

Trypsin 반응에 대한 용매의 유전상수 및 압력의 영향

박 현 · 지영민*

고려대학교 응용생명환경화학과

Effect of Pressure and Solvent Dielectric Constant on the Kinetic Constants of Trypsin-Catalyzed Reaction. Park, Hyun, and Young-Min Chi*. *Department of Agricultural Chemistry, College of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701, Korea* – Electrostatic forces contribute to the high degree of enzyme transition state complementarity in enzyme catalyzed reaction and such forces are modified by the solvent through its dielectric constant and polar properties. The contributions of electrostatic interaction to the formation of ES complex and the stabilization of transition state of the trypsin catalyzed reaction were probed by kinetic studies with high-pressure and solvent dielectric constant. A good correlation has been observed between the increase of catalytic efficiency of trypsin and the decrease of solvent dielectric constant. Activation volume linearly decreased as the dielectric constant of solvent decreased, which means the increase in the reaction rate. Moreover, the decrease of activation volume by lowering the solvent dielectric constant implies a solvent penetration of the active site and a reduction of electrostatic energy for the formation of dipole of the active site oxyanion hole. When the dielectric constant of the solvents was lowered to 4.7 unit, the loss of activation energy and that of free energy of activation were 2.262 KJ/mol and 3.169 KJ/mol, respectively. The results of this study indicate that the high pressure kinetics combined with solvent effects can provide unique information on enzyme reaction mechanisms, and the controlling the solvent dielectric constant can stabilize the transition state of the trypsin-catalyzed reaction.

Key words: electrostatic interaction, dielectric constant, high-pressure kinetics, transition state, trypsin

효소를 이용하여 유용한 물질을 생산하고자 하는 반응의 반응동력학 정수는 온도, pH, 압력, 용매의 유전상수등과 같은 반응환경과 관련된 변수들에 의하여 영향을 받는다. 이와 같은 요인들중 온도 및 pH는 빈번하게 취급되는 요인 들인 반면, 압력 및 용매의 유전상수의 영향에 관하여는 비교적 연구결과가 제한적인 것이 현실이다. 고압 하에서의 효소반응동력학 연구는, 효소반응 메커니즘 연구를 위한 일반적 연구결과가 불충분할 때 효소반응의 반응기작을 유추하는데 유용한 정보를 제공한다. 효소반응속도에 대한 압력의 영향은 다음과 같이 표현된다[7].

$$\Delta V^{\ddagger} = -RT[\text{dln}(k_{\text{cat}}/K_M)/\text{dP}]_T \quad (1)$$

1) 식에서 ΔV^{\ddagger} 는 활성화 체적으로, 이 값은 일반적으로 속도결정 단계에서 결합의 형성, 전하의 생성 및 입체적 방해에 의해 음의 값이 되고, 반대의 경우에는 양의 값으로 나타난다[14]. 그러므로 반응 중의 천이상태에서 새롭게 전하나 쌍극자가 형성되면 용매의 정전기적 특징에 의존하

여 활성화 체적의 감소가 일어나게 된다. 따라서 생물 공학 적인 측면에서, 효소를 이용하여 유용한 물질을 생산하고자 할 때 사용되는 효소의 활성자리부위에서의 반응특성을 이해함으로써 압력의 가감이 반응속도의 증감을 위한 유력 한 수단이 될 수 있음을 예측할 수 있다.

한편, 용매의 유전상수를 변수로 한 연구도 비교적 등한 시 되어온 분야이다. 그러나 최근에 효소를 이용하여 물- 유기용매의 혼합용매 속에서 가수분해를 억제하며 합성반응을 유도하여 유용물질을 생산하려는 연구가 각광 을 받으면서, 실험결과를 혼합용매의 유전상수를 변수로 이용하여 혼합용매 속에서의 효소의 거동을 설명하고자 하는 노력이 이루어지고 있다[15,17-18]. 즉, 효소는 반응용 매로서 유기용매를 이용함으로써 수용액에서와 다른 현상 을 나타내는데, 이는 효소의 특이성, 안정성 및 활성의 변화 등이다[10]. 이와 같은 변화는 사용된 유기용매가 효소의 활성자리의 구조적 변성을 유도하거나, 효소에 대한 수화의 변화 등에 영향을 미치기 때문임과 동시에 용매의 극성의 차이가 효소의 구조유지뿐만 아니라, 효소와 기질 사이의 촉매 활성에 주요한 역할을 하는 정전기적 상호 작용에 영향을 미치기 때문이다[5, 11]. 이러한 영향들 은 용매의 유전 상수의 변화에 의존하는 변화들로서 유전 상수도 효소반응의 거동을 이해하는데 중요한 요소가 됨을 알 수 있다.

