

효소반응 모델식에서의 매개변수 추정

채 희 정 · 김 지 현 · 차 형 준 · 유 영 제
서울대학교 공과대학 화학공학과

Parameter Estimation in Enzymatic Reaction Model

Hee Jeong Chae, Ji Hyeon Kim, Hyung Joon Cha and Young Je Yoo
Department of Chemical Engineering, Seoul National University
Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

A simple and convenient method was introduced to determine the kinetic parameters for various enzymatic reaction kinetics. The method based on integrated formular can be applied to the parameter estimations from a single experiment. A modified three-parameter model was applied for the parameter estimation in reversible reaction and the equilibrium substrate concentration could be also estimated. It is possible to identify the enzymatic reaction pattern by inspecting the parameter values and the square of the correlation coefficient.

서 론

효소반응 모델식에서 매개변수를 정확히 추정하는 것은 효소반응 속도론의 이해에 있어서, 그리고 효소 반응기의 설계, 제어 및 최적화에 있어서 매우 중요하다. 매개변수를 결정하는 방법에는 여러가지가 있다. 그 중 전통적으로 많이 사용되고 있는 방법들은 시간에 대한 농도의 데이터로부터 반응속도를 구하여 속도데이터와 농도데이터 간의 이중역수 도해(double-reciprocal plot)를 통해 매개변수를 추정하는 방법으로 Lineweaver-Burk (1), Eadie-Hofstee(2) 및 Hanes(3) plot 등이 있다. 그러나 이러한 방법들은 반응속도를 구하는데 많은 오차를 포함하기 때문에 정확한 매개변수의 추정이 어려우며 저해작용이 있을 경우에는 초기 기질농도 및 저해제의 농도를 바꿔가면서 여러번의 반복실험을 하여야

한다.

효소반응 모델식에서 매개변수를 추정하는 데 있어 도식적인(graphical) 방법대신에 최소자승법 등과 같은 통계적인 방법의 적용이 시도되어 왔다(4-7).

반응속도식을 적분하면 기질농도와 시간에 대한 관계식을 얻는데, 이 적분식을 이용하여 매개변수를 추정할 수 있으며 이렇게 함으로써 반응속도 추정에서 발생하는 부정확성을 극복할 수 있다. Halwachs(7)는 저해작용이 없는 단순한 Michaelis-Menten 속도식을 적분하여 매개변수인 최고효소반응속도(V_{max})와 Michaelis-Menten 속도상수(k_m)를 추정하는 방법을 제시하였다. 그러나 실제의 효소반응은 기질 저해나 생산물 저해를 받는 경우가 많으므로 이러한 방법으로는 저해 모델식의 매개변수를 추정할 수 없다. Hsu와 Tsao(8)도 유사한 방법을 이용하여 생산물 저해가 있는 모델식의 매개변수를 추정하는

방법 및 저해패턴을 확인(identification)하는 방법을 제시 하였으나 기질 저해가 있는 모델식이나 가역반응 모델식 에 대해서는 고려하지 않았다. 최근에 Yang과 Okos(9)는 복잡한 생산물 저해가 있는 효소반응에서의 매개변 수를 추정하는데 적분식을 사용하였는데 이 방법은 여러 번의 실험결과를 도시해야만 매개변수값을 얻을 수 있다. 이외에도 Gauss-Newton method, Marquardt method (10)등의 nonlinear regression에 의한 매개변수 추정 방법 이 있는데 이들 방법은 수학적으로 복잡하며 매개변수의 초기추정치를 잘 설정하여야 하는 문제점이 있다.

본 논문에서는 1회의 회분실험 데이터를 적분식에 이용하여 비저해반응은 물론 기질 저해반응, 생산물 저해 반응 및 가역반응 등 여러가지 모델식의 매개변수 값들 을 추정할 수 있는 방법을 제시하였다. 또한 반응특성이 잘 알려져 있지 않은 효소반응의 경우에도 실험 데이터 로부터 여러가지 모델식에서의 매개변수 값을 추정하 고, 이들 변수 값들을 이용한 모사결과와 실험결과를 비교함으로써 효소반응 모델식을 확인할 수 있었다.

