

Leuconostoc sp.에 의한 Sucrose로부터 Glucose-1-phosphate의 생산

엄익춘 · 황기철 · 방원기*

고려대학교 농화학과

The Production of Glucose-1-phosphate from Sucrose by *Leuconostoc* sp.

Eom, Ik-Chun, Ki-Chul Hwang and Won-Gi Bang*

Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — For the production of glucose-1-phosphate from sucrose, bacteria having sucrose phosphorylase were isolated from Kimchi. Among them, JS-05, newly isolated strain having high activity of sucrose phosphorylase was selected and identified as *Leuconostoc* sp. The specific activity of sucrose phosphorylase of *Leuconostoc* sp. JS-05 was the highest when the strain was cultured at 25°C for 20 hrs in the medium(pH 7.5) containing 10 g sucrose, 5 g corn steep liquor, and 2.5 g yeast extract per liter. Meanwhile, in the glucose-1-phosphate production through the reaction with toluene-treated resting cells, 21.83 g/l of glucose-1-phosphate was produced from 68 g/l of sucrose after incubation of 2 hrs under optimum conditions, which corresponds to 93.24% of theoretical glucose-1-phosphate yield.

Glucose-1-phosphate는 모든 생물체의 starch와 glycogen 대사에 있어 중간물질로 알려져 있으며, 의학과 제약분야에서는 혈관확장제, 강장제, 신경촉진제, 항생제, 항암제 및 심장병 치료제의 제조시와 심한 출혈을 수반하는 저혈압 치료시에 사용되며, 글루카르산과 글루크론산의 합성시에 출발물질로 이용된다. 또한, 화학공업분야에서는 vinyl chloride 중합 공정시에 생성된 polymer의 침전을 방지하기 위해서 반응기내의 벽면을 glucose-1-phosphate로 도말하는 것으로 알려져 있다(1).

현재까지, glucose-1-phosphate의 생산은 yeast로부터 직접 추출하는 방법, starch phosphorylase[EC 2.4.1.1]을 이용하여 starch로부터 생산하는 방법 및 유기 합성법 등에 의해 이루어져 왔다(1).

한편, Kagan(2) 등이 *Leuconostoc mesenteroides*에 의한 sucrose의 phosphorolysis를 최초로 발견한 이래, sucrose의 phosphorolysis 기작과 이에 관여하는 효소인 sucrose phosphorylase(EC 2.4.1.7)에 대한 연구가 활발히 수행되어(3, 4), 최근에는 sucrose pho-

sphorylase를 이용하여 glucose-1-phosphate를 생산하려는 시도가 이루어지고 있다(5, 6).

본 연구에서는 높은 sucrose phosphorylase 활성을 지닌 균주를 선별하였으며, sucrose phosphorylase의 활성을 증대시키기 위한 최적 배양학적 조건을 조사하였다. 그 다음, sucrose phosphorylase의 활성이 최대인 휴지 세포를 직접 효소원으로 이용하여 sucrose로부터 glucose-1-phosphate를 생산하기 위한 최적 반응조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용한 *Leuconostoc* sp. 균주는 김치로부터 분리하여 사용하였다.

사용 배지

분리용 배지로는 sucrose 10 g/l, K_2HPO_4 5 g/l 및 yeast extract 0.5 g/l를 함유하는 배지를 사용하였으며 (7), 전배양 배지로는 proteose peptone 10 g/l, beef extract 10 g/l, yeast extract 5 g/l, dextrose 20 g/l, tween 80 1 g/l, ammonium citrate 2 g/l, sodium ace-

Key words: Glucose-1-phosphate, *Leuconostoc* sp., sucrose

*Corresponding author

tate 5 g/l, MgSO₄ 0.1 g/l, MnSO₄ 0.05 g/l 및 KH₂PO₄ 2 g/l를 함유하는 MRS 배지를 사용하였다. 또한, 본 배양 배지로는 분리용 배지에 thiamine HCl 100mg/l, MgSO₄ 7H₂O 40 mg/l, FeSO₄ 7H₂O 1 mg/l, MnSO₄ 7H₂O 20 mg/l 및 ascorbic acid 5 mg/l을 첨가하여 사용하였다.

균주의 분리 및 선별

김치로부터 sucrose 자화성 세균을 분리하기 위하여, sucrose를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 첨가한 분리용 배지에 김치 국물 시료를 가하고 30°C에서 진탕배양(100 rpm/min)으로 3회에 걸쳐 24시간 간격으로 enrichment culture을 수행한 후, streak-plate 법에 의해 sucrose 자화능을 지닌 균락들을 순수 분리하였다.

Glucose-1-phosphate 생산능이 우수한 균주를 선별하기 위하여, 순수 분리한 균주들을 전배양 배지인 Lactobacilli MRS broth(Difco)가 10 ml씩 함유되어 있는 50 ml용 Erlenmeyer flask에 각각 접종한 후, 30°C에서 24시간 배양하였다. 이렇게 배양한 균체를 수확하여, 30%(v/v) toluene으로 30분간 처리한 다음 동일량의 균체를 33 mM phosphate buffer(pH 6.64)에 0.2M sucrose가 함유되어 있는 반응 용액에 첨가하여 30°C에서 3시간 반응시켰다. 이들 반응액내에서 glucose-1-phosphate량을 측정하여 가장 glucose-1-phosphate 생산능이 우수한 균주를 선별하였다.

분석방법

Glucose-1-phosphate의 정성 분석은 Leblanc(8)의 방법에 따라 gas chromatograph에 의하여 수행하였으며, 정량 분석은 Gerhard(9)의 방법에 따라 phosphoglucomutase[EC 2.7.5.1]와 glucose-6-phosphate dehydrogenase [EC 1.1.1.49]을 사용하여 수행하였다.

반응액내의 무기 인산의 농도는 Chen(10) 등의 방법에 따라 분광광도계를 사용하여 측정하였다.

Sucrose phosphorylase[EC 2.4.1.7]의 활성 측정은 Doudoroff(11) 등의 방법을 약간 변형하여 분광광도계를 사용하여 820 nm에서 시간에 따른 흡광도의 감소로 측정하였다. Sucrose phosphorylase활성의 1 unit는 반응 조건하에서 20분동안에 1 μmole의 유리 인산이 감소되는 것으로 정의하였으며, 비활성은 units를 mg 단백질로 나눈 것으로 정의하였다.

단백질의 양은 표준물질로 bovine serum albumin

(Sigma사)을 이용하여 Lowry(12) 등의 방법에 의하여 750 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

균체량은 분광광도계를 사용하여 608 nm에서 배양액의 혼탁도(Optical density, O.D.)를 측정하여 구하였다.

균주의 동정

분리 및 선별된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(12)에 의거하여 수행하였다.

결과 및 고찰

Sucrose phosphorylase의 활성을 지닌 균주의 분리 및 비활성이 높은 균주의 선별

Sucrose phosphorylase의 활성을 지닌 균주를 분리하기 위하여 앞서 기술한 재료 및 방법에 따라 30여종의 균주를 순수 분리 하였다. 이들 균주들로부터 일반적으로 높은 sucrose phosphorylase의 활성을 지니는 *Leuconostoc* sp.가 sucrose을 지닌 배지상에서 점액물질을 생산하는 것으로 알려져 있기 때문에(13), 점액질을 생성하는 균락을 3종 선별하였다. Table 1에서 볼 수 있듯이, JS-05 균주가 다른 균주에 비하여 생육 및 sucrose phosphorylase의 비활성이 가장 좋았기 때문에 본 실험의 공시 균주로 사용하였다.

