

Phytase에 의한 phytic acid의 분해 반응속도 연구

김재석, 이재홍*

Enzyme Kinetic Study for Degradation of Phytic acid by Phytase

Jae-Seok Kim and Jae-Heung Lee*

접수: 2011년 3월 3일 / 게재승인: 2011년 4월 21일
 © 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Phytases are hydrolytic enzymes that catalyze the sequential hydrolysis of phytic acid (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate) to *myo*-inositols with lower numbers of phosphate groups. Two types of phytases have been identified which initiate hydrolysis of the phytic acid at either the 3- or 6- position of the inositol ring. In the present investigation, a mathematical model was proposed and computed to estimate maximum enzyme reaction rate constants which fit the experimental data obtained by other authors. Although the data points were scattered to some extent, good agreement was found between the model and the experiment data. It appears that the maximum rate constants of removal of the first, second, and third phosphate groups were not equal. Also there was neither a steady trend upward or downward in the rate constants with the stepwise hydrolysis reactions.

Keywords: Consecutive reactions, enzyme kinetics, inositol, phytase, phytic acid

1. 서론

Phytase는 phytic acid (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate, IP₆)에 붙어 있는 6개 인산염그룹 (phosphate groups)의 분해를 개시해 주는 가수분해 효소이다 [1-4]. Phytic acid가 Na, Zn, Mg, Ca, Fe와 같은 염의 형태로 있을 때 이를 phytate

라고 부르며, Fig. 1에 phytic acid의 구조와 phytic acid가 phytase에 의해 궁극적으로 분해되어 생성될 수 있는 *myo*-inositol의 구조식을 나타내었다 [5]. 통상 phytate는 식물유래 곡류 중에 약 1%-5% (w/w) 함유되어 있는 것으로 알려져 있다 [3,4]. Phytases는 식물, 미생물, 그리고 동물을 포함하는 여러 세포에서 발견되는데 기질특이성, 최적 pH 및 가수분해 특성 등이 서로 상이한 것으로 알려졌다 [2,3]. 현재까지 식물유래 6-phytase (EC 3.1.3.26)와 미생물 유래 3-phytase (EC 3.1.3.8)의 두 종류 phytases가 많이 연구되었는데, 각각 inositol ring의 6번 또는 3번 위치에 있는 인산염의 분해가 먼저 시작되고 그 이후 순차적인 가수분해 (sequential hydrolysis) 방법으로 inositol penta-(IP₅), inositol tetra-(IP₄), 그리고 inositol tri-phosphate (IP₃) 등으로 인산염 (phosphate)이 분해 (경우에 따라서는 free *myo*-inositol 까지) 되는 것으로 알려져 있다 [1,3,5].

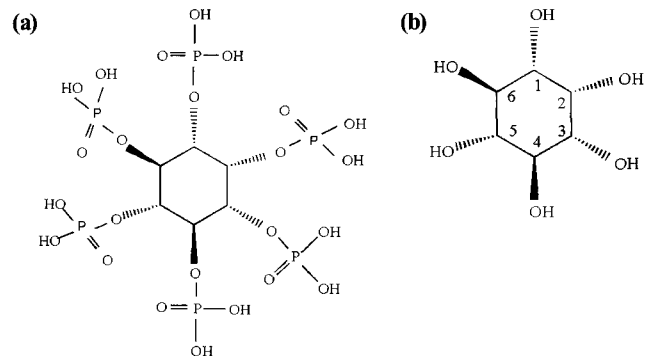


Fig. 1 Chemical structures of phytic acid (a) and *myo*-inositol (b).