변수 추정 방법

Michaelis-Menten 속도식

(1)식과 같이 표현되는 효소반응의 메카니즘으로부터 유도된 식(2)는 가장 일반적인 효소반응 모델식으로서 Vmax와 Km의 두 매개변수를 포함하고 있다.

$$S + E \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P \quad (1)$$

$$V = -\frac{dS}{dt} = \frac{V_{max}S}{K_m + S} \quad (2)$$

여기서, Vmax = k₂(E₀)
 K_m = (k₋₁+k₂) / k₁

식(2)를 변수 분리하여 시간을 0에서 t까지, 기질농도를 S₀에서 S까지 적분하면 식(3)을 얻는다.

$$t = (K_m \cdot \ln S_0 + S_0) / V_{max} - (1 / V_{max}) \cdot S - (K_m / V_{ax}) \cdot \ln S \quad (3)$$

S = X₁, ln S = X₂로 놓으면 식(4)와 같은 선형속도식이 얻어진다.

$$t = a - b X_1 - c X_2 \quad (4)$$

여기서, a = K_m · lnS₀ / V_{max} + S₀ / V_{max}
 b = 1 / V_{max}
 c = K_m / V_{max}

효소반응 실험으로부터 시간에 따른 기질농도의 변화 를 측정하고 이를 식(4)에 대입하여 최소자승법을 적용 시켜, 식(5)와 같이 표현되는 표준편차 σ_{N-1}를 최소화시 키는 계수 a,b,c를 구하면 식(6)으로부터 매개변수를 구할 수 있다. 이러한 방법은 시간에 대한 기질농도의 데이터로부터 반응속도를 구할 필요가 없이 직접 기질농

도 데이터를 사용할 수 있으므로 매개변수를 정확하게 추정할 수 있다.

$$\sigma_{N-1} = \sqrt{\sum(t_i - a + bX_{i1} + cX_{i2})^2 / (N-1)} \quad (i=1,2,\dots,N) \quad (5)$$

$$V_{max} = 1 / b$$

$$K_m = c / b \quad (6)$$

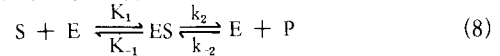
모델식에 대한 추정변수의 적합성(goodness of fit)를 평가하는 지표로 상관계수의 제곱(R²)을 사용하며 이는 식(7)과 같이 정의된다. R²의 값이 1에 가까울수록 추정 된 매개변수의 값의 신뢰도가 높아진다.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(t_i - a + bX_{i1} + cX_{i2})^2}{\sum(t_i - \bar{t})^2} \quad (i=1,2,\dots,N) \quad (7)$$

여기서, \bar{t} 는 t_i의 평균값

가역반응 속도식에서의 변수추정

가역반응의 속도식에 있어서도 같은 방법으로 매개변 수들을 추정할 수 있다. 일반적인 가역반응의 메카니즘 및 속도식은 식(8-9)와 같다.



$$V = -\frac{dS}{dt} = \frac{(V_s / K_s)S - (V_p / K_p)}{1 + S / K_s + P / K_p} \quad (9)$$

여기서, V_s = K₂(E₀)
 K_s = (k₋₁+k₂) / k₁
 V_p = k₋₁ V_s / k₂
 K_p = k₁K_s / k₂

가역반응 속도식에서의 매개변수는 4개(V_s, V_p, K_s, K_p)이나 실제의 모사나 제어에 있어서 Table I에서와 같이 매개변수의 수를 3개(A,B,C)로 줄여서 사용하는 것이 간편하다. 이 때 새로운 매개변수 A는 평형상태의 기질농도, Seq와 같다. Seq가 알려지지 않은 경우에는 식(10)으로부터 구할 수 있다. Seq는 최소자승법을 사용 하기 앞서 변수 X₂를 계산할 때 사용되어야 하므로 Seq 에 적절한 값을 가정한 다음 매개변수를 추정한다. 추정 된 Seq가 수렴할 때까지 위의 과정을 반복하므로써 Seq 를 구한 다음 이를 이용하여 매개변수 B, C를 정한다.

$$Seq(=A) = S_0 - \exp[(a-bS_0) / c] \quad (10)$$

저해반응 속도식에서의 변수추정

기질에 의한 저해현상을 고려한 속도식에서는 직분식 이 4개의 계수를 갖는 선형속도식이 되어 Table I에서와 같이 최소자승법을 이용하여 매개변수를 구할 수 있다.