분리 균주의 동정

분리 균주인 JS-05는 Gram 양성의 구균으로 생리적 및 생화학적 성질을 조사한 결과 Table 2와 같았으며, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(12)에 의해 JS-05 균주는 *Leuconostoc* sp.로 부분 동정하였다.

Table 1. Comparison of growth and specific activity of sucrose phosphorylase of isolated microorganisms

Strains	Growth (O.D. 608 nm)	Specific activity (Units/mg protein)
JS-01	1.316	6.16
JS-03	1.431	6.17
JS-05	1.739	6.42

* Cultivations were carried out for 4 hrs at 30°C in the medium containing 10 g/l sucrose, 10 g/l yeast extract, 5 g/l KH₂PO₄ and trace elements.

Table 2. Characteristics of the isolated strain, JS-05

Tests	Results
Motility	-
Oxidase	-
Catalase	-
Oxygen requirement	Facultative anaerobe
Growth in broth at	
pH 4	ND
pH 4.8	Slow
pH 6.5	Fast
Production of:	
NH ₃ , from arginine	-
CO ₂ , from glucose	-
Dextran from sucrose	+
Acid from fructose, glucose, lactose, mannitol, raffinose, sucrose	+
Milk clotting	-

* Symbols; +: Positive, -: Negative ND: Not determined.

Table 3. Effect of nitrogen sources on the specific activity of sucrose phosphorylase in *Leuconostoc* sp. JS-05

Nitrogen sources	Concentration (g/l)	Growth (O.D.608 nm)	Specific activity (Units/mg protein)
Yeast extract	10.0	1.60	6.50
Tryptone	10.0	1.42	6.80
Peptone	10.0	1.60	6.25
CSL	5.0	1.23	11.70
	10.0	1.05	10.82
	15.0	1.02	8.31
	20.0	1.01	5.32

* Cultivations were carried out for 24 hrs at 30°C in the medium containing 10 g/l sucrose, 5 g/l KH₂PO₄ and trace elements, in addition to organic nitrogens. CSL: Corn steep liquor.

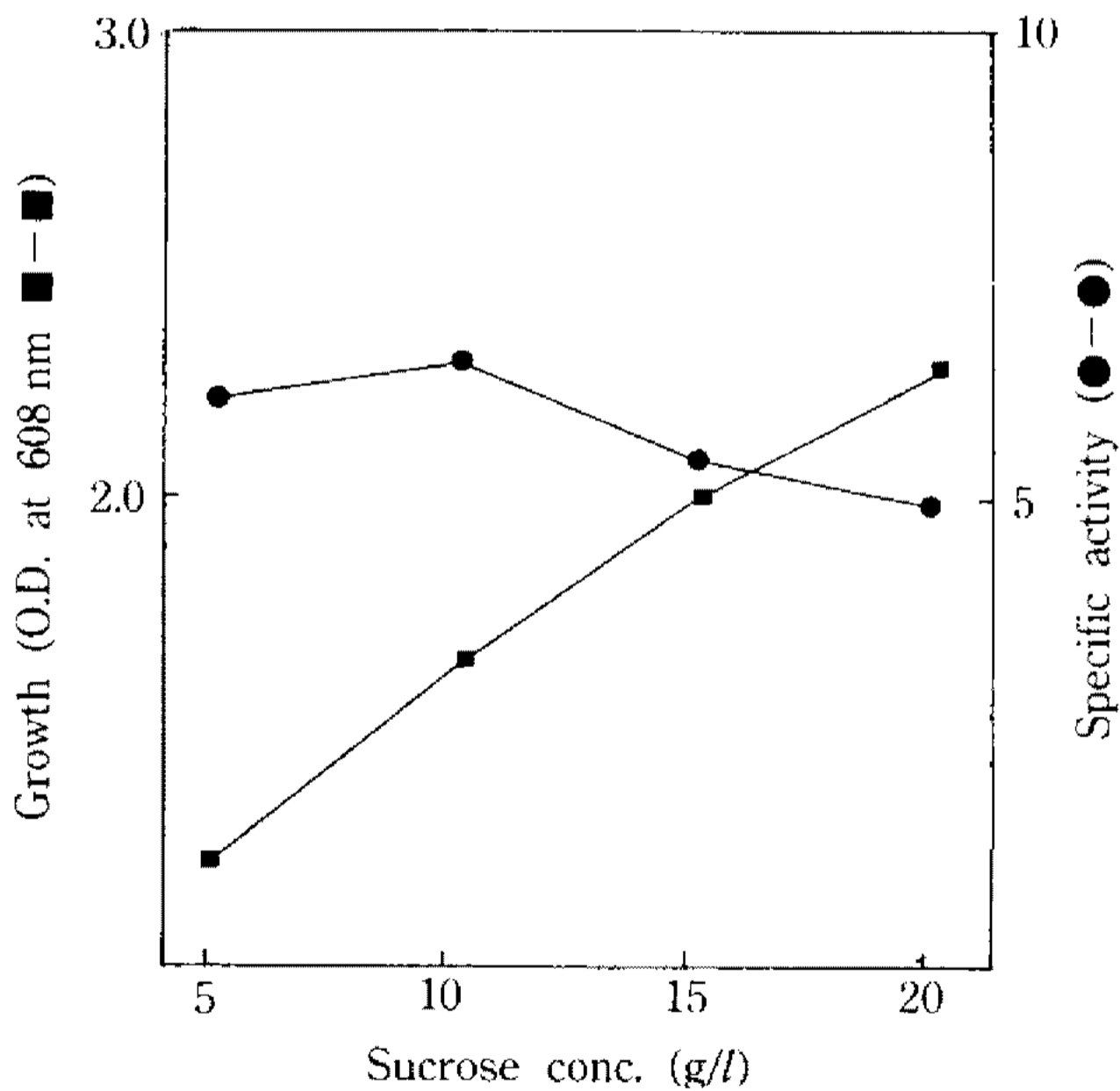


Fig. 1. Effect of sucrose concentration in culture medium on the specific activity of sucrose phosphorylase of *Leuconostoc* sp. JS-05.

Cultivations were carried out for 24 hrs at 30°C in the medium containing 10 g/l yeast extract, 5 g/l KH₂PO₄, and trace elements, in addition to sucrose.

증식 세포의 sucrose phosphorylase의 비활성에 미치는 영향

분리 균주인 *Leuconostoc* sp. JS-05의 생육과 suc-

rose phosphorylase의 비활성에 미치는 배지중의 sucrose 농도의 영향을 조사하기 위하여 본배양 배지의 sucrose의 농도를 5.0 g/l에서 20.0 g/l까지 변화시켜 실험을 수행한 결과 Fig. 1에서 볼 수 있듯이, 농도가 5.0 g/l에서 20.0 g/l까지는 균체의 생육 속도가 증가 하였으나, sucrose phosphorylase의 비활성은 5.0 g/l에서 10.0 g/l까지는 증가하였고 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 따라서, 이후의 실험에서는 비교적 생육 속도가 좋으며 sucrose phosphorylase의 비활성이 가장 좋은 10.0 g/l의 sucrose를 사용하였다.

