

최 종  
연구보고서

내열성을 지닌 유전자 재조합 phytase의  
생산기술 개발

Development of thermostable  
recombinant phytase

연구기관  
부경대학교  
고려대학교  
여수대학교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “내열성을 지닌 유전자 재조합 phytase의 생산기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 10월 일

주관연구기관명 : 부경대학교

총괄연구책임자 : 김 형 락

세부연구책임자 : 김 형 락

연 구 원 : 변 대 석

연 구 원 : 서 호 찬

연 구 원 : 김 두 상

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 김 재 호

협동연구기관명 : 여수대학교

협동연구책임자 : 신 태 선

# 요 약 문

## I. 제 목

내열성을 지닌 유전자 재조합 phytase의 생산기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

Phytic acid는 곡류 또는 종자식물의 씨앗이 성장하는 중에 생성되는 화합물로서, 곡류와 콩과식물의 씨앗중 인과 inositol의 주요한 저장형태이다. 곡류 중 총 인의 70-80%가 phytic acid 상태로 존재하며 구조적으로는 단백질과 결합된 마그네슘염 또는 칼슘염의 형태로 존재한다. 현재 가축사료로 사용되고 있는 옥수수, 대두 및 쌀겨 중에는 다량의 인을 함유하는 phytic acid가 단백질과 결합된 phytin 상태로 존재하며 전체 중량의 1-9%에 달한다. 이러한 인산염의 형태는 단위동물의 소화관에서 소화, 흡수되지 않아 가축의 무기질 결핍이라는 영양적인 면과 가축 사육지역의 하천이나 호수를 부영양화시켜 수질 오염을 야기시키는 환경적인 면에서 악영향을 미치고 있다. Phytic acid를 분해시키기 위한 방편으로 화학적인 처리가 시도되었으나 공존하는 영양소를 파괴시키기 때문에 실용화되지 못하는 실정이다.

영양적인 악영향을 미치지 않고 phytic acid를 분해시키기 위한 수단으로써 phytase가 가장 효과적이라는 사실이 입증된 후에 phytase를 생산하는 미생물을 검색하기 위한 연구가 1960년대부터 행해지고 있으며, 1993년 곰팡이로부터 phytase 유전자가 분리됨으로써 외국의 몇몇 생물공학 회사(BASF사, Novo Nordisk사)에 의해 상품화되어 국내로 수입되고 있다.

Phytase에 관한 연구는 주로 사료중의 phytic acid를 분해시키기 위하여 pelleting 온도에서 견딜 수 있는 내열성을 향상시킬 목적으로 진행되고 있으며, 미국의 농무성, 스위스의 Hoffmann-La Roche사, 핀랜드의 Rohm사 및 네델란드의 Gist-brocades사 등이 주도적인 연구를 행하고 있으며, 이러한 연구는 *A. niger* NRRL 3135의 *phyA*와 *phyB* 유전자를 이용한 promoter와 vector의 개발, site-specific mutation과 glycosylation에 의한 내열성과 단백질 분해 효소에 대한 안정성 향상에 치중되고 있다. 국내에서의 phytase에 관한 연구는 세균에 국한된 연구로써 주로 *Bacillus* sp.와 *Enterobacter* sp.가 산생하는 phytase에 국한된 실정이다. 세균에 의해 생산되는 phytase는 glycosylation되어 있지 않기 때문에 곰팡이가 생산하는 phytase에 비해 단백질 분해효소에 대하여 민감하며, 낮은 pH에서 불안정하기 때문에 사료첨가제로서의 실용화에 다소 문제점이 있다. 그리고 세균에 의해 생산되는 phytase는 1종으로 2종류의 phytase와 1종의 phosphatase를 동시에 생산하는 *Aspergillus*속의 곰팡이에 비해 phytase 활성이 훨씬 낮은 것이 단점이다.

최근 본 연구 책임자에 의해 토양으로부터 30여종의 곰팡이를 분리하여 phytase 활성을 측정 한 결과 2종의 곰팡이가 phytase 활성이 높은 것으로 나타났다. 그 중에서도 *Aspergillus* sp. 5990 (KCTC 8939P)은 현재 상용 phytase로 사용되고 있는 *A. niger* NRRL 3135에 비해 phytase 활성이 5배 가량 높은 것으로 나타났으며 내열성 또한 우수한 것으로 판명되었다.

따라서 본 연구책임자에 의해 분리된 *Aspergillus* sp. 5990이 산생하는 phytases를 사료첨가제로 이용하기 위하여 phytases의 특성을 규명하며, 이들의 유전자를 분리하여 phytases 대량 생산을 위한 효모와 곰팡이 발현 system을 개발하고자 한다 그리고 *Aspergillus* sp. 5990을 사용하여 사료원으로 이용되고 있는 곡류부산물 중의 phytic acid를 분해할 수 있는 액상 및 고상 발효 조건을 확립함으로써 사료중의 인을 비롯한 무기질의 생물이용도를 증가시켜 영양적, 환경적인 유해인자가 제거된 환경친화성 저오염 사료개발을 위한 발효 조건을 확립하고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

내열성을 지닌 유전자 재조합 phytase의 생산기술을 개발하기 위하여 기존의 phytase보다 내열성이 높은 phytase를 생산하는 균주를 선발하여 생산된 phytase의 효소적인 특성을 규명하고, phytase 유전자를 확보하여 재조합 효소를 생산하기 위한 발현시스템을 개발함으로써 재조합 효소의 대량 생산 기술을 확립하고자 한다. 본 연구개발을 위한 연구개발 내용과 범위는 다음과 같다.

제 1 세부과제에서는 phytase의 특성규명 및 실용화에 관한 연구로;

- 가. Phytase 생산균주의 분리 및 동정
- 나. Phytase의 정제방법 확립
- 다. 정제 효소의 특성분석
- 라. 가축의 소화효소에 의한 효소의 안정성 측정
- 리. 재조합 효소의 특성분석

제 2 세부과제에서는 Phytase 대량생산을 위한 발현시스템 개발;

- 가. 유전자 cloning
- 나. RT-PCR에 의한 cDNA 제조
- 다. Phytases 유전자 sequencing 및 분석
- 라. Phytase 발현 시스템 구축
- 마. 재조합 효소의 생산

제 3 세부과제에서는 사료원 영양가향상을 위한 발효조건 확립;

- 가. Phytase 생산을 위한 발효조건 확립
- 나. 야생주에 의한 사료원의 액상발효조건
- 다. 야생주를 이용한 고상 발효조건 확립
- 라. 재조합 효소를 이용한 phytic acid 분해조건

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구개발결과 *Aspergillus* sp. 5990이 생산하는 phytase는 기존의 *Aspergillus ficcum* NRRL 3135균이 산생하는 효소보다 최적온도가 7-10°C 가량 높은 것으로 평가되었으며, 내열성 또한 기존의 phytase에 비해 높은 것으

로 평가되었다. 그리고 본 연구개발에서 phytase를 대량생산하기 위한 유전자 확보 및 생산조건을 확보하였으므로 생산시설에 적합한 생산조건을 확립함으로써 대량생산은 용이하게 달성될 수 있다. 그리고 본 연구개발에서 확립된 phytase의 신속한 정제방법은 앞으로 다른 phytase의 정제에 용이하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다

현재 phytase의 시장이 최근 2-3년간 정체되어 있으므로 현재 상황으로는 새로운 상표로 이미 형성된 시장에 진입하여 기존 제품과 경쟁하기에는 어려운 점이 많을 것으로 예상된다. 그러나 향후 환경 문제와 더불어 phytase 시장이 급속히 성장하리라 예상되기 때문에 현재의 시장보다는 미래 시장을 예측하여 기술을 확보하여 산업화에 대비하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. 그리고 현재까지 다수의 논문을 발표하였으며, 외국학회지를 통한 발표로써 본 연구개발의 효과를 국제적으로 홍보할 수 있는 기회가 올 것으로 기대된다.

본 연구개발에서는 실험실적으로 대량생산방법이 확립되었으며, 앞으로 기업체에서 대량생산하기 위하여 보다 pilot 규모 또는 plant 규모의 발효조건확립이 필요하다. 이러한 2차적인 연구는 본 연구진에 의하여 기술을 이전할 계획이다.

## SUMMARY

Two fungi producing phytase activities were isolated from soil. The fungus secreting highest phytase activity was identified as *Aspergille* by morphological and cultural characteristics. Isolated fungus producing highest phytase activities was tentatively named *Aspergillus* sp. 5990 and donated to Korean Collection for Type Cultures (KCTC 8939P). Extracellular phytases produced by *Aspergillus* sp. 5990 showed a 5-fold higher activity in liquid culture when compared with cultures of *Aspergillus ficuum* NRRL 3135. The optimum fermentation conditions were determined to be 35°C, neutral pH, and 4 days incubation. The phytase activity was high over 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> in the medium and that was maximum at the concentration of 0.05% phosphorus in the medium. Degradation of phytate in rice bran by liquid fermentation with *Aspergillus* sp. 5990 was maximized at the concentration of 10% rice bran in the medium. After 4 days liquid fermentation of rice bran with *Aspergillus* sp. 5990, total concentration of IP<sub>4</sub>, IP<sub>5</sub>, and IP<sub>6</sub> was estimated lower than 0.2 mM and the concentration of IP<sub>3</sub> was calculated to be 9.1-13.3 mM. The fermentation efficiency of rice bran by *Aspergillus* sp. 5990 was not affected by fermentation temperature and pH. Degradation of phytate in rice bran by solid fermentation with *Aspergillus* sp. 5990 was increased with fermentation time and almost phytate was degraded to the derivatives of inositol phosphates after 5 days fermentation. Optimum solid fermentation temperature of rice bran by *Aspergillus* sp. 5990 was determined to be 25°C and degradation of phytate was decreased with increment of fermentation temperature. Degradation of phytate in soybean flour by liquid fermentation with *Aspergillus* sp. 5990 was maximized at the concentration of 3% soybean flour in the medium. After 3 days of liquid fermentation by *Aspergillus* sp. 5990, almost phytate in soybean flour was degraded to the

derivatives of inositol phosphates. The fermentation efficiency of soybean flour by *Aspergillus* sp. 5990 was not affected pH, however, that was higher fermentation at 40°C than at 30 and 35°C. Degradation of phytate in soybean flour by solid fermentation with *Aspergillus* sp. 5990 was increased with fermentation time and almost phytate was degraded to the derivatives of inositol phosphates after 2 days fermentation. Optimum solid fermentation temperature of soybean flour by *Aspergillus* sp. 5990 was determined to be 25°C and degradation of phytate was not affected by initial pH of the medium.

Extracellular phytases from *Aspergillus niger* var. *awamori* were purified to homogeneity using Q-Sepharose, S-Sepharose and Mono-S column. Purities of phytase A and B increased 19.7- and 26.5-fold with approximately 66 and 56.2% yield, respectively. The molecular weights of phytase A and B were estimated to be 84 and 74 kDa, respectively, by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and 98 and 330 kDa using Superose 6 gel filtration. The phytase A showed maximum activity at pH 5.5 with a second activity peak occurring at pH 2.8 and maximum activity of phytase B showed at pH 3.0. Optimum temperature of both enzymes was 65°C. The phytase A was stable up to heat treatment at 65°C for 30 min and phytase B displayed considerably higher thermostability than phytase A and commercial phytase. Phytase A has high activity for sodium phytate and less activities on other phosphorylated compounds and phytase B displays rather broad substrate specificity at pH 2.5 but low activity with sodium phytate. The apparent Michaelis-Menten ( $K_m$ ) constants and substrate turnover numbers ( $V_{max}$ ) of phytase A were determined to be 1.20 mM and 6,800 sec<sup>-1</sup> at pH 2.5 and 0.37 mM and 2,200 sec<sup>-1</sup>, respectively, at pH 5.5. The  $K_m$  value and  $V_{max}$  of phytase B were estimated to be 0.29 mM and 2,100 sec<sup>-1</sup>, respectively, at pH 2.5 and 37°C. The residual activities of the phytase A and B were determined at pH 5.5 for phytase A and at pH 2.5 for phytase



B at 37°C after deglycosylation. Phytase A activity decreased to 80% of the original activity by deglycosylation, however, phytase B was not changed by deglycosylation, which suggested that activity of phytase B was not affected by glycosylation. Antibody of phytase A recognized only phytase without cross-reaction with phytase B, which supports the antibody has high specificity. However, antibody of phytase B reacted with phytase A as well as phytase B that gives a possibility the phytase A and B have a structural similarity in epitope region of phytase B antibody. Degradation of phytic acid was highest in the pH range of 4.5-5.5 in both

The objectives were to isolate thermostable phytase and express the phytase gene in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. Extracellular phytase produced by *Aspergillus* sp. 5990 showed a 5-fold higher activity in liquid culture when compared with culture of *Aspergillus ficcum* NRRL 3135. Further analysis, *Aspergillus* sp. 5990 was identified as *Aspergillus niger* var. *awamori*. Based on N-terminal sequencing data, mRNA was isolated and amplified using RT-PCR. The gene (1.4kb) was inserted into an expression vector pPIC9K with a signal peptide  $\alpha$ -factor, under control of AOX1 promoter. The resulting plasmid was electrotransformed into two *P. pastoris* strains: KM71 and GS115. Expressed and wild type phytase and commercial phytase from BASF were purified to homogeneity using two ionic exchange chromatographic steps. SDS-PAGE shows that wild-type phytase from *Aspergillus* sp. 5990 was highly glycosylated than two others while deglycosylated form of three phytase were same as 49 KD. Sequence homology of these phytase was almost same as 99% but thermostability of phytase from *Aspergillus* sp. 5990 relatively high than others. In conclusion, glycosylation plays in a key roll of thermostability of phytase and its enzymatic characterization.

# CONTENTS

Presentation.....	1
Summary(Korean).....	2
I. Title.....	2
II Purpose and necessity of the study.....	2
III. Content and scopy of the study.....	3
Summary.....	6
Contents.....	9
Contents(Korean).....	16
Chapter 1. Summary of the study.....	22
Part 1. Purpose of the study.....	22
Part 2. Necessities of the study.....	22
1. Necessities of technical aspect.....	22
2. Necessities of economic and industrial aspect.....	25
3. Necessities of social and cultural aspect.....	26
Part 3. Scopes of the study.....	28
Chapter 2. Present conditions of world-wide technical development.....	29
Chapter 3. Contents and results of the study.....	32
Part 1. Methods for the study.....	32
1. The First Subject: Characterization and practical use of phytase.....	32
A. Isolation and identification of phytase-producing microorganism.....	32
1) Isolation of phytase-producing microorganism.....	32
2) Identification and isolation of microorganism.....	32
3) Screening of phytase-producing microorganism.....	33
4) Preservation of phytase-producing microorganism.....	33
5) Identification of phytase-producing microorganism.....	33
B. Assay of phytase activity and protein concentration.....	33
1) Assay of protein concentration.....	33
2) Assay of phytase activity.....	34
3) Assay of phosphatase activity.....	34
C. Measurement of phytic acid.....	34
D. Measurement of cell mass.....	35
E. Fermentation conditions for phytase production.....	35
1) Optimum concentration of Ca <sup>2+</sup> ions for phytase production.....	35
2) Optimum phosphate ion concentrations for phytase production.....	35
3) Optimum pH for production of phytase.....	35
4) Optimum temperature for production of phytase.....	35
5) Optimum fermentation time for production of phytase.....	36
F. Purification of phytases.....	36
1) Purification of phytase A.....	36

2) Purification of phytase B.....	36
G. Biochemical characterization of phytases.....	37
1) Determination of purity and molecular weight.....	37
2) Optimum reaction conditions for phytase activities.....	37
3) Reaction temperature and thermal stability.....	37
4) Kinetics constant.....	37
H. Stability of phytases.....	37
1) Stability against digestive proteinases.....	37
2) Stabilization by feed additives.....	38
2. The Second Subject: Development of expression system for overproduction of phytase.....	38
A. Experimental microorganism and culture conditions.....	38
B. Isolation of genomic DNA.....	39
C. Isolation of mRNA.....	39
D. Amplification of phytase genes.....	39
E. Cloning and transformation of phytase gene using pBlueScript.....	39
F. Analysis of DNA.....	40
G. Amplification of cDNA.....	40
H. Construction of expression vector.....	41
I. Selection of His <sup>r</sup> transformant.....	42
J. Phytase expression from transformed <i>Pastoris</i> .....	42
3. The third subject: Establishment of fermentation conditions for improving nutritional value of feed additives.....	43
A. Chemical analysis of rice bran and soybean flour.....	43
1) Chemical analysis.....	43
2) Quantification of inorganic phosphate content.....	43
3) Quantification of Inositol phosphate content.....	43
4) Quantification of phytic acid content.....	44
5) Measurement of cell mass.....	44
B. Fermentation conditions for degradation of phytic acid in rice bran.....	44
1) Degradation conditions of phytic acid by fermentation.....	44
A) Effect of substrate concentrations.....	44
B) Effect of fermentation times.....	46
C) Effect of fermentation temperatures.....	46
D) Effect of fermentation pHs.....	46
2) Degradation conditions of ricebran phytic acid by solid fermentation.....	46
A) Effect of fermentation times.....	46
B) Effect of fermentation temperatures.....	47
C. Fermentation conditions for degradation of phytic acid in soybean flour.....	47
1) Degradation conditions of phytic acid by fermentation.....	47
A) Effect of substrate concentrations.....	47

B) Effect of fermentation times.....	47
C) Effect of fermentation temperatures.....	47
D) Effect of fermentation pHs.....	48
2) Degradation conditions of phytic acid by solid fermentation.....	48
A) Effect of fermentation times.....	48
B) Effect of fermentation temperatures.....	48
C. Enzymatic reaction conditions for the degradation of phytic acid in rice bran and soybean flour.....	48
1) Enzymatic reaction conditions for the degradation of phytic acid in rice bran.....	48
2) Enzymatic reaction conditions for the degradation of phytic acid in soybean flour.....	49
Part 2. Results of the study.....	49
1. The First Subject: Characterization and practical use of phytase.....	49
A. Isolation and characterization of phytase-producing microorganism.....	49
1) Isolation of phytase-producing microorganism.....	49
2) Identification of phytase-producing microorganism.....	49
B. Purification of phytase.....	50
1) Production of phytase.....	50
2) Purification of phytase.....	50
A) Purification of phytase A.....	50
B) Purification of phytase B.....	54
C. Characterization analysis of purified enzyme.....	64
1) Determination of molecular weight.....	64
2) Optimum pH for reaction.....	67
3) Optimum temperature.....	68
4) Thermostability.....	68
5) Characterization of kinetics.....	72
6) Substrate specificity.....	75
7) Changes of activity and molecular weight by deglycosylation.....	75
D. Production of polyclonal antibody.....	78
E. Phytase activity with digestive enzyme.....	82
1) Effect of proteolytic enzyme for degradation of phytin in rice bran.....	82
2) Effect of proteolytic enzyme for degradation of phytin in soybean flour.....	83
F. Stability of enzyme.....	86
1) Stability of enzyme by digestive enzyme.....	86
2) Storage stability of coenzyme.....	87
3) Establishment of drying and preparation technique.....	95
A) Hot-air drying method.....	98
B) Cold-air drying method.....	98
C) Spray-drying method.....	98

D) Lozophilization method.....	99
E) Examination of economical efficiency.....	99
F) Characterization of dried preparation.....	99
2. The Second Subject: Development of expression system for overproduction of phytase.....	101
A. Cloning of <i>Aspergillus</i> sp. 5990 phytase genes.....	101
B. Amplification of cDNA.....	101
C. Construction of expression vector for multiple integration.....	104
D. Analysis of <i>Aspergillus</i> sp. 5990 phytase A genes.....	111
E. Analysis of transformation for phytase production.....	111
F. Overproduction of recombination phytase.....	111
G. Purification of recombination, wild type and commercial phytase.....	111
1) Purification of phytase.....	111
A) Purification of wild type phytase A.....	114
B) Purification of BASF phytase.....	117
C) Purification of recombination phytase.....	117
H. Characterization of purified recombination enzyme.....	120
1) Assay of glycosylation.....	120
2) Optimum reaction condition of purified recombination enzyme.....	124
3) Temostability of purified recombination enzyme.....	128
4) Substrate specificity of purified recombination enzyme.....	130
5) Kinetics of purified recombination enzyme.....	132
3. The third subject: Establishment of fermentation conditions for improving nutritional value of feed additives.....	135
A. Culture conditions for production of phytase.....	135
1) Optimum concentration of Ca <sup>2+</sup> ions for phytase production.....	135
2) Optimum phosphate ion concentrations for phytase production.....	135
3) Optimum pH for production of phytase.....	139
4) Optimum temperature for production of phytase.....	139
5) Optimum fermentation time for production of phytase.....	143
B. Fermentation conditions for degradation of phytic acid in rice bran.....	143
1) Chemical analysis of rice bran.....	143
2) Degradation conditions of phytic acid in rice bran by fermentation.....	143
A) Effect of substrate concentration.....	143
B) Effect of fermentation times.....	144
C) Effect of fermentation temperatures.....	148
D) Effect of fermentation pHs.....	148
C. Degradation conditions of phytic acid in rice bran by solid fermentation.....	148
1) Effect of fermentation times.....	148
2) Effect of fermentation temperatures.....	152
D. Fermentation conditions for degradation of phytic acid in soybean	

flour.....	152
1) Chemical analysis of soybean flour.....	152
2) Degradation conditions of phytic acid in soybean flour by fermentation.....	152
A) Effect of substrate concentration.....	152
B) Effect of fermentation times.....	153
C) Effect of fermentation temperatures.....	158
D) Effect of fermentation pHs.....	158
3) Degradation conditions of phytic acid in soybean flour by solid fermentation.....	158
A) Effect of fermentation times.....	158
B) Effect of fermentation temperatures.....	162
E. Degradation conditions of phytic acid by enzyme.....	162
1) Effect of phytase concentration.....	162
2) Effect of pHs.....	163
3) Effect of temperatures.....	167
Chapter 4. Achievements and contribution of the reserch.....	169
Part 1. Object of the first year.....	169
1. The First Subject: Characterization and practical use of phytase.....	169
A. Isolation and identification of phytase-producing microorganism.....	169
B. Establishment of purification method of phytase.....	169
C. Characterization analysis of purified enzyme.....	170
1) Molecular weight.....	170
2) Optimum pH of reaction.....	170
3) Optimum temperature reaction.....	170
4) Temostability.....	171
5) Characterization of kinetics.....	171
6) Substrate specificity.....	171
2. The Second Subject: Development of expression system for overproduction of phytase.....	171
A. Cloning of genes.....	171
B. Amplication of cDNA by RT-PCR.....	172
C. Sequencing and analysis of phytase genes.....	172
3. The third subject: Establishment of fermentation conditions for improving nutritional value of feed additives.....	173
A. Establishment of fermentation conditions for phytase production.....	173
B. Fermentation conditions of feed additives by wild type phytase.....	173
1) Degradation conditions of phytic in rice bran by fermentation.....	173
A) Effect of rice bran concentration.....	173
B) Effect of fermentation times.....	174
C) Effect of fermentation temperatures.....	174
D) Effect of fermentation pHs.....	174

2) Degradation conditions of phytic in soybean flour by fermentation.....	174
A) Effect of soybean flour concentration.....	174
B) Effect of fermentation times.....	175
C) Effect of fermentation temperatures.....	175
D) Effect of fermentation pHs.....	175
Part 2. Object of the secondary yaer.....	175
1. The First Subject: Characterization and practical use of phytase.....	176
A. Changes of activity and molecular weight by deglycosylation.....	176
B. Production of polyclonal antibody.....	176
C. Degradation ability of phytin with digestive enzyme.....	176
1) Effect of proteolytic enzyme for Degradation of phytin in rice bran....	176
2) Effect of proteolytic enzyme for Degradation of phytin in soybean flour.....	177
D. Stability of enzyme.....	177
1) Stability of enzyme against digestive enzyme.....	177
2) Storage stability of coenzyme.....	178
3) Establishment of drying and preparation technique.....	178
4) Characterization of dried preparation.....	178
2. The Second Subject: Development of expression system for overproduction of phytase.....	179
A. Construction of expression system of phytase.....	179
B. Production of recombination enzyme.....	179
C. Characterizaion analysis of recombination enzyme.....	180
1) Assay of glycosylation.....	180
2) Optimum condition of reaction of purified recombination enzyme.....	180
3) Temostability of purified recombination enzyme.....	180
4) Substrate specificity of purified recombination enzyme.....	181
5) Kinetics of purified recombination enzyme.....	181
3. The third subject: Establishment of fermentation conditions for improving nutritional value of feed additives.....	181
A. Establishment of solid rementation conditions using wild type.....	181
1) Degradation conditions of phytic acid in rice bran by solid fermentation.....	181
A) Effect of fermentation times.....	181
B) Effect of fermentation temperatures.....	182
2) Degradation conditions of phytic acid in soybean flour by solid fermentation.....	182
A) Effect of fermentation times.....	182
C) Effect of fermentation temperatures.....	182
B. Degradation conditions of phytic acid using recombination enzyme.....	182
1) Effect of phytase concentration.....	182
2) Effect of pHs.....	183

3) Effect of temperatures.....	183
Chapter 5. Application of the research.....	184
1. Necessities of additional study.....	184
2. Application of study.....	184
3. Direction of industrialization.....	184
Chapter 6. Information of foreign science and technology.....	186
Chapter 7. References.....	187



# 목 차

제출문.....	1
요약문.....	2
I. 제 목.....	2
II. 연구개발의 목적 및 필요성.....	2
III. 연구개발 내용 및 범위.....	3
영문요약.....	6
영문목차.....	9
국문목차.....	16
제 1 장 연구개발과제의 개요.....	22
제 1 절 연구개발의 목적.....	22
제 2 절 연구개발의 필요성.....	22
1. 기술적 측면.....	22
2. 경제·산업적 측면.....	25
3. 사회·문화적 측면.....	26
제 3 절 연구개발의 범위.....	28
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	29
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	32
제1 절 연구개발수행 방법.....	32
1. 제 1 세부과제: Phytase의 특성규명 및 실용화.....	32
가. Phytase 생산 균주의 분리 및 동정.....	32
1) Phytase 생산 균주의 분리 .....	32
2) 균주의 분리 및 동정.....	32
3) Phytase 생산 균주의 선발.....	33
4) 선별균주의 보존.....	33
5) 균주의 동정.....	33
나. 효소활성 및 단백질 농도측정.....	33
1) 단백질 농도측정.....	33
2) Phytase 활성 측정.....	34
3) Phosphatase 활성의 측정.....	34
다. Phytic acid의 정량.....	34
라. 균체량 측정.....	35
마. Phytase 생산을 위한 배양조건.....	35
1) Phytase 생산을 위한 최적 Ca <sup>2+</sup> ion 농도.....	35
2) Phytase 생산을 위한 최적 무기인산 농도.....	35
3) Phytase 생산을 위한 최적 pH.....	35
4) Phytase 생산을 위한 최적 온도.....	35
5) Phytase 생산을 위한 최적 배양 시간.....	36
바. Phytase의 정제.....	36

1) Phytase A 정제.....	36
2) Phytase B의 정제.....	36
사. Phytase의 생화학적 특성.....	37
1) 전기영동에 의한 순도검정 및 분자량 결정.....	37
2) 활성 최적조건.....	37
3) 온도 및 pH 안정성.....	37
4) Kinetics constant.....	37
아. Phytase의 안정성.....	37
1) 단위동물의 소화효소에 의한 안정성.....	37
2) 부형제에 의한 안정화.....	38
2. 제 2세부과제: Phytase 대량생산을 위한 발현시스템 개발.....	38
가. 실험균주와 배양조건.....	38
나. Genomic DNA의 분리.....	38
다. mRNA 분리.....	39
라. Phytase 유전자 증폭.....	39
마. pBlueScript를 이용한 cloning과 형질전환.....	39
바. DNA 분석.....	40
사. cDNA 증폭.....	40
아. Expression vector의 구축.....	41
자. His <sup>r</sup> 형질전환체의 선별.....	42
차. 형질전환 <i>Pastoris</i> 에서 phytase expression.....	42
3. 제 3 세부과제: 사료원 영양가향상을 위한 발효조건 확립.....	43
가. 미강 및 대두박의 분석.....	43
1) 일반성분의 분석.....	43
2) 무기인의 정량.....	43
3) Inositol phosphate의 정량.....	43
4) Phytic acid의 정량.....	44
5) 균체량 측정.....	44
나. 미강 중의 phytic acid 분해를 위한 발효조건.....	44
1) 액상 발효에 의한 phytic acid 분해조건.....	44
가) 농도에 따른 영향.....	44
나) 발효 시간에 따른 영향.....	46
다) 발효 온도에 따른 영향.....	46
라) 발효 pH에 따른 영향.....	46
2) 고상 발효에 의한 미강 중의 phytic acid 분해조건.....	46
가) 발효 시간에 따른 영향.....	46
나) 발효 온도에 따른 영향.....	47
다. 대두박 중의 phytic acid 분해를 위한 발효조건.....	47
1) 액상 발효에 의한 phytic acid 분해조건.....	47
가) 농도에 따른 영향.....	47
나) 발효 시간에 따른 영향.....	47
다) 발효 온도에 따른 영향.....	47

라) 발효 pH에 따른 영향.....	48
2) 고상 발효에 의한 phytic acid 분해조건.....	48
가) 발효 시간에 따른 영향.....	48
나) 발효 온도에 따른 영향.....	48
라. 미강과 대두박 중의 phytic acid 분해를 위한 효소반응조건.....	48
1) 미강 중의 phytic acid 분해를 위한 효소반응조건.....	48
2) 대두박 중의 phytic acid 분해를 위한 효소반응조건.....	49
제 2 절 연구개발수행 결과.....	49
1. 제1 세부과제 : Phytase의 특성규명 및 실용화.....	49
가. Phytase 생산균의 분리 및 특성.....	49
1) Phytase 생산균의 분리.....	49
2) Phytase 생산균의 동정.....	49
나. Phytase 정제.....	50
1) Phytase의 생산.....	50
2) Phytase의 정제.....	50
가) Phytase A 정제.....	50
나) Phytase B 정제.....	54
다. 정제효소의 특성 분석.....	64
1) 분자량 결정.....	64
2) 반응최적 pH.....	67
3) 최적 온도.....	68
4) 내열성.....	68
5) 동력학적 특성.....	72
6) 기질특이성.....	75
7) Deglycosylation에 따른 활성 및 분자량 변화.....	75
라. Polyclonal antibody 생산.....	78
마. 소화효소 공존시 phytase 활성.....	82
1) 미강 phytin 분해에 대한 단백질분해효소의 영향.....	82
2) 대두박 phytin 분해에 대한 단백질분해효소의 영향.....	83
바. 효소의 안정성.....	86
1) 가축의 소화효소에 의한 효소의 안정성.....	86
2) 조효소의 저장안정성.....	87
3) 건조, 제제화 기술 확립.....	95
가) 열풍건조법.....	98
나) 냉풍건조법.....	98
다) 분무건조법.....	98
라) 동결건조법.....	99
마) 경제성 비교 검토.....	99
바) 건조 제제 특성.....	99
2. 제 2세부과제: Phytase 대량생산을 위한 발현시스템 개발.....	101
가. <i>Aspergillus</i> sp. 5990 phytase 유전자 cloning.....	101
나. cDNA 증폭.....	101

다. Multiple integration을 위한 발현 벡터 구축.....	104
라. <i>Aspergillus</i> sp. 5990 <i>PhyA</i> 유전자 분석.....	111
마. Phytase 생산용 <i>Pichia pastoris</i> 형질전환체의 분석.....	111
바. 재조합 phytase 대량생산.....	111
라. 재조합, 야생형 및 시판용 phytase의 정제.....	111
1) Phytase의 정제.....	111
가) 야생형 phytase A의 정제.....	114
나) BASF phytase의 정제.....	117
다) 재조합 phytase의 정제.....	117
마. 재조합 정제효소의 특성.....	120
1) Glycosylation 정도.....	120
2) 재조합 정제효소의 반응최적 조건.....	124
3) 재조합 정제효소의 내열성.....	128
4) 재조합 정제효소의 기질 특이성.....	130
5) 재조합 정제효소의 kinetics.....	132
3. 제3 세부과제: 사료원 영양가향상을 위한 발효조건 확립.....	135
가. Phytase 생산을 위한 배양조건.....	135
1) Phytase 생산을 위한 최적 $Ca^{2+}$ ion 농도.....	135
2) Phytase 생산을 위한 최적 무기인산 농도.....	135
3) Phytase 생산을 위한 최적 pH.....	139
4) Phytase 생산을 위한 최적 온도.....	139
5) Phytase 생산을 위한 최적 배양 시간.....	143
나. 미강 중의 phytic acid 분해를 위한 발효조건.....	143
1) 미강의 일반성분 분석.....	143
2) 액상 발효에 의한 미강 중의 phytic acid 분해조건.....	143
가) 농도에 따른 영향.....	143
나) 발효 시간에 따른 영향.....	144
다) 발효 온도에 따른 영향.....	148
라) 발효 pH에 따른 영향.....	148
다. 고체 발효에 의한 미강 중의 phytic acid 분해조건.....	148
1) 발효 시간에 따른 영향.....	148
2) 발효 온도에 따른 영향.....	152
라. 대두박 중의 phytic acid 분해를 위한 발효조건.....	152
1) 대두박의 일반성분 분석.....	152
2) 액상 발효에 의한 대두박 중의 phytic acid 분해조건.....	152
가) 농도에 따른 영향.....	152
나) 발효 시간에 따른 영향.....	153
다) 발효 온도에 따른 영향.....	158
라) 발효 pH에 따른 영향.....	158
3) 고상 발효에 의한 대두박 중의 phytic acid 분해조건.....	158
가) 발효 시간에 따른 영향.....	158
나) 발효 온도에 따른 영향.....	162

마. 효소를 이용한 곡류 부산물중의 phytic acid의 분해조건.....	162
1) Phytase 농도의 영향.....	162
2) pH의 영향.....	163
3) 온도의 영향.....	167
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	169
제 1절 1차년도 연구개발 목표.....	169
1. 제 1 세부과제 Phytase의 특성규명 및 실용화.....	169
가. Phytase 생산균주의 분리 및 동정.....	169
나. Phytases의 정제방법 확립.....	169
다. 정제 효소의 특성분석.....	170
1) 분자량.....	170
2) 최적 반응 pH.....	170
3) 최적 반응 온도.....	170
4) 내열성.....	171
5) 동력학적 특성.....	171
6) 기질특이성.....	171
2. 제 2 세부과제 Phytase 대량생산을 위한 발현시스템 개발.....	171
가. 유전자 cloning.....	171
나. RT-PCR에 의한 cDNA 제조.....	172
다. Phytases 유전자 sequencing 및 분석.....	172
3. 제 3 세부과제 사료원 영양가향상을 위한 발효조건 확립.....	173
가. Phytase 생산을 위한 발효조건 확립.....	173
나. 야생주에 의한 사료원의 액상발효조건.....	173
1) 액상 발효에 의한 미강 중의 phytin 분해조건.....	173
가) 미강 농도에 따른 영향.....	173
나) 발효 시간에 따른 영향.....	174
다) 발효 온도에 따른 영향.....	174
라) 발효 pH에 따른 영향.....	174
2) 액상 발효에 의한 대두박 중의 phytin 분해조건.....	174
가) 대두박 농도에 따른 영향.....	174
나) 발효 시간에 따른 영향.....	175
다) 발효 온도에 따른 영향.....	175
라) 발효 pH에 따른 영향.....	175
제 2절 2차 년도 연구개발 목표.....	175
1. 제 1 세부과제 Phytase의 특성규명 및 실용화.....	176
가. Deglycosylation에 따른 활성 및 분자량 변화.....	176
나. Polyclonal antibody 생산.....	176
다. 소화효소 공존시 phytin 분해능.....	176
1) 미강 phytin 분해에 대한 단백질분해효소의 영향.....	176
2) 대두박 phytin 분해에 대한 단백질분해효소의 영향.....	177
라. 효소의 안정성.....	177
1) 가축의 소화효소에 의한 효소의 안정성.....	177

2) 조효소의 저장안정성.....	178
3) 건조, 제제화 기술 확립.....	178
4) 건조 제제 특성.....	178
2. 제 2 세부과제 Phytase 대량생산을 위한 발현시스템 개발.....	179
가. Phytase 발현 시스템 구축.....	179
나. 재조합 효소의 생산.....	179
다. 재조합효소의 특성분석.....	180
1) Glycosylation 정도.....	180
2) 재조합 정제효소의 반응최적 조건.....	180
3) 재조합 정제효소의 내열성.....	180
4) 재조합 정제효소의 기질 특이성.....	181
5) 재조합 정제효소의 kinetics.....	181
3. 제 3 세부과제 사료원 영양가향상을 위한 발효조건 확립.....	181
가. 야생주를 이용한 고상 발효조건 확립.....	181
1) 고체 발효에 의한 미강 중의 phytic acid 분해조건.....	181
가) 발효 시간에 따른 영향.....	181
나) 발효 온도에 따른 영향.....	182
2) 고상 발효에 의한 대두박 중의 phytic acid 분해조건.....	182
가) 발효 시간에 따른 영향.....	182
나) 발효 온도에 따른 영향.....	182
나. 재조합 효소를 이용한 phytic acid 분해조건.....	182
1) Phytase 농도의 영향.....	182
2) pH의 영향.....	183
3) 온도의 영향.....	183
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	184
1. 추가연구의 필요성.....	184
2. 타연구에의 응용.....	184
3. 기업화 추진방향.....	184
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	186
제 7 장 참고문헌.....	187

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적

본 연구의 최종목표는 *Aspergillus* sp. 5990이 생산하는 phytase를 식품 또는 사료첨가제로서 활용하기 위하여 상용화 가능한 phytase를 대량 생산하는데 있다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 토양으로부터 phytase 생산능이 강한 곰팡이를 분리하여 분리된 곰팡이의 동정과 phytase 생산을 위한 최적 발효조건을 확립하고, 생산된 phytase의 생화학적 특성을 확립하여 phytase를 사료첨가물로 사용하기 위한 실용화에 대한 기술을 확립하고자 한다. 제 2 세부과제에서는 분리된 phytase 생산균으로부터 phytase 유전자를 분리하여 유전자의 분석과 재조합 phytase를 대량생산하기 위한 yeast expression system을 개발하여 phytase 대량생산 기술을 확립하고자 한다. 생산된 재조합 phytase의 특성을 야생효소와 비교 분석함으로써 재조합 phytase의 실용화에 대한 기초자료를 확립하고, 사료첨가물로 사용할 것에 대비한 기초기술을 확립한다. 그리고 야생 및 재조합효소를 이용하여 사료원으로 이용되는 곡류부산물 중의 phytate를 분해하기 위한 효소반응조건을 확립하며, 야생주를 사용하여 사료원으로 이용되는 곡류부산물 중의 phytate를 분해하기 위한 액상 및 고상 발효조건을 확립하여 곡류부산물 중의 phytin을 효과적으로 분해시킴으로써 단위동물의 분변으로 배성되는 유기태인의 함량을 감소시킴으로써 환경친화형 사료개발을 위한 기술을 개발하고자 한다.

### 제 2 절 연구개발의 필요성

#### 1. 기술적 측면

Phytic acid (myoinositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate)는 곡류 또는 종자식물의 씨앗이 성장하는 중에 생성되는 화합물로서, 곡류와 콩과식물의 씨앗중 인과 inositol의 주요한 저장형태이다. 곡류중 총 인의 70-80%가

phytic acid 상태로 존재하며 구조적으로는 단백질과 결합된 마그네슘염 또는 칼슘염의 형태로 존재한다 (5, 23, 그림 1). 현재 가축과 양어용 사료로 사용되고 있는 옥수수, 대두 및 쌀겨 중에는 다량의 인을 함유하는 phytic acid가 단백질과 결합된 phytin 상태로 존재하며 전체 중량의 1-9%에 달한다. 이러한 인산염의 형태는 단위동물의 소화관에서 소화, 흡수되지 않아 가축의 무기질 결핍이라는 영양적인 면과 가축 사육지역의 하천이나 호수를 부영양화시켜 수질오염을 야기시키는 환경적인 면에서 악영향을 미치고 있다. Phytic acid를 분해시키기 위한 방편으로 화학적인 처리가 시도되었으나 공존하는 영양소를 파괴시키기 때문에 실용화되지 못하는 실정이다.

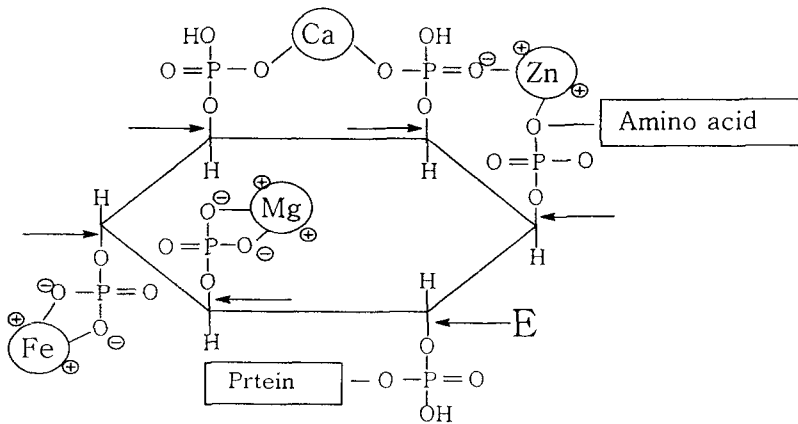


그림 1. 식물중 phytin의 구조

식품이나 사료에 영양적인 악영향을 미치지 않고 phytic acid를 분해시키기 위한 수단으로써 phytase가 가장 효과적이라는 사실이 입증된 후에 phytase를 생산하는 미생물을 검색하기 위한 연구가 1960년대부터 행해지고 있으며(41), 1993년 곰팡이로부터 phytase 유전자가 분리됨으로써(4) 외국의 몇몇 생물공학 회사(BASF사, Novo Nordisk사)에 의해 상품화되어 국내로 수입되고 있다.

사료중의 phytin-P의 생물이용도를 향상시키기 위한 목적으로 세 가지 방법이 주로 연구되고 있다. 첫째로 phytase를 산생하는 곰팡이를 이용하여 식물성



사료원인 대두분이나 canola분을 발효시켜 사료원 중의 phytin을 분해시키는 방법으로, 발효생성물을 가축에 급여한 결과 인의 흡수가 향상되는 것으로 보고되고 있다(13, 25, 27, 1). 두 번째는 사료원에다 직접 phytase를 가하여 일정 온도에서 효소반응을 시켜 phytin을 가수분해하는 방법으로 phytin의 분해는 효과적으로 일어나나 시설비가 높은 단점이 있다(19). 마지막으로 pellet 사료 제조시 phytase를 첨가하여 사료를 제조함으로써 사료와 함께 인위적으로 phytase를 공급하는 방법으로 부대설비가 필요치 않기 때문에 현재 가장 활발하게 연구되고 있는 방법이다. 그러나 pellet 사료 제조시에 사료의 내부온도는 약 90°C로 상승된다. 이러한 pelleting 온도에서 효소가 안정해야 사료를 섭취한 가축의 소화관에서 phytase가 활성을 나타내어 사료중의 phytic acid를 분해하여 인을 흡수할 수 있다(54). 따라서 pelleting 온도에서도 안정한, 보다 내열성이 강한 phytase를 생산하기 위하여 내열성 곰팡이를 대상으로 연구가 진행되고 있으나 현재까지 뚜렷한 결과가 없는 실정이다.

국내에서의 phytase에 관한 연구는 세균에 국한된 연구로써 주로 *Bacillus* sp.(18)와 *Enterobacter* sp. (54)가 산생하는 phytase에 국한된 실정이다. 세균에 의해 생산되는 phytase는 glycosylation되어 있지 않기 때문에 곰팡이가 생산하는 phytase에 비해 단백질 분해효소에 대하여 민감하며, 낮은 pH에서 불안정하기 때문에 사료첨가제로서의 실용화에 의문을 제시하고 있다. 그리고 세균에 의해 생산되는 phytase는 1 종으로 2 종류의 phytase와 1종의 phosphatase를 동시에 생산하는 *Aspergillus*속의 곰팡이에 비해 phytase 활성이 훨씬 낮은 것이 단점이다.

최근 본 연구 책임자에 의해 토양으로부터 30여종의 곰팡이를 분리하여 phytase 활성을 측정된 결과 2종의 곰팡이가 phytase 활성이 높은 것으로 나타났다. 그 중에서도 *Aspergillus* sp. 5990 (KCTC 8939P)은 현재 상용 phytase로 사용되고 있는 *A. niger* NRRL 3135에 비해 phytase 활성이 5배 가량 높은 것으로 나타났으며 내열성 또한 우수한 것으로 판명되었다(20, 21).

따라서 본 연구책임자에 의해 분리된 *Aspergillus* sp. 5990이 산생하는 phytases를 사료첨가제로 이용하기 위하여 phytases의 특성을 규명하며, 이들의 유전자를 분리하여 phytases 대량 생산을 위한 효모와 곰팡이 발현 system을 개발하고자 한다 그리고 *Aspergillus* sp. 5990을 사용하여 사료원으로 이용

되고 있는 곡류부산물 중의 phytic acid를 분해할 수 있는 액상 및 고상 발효 조건을 확립함으로써 사료중의 인을 비롯한 무기질의 생물이용도를 증가시켜 영양적, 환경적인 유해인자가 제거된 환경친화성 저오염 사료개발을 위한 발효 조건을 확립하고자 한다.

## 2. 경제·산업적 측면

육상동물의 정상적인 생리작용을 유지하기 위하여 3대 영양소는 물론 비타민류와 함께 각종 무기질을 요구한다. 이러한 무기질들은 체 골격 형성, 산-염기의 평형조절, 삼투압 조절 및 각종 효소의 보조인자로 작용해 생체의 활동, 성숙 및 성장에 필수적인 요소이다. 현재와 같이 밀집 사육이 이루어지고 있는 돼지나 닭의 경우 성장에 필요한 량의 무기질을 공급하기 위하여 인위적으로 배합사료에 무기질을 비롯한 무기질이 첨가된다. 그리고 배합사료 제조시 무기질의 첨가는 사료의 제조단가를 상승시킨다. 그 예로써 1995년 미국의 양계사료 중 phytin-P로써 배설된 인의 양은 9,000만불에 이르며, 배설되는 인은 수질오염의 원인으로 작용한다고 보고되고 있다

우리 나라의 경우 사료중의 무기질을 공급하기 위하여 triphosphate-Ca, biphosphate-Ca 또는 monophosphate-Ca 상태로 사료에 첨가되며, 연간 소비량은 100,000 톤 가량되며, 이는 400-450억원에 달한다. 막대한 양의 무기질을 사료에 첨가함으로써 사료의 단가가 상승되고, 흡수되지 않은 phytin-P는 분변으로 배설됨으로써 환경오염원으로 작용한다. 최근 들어 사료중의 phytin-P를 분해시킬 목적으로 배합사료에 phytase를 첨가하여 사료의 제조단가를 저하시키고 분변으로 배설되는 인의 함량을 감소시키고 있으며, 현재 우리나라에 수입되는 phytase의 량은 200 톤 가량으로 60억원에 달하며 매년 증가 추세에 있다.

