

## 내열성 포도당 이성화효소를 생산하는 *Streptomyces chibaensis* J-59의 분리 및 동정

주길재 · 권기석<sup>1</sup> · 이인구\*

경북대학교 농화학과, <sup>1</sup>KIST 생명공학연구소

**Isolation and Identification of a *Streptomyces chibaensis* J-59 Producing Thermostable Glucose Isomerase.** Gil-Jae Joo, Gi-Seok Kwon<sup>1</sup> and In-Koo Rhee\*. Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea, <sup>1</sup>Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon, 305-600, Korea - A bacterial strain J-59 was isolated from a humus soil, which produced simultaneously a thermostable glucose isomerase as well as xylanase. The morphological, cultural and physiological characteristics of the isolated strain J-59 were determined by the use of the media and methods described in International Streptomyces Project. The chemotaxonomic characteristics of the isolated strain J-59 were determined by the analysis of G+C molar % of DNA, diaminopimelic acid, composition of fatty acid and menaquinone. As the results of various examinations, the strain J-59 was identified to be *Streptomyces chibaensis*. This strain produced glucose isomerase intracellularly and xylanase extracellularly when grown in a medium containing xylan, but it was not able to utilize the xylose or xylan as a carbon source. The glucose isomerase of *S. chibaensis* J-59 was highly thermostable, which retained more than 75% activity in the presence of Co<sup>2+</sup> at 80°C for 72 h.

Xylose isomerase(D-xylose ketol-isomerase; E.C. 5. 3. 1. 5)는 미생물에서 xylose의 대사에 관여하는 첫 단계 효소로써 xylose를 xylulose로 이성화시키는 효소이며 동시에 포도당을 과당으로 전환시킬 수 있기 때문에 포도당 이성화효소(glucose isomerase)라고 부르기도 하며 HFGS(high fructose glucose syrup) 생산에 중요한 효소이다(1).

미생물이 생산하는 포도당 이성화효소는 대부분 유도 효소이며 유도물질(inducer)로 xylose를 필요로 하고 있다(1, 2). 따라서 포도당 이성화효소를 생산하는 균주가 xylan 가수분해효소를 동시에 생산할 수 있다면 비싼 xylose를 값싼 xylan으로 대체할 수 있다. 이때 xylan은  $\beta$ -1,4-xylanase와  $\beta$ -xylosidase에 의하여 최종적으로 xylose로 분해되어 포도당 이성화효소 생산을 위한 유도 물질로 작용하게 된다(3). HFGS 공업에서 또하나의 해결과제는 효소의 열 안정성을 높이는 일이다. 공업적으로 HFGS 생산과정에서의 이성화온도는 58°C내지 60°C이며 이때 40내지 42%의 과당시럽이 얻어지고 있으나 효소의 내열성이 높아서 85°C나 95°C에서 반응시킨다면 별도의 크로마토그래피 과정없이 55%의 과당시럽을 얻을 수 있다(4).

따라서 본 연구에서는 방선균으로부터 열 안정성이 높은 포도당 이성화효소를 생산하며, 값싼 xylan을 포도당 이성화효소 생산의 유도물질로 이용할 수 있는 균주를 분리하여 균의 특성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 방선균의 분리 및 배양

방선균을 분리하기 위한 토양시료는 대구근교의 낙엽 부식토양과 퇴비 등에서 채취하였다. 각각의 토양시료 1g을 0.85% NaCl 용액 5ml에 현탁시켜 glucose-asparagine 배지(1.5% glucose, 0.1% asparagine, 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0)가 5ml씩 들어있는 시험관에 상기 토양시료 현탁액 2~3방울을 접종하고 진탕배양기(rotary shaker)에서 30°C에서 2일간 진탕배양 하였다. 각 시험관에서 배양액 50  $\mu$ l를 취하여 glucose-asparagine 한천 평판배지에 각각 도말하고 30°C에서 5~7일 이상 배양한 후 형성된 독립 콜로니를 새로운 glucose-asparagine 평판배지에 계대배양하였다. 순수 분리균의 콜로니 형태, 기균사의 생성 유무 및 냄새 등을 관찰하여 방선균이라고 판단되는 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별균들 중 xylan을 포도당 이성화효소 생산의 유도물질로 이용하는 미생물을 분리하기 위하여 CSL 배지(1.0% xylan, 1.0% corn steep liquor, 0.1% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, pH 7.0) 5ml에 순수분리한 독립 콜로니를 접종하여 30°C에서 48시간

\*Corresponding author

Tel. 82-53-950-5718, Fax. 82-53-953-7233

E-mail: ikrhee@bh.kyungpook.ac.kr

Key words: Identification, *Streptomyces chibaensis*, Glucose isomerase, Xylose isomerase, Xylanase

배양하였다. 이 배양액을 원심 집균한 후 xylanase 및 포도당 이성화효소 활성을 측정하여 배양 상징액에서 xylanase 활성이 높고, 균체내의 포도당 이성화효소(intracellular glucose isomerase) 활성이 높은 균주를 2차 선별하였다. 열 안정성이 우수한 포도당 이성화효소를 선별하기 위하여 2차 선별균을 CSL 배지로 30°C에서 48시간 배양하고 원심 집균한 후 균체를 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 동량 현탁하여 80°C에서 60분간 열 처리하였다. 열 처리한 균체로 포도당 이성화효소 활성을 측정하여 효소의 실활이 없는 내열성이 높은 균주를 최종 선별하였다.