증식 세포의 sucrose phosphorylase의 비활성에 미치는 배지 질소원의 영향을 조사하기 위하여 10.0 g/l의 sucrose를 함유하는 본배양 배지에 Table 3과 같이 질소원을 가하여 실험을 수행한 결과, yeast extract, tryptone 및 peptone은 비슷한 비활성을 보였으나 corn steep liquor(CSL)는 다른 질소원들에 비해 50% 정도의 sucrose phosphorylase의 비활성 증가를 보여 주었다. CSL의 농도가 7.5 g/l까지는 거의 비슷한 sucrose phosphorylase의 비활성을 보여 주었지만 그 이상일 때는 비활성의 감소를 보였기 때문에 질소원으로서 CSL의 최적 농도는 5.0 g/l로 하였다.

증식 세포의 sucrose phosphorylase의 비활성에 미치는 증식인자들의 첨가 효과를 검토하기 위하여 Table 4와 같이 증식 인자들을 사용한 결과, sucrose phosphorylase 비활성은 tryptone이나 peptone을 사용하였을 때보다 2.5 g/l의 yeast extract가 사용되었을 때에 가장 좋았으며 대조구에 비해 83.3% 증가하였다.

배지의 초기 pH가 sucrose phosphorylase의 활성

Table 4. Effect of growth factors on the specific activity of sucrose phosphorylase in *Leuconostoc* sp. JS-05

Growth factor (g/l)	Growth (O.D. 608 nm)	Specific activity (Units/mg protein)
None	1.01	12.0
Yeast extract	1.47	22.0
5.00	1.62	9.1
Tryptone	1.24	18.1
5.00	1.19	14.8
Peptone	1.18	18.9
5.00	1.46	12.3

* Cultivations were carried out for 24 hrs at 30°C in the medium containing 10 g/l sucrose, 5 g/l corn steep liquor, 5 g/l KH₂PO₄, and trace element, in addition to growth factors.

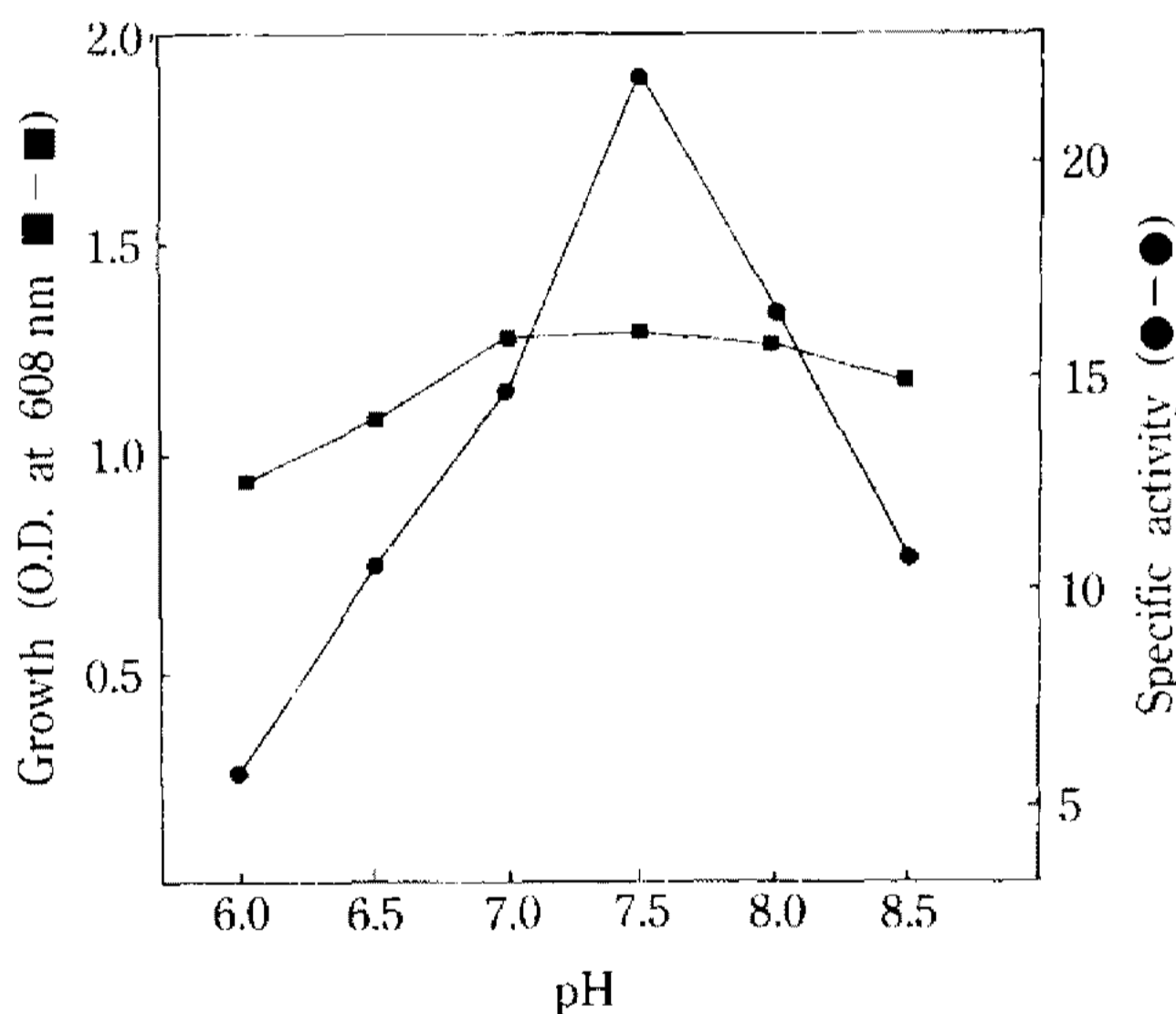


Fig. 2. Effect of pH on the specific activity of sucrose phosphorylase of *Leuconostoc* sp. JS-05.

Cultivations were carried out for 24 hrs at 30°C in the medium containing 10 g/l sucrose, 5 g/l corn steep liquor, 5 g/l KH₂PO₄, and trace elements.

에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH를 6.0에서 부터 8.5까지 변화시켜 실험을 수행한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이, 초기 pH의 변화는 균체의 생육에 큰 영향을 주지 못하였으며 sucrose phosphorylase의 비활성은 초기 pH가 6.0에서 7.5까지는 비례적으로 증가하였으나 그 이상에서는 급격히 감소함을 보였다.

