

Streptomyces luteogriseus TH34가 생산하는 Glucose Isomerase의 특성

홍승서 · 백진기 · 이현수 · 국승욱¹ · 박관화^{1*}

선일포도당(주) 기술연구소, ¹서울대학교 식품공학과

The Properties of Glucose Isomerase Produced by *Streptomyces luteogriseus* TH34

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 — The enzymes were immobilized by treating the microbial cells in 0.05% chitosan and 0.28% glutaraldehyde solution. The activity of immobilized cell was about 535 IGIC/g. Glucose isomerase was purified by 6.5 times after homogenization using 60% (NH₄)₂SO₄ fractionation, DEAE-cellulose and Sephadex G-150 gel filtration. The molecular weight of enzyme was about 140,000 when it was measured by HPLC and the purified enzyme had only one band by electrophoresis. It showed good enzyme activity at pH 7.5 and 75°C. The optimum conditions for enzyme reactions were shifted to pH 7.0 and 80°C when the enzyme was immobilized. The enzyme reaction was activated by the addition of 5~10 mM magnesium ion and the thermostability was improved by the addition of 0.25 mM cobalt ion. The enzyme activity was competitively inhibited by sugar alcohols.

Glucose isomerase는 전분공업에서 널리 이용되는 효소이며 기질의 분자량이 작아서(glucose) 고정화 담체 및 균체 내부로의 이동이 용이하기 때문에 다양한 고정화방법이 개발되어 특허화 되었다. 물론 그 중에서 산업화된 예는 몇가지에 불과한데 특히 덴마크의 NOVO사(1), 다국적의 Gist-Brocades사, 미구기의 CPC, SOLVAY사 및 일본의 Nagase 등이 대표적인 Glucose isomerase 제조회사들이다. 이 중에는 Takasaki 등의 개발한 열처리(heat fixation) 방법(2)이 있고 Glutaraldehyde로 cross-linking시키는 방법(34) 외에도 collagen 흡착법(3), Gelatin 포괄법(5) 등 다양한 방법이 있다. 최근 들어 필란드의 Finnsugar(Cultur)사에서는 *S. rubiginosus*를 효소원으로 하고 DEAE-Cellulose, Polystyrene 및 titania를 이

용하여 고정화시키므로써 역가가 감소하면 액상효소로 재생시켜 사용하는 방법을 개발하여 효소의 사용 원가를 낮추었다(6-8).

주요 미생물로부터 분리한 glucose isomerase의 특성은 일반적으로 분자량이 165,000 내지 191,000으로 유사하며 4개의 동일한 subunits로 구성되어 있다. 대부분 효소의 최적온도는 65°C 이상이며(9, 10) 최적 pH는 넓은 범위를 보인다.

본 연구에서는 *S. luteogriseus*를 균체로 고정화하고 효소를 분리, 정제하여 특성을 비교하였으므로 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

미생물 및 배지

토양으로부터 분리한 *Streptomyces luteogriseus* TH 34(11)를 대상으로 xylose 3.0%, Glucose 0.5%,

Key words: Glucose isomerase, *Streptomyces luteogriseus*

*Corresponding author

MgSO₄·7H₂O 0.1%, CoCl₂·6H₂O 0.05% 그리고 CSL 7.5%의 조성을 가진 배지를 사용하였다. 이때 pH는 7.2로 조정하였고 30°C에서 배양하였다.

Glucose isomerase 역가

Takasaki의 방법(12)을 변형시켜 사용했다. 즉 0.02 M magnesium ion 존재하에 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)로 만든 7.2% glucose 용액을 기질로 하여 기질 1 ml에 증류수 0.8 ml와 효소용액을 0.2 ml를 첨가한 다음 70°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이때 효소원으로는 액상효소의 경우 희석하여 사용하였고 고정화 세포의 0.01g을 증류수 0.2 ml와 함께 첨가하여 반응을 중지시키고 생성된 fructose를 Cysteine-carbazole법(13)으로 정량하였다. 효소역가 1 unit는 주어진 조건하에서 1분 동안에 fructose 1 μmole을 생산하는 효소량으로 정의하였다.

단백질 정량

효소분리시의 각 분획은 spectrophotometric method에 의해 다음 식으로 정량하였다(14). 그리고 효소용액의 정확한 단백질 함량은 Lowry 등의

$$\text{Protein (mg/ml)} = 1.55(\text{Abs. } 280) - 0.76(\text{Abs. } 260)$$

방법(15)으로 정량하였으며 CSL과 같이 정제되지 않은 시료는 Kjeldahl 방법을 기계화시킨 자동분석 장치(Buchi사의 322 model Distillation Unit, Buchi 342)로 분석하였다.

열안정성

Hong(16)이 실시한 동일한 방법으로 측정하였는데 시험관에 완충용액을 넣고 예열시킨 후 효소액을 가하고 교반하면서 열불활성화를 시켰다. 일정시간 후

Table 1. Ammonium sulfate fractionation of glucose isomerase

Ammonium sulfate saturation	Protein Concentration of precipitate (mg/ml)	Activity (ΔAbs.)
40%	25.90	1.249
50%	3.43	1.728
60%	11.26	8.004
70%	16.63	7.874
80%	18.26	7.124

시료를 취해 얼음으로 미리 냉각시켜 놓은 시험관에 넣어 잔류역가를 측정하였다.

분자량 측정

DEAE-cellulose와 Sephadex G-150으로 정제한 효소의 분자량을 HPLC로 분석하였는데 분석조건은 다음과 같다.

Model : Shimadzu LC-6A

Column : Shimpak-Diol(7.9 mm×25 cm)

Mobile phase : 10 mM phosphate buffer(pH 6.9) containing 0.2 M sodium sulfate

Flow rate : 1 ml/min

Detector : UV detector(280 nm. 0.08 AUFS)

효소의 분리 및 정제

1. Step 1. Cell 파괴 및 autolysis : homogenizer (Fisher사, soniz demembrator, Model 300)을 이용하여 10 kc로 10분 처리 후 10분간 냉각하는 방식으로 12회 실시하였다. Glucose isomerase는 membrane-bound enzyme이므로 자체의 lytic enzyme을 이용하기 위하여 50°C에서 24시간 진탕배양시켜 autolysis를 실시하였는데 이때 autolysis를 돕기 위해 toluene 1%를 첨가하였다.

2. Step 2. (NH₄)₂SO₄ fractionation : Table 1에서와 같이 (NH₄)₂SO₄ 60% 포화시 침전물 중의 glucose isomerase 역가가 가장 높았으므로 60% (NH₄)₂SO₄를 이용하여 효소단백질을 회수하였다.

3. Step 3. DEAE-cellulose column chromatography : Table 2에서 보는 바와 같이 tris buffer는 효소의 활성을 현격히 저해하므로 0.05 M phosphate buffer(pH 6.0)를 사용했고 3×20 cm column에서 flow rate는 30 ml/hr로 했으며 NaCl 1.0 M gradient를 사용했다.

Table 2. Effect of buffers on the enzyme reaction obtained from isolated strain. Each buffers (0.4 M, pH 7.0) were used when the substrate was made

Sample	Phosphate buffer (A)	Tris-HCl buffer (B)	A/B ratio
Freeze Dried Cell	0.940 #	0.312	3.01
Immobilized Cell	4.520	2.890	1.56

: Unit is ΔAbs.

4. Step 4. sephadex G-150 gel filtration : 0.1 M NaCl을 함유하는 0.05 M phosphate buffer(pH 7.0)를 사용했고 2.5×90 cm column에 flow rate는 20 ml/hr로 했으며 각 분획 중 효소활성을 보이는 부분을 모아 부분 정제효소로 사용하였다.

5. Step 5. Electrophoresis : 분리, 정제한 효소의 정제도를 확인하기 위하여 효소단백질 60 ng/ μ l의 농도에서 SDS, β -mercaptoethanol 및 bromophenol blue를 첨가한 후 100°C에서 5분간 반응시켜 phast system(pharmacia)를 이용하여 분석하였으며 표준효소는 Sigma 제품인(phosphorylase b(M.W. 94,000), albumina(M.W. 67,000), ovalbumin(M.W. 43,000), carbonic anhydrase(M.W. 30,000), trypsin inhibitor (M.W. 20,000) 및 α -lactalbumin(M.W. 14,400)을 사용하였다.

세포고정화

배양액의 세포를 원심분리로 회수하여 냉동, 건조시킨 후 30g/l의 농도로 증류수에 재분산시키고 pH 조정 후 83°C에서 3분간 열처리하고 chitosan을 첨가하여 응집시켰다. 이 경우 chitosan을 증류수에 용해시킬 때 pH 4.3을 유지하기 위하여 acetic anhydride를 사용하였으며(17) 응결된 세포를 회수, 건조시키고 glutaraldehyde를 처리해 cross-linking 후 건조하여 고정화 세포로 사용하였다.

