

단 신

Brevibacterium sp. CHI로부터 Nitrile Hydratase의 반응 속도론

장호남 · 이처영 · 황준식*

한국과학기술원 화학공학과
*국방과학연구소
(1989년 7월 15일 접수, 1990년 9월 15일 채택)

Reaction Kinetics of Nitrile Hydratase from *Brevibacterium* sp. CHI

Ho Nam Chang, Cheo Young Lee and Jun Sik Hwang*

Department of Chemical Engineering, KAIST, P.O. Box 131, Seoul, Korea

*Agency for Defense Development, Daejeon

(Received 15 July 1989; accepted 15 September 1990)

요 약

Nitrile의 생변환에 이용되는 nitrile hydratase의 enzyme action에 영향을 주는 기질과 생산물 및 저해물질 등의 효과를 알아보았다. 기질로서 과잉의 acrylonitrile은 효소의 활성을 저해하는데, 기질농도가 비교적 높은 0.2 mol/L에서부터 저해가 일어났다. Nitrile 생변환의 생산물인 acrylamide와 propionamide 및 이와 유사한 구조를 가지는 acrylic acid와 cyanide 등은 nitrile hydratase를 경쟁적으로 저해하였다. Cyanide에 의한 저해가 가장 크게 나타났으며, 이 때 competitive inhibition constant K_i 는 3.8×10^{-3} mol/L이었다.

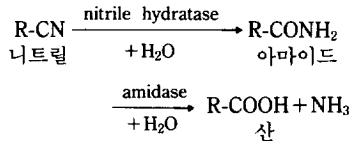
Abstract—The effect of several compounds on the enzyme action of the nitrile hydratase was studied. An excess of acrylonitrile as substrate was shown to inhibit the activity of the enzyme. This inhibition occurred at a substrate concentration of 0.2 mol/L. The nitrile bioconversion products (acrylamide, propionamide) and their structural analogues (acrylic acid, cyanide) were shown to inhibit the enzyme competitively. The most important inhibition found was that of cyanide ($K_i = 3.8 \times 10^{-3}$ mol/L), a breakdown product of some nitriles.

1. 서 론

최근에 *Nocardia*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* 등 여러 종류의 박테리아가 니트릴을 연속적으로 그에 대응하는 아마이드와 카르복실산으로 변화시킬 수 있다는 것을 발표하였다[1-6]. *Nocardia*에 의한 아세토니트릴의 물질대사가 Digeronimo 등에 의하여 연구되었다[1]. Asano 등은 nitrile hydratase 활성을 가진 *Pseudomonas chlororaphis*를 분리, 효소생산의 kinetics를 연구하였으며, nitrile hy-

dratase가 아크릴로니트릴, 아크릴아마이드 및 시아나이드에 의해 저해(inhibition)받음을 보고하였다[3, 4, 7]. Fradet 등은 *Brevibacterium* A4로부터 추출하여 부분적으로 정제한 nitrile hydratase를 이온교환수지로 고정화하여, 이 고정화 효소를 충전층반응기에 충전후 효소반응시켜 프로피온아마이드 생산실험을 수행하였다[8]. Hwang과 Chang은 *Brevibacterium* sp. CHI를 분리하여 이중실관반응기와 재순환 유가식반응기에서 고정화된 균에 의한 아크릴아마이드의 생산에 대하여 연구하였다[9-11].

Brevibacterium sp. CHI은 니트릴의 수화과정에 두 개의 효소를 가진다. 하나는 nitrile hydratase로 수용성 니트릴을 그에 대응하는 아마이드로 변환시키는 효소와 또 하나는 amidase로 아마이드를 그에 대응하는 산과 암모니아로 변환시키는 효소이다. 이들 효소가 작용하는 전체적인 반응식은 다음과 같다.



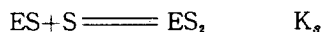
Nitrile hydratase의 비활성이 amidase의 비활성보다 상당히 크기 때문에 아크릴로니트릴이 아크릴아마이드로 거의 100% 전환되며 부산물로 미량의 아크릴산이 생성된다.

생물학적 방법에 의한 아크릴아마이드의 경제적 생산을 위해서는 nitrile hydratase의 활성에 영향을 주는 기질, 생산물 및 저해물질 등에 의한 저해정도를 아는 것이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 기질과 생산물의 과량에 의한 nitrile hydratase의 저해정도와 저해물질인 시아나이드에 의한 저해정도를 알아보았다.

