

*Bacillus subtilis*가 생산하는 Phytase의 정제 및 특성

고현정 · 추인호 · 정건섭*
연세대학교 생물자원공학과

Purification and Characterization of Phytase from *Bacillus subtilis*. Koh, Hyun Jung, In Ho Chu, and Kun Sub Chung*. Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea - A bacterial strain producing high level of a phytase was isolated from cattle feces and identified as *Bacillus subtilis*, and designated as *Bacillus* sp. CF 5-26. The production of the phytase from *Bacillus* sp. CF 5-26 reached the highest level after 72 hours at 37°C. The optimum condition of the media for the production of phytase was 10% rice bran extract, 0.1% whey protein powder, 0.01% CaCl₂, 0.01% KH₂PO₄. The phytase was purified 20.3 folds with ethanol precipitation, Sephadex G-100, CM Sepharose CL-6B and Sephacryl S-100-HR column chromatography. The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 66 kDa on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The purified phytase activity was stable up pH 5.0, 7.0, 11.0 and the remaining activity was 50% when it was treated at 100°C for 1 hour. The substrate specificity of phytase was most active against sodium phytate and inositol polyphosphate compound. And the phytase hydrolysed tri-polyphosphate and pyrophosphate a little. The Km value for the sodium phytate was 0.64 mM and the Vmax value was 4.41 μmol/min.

Key words: Phytate, *Bacillus subtilis*, phytase

환경오염에 대한 관심이 높아지면서 오염 문제 해결을 위한 여러 방안이 모색되는 가운데 축산폐수로 인한 환경 및 수질오염의 문제도 심각히 대두되고 있다. 특히 수질 내 인의 축적은 조류와 플랑크톤 등 미생물의 과다성장을 유발하여 수질 부영양화(eutrophication)의 원인이 되고 있다. 인은 생체 내 구성물질 중 nucleic acid, coenzyme, phospho-protein, phospho-lipid와 같은 중요한 성분으로 동물에 필수적인 영양소이다. 동물의 사료성분 중에는 유기인이 존재하는데 이것을 동물은 완전히 이용하지 못하고 20~30% 정도의 유기인만을 이용하고 나머지는 배설하기 때문에 환경오염의 주원인이 될 뿐만 아니라 낮은 인 이용률 때문에 사료 내 값비싼 무기인을 첨가해야 하는 문제점이 부각되고 있다. 대부분의 배합사료는 주로 식물성 곡류나 그 부산물 및 박류로 이루어지는데 식물성 사료에 함유된 인은 70% 정도가 phytate 형태로 존재하고 있으며, 단위동물(monogastric animal)은 이를 가수분해시키는 효소인 phytase를 갖고있지 않아 인을 효율적으로 이용할 수 없다는 데에 그 문제점이 있다. 이러한 이유로 phytate는 가축을 집약적으로 사육하는 한국, 일본, 네덜란드 등의 나라에서 인 오염의 주원인으로 작용하고 있다. 반추동물의 경우는 이러한 phytate를 inositol과 무기인으로 전환시키는 phytase가 반추위에 서식하는 여

러 종의 미생물들에 의해 분비되어 존재하므로 인 성분을 따로 공급할 필요가 없으나, 단위동물에는 이 효소가 존재하지 않아 동물들의 성장에 필수적인 인 성분을 반드시 공급해야 한다[13]. 또한, phytate는 칼슘, 마그네슘, 아연 등의 여러 금속이온과 chelate를 형성하므로 이들 금속이온을 동물들이 이용할 수 없도록 하는 항영양성 인자(antinutritional factor)로 작용하며 각종 단백질 및 중요 무기물이 체내에서 이용되는 것을 방해한다[3,4]. 그러므로 phytase가 사료에 첨가되면 phytate를 inositol과 무기인으로 가수분해시켜 동물이 이용할 수 있는 무기인의 형태로 전환시킬 뿐 아니라 여러 무기물의 이용률을 증가시킬 수 있다.

Phytase(myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.8)는 phytate로부터 단계적으로 무기인을 유리하는 효소로서 Suzuki 등[17]에 의해 최초로 발견되었다. 그들은 phytic acid가 inositol과 무기인으로 분해되는 것을 촉매하는 효소가 rice bran에 존재한다는 사실을 밝혔다. Phytate는 phytase에 의해 무기인과 penta-, tetra-, tri-, di-, mono-phosphate inositol 등의 중간물질 및 free myo-inositol로 분해된다[11].

