

공학분야 학부교육용 효소반응속도식의 수치해석

Numerical Analysis of Enzyme Kinetics for Undergraduate Education in Engineering

김 재 석*, 김 재 윤*, 이 재 흥*

Jae-Seok Kim*, Jae-Yoon Kim*, Jae-Heung Lee*

요 약

효소촉매반응은 통상적으로 반응속도가 매우 빠르고 동시에 높은 선택성을 보여 주는 특징이 있다. 단순 효소촉매 반응속도식을 보통 Michaelis-Menten식이라고 부른다. 효소의 활성을 간섭하는 화학물질을 저해제라고 하는데, 효소활성의 저해에는 가역적저해와 비가역적저해의 두 가지 형태로 나타난다. 만일 저해제가 수소결합과 같은 약한 결합으로 효소에 붙게 되면 이런 경우 효소저해는 가역적인 저해로 나타난다. 많은 효소 반응들은 그 반응으로부터 생성되는 생성물 자체에 의해서도 가역적 저해를 받게 된다. 생성물의 생성속도와 더불어 기질의 감소속도식은 비선형 미분방정식으로 나타 낼 수가 있다. 본 연구는 공학 분야의 학부교육을 목적으로 단순 효소반응속도식과 보다 더 복잡한 저해 효소반응속도식에 대한 수치해석의 결과를 보고 하고자 한다.

Key Words: Michaelis-Menten kinetics, Lineweaver-Berk plot, Enzyme Inhibition

ABSTRACT

An enzyme-catalyzed reaction is usually characterized by a very large increase in the rate and high specificity. Kinetics of simple enzyme-catalyzed reactions are often referred to as Michaelis-Menten kinetics. A chemical that interferes with an enzyme's activity is called inhibitor. There are two types of enzyme inhibitions (viz. reversible and irreversible). If an inhibitor attaches to the enzyme with weak bonds, such as hydrogen bonds, the inhibition is usually reversible. Many enzyme reactions are also inhibited reversibly by their corresponding products. The rate of substrate disappearance together with the rate of product formation may be written by nonlinear differential equations. In the present study, numerical analyses of simple enzyme kinetics and inhibited enzyme kinetics are reported for the purpose of undergraduate education in engineering.

*한국기술교육대학교 기계정보공학부(jaehung@kut.ac.kr)

제1저자 (First Author) : 김재석

교신저자 : 이재흥

접수일자 : 2010년 4월 26일

수정일자 : 2010년 5월 23일

확정일자 : 2010년 6월 05일

I. 서론

효소(enzyme)는 반응과정에서 다른 물질로 변화되지 않으면서 기질의 활성화에너지를 낮추어 화학반응의 속도를 증가시키는 생물학적 촉매로 작용하는 단백질이다. 현재까지 약 2,500 개 이상의 효소가 알려져 있고, 이 중에서 약 400 여 효소가 공업적으로 사용되고 있다. 지금까지 α -amylase, β -amylase, glucoamylase, glucose isomerase 등이 전분의 가수분해 반응에, protease와 lipase 등이 세제용으로 광범위하게 사용되고 있다. 의학분야에서는 penicillin acylase 및 glutaryl amidase 등을 특수한 담체에 고정화시키고 바이오리액터(bioreactor)를 사용하여 β -lactam 항생물질을 생산 해 오고 있다. 뿐만 아니라 축산분야에도 phytase 등과 같은 많은 효소가 사용되고 있으며, 아미노산제조(aspartase 및 D-amino acid aminotransferase), 치즈제조(rennin), 감미료제조(protease), 우유가공(lactase)에도 폭 넓게 여러 종류의 효소가 사용되고 있다[1-5]. 최근에는 섬유소(cellulose)와 같이 자연에 풍부한 바이오매스 자원으로부터 바이오에너지 생산을 위하여 강력한 활성을 가지는 cellulase 개발에도 진전이 이루어지고 있어서 앞으로 여러 산업에 효소의 활용은 더욱 확대 될 것으로 사료된다.