*Corresponding author
Tel. 82-2-3290-3025, Fax. 82-2-921-3702;
E-mail: ezeg@kucncx.korea.ac.kr

Serine protease는 촉매 기작에 있어서 serine의 OH기, histidine의 imidazole과 aspartic acid의 carboxylate를 포함하는 triad가 관여하며, 천이상태의 반응 중간체는 Ser-195와 Gly-193의 -NH기와 oxyanion hole이 생성되어 천이상태가 안정화되는 것으로 알려져 있다[8, 16]. 반응중간에 형성되는 oxyanion hole의 수화현상은 앞에서 언급한 바와 같이 압력에 의존하며, 또한 trypsin은 양전하를 띠는 기질에 특이적으로 이는 유전상수의 영향을 받을 것으로 예측할 수 있다. 따라서 본 논문에서는 용매의 유전상수 및 압력이 효소를 이용한 유용물질 생산에 유용한 변수로 이용될 수 있는지를 조사하기 위하여, 모델 효소로서 trypsin을 이용하고, 용매의 유전상수가 효소와 기질사이의 정전기적 상호작용에 어떠한 영향을 미치며, 고압 하에서 어떠한 변화를 보이는지를 열역학 변수를 이용하여 조사하였다.

재료 및 방법

시약

Bovine pancreatic trypsin[EC 3.4.21.4]은 Sigma사(USA)로부터 구입하였으며 더 이상 정제 과정 없이 사용하였다. 기질로 사용된 N^α -Cbz-L-lysine-*p*-nitrophenyl ester, 활성효소의 적정에 사용된 *p*-nitrophenyl *p'*-guanidinobenzoate는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였다. 또한 Acetonitrile (Malinkrodt Co., USA)과 Methanol(J. T. Baker Co., USA)은 HPLC 등급을 사용하였다. N^α -Cbz-L-lysine-*p*-nitrophenyl ester는 90% acetonitrile에 50 mM stock solution을 제조하여 사용하였고, trypsin은 1 mM HCl, 0.1 M KCl 용액에 50 μ M stock solution을 제조하여 4°C이하에서 보존하여 DU-64 spectrophotometer(Beckman Co., Ger-

many)를 이용하여 매주 활성을 측정하여 사용하였다.

활성효소 농도 측정

활성효소의 농도는 *p*-nitrophenyl-*p'*-guanidinobenzoate를 이용하여 pH 5.5, 25°C에서 활성자리를 적정함으로써 구하였다. 위의 반응조건에서 *p*-nitrophenyl-*p'*-guanidinobenzoate는 trypsin에 의해 빠르게 acylate되어 화학 양론적으로 *p*-nitrophenol을 내놓는다[1]. 따라서 초기반응의 *p*-nitrophenol의 농도는 활성효소의 농도와 화학 양론적으로 같게 된다. *p*-nitrophenyl-*p'*-guanidinobenzoate는 1.0 ml dimethylformamide와 4.0 ml acetonitrile에 10 mM stock 용액을 만들어 사용하였고, trypsin은 13.1 mg을 0.1 M KCl, 1 mM HCl 1 ml에 녹여 사용하였다, 반응은 1 ml cuvette에 acetate buffer 0.8 ml, 효소용액 0.2 ml, *p*-nitrophenyl-*p'*-guanidinobenzoate 용액 5 μ l를 가하여 spectrophotometer를 이용하여 410 nm에서 비색 정량 하여 활성효소의 농도를 구하였다.

반응 조건

N^α -Cbz-L-lysine-*p*-nitrophenyl ester를 기질로 한 trypsin 촉매반응은 $[E]_0=0.05 \mu\text{M}$, $[S]_0=0.1-0.75 \text{ mM}$ 의 농도 조건 하에서 수행하였으며 반응수조의 온도는 circulator를 이용하여 조정하였다. 반응용액의 pH는 유전상수를 조절하기 위해 사용된 유기용매와 혼합 후 pH meter(glass electrode, Corning 240 model)를 이용하여 측정된 겉보기 pH를 이용하였다. 반응 종결은 10% 인산을 시료부피에 대하여 부피 비로 10%를 첨가하여 pH 2.0으로 조정하여 종결시켰다.