가축사료에 phytase를 첨가하여 인의 이용율을 높이기 위하여 phytase가 효과적으로 소화기관내에서 작용하여야한다. 이러한 효과를 검증하기 위하여 phytase를 사료에 첨가한 결과, 위에서는 효소가 안정하여 높은 활성을 나타내지만 약알칼리성의 소장에서는 작용 pH의 차이로 인하여 활성이 저하된다. 그리고 보다 체계적인 연구로써 phytase를 소화효소인 trypsin과 pepsin으로 처

리한 결과, 소화효소에 의해 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(40). 이러한 결과는 소화기관내에서 phytase가 효과적으로 작용할 수 있는지의 척도가 되며, 특히 phytase가 사료첨가제로 사용되는 동물의 소화효소에 의한 phytase의 분해여부를 판정함으로써 보다 효과적인 phytase의 첨가량을 확립할 수 있다.

그리고 phytase에 의한 phytic acid의 가수분해물인 inositol phosphate들은 생리적으로 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히, inositol triphosphate는 동물과 식물세포에서 신호전달과 second messenger로서의 역할을 한다(41). 그리고 phytic acid와 inositol 유도체들은 당의 소화와 혈당조절기능(46), 항산화기능(8, 38, 17, 33), cholesterol과 triglyceride 저하효과(16), 삼투조절기능(30), 암치료(48, 6, 31, 36, 50, 51), Alzheimers 치료제, Parkinson 씨 병 치료제 및 동맥경화 치료제로서의 광범위한 약리기능이 있는 것으로 알려져 있으며(16) 이들에 대한 보다 체계적인 연구의 필요성이 부각되고 있으며, phytic acid의 분해산물을 이용한 제약산업에의 가능성이 기대되고 있다.

곡류 사료에 존재하는 인의 이용도를 높이기 위하여 phytase의 사료첨가효과는 우수한 것으로 알려져 있으나, 우리 나라에서의 phytase 생산은 전무한 실정이며, 외국의 효소회사로부터 전량 수입에 의존하고 있다. 따라서 국내의 기술로 phytase를 대량 생산함으로써 연간 60억원에 달하는 phytase의 수입을 대체함과 동시에 수출로 외화획득이 가능하다.

### 3. 사회·문화적 측면

반추동물은 phytic acid를 분해시킬 수 있는 미생물을 반추위에 보유하고 있기 때문에 미생물 효소에 의한 phytic acid로부터 무기인의 유리가 가능하다. 그러나 사람, 가금류 및 돼지와 같은 단위동물의 경우 phytic acid에 결합된 무기인의 이용이 불가능하다(26, 27). 영양적인 측면으로는 인산기를 지닌 phytic acid의 음이온이  $Ca^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Mg^{++}$  등의 이온과 이온결합을 형성하여 생성된 양이온-phytic acid의 복합체는 산성의 pH 영역에서는 용해되나, 소장과 같은 중성의 pH 영역에서는 불용성이 된다(49). 이러한 양이온-phytic acid의 복합체는 소장에서 흡수되지 않고 배설됨으로서 인과 무기질의 결핍증

을 초래한다. 특히 phytic acid와 잘 결합하여 흡수되지 않는 무기질은 Zn, Fe, Ca, Cu 등이며 phytic acid에 의한 Zn의 결핍이 실험동물과 가축에 대하여 보고되고 있다(3, 25, 35, 36, 39). Phytase로 처리된 대두분을 사료로 사용할 경우 생쥐와 원숭이의 Zn과 Cu의 흡수가 증가되며, 특히 *A. usamii*로 발효된 대두분을 투여한 경우도 동일한 결과를 나타내고 있다(13). 그리고 흡수되지 않고 동물의 배설물에 존재하는 phytic acid는 토양 미생물에 의하여 효소적으로 가수분해되어 생성된 유리인이 강이나 호수로 유입되어 인이 제한되어 있는 수생환경의 부영양화를 초래하여 조류의 과도한 성장과 산소결핍을 초래한다.

1998년 미국 Washington주의 수질관리부서의 보고에 위하면 Washington주에 있는 강의 59% 강하구의 65% 그리고 호수의 35%가 가축의 분변에 의한 무기인으로 오염되어 있다. 가축의 분변으로부터 인배설을 줄이기 위하여 유럽의 동물 사료업체들은 사료에 의무적으로 phytase를 첨가하기를 권장하고 있으며, 돼지나 닭사료에 phytase를 첨가함으로써 인의 흡수는 물론 인배설량을 60% 가량 감소시킬 수 있다고 보고되고 있다 (BASF Report).

최근의 조사에 의하면 가두리 양식장으로 인한 양식장 주변해역의 유기인은 양식장이 없는 곳보다 5 배 정도 높은 값으로 나타나 부영양화를 촉진시키는 것으로 나타났다 (29) 이러한 수질오염으로 인하여 병원균이 증식하기에 알맞은 환경이 조성되어 양식생물의 생리적 조건이 악화되면서 어류 질병이 빈발하게 발생하게 된다. 연안의 자가오염을 방지하기 위하여 무엇보다도 중요한 것은 양식어류의 사료로 이용되는 배합사료의 먹다 남은 찌꺼기와 배설되는 분비물이다. 따라서 어류가 완전히 섭취할 만큼 적정량의 사료를 투여하더라도 사료중의 phytin-P가 소화, 흡수되지 않는다면 이는 심각한 수질오염원으로 작용할 수 있다. 따라서 식물조직으로부터 이환되는 사료중의 phytic acid를 효소로 분해시켜 사료의 소화흡수율을 높인다면 양식어의 분비물이 감소하여 수계의 오염을 방지할 뿐만 아니라 사료효율을 높일 수 있다.

따라서 곡류부산물중에 존재하는 phytin-P을 생물학적 또는 효소적으로 분해시킴으로써 동물의 영양적인 면을 향상시킴과 동시에 분변으로 배설되는 인 함량을 감소시킴으로써 환경친화적인 저오염사료 개발이 가능하다.

### 제 3 절 연구개발의 범위

제 1 세부과제에서는 Phytase의 특성규명 및 실용화에 관한 연구로

- Phytase 생산균주의 분리
- Phytase 생산 균주의 동정
- Phytases의 정제방법 확립
- 정제 효소의 특성분석
- 정제효소의 특성 분석 및 항체제조
- 온도에 따른 효소의 활성과 2 차 구조분석
- 가축의 소화효소에 의한 효소의 안정성 측정
- 재조합 효소의 정제 및 특성
- 소화효소에 대한 안정성
- 재조합 효소의 저장안정성

제 2 세부과제에서는 Phytase 대량생산을 위한 발현시스템 개발;

- 유전자 cloning
- RT-PCR에 의한 cDNA 제조
- Phytases 유전자 sequencing 및 분석
- Phytase 발현 시스템 구축
- 재조합효소의 생산
- 발현최적화를 위한 배지조건 확립
- 발현최적화를 위한 배양조건 확립
- Phytase의 실용화 및 기술이전

제 3 세부과제에서는 사료원 영양가향상을 위한 발효조건 확립;

- Phytase 생산을 위한 발효조건 확립
- 야생주에 의한 사료원의 액상발효조건
- 야생주를 이용한 고상 발효조건 확립
- 효소를 이용한 phytic acid 분해조건
- 재조합효소의 대량생산

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재까지 발견된 phytase는 3-phytase와 6-phytase로 2종이 알려져 있다. 3-phytase (EC 3.1.3.8)는 *myoinositolhexakis phosphate*의 3-번위치에 있는 인산기를 우선적으로 분해하여 1,2,4,5,6-pentakisphosphate와 유리인산을 생성하며, 6-phytase (EC 3.1.3.26)는 *myoinositolhexakis phosphate*의 6-번위치에 있는 인산기를 우선적으로 분해하여 1,2,3,4,5-pentakisphosphate와 유리인산을 생성한다. 6-phytase의 경우 phytic acid를 완전히 분해하여 inositol과 유리인산을 생성하나, 3-phytase의 경우 최종산물은 inositol 대신에 phosphomonoester와 유리인산이다. 두 효소 공히 연속적인 탈인산화 반응에 의하여 phytic acid를 IP4, IP3, IP2 및 IP1로 분해시킨다. 3-phytase는 주로 세균이나 곰팡이 같은 미생물에서 주로 발견되며, 곡류와 같은 고등 식물에서는 6-phytase가 주로 발견된다(7). 대부분의 식물종자에 phytase가 존재하며, 특히 발아시 phytase의 활성이 증가된다(36, 7). 식물의 조직중에 분포하는 phytase는 사료제조시 열처리에 의하여 변성되어 소화관에서 그 기능을 발휘하지 못하고, 특히 식물유래 phytase는 위장에서의 낮은 pH와 pepsin의 작용에 의하여 대부분의 활성이 소실된다. 따라서 보다 내열성이 강하고 낮은 pH와 pepsin에 보다 안정한 phytase를 찾기 위한 연구로 미생물이 주 대상으로 부각되고 있다.

세균성 phytase에 관한 연구로써 대장균에서 분리된 2종의 phytase(10)와 토양의 인 cycle에 관여하는 4종의 *Pseudomonas*속(37)으로부터 분리된 phytase는 균체내 효소로 산성의 pH 영역에서 최대활성을 나타낸다. 그리고 *Aerobacter aerogenes*(11), *Bacillus subtilis*(34), *Klebsiella aerogenes*(45), *Pseudomonas* sp.(15) 등의 세균에서 phytase가 분리되어 보고되고 있으나 균체내 효소로 알려져 있다. 그러나 *Bacillus*속(34), *Bacillus subtilis* (natto) N-77균(44) 및 *Bacillus* DS-11(18)로부터 분리된 phytase들은 균체외로 분비되기 때문에 상용화 가능성이 높다. 특히 *Bacillus* DS-11로부터 분리된 phytase는 내열성이 높아 사료제조시에 수반되는 고온의 팔렛팅 온도에서도 안정한 것으로 밝혀졌다. 그러나 세균이 생산하는 phytase는 glycosylation되어

있지 않기 때문에 곰팡이가 생산하는 phytase에 비해 분자량이 적으나 단백질 분해효소에 대하여 민감하며, 낮은 pH에서 불안정하기 때문에 사료첨가제로서의 실용화에 의문을 제시하고 있다. 특히 세균에 의해 생산되는 phytase는 1종으로 2 종류의 phytase와 1종의 phosphatase를 동시에 생산하는 *Aspergillus*속의 곰팡이에 비해 phytase 활성이 훨씬 낮다.

이러한 이유 때문에 곰팡이가 생산하는 phytase가 보다 효율적이며, 토양으로부터 84종의 곰팡이를 검색한 결과 *Aspergillus*속이 phytase 생산능이 가장 우수한 것으로 나타났다(14). 그 중에서도 특히 *A. niger* NRRL 3135가 가장 높은 활성의 phytase를 생산하며(43), 이 균주는 2종의 phytase와 1종의 phosphatase를 생산하는 것으로 밝혀졌다. 그후 *A. niger*로부터 2 개의 유전자, *phyA*와 *phyB*, 가 분리되어 형질전환의 시발점이 마련되었다(4). *A. niger* phytase의 3 차 구조의 안정화에 있어서 disulfide 결합이 주요한 역할을 하며, 유전공학적으로 보다 많은 disulfide 결합을 부여함으로써 내열성이 높은 phytase 생산이 가능한 것으로 보고되고 있다(47). Phytase를 생산하는 6종의 곰팡이로부터 phytase 유전자를 cloning하여 다른 곰팡이 또는 효모에 형질전환시켜 얻은 phytase들의 물리화학적인 특성을 조사한 결과, 다소 차이는 있지만 모두 glycosylation된 채 발견되었으며, glycosylation의 정도는 효소의 비활성과 효소의 folding에 영향을 미치지 않은 것으로 보고되고 있다(32, 53). 그리고 *A. niger*의 phytase 유전자(*phyA*)를 효모의 형질발현 vector인 pYES2에 도입시켜 *S. cerevisiae*로 phytase를 생산한 결과, 천연효소보다 glycosylation의 정도가 2배 가량 높게 나타났으며 내열성이 향상되었다. 그리고 당부분을 제거함으로써 효소활성은 9% 정도 감소하였으며, 내열성은 40% 정도 소실됨으로써 phytase의 내열성은 glycosylation의 정도에 따라 영향을 미친다는 것을 알 수 있다(11).

이상과 같이 phytase에 관한 연구는 주로 사료중의 phytic acid를 분해시키기 위하여 pelleting 온도에서 견딜 수 있는 내열성을 향상시킬 목적으로 진행되고 있으며, 미국의 농무성, 스위스의 Hoffmann-La Roche사, 핀랜드의 Rohm사 및 네델란드의 Gist-brocades사 등이 주도적인 연구를 행하고 있으며, 이러한 연구는 *A. niger* NRRL 3135의 *phyA*와 *phyB* 유전자를 이용한 promoter와 vector의 개발, site-specific mutation과 glycosylation에 의한 내열

성과 단백질 분해효소에 대한 안정성 향상에 치중되고 있다. 그러나 우리나라의 경우 phytase에 관한 연구는 내열성 세균인 *Bacillus amyloliquefaciens*에 국한되어 있는 실정이며, 보다 촉매활성이 높고, 산성의 pH 영역에서 안정한 곰팡이 phytase에 관한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구책임자에 의해 분리된 *Aspergillus* sp. 5990은 현재 상업적으로 사용되고 있는 *A. niger* NRRL 3135에 비해 phytase 생산성이 5배 가량 높고 내열성 또한 높은 것으로 나타나 현재 특허출원 중에 있다. 따라서 이균의 유전자를 이용하여 재조합 phytase를 생산함으로써 국내 생물벤처산업의 활성화에 기여할 수 있다. 그리고 국내 기술에 의해 BASF사나 Novo사에서 생산되는 phytase보다 우수한 phytase 생산이 가능하여 수입되는 phytase를 대체할 수 있다.

사료원료로 사용되는 곡류 및 두류 부산물 중의 phytic acid를 액상 또는 고상발효를 통하여 분해시킴으로써 부산물의 영양가를 향상시키고 가축의 분변으로 배설되는 인량을 감소시킴으로써 환경친화성 사료개발이 가능하다. 그리고 다른 식물성 사료원료(옥수수박, canola 박, 면실박 등)에 적용함으로써 부산물의 소화율을 증가시키고 아울러 사료의 단가를 저하시킴으로써 사료산업의 활성화를 꾀할 뿐 아니라 축산인의 사료구입비용을 경감시킬 것으로 예상된다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1 절 연구개발수행 방법

#### 1. 제 1 세부과제: Phytase의 특성규명 및 실용화

제 1 세부과제에서는 토양으로부터 분리된 phytase 생산균주가 생산한 야생형 phytase와 yeast expression system을 사용하여 생산된 재조합 phytase의 정제방법을 확립하고 두 효소의 생화학적 특성을 규명하여 산업화에 대비한 자료를 구축한다. 그리고 재조합 phytase의 실용화를 소화효소에 대한 안정성과 저장방법 및 저장 기간에 개한 안정성을 확립함으로써 phytase의 실용화에 대비한 안정성 조건을 확립한다.

#### 가. Phytase 생산 균주의 분리 및 동정

##### 1) Phytase 생산 균주의 분리

균주 분리용 지료로서 토양, 썩은 미강 등을 시료로 하여 phytase screening medium (PSM)으로 검색, 분리하였다. 본 연구개발에 사용된 배지 중 phytase 생산 균주의 검색 배지로서는 PSM (phytase screening medium; 1% sucrose, 0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.3% trypton, 0.2% yeast extract, 0.005% KCl, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.001% MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.001% FeSO<sub>4</sub>, pH7.0)을 사용하였다. 그리고, 균주의 배양에는 최소배지로 CD 배지 (Czapek-Dox medium, NaNO<sub>3</sub> 0.3%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, KCl 0.05%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001%, sucrose 3%)를 사용하였고, 완전배지로서 CD 배지에 casamino acid 와 yeast extract를 각각 0.2%씩 첨가된 것을 사용하였다. 그리고, 고체배지는 위의 액체배지에 1.5%의 한천을 첨가하여 조제하였다.

##### 2) 균주의 분리 및 동정

균주의 분리는 토양 5 g에 멸균한 0.1% Tween#80 용액을 100 ml 가하여 초음파 세척기 (주파수 47 kHz, 5분)로써 현탁시켜 glass filter (1G3)로서 여

과하였다. 이 여액을 0.1% Triton X-100을 함유한 PSM 평판배지에 각각 도말하여 30℃에서 3일간 배양하여 각 colony를 취하였다. 분리된 균주는 다시 PSM 액체 배지에 각각 접종하고, 30℃에서 3일간 배양한 후에 원심 분리하여 균체를 제거한 다음, phytase활성을 측정, 비교하였다. 이 결과 균주 배양액의 효소활성이 강한 균주는 *Aspergillus* 속 균주로 추정되었기에 이후의 실험은 *Aspergillus* 속 균주와 관련하여 진행하였다.

### 3) Phytase 생산 균주의 선별

Phytase 생산 미생물의 검색은 위에서 분리한 균주를 30℃에서 7일간 배양한 사면배지에 0.1% Tween#80 용액 5 ml를 가한 후, 1 g의 CaCO<sub>3</sub>를 가하여 격렬하게 교반하였다. 이를 무균적으로 흡인여과 (glass filter 1G3) 후, 여액을 원심분리 (3,000xg, 10분) 하고 잔사에 멸균 증류수를 가하여 포자수가 약 1x10<sup>6</sup>/ml의 포자 현탁액을 얻었다. 이 포자 현탁액 0.1 ml씩을 각각 취하여, PSM배지에 도말하고 30℃에서 3일간 배양하여 각각의 균주를 얻었다. 분리된 각 균주는 다시 PSM액체배지에 접종하여 30℃에서 3일간 진탕 배양하고 원심분리 (3,000xg, 20분)한 후 균체를 제거한 배양액 중 phytase 활성이 가장 높은 균주를 선별하였다.

### 4) 선별균주의 보존

선별된 균주의 보존은 최소 한천사면배지에 각각 도말하여 30℃에서 3일간 배양하고, 4℃에 보존하면서 2개월마다 계대배양하여 본 실험에 사용하였다.

### 5) 균주의 동정

균주의 동정은 한국과학기술원 생명과학연구소에 의뢰하여 동정하였다.

## 나. 효소활성 및 단백질 농도측정

### 1) 단백질 농도측정

효소 단백질의 농도는 Bradford의 방법 (1976)에 따라 측정하고, 표준단백

질 (bovine serum albumin)로서 측정된 검량곡선에 의하여 단백질 농도를 결정하였다.

## 2) Phytase 활성 측정

Phytase 활성측정은 Greiner 등 (1993)의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 즉, 원심분리된 배양액 50  $\mu$ l에 250  $\mu$ l의 5 mM Na-phytate를 함유하는 0.5 M Na-citrate buffer, pH 5.0를 가하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후 1.5 ml의 발색액 (acetone: 5 N sulfuric acid: 10 mM ammonium hexamolybdate = 2 : 1 : 1 (v/v/v))과 100  $\mu$ l의 1.0 M citric acid를 순차적으로 가하여 반응을 정지시키고 동시에 발색시켰다. 이를 2,500 x g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 파장 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 활성단위 (Unit)는 분당 유리된 무기인산의  $\mu$  mole수로서 나타내었다.

## 3) Phosphatase 활성의 측정

Phosphatase 활성의 측정은 Pasamontes 등 (1997)의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 즉, 적절히 희석된 효소용액 10  $\mu$ l에 2.5 ml의 0.8 mM p-nitrophenyl phosphate를 함유하는 0.5 M Na-citrate buffer, pH 5.0를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 1.0 ml의 0.5 N NaOH로서 반응을 종료시켜 이를 파장 407 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 활성단위 (Unit)는 위 반응 조건에서 1분 동안 1  $\mu$  mole의 p-nitrophenyl를 유리시키는 효소의 량으로 나타내었다.

## 다. Phytic acid의 정량

Phytic acid의 정량은 Latta와 Eskin의 방법 (1980)으로 하였다. 즉, 시료 5 g에 100 ml의 2.4% HCl을 가하여 실온에서 1시간 동안 교반 추출 후 원심분리하였다. 원심분리 상층액 1-5 ml (5-40  $\mu$ g phytic acid/ml)을 취하여 증류수로서 25 ml로 정용하고 이를 AG 1X8 컬럼 (Cl<sup>-</sup> form, 200-400 mesh)에 흡착시켰다. 여기에 15 ml의 0.1 M NaCl로서 무기인산을 제거한 후, 15 ml의 0.7 M NaCl로 phytic acid를 용출시켰다. Phytic acid 용출액 1.5 ml에 Wade 시약 (0.03% FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O in 0.3% sulfosalicylic acid)을 0.5 ml 가하여 5초 동안

vortex한 후, 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준용액으로서는 sodium phytate (Sigma Chemical Co.)를 사용하여 표준곡선을 작성하고 여기에 근거하여 시료 중의 phytic acid 함량을 결정하였다.

#### 라. 균체량 측정

균체량은 각 배양액의 원심분리 침전물에 증류수를 가하여 여과지 (Whatman No. 2)로 감압 여과하여 dry oven (105°C)에서 건조 후 무게를 측정하였다. 균체량은 건조무게에서 여과지 무게를 뺀 값을 배양액 ml당 무게 (mg)로서 환산하여 구하였다.

#### 마. Phytase 생산을 위한 배양조건

##### 1) Phytase 생산을 위한 최적 $Ca^{2+}$ ion 농도

본 효소의 최대생산을 위해 basal medium (1% pepton, 1% glucose, 0.3% phytic acid)에  $Ca^{2+}$  ion 농도가 1, 10, 30, 50, 100, 300, 500 및 1000  $\mu M$ 로 각각 조제하여 121°C에서 15분간 멸균한 후, 본 균주를 접종하고, 회전식 진탕 배양기 (30°C, 150 rpm)에 5일간 배양, 원심분리 (2,500 x g, 30 min) 시켜 얻은 상등액으로 효소활성을 측정하여 배지 중 최적  $Ca^{2+}$  농도를 결정하였다.

##### 2) Phytase 생산을 위한 최적 무기인산 농도

PSM에 인산 염 농도를 각각 0, 0.01, 0.05, 0.075, 0.1 및 0.2% 되도록 조제하여 멸균 후, 접종 배양후 위와 같은 방법으로 배지 중 최적 인산 염 농도를 결정하였다.

##### 3) Phytase 생산을 위한 최적 pH

최적  $Ca^{2+}$  ion과 최적 대두박 농도를 가한 basal medium을 멸균하기 전 각각 pH를 3, 4, 5, 6, 7 및 8로 조정하여 다음 멸균, 접종, 배양 후 효소활성을 측정하여 결정하였다.

##### 4) Phytase 생산을 위한 최적 온도

최적  $Ca^{2+}$  농도, 무기인산 농도의 배지로서 배양온도를 25°C에서 40°C까

지의 온도범위 (25, 30, 35 및 40)에서 배양한 다음, 효소활성을 측정하여 결정하였다.

#### 5) Phytase 생산을 위한 최적 배양 시간

최적  $\text{Ca}^{2+}$  ion 과 최적 대두박 농도 및 최적 pH로 basal medium을 조제한 다음 멸균 후 최적 온도에서 각각 배양시간을 24시간에서 192시간 (8일간) 까지 배양한 후 원심분리한 다음 상등액의 효소 활성을 측정하였다.

### 바. Phytase의 정제

#### 1) Phytase A 정제

예비실험을 통하여 *Aspergillus* sp. 5990의 배양액 중에는 2종류의 phytases가 존재함이 밝혀졌으며 본 연구진에 의해 확립된 방법에 따라 phytase A를 정제하였다. 먼저 조효소 용액의 pH를 8.0으로 조절하여 원심분리한 후 Q-Sepharose column에 통과시킴으로써 phytase B로 추정되는 단백질을 흡착시켰으며 Q-Sepharose 칼럼을 통과시켰던 효소 용액의 pH를 다시 3.0으로 조절하여 원심분리한 후 S-sepharose column에 phytase A를 흡착시켰다. 여기에 완충액의 NaCl 농도가 0-0.5 M되도록 직선 농도 구배법으로 S-Sepharose에 흡착된 단백질을 분당 2 ml의 유속으로 tube 당 4 ml씩 받아서 단백질 농도 및 효소 활성을 측정하여, 효소활성이 있는획분을 모아 1 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 함유하는 20 mM Na-citrate (pH 3.0) 완충액으로 3시간 동안 투석시킨 후 FPLC에 연결된 Mono-S column으로 정제하였다.

#### 2) Phytase B의 정제

조효소 용액의 pH를 8.0으로 조정하여 Q-Sepharose column에 phytase B를 흡착시킨 후 1 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 함유하는 Na-citrate (pH 8.0) 완충액에 NaCl 농도가 0-0.5 M되도록 하여 직선농도 구배법으로 분획 (2 ml/min, 4 ml/tube) 하여 단백질 농도 및 효소 활성을 측정하여 phytase B 활성이 높은 획분을 모아 20 mM Na-citrate (pH 3.0) 완충액으로 3시간 동안 투석한 후 Mono-S column으로 정제하였다.

## 사. Phytase의 생화학적 특성

### 1) 전기영동에 의한 순도검정 및 분자량 결정

순도 검정을 위한 분석은 SDS-PAGE 전기영동법 (22)에 따라 검정하며 표준단백질과의 이동을 비교하여 분자량을 결정하였다. 효소가 multimer 또는 monomer로 존재하는지의 여부를 알기 위하여 Superose 6 column을 통하여 gel 여과하여 분자량의 결정은 Whitaker 등의 방법(52)에 준하였다.

### 2) 활성 최적조건

효소의 반응 최적조건은 pH, 온도 및 효소의 농도, 반응시간에 각 조건별로 시판되는 phytic acid를 이용하여 측정하였다.

### 3) 온도 및 pH 안정성

30-70°C의 온도범위에서 효소용액을 30분간 방치 후 최적조건에서 활성을 측정하여 방치전과 비교하여 잔류활성을 측정하여 온도 안정성을 결정한다. pH 2.5-10.0의 범위에서 각 pH별로 30°C에서 30분간 방치 후 최적조건에서 활성을 측정하여 방치전과 비교하여 잔류활성을 측정하여 pH 안정성을 결정하였다.

### 4) Kinetics constant

Michaelis-Menten 상수 ( $K_m$ )와 최대 반응속도 ( $V_{max}$ )는 각기 다른 농도의 phytic acid를 사용하여 효소활성을 측정한 후 Enzifitter Program으로 결정한다.

## 아. Phytase의 안정성

### 1) 단위동물의 소화효소에 의한 안정성

일정량의 phytase를 porcine pancreatin, pepsin, trypsin 또는 chymotrypsin 과 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨후 phytase 활성을 측정하여 단백질 분해효소처리되지 않은 phytase에 대한 상대활성으로 결정하였다.

## 2) 부형제에 의한 안정화

정제된 phytase를 각기 다른 농도의 sorbitol, glycerol, xylitol과 혼합 한 후 10°C와 30°C에서 6개월간 저장하면서 효소활성의 변화를 측정하여 그 영향을 평가하였다.

## 2. 제 2세부과제: Phytase 대량생산을 위한 발현시스템 개발

### 가. 실험균주와 배양조건

Phytase 유전자를 분리하기 위한 균주는 제 1 세부과제에서 분리된 *Aspergillus* sp. 5990을 사용하였다. 균주배양을 위한 배지는 PSM (phytase screening medium; 1% sucrose, 0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.3% trypton, 0.2% yeast extract, 0.005% KCl, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.001% MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.001% FeSO<sub>4</sub>, pH7.0)을 사용하였다. 형질전환용 대장균은 100 mg의 ampicillin이 함유된 Lauria broth (LB)에서 37°C에서 배양하였다.

### 나. Genomic DNA의 분리

Genomin DNA는 Pasamontes (55)의 방법을 다소 수정하여 사용하였다. 즉, CD 배지 ml 당 106의 곰팡이 포자를 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 교반, 배양하여 균사체를 얻었다. 멸균 cheese gauze로 여과하여 2 g의 균사체를 genomic DNA와 mRNA 분리용 시료로 사용하였다. 균사체를 액체질소에서 미세하게 간 다음 0.1 g의 균사체 분말을 추출용 완충액 (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS), 0.4 g의 glass bead, 0.2 ml의 phenol:chloroform (1:1)을 Mini-beadbeater (Biospec, USA)에 넣고 vortex하였다. 진탕 후 시료를 20,000xg에서 15분간 원심분리 후 수용층을 회수하였다. 최종농도가 2.5 mg/ml이 되도록 RNase A를 가한 후 37°C에서 15분간 배양하였다. 반응혼액을 chloroform으로 추출하여 수용층을 원심분리하여 회수한 sgn DNA를 ethanol로 침전시켜 증류수에 용해시켰다. Proteinase K (50 mg/ml)를 가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 DNA를 phenol:chloroform으로 2회 추출한 후 ethanol로 침전시킨 후 증류수에 녹여

사용하였다.

#### 다. mRNA 분리

mRNA는 mRNA DIRECT Kit (Dynabeads, Oslo, Norway)를 사용하여 지침서에 따라 사용하였다. 즉, 0.1 g의 균사체 분말을 1 ml의 lysis/binding 완충액과 혼합한 후 0.4 g의 glass bead를 가하여 1 분 동안 vortex하였다. 반응액을 4°C, 20,000xg에서 5분 동안 원심분리 후 수용층을 회수하였다. Lysate를 Oligo(dT)25와 혼합시킨 후 상온에서 5분간 annealing 시켰다. mRNA 반응혼액이 든 vial을 Dynal MPC에 넣고 상등액을 제거한 후 mRNA를 0.5 ml의 bufer A로 2 회 씻은 후 buffer B로 1회 씻었다. 시료에 10 ml의 10 mM Tris-HCl을 가하고 65°C에서 2분간 방치하여 mRNA를 회수하였다. 분리된 mRNA는 -80°C에 저장하면서 사용하였다.

#### 라. Phytase 유전자 증폭

*Aspergillus* sp. 5990으로부터 분리된 genomic DNA를 PCR로 증폭시켰다. GeneBank를 근거로 DnaStar (Lasergene, USA)를 사용하여 *A. niger* phytase와 다른 histidine acid phosphatase간의 보존 구간을 확보하여 phyA/b 유전자에 특이한 primer를 design하였다. phytase A의 primer로는 primer AU, 5'-TCA-TAG-GCA-TCA-TGG-GCG-TCT-CTG-CTG-3'와 primer AD2, 5'-TCA-GCT-AAG-CAG-AAC-ACT-CCG-CCC-AAT-C-3'를 design하였다. Phytase B의 primer는 primer BU, 5'-CCT-TGG-CAA-TGC-CTC-GCA-CCT-CTC-TCC-3'과 primer BD2 5'-ATC-TAG-TCC-ATA-GCA-TCA-CCC-TCC-TGG-CA-3'을 합성하였다. PCR 반응을 위한 primer의 최종 농도는 100 pmol과 2.5 U pyrobest Taq polymerase (TaKaRa, Korea)를 사용하였다. 증폭 첫 cycle은 94°C에서 2분간 template DNA를 변성시키고, 다음 cycle부터는 94°C 1분간의 변성과 63°C (phytase A)과 62°C (phytase B)에서 2분간의 annealing, 72°C에서 3분간 enlongation을 30회 하였다. 최종 cycle에서는 enlongation을 10분간 시켰다.

#### 마. pBlueScript를 이용한 cloning과 형질전환



*Sma*I 제한효소로 처리하여 pBlueScript (Stratagene, Ca, USA)를 직선화시킨 후 phenol:chloroform과 ethanol처리로 정제하였다. 20 pmol의 정제된 vector와 40 U의 CIAP (TaKaRa, Shiga, Japan)를 50 ul의 반응혼액에 넣고 37°C에서 5분간 반응시켜 5'의 인산기를 제거하였다. 75°C에서 10분간 열처리하여 calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)를 불활성화시킨 후 탈인산화된 vector를 phenol:chloroform: isopropanol (PCI)로 2회 추출하여 최종적으로 QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)로 정제하였다. PCR로 얻은 phytase 유전자를 동량의 PCI로 처리하여 ethanol로 정제하였다. 5 ug의 정제된 DNA를 1 ul의 10 mM ATP, 20 U의 T4 polynucleotide kinase (TaKaRa, Shiga, Japan), reaction buffer를 가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 95°C 10분간 열처리하여 효소를 불활성화 시켰다. 인산화된 DNA를 PCI로 추출하고 QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)로 정제하였다.

정제된 *phyA/B*를 *Sma*I site가 있는 pBluescript에 삽입시키기 위해 60 fmol의 pBluescript, 0.54 pmol의 인산화된 DNA와 3 U의 T4 DNA ligase를 혼합하여 15°C에서 60시간 반응시켰다. Ligation된 DNA를 DH5  $\alpha$  F' (BRL)에 형질전환시켜 IPTG와 ampicillin이 함유된 LB 배지에서 배양하였다. Phytase 유전자를 지닌 clone은 *Xba*I-*Hind*III 효소로 처리하여 확인하였다.

#### 바. DNA 분석

DNA 분석은 ALFexpress AutoRead sequencing kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 이용하여 dideoxy chain termination법으로 행하였다(56). Sequencing용 primer는 미지의 영역을 결정하기 위한 universal primer로써 기지의 sequence를 근거로 합성하였다. ALF win sequence analysis package로 분석된 sequence를 DNASTAR program으로 더 분석하였다. Sequence homology를 비교하기 위하여 BLAST (Basic Local Alignment Tool)와 FASTA 및 CLUSTALW program을 사용하였다.

#### 사. cDNA 증폭

*Aspergillus* sp. 5990 phytase 유전자의 cDNA는 RT-PCR에 의하여 행하

였다 (57). cDNA의 first strand는 0.25 U AMV reverse transcriptase XL (TaKara, Korea)와 0.125 uM oligo-dT adaptor primer 및 1 ul의 *Aspergillus* sp. 5990 mRNA를 주형으로 사용하였다. 증폭은 TP 240 (TaKara, Japan)을 사용하였다. cDNA 합성은 42°C에서 30분간 행하고 99°C에서 5분간 열처리하여 RT를 변성시켰다. 두 번째 PCR에 의한 DNA 증폭은 primer AUMEcoRI 5'-CGG AAT TCC TGG CAG TCC CCG CCT-3'와 primer ADMEcoRI 5'-CGG AAT TCA GGT AAT TCA GCT AAG CAA AAC ACTC-3' B를 이용하여 phytase A 유전자를 PCR로 증폭시켰다. 반응혼액의 최종농도는 200 pmol의 각 primer, 2.5 mM의 MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U의 TaKaRa Taq (TaKaRa, Korea)를 80 ul로 맞추었다. 최종 반응 혼액에 20 ul의 cDNA를 가하고 PCR 하였다. 증폭 첫 cycle은 94°C에서 2분간 template DNA를 변성시키고, 다음 cycle부터는 94°C에서 1분간의 변성과 63°C (*phyA*)과 62°C (*phyB*)에서 2분간의 annealing, 72°C에서 3분간 enlongation을 30회 하였다. 최종 cycle에서는 enlongation을 10분간 시켰다.

#### 아. Expression vector의 구축

pPIC9K (Invitrogen, CA, USA) expression vector를 *EcoR*I으로 처리하여 직선화하고, agarose 전기영동에 의해 분리된 DNA band를 electroelution에 의하여 분리하였다. 분리된 DNA를 phenol-chloroform extraction에 의하여 정제하고 2.5 M ammonium acetate 및 3 M sodium acetate로 추출한 후 탈이온수에 녹였다. 20 pmole의 정제된 vector를 40 U의 CIAP를 가하여 37°C에서 30분간 처리하여 5'말단의 인산기를 제거하였다. 탈인산화된 vector를 2회의 PCI에 의하여 추출하고 QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다.

RT-PCR에 의해 증폭된 phytase cDNA 절편 (*PhyAMC*, 1.4 kb)을 *EcoR*I으로 처리하여 cohesive 말단을 만들고 PCI 추출과 Qiaquick Nucleotide Removal Kit를 이용하여 정제하였다 (*PhyAMC*).

정제된 *PhyAMC* fragmant를 *EcoR*I site가 있는 pBluescript에 ligation시켰다. 30 fmol의 *EcoR*I digested-vector, 90 fmol의 insert, 1 U의 T4 DNA ligase을 20 ul의 반응액에 혼합하여 15°C에서 60시간 반응시켰다. Ligation된

DNA를 DH5  $\alpha$  F' (BRL)에 형질전환시켜 ampicillin이 함유된 LB 배지에서 배양하였다. Phytase 유전자를 지닌 clone은 *EcoRI*으로 처리하여 확인하였다. Insert의 위치는 *BglII*로 확인하였다. 정확한 위치와 size를 지닌 적당한 clone을 선별하여 PKAMC라 명명하였다. PKAMC를 Midi Prep Kit (Promega, WI, USA)로 제조하여 부분적으로 DNA를 분석하여 reading frame을 확인하였다.

자. His<sup>+</sup> 형질전환체의 선별

PKMC를 *PmeI*으로 직선화한 후 두 종의 *P. pastoris*, KM71 (Mut<sup>s</sup>, methanol utilization slow)과 GS115 (야생형)에 Gene PulserII (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 electroporation 시켰다. *Pichia pastoris*를 배양한 5 ml의 YPD 배지를 500 ml의 새 배지로 옮긴 후 OD<sub>600</sub>에서 1.5가 될 때까지 배양하였다. 세포를 15,000xg에서 5분간 원심분리하여 500 ml의 냉 DW와 250 ml의 냉 DW로 씻고 최종적으로 20 ml의 1 M sorbitol로 씻는다. *Pichia pastris* competent cell을 1 ml의 냉 1 M sorbitol에 현탁시켜 80  $\mu$ l씩 분주하였다. 20  $\mu$ l의 직선화된 vector를 5  $\mu$ l의 TE buffer에 녹여 80  $\mu$ l의 competent cell과 혼합하여 0.2 cm Pulser cuvette에 옮긴다. Cuvette를 얼음에서 5분간 냉각시킨 후 electroporation 시킨다. 처리된 cell을 1 ml의 냉 1 M sorbitol과 혼합하여 얼음에 방치한다.

형질전환된 세포를 RDB (1 M sorbitol, 2% dextrose, 1.34% YNB, 4x10<sup>5</sup>% biotin, 0.005% amino acid)에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하여 His<sup>+</sup> 형질전환체를 선별하였다. 모든 His<sup>+</sup> 형질전환체를 각기 농도가 다른 G418 sulfate를 함유한 YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose)에 도말하여 30°C에서 5일간 배양하였다. 가장 높은 G418을 함유한 배지에서 생성되는 colony는 가장 많은 phytase gene이 multi-copy된 것으로 간주하여 -70°C에 저장하였다.

차. 형질전환 *Pastoris*에서 phytase expression

AMC/KM71이라 명명된 colony를 500 ml의 BMGY 배지 (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, 1.34% YNB, 4x10<sup>5</sup>%

amino acid, 1% glycerol)에 접종시켜 30°C에서 OD<sub>600</sub>에서 5.0까지 될 때까지 (15시간) 배양시켰다. 원심분리에 의해 세포를 회수하여 100 ml의 BMMY 배지 (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, 1.34% YNB, 4x10<sup>5</sup>% amino acid, 0.5% methanol)에 접종시켜 30°C, 250 rpm으로 5 일 동안 배양하였다. 효소유도를 위하여 100% methanol을 24시간마다 배지의 0.5%를 가하였다.

### 3. 제 3 세부과제: 사료원 영양가향상을 위한 발효조건 확립

본 연구개발에 사용된 균주는 제 1 세부과제에서 분리된 *Aspergillus* sp. 5990을 사용하였으며, 실험 재료로 사용된 미강과 대두박은 (주)대한제당으로부터 기증 받아 실험에 사용하였다.

#### 가. 미강 및 대두박의 분석

##### 1) 일반성분의 분석

동결상태로 보관중인 미강, 대두박을 AOAC법 (1980)에 따라 수분은 상압 가열 건조법으로 단백질은 semimicro kjeldahl법, 지질은 Soxhlet법 그리고 회분은 건식회화법으로 정량하였다.

##### 2) 무기인의 정량

무기인의 정량은 Greiner 등 (1993)의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 즉, 원심분리된 배양액 50  $\mu$ l에 250  $\mu$ l의 5 mM Na-phytate를 함유하는 0.5 M Na-citrate buffer, pH 5.0를 가하여 1.5 ml의 반응 정지액 (aceton: 5 N sulfuric acid: 10 mM ammonium hexamolibdate = 2 : 1 : 1 (v/v/v))과 100  $\mu$ l의 1.0 M citric acid를 순차적으로 가하여 반응을 정지시킴과 동시에 발색시켰다. 이를 2,500 x g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 파장 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 활성단위 (Unit)는 분당 유리된 무기인산의  $\mu$  mole수로서 나타내었다.

##### 3) Inositol phosphates의 정량

Inositol phosphates의 정량은 Heinonen 와 Lahti의 방법 (1981)으로 하였다. 즉, 시료 5 또는 10 g에 40 or 45 ml의 0.5 M HCl을 가한 후 실온에서 30 분 동안 교반 추출시킨 후 12,000 x g에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리된 상층액을 25 ml 취하여 이를 Dowex-50컬럼에 불순물을 흡착시켰다. 여기에 10 ml의 D.W로 씻어 모든 획분을 모아 농축시켰다. 농축액을 D.W로 5 ml 정용한 후 여과하여 Table 1.의 조건으로 HPLC로써 분석하였다.

#### 4) Phytic acid의 정량

Phytic acid의 정량은 Latta와 Eskin의 방법 (1980)으로 하였다. 즉, 시료 5 g에 100 ml 의 2.4% HCl을 가하여 실온에서 1시간 동안 교반 추출 후 원심 분리하였다. 원심분리 상층액 1-5 ml (5-40  $\mu\text{g}$  phytic acid/ml)을 취하여 증류수로서 25 ml로 정용하고 이를 AG 1X8 컬럼 ( $\text{Cl}^-$  form, 200-400 mesh)에 흡착시켰다. 여기에 15 ml의 0.1 M NaCl로서 무기인산을 제거한 후, 15 ml의 0.7 M NaCl로 phytic acid를 용출시켰다. Phytic acid 용출액 1.5 ml에 Wade 시약 (0.03%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in 0.3% sulfosalicylic acid)을 0.5 ml 가하여 5초 동안 vortex한 후, 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준용액으로서는 sodium phytate (Sigma Chemical Co.)를 사용하여 표준곡선을 작성하고 여기에 근거하여 시료 중의 phytic acid 함량을 결정하였다.

#### 5) 균체량 측정

균체량은 각 배양액의 원심분리 침전물에 증류수를 가하여 여과지 (Whatman No. 2)로 감압 여과하여 dry oven (105°C)에서 건조 후 무게를 측정하였다. 균체량은 건조무게에서 여과지 무게를 뺀 값을 배양액 ml당 무게 (mg)로서 환산하여 구하였다.

#### 나. 미강 중의 phytic acid 분해를 위한 발효조건

##### 1) 액상 발효에 의한 phytic acid 분해조건

##### 가) 농도에 따른 영향

Table 1. Analysis conditions for inositol phosphates by high performance liquid chromatography

Column	LiChrospher 60 RP-select B (5 $\mu\text{m}$ ) 125 x 4 mm (Merck, Darmstadt)
Eluents	500 ml DW + 500 ml methanol + 22.5 mM TBA-OH (adjusted to pH 4.3 with 9 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
Flow rate	1 ml/min
temperature	40°C
Injection volume	10 $\mu\text{l}$

미강 3, 5, 7, 10, 20, 30 g을 250 ml 삼각 플라스크에 각각 3개씩 취하여, 100 ml씩의 증류수를 첨가한 다음 121℃에서 15분간 멸균하였다. 각각의 flask에 포자 현탁액 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml)을 100  $\mu$ l씩 접종하여, 35℃에서 150 rpm으로 5일간 진탕배양 한 후 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하여 농도에 따른 영향을 결정하였다.

#### 나) 발효 시간에 따른 영향

미강 10 g을 18개의 250 ml 삼각 플라스크에 각각 취하여, D.W 100 ml씩 첨가한 다음 121℃에서 15분간 멸균하였다. 각각의 flask에 포자 현탁액 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml)을 100  $\mu$ l씩 접종하여, 35℃에서 150 rpm으로 5일간 진탕배양하면서 0, 1, 2, 3, 4, 5일에 각각 3개씩 무작위로 꺼내어, 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하였다

#### 다) 발효 온도에 따른 영향

미강 10 g을 9개의 250 ml 삼각 플라스크에 취하여, D.W 100 ml씩 첨가한 다음, 121℃에서 15분간 멸균하였다. 각각의 flask에 포자 현탁액 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml)을 100  $\mu$ l씩 접종하여, 30℃, 35℃ 및 40℃에서 150 rpm으로 5일간 진탕배양 한 후, 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하였다.

#### 라) 발효 pH에 따른 영향

미강 10 g을 18개의 250 ml 삼각 플라스크에 취하여, D.W 100 ml씩 첨가한 다음, pH를 4, 5, 6, 7, 8, 및 9로 각각 3개씩 조정 한 후, 121℃에서 15분간 멸균하였다. 각각의 flask에 포자 현탁액 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml)을 100  $\mu$ l씩 접종하여, 35℃에서 150 rpm으로 5일간 진탕배양 한 후, 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하였다.

### 2) 고상 발효에 의한 미강 중의 phytic acid 분해조건

#### 가) 발효 시간에 따른 영향

미강 10 g을 18개의 100ml 삼각 플라스크에 각각 취하여, D.W 10 ml씩

첨가한 다음 121℃에서 15분간 멸균하였다. 각각의 flask에 포자 현탁액 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml)을 500  $\mu$ l씩 접종하여, 35℃에서 배양하면서 0, 1, 2, 3, 4, 5일에 각각 3개씩 무작위로 꺼내어, 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하였다.

나) 발효 온도에 따른 영향

미강 10 g을 12개의 100 ml 삼각 플라스크에 취하여, D.W 10 ml씩 첨가한 다음, 121℃에서 15분간 멸균하였다. 각각의 flask에 포자 현탁액 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml)을 500  $\mu$ l씩 접종하여, 25℃, 30℃, 35℃ 및 40℃에서 5일간 배양하여, 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하였다.

다. 대두박 중의 phytic acid 분해를 위한 발효조건

1) 액상 발효에 의한 phytic acid 분해조건

가) 농도에 따른 영향

대두박 0.3, 0.6, 0.9, 1.5, 2.1, 3 g 을, 100 ml 삼각 플라스크에 각각 3개씩 취하여, D.W 30 ml씩 첨가한 다음 121℃에서 15분간 멸균하였다. 각각의 flask에 포자 현탁액 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml)을 100  $\mu$ l씩 접종하여, 35℃에서 150 rpm으로 5일간 진탕배양 한 후 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하여 농도에 따른 영향을 결정하였다.

나) 발효 시간에 따른 영향

대두박 3 g을 18개의 100 ml 삼각 플라스크에 각각 취하여, D.W 30 ml씩 첨가한 다음 121℃에서 15분간 멸균하였다. 각각의 flask에 포자 현탁액 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml)을 100  $\mu$ l씩 접종하여, 35℃에서 150 rpm으로 5일간 진탕배양하면서 0, 1, 2, 3, 4, 5일에 각각 3개씩 무작위로 꺼내어, 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하였다.

