

葡萄糖 異性化 酵素에 關한 研究 (第四報)

酵素學的 性質 및 酵素生成能에 對하여

李 麟 九 · 徐 正 埏

慶北大學校 農科大學 農化學科

(1969. 7. 31 受理)

Studies on the glucose isomerizing enzyme. (Part IV)

On the enzymatic properties and treating conditions
for high activity containing cells.

In-Koo Rhee, Jung-Hwn Seu

Department of applied microbiology, Agriculture college,
Kyung-Pook National University.

Summary

This glucose isomerizing enzyme, which *Actinomyces sp.* (strain, K-17) produced, was inhibited by citrate, oxalate, ethylene diamine tetraacetic acid and cysteine on the enzyme reaction. This enzyme isomerized xylose to ketose as well as glucose. The Michaelis constant of this enzyme was $7.2 \times 10^{-1} M$. on D-glucose. The enzyme activity of intact cells which were harvested in the none xylose containing medium was very weak. If these intact cells of low activity were treated in the buffered xylose solution, its activity was considerably increased. After fifteen hours at 32°C. on xylose treatment, the enzyme activity was increased to equilibrium and the treating condition was proper at neutral pH and in aerobic state. The adequate concentration of xylose on the treatment was about 0.5 percent.

緒 言

前報¹⁻³⁾에 이어 本報에서는 本 K-17 菌株의 Glucose Isomerizing Enzyme 의 酵素學的 性質로서 Michaelis Constant, Chelating 試藥 및 SH 試藥의 影響을 調査하고 아울러 Xylose, Mannose 等の 基質에 對한 酵素作用도 調査하였다. 또 實地 Glucose Isomerizing Enzyme 의 工業的 利用에 있어서 重要視되는

酵素生成에 對한 Inducer 의 問題 即 本 Glucose Isomerase 의 生活菌은 거의가 高價의 Xylose 를 Inducer 로 要求하고 있다. 이 點에서 볼 때 Xylose 自體가 要求되는 境遇⁴⁻⁷⁾와 Xylan, Sorbitol 等の 他物質로써 代置될 수 있는 境遇⁸⁻¹⁰⁾가 있으며 前報³⁾에서 報告한 바와같이 本 K-17 菌株의 酵素生成에 는 Inducer 로서 Xylose 가 絕對的으로 要求되지는 않으나 Xylose 의 存在下에서 크게 酵素生成能이 增加되므로 高力價의 酵素를 얻기 爲해서 Xylose 를 添加하지 않은 培地에서 培養한 菌體를 少量의 Xylose 溶液에 懸濁處理하므로 강한 酵素能을 가진 菌體를 얻을 수 있었다. 이에 對한 研究은 Yamada 의 *Brevibacterium aminopentosum*¹⁷⁾에 對한 報告가 있으나 實地 處理에 있어서 酵素源이 細菌이므로 取致이 困難하였으리라 생각되나 菌體가 크고 培養時 Pilet 를 形成하는 本菌은 이의 處理가 대단히 容易 하였으며 또 좋은 結果를 얻었으므로 이를 여기에 아울러 發表코저함.

實驗方法 및 結果

使用한 酵素는 前報¹⁾에서와 같이 生菌體를 集菌 洗滌한 後 Acetone 으로 乾燥시켜 使用하거나 또 이들 乾燥菌體 1.5g 을 10ml 의 M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2)와 菌體量의 約 1/3 Volume 의 Glasspowder 를 넣고 Homogenizer 로써 Ice Bath 속 에서 1時間 磨碎한 後 다시 30ml 의 Buffer 를 넣고

遠心分離하여 上澄液을 酵素液으로 使用하였고 本實驗에 使用한 緩衝溶液은 M/15 Phosphate Buffer 였다.

1. Chelate 試藥과 SH 試藥에 對한 影響

Citric Acid Oxalic Acid, EDTA-2 Na, Cysteine과 Cystine 을 pH7.2의 M/15 Phosphate Buffer 에 녹여 이들 試藥에 對한 影響을 抽出酵素液을 使用하여 다음과 같은 條件으로 處理하였다.

