

葡萄糖 異性化 酵素에 關한 研究*

第三報 分離 選定된 菌株 酵素의 作用에 미치는 金屬鹽의 影響에 對해서

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 III The Effects of Metal Ions on the Reaction of K-17 Strain's Glucose Isomerizing Enzyme.

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

This K-17 strain was not absolutely requiring xylose as an inducer for enzyme formations. The most activity of this enzyme was lost when treated at 75°C. for 30 hours but was not influenced at 70°C. for 70 hours of treatment. The activity of this enzyme was increased by the addition of magnesium ions or cobalt ions in the reaction system. In the studies, we found that the magnesium ions simply activate the enzyme reaction and the cobalt ions do not but protect the enzyme from heat inactivation. And it was also found the phosphate buffer solution was very suitable as glucose dissolving solvent on the enzyme reaction. The mixed carbon source medium containing glucose, fructose, sorbitol, xylose and sucrose was more favorable for enzyme production than a sole carbon source containing medium on the shaking culture method.

I. 緒 論

前報^(1,2)에서 供試한 K-17 菌株가 生成하는 Glucose Isomerizing Enzyme의 酵素學的 性質을 調査 發表하였으나 그 後 繼續하여 얻어진 金屬 ion, Buffer의 種類, 酵素生成에 미치는 炭素源의 影響

및 熱安定性等에 關한 實驗 結果를 여기에 報告코 져하는 바이다.

II. 實驗方法 및 結果

本 實驗에서 使用한 菌의 培養, Fructose의 測定法(酵素 活性의 測定法), 酵素의 調製方法 等은 特別한 方法의 提示가 없는 前報^(1,2)와 同一한 方法에 準하여 行하였다.

1. 本 菌株의 酵素 生成에 미치는 Xyloes의 影響

只今까지의 여러 研究者들의 研究 結果 Glucose Isomerizing Enzyme 生成菌의 Xylose 要求性을 보면 Xylose가 酵素 生成에 必須的인 Inducer가 되는 境遇⁽³⁻⁶⁾와 反對로 Xylose 外의 다른 炭素源도 酵素生成의 Inducer가 된다는 事實⁽⁷⁻¹⁰⁾이 알려져 있으며 어떤 試供菌이 酵素生成의 Inducer로서 Xylose를 絕對的으로 要求하지 않는다는 것은 Glucose Isomerizing Enzyme 生成에 있어서 比較의 幅이 넓은 範圍의 炭素源要求性을 나타내며 또 더 廉價의 物質을 給源으로 할 수 있을 可能性을 提示한 것이므로 本 研究에서도 우선 K-17 菌株가 Xylose 以外의 他 炭素源으로서도 Glucose Isomerizing Enzyme을 生成할수 있는 가의 與否를 實驗하였다.

*: 本研究의 一部는 FY-68 科學技術處와의 研究開發用役契約下에 이루어진 것임.

Composition of the Culture Medium

Peptone	1.0 %
NaCl	0.5 %
Glucose	0.4 %

final pH 7.2

Culture Conditions at 32~35°C for 29 hrs.

위와 같은 條件下에서 얻어진 培養 菌株는 第 1 報에서 記述한 바와 같은 方法으로 Acetone 으로 脫水乾燥하여 이 乾燥菌體를 酵素源으로서 다음과 같이 그 活性의 有無를 測定하였다.

Reaction Mixture

1.0 M Glucose	2.0 ml
M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2)	2.0 ml
Enzyme (Dry cell)	50 mg
Reaction Temperature	75°C
Reaction Time	30 hrs.

위와같이 反應을 시킨 反應液中에 含有된 Fructose의 生成量은 45 mg/ml로서 反應液 1 ml 中の 含有되어 있는 Glucose의 總量이 90 mg/ml 이므로 反應液中에 含有된 Glucose의 50%가 Fructose로 異性화된 것이며 이 結果로서 本菌의 Glucose Isomerizing Enzyme의 生成에 있어서 Xylose가 必須的인 Inducer가 되지 못함을 確認하였다.

