

Bacillus coagulans IDCC 1201이 생산하는 Phytase의 특성

이승훈 · 권혁상 · 구교탄 · 강병화 · 김태용*
일동제약(주) 중앙연구소

Characterization of Phytase from *Bacillus coagulans* IDCC 1201. Lee, Seung-Hun, Hyuk-Sang Kwon, Kyo-Tan Koo, Byung-Hwa Kang, and Tae-Yong Kim*. ILDONG Research Laboratories, ILDONG Pharmaceutical Co., Ltd., 260-5, Eonnam-dong, Giheung-gu, Yongin, Gyonggi-do 449-915, Korea – A native extracellular acid phosphatase, phytase (EC 3.1.3.8), from *Bacillus coagulans* IDCC 1201 (commercially known as *Lactobacillus sporogenes*) used as probiotics, was characterized. Though some strains of *B. coagulans* have been evaluated with regard to several health-promoting effects, it has not been reported to produce phytase. Partially purified phytase from the strain IDCC 1201 had a pH optimum of 4.0 and a temperature optimum of 50°C, respectively. The requirement for divalent cations was studied and cobalt ion remarkably increased the enzyme activity. The removal of metal ions from the enzyme by EDTA decreased activity below 50%. The enzyme activity depleted restored when the assay was performed in the presence of Co²⁺. Also, Co²⁺ is the most active stimulator and has unique activation effect at high temperature. The phytase was specific for sodium phytate and *p*-nitrophenylphosphate, which is different from other known *Bacilli* phytases. The putative amino acid sequences of the phytase from *B. coagulans* IDCC 1201 were very similar to that of the phytase from *B. subtilis* strain 168. Based on these data, we concluded that the phytase from *B. coagulans* IDCC 1201 is a Co²⁺-dependent acid phosphatase. Therefore, the strain *B. coagulans* IDCC 1201 is thought to be a valuable additive for livestock as well as a beneficial probiotics for human.

Key words: Acid phytase, phytic acid, Co²⁺-dependent metalloenzyme, thermostability, *Bacillus coagulans*

서 론

Phytase(*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase)는 phosphatase의 한 종류로 기질인 phytic acid(*myo*-inositol hexakisphosphate)를 분해하여 *myo*-inositol과 phosphorus를 형성하게 하는 효소로서 식물, 동물의 장관 및 미생물 등에 존재한다[26].

Phytic acid는 곡물 중량의 1~4% 가량을 차지하며, 그 구조는 inositol 링에 하전된 6개의 phosphate 기가 결합되어 있다. 이러한 phytic acid는 단위가축으로 분류되는 닭, 돼지, 칠면조 등에서는 이용하지 못하는 데, 이들 단위 가축은 소화관에서 phytase를 분비하지 못하기 때문이다. 따라서, 소화 흡수되지 못한 phytic acid는 가축으로부터 배설되어, 토양 및 상수원 오염을 유발하며, 또한 가축의 영양에 있어, 무기 이온 및 비타민, 아미노산 등과 강하게 결합하여, 흡수를 막는 항 영양인자로 작용한다[1, 2]. 이런 문제점을 해결하는 방안으로 phytase 효소 개발연구가 진행되어 왔으며, 그 결과, 곰팡이, 세균, 효모 등의 미생물 자원으로부터 분

리되었다. Phytase는 분리원에 따라 미생물이 생산하는 3-phytase(EC 3. 1. 3. 8) 와 식물에서 보여지는 6-phytase (EC 3. 1. 3. 26)으로 나누어지며[10, 13, 14, 15], 미생물에서는 작용 pH에 따라 *Aspergillus* sp.가 주로 생산하는 acid phytase와 *Bacillus* sp. 가 생산하는 alkaline phytase로 분류된다[12]. 또한 순수하게 분리된 phytase를 사료에 첨가하여 단위동물에 급여하는 방법이 개발되었다[10]. 그러나, 이러한 방법은 분리 정제하는 과정에 있어 많은 시간과 노력이 필요하며, 특히 생산 수율이 낮아 유전 공학적인 방법으로 극복하려는 실험들이 진행중에 있다. 본 연구는 위산이나 소화효소 등에 안정하며, 장 정착성에 우수한 특성을 가진 probiotics에서, phytase를 분비하는 균종을 선별하고, 선별된 균주의 phytase 특성을 규명함으로써 가축이 곡물로부터 phytic acid의 섭취로 인한 문제점을 해결하고, 종래의 phytase를 처리한 사료를 급여하는 방식을 대신하여, 사료와 함께 첨가하여 급여하는 방식을 택함으로써 phytase 효소 작용 외에 선별 균주가 갖는 probiotics로의 장내 균총의 정상화를 가져와, 질병 예방과 면역력 향상을 구현함으로써 산업적 이용가치를 극대화할 목적으로 수행하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-31-287-1700 (Ext. 501), Fax: 82-31-287-1800

