였다. 다음은 B완충액으로 미리 활성화된

Minced tissue

Homogenization with 4 vol, of 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 contaning 5 mM $CaCl_2$.
Centrifugation at 7,690 ×g for 10 min.

Supernatant

Removal remained lipid with 20%(v/v) of carbontetra choride.
Centrifugation at 7,690 ×g for 10 min.

Supernatant (Crude extract)

Salting out with $(NH_4)_2SO_4$ in 20 80% saturation range.
Centrifugation at 7,690 ×g for 15 min.

Precipitate

Dialysis against 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0).
DEAE-Sephadex A-50 column(ø3.8×40 ㎝) chromatography by liner gradient elution of 0 1.0 M NaCl in 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0).
Combining of the active fractions and concentration with ultrafilter(MWCO 10,000).
Dialysis against 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0).

Concentrae

Sephadex G-150 column(ø 2.5×100 ㎝) chromatography with 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0).
Elution with the same buffer.
Combining of the active fractions and concentration with ultrafilter(MWCO 10,000).

Concentrate

DEAE-Sephacel column(ø3.8×40 ㎝) chromatography by liner gradient elution of 0 1.0 M NaCl in 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0).
Combining of the active fractions and concentration with ultrafilter(MWCO 10,000).
Dialysis against 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0).

Concentrate

Sephacryl S-300 column(ø 2.5×100 ㎝) chromatography with 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0).
Elution with the same buffer.
Combining of the active fractions and concentration with ultrafilter(MWCO 10,000).

Purified catalase

Fig. 1. Scheme of purification procedure for the catalase from liver of bullfrog.

Sephadex G-150 컬럼(ø 2.5×100 ㎝)에 주입하고 B완충액을 0.3 ml/min의 유속으로 통과시켜 5 ml씩 분획하였다. 각 획분마다 단백질과 활성을 측정하고 가장 높은 활성을 가진 부분을 질소압력 농축하여 위와 동일한 방법으로 DEAE-Sephacel 컬럼(ø3.8×40 ㎝)을 이용하여, 흡착된 활성단백질은 A완충액에 NaCl 농도가 0에서 1.0 M이 되도록 선형상 농도구배법을 실행하였다(유속 : 1 ml/min, 분획량 : 5 ml). 얻어진 획분에서 다시 단백질 및 활성을 측정하여 질소압력으로 농축하고 B완충액으로 투석하였다. 마지막 단계로 부분 정제된 획분을 B완충액으로 평형화시킨 Sephacryl S-300 컬럼(ø 2.5×100 ㎝)에 주입하고 동일 완충액으로 용출(유속 : 1 ml/min, 분획량 : 5 ml)시켰다. 각 획분에서 단백질 및 catalase 활성을 측정하여, 최종적으로 모은 활성획분을 질소압력 농축하였다.

이상의 과정을 거쳐 정제한 효소를 -4℃ 이하에서 냉동 보관하면서 정제 효소의 특성 실험에 사용하였다.

2-3. Catalase 활성측정

Catalase의 활성은 Beers(1952)와 Abei(1974)의 방법에 준하여 catalase에 의해 기질인 H_2O_2(hydrogen peroxide)가 분해되는 것을 이용하여 측정하였다. 즉, 효소용액 0.6 ml를 25℃(실온)에서 5분간 평형화시킨 뒤 30 mM H_2O_2용액 0.3 ml를 첨가하여 240 nm(ε_{240nm} = 19.4 $M^{-1}Cm^{-1}$)에서 H_2O_2분해에 따른 흡광도의 감소를 10초 간격으로 1분동안 측정하였다. 효소의 활성도는 25℃, pH 7.0 에서 1분동안 분해된 1 μmol의 H_2O_2를 1 unit로 정의하였고 단백질 1 mg을 기준으로

표시하였다.

2-4. 단백질 정량

Bovine serum albumin을 표준으로 하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 미리 구한 검량선으로부터 단백질 농도를 구하였다. 즉 단백질용액 0.3 ml에 0.1 N NaOH에 녹인 2% Na_2CO_3 용액과 1% potassium sodium tartrate에 녹인 0.5% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$용액을 50 : 1 (v/v)로 혼합한 용액 3.6 ml을 가하고 20분 후 Folin-reagent 0.3 ml를 가하여 30분간 방치한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 정제과정 중의 단백질 획분의 검색은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

2-5. Catalase의 동정

2-5-1. 전기이동 분석

최종 정제된 catalase의 subunit 양상 및 분자량은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 실행하였다. 즉 subunit을 측정하기 위하여 SDS-PAGE(0.1% SDS를 함유하는 12.5% polyacrylamide gel)를 사용하여 2% SDS로 처리된 catalase 시료와 SDS-marker protein을 농도별로 slab gel (6×8 ㎝)에 주입하고 0.1% SDS를 함유한 0.25 M Tris-0.192 M glycine 완충용액(pH 8.3)을 이용해서 각 well당 2 mA 의 전류로 전기이동 시켰다. 전기이동 후 0.1% Coomassie Blue G-250, 45% methanol/10% glacial acetic acid를 사용하여 염색하였다. 염색이 끝난 겔은 10% acetic acid로 탈색시킨 후 0.005% Coomassie Blue G-250/6% perchloric acid로 보존하였다. 또한 SDS-marker protein의 전기이동도와 SDS화한 단백질의 전기이동도를 비교하여 catalase의 구성, subunit의 분자량 측정 및 순도를 판정하였다.

2-5-2. 겔여과에 의한 분석

겔 여과를 이용한 분자량의 측정은 Andrews 등(1970)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-150 컬럼(ø 2.5×100 ㎝)에 정제된 catalase와 겔 여과용 분자량 표준 단백질(Aproferritin : MW 443 kDa, β-Amylase : MW 20 kDa, Alcohol dehydrogenase : 15 kDa, Bovine serum albumin : MW 66 kDa)을 정제과정 중의 겔 여과와 동일한 조건으로 하여 교대로 용출(유속 : 0.3ml/min, 분획량 : 4.8ml)시킨 후에 용출부피(Ve)와 blue dextran의 용출부피(Vo)의 비로써 분자량을 측정하였다.

2-6. 정제 Catalase의 특성

2-6-1. pH 안정성

효소 용액을 50 mM Glycine-HCl 완충용액(pH 3.0), 50 mM Sodium acetate

완충용액(pH 4.0 5.0), 50 mM Sodium phosphate 완충용액(pH 6.0 8.0), 50 mM Glycine-NaOH 완충용액(pH 9.0 10.0)으로 각각 제조하여, 활성측정 온도 25℃에서 1시간 동안 정치시킨 후 잔류하는 효소의 활성을 측정하였다. 각각의 pH별로 측정한 효소 활성을 비교하여 상대활성으로 pH 안정성을 나타내었다.

2-6-2. 열 안정성

효소 용액을 30℃에서 80℃까지 10℃의 간격으로 각 온도에서 30분간 가온한 후, 활성측정 온도 25℃에서 15분간 안정화시킨 다음, 잔류하는 효소의 활성을 측정하였다. 각각의 온도별로 가온한 후에 측정한 효소의 활성을 비교하여 상대활성으로 열 안정성을 나타내었다.

2-6-3. 기질농도에 의한 영향

기질농도의 변화에 따른 catalase의 활성의 영향을 알아보기 위해, 15 mM, 30 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM의 각각 다른 농도의 H_2O_2용액을 기질로 사용하여 효소 활성을 측정하였다.