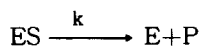
2. 반응속도론

기질 및 반응물 저해반응에 대한 기질 및 반응물 농도와 반응속도사이의 관계식은 Michaelis-Menten type을 사용하여 modeling할 수 있다. 여기서 가정한 mechanism은 S와 ES 복합체가 결합하는 경우와 E가 I와 결합하여 EI를 형성하는 경우에 반응성이 없는 중간물질을 형성한다고 가정한다.

평형상태에서의 반응단계



율속단계



그러므로

$$K_m = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} \quad (1), \quad K_s = \frac{[\text{ES}][\text{S}]}{[\text{ES}_2]} \quad (2),$$

$$K_i = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]} \quad (3)$$

총 효소량 ($[E_o]$)에 대한 수식식 :

$$[E_o] = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{ES}_2] + [\text{EI}] \quad (4)$$

반응속도식 :

$$V = k[\text{ES}] \quad (5)$$

(1)-(5)식으로부터 반응속도식은 다음과 같다.

$$V = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[\text{S}]} + \frac{K_m}{K_s} \frac{[\text{I}]}{[\text{S}]}} \quad (6)$$

여기서, $V_{max} = k[E_o]$.

3. 재료 및 방법

3-1. 균주

균주는 토양에서 분리한 *Brevibacterium* sp. CHI[10]을 사용하였다.

3-2. 배지 및 배양조건

배지의 조성은 glucose 10 g/L, bacto peptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl 각각 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L이다. 배양은 24시간 동안 28°C에서 flask 배양후, 이 배양액 5%를 동일배지의 1.5 L 발효조(Rikakikai, M100)에 접종하여 24시간 동안 주배양후 cell을 회수하여 효소원으로 사용하였다.

3-3. 효소활성 측정

배양액 1 ml를 원심분리하여 3%(v/v) 아크릴로니트릴 1 ml를 첨가하여 균일하게 교반하면서 3분 동안 4°C에 반응시켜서 효소의 활성을 측정하였다. 이 반응을 통해 생성된 아크릴아마이드의 농도는 FID gas chromatography(Gow Mac Model 750P)에 의하여 측정하였다. Detector와 injection ports의 온도는 각각 210°C와 180°C로 유지하였고, carrier gas는 Helium을 사용하였으며 flow rate는 30 ml/min이었다.

Nitrile hydratase의 아크릴아마이드 생성활성 1 unit는 1분당 1 μmol의 아크릴아마이드를 생성하는 균체의 양으로 정의하였다.

4. 검토 및 고찰

4-1. 기질(아크릴로니트릴)에 의한 nitrile hydratase의 저해

아크릴로니트릴을 아크릴아마이드로 변환하는 반응

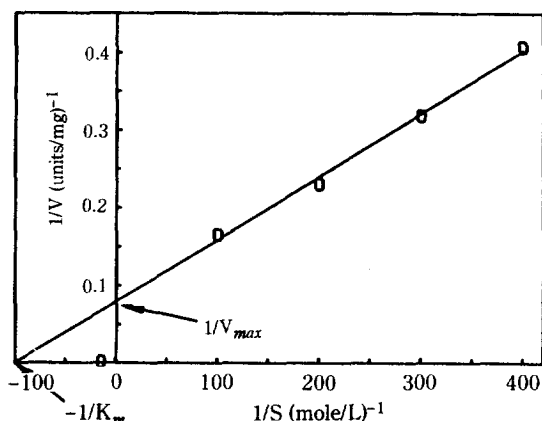


Fig. 1. Excess substrate (acrylonitrile) inhibition of nitrile hydratase of *Brevibacterium* sp. CHI (Lineweaver-Burk plot).

이 산업화의 관점에서 가장 흥미있기 때문에 아크릴로니트릴에 의한 기질저해 여부를 실험하였다. 그 결과가 Fig. 1의 Lineweaver-Burk plot으로 요약된다. Nitrile hydratase에 대한 기질저해는 아크릴로니트릴 농도가 1.25%(v/v)에 해당하는 0.2 mol/L에서부터 나타나기 시작하였다.

이 실험에 사용한 아크릴로니트릴(Sigma Co.)은 순도가 매우 높고 안정된 것이므로 아크릴로니트릴 용액에서 불순물이나 분해산물로서 시아나이드나 아크릴산을 탐지하지 못하였다. 그러므로 관찰된 저해는 오염된 물질에 의한 것이 아니라 아크릴로니트릴의 과량에 의해서 초래된 것이다.

