

Streptomyces sp. YB-26으로부터 생산된 phytase의 특성

윤 기 홍*

우송대학교 의료영양식품과학부 식품생물과학전공

Characterization of Phytase Produced by Streptomyces sp. YB-26

Yoon, Ki-Hong*

School of Food Science & Biotechnology, Woosong University, 17-2, Jayang-dong, Dong-ku, Daejeon 300-718, Korea

Received September 28, 2005; Accepted November 16, 2005

Approximately twelve hundred strains of *Actinomycetes* isolated from domestic soli were tested for their ability to produce extracellular phytase. Of all these isolates a strain, YB-26, that had the highest potential for phytase activity was chosen. The nucleotide sequence of 16S rDNA of the isolate YB-26 showed the highest similarity to that of strains belonging to genus *Streptomyces*. The partially purified extracellular phytase was obtained from the culture filtrate of *Streptomyces* sp. YB-26 grown on GSM broth by ammonium sulfate precipitation (15-70%), DEAE-Sepharose column and Q-Sepharose column chromatography. The partially purified enzyme showed the maximum activity for hydrolysis of phytate at 60°C and pH 7.0, and retained 90% of its maximum activity at the range of pH 6.0~8.0. It was thermolabile and its thermostability did not increase in the presence of calcium chloride.

Key words: *Streptomyces*, phytase, reaction property

서 론

Phytate는 사료에 사용되는 곡류와 박류를 포함한 식물의 인의 주요 저장화합물로 inositol과 인산염이 결합된 형태이다.¹⁾ 이러한 phytate는 단위 가축의 소화기관에 의해 소화되지 않을 뿐만 아니라, 마그네슘, 칼슘, 아연, 구리, 철과 같은 주요 식이 미량원소 및 단백질과 결합하여 있으므로 항영양인자로 작용한다.^{2,3)} 또한 소화되지 않고 분뇨로 배출된 phytate는 미생물에 의해 가용성 인으로 분해되어 하천과 호수의 부영양화 현상을 일으키는 원인이 된다.

Phytase는 inositol에 결합된 인을 완전 또는 부분적으로 가수분해하여 phytate로부터 무기인을 방출시킴으로써, 사료식물에 존재하는 phytate 및 이와 결합된 영양분이 효과적으로 소화 흡수될 수 있도록 전환하여 사료효율성을 높이게 되므로 가금류와 돼지의 사료첨가용 효소로 사용되고 있다.⁴⁾ 식물과 동물의 조직에서도 phytase가 생산되지만, 미생물이 생산하는 phytase가 그 생산성과 반응성 측면에서 사료첨가용 효소로 이용 가치가 높다. Phytase를 생산하는 미생물로는 *Bacillus subtilis*,⁵⁾ *Klebsiella oxytoca*,⁶⁾ *Escherichia coli*와⁷⁾ 같은 세균, *Saccharomyces cerevisiae*,⁸⁾ *Pichia anomala*와⁹⁾ 같은 효모 및 *Aspergillus*

ficuum,¹⁰⁾ *A. terreus*와¹¹⁾ 같은 곰팡이가 잘 알려졌다. 이들 미생물로부터 phytase 유전자가 다수 크로닝 되었으며, 효소 생산성이 증가된 유전자 재조합 균주가 개발되었다.^{12,13)} 또한 pellet 사료제조에 사용될 수 있는 phytase에 대한 관심이 높아지면서 유전자의 분자진화기술을 이용하여 내열성 효소를 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁴⁾ 한편 방선균에 속하는 여러 균주들이 xylanase, cellulase 및 각종 가수분해 효소를 생산하는 것으로 알려져 있으나, phytase의 생산성 균주는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 국내 토양으로부터 phytate 분해력이 우수한 방선균을 분리하고 분리균이 생산하는 phytase 반응 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용배지와 시약. Humic acid vitamin 평판배지를 사용하여 토양으로부터 방선균을 분리하였다.¹⁵⁾ 분리된 방선균 중 phytase 생산균을 탐색하기 위해서는 G.S.M 배지(soluble starch 10 g/l, K₂HPO₄ 0.25 g/l, molasses 20 g/l, beef extract 1 g/l, yeast extract 4 g/l, NaCl 2 g/l, glucose 20 g/l, CaCO₃ 2 g/l(pH 7.2))를 방선균 배양에 사용하였다. Sodium phytate, calcium chloride, ammonium heptamolybdate, ammonium metavanadate, potassium phosphate 등의 분석시약은 Sigma 제품을 사용하였으며, nitric acid는 Merck로부터 구입하였다. 중합효소 연쇄반응(PCR)을 위한 *Taq* DNA polymerase와 DNA 정제 kit는 솔