반응산물 분석

반응생성물은 TSP gradient HPLC system을 이용하여

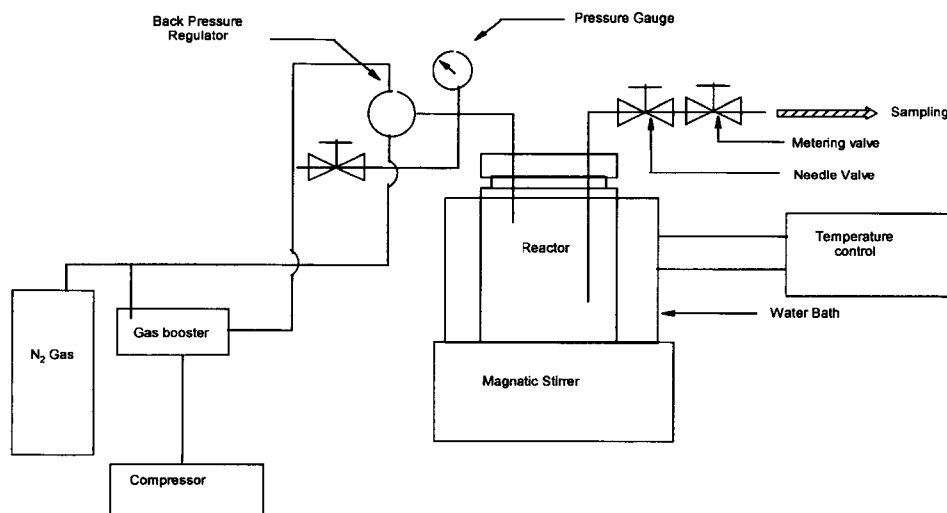


Fig. 1. Schematic diagram of high pressure reactor for enzymatic catalysis.

ODS C18 reverse-phase column(YMC H-80, USA)을 사용하여 분석하였다. 전개용매 A는 aqueous phosphoric acid, pH 2.4, 전개용매 B는 100% acetonitrile을 이용하였다. Gradient는 전개용매 B 20%로 시작하여 25분간 전개용매 B 90%를 최종으로 하였으며 전개용매의 유속은 0.5 ml/min를 이용하였다. 반응신물은 UV 검출기를 이용하여 220 nm의 파장에서 검출하였으며, HPLC에 의한 peak 면적은 Datajet integrator(TSP Co., USA)를 이용하여 계산하였다.

효소반응을 위한 입력 장치

고압 하에서 효소반응을 위해 stainless steel의 반응기에 N₂를 이용하여 가압하였다. 가압은 gas booster(Haskel, Inc., USA)를 이용하였고 Back pressure regulator (Tescom, Co., USA)를 이용하여 반응기내의 압력을 조절하였으며 원하는 압력까지는 2분 이내에 도달하였다. 시료는 metering valve와 needle valve를 이용하여 취하였고, 반응온도는 water bath내에서 cooling circulator를 이용하여 조절하였다. 효소반응을 위한 고압장치는 Fig. 1에 나타내었다. 반응기 내에서의 반응은 자석교반기를 이용하여 교반하였으며, 주기적으로 시료를 취하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Trypsin 촉매반응에 미치는 용매의 유전상수의 영향

반응용매의 유전상수가 trypsin의 촉매 효율에 미치는 영향을 조사하였다. 모델 효소로서 trypsin은 구조적 특징이나 반응 기작이 잘 알려져 있으므로 선택하였다. 이전의 논문에서 용매의 유전상수를 낮추기 위해 isopropyl alcohol을 첨가한 물-메탄올 혼합 용매에서의 trypsin의 촉매 효율에 대한 용매의 유전상수의 영향을 보고하였다[9]. 그 결과 용매의 유전상수의 감소에 따라 trypsin 촉매반응의 촉매 효율은 대수적으로 증가하는 관계가 있음을 나타내었다. 따라서 본 논문에서는 이와 같은 용매의 유전 상수에 의한 영향을 확인하기 위하여 formamide를 이용하여 반응용매의 유전상수를 증가시켰을 때 N^α-Cbz-L-lysine-p-nitrophenyl ester에 대한 trypsin 촉매반응의 반응 효율은 어떻게 변화하는지 조사하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 반응효율은 유전상수가 증가함에 따라 대수적으로 감소하였고, K_M 값은 증가하는 결과를 보였다. 따라서, 이 결과는 용매의 특이적 상호작용을 배제한다면 용매의 유전상수의 감소에 따른 효소의 반응 효율의 증가라 할 수 있다. 그러므로 trypsin 반응과 같이 양전하를 띠는 기질과 음전하를 띠는 효소간의 반응의 경우 반응속도 parameter는 용매의 유전상수와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 여기서 유기용매와 혼합 수용성 용매의 유전상수 값은 참고문헌에서 구하였다[3, 13].

한편, trypsin과 같이 기질의 lysine 잔기의 양전하와 효소 활성자리의 aspartic acid의 음전하 간의 이온-이온 상호작용이 관여하는 반응은 앞에서 언급한 용매의 유전상수 뿐만 아니라 용매의 이온강도에 의하여도 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 반응 내에서 두 개의 전하간의 정전기적 상호 작용의 자유에너지(G_{el})에 대한 이온강도의 영향은 다음과 같이 나타낼 수 있다[6].

$$G_{el} = \frac{\alpha Z_1 Z_2 e^2}{\epsilon r} \cdot \frac{\exp K(r_o - r)}{1 + Kr_o} \tag{2-1}$$

$$K = \left(\frac{8\pi N e^2 I}{1000 \kappa T \epsilon} \right)^{1/2} \tag{2-2}$$

여기에서 α: numerical constant, Z₁, Z₂: 전하 기수, e: 단위 전하, r_o: 가장 근접했을 때의 전하간 거리, r: 두 이온간의 실제거리(r ≥ r_o), ε: 용매의 유전상수, K: Debye-Huckel Constant, I: 이온 강도.