증식세포의 sucrose phosphorylase의 비활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 배지 온도를 20°C에서 37°C까지 변화시키면서 비활성을 비교 검토한 결과 Fig. 3에서 알 수 있듯이, 20°C에서 33°C 사이

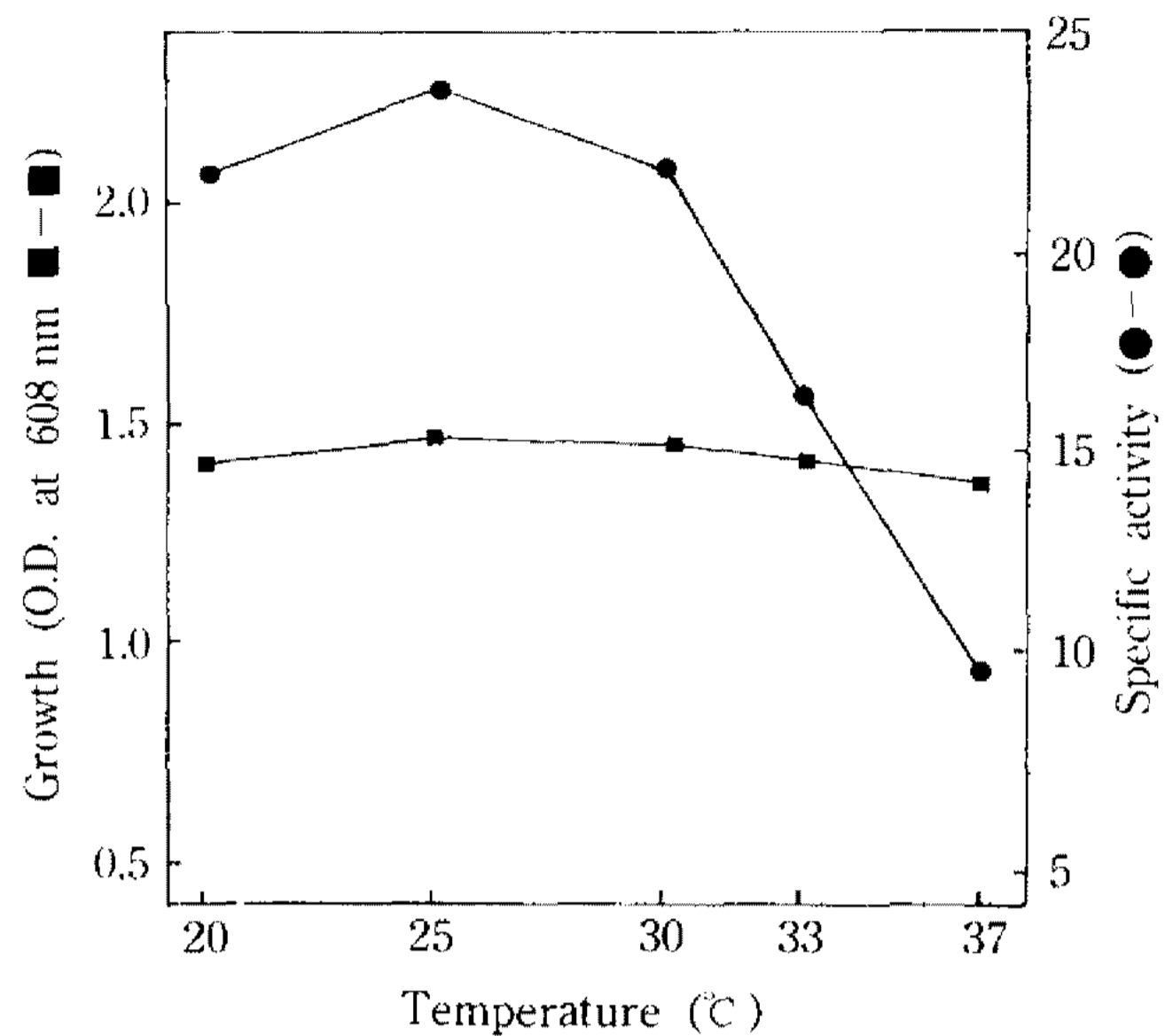


Fig. 3. Effect of temperature on the specific activity of sucrose phosphorylase of *Leuconostoc* sp. JS-05.

Cultivations were carried out for 24 hrs at 30°C in the medium containing 10 g/l sucrose, 5 g/l corn steep liquor, 5 g/l KH₂PO₄, and trace elements.

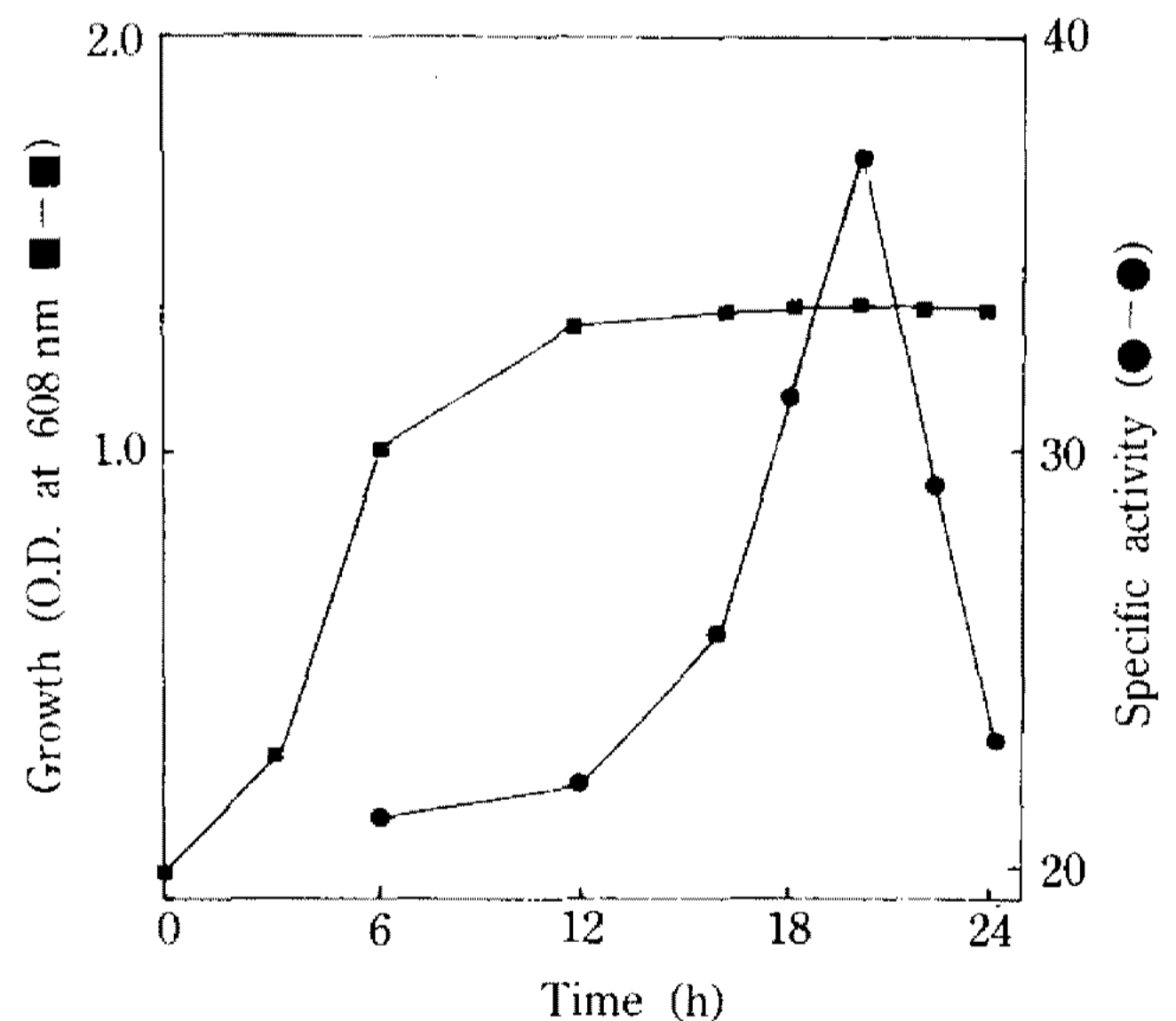


Fig. 4. Time courses of the specific activity of sucrose phosphorylase of *Leuconostoc* sp. JS-05.

