

포도당 이성화를 위한 Alkalophilic *Streptomyces* sp. B-2의 균체 고정화에 관한 연구

이 은 숙

경산대학교 한의예과

Studies on the Cell Immobilization of Alkalophilic *Streptomyces* sp. B-2 for the Glucose Isomerization

Eun-Sook Lee

Department of Preparatory Oriental Medicine, Kyungsan University

Abstract

The whole cells of alkalophilic *Streptomyces* sp. B-2 which produce glucose isomerase was immobilized by entrapment method for the effective production of high fructose syrup. The highest immobilized activity was achieved when the enzyme was bound to 2% κ -carrageenan. Immobilized glucose isomerase the pH optimum was about pH 7.5~8.5. Immobilization of alkalophilic *Streptomyces* sp. B-2 on 2% κ -carrageenan at 70°C showed an increase in glucose isomerase activity. GI activity of immobilized cells was maximum Co^{2+} concentration 10^{-3} M, Mg^{2+} concentration 10^{-3} M.

Key words : alkalophilic *Streptomyces* sp. B-2, glucose isomerization, fructose syrup, κ -carrageenan.

서 론

D-Glucose isomerase(D-glucose-6-phosphate-ketol-isomerase, EC 5.3.1.9)는 주로 intracellular enzyme 이며, D-glucose를 D-fructose 로 이성화 하므로, high fructose syrup을 제조하는데 이용되는 산업적으로 중요한 효소이다¹⁻³⁾.

Fructose는 sucrose보다 식품 이용면에서의 만족스런 물리 화학적 특성으로 인해 soft drink 등의 제조에 sucrose의 대체 감미료로 사용이 가속화 되었다.

Takasaki 등⁴⁾은 *Streptomyces albus*를 이용하여 열처리를 하여 균체내에 효소를 고정화하여 포도당 이성화 활성을 가진 고정화 균체를 얻었다.

열 처리한 *Streptomyces* sp.나 soluble glucose isomerase를 DEAE-cellulose에 흡착시켜 Press-Leaf filter에 여과한 다음 이 filter를 효소 반응기에 사용한 것이다.

Blanch 등에 의하여 intracellular 효소의 whole

-cell을 고정화하는 방법이 연구되었다⁵⁾.

본 연구에서는 토양에서 분리한 Alkalophilic *Streptomyces* sp.를 이용하여 포도당 이성화 반응을 행할 수 있는 균체 고정화 방법을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 균의 분리 및 선정

Glucose isomerase(GI)를 생성하는 호알칼리성 방선균을 전국 각지에서 채취한 토양시료에서 분리하였다.

채취된 토양시료 1g씩을 5ml의 생리식염수(0.85% NaCl 용액)에 현탁시키고 그 부유물이 침전되었을 때 상등액 0.1ml를 취하여 Table 1과 같은 분리용 배지에 도말하였다. 이때 배지로서 특징적인 것은 Na_2CO_3 를 별도로 멸균하여 agar가 굳기 전에 1% 수준으로 첨가하여 pH가 10.5정도의 알칼리성이 되게 하였다.

Table 1. Medium composition for isolation of glucose isomerase producing alkalophilic *Streptomyces* sp. B-2 (%)

*Xylose	1.0
Peptone	1.0
Meat extract	0.5
Yeast extract	0.25
NaCl	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
*Na ₂ CO ₃	1.0
Agar	0.5
pH	10.5

* Sterilized separately.

2. 균의 배양

분리 선정한 균주는 경산 일대의 밭에서 채취한 토양 시료에서 분리한 균주이다. GI 생성을 위해 사용된 배지 조성은 Table 2와 같다. 균주를 250ml의 Erlenmeyer flask 배지에 25ml씩 넣어서 rotary shaker (120 stroke/min)에서 30℃에서 50시간 동안 배양하였다.

3. 균체 고정화

1) 담체의 선택

담체로는 κ -carrageenan을 사용하였다. κ -Carrageenan은 최근에 주목되고 있는 담체 물질로서, 화학적으로 안정하며, gel 안정성을 상당히 증가시키는 것으로 알려져 있다⁶⁾.

