

캐탈레이스의 반응속도 결과보고서

서울대학교 전기정보공학부 2018-12432 박정현*
(Dated: 실험일자: 10/10/2023, 제출일자 : 10/15/2023)

본 실험에서는 식물의 세포의 퍼옥시좀에서 과산화수소의 분해의 촉매로 작용하는 효소 카탈레이스를 활용하여 산소기체의 발생 속도를 과산화수소의 농도에 따라 측정하고 Michaelis-Menten equation와 효소 및 촉매에 대한 이해도를 높인다. 낮은 농도에서 오차가 발생하는 이유, 그리고 이를 해결하기 위한 해결법, 그리고 산소 기체 생성량을 측정하는 새로운 방법을 제시하였다.

I. ASSIGNMENT

A. 1

아래의 화학반응에서 화학반응 속도는 다음과 같다.



$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] \quad (2)$$

아레니우스 식에 의해 k_1 은 식(3)와 같이 나타난다. 여기서 E_a 는 아레니우스 에너지이고 A 는 k_1 과 같은 차원을 가지는 상수이다. 따라서 온도가 상승함에 따라 k_1 은 증가하게 되고 화학 반응속도는 증가하게 된다. 하지만 온도가 증가함에 따라 단백질은 변성이 일어나게 되면서 단백질의 구조가 바뀌므로 enzyme이 작용하기 위한 key와 lock 관계가 사라지게 되어 activity가 감소하게 된다. [3]

$$k_1 = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (3)$$

Protein은 4개의 level을 가지고 있다. Primary structure은 아미노산의 배열, secondary structure은 primary structure의 아미노산들이 서로 상호작용하여 단백질이 나선형, 혹은 평면형으로 배열을 이루는 것이며 각각을 α -helix, β -strand이라고 한다. Tertiary structure는 secondary structure사이의 상호작용으로 3차원 구조를 이룬 단백질 구조이며 Quaternary Structure은 하나 이상의 chain이 존재하는 경우의 단백질이다.[5]

깁스에너지는 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 이다. 아미노산 사이의 이온 결합, 수소결합, 분산력과 같은 결합력은 ΔH 를 낮추게 된다. 따라서 저온에서는 작은 ΔS 에도 불구하고 아미노산들 사이 가장 많은 상호작용을 하는 tertiary structure, quaternary structure와 같이 꼬여 있는 상태가 더 안정한 상태이다. 하지만 온도가 증가함에 따라 ΔS 에 의한 영향이 증가하게 된다. 이때 꼬여 있는 상태가 아닌 풀어져 있는 protein의 상태가 더 낮은 깁스에너지를 가지게 된다. 따라서 Fig.2와 같이 단백질의 구조가 붕괴되는 denaturation가 발생하게 된다.[3][6]

B. 2

효소와 함께 생성되는 물질의 생성 속도를 나타내는 식 (Michaelis-Menten equation)은 식(4)와 같다.[2] 단, $[E]$ 는

촉매, $[S]$ 는 반응하는 기질의 농도이다.

$$v = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]}{[S] + K_m} \quad (4)$$

라인웨버-버크 식(Lineweaver-Burk equation)은 식 (5)와 같다.[1] $[S]$ 가 감소함에 따라 반응속도 v 가 감소함을 알 수 있다. 따라서 $[S]$ 가 최대 값을 가질 때 속도 또한 최대이므로 $[S] = \infty$ 로 두는 경우 최대 속도는 식 (6)와 같다.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_2[E]_0} + \frac{K_m}{k_2[E]_0[S]} \quad (5)$$

$$v_{max} = k_2[E]_0 \quad (6)$$

$$= 8 \times 10^5 \times 5 \times 10^{-5} M/s \quad (7)$$

$$= 40[M/s] \quad (8)$$

최대 속도의 0.2배인 경우 식(9)을 만족한다.

$$\begin{aligned} 0.2v_{max} &= 0.2k_2[E]_0 \\ &= \frac{k_2[E]_0[S]}{[S] + K_m} \end{aligned} \quad (9)$$

따라서 $[S]$ 는 아래의 식을 만족한다.

$$\frac{[S]}{[S] + K_m} = 0.2 \quad (10)$$

$$[S] = \frac{K_m}{4} \quad (11)$$

$$= 1 \times 10^{-5} [M] \quad (12)$$

II. DATA & RESULT

A. 1

시간에 따라 생성된 산소원자의 몰량은 Fig.3와 같다. 단, 산소원자의 몰량은 이상기체임을 가정하고 $n = \frac{P_{O_2}V}{RT}$ 를 이용해 계산하였다. 이때 실험에 사용된 삼각플라스크의 부피는 100mL, 그리고 그외의 상수들은 $R = 8.3145 J/molK$, $T = 300K$ 으로 두고 계산하였다. 단, 실험 장비에서 측정단위가 hPa이므로 Pa로 변환하였다. 또한 산소기체가 빠져나가는 것을 고려하여 증가하는 압력중 가장 높은 기울기를 가지고 R^2 이 가장 1에 가까운 데이터를 추출하여 기울기를 계산하였다.

