

## Phytic Acid와 Phytase에 관한 동물산업적 고찰

양시용 · 김창원\* · 강창원\*

건국대학교 자연과학연구소

## An Animal-Industrial Review on Phytic Acid and Phytase

Yang S. Y., Kim C. W.\* and Kang C. W.\*

Institute of Natural Sciences

### Summary

Phytic acid (*myo*-inositol hexakisphosphate or IP6) is the major storage form of phosphorus in cereals and legumes, representing 18 to 88% of the total phosphorus. Phytate form of phosphorus is not readily utilized by monogastric animals and this result causes pollution problem by phosphorus released in areas of intensive livestock production. The interaction between phytic acid and essential dietary minerals, protein, or vitamins is considered to be one of the primary factors limiting the nutritional values of cereals and legumes in monogastric animals. Attempts have been made to hydrolyze dietary phytic acid by phytases to improve the feed quality and to decrease the amount of phosphorus excreted by animals. Phytase (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) hydrolyzes phytic acid to *myo*-inositol and phosphoric acid. Two types of phytases are known: 3-phytase (EC 3.1.3.8) and 6-phytase (EC 3.1.3.26), indicating the initial attack to the susceptible phosphoester bond. Because of its great industrial importance, there is ongoing interest in isolating new bacterial strains producing novel and efficient phytases.

(Key words : Phytic acid, Phytase, Phosphorus, Pollution, Animal)

### 서 론

Phytase(*myo*-inositol hexaphosphorylase; EC 3.1.3.8)는 대부분의 종실에 있어 인(P)의 주요 저장원인 phytic acid(*myo*-inositol hexaphosphate)를 분해하여 *myo*-inositol과 무기 인을 형성하게 하는 효소로서 식물, 동물의 장관 및 미생물 등에서 보고되었으며, 산업적 이용을 위한 phytase는 상대적으로 phytase 활성

및 생산성이 높은 미생물이 생산하는 phytase를 주로 이용하고 있다. Phytic acid는 영양적 측면에서 항영양인자로서 단위가축에서는 분해율이 낮기 때문에 인의 이용성을 저하시킬 뿐만 아니라 phytic acid와 결합되어 있는 아연, 칼슘, 마그네슘 및 철 등 중요한 광물질의 이용성을 저하시키고, 장관내에서 소화효소(amylase, trypsin, chymotrypsin)를 비롯한 단백질과 결합하여 이용성 및 활성을 저하시

\* 건국대학교 축산대학 (College of Animal Husbandry, Konkuk University)

킨다. Phytase를 단위가축에 공급할 경우 원료사료에 존재하는 phytic acid 분해에 따른 인의 이용성 증대로 인 배설량을 감소시키고, 또 인 급여량을 줄일 수 있다.

국내외적으로 환경오염 억제 및 사료 이용효율 제고를 위해 산업적으로 유용한 phytase에 관한 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 특히 효소 생산성이 높거나 내열성 등의 효소특성이 우수한 균주를 얻기 위한 많은 연구들이 수행되고 있다. 본 논문은 환경오염 억제 및 단위가축 사료의 이용효율 제고 측면에서 phytic acid와 phytase에 관해 고찰하고자 한다.

## 본 론

### 1. Phytic acid

#### 가. Phytic acid의 구조

가축에 있어 항영양인자로 간주되는 phytic acid의 구조는 Anderson(1914)에 의해 myo-inositol과 hexa-phosphate의 결합구조가 제시되었다. IUPAC-IUB(1968)에 의해 phytic acid가 myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihydrogen phosphate)로 명명되었으며, Weingartner와 Erdman(1978)에 의해 Anderson(1914)이 제시한 구조를 바탕으로 새로운 구조가 제시되었다. 중성 pH에서 phosphate기는 한 개 또는 두 개의 음전하를 띤 산소원자와 결합되어 있어, 이러한 구조로 인해 Ca, Mg, Zn와 같은 다양한 양이온과 두 개의 phosphate기와 강한 킬레이트를 형성하거나 phosphate기 내에서 약한 결합을 형성한다.

#### 나. Phytic acid의 분포

Phytic acid는 식물 종자나 곡류(Rose, 1912; Averill과 King, 1926; Belavady와 Banerjee,

1953; O'Dell, 1979), 뿌리와 괴경(Rose, 1912; McCance와 Widdowson, 1935), 새와 거북의 적혈구(Rapoport, 1940; Rapoport와 Guest, 1941; Oshima 등, 1964; Johnson과 Tat, 1969), 그리고 흙(Dyer 등 1940; Caldwell과 Black, 1958) 등에서 광범위하게 발견된다. 그리고 씨앗내에서  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  등의 1가 및 2가 양이온과 염 형태로 존재하여 양이온과 킬레이트 화합물을 형성하기 때문에, 인뿐만 아니라 양이온의 저장 형태이고(Sobolev, 1966; Cosgrove, 1966), 숙성과정에서 전분, 지질 등의 저장 물질과 함께 씨앗에 축적되는 물질이다(Asada와 Kasai, 1962; Asada 등, 1969; Sobolev, 1966; Makower, 1969; Abernethy 등 1973; Nahapetian와 Bassiri, 1975).

단위가축에 있어 phytic acid의 이용성과 관련하여 곡류와 유실류의 phytic acid 함유부분을 보면 옥수수의 경우 phytic acid의 90% 이상이 kernel의 배아 부분에 함유되어 있고(O'Dell 등, 1972), 대두와 같은 유실류는 단백질체(protein bodies)와 연관되어, 종자 전체에 넓게 퍼져있다(Maga, 1982). 이와는 반대로 땅콩, 면실 및 해바라기씨의 경우 단백질체 막에 있는 crystalloids 또는 globoids라 불리는 구조에 집중되어 있다(Erdman, 1979). Biehl과 Baker(1997)는 이와 같이 유실류는 phytic acid의 함유 부위가 다르기 때문에 phytase의 첨가 효과도 원료 사료에 의해 좌우된다고 하였다.

#### 다. Phytic acid의 항영양 효과

영양적 측면에서 phytic acid의 중요성을 인식하여 많은 연구가 이루어진 이유는 phytic acid의 음이온 phosphate기가 칼슘, 마그네슘, 철 및 아연과 같은 양이온의 필수 미네랄과 결합하여 체내 이용성을 저하시킬 뿐만 아니라(Maga, 1982; Torre 등, 1991), 사료내 단백질의 양이온, 특히 염기성 아미노

산의 아미노기와 결합하여 단백질의 이용성을 저하시키고(Cosgrove, 1966; Reddy 등, 1982; Champagne 등, 1982; Nosworthy와 Caldwell, 1988), 사료에 함유된 단백질 및 펩타이드와의 결합 이외에도 trypsin, chymotrypsin(Singh와 Krikorian, 1982) 및  $\alpha$ -amylase(Cawley와 Mitchell, 1968; Sharma 등, 1978)와 같은 효소의 기능을 억제하기 때문이다. 즉, 영양소와 킬레이트 화합물을 만들어 단백질, 전분, 지방 및 광물질의 이용성을 저하시키게 된다(Reddy 등, 1989).

최근 들어 phytase 첨가에 의한 phytic acid 분해에 따른 단백질 및 아미노산 이용성 증가에 관해 많은 연구들이 진행되고 있는데, 특히 아미노산 대체 효과를 파악하기 위한 연구들이 진행되고 있다. Officer와 Batterham(1993) 및 Yi 등(1996)에 의하면 각각 육성돈과 칠면조 사료에 phytase 첨가에 따라 아미노산과 질소의 회장소화율이 유의적으로 개선되었다고 보고하였다. Biehl과 Baker(1997)는 닭에 phytase 첨가시 아미노산 이용성이 증가하였는데, 사료의 아미노산 수준 및 단백질원에 따라 달라진다고 하였다. 옥수수-땅콩박 사료를 급여한 닭에서는 아미노산 수준이 낮거나 적절한 경우 양쪽 모두 사료효율 개선효과가 없었으나, 대두박 사료를 급여한 경우 아미노산 수준이 낮을 경우 사료효율 개선효과를 보였으나, 아미노산 수준이 적정할 경우 사료효율 개선효과가 없었다고 하였다.