Reaction Mixture

0.5M	Glucose	1.0ml
$10^{-2}M$ & $10^{-3}M$	Reagent	1.0ml
	Buffer (pH7.2)	2.0ml
	Enzyme solution	1.0ml

Reaction Temperature: 75°C

Reaction Time; 4hrs

Table 1. The effects of chelating and hydrogen sulfide reagent on the enzyme reaction.

kinds of Reagent	$2 \times 10^{-3}M$		$2 \times 10^{-4}M$	
	Fructose $\mu g/ml \times 200$	Activity %	Fructose $\mu g/ml \times 200$	Activity %
Citrate	2.4	47	5.3	106
Oxalate	3.7	74	5.5	110
EDTA-2 Na	0.3	6	5.9	118
Cysteine	3.8	76	5.3	106
Cystine	5.4	108	6.1	122
None	5.0	100	5.0	100

結果는 위의 Table 1에서 보는 바와 같이 이들 試藥을 넣지 않는 것을 對照로 하여 力價를 比較해 본 結果 Citrate, Oxalate, EDTA 와 Cystine은 $2 \times 10^{-3}M$ 에서는 阻害하나 $2 \times 10^{-4}M$ 에는 Citrate, Cysteine 등은 別影響이 없으나 EDTA, Oxalate 와 Cystine 은 若干의 Activating 하는 現象이 있으므로 EDTA 를 取하여 各 濃度別 影響을 본 結果는 다음과 같다. 그리고 이때의 反應條件은 위와 同一하게 行하였다.

前과 마찬가지로 低濃度에서는 若干 Activate 하는 現象을 나타내었으며 $4 \times 10^{-4}M$ 以上の 濃度에 있어서는 강한 阻害現象을 나타내었다. 이로써 本 Glucose Isomerizing Enzyme 은 金屬을 含有한 酵素임을 알 수 있었다.

2. 酵素作用에 있어서 基質濃度에 對한 影響

本 K-17 菌株가 生成하는 Glucose Isomerizing Enzyme 의 基質에 對한 影響을 抽出酵素液을 使用하여 다음과 같은 條件에서 Glucose 濃度를 0.1M 에서 1.0M 까지 調査한 結果는 아래 Fig 2와 같다

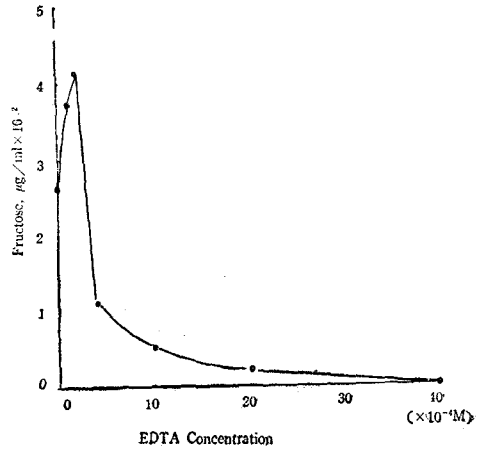


Fig. 1. The effects of EDTA concentration on the enzyme reaction.

Lineweaver-Burk's plot 法에 따라 k_m 値를 計算한 結果 $7.2 \times 10^{-1} M$ 였다.

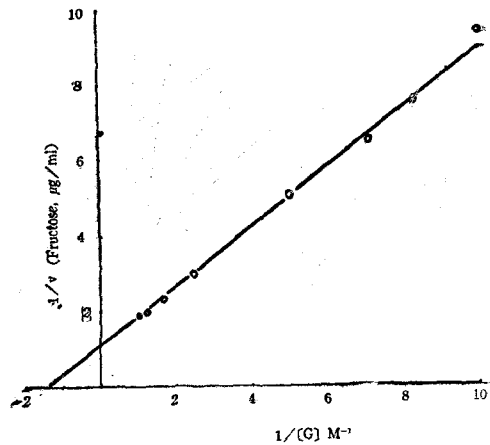


Fig. 2. The effect of substrate concentration on enzyme reaction.

3. 酵素作用에 있어서 基質의 種類에 對한 影響

本 K-17 菌株의 抽出酵素液의 Glucose, Mannose 와 Xylose 에 對한 Isomerizing Activity 를 다음과 같이 基質의 最終濃度가 0.1M 가 되게하여 調査한 結果는 다음과 같다.

Reaction System

Buffer Solution (Containing $5 \times 10^{-3}MMg^{#}$)	8.0ml (pH7.2)
Enzyme Solution	2.0ml
Sugar (Final Concentration 0.1M)	180mg & 150mg
Reaction Temperature	75°C

Reaction Time: 4hrs.

Table 2. The effects of substrates on the enzyme reaction

Substrate	Time(hrs)	
	2	4
Glucose	0.791(-LogT)	1.051(-logT)
Mannose	0.006	0.004
Xylose	0.307	0.211

위의 Table 2에서 보는 바와같이 本菌의 抽出 酵素液을 基質에다 75°C에서 4時間까지 反應시킨 結果 Glucose 뿐만 아니라 Xylose isomerizing activity도 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 그러나 六炭糖인 mannose의 異性化能은 存在하지 않았다. 그러므로 위의 꼭 같은 條件에서 Xylose 異性化能을 時間에 따라 본 結果는 다음과 같다.