Phytase는 식물과 미생물뿐 아니라 동물조직 등에 널리 분포하고 있는데 주로 식물 유래 phytase가 연구되었으며, *Aspergillus*와 같은 곰팡이[18, 19] 및 효모[2, 7], 세균[8, 12, 15] 등의 phytase에 대해서도 연구가 계속되고 있다. 세균 유래 phytase는 *Bacillus subtilis*[12], *B. subtilis*(natto) N-77[15], *B. amyloliquefaciens* DS11[8], *Escherichia coli*

*Corresponding author

Tel: 82-33-760-2252, Fax: 82-33-760-2186

E-mail: kschung@yonsei.ac.kr

[6], *Enterobacter* sp.4[21]와 *Selenomonas ruminantium* [20] 등이 생산하는 것으로 보고되고 있다. 이들 세균 유래 phytase는 최적 pH가 중성에서 알칼리이며 최적 활성온도는 60°C 이상이며 안정성도 높아 사료 가공 시 활성유지가 용이한 큰 장점을 가지고 있다.

본 연구는 자연계의 미생물로부터 phytase 활성이 뛰어난 균주를 분리하고, 분리미생물이 생산하는 phytase를 정제하여 효소 단백질의 물리 화학적 성질을 연구하였다.

재료 및 방법

Phytase 생산 균주의 분리

Phytase 활성이 있는 균주를 탐색하기 위하여 소의 장내 용물, 분변 등에서 얻은 시료를 5 ml의 생리 식염수에 현탁하고 70°C에서 1시간 동안 방치한 다음 상층액 0.1 ml을 1.5 % (w/v) agar를 함유한 phytase screening 배지(Glucose 30 g/L, Sodium phytate 1 g/L, Tryptone 1 g/L, CaCl₂ 0.3 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L, MnCl₂ · 4H₂O 0.04 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.0025 g/L, Agar 15 g/L)에 도말한 후, 37°C에서 3일간 배양하여 투명환이 생기는 균주를 1차 선별하였다. 이때, 투명환은 Bae 등[1]의 방법으로 2% (w/v) CoCl₂ 용액을 붓고 30분 동안 방치한 다음 6.25% (w/v) (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.42% (w/v) NH₄VO₃ 용액을 다시 첨가하여 산에 의한 투명환 생성 균주는 배제하였다. 1차 선별한 균주들은 phytase screening 액체배지(PSL 배지)에 배양한 후 sodium phytate를 기질로 하여 효소 활성을 측정하여 효소 활성이 가장 높은 1균주를 최종적으로 선별하였다.

균주의 동정

분리 선별한 균의 동정은 Gram 염색, catalase 반응시험, spore 형성유무, 운동성 시험을 수행하였다. 당 이용성 조사를 위하여 API 50 CHB kit(bioMerieux Co., France)를 사용하였으며, 보다 더 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene sequencing 분석을 통하여 동정하였다.

Phytase 활성 측정

Phytase 활성은 Fiske 등[5]의 방법에 따라 유리된 inorganic phosphate의 양을 측정하였다. 150 μl의 효소용액과 0.2 % (w/v) sodium phytate를 함유한 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 600 μl를 37°C에서 10분간 반응시킨 후 750 μl의 5% (w/v) TCA 용액을 첨가하여 반응을 정지시키고 750 μl의 발색시약을 첨가한 다음 37°C에서 30분간 반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 효소용액 대신 활성측정 buffer를 첨가하여 상기와 동일한 조건하에서 활성을 측정하였다. 발색시약은 1.5% (w/v) (NH₄)₆Mo₇O₂₄를 함유한 5.5% (v/v) H₂SO₄와 2.7% (w/v) FeSO₄ · 7H₂O 용액을 4 : 1(v:v)로 혼합하여 이용하였다. 이때 유리된 무기인산을

정량하기 위하여 KH₂PO₄(M.W. 136.09)를 standard로 사용하여 농도별 용액을 만든 후 발색시약으로 발색시켜 700 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 효소 활성 1 unit은 상기 조건하에서 1분 동안 1 μmol의 Pi를 유리하는 효소량으로 나타내었으며, specific activity는 단백질 mg 당 효소활성 unit으로 나타내었다.

단백질 함량 측정

단백질 함량은 Lowry법[10]을 이용하여 분석하였다. Sigma사의 protein assay kit(690-A)을 사용하여 bovine serum albumin을 표준시료로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Column chromatography를 행할 때에는 단백질 농도를 280 nm에서의 흡광도로 표시하였다.

효소생산을 위한 분리 균주의 배양조건 검토

기본 배지로 0.1% tryptone, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.004 % MnCl₂ · 4H₂O, 0.00025% FeSO₄ · 7H₂O, 0.03% CaCl₂, 0.1% sodium phytate로 고정하고 xylose, glucose, maltose, starch, wheat bran extract, rice bran extract 등의 탄소원들을 각각 3% (w/v)씩 첨가하여 효소 생산정도를 비교하였다. 질소원의 영향을 알아보기 위하여 질소원이 제거된 기본배지에 고정된 탄소원을 최적 농도로 첨가하고 whey protein powder, casein, ammonium sulfate, yeast extract를 각각 0.1% (w/v)씩 첨가하여 효소 생산정도를 비교하였다. 무기염류의 영향은 고정된 탄소원과 질소원이 최적 농도로 첨가되고 0.1% sodium phytate를 포함하는 배지에 무기염류가 완전히 제거된 배지와 CaCl₂가 농도별로 첨가된 배지에서 효소 생산정도를 비교하였다. Phytase 생산에 미치는 무기인의 영향은 배지 내 인 공급원인 sodium phytate 대신 inorganic phosphate(KH₂PO₄)를 농도별로 첨가하여 활성을 비교하였다.