### 효소활성의 측정

포도당 이성화효소 활성측정은 Takasaki(3)의 방법을 변형하여 측정하였다. 반응액[50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0), 20 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 200 mM glucose] 1 ml에 배양균체 현탁액(0.4 g/ml) 1 ml를 섞어 전체 반응액을 2 ml로 하여 측정하거나 또는 배양균체 현탁액(0.4 g/ml)을 90  $\mu A$ 에서 5분 간격으로 4회 초음파 파쇄기(Ultrasonic사)로 파쇄하고 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 그 상징액 0.2 ml를 상기 반응액 1 ml에 첨가하고 증류수로 전체 반응액을 2 ml가 되게하여 측정하는 2가지 방법을 병행하였다. 각각 반응액을 70°C에서 30분간 반응시킨 후 0.5 M perchloric acid 2 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 생성된 fructose를 cysteine-carbazole 법(5)으로 560 nm의 파장에서 정량하였다. 효소활성 단위는 국제단위(GIU)로 상기 반응조건에서 분 당 1  $\mu mol$ 의 fructose를 생산하는 효소의 양으로 나타내었다.

Xylanase 활성측정은 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.5) 0.5 ml에 효소액(배양 상징액) 0.1 ml와 1% xylan 현탁액 0.5 ml를 잘 혼합하여 50°C에서 30분간 반응 시킨 후 3,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상징액 1 ml에 DNS(dinitrosalicylic acid; 6) 용액 1 ml를 가하여 15분간 비등수조(boiling water bath)에서 반응시킨 후 급냉하고 재증류수 4 ml를 첨가하여 546 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 단위는 상기 반응조건에서 분 당 1  $\mu mol$ 의 xylose를 생산하는 효소의 양으로 나타내었다.

### 분리균주의 특성조사 및 동정

분리균주의 형태학적 특성으로 기균사의 형태, 콜로니 표면의 형태, 균사의 분지 형태 등을 oatmeal agar 배지를 포함한 방선균의 동정용 배지는 International Streptomyces Project(ISP; 7)의 처방에 따라 조제하였으며, 분리균주는 30°C에서 14~21일간 배양하면서 관찰하였다. 분리균주의 기균사 및 균사의 분지 형태는 광학현미

경(Olympus CH-2, 일본)으로 검경하였다. 포자의 사슬 형태, 표면의 형태, 크기, 모양, 배열상태 등의 조사는 oatmeal agar, yeast extract-malt extract agar와 glycerol-asparagine agar 배지를 사용하여 30°C에서 14~21일간 배양한 분리균주의 포자를 채취하여 관찰하였다. 즉 채취한 포자는 glutaraldehyde와  $OsO_4$ 로 고정시키고 에탄올로 탈수시킨 후 임계점 건조기(Hitachi HCP-2)로 건조시켜 inclined cover-slip method(8)에서와 같은 방법으로 Iron Coater(Eiko IB-5)로 coating하여 주사 전자현미경(Carl Zeiss 109; Swiss)으로 관찰하였다.

분리균주의 배양학적 특성은 Shirling과 Gottlieb(7) 등이 행한 것과 같이 일반적인 균의 성장 정도, 콜로니의 색깔, 기균사의 색깔, 배지의 상면과 저면의 색깔변화, 생육정도, 가용성 색소 생성유무 등을 inorganic salt-starch agar, oatmeal agar, yeast extract-malt extract agar, glycerol asparagine agar 및 Czapek's agar 등을 사용하여 균을 접종한 후 30°C에서 배양하면서 7일 간격으로 관찰하였다. 멜라닌 색소생성은 peptone yeast extract iron agar, tyrosine agar 및 멜라닌 색소생성 한천배지 등에서 7일 간격으로 배양하면서 관찰하였다. 형태 및 배양학적 특성 조사에서의 색깔 판정에는 Tresner와 Backus(9)의 color wheel을 사용하였다.

생리학적 특성은 Shirling과 Gottlieb(7)의 방법과 Williams 등(10, 11)의 방법에 따라 항균 활성, 효소력 실험, 물질의 분해력, 항생제에 대한 내성, 균의 생육도 실험(pH 별, 온도별 및 NaCl 농도별), 탄소원 및 질소원의 영향 등을 관찰하였다.

균체성분의 화학적 특성조사로 세포벽 peptidoglycan 층의 구성성분인 DAP(2,6-diaminopimelic acid) type은 Yamada와 Komagata(12)의 방법에 따라 조사하였으며, 호흡연쇄에서 전자전달에 관여하는 quinone type은 Tamaoka와 Komagata(13)의 방법, 지방산의 분석은 Komagata와 Suzuki (14)의 방법, 분리주의 G+C 몰 함량비는 Tamaoka 등(15)의 방법으로 조사하였다.