다) 발효 온도에 따른 영향

대두박 3 g을 9개의 100 ml 삼각 플라스크에 취하여, D.W 30 ml씩 첨가



한 다음, 121℃에서 15분간 멸균하였다. 각각의 flask에 포자 현탁액 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml)을 100  $\mu$ l씩 접종하여, 30℃, 35℃, 및 40℃에서 150 rpm으로 5일간 진탕배양 한 후, 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하였다.

라) 발효 pH에 따른 영향

대두박 3 g을 18개의 100 ml 삼각 플라스크에 취하여, D.W 30 ml씩 첨가한 다음, pH 4, 5, 6, 7, 8, 9를 각각 3개씩 맞춘 후, 121℃에서 15분간 멸균하였다. 각각의 flask에 포자 현탁액 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml)을 100  $\mu$ l씩 접종하여, 35℃에서 150 rpm으로 5일간 진탕배양하여, 무기인산, phytic acid 및, pH를 측정하였다.

2) 고상 발효에 의한 phytic acid 분해조건

가) 발효 시간에 따른 영향

미강 10 g을 18개의 100 ml 삼각 플라스크에 각각 취하여, D.W 10 ml씩 첨가한 다음 121℃에서 15분간 멸균하였다. 각각의 flask에 포자 현탁액 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml)을 500  $\mu$ l씩 접종하여, 35℃에서 배양하면서 0, 1, 2, 3, 4, 5일에 각각 3개씩 무작위로 꺼내어, 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하였다.

나) 발효 온도에 따른 영향

미강 10 g을 12개의 100 ml 삼각 플라스크에 취하여, D.W 10 ml씩 첨가한 다음, 121℃에서 15분간 멸균하였다. 각각의 flask에 포자 현탁액 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml)을 500  $\mu$ l씩 접종하여, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃에서 15일간 배양 한 후, 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하였다.

라. 미강과 대두박 중의 phytic acid 분해를 위한 효소반응조건

1) 미강 중의 phytic acid 분해를 위한 효소반응조건

미강 중의 phytic acid 분해를 위하여 1 L flask에 미강 100g을 취하고 5배량의 물을 가하여 효소농도, 반응시간, 반응 pH 및 반응온도를 달리하여 반응

시킨 후 유리되는 유리인을 정량하여 효소반응의 최적조건을 확립하였다.

## 2) 대두박 중의 phytic acid 분해를 위한 효소반응조건

대두박 중의 phytic acid 분해를 위하여 1 L flask에 대두박 100g을 취하고 5배 량의 물을 가하여 효소농도, 반응시간, 반응 pH 및 반응온도를 달리하여 반응시킨 후 유리되는 유리인을 정량하여 효소반응의 최적조건을 확립하였다.

## 제 2 절 연구개발수행 결과

### 1. 제1 세부과제 : Phytase의 특성규명 및 실용화

#### 가. Phytase 생산균의 분리 및 특성

##### 1) Phytase 생산균의 분리

여수시 화양면과 부산시 남천동 소재 토양으로부터 분리된 20여종의 곰팡이를 phytase screening medium (PSM)으로 phytase 생산균을 검색한 결과 5종의 곰팡이가 분리되었다. 고상배지에서 phytase활성이 높은 5종의 *Aspergillus* 속과 KTCC에서 분양 받은 *A. niger* NRRL 3135를 액체배지에서 4일간 배양하여 phytase 활성을 비교한 결과 *A. niger* NRRL 3135에 비해 *Aspergillus* sp. 5990은 5배 정도 높은 phytase 활성을 나타내었다 (Table 2). 그리고 *Aspergillus* sp. 5970, 5960 및 5950은 액체 배양시에 phytase활성이 나타나지 않았다. 이러한 차이는 곰팡이가 성장시 산생하는 유기산에 의하여 calcium phytate가 용해됨으로써 false-positive로 나타난 것으로 추정된다.

##### 2) Phytase 생산균의 동정

특히 phytase 활성이 높은 *Aspergillus* sp. 5990을 생명공학연구소에 의뢰하여 동정하였다. 분리된 균주는 완전 한천배지에서 배양하였을 때,

외관상으로 곰팡이의 형태를 갖추고, 흰색 colony의 분생자의 색상이 초기에는 흰색에서 배양기간이 지남에 따라 연갈색에서 점차 진갈색의 색상을 가지는 것으로 나타났다. 또한 균사체가 솜털뭉치 형태를 가지고 부드러운 분생자를 가짐으로써 *Aspergillus* 속의 대표적인 특성을 나타내었으며, 배지에 따른 colony의 특성을 Table 2와 부표에 나타내었다. *Aspergillus niger* var. *awamori*로 동정된 본 균주는 유전자은행에 수탁하였다 (KTCT 8939P).

#### 나. Phytase 정제

##### 1) Phytase의 생산

멸균한 배지 6 L에 *Aspergillus* sp. 5990을 접종한 후 온도 30°C, pH 7.0, 교반 속도 350 rpm으로 하여 발효조에서 배양한 결과 24시간 후 균체의 성장이 일어나 균체 성장시 분비되는 유기산 등으로 인해 pH가 2.8 정도까지 저하하였다. 그리고 배양 후 50여 시간부터 pH가 상승하여 55시간 정도 경과했을 때 pH는 4.1이었으며, 배양 후 40 시간 정도부터 활성이 나타나기 시작하여 75 시간 정도 배양하였을 때 최대 활성을 나타냈으며, 이후 8일 정도까지도 활성을 유지하고 있었다. 그러나 균체량과 생성되는 단백질의 양은 계속 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 1). 따라서 phytase 정제를 위해 배양기간은 4일로 결정하였다.

##### 2) Phytase의 정제

###### 가) Phytase A 정제

*Aspergillus* sp. 5990 배양액으로부터 효소를 정제하기 위하여 통상 여과(100 mesh)와 원심분리(12,000 x g, 30분)법을 행하나 균사가 완전히 제거되지 않는 문제점이 있다. 본 기술개발에서는 혼재된 균사를 완전히 제거하기 위하여 배양액을 냉동 후 상온에서 해동한 cheese gauze로 여과함으로써 균사체를 완전히 제거할 수 있었다. *A. niger* var. *awamori* 균주의 배양액에는 두 종 이상의 phytase가 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 예비 실험 결과 phytase B는 pH 8.0에서 Q-Sepharose에 흡착되었으나 phytase A는 같은 조건의 칼럼에

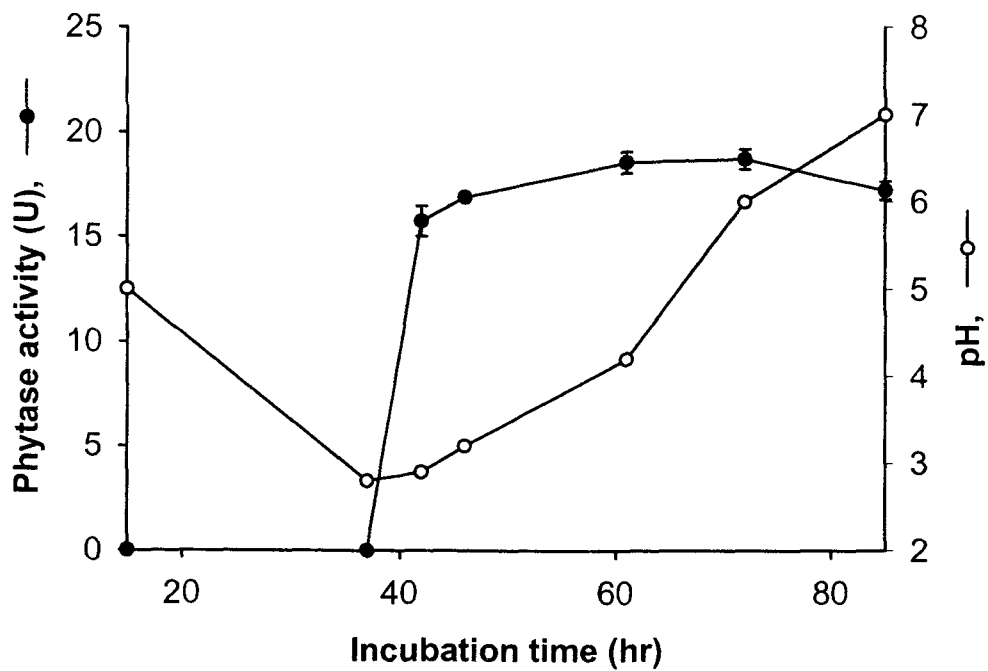
Table 2. Phytase activities from *Aspergillus* spp. isolated from soil compared with *A. ficuum* NRRL 3135

Strain	Activity* (U/ml)	
	pH 2.5	pH 5.5
<i>A. ficuum</i> NRRL 3135	2.58 (1.43)	2.97 (1.27)
<i>Aspergillus</i> sp. 5990	13.30 (2.14)	14.60 (1.22)
<i>Aspergillus</i> sp. 5980	1.97 (0.22)	2.13 (0.22)
<i>Aspergillus</i> sp. 5970	0.31 (0.12)	0.44 (0.11)
<i>Aspergillus</i> sp. 5960	0.01 (0.01)	0.02 (0.01)
<i>Aspergillus</i> sp. 5950	0.01 (0.01)	0.02 (0.01)

\*Activity was measured with culture media after 4 days incubation in dextrose medium at 35°C (Shieh and Ware, 1968). Parenthesis indicates standard deviation.

Table 2. Macroscopic characteristics of *Aspergillus* sp. 5990

	CYA	MEA	CY20S
Diameter (mm)	25-30	>60	40-42
Texture	Radially sulcated, low, floccose	Plane, low, sparse	Floccose
Mycelium	White	White	White
Conidial color	Brown to black	Brown to black	Brown to black
Exudate	-	-	-
Conidiogenesis	Rare	Sparse	Rare
Reverse	Pale yellow (Peanut color)	Pale yellow	Pale yellow (Peanut color)



**Fig. 1. Distribution of phytase from *Aspergillus* sp. 5990 during growth. The phytase activity (U) was expressed as 1 mmol phosphate liberated per min per ml of enzyme solution at 37°C.**

흡착되지 않았다. Phytase A를 정제하기 위한 정제단계를 Fig. 2에 나타내었다. 즉, 냉동된 배양액을 해동하여 cheese gauze로 여과하여 균사체를 제거한 다음 여과액을 12,000xg에서 20분동안 원심분리하여 미량의 협잡물들을 제거하였다. 원심분리 후 얻은 상등액에 0.1 M NaOH 용액으로 서서히 가하여 pH를 8.0으로 조정한 후 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충액으로 평형화된 Q-Sepharose column (2.5 x 12 cm)에 흡착시켰다. Q-Sepharose에 흡착되지 않은 시료에서는 phytase A 활성만 측정되었으며 이 단계를 거친 결과 수율이 96%였고 순도는 2.4배 증가하였다. Q-Sepharose 칼럼을 통과시킨 효소용액의 pH를 1.0 M citric acid로써 pH 3.0으로 조정한 후 12,000 x g에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Na-citrate (pH 3.0) 완충액으로 평형화된 S-Sepharose column (1.5 x 10 cm)에 흡착시켰다. 흡착 후 완충용액 50 ml로 흡착되지 않은 단백질을 제거한 후 NaCl 농도가 0-0.4 M이 되도록 한 완충용액 300 ml로써 직선농도구배법으로 phytase A를 분리하였다 (Fig. 3). S-Sepharose column chromatography에 의해 phytase는 NaCl 농도 0.2 M 정도에서 분리되었다. 그림에 나타난바와 같이 단백질 농도 피크와 효소활성 피크가 일치하지 않음을 알 수 있다. 이는 분리된 효소용액내에 다른 전하가 다른 단백질 공존함을 의미한다. 따라서 공존하는 다른 단백질을 제거하기 위하여 2차적인 정제수단이 필요함을 의미한다. 이 정제단계를 거침으로써 85.5%의 수율로 순도가 4.0배 증가한 phytase A를 얻을 수 있었다. Phytase A의 정제단계를 높이기 위하여 활성획분 (획분 26-38)을 모아 2배의 완충액 (1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Na-citrate, pH 3.0)으로 희석하여 염농도를 저한시킨 후 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Na-citrate, pH 3.0 완충액으로 평형화된 Mono-S HR 5/5 FPLC column (Pharmacia, Upsala, Sweden) 칼럼에 흡착하였다. 흡착된 phytase A를 FPLC를 이용한 shallow-gradient로 phytase A를 정제하였으며 (Fig. 4) 정제된 phytase A의 수율은 66%였으며 순도는 19.7배로 증가하였다 (Table 3).

#### 나) Phytase B 정제

*Aspergillus* sp. 5990을 이미 확립된 배지조건과 배양조건하에서 4일간 배양하여 얻은 배양액을 -20°C에서 동결한 후 상온에서 해동하여 균사체를 응

집시킨 후 cheese gauze로 여과하여 제거하였다. 균사체가 제거된 여과액을 냉동원심분리기를 이용하여 12,000xg에서 20분간 원심분리하여 상층액을 phytase B 정제를 위한 조효소로 사용하였다. Phytase를 정제하기 위한 전체적인 방법은 Fig. 5에 나타나 내었다. 즉, 상층액을 교반하면서 0.1 M NaOH 용액을 서서히 가하여 최종 pH를 8.0으로 조정한 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액을 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충액으로 평형화된 Q-Sepharose column (2.5 x 12 cm)에 흡착시켰다. 흡착 후 완충용액 50 ml로 흡착되지 않은 단백질을 제거하고, NaCl 농도가 0-0.5 M을 함유한 완충용액 (1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) 400 ml로써 직선농도구배법으로 흡착된 phytase B를 분리하였다 (Fig. 6). 그림에 나타난 바와 같이 phytase B는 염농도가 0.23 M일 때 용리되었으며, 계속적인 정제과정을 필요로함을 알 수 있었다. 이 정제과정을 거친 phytase B의 순도는 4.4배 증가하였고 수율은 70.9%로 나타났다. 활성이 나타난 획분 (획분 32-42)들을 모아 2배의 20 mM



Culture media

Filter through cheese gauze

Filtrate

Centrifuge at 12,000xg for 20 min

Supernatant

Adjust pH to 8.0 with 0.1 M NaCl

Load onto Q-Sepharose column

Flow through from Q-column

Adjust pH to 3.0 with 1.0 M citrate

Load onto a S-Sepharose column (1.5 x 10 cm) equilibrated with

20 mM Na-citrate, pH 3.0 containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>

Wash with 50 ml of equilibration buffer

Elute phytase A with 400 ml of linear gradient ranging from

0 to 0.4 M NaCl in equilibration buffer

Pool phytase A fraction

Phytase A fraction

Dialyzed against 20 mM Na-citrate, pH 3.0 containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>  
for 3 hr

Centrifuge for 20 min at 12,000 x g at 4°C

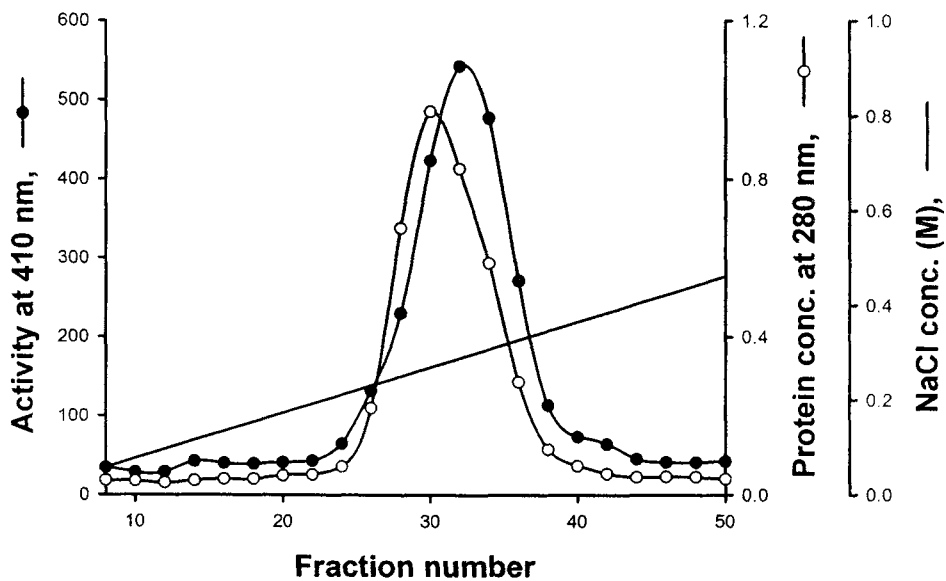
Supernatant

Dialyzed against 20 mM Na-citrate, pH 3.0 containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>  
for 3 hr

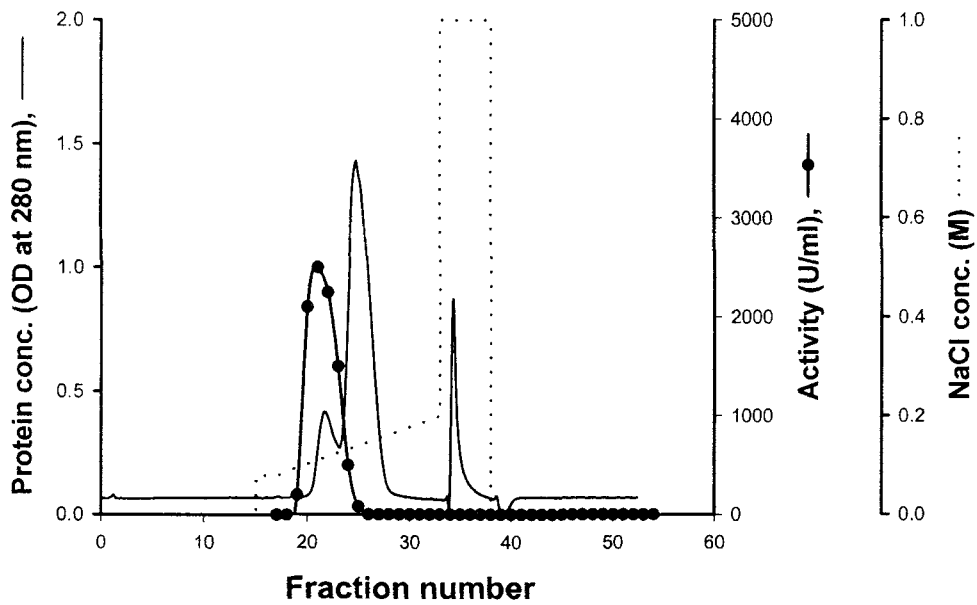
Centrifuge for 20 min at 12,000 x g at 4°C

Purified phytase A

**Fig. 2. Scheme of purification for phytase A from *Aspergillus* sp. 5990**



**Fig. 3. Chromatogram of a first S-Sepharose cationic exchange chromatography of the flow-through from Q-Sepharose column. Flow rate was 120 ml/hr and fraction volume was 4 ml/tube. The phytase A was eluted with a gradient of 0-0.5 M NaCl in 20 mM Na-citrate buffer containing 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 3.0.**



**Fig. 4. Chromatogram of a third Mono-S cationic exchange chromatography of phytase A fraction from the second S-Sepharose chromatography. Flow rate was 30 ml/hr and fraction volume was 1 ml/tube.**

The culture

Centrifuge at 12,000xg for 20 min at 4°C

Supernatant

Adjust pH to 8.0 with 0.1 M NaOH

Load onto a Q-Sepharose column (2.5 x 12 cm) equilibrated with  
1 mM CaCl<sub>2</sub> in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0

Wash with 100 ml of equilibration buffer

Elute phytase B with 400 ml of linear gradient ranging from  
0 to 0.4 M NaCl in equilibration buffer

Pool phytase B fraction

Phytase B fraction

Dialyzed against 20 mM Na-citrate, pH 3.0 containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>  
for 3 hr

Centrifuge for 20 min at 12,000 x g at 4°C

Supernatant

Load onto a Mono-S HR 5/5 FPLC column equilibrated with 20 mM  
Na-citrate, pH 3.0 containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>

Wash with 2 ml of 50 mM NaCl in equilibration buffer

Elute the phytase B with 20 ml linear gradient from 50 mM  
to 400 mM NaCl in equilibration buffer

Pool phytase B fraction

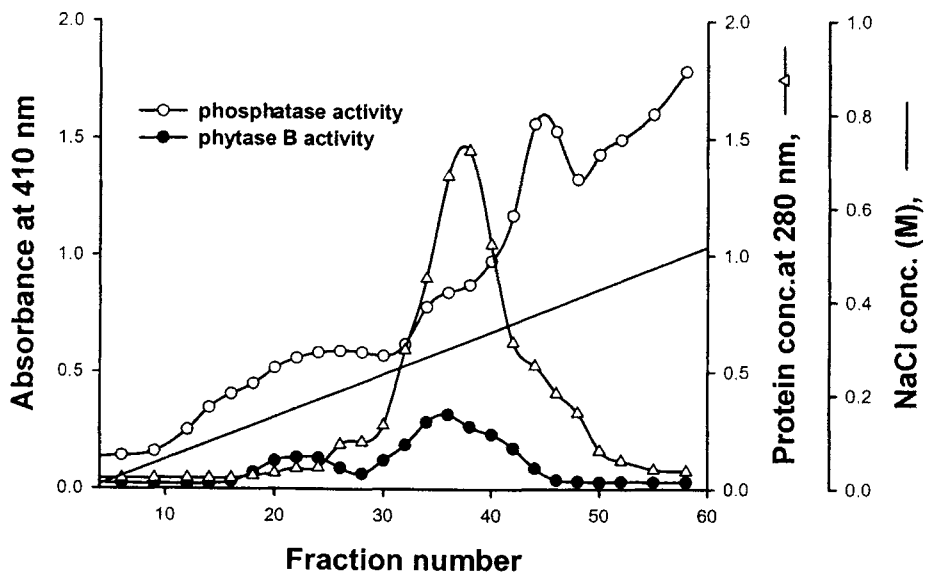
Purified phytase B

**Fig. 5. Scheme of purification for the phytase B from  
*Aspergillus* sp. 5990.**

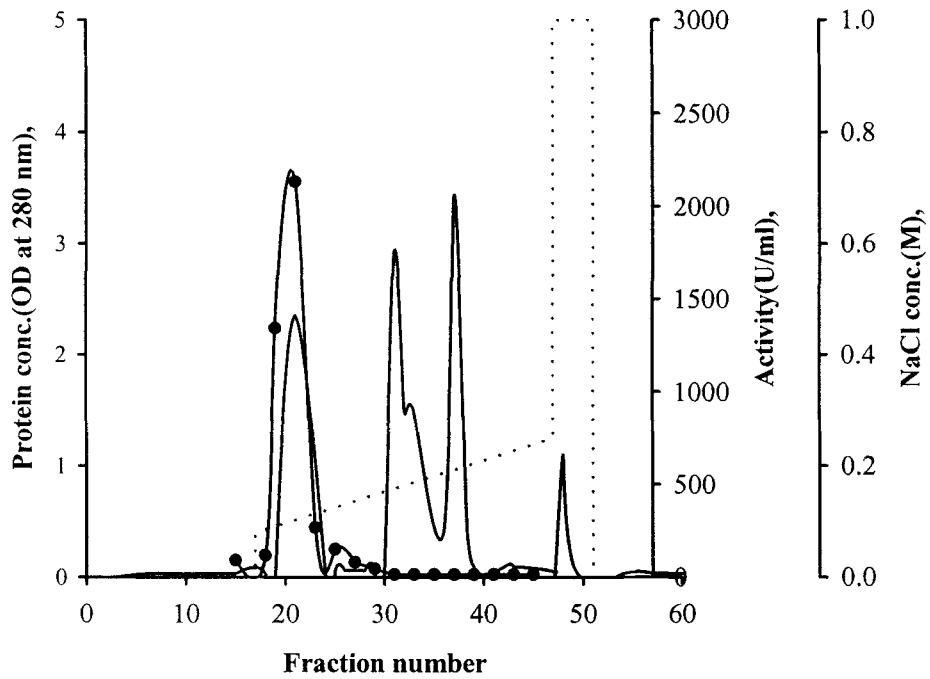
Na-citrate 완충액 (pH 3.0)으로 희석하여 염농도를 저하시킨 후 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Na-citrate, pH 3.0 완충액으로 평형화된 Mono-S HR 5/5 FPLC column (Pharmacia, Upsala, Sweden) 칼럼에 흡착하였다. 흡착된 phytase A를 FPLC를 이용한 shallow-gradient로 phytase B를 정제하였으며 (Fig. 7) 최종적으로 정제된 phytase B의 수율은 56.2%로 순도는 26.5배 증가하였다.

Table 3에 나타낸 바와 같이 *A.niger* var. *awamori*로부터 분리한 phytase A와 pH 2.5 acid phytase(phytase B)의 순도 및 수율은 각각 19.7배와 66%, 26.5배와 56.2%였다. Phytase A의 비활성은 37°C, pH 5.5에서 9,182 U/mg이었고, phytase B의 비활성은 37°C, pH 2.5에서 8,473 U/mg으로 나타났다. *A.niger* var. *awamori*를 6 L 배양하여 이상의 정제과정을 거침으로써 phytase A는 1.5 mg, phytase B는 0.93 mg 얻을 수 있었다.

그리고 본 연구개발에서 분리된 *Aspergillus* sp. 5990 균주는 단백질 분해 효소를 분비하지 않은 것으로 판단되었다. 따라서 phytase 정제는 상온에서도 가능하였다. 대체로 곰팡이가 산생하는 phytase는 2종으로 알려져 있으며 (Wodzinski and Ullah, 1996; Moore et al., 1995; Piddington et al., 1993) 본 연구개발에서도 마찬가지로 *Aspergillus* sp.에 의하여 2종의 phytase가 분비되었다. *A. niger* NRRL 3135가 분비하는 2종의 phytase는 비슷한 등전점을 지니고 있기 때문에 이온교환크로마토그래피에 의해서 비슷하게 해리되어 분리가 어렵다. 현재까지 연구되고 있는 곰팡이가 생산하는 phytase의 정제방법은 대단히 복잡하고 시간과 인력을 요하는 과정이 필요하다. 곰팡이 산생 phytase를 정제하기 위한 방법은 일련의 이온교환 크로마토그래피와 겔여과 그리고 최종적으로는 등전점 전기 영동 또는 등전점 크로마토그래피에 의하여 정제되고 있으며 약 2-3주간의 정제시간이 소요된다. 그러나 본 연구개발에서 개발된 phytase 정제 방법은 효소와 이온교환수지와의 pH에 따른 결합력을 이용한 방법으로써 해동된 균사체를 이용하여 2-3일 내에 정제가 가능하다.



**Fig. 6. Chromatogram of a first Q-Sepharose chromatography of the culture. Flow rate and fraction volume was 120 ml/hr and 4 ml/tube. The phytase B was eluted with a gradient of 0-0.5 M NaCl in 20 mM Tris-HCl containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0.**



**Fig. 7. Chromatogram of a Mono-S column chromatography of phytase B fraction from the Q-Sepharose fraction. Flow rate was 30 ml/hr and fraction volume was 1 ml/tube.**

Table 3. Purification of phytase A and B from *Aspergillus* sp. 5990

Fraction	Volume (ml)	Protein conc. (ug/ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
Crude	2,000	21.9	10.2	465	1	100
FT of Q-Sep(A)	2,020	12.6	9.8	778	2.41	97
S-Sep fraction(A)	60	156	290	1,860	4.0	85.3
Mono-S(A)	4	367	3,370	9,182	19.7	66.0
Crude	2,000	21.9	7.0	320	1	100
Q-Sepharose(B)	52	135	191	1,413	4.4	70.9
Mono-S(B)	10	93	788	8,473	26.5	56.2

Phytase activities were determined at 37°C and at pH 5.5 for phytase A and at pH 2.5 for phytase B.



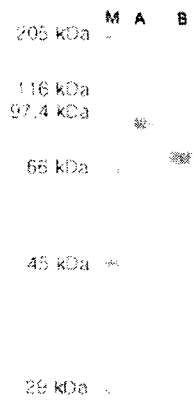
## 다. 정제효소의 특성 분석

### 1) 분자량 결정

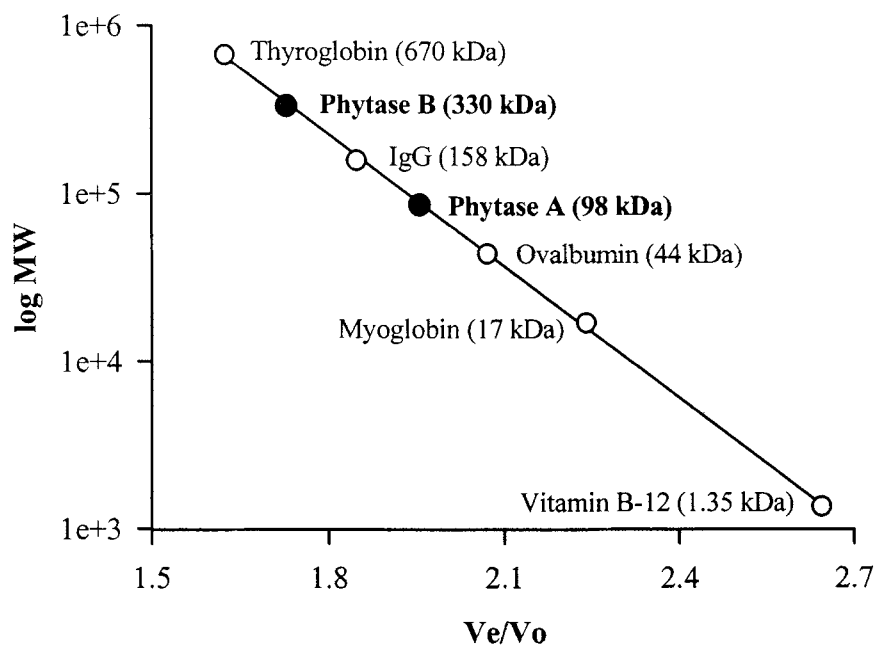
10% acrylamide gel을 이용하여 Sododecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로써 정제된 phytase A와 B의 분자량을 측정한 결과 두 정제 효소 phytase A와 phytase B의 분자량은 각각 84, 74.1 kDa으로 나타났다 (Fig. 8). 그러나 Superose 6 gel filtration에 의한 두 효소의 분자량을 측정한 결과 (Fig. 9)는 phytase A가 98, B가 330 kDa으로 나타났다. 이러한 결과는 phytase A는 monomer로써 활성형을 나타내고, phytase B는 tetramer로써 활성을 나타내는 단백질을 의미하고 있다.

곰팡이가 산생하는 phytase의 분자량은 단백질의 serine 잔기의 glycosylation 정도에 따라 다양하게 보고되고 있다. *A. ficcum* NRRL 3135에 의해 산생된 phytase A는 SDS-PAGE에 의해 85-100 kDa으로 보고되고 있으며, monomer의 형태를 취하고 있다 (Ullah and Gibson, 1987). 그러나 phytase B는 SDS-PAGE에 의하여 68 kDa로 알려져 있으며, gel 여과에 의한 활성형의 분자량을 측정한 결과 130 kDa으로 dimer로 알려져 있다 (Ullah and Cummins, 1987). 그리고 *A. niger* CB, *Aspergillus terreus* 9A1, *A. fumigatus*, 및 *Emericella nidulans*의 phytase 유전자를 *A. niger*에서 발현시켜 phytase를 SDS-PAGE, analytical ultracentrifugation, gel permeation chromatography, 및 mass spectrophotometry로 분석한 결과 monomer의 활성형을 지니는 것으로 보고되고 있다(Wyss et al., 1999b).

현재까지 알려진 곰팡이 phytase들은 glycosylation되어 있기 때문에 SDS-PAGE나 gel permeation chromatography에 의하여 분석된 분자량은 그들의 아미노산 sequence에 의해 분석된 분자량 보다 높게 나타난다. 통상적으로 phytase의 glycosylation 전도는 20-65% 가량되며, 이들의 분자량 차이는 glycosylation 정도에 따라 차이가 나는 것으로 알려져 있다 (Wyss et al., 1999a). 따라서 gel permeation chromatography에 의해 나타나는 높은 분자량은 glycosylation에 의하여 일어나는 artifacts로 알려져 있으며, 이와 비슷한 현상으로 glycoprotein을 Sephadex 수지로 여과할 경우 예상보다 빨리 용출되어 단백질의 분자량이 높게 계산될 수 있다 (Andrews, 1965).



**Fig. 8. SDS-PAGE pattern of the purified phytase A and B.**



**Fig. 9. Determination of molecular weights of phytases purified from *Aspergillus* sp. 5990 using gel filtration.**

## 2) 반응최적 pH

*Aspergillus* sp. 5990으로부터 분리된 phytase A와 phytase B의 pH 의존성을 측정한 결과 Fig. 10에서와 같이 phytase A는 pH 5.0-6.0에서 높은 활성을 나타내었고 pH 2.5-2.8에서도 2차적인 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 또한 Phytase A는 pH 2.5에서 최대활성의 35%를 나타내었으며, pH 7.0에서도 최대활성의 38%를 유지하였고 pH 8.0에서는 활성을 소실하였다. 반면 phytase B의 경우는 pH 2.8-3.2에서 최대활성을 나타내었으며 pH 4.0에서 활성을 60% 소실하였고 pH 4.5 이상에서는 활성을 소실하였다. 야생형 phytase와 재조합형 phytase는 pH 2.5에서 최대활성의 70-80%를 나타내었으며, pH 7.0에서도 최대활성의 40%를 유지하였고 pH 8.0에서는 활성을 소실하였다. 반면 시판된 phytase의 경우 pH 2.5부근에서 최대활성의 50% 가량을 나타내었다.

곰팡이로부터 분리된 phytase는 두개의 pH 영역에서 높은 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 (61, 62), 이는 본 연구개발의 결과와 일치하고 있다. 그러나 *A. terreus*, *Emericella nidulans* 및 *Myceliophthora thermophila* 으로부터 분리된 phytases는 하나의 최적 pH를 지니는 것으로 보고되고 있다 (63). *A. fumigatus*로부터 4종의 phytase를 분석한 결과 그들의 pH와 온도의존성을 측정한 결과 pH 4.0과 pH 5.0에서 최대활성을 지니는 2개의 그룹으로 대별된다고 보고하고 있으며 (64), pH 5.0에서 최대활성을 지니는 *A. fumigatus*의 phytase는 산성영역에서는 전혀 활성을 나타내지 않는 것으로 보고되고 있다. 따라서 phytase의 pH-profile은 phytase를 생산하는 종에 따라 다르게 나타내는 것으로 예측된다.

*A. fumigatus*. 와 같은 내열성 phytase의 최적 pH에 대하여 다소 상반된 견해들이 있다. *A. fumigatus*. 의 유전자를 이용하여 *A. niger*에서 발현시킨 phytase는 pH 3.0에서 2차적인 높은 활성을 나타내며 (61), 그리고 동일한 host에서 발현시킨 phytase는 pH 4.0에서 7.3 영역에서 최대활성의 80%를 나타내는 것으로 보고하고 있다 (63). 또 다른 경우로 *A. fumigatus*. 의 phytase 유전자를 *A. niger*에서 발현시킨 phytase의 경우 하나의 최적 pH를 지닌다고 보고하고 있다 (64, 65). 따라서 *A. fumigatus* 의 경우 숙주에 따라서 phytase의 최적 pH는 다소 달라질 수 있음을 알 수 있다.

### 3) 최적 온도

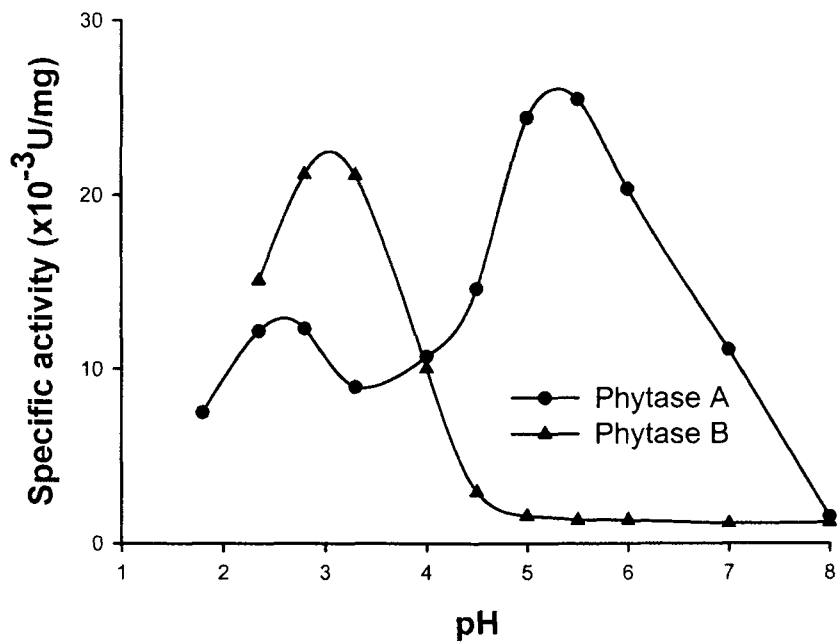
두 효소를 30-70°C의 온도범위에서 활성을 측정한 결과 phytase A, B 모두 65°C 부근에서 최대 활성을 나타내었으며 70°C에서는 대부분의 활성이 소실되었다 (Fig. 11). 두 효소의 활성은 70°C이상에서 급격히 소실되어 phytase A의 경우는 최대활성의 18%, phytase B의 경우는 활성을 완전히 소실하였다. Phytase의 활성 최적 온도는 효소의 내열성과 관련이 있다. 본 연구개발에서 분리된 phytase는 시판되는 phytase보다 내열성이 5-7°C 가량 높은 것으로 판단되며, 이러한 높은 온도에서의 효소활성은 배합사료의 팔렛팅시에 수반되는 수초간의 85-90°C의 온도에서도 견딜 수 있음을 시사하고 있다.

*Thermomyces lanuginosus*의 phytase는 65°C에서 최대활성을 나타내며, 75°C에서도 약간의 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있으며 (66), 특히 65°C에서의 촉매활성은 다른 곰팡이 phytase 보다 훨씬 우수한 것으로 알려져 있다. *A. fumigatus* SRRC 2397과 SRRC 45로부터 분리된 phytase의 아미노산 서열은 같으나, 각각 70°C와 58°C에서 최대활성을 나타내며, 이러한 최적온도의 차이는 두 효소의 번역후 수식에 의한 차이로 추정되고 있다 (64).

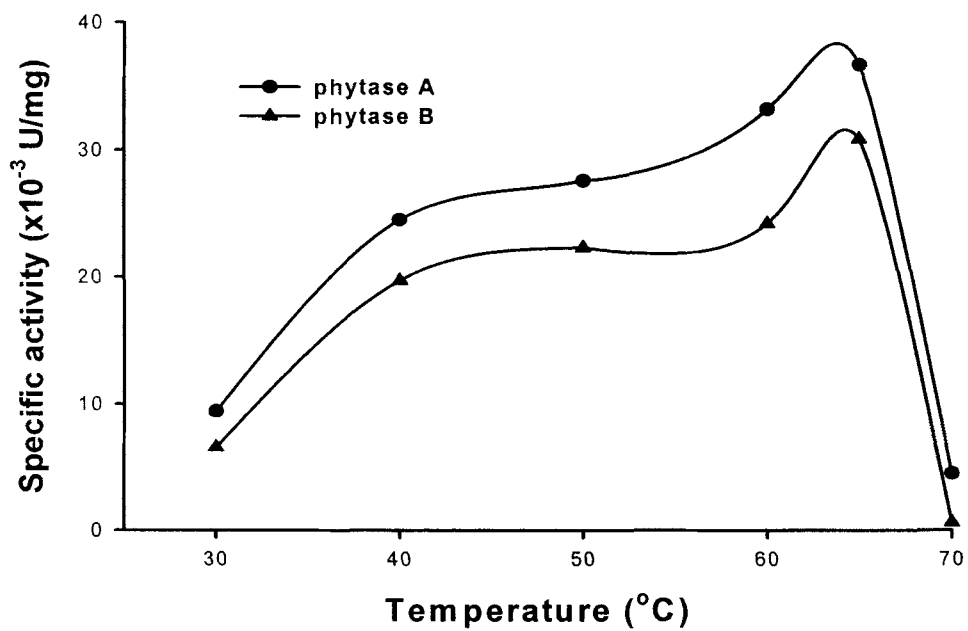
### 4) 내열성

사료공정시 pelleting 과정에서 85-90°C까지 순간적으로 온도가 올라가는데 사료산업에 적용시켰을 때 이 온도에서 효소가 활성을 유지할 수 있어야 효소 첨가 효과를 거둘 수 있다. 두 정제 효소를 37-80°C의 각 온도에서 30분간 열처리한 후 최적 pH, 37°C에서 잔여활성을 측정한 결과 같은 종에서 분리한 효소임에도 불구하고 두 효소의 내열성은 다르게 나타났다 (Fig. 12). Phytase A의 경우 65°C까지의 열처리에서는 활성을 그대로 유지하였으나 70°C에서 약 40%, 80°C에서 70% 이상의 활성을 소실하였다. 이에 반해 phytase B의 경우는 75°C까지의 열처리에 안정했고 80°C에서 70% 이상이 소실되어 두 효소가 비슷한 온도에서 최적활성을 나타내는 것과는 달리 내열성은 phytase B가 A보다 높은 것으로 나타났다. 그러나 두 효소 모두 65°C에서 50%이상의 활성을 소실하는 *A. ficuum* NRRL 3135 보다 높게 나타났다.

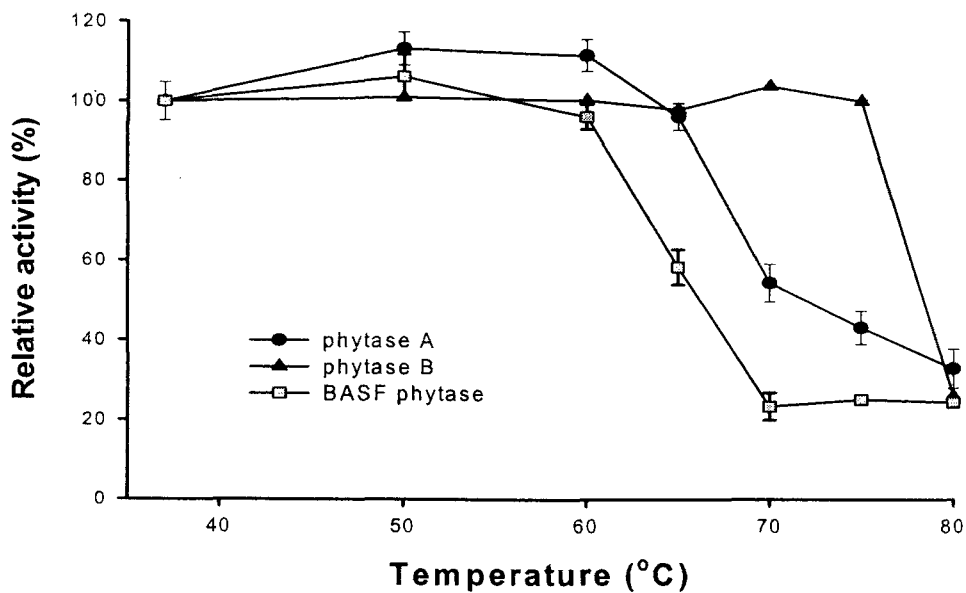
Phytase의 내열성에 영향을 미치는 인자로써 phytase의 구조적인 형태가



**Fig. 10. Effect of pH on phytase activities. Buffers used were 0.1 M glycine-HCl (pH 1.8-2.8), 0.1 M Na-citrate (pH 3.2-6.0), and 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0-8.0).**



**Fig. 11. Effect of temperature on phytase activities. Reaction was performed for 30 min at pH 5.0 for phytase A and at pH 2.5 for phytase B.**



**Fig. 12. Thermal stability of purified phytases from *Aspergillus* sp. 5990 and BASF phytase. Phytases were incubated for 30 min at indicated temperatures and then immediately put on ice.**



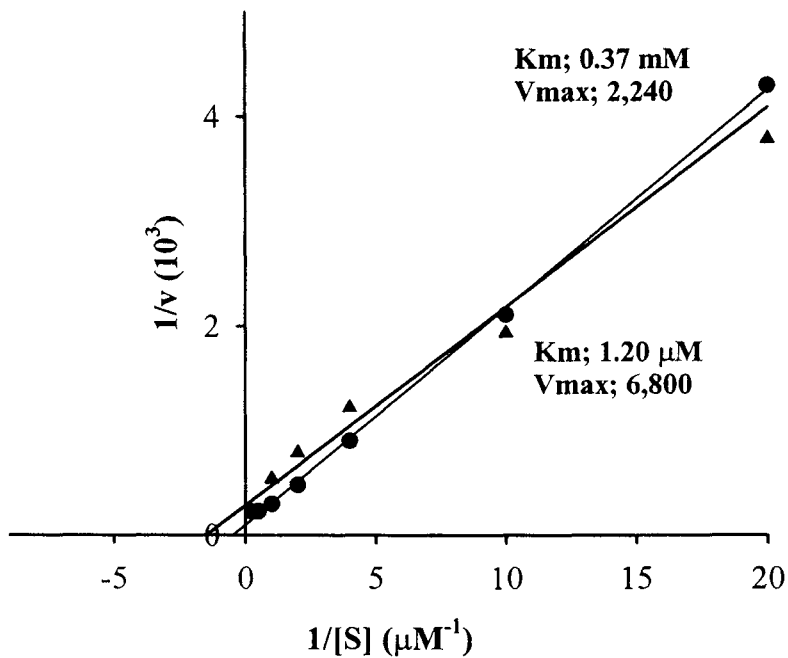
관심을 끌고 있다. 그러나 *Myceliophthora*, *Talaromyces* 및 *Thermomyces*로부터 분리된 내열성의 phytase와 *A. niger* 와 *A. fumigatus*로부터 분리된 중온성의 phytase간에 뚜렷한 구조적인 차이가 나타나지 않는다. 특히 phytase의 열안정성에 영향을 미치는 소수성 상호작용, 염결합, S-S 결합 등의 결합에 차이가 나타나지 않는다 (Berka et al., 1998). 그러나 phytase의 내열성에 가장 큰 영향을 미치는 인자를 알기 위하여 *Aspergillus* phytase를 대상으로 연구한 결과 효소의 glycosylation이 내열성에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 (Wodzinski and Ullah, 1996).

Phytase가 사료 산업에 활용되기 위하여 여러 가지 조건이 충족되어야 한다. 즉, 사료가공시에 수반되는 pelleting 온도에 견딜 수 있을 만큼 내열성이 강해야 하고, 단위동물의 소화효소에 견딜 수 있도록 단백질 분해효소에 대한 저항성이 강해야 하며, 높은 활성과 기질 특이성이 광범위해야 한다. *A. terreus* 9A1과 *Myceliophthora thermophila* 로부터 생산된 phytase는 50°C와 55°C에서 20분간 열처리할 경우 원래활성의 50%를 유지하였으며. 특히 *A. fumigatus* phytase는 100°C에서 20분간의 열처리에 의해 원래활성의 10% 만이 소실되었으므로 (Pasamontes et al., 1997) 내열성 phytase의 상용화를 위한 주요한 효소로 지목받고 있다.

