

## 방선균의 *xylB* 변이주에 의한 포도당 이성화효소의 생산

주길재 · 이인구\*

경북대학교 농과대학 농화학과

**Production of Glucose Isomerase from *xylB* Mutant *Streptomyces chibaensis* J-59. Gil-Jae Joo and In-Koo Rhee\***. Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea - *Streptomyces chibaensis* J-59 did not grow in the culture medium containing only xylose or xylan as a carbon source, because it was defective in xy-lulokinase production; *xylB* mutant. *S. chibaensis* J-59 was able to produce xylanase and  $\beta$ -xylosidase as well as glucose isomerase. The glucose isomerase in *S. chibaensis* J-59 was induced in the medium containing xylan or xylose which could be utilized as an inducer but not as carbon and energy sources. So we tried to produce glucose isomerase without consumption of xylose or xylan as an inducer by using *xylB* mutant *S. chibaensis* J-59. The optimum condition for the production of the glu-cose isomerase was attained in a culture medium composed of 1% xylan, 0.15% glucose, 1.5% corn steep liquor, 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , and 0.012%  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (pH 7.0). The production of the en-zyme reached to a maximum level when the bacteria were cultured for 42 h at 30°C. The enzyme pro-duction in a jar fermentor was increased twice as much as that in a flask culture.

대장균과 *Salmonella typhimurium*에서의 xylose 대사 과정은 xylose가 세포막을 통하여 세포내로 이동된 후 xylose isomerase(*xyIA* gene)에 의해 xylulose로 이성화 되고 xylulokinase(*xyIB* gene)에 의해 xylulose-5-phos-phate로 인산화 된 다음 오탄당 인산경로를 통하여 대사 된다고 알려져 있다(1). *Streptomyces*에서의 xylose 대사 과정도 다른 세균과 유사한 것으로 알려져 있다(2). 이러 한 xylose 대사에 관여하는 xylose isomerase는 포도당 을 과당으로 전환시킬 수 있는 포도당 이성화효소의 활 성을 가지고 있으므로 이성화당(High Fructose Glucose Syrup; HFGS) 생산에 이용되고 있다.

대부분의 미생물이 포도당 이성화효소를 생산하기 위 해서는 유도물질로 고가의 xylose가 필요하며 또한 배지 에 첨가한 xylose를 탄소원 및 에너지원으로 소모해 버 리기 때문에 효소생산에 많은 양의 xylose를 필요로 하 고있다. 대장균이나 방선균의 포도당 이성화효소의 생산 은 양의 조절(positive control)을 받기 때문에 몇몇 예 를 제외하고는 많은 연구자들의 노력에도 불구하고 유도 물질인 xylose를 필요로 하지않는 구성적 변이주의 분리 에 실패하였다(3, 4). 그래서 포도당 이성화효소의 생산 공정에는 항상 고가의 xylose를 유도물질로 첨가해 주어 야 한다.

*Streptomyces chibaensis* J-59는 70°C에서 7일간 열처리

에도 전혀 실활이 없고, 80°C에서 72시간 처리에서 75% 이상의 잔존활성을 가지는 내열성이 높은 포도당 이성화 효소를 생산하는 균주이다(5). 또한 *S. chibaensis* J-59는 xylose를 탄소원으로 이용하지 못하고 단지 포도당 이성 화효소의 생산에서 유도물질로만 사용하는 특성을 가지 고 있기 때문에 고가의 xylose를 소모하지 않고 포도당 이성화효소를 생산할 수 있다(5). 그래서 본 연구에서는 *xylB* 변이주인 *S. chibaensis* J-59를 사용하여 xylose의 소모없이 포도당 이성화효소의 생산조건을 검토하였기 에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주 및 배지

부식토양으로부터 분리한 *S. chibaensis* J-59(5)를 공 시균주로 사용하였으며, xylose 대사에 관여하는 효소실 험을 위하여 *S. chibaensis* KCCM 11214와 *S. rubigin- osus* KCTC 9042를 각각 한국종균협회 및 생명공학연구 소 유전자은행에서 분양받아 대조균으로 사용하였다. 배 지는 glucose-asparagine 배지(1.5% glucose, 0.1% as- paragine, 0.05%  $K_2HPO_4$ , pH 7.0)와 CSL 배지(1% xy- lan, 1% corn steep liquor, 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , pH 7.0) 에 각 성분들을 첨가하거나 약간 변형하여 사용하였다.

#### 균의 배양

플라스크 배양은 glucose-asparagine 배지에서 36시간 배양한 종배양액을 CSL 배지에 1% (v/v)되게 접종한

\*Corresponding author

Tel. 82-53-950-5718, Fax. 82-53-953-7233

E-mail: ikrhee@bh.kyungpook.ac.kr

Key words: *xylB* mutant, *Streptomyces chibaensis*, Glucose isomerase, Xylose isomerase

후, 120 rpm으로 진탕하면서 30°C에서 40시간 이상 배양하였다. 250 ml 및 500 ml 삼각 플라스크(baffles flask)에 CSL 배지 50 ml 및 100 ml를 각각 넣어서 배양하면서 포도당 이성화효소의 생산에 미치는 각종의 탄소원, 질소원, 금속이온, pH, 배양시간 및 온도의 영향을 조사하였다.

Jar fermentor(2.5 l, 한국발효기상사) 배양에서의 사용배지는 플라스크 배양에서의 최적배지인 CSL 배지를 이용하였고, 공기 주입량은 1 vvm, 교반 속도는 400 rpm으로 임의 설정하여 배양하였으며, 배양중 pH의 변화, 균체 성장 및 포도당 이성화효소 활성 등을 조사하였다. 초기 pH를 7.0으로 하였고, 배양온도는 30°C로 고정하여 60시간 배양하였다.

### 균체량 측정

균체량은 Schmidell과 Fernandes의 방법(6)에 따라 측정하였다. 즉, 배양액 1 ml를 원심분리하여 집균하고 증류수로 2회 세척한 다음 증류수로 현탁하여 0.5 ml로 만든다. 이 균체 현탁액 0.5 ml와 2N-NaOH 0.5 ml를 넣고 100°C에서 30분간 가열하여 균체 단백질을 추출한다. 이 추출액을 원심분리한 후 소의 혈청 알부민을 표준 단백질로 하여 Bradford법(7)에 따라 상징액의 단백질 함량을 측정하여 배양액 ml당 단백질의 함량을 상대적인 균체량으로 나타내었다.

### 효소활성의 측정

포도당 이성화효소 활성측정은 전보(5)에서와 같이 측정하였다. 효소활성 단위는 국제단위(GIU)로 상기 반응 조건에서 분 당 1  $\mu\text{mol}$ 의 fructose를 생산하는 효소의 양으로 나타내었다.