E-mail: tykim@ildong.com

재료 및 방법

분리방법 및 선발

Phytase를 생산하는 균주를 분리하기 위하여, 일동 유산균 은행의 보관균주를 대상으로 검색을 하였다. 각각의 균주군을 nutrient broth에서 1차 배양한 후, 그 배양액을 점적한 paper disc를 PIM 평판배지(bacto peptone, 10 g; beef extract, 5 g; glucose, 10 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g; $CaCl_2$, 1 g; Ca-phytate, 5 g; bacto agar, 15 g; water, 1 liter, pH 5.6)상에 올려 놓고, 37°C, 48시간 배양하였다. 배양 후, clear zone 생성 유무로 phytase의 존재 및 clear zone의 크기를 판단하여 선발하였다[6]. Phytic acid 분해능을 가진 보관균주들 중, 분해능이 가장 우수한 균주를 최종 선발하였다.

사용배지 및 시약

B. coagulans IDCC 1201로부터 phytase 생산배지는 PPM 배지로 glucose 10 g/l, peptone 10 g/l, beef stock 5 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l, $CaCl_2$ 1 g/l, $CoCl_2$ 1 g/l, Ca-phytate 5 g/l의 조성으로 pH 5.5이 되도록 조정하여 사용하였다. Phytic acid, pNPP등의 기질은 Sigma-Aldrich사에서 구입하여 사용하였으며, 그 외의 시약은 특급시약을 사용하였다.

Phytase 활성의 측정

Phytase 활성은 1.2 mM sodium phytate를 포함한 0.1 M sodium acetate-acetic acid buffer(pH 5.0) 200 μ l을 첨가한 반응액을 실험군과 대조군으로 나누어 phytase 효소액 100 μ l를 첨가하여 혼합한 후, 50°C에서 2시간 반응시킨 후, 25% (w/v) trichloroacetic acid(TCA) 용액 50 μ l를 첨가하여 반응을 종료시켜, 유리된 무기인을 ammonium molybdovanadate method에 의해 spectrophotometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다[24]. Phytase 활성(U)은 50°C에서 시간당 1 mmole의 무기인을 생성시키는 효소의 양으로 정의 하였다.

Phytase의 부분 분리정제

Phytase의 분리를 하기 위해, *B. coagulans* IDCC1201의 40% glycerol stock solution(1:1 v/v)을 PIM broth 배지에 2%(v/v)되게 접종하고, 50°C에서 baffled flask를 사용하여 5시간 전배양 하였다. 3 l jar fermenter에 동일 배지에 전배양액을 5%(v/v)되게 접종하고, 45°C에서 16시간 배양하였다. 배양액을 8,000 rpm으로 원심분리 한 후, 상등액을 회수하여 crude enzyme 으로 사용하였다. 이 crude enzyme 을 다시 ammonium sulfate로 30~70% 분별 침전시킨 후, 12,000 rpm, 10분간 원심 분리하여 침전된 단백질을 회수하고, 0.1 M acetate buffer(pH 5.0)에 녹인 후, desalting

column을 통해 정제하여, 활성이 있는 fraction을 효소액으로 사용하였다.

온도의 영향

B. coagulans IDCC 1201이 생산하는 phytase 활성에 미치는 최적 온도를 조사하기 위해, 30°C에서 80°C까지 각각의 온도에서 기질과 효소 혼합액을 반응시킨 후, 활성을 측정하였다. Phytase의 열 안정성을 측정하기 위해서, 30°C에서 80°C까지 각각의 온도에서 1시간 열처리 한 후, 그 잔존 활성을 50°C에서 측정하였다.

pH의 영향

B. coagulans IDCC 1201가 생산하는 phytase 활성에 미치는 최적 pH를 결정하기 위해, pH 3.0에서 pH 10.0까지 각각의 pH 에서 기질과 효소 혼합액을 반응시킨 후, 활성을 측정하였다. Phytase의 pH 안정성을 측정하기 위해서, 각각 다른 pH buffer에 1시간 반응시킨 후, 그 잔존 활성을 나타내었으며, 사용한 buffers는 다음과 같다: 0.1 M citric acid-NaOH buffer(pH 2-3), 0.1 M sodium acetate buffer(pH 4-5), 0.1 M phosphate buffer(pH 6~7), 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8-9).

