

# 葡萄糖 異性化 酵素에 關한 研究\*

第二報; 分離選定된 菌株 酵素의 性質에 對해서

徐正埏, 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 II. Some Properties of the Glucose Isomerizing Enzyme of K-17 strain.

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

Some properties of glucose isomerizing enzyme which produced by the strain K-17 in xylose containing nutrient broth medium were investigated. The optimal pH for enzyme reaction was indicated about 7.2 and optimal temperature was about 75° C. The same optimal temprature was indicated by both cell free extract and acetone dried cells using as enzyme. The glucose isomerizing enzyme from strain K-17 was not inhibited by the high concentration of substrate even in a saturated glucose solution, but most enzyme was inactivated by the heat treatment at 80° C. The maximum fructose forming ratio from glucose was about 50 percents.

## I 緒 論

前報<sup>(23)</sup>에서와 같이 Glucose를 Fructose로 轉化시키는 Glucose Isomerizing Enzyme를 生成하는 Actinomyces科 菌株를 分離選定하였으며 또 이 酵素가 Glucose에 作用할때 Fructose 以外的 다른 種類가 副生되지 아니함을 確認하였으므로 이 菌株의 酵素를 使用하여 最適作用 溫度, pH, 最高 Glucose 轉化率等 若干의 性質을 調查하였으므로 그 結果를 여기에 報告하는 바이다.

## II 實驗方法 及 結果

前報<sup>(23)</sup>에서 分離 選別한 菌株 K-17을 使用하였

으며 菌의 培養, 酵素液의 調製方法 酵素力價의 測定法(生成된 Fructose의 定量)은 前報와 같이 하였다.

### 1. K-17 菌株가 生成한 Glucose Isomerizing Enzyme의 pH에 對한 影響

生 菌體 10g에 10倍 稀釋의 M/15 phosphate Buffer(pH 7.0) 3ml를 加하고 여기에 約 1/2 量의 Glass powder를 加하여 常溫에서 15時間 磨碎한 後 50ml의 蒸溜水를 加하고 여기에 濾過 補助劑(Celite)를 加하여 濾過하고 濾液을 酵素液(pH 6.8)으로 使用하여 다음과 같은 條件으로 反應시킨 後 酵素力價를 測定하였다.

Reaction Mixture	
0.5M Glucose in Buffer	0.8ml
Enzyme Solution	0.4ml

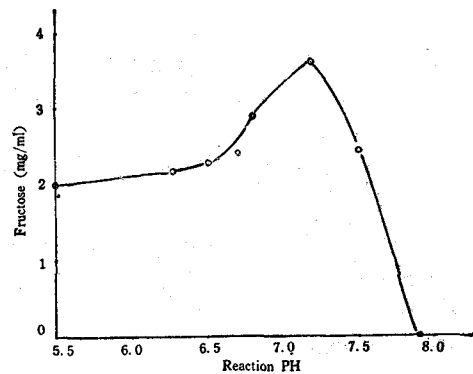


Fig. 1 Optimal pH of K-17's Glucose Isomerizing Enzyme.

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

M/15 Phosphate Buffer 0.4ml  
 Reaction Temperature 75°C  
 Reaction Time 12hrs.

위의 Fig. 1에서 보는 바와 같이 12時間 後에 生成된 Fructose 를 測定한 結果 pH 7.2 附近에서 가장 높은 Activity 를 나타내었다.

그러나 여기서 얻어진 結果는 反應後 12時間이 經過한 時點에서의 結果이므로 다시 經時的으로 이 酵素의 Activity 를 調査하였으며 이때 反應液 組成 및 條件은 다음과 같다.

