

Chapter 3 Enzyme (효소)

Enzymes	
Objective	<ul style="list-style-type: none"> ○ 효소의 분류법(6 group)과 촉매하는 반응의 형태는? ○ 효소활성에 영향을 주는 요인들은 무엇인가? ○ 효소 활성조절에 대한 4가지 기작은 무엇인가?
Key words	<ol style="list-style-type: none"> 1. 완전효소(holoenzyme) 2. 보효소(coenzyme) 3. 보결단(prosthetic group) 4. 활성자리(Active site) 5. 활성화 에너지(activation energy) 6. 효소의 일반적 특성(성질) 7. 입체다른자리 효소(allosteric enzyme) 8. 동위효소(isoenzyme) 9. Km value(Km 값) 10. 미하엘리스-멘텐식(Michaelis-Menten equation) 11. Lock and key model and Induced-fit model (열쇠와 자물쇠 모델과 유도적합 모델) 12. Concerted model and Sequential model (협동적모델과 순차적 모델) 13. 효소의 활성화에 미치는 인자 14. 효소의 정제과정 15. 효소 활성화에 미치는 저해제의 영향 16. 대사전환수(turnover number) 17. 효소원(zymogen) 18. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 19. The role of cofactors and coenzyme in enzyme catalysis (효소촉매 반응에서 보인자와 보효소의 역할) 20. Ribozyme (리보자임) : RNA enzyme

◎ 효소의 촉매 기능

- 생체화합물의 **합성반응**을 촉매
- 세포의 **에너지 공급반응**을 촉매
- 화합물의 **독성제거반응**을 촉매

◎ 효소의 응용분야

- Medicine (질병진단), Chemical industry(화학공업)
- Food processing(식품가공), Agriculture (농업)

1. Introduction to enzymes : history

- 1) L. Pasteur (1860년)
 - * alcohol fermentation : 효소에 의해서 일어난다.
 - * starch →→→→→ ethanol
 - * **living cell** 내에서만 효소의 활성을 가진다(X).
- 2) E. Buchner (1897년)
 - * yeast cell free extract 로 실험
 - * 생세포 외에서도 효소 작용이 일어난다.
- 3) J. Summer (1926년)
 - * urease 의 결정화에 성공, 순수분리 및 정제
- 4) J. B. S. Haldane : enzymes이라는 제목의 논문을 기술

2. 효소의 일반적 성질

- 1) 효소는 생체내에서 합성되는 일종의 **단백질성 유기촉매**다.
- 2) **열역학적으로 가능한 반응을 촉매 하며, 고도의 특이성**을 가진다.
- 3) **효소의 반응속도는 pH, 온도, 저해제, activator, 반응생성물** 등에 의해서 영향을 받는다.
- 4) 효소는 강산, 강염기, heating에 의해서 촉매 성질을 상실(**변성**)한다.
- 5) 효소는 어떤 **반응의 Keq(평형상수) 나 ΔG(자유에너지)는 변화**시킬 수 없다.
- 6) 효소는 반응속도에 영향을 주며 활성화 에너지에 의해서 좌우된다.
- 7) 효소는 **activation energy(활성화 에너지)를 낮추어주는 역할**을 한다.
- 8) 효소는 **반응의 평행에는 영향을 주지 않고 반응속도에 영향**을 준다.
- 9) 많은 효소는 두개 이상의 기질과의 반응을 촉매한다.



◎ **활성화 에너지(activation energy)** : 바닥상태와 전이상태의 에너지 차

◎ **전이 상태 (transition state)** : 에너지 장벽의 정점에서 S 혹은 P상태로 붕괴가 동일하게 되는 한 지점을 말한다.

◎ **효소촉매반응(enzyme-catalyzed reaction)의 특징** : 효소분자의 극히 한정된 영역인 활성화자리에서 일어난다.

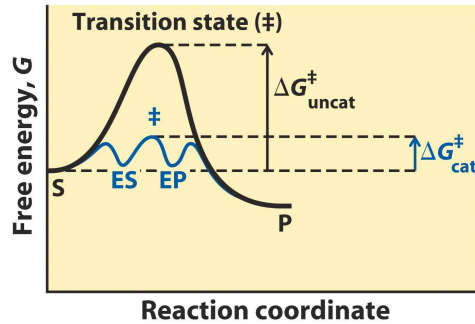


Fig. 효소 촉매반응과 비촉매 반응을 비교한 반응좌표

3. 효소의 명명과 분류 (Nomenclature and classification of enzyme)

1) 효소가 촉매 하는 반응에 의해서 분류된다.