식물유래 6-phytase는 씨앗이 발아하면서 phytase가 생성 축적되고 이의 작용으로 인이 용출되어 씨가 잘 자라게 되며, 동시에 생성되는 *myo*-inositol은 식물의 성장인자인 것으로

한국기술교육대학교 기계정보공학부
 School of Mechanical Engineering, Korea University of Technology and Education, Cheonan 330-708, Korea
 Tel: +82-41-560-1249, Fax: +82-41-560-1253
 e-mail: jaeheung@kut.ac.kr

Table 1. Characteristics of various phytases obtained from plants, microorganisms and animal tissues

Origin	M _r (kDa)	Optimum pH	Optimum Temperature (°C)	Product	Reference
Phytase from rye	67	6	45	IP ₅ , IP ₄ , IP ₃	[1]
from lily pollen	-	-	-	IP ₅ , IP ₄ , IP ₃	[3]
from maize	76	4.8	55	-	[7]
from spelt	68	6.0	45	IP ₅ , IP ₄ , IP ₃	[8]
Phytase from <i>Bacillus</i>	-	-	-	IP ₅ , IP ₄ , IP ₃	[5]
from <i>Aspergillus</i>	-	6.0	-	IP ₅ , IP ₄ , IP ₃ , IP ₂ , IP ₁	[11]
from <i>Escherichia</i>	39-47	4.5	-	IP ₅ , IP ₄ , IP ₃ , IP ₂ , IP ₁	[11]
from <i>Sporotrichum</i>	456	5.0	60	-	[14]
Multiple inositol polyphosphate phosphatase from rat liver	-	-	-	IP ₅ , IP ₄ , IP ₃	[17]

알려져 있다 [5]. 이미 옥수수, 보리, 밀, canola seed, 그리고 호밀 등 여러 곡류 씨앗들이 발아되면서 생성되는 phytases에 대하여 많은 문헌이 보고되어 있다 [1,2,4,6-10]. 한편 3-phytase는 *Aspergillus niger* 및 *Bacillus amyloliquefaciens*와 같은 미생물 [11-14]로부터 얻어지며 이 효소들에 대한 단백질구조는 이미 밝혀졌다 [15,16]. 사람을 포함하여 돼지나 닭과 같은 단위동물들은 소화기관 내에 phytase가 없기 때문에 phytate에 붙어 있는 인을 이용할 수 없다 [8,13]. 따라서 영양적 관점에서 고가의 인을 사료에 첨가시켜 주어야 한다 [12]. 더욱 중요한 것은 phytate에 붙어 있는 인이 이러한 동물들의 체내에서 분해되지 않고 분으로 배설되기 때문에 나중에 하천이나 강으로 흘러 들어간 후 분해되어 부영양화를 초래할 수 있게 된다 [12,13]. 그러나 phytase를 사료에 적절하게 첨가시켜주면 추가로 인을 첨가해 줄 필요가 없으며 돼지나 닭과 같은 동물들로부터 배출되는 인의 배출량도 50%정도까지 줄일 수 있는 것으로 알려져 있다 [12]. 따라서 지난 20여 년 동안 생명공학 분야, 영양학 분야, 환경공학 분야의 많은 과학자들이 phytase에 관심을 가지게 되었다. 현재 독일의 BASF 등 회사에서는 미생물을 이용하여 이 효소를 대량 생산 판매 (상품명: Natuphos[®])하고 있으며, 이미 10년 전에 사료 첨가제로서 US\$ 5억 이상의 시장이 형성되어 있다 [12].

문헌 [1,3,5,8,11]에 의하면 여러 다른 종류의 phytase를 사용하여 phytic acid로부터 가수분해 되어 생성되는 생성물의 종류 또는 조성에 대한 정성·정량적 연구가 보고되었는데, Table 1에 식물, 미생물 및 동물유래 phytase들에 대한 특성과 반응 생성물들을 요약하였다. 이 효소반응들은 특이하게도 전형적인 consecutive reactions의 형태로 일어난다 [1,5,8,11]. 즉 IP₆로부터 IP₅가 생성되고, 다시 IP₅가 IP₄로 분해되며, 더 나아가서 최종 생성물로 IP₃가 되는 경우가 일반적인 것으로 알려졌다 [1,5,8]. 그러나 phytase 종류에 따라서는 그 이상까지 분해되어 최종적으로 IP₁, 또는 myo-inositol로 분해되는 경우도 있다 [3,11].