Reaction Mixture.  
 1.0M Glucose 0.5ml  
 M/15 Phosphate Buffer 4.5ml  
 Enzyme (Dry Cell) 250mg  
 MgSO<sub>4</sub> 10<sup>-2</sup>M  
 Reaction Temperature 75°C

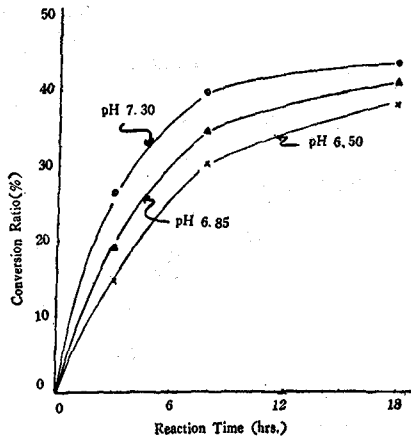


Fig. 2 The Effects of Various pH on the Enzyme Activity.

위에서 보는 바와 같이 본 Glucose Isomerizing Enzyme 의 作用은 經時的으로도 Fig. 1의 結果와 同一함을 確認하였다.

2. K-17 菌株의 Glucose Isomerizing Enzyme 의 溫度에 對한 影響

(1) 本 菌株의 磨碎抽出한 酵素의 作用에 미치는 溫度의 影響에 對한 反應液組成 및 作用條件은 다음과 같다.

Reaction Mixture.  
 0.1M Glucose 1.0ml  
 Enzyme Solution (pH 7.2) 2.0ml  
 M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2) 2.0ml  
 Reaction Time 5.5hrs.

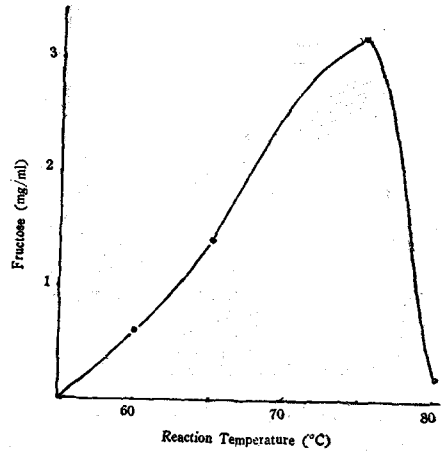


Fig. 3 Optimal Temperature of K-17's Glucose Isomerizing Enzyme (used extracted Enzyme)

위 Fig. 3에서 보는 바와 같이 本菌은 抽出 酵素의 作用에 있어서 그 最適作用 溫度는 75°C 附近에 位置함을 알게 되었다.

(2) 乾燥菌體를 使用한 境遇

위에서는 本 菌株酵素를 抽出하여 使用하였으나 實地로 이 酵素를 多量으로 必要로 하는 境遇를 生覺한다면 菌體를 그대로 酵素로서 使用하는 것이 便利하므로 乾燥菌體를 使用하여 各 溫度에서 生成된 Fructose 를 反應 3時間後와 6時間後를 各各比較 測定하였으며 이때의 反應液 組成과 條件은 다음과 같다.

Reaction Mixture  
 1.0M Glucose 2.5ml  
 M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2) 2.5ml  
 Enzyme (Dry Cell) 250mg  
 Reaction Time 3hrs and 6hrs.  
 Reaction Temperature 55°C to 85°C (5° Interv- als)

위의 實驗 結果와 같이 Dry Cell 을 使用한 Enzyme 의 最適溫度는 처음 3時間까지의 反應에서는 80°C 로 나타났으나 그 後 反應이 繼續되어 6時間 後에서는 75°C 가 最適 溫度로 나타난다. 그 理由는 反應 初期에 있어서 Dry Cell 內로부터의 酵素의 溶出은 75°C 보다 80°C 의 狀態에서 더 容易하게 溶出되어 처음 3時間까지는 80°C 에서 反應이 더 強하게 일어나는 것이 그 後 이 酵素는 80°C 에서 比較的 不安定하므로 繼續해서 作用하지 못하고 失活하는 反面 75°C 에서는 酵素의 溶出은 80°C 보다