* alexist@snu.ac.kr

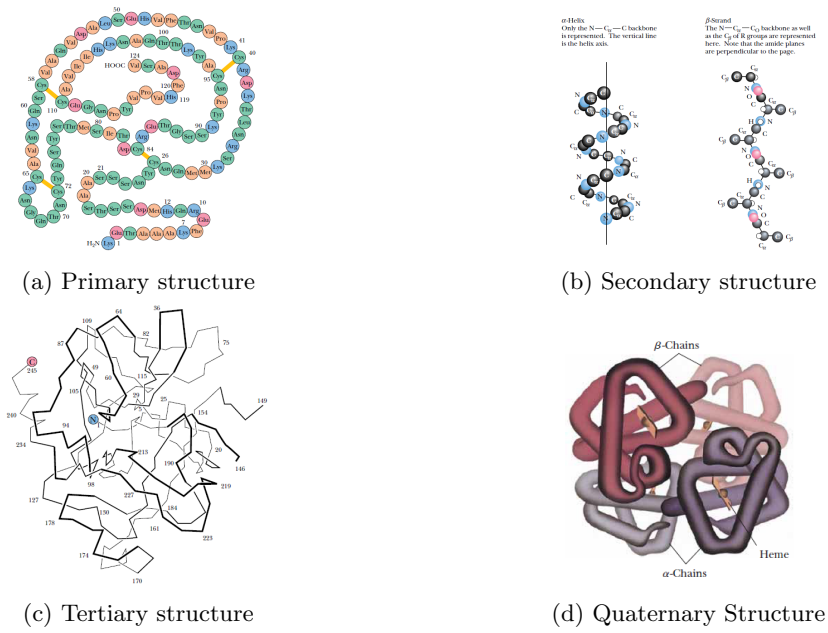


FIG. 1: 여러 protein구조

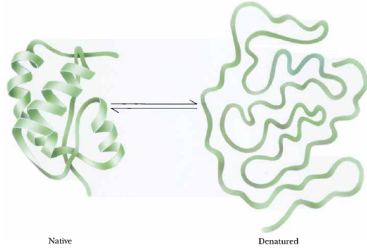
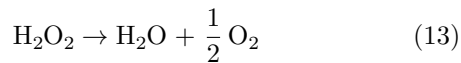


FIG. 2: Denaturation

기울기를 통해 계산된 속도를 통해 $1/v$, $1/[H_2O]$ 에 대한 그래프는 Fig.4와 같다. 단, 여기서 $[H_2O]$ 는 반응을 통해 생성된 물의 농도이다. 이 때 화학반응과 생성된 물의 농도는 아래의 관계식 (14)을 만족한다. 투입된 카탈레이스의 부피와 H_2O_2 의 부피가 각각 $2mL$, $30mL$ 이므로 총부피는 $V_{liq} = 0.032L$ 을 대입하여 계산하였다. 이 때 0.5% H_2O_2 데이터의 경우 측정 다른 농도의 측정 값으로부터 먼 거리에 떨어져 있어 큰 오차를 발생시켜 해당 데이터를 포함한 경우와 포함하지 않은 경우에 대해 모두 fitting하였으며 각각에 대한 그래프는 Fig.4a, 4b와 같다. 각각에 대한 결과로부터 Michaelis constant K_m 을 계산하면 Tab.I, 측정된 V_{max} 값은 Tab.II와 같다. 카탈레이스를 가열한 후 6%의 H_2O_2 용액에 넣은 경우 그래프는 Fig.5와 같다.



$$[H_2O] = \frac{n_{O_2}}{2V_{liq}} \quad (14)$$

| | w/ 0.5% Data | w/o 0.5% Data | 이론값[4] |
|----------|--------------|-----------------|----------------|
| $K_m[M]$ | 11 ± 1 | 0.92 ± 0.01 | 1.1 ± 0.25 |
| 오차 | 900% | 16% | - |

TABLE I: Michaelis constant 측정 및 참값

| | w/ 0.5% Data | w/o 0.5% Data |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| $V_{max}[mM/s]$ | 0.89 ± 0.09 | 0.12 ± 0.01 |