- ① substrate + ase (접미사) : urease, proteinase
- ② substrate + chemical procedure + ase : alcohol dehydrogenase
- ③ source + substrate + chemical procedure + ase :
ex) Rabbit muscle alcohol dehydrogenase

2) 효소는 4개의 분류번호로 표시된다.

: 계통명(a systematic name)은 촉매 하는 반응을 확인 한다.

ex) Glucose + ATP \rightarrow glucose-6-phosphate + ADP

[glucose phosphotransferase]

분류번호(Classification number) : 2.7.1.1

- first digit (2), denotes the class name (transferase)
- second digit (7), subclass (phosphotransferase)
- third digit (1), phosphotransferases with a hydroxyl group as acceptor
- fourth digit (1), glucose as the phosphate-group acceptor

◎ 국제 생화학 연합 [IUB, International Union of Biochemistry]

효소를 촉매작용을 하는 반응에 따라 6 class로 나누고 각 효소를 그들의 활성도에 따라 네 자리로 된 고유한 code number를 가지도록 한다.

3) 효소의 분류

① 산화-환원효소(oxidoreductase) : 전자의(H atoms) 전달

- subclass : dehydrogenase(탈수소효소), oxidase(산화효소), reductase(환원효소)
oxygenase(산소화효소), peroxidase(과산화효소), hydroxylase(수산화효소)

② 전달효소(transferase) : 작용기(functional group) 전달

- 대표적 작용기 : amino기, carboxyl기, carbonyl기, methyl기, 인산기, acyl기
- subclass : carboxylase(카르복실화 효소), transmethylase(메틸기전이효소)

transaminase(아미노기전달효소)

- ③ 가수분해효소(hydrolase) : 물의 첨가에 의한 화학결합의 절단을 촉매 하는 반응
 - subclass : esterase, **phosphatase(인산가수분해효소)**, peptidase
- ④ 분해효소(lyase) : 이중결합에 작용기의 부가 반응,
 - 작용기의 제거에 의한 이중결합 형성 반응
 - ex) H₂O, CO₂, NH₃ 제거 or 부가
 - subclass : **decarboxylase, dehydratase(탈수효소), deaminase(탈아미노화효소)**
- ⑤ 이성질화효소(isomerase) : 이성질을 만들기 위해 분자내에서의 작용기의 전이
 - subclass : epimerase, mutase(자리옮김 효소)
- ⑥ 연결효소(ligase) : 두 기질분자 사이에 화학결합을 촉매하는 효소
 - synthetase, carboxylase, **DNA ligase**

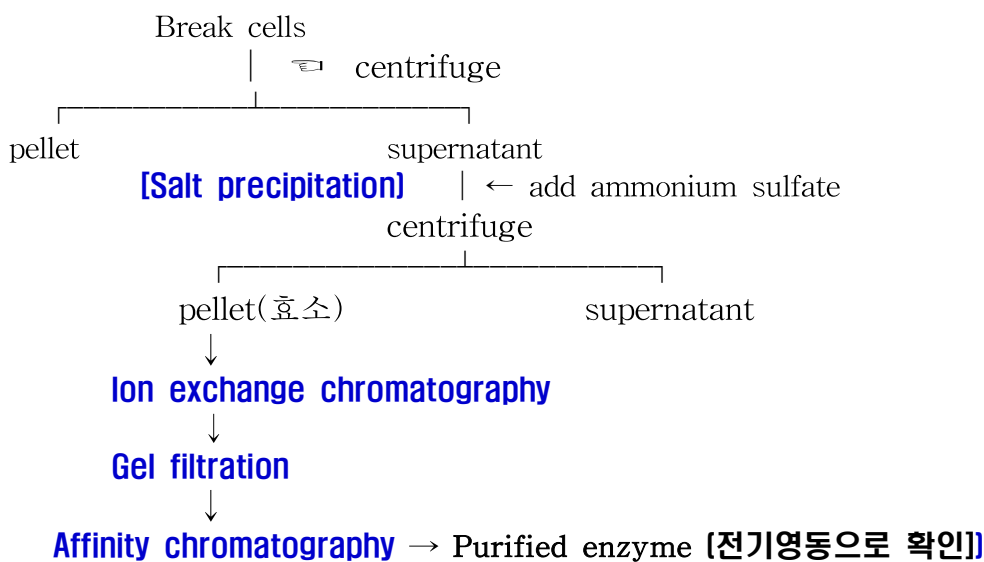
TABLE 6-3 International Classification of Enzymes