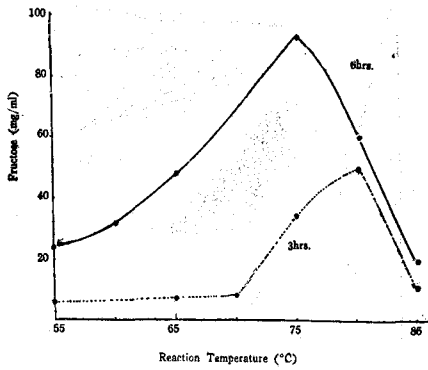


Fig. 4 Optimal Temperature of K-17's Glucose Isomerizing Enzyme (Used Acetone dried cell)

더徐徐히 일어나지만 75°C가 最適 溫度이어서 酵素가 繼續的으로 强하게 作用하므로 各各 相異한 時間에서는 相異한 最適 溫度를 나타냈으나 앞의 結果를 參酌하여 볼때 本 酵素의 最適 溫度는 75°C에 位置함을 알게 되었고 또 이 酵素는 85°C에서는 比較的 不安定하다는 結果를 얻었다.

3. 酵素作用에 미치는 基質濃度の 影響

本 菌株가 生成하는 Glucose Isomerizing Enzyme의 作用에 있어서 基質인 Glucose의 濃도가 酵素作用에 미치는 影響을 다음과 같은 條件으로 調査하였다.

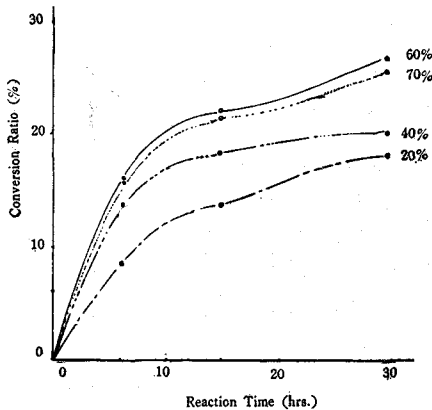


Fig. 5 The Effect of Glucose Concentration to the Enzyme Reaction.

Reaction Mixture.

Glucose (20%, 40%, 60%, 70%) dissolved in M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2)

MgSO<sub>4</sub> 10<sup>-3</sup>M  
 Enzyme (Dry Cell) 20mg/1g of Glucose  
 The final pH of the Reaction Mixture, if need was adjusted to 7.2 with NaOH

Reaction Temperature 75°C  
 Reaction Time Total 30hrs.

위 Fig. 5에서 보는 바와 같이 本 酵素는 高濃度 即 飽和狀態의 Glucose 溶液에 있어서 그 作用이 阻害되지 않으며 오히려 促進 現狀을 나타내고 있으며 이것은 實際利用에서도 作業에 支障을 주지 않을 것으로 믿어진다.

4. 本 酵素에 의한 Glucose의 最大 異性化 率

以上の 여러 가지의 酵素學的인 性質을 參酌하여 本 酵素가 作用하는데 가장 理想的인 條件을 設定하여 Glucose의 最高異性化率을 調査하였다.

Reaction Mixture

Glucose 20%  
 MgSO<sub>4</sub> 10<sup>-2</sup>M  
 Buffer M/15 Phosphate (pH 7.2)  
 Enzyme; 0.1g/1g of Glucose (Dry Cell)  
 Reaction Temperature 75°C  
 Reaction Time Total 60 hrs

Table. 1 The Maximum Glucose Conversion Ratio by K-17's Enzyme\*

Time in hrs.	5	10	20	30	45	60
Conversion ratio %	23.5	36.0	42.2	44.8	45.0	49.8

\*Total sugar was measured by Somogyi's Method.

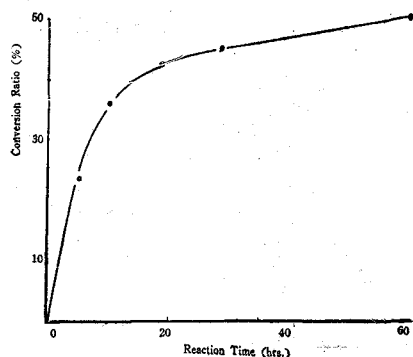


Fig. 6 The Maximum Conversion Ratio.