전술한 바와 같이 산업적으로 뿐만 아니라 환경공학 측면에서도 매우 중요한 이 효소반응에 대한 수학적 모델과 정량적으로 설명할 수 있는 반응 속도론적 연구는 저자가 아는 한 아직까지 보고되지 않았다. 따라서 본 연구의 목적은 IP₆부터 IP₅, IP₄, IP₃등 단계적으로 생성되었다가 감소하는 생성물 농도의 경시적 변화를 설명할 수 있는 반응 속도식을 설정하고,

각 단계에 해당하는 최대반응속도 상수를 계산하여 효소의 반응 특성을 정량적으로 조사 하는데 있다.

1.1. 효소반응의 수학적 모델

기질 저해나 생성물 저해의 영향을 무시할 수 있는 단순 효소반응속도는 Michaelis-Menten (MM)식으로 잘 설명 될 수 있다. 본 논문에서는 sodium phytate (C₆H₆Na₁₂O₂₄P₆, phytic acid dodecasodium salt)를 기질로 사용하여 얻어진 실험 결과들 [1,8]을 사용하였으며, 이 효소들의 특성과 실험 조건을 Table 2에 간단히 요약하였다. 아래의 수학적 모델에서 IP₆, IP₅, IP₄등의 분자량은 모두 나트륨염의 형태로 나타내었다.

Table 2. Kinetic constants and reaction conditions

Source	K _m (μM)	k _{cat} (S ⁻¹)	Temperature and pH	Reference
rye phytase	300	358	35°C, 6.0	[1]
spelt phytase	400	368	35°C, 6.0	[8]

우선 IP₆ (분자량 = 924)가 분해되는 효소 반응식 (MM)은 다음 식 (1)로 나타낼 수 있다.

$$-\frac{d[IP_6]}{dt} = V_{m,6} \left(\frac{[IP_6]}{K_m + [IP_6]} \right) \quad (1)$$

여기서 [IP₆]는 IP₆의 농도 (gL⁻¹)이며, K_m는 Michaelis constant (gL⁻¹), V_{m,6}는 효소의 특성 및 농도 (즉 V_{m,6} = k_{cat} · E₀)와 관련되는 최대반응속도상수 (gL⁻¹hr⁻¹), 그리고 t는 반응시간 (hr)이다. 실험결과 [1,3,5,8]에 의하면 phytase에 의한 효소반응은 consecutive reactions으로 나타나기 때문에 IP₆가 분해되면서 곧바로 IP₅ (분자량 = 800)가 생성되고, 이어서 동시에 IP₅로부터 IP₄ (분자량 = 676)가 생성 (이때의 최대반응속도상수 = V_{m,5})되므로 IP₅ 농도의 시간에 대한 변화율은 다음 식 (2)로 나타낼 수 있다.

$$\frac{d[IP_5]}{dt} = \frac{800}{924} V_{m,6} \left(\frac{[IP_6]}{K_m + [IP_6]} \right) - \frac{676}{800} V_{m,5} \left(\frac{[IP_5]}{K_m + [IP_5]} \right) \quad (2)$$

