J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
27(1), 38~45(1998)

한국식품영양과학회지

# *Aspergillus*속 균주가 생산하는 Phytase의 분리 정제 및 특성

천성숙 · 조영제* · 차원섭* · 이희덕 · 이선호 · 최 청†

영남대학교 식품가공학과
*상주산업대학교 식품공학과

# Isolation, Purification and Characterization of Phytase from *Aspergillus* sp.

**Sung-Sook Chun, Young-Je Cho*, Woen-Suep Cha*, Hee-Duck Lee, Sun-Ho Lee and Chung Choi†**

*Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyungsan 712-749, Korea*
**Dept. of Food Engineering, Sangju National Polytechnic University, Sangju 742-170, Korea*

## Abstract

**To extract insoluble proteins and to improve funtional properties of abolished proteins, an phytase producing *Aspergillus* sp. SM-15 was isolated from soil. The enzyme was purified and its enzymological characteristics were investigated. Phytase production reached to maximum when the wheat bran medium containing 1% mannose, 1% yeast extract, 1% $(NH_4)_2HPO_4$ and 0.2% calcium chloride was cultured for 4 days. Phytase was purified 17.1 fold and specific activity was 244.32unit/mg by a sequencial process of ammonium sulfate fraction, ion exchange chromatography and gel filtration. Purified enzyme was confirmed as a single band by the polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of phytase was estimated to be 46,000. The optimum pH and temperature for the phytase activity were 5.5 and 50°C. The enzyme is stable in pH 4.5~5.5, 60°C. The activity of purified enzyme was inhibited by $Hg^{2+}$ whereas activited by $Pb^{2+}$ and $Fe^{2+}$. The activity of phytase was inhibited by the treatment with iodine. The result indicate the possible involvement of histidine at active site. Km and Vmax of the purified phytase were 37.037mM/L and 159.87μmol/min, respectively.**

**Key words:** *Aspergillus* sp. phytase, purification, characterization

## 서 론

인구 증가에 따른 단백질의 부족 현상은 가까운 장래에 현실화될 것이다. 이에 대처하기 위해 연구자들은 미개발 자원으로부터 식용단백질을 얻기 위해 단세포 단백질, 어류, 식물의 잎, 종실류 등에 대한 많은 연구를 하여 왔으며, 현재 식물단백질 자원으로는 대두를 비롯한 땅콩, 면실, 유채, 해바라기 종자 및 참깨 등에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(1-12). 그러나 이들 종자 식물에는 영양 저해인자로 알려진 phytic acid가 많이 함유되어 있어 이의 제거를 위한 연구가 요구되고 있다. 식물성 식품 중에 약 1~2% 존재하는 phytic acid는 담황색의 점조한 용액으로서 물 및 알콜과 잘 혼합되는 강산성 물질이며 Ca, Mg, Fe, Cu 및 Zn 등의 2가 혹은 3가 금속이온 등 여러가지 금속 이온과 복합체를 만들어 불용성 화합물이 되기 때문에 무기질의 체내 흡수를 저해하는 중요한 antinutritional factor로 작용한다(13). 더욱이 단백질과 결합하여 protein-phytate 복합체를 형성하기 때문에 용해도를 감소시켜 단백질 분해 효소의 작용을 저해하고 단백질 체내흡수를 감소시킨다고 보고된 바 있다(14). 따라서, 식품 중에 함유되어 있는 단백질의 이용도를 높이기 위해 phytic acid 함량을 감소시키거나 제거시키는 방법에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며(15-20), Lolas와 Markakis(21)가 식물종자에서 phytic acid를 가수분해할 수 있는 plant phytase의 존재를 밝혀 낸 이후, Lee(22)와 Peers(23)는 보리와 밀의 phytase를 분리, 정제하여 그 특성을 보고하였고, Gibbin와 Norris(24), Nair과 Duvnjak

†To whom all correspondence should be addressed

(25), Han 등(26)은 미생물이 생성하는 phytase에 의한 phytic acid의 분해에 관하여 보고하였다. 미생물이 생성하는 phytase는 동물체나 식물체에서 분리한 효소에 비하여 공업적으로 대량생산과 생산 원가면에서 훨씬 유리하므로(27), 최근에는 미생물이 생산하는 효소에 대한 연구가 활발한 편이다(28-32). 또한 기존에 보고된 미생물 phytase를 이용할수도 있으나 phytate 분해능이 더 우수한 균주의 개발도 병행되어야 한다고 생각된다.

본 연구에서는 폐단백질의 재활용에 이용하기 위해 기존의 미생물 phytase보다 활성이 뛰어난 균주를 개발하기 위하여 토양으로부터 활성 균주를 탐색하였으며 이균주가 생산하는 phytase를 분리, 정제하고 특성을 검토하여 폐단백질에 적용시키기 위한 최적 작용조건을 제시하기 위한 기초자료로 활용코자 하였다.

