

*Streptomyces canus*와 *Streptomyces malachiticus*의 Xylose Isomerase에 관하여

金 槿 · 李敏載 · 權寧命

(서울대학교 자연과학대학 식물학과)

Properties of Xylose Isomerases in Cell Free Extracts from *Streptomyces canus* and *Streptomyces malachiticus*

KIM, Keun, Min Jai LEE, and Young Myung KWON

(Department of Botany, Seoul National University)

Abstract

Xylose isomerase (D-xylose ketol-isomerase, EC 5,3,1,5) have been demonstrated in the cell-free extracts of *Streptomyces canus* and *Streptomyces malachiticus* grown in the presence of xylose. Xylose, glucose and ribose served as substrates for the enzymes of the two strains with respective K_m values of 22, 130, 230 mM (*S. canus*) and 7, 83, 637 mM (*S. malachiticus*), and V_{max} values of 1.000, 0.087, 0.222 μ moles/min/mg protein (*S. canus*) and 0.312, 0.083, 0.500 μ moles/min/mg protein (*S. malachiticus*). L-Rhamnose was also isomerized by the crude enzyme solutions of the two strains. The maximal activities of the two xylose-isomerases were observed at pH 7.5 and 75°C. The xylose isomerase activities of the two strains were activated two-three times by Mg^{++} or Co^{++} as that of control, partially activated by Ba^{++} and inhibited by Ni^{++} , Ca^{++} and Zn^{++} . Particular, the addition of Mn^{++} stimulated xylose-isomerizing activities, but inhibited glucose-isomerizing activities in both strains. However, Cu^{++} inhibited xylose-isomerizing activities, while stimulated glucose-isomerizing activities of the enzymes.

緒 論

D-Xylose isomerase (D-xylose ketol-isomerase, EC 5,3,1,5, 一名 glucose isomerase)는 五炭糖인 xylose를 xylulose로 異性化시키는 酵素로서 여러 微生物의 경우(Marshall and Kooi, 1957; Yamanka, 1963; Tsumura and Sato, 1965; Takasaki and Kosugi, 1966; Danno, 1970; Sanchez and Smiley, 1975) xylose가 存在할 때 誘導生成되며 xylose를 炭素原으로 한 生長을 가능하게 하여주는 xylose代謝에 있어서 機能的으

로 가장 重要な 酵素의 하나이다.

여러 微生物에서 檢出된 이 酵素는 多様な substrate spectrum을 보여주고 있는데, *Pseudomonas hydrophila*(Marshall and Kooi, 1957), *Streptomyces phaeochromogenes*(Tsumura and Sato, 1965) 그리고 *Streptomyces* sp. (Takasaki *et al.*, 1969)의 xylose isomerase들은 glucose를 fructose로 變化시킬 수 있었으며, *Lactobacillus brevis*(Yamanaka, 1968)와 *Bacillus coagulans*(Danno, 1970)의 경우는 xylose와 gl-

ucose뿐만 아니라 D-ribose도 基質로 이용할 수 있다는 것이 알려졌다. 더욱이 최근에 Sanchez와 Smiley(1975)는 *Streptomyces albus*의 xylose isomerase가 xylose, glucose, 그리고 ribose 외에 D-allose, L-arabinose, 그리고 L-rhamnose와 같은 여러 五炭糖과 六炭糖들도 基質로 이용할 수 있다고 하였다.

지금까지 發表된 以上の 研究結果들(Marshall and Kooi, 1957; Tsumura and Sato, 1965; Yamanaki, 1968; Takasaki *et al.*, 1969; Danno, 1970; Sanchez and Smiley, 1975)로부터 미루어보아, xylose isomerase는 比較의 多樣한 單糖類들을 基質로 利用할 수 있다는 事實은 밝혀졌으나, 대부분이 果糖生産에 利用하려는 理由에서 glucose를 基質로 썼을 때의 酵素性質만을 重點의 研究하였으며, 특히 *Streptomyces* 속에 속하는 菌種들 중에서 xylose가 基質인 때의 酵素性質과 glucose가 基質인 때의 酵素性質을 相互比較한 研究報告는 아직까지 없는 實情이다(Tsumura and Sato, 1965; Takasaki and Kosugi, 1966; Takasaki *et al.*, 1969; Sanchez and Smiley, 1975).

이에 본 연구에서는 우리나라에서 分離 同定된 *Streptomyces* 屬 菌中에서 xylose와 그리고 glucose에 가장 높은 親和力을 가진 酵素를 生産하는 2種을 選定하여 이들 酵素들의 活性에 미치는 온도, pH 그리고 無機이온들의 영향을 비롯하여 基質 특이성 등과 같은 一般的인 酵素學的 性質들을 相互比較하였기에 그 결과를 보고한다.