생물공학관련 학부과정에서 학습하는 효소관련 이론과 응용은 주로 “생물공정공학(Bioprocess

Engineering)”에서 다루어지고 있다[6]. 일반적으로 효소반응은 저해제 존재 여부 또는 기질저해여부 등에 따라 여러 가지 다소 복잡한 미분방정식으로 나타낼 수 있다. 통상적으로 효소반응속도식(enzyme kinetics)은 특정 효소 반응의 메카니즘을 설명 하는데 필요할 뿐만 아니라 반응의 속도를 정량화하여 최적 바이오리액터의 설계 및 운전에도 꼭 필요하다. 그러나 효소반응속도식에서 다루어지는 미분방정식은 간단한 편이긴 하지만 대부분 비선형으로 나타나기 때문에 컴퓨터를 활용하여 해를 구하면 편리하다. 공학을 전공하는 대부분의 학부생들이 1-2학년 동안에 프로그래밍과목을 이수하게 된다. 그럼에도 불구하고 공학 전공 고학년 학부생들의 경우에도 컴퓨터를 사용하여 간단한 미분방정식의 해를 구하는데 놀랍게도 잘 적용하지 못하고 있는 것이 오늘 날의 현실이다.

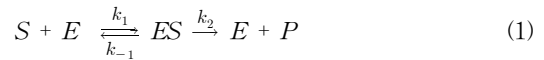
본 논문에서는 단순 효소반응속도식(simple enzyme kinetics) 과 경쟁적저해 또는 비경쟁적저해가 있는 보다 복잡한 저해효소반응속도식(inhibited

enzyme kinetics)에 대하여 미분방정식의 해를 구하고, 여러 매개변수들의 영향을 조사하여 그림으로 나타냄으로서 효소반응에 대한 속도식의 의미와 Michaelis-Menten kinetics의 특징을 조사하여 학부생 공학교육에 활용하는데 그 목적이 있다.

II. 단순 효소반응속도식의 수치해석

1. Michaelis-Menten식의 해석

단순효소촉매반응의 수학적 모델은 Michaelis and Menten에 의하여 만들어졌다. 일반적으로 단순 효소촉매반응은 다음과 같이 나타 낼 수 있다[6].



여기서 S는 기질(substrate)농도, E는 효소(enzyme) 농도, ES는 효소-기질 복합체(enzyme-substrate complex)농도, P는 생성물(product)농도, 그리고 k는 반응속도 상수이다. 식(1)에 대한 반응속도식은 다음과 같이 나타 낼 수 있다.

$$v = \frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} = \frac{k_2 E_0 S}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + S} \quad (2)$$

여기서 E_0 는 반응 초기에 첨가한 효소의 농도이며 t 는 반응시간(h)이다. 식(2)는 다음의 식(3)과 같이 정리 할 수 있는데, 이 식을 Michaelis-Menten식이라고 부르며 여기서 K_m 은 Michaelis constant 이다. 저해제의 영향이 없는 대부분의 효소반응은 이 식이 잘 적용될 수 있다.

$$v = \frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} = \frac{V_m S}{(K_m + S)} \quad (3)$$

효소촉매 반응에서 농도는 통상 몰농도(M, mol/L)로 나타내므로 V_m 과 K_m 의 단위는 각각 M/h와 M이 된다. 식(3)의 좌변과 우변의 역수를 취하여 정리하면 다음과 같이 나타 낼 수 있다.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \left(\frac{K_m}{V_m}\right) \frac{1}{S} \quad (4)$$

여러 기질농도에서 각각의 경우에 해당하는 초기반응 속도를 실험적으로 측정 한 후 기질농도의 역수(1/S)에 대하여 초기 반응속도의 역수 (1/v)을 plot하면 식(4)에서 알 수 있듯이 직선이 얻어지는데, 이것을 Lineweaver-Burk plot[6]라 부른다. 이 직선의 Y축 절편은 1/Vm이 되고 기울기는 Km/Vm이 되므로 Vm과 Km을 계산 할 수 있다.