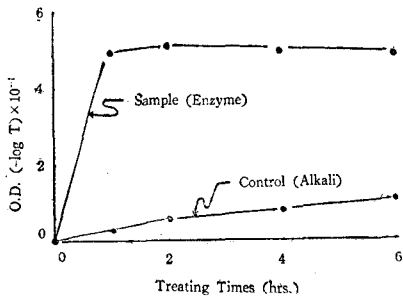


Fig. 3. The effects of xylose isomerization with K-17's isomerizing enzyme.

Fig. 3에서 보는 바와같이 이와같은 條件에서는 1時間 以上이 되면 酵素反應은 거의 平衡에 到達하게 되고 이때 Control은 反應液의 Alkali 性에 依한 化學的 反應으로 Conversion된 것과 Alkali에 依한 것이 合해진 것이다. 여기서 Activity는 $-\log T$ 로써 表示한 것이며 Xylose Isomerization은 吸收波長을 $450m\mu$ 에서 測定하였다.

3. 生菌體의 Xylose 處理法

本 菌株는 自體의 生育에 있어서는 glucose가 存在하는 狀態下에서는 Xylose를 添加했을 境遇나 添加하지 않았을 境遇나 아무런 差異가 없었다. 그러나 酵素生成能에 있어서는 兩條件에서 볼 때 Xylose를 添加한 培地에서 培養했을 때가 훨씬 더 強하였다. 그래서 Xylose의 使用量을 줄이고 또 Enzyme Activity가 높은 菌體를 얻기 위하여 Xylose 代身 Glucose를 添加한 培地에서 25時間 培養한 菌體를 濾別하여 한테 모아서 0.8% 食鹽水로 洗滌하고 이

것을 pH7.2인 M/15 Phosphate Buffer에 녹인 1% Xylose 溶液에 密集 懸濁시켜 32°C에서 15 時間處理시킨 後 다시 濾過集菌하여 Acetone으로 脫水乾燥시켜서 다음과 같은 條件에서 Enzyme Activity를 測定하여 Xylose를 添加한 培地에서 培養한 것과 比較해 보았다.

Reaction Mixture

Acetone dry cells 10mg

0.25M Glucose 2.0ml

M/15 Phosphate Buffer (pH7.2), Containing $1.7 \times 10^{-3} \text{MMg}^{#}$ 3.0ml

Reaction Temperature; 75°C

Reaction Time; 15hrs

a) Xylose 處理 時間에 對한 影響

集菌洗淨한 生菌體 3.5g를 1% Xylose 溶液 50ml에 懸濁시켜 Gyrotory Shaker에서 處理하였다. 1% Glucose 溶液으로도 위와 同一한 方法으로 處理한 것을 對照로 하였다.

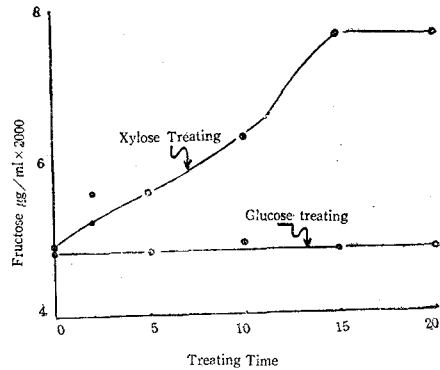


Fig. 4. The effects of xylose treating time.

그 結果는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 1% Glucose 溶液에서 處理했을 때는 아무런 Activity의 上昇을 볼 수 없었으나 Xylose 溶液에 處理했을 때는 Activity가 上昇하였으며 15時間 以上 經過時는 거의 平衡에 到達하였다.

b) Xylose 處理時 pH에 對한 影響

M/15 Phosphate Buffer를 使用하여 pH5.3에서 8.0까지에 있어서는 影響을 調査해 보았다. 生菌體 2.0g를 Buffer Solution에 녹인 Xylose 溶液 50ml에 懸濁시켜 往復式 振盪器에 15時間 振盪 處理하여 Enzyme Activity를 調査한 結果는 다음과 같다. 生菌體를 Xylose 溶液으로 處理 시킬 境遇에 Xylose 溶液의 pH는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 中性部近으로 하는 것이 가장 좋은 結果를 얻었다.