분리균의 동정은 International Streptomyces Project(16-19), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(20), Williams(10, 11) 및 Nonomura 등(21)의 방법에 따라 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 방선균의 분리

방선균은 낙엽 부식토양 및 퇴비로부터 채취한 310점의 토양시료를 glucose-asparagine 평판배지에서 배양한 후 콜로니 형태, 기균사의 생성, 냄새 등을 관찰하여 방선균이라고 판단되는 712주를 1차 분리하였다. 포도당 이성화효소의 유도물질로 사용되는 xylose 대신 xylan을

효소 생산의 유도물질로 이용할 수 있는 균을 선별하기 위하여 먼저 xylose를 첨가하지 않고 oatpelt xylan을 첨가하여 포도당 이성화효소를 생산하는 균의 선별을 시도하였다. 1차 분리한 712주를 탄소원으로 1% oatpelt xylan만 포함된 CSL 배지에 배양한 후 배양 균체의 포도당 이성화효소의 활성과 xylanase 활성을 조사하여 효소 활성이 높은 28주를 2차 선별하였다. 선별균 28주를 다시 상기 CSL 배지에 배양하여 원심집균하고 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 동량 현탁하여 80°C에서 60분간 열처리하였다. 열 처리 균체의 포도당 이성화효소 활성을 조사한 결과, 28주 중 9주가 포도당 이성화효소의 활성이 나타났으며, xylanase 활성은 배양 여액에서 모두 효소활성을 가지고 있었다. 따라서 이들 9주 중 포도당 이성화효소의 활성이 2.4 단위(GIU/ml)로 가장 높고, 세포외 xylanase 활성이 0.67 단위(unit)로 다른 균주들에 비해 비교적 높은 분리균주 No. J-59를 최종 선별하여 공시균주로 사용하였다.

#### 분리균주의 형태학적 특성

분리균주 No. J-59의 형태학적 특성을 조사한 결과, 포자 형성은 oatmeal agar(ISP No. 3), yeast extract-malt extract agar(ISP No. 2), inorganic salt-starch agar(ISP No. 4) 및 glycerol-asparagine agar(ISP No. 5) 배지에서는 배양 7일 이후 부터 포자를 형성하였고, peptone-yeast iron agar(ISP No. 6)와 starch agar 배지에서는 상기 배지에서 보다 3~4일 더 경과한 배양 10일 이후에 형성하였으며 Czapek's agar 및 nutrient agar 배지에서는 14일 이후에 포자를 형성하였다. 콜로니의 형태는 粉狀(powdery)으로 전형적인 방선균의 형태이었으며, 기균사의 형태는 광학현미경으로 관찰한 결

과, 젊은 기균사는 retinaculum-apertum형으로 나타났으나 배양 14일 이후에는 spiral형으로 변하였고 분지점을 형성하고 있었다. 포자의 사슬(spore chain)은 전자현미경으로 관찰한 결과, 기균사가 2~5번 정도 꼬인 전형적인 spiral 구조에 포자가 10~20개로 구성되어 있었다(Fig. 1). 포자 형태는 계란형(oval)으로 크기는  $0.8 \times 0.6 \mu\text{m}$ 이었으며, 포자표면은 전형적인 smooth type이었다(Fig. 2).

#### 분리균주의 배양학적 특성

분리균주 No. J-59의 배양학적 특성을 yeast extract-malt extract agar 및 oatmeal agar, glycerol-asparagine agar 배지 등을 포함하여 전체 10종의 평판배지에서 7, 14 및 21일 동안 배양하여 균의 성장, 콜로니의 색깔, 기균사의 형태, 배면의 색깔, 수용성의 색소생성 등을 관찰한 결과, Table 1과 같이 균의 성장은 oatmeal agar 배지를 비롯하여 대부분 우수하였으나, inorganic salt-starch agar, tyrosine agar, nutrient agar, Czapek's agar 배지에서는 다른 배지에 비해 다소 저조한 생육을 보였다. 콜로니의 색깔은 oatmeal agar, inorganic salt-starch agar 배지에서 배양 초기 2~3일 동안에는 노란색에서 4~7일 후 흰색, 7일 이후 부터는 모두 회색(gray)으로 나타났고, glycerol-asparagine agar 배지에서는 7일 후에도 회백색으로 존재하다가 14일 이후에 회색으로 나타났으며, yeast extract-malt extract agar 배지에서는 균의 성장이 가장 양호하였고, 콜로니의 색깔은 배양초기 2~3일 동안은 노랑색에서 4~6일 후 녹색, 10일 이후 부터 회색으로 나타났다. 그러나 배양 14일 이후에 균체의 lawn에 검은 물방울이 형성되어 다른 배지에서 볼 수 없는 특징을 나타내었다. 그 외 대부분의 배지에서 21일 이후에는 모두 회색으로 변하였다. 기



Fig. 1. Microphotograph of the aerial mycelia and spore chains of the isolated strain No. J-59 from a 14-day-old culture on oatmeal agar (ISP No. 3) at 30°C ( $\times 1,000$ ).



Fig. 2. Scanning electron micrograph of the isolated strain No. J-59 from a 14-day-old culture on oatmeal agar (ISP No. 3) at 30°C.

Spore surface were observed to be smooth ( $\times 40,000$ ).



Table 1. Cultural characteristics of the isolated strain No. J-59

| Medium                                      | Growth* | Colony color | Aerial mycelium | Reverse side color | Soluble pigment |
|---|---------|--------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| Yeast extract-malt extract agar (ISP No. 2) | G       | gray         | powdery         | pale yellow-ish    | faint brown     |
| Oatmeal agar (ISP No. 3)                    | G       | gray         | powdery         | brown              | none            |
| Inorganic salt-starch agar (ISP No. 4)      | M       | gray         | powdery         | pale yellow        | none            |
| Glycerol-asparagine agar (ISP No. 5)        | G       | gray         | powdery         | pale yellow        | pale yellow     |
| Peptone yeast iron agar (ISP No. 6)         | G       | gray         | none            | none none          | none            |
| Tyrosine agar (ISP No. 4)                   | M       | gray         | powdery         | none               | none            |
| Tryptone yeast extract broth (ISP No. 1)    | G       | ---          | ---             | ---                | none            |
| Nutrient agar                               | M       | gray         | none            | none               | none            |
| Starch agar                                 | G       | gray         | powdery         | pale yellow        | none            |
| Czapek's agar                               | M       | gray         | powdery         | none               | none            |

\*Arbitrary decision of cell growth: G, good; M, moderate. This isolated strain No. J-59 was cultured in various kinds of media at 30°C for 14~21 days.

