

***Streptomyces* GI 32 방선균의 Glucose Isomerase 생산과 효소특성**

서형주 · 김진만 · 이태경 · 양한철*

고려대학교 생물공학연구소

Studies on the Production and Characteristics of Glucose Isomerase from *Streptomyces* sp. GI 32.

Suh, Hyung-Joo, Jin-Man Kim, Tae-Kyung Lee and Han-Chul Yang*

Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

***Streptomyces* sp. GI 32 with high production of glucose isomerase was isolated from soil. The maximum enzyme production was observed in the culture medium containing 1% sorbitol, 0.6% tryptone, 0.4% yeast extract, 1mM Fe₂(SO₄)₃ with initial pH 7.0 when the cell was cultured at 35°C about 18 hours with shaking. The enzyme was partially purified by ammonium sulfate fractionation and DEAE cellulose chromatography. The enzyme was also appeared to be relatively thermostable, and no appreciable inactivation was observed after incubation at 70°C for 1 hour. The optimal pH and temperature of the enzyme were pH 8.0 and 70°C, respectively.**

서 론

Glucose isomerase (EC 5.3.1.18)은 glucose를 fructose로 이성화시키는 효소로 Takasaki 등의 *Bacillus megaterium* Al(1)으로부터 추출 분리한 효소가 glucose를 fructose로 이성화시킨다는 사실이 보고됨에 따라 이 분야의 연구가 본격적으로 진행되었다.

Glucose isomerase는 *Bacillus megaterium* Al 등의 세균(2,3)과 *Streptomyces* sp.를 비롯한 방선균(4,5)들이 보고되었다.

최근의 연구보고에 의하면 일부 방선균종에서 분리, 추출한 glucose isomerase는 inducer로서 작용하는 xylose의 요구도가 적거나(6) xylose 이외의 당을 요구하는 것(7)으로 보고되었다.

Glucose isomerase 생산에 대한 연구는 감미원으로 주로 사용하는 sucrose의 과다섭취에 따른 비만증과 당뇨병 등 성인병을 유발하는데 비하여, glucose isomerase를 이용하여 생산하는 이성화당은 glucose 일부가 fructose로 전환됨에 따라 sucrose에 비해 감미도가 약 1.7배 상승할 뿐만 아니라,

sucrose 과다섭취에 의해 야기되는 비만증, 당뇨병 등 성인병을 예방할 수 있다는 잇점이 보고되었고(8,9) 전세계적으로 그 생산량이 급증하고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구실에서도 glucose isomerase의 생산능력이 우수한 균주를 토양으로부터 분리, 동정하였고(10), 효소생산조건과 부분정제를 행하여 효소의 특성을 연구 검토하여, 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

전국에서 채취한 토양시료로부터 분리 동정한(10)한 균주를 사용하였다.

배양조건 검토

Tsumura(11)가 이용한 xylose 2%, peptone 1%, meat extract 0.5%, yeast extract 0.25%, NaCl 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.05% 조성의 기본배지를 사용하여 배양조건을 검토하였다.

효소활성 측정

Key words: *Streptomyces* sp., glucose isomerase

*Corresponding author

Table 1. Effect of carbon sources on the production of glucose isomerase from *Streptomyces* sp. GI 32.

Carbon sources (2%)	Final pH	Cell mass (mg/ml)	Units/Dry cell mass (U/mg)
Xylose	8.00	3.38	29.57
Sucrose	8.60	1.88	28.04
Glucose	7.90	4.24	6.13
Fructose	8.20	2.60	2.37
Glycerol	7.40	4.90	13.16
Sorbitol	8.40	2.46	44.36

Cultivation was carried out for 24hrs at 30°C in basal medium containing 1.0% peptone, 0.5% meat extract, 0.25% yeast extract, 0.5% NaCl and 0.05% MgSO₄·7H₂O with initial pH 7.0.

효소활성은 Takasaki(7) 방법에 의해 측정하였다. 기질인 1 M glucose 0.2 ml, 0.1 M MgSO₄·7H₂O 0.1 ml, 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2) 0.5 ml 에 효소액 0.5 ml 또는 효소원으로 균체 (dry base 10~20 mg)를 넣고, 최종 부피를 2 ml로 조정 후 70°C에서 1 시간 반응 후 0.5 M perchloric acid 2 ml를 가하여 반응을 정지시킨 후, cystein-carbazole 법(12)에 의해 효소활성을 측정하였다. 효소활성은 반응조건에서 1 μg의 fructose를 생성하는 효소량을 1 unit로 하였고, 비활성은 효소 단백질 mg 당 효소활성단위로 표시하였다.