2-6-4. 흡광 스펙트럼

정제된 효소의 visible, ultraviolet absorption spectra를 spectrophotometer로 측정하였다. 즉 순수한 정제효소의 흡광 스펙트럼과 10 mM KCN용액을 첨가하

였을때의 흡광 스펙트럼을 비교하여 살펴보았다.

2-6-5. 화학약제에 의한 영향

여러 가지 화학약제들이 catalase의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 potassium cyanide(KCN), EDTA, cystein, soidum azide, hydroxyamin을 활성 측정용 혼합액에서의 최종 농도가 각각 1.0 mM이 되도록 만든 다음, 효소용액과 25℃에서 10분동안 반응시킨 후 활성을 측정하여 화학약제가 첨가되지 않은 경우의 활성과 비교하여 상대활성을 계산하였다.

결과 및 고찰

1. Catalase의 분리 정제

Catalase를 Fig. 1에 나타낸 방법에 따라 분리·정제하였다. 즉, 개구리간에 5 mM $CaCl_2$를 포함한 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)을 4배가 되도록 첨가하여 마쇄한 후 원심분리(7,690×g, 10 min)하여 침전물을 제거하고, 반응액에 대해 20 80% ammonium sulfate로 염석한 다음 투석하였다. 그 투석액을 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 평형화된 DEAE-Sephadex A-50 컬럼(ø3.8×40 ㎝)에 주입하여, 동일 완충액을 충분히 흘려 비흡착 부분의 제거시키고 0 1.0 M NaCl/10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 선형상 농도 구배법으로 분별용출(유속 : 0.8 ml/min, 분획량 : 4.8 ml)하여 분리한 후, 각 획분에 대한 280 nm에서의 흡광도와 catalase활성을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 단백질(A_{280})은 전체적으로 넓게 나타났지만 catalase 활성은 0.3 0.4 M NaCl 농도에서 나타났다.

DEAE-Sephadex A-50 컬럼에서 분리한 활성 획분을 모아 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)에 대해 투석하고 농축하여 분자량 범위가 300,000 5,000 Da인 Sephadex G-150 컬럼(ø 2.5×100 ㎝)에 주입하고 용출시켜(유속 : 3 ml/min 분획량 : 5 ml) 분리한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 두개의 단백질 획분이 관찰되었지만 하나의 단백질 획분에서만 활성이 나타났다. 활성이 나타난 획분을 모아 질소 농축하고 다시 위와 동일한 방법으로 DEAE-Sephacel 컬럼(ø3.8×40 ㎝)을 이용하여 흡착된 활성단백질을 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 NaCl

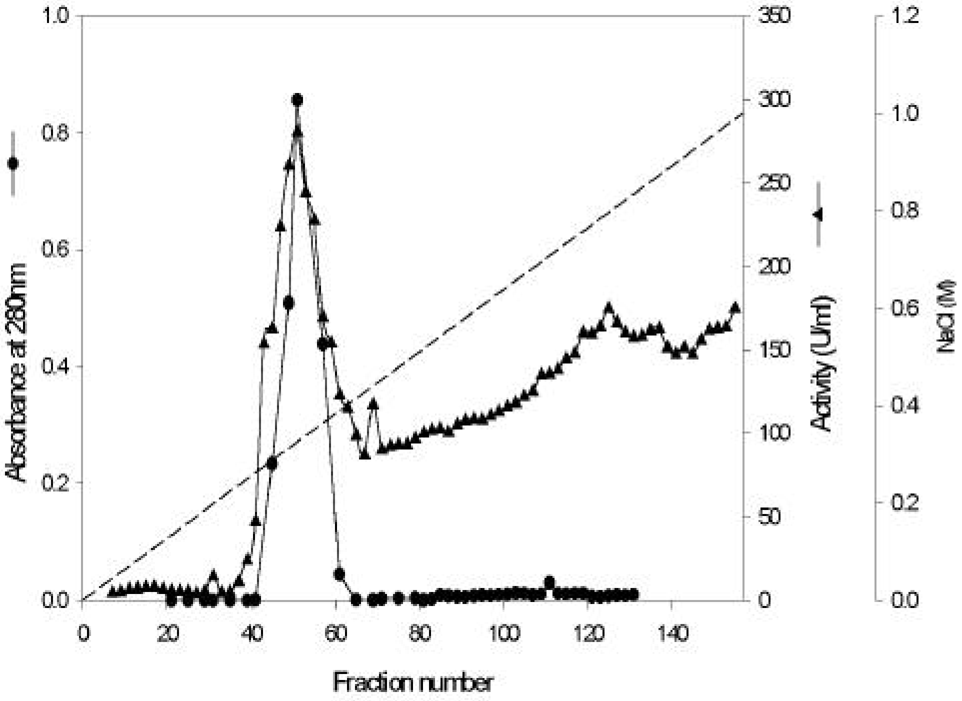

Fig. 2. Chromatogram of DEAE-Sephadex A-50 column(3.8 4.0 cm) chromatography of the ammonium sulfate saturation in the range of 20% to 80%. The column was eluted with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 and then a linear gradient of 0 1.0 M NaCl in the same buffer. Flow rate and fraction volume was 4.8 ml and 0.8 ml/min respectively.

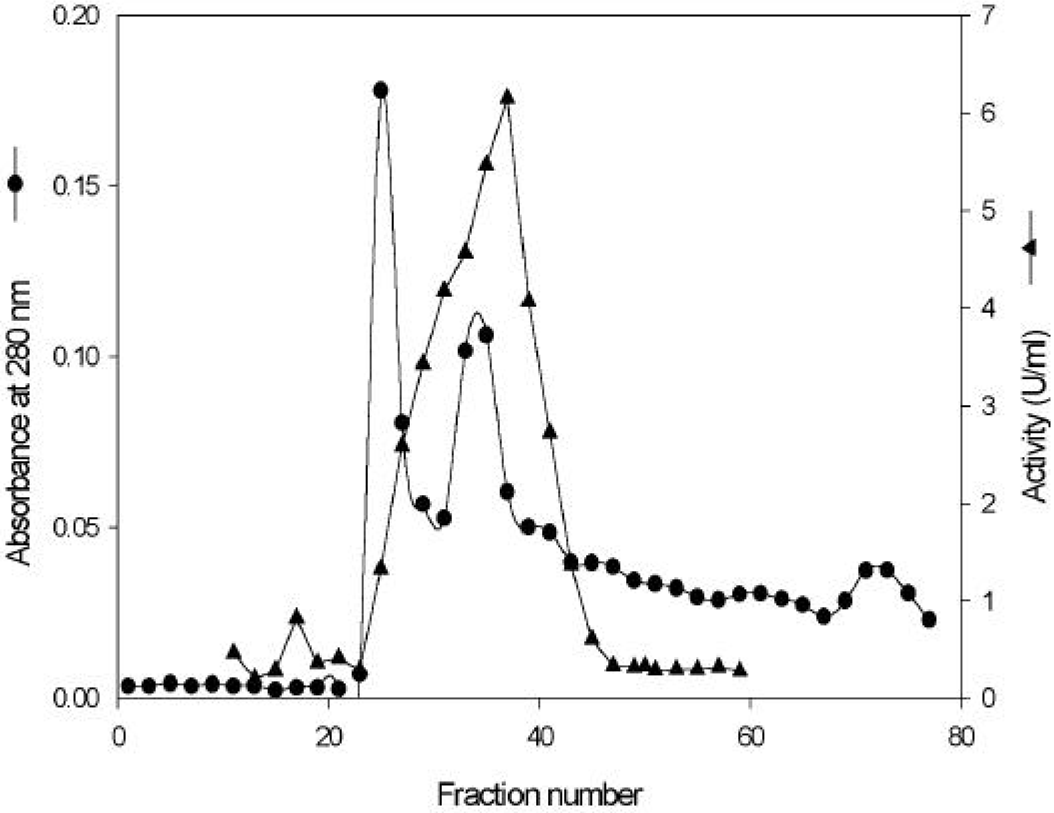

Fig. 3. Sephadex G-150 gel filtration chromatography of the partially purified catalase from liver of bullfrog. The active fractions from ion exchange chromatography was applied to Sephadex G-150 gel column(2.5×100 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0 and eluted with the same buffer. Each fraction containig of 5 ml were collected at a flow rate of 0.3 ml/min.