No.	Class	Type of reaction catalyzed
1	Oxidoreductases	Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)
2	Transferases	Group transfer reactions
3	Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)
4	Lyases	Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups
5	Isomerases	Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms
6	Ligases	Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to ATP cleavage

Note: Most enzymes catalyze the transfer of electrons, atoms, or functional groups. They are therefore classified, given code numbers, and assigned names according to the type of transfer reaction, the group donor, and the group acceptor.

4. 효소의 정제 과정

: 세포 파괴 → salt 침전 → **Ion exchange chromatography** →
Gel filtration → **Affinity chromatography** → 전기영동



◎ Purified enzyme (정제된 효소)

: kinetics, cofactor, active site, structure, action mechanism 등을 연구

5. 효소의 활성에 영향을 미치는 인자

: 기질농도, 온도, pH, 저해제, 반응생성물, cofactor (coenzyme, metal)

1) Substrate concentration (기질농도)는 효소 촉매반응의 속도에 영향을 준다

① 기질과 효소 결합의 두 model

- 기질은 효소의 active site에 결합한다.

* Lock-and key model (열쇠와 자물쇠 가설)

- 효소결합부위의 입체모형과 기질형태사이의 고도의 유사성을 가진다.

* Induced-fit model (유도적합가설) : 기질이 결합하면 효소의 구조가 변형

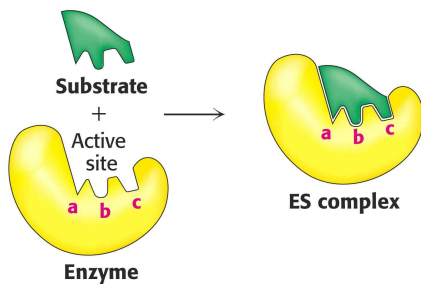
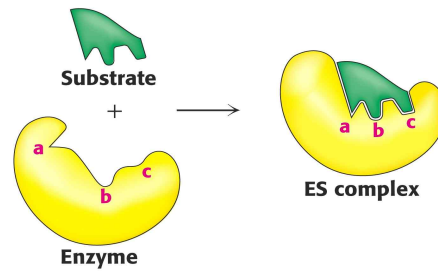


Fig. Lock and key model of enzyme-substrate binding



Induced-fit model of enzyme-substrate binding

② 효소반응속도(enzyme kinetics)는 초기 기질농도에 의존

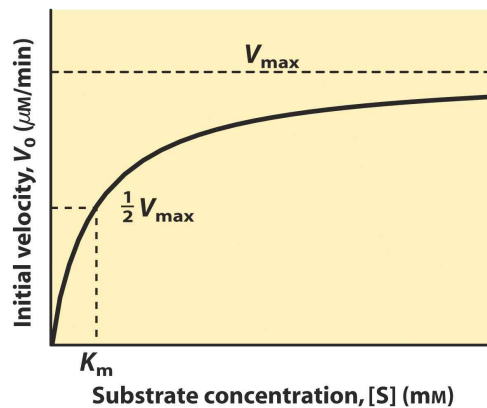


Fig. 기질농도에 대한 초기 속도의 의존성

③ 기질농도와 효소반응속도 사이에 정량적인 관계가 있다

◎ 미하엘리스-멘텐식(Michaelis-Menten equation) :

- 많은 효소반응속도(enzyme kinetics)를 설명한다.

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{or} \quad V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

V : velocity of enzyme reaction(효소반응속도)

Vmax : maximum velocity(최대속도)

[S] : substrate conc.(mole/L)

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

◎ **Michaelis -Menten equation (미카엘리스-멘텐식)**

[S] > K_m 이면 V = V_{max}

[S] = K_m 이면 V = ½V_{max}

[S] ≥ K_m 이면 Zero order

[S] ≤ K_m 이면 First order

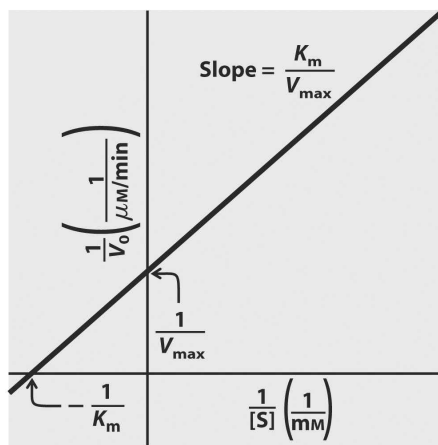
◎ **K_m 치** : 반응속도가 최대속도의 절반 일 때의 기질의 농도로 정의
K_m값이 작을수록 ES 복합체에 대한 효소의 친화도는 커진다.