생산물 저해작용을 고려한 속도식에서 P=n(S₀-S) (n은 양론계수)인 관계가 성립하는 경우 반응속도식을 S의 함수로 정리한 다음 위의 방법을 적용한다. Table I에서와 같이 경쟁적 저해속도식은 저해작용이 없는

Table 1. Parameter estimation method for various enzymatic reaction

reaction type	kinetic model equation	integrated equation	coefficients in equation	kinetic parameters
Michaelis-Menten kinetics	$V = \frac{V_{max} S}{K_m + S}$	$t = a - bX_1 - cX_2$,where $X_1 = S$ $X_2 = \ln S$	$a = (K_m \ln S_0 + S_0) / V_m$ $b = 1 / V_m$ $c = K_m / V_m$	$V_{max} = 1/b$ $K_m = c/b$
Michaelis-Menten kinetics with substrate inhibition	$V = \frac{V_{max} S}{K_m + S + S^2 / K_i}$	$t = a - bX_1 - cX_2 - dX_3$,where $X_1 = S$ $X_2 = \ln S$ $X_3 = S^2$	$a = (K_m \ln S_0 + S_0 - S_0 / 2K_i) / V_{max}$ $b = 1 / V_{max}$ $c = K_m / V_{max}$ $d = 1 / 2V_{max} K_i$	$V_{max} = 1/b$ $K_m = c/b$ $K_i = b/2d$
Reversible reaction	$V = \frac{(V_s/K_s)S + (V_p/K_p)P}{1 + S/K_s + P/K_p}$ $= \frac{S - A}{B + CS}$,where n=stoichiometric coefficient $A = nK_s V_p / (V_s K_p + nV_p K_s)$ $B = K_s (K_p + nS_0) / (V_s K_p + nV_p K_s)$ $C = (K_p - nK_s) / (V_s K_p + nV_p K_s)$	$t = a - bX_1 - cX_2$,where $X_1 = S$ $X_2 = \ln(S-A)$	$a = CS_0 + (AC+B) \ln(S_0-A)$ $b = C$ $c = AC+B$	$A: \text{by iteration}$ $B = c - Ab$ $C = b$
Michaelis-Menten kinetics with competitive product inhibition	$V = \frac{V_{max} S}{K_m(1+P/K_i) + S} = \frac{V_m' S}{K_m' + S}$,where $V_m' = V_{max} / (1 - nK_m/K_i)$ $K_m' = (K_i K_m + nK_m S_0) / (K_i - nK_m)$	$t = a - bX_1 - cX_2$,where $X_1 = S$ $X_2 = \ln S$	$a = (K_m' \ln S_0 + S_0) / V_m'$ $b = 1 / V_m'$ $c = K_m' / V_m'$	$V_m' = 1/b$ $K_m' = c/b$
Michaelis-Menten kinetics with uncompetitive product inhibition	$V = \frac{V_{max} S}{K_m + S(1+P/K_i)}$	$t = a - bX_1 - cX_2 - dX_3$,where $X_1 = S$ $X_2 = \ln S$ $X_3 = S^2$	$a = (K_m \ln S_0 + S_0 + nS_0 - nS_0 / 2K_i) / V_{max}$ $b = (1 + nS_0 / K_p) / V_{max}$ $c = K_m / V_{max}$ $d = n / 2V_{max} K_p$	$V_{max} = 1 / (2dnS_0 + nb)$ $K_m = c / (2dnS_0 + nb)$
Michaelis-Menten kinetics with noncompetitive product inhibition	$V = \frac{V_{max} S}{K_m(1+P/K_i) + S(1+P/K_i)}$ $= \frac{V_m' S}{K_m' + S + S^2 / K_i'}$,where $V_m' = V_{max} K_i / (K_i - nK_m + nS_0)$ $K_m' = (K_m K_i + nK_m S_0) / (K_i - nK_m + nS_0)$ $K_i' = nK_m - nS_0 - K_i$	$t = a - bX_1 - cX_2 - dX_3$,where $X_1 = S$ $X_2 = \ln S$ $X_3 = S^2$	$a = (K_m' \ln S_0 + S_0 - S_0 / 2K_i') / V_m'$ $b = 1 / V_m'$ $c = K_m' / V_m'$ $d = 1 / 2V_m' K_i'$	$V_m' = 1/b$ $K_m' = c/b$ $K_i' = b/2d$
Michaelis-Menten kinetics with mixed-type product inhibition	$V = \frac{V_{max} S}{K_m(1+P/K_1) + S(1+P/K_2)}$ $= \frac{V_m' S}{K_m' + S + S^2 / K_i'}$,where $V_m' = V_{max} / (1 - nK_m/K_1 + nS_0/K_2)$ $K_m' = (K_m + nK_m S_0 / K_1) / (1 - nK_m/K_1 + nS_0/K_2)$ $K_i' = nK_m K_2 / K_1 - nS_0 - K_2$	$t = a - bX_1 - cX_2 - dX_3$,where $X_1 = S$ $X_2 = \ln S$ $X_3 = S^2$	$a = (K_m' \ln S_0 + S_0 - S_0 / 2K_i') / V_m'$ $b = 1 / V_m'$ $c = K_m' / V_m'$ $d = 1 / 2V_m' K_i'$	$V_m' = 1/b$ $K_m' = c/b$ $K_i' = b/2d$