그러나 Table 1에서 보는바와 같이 trypsin 반응의 동력학적 parameter에 대한 이온강도의 영향은 관찰되지

Table 1. The effect of ionic strength on trypsin-catalyzed reaction of N^α-Cbz-L-lysine-p-nitrophenyl ester in 30% methanol mixed acetate buffer at 0°C, pH 5.5 [E]_o=0.05 mM, [S]=0.1-0.5 mM

Salt	Concentration(M)	k _{cat} (/min)	K _M (μM)
Control	-	47.3	27.6
Na ₂ SO ₄	0.5	46.5	27.2
	1.0	48.0	28.1
	1.5	47.1	26.8

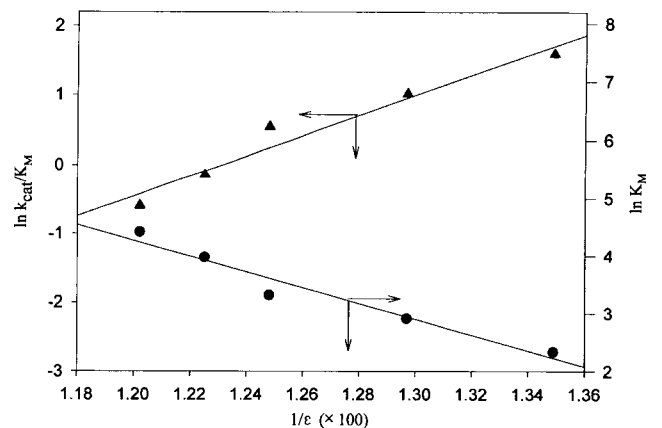


Fig. 2. Effect of the solvent dielectric constant on the catalytic parameters for trypsin-catalyzed reaction of N^α-Cbz-L-lysine-p-nitrophenyl ester. The reaction was carried out at 0°C and pH 5.5. The dielectric constant of solvents were controlled with isopropyl alcohol and formamide. [E]_o=0.05 M, [S]=0.1-0.5 mM.

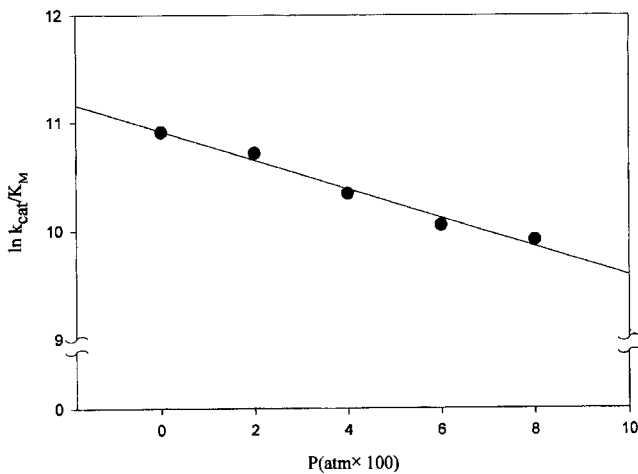


Fig. 3. Catalytic efficiency of trypsin-catalyzed N^{α} -Cbz-L-lysine-*p*-nitrophenyl ester as a function of pressure in 30% methanol mixed solvents at 0°C and pH=5.5.

Activation volumes are obtained from the slope of the plots.

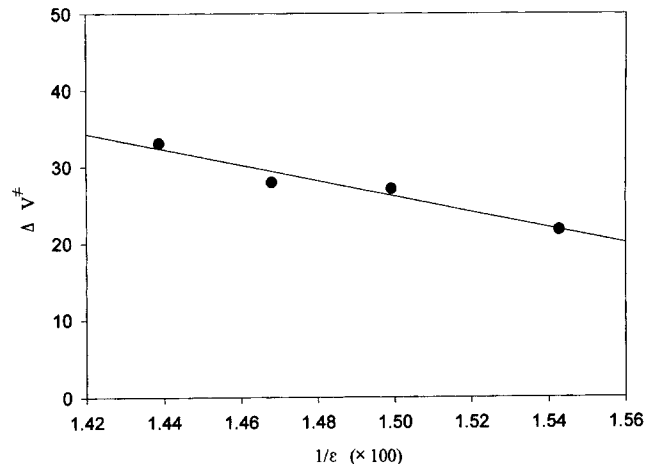


Fig. 4. Solvent dielectric constant effect on activation volumes for k_{cat}/K_M of trypsin-catalyzed reaction.

All the experiments were performed at 0°C and pH=5.5 in the pressure range of 1-800 atm. The dielectric constant of solvents were controlled by adding isopropyl alcohol 0%, 2.5%, 5% and 7.5%(v/v).