## 재료 및 방법

### Phytase 생성균의 분리 및 배양

대구 및 경북지방의 토양과 부식토를 채취하여 상법(33)에 따라 순수분리하고, 분리된 균주 중 phytase 생성능이 뛰어난 3균주를 1차 선발하고 3차례 반복실험을 행하여 효소생성능력이 가장 우수한 균주를 선발하였다. 균의 순수분리를 위해서는 potato dextrose agar (Difco.)를, 효소생산을 위하여 밀기울배지(밀기울 50g에 2% glucose 50ml를 첨가)를, 균주 보관용 배지로는 Czapek-dox agar(Difco.)를 사용하였으며, 효소생산을 위해서는 밀기울배지 600g에 공시균주의 균사체 및 포자를 5백금이 접종하고, 35℃에서 3일간 배양하였다.

### 효소생산을 위한 최적조건 결정

수분이 60% 함유된 밀기울배지에 공시균을 접종하여 35℃에서 배양하면서 경시적으로 phytase활성 변화를 측정하였으며, 밀기울배지에 다양한 유기질소원, 무기질소원, 탄소원을 각 1 %씩, 무기염을 0.2 %씩 첨가하고 35℃에서 최적 배양시간 동안 배양하였을 때 효소의 활성을 측정 비교하였다.

### 효소의 정제

배양이 완료된 밀기울배지에 8배의 0.2M acetate buffer(pH 5.0)를 가하여 균질화시킨 후, 4℃에서 24시간 교반하여 효소를 용출하고, 4,000×g로 30분간 원심분리한 후 상징액을 모아 여과하여 정제를 위한 조효소액으로 사용하였다. 조효소액에 황산암모늄을 가하여 70 % 포화시켰을 때 석출되는 침전물을 0.2M acetate buffer(pH 5.0)로 투석하고, 저온실에서 Sephadex G-100과 G-150컬럼을 이용한 gel filteration과 DEAE-cellulose를 이용한 이온교환 크로마토그라피로 정제하였다.

### 단백질 정량

Lowry 등의 방법(34)에 따라 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 단백질을 정량하였다.

### Phytase 활성측정

Phytase 활성측정은 p-nitrophenylphosphate(PNPP)를 기질로 Heinonen과 Lahti의 방법(35)에 따라 실시하였으며, 효소활성은 효소액 1ml가 1분간에 1μmole의 p-nitrophenol(PNP)을 생성하는 것을 1unit로 정하였다.

### Polyacrylamide gel electrophoresis

정제된 효소 단백질은 Davis법(36)에 따라 polyacrylamide gel disc 전기영동으로 분석하였다. 영동이 끝난 gel은 1% amido black 10-B용액으로 2시간 염색한 후 7% acetic acid용액으로 탈색하였다.

### 분자량측정

정제된 효소의 분자량을 Weber와 Osborn의 방법(37)에 의하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에 의하여 측정하였다. 전기영동 후 표준단백질로 bovine serum albumin(MW: 66,000), egg albumin(MW: 45,000), pepsine(MW: 34,700), trypsinogen(MW: 24,000), β-lactoglobulin(MW: 18,400), lysozyme(MW: 14,300)을 사용한 표준곡선을 작성하여 Rm값에 따라 분자량을 측정하였다.

### 효소학적 특성

#### pH의 영향

pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 3~11까지의 pH영역에서 효소활성을 측정하였으며, 이때 사용된 buffer는 25mM phosphate-HCl buffer(pH 3.0~4.0), 25mM acetate buffer(pH4.5~6.0), 25 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0~8.0) 및 25mM boric acid-NaOH buffer(pH 9.0~11.0)이었다.

#### pH 안정성

효소의 pH에 대한 안정성을 조사해 보기 위하여 효소를 pH 3~11까지의 범위에서 4℃, 24시간 동안 방치한 뒤 최적 pH인 5.0으로 조절하고 잔존활성을 조사하였다.

온도에 의한 영향

효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 효소반응온도를 20~70°C까지 변화시키면서 활성을 측정하였다.

열 안정성

Phytase의 열안정성을 조사하기 위하여 20~70°C의 범위에서 10~60분간 열처리한 후 최적 반응온도에서 활성을 측정하였다.

금속이온의 영향

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검사하기 위하여 각종 금속이온들과 효소액을 혼합하고 30°C에서 1시간 동안 방치한 뒤 효소활성을 조사하였다.

활성저해제의 영향

금속과 결합하여 chelate를 형성하는 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 효소분자 중의 SH기와 alkyl화되어 불가역적으로 저해하는 bromoacetic acid, 말단 아미노기와 친화력이 강하여 이 말단 활성아미노기를 저해하게 되는 2,4-dinitrophenol, methionine과 cystein의 modifier인 $H_2O_2$, N-말단 amino group과 histidine의 imidazole group을 저해하는 maleic anhydride (MA), tryptophane의 phenolic hydroxyl group, histidine의 imidazole group을 저해하는 iodine을 선정하여 효소액에 각종 저해제를 10mM의 농도로 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 방치한 후 잔존활성을 측정하였다 (28,32).