단백질 측정

Bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 법(13)에 의해 측정하였다.

결과 및 고찰

Glucose isomerase 생산을 위한 배양조건 검토

탄소원 영향: 각종 탄소원을 2% 함유하는 기본배지를 사용하여 효소생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과, Table 1과 같이 효소생산량은 sorbitol 첨가시 가장 높았으며, *E. intermedia* glucose isomerase(2)는 glucose가 sorbitol 첨가시보다 20% 정도 높았으나, 본 균주는 glucose보다 sorbitol 첨가시 효소생산량이 85% 정도 증가하였다. 이는 sorbitol이 구조상 glucose의 CHO-기가 -CH₂OH기로 산화된 당알콜형으로 특이 효과가 있는 것으로 추정된다.

Sorbitol 농도에 따른 효소생산량을 검토한 결과,

Table 2. Effect of sorbitol concentration on the production of glucose isomerase from *Streptomyces* sp. GI 32.

Sorbitol (2%)	Final pH	Cell mass (mg/ml)	Units/Dry cell mass (U/mg)
0.50	8.46	2.57	51.77
1.00	8.32	2.23	52.92
1.50	8.30	2.34	49.22
2.00	8.30	2.49	43.98

Cultivation was carried out for 24hrs at 30°C in basal medium containing 1.0% peptone, 0.5% meat extract, 0.25% yeast extract, 0.5% NaCl and 0.05% MgSO₄·7H₂O with initial pH 7.0.

Table 3. Effect of yeast extract and tryptone concentration on the production of glucose isomerase from *Streptomyces* sp. GI 32.

Tryptone (%)	Yeast extract (%)	Final pH	Cell mass (mg/ml)	Units/Dry cell mass (U/mg)
1.0	0.0	8.60	2.08	74.10
0.8	0.2	8.60	2.39	143.09
0.6	0.4	8.60	2.24	198.14
0.4	0.6	8.70	2.67	127.45
0.2	0.8	8.65	2.85	99.82
0.0	1.0	8.70	3.09	78.90

Cultivation was carried out for 24hrs at 30°C in basal medium containing 1.0% sorbitol, 0.5% NaCl and 0.05% MgSO₄·7H₂O with initial pH 7.0.

Table 2와 같이 sorbitol 1% 첨가시 가장 높게 나타났다.

질소원의 영향: 질소원으로 yeast extract와 tryptone을 혼합 사용한 결과, Table 3에서와 같이 효소생산량은 yeast extract 0.4%, tryptone 0.6% 첨가했을 때 현저히 높은 효소활성을 나타냈으며, yeast extract 0.6% 이상의 농도에서는 균체중식은 좋았으나, 효소생산량이 급격히 감소되므로 배지중 yeast extract의 최적농도 조절이 glucose isomerase 생산에 매우 중요한 인자로 작용하였다.

금속이온의 영향: 효소생산에 가장 좋은 효과를 나타내었던 탄소원과 질소원이 최적농도인 배지에 각종 금속이온을 첨가한 결과(자료는 제시하지 않았음), Mg⁺²와 CO⁺²이온 첨가시 높은 효소생산량을 보이는 Seu(4)와 Han(14)의 결과와 달리, 본 균주는 Ba⁺², Fe⁺² 1mM 첨가시 효소생산량이 35% 높

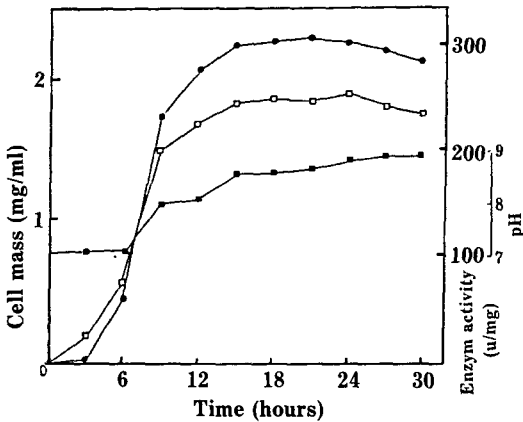


Fig. 1. Changes of enzyme activity, pH of medium, and cell growth during the cultivation of the strain GI 32. The reaction was carried out at 35°C.

