

# 葡萄糖 異性化 酵素에 關한 研究\*

第一報, 葡萄糖 異性化 酵素生成菌의 分離 및 檢索

徐正垣, 金鍾奎, 奇宇京, 李麟九, 權泰鍾, 禹斗理

慶北 大學校, 農科大學

(1969年 2月 28日 受理)

## Studies on the Glucose Isomerizing Enzyme

Part I. The Isolation and Detection of Glucose Isomerizing Enzyme produced by Microorganism.

J.H. Seu, C.K. Kim, W.K.Ki, I.K.Rhee,  
T.J.Kwon, D.L.Woo.

Dept. of Applied Microbiology, Agr. College, Kyung-Pook  
National University, Taegu.

### Summary

With an attempt to obtain a glucose isomerizing enzyme producing microorganism, one hundred and thirty-three strains of microorganism were isolated from soil samples. After screening, a strain K-17 which belonging to actinomyces family, was finally selected.

Using this strain of K-17, sugars produced from glucose by the reaction of sugar isomerizing enzyme were tested with paper chromatography. Only a kind of resulting sugar, fructose, was detected from enzyme reaction sample and other sugars were never detected. By these results, the enzyme produced by strain K-17 is classified as a glucose isomerase.

### I. 緒 論

現在 여러나라에서 澱粉을 糖化하여 만들어진 澱粉糖인 Glucose를 甘味/物質로 食生活에 利用하고 있으나 이 Glucose의 甘味度가 弱하므로 Glucose를 Fructose로 轉化시키려는 研究가 많이 이루어지고 있으며 그 中에는 이미 工業化에 成功한 例도 있다. 이 Glucose의 Fructose로의 轉化는 化學的인 方法과 酵素學的인 方法이 있으며 여러가지 面으로 보아 酵素的인 方法이 더 理想的이란 結論을 얻고 있다. 이 酵素에 依한 糖의 異性化를 論하는 데 있어서 Lohman<sup>(1)</sup>氏의 業績을 無視할 수 없다. 氏는 1933年에 動物의 筋肉 抽出液이 Glucose-6-

Phosphate와 Fructose-6-phosphate를 서로 可逆的으로 異性化시킨다는 것을 처음 確認하였으며 그 後 많은 研究者들에 依해서 Yeast 其他 많은 細胞內에서 反應을 觸媒하는 酵素인 Phosphohexose Isomerase가 存在한다는 것이 밝혀지고, 이어 1940年代에는 有名한 E.M 徑路가 確立되었던 것이다. 그러나 그 後 糖의 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>鹽이 아닌 遊離의 糖이 或種의 Enzyme에 依해서 異性化된다는 것을 처음 發見한 사람은 赤堀<sup>(2)</sup> 등이었다. (1952) 그 後 1960年 Marshall<sup>(3)</sup>가 細菌性 酵素를 使用하여 Glucose를 Fructose로 轉移시켜 實用化할 수 있다는 事實이 美國에 特許되므로써 그 方面의 研究者들을 刺戟하여 그 後 不過 5~6年사이에 數없이 많은 研究들이 이루어졌다.

지금 이 方面의 研究 結果는 大略 다음과 같다. 即 이들 Saccharide의 Isomerase에 關한 研究中 基礎科學에 屬하는 Isomerase의 同定及 性狀에 對해서는 Isomerase의 Inhibitor에 關해서 Parr<sup>(4)</sup>의 研究가 있으며 Xylose Isomerase에 對해서는 Hichman<sup>(5)</sup>, Erythrose Isomerase에 對해서는 Willstätter<sup>(6)</sup>, Arabinose Isomerase에 對해서는 Yamanaka<sup>(7,10,11)</sup>, Simpson<sup>(8)</sup>, Rhodes<sup>(9)</sup>, Cohen<sup>(12)</sup>, Green<sup>(13)</sup>, Cohen<sup>(14)</sup>, Rhamnose Isomerase에 對해서는 Willson<sup>(15)</sup>, Dische<sup>(16)</sup>, Mannose Isomerase에 對해서는 Roe<sup>(17)</sup>, 등의 業績이 發表되어 있다. 한편 實用化 方案을 考慮한 研究에 있어서는 前述한 Marshall氏의 研究 結果가 特許되어 있으며 그 內容은 *Pseudomonas hydrophila*를 D-Xylose가 含有된 Medium

\* 本研究는 FY-68 科學技術處와의 研究開發用役契約下에 이루어진 것임.