Xylose isomerase 활성측정은 포도당 이성화효소 활성측정 방법에서 반응액에 200 mM의 glucose 대신 100 mM의 xylose를 기질로 사용하여 포도당 이성화효소의 활성측정 방법과 동일하게 반응시키고 생성된 xylulose를 cysteine-carbazole 법(8)으로 540 nm에서 측정하였다. 효소활성 단위는 상기조건에서 균체 현탁액 ml당 D-xylose가 D-xylulose로 전환될때 540 nm의 파장에서 흡광도의 증가수로서 나타내었다.

Xylulokinase 활성측정은 Simpson의 방법(9)으로 0.5M Tris-0.5M KCl-0.01M EDTA buffer (pH 8.0) 0.1 ml와 0.01M phosphoenolpyruvate, 0.05M  $\text{MgCl}_2$ , 0.01M ATP(1:1:0.5 v/v)를 조제해서 만든 혼합액 0.25 ml, 0.003M NADH 0.03 ml, 0.01M D-xylulose 0.1 ml, L-lactic dehydrogenase 0.03 ml(60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sigma Co. L2375) 및 증류수 0.39 ml를 혼합한 후 40°C에서 3분간 예열시켰다. 전보(5)에서와 같이 조제한 효소액을 0.01M Tris-HCl-1mM EDTA-1mM dithio-

threitol buffer(pH 8.0)로 2배 희석하여 0.1 ml를 가한 후 340 nm에서 1분간 흡광도의 감소량으로 효소활성을 측정하였다. 효소 활성 단위는 상기 반응조건에서 분 당 1  $\mu\text{mol}$ 의 D-xylulose를 인산화 시킬 수 있는 효소의 양으로 나타내었다.

Xylanase 활성측정은 전보(5)에서와 같이 측정하였다. 효소활성 단위는 분 당 1  $\mu\text{mol}$ 의 xylose를 생산하는 효소의 양으로 나타내었다.

$\beta$ -xylosidase 활성측정은 Kluepfel 등(10)의 방법에 따라 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0)에 현탁시킨 0.1% PNPX(p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside) 용액 1 ml에 전보(5)의 포도당 이성화효소 측정시와 같이 조제한 효소액 1 ml를 가하고 40°C에서 10분간 반응시킨 후 0.5M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 2 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 단위는 상기 반응조건에서 분 당 1  $\mu\text{mol}$ 의 p-nitrophenol을 생성할 수 있는 효소의 양으로 나타내었다.

### 당의 분석

배양액에 존재하는 glucose는 glucose oxidase-peroxidase (PGO) kit(Sigma Diagnostic Kit No. 510)를 사용하여 정량하였다. Glucose 용액 0.5 ml에 PGO 시약 5 ml를 넣고 섞은 후 실온에서 45분간 반응하여 광전비색계(Spectrophotometer, Hitachi Model U-2000)로 560 nm에서 측정하였다. 전체당은 dinitrosalicylic acid (DNS; 11)법으로 환원당 정량하여 측정하였고, xylose는 전체당에서 glucose의 양을 제외한 양으로 환산하여 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### xy/B 변이주의 확인

전보(5)에서 *S. chibaensis* J-59는 xylose를 탄소원 및 에너지원으로 이용하지 못하였다. 따라서 본 균의 xylose 대사과정을 규명하기 위하여 Pridham과 Gottlieb(12)가 사용한 최소배지(basal mineral salts agar)에서 오탄당의 이용성을 조사한 결과, Fig. 1과 같이 glucose와 오탄당 중에서 arabinose, ribose 등은 잘 이용하였으나 xylose 및 xylulose는 탄소원으로 이용하지 못하였다.

*S. chibaensis* J-59가 xylose 및 xylulose를 탄소원으로 이용하지 못하는 것으로 보아 xylose 대사과정에 이상이 있을 것으로 판단되었다. 그래서 xylose 대사에 관여하는 xylose isomerase 및 xylulokinase 활성을 조사한 결과, Table 1과 같이 xylose isomerase 활성은 *S. chibaensis* J-59가 2.87 단위로 나타났으며, 대조균으로 사용한 *S. rubiginosus* KCTC 9042는 1.64 단위, *S. chibaensis* KCCM 11214는 1.67 단위로 효소 활성이 약간의 차이는

있으나 비교실험한 균주 모두 xylose isomerase를 생산하였다. 그러나 xylulokinase 활성은 *S. rubiginosus* KCTC 9042는 10.24 단위, *S. chibaensis* KCCM 11214는 8.63 단위로 생산하였으나 *S. chibaensis* J-59는 생산하지 않았다. 또한 *S. chibaensis* J-59는 xylan을 분해할 수 있는 xylanase 및 세포내 β-xylosidase를 생산할 수 있었다 (Table 1).