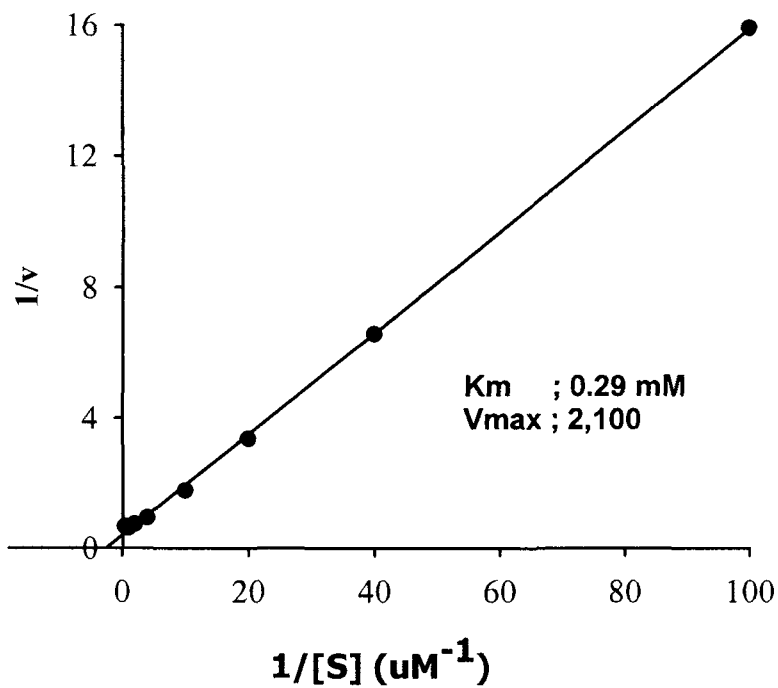
##### 5) 동력학적 특성

*Aspergillus* sp. 5990으로부터 분리된 phytase A와 B의 kinetic 상수를 측정한 결과 pH 5.0에서 phytase A의  $K_m$  치는 0.37 mM이고  $V_{max}$ 는 2,240/sec로 나타났다 (Fig. 12; 13). 그리고 pH 2.5에서의  $K_m$  치는 1.20 mM이었으며  $V_{max}$ 는 6,800/sec로 나타났다. Phytase A에 비해 phytase B의 pH 2.5에서의  $K_m$  치는 0.29 mM이었으며,  $V_{max}$ 는 phytase A에 비해 다소 낮은 2,100/sec로 나타났다.

합성기질을 이용한 *A. ficuum* phytase의  $K_m$ 치는 40uM (Ullah, 1988)- 250 uM (Gorcom et al., 1995)로 나타났으며, 이러한 결과는 분석조건에 의해 많은 영향을 받을 수 있으며, 이러한 동력학적 상수는 효소의 촉매활성을 비교하기 위한 절대적인 인자는 될 수 없으나, 특이한 기질에 대한 상대적인 비교치로서만 활용 가능함을 시사하고 있다.



**Fig. 12. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of sodium phytate by phytase A at pH 2.5 ( $\blacktriangle$ ) and at pH 5.5 ( $\bullet$ ) at 37°C.**



**Fig. 13. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of sodium phytate by phytase B at pH 2.5 and 37<sup>0</sup>C.**

## 6) 기질특이성

Table 4에 나타난바와 같이 15종의 인산 화합물을 사용하여 정제된 phytase A와 B의 기질 특이성을 조사하였다. Table 4에 나타난바와 같이 phytase A는 phytic acid에 높은 활성을 나타내었으며, phosphatase의 활성은 낮게 나타났다. 그리고 phytase B는 phytic acid 보다는 여러 가지 인산화합물에 대한 phosphatase 활성이 더 높게 나타났다. 본 연구개발에서 분리된 phytase A는 곰팡이로부터 생산되는 전형적인 phytase의 특성을 지닌 것으로 판단된다.

*E. coli* (Greiner et al., 1993), *Klebsiella terrigena* (Greiner et al., 1977) 및 *Bacillus* sp. DS11 (Kim et al., 1998) 등의 세균이 생산하는 phytate에 대한 특이성이 강한 것으로 알려져 있으나, *A. fumigatus*, *Emmericella nidulans* 및 *Myceliophthora thermophila* 등이 생산하는 곰팡이 phytase는 다소 특이성이 넓은 것으로 알려져 있다 (Wyss et al., 1999a). 넓은 특이성을 지닌 phytase는 phytase와 구조적으로 유사한 인산화합물 (phenyl phosphate, pNPP, and phosphoenolpyruvate 등) 뿐만 아니라 phytate를 소화관내에서 신속하게 가수분해하여 무기태 인으로 전환할 수 있다. 그리고 기질 특이성이 좁은 phytase는 *myo*-inositol phosphates에만 작용하여 phytate가 가수분해되는 동안에 *myo*-inositol tris- 및 bisphosphate의 축적을 초래할 수 있다.

## 7) Deglycosylation에 따른 활성 및 분자량 변화

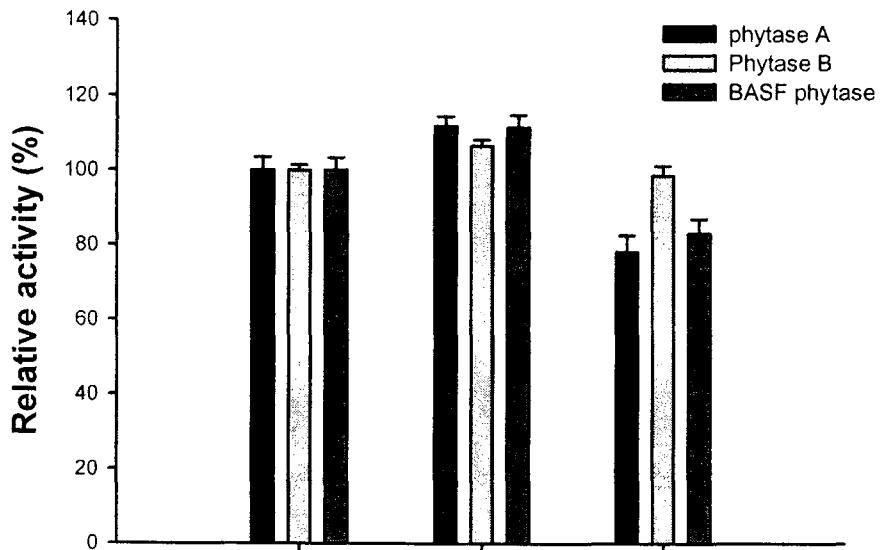
두 정제효소에 glycosidase인 Endo H<sub>r</sub>를 phytase 1 ug 당 30 NEB U 되도록 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 활성을 측정하여 각 효소의 잔류활성을 측정하고 SDS-PAGE를 통해 분자량의 변화를 분석하였다. 두 정제 효소에 glycosidase인 Endo H<sub>r</sub>를 phytase 1 ug 당 30 NEB U 되도록 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 각 효소의 잔여활성을 측정하였다 (Fig. 14). 그 결과 glycosidase를 처리하여 활성을 측정한 결과 phytase A의 경우 활성이 약 30% 정도 소실된 반면 phytase B는 거의 영향을 받지 않았다. 두 효소와 함께 시판효소의 활성변화도 같이 병행한 결과 deglycosylation에 의해 약 20% 정도 실패한 것으로 나타났다. 분자량의 변화를 보기 위해 SDS-PAGE한 결과 phytase A는 84 kDa에서 50 kDa로, phytase B는 74 kDa에서 55 kDa로 분자량이 감소하였다. 따라서 phytase B보다 phytase A의

Table 4. Substrate specificity of purified phytase A and phytase B from *A. niger* var. *awamori* (Unit: % of activity)

Substrate Conc.	Phytase A	Phytase B
Na-phytate	5 mM 100 (8.46)	100 (5.5)
NPP	5 mM 8.6(1.2)	396 (3.8)
Fru-1,6-DP	5 mM 25.0 (5.0)	504 (23)
Fru-6-P	5 mM 28.7 (1.1)	267 (21)
Pyr-5-P	5 mM 27.4 (0.7)	239 (7.5)
$\alpha$ -Nap-P	5 mM 31.4 (1.1)	438 (25)
$\beta$ -Nap-P	5 mM 32.5 (1.1)	493 (5.5)
Glu-6-P	5 mM 30.0 (1.2)	505 (23)
Ser-P	5 mM 28.1 (2.0)	207 (6.4)
Gly-P	5 mM 27.4 (0.7)	327 (1.6)
ATP	5 mM 28.3 (0.4)	659 (9.0)
ADP	5 mM 29.2 (0.7)	374 (9.6)
AMP	5 mM 28.3 (0.4)	95 (2.4)
IMP	5 mM 25.6 (1.0)	136 (4.2)
NADPH	1 mM 1.7 (0.3)	487 (8.8)

Twenty  $\mu$ l of each enzyme solution (2 g/ml) were used for activity measurement.

NPP; *p*-nitrophenyl phosphate; Fru-1,6-DP; D-fructose-1,6-diphosphate; Fru-6-P; D-fructose-6-phosphate; Pyr-5-P; pyridoxal-5-phosphate;  $\alpha$ -Nap-P;  $\alpha$ -naphthyl-phosphate;  $\beta$ -Nap-P;  $\beta$ -naphthyl-phosphate; Glu-6-P; D-glucose-6-phosphate; Ser-P; o-phospho-L-serine; Gly-P; -glycerophosphate; ATP; adenosine triphosphate; ADP; adenosine diphosphate; AMP; adenosine monophosphate; IMP; inosinen monophosphate; NADPH; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.



**Fig. 14. Comparison of relative activities of *Aspergillus* sp. 5990 phytases and BASF phytase. Three enzymes were glycosylated by Endo H<sub>f</sub>.**

glycosylation 정도가 높음을 알 수 있었다. 또한 정제 후 보관 과정에서 glycosidase 없이도 glycosylation이 일어나는지 두 효소 모두 분자량이 처음보다 작아졌으며 그 정도는 phytase A가 좀 더 컸고 활성에 있어서도 phytase B보다 불안정하였다. 따라서 glycosylation이 효소 안정성에 영향을 줄 것으로 추측할 수 있으나 phytase B는 보관 중이나 또는 Endo H<sub>f</sub>에 의해 분자량이 작아졌음에도 불구하고 활성을 그대로 유지하고 있어 모든 효소에 해당되지 않음을 알 수 있었고 phytase B는 매우 안정한 효소인 것으로 나타났다.

#### 라. Polyclonal antibody 생산

항원으로 두 효소를 complete adjuvant (Sigma, USA)와 1:1로 혼합하여 토끼 (New Zealand white female, 2-2.5 kg, Institute of Chemical Research, Korea)의 복강에 500 ul씩 주사하고 다시 incomplete adjuvant와 섞어 2주 간격으로 두 번 더 주사한 뒤 최종 주사 10일 후 혈액으로부터 항체를 분리하였다. 이때 antiserum 실험을 실시하여 항혈청이 형성되었는지의 여부를 판단하였다. 토끼로부터 polyclonal antibodies가 생성되었음을 ELISA로써 확인하고 두 정제효소를 Endo H<sub>f</sub> 처리하여 deglycosylation 시킨 후 western blot을 행한 결과 원래의 정제효소 뿐만 아니라 deglycosylation된 효소도 항원으로 작용하였다 (Fig. 15). Phytase A antibody를 사용하였을 경우에는 phytase A 뿐만 아니라 B도 항원으로 작용하였으나, phytase B antibody를 사용하여 western blotting을 할 경우 phytase B만이 항원으로 작용하였다. Western blotting의 결과 이 항체들을 이용해 정제된 두 phytases를 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 생산된 polyclonal antibody는 토양 또는 해양으로부터 phytase를 산생하는 균주의 검색에 용이하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

배합사료의 대체 단백질원으로 사용되는 곡류부산물에는 다량의 phytic acid가 phytin 상태로 존재하고 있다. 금속이온 또는 단백질과 결합된 상태의 phytin은 단위동물의 소화관에서 소화 흡수되지 않기 때문에 사육동물의 항영양인자로 작용한다. 그리고 동물의 배설물로 분비되는 phytic acid는 토양과 수계 미생물에 의해 더욱 분해되어 무기인을 비롯한 무기질과 inosine으로 분해되어 수계오염의 주 원인으로 주목받고 있다. Phytic acid를 분해하는 phytase 산생 미생물을 분리하여 사료중의 phytic acid를 분해하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 자연에서 분리된 phytase 산생 미생물을 분리하여 각각의 균주에 대한 phytase 활성을 측

M 1 2 3 4

**A**



Fig. 15. Western blot of purified phytase A and B  
M, molecular marker; Lane 1, phytase A; Lane 2,  
deglycosylated phytase A; Lane 3, phytase B;  
Lane 4, deglycosylated phytase B.



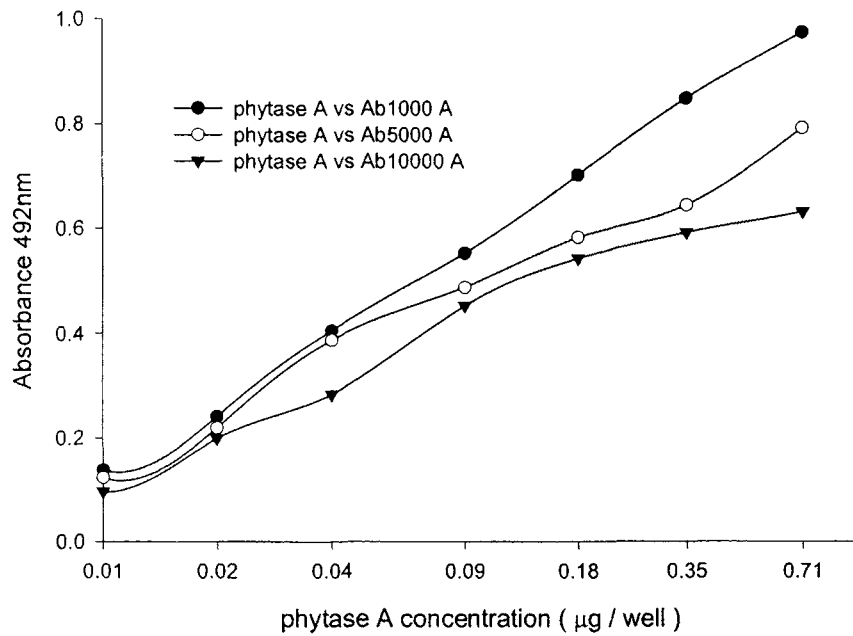


Fig. 16. Effect of anti-phytase B antibody on the concentration of phytase B.

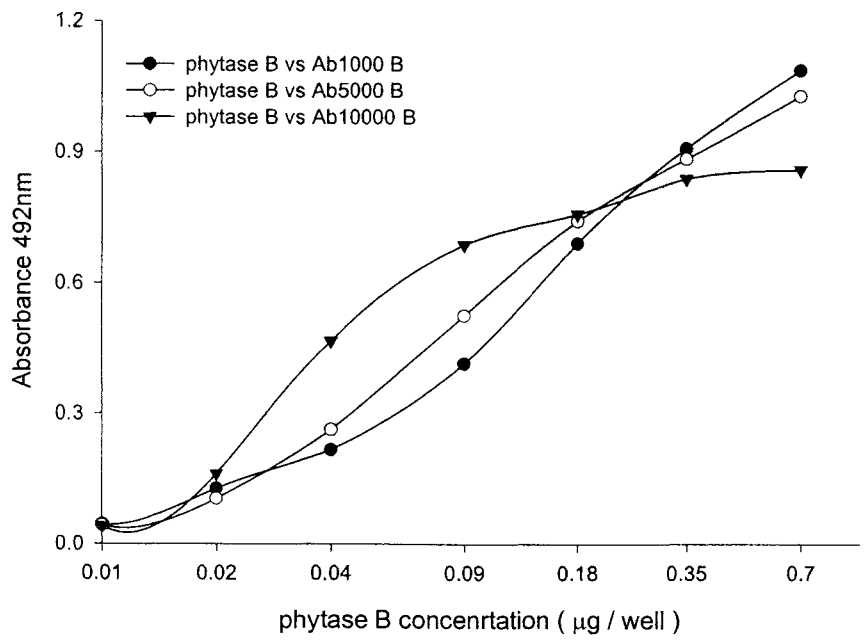


Fig. 17. Effect of anti-phytase B antibody on the concentration of phytase B.

정하기에는 어려운 점들이 있다. 그 중에서도 특히 배지중의 무기인 또는 공존하는 phosphatases 에 의한 false-positive가 대표적인 방해인자이다. 본 연구는 *Aspergillus* sp. 5990이 생산하는 phytase A와 B에 대한 polyclonal 항체를 조제하여 토양에서 분리된 곰팡이를 대상으로 ELISA 분석방법을 확립하였다.

ELISA 법에 의한 1차 항체의 최적농도는 1,000 희석비였으며, 이러한 희석비로 phytase를 검출한 결과 phytase는 4 ng, phytase는 16 ng의 한도까지 검출되었다 (Fig. 16, 17). Phytase A와 phytase B에 대한 항혈청의 교차반응은 12%를 나타내었다. ELISA 법의 결과와 phytase 생산균 배양액의 활성간에는 높은 상관관계를 나타내었다. 그리고 phytase 생산 배양액을 Western blot한 결과 phytase 이동거리에서 단백질 밴드가 나타났다. 따라서 확립된 ELISA 법과 Western blot의 방법은 phytase를 산생하는 미생물을 다량으로 동시에 검색하기 위한 효과적인 방법으로 판단되었다.

#### 마. 소화효소 공존시 phytase 활성

##### 1) 미강 phytin 분해에 대한 단백질분해효소의 영향

곡류부산물에 존재하는 phytic acid는 단백질과 결합된 상태의 phytin으로 존재하고 있다. 사료로 섭취된 phytin은 주로 위장에서 pepsin에 의해서, 소장에서는 trypsin, chymotrypsin 등을 함유하고 있는 pancreatin에 의해 분해될 소지가 있다. 미강 중의 phytin형의 phytic acid 분해도를 알기 위하여 (1) phytase와 protease를 동시에 처리하여 phytase 활성을 측정하는 실험과 (2) 미강을 protease로 처리 후 phytase로 처리하여 phytase활성을 측정하는 실험을 병행하여 그 결과를 Table 5에 나타내었다. Table 5에 나타난바와 같이 pH 5.0에서 phytase A와 pepsin 또는 pancreatin을 처리하여 phytase 활성을 측정하는 결과 대조구 (단백질분해효소를 첨가하지 않은 실험구)에 비하여 약 10% 가량의 활성소실이 일어났으나, phytase와 trypsin을 동시에 처리한 결과는 phytase 활성 소실이 나타나지 않았다. 그리고 pH 2.5에서 phytase A와 pepsin을 동시에 처리한 결과 약 22%의 활성 소실이 나타났으며, pH 7.0에서 trypsin과 phytase A를 동시에 처리한 결과 10% 가량의 활성 소실이 나타났다. Pepsin과 trypsin처리보다는 pancreatin처리에 의하여 phytase 활성 소실은

심하게 일어났다. 즉, pH 7.0에서 phytase A와 pancreatin을 동시에 처리한 결과는 phytase A와 pepsin 또는 trypsin을 동시에 처리한 결과보다 낮은 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 단일형태의 단백질 분해효소보다는 단백질 분해효소 복합체인 pancreatin의 효소활성이 높아 phytase A를 분해시킨 결과로 추정할 수 있다.

Phytase와 protease를 동시에 처리한 후의 phytase 활성과는 달리 phytin을 protease로 30분간 처리 후 protease를 열처리하여 불활성화한 후 phytase를 처리하여 phytin의 분해능을 분석하였다 (Table 5). 그 결과 pH 5.0에서 3종 효소의 전처리에 의하여 효소활성은 변하지 않았으나, pH 7.0에서 trypsin EH는 pancreatin 처리 후 phytase로 처리할 경우 phytase 활성은 2배 가량 증가되었다.

그리고 pH 7.0에서의 phytase A의 효소활성은 pH 5.5의 효소활성에 비하여 약 40% 가량 된다. 따라서 소장 (pH 7.0)에서의 phytase에 의한 phytin의 분해는 미미한 것으로 보고되고 있다. 그러나 소장에서 pancreatin의 도움을 받을 경우 phytase에 의한 효소활성 2배 가량 증가됨을 알 수 있다. 이러한 결과는 소장에서 pancreatin의 도움을 받아 사료첨가제로 사용된 phytase의 활성을 향상시켜 미강중의 phytic 분해는 용이하게 일어날 수 있음을 시사하고 있다.

## 2) 대두박 phytin 분해에 대한 단백질분해효소의 영향

대두박 중의 phytin형의 phytic acid 분해도를 알기 위하여 (1) phytase와 protease를 동시에 처리하여 phytic acid 분해능을 측정한 실험과 (2) 대두박을 protease로 처리 후 phytase로 처리하여 phytic acid 분해능을 측정하는 실험을 병행하여 그 결과를 Table 6에 나타내었다. Table 6에 나타난바와 같이 pH 5.0에서 phytase A와 pepsin, trypsin 또는 pancreatin을 처리하여 phytic acid 분해능을 측정한 결과 대조구 (단백질분해효소를 첨가하지 않은 실험구)에 비하여 약 5-10% 가량 높은 phytic acid 분해능을 나타내었으며, pH 2.5에서 pepsin과 phytase를 동시에 처리한 결과도 대조구에 비해 약 10% 가량 높은 phytic acid 분해능을 나타내었다. 그리고 pH 7.0에서 phytase와 trypsin 또는 pancreatin을 동시에 처리하여 phytic acid의 분해능을 측정한 결과 대조구에

Table 5. Effect of protease on degradation of phytic acid from rice bran

(%)

Co-reaction with protease				
	w/o protease	Pepsin	Trypsin	Pancreatin
Phy. act. at pH 5.0	100	91.5±1.26	97.3±2.12	89.6±0.39
Phy. act. at pH 2.5	75	78.6±1.16	ND	ND
Phy. act. at pH 7.0	40	ND	79.9±1.55	71.5±1.16
Separated reaction with protease				
	w/o protease	Pepsin	Trypsin	Pancreatin
Phy. act. at pH 5.0	100	99.7±0.78	101±2.43	101±1.98
Phy. act. at pH 2.5	75	80.5±0.78	ND	ND
Phy. act. at pH 7.0	40	ND	79.2±1.16	79.0±1.12

Co-reaction was performed with 1 g of rice bran, 10 U of phytase and 10 U of each protease at indicated pH for 60 min.

Separated reaction was performed with 1 g of rice bran and 10 U of protease for 30 min and then reaction was repeated more 30 min after adding 10 U of phytase.

Table 6. Effect of protease on degradation of phytic acid from soybean (%)

	Co-reaction with protease			
	w/o protease	Pepsin	Trypsin	Pancreatin
Phy. act. at pH 5.0	100	111±1.81	109±1.55	104±1.04
Phy. act. at pH 2.5	75	84.6±0.52	ND	ND
Phy. act. at pH 7.0	40	ND	73.4±1.84	71.4±1.55
	Separated reaction with protease			
	w/o protease	Pepsin	Trypsin	Pancreatin
Phy. act. at pH 5.0	100	106±1.82	113±1.56	111±1.55
Phy. act. at pH 2.5	75	87.2±1.55	ND	ND
Phy. act. at pH 7.0	40	ND	81.1±1.30	70.1±0.26

Co-reaction was performed with 1 g of soybean meal, 10 U of phytase and 10 U of each protease at indicated pH for 60 min.

Separated reaction was performed with 1 g of soybean meal and 10 U of protease for 30 min and then reaction was repeated more 30 min after adding 10 U of phytase.

비해 1.8배 가량 높은 효소활성을 나타내었다.

Phytase와 단백질 분해효소를 동시에 처리한 결과에 비하여 대두박의 phytin을 단백질 분해효소로 먼저 처리한 후 phytase로 처리함으로써 phytic acid의 분해능은 높게 나타남을 알 수 있었다.

#### 바. 효소의 안정성

##### 1) 가축의 소화효소에 의한 효소의 안정성

Phytase를 사료첨가물로 사용할 경우 사료에 첨가된 phytase는 위에서 pepsin에 의해, 소장에서는 pancreatin에 의해 단백질분해가 일어날 가능성이 높다. 생체내에서의 소화효소에 의한 phytase의 분해를 예측하기 위하여 가축의 대표적인 단백질 분해효소를 이용하여 시험관 실험을 수행하였다. Phytase A와 B에 대해 0.001, 0.002, 0.005, 0.01 및 0.05%의 중량비로 porcine trypsin, chymotrypsin 및 pancreatin을 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 phytase A와 B의 잔류활성을 측정하였다 (Table 7). Pepsin으로 phytase B를 처리한 결과 0.005%의 pepsin에 의해 영향을 받지 않았으며, 0.01 및 0.05%의 pepsin 처리에 의해 각각 31 및 38%의 효소활성이 소실되었다. 0.01 및 0.05%의 trypsin 처리에 의해 phytase A의 활성은 각각 17 및 25%의 활성이 소실되었다. 그리고 pancreatin에 의한 phytase A의 활성소실은 pepsin과 trypsin 보다는 심하게 일어났다. 이러한 현상은 pancreatin이 여러 종류의 단백질분해 효소를 함유하기 때문인 것으로 추정된다. 이상의 결과는 본 연구에 사용된 phytase A와 B는 돼지의 소화효소에 대하여 비교적 안정한 효소활성을 나타내었으며, 이러한 결과는 본 연구개발에 사용된 효소의 상용화 가능성을 시사하고 있다.

Table 7. Residual activities of phytase A and B after treatment of pepsin, trypsin, and chymotrypsin.

(%)

Enzyme		Phytase A	Phytase B
Trypsin	0.001%	102 ± 2.45	
	0.002%	99.2 ± 1.59	
	0.005%	97.6 ± 2.16	ND
	0.01%	82.8 ± 1.57	
	0.05%	75.4 ± 1.38	
Pepsin	0.001%		105 ± 2.83
	0.002%		105 ± 1.96
	0.005%	ND	94.3 ± 2.84
	0.01%		78.8 ± 2.01
	0.05%		72.4 ± 1.27
Pancreatin	0.001%	100 ± 2.07	
	0.002%	92.6 ± 2.18	
	0.005%	81.3 ± 1.87	ND
	0.01%	73.9 ± 1.92	
	0.05%	65.3 ± 2.19	

## 2) 조효소의 저장안정성

재조합 균주로부터 생산한 효소의 저장기간에 따른 안정성을 검토하기 위하여 대량발효를 통하여 배양액을 확보하였다. 조효소액은 배양물을 한외여과 (MWCO, 50 kDa)를 통해 균주를 제거한 것을 사용하였다. 첨가제가 균주 및 효소의 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다양한 농도의 erythorbitol, glycerol 및 sorbitol을 효소에 첨가하여 비교하였다. 각각의 시료를 0.4 µm의 filter로 여과하여 무균상태로 처리한 후 10°C 냉장고와 30°C 항온기에 두고 4개월 동안 저장하면서 활성을 측정하였다. 두 온도조건하에서 저장된 시료를 120일 동안 저장 후 생균수를 측정한 결과 음성으로 나타났다.

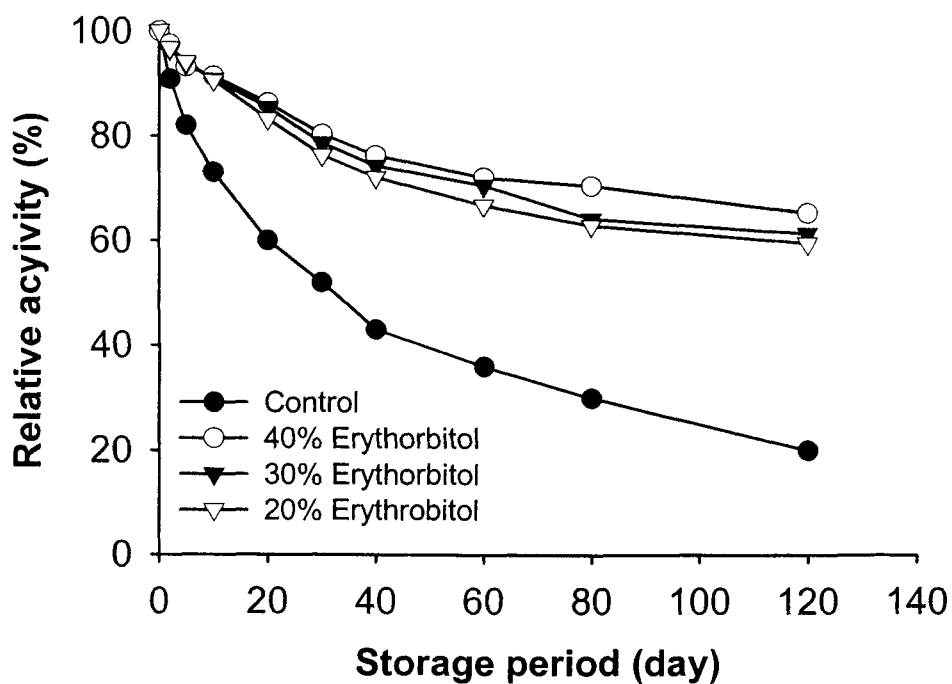
Erythorbitol의 농도를 20, 30 및 40%의 농도로 조효소액에 가하여 10°C



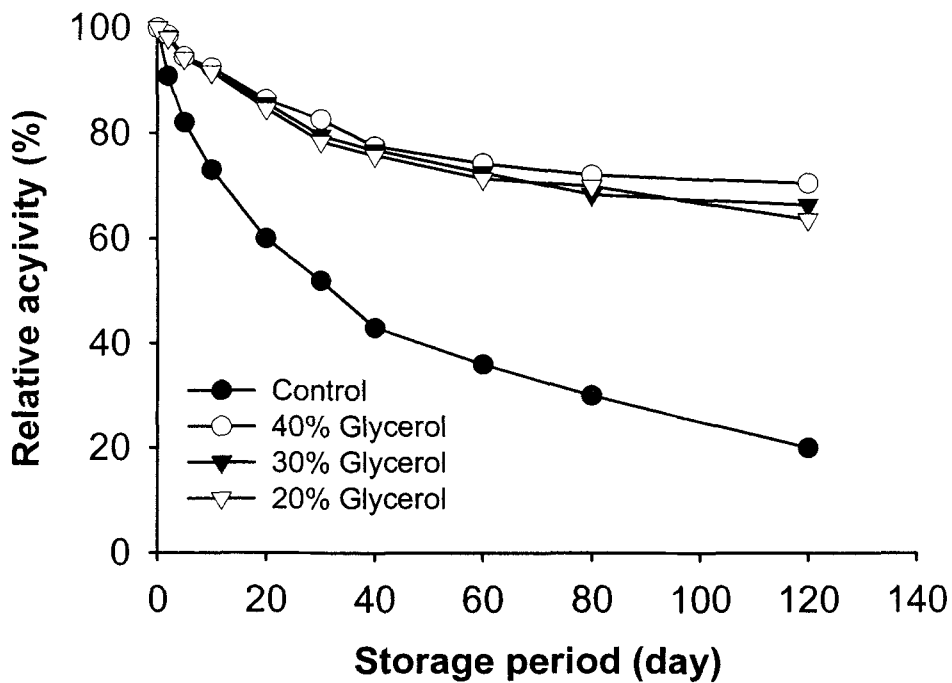
냉장고에서 4개월동안의 효소활성 변화를 측정한 결과 첨가제인 erythorbitol를 가한 경우 대조구에 비하여 효소의 안정성이 향상되었다 (Fig. 18). 첨가제를 함유하지 않은 대조구의 경우 저장기간 20일 만에 원래활성의 60%를 유지하였고 저장 120일 이후에는 원래활성의 20%를 유지하였다. 그러나 erythorbitol을 첨가한 경우 농도에 따른 큰 차이는 나타나지 않지만 10℃ 냉장고에서 저장 4개월까지도 원래활성의 63-67%를 유지하였다. 저장 40일 경에 원래활성의 25% 가량을 소실하였으며, 4개월 후에는 40%의 erythorbitol을 첨가한 효소용액의 경우 원래활성의 65%, 30%의 첨가제를 가한 경우 61% 그리고 20%의 첨가제를 가한 경우 원래활성의 59% 가량을 유지하였다. 4개월간의 저장에 의하여 대체로 첨가제의 농도가 높을 경우 효소활성의 안정화에 보다 많이 기여하는 것으로 나타났다.

Glycerol을 첨가제로 사용한 경우 erythorbitol을 첨가한 경우보다도 효소의 안정화에 더욱 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Fig. 19). 4개월 동안의 저장에 의하여 20, 30 및 40% 가한 시료의 경우 효소활성은 원래활성의 63-71%를 유지하는 것으로 나타났다. 저장기간 40일경까지 효소활성의 약 25%가 실했되었으며, 그 이상의 저장기간에 의하여 효소활성의 변화는 크게 나타나지 않았다. 40%의 glycerol을 효소안정제로 첨가한 경우 4개월 후의 잔존활성은 원래활성의 71%를 나타내었으며, 30%의 glycerol을 첨가한 경우 원래활성의 66%, 그리고 20%의 glycerol을 첨가한 경우 원래활성의 63%를 지니고 있었다. Glycerol의 경우 효소의 구조적인 안정화에 기여하므로 효소의 저장에 널리 사용하는 안정제로 알려지고 있다. 본 실험의 경우 glycerol은 erythorbitol보다도 효과적인 효소 안정제로 작용하는 것으로 판단된다.

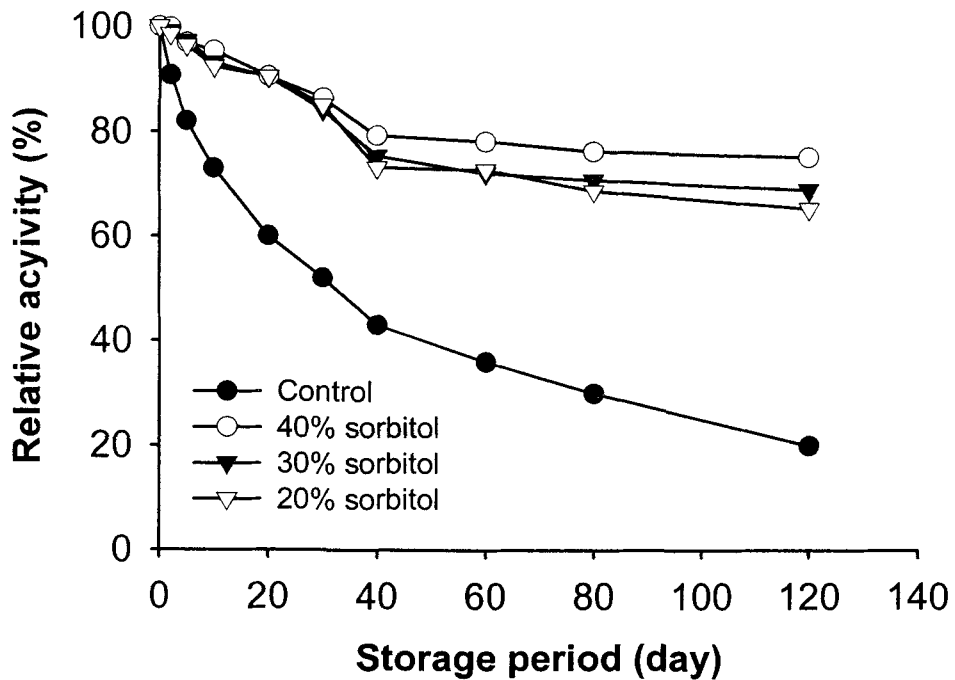
조효소액에 대하여 20, 30 및 40%의 sorbitol을 가하여 4개월간 효소를 저장하면서 phytase 활성을 측정하였다 (Fig. 20). 그림에 나타난 바와 같이 저장 4개월까지 효소활성을 측정한 결과, sorbitol의 농도가 높을수록 효소의 안정화에 기여하는 효과가 높게 나타났다. 저장 4개월 후에 40%의 sorbitol을 첨가한 경우 원래활성의 76%를 유지하였으며, 30%의 sorbitol의 경우 69%, 20%의 sorbitol을 첨가한 경우 65% 가량의 효소활성을 유지하였다. Sorbitol을 효소안정제로 사용한 경우 glycerol과 erythorbitol 보다 더 효과적인 것으로 나타났으며, 이러한 다가 알콜류는 효소의 표면에 잔존하는 친수성 아미노산과의



**Fig. 18. Effect of storage time on the phytase activity. Enzyme and different concentration of erythorbitol was mixed and stored at 10°C. The phytase solutions were mixed with the respective stabilizer in % ratio.**



**Fig. 19. Effect of storage time on the phytase activity. Enzyme and different concentration of glycerol was mixed and stored at 10°C. The phytase solutions were mixed with the respective stabilizer in % ratio.**

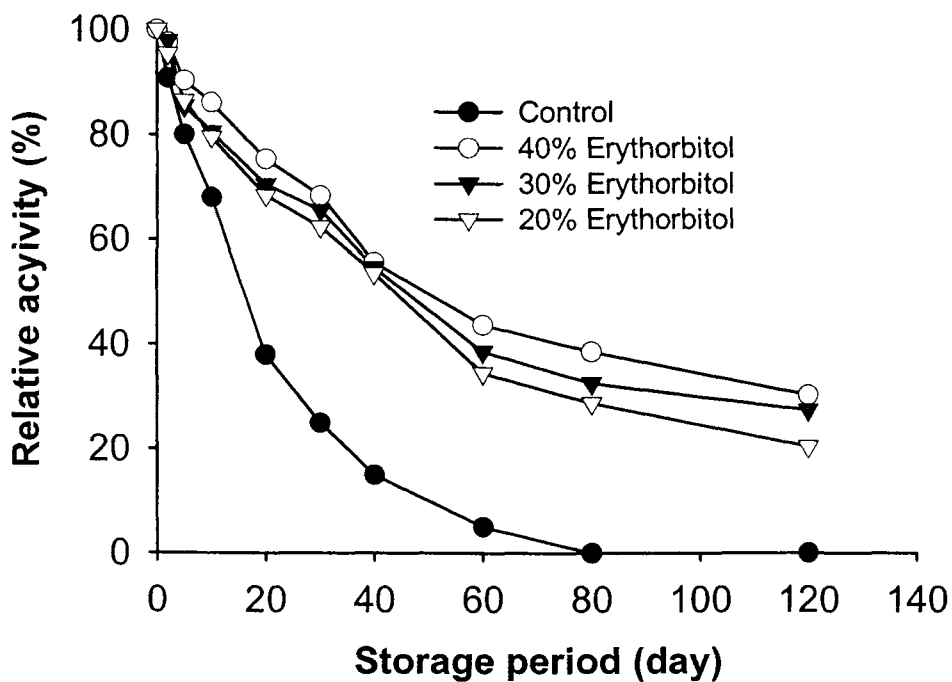


**Fig. 20. Effect of storage time on the phytase activity. Enzyme and different concentration of sorbitol was mixed and stored at 10°C. The phytase solutions were mixed with the respective stabilizer in % ratio.**

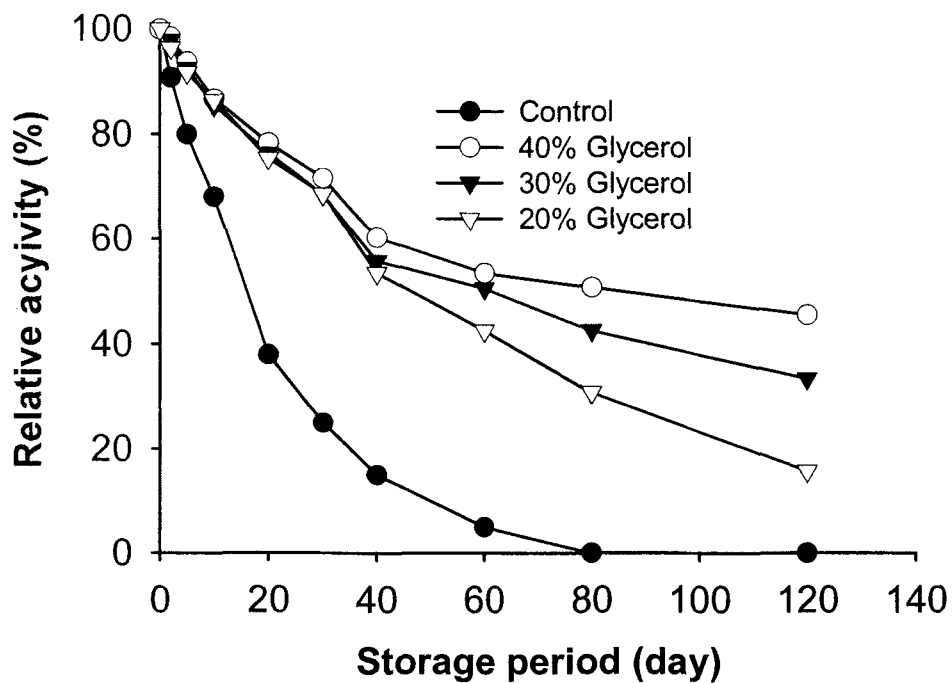
화학적인 결합으로 효소분자의 구조적인 안정화에 기여하는 것으로 판단된다. 그리고, 본 phytase의 경우 phytase 분자내에 glycosylation된 당잔기와 다가 알콜과의 친화도에 의하여 효소의 안정화에 기여하는 것으로 평가된다. 이상의 결과로 종합컨대 phytase 조효소액의 저장시 erythorbitol과 glycerol 보다는 sorbitol이 효소의 안정화에 효과적인 것으로 나타났으며, 액상으로 효소를 판매시에 다가 알콜류로는 sorbitol이 효과적인 것으로 판단된다.

재조합균주로부터 생산된 phytase 조효소를 상온 유통시에 대비하여 30°C의 항온기에서 4개월간 보관하면서 부형제에 따른 phytase 효소활성을 측정하였다. 10°C 저장시와 동일한 조건으로 erythorbitol의 농도를 20, 30 및 40%의 농도로 조효소액에 가하여 30°C의 항온조에서 4개월 동안의 효소활성 변화를 측정한 결과 첨가제인 erythorbitol를 가한 경우 대조구에 비하여 효소의 안정성이 향상되었다 (Fig. 21). 첨가제를 함유하지 않은 대조구의 경우 저장기간 20일 만에 원래활성의 38%를 유지하였고 저장 60일 이후에는 거의 모든 활성이 소실되었다. 그러나 erythorbitol을 첨가한 경우 농도에 따른 큰 차이는 나타나지 않지만 30°C 항온기에서 저장 4개월까지 저장한 결과 40%의 erythorbitol을 첨가한 경우 원래활성의 46%, 30%의 erythorbitol을 첨가한 경우 원래활성의 33% 그리고 20%의 erythorbitol을 첨가한 경우 원래활성의 15%를 나타내었다. 그러나 보다 단기간의 저장기 효소활성의 감소는 뚜렷하게 낮아졌다. 40%의 erythorbitol을 첨가한 시료의 경우 원래활성의 72%, 30-20%의 erythorbitol을 첨가한 시료의 경우 원래활성의 53-55%를 유지하였다. Fig. 21에 나타난바와 같이 30°C에서 40일까지의 저장기간 동안에 erythorbitol의 농도에 따른 영향은 나타나지 않았으나, 그 이후의 저장기간 동안 erythorbitol의 농도가 높을수록 효소의 안정화에 영향을 크게 미치는 것으로 나타났다.

10°C의 저장에서와 마찬가지로 glycerol을 첨가제로 사용한 경우 erythorbitol을 첨가한 경우보다도 효소의 안정화에 보다 높은 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Fig. 22). 4개월 동안의 저장에 의하여 20, 30 및 40% 가한 시료의 경우 효소활성은 각각 원래활성의 16, 33 및 46%를 유지하는 것으로 나타났다. 저장기간 40일경, 40%의 glycerol을 첨가한 경우 원래활성의 60%를 유지하였으며, 30%와 20%의 glycerol을 첨가한 경우 55% 정도의 효소활성을 유지하였다. Erythorbitol에 의한 효소안정화와 마찬가지로 glycerol에 의한 저



**Fig. 21. Effect of storage time on the phytase activity. Enzyme and different concentration of erythorbitol was mixed and stored at 30°C. The phytase solutions were mixed with the respective stabilizer in % ratio.**



**Fig. 22. Effect of storage time on the phytase activity. Enzyme and different concentration of glycerol was mixed and stored at 30°C. The phytase solutions were mixed with the respective stabilizer in % ratio.**

장안정성은 저장기간 40일 이후에 첨가제에 의한 농도의존성이 높게 나타났다. Glycerol의 경우 효소의 구조적인 안정화에 기여하므로 효소의 저장에 널리 사용하는 안정제로 알려지고 있다. 본 실험의 경우 glycerol은 erythorbitol 보다도 효과적인 효소 안정제로 작용하는 것으로 판단된다.

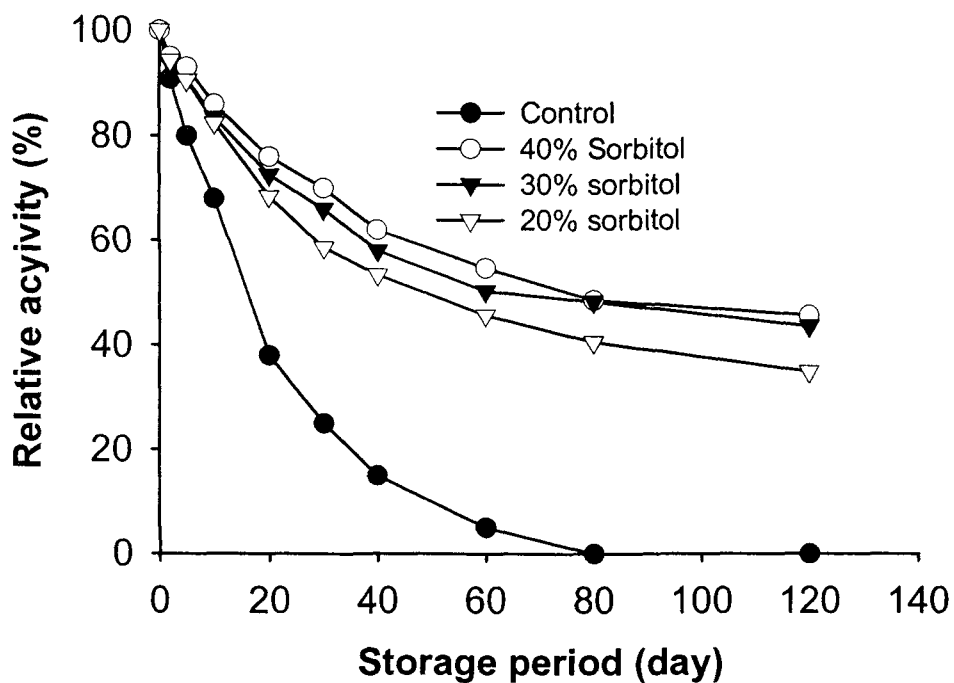
조효소액에 대하여 20, 30 및 40%의 sorbitol을 가하여 효소를 30°C의 항온조에서 4개월 동안 저장하면서 phytase 활성을 측정하였다 (Fig. 23). 그림에 나타난 바와 같이 저장 4개월까지 효소활성을 측정한 결과, sorbitol의 농도가 높을수록 효소의 안정화에 기여하는 효과가 높게 나타났다. 30°C에서 저장 30일까지 20%의 sorbitol을 첨가한 경우 원래활성의 59%를 유지하였고, 30%의 sorbitol을 첨가한 경우 원래활성의 66% 그리고 40%의 sorbitol을 첨가한 경우 원래활성의 70%를 유지하였다. 그리고 저장 40일경까지 20%의 sorbitol을 첨가한 경우 원래활성의 53%, 30%의 sorbitol을 첨가한 경우 58% 그리고 40%의 sorbitol을 첨가한 경우 원래활성의 62%를 유지하고 있었다. 그리고 저장 4개월 후까지도 20%의 sorbitol을 첨가한 경우 원래활성의 35%를 유지하였으며, 30%의 sorbitol의 경우 44%, 40%의 sorbitol을 첨가한 경우 46% 가량의 효소활성을 유지하였다. 10°C에서와 마찬가지로 sorbitol을 효소 안정제로 사용한 경우 glycerol과 erythorbitol 보다 더 효과적인 것으로 나타났으며, 이러한 다가 알콜류는 효소의 표면에 잔존하는 친수성 아미노산과의 화학적인 결합으로 효소분자의 구조적인 안정화에 기여하는 것으로 판단된다. 이상의 결과를 종합하면, 배양액의 경우 효소활성은 30°C에 보관할 경우 40일 까지는 효소활성을 50%이상 지나나 그이상의 보존기간에 의하여 효소활성의 실활이 높아진다. 따라서 액체상태의 효소를 장기 보관할 경우 부형제가 첨가된 상태에서 저온에서 보관함으로써 효소활성을 유지시킬 수 있다.