에 培養해서 이 菌의 Endo-Enzyme 을 抽出하여 As 化合物의 存在下에 Glucose 에 作用시키면 33% 相當의 Glucose 가 Fructose 로 異性化된다고 한다. 그러나 이 方法의 重要한 缺點은 高價인 D-Xylose 가 Glucose Isomerizing Enzyme 의 生成에 있어서 絕對 不可缺의 Inducer 가 된다는 點 또 食品工業에서 아주 有毒視되는 砒素化合物이 Enzyme 作用에 必要하며 事後 精製 過程이 아주 困難하다는 點 또 하나는 生成되는 Fructose 의 量이 적어 크게 甘味가 增加되지 않는다는 點을 들 수 있으며 이들의 缺點을 가지지 않는 方法을 模索하기 爲한 研究가 이루어 졌다.

高崎, 田邊<sup>(18-21)</sup> 등은 松蜜에서 分離한 Bacteria 의 一種인 *Bacillus Megaterium* A-1 菌株가 Glucose 를 炭素源으로한 培地에서 잘 生育하며 또한 강한 Glucose Isomerizing Enzyme 을 生成하며 이 Enzyme 은 作用時 有毒金屬의 要求性도 없으며 最適 pH 는 約 7.5, 最適 溫度 約 35°C, 또 Co-Enzyme 로서 D. P.N. (N.A.D), T.P.N. (N.A.D.P.) 등을 要求한다는 結果를 얻어 酵素法의 缺點으로 되어있는 Xylose 及 砒素 化合物의 要求性은 除去되었으나 反面 이 Enzyme 은 그 作用에 있어서 D.P.N 或은 T.P.N 等 Co-Enzyme 을 要求하는 不安定한 酵素이며 同時에 또 熱에 對해서 極히 弱하여 50°C, 2分間 處理에 70% 의 Enzyme 가 破壞되며 또 70°C 2分間 加熱에 100% 失活하므로 實地 利用이 거의 不可能하다는 結果를 얻었다. 또 Natak<sup>(22-24)</sup> 등은 *Escherichia intermedia* 의 菌株를 使用하여 Glucose 를 Enzyme 生産의 Inducer 로 하여 培養한 後 이 菌의 Glucose Isomerizing Enzyme 를 抽出하여 使用한 結果 Glucose Isomerization Ratio 는 約 45% 라고 하며 이 Isomerase 는 Glucose 에 作用할 때는 砒素化合物을 要求하나 Glucose-6-Phosphate 에 作用時는 砒素 化合物을 要求하지 않으며 菌體收量은 約 4.0 g/l 이고 Opt. pH 는 7.0, Opt. Temp. 는 40°C 라고 하였다.

이 Enzyme 亦是 砒素化合物의 要求性이 있어 實用化에 不適當함을 알게되었다. 또 Yamanaka<sup>(25,26,27)</sup> 는 Heterolactic Acid Fermentating Bacteria 의 한 菌을 使用하여 行한 研究에서 Glucose 異性化率 60% 로 比較的 높으며 酵素作用에 砒素化合物이 不必要한 點은 理想的이나 Enzyme 生成에 있어서 Xylose 만이 唯一의 Inducer 가 되므로 亦是 實用化가 不可能하다는 結果를 얻었다. 또 Tsumura<sup>(28-33)</sup> 등은 *Actinomyces* 屬 菌株 *Streptomyces phaeochromogenus* S.K 를 擇하여 많은 研究를 行한 結