속도식으로, 비경쟁적 저해속도식과 혼합형 저해속도식은 기질저해 속도식으로 각각 변환할 수 있어 이들 속도식에 적합한 겉보기(apparent) 매개변수 V_m' , K_m' , K_i' 를 이용하여 매개변수를 추정한다.

결과 및 고찰

Michaelis-Menten 속도식에서의 변수추정

저해작용이 없다고 알려진 효소반응 시스템의 실험데이터를 이용하여 매개변수를 추정하였다. β -glucosidase에 의한 salicin의 가수분해반응은 기질이나 생산물에 의한 저해작용이 없는 Michaelis-Menten식을 따른다고 알려져 있는데(11), 이 실험데이터를 사용하여 매개변수를 추정하여 그 결과를 Fig.1에 도시하였다. 추정된 매개변수값들을 이용하여 모델식을 풀어 모사한 결과 Table 2에서와 같이 모사치가 실제치에 잘 일치하였으며 다른 연구자들의 추정정보보다 R^2 은 크고 표준편차는 작음을 보였다.

가역반응 모델식에서의 매개변수 추정

가역반응에서는 일정시간이 지나면 기질의 농도가 평형점에 도달한다. 매개변수 V_s , V_p , K_s , K_p 에 임의의 변수값을 지정하고 미분방정식으로 표시되는 속도식의 수치해를 구한 다음 적당한 허용한계(fudge)를 정하여 난수(random number)를 발생시켰다. 이렇게 얻은 데이터를 이용하여 매개변수를 추정하였다. 이때 Seq 의 값은 식(10)을 이용하여 시행착오법에 의해 구하였다. 매개변수를 추정한 결과는 Table 3에서와 같이 추정치가 실제치에 근접하였으며 ($R^2=0.99$) 평형상태의 기질농도 값도

정확하게 (상대오차=0.24%) 얻을 수 있었다.

