

최 종
연구보고서

구조해석과 DNA shuffling 기술을 이용한
내열성 및 내산성 phytase의 개발에 관한 연구

Studies on Development of
A Thermostable and Acid Tolerant Phytase
by Structural Analysis and DNA Shuffling Technology

연 구 기 관
아 미 코 젠 (주)

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “구조해석과 DNA shuffling 기술을 이용한 내열성 및 내산성 phytase의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 07 월 26 일

주관연구기관명 : 아미코젠(주)

총괄연구책임자 : 김 영 수

세부연구책임자 : 김 영 수

연 구 원 : 정 경 화

연 구 원 : 박 철

연 구 원 : 김 종 덕

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 신 용 철

협동연구기관명 : 연암축산원예대학

협동연구책임자 : 장 재 익

요 약 문

I. 제 목

구조해석과 DNA shuffling 기술을 이용한 내열성 및 내산성 phytase의 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

Phytase란 곡물(콩, 보리, 옥수수 등)속에 1~2% 포함된 phytic acid를 분해하여 인산을 유리시켜 가축이 이용하도록 하게 하는 유용한 산업적 효소이다. 단위동물인 돼지, 닭은 phytic acid를 분해할 수 효소(phytase)를 가지고 있지 않기 때문에 사료 첨가제로서 필수불가결한 성분이다. 사료에 있어서 phytase의 필요성은 사료에 별도의 인산염을 첨가할 필요가 없게 하고, 단위동물인 돼지나 가금류의 경우에는 장내에 이 효소를 분비하는 미생물군이 결핍되어 사료중의 phytic acid를 분해 흡수하지 못하므로 이들이 가지고 있는 인들의 대부분이 동물의 분변 폐기물에 함유되어 자연계에 배출되므로 환경오염에 큰 요인을 차지하고 있다. 지금까지 국내를 포함한 세계는 단위동물에 최적의 phytase를 생산하지 못하고 있다. 이에 본 연구팀은 본 연구를 통하여 사료첨가제 용도로서 적합한 효소 반응특성을 지닌 phytase 및 개량효소 고생산 균주를 개발하고 산업적 생산의 기틀을 마련하여 환경오염 방지와 수입대체 효과를 동시에 얻고자 한다.

2. 연구개발 필요성

단위동물을 위한 사료 (특히 양돈, 양계사료) 내에 함유된 곡물 중의 인 복합체 (phytate)는 동물의 체내에서 분해되지 않고 분변으로 배출되어 환경 오염의 큰 요인으로 작용하고 있다. 또한 phytate는 사료내의 미량 영양원인 여러 금속이온들과 착화합물을 강하게 형성할 뿐만 각종 단백질들과 결합되어 있으므로 단위동물의 미량원소와 단백질의 소화흡수에 장애를 일으킨다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 유력한 대안으로 사료 첨가제로써 phytate 분해효소인 phytase (EC 3.1.3.8)를 사용하는 방법이 적용되고 있다. Phytase

를 사료에 첨가하였을 경우에 인산염 첨가량을 획기적으로 줄임과 동시에 가축들의 무기금속 이온들에 대한 효용성 및 단백질 소화율이 증가하여 생산성을 증진시킬 뿐만 아니라 유효 인의 배설을 50%까지 감소시킬 수가 있게 된다. 이러한 점에 착안하여 네덜란드를 비롯한 구미 지역에서는 축산 폐기물에서 배출되는 인의 함량을 감소시킬 목적으로 사료에 phytase 첨가를 유도하고 있고 국내 배합사료에도 phytase 사용이 증대되는 추세에 있다.

21세기에 접어들면서 환경문제가 전산업·전분야에 걸쳐서 중요한 요소로 대두되고 있다. 따라서 전세계는 축산 폐수의 인 함량을 규제하는 추세에 있다. 우리나라도 예외가 아니어서 총 인의 함량에 대한 규제가 예상되므로 오염 배출원들에 대한 근본적인 인의 함량을 낮추는 문제는 경제적·환경적인 측면에서 중요한 사항이 되고 있다. 따라서 phytase의 사용은 필수적으로 예상된다. 특히 국내 축산농가의 경우에 축산분뇨의 해양투기도 환경적 문제로 한계에 이를 것으로 예상되며, 질소와 인의 함량을 낮추기 위한 폐수처리도 경제적 문제로 인하여 많은 어려움을 겪을 것으로 예상된다. 이러한 상황을 고려하여 국내 배합사료 제조회사들은 사료 내 phytase 첨가 필요성을 절감하고 있으며, 실제 phytase 사용을 점차 확장하는 추세에 있고 앞으로는 phytase 효소제 시장이 급격하게 확대될 것으로 예상된다. 이러한 상황들을 고려해 볼 때 국제경쟁력을 지닌 phytase 효소제의 개발은 절실하게 요구된다고 사료된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 양계 및 양돈용 사료 첨가제로서의 phytase 효소제 개발에 관한 것이다. 그런데, phytase가 단위동물을 위한 사료첨가제로 개발되기 위해서는 phytase가 갖추어야 할 몇가지 효소적 특성들이 있는데, 그 중에서 내열성, 내산성, 중성 pH와 중온에서의 높은 비활성, 단백질분해효소에 대한 저항성 등이 특히 중요하다고 할 수 있다. 그러나 지금까지 국내를 포함한 전 세계적으로 단위동물을 위한 최적의 phytase를 생산하지 못하고 있다. 즉, 이미 상용화되어 있는 곰팡이 유래 phytase는 내산성이 강한 반면에 내열성이 약하고, *Bacillus* 유래 세균성 phytase는 내열성은 강하나 내산성이 약한 단점이 있다. 따라서, 외국의 많은 기업들은 단위동물을 위한 사료첨가제 용도로 더욱 적합한 최적의 phytase 유전자원을 지속적으로 발굴·개발하고자 하는 노력이 진행되고 있다. 그러므로 사료첨가용 phytase 효소제를 개발하기 위해서는 사료첨가제 용도에 적합한 특성을 지닌 효소 유전자원

의 개발이 필수 선결과제라고 판단된다. 본 과제 연구에서는 내열성이 좋은 *Bacillus* 유래 phytase에 내산성을 부여함으로써 사료첨가제 용도에 더욱 적합한 최적 phytase 유전자원을 개발하고 궁극적으로는 사료첨가제용 phytase 효소제를 개발하고자 하였다. 그러므로 본 과제 연구에서는 최적 phytase 유전자원의 개발, 특히 분자진화기술을 이용한 내열성 phytase의 내산성 증진 개량 연구가 본 과제 연구의 핵심요소라고 할 수 있다.

본 연구 과제에서는 단위동물을 위한 phytase 효소제를 개발하기 위해서 우선적으로 토양으로부터 phytase를 생산하는 *Bacillus* 균주를 선발하고, 이 분리균주로부터 phytase 유전자의 클로닝 및 분리균주가 생산하는 phytase의 반응특성을 분석하고, 그 후에 주관연구기관에서 개발한 분자진화기술을 적용하여 내열성 phytase에 내산성을 부여하고, 또한 내열성·내산성 phytase의 비활성을 증진시키고, 그 후에 개량 phytase 고생산 균주의 개발 및 발효조건 최적화를 수행하고, 배양액으로부터 phytase 정제공정을 확립하고, 최종적으로 phytase 효소제 시제품을 사용한 동물시험을 통하여 개량 phytase의 효용성을 검증하고자 하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

자연계로부터 phytase를 생산하는 미생물을 탐색하여 내열성이 뛰어나고 내산성이 상대적으로 우수한 phytase 생산 균주를 최종적으로 1개 선발하였고, *Bacillus licheniformis* 균주로 동정된 본 과제 분리 균주를 *B. licheniformis* SP4로 명명하였다. 또한, *B. licheniformis* SP4 균주의 배양액으로부터 44 kDa 크기의 phytase 단백질을 순수 분리하여 반응특성을 조사하였다. 그 결과, 본 과제 phytase는 60°C와 pH 8.0에서 최고의 활성을 나타냈다. 그리고 이 SP4 phytase는 낮은 pH에서는 쉽게 실활되지만 75°C까지 안정하고 80°C에서 10분간 방치하여도 50% 이상의 잔존활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

그 후에 *B. licheniformis* SP4 균주로부터 phytase 유전자를 분리하여 대장균에서 클로닝을 하였고, 이 phytase 유전자의 염기서열을 결정하여 특성분석을 완료하였다.

분자진화기술을 적용하기 위해서 내산성이 증대된 phytase mutant를 효율적으로 선별할 수 있는 nitrocellulose membrane을 이용한 초고속 탐색기술을 확립하였다. 그 후에 1·2차년도 연구를 통하여 모두 5차례에 걸친 분자진화를 수행하여 최종 SM2로 명명된 내열성·내산성 phytase를 개발하였다. SM2 phytase는 25°C, pH 3.0에서의 내산성이 wild type phytase에 비하여 100배 이상 증가하였고, 37°C에서도 pH 3.0에서 1시간 방치하였을

때 80% 이상의 높은 잔존활성을 유지하였다. 그리고, SM2 phytase의 내열성은 wild-type과 비슷한 수준을 나타내어 75℃까지 안정하고 80℃에서 10분간 방치하여도 50% 이상의 잔존활성을 나타냈다. 또한, SM2 phytase는 동물의 소화효소인 trypsin, chymotrypsin, pepsin과 같은 단백질분해효소의 작용에 대해서도 매우 안정하였다.

본 과제 of 내열성·내산성 SM2 phytase의 비활성 증진 개량을 위해서 모두 2차례에 걸친 분자진화를 수행하여 최종 Re84로 명명된 내열성·내산성 SM2 phytase의 비활성 증진 변이체를 선발하였다. Re84 phytase의 내열성 및 내산성은 SM2 phytase의 내열성 및 내산성과 비슷한 수준이었지만 비활성이 SM2 비활성 대비 약 2.4배가 증가한 것을 확인하였다.

본 연구의 phytase 유전자를 강력한 *Bacillus* promoter가 들어있는 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector에 도입하고 이 플라스미드를 함유한 재조합 *B. subtilis* DB431 균주를 제조하여 플라스크 배양을 수행한 결과, *B. licheniformis* SP4 균주 phytase 생산성의 약 40배에 해당하는 2 U/ml 수준의 야생형 phytase 생산성을 확보하였다. 그 후에 phytase 생산성을 부가적으로 증가시키기 위해 *B. subtilis* DB431 숙주균의 무작위 돌연변이를 수행하여 phytase 생산성이 2.1배 증가한 B34 변이 숙주균을 개발하였다. 그 결과, B34 (pJH27-phy4) 균주, B34 (pJH27-SM2) 균주 및 B34 (pJH27-Re84) 균주의 LB 배지를 사용한 플라스크 배양에서 phytase 최대 생산성이 각각 3.9 U/ml (야생형), 2.1 U/ml (내열성·내산성 변이형), 5.3 U/ml (내열성·내산성 비활성·증진 변이형)로 확인되었다.

Phytase 생산성을 증가시키기 위하여 *B. subtilis* DB431 (pJH27-SM2) 균주의 플라스크 규모 배양을 통하여 배지 최적화 연구를 수행한 결과, LB 배지에서의 phytase 생산성 대비 약 10배의 생산성 증가를 가능케 한 최적 배지를 개발하였다. 이 최적배지 상에서의 *B. subtilis* DB431 (pJH27-SM2) 균주 및 B34 (pJH27-Re84) 균주의 플라스크 규모에서의 phytase 최대 생산성은 각각 약 12 U/ml 및 약 57 U/ml로 나타났다.

B. subtilis DB431 (pJH27-SM2) 균주를 대상으로 2L 및 30L 규모 발효를 통하여 발효조건을 최적화하였다. 또한, 30L 발효액을 사용하여 연속 원심분리기를 이용하여 균체를 제거하고, 제균된 효소액을 한외여과막으로 농축 및 세척하고, 그 후에 동결건조를 수행함으로써 분말 효소를 제조하였다. 그 결과, 개량 phytase의 최종 회수율은 80% 이상으로 높게 나타나 산업적으로 이용 가능한 정제공정을 개발하였다.

B. subtilis DB431 (pJH27-SM2) 균주를 대상으로 300L 규모 발효를 수행하여 상기 공정에 따라 시제품 (1,700 FTU/g)를 제조하였고, 이 내열성·내산성 phytase 효소제를

산란계 동물시험을 위한 사료첨가제로 협동연구기관에 공급하였다.

본 과제외의 *B. licheniformis* sp. SP4 유래 내열성·내산성 개량 phytase의 실제 산업현장에서의 효용성을 검증하기 위해서 산란계 동물시험을 실시하였다. 이 때, 옥수수-대두박 위주의 산란계 사료에 인의 공급량을 NRC 요구량의 68% 수준으로 조정하고 본 과제 개량 SM2 phytase를 각각 250 FTU, 500 FTU 및 1,000 FTU를 첨가한 구를 시험구로 하고, 처리당 7반복, 반복당 8수씩 총 392수의 52주령된 하이라인 브라운 산란계를 공시축으로 하여 완전임의배치법으로 시험을 수행하였다. 그 결과, 산란율, 연과란율 및 사료섭취량은 처리구간에 유의적인 차이가 없었으며 phytase의 종류와 첨가수준 간에도 차이가 없었다. 산란계의 산란능력과 난질의 결과를 볼 때, 급여사료에 인 공급량을 68% 수준으로 하고 본 과제 개량 phytase를 급여하면 산란계의 생산능력과 난질이 차이가 없어 phytase의 첨가로 인 공급량을 30%까지 감소시켜도 생산성에는 문제가 없다고 할 수 있다. 한편, 조단백질의 이용율은 본 과제 개량 phytase가 Natuphos phytase보다 높았으며, phytase의 함량이 증가함에 따라 조단백질의 이용율도 증가하였다. 인 이용율은 1,000 FTU를 첨가한 구가 가장 높았으며, phytase의 첨가수준간에는 첨가량이 증가함에 따라 증가하였다. 특히, 본 과제 개량 phytase는 500 FTU 이상은 무처리와 차이가 없어 인 공급량을 30% 감소할 경우 500 FTU를 첨가하는 것이 좋을 것으로 판단된다. 또한, 산란계의 분 배설량은 phytase 첨가량이 증가함에 따라 분배설량은 감소하였다. 인 배설량은 무처리보다 phytase 첨가구가 배설량이 적었으며, phytase의 첨가수준이 증가함에 따라 인 배설량은 감소하였다. 산란계의 건물 및 인 배설량 결과를 볼 때 phytase 첨가구는 대조구보다 분 배설량이 줄었으며, 특히 phytase 500 FTU 이상에서 효과가 있었다.

본 과제 연구결과를 사업화하기 위해서는 과제 종료 이후에 수개월간의 내열성·내산성 phytase의 비활성 증진 연구가 추가로 필요하고 그 후에 최종 개량 phytase를 사용한 육계 및/또는 양돈 사양시험을 수행해야 할 것으로 판단된다.

본 과제의 사료첨가용 phytase 개발에 따른 기술 및 자원은 본 연구에 참여하고 있는 기업체인 아미코젠(주)에서 산업화를 추진하여 외국 거대기업으로의 기술이전을 우선적으로 추진하고 이후에 국내생산을 도모하고자 한다.

SUMMARY

Phytate phosphorous is the major storage form of phosphorous in almost all seed plants. This phytate phosphorous has low phosphorous availability, which lead to the use of inorganic phosphorous sources to meet the phosphorous requirement of poultry. Therefore, large amounts of phosphorous are unabsorbed and excreted through poultry excreta. Therefore, there have been many studies on phytase supplementation and the use of enzymes as feed additives is well established. During recent years, focus has been on the utilization of natural phosphorus bound in phytic acid in cereal-based feed for mono-gastrics. Better utilization of total plant phosphorus, of which 85-90% is bound in phytic acid, is only obtained by adding the enzyme phytase to the feed. The most recent advanced in feed enzymes have been aimed at improvements in the applicability and performance of phytases. The ability of any given phytase to hydrolyze phytate-P in the digestive tract is determined by its enzymatic properties, such as catalytic efficiency, substrate specificity, temperature and pH optima and stability, and resistance to proteolysis. In this research project, we have developed the *Bacillus licheniformis* sp. SP4 phytase as a feed additive enzyme.

First of all, a bacterial strain producing high level of a thermostable phytase was isolated from soil. From the results of the physiological and biochemical characteristics and photomicrograph, the strain SP4 was identified as a *Bacillus licheniformis* strain. This strain was named as *Bacillus licheniformis* sp. SP4.

An extracellular phytase from the *B. licheniformis* SP4 cultures was purified to homogeneity and its molecular weight was estimated to be 44 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Its optimum temperature for phytase activity was 60°C and about 40% of its original activity remained after incubation at 90°C for 10 min in the presence of 5 mM CaCl₂. The optimum pH for activity was 8.0 and fairly stable ranging of pH 3.5~10.0. As for substrate specificity, it was very specific for phytate and no activity on other phosphate esters. This phytase hydrolyses only three phosphates from phytic acid.

The gene encoding phytase from *B. licheniformis* SP4 was cloned and its sequence was determined. Nucleotide sequence analysis of the gene revealed an open reading frame of 1,152 base pairs and encodes a polypeptide of 383 amino acids. This phytase gene, designated *phy4*, had 98.2%, 93.2%, 98.2%, and 64.9% identities with *TS-phy* (*B. amyloliquefaciens*), *phyC* (*B. subtilis* VTT E-68013), *168phyA* (*B. subtilis* 168), and *phyL* (*B. licheniformis*) in protein level, respectively.

For industrial applications in animal feed, a phytase of interest must be stable in the acidic pH of the stomach. In this study, we have used directed molecular evolution technologies to improve acid-stability of the *B. licheniformis* SP4 phytase. The mutant libraries were generated by error-prone PCR, RETT technique, and saturation mutagenesis technique, and positive clones with improved acid-tolerance were screened on the basis of high-throughput screening method using the nitrocellulose membrane. Five rounds of directed evolution (error-prone PCR → RETT → saturation mutagenesis → error-prone PCR → saturation mutagenesis) resulted in the best mutant SM2 with a significantly improved acid-tolerance. Acid-tolerance of the evolved enzyme SM2 was 100 times higher than that of wild-type phytase on the half-life at pH 3.0. DNA sequence analysis revealed that seven amino acid residues were substituted in the SM2 phytase.

The protease stabilities of the wild-type and the variant phytase, SM2, were tested with trypsin, chymotrypsin, and pepsin. Both enzymes were stable against digestion of trypsin and chymotrypsin. Wild-type enzyme was rapidly degraded by pepsin. However, the acid-stable SM2 phytase showed 85% residual activity after pepsin digestion. This result indicates that the pepsin sensitivity of the wild-type enzyme is most likely due to denaturation of the enzyme as a result of low pH making it more susceptible for pepsin. It seemed that acid-stability of SM2 enzyme gives stability to pepsin digestion.

The variant phytase, SM2, has high thermostability and resistance to low pH and proteolysis (trypsin, chymotrypsin, and pepsin). These enzymatic properties improve the bioavailability and digestibility of phytic acid phosphorus in the diet, and also increase the processibility of phytase as a feed additive. For the use of the SM2

phytase in the feed industry, further studies about developing more cost-effective expression systems are needed. Nevertheless, SM2 phytase has the potential as a successful feed additive for monogastric animals to improve phosphorus digestibility for industrial applicability.

To determine if the SM2 phytase supplementation can reduce non-phytate phosphorus(NPP) level in laying diets, a 6 week feeding experiment was conducted with 392 High Line Brown laying hens, 52 weeks old. The experiment consisted of seven dietary treatments: C, control diet with 0.25% NPP(0.47% total P); P250, 0.17% NPP(0.39% total P) diet with 250 FTU of microbial phytase/kg of diet; P500, 500 FTU of microbial phytase/kg of diet ; P1,000, 1,000 FTU of SM2 phytase/kg of diet ; N250, 0.17% NPP(0.39% total P) diet with 250 FTU of Natuphos phytase/kg of diet; ; N500, 500 FTU of Natuphos phytase/kg of diet; N1,000, 1,000 FTU of Natuphos phytase/kg of diet.

There were no statistical significances in egg production, egg weight, broken egg and feed intake among the seven treatments as well as the type and level of phytase. The strength and thickness of egg shell containing phytase was similar to those of control, but there were no significances among treatments. The utilization of crude protein and crude ash of P500 and P1,000 treatments were higher than other phytase treatments. The utilization of phosphorus in P1,000 treatment was the highest among all treatments, and that of P500 was similar to control. The utilization efficiency of phosphorus showed significant increase by the addition of phytase. The excretion of dry matter and phosphorus weights tended to decrease by the increment of the amount of phytase. Then, the dry matter and P weight of treatments with phytase were lower than control. In conclusion, supplementation of the SM2 phytase to normal corn-soybean diet improved egg production and can reduce non-phytate phosphorus level in the diet without affecting egg production and egg quality. Significant reduction of P excretion can be also achieved.

CONTENTS

Chapter 1. The outline of this research project	16
Section 1. The outline of a phytase	16
1. The outline of phytic acids	16
2. The outline of phytases	18
Section 2. The aim and necessity of this research project	22
1. The aim of this research project	22
2. The necessity of this research project	23
Section 3. The goal and major extents of this research project	24
1. The final goal of this research project	24
2. The annual goal and major extents of this research project	24
Chapter 2. The present status of technology developments in the inside and outside of the country	26
Chapter 3. The research contents and results by this project achievement	28
Section 1. Materials and methods	28
1. Materials	28
2. Methods for development of a feed-additive phytase	29
3. Methods for a feeding experiment with laying hens	37
Section 2. Isolation of a phytase-producing strain	41
1. Screening of a phytase-producing strain and its identification	41
2. Purification and characterization of the <i>B. licheniformis</i> SP4 phytase	42
Section 3. Cloning of the <i>B. licheniformis</i> SP4 phytase gene and determination of the its nucleotide sequence	53
1. Cloning of the <i>B. licheniformis</i> SP4 phytase gene	53
2. Nucleotide sequence of the <i>B. licheniformis</i> SP4 phytase gene	53
Section 4. Development of a thermostable and acid-tolerant phytase	

by directed molecular evolution technologies	56
1. Development of a high-throughput screening system	56
2. 1st improvement for endowing a thermostable phytase with acid-tolerance	58
3. 2nd improvement for endowing a thermostable phytase with acid-tolerance	63
4. 3rd improvement for endowing a thermostable phytase with acid-tolerance	67
Section 5. Specific activity improvement of a thermostable and acid-tolerant phytase by directed molecular evolution technologies	71
1. Development of a high-throughput screening system	71
2. Generation of a random mutant library by a Tn-RCM technology	72
3. Selection of the specific activity-improving phytase mutants	74
4. <i>In vitro</i> mutants recombination	76
5. Effectiveness of this research phytase as a feed-additive enzyme	77
Section 6. Development of a phytase-high producing strain and fermentation	78
1. Development of the phytase-high producing <i>B. subtilis</i> strains	78
2. Fermentation of a phytase-high producing strain and large-scale production of the thermostable and acid-tolerant phytase	82
Section 7. A feeding experiment with laying hens	86
1. The aim of a feeding experiment with laying hens	86
2. The results of a feeding experiment with laying hens	88
3. The feeding experiment results in availability and excretion of nutrients	94
Chapter 4. Achievement level against this research goal and contribution to related research fields	96
Section 1. The goal of this research project and research-evaluation points	96
1. The final goal of this research project	96
2. The annual goal and major extents of this research project	96
3. Points for evaluation of achievement level against this research goal	96
Section 2. Achievement level against this research goal	98
1. Isolation of a phytase-producing strain and phytase characteristics	98
2. Cloning of the <i>B. licheniformis</i> SP4 phytase gene	98

3. Development of a thermostable and acid-tolerant phytase	99
4. Specific activity improvement of a thermostable and acid-tolerant phytase	99
5. Crystallization of a thermostable and acid-tolerant phytase	100
6. Development of a phytase-high producing strain and fermentation	101
7. A feeding experiment with laying hens	102
Section 3. Contribution to related research fields	103
Chapter 5. Practical use plan of the project results	104
Section 1. The necessity of further research	104
Section 2. Application to other research fields	105
Section 3. Commercialization of the project results	107
Chapter 6. State of the foreign research informations	110
Section 1. Reduction of animal wastes	110
Section 2. Environmental effect of phosphorous excretion	111
Section 3. Phytate phosphorus	112
Section 4. Three dimensional structures of various phytases	113
Section 5. Reaction properties of various phytases	115
Section 6. Nutritional effects for animal by the phytase addition to animal feeds	119
1. Pigs	119
2. Broilers and laying hens	121
Chapter 7. References	123

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	16
제 1 절 Phytase 개요	16
1. Phytic acid 개요	16
2. Phytase 개요	18
제 2 절 연구개발 목적 및 필요성	22
1. 연구개발 목적	22
2. 연구개발 필요성	23
제 3 절 연구개발 목표 및 주요 연구내용	24
1. 연구개발 최종목표	24
2. 년차별 연구개발 목표 및 주요 연구내용	24
제 2 장 국내외 기술개발 현황	26
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	28
제 1 절 실험 재료 및 방법	28
1. 실험 재료	28
2. Phytase 효소제 개발 연구의 실험 방법	29
3. 산란계 동물시험 연구의 실험 방법	37
제 2 절 Phytase 생산균주의 선발	41
1. Phytase 생산균주의 탐색 및 동정	41
2. <i>Bacillus</i> sp. SP4 균주가 생산하는 phytase의 정제 및 반응특성 분석	42
제 3 절 Phytase 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정	53
1. Phytase 유전자의 클로닝	53
2. SP4 phytase 유전자의 염기서열 분석	53
제 4 절 분자진화기술에 의한 내열성·내산성 phytase의 개발	56
1. 내산성 증진 변이체 선별을 위한 High-throughput screening system 개발	56
2. 내열성·내산성 phytase 개발을 위한 1차 개량	58

3. 내열성 · 내산성 phytase 개발을 위한 2차 개량	63
4. 내열성 · 내산성 phytase 개발을 위한 3차 개량	67
제 5 절 분자진화기술에 의한 내열성 · 내산성 phytase의 비활성 증진	71
1. 비활성 증진 변이체 선별을 위한 High-throughput screening system 개발	71
2. Tn-RCM 기술을 이용한 random mutant library의 제조	72
3. Tn-RCM library로부터 비활성 증진 phytase mutant의 선발	74
4. 부가적인 비활성 증진을 위한 <i>in vitro</i> mutants recombination	76
5. 개량 phytase의 사료첨가제로서의 효용성 평가	77
제 6 절 개량효소 고생산 균주의 개발 및 발효	78
1. 개량효소 고생산 <i>B. subtilis</i> 균주의 개발	78
2. 개량 효소 고생산 균주의 발효 및 개량 효소의 대량 생산	82
제 7 절 Phytase 효능 분석을 위한 동물시험	86
1. 산란계 동물시험의 목적	86
2. 산란계 사양시험 결과	88
3. 산란계 대사시험 결과	94
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	96
제 1 절 연구개발 목표 및 평가의 착안점	96
1. 연구개발 최종목표	96
2. 년차별 연구개발 목표 및 주요 연구내용	96
3. 연구평가의 착안점	96
제 2 절 연구개발 목표의 달성도	98
1. Phytase 생산균주의 선발 및 순수정제 phytase의 반응특성 분석	98
2. Phytase 유전자의 클로닝 및 특성분석	98
3. 분자진화기술에 의한 내열성 및 내산성 phytase의 개발	99
4. 분자진화기술에 의한 내열성 · 내산성 phytase의 비활성 증진 개량	99
5. Phytase 초순수분리 및 최적 결정화 조건 확립	100
6. 개량효소 고생산 균주 개발 및 발효	101
7. 개량효소 동물사양시험	102
제 3 절 관련 분야에의 기여도	103

제 5 장	연구개발결과의 활용계획	104
제 1 절	추가연구의 필요성	104
제 2 절	타연구에의 응용	105
제 3 절	기업화 추진방안	107
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	110
제 1 절	축산 폐기물의 감소 방안	110
제 2 절	인 배설이 환경에 미치는 영향	111
제 3 절	Phytate phosphorus	112
제 4 절	Phytase 3차 구조	113
제 5 절	Phytase 특성 연구	115
제 6 절	가축에 있어서 Phytase 의사용 효과	119
1.	돼지	119
2.	육계와 산란계	121
제 7 장	참고문헌	123

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 Phytase 개요

1. Phytic acid 개요

가. Phytic acid의 화학 구조

곡물, 콩류, 유지종자에서 인은 주로 phytic acid의 염 형태로 존재한다. Phytic acid는 여러 가지 금속이온, 미네랄, 단백질과 복합체를 형성하여 존재하며 식물의 발아와 생육에 중요한 작용을 한다. Phytic acid는 화학명으로 *myo*-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakis dihydrogen phosphate로서 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등 양이온과 결합된 복합물질을 phytate라고 한다 (1).

Phytic acid (*myo*-inositol hexakisphosphate)는 cyclic inositol에 6개의 인산군이 각각 mono-ester 결합으로 만들어진 물질로서 칼슘, 마그네슘, 철, 아연 등과 같은 양이온과 결합하여 염의 형태인 phytate로 존재한다 (Fig. 1) (2, 3). Costello 등은 P-NMR과 pH 적정법으로 phytic acid의 pK_a 값을 측정해 본 결과, 인의 개수에 따라서 1.1~12.0으로 넓은 범위에 있었다 (4). 이런 것을 볼 때 phytic acid는 넓은 pH 범위에서 여러 가지 양이온과 positive charge를 띤 단백질들과 강한 결합의 복합물을 형성할 수 있음을 알 수 있었다 (5).

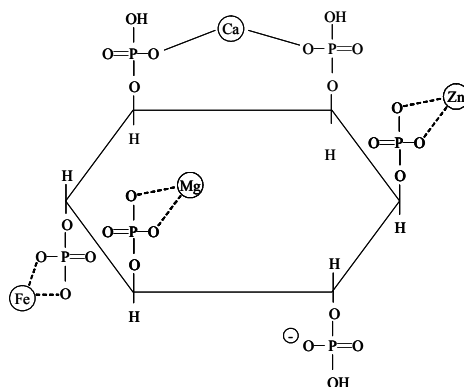


Fig. 1. Structure formula of *myo*-inositol hexakisphosphate (phytate)

나. Phytic acid의 생리적 기능

곡물과 식물의 종자에 있어서 phytic acid는 중요한 역할을 하고 있다. (i) 인의 저장, (ii) 에너지의 저장, (iii) 금속이온의 저장, (iv) myo-inositol의 저장 (세포막의 전구체), (v) 종자의 휴지 등에 있어서 phytic acid의 기능은 절대적이다 (6). 최근에는 식물과 동물세포의 signal transduction에 있어서 phytic acid의 역할에 관한 연구가 진행되고 있다 (7-10). 그 외 phytic acid 또는 inositol intermediate은 항산화제로서 전분 소화율과 혈액 글루코스 반응 (11), 종양형성, 알츠하이머, 파킨슨병의 치료 (12)와 콜레스테롤과 triglycerides의 감소 (13), 다양한 경화증 (sclerosis)의 치료 (14)와 관련 있다고 보고되었다. 이러한 여러 가지 phytic acid의 광범위한 영양학적, 의학적 중요성은 주로 myo-inositol, di-, tri-, tetra-와 penta-phosphate esters와 다른 다가 양이온과의 상호작용에 있다고 한다 (15).

다. Phytic acid의 항영양작용

사료원료로 사용되는 여러 가지 곡류에는 영양소의 이용성을 방해하는 물질들이 있다. 이러한 물질들을 항영양성 인자 (Anti-nutritional factors, ANF)라 하는데 이것은 생체 내에 이들을 분해할 효소가 없든지 부족하기 때문이다. Phytic acid는 6개의 인 그룹으로 하여 강한 negative charge를 띠고 있다. 때문에 phytic acid는 2가와 3가 양이온인 Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} 와 Fe^{3+} 그리고 미량 미네랄인 Mn^{2+} , Cu^{2+} , Mo^{2+} 와 결합하거나 또는 단백질과 결합하여 동물들이 이용할 수 없는 불용성 복합물을 형성한다 (16-18).³⁻⁵⁾ 따라서 사료에 가축의 성장에 필요한 영양성분을 고농도로 첨가하여 왔다. 만일 사료 내에 phytate를 분해할 수 있는 미생물 phytase를 첨가하면 phytate에 의해 chelating된 영양분의 소화율을 높이고 환경문제를 일으키는 무기물의 배출을 줄일 수 있다. Simon과 Versteegh는 2주령 병아리 사료에 750units/kg의 phytase를 첨가한 결과 칼슘과 인의 이용율이 약 65%나 증대되었다고 하였다 (19). 또한 Saylor 등은 병아리에 phytase를 급여하였을 때 인의 배설량은 34%까지 감소하였다고 하였다 (20).

2. Phytase 개요

가. Phytase의 정의와 그 분포

Phytase (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase)는 phytate를 lower *myo*-inositol phosphate 혹은 *myo*-inositol과 inorganic phosphate로 가수분해시키는 효소이다. International Union of Biochemistry는 phytase를 크게 두 가지로 분류하였다 (21). 한 가지는 미생물에서 생산되는 3-phytase (EC 3.1.3.8)로서 *myo*-inositol hexakisphosphate의 3번 위치의 ester bond를 먼저 가수분해하고 다른 한 가지는 고등식물의 종자에 포함된 6-phytase로 *myo*-inositol hexakisphosphate의 6번 위치의 ester bond를 먼저 가수분해한다.