果이 菌은 Glucose 가 Enzyme 生成에 Inducer 가 되고 菌의 生育에는  $Co^{++}$ 가 必要하며 Conversion Ratio 50% 라는 比較的 좋은 結果를 얻었으나 단지 菌이 pH 6.0 以下에서는 全然 生育이 不可能하며 또 菌 自體가 生育中 多量의 酸을 生成하여 培養液의 pH 가 6.0 以下로 低下되어 生育하지 못하며 이에 Alkali 를 加하여 培養液의 pH 를 上昇시켜도 한 時間內에 곧 酸性으로 移行하며 이 pH 調節 操作을 1時間 間隔으로 10回를 反復하여도 같은 結果를 얻었으며 이 結果 菌株가 多量 必要로 하는 實用化에서는 거의 適用이 不可能하다는 結果를 얻게 되었다. 이 외에도 Ichiura,<sup>(34)</sup> 團野,<sup>(35)</sup> Yamanaka<sup>(36-38)</sup> 名武<sup>(39-42)</sup> 등 여러 研究가 있으나 여러가지 不合理한 點이 있어 實用化의 試圖는 不可能하다.

以上 紹介한 여러 研究外에 Takazaki<sup>(43,51,52)</sup> 에 依해서 이루어진 研究가 現在 實用化 되고 있으며 이 方法에 있어서는 *Streptomyces* 의 一株를 使用하고 있으나 그 詳細한 內容은 아직 充分한 發表가 없어 그 細部를 알기는 困難하나 斷片的인 發表를 綜合하면 菌株를 Xylan 等이 含有되어 있는 天然物 培地에서 通氣 培養한 菌體를 酵素源으로 하여  $Mg^{++}$ 의 存在下에 約 30~40%의 Glucose 에 作用시켜 結果적으로 約 48%의 Fructose 를 얻고 있다고 하며 이 때 反應條件은 pH 7.0~7.5, 溫度 75°C, 反應時間 60~80時間이며 이 때 酵素 作用에 As 化合物을 必要로 하지 않는다고 한다.

以上 여러 研究 結果를 參酌하여 本人等도 Glucose 轉化의 利用을 最終 目的으로 하여 研究한 약간의 結果를 여기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗方法及 結果

### 1. 菌源 Sample 及 菌의 分離 方法

菌源 Sample 로서는 市街地, 住宅地, 山林의 濕地帶 및 學校 校庭 土壤 등으로 總 61點을 採取하여 供試하였으며 菌分離用 培地는 다음과 같다.

- |                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| (1) Meat extract                 | 0.3%    |
| Glucose                          | 3.0%    |
| Agar                             | 3.0%    |
| (15 Lb 에서 15分間 殺菌, final pH 7.0) |         |
| (2) Malt extract (Bullg. 9°)     | 1000 ml |
| Potato extract <sup>(48)</sup>   | 1000 ml |
| NaNO <sub>3</sub>                | 2.0 g   |
| KCl                              | 0.5 g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1.0 g   |

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
Spring Water	1000 ml
Agar	3.0 %
(15 Lb 에서 20 分間 殺菌. final pH 5.8)	
(3) Meat extract	0.3 %
Glucose	2.0 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 %
Yeast extract	0.3 %
Agar	3.0 %
(15 Lb. 에서 15 分間 殺菌. final pH 7.2)	
(4) Meat extract	0.3 %
Glucose	3.0 %
Bran extract*	30 %
Agar	3.0 %

(20 Lb. 에서 20 分間 殺菌, final pH 7.2)  
 \* Bran 10 g 에 水道水 100ml 를 加하여  
 Boiling water bath 에서 30 分間 抽出하여  
 濾過한 後 다시 遠心分離하여 그 上澄液을  
 使用함.

以上 4 種類의 培地를 使用하여 供試菌源 Sample  
 土壤으로부터 總 133 株의 菌株를 常法에 依하여  
 分離하였으며 그 內譯은 細菌類가 117 株 放線菌  
 類가 16 株이었다.

## 2. 分離菌의 Glucose Isomerase 生成有無의 檢索

### (1) 供試菌의 培養

上記 分離菌株 133 株를 各各 다음과 같은 條件

으로 培養하였으며 使用한 液體 培地의 組成及 調  
 製는

Bran Extract*	15 %
Nutrient Broth	0.8 %
Xylose	0.05 %
Glucose	0.15 %

Tap Water

(15 Lb 에서 15 分間 殺菌, final pH 7.2)

\*水道水 1000ml 에 HCl 로서 pH 2.0 으로 調節  
 한 後 여기에 Bran 100g 를 加하여 100°C 에서  
 1 時間 浸出시킨 後 NaOH 로서 中和後 濾過하  
 여 使用함.