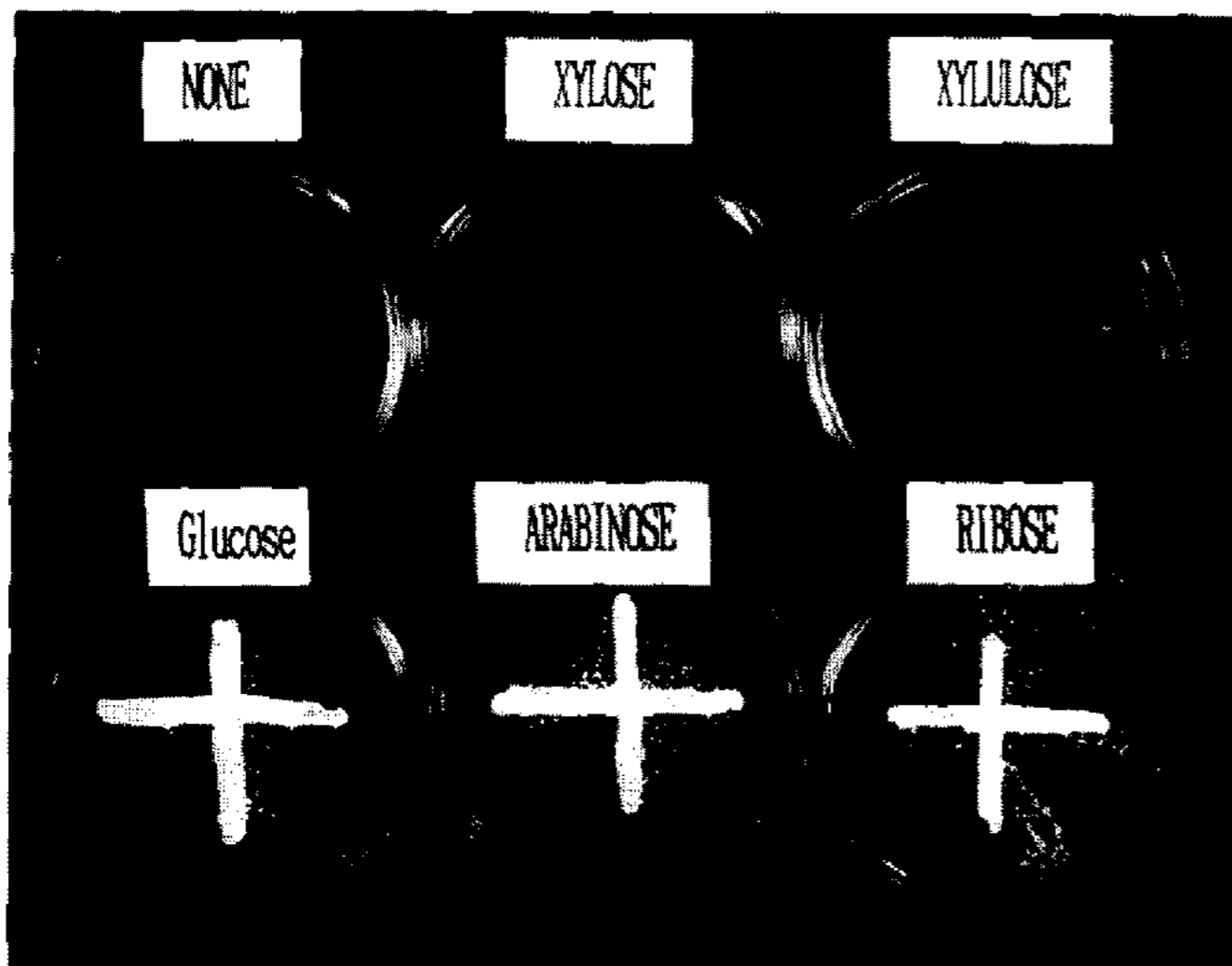
따라서 본 균은 xylanase와 β-xylosidase에 의한 xylan의 분해로 생긴 xylose가 xylose isomerase에 의해 xylulose로 이성화된 다음 xylulokinase를 생산할 수 없기 때문에 xylulose-5-phosphate로 전환되지 못하여 xylose와 xylulose를 탄소원으로 이용할 수 없음을 알 수 있었다. *S. chibaensis* J-59는 Table 1에서와 같이 xylose isomerase, xylanase 및 xylosidase 활성이 있고 xylulokinase의 활성이 없으므로 xyIB 변이주인 것으로 판단되었다. 본 균을 변이주로 만들기 위하여 별도의 돌연변이 유발원을 처리하지 않았고 분리될 당시부터 xyIB 변이주이였으므로 자연계에서 우연히 생긴 돌연변이주인 것으로 생각된다. xyIB 변이주복의 귀돌연변이 빈도는 30°C에서 14일간 배양한 oatmeal 평판배지(5)로부터 조제한 포자현탁액을 Pridham과 Gottlieb(12)의 1% xylose 함유 최소배지(basal mineral salts agar)에 도말하고 30°C에서 14일간 배양하여 형성된 colony의 수

로 판정하였고, 그 결과 xyIB 변이주는 10<sup>-10</sup> 이하의 빈도로 xyIB<sup>+</sup>로 복귀되지 않았다.

**효소생산에 미치는 탄소원의 영향**

본 균에서 xylose가 포도당 이성화효소의 유도물질로 작용하는 지를 확인하기 위하여 탄소원을 제거한 CSL 배지에서의 xylose 농도별 포도당 이성화효소의 유도 정도를 조사한 결과, xylose의 농도가 증가함에 따라 포도당 이성화효소의 활성이 유도되었으며, xylose 농도가 0.4%에서 포도당 이성화효소 활성이 2.46 단위(GIU/ml)로 가장 높았다. 그러나 glucose, fructose, mannose, ribose 및 arabinose 등을 첨가한 배지에서는 포도당 이성화효소를 생산하지 못하였다. 반면 균의 생육은 탄소원을 가하지 않는 대조구나 xylose를 첨가한 배지를 제외하고는 모두 높았다.

따라서 xylose를 탄소원으로 이용하지 못하면서 포도당 이성화효소의 유도에 사용되므로 균의 배양중 포도당 이성화효소의 생산배지 내의 xylose 소모성을 조사하였다. Glucose-asparagine 배지에 glucose 대신 0.2% xylose를 첨가하여 시간별 xylose의 소모와 효소활성을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 이때 xylose는 전혀 소모되지 않았으나 배양시간이 길어짐에 따라 포도당 이성화효소의 활성은 증가하였으며 배양 36시간 이후 거의 일정한 수준에 도달하였다.



**Fig. 1. Utilization of pentoses by *S. chibaensis* J-59.**  
The bacteria were grown in basal mineral salts agar medium containing 1% sugars at 30 °C for 42 h.

**Table 2. Effect of carbon sources on the production of glucose isomerase by *S. chibaensis* J-59**

Carbon source (%)	Growth	Glucose isomerase (GIU/ml)	Relative activity (%)
None	Moderate	0.42	17
Xylose (0.2)	Moderate	2.02	82
	Moderate	2.46	100
	Moderate	2.43	98
	Moderate	2.41	98
Glucose (1.0)	Good	0.06	2
Fructose (1.0)	Good	0.04	2
Mannose (1.0)	Good	0.11	4
Ribose (1.0)	Good	0.42	17
Arabinose (1.0)	Good	0.02	1
Sorbitol (1.0)	Good	0.43	18

The basic medium contains 1% CSL, 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 7.0. The glucose isomerase activity was determined after growth for 40 h at 30 °C.

**Table 1. Detection of enzyme activities for xylose metabolism in *Streptomyces chibaensis* J-59**

	Xylose isomerase (unit/ml)	Xylulokinase (unit/ml)	Xylanase (unit/ml)	Xylosidase (unit/ml)
<i>S. chibaensis</i> J-59	2.87	ND	0.67	1.31
<i>S. chibaensis</i> KCCM 11214	1.67	8.63	0.23	-
<i>S. rubiginosus</i> KCTC 9042	1.64	10.24	0.12	-