저해작용이 있는 효소반응속도식에서의 변수추정

기질저해 모델식의 매개변수 V_{max} , K_m , K_i 에 임의의 변수값을 지정하여 속도식을 풀어 난수를 발생시킨 다음

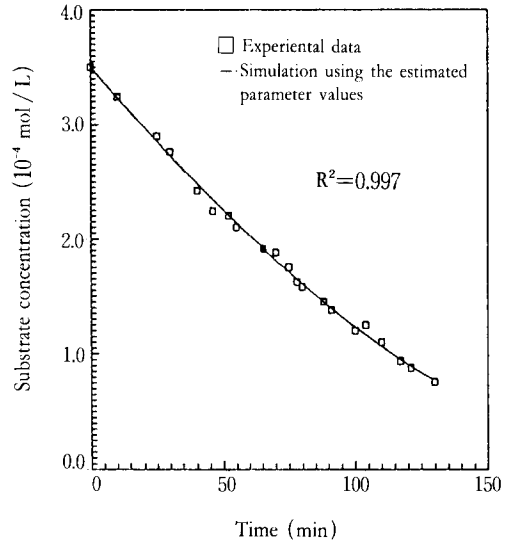


Fig. 1. Experimental data(11) and simulation result using estimated parameter values for Michaelis-Menten kinetics. Estimated parameter values: $V_{max}=3.755 \times 10^{-6}$, $K_m=1.424 \times 10^{-4}$

Table 2. Estimated parameter values for the experimental data in Figure 1.

	parameter estimation method		
	Halwachs(7)	Hsu and Tsao(8)	This study
V_{max} (mol / L·min)	3.42×10^{-6}	3.36×10^{-6}	3.76×10^{-6}
K_m (mol / L)	1.05×10^{-4}	1.42×10^{-4}	1.42×10^{-4}
standard deviation, ¹			
σ_{N-1} (mol / L)	5.20×10^{-6}	5.19×10^{-6}	4.38×10^{-6}
R^2	0.995	0.930	0.997

1: standard deviation in terms of substrate concentration,

$$\sigma_{N-1} = \sqrt{\sum(S_i - S) / (N-1)}$$

, Where \hat{S} = substrate concentration calculated from the model equation

Table 3. Simulation results on reversible reaction kinetics

parameter	true value	estimated value ¹	%error
A (mol / L.)	0.1691	0.1687	0.24
B (min)	28.512	29.933	4.98
C (min·L. / mol)	33.921	28.807	15.1
standard deviation,			
σ (mol / L.)		3.539×10^{-3}	
R^2		0.99	

1 : generated data : 30 data points with 3% fudge

매개변수를 추정하였다. Fig. 2에서와 같이 추정치가 참값과 비교하여 상당히 작은 오차(2% 이내)를 보였다. Fig. 3은 생산물저해가 있고 저해패턴이 uncompetitive 한 반응시스템에서 매개변수를 추정할 결과를 보여주고 있다. 추정치가 참값에 대해서 상당한 오차를 포함하고 있다. 추정된 매개변수를 이용한 모사의 표준편차만으로는 변수 추정의 신뢰도를 가늠할 수 없기 때문에 R^2 의 값을 계산하여 본 결과 비교적 작은 값($R^2=0.680$)이 나왔는데 이는 합성데이터(synthetic data)에 난수를 발생시킬 때 사용한 높은 fudge에 기인한다.

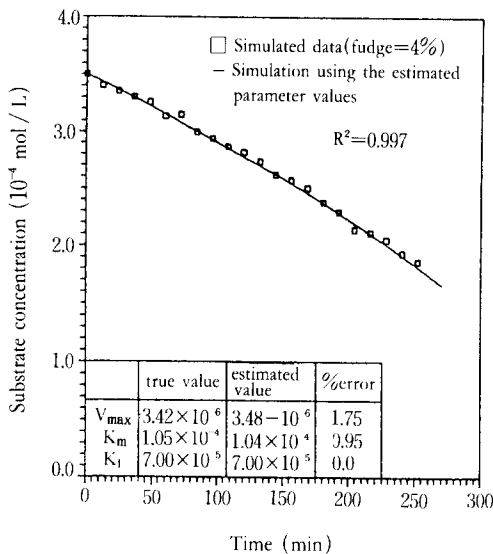


Fig. 2. Simulation result using estimated parameter values for substrate inhibition kinetics.