이였으며 上記 培養液 80ml 를 500ml 의 振盪  
 flask 에 넣어 殺菌後 供試菌을 接種하여 32°C ~  
 35°C 에서 25~30 時間 振盪培養했으며 振盪 條件은

振盪方法……………復式  
 振盪回收……………120回/分  
 振 幅……………5 cm 이었다,

### (2) 酵素의 調製 方法

위와 같이하여 培養하여 얻은 菌體는 常溫(20°C)  
 에서 遠心 集菌하여 0.8 % 冷 NaCl 液으로 3~4 回  
 遠心洗滌한 後 다음과 같은 方法으로 酵素를 調製  
 하였다.

①이 菌體를 冷 Acetone (5°C)으로 脫水乾燥하  
 여 菌體를 그대로 酵素源으로 使用하거나.

②0.8 % 冷 NaCl 로 洗滌한 生 菌體의 1/3 Volume  
 의 M/15 Phosphate buffer (pH 7.0)를 加하여 常

### Enzyme Preparation

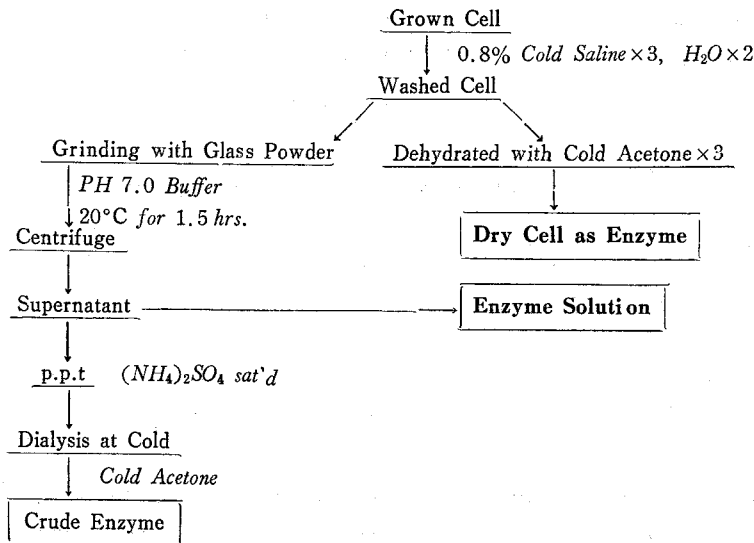


Fig. 1. Method of Glucose Isomerizing Enzyme Preparation

溫(15°C)에서 Glass power(49)로 1~2時間 磨碎한 後 遠心分離하여 그 上澄液을 直接 酵素液으로 使用하거나

③ 이 上澄液을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 飽和시켜 沈澱水에 溶解하여 濾過한 後 5°C에서 Dialysis 하여 冷 Acetone (-10°C)으로

沈澱시켜 이것을 粗酵素로 使用하여 分離菌株의 Glucose Isomerizing Enzyme 生成有無를 檢索하였으며 酵素의 調製 過程을 圖試하면 다음 Fig. 1와 같다.

### 3. Fructose의 定量法

Glucose Isomerizing Enzyme에 依하여 Glucose로부터 轉化된 Fructose의 定量은 Cysteine Carbazole Sulfuric Acid Method<sup>(44-47)</sup>를 使用하였으며 그 例는 Sample 1 ml에 新鮮한 1.2% Cysteine HCl液 0.2ml를 加한 後 氷水로서 冷却하여 75%의 特級 黃酸 5 ml를 徐徐히 加하여 混合 冷却한 後 다시 여기에 0.1% Carbazole (in abs. Ethanol) 溶液 0.2ml를 加한 後 混合하여 60°C에서 10分間 發色시킨 後 Erma photo electric photometer Type N-5로서 570 mμ의 吸光度를 測定하였으며 本 研究에 있어서 이 測定 方法을 適用한 結果 25 μg/ml의 Fructose의 測定이 可能하였으며 이때 100 μg/ml까지의 Glucose의 混存은 測定에 別 影響을 미치지 않았다.