### 3) 건조, 제제화 기술 확립

이상과 같이 액상의 효소제제를 장기저장할 경우 효소활성의 소실이 심하였다. 따라서 효소를 장기저장하기 위한 방편으로 효소용액을 건조하여 제제화하였다. 대량배양으로 확보한 재조합 효소가 포함된 배양물을 제제화하기 위하여 네 가지 방법을 비교검토 하였다. 부형제를 첨가한 열풍건조, 냉풍건조, 분무건조 및 동결건조법을 각각의 제제화 방법으로 가장 일반적인 조건을 기준



여 백



**Fig. 23. Effect of storage time on the phytase activity. Enzyme and different concentration of sorbitol was mixed and stored at 30°C. The phytase solutions were mixed with the respective stabilizer in % ratio.**

으로 네가지 방법을 비교하였다. 각각의 방법으로 제제화 하기 전에 액체배양 물로부터 일정량의 시료를 확보하여 기존에 사용한 효소측정법을 이용하여 효소활성을 측정하였다. 각 제제물의 수분은 적외선 수분 측정기를 이용하여 측정하였다.

#### 가) 열풍건조법

가장 일반적인 방법인 열풍건조는 60℃에서 열풍을 강제 송풍하는 방법으로 건조하였다. 액체배양물과 부형제인 대두박을 1:2로 혼합하여 교반기로써 골고루 섞은 후 60x30x2 cm의 건조팬에 담아 열풍건조기를 이용하여 8시간동안 건조하였다. 열풍건조를 이용하여 건조한 결과 최종수분은 초기수분 32.6%에 비해 10.7%로 감소하였다. 건조 전후의 배양물 내의 효소활성을 비교해 본 결과 건조 후 효소활성은 건조전에 비해 49.1%의 효소활성을 유지하고 있음을 알 수 있었다.

#### 나) 냉풍건조법

가장 일반적인 방법인 냉풍건조는 40℃에서 냉풍을 강제 송풍하는 방법으로 건조하였다. 액체배양물을 1:2로 부형제인 대두박에 첨가한 후 250 rpm으로 골고루 교반하여 열풍건조기와 동일한 팬에 담아 냉풍건조기를 이용하여 24시간동안 건조하였다. 냉풍건조를 이용하여 건조한 결과 최종수분은 초기수분 32.6%에 비해 11.9%로 감소하였다. 건조 전후의 배양물 내의 효소활성을 비교해 본 결과 건조 후 효소활성은 건조전에 비해 71.4%의 효소활성을 유지하고 있음을 알 수 있었다.

#### 다) 분무건조법

분무건조를 이용한 건조방법은 대량배양한 효소용액, 미세한 분말상태의 대두박과 sorbitol을 3:1:1로 섞어 약 40°Brix로 조정하여 분무건조기를 사용하여 건조하였다. 액체배양물로부터 균체 및 효소는 MWCO 50,000 한외여과법으로 회수 농축하여 사용하였다. 분무건조 후 효소 활성을 측정한 결과 원래활성의 84.5%를 유지하였으며, 수분함량은 7.2%였다.

#### 라) 동결건조법

대량배양된 효소배양액을 1:2로 부형제인 대두박에 첨가한 후 250 rpm으로 골고루 교반하여 동결건조기의 동결팬에 담아 24시간동안 건조하였다. 동결건조를 이용하여 건조한 결과 최종수분은 초기수분 32.6%에 비해 6.5%로 감소하였다. 건조 전후의 배양물 내의 효소활성을 비교해 본 결과 건조 후 효소활성은 건조전에 비해 92.2%의 효소활성을 유지하고 있음을 알 수 있었다.

#### 마) 경제성 비교 검토

위에서 실험한 방법으로 각 결과에 비추어 효소활성 잔존율을 비교한 결과 효소 활성 잔존율은 동결건조법 다음으로 분무건조법이 가장 효율적이었다. 그러나, 동결건조법과 분무건조법은 효소활성 유지율이 매우 높은 편이나 제조시 부형제의 미세입자화, 운전비용의 고단가, 추가적인 고설비 투자비용이 소요된다는 단점이 있다. 열풍건조법과 냉풍건조법은 효소활성의 유지에는 다소 낮은 공정이지만 제조가격과 공정이 단순하여 이용하기 편리한 면이 있다. 이와 같은 점을 고려하여 가상 경제성인 생산성을 비교를 해 본 결과 냉풍건조법이 가장 효율적이고 경제적인 방법으로 판단되었다.

#### 바) 건조 제제 특성

최종 건조된 제품에 대해 각 온도별로 보존한 다음 효소활성을 측정한 결과, 10℃에서 유지할 경우 효소 활성은 6개월 경과 후에도 94% 이상이 유지되었다. 그러나, 30℃에서 보관할 경우에는 효소 활성은 72% 정도로 감소함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 다가 알콜을 첨가한 효소용액과 비슷한 경향을 나타내었으나 효소활성의 안정화 측면에서는 액상효소의 저장에 비해 월등히 높은 효소활성을 유지할 수 있었다. 건조제제의 효소 안정화 정도가 훨씬 강하게 나타난 이유는 건조제품에 있어서 제제화시 이미 효소가 안정화되어 다른 물질에 의한 효소 활성 저해 효과나 효소 분해 현상이 억제되기 때문인 것으로 판단된다. 결과적으로 이와 같은 결과는 본 연구결과에 의해 제제화된 효소를 10℃에 보존 할 경우 매우 안정적으로 장기간 유지될 수 있다는 것을 의미하며 이는 6개월 경과중인 시험이 그 기간이 연장되어도 유사한 결과를 나타낼 것으로 보인다.

Table 8. Comparison of phytase activities and moisture contents of dried phytases with different drying methods.

	Phytase activity (relative activity)	Moisture content
Hot air drying	49.1%	10.7%
Cold air drying	71.4%	11.9%
Spray drying	84.5%	7.2%
Freeze drying	92.2%	6.5%

## 2. 제 2세부과제: Phytase 대량생산을 위한 발현시스템 개발

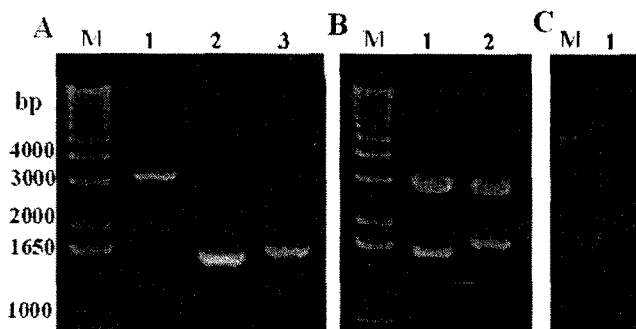
### 가. *Aspergillus* sp. 5990 phytase 유전자 cloning

*Aspergillus* sp. 5990을 35°C에서 2일간 배양한 후 균사체를 액체 질소하에서 갈아 Mini-beadbeater로 DNA를 추출하였다. Primer는 Genbank에 등록된 *Aspergillus niger* phytase 유전자 A와 B를 토대로 *A. niger* phytase와 다른 histidine acid phosphatase 들간의 보존적 영역을 DnaStar를 이용하여 합성하였다. Table 11에 제시된 primer AU/AD2 (*phyA*), primer BU/BD2 (*phyB*)를 사용하여 *Aspergillus* sp. 5990으로부터 분리된 genomic DNA를 template로 하여 PCR한 결과 단일 밴드를 나타내었다 (Fig. 24A). 증폭된 *phyA*와 *phyB* 유전자의 크기는 각각 1.5 kb와 1.6 kb를 나타내었다. 이러한 DNA 단편의 크기는 이미 곰팡이에서 분리된 phytase 유전자의 크기와 유사한 결과를 나타내었다.

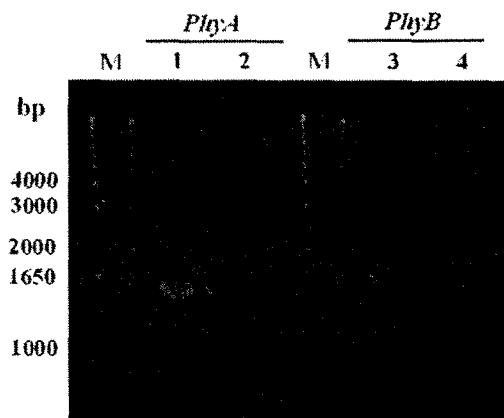
증폭된 DNA 단편이 phytase 유전자인지를 확인하기 위하여 *SmaI* site로 직선화시킨 pBluescript vector에 삽입하였다. Ligated된 clone을 *XbaI-HindII* 제한 효소로 처리하여 DNA 단편을 확인하였으며 (Fig. 24B) 부분적으로 DNA 구조를 분석하여 확인하였다. 부분적인 DNA 분석 결과 *phyA*와 *phyB* 유전자로 확인되었으며 *Aspergillus ficcum*과 *Aspergillus niger* var. *awamori*의 phytase 유전자와 상동성이 높게 나타났다. *phyA*와 *phyB* 유전자를 pBluescript SK에 ligation한 후 *E. coli* DH5  $\alpha$ 에 형질전환시켜 positive colony로부터 plasmid를 분리한 후 동일한 제한효소로 처리하여 전기영동한 결과 plasmid와 유전자의 존재를 확인할 수 있었다 (Fig. 25).

### 나. cDNA 증폭

*Aspergillus* sp. 5990으로부터 분리된 mRNA를 주형으로 RT-PCR에 의해 cDNA를 합성하였다. cDNA의 first strand는 0.25 U AMV reverse transcriptase XL (TaKara, Korea)와 0.125 uM oligo-dT adaptor primer 및 1 ul의 *Aspergillus* sp. 5990 mRNA를 주형으로 사용하였다. 증폭은 TP 240 (TaKara, Japan)을 사용하였으며, cDNA 합성은 42°C에서 30분간 행하여 합성하였으며 99°C에서 5분간 열처리하여 RT를 변성시켰다. 두 번째 PCR에 의한



**Fig. 24.** Cloning of phytase A incoding gene from *Aspergillus* sp. 5990. PCR product and vector (A): lane 1, *Sma*I digested pBluescript SK. lane 2, PCR product of *phy A* gene. lane 3, PCR product of *phy B* gene. Phytase clones (B): lane 1, *Xba*I-*Hind*III digested clone of *phy A*. lane 2, *Xba*I-*Hind*III digested clone of *phy B*. Genomic DNA from *Aspergillus* sp. 5990 (C). 1kb plus DNA ladder (BRL) was used as a standard marker (M).



**Fig. 25.** RT-PCR results from *Aspergillus* sp. 5990. PCR product and RT-PCR product was resolved on same agarose gel from the left *phyA* gene and *phyB* gene. lane 1 and 3, PCR product with genomic DNA as a template. lane 2 and 4, RT-PCR product with mRNA as a template. 1kb plus DNA ladder (BRL) was used as a standard marker (M).



DNA 증폭은 primer AUMEcoRI 5'-CGG AAT TCC TGG CAG TCC CCG CCT-3'와 primer ADMEcoRI 5'-CGG AAT TCA GGT AAT TCA GCT AAG CAA AAC ACTC-3'를 이용하여 *phytase A* 유전자를 PCR로 증폭시켰다. *Phytase B*의 유전자 증폭을 위한 RT-PCR용 primer는 B\_UXbaI 5-GCT CTA GAC CTT GGC AAT GCC TCG CAC CTC TCC-3와 B\_DEcoRI 5-GGA ATT CAT CTA GTC CAT AGC ATC ACC CTC CTG GCA C-3를 사용하였다. RT-PCR 결과 *phytA*는 1.4 kb (Fig. 25 lane 2) 그리고 *phyB*는 1.5 kb (Fig 25. lane 4)의 밴드가 나타났다. 그리고 염색체 DNA를 template로 하여 PCR한 결과 RT-PCR 산물보다도 높은 염기수를 지닌 DNA band를 나타내었다. 이러한 결과는 *phytase* 유전자내에 intron이 존재함을 의미한다.

#### 다. Multiple integration을 위한 발현 벡터 구축

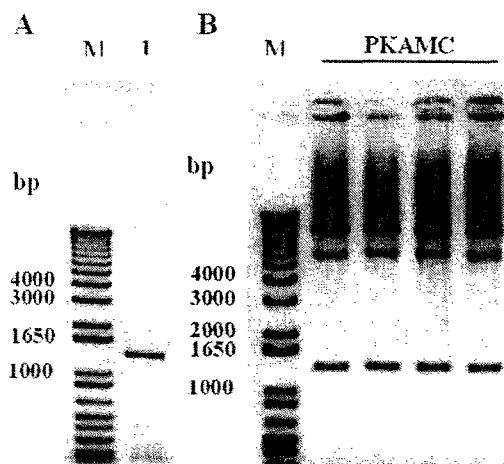
사료첨가용으로 사용되는 *phytase*는 주로 중성인 소장내에서 활성을 발휘하는 *phytase A*를 목표로 하고 있으며, *phytase A*만이 사료첨가용으로 사용되고 있다. *Phytase B*는 산성에서는 활성이 강하나 중성에서는 활성을 나타내지 않기 때문에 주로 단위동물의 위에서만 활성을 발휘하여 유기태인의 분해에 관여하기 때문에 *phytase B*에 대하여 효용성이 많이 떨어진다. 따라서 본 연구개발에서는 *phytase A*를 대량생산하기 위한 목표로 설정하였다.

*Aspergillus* 속의 *phytase*는 유전자내에 intron을 지니고 있기 때문에 *Aspergillus* sp. 5990으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA를 제조하기 위하여 RT-PCR용 template로 사용하였다. pSKphyA/B의 부분적인 DNA 구조를 근거로 제한 효소부위를 지닌 *phytase* primer를 제작하여 *phyA*와 *phyB*를 증폭하기 위한 cDNA를 합성하였다 (Table 9). Genomic DNA의 동일 부분을 증폭하기 위한 primer set도 제작하였다.

*Aspergillus* sp. 5990의 mRNA를 oligo-dT magnetic bead를 이용하여 분리한 후 oligo-dT adapter primer와 *phytase A*와 *B*에 특이적인 primer를 이용하여 RT-PCR를 행하였다. Fig. 25에 나타난바와 같이 CD 배지상에서 확보한 균사로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR한 결과 *phyA*와 *phyB* 유전자가

**Table 9. Primer sequence**

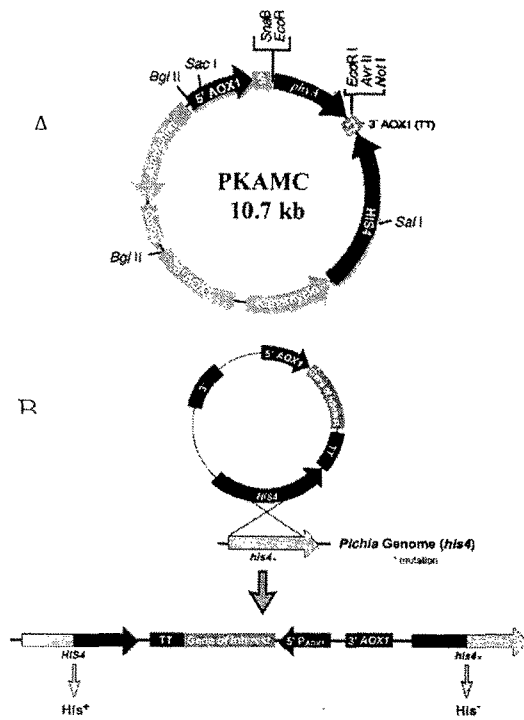
<b>Target Gene</b>	<b>Primers</b>	<b>Sequence</b>
<i>PhyA</i> gene (With signal sequence)	A_UEcoRI	5-CGG AAT TCC TA GGC ATC ATG GGC GTC TC-3
	A_DEcoRI	5-CGG AAT TCC ATC AAG GTA ATT CAG CTA AGC AAA AC-3
<i>PhyA</i> gene (Without signal sequence)	A_UMecoRI	5-CGG AAT TCC TGG CAG TCC CCG CCT-3
	A_DMEcoRI	5-CGG AAT TCA GGT AAT TCA GCT AAG CAA AAC ACTC-3
<i>PhyB</i> gene (With signal sequence)	B_UXbal	5-GCT CTA GAC CTT GGC AAT GCC TCG CAC CTC TCT C-3
	B_DEcoRI	5-GGA ATT CAT CTA GTC CAT AGC ATC ACC CTC CTG GCA C-3



**Fig. 26.** Cloning of phytase A incoding gene from *Aspergillus* sp. 5990 *PhyA* (1.4kb) cDNA from mRNA of *Aspergillus* sp. 5990 (A) inserted into *Pichia* expression vector pPIC9K (Invitrogene) at the EcoRI site (B). The resulting plasmid, PKAMC, was confirmed by EcoRI digestion. The linearized plasmid was resolved by a 1% Sekem LE (FMC) agarose gel and visulized by ethidium bromide staining method.

증폭되었으나, PDB 배지상에서 기른 균사를 이용하여 RT-PCR한 결과 *phyA*와 *phyB* 유전자가 증폭되지 않았다. 그 원인은 phosphate가 제한된 배지상에서 자란 균사만이 phytase를 발현하기 때문으로 예상된다. 이러한 결과는 *A. ficcum* phytase 유전자 cloning 결과와 동일하였으며, phytase 유전자내에 intron을 지니고 있는 결과와 일치하였다. *Aspergillus* signal sequence를 지닌 증폭된 DNA를 제한 효소로 처리하여 pBluescript vector에 삽입하여 계속적인 분석에 사용하였다. *phyA* 유전자에 대하여 말단에 *EcoRI* site를 지닌 A\_UM*EcoRI*, A\_DM*EcoRI* primer를 합성하여 RT-PCR 함으로써 signal sequence를 지니지 않는 1.35 kb의 DNA 단편을 얻었다 (Fig. 26A). Phytase A 유전자를 coding하는 RT-PCR 산물을 pPIC9K (Invitrogen, CA, USA) 발현 vector의 *EcoRI* site ( $\alpha$ -factor signal sequence의 개시 codon이 있는 부위)에 삽입하였다. 그 결과로 생성된 plasmid를 PKAMC (Fig. 27A)라 명명하였으며, methanol induction에 의해 조절되는 AOX1 promotor를 지니고 있다. 게다가 이 vector는 in vitro상에서 multiple copy inserts를 screening하기 위한 kanamycin 내성 유전자를 지니고 있으며 *Pichia* strain인 GS115와 KM71 균주에서는 phytase를 배양액으로 분비하는 기능을 지니고 있기 때문에 곰팡이 유래 재조합 단백질의 대량생산에 용이하게 사용되고 있다.

GS115 (Mut<sup>1</sup>) 또는 KM71(Mut<sup>s</sup>)에서 유전자 삽입은 염색체의 *his4* locus와 vector의 *HIS4* 유전자 사이에서 single crossover가 일어나 *his4* locus에 삽입된다. 그 결과 1 개 이상의 phytase 유전자가 *his4* locus에 삽입된다. genomic AOX1 또는 *aox1::ARG4* 위치는 이러한 재조합이 일어나지 않기 때문에 His<sup>+</sup> 형질전환체의 표현형은 모세포처럼 Mut 표현형과 동일하다. PKAMC의 DH5  $\alpha$  형질전환체로부터 plasmid를 분리하여 *EcoRI* 제한효소로 처리한 다음 1% agarose 전기 영동으로 분리하였다 (Fig. 26B). Positive clone은 *BglIII* 제한 효소로 처리하여 insert DNA 방향성을 확인하고 *Pichia* 균에 형질전환용으로 사용하였다. 정확한 방향성과 크기를 지닌 clone을 선별하여 PKAMC라 명명하였다. PKAMC는 Mini Prep Kit (Promega, WI, USA)를 이용하여 miniprep하였고 유전자를 sequencing하여 ORF를 확인하였다.



**Fig. 27.** Construction of expression system. Map of the PKAMC expression vector (A). Gene insertion event at *his4* locus (B). This result in the insertion of one or more copies of the phytase genes at the *his4* locus.

라. *Aspergillus* sp. 5990 *PhyA* 유전자 분석

*Aspergillus* sp. 5990 phytase 유전자를 분석하기 위하여 Universal primer와 Rivers primer를 사용하여 1차 구조를 분석하였다. 1차 sequencing 결과를 토대로 서로 겹치도록 매 300 bp마다 primer를 design하여 phytase A 유전자의 전체 구조를 분석하였으며, phytase B 유전자는 RT-PCR을 확인하기 위하여 부분적으로 sequencing 하였다.

Fig 28은 15,129 nt의 phytase A 유전자의 완전한 sequence를 나타내며 5' 말단의 signal sequence 근처에 103 nt의 intron이 내재되어 있었다. Signal sequence는 소문자로 나타내었으며 활성부위인 RHGXRXP는 box로 표시하였다. 이 유전자는 10개의 N-glycosylation 부위 (사각형의 N)가 존재하며 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr의 규칙적인 sequence를 나타내었다. Mature 효소는 452개의 아미노산으로 구성되었으며, 이론적인 분자량은 49,616이었다. 단백질 sequence로 계산된 효소의 이론적인 pI는 4.84였다. 분리된 *Aspergillus* sp. 5990의 phytase A 유전자 서열은 *Aspergillus ficcum*, *A. niger* var. *awamori*, *A. fumigatus*, *A. terreus*의 phytase와 각각 99, 97, 66 및 62%의 상동성을 나타내었다. 형태학적인 특성은 *A. niger* var. *awamori*와 유사하나 유전자 구조는 *A. ficcum*과 유사하였다.

마. Phytase 생산용 *Pichia pastoris* 형질전환체의 분석

PKAMC를 *PmeI*으로 처리하여 직선화하여 head에서 tail 방향으로 His<sup>+</sup> 위치에 integration시켜 His<sup>-</sup>를 His<sup>+</sup>로 전환하였다 (Fig. 26B). pPIC9K 또한 직선화하여 대조실험으로 *Pichia*에 형질전환시켰다. RDB plate상의 모든 His<sup>+</sup> 형질전환체를 다양한 농도의 G418-YPD plate에 transfer시켜 높은 농도의 G418에서 생성된 colony를 분리하였다. Fig. 29은 0.25, 0.5 및 0.75 mg/ml의 G418을 함유한 YPD plate상의 His<sup>+</sup>형질전환체를 나타내고 있으며, 1.0 mg/ml의 G418을 함유한 YPD plate상에서는 colony가 나타나지 않았다 (Fig. 29). KM71 균주의 형질전환율이 GS115보다 높기 때문에 30개의 KM71 균주의 colony를 0.75 mg/ml의 G418을 함유한 YPD plate에서 분리하여 BGMY 액체 배지에서 성장시켜 효소의 유도를 위하여 BMMY 배지로 transfer시켰다. 4일 동안의 methanol induction에 의하여 배양액의 단백질 농도는 38 mg/ml이었으

```

C TC  ATA  GGC  ATC  AAG  EGG  GTC  TGT  GGT  GTC  CTA  CTT  CCG  TTG  TAT  CTT  CCG  TCT  GGG  TAT  GGT  AAG  GAG  GAG  AAT  CAA  78
VET  CTA  ATA  GGG  ACC  CTC  CCG  TCC  GAG  GGG  GCG  TGA  AAG  TCG  GAG  TGT  GTC  CCA  CTA  CTT  ATC  GGT  GAG  TAT  CTT  TCG  156
AAG  GTC  AAG  TGG  CCA  CTG  GCA  GTC  CCG  GCC  TCG  AGA  AAT  CAA  TCC  AGT  TGC  GAT  ACG  GTC  GAT  CAG  GGG  TAT  CAA  TCC  234
TTC  TCC  GAG  ACT  TCG  CAT  CTT  TGG  GGT  CAA  TAC  GCA  CCG  TTC  TTG  TCT  CTG  GCA  AAC  GAA  TCG  GTC  ATC  TCC  CCT  GAG  312
GTG  CCG  GCG  GGA  TCG  AGA  GTC  ACT  TTC  GGT  CAG  GTC  CTC  TCC  CCG  CAT  GGA  GCG  CCG  TAT  CCG  ACC  GAC  TCC  AAG  GGC  390
AAG  AAA  TAC  TCC  GCT  CTC  ATT  GAG  GAG  ATC  CAG  CAG  AAG  GCG  ACC  ACC  TTT  GAG  GGA  AAA  TAT  GCG  TTC  CTG  AAG  ACA  468
TAC  AAC  TAC  AGC  TTG  GGT  GCA  GAT  GAC  CTG  ACT  CCG  TTC  GGA  GAA  CAG  GAG  CTA  GTC  AAC  TCC  GGC  ATC  AAG  TTG  TAC  546
CAG  CCG  TAC  GAA  TCG  CTC  ACA  AGG  AAC  ATC  GTT  CCA  TTC  ATC  CGA  TCC  TGT  GGC  TCC  AGC  CCG  GTG  ATC  GCC  TCC  GGC  624
AAG  AAA  TTC  ATC  GAG  GGC  TTC  CAG  AGC  ACC  AAG  CTG  AAG  GAT  CCT  CGT  GCC  CAG  CCC  GGC  CAA  TCG  TCG  CCG  AAG  ATC  702
GAC  GTG  GTC  ATT  TCC  GAG  CCG  AGC  TCA  TCC  AAC  AAC  ACT  CTC  GAC  CCA  GGC  ACC  TGG  ACT  GTC  TTC  GAA  GAC  AGC  GAA  780
TTG  CCG  GAT  ACC  GTC  GAA  GCC  AAT  TTC  ACC  GCG  ACG  TTC  GTC  CCG  TCC  ATT  CGT  CAA  CGT  CTG  GAG  AAC  GAC  GAC  TCC  858
GGT  GTC  ACT  CTC  ACA  GAC  ACA  GAA  GTG  ACC  TAC  CTG  ATG  GAC  ATG  TGC  TCC  TTG  GAC  ACC  ATC  TCC  ACC  AGC  ACC  GTC  936
GAC  ACC  AAG  CTG  TCC  CCG  TTC  TGT  GAC  CTG  TTG  ACC  CAT  GAC  GAA  TGG  ATC  AAC  TAC  GAC  TAC  CTC  CAG  TCC  TTG  AAA  1014
AAG  TAT  TAC  GGC  CAT  GGT  GCA  GGT  AAC  CCG  CTC  GGC  CCG  ACC  CAG  GGC  GTC  GGA  TAC  GGT  AAC  GAG  CTC  ATC  GCC  CGT  1092
CTG  ACC  CAG  TCC  CCG  GTC  CAG  GAT  GAC  ACC  AGT  TCC  AAC  CAG  ACT  TTG  GAC  TCG  AGC  CCG  GGT  ACC  TTT  CCG  CTC  AAC  1170
TCT  ACT  CTC  TAC  GCG  GAC  TTT  TCG  CAT  GAC  AAC  GGC  ATC  ATC  TCC  ATT  CTC  TTT  GCT  TTA  GGT  CTG  TAC  AAC  GGC  ACT  1248
AAG  CCG  CTA  TCT  ACC  ACC  ACC  GTG  GAG  AAT  ATC  ACC  CAG  ACA  GAT  GGA  TTC  TCG  TCT  GCT  TGG  ACG  GTT  CCG  TTT  GCT  1326
TCG  GGT  TTG  TAC  GTC  GAG  ATG  ATG  CAG  TGT  CAG  GCG  GAG  CAG  CCG  CTG  GTC  CGT  GTC  TTG  GTT  AAT  GAT  CCG  GTT  1404
GTC  CCG  CTG  CAT  GCG  TGT  CCG  GTT  GAT  GCT  TTG  GGG  AGA  TGT  ACC  CCG  GAT  AGC  TTT  GTG  ACG  GGG  TTG  AGC  TTT  GCT  1482
AGA  TGT  GGG  GGT  GAT  TGG  GCG  GAG  TGT  TTT  GCT  TAG  CTG  AAT  TAC  CTT  GAT  GAA  TGG  1529

```

**Fig. 28.** DNA sequence of clone pSKphyA carrying the complete phytase encoding gene of *Aspergillus* sp. 5990. The possible signal sequence is indicated by lower-case letters. The putative intron is marked within vertical arrows. The putative cleavage site of signal peptidase is show ( ^ ). The PCR primer site indicated by horizontal arrows under the sequence. Potential N-glycosylation sites are indicated by N . Box region is the RHGXRXRP active site motif.

며, 배양액의 phytase 활성은 높게 나타났다. 그리고 배양액을 SDS-PAGE로 전기영동한 결과 85 kDa 부근에서 하나의 단백질 밴드를 나타내었으며, phytase A와 동일한 분자량을 나타내었다. *Pichia pastoris*는 분비되는 단백질의 양이 작기 때문에 배지상에 분비된 거의 모든 단백질은 재조합 phytase로 판단되었다.

#### 바. 재조합 phytase 대량생산

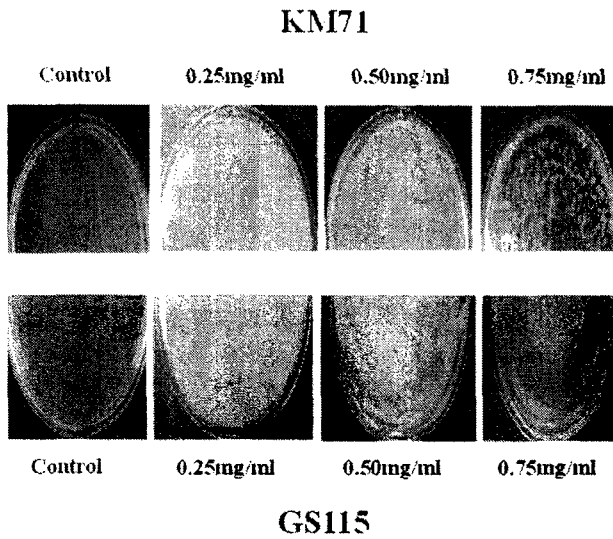
Chlorosomal integration 효율이 높은 KM71 균주를 BGM MY 액체배지에서 성장시킨 후 효소의 유도를 위하여 10 L 발효조를 이용한 BMMY 배지로 transfer시켜 30°C에서 180 시간 동안 배양하면서 재조합 phytase의 대량생산을 위한 조건을 확립하였다 (Fig. 30). 즉 발효 24시간부터 48시간동안 시간당 20 ml의 sucrose와 methanol 혼합액을 가하고 48시간 이후부터는 시간당 50 ml의 혼합액을 가하여 재조합 phytase의 생산을 유도하였다. 그 결과 발효 120시간대에 phytase 생산이 최대로 되었으며, 이때의 생산량은 1 liter 당 약 2.2 g으로 나타났다. 실험실 규모의 phytase 생산은 성공적으로 나타났다. 그러나 산업적인 생산을 위하여 보다 대형의 발효조를 사용할 경우 본 연구개발에서 확립된 조건을 바탕으로 생산성을 향상시키기 위한 induction 시간과 빈도, feeding supplements의 조성을 개선할 필요가 있다. 특히 대량 생산을 위한 scale-up시 pilot 규모와 plant 규모의 발효공정시 induction 조건과 seeding 조건 등의 추가적인 연구가 필요하다. 이러한 연구는 대형 발효조가 구비된 참여업체의 전문 인력에 의한 산업화를 위한 자료구축이 보다 효율적이다. 따라서 본 재조합 phytase의 산업화를 위한 대량생산 조건은 참여업체로 기술이전을 완료하여 참여업체에서의 추가적인 생산조건을 확립할 예정이다.

#### 라. 재조합, 야생형 및 시판용 phytase의 정제

##### 1) Phytase의 정제

본 연구에서 개발된 재조합 phytase의 특성을 비교·분석하기 위하여 3종의 phytase (*P. pastoris*로부터 생산된 재조합 효소, *Aspergillus* sp. 5990로부터 생산된 야생형 phytase, BASF에서 시판되는 phytase)를 시료로 하여 야생형 phytase 정제방법에 준하여 세 효소를 정제하였다.





**Fig. 29.** Phytase transformant on a various concentration of G418 plates. Electro-transformed His<sup>+</sup> transformant was transferred on G418 plates for screening of multi-copy integrated transformant. KM71, GS115 transformant strains show in upper and lower law, respectively. Control was a non-transformant.

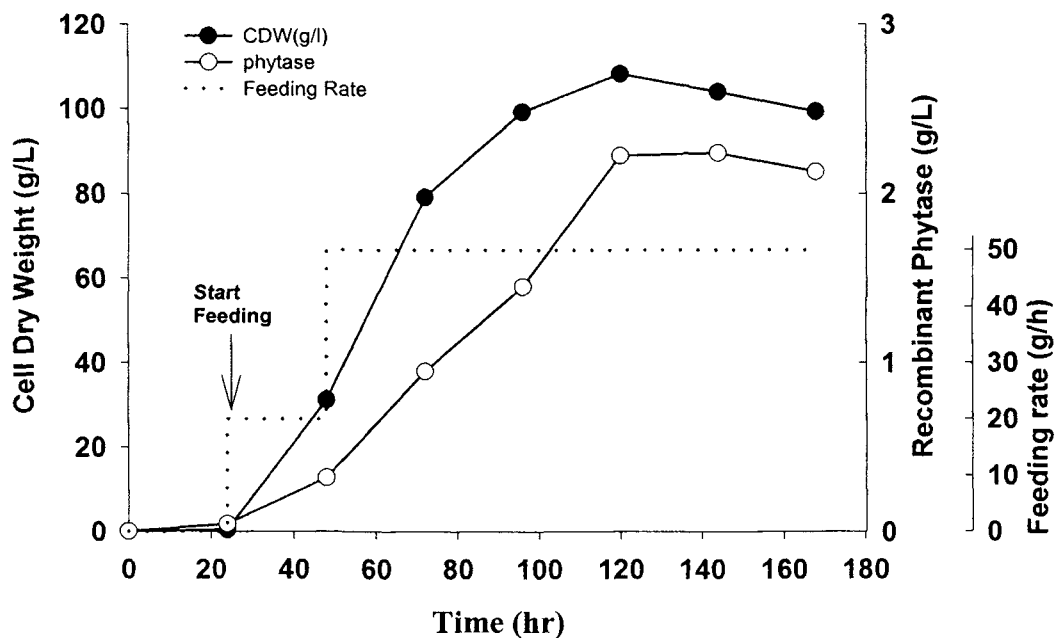
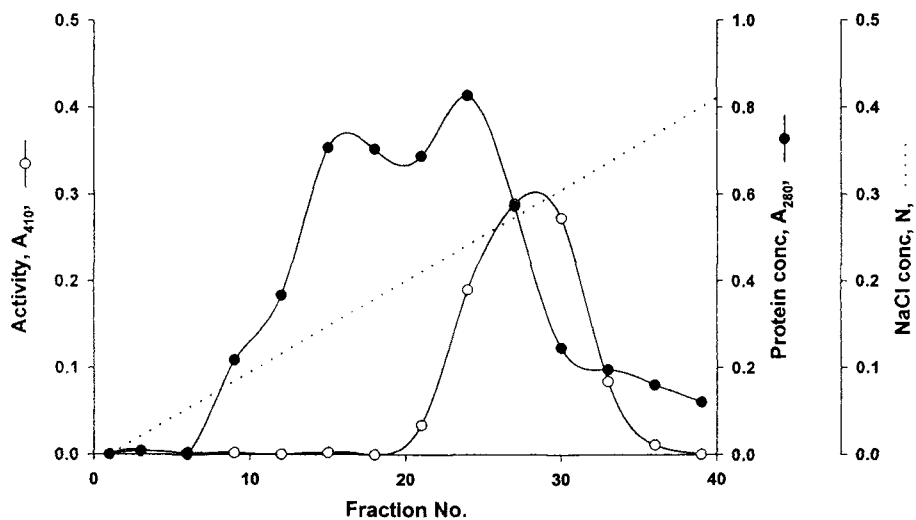


Fig. 30. Time course of cell Dry weight( ● ) and recombinant phytase production ( ○ ). 10 L Jar fermentor Cultivation using a 700 g/L glucose solution in fed-batch phase (feeding rates are indicated by the dashed line) was performed.

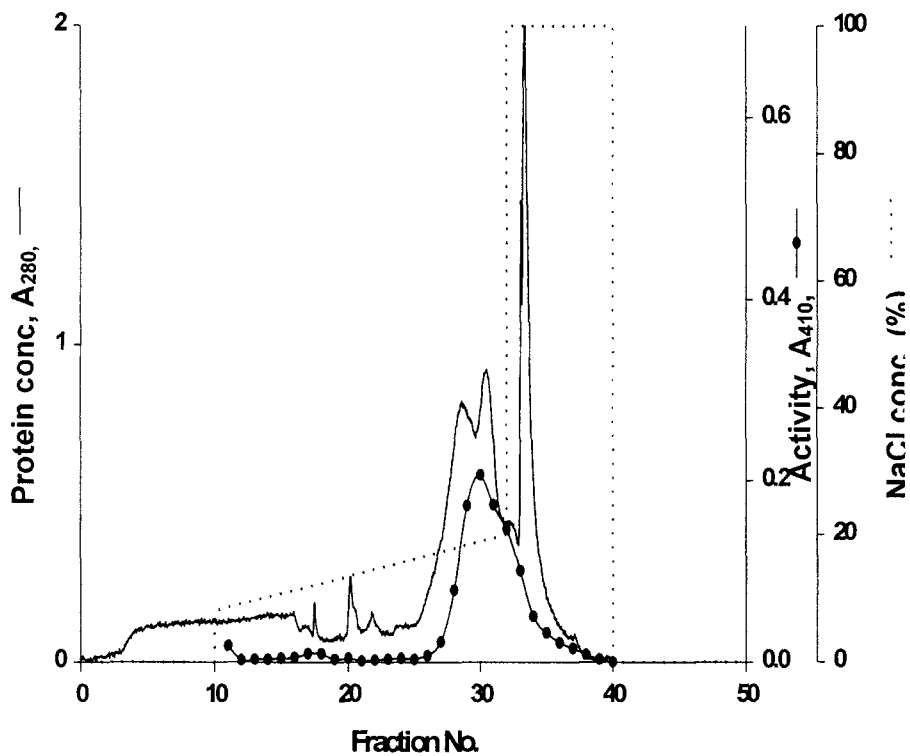
가) 야생형 phytase A의 정제

*Aspergillus* sp. 5990 균주의 배양액에는 두 종 이상의 phytase가 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 예비 실험 결과 phytase B는 pH 8.0에서 Q-Sepharose에 흡착되었으나 phytase A는 같은 조건의 칼럼에 흡착되지 않았다. 즉, 냉동된 배양액을 해동하여 cheese gause로 여과하여 균사체를 제거한 다음 여과액을 12,000xg에서 20분 동안 원심분리하여 미량의 협잡물들을 제거하였다. 원심분리 후 얻은 상등액에 0.1 M NaOH 용액으로 서서히 가하여 pH를 8.0으로 조정한 후 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충액으로 평형화된 Q-Sepharose column (2.5 x 12 cm)에 통과시켰다. Q-Sepharose에 흡착되지 않은 시료에서는 phytase A 활성만 측정되었으며 이 단계를 거친 결과 수율이 96%였고 순도는 2.4배 증가하였다. Q-Sepharose 칼럼을 통과시킨 효소 용액의 pH를 1.0 M citric acid로써 pH 3.0으로 조정한 후 12,000 x g에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Na-citrate (pH 3.0) 완충액으로 평형화된 S-Sepharose column (1.5 x 10 cm)에 흡착시켰다. 흡착 후 완충용액 50 ml로 흡착되지 않은 단백질을 제거한 후 NaCl 농도가 0-0.4 M이 되도록 한 완충용액 300 ml로써 직선농도구배법으로 phytase A를 분리하였다 (Fig. 31). S-Sepharose column chromatography에 의해 phytase는 NaCl 농도 0.2 M 정도에서 분리되었다. 그림에 나타난바와 같이 단백질 농도 피크와 효소활성 피크가 일치하지 않음을 알 수 있다. 이는 분리된 효소용액내에 전하가 다른 단백질 공존함을 의미한다. 따라서 공존하는 다른 단백질을 제거하기 위하여 2차적인 정제수단이 필요함을 의미한다. 이 정제단계를 거침으로써 85.5%의 수율로 순도가 4.0배 증가한 phytase A를 얻을 수 있었다.

Phytase A의 정제단계를 높이기 위하여 활성획분 (획분 26-38)을 모아 3배의 완충액 (1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Na-citrate, pH 3.0)으로 희석하여 염농도를 저하시킨 후 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Na-citrate, pH 3.0 완충액으로 평형화된 Mono-S HR 5/5 FPLC column (Pharmacia, Upsala, Sweden) 칼럼에 흡착하였다. 흡착된 phytase A를 FPLC를 이용한 shallow-gradient로 phytase A를 정제하였으며 (Fig. 32) 정제된 phytase A의 수율은 66%였으며 순도는 19.7배로 증가하였다 (Table 10).



**Fig. 31.** Chromatogram of a first S-Sepharose cationic exchange chromatography of the Q-Sepharose column fraction eluted from *Aspergillus* sp. 5990 culture supernatant. Flow rate was 120ml/hr and fraction volume was 4ml/tube. The enzyme was eluted with a gradient of 0-0.5M NaCl in 20mM Na-citrate buffer containing 1mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 3.0.



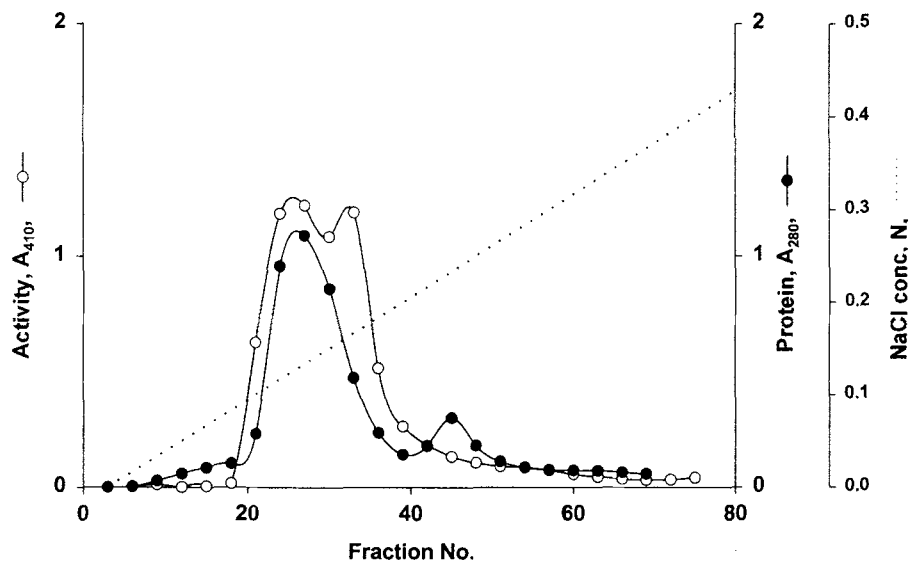
**Fig. 32.** Chromatogram of a first Mono-S HR 5/5 cationic exchange chromatography of *Aspergillus* sp. 5990 phytase A fraction from the S-Sepharose chromatography. Flow rate 30 ml/hr and fraction volume was 1ml/tube.

#### 나) BASF phytase의 정제

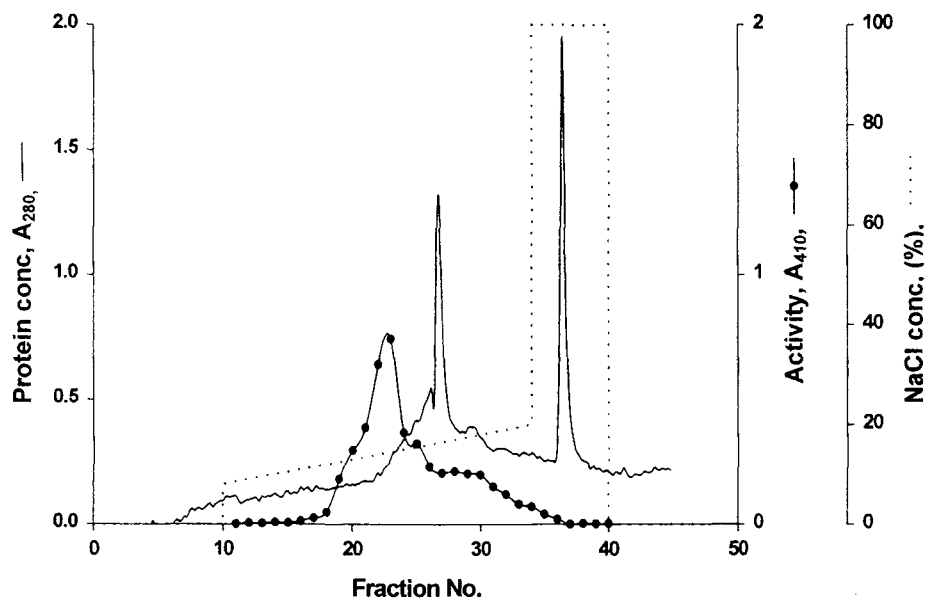
시판되는 Natuphos (BASF사제) 1g를 1 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 함유하는 10 배량의 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.0)에 녹인 후 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상등액을 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.0)으로 평형화시킨 Q-Sepharose 칼럼 (2.5 x 12 cm)에 통과시킨 후 Q-Sepharose 칼럼에 흡착되지 않은 효소용액의 pH를 1.0 M citric acid로써 pH 3.0으로 조정한 후 12,000 x g에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 1 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 함유한 20 mM Na-citrate (pH 3.0) 완충액으로 평형화된 S-Sepharose column (1.5 x 10 cm)에 흡착시켰다. 흡착 후 완충용액 50 ml로 흡착되지 않은 단백질을 제거한 후 NaCl 농도가 0-0.5 M이 되도록 한 완충용액 300 ml로써 직선농도구배법으로 phytase A를 분리하였다 (Fig. 33). S-Sepharose column chromatography에 의해 phytase는 NaCl 농도 0.2 M 정도에서 분리되었다. 그림에 나타난바와 같이 단백질 농도 피크와 효소활성 피크가 일치하지 않음을 알 수 있다. 이는 분리된 효소용액내에 전하가 다른 단백질 공존함을 의미한다. 따라서 공존하는 다른 단백질을 제거하기 위하여 분리된 활성획분을 모아 3배의 1 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 함유한 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충액으로 희석한 후 1 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 함유한 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충액으로 평형화된 Mono-S HR 5/5 FPLC column (Pharmacia)으로 phytase를 정제하였다 (Fig. 34). 이 정제단계를 거침으로써 18%의 수율로 순도가 17배 증가한 phytase를 얻을 수 있었다 (Table 10).

