

포도당 이성화 효소 생산성 신균주 *Streptomyces luteogriseus*의 분리 및 발효특성

홍승서 · 백진기 · 이현수 · 국승욱¹ · 박관화^{1*}
선일포도당(주)기술연구소, ¹서울대학교 식품공학과

Isolation of Glucose Isomerase-Producing Microorganism, *Streptomyces luteogriseus* and Determination of Fermentation Conditions

Hong, Seung-Suh, Jin-Ki Baek, Hyun-Soo Lee,
Seung-Uk Kuk¹ and Kwan-Hwa Park^{1*}

Technology Research Institute, Sunhill Glucose Co., Ltd, Incheon 403-020, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract — Glucose isomerase producer, which produces 488 U/ml of glucose isomerase activity in 500 ml flask scale, was isolated among 666 isolates of Actinomycetes from pine forest soil samples. The isolate was identified as *Streptomyces luteogriseus* through the studies about morphology (spiral aerial mycelia), cell wall type (Type I), spore chains (spiral form), pigment formation (gray melanine pigment) & metabolism (sugar utilization etc). The optimum conditions of fermentation were determined in 500 ml flask scale. The enzyme production was reached maximum after 4 days at pH 6.0~8.0 and 27~30°C in the medium containing 1.5~3.0% of xylose; 0.5~0.8% of glucose; 0.1% of MgSO₄·7H₂O; 0.05% of CoCl₂·6H₂O; 7.5% of corn steep liquor.

1950년대 초반 몇몇의 단당류 이성화 효소가 동물 조직과 박테리아 등에서 발견되었으며(1) Marshall과 Kooi는 *Pseudomonas hydrophila*가 xylose isomerase, 일명 glucose isomerase를 생산한다고 보고하였다(2).

*Pseudomonas*가 glucose isomerase를 생산한다는 것이 알려진 이후 *Actinomyces*(3), *Actinoplanes*(4), *Aerobacter*(5), *Arthrobacter*(6), *Bacillus*(7), *Flavobacterium*(8), *Brevibacterium*(9), *Curtobacterium*(10), *Lactobacillus*(11), *Microbispora*(12), *Nocardia*(13), *Streptomyces*(14-17), *Corynebacterium* 및 *Streptosporangium*(14) 등에서 효소가 생산된다는 것이 알려져 있다.

*Streptomyces*속은 효소생산성이 우수하며 취급이

간편하고 세포회수가 용이하여 glucose isomerase 생산에 널리 이용될 수 있는 것으로 *S. phaeochromogenes* 외에 21개의 서로 다른 종(species)에서 생산한다고 보고되었다. 이외에도 Actinomycetes과에 속하는 *Actinoplanes missouriensis*가 효소생산성이 우수한 것으로 보고되었고(4) 특히 *Bacillus coagulans*와 *B. stearothermophilus* 효소는 열안정성이 매우 우수한 것으로 알려져 있다(18, 19).

본 연구에서는 산업적으로 유용한 glucose isomerase를 생산할 목적으로 토양으로부터 새로운 방선균을 분리, 동정하고 발효조건을 검토하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용배지 및 균주의 분리

Key words: Glucose isomerase, *Streptomyces luteogriseus*

*Corresponding author

Table 1. Composition of media for stock culture and glucose isomerase production

Medium for stock culture			
Glucose	0.4%	Malt extract	1.0%
Yeast extract	0.4%	Agar	1.8% pH 7.3
Medium for enzyme production			
Xylose	1.0%	Corn Steep liquor	7.5%
Glucose	0.2%	Yeast extract	0.25%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1%	Antifoamer	0.02%
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.024%	pH	6.5

방선균만을 선택적으로 분리할 목적으로 soluble starch 1.0%, KH₂PO₄ 0.2%, CaCO₃ 0.002%, KNO₃ 0.2%, NaCl 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.005%, FeSO₄·7H₂O 0.001%, Agar 1.8%, cycloheximide 50 mg/l 및 nystatin 50 mg/l을 함유한 배지를 pH 7.0으로 조절하여 사용하였다. 선별한 방선균의 저장 및 효소생산성 검정은 Hunter-Cevera 등의 방법(20)을 변형시켜 사용하였으며 Table 1과 같은 조성의 배지를 사용하였다. 방선균의 glucose isomerase 생산능력은 Table 1의 효소생산용 배지에서 4일간 진탕배양한 후 배양액의 포도당 이성화율을 정량하여 효소생산균주를 선별하였다.

Glucose isomerase의 역가측정

Takasaki 방법(21)을 변형시켜 측정하였다. 즉 0.02 M Mg²⁺ ion 존재하에 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)로 만든 7.2% glucose 용액을 기질로하여 1 ml 기질에 증류수 0.8 ml와 효소용액 0.2 ml를 첨가하고 70°C에서 1시간 반응시켰다. 반응종료 후 cycteine-carbazole법(22)으로 생성된 fructose를 정량하였다. 효소역가 1 unit는 주어진 조건하에서 분당 1 μmole glucose를 fructose로 이성화시키는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

발효경과 중 gas 분석

발효 중 발효기의 배기구에 Mass-spectrometer (VG Quadrupoles사, Micromass PC model, 영국)를 연결하여 CO₂, ethanol, acetate, N₂, H₂O 등을 on-line으로 분석하였다.

분리균주의 동정

기균사와 영양균사의 특징을 전자현미경과 광학현미경으로 관찰하였고 세포벽의 DAP 이성체는 Becker (23) 방법으로 분석하였으며 세포벽 당 조성은 Meyerton, 인지질 조성은 Lechevalier 등의 방법(24)을 이용하였다. 균주의 생리적 특성은 Gordon 등에 의한 배지와 방법(25)을 이용하였다.

Corn steep liquor의 전처리

질소원으로 사용한 옥수수 참지수(CSL)는 불순물을 제거하기 위해 pH 3.9인 CSL을 2배 희석하고 pH 5.0으로 조절한 후 115°C에서 10분간 멸균하고 여과하여 사용하였다.

결과 및 고찰

이성화 효소 생산균주의 분리

토양에서 분리한 방선균 666주 중 14%인 91주의 방선균이 glucose isomerase를 생산하였다. 이 중에서 배양액 평균 효소역가가 488 U/ml이고 Fig. 1에서와 같이 40% glucose 용액에서 53%의 이성화율을 보이는 TH34를 최종적으로 선별하였다. 53%의 전환율을 비교적 높은 것으로 지금까지 실험실적으로는 50% 내외의 전환율이 보고(26)되고 있어 본 균주는 실용화 가능성이 있는 것으로 보였다.