지금까지 많은 종류의 식물, 동물 조직 그리고 미생물에서 phytase의 활성이 측정되어 보고되어 왔다. 특히, Shieh와 Ware는 약 2000개 정도의 미생물을 분리하여 phytase의 생산 여부를 확인하였다 (22). 그 결과, phytase를 세포외로 분비되는 미생물은 30개뿐이고 대부분은 *Aspergillus*속의 곰팡이였다. *Aspergillus niger* NRRL 3135, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*를 비롯한 *Aspergillus* 종류와 *Sacharomyces cerevisiae* 등 미생물에서도 비교적 높은 활성의 phytase가 생산된다고 보고되었다. 세균유래의 phytase는 *Acrobactor aerogenus*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* (natto) N-77, *Bacillus amyloliquefacience*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter* sp. 등에서 보고되었다. 세포외로 phytase를 분비하는 세균은 유일하게 *Bacillus* 종류와 *Enterobacter*이고 *E. coli*가 생산하는 phytase는 periplasmic 효소이다.

식물에서의 phytase의 분포를 보면 콩, 상추, 밀 등의 종자 속에 많이 포함되어 있으며 (23-25), 옥수수, 보리, 대두박과 같은 곡류 사료 속에서도 발견되었지만 밀과 보리에서 phytase의 활성이 가장 큰 것으로 보고되었다 (26). Suzuki 등은 벼와 밀기울에서 처음으로 phytase의 존재를 밝혔고 반응산물로서 inositol을 분리하였다 (27). 발아식물에서 phytase의 발생은 Gibson 등에 의해 연구되었고 (7), Houde 등은 8일간 발아시킨 canola 종자로부터 2가지 형태의 phytase isozyme을 분리하였다. Bewley 등은 대부분의 종자 내에 phytate와 이를 가수분해하는 phytase가 존재하는 이유는 자연상태에서 종자의 발아와 ATP 생산에 많은 인산이 필요하며 이러한 인산은 무기태 인의 형태로는 종자 내에 다량 저장하는 것이 어렵기 때문이라고 하였다 (28).

동물에서의 phytase는 주로 단위동물에서 발견되었다 (29-32). 하지만 동물의 창자

에서 발견된 이런 phytase는 사료속의 phytate를 분해하지 못했다 (33).

나. Phytase의 아미노산 서열과 active site에 대한 연구

최근까지 많은 미생물 phytase의 1차구조가 밝혀져 왔다. *A. niger* var *awmori*로부터 cloning된 phytase 유전자는 *A. niger* NRRL 3135 phytase (*phyA*)와 97%의 높은 유사성을 보인 반면 *A. fumigatus* (65%), *A. terreus* (62%), *E. nidulans* (62%), *T. thermophilus* (61%), *M. thermophila* (46%) 등 phytase는 *A. niger* NRRL 3135 phytase (*phyA*)와 비교적 낮은 유사성을 보였다 (34-35). *A. niger* NRRL 3135로부터 유래된 또 다른 phytase *phyB*는 *A. niger* var *awmori*의 *phyB*와 99%의 유사성을 보이지만 *phyA*와 *phyB*는 단지 23%의 유사성을 보였다 (36-37). *E. coli* (*appA*), *B. subtilis* VTT E-68013 (*phyC*), *B. subtilis* 168 (*168phyA*), *B. amyloliquefaciens* (*TS-phy*), *B. licheniformis* (*phyL*) 등 bacterial phytase와 동물 phytase (쥐 간장의 MIPP)는 *A. niger* NRRL 3135 phytase와 아무런 유사성이 없었다.

Bacterial phytase 사이의 유사성을 조사한 결과, *E. coli* phytase (*appA*)는 다른 *Bacillus* 종류의 phytase와 유사성이 없었다. *B. subtilis* VTT E-68013 (*phyC*), *B. subtilis* 168 (*168phyA*), *B. amyloliquefaciens* (*TS-phy*) phytase는 서로 높은 유사성이 있는 반면 *B. licheniformis* (*phyL*)와는 각각 67%, 69%, 65%의 낮은 유사성을 나타냈다 (38).

Tye 등은 지금까지 밝혀진 phytase들의 아미노산 서열을 비교하여 모두 세 개의 그룹으로 분류하였다 (Table 1) (38). 대부분 곰팡이 유래의 phytase와 *E. coli* phytase가 첫 번째 그룹인 histidine acid phosphatase에 속한다. 이들 phytase의 active site에는 아주 보존적인 RHGXRXR 아미노산 서열이 존재하였다. Arginine의 guanido 그룹의 positive charge는 active site에서 histidine 잔기의 가까이에서 negative charge를 띤 phosphate 그룹의 인지와 고정에 관여하며 이 phosphate 그룹은 일시적으로 histidine 그룹에 이동하여 불안정한 phospho-enzyme complex를 형성한다고 알려져 있다. 두 번째 그룹에는 주로 *Bacillus* phytase가 포함되어 있는데 six-bladed-propeller식 접힘구조를 갖고 있다 (39). 이들 phytase 단백질에는 여섯 개의 calcium-binding site가 존재하여 phytase의 활성은 칼슘의 존재 여부에 좌우된다. 마지막으로 soybean 과 같은 plant phytase는 purple acid phosphatase로 분류하였다. purple acid phosphatase는 주로 식물에서 발견되는 효소로서 Fe(III)-Zn(II) active site를 갖고 있는 homodimeric glycoprotein이다.

Table 1. Classification of phytases

Gene	Origin	Classification	Reference
<i>appA</i>	<i>Escherichia coli</i>	Histidine acid phosphatase	40
<i>F21M12.26</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Histidine acid phosphatase	41
<i>MIPP</i>	Rat	Histidine acid phosphatase	42
<i>phyA</i>	<i>Aspergillus ficum</i>	Histidine acid phosphatase	37
<i>phyB</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Histidine acid phosphatase	36
<i>phyS11</i>	<i>Zea mays</i>	Histidine acid phosphatase	43
<i>GmPhy</i>	Soybean	Purple acid phosphatase	44
<i>KBPAP</i>	Kidney bean	Purple acid phosphatase	45
<i>spPAP</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	Purple acid phosphatase	46
<i>TRAP</i>	Mammals	Purple acid phosphatase	47
<i>phyC</i>	<i>B. subtilis</i> VTT E-68013	Beta-propeller phytase	48
<i>TS-phy</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Beta-propeller phytase	49
<i>phyL</i>	<i>B. licheniformis</i>	Beta-propeller phytase	38
<i>168phyA</i>	<i>B. subtilis</i> 168	Beta-propeller phytase	38

다. Phytase 특성 연구

1) 생물 물리학적 특성

지금까지 많은 종류의 phytase가 발견되고 그 특성이 연구되어 왔다. Phytase의 단백질 분자량은 보통 단백질보다 훨씬 큰 700 kDa 크기가 있는가 하면 10~13 kDa의 극히 작은 peptide도 phytase의 활성이 있었다 (50).

Bacterial phytase의 분자량은 대부분 곰팡이 phytase보다 작았다. 곰팡이 phytase는 추정되는 분자량의 크기는 50 kDa이었지만 glycosylation에 의하여 전기영동 상에서 65-70 kDa으로 크게 나타났다. Wyss 등은 곰팡이 phytase의 glycosylation은 효소의 열 안정성에 영향을 준다고 보고하였다 (51). *A. fumigatus*, *Emericella nidulans*, *A. terreus*, *Myceliophthora thermophila* 등 곰팡이 phytase는 단백질 분해효소에 의해서 분해되는 경향이 있다고 보고하였다 (52). 하지만 *Bacillus subtilis*에서 생산되는 phytase는 trypsin, papain, elastase 등 단백질 분해효소에 안정하였다 (53).

2) Phytase의 온도 및 pH 특성

대부분의 곰팡이에서 생산되는 phytase의 최적 pH는 4.5에서 5.6 사이에 있다. 그 중 *A. fumigatus* phytase는 다른 곰팡이 phytase와는 달리 pH 4.0에서 7.3까지의 범위에서 80% 이상의 활성을 유지하는 넓은 pH 범위를 갖고 있다. Bacterial phytase에서 *Bacillus* 유래의 phytase는 중성 pH인 6.5-7.5에서 가장 높은 활성을 나타내고 있었다. 때문에 가축 사료의 첨가제로서 사용할 때 중성인 소장에서 곰팡이 phytase보다 높은 활성을 나타낼 것으로 예상된다.

대부분 phytase의 최적 온도는 45~77°C로서 곰팡이 유래의 phytase는 보통 *Bacillus* 유래의 phytase보다 비교적 낮은 온도에서 최적의 활성을 나타낸다. 동물사료의 pelleting은 높은 온도 (65~80°C)에서 가공되기 때문에 사료에 첨가되는 phytase는 열에 안정하여야 한다. 지금까지 밝혀진 곰팡이 유래의 phytase 중 *A. fumigatus* phytase가 열에 안정하여 100°C에서 20분간 방치하여도 90% 정도의 잔존활성을 유지하고 (54) 나머지 곰팡이 유래의 phytase는 구조의 불안정성으로 높은 온도에서 쉽게 실활한다 (52, 55). 이와 반대로 *Bacillus* 유래의 phytase는 대부분 열에 안정하다. *Bacillus licheniformis* 유래의 *phyL* phytase는 90°C에서 15분간 방치하여도 61%의 잔존활성을 나타냈고 (56) *Bacillus amyloliquefaciens* 유래의 *TS-phy* phytase는 90°C에서 10분간 방치하였을 때 50%의 잔존활성을 나타냈다 (39). 하지만 *Bacillus* 유래의 phytase는 calcium-free 상태에서는 극히 불안정하여 상온에서도 쉽게 실활하는 것으로 보아 칼슘이온이 phytase의 열 안정성에 아주 중요한 작용을 한다는 것을 알 수 있다.

곰팡이 유래의 phytase는 *Bacillus* 유래의 phytase보다 열 안정성이 떨어지는 반면 낮은 pH에서는 아주 안정하다. *A. terreus* 유래의 phytase는 pH 1.2~9.0의 서로 다른 완충 용액에 섞은 후 4°C에서 40시간 방치한 후에도 거의 100%의 잔존활성을 나타냈다 (57). Bacterial 유래의 phytase 중 *E. coli* phytase는 pH 2.0~10.0에서 안정한 활성을 유지한다 (58). 하지만 *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* VTT E-68013 유래의 bacterial phytase는 중성부근의 pH에서는 아주 안정하였으나 pH 4.0 이하의 낮은 pH에서는 급격히 실활되었다.

라. Phytase의 산업적 이용

가축사료의 제조에 사용되는 곡물, 콩류, 유지종자에서 인의 70~80%는 phytate 형태로 존재한다. 돼지나 가금류와 같은 단위동물들은 장내에서 phytase가 생산되지 않기 때문에 사료내의 phytate-P를 이용할 수가 없다. 따라서, 사료내에 무기인을 첨가하여 동물의 인 요구량을 충족시켜 주었다. 이것은 가축사료 비용을 높인 것은 물론이고 가축의 인 배설량을 증가시켜 가축의 사육밀도가 높은 지역에서 환경오염 문제를 일으키는 주요 원인이 되었다. 최근 몇 십년 간 사료에 무기인 대신에 활성도가 좋은 미생물 phytase를 첨가하여 동물의 인의 소화율과 사료내의 단백질, 미네랄의 이용성을 높이는 연구가 활발히 진행되고 있다. Nelson 등은 corn-soya diet에 *A. niger* NRRL 3135 phytase를 함유한 배양액 filtrate를 처리한 후 사료에 첨가했더니 phytic phosphate의 방출로 bone ash에서 phosphate의 증가를 보였다 (59). Hoppe 등은 돼지사료에 phytase를 첨가했을 때 인의 체외로의 방출이 56±9% 감소되었다 (60).

제 2절 연구개발 목적 및 필요성

1. 연구개발 목적

본 연구팀은 양계 및 양돈용 사료 첨가제로 phytase 효소제를 개발하고자 한다.

Phytase란 곡물(콩, 보리, 옥수수 등)속에 1~2% 포함된 phytic acid를 분해하여 인산을 유리시켜 가축이 이용하도록 하게 하는 유용한 산업적 효소이다. 단위동물인 돼지, 닭은 phytic acid를 분해할 수 효소(phytase)를 가지고 있지 않기 때문에 사료 첨가제로써 필수불가결한 성분이다. 사료에 있어서 phytase의 필요성은 사료에 별도의 인산염을 첨가할 필요가 없게 하고, 단위동물인 돼지나 가금류의 경우에는 장내에 이 효소를 분비하는 미생물군이 결핍되어 사료중의 phytic acid를 분해 흡수하지 못하므로 이들이 가지고 있는 인들의 대부분이 동물의 분변 폐기물에 함유되어 자연계에 배출되므로 환경오염에 큰 요인을 차지하고 있다. 이러한 측면에서 phytase는 환경오염 방지에 중요한 역할을 하는 유용한 효소이다. 또한 phytic acid는 사료내의 미량 영양원인 여러 금속이온(Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} 등)들과 착화합물을 강하게 형성하므로 가축의 금속이온에 대한 소화효율성을 저해하고 밀과 옥수수의 고섬유질 부분과 대두와 유채의 protein concentrate에 고함량으로 존재하여 각종 단백질들과 결합하여 단백질 분해효소의 작용을 억제함으로써 가축과 사람의 단백질의 소화흡수에 저해를 일으킨다. 지금까지 국내를 포함한 세계는 단위동물에 최적의 phytase를 생산하지

못하고 있다. 즉, BASF phytase의 경우 내산성이 강한 반면에 내열성이 약하고, 국내 대성 미생물연구소 제품의 경우 내열성은 강하나 내산성이 약한 단점이 있다.

이에 본 연구팀은 본 연구를 통하여 사료첨가제 용도로서 적합한 효소 반응특성을 지닌 phytase 및 개량효소 고생산 균주를 개발하고 산업적 생산의 기틀을 마련하여 환경오염 방지와 수입대체 효과를 동시에 얻고자 한다.

2. 연구개발 필요성

단위동물을 위한 사료 (특히 양돈, 양계사료) 내에 함유된 곡물 중의 인 복합체 (phytate)는 동물의 체내에서 분해되지 않고 분변으로 배출되어 환경 오염의 큰 요인으로 작용하고 있다. 또한 phytate는 사료내의 미량 영양원인 여러 금속이온들과 착화합물을 강하게 형성할 뿐만 각종 단백질들과 결합되어 있으므로 단위동물의 미량원소와 단백질의 소화흡수에 장애를 일으킨다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 유력한 대안으로 사료 첨가제로써 phytate 분해효소인 phytase (EC 3.1.3.8)를 사용하는 방법이 적용되고 있다. Phytase를 사료에 첨가하였을 경우에 인산염 첨가량을 획기적으로 줄임과 동시에 가축들의 무기금속 이온들에 대한 효용성 및 단백질 소화율이 증가하여 생산성을 증진시킬 뿐만 아니라 유효 인의 배설을 50%까지 감소시킬 수가 있게 된다. 이러한 점에 착안하여 네덜란드를 비롯한 구미 지역에서는 축산 폐기물에서 배출되는 인의 함량을 감소시킬 목적으로 사료에 phytase 첨가를 유도하고 있고 국내 배합사료에도 phytase 사용이 증대되는 추세에 있다.

21세기에 접어들면서 환경문제가 전산업·전분야에 걸쳐서 중요한 요소로 대두되고 있다. 따라서 전 세계는 축산 폐수의 인 함량을 규제하는 추세에 있다. 우리나라도 예외가 아니어서 1996년부터는 폐수처리에 있어 분뇨처리장의 경우 총 인의 함량을 16mg/l 이하로 규제·입법하고 있으므로 오염 배출원들에 대한 근본적인 인의 함량을 낮추는 문제는 경제적·환경적인 측면에서 중요한 사항이 되고 있다. 따라서 phytase의 사용은 필수적으로 예상된다. 특히 국내 축산농가의 경우에 축산분뇨의 해양투기도 환경적 문제로 한계에 이를 것으로 예상되며, 질소와 인의 함량을 낮추기 위한 폐수처리도 경제적 문제로 인하여 많은 어려움을 겪을 것으로 예상된다. 이러한 상황을 고려하여 국내 배합사료 제조회사들은 사료 내 phytase 첨가 필요성을 절감하고 있으며, 실제 phytase 사용을 점차 확장하는 추세에 있고 앞으로는 phytase 효소제 시장이 급격하게 확대될 것으로 예상된다.

그런데, 국내 사료시장의 경우에 사료첨가용 phytase를 전량 외국에서 수입하여 사용하고 있는 실정이다. BASF사의 phytase 효소제가 시장을 선점한 상황에서 Roche사의

phytase가 국내에 도입되었다. 그러나 Roche사의 phytase 뿐만 아니라 최근에 국내에서 사료첨가용 효소제로 개발된 대성미생물(주)의 phytase 또한 시장진입에 실패하여 국내시장 분할에 전혀 참여하지 못하고 있는 실정이다. 이러한 상황들을 고려해 볼 때 국제경쟁력을 지닌 phytase 효소제의 개발은 절실하게 요구된다고 사료된다.

제 3절 연구개발 목표 및 주요 연구내용

1. 연구개발 최종목표

본 연구는 양계 및 양돈용 사료 첨가제로서의 phytase 효소제 개발에 관한 것이다. 그런데, phytase가 단위동물을 위한 사료첨가제로 개발되기 위해서는 phytase가 갖추어야 할 몇가지 효소적 특성들이 있는데, 그 중에서 내열성, 내산성, 중성 pH와 중온에서의 높은 비활성, 단백질분해효소에 대한 저항성 등이 특히 중요하다고 할 수 있다. 그러나 지금까지 국내를 포함한 전 세계적으로 단위동물을 위한 최적의 phytase를 생산하지 못하고 있다. 즉, 이미 상용화되어 있는 곰팡이 유래 phytase는 내산성이 강한 반면에 내열성이 약하고, *Bacillus* 유래 세균성 phytase는 내열성은 강하나 내산성이 약한 단점이 있다. 따라서, 외국의 많은 기업들은 단위동물을 위한 사료첨가제 용도로 더욱 적합한 최적의 phytase 유전자원을 지속적으로 발굴·개발하고자 하는 노력이 진행되고 있다. 그러므로 사료첨가용 phytase 효소제를 개발하기 위해서는 사료첨가제 용도에 적합한 특성을 지닌 효소 유전자원의 개발이 필수 선결과제라고 판단된다. 본 과제 연구에서는 내열성이 좋은 *Bacillus* 유래 phytase에 내산성을 부여함으로써 사료첨가제 용도에 더욱 적합한 최적 phytase 유전자원을 개발하고 궁극적으로는 사료첨가제용 phytase 효소제를 개발하고자 하였다. 그러므로 본 과제 연구에서는 최적 phytase 유전자원의 개발, 특히 분자진화기술을 이용한 내열성 phytase의 내산성 증진 개량 연구가 본 과제 연구의 핵심요소라고 할 수 있다.

2. 년차별 연구개발 목표 및 주요 연구내용

- 1년차: 효소개량 기초 연구
 - 최적 후보 phytase 생산균주의 선발
 - 최적 후보 phytase 유전자의 클로닝 및 특성분석

- Phytase의 초순수분리 및 최적 결정화 조건 확립
- 2년차: 효소개량 및 생산기술 개발
 - 분자진화기술에 의한 내열성 및 내산성 phytase 개량
 - 개량효소 생산 균주의 개발 및 발효
 - 돌연변이체 phytase의 대량 분리 정제 및 초기 결정화 조건의 확립
- 3년차: 생산 및 제품화
 - 분자진화기술에 의한 내열성·내산성 phytase의 비활성 증진 개량
 - 개량효소 생산 균주의 개발 및 발효연구(5L, 50L 규모)
 - 개량 phytase의 제품화 연구 (시제품 생산)
 - 개량 phytase의 동물사양 시험

제 2 장 국내외 기술개발 현황

21세기에 접어들면서 환경문제가 전산업·전분야에 걸쳐서 중요한 요소로 대두되고 있다. 그런데, 단위동물을 위한 사료 내에 함유된 곡물 중의 인 복합체(phytate)는 동물의 체내에서 분해되지 않고 분변으로 배출되어 환경 오염의 큰 요인으로 작용하고 있다. 따라서 전세계는 축산 폐수의 인 함량을 규제하는 추세에 있다. 그러므로 오염 배출원들에 대한 근본적인 인의 함량을 낮추는 문제는 경제적·환경적인 측면에서 중요한 사항이 되고 있다. 또한, phytate는 사료내의 미량 영양원인 여러 금속이온들과 착화합물을 강하게 형성할 뿐만 각종 단백질들과 결합되어 있으므로 단위동물의 미량원소와 단백질의 소화흡수에 장애를 일으킨다. 그러나 phytase를 사료에 첨가하였을 경우에 인산염 첨가량을 획기적으로 줄임과 동시에 가축들의 무기금속 이온들에 대한 효용성 및 단백질 소화율이 증가하여 생산성을 증진시킬 뿐만 아니라 유효 인의 배설을 50%까지 감소시킬 수가 있게 된다. 이러한 점에 착안하여 지금까지 몇 종류의 미생물 유래 phytase가 사료첨가제로 개발되어 산업화되었다; BASF사의 *Aspergillus niger* 유래 phytase (상품명: Natuphos), Roche사의 *Aspergillus ficuum* 유래 phytase (상품명: Ronozyme), Alltech사의 *Peniophora lycii* 유래 phytase (상품명: Allzyme), Finfeeds사의 *E. coli* 유래 acid phosphatase 등.

Phytase가 단위동물을 위한 사료첨가제로 개발되기 위해서는 phytase가 갖추어야 할 몇 가지 효소적 특성들이 있다. 그 중에서 내열성, 내산성, 중성 pH와 중온에서의 높은 비활성, 단백질분해효소에 대한 저항성 등이 특히 중요하다고 할 수 있다. 가장 이상적인 사료첨가제용 phytase는 pellet 형태의 사료 제조공정 중에 수반되는 고온 가공 조건에서 효소가 변성되지 않아야 하며, 단위동물에 의해 사료와 함께 섭취된 phytase가 위산과 담즙산의 낮은 pH에서 안정하게 유지되어 많은 양의 효소가 장관까지 도달해야 하며, 장관에 도달한 phytase는 소장 내의 소화효소(특히 단백질분해효소)에 안정하게 유지되어 하며, 장관 내의 조건인 중성 pH와 중온에서 phytate에 대한 높은 활성을 나타내야 할 것이다. 그런데, 지금까지 대부분 곰팡이 유래의 phytase가 사료첨가제용 효소제로서 개발되었다. 특히, 덴마크의 Novo Nordisk사는 *Aspergillus niger* subsp. *ficuum* phytase의 효소 및 유전자에 관한 특허를 보유하고 있을 뿐만 아니라 곰팡이 phytase를 공업적으로 생산하여 세계 시장의 약 50%를 선점하고 있다. 이러한 Novo phytase를 공급받은 BASF사는 이지바이오(주)를 통하여 국내 사료회사에 전량 공급하고 있다. 그러나 BASF사의 Natuphos 등 기존에 개발된 곰

팡이 유래의 phytase 효소제는 내산성은 뛰어나지만 내열성이 떨어지고 곡물 중의 phytate에 대한 분해력이 다소 떨어지는 등의 문제가 있어 지금까지 국내를 포함한 전 세계에서 최적의 phytase를 생산하지 못하고 있는 실정이다. 따라서 외국의 많은 기업들은 단위동물을 위한 사료첨가제 용도로 더욱 적합한 phytase 유전자원을 지속적으로 발굴·개발하고자 하는 노력이 진행되고 있다.

한편, 국내에서는 최근 여러 대학과 연구기관에서 phytase에 관한 연구가 진행되고 있다. 특히, 생명공학연구원(KRIBB)의 오태광 박사 연구팀은 국내기업인 대성미생물(주)과 공동으로 *Bacillus amyloliquefaciens* 유래의 세균성 phytase를 연구하여 세균성 phytase의 시제품 생산 및 동물사양을 거친 후에 제품을 생산한 바가 있다. 그러나 이 제품은 현재 사료첨가용 phytase 시장진입에 실패하여 국내시장 분할에 전혀 참여하지 못하고 있는 실정이다. 본 연구팀의 소견으로는 이 효소의 경우 내산성이 매우 낮기 때문에 단위 동물의 위에서 대부분 실활되어 장관 내에서 효소활성을 나타내기 어려울 것으로 판단된다. 따라서, 국내에서 필요로 하는 phytase 효소제를 전량 외국에서 수입하는 실정 등을 감안할 때 phytase 효소제의 개발이 시급한 실정이고 또한 이를 위해서는 사료첨가제 용도에 적합한 특성을 지닌 효소 유전자원의 개발이 필수 선결과제라고 판단된다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1절 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

가. 사용균주와 plasmid 및 배지

본 연구에 사용된 phytase 생산균주 *Bacillus licheniformis*는 자연계에서 선별하였고, 선별 시에는 PSM agar와 액체배지를 사용하였다. Chromosomal DNA와 모든 plasmid DNA를 분리하기 위한 균주 배양에서는 LB를 사용하였다. *E. coli* transformant를 배양할 시 ampicillin은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로, *Bacillus* transformant를 배양할 시에는 kanamycin은 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하였다. Phytase의 유전자 cloning 및 염기서열 분석 실험에서는 pBluescript II SK (Stratagene, USA) plasmid를 사용하였고 *Bacillus subtilis* DB431에 발현시키기 위하여 *Bacillus-E. coli* shuttle vector pJH27를 사용하였다 (61). *E. coli*에서의 모든 유전자 조작은 XL1-Blue [F' proA⁺B⁺lacIq Δ (lacZ)M15/recA1endA1]와 MC1061 [F^- araD139 Δ (leu)7696galE15galK16 Δ (lac)X74rpsL(Str^r)hsdR2(r_k⁻m_k⁺)mcrAmcrB1] 균주를 사용하였다. *Bacillus subtilis* 균주의 competent cell을 제조하기 위해서는 SPI 배지 [0.2% (NH₄)₂SO₄, 1.4% K₂HPO₄, 0.6% KH₂PO₄, 0.1% Na₃-Citrate · 2H₂O, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, 0.5% glucose, 0.02% casamino acid, 0.1% yeast extract] 및 SPII 배지 [SPI 배지에 0.5mM CaCl₂ · 2H₂O와 2.5mM MgCl₂ · 2H₂O를 첨가]를 사용하였다.

나. 사용한 효소, 시약 및 기계

유전자 조작에서 사용된 모든 제한효소는 New england Bio-Labs (USA)와 Roche Molecular Biochemical (Germany)로부터 구입하였으며, T4 DNA ligase, DNA polymerase (Klenow fragment), Alkaline phosphatase, DNase I 은 Roche Molecular Biochemical (Germany)로부터 구입하였다. ExTaqTM DNA polymerase와 rTaqTM DNA polymerase는 TaKaRa (Japan)에서 구입하였고 dATP, dGTP, dCTP, dTTP는 Promega (USA)에서 구입하였다. 그리고 모든 plasmid DNA의 정제는 QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA)를 사용하였

다. 내산성 돌연변이체 screening에서 사용된 nitrocellulose membrane은 Amersham Biociences (UK)으로부터 구입하였고, TLC plate는 Merck사 (Germany)로부터 구입하였다. *Myo*-inositol-hexakisphosphate, *myo*-inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate, *D*-*myo*-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate, *D*-*myo*-inositol-1,4,5-trisphosphate, *D*-*myo*-inositol-1,4-bisphosphate, *D*-*myo*-inositol-1-monophosphate는 Sigma Chemical Co. (USA)로부터 구입하였으며, 그 외 실험에 사용한 시약들은 주로 Sigma Chemical Co. (USA), Merck (Germany), Junsei Chemical Co. (Japan)에서 구입하였다.

PCR은 PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.)를 사용하였다. Mutant screening시 QPix (Genetix, UK)를 이용하여 picking하고 gridding 하였다. 배양 상등액을 옮길 시 HT Station 1200 (Cosmotech, Japan)를 사용하였고 최종 돌연변이체에 의한 기질 반응 액의 흡광도는 Microplate reader (Model 550, BioRad, USA)를 이용하여 측정하였다.

2. Phytase 효소계 개발 연구의 실험 방법

가. Phytase 생산균주의 선별 및 동정

내열성, 내산성 phytase 활성이 있는 균주를 탐색하기 위하여, 국내 각지의 토양 시료를 sampling한 후에 시료 1 g을 50℃에서 밤새 말리고 다시 80℃에서 30분간 열처리를 한 후 9 ml의 멸균 증류수에 현탁하였다. 그 후, 상층액 0.1 ml을 PSM (Phytase Screening Medium, 0.5% Glucose, 0.5% Ca-phytate, 0.5% NH₄·NO₃, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 0.001% MnSO₄·7H₂O, 0.01% Yeast nitrogen base, 15% Agar) 한천 배지에 도말하여 37℃에서 2일간 배양한 후 자라난 콜로니 부위에 투명한 분해환이 생기는 균주들을 phytase 활성을 갖는 균주로 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주들을 5 ml PSM 액체배지에 접종하여 37℃에서 2일간 진탕 배양한 후 배양액을 원심 분리하고 그 상층액의 phytase 활성을 측정하여 활성이 높은 균주들을 2차 선별하였다. 2차 선별한 균주들을 25 ml PSM 액체배지에 접종하여 37℃에서 2일간 진탕 배양한 후 배양액을 원심 분리하고 그 상층액을 Centrifugal Filter (10K, NMWL membrane)를 사용하여 농축, 투석하였다. 그 후에 농축액 phytase의 열 안정성과 산 안정성을 측정하여 그 중에서 안정성이 가장 좋은 균주를 최종 선별하였다.

분리 선별한 균주의 동정은 형태학적, 생화학적 성질을 검토하여 “Bergey's

manual of Determinative Bacteriology”에 제시되어 있는 방법에 준하여 수행하였다. 또한 API kit 및 Vitek system의 data와 비교하여 분리균주를 동정하였다.

나. Phytase의 활성 측정

Phytase 활성은 Shimizu 등의 방법을 변형하여 아래에 설명한 바와 같이 inorganic phosphate의 양을 측정함으로써 효소활성을 측정하였다 (56). 100 μ l의 효소용액에 900 μ l의 기질용액 (2 mM sodium phytate in 0.1 M Tris-Cl buffer, 1 mM CaCl_2 , pH 7.0)을 넣고 50°C에서 일정시간 반응시킨 후 750 μ l의 5% TCA 용액을 넣어 반응을 정지시켰다. 대조구는 효소용액에 TCA 용액을 넣어 효소를 불활성화 시킨 다음 기질 용액을 가하여 방치하였다. 그 후에 1.5 ml의 발색용액 (4 volume of 2.5% ammonium molybdate solution in 5.5% sulfuric acid, 1 volume of 2.5% ferrous sulfate solution)을 가하여 일정시간 반응시킨 후 700 nm에서 효소 반응 용액과 대조구 용액 사이의 흡광도 값 차이를 측정하였다. 효소의 1 unit는 1분 동안에 1 μ mol의 phosphate를 방출시키는 효소량으로 정의하였다. 본 연구에서는 모든 phytase의 활성 측정에 반응액에 1 mM CaCl_2 를 첨가하였다.

다. 열안정성 및 pH 안정성 측정

Phytase 열안정성은 효소를 20~90°C까지 각 온도에서 10분간 방치한 후 4°C에서 냉각시키고 난 다음 효소의 잔존 활성을 측정하였다. Phytase의 pH 안정성을 검토하기 위해서 각 pH 별로 제조한 완충액 (pH 2.0~3.0은 glycine-HCl 완충액, pH 3.0~4.0은 formic acid-NaOH 완충액, pH 4.0~7.0은 maleic acid-Tris-NaOH 완충액, pH 7.0~9.0은 Tris-HCl 완충액, pH 9.0~11.0은 glycine-NaOH 완충액)에 효소액을 가해 25°C 혹은 37°C에서 일정시간 방치한 후 효소의 잔존 활성을 측정하였다.

라. Phytase의 순수분리 및 정제

Phytase 생산 *Bacillus* 균주를 37°C에서 2일간 진탕 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양상등액을 Polyethersulfone membrane을 사용한 ultrafiltration을 통해서 농축을 하였다. 그 후에 DEAE-sepharose CL-6B column chromatography를 수행하여 0~0.5N NaCl gradient 부분에서 phytase 활성을 나타내는 단백질 분획을 회수하였다. 그 후에 불용성의 기질인 Ca^{++} 과 sodium phytate의 결합체(Ca-phytate)와 phytase의 결합력을 이용하여 phytase를 순수정제 하였다. 즉, 먼저 0.2 g의 sodium phytate를 증류수에 녹인 후 1M

CaCl₂ 용액을 첨가하여 충분히 침전시키고 10mM Tris-Cl(pH 7.0) 완충용액으로 washing하여 Ca-phytate를 얻는다. 그리고 나서 phytase 활성 분획을 Ca-phytate 용액에 첨가하여 4℃에 1시간동안 방치하였다. 그 후에 10mM Tris-Cl (pH 7.0) 완충용액으로 세척하고 최종 0.05 M NaCl을 함유한 완충용액으로 두 번 세척하였다. 그 후에 불용성의 Ca-phytate에 결합된 phytase를 회수하기 위해서 0.2M sodium acetate-acetic acid (pH 4.0) 완충용액을 첨가한 후에 Centrifugal Filter를 이용하여 10mM Tris-Cl (pH 7.0) 완충용액으로 세척, 농축하였다.