매개변수(Vm과 Km)의 값과 초기조건 (S와 P의 농도)이 주어지면 식(3)을 적분하여 효소촉매반응의 시간에 따른 기질감소와 생성물의 농도변화를 계산 할 수 있다. 식(3)은 BASIC, FORTRAN, MATLAB 등 컴퓨터 프로그래밍 언어를 사용하여 쉽게 해를 구할 수 있고, 예로서 Vm=0.1 M/h, Km=0.1 M에 대한 결과를 그림 1에 나타내었다. 식(3)에서 알 수 있듯이 S>>Km 이면 dS/dt는 기질농도에 대하여 0차 반응(zero-order reaction)속도식이 되고, 반대로 S<<Km 이면 1차반응(first-order reaction)속도식이 됨을 알 수 있는데 각각의 영역을 그림 1에 표시하였다.

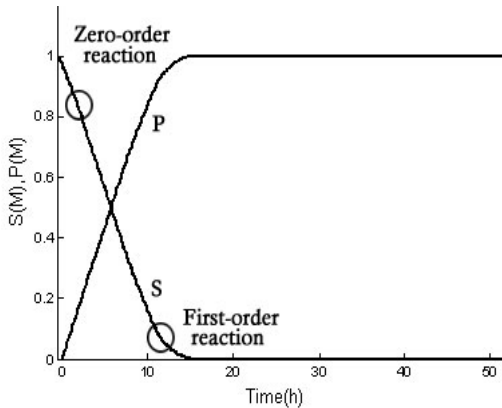


그림 1. 반응시간에 따른 기질과 생성물농도의 경시적 변화
Fig. 1. A time-course kinetics for product formation from substrate

2. 효소촉매반응에서의 Michaelis constant 영향

식(3)에서 알 수 있듯이 기질농도 S가 Km과 같을 때 $v = Vm/2$ 가 된다. 즉 Km은 반응속도(v)가 최대 값(Vm)의 절반으로 줄어 들 때의 기질의 농도를 의미한다. 즉, 어떤 효소촉매반응에서 Km값이 상대적으로 작다는 것은 그 기질에 대하여 친화도가 높다는 의미이다. 따라서 반응이 진행됨에 따라 기질농도가 낮아져도 상대적으로 반응속도가 높게 유지되고 기질에서 생성물로의 전환속도가 빨라지게 된다. 예로서

Vm=0.1 M/h의 경우 그림 2에 여러 상이한 Km값에 대하여 반응시간에 따른 생성물농도(P)를 나타내었다.

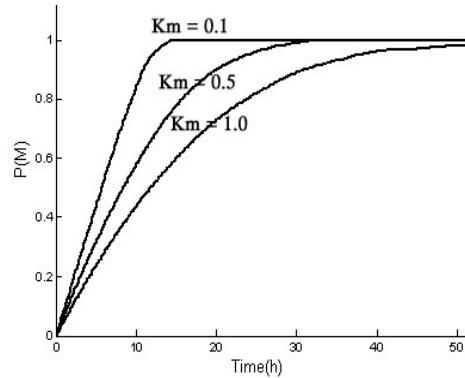


그림 2. 효소반응에서 생성물 농도에 미치는 Km의 영향
Fig. 2. Effect of Km on product concentration

3. 효소촉매반응에서의 효소농도(E0)의 영향

반응 초기에 첨가되는 효소 농도는 반응속도에 큰 영향을 주게 된다. 식(2)와 식(3)에서 알 수 있듯이 $Vm = k_2 E_0$ 이므로, 결국 Vm값은 효소농도에 따라 선형적으로 변하게 된다. 예로서 Km=0.1 M 인 경우 그림 3에 여러 Vm에 대하여 반응시간에 따른 생성물의 경시적 변화를 나타내었다. 그림 3에서 알 수 있듯이 Vm값이 증가함에 따라 기질이 생성물로 전환되는 속도가 빨라짐을 알 수 있다. 그러나 효소농도가 낮더라도 오랜 시간이 지나면 모든 기질이 생성물로 전환 될 수 있음을 알 수 있다. 이는 식(1)에 나타난 것과 같이 효소주기에 따라 반응에 참여한 효소가 분해되거나 또는 소멸되지 않고 다시 새로운 반응에 참여 할 수 있기 때문이다.