#### 라. Phytic acid의 소화와 이용성

Phytic acid의 소화 및 이용성은 동물의 종류와 연령, 장내 phytase 활성 수준, 사료내 칼슘 함량과 칼슘과 인의 비율, cholecalciferol(D<sub>3</sub>) 함량, 원료 사료의 종류(phytate-P 함량, phytic acid 분포위치, phytase 함유량 등) 및 외부로부터의 phytase 첨가 수준 등에 따라 영향을 받는다.

동물의 종류 및 연령에 따라 phytate-P의 이용성은 달라지는데, 반추가축의 경우 Nelson 등(1976)에 의하면 대두박, 수수 및 옥분의 phytic acid가 비육우의 경우 100%, 송아지의 경우 99%가 분해되어 이용되었으며(Table 1), 대두박과 수수를 위주로 한 사료를 급여한 송아지의 반추위, 4위, 소장 및 대장 내용물을 조사한 결과 phytic acid가 검출되지 않아 반추위내에서 쉽게 완전히 분해된다고 하였다.

돼지는 phytate-P의 이용성이 연령에 따라 다르나, 보고된 연구(Barley와 Thompson, 1969; Woodman과 Evans, 1948; Noland 등, 1968; Anon, 1984)를 종합해 보면 돼지(체중 23~41 kg)의 경우 평균 34%(20~60% 범위) 가량의 phytate-P를 이용하며 연령 증가에 따라 phytate-P의 이용성이 증가한다. 닭에 있어서 phytate-P의 이용성에 관한 많은 연구들이 수행되었으나 종간의 차이, 실험동물의 연령, phytic acid 공급원, 반응 특징 및 사료의 칼슘과 cholecalciferol 함량에 따라 영향을 받기 때문에 보고자마다 상당히 다른데, 일반적으

Table 1. Hydrolysis of phytate-P by mature steers and calves<sup>1</sup>

Item	Phytate-P		
	Intake (g)	Excreted (g)	Hydrolyzed (%)
Steers (9 months old)	71	0	100
Calves (56 days old)	20	0.06	99

<sup>1</sup>Source: Nelson et al. (1976).

로 돼지에 비해서 phytate-P의 이용성이 낮은 것으로 알려져 있다(Nelson, 1976; Anon, 1984). 한편, Peeler(1972)에 의하면 성계에 있어서는 반 정도의 phytate-P가 이용되는 반면, 어린 닭에 있어서는 생물학적 이용성이 매우 낮다고 보고하였다.

Nelson(1976)은 옥수수를 급여원으로 하여 육계와 산란계에 대한 사료내 phytic acid의 분해량을 측정한 결과 4주령과 9주령의 육계와 산란계에 있어 각각 0, 3 및 8%의 phytic acid만이 분해되었다고 하였고, 옥수수 50%를 밀로 대체하였을 경우 각각 8, 13 및 18%

의 분해율을 나타내어 원료사료의 종류에 따라 phytate-P의 이용성이 달라진다고 하였다. Calvert 등(1978)에 의하면 육성돈은 보리와 옥수수의 phytate-P 이용성이 매우 낮다고 하였다.

이와 같이 원료사료의 종류에 따라 phytate-P의 이용성이 달라지는데, 이는 phytate-P 함량 및 phytase 함량에 의해 상당부분 좌우되어진다. 이와 관련하여 Eeckhout와 Paepe(1994)는 각종 원료사료의 total-P, phytate-P 함량 및 phytase 활성에 관해 보고하였다 (Table 2).

Table 2. Total P, phytate-P and phytase activity of feedstuffs<sup>1</sup>

Item	Total P (%)	Phytate-P (%)	(Phytate-P/total P)×100	Phytase (units kg <sup>-1</sup> )
<i>Grains</i>				
Rye	0.36	0.22	61	5,130
Triticale	0.37	0.25	67	1,688
Wheat	0.33	0.22	67	1,193
Barley	0.37	0.22	60	582
Peas	0.38	0.17	45	116
Corn	0.28	0.19	68	15
Oats	0.36	0.21	59	42
Sorghum	0.27	0.19	70	24
Corn (moist ensiled)	0.30	0.13	43	12
<i>By-products</i>				
Wheat fine bran	0.95	0.72	76	4,601
Wheat fine bran (pellets)	1.01	0.78	77	2,573
Wheat middlings	0.80	0.53	66	4,381
Wheat feed flour	0.56	0.39	70	3,350
Wheat bran	1.16	0.97	84	2,957
Malt sprouts (pellets)	0.60	0.01	2	877
Corn distillers	0.90	0.19	21	385
Rice bran	1.71	1.10	64	122
<i>Cereal by-products</i>				
Corn gluten feed	0.87	0.47	54	48
Corn gluten feed (pellets)	0.89	0.52	58	5
Corn germs (extracted)	0.65	0.42	65	16
Corn feed flour	0.23	0.14	61	5
Rice feed flour	0.32	0.23	72	0
Rice bran (extracted)	1.89	0.79	42	45
Wheat gluten feed	0.78	0.56	71	25

Table 2. Continued

Item	Total P (%)	Phytate-P (%)	(Phytate-P/total P) × 100	Phytase (units kg <sup>-1</sup> )
<i>Oil meals</i>				
Peanut (extracted) (pellets)	0.68	0.32	47	3
Coconut (expeller)	0.53	0.18	34	24
Linseed (expeller)	0.75	0.42	55	5
Linseed (extracted)	0.82	0.47	57	41
Rapeseed (extracted)	1.12	0.40	36	16
Palm-kernel (expeller)	0.59	0.39	66	37
Sunflower (extracted) (pellets)	1.00	0.44	44	62
Soybean 44 (extracted)	0.66	0.35	53	40
Soybean 48 (extracted)	0.61	0.32	52	8
Soybean 50 (extracted)	0.71	0.38	54	31
<i>Legume seeds</i>				
Soybeans (heated)	0.57	0.26	46	55
Field beans (heated)	0.50	0.23	46	81
Lupins	0.25	0.05	20	0
<i>Roots and tubers</i>				
Beet pulp (pellets)	0.10	0	0	3
Potato (chips)	0.10	0	0	0
Potato starch	0.10	0	0	0
Cassava root (chips)	0.09	0	0	6
Sweet potatoes	0.11	0	0	26
<i>Other by-products (+ alfalfa)</i>				
Citrus pulp (pellets)	0.10	0	0	3
Cocoa shells	0.40	0	0	65
Soybean hulls	0.19	0	0	99
Flax chaff	0.10	0	0	58
Mycelium	0.14	0	0	77
Alfalfa (dehydrated) (pellets)	0.23	0	0	60
Corn cob	0.05	0	0	58

<sup>1</sup> Source: Eeckhout and Paepe (1994).

동물에 따른 차이는 Anon(1984)에 의하면 돼지와 쥐는 phytate-P를 각각 37% 및 44% 이용하는 반면, 닭은 7%만을 이용한다고 하였으며, 8%만의 phytate-P가 이용된다는 Nelson (1976)의 결과와도 일치하고 있다.

사료의 칼슘 함량 및 칼슘과 인의 비율에 따라 phytic acid의 이용성이 달라지는데 Nahapetian과 Young(1980)에 의하면 쥐에 있

어 방사성 동위원소(<sup>14</sup>C)를 부착한 phytic acid를 이용한 실험에서 칼슘 함량이 매우 낮은 사료를 섭취한 경우 방사성 동위원소를 부착한 phytic acid의 94%가 흡수된 반면, 칼슘 함량이 높은 사료를 섭취한 경우 분대로 54%가 배설되었다고 하였다. 이와 같은 결과에서 쥐의 경우 소장내 phytase 활성이 상당히 높으며, phytase는 soluble phytic acid에만

작용할 수 있으므로 칼슘 섭취가 많을 경우 불용성의 phytic acid 화합물을 형성하기 때문에 phytic acid 이용성이 저하된다고 하였다. 그리고 Fisher(1993)에 의하면 phytate-P 소화율은 칼슘 섭취량 감소 및 cholecalciferol 섭취량 증가에 따라 상당히 개선된다고 하였다.