Metal ions과 inhibitors의 영향

B. coagulans IDCC 1201가 생산하는 phytase에 대한 metal ions의 영향을 조사하기 위하여, 각각의 metal ion에 대해서 phytase 효소를 45°C, 1시간 반응시킨 후, 효소 활성을 측정하여 metal ion을 첨가하지 않은 군과 비교 백분율로 나타내었다. Inhibitors에 대해서는 *B. coagulans*의 phytase 효소를 45°C, 1시간 동안 각각의 inhibitor처리를 한 후, 효소 활성을 측정하여 inhibitor를 처리하지 않은 군과 비교 백분율로 나타내었다. *B. coagulans*가 생산하는 phytase가 Co^{2+} 를 cofactor로 사용하는 metalloenzyme임을 규명하기 위해, inhibitors에 작용을 하는 EDTA, EGTA, o-phenanthroline을 1 mM과 5 mM씩 각각 1시간 처리하여, apoenzyme으로 전환하여 다시 동일 농도의 $CoCl_2$ 를 가하여, 상대활성을 측정하였다.

Co^{2+} ion이 열 안정성에 미치는 영향

Co^{2+} ion이 *B. coagulans* IDCC 1201이 생산하는 phytase의 열 안정성에 미치는 영향을 조사하기 위해, 60°C에서 80°C까지 각각의 시간대 별로 효소를 열처리 한 후, 기질과 반응시킨 후, 잔류 활성을 측정하였다[8].

기질 특이성

Phosphate ester groups을 가진 서로 다른 기질을 포함한 0.1 M sodium acetate-acetic acid buffer(pH 5.0) 200 μ l를 첨가한 반응액을 실험군과 대조군으로 나누어 phytase

효소액 100 μ l를 첨가하여 혼합한 후, 50°C에서 2시간 반응시킨 후, 25%(w/v) trichloroacetic acid(TCA) 용액 50 μ l를 첨가하여 반응을 종료시킨다. 유리된 무기인을 ammonium molybdovanadate method에 의해 spectrophotometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 상대활성을 비교하였다.

Phytase 유전자의 염기서열 결정

Phytase 유전자를 증폭하기 위하여 *B. subtilis* 168 균주의 complete genome 염기서열(GenBank accession no. Z99114) 중 각각 135625-135642와 134373-134389위치에 상보적으로 제작한 forward primer IDPCF2-F(5'-CTCACGGTA-ATCACCTGT-3')와 reverse primer IDPCF2-R(5'-AGCTGCAACAAGCTGCTT-3')를 사용하였다. PCR 반응을 위하여 template DNA는 0.1 μ g 이하로, 각각의 primer는 50 pmol 농도로 첨가하였고, 0.5 mM의 dNTP와 1.5 U의 *Taq* polymerase(SuperBio, Suwon, Korea)를 첨가 후 PTC-0200 DNA Engine(MJ Research, Waltham, MA)을 사용하였다. 온도조건은 96°C에서 5분간 예열한 다음, 94°C에서 20초, 57°C에서 40초, 72°C에서 30초 과정을 40회 반복한 다음 마지막으로 72°C에서 5분간 유지 후 반응이 종료되도록 설정하였다.

증폭된 단편은 전기영동 한 다음, 0.8% agarose gel에서 회수하여 pGEM-T Easy vector(Promega Corporation, Madison, WI)에 cloning한 후, ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer Inc., Wellesley, MA)을 사용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 미국 NCBI의 BLAST 검색방법(tblastp)을 사용하여 기존에 등록된 다양한 phytase 아미노산서열과 비교하였다.

결과 및 고찰

Paper disc법에 의한 phytase screening

선별균주에 대하여 PIM배지에서 paper disc법에 의한 phytic acid 분해능을 조사하였다. 따라서 이 균주를 최종 선별 균주로 확정하였다. 이 균주는 *B. coagulans* IDCC 1201로 국내에서 probiotics로 사용되고 있으며, 내열성, 내산성이 강하고, 장정착성이 우수하여 혈중 cholesterol 저하 및 면역증강의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[11, 16, 22]. 현재까지 *B. coagulans*로부터 phytase를 생산한다는 사실은 학계에 미보고된 상태이다.