2. 本 酵素의 熱에 對한 安定性

本 Glucose Isomerizing Enzyme를 糖에 作用시켜 Fructose를 生成시키는 境遇는 다른 酵素作用에서 그다지 그 例를 보지 못할만큼 長 時間에 걸쳐 作用을 시켜야 하는 만큼 이 酵素의 熱에 對한 安定性이 크게 主要한 結果를 지니게 되므로 다음과 같은 方法으로 熱安定性을 調査하였다.

酵素의 熱處理 方法

Acetone 乾燥 菌體를 酵素源으로 하여 그 10 mg 씩을 取하여 여기에 M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2) 1.0 ml를 加하여 所定溫度(70°C, 75°C)에서 各各 所定時間 熱處理하였으며 이 處理된 全菌株를 各各 定量된 酵素로 하여 다음과 같은 量의 基質과 MgSO₄와 Buffer를 加하여 作用시켜 生成된 Fructose를 測定하였다.

Reaction Mixture

To treated Enzyme were added	
0.5 M Glucose	1.0 ml
MgSO ₄	5 × 10 ⁻³ M
M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2)	3.0 ml
Reaction Temperature	75°C
Reaction Time	10 hrs.

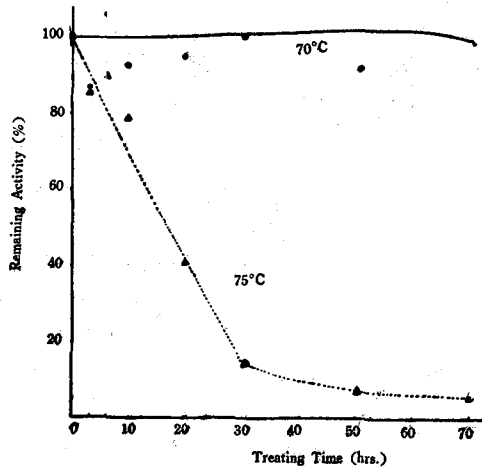


Fig. The Heat Stability

위에서 보는 바와같이 本 酵素는 70°C의 溫度에서 거의 酵素의 破壞가 없고 70時間의 加熱處理로 約 10%程度의 活性이 低下되며 75°C에서 處理하면 30時間에서 거의 大部分의 酵素가 破壞됨을 알 수 있었다. 이 結果는 本 酵素의 最適 溫度가 75°C라는 것을 考慮할때 重要視되어야 할 點이며 實地 反應에 있어서 初期에는 反應速度(V_{max})가 多少 낮다고 하더라도 70°C附近의 溫度에서 反應시켜 末期에 가서 75°C로 溫度 遷移를 하여 주는 것이 가장 理想的인 反應方法이라는 것이 豫測되었다. 한편 이 酵素의 熱處理는 Free Incubation 狀態이므로 耐熱性이 缺與된 것이나 Substrate와 混存된 狀態에서는 熱 安定性이 增加할 可能性도 있으므로 이 點은 더욱 檢討하여야 할 問題라고 보여진다.

3. 酵素作用에 미치는 金屬 Ion의 影響

本 K-17 菌株의 酵素作用에 金屬이 影響을 주는 가의 與否를 調査하기 爲하여 Na₂HAsO₃, BaCl₂, FeSO₄, HgCl₂, MnCl₂, LiSO₄, CaCl₂, CuSO₄, Fe₂(SO₄)₃, ZnSO₄, NiSO₄, PbAc, CoAc, MgSO₄ 등 14種의 金屬鹽類를 對象으로 하여 金屬鹽類의 濃度를 10⁻⁵M부터 10⁻²M까지 調節하여 酵素反應液에 添加하였으며 그 結果는 다음 表 1과 같으며 이때의 反應條件은

Reaction Mixture

0.5 M Glucose	1.0 ml (adjusted pH to 7.2 with NaOH)
Metal solution	1.0 ml
M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2)	3.0 ml

Enzyme 10 mg (Dry Cell)
 Reaction Time 18 hrs
 Reaction Temperature 75°C 이었다.
 以上の結果에서 重要視되어왔던 As化合物은 본 酵素作用에 影響이 없음을 알았으며 14種의 Metal Ion 中 特히 酵素作用을 強하게 促進시킨다고 보여 지는 PbAc, CoAc, MgSO₄의 三種을 擇하여 다시

다음과 같은 實驗을 하였다. 即 다음의 表1의 結果에서 나타난 各 鹽類의 各濃度에 있어서 生成된 Fructose의 量은 酵素에 依해서 轉化된 Fructose와 鹽自體의 化學的 反應에 依해서 生成된 Fructose가 合해진 量이므로 다음 實驗에서는 酵素自體만의 作用에 미치는 金屬의 影響을 調査하였다.