문헌에 의하면 IP₆에 대한 K_m값 (Table 2)은 알려져 있지만 IP₅와 IP₄ 등 유사한 다른 기질에 대한 K_m 실험값은 아직

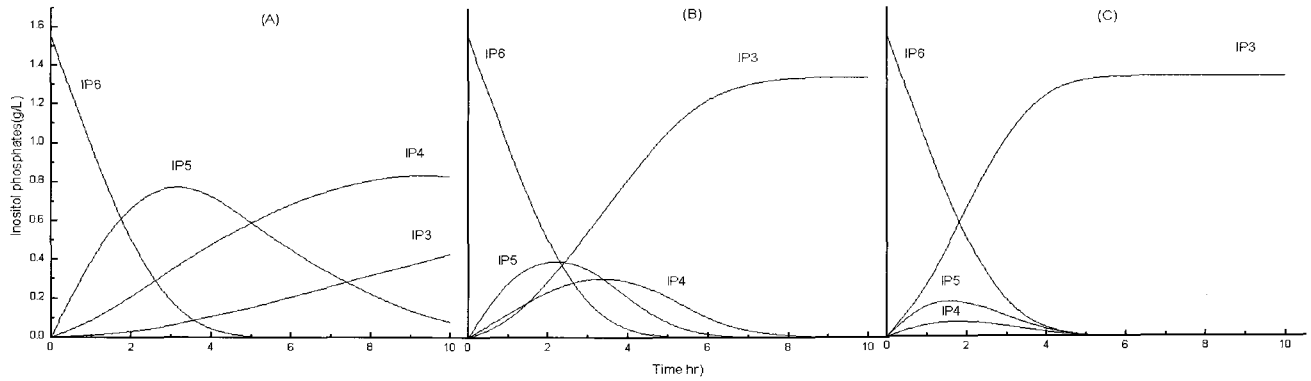


Fig. 2 Effects of maximum reaction rate constants on the degradation kinetics of sodium phytate by phytase. (A) $V_{m,6} = 0.75$, $V_{m,5} = 0.3$, $V_{m,4} = 0.1$, (B) $V_{m,6} = V_{m,5} = V_{m,4} = 0.75$, (C) $V_{m,6} = 0.75$, $V_{m,5} = 1.5$, $V_{m,4} = 3.0$.

보고되지 않아 부득이 본 연구에서는 이들 각각에 대한 K_m 값을 같다고 가정하였다.

또한 IP_4 가 IP_3 로 분해될 때의 최대반응속도상수가 $V_{m,4}$ 이면 IP_4 농도의 시간에 따른 변화율은 다음 식 (3)으로 나타낼 수 있다. 여기서 IP_3 의 분자량은 552이므로

$$\frac{d[IP_4]}{dt} = \frac{676}{800} V_{m,5} \left(\frac{[IP_5]}{K_m + [IP_5]} \right) - \frac{552}{676} V_{m,4} \left(\frac{[IP_4]}{K_m + [IP_4]} \right) \quad (3)$$

한편 이 효소 가수분해반응의 최종 생성물이 IP_3 인 경우 [1,3,5,8]에는 IP_3 의 생성 속도식은 다음 식 (4)로 간단히 정리할 수 있다. 즉

$$\frac{d[IP_3]}{dt} = \frac{552}{676} V_{m,4} \left(\frac{[IP_4]}{K_m + [IP_4]} \right) \quad (4)$$

주어진 초기조건하에서 식 (1)-(4)의 미분방정식을 풀고, 실제 실험값과 비교함으로써 최대반응속도 상수값을 얻을 수 있다.

2. 결과 및 고찰

2.1. 최대반응속도 상수값이 효소반응속도에 미치는 영향

최대반응속도상수 V_m 은 효소와 기질과의 관계 그리고 효소 농도에 선형적으로 비례한다. 문헌에 의하면 식물유래 phytase 뿐만 아니라 *Aspergillus niger*, *Escherichia coli* 등 미생물 유래 phytase의 경우 반응속도관점에서 볼 때 phytic acid에 비하여 phosphate group의 수가 적게 붙어 있는 기질일수록 이 반응은 더디게 일어나는 것으로 알려져 있다 [1,3,11]. 최대반응속도 상수값을 변경시켰을 때 IP_6 로부터 얻어지는 여러 경우의 degradation kinetics를 Fig. 2에 나타내었다. 문헌에 의하면 rye phytase의 경우 $I(1,2,3,4,5,6)P_6$ 로부터 생성되는 IP_5 는 $I(1,2,3,4,5)P_5$, IP_4 는 $I(2,3,4,5)P_4$ 임이 밝혀졌고 [1], lily phytase의 경우에는 IP_5 는 $I(1,2,3,4,6)P_5$, IP_4 는 $I(1,2,3,4)P_4$ 또는 $I(1,2,3,6)P_4$, 그리고 IP_3 는 $I(1,2,3)P_3$ 로

알려졌다 [3].