분리균주의 동정

형태학적 특징 및 세포의 화학적 조성 : 기균사가 coil 형태의 spore 사슬모양을 하고 있었으며 이것을 Pridham 방법(27)에 의거 Spira(S) 형태로 분류하였다. 세포 가수분해물에는 LL-DAP가 함유되어 있었으므로 cell wall type I균으로 분류되었고 당은 전혀 검출되지 않았다. 인지질은 phosphatidyl ethanolamine을 갖고 있어 인지질 Pattern II로 분류되었으며 Mycolic acid는 검출되지 않았다. 즉 이와 같은 균주의 형태학적 특징과 세포의 화학적 조성으로부터 cell wall type I균으로 분류되었는데 여기에는 *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Microellobospora* 및 *Sporichthya* 등이 존재하나 포자형성시 verticillium이 형성되지 않고 포자가 비활동성인 것으로 보아 *Streptomyces*속으로 동정할 수 있었다.

생리적 특징 : 탄수화물 이용성, melanine pigment 생성능력 등의 생리적 특성을 조사하여 본 결과는

Table 2와 같다. 모든 당을 이용하여 melanine 색소를 생성하였고 colony 모양은 smooth하였으므로 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'에 의하여 *Streptomyces luteogriseus*나 *S. neyagawaensis*와 유사한 것으로 분류되었다. 그런데 Fig. 2의 전자현미경 사진에서 볼 수 있듯이 spore의 형태가 전형적인 spira(s) 형태이므로 *Streptomyces luteogriseus*로 최종

동정하였다. 그러나 이 균주가 glucose isomerase를 생산하는지 여부에 대하여는 보고되어 있지 않다.

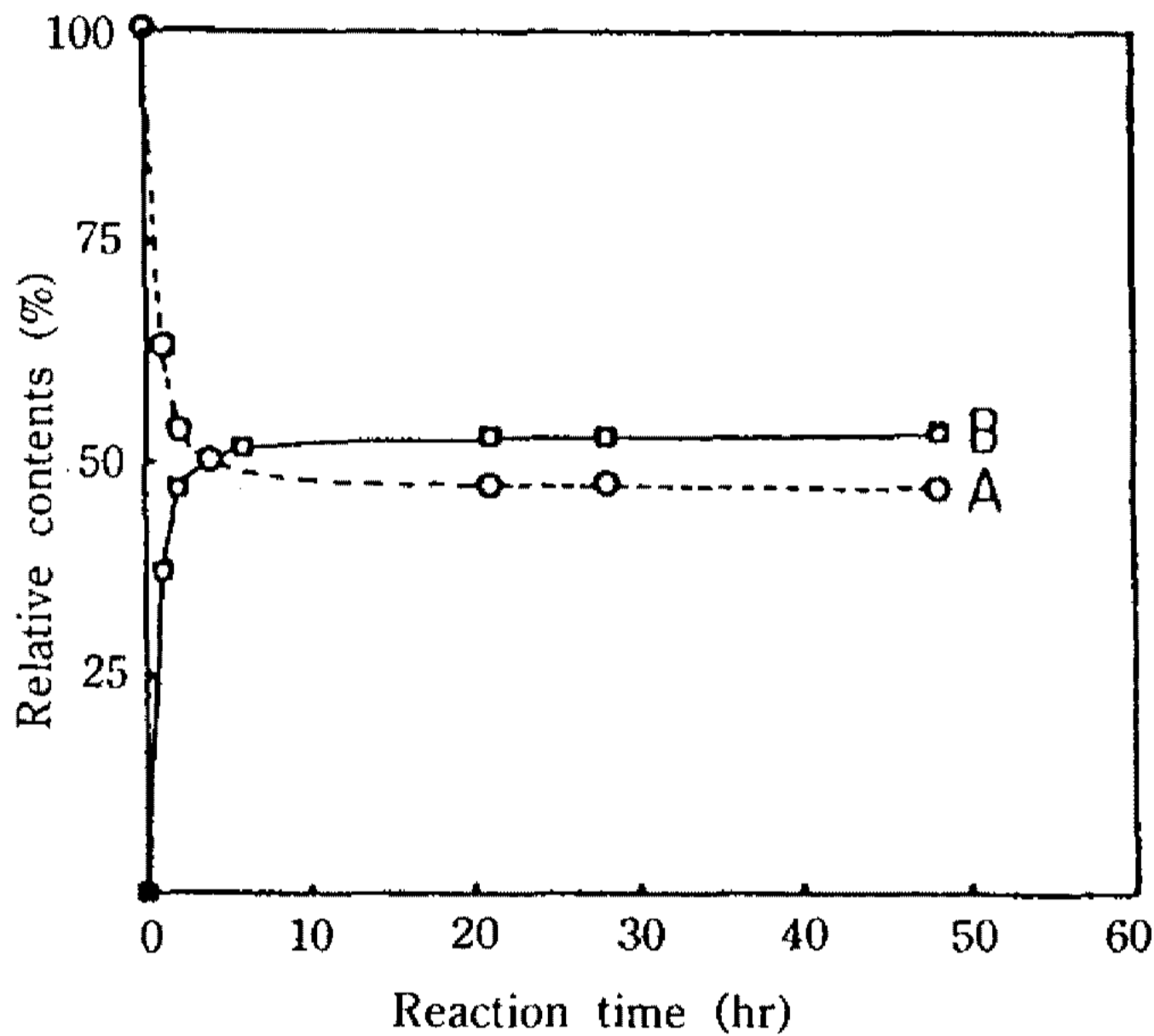


Fig. 1. Reaction equilibrium of glucose isomerase from *Streptomyces* sp. TH34 using 40% glucose solution. A. Glucose, B: Fructose.

Table 2. Utilization of carbohydrates by *Streptomyces* sp. TH34 and the known species of the genus *Streptomyces*

	<i>S. luteogriseus</i>	<i>S. neyagawaensis</i>	<i>Streptomyces</i> sp. TH34
Spore color	Gray	Gray	Gray
Spore chain morphology	spiral	spiral & RA**	spiral
Melanin pigment	+	+	+
Spore surface	smooth	smooth	smooth
Utilization of carbohydrates			
Glucose	+	+	+
Xylose	+	+	+
Arabinose	+	+	+
Rhamnose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Raffinose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Inositol	+	+	+
Salicin	+	+	+
Sucrose	+	+	+