마. 단백질 정량

단백질 농도는 Bradford 방법을 이용하였다. Bovine serum albumin (Sigma chem Co.)를 표준시료로 하고 Bio-Rad사의 protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, column chromatography를 사용하였을 때는 UV (280 nm)법을 이용하였다.

바. SDS-PAGE

Phytase의 정제도와 분자량을 측정하기 위하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 수행하였다. Laemmli 등의 방법에 따라 조제하였으며, phytase 단백질 시료와 표준단백질을 12% acrylamide gel에 loading하여 30 mA로 전기영동한 후 gel을 Coomassie Brilliant Blue 용액으로 염색하고 destaining buffer (methanol: acetic acid: 증류수= 10: 10: 80)로 탈색시켰다.

사. N-말단 아미노산 서열 결정

단백질 시료를 SDS-PAGE를 수행한 후 polyacrylamide gel과 PVDF membrane을 CAPS buffer (10 mM 3-[cyclohexylamino]-1-propane sulfonic acid (CAPS), 10% (v/v) methanol, pH 11.0)에 침지하였다. 그 후에 Bio-Rad사의 Trans-Blot Electrophoretic-Dry Transfer cell를 사용하여 4℃에서 100V, 200 mA로 2~3시간 protein transfer를 수행하였다. 그 다음에 단백질이 blotting된 PVDF membrane을 staining solution (0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 50% methanol, 10% acetic acid)에서 10~30초간 염색하고 destaining solution (methanol: acetic acid: DW= 10: 10: 80)으로 탈색시켰다. PVDF membrane을 말린 후 염색된 단백질 band를 오려서 N-말단 아미노산 서열 결정에 사용하였다. N-말단 아미노산 서열은 한국표준연구소에 의뢰하여 Applied Biosystems model

476A Protein/peptide sequences (Applied Biosystems Inc., USA)로 분석하였다.

아. Phytase 유전자의 cloning 및 염기서열 결정

1) *Bacillus* sp. SP4 균주로부터 chromosomal DNA 분리

Bacillus sp. SP4 균주를 3 ml의 LB 배지에 접종하여 37°C에서 5시간 정도 배양한 후 1 ml의 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하였다. 균체를 1 ml의 TEN (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 8.0) 완충액으로 1회 세척한 후 1 mg/ml의 lysozyme이 포함된 SET (20% sucrose, 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0) 완충용액 0.5 ml에 suspension하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그 후에 100 mg/ml의 protease K 용액 5 μ l, 10%의 SDS 용액 50 μ l를 첨가하여 cell을 용해시키고, 0.1 ml의 5N NaCl 용액을 첨가한 후 phenol/chloroform extraction을 1회 실시하였다. 그 후 2 volume의 absolute ethanol을 첨가하여 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 70% ethanol로 세척하여 말린 후 최종 0.1 ml의 TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) 완충용액에 용해시킴으로써 염색체 DNA를 제조하였다.

2) *E. coli*와 *Bacillus*에서 plasmid DNA의 분리

*E. coli*로부터 plasmid DNA의 대량 분리 및 정제는 Sambrook 등의 방법을 이용하였다. 먼저 균주를 항생제가 첨가된 LB 배지에서 하룻밤 배양한 후 균체를 회수하고 균체로부터 alkaline lysis 방법으로 plasmid DNA를 분리하였다. 그 후에 CsCl-EtBr ultracentrifugation 방법으로 정제하였다. DNA 소량 분리는 QIAprep Spin Miniprep Kit를 이용하여 제조 회사에서 제공하는 방법에 따라 사용하였다. *Bacillus*로부터 plasmid DNA를 소량 정제할 때는 QIAprep Spin Miniprep Kit를 사용하였는데 다만 solution I에 lysozyme을 2 mg/ml의 농도로 첨가하여서 사용하였다.

3) Phytase 유전자의 PCR cloning

이미 염기서열이 밝혀져 있는 *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 phytase 유전자의 염기서열에 기초하여 primer를 합성하고 *Bacillus licheniformis* SP4 균주의 chromosomal DNA를 template로 한 PCR을 수행하여 SP4 phytase 유전자를 증폭하였다. 이때 사용한 primer의 염기서열은 N 말단 primer의 경우 5' -CCTCACATTCGGACAATCTTCAC-3' ,

이고 C말단 primer의 염기서열은 5' -TCAAGAGACAGTACCGGCGTAC-3' 와 같다. 증폭된 DNA를 전기영동하여 elution하였고 pGEM-T Easy vector와 16°C에서 15시간 ligation한 후 *E. coli* XL1-Blue competent cell에 transformation하였다. 이렇게 얻은 재조합 plasmid DNA인 pGEM-phy4를 *Spe* I, *Nco* I 제한효소로 절단하여 동일한 제한효소로 절단한 pBluescript II SK (+) plasmid DNA에 정방향으로 insertion하였고, 이 재조합 plasmid DNA를 pBSK-phy4로 명명하였다.

4) Phytase 유전자의 염기서열 결정

Phytase 유전자의 염기서열을 결정하기 위하여 pBSK-phy4 DNA를 각각 제한효소 *EcoR* I, *EcoR* V, *Hind* II로 절단하여 단편조각들을 얻은 후 각 단편들을 동일한 제한효소로 절단한 pBluescript II SK (+) plasmid DNA에 insertion하여 *E. coli* XL1-Blue competent cell에 transformation하였다. 그 후에 각 clone들을 액체 배양하여 QIAprep Spin Miniprep Kit를 이용하여 plasmid DNA를 분리하였고 염기서열 결정에 사용하였다. DNA sequencing kit (Applied Biosystem)를 사용하여 PCR 반응을 한 후 ABI 310 sequencer (Applied Biosystem)를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

자. Phytase의 protease 저항성 측정

100 mM Tris-HCl (1 mM CaCl₂, pH 7.0) 완충용액에 용해되어 있는 트립신, 키모 트립신 효소액과 100 mM glycine-HCl (1mM CaCl₂, pH 3.5) 완충용액에 용해되어 있는 펩신 효소액 2 unit에 정제된 phytase를 각각 10 unit의 비율로 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 방치한 후에 50°C에서 잔존 활성을 측정하여 protease 저항성을 평가하였다.

차. TLC를 이용한 phytate 반응산물 분석

Phytate 반응산물 분석을 위해 0.1 M Tris-HCl (pH7.0) 완충용액에 녹아있는 2 mM sodium phytate 900 μ l에 효소액 100 μ l를 첨가하여 37°C에서 0분, 10분, 30분, 1시간, 2시간, 12시간 반응시킨 후에 5분간 boiling하여 반응을 중지시켰다. 또한 Inositol phosphate의 반응산물을 분석하기 위해서 각각의 2mM 기질 900 μ l에 phytase 100 μ l를 첨가하여 37°C에서 12시간 동안 반응시킨 다음에 5분간 boiling하여 반응을 중지시켰다. 이와 같이 제조된 반응혼합물을 TLC plate (HPTLC-Platten cellulose, Merck)에 1cm 간격으로 3 μ l씩 spotting 하고 전개용액 (1-propanol : 25% ammonia solution : water, 5:4:1) 100ml을 채운 chamber

에 넣어 4시간 정도 전개시켰다. 그 후에 TLC plate를 air dry시킨 다음 molybdate reagent (8 mM ammonium heptamolybdate tetrahydrate, 0.1 M HCl, 0.5 M HClO₄)를 spray해서 85°C oven에 6.5분 동안 정치시켰다. 그리고 나서 TLC plate를 자외선(254 nm)에 2시간동안 노출시킨 후에 TLC plate 상의 blue spots을 관찰하였다. 이때 사용된 표준시료는 Ins(1)P, Ins(1,4)P₂, Ins(1,4,5)P₃, Ins(3,4,5,6)P₄, Ins(1,2,3,4,5,6)P₆로써 각각 4 nmol씩 spotting 하였다.

카. *E. coli* electro-transformation

1) Electroporation cell의 조제

LB 한천 배지에서 자라난 *E. coli* XL1-Blue 또는 *E. coli* MC1061 single colony를 3 ml의 LB 액체 배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양한 후 배양액 0.5 ml를 500 ml의 LB에 접종하여 37°C에서 진탕 배양한다. 600 nm에서의 배양액의 흡광도가 0.5~0.6이 될 때까지 배양한 후 배양액을 얼음에서 10분간 냉각시킨다. 그 후에 4°C, 4,200 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 버리고 pellet을 500 ml의 냉각된 살균 증류수에 2회 세척한다. Cell pellet을 살균, 냉각된 40 ml의 10% glycerol에 현탁시켜 2°C, 4,200 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 버린다. 이렇게 얻은 균체를 1 ml의 10% glycerol에 현탁시킨 후 50 μ l씩 분주하여 -70°C에 보관하였다.

2) Electro-transformation

-70°C에 보관된 electroporation cell을 얼음에서 천천히 녹인 후 1~3 μ l의 DNA를 첨가하고 pipetting하여 섞어준다. 그 다음 미리 냉각시킨 0.2 cm *E. coli* Pulser cuvette에 옮겨 1분간 얼음에 방치한다. *E. coli* Pulser apparatus (Bio-rad)를 사용하여 2.5 kV로 pulse를 가한 뒤 재빨리 1 ml의 LB 배지를 첨가하고 37°C에서 1시간 shaking incubation한다. 그 후에 cell-DNA 혼합액 일정량을 적당한 항생제가 들어 있는 한천배지에 도말하여 30°C에서 배양하였다.

타. *Bacillus* natural transformation

LB 한천 배지에서 fresh하게 자라난 *Bacillus subtilis* DB431 single colony를 3 ml의 LB 액체 배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양한 후 배양액 0.5 ml를 미리 37°C에

서 pre-incubation한 50 ml (1L 삼각플라스크)의 SPI 배지에 접종하여 37°C, 200 rpm에서 진탕 배양한다. Early stationary phase까지 배양한 후 배양액 5 ml를 미리 37°C에서 pre-incubation한 SPII 배지에 접종하여 37°C, 50 rpm에서 90분간 배양한다. 배양액을 얼음에 방치하여 냉각시킨 후 6,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 버린다. 이렇게 얻은 pellet을 5 ml의 SPII 배지/10% glycerol 용액에 녹여 200 μ l씩 분주한 후 -70°C에 보관하였다. Transformation시킬 시 frozen cell을 42°C에서 재빨리 녹인 후 1 μ g 정도의 DNA를 첨가하여 섞어서 37°C에서 30분간 shaking incubation 한다. 다음 LB 1 ml을 첨가하여 37°C에서 60분간 정치 배양한 후 5 μ g/ml의 kanamycin이 함유된 LB 한천 배지에 도말하였다.

파. 내산성 phytase의 개량

1) Mutant DNA library의 제작

가) Error-prone PCR random mutagenesis

토양 분리균으로부터 클로닝된 phytase 유전자(*phy4*)에 돌연변이를 도입하기 위해 automated thermal cycler(MJ Research PTC-200)를 이용하여 1.2 kb 크기의 *phy4* 유전자를 template로 한 error-prone PCR을 수행하였다. 이 때 error-prone PCR에 사용된 N-말단 primer (5' -CTAGTCTAGAGCCAAAATGATGCG-3')에는 *Xba*I 제한효소 인식부위를 첨가하였고, C-말단 primer (5' -TTTCTGCAGGTTTATTTTCCGCTTCTG-3')에는 *Pst*I 제한효소 인식부위를 첨가하였다. 또한 error-prone PCR 조건은 아래와 같다. 즉, 100 μ l의 PCR 반응액 (1 μ g template DNA, 10 mM Tris-Cl(pH 8.3), 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂, 0.3 mM MnCl₂, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 1.0 mM dCTP, 1.0 mM dTTP, 0.3 μ M each primers and 5U Taq polymerase)를 제조하고 그 후에 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초 조건의 PCR 반응을 수행하였고 증폭 횟수는 30 cycle로 하였다. 그 후에 PCR 반응산물을 전기영동하고 QIAquick Gel Extraction Kit를 이용하여 1.2 kb 크기의 DNA band를 elution하였다. 그리고 나서 PCR 반응산물을 *Pst*I과 *Xba*I 제한효소로 절단하고 동일한 제한효소로 절단된 pBluescrit II SK(+) vector와 ligation 시킨 후에 *E. coli* XL1-Blue에 electro-transformation을 수행하고 앰피실린 항생체가 첨가된 LB 배지에 도말하여 30°C에서 정치배양을 함으로써 phytase mutant DNA library를 제조하였다. 그 후에 ampicillin (100 μ g/ml)이 첨가된 LB agar plate에서 자라난 약 10만여 마리의 형질전환체들을 한데 모

아서 ultracentrifugation 방법에 의해 plasmid DNA를 분리한 후에 이들 플라스미드를 *B. subtilis* DB431 균주에 도입함으로써 내산성이 증가된 돌연변이체를 screening하기 위한 mutant library를 제조하였다.

나) *In vitro* recombination mutant library의 제조

Error-prone PCR random mutagenesis에서 선발된 6개의 mutant를 주관연구기관인 아미코젠(주)에서 개발한 RETT 방법에 의하여 재조합을 실행하였다. 먼저 6개의 mutant와 wild-type 유전자를 섞어서 *Sma* I 제한 효소로 절단하여 linearization 하였다. 이렇게 얻은 DNA를 주형으로 하고 40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 10 mM NaCl, 10 mM DTT, 0.5 mM each rNTP, 40 units의 RNasin (Promega), 17 U의 T3 RNA polymerase (Promega)를 각각 첨가하고 총 반응액 부피를 20 μ l로 조정하였다. 그 후에 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨 후 RNA easy column (Qiagen)을 이용하여 RNA transcript를 정제하였다. 이렇게 얻은 RNA transcript 200 μ g을 주형으로 하고 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15 mM KCl, 0.6 mM MgCl₂, 0.2 mM DTT, 6 μ g의 random DNA hexamer, (Genotech, Inc., Korea), 0.2 mM each dNTP, 40 unit의 RNasin, 50 U의 M-MLV reverse transcriptase (Stratagene)를 첨가하고 반응액 총 부피를 50 μ l로 한 후 37°C에서 1 시간 반응시켰다. 다음 0.02 μ g의 RNase I을 첨가하여 37°C에서 1 시간 반응시킴으로써 RNA를 제거하였다. 마지막으로 반응혼합액을 전기영동하여 ssDNA 단편을 정제하였다. 이렇게 제조한 ssDNA 단편 DNA 0.02 μ g을 주형으로 하고 25 pmole의 forward primer를 첨가하여 30 cycle의 94°C에서 30 sec, 55°C에서 30 sec, 72°C에서 30 sec의 조건으로 PCR을 수행하였다. 그 후에 PCR 산물을 정제하여 주형으로 하고 reverse primer를 첨가하여 30 cycle의 94°C에서 30 sec, 55°C에서 30 sec, 72°C에서 30 sec의 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 0.8% 아가로스 gel에서 elution, 정제하여 dsDNA를 제작하였다. 이렇게 얻은 dsDNA를 주형으로 하고 *Xba*I and *Pst*I primer를 이용하여 phytase 유전자를 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 정제한 후 *Xba*I 과 *Pst*I 제한 효소로 절단하여 동일 효소로 절단하여 만든 pJH27 vector와 ligation 하였다. 약 200,000개 정도의 MC1061 형질전환체에서 library DNA를 추출하였다. 이렇게 얻은 library DNA를 *B. subtilis* DB431 균주에 형질전환하여 내산성이 증가한 mutant를 screening 할 library를 제조하였다.

2) 내산성 증진 phytase mutant의 screening

B. subtilis 형질전환체들을 kanamycin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 LB 액체배지 200 μl 씩을 분주한 96 well-plate에 접종하여 30°C에서 48시간 동안 진탕배양하였다. 그 후에 *Bacillus* 배양체를 kanamycin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 LB 한천배지 위에 놓여 있는 nitorcellulose membrane에 picking을 하고 30°C에서 20시간 정도 정치 배양하였다. 그 후에 membrane 상에 자라난 콜로니들을 물에 적셔 제거하고 membrane을 산성용액에 일정시간 동안 방치하여 산처리를 실행하였다. 그 후에 membrane을 100 mM Tris-Cl (1 mM CaCl_2 , pH 7.0) 완충액에 담구어 중화시키고 2 mM sodium phytate를 함유한 agarose plate (100 mM Tris-Cl, 1 mM CaCl_2 , pH 7.0)에 올려놓고 50°C 배양기에 방치하여 효소반응을 시켰다. 일정시간 후에 발색 용액으로 발색시키고 나서 sodium phytate를 함유한 agarose plate 상에서 진한 파란색을 띠는 콜로니들을 1차 선발하였다. 그 후에 1차 선발균들의 내산성을 측정함으로써 내산성 증진 phytase mutant를 최종 선발하였다. 이때 1차 선발균들의 내산성 측정을 위해서는 LB 액체배지에서 진탕배양하여 얻은 배양 상등액을 1 mM CaCl_2 을 포함한 10 mM Tris-Cl (1 mM CaCl_2 , pH 7.0) 완충용액에 투석함으로써 조효소액을 제조하였다.

3. 산란계 동물시험 연구의 실험 방법

가. 시험장소 및 기간

사양시험은 2003년 3월 31일부터 5월 9일까지 총 8주로 2주간 예비사양 후 6주간 연암축산원예대학 부속 실습농장에서 사양시험을 실시하였고, 대사시험은 같은 장소에서 4일간 적응시험을 한 후 5일간 실시하였다. (Fig. 2).

나. 시험동물

시험동물은 현재 농가에서 가장 많이 이용하는 하이라인 갈색 산란계로 50주령 392수(7처리×7반복×8수)를 공시축으로 하여 사양시험을 실시하였다. 대사시험은 같은 주령의 산란계를 112수(7처리×4반복×4수)를 공시하였다.



Fig. 2. Experimental station

다. 시험설계

Corn/soy diet을 사용하여 대조구는 유효인을 NRC 요구량의 100%로 하는 구로 하였고, 시험구는 유효인을 NRC 요구량의 68%로 하는 가축 사료에 본 연구의 phytase 250 FTU (P250), 500 FTU (P500) 및 1000 FTU (P1000) 첨가구와 Natuphos 250 FTU (N250), 500 FTU (N500), 1000 FTU (N1000)를 첨가한 구 등 총 7개 처리구를 7반복 완전 임의배치법으로 반복당 8수씩을 배치하였다 (Table 2).

Table 2. Experimental design

Treatment	Nonphytate P and phytase	No of Rep.	No of layer/rep.
C	100% P required by NRC	7	8
P250	68% P required by NRC + phytase 250 FTU ¹	7	8
P500	68% P required by NRC + phytase 500 FTU	7	8
P1000	68% P required by NRC + phytase 1,000 FTU	7	8
N250	68% P required by NRC + Natuphos 250 FTU	7	8
N500	68% P required by NRC + Natuphos 500 FTU	7	8
N1000	68% P required by NRC + Natuphos 1,000 FTU	7	8

¹ Phytase 1 unit(FTU)은 pH 5.5, 37°C 조건에서 0.0015 mol/l sodium phytate로부터 분당 1 μ mol의 무기인을 방출할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다.

라. 시험사료

시험사료는 옥수수-대두박 위주 사료로 에너지 함량은 2,778 kcal ME/kg, CP는 16.59%로 모든 처리구에서 동일한 수준이 되도록 조절하였으며, 유효인은 dicalcium phosphate(DCP)로 조절하였다. 시험사료의 배합을 및 영양소 Table 3에서 보는 바와 같다.

마. 사양관리

공시 산란계는 2수용 2단 철재 케이지에서 사육하였으며, 산란계의 요구량에 충족하도록 일일 수수당 평균 120 g을 시험사료로 급여하였고, 급수는 니플급수로 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 시험기간중 평균 온도는 20℃ 내외로 유지하였으며, 점등관리 및 기타 관리는 농장의 관행에 준하였다.

바. 산란능력 및 난각강도

사양기간 동안 매주 1번씩 사료잔량 및 분석에 이용할 계란을 채취하며 사료 섭취량을 측정하였고, 산란수와 연과란수는 시험기간중 매일 17:00시에 측정하여 산란율과 연과란율을 조사하였다. 그리고 산란율은 헨데이(hen-day) 산란율로 하였다.

난각강도 및 난각두께는 2주마다 수집한 계란 중에서 반복당 5개씩 처리구당 35를 선발하여 난중, 난각강도, 난각색, 농후난백높이, Haugh unit, 난황색도, 난각두께 등을 조사하였다.

사. 영양소 이용율 및 배분량

영양소 이용율과 분에 함유된 인을 측정하기 위하여 대사시험의 각각 케이지에서 전분채취법으로 5일 동안 대사시험을 실시하였다. 3일간의 적응기간을 가진 후 5일간 채취한 분을 pooling한 후 순환식 drying oven에 넣어 60℃에서 72시간 건조시킨 후 Wiley mill로 분쇄하여 분석에 이용한다.

사료 및 분 중의 영양소 함량은 AOAC 법(62)에 따라 분석하고, 인은 시료를 550℃에서 6시간 이상 회화한 후 전처리하여 spectrophotometer(Hitach Co. Japan)로 분석하였다.

아. 통계분석

모든 자료는 SAS (63)의 GLM procedure를 이용하여 Duncan's multiple range test(64)로 처리 평균간의 유의성 검정을 하였다.

Table 3. Formula and chemical composition of experimental diets

Item	C	P250	P500	P1,000	N250	N500	N1,000
Ingredients							
Corn	61.89	61.89	61.89	61.89	61.89	61.89	61.89
Animal fat	1.65	1.65	1.65	1.65	1.65	1.65	1.65
Soybean meal	25.68	25.68	25.68	25.68	25.68	25.68	25.68
DL-Methionine	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Limestone	9.09	9.09	9.09	9.09	9.09	9.09	9.09
di-Cal. phosphate	0.75	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Salt	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27
Mineral mix ¹	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
Vitamin mix ²	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
B-COM(A) ³	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
Choline chloride	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Scoria	0.00	0.40	0.35	0.25	0.40	0.35	0.25
phytase	0.00	0.05	0.10	0.20	0.05	0.10	0.20
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical compositions⁴							
MEn (kcal/kg)	2778.00	2778.00	2778.00	2778.00	2778.00	2778.00	2778.00
Crude protein (%)	16.59	16.59	16.59	16.59	16.59	16.59	16.59
Ether extract (%)	4.21	4.21	4.21	4.21	4.21	4.21	4.21
Crude fiber (%)	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16
Lysine (%)	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
Methionine (%)	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
Calcium (%)	3.70	3.61	3.61	3.61	3.61	3.61	3.61
Total P (%)	0.47	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39
P(%), available	0.25	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17

¹ Mineral mix: Mn, 20mg/kg; Zn, 25mg/kg; Fe, 30g/kg; Cu, 5g/kg; I, 0.25g/kg; Co, 0.15g/kg; Se, 0.10g/kg.

² Vitamin mix(unit/kg): vitamin A, 40,000,000IU; vitamin D3, 8,000,000IU; vitamin E, 1,000IU.

³ B-COM(A): vitamin B₁, 2,000mg; vitamin B₂, 6,000mg; Pha. acid, 1,000mg; Niacin, 3,000mg; vitamin B₆, 3,000 mg; Folic acid, 1,000mg; vitamin B₁₂, 10mg.

⁴ Calculated values.

제 2절 Phytase 생산균주의 선발

1. Phytase 생산균주의 탐색 및 동정

경남 남해안 및 중국 일대에서 수집한 토양 시료를 80℃에서 30분간 열처리를 한 후에 phytase screening medium (PSM)에 도말하여 37℃에서 2일간 정지 배양하여 PSM 평판배지 위에서 phytate 분해 환을 형성하는 균주를 1차적으로 선발하였다. 그 후에 1차 분리균주를 PSM 액체배지에서 진탕배양한 후에 원심 분리하여 균체를 제거하고 배양 상등액의 phytase 활성을 측정하여 활성이 높게 나타나는 7개의 균주를 2차 선발하였다. 그리고 이들 균주 중에서 상대적으로 활성이 높은 4개 균주의 PSM 액체배지 배양액을 이용하여 내열성과 내산성 조사를 한 후에 내열성과 내산성이 우수한 1개의 균주를 최종 선발하였고, 이 토양 분리 균을 SP4로 명명하였다.

토양으로부터 분리한 SP4 균주의 형태학적, 생화학적 특성을 조사하고 (Table 4) 전자현미경으로 관찰 한 결과 (Fig. 3), SP4 균주는 *Bacillus licheniformis*균으로 동정되었다.

Table 4. Morphological and biochemical characteristics of strain SP4

Morphology	
Spore shape	Rod
Spore	Subterminal
Mobility	+
Sporangium	Swollen
Biochemical characteristics	
Gram stain	+
Growth at 50℃	+
Growth in anaerobic	-
Enzyme activity of catalase	+
Nitrate reduction	+
Citrate utilization	-
VP	+
Gelatin	+
ADH	+

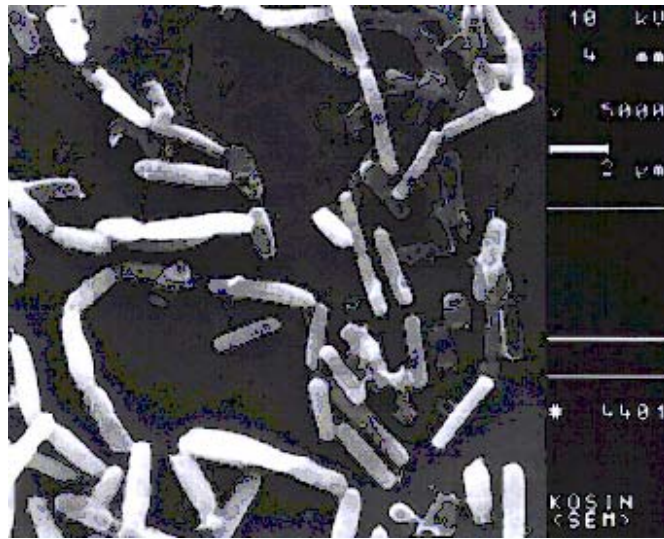


Fig. 3. Screening electron micrograph of strain SP4.

2. *Bacillus* sp. SP4 균주가 생산하는 phytase의 정제 및 반응특성 분석

가. *Bacillus* sp. SP4 균주가 생산하는 phytase의 정제

SP4 균주의 배양상등액으로부터 ultrafiltration과 DEAE-Sepharose 칼럼 크로마토그래피를 통해서 phytase를 부분정제하고 그 후에 불용성 Ca-phytate에 대한 phytase의 affinity를 이용하여 SP4 phytase를 순수하게 정제하였다 (Table 5). 본 연구에서 정제한 phytase를 SDS-PAGE로 분석한 결과 (Fig. 4), phytase가 순수하게 정제되었으며 그 분자량이 약 44 kDa임을 알 수 있었다.

Table 5. Purification summary of the *B. licheniformis* SP4 phytase

Purification step	Total activity (U/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Culture supernatant	61.8	66.5	1.1	1.0	100.0
Ultrafiltration	20.8	54.8	2.6	2.4	82.4
DEAE-Sepharose	2.4	15.2	6.3	5.7	22.9
Ca-phytate affinity	0.9	15.5	16.3	14.8	23.3

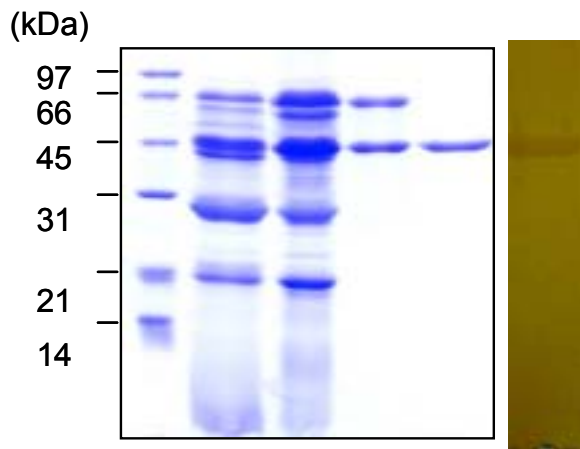


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified phytase from *B. licheniformis* SP4. Lane 1, molecular weight size marker; lane 2, culture supernatant; lane 3, ultrafiltration; lane 4, DEAE-sepharose column chromatography; lane 5, Ca-phytate affinity column chromatography; lane 6, activity staining of SDS-PAGE gel.

나. 정제 phytase의 반응특성

1) 기질 특이성

정제된 SP4 phytase의 기질특이성을 조사한 결과, phytate에 대해서는 높은 활성을 나타내지만 *p*-nitrophenylphosphate를 포함한 다른 phosphorylated compound는 전혀 분해하지 못하는 것으로 보아 본 연구의 *Bacillus licheniformis* SP4 phytase는 inositol phosphate에 특이적인 효소라는 것을 확인할 수 있었다 (Table 6).

한편, sodium phytate에 대한 SP4 phytase의 기질 친화력을 알아보기 위해 기질농도별로 효소 반응속도를 측정된 결과, Michaelis constant (K_m)가 0.38 mM로 나타났다 (Fig. 5). 지금까지 알려진 미생물 유래의 phytase 중 *A. niger* phytase는 0.005 mM, *A. terreus* 9A1 phytase는 0.011 mM, *E. coli* phytase가 0.13 mM인 것에 비하면 SP4 phytase 효소의 기질 친화력이 다소 떨어지지만 다른 *Bacillus* 유래의 phytase와는 기질 친화력이 다소 높거나 유사하였다.

Table 6. Relative activities of phytase for various substrates.

Substrate	Relative Activity (%)
Sodium phytate	100
Sodium pyrophosphate	ND
α -Glycerophosphate	ND
β -Glycerophosphate	ND
α -Naphthylphosphate	ND
<i>o</i> -Nitrophenyl phosphate	ND
Triphosphate	ND
ATP	ND
ADP	ND
AMP	ND

❖ ND: Not detected

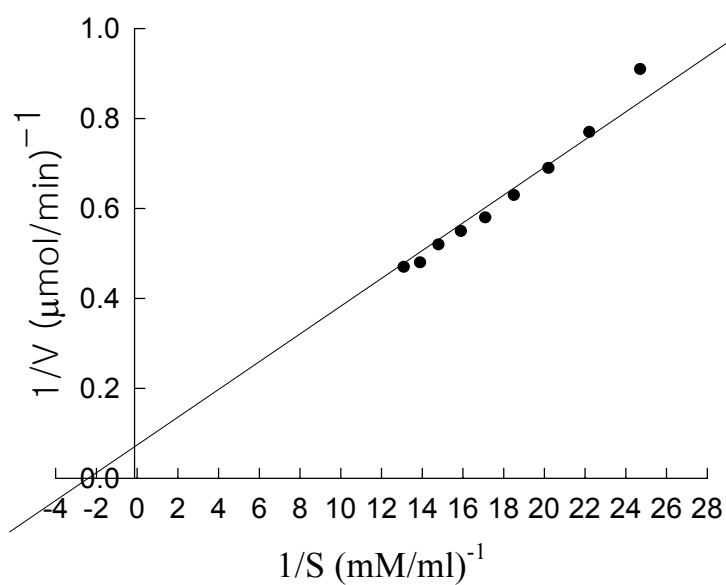


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of phytase on sodium phytate.

2) pH에 따른 반응특성 영향

Bacillus licheniformis SP4 phytase의 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 2.0~3.0은 100 mM Glycine-HCl 완충용액, pH 3.0~4.0은 100 mM formic acid-NaOH 완충용액, pH 4.0~7.0은 100 mM maleic acid-Tris-NaOH 완충용액, pH 7.0~9.0은 100 mM Tris-HCl 완충용액, pH 9.0~11.0은 100 mM Glycine-NaOH 완충용액을 사용하여 2 mM sodium phytate 기질용액을 사용하여 효소 활성을 측정된 결과, pH 7.0-8.0에서 최대 활성을 나타내었다 (Fig. 6). 이와 같은 결과는 다른 *Bacillus* 유래의 phytase가 중성 부근에서 최적 활성을 보이는 것과 비슷하였다. 그런데, *E. coli* phytase와 대부분 곰팡이 유래의 phytase는 비교적 낮은 pH에서 최고 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

본 효소의 pH 안정성을 검토하기 위하여 각 pH 별로 제조한 완충용액에 효소 액을 첨가하여 25°C에서 1시간 방치한 후 pH 7.0에서 효소의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과, SP4 phytase는 pH 5.0~11.0까지의 범위에서 안정하였다. 하지만 pH 4.0 이하의 낮은 pH에서는 급격히 실활하였다 (Fig. 7).