Table 1. The Effects of Metal Ions on the Glucose Isomerase Reaction.

Metal compound	Fructose mg/ml of reaction mixture				pH after treatment	
	final concentration 10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻² M	
Na ₂ HAsO ₃	1.62	1.36	1.40	1.42	7.0	
BaCl ₂	1.42	1.70	1.86	1.70	7.0	
FeSO ₄	1.70	1.76	1.88	1.52	6.3	
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.60	1.16	1.88	1.60	2.0	
HgCl ₂	0	0.88	1.40	1.56	6.2	
MnCl ₂	1.68	2.00	2.20	1.60	6.3	
LiSO ₄	1.40	1.42	1.48	1.48	7.0	
CaCl ₂	0.88	1.48	1.60	1.44	6.7	
CuSO ₄	0	0.86	1.30	1.64	6.0	
ZnSO ₄	0.28	1.60	1.96	1.82	6.3	
NiSO ₄	1.24	1.70	1.70	1.64	6.3	
PbAc	5.50	1.82	1.62	1.56	8.0	
CoAc	3.08	2.68	2.66	1.60	6.4	
MgSO ₄	very Activating				6.6	
None	1.58				7.1	

Reaction Mixture 0.5 M Glucose 1.0 ml
 M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2) 3.0 ml
 Enzyme (Dry cell) 10 mg
 Reaction Temperature 75°C

Reaction Time 15.5 hrs.
 上記 反應液의 Control로서는 個個의 濃度의 反應液을 위와 같이 만들어 단지 酵素만 除外한 狀態로 하여 同一溫度에서 같은 時間 作用시켰으며 그 結果는 다음 表2와 같다.

Table 2. The Effects of Mg⁺⁺, Co⁺⁺ and Pb⁺⁺ on the Enzyme Reaction.

	Ion Concentration	Sample Fructose mg/ml	Control Fructose mg/ml	Balance	pH after treatment	
					Sample	Control
MgSO ₄	10 ⁻⁵ M	2.26	1.60	0.66	7.3	7.3
	⁻⁴ M	2.26	1.65	0.61	7.2	7.2
	⁻³ M	4.75	1.55	3.20	7.2	7.2
	⁻² M	4.54	0.80	3.74	6.8	6.9
	⁰ M	2.15	1.75	0.40	7.3	7.2
CoAc	-5	2.26	1.68	0.58	7.3	7.3
	-4	2.70	1.60	1.10	7.2	7.2
	-3	3.62	1.48	2.14	7.1	7.2
	-2	2.98	0.42	2.56	6.8	6.9

	0	2.15	1.75	0.40	7.3	7.2
PbAc	-5	2.15	1.55	0.60	7.4	7.4
	-4	2.10	1.65	0.45	7.2	7.4
	-3	2.65	2.40	0.25	7.2	7.3
	-2	6.02	6.10	-0.08	7.7	7.7
	0	2.15	1.75	0.40	7.3	7.2

위의 表2에서 各 金屬鹽類別 各 濃度에 있어서 酵素作用에 미치는 純鹽類에 依해서 促進되거나 或은 阻害로 因하여 나타난 Fructose의 量은 다음 式으로 求할수 있다.

即 $A - B = P$

A = 各 鹽類別 各 濃度別의 Sample의 Fructose의 mg 數 - 該當하는 Control Fructose mg 數.

B = 無鹽狀態의 Sample Fructose mg 數 - 該當하는 Control의 mg 數

P = 純金屬鹽類가 酵素作用에 미친 影響에 該當하는 Fructose의 mg 數 이며 그 結果는 다음 表3과 같다.