*+: Positive, -: Negative

**RA Stands for Retinaculiaperti (looped, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. IV)

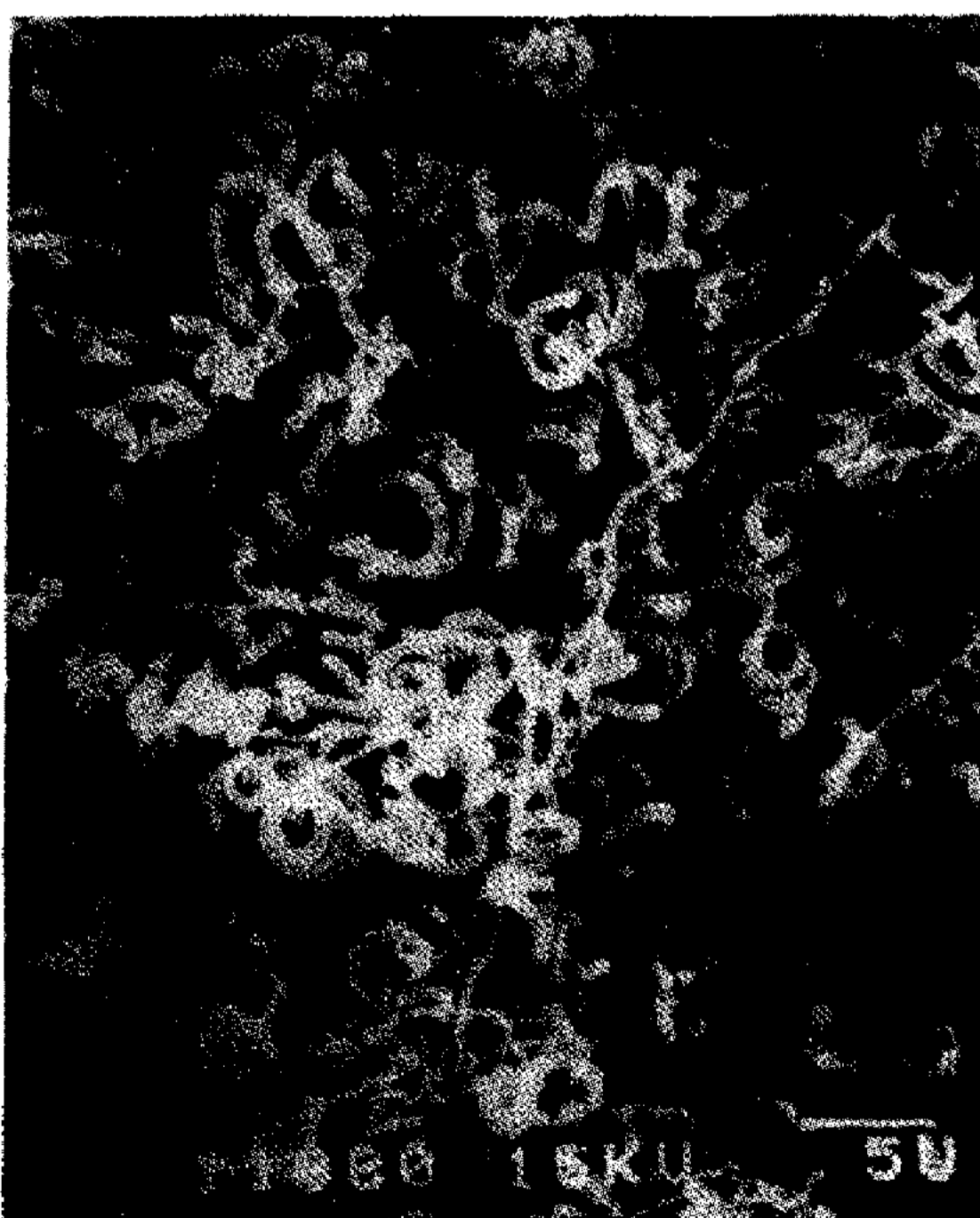


Fig. 2. Scanning electron microscopes of *S. luteogriseus* TH34 spores.

***Streptomyces luteogriseus* TH34의 발효 최적 조건**

온도 및 pH : 최적 배양온도를 결정하기 위해서 일반적으로 방선균의 생육이 왕성한 온도인 25, 27, 30, 33°C 및 35°C에서 효소생산을 위한 최적온도를 확인하였는 바 Fig. 3에서와 같이 27~30°C에서 최적온도를 보였다.