2) κ -Carrageenan에 의한 균체 고정화

Wang의 방법⁷⁾을 사용하였다. 습균체 1g을 살균한 생리식염수 1ml에 현탁시켜 45℃로 유지하면

Table 2. Medium composition of the glucose isomerase by the alkalophilic *Streptomyces* sp. B-2 (g/l)

*Glucose	4.0
*Xylose	6.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.1
Peptone	3.0
NaCl	3.0
Yeast extract	2.0
K ₂ HPO ₄	5.0
*Na ₂ CO ₃	10.0
pH	10.5

* Separately sterilized.

서 실험에 사용하였다.

κ -Carrageenan 0.6g을 19ml의 멸균 증류수에 넣고, 80℃로 온도를 높여 잘 녹인 후, 45~50℃로 유지하여 준비한 균체 현탁액을 넣고 잘 혼합한 다음, 얼음수조 내에서 0.3M KCl 용액 속으로 바늘 크기가 $18G \times 1\frac{1}{2}$ "인 주사기를 통하여 압출시켜 gel을 만들고 gel을 10mm 크기로 자른 다음 1시간 동안 재침지하여 gel 안정화를 꾀하였다. 사용할 때는 증류수로 충분히 세척한 후 사용하였다.

3) Stabilizing agent 처리

고정화 균체의 gel 안정화를 증가시키기 위하여 Stabilizing agent를 처리하였다.

실험에 사용한 agent는 hexamethylenediamine 0.4M과 KCl 0.2M을 사용하였으며, 처리하지 않은 것보다 glucose isomerase activity가 50% 증가하였다. Stabilizing agent 처리 방법과 농도는 Tosa 등에 의한 방법에 준하였다⁸⁾. Gel을 0.3M stabilizing agent 용액 100ml에 완전히 잠기도록하여 30분 처리하고 증류수로 충분히 세척한 다음 glucose isomerase activity와 gel 강도를 측정하여 gel 안정성에 미치는 효과를 살펴보았다.

4) Hardening agent의 처리

포도당 이성화 반응은 고온에서 (60℃ 이상) 장시간에 걸쳐 이루어져야 하기 때문에 높은 gel 견고성으로써 구조적 안정화가 유지되어야 한다^{9,~11)}. 본 실험에서는 glutaraldehyde를 hardening agent로 사용하였다.

습균체 1g에 해당하는 고정화 균체를 최적 stabilizer에 처리하여 gel 안정성을 향상시킨 후 여기에 glutaraldehyde를 첨가하고 30분간 조용히 흔들면서 반응시켰다. Hardening 처리후 처리된 고정화 균체는 5℃ 이하의 증류수로 충분히 세척하고 glucose isomerase activity와 gel 강도를 측정하였으며, 고온에서 gel 안정성 변화를 살펴보기 위하여 60℃에서 1시간 처리하고 gel 강도를 측정해 보았다. 고정화 균체의 gel 견고성은 Texturometer(Zenken Company, Japan)를 사용하였다. 고정화 균체를 평판위에 올려놓고 gel 강도를 측정한다.

4. Glucose isomerase activity 측정

1) 생 균체의 G. I. activity 측정

G. I. 활성은 Takasaki의 방법¹²⁾을 변형한 res-

orcinol 법에 의하여 정량하였다¹³⁾ 즉 효소 반응은 기질 1ml와 효소용액 1ml를 혼합해서 65℃에서 1시간 반응시킨 다음 0.5M HClO₄ 2ml를 첨가해서 효소 반응을 중지시켰다.

2) 고정화 균체의 G. I. activity 측정

고정화 균체의 G. I. activity 는 1.0M D-glucose, 0.25M MgSO₄ · 7H₂O를 포함하는 pH 7.5의 0.05M Tris- HCl buffer 10ml을 기질용액으로하여 생균체 0.25g에 해당하는 고정화 균체를 사용하여 60℃의 shaking water bath에서 1시간 반응시킨 다음, 0.5M HClO₄용액 10ml을 첨가하여 효소반응을 중지하였다. 반응액은 예상되는 fructose의 농도가 100μg/ml이하가 되도록 희석하여 resorcinol 법에 의해 생성된 fructose를 정량하였다. 고정화 균체의 G. I. activity 1 unit은 생균체와 마찬가지로, 위와 같은 반응조건에서 1분 동안에 1μmole의 fructose를 생성할 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

결과 및 고찰

1. pH stability

효소 활성의 최적 pH를 알아보기 위하여 기질이 들어있는 buffer를 pH 5.5~11.0(citrate phosphate 5.5~6.5, phosphate 7.0~8.5, barbital 9.0~9.5, Tris-NaOH 10~10.5, glycine-NaOH 11.0)으로 조절하여 GI 활성을 측정하였다.