\*ND, not detected ; -, not tested

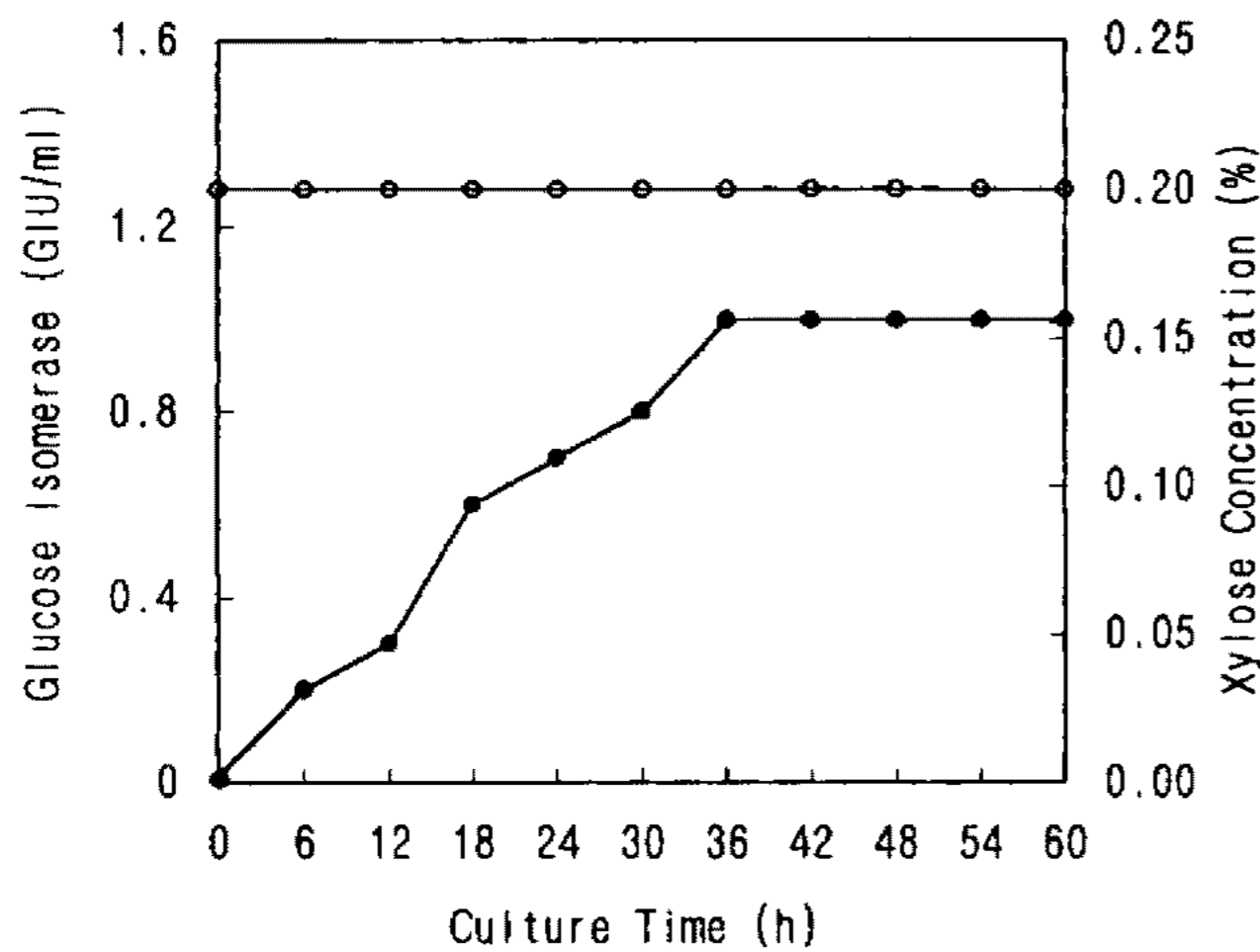


Fig. 2. Production of glucose isomerase and xylose consumption by *S. chibaensis* J-59 in glucose-asparagine medium containing 0.2% xylose instead of 1.5% glucose.

●, glucose isomerase; □, xylose concentration.

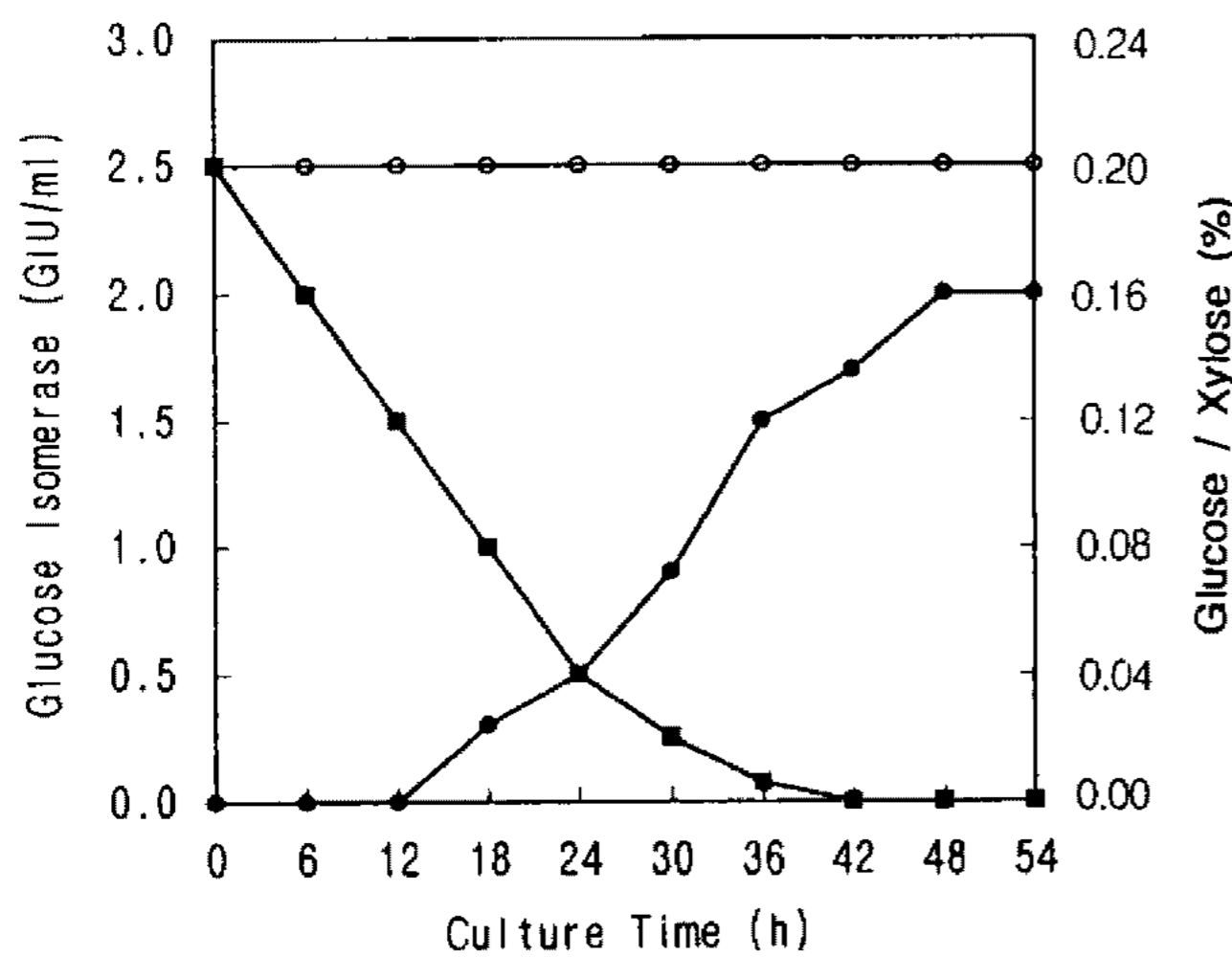


Fig. 3. Production of glucose isomerase and consumption of sugars in glucose-asparagine medium containing 0.2% xylose and 0.2% glucose.