## 결과 및 고찰

### Phytase 생성균주 분리 및 동정

대구, 경북지역에서 채취한 토양으로 부터 분리한 85균주를 대상으로 phytase활성을 가지는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 Koneman 등(38)의 방법에 따라 Czapeck- Dox agar에 slide culture하면서 현미경으로 관찰한 결과 Fig. 1과 같이 colony는 검은색을 띠고 있었고 가근은 없으며 균사에는 격벽이 있고 foot cell에서 분지된 condiophore의 선단은 비대하여 vesicle이 되고 그 끝에 타원형의 conidia가 달려있었다. 따라서 이 균주는 *Aspergillus* sp.으로 추정되어 이를 *Aspergillus* sp. SM-15로 명명하고 본 실험에 공시 균주로 사용하였다.

### 최적 배양조건

*Aspergillus* sp. SM-15의 phytase 활성을 수분이 60% 함유된 밀기울배지를 사용하여 배양시간별로 측정한 결과 Fig. 2와 같이 배양 4일째 효소활성이 가장 높았으며, 5일째부터 서서히 활성이 감소되기 시작하였다. 이 결과는 Han 등(26)이 *Aspergillus* sp.의 phytase가 밀기울 배양시 배양 3일째 활성이 최대에 도달하였다는 보고와 다소 차이가 있었다. 각종 영양성분을 밀기울배지 제조시 수용액 상태로 첨가시킨 후 배양시켜 효소활성을 측정한 결과, Table 1과 같이 탄소원 중 mannose, sorbitol, fructose 및 galactose의 순으로 활성이 높았으며, 유기질소원 중에서는 yeast extract, soytone, urea 및 trypton의 순으로 활성이 높았다. 무기질소원 중에서는 $(NH_4)_2HPO_4$와 $(NH_4)_2SO_4$에 의해서 활성이 다소 증가되었으며, 특히 무기염인 calcium chloride에 의해서 활성이 135%까지 증가되었다.

**Fig. 1. Microscopic morphology of *Aspergillus* sp. SM-15.**

### Phytase의 정제

DEAE-cellulose ion exchange chromatography

조효소액을 황산암모늄으로 70% 포화시켰을 때 얻

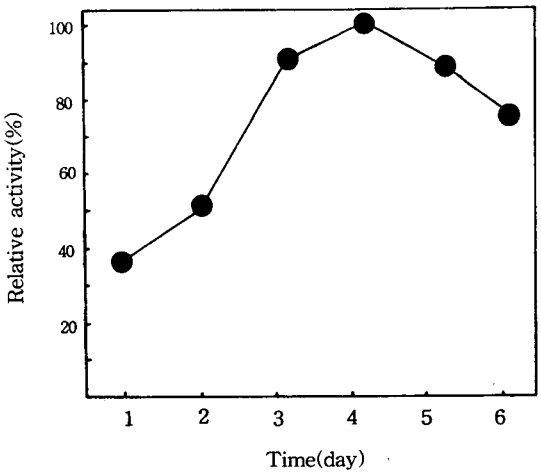


**Fig. 2. Effect of cultivation time on the production of phytase from *Aspergillus* sp. SM-15.**

**Table 1. Production of phytase by various sources after 3 days cultivation**

| Source | Concetration | Activity | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Unit | % |
| | | None | 49.74 | 100.00 |
| Carbon | 1% | Galactose | 50.84 | 102.22 |
| | | Arabinose | 48.91 | 98.34 |
| | | Glycerin | 46.98 | 94.46 |
| | | Lactose | 47.12 | 94.74 |
| | | Glucose | 42.98 | 86.43 |
| | | Fructose | 53.32 | 107.20 |
| | | Sorbitol | 54.14 | 108.86 |
| | | Mannitol | 45.88 | 92.24 |
| | | Maltose | 46.29 | 93.08 |
| | | Mannose | 54.56 | 109.70 |
| | | Sucrose | 45.33 | 91.14 |
| | | Starch | 50.29 | 101.11 |
| | | Citrate | 41.61 | 83.66 |
| Organic nitrogen | 1% | Soytone | 59.65 | 119.95 |
| | | Pepton | 46.57 | 93.63 |
| | | Glycine | 54.14 | 108.86 |
| | | Albumin | 52.35 | 105.26 |
| | | Yeast extract | 61.31 | 123.27 |
| | | Trypton | 55.52 | 111.63 |
| | | Urea | 58.14 | 116.90 |
| Inorganic nitrogen | 1% | $Ca(NO_3)_2$ | 46.98 | 94.46 |
| | | $(NH_4)_2S_2O_8$ | 48.63 | 97.78 |
| | | $(NH_4)HPO_4$ | 53.04 | 106.65 |
| | | $KNO_3$ | 43.40 | 87.26 |
| | | $NH_4Cl$ | 46.98 | 94.46 |
| | | $(NH_4)_2SO_4$ | 51.39 | 103.32 |
| | | $NaNO_2$ | 44.22 | 88.92 |
| Inorganic salt | 0.2% | $MgSO_4$ | 44.50 | 89.47 |
| | | $FeSO_4$ | 51.80 | 104.16 |
| | | $KH_2PO_4$ | 54.70 | 109.97 |
| | | NaCl | 44.91 | 90.31 |
| | | $K_2HPO_4$ | 44.64 | 89.75 |
| | | $NaH_2PO_4$ | 47.81 | 96.12 |
| | | $MgCl_2$ | 47.53 | 95.57 |
| | | $Na_2HPO_4$ | 52.63 | 105.82 |
| | | $CaCl_2$ | 67.09 | 134.90 |
| | | $CuSO_4$ | 36.79 | 73.96 |