않았다. 그러므로 trypsin 반응의 전하간의 정전기적 상호작용의 자유에너지는 2-1)식의 우변항의 첫 번째 부분, 즉, 유전상수에 의해서 결정되어짐을 알 수 있었다. $\ln K_M$ 의 $1/\epsilon$ 에 대한 관계는 직선적 관계를 가지며 이것으로부터도 효소와 기질의 정전기적 상호작용은 용매의 유전상수를 감소시킴으로서 강화되어 친화성이 증가되는 것으로 알 수 있었다. 그러므로, 정전기적 특징에 의하여 효소-기질 복합체를 형성하는 효소를 이용하여 유용물질을 생산하고자 할 때, 반응용매의 유전상수를 조절함으로써 반응효율을 개선할 수 있음을 고찰하였다.

Trypsin 촉매 반응에 미치는 압력의 영향

물-유기용매 혼합 용매에서 용매의 유전상수와 압력의 두가지 변수가 trypsin 촉매 반응에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서 조사하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이, 일정한 유전상수하에서 기질 N^{α} -Cbz-L-lysine-*p*-nitrophenyl ester에 대한 trypsin 촉매 반응의 반응 효율은 압력에 대하여 대수적으로 감소함을 관찰하였다. 이와 같은 직선적 기울기는 실험 조건의 압력 범위에서 효소의 반응 기작과 구조적인 변화는 없다는 것을 의미하는 것으로 해석되었다. 한편, 반응의 활성화 체적 ΔV^{\ddagger} 는 1)식에 의하여 Fig. 3의 기울기로부터 구하였다. Fig. 3에서 음의 기울기는 trypsin 촉매 반응이 양의 활성화 체적을 갖는 것을 의미한다.

Trypsin 촉매 반응에서 반응 효율은 용매의 소수적 특성과 유전상수 모두에 의해 영향을 받는다고 알려지고 있다[6]. 그러나 용매의 소수성과 활성화 체적과는 상관관계가 존재하지 않으므로, 활성화 체적은 용매의 유전상수,

즉, 정전기적 특성과 관련되어 고려되어진다. 활성화 체적 변화는 일반적으로 두가지 요인에 기인한다는 것으로 해석되어 지고 있다[12]. 첫 번째는 화학 결합의 형성과 끊어짐에 의한 요인이고, 두번째는 반응물과 효소의 활성 복합체와 주변의 용매분자와의 상호 작용에 의해서 기인된다. 따라서, ΔV^{\ddagger} 는 반응물이 활성화 복합체를 형성하는데 있어서의 몰 체적(molar volume)에 대한 분자 자체의 체적 변화인 ΔV_i^{\ddagger} 뿐만 아니라, 활성화 과정동안의 용매 분자의 용매화(solventation)에 의한 몰 체적의 변화인 $\Delta V_{sol}^{\ddagger}$ 의 두 요소가 ΔV^{\ddagger} 에 영향을 미친다고 생각할 수 있다($\Delta V^{\ddagger} = \Delta V_i^{\ddagger} + \Delta V_{sol}^{\ddagger}$). 그러나 Low등은 두 가지 요인 중 효소 반응의 경우는 효소와 용매간의 상호작용에 의한 변화, 즉, 용매에 의한 효소의 용매화 정도의 변화가 활성화 체적 변화에 주요한 기여를 한다고 보고하였다[4]. 따라서 Fig. 4에서 보여주는 바와 같이 용매의 유전상수의 감소에 대해서 trypsin 촉매 반응의 활성화 체적이 직선적인 관계로 감소되는 것은 촉매 반응 과정중의 하전된 천이상태의 형성에 의해 새로운 전장(electric field)의 형성의 결과로서 나타나는 용매에 의한 전축(electrostriction)이 용매의 유전상수가 작을수록 더 강하게 일어나는 것을 의미한다. 그러므로 trypsin 촉매 반응에서 활성화 체적이 용매의 유전상수의 감소에 따라 감소되는 결과는 천이 상태에서 활성 자리 내의 높은 극성 쌍극자가 형성되고, 이 쌍극자에 의한 용매의 전축이 용매의 유전상수가 작을수록 더 강하게 일어나는 것을 알 수 있다. 즉, 반응에서 새롭게 형성된 천이상태의 쌍극자 주변에 용매의 유전상수가 작아짐에 따라 더 강한 정전기력에 의해서 용매 분자들

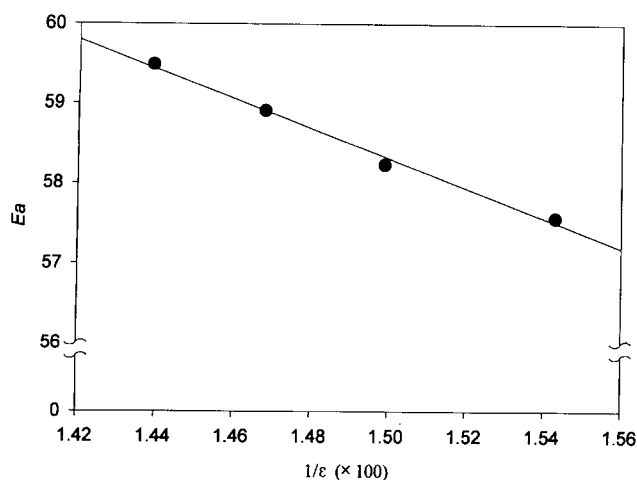


Fig. 5. Activation energy for trypsin-catalyzed reaction as a function of solvent dielectric constant.