◎ **Lineweaver-Burk Plot (라인웨버-버크 식)**

(The Double-Reciprocal Plot, **이중-역수 도표**)

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



2) 효소의 활성은 pH에 의하여 영향을 받는다

- **Enzyme 활성이 최고가 되는 최적 pH**를 가지고 있다
- 단백질변성(protein denaturation) : loss of enzyme activity
- pH는 효소, 기질, 효소-기질복합체(ES-complex)에 영향을 준다
- pH는 효소의 **active site (carboxyl, imidazole, -SH기)**에 영향을 준다



- ① 활성화자리의 저당한 형태의 유지
- ② 효소에 기질의 결합
- ③ 생성물에 대한 기질의 전환에 관여

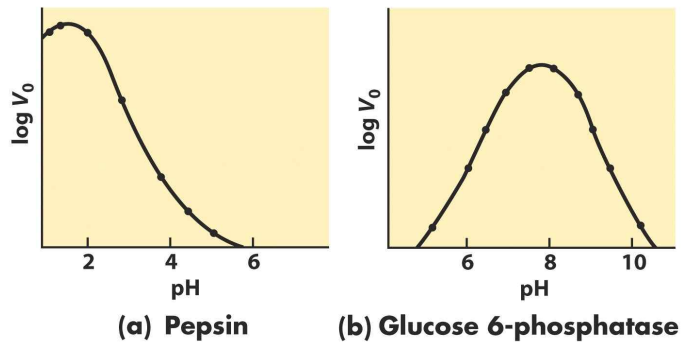


Fig. The pH activity profiles of two enzymes

3) 온도의 영향(Effect of temp.)

- 단백질의 열변성(protein thermal denaturation)
- 충돌이론(collision theory), transition state 등으로 온도와 반응속도와의 관계를 설명
- 최적온도 : animal(37°C), plant(37°C 보다 낮다)

4) Effect of cofactor

- coenzyme group : loosely bond to protein
- prosthetic group : tightly bond to protein
- metal ion : Na, K, Mg, Mn, Cu, Fe

TABLE 6-2 Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups

Coenzyme	Examples of chemical groups transferred	Dietary precursor in mammals
Biotin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (:H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin B ₁)

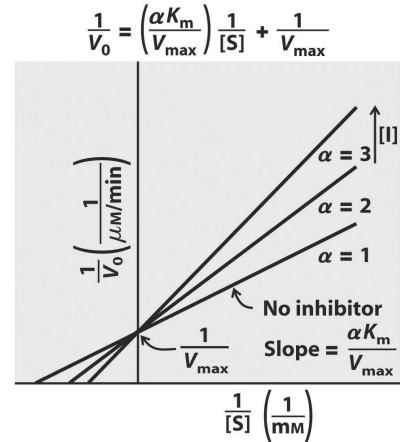
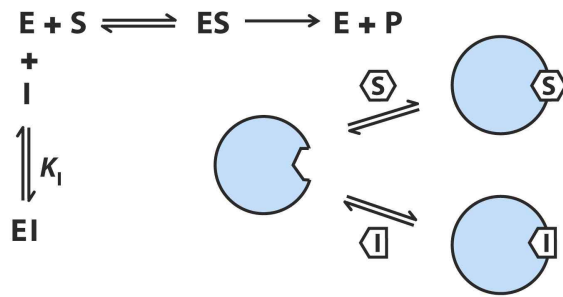
Note: The structures and modes of action of these coenzymes are described in Part II.