●, glucose isomerase; ○, xylose concentration; ■, glucose concentration.

또한 0.2% xylose와 0.2% glucose를 동시에 첨가하여 비교 실험한 결과, Fig. 3과 같이 xylose는 배양 종료까지 전혀 소모되지 않았지만, glucose는 배양 42시간때 전부 소모하였고, glucose가 반이상 소모된 배양 12시간 이후부터 포도당 이성화효소가 생성되기 시작하여 48시간 배양시 포도당 이성화효소의 활성은 최대에 도달하였다.

대부분 미생물의 포도당 이성화효소 생산에는 xylose를 필요로 하고 있으나(13), 서 등(14)은 *Streptomyces* sp. GI32에서 sorbitol 첨가시 xylose보다 50% 정도의 효소 생산량이 증가하였다고 보고한 바 있고, Nataka와 Yoshimura(15)에 의하면 *Escherichia intermedia*에서 포도당 이성화효소 생산은 glucose보다 sorbitol을 첨가하였을 때 20%, xylose를 첨가하였을 때 10% 정도로 효소생

Table 3. Effect of xylan containing materials on glucose isomerase production

Xylan (%)	Glucose isomerase (GIU/ml)	Relative activity (%)
None	0.42	17
Oatspelt xylan (1.0)	2.01	81
Birchwood xylan (0.5)	1.74	70
(1.0)	2.42	98
(1.5)	2.41	98
(2.0)	2.43	99
Poplarwood xylan (1.0)	1.96	80
Mongolian oak xylan (1.0)	1.97	80
Xylose (0.4)	2.46	100

The culture conditions were the same as Table 2.

산이 낮았다고 한다. 그러나 본 균의 경우 sorbitol 첨가시 균체 성장은 양호하였으나 포도당 이성화효소 생산은 거의 유도되지 않았다.

#### 효소생산에 미치는 xylan의 영향

Xylan은 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*, poplarwood)와 신갈나무(*Quercus mongolica*, mongolian oak) 등에서 Wise 등의 방법(16)으로 holocellulose를 추출한 후, KOH 법(17)으로 xylan을 추출하였다. 추출한 xylan 및 Sigma사로 부터 구입한 자작나무(birchwood) xylan과 oatspelt xylan들을 1% 첨가한 배지에서의 포도당 이성화효소 생산력을 조사한 결과는 Table 3과 같다. Oat spelt, 현사시나무 및 신갈나무의 xylan보다 자작나무 xylan을 첨가할 경우 효소생산이 높았고, 1% 자작나무 xylan을 첨가시에 2.42 단위로 0.4% xylose를 첨가하였을 때의 효소 활성과 비교하면 약 98%로 나타나 거의 비슷하였다.

현사시나무, 신갈나무, 벗짚 및 콩각지 등에서 추출한 holocellulose를 첨가할 경우, 균체의 성장은 현저히 증가하였으나 포도당 이성화효소의 생산은 xylose를 첨가하였을 때의 약 60% 정도로 낮았다(데이터 미발표). 또 자작나무 xylan에 비해 oatspelt, 현사시나무 및 신갈나무 xylan에서 효소생산이 낮은 이유는 자작나무 xylan이 90% 이상 xylose 잔기로 구성되어있는 반면, oatspelt xylan은 glucose 잔기가 15%, arabinose 잔기가 10% 정도 포함되어 있으며, 또한 현사시나 신갈나무 xylan은 80%의 xylose 잔기를 주축으로 glucose, arabinose 및 galactose 등의 잔기를 다량 함유하고 있으므로(18) 분해산물중에 존재하는 glucose가 효소생산을 억제하거나, 또는 가수분해율이 낮기 때문인 것으로 생각된다.