또한 glucose isomerase 생산에 미치는 초기 pH의

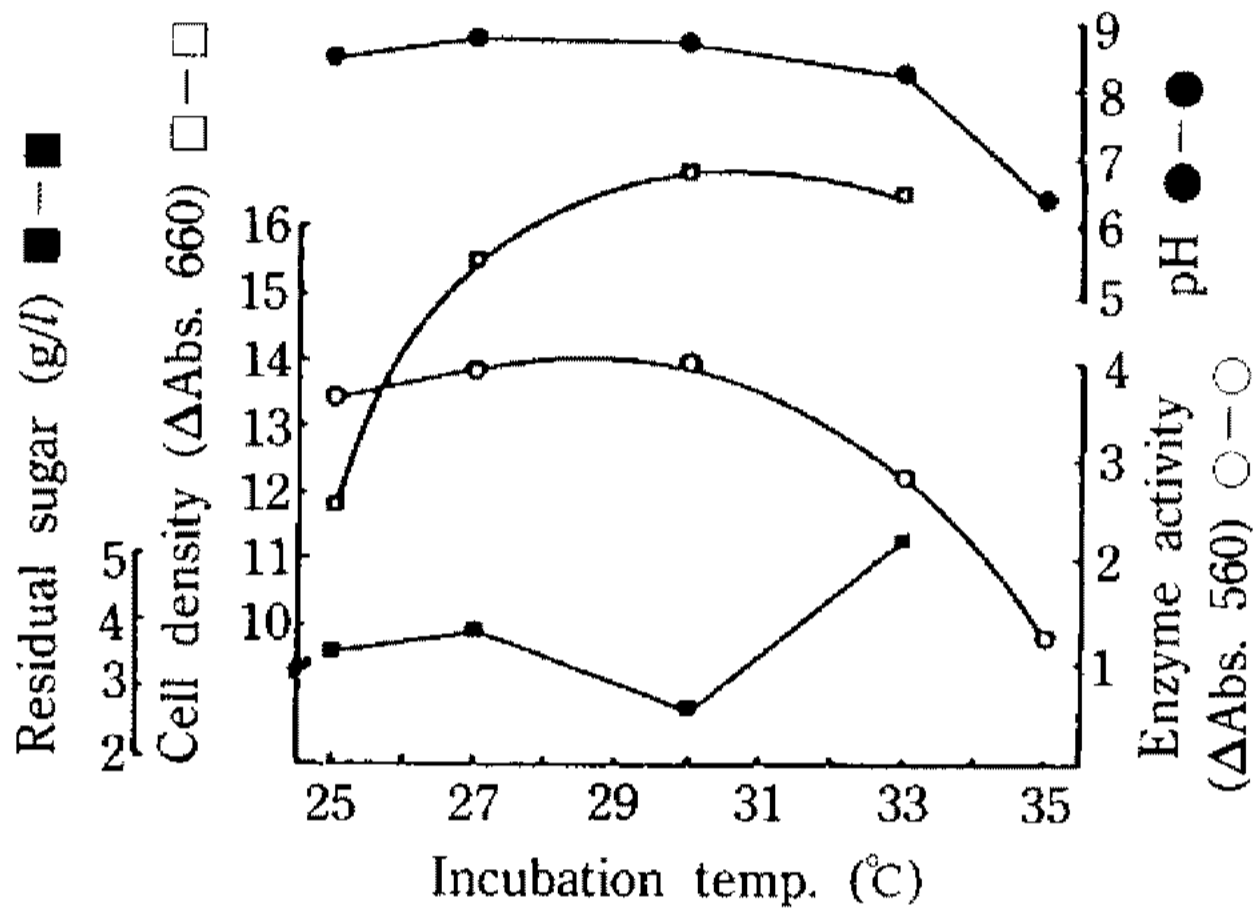


Fig. 3. Effect of temperature on glucose isomerase production by *S. luteogriseus* TH34.
Fermentation conditions: pH 7.2, 200 rpm, 4 days.

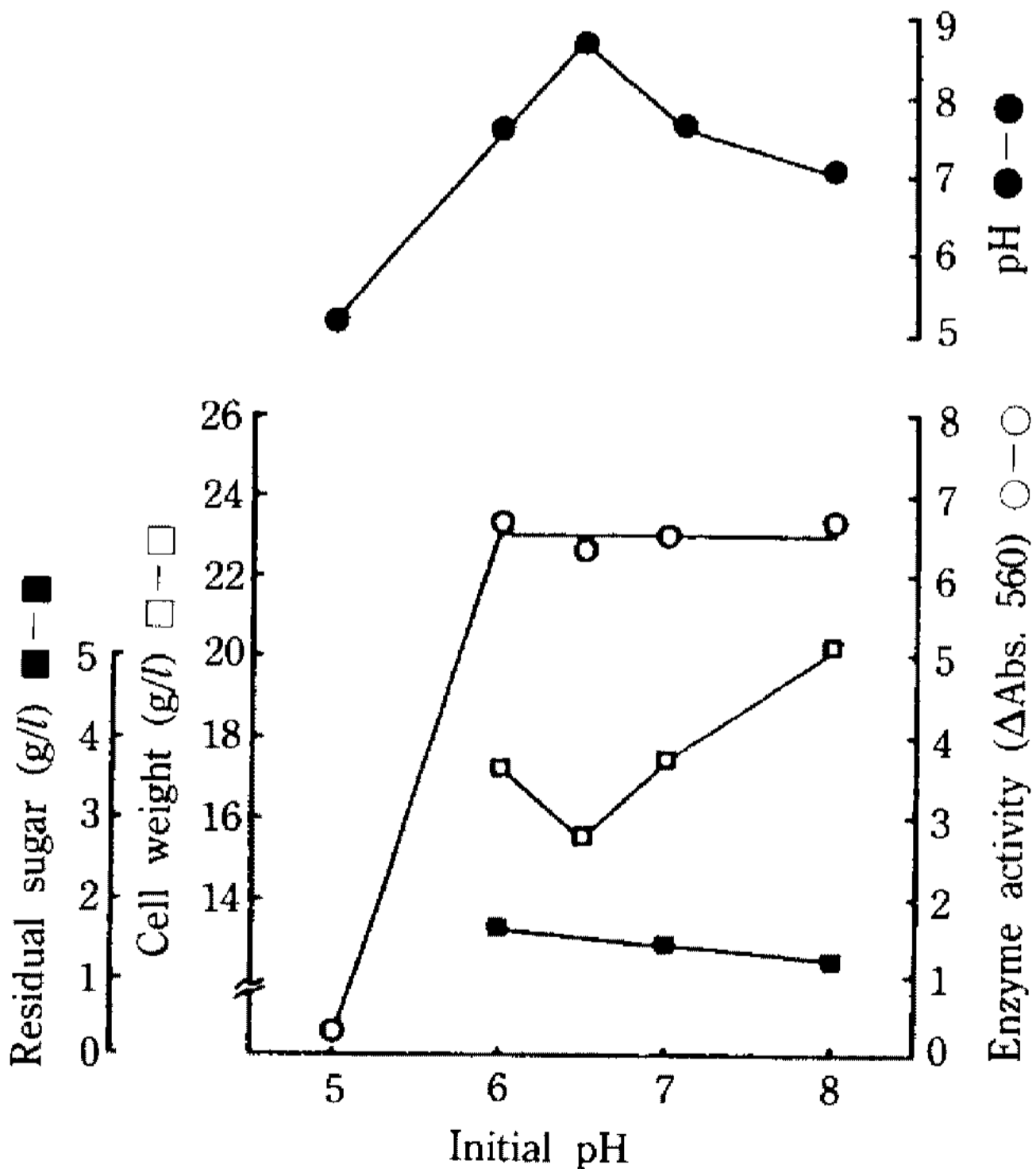


Fig. 4. Effect of initial pH on glucose isomerase production by *S. luteogriseus* TH34.
Fermentation conditions: 330°C, 200 rpm, 4 days.

영향을 알아보기 위하여 배양 중 pH 조절없이 flask에서 배양초기 pH를 5.0에서 8.0까지 변화시켜 96시간 후의 효소생산량을 비교한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 pH 6.0 내지 8.0의 넓은 범위에서 최대 효소생산량을 보였다.

생육곡선 : 이와 같이 결정된 배양조건에서 배양시간 및 탄소원의 이용률 등을 검토하기 위하여 seed 배지에 한 백금니와 효소생산용 배지에 10%를 접종하여 30°C, 200 rpm의 조건으로 flask에서 배양한 결과는 Fig. 5, 6에서와 같았다. 즉 seed의 경우 28시간 배양 후 cell growth가 stationary phase로 들어가며 잔존당은 28시간까지 급격히 감소하다가 그 후 서서히 감소하여 48시간 경과 후에는 잔존당이 0.2 g/l로 되었다. 따라서 seed는 대체로 24시간 배양 후 사용하는 것이 적당한 것으로 생각되고 효소생산용 배양의 경우에는 24시간 이후에 stationary phase가 시작되며 잔존당은 대수기가 시작되는 10시간부터 감소하여 48