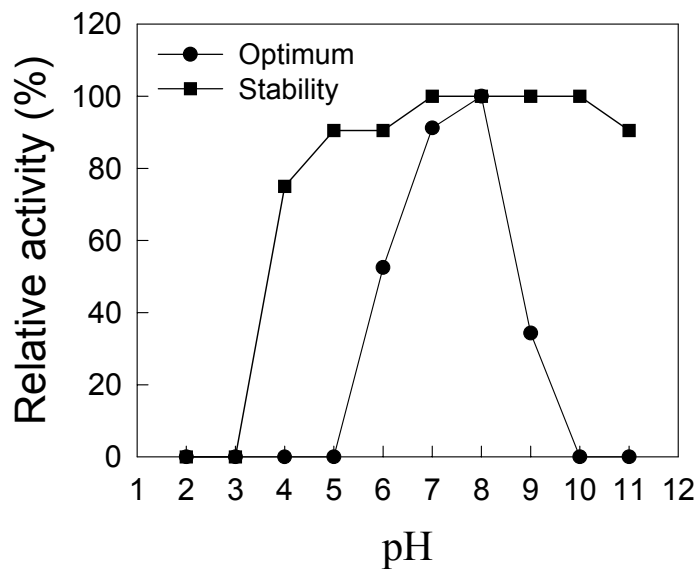


Fig. 7. Effects of pH on the phytase activity and stability. The enzyme was assayed various pHs. For the pH stability, the enzyme was pre-incubated at various pH buffer for 1h and remaining activity was measured at pH 7.0.

3) 온도에 따른 반응특성 영향

Bacillus licheniformis SP4 phytase의 최적 온도를 알아보기 위하여 20~90℃까지의 각 온도 별로 효소의 활성을 측정한 결과, 60℃에서 최대 활성을 나타내었다 (Fig. 8). 또한 정제 효소의 열 안정성을 알아보기 위하여 각 온도에서 10분간 처리한 후 잔존활성을 측정한 결과, 70℃까지의 온도에서는 활성이 전혀 감소하지 않는 것으로 확인되어 내열성이 뛰어남을 알 수 있었다 (Fig. 8). 이 결과로부터 본 연구의 SP4 phytase는 사료 제조과정 중의 pelleting 조건에 안정한 것으로 나타나 사료첨가제 용도로서의 효용성이 클 것으로 판단된다.

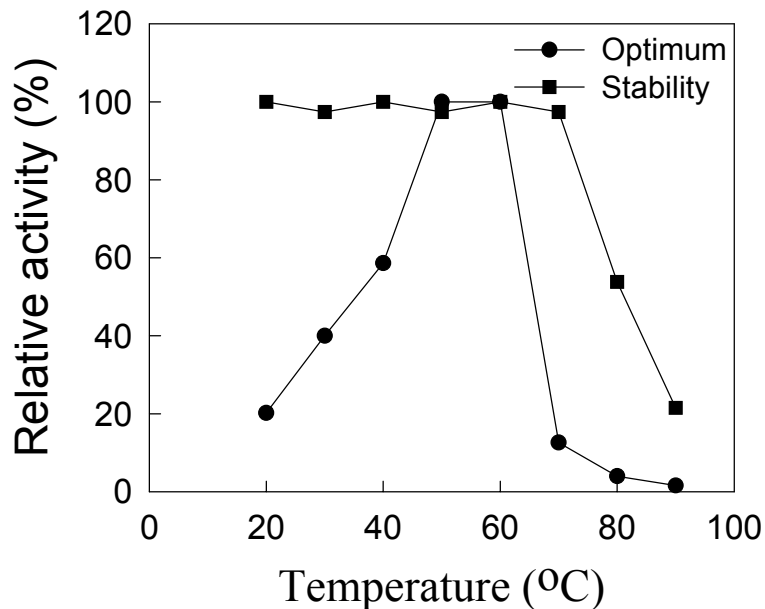


Fig. 8. Effects of temperature on the phytase activity and stability. The enzyme was assayed at various temperature. For the temperature stability, the enzyme was preincubated at various temperature for 10 min and the remaining activity was measured at 37°C for 20 min.

4) 칼슘이온이 효소의 pH 및 온도의 안정성에 미치는 영향

기존에 보고가 되어 있는 *Bacillus* 유래의 phytase는 효소활성에 있어서 칼슘이온의 존재가 필수적인 것으로 알려져 있기 때문에 칼슘이온이 SP4 phytase의 활성화에 미치는 영향을 조사해보았다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 정제된 SP4 phytase는 1 mM EDTA를 처리하였을 때 효소활성을 완전히 잃었다가 5 mM CaCl₂를 첨가하면 다시 phytate 분해능이 회복되는 것으로 보아 SP4 phytase도 calcium-dependent enzyme으로 판단된다. 그리고 정제된 효소에 1mM의 CaCl₂를 첨가하였을 때 첨가하지 않은 것에 비하여 효소의 고온에서의 열안정성이 크게 향상되었으며 pH 4에서의 내산성도 증가되었다 (Fig. 10).

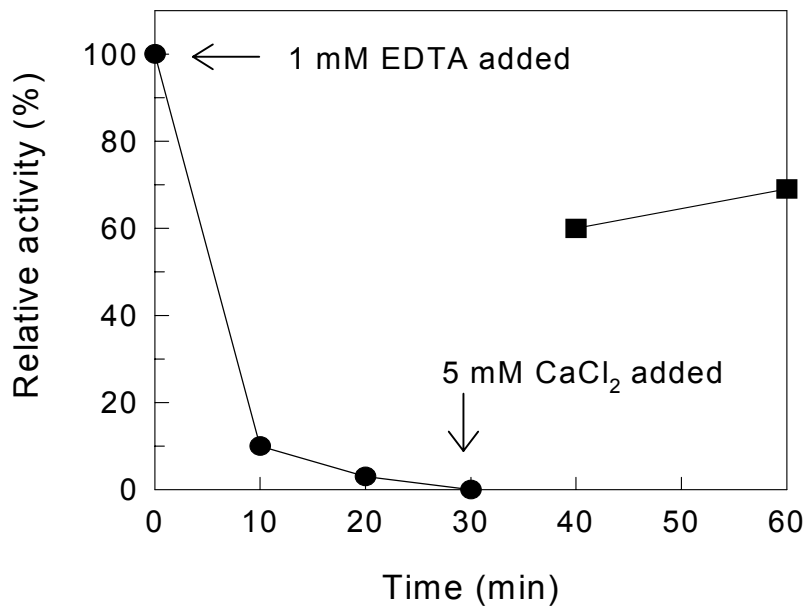


Fig. 9. Regeneration of EDTA-inactivated phytase by addition of CaCl₂. The phytase was incubated in addition of 5mM CaCl₂ after EDTA inhibition.

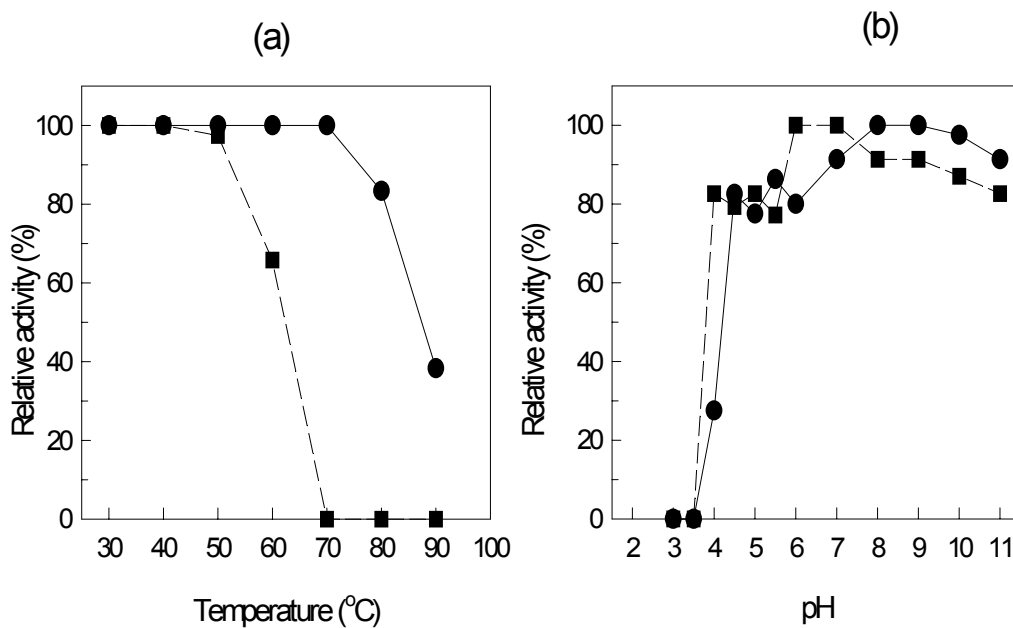


Fig. 10. Effects of CaCl₂ on the temperature and pH stability of phytase. For the temperature stability, the enzyme was preincubated at various temperature for 10min without or with 1mM CaCl₂ and the remaining activity was measured at 37°C for 20min. For the pH stability, the enzyme was pre-incubated at various pH buffer for 1h without or with 1mM CaCl₂ and the remaining activity was measured at pH 7.0.

5) 금속이온이 효소의 활성화에 미치는 영향

효소에 대한 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 각종 금속이온을 1 mM과 5 mM 농도로 효소에 첨가하여 37°C에서 30분간 방치한 후 잔존활성을 측정하였다. 그 결과, 칼슘 이온에 의해서는 활성화되었으나 Fe²⁺에 의해서는 강하게 저해를 받았고 Cu²⁺와 Zn²⁺에서도 약간의 저해를 받았다 (Table 7).

Table 7. Effect of metal ions on phytase activity.

Reagents	Relative activity (%)	
	1mM	5mM
None	100	100
CuSO ₄	82	80
ZnSO ₄	91	67
MgCl ₂	103	103
LiCl ₂	100	112
CaCl ₂	105	121
RbCl ₂	108	112
AgNO ₃	100	93
CoCl ₂	94	85
MnCl ₂	98	44
FeCl ₂	0	0

6) TLC를 이용한 phytate 반응산물 분석

가) Phytase 반응기작 모델

Phytic acid의 6개의 phosphate 그룹은 phytase의 종류에 따라서 가수분해 정도가 다르다. *A. niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *Emericella nidulans*, *Myceliophthora thermophila* 등 여섯 종류의 곰팡이 유래의 phytase의 최종 phytate 분해산물을 조사한 결과, 대부분 5개의 phosphate가 떨어진 *myo*-inositol 2-monophosphate였고 소량의 *myo*-inositol 혹은 *myo*-inositol 1-monophosphate가 검지되었다 (65). 이로부터 phytase는 기질에 대한 뚜렷한 입체특이성이 있다는 결론을 내릴 수 있었다. *E. coli* 유래의 phytase의 경우, 초기 반응산물에는 대부분의 *myo*-inositol tetrakisphosphate가 축적되다가 최종 산물은 *myo*-inositol bisphosphate와 trisphosphate이고 *myo*-inositol monophosphate는 생성되지 않았다. 이들 phytase의 반응 경로에 대해서는 아직 발표된바가 없다. 다만 3-phytase의 경우에는 반응초기에 phytic acid의 D-3 position phosphoester 결합을 가수분해하여 D-Ins(1,2,4,5,6)P₅이 중간산물이고, 6-phytase의 경우에는 L-6 (혹은 D-6) position에서 초기 가수분해가 일어나서 L-Ins(1,2,3,4,5)P₅가 중간산물로 나타난다.

Kerovuo 등은 처음으로 *Bacillus* 유래의 phytase (PhyC) 의 반응 경로를 분석하였다 (66). *Bacillus* 유래의 phytase는 6개의 phosphate 그룹 중 3개만 가수분해하여 두가지 *myo*-inositol trisphosphate 즉 $\text{Ins}(2,4,6)\text{P}_3$ 와 $\text{Ins}(1,3,5)\text{P}_3$ 가 최종 산물로 나타났다. 이러한 실험 결과와 *Bacillus* phytase의 구조분석에 근거하여 phytate의 가수분해에는 Fig. 11과 같은 경로가 있다고 추측하였다. 즉, phytase는 먼저 phytic acid의 2-과 4-position에 binding한 후 가운데 있는 3-position phosphate를 가수분해하여 $\text{Ins}(1,2,4,5,6)$ 을 생성하고, 계속하여 $\text{Ins}(1,2,4,5,6)$ 의 2-와 6-position에 binding하여 1-position phosphate를 가수분해하여 $\text{Ins}(2,4,5,6)$ 을 생성하고, 마지막으로 $\text{Ins}(2,4,5,6)$ 의 4-와 6-position에 binding하여 5-position phosphate를 가수분해하여 $\text{Ins}(2,4,6)\text{P}_3$ 을 생성한다. 혹은 똑 같은 원리로 6-, 4-, 2-position을 가수분해하여 $\text{Ins}(1,3,5)\text{P}_3$ 을 생성한다.

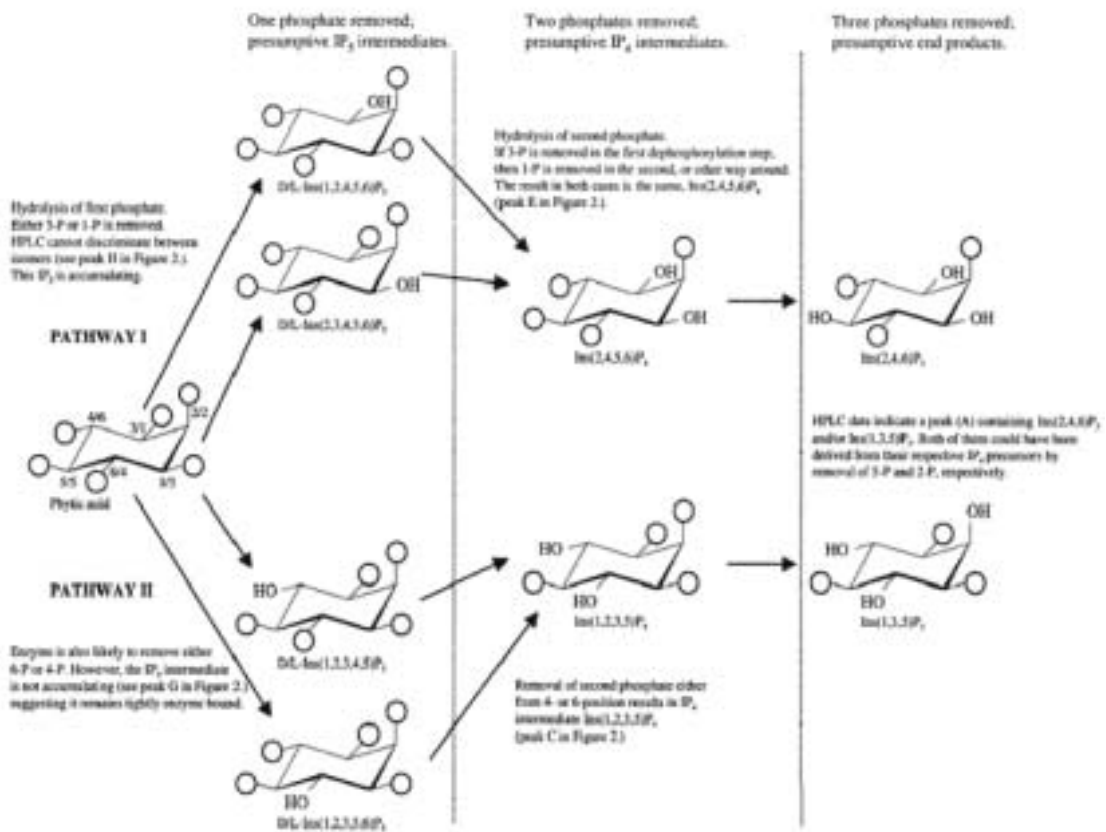


Fig. 11. Scheme of hydrolysis pathway of *B. subtilis* phytase.

Shin 등은 phytase의 단백질 구조에 근거하여 Fig. 12에서와 같은 또 다른 분해경로를 제시하였다 (67). 그들은 *Bacillus* phytase 효소에는 두개의 phosphate binding site가 존재한다고 하였다. 그중 하나는 phosphate를 자르는 site로 Pho1이라 하고 다른 하나는 phosphate binding affinity site로 Pho2라고 하였다. Phytic acid의 phosphate는 인접한 두개 그룹에서 한개의 phosphate는 효소의 phosphate binding site에 즉 Pho2 site에 binding하고 다른 한개는 cleavage site 즉 Pho1 site에서 가수분해되어 Ins(2,4,6)P₃혹은 Ins(1,3,5)P₃가 생성된다. 결국 *Bacillus* phytase는 phytic acid의 모든 위치의 phosphate를 가수분해할 수 있는데 Ins(2,4,6)P₃혹은 Ins(1,3,5)P₃가 생성된 후에는 Pho2 site에 대한 phosphate의 binding affinity가 떨어지기 때문에 반응이 아주 느리게 진행될 것으로 추측하였다.

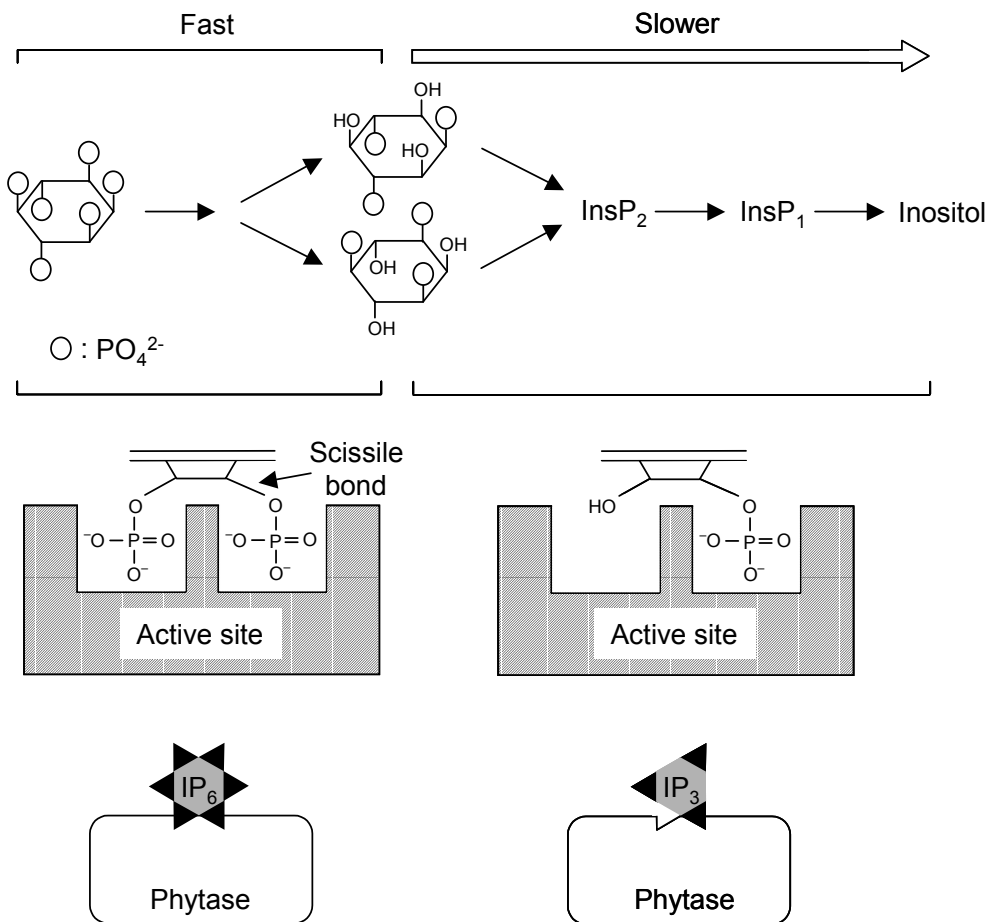


Fig. 12. The pathway of phytate hydrolysis with the *B. amyloliquefacience* phytase.

나) *Bacillus* sp. SP4 phytase의 반응기작

Bacillus sp. SP4 phytase의 반응기작을 알아보기 위해서 phytate 반응산물을 TLC를 통해서 분석하였다. 그 결과, 그림 13(a)에서 보는 바와 같이 순수정제된 효소를 이용하여 phytate를 가수분해하였을 때 free phosphate와 inositol triphosphate가 최종산물로 생성되는 것을 확인할 수가 있었다. 그리고 여러가지 inositol phosphate 기질 중에서 Ins(1)P₁와 Ins(1,4)P₂는 절단할 수 없고, Ins(1,4,5)P₃와 Ins(3,4,5,6)P₄에서는 한개의 phosphate를 가수분해하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 13b). 이러한 사실로 미루어 보아 SP4 phytase는 곰팡이 유래의 phytase와는 다른 반응기작을 가지고 있으며, 기존에 보고가 되어 있는 다른 *Bacillus* 유래의 phytase와 유사한 반응기작을 가지고 있는 것으로 판단된다.

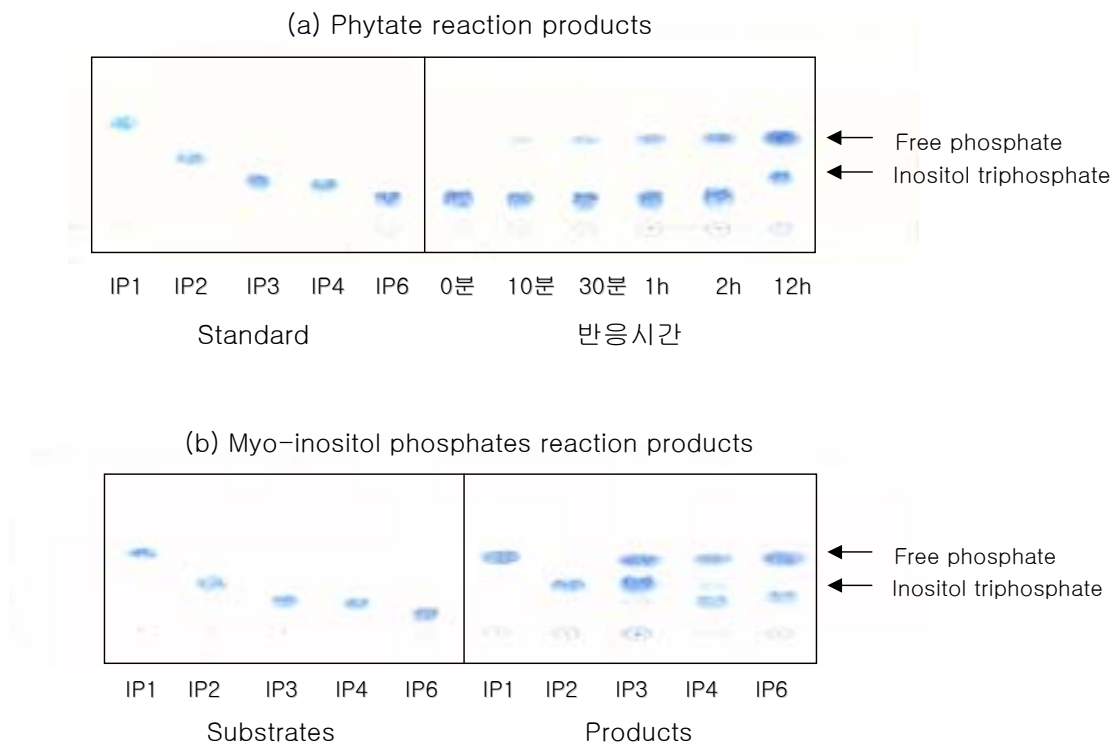


Fig. 13. HPTLC analysis of hydrolytic products of *B. licheniformis* SP4 phytase for sodium phytate (A) and various inositol phosphate (B). IP1, Ins (1)P; IP2, Ins(1,4)P₂; IP3, Ins(1,4,5)P₃; IP4, Ins(3,4,5,6)P₄; IP6, Ins(1,2,3,4,5,6)P₆.

7) 정제효소의 N-말단 아미노산 서열의 분석

정제된 SP4 phytase의 N-terminal sequencing을 통하여 mature protein의 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과, Ser-Asp-Pro-Tyr-His-Phe-Thr-Val-Asn-Ala-Ala-Ala-Glu-Thr-Glu-Pro 순으로 확인되었다. GenBank database를 이용하여 분석을 해본 결과, SP4 phytase의 N-말단 아미노산 서열은 기존에 보고된 *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 유래의 phytase와 높은 상동성을 나타냈다.

제 3절 Phytase 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정

1. Phytase 유전자의 클로닝

Bacillus sp. SP4 phytase 유전자를 클로닝하기 위해서 순수 정제된 SP4 효소의 N-terminal sequencing 결과와 기존에 보고가 되어있는 *B. amyloliquefaciens* DS11 phytase 유전자의 염기서열 결과를 고려하여 SP4 phytase 유전자를 증폭하기 위한 primer 5'-AACTGCAGCAATTAAGTGCACG-3'와 5'-GCTCTAGAGCTTGGATAAGCTGC-3'를 합성하였다. 그리고 이들 primer를 사용하여 SP4 염색체 DNA를 주형으로 한 PCR을 실시하였고, PCR에 의해 증폭된 1.3kb 정도의 DNA 조각을 pGEM-T Easy vector에 클로닝하였다. 이렇게 얻은 재조합 plasmid DNA인 pGEM-phy4를 *Spe* I, *Nco* I 제한효소로 절단하여 동일한 제한효소로 절단한 pBluescript II SK (+) plasmid DNA에 정 방향으로 insertion하였고 *E. coli* transformant에서 phytase의 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 이 재조합 plasmid를 pBSK-phy4로 명명하였다.

2. SP4 phytase 유전자의 염기서열 분석

Bacillus sp. SP4 유래 DNA의 염기서열은 재조합 plasmid pBSK-phy4를 분리하여 ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing kit와 자동 염기서열 분석기 (Automatic Sequencer ABI310)를 사용하여 결정하였다. 염기서열 결정으로 밝혀진 *Bacillus* sp. SP4 유래의 phytase 유전자는 Fig. 14에서 보는 바와 같이 1,152개의 염기로 구성되어 있었고 383개의 아미노산을 암호화하고 있었다. 그리고 30개의 아미노산으로 구성된 signal sequence가 발견되었고, mature enzyme의 N-말단 아미노산 서열은 *Bacillus* sp. SP4 균주의 배양상등액에서 정제된 phytase의 N-말단 아미노산 서열(Fig. 14의 밑줄)과 정확하게 일치하였다.

한편, SP4 phytase 유전자의 염기서열과 아미노산 서열을 기존에 보고가 되어있는

다른 phytase 유전자와 상동성을 비교해 보았을 때, SP4 phytase 유전자는 *B. amyloliquefaciens* DS11 유래의 *TS-phy* 유전자 (98.2%), *B. subtilis* VTT E-68013 유래의 *phyC* 유전자 (93.2%), *B. subtilis* 168 유래의 *168-phy* 유전자 (98.2%)와 높은 상동성을 나타냈고 *B. licheniformis* 유래의 *phyL* 유전자 (64.9%)와는 낮은 상동성을 보였다 (Fig. 15). 그리고 이들 phytase의 아미노산을 비교해 본 결과, 여섯 개의 칼슘 binding site를 구성하는 21개의 아미노산 중에서 *168phyA*에서 한개 (60L→V), *phyL*에서 세 개 (60L→V, 339I→T, 340D→E)를 제외하고 나머지는 모두 같았다.

1	CCTCACATTGGACAATCTTCACAAAACTTAACACTGAACCTTCCTGTATGTTATTTACAATTAAGTGAACGTTCAITAAAAGGAGGAAAGGAAA	9
96	ATG AAT CAT TCA AAA ACA CTT TTG TTA ACC GCG GCA GCC GGA TTG ATG CTC ACA TGC GGT GCG GTT TCT TCC CAG GCC AAG CAT MET Asn His Ser Lys Thr Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Gly Leu MET Leu Thr Cys Gly Ala Val Ser Ser Gln Ala Lys His	179
180	AAG CTG TCT GAT CCT TAT CAC TTT ACC GTG AAT GCG GCG GCG GAA ACG GAG CCG GTT GAT ACA GCC GGT GAT GCA GCT GAT GAT Lys Leu <u>Ser Asp Pro Tyr His Phe Thr Val Asn Ala Ala Ala Glu Thr Glu Pro</u> Val Asp Thr Ala Gly Asp Ala Ala Asp Asp	263
264	CCT GCG AIT TGG CTG GAC CCC AAG AAT CCT CAG AAC AGC AAA TTG ATC ACA ACC AAT AAA AAA TCA GGC TTA GTC GTG TAC AGC Pro Ala Ile Trp Leu Asp Pro Lys Asn Pro Gln Asn Ser Lys Leu Ile Thr Thr Asn Lys Lys Ser Gly Leu Val Val Tyr Ser	347
348	CTA GAG GGA AAG ACG CTT CAT TCC TAT CAT ACC GGG AAG CTG AAC AAT GTT GAT ATC CCG TAT GAT TTT CCG TTG AAC GGA AAA Leu Glu Gly Lys Thr Leu His Ser Tyr His Thr Gly Lys Leu Asn Asn Val Asp Ile Arg Tyr Asp Phe Pro Leu Asn Gly Lys	431
432	AAA GTC GAT AIT GCG GCG GCA TCC AAT CCG TCT GAA GGA AAG AAT ACC ATT GAG ATT TAC GCC ATT GAC GGG AAA AAC AGC ACA Lys Val Asp Ile Ala Ala Ala Ser Asn Arg Ser Glu Gly Lys Asn Thr Ile Glu Ile Tyr Ala Ile Asp Gly Lys Asn Ser Thr	515
516	TTA CAA AGC AIT ACA GAT CCA GAC CCG CCG ATT GCA TCA GCA AIT GAT GAA GTA TAC GGT TTC AGC TTG TAC CAC AGT CAA AAA Leu Gln Ser Ile Thr Asp Pro Asp Arg Pro Ile Ala Ser Ala Ile Asp Glu Val Tyr Gly Phe Ser Leu Tyr His Ser Gln Lys	599
600	ACA GGA AAA TAT TAC GCG ATG GTG ACA GGG AAA GAA GGC GAA TTT GAA CAA TAC GAA TTA AAT GCG GAT AAA AAT GGA TAC ATA Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala MET Val Thr Gly Lys Glu Gly Glu Phe Glu Gln Tyr Glu Leu Asn Ala Asp Lys Asn Gly Tyr Ile	683
684	TCC GGC AAA AAG GTA AGG GCG TTT AAA ATG AAT TCT CAG ACA GAA GGG ATG GCA GCA GAC GAT GAA TAC GGC AGT CTT TAT ATC Ser Gly Lys Lys Val Arg Ala Phe Lys MET Asn Ser Gln Thr Glu Gly MET Ala Ala Asp Asp Glu Tyr Gly Ser Leu Tyr Ile	767
768	GCA GAA GAA GAT GAG GCC ATC TGG AAG TTC AGC GCT GAG CCG GAC GGC GGC AGT AAC GGA ACG GTT ATC GAT CGT GCC GAC GGC Ala Glu Glu Asp Glu Ala Ile Trp Lys Phe Ser Ala Glu Pro Asp Gly Gly Ser Asn Gly Thr Val Ile Asp Arg Ala Asp Gly	851
852	AGG CAT TTA ACC CCT GAT AIT GAA GGA CTG ACG AIT TAC TAC GCT GCT GAC GGG AAA GGT TAT CTG CTT GCA TCA AGC CAG GGT Arg His Leu Thr Pro Asp Ile Glu Gly Leu Thr Ile Tyr Tyr Ala Ala Asp Gly Lys Gly Tyr Leu Leu Ala Ser Ser Gln Gly	935
936	AAC AGC AGC TAC GCG AIT TAT GAA AGA CAG GGA CAG AAC AAA TAT GIT GCG GAC TTT CAG ATA ACA GAC GGG CCT GAA ACA GAC Asn Ser Ser Tyr Ala Ile Tyr Glu Arg Gln Gly Gln Asn Lys Tyr Val Ala Asp Phe Gln Ile Thr Asp Gly Pro Glu Thr Asp	1019
1020	GGC ACA AGC GAT ACA GAC GGA AIT GAC GIT CTG GGT TTC GGG CTG GGG CCT GAA TAT CCG TTC GGC CTT TTT GTC GCA CAG GAT Gly Thr Ser Asp Thr Asp Gly Ile Asp Val Leu Gly Phe Gly Leu Gly Pro Glu Tyr Pro Phe Gly Leu Phe Val Ala Gln Asp	1103
1104	GGA GAA AAT ATA GAT CAC GGC CAA AAA GTG AAT CAA AAT TTT AAA ATG GTG CCT TGG GAA AGA ATC GCC GAT AAA ATC GGC TTT Gly Glu Asn Ile Asp His Gly Gln Lys Val Asn Gln Asn Phe Lys MET Val Pro Trp Glu Arg Ile Ala Asp Lys Ile Gly Phe	1187
1188	CAC CCG CAG GTC AAT AAA CAG GTT GAC CCG AGA AAA CTG ACT GAC AGA AGC GGA AAA TAA ACATGAAAAAAGCAGCCTTATCAAAGCTGCTT His Pro Gln Val Asn Lys Lys Val Asp Pro Arg Lys Leu Thr Asp Arg Ser Gly Lys ***	1278
1279	TTTTTGTGTGTAAGAGCGTTCATGAGAAAAGTCTTGAAACGGATAGCCGCAAGCAGCACGCCGCGACCGGTACTGTCTCTTGA	1377

Fig. 14. Nucleotide sequence of the *phy4* and its deduced amino acid sequence. The N-terminal amino acid of the purified SP4 phytase are underlined.