온도의 영향

B. coagulans IDCC 1201 phytase의 활성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이, 50°C에서 최대 활성을 나타내었다. 또한 phytase의 열에 대한 안정

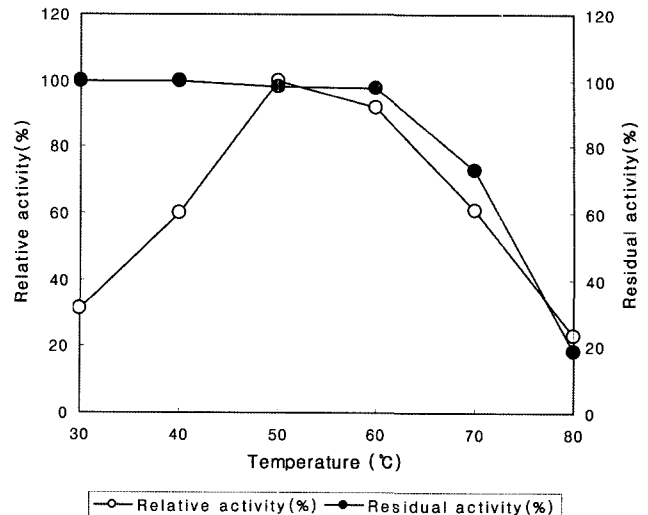


Fig. 1. Effects of temperature on the activity and stability of phytase from *B. coagulans* IDCC 1201. The enzyme activities were measured at different temperatures. The residual activities were measured after the enzymes were incubated at each temperature for 1 hr.

성을 검토한 결과 70°C까지 열에 대한 안정성이 유지된 반면, 그 이상의 온도에서는 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 포자 형성균이 일반적으로 높은 온도에서도 잘 성장하는 점이 효소 활성에도 반영된 결과라 판단된다. 현재까지 보고된 phytase의 최적 온도는 *Enterobacter* sp.[13]가 50~60°C, *Bacillus subtilis*(natto) N-77[23]가 60°C, 그리고 fungal phytase[21]가 58°C였다.

pH의 영향

B. coagulans IDCC 1201이 생산하는 phytase의 활성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과는 Fig. 2과 같이 pH 4.0에서 최대활성을 나타내었다. 이러한 결과는 phytase가 산성에서 작용하는 acid phosphatase의 일종으로 API ZYM kit의 결과와 일치하며, 일반적으로 *Bacillus* sp.의 미생물들이 생산하는 phytase가 alkaline phytase라는 점에서 상이한 결과였다. 선행연구에 있어, *Bacillus* sp. 계열의 phytase가 최적 pH가 6.0~7.5라는 점에서 상이한 결과를 나타내며, *Escherichia coli* phytase[4, 5]와 *Aspergillus* sp. phytase[3, 7, 12, 17-20]가 pH 4.0~5.0의 산성영역에서 최적치를 갖는다는 점과 유사하였다. 이는 일반 Bacilli phytase와는 달리, *E. coli*, *Aspergillus* sp.이 생산하는 acid phytase와 유사한 특성을 나타내었다. *B. coagulans* IDCC 1201이 생산하는 phytase의 pH의 안정성은 각각 다른 pH buffer에 1시간 반응시킨 후, 그 잔존 활성을 나타내었으며, Fig. 2에서 보는 바와 같이 pH 3.0~5.0 구간에서는 80% 이상의 잔존 활성도를 나타내었다. pH 6.0부터는 감소하여, pH 7.0에서 50%까지 떨어진 후, pH 8.0~9.0에서 60%까지 상승하는 결과를 나타내었다. 이는 산성 pH 범위에서는 높은 안정성을 보이고,