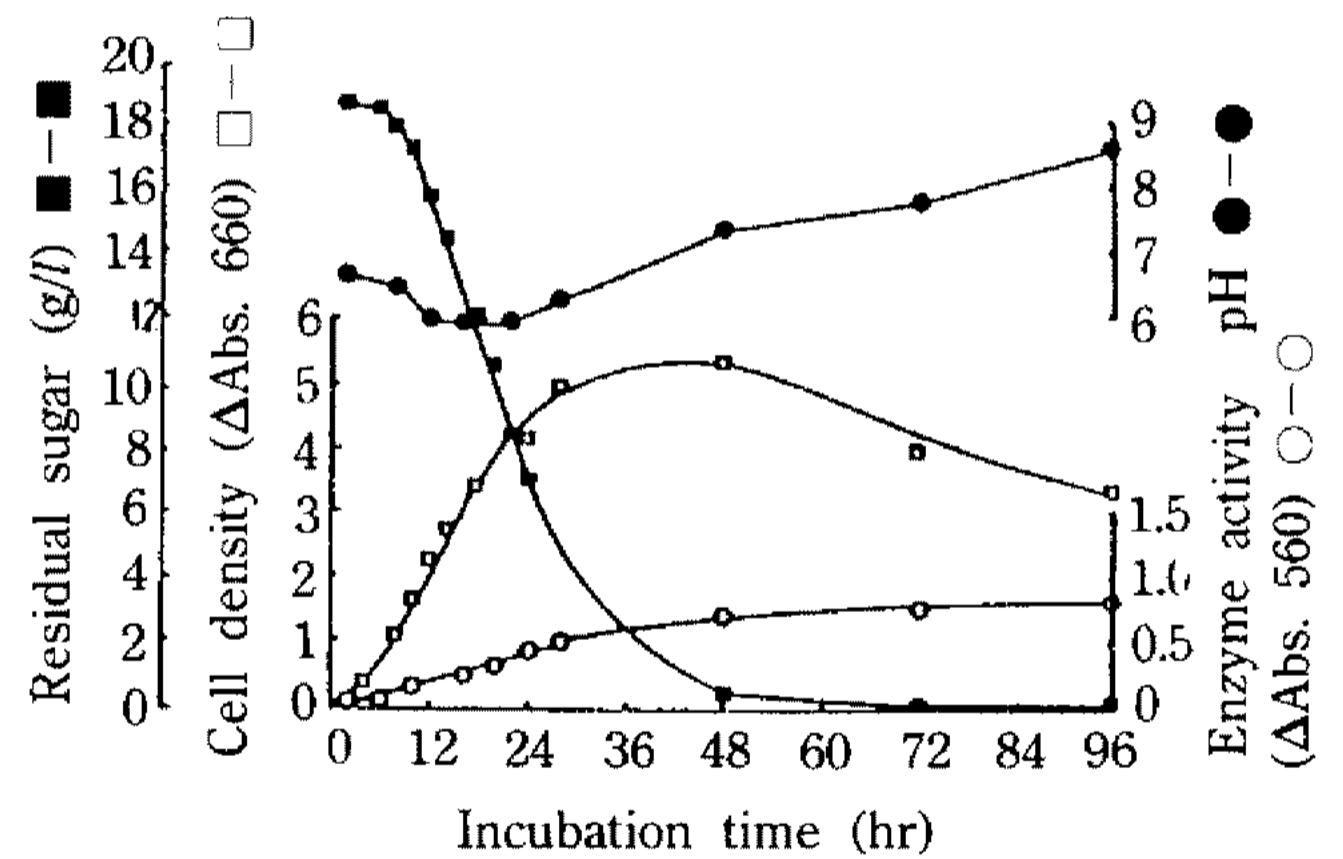


Fig. 5. Growth curve of *S. luteogriseus* TH34 in seed culture medium.

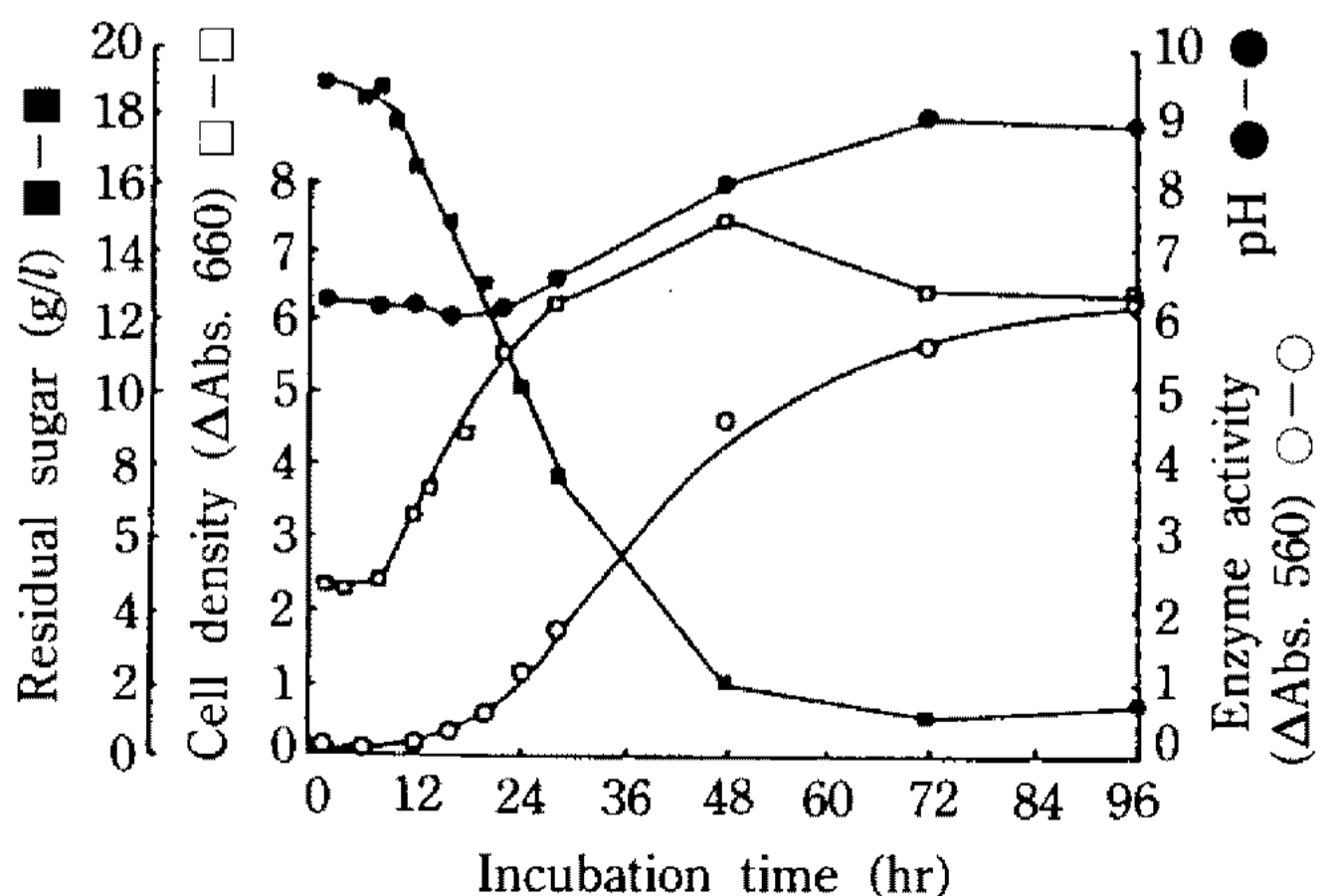


Fig. 6. Growth curve of *S. luteogriseus* TH34 in production culture medium.