<i>Phy4</i>	1	MNHSKTLTLLT	AAAGLMLTCG	AVSSQAKHKL	SDPYHFTVNA	AA	TEPVDTA	GDAAD	AIW	60
<i>TS-phy</i>	1	60
<i>PhyC</i>	1	60
<i>PhyL</i>	1	..FY...A.S	TL.ASLWS-P	SW..LPHNEA	AAHKE...T	D.P	D.....	60
<i>168Phy</i>	1	60
<i>Phy4</i>	61	LDPKNPQNSK	LITTNKKSGL	VVYSLEGKTL	HSYHTGKLN	DIRYDFPLN	GKKVDIAAAS	120
<i>TS-phy</i>	61	A.....M	120
<i>PhyC</i>	61T.....	D.MN	120
<i>PhyL</i>	61	VH..Q.ED.R	I..D.K.Q	AA.PF	L..N...DI..G	120
<i>168Phy</i>	61MP	120
<i>Phy4</i>	121	NRSEGKNTIE	IYAIDGKNST	LQSITDPDRP	IASAIDEVYG	FSLYHSQKTG	KYYAMVTGKE	180
<i>TS-phy</i>	121GN	180
<i>PhyC</i>	121	M..H	T.N	T	180
<i>PhyL</i>	121	..D...V	..F.EKSK	KN.VN.QK	QTD.QFN	180
<i>168Phy</i>	121G	180
<i>Phy4</i>	181	GEFEQYELNA	DKNGYISGKK	VRAFKMNSQT	EGMAADDEYG	SLYIAEEDA	IWKFSAPEDG	240
<i>TS-phy</i>	181	240
<i>PhyC</i>	181K	R	240
<i>PhyL</i>	181FD	NGK.QVE	..S..S	..LKMV	..S	240
<i>168Phy</i>	181	240
<i>Phy4</i>	241	GSNGTVIDRA	DGRHLTPDIE	GLTIYYAADG	KGYLLASSQG	NSSYAIVERQ	GQNKYVADFQ	300
<i>TS-phy</i>	241	300
<i>PhyC</i>	241R	MDKR	300
<i>PhyL</i>	241	DK.KIV	..P..SGE	E..I	DDRD.R	K.D	TA.S	300
<i>168Phy</i>	241	300
<i>Phy4</i>	301	ITDGPET	T	SDTDGIDVLG	FGLGPEYPFG	LFVAQ	G	HGQKVNQNF	KMVPWERIAD	360
<i>TS-phy</i>	301A	360
<i>PhyC</i>	301	IAI	360
<i>PhyL</i>	301	E..K.I	I	KT..Y	I	N.PAI.S.K	360
<i>168Phy</i>	301	FA	360
<i>Phy4</i>	361	KIGFHPQVNK	QVDPKLTDR	SGK	383
<i>TS-phy</i>	361M	383
<i>PhyC</i>	361	Q...R.LA.E	383
<i>PhyL</i>	361	ALDDK.DIDD	KN	A-	381
<i>168Phy</i>	361T	383

Fig. 15. Peptide sequence comparison among five *Bacillus* phytases. The peptide sequences of the *phy4* (this study), *TS-phy* (*B. amyloliquefaciens* DS11), *phyC* (*B. subtilis* VTT E-68013), *phyL* (*B. licheniformis*) and *168phy* (*B. subtilis* 168) phytases are aligned. The residues involved in conforming the six calcium binding sites, ten of which are low-affinity sites and are involved in enzyme activity (gray box), while the other eleven are high-affinity sites and are responsible for enzyme thermostability (black box).

제 4절 분자진화기술에 의한 내열성 · 내산성 phytase의 개발

1. 내산성 증진 변이체 선별을 위한 High-throughput screening system 개발

Phytase가 단위동물을 위한 사료첨가제로 개발되기 위해서는 phytase가 갖추어야 할 몇가지 효소적 특성들이 있는데 그 중에서 내열성, 내산성, 중성 pH와 중온에서의 높은 비활성, 단백질분해효소에 대한 저항성 등이 특히 중요하다고 할 수 있다. 가장 이상적인 사료첨가제용 phytase는 pellet 형태의 사료 제조공정 중에 수반되는 고온 가공 조건에서 효소가 변성되지 않아야 하며, 단위동물에 의해 사료와 함께 섭취된 phytase가 위산과 담즙산의 낮은 pH에서 안정하게 유지되어 많은 양의 효소가 장관까지 도달해야 하며, 장관에 도달한 phytase는 소장 내의 소화효소(특히 단백질분해효소)에 안정하게 유지되어 하며, 장관 내의 조건인 중성 pH와 중온에서 phytate에 대한 높은 활성을 나타내야 할 것이다. 그런데 본 연구의 SP4 phytase는 앞에서 기술한 바와 같이 내열성이 우수하여 pellet 가공조건에 매우 안정한 것으로 밝혀졌으며, 단위동물에 의해 섭취된 곡물 중 phytate의 가수분해가 이루어지게 되는 장관 내의 조건인 중성 pH와 중온에서 높은 안정성과 비교적 우수한 상대활성을 나타냈다. 그러나 본 연구를 통해서 SP4 phytase가 낮은 pH에서 안정성이 낮은 것으로 나타나 SP4 phytase를 사료첨가제로 개발하기 위해서는 단위동물의 위에서 효소가 안정하게 유지될 수 있도록 내산성을 증대시키는 것이 바람직할 것으로 여겨진다.

분자진화기술 (Directed molecular evolution)은 자연계 진화 현상을 *in vitro*에서 인위적으로 가속화시켜 단기간 내에 우리가 원하는 성질을 갖는 유전자를 선별하는 기술을 말한다. 즉, 서로 다른 돌연변이를 가지고 있는 상동유전자 군으로부터 유전자의 일부를 서로 바꾸어 다양한 재조합 유전자 라이브러리(random mutants library)를 만들어 내고, 이 library부터 유용한 유전자를 선별하는 기술을 말한다. 그러므로 random mutants library 제조기술과 더불어 다양한 재조합 유전자 변이체들 중에서 원하는 유전자 변이체를 간편하고, 빠르며, 대량으로 선별할 수 있는 탐색 기술, 즉 HTS(High-Throughput Screening) 기술 또한 매우 중요하다. 그런데 효소 개량을 위한 범용의 변이체 탐색기술은 있을 수가 없다. 효소가 달라지면 screening 방법이 달라져야 하고 같은 효소일지라도 개량목적에 따라서 screening 방법이 달라질 수 밖에 없다. 그러므로 특정효소의 개량을 위해서는 개량목적에 맞는 screening 방법을 그때그때 맞게 구축해나가는 수 밖에 없다.

내산성 증진 phytase mutant를 선별하는 데에는 배지성분 중에 phosphate가 존재하고 선별과정 중에 산처리 조건을 도입해야 하는 등의 어려움이 존재하였다. 그러나 본 연구팀은 Fig. 16에 나타낸 바와 같이 내산성이 증대된 phytase mutant를 효율적으로 선별할 수 있는 nitrocellulose membrane을 이용한 hightroughput screening(HTS) system 을 확립하였다.

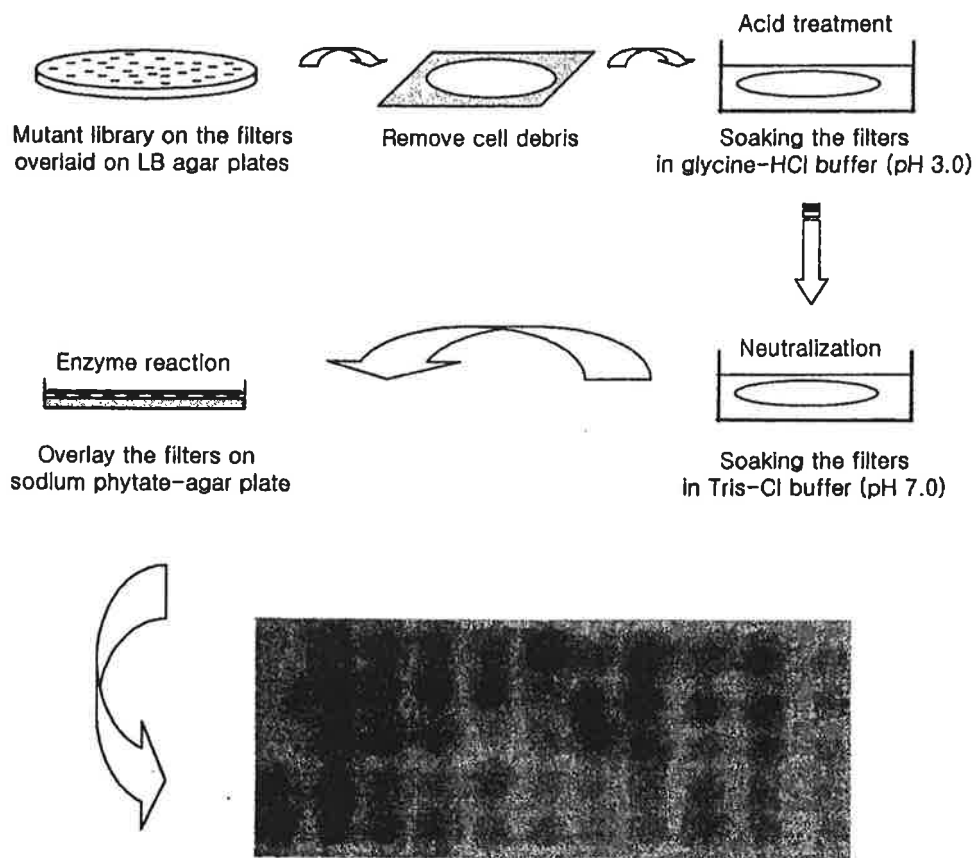


Fig. 16. The procedure of screening for acid tolerance phytases.

2. 내열성 · 내산성 phytase 개발을 위한 1차 개량

가. Error-prone PCR mutagenesis

Bacillus sp. SP4 phytase 유전자에 돌연변이를 도입시키기 위해서 1.2 kb 크기의 *phy4* 유전자를 template로 하여 error-prone PCR을 수행하였다. 그 후에 error-prone PCR 산물을 pJH27 vector에 연결하고 *B. subtilis* DB431 균주에 도입함으로써 내산성이 증가된 *phy4* 유전자의 돌연변이체를 screening하기 위한 random mutant library를 제조하였다. 이 library로부터 내산성이 증가된 *phy4* 유전자의 돌연변이체를 nitrocellulose membrane을 이용한 초고속 선별방법(High Throughput Screening)에 의해 선별하였다. 이때 phytase가 부착된 nitrocellulose membrane을 100 mM glycine 완충용액(pH 3.0)에 2시간동안 방치한 후에 잔존활성을 관찰하였다. 그 결과, 약 1만마리의 돌연변이체로부터 야생종에 비해 내산성이 증가된 것으로 추정되는 37개의 colony를 1차적으로 선별하였다. 그 후에 이들 재조합 *Bacillus*의 배양상등액을 1 mM CaCl₂가 첨가된 100 mM Tris-Cl bufer(pH 7.0) 용액으로 투석하여 얻은 조효소액을 이용하여 내산성을 정량적으로 조사하였다. 그 결과, Fig. 17에서 보는 바와 같이 pH 3.0 조건에서 야생종에 비해 내산성이 증가된 6개의 mutant (EP2-2, EP8-1, EP19-1, EP19-2, EP19-3, EP25-1)를 최종적으로 선별하였다. 이들 변이체 내에서의 변이부위는 Fig. 19에 나타낸 바와 같다.

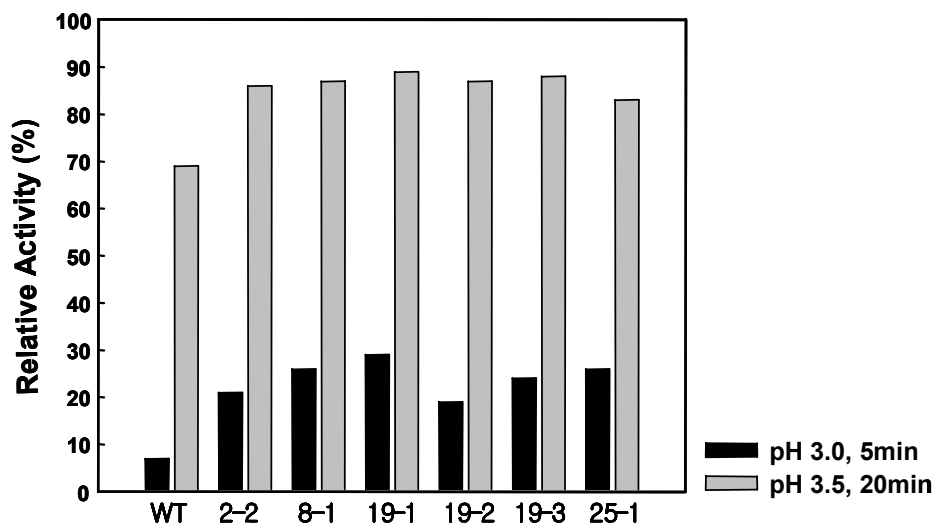


Fig. 17. pH stability of the error-prone PCR mutants.

나. Error-prone PCR mutants의 *in vitro* recombination

Error-prone PCR random mutagenesis에서 선발된 6개의 돌연변이체를 사용한 *in vitro* recombination을 수행한 후에 상기와 같은 방법으로 약 1만개 정도의 형질전환체를 screening 하였다. 이때 산처리 조건은 pH 2.7, 2시간이었다. Error-prone PCR mutants 중의 하나인 EP25-1보다 내산성이 더욱 증진된 변이체 후보들을 스크리닝한 후에 이들 배양 상등액을 1 mM CaCl₂가 첨가된 100 mM Tris-Cl bufer(pH 7.0) 용액으로 투석하여 얻은 조효소액을 이용하여 내산성을 정량적으로 조사하였다. 그 결과, 내산성이 부가적으로 증진된 4종의 변이체 (S5, S13, S14, S15)를 최종 선발하였고, 이들 중에서도 S15 mutant의 내산성이 야생종 뿐만 아니라 error-prone PCR을 통하여 얻은 mutant들보다 내산성이 크게 증진된 것이 확인되었다 (Fig. 18)

상기 S5, S13, S14, S15 mutant 유전자의 염기서열을 분석해 본 결과, Fig. 19에서 보는 바와 같이 His28Tyr, Tyr105Arg, Gly126Arg, Ser153Gly 변이잔기가 4개의 mutant 내에서 다수 포함된 것을 확인할 수 있었고 따라서 이들 4개 변이잔기가 내산성 증진에 크게 기여할 것으로 유추되었다. 그런데, 내산성이 가장 높은 S15 mutant에서는 이들 변이잔기를 모두 포함하고 있었고 결국 wild-type phytase에서 5개 아미노산이 치환된 mutant라는 것을 확인하였다 (Fig. 19).

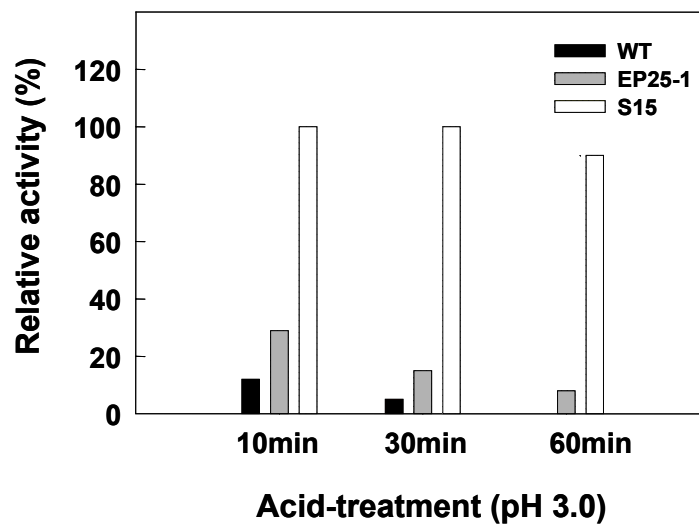


Fig. 18. pH stability of the S15 phytase mutant.

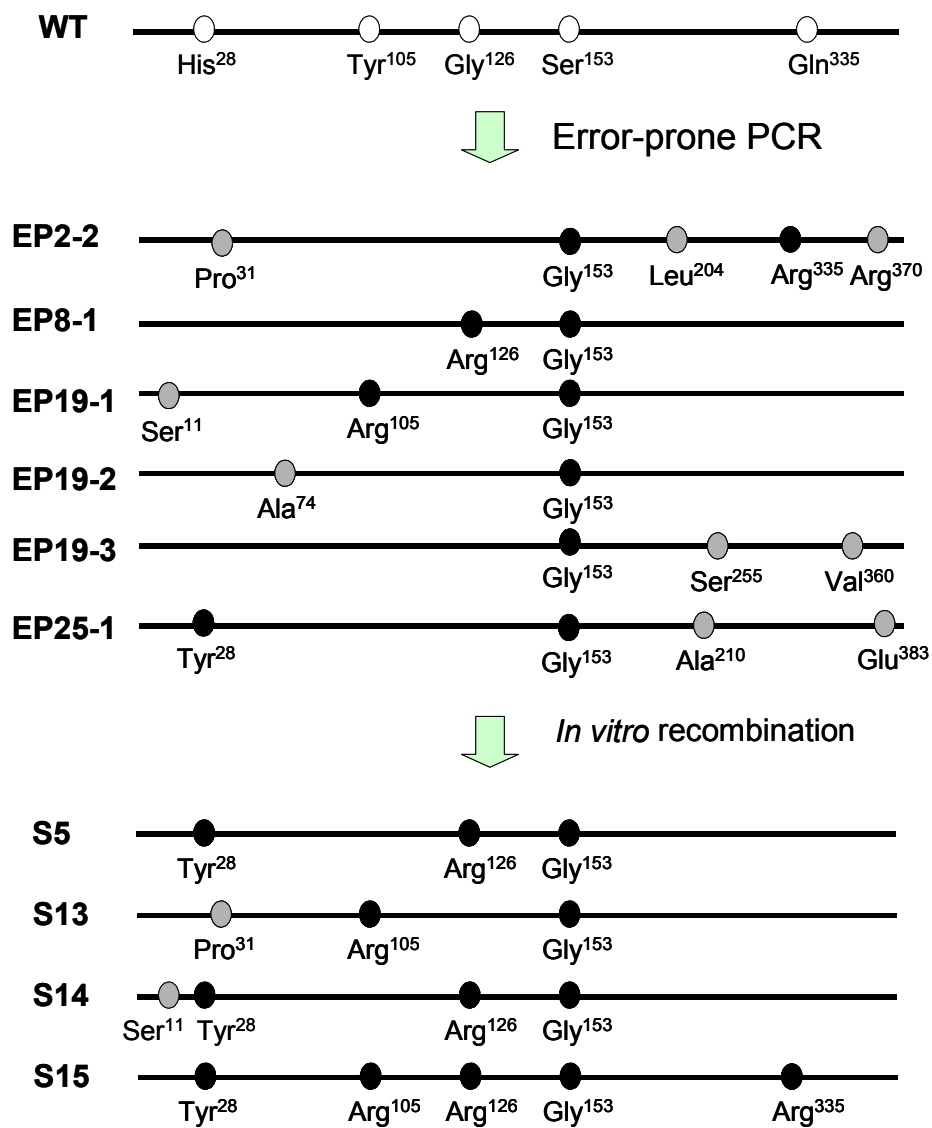


Fig. 19. Mutation positions of error-prone PCR mutants and the *in vitro* recombination mutant in the phytase wild-type gene.

다. S15 phytase의 반응특성 분석

S15 phytase의 효소 반응특성을 wild-type phytase의 반응특성과 비교하기 위해서 wild-type, EP25-1, S15 phytase 효소 단백질을 정제하였다. 세 가지 균주의 배양 상등액으로부터 ultrafiltration과 DEAE-Sepharose column chromatography를 통해서 phytase를 부분 정제하고 그 후에 불용성 Ca-phytate에 대한 phytase의 affinity를 이용하여 phytase를 순수하게 정제하였다.

Wild-type, EP25-1, S15 phytase 시료를 SDS-PAGE로 분석한 결과, phytase가 비교적 순수하게 정제되었고, specific activity는 각각 34.3 U/mg, 35.0 U/mg, 36.4 U/mg으로 큰 차이가 없음을 확인하였다 (data not shown).

그리고 정제 phytase의 상온에서의 내산성을 측정하여 pH 3.0 (100mM Glycine-Cl buffer, 1mM CaCl₂)에서의 half-life ($T_{1/2}$)를 비교한 결과, S15 phytase의 half life는 44분으로 wild-type에 비하여 pH 3.0에서의 내산성이 20배 이상 증가하였고 산처리 2시간 후에도 30% 가까이 활성이 남아있음을 알 수 있었다 (Fig. 20).

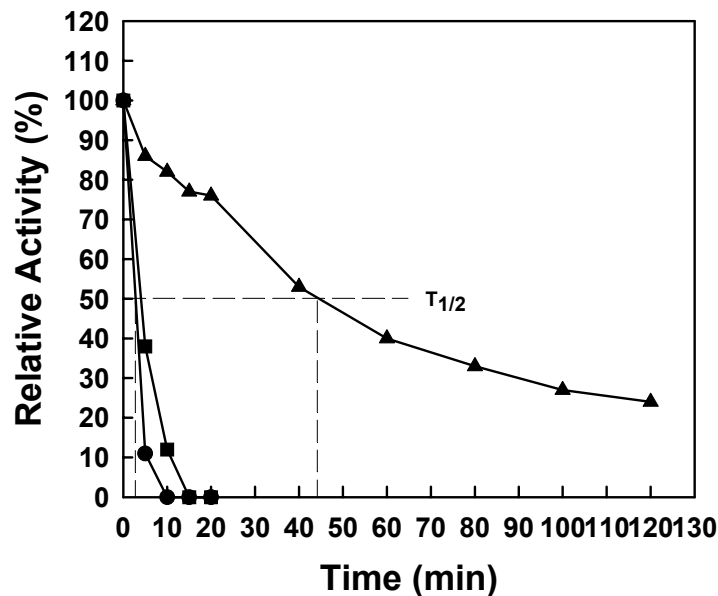


Fig. 20. pH stability of the wild type phytase (●), EP25-1 phytase (■) and S15

phytase (▲). These enzymes were pre-incubated at pH 3.0 buffer for 1h and the remaining activity was measured at pH 7.0.

또한 Wild-type, EP25-1, S15 phytase의 내열성을 비교한 결과, S15 phytase의 내열성이 wild-type에 비하여 다소 낮아진 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 21). 그러나 충분한 양의 CaCl_2 를 첨가했을 때는 S15 phytase의 내열성이 wild-type phytase의 내열성과 같은 수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다 (data not shown).

한편, 단위동물의 위와 소장에서 분비되는 단백질 분해효소에 대한 개량 phytase의 저항성 정도를 분석하였다. 그 결과, wild-type phytase나 S15 phytase 모두가 소장에서 분비되는 단백질분해 효소인 트립신과 키모트립신에 대해서 저항성을 나타냈다. 그러나 위에서 분비되는 단백질 분해 효소인 펩신에 대해서 wild-type phytase는 펩신 반응에 매우 민감한 반면에 S15 phytase는 펩신 반응에 대해서 저항성을 나타냈다 (Fig. 22). 이들 결과로 미루어보아 wild-type phytase가 펩신 반응에 민감한 이유는 펩신에 의한 phytase의 분해라 하기 보다는 펩신 반응조건인 산성조건에서 내산성이 낮은 것에 기인된 것으로 여겨진다. 결국, 본 연구에서 개량된 S15 phytase는 단위동물에서 분비되는 단백질분해효소인 펩신, 트립신, 키모트립신에 대해서 모두 저항성을 가지고 있는 것으로 확인되었다.

그 외 정제된 wild-type, EP25-1, S15 phytase의 최적 온도와 최적 pH, 금속이온에 의한 영향을 측정하여 비교한 결과 비슷한 것을 확인하였다 (data not shown).

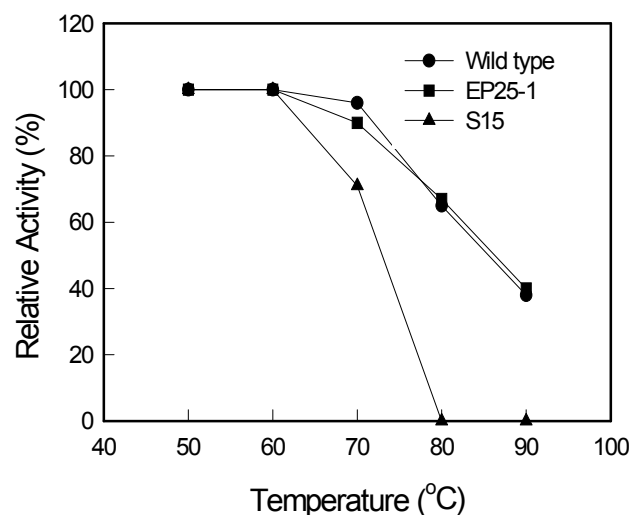


Fig. 21. Temperature stability of wild type phytase (●), EP25-1 phytase (■) and S15 phytase (▲). These enzymes were pre-incubated at various temperature for 10 min and the remaining activity was measured at 37°C for 20 min.

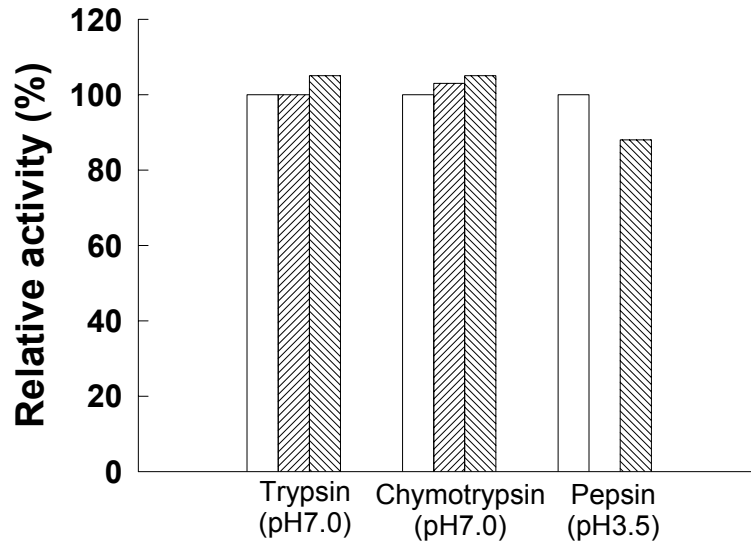


Fig. 22. Retained enzyme activities after 2hr incubation at 37°C in the presence of trypsin, chymotrypsin and pepsin. □, *Aspergillus ficcum* phytase as a control; ▨, SP4 wild-type phytase; ▩, SP4 S15 mutant phytase.

3. 내열성 · 내산성 phytase 개발을 위한 2차 개량

가. 각 변이잔기가 S15 phytase의 내열성 및 내산성에 미치는 영향

S15 phytase 내에 존재하는 5개의 변이잔기들 중에서 각각의 변이잔기가 S15 phytase의 내열성 및 내산성에 기여하는 정도를 확인해 보기 위해서 통상의 site-directed mutagenesis 방법에 의해 wild-type 유전자에 각각의 S15 변이잔기가 도입된 5개의 mutants를 제조하였고 또한 S15 유전자에 각각의 변이잔기를 야생형 잔기로 역 돌연변이시킨 5개의 mutants를 제조하였다. 그 후에 부분 정제한 효소 액을 사용하여 각 mutant들의 내산성과 내열성을 조사하였다. Table 8에서 보는 바와 같이 wild-type 유전자에서 각각 His28Tyr, Tyr105Arg, Gly126Arg로 치환시킨 mutant들의 내산성이 증가하였고, S15 유전자에서도 이 3개의 잔기를 각각 wild-type residue로 back-mutation 시킨 mutant들의 내산성이 S15 phytase의 내산성보다 떨어지는 것으로 보아 이들 3개의 잔기가 내산성 증진에

가장 큰 영향을 미치는 것으로 유추된다. 또한 이들 잔기는 내열성에도 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 그리고 Ser153 잔기는 내산성 보다는 오히려 내열성에 더 영향을 미치는 것으로 판단된다. 또한 Gln335 잔기의 경우에는 내산성 증진에는 어느 정도 기여를 하지만 내열성에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

Table 7. Site-directed mutagenesis of the wild-type and S15 phytase, and its effect on pH and temperature stability.

처리조건 \ 잔존활성	대조구	Wild-type 유도 변이체					
	WT	H28Y	Y105R	G126R	S153G	Q335R	
내산성	pH 3.0, 5분	8%	24%	21%	17%	8%	10%
	pH 3.0, 10분	8%	13%	10%	8%	7%	9%
	pH 3.0, 30분	ND	ND	ND	ND	ND	ND
내열성	80℃, 10분	36%	35%	23%	14%	24%	13%
	80℃, 15분	25%	22%	12%	7%	16%	11%
	80℃, 20분	18%	16%	9%	5%	13%	8%

처리조건 \ 잔존활성	대조구	S15 유도 변이체					
	S15	Y28H	R105Y	R126G	G153S	R335Q	
내산성	pH 3.0, 5분	70%	51%	53%	51%	68%	61%
	pH 3.0, 10분	60%	38%	44%	46%	57%	55%
	pH 3.0, 30분	43%	11%	17%	21%	38%	32%
내열성	80℃, 10분	28%	10%	8%	19%	17%	30%
	80℃, 15분	15%	4%	6%	15%	6%	15%
	80℃, 20분	9%	5%	5%	10%	5%	12%

ND, Not Detected.

나. Site-directed saturation mutagenesis

상기 결과로부터 내산성 증진에 가장 큰 영향을 미치는 아미노산 잔기는 His28Tyr, Tyr105Arg, Gly126Arg임을 알 수 있었다. 따라서 S15 phytase의 내산성을 부가적으로 증진시키기 위하여 site directed mutagenesis 방법을 이용하여 추가 개량을 수행하였다. 먼저 3개의 잔기 중에서 내산성 증진에 대한 기여도가 다소 약한 Gly126Arg 잔기의 saturation mutagenesis를 수행하였다. 상기 연구수행 방법에서 서술한 바와 같이 mutant library를 제작한 후 약 1,000개 정도의 형질전환체를 screening한 결과, S15 phytase와 내산성 정도가 조금 증진된 Arg126Pro 변이체를 선발할 수 있었다 (data not shown).

그 후에 126번 아미노산 잔기를 S15 잔기인 arginine 또는 새로 선발된 proline으로 고정하고 28번과 105번 잔기를 동시에 saturation mutagenesis 시켰다. Mutant library를 제조하여 약 1만마리 정도의 transformant를 pH 2.7에서 산처리한 후 내산성이 증진된 변이체를 screening하였다. 그 결과, 18개의 mutant를 1차적으로 선발하였고 이들 변이체들의 유전자 염기서열 및 내산성 측정 등을 통하여 내산성 및 내열성이 가장 뛰어난 Tyr28Trp/Arg105Leu/Arg126Pro 변이체 (R12로 명명함)를 최종 선발하였다.

다. R12 phytase의 반응특성 분석

R12 phytase의 내산성과 내열성을 평가하기 위해서 wild-type, EP25-1 (error-prone PCR mutant), S15 (*in vitro* recombination mutant), R12 (saturation mutagenesis mutant) phytase를 순수 분리하였다 (data not shown).

상기 순수정제된 phytase들의 내산성과 내열성을 측정한 결과, pH 3.0 (25°C)에서 조건에서 R12 phytase의 내산성이 S15 phytase보다 더 증가하였고 (Fig. 23), 내열성도 S15 phytase보다 더 증가하여 wild-type phytase의 내열성과 비슷한 수준을 나타내는 것을 확인하였다 (Fig. 24). 그러나 R12 phytase의 내산성을 동물의 체온과 비슷한 37°C에서 측정한 결과, pH 3.0 조건에서 내산성이 낮은 낮음을 확인하였다 (Fig. 25). 따라서, R12 phytase의 내산성을 더욱 증가시키기 위한 추가개량이 필요할 것으로 판단되었다.

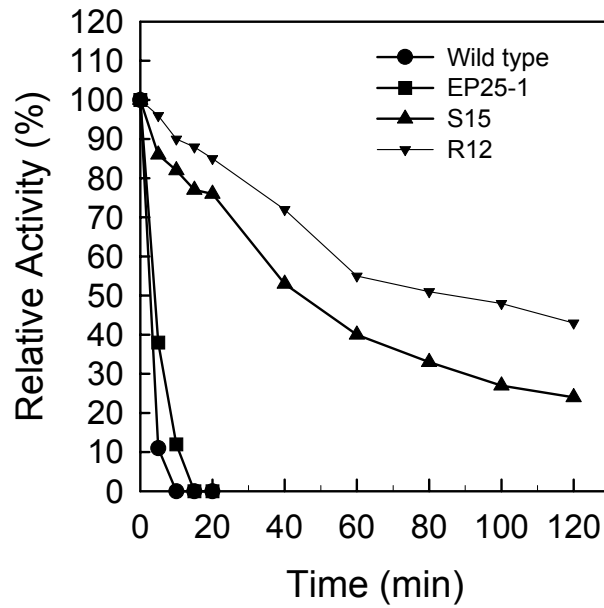


Fig. 23. pH stability of wild type phytase (●), EP25-1 phytase (■), S15 phytase (▲) and R12 phytase (▼). These enzymes were pre-incubated at pH 3.0 buffer, 25°C and the remaining activity was measured at pH 7.0.