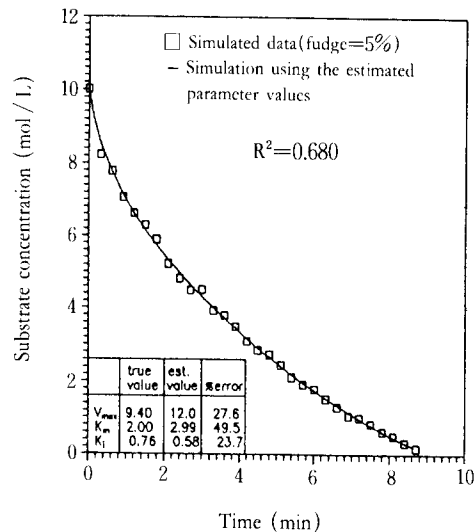


Fig. 3. Simulation result using estimated parameter values for product inhibition kinetics.

모델식의 패턴 인식

Fig. 4는 uncompetitive한 저해패턴을 갖는 모델식의 데이터를 이용하여 매개변수를 추정한 결과를 보여주고 있다. 실선은 대상 시스템에 적합한 모델식, 즉 uncompetitive한 생산물 저해패턴 모델식에 의한 모사결과이며, 점선은 경쟁적(competitive) 생산물저해 모델식에 의한 모사결과이다. 이 그림에서 보는 바와 같이 경쟁적 생산물저해 모델식을 가정하여 변수를 추정하면 실제치를 정확하게 모사해 줄 수 없으며(Table 4), 이로써 가정

된 모델식이 실제 시스템에 적합하지 않은 것임을 알 수 있다.

저해현상이 없다고 알려져 있는 실험데이터에 여러가지 저해패턴의 모델식을 적용시켜 매개변수를 추정· 비교하였고, 그 추정된 매개변수로부터 효소반응을 모사하여 그 표준편차를 비교하여 Table 5에 정리하였다. 그 결과 저해현상을 고려하지 않은 모델식에 의한 매개변수 추정의 경우가 가장 작은 표준편차 및 가장 큰 R²을 보였으며 기질저해나 생성물저해를 고려한 모델식을 통해 추정된 매개변수는 물리적으로도 전혀 의미가 없는 음의 매개변수값이 나오므로써 저해작용을 고려한 모델식은 이 효소반응에 적합하지 않음을 알 수 있다. 이와 같이 임의의 모델식에 대한 매개변수값과 표준편차를 비교함으로써 효소반응의 저해여부를 확인할 수 있었다. 위와 같은 방법에 의하여 효소반응 모델식에 있어서 간편하고도 정확한 매개변수 추정 및 효소반응의 저해작용 여부와 저해패턴의 확인이 가능하였다.

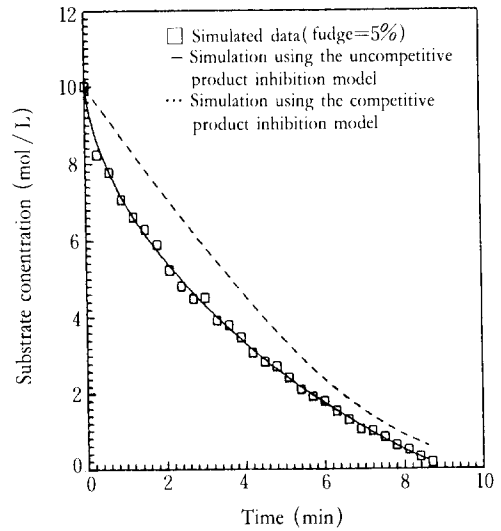


Fig. 4. Simulation results using two inhibition models for model identification.