5) Effect of inhibitor(저해제 효과)

① Competitive inhibition (경쟁적 저해)

- 기질과 구조적으로 유사하여 효소의 active site에 기질과 경쟁적 결합으로 일어나는 저해
- 기질의 양을 증가시키면 저해를 극복 ex) succinate dehydrogenase
- Km 치 증가, Vmax 불변

(a) Competitive inhibition

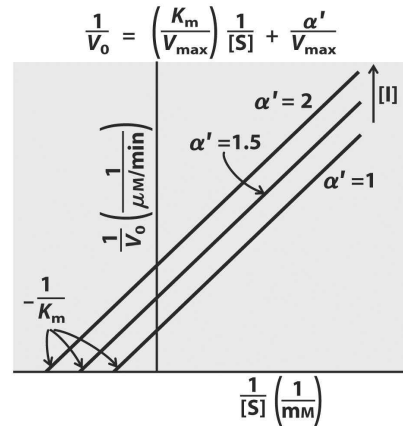
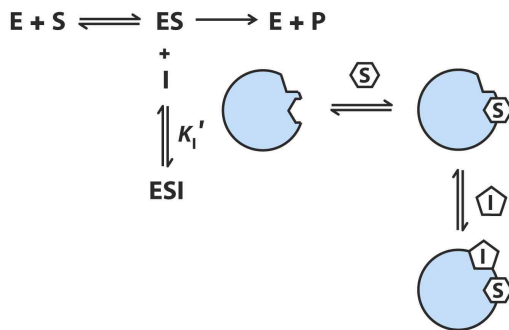


② Uncompetitive inhibition(무경쟁적 저해, 불경쟁적 저해)

- 무경쟁적 저해는 저해제가 free enzyme 이나 free substrate에는 작용 못하고 ES complex를 만든 후에 I 가 결합 저해하는 형태

- **Km 치 감소, Vmax 감소**

(b) Uncompetitive inhibition

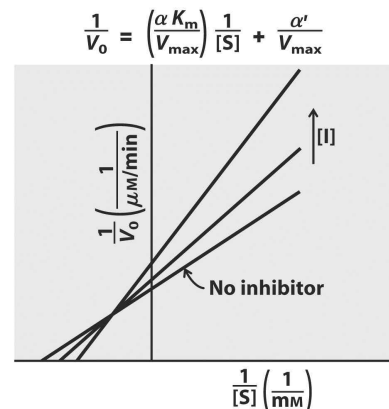
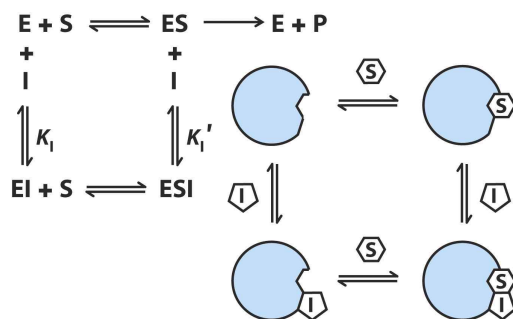


③ mixed inhibition(혼합형저해, 비경쟁적 저해)

- 효소의 turnover number 를 감소시키므로 반응속도를 낮춘다.
- 효소의 활성화 자리에 대한 기질의 결합에는 영향을 미치지 않음
- 효소와 효소기질 복합체에 가역적으로 결합하는 화합물

- **Km 치 불변, Vmax 감소,**

(c) Mixed inhibition



* Mixed inhibitor 는 주로 중금속들인데 이들은 주로 enzyme protein의 SH group 등과 결합하여 단백질의 구조를 변경함으로써 저해작용

6. 다기질 반응의 반응속도 [Biochemistry, Leninger]

1) Ordered & random mechanism :

- 생성물이 유리되기 전에 모든 기질이 효소에 부가되는 반응
- 효소 및 both substrate가 ternary complex를 형성

ex) Order mechanism : alcohol dehydrogenase

ex) Random mechanism : glycogen phosphorylase (글리코겐가인산 분해효소)

2) Ping pong mechanism :

- 모든 기질이 효소와 반응하기 전에 하나 이상의 생성물이 효소로 부터 유리되는 것

① 기질에 존재하는 functional group을 효소에 전달 → E'