#### 다) 재조합 phytase의 정제

0.5% BMMY 배지에 chlorosomal integration 효율이 높은 KM71 균주를 BGMY 액체배지에서 성장시킨 후 10 L 발효조를 이용한 BMMY 배지에 접종시켜 30°C에서 methanol induction으로 5일간 배양하여 재조합 phytase를 대량생산하였다. 배양액 중에 존재하는 phytase A를 야생형 phytase 정제시에 적용한 이온크로마토그래피조건과 동일하게 행하였다. 즉, BMMY 배지에서 5일간 배양된 배양액을 12,000xg에서 10분간 원심분리한 후 상등액의 pH를 0.1 N NaOH로 pH 8.0으로 조정한 후 1 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 함유한 20 mM Tris-HCl 완충액, pH 8.0으로 투석시켰다. 투석액을 동일한 완충액으로 평형화시킨



**Fig. 33.** Chromatogram of a second Q-Sepharose anionic exchange chromatography of crude enzyme from Natuphos (BASF Korea). Flow rate was 120 ml/hr and fraction volume was 4ml/tube. The enzyme was eluted with a gradient of 0-0.5M NaCl in 20mM Tris-HCl buffer containing 1mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0.



**Fig. 34.** Chromatogram of a first Mono-S HR 5/5 cationic exchange chromatography of Natuphos phytase A fraction from the S-Sepharose chromatography. Flow rate 30ml/hr and fraction volume was 1ml/tube.

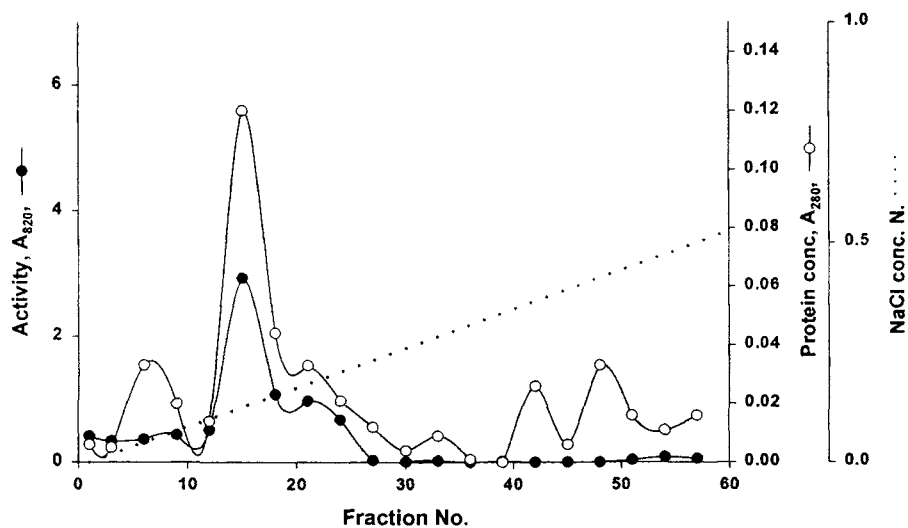


Q-Sepharose 칼럼 (2.5 x 12 cm)에 통과시킨 후 Q-Sepharose 칼럼에 흡착되지 않은 효소용액의 pH를 1.0 M citric acid로써 pH 3.0으로 조정 한 후 12,000 x g에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Na-citrate (pH 3.0) 완충액으로 평형화된 S-Sepharose column (1.5 x 10 cm)에 흡착시켰다. 흡착 후 완충용액 50 ml로 흡착되지 않은 단백질을 제거한 후 NaCl 농도가 0-0.5 M이 되도록 한 완충용액 300 ml로써 직선농도구배법으로 재조합 phytase A를 분리하였다 (Fig. 35). S-Sepharose column chromatography에 의해 phytase는 NaCl 농도 0.2 M 정도에서 분리되었다. 그림에 나타난바와 같이 단백질 농도 피크와 효소활성 피크가 일치하지 않음을 알 수 있다. 따라서 공존하는 다른 단백질을 제거하기 위하여 분리된 활성획분을 모아 3배의 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충액으로 희석한 후 1 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충액으로 평형화된 Mono-S HR 5/5 FPLC column (Pharmacia)으로 phytase를 정제하였다 (Fig. 35). 이 정제단계를 거침으로써 26%의 수율로 순도가 20배 증가한 phytase를 얻을 수 있었다 (Table 10). 그리고 3종의 효소의 정제과정에 대한 수율과 정제도를 Table 10에 나타내었다. 각각의 정제 효소의 SDS-PAGE에 의한 정제도를 Fig. 36에 나타내었다.

#### 마. 재조합 정제효소의 특성

##### 1) Glycosylation 정도

정제된 *Aspergillus* sp. 5990, BASF phytase 및 *P. pastoris*에서 생산된 재조합 phytase를 N-Glycosidase F를 처리하여 deglycosylation시킨 후 SDS-PAGE로 전기영동한 결과를 Fig 36에 나타내었다. *P. pastoris*에서 생산된 재조합 phytase, *Aspergillus* sp. 5990 및 BASF phytase의 분자량은 각각 80, 85, 및 75 kDa의 단일 밴드로 나타났다. 그리고 3종의 효소를 deglycosylation시킨 결과 분자량은 공히 50 kDa로 나타났다. 이러한 결과는 아미노산 서열로 구한 이론적인 분자량인 49,616 Da과 아주 유사하게 나타났다 (55). 3종 효소의 분자량을 비교하면 야생형 효소가 BASF와 재조합 효소보다도 분자량이 높게 나타났으며 이는 야생형 phytase가 다른 효소보다도



**Fig. 35.** Chromatogram of a first Q-Sepharose anionic exchange chromatography of the crude recombinant phytase from *P. pastoris*. Flow rate was 120 ml/hr and fraction volume was 4ml/tube. The enzyme was eluted with a gradient of 0 - 0.5M NaCl in 20mM Tris-HCl buffer containing 1mM CaCl<sub>2</sub>. pH 8.0.

Table 10. Purification of phytases Phytase activity was determined at 37°C at pH 5.5.

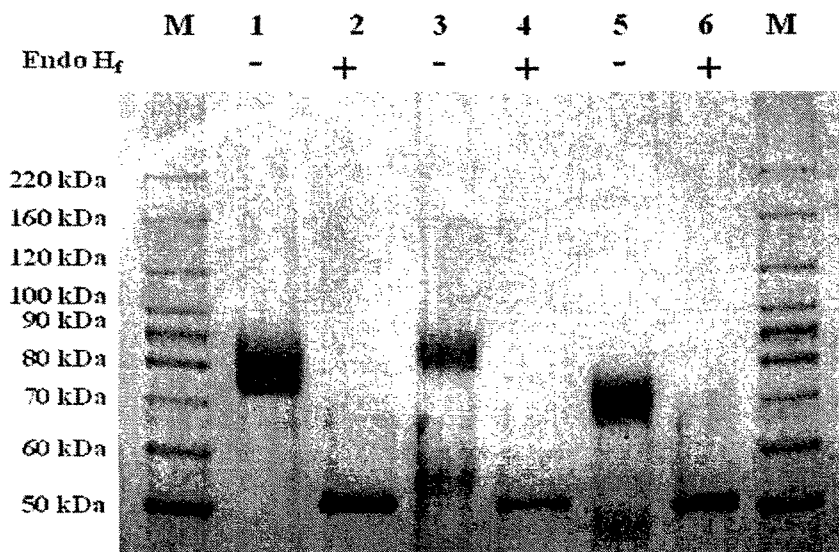
	Step	Volume (ml)	Protein conc. (mg/ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
A. sp. 5990	Crude	2,000	0.22	11.4	54.1	1.0	100
	Q-Sep.	2,000	0.126	10.4	82.6	1.59	57.1
	S-Sep.	60	0.156	29.3	187.8	3.6	7.7
	Mono-S	4.0	0.37	358	986	18.7	6.2
Natuphos	Crude	200	2.0	49.2	24.6	1.0	100
	Q-Sep.	24	1.2	230	192	7.8	56.1
	Mono-S	4.0	0.64	279	440	17.9	17.2
Recom- binant	crude	500	3.2	70.2	31.9	1.0	100
	Q-Sep.	34	0.79	466	587	18.4	45.3
	Mono-S	30	0.48	306	639	20.0	26.2

glycosylation 정도가 높음을 의미한다. 그러나 발효조건에 따라 glycosylation의 정도는 다소 달라짐을 본 연구를 통해서 알 수 있었으며, glycosylation 정도에 따라 내열성도 다소 차이가 남을 알 수 있었다. 특히 glycoprotein의 경우 내열성과 안정성을 향상시키기 위한 glycosylation의 정도를 향상시키기 위한 발효조건 개선은 차후에 연구되어야 할 과제이며, 특히 phytase의 열안정성을 향상시키기 위한 방안이 될 가능성이 있다.

Phytase 유전자는 Asn-X-Ser과 Asn-X-Thr과 같은 10개의 N-glycosylation site가 존재하나 재조합 phytase는 야생형 phytase에 비해 이보다 낮은 glycosylation 정도를 나타내고 있다. 이러한 결과는 glycosylation 정도는 *A. fumigatis*에서 나타난 바와 같이 대단히 가변적인 결과와 일치한다 (53). *Aspergillus* sp. 5990의 DNA sequence에 나타난바와 같이 Asn-59와 Asn-120 위치는 이질성 때문에 N-glycosylation 정도가 가변적이거나, Asn-207과 Asn-339는 보존성이 높기 때문에 glycosylation 정도가 일정한 것으로 예상된다. Glycosylation은 효소의 여러 가지 특징에 영향을 미친다. 첫째로, 단백질의 안정성과 folding에 영향을 미쳐 촉매활성의 변화를 초래한다. 몇몇 단백질의 경우 N-glycosylation에 의하여 그들의 기능을 유지하고(57, 58) 정확한 위치에 정좌한다 (59). N-linked glycosylation은 일정하게 일어나고 단백질 folding과정에 영향을 미친다 Glycosylation은 여러 가지 단백질의 folding과 조합에 중심적인 역할을 하며 (60), 단백질의 3차 구조를 변화시켜 안정화에 기여한다. 둘째로 acidic carbohydrate의 modification의 경우 단백질의 pI 변화를 초래한다 (53). 이러한 pI의 변화는 phytase의 정제를 어렵게 하는 하나의 원인으로 간주되고 있다. 마지막으로 glycosylation은 대사에너지를 변화시켜 초래함으로써 phytase 발현정도를 낮추는 원인이 되고 있다. 대체로 곰팡이나 효모를 이용한 재조합 phytase의 생산시 야생균에 비해 glycosylation 정도가 낮은 이유 중의 하나이다.

## 2) 재조합 정제효소의 반응최적 조건

pH 1.0 - 8.0까지의 완충액 (pH 1.0-2.8, 0.1 M glycine-HCl; pH 3.5-6.0, 0.1 M Na-acetate; pH 7.0-8.0, 0.1 M Tris-HCl)에 Na-phytate가 5.5 mM 되



**Fig. 36.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified three phytases before and after deglycosylation by Endo H<sub>f</sub>. Lane M, protein standard marker from BRL. Lane 1 and 2, recombinant phytase A expressed in *P.pastoris* with and without Endo H<sub>f</sub>. Lane 3 and 4, *Aspergillus* sp. 5990 phytase A with and without Endo H<sub>f</sub>. Lane 5 and 6, *A.niger* phytase; Natphos from BASF with and without Endo H<sub>f</sub>.

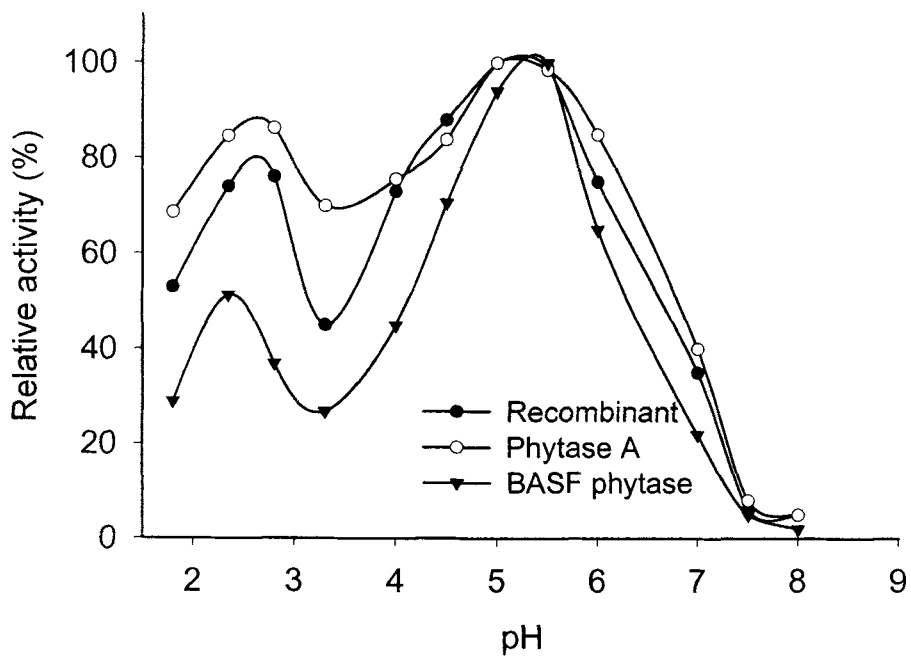
도록 녹인 후 기질로 사용하여 정제된 야생형, 재조합형 및 상용의 phytase를 37°C에서 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정된 결과를 Fig. 37에 나타내었다. 전형적인 곰팡이 유래 phytase와 같이 야생형 phytase, 재조합형 phytase 및 Natuphos는 pH 5.5에서 최대활성을 나타내었으며 pH 2.5에서도 다소 높은 효소활성을 나타내었다.

야생형 phytase와 재조합형 phytase는 pH 2.5에서 최대활성의 70-80%를 나타내었으며, pH 7.0에서도 최대활성의 40%를 유지하였고 pH 8.0에서는 활성을 소실하였다. 반면 시판되는 phytase의 경우 pH 2.5부근에서 최대활성의 50% 가량을 나타내었다.

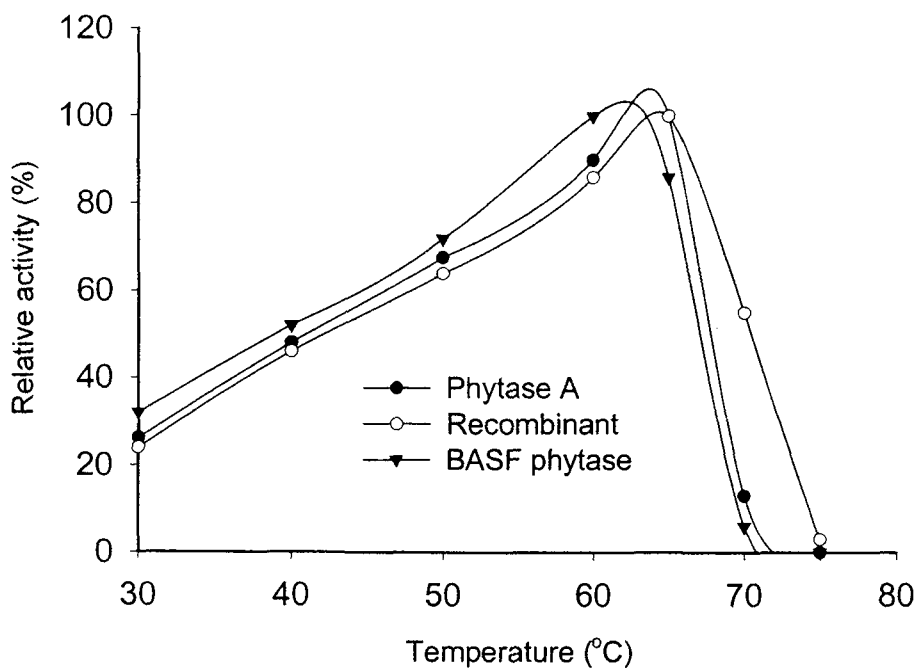
곰팡이로부터 분리된 phytase는 2 pH 영역에서 높은 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 (61, 62), 이는 본 연구개발의 결과와 일치하고 있다. 그러나 *A. terreus*, *Emericella nidulans* 및 *Myceliophthora thermophila* 으로부터 분리된 phytases는 하나의 최적 pH를 지니는 것으로 보고되고 있다 (63). *A. fumigatus*로부터 4종의 phytase를 분석한 결과 그들의 pH와 온도의존성을 측정된 결과 pH 4.0과 pH 5.0에서 최대활성을 지니는 2개의 그룹으로 대별된다고 보고하고 있으며 (64), pH 5.0에서 최대활성을 지니는 *A. fumigatus*의 phytase는 산성영역에서는 전혀 활성을 나타내지 않는 것으로 보고되고 있다. 따라서 phytase의 pH-profile은 phytase를 생산하는 종에 따라 다르게 나타나는 것으로 예측된다.

*A. fumigatus*. 와 같은 내열성 phytase의 최적 pH에 대하여 다소 상반된 견해들이 있다. *A. fumigatus*. 의 유전자를 이용하여 *A. niger*에서 발현시킨 phytase는 pH 3.0에서 2차적인 높은 활성을 나타내며 (61), 그리고 동일한 host에서 발현시킨 phytase는 pH 4.0에서 7.3 영역에서 최대활성의 80%를 나타내는 것으로 보고하고 있다 (63). 또 다른 경우로 *A. fumigatus*. 의 phytase 유전자를 *A. niger*에서 발현시킨 phytase의 경우 하나의 최적 pH를 지닌다고 보고하고 있다 (64, 65). 따라서 *A. fumigatus* 의 경우 숙주에 따라서 phytase의 최적 pH는 다소 달라질 수 있음을 알 수 있다.

3종 효소의 온도에 따른 phytic acid의 분해능을 살펴보기 위하여 기질의 pH를 5.5로 고정시킨 후 온도에 따른 효소활성을 측정하였다 (Fig. 38). 재조합 phytase는 68°C, 야생형 phytase는 65°C 그리고 Natuphos는 60°C에서 최대



**Fig. 37.** Optimum pH of phytase activity of the purified *Aspergillus* sp. 5990 phytase A expressed in *P.pastoris* (●), *Aspergillus* sp. 5990 phytase A (○), and Natuphos from BASF (▲) with sodium phytate as the substrate at various pH. 0.2 M glycine-HCl (pH 1.0, 2.0, and 2.5), 0.2 M sodium citrate (pH 3.0, 4.0, 5.0, and 5.5), and 0.2 M Tris-HCl (pH 6.0, 7.0, and 8.0). Results are expressed as means of three experiments.



**Fig. 38.** Temperature dependence of phytase activity of the purified *Aspergillus* sp. 5990 phytase A expressed in *P.pastoris* (●), *Aspergillus* sp. 5990 phytase A (○), and Natuphos from BASF (▼) with sodium phytate as the substrate at pH 5.5. Results are expressed as means of three experiments.

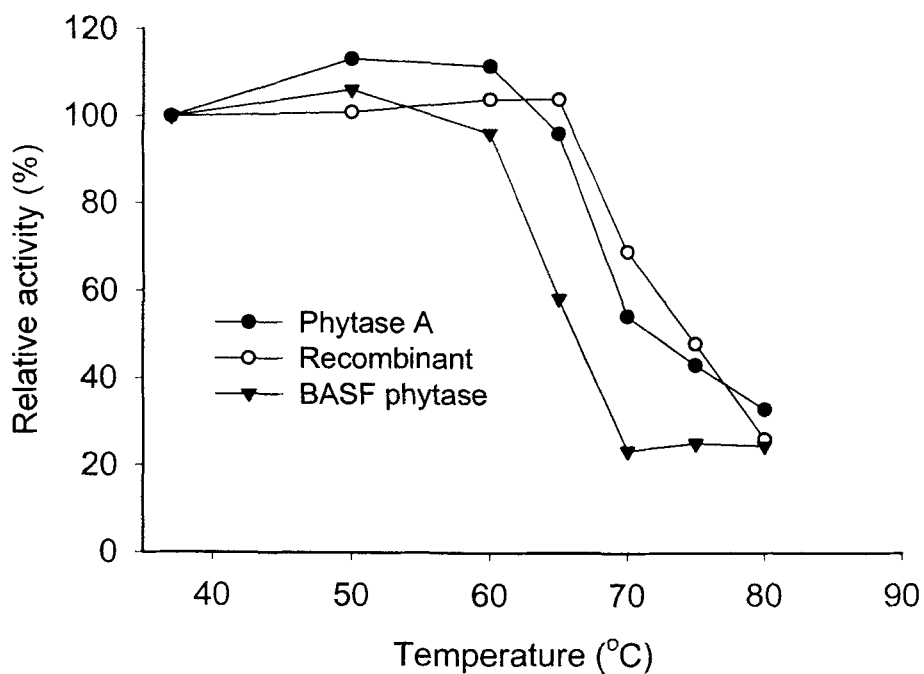


활성을 나타내었으며, 시판효소보다는 본 연구개발에 사용된 야생형 효소의 최적온도가 다소 높은 것으로 나타났다. 그리고 재조합 효소의 최적온도 또한 야생형 효소의 최적온도보다도 다소 높게 나타났다. 이러한 최적온도의 상승은 host 균에서 phytase 유전자가 발현될 때의 glycosylation 정도에 따라 달라지는 것으로 예상된다. 두 효소의 활성은 70°C 이상에서 급격히 소실되어 phytase A의 경우는 최대활성의 18%, Natuphos의 경우는 5% 가량의 잔류활성을 나타내었다. 그러나 재조합효소의 경우 70°C에서도 최대활성의 50% 가량을 유지하였다. Phytase의 활성 최적 온도는 효소의 내열성과 관련이 있다. 본 연구개발에서 분리된 phytase는 시판되는 phytase보다 내열성이 5-7°C 가량 높은 것으로 판단되며, 이러한 높은 온도에서의 효소활성은 배합사료의 팔렛팅시에 수반되는 수초간의 85-90°C의 온도에서도 견딜 수 있음을 시사하고 있다.

*Thermomyces lanuginosus*의 phytase는 65°C에서 최대활성을 나타내며, 75°C에서도 약간의 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있으며 (66), 특히 65°C에서의 촉매활성은 다른 곰팡이 phytase 보다 훨씬 우수한 것으로 알려져 있다. *A. fumigatus* SRRC 2397과 SRRC 45로부터 분리된 phytase의 아미노산 서열은 같으나, 각각 70°C와 58°C에서 최대활성을 나타내며, 이러한 최적온도의 차이는 두 효소의 번역후 수식에 의한 차이로 추정되고 있다 (64).

### 3) 재조합 정제효소의 내열성

Phytase가 가축의 사료첨가제로 사용되기 위하여 단시간이지만 고온에서 불활성화가 일어나지 않아야 한다. 따라서 재조합 phytase의 상용화를 위한 예비실험으로 야생형 phytase A와 상용되는 BASF phytase와 비교하였다. 내열성 측정을 위해 정제된 세 효소를 37, 50, 60, 65, 70, 75, 80°C의 각 온도에서 20분간 열처리하여 냉각시킨 후 pH 5.0, 37°C에서 각각 30분간 반응시켜 잔류활성을 측정하여 열처리하지 않은 효소의 활성에 대한 상대활성을 결정하였다 (Fig. 39). 야생형 phytase의 경우 65°C까지의 열처리에서는 활성을 그대로 유지하였으나 70°C에서 약 46%, 80°C에서 70% 이상의 활성을 소실하였다. BASF phytase의 경우 60°C까지의 열처리에 의해 활성소실은 크게 일어나지 않았으나, 70°C의 열처리에 의해 원래활성의 80% 가량을 소실하였다. 그러나 재조합효소의 경우 70°C의 열처리에 의해 원래화르성의 30% 가량을 소실하였



**Fig. 39.** Residual enzymatic activity of the purified phytases from recombinant *P. pastoris* (○), wild type *A.sp.5990* phytase (●), and the purified commercial phytase (from *A. niger*; BASF) (▼) after exposure for 20 min to the indicated temperatures, in 0.2M sodium citrate (pH 5.5) buffer. Results are expressed as means of three experiments.

으며, 75°C의 열처리에 의해서도 원래활성의 50% 가량을 유지하였다.

사료공정시 pelleting 과정에서 85-90°C까지 순간적으로 온도가 올라가는데 사료산업에 적용시켰을 때 이 온도에서 효소가 활성을 유지할 수 있어야 효소 첨가 효과를 거둘 수 있다. Phytase의 내열성에 영향을 미치는 인자로서 phytase의 구조적인 형태가 관심을 끌고 있다. 그러나 *Myceliophthora*, *Talaromyces* 및 *Thermomyces*로부터 분리된 내열성의 phytase와 *A. niger* 와 *A. fumigatus*로부터 분리된 중온성의 phytase간에 뚜렷한 구조적인 차이가 나타나지 않는다. 특히 phytase의 열안정성에 영향을 미치는 소수성 상호작용, 염결합, S-S 결합 등의 결합에 차이가 나타나지 않는다 (66). 그러나 phytase의 내열성에 가장 큰 영향을 미치는 인자를 알기 위하여 *Aspergillus* phytase를 대상으로 연구한 결과 효소의 glycosylation이 내열성에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 (56).

Phytase가 사료 산업에 활용되기 위하여 여러 가지 조건이 충족되어야 한다. 즉, 사료가공시에 수반되는 pelleting 온도에 견딜 수 있을 만큼 내열성이 강해야 하고, 단위동물의 소화효소에 견딜 수 있도록 단백질 분해효소에 대한 저항성이 강해야 하며, 높은 활성과 기질 특이성이 광범위해야 한다. *A. terreus* 9A1과 *Myceliophthora thermophila* 로부터 생산된 phytase는 50°C와 55°C에서 20분간 열처리할 경우 원래활성의 50%를 유지하였으며, 특히 *A. fumigatus* phytase는 100°C에서 20분간의 열처리에 의해 원래활성의 10% 만이 소실되었으므로 (61) 내열성 phytase의 상용화를 위한 주요한 효소로 지목 받고 있다.

#### 4) 재조합 정제효소의 기질 특이성

*P. pastoris* 배양액으로부터 정제된 phytase A와 B를 다양한 인산화합물을 이용하여 기질 특이성을 분석하였다 (Table 11). 분석에 사용된 기질의 농도와 종류는 sodium phytate, *p*-nitrophenyl phosphate (NPP), D-fructose-1,6-diphosphate (Fru-1,6-DP), D-fructose-6-phosphate (Fru-6-P), pyridoxal-5-phosphate (Pyr-5-P),  $\alpha$ -naphthyl-phosphate ( $\alpha$ -Nap-P),  $\beta$ -naphthyl-phosphate ( $\beta$ -Nap-P), D-glucose-6-phosphate

Table 11. Substrate specificity of purified wild type phytase A, recombinant phytase, and BASF phytase

(Unit: % of activity)

Substrate	Conc.	Wild phytase	Recombinant phytase	BASF phytase
Na-phytate	5 mM	100 (8.46)	100 (7.4)	100 (6.2)
NPP	5 mM	8.6(1.2)	23.8 (1.2)	14.5 (1.3)
Fru-1,6-DP	5 mM	25.0 (5.0)	48.2 (3.7)	30.2 (0.9)
Fru-6-P	5 mM	28.7 (1.1)	50.3 (2.9)	33.6 (1.1)
Pyr-5-P	5 mM	27.4 (0.7)	47.8 (4.0)	29.3 (0.9)
$\alpha$ -Nap-P	5 mM	31.4 (1.1)	52.1 (3.2)	36.4 (1.3)
$\beta$ -Nap-P	5 mM	32.5 (1.1)	54.7 (3.7)	39.2 (1.5)
Glu-6-P	5 mM	30.0 (1.2)	50.6 (4.2)	32.8 (0.9)
Ser-P	5 mM	28.1 (2.0)	49.3 (3.5)	33.7 (0.9)
Gly-P	5 mM	27.4 (0.7)	46.1 (4.3)	32.9 (1.2)
ATP	5 mM	28.3 (0.4)	48.3 (4.7)	36.8 (1.5)
ADP	5 mM	29.2 (0.7)	53.4 (3.9)	34.7 (0.9)
AMP	5 mM	28.3 (0.4)	51.9 (3.2)	36.2 (1.1)
IMP	5 mM	25.6 (1.0)	48.5 (4.9)	30.9 (1.2)
NADPH	1 mM	1.7 (0.3)	10.4 (0.8)	3.4 (0.1)

T

wenty l of each enzyme solution (2 g/ml) were used for activity measurement.

NPP; *p*-nitrophenyl phosphate: Fru-1,6-DP; D-fructose-1,6-diphosphate: Fru-6-P; D-fructose-6-phosphate: Pyr-5-P; pyridoxal-5-hosphate: -Nap-P; -naphthyl-phosphate: -Nap-P; -naphthyl-phosphate: Glu-6-P; D-glucose-6-phosphate: Ser-P; *o*-phospho-L-serine: Gly-P; -glycerophosphate: ATP; adenosine triphosphate: ADP; adenosine diphosphate: AMP; adenosine monophosphate: IMP; inosinen monophosphate: NADPH; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

(Glu-6-P), o-phospho-L-serine (Ser-P), -glycerophosphate, adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), and inosinen monophosphate (IMP) 및 2 mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)이었다. 기질 특이성을 분석한 결과 야생형 phytase와 BASF phytase는 sodium phytate에 가장 높은 기질특이성을 나타낸 반면, *P. pastoris*에서 발현된 재조합 phytase는 sodium phytate를 비롯한 모든 인산화합물에 대하여 광범위한 활성을 나타내었다.

*E. coli* (10), *Klebsiella terrigena* (Greiner et al., 1977) 및 *Bacillus* sp. DS11 (20) 등의 세균이 생산하는 phytate에 대한 특이성이 강한 것으로 알려져 있으나, *A. fumigatus*, *Emericella nidulans* 및 *Myceliophthora thermophila* 등이 생산하는 곰팡이 phytase는 다소 특이성이 넓은 것으로 알려져 있다 (53). 넓은 특이성을 지닌 phytase는 phytase와 구조적으로 유사한 인산화합물 (phenyl phosphate, pNPP, and phosphoenolpyruvate 등) 뿐만 아니라 phytate를 소화관내에서 신속하게 가수분해하여 무기태 인으로 전환할 수 있다. 그리고 기질 특이성이 좁은 phytase는 *myo*-inositol phosphates에만 작용하여 phytate가 가수분해되는 동안에 *myo*-inositol tris- 및 bisphosphate의 축적을 초래할 수 있다.

#### 5) 재조합 정제효소의 kinetics

반응 속도 정수( $K_m$ )와 최대 반응 속도( $V_{max}$ )를 결정하기 위하여 0.1 mM-10 mM의 sodium phytate 농도범위의 조건에서 30분간 반응시킨 후 기질의 농도와 반응속도와의 관계를 Lineweaver-Burk 식에 대입해 구하였다 (Table 12). Phytase A는 pH 2.5와 5.5에서 높은 활성을 나타내었으므로 두 영역의 pH에서  $K_m$ 과  $V_{max}$ 를 결정하였다. 그 결과 pH 2.5에서 phytase A의  $K_m$ 과  $V_{max}$ 는 각각 1.20 mM과 6,800  $\text{sec}^{-1}$ 로 나타났으며, pH 5.5에서는 각각 0.37 mM과 2,240  $\text{sec}^{-1}$ 로 나타났다. *P. pastoris*에서 생산된 재조합 phytase의 경우 pH 2.5에서 recombinant phytase의  $K_m$ 과  $V_{max}$ 는 각각 0.81 mM과 8,400  $\text{sec}^{-1}$ 로 나타났으며, pH 5.5에서는 각각 0.64 mM과 1,600  $\text{sec}^{-1}$ 로 나타났다. BASF phytase의 경우 pH 2.5에서  $K_m$ 과  $V_{max}$ 는 각각 1.38 mM과 6,600  $\text{sec}^{-1}$ 로 나타났으며, pH 5.5에서는 각각 0.49 mM과 2,300  $\text{sec}^{-1}$ 로 나타났다.

Table 12. Kinetic properties of wild type phytase A, recombinant phytase, and BASF phytase

	Km (mM)	Vmax (sec <sup>-1</sup> )
Phytase A at pH 5.0	0.37	2,240
Phytase A at pH 2.5	1.20	6,800
Recombinant phytase at pH 5.0	0.64	1,600
Recombinant phytase at pH 2.5	0.81	8,400
BASF phytase at pH 5.0	0.49	2,300
BASF phytase at pH 2.5	1.38	6,600

이상의 결과로 볼때 BASF에서 시판되는 phytase의 촉매활성은 본 연구개발에서 분리된 야생효소보다는 촉매활성은 약간 낮게 나타났으나, 재조합 효소의 경우 pH 5.5에서는 야생형 효소보다는 촉매활성이 낮게 나타났으나, pH 2.5에서는 야생형 효소보다 촉매효율이 훨씬 높게 나타났다. 이는 *P. pastoris*의 숙주에서 재조합효소가 생산될 때 glycosylation의 정도의 차이 때문인 것으로 추정된다.

합성기질을 이용한 *A. ficuum* phytase의 Km치는 40uM (Ullah, 1988)- 250 uM (Gorcom et al., 1995)로 나타났으며, 이러한 결과는 분석조건에 의해 많은 영향을 받음을 알 수 있으며, 이러한 동력학적 상수는 효소의 촉매활성을 비교하기 위한 절대적인 인자는 될 수 없으나, 특이한 기질에 대한 상대적인 비교치로서만 활용 가능성을 시사하고 있다.

### 3. 제3 세부과제: 사료원 영양가향상을 위한 발효조건 확립

#### 가. Phytase 생산을 위한 배양조건

##### 1) Phytase 생산을 위한 최적 $\text{Ca}^{2+}$ ion 농도

PSM 염화칼슘 농도를 0, 0.1, 0.5, 0.75, 1, 2 mM의 범위로 각각 첨가하여 배양시킨 다음, 배양액 중에 분비된 phytase 및 phosphatase 활성, 균체량의 변화, pH 및 단백질 농도를 측정하여 Fig. 40에 나타내었다.

염화칼슘의 농도가 0.1 mM 이상에서 phytase 및 phosphatase 활성이 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 거의 변화가 없었으며, 균체량 및 단백질 함량의 변화도 이와 유사하였다. 이 결과 분리된 *Aspergillus* sp. 5990의 phytase 생산에 있어서는 0.1 mM의 염화칼슘이 효과적인 것으로 나타났다. 효소의 활성과 균체 중량과의 관계가 일정하게 비례하지 않는 이유로서, 균체의 성장에 관한 대사와 효소분비의 대사가 분리되어 상호보완적이기는 하지만, 배지 중에 영양분의 고갈이 균체의 성장을 저지시킴으로서 2차 대사인 분해계 효소들을 많이 분비되어 배지중의 고분자 물질들을 분해 후 그것을 영양원으로 이용하기 때문이다 (Frost 등, 1987). Solomons (1977)는 *Aspergillus* 속의 균체의 성장과 효소 생산과의 관계에서 균체의 성장에 효소의 생성이 비례하여 이루어지지 않는 것은 균체의 효소 합성 속도에 비하여 배지 중의 효소의 변성으로 인한 효소 잔존 반감기가 빠름으로 인하여 최종적으로 남는 효소량이 줄어들기 때문이라고 하였다.

배양중의 pH 변화 특히, 진균류에 있어서 배양 중 균체의 성장에 따라 많은 유기산이 분비되어 배양액의 pH가 급격히 떨어질 수 있으며, 이에 대한 방지책으로서는 Ca염을 배지 중에 첨가함으로써 배양액이 산성화하면 유기산과 불용성 염을 형성함으로써, 유기산에 의한 pH의 저하를 막을 수 있다 (Aunstrup, 1979). 이는  $\text{CaCl}_2$ 의 함량이 높아짐에 따라 균체의 성장률이 증가해도 배지의 pH는 거의 일정한 본 실험의 결과와 유사성을 찾을 수 있었다.

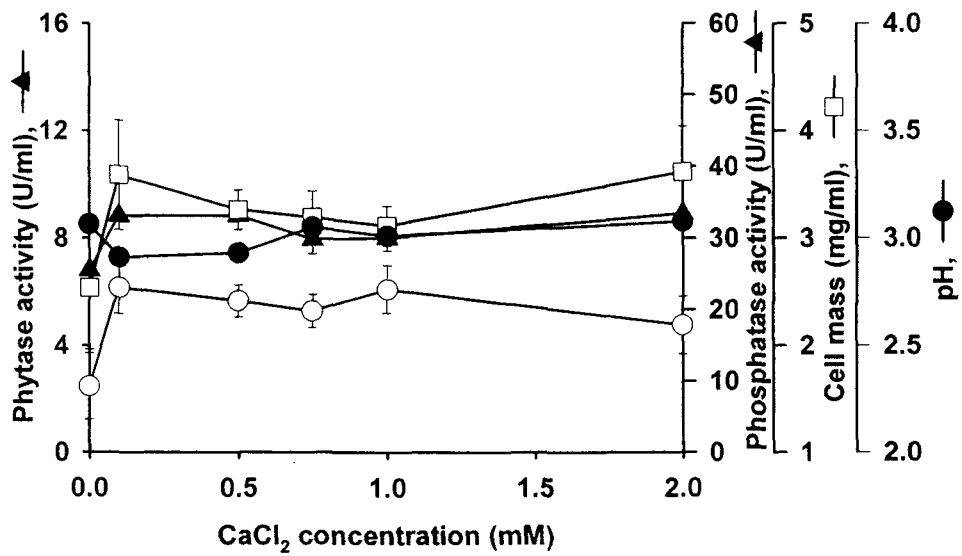
##### 2) Phytase 생산을 위한 최적 무기인산 농도

PSM에 무기인산을 각각 0, 0.01, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2% 의 범위로 첨가하



여 배양시킨 후, 배양액 중에 분비된 phytase 및 phosphatase 활성, 균체량의 변화 및 단백질 농도를 측정하여 Fig. 41에 나타내었다. 무기인산의 농도가 0.05%까지는 phytase 및 phosphatase 활성은 약간 증가하다가 이후의 농도에서는 급격히 감소하였다. 그러나 균체량 및 단백질 농도 변화는 거의 나타나지 않았다.

*A. niger* NRRL 3135에 의한 phytase의 생합성은 배지 중의 무기인산의 농도에 영향을 받는다 (Ware와 Shieh, 1967). 이때 무기 인산염의 농도가 0.01 ~ 0.05% 첨가시에 무첨가군 보다 약 5배의 효소 생합성이 증대되며, 이보다 더 높은 무기인산 농도에서는 오히려 감소하는 경향을 보인다. 그러나 균체량에 있어서는 0.05%의 무기인산 농도까지는 증가하다가



**Fig. 40. Effect of CaCl<sub>2</sub> concentration on phytase production by *Aspergillus* sp. 5990.**

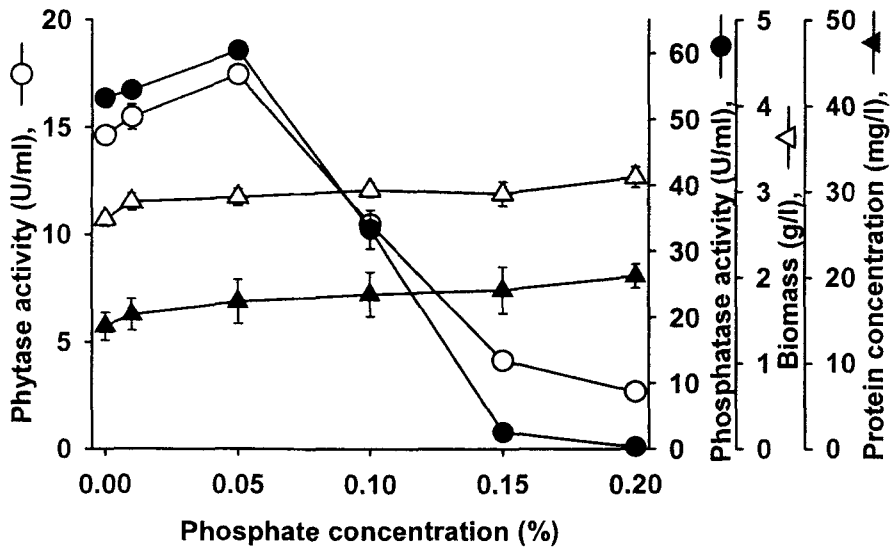


Fig. 41. Effect of phosphate concentration on phytase production by *Aspergillus* sp. 5990.

이후는 일정한 경향을 보인다고 보고되고 있다. 이러한 결과로 *A. niger* NRRL 3135에 의한 phytase 생합성의 최적 조건은 배지 중 옥수수 전분의 농도가 8% 일때 0.4 mg/100 ml의 무기인산일 때가 최적으로 결정되어졌다 (Ware와 Shieh, 1967). 높은 농도의 인산염은 모든 곰팡이류와 효모에 있어서 phytase의 생산을 저해한다는 것이 일반적이다 (Wodzinsky와 Ullah, 1996). 그리고 *A. niger* NRRL 3135에서의 배지 중의 무기인산의 농도에 따라 최적 반응 pH가 2.0 (phyB)과 5.0 (phyA) 인 phytase의 상대적인 비율이 달라지는 것으로 보고되고 있다 (Shieh 등1969).

### 3) Phytase 생산을 위한 최적 pH

Phytase 생산 배지를 멸균하기 전 배지의 pH를 3, 4, 5, 6, 7 및 8로 맞춘 다음 멸균, 접종하여 배양한 후 phytase 생산을 위한 최적 pH를 결정하였다. 각각의 배지에 대하여 phytase 활성, phosphatase 활성, 균체량 및 단백질 농도를 측정하였다. 초기 배지의 pH가 7.0까지는 phytase 활성, phosphatase 활성, 균체량 및 단백질 농도가 증가하였으며, pH 8.0에서는 다소 낮은 효소활성과 균체 성장률을 나타내었다 (Fig. 42). 따라서 phytase 생산을 위한 pH 조건은 7.0으로 확정하였다.

Fukushima (1989)에 의하면, *A. oryzae* NISL 1913은 그 성장에 있어서 약산성의 조건에서 균체의 생육이 촉진되며, 효소의 생산성은 중성 부근에서 높았다. 따라서 동 균주의 생육과 효소 생성은 비례관계를 보이지 않으며, 또한 생성된 효소들은 중성의 pH 이상에서 최대활성을 나타내었고, 그 성장에 있어서 약산성의 조건에서 균체의 생육이 촉진되었으며, 효소의 생산성은 중성 부근에서 높았다. 따라서 동 균주의 생육과 효소의 생산은 비례관계를 보이지 않으며, 또한 생성된 효소들은 중성의 pH 이상에서 최대활성을 나타내었다. 균체 성장에는 pH와 온도가 가장 중요하며, 이밖에 통기량, 수분함량 등이 영향을 미치므로, 본 실험 결과에서 효소 생산은 성장촉진으로 인한 효소 생성이 이루어진 결과인 것으로 생각된다.

### 4) Phytase 생산을 위한 최적 온도

멸균된 PSM에 균주를 접종하여 25℃에서 40℃까지의 온도범위 (25, 30,

35, 40)에서 배양한 다음, 4일 동안 배양 후 효소활성을 측정하여 효소 생산의 최적 온도를 결정하였다 (Fig. 43). Phytase는 35℃에서 최적으로 나타나 30℃에서 보다 약 2배 가량 활성이 높게 나타났다. 그러나, phosphatase의 효소활성은 30℃에서는 거의 나타나지 않았다가 35℃에서 최고치를 나타내었으며 그 이상의 온도에서 배양시 효소활성은 급격히 감소하였다. 균체량에 있어서는 30℃에서 가장 높게 나타났다.

*A. oryzae*의 액체배양에 있어서 효소의 생산은 30℃가 최적온도이며, 균체 성장도 현미경 관찰에 의해 그 형태가 가장 생육 왕성할 때와 그 모양이 비슷하다고 하였다 (Ueno 등, 1987). 균체 성장에는 pH와 온도가 가장 중요하며, 이밖에 통기량, 수분함량 등이 영향을

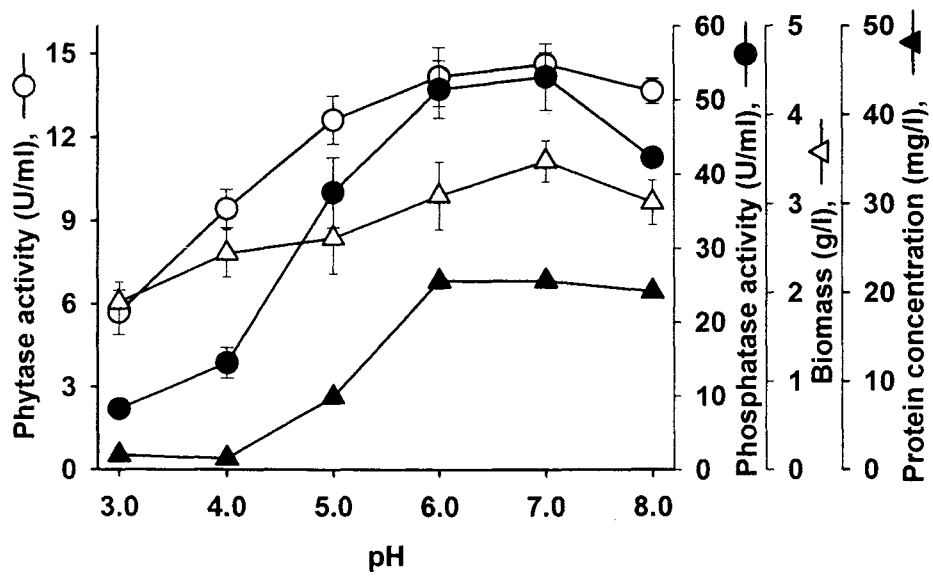


Fig. 42. Effect of initial pH on phytase production by *Aspergillus* sp. 5990.

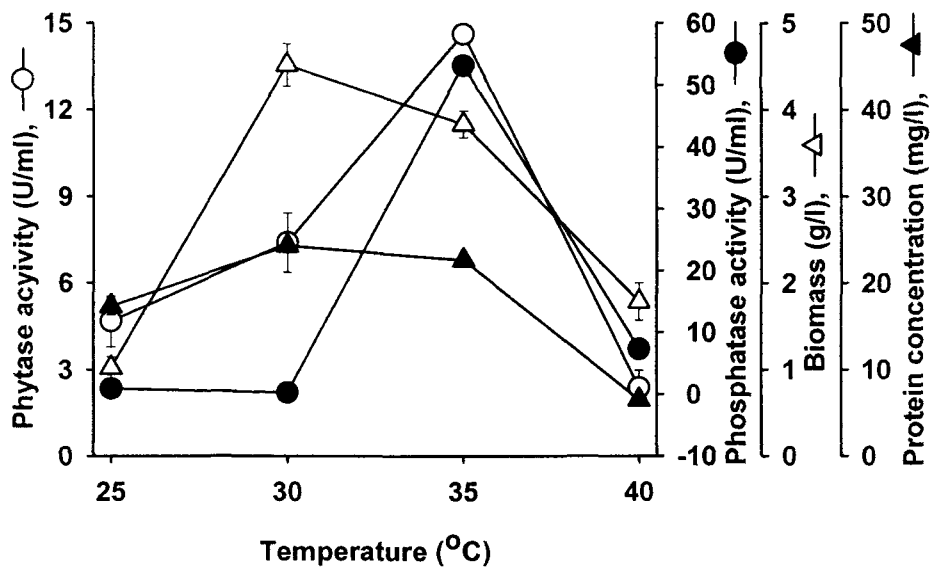


Fig. 43. Effect of temperature on phytase production by *Aspergillus* spp.