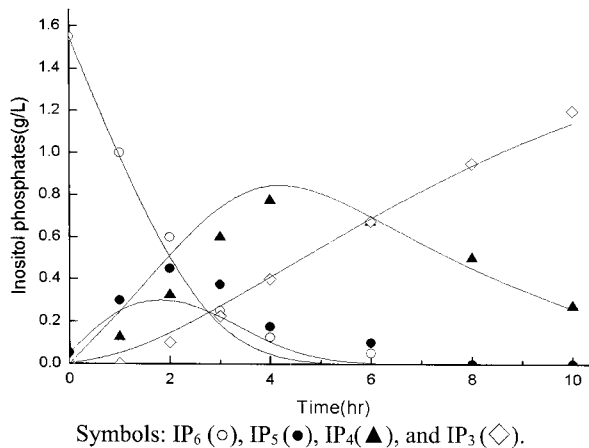
Fig. 2에서 알 수 있듯이 최대반응 속도 값이 $V_{m,6} > V_{m,5} > V_{m,4}$ 인 경우 (case A) 반응 초기에 IP_5 와 IP_4 의 축적이 있음을 알 수 있다. 이러한 축적은 반응초기에 중간생성물들의 생성속도가 분해속도보다 크기 때문이다. Lily pollen 으로부터 생성된 phytase 경우 두 번째, 세 번째 phosphate가 떨어져 나가는 속도는 점차 현저히 줄어진다 보고 [3]하였고, *Bacillus phytase*에 대하여도 비슷한 결과, 즉 phytic acid 보다 lower myo-inositol phosphates에 대한 분해속도가 늦어진다는 것이 알려졌다 [5]. 그러나 이러한 선행 연구들은 모두 정량적이 아닌 정성적인 결과 이었다. 한편 반대의 경우, 즉 $V_{m,6} < V_{m,5} < V_{m,4}$ (case C)를 보면 중간생성물인 IP_5 와 IP_4 의 축적은 미미하며 매우 빠르게 IP_3 가 생성됨을 알 수 있다. 최대반응속도 상수값이 모두 같을 때, 즉 $V_{m,6} = V_{m,5} = V_{m,4}$ 인 경우 (case B) 중간생성물인 IP_5 와 IP_4 는 약간 축적되고 IP_3 의 생성도 비교적 빠르게 일어나고 있음을 알 수 있다. 따라서 경시적 효소반응의 패턴은 최대반응속도 상수값의 크기에 따라 크게 변화되는 것을 알 수 있다.

2.2. 실제 효소반응 실험결과와 수학적 모델과의 비교

본 연구에서는 밀 (spelt 및 rye)을 발아시켜 생성된 phytase를 사용하여 얻어진 실험결과들을 사용하였다 [1,8]. Spelt phytase를 사용하여 얻어진 sodium phytate와 myo-inositol phosphates 중간체들의 경시적 농도변화 패턴은 Fig. 2의 case B 매우 유사하게 나타나고 있다. 우선 반응초기 (0-1 hr)에는 IP_4 와 IP_3 의 생성은 무시할 수 있으므로 $V_{m,5} \approx 0$, $V_{m,4} \approx 0$ 로 놓고 IP_6 감소와 IP_5 생성 패턴에 맞는 상수 $V_{m,6}$ 를 결정해 본 결과 이 값이 $0.75 \text{ gL}^{-1}\text{hr}^{-1}$ 로 얻어졌다. 이어서 IP_4 와 IP_3 의 경시적 농도변화 패턴에 맞는 상수값은 sensitivity analysis를 통하여 계산하였고, 얻어진 최적 근사값은 $V_{m,5}$ 가 1.0, $V_{m,4}$ 는 $0.25 \text{ gL}^{-1}\text{hr}^{-1}$ 이었다. Fig. 3는 수학적 모델에 의하여 얻어진 컴퓨터 계산값과 실제 실험 측정값을 비교해 본 그림이다.