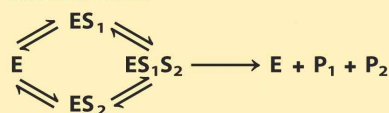
② E' 변화된 효소

③ 기질 (S₂)에 functional group을 전달

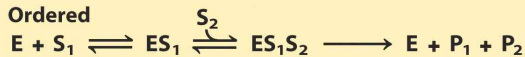
④ regenerated 효소

(a) Enzyme reaction involving a ternary complex

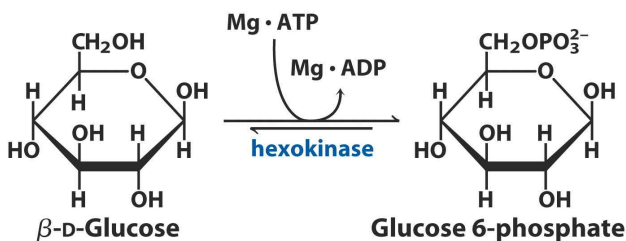
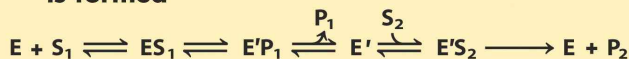
Random order



Ordered



(b) Enzyme reaction in which no ternary complex is formed



7. 대사의 효소적 조절

1) Allosteric 조절 (다른자리입체성 조절)

Multienzyme system에서 end product가 이 반응 순서의 맨 처음 혹은 처음에 가까운 효소의 specific inhibition 역할을 하는 경우가 있으며 이런 형태의 저해를 feedback inhibition, end product inhibition이라 칭하고 end product에 의해서 저해 받는 효소를 allosteric enzyme (다른 자리 입체성효소)이라 하며 생체내의 대사조절의 중요한 기작이다

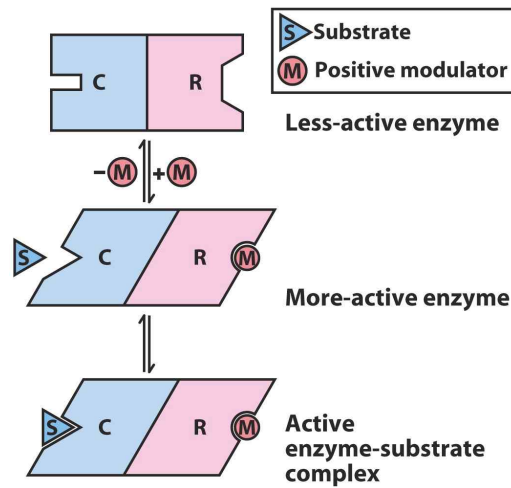
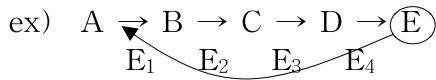


Fig. 입체다른자리 효소의 소단위 사이의 상호작용과 억제자와 활성자의 상호작용
 ◎ In many pathways a regulated step is catalyzed by an allosteric enzymes
 (많은 대사경로에서 조절단계는 입체다른자리 효소의 촉매작용을 받는다)

① Concerted model(협동적 모델)

- * 단백질이 기질과 강하게 결합한 형태 R(relaxed)구조와 기질이 상대적으로 약하게 결합하는 T(tout) 구조의 두 형태를 가진다.
- * 모든 소단위체의 구조가 동시에 변한다.
- * 기질 한 분자가 한 소 단위체에 결합하면 두 번째 기질분자가 다른 소 단위체에 결합하는 것을 촉진한다. (corporative)

② Sequential model (순차적 모델)

- * 기질결합이 T형태에서 R형태로 구조적 변화를 유발
- * 기질이 효소에 결합할 때 볼 수 있는 유도-적합 이론과 같다.

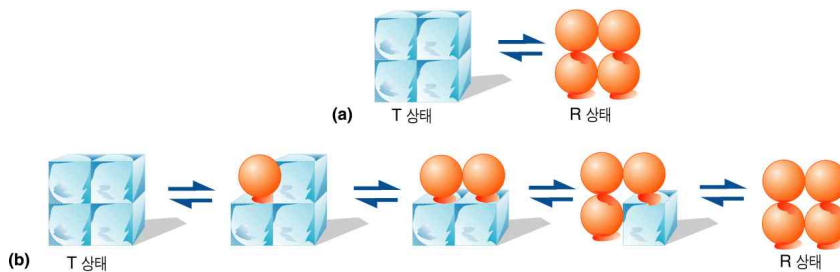
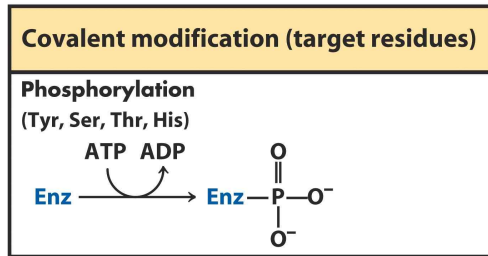