□-□ Glucose isomerase activity
●-● Cell mass ■-■ pH

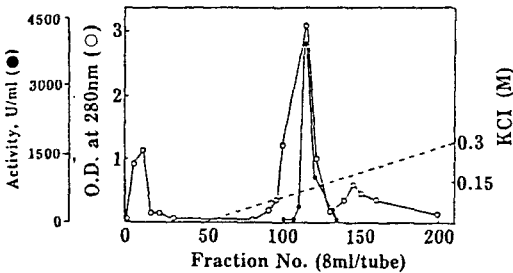


Fig. 2. Chromatography of the glucose isomerase on DEAE-cellulose.

아졌으나, Cd²⁺이온 첨가는 효소생산에 별 영향을 주지 않았다.

배양온도 및 초기 pH의 영향: 본 균주를 효소생산 최적배지에서 온도별로 생육하여 효소생산량을 살펴 본 결과, 본 균주는 50°C 이상에서도 생육이 가능하였고 35°C일 때 효소생산량이 가장 높았으나, 55°C에서는 효소생산이 거의 일어나지 않았다.

효소생산에 대한 초기 pH의 영향을 비교한 결과, 초기 pH가 알칼리성일 때 산성에 비해 균체증식은 왕성하였으나, 효소생산량은 pH 6.5~7.0 사이에 가장 높았다.

배양시간에 따른 효소생산: 이상의 결과를 종합하여 확립한 sorbitol 1.0%, yeast extract 0.4%, tryptone 0.6%, Fe₂(SO₄)₃, 초기 pH 7.0, 배양온도 35°C인 효소생산 최적 배양조건에서 본 균주를 진탕 배양(90 strokes/min)하면서, 배양시간에 따른 균체

Table 4. Summary of purification of glucose isomerase from *Streptomyces* sp. GI 32.

Steps	Volume (ml)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude ext.	2000	3301560	9196	359.02	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 45-65%	66	2401920	3470	692.20	72.7	1.93
DEAE-Cellulose	12	111240	104	1069.62	4.6	2.98

증식, 효소생산 및 pH 변화 결과를 Fig.1에 나타내었다. 배양시간 12시간 이후에 높은 효소생산량을 보이고 있으며, 균체가 증식할수록 pH가 증가되는 양상을 보이는데 이 현상은 Takasaki(7)의 보고와 일치하며, 이는 양이온이 질소원을 이용하기 때문인 것으로 추측된다.

효소추출

18시간 진탕배양한 배양액을 원심분리하여 균체를 회수한 후, 0.05 M phosphate 완충용액 (pH 7.2)으로 세척하였다. 세척한 균체는 적당량의 동일 완충용액에 현탁시켜 sonicator (Karl Kolb 200-W)를 이용, 균체를 파쇄한 다음 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소정제 과정에서 0.05 M phosphate 완충용액 (pH 7.2)을 사용하였다.

효소부분정제

Ammonium sulfate 분획: 조효소액에 유안을 첨가 45~65% 포화농도 사이의 분획을 분리하여 12시간 완충용액에서 투석하였다.

DEAE cellulose ion chromatography: 투석이 끝난 효소액을 미리 완충용액으로 평형시킨 DEAE cellulose column (4×25 cm)에 흡착시키고 완충용액으로 세척 후 동완충용액에 KCl을 0.3 M까지 직선적으로 gradient elution을 실시하여 8ml/씩 분취하였다. Fig.2에서와 같이 0.1 M 부근에서 glucose isomerase 활성을 나타내었다. 이상의 결과를 Table 4에 요약하였으며, 비활성은 유안분획에서 2배, DEAE cellulose chromatography를 실시함으로써 약 3배 증가하였다.

효소의 pH 영향

Fig.3에서 glucose isomerase 반응 최적 pH는 8.0

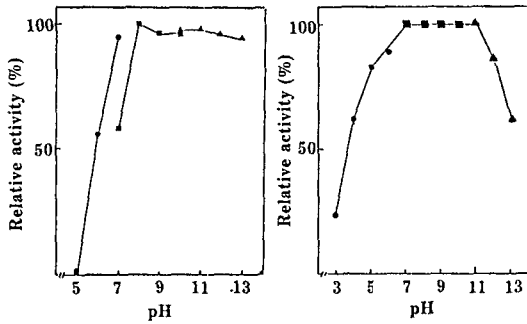


Fig. 3. Effect of pH on activity and stability of the glucose isomerase.