實驗材料 및 方法

1. 菌 株

본 실험에 사용한 균주는 Lee *et al.*(1976)에 의하여 우리나라 土壤에서 分離 同定된 16種의 *Streptomyces* 中에서 xylose에 제일 높은 活性을 가진 xylose isomerase를 生産하는 *S. canus*와 glucose에 제일 높은 活性을 가진 xylose isomerase를 生産하는 *S. malachiticus*를 각각 選擇하여 본 實驗

Table 1. Xylose-, and glucose-isomerizing activities in several *Streptomyces* species

Species	Specific activities OD x 10 ³ /min/mg protein	
	Substrate	
	Xylose	Glucose
<i>S. canus</i>	3.7	3.2
<i>S. malachiticus</i>	3.6	13.0
<i>S. albulus</i>	1.4	9.3
<i>S. intermedius</i>	0.4	3.7
<i>S. narbonensis</i>	1.2	4.6
<i>S. showdoensis</i>	2.6	8.7
<i>S. rubiginosus</i>	1.5	5.0
<i>S. griseoflavus</i>	1.3	8.7
<i>S. griseocarnatus</i>	2.0	9.0
<i>S. setonii</i>	2.0	2.0
<i>S. bacillaris</i>	2.1	5.3
<i>S. parvullus</i>	1.3	4.0
<i>S. chibaensis</i>	1.5	9.3
<i>S. nashvillensis</i>	2.4	2.0
<i>S. griseorubiginosus</i>	2.0	9.7
<i>S. griseinus</i>	1.7	2.3

The protein contents of the reaction mixtures were variable. Incubation time was 40 min.

에 使用하였다(Table 1).

2. 培 養

各 菌株을 無機鹽類—녹말 agar培地(1% starch, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% MgSO₄, 0.1% NaCl, 0.2% (NH₄)₂ SO₄, 0.2% CaCO₃, 微量의 FeSO₄, 微量의 MnCl₂, 微量의 ZnSO₄, 2% agar; pH 7.0)에서 培養하여 胞子를 얻은 後, 液體培養液(0.5% xylose, 1% beef extract, 0.5% yeast extract, 0.25% NaCl, 0.05% MgSO₄; pH 7.0)에 接種하여 reciprocal type 振盪機(112 rev/min)를 써서 30°C에서 40時間 振盪培養하였다.

3. 粗酵素(crude enzyme)의 調製

培養이 끝나면 培養液을 Buchner funnel로 여과하여 集菌하고, 0.2M potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 두번 씻은 後, 生重量 10g의 菌體와 5ml의 0.2 M potassi-

um phosphate buffer(pH 7.0)를 서로 혼합하였다. 이와 같이하여 얻은 細胞浮遊液(均一한 混合狀態는 아님)을 1/2量의 glass powder(100 mesh 以下)와 섞고, ice water bath에서 물탈로 세포를 파괴시킨 후, IEC Model PR-2 遠心分離機를 사용하여, 4°C에서 13,000 rpm 으로 1시간 동안 원심분리하여 얻은 上騰液을 粗酵素溶液으로 使用하였다.

4. 酵素活性的測定

Xylose 이성화 효소의 활성측정은 Takasaki(1966)의 方法을 기초로 하였는데 反應混合物는 0.2M potassium phosphate buffer(pH 7.0), 0.5ml; 0.1M xylose 溶液 혹은 1M glucose 溶液 0.2ml; 0.1M MgSO₄ 용액 0.1ml; 粗酵素용액 (0.5~2mg protein/ml of reaction mixture)로 構成하여 전체의 부피가 2ml되게 蒸溜水로 채운다음, 60°C에서 10분 혹은 30분 반응시킨 후, 0.5 M perchloric acid 2ml를 添加하여 반응을 停止시켰다. 反應결과 生成된 ketose는 Cystein carbazole法(Dische and Borenfreund, 1951)에 의하여 室溫에서 30分동안 發色시킨 후, Beckman Model DU Spectrophotometer로 560nm에서 그의 吸光度를 측정했다. 生成된 ketopentose 또는 ketohexose의 量은 fructose의 경우를 standard로 하여 計算하였다. 효소 活性은 蛋白質 1mg에 해당하는 cell free extract가 1分동안에 生産하는 ketose의 量(μ moles)으로 表示하였다. 효소용액의 단백질含量은 Lowry法(Lowry et al., 1951)에 의해 定量하였으며, egg albumin을 standard로 使用하였다.

結 果

1. 溫度가 酵素活性的에 미치는 影響

효소활성에 미치는 온도의 영향은 Fig. 1에 나타난 바와 같다. *S. canus*의 경우 온도의 변화에 따른 효소활성의 변화는 xylose가 基質인 때나 glucose가 기질인 때나 매우 비슷한 경향을 보였고, 75°C에서 모두

최대의 효소활성을 나타냈으며, *S. malachiticus*의 경우도 두 基質에 대한 효소활성의 변화가 대개 비슷한 경향을 보여 모두 75°C에서 최대의 활성을 나타내었다.

2. 水素이온濃도가 酵素活性的에 미치는 影響

Fig. 2에서 보는 바와 같이 *S. canus*의 xylose isomerase는 xylose가 기질인 때 pH 6부터 pH 8까지의 범위에서 높은 活性을 나타냈으며, pH 8에서부터는 그 活性이 低下하여 pH 9.5 이상의 수소 이온농도에서는 活性이 거의 없었으며, glucose가 기질인 때 pH변화에 따른 효소活性的의 변화는 심하지 않았으나, 최적 pH에 있어서는 두 기질의 경우가 다같이 pH 7.5로서 일치하고 있다. 한편 *S. malachiticus*의 경우에도 Fig. 2에서와 같이 xylose가 기질인 때 pH 6에서 pH 8까지의 범위에서 높은 활성을 보였으며, pH 8부터는 활성이 매우 급격하게 저하하여 pH 10에서는 그 활성이 거의 없었고, glucose가 기질인 때는 급격한 활성의 변화는 보이지 않았으나, 두 기질의 경우가 다같이 pH 7.5에서 최대활성을 나타내어, 최적 pH는 두 strain의 경우가 pH 7.5로서 一致하였다.