위 Table. 1에서 보는 바와 같이 本 實驗에서는 最高 49.8%의 異性化率을 얻었으나 Fig. 6의 轉異曲線의 傾向을 봐서 反應時間을 더 延長한다면 더 높은 異性化 率을 얻을 수 있을 것으로 生覺되며 이 點은 더 檢討해 볼 點이라 믿어진다.

### 5. 本 酵 素 的 Fructose 에 對 한 作 用

現在까지 알려진 모든 Glucose Isomerizing Enzyme 은 Fructose 와 Glucose 에 對해서 可逆的인 異性化 反應을 한다는 것이 알려졌으므로 本 酵素를 使用하여 理論的 平衡係數(Equilibrium Constant (KeQ))算出의 參考로 하고져 하였으며 그 反應 條件은 다음과 같다.

#### Reaction Mixture

1.0M Fructose in M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2)	5.0ml
MgSO <sub>4</sub>	10 <sup>-2</sup> M
Enzyme (Dry Cell)	250mg.
Reaction Temperature	75°C
Reaction Time. Total	18hrs.

위의 結果로서 本 酵素의 Glucose 에 對한 最高 異性化率은 通常的인 反應條件으로서는 49.8%부터 53.9%의 中間에 位置하리라고 믿어진다.

### III 考 察

本 研究에서 使用한 菌株의 Glucose Isomerizing

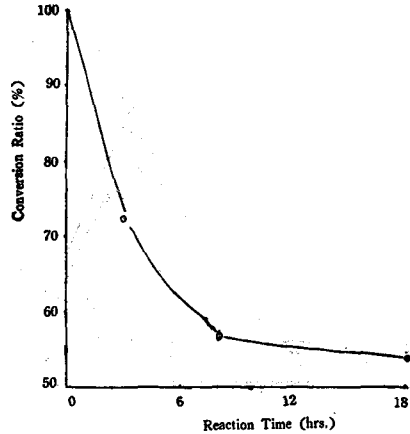


Fig. 7 The Fructose Isomerizing Enzyme.

Enzyme 의 얻어진 酵素學的 性質을 他 研究와 比較해 보면 大略 다음 Table 2 와 같다.

Table. 2 Glucose Isomerizing Enzyme from Microorganism.

Organism	Properties	Metal ion or Co-Enzyme Requirement	Substrate	Optimal pH	Optimal Temp (C°)	Optimal for Enzyme Formation	Max. Conversion Ratio %	Metal Inhibitor	
								strongly	slightly
K-17 strain <sup>(23)</sup>		Mg <sup>++</sup>	glucose other sugar?	7.2	75	Xylose?	50%	Hg <sup>++</sup> , Cu <sup>++</sup> , Zn <sup>++</sup>	Pb <sup>++</sup> , Fe <sup>+++</sup>
Pseudomonas hydrophila <sup>(1)</sup>		As	glucose xylose	8.5	42~43	Xylose	33%		
Aerobacter Cloaces <sup>(2)</sup>		Mg <sup>++</sup>	glucose xylose	7.6~7.7	50	Xylose		As	
Lactobacillus brevis <sup>(3-5)</sup>		Mn <sup>++</sup>	glucose xylose	6.0~7.0	60	Xylose	60%		
Escherichia Intermedia <sup>(6)</sup>		As	glucose glucose -6-p	7.0	40	Glucose	45%		
Brevibacterium penta-aminoacidium <sup>(7-8)</sup>		Co <sup>++</sup>	glucose xylose	8.0~8.5	70	Xylose	50%	Mn <sup>++</sup> , Ca <sup>++</sup> , Zn <sup>++</sup> , Hg <sup>++</sup> , Ni <sup>++</sup>	
Streptomyces phaeochromogenus <sup>(2,9-13)</sup>		Mg <sup>++</sup>	glucose xylose	9.3~9.5	80	Xylose	52%		
Bacillus Coagulans <sup>(14)</sup>		Co <sup>++</sup>	glucose xylose Ribrose	7.0	75	Xylose	50%	Cu <sup>++</sup> , Zn <sup>++</sup> , Ni <sup>++</sup> , Mn <sup>++</sup> , Ca <sup>++</sup>	
Bacillus Megaterium <sup>(15-18)</sup>		D.P.N T.P.N	glucose	7.5~7.7	35	Glucose		Fe <sup>++</sup> , Fe <sup>+++</sup> , Cu <sup>++</sup> , Hg <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup> , Mn <sup>++</sup> , Co <sup>++</sup>
Paracolobacterium Aerogenoides <sup>(19-20)</sup>		D.P.N Mg <sup>++</sup>	glucose Mannose	7.0	40	Glucose			
Streptomyces bobilliae <sup>(21)</sup>		Mg <sup>++</sup>	glucose xylose	7.0	70	xylose	48%		
Streptomyces sp. <sup>(22)</sup>		Mg <sup>++</sup>	glucose xylose	7.0	80	Xylose Xylan			