Cultivations were carried out for 24 hrs at 30°C in the medium containing 10 g/l sucrose, 5 g/l corn steep liquor, 5 g/l KH₂PO₄, and trace elements.

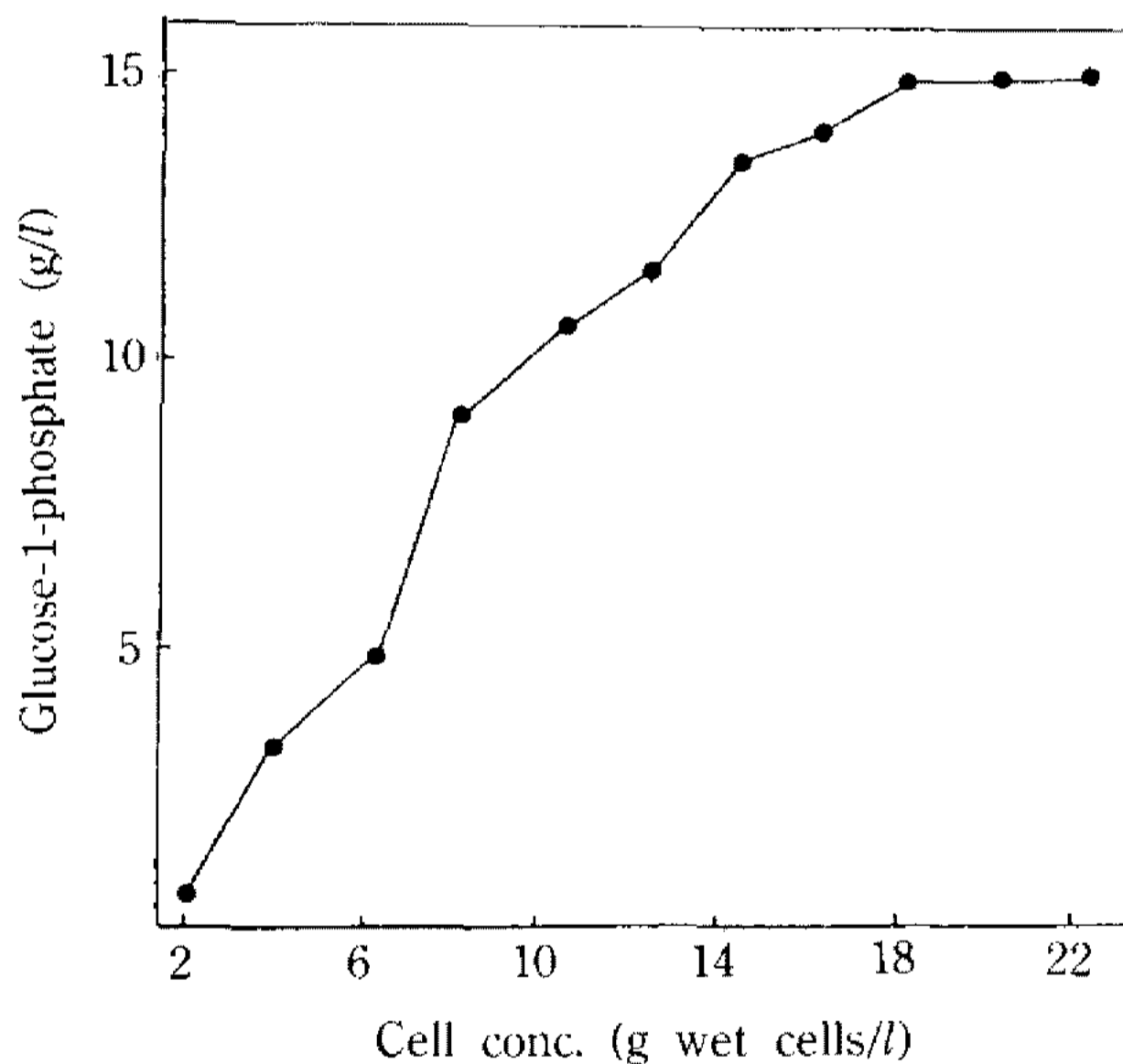
에서는 거의 비슷한 비활성을 보여주었지만 33°C 이상의 온도에서는 비활성이 크게 감소되었다.

상기의 최적 조건하에서 시간의 경과에 따른 균체량과 sucrose phosphorylase의 비활성과의 관계를 조사한 결과 Fig. 4에서 볼 수 있듯이, 배양 시간이 20시간이 되었을 때 균체의 sucrose phosphorylase

Table 5. Cell treatment and their effect on enzyme release

Cell treatment	Concentration (% v/v)	Amount of produced glucose-1-phosphate(g/l)
Whole cell		0.10
Crude extract		4.22
Acetone	30	ND
Toluene	10	2.53
	20	4.92
	30	8.21
	40	10.22
	50	10.18

*Reactions were carried out for 3 hrs at 25°C in reaction mixture (pH 7.0) containing 10 g/l (wet weight) of cell concentration, 0.2M sucrose and 0.1M KH_2PO_4 . ND: Not detected.