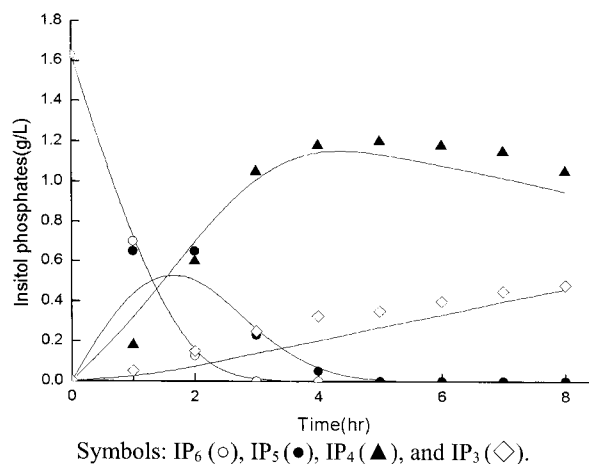
또 다른 실험 결과로서 rye phytase를 사용하여 얻어진 sodium phytate와 myo-inositol phosphates 중간체들의 경시적 농도변화 패턴을 수학적 모델과 비교하여 Fig. 4에 나타내었다. 이 경우는 Fig. 2의 case A 매우 유사하게 나타나고 있음

을 알 수 있었고 $V_{m,6}=1.2$, $V_{m,5}=0.8$, $V_{m,4}=0.1$ $\text{gL}^{-1}\text{hr}^{-1}$ 일 때 실험적 결과와 이 수학적 모델이 잘 부합되었다. Fig. 3과 Fig. 4에서 알 수 있듯이 식 (1)-(4)의 수학적 모델은 실제 실험결과를 비교적 잘 설명해 주고 있기 때문에 이 효소반응은 전형적인 consecutive reactions을 통하여 이루어지고 있음을 확인 할 수 있었다. 최대반응속도 상수값은 spelt phytase의 경우 $V_{m,6}$ 를 기준으로 할 때 $V_{m,5}$ 은 1.33배 그리고 $V_{m,4}$ 는 0.33배 이었으며, rye phytase의 경우 $V_{m,5}$ 은 0.66배 그리고 $V_{m,4}$ 는 0.08배 이었다. 이처럼 효소의 종류에 따라서 뿐만 아니라 반응 단계별로도 이 상수값의 상대적 크기가 서로 상당히 차이가 생기는 이유를 밝혀내기 위하여는 추가 연구가 필요하다. 효소 활성중심에서 구조적으로 상이한 각각의 기질과 이 효소의 기질-효소복합체의 형태에 차이가 있고 따라서 기질에 대한 specificity의 차이가 있을 수 있다고 생각된다. 앞으로 이 효소의 구조가 밝혀지게 되면 이 효소와 여러 구조적으로 상이한 기질들을 docking시켜서 그 차이점을 연구 해 보면 부분적으로 그 이유가 설명될 수 있을 것으로 사료된다.



Symbols: IP₆ (○), IP₅ (●), IP₄ (▲), and IP₃ (◇).

Fig. 3 Comparison of the mathematical model and the experimental data obtained with spelt phytase at pH 6.0 and 35°C. The values of $V_{m,6}$, $V_{m,5}$ and $V_{m,4}$ were 0.75, 1.0 and 0.25 $\text{gL}^{-1}\text{hr}^{-1}$, respectively.



Symbols: IP₆ (○), IP₅ (●), IP₄ (▲), and IP₃ (◇).

Fig. 4 Comparison of the mathematical model with the experimental data obtained with rye phytase at pH 6.0 and 35°C. The values of $V_{m,6}$, $V_{m,5}$ and $V_{m,4}$ were 1.2, 0.8 and 0.1 $\text{gL}^{-1}\text{hr}^{-1}$, respectively.