Phytase의 정제

Phytase 생산 균주의 진탕배양한 배양액을 10,000 g에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 4°C에서 cold ethanol을 상층액의 3배 부피만큼 첨가하여 2시간 방치한 후 10,000 g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 20 mM sodium acetate buffer(pH 5.5)를 첨가하여 침전물을 paste 상태로 만들어 원심분리한 후 buffer에 녹지않는 물질을 제거한 상층액을 조효소액으로 사용하였다. Gel chromatography는 Sephadex G-100(Sigma G-100-120) 수지를 사용하였으며, 20 mM sodium acetate buffer(pH 5.5)로 용출하였다. 이온교환 chromatography는 CM Sepharose CL-6B(Sigma CCL-6B-100)를 사용하였으며, 용출 완충액은 20 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 NaCl을 0~0.25 M 농도 구배로 첨가하여 사용하였다. Gel rechromatography에는 Sephacryl S-100-HR gel(Sigma S-100-HR)을

사용하였다. 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 평형화시키고 동일 buffer로 용출시켰다. 1차 Sephacryl S-100-HR rechromatography의 활성분획을 모아 동결건조 시킨 후 2차 rechromatography를 실시하였다.

SDS-PAGE에 의한 분자량 측정

정제된 효소를 13% SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동을 한 후, 표준단백질과의 이동속도를 비교하여 분자량을 계산하였다. SDS-PAGE는 Laemmli 등[9]의 방법에 따라 조제하였으며, 이때 사용한 표준단백질은 myosin(M.W. 205,000), galactosidase(M.W.116,000), phosphorylase(M.W. 97,000), fructose-6-phosphatekinase(M.W.84,000), albumin (M.W.66,000), glutamic dehydrogenase(M.W.55,000), ovalbumin(M.W.45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(M.W.36,000) 이었다.

pH 및 온도에 대한 안정성

효소에 대한 pH의 영향을 알아보기 위해 조효소액과 정제된 효소액 각각 10 μ l에 각 pH별 용액(pH 2.0, 5.0, 7.0, 11.0)을 각각 190 μ l씩 가하여 30°C에서 12시간 방치한 후 잔존효소활성을 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0)를 사용하여 37°C에서 10분간 반응시켜 측정하였다.

효소에 대한 온도의 영향은 30, 60, 100, 121°C에서 실시하였다. 온도 안정성은 조효소액과 정제된 효소액을 각 온도에서 1시간 방치하였고, 121°C에서는 15분간 처리한 후 급냉하고 잔존효소 활성을 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0)를 사용하여 37°C에서 10분간 반응시켜 측정하였다.

효소의 기질 특이성

효소의 기질 특이성을 알아보기 위해 phosphate ester 결합을 하고 있는 adenosine monophosphate, adenosine diphosphate, adenosine triphosphate, α -glycerophosphate, β -glycerophosphate, α -naphthyl phosphate, *p*-nitrophenyl phosphate, pyrophosphate, tripolyphosphate, sodium phytate 등의 기질을 2 mM 농도로 사용하여 효소 활성은 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 37°C에서 10분간 반응시켜 측정하였다.

효소의 Km 및 Vmax 측정

Sodium phytate에 대한 기질 친화력을 측정하기 위해 농도별 기질 용액의 반응정도를 측정후 $1/[S]$ 에 대해 $1/v$ 를 plot하는 방법인 Lineweaver-Burk 역수 plot에 의하여 Km 값과 Vmax 값을 계산하였다. 이때, 각 기질 농도에서의 phytase 효소활성 측정을 위하여 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0)를 사용하였고, 37°C에서 10분간 반응시켰다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

소의 분변에서 분리한 CF 5-26은 Gram 양성, 간균이며, catalase 양성을 보였고, spore를 형성하며, 운동성을 갖는 전형적인 *Bacillus*속 균주로, 분리균주의 당이용성 검토를 위하여 API 50 CHB kit test를 실시한 결과 *Bacillus circulans*와 99.7%의 identify를 보였다.

보다 더 정확한 동정을 위하여 16S rRNA 분석을 실시한 결과, 분리균주는 *Bacillus subtilis*와 99% 이상의 높은 상동성을 보여 API test와는 다른 결과를 보였다. 따라서 본 실험에 사용한 분리 균주를 *Bacillus* sp. CF 5-26이라 명명하였다.