#### 균의 생육 및 효소생산에 미치는 glucose의 영향

대부분의 유도효소는 glucose에 의해 이화물 억제를

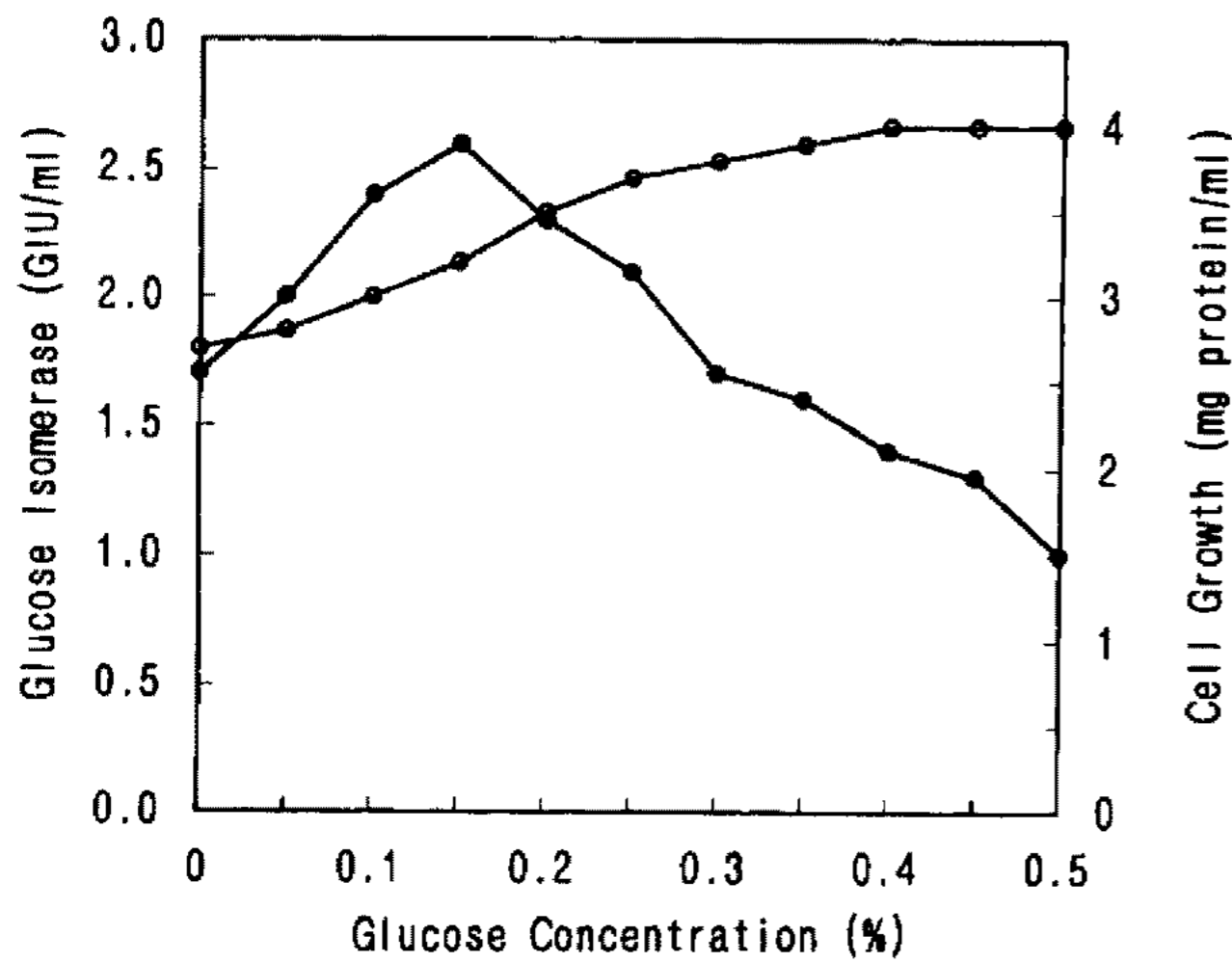


Fig. 4. Effect of glucose concentration on the glucose isomerase production.

The bacteria were grown in CSL medium containing 1% birchwood xylan and glucose at 30°C for 42h. ○, cell growth; ●, glucose isomerase.

받지만 소량 첨가시 배양초기에 에너지원으로 우선적으로 소모될 수 있다. CSL 배지에 glucose를 농도별로 첨가하여 효소의 생산량을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4에서와 같이 glucose를 0.15% 첨가시 균의 성장이 높았으며, 포도당 이성화효소 활성도 2.55 단위로 증가하였다. Glucose 농도가 증가할수록 균의 성장은 높았으나, 효소 생산은 점차 감소하였다. 이러한 현상은 glucose에 의한 이화물 억제(catabolite repression)의 효과가 나타난 것으로 판단된다.

배지중에 xylose만 존재할 경우(Fig. 2) 효소생산이 배양초기 부터 시작되는데 반해 xylose와 glucose가 공존할 경우(Fig. 3) 처음부터 효소가 생산되지않고 배양중 glucose 농도가 0.1% 이하로 하강한 12시간 이후 부터 효소생산이 시작되는 현상도 glucose에 의한 이화물 억제 효과로 생각된다. 위에서 언급한 바와 같이 holo-cellulose 사용시 효소생산이 저조한 것은 본 균이 생산하는 cellulase(5)에 의해 holocellulose가 분해되어 glucose의 농도가 증가하기 때문이다. 이와같이 glucose 농도증가로 균체의 성장은 왕성하였지만 효소의 생산은 glucose에 의해 이화물 억제를 받기 때문에 낮은 것으로 추측된다.

#### 기타 배양조건

질소원이 포도당 이성화효소의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1% birchwood xylan, 0.15% glucose, 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (pH 7.0)로 구성된 기본배지에 1% 유기 질소원(corn steep liquor, yeast extract, beef extract, malt extract, peptone, autolyzed yeast, casamino acid, nutrient broth 및 tryptone) 또는 0.5% 무기 질

Table 4. Optimum composition of culture medium and cultural conditions for the glucose isomerase production in the baffled flask by *S. chibaensis* J-59

Birchwood xylan	1%	pH	7.0
Glucose	0.15%	Cultural temp.	30°C
Corn steep liquor	1.5%	Cultural time	42h
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1%	Enzyme activity	2.78 (GIU/ml)
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.012%		

소원( $(NH_4)_2SO_4$ ,  $NH_4Cl$ ,  $KNO_3$ ,  $NaNO_3$ ,  $(NH_4)HPO_4$  및 urea)을 첨가하여 효소생산성을 조사하였다. 그 결과 균의 성장은 yeast extract 및 malt extract에서 높았고, 효소생산성은 corn steep liquor(CSL)에서 높았다. CSL을 농도별로 조사한 결과 1.5% CSL에서 포도당 이성화효소의 활성이 2.66 단위로 가장 높았다. 그러나 무기 질소원은 균의 성장 및 효소 생산성에 별 영향을 주지 못하였다.

금속이온( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  및  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )을 각각 0.1%가 되게 첨가하여 효소 생산성을 조사한 결과,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 첨가할 경우 효소 활성은 2.66 단위로 가장 우수하였다. 더우기 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 에 0.012%  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 첨가한 경우 효소활성이 2.74 단위로 증가되었다.

효소생산에 미치는 배지의 초기 pH의 영향을 조사한 결과 효소생산이 pH 7.0일때 가장 우수하였다. 20°C에서 부터 40°C까지 2°C 간격으로 온도별 효소생산성을 조사한 결과, 30°C일때 가장 좋았으며 50°C 이상의 온도에서는 균의 생육 뿐 아니라 효소생산성도 아주 낮았다. 균의 성장은 36시간 이후에 정지기에 도달하였고 효소 활성은 42시간 배양시 가장 높았다(Table 4). 500 ml 플라스크에서 조사한 최적배지(Table 4) 100 ml를 넣고 배양하여 포도당 이성화효소 생산성을 조사한 결과 2.78 단위로 나타났으며, 또한 1% xylan 대신 0.4% xylose를 첨가할 경우 2.80 단위로 나타나 거의 비슷하였다.