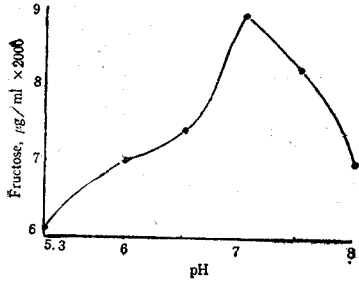


Fig. 5. The effects of treating pH.

c) Xylose 處理時 Xylose 濃度에 對한 影響
 Xylose 處理時 Xylose 의 濃度를 0.1%부터 10%사
 이에서 上法 a 와 같은 條件으로 處理調查하여 본 結
 果는 다음과 같다. 處理時 振盪條件은 往復式 振盪
 器에서 처음 5時間은 振盪하고, 다음 5時間은 靜置
 한後, 마지막 5時間은 처음과 마찬가지로 振盪하였다.

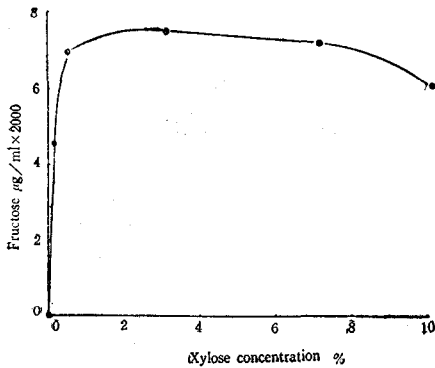


Fig. 6. The effects of xylose concentration on the activity increasing treatment.

Fig. 6에서 보는 바와같이 Xylose 의 處理時 Xylose
 의 濃度가 0.5%以上 이면 濃度에 있어서는 거의 影
 響이 없다는 것을 알 수 있었다. 그리고 10%의 高
 濃度에 있어서는 오히려 나쁜 影響을 나타내었다.

d) Xylose 處理時 振盪效果에 對한 影響處理時 生
 菌體를 懸濁시킨 Xylose 溶液의 振盪效果를 Xylose
 를 添加해서 培養한 乾燥 菌體와 比較해서 調査해
 본 結果는 다음의 Fig. 7과 같다.

Xylose 를 添加한 培養液에서 얻은 菌體를 基準으
 로 하여 他的 試藥의 相對力價로 나타낸 것이며 이
 때 通氣效果가 가장 좋은 것이 (II)區이며 다음이
 III, IV區이다. Fig. 7에서 보는 바와같이 通氣效果가
 가장 좋은 것이 第一良好했으며 V의 靜置區에서
 가장 不良하다는 것을 알았다. 그러므로 Xylose 處
 理時는 好氣性에서 하는 것이 가장 좋을 것으로 推

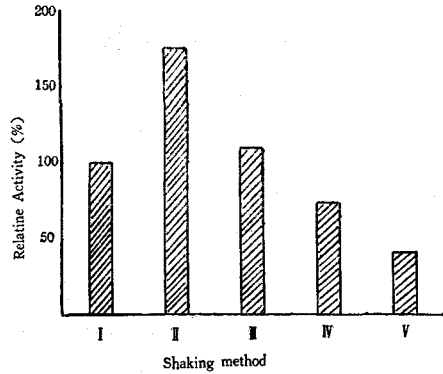


Fig. 7. Effects of shaking method on Xylose treatment.

- I. Dry cells (enzyme) harvested from Xylose containing media.
- II. Shaking for 15 hrs. on reciprocal shaker.
- III. Shaking for 5 hrs. on reciprocal shaker.
- IV. 100r.p.m. on gyratory shaker for 15 hrs.
- V. Standing for 15 hrs.

測된다.

考 察

放線菌類에 屬하는 本 K-17菌株의 菌體에서 抽出
 한 無細胞抽出酵素液을 使用하여 Citrate, Oxalate,
 EDTA, Cysteine, Cystine 에 對한 影響은 Cysteine
 을 除外한 他試藥에서는 $2 \times 10^{-4}M$ 의 低濃度에서는
 약간 Activate 하는 現象을 나타냈으나 $2 \times 10^{-3}M$
 以上の 濃度에서는 阻害現象을 나타냈으며, 特히 ED
 TA 에 對해서는 $4 \times 10^{-4}M$ 以上の 濃度에서는 強
 한 阻害現象을 나타냈다. 故로 本酵素는 金屬酵素로 看
 做된다. 그리고 低濃度에서는 Activator 로 作用하
 는데 對해서는 아직 調査해 보지 못했다. 本 菌株
 가 生成하는 酵素의 基質에 對한 特異性은 *Lactobacillus Brevis*¹⁸⁾
 와 *Brevibacterium pentose-amino acidicum*¹⁷⁾ 등과 같이 D-Glucose
 와 D-Xylose 로부터 이 에 相當하는 Ketose 를 生成하였다.
 그러나 Mannose 에 對해서는 異性化能이 없었다. *Bacillus coagulans*,
Lactobacillus brevis, *Brevibacterium pentose-aminoacidi-
 cum*, *Streptomyces phaeochromogenus* 의 酵素의 Glucose
 에 對한 km 値가 各各 9×10^{-2} , 9.3×10^{-1} , 5×10^{-1}
 및 $3 \times 10^{-1}M$ 인데 反하여 本酵素의 Glucose 에 對
 한 km 値가 $7.2 \times 10^{-1}M$ 로서 서로 差가 있으며 또
 Xylose 를 添加하지 않은 培地上에서 얻은 Enzyme
 Activity 가 弱한 生菌體를 Xylose 溶液에 處理할 때
 이들 處理條件은 中性部近의 pH 에서, 好氣性으로
 하여 15時間 程度가 가장 좋다는 것을 알았다. 이