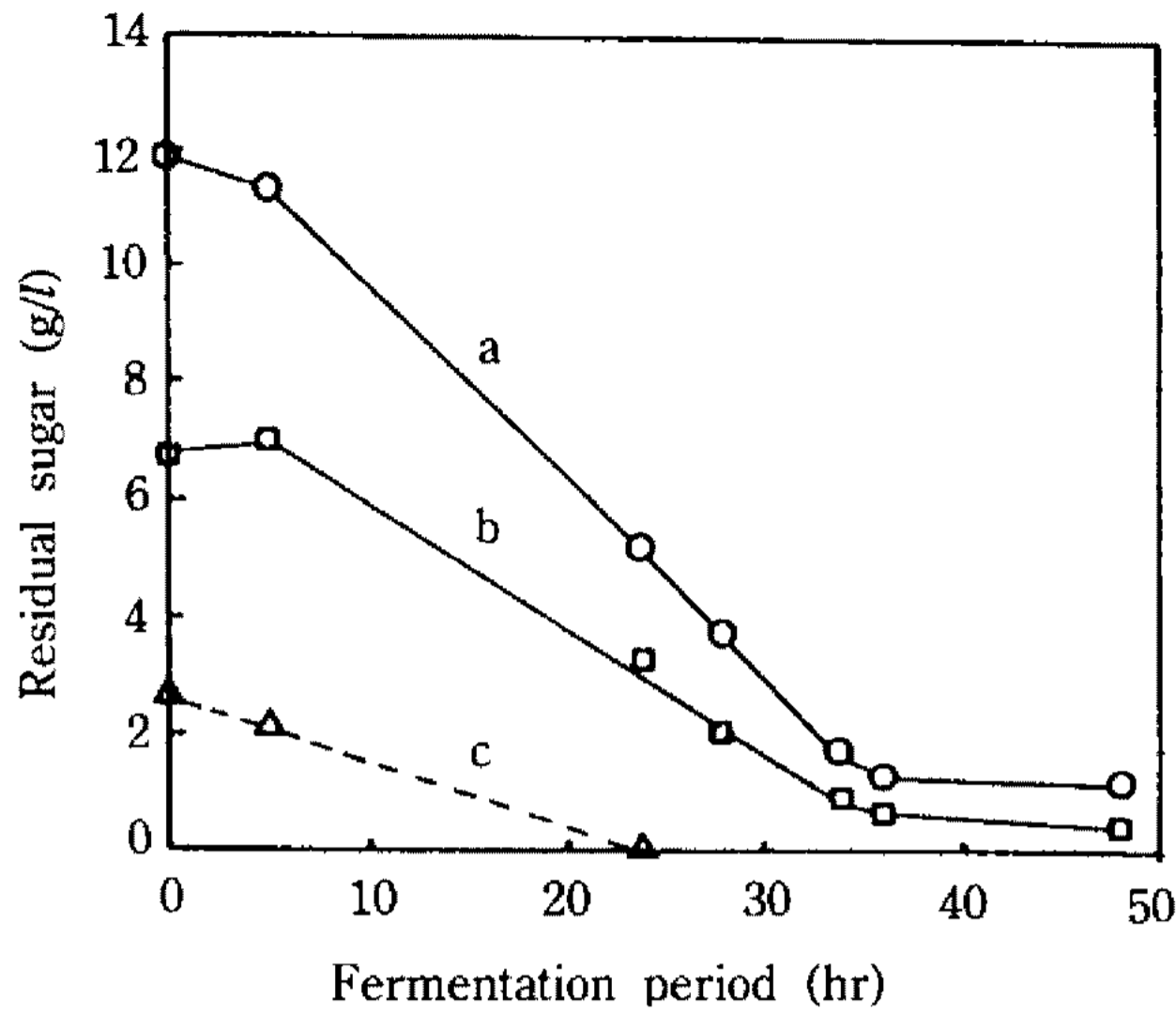


Fig. 7. Profile of residual sugars during glucose isomerase production by *S. luteogriseus* TH34.
a: total sugar, b: xylose, c: glucose