결과 및 고찰

세포 고정화

세포용액을 chitosan 용액과 같은 비율로 혼합하여 chitosan의 최종 농도가 0.001 내지 0.5%가 되도록 하였다. 이때, agglutination 상태를 육안으로 비교한

결과 0.05%에서 균체의 고정화 상태가 가장 좋았으며 고농도에서 침전상태가 불량한 것은 점성이 높아지므로 균체의 응집이 방해된 것으로 생각되며 Tsumura 등의 보고(17)와 유사한 결과를 보이고 있다. 이와 같이 제조한 효소를 기존의 상품효소와 비교하였는데(Table 3) chitosan만을 처리하였을 때에는 역가가 높았으나 glutaraldehyde를 동시에 처리했을 때에는 역가가 상당히 낮아졌다. 고정화된 효소 1g 당의 역가로 환산하면 약 535 IGIC/g의 역가를 보여 산업적으로 사용이 가능할 것으로 보였다.

효소의 분리 및 정제

균체에 증류수를 가하여 현탁액으로 만들어 107 kc에서 2시간 ultrasonication 처리한 후 1% toluene 존재하에 50°C에서 24시간 동안 autolysis시켜서 얻은 효소용액을 (NH₄)₂SO₄ fractionation, DEAE-cellulose anion exchange, Sephadex G-150 filtration으로 정제하고 Polyacrylamide gel electrophoresis로 정제도를 확인하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 6.3배 정제되었고 yield는 3.1%이었다. 40% (NH₄)₂SO₄ fractionation 후 침전물을 제거하고 60% (NH₄)₂SO₄

Table 3. Comparison of immobilized enzyme activities from *S. luteogriseus* TH34 and commercial enzyme

Sample	Activity (Δ Abs. 560)*	Relative activity (%)
Commercial enzyme (265 IGIC/g)**	0.750	100
Chitosan treated enzyme	3.262	435
Chitosan and glutaraldehyde treated enzyme	1.517	202

*Activity assay condition; 0.01g immobilized cells were subjected to react for 20 min. at 70°C

**IGIC/g means immobilized glucose isomerase column unit/g

Table 4. Summary of purification procedures for glucose isomerase from *Streptomyces luteogriseus* TH34

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific act. (U/mg protein)	Yield	Purification fold
Culture extract*	3842.40	153204.8	39.9	100	1
Ammonium sulfate fractionation	562.65	40871.0	90.7	33	2.3
DEAE-cellulose	155.50	32387.8	208.3	21	5.2
Sephadex G-150	18.90	4787.3	253.3	3.1	6.3

*Culture extract is the supernatant after autolysis

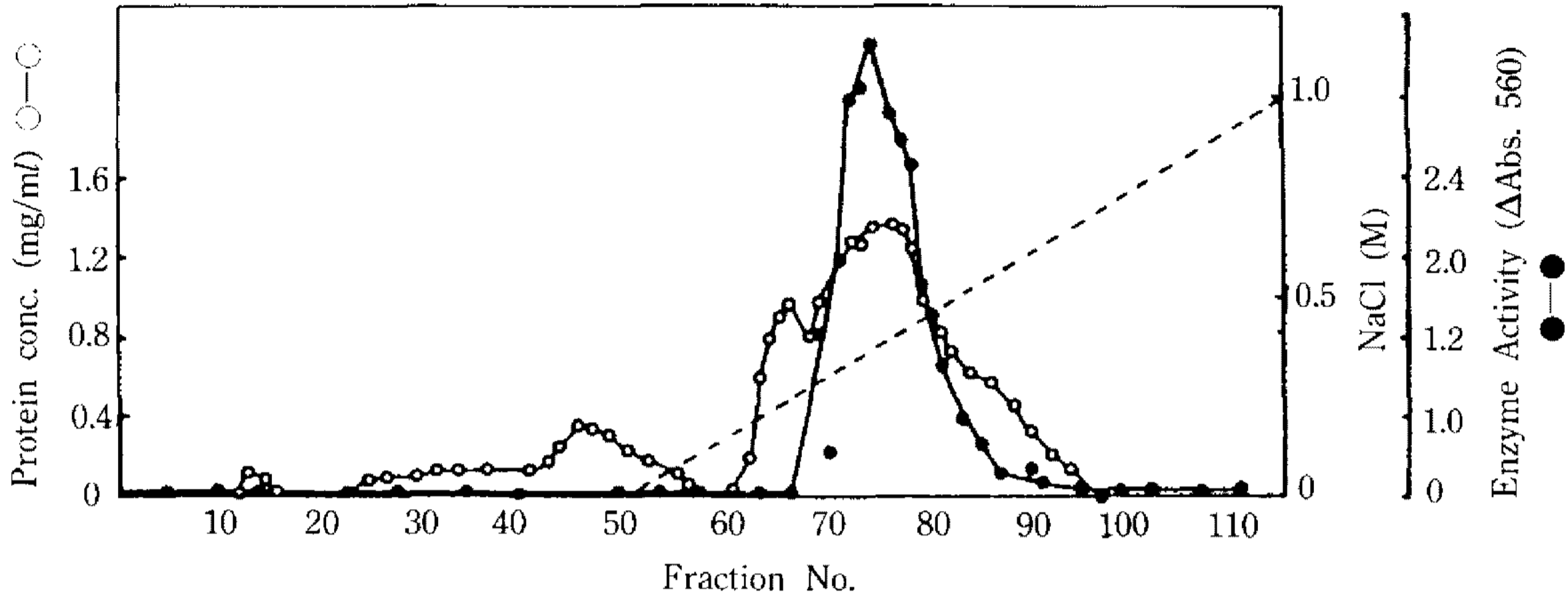


Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatogram of glucose isomerase from *S. luteogriseus* TH345. Flow rate: 50 ml/hr