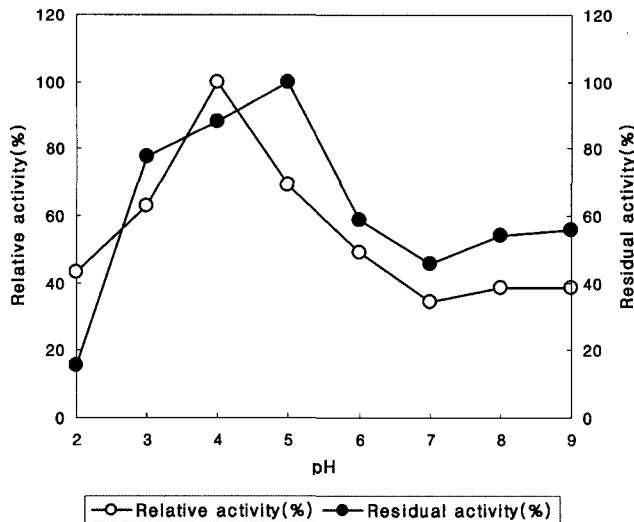


Fig. 2. Activity and stability of the phytase from *B. coagulans* IDCC 1201 at various pHs. The enzyme activities were measured at various pHs: 0.1 M citric acid-NaOH buffer (pH 2~3), 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4~5), 0.1 M phosphate buffer (pH 6~7), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8~9).

알칼리 pH 범위에서도 약 50%의 안정성을 보이는 것으로 *B. coagulans*가 probiotics로 사용시, 내산성과 내담즙산성에 있어서의 균체 생존율이 우수한 결과가 생산 효소에서 그대로 반영된 것으로 사료된다. 이러한 pH 안정성은 사료첨가제로 사용시, 각각의 소화관에서의 pH 변화에 높은 안정성을 보일 수 있는 것으로 사료된다.

Metal ions과 inhibitors의 영향

B. coagulans IDCC 1201이 생산하는 phytase에 대한 metal ions의 영향은 Table 1과 같다. 1 mM 처리시에, Co^{2+} 에서 1.5배 상대활성이 증가되었으며, 5 mM 처리시에는 약 2배의 상대활성이 증가되었다. 반면, Cu^{2+} 는 1 mM 처리시, 약 40%의 활성이 감소하는 저해효과를 나타내었다. 이와같

Table 1. Effect of metal ions on the activity of phytase from *B. coagulans* IDCC 1201.

Metal	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100.0	100.0
KCl	113.2	86.3
BaCl ₂	110.7	88.2
CaCl ₂	120.2	104.9
CoCl ₂	158.0	214.0
CuCl ₂	63.3	78.1
FeCl ₂	100.2	103.7
MgCl ₂	120.7	135.2
MnCl ₂	116.9	140.1
ZnCl ₂	119.2	126.7

Table 2. Effect of inhibitors on the phytase activity from *B. coagulans* IDCC 1201.

Inhibitors	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100.0	100.0
EDTA	40.7	38.1
EGTA	85.0	76.1
<i>o</i> -Phenanthroline	84.7	73.0
PMSF	133.7	111.1

Table 3. Effect of Co^{2+} ion on the reactivation of inhibited phytase from *B. coagulans* IDCC 1201.

Inhibitors	Restored enzyme activity (%)	
	1 mM $CoCl_2$	5 mM $CoCl_2$
EDTA	55.1	98.7
EGTA	22.8	41.5
<i>o</i> -Phenanthroline	18.2	26.6

은 결과는 *Aspergillus* sp.에서 생산되는 acid phytase가 Co^{2+} 를 중심원소로 갖는 metalloenzyme이라는 점에서 일치하는 결과이며 또한 Cu^{2+} 가 활성 저해금속이온이라는 점에서도 동일한 결과를 나타냈다. *Bacillus* sp.에서 생산되는 alkaline phytase가 Ca^{2+} 를 activator로 이용한다는 점에서 상이한 결과이다[9].

Inhibitors에 대해서는 Table 2에서 보는 바와 같이, EDTA 1 mM, 5 mM 처리할 때 약 60% 정도 상대활성이 감소하였으며, EGTA와 *o*-phenanthroline 처리시에도 약 20~30% 정도 상대활성이 감소하였다. 그러나, serine protease inhibitor인 PMSF에서는 저해효과를 보이지 않았다. *B. coagulans* IDCC 1201이 생산하는 phytase가 Co^{2+} 를 cofactor로 사용하는 metalloenzyme임을 규명한 결과, Table 3에서와 같이, 1 mM, 5 mM EDTA 처리한 군에서 각각 55%, 98%의 상대활성을 부분적으로 회복하였다. 이러한 결과는 *B. coagulans* IDCC 1201 phytase가 Co^{2+} 를 cofactor로서 요구하는 metalloenzyme임을 밝혀주는 결과로 *Bacillus* sp.에 속하는 미생물이지만, 생리적인 특성으로는 *Aspergillus* sp.이 생산하는 phytase와 매우 근접한 유사성을 보여주었다.