어진 침전물을 탈염한 후 0~1.0M까지의 NaCl linear gradient로 DEAE-cellulose ion exchange column(3×50cm)을 이용하여 분당 0.81ml의 유속으로 tube당 10 ml씩 chromatography한 결과, Fig. 3에서와 같이 약 6개의 peak가 검출되었으며 0.4 M NaCl정도에서 활성단백질이 용출되었다. DEAE-cellulose ion exchange chromatography한 활성단백은 Amicon membrane filter(PM-10)으로 농축하였다

Sephadex G-100 gel filtration

농축된 효소단백은 Sephadex G-100 column(2×70 cm)을 이용하여 0.2M acetate buffer(pH 5.0)로 분당

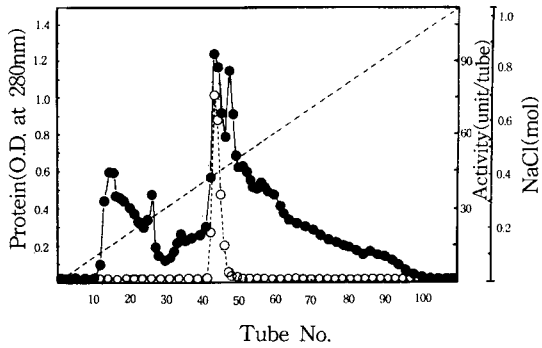


**Fig. 3. DEAE-cellulose ion exchange chromatography of phytase from the culture of *Aspergillus* sp. SM-15.**
Fraction size was 10ml/tube.
●—●: Protein, ○—○: Activity

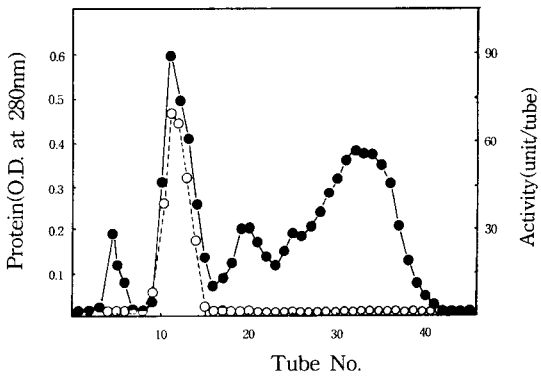


**Fig. 4. Sephadex G-100 gel filtration of phytase from the culture of *Aspergillus* sp. SM-15.**
Fraction size was 5.4ml/tube.
●—●: Protein, ○—○: Activity

0.69ml의 유속으로 gel filteration 하였으며, tube당 5.4 ml씩 분획한 결과 Fig. 4에서와 같이 4개의 peak가 확인되었고 2번째 분획에서 효소활성이 검출되었으며, 활성단백은 모아서 농축하였다.

Sephadex G-150 gel filtration

Sephadex G-100을 통과시킨 활성단백은 Sephadex G-150 column(2×70cm)을 이용하여 동일 buffer로 gel filteration 하였으며, 이때 유속은 분당 0.2ml이었고 tube당 3ml씩 분획하였으며, 그 결과 Fig. 5에서와 같이 2개의 분획 중 1개에서 활성이 검출되었으며, 활성분획만 모아서 동결 건조하였다. 상기와 같이 정제한 결과 효소의 비활성 역가는 244.32unit/mg이었고, 정제배수는 17.07배였으며(Table 2), 본 균주가 Han 등(26)이 보고한 *Asp. ficuum*이 생성하는 phytase의 8.25unit/mg보다 활성이 약 3배 정도 높았다.