농도가 0에서 1.0 M이 되도록 선형상 농도구배법을 실행하여 (유속 : 1 ml/min, 분획량 : 5 ml) 분리한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 0.5 M NaCl 농도를 전후한 부분에서 효소 활성이 현저하게 나타났으며, 그 활성 획분을 다시 모아 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)에 대해 투석하고 농축한 다음, 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)으로 충진하여 평형화 시킨 Sephacryl S-300 컬럼(ø 2.5×100 ㎝)에 주입하고 동일 완충액으로 용출(유속 : 1 ml/min, 분획량 : 5 ml)시켰다. 각 획분에서 단백질 및 catalase 활성을 측정한 결과 하나의 획분으로 용출되었다(Fig. 5). 이 단계에서 catalase활성을 보인 획분을 농축하여 SDS-PAGE 전기이동법에으로 순도를 확인하였으며, 특성 실험에 이용하였다.

개구리간에 분포하는 catalase의 정제 단계별 총 단백질량, 고유활성, 수율을 정제한 정제도를 Table 1에 나타내었다. 20 80%의 포화황산암모늄을 처리한 경우는 조효소에 비해 고유 활성이 2.26배 증가하였고, DEAE-Sephadex A-50 이온 교환크로마토그래피를 실시함으로써 고유활성이 26.95배로 크게 증가하였다. 다음 단계로 겔여과와 2차 이온 교환 크로마토그래피를 실행함으로써 조효소와 비교하여 55.72배 고유활성이 증가하여 472.53 units/mg이었다. 마지막 단계로 Sephacryl S-300컬럼으로 최종 분리한 활성 획분의 고유 활성은 623.92 units/mg으로 약 73.57배 고유활성이 증가하였고 이때의 수율은 약 0.25%였다.

Kouichi(2000)는 개의 간에서 catalase를 분리한 결과 5.8% 수율로 147.6배 정제되어 36,720.0 units/mg의 고유활성을 가진다고 보고하였고, Halobacteria로부터 분리한 catalase도 6,422.0 units/mg으로써 106배의 정제도를 나타내는 것으로 보고된 바 있다(Nany 등, 1994). 또 밀의 배에서 분리한 catalase는 83 units/mg의 활성을 가지며 54배 정제되어 3.2 %의 수율은 가진다고 보고하였다(Garcia

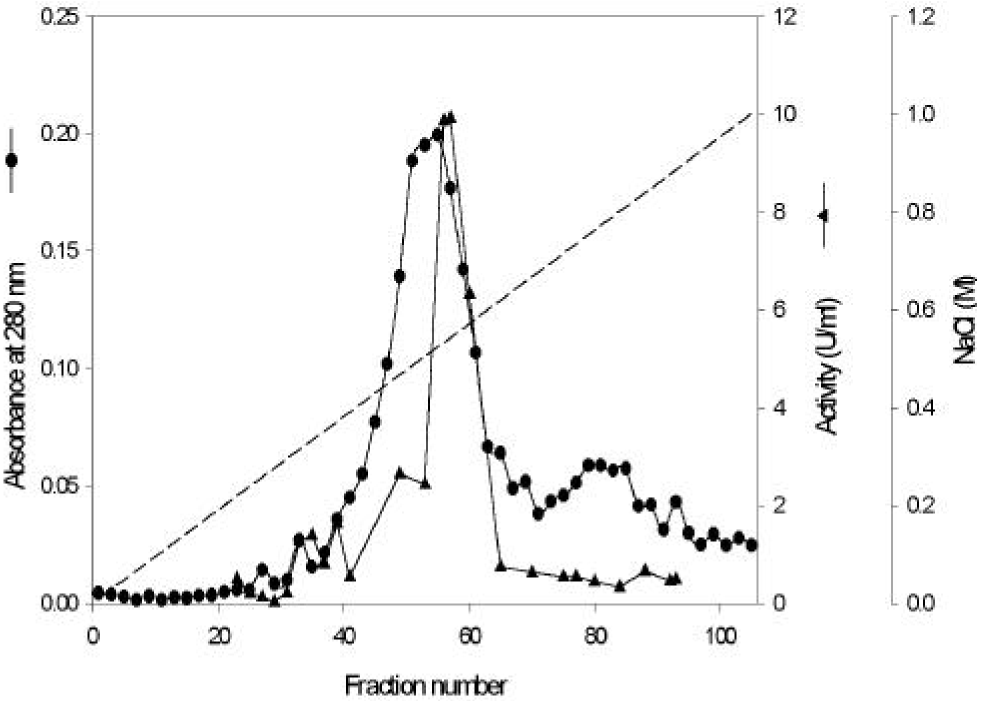

Fig. 4. Rechromatogram of the catalase fraction pooled from Sephadex G-150 column chromatography. The column(3.8×40 cm) was eluted with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 and then a linear gradient of 0 1.0 M NaCl in the same buffer. Flow rate and fraction volume was 5 ml and 1 ml/min respectively.

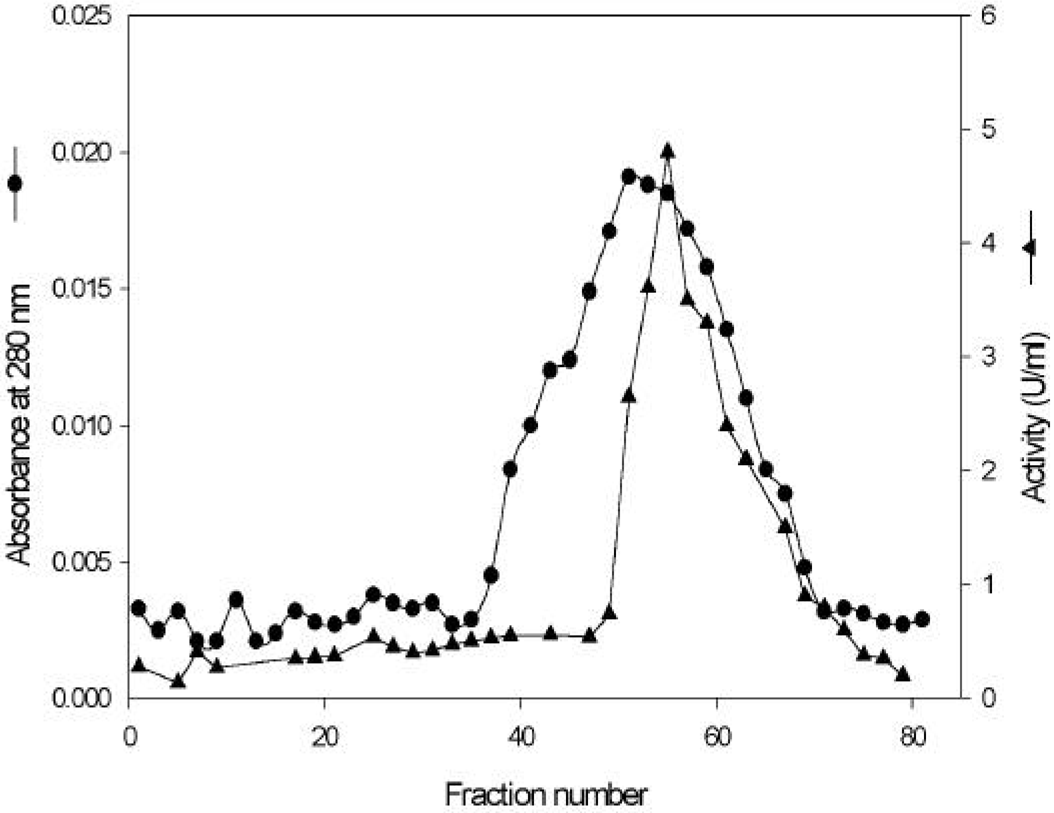

Fig. 5. Sephacryl S-300 gel filtration rechromatography of catalase from liver of bullfrog. The active fractions from after ion exchange chromatography was applied to Sephacryl S-300 column (2.5×100 cm). The column was eluted with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. Fractions of 5 ml each were collected at flow rate of 1 ml/min.