*Corresponding author

Phone: 82-42-630-9742; Fax: 82-42-636-2676

E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

젠트사로부터 구입하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석. 분리균의 16S rRNA 유전자 단편은 Lee 등이¹⁵⁾ 실시한 방법과 동일하게 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열을 primer로 사용하여 PCR로 증폭하고 그 염기서열을 결정하였다. 주형 DNA로 사용할 *Streptomyces* sp. YB-26의 총 염색체 DNA는 평판배지에 자란 콜로니를 취해 증류수에 현탁하여 얻은 균 현탁액을 끓는 물에 3분간 방치한 후 원심분리하여 상등액을 취해 제조하였다.

Phytase의 부분정제. 분리균을 G.S.M 배지에 접종하여 28°C에서 6일 동안 진탕 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양상등액을 15~70% ammonium sulfate로 처리하였다. 침전된 단백질을 20 mM Tris·HCl buffer(pH 8.0)에 녹이고 동일 buffer에 투석하였다. 투석한 단백질 용액을 20 mM Tris·HCl buffer(pH 8.0)로 평형시킨 DEAE-Sepharose column에 loading하고 NaCl 농도를 0~0.4 M이 되도록 농도구배를 주어 증가시키면서 흡착된 단백질을 용출하였다. Phytase 활성을 보이는 분획을 모아 한외초여과 과정을 수행하여 농축한 효소액을 20 mM Tris·HCl buffer(pH 8.0)에서 투석한 후 동일한 완충용액으로 평형화시킨 Q-Sepharose column을 사용하여 DEAE-Sepharose column 크로마토그래피와 동일한 조건으로 정제과정을 수행하였다. 용출된 분획 중 phytase의 활성이 높은 분획을 부분정제 효소로 사용하였다.

Phytase 활성 측정. Phytase 활성은 dodecasodium phytate를 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 무기인을 발색법으로 정량함으로써 측정하였다.¹⁶⁾ 증류수에 10 mM sodium phytate와 10 mM CaCl₂를 증류수에 녹여 pH를 7.0으로 맞추어 기질용액으로 사용하였다. 효소 반응을 위해서는 2 mM sodium phytate, 2 mM CaCl₂, 50 mM 완충용액을 포함한 혼합물에 효소액을 첨

가하여 최종 0.5 ml이 되도록 하여 적정온도에서 30분간 방치하였다. 반응액에 color-stop 용액(Nitric acid solution : Molybdate stock solution : Vanadate stock solution = 2 : 1 : 1)을 0.5 ml 첨가하고 15분 후에 415 nm에서 흡광도를 측정하고 이를 KH₂PO₄를 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 무기인의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 1 μmol의 KH₂PO₄에 상응하는 무기인을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

Phytase 생산균주의 분리. 다양한 환경의 토양에서 채취한 시료를 생리식염수로 희석하여 humic acid vitamin 평판배지에 도말하고 28°C에서 7일간 배양하였다. 형태가 서로 다른 것으로 판단되는 약 1,200개의 방선균 콜로니를 G.S.M 복합 액체배지에 접종하여 28°C에서 5일간 진탕 배양하여 얻은 배양상등액을 사용하여 phytate의 분해활성을 조사하였다. 그 결과 몇 주의 분리균주가 phytase를 생산하는 것으로 확인되었으며, 이들 중 효소 생산성이 높은 균주 YB-26을 선발하였다.