Fig. 다른자리 입체성효소의 모형.
 (a) 협동적모형, (b) 순차적모형

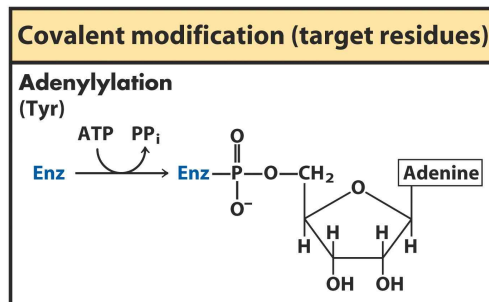
2) Covalent modification (공유결합 변형)

* 많은 조절효소들은 가역적인 공유결합변형을 한다

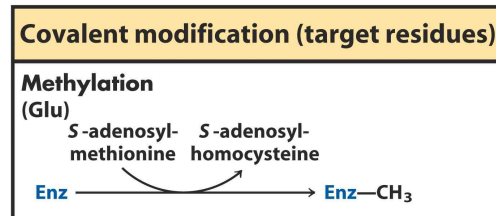
① 인산화(Phosphorylation) : 인산기는 단백질의 구조와 촉매활성에 영향을 준다.



② adenylation : Tyr



③ methylation (메틸화) : glu



④ ADP-ribosylation : Arg, Gln, Cys

3) 유전적 조절(genetic control)

① 효소유도(enzyme induction) :

세포내에서 일어나는 대사의 요구에 반응하여 효소가 생산되는 현상

② 억제작용(repression reaction)

4) 구획화(compartmentation)

- 대사에서 합성과 분해가 다른 organelle(소기관)에서 일어난다.

ex) 합성 : 세포질(해당작용, 대부분 합성반응)

분해 : 미토콘드리아(호기적 조건), citrate cycle, 베타산화

8. 효소의 형태

- * Enzyme : protein 만으로 효소활성을 가지는 효소 (소화효소)
- * **Holoenzyme(완전효소)** : 단백질이 금속이온이나 coenzyme과 결합하여 효소의 활성을 가지는 효소(산화 환원 효소)
 - Protein (inactive) : apoenzyme (apoprotein)
 - Cofactor (metal ion : Fe, Mg, Mn, Zn)
 - Coenzyme (organic molecule) : 대부분 vit B complex (loosely bond)

Table. Some enzymes containing or requiring inorganic element as cofactors	
Fe ²⁺ or Fe ³⁺	Cytochrome oxidase, Catalase, Peroxidase
Cu ²⁺	Cytochrome oxidase
Zn ²⁺	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase
Mg²⁺	Hexokinase, Glucose-6-phosphatase, Pyruvate kinase
Mn ²⁺	Arginase, Ribonucleotide reductase
K ⁺	Pyruvate kinase
Ni ²⁺	Urease
Mo	Dinitrogenase
Se	Glutathione peroxidase

TABLE 6-2 Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups

Coenzyme	Examples of chemical groups transferred	Dietary precursor in mammals
Biotin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (:H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin B ₁)

Note: The structures and modes of action of these coenzymes are described in Part II.

9. 효소의 이용

이론적인 분야 및 실제 응용분야에 이용

1) 산업적 이용

- Glucose, 물엿 : α-amylase, glucoamylase
- 포도주, 청정제 : pectinase
- 된장, 간장 : protease, amylase
- Cheese : renin
- 사 료 : cellulase, hemicellulase

2) 의학적 이용

- 소화제 : amylase, protease, lipase 등
- 병의 진단 : 혈액중의 특수 효소의 활성을 측정하여 병을 진단
- 효소를 사용한 치료

ex) Streptokinase(단백질 가수분해효소) :

혈전을 분해(plasminogen→plasmin)

ex) asparaginase : 암 치료제로 사용

3) 농업적 이용

- 병충해 저항성 증가 : chitinase 등을 이용

10. 보충학습(중요 용어 설명)

1) 고정화 효소

: Enzyme을 고체지지물 (대개 작은 bead)에 연결시킨 것

- 고정화효소는 액체 현탁액에서 쉽게 제거할 수 있다
- 생성물이 효소로 오염되지 않는다.
- 효소를 재사용 할 수 있다.
- 불활성화에 대해 안정하다
- **불용성 기질에 작용할 수 없고, 중합된 기질에 매우 낮은 효율을 가진다.**
- 효소를 가지는 세포를 고정화 시킨다.

