

해양으로부터 phytase 생산 균주의 분리동정 및 효소 특성

김영옥 · 이정호 · 김경길 · 김한우

국립수산과학원 생명공학연구단

서 론

Phytase는 phytic acid (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis dihydrogen phosphate)를 분해하여 phosphate와 phosphate inositol를 만드는 효소이다. Phytic acid는 가축의 사료로 사용하고 있는 곡물의 경우 인함량의 50~70%를 차지하지만, 물고기, 닭, 돼지와 같은 단위동물은 생체 내에 phytic acid를 분해하는 phytase가 존재하지 않기 때문에 식물성 인의 이용률이 극히 낮아서 성장에 필요한 인을 무기물 형태로 외부에서 따로 충분히 공급해줘야만 한다. 이처럼 사료에 존재하지만 단위 동물이 소화하지 못한 phytic acid는 토양이나 물속에 존재하는 미생물에 의해 효소적으로 분해되어 강과 호수로 수송되어 인이 제한된 수중 환경에서 인의 대량유입으로 해조류 성장과 산소고갈을 유도하는 부영양화를 야기한다. 또한 phytic acid는 중요한 미량광물질, 아미노산, 비타민 등과 킬레이팅(chelating)후 불용화 되어 생체에서 이용할 수 없게 되어 사료 중 영양손실을 크게 하는 항영양인자로 작용한다. 따라서 phytase를 사료에 첨가하여 단위동물에 급여할 경우, 사료내의 불용성 인의 이용성 증가로 무기태인의 사료 중의 급여량을 줄일 수 있어 경제적인 이익을 가져옴과 동시에 중요한 미량 생체활성물질의 이용성을 좋게 하고 동물분으로 배출되는 인의 양을 줄여 이로 인한 환경오염을 감소시킬 수 있어, 경제적 측면 뿐 아니라 환경 보호차원에서 중요한 의미를 가진다. 본 연구에서는 부산 근교의 해양으로부터 phytase 활성이 있는 균주를 분리 동정하였으며, 그 중 효소 활성이 높은 *Citrobacter braakii*.균주로부터 phytase를 정제하고 효소의 특성을 조사하였다

재료 및 방법

광안리입구 하수처리장, 송정, 해운대, 대변, 신선대, 이기대, 낙동강 하구언 등의 부산근교의 해수로부터 시료를 채취 후 스크리닝 플레이트에서 phytic acid 분해능이 우수한 균주를 선별하고, 이를 액체 배양하여 phytase 활성이 높은 5 균주를 선별하였다. 분리된 미생물의 동정은 그람 염색, API 20E를 이용한 생리학적 특성과 16S rDNA sequencing 분석 결과를 토대로 행하였다. 그 중 phytase 활성이 뛰어난 *Citrobacter braakii* YH-15균주의 세포내 분획으로부터 A/S 침전, column chromatography를 수행하여 phytase를 분리 정제하였으며, 또한 N-말단 아미노산 서열과 생화학적 특성을 조사하였다.

결과 및 고찰

부산근교의 해양으로부터 phytase 활성이 높은 5 균주(PHY 11, 13, 15, 60, 103)를 선별하였다. 동정 결과 PHY11와 PHY103 균주는 *Enterobacter cloacae*, PHY13 균주는 *Escherichia coli*, PHY15 균주는 *Citrobacter braakii*, PHY60 균주는 *Enterobacter amnigenus*로 판명되었다. *Citrobacter braakii*균을 효소최적생산배지에서 키운 후 세포 내 분획으로부터 A/S 침전, Pheny-, DEAE-, CM-과 Mono S HR 5/5 FPLC컬럼을 거친 후 효소를 순수분리 정제하였다. Phytase는 최종단계에서 3,457 units/mg이었으며 회수율은 28%이었고 12,950배 정제되었다. *C. braakii* 유래의 phytase는 SDS-PAGE에 의한 분자량은 47 kDa로 추정되었으며, phytate에 특이적인 분해능이 있었다. Phytase의 최적 pH와 최적 온도는 각각 4.0, 50°C이었으며, 다양한 금속이온 중 Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} 에 효소활성이 강하게 억제되었다. Sodium phytate에 대한 Km값은 0.46mM이며, Vmax값은 6.027 U/mg이었다. 효소의 이러한 특성은 비반추동물의 사료첨가제로 phytate phosphate의 이용성을 증가시키는데 유용하리라 사료된다.

참고문헌

- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T., 1994. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins
- Greiner, R., Konietzny, U. and Jany, K.D., 1993. Purification and characterization of two phytase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 303: 107-113
- Laboure, A.M., Gagnon, J. and Lescure, A.M., 1993. Purification and Characterization of a phytase (*myo*-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochem. J.*, 295: 413-419
- Kim Y.O, Kim H.K, Bae K.S. and Oh T.K., 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Technol* 22: 2-7
- Cosgrove, D.J., Irving, G.C.J. and Bromfield, S.M., 1970. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. The isolation of soil bacteria having inositol phosphate phosphatase activity. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23: 339-34
- Fiske, C.H. and Subbarow, Y.P., 1925. The colorimetric determination of phosphorus, *J. Biol. Chem.* 66: 375-410