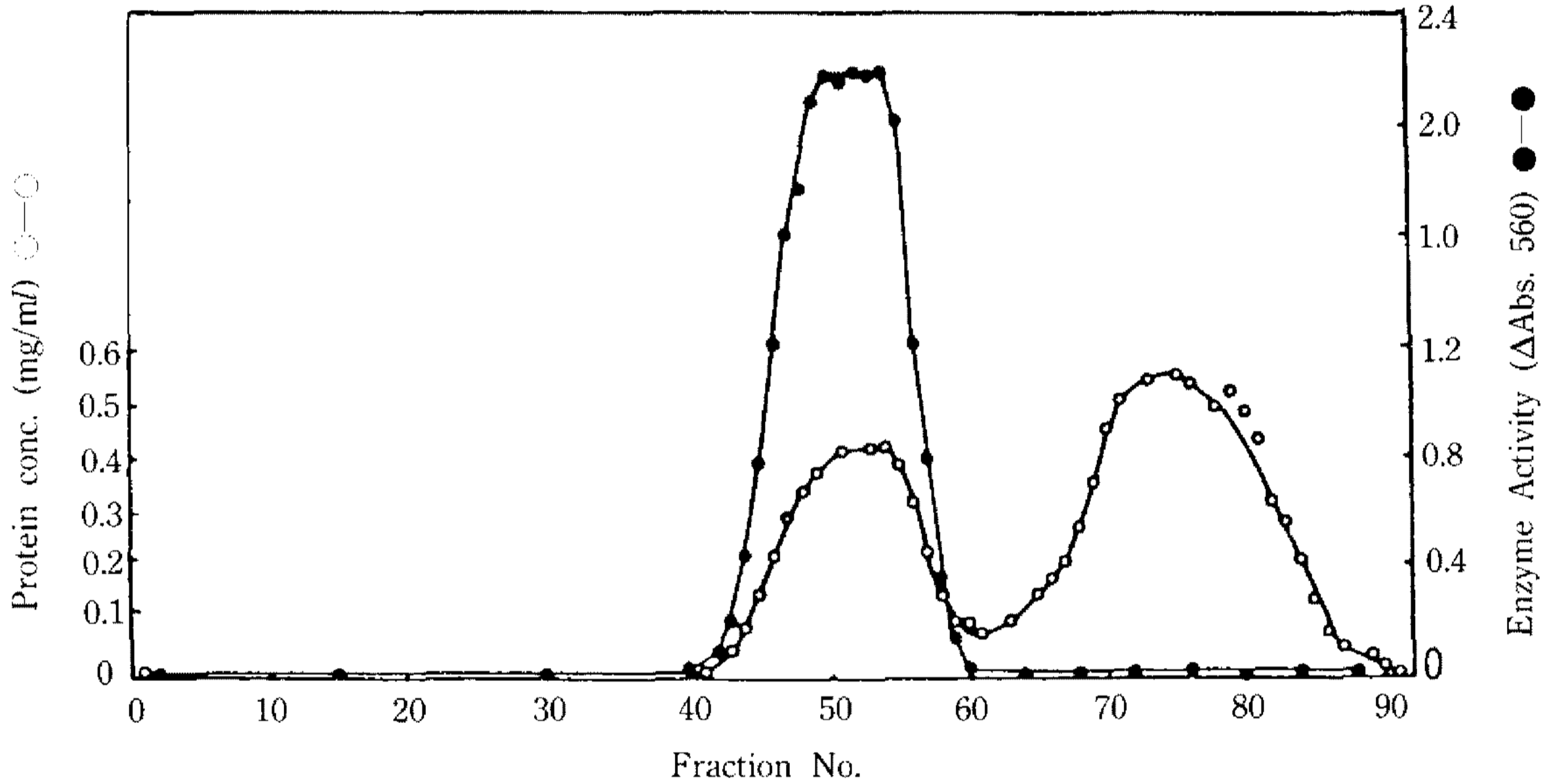


Fig. 2. Gel filtration of glucose isomerase from *S. luteogriseus* TH34 on Sephadex G-150. Column size: 2.5×90 cm, flow rate: 20 ml/hr.

fractionation으로 67% 역가가 상실되었고 2.3배 정제되었다. DEAE-column chromatography 결과(Fig. 1) 4개의 단백질 peak가 분획되었으며 이 중 NaCl 0.4 M 내지 0.5 M 사이에서 용출된 4번째 peak에서 효소활성이 나타났으며 5.2배 정제된 효소를 얻을 수 있었다. 또한 Sephadex G-150 filtration(Fig. 2)에 의해 6.3배 정제된 효소를 얻었다. 부분정제한 Glucose isomerase를 60 ng/μl 농도로 조정하고 SDS β-mercaptoethanol 및 bromophenol blue를 첨가하고 100°C에서 5분간 처리하여 Phast system(pharmacia)으로 전기영동한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 분자량 약 45,000의 단일 subunit로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 이는 변성된 subunit로 3차 구조시 분자량이 작아질 것으로 사료된다.

효소특성

분자량 : HPLC(Shimadzu LC-6a Model, Shim-pak-Diol column)를 이용하여 분자량을 측정된 결과(Fig. 4) 140,000 정도로 추정되었다. 전기영동시에 분자량이 45,000 정도인 것으로 나타난 것으로 미루어 보아 이는 4개의 subunit로 구성된 것으로 생각된다. 전기영동의 결과와 분자량이 차이를 보이는 것은 변성에 의한 것으로 사료된다. Takasaki 등(18)은 *S. albus*로부터 분자량 165,000인 효소를 분리하였고 Yamanaka 등(19, 20)은 *Lactobacillus* 등에서 분자량이 180,000 내지 191,000인 효소를 분리하였는 바 본 효소는 이들보다 약간 작은 것으로 보인다.

작용 최적온도 및 열안정성 : 각 온도에서 1시간 반응시킨 후 생성된 fructose를 정량한 결과는 Fig. 5

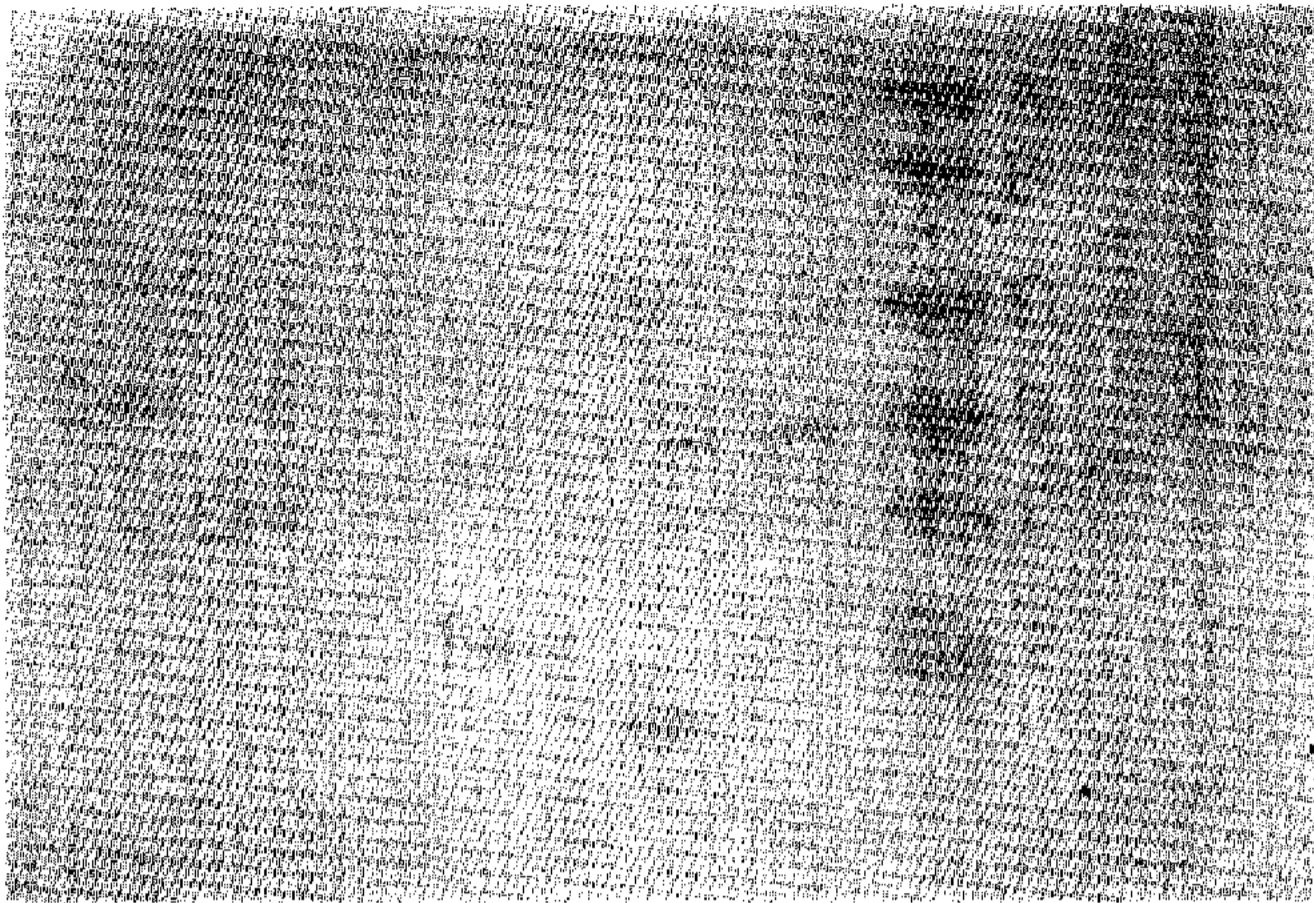


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of partially purified glucose isomerase treated with β -mercaptoethanol and SDS.

Reference proteins: A. α -lactoalbumin (14,400), B. trypsin inhibitor (20,000), C. carbonic anhydrase (30,000), D. ovalbumin (43,000), E. albumin (67,000) and F. phosphorylase b (94,000).