선발된 YB-26의 동정을 위해 16S rRNA의 염기서열을 조사하였다. PCR로 증폭된 DNA 단편으로 직접 결정된 염기서열 (GenBank accession No. DQ207806)은 미국 NCBI의 BLAST 검색방법을 사용하여 기존에 등록된 다양한 세균들의 상응하는 염기서열과 비교한 결과 *Streptomyces*속 균주와 유사도가 높았다. 분리균의 정확한 계통학적 분석을 위해서 CLUSTAL W software를 사용하여 상동성이 높은 균주들의 16S rRNA 염기서열과 비교하고, 5', 3'의 gap을 제거하거나 적절히 수정한 후,

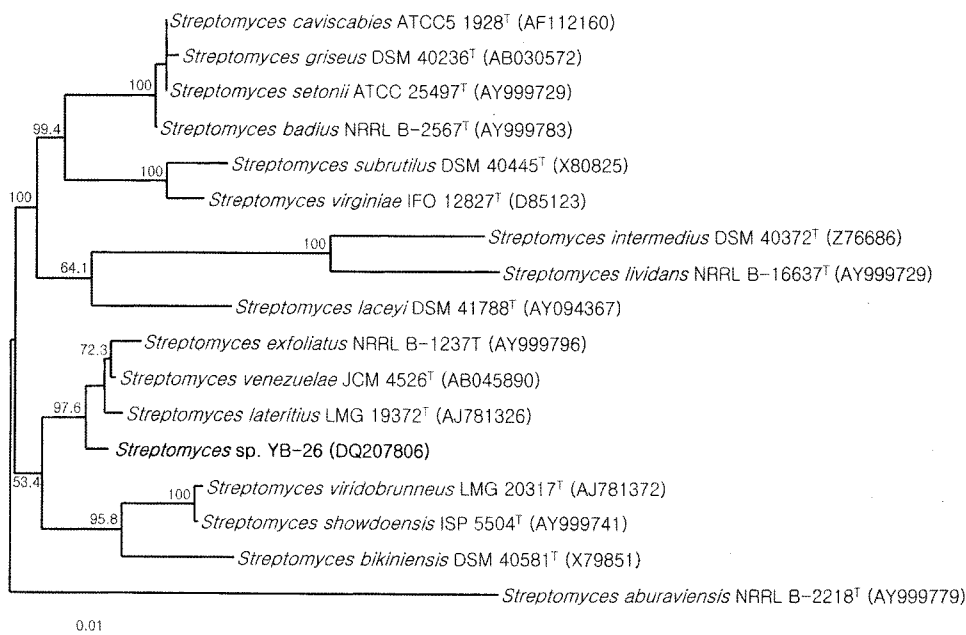


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships based on 16S rRNA sequences of *Streptomyces* sp. YB-26 and other related strains belonging *Streptomyces* genus. Bootstrap values are shown in percentages of 1000 replicates. *Streptomyces aburaviensis* NRRL B-2218T was used as an out group. The scale bar is equal to 0.01 changes per nucleotide position. Nucleotide sequence of the isolate YB-26 16S rDNA has been deposited with GenBank under accession number DQ207806.

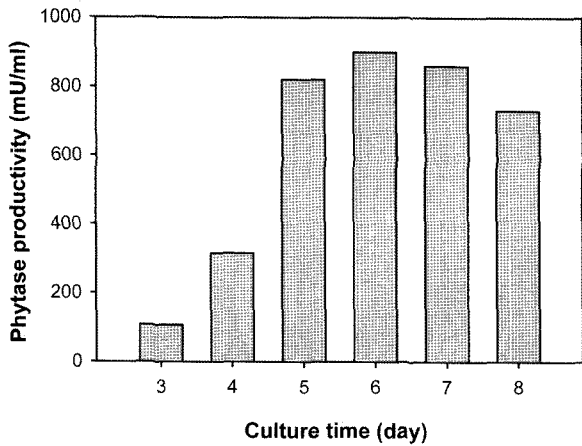


Fig. 2. Phytase productivity of *Streptomyces* sp. YB-26. *Streptomyces* sp. YB-26 was grown on G.S.M medium at 28°C with vigorous shaking. Phytase activity was determined with the culture filtrate at different culture times. Reaction was performed at 45°C and pH 7.0.