균사의 형태는 상기 한천 평판 배지 모두에서 粉狀으로 전형적인 방선균의 형태로 나타났다. 背面色은 yeast extract-malt extract agar 배지에서 연한 황갈색으로 나타났으며 oatmeal agar, starch agar, glycerol-asparagine agar 배지 등에서는 연한 황색, 그 이외의 배지에서는 배면의 색깔이 나타나지 않았다. 수용성 색소생성은 yeast extract-malt extract agar 배지에서는 연한 갈색, glycerol-asparagine agar 배지에서는 연한 황색의 색소를 생성하였다. 또한 tyrosine agar, tryptone yeast extract broth(ISP No. 1) 배지 등 멜라닌 색소 생성배지에서 배양한 결과, 멜라닌색소는 모두 생성되지 않았으나 액체배양시 균체 덩어리가 좁쌀 형태로 뭉쳐 존재하였고 접종 직후 배지의 색보다 약간 진한 황갈색으로 나타났다.

### 분리균주의 생리학적 특성

Gram 양성균인 분리균주 No. J-59의 생리 및 생화학적 특성은 주로 Williams 등(10, 11)의 방법에 준하여 139 종류의 실험체계 중 110여종의 실험을 행한 결과는 Table 2와 같다. 특이하게도 분리균주 No. J-59는 xylanase를 생산하면서도 xylan 분해산물인 xylose를 탄소원으로는 이용하지 못하였고(Table 2, 3), 또한 xylose나 xylan을 첨가하지 않고 배양하였을 경우에는 포도당 이성화효소를 생산하지 않았다(데이터 미제시).

### 균체성분의 화학적 분석

세포벽의 peptidoglycan층에 존재하는 DAP는 같은屬일 경우 동일한 DAP를 가진다는 Becker 등(22)의 보고에 따라 peptidoglycan 층에 존재하는 DAP의 이성질체형을 결정하기 위해 TLC로 분석한 결과, Fig. 3과 같이 LL-DAP(Rf 0.24)를 함유하고 있었으며 이 점적은 발색 직후에 진한 녹색에서 시간이 경과함에 따라 황색으로 변화하였으며 아미노산은 alanine(Rf 0.63), glutamic acid

(Rf 0.52)와 glycine(Rf 0.35)이 존재하였다. 호흡연쇄에서의 전자전달에 관계하는 menaquinone(MK) type이 *Streptomyces*는 MK-9(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>), *Actinomadura*는 MK-9(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>), *Nocardia*는 MK-8(H<sub>4</sub>)나 MK-9(H<sub>2</sub>), *Nocardioopsis*는 MK-10(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>)으로 구성되어 있다고 알려져 있다(20). 본 분리균의 이소프렌 사슬이 9개로 연결된 MK-9(H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>)을 가지고 있어 *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardioopsis*와 유사하였다. *Streptomyces*의 지방산은 포화된 straight chain과 iso- 및 anteiso-branched type으로 존재하며, 이 외의 방선균은 불포화 지방산도 존재한다고 알려져 있다(20). 본 균에서는 불포화 지방산은 관찰되지 않았으며, 지방산은 C<sub>15</sub>와 C<sub>16</sub>의 iso-branched 지방산과 C<sub>15</sub>와 C<sub>17</sub>의 anteiso-branched 지방산으로 구성되어 있었고, 염색체 DNA의 평균 G+C 몰함량을 조사한 결과 75몰%로 전형적인 *Streptomyces* 속의 G+C 몰함량인 69~78%(20)의 범위내에 포함되었다.

### 분리균주의 동정

형태 및 배양학적 특성, 생리 및 생화학적 특성 그리고 균체 성분의 화학적 특성 등을 조사하여 Williams 등(10, 11)의 방법에 의한 139가지 실험체계에 따라 분류한 결과, 분리균주 No. J-59는 주군집 A에서 J까지 중 A에 속하였으며 A군집 1~41 중에서 24군(대표 균주, *Streptomyces flaveolus*)에 속하였다. 24군에 속하는 3개의 strain 즉, *Streptomyces chibaensis*, *Streptomyces flaveolus*, *Streptomyces xantholiticus* 중에서 분리균주 No. J-59는 *S. chibaensis*에 가장 근접하였다. 또한 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(20) 및 Nonomura 등(21)의 방법에 따라 동정한 결과도 거의 일치하였다. 따라서 한국 종균협회 부설 미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 *S. chibaensis* KCCM 11214를 표준균주로 하여 비교 실험한 결과, Table 3과 같이 거의 동일하게 나타났으나,

**Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain No. J-59**

| Factor                             | Characteristics | Factor                                     | Characteristics |
|------------------------------------|-----------------|--|-----------------|
| Antimicrobial activity against:    |                 | 4°C  | -               |
| <i>Bacillus subtilis</i>           | -               | 10°C                                       | +               |
| <i>Escherichia coli</i>            | -               | 37°C                                       | +               |
| <i>Micrococcus luteus</i>          | -               | 45°C                                       | +               |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>     | -               | pH 4.3                                     | -               |
| <i>Candida albicans</i>            | -               |  |                 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>    | -               | Growth in the presence of (% w/v)          |                 |
| <i>Aspergillus niger</i>           | ±               | Sodium chloride (4)                        | +               |
|                                    |                 | Sodium chloride (7)                        | -               |
| Enzyme activity:                   |                 | Sodium chloride (10)                       | -               |
| Proteolysis                        | +               | Sodium chloride (13)                       | -               |
| Pectin hydrolysis                  | -               | Sodium azide (0.01)                        | -               |
| Chitin hydrolysis                  | -               | Sodium azide (0.02)                        | -               |
| Nitrate reduction                  | ±               | Crystal violet (0.0001)                    | +               |
| H <sub>2</sub> S production        | +               | Phenol (0.1)                               | -               |
| Hippurate hydrolysis               | -               |  |                 |
| Cellulose hydrolysis               | +               | Growth on sole nitrogen source (0.1%, w/v) |                 |
| Hippurate hydrolysis               | -               | Potassium nitrate                          | +               |
|                                    |                 | L-Cysteine                                 | +               |
| Degradation of (%):                |                 | L-Valine                                   | +               |
| Hypoxanthine (0.4)                 | +               | L-Threonine                                | +               |
| Guanidine (0.5)                    | +               | L-Serine                                   | +               |
| Tyrosine (0.5)                     | +               | L-Phenylalanine                            | +               |
| Adenine (0.5)                      | +               | L-Methionine                               | +               |
| Tween 80 (0.001)                   | +               | L-Histidine                                | +               |
| Starch (1)                         | +               | L-Arginine                                 | +               |
| Xylan (0.4)                        | ±               |  |                 |
| Casein (0.1)                       | +               | Growth on sole carbon source (1%, w/v)     |                 |
| Urea (0.3)                         | +               | Sucrose                                    | +               |
| Gelatin (0.4)                      | +               | Cellobiose                                 | +               |
| Xanthine (0.4)                     | +               | D-Xylose                                   | -               |
| Elastin (0.3)                      | +               | meso-Inositol                              | +               |
| Allantoin (0.3)                    | +               | Mannitol                                   | +               |
| Aesculin (0.1)                     | +               | D-Fructose                                 | +               |
| Arbutin (0.1)                      | +               | L-Rhamnose                                 | +               |
|                                    |                 | Raffinose                                  | +               |
| Resistance to antibiotics (µg/ml): |                 | Melezitose                                 | +               |
| Gentamicin (100)                   | -               | D-Mannose                                  | +               |
| Neomycin (50)                      | -               | Lactose                                    | +               |
| Streptomycin (100)                 | -               | Inulin                                     | ±               |
| Tobramycin (50)                    | -               | Salicin                                    | -               |
| Rifampicin (50)                    | +               | Dextran                                    | -               |
| Cephaloridine (100)                | +               | Trehalose                                  | +               |
| Vancomycin (50)                    | -               | Melibiose                                  | +               |
| Tetracycline (500)                 | ±               | D-Galactose                                | +               |
| Oleandomycin (100)                 | -               | Xylitol                                    | ±               |
| Lincomycin (100)                   | +               | Sodium acetate                             | +               |
| Penicillin G (10 i.u./ml)          | ±               | Sodium citrate                             | +               |
|                                    |                 | Sodium propionate                          | -               |
| Growth at:                         |                 | Sodium pyruvate                            | -               |

+ , utilized; - , not utilized; ± , utilized weakly

단지 xylose의 이용성에 차이를 보였다. 따라서 분리균 주 No. J-59를 *S. chibaensis*이거나 이 균의 새로운 변이

주로 판단하여 *S. chibaensis* J-59라 명명하였다. *S. chibaensis* ATCC 23895는 1958년 Suzuki 등(23)