以上과 같이 여러 사람들에 依해서 이루어진 究의 對象菌인 K-17 菌株의 酵素는 現今까지 發表된 菌株의 酵素와는 全然 다른 性質을 나타내고 있

음을 알 수 있으며 아직 本 菌株는 同定되지 않았으며 또 金屬의 要求性 Xylose의 要求性等도 앞으로 調査코져 한다.

### 要 約

本 研究에서 얻어진 結果를 要約하면 大略 다음과 같다.

- (1) 本菌의 最適作用 pH는 7.2附近에 位置하며
- (2) 最適作用溫度에 있어서는 抽出酵素나 乾燥菌體를 그대로 使用하거나 다같이 75°C附近에 位置하며.
- (3) 本 酵素는 그 作用에 있어서 基質인 Glucose의 濃도가 飽和狀態에서도 阻害 現象을 나타내지 않으며
- (4) 本 酵素의 Glucose에 對한 最高 異性化率은 約 50%에 達하며 反應條件을 改善하므로써 더 높은 異性化率을 얻을수 있으리라고 생각되며
- (5) 本 酵素는 80°C의 溫度에서는 거의 大部分이 失活됨을 알 수 있었다.

### 參 考 文 獻

1. R.O. Marshall; U.S. Patent, 2, 950, 228(1930)
2. N. Tsumura, et al; Agr. Biol. Chem., 29, 11 29(1965)
3. K. Yamanaka; Agr. Biol. Chem., 27, 4, 265 (1963)
4. K. Yamanaka; J. Agr. Chem., Japan, 37, 4, 231(1963)
5. K. Yamanaka; ibid 37,4(1963)
6. M. Natake, et al; Agr. Biol. Chem., 32, 3, 303(1968)
7. M. Ichimura, et al; J. Agr. Chem. Soc., Japan, 39, 8(1965)
8. 市村正道 外 1人; 醱協誌 22, 11, 48(1964)
9. N. Tsumura, et al; 日本農化講演要旨 209(1965)
10. N. Tsumura, et al; J. Ferm. Assoc., Japan, 22, 32(1965)
11. N. Tsumura, et al; Agr. Biol. Chem., 31, 8, 902(1967)
12. N. Tsumura, et al; ibid 31, 8, 908(1967)
13. N. Tsumura, et al; 日本農化講演要旨 160(1967)
14. G. Danno, et al; Agr. Biol. Chem., 31, 3, 284 (1967)
15. Y. Takazaki, et al; J. Agr. Chem. Soc., Japan, 36, 12(1962)
16. Y. Takazaki, et al; ibid 36, 12(1962)
17. Y. Takazaki, et al; ibid 37, 2(1963)
18. Y. Takazaki, et al; ibid 37, 3(1963)
19. Y. Takazaki, et al; Agr. Biol. Chem., 28, 740 (1964)
20. Y. Takazaki, et al; ibid 30, 220(1966)
21. 高崎義幸; 日本工業技術院 醱酵研究所 發表會 (1965)
22. 應用微生物研究所 Symposium No. 8 Tokyo Univ. (1967)
23. 徐正墳 外 4人; 韓農化誌 11, 43 (1969)