2) Sucrose gradient centrifuge (sucrose 밀도구배 원심분리)

* Sucrose 농도 : 7 - 25%

* 침강계수(S) : 분자나 입자의 특징적인 상수
분자의 크기, 모양, 밀도의 함수

3) 동위효소 (Isoenzyme, isozyme)

- 같은 생물에 존재하고 같은 반응을 촉매하는 한 효소의 2가지 이상의 형태

ex) Lactic dehydrogenase (LDH : 5ea)

M-form : 골격근, H-form : 심장근

4) Turnover number (회전수)

- 효소 1 mol이 1 분 동안 생성물로 전환시키는 기질의 mol 수
- **회전수는 촉매의 효율을 나타낸다.**

5) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

- 복잡한 혼합물에서 nano gram의 단백질 혹은 항원을 검출하고 정량할 수 있다
- antibody를 이용하여 단백질 등을 정량하는 원리

6) Prosthetic group (보결단)

- 보조인자가 효소에 대단히 단단히 결합되어 효소에 손상을 입히지 아니하고 분리할 수 없는 **조효소** ex) Biotin

7) Ribozyme (리보자임) : RNA enzyme

- 촉매 활성을 가지고 있는 RNA
- ex) Ribonuclease p (단백질 subunit, 분자량(14,000), RNA(377bp))
- 기능 : 비활성 tRNA → 성숙한 tRNA

8) 효소기질복합체의 이점(ES-complex)

- 2가지 기질사이의 상대적 운동성의 대표적인 제한 즉 엔트로피의 감소의 결과로 반응속도는 상승
- 기질-효소사이의 약한 결합이 형성됨으로써 기질은 탈 용매화(desolvation)를 가져온다.

9) Zymogen(효소원, 자이모젠)

- 단백질 가수분해 효소의 proenzyme 형태
- 불활성인 단백질 가수분해 효소 (Zymogen)의 합성은 그 효소의 잠재적인 파괴 효과로 부터 세포를 보호해 준다
- ex) pepsinogen, trypsinogen 등

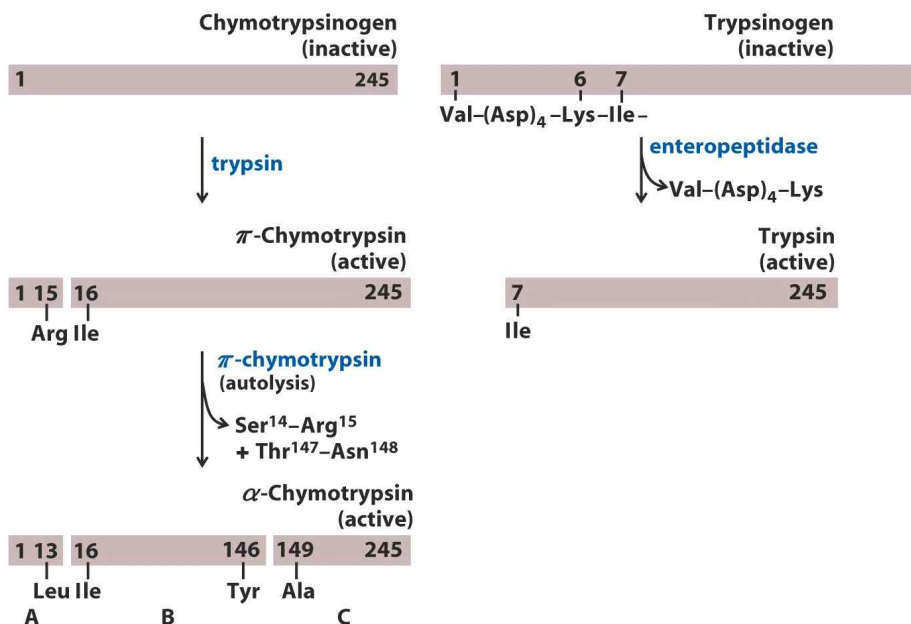


Fig. Activation of zymogens by proteolytic cleavages
(단백질 절단에 의한 효소원의 활성화)