**Table 3. Comparison of characteristics of strain No. J-59 with standard strain *S. chibaensis* KCCM11214**

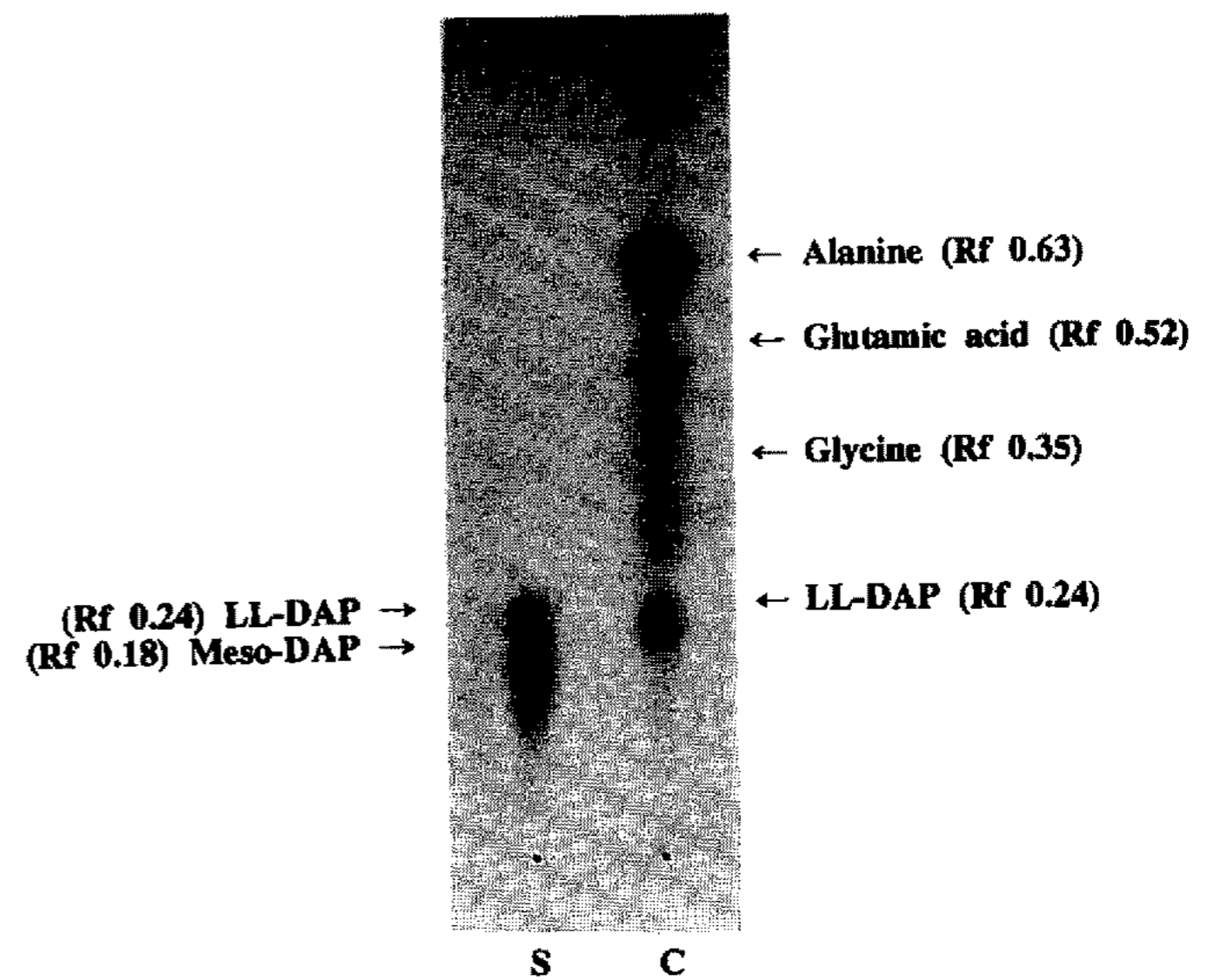
| Factor                | <i>Streptomyces chibaensis</i> * | Isolated strain No. J-59   |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Aerial mass color     | Gray                             | Gray                       |
| Spore chains**        | RA, S                            | RA, S                      |
| Spore surface         | Smooth                           | Smooth                     |
| Melanoid pigment      | Negative                         | Negative                   |
| Reverse side pigment  | Negative                         | Negative                   |
| Soluble pigment       | Grayish green                    | Grayish green              |
|                       | Pale yellow                      | Pale yellow                |
|                       | Yellow                           | Pale yellow<br>Faint brown |
| Vegetative mycelium   | Bright yellow                    | Bright yellow              |
| NaCl tolerance        | ≥5%                              | ≥5%                        |
| 45°C growth           | Positive                         | Positive                   |
| Sodium azide (0.001%) | Negative                         | Negative                   |
| Carbon utilization*** |                                  |                            |
| D-Glucose             | +                                | +                          |
| D-Xylose              | +                                | -                          |
| L-Rhamnose            | +                                | +                          |
| D-Fructose            | +                                | +                          |
| D-Galactose           | +                                | +                          |
| Raffinose             | +                                | +                          |
| D-Mannitol            | +                                | +                          |
| i-Inositol            | +                                | +                          |
| Salicin               | -                                | -                          |
| Sucrose               | +                                | +                          |

\*: *Streptomyces chibaensis* KCCM 11214 was obtained from Korea Culture Center of Microorganisms (KCCM), \*\*: S, spiral; RA, retinaculum-apertum, \*\*\*: +, utilized; -, not utilized

에 의해 처음으로 분리되었고, 이들은 항세균 및 항암성 항생물질인 acetylene dicarboxamide(aquamycin)을 생산한다고 보고하였다. 그러나 Williams의 분류체계의 A 군집 24에서는 여러가지 미생물에 대한 항균 활성이 없는 것으로 보고되었다. 본 실험에서도 Williams의 실험과 동일하게 항균 활성이 나타나지 않았으나, *Aspergillus niger*에 대한 항균 활성이 있었다(Table 2). Chatterjee와 Nandi(24)는 벼의 그루터기를 분해하는 미생물로 *S. chibaensis*가 polyphenol oxidase, peroxidase와 cellulase를 생산한다고 보고하였다. 그러나 아직까지 *S. chibaensis*에 의해 포도당 이성화효소 및 xylan 가수분해효소를 생산한다는 보고는 없었다.