### 4. 分離된 試供菌株의 選別

分離한 各 菌株을 上記 方法에 依해서 酵素로 調製한 後 다음과 같은 方法으로 Glucose Isomerizing Enzyme의 有無를 檢索하였다. 0.1 M 또는 1.0 M Glucose Solution 1 ml에 M/15 Phosphate buffer

(pH 7.2) 2 ml를 加하고 여기에 Enzyme Solution 2 ml (萬一 dry cell을 Enzyme 源으로 使用할 때는 200 mg의 dry cell를 2 ml의 Buffer solution에 懸濁하여 使用함)를 加하여 70°C에서 3~10時間 作用시킨 後 이 反應液을 稀釋하여 Glucose 濃度가 60~100 μg/ml가 되게한 後 그 1 ml를 取하여 前述한 方法으로 生成된 Fructose를 發色시켜 그 吸光度를 測定하여 Control과 比較하여 酵素에 依한 Fructose가 生成되었는가를 檢討한 結果 K-17 菌株가 Glucose Isomerase를 生成함을 確認하였다.

### 5. K-17 菌株에 依해 生成된 Fructose의 確認

K-17 菌株가 生成하는 酵素를 使用하여 Glucose를 Fructose로 異性化 시켰으며 그 生成된 Fructose를 確認하기 爲하여 75°C에서 50時間 酵素 作用을 시킨 反應液을 Sample로 하여 Paper chromatography로서 調査하였다.

Sample: 0.1 M Glucose 0.5 ml.  
M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2) 4.5 ml  
Enzyme (Dry Cell) 0.25 g  
MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 12.3 mg

Running Solvent System:

① n-Butanol 4  
Acetic Acid 1  
Water 5

#### ② Water Saturated Phenol.

Running Method: descending type.

兩 Running Solvent System에서 Descending Type로 室溫(20°C)에서 展開시킨 後 Silver Nitrate Method<sup>(50)</sup>로 發色시켜 얻은 Paper chromatography의 結果는 다음 表 1과 같다.

Table 1. The Results of Paper Chromatography

Sample	Solvent System	Moving distance or Rf Value
Control Glucose	Butanol: Acetic Acid: Water(4:1:5)	19.6 cm
Control Fructose	Butanol: Acetic Acid: Water(4:1:5)	22.5 cm
Reaction Sample	Butanol: Acetic Acid: Water(4:1:5)	spots, 19.6cm and 22.4cm
Control Glucose	Water Saturated Phenol	Rf 0.47
Control Fructose	Water Saturated Phenol	Rf 0.65
Reaction Sample	Water Saturated Phenol	Spots, Rf 0.47 and 0.65

이와같이 Paper Chromatography 한 Strip에서 遊離糖을 溶出시켜 旋光度 및 α-Methyl Phenylhydrazine으로 Glucose及 Fructose를 確認해야하나 本 Paper Chromatogram에서는 他 種類의 糖의 Spot가 發見되지 않았으며 Standard Glucose及 Fructose

와 同一한 Moving Distance及 Rf.Value를 나타내었으므로 機械의 未備 및 試藥의 購入不能으로 上記 方法으로 確認은 못하였으나 本 實驗이 基質에 特異를 가지는 酵素 反應이므로 本 K-17 菌株가 生成하는 Glucose Isomerizing Enzyme은 Glucose를

基質로 使用하였을때 Fructose 以外の 다른 種類の 糖은 生成되지 않음을 알수있었다.

### 要 約

本 研究에서 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같  
다.

1. Glucose Isomerizing Enzyme 을 分泌하는 *Actinomyces* 科 菌株를 土壤으로부터 分離하였으며
2. 本 菌株가 生成하는 Glucose Isomerizing Enzyme 를 Glucose 에 作用시킨 結果 生成된 糖은 Fructose 一 種만을 生成하였으며 그외의 糖의 副生物 은 檢出되지 아니 하였다.