Co^{2+} ion이 열 안정성에 미치는 영향

Co^{2+} ion이 *B. coagulans* IDCC 1201이 생산하는 phytase의 열 안정성에 미치는 영향을 조사한 결과, Fig. 3A에서 보는 바와 같이, 60-65°C까지는 50% 이상의 효소활성을 유지한 반면, 75-80°C 구간에서는 급격한 열변성으로 인하여, 효소활성을 유지하지 못했다. 이와는 대조적으로 Fig. 3B에서와 같이, 5 mM 농도의 Co^{2+} ion을 1시간 처리한 phytase군에서는 70°C까지 약 50% 이상의 효소활성을 유지하였으며,

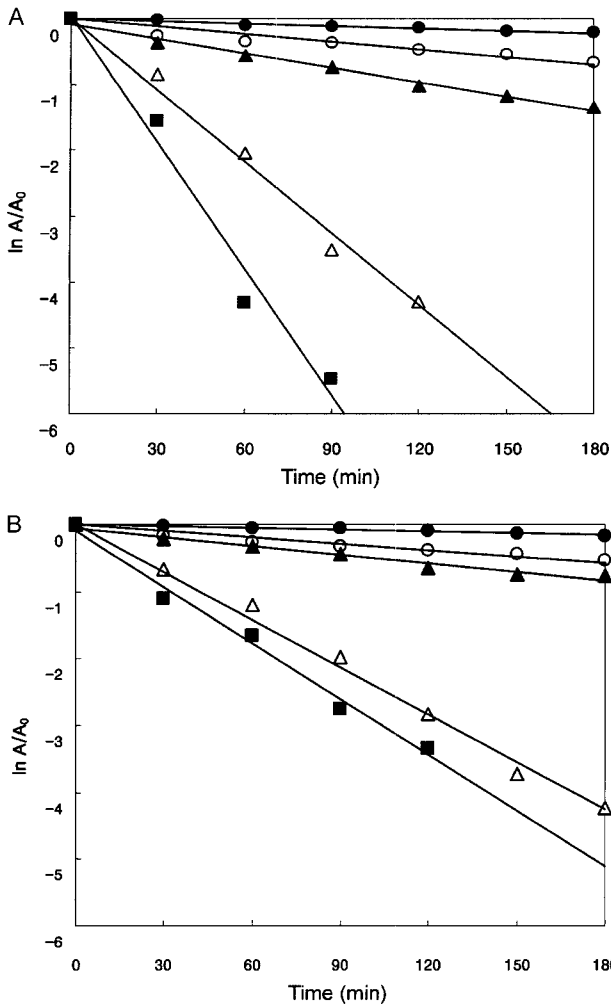


Fig. 3. Thermostability of phytase from *B. coagulans* IDCC 1201. ●, 60°C; ○, 65°C; ▲, 70°C; △, 75°C; ■, 80°C. A: without 5 mM Co²⁺ ion, B: with 5 mM Co²⁺ ion. Isothermal inactivation of phytase can be described by a first-order kinetic model. The integral effect of the inactivation process at constant temperature, assuming the inactivation rate constant independent of time, is given in Eq.; $\ln(A/A_0) = -kt$.

80°C에서 1시간 처리한 구간에서도 약 25%의 잔존 활성을 유지하였다. 이같은 결과는 Co²⁺ ion이 효소활성 및 열에 대한 안정성에 있어서 중요한 인자임을 보여주었다.

기질 특이성

여러가지 phosphate esters 기를 가진 기질에 대한 효소 활성을 조사한 결과, Table 4과 같다. *B. coagulans* IDCC 1201 phytase는 Na-phytate에서 가장 높은 활성을 나타냈으며, pNPP에서도 90% 이상의 상대활성을 나타내었다. 이러한 결과는 *B. coagulans* IDCC 1201 phytase가 acid phosphatase군에 속하는 phytase임을 확인시켜 주었다.

Table 4. Substrate specificity of the phytase from *B. coagulans* IDCC 1201.