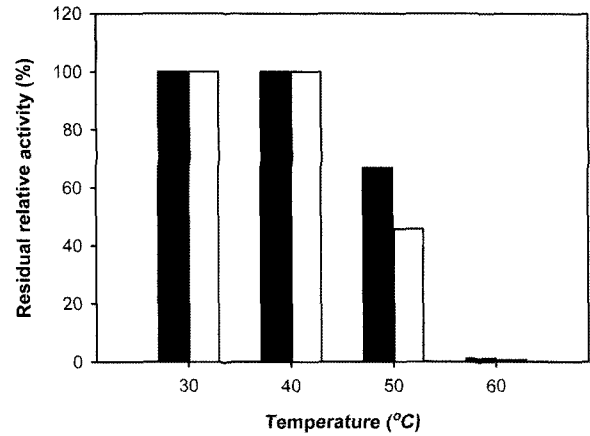


Fig. 4. Thermostability of phytase. The residual activity was measured with enzyme pre-incubated at various temperature for 30 min (closed bar) and 60 min (open bar).

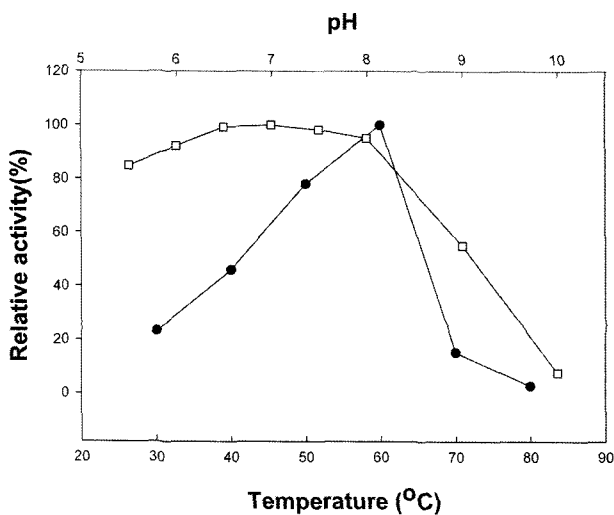


Fig. 3. Effects of reaction temperature and pH on the phytase activity. Temperature profile (-●-) was obtained by measuring the phytase activities at pH 7.0 and different temperatures. The reactions were done at 45°C and various pHs for determining the pH profile (-○-). The following buffer systems were used: pH 5.5 to 8.0, 50 mM Tris-maleate; pH 8.0 to 10.0, 50 mM KCl-borate.

분자계통학적 계통수의 작성은 PHYLIP 프로그램 패키지를 사용하여 수행하였다.¹⁷⁾ 분자진화거리는 DNADIST 프로그램속의 Jukes & Cantor의 알고리즘을 이용하여 계산하였고 최종적인 계통수는 NEIGHBOR 프로그램 속의 neighbor-joining method 에¹⁸⁾ 기초해서 작성하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 분리균 *Streptomyces* sp. YB-26은 *S. lateritius*와 가장 근연관계에 있는 것으로 확인되었다.

Phytase의 반응 특성. *Streptomyces* sp. YB-26을 G.S.M 배지를 사용하여 28°C에서 8일간 진탕배양하면서 배양상등액의 효소활성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에 보인바와 같이 배양 후 2일까지는 배양상등액에서 phytase 활성이 관찰되지 않았고, 3일부터 활성이 관찰되었다. 배양후 6일이 되었을 때 효소 생산이 900 mU/ml로 최대에 도달하였으며, 7일 이후에는 약간씩

감소하는 것으로 나타났다.