미치므로, 본 실험 결과에서 효소 생산은 성장촉진으로 인한 효소 생성이 이루어진 결과인 것으로 생각된다.

#### 5) Phytase 생산을 위한 최적 배양 시간

최적  $Ca^{2+}$  ion 과 최적 대두박 농도 및 최적 pH로 basal medium을 조제한 다음 멸균 후 최적 온도에서 각각 배양시간을 12시간에서 7일 까지 배양 후 원심분리한 다음 배양액 중에 분비된 phytase 및 phosphatase 활성, 균체량 및 단백질 농도를 측정하여 Fig. 44에 나타내었다.

Phytase 와 phosphatase는 배양 후 4일에서 최대로 나타나 3일에서보다 약5배 가량 활성이 높게 나타났다. 그러나 4일 이후에는 약간 감소하는 경향을 보이기는 하였으나 거의 변화가 없었다. 균체량과 단백질농도는 시간이 지남에 따라 다소 증가하는 경향을 보였으나 7일 이후에는 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

### 다. 미강 중의 phytic acid 분해를 위한 발효조건

#### 1) 미강의 일반성분 분석

실험에 사용한 미강 중에는 수분, 회분, 지질 및 단백질이 각각 15.60, 7.75, 18.34 및 2.96%의 조성으로 나타났으며, 전체인의 함량은 5.81%였다 (Table 13). 이중 phytic acid의 형태로 존재하는 인은 5.65%로 전체 인 함량의 97%를 차지하였다. 따라서 미강 중에 다량 존재하는 인의 흡수도를 높이기 위하여 phytase 생산 균주에 의한 phytic acid 인의 분해가 요구된다.

#### 2) 액상 발효에 의한 미강 중의 phytic acid 분해조건

##### 가) 농도에 따른 영향

본 실험에서 분리된 *Aspergillus* sp. 5990을 사용하여 미강 중의 phytic acid의 분해를 위한 발효 조건을 확립하였다. 미강 중의 phytic acid를 분해하기 위해 미강을 농도별 (3, 5, 7, 10, 20 및 30%)로 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하여 30℃에서 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH 를 측정하여 나타내었다 (Fig. 45). 미강 농도에 따른 분해 효과를 분석한 결과, 미강 농도 중 5-30%의 범위에서 phytic acid의 분해도가 대체적으로 높



았으며, 3%에서 7%까지 급격히 증가하다가 10% 일때 가장 높은 분해도를 나타내었고, 배양액 중의 미강의 농도에 따라 발효후의 pH가 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

나) 발효 시간에 따른 영향

미강 중의 phytic acid를 분해하기 위해 10%의 미강 농도로 조정하여 멸균 한 후 균주를 접종하여 30°C에서 0, 1, 2, 3, 4, 5일간 배양한 후 배양시간에 따른 배양액 중의 무기인

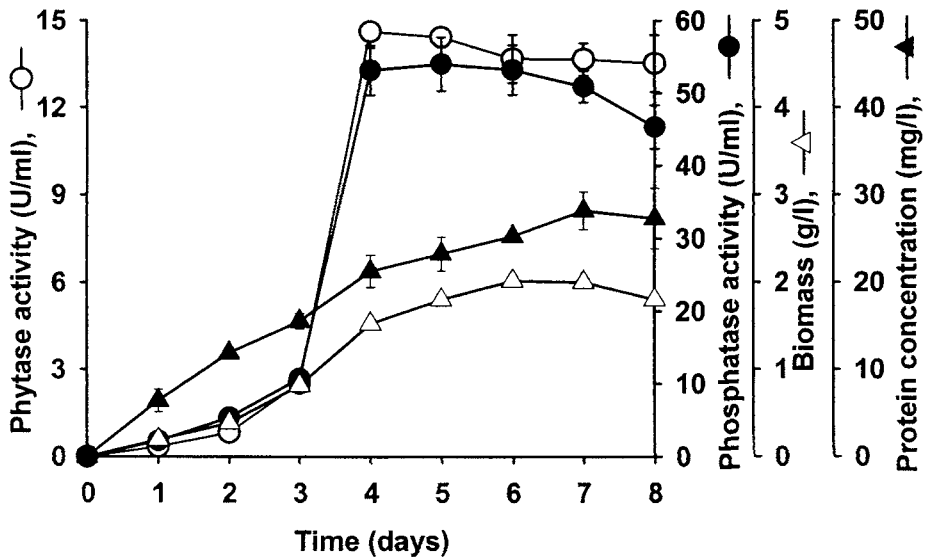
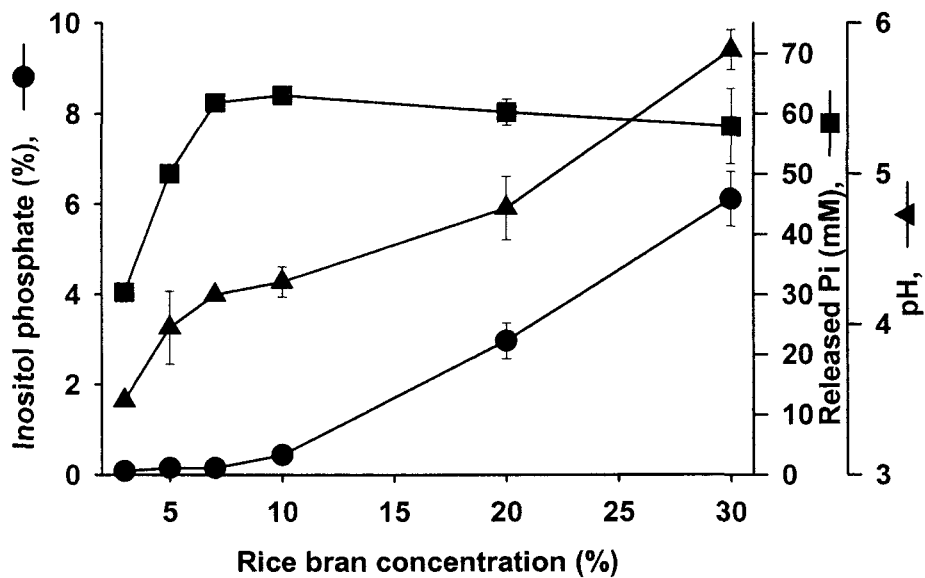


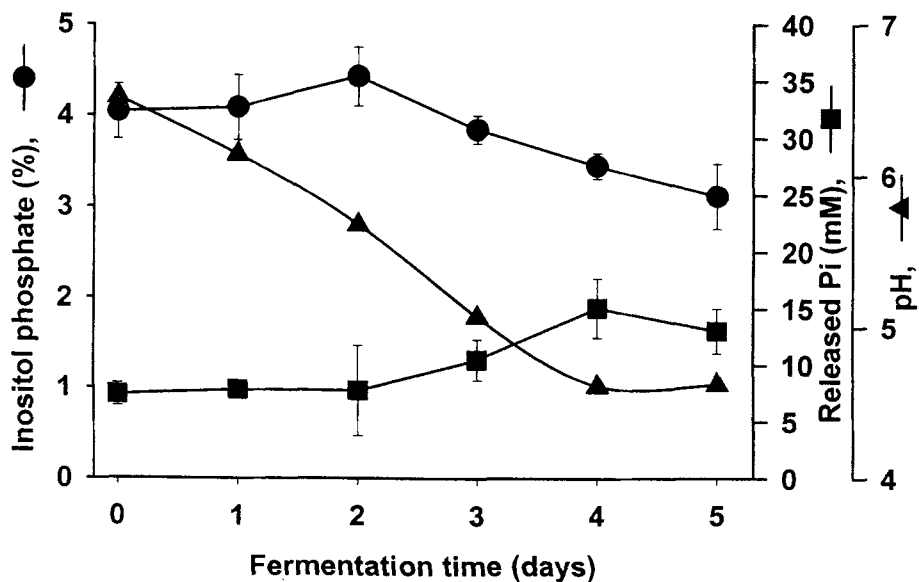
Fig. 44. Effect of time course on phytase production by *Aspergillus* sp. 5990.

**Table 13. Proximate and phosphates composition of rice bran**

Composition	Rice bran (%)
Proximate composition	
Moisture	15.60 ± 0.10
Ash	7.75 ± 0.07
Crude lipid	18.34 ± 0.55
Crude protein	2.96 ± 1.19
Phosphates composition	
Phytic acid phosphate	5.65 ± 0.04
Free phosphate	0.16 ± 0.01



**Fig. 45. Effect of rice bran concentration on the degradation of phytic acid of rice bran. Fermentations were performed at pH 6.8 and at 30 °C with stirring at 150 rpm for 5 days.**



**Fig. 46. Effect of fermentation time on hydrolysis of phytic acid of rice bran. Fermentations were done in 10% rice bran at pH 6.8 and at 30°C with stirring at 150 rpm.**

산, phytic acid 및 pH를 측정하여 나타내었다 (Fig. 46). 발효 시간에 따른 분해 효과를 분석한 결과, 0, 1, 2 일에는 유리인의 증감에 거의 변화가 없었으나, 배양 3일부터 유리인의 증가가 나타났으며, 배양 4일만에 대부분의 phytic acid가 분해되었고, 배양시간이 지남에 따라 발효후의 pH가 발효시간에 반비례하는 경향을 나타내었다.

#### 다) 발효 온도에 따른 영향

미강 중의 phytic acid를 분해하기 위해 10%의 미강 농도로 조정하여 균주를 접종한 후 각각 30, 35 및 40°C에서 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하여 배양온도에 따른 효과를 나타내었다 (Fig. 47).

발효 온도에 따른 분해 효과를 분석한 결과, 30, 35, 40°C에서 큰 차이는 없었으나, 온도가 증가함에 따라 다소 비례적으로 분해량이 증가하였고, 30°C와 35°C에 비해 40°C에서의 발효에 의해 phytic acid의 분해로 인한 유리인의 생성이 다소 높게 나타났으며, 배양온도에 따른 발효후의 pH는 온도에 따라 비례적인 경향을 나타내었다.

#### 라) 발효 pH에 따른 영향

미강 중의 phytic acid를 분해하기 위해 미강을 10%로 첨가하여 멸균 한 후 균주를 각각 초기 pH가 4, 5, 6, 7, 8 및 9로 조정된 배지에 접종하여 30°C에서 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하여 나타내었다 (Fig. 48).

발효 pH에 따른 분해 효과를 분석한 결과, pH 4에서 가장 분해 효과가 높았으며, pH 5와 9에서는 분해 효과가 낮게 나타났으며, 배양 pH에 따른 발효후의 pH는 초기 pH와 거의 비례하는 경향을 나타내었다.

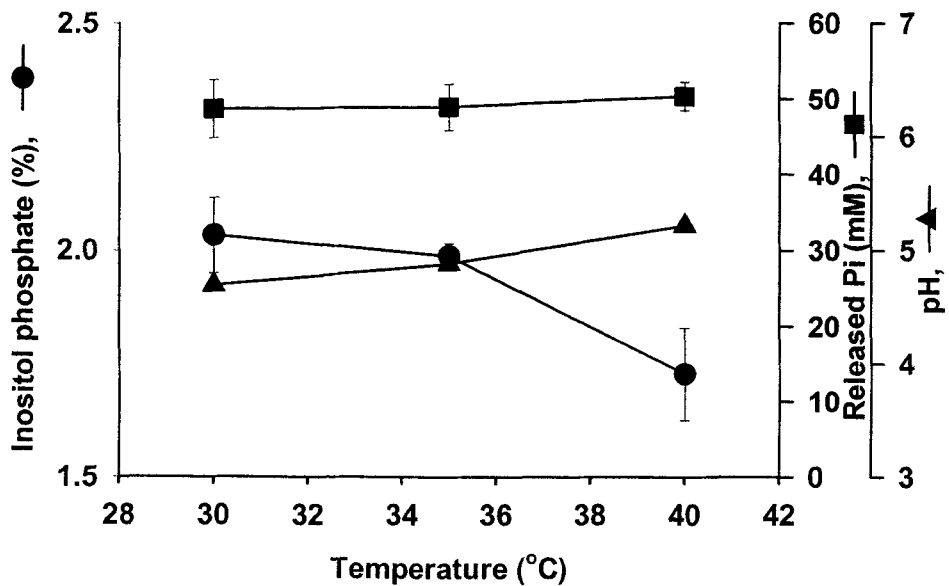
### 라. 고체 발효에 의한 미강 중의 phytic acid 분해조건

#### 1) 발효 시간에 따른 영향

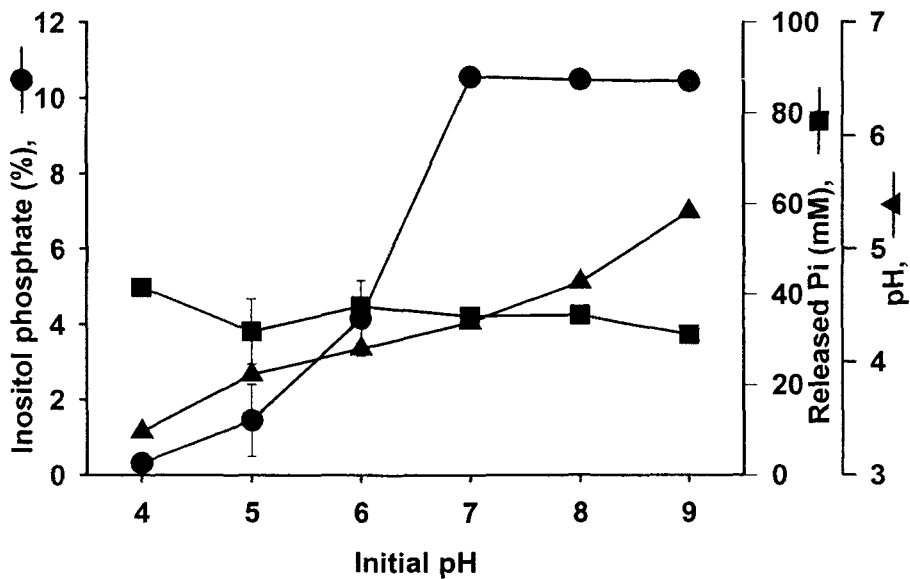
본 실험에서 분리된 *Aspergillus* sp. 5990을 사용하여 미강 중의 phytic acid의 분해를 위한 발효 조건을 확립하였다. 미강 중의 phytic acid를 분해하

기 위해 미강 10 g에 D.W 10 ml씩 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하였다. 35°C에서 0, 1, 2, 3, 4, 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하여 나타내었다 (Fig. 49).

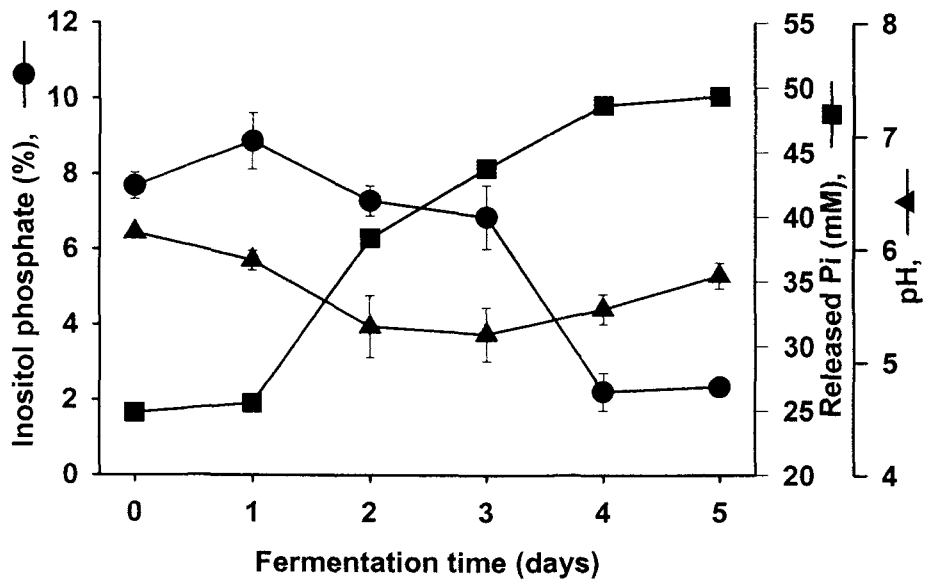
발효 시간에 따른 분해 효과를 분석한 결과, 1일까지는 분해효과가 거의 없으나 배양한 후 1일 이후 유리 인이 급격하게 증가하는 경향을 보이며 배양한 후 4일만에 대부분의 phytic acid가 분해되었음을 알 수 있고, 발효 5일에 가장 높은 분해 효과가 나타났다. 배양 시간에 따른 발효후의 pH는 차이가 거의 없으나 2-3일 후에 약간 감소하는 경향으로 나타났다.



**Fig. 47. Effect of temperature on hydrolysis of phytic acid of rice bran. Fermentations were performed in 10% rice bran at pH 6.8 with stirring at 150 rpm for 5 days.**



**Fig. 48.** Effect of initial pH on hydrolysis of phytic acid of rice bran. Fermentations were carried out in 10% rice bran at 30°C with stirring at 150 rpm for 5 days.



**Fig. 49. Effect of fermentation time on hydrolysis of phytic acid of rice bran. Fermentations were done in 50% rice bran at pH 6.8 and at 30°C.**



## 2) 발효 온도에 따른 영향

미강 중의 phytic acid를 분해하기 위해 미강 10 g에 D.W 10 ml씩 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하였다. 각각 25, 30, 35 및 40℃에서 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하여 나타내었다 (Fig. 50).

발효 온도에 따른 분해효과를 분석한 결과, 온도가 상승함에 따라 반비례하는 경향으로 나타났으나 25℃에서 최고의 분해효과를 나타내었으며, 40℃에서의 분해효과 보다 15 mM 정도 높게 나타났다. 배양 온도에 따른 발효후의 pH의 변화는 25-35℃까지는 비례적으로 증가하는 경향을 보이나 40℃에서는 급격히 감소하였다.

## 라. 대두박 중의 phytic acid 분해를 위한 발효조건

### 1) 대두박의 일반성분 분석

실험에 사용한 대두박 중에는 수분, 회분, 지질 및 단백질이 12.27, 6.21, 2.43 및 20.65%의 조성으로 나타났으며, 전체인의 함량은 대두박이 2.77%였다. 이중 phytic acid의 형태로 존재하는 인은 1.84%로 전체 인 함량의 66%를 차지하였다 (Table 14.).

### 2) 액상 발효에 의한 대두박 중의 phytic acid 분해조건

#### 가) 농도에 따른 영향

본 실험에서 분리된 *Aspergillus* sp. 5990을 사용하여 미강 중의 phytic acid의 분해를 위한 발효 조건을 확립하였다. 대두박 중의 phytic acid를 분해하기 위해 대두박을 농도별 (1, 2, 3, 5, 7 및 10%)로 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하여 30℃에서 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하여 나타내었다 (Fig. 51).

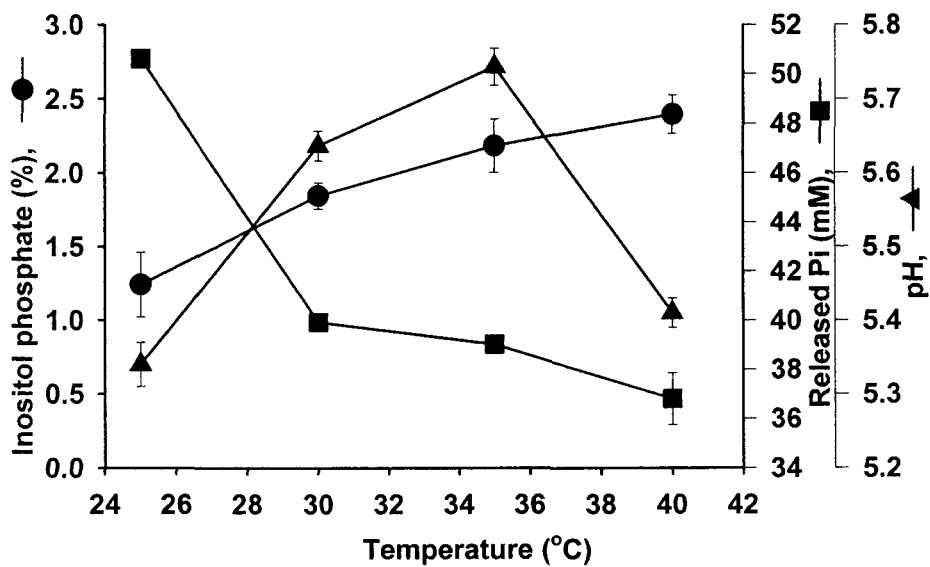
대두박 농도에 따른 분해 효과를 분석한 결과, 1-10% 대두박 농도 범위에서 대두박의 농도에 비례하여 phytic acid 분해가 증가되었고, 대두박 농도가 10% 일 때 가장 최고치를 나타내었으며 이때 유리인의 함량은 30 mM 정

도였으며, 대두박 농도에 따른 발효후의 pH는 농도에 반비례하는 경향으로 나타났다.

#### 나) 발효 시간에 따른 영향

대두박 중의 phytic acid를 분해하기 위해 대두박을 10%로 첨가하여 멸균한 후 균주를 접종하여 30℃에서 0, 1, 2, 3, 4, 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하여 발효시간에 따른 phytic acid분해 효과를 나타내었다 (Fig. 52).

발효 시간에 따른 분해 효과를 분석한 결과, 0-5일의 범위에서 분해효과가 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었으나 배양 1일까지는 phytic acid는 거의 분해되지 않고 2일 이후 급격하게 분해가 증가하여, 발효 3일만에 대부분의 phytic acid가 분해되었다. 발효 4일에



**Fig. 50.** Effect of temperature on hydrolysis of phytic acid of rice bran. Fermentations were performed in 50% rice bran at pH 6.8 for 5 days.

**Table 14. Proximate and phosphates composition of soybean flour**

Composition	Soybean flour (%)
Proximate composition	
Moisture	12.27 ± 0.05
Ash	6.21 ± 0.05
Crude lipid	2.43 ± 0.44
Crude protein	20.65 ± 0.67
Phosphates composition	
Phytic acid phosphate	1.84 ± 0.04
Free phosphate	0.93 ± 0.10

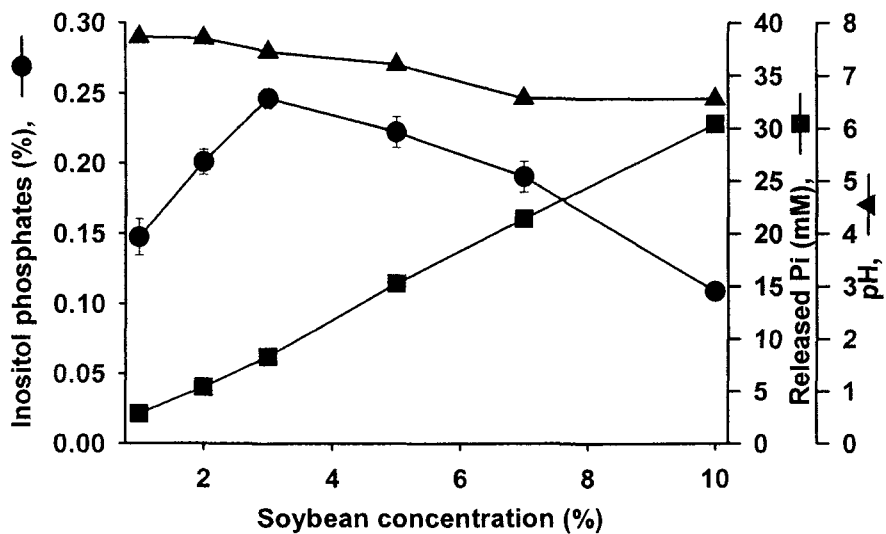
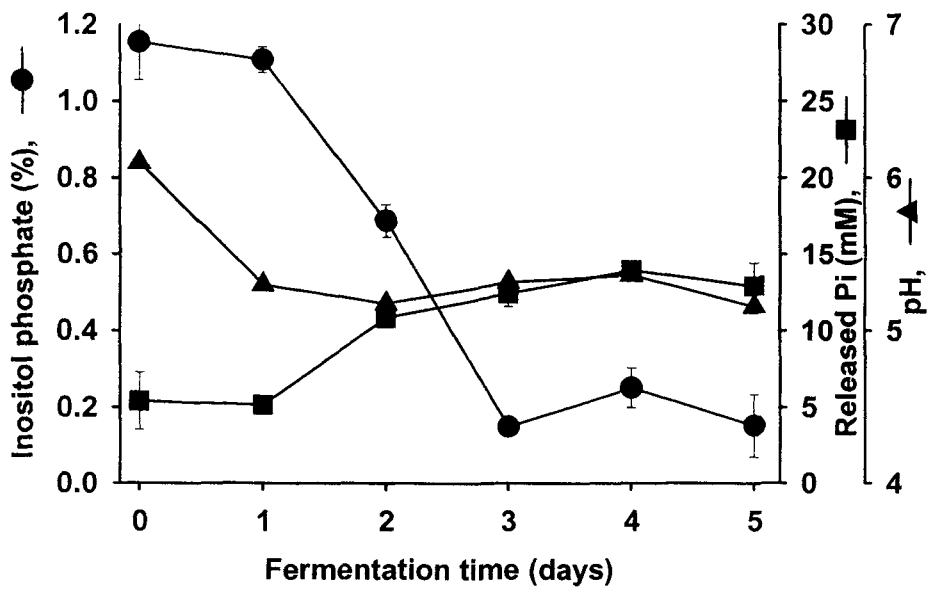


Fig. 47. Effect of soybean concentration on the hydrolysis of phytic acid of a defatted soybean flour. Fermentations were performed at pH 6.7 and at 30°C with stirring at 150 rpm for 5 days.



**Fig. 48.** Effect of fermentation time on hydrolysis of phytic acid of a defatted soybean flour. Fermentations were done in 10% defatted soybean flour at pH 6.7 and at 30°C with stirring at 150 rpm.

phytic acid 의 분해율은 최고치를 나타내었으며 발효시간에 따른 발효후의 pH는 발효시간이 증가함에 따라 감소하는 경향으로 나타났다.

#### 다) 발효 온도에 따른 영향

대두박 중의 phytic acid를 분해하기 위해 대두박을 10%로 첨가하여 멸균한 후 균주를 접종하여 각각 30, 35, 40℃에서 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid, 및 pH를 측정하여 발효온도에 따른 phytic acid의 분해효과를 나타내었다 (Fig. 49).

발효 온도에 따른 분해 효과를 분석한 결과, 30-40℃의 범위에서 비슷한 분해 효과가 나타났으나 발효 온도 30℃와 35℃에 비해 40℃에서의 발효에 의한 phytic acid의 분해로 인한 유리인의 생성이 높게 나타났으며, 발효 온도에 따른 발효후의 pH는 6-7의 범위로 나타났다.

#### 라) 발효 pH에 따른 영향

대두박 중의 phytic acid를 분해하기 위해 대두박을 10%로 첨가하여 초기 pH가 4, 5, 6, 7, 8, 및 9로 조정된 배지를 멸균한 후 균주를 접종하여 30℃에서 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid, 및 pH를 측정하여 배지의 초기 pH에 따른 영향을 측정하였다 (Fig 50).

배지의 pH에 따른 분해 효과를 분석한 결과, pH에 따른 영향은 거의 없었으나, pH4-6의 범위에서 비교적 높은 분해효과를 나타내었으며, 그중 pH4에서 가장 높은 분해효과를 나타내었고, 발효 pH에 따른 발효후의 pH는 pH의 증가에 따라 비례적으로 증가하였다.

### 3) 고상 발효에 의한 대두박 중의 phytic acid 분해조건

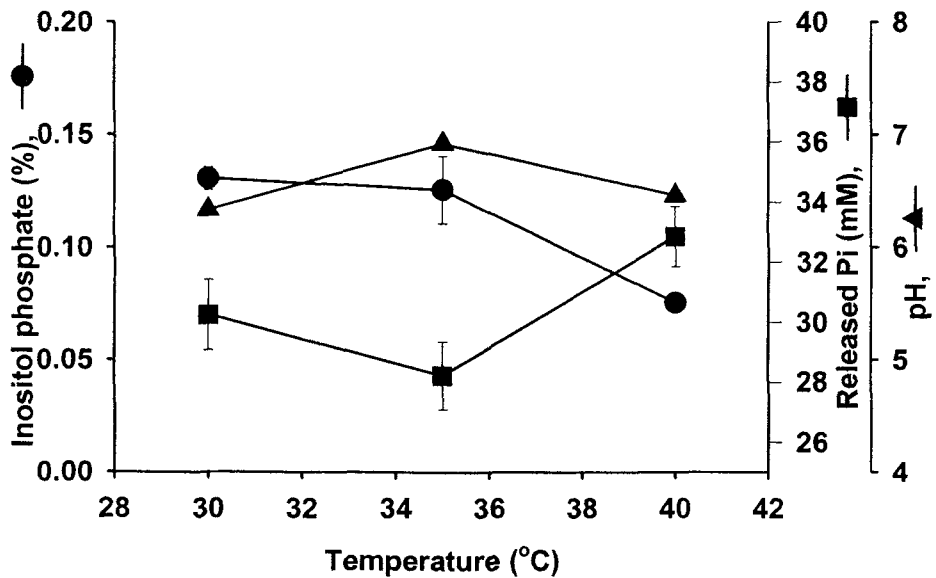
실험실에서 분리된 *Aspergillus* sp. 5990을 사용하여 대두박 중의 phytic acid의 분해를 위한 고상 발효 조건을 확립하였다.

#### 가) 발효 시간에 따른 영향

대두박 중의 phytic acid를 분해하기 위해 대두박 10 g에 D.W 10 ml씩 첨가하여 멸균한 후 균주를 접종하였다. 35℃에서 0, 1, 2, 3, 4, 및 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하여 발효시간에 따

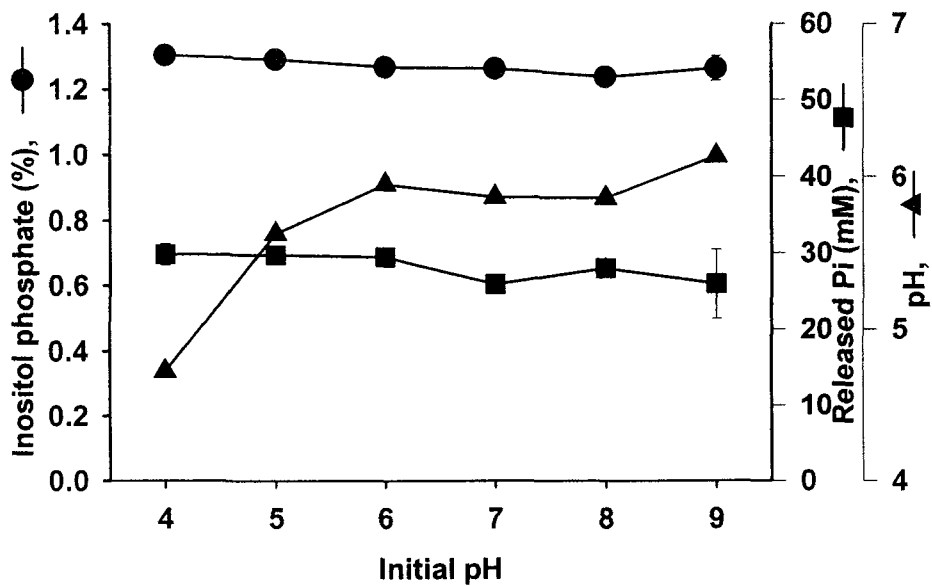
른 phytic acid 분해효과를 나타내었다. (Fig 51).

발효 시간에 따른 분해 효과를 분석한 결과, 비교적 높은 분해효과를 나타내었는데 발효 1일 만에 대부분의 phytic acid가 분해되어 유리인의 함량이 높게 나타났고, 발효 2일에 가장 높은 분해 효과가 나타났으며 그때의 유리인의 함량은 약 40 mM 정도였다. 발효 시간에 따른 발효후의 pH는 발효 시간이 증가함에 따라 비례적으로 나타났다.

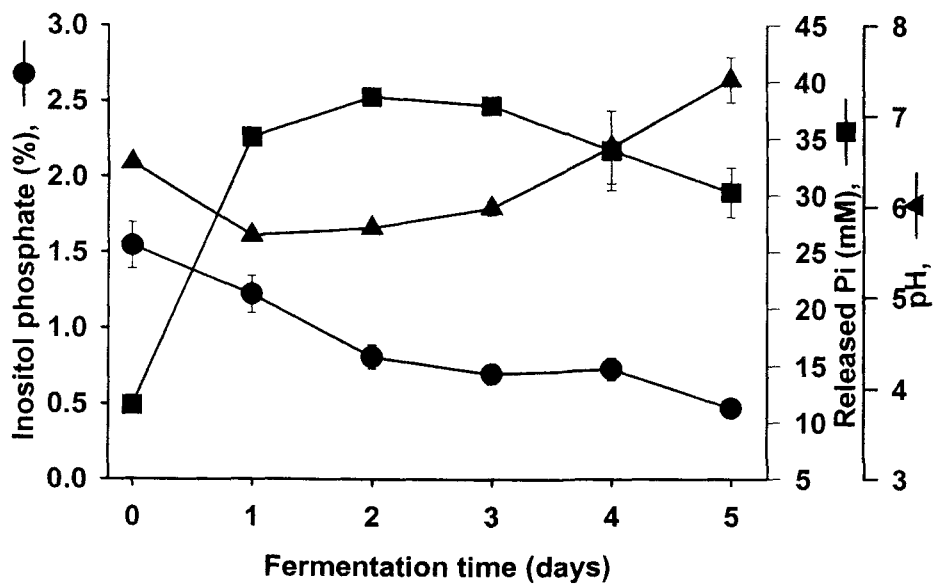


**Fig. 49. Effect of temperature on hydrolysis of phytic acid of a defatted soybean flour. Fermentations were performed in 10% defatted soybean flour at pH 6.7 with stirring at 150 rpm for 5 days.**





**Fig. 50. Effect of initial pH on hydrolysis of phytic acid of a defatted soybean flour. Fermentations were carried out in 10% defatted soybean flour at 30°C with stirring at 150 rpm for 5 days.**



**Fig. 51. Effect of fermentation time on hydrolysis of phytic acid of a defatted soybean flour. Fermentations were done in 50% defatted soybean flour at pH 6.7 and at 30°C .**

## 2) 발효 온도에 따른 영향

대두박 중의 phytic acid를 분해하기 위해 대두박 10 g에 D.W 10 ml씩 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하였다. 각각 25, 30, 35 및 40°C에서 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정하여 나타내었다. (Fig. 52).

발효 온도에 따른 분해효과를 분석한 결과, 온도범위 25, 30, 35, 및 40°C에서 분해효과가 비교적 높게 나타났으나 반비례적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 발효 온도 25°C에서 phytic acid의 분해 효과가 가장 높게 나타났으며 발효 온도에 따른 발효 후의 pH는 온도에 영향 없이 거의 일정하게 나타났다.

### 마. 효소를 이용한 곡류 부산물중의 phytic acid의 분해조건

미강에는 약 30%의 단백질과 대두박에는 약 70%의 단백질이 함유되어 있으며, 특히 대두박은 사료의 단백질원으로 많이 사용되고 있으며, 미강 또한 사료원으로 사용 가능하다. 그러나 미강과 대두박에 존재하는 다량의 phytic acid는 소화 흡수되지 않아 유기태인의 배설로 인한 토양과 수계 오염의 원인이 되고 있다. 미강과 대두박을 사료의 대체단백질로 사용할 경우 유기태인의 배설을 방지하기 위한 2가지 방법이 제시될 수 있다. 하나는 사료중에 phytase를 첨가하여 동물체의 소화기내에서 phytic acid가 분해되도록 유도하는 것이고, 나머지는 사료에 사용된 미강과 대두박중의 phytic acid를 phytase로 처리한 후에 사료원으로 사용하는 방법이 가능하다. 이미 전자는 광범위하게 사용되는 방법이나, 후자에 관한 연구결과는 아직 제시되고 있지 않다. 따라서 미강과 대두박중의 phytic acid를 분해시키기 위한 효소적인 실험을 행하였다.

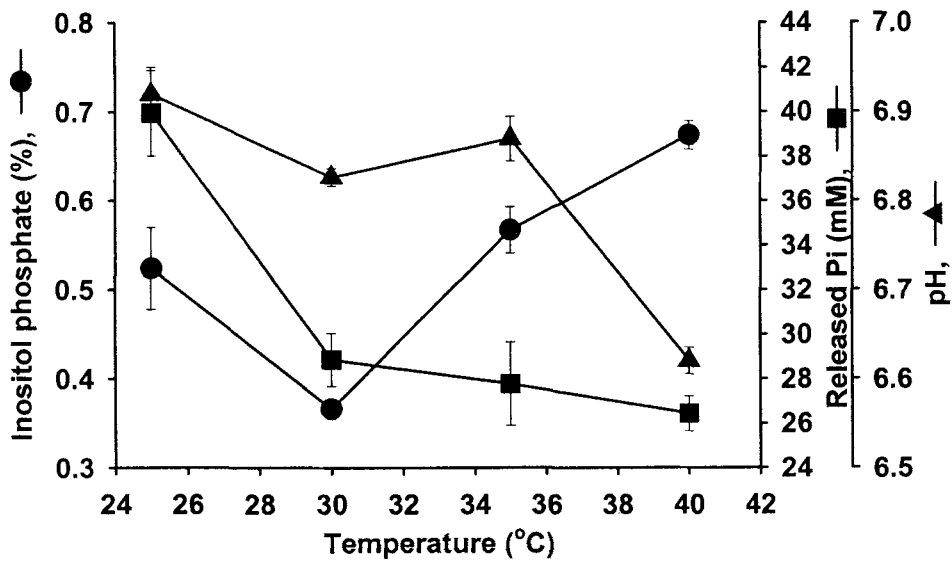
### 1) Phytase 농도의 영향

이미 알려진 바와 같이 미강과 대두박에는 각각 5-6과 1.5-2.0%의 phytic acid가 함유되어 있다. 이들에 함유되어 있는 phytic acid를 분해시키기 위하여 다양한 농도의 phytase를 사용하여 유기태인을 분해시켰다. Fig. 53에 나타난바와 같이 5 g의 미강과 대두박을 phytase로 분해시킬 경우 효소의 농도에 비례

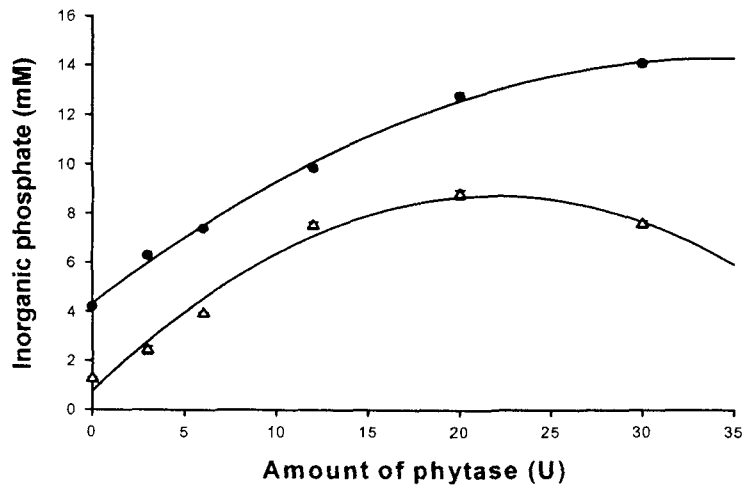
하여 유리되는 유기태인의 양이 증가하였으며, 미강의 경우 30U, 대두박의 경우 20 U의 phytase로 처리할 경우 대부분의 phytic acid가 분해됨을 알 수 있었다.

## 2) pH의 영향

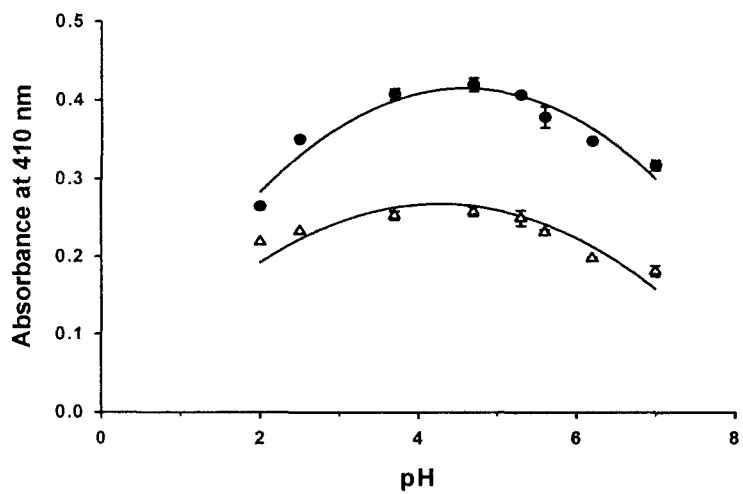
미강은 30 U의 phytase 그리고 대두박은 20 U의 phytase를 가하여 pH 2.0에서 7.0의 영역에서 phytic acid의 분해정도를 측정하였다. Fig. 54에 나타난 바와 같이 두 시료의 경우 공히 pH 4.0-5.0에서 최대 분해됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구에 사용된 phytase에는 phytase A와 B가 공존하는 결과로 알 수 있었다. 따라서 미강과 대두박 중의



**Fig. 52. Effect of fermentation temperature on hydrolysis of phytic acid of a defatted soybean flour. Fermentations were done in 50% defatted soybean flour at pH 6.7 and at 30°C .**



**Fig. 53. Effect of phytase amount for hydrolysis of phytate.**



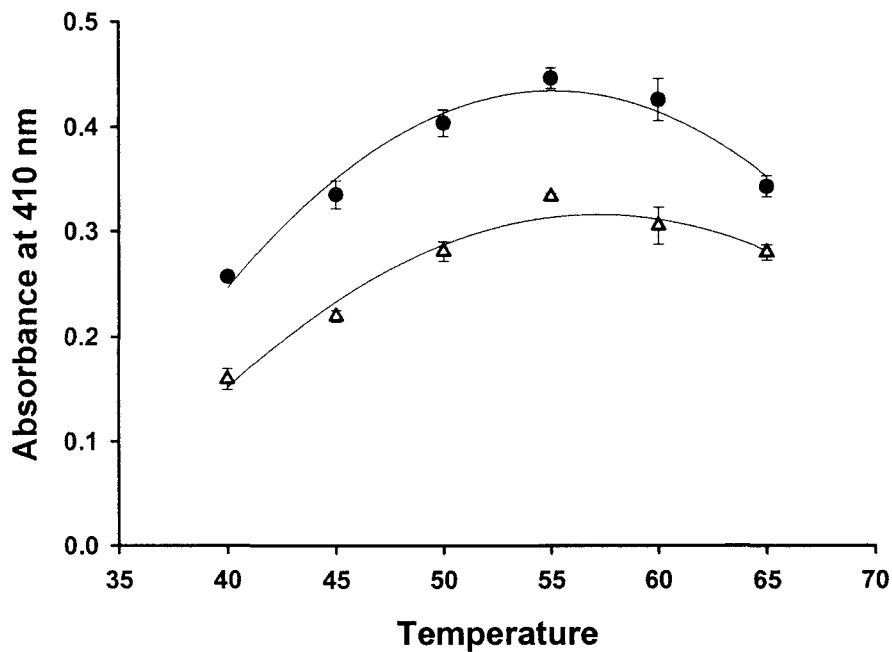
**Fig. 54. Effect of pH for hydrolysis of phytates.**  
Phytates were incubated for 30 min at indicated pH.

phytic acid를 분해시키기 위한 pH는 5.0으로 설정하였다.

(3) 온도의 영향

미강에 30 U의 phytase와 대두박에 20 U의 phytase를 가하여 pH 5.0에서 30분동안 40-65°C의 온도범위에서 반응시킨 결과 정제효소와 마찬가지로 55°C에서 최대활성을 나타내었다 (Fig. 55). 이러한 결과는 사료원으로 사용된 미강과 대두박의 유기태인을 효과적으로 분해시키기 위한 반응조건을 제시하고 있다.





**Fig. 55. Effect of temperature for hydrolysis of phytate in rice bran( ●) and soybean meal ( Δ). Reaction was performed for 30 min at pH 5.0.**

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1절 1차년도 연구개발 목표

1차 년도의 연구개발목표로 제1세부과제에서는 토양으로부터 phytase 생산균을 분리하여 균주의 동정과 균주가 생산하는 phytase의 정제방법을 확립하고 정제효소의 특성규명에 있다. 제 2세부과제에서는 분리된 phytase 생산균주로부터 phytase 유전자를 cloning하고 RT-PCR에 의한 *phyA*의 cDNA를 확보와 유전자 sequencing에 있다. 그리고 제3세부과제에서는 *Aspergillus* sp. 5990을 이용하여 phytase 생산조건을 확립하고 미강과 대두박중의 phytin을 분해하기 위한 액상 발효조건을 확립하는데 있다. 1차년도 연구개발 평가 착안점은 1) Phytase의 정제와 특성분석, 2) 유전자 cloning 및 분석 및 3) 야생균주의 발효조건으로 평가항목 연구를 달성하였다.

#### 1. 제 1 세부과제 Phytase의 특성규명 및 실용화

##### 가. Phytase 생산균주의 분리 및 동정

본 연구개발을 수행하는 동안 토양으로부터 3종의 phytase 생산균을 분리하여 그중 phytase 활성이 높은 균을 순수분리하여 동정한 결과 *Aspergillus* sp. 5990으로 명명하여 유전자 은행에 수탁 (KTCC8939P)하였으며, 특허로 출원하였다.

##### 나. Phytases의 정제방법 확립

현재까지의 곰팡이가 생산하는 phytase를 정제하는 방법은 이온교환 크로마토그래피, 겔여과, 친화성 크로마토그래피, isoelectrofocusing 등의 단백질 분리방법을 적용하여 장기간의 노력에 의하여 정제하고 있으며, 정제시에 수반되는 고가의 장비와 비용 또한 높은 실정이다. 특히 *Aspergillus* 속의 곰팡이는 등전점이 유사한 2종의 phytase를 생산하기 때문에 초기의 정제 단계에 시도하는 이온크로마토그래피에 의하여 항상 같이 분리된다. 본 연구개발을 수행하는 동안 두 종의 phytase를 신속하게 정제하기 위하여 pH 3.0에서 7.0까지의 영역에서 여러 가지 종류의 이온교환 수지와와의 binding test를 시도한 결과,

두종의 phytase는 각기 다른 pH에서 이온교환수지에 대한 흡착력이 다르다는 것을 찾았다. 즉, phytase A는 pH 3.0에서 양이온 교환수지와 강하게 결합하는 반면에 phytase B는 pH 8.0에서 음이온 교환수지와 강한 결합을 하는 사실을 알았다. 따라서 곰팡이가 생산하는 2종의 phytase를 간편하게 정제할 수 있는 신속 정제방법을 개발하여 현재 특허출원 준비중에 있다.