Substrates	Relative activity(%)
Sodium phytate	100.0
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	91.0
D-Fructose-6-phosphate	2.8
D-Glucose-6-phosphate	1.1
O-Phospho-L-serine	0

Phytase 유전자 염기서열 분석

B. coagulans IDCC 1201 균주로부터 실제 phytase의 존재 여부를 확인하기 위하여 *Bacillus* 속에서 등록된 15종의 phytase gene(AF006665, AF029053, AF292103, AF298179, AF453255, AF469936, AJ277890, AJ584664, AY055220, AY220075, AY518208, AY651979, AY836773, BD062759, U85968)을 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)로부터 얻고 Clustal X를 이용하여 계통유전학적으로 분류한 결과, *B. subtilis* 및 *B. amyloliquefaciens* 유래의 *phyC*, *B. licheniformis* 유래의 *phyL*, 그리고 *B. subtilis* 168 유래의 *phyA* 등 3종류로 분류됨을 알 수 있었다(data not shown). 각각을 증폭할 수 있는 primer를 제작하여 PCR 반응을 수행하여 *phy* 유전자에 상보적인 primer에 특이적으로 증폭되는 1,237 bp 길이의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열(DQ346195)은 NCBI의 translated query들에 대한 BLAST 검색방법(blastx)을 사용하여 기존에 등록된 다양한 phytase 아미노산 서열과 비교한 결과, *B. subtilis* 168 유래의 phytase precursor 서열(CAP13871)과 99%의 상동성을, *B. amyloliquefaciens*와 *B. licheniformis* 유래의 서열들(AAA87722, AAM74021)과 각각 73, 72%의 상동성을 나타내었다. 본 서열은 *B. subtilis*의 *phyA*과 3개의 amino acid 서열(P4→S, N147→K, K291→E)에서만 차이를 보인다 [25]. 이러한 서열의 유사성을 감안할 때, *B. coagulans* IDCC 1201 유래의 phytase는 *B. subtilis* 168 유래의 enzyme과 유사한 특성을 보일 것으로 예상되었다. 실제로 168*phyA*에 암호화 되어있는 phytase는 적정 온도는 50~60°C로 *B. coagulans* IDCC 1201 유래의 것과 유사한 범위에 속하였으나, 적정 pH 범위는 각각 5.0~6.5와 4.0~5.0으로 다소간 차이를 보였다. 이러한 차이는 *B. coagulans* IDCC 1201 유래의 phytase의 서열이 polar 하거나 상대적으로 charge가 약한 amino acid로 대체된 결과로 생각된다. 또한 signal peptide에서의 두 균주간 서열 차이는 enzyme의 distribution 및 pI 등에도 차이를 미칠 것으로 예상된다. 앞선 결과들을 종합할 때, *B. coagulans* IDCC 1201 선별주의 phytase 활성은 기존 보고된 enzyme들과 차이를 나타내므로, 이 균주로부터 phytase를 순수 분리하여 실질적인 특성을 분자생물학적으로 규명하고 이를 기존에 보고된 것들과의 비교가 필요하다.

요 약

현재 probiotics로 상업화되어 있는 *B. coagulans* IDCC 1201(상업용 명칭: *Lactobacillus sporogenes*)이 acid phytase 및 Co^{2+} 를 cofactor로 갖는 metalloenzyme 특성을 가진 phytase를 생산하고, cofactor로 사용되는 Co^{2+} ion이 *B. coagulans* IDCC 1201 유래 phytase의 열 안정성에 기여하였다. 또한 *B. coagulans* IDCC 1201의 phytase 유전자 서열을 분석한 결과 *B. subtilis* 168 유래의 enzyme 서열과 높은 상동성을 나타내었다. 본 연구결과를 토대로 *B. coagulans* IDCC 1201이 장내 균총의 정상화를 가져와, 질병 예방과 면역력 향상을 구현함과 동시에 가축이 곡물에 함유된 phytic acid의 섭취로 인한 항영양인자, 환경오염등의 문제점을 해결할 수 있는 사료 첨가제로써의 산업적 효용가치가 풍부할 것으로 전망된다.