식 (6)에서 $[S]$ 가 충분히 작은 범위에서는 기질저해를 무시할 수 있으며, 또한 이 때 생성된 $[I]$ 도 충분히 작기 때문에 product inhibition을 무시할 수 있다. 이 경우 Fig. 1 (Lineweaver-Burk plot)의 절편에서 $V_{max} = 0.936 \text{ mol/h} \cdot \text{g}$, $K_m = 0.01 \text{ mol/L}$ 의 값을 얻었다. 또한 식 (6)에서 $[S] \gg K_m$, $[S] \gg [I]$ 인 경우 Fig. 2의 S절편으로부터 $K_s = 0.045 \text{ mol/L}$ 의 값을 얻었다.

4-2. 아마이드와 다른 저해물질에 의한 nitrile hydratase의 저해

많은 효소들이 그들 반응의 생산물에 의해 저해를 받는데[12], 분리비용을 줄이고저 고농도의 아크릴아마이드를 생산하려고 할 때 생산물의 저해정도를 아는 것이 경제성 평가에 중요하므로 *Brevibacterium* sp. CHI의 nitrile hydratase에 대한 생산물인 아크릴아마이드에 의한 저해정도를 실험하였다. 또한 반응산물과

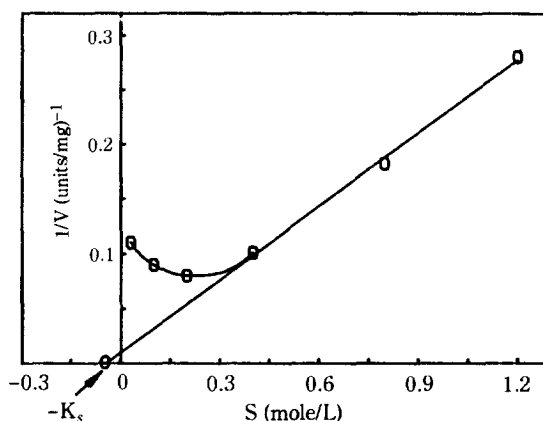


Fig. 2. K_s determination from plot of $1/V$ vs. S .

Table 1. Competitive inhibition constant (K_i) of different compounds on nitrile hydratase activity using acrylonitrile as substrate

Compound	Chemical formula	K_i (mole/L)
Acrylamide	$\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CONH}_2$	0.06
Propionamide	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$	0.06
Acrylic acid	$\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{COOH}$	0.5
Cyanide	KCN	3.8×10^{-3}

화학적으로 서로 관련있는 화합물인 프로피온아마이드와 두 종류의 잠정적인 저해물질(아크릴산, 시아나이드)에 의한 저해정도를 알아보았다. 이 물질들이 효소의 active site와 친화력이 있을 것으로 여겨지기 때문이다.

실험영역인 $[S] = 5-10 \text{ mmol/L}$ 는 K_s 보다 충분히 작은 범위이므로 기질 저해를 무시할 수 있으며, 이 경우 Fig. 3의 Dixon plots으로부터 경쟁적 저해상수, K_i 값을 얻을 수 있으며, 각각의 저해물질에 대한 K_i 값은 Table 1에 나타나 있다. 아크릴아마이드와 프로피온아마이드는 비슷한 K_i 값을 보여주는데, 아마이드와 유사한 구조를 가지는 아크릴산은 아마이드보다 더 작은 저해효과를 나타냈다. 그러므로 아마이드의 저해가 크게 나타나는 것은 $-\text{CONH}_2$ 에 의한 영향으로 생각된다.

몇몇 니트릴들은 분해산물로서 시아나이드를 생성하면서 분해된다[13]. 이 화합물이 그 독성과 효소에 대한 저해효과가 잘 알려져 있고 아크릴로니트릴-아크릴아마이드의 생물학적 변환에 저해효과가 있다고 보고되었기 때문에[3], 시아나이드에 의한 nitrile hydratase의 저해효과를 알아보았다. Dixon plot으로부터

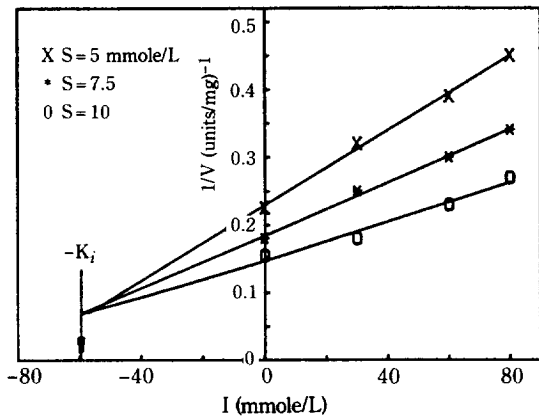


Fig. 3. Inhibition of nitrile hydratase activity by acrylamide.
S(acrylonitrile), I(acrylamide)