## 2. Phytase

### 가. Phytase의 정의

Phytase(*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.8)는 단계적으로 phytate로부터 무기태 인을 제거하는 효소로서 현재 phytase는 3-phytase 및 6-phytase의 2 종류로 분류된다. 3-phytase(EC 3.1.3.8)는 초기에 phytic acid의 3번 인을 분해하는 반면 6-phytase(EC 3.1.3.26)는 phytic acid의 6번 인을 분해하는 특성을 나타내며 지속적인 탈인산화 분해에 따라 penta-, tetra-, di-, mono-phosphate inositol과 같은 중간물질 및 free *myo*-inositol이 형성된다. 곰팡이를 비롯한 미생물이 분비하는 phytase는 3-phytase인 반면 고동식물의 종자는 6-phytase를 함유하고 있다.

### 나. Phytase의 생산원 및 특성

Phytase는 식물(Peers, 1953; Gibbins와 Norris, 1963; Lim과 Tate, 1973; Lolas와 Markakis, 1977; Hara 등, 1985; Sutardi와 Buckle, 1986; Gibson과 Ullah, 1988; Houde 등, 1990), 미생물(Yamada 등, 1968; Irving과 Cosgrove, 1972; Skowronski 1978; Wang 등, 1980; Powar와 Jagannathan, 1982; Ullah와 Gibson, 1987; Mahajan과 Chauhan 1987; Khetarpaul과 Chauhan, 1989, 1991; Shimizu, 1992; Lambrechts 등, 1992; Lopez 등, 1993; Yoon 등,

1996; Pasamontes 등, 1997; 오 등, 1998; Yang 등, 1999; 양 등, 2000; 김 등, 2001) 및 동물장관(Davies와 Motzok, 1972; Davis와 Flett, 1978; Maga, 1982; Cooper와 Gowing, 1983; Iqbal 등, 1994) 등에 폭넓게 분포되어 있다.

지금까지 보고된 식물 유래 phytase의 최적 pH, 온도 및 Km값을 Table 3에 나타내었다. 최적 pH는 wheat bran의 F2 fraction, mung bean 및 *Typha latifolia* L.의 pollen을 제외하고는 대부분 4.0~5.6 사이의 약산성 pH에서 최적활성을 나타내고, 최적 온도는 40~60℃ 사이로 중온보다 약간 높은 온도 범위이다. 또한 Michaelis-Menten 상수인 Km값은 0.017~0.99 mM로 유래식물에 따라 상당히 다른데, Km값은 효소의 정제도 및 분석조건에 따라 다르게 나타날 수 있지만 wheat bran, navy bean 및 pollen의 경우 상대적으로 낮은 Km값을 나타내고 있어 다른 식물성 유래 phytase에 비해 기질인 phytate에 대한 친화도가 상대적으로 높은 것을 알 수 있다.

지금까지 보고된 미생물 유래 phytase 중 가장 많은 연구가 이루어진 *Aspergillus* sp. 및 *Bacillus* sp.가 생산하는 phytase의 최적 pH, 온도, Km값 및 분자량에 관해 Table 4에 나타냈다. 이밖에 *Pseudomonas* sp.(Cosgrove 등, 1970; 김 등, 2001), *R. oligoporus* (Sudarmadji와 Markakis, 1977), *Penicillium* sp.(Yang 등, 1999; 오 등, 1998), *A. aerogenes*(Greaves 등, 1967), *E. coli*(Greiner 등, 1993), *S. castellii* CBS 2836(Lambrechts 등, 1992)이 생산하는 phytase 등에 대해 보고된 바 있다.

*Aspergillus* sp.와 같은 곰팡이 유래 phytase의 경우 pH 4.5~5.5의 약산성 pH 범위에서 최적활성을 나타냈고, *A. ficuum* NRRL 3135 및 *A. niger*는 pH 2.0 및 2.7에서도 최적 pH를 나타내기 때문에 가축에게 급여시 위장내의 산성조건(pH 2.0~3.0)에서 효과적으로 작

용한다고 보고하였지만, 이와 같은 강산 조건의 경우 acid phosphatase에 의한 영향이라고 파악된다(Ullah와 Cummins, 1987).

*Bacillus* sp.의 경우는 최적 pH가 6.0~7.5 범위로 중성 pH 범위인 것으로 알려졌다. 아직까지 phytase의 장관내 작용기작에 관해 정확히 밝혀지지 않았지만 이와 같이 중성범위에서 최적활성을 나타내는 *Bacillus* sp. 유래 phytase의 경우 위장 내에서 안정성이 이용성에 미치는 가장 중요한 문제로 대두되고 있다. *B. subtilis*(natto) N-77의 경우 pH 5.0~11.0의 범위에서 안정하였으며, pH 4.0 이하에서는 거의 효소활성을 나타내지 않았다. *Bacillus* sp. DS11에 있어서도 pH 4.0~8.0의 범위에서 안정하였으나, pH 3.0 이하에서는 효소활성을 나타내지 않았다. 이밖에 *Enterobacter* sp. 4에 있어서도 pH 6.5~8.0의 범위에서는 안정하였으나 pH 5.0 이하에서는 효소활성이 낮았다.

미생물 유래 phytase에 있어서 최적 온도는 50~70°C의 범위로 40~60°C 범위의 식물성 유래 phytase에 비해 다소 높으며, Km값에 있어서는 0.035~0.55 mM까지 다양하며, Km값은 효소의 정제도 및 분석조건에 따라 다르게 나타날 수 있다. *A. ficuum* NRRL 3135 및 *B. subtilis*의 경우 각각 0.04 및 0.035 mM로서 상대적으로 매우 낮은 Km값을 나타내고 있어 다른 미생물 유래 phytase에 비해 기질인 phytate에 대한 기질 친화도가 상대적으로 높은 것을 알 수 있다.

이밖에 동물 조직에 있어 쥐(Pileggi, 1959; Bitar와 Reinhold, 1972; Yang 등, 1991; Iqbal 등, 1994), 가금(Muriel 등, 1971; Bitar와 Reinhold, 1972), 송아지(Bitar와 Reinhold, 1972) 및 사람(Bitar와 Reinhold, 1972; Iqbal 등, 1994)의 장관과 가금의 혈장 및 erythrocytes(Rapoport 등, 1941)에서 분비되는 phytase에 대해 보고되었다. 이와 같은 동물

Table 3. Optimum pH, temperature, and Km value of phytases from cereals, legumes, other oil seed, and pollen

Phytase source	Optimum pH	Optimum temp. (°C)	Km (mM)	Reference
<b>Cereals and products</b>				
Wheat bran	F <sub>1</sub> :5.6 F <sub>2</sub> :7.2	-	F <sub>1</sub> :0.022 F <sub>2</sub> :0.2	Lim & Tate (1973)
Wheat flour	5.15	55	0.33	Peers (1953)
Rice aleurone particles	4.0~5.0	45	-	Yoshida <i>et al.</i> (1975)
Corn	5.6	50	0.99	Chang (1967)
Triticale	5.4	45	0.22	Singh & Sedeh (1979)
<b>Legumes</b>				
Navy bean	5.3	50	0.018	Lolas & Markakis (1977)
Soybean	4.8	60	2.4	Sutardi & Buckle (1986)
Soybean (germinating)	4.5~4.8	55	0.048	Gibson & Ullah (1988)
California small white bean	5.2	60	0.22	Chang (1975)
Dwarf french bean	5.2	40	0.15	Gibbins & Noris (1963)
Mung beans (germinating)	7.5	57	0.65	Mandal & Biswas (1970)
<b>Other oil seed</b>				
Canola seed	5.2	50	0.36	Houde <i>et al.</i> (1990)
Pollen ( <i>Typha latifolia</i> L.)	8.0	-	0.017	Hara <i>et al.</i> (1985)

조직에서 분비되는 phytase의 최적 pH는 중성(pH 6.5~8.6) 부근인 것으로 알려져 있으며, Sandberg와 Andersson(1987)에 의하면 사람 소장 점막의 phytase와 alkaline phosphatase의 경우 phytic acid 소화에 있어 별 영향을 미치지 못하고 phytase를 섭취할 경우 섭취된 phytase에 의해 효과적으로 phytic acid가 분해된다고 하였다.

다. 미생물에 의한 phytase 생산에 영향을 미치는 요인

미생물에 의한 phytase 생산은 배양 방법, 배지 pH, 배지의 인 함량, 배지의 phytic acid 함량 및 배지조성 등에 의해 영향을 받는다.