3. 여러 無機이온들이 酵素活性的에 미치는 影響

Table 2에서 보는 바와 같이, 두 strain의 xylose isomerase의 활성에 Mg⁺⁺와 Co⁺⁺가 가장 좋은 activator로 作用했으며, glucose가 기질인 경우 *S. canus*의 효소활성에 대한 Mg⁺⁺와 Co⁺⁺의 效果가 거의 同等하였으나, *S. malachiticus*의 경우는 Mg⁺⁺보다 Co⁺⁺의 活性化 효소가 越等히 좋았다. Ba⁺⁺는 두 strain에서 모두 xylose가 기질인 때에는 뚜렷한 activator로 作用하였으나, glucose가 기질인 때에는 그 活性化 效果가 뚜렷하지 못하였다. Mn⁺⁺은 두 strain에 있어 모두 xylose가 기질인 때에만 activator로 作用하였으며, glucose가 기질인 때에는 inhibitor로 作用하였다. 그리고, Ni⁺⁺, Ca⁺⁺, Zn⁺⁺는 효소 활성에 대한 inhibitor로 作用하였는데, glucose가 기질인 때, *S. canus*

의 경우는 *S. malachiticus*보다 Ca^{++} , Zn^{++} 에 의한 抑制효과가 뚜렷하였다. Cu^{++} 는 두 strain에서 모두 xylose가 기질인 때에는 가장 강한 inhibitor로 작용을 하였으나, glucose가 기질인 때에는 反對로 activator로 작용을 하였다.

4. 酵素의 基質特異性

두 strain에서 얻은 xylose isomerase가 여러 種類의 糖에 대하여 나타내는 효소활성은 Table 2에 나타낸 바와 같은데 xylose, glucose, ribose 그리고 rhamnose의 존재하에서 각각의 生成된 ketose를 측정할 수 있었으나, galactose, arabinose 그리고 mannose의 존재하에서는 효소활성을 측정할 수 없었다.

한편, 기질 濃度와 효소 반응速度와의 관

계를 Lineweaver-Burk의 方法에 따라 圖表로 나타낸 결과로 부터 두 효소의 xylose (Fig. 3), glucose (Fig. 4) 그리고 ribose (Fig. 5)에 대한 K_m 과 V_{max} 를 구할 수 있었다. xylose, glucose 그리고 ribose에 대한 K_m 은 *S. canus*의 경우 각각 22, 130 그리고 290mM이었으며, *S. malachiticus*의 경우는 7, 83과 637mM이었다. 또 *S. canus*에서 xylose, glucose, ribose에 대한 V_{max} 은 각각 1.000, 0.087과 0.222 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ protein이었고 *S. malachiticus*에서는 0.312, 0.083과 0.500 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ protein으로 나타났다. 여기에서 세 기질 中 xylose가 이 효소의 가장 좋은 기질이라는 것이 두 strain 모두에서 究明되었다.

Table 2. Effects of metal ions on the enzyme activity of the cell free extracts

Addition	Relative activity(%)			
	<i>S. canus</i>		<i>S. malachiticus</i>	
	Xylose	Glucose	Xylose	Glucose
None	100	100	100	100
MgSO ₄	226	306	261	237
CoCl ₂	258	300	262	331
BaCl ₂	122	104	175	105
MnCl ₂	164	70	208	82
NiCl ₂	40	72	53	63
CaCl ₂	58	32	67	83
ZnSO ₄	82	40	109	70
CuSO ₄	18	156	25	143

The protein contents of the reaction mixtures were 2 mg/ml. The incubation time was 30 min. Other condition was the same as the text.

考 察

1. 溫度가 酵素活性에 미치는 影響

*S. canus*와 *S. malachiticus*의 xylose isomerase는 xylose와 glucose를 기질로 使用하였을때, Fig. 1에서 보는 바와 같이 모두 75°C에서 최대의 活性을 나타냈는데, 다른 genus에 속하는 *Pseudomonas hydrophila* (Marshall and Kooi, 1957)와 *Aerobacter*

cloacae (Tsumura and Sato, 1965)의 경우, 각기 42°C와 50°C에서 가장 높은 活性을 보인데 반해 *Streptomyces*屬에 속하는 菌種들 (Tsumura and Sato, 1965; Takasaki *et al.*, 1969; Sanchez and Smiley, 1975; Chou *et al.*, 1973)의 효소활성은 본 실험결과와 같이 70°C부터 80°C까지의 범위내에서 가장 높은 活性을 보이고 있다. 또한 *Streptomyces*屬에 속하는 菌種들은 이렇게