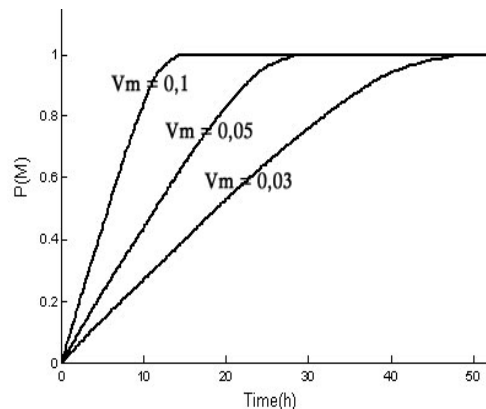


그림 3. 효소반응에서 생성물 농도에 미치는 Vm의 영향
Fig. 3. Effect of Vm on product concentration

III. 저해 효소반응속도식의 수치해석

효소반응은 저해제에 의해 영향을 받는데 가역적 저해와 비가역적저해로 구분된다. 비가역적저해제로는 수은, 납, 카드뮴 등 중금속과 같이 효소와 결합하여 안정한 결합물을 형성하고 그 결과 효소활성도를 감소시킨다. 가역적 저해제는 효소와 결합한 뒤 효소로부터 쉽게 해리되는 경우에 해당된다. 통상 항생제 및 콜레스테롤을 저하시키는 의약품 등이 이러한 형태의 저해제들이며, 효소반응이 진행되면서 생성되는 생성물 자체가 가역적저해제로 작용하는 경우도 있다. 여기서 가역적인 저해반응의 종류로는 잘 알려진 경쟁적저해(competitive inhibition), 비경쟁적저해(noncompetitive inhibition) 그리고 반경쟁적저해(uncompetitive inhibition)등 세가지 형태로 구분된다. 그림 4는 경쟁적 저해와 비경쟁적 저해의 차이점을 개념적으로 보여주고 있다[7]. 경쟁적 저해의 경우 효소의 활성부위(active site)에 기질과 저해제가 경쟁적으로 결합하여 반응이 저해 되는 경우이고, 비경쟁적 저해는 저해제가 활성부위에 결합하지는 않지만 저해제가 효소의 다른 부위(allosteric site)에 결합됨으로서 결국 활성부위의 입체 구조의 변화가 초래되어 반응속도가 저하하게 된다. 반경쟁적 저해는 1기질반응계에서는 거의 없으며 다기질 효소반응계에서 일어난다. 그림 5는 저해가 없는 경우와 비교하여, 경쟁적저해 및 비경쟁적저해가 있는 경우에 대한 상이한 Lineweaver-Burk plot를 보여 주고 있다.

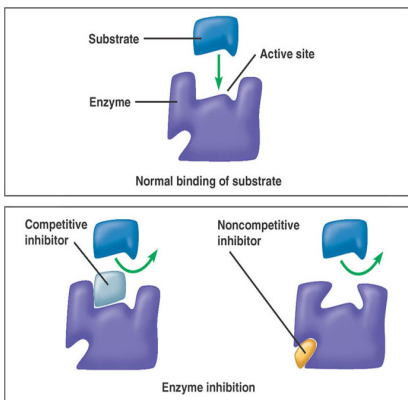


그림 4. 경쟁적저해와 비경쟁적저해에 대한 개념적 설명
Fig. 4. Comparison of competitive and noncompetitive inhibition

경쟁적저해는 기질농도를 높혀 주면 저해정도가 감소되는 것을 알 수 있지만, 결국 apparent Km (즉 K'm)은 증가 된다. 한편 비경쟁적저해의 경우에는 저해제가 있는 한 아무리 기질농도가 높아도 Vm에는 도달 될 수 없고, 다만 Km은 저해제가 있더라도 변화되지 않음을 알 수 있다.