(1) 배양 방법

배양 방법으로는 크게 고체 배양 또는 반고체 배양 및 액상 배양으로 나눌 수 있는데 일반적으로 고체 배양 또는 반고체 배양의 경우 액상 배양에 비해 발효가 용이하고, 생산비가 저렴하며 생산성이 높은 것으로 알려

져 있으며, 효소, 곰팡이 독소, 버섯, 발효식품 및 발효사료 제조에 널리 이용되고 있다 (Han 등, 1987). 액상 배양과 고체 배양 또는 반고체 배양의 가장 큰 차이점은 액상 배양의 경우 배지 성분에 따라 다소 다르지만 대부분 완전히 녹아 동일한 배지상을 이루는 반면 고체 배양 또는 반고체 배양의 경우 상대적으로 수분 함량이 적어 배지 성분이 대부분 녹아있지 않은 상태로서 동일한 배지상을 이루지 못하여 배양 방법이 간단하고 작업이 용이함에도 불구하고 특히 대량 배양시에 조절이 어려워 균일화된 효소를 얻기가 어려운 단점이 있다(Han 등, 1987).

근래 들어 효소 생산은 대부분 액상 배양을 통해 이루어지고 있으며, 균주에 따라 다르긴 하나 일반적으로 액상 배양의 경우 고체 배양 및 반고체 배양에 비해 배양 시간이 상대적으로 짧은 것도 액상 배양의 큰 장점이다(액상배양; 0.5일~3일, 고체배양; 7일~15일). 고체 배양 및 반고체 배양을 통한 phytase 생산에 관한 보고는 Han 등(1987)의 *A. ficuum*을 균주로 하여 밀기울, 대두박 및

Table 4. Optimum pH, temperature, Km value, and molecular weight of phytases from various microorganisms

Phytase source	Optimum pH	Optimum temp.(°C)	Km (mM)	M.W. (kDa)	Reference
<b>Molds</b>					
<i>A. terreus</i>	4.5	70	-	214	Yamada et al. (1968) Yamamoto et al. (1972)
<i>A. ficuum</i> NRRL 3135	2.2 & 5.0-5.5	58	0.04	85-100	Ullah & Gibson (1987)
<i>A. niger</i>	2.7 & 5.5	-	0.48	200	Skowronski (1978)
<i>A. oryzae</i>	5.3	50	0.47	-	Wang et al. (1980)
<i>P. waksmanii</i>	4.5	55	0.09	24	Yang et al. (1996)
<b>Bacteria</b>					
<i>B. subtilis</i>	7.5	-	0.035	-	Powar et al. (1982)
<i>B. subtilis(natto)</i> N-77	6.0~6.5	60	0.5	36~38	Shimizu (1992)
<i>Bacillus</i> sp. DS11	7.0	70	0.55	-	Kim et al. (1998)
<i>Enterobacter</i> sp. 4	7.0~7.5	50	-	-	Yoon et al. (1996)



옥수수를 이용한 반고체 배양을 통한 phytase 생산이 있으며, Al-Asheh와 Duvnjak(1995)는 *A. carbonarius*를 균주로 하여 채종박을 이용한 고체 배양을 통한 phytase 생산에 대해 보고된 바 있으나 대부분의 경우 액상 배양을 통해 phytase를 생산하고 있다(Han과 Gallagher, 1987; Kim 등, 2001; Irving과 Cosgrove, 1972; Powar과 Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992; Skowronski, 1978; Ullah, 1988; Ullah와 Gibson, 1987; Wang 등, 1980; Yamada 등, 1968; Yang 등, 1998, 1999; 김 등, 2001).

### (2) 배지 성분

Phytase 생산 균주에 따라 질소원, 탄소원 및 특정 성분에 의해 phytase 생산성이 달라진다. Yamada 등(1968)에 의하면 *A. terreus*의 최적 배지 조성은 쌀겨 3%, ammonium sulfate 0.3%를 포함한 배지에서 최대의 phytase 생산성을 나타냈으며, *Bacillus* sp.의 경우 적정 수준의  $Ca^{2+}$  첨가가 phytase 생산을 높인다고 하였으며(Powar와 Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992; Kim 등, 1998), Kim 등(1998) 및 Powar와 Jagannathan(1982)에 의하면 밀기울 추출물 및 카제인 분해물이 *Bacillus* sp.에 있어 phytase 생산에 효과적인 배지 성분이라고 하였다.

Nahas 등(1982)은 *N. crassa*에 있어 탄소원이 phosphatase의 생산 및 분비에 영향을 미친다고 하였는데 sucrose에 의해 acid phosphatase 및 alkaline phosphatase 생산이 모두 촉진되었다고 보고하였다. Yang과 Schweingruber(1990)는 *S. pombe*가 생산하는 phosphatase의 경우 thiamine에 의한 thiamine-repressible acid phosphatase라고 하였으며 *pho4* gene이 thiamine에 의해 조절된다고 하였다.

### (3) 배지의 무기태 인 함량

Phytase를 비롯한 phosphatase는 균주에 따

라 다르긴 하나 대부분의 균주에 있어 배지의 인 함량이 효소의 생산성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 균주 및 phosphatase에 따라 억제 또는 촉진되며 영향을 받지 않는 경우도 있다. Shieh 등(1969)에 의하면 *A. ficuum* NRRL 3115에 있어 초기 배지의 인 함량에 따라 phosphatase 합성이 좌우된다고 하였는데 높은 수준의 인을 함유할 경우 acid phosphatase 합성 및 phytase 합성 모두 저하된다고 하였으며, 인 함량이 낮을 경우 초기 성장 단계에서는 phytase 생산이 acid phosphatase에 비해 높으나 성장 후기인 5일 후에는 phytase 생산에 비해 acid phosphatase 생산이 높아진다고 하였다.

Sakurai와 Shiota(1980)는 *A. oryzae*의 경우 Ia, Ib, IIa 및 IIb의 4 종류의 acid phosphatase를 생산하는데, Ia와 Ib는 배지내 인 함량에 의해 합성이 촉진되는 반면 IIa와 IIb는 이와 반대로 배지내 인 함량에 의해 합성이 촉진되는 것으로 보고하였다. Al-Asheh와 Duvnjak(1995)에 의하면 적정 수준(1~5 mg  $KH_2PO_4$ /110 g 고체배지)의 인 첨가시 *A. carbonarius*의 성장, phytase 생산 및 phytic acid 분해가 촉진된 반면 고 수준(50~100 mg  $KH_2PO_4$ /110 g 고체 배지)의 경우 성장, phytase 생산 및 phytic acid 분해 속도가 늦어졌다고 하였다.

무기태 인 함량이 phosphatase 생산에 미치는 영향은 phosphatase 합성 뿐만 아니라 분비에 영향을 미치는 경우도 있는데 Pedregosa 등(1991)에 의하면 *C. cucumerinum*의 경우 배지의 무기태 인 함량에 의해 acid phosphatase와 alkaline phosphatase의 합성보다는 분비가 조절된다고 하였는데 이는 외부의 무기태 인에 의해 세포벽 조성 과 구조가 변경되어 세포벽이나 periplasmic space 내에 있는 효소가 분비되기 때문이라 하였다. 효모의 경우 Segueilha 등(1993)과 Lambrechts 등(1993)에 의하면 *S. castellii*에 있어 배지의 무기태 인

에 의해 phytase 합성이 저하된다고 하였다.

Segueilha 등(1993)에 의하면 밀기울과 면실 가루를 주요 배지 성분으로 하여 발효시 배양 초기 배지의 무기태 인 함량이 1 mM 이상일때 phytase 합성을 저해한다고 하였으며, Lambrechts 등(1993)은 연속 배양을 통한 *S. castellii*를 균주로 한 phytase 생산에 있어 Segueilha 등(1993)과 마찬가지로 배지의 인 함량이 1 mM 이상부터 phytase 합성이 크게 감소하였다고 하였다. 이와 같이 배지의 인 함량이 phytase를 비롯한 phosphatase의 합성 및 분비에 영향을 미치는데, 합성의 경우 MacRae 등(1988)은 배지의 인에 의한 유전자 발현의 조절로 인해 phosphatase 합성이 영향을 받는 것이라고 보고하였다.

#### (4) 배지 pH

pH에 의한 phytase를 비롯한 phosphatase 생산은 다른 효소 생산과 마찬가지로 배지의 pH에 따라 phytase를 비롯한 phosphatase의 생산성이 달라진다.