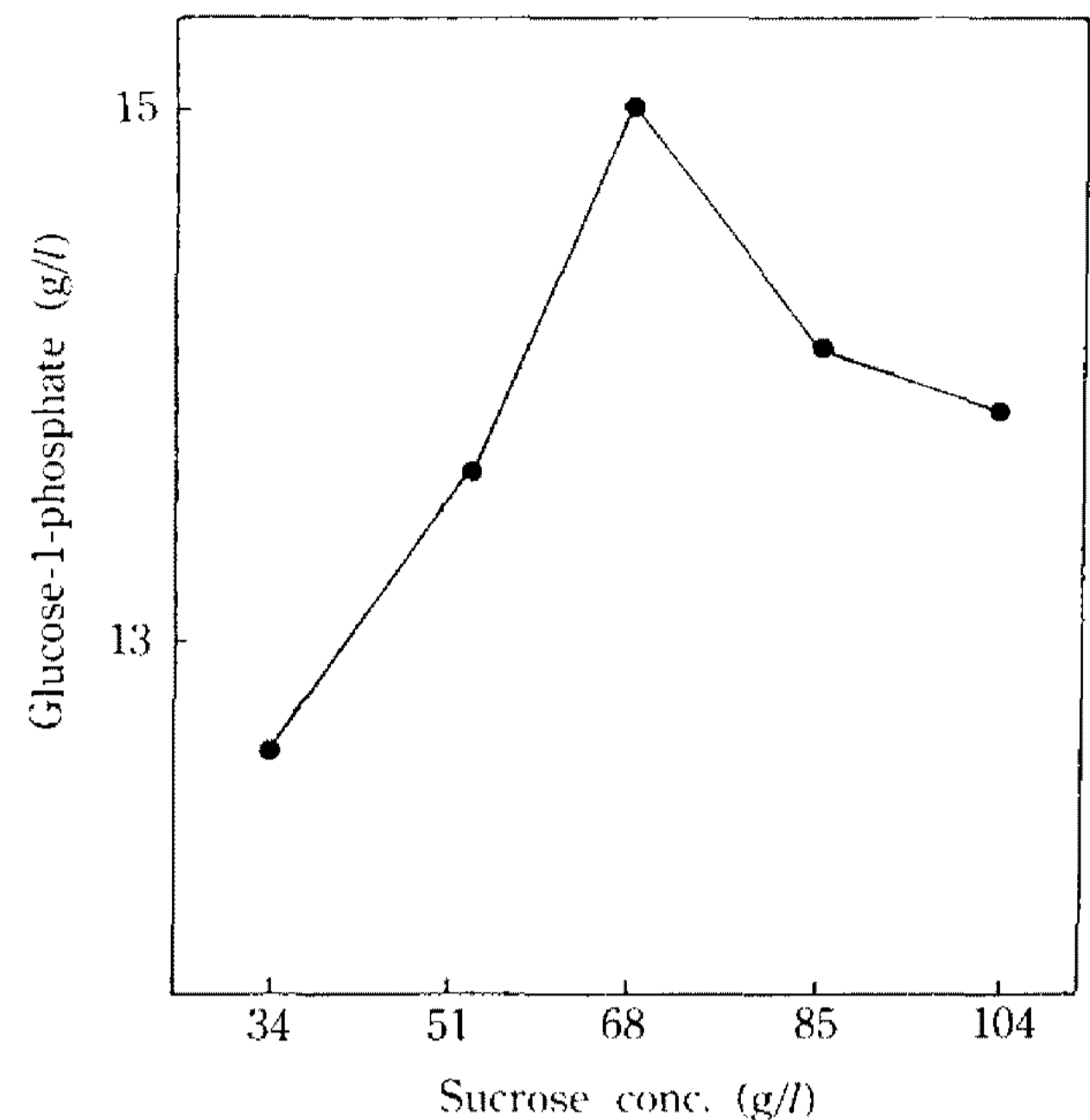
**Fig. 6. Effect of sucrose concentration on glucose-1-phosphate production with whole cells.**

Reactions were carried out for 3 hrs at 25°C in reaction mixture (pH 7.0) containing 20 g/l cell concentration and 0.1M KH_2PO_4 .

비활성이 최대가 되었으며 시간이 더 경과함에 따라 sucrose phosphorylase의 비활성이 급격하게 저하되는 것을 알 수 있었다.

휴지세포를 이용한 sucrose로부터 glucose-1-phosphate의 생산

일반적으로 sucrose phosphorylase는 세포내 효소로 알려져 있기 때문에(14) 반응 용액에서 효소의 작용을 유도하기 위하여 수확된 균체를 Table 5와

**Fig. 5. Effect of cell concentration on glucose-1-phosphate production with whole cells.**

Reactions were carried out for 3 hrs at 25°C in reaction mixture (pH 7.0) containing 0.2M sucrose and 0.1M KH_2PO_4 .

같이 처리하여 실험을 수행한 결과, 40% toluene으로 균체를 처리하였을 경우 glucose-1-phosphate 생산량은 10.22 g/l이었으며, 이는 균체를 초음파 처리하였을 때보다 glucose-1-phosphate 생산량이 41.29% 증가되었다.

휴지 세포에 의한 glucose-1-phosphate 생산에 있어 생균체량과 glucose-1-phosphate의 생산량과의 관계를 검토한 결과 Fig. 5에서 볼 수 있듯이, 생균체량이 18.0 g/l에 이를 때까지는 glucose-1-phosphate의 생산량도 거의 직선적인 비례 관계를 나타내었으나 생균체량이 20 g/l 이상이 될 때에는 거의 glucose-1-phosphate 생산량이 정상상태가 됨을 알 수 있었다. 이 때의 glucose-1-phosphate 생산량은 14.86 g/l이었다.

휴지 세포에 의한 glucose-1-phosphate 생산시 sucrose 농도가 glucose-1-phosphate의 생성에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 6에서와 같이, sucrose의 농도가 68 g/l이었을 때에 glucose-1-phosphate의 생산량은 최대치인 15.01 g/l이었다.

휴지 세포에 의한 glucose-1-phosphate 생산에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 반응 혼합액내의 pH값을 6.0에서 8.0까지 변화시키면서 glucose-1-phosphate 생산량을 검토한 결과 Fig. 7와 같이, glucose-