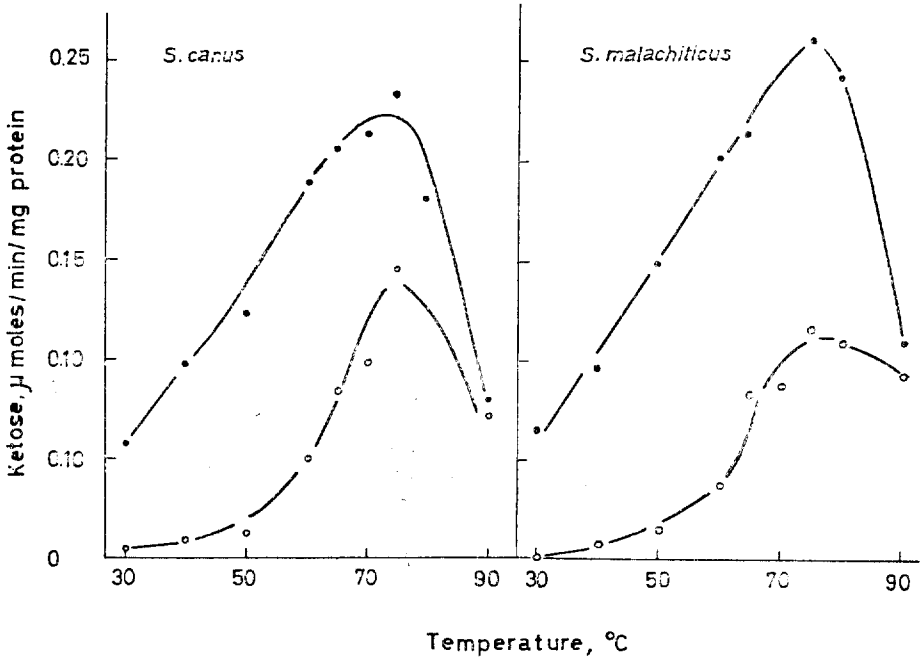


Fig. 1. Effect of temperature on the xylose isomerase activities.

The protein contents of the reaction mixtures were 0.9 mg/ml in the case of *S. canus* and 0.8 in *S. malachiticus*. Incubation time was 30 min. —●—; Xylose isomerizing activity, ○—○; glucose isomerizing activity.

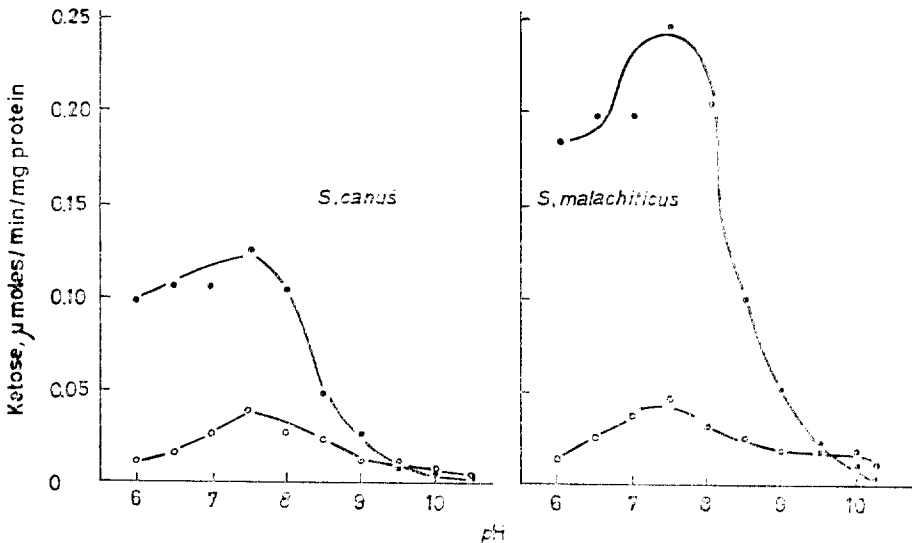


Fig. 2 Effect of hydrogen ion concentrations on the xylose isomerase activity.

Potassium phosphate buffers(0.05M) were used at pH 5.0–8.5 and carbonate-bicarbonate buffers(0.05M) at over pH 8.5. The protein contents of the reaction mixtures were 1.35mg/ml in the case of *S. canus* and 0.6 in *S. malachiticus*. The reaction time was 30 min at 60°C. —●—; Xylose isomerizing activity, ○—○; glucose isomerizing activity.

높은 온도에서 최대활성을 나타내고 있기 때문에, crude extract를 효소용액으로 사용하여도 효소반응에서 생성된 ketose가 다른 효소에 의해 넘어갈 우려가 없을 것으로 생각된다.

2. 水素이온 濃도가 酵素活性에 미치는 影響

Fig. 2에서 보는 바와같이 두 균종의 xylose isomerase活性에 있어 최적 pH는 7.5로서 두 경우가 일치하고 있는데, 이러한 결과는 *S. phaeochromogenes*의 경우 최적 pH가 9.5인 사실과 비교하면, 상당히 낮은 pH에서 최대의 활성을 나타낸다고 하겠으나, 다른 미생물들(Natake and Yoshimura, 1963; Yamanaka, 1963; Tsumura and Sato, 1965; Takasaki and Kosugi, 1966; Yamanaka, 1968; Takasaki et al., 1969; Danno, 1970 Sanchez and Smiley, 1975)에서 검출된 Xylose isomerase들이 pH 6에서 pH 8 범위내에서 활성이 가장 높게 나타난 사실과 비교하면 별다른 차이가 없다고 하겠다. 또한 Fig. 2에서 보는 바와같이 두 균종의 효소는 xylose가 기질인 때나 glucose가 기질인 때나 최적 pH가 모두 일치하였는데, 이는 *Lactobacillus brevis*(Yamanaka, 1963, 1968)의 경우와 같은 결과를 보였으나, *Bacillus coagulans* (Danno, 1970)의 경우 xylose가 기질인 때 효소활성의 최적 pH가 8.0—8.5, glucose가 기질인 때 7.0으로 다르게 나타난 것과는 對照를 이룬다.

한편 Fig. 1과 2에서 서로 같은 조건이면서도 酵素의 活性이 틀리게 나타난 것은, 酵素標品을 냉동저장할 때 活性의 變化가 일어난 것으로 생각된다.