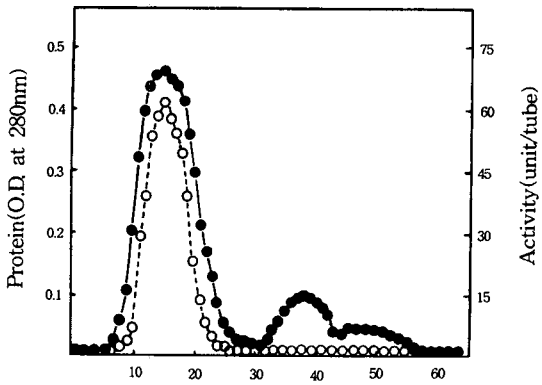


**Fig. 5. Sephadex G-150 gel filtration of phytase from the culture of *Aspergillus* sp. SM-15.**
Fraction size was 3.0ml/tube.
●—●: Protein, ○—○: Activity

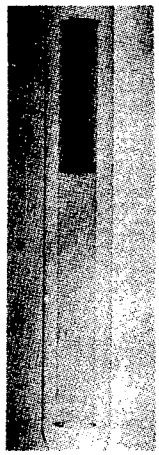

**Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of phytase from the culture of *Aspergillus* sp. SM-15.**

## Polyacrylamide gel electrophoresis

정제된 효소단백질을 동결건조한 후 Davis법(36)에 따라 polyacrylamide gel로써 disc gel electrophoresis 행하여 본 결과 Fig. 6에서와 같이 단일밴드로 나타났다.

## 분자량 측정

Weber와 Osborn의 방법(37)에 따라 SDS-polyacrylamide 전기영동에 의한 분자량 측정 결과는 Fig. 7에 나타난 바와 같이 46000 정도의 단일단백이 확인되어 이 효소는 monomeric상태로 존재하는 것으로 추측되었다.

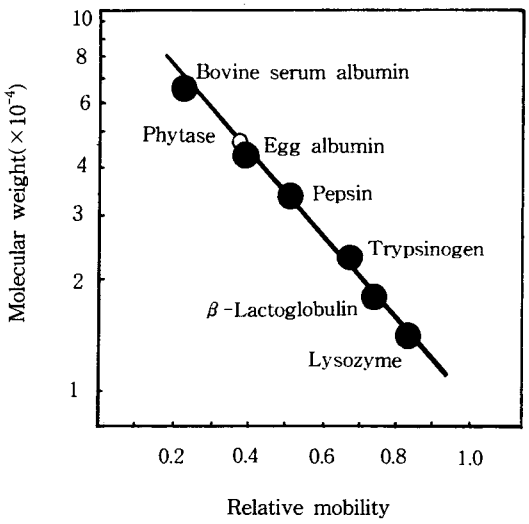


**Fig. 7. The calibration curve for determination of molecular weight of phytase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.**
Molecular markers: Bovine serum albumin(MW: 66,000), Egg albumin(MW: 34,700), Trypsinogen(MW: 24,000), β-Lactoglobulin(MV: 18,400), Lysozyme(MW: 14,300)

## Phytase의 특성

### pH에 의한 영향

pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 3~11까지의 pH영역에서 효소활성을 측정한 결과 Fig. 8-A와 같이 효소의 최적 pH는 5.0이었으며, pH 6.0 이상에서 효소활성이 급격히 감소하여 43~26% 정도의 활성만이 검출되었다. Peers(23)와 Lee(22)는 밀과 보리의 phytase가 pH 5.0에서 최적이라고 보고한 것과 유사하였다.

### pH 안정성

효소의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 효소

**Table 2. Purification procedure of phytase from the culture of *Aspergillus* sp. SM-15**

| | Total protein (mg) | Total activity (unit) | Specific activity (unit/mg) | Yield (%) | Purification fold |
|---|---|---|---|---|---|
| Crude enzyme solution | 763.17 | 10922.73 | 14.31 | 100.00 | 1.00 |
| Ammonium sulfate | 150.64 | 4026.03 | 26.73 | 36.86 | 1.87 |
| DEAE-cellulose | 18.20 | 2105.50 | 115.69 | 19.28 | 8.09 |
| Sephadex G-100 | 6.99 | 1270.50 | 181.76 | 11.63 | 12.70 |
| Sephadex G-150 | 4.19 | 1023.70 | 244.32 | 9.37 | 17.07 |

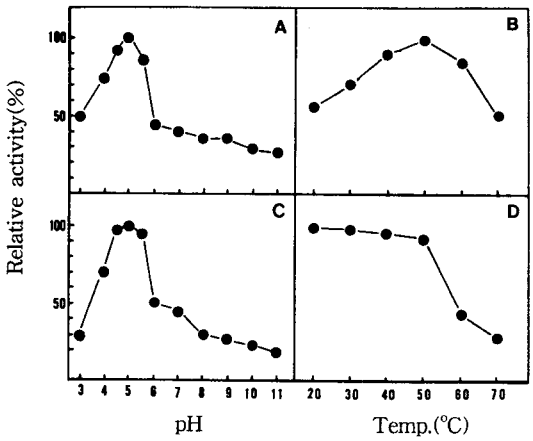


**Fig. 8. Effect of pH and temperature on the activity of phytase from the culture of *Aspergillus* sp. SM-15.**
A: Effect of pH, B: Effect of temperature
C: Stability of pH, D: Stability of temperature