분리 균주의 생육곡선 및 배양조건 검토

Phytase 생산 균주의 배양시간에 따른 균체의 생육 및 효소 생산 정도를 경시적으로 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 균체의 생육은 48시간부터 정지기에 들어갔으며 효소의 생산은 72시간 이후에 최대 활성을 나타내었다. *B. subtilis*[12]는 72시간 배양 후에 phytase 최대활성을 나타낸다고 보고되었으며, *B. subtilis*(natto) N-77[15]은 5일 배양 후 효소 활성이 최대에 도달한 것으로 보아 *Bacillus* sp.가 생산하는 phytase는 균체생육이 정지기에 도달된 이후에 phytase 활성이 최대가 되는 것을 알 수 있다. 그러나 *B. amyloliquefaciens* DS11[8]의 phytase 활성은 대수증식기 후기인 23시간에 최대 활성을 나타낸다고 보고되었다.

Phytase 생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토한 결과, rice bran extract가 3%(w/v) 첨가되었을 때 최대활성을 나타내었다. *B. subtilis*[12]와 *B. amyloliquefaciens* DS11[8]이 생산하는 phytase의 경우, wheat bran이 phytase 생성을 유도한다고 보고한바 있다. 이는 rice bran과 wheat bran에 존재하는 phytate가 배지에 첨가되므로 미생물의 phytase 생산을

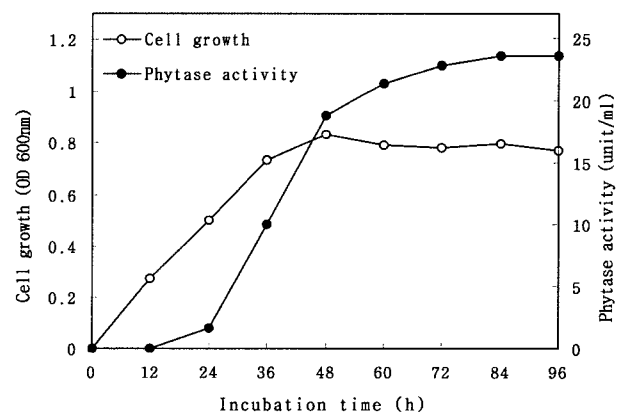


Fig. 1. Time course of growth and phytase production from *Bacillus* sp. CF 5-26. Agitation, 150 rpm; culture temperature, 37°C.

유도하는 것으로 추측된다. 최적 탄소원인 rice bran extract의 농도를 변화시키면서 효소 생산을 검토한 결과 10% 첨가 시 최대의 phytase 생산을 보여 이후 실험에서는 탄소원으로 rice bran extract를 10% 첨가하였다.

Phytase 생산에 미치는 질소원의 영향을 검토하기 위하여 10% rice bran extract를 첨가하고 질소원을 달리하여 효소 생산정도를 비교한 결과, 0.1% whey protein powder 첨가 시 가장 높은 활성을 보였다.

탄소원으로 10% rice bran extract, 질소원으로 0.1% whey protein powder가 고정된 조건에서 무기염류의 영향을 검토하였다. 기본배지에서 CaCl₂를 제외한 무기염류(MgSO₄·7H₂O, MnCl₂·4H₂O, FeSO₄·7H₂O)는 phytase 활성에 큰 영향을 보이지 않아 이들 무기염류를 제외한 배지조성에서 CaCl₂의 농도를 변화시켜가며 효소 생산 최적 농도를 검토한 결과, 0.01%의 CaCl₂ 첨가 시에 가장 높은 활성을 보였다. 그러나 칼슘이 0.3% 이상 첨가되면 phytase 활성이 급격히 감소하는 경향을 보였다. 이러한 현상은 Sculz와 Oslage[14]가 보고한 바와 같이 적정 수준 이상의 칼슘 농도에서는 phytase의 기질인 phytate와 칼슘이 결합하여 억제인자로 작용하는 것으로 생각된다.

Phytase 생산에 미치는 무기인의 영향을 검토하기 위해 인 공급원인 sodium phytate 대신 inorganic phosphate인 KH₂PO₄(potassium phosphate monobasic)을 농도별로 첨가하고 배양하여 활성을 비교하였다. 그 결과, KH₂PO₄ 0.01% 첨가 시 가장 높은 활성을 나타내었다.