Table 3. The Effects of Metal Ions on Enzyme Activity.

	$10^{-2}M$	$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$
Mg ⁺⁺	3.34	2.80	0.21	0.26
Co ⁺⁺	2.16	1.74	0.70	0.18
Pb ⁺⁺	-0.46	-0.15	0.05	0.20

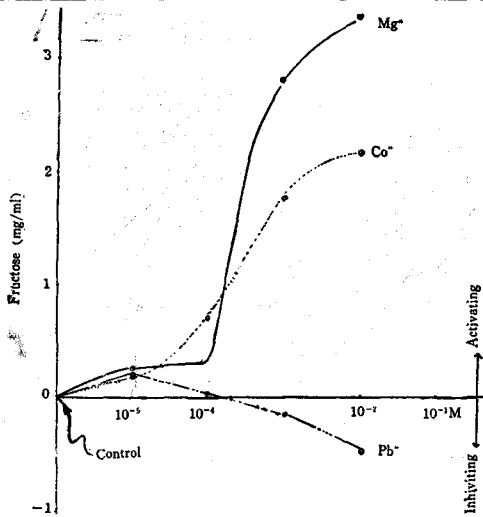


Fig. 2. The Effects of Mg⁺⁺, Co⁺⁺ and Pb⁺⁺ on Enzyme Activity.

即 上記 表3에서 보는바와 같이 Mg⁺⁺ Co⁺⁺는 酵素作用을 促進하나 效果에 있어서는 Mg⁺⁺가 Co⁺⁺에 비해 더 크며 反對로 Pb⁺⁺는 $10^{-4}M$ 以上

의 濃度에서는 오히려 酵素作用을 阻害한다는 結果를 얻었으며 表1에서 Pb⁺⁺의 存在下에서 Fructose가 比較的 많이 生成된 것은 酵素作用을 促進시킨 것이 아니고 化學的인 反應에 依하였다는 것을 알수있었다.

4. 金屬 Ion 이 Glucose Isomerizing Enzyme의 熱破壞에 미치는 影響

Glucose Isomerizing Enzyme에 미치는 金屬 Ion의 影響에 對해서는 여러가지의 研究가 이루어져 있으나 그中 Tsumura⁽²⁰⁾는 *Streptomyces Phaeochromogenus*에 對해서 Co⁺⁺이 熱破壞를 保護한다는 事實을 發表하였으며 또 Ichimura⁽²¹⁾는 *Brevibacterium Pentosaminoacidum*에 對해서 또 Takazaki⁽²²⁾도 *Streptomyces*屬의 한 菌株酵素에 對해서 Co⁺⁺가 熱失活을 保護한다고 報告한 바 있으므로 本人等도 K-17 菌株 時素에 影響을 주는 Mg⁺⁺, Co⁺⁺을 主로하여 이들 金屬이 酵素作用을 Activate 하는가 或은 酵素破壞를 保護하는가의 興否를 調査하였다.

熱處理 Sample의 調製

MgSO₄ $10^{-3}M$ in M/15 Phosphate Buffer(pH 7.2)

Co-Ac $10^{-8}M$

BaCl₂ 10^{-3}

None M/15 Phosphate Buffer only

위의 各各의 金屬 Ion을 含有한 溶液 1 ml에

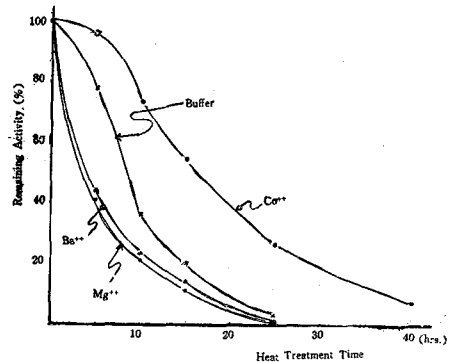


Fig. 3. The Effect of Ions on the Heat Treatment of Enzyme.