분리균이 생산하는 효소의 반응특성을 조사하기 위해 G.S.M 배지에서 6일간 배양하여 얻은 배양 상등액을 ammonium sulfate(15%~70%), DEAE-Sephrose column 크로마토그래피, 한외여과(PM10)와 Q-Sephrose column 크로마토그래피를 수행하였다. 최종적으로 Q-Sephrose column에서 용출된 분획 중 가장 효소활성이 높은 분획을 SDS-PAGE로 조사한 결과 완전히 정제되지 않은 것으로 나타났다. 따라서 이를 phytase의 부분정제 효소액으로 사용하여 반응온도와 pH가 phytase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30~70°C까지의 온도에서 각각 효소 활성을 측정하였으며, 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위해서는 pH 5.5에서 pH 10.0까지의 범위에서 효소 활성을 각각 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보인바와 같이 pH 7.0과 60°C에서 최대활성을 보였고, pH 6.0~8.0 부근에서 최대 활성의 90% 이상에 해당하는 활성을 나타냈다. 한편 *Aspergillus*속 균주의 효소는 pH 4.5-5.5, *S. cerevisiae*의 효소는 pH 4.6에서 활성이 높으며, 세균의 효소는 종류에 따라 pH 5.0 부근과 중성부근에서 최대활성을 보이는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁾ 따라서 분리균의 효소를 다른 균주의 효소와 비교하였을 때 *B. subtilis*와⁵⁾ *B. amyloliquefaciens*의²⁰⁾ 효소와 유사한 최적반응 pH를 갖는 것을 알 수 있었다. 반응온도의 경우는 대부분의 미생물 유래 효소가 55~60°C에서 최대반응 활성을 보이고 있어 분리균의 효소도 이와 유사한 수준으로 여겨진다.

Phytase의 열안정성. Phytase는 사료첨가용 효소로 이용되기 위해서는 80~90°C에서 수분간을 실활되지 않는 특성이 있어야 한다. *Aspergillus*속 균주의 효소는 60°C,¹¹⁾ *S. cerevisiae*의 효소는⁸⁾ 40°C에서 각각 빠르게 실활된다. 한편 세균의 효소는 열안정성에 있어서 균주간 차이가 많으며 *B. amyloliquefaciens*의 효소는²⁰⁾ 내열성이 우수한 것으로 알려졌다.

YB-26이 생산하는 phytase의 열안정성을 조사하기 위해 30~60°C의 범위에서 30분과 60분간 각각 열 처리후 37°C 잔존 활성을 조사하였다. 그 결과 40°C 이하에서는 거의 실활되지 않았으나, 50°C에서는 급격히 실활되어 비교적 열안정성이 낮은 것으로 확인되었다. *K. oxytoca*의 효소도 50°C에서 급격히

실활되는 것으로 보고되었다.⁶⁾ CaCl₂에 의한 효소의 열안정성 증가 여부를 관찰하기 위해 5 mM이 되도록 효소액에 CaCl₂를 첨가한 후 phytase의 열안정성을 조사하였으나, 이를 첨가하지 않았을 때와 차이가 없었다(결과 미제시). 따라서 *Streptomyces* sp. YB-26이 생산하는 phytase는 열안정성이 낮아 pellet 사료 제조용 효소로는 적합하지 않은 것으로 여겨진다. *Streptomyces* 속 균주에서 phytase에 대한 보고가 없었지만, 본 연구를 통해 phytase가 방선균에서도 생산된다는 사실이 확인되었으므로 방선균도 phytase의 생산균으로 탐색가치가 있다고 판단된다.