이렇게 *S. canus*와 *S. malachiticus*의 효소활성에 미치는 온도와 pH의 영향이 동일하게 나타난 것으로 보아 효소의 物理化學的 性質이 서로 類似한 것으로 思料되며, 이러한 결과는 두 菌種이 形態의 그리고 生理的으로 서로 類似하여(Lee et al., 1976) 系統學的 近親關係가 매우 가까운 까닭이 아난가 생각되는 바이다.

3. 여러 無機이온들이 酵素活性에 미치는 影響

Table 2에서 볼 수 있듯이, 두 菌種의 xylose isomerase는 기질에 상관없이, Mg^{++} 과 Co^{++} 에 의해 가장 크게 활성화 되었는데, glucose가 기질인 때 지금까지의 실험보고를 정리하면, ① Mg^{++} 이 효소의 活性을 가장 크게 하는 경우(Tsumura and Sato, 1965; Takasaki and Kosugi, 1966; Sanchez and Smiley, 1975)와 ② Co^{++} 가 효소의 活性을 가장 크게 하는 경우(Danno, 1970, 1971; Chou et al., 1976), 그리고 ③ Mg^{++} 과 Co^{++} 두 이온이 모두 효소 活性을 가장 크게 하는 경우(Takasaki et al., 1969)로 나눌 수 있는데, 이에 따르면 *S. canus*는 ③의 경우에, *S. malachiticus*는 ②의 경우에 각각 속하고 있다. 한편 xylose가 기질인 때도 Mg^{++} , Co^{++} 가 가장 좋은 activator로 作用했는데, *Lactobacillus brevis*(Yamanaka, 1968)의 경우에는 Mg^{++} 은 효소활성에 아무런 효과가 없었고, Co^{++} 은 약간의 활성화 효과를 보였으며, *Bacillus coagulans*(Danno, 1970)의 경우도 Mg^{++} 과 Co^{++} 활성화 효과가 아주 약하게 나타난 사실과 비교하면 대조적이라 할 수 있다.

Ba^{++} 은 실험결과에서 보는 바와같이 약한 activator로 作用하였는데, 이는 다른 實驗報告들(Takasaki et al., 1969; Danno, 1970)과 일치하고 있다.

Mn^{++} 은 두 strain에 있어 모두 xylose가 기질인 때는 activator, glucose가 기질인 때는 inhibitor로 作用하였는데, heterolactic acid bacteria(Yamanka, 1963)의 경우는 두 기질에 대한 효소활성에 모두 Mn^{++} 을 필요로 하였으며, *B. coagulans*(Danno, 1970, 1971)에서는 xylose가 기질인 때는 Mn^{++} 이 효소활성에 꼭 필요한 무기이온이면서, glucose가 기질인 때는 Mn^{++} 의 활성화 효소가 극히 微微하였다.

Xylose isomerase에서 glucose가 기질인 때 Cu^{++} 가 효소활성에 대한 inhibitor로 작용한다는 보고가 있음에도 불구하고, *S. canus*와 *S. malachiticus*의 경우에는 Cu^{++}

가 activator로 작용하였는데, xylose가 기질인 때는 가장 강한 inhibitor의 효과를 보여, Mn^{++} 의 경우와 완전한 對照를 이루었다.

또 Ni^{++} , Ca^{++} 그리고 Zn^{++} 들은 모두 inhibitor로 작용하였는데, 이러한 결과는 다른 실험보고들(Tsumura and Sato, 1965; Takasaki and Kosugi, 1966; Danno, 1970)과도 一致하는 것이었다.

한편, Danno(1971)에 의하면, *B. coagulans*의 xylose isomerase는 Co^{++} 와 Mn^{++} 이 자기 酵素의 다른 部位에 結合하여 효소의 active site의 형태에 변화를 일으킴으로써, Co^{++} 와 결합된 효소의 active site는 glucose의 異性化에 알맞게 되고, 효소에 Mn^{++} 이 결합했을 때 효소의 active site는 xylose의 異性化에 알맞게 된다고 하였다. 이러한 생각에 비추어 볼 때, Table 2에서 보는 바와같이, 기질에 관계없이 효소를 가장 크게 활성화시킨 Mg^{++} 와 Co^{++} 는 효소와의 결합부위가 자기 다르다 할지라도, 효소의 active site가 xylose나 glucose 이성화에 모두 알맞는 형태가 된다고 할 수 있다. 또 Mn^{++} 이 xylose가 기질인 때는 activator이면서 glucose가 기질인 때는

inhibitor로 작용한 사실은, Mn^{++} 이 효소와 결합하였을 때 효소의 active site는 xylose와는 결합이 가능한 형태이지마는 glucose와는 결합할 수 없는 형태가 된다고 해석할 수 있다. 또 Mn^{++} 과 반대로 효과를 나타낸 Cu^{++} 경우는, 효소에 Cu^{++} 가 결합했을 때 효소의 active site 형태는 glucose와의 결합은 可能하지마는, xylose와 결합하기는 매우 곤란한 형태가 된다고 해석해 볼 수가 있다.

한편 이상과 같이 온도와 pH의 변화에 따른 효소활성의 변화는 xylose가 기질인 때나 glucose가 기질인 때나 차이가 없었으나, 여러 무기이온들이 효소활성에 미치는 효과에 있어서는 기질에 따라 뚜렷한 차이를 보이고 있어, 이 이유를 糾明하자면 계속적인 연구가 필요하며, 그 결과도 매우 흥미로울 것이 期待된다.