Table 4. Model identification results for product inhibition patterns

parameter	true value	estimated value	estimated value using
		using uncompetitive product inhibition model	using competitive product inhibition model
V _{max} (or V _{max} ')	9.40	12.0	1.76
K _m (or K _m ')	2.00	2.99	2.06
K _i (or K _i ')	0.76	0.58	—
standard deviation,			
σ _{N-1} (mol/L)		0.108	1.172
R ²		0.992	0.790

Table 5. Model identification results for various inhibition patterns

parameter	Michaelis-Menten kinetics	Michaelis-Menten kinetics with substrate inhibition	Michaelis-Menten kinetics with product inhibition
	V _{max} (mol/L·min)	3.42 × 10 ⁻⁶	3.87 × 10 ⁻⁶
K _m R(mol/L)	1.05 × 10 ⁻⁴	8.44 × 10 ⁻⁵	-5.87 × 10 ⁻⁵
K _i (mol/L)	—	-1.44 × 10 ⁻⁴	-6.19 × 10 ⁻⁴
standard deviation,			
σ _{N-1} (mol/L)	4.38 × 10 ⁻⁶	3.40 × 10 ⁻⁴	3.78 × 10 ⁻⁴
R ²	0.997	0.620	0.620

요 약

1회의 회분실험 데이터로부터 효소반응 속도식의 매개 변수를 쉽게 추정할 수 있는 방법을 제시하였다. 여러가지 반응패턴을 갖는 모델식에 있어서 효소반응 데이터를 적용시킨 결과 정확하고 간편하게 매개변수값을 추정할 수 있었다. 가역반응의 경우에는 3개의 매개변수를 갖는 모델식의 형태로 평형 기질농도 및 매개변수를 추정할 수 있었다. 또한 반응특성이 잘 알려져 있지 않은 효소반응 시스템에 있어서는 효소반응이 기질이나 생산물의 저해작용을 받는지 여부와 그 저해패턴을 확인할 수 있었다.

사 용 기 호

A,B,C	= parameters of reversible reaction
a,b,c,d	= coefficients of least-square method
E	= enzyme or its concentration (mol/L)
E ₀	= initial enzyme concentration (mol/L)
ES	= enzyme-substrate complex
K _i	= inhibition constant (mol/L)
K _i '	= apparent inhibition constant (mol/L)
K _m	= Michaelis-Menten constant (mol/L)
K _m '	= apparent Michaelis-Menten constant (mol/L)
K _p	= Michaelis-Menten constant of backward reaction in reversible reaction (mol/L)
K _s	= Michaelis-Menten constant of forward reaction in reversible reaction (mol/L)
k ₁	= forward reaction rate constant
k ₋₁	= backward reaction rate constant
k ₂	= forward reaction rate constant of the second step in enzyme reaction
k ₋₂	= backward reaction rate constant of the second step in enzyme reaction
N	= number of sample data
n	= stoichiometric coefficient
p	= product or its concentration (mol/L)
R ²	= square of correlation coefficient

S	= substrate or its concentration (mol/L)
S ₀	= initial substrate concentration (mol/L)
S	= substrate concentration calculated from the model equation (mol/L)
t, t ₁	= enzyme reaction time(min)
t	= mean of enzyme reaction times (min)
V _{max}	= maximum reaction rate (mol/L·min)
V _{max} '	= apparent maximum reaction rate (mol/L·min)
V _p	= maximum reaction rate of backward reaction in reversible reaction (mol/L·min)
V _s	= maximum reaction rate of forward reaction in reversible reaction (mol/L·min)
X ₁ , X ₂ , X ₃	= variables of least-square method
σ _{N-1}	= standard deviation in least-square method (min)
σ _{N-1}	= standard deviation in terms of substrate concentration(mol/L)

참 고 문 헌

1. H. Lineweaver and D. Burk (1934), *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658
2. G. S. Eadie (1942), *J. Biol. Chem.*, **146**, 85
3. C. S. Hanes (1932), *Biochem. J.*, **26**, 1406
4. G. N. Wilkinson (1961), *Biochem. J.*, **80**, 324
5. G. W. Schwert (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**(5), 1278
6. R. R. Jennings and C. Niemann (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5432
7. W. Halwachs (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 281
8. T. A. Hsu and G. T. Tsao (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2235
9. S. T. Yang and M. R. Okos (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 763
10. D. W. Marquardt (1963), *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, **11**(2), 431
11. D. B. Van Dongen and D. O. Cooney (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1253

(Received: June 14, 1990, Accepted: July 31, 1990)