를 pH 3~11까지의 범위에서 4°C, 24시간 동안 방치한 뒤 최적 pH인 5.0으로 조절하고 잔존활성을 조사한 결과는 Fig. 8-B와 같다. *Aspergillus* sp. SM-15가 생산하는 phytase는 그 안정범위가 pH 4.5~5.5까지로 안정범위가 비교적 좁은 편이었다.

온도에 의한 영향

효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 효소반응온도를 20~70°C까지 변화시키면서 활성을 측정한 결과는 Fig. 8-C와 같으며 50°C에서 반응시켰을 때 그 상대활성이 가장 높게 나타났으며 70°C에서 반응시켰을 때는 그 활성이 약 50% 정도만을 나타내었다.

열 안정성

Phytase의 열안정성을 조사하기 위하여 20~70°C의 범위에서 10~60분간 열처리한 후 최적 반응온도에서 활성을 측정한 결과 Fig. 8-D에서와 같이 50°C까지는 활성감소가 거의 없었으나 60 및 70°C의 온도에서는 효소활성이 급격히 떨어졌다.

금속이온의 영향

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 금속이온들과 효소액을 혼합하고 30°C에서 1시간 동안 방치한 뒤 효소활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 본 효소는 $Fe^{2+}$와 $Pb^{2+}$에 의해서 활성이 촉진되었으며, $Hg^{2+}$에 의해서 약 40% 가량의 저해가 발생하였다.

활성저해제의 영향

효소활성저해제 중 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), bromoacetic acid, 2,4-dinitrophenol, $H_2O_2$,

**Table 3. Effect of metal ions on the activity of phytase produced by *Aspergillus* sp. SM-15**

| Ion | Metal | Activity | |
|---|---|---|---|
| | | Unit | % |
| None | - | 65.25 | 100.00 |
| $Cu^{2+}$ | $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 52.43 | 80.35 |
| $Zn^{2+}$ | $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 60.30 | 92.41 |
| $Ca^{2+}$ | $CaCl_2$ | 65.48 | 100.35 |
| $Pb^{2+}$ | $Pb(CH_2COO)_2$ | 69.97 | 107.24 |
| $Mn^{2+}$ | $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ | 63.68 | 97.59 |
| $Hg^{2+}$ | $HgCl_2$ | 38.48 | 58.97 |
| $Mg^{2+}$ | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 65.03 | 99.66 |
| $Fe^{2+}$ | $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 121.72 | 186.55 |
| $Ba^{2+}$ | $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 65.25 | 100.00 |
| $Na^{+}$ | NaCl | 63.00 | 96.55 |
| $K^{+}$ | $K_2SO_4$ | 65.48 | 100.35 |

The reaction mixture, consisted of 0.1ml enzyme solution and 0.1ml metal ion solution(20mM), was incubated at 35 °C for 5 hrs and the residual activity was assayed

**Table 4. Effect of various inhibitors on the activity of phytase produced by *Aspergillus* sp. SM-15**

| Inhibitor | Activity | |
|---|---|---|
| | Unit | % |
| None | 43.26 | 100.00 |
| 2,4-Dinitrophenol | 45.75 | 105.76 |
| Ethylenediaminetetraacetic acid | 38.90 | 89.91 |
| Maleic anhydride | 41.14 | 95.10 |
| Iodine | 32.79 | 75.79 |
| Hydrogen peroxide | 42.89 | 99.14 |
| Bromoacetic acid | 41.14 | 95.10 |

The reaction mixture of 0.1ml enzyme solution and 0.1ml inhibitor solution(20mM) was incubated at 30 °C for 1 hr and the residual activity was assayed

maleic anhydride(MA), iodine을 선정하여 효소액에 각종 저해제를 최종 농도가 10mM되게 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 방치한 후 잔존활성을 측정한 결과 Table 4와 같이 iodine과 EDTA에 의해서 약간의 활성이 저해되었다. Iodine은 histidine의 imidazole group에 작용하여 효소의 활성을 저해하고 EDTA는 금속과 결합하여 chelate를 형성함으로서 효소활성을 저해하는 바, 이러한 결과로 보아 본 효소의 active site로 histidine 잔기의 imidazole group과 금속이온이 효소활성에 어느 정도 관여함을 나타내고 있다.

Km과 Vmax

Phytase의 기질에 대한 친화력을 조사하기 위하여 Lineweaver-Burk plot로 Km치와 Vmax를 측정한 결과는 Fig. 9와 같이 Km치는 37.037mM/L였으며 Vmax는 159.87μM/min이었다.