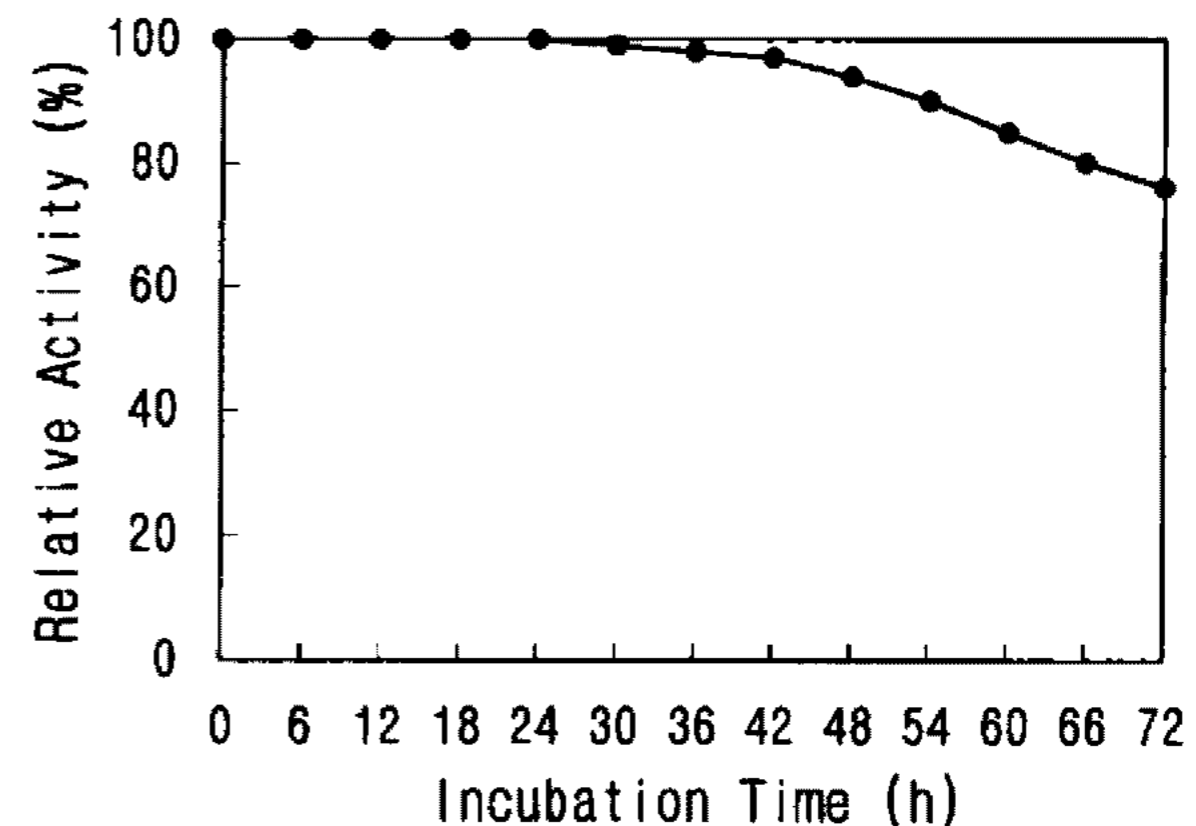
#### *S. chibaensis* J-59 포도당 이성화효소의 열안정성

CSL 배지에서 배양한 균체를 원심 집균하여 2.5 mM Co<sup>2+</sup>을 함유한 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 현탁하여 초음파 처리한 후 얻은 원심 상정액을 70°C에서 30분간 열처리하고 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상정액을 효소액으로 사용하여 80°C에



**Fig. 3. Amino acid profile of peptidoglycan hydrolysate of strain J-59 analyzed by thin layer chromatography.**

LL-diaminopimelic acid (DAP), glycine, glutamic acid and alanine were observed. S, standard LL-DAP and Meso-DAP; C, whole cell hydrolysates. Identification of the DAP isomers is achieved TLC in a solvent system containing methanolwater-6N HCl-pyridine (80: 20: 4: 10, v/v).



**Fig. 4. Thermostability of *S. chibaensis* J-59 glucose isomerase at 80°C.**

The enzyme in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 2.5 mM CoCl<sub>2</sub> was treated at 80°C for various times and then the residual activity was determined at 70°C.

서 열안정성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 본 효소는 80°C에서 72시간 가열하여도 잔존활성이 최초 활성의 75% 이상 남아 있는 열안정성이 높은 효소이었다.

*S. chibaensis* J-59는 10°C에서 45°C까지는 생육할 수 있고 최적온도가 30°C인 중온균이지만 내열성이 높은 포도당 이성화효소를 생산하고 있다(Table 4). *Streptomyces violaceoniger* 및 *Streptomyces olivochromogenes*의 포도당 이성화효소에서 내열성을 보면 70°C에서 100% 활성을 유지할 수 있는 열처리시간은 각각 10분 및 200분이었다고 한다(25). 또한 *Streptomyces* sp(PLC) 및 *Thermotoga neapolitana*의 포도당 이성화효소는 70°C에

서 각각 5일 및 267분 열처리로 50%의 활성이 파괴되었다고 한다(26, 27). 그러나 *S. chibaensis* J-59의 포도당 이성화효소는 70°C에서 7일간 열처리하여도 전혀 실활이 되지 않는 내열성이 높은 효소이었다.

본균의 포도당 이성화효소는 내열성이 우수하고 효소 생산의 inducer로 xylose 대신 xylan을 사용할 수 있으므로 HFGS 제조에 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 그래서 효소의 정제, 특성조사 및 유전자의 클로닝 등에 대한 연구를 진행중에 있다.

## 요 약

내열성 포도당 이성화효소 및 xylanase를 동시에 생산하는 미생물 No. J-59를 부식토양으로부터 분리하였다. 분리균주 No. J-59는 International Streptomyces Project와 Williams의 방법에 따라 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성 등을 조사하여 동정하였다. 분리균주 No. J-59의 콜로니 형태는 粉狀으로 갈색이었으며, 포자사슬은 spiral형으로 2~5번 꼬여 있었고 기균사의 끝부분에 포자가 10~20개 부착되어 있었다. 포자는 타원형으로 크기는  $0.8 \times 0.6 \mu\text{m}$ 이었으며 포자표면은 smooth type이었다. 세포벽의 성분 중 DAP형은 LL-DAP type으로 나타났으며, menaquinone은 MK-9( $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_6$ )를 가지고 있었고, 지방산은 iso-branched와 ante-isobranched type으로 구성되어 있었으며, 염색체의 DNA의 평균 G+C 몰함량은 75%로 나타나 전형적인 *Streptomyces* 속의 특징을 보였다. 따라서 분리균주 No. J-59는 *S. chibaensis*로 동정되었다.