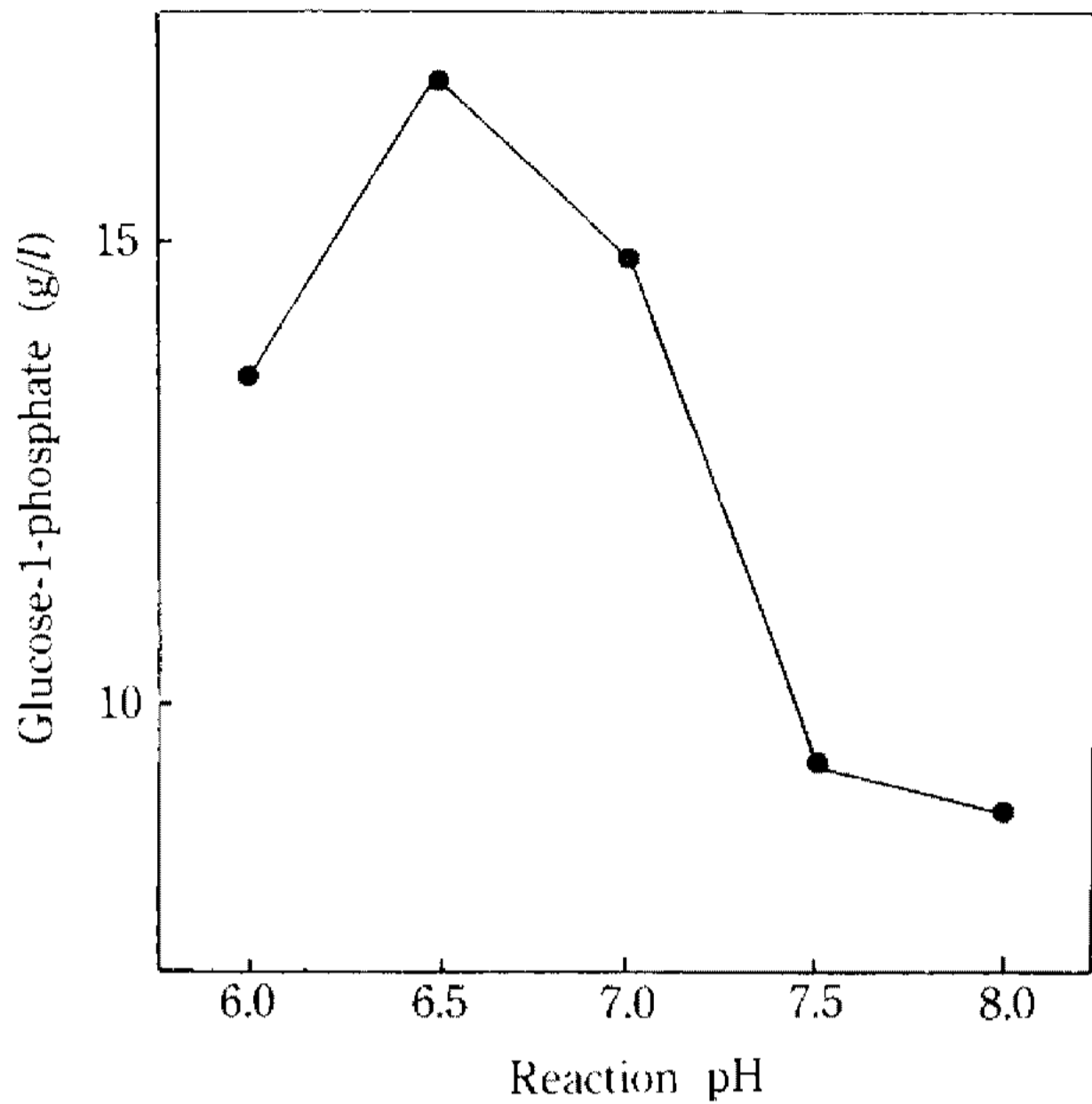


Fig. 7. Effect of pH on glucose-1-phosphate production with whole cells.
 Reactions were carried out for 3 hrs at hours at 25°C in reaction mixture containing 20 g/l cell concentration, 0.2M sucrose and 0.1M KH₂PO₄.

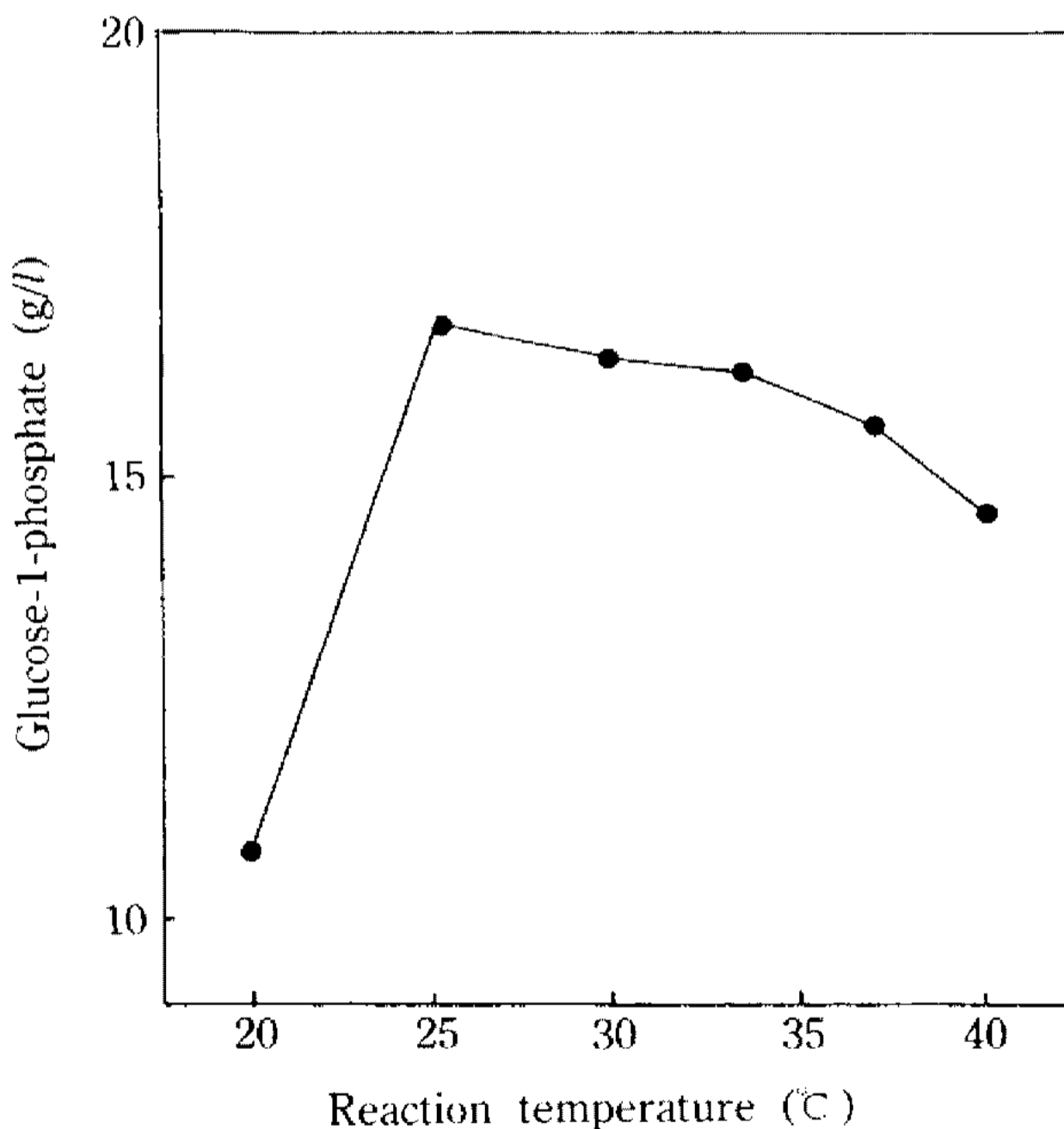


Fig. 8. Effect of temperature on glucose-1-phosphate production with whole cells.
 Reactions were carried out for 3 hrs in reaction mixture (pH 6.5) containing 20 g/l cell concentration, 0.2M sucrose and 0.1M KH₂PO₄.

1-phosphate 생산에 있어서의 최적 pH값은 6.5이었으며 pH 6.5 이상에서는 glucose-1-phosphate 생산량이 급격히 감소됨을 알 수 있었다.