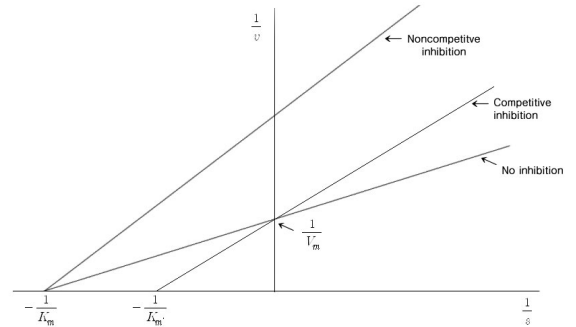


그림 5. 경쟁적 및 비경쟁적저해에 대한 Lineweaver-Burk plots
Fig. 5. Lineweaver-Burk plots in the presence of a competitive and a noncompetitive inhibitor

1. 경쟁적저해 효소반응속도식의 해석

이 경우 효소반응속도식은 다음 식(5)로 나타낼 수 있다[8].

$$v = \frac{V_m S}{K_m + S + \left(\frac{K_m}{K_i}\right)I} \quad (5)$$

여기서 I는 저해제(inhibitor)의 농도이며, Ki는 저해상수(inhibition constant)이다. 경쟁적저해의 잘 알려진 예로서는 체내 콜레스테롤 합성에 관여하는 HMG CoA(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) reductase inhibitor인 lovastatin과 simvastatin 등이 있다. 이 식(5)에서 알 수 있듯이 Ki가 커질수록 저해정도는 감소하며, 저해제농도가 커질수록 저해정도는 증가한다. 반응초기에 저해제를 첨가하여 생성되는 생성물의 경시적 변화를 그림 6(Vm=0.1 M/h, Km=0.1 M, Ki=0.1 M and I=0.1 M의 경우)에 나타내었다. 이 경우 생성물은 저해제로 작용하지 않는 경우에 대한 결과이다. 여기서 생성물 자체가 저해제로 작용하게 될 경우에는 I를 P로 대체하면 된다. 이

경우 반응이 진행됨에 따라 생성물의 농도는 증가하게 되어 저해정도가 점차 증가하게 된다.

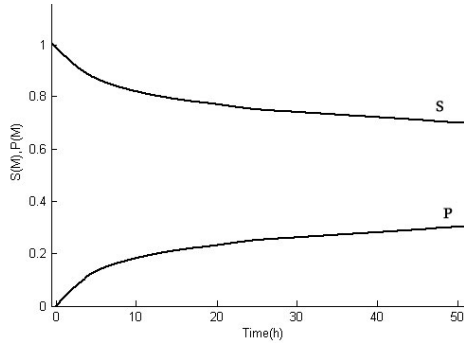


그림 6. 경쟁적저해제가 존재할 경우 생성물의 경시적 변화
Fig. 6. A time-course kinetics in the presence of a competitive inhibitor

그림 7는 반응시간에 따른 전형적인 경쟁적저해 반응 패턴($V_m=0.1$ M/h, $K_m=0.1$ M and $K_i=0.1$ M의 경우)을 보여 주고 있다. 반응 초기에 저해제가 존재하는 경우(그림 6)와는 다르게 저해제농도가 반응초기에는 무시할 정도이기 때문에 생성물은 반응초기에 빠르게 축적되게 된다. 좋은 사례로서 설탕을 기질로 하여 효소반응으로부터 프럭토올리고당을 생산 할 때 생성물 중의 하나인 포도당이 경쟁적저해제로 작용하는 경우가 보고되어 있다[9].

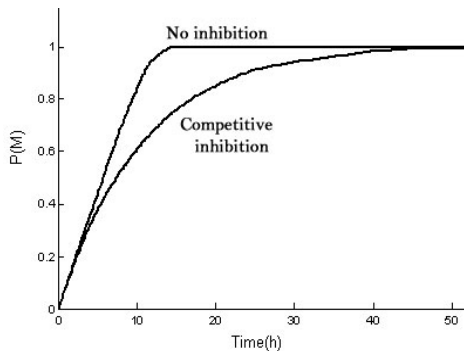


그림 7. 생성물이 경쟁적저해제로 작용하는 경우에 대한 생성물의 경시적 변화
Fig. 7. A time-course kinetics in the presence of a competitive inhibitor as a product

2. 비경쟁적저해 효소반응속도식의 해석

비경쟁적저해의 경우 반응속도식은 다음 식(6)으로 나타 낼 수 있다[8].