효소의 정제 및 분자량 측정

배양액을 원심분리하여 얻은 상층액에 4°C에서 cold ethanol을 상층액의 3배 부피만큼 첨가하여 얻은 침전물에 20mM sodium acetate buffer(pH 5.5)를 첨가하여 침전물을 paste 상태로 만들어 원심분리한 후 buffer에 녹지않는 물질을 제거한 상층액을 조효소액으로 사용하였다. Ethanol 침전 후 20 mM sodium acetate buffer(pH 5.5)를 사용하여 Sephadex G-100 gel chromatography를 수행하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. Phytase 효소 활성은 fraction number 29에서부터 36사이에서 얻어져 이들 활성 분획만을 모아 동결 건조 후 소량의 20 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 녹였다. 이 활성 분획을 사용하여 CM Sepharose CL-6B ion exchange chromatography를 수행하여 Fig. 3와 같은 결과를 얻었다. 이때 효소 용출은 20 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)를 사용하여 NaCl 0~0.25 M 농도구배로 하였다. NaCl 농도 0.03~0.05 M 사이인 fraction number 56에서부터 60사이에서 phytase 활성이 용출되었으며 활성 분획만을 모아 동결건조시켜 다시 gel chromatography를 수행하였다. Sephacryl S-100-HR gel chromatography를 수행하여 Fig. 4과 같은 결과를 얻었고, 여기서 phytase 활성 분획인 fraction number 39에서 44를 모아 Sephacryl S-100-

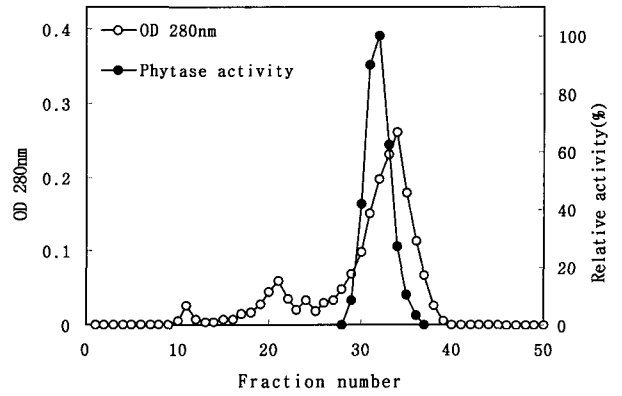


Fig. 2. Chromatogram of the crude enzyme on a Sephadex G-100 column. The enzyme was eluted with 20 mM sodium acetate (pH 5.5) at a flow rate 0.5 ml/min. The volume of each fraction was 3 ml.

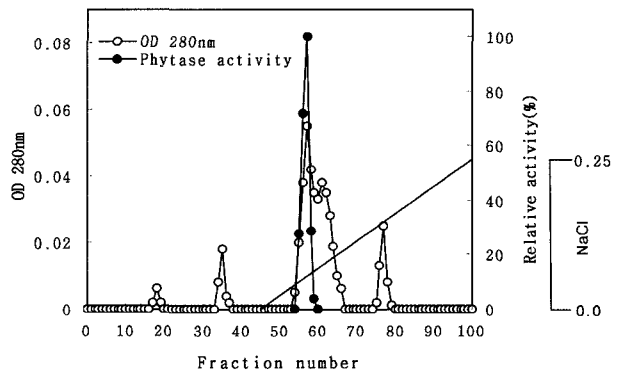


Fig. 3. CM Sepharose CL-6B column chromatogram of Sephadex G-100 phytase fractions. The enzyme was eluted with 20 mM sodium acetate (pH 5.0) at a flow rate 0.8 ml/min. The volume of each fraction was 3 ml.

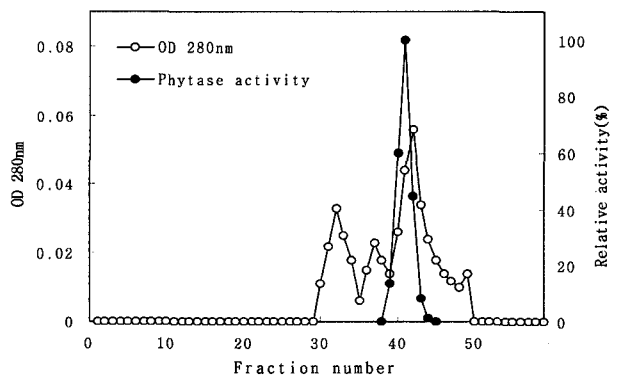


Fig. 4. Sephacryl S-100-HR column chromatogram of CM Sepharose CL-6B phytase fractions. The enzyme was eluted with 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) at a flow rate 0.5 ml/min. The volume of each fraction was 3 ml.

HR gel을 사용하여 rechromatography를 수행하였다(Fig. 5). Rechromatography에서 얻어진 phytase 활성 분획인 fraction number 40에서 47을 모아 최종적으로 phytase 효소를 정제

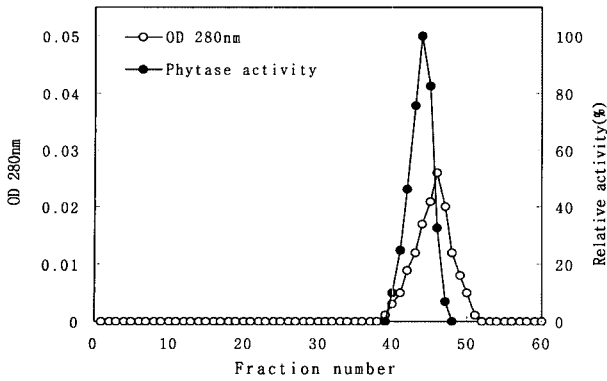


Fig. 5. Sephacryl S-100-HR column rechromatogram of Sephacryl S-100-HR phytase fractions. The enzyme was eluted with 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) at a flow rate 0.5 ml/min. The volume of each fraction was 2 ml.