Acetone 乾燥菌體 10 mg 씩을 加하여 75~77°C에
서 40 時間까지 熱 處理한 後 이 各各의 處理된 酵
素液에 Mg^{++} 와 Co^{++} 가 同時에 $10^{-3}M$ 씩 같이
含有되도록 調製하여 여기에 0.1 M의 Glucose 濃度
가 되도록 加糖한 後 이 反應液을 75°C에서 12 時
間 反應시킨 後 生成된 Fructose 를 測定하여 殘存
酵素 活性을 算出하였다.

위 Fig. 3.에서 보는 바와 같이 Mg^{++} 는 단순한
酵素的 Activator 로 作用함을 알았으나 Co^{++} 는 本

Glucose Isomerizing Enzyme의 熱失活을 保護한다
는 것을 알게 되었다.

5. 酵素作用에 미치는 Buffer Solution 及 鹽溶液 의 影響

本 酵素를 Glucose 에 作用시킬때 Glucose의 溶
媒로서 Buffer 가 多少의 影響을 줄것으로 생각되므
로 여러가지의 溶媒가 酵素作用에 미치는 影響을
調査하였으며 그 結果는 다음의 表 5 와 같다.

Table 4. The Kinds of Solvent.

	pH of solvent※	pH of the Reaction Mixture
M/15 Phosphate Buffer	7.2	7.2
M/30 Phosphate Buffer	7.2	7.2
Mcllvaine's (citrate) Buffer	7.2	7.2
Borate Buffer	7.2	7.1
0.4 % Na_2SO_4	7.2	6.3
0.4 % NaCl	7.2	6.5
0.8 % NaCl	7.2	6.3
Distilled Water	7.2	6.5

※ pH, if need, adjusted to 7.2 with NaOH

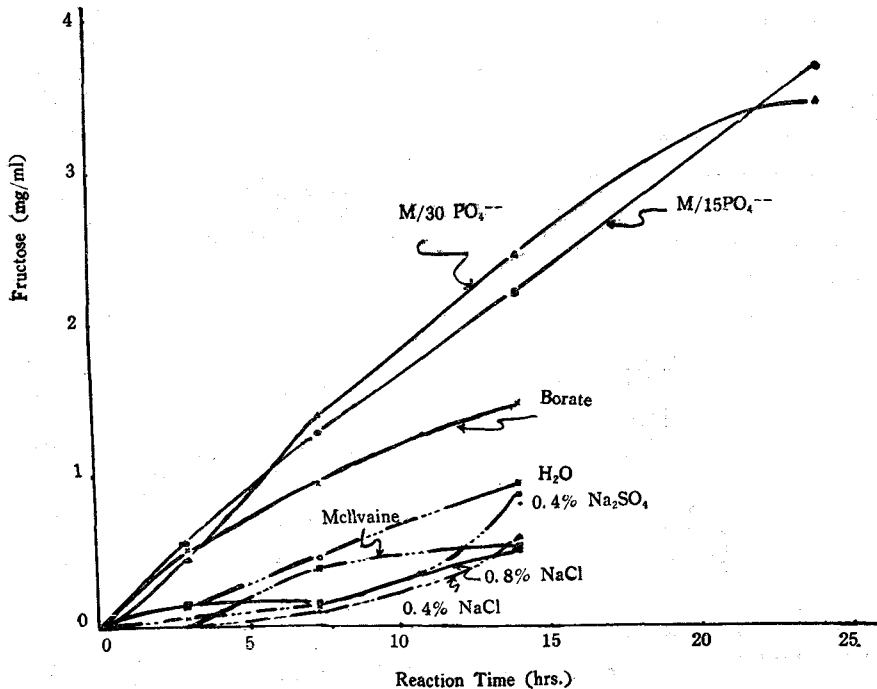


Fig. 4. The Effect of the Solvents on the Enzyme Reaction.

Table 5. The Effect of the Solvents on Enzyme Reaction.