활성화에너지

Phytase의 활성화에너지를 측정하기 위하여 10°C에서 45°C의 범위에서 온도 변화에 따른 효소활성을 Arr-

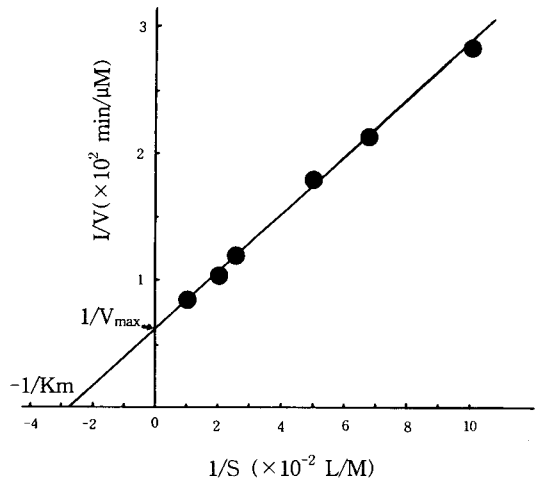


**Fig. 9. Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of substrate by the purified phytase from the culture of *Aspergillus* sp. SM-15.**

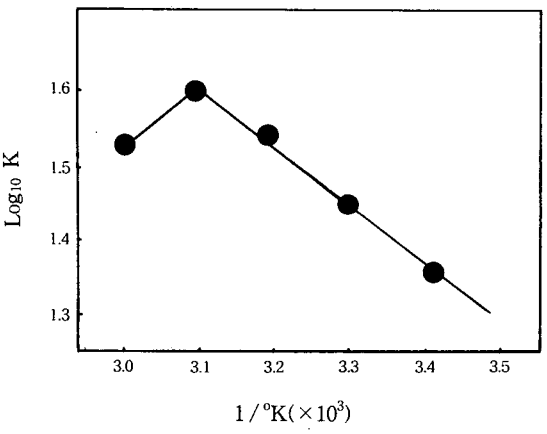


**Fig. 10. Arrhenius plot of phytase reaction.**

henius방정식에 의해 plot한 결과는 Fig. 10과 같으며 활성화에너지는 3.416kcal/mole이었다.

## 요 약

단백질과 결합하여 단백질의 용해도를 저하시키고, 무기질의 흡수를 저해하는 phytic acid의 효소에 의한 분해, 제거를 목적으로 phytase를 생산하는 *Aspergillus* sp. SM-15 균주를 토양으로 부터 분리하고 이 균주가 생산하는 효소를 정제하여 특성을 규명하였다. Phytase생산조건은 밀기울배지에 1.0% mannose, 2% yeast extract, 0.5% $(NH_4)_2HPO_4$, 0.2% calcium chloride를 첨가하여 4일 배양시 최대 활성을 나타내었다. 효소는 ion exchange chromatography, gel filtration 등으로 약 17.1배 정제하였고 효소의 비활성역가는 244.32unit/mg이었다. 정제효소는 polyacrylamide gel 전기영동상 단일밴드로 나타났으며, 분자량은 46,000 정도로 추정되었다. 정제효소의 특성은 최적 pH와 온도는 각각 5.0, 50°C였으며, 안정범위는 pH 4.5~5.5까지 였다. 금속이온 중 $Fe^{2+}$, $Pb^{2+}$ 등에 의해 활성이 증대되었으나, $Hg^{2+}$에 의해 효소활성이 저해되었고, 저해제 중 iodine에 의해서 활성저해가 관찰되어 active site에 histidine 잔기가 존재하는 것으로 추정되었으며, 정제효소의 Km과 Vmax는 각각 37.037mM/L, 159.87μmol/min이었다.