4. 酵素의 基質特異性

Table 3.에서 나타난 바와같이 *S. canus*와 *S. malachiticus*의 crude enzyme은 xylose, glucose, ribose 그리고 L-rhamnose에 활성을 보이고 있다. 그런데 Takasaki et. al.(1969)은 xylose에 활성을 나타내는 효소와 glucose에 활성을 나타내는 효소를

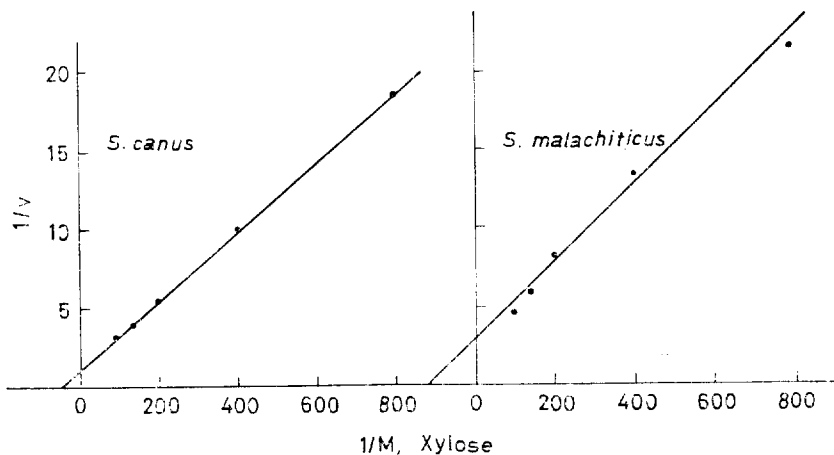


Fig. 3. Lineweaver-Burk plots for xylose isomerization by the cell free extracts.

The protein contents of the reaction mixtures were 1.85 mg/ml in *S. canus* and 1.65 in *S. malachiticus*. The reaction time was 10 min.

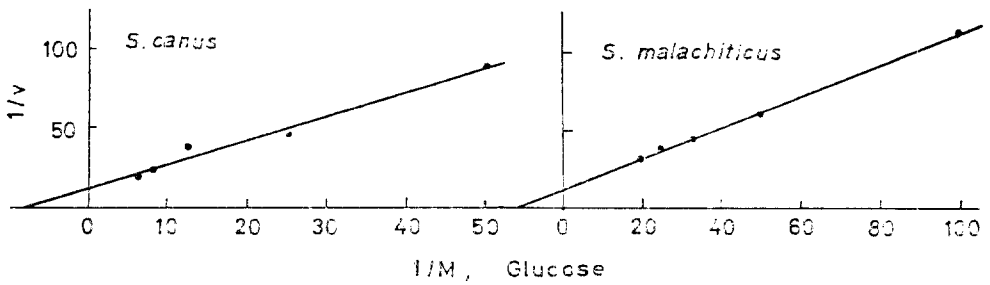


Fig. 4. Lineweaver-Burk plots for glucose isomerization by the cell free extracts. The protein contents of the reaction mixtures were the same as Fig. 3. The reaction time was 10 min.

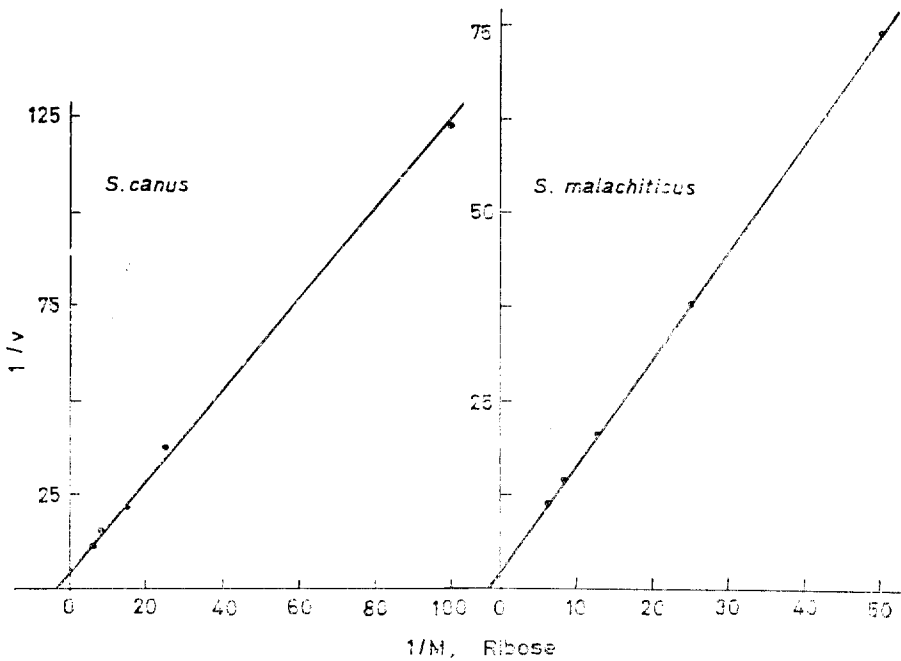


Fig. 5. Lineweaver-Burk plots for ribose isomerization by the cell free extracts. The protein contents of the reaction mixture were the same as Fig. 3. The incubation time was 10 min.