Table 1. Purification of catalase from liver of bullfrog.

Purification step	Total protein (mg/ml)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude enzyme	10,123.93	85,850.92	8.48	1	100
Ammonium sulfate	1,124.93	21,564.91	19.17	2.26	25.12
DEAE-Sephadex A-50	55.37	12,652.05	228.50	26.95	14.73
Sephadex G-150	8.53	2,892.18	339.06	39.98	3.37
DEAE- Sephacel	1.53	722.97	472.53	55.72	0.84
Sephacryl S-300	0.34	212.13	623.92	73.57	0.25

등, 2000).

2. Catalase의 동정 및 분자량

최종 정제된 catalase의 순도와 구성 subunit의 확인 및 분자량 측정은 SDS-PAGE 전기 이동법과 Sephdex G-150 겔 여과법으로 실행하였다. Fig. 6은 정제된 효소의 12.5% SDS-PAGE 전기이동상 단일 band로 나타나 순수한 물질임을 확인할 수 있었으며, marker protein으로 fumarase (MW : 58.6 kDa), egg albumin (MW : 45 kDa), pepsin (MW : 34.7 kDa), trypsinogen (MW : 24 kDa)을 사용하여 측정한 결과 분자량은 47.7 kDa 이었다.

또한 Sephadex G-150을 사용하여 catalase의 분자량을 측정한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Marker protein으로는 Aproferritin (MW 443 kDa), β-Amylase (MW 20 kDa), Alcohol dehydrogenase (15 kDa), Bovine serum albumin (MW 66 kDa)을 사용하였으며, catalase의 분자량은 186 kDa으로 SDS-PAGE 전기 이동법에 의해 얻은 값의 약 4배에 해당하는 값을 나타내었는데, 이러한 결과로부터 catalase는 47.7 kDa의 subunit 4개로 구성된 homotetrameric 효소임을 확인했다. 이는 일반적인 catalase의 구조와 일치되는 결과로써(tanford 등, 1962 ; Sund 등, 1967), Kouichi 등(2000)의 보고에 의하면 개의 간에서 분리한 catalase는 겔 여과법에 의해 분자량을 측정한 결과 230 kDa의 분자량을 가졌는데 SDS-PAGE 전기이동법에 의하면 63 kDa 4개의 동일한 subunit으로 구성된 homotetrameric 효소임을 밝혔고, Clyate 등(1959)도 Rhodabacter sphaeroides에서 분리한 catalase 역시 232 kDa 으로 homotetrameric 효소임을 밝혔다. 이 외

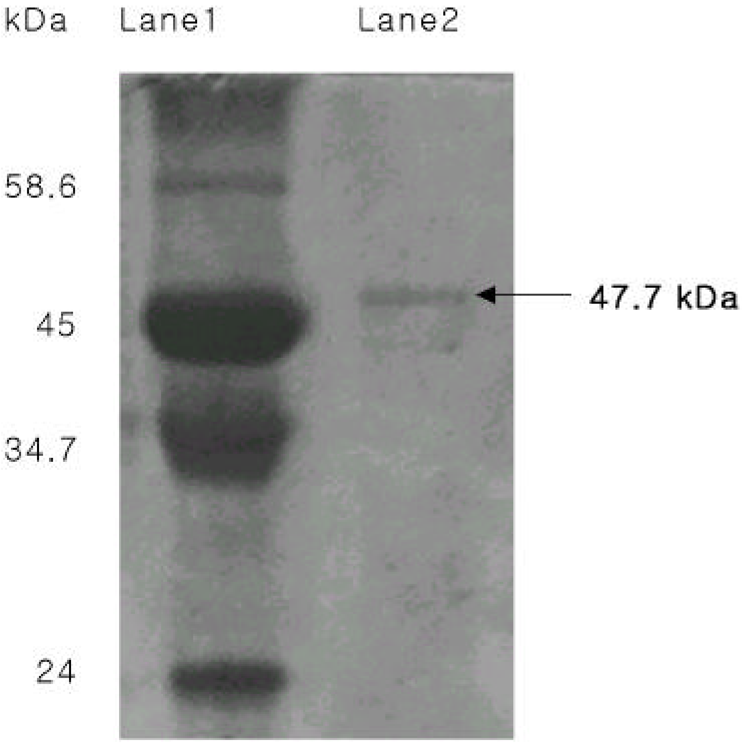
kDa
Lane1
Lane2
58.6
45
34.7
24
47.7 kDa

Fig. 6. 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified catalsae from live of bullfrog. Lane 1 : Marker proteins ; fumarase (58.6 kDa), egg albumin (45 kDa), pepsin (34.7 kDa), trypsinogen (24 kDa). Lane 2 : subunit of catalase (47.7kDa)