Alkalophilic *Streptomyces* sp. B-2의 고정화 균체에 있어서 G. I. activity에 미치는 기질용액의 pH의 영향을 조사한 결과는 Fig. 1에 나타낸 바와

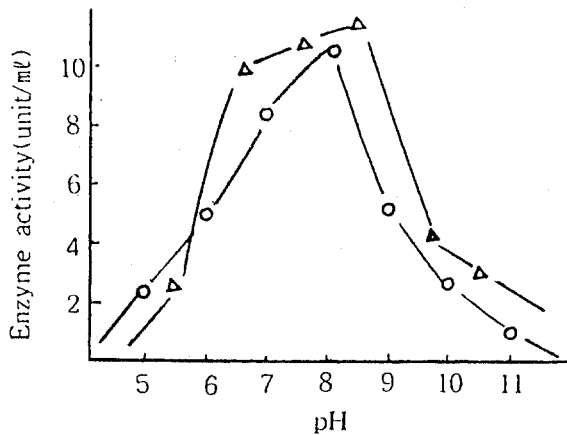


Fig. 1. Effect of pH on G. I. activity of the intact cells (O-O) and the immobilized cells (Δ-Δ).

같았다.

최적 pH 범위는 6.5~8.5이며, pH 7.5~8.5가 가장 높은 activity를 보여주었는데 생균체의 경우 pH가 높아짐에 따라 G. I. activity가 상당히 감소하였으나 고정화를 함으로써 pH 8.5까지 안정상태를 보였다.

본 실험에서 분리한 alkalophilic *Streptomyces* sp.는 최대 성장을 위하여 호알칼리성 pH를 필요로 하지만 고정화 균체의 최적 pH는 중성~약알칼리로 나타났다.

2. Reaction temperature의 영향

GI 반응 온도를 40, 50, 60, 70, 80, 90℃로 맞추어 GI 활성을 측정하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

온도는 효소 반응시 glucose isomerase의 활성뿐만 아니라, 고정화 균체의 gel 안정성에도 직접 관련된다.

생균체의 경우, 60℃에서 G. I. activity가 가장 높은 것으로 나타났으나, 균체를 고정화 하였을 때는 70℃에서 가장 높은 활성도를 높였다. 반응 온도가 올라 갈수록 반응 공간이 넓어져서 포도당 이성화 반응의 활성화가 촉진되는 것으로 생각된다.

3. Co²⁺ 효과

Alkalophilic *Streptomyces* sp.의 glucose isomerizing enzyme이 Co²⁺에 대하여 어떤 영향을 미치는가를 알아 보았다(Table 3).

Alkalophilic *Streptomyces* sp.는 Co²⁺를 첨가했을 때 GI 활성이 증가하는 것으로 나타났다.

4. Mg²⁺의 효과

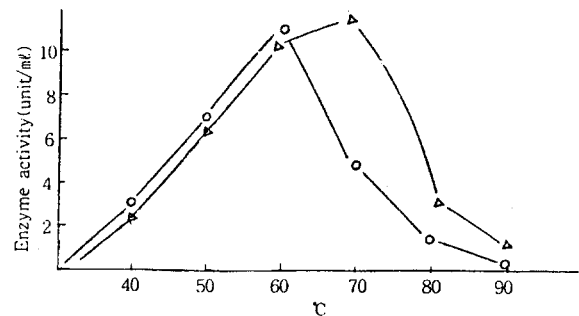


Fig. 2. Effects of reaction temperature on the enzyme activity of the intact cells (O-O) and the immobilized cells (Δ-Δ).