서로 分離할 수 없었으며, Yamanaka(1968)와 Danno(1970)는 crystalline enzymes로 實驗한 結果에서 xylose isomerase가 xylose, glucose 그리고 ribose에 活性이 있다고 하였고, Sanchez와 Smiley(1975)는 여러 실험결과에서 xylose외에 glucose, ribo-

se, L-rhamnose, D-allose 그리고 L-rhamnose에 活性이 있다고 결론을 내렸다. 이렇게 볼 때에 Table 3.에 나타난 바와 같이, xylose, glucose, ribose 그리고 L-rhamnose는 xylose isomerase에 의해 各各의 ketose로 變換한다는 사실은 確실시 된다.

Yamanaka(1963, 1968)는 *Lactobacillus brevis*의 xylose isomerase가 單糖類의 straight-chain(aldehyd) form에 있어 C-2와 C-4에 있는 -OH group 이 cis-configuration으로 配列된 單糖類, 즉 D-xylose, D-glucose 그리고 D-ribose에 作用하며 그렇지 않은 單糖類, 즉 D-mannose, D-galactose, L-arabinose에는 活性이 없는 것으로 보아, 糖의 C-2와 C-4에 있는 OH-configuration이 異性化에 參與한다고 하였다. 그러나, 本實驗 결과와 Sanchez와 Smiley(1975)의 實驗結果에서 나타난 바와같이 xylose isomerase는 C-2와 C-4에 있는 -OH group이 trans-configuration으로 된 L-rhamnose에도 活性을 보이고 있고, Takasaki *et al.*(1969)에 의해 발표된 *Streptomyces* sp.의 xylose isomeraae는 C-2와 C-4에 있는 -OH group이 cis-configuration으로 된 D-ribose에 活性이 없는 점들을 볼 때에 C-2와 C-4에 있는 -OH基가 異性化에 關여된다고 一律적으로 말하기는 어려운 形편이다.

xylose에 대한 K_m 이 다른 미생물들(Yamanaka, 1963; Yamanaka, 1968; Takasaki *et al.*, 1969; Danno, 1970; Sanchez and Smiley, 1975)의 경우 1mM에서 93mM內에 分布하고 있는 것을 볼때, *S. canus*와 *S. malachiticus*는 K_m 이 각각 2,7mM로 나타나, 두 strain의 효소가 xylose에 대하여 비교적 높은 親和度를 가지고 있음을 알 수

있다. 특히 다른 미생물들(Yamanaka, 1963 Tsumura and Sato, 1965; Yamanaka, 1968; Takasaki *et al.*, 1969; Danno, 1970 Sanchez and Smiley, 1975)의 경우를 보면 glucose에 대한 K_m 이 86mM에서 920mM에 分布함을 볼 때, *S. canus*와 *S. malachiticus*의 glucose에 대한 K_m 이 각각 130 mM, 83mM로 나타나 glucose에 대한 친화력이 높음을 알 수 있는데 이 효소가 산업적으로 쓰는 果糖生産에 많이 使用되고 있다는 점을 생각할 때, 이들 두 균종의 xylose isomerase에 대한 연구를 계속한다면, 좋은 결과가 나오리라고 기대하는 바이다.

Table 3. Substrate specificity of xylose isomerase of the cell free extracts.

Substrate	Activities μ moles of ketose formed/min/mg. protein	
	<i>S. canus</i>	<i>S. malachiticus</i>
D-Xylose	(0.01 M) 0.308	0.227
D-Glucose	(0.04 M) 0.020	0.025
D-Ribose	(0.04 M) 0.031	0.027
L-Rhamnose	(0.04 M) 0.010	0.021
D-Galactose	(0.04 M) 0.000	trace
L-Arabinose	(0.04 M) 0.000	0.000
D-Mannose	(0.04 M) 0.000	0.000

The protein contents of the reaction mixtures were variable. Incuvation time was 10 min.

摘 要

*Streptomyces canus*와 *S. malachiticus*에서 얻은 cell free extract를 사용하여 xylose isomerase의 효소학적성질을 조사비교하였다. xylose, glucose, ribose에 대한 효소의 K_m 은 22, 130, 290 mM(*S. canus*)과 7, 83, 637mM(*S. malachiticus*)이었다. 그리고 V_{max} 는 1.0, 0.087 0.222 μ moles/min/mg protein(*S. Canus*)과 0.312, 0.083 0.5 μ moles/min/mg protein(*S. malachitricus*)이었다. xylose를 기질로 사용할때 두 homogenate의 효소 活化에 필요한 최적 pH는 모두 7.5이었고 최적온도 온도는 75°C였다. 한편 Mg⁺⁺, Co⁺⁺, Ba⁺⁺은 두 homogenate의 xylose isomerase활성을 촉진시켰으며, Ni⁺⁺, Ca⁺⁺, Zn⁺⁺은 억제효과를 나타냈다. 한편 Mn⁺⁺은 xylose→xylulose의 반응은 촉진시켰으나, glucose→fructose의 반응은 억제하였고, Cu⁺⁺는 Mn⁺⁺의 경우와는 반대로 glucose→fructose를 촉진하고 xylose→xylulose의 반응을 억제하였다.