*S. chibaensis* J-59는 xylan을 가수분해시키는 xylanase를 생산하였으나 xylan 분해산물인 xylose를 탄소원으로 이용하지 못하고 단지 포도당 이성화효소 생산의 유도물질로만 이용하는 특성을 나타내었다. *S. chibaensis* J-59는 80°C에서 72시간 열처리시 잔존 활성이 75% 이상으로 남아있는 내열성이 높은 포도당 이성화효소를 생산하는 균주이다.

## 감사의 글

이 연구는 1995년도 한국과학재단의 핵심전문연구비(951-0605-071-2)에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Chen, W. P. 1980. Glucose isomerase(a review). Part I. *Process Biochem.* **15**: 30-35.
2. Tsumura, N., M. Hagi, and T. Sato. 1965. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. Part II. Properties of the enzyme from *Streptomyces phaeochromogenes*.

- Agri. Biol. Chem.* **29**: 1129-1134.
3. Takasaki, Y. 1966. Studies on sugar-isomerizing enzyme production utilization of glucose isomerase from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* **30**: 1247-1253.
4. Zeikus, J. G. 1995. Molecular determinants of the thermozyme activity and stability: analysis of xylose isomerase and amylopullulanase, Pp. 29-51. *Enzyme for Carbohydrate Engineering II, '95 Agricultural Biotechnology Symposium*, The Reseach Center for New Bio-Materials in Agriculture, Suwon, Korea.
5. Dische, Z., and E. Borenfreund. 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination at keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.* **192**: 583-587.
6. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
7. Shirling, E. B., and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
8. Williams, S. T., and T. Cross. 1971. Actinomycetes, Pp. 295-334. In C. Booth(ed.), *Method in Microbiology*, Vol. 4, Academic Press, New York and London.
9. Tresner, H. D., and E. J. Backus. 1963. System of color wheels for Streptomycete taxonomy. *Appl. Microbiol.* **11**: 335-338.
10. Williams, S. T., M. Goodfellow, G. Alderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath, and M. J. Sackin. 1983. A numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
11. Williams, S. T., M. Goodfellow, E. M. H. Wellington, J. C. Vickers, G. Alderson, P. H. A. Sneath, M. J. Sackin, and A. M. Mortimer. 1983. A probability matrix for identification of some Streptomyces. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1815-1830.
12. Yamada, K., and K. Komagata. 1970. Taxonomic studies on Coryneform Bacteria II. Principal amino acid in the cell wall and their taxonomic significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**: 103-113.
13. Tamaoka, J., and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiology Lett.* **25**: 125-128.
14. Komagata, T., and K. I. Suzuki. 1987. Lipid and cell wall analysis in bacterial systematics, Pp. 161-207, In R. R. Colwell, and R. Grigorova, (ed.), *Methods in Microbiology*, Vol. 19, Academic Press, New York and London.
15. Tamaoka, J., Y. Katayama, and H. Kuraish. 1983. Analysis of bacterial menaquinone mixtures by high performance liquid chromatography. *J. Appl. Bacteriol.* **54**: 31-36.
16. Shirling, E. B., and D. Gottlieb. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species description from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 69-189.



17. Shirling, E. B., and D. Gottlieb. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. III. Additional species description from first and second studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 279-392.
18. Shirling, E. B., and D. Gottlieb. 1969. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**: 391-512.
19. Shirling, E. B., and D. Gottlieb. 1972. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. V. Additional descriptions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**: 265-394.
20. Locci, R. 1989. Streptomycetes and related genera, Pp 2451-2492. In S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt(ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th, Vol. 4, Williams & Willikins. Baltimore.
21. Nonomura H. 1974. Key for classification and identification of 458 species of the Streptomycetes included in ISP. *J. Ferment. Technol.* **52**: 78-92.
22. Becker, B., M. P. Lechevalier, R. E. Gordon, and H. A. Lechevalier. 1964. Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* **12**: 421-423.
23. Suzuki, S., G. Nakamura, K. Okuma, and Y. Tomiyama. 1958. Collocidin, a new antibiotic. *J. Antibiol.* **11**: 81-83.
24. Chatterjee, S. K., and B. Nandi. 1981. Role of some mesophilic soil organisms in rice stubble degradation. *International Biodeterioration Bulletin* **17**: 133-139.
25. Tiraby, G., S. Bejar, D. Drocut, J. P. Reynes, P. J. Siccard, G. K. Farber, A. Glasfeld, D. Ringe, and G. A. Petsko. 1989. Genetic, enzymatic, and crystallographic studies of the glucose isomerase of two *Streptomyces* species, Pp 119-126. In O. L. Hershberger *et al.*,(eds), *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms*, ASM, Washington D. C.
26. Vieille, C., J. M. Hess, R. M. Kelly, and J. G. Zeikus. 1995. *xylA* cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1867-1875.
27. Inyang, C. U., U. Gebhart, S. K. C. Obi, and H. Bisswanger. 1995. Isolation and characterization of a D-glucose/xylose isomerase from a new thermophilic strain *Streptomyces* sp. (PLC). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 632-638.

(Received 15 October 1996)