Solvent	Time	3hrs.	7hrs.	14hrs.	24hrs.
	Fructose mg/ml				
M/15 Phosphate		0.55	1.28	2.20	3.64
M/30 Phosphate		0.44	1.40	2.44	3.42
Mcllvaine's		0.14	0.38	0.52	—
Borate		0.51	0.94	1.48	—
0.4 % Na ₂ SO ₄		0.06	0.14	0.88	—
Water		0.14	0.44	0.94	—
0.8 % NaCl		0	0.10	0.60	—
0.4 % NaCl		0	0.16	0.54	—

Reaction Mixture
 0.5 M Glucose 1.0 ml
 5 × 10⁻³M MgSO₄ 1.0 ml
 Solvent 3.0 ml
 Enzyme (Acetone Dry Cell) 10 mg
 Reaction Temperature 75°C
 Reaction Time 24hrs.(Total)
 위의 表 5에서 보는 바와 같이 Glucose의 溶媒로서 調査한 範圍內에서는 Phosphate Buffer가 가장 좋은 結果를 나타내었으며 M/15나 M/30의 Phosphate Buffer 사이에는 別差가 없었다.

6. 酵素生成에 있어서의 培地組成的 影響

一般的으로 微生物의 酵素生成에 있어서 營養物質의 影響을 크게 받는다는 것은 이미 잘 알려져 있는 事實이며 특히 본 K-17 菌株의 Glucose Isomerase는 Endoenzyme에 屬하므로 菌體收量 또한 重要하므로 爲先 炭素源의 影響을 一部 調査하여 菌體量에 따르는 全體活性(Total Activity)과 單位菌體量의 活性(Unit Activity)를 調査하였다. 元來 Enzyme Activity의 調査에 있어서 一定한 條件下에서 全細胞內의 酵素를 體外로 遊離시켜 그 一定量이 주어진 溫度 K에 있어서 反應生成物 P와 時間 T가 函數關係를 成立시키는 條件下에서 檢討되어야 할 問題이나 本研究에 있어서 實驗施設의 關係上 絕對 Unit를 算出하지 못하고 V=kE의 關係를 無視한 狀態下에서 얻어진 結果이므로 여기서

나타난 數値는 絕對 Unit와 多少 差가 生길 可能性이 있는 것은 不可避하나 大體的인 傾向을 얻는 데는 充分하다고 生覺되며 그 實驗方法과 結果는 다음과 같다. 即 使用한 Carbon Source로서는 Glucose, Fructose, Sorbitol, Xylose, Sucrose 이었으며 이들 各 糖類를 다음과 같은 基礎培地에 0.5%씩 加하였으며 Mixed Carbon 區에 있어서는 上記 5種의 糖을 各各 0.1%씩 加하여 總糖을 0.5%로 하여 使用하였고 培養 條件은 29~32°C에서 25時間 振盪培養하였다.

Basal Medium

K ₂ HPO ₄	0.3 %
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.05 %
Peptone	1.0 %
Nutrient broth	0.3 %

위와 같이하여 培養된 菌體를 各各 遠心集菌하여 0.8%의 冷 NaCl 溶液으로 數回 洗滌한 後 冷 Acetone으로 脫水한 後 眞空乾燥하여 그 重量을 測定하고 또 이 乾燥菌體를 酵素源으로 直接 使用하였다.

Reaction Mixture

0.5 M Glucose	1.0 ml
5 × 10 ⁻³ M MgSO ₄	1.0 ml
M/15 Phosphate Buffer (pH 7.2)	3.0 ml
Enzyme Dry Cell)	10 mg
Reaction Temperature	75°C
Reaction Time	15hrs.

Table 6. The Effect of Carbon Source on Enzyme Formation.

Carbon Source	Cell yield* (mg)	Specific Activity		Total Activity	
		Fructose(mg)**	Related %	Fructose%**	Related %
Glucose	965.0	0.22	11	21.23	21
Fructose	841.0	0.30	15	25.23	25
Sorbitol	436.7	0.32	16	13.97	14

Xylose	496.7	0.03	100	100.83	100
Sucrose	418.2	0.28	14	11.71	12
Mixed	753.0	2.54	125	191.21	190
None	364.0	0.34	17	12.38	12

* Cell yield: as dry cell mg in 200ml of culture medium,

** Fructose: mg of Fructose in 1ml of reaction mixture.

위와같이 反應시킨後 生成된 Fructose 를 測定하여 各各 相對的인 活性을 定하였으며 이때 Xylose 添加培地에서 얻은 結果를 100 으로하여 各各의 結果를 相對的으로 表示하였으며 그 結果는 위의 表 6 과 같다.