본 균주가 xylose를 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 없고 배양액 중에 남아있으므로 배양여액의 효율적 이용을 위하여 재사용을 시도하였다. 먼저 상기 최적조건으로 균을 배양하여 균체를 수거한 후 배양여액을 두번째 배양에 이용하였다. 두번째 배양은 첫번째 배양여액에 xylan을 제외한 성분 즉, 0.15% glucose, 1.5% CSL, 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.012%  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (pH 7.0)을 첨가하고 살균하여 균을 접종한 후 첫번째와 동일하게 배양하였다. 세번째 배양은 두번째 배양여액에 0.15% glucose만 첨가하여 상기조건과 동일하게 배양하였다. 그 결과 효소생산은 첫번째 배양에서 2.78 단위(GIU/ml), 두번째 배양에서 2.76 단위, 세번째 배양에서 2.73 단위의 효소를 얻을 수 있었다. 이와같이 xyIB 변이주인 *S. chibaensis* J-59는 xylan을 한번만 첨가해준 배양여액

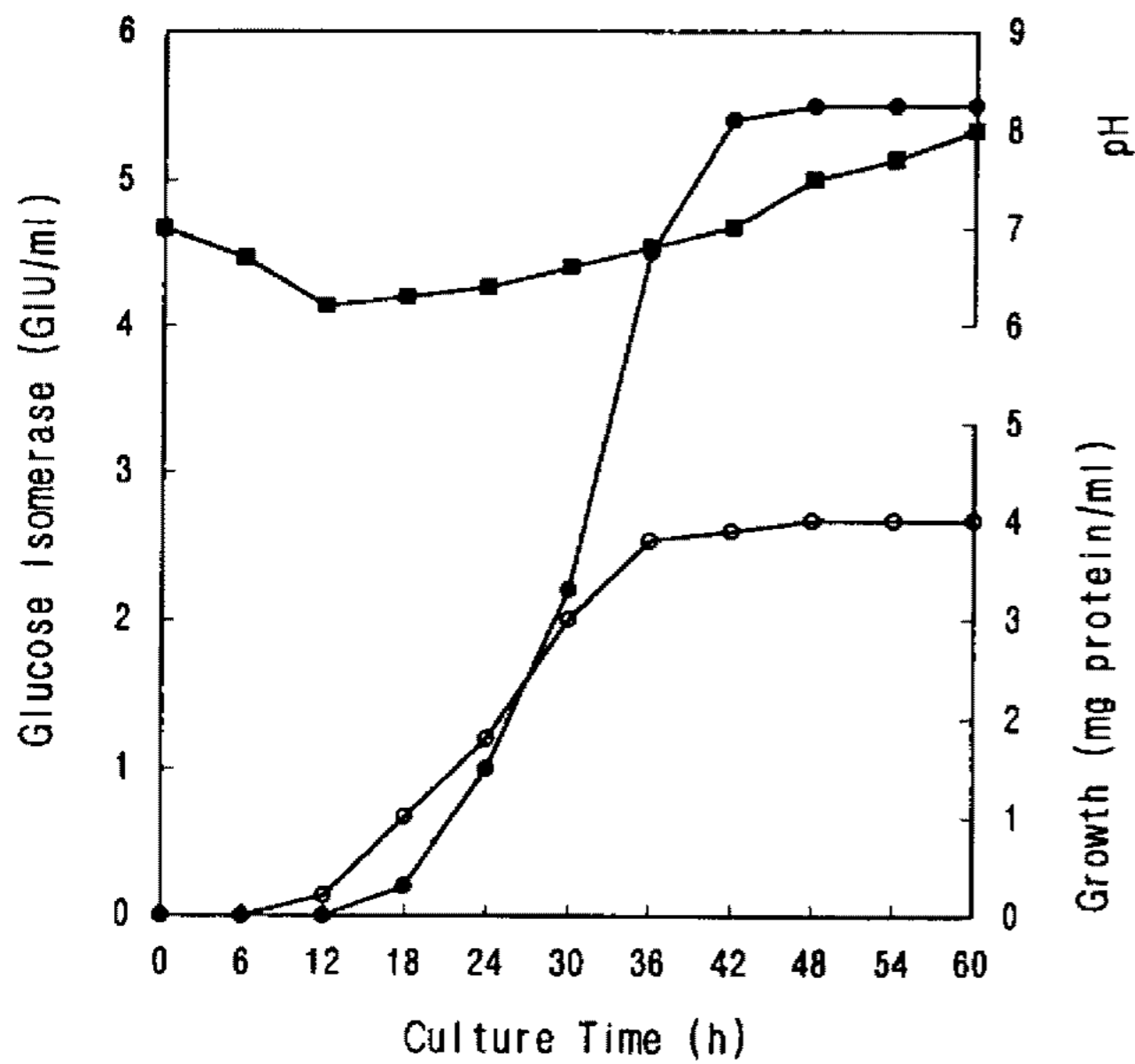


Fig. 5. Changes of enzyme activity, pH, cell growth and xylose consumption during the cultivation of *S. chibaensis* J-59 in the jar fermentor.

○, cell growth; ●, glucose isomerase; ■, pH.

의 세번 재사용에서도 xylose와 xylan의 첨가없이 포도당 이성화효소를 계속 생산할 수 있었다.

#### Jar fermentor 배양

Jar fermentor 배양은 Table 4와 같이 플라스크 배양에서의 효소생산 최적배지인 CSL 배지(1% birchwood xylan, 0.15% glucose, 1.5% CSL, 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.012%  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , pH 7.0)에서 60시간 배양하였다. 2.5 l jar fermentor에 1 l의 상기배지를 넣고 재료 및 방법에서와 같이 배양한 결과, Fig. 5와 같이 pH는 배양초기에 pH 7.0에서 배양 12시간에 6.5까지 낮았으나 그 이후 계속 증가하여 배양 60시간에는 pH 8.0까지 도달하였다. 균의 성장은 배양 18시간 이후 급격히 증가하여 36시간 배양이후 정지기에 달하였고, 포도당 이성화효소 활성은 배양 42시간 이후 ml당 5.5 단위로 최대의 활성을 나타내었으며, 플라스크 배양시 효소활성 보다 2배 가량 증가하였다.

이러한 효소생산량은 *S. flavogriseus*(10; 3.5 GIU/ml) 등 대부분의 *Streptomyces*속 보다 높고 *S. phaeochromogenes*(13; 5.5 GIU/ml)와 비슷하였다. *Streptomyces*에서 포도당 이성화효소의 생산 유도물질로 사용하는 xylose량은 Tsumura와 Sato(19)와 Takasaki(20)를 비롯하여 대부분의 연구자들(4, 21, 22)이 1%의 xylose를 사용하였다. 또한 홍 등(23)은 *Streptomyces luteogriseus* TH 34에서 3%의 xylose를, Ohmomo 등(24)은 *Streptomyces flavoriensis*에서, Inyang 등(25)은 *Streptomyces* sp. PLC에서, 서 등(14)은 *Streptomyces* GI32에서 2% xylose를 유도물질로 사용하였다. 그러나 *xyIB* mutant인

*S. chibaensis* J-59는 jar fermentor 배양에서도 0.4% xylose 첨가시 플라스크 배양과 마찬가지로 최대활성을 나타내었으며, 첨가한 xylose는 배양초기부터 배양이 끝날 때까지 소모되지 않고 남아있었다. 따라서 본 균은 효소생산에서의 유도물질로 첨가하는 xylose의 양을 줄일 수 있으며, 또한 xylanase 및 xylosidase를 생산하므로 0.4% xylose 대신 1% xylan으로 유도물질의 대체가 가능하여 효소의 생산원가가 절감될 수 있을 것으로 생각된다.