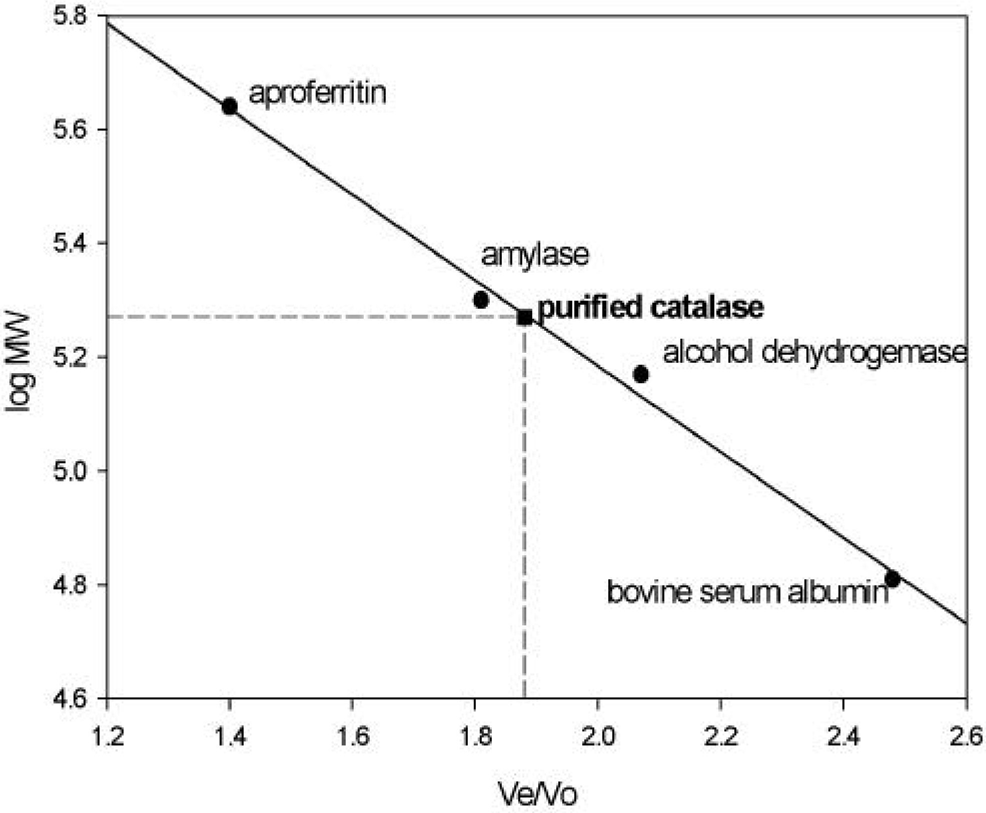

Fig. 7. Estimation of molecular weight of the bullfrog catalase by gel filtration with Sephadex G-150 column (2.5×100 cm). Fractions of 4.8 ml eachwere collected at a flow rate 0.3 ml/min. Molecular weight standards : aproferritin(443 kDa), β-amylase(200 kDa), alcohol dehydrogenase(150 kDa), bovine serum albumin(66 kDa).

에도 사람, 소, 돼지, 양의 간에서 분리한 catalase도 마찬가지로 4개의 subunit로 구성되어 있다는 것이 밝혀졌다(Roger 등, 1972).

3. 정제 Catalase의 특성

3-1. pH 안정성

황소 개구리 간으로부터 정제되어진 catalase의 활성에 대한 pH의 안정성을 알아보기 위하여 25℃에서 1시간 동안 각 pH 별로 반응시킨 후 잔존하는 활성을 측정하였으며, 그 결과는 최고 활성을 나타내는 pH 6에서의 값에 대한 상대 값으로 계산하여 Fig. 8에 나타내었다. 정제된 catalase는 pH 6 10 범위에서 80% 이상의 안정성을 보였고, pH 6 이하의 범위에서는 그 활성이 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다.

많은 생물에서 분리된 catalase는 넓은 pH 영역에서 안정한 활성을 가진다고 보고되어 지고 있는데(Schonbaum 등, 1976), Halobacteria로부터 분리한 catalase도 pH 7 이상에서는 pH에 대한 높은 안정성을 가지지만 pH 7이하에서는 활성이 급격히 감소하는 경향을 보인다고 보고되었으며(Nancy 등, 1995), Rhodospirillaceae의 catalase 역시 pH 6과 10사이에서는 높은 안정성을 보이나 pH 6 이하에서는 그 활성이 급격한 감소를 나타내는 것으로 보고된 바 있다(Detlef 등, 1998). 황소개구리 간에서 추출한 catalase도 마찬가지로 pH 6 10 의 넓은 영역에서 pH에 대한 안정성을 가진다는 것을 알 수 있었다.

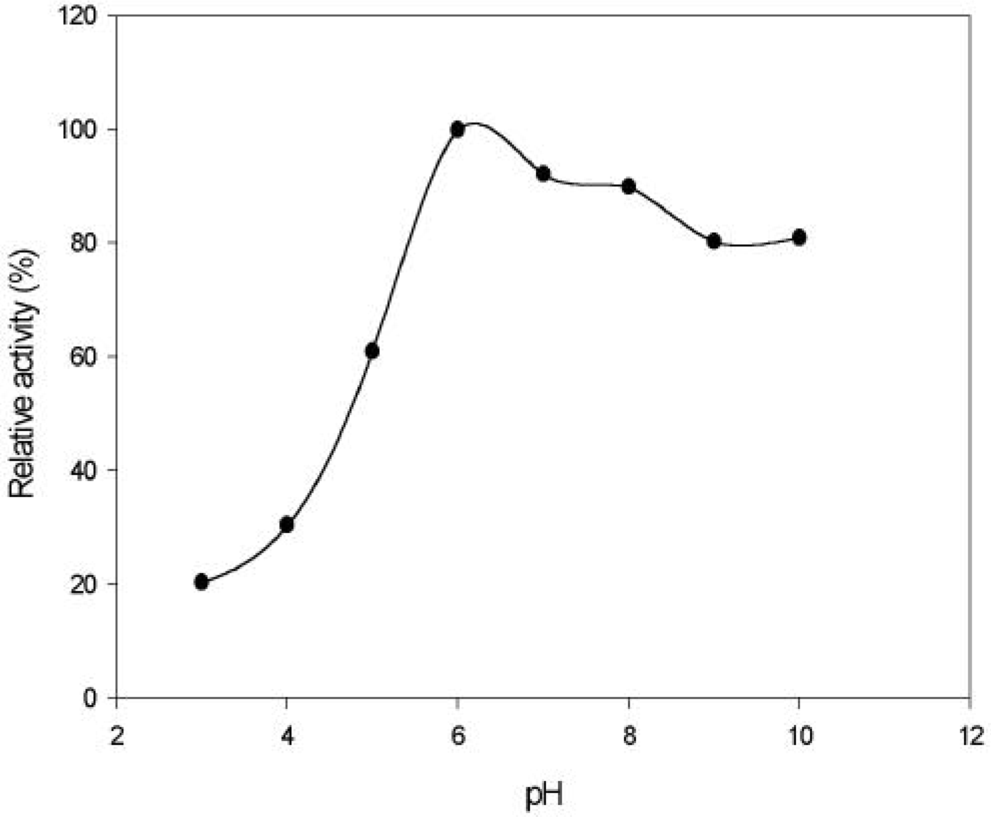

Fig. 8. Effect of pH on the activity of purified catalase from bullfrog liver. Buffer system used were glycine/HCl (50 mM, pH 3.0); sodium acetate (50 mM, pH 4.0-5.0); sodium phosphate (50 mM, pH 6.0-8.0); glycine/NaOH (50 mM, pH 9.0-10.0). The reaction mixtures were incubated at 25℃ for 1 hr.

3-2. 열 안정성

정제된 catalase를 30℃에서 80℃까지 10℃의 간격으로 각 온도에서 30분간 가온한 후, 잔류하는 효소의 활성을 측정한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. Fig. 9에 나타난 바와 같이 30℃에서 50℃까지는 90%이상의 높은 활성을 나타내었으나, 60℃이상의 온도에서는 활성이 급격히 감소함을 알 수 있었다. 소의 간으로부터 분리한 catalase는 65℃에서 가온하였을 경우 완전히 활성을 잃는다고 밝혀져 있으며, 미생물인 *Asp. niger*로부터 분리한 catalase 역시 60℃로 반응시킬 경우 85%의 활성을 잃어버리는 것으로 밝혀져 있다(Scott 등, 1960). 본 연구에서 정제된 catalase도 60℃ 이상의 온도에서 약 70% 이상의 활성을 잃는 것으로 밝혀져 다른 catalase들과 비슷한 경향을 가진다는 것을 알 수 있었다.