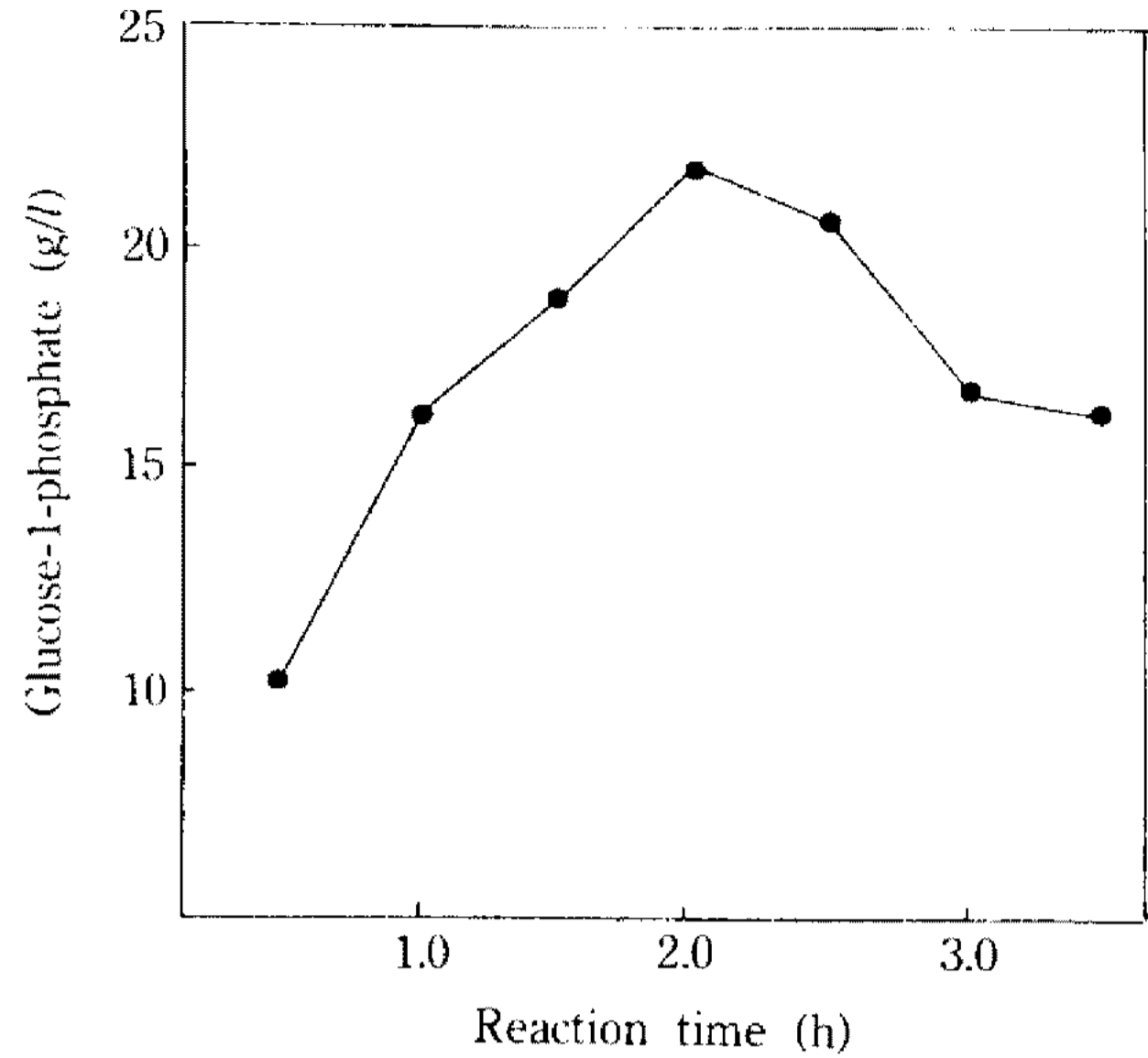


Fig. 9. Time course of glucose-1-phosphate production with whole cells.
 Reaction was carried out at 25°C in reaction mixture (pH 6.5) containing 20 g/l cell concentration, 0.2M sucrose and 0.1M KH₂PO₄.

휴지 세포에 의한 glucose-1-phosphate 생산에 있어서 온도가 미치는 영향을 조사하기 위하여 반응액의 반응온도를 20°C 에서 40°C 까지 변화시키면서 glucose-1-phosphate 생산량을 조사한 결과 Fig. 8와 같이, glucose-1-phosphate 생성량은 25°C 부터 37°C까지는 거의 일정함을 보였다.

이상의 결과들로 부터 얻어진 최적 조건하에서 *Leuconostoc* sp.의 휴지 세포에 의한 sucrose로 부터 glucose-1-phosphate 생산의 경시적인 변화를 Fig. 9에 나타내었다. 반응 후 2시간 때까지는 glucose-1-phosphate 생성량이 계속적으로 증가하지만, 2시간 이후에는 glucose-1-phosphate 생성량이 감소하는 경향을 나타내고 있다. 이 때의 최대 glucose-1-phosphate 생산량은 21.83 g/l이었으며 이는 이론적 glucose-1-phosphate 전환율로는 93.24%에 해당되었다.

요 약

Sucrose로부터 glucose-1-phosphate를 생산하기 위하여 sucrose phosphorylase 활성을 지닌 균주를 김치로부터 분리하였으며, 이들 분리 균주로부터 sucrose phosphorylase 비활성이 가장 높은 균주인 JS-05를 선별하였고, *Leuconostoc* sp.로 동정하였다. *Leuconostoc* sp. JS-05의 sucrose phosphorylase 비활성은 10 g/l sucrose, 5.0 g/l corn steep liquor 및 2.5 g/l

yeast extract를 함유하는 배지를 사용하여, 초기 pH 7.5로 조정된 후 25°C에서 20시간 배양할 때 가장 높았다. 한편, toluene으로 처리된 휴지세포를 이용하여 glucose-1-phosphate를 생산하기 위하여 최적 반응 조건하에서 2시간 반응시킨 결과 68 g/l의 sucrose로부터 21.83 g/l의 glucose-1-phosphate가 생산되었으며, 이는 이론적 glucose-1-phosphate 전환율로는 93.24%에 해당되었다.

감사의 말

본 연구는 1992년도 한국과학재단 일반 기초 연구비 지원(921-040-006-1)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Vandamme E. J., J. Vanloo, L. Machtelinckx and A. De Laporte. 1987. Microbial sucrose phosphorylase; fermentation process, properties and biotechnical applications. *Advances Applied Microbiol.* **32**, 163-201.
2. Kagan B O., S N. Latker and E M. Zsafman. 1942. Phosphorolysis of saccharose by cultures of *Leuconostoc mesenteroides*. *Biokhimiya*. **7**, 93-108.
3. Doudoroff M. 1943. Studies on the phosphorolysis of sucrose. *J. Biol. Chem.* **151**, 351-361.
4. Doudoroff M., N. Kaplan and W. Z. Hassid. 1943. Phosphorolysis and synthesis of sucrose with a bacterial preparation. *J. Biol. Chem.* **148**, 67-75.
5. Guibert A., P. Perlot and P. Monsan. 1983. Sucrose phosphorylase and its use in the synthesis of glucose-1-phosphate and its salts. *FR. 2,547,593*.
6. Guibert A. and P. Monsan. 1988. Production and purification of sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **542**, 307-309.
7. Doudoroff M. 1955. Sucrose phosphorylase of *Pseudomonas saccharophila* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Methods. Enzymol.* **1**, 225-231.
8. Leblanc, D.J. and A.J.S. Ball. 1978. A fast one step method for the silylation of sugars and sugar phosphates. *Anal. Biochem.* **84**, 574-578.
9. Gerhard M. 1983. D-glucose-1-phosphate, Pp. 185-191. *Methods of enzymatic analysis.*, Academic press, New York.
10. Chen P S., T Y. Toribara and W. Huber. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, **28**, 1756-1758.
11. Lowry O.H., N.J. Rosebrough and A.I. Farr. 1951. Protein measurement with folin phenol Reagent. *J. Biol Chem.* **193**, 264.
12. Buchanan R.E. and N. E. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Detremiative Bacteriology*. 8th ed., The Williams and Wilkins Co, Baltimore.
13. Vandamme E. J., J. Vanloo and A. De Laporte. 1987. Dynamics and regulation of sucrose phosphorylase production in *Leuconostoc mesenteroides* fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 8-15.

(Received September 1, 1993)