Table 3. Effects of Co^{2+} on the enzyme activity

CoCl ₂ ion concentration	Enzyme activity (unit /ml)	
	Intact cells	Immobilized cells
0	7.3	7.6
10 ⁻¹	8.9	8.7
10 ⁻²	9.1	9.0
10 ⁻³	10.3	10.2
10 ⁻⁴	9.4	9.8
10 ⁻⁵	9.3	9.4

Table 4. Effects of Mg^{2+} on the enzyme activity

MgSO ₄ ion concentration	Enzyme activity (unit /ml)	
	Intact cells	Immobilized cells
0	7.2	7.0
10 ⁻¹	9.3	8.3
10 ⁻²	9.7	9.6
10 ⁻³	10.4	10.3
10 ⁻⁴	10.1	10.1
10 ⁻⁵	9.9	9.7

Alkalophilic *Streptomyces* sp. B-2의 glucose isomerizing enzyme이 Mg^{2+} 에 대하여 어떤 영향을 미치는 가를 알아 보았다(Table 4).

Alkalophilic *Streptomyces* sp. B-2가 생성하는 glucose isomerase는 G. I 활성을 최적으로 유지하기 위해서는 Mg^{2+} 가 필요하다. Immobilized cell이 intact cell 보다 조금 높은 농도의 Mg^{2+} 를 필요로 하는 것으로 나타났다. 이것은 고정화에 사용된 Ca^{2+} 와 K^{+} 때문으로 생각된다. Ca^{2+} 와 K^{+} 이온은 glucose isomerase의 강력한 inhibitor로 알려져 있다¹⁴⁾. 고정화 균체의 G. I. activity에 있어서 Mg^{2+} 의 역할은 매우 중요하다고 생각된다.

요 약

본 실험에서는 GI 활성이 높은 alkalophilic *Streptomyces* sp.를 사용하여 2% κ -carrageenan에 균체를 고정화한 후 고정화 균체의 효소학적 특성을 살펴 보았다.

pH stability는 pH가 7.5~8.5에서 GI 활성이 가장 높았으며, reaction temperature는 70℃,

Co^{2+} 는 10⁻³M, Mg^{2+} 는 10⁻³M일 때 GI 활성이 가장 높은 것으로 나타났다.

참고문헌

- Gong, C. S., Chen, L. F. & Taso, G. T. : *Biotechnol. Bioeng.*, 12, 833~845(1980).
- Takasaki, Y., Kosugi, Y. & Kanbayshi, A. : *Agric. Biol. Chem.* 33, 1527~1534(1969).
- Chen, W. P. : *Process Biochemistry*, June/July, 30 (1980).
- Takasaki, Y. and Tanabe, O. : Enzyme method for converting glucose in glucose Syrup to fructose, U. S. patent 3, 616, 221.
- Blanch, H. W. : Immobilized microbial Cells, *Ann. Reports on Fermentation Processes*, 7, 81~105(1984).
- Klein, J. and Wagner, F. : Methods for the immobilization of microbial cells, *Appl. Biochem. Bieng.* 4, 12~51(1983).
- Wang, H. Y. and Hettwer, D. J. : Cell immobilization in κ -carrageenan with tricalcium phosphate, *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1827~1838(1982).
- Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Yamamoto, K., Takata, I., Nishida, Y., and Chibata, I. : Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1697~1709(1979).
- DeRosa, M., Gambacorta, A., and Esposito, E. : High-temperature membrane entrapped cells, *Biotech. Bioeng.*, 23, 221~223(1981).
- Petre, D., Noel, C., and Thomas, D. : A new method for cell immobilization. *Biotech. Bioeng.*, 20, 127~134(1978).
- Bachman, S., Gabricka, L., and Gasyna, Z. : Immobilization of glucose isomerase on radiation-modified gelatin gel. *Starch*, 33, 63~66(1981).
- Takasaki, Y. : Studies on sugar isomerizing enzyme; Production and utilization of glucose isomerase from *Streptomyces* sp., *Agric. Biol. Chem.*, 30 (12), 1247~1253(1966).
- Ashwell, G. : Enzyme of carbohydrate metabolism, *Method in Enzymology*, 3(73), 208~211 (1957).
- Richard, L. A., William, C., and Bem, J. S. : Glucose isomerase production of high-fructose syrups, *Appl. Biochem. Bioeng.*, 2, 110~111(1979).

(1998년 4월 17일 접수)