#### 다. 정제 효소의 특성분석

##### 1) 분자량

*Aspergillus* sp. 5990으로부터 2종의 phytase를 정제하여 10% SDS-PAGE를 이용하여 phytase A와 B의 분자량을 측정된 결과 두 정제 효소 phytase A와 phytase B의 분자량은 각각 84, 74.1 kDa으로 나타났다. 그러나 Superose 6 gel filtration에 의한 두 효소의 분자량을 측정된 결과, phytase A가 98, B가 330 kDa으로 나타났다. 따라서 phytase A는 monomer로써 활성형을 나타내고, phytase B는 tetramer로써 활성을 나타내는 효소로 판단되었다.

##### 2) 최적 반응 pH

*Aspergillus* sp. 5990으로부터 분리된 phytase A와 phytase B의 pH 의존성을 측정된 결과 Fig. 10에서와 같이 phytase A는 pH 5.0-6.0에서 높은 활성을 나타내었고 pH 2.5-2.8에서도 2차적인 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 또한 Phytase A는 pH 2.5에서 최대활성의 35%를 나타내었으며, pH 7.0에서도 최대활성의 38%를 유지하였고 pH 8.0에서는 활성을 소실하였다. 반면 phytase B의 경우는 pH 2.8-3.2에서 최대활성을 나타내었으며 pH 4.0에서 활성을 60% 소실하였고 pH 4.5 이상에서는 활성을 소실하였다.

##### 3) 최적 반응 온도

정제된 phytase A, B 모두 65°C 부근에서 최대 활성을 나타내었으며 70°C에서는 대부분의 활성이 소실되었다. 두 효소의 활성은 70°C 이상에서 급격히 소실되어 phytase A의 경우는 최대활성의 18%, phytase B의 경우는 활성을

완전히 소실하였다.

#### 4) 내열성

두 효소의 내열성을 측정한 결과 Phytase A의 경우 65°C까지의 열처리에서는 활성을 그대로 유지하였으나 70°C에서 약 40%, 80°C에서 70% 이상의 활성을 소실하였다. 이에 반해 phytase B의 경우는 75°C까지의 열처리에 안정했고 80°C에서 70% 이상이 소실되어 두 효소가 비슷한 온도에서 최적활성을 나타내는 것과는 달리 내열성은 phytase B가 A보다 높은 것으로 나타났다. 그러나 두 효소 모두 65°C에서 50%이상의 활성을 소실하는 BASF phytase인 Natuphos보다 내열성이 높은 것으로 나타났다.

#### 5) 동력학적 특성

정제된 phytase A와 B의 kinetic 상수를 측정한 결과 pH 5.0에서 phytase A의  $K_m$  치는 0.37 mM이고  $V_{max}$ 는 2,240/sec로 나타났다. 그리고 pH 2.5에서의  $K_m$  치는 1.20 mM이었으며  $V_{max}$ 는 6,800/sec로 나타났다. Phytase A에 비해 phytase B의 pH 2.5에서의  $K_m$  치는 0.29 mM이었으며,  $V_{max}$ 는 phytase A에 비해 다소 낮은 2,100/sec로 나타났다.

#### 6) 기질특이성

정제된 phytase A와 B의 기질 특이성을 조사하기 위하여 15종의 인산 화합물을 사용하여 기질특이성을 분석하였다. 그 결과 phytase A는 phytic acid에 높은 활성을 나타내었으며, phosphatase의 활성은 낮게 나타났다. 그리고 phytase B는 phytic acid 보다는 여러 가지 인산화합물에 대한 phosphatase 활성이 더 높게 나타났다. 본 연구개발에서 분리된 phytase A는 곰팡이로부터 생산되는 전형적인 phytase의 특성을 지닌 것으로 판단되었다.

## 2. 제 2 세부과제 Phytase 대량생산을 위한 발현시스템 개발

### 가. 유전자 cloning

*Aspergillus* sp. 5990의 균사체로부터 추출한 DNA를 template와 primer

AU/AD2 (*phyA*), primer BU/BD2 (*phyB*)를 사용하여 PCR 산물을 얻었다. 증폭된 *phyA*와 *phyB* 유전자의 크기는 각각 1.5 kb와 1.6 kb를 나타내었다. 이러한 DNA 단편의 크기는 이미 곰팡이에서 분리된 phytase 유전자의 크기와 유사한 결과를 나타내었다. 증폭된 DNA 단편이 phytase 유전자인지를 확인하기 위하여 *SmaI* site로 직선화시킨 pBluescript vector에 삽입하여 Ligated된 clone을 *XbaI-HindII* 제한 효소로 처리하여 DNA 단편을 확인하여 부분적으로 DNA 구조를 분석하여 확인하였다. 부분적인 DNA 분석 결과 *phyA*와 *phyB* 유전자로 확인하였다. 그리고 *phyA*와 *phyB* 유전자를 pBluescript SK에 ligation한 후 *E. coli* DH5  $\alpha$ 에 형질전환시켜 positive colony로부터 plasmid를 분리한 후 동일한 제한효소로 처리하여 전기영동한 결과 plasmid와 유전자의 존재를 확인할 수 있었다.

#### 나. RT-PCR에 의한 cDNA 제조

*Aspergillus* sp. 5990으로부터 분리된 mRNA를 주형으로 RT-PCR에 의해 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성은 42°C에서 30분간 행하여 합성하였으며 99°C에서 5분간 열처리하여 RT를 변성시켰다. 두 번째 PCR에 의한 DNA 증폭은 primer AUMEcoRI 5'-CGG AAT TCC TGG CAG TCC CCG CCT-3'와 primer ADMEcoRI 5'-CGG AAT TCA GGT AAT TCA GCT AAG CAA AAC ACTC-3'를 이용하여 phytase A 유전자를 PCR로 증폭시켰다. Phytase B의 유전자 증폭을 위한 RT-PCR용 primer는 B\_UXbaI 5-GCT CTA GAC CTT GGC AAT GCC TCG CAC CTC TCC-3와 B\_DEcoRI 5-GGA ATT CAT CTA GTC CAT AGC ATC ACC CTC CTG GCA C-3를 사용하였다. RT-PCR 결과 *phytA*는 1.4 kb, 그리고 *phyB*는 1.5 kb의 밴드가 나타났다.

#### 다. Phytases 유전자 sequencing 및 분석

*Aspergillus* sp. 5990 phytase 유전자를 분석하기 위하여 Universal primer와 Rivers primer를 사용하여 1차 구조를 분석하였다. 1차 sequencing 결과를 토대로 서로 겹치도록 매 300 bp마다 primer를 design하여 phytase A 유전자의 전체 구조를 분석하였다. Phytase A는 15,129 nt의 sequence를 나타내었으

며 5' 말단의 signal sequence 근처에 103 nt의 intron이 내재되어 있었다. Mature 효소는 452개의 아미노산으로 구성되었으며, 이론적인 분자량은 49,616 이었다. 단백질 sequence로 계산된 효소의 이론적인 pI는 4.84였다. 분리된 *Aspergillus* sp. 5990의 phytase A 유전자 서열은 *Aspergillus ficcum*, *A. niger* var. *awamori*, *A. fumigatus*, *A. terreus*의 phytase와 각각 99, 97, 66 및 62%의 상동성을 나타내었다.

### 3. 제 3 세부과제 사료원 영양가향상을 위한 발효조건 확립

#### 가. Phytase 생산을 위한 발효조건 확립

분리된 *Aspergillus* sp. 5990을 이용하여 phytase 생산을 위한 발효조건을 Ca<sup>++</sup> ion의 농도 영향, 무기인산 농도의 영향, 배지의 pH, 배양온도 및 배양 기간에 따른 phytase 생산조건을 검토한 결과 Ca<sup>++</sup> ion의 농도는 0.1 mM, 무기인산의 농도는 0.05%, pH 7.0, 35°C에서 4일간의 배양에 의해서 phytase 생산이 최대였다.

#### 나. 야생주에 의한 사료원의 액상발효조건

##### 1) 액상 발효에 의한 미강 중의 phytin 분해조건

미강 중에는 수분, 회분, 지질 및 단백질이 각각 15.60, 7.75, 18.34 및 2.96%의 조성으로 나타났으며, 전체인의 함량은 5.81%이다. 이 중 phytic acid의 형태로 존재하는 인은 5.65%로 전체 인 함량의 97%를 차지하였다. 따라서 미강 중에 다량 존재하는 인의 흡수도를 높이기 위하여 phytase 생산 균주에 의한 유기태인의 분해를 위한 액상 발효조건을 확립하였다.

##### 가) 미강 농도에 따른 영향

*Aspergillus* sp. 5990을 사용하여 미강 중의 phytic acid의 분해를 위한 발효 조건을 확립하였다. 미강 중의 phytic acid를 분해하기 위해 미강을 농도 별 (3, 5, 7, 10, 20 및 30%)로 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하여 30°C에서 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산과 phytic acid를 측정된 결과, 10% 일 때 가장 높은 분해도를 나타내었다.

#### 나) 발효 시간에 따른 영향

미강 중의 phytic acid를 분해하기 위해 10%의 미강 농도로 조정하여 멸균 한 후 균주를 접종하여 30°C에서 0, 1, 2, 3, 4, 5일간 배양한 후 배양시간에 따른 배양액 중의 무기인산과 phytic acid를 측정된 결과 배양 3일부터 유리인의 증가가 나타나 배양 4일만에 대부분의 phytic acid가 분해되었다.

#### 다) 발효 온도에 따른 영향

미강 중의 phytic acid를 분해하기 위해 10%의 미강 농도로 조정하여 균주를 접종한 후 각각 30, 35 및 40°C에서 4일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산과 phytic acid를 측정된 결과 발효 온도에 따른 큰 차이가 나타나지 않아 발효온도를 30°C로 설정하였다.

#### 라) 발효 pH에 따른 영향

미강 중의 phytic acid를 분해하기 위해 미강을 10%로 첨가하여 멸균 한 후 균주를 각각 초기 pH가 4, 5, 6, 7, 8 및 9로 조정된 배지에 접종하여 30°C에서 4일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산과 phytic acid를 분석한 결과, pH 4에서 가장 분해 효과가 높았으며, pH 5와 9에서는 분해 효과가 낮게 나타났다. 따라서 *Aspergillus* sp. 5990에 의한 미강 중의 phytin을 분해하기 위한 발효조건은 미강 10%, 30°C, pH 4.0의 조건에서 4일간의 발효가 가장 적합하였다.

### 2) 액상 발효에 의한 대두박 중의 phytin 분해조건

실험에 사용한 대두박 중에는 수분, 회분, 지질 및 단백질이 12.27, 6.21, 2.43 및 20.65%의 조성으로 나타났으며, 전체인의 함량은 대두박이 2.77%이며, 이중 phytic acid의 형태로 존재하는 인은 1.84%로 전체 인 함량의 66%를 차지하였다.

#### 가) 대두박 농도에 따른 영향

*Aspergillus* sp. 5990을 사용하여 대두박 중의 phytic acid의 분해를 위한 발효 조건을 확립하였다. 대두박 중의 phytic acid를 분해하기 위해 대두박을

농도별 (1, 2, 3, 5, 7 및 10%)로 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하여 30℃에서 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산과 phytic acid를 측정된 결과, 대두박 농도가 10% 일 때 가장 최고치를 나타내었으며 이때 유리인의 함량은 30 mM 정도였다.

#### 나) 발효 시간에 따른 영향

대두박 중의 phytic acid를 분해하기 위해 대두박을 10%로 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하여 30℃에서 0, 1, 2, 3, 4, 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산과 phytic acid를 측정된 결과, 2일 이후 급격하게 분해가 증가하여, 발효 3일만에 대부분의 phytic acid가 분해되었다.

#### 다) 발효 온도에 따른 영향

대두박 중의 phytic acid를 분해하기 위해 대두박을 10%로 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하여 각각 30, 35, 40℃에서 3일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산과 phytic acid를 측정된 결과, 30-40℃의 범위에서 비슷한 분해 효과가 나타났다.

#### 라) 발효 pH에 따른 영향

대두박 중의 phytic acid를 분해하기 위해 대두박을 10%로 첨가하여 초기 pH가 4, 5, 6, 7, 8, 및 9로 조정된 배지를 멸균 한 후 균주를 접종하여 30℃에서 3일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산과 phytic acid를 측정된 결과 pH 4-6의 범위에서 비교적 높은 분해효과를 나타내었으며, 그중 pH4에서 가장 높은 분해효과를 나타내었다.

## 제 2절 2차 년도 연구개발 목표

2차 년도의 연구개발목표는 1차년도에서 분리된 phytase 생산균으로부터 효소를 대량생산하여 추가적인 효소의 생화학적 특성 규명과, 가축소화효소에 대한 안정성을 규명하며, 제 2세부과제에서는 재조합 phytase를 생산하기 위한 phytase 발현 시스템 구축, 재조합 균주로부터 재조합 효소의 대량생산 및 재조합 효소의 특성분석이다. 그리고 제3세부과제에서는 야생주를 이용한 고상 발효조건 확립과 재조합 효소를 이용한 phytic acid 분해조건을 확립하고자 한다. 2차년도 연구개발 평가 착안점은 재조합 효소의 특성, 발현시스템 개발, 재조합균주의 발효조건확립으로 연구개발 계획에 따른 목표를 달성하였다.



## 1. 제 1 세부과제 Phytase의 특성규명 및 실용화

### 가. Deglycosylation에 따른 활성 및 분자량 변화

두 정제효소에 glycosidase를 37°C에서 2시간 동안 처리시킨 후 활성을 측정하여 각 효소의 잔류활성을 측정하고 SDS-PAGE를 통해 분자량의 변화를 분석한 결과, phytase A의 경우 활성이 약 30% 정도 소실된 반면 phytase B는 거의 영향을 받지 않았다. 두 효소와 함께 시판효소의 활성변화도 같이 병행한 결과 deglycosylation에 의해 약 20% 정도 실활한 것으로 나타났다. 분자량의 변화를 보기 위해 SDS-PAGE한 결과 phytase A는 84 kDa에서 50 kDa로, phytase B는 74 kDa에서 55 kDa로 분자량이 감소하였다. 따라서 phytase B보다 phytase A의 glycosylation 정도가 높음을 알 수 있었다.

### 나. Polyclonal antibody 생산

정제된 phytase A와 B를 각각 토끼에 주사하여 일반적인 방법으로 polyclonal antibodies를 생산하였다. 생산된 혈청을 ELISA로써 확인하고 두 정제효소를 Endo Hf 처리하여 deglycosylation 시킨 후 western blot을 행한 결과 원래의 정제효소 뿐만 아니라 deglycosylation된 효소도 항원으로 작용하였다. Phytase A antibody를 사용하였을 경우에는 phytase A뿐만 아니라 B도 항원으로 작용하였으나, phytase B antibody를 사용하여 western blotting을 할 경우 phytase B만이 항원으로 작용하였다. Western blotting의 결과 이 항체들을 이용해 정제된 두 phytases를 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 생산된 polyclonal antibody는 토양 또는 해양으로부터 phytase를 산생하는 균주의 검색에 용이하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

### 다. 소화효소 공존시 phytin 분해능

#### 1) 미강 phytin 분해에 대한 단백질분해효소의 영향

미강 중의 phytin형의 phytic acid 분해도를 알기 위하여 (1) phytase와 protease를 동시에 처리하여 phytase 활성을 측정한 실험과 (2) 미강을 protease로 처리 후 phytase로 처리하여 phytase활성을 측정하는 실험을 병행하여 비교하였다. 그 결과 pH 7.0에서의 phytase A의 효소활성은 pH 5.5의 효소활성에 비하여 약 40% 가량 되며, 소장 (pH 7.0)에서의 phytase에 의한 phytin의 분해는 미미한 것으로 보고되고 있다. 그러나 소장에서 pancreatin의 도움을 받을 경우 phytase에 의한 효소활성 2배 가량 증가됨을 알 수 있다. 이러한 결과는 소장에서 pancreatin의 도움을 받아 사료첨가제로 사

용된 phytase의 활성을 향상시켜 미강 중의 phytic 분해는 용이하게 일어날 수 있음을 시사하고 있다.

## 2) 대두박 phytin 분해에 대한 단백질분해효소의 영향

대두박 중의 phytin형의 phytic acid 분해도를 알기 위하여 미강과 동일한 조건으로 실험을 행한 결과 pH 5.0에서 phytase A와 pepsin, trypsin 또는 pancreatin을 처리하여 phytic acid 분해능을 측정한 결과 대조구에 비하여 약 5-10% 가량 높은 phytic acid 분해능을 나타내었으며, pH 2.5에서 pepsin과 phytase를 동시에 처리한 결과도 대조구에 비해 약 10% 가량 높은 phytic acid 분해능을 나타내었다. 그리고 pH 7.0에서 phytase와 trypsin 또는 pancreatin을 동시에 처리하여 phytic acid의 분해능을 측정한 결과 대조구에 비해 1.8배 가량 높은 효소활성을 나타내었다. 이러한 결과는 체내에서 단백질 분해효소와 공존시 phytase에 의한 phytin의 분해능이 향상되어 유기태인의 분해가 용이하게 일어날 수 있음을 의미한다.

## 라. 효소의 안정성

### 1) 가축의 소화효소에 의한 효소의 안정성

Phytase를 사료첨가물로 사용할 경우 사료에 첨가된 phytase는 위에서 pepsin에 의해, 소장에서는 pancreatin에 의해 단백질분해가 일어날 가능성이 높다. 생체내에서의 소화효소에 의한 phytase의 분해를 예측하기 위하여 가축의 대표적인 단백질 분해효소를 이용하여 시험관 실험을 수행하였다. Phytase A와 B에 대해 0.001, 0.002, 0.005, 0.01 및 0.05%의 중량비로 porcine trypsin, chymotrypsin 및 pancreatin을 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 phytase A와 B의 잔류활성을 측정하였다. Pepsin으로 phytase B를 처리한 결과 0.005%의 pepsin에 의해 영향을 받지 않았으며, 0.01 및 0.05%의 pepsin 처리에 의해 각각 31 및 38%의 효소활성이 소실되었다. 0.01 및 0.05%의 trypsin 처리에 의해 phytase A의 활성은 각각 17 및 25%의 활성이 소실되었다. 그리고 pancreatin에 의한 phytase A의 활성소실은 pepsin과 trypsin보다는 심하게 일어났다. 이상의 결과는 phytase A와 B는 돼지의 소화효소에 대하여 비교적 안정한 효소활성을 나타내었으며, 이러한 결과는 본 연구개발에 사용된 효소의 상용화 가능성을 시사하고 있다.

## 2) 조효소의 저장안정성

통상적으로 이용하는 액상효소의 안정제로써 glycerol, erythorbitol 및 sorbitol을 효소의 20, 30 및 40% 가량을 첨가하여 4개월동안의 저장시 효소활성의 변화를 측정한 결과 phytase 조효소액의 저장시 erythorbitol과 glycerol 보다는 sorbitol이 효소의 안정화에 효과적인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 10°C와 30°C의 저장에 대해서도 동일한 결과를 나타내었다.

## 3) 건조, 제제화 기술 확립

효소를 장기저장하기 위한 방법으로 효소용액을 부형제를 첨가한 열풍건조, 냉풍건조, 분무건조 및 동결건조법으로 제제화하여 효소활성 잔존율을 비교한 결과 효소 활성 잔존율은 동결건조법 다음으로 분무건조법이 가장 효율적이었다. 그러나, 동결건조법과 분무건조법은 효소활성 유지율이 매우 높은 편이나 제조시 부형제의 미세입자화, 운전비용의 고단가, 추가적인 고설비 투자비용이 소요된다는 단점이 있다. 열풍건조법과 냉풍건조법은 효소활성의 유지에는 다소 낮은 공정이지만 제조가격과 공정이 단순하여 이용하기 편리한 면이 있다. 이와 같은 점을 고려하여 가상 경제성인 생산성을 비교를 해 본 결과 냉풍건조법이 가장 효율적이고 경제적인 방법으로 판단되었다.

## 4) 건조 제제 특성

냉풍건조법에 의해 최종 건조된 제품에 대해 각 온도별로 보존한 다음 효소활성을 측정한 결과, 10°C에서 유지할 경우 효소 활성은 6개월 경과 후에도 94% 이상이 유지되었다. 그러나, 30°C에서 보관할 경우에는 효소 활성은 72% 정도로 감소함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 다가 알콜을 첨가한 효소용액과 비슷한 경향을 나타내었으나 효소활성의 안정화 측면에서는 액상효소의 저장에 비해 월등히 높은 효소활성을 유지할 수 있었다. 건조제제의 효소 안정화 정도가 훨씬 강하게 나타난 이유는 건조제품에 있어서 제제화시 이미 효소가 안정화되어 다른 물질에 의한 효소 활성 저해 효과나 효소 분해 현상이 억제되기 때문인 것으로 판단된다. 이와 같은 결과는 본 연구결과에 의해 제제화된 효소를 10°C에 보존할 경우 매우 안정적으로 장기간 유지될 수 있다는 것을 의미한다.

## 2. 제 2 세부과제 Phytase 대량생산을 위한 발현시스템 개발

### 가. Phytase 발현 시스템 구축

1차년도의 RT-PCR로 확보한 Phytase A 유전자를 coding하는 RT-PCR 산물을 methanol induction에 의해 조절되는 AOX1 promotor를 지닌 pPIC9K 발현 vector의 *EcoRI* site에 삽입하여 PKAMC plasmid를 제작하였다. PKAMC의 DH5 $\alpha$  형질전환체로부터 plasmid를 분리하여 *EcoRI* 제한효소로 처리한 다음 1% agarose 전기 영동으로 분리하였다. Positive clone은 *BglIII* 제한 효소로 처리하여 insert DNA 방향성을 확인하고 *Pichia* 균에 형질전환용으로 사용하였다. 정확한 방향성과 크기를 지닌 clone을 선별하여 PKAMC라 명명하였다. PKAMC를 *PmeI*으로 처리하여 직선화하여 head에서 tail 방향으로 His 위치에 integration시켜 His를 His'로 전환하였다. pPIC9K 또한 직선화하여 대조실험으로 *Pichia*에 형질전환시켰다. RDB plate상의 모든 His' 형질전환체를 다양한 농도의 G418-YPD plate에 transfer시켜 높은 농도의 G418에서 생성된 colony를 분리하였다. KM71 균주의 형질전환율이 GS115보다 높기 때문에 30개의 KM71 균주의 colony를 0.75 mg/ml의 G418을 함유한 YPD plate에서 분리하여 BGM MY 액체배지에서 성장시켜 효소의 유도를 위하여 BMMY 배지로 transfer시켰다. 4일 동안의 methanol induction에 의하여 배양액의 단백질 농도는 38 mg/ml이었으며, 배양액의 phytase 활성은 높게 나타났다.

### 나. 재조합 효소의 생산

Chlorosomal integration 효율이 높은 KM71 균주를 BGM MY 액체배지에서 성장시킨 후 효소의 유도를 위하여 10 L 발효조를 이용한 BMMY 배지로 transfer시켜 30°C에서 180 시간 동안 배양하면서 재조합 phytase의 대량생산을 위한 조건을 확립하였다. 즉 발효 24시간부터 48시간동안 시간당 20 ml의 sucrose와 methanol 혼합액을 가하고 48시간 이후부터는 시간당 50 ml의 혼합액을 가하여 재조합 phytase의 생산을 유도하였다. 그 결과 발효 120시간대에 phytase 생산이 최대로 되었으며, 이때의 생산량은 1 liter 당 약 2.2 g으로 나타났다.

## 다. 재조합효소의 특성분석

### 1) Glycosylation 정도

정제된 *Aspergillus* sp. 5990, BASF phytase 및 *P. pastoris*에서 생산된 재조합 phytase를 N-Glycosidase F를 처리하여 deglycosylation시킨 후 SDS-PAGE로 전기영동한 결과, *P. pastoris*에서 생산된 재조합 phytas, *Aspergillus* sp. 5990 및 BASF phytase의 분자량은 각각 80, 85, 및 75 kDa의 단일 밴드로 나타났다. 그리고 3종의 효소를 deglycosylation시킨 결과 분자량은 공히 50 kDa로 나타났다. 이러한 결과는 아미노산 서열로 구한 이론적인 분자량인 49,616 Da과 아주 유사하게 나타났다.

### 2) 재조합 정제효소의 반응최적 조건

pH 1.0 - 8.0까지의 완충액 (pH 1.0-2.8, 0.1 M glycine-HCl; pH 3.5-6.0, 0.1 M Na-acetate; pH 7.0-8.0, 0.1 M Tris-HCl)에 Na-phytate가 5.5 mM 되도록 녹인 후 기질로 사용하여 정제된 야생형, 재조합형 및 상용의 phytase를 37°C에서 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정한 결과, 전형적인 곰팡이 유래 phytase와 같이 야생형 phytase, 재조합형 phytase 및 Natuphos는 pH 5.5에서 최대활성을 나타내었으며 pH 2.5에서도 다소 높은 효소활성을 나타내었다. 야생형 phytase와 재조합형 phytase는 pH 2.5에서 최대활성의 70-80%를 나타내었으며, pH 7.0에서도 최대활성의 40%를 유지하였고 pH 8.0에서는 활성을 소실하였다. 반면 시판되는 phytase의 경우 pH 2.5부근에서 최대활성의 50% 가량을 나타내었다.

### 3) 재조합 정제효소의 내열성

재조합 phytase의 상용화를 위한 예비실험으로 야생형 phytase A와 상용되는 BASF phytase와 비교하였다. 내열성 측정을 위해 정제된 세 효소를 37, 50, 60, 65, 70, 75, 80°C의 각 온도에서 20분간 열처리하여 냉각시킨 후 pH 5.0, 37°C에서 각각 30분간 반응시켜 잔류활성을 측정하여 열처리하지 않은 효소의 활성에 대한 상대활성을 결정한 결과, 야생형 phytase의 경우 65°C까지의 열처리에서는 활성을 그대로 유지하였으나 70°C에서 약 46%, 80°C에서 70% 이상의 활성을 소실하였다. BASF phytase의 경우 60°C까지의 열처리에 의해 활성소실은 크게 일어나지 않았으나, 70°C의 열처리에 의해 원래활성의 80% 가량을 소실하였다. 그러나 재조합효소의 경우 70°C의 열처리에 의해 원래활성의 30% 가량을 소실하였으며, 75°C의 열처리에 의해서도 원래활성의

50% 가량을 유지하였다.

#### 4) 재조합 정제효소의 기질 특이성

정제된 *Aspergillus* sp. 5990, BASF phytase 및 *P. pastoris*에서 생산된 재조합 phytase를 다양한 인산화합물을 이용한 기질 특이성을 분석한 결과 야생형 phytase와 BASF phytase는 sodium phytate에 가장 높은 기질특이성을 나타낸 반면, *P. pastoris*에서 발현된 재조합 phytase는 sodium phytate를 비롯한 모든 인산화합물에 대하여 광범위한 활성을 나타내었다.

#### 5) 재조합 정제효소의 kinetics

반응 속도 정수(Km)와 최대 반응 속도(Vmax)를 결정한 결과, *P. pastoris*에서 생산된 재조합 phytase의 경우 pH 2.5에서 recombinant phytase의 Km과 Vmax는 각각 0.81 mM과 8,400 sec<sup>-1</sup>로 나타났으며, pH 5.5에서는 각각 0.64 mM과 1,600 sec<sup>-1</sup>로 나타났다. BASF phytase의 경우 pH 2.5에서 Km과 Vmax는 각각 1.38 mM과 6,600 sec<sup>-1</sup>로 나타났으며, pH 5.5에서는 각각 0.49 mM과 2,300 sec<sup>-1</sup>로 나타났다. 이상의 결과로 볼때 BASF에서 시판되는 phytase의 촉매활성은 본 연구개발에서 분리된 야생효소보다는 촉매활성은 약간 낮게 나타났으나, 재조합 효소의 경우 pH 5.5에서는 야생형 효소보다는 촉매활성이 낮게 나타났으나, pH 2.5에서는 야생형 효소보다 촉매효율이 훨씬 높게 나타났다. 이는 *P. pastoris*의 숙주에서 재조합효소가 생산될 때 glycosylation의 정도의 차이 때문인 것으로 추정된다.

### 제 3 세부과제 사료원 영양가향상을 위한 발효조건 확립

#### 가. 야생주를 이용한 고상 발효조건 확립

##### 1) 고체 발효에 의한 미강 중의 phytic acid 분해조건

##### 가) 발효 시간에 따른 영향

*Aspergillus* sp. 5990을 사용하여 미강 중의 phytic acid의 분해를 위한 발효 조건을 확립하였다. 미강 중의 phytic acid를 분해하기 위해 미강 10 g에 D.W 10 ml씩 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하였다. 35°C에서 0, 1, 2, 3, 4, 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정된 결과, 발효 1일까지는 분해효과가 거의 없으나 배양한 후 1일 이후 유리 인이 급격하

게 증가하는 경향을 보이며 배양한 후 4일만에 대부분의 phytic acid가 분해되었으며, 발효 5일에 가장 높은 분해 효과가 나타났다.

나) 발효 온도에 따른 영향

미강 중의 phytic acid를 분해하기 위해 미강 10 g에 D.W 10 ml씩 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하였다. 각각 25, 30, 35 및 40℃에서 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정된 결과, 발효 온도에 따른 분해효과를 분석한 결과, 온도가 상승함에 따라 반비례하는 경향으로 나타났다으나 25℃에서 최고의 분해효과를 나타내었다.

2) 고상 발효에 의한 대두박 중의 phytic acid 분해조건

가) 발효 시간에 따른 영향

대두박 중의 phytic acid를 분해하기 위해 대두박 10 g에 D.W 10 ml씩 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하였다. 35℃에서 0, 1, 2, 3, 4, 및 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정된 결과, 비교적 높은 분해효과를 나타내었는데 발효1일 만에 대부분의 phytic acid가 분해되어 유리인의 함량이 높게 나타났고, 발효 2일에 가장 높은 분해 효과가 나타났다.

나) 발효 온도에 따른 영향

대두박 중의 phytic acid를 분해하기 위해 대두박 10 g에 D.W 10 ml씩 첨가하여 멸균 한 후 균주를 접종하였다. 각각 25, 30, 35 및 40℃에서 5일간 배양한 후 배양액 중의 무기인산, phytic acid 및 pH를 측정된결과, 온도범위 25, 30, 35, 및 40℃에서 분해효과가 비교적 높게 나타났으나 반비례적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 발효 온도 25℃에서 phytic acid의 분해 효과가 가장 높게 나타났다.

나. 재조합 효소를 이용한 phytic acid 분해조건

1) Phytase 농도의 영향

이미 알려진 바와 같이 미강과 대두박에는 각각 5-6과 1.5-2.0%의 phytic acid가 함유되어 있다. 이들에 함유되어 있는 phytic acid를 분해시키기 위하여 다양한 농도의 phytase를 사용하여 유기태인을 분해시켰다. 5 g의 미강과 대두박을 phytase로 분해시킬 경우 효소의 농도에 비례하여 유리되는 유기태인의

양이 증가하였으며, 미강의 경우 30U, 대두박의 경우 20 U의 phytase로 처리할 경우 대부분의 phytic acid가 분해됨을 알 수 있었다.

### 2) pH의 영향

미강은 30 U의 phytase 그리고 대두박은 20 U의 phytase를 가하여 pH 2.0에서 7.0의 영역에서 phytic acid의 분해정도를 측정하였다. 두 시료의 경우 공히 pH 4.0-5.0에서 최대 분해됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구에 사용된 phytase에는 phytase A와 B가 공존하는 결과로 알 수 있었다. 따라서 미강과 대두박 중의 phytic acid를 분해시키기 위한 pH는 5.0으로 설정하였다.

### 3) 온도의 영향

미강에 30 U의 phytase와 대두박에 20 U의 phytase를 가하여 pH 5.0에서 30분동안 40-65°C의 온도범위에서 반응시킨 결과 정제효소와 마찬가지로 55°C에서 최대활성을 나타내었다. 이러한 결과는 사료원으로 사용된 미강과 대두박의 유기태인을 효과적으로 분해시키기 위한 반응조건을 제시하고 있다.



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. 추가연구의 필요성

본 연구개발을 수행함으로써 기존의 상용되는 pphytase 보다도 내열성이 우수한 phytase 생산균을 분리하여 분리된 균주로부터 생산된 phytase의 생화학적인 특성을 규명하였으며, 또한 재조합 phytase를 대량으로 생산하기 위한 효소생산 시스템을 확립하였다. 현재까지의 결과는 실험실적인 발효조 (14L)를 통한 대량생산조건이 확립되었으나, 산업화를 위한 추가적인 연구가 필요하다. 즉, 산업적인 생산을 위하여 보다 대형의 발효조를 사용할 경우 본 연구개발에서 확립된 조건을 바탕으로 생산성을 향상시키기 위한 induction 시간과 induction 빈도, feeding supplements의 조성을 개선할 필요가 있다. 특히 대량 생산을 위한 scale-up시 pilot 규모와 plant 규모의 발효공정시 induction 조건과 seeding 조건 등의 추가적인 연구가 필요하다. 이러한 연구는 대형 발효조가 구비된 참여업체의 전문 인력에 의한 산업화를 위한 자료구축이 보다 효율적이다.

### 2. 타연구에의 응용

본 연구개발의 결과로 다수의 국제적인 학회발표와 국내특허와 2편의 SCI급 논문이 발표되었다. 연구개발의 결과 곰팡이 phytase를 간단하게 정제할 수 있는 방법을 개발하였으며 이러한 결과는 추후 곰팡이 phytase의 기능과 구조 연구에 많은 기여를 할 것으로 기대된다. 그리고 본 연구개발시에 개발되었는 phytase A와 B의 항체를 이용한 ELISA법의 개발은 토양과 해수로부터 phytase 생산균을 신속하게 검색할 수 있는 간편한 방법을 제시하였다. 또한 *Aspergillus* sp. 5990을 이용한 미강과 대두박의 발효조건은 농가에서도 용이하게 사료원의 유기태인을 분해시키기 위한 간편한 방법으로 활용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

### 3. 기업화 추진방향

당초 예상과 달리 phytase 효소시장이 연간 100억원대에서 신장하지 못하고 정체상태에 이르고 있으므로 현재상태로는 기업화 전망이 불투명하다. 그러

나 향후 환경문제와 더불어 phytase 시장이 성장할 것으로 전망되고 있기 때문에 앞으로 phytase의 수요팽창에 맞추어 기업화를 추진하는 것이 바람직하다. 본 연구개발로 이루어진 결과물을 참여업체에 이전하여 시장의 유동성에 대비한 기술적인 문제해결에 대비함으로써 기업화에 대한 준비를 할 예정이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

현재까지 알려진 바로는 세균이나 효모가 생산하는 phytase에 비해 곰팡이가 생산하는 phytase의 활성이 높고 기질특이성이 광범위하여 사료첨가물로서 효능성이 크다고 알려져 있다. 이러한 관점에서 특히 내열성 phytase를 개발하기 위한 다양한 곰팡이를 검색하여 유전자원의 확보에 치중하고 있다. 그리고 내열성 phytase와 중온성 phytase의 유전자서열을 분석한 결과로 유전자 구조보다는 효소의 glycosylation에 중점을 두고 연구되고 있는 group도 있다. 한편 phytate가 많이 함유된 canola, 대두 등의 식물의 종자에 곰팡이 phytase를 형질전환시켜, 사료원으로 사용시 내재되어 있는 phytase의 활성을 유도하여 종자자체에 있는 phytase를 활용하기 위한 방법도 시도되고 있다. 그러나 이러한 방법은 특히 GMO의 안정성에 대한 우려로 인해 즉시 사업화하기는 매우 어려울 것으로 전망된다.

Phytase의 필요성에 대한 연구는 BASF사와 NOVO사가 주도적으로 행하고 있으며, 미농무성의 phytase에 관한 연구는 주로 기초연구에 국한된 실정이다.

## 제 7 장 참고문헌

1. Al-Asheh, S. and Duvnjak, Z. 1995. The effect of phosphate concentration on phytase production and the reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during a solid-state fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43; 25-30.
2. Choli, T., Kapp, U., and Wittmann-Liebold, B. 1989. Blotting of proteins onto immobilon membranes: in situ characterization and comparison with high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 476, 59-72.
3. Couzy F, Mansourian R, Lavate A, Guinchard S, Montagne DH, Dirren H. 1998. Effect of dietary phytic acid on zinc absorption in the healthy elderly, as assessed by serum concentration curve tests. *Br J Nutr.* 80(2): 177-82.
4. Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Mullaney, E.J., Dischinger, H.C., and Ullah, A.H.J. 1993. Identification and cloning of a second phytase gene (phyB) from *Aspergillus niger (ficcum)*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 195; 53-57.
5. Erdman, J. W. 1979. Oilseed phytate: nutritional implications, *J. Am. Oil Chem.*, 56, 736.
6. Ferguson L.R. and Harris PJ. 1999. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *Eur J Cancer Prev.* 8(1): 17-25.
7. Gibson, D.M. and Ullah, A.B.J. 1990. Phytases and their action on phytic acid. *Inositol Metabolism in Plants.* Wiley-Liss Inc., pp 72-92.
8. Graf, E., Empson, K. L., and Eaton, J. W. 1987. *J. Biol. Chem.* 262, 11647-11650.
9. Greaves, M. P., Anderson, G., and Webley, D. M. 1967. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aeromonas aerogens*. *Biochem. Biophys. Acta.* 132, 412-418.
10. Greiner, R., Konietzny, U., and Jany, K.D. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 303; 107-113.
12. Han, Y., Wilson, D.B., Lei, X.G. 1999. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (phyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1915-1918.
12. Hashimoto, A. and Arai, K. 1985. The effect of pH on the thermostability of fish myofibrils. *Bull. Hapan. Soc. Sci. Fish.*, 51; 99-105 (in Japanese).
13. Hirabayashi M, Matsui T, Yano H. 1998. Fermentation of soybean flour with *Aspergillus usamii* improves availabilities of zinc and iron in rats. *J Nutr Sci Bitaminol(Tokyo).* 44(6): 877-86.
14. Howson, S. J., and Davis, R. P. 1983. Production of phytate hydrolyzing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 5, 377-382.
15. Irving, G.C J. and Cosgrove, D. J. 1971. Inositol phosphate phosphatase

- of microbiological origin some properties of partially purified Bacteril(*Pseudomonas* sp.) phytase. *Austr. J. Biol. Sci.* 24, 547-557.
16. Jariwalla, R. J., Sabin, R., Lawson, S., Bloch, D. A., Prender, M., and Herman, Z, S. 1988. Effects of dietary phytic acid (phytate) on the incidence and growth rate of tumors promoted in Fisher rats by a magnesium supplement, *Nutr. Res.*, 8; 813.
  17. Johnson IT. 1998. Antioxidants and anticarcinogens. *Eur J Cancer Prev.* 7:S55-62.
  18. Kim, Y. O., Kim, H. K., Yu, J. H., and Oh, T. K. 1997. Purification and properties of a thermostable phytase from bacillus sp DS II enzyme. *Microb. Technol.* 22, 2-7.
  19. Kim et al., 1998. Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from bacillus sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1: 162(1): 185-191.
  20. Kim et al., 1999. Medium composition of *Aspergillus oryzae* PF for the production of proteolytic enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27(5): 404-409.
  21. Kim, H.R. 1999. Purification and characterization of phytases from *Aspergillus* sp. 5990. *Marine Biol. Res.* 5: 123-134.
  22. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227; 680-686.
  23. Latta, M. and Eskin, M. 1980. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agric. Food Chem.* 28; 1313-1315.
  24. Lott, J. N. A. 1984. Accumulation of seed reserves of phosphorus and other minerals, in *Seed Physiology*, Sydney, Academic Press.
  25. Maga, J. A. 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance and methods of analysis, *J. Agri. Food Chem.*, 30; 1.
  26. Nelson, T. S., Shieh, T. R., Wodzinski, R. J., and Ware, J. H. 1968a. The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poult. Sci.* 48, 1842-1848.
  27. Nelson, T. S., Ferrara, L. W., and Storer, N. L. 1968b. Phytate phosphorus content of feed ingredients derived from plants. *Poult. Sci.* 48, 1372-1373.
  28. Nelson, T. S., Shieh, T. R., Wodzinski, R. J., and Ware, J. H. 1971. Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *J. Nutr.* 101, 1289-1294.
  29. Oh, M.J. 1999. Personal communication.
  30. Ongusaha PP, Hughes PJ, Davey J, Michell RH. 1998. Inositol hexakisphosphate in *Schizosaccharomyces pombe*: synthesis from Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> and osmotic regulation. *Biochem J.* 335(Pt3): 671-9.
  31. Owen RW, Spiegelhalter B, Bartsch H. 1998. Phytate, reactive oxygen species and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev.* 7(2): S41-54.
  32. Panchal, T. and Wodzinski, R.J. 1998. Comparison of glycosylation patterns of phytase from *Aspergillus niger* (A. ficuum) NRRL 3135

- and recombinant phytase. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 28, 201-217.
33. Porres JM, Stahl CH, Cheng WH, Fu Y, Roneker KR, Pond WG, Lex XG. 1999. Dietary intrinsic phytate protects colon from lipid peroxidation in pigs with a moderately high dietary iron intake. *Proc Soc Exp Biol Med.* 221(1):80-6.
  34. Powar, V.K. and Jagannathan, V. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 151: 1102-1108.
  35. Reddy, N. R., Sathe, S. K., and Salunkhe, D. K. 1982. Phytates in legumes and cereals, *Adv. Food Res.*, 28; 1.
  36. Reddy BS. 1999. Role of dietary fiber in colon cancer: an overview. *Am J Med.* 106(1A): 16S-19S; discussion 50S-51S.
  37. Richardson, A.E. and Hadobas, P.A. 1997. Soil isolates from pseudomonas spp. that utilize inositol phosphates. *Can. J. Microbiol.* 43; 509-516.
  38. Rimbach G, Rallauf J. 1998. Phytic acid inhibits free radical formation in vitro but does not affect liver oxidant or antioxidant status in growing rats. *J Nutr.* 128(11): 1950-1955.
  39. Rimbach G, Pallauf J. 1999. Effect of dietary phytate on magnesium bioavailability and liver oxidant status in growing rats. *Food Chem Toxicol.* 37(1): 37-45.
  40. Rodriguez, E., Han, Y., and Lei, X.G. 1999b. Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 117-123.
  41. Shears, S. B. 1998. The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochim Biophys Acta.* 1436(1-2): 49-67.
  42. Shieh, T. R., and Ware, J. H. 1968. Survey of micro-organism for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.* 16, 1348-1351.
  43. Shieh et al., Wodzinski, R. J., and Ware, J. H. 1969. *J. Bacteriol.* 100, 1161-1165.
  44. Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis (natto)* N-77. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1266-1269.
  45. Tambe, S. M., Kaklij, G. S., Kelkar, S. M., and Parekh, L. J. 1994. *J. Ferment. Bioeng.* 77, 123-127.
  46. Thompsom, L. U. 1986. In "Phytic Acid: Chemistry and Applications." (E. Graf, ed.), pp. 173-194. Pilatus Press, Minneapolis, MN.
  47. Ullah, A.H.J. and Mullaney, E.J. 1996. Disulfide bonds are necessary for structure and activity in *Aspergillus ficuum* phytase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 227; 311-317.
  48. Ullah and Shamsuddin, 1990. Differences in the active site environment of *Aspergillus ficuum* phytases. *Biochem. Biophys. Commun.*, 243(2): 458-462.
  49. Vohra, P., Gray, G. A., and Kratzer, F. H. 1965. Phytic acid-metal complexes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 120; 447.

50. Vucenik I, Tantivejkul K, Zhang Zs, Cole KE, Saied I, Shamsuddin AM. 1998 IP6 in treatment of liver cancer. I. IP6 inhibits growth and reversed transformed phenotype in HepG2 human liver cancer cell line. *Anticancer Res.* 18(6A): 4083-90.
51. Vucenik I, Zhang ZS, Shamsuddin AM. 1998. IP6 in treatment of liver cancer. II. Intra-tumaoral injection of IP6 regressed pre-existing human liver cancer xenotransplanted in nude mice. *Anticancer Res.* 18(6A): 4091-6.
52. Whitaker et al., 1963. Determination of molecular weights proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.*, 35, 1850-1853.
53. Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Remy R, Fimbel R, Oesterhelt G, Lehmann M, van Loon AP. 1999. Biochemical characterization of jungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl Environ Microbiol.* 65(2): 367-73.
54. Yoon, S.J., Choi, Y.J., Min, H.K., Cho, K.K., Kim, J.W., Lee, S.C., and Jung, Y.H. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme and Microbial. Technol.* 18: 449-454.
55. Yanming Han and Xin Gen Lei. 1999. Role of Glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phy*) in *Pichia pastoris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 364:83-9055.
56. Wodzinski, R.J. and Ullah, A.H. 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302.
57. Joao, H.C., Scragg, I.G., Dwek, R.A., 1992. Effects of glycosylation on protein conformation and amide proton exchange rates in RNase B. *FEBS Lett.* 307: 343346
58. Rudd, P.M., Joao, H.C., Coghill, E., Fiten, P., Saunders, M.R., Opdenakker, G., Dwek, R.A., 1994. Glycoforms modify the dynamic stability and functional activity of an enzyme. *Biochemistry* 33: 1722.
59. Pfeffer, S.R., Rothman, J.E., 1987. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 82985259.
60. Cassader, M., Ruiiu, G., Gambino, R., Guzzon, F., Pagano, A., Veglia, F., Pagni, R., Pagano, G., 1994. Influence of Marquardt, T., Helenius, A., 1992. Misfolding and aggregation of newly synthesised proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 117: 505513.
61. Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., and van Loon. A. P. G. M. 1997. Gene cloning, purification, and characterization of heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1696-170055.
62. Ullah, A. H. J., and D. M. Gibson. 1987. Extracellular phytase (EC. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep. Biochem.* 17:63-91.62.
63. Markus Wyss, Luis Pasamontes, Arno Friedlein, Roland Remy, Michel Tessier, Alexandra Kronenberger, Anke middendorff, Martin Lehmann,

- Line schnoebelen, Urs Rothlisberger, Eric kuszniir, Guido Wahl, Francis Muller, Hans-werner lahm, kurt vogel, and Adolphus P. G. M. van Loon. 1999b. Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): Molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:359-366.
64. Mullaney. E. J, Daly. C. B, Sethumadhavan. K, Rodriquez, E, Lei. X. G, and Ullah. H. J. 2000. Phytase activity in *Aspergillus fumigatus* isolates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275:275-763.
65. Ullah, A.H.J., Sethumadhavan, K., Lei, X.G., and Mullaney, E.J. 2000. Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 275, 279-285.
66. Berka, B.M., Rey, M.W., Brown, K.M., Byun, T., and Klotz, A.V. 1998. Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4423-4427.
56. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.56.
57. Carl W. Dieffenbach, Gabriela S. Dveksler. 1995. PCR Primer: a laboratory manual. CSHL Press.381-409.57.