3-3. 기질 농도에 의한 영향

기질 용액의 농도가 정제 catalase의 활성에 미치는 영향을 알아보기 H_2O_2를 기질로 사용하여 15 mM에서 150 mM 까지의 각각 다른 농도의 H_2O_2 용액을 만든 다음 효소용액과 함께 반응시켜 활성을 측정하였다. H_2O_2 용액의 농도가 높아짐에 따라 효소 활성도 함께 증가하는 것이 관찰되었고, H_2O_2 용액의 농도가 100 mM 이상에서는 활성이 약간 줄어들긴 하였으나 거의 일정한 수준으로 유지되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 10). H_2O_2 용액의 농도가 15 mM에서 100 mM까지는 일차방정식 상태로 활성이 빠르게 증가하는 경향을 볼 수 있는데 이는 catalase의 전형적이 특성을 나타내는 것이다. 이때의 H_2O_2 용액의 농도와 활성

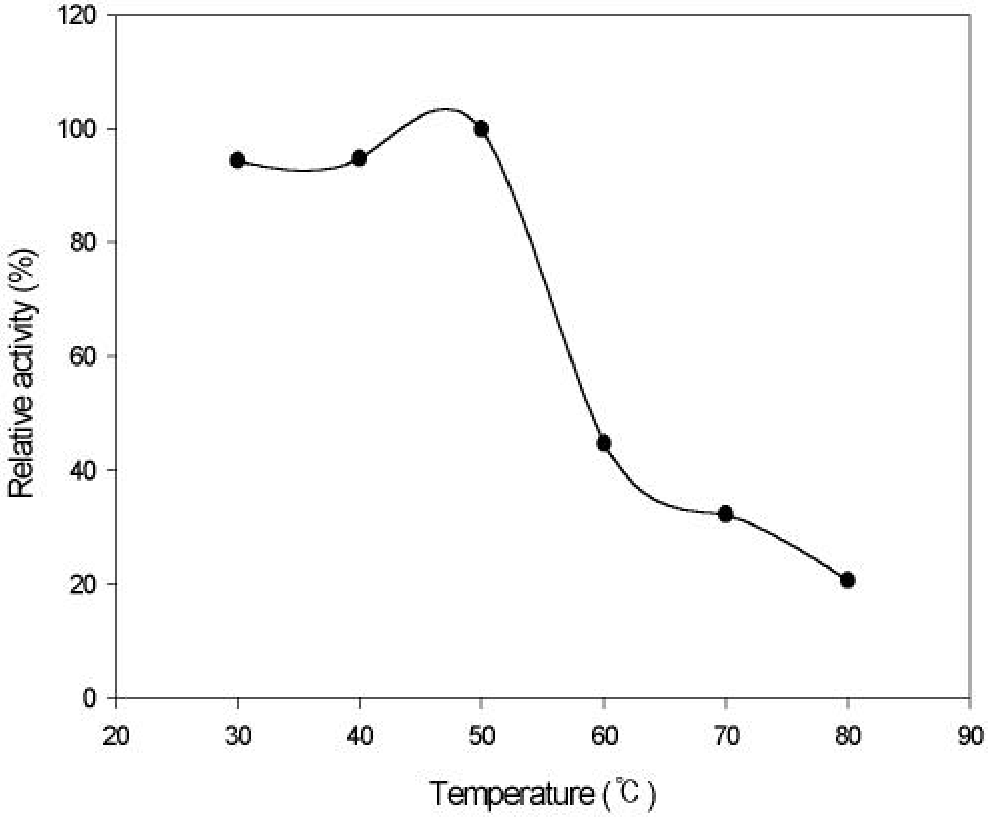

Fig. 9. Effect of temperature on the activity of purified catalase from bullfrog liver.

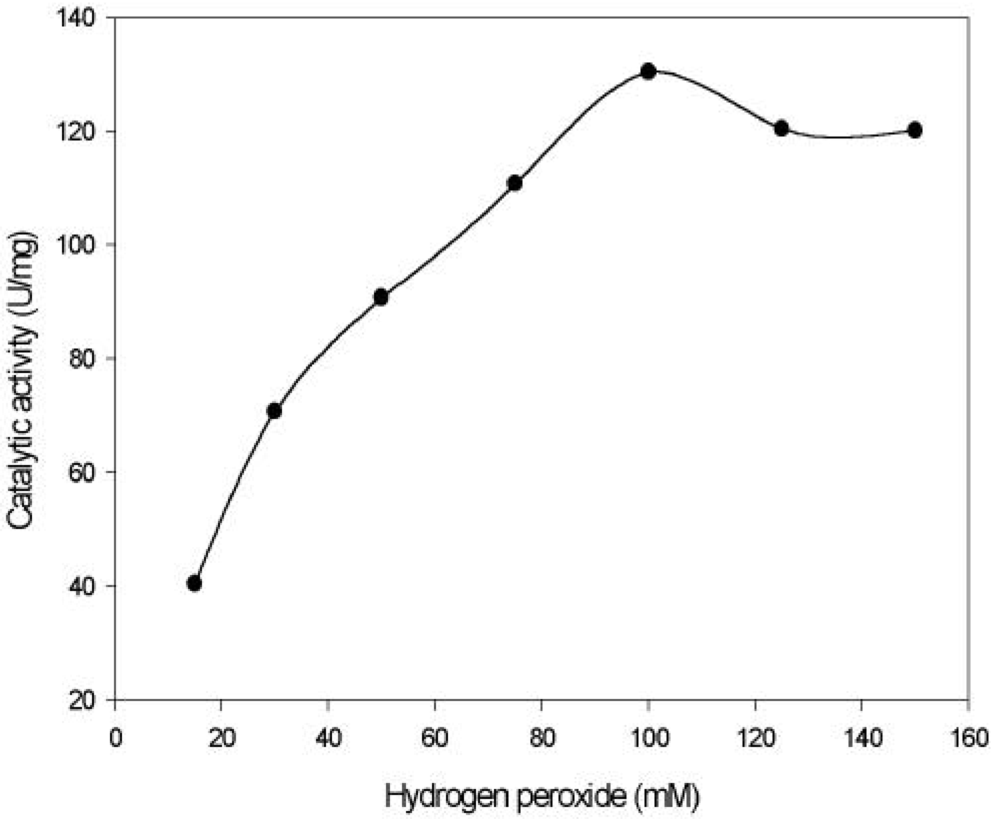

Fig. 10. Effect of hydrogen peroxide concentration on the purified bullfrog catalase activity.

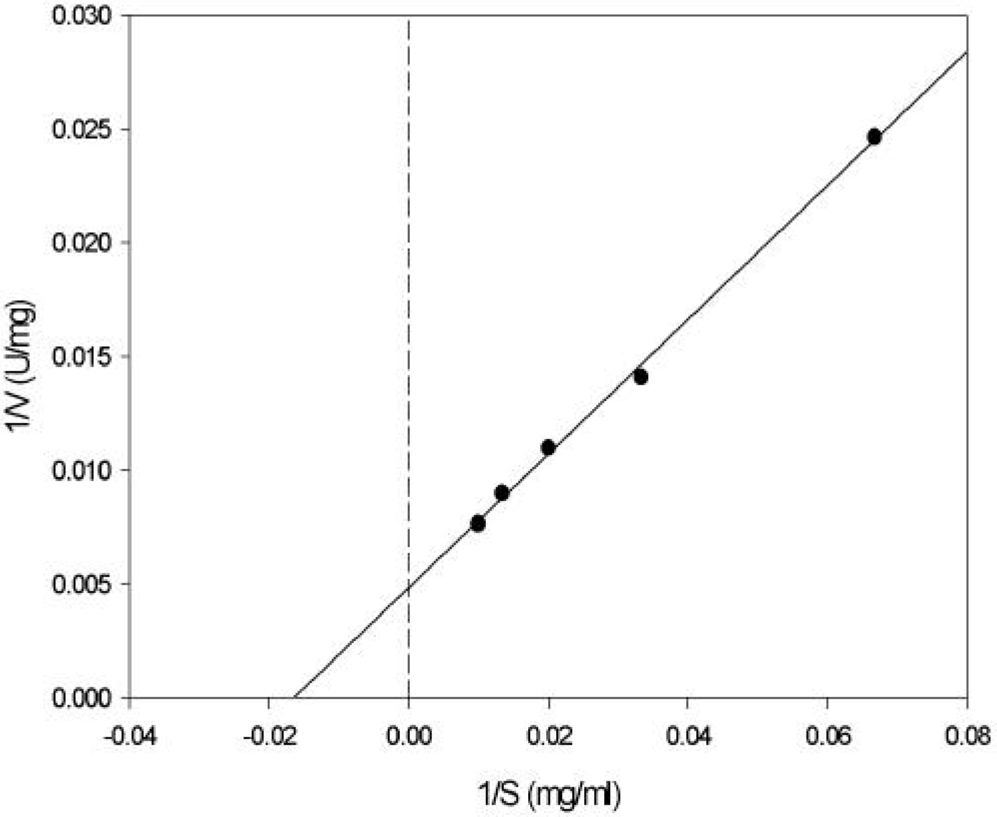

Fig. 11. Lineweaver-Burk plot of the bullfrog catalase. Initial velocity was plottedas a function of substrate(hydrogen peroxide) concentration.