All the experiments were performed at 273-303K and pH=5.5. Activation energy was determined from an Arrhenius plot of rate constants versus $1/T$, where T is the absolute temperature. From the slope, we calculated the E_a values (slope = $-E_a/2.303R$, where R is the gas constant). No deviation from linearity was observed over the experimental temperature range.

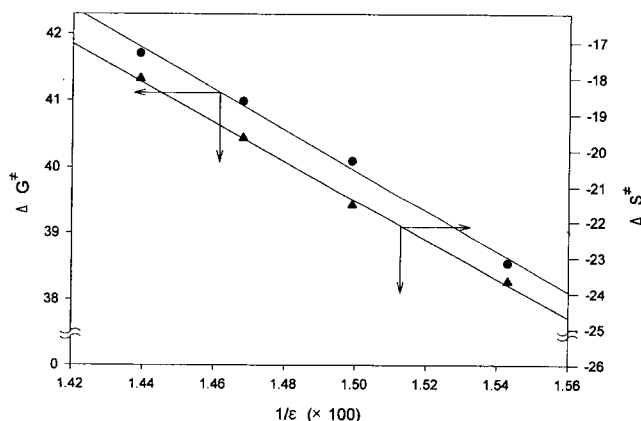


Fig. 6. Free energy of activation as a function of solvent dielectric constant in 0°C and pH=5.5.

The free energy of activation was estimated from $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$. Activation enthalpy (ΔH^\ddagger) and activation entropy (ΔS^\ddagger) of the activated state were calculated from a modification of the linear Arrhenius equation: $\text{Log}(k_{\text{cat}}/K_M) = -[(\Delta H^\ddagger/2.303R)(1/T)] + \text{log}(\kappa_b/h) + (\Delta S^\ddagger/2.303R)$, where κ_b is Boltzman constant and h is Planks constant.

쌍극자 주변으로 강하게 끌어당기는 것을 의미한다(활성화 체적의 감소, 즉 수화의 증가). Gorman등은 유기용매 내에서 효소주변의 물분자의 거동을 관찰하였는데, 용매의 유전상수가 증가하면 효소주변의 물분자가 이탈하는 현상을 보고하였다[18]. 이것은 물분자가 정전기력에 의해서 단백질의 극성 또는 하전된 잔기에 결합되는 특성이 용매

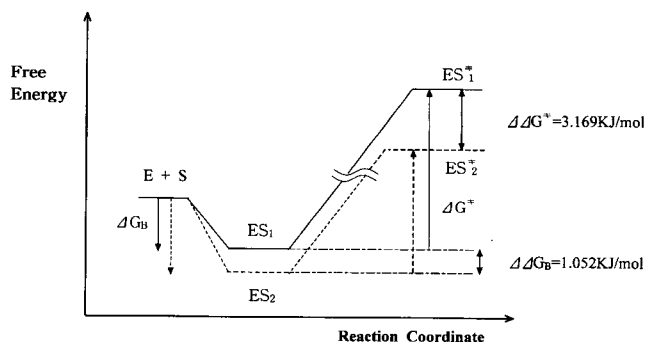


Fig. 7. Schematic free energy diagram for trypsin catalyzed reaction.

The subscripts 1 and 2 correspond to the values 69.504 (indicated by straight line) and 64.815 (indicated by dashed line) of solvents dielectric constant.

의 유전상수가 증가할수록 이 정전기력이 약해져서 효소로부터 물분자 이탈이 증가한다는 것을 의미하는 것이다. 또한 이 결과는 용매의 소수적 특성과는 무관하다는 의견을 제시하였다. 따라서 본 연구에서의 용매의 유전상수의 감소에 의해서 용매의 전축의 증가에 의한 체적의 감소 결과는 Gorman등의 유전상수 증가에 따른 물분자 이탈 현상의 결과와도 일치하였다. 이상의 결과로부터 효소반응 중 이온 및 쌍극자가 새롭게 형성되는 반응의 경우는 유전상수를 감소시킴에 따라 반응의 효율을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 압력의 가감에 따라서도 효소의 수화정도를 조절하여 반응의 효율성을 증감시킬 수 있음을 관찰하였다.