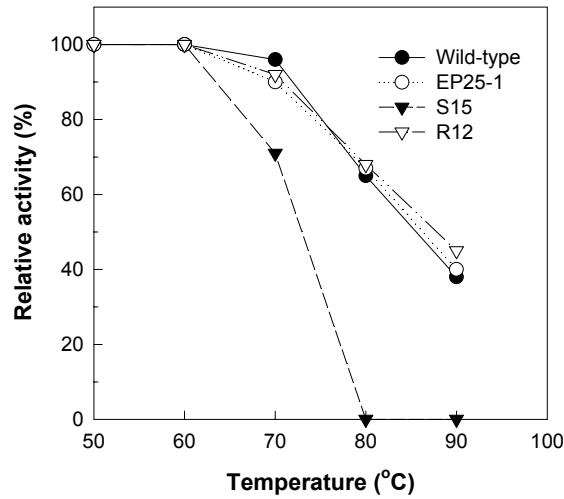


Fig. 24. Temperature stability of the wild type phytase (●), EP25-1 phytase (○), S15 phytase (▼) and R12 phytase (▽).

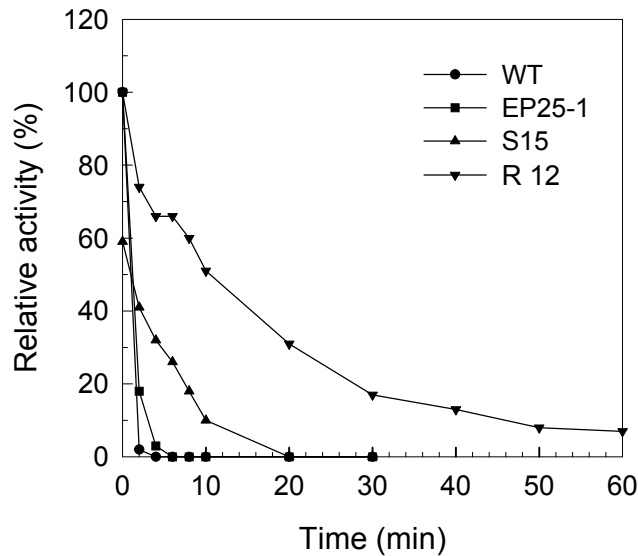


Fig. 25. pH stability of wild type phytase (●), EP25-1 phytase (■), S15 phytase (▲) and R12 phytase (▼). These enzymes were pre-incubated at pH 3.0 buffer, 37°C and the remaining activity was measured at pH 7.0.

4. 내열성 · 내산성 phytase 개발을 위한 3차 개량

가. Error-prone PCR mutagenesis

R12 phytase의 내산성을 부가적으로 증대시키기 위해서 R12 phytase 유전자 DNA를 주형으로 한 error-prone PCR mutagenesis를 수행하였다. Error-prone PCR 조건은 1차 개량에서의 PCR 조건과 거의 비슷한데, 다만 $MnCl_2$ 를 0.05 mM 농도로 낮추고 PCR cycle 수를 15 cycle로 낮춰서 무작위 돌연변이가 적게 도입되게 하였다. 그 후에 상기와 동일한 방법으로 random mutant library를 제작하였고 pH 2.5, 2시간 조건으로 산처리를 수행한 후 내산성이 증진된 mutant를 screening하였다. 약 1만 마리 정도의 변이체를 screening한 결과, R12 phytase보다 내산성이 부가적으로 증진된 mutant 2개 (EPII-26, EPII-40)를 최종 선발하였다. 이들 변이체 유전자의 염기서열을 분석하여 아미노산을 비교한 결과, EPII-26 변이체는 R12 phytase에 Asp312Asn 변이가 도입되었고 EPII-40 변이체의

경우에는 R12 phytase에 Glu218Val 변이가 도입되어 있었다 (Fig. 26).

나. Site-directed saturation mutagenesis

상기 결과의 변이잔기인 Asp312Asn과 Glu218Val를 R12 phytase에 도입함으로써 내산성을 극대화시키고자 하였다. 이를 위해서 내산성이 상대적으로 더 증가한 Asp312Asn 변이체 (EPII-26) 유전자 DNA를 주형으로 하여 Glu218 잔기의 saturation mutagenesis를 수행하였다. 약 500마리 정도의 변이체를 screening하여 내산성이 더욱 증가된 변이체 1개를 최종 선발하였고, 이 phytase 변이체를 SM2로 명명하였다. SM2 phytase 유전자의 염기서열을 분석한 결과, Glu218 잔기가 Phe으로 치환되어 있었다 (Fig. 26).

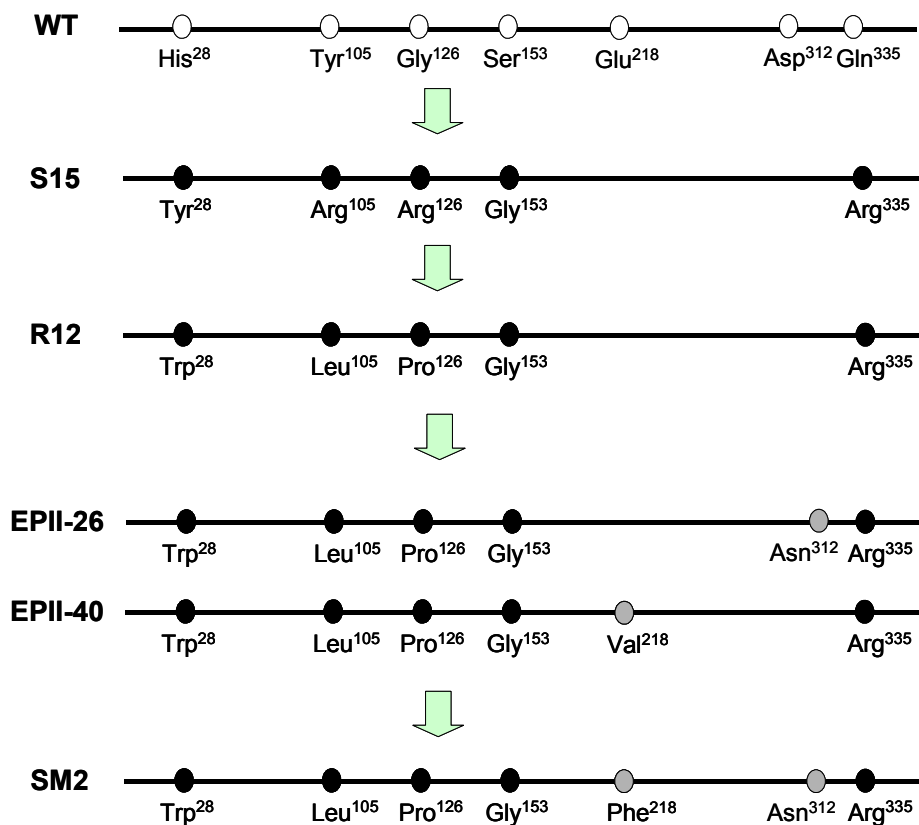


Fig. 26. Mutation positions of mutants in the phytase gene.

다. SM2 phytase의 반응특성 분석

SM2 phytase의 내산성과 내열성을 평가하기 위해서 wild-type, EP25-1, S15, R12, SM2 phytase를 순수 분리하였다 (data not shown).

상기 순수정제된 phytase들의 내산성과 내열성을 측정한 결과, pH 3.0, 25°C 조건에서 산처리를 하였을 경우에 SM2 phytase의 내산성 half-life가 wild-type phytase보다 100배 이상 증가하였고 산처리 2시간 후에도 70% 이상의 활성이 잔존함을 확인하였다 (Fig. 27). 그리고 내열성도 R12 phytase와 마찬가지로 wild-type phytase 수준과 비슷함을 확인하였다 (Fig. 28). 또한 37°C, pH 3.0 조건에서 내산성을 확인한 결과, 산처리 1시간 후에도 80% 이상의 잔존활성을 유지하였다 (Fig. 29). 한편, SM2 phytase의 sodium phytate에 대한 비활성 및 최적 pH, 최적 온도 등의 반응특성 들은 wild-type phytase와 비슷한 경향을 보였다 (data not shown). 이러한 결과로부터 SM2 phytase는 다른 반응특성들은 wild-type과 크게 변함이 없으나 사료첨가제 용도로서 단점으로 지적되었던 wild-type phytase의 낮은 내산성을 크게 변화시켜 내산성이 매우 증가된 것으로 평가된다.

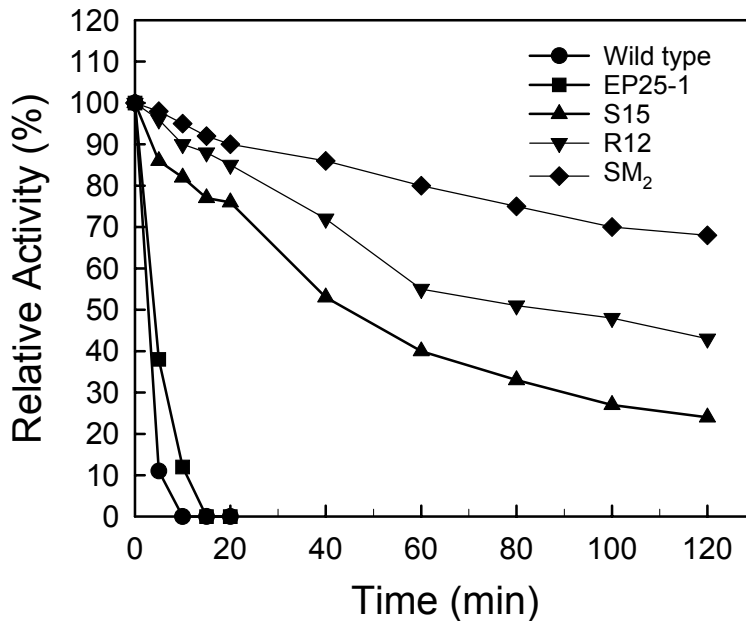


Fig. 27. pH stability of the wild type phytase (●), EP25-1 phytase (■), S15 phytase (▲), R12 phytase (▼) and SM2 phytase (◆). These enzymes were pre-incubated at pH 3.0 buffer, 25°C and the remaining activity was measured at pH 7.0.

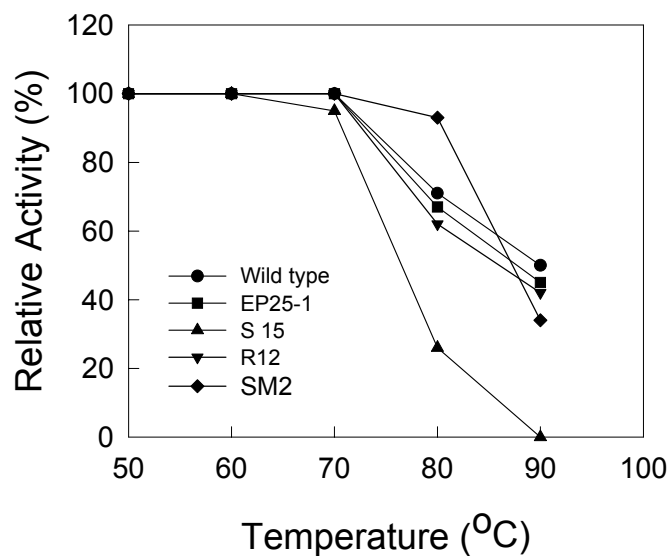


Fig. 28. Temperature stability of the wild type phytase (●), EP25-1 phytase (■), S15 phytase (▲), R12 phytase (▼) and SM2 phytase (◆). These enzymes were pre-incubated at various temperature for 10min and the remaining activity was measured at 37°C for 20 min.

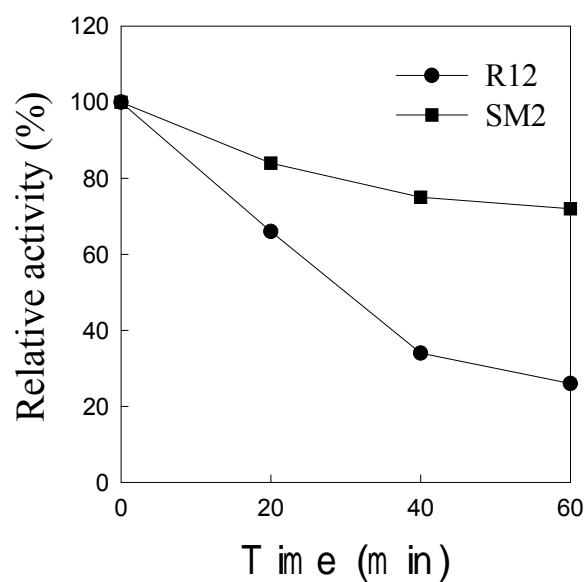


Fig. 29. pH stability of the R12 phytase and SM2 phytase. These enzymes were pre-incubated at pH 3.0 buffer, 37°C and the remaining activity was measured at pH 7.0.

제 5절 분자진화기술에 의한 내열성 · 내산성 phytase의 비활성 증진

1. 비활성 증진 변이체 선별을 위한 High-throughput screening system 개발

비활성 증진 phytase mutant를 선별하기 위한 high throughput screening(HTS) system을 확립하였다. 내산성 증진 phytase mutant를 선별하기 위한 HTS system에서는 nitrocellulose membrane을 이용하였으나 비활성 증진 phytase mutant를 선별하기 위한 HTS system에서는 96-well plate를 사용하여 sodium phytate 기질에 대한 효소반응 정도를 측정하였다.

B. subtilis DB431 형질전환체를 QPix (GENETIX, UK)를 이용하여 최소배지 (0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.1% sodium citrate, 0.02% MgSO₄, 0.2% Yeast extract, 0.5% glucose, 1mM CaCl₂, 50μg/ml Tryptophan, 5μg/ml kanamycin) 200μl씩 분주되어 있는 96-well plate에 picking하여 30℃에서 2일간 정치 배양하였다. 배양액은 4,200 rpm에서 15분간 원심분리한 후 HT Station 1200 (Cosmotech, Japan)를 사용하여 배양상등액을 4배 희석하였다. 그 후에 희석액 20 μl씩을 새 96-well plate에 옮기고 80 μl의 기질 (2 mM sodium phytate)을 첨가한 후 37℃에서 2시간 반응을 시켰다. 마지막으로 100 μl의 발색시약을 첨가하여 발색한 후 Microplate reader (Model 550, Bio-Rad, USA)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였고 대조구보다 높은 흡광도 값을 나타내는 변이체를 screening하였다.

2. Tn-RCM 기술을 이용한 random mutant library의 제조

분자진화기술에 이용되는 단백질의 변이를 만드는 기술로써 현재 많이 이용되고 있는 기술로는 site-directed mutagenesis, saturation mutagenesis, error-prone PCR 등이 있다. 그런데, site-directed mutagenesis 기법은 돌연변이 염기서열을 가지는 oligonucleotide를 이용해서 DNA 상의 특정 부위를 치환시켜 원하는 부위에 DNA 변형을 유도하는 기술이다. 이 방법은 치환시키고자 하는 단백질 특정부위의 구조나 기능 등에 대한 정보를 미리 알고 있어야 한다는 점 때문에 제한적으로 이용되고 있으며 폴리펩티드 상의 각 아미노산 잔기를 따라가면서 체계적으로 모든 돌연변이를 유도하기에는 부적절한 방법이다. 또한, 특

정 아미노산 잔기를 모든 가능한 아미노산으로 치환시키기 위해서는 degenerated oligonucleotides를 이용한 saturation mutagenesis 기법이 이용되고 있다. 그러나 이 방법 역시 폴리펩티드 서열을 따라서 각 아미노산 잔기를 체계적으로 돌연변이를 유도하기에는 적합하지 않다. 만약 500개의 아미노산 잔기로 이루어진 단백질의 모든 잔기를 다른 아미노산으로 치환된 mutant library를 제조하고자 한다면 최소한 500개 이상의 돌연변이성 oligonucleotides가 필요하며, 또한 500개의 독립적인 돌연변이 유발 반응이 필요하게 되어 경제적 부담과 노동력이 요구된다. 한편, library 형태로 DNA 상에서 무작위 돌연변이를 유도하는 방법으로는 error-prone PCR이 가장 많이 사용되고 있다. 이 방법은 PCR시 반응조건을 조절함으로써 Taq polymerase의 에러율을 변화시켜 random mutant library를 쫓는 것이다. 이 방법은 원하는 돌연변이 빈도를 얻기 위해서는 에러율을 적절히 조절해야 하는 단점이 있고, 짧은 길이의 DNA 부위 내에도 다수의 돌연변이들이 함께 일어날 빈도가 낮아 소 multiple mutation을 유발시키기에는 충분하지 않다. 또한 각각의 아미노산 잔기에 대해서 가능한 모든 아미노산 치환을 유발시킬 수 없는 단점이 있다. 그러나 본 과제 주관연구기관에서 상기의 돌연변이 기법들의 단점을 극복할 수 있는 새로운 기술을 phytase를 model system으로 하여 개발하였다. Tn-RCM으로 명명된 이 기술은 폴리펩티드의 무작위 위치에서 각각의 아미노산 잔기에 대해서 모든 가능한 아미노산 치환을 유발할 수 있는 기술이다.

가. Transposon을 삽입할 기질 plasmid DNA의 제작

pJH27-SM2 plasmid를 주형으로 5'-CCGCTCGAGCGTTCATTAAGGAGG-3' primer와 5'-CGGACTAGTGTATTTCGCTTCTG-3'를 이용하여 SM2 phytase 유전자를 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 PCR purification kit (Qiagen)로 정제한 후 *Xho* I 과 *Spe* I 제한효소로 절단하여 0.8% 아가로스 gel에서 elution 하였다. 다음 *Xho* I 과 *Spe* I 제한효소로 절단한 pBluescript IISK plasmid에 삽입하여 pBSK-SM2 (파이타제 유전자는 Lac promoter 방향과 반대방향으로 삽입됨)를 제작하였다.

나. Transposon의 삽입

pBSK-SM2 plasmid DNA를 기질로 하고, GPS-LS system (New England BioLabs Inc.)을 이용하여 Tn7 transposon을 아래와 같이 삽입하였다. 약 0.08 μ g 정도의 pBSK-SM2 plasmid DNA에 1× GPS Buffer, 1 μ l의 pGPS5 Donor DNA (0.02 μ g)를 첨가

하여 총 부피를 18 μ l로 조정하였다. 여기에 1 μ l의 TnsABC Transposase를 첨가한 후 37°C에서 10분간 incubation 하였다. 그 후에 1 μ l의 Start Solution를 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시켰고 마지막으로 75°C에서 10분간 열처리하여 반응을 중지시켰다. 이 반응액으로 *E. coli* MC1061을 형질전환하여 ampicillin (100 μ g/ml)과 kanamycin (15 μ g/ml)이 함유된 LB 한천 배지에 도말하였다. 한천 배지에서 자란 콜로니 약 50만개 정도를 모아서 DNA를 추출하였다. 이렇게 얻은 pBSK-SM2/Tn plasmid를 *Pme* I 제한효소(Tn7 유전자 내부에 존재하는 *Pme* I 제한효소 인식 염기서열이 존재)로 절단하여 Tn7 유전자를 제거하여 pBSK-SM2/Tn/ *Pme* I 단편 DNA를 얻었다. 이때 phytase 유전자 내에서 Tn7이 삽입되었던 부위에 모두 15 bp의 염기가 첨가된다.

다. 카세트 유전자를 이용한 무작위적인 코돈의 치환

1) 제1카세트 유전자의 삽입 및 제거

pBC KS plasmid DNA를 주형으로 하고 phycas1-f primer (5'-ATCCCCCGGG ATC CTATGTATCCGCTCATGAGACAATAACC-3', *Sma* I 과 *Bam*H I 제한효소 인식 염기서열을 함유)와 phycas1-r primer (5'-ATCCCCCGGGTCTGCACTCTTACTACTAGATCCTTTTTTGATC-3', *Sma* I 과 *Bsg* I 제한효소 인식 염기서열을 함유)를 이용하여 PCR를 수행하여 chloramphenicol-resistance 유전자 (promoter 포함)를 증폭하였다. 그 후에 *Sma* I 제한효소로 절단하고 아가로스 젤에서 elution하여 제1카세트 유전자를 얻었다. 이렇게 얻은 제1카세트 유전자를 insert로 하고 pBSK-SM2/Tn/*Pme* I 단편과 ligation 하여 제1카세트 library를 제작하였다. 약 50만개 정도의 형질전환체 colony에서 추출한 library DNA를 다시 *Xho* I 과 *Spe* I 제한효소로 절단하여 단편 DNA를 추출하여 새로운 pBluescript II SK plasmid에 삽입하여 Tn7 유전자가 vector 내부에 들어간 부분은 제거하여 pBSK-SM2/CAS1 library를 제작하였다. pBSK-SM2/CAS1 library DNA를 먼저 *Bsg* I 제한효소로 절단하고 T4 DNA polymerase를 이용하여 3' 돌출말단 염기를 제거하였다. 이때 1 μ g DNA 당 0.1~0.3 unit의 T4 DNA polymerase를 사용하여 12°C에서 20분 반응시킨 후 1 mM의 EDTA를 첨가하여 75°C에서 10분 열처리하여 반응을 중지시켰다. 계속하여 *Bam*H I 제한효소로 절단하고 정제하여 제2카세트 유전자를 삽입할 vector를 제작하였다. 이때 *Clas*II 효소인 *Bsg* I 의 절단에 의하여 파이타제 유전자에서 2 bp의 염기가 제거된다.

2) 제2 카세트 유전자의 삽입 및 제거

pBC KS plasmid DNA를 주형으로 하고 phycas2-f primer (5'-CGCGGATCCTA TCTGCACTATGTATCCGCTCATGAGACAATAACC-3', *Bam*H I 과 *Bsg* I 제한효소 인식 염기서열을 함유)와 20개의 phycas2-r primer (5'-TCGTAXXXTTGACTCCTAGCCA TTCTGCACTCTTCAVVTAGATCCTTTTTTGA-3', *Mly* I 과 *Bsg* I 제한효소 인식 염기서열을 함유, XXX 위치에 각각 20가지의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 포함)를 이용하여 rTaq polymerase를 사용한 PCR를 수행하여 chloramphenicol-resistance 유전자 (promoter 포함)를 증폭하였다. 그후에 *Bam*H I 과 *Mly* I 제한효소로 절단하고 정제하여 위에서 제조한 pBSK-SM2/CAS1 library/*Bam*H I /*Bsg* I -T4 단편 DNA와 ligation 하였다. 약 50만개 정도의 형질전환체 colony에서 DNA를 추출하여 pBSK-SM2/CAS2 library를 제작하였다. 이렇게 만든 pBSK-SM2/CAS2 library DNA를 위의 방법에서와 같이 *Bsg* I 제한효소로 절단하고 T4 DNA polymerase를 사용하여 제2카세트 유전자를 제거하였다. 이때 *Bsg* I 제한효소의 절단에 의하여 파이타제 유전자에서 또 1 bp의 염기가 제거되는 동시에 primer를 디자인할 때 합성해 넣은 20가지의 아미노산을 코딩하는 세 개의 염기가 각각 첨가된다.

3) 최종 Tn-RCM library의 제작

상기에서 제조한 pBSK-SM2/CAS2 library/*Bsg* I -T4 단편 DNA를 self-ligation을 수행한 후 약 50만개 정도의 형질전환체 colony에서 DNA를 추출하여 pBSK-SM2/Tn-RCM library를 제작하였다. 마지막으로 *Xba* I 과 *Pst* I 제한효소로 절단하여 1.2 kb의 파이타제 유전자를 elution하여 똑 같은 효소로 절단한 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector인 pJH27과 ligation 하여 *E. coli* MC1061에 형질전환하였다. 약 100만개 정도의 colony를 모아서 DNA를 추출하여 pJH27-SM2/Tn-RCM library를 제작하였다. 이렇게 얻은 library DNA를 *B. subtilis* DB431에 발현시킨 후 비활성이 증가한 mutant를 screening하였다.

3. Tn-RCM library로부터 비활성 증진 phytase mutant의 선발

가. 비활성이 증진 phytase mutant의 screening

pJH27-SM2/Tn-RCM library DNA를 함유한 *B. subtilis* DB431 형질전환체를 QPix (GENETIX, UK)를 이용하여 picking하여 배양한 후에 상기한 방법과 동일하게 약 5

만 마리 정도의 변이체를 screening 하였다. 그 결과, control로 사용한 SM2 phytase 보다 큰 흡광도 값을 나타내는 54개의 mutant를 1차 선발하였다. 이들 1차 선발된 mutant를 LB 액체배지에 배양하여 활성을 측정한 결과, 모두 8개의 mutant를 최종 선발하였다. 이들 변이체는 SM2 phytase 대비 약 1.2-1.3배 정도 활성이 증가하였다 (Fig. 30).

나. 비활성 증진 mutant의 변이부위

상기 8개 mutant들의 유전자 염기서열을 조사한 결과, 모두 4개의 변이체가 서로 다른 mutant임을 확인할 수 있었고, 이들 4개의 mutant는 SM2 phytase에 각각 1개의 아미노산이 치환 (Leu71Val, Leu105Gln, Asp217Gly, Asp279Asn) 된 것을 알 수 있었다. 그런데, 이들 변이잔기들 중에서 Leu105 잔기는 상기 연구에서 파이타제의 내산성에 관여하는 잔기로 확인된 잔기이고, Leu71 잔기는 파이타제의 열안정성에 영향을 주는 calcium-binding site로 알려진 잔기이다. 또한, Asp217 잔기는 효소의 활성에 영향을 주는 calcium-binding site로 알려진 잔기이다.

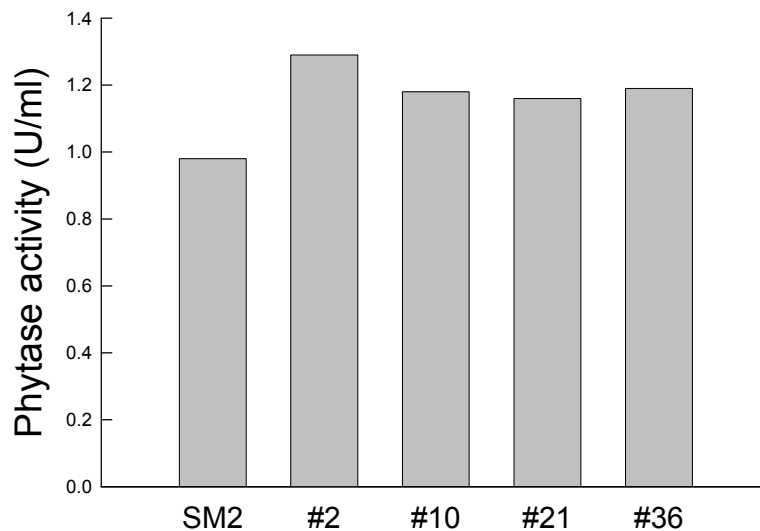


Fig. 30. Phytase activity by *B. subtilis* strains harboring SM2 and Tn-RCM mutants.

4. 추가적인 비활성 증진을 위한 *in vitro* mutants recombination

Tn-RCM library에서 선발된 4개의 mutant를 상기 연구방법에서 서술한바와 같이 주관연구기관의 RETT 기술을 적용하여 *in vitro* mutants recombination library를 제조하고 이들로부터 비활성 증진 mutant를 screening한 결과, Tn-RCM mutants보다 흡광도 값이 증가한 10개의 mutant를 최종 선발하였다 (Fig. 31). 이들 mutants의 조효소액을 사용하여 비활성을 측정된 결과, Re84 phytase의 비활성이 SM2 대비 약 2.4배가 증가한 것을 확인하였다. 또한 Re84 phytase 유전자의 염기서열을 결정된 결과, Re84 phytase는 SM2 phytase에 Leu71Val, Leu105Gln, Asp279Asn 3개의 변이잔기가 도입된 것을 확인하였다. 한편, Re84 phytase의 내열성 및 내산성을 조사한 결과, Re84 phytase는 SM2 phytase의 내열성 및 내산성과 비슷한 수준의 내열성과 내산성을 나타내는 것으로 확인되었다 (data not shown).

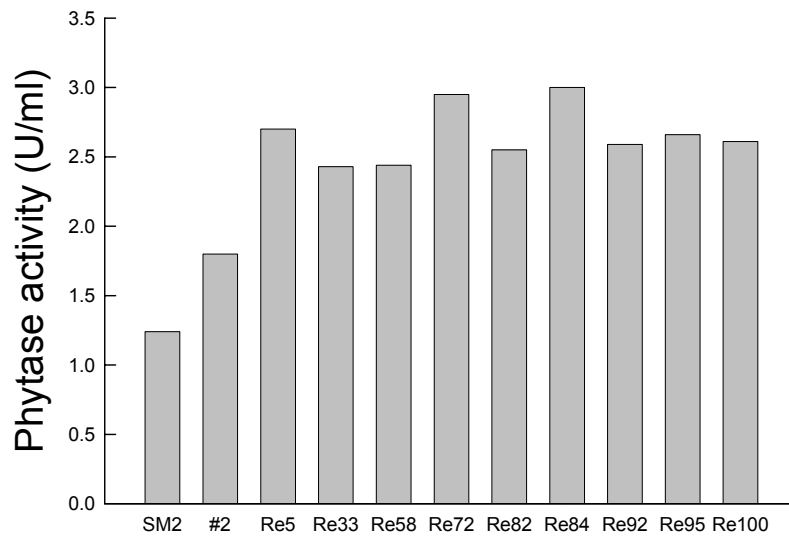


Fig. 31. Phytase activity by *B. subtilis* strains harboring SM2 and *in vitro* recombination mutants.

5. 개량 phytase의 사료첨가제로서의 효용성 평가

Phytase가 단위동물을 위한 사료첨가제로 개발되기 위해서는 phytase가 갖추어야 할 몇가지 효소적 특성들이 있는데 그 중에서 내열성, 내산성, 중성 pH와 중온에서의 높은 비활성, 단백질분해효소에 대한 저항성 등이 특히 중요하다고 할 수 있다. 그런데, 본 연구의 개량 phytase (Re84)는 Table 8에 요약한 바와 같이 내열성이 우수하여 pellet 가공조건에 매우 안정한 것으로 밝혀졌으며, 본 과제 연구의 내산성 개량을 통하여 위의 낮은 pH 조건에서도 비교적 안정하게 되었으며, 십이지장에서 분비되는 담즙산에 대해서도 안정한 것이 확인되었으며 (data not shown), 위와 십이지장에서 분비되는 단백질 분해효소들에 대해서도 안정한 것으로 확인되었고, 단위동물에 의해 섭취된 곡물 중 phytate의 가수분해가 이루어지게 되는 장관 내의 조건인 중성 pH와 중온에서 높은 안정성과 비교적 우수한 상대활성을 나타냈다 (data not shown). 이와 같이 본 과제를 통하여 *B. licheniformis* sp. SP4 균주 유래의 내열성 phytase를 분자진화기술에 의한 연쇄적인 개량을 통하여 내산성을 현저히 증가시키고 비활성을 증진시킴으로써 본 과제의 개량 phytase가 사료용 효소로서 유용성이 매우 증대된 것으로 판단된다. 특히 본 과제의 개량 phytase는 기존의 사료첨가제로 시장에서 사용되고 있는 곰팡이 유래 phytase의 가장 큰 장점 중의 하나인 내산성을 보유하고 있을 뿐만 아니라 곰팡이 유래 phytase의 단점이라고 할 수 있는 내열성과 중성 pH에서의 높은 반응성 등의 효소특성까지 보유하고 있으므로 사료첨가제 효소로서 산업화 가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

Table 8. 본 과제 개량 phytase의 사료첨가용 효소로서의 효용성 평가

사료첨가용 효소 중요인자	평가조건	개량 phytase 특성
사료가공: 내열성	80°C, 10분	안정함
위: 내산성	pH 3.0, 2시간	비교적 안정함
펩신 저항성	37°C, pH 3.5, 2시간	안정함
십이지장: 담즙산 내성	37°C, 2시간	안정함
Protease 저항성	37°C, pH7.0, 2시간	안정함
소장: 중성 pH작용	최적 pH	최적 pH가 7.0임
높은 비활성	비활성	곰팡이 효소에 비해 다소 낮음

제 6절 개량효소 고생산 균주의 개발 및 발효

1. 개량효소 고생산 *B. subtilis* 균주의 개발

가. *B. licheniformis* sp. SP4 phytase의 *B. subtilis*에서의 발현

1) SP4 phytase 유전자의 고발현 plasmid 제조

pBSK-phy4 plasmid DNA를 *Not* I 과 *Pst* I 제한효소로 절단하여 1.2 kb의 SP4 phytase 유전자 단편을 gel에서 elution한 후 Klenow 효소로 filling하여 insert로 하였다. 그리고 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector인 pJH27 plasmid를 *Sal* I 과 *Pst* I 제한 효소로 절단하고 Klenow 효소로 filling하여 vector로 하였다 (Fig. 32). 이렇게 제조한 insert와 vector를 ligation한 후 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환하여 *B. subtilis*에 발현시키기 위한 재조합 plasmid, pJH27-phy4를 제조하였다.