*S. castellii*에 있어 pH 6.0 이상 배지에서 phytase 활성이 뚜렷하게 증가하였는데 이러한 결과는 pH에 의해 직접 또는 간접적인 영향으로 일반적인 phytase의 최적 활성 pH (pH 4.0~5.5)보다도 높으며, 이러한 pH 조건 하에서 양이온과 phytic acid와의 불용성 화합물 생성으로 인해 상대적으로 phytate-P의 분해가 적어 무기태 인에 의한 phytase 생합성 저해 효과가 적기 때문이라고 하였다 (Lambrechts 등, 1993).

곰팡이에 있어서도 pH가 phosphatase 생합성에 주요 영향을 미치는 요인으로 보고되었는데, Sakurai와 Shita(1977)는 *Aspergillus* sp.의 2종류 acid phosphatase의 생합성은 초기 배지의 pH 또는 배양 중의 pH 변화에 의해 영향을 받는다고 하였으며, Caddick 등(1986)은 배지 pH에 의한 gene expression의 조절로 인해 phosphatase 합성이 조절된다고 하였는

데 *A. nidulans*에 있어 pH가 낮은 경우 acid phosphatase의 생합성이 높고, alkaline phosphatase 생합성이 낮은 반면 pH가 높은 경우 이와 반대로 합성된다고 하였다. *N. crassa*의 경우에도 pH 5.7 이하인 경우 acid phosphatase의 합성이 높고 alkaline phosphatase 합성이 낮은 반면 pH 7.4 이상인 경우 이와 반대로 합성된다고 하였다(Nahas 등, 1982).

#### (5) Phytic acid 함량

Phytic acid 함량이 phytase 생산에 미치는 영향에 관해 Yamada 등(1968)은 Ca-phytate를 potassium phosphate로 대체시 phytase 생산이 이루어지지 않아 phytase 생산에 phytic acid는 반드시 필요하며 쌀겨가 phytase 생산을 위해 가장 적합한 phytic acid 공급원이라고 하였으나, Han 등(1987)은 인 공급원으로  $Ca_2P_2O_7$ , Na-phytate 및  $KH_2PO_4$ 를 비교한 실험에서  $Ca_2P_2O_7$ 와 Na-phytate 첨가가  $KH_2PO_4$ 에 비해 4배 이상 phosphatase의 생산이 증가되었고,  $Ca_2P_2O_7$  첨가가 Na-phytate 첨가에 비해 다소 높은 생산을 나타냈으며, 현재는 phytase 생산에 있어 배지내에 친천히 해리되어 이용되는 인 공급원이 적당량 존재할 경우 phytic acid가 반드시 필요한 인 공급원은 아니라고 하였다.

한편, Lambrechts 등(1993)은 효모인 *S. castellii*에 있어 Na-phytate를 phytic acid로서 0.51에서 4.23 mM까지 첨가량이 증가함에 따라 phytase 생산성이 저하된다고 하였는데, 이와같이 phytic acid가 phytase 및 phosphatase의 생산성에 미치는 영향은 균주의 종류, 배지내 인 함량 및 인 공급원에 따라 달라지며 이밖에 phytic acid 이용성과 관련하여 배지의 pH 및 양이온 함량이 영향을 미친다.

#### (6) 기타 요인

Phytase를 비롯한 phosphatase 생산에 미치는 기타 요인으로는 배지의 용존산소량, 회

석률(dilution rate) 및 고체 배양시 계면 활성제(surfactant) 등의 사용을 들 수 있다.

Lambrechts 등(1993)은 연속 배양에 의한 *S. castellii*의 phytase 생산에 있어 배지의 인 함량 및 pH 외에 용존 산소량과 희석률이 phytase 생합성에 영향을 미친다고 하였는데, 산소 제한 공급에 의해 약간의 phytase 합성량의 증가가 나타났으며, 일정 수준(D=0.25 h<sup>-1</sup>)까지의 희석률에 의해 phytase 합성이 증가한다고 하였다.

일반적으로 균주 성장 및 효소 생산을 촉진하기 위한 목적으로 계면 활성제가 이용되어 왔는데(Reese와 Maguire, 1969), phytase 생산성을 높이기 위한 계면 활성제 이용에 관해 Han 등(1987)은 배지에 계면활성제를 0.5% 수준으로 Triton X-100, Tween 80 및 Na-oleate 첨가할 경우 대조구에 비해 각각 1.3배, 1.7배 및 4.8배씩 phytase 생산성이 증가하였다고 하였으며, phosphatase 생산도 각각 3.9배, 1.6배 및 1.3배씩 증가하였다고 하였다. Al-Asheh와 Duvnjak(1994)는 캐놀라박을 기질로 한 고체 배양에서 계면 활성제 첨가에 따라 phytase 생산성을 높였다고 하였는데, Na-oleate와 Tween 80의 첨가에 따라

phytase 생산성이 높아진 반면, Triton X-100은 대조구에 비해 생산성이 저하되었다고 하였으며, Na-oleate의 적정 첨가 수준은 1%라고 하였다. 계면 활성제의 이용과 관련하여 Reese와 Maguire(1969)는 배지에 계면 활성제 첨가에 따라 일반적으로 세포 투과성의 증가로 인해 효소 분비량이 증가한다고 하였으나, 이러한 첨가 효과는 균주 및 효소에 따라 달라진다고 하였다.

라. Phytic acid 감소 및 제거 방법

(1) 가열 처리 및 멸균

가열 및 멸균을 통한 phytic acid의 분해 또는 감소는 원료의 단백질 및 양이온 함량(de Boland 등, 1975), 수분 함량 등의 여러 가지 요인에 의해 영향을 받으나 대부분의 보고에 따르면 가열 및 멸균이 phytic acid의 분해 또는 감소 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. Kumar 등(1978)은 green gram, cowpea 및 chickpea와 같은 곡류는 가열에 의해 물 및 산 추출 phytic acid 함량이 감소한다고 하였으며(Table 5), 산 추출에 있어 총 인 함량에 대한 phytate-P의 비율이 달라진다

Table 5. Effects of cooking on water and acid-extractable phytate-P concentrations in green gram, cowpea and chickpeas (DM basis)<sup>1</sup>

Legume	Phytate-P (%)			
	Water extracted	Retained	Acid extracted	Retained
Green gram				
Uncooked	0.142	100.00	0.185	100.00
Cooked	0.080	56.30	0.150	81.20
Cowpea				
Uncooked	0.090	100.00	0.123	100.00
Cooked	0.032	35.56	0.090	73.20
Chickpea				
Uncooked	0.056	100.00	0.0078	100.00
Cooked	0.036	64.29	0.075	96.15

<sup>1</sup> Source: Kumar et al. (1978).

고 하였다.

또한 가열된 곡류에 있어 물 및 산에 의한 phytate-P 추출이 낮은 것은 가열에 의해 phytic acid와 다른 성분들 사이에 불용성 화합물을 형성하기 때문이다.

(2) 발 아

Phytic acid는 종자 발아시 phytase에 의해 무기태 인으로 분해되어 식물의 성장 및 발달에 이용되는 것으로 알려지고 있는데 이는 몇몇 종자에 있어 발아시 phytase 활성이 높아지는 것으로 알 수 있다(Walker, 1974; Lolas와 Markakis, 1977). 종자 또는 곡류를 발아시킴에 의해 상당량의 phytic acid가 감소 또는 제거되는 것으로 알려져 있는데, Mihailovic 등(1965)은 밀에 있어 발아 단계에 따라 밀 추출물을 분석한 결과 phytase에 의해 penta-, tetra-, tri-, di- 및 monophosphate myoinositol 순으로 단계별로 중간 물질을 형성한다고 하였다.

발아에 의한 phytic acid 감소는 종자 및 곡류의 종류에 따라 상당히 다른 결과를 보이는데, 보고에 의하면 phytic acid 분해와 phytase 활성간에 높은 상관 관계를 보이는 것으로 보아 발아에 의한 phytic acid 감소는 함유된 phytase 활성에 의해 좌우되었다(Walker, 1974; Chen과 Pan, 1977; Lolas와 Markakis, 1977).