열역학값의 해석

용매의 유전상수가 trypsin에 의한 N^α -Cbz-L-lysine-*p*-nitrophenyl ester의 촉매 반응의 활성화 에너지(E_a), 활성화 자유에너지(ΔG^\ddagger), 활성화 엔트로피(ΔS^\ddagger)에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다. Fig. 5에는 위 반응의 활성화 에너지가 용매의 유전상수의 감소에 따라 직선적으로 감소함을 나타내었으며, 이는 trypsin 반응의 효율이 용매의 유전상수에 의존함을 보여주고 있다. Fig. 6은 용매의 유전상수의 변화에 따른 활성화 자유 에너지와 활성화 엔트로피의 변화를 나타내었다. Fig. 6에서 보여주는 바와 같이 trypsin 촉매 반응은 음의 활성화 엔트로피를 갖는데 ($\epsilon=69.504$ 에서 $\Delta S^\ddagger = -18.004 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$), 이것으로 보아 반응과정에서 전하 형성이 일어나는 것을 알 수 있다. 또한 용매의 유전상수의 감소에 따라 활성화 엔트로피가 감소하는 결과를 보여준다. 즉, ΔS^\ddagger 가 음의 값으로 감소하는 것은 용매가 반응과정에서 형성되는 천이상태의 중간체상에 새롭게 형성된 쌍극자에 더 강하게 결합되는 용매의 영향을 나타내며, 이 결과로 보아 용매의 유전 상수가 작아 질수록 극성인 활성화 복합체에 전축이 증가한다는 것을

의미한다. 또한 천이 상태의 활성화 자유에너지도 용매의 유전상수의 감소에 따라 감소되는 경향을 보이는데(Fig. 6), 용매의 유전상수의 변화에 따라 천이상태의 정전기적 상호작용이 변화되고, 이것이 효소반응에 있어서 중요한 인자라는 것을 나타내고 있다.

Fig. 7에는 용매의 유전상수의 변화에 따른 천이 상태의 활성화 자유 에너지의 변화에 대한 자유 에너지 도식도를 나타내었다. 용매의 유전상수가 69.5에서 64.8로 4.7 감소됨에 따라 효소와 기질이 ES 복합체를 형성하는데 있어서 결합에 대한 자유에너지의 변화 $\Delta\Delta G_B=1.052 \text{ KJmol}^{-1}$ 이었고, 천이 상태에서의 자유에너지는 $\Delta\Delta G^*=3.169 \text{ KJmol}^{-1}$ 의 감소를 나타내었다. 위의 결과로 보았을 때 trypsin 촉매 반응에서 용매의 유전상수의 감소에 따른 반응 속도의 증가의 원인은 두가지로 나누어 생각할 수 있는데, 첫째로는 앞에서 언급한 효소와 기질의 결합과정에 대한 영향이다. Trypsin 반응은 효소와 기질의 결합에 대하여 정전기적 상호작용이 기여하므로 용매의 유전상수가 감소함에 따라 활성 자리의 결합 부위와 기질의 잔기의 반대전하에 의한 정전기적 상호작용이 더 강하게 되고, 이것이 곧 더 작은 ΔG_B 값을 갖는데 기여하게 된다. 따라서 더 작은 K_M 값을 갖게 되는, 효소와 기질의 친화성이 증가되어 반응효율이 증가하는 결과를 나타낸다. 두 번째는 천이 상태에서의 정전기적 상호작용에 미치는 영향이다. 용매의 유전상수의 감소에 따른 천이 상태의 자유 에너지가 $\Delta\Delta G^*$ 는 3.169 KJmol^{-1} 의 감소되는 결과를 보였는데, trypsin과 같은 serine protease는 천이 상태 중간체 형성 시 양성자화된 활성자리의 His-57과 oxyanion hole 사이에 전장의 형성에 의해 쌍극자가 형성되어지므로, 이 때 용매의 유전상수가 감소함에 따라 His 57과 oxyanion hole 사이의 전하를 형성하는데 있어서 정전기적 감소를 주게 되어 천이 상태 중간체 형성에 있어서의 활성화 자유 에너지의 감소를 가져와서 천이 상태가 안정화되었기 때문이다.

위의 결과들로부터 trypsin 촉매 반응에 있어서 중요한 요인은 천이 상태의 정전기적 안정화(electrostatic stabilization)이고, 이것은 용매의 유전상수에 따른 oxyanion hole의 쌍극자에 결합된 용매의 상호작용에 의해 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 따라서 trypsin 촉매 반응과 같이 기질과 효소 사이에 정전기적 상호작용이 존재하고, 천이 상태에 쌍극자를 형성하는 효소반응에서 용매의 유전상수는 반응 효율에 주요한 영향을 미치게 된다. 용매의 유전 상수가 감소함에 따라 반응 효율은 대수적으로 증가하는데, 그것은 천이 상태의 정전기적 에너지의 감소를 가져와서 자유 에너지의 감소를 가져오게 되며 또한 활성화 체적의 감소를 수반한다. 즉, 반응용매로써 유기용매를 사용함으로써 용매의 물리적 특징 중 하나인 유전상수를 변화시킬 수 있고, 이 변화에 의해서 효소 반응 속도를 결정하는 중요한 요인 중 하나인 천이 상태가 용매의 전극의 변화에 의해 안정화