3. 결론

Phytic acid (IP₆)에 붙어 있는 6개의 인산염그룹은 phytase의 작용으로 순차적으로 분해되어 IP₅, IP₄, IP₃ 등이 생성 되는데, 이 반응은 전형적인 consecutive reactions (IP₆ → IP₅ → IP₄ → IP₃)을 통하여 일어나는 것으로 알려져 있다. 본 논문에서는 sodium phytate로부터 밀 유래의 두 종류 phytase에 의해 생성되는 각 단계별 중간체의 경시적 농도변화를 설명하는 수학적 모델을 세우고, 각 단계의 최대반응속도 상수값을 계산하여 서로 비교하여 보았다. 그 결과 본 모델은 실험 결과를 잘 설명해줄 수 있는 모델임이 밝혀졌으며, 각 단계의 최대반응속도 상수값은 서로 다르며 그 크기의 순서에 있어서도 어떠한 일률적인 경향은 보이지 않았다.

감사

이 논문은 한국기술교육대학교 교육연구진흥비지원 프로그램의 일부 지원에 의해 수행되었음.

References

- Greiner, R., U. Konietzny, and K. D. Jany (1998) Purification and properties of a phytase from rye. *J. Food Biochem.* 22: 143-161.
- Greiner, R., M. Muzquiz, C. Burbano, C. Cuadrado, M. M. Pedrosa, and C. Goyoaga (2001) Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated Faba Beans (*Vicia faba* Var. Alameda). *J. Agric. Food Chem.* 49: 2234-2240.
- Barrientos, L., J. J. Scott, and P. P. N. Murthy (1994) Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiol.* 106: 1489-1495.
- Greiner, R., K. D. Jany, and M. Alminger (2000) Identification and properties of *myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (phytases) from barley (*Hordeum vulgare*). *J. Cereal Sci.* 31: 127-139.
- Kerovuo, J., J. Rouvinen, and F. Hatzack (2000) Analysis of *myo*-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism. *Biochem. J.* 352: 623-628.
- Houde, R. L., I. Alli, and S. Kermasha (1990) Purification and characterization of canola seed (*Brassica* sp.) phytase. *J. Food Biochem.* 14: 331-351.
- Laboure, A. M., J. Gagnon, and A. M. Lescure (1993) Purification and characterization of a phytase (*myo*-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochem. J.* 295: 413-419.
- Konietzny, U., R. Greiner, and K. D. Jany (1995) Purification and characterization of a phytase from spelt. *J. Food Biochem.* 18: 165-183.
- Ebune, A., S. Al-Asheh, and Z. Duvnjak (1995) Production of phytase during solid state fermentation using *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 in canola meal. *Bioresour. Technol.* 53: 7-12.
- Sung, H. G., H. T. Shin, J. K. Ha, H. L. Lai, K. J. Cheng, and J. H. Lee (2005) Effect of germination temperature on characteristics of phytase production from barley. *Bioresour. Technol.* 96: 1297-1303.

11. Wyss, M., R. Brugger, A. Kronenberger, R. Remy, R. Fimbel, G. Oesterhelt, M. Lehmann, and A. van Loon (1999) Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphates): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 367-373.
12. Lei, X. G. and C. H. Stahl (2001) Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 474-481.
13. Casey, A. and G. Walsh (2003) Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresour. Technol.* 86: 183-188.
14. Singh, B. and T. Satyanarayana (2009) Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. *Bioresour. Technol.* 100: 2046-2051.
15. Oakley, A. J. (2010) The structure of *Aspergillus niger* phytase PhyA in complex with a phytate mimetic. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397: 745-749.
16. Ha, N. C., B. C. Oh, S. Shin, H. J. Kim, T. K. Oh, Y. O. Kim, K. Y. Choi, and B. H. Oh (2000) Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. *Nat. Struct. Biol.* 7: 147-153.
17. Craxton, A., J. J. Caffrey, W. Burkhart, S. T. Safrany, and S. B. Shears (1997) Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Biochem. J.* 328: 75-81.