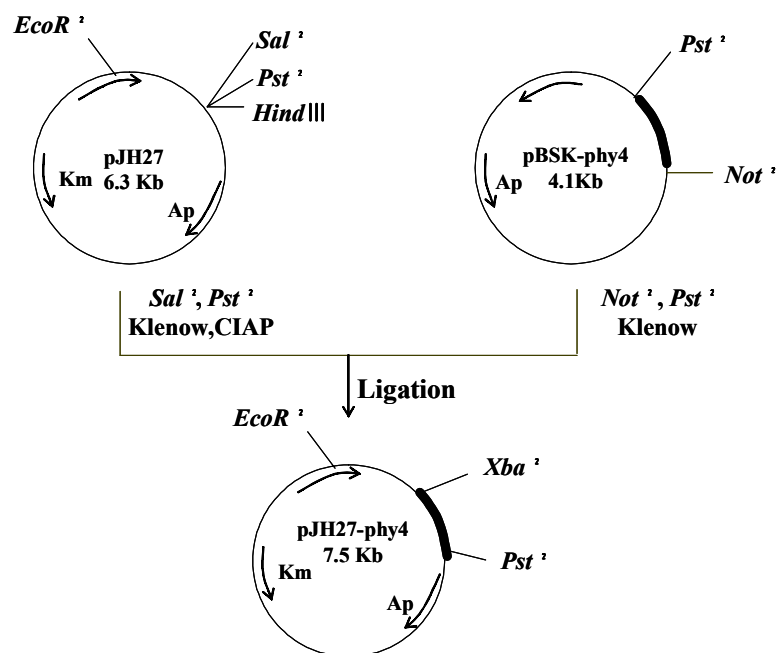


Fig. 32. Construction of the recombinant pJH27-phy4 plasmid. pJH27-phy4 has 1.2kb fragment of the *B. licheniformis* SP4 phytase gene (*phy4*).

2) SP4 phytase의 *B. subtilis*에서의 발현

토양분리균 *Bacillus* sp. SP4로부터 분리한 내열성 phytase 유전자의 과잉발현을 통한 phytase 고생산 재조합 균주를 개발하기 위한 방편의 일환으로 *Bacillus* sp. SP4 유래 phytase 유전자를 *B. subtilis*로 도입하여 재조합 phytase의 생산성을 조사하였다. *Bacillus* sp. SP4 유래 phytase 유전자(*phy4*)를 *B. subtilis*에서 과잉발현시키기 위한 vector로는 pJH27 플라스미드를 사용하였는데, pJH27 플라스미드는 *Bacillus*에서 강력하게 작용하는 promoter를 함유한 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector로서 high-copy vector이다. 그 결과, pJH27 벡터에 *phy4* 유전자가 도입된 재조합 플라스미드 pJH27-*phy4*를 상기와 같이 제조하였다. 또한 phytase 생산을 위한 숙주균으로는 4개의 protease 유전자가 결손된 *B. subtilis* DB431 균주와 7개의 protease 유전자가 결손된 *B. subtilis* WB700 균주를 사용하였다.

재조합 플라스미드 pJH27-*phy4*를 각각 *B. subtilis* DB431 균주와 *B. subtilis* WB700 균주에 도입한 후에 LB 배지에서의 phytase 생산성을 37°C에서 flask 배양을 통하여 조사하였다. 그 결과, Fig. 33에서 보는 바와 같이 pJH27-*phy4*를 함유하고 있는 *B. subtilis* DB431 균주와 *B. subtilis* WB700 균주의 배양상등액에서 모두 배양시간 10시간만에 1.1 unit/ml의 최대 생산성을 나타냈다. 그러나 이후에는 두 균주의 배양상등액 모두에서 세포외로 분비된 phytase의 급격한 실활이 관찰되었는데, 이는 phytase가 *B. subtilis* 유래의 protease의 작용에 의해 분해가 되는 것으로 추측되어진다. 그런데 phytase의 분해정도는 4개 protease 유전자 결손 변이주인 DB431과 7개 protease 유전자 결손 변이주인 WB700 균주간에 큰 차이가 없었다. 그런데 재조합 플라스미드 pJH27-*phy4*를 함유한 *B. subtilis* DB431 균주를 1 mM CaCl₂가 첨가된 LB 배지에 접종하여 30°C에서 flask 배양했을때는 Fig. 34에서와 같이 *B. subtilis* DB431(pJH27-*phy4*) 균주의 배양상등액에서는 1.9 unit/ml의 최대 생산성을 보였을 뿐만 아니라 37°C 배양의 경우와는 달리 10시간 이후의 배양에서도 세포외로 생산된 phytase가 안정되게 유지되는 것을 확인하였다. 약 2 unit/ml의 phytase 생산성은 phytase 원균주인 *Bacillus* sp. SP4 균주의 phytase 생산성과 비교했을 때 약 40 배 증가한 것이다.

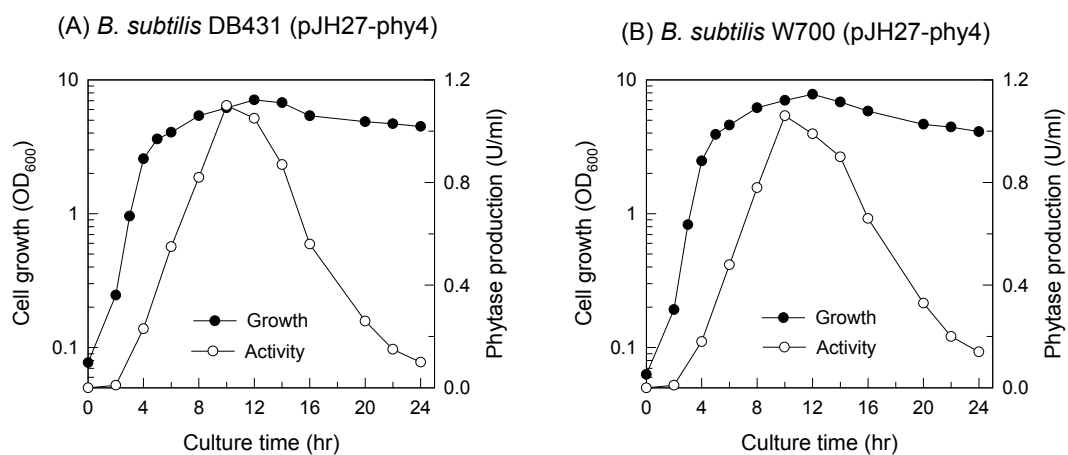


Fig. 33. Production of phytase by *B. subtilis* DB431 (pJH27-phy4) (A) and WB700 (pJH27-phy4) (B) at 37°C. (●), Cell growth; (■), phytase activity.

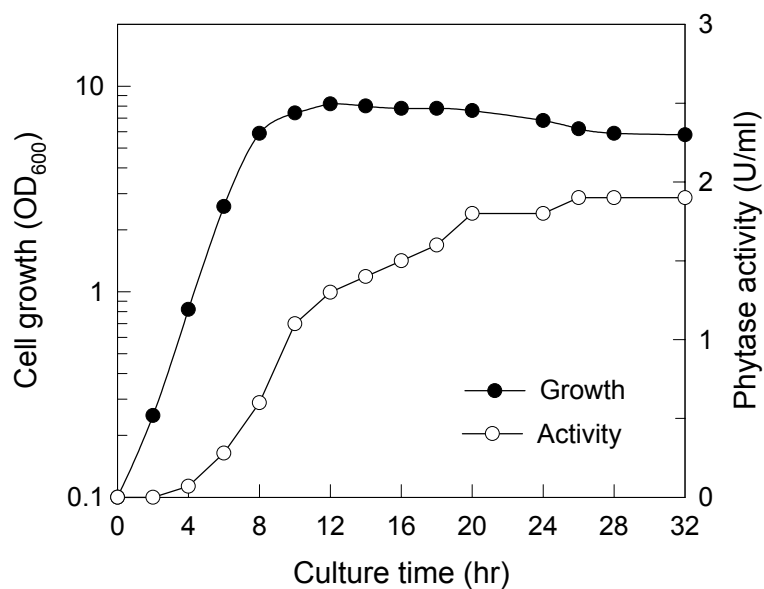


Fig. 34. Production of phytase by *B. subtilis* DB431 (pJH27-phy4) at 30°C. (●), Cell growth; (■), phytase activity.

나. 개량 phytase의 *B. subtilis*에서의 발현

1) Phytase 생산균주의 개량

상기 결과에서 *B. subtilis* DB431(pJH27-phy4) 균주의 플라스크 배양에서 1.9 unit/ml의 생산성을 확인한 바가 있다. 이 재조합 균주의 phytase 생산성을 부가적으로 증대시키기 위해서 강력한 돌연변이원인 nitrosoguanidine (NTG)를 처리하여 무작위 돌연변이를 시킨 다음 phytase 생산성이 증가된 돌연변이체를 선별하였다. 이 때, NTG 돌연변이에 의한 재조합 *Bacillus* 균주의 사멸율은 98% 조건으로 처리하였고, phytase 생산성이 증가한 돌연변이체의 선별은 상기 비활성 증진 phytase 개량시 사용했던 HTS 방법을 적용하였다.

약 5만마리 정도의 돌연변이체를 screening한 결과, phytase 생산성이 증가한 돌연변이체 23종을 1차적으로 선별하였다. 그 후에 *Bacillus* 염색체 DNA에 변이가 일어나지 않고 pJH27-phy4 플라스미드에 변이가 일어나서 phytase 생산성이 증가될 수 있는 가능성을 배제하기 위하여 1차 선별한 돌연변이 균주로부터 pJH27-phy4 플라스미드를 curing 시킨 후에 야생형 pJH27-phy4 플라스미드를 돌연변이 균주에 도입하여 phytase 생산성을 정량함으로써 최종적으로 phytase 생산성이 증가한 3종의 돌연변이 균주 (B34, C54, G90)를 선별하였다. 3종의 돌연변이 중에서도 *B. subtilis* B34 (pJH27-phy4) 균주의 phytase 생산성이 가장 높게 증가하여 야생형인 *B. subtilis* DB431(pJH27-phy4) 균주의 phytase 생산성 대비 약 2.1배가 증가하였음을 확인하였다 (Fig. 35).

Phytase 고생산을 위한 숙주균으로 개발된 B34 균주 상에서 개량 phytase의 생산성을 확인하기 위해서 내산성 증진 변이체인 SM2 phytase와 비활성 증진 변이체인 Re84 phytase 유전자가 삽입된 각각의 재조합 플라스미드를 B34 균주로 도입한 후에 phytase 생산성을 확인하였다. 1 mM CaCl₂가 첨가된 LB 배지에 접종하여 30°C에서 flask 배양한 결과, B34 (pJH27-phy4) 균주 및 B34 (pJH27-SM2) 균주, B34 (pJH27-Re84) 균주의 최대 생산성은 각각 3.9 U/ml, 2.1 U/ml, 5.3 U/ml로 확인되었다. 또한 B34 (pJH27-Re84) 균주를 하기의 최적화된 배지 상에서 1 mM CaCl₂ 존재 하에 플라스크 배양을 수행한 결과, 배양 시간 60시간에 57 U/ml의 최대생산성을 나타냈다 (data not shown).

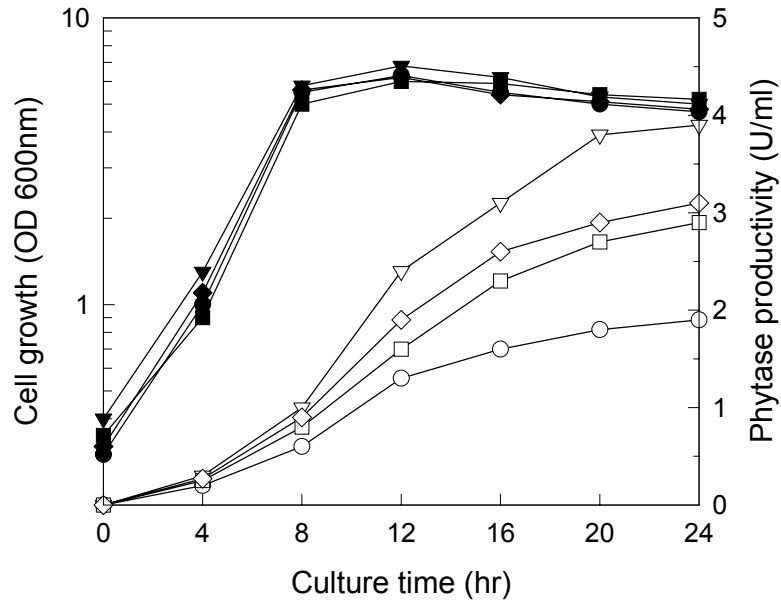


Fig. 35. Production of phytase by *B. subtilis* DB431 (pJH27-phy4) (●), B34 (pJH27-phy4) (▼), C54 (pJH27-phy4) (■) and G90 (pJH27-phy4) (◆) at 30°C. Closed symbols, Cell growth; open symbols, phytase productivity.

2. 개량 효소 고생산 균주의 발효 및 개량 효소의 대량 생산

가. 소규모 배양에서의 배지 최적화

Phytase 생산성을 증가시키기 위하여 플라스크 규모 배양을 통하여 배지 최적화 연구를 수행하였다. 이때, 배지 최적화에 사용된 균주는 *B. subtilis* DB431 (pJH27-SM2)이다. 그 결과, 소규모 배양 연구에서 최종 선정된 최적 배지 조성은 Table 9에 나타난 바와 같다. 본 연구의 최적 배지 (Fix 배지로 명명함)와 LB 배지에서 *B. subtilis* DB431 (pJH27-SM2) 균주를 플라스크 배양하여 phytase 생산성을 비교한 결과, Fix 배지 상에서 phytase 생산성이 약 10배 증가한 결과를 나타냈다 (Table 10).

Table 9. 배양 배지의 최적화 조성표

성 분	함 량(%)
yesat extract	3
maltodextrin	3
KH ₂ PO ₄	0.2
K ₂ HPO ₄	0.1
MgSO ₄	0.03
CaCl ₂	0.03
KCl	0.03
NaCl	0.03

배양시간(h)	LB medium (U/ml)	Fix medium (U/ml)
24	0.7	5.2
48	1.2	11.2
72	1.0	11.7

Table 10. 배양 배지별 역가 비교

나. 2L 규모 발효 최적화

분자진화기술에 의해 개량된 내열성·내산성 phytase인 SM2 phytase의 대량생산을 위해서 *B. subtilis* DB431 (pJH27-SM2) 균주를 사용하여 소규모 배양 연구에서 선정된 최적 배지를 이용한 2L 규모 (3L 발효조)의 배양 최적화 연구를 수행하였다. 기본 배양 조건은 배양온도 30℃, 교반속도 300 rpm, 배양시간 84시간 등이었다. 여러 가지 배양조건을 달리하여 phytase 생산성을 비교한 결과, 교반속도가 phytase 생산성에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 즉, Fig. 36에서 보는 바와 같이 교반속도를 300 rpm에서 500 rpm으로 증가시켜 배양했을 경우에 균주 성장과 phytase 생산이 모두 빨라졌다. Phytase 생산

균주의 배양에 있어서 aeration이 중요한 factor라는 사실을 확인하였다.

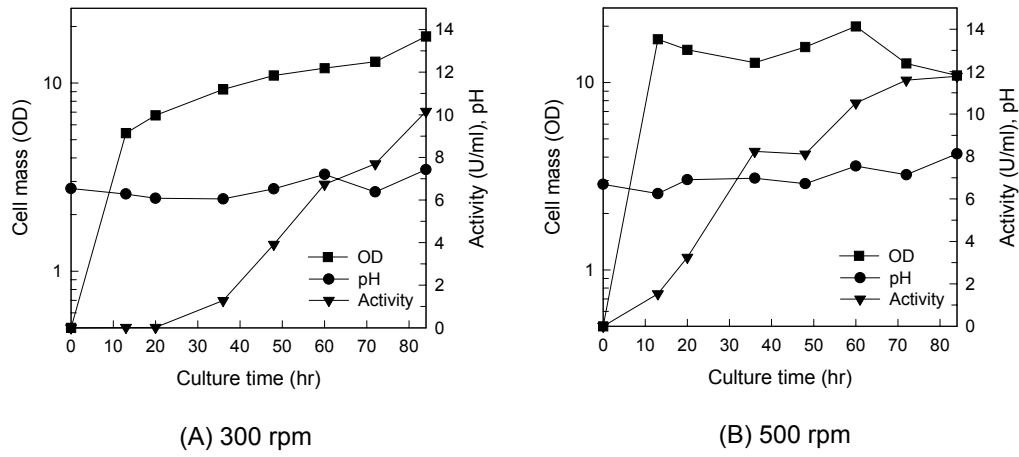


Fig. 36. 교반속도에 따른 SM2 phytase의 생산성

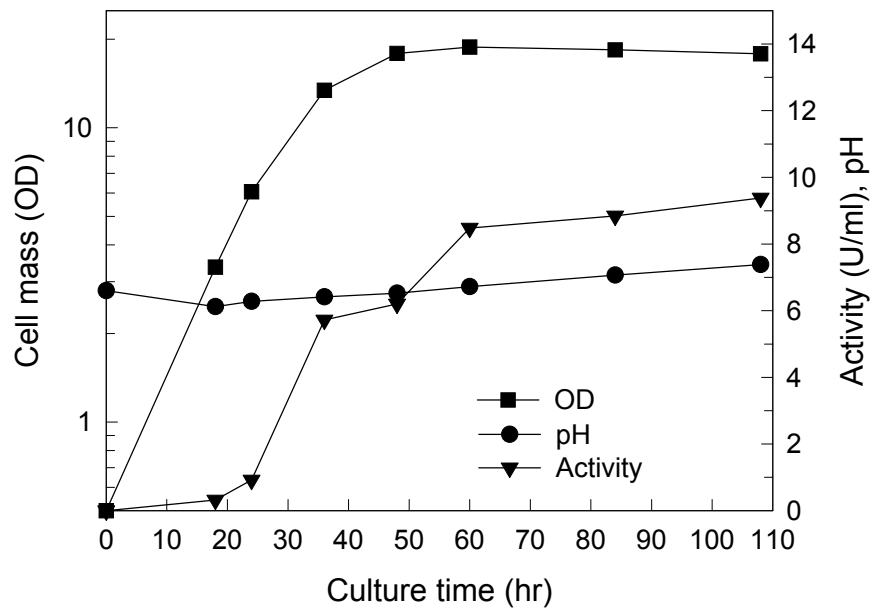


Fig. 37. 30L 규모 회분식 발효

다. 30L 발효 최적화 및 정제 공정 개발

2L 발효에서 확립된 발효조건을 이용하여 30L 발효를 수행하였다. 50L 발효조에서의 배양조건은 교반속도 120 rpm, Air 1 vvm으로 행하였다. 30L 규모 발효에서의 phytase 생산성은 플라스크 규모 및 2L 규모의 배양에서와 비슷한 결과를 나타내었다 (Fig. 37). 배양이 완료된 후에 30L 발효액을 정제 공정 개발에 이용하여 정제 공정을 거쳐 분말화 하였다. 완료된 발효액을 연속 원심분리기(15,000 rpm)를 이용하여 균체를 제거하고, 제균된 효소액을 한외여과막(MW 100,000)으로 농축 및 세척하고, 그 후에 동결건조를 수행하여 분말 효소를 제조하였다. 각 공정의 요약과 회수율은 Table 11에 표시된 바와 같다. 최종 phytase의 회수율은 80% 이상으로 높게 나타났으며, 본 연구의 정제 공정은 산업적으로 이용 가능한 공정으로 판단된다.

Table 11. 30L 규모 발효액의 정제공정 요약

공정	역가(U/ml)	액 량(L)	총역가(U)	수율(%)
배양액	9.38	25	234,500	100
원심 및 제균	9.32	25	233,000	99
한외여과(농축 및 세척)	70	3	210,000	89.6
동결건조	1,900U/g	110g		89.1

라. 사양 시험용 phytase 시제품 제조

본 과제에 산란계 사양시험을 수행하기 위하여 *B. subtilis* DB431 (pJH27-SM2) 균주를 사용한 300L 발효 (500L 발효조)를 통하여 phytase 시료를 제조하였다 (Fig. 38). 300L 규모의 발효는 2L 및 30L 규모 발효에서 얻어진 결과를 바탕으로 수행하였으며, 효소 정제 공정은 30L 규모 발효에서의 정제공정을 따랐다. 300L 발효에서의 효소 생산성은 60 시간에서 최대로 나타났다. 5회에 걸쳐 제조된 최종 3kg (1,700 FTU/g)의 phytase 효소제를 산란계 동물시험을 위해서 협동연구기관인 연암축산원예대학에 공급하였다.

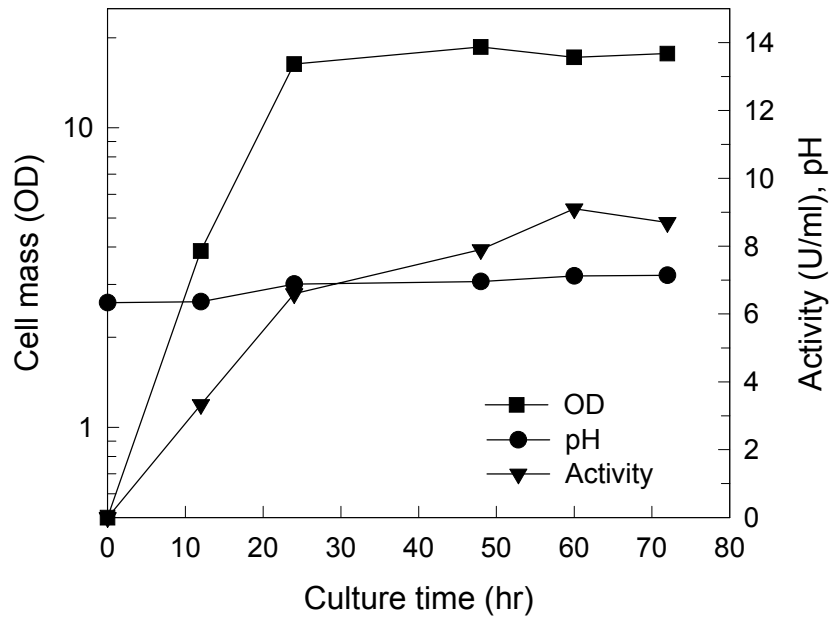


Fig. 38. 300L 규모 회분식 발효.

제 7절 Phytase 효능 분석을 위한 동물시험

1. 산란계 동물시험의 목적

본 과제에의 *B. licheniformis* sp. SP4 유래 내열성·내산성 개량 phytase의 실제 산업현장에서의 효용성을 검증하기 위해서 동물시험을 실시하였다. 그런데, phytase는 체내에서 곡물 중의 phytate를 소화하지 못하는 단위동물 (특히, 돼지 및 닭)을 위한 사료첨가제로 사용되고 있다. 따라서 본 과제의 개량 phytase 효능 분석을 위해서 산란계 시험을 우선적으로 추진하였다. 산란계를 우선적인 동물시험 대상으로 선정한 이유는 산란계가 돼지보다 인 요구량이 많아서 본 과제 개량 phytase의 효능 평가가 더 용이하리라고 판단되었기 때문

이다. 또한, 유럽에서는 분변 중의 인에 대한 총량 규제가 시행되고 있기 때문에 양돈산업에서의 phytase 요구도가 높은 편이지만 국내에서는 분변 중 인에 대한 총량 규제가 시행되고 있지 않아서 현재 양돈산업에서의 phytase 요구도는 미약한 편이고 오히려 원가 절감 등의 이유로 양계산업 (특히, 산란계)에서 phytase 요구도가 매우 높은 실제 시장 상황도 고려하였다.

양계 산업에 있어서 생산효율을 높이기 위해 사육 규모의 대형화 및 기계화가 다른 축산업에 비해 빠른 속도로 진행되어 왔으며, 그 결과 계분이 공해문제와 관련되어 큰 문제로 지적되고 있다. 특히, 계분 중의 인산은 궁극적으로 토양 내의 인산 과다 및 수질의 부영양화와 크게 관계가 있으므로 계분 중의 인 함량을 효과적으로 감소시키는 방법이 강구되어야 할 것이다. 계분에 다량의 인이 함유되어 있는 원인은 산란계는 0.21-0.31% 수준의 nonphytate phosphorus를 요구하는데 (68), 산란계의 원료 사료로 사용하는 옥수수나 대두박에는 대부분의 인이 phytate형태로서 산란계의 장 속에서 거의 분해되지 않는 불용성이기 때문이다. 곡류 내의 phytate는 phenol 계통에 chelate 형태로 동물들의 정상적인 성장 및 생리 활동에 필수적인 Ca, P, Fe, Cu, Zn 등과 결합되어 있다. 따라서 phytate의 분해는 무기물과 inositol phosphate를 생산하여 체내에서 이용 가능한 무기물을 제공할 뿐만 아니라 인의 흡수 이용율을 높여서 무기태 인의 공급량을 감소시키므로 분 내의 인 함량을 줄일 수 있다. 이러한 취지에서 현재 수행되고 있는 연구에는 곡류의 숙성과 가공, 곡류 가운데 phytate에 비해서 활력이 높은 밀이나 밀기울의 이용, 곡류 내 phytate에 비해서 활력이 수천 배나 높은 미생물 phytate의 사용 등이 있으나 미생물 phytate의 이용에 의한 곡류중의 인 이용율 증대에 관한 연구가 가장 성공적인 결과를 얻고 있는 편이다 (69-73). 특히, Simons 등은 산란계 사료에 500 FTU 수준의 미생물에서 추출한 phytate를 첨가하여 2배의 인 이용성 증대와 유의적인 인배설량 감소가 가능하였음을 발표한 바 있고 (69), Peter 등도 인이 결핍된 산란계 사료의 미생물에서 추출한 phytate를 첨가한 결과 산란율, 산란량, 사료 요구율 등에서 유의적인 효과가 있었다고 하였다 (74).

그러나, 우리나라에서는 미생물 phytase에 의한 인 이용율에 대한 연구는 최근 많이 이루어졌으나 현재까지 실제 산업현장에서 효용가치가 그리 크지 않은 BASF사의 Natuphos phytase를 대부분의 사료회사에서 사료첨가제로 사용하고 있다. 따라서 본 연구에서는 우리나라 현실에 적합한 산란계 배합사료에 주관연구기관의 *Bacillus* 유래 개량 phytase를 첨가하여 산란능력, 난질, 영양소 이용율 및 인 배설량에 미치는 영향 등을 규명하기 위하여 산란계 시험을 실시하였다.

본 연구에서는 옥수수-대두박 위주의 산란계 사료에 인의 공급량을 NRC 요구량의 100% 수분으로 한 대조구(C), 인의 공급량을 대조구의 68%에 본 과제 개량 SM2 phytase를 250 FTU 첨가한 구(P250), 500 FTU 첨가한 구(P500) 및 1,000 FTU를 첨가한 구(P1,000)로 하였으며, 대비구는 인의 공급량을 대조구의 68%에 BASF사 Natuphos phytase를 250 FTU 첨가한 구(N250), 500 FTU 첨가한 구(N500) 및 1,000 FTU를 첨가한 구(N1,000)로 두고, 처리당 7반복, 반복당 8수씩 총 392수의 52주령된 하이라인 브라운 산란계를 공시축으로 하여 완전임의배치법으로 시험을 수행하였다. 산란계 사양시험을 통해서 산란율, 연파란율, 난각두께 및 난각강도 등을 측정하였으며, 산란계 대사시험을 통해서 영양소 이용율, 인 배설량 등을 측정하였다.

2. 산란계 사양시험 결과

가. 산란능력

1) 산란율

6주간 평균 산란율은 Table 12에서 보는 바와 같다. 산란율은 대조구가 85.3%였으며, phytase 처리구는 대조구보다 적었으나 통계적인 유의성은 없었다. 그리고 개량 SM2 phytase 처리구(P250, P500 및 P1,000)는 Natuphos 처리구(N250, N500 및 N1,000)보다 산란율이 높았으나 이는 시험개시 때부터 다른 구에 비해 성적이 낮았던 결과로 사료된다. Phytase 처리구의 산란율이 대조구보다 낮은 결과는 권 등(75)과 Um 및 Paik(76)의 연구결과와 같은데, 이들은 TCP 첨가수준을 50%로 줄이고 미생물 phytase를 첨가하였을 때 대조구와 비교하여 산란율의 변화는 일어나지 않는다고 하였다. 권 등의 실험에서는 인 수준을 90%로 낮추면 산란율이 감소하지 않으나 80%를 낮추면 감소한다고 하였다 (77). 한편, 손 등은 산란율이 증가한다고 하여 상반된 결과를 보였다 (78).

이상의 시험결과를 다른 시험과 비교할 때 산란율은 인 공급량의 수준에 따라 상이한 결과를 보였으며, 본 시험에 산란율을 볼 때 인 공급량을 NRC 요구량에 68%로 공급하여도 산란율에 유의적인 감소가 일어나지 않는다고 할 수 있다.

Table 12. Effect of phytase type and level on the egg production of layers

Treatment	Weeks					Mean
	53wks	54wks	55wks	56wks	57wks	
	----- % -----					
C	85.1	86.7	86.3	86.0	82.4	85.3
P250	83.7	83.9	83.7	83.6	80.6	83.1
P500	78.7	78.3	78.4	83.4	82.1	80.2
P1000	83.6	86.5	81.9	80.7	79.0	82.3
N250	84.0	85.1	81.7	82.0	79.6	82.5
N500	82.8	81.2	81.1	78.9	79.6	80.7
N1000	79.0	79.8	77.9	81.5	78.4	79.3
Mean	82.4	83.1	81.6	82.3	80.2	81.9
SEM	2.62	2.99	3.11	2.43	2.13	2.07

SEM=standard error of the mean.

2) 연과란율

Table 13은 연과란율을 나타낸 것으로 평균 연과란율이 대조구는 6.4%였으며, P250, P500 및 P1,000 처리구는 각각 5.8, 3.3 및 4.8%였고, N250, N500 및 N1,000 처리구는 각각 5.5, 5.5 및 3.9%로 phytase의 첨가량이 증가함에 따라 연과란율이 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 그리고 Natuphos phytase와 SM2 phytase의 비교에서도 차이가 없었다.

3) 사료섭취량

산란계의 사료섭취량은 대조구에 비하여 개량 SM2 phytase는 섭취량이 많았고, Natuphos phytase는 적었으나 통계적인 유의성은 없었다 (Table 14). Van der Klis 등의 시험에서도 낮은 유효인 수준은 사료 섭취량을 감소시키지만 phytase의 첨가로 이를 완화시킬 수 있다고 하였다 (79).

Table 13. Effect of phytase type and level on the broken and soft eggs of layers

Treatment	Weeks					Mean
	53wks	54wks	55wks	56wks	57wks	
	----- % -----					
C	5.3	6.0	7.3	6.9	6.6	6.4
P250	4.2	6.1	5.2	6.6	6.9	5.8
P500	3.2	3.3	3.4	3.5	3.2	3.3
P1000	4.6	4.0	7.0	4.9	3.7	4.8
N250	5.2	4.9	5.1	6.1	6.2	5.5
N500	4.8	5.6	6.1	5.2	5.6	5.5
N1000	3.7	2.9	4.3	3.9	4.5	3.9
Mean	4.4	4.7	5.5	5.3	5.2	5.0
SEM	1.14	1.48	1.50	1.54	1.78	1.26

SEM=standard error of the mean.

Table 14. Effect of phytase type and level on the feed intake of layers

Treatment	Weeks					Mean
	53wks	54wks	55wks	56wks	57wks	
	----- g/hen/day -----					
C	119.9	125.0	126.9	121.2	121.8	123.0
P250	120.0	125.0	124.8	119.6	125.1	122.9
P500	117.4	123.5	123.6	123.5	124.5	122.5
P1000	119.8	125.3	124.0	119.8	125.8	122.9
N250	122.7	125.1	124.2	121.8	124.4	123.6
N500	116.0	126.5	121.2	119.3	126.0	121.8
N1000	116.5	125.0	121.1	120.8	124.5	121.6
Mean	118.9	125.1	123.7	120.9	124.6	122.6
SEM	2.39	0.84	2.14	1.51	1.46	0.81

SEM=standard error of the mean.

나. 난질

1) 난중 및 난황고

본 과제 SM2 phytase의 첨가수준에 따른 산란계의 난중 및 난황고는 Table 15에서 보는 바와 같다. 먼저 평균 난중은 처리간에 유의성은 없었으나 phytase 첨가구중에서 500FTU가 다른 처리구보다 높았다.

한편, 손 등은 인 공급량을 NRC 요구량의 60%로 낮추면 난중은 현저하게 감소하였으며, phytase를 100FTU 첨가하여도 난중은 개선되지 않았으나 phytase를 500FTU와 1,000FTU로 증가시키면 난중은 대조구 수준으로 개선된다고 하였다 (78). 난황고도 난중과 마찬가지로 처리구간에 차이가 없었다.

2) Haugh unit 및 난황색

실험개시후 2주 간격으로 측정된 Haugh unit와 Roche yolk color fan으로 측정하는 난황색은 Table 16에서 보는 바와 같이 처리간에 유의성이 없었다.

3) 난각강도 및 난각두께

난각강도 및 난각두께는 Table 17에서는 보는 바와 같이 처리간에 유의성이 없었으나 phytase의 첨가량이 증가함에 따라 난각강도와 두께는 조금씩 증가하였다.

손 등은 난각두께의 경우 처리구간에 비슷한 경향을 보였으나 대조구가 phytase 첨가구들에 비해 두꺼운 경향을 보였다고 하였는데 (78), 본 시험의 결과는 이와 상반되는 경향을 보였다.

4) 난각색 및 혈·육반

난각색 및 계란내 혈·육반 지수는 Table 18에서 보는 바와 같이 처리간에 유의적인 차이가 없었다.