#### 요 약

*S. chibaensis* J-59는 xylanase,  $\beta$ -xylosidase, 및 xylose isomerase를 생산할 수 있지만 xylose를 탄소원으로 이용할 수 없는 *xyIB* 변이주로 확인 되었다. Xylose를 에너지원으로 이용할 수 없는 *xyIB* 변이주를 사용하므로서 고가의 xylose를 소모하지 않고 포도당 이성화효소를 생산할 수 있는 조건을 검토하였다. 그 결과 탄소원으로 0.4% xylose에서 포도당 이성화효소의 활성이 가장 높았고, xylose 대신 여러 종류의 목재로부터 추출한 xylan을 첨가하여 효소생산성을 조사한 결과에서는 1% 자작나무 xylan이 가장 효소생산량이 높았으나, 균의 성장은 xylose나 xylan 모두에서 낮았다. 따라서 균의 성장을 위해 CSL 배지에 0.15% glucose를 첨가할 경우 균체 성장 및 효소생산량이 증가되었다. 질소원은 1.5% CSL이 좋았고 무기질소원은 효소생산에 큰 영향을 미치지 못하였다. 금속 이온으로 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 에 0.012%  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 첨가할 경우 효소 생산량이 더 증가하였다. 배지의 초기 pH가 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과에서 배지의 pH가 7.0일때 가장 좋았고, 배양시간은 42시간이었다. 따라서 효소의 최적 생산조건은 1% 자작나무 xylan, 1.5% CSL, 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.012%  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (pH 7.0)로 구성된 배지에서 30°C로 42시간 배양하는 경우이며 이때 효소 활성은 2.78 단위(GIU/ml)로 나타났다. Jar fermentor 배양에서의 포도당 이성화효소 활성은 배양 42시간 이후 5.5 단위로 플라스크 배양시 효소활성 보다 2배 가량 증가하였다.

#### 감사의 글

이 연구는 1995년도 한국과학재단의 핵심전문연구비(951-0605-071-2)에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Shamanna, D. K., and K. E. Sanderson. 1979. Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.* **139**: 64-70.

2. Marcel, T., D. Drocourt, and G. Tiraby. 1987. Cloning of the glucose isomerase (D-xylose isomerase) and xylose kinase gene of *Streptomyces violaceoniger*. *Mol. Gen. Genet.* **208**: 121-126.
3. Hafner, E. W. 1985. Constitutive glucose isomerase producer. U.S. patent 4,532,208.
4. Sanchez, S. and C. M. Quinto. 1975. D-Glucose isomerase: Constitutive and catabolite repression-resistant mutant of *Streptomyces phaeochromogenus*. *Appl. Microbiol.* **30**: 750-754.
5. 주길재, 권기석, 이인구. 1997. 내열성 포도당 이성화효소를 생산하는 *Streptomyces* sp. J-59의 분리 및 동정. 한국산업미생물학회지 **25**(1): 15-22.
6. Schmidell, W., and M. V. Fernandes. 1976. The measurement of cellular protein content as a method for determining mold concentration. *J. Ferment. Technol.* **54**: 225-228.
7. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
8. Dische, Z., and E. Borenfreund. 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.* **192**: 583-587.
9. Simpson, F. J. 1966. D-xylose kinase, *Methods Enzymol.* **9**: 454-458.
10. Kluepfel, D., L. Biron, and M. Ishaque. 1982. Simultaneous production of cellulase complex and glucose isomerase by *S. flavogriseus*. *Biotechnol. Lett.* **2**: 309-314.
11. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
12. Shirling, E. B., and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
13. Tsumura, N., M. Hagi, and T. Sato. 1965. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. Part II. Properties of the enzyme from *Streptomyces phaeochromogenes*. *Agric. Biol. Chem.* **29**: 1129-1134.
14. 서형주, 김진만, 이태경, 양한철. 1989. *Streptomyces* sp. GI32 방선균의 glucose isomerase 생산과 효소특성. 한국산업미생물학회지 **17**: 198-201.
15. Natake, M., and S. Yoshimura. 1964. Studies on glucose isomerase of bacteria. Part II. The glucose isomerizing activity of *Escherichia intermedia*, HN-500. *Agric. Biol. Chem.* **28**: 505-509.
16. Wise, L. E., M. Murphy, and A. A. D'Aioco. 1946. Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicellulose. *J. Paper Trade* **122**: 35-43.
17. 李鍾潤, 趙南奭, 石律丁, 中野準三. 1981. 熱葉産 廣葉樹材キシランに関する研究. 木材學會誌 **27**: 745-747.
18. 이종윤, 엄태진. 1986. 참나무류의 hemicellulose 중 xy-lan. 한국 펄프·종이 공학회 **18**: 3-13.
19. Tsumura, N. and T. Sato. 1965. Enzymatic conversion of the D-glucose to D-fructose. Part VI. Properties of the enzyme from *Streptomyces phaeochromogenus*. *Agric. Biol. Chem.* **29**: 1129-1134.
20. Takasaki, Y. 1966. Studies on sugar isomerization enzyme. Production and utilization of glucose isomerase from *Streptomyces* spp. *Agric. Biol. Chem.* **30**: 1247-1253.
21. Chou, C. C., M. R. Ladisch, and G. T. Tsao. 1976. Studies on glucose isomerase from a *Streptomyces* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 489-493.
22. Kasumi, T., K. Hayashi, and N. Tsumura. 1981. Subunit structure of glucose isomerase from *S. griseofuscus* S41. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 1097-1103.
23. 홍승서, 백진기, 이현수, 국승욱, 박관화. 1991. 포도당 이성화 효소 생산성 신균주 *Streptomyces luteogriseus*의 분리 및 발효특성. 한국산업미생물학회지 **19**: 296-302.
24. Ohmomo, S., T. Shikawak, Y. Kurosaki, T. Hashizume, Y. Tozawa, and K. Ueda. 1985. Biotransformation of D-xylose to D-glucose by immobilized enzyme prepared from *Streptomyces flavorinensis*. *J. Ferment. Technol.* **63**: 331-335.
25. Inyang, C. U., U. Gebhart, S. K. C. Obi, and H. Bisswanger. 1995. Isolation and characterization of a D-glucose/xylose isomerase from a new thermophilic strain *Streptomyces* sp. PLC. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 632-638.

(Received 15 October 1996)