TABLE II: V_{max} 측정값

III. CONCLUSION & DISCUSSION

속도측정값을 fitting했을 때 모두 높은 R^2 값을 가져 실험의 재현도가 높음을 알 수 있다. 하지만 0.5%농도에서의 데이터를 Lineweaver-Burk equation fitting에 포함시키는 경우 약 900%의 큰 오차를 발생시킨다. 반면에 0.5%농도에서의 데이터를 제외하는 경우 오차는 16%로 크게 감소한다. 이것은 압력 측정 장비의 해상도가 약 $1.321hPa$ 인 반면 0.5%농도에서 증가하는 압력의 기울기가 너무 작고 도중에 유출되는 산소기체가 많아 발생하는 현상으로 결론지었다. 따라서 산소 기체가 유출되기 전 빠르게 압력을 측정할 수 있는 고농도의 데이터만을 이용하고 해당 농도의 숫자를 늘려 K_m 값을 계산하는 것이 정확한 결과를 도출할 수 있을 것으로 결론지었다.

실험 측정값은 16%오차내에서 높은 재현도와 정확도를 보여주었다. 또한 가열한 카탈레이스를 이용한 실험에서 시간당 발생하는 산소의 양이 감소하는 것을 확인하여 화학반응에서 촉매, 혹은 효소의 역할을 확인하였으며 가열 시 발생하는 단백질의 변성에 의한 효소 기능 저하 또한 확인하였다. 하지만 실험도중 빠져나가는 산소기체로 인해 측정 실제 발생한 산소기체의 압력보다 더 낮은 값이 측정

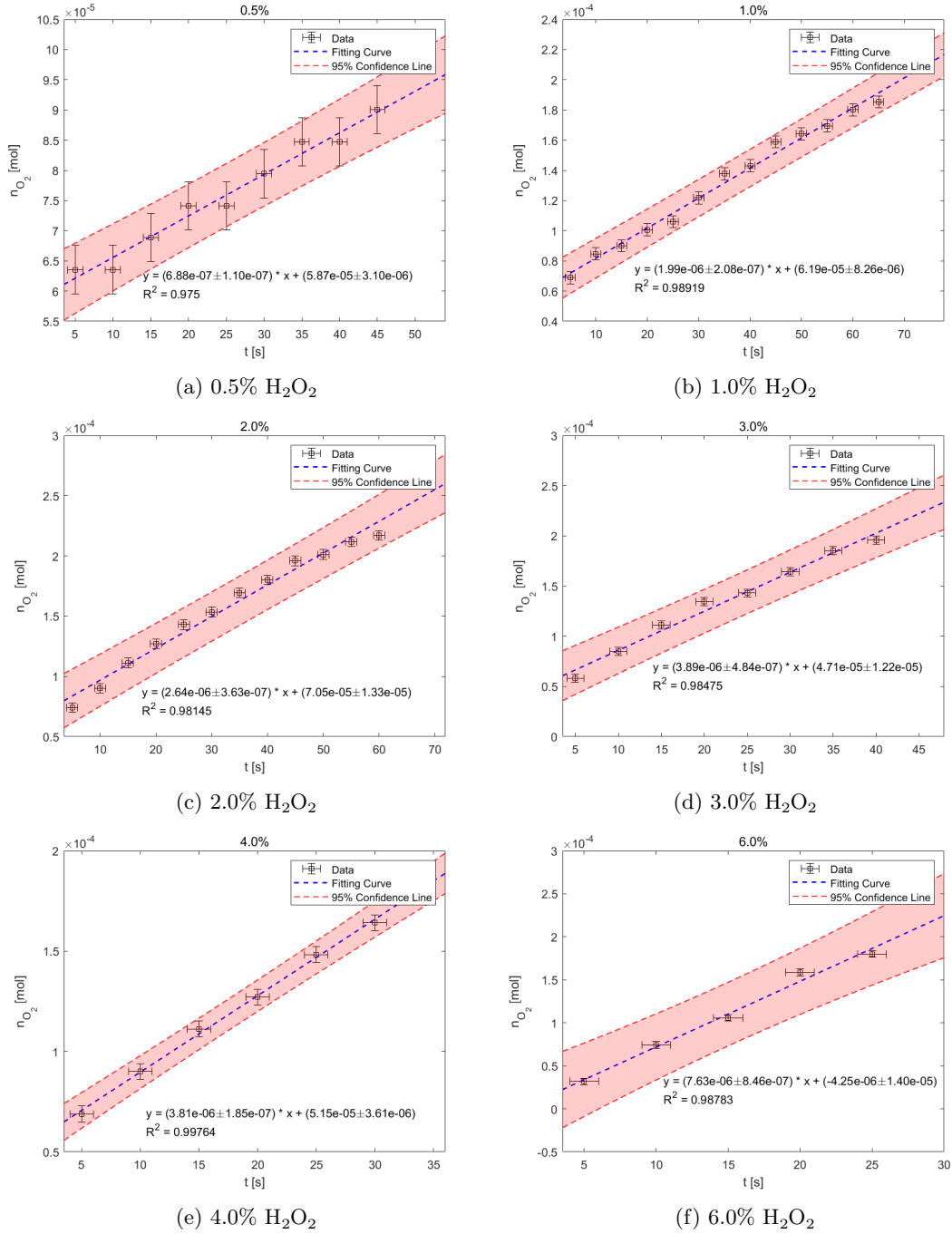
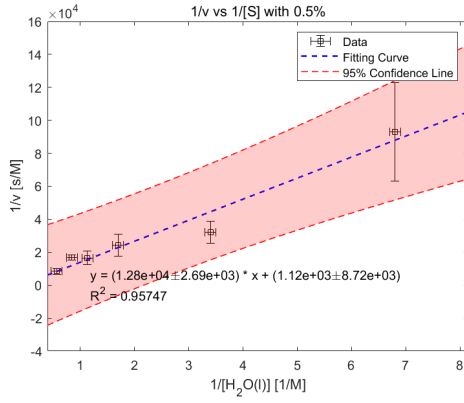