때 Xylose 溶液의 濃度는 0.5% 以上이던 아무런 支障이 없으며 菌體의 懸液比率은 本 實驗에 使用한 것의 3倍 以上 使用하여도 다른 影響이 없었으며, 同一한 條件에서 Xylose를 添加한 培地上에서 얻은 菌體와 Xylose를 添加하지 않은 培地上에서 얻은 菌體를 Xylose 處理한 菌體와 比較해 볼 때 前者보다 最高 約 70% 以上의 Activity 上昇을 나타내었다. Chelate 試藥에 對한 影響 등의 酵素學的 性質 및 實地 工業的인 利用을 爲한 Xylose 處理條件과 Activity 上昇 Mechanism 에 對해서는 더 詳細히 檢討해 보겠다.

要 約

本 實驗에 使用한 供試菌인 放線菌類의 K-17 菌株가 生成하는 異性化 酵素가 作用時 酵素學的 性質 및 가지와, Xylose를 添加하지 않은 培地上에서 얻은 Enzyme Activity가 낮은 生菌體를 Xylose 溶液에 處理하므로써 Enzyme Activity가 높은 生菌體를 얻을 수 있었다.

이들의 結果를 要約하면

1. 酵素作用時 $2 \times 10^{-3}M$ 以上の 濃度の Citrate, Oxalate, Cysteine 에는 阻害作用이 있었으며, 특히 $4 \times 10^{-4}M$ 以上の 濃度の EDTA 에서는 강한 阻害作用을 나타내었다.
2. 本 菌株가 生成하는 Enzyme 은 Glucose 와 마찬가지로 Xylose 를 異性化하여 相當하는 Ketose 를 生成하였다.
3. 本 Glucose Isomerizing Enzyme 의 Glucose 에 對한 km 値는 $7.2 \times 10^{-1}M$ 이다.
4. Xylose 의 處理時間은 15時間 以上이던 適當하고
5. 處理時 最適 pH 는 中性部附近이며
6. Xylose 의 濃度는 0.5% 以上이던 濃度에는 아무

影響이 없으며, 絶對好氣性에서 處理하는 것이 가장 좋다.

參 考 文 獻

1. Seu, J.H. et al: J. Korean Agr. Chem. Soc., 11, 43 (1969)
2. Seu, J.H. et al: ibid 11, 49 (1969)
3. Seu, J.H. et al: ibid 11, 55 (1969)
4. Marshall- R.O.: U.S. Patent, 2,950,228(1960)
5. Yamanaka, K.: Agr. Biol. Chem., 27, 4 267 (1963)
6. Yamanaka, K.: J. Agr. Chem., Japan, 37, 4, 231 (1963)
7. Yamanaka K; ibid 37, 4, 237 (1963)
8. Takazaki, Y., et al: J. Agr. Chem. Soc., Japan, 36, 12, 1010 (1962)
9. Takazaki, Y., et al: ibid 37, 2, 93 (1963)
10. Takazaki, Y., et al: ibid 37, 3, 151 (1963)
11. Natake, M., et al: Agr. Biol. Chem., Japan, 27, 5, 342 (1963)
12. Natake, M., et al: ibid 30, 887 (1966)
13. Natake, M., et al: ibid 32, 3, 303 (1968)
14. Tsumura, N., et al: ibid 29, 1129 (1965)
15. Tsumura, N., et al: J. Ferm. Assoc., Japan, 22, 32 (1965).
16. Tsumura, N., et al: Agr. Biol. Chem., 31, 8, 902 (1967)
17. Ichimura, M., et al: J. Agr. Chem. Soc., Japan, 39, 8, 291 (1965)
18. Yamanaka, K.,: Agr. Biol. Chem., 27, 4, 271 (1963)