은 K_i 값은 3.8×10^{-3} mol/L였다. 시아나이드는 아크릴로니트릴, 아크릴아마이드, 프로피온아마이드 및 아크릴산보다 훨씬 강한 저해효과를 나타냈다. 그러나 *Brevibacterium* sp. CHI의 nitrile hydratase는 *Arthrobacter* J-1($K_i = 1.5 \times 10^{-6}$ mol/L)의 nitrile hydratase보다 시아나이드에 훨씬 덜 민감하였다[3].

생물학적인 변환을 통한 높은 질의 아마이드 산물을 얻기 위해서는 특히 순수한 니트릴을 기질로 사용하는 것이 중요하다. 특히 시아나이드는 원하지 않는 부산물의 생성 뿐만 아니라 nitrile hydratase의 경쟁적 저해를 초래하기 때문에 제거하여야 한다.

5. 결 론

Brevibacterium sp. CHI의 nitrile hydratase에 의한 아크릴로니트릴-아크릴아마이드의 생변환은 기질(아크릴로니트릴)과 생산물(아크릴아마이드)에 의해 저해를 받는 전형적인 competitive inhibition(경쟁적 저해)이다. 이 반응의 속도식은 다음과 같다.

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

반응생산물인 아크릴아마이드에 의한 경쟁적 저해 상수, $K_i = 0.06$ mol/L로 상당히 작은 저해효과를 나타냈으며, 또한 시아나이드에 의한 저해는 아크릴로니트릴, 아크릴아마이드 및 프로피온니트릴보다 훨씬 크게 나타났다. 또한 nitrile hydratase에 대한 기질저해는

아크릴로니트릴 농도가 비교적 낮은 0.2 mol/L부터 나타나기 시작하였다.

NOMENCLATURE

- [E] : enzyme concentration [mol/L]
- [E_o] : total enzyme concentration [mol/L]
- [S] : substrate concentration [mol/L]
- [P] : product concentration [mol/L]
- [ES] : complex of enzyme and substrate [mol/L]
- [ES₂] : complex of ES and substrate [mol/L]
- [EI] : complex of enzyme and inhibitor [mol/L]
- V_{max} : maximum reaction rate [mol/h/g]
- k : reaction rate constant [L/h/g]
- K_m : substrate concentration where the reaction velocity is equal to V_{max}/2 [mol/L]
- K_s : substrate inhibition constant [mol/L]
- V : reaction rate [mol/h/g]
- K_i : competitive inhibition constant [mol/L]

REFERENCES

1. Digeronimo, M.J. and Antoine, A.D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 900 (1976).
2. Arnaud, A., Galzy, P. and Jallageas, J.C.: *Comptes rendus de l'Academie des Science de Paris*, **287**, 571 (1976).
3. Asano, Y., Fujishiro, K., Tani, Y. and Yamada, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1165 (1982).
4. Asano, Y., Yasuda, T., Tani, Y. and Yamada, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1183 (1982).
5. Mauger, J., Nagasawa, T. and Yamada, H.: *J. Biotechnol.*, **8**, 87 (1988).
6. Nagasawa, T., Mathew, C.D., Mauger, J. and Yamada, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1766 (1988).
7. Bui, K., Maestracci, M., Thiery, A., Arnaud, A. and Galzy, P.: *J. Appl. Bacteriol.*, **57**, 183 (1984).
8. Fradet, H., Arnaud, A., Rios, G. and Galzy, P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1581 (1985).
9. Hwang, J.S. and Chang, H.N.: *Biotechnol. Lett.*, **9**, 237 (1987).
10. Chang, H.N., Lee, C.Y. and Hwang, J.S.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 429 (1989).
11. Hwang, J.S. and Chang, H.N.: *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 380 (1989).
12. Webb, J.L.: "Enzyme and Metabolic Inhibitors", vol. 1, Academic Press, New York, NY (1963).
13. Vennesland, B., Conn, E.E., Knowles, C.Y., Westley, J. and Wissing, F.: "Cyanide in Biology", Academic Press, London (1981).