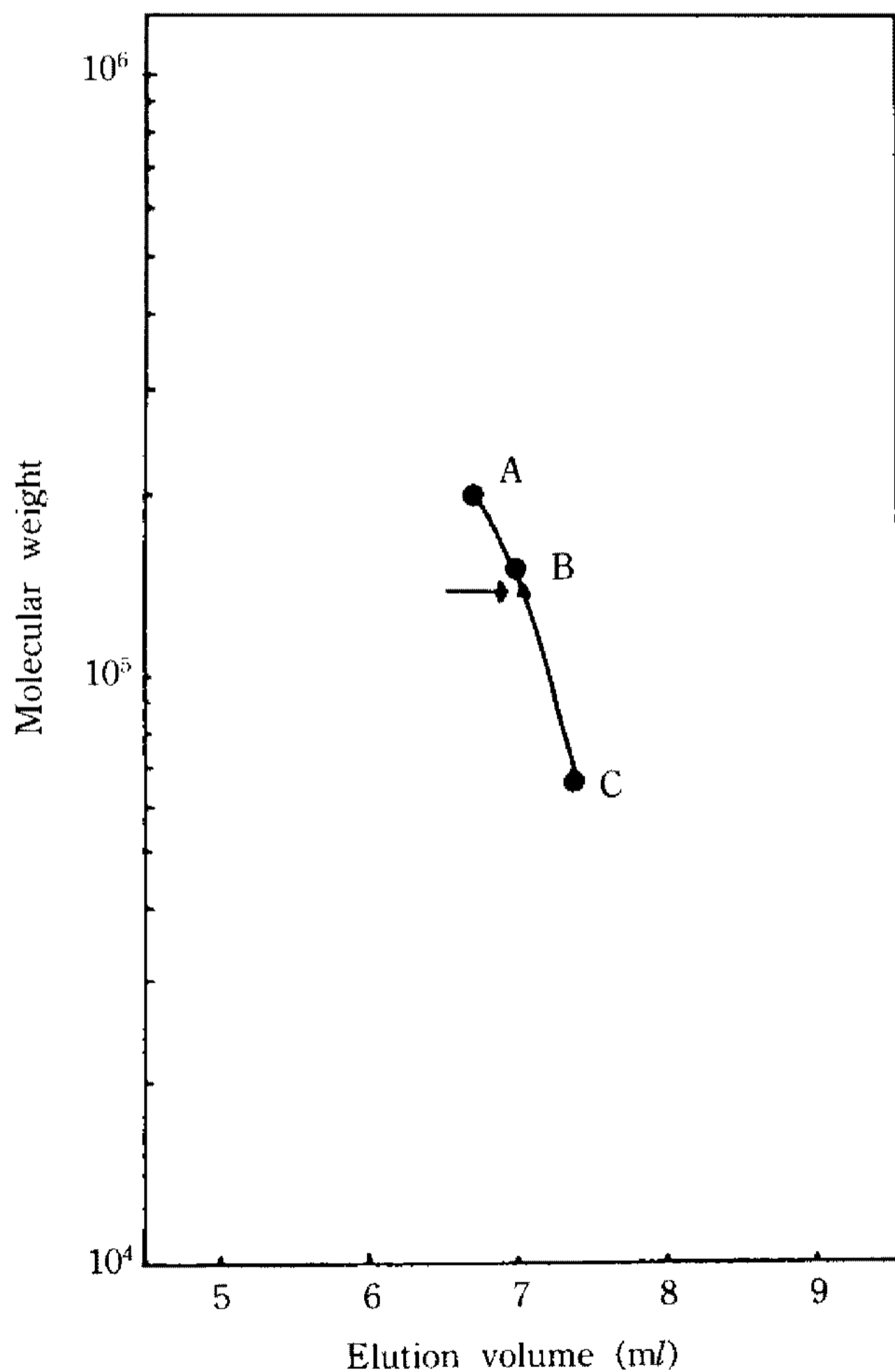


Fig. 4. Estimation of molecular weight using HPLC. A: β -amylase (MW 200,000), B: alcohol dehydrogenase (MW 150,000), C: BSA (MW 66,000). Arrow denotes glucose isomerase from *S. luteogrseus* TH34.

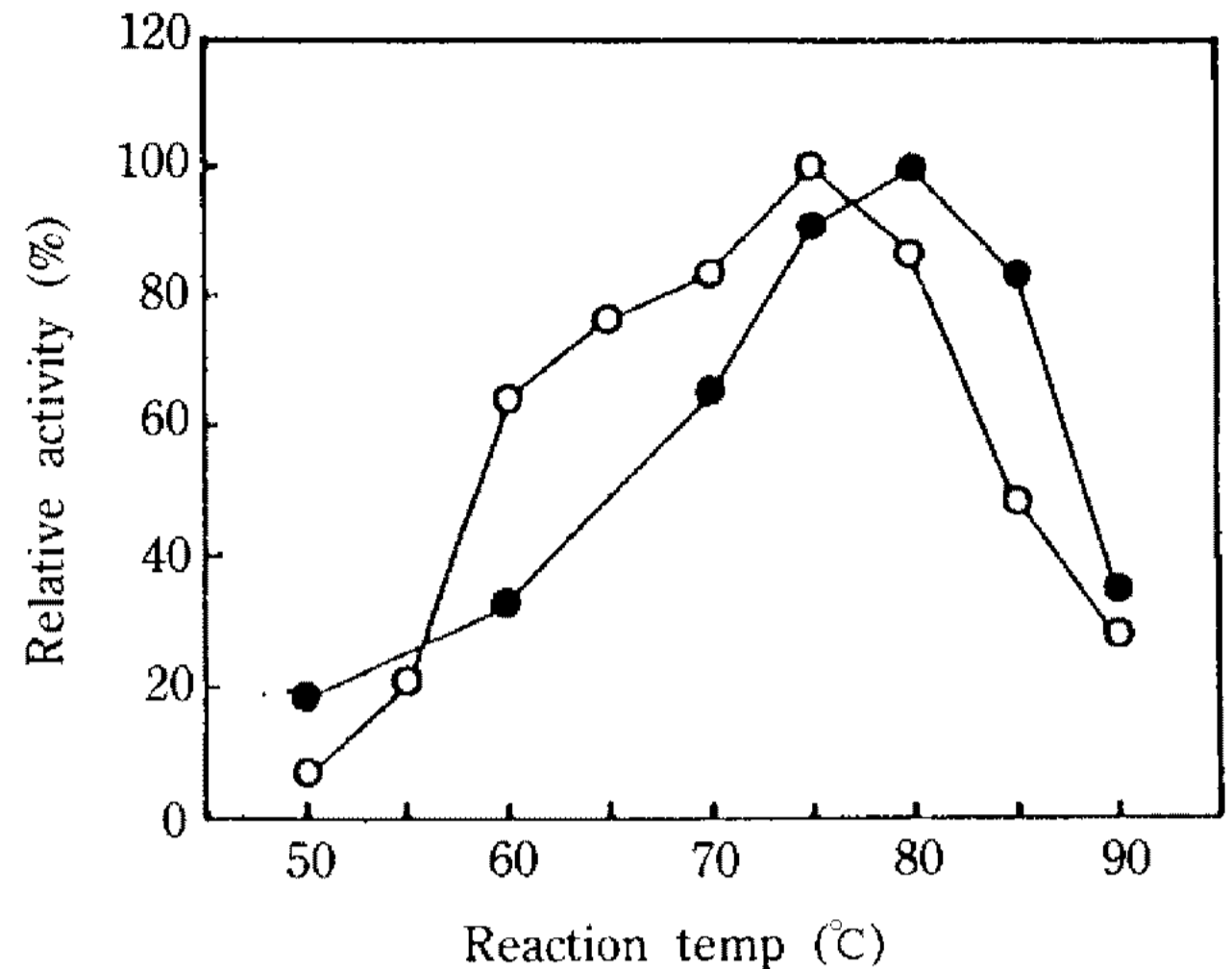


Fig. 5. Temperature activity profile of purified glucose isomerase (○) and immobilized cell (●) from *S. luteogrseus* TH34 at pH 7.0.