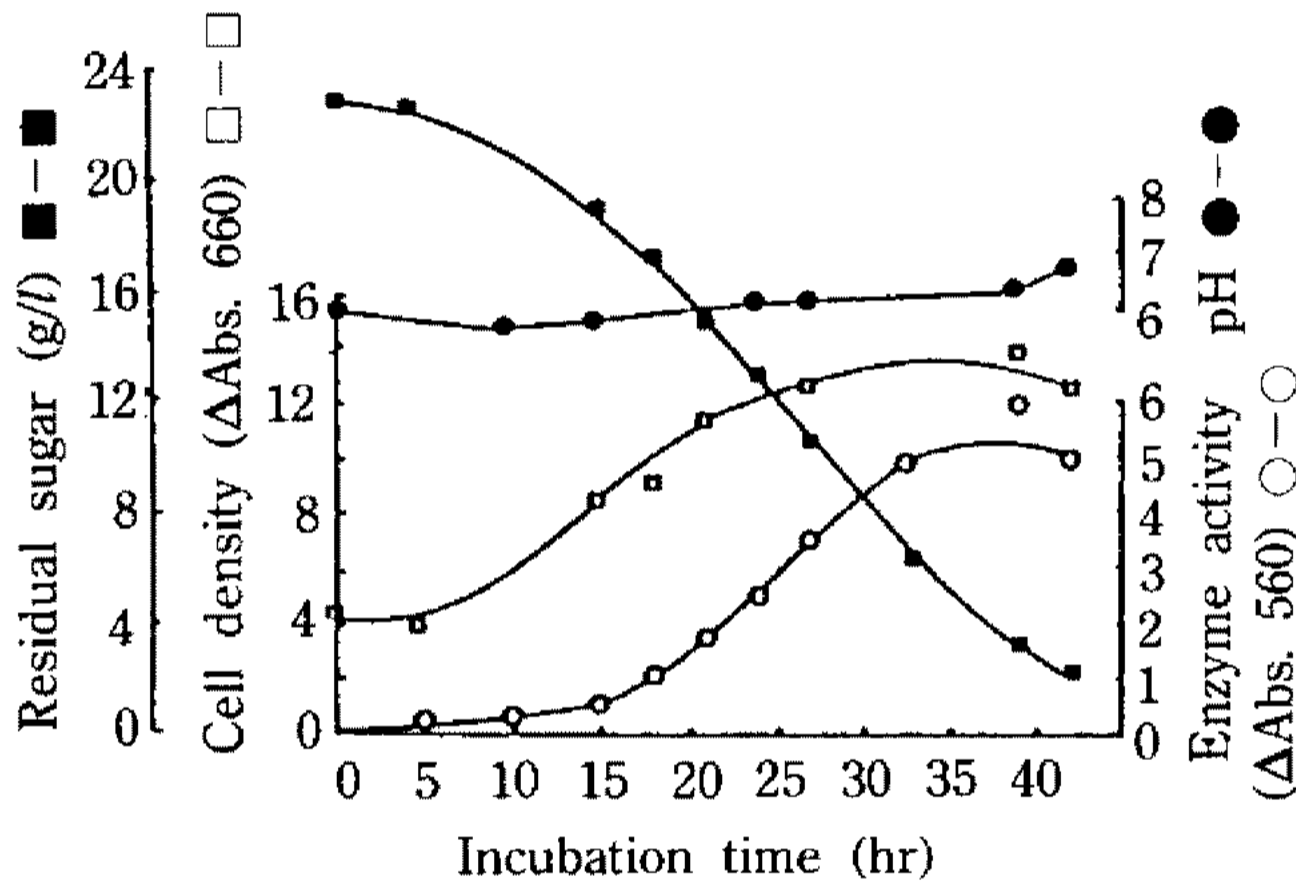


Fig. 8. Growth curve of *S. luteogriseus* TH34 in 3l production culture medium using 5l jar fermentor. Fermentation conditions: 400 rpm. and 1 vvm.

시간 이후 완전히 감소하는데 당이 완전히 소모된 후에도 효소생산은 계속되어 4일 경과 후 효소생산량이 최대가 되는 Mixed type의 growth pattern을 보였다. Fig. 7에서 보면 배지 중의 잔존당은 24시간 이후 포도당의 완전히 소멸되며 40시간 경에 xylose가 검출되지 않았다. 즉 발효를 시작한지 5시간까지 포도당이 선택적으로 이용되고 균체가 활성화되어 대수기가 시작된 이후 xylose의 이용속도가 빨라졌다. 즉 배지 중에 glucose와 xylose를 적당한 비율로 혼합하여 탄소원으로 이용한다면 효율적으로 효소를 생산할 수 있을 것으로 생각된다. 5l jar fermentor에 3l의 배지를 넣고 초기 pH 6.2, 30°C에서 배양한 결과 Fig. 8에서와 같이 30~35시간에서 효소활성이 최대에

Table 3. Effect of various carbon sources on fermentation yield of glucose isomerase

C-sources	pH	Residual sugar (g/l)	Cell density (ΔAbs. 660 nm)	Enzyme activity (ΔAbs. 560 nm)
Xylose	7.89	1.96	12.54	3.97
Glucose	9.01	1.18	13.87	0.92
Sucrose	9.15	—	11.76	1.00
Soluble starch	8.85	—	12.34	0.56
Fructose	8.97	0.81	12.80	1.09
Galactose	9.08	3.99	13.10	1.61
Maltose	8.58	—	9.83	1.40
Mannose	8.23	7.85	12.85	1.40
Arabinose	7.79	2.60	13.14	0.84
Lactose	8.33	—	8.47	0.94
Rhamnose	8.16	—	13.05	0.63
Inositol	8.47	—	8.95	0.88
Mannitol	8.26	—	13.66	0.83
Glycerol	8.31	—	11.06	0.45

Composition of basal medium: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.024%, CSL 1.5% (as protein content), Initial pH 6.0~6.2, 30°C, 4 days, 200 rpm, 20 ml medium in 500 ml Erlenmeyer flask, C-source 3.0%.

도달하며 그 이후 급격히 역가가 감소하며 cell growth는 24시간에 stationary phase에 도달하였다. Mass spectrometer를 이용하여 배양기에서 배출되는 가스를 분석한 결과 통기량이 1 vvm일 때 cell growth가 대수기로 들어가면서 CO_2 , ethanol, acetate가 소량 생성되었으나 2 vvm일 때에는 ethanol과 acetate가 생성되지 않았는데 1 vvm의 경우 균체 성장이 활발해지면서 산소부족에 의해 TCA cycle이 활발히 진행되지 못하므로 glycolysis에서 생긴 pyruvic acid의 일부가 alcoholic fermentation으로 진행된 것으로 생각되므로 통기량을 늘리는 것이 좋을 것으로 사료된다. 이때 배양액의 효소역가는 10% 상승하였다.

배지 조성: 1) 탄소원—*S. luteogriseus* TH34의 탄소원을 검토하기 위하여 옥수수 침지수(선일포도당(주) 제품) 7.5%를 질소원으로 하여 3.0%의 농도로 첨가하였을 때 Table 3에서와 같이 xylose>galactose>mannose>maltose의 순서로 효소생산성이 우수하였으며 glucose와 sucrose는 maltose보다 효율이 낮았다. Glucose를 첨가했을 때에는 균체성장이 왕성하였고 xylose는 효소의 유도제(inducer)로서 효소생산을 촉진하였다. Glucose와 xylose를 적당한 비

Table 4. Effect of organic nitrogen sources on glucose isomerase production by *S. luteogriseus* TH34

Organic nitrogen sources	Enz. act. (Δ Abs. 560)
Polypeptone	2.72
Beef extract	1.20
Yeast extract	3.55
Soytone	1.64
CSL	4.35

율로 혼합할 때 균체의 성장과 함께 효소의 생산량을 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다. Xylose를 단독으로 첨가했을 때에는 3.0%에서 최대활성에 도달하며 그 이후 감소하였고 glucose 0.4% 존재하에 xylose를 첨가했을 때에도 xylose 3.0%에서 최대활성을 나타내었다. 또한 저농도의 xylose(3% 이하)에서 glucose를 첨가했을 때 glucose 부재시보다 높은 효소 생산성을 보였으며 최적농도인 xylose 3%에서의 효소생산성은 glucose 0.4% 존재시에는 45% 증가하였는데 이는 glucose에 의해 균체 성장이 일부 진행된 후 xylose에 의해 induction되는 것으로 Fig. 7에서와 같이 초기에 glucose가 선택적으로 소모되고 5시간 이후 즉 균체의 대수증식기가 시작되면서 xylose와 glucose가 동시에 이용되는 사실과 일치하고 있다. 즉 glucose에 의해 성장한 균체에 xylose가 유도물질로 작용하므로서 xylose에 대한 효소생산수율($Y_{P/S}$)이 향상된 것으로 생각된다.