## 문 헌

1. World Conference on Vegatable Food Proteins, Amsterdam. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **56**, 99(1979)
2. King, J., Aguirre, C. and De Pablo, S. : Functional properties of lupin protein isolates(Lupinus albus cv Multolupa). *J. Food Sci.*, **50**, 82(1985)
3. Yang, C. I. : Studies on the nutritional quality of rapeseed protein isolates. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **12**, 109(1980)
4. Kim, J. P., Shim, W. M. and Kim, C. I. : Separation and composition of sesame meal protein. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, **23**, 14(1980)
5. Shin, H. S. : Chemical and nutritional studies of Sesamum indicum. *Korean J. Food Sci. Tech.*, **5**, 113 (1973)
6. Choi, C., Cho, Y. J., Son, G. M., Lim, S. I. and Lee, W. J. : Effect of pH and salts on protein and phytate solubility of defatted sesame meal. *J. Resource Development, Yeungnam Univ.*, **8**, 85(1989)
7. Nilo, R., Dench, J. E. and Caygill, J. C. : Nitrogen extractability of sesame(*Sesamum indicum* L.) seed and the preparation of two protein isolates. *J. Sci. Food Agric.*, **32**, 565(1981)
8. Boloorforooshan, M. and Markakis, P. : Protein supplementation of navy bean with sesame. *J. Food Sci.*, **44**, 390(1979)
9. Brito, O. J. and Nunez, N. : Evaluation of sesame flour as a complementary protein source for combinations with soy and corn flours. *J. Food Sci.*, **47**, 457(1982)
10. El, T. A. H., Khattab, A. H. and Khidir, M. O. : Protein and oil compositions of sesame seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**, 648(1976)
11. Robert, L. A., Walter, J. W. and Donald G. : Extraction of soybean meal proteins with salt solutions at pH 4.5. *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 251(1973)
12. De Pauda, M. R. : Some functional and utilization characteristics of sesame flour and proteins. *J. Food Sci.*, **48**, 1145(1983)
13. Kim, K. H. and Kim, D. H. : Improved soy food products through food science and nutrition application. *Food Sci. Ind.*, **29**, 37(1996)
14. Chang, C. W. : Study of phytase and fluoride effects in germinating corn seeds. *Cereal Chem.*, **44**, 129(1967)

15. Mandal, N. C., Burman, S. and Biswas, B. B. : Isolation, purification and characterization of phytase from germinating mung beans. *Phytochem.*, **11**, 495(1972)
16. Nelson, T. S., Shieh, T. R., Wodzinsk, R. J. and Ware, J. H. : The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with mold phytase. *Poultry Sci.*, **47**, 1842(1968)
17. Lee, H. Y. and Chung, H. J. : Effect of phytase-producing bacteria on the fermentation of soybean and corn meals. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 509(1991)
18. Jung, J. H., Kang, S. G., Kim, Y. S. and Chung, H. J. : Degradation of phytic acid in Chungkookjang fermented with phytase-producing bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 423(1990)
19. Dietrich, K., Tom, R. W. and Beth, L. C. : Enzymatic reduction of phytate in whole wheat breads. *J. Food Sci.*, **46**, 1866(1981)
20. Sigmund, S. and Hora, T. : Phytate; removal from whole dry beans by enzymatic hydrolysis and diffusion. *J. Food Sci.*, **42**, 1098(1977)
21. Lolas, G. M. and Markakis, P. : The phytase of Navy Beans. *J. Agr. Food Chem.*, **23**, 13(1975)
22. Lee, W. J. : Phytic acid content and phytase activity. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **18**, 40(1989)
23. Peers, F. G. : The phytase of wheat. *Biochem. J.*, **53**, 102(1953)
24. Gibbin, L. N. and Norris, F. W. : Phytase and acid phosphatase in the warf bean, Phaseolus vulgalis. *Biochem. J.*, **86**, 67(1963)
25. Nair, V. C. and Duvnjak, Z. : Reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus ficuum* in solid state fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 183(1990)
26. Han, Y. W., Gallagher, D. J. and Wilfred, A. G. : Phytase production by *Aspergillus ficuum* on semisolid substrate. *J. Industrial Microbiology*, **2**, 195(1987)
27. Jung, Y. S., Cho, Y. and Han, S. H. : Studies about acid protease of *A. tubingensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 105(1982)
28. Cha, W. S., Cho, Y. J. and Choi, C. : Production and purification of alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, **18**, 279(1989)
29. Kazuo, S., Kyo, S. and Kinichi, M. : Purification and some properties of serine proteinase from a mutant of *A. niger*. *J. Ferment. Technol.*, **63**, 479(1985)
30. Shigeki, F., Kenji, N., Masaru, M. and Munetsugu, K. : Some properties of two proteinases from a luminous bacterium *Vibrio harveyi* strain FLN-108. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3009(1988)
31. Don, A. C., Roy, M. D. and Hugh, W. M. : A comparison of extracellular serine proteases from four strains of Thermus aquaticus. *Fems Microbiology Letters*, **45**, 155(1987)
32. Choi, C., Jung, Y. G., Sung, S. K., Choi, K. S., Lee, J. S., Cho, Y. J. and Kwon, O. J. : Production and purification of alkaline protease from *Streptomyces* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 169(1992)
33. 京都大學 農學部 食品工學 教室 : 食品工業實驗書. 養賢堂, p.51(1970)
34. Lowry, O. H., Rosebrogh, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
35. Heinonen, J. K. and Lahti, R. J. : A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatese. *Anal. Biochem.*, **113**, 313(1981)
36. Davis, B. J. : Disc electophoresis II. Method and application of human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404(1964)
37. Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determination sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
38. Koneman, E. W., Roberts, G. D. and Wright, S. E. : *Partical labolatoy mycology*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, p.20(1979)

(1997년 10월 4일 접수)