을 이용하여 Michaelis-Menten 식에 적용시키면 반응속도를 구할 수 있다(Fig. 11). 이 때의 *Km*값은 20 mM이였고, *Vmax*는 51.91 U/mg인 것을 알 수 있었다.

3-4. 흡광 스펙트럼

황소개구리 간으로부터 정제한 catalase의 흡광 스펙트럼을 Fig 12에 나타내었다. 순수 정제된 효소는 408 nm에서 Soret band를 가지고 있으며, 이 band는 10 mM cyanide를 첨가하면 417 nm로 이동하는 것을 알 수 있었다. 다른 여러 catalase도 이와 비슷한 경향을 가지는 것으로 보고되어 지고 있는데(Hochman 등, 1987 ; Goldberg 등, 1989), 이는 전형적인 heme prosthetic group을 가진 heme catalase란 것을 알 수가 있다. 또한 정제된 catalase 시료의 heme에 대한 흡광도와 단백질에 대한 흡광도의 비율(A_{406}/A_{280})을 살펴보면 0.54로 약간 낮은 편인데 이는 정제 과정 동안 부분적으로 heme을 잃었기 때문이라고 생각할 수 있다.

3-5. 화학약제에 의한 영향

여러 가지 화학약제들이 황소개구리 간으로부터 정제된 catalase의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 효소용액을 potassium cyanide, EDTA, cystein, soidum azide, hydroxyamin등의 화학약제와 반응시킨 후 활성을 측정하여 화학약제가 첨가되지 않은 경우의 활성과 비교하여 상대활성을 계산하여 Table 2에 나타내었다. 대부분의 catalase의 경우 soidum azide, hydroxyamin,

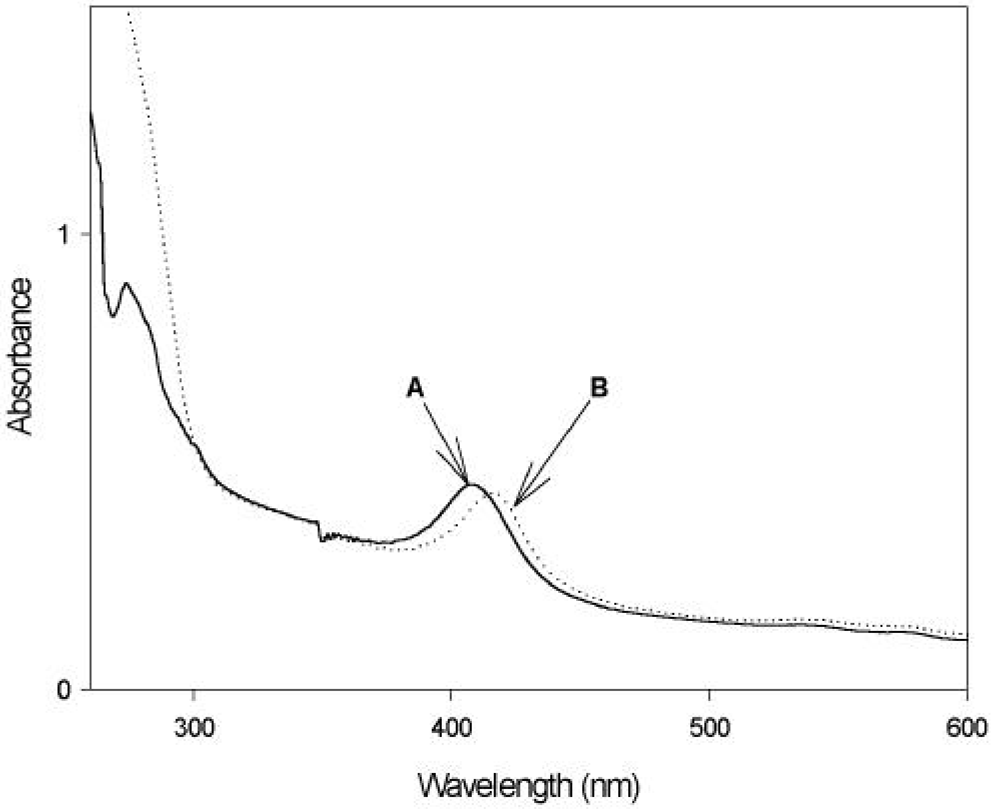

Fig. 12. UV-Visible absorption spectra of the purified bullfrog catalase. The spectrum of the native enzyme(**A**) and that of the enzyme(**B**) in the presence of 10 mM CN^- were shown.

Table 2. Effect of various reagents on the catalase activity.

Reagent	Relative activity(%)
None	100
EDTA	96
KCN	38
Cystein	80
Hydroxyamine	14
NaN_3	22

The concentration of each reagents in the assay mixture was 1.0 mM.

potassium cyanide 시약에 의해 활성이 저해된다고 보고되어지고 있는데 (Masayu,ki 등, 1999 ; Anke 등 2001), 본 연구에서도 마찬가지로 이 세 가지 시약에 대하여 활성이 크게 저해된다는 것을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 황소개구리 간에 분포하는 catalase를 황산암모늄으로 염석한 다음 두 차례의 이온 교환 크로마토그래피와, 겔 크로마토그래피를 거쳐 분리·정제하였고, 정제한 catalase에 대하여 생화학적 특성을 검사한 결과는 다음과 같았다.

1. 정제된 catalase의 고유 활성은 조효소에 비해 73.57배 증가하여, 623.92 units/mg이었다.
2. SDS-PAGE 전기이동과 Sephadex G-150 겔여과에 의해 측정된 황소개구리 간에 존재하는 catalase의 분자량은 186 kDa으로, 네 개의 동등한 subunit로 구성된 homotetrameric 효소임을 확인했다.
3. 정제된 catalase의 pH안정성은 pH 6에서 pH 10까지 거의 활성을 유지하여 비교적 넓은 pH에서 안정함을 알 수 있었다.
4. 정제된catalase의 온도에 대한 안정성은 30℃에서 50℃까지의 온도에서는 90% 이상의 높은 활성을 나타내었으나, 60℃이상의 온도에서는 활성이 급격히 감소하였다.
5. 정제된 catalase는 기질 용액의 농도가 10 mM과 100 mM일때는 활성이 빠르게 증가하나 100 mM이상에서는 어느 정도 일정한 수준으로 유지되었다.
6. 황소개구리 간의 catalase는 408nm에서 Soret band를 가지고 있었으며 heme에 대한 흡광도와 단백질에 대한 흡광도의 비율은 0.54였다.
7. 정제된 catalas는 KCN, NaN_3, Hydroxyamine에 의해 활성이 급격히 감소하였다.