또한 Khetarpaul과 Chauhan(1989)은 발아(24 시간, 30°C)에 의해 pearl millet의 Ca, Fe, Zn, Cu 및 Mn과 같은 2가 미네랄의 산(HCl) 추

출성이 증가하였다고 하였는데(Table 6), 이는 pearl millet에 함유된 phytase 및 미생물이 생산하는 phytase의 작용에 의한 것이라고 보고하였다.

(3) 발 효

발효에 의해 곡류 등의 원료 사료의 phytic acid 함량을 효과적으로 감소시킬 수 있는데, 자연 발효의 경우 원료에 함유된 내생 phytase 및 미생물에 의해 phytic acid가 분해되며, pure culture fermentation의 경우 접종 균주에 의한 발효를 통해 phytic acid 함량이 감소된다.

Lopez 등(1983)은 분쇄한 옥수수를 증류수와 1 : 4(w : v)로 혼합하여 자연발효를 통해 발효 5일째 65%의 phytate-P 감소 및 Fiske-Subbarow positive P(%), P soluble in 0.1 HCl/Total P × 100)가 3.39배(89.32%/26.34%) 증가되었으며, 이는 옥수수내의 미생물이 생산하는 phytase에 의한 결과라고 하였다. Mahajan과 Chauhan(1987)도 pearl millet을 자연 발효시킨 결과 내생 phytase에 의해 유의적인 phytic acid 함량 감소 및 인 추출(%) 개선 효과가 나타났는데 이러한 개선 효과는 pH 및 발효 온도에 의해 좌우된다고 하였으며, Khetarpaul과 Chauhan(1991)은 pearl millet을 자연 발효시킨 결과 phytic acid 함량 감소에 따라 전분과 단백질의 *in vitro* 소화율이 개선되었으며 이러한 개선 효과는 발효 온도에 따라 영향을 받는다고 하였다(Table 7).

Table 6. Effects of germination on HCl extractability(%) of divalent metals (DM basis)<sup>1</sup>

Treatment	Ca	Fe	Zn	Cu	Mn
Content (mg/100g)	50	18.4	2.6	0.85	1.5
Raw	36.0	19.4	42.2	35.2	52.8
Germinated	65.7	34.9	48.8	56.5	59.9

<sup>1</sup> Source: Khetarpaul and Chauhan(1989).

Table 7. Effects of natural fermentation for 72 h on *in vitro* starch digestibility (mg maltose released/g flour) and *in vitro* protein digestibility(%) of pearl millet flour (DM basis)<sup>1</sup>

Treatment	Starch digestibility	Protein digestibility
Natural fermentation(°C)		
20	90.9	64.3
25	90.5	75.5
30	110.1	83.3
Control		
Raw pearl millet	17.8	51.0
Zero hour fermentation (autoclaved unfermented pearl millet flour)	18.7	59.2

<sup>1</sup>Source: Khetarpaul and Chauhan (1991).

Table 8. Phytic acid concentrations in soybeans and tempeh (DM basis)<sup>1</sup>

Sample	Phytic acid(%)	Phytic acid hydrolyzed(%)
Soybeans		
Soybeans, raw	1.41	0.00
Soybeans, soaked	1.43	0.00
Soybeans, boiled	1.23	13.99
Tempeh	0.96	32.88

<sup>1</sup>Source: Sudarmadji and Markakis (1977).

또한 옥수수 및 pearl millet외에 black gram, 쌀 및 black gram과 쌀의 혼합물(1 : 1, w : v)의 자연 발효를 통한 phytic acid 감소 효과에 대해 보고되었다(Reddy와 Salunkhe, 1980).

자연 발효 외에 미생물 첨가에 의한 순수 배양 발효(pure culture fermentation)를 통한 곡류의 phytic acid 함량을 감소시키기 위한 연구들이 진행되어 왔다. Sudarmadji와 Markakis (1977)는 가열한 대두에 *R. oligosporus*를 이용한 발효에 의한 템프(tempeh) 제조시 phytic acid의 함량 변화에 관해 연구하였는데, Table 8에서 가열에 의해 phytic acid가 14.0% 감소되었으며, 발효시에는 phytic acid

의 1/3이 감소하였는데, 이러한 결과는 발효 과정 중에 곰팡이가 생산하는 phytase에 의한 결과라고 하였다.

## 적 요

Phytic acid(myo-inositol hexakisphosphate or IP6)는 곡류와 유실류의 총 인의 18~88%를 차지하는 인의 주요 저장 형태이다. Phytic acid는 영양적 측면에서 항영양인자로 간주되는데 이는 단위가축에 있어 축종별로 다소 차이가 있지만 분해율이 낮기 때문에 인의 이용성을 저하시킬 뿐만 아니라 phytic acid와 결합되어 있는 아연, 칼슘, 마그네슘 및

철 등의 중요한 광물질들의 이용성을 저하시키고, 장관내에서 소화효소(amylase, trypsin, chymotrypsin)를 비롯한 단백질과 결합하여 이용성 및 활성을 저하시키기 때문이다. 또한 가축분뇨에 의한 환경오염과 관련하여 사료원료의 인 이용성 제고를 위한 많은 관심과 연구가 집중되고 있다.

Phytate-P 이용성을 높이기 위한 방법으로 가열처리 및 멸균, 발아, 발효 등의 가공처리와 함께 phytase 효소 이용에 관한 많은 연구가 수행되어 왔다. 산업적으로 phytase에 대한 관심이 높는데 이는 phytase를 단위가축사료에 첨가하여 공급할 경우 원료사료에 존재하는 phytic acid 분해에 따른 인, 미네랄, 단백질 등의 이용성 증대와 함께 인 배설량을 감소시키기 때문에 사료에 phytase를 첨가하여 인 배설량을 효과적으로 줄일 수 있다. Phytase(myo-inositol hexaphosphorylase)는 단계적으로 phytic acid로부터 무기태 인을 제거하는 효소로서 초기 분해 인의 위치에 따라 3-phytase(EC 3,1,3,8)과 6-phytase(EC 3,1,3,26)로 분류되며 미생물이 분비하는 phytase는 3-phytase인 반면 고등식물의 종자는 6-phytase를 함유하고 있다. 현재 이용되는 대부분의 phytase는 미생물 유래 phytase이며 생산성 및 특성(내열성, Km, 최적 pH, 최적 온도, 분자량 등)이 우수한 다양한 미생물 균주 개발에 관한 많은 연구가 수행되고 있다.

### 인 용 문 헌

1. Abernathy, R. H., G. M. Paulsen and R. Ellis, Jr. 1973. Relationship among phytic acid, phosphorus, and zinc during maturation of winter wheat. *J. Agric. Food Chem.* 21:282.
2. Al-Asheh, S. and Z. Duvnjak. 1995. Phytase production and decrease of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* in solid-state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11:228.
3. Anderson, R. J. 1914. A contribution to the chemistry of phytin. *J. Biol. Chem.* 17: 171.
4. Anon. 1984. Phosphorus bioavailability in poultry nutrition. *Nutr. Rev.* 42:387.
5. Averill, H. P. and C. G. King. 1926. The phytin content of food stuffs. *J. Am. Chem. Soc.* 48:724.
6. Bayley, H. S. and R. G. Thompson. 1969. Phosphorus requirements of growing pigs and effect of steam pelleting on phosphorus availability. *J. Anim. Sci.* 28: 484.
7. Belavady, B. and S. Banerjee. 1953. Studies on the effect of germination on the phosphorus values of some common Indian pulses. *Food Res.* 18:223.
8. Biehl, R. R. and D. H. Baker. 1996. Efficacy of supplemental 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol and microbial phytase for young pigs fed phosphorus- or amino acid-deficient corn-soybean meal diets. *J. Anim. Sci.* 74:2960.
9. Biehl, R. R. and D. H. Baker. 1997. Microbial phytase improves amino acid utilization in young chicks fed diets based on soybean meal but not diets based on peanut meal. *Poultry Sci.* 76:355.
10. Bitar, K. and J. G. Reinhold. 1972. Phytase and alkaline phosphatase activities in the intestinal mucosac of rat, chicken, calf and man. *Biochim. Biophys. Acta.* 268:442.