REFERENCES

1. Angelis, M., G. Gallo, M. Rosaria, P. McSweeney, M. Faccia, M. Giovine, and M. Gobetti. 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int. J. Food Microbiol.* **87**: 259-270.
2. Bae, H. D., L. J. Yanke, K. J. Cheng, and L. B. Selinger. 1999. A novel staining method for detecting phytase activity. *J. Microbiol. Methods.* **39**: 17-22.
3. Choi, J. M., D. S. Kim, M. S. Yang, H. R. Kim, and J. H. Kim. 2001. Expression of the *Aspergillus niger* var. *awamori* phytase gene in *Pichia pastoris*, and comparison of biological properties. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 1066-1070.
4. Choi, W. C., B. C. Oh, H. K. Kim, and E. S. Lee. 2002. Medium optimization for phytase production by recombinant *Escherichia coli* using statical experimental design. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 490-496.
5. Choi, W. C., B. C. Oh, H. K. Kim, S. C. Kang, and T. K. Oh. 2002. Characterization and cloning of a phytase from *Escherichia coli* WC7. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 1-7.
6. Choi, Y. M., D. O. Noh, S. H. Cho, H. K. Lee, H. J. Suh, and S. H. Chung. 1999. Isolation of a phytase-producing *Bacillus* sp. KHU-10 and its phytase production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 223-226.
7. Dvorakova, J., O. Volfova, and J. Kopecky. 1997. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* **42**: 349-352.
8. Gong, N., C. Chen, L. Xie, and H. Chen. 2005. Characterization of a thermostable alkaline phosphatase from a novel species *Thermus yunnanensis* sp. nov. and investigation of its cobalt activation at high temperature. *Biochim. Biophys. Acta* **1750**: 103-111.
9. Kerovu, J., I. Lappalainen, and T. Reinikainen. 2000. The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**: 365-369.
10. Kim, D. H., B. C. Oh, W. C. Choi, J. K. Lee, and T. K. Oh. 1999. Enzymatic evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* phytase as a feed additive. *Biotechnol. Lett.* **21**: 925-927.
11. Kim, H. S., S. S. Choi, E. C. Choi, B. K. Kim, J. C. Lee, and T. H. Kim. 1989. Development of *Lactobacillus sporogenes* resistant to rifampicin, an antituberculosis agent. *Kor. J. Microbiol.* **27**: 155-161.
12. Kim, K. H., H. S. Yang, Y. J. Choi, and H. C. Yang. 1982. Studies on the conditions of extracellular phytase production by *Aspergillus niger*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 133-144.
13. Kim, Y. H., S. Y. Yang, D. Y. Kim, C. W. Kim, W. H. Jung, M. N. Gwon, and M. D. Song. 2001. Isolation of *Enterobacter cloacae* producing phytase and medium optimization of its production. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 78-83.
14. Kim, Y. O., J. K. Lee, H. K. Kim, J. H. Yu, and T. K. Oh. 1998. Cloning of the thermostable phytase gene(phy) from *Bacillus* sp. DS 11 and its over-expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**: 185-191.
15. Kim, Y. O., J. K. Lee, B. C. Oh, and T. K. Oh. 1999. High-level expression of a recombinant thermostable phytase in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 2205-2207.
16. Mohan, J. C., R. Arora, and M. Khalilullah. 1990. Short term hypolipidemic effects of oral *Lactobacillus sporogenes* therapy in patients with primary dyslipidemias. *Indian Heart J.* **42**: 361-364.
17. Nagashima, T., T. Tange, and H. Anazawa. 1999. Dephosphorylation of phytate by using the *Aspergillus niger* phytase with a high affinity for phytate. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4682-4684.
18. Nair, V.C., J. Laflamme, and Z. Uvnjak. 1991. Production of phytase by *Aspergillus ficuum* and reduction of phytic acid content in canolameal. *J. Sci. Food Agric.* **54**: 355-365.
19. Panchal, T. and R. J. Wodzinski. 1998. Comparison of glycosylation patterns of phytase from *Aspergillus niger* (*A. ficuum*) NRRL3135 and recombinant phytase. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **28**: 201-217.
20. Papagianni, M., S. E. Nokes, and K. Filer. 2000. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem.* **35**: 397-402.
21. Pasamontes, L., M. Haiker, M. Wyss, M. Tessier, and A. P. G. M. VanLoon. 1997. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1696-1700.
22. Seok, E. K., T. H. Kim, J. C. Lee, P. K. Chung, and K. K. Lee. 1987. Lowering of serum cholesterol by *Lactobacillus sporogenes*. *Yakhak Hoeji.* **31**: 302-307.
23. Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (Natto) n-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 1266-1269.
24. Tanner, J. T. and S. A. Barnett. 1986. Methods of analysis for

- infant formula : Food and drug administration and infant formula council collaborative study, phase III. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **69**: 777-785.
25. Tye, A. J., F. K. Y. Siu, T. Y. C. Leung, and B. L. Lim. 2002. Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 190-197.
26. Wodzinski, R. J. and A.H. Ullah. 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**: 263-302.

(Received Jan. 18, 2006/Accepted Feb. 24, 2006)