하였다. 전체적인 효소의 정제과정은 Table 2에 나타난 바와 같다. 최종 정제된 효소는 배양 상등액에 비해 20.3배 효소 활성이 증가되었으며, 이때 효소 단백질의 회수율은 5.6% 정도였다.

정제된 phytase의 정제도를 확인하고 분자량을 측정하기 위하여 13% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 수행하였다. Fig. 6의 전기영동 결과에서 최종적으로 Sephacryl S-100-HR gel chromatography에서 얻어진 효소 활성 분획 시료는 lane 1에서 단일 band를 보여주므로 정제가 되었음을 보여주고 있다. 또한 표준단백질들로 구성된 분자량 marker들과 비교하여 Fig. 6(B)처럼 분자량을 측정된 결과 분리 균주 *Bacillus* sp. CF 5-26이 생산하는 phytase의 분자량은 66 kDa으로 추정되었다.

곰팡이 유래 phytase중 *A. ficuum* NRRL 3135[19] phytase는 85~100 kDa, *A. niger*[16] phytase는 200 kDa으로 비교적 큰 분자량인 것에 비해 *B. subtilis*(natto) N-77 [15] phytase는 36~38 kDa이었고, *B. amyloliquefaciens* DS11[8] phytase는 44 kDa이었으며, *E. coli*[6] phytase는 42 kDa으로 보고되었다. 본 연구에서 분리된 *Bacillus* sp. CF 5-26이 생산하는 phytase는 기존에 보고되어있는 세균유래의 phytase 보다는 분자량이 큰 것으로 나타났다.

Table 1. Purification summary of the phytase from *Bacillus* sp. CF 5-26.

Purification Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Culture supernatant	28,482	976	29	1	100
Ethanol precipitation	5,876	41.6	141	4.9	20.6
Sephadex G-100	3,050	9.2	333	11.5	10.7
CM-Sepharose CL-6B	2,967	5.7	524	18.1	10.4
1st Sephacryl S-100-HR	1,759	3.2	554	19.1	6.2
2nd Sephacryl S-100-HR	1,582	2.7	588	20.3	5.6

Table 2. Effect of pH on the phytase stability.

pH	Relative activity (%)	
	Crude enzyme	Purified enzyme
2.0	90	69
5.0	100	100
7.0	100	100
11.0	100	86

For the pH stability, the enzyme was preincubated at various pH buffer for 12 hr and the remaining activity was measured at pH 7.0 for 10 min. The 0.1 M buffers used were as follows: pH 2.0, glycine-HCl; pH 5.0, sodium acetate; pH 7.0, Tris-HCl; pH 11.0, glycine-NaOH.

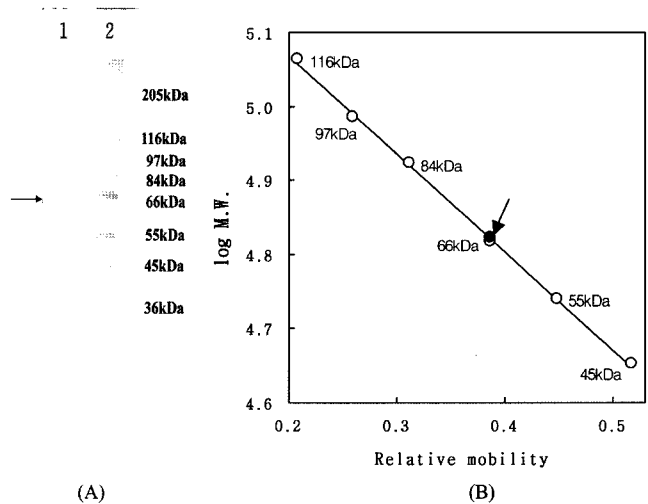


Fig. 6. Determination of molecular weight of the purified phytase by SDS-PAGE. (A) : 1, purified phytase ; 2, molecular weight marker, (B) : myosin (M.W. 205,000), galactosidase (M.W. 116,000), phosphorylase (M.W. 97,000), fructose-6-phosphatase (M.W. 84,000), albumin (M.W. 66,000), glutamic dehydrogenase (M.W. 55,000), ovalbumin (M.W. 45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (M.W. 36,000). Relative mobility = protein mobility / dye mobility.

pH 및 온도에 대한 안정성

효소에 대한 pH의 영향을 알아본 결과, pH 5와 7에서는 조효소액과 정제된 효소액 모두 안정하였으며, pH 11에서는 정제 후 잔존활성 86%로 약간 활성이 소실되었으나 안정함

을 보였다(Table 2). *B. subtilis* (natto) N-77[15]이 생산하는 phytase는 pH 5부터 11까지 안정하다고 보고하였고, *B. amyloliquefaciens* DS11[8] phytase는 pH 4부터 8까지 안정하다고 보고하였다.