11. Caddick, M. X., A. G. Brownlee and H. N. Arst, Jr. 1986. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 203:346.
12. Caldwell, A. G. and C. A. Black. 1958. Inositol hexaphosphate. III. Content in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 22:296.
13. Calvert, C. C., R. J. Besecker, M. P. Plumlee, T. R. Cline and D. M. Forsyth. 1978. Apparent digestibility of phosphorus in barley and corn for growing swine. J. Anim. Sci. 47:420.
14. Cawley, R. W. and T. A. Mitchell. 1968. Inhibition of wheat  $\alpha$ -amylase by bran phytic acid. J. Sci. Food. Agric. 19:106.
15. Champagne, E. T., R. M. Rao, J. A. Liuzzo, J. W. Robinson, R. J. Gale and F. Miller. 1985. Solubility behaviours of the minerals, proteins, and phytic acid in rice bran with time, temperature and pH. Cereal Chem. 62:218.
16. Chen, L. H. and S. H. Pan. 1977. Decrease of phytates during germination of pea seeds (*Pisum sativa*). Nutr. Rep. Int. 46:125.
17. Cooper, J. R. and H. S. Gowing. 1983. Mammalian small intestinal phytase(EC 3.1.3.8). J. Nutr. 50:673.
18. Cosgrove, D. J. 1966. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. Rev. Pure Appl. Chem. 16:209.
19. Cosgrove, D. J., G. C. J. Irving and S. M. Bromfield. 1970. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. The isolation of soil bacteria having inositol phosphate phosphatase activity. Aust. J. Biol. Sci. 23:339.
20. Davies, M. I. and I. Motzok. 1972. Properties of chick intestinal phytase. Poultry Sci. 51:494.
21. Davies, N. T. and A. A. Flett. 1978. The similarity between alkaline phosphatase(EC 3.1.3.1) and phytase(EC 3.1.3.8) activities in rat intestine and their importance in phytate-induced zinc deficiency. Br. J. Nutr. 39:307.
22. de Boland, A., G. B. Garmer and B. L. O'Dell. 1975. Identification and properties of phytate in cereal grains and oilseed products. J. Agric. Food Chem. 23:1186.
23. Dyer, W. J., C. L. Wrenshall and G. R. Smith. 1940. The isolation of phytin from soil. Science. 91:319.
24. Eeckhout, W. and M. De Paepe. 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. 1994. Anim. Feed Sci. Tech. 47:19.
25. Erdman, J. W., Jr. 1979. Oilseed phytates: Nutritional implications. J. Am. Oil Chem. Soc. 56:736.
26. Fisher, H. 1993. Low-calcium diets enhance phytate-phosphorus availability. Nutr. Rev. 50:170.
27. Gibbins, L. N. and F. W. Norris. 1963. Phytase and acid phosphatase in the dwarf bean, *Phaseolus vulgaris*. Biochem. J. 86:67.
28. Gibson, D. M. and A. H. J. Ullah. 1988. Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. Arch. Biochem. Biophys. 260: 503.
29. Greaves, M. P., G. Anderson and D. M. Webley. 1967. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*.

- Biochem. Biophys. Acta. 132:412.
30. Greiner, R., U. Konietzny and K. D. Jany. 1993. Purification and characterization of two phytase from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys. 303:107.
  31. Han, Y. W., D. J. Gallagher and A. G. Wilfred. 1987. Phytase production by *Aspergillus ficuum* on semisolid substrate. J. Ind. Microbiol. 2:195.
  32. Han, Y. W. and D. J. Gallagher. 1987. Phosphatase production by *Aspergillus ficuum* J. Ind. Microbiol. 1:295.
  33. Hara, A., S. Ebina, A. Kndo and T. Funaguma. 1985. A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. Agric. Biol. Chem. 49:3539.
  34. Haude, R. L., I. Alli and S. Kermasha. 1990. Purification and characterization of canola seed phytase. J. Food Biochem. 14: 331.
  35. Iqbal, T. H., K. O. Lewis and B. T. Cooper. 1994. Phytase activity in the human and rat small intestine. Gut. 35: 1233.
  36. Irving, G. C. J. and D. J. Cosgrove. 1972. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin: the inositol hexaphosphate products of *Aspergillus ficuum* phytases. J. Bacteriol. 112:434.
  37. IUPAC-IUB. 1968. The nomenclature of cyclitols. Eur. J. Biochem. 5:1.
  38. Johnson, L. F. and M. E. Tate. 1969. Structure of "phytic acids." Can. J. Chem. 47:63.
  39. Khetarpaul, N. and B. M. Chauhan. 1989. Effects of fermentation by pure culture of yeasts and lactobacilli on phytic acid and polyphenol content of pearl millet. J. Food Sci. 55:1180.
  40. Khetarpaul, N. and B. M. Chauhan. 1991. Effect of natural fermentation on phytate and polyphenolic content and *in-vitro* digestibility of starch and protein of pearl millet (*Pennisetum typhoideum*). J. Sci. Food Agri. 55:189.
  41. Kim, Y. O., H. K. Kim, K. S. Bae, J. H. Yu and T. K. Oh. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. Enzyme Microb. Technol. 22:2.
  42. Kumar, K. G., L. V. Venkataraman, T. V. Jaya and K. S. Krishnamurthy. 1978. Cooking characteristics of some germinated legumes: Changes in phytin, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, and pectins.
  43. Lambrechts, C., H. Boze, G. Moulin and P. Galzy. 1992. Utilization of phytate by some yeasts. Biotech. Letters. 14:61.
  44. Lambrechts, C., H. Boze, L. Segueilha, G. Moulin and P. Galzy. 1993. Influence of culture conditions on the biosynthesis of *Schwanniomyces castellii* phytase. Biotech. Letters. 15:399.
  45. Lim, P. E. and M. E. Tate. 1973. The phytase. II. Properties of phytase fraction F1 and F2 from wheat bran and myoinositol phosphates produced by fraction F2 Biochem. Biophys. Acta. 302: 316.
  46. Lolas, G. M. and P. Markakis. 1977. The phytase of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci. 42:1094.
  47. Lopez, Y., D. T. Gordon and M. L. Fields. 1993. Release of phosphorus from phytate by natural lactic acid fermen-



- tation. J. Food Sci. 48:953.
48. McCance, R. A. and E. M. Widdowson. 1935. Phytin in human nutrition. Biochem. J. 29B:2694.
  49. MacRae, W. D., F. P. Buxton, S. Sibley, S. Garven, D. I. Gwynne, R. W. Davis and H. N. Arst, Jr. 1988. A phosphate-repressible acid phosphatase gene from *Aspergillus niger*: its cloning, sequencing and transcriptional analysis. Gene. 71:339.
  50. Maga, J. A. 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions nutritional significance, and methods of analysis. J. Agric. Food Chem. 30:1.
  51. Mahajan, S. and B. M. Chauhan. 1987. Phytic acid and extractable phosphorus of pearl millet flour as affected by natural lactic acid fermentation. J. Sci. Food Agric. 41:381.
  52. Makower, R. U. 1969. Changes in phytic acid and acid-soluble phosphorus in maturing pinto beans. J. Sci. Food Agric. 20:82.
  53. Mihailovic, M. L., M. Antic and D. Hadzijevec. 1965. Chemical investigation of wheat. VIII. Dynamics of various forms of phosphorus in wheat during its ontogenesis. The extent and mechanism of phytic acid decomposition in germinating wheat grain. Plant Soil. 23:117.
  54. Muriel, I. D. and I. Motzok. 1972. Properties of chick intestinal phytase. Poultry Sci. 51:494.
  55. Nahapetian, A. and A. Bassiri. 1975. Changes in concentrations and interrelationships of phytate, phosphorus, magnesium, calcium, and zinc in wheat during maturation. J. Agric. Food Chem. 23: 1179.
  56. Nahapetian, A. and V. R. Young. 1980. Metabolism of <sup>14</sup>C-phytate in rats: effect of low and high dietary calcium intake. J. Nutr. 110:1458.
  57. Nahas, E., H. F. Terenzi and A. Rossi. 1982. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase(EC 3.1.3.2) and alkaline phosphatase(EC 3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. J. Gen. Microbiol. 128:2017.
  58. Nelson, T. S., J. B. Daniels, J. R. Hall and L. G. Shields. 1976. Hydrolysis of natural phytate phosphorus in the digestive tract of calves. J. Anim. Sci. 42:1509.
  59. Noland, P. R., M. Funderburg and Z. Johnson. 1968. Phosphorus availability in a practical diet for swine. J. Anim. Sci. 27:1155.
  60. Nosworthy, N. and R. A. Caldwell. 1988. The interaction of zinc(II) and phytic acid with soya bean glycinin. J. Sci. Food Agric. 44:143.
  61. O'Dell, B. L. 1979. Effect of soy protein on trace mineral bioavailability. In "Soy Protein and Human Nutrition" (H. L. Wilcke, D. T. Hopkins and D. H. Waggle eds.), p. 187. Academic Press, New York.
  62. O'Dell, B. L. and A. de Boland. 1976. Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oilseed meals. J. Agric. Food Chem. 24:804.
  63. Officer, D. I. and E. S. Batterham. 1993. Enzyme supplementation of Linola meal for grower pigs. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. 19:288. (Abst.)
  64. Oshima, M., T. G. Taylor and A.