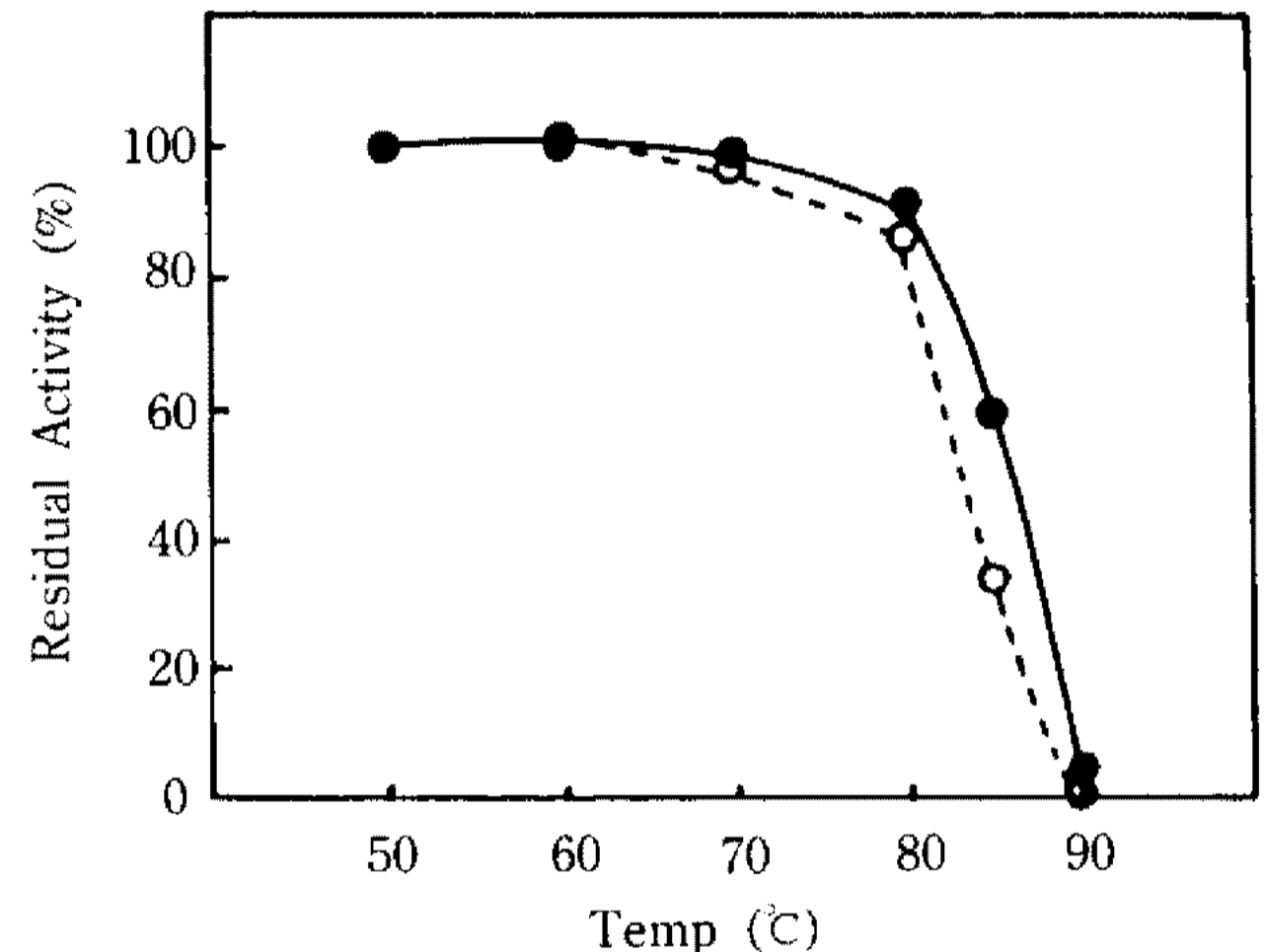


Fig. 6. Thermostability of partially purified enzyme (○) and immobilized cell (●).

에서 보는 바와 같다. 정제한 효소는 75°C, 고정화 효소는 80°C에서 각각 최고의 반응속도를 보였다. 즉 고정화에 의해 최적 반응온도가 5°C 상승하였으며 이는 고정화에 의해 효소단백질의 3차 구조가 안정화된 것으로 추정되는데 Kasumi 등(21)도 유사한 결과를 보고하였다. 일반적으로 glucose isomerase는 60°C 내지 70°C에서 최적 반응온도를 보인다고 알려져 있으나 85°C 내지 100°C에서 최적온도를 보이는 것도 있다(22).

열안정성을 살펴보기 위해 각 온도에서 20분간 열처리한 후 잔류여가를 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 정제효소는 80°C에서 85%의 역가가 남았으며 85°C에서는 40%의 역가가 남았다. 한편 고정화 효소는 80°C에서 90%, 85°C에서 50%의 역가가 각각

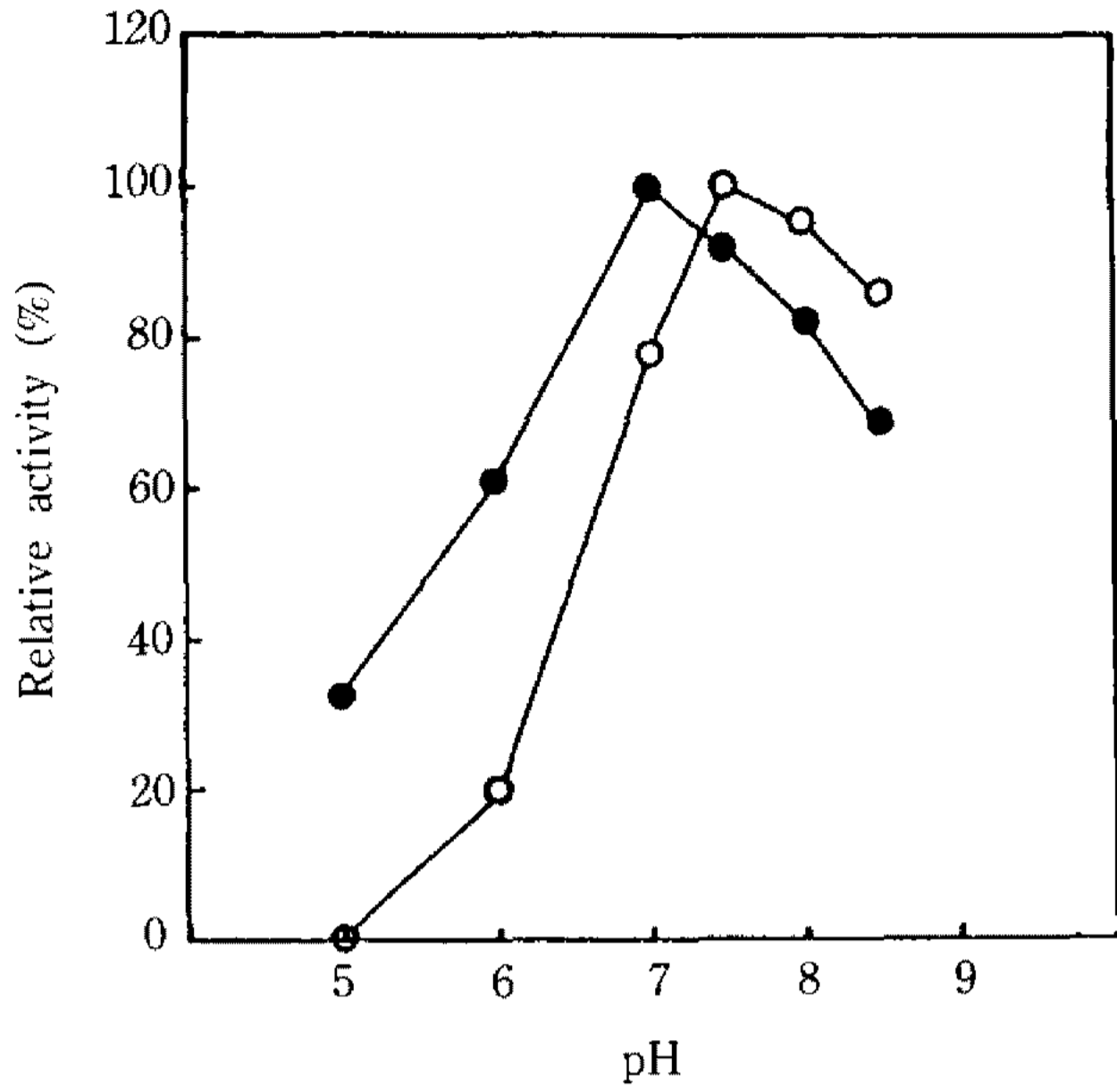


Fig. 7. Effect of pH on the reaction rate of purified glucose isomerase (○) and immobilized cell (●) from *S. luteogriseus* TH34.