$$v = \frac{V_m SK_i}{(K_m + S)(I + K_i)} \quad (6)$$

저해제의 농도가 커질수록 반응속도는 감소하게 되며, K_i 가 커질수록 저해정도는 감소하게 된다. 잘 알려진 비경쟁적저해제로서는 sarin(맹독성 신경가스)과 같은 organophosphorus compounds들이다. 이러한 화합물은 acetylcholinesterase를 비경쟁적으로 저해하여 궁극적으로 생물들이 죽음에 이르게 만든다. 그림 8 (예로서 $V_m=0.1$ M/h, $K_m=0.1$ M, $K_i=0.1$ M and $I=0.1$ M의 경우)은 비경쟁적저해제를 반응초기가 넣어 반응시켰을 때 반응시간에 따른 생성물의 경시적 변화를 보여준다. 저해제가 존재할 때 효소반응이 현저히 저해되어 생성물이 거의 얻어지지 않음을 알 수 있다.

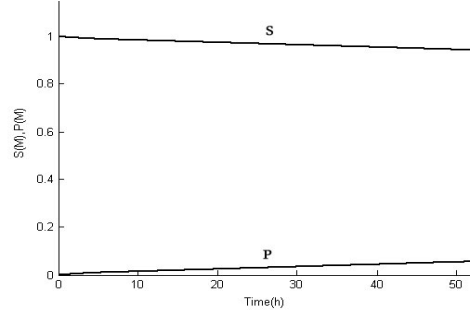


그림 8. 비경쟁적저해제가 존재할 경우 생성물의 경시 변화
Fig. 8. A time-course kinetics in the presence of a noncompetitive inhibitor

한편 생성물 자체가 비경쟁적저해제로 작용하게 될 경우에는 식 (6)의 I를 P로 대체하면 된다. 이 경우 반응시간이 경과하면서 생성되는 생성물(비경쟁적저해제)이 효소의 allosteric site에 결합하면서 효소분자의 활성부위 형태가 점점 변형되게 되어 저해정도는 증가하게 된다. 즉, 반응초기에 비경쟁적저해제를 넣어 반응할 때와는 다르게 반응이 진행됨에 따라 어느 정도는 생성물이 생겨나고 시간이 경과하면서 저해정도가 점차 증가하게 된다. 그림 9(예로서 $V_m=0.1$ M/h, $K_m=0.1$ M and $K_i=0.1$ M의 경우)는 반응시간에 따른 전형적인 비경쟁적저해 반응 패턴을 보여 주고 있다. 반응 초기에 저해제가 존재하는 경우(그림 8)와는 다르게 저해제농도가 반응초기에는 무시할 정도이기 때문에 생성물은 어느 정도 얻어지게 됨을 알 수 있다.

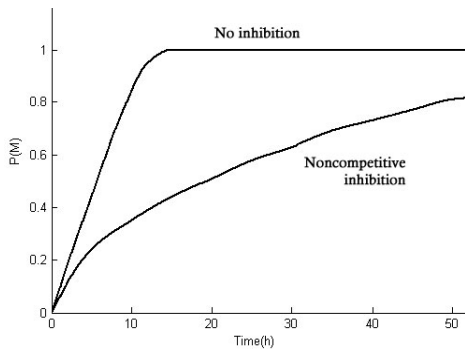


그림 9. 생성물이 비경쟁적저해제로 작용하는 경우에 대한 생성물의 경시적 변화
 Fig. 9. A time-course kinetics in the presence of a competitive inhibitor as a product

IV 결론

본 논문에서는 생물공학공학관련 학부과정에서 학습하는 단순 효소반응속도식(simple enzyme kinetics) 과 일반적으로 다소 복잡한 저해효소반응속도식 (inhibited enzyme kinetics)에 대하여 미분방정식의 해를 구하고, 매개변수들의 영향을 조사하여 그림으로 나타냄으로서 여러 종류의 효소반응속도식의 의미와 특징을 조사하고 이를 학부생 공학교육에 활용하고자 하였다.