- Williams. 1964. Variations in the concentration of phytic acid in the blood of the domestic fowl. *Biochem. J.* 92:42.
65. Pasamontes, L., M. Haiker, M. Wyss, M. Tessier and A. P. G. M. van Loon. 1997. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microb.* 63:1696.
66. Pedregosa, A. M., F. Pinto, I. F. Monistrol and F. Laborda. 1991. Regulation of acid and alkaline phosphatases of *Cladosporium cucumerinum* by inorganic phosphate. *Mycol. Res.* 95:720.
67. Peers, F. G. 1953. The phytase of wheat. *Biochem. J.* 53:102.
68. Pileggi, V. J. 1959. Distribution of phytase in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 80:1.
69. Powar, V. K. and V. Jagannathan. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 151:1102.
70. Rapoport, S. 1940. Phytic acid in avian erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 145: 403.
71. Rapoport, S. and G. M. Guest. 1941. Distribution of acid-soluble phosphorus in the blood cells of various vertebrates. *J. Biol. Chem.* 138:269.
72. Reddy, N. R. and D. K. Salunkhe. 1980. Effects of fermentation on phytate phosphorus and minerals of black gram, rice, and black gram rice blends. *J. Food Sci.* 45:1708.
73. Reddy, N. R., S. K. Sathe and D. K. Salunkhe. 1982. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* 28:1.
74. Reese, E. T. and A. Maguire. 1969. Surfactants are stimulants of enzyme production by microorganisms. *Appl. Microbiol.* 17:242.
75. Rose, A. R. 1912. A resume of the literature on inosite phosphoric acid, with special reference to the relation of that substance to plants. *Biochem. Bull.* 2:21.
76. Sakurai, Y. and H. Shiota. 1980. Some properties of multiple acid phosphatases produced on phosphate-restricted or enriched culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 26:315.
77. Sandberg, A. -S. and H. Andersson. 1988. Effect of dietary phytase on the digestion of phytate in the stomach and small intestine of humans. *J. Nutr.* 118:469.
78. Segueilha, L., G. Moulin and P. Galzy. 1993. Reduction of phytate content in wheat bran and glandless cotton flour by *Schwanniomyces castelli*. *J. Agric. Food Chem.* 41:2451.
79. Sharma, C. B., M. Goel and M. Irshad. 1978. Myoinositol exaphosphate as a potential inhibitor of  $\alpha$ -amylase. *Phytochemistry.* 17:201.
80. Shieh, T. R., R. J. Wodzinski and J. H. Ware. 1969. Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. *J. Bact.* 100:1161.
81. Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis (natto)* N-77. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:1266.
82. Singh, M. and A. D. Krikorian. 1982. Inhibition of trypsin activity *in vitro* by phytate. *J. Agric. Food. Chem.* 30:799.
83. Skowronski, T. 1978. Some properties of

- partially purified phytase from *Aspergillus niger*. Acta Microbiol. Polonica. 27:41.
84. Sobolev, A. M. and M. A. Rodionova. 1966. Phytin synthesis by aleurone grain in ripening sunflower seeds. Sov. Plant Physiol. 13:958.
  85. Sudarmadji, S. and P. Markakis. 1977. The phytate and phytase of soybean temp. J. Sci. Food Agric. 28:381.
  86. Sutardi and K. A. Buckle. 1986. The characteristics of soybean phytase. J. Food Biochem. Tech. 10:197.
  87. Torre, M., A. R. Rodriguez and F. Saura-Calixto. 1991. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 30:1.
  88. Ullah, A. H. J. 1988. Production, rapid purification and catalytic characterization of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum*. Prep. Biochem. 18:443.
  89. Ullah, A. H. J. and B. J. Cummins. 1987. Purification, N-terminal amino acid sequence and characterization of pH 2.5 optimum acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*. Prep. Biochem. 17:397.
  90. Ullah, A. H. J. and D. M. Gibson. 1987. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: Purification and characterization. Prep. Biochem. 17:63.
  91. Walker, K. A. 1974. Changes in phytic acid and phytase during early development of *Phaseolus vulgaris*. Planta. 116: 91.
  92. Wang, H. L., E. W. Swain and C. W. Hesseltine. 1980. Phytase of molds used in oriental food fermentation. J. Food Sci. 45: 1262.
  93. Weingartner, K. E. and J. W. Erdman, Jr. 1978. Bioavailability of minerals in human soybean foods. III. Res. 20:4.
  94. Yamada, K., Y. Minoda and S. Yamamoto. 1968. Phytase from *Aspergillus terreus*. Part I. Production, purification and some general properties of the enzyme. Agr. Biol. Chem. 32:1275.
  95. Yamamoto, S., Y. Minoda and K. Yamada. 1972. Chemical and physico-chemical properties of phytase from *Aspergillus terreus*. Agr. Biol. Chem. 36: 2097.
  96. Yang, S. Y., B. K. Kim, W. H. Jung, K. K. Park and C. W. Kim. 1998. Determination of factors affecting phytase production from *Penicillium* sp. The Korean Society for Applied Microbiology, Proceeding, p319.
  97. Yang, S. Y., T. G. Oh, J. K. Lee, H. K. Kim, D. W. Kim, Y. O. Kim, C. W. Kim and K. K. Park. 1996. Purification and properties of phytase from *Penicillium waksmanii*. The Korean Society for Applied Microbiology, Proceedings, p309.
  98. Yang, S. Y., T. G. Oh, K. S. Bae, K. K. Park and C. W. Kim. 1999. Isolation and identification of a fungal strain producing phytase. J. Anim. Sci. Tech. 20:21.
  99. Yang, W. J., Y. Matsuda, S. I. Sano, H. Masutani and H. Nakagawa. 1991. Purification and characterization of phytase from rat intestinal mucosa. Biochem. Biophys. Acta. 1075: 72.
  100. Yi, Z., E. T. Kornegay and D. M. Denbow. 1996. Effect of microbial phy-

- tase on nitrogen and amino acid digestibility and nitrogen retention of turkey poults fed corn-soybean meal diets. Poultry Sci. 75:979.
101. Yoon, S. J., Y. J. Choi, H. K. Min, K. K. Cho, J. W. Kim, S. C. Lee and Y. H. Jung. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. Enzyme Microb. Tech. 18:449.
102. 김영훈, 송민동, 양시용, 권문남, 김대영, 조왕식, 오세택. 2001. 토양으로부터 phytase를 생산하는 *Pseudomonas* sp.의 분리 및 효소생산의 배지 최적화. 한국동물자원과학회, Proceedings vol. II. p 154.
103. 김영훈, 양시용, 김대영, 김창원, 정원형, 권문남, 송민동. 2001. Phytase를 생산하는 *Enterobacter cloacae*의 분리 및 효소생산의 배지 최적화. 한국산업미생물학회지. 29(2):78.
104. 양시용, 김창원, 강창원, 유계현, 이낙형. 2000. 파이테이즈 분비 유산균. 대한민국 특허 제 0284316호.
105. 양시용, 송민동, 김언현, 김창원. 2001. Probiotics용 복합효소 분비 *Bacillus* sp.의 분리 및 원료사료를 이용한 균주생산을 위한 배지 조건의 최적화. 한국산업미생물학회지. 29(2):110.
106. 오태광, 김형권, 이정기, 배경숙, 양시용, 김창원, 이동규. 1998. 신균주 페니실리움속 AM301 및 이로부터 생산되는 신규 파이타아제. 대한민국 특허 제 0154398호.