Buffer used were acetate buffer (●), Tris buffer (■), NaOH-glycine buffer (▲) at the concentration of 0.05M.

이었으며 pH 13 에서도 90% 이상의 효소활성을 나타내고 있으며 pH 안정성도 pH 7~11의 알칼리성에서 100%의 효소활성을 나타내고 있다. 이것은 Han 등(14)의 *Streptomyces* 속의 glucose isomerase 와 같이 알칼리성에서 안정한 효소임을 알 수 있었다.

효소의 온도영향

Fig.4에서 glucose isomerase 의 반응 최적온도는 70°C이며, 열안정성은 70°C에서 1시간 가열하여도 전혀 실활되지 않았으며 85°C에서도 50% 정도 활성을 나타내었다. 이상의 결과는 Yoshiyuke 등의 *Paracolobacterlum* 속 효소(3) (45°C, 5분 가열에 의해 20% 정도 실활)와 *Streptomyces* 속 효소(15) (75°C, 30분 가열에 의해 20% 실활)의 내열성에 비해 훨씬 높은 열안정성을 가진 효소로 판단되며, 공업적 이용에 유리한 효소로 생각된다.

요 약

토양에서 분리, 동정한 *Streptomyces* sp. GI32 의 glucose isomerase 생산은 sorbitol 1%, yeast extract 0.4%, tryptone 0.6%, 1 mM Fe₂(SO₄)₃의 조성을 가진 배지에서 초기 pH 7.0으로 조절하여 35°C에서 약 18시간 진탕배양시 효소생산량이 최고로 240 units/mg 이었다. 효소는 ammonium sulfate 분획, DEAE cellulose chromatography 등의 과정을 거쳐 부분정제한 결과 3배 정도 효소 비활성이 증가하였다. 효소활성의 최적온도는 70°C이며, 최적 pH

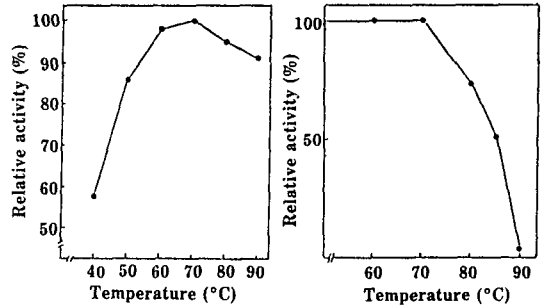


Fig. 4. Effect of temperature on activity and stability of the glucose isomerase.

는 8.0 이었다. 특히 효소의 열안정성이 70°C에서 1시간 가열하여도 전혀 실활되지 않았다.

참고문헌

1. Takasaki, Y. and O. Tanabe : *J. Agr. Chem. Soc., (Japan)* **36**, 1010 (1962)
2. Natake, M. and S. Yoshimura : *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 505 (1964)
3. Suekane, M. and M. Tamura : *Agr. Biol. Chem.*, **42**, 909 (1978)
4. 이인구, 서정운 : *농화학회지* **12**, 69(1969).
5. Cung, T.W. and H.U. Kim : *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **4**, 138 (1976)
6. Yamamaka, K : *Agr. Biol. Chem.*, **27**(4), 265 (1963)
7. Takasaki, Y. and O. Tanabe : *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1247 (1966)
8. Mermelstein, N.H : *Food, Technol.*, **29**, 20 (1975)
9. Chen, W.P : *Process Biochem.*, June/July (1980)
10. 김진만 : 고려대학교 석사논문.
11. Tsumura, N., M. Hagim and T. Sato : *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 902 (1967)
12. Diche, Z. and E. Borenfreud : *J. Biol. Chem.*, **192**, 583 (1950)
13. Lowry, O.H, N.J. Rosebrough and R.J. Randal : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
14. Han, M.H. and T.W. Chung : *Korean J. Food Sci. Technol.* **10**, 380 (1978)
15. Takasaki, Y., Y. Kosugi and A. Kanbayash ; *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1527 (1969)

(Received March 24 1989)