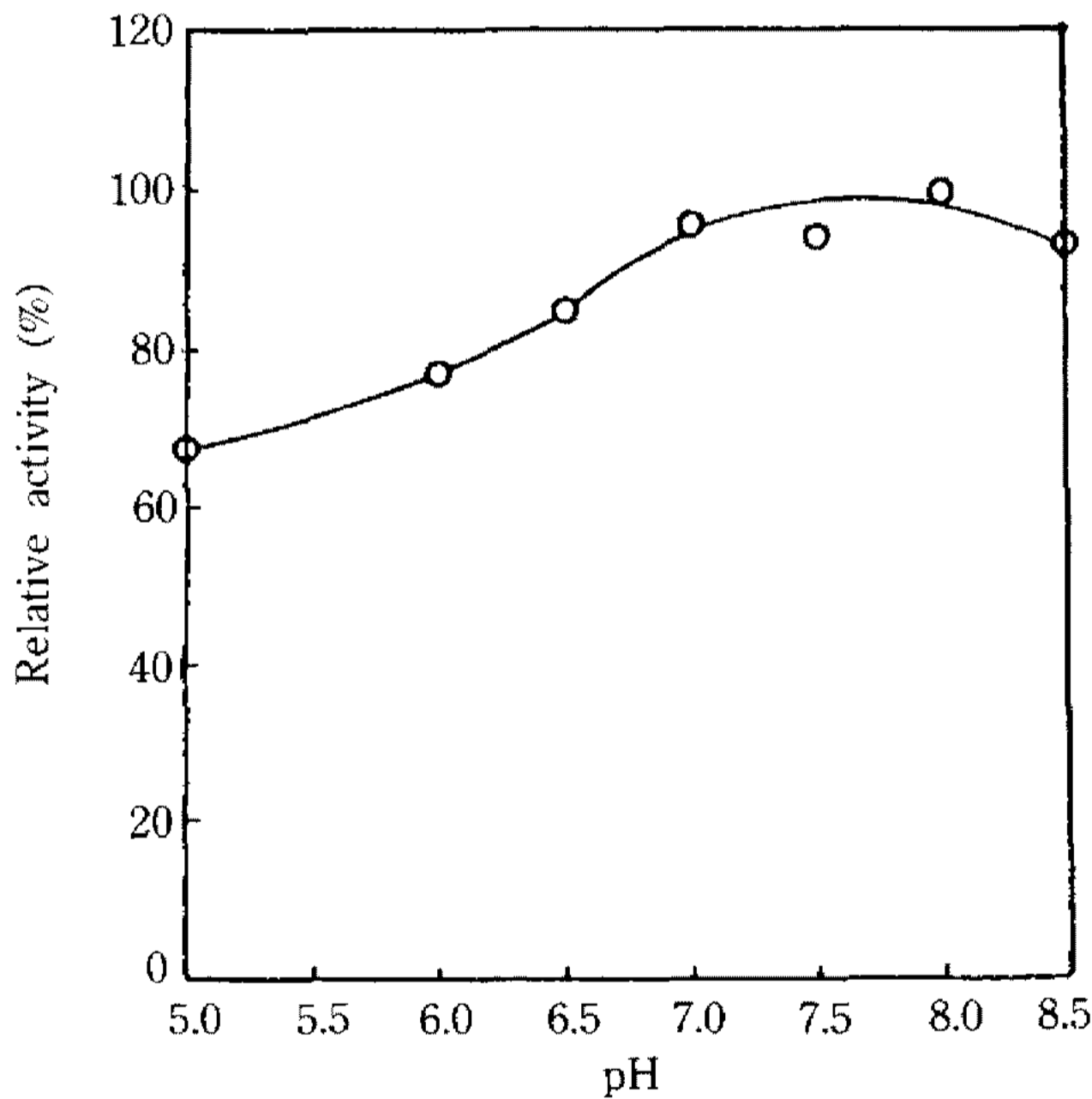


Fig. 8. pH-stability profile of immobilized glucose isomerase from *S. luteogriseus* TH34.

유지되었다. 즉 고정화 효소가 열에 약간 더 안정함을 알 수 있었다. 일반적으로 80°C까지는 거의 역가가 감소되지 않는 열에 안정한 효소라고 생각된다. 90°C에서 80% 이상의 역가가 유지되는 안정한 효소에 대한 보고(23)도 있으며 공업적으로 60°C에서 장기간 사용하게 되므로 열안정성이 요구되는 효소로서 본 고정화 효소는 산업적 이용이 가능할 것으로 생각된다.

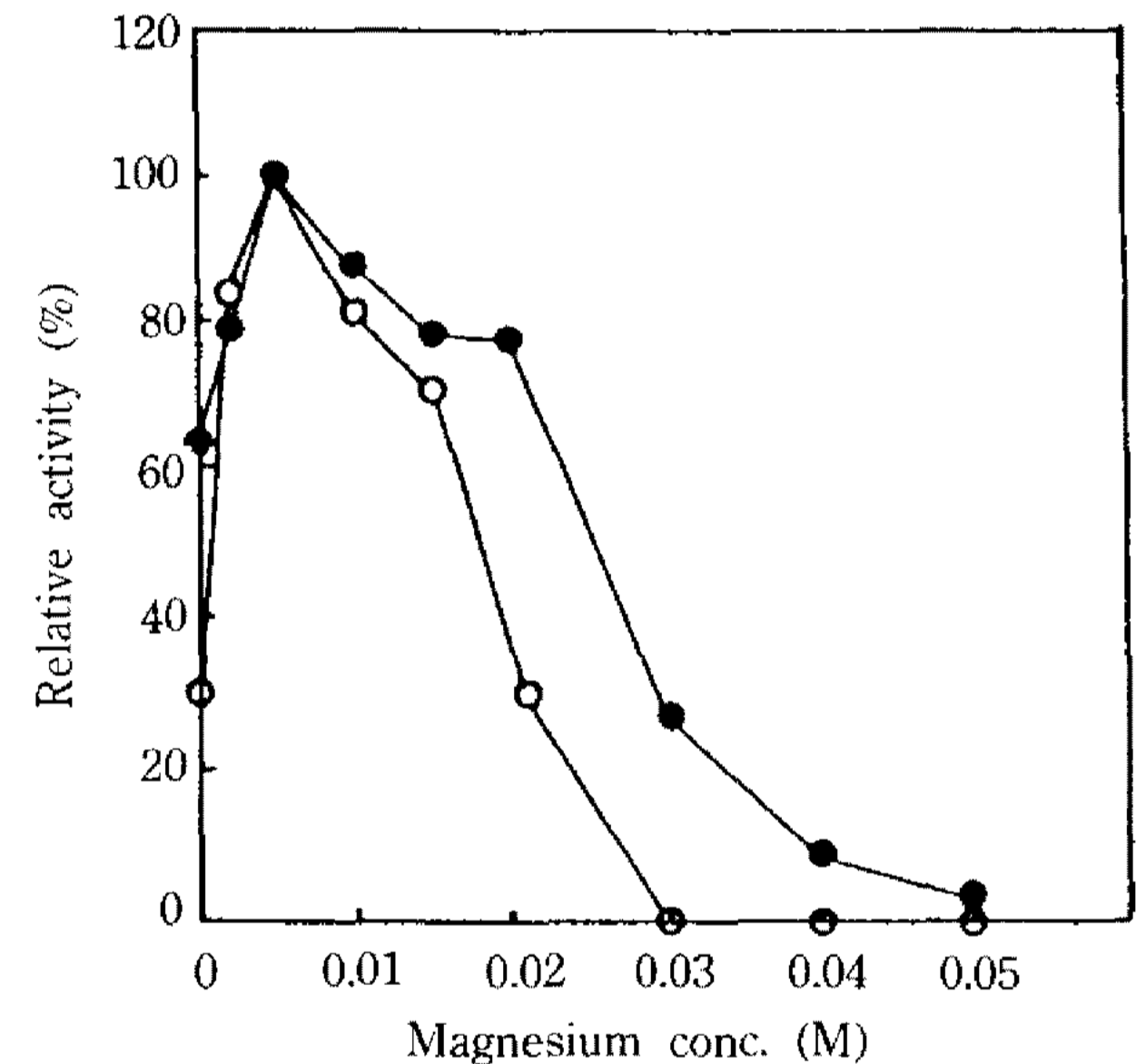
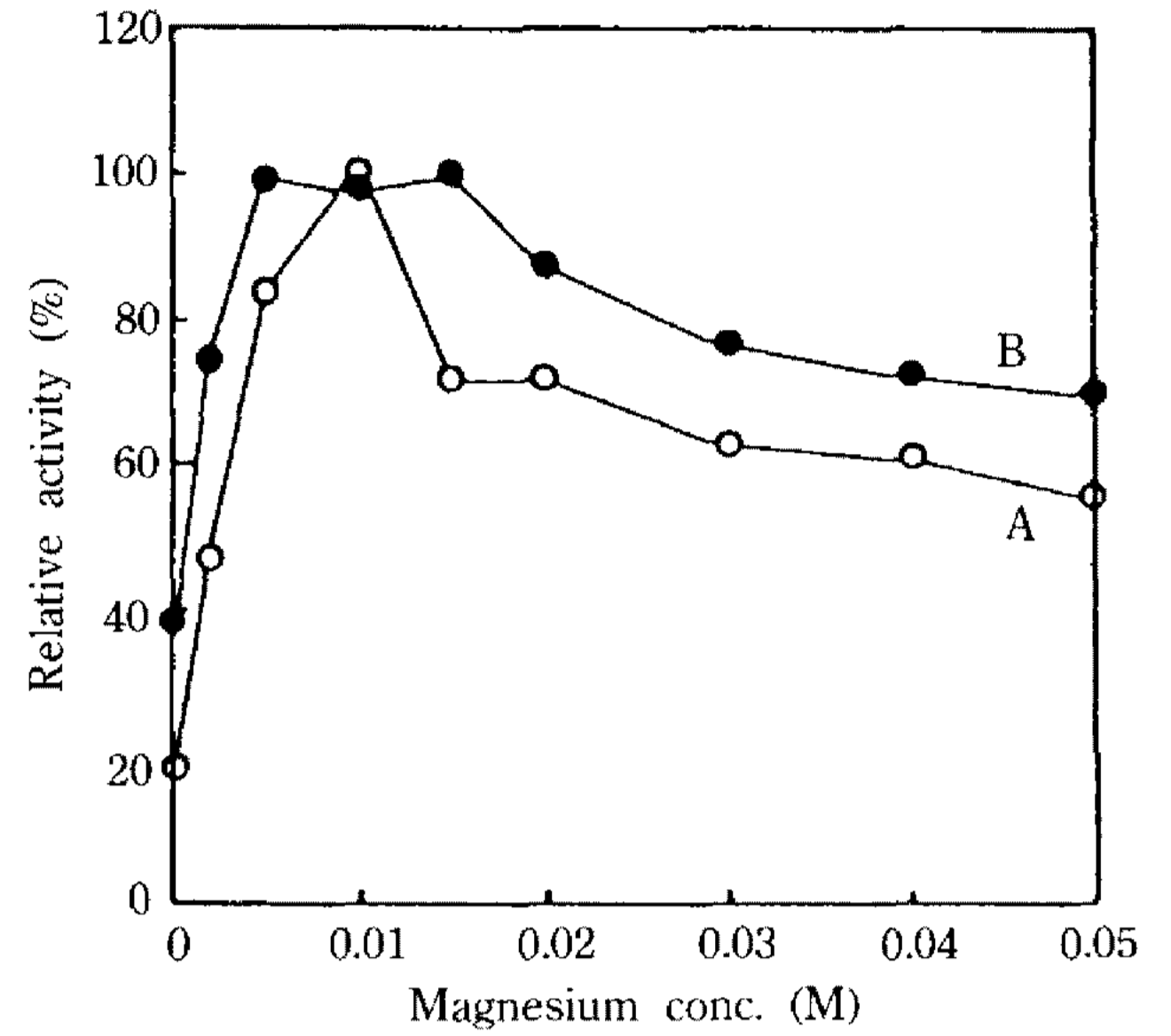