### 參 考 文 獻

1. K. Lohman; *Biochem.*, 2, 262. 137 (1933)
2. S. Akabori, et al; *Proc. Japan, Acad.*, 28, 39 (1952)
3. R.O. Marahall; *U.S. Patent*, 2, 950,228(1960)
4. C.W. Parr; *Nature*, 178, 1401 (1956)
5. J. Hichman, et al; *J. Biochem.*, 234, 758 (1959)
6. R. Willstätter; *Enzyme Hand book*, Asakura, 691 (1966)
7. K. Yamanaka; *Agr. Biol. Chem.*, 25, 272 (1961)
8. F.J. Simpson, et al; *J. Biol. Chem.*, 230, 457 (1958)
9. M.E. Rhodes, et al; *J. Microbiol. Serol.*, 28, 302 (1962)
10. K. Yamanaka; *Agr. Biol. Chem.*, 26, 167(1962)
11. K. Yamanaka; *ibid.* 26, 175 (1962)
12. S.S. Cohen; *J. Biol. Chem.*, 201, 71 (1953)
13. M. Green, et al; *J. Biol. Chem.*, 219, 55 (1956)
14. S.C. Cohen; *Method in Enzymology Vol. 1*, 366 (1955)
15. D.W. Willson; *J. Bacteriol.*, 73, 410 (1957)
16. Z. Dische, et al; *J. Biol. Chem.*, 175, 595 (1948)
17. J.H.Roe; *J. Biol. Chem.*, 107, 15 (1934)
18. Y. Takazaki, et al; *J. Agr. Chem. Soc., Japan*, 36, 12 (1962)
19. Y. Takazaki, et al; *ibid.* 37, 2 (1963)
20. Y. Takazaki, et al; *ibid.*, 36, 12 (1962)
21. Y. Takazaki, et al; *ibid.*, 37, 3 (1963)
22. M. Natake, et al; *Agr. Biol. Chem.*, 27, 5, 342 (1963)
23. M. Natake, et al; *ibid.*, 30, 887 (1966)
24. M. Natake, et al; *ibid.*, 32, 3, 303 (1968)
25. K. Yamanaka; *Agr. Biol. Chem.*, 27, 4, 265 (1963)
26. K. Yamanaka; *J. Agr. Chem., Japan*, 37, 4, 23 (1963)
27. K. Yamanaka; *ibid.* 37 (1963)
28. N. Tsumura, et al; *Agr. Biol. Chem.*, 29, 1129 (1965)
29. N. Tsumura, et al; 『日本農化講演要旨 209 (1965)
30. N. Tsumura, et al; *J.Ferm. Assoc., Japan*, 22, 32 (1965)
31. N. Tsumura, et al; *Agr. Biol. Chem.*, 31, 8, 902 (1967)
32. N. Tsumura, et al; *ibid.*, 31, 8, 908 (1967)
33. N.Tsumura, et al; 日本農化講演要旨 160(1967)
34. M. Ichimura, et al; *J. Agr. Chem. Soc., Japan*, 39, 8 (1965)
35. 團野源一; 日本農化講演要旨, 161 (1967)
36. K. Yamanaka; *Agr. Biol. Chem.*, 25, 272(1961)
37. 山中啓; 日本 農化講演要旨, 17 (1965)
38. 山中啓; 日本 農化講演要旨. 90 (1966)
39. 名武昌人; 日本 農化講演要旨, 16 (1966)
40. 名武昌人; *ibid.* 90 (1965)
41. 名武昌人; *ibid.* 280 (1966)
42. 名武昌人; *ibid.* 160 (1966)
43. 高崎義幸; 日本工業技術院 醱酵研究所發表會 (1965)
44. Z. Dische, E. Borentrend; *J. Biol. Chem.*, 192, 583 (1961)
45. Z. Dische; *Methods of Biochemical Analysis Vol.2*, 313 (1955)
46. 安藤鏡郎; 生化學 研究法 I, 259 (1967)
47. Y.Takazaki, et al; *J. Agr. Chem. Soc., Japan*, 36, 12, 1010 (1962)
48. 日本工業製品(J.I.S)規格檢査法中 纖維製品檢査方法 (1965)
49. 赤堀四郎編; 酵素研究法一卷 5 (1955)
50. D. Glick; *Method of Biological Analysis, Vol. 1*, 218 (1954)
51. 東京大學應用微生物研究所 Symposium, 8, 90 (1967)
52. 高崎幸夫, 外 2 人; 日本農化講演要旨 60 (1968)