FIG. 3: Generate Oxide mole value versus time

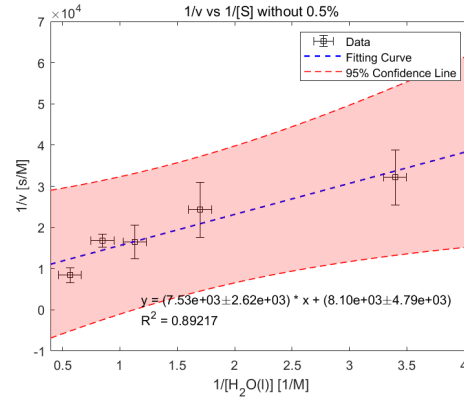
되어 큰 오차가 발생하였다. 이를 해결하기 위해 산적정을 수행하여 변화한 H_2O_2 의 양을 측정하여 더 정확한 반응속도를 측정할 수 있을 것이다. 이외에도 기체가 빠져나가는 현상을 방지하기 위해 수상치환하여 발생한 기체의 부피를 측정하는 방법 또한 있을 것이다.

IV. REFERENCE

- [1] 김. (2010, August 1). 캐탈레이스의 반응속도. In *일반화학실험* (1th ed., p. 186).
- [2] Oxtoby, D., Gillis, H., & Campion, A. (2007, April 2). Rates of Chemical and Physical Processes. In *Principles of Modern Chemistry* (6th ed., pp .778-780). Cengage Learning.
- [3] Garrett, R. H., & Grisham, C. M. (2002, January

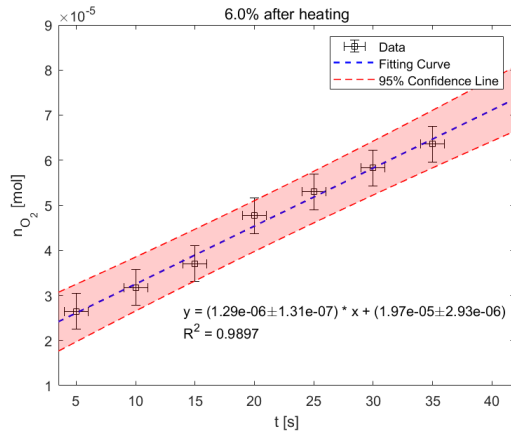


(a) 0.5% 데이터를 포함한 경우



(b) 0.5% 데이터를 포함하지 않은 경우

FIG. 4: Lineweaver-Burk equation에 fitting한 결과

FIG. 5: 6.0% H₂O₂ after heating

1). Enzyme Kinetics. In *Principles of Biochemistry* (pp. 442-443). Cengage Learning.

[4] Jones, P., & Suggett, A. (1968, December 1). The catalase-hydrogen peroxide system. A theoretical appraisal of the mechanism of catalase action. *Biochemical Journal*, 110(4), 621-629. <https://doi.org/10.1042/bj1100621>

[5] Garrett, R. H., & Grisham, C. M. (2002, January 1). Proteins: Their Biological Functions and Primary Structure. In *Principles of Biochemistry* (pp. 115-119). Cengage Learning.

[6] Garrett, R. H., & Grisham, C. M. (2002, January 1). Chemistry Is the Logic of Biological Phenomena. In *Principles of Biochemistry* (p. 20). Cengage Learning.