위의 表 6에서 나타난 바와같이 本 K-17 菌株은 Xylose 가 酵素生成에 있어서 絕對的은 아니나 一種의 Inducer 로 作用하는 것 같으며 菌體의 增殖은 Glucose 에서 가장좋은 結果를 나타내었다. 反面 Xylose 는 Glucose 에 비해 1/2 의 菌體收量을 나타내었으나 單位量의 菌體內에 含有되어 있는 酵素의 量은 Glucose 區에 비해 Xylose 區가 約10倍量을 含有하고 있음을 알았으며 混合區에 있어서는 比活性이나 總活性이 다같이 Xylose 單用區에 비해 매우 높음을 알았으며 이것은 本菌의 榮養物質을 더 廣範圍하게 檢討하면 훨씬 効果的인 培地를 얻을 수 있을 것으로 믿어지며 이것은 實用化에 있어서도 아주 重要한 課題라고 생각된다.

要 約

本 研究에서 使用한 K-17 菌株의 酵素生成 및 그 의 金屬鹽 等에 對한 影響等을 要約하면 大略 다음과 같다.

1. 本 菌株은 Glucose Isomerizing Enzyme 生成에 있어서 Xylose 를 絕對的으로 要求하지 않는다.
2. 本 酵素는 Free Incubation 狀態에서는 75°C, 30 時間의 加熱로서 大部分의 酵素가 失活된다.
3. 金屬 Ion 中 Mg^{++} 는 酵素作用에 있어서 一種의 Activator 로 作用하며 Co^{++} 는 Activator 로서의 作用은 없고 酵素의 熱失活을 保護하는 作用을 나타낸다.
4. 本 酵素作用에 있어서 Glucose 의 溶媒로서는 Phosphate Buffer 가 가장 優秀한 結果를 나타내었다.
5. 本 菌株의 酵素 生成 培地로서는 炭素源으로서 주어지는 糖類의 混用이 單用에 비해 菌體의 收量이나 酵素能이 다같이 높아짐을 알게

되었다.

參考文獻

1. 徐正埏外 4 人; 韓農化誌 11, 43(1969)
2. 徐正埏外 4 人; 韓農化誌 11, 49(1969)
3. R.O. Marshall; U.S. Patent, 2,950,228(1960)
4. K. Yamanaka; Agr. Biol. Chem., 27, 4, 265 (1963)
5. K. Yamanaka; J. Agr. Chem., Japan, 37, 4, 231 (1963)
6. K.Yamanaka; ibid. 37, 4 (1963)
7. Y. Takazaki, et al; J. Agr. Chem. Soc., Japan, 36, 12 (1962)
8. Y. Takazaki, et al; ibid. 36, 12 (1962)
9. Y. Takazaki, et al; ibid. 37, 2 (1963)
10. Y. Takazaki, et al; ibid. 37, 3 (1963)
11. M. Nataka, et al; Agr. Biol. Chem., 27, 5, 342 (1963)
12. M. Nataka, et al; ibid. 30, 887 (1966)
13. M. Nataka, et al; Agr. Biol. Chem., 32, 3, 303 (1968)
14. N. Tsumura, et al; Agr. Biol. Chem., 29, 1129 (1965)
15. N. Tsumura, et al; 日本農化講演要旨 209 (1965)
16. N. Tsumura, et al; J. Ferm. Assoc., Japan, 22, 32 (1965)
17. N. Tsumura, et al; Agr. Biol. Chem., 31, 8, 902 (1967)
18. N. Tsumura, et al; ibid. 31, 8, 908 (1967)
19. N. Tsumura, et al; 日本農化講演要旨 160 (1967)
20. N. Tsumura et al; Agr. Biol. Chem., 29, 12, 1123 (1965)
21. M. Ichimura et al; 日本農化關東支部第 231 回講演會 (1964)
22. 東京大學; 應用微生物研究所 Symposium, 8, 90 (1967)