참고문헌

Abei, H. (1974) Methods of enzymatic analysis, *Acad. Press*, **105**, 673-684.

Alonso-Bedate, M. (1985) Catalase enzymatic activity and electrophoretic patterns in adult amphibians--a comparative study. *Comp Biochem Physiol B*., **80**, 853-8.

Anger, K. (1943) Crystallin Horse Liver Catalase. *Ark. Kemi Min, Geol.*, **16A**.

Arun, S. and P. Subramanian (1998) Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development, *Comp. Biochim. Physiol.*, **121**, 273-277.

Detlef, P. and M. Blaut (1998) Purification and characterization of a catalase from the nonsulfur phototrophic bacterium *Rhodobacter Sphaeroides* ATH 2.4.1 and its role in the oxidative stress response, *Arch Microbiol.*, **169**, 503-508.

Dounce, A. L. (1942) Further Observation Concerning the preparation and properties of Catalse from different Sources. *J. Biol. Chem*., **143**, 497.

Garcia, R., N. Kaid., C. Vignaud and J. Nicolas (2000) Purification and some properties of catalase from Wheat Germ, *J. Agric. Food Chem*., **48**, 1050-1057.

Goldberg, I. and A. Hochman (1989) Purification and characterization of novel type of catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae, Biochim*

Biophys Acta., **991**, 330-336.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1989) Free radical in biology and medicine, Clarendon Press, Oxford.

Hamilton-Koch, W., R. D. Snyder and J. M. Lavelle (1986) Metal-induced DNA damage and repair in human diploid fibroblasts and Chinese hamster ovary cell, *Chem. Biol. Interact*., **59**, 17-28.

Herber, D. and J. Pinsent (1948) Crystalline Human Erythrocyte Catalase. *Biochem. J*., **43** 203.

Hochmann, A. and A. Shemesh (1987) Purification and characterization of catalase-peroxidase and a typical catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae, Biochim Biophys Acta*., **1077**, 299-307.

Holmes, R. S. and J. C. Masters (1972) Species specific feaures of the distribution and multiplicity of mammalian liver catalase, *Arch. Biochem. Biophy*., **148,** 217-223.

Jacob, G. S. and Orme-Johnson, W. H (1979) Catalase of *Neurospora crassa*. 1. Induction, Purification and physical properties. *Biochem*., **18**, 2967.

Jokoby, W. B. (1980) "Glutation peroxidase" enzymatic basis of detoxication I, *New York Academic Press*., 333-353.

Jovita, A., S. Richard and S. Jhon (1995) Purification and Characterization of the Mycobacterium smegmatis Catalase-Peroxidase involved in isoniazid activation, **270,** 22290-22295.

Kagawa. M., N. Murakoshi and Y. Nishikawa (1999) Purification and clonig of thermostable manganese catalase from a Thermophilic Bacterium, *Arch. Biochem. Biophys*., **362**, 346-355.

Kuusk, H., M. Björklund and J. Rydström (2001) Purification and charaterization of a novel bromoperoxidase-catalase isolated from bacteria found in recycled pulp white water, *Enzyme and Microbial Technology*, **28,** 617-624.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterilphage T4. *Nature,* **227**, 680.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem*., **193,** 265-275.

Lung, R. H., A. R. Soames and R. Coleman (1974) Catalase- like crytals in parathyroid gland cells of Rana temporaria L. *Cell Tissue Res*., **153**, 167-173.

McCord, J. M. and I. Fridovih (1969) Superoxide dismutase : Enzymatic function erythrocuprein (hematocuprein), *J. Biol. Chem*., **244,** 6049-6055.

Nakamura, K., M. Watanabe., Y. Sasaki and T. Ikeda (2000) Purification and characterization of liver catalase in acatalasemic beagle: comparison with nomal dog liver catalase, *The International Journal of Biochemistry & Cell Bilogy*, **32,** 89-98.

Nancy. J. and M. L. Salin (1995) Purification and characterization of mesohalic catalase from the Halophilic Bacteriunm *Halobacterium halobium*, *J. Bacteriol*., **177,** 278-384.

Nelson, D. P. and L. A. Kiesow (1972) Enthalphy of decomposition of hydrogen peroxide vy catalase at 25℃, *Analytical Biochemistry*, **49,** 474-478.

Nelson, S. D. (1995) Mechanism of the formation and disposition of reactive metabolites that can acute liver injury, *Drug Meta Rew*., **27**, 147-177.

Oleinick, N. L., S. Chiu, N. Ramarkrisshnan and L, Xue (1987) The formation, identification and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells, *Br. J. Cancer*, **55,** 135-140.

Paniker, N. V. and G. Y. Iyer (1965) Erythrocyte catalase and detoxication of hydrogen peroxide. *Can J Biochem*., **43.** 1029-1039.

Schonbaum, G. R. and B. Chance (1976) Catalase p. 363-408, In. P. D. Boyer(ed.), The enzyme, vol. 13. Academic Press, New York

Shim. S., A. Netrusov, M. Sordel and M. Wicke (1999) Purification, characterization, and primary structure of a monofunctional catalase from *Methanosarcina barkeri*, *Arch Microbiol*., **171**, 317-323.

Sumner, J. B. and A. L. Dounce (1936) Crystalline Catalase, *J. Biol. Chem*., **121,** 417.

Sunderman, F. W. Jr. (1986) Carcinogenicity and mutagenicity of some metals and their compounds, Lyon, IARC, *Scientific Publications*., **71**, 17-43.

Wanger, G. and D. Santos (2000) Purification and characterization of an iron superoxide dismutase and a catalase from sulfate- reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*, *J. Bacteriol*., **182,** 796-804.

Yang, H. S., H. C. Yang and Y. Tani (1988) Catalase from *Aspergillus niger* KUF-04, *Kor. J. Apple. Microbiol. Bioeng.*, **16,** 193-198.

Yang, Q. and W. D. Joseph (1998) Rapid one-step isolation of mouse liver catalase by immobilied metal ion affinity chromatograph,. *Protein expression and purfition*, **12,** 277-283.

감사의 글

본 연구와 수학과정 중 부족함이 많은 저에게 끊임없는 관심과 세심한 배려로 지도하여 주신 김세권 지도교수님께 진심으로 깊은 감사와 존경을 올립니다. 부족한 논문을 깊은 관심으로 성신 성의껏 논문 심사를 해 주신 문성훈 교수님, 손병화 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 저의 학위 과정 중 격려와 도움을 주신 황금소 교수님, 이동재 교수님, 이욱 교수님, 문성두 교수님, 심현관 교수님, 김주창 교수님, 김돈 교수님, 변상용 교수님, 김영일 교수님, 강영수 교수님께도 감사를 드립니다.

논문이 완성될 때까지 좋은 말씀들과 가르침을 주셨던 변희국 선생님, 송병권 선생님, 박표잠 선생님께 진심으로 감사드립니다. 2년동안 같이 생활하면서 힘들때마다 격려와 도움을 아끼지 않으셨던 이상훈 선배님, 제재영 선배님께도 깊이 감사드립니다. 그리고 전신영 동기님과 천충길, 박지영, 조영숙, 허성달 후배님께도 고마움을 전합니다.

대학원 생활동안 저에게 많은 힘이 되어준 영숙이, 희진이, 수진이, 은정이에게도 고마운 마음을 전합니다.

오늘의 제가 있기까지 사랑과 믿음으로 그 누구보다도 큰 힘이 되어주신 부모님과 공부한다고 항상 바쁜 동생 민재, 지금 나라를 지키고 있는 동생 정욱이와 이 작은 결실을 나누고 싶습니다.