효소에 대한 온도 안정성은 조효소액과 정제된 효소액을 각 온도에서 1시간 방치하였고, 121°C에서는 15분간 처리한 후 급냉하고 잔존효소 활성을 측정하였다. 그 결과, Table 3과 같이 조효소액은 100°C까지 100% 안정함을 보였고, 정제된 효소액은 100°C에서 50% 정도의 안정성을 보였으며 121°C에서는 활성이 소실되었다. 이것은 다른 미생물 유래 phytase인 *B. subtilis*(natto) N-77[15]이 생산하는 phytase가 20~60°C, *Entoerobacter* sp.4[21]가 생산하는 phytase가 30~55°C, *B. amyloliquefaciens* DS11[8] phytase가 40°C까지 인 것에 비해 높은 열안정성을 보였다. 그러나 *B. amyloliquefaciens* DS11[8] phytase는 칼슘이 첨가되면 열안정성이 증가된다고 보고한바 있다. 이러한 열안정성은 phytase를 산업적으로 이용할 때 사료로 가공하는 동안 열에 의한 효소의 불활성을 견디는데 매우 유용하기 때문에 산업적으로 이용가치가 높다고 생각된다.

효소의 기질 특이성

효소의 기질 특이성을 알아보기 위해 phosphate ester 결합을 하고 있는 adenosine monophosphate, adenosine diphosphate, adenosine triphosphate, α-glycerophosphate, β-glycerophosphate, α-naphthyl phosphate, p-nitrophenyl phosphate, pyrophosphate, tripolyphosphate, sodium phytate 등의 기질을 2 mM 농도로 사용하여 효소 활성을 측정하였다. 그 결과, sodium phytate를 기질로 사용하였을 때 분해 활성이 뛰어났으며, tripolyphosphate와 pyrophosphate에도 분해활성을 보였다(Table 4). 그러나 acid phosphatase의 기질인 p-nitrophenyl phosphate는 분해하지 못하였다. *B. subtilis*(natto) N-77[15]이 생산하는 phytase는 phytate 분해 활성이 우수하였고, 다른 phosphorylated compound에도 약간의 분해활성이 있다고 보고하였다. *Bacillus* sp. CF 5-26이 생산하는 phytase는 *B. subtilis*(natto) N-77[15]이 생산하는 phytase와 유사한 기질 특이성을 보였다.

Table 3. Effect of temperature on the phytase stability.

Temperature (°C)	Relative activity (%)	
	Crude enzyme	Purified enzyme
30	100	
60	100	
100	100	
121	-	

For the temperature stability, the enzyme was preincubated at various temperature for 1hr and the remaining activity was measured at 37°C for 10 min.

Table 4. Substrate specificity of the phytase from *Bacillus* sp. CF 5-26.

Substrate (2 mM)	Relative activity (%)
Adenosine monophosphate	0
Adenosine diphosphate	0
Adenosine triphosphate	0
α-Glycerophosphate	0
β-Glycerophosphate	0
α-Naphthyl phosphate	0
p-Nitrophenyl phosphate	0
Pyrophosphate	25
Tripolyphosphate	41
Sodium phytate100	

The enzyme activity was measured at 37°C for 10 min.

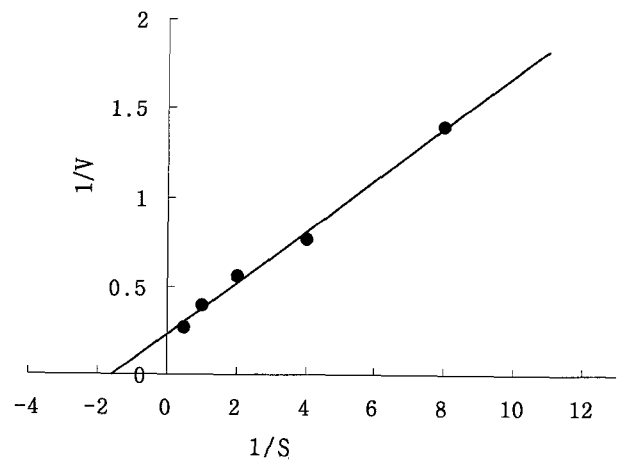


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of the phytase on sodium phytate. The enzyme activity was measured at 37°C for 10 min.