引用文獻

1. Armbruster, F.C., R.E. Heady, and R.P. Cory, 1971. Xylose (glucose)-isomerase enzyme compositions. (CPC International Inc.) *Ger. Offen.* 2, 245, 402 (Cl. C 12 d), 22 Mar. 1973, US Appl. 181,639, 17 Sep. 1971:31 pp. (Cited from Chem. Abst. 3843 u, 1973).
2. Chou, C.C., M.R. Ladisch, and G.T. Sato, 1967, Studies on glucose from a *Streptomyces* species, *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 489—493.
3. Danno, G., 1970. Studies on D-glucose-isomerizing enzyme of *Bacillus coagulans*, strain HN-68. Part III. Induced formation of D-glucose-isomerizing enzyme by D-glucose-grown cells of *Bacillus coagulans*. *Agr. Biol. Chem.* **34**: 1658—1667.
4. _____, 1970. Studies on D-glucose-isomerizing enzyme from *Bacillus coagulans*, strain HN-68. Part IV. Purification, crystallization and some physicochemical properties. *Agr. Biol. Chem.* **34**: 1735—1804.
5. _____, 1970. Studies on D-glucose-isomerizing enzyme from *Bacillus coagulans*, strain HN-68. Part V. Comparative study on the three activities of D-glucose, D-Xylose and D-ribose isomerization of the crystalline enzyme. *Agr. Biol. Chem.* **34**: 1805—1814.
6. _____, 1971. Studies on D-glucose-isomerizing enzyme from *Bacillus coagulans*, strain HN-68. Part VI. The role of metal ions on the isomerization of D-glucose and D-Xylose by the enzyme. *Agr. Biol. Chem.* **35**: 997—1006.
7. _____, 1973. Effect of sodium dodecyl sulfate on D-glucose isomerizing enzyme from *Bacillus coagulans*, strain HN-68. *Agr. Biol. Chem.* **37**: 1849—1855.
8. Dische, Z. and E.J. Borenfreund, 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugar and trioses. *J. Biol. Chem.* **192**: 583—587.
9. Lee, M.J., Y.C. Hah, and C.S. Ahn. 1976. Studies on the isolation and identification of genus *Streptomyces*. *Kor. Jour. Microbiol.* **14**: 25—35.
10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265—275.
11. Marshall, R.O. and E. R. Kooi. 1957. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. *Science* **125**: 648—649.
12. Mitsuhashi, S., and J.O. Lampen, 1953. Conversion of D-Xylose to D-Xylulose in extracts of *Lactobacillus pentosus*. *J. Biol. Chem.* **204**: 1011—1018.
13. Natake, M. and S. Yoshimura. 1963. Studies on glucose isomerase of bacteria. Part I. Formation of glucose isomerase by *Aerobacter aerogenes*, strain HN-56, and its relationship to xylose isomerase. *Agr. Biol. Chem.* **27**: 342—348.
14. Park, Y.K. and I. Nakamura, 1974. Production of glucose-isomerase and isomerization of glucose to fructose. Relation between various culture media, cell growth, and enzyme production. *Rev. Bras. Technol.* 5(3—4), 185—90 (Port). (Cited from Chem. Abst. 41484t, 1975.).
15. Sanchez, S. and K.L. Smiley, 1975. Properties of D-xylose isomerase from *Streptomyces albus*. *Appl. Microbiol.* **29**: 745—750.
16. Sanchez, S. and C.M. Quinto, 1975. D-Glucose isomerase: Constitutive and catabolite repression-resistant mutants of *Streptomyces phaeochromogenes*. *Appl. Microbiol.* **30**: 750—754.
17. Sato, Y. and S.T. Sumura, 1969. Isolation of a glucose isomerizing enzyme from *Streptomyces*. Japan. 6928, 473 (Cl. 36 CO), 22 Nov Appl. 12 Jun 1964; 2pp. (Cited from Chem. Abst. 107407 B, 1970.).
18. Takasaki, Y. Kosugi, 1966. Studies on sugar-isomerizing enzyme. Production and utilization of glucose isomerase from *Strep-*

- tomyces* sp. *Agr. Biol. Chem.* **30** : 1247—1253.
19. Takasaki, Y., Y. Kosugi, and A. Kanbayashi, 1969. Studies on sugar-isomerizing enzyme. Purification, crystallization and some properties of glucose isomerase from *Streptomyces* sp. *Agr. Biol. Chem.* **33** : 1527—1534.
20. Takasaki, Y., 1973. Production of glucose isomerase. Japan. Kokai 73 49,981 (Cl. 36 (2) CO), 14 Jul 1973. 71, 85,886.28 Oct. 1971; 2pp. (Cited from *Chem. Abst.* 103653a. 1973).
21. Takasaki, Y. and A. Kanbayashi, 1970. Sugar-isomerizing enzyme. V. Fixation of glucose isomerase by heat-treatment of cells of *Streptomyces* species and its application. Kogyo Gijutsuin Biseibutsu Kogyo Gijutsu Kenkyusho Kenkyu Hokoku. **37**:31—37(Cited from *Chem. Abst.* 139538 c., 1971.).
22. Tsumura, N. and T. Sato, 1965. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. Part V. Partial purification *Aerobacter cloacae*. *Arg. Biol. Chem.* **29** : 1123—1128.
23. _____, 1965. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. Part VI. Properties of the enzyme from *Streptomyces phaeochromogenes*. *Agr. Biol. Chem.* **29** : 1129—1134.
24. Yamanaka, K., 1963. Sugar isomerases. Part I. Production of D-glucose isomerase from heterolactic acid bacteria. *Agr. Biol. Chem.* **27** : 265—270.
25. _____, 1963. Sugar isomerases. Part II. Purification and properties of D-glucose isomerase from *Lactobacillus brevis*. *Agr. Biol. Chem.* **27** : 271—278.
26. _____, 1963. Purification, Crystallization and properties of the D-xylose isomerase from *Lactobacillus brevis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **151** : 670—680.
27. Yoshiyuki, T., 1974. Formation of glucose isomerase by *Streptomyces* sp. *Agr. Biol. Chem.* **38** : 667—668.