Fig. 9. Effect of magnesium and cobalt ion on the reaction of purified glucose isomerase (○) and immobilized cell (●) from *S. luteogriseus* TH34.

반응 최적 pH 및 pH 안정성 : 효소반응에 대한 최적 pH를 규명하기 위해 pH 5.0~9.0 범위에서 역가를 측정하였는 바 Fig. 7에서 보는 바와 같이 정제 효소는 pH 7.5, 고정화 효소는 pH 7.0에서 각각 최고의 활성을 보였다. 고정화 효소에서는 최적 pH가 산성 쪽으로 낮아졌음을 알 수 있다.

효소의 pH에 대한 안정성을 실온에서 24시간 방치한 후 잔류역가를 측정하여 확인하였는데 Fig. 8에서와 같이 pH 7.0 이상에서 안정하였고 pH 6.5 이하에서는 안정성이 현격히 저하하였다.

금속이온이 효소반응 및 열안정성에 미치는 영향 : 효소활성에 대한 magnesium ion의 효과를 확인하기

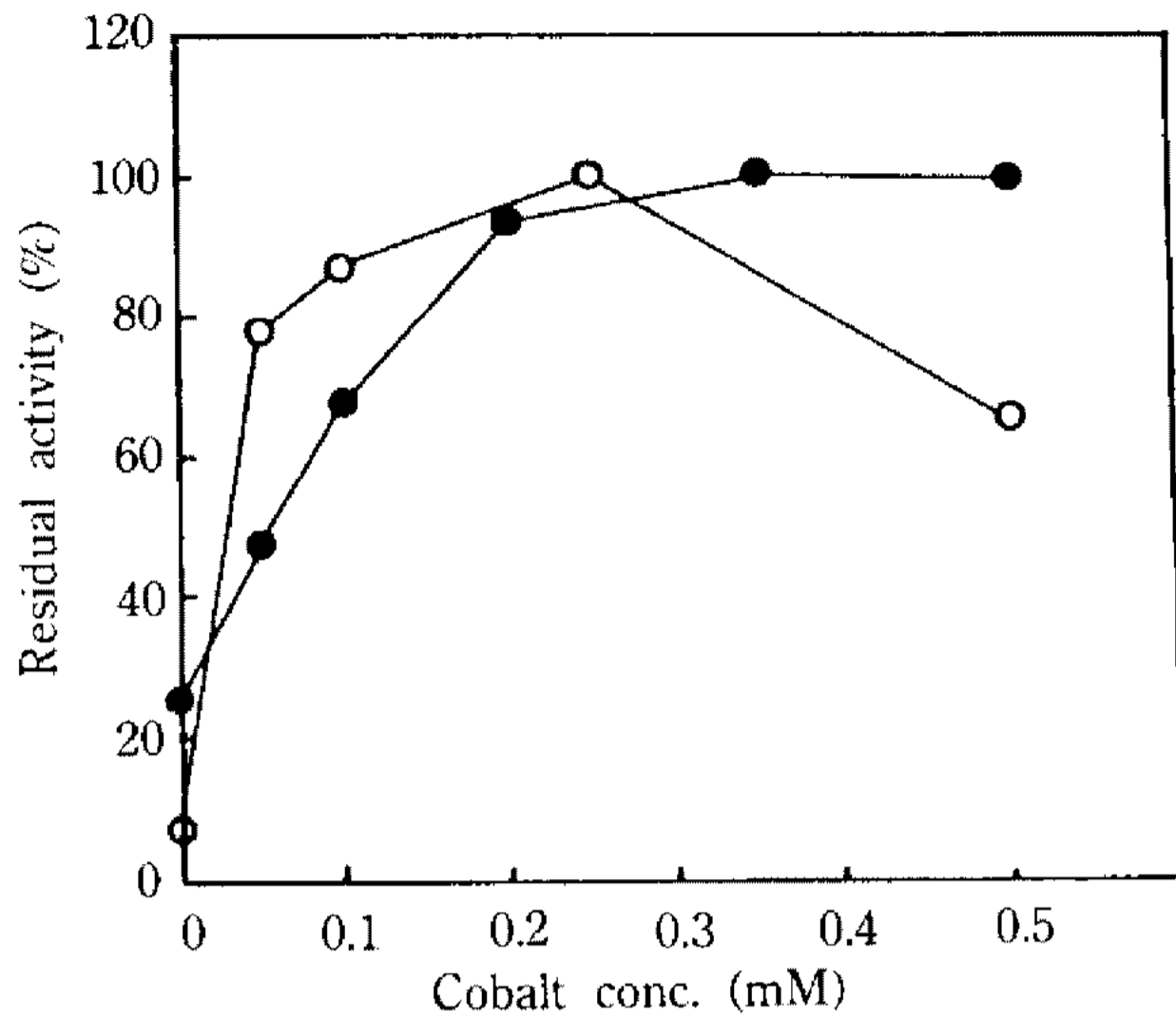


Fig. 10. Effect of cobalt ion on thermostability of purified glucose isomerase (○) and immobilized cell (●) from *S. luteogriseus* TH34.

The enzymes were treated at 90°C for 10 min.

위해 농도를 달리하여 기질에 첨가하고 역가를 측정 한 결과 0.01 M에서 최대활성을 보였으며 대조구에 비해 2.5배 내지 4배의 활성이 증가하였다(Fig. 9). 한편 효소를 고정화시키면(Fig. 9) 요구되는 magnesium ion의 농도가 0.005 M로 낮아지는데 이는 세포고정화시 일부의 magnesium ion이 배지 중에 존재하였기 때문일 수도 있다.

Cobalt ion의 영향을 확인하기 위해 농도별로 첨가한 후 역가를 측정하였다(Fig. 9). 정제효소와 고정화효소에서 다같이 5 mM의 cobalt를 첨가했을 때 효소의 활성이 최대가 되었다. Cobalt ion의 첨가에 의한 효소활성의 증가효과는 고정화 효소보다 정제 효소에서 높았는데 이는 고정화효소내에는 어느 정도의 Cobalt ion이 존재하고 또한 cobalt ion이 없더라도 담체와의 물리화학적인 결합으로 인해 효소의 3차 구조가 안정화된 것으로 생각된다. 또한 cobalt ion의 열안정성에 대한 영향을 확인한 결과 전혀 첨가하지 않았을 때에는 90°C 10분 열처리시 잔류활성을 거의 보이지 않았다(Fig. 10). 그러나 0.25 mM cobalt ion의 첨가에 의해 정제효소의 경우 18배, 고정화효소의 경우에 4배의 열안정성 증대효과를 보였다. 이는 Park 등이 보고(24)한 것(1 mM)보다 낮은 농도에서 효소가 안정화된 것이다.