되고, 그 결과로서 반응속도의 증가가 일어나는 것을 관찰하였다. 이와 같이 효소 반응의 반응 동력학 정수에 대한 용매의 유전상수와 압력의 영향에 대한 연구는 앞으로 효소 반응 기작의 연구에 유용한 수단으로 사용될 수 있음을 고찰하였고, 또한 효소를 이용하여서 유용물질을 생산하고자 할 때 효소반응의 반응 기작에 대한 더 많은 정보를 가지고 대처함으로써 반응효율을 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

Trypsin 촉매반응의 반응효율에 대하여 용매의 유전상수 및 압력이 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 조사하였다. Trypsin 반응의 촉매효율은 용매의 유전상수가 감소함에 따라 대수적으로 증가하였다. 또한 용매의 유전상수의 감소에 대하여 활성화 체적은 직선적으로 감소하는 것을 보였는데, 이는 용매의 유전상수의 감소에 따라 반응중간과 정에서 형성되는 극성 쌍극자에 대한 용매의 전극이 증가하여, 극성 쌍극자의 형성을 위한 정전기적 에너지가 감소 되었음을 의미하는 것으로 해석되었다. Trypsin 촉매 반응에 대한 용매의 유전상수의 영향에 대하여 열역학 변수를 통하여 고찰해 본 결과 용매의 유전상수가 4.7 만큼 감소하였을 때 활성화 에너지는 2.262 KJ/mol 이 감소하였고, 활성화 자유에너지는 3.169 KJ/mol 이 감소되는 결과를 보였다. 이와 같은 결과로부터 용매의 유전상수를 조절함으로써 효소반응과정의 천이 상태를 안정화시킴으로써 반응 속도를 증가시킬 수 있음을 시사하고 있다. 따라서 효소를 이용하여 유용물질을 생산하고자 할 때 효소반응의 반응 기작에 대한 더 많은 정보를 가지고 용매의 유전상수 및 압력을 조절함으로써 반응효율을 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Bergmeyer, H. U. 1986. *Methods of enzymatic analysis*. 3rd ed. VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim.
2. Gorman, L. S. and J. S. Dordick. 1991. Organic solvents strip water off enzyme. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 392-397.
3. Harned, H. S. 1950. *The physical chemistry of electrolytic solutions*. Reinhold Publishing Co. New York.
4. Low, P. S. and G. N. Somero. 1975. Activation volumes in enzymic catalysis: Their sources and modification by low-molecular-weight solutes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**: 3014-3018.
5. Mattheu, J. B., G. H. Hanaia, and F. N. Gurd. 1979. Electrostatic effects in Hemoglobin: Hydrogen ion equilibria in human deoxy- and oxyhemoglobin A. *Biochemistry* **18**: 1919-1928.
6. Maurel, P. 1978. Relevance of dielectric constant and sol-

- vent hydrophobicity to the organic solvent effect in enzymology. *J. Biol. Chem.* **253**: 1677–1683.
7. Molid, E. 1981. The theory of pressure effects on enzymes. *Adv. Prot. Chem.* **34**: 93–166.
 8. Ménard, R. and A. C. Storer. 1992. Oxyanion hole interactions in serine and cysteine protease. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **373**: 393–400.
 9. Park, H. and Y. M. Chi. 1998. Distinction between the influence of dielectric constant and of methanol concentration on trypsin-catalyzed hydrolysis and methanolysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 656–662.
 10. Perry, K. M., J. J. Onuffer, M. S. Gitteiman, L. Barmat, and R. Matthews. 1989. Long-range electrostatic interaction can influence the folding, stability, and cooperativity of dihydroforate reductase. *Biochemistry* **28**: 7961–7968.
 11. Perutz, M. F., G. Fermi, and T. B. Shih. 1984. Structure of deoxyhemoglobin cowtown [His HC3(146)Leu]: Origin of the alkaline Bohr effect and electrostatic interactions in hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4781–4784.
 12. Reichardt, C. 1988. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim.
 13. Rohdewald, P. and M. Moldner. 1973. Dielectric constants of amide-water systems. *J. Phys. Chem.* **77**: 373–377.
 14. Taniguchi, Y. and S. Makimoto. 1988. High pressure studies of catalysis. *J. Mol. Cat.* **47**: 323–334.
 15. Ullmann, G., M. Haensler, W. Gruender, M. Wagner, H. J. Hofmann, and H.-D. Jakubke. 1997. Influence of freeze-concentration effect on proteinase-catalyzed peptide synthesis in frozen aqueous systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1338**: 253–258.
 16. Warshel, A., G. Naray-Szabo, F. Sussman, and J. K. Hwang. 1989. How do serine proteases really work? *Biochemistry* **28**: 3629–3637.
 17. Wlodek, S. T., J. Antosiewicz, and J. M. Briggs. 1997. On the mechanism of acetylcholinesterase action: The Electrostatically induced acceleration of the catalytic acylation step. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 8159–8165.
 18. Zaks, A. and A. J. Russell. 1988. Enzymes in organic solvents: Properties and applications. *J. Biotechnol.* **8**: 259–270.

(Received December 1, 1999)