단순효소반응속도식의 해를 그림으로 나타내 본 결과 반응초기 즉 기질농도가 Km보다 훨씬 큰 경우에는 효소반응은 기질농도에 대하여 0차 반응, 기질농도가 Km보다 낮은 경우에는 1차 반응형태로 나타남을 확인 할 수 있었다. 또한 효소의 Km값이 커질수록 기질과의 친화도가 점차 감소하게 됨으로서 반응속도는 낮아지게 된다. 한편 효소농도를 증가시키 주면 Vm값이 선형적으로 증가하게 되어 반응속도가 점차 증가하게 됨을 알 수 있었다. 이것이 바로 Michaelis-Menten식의 중요한 의미이고 결론에 해당한다.

저해반응속도식에 있어서 경쟁적저해제가 존재하면 반응속도가 저해되지만 기질농도가 상대적으로 저해제농도보다 높은 시기에는 저해제의 영향이 작아서 반응초기(즉 기질농도가 높을 때)에는 생성물이 잘 생성된다. 그러나 비경쟁적저해효소반응의 경우에는 비경쟁적저해제가 효소에 활성부위(active site)가 아닌 다른 부위(allosteric site)에 결합함으로써 이로 인해 활성부위의 형태가 변형되고 따라서 처음부터 생

성물의 생성은 현저하게 저하하게 된다. 본 연구에서는 각각의 경우에 대하여 미분방정식을 풀고, 그 결과를 그림으로 나타내어 상호간의 차이점을 비교함으로써 저해효소반응의 정량적 의미를 고찰하였다.

참고문헌

- [1] C. Ratledge and B. Kristiansen, Basic Biotechnology, Cambridge University Press, pp. 391- 408, 2001.
- [2] J. H. Lee, R. J. Pagan, P. L. Rogers, "Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using *Zymomonas mobilis*", Biotechnol. Bioeng.,25, 659-669, March 1983.
- [3] J. W. Won, C. G. Kim, J. H. Kim, J. H. Lee, Y. J. Jeon, "The effect of 2-mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazole on enzymatic synthesis of cefazolin", Appl. Biochem. Biotechnol., 69, 1-9, January 1998.
- [4] J. H. Lee, M. H. Sung, Y. J. Jeon, "Kinetic study on the enzymatic production of D-alanine from D-aspartic acid", J.Microbiol., 40, 33-37, March 2002.
- [5] H. G. Sung, H. T. Shin, J. K. Ha, H. L. Lai, K. J. Chen, J. H. Lee, "Effect of germination temperature on characteristics of phytase production from barley", Bioresour. Technol., 96, 1297-1303, July 2005.
- [6] M. L. Shuler and F. Kargi, Bioprocess Engineering Basic Concepts, Prentice Hall International, pp. 57-75, 2002.
- [7] N. A. Campbell, J. B. Reece, M. R. Taylor, E. J. Simon, Biology Concepts & Connections, Benjamin Cummings, pp. 70-78, 2006.
- [8] R. Chang, Physical Chemistry with Applications to Biological Systems, Collier Macmillan Publishers, pp.391-421, 1981.
- [9] K. H. Jung, J. W. Yun, K. R. Kang, J. Y. Lim, J. H. Lee, "Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose", Enzyme Microb. Technol., 11, 491-494, August 1989.

김 재 석 (Jae-Seok Kim)

학생회원



2004년 3월~ 현재: 한국기술교
육대학교 기계정보공학부 재학
<관심분야> Robotics, Bioenergy

김 재 윤 (Jae-Yoon Kim)

학생회원



2004년 3월~ 현재: 한국기술교
육대학교 기계정보공학부 재학
<관심분야> 환경공학, Bioenergy

이 재 흥 (Jae-Heung Lee)

정회원



1975년 2월: 서울대학교, 응용화학과
(現 화학생물공학부) 졸업 (공학사)
1977년 2월: 한국과학원 (現 KAIST),
화학 및 화학공학과 졸업(공학석사)
1982년 10월: University of New
South Wales, School of Biotechnology
졸업 (공학박사)

2008년 3월~현재: 한국기술교육대학교, 기계정보공학부 교수
<관심분야> Microbial Biotechnology, Enzyme Engineering,
Bioenergy