요 약

토양으로부터 분리된 약 1,200여종의 방선균으로부터 세포외로 phytase를 분비 생산하는 방선균 YB-26이 분리되었다. 분리균의 16S rRNA 염기서열을 조사한 결과 *Streptomyces*속 속하는 균주의 서열과 상동성이 높았다. GS.M 배지에서 분리균을 배양하여 얻은 배양 상등액을 ammonium sulfate 분획(15-70%), DEAE-Sepharose column 및 Q-Sepharose column 크로마토그래피를 하여 phytase를 부분 정제하였다. 부분정제된 phytase를 사용하여 효소반응을 실시한 결과 60°C와 pH 7.0에서 최대활성을 보였으며, pH 6.0-8.0 범위에서 최대활성의 90% 이상이 되는 활성을 나타냈다. 이 효소는 열안정성이 높지 않으며, CaCl₂의 존재하에서도 열안정성이 변화가 없는 것으로 확인되었다.

Key words: *Streptomyces*, 파이테이즈, 반응특성

참고문헌

- Reddy, N. R., Sathe, S. K. and Salunkhe, D. K. (1982) Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* **28**, 1-92.
- Erdman, J. W. Jr. and Ponerros-Schneier, A. (1989) Phytic acid interactions with divalent cations in foods and in the gastrointestinal tract. *Adv. Exp. Med. Biol.* **249**, 161-171.
- Nayani, N. R. and Markakis, P. (1983) Effects of inositol phosphates on mineral utilization. *Fed. Proc.* **45**, 819-826.
- Urbano, G., Aranda, P., Gomez-Villalva, E., Frejnagel, S., Porres, J. M., Frias, J., Vidal-Valverde, C. and Lopez-Jurado, M. (2003) Nutritional evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) protein diets after mild hydrothermal treatment and with and without added phytase. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2415-2420.
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N. and Apajalathi, J. (1998) Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2079-2085.
- Jareonkitmongkol, S., Ohya, M., Watanabe, R., Takagi, H. and Nakamori, S. (1997) Partial purification of phytase from a soil isolate bacterium, *Klebsiella oxytoca* MO-3. *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 393-394.
- Greiner, R., Konietzny, U. and Jany, K. -D. (1993) Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 107-113.
- Nayani, N. R. and Markakis, P. (1984) The phytase of yeast. *Lebensm Wiss Technol.* **17**, 24-26.
- Vohra, A. and Satyanarayana, T. (2004) A cost-effective cane molasses medium for enhanced cell-bound phytase production by *Pichia anomala*. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 471-476.
- Howson, S. J. and Davis, R. P. (1983) Production of phytate-hydrolyzing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **5**, 377-382.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M. and van Loon, A. P. (1999) Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 367-373.
- Xiong, A. S., Yao, Q. H., Peng, R. H., Li, X., Fan, H. Q., Guo, M. J. and Zhang, S. L. (2004) Isolation, characterization, and molecular cloning of the cDNA encoding a novel phytase from *Aspergillus niger* 113 and high expression in *Pichia pastoris*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 282-291.
- Xiong, A. S., Yao, Q. H., Peng, R. H., Han, P. L., Cheng, Z. M. and Li, Y. (2005) High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 418-428.
- Garrett, J. B., Kretz, K. A., O'Donoghue, E., Kerovuo, J., Kim, W., Barton, N. R., Hazlewood, G. P., Short, J. M., Robertson, D. E. and Gray, K. A. (2004) Enhancing the thermal tolerance and gastric performance of a microbial phytase for use as a phosphate-mobilizing monogastric-feed supplement. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3041-3046.
- Lee, E. -H., Kim, C. -J. and Yoon, K. -H. (2005) Characterization and xylanase productivity of *Streptomyces* sp. WL-2. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 178-183.
- Engelen, A. J., van der Heeft, F. C., Randsdorp, P. H. and Smit, E. L. (1994) Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* **77**, 760-764.
- Felsenstein, J. (2002) In PHYLIP(phylogeny inference package), version 3.6a: Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA.
- Sautou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Oh, B. -C., Choi, W. -C., Park, S., Kim, Y. -O. and Oh, T. -K. (2004) Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 362-372.
- Oh, B. C., Chang, B. S., Park, K. H., Ha, N. C., Kim, H. K., Oh, B. H. and Oh, T. -K. (2001) Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochemistry* **40**, 9669-9676.