반응저해제 : Xylitol, sorbitol, mannitol, maltitol 및 inositol을 농도별로 기질에 첨가하여 활성에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 11과 같다. Xylitol에 의한

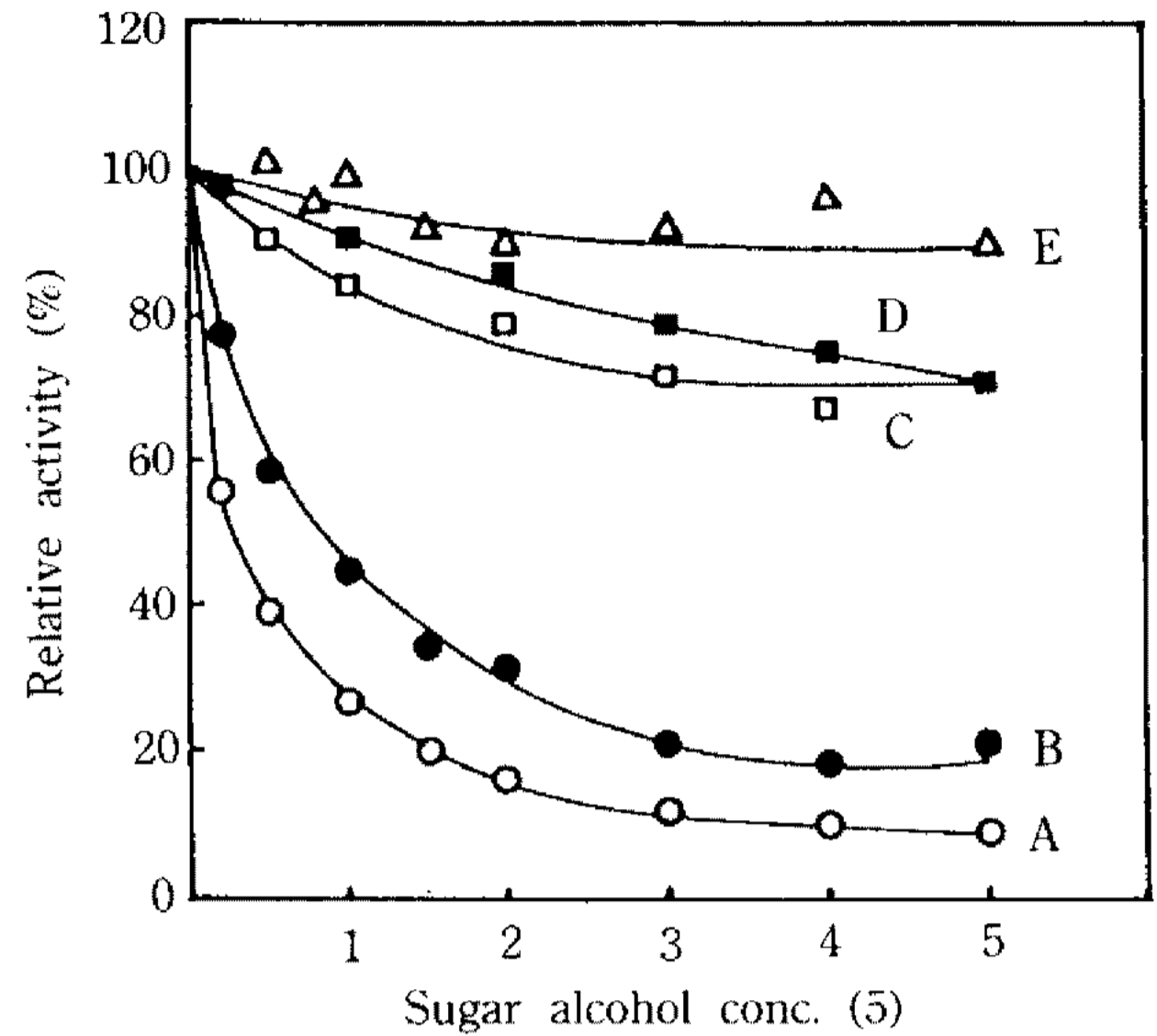


Fig. 11. Inhibition of glucose isomerase activity by sugar alcohols such as xylitol (A), sorbitol (B), maltitol (C), mannitol (D) and inositol (E).

저해정도가 가장 커서 기질내에 1% 존재시 약 75%의 저해를 받았으며 sorbitol(D-glucitol)에 의해서는 약 55%의 저해작용이 나타났다. Mannitol에 의해서는 20% 미만의 약한 저해작용이 확인되었다. Sorbitol과 mannitol은 2번 탄소에 있는 hydroxyl기의 위치만 다른 epimer인 것으로 보아 2번 탄소의 hydroxyl기의 위치가 효소 active site 결합에 중요한 역할을 하는 것 같다.

요 약

토양에서 분리한 glucose isomerase 생산균주인 *Streptomyces luteogriseus* TH34를 0.05% chitosan과 0.28% glutaraldehyde를 이용하여 고정화시켜 역가가 기존 시제품보다 우수한 535 IGIC/g인 효소를 얻었다. 한편 효소를 세포파괴 후 60% (NH₄)₂SO₄ fractionation, DEAE-Cellulose 및 Sephadex G-150을 이용하여 분리, 정제하여 6.3배 정제된 효소를 얻었고 고정화시킨 효소와 특성을 비교하였다. 효소의 분자량은 140,000이고 분자량 35,000의 4개 subunits로 구성되어 있으며 최적 반응온도는 정제효소, 고정화효소에서 각각 75°C, 80°C이고 열안정성은 고정화 효소가 높았으나 두 효소는 다같이 80°C에서 20분 처리시 역가 감소가 거의 없었다. 한편 효소의 작용 최적 pH는 정제효소의 7.5에서 고정화시 7.0으로 이동하는 현상을 볼 수 있었으며 pH 7.0 이상에서 대단히 안정함을

보였다. 본 효소반응은 5~10 mM magnesium ion에 의해 활성화되며 열에 대한 안정성은 0.25 mM cobalt ion에 의해 향상되었고 특히 본 효소는 당 알코올에 의해 경쟁적인 저해작용을 보이는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Joggensen, O.B.: *Starch*, **40**, 307 (1988)
- Takasaki, Y. and A. Kamibayashi: *U.S. Patent*, **3**, 753, 858 (1973)
- Saini, R. and W.R. Vieth: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **25**, 115 (1975)
- Amoty, S., T.K. Nielsen and N.O. Thiesen: *U.S. Patent*, **3**, 980,521 (1976)
- ZHupkes, J.V. and Van Tilberg, R.: *Starch*, **28**, 356 (1976)
- Antrim, R.L. and A.L. Auterinen: *Starch*, **38**, 132 (1986)
- Antrim, R.L., N.E. Lloyd and A.L. Auterinen: *Starch*, **41**, 155 (1989)
- Fujita, Y., a. Matsumoto, I. Miyachi, N. Imai, I. Kawakami, T. Hishida and A. Kamata: *U.S. Patent*, **4**, 205,127
- Outtrup, H.: *German Patent*, 2,400,323 (1974)
- Stranberg, G.W. and K.L. Smiley: *Appl. Microbiol.*, **21**, 588 (1970)
- Hong, S.S., J.K. Baek, H.S. Lee, S.U. Kuk and K.H. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 296 (1991)
- Takasaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 1247 (1966)
- Dische, Z. and E. Bovenfreund: *J. Biol. Chem.*, **192**, 583 (1951)
- Warburg, O. and W. Christian: *Biochem. Z.*, **310**, 384 (1941)
- Lowry, O., O.H. Rosenbrough, N.E. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- Hong, S.S.: *Thesis of Master Science* (1986)
- Tsumura, N., T. Kasumi and M. Ishikawa: *Rept. Nat. Food. Res. Inst.*, No. 31 (1971)
- Takasaki, Y., Y. Kosusi and a. Kamibayashi: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1527 (1969)
- yamanaka, K.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **151**, 670 (1968)
- Yamanaka, K. and N. Takahara: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1909 (1977)
- Kasumi, T., M. Tsuji, K. Hayashi and N. Tsumura: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1865 (1977)
- Scallet, B.L.: *Starch*, **26**, 405 (1974)
- Kasumi, T., N. Tsumura and T. Kobayashi: *Starch*, **31**, 25 (1979)
- Park, K.H.: *Enzyme Microbi. Technol.*, **2**, 227 (1980)

(Received May 30, 1991)