2) 질소원-무기질소원은 효과가 확인되지 않았으며 유기질소원 첨가실험은 xylose 3.0%, glucose 0.8%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05% 존재하는 배지에 각 유기질소원을 2.0% 농도로 첨가하여 효소생산능력을 평가하였는 바 CSL이 가장 효과적이었다 (Table 4). 이밖에 yeast extract, polypeptone 등도 우수하였다. CSL 농도별로 효소생산성을 비교하였을 때에는 단백질 함량으로 1.5%에서 효소생산성이 가장 우수하였다.

3) 금속이온-xylose 3.0%, glucose 0.8%, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.024% 및 CSL 1.5%(단백질 함량기준)의 배지조성에 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 0.05%에서 0.5% 사이의 농도로 첨가하였을 때 Table 5에서 볼 수 있는 바와 같이 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 첨가시에 효소생산성이 최대값을 보였으며 그 이상의 농도에서는 강한 저해작용이 나타났다. Suekane 등(7, 28)은 0.1% $MgSO_4 \cdot 7$

Table 5. Effect of magnesium and cobalt ion concentration on enzyme production by *S. luteogriseus* TH34

% Cell density (Δ Abs. 660)		Enz. Act. (Δ Abs. 560)	
Mg^{2+}	0	9.2	6.5
	0.05	—	6.9
	0.1	8.8	7.6
	0.15	10.7	6.4
	0.2	9.5	6.0
	0.3	9.1	6.1
	0.5	8.1	5.4
Co^{2+}	0	9.5	5.2
	0.02	11.1	7.7
	0.03	—	7.8
	0.04	11.1	7.9
	0.05	10.7	8.3
	0.07	10.8	8.1
	0.1	8.1	8.0

H_2O 가 효소생산에 최적이라고 하였는데 이는 본 연구와 유사한 결과이었다. 또한 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 0.01%에서 0.1% 사이의 농도로 첨가하여 배양시켰을 때 Table 5에서 보는 바와 같이 0.05% $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 첨가하였을 때 최고의 효소생산성을 보였으며 Co^{2+} 이온은 고농도에서의 저해작용을 보이지 않았다.

요 약

소나무 숲 토양에서 방선균을 666주 선별한 후 이중 glucose isomerase 생산성이 우수하고(488 U/ml) 40% 포도당액의 이성화율이 53%에 도달하는 TH34 균주를 선별하였다. 이 균주는 세포벽을 구성하는 diaminopimelic acid(DAP), 기균사의 색깔, spiral type의 spore 사슬의 형태, melanoid 색소형성, 탄수화물 이용성 및 전자현미경 사진 등으로 미루어 보아 *Streptomyces luteogriseus*로 동정하였다.

분리 동정한 *S. luteogriseus*의 발효조건 및 배지조성 등을 검토하여 본 결과 28~29°C에서 효소생산이 최대이었으며 pH 6.0~8.0의 넓은 범위에서 안정한 효소생산을 보였다. Flask 배양에서는 4일 경과 후 효소역가가 최대값을 나타내었고 5l jar fermentor에서는 30~35 hr 이후 최고 효소역가를 보였다. 한편 탄소원으로는 xylose가 가장 효과적이었으나 단독으

로 사용하는 것보다 glucose와 혼합사용시 효율이 향상되었다. 질소원은 옥수수 침지수 농축액이 가장 좋았으며 7.5%에서 효소생산성이 가장 높았고 Mg^{2+} 0.1%, Co^{2+} 0.05%가 최적이었다.

참고문헌

- Makkee, M., A.P.G. Kieboom and H. Van Bekkum: *Starch*, **37**, 232 (1985)
- Marshall, R.O. and E.R. Kooi: *Science*, **125**, 648 (1957)
- Volkova, L.P. and V.P. Piskunov: *Microbiologia*, **41**, 29 (1972)
- Bachman, S., L. Gebicka and Z. Gasyna: *Starch*, **33**, 63 (1981)
- Shieth, K.K. *et al.*: *U.S. Patent*, 3,813,320 (1974)
- Standard Brands Inc.: *Netherland Patent*, 7,406,146 (1975)
- Suekane M. *et al.*: *U.S. Patent*, 3,826,714 (1974)
- Lee, C.K.: *U.S. Patent*, 4,061,539 (1977)
- Ichimura, M: *J. Agri. Chem. Soc. (Japan)*, **39**, 291 (1965)
- Kelly, J.M. and J.C. Meers: *German Patent*, 2,513,903 (1974)
- Weetall, H.H.: *Food Product Development*, April, 46 (1973)
- Horwath, R. *et al.*: *German Patent*, 2,247,922 (1973)
- Sato, M. and K. Tanaka: *Japanese Patent*, 74-101,586 (1974)
- Nonomura, H. and K. Kaji: *Japanese Patent*, 74-14,684 (1974)
- Antrim, R.L. and A.L. Auterinen: *Starch*, **38**, 132 (1986)
- Weidenbach, G., D. Bonse and G. Richter: *Starch*, **36**, 412 (1984)
- Joggensen, O.B. *et al.*: *Starch*, **40**, 307 (1988)
- Outtrup, H.O.: *U.S. Patent*, 3,979,261 (1976)
- Diers, I.V.: *U.W. Patent*, 4,042,460 (1977)
- Hunter-Cevera, J.C., M.E. Fonda and Angela Belt: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, (Demain, A.L. *et al.*, eds.) ASM, Vol. **3**, 23 (1986)
- Takasaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 1247 (1966)
- Dische, Z. and E. Borenfreund: *J. Biol. Chem.*, **192**, 583 (1951)
- Becker, B., M.P. Lechevalier, R.E. Gordon and H.A. Lechevalier: *Appl. Microbiol.*, **12**, 421 (1964)
- Lechevalier, M.P. and H.A. Lechevalier: *Actinomycete Taxonomy*, (Deitz, A. and D.W. Thayer eds.) Society for Industrial Microbiology, Arlington, VA, SIM special Publication No. **5**, 225 (1981)
- Gordon, R.E. S.K. Mishra and D.A. Barnett: *J. General Microbiol.*, **109**, 69 (1978)
- Suh, H.J., J.M. Kim, T.K. Lee and H.C. Yang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 198 (1989)
- Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Vol. **4**, 2451 (1986)
- Kasumi, T. and N. Tsumura: *Starch*, **31**, 25 (1979)

(Received May 13, 1991)