효소의 Km 및 Vmax 측정

Sodium phytate에 대한 기질 친화력을 측정하기 위하여 농도별 기질용액의 반응정도를 측정한 후 Lineweaver-Burk 역수 plot에 의하여 Km과 Vmax를 계산하였다. 이 plot으로부터 산출된 Michaelis constant(Km)는 0.64 mM 이었고, Vmax는 4.41 μmol/min이었다(Fig. 7). 이것은 *B. subtilis* (natto) N-77[15]이 생산하는 phytase의 Km은 0.5 mM, *B. amyloliquefaciens* DS11[8] phytase의 Km은 0.55 mM인 것에 비해 기질친화도가 낮으나 효소 정제도 및 실험 조건에 따라 다를 수 있어 일률적으로 비교하기는 어렵다.

요 약

단위 동물의 사료 내 phytate 인의 효율적 이용으로 배출되는 인의 양을 줄여 환경오염을 감소시키기 위해 phytate의 분해활성이 뛰어난 phytase 효소 분비 미생물을 탐색하기 위하여 우분으로부터 phytate 분해활성이 뛰어난 phytase를 생산하는 균주를 분리하였다. 분리균주를 동정한 결과, API 50

CHB test에 의해 *B. circulans*로 분류되었고, 16S rRNA sequencing 결과, *B. subtilis*로 동정되어 *Bacillus* sp. CF 5-26으로 명명하였다. 효소생산을 위한 최적배지 조성은 10% rice bran extract, 0.1% whey protein powder, 0.01% CaCl₂, 0.01% KH₂PO₄ 이었다. *Bacillus* sp. CF 5-26이 생산하는 phytase는 ethanol 침전, Sephadex G-100, CM Sepharose CL-6B, Sephacryl S-100-HR column chromatography를 통하여 정제도 20.3배, 수율 5.6%로 정제되었고, SDS-PAGE에서 분자량 66 kDa의 단일 band를 확인하였다. 정제된 phytase는 pH 5.0, 7.0, 11.0에서 안정하였으며, 100°C에서 1시간 처리하였을 때 50%의 잔존활성을 보였다. 기질 특이성은 inositol polyphosphate인 sodium phytate 분해활성이 뛰어났으며, tripolyphosphate와 pyrophosphate에도 약간의 활성을 보였다. *Bacillus* sp. CF 5-26이 생산하는 phytase의 sodium phytate에 대한 Km은 0.64 mM 이었고, Vmax는 4.41 μmol/min 이었다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 정부재원(지역대학우수과학자지원)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(R05-2004-000-11033-0).

REFERENCES

- 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.
- Christel, L., B. Helene, G. Moulin, and P. Galzy. 1992. Utilization of phytate by some yeasts. *Biotechnol. Lett.* **14**: 61-66.
- Ellis, R. and E. R. Morris. 1981. Relation between phytic acid and trace metals in wheat bran and soybean. *Cereal Chem.* **58**: 367-370.
- Erdman, J. W. and R. M. Forbes. 1977. Mineral bioavailability from phytate containing foods. *Food Prod. Dev.* **11**: 46-48.
- Fiske, C. H. and Y. P. Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **68**: 375-400.
- Greiner, R., U. Konietzny, and D. Jany. 1993. Purification and characterization of two phytase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**: 107-113.
- Harland, B. F. and D. O. Oberleas. 1977. The determination of phytate by ion exchange method. *Cereal Chem.* **54**: 827-832.
- 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**: 2-7.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Nagai, Y. and S. Fumashi. 1962. Phytase(myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase) from wheat bran. Part I. Purification and substrate specificity. *Agric. Biol. Chem.* **26**: 794-803.
- Powar, V. K. and V. Jagannathan. 1982. Purification and properties of phytase-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **151**: 1102-1108.
- Reddy, N. R., S. K. Sathe, and D. K. Salunkhe. 1982. Phytate in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* **28**: 1-92.
- Sculz, E. und H. J. Oslage. 1972. Untersuchungen zur intestinalen Hydrolyse in osit-phosphosaureester und zur absorption von phytinphosphor beim schwein; 2. Mitteilung untersuchungen zur intestinalen von inosit-phosphosaureester im verdauungstrakt beim schwein. *Z. TierPhysiol., Tiereruhg. u. Futtermittler Kde.* **30**: 76-91.
- Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 1266-1269.
- Skowrinski, T. 1978. Some properties of partially purified phytase from *Aspergillus niger*. *Acta Microbiol. Polonica* **27**: 41-48.
- Suzuki, U., K. Yoshimura, and M. Takaishi. 1907. Ueber ein Enzym "Phytase" das "Anhydro-oxymethylen diphosphorsäure" Spaltet. *Bull. Coll. Agric. Tokyo Imp. Univ.* **7**: 503-12.
- Tadashi, N., 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.
- Ullah, A. H. 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**: 397-422.
- Yanke, L. J., H. D. Bae, L. B. Selinger, and K. J. Cheng. 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology* **144**: 1565-1573.
- 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. Technol.* **18**: 449-454.

(Received Mar. 2, 2006/Accepted Mar. 16, 2006)