Table 15. Effect of phytase type and level on egg weight and height of layers

Treatment	Egg weight (g)				Egg height (mm)			
	2wks	4wks	6wks	Mean	2wks	4wks	6wks	Mean
C	67.5	67.2	66.7	67.1	7.6	7.4	7.2	7.4
P250	65.4	66.6	66.6	66.2	7.7	7.3	7.3	7.4
P500	67.9	68.8	67.5	68.1	7.7	7.7	7.7	7.7
P1000	67.3	68.4	67.0	67.6	7.4	7.5	7.7	7.5
N250	67.5	66.4	67.5	67.1	7.8	7.9	8.1	7.9
N500	67.0	67.4	66.6	67.0	7.9	7.6	7.7	7.7
N1000	66.0	67.7	67.0	66.9	7.5	7.6	7.6	7.5
Mean	66.9	67.5	67.0	67.1	7.6	7.6	7.6	7.6
SEM	0.92	0.87	0.40	0.59	0.19	0.20	0.30	0.19

SEM=standard error of the mean.

Table 16. Effect of phytase type and level on the haugh unit(HU) and yolk color of layers

Treatment	HU				Yolk color (1-15)			
	2wks	4wks	6wks	Mean	2wks	4wks	6wks	Mean
C	84.3	83.9	81.8	83.3	7.7	7.6	7.4	7.6
P250	84.9	82.0	83.2	83.4	7.3	7.7	8.0	7.7
P500	85.8	84.6	85.4	85.3	7.3	7.6	8.0	7.6
P1000	83.8	83.4	84.2	83.8	7.4	7.6	7.7	7.6
N250	85.8	87.0	85.1	86.0	7.5	7.6	7.8	7.6
N500	87.0	84.1	84.7	85.3	7.2	7.4	8.0	7.6
N1000	84.4	84.2	85.7	84.8	7.4	7.5	7.9	7.6
Mean	85.2	84.2	84.3	84.5	7.4	7.6	7.8	7.6
SEM	1.12	1.51	1.39	1.05	0.16	0.09	0.22	0.04

SEM=standard error of the mean.

Table 17. Effect of phytase type and level on the egg shell strength and thickness of layers

Treatment	Egg shell strength(kg/cm ²)				Egg shell thickness(mm)			
	2wks	4wks	6wks	Mean	2wks	4wks	6wks	Mean
C	3.2	3.3	3.3	3.3	36.3	36.1	36.7	36.4
P250	3.2	3.1	3.0	3.1	35.7	35.0	35.6	35.5
P500	3.2	3.4	3.4	3.3	36.0	34.9	36.6	35.9
P1000	3.2	3.4	3.4	3.3	35.8	35.6	36.2	35.9
N250	3.3	3.1	3.0	3.1	35.5	34.5	35.9	35.3
N500	3.4	3.2	3.3	3.3	36.3	35.1	37.2	36.2
N1000	3.2	3.1	3.2	3.2	36.2	35.1	36.0	35.6
Mean	3.3	3.2	3.2	3.2	36.0	35.2	36.3	35.8
SEM	0.06	0.15	0.18	0.10	0.31	0.52	0.55	0.38

SEM=standard error of the mean.

Table 18. Effect of phytase type and level on the egg shell color, and blood and meat spots of layers

Treatment	Egg shell color (%) [*]				Blood and meat spots (1-3) ^{**}			
	2wks	4wks	6wks	Mean	2wks	4wks	6wks	Mean
C	31.7	32.4	32.2	32.1	1.6	2.0	2.0	1.8
P250	29.7	30.7	29.7	30.0	1.9	2.1	2.1	2.0
P500	30.7	31.2	31.4	31.1	2.1	1.8	2.3	2.1
P1000	30.4	31.2	30.8	30.8	2.0	2.0	2.2	2.1
N250	30.1	32.1	32.1	31.5	2.0	2.2	2.3	2.1
N500	30.9	32.4	33.0	32.1	1.7	2.0	2.3	2.0
N1000	31.6	32.6	33.5	32.6	1.9	1.9	2.0	1.9
Mean	30.7	31.8	31.8	31.5	1.9	2.0	2.1	2.0
SEM	0.73	0.77	1.29	0.88	0.20	0.14	0.13	0.11

^{*}Egg shell color: black=0, white=100, ^{**}1-3: 1=none , 2=a little, 3=much, SEM=standard error of the mean,

3. 산란계 대사시험 결과

가. 영양소 이용율

본 과제 SM2 phytase의 첨가에 따른 건물, 조단백질, 조회분 및 인 이용율은 Table 19에서 보는 바와 같다. 건물 이용율은 처리간에 유의적인 차이가 없었다. 한편, 조단백질의 이용율은 SM2 phytase가 Natuphos phytase보다 높았으며, phytase의 함량이 증가함에 따라 조단백질의 이용율도 증가하였다($P < 0.05$). 조회분의 이용율은 phytase 첨가구가 무처리구보다 적었으나, 첨가수준간에는 phytase의 첨가량이 증가함에 따라 조회분의 이용율이 증가하였다. 인 이용율은 처리구중에서 P1,000처리구가 가장 높았으며, phytase의 첨가수준간에는 첨가량이 증가함에 따라 증가하였다. 특히 SM2 phytase는 500 FTU 이상은 무처리와 차이가 없어 인 공급량을 30% 감소할 경우 500 FTU를 첨가하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

Klein 등은 무기태 인을 첨가하였을 때의 인 이용율이 47%였으며, phytase의 사용으로 인의 이용율이 64%로 증가한다고 하였으며 (79), Klis 등도 산란계에서 무기태 인을 사용한 대조구의 인 이용율은 22.3%였으며, phytase를 500 FTU를 첨가하면 인 이용율이 51.8%로 증가되며 따라서 인 배설량은 약 16% 감소된다고 하였다 (80).

Table 19. Effect of phytase type and level on the nutrient utilization of layers

Item	C	P250	P500	P1000	N250	N500	N1000	Mean	SEM
	----- % -----								
Dry matter	81.9	80.7	81.6	82.2	80.3	80.2	81.7	81.4	0.68
Crude protein	65.7 ^{ab}	66.6 ^a	67.3 ^a	68.1 ^a	61.1 ^c	62.1 ^{bc}	65.4 ^{ab}	65.9	2.91
Crude ash	58.0 ^a	54.0 ^{bc}	56.6 ^{ab}	57.7 ^a	52.4 ^c	53.3 ^{bc}	53.5 ^{bc}	55.1	2.28
Phosphorous	76.7 ^{ab}	72.9 ^c	76.0 ^b	77.9 ^a	68.1 ^d	71.8 ^c	75.8 ^b	74.2	3.43

SEM=standard error of the mean.

나. 분 배설량

산란계 분의 건물 배설량은 phytase의 종류에서는 본 과제 SM2 phytase가 많았으나 유의성 있는 차이가 아니었으며, phytase의 첨가수준간에는 phytase의 첨가량이 증가함에 따라 분 배설량은 감소하였다(P<0.05). 한편, 질소의 배설량은 phytase의 함량이 증가함에 따라 질소의 배설량은 감소하였으나 유의성은 없었다.

인 배설량은 무처리보다 phytase 첨가구가 배설량이 적었으며, phytase를 첨가함에 따라 인 배설량은 감소하였다(P<0.05). 그러나 phytase의 종류간에는 차이가 없었다. 권 등은 인 공급량을 NRC 요구량의 80%로 하고 phytase를 500FTU 첨가하면 인 공급량을 NRC의 100%로 할 경우에 비해 인 배설량을 약 27% 감소시킬 수 있다고 하였는데 (77), 본 시험의 결과도 이와 일치하는 경향을 보여주고 있다. 또한 phytase 첨가수준이 증가할수록 인 배설량이 감소된다고 Simons 등의 시험결과 (69)와 일치되는 경향을 보여 주고 있다.

Table 20. Effect of phytase type and level on the nutrient excretion of layers

Item	C	P250	P500	P1000	N250	N500	N1000	Mean	SEM
----- g/bird/d -----									
Dry matter	28.48 ^{bc}	31.34 ^a	28.78 ^{bc}	28.27 ^{bc}	29.90 ^{ab}	28.28 ^{bc}	27.48 ^c	28.93	1.296
Nitrogen	1.60	1.67	1.57	1.52	1.70	1.64	1.50	1.60	0.075
Phosphorous	0.53 ^a	0.50 ^{ab}	0.48 ^{bc}	0.45 ^{cd}	0.50 ^{ab}	0.47 ^{bcd}	0.43 ^d	0.48	0.036
----- g/100g egg mass -----									
Dry matter	50.00	56.62	53.24	51.26	53.70	52.61	51.60	52.81	1.988
Nitrogen	2.81	3.02	2.90	2.76	3.05	3.05	2.81	2.89	0.124
Phosphorous	0.91 ^a	0.91 ^a	0.88 ^{ab}	0.82 ^{bc}	0.90 ^a	0.87 ^{abc}	0.80 ^{bc}	0.88	0.052

SEM=standard error of the mean.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연구개발 목표 및 평가의 착안점

1. 연구개발 최종목표: 사료첨가제용 phytase 효소제 개발

2. 년차별 연구개발 목표 및 주요 연구내용

- 1년차: 효소개량 기초 연구
 - 최적 후보 phytase 생산균주의 선발
 - 최적 후보 phytase 유전자의 클로닝 및 특성분석
 - Phytase의 초순수분리 및 최적 결정화 조건 확립
- 2년차: 효소개량 및 생산기술 개발
 - 분자진화기술에 의한 내열성 및 내산성 phytase 개량
 - 개량효소 생산 균주의 개발 및 발효
 - 돌연변이체 phytase의 대량 분리 정제 및 초기 결정화 조건의 확립
- 3년차: 생산 및 제품화
 - 분자진화기술에 의한 내열성·내산성 phytase의 비활성 증진 개량
 - 개량효소 생산 균주의 개발 및 발효연구(5L, 50L 규모)
 - 개량 phytase의 제품화 연구 (시제품 생산)
 - 개량 phytase의 동물사양 시험

3. 연구평가의 착안점

가. 1년차 연구의 평가항목 및 평가방법

- 1) 후보 phytase의 확보: 확보 유무
- 2) 후보 phytase 유전자의 확보: 확보 유무
- 3) 분자진화기술 방법 확립: 탐색 및 기술 확보 유무
- 4) 효소 생산, 정제, 특성화: 효소 기초연구 확립 유무

- 5) 효소결정화 조건확립: 조건 설정 유무

나. 2년차 연구의 평가항목 및 평가방법

- 1) 내열성 및 내산성 phytase 개발
 - 내열성 및 내산성 phytase 개발 유무
 - 70℃에서 10분간 열처리 후의 phytase 활성이 야생형 phytase 활성의 100% 유지
 - pH 3.0에서 30분간 산처리 후의 변이효소 활성이 야생형 phytase 활성의 50% 이상 유지
- 2) 개량효소 고생산 균주 개발
 - 개량효소 고생산 균주 개발 유무
 - 재조합 균주의 flask 배양에서 5 U/ml 수준의 효소 생산성 확보
- 3) 돌연변이체 phytase의 초기 결정화 조건의 확립: 돌연변이체의 초기결정 확보

다. 3년차 연구의 평가항목 및 평가방법

- 1) 내열성 및 내산성 phytase의 비활성 증진 개량
 - 비활성 증진 개량 유무
 - wild type phytase 비활성의 3배 이상 유지
 - 70℃에서 10분간 열처리 후의 phytase 활성이 야생형 phytase 활성의 100% 유지
 - pH 3.0에서 30분간 산처리 후의 변이효소 활성이 야생형 phytase 활성의 50% 이상 유지
- 2) 개량효소 고생산 균주 개발 및 발효
 - 개량효소 고생산 균주 개발 유무
 - 100 U/ml 수준의 효소 생산성을 확보한 개량효소 고생산 균주의 개발
 - 150 U/ml 수준의 효소 생산성을 확보한 발효조건 확립
- 3) 개량효소 동물사양시험
 - 동물사양시험 유무
 - 산란계 사양시험 및 대사시험을 통한 개량효소의 산업적 효능 평가

제 2절 연구개발 목표의 달성도

1. Phytase 생산균주의 선발 및 순수정제 phytase의 반응특성 분석

자연계로부터 phytase를 생산하는 미생물을 탐색하여 내열성이 뛰어나고 내산성이 상대적으로 우수한 phytase 생산 균주를 최종적으로 1개 선발하였고, *Bacillus licheniformis* 균주로 동정된 본 과제 분리 균주를 *B. licheniformis* SP4로 명명하였다.

Bacillus licheniformis SP4 균주의 배양액으로부터 ultrafiltration, Q-Sepharose column chromatography, Ca-phytate affinity column chromatography 과정을 통하여 44 kDa 크기의 phytase 단백질을 순수 분리하였다. Phytase의 Ca-phytate에 대한 affinity를 이용한 효소의 정제는 본 과제를 통하여 처음 시도된 방법으로서 기존의 phytase의 정제 과정에 비하여 훨씬 빠르고 순수하게 phytase를 정제할 수 있는 것으로 평가된다.

정제 효소를 이용하여 phytase의 여러가지 특성을 조사하였다. 그 결과, 본 과제 phytase는 60°C와 pH 8.0에서 최고의 활성을 나타냈다. 그리고 이 SP4 phytase는 낮은 pH에서는 쉽게 실활되지만 75°C까지 안정하고 80°C에서 10분간 방치하여도 50% 이상의 잔존 활성을 나타내기 때문에 내열성 phytase로서 사료 첨가제로 이용시 열에 의한 실활 문제는 없을 거라고 판단하였다. 하지만 3.5 이하의 낮은 pH에서는 불안정하여 내산성 개량이 필요한 것으로 평가되었다. 또한, SP4 phytase는 sodium phytate에 특이적으로 높은 분해능을 보였으며, *myo*-inositol phosphate 중에서 3개의 phosphate만 분해하였다.

이상에서 설명한 바와 같이 상기 항목의 목표를 100% 달성하였다고 평가된다.

2. Phytase 유전자의 클로닝 및 특성분석

본 연구의 phytase 생산균주 (*B. licheniformis* SP4)로부터 phytase 유전자를 분리하여 대장균에서 클로닝을 하였고, 이 phytase 유전자의 염기서열을 결정하여 특성분석을 완료하였다. *B. licheniformis* SP4 유래 phytase 유전자 (*phy4*)는 모두 1,152개 염기로 open reading frame을 구성하고 있으며 383개의 아미노산을 암호화하고 있었다. 본 연구의 SP4 phytase 유전자는 곰팡이 유래의 phytase 유전자 (*phyA*, *phyB*), *E. coli* 유래의 phytase 유전자 (*appA*)와는 유사성이 거의 없었지만 다른 *Bacillus* 유래의 phytase 유전자 (*TS-phy*,

phyC, *168-phy*)와는 높은 유사성을 나타냈다.

이상에서 설명한 바와 같이 상기 항목의 목표를 100% 달성하였다고 평가된다.

3. 분자진화기술에 의한 내열성 및 내산성 phytase의 개발

분자진화기술 (Directed molecular evolution)을 적용하기 위해서는 random mutants library 제조기술과 이와 더불어 다양한 재조합 유전자 변이체들 중에서 원하는 유전자 변이체를 간편하고, 빠르며, 대량으로 선별할 수 있는 초고속 탐색 (High-Throughput Screening, HTS) 기술이 매우 중요하다. 본 과제 of phytase 개량을 위해서 통상의 기술 및 주관연구기관인 아미코젠(주)에서 독자적으로 개발한 random mutants library 제조기술을 적용하였다. 또한, 본 과제 연구를 통하여 내산성이 증대된 phytase mutant를 효율적으로 선별할 수 있는 nitrocellulose membrane을 이용한 초고속 탐색기술을 확립하였다.

1·2차년도 연구를 통하여 모두 5차례에 걸친 분자진화를 수행하여 최종 SM2로 명명된 내열성·내산성 phytase를 개발하였다. SM2 phytase는 25℃, pH 3.0에서의 내산성이 wild type phytase에 비하여 100배 이상 증가하였고, 37℃에서도 pH 3.0에서 1시간 방치하였을 때 80% 이상의 높은 잔존활성을 유지하였다. 그리고 SM2 phytase의 내열성은 wild-type과 비슷한 수준을 나타내어 75℃까지 안정하고 80℃에서 10분간 방치하여도 50% 이상의 잔존활성을 나타냈다. 또한, SM2 phytase는 동물의 소화효소인 trypsin, chymotrypsin, pepsin과 같은 단백질분해효소의 작용에 대해서도 매우 안정하였다.

이와 같이 내산성 개량에서 최종 선발된 SM2 phytase는 내열성이 우수하여 사료 제조 공정 중의 높은 온도에서 안정하고, 동물 위 속의 낮은 pH (pH 3.0)에서도 안정할 것으로 예상되고, 동물의 소화효소 (trypsin, chymotrypsin, pepsin)에 대해서도 안정하고, 중성 pH와 37℃ 부근에서 높은 활성을 나타내기 때문에 소장에서의 phytate 분해 효율이 높을 것으로 판단되므로 사료 첨가제용 phytase로서 효용성이 매우 높을 것으로 기대된다.

이상에서 설명한 바와 같이 본 과제 연구를 수행하여 상기 항목의 목표를 초과 달성하였다고 평가된다.

4. 분자진화기술에 의한 내열성·내산성 phytase의 비활성 증진 개량

본 과제의 내열성·내산성 SM2 phytase의 비활성 증진 개량을 위해서 주관연구기

관인 아미코젠(주)에서 독자적으로 개발한 random mutants library 제조기술을 적용하였다. 또한, 본 과제 연구를 통하여 내산성이 증대된 phytase mutant를 효율적으로 선별할 수 있는 96-well plate를 이용한 초고속 탐색기술을 확립하였다.

3차년도 연구를 통하여 모두 2차례에 걸친 분자진화를 수행하여 최종 Re84로 명명된 내열성·내산성 SM2 phytase의 비활성 증진 변이체를 선발하였다. Re84 phytase의 내열성 및 내산성은 SM2 phytase의 내열성 및 내산성과 비슷한 수준이었지만 비활성이 SM2 비활성 대비 약 2.4배가 증가한 것을 확인하였다.

이상에서 설명한 바와 같이 본 과제 연구를 수행하여 상기 항목의 목표를 거의 달성하였다고 평가된다. 그런데, 본 항목 연구는 3차년도에 개시된 연구이고 과제 종료 시점인 현재에도 추가 개량 연구가 진행 중에 있으므로 수개월 내에 비활성이 획기적으로 증대된 내열성·내산성 phytase 변이체를 개발 할 수 있을 것으로 기대된다.

5. Phytase 초순수분리 및 최적 결정화 조건 확립

본 과제에서 야생종 또는 돌연변이 phytase의 3차구조 연구를 수행하고자 했던 당초 목적은 본 과제의 토양 분리 균주가 생산하는 신규 phytase의 분자 3차구조를 규명하여 특히 효소활성 부위 등을 밝힘으로써 효소개량에 필요한 구조정보를 제공받고자 하는데 있었다. 그러나 1·2차년도 연구를 통하여 본 과제의 *B. licheniformis* SP4 유래 phytase의 3차구조가 기존에 보고가 되어있는 *B. amyloliquifaciens* DS11 phytase의 3차구조와 매우 유사한 것으로 예상되었다. 특히, SP4 phytase의 아미노산 서열을 컴퓨터 분석을 통하여 *B. amyloliquifaciens* DS11 phytase의 3차구조에 적용해 보았을 때, 실제 활성부위 등이 보존되어 있고 구조적으로 매우 유사함을 확인하였다. 따라서 SP4 유래 phytase의 구조결정 결과는 지적재산권으로 보호를 받을 수 없을 뿐만 아니라 *B. amyloliquifaciens* DS11 phytase의 구조를 이용한 modeling을 통하여 본 과제 SP4 phytase의 개량에 필요한 정보들을 얻을 수 있을 것으로 판단되어 SP4 유래 phytase의 구조결정에 관한 연구는 2년차로 조기 중단하였다.

그런데, 지금까지 많은 연구자들에 의해서 특정 효소에 대한 비활성, 기질 특이성 등의 여러 반응특성에 관한 연구가 진행되어 왔고 실제 많은 연구결과가 축적되어 있는 상태이지만, 내산성의 경우에는 관련 연구 및 축적된 지식이 거의 없는 실정이다. 따라서 내열성·내산성 phytase를 개발하고자 했던 본 연구팀에서는 내열성 phytase의 3차구조 정보에

의존하지 않고 무작위 돌연변이 및 변이 재조합을 통한 분자진화기술에 의해 내열성 phytase의 내산성 증진 연구를 수행하는 것이 더 효율적일 것으로 판단하였다. 실제, 상기에 서 설명한 바와 같이 일련의 분자진화 연구를 수행하여 야생종에 비해 내산성이 100배 이상 증가한 내열성·내산성 SM2 phytase를 개발할 수 있었다.

6. 개량효소 고생산 균주 개발 및 발효

본 연구의 야생형 및 개량 phytase 유전자를 강력한 *Bacillus* promoter가 들어있는 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector에 도입하고 이 플라스미드를 함유한 재조합 *B. subtilis* DB431 균주를 제조한 후에 LB 배지 상에서 30°C 조건으로 플라스크 배양을 수행한 결과, *B. licheniformis* SP4 균주 phytase 생산성의 약 40배에 해당하는 2 U/ml 수준의 야생형 phytase 생산성을 확보하였고, 내산성 SM2 phytase의 경우에는 약 1 U/ml 수준의 생산성을 확보하였다.

Phytase 생산성을 부가적으로 증가시키기 위해 *B. subtilis* DB431 숙주균의 무작위 돌연변이를 수행하여 phytase 생산성이 2.1배 증가한 B34 변이 숙주균을 개발하였다. 그 후에 B34 (pJH27-phy4) 균주, B34 (pJH27-SM2) 균주 및 B34 (pJH27-Re84) 균주의 LB 배지를 사용한 플라스크 배양을 수행한 결과, phytase 최대 생산성이 각각 3.9 U/ml (야생형), 2.1 U/ml (내열성·내산성 변이형), 5.3 U/ml (내열성·내산성 비활성·증진 변이형)로 확인되었다.

Phytase 생산성을 증가시키기 위하여 *B. subtilis* DB431 (pJH27-SM2) 균주의 플라스크 규모 배양을 통하여 배지 최적화 연구를 수행한 결과, LB 배지에서의 phytase 생산성 대비 약 10배의 생산성 증가를 가능케 한 최적 배지를 개발하였다. 이 최적배지 상에서의 *B. subtilis* DB431 (pJH27-SM2) 균주 및 B34 (pJH27-Re84) 균주의 플라스크 규모에서의 phytase 최대 생산성은 각각 약 12 U/ml 및 약 57 U/ml로 나타났다.

B. subtilis DB431 (pJH27-SM2) 균주를 대상으로 2L 및 30L 규모 발효를 통하여 발효조건을 최적화하였다. 또한, 30L 발효액을 사용하여 연속 원심분리기를 이용하여 균체를 제거하고, 제균된 효소액을 한외여과막으로 농축 및 세척하고, 그 후에 동결건조를 수행함으로써 분말 효소를 제조하였다. 그 결과, 개량 phytase의 최종 회수율은 80% 이상으로 높게 나타나 산업적으로 이용 가능한 정제공정을 개발하였다.

B. subtilis DB431 (pJH27-SM2) 균주를 대상으로 300L 규모 발효를 수행하여 상

기 공정에 따라 시제품 (1,700 FTU/g)를 제조하였고, 이 내열성·내산성 phytase 효소제를 산란계 동물시험을 위한 사료첨가제로 협동연구기관에 공급하였다.

이상에서 설명한 바와 같이 본 과제 연구를 수행하여 상기 항목의 목표를 90% 달성하였다고 평가된다.

7. 개량효소 동물사양시험

본 과제의 *B. licheniformis* sp. SP4 유래 내열성·내산성 개량 phytase의 실제 산업현장에서의 효용성을 검증하기 위해서 동물시험을 실시하였다. 본 연구에서는 옥수수-대두박 위주의 산란계 사료에 인의 공급량을 NRC 요구량의 100% 수준으로 한 대조구(C)로 하고, 시험구는 인 공급량을 대조구의 68%로 조정하고 이에 본 과제 개량 SM2 phytase를 250 FTU 첨가한 구(P250), 500 FTU 첨가한 구(P500) 및 1,000 FTU를 첨가한 구(P1,000)로 하였으며, 대비구는 인 공급량을 대조구의 68%로 조정하고 이에 BASF사 Natuphos phytase를 250 FTU 첨가한 구(N250), 500 FTU 첨가한 구(N500) 및 1,000 FTU를 첨가한 구(N1,000)로 두고, 처리당 7반복, 반복당 8수씩 총 392수의 52주령된 하이라인 브라운 산란계를 공시축으로 하여 완전임의배치법으로 시험을 수행하였다. 산란계 사양시험을 통해서 산란율, 연과란율, 난각두께 및 난각강도 등을 측정하였으며, 산란계 대사시험을 통해서 영양소 이용율, 인 배설량 등을 측정하였다.

그 결과, 산란율, 연과란율 및 사료섭취량은 처리구간에 유의적인 차이가 없었으며 phytase의 종류와 첨가수준 간에도 차이가 없었다. 난중, 난항고, HU, 난각강도 및 난각두께에서도 처리간에 유의적인 차이가 없었다. 산란계의 산란능력과 난질의 결과를 볼 때, 급여 사료에 인 공급량을 68% 수준으로 하고 phytase를 급여하면 산란계의 생산능력과 난질이 차이가 없어 phytase의 첨가로 인 공급량을 30%까지 감소시켜도 생산성에는 문제가 없다고 할 수 있다.

본 과제 개량 phytase의 첨가에 따른 조단백질, 조회분 및 인 이용율은 처리간에 유의적인 차이가 있었다. 조단백질의 이용율은 본 과제 개량 phytase가 Natuphos phytase 보다 높았으며, phytase의 함량이 증가함에 따라 조단백질의 이용율도 증가하였다($P<0.05$). 인 이용율은 처리구중에서 P1000처리구가 가장 높았으며, phytase의 첨가수준간에는 첨가량이 증가함에 따라 증가하였다. 특히, 본 과제 개량 phytase는 500 FTU 이상은 무처리와 차이가 없어 인 공급량을 30% 감소할 경우 500 FTU를 첨가하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

산란계의 분 배설량은 phytase의 종류에서는 차이가 없었으나 phytase의 첨가수준은 첨가량이 증가함에 따라 분배설량은 감소하였다($P < 0.05$). 인 배설량은 무처리보다 phytase 첨가구가 배설량이 적었으며, phytase의 첨가수준이 증가함에 따라 인 배설량은 감소하였다($P < 0.05$). 그러나 phytase의 종류간에는 차이가 없었다. 산란계의 건물 및 인 배설량을 볼 때 phytase 첨가구는 대조구보다 분 배설량이 줄었으며, 특히 phytase 500 FTU 이상에서 효과가 있었다.

이상에서 설명한 바와 같이 본 과제 연구를 수행하여 상기 항목의 목표를 100% 달성하였다고 평가된다.

제 3절 관련 분야에의 기여도

본 과제 연구를 통하여 확립된 분자진화기술에 의한 효소개발 기술은 산업적으로 유용한 많은 효소·단백질의 개발에 적용가능하기 때문에 그 과급효과가 막대할 것으로 기대된다. 그리고 본 연구를 통하여 확립된 효소의 상업적 생산기술은 고도의 기술과 지식을 필요로 하는 첨단 생명공학 기술이다. 이러한 기술은 앞으로 다양한 용도의 신규 효소제 개발 및 생산에 응용 될 것이다. 이러한 기술의 확대를 통해서 장기적으로는 외국에서 수입되는 약 200억원/년의 수입 효소를 국산화시킬 수 있을 것이며, 세계 효소 시장의 확대와 더불어 수출에 기여할 수 있을 것이다.

본 연구에서 개발한 내열성 및 내산성 phytase를 산란계 사료에 급여하여 사양시험과 대사시험을 실시한 결과, 단백질 이용율과 인 이용율이 증가되어 질소와 인의 배설량을 줄였다. 따라서 본 연구에서 개발한 내열성·내산성 phytase는 산란계 뿐만 아니라 육계 및 양돈사료에 첨가하면 질소와 인의 소화율을 증가시켜 질소와 인의 배설량을 줄여줄 것으로 기대된다. 이와 같은 사료 첨가용 효소제의 개발은 국내 사료제품의 원가 절감과 품질 향상에 기여하게 될 것이고, 사료용 효소제의 사용으로 가축 분변 중의 질소와 인의 함량을 줄임으로써 축산 농가에서 총질소와 총인 함량 규제를 벗어날 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 농가의 입장에서는 사육두수를 유지 또는 증가시킬 수 있으므로 생산성 향상에 도움이 될 것이고 국가적으로는 하천과 호수의 수질개선에 기여하게 될 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 추가연구의 필요성

Phytase가 단위동물을 위한 사료첨가제로 개발되기 위해서는 phytase가 갖추어야 할 몇가지 효소적 특성들이 있는데 그 중에서 내열성, 내산성, 중성 pH와 중온에서의 높은 비활성, 단백질분해효소에 대한 저항성 등이 특히 중요하다고 할 수 있다. 그런데, 본 연구의 개량 내열성·내산성 SM2 phytase는 내열성이 우수하여 pellet 가공조건에 매우 안정한 것으로 밝혀졌으며, 본 과제 연구의 일련의 내산성 개량을 통하여 위의 낮은 pH 조건에서도 비교적 안정하게 효소특성이 바뀌었으며, 십이지장에서 분비되는 담즙산에 대해서도 안정한 것이 확인되었고, 위와 십이지장에서 분비되는 단백질 분해효소들에 대해서도 안정한 것으로 확인되었고, 단위동물에 의해 섭취된 곡물 중 phytate의 가수분해가 이루어지게 되는 장관 내의 조건인 중성 pH와 중온에서 높은 안정성과 비교적 우수한 상대활성을 나타냈다. 이와 같이 본 과제를 통하여 *B. licheniformis* sp. SP4 균주 유래의 내열성 phytase를 분자진화기술에 의한 연쇄적인 개량을 통하여 내산성을 현저히 증가시킴으로써 본 과제의 개량 SM2 phytase가 사료용 효소로서 유용성이 매우 증대된 것으로 판단된다. 특히, 본 과제의 개량 SM2 phytase는 기존의 사료첨가제로 시장에서 사용되고 있는 곰팡이 유래 phytase의 가장 큰 장점 중의 하나인 내산성을 보유하고 있을 뿐만 아니라 곰팡이 유래 phytase의 단점이라고 할 수 있는 내열성과 중성 pH에서의 높은 반응성 등의 효소특성까지 보유하고 있다. 그러나, 곰팡이 유래 phytase는 phytate로부터 5개의 phosphate를 제거하여 반응산물로서 free phosphate와 myo-inositol-2'-monophosphate를 생성하는 반면에 본 과제의 *Bacillus* 유래 phytase는 phytate로부터 단지 3개의 phosphate를 가수분해하여 최종산물로써 free phosphate와 두 가지 myo-inositol triphosphate (Ins(2,4,6)P₃ and Ins(1,3,5)P₃)를 생성하는 것이 확인되었다. 또한, 본 과제의 내열성·내산성 phytase의 Michaelis constant (K_m)가 0.38 mM로 확인되어 곰팡이 유래의 phytase 보다 기질 친화력이 다소 낮은 것으로 확인되었다. 결국, 최적의 반응특성을 지닌 사료첨가용 phytase를 개발하기 위해서는 본 과제 내열성·내산성 phytase의 비활성 개량이 필요할 것으로 판단된다. 그런데, 본 연구팀은 이를 위해서 본 과제 3차년도 연구를 통하여 비활성이 2.4배가 증가된 내열성·내

산성 phytase 변이체를 개발한 바가 있고 또한 과제 종료 시점인 현재에도 추가 개량 연구가 진행 중에 있으므로 수개월 내에 비활성이 획기적으로 증대된 내열성·내산성 phytase 변이체를 개발 할 수 있을 것으로 기대된다. 추가연구를 통하여 비활성이 증진된 내열성·내산성 phytase 변이체가 개발된다면 사료첨가제로서의 가장 이상적인 phytase 유전자원이 개발될 것으로 기대된다. 또한 내열성·내산성 phytase의 비활성 증진 개량은 대규모 배양에서의 효소 생산성 증가 효과를 가져오게 되므로 개량 효소제의 경제성을 확보할 수 있는 유력한 방안이 될 것으로 기대된다.

본 과제의 *B. licheniformis* sp. SP4 유래 내열성·내산성 개량 phytase의 실제 산업현장에서의 효용성을 검증하기 위해서 동물시험을 실시한 바가 있다. Phytase는 체내에서 곡물 중의 phytate를 소화하지 못하는 단위동물 (특히, 돼지 및 닭)을 위한 사료첨가제로 사용되고 있는데, 본 과제에서는 산란계 시험을 우선적으로 추진하였다. 그 이유는 산란계가 돼지보다 인 요구량이 많아서 본 과제 개량 phytase의 효능 평가가 더 용이하리라고 판단하였을 뿐만 아니라 유럽에서는 분변 중의 인에 대한 총량 규제가 시행되고 있어서 양돈산업에서의 phytase 요구도가 높은 편이지만 국내에서는 분변 중 인에 대한 총량 규제가 시행되고 있지 않아서 양돈산업에서의 phytase 요구도가 미약한 편이고 오히려 원가 절감 등의 이유로 양계산업 (특히, 산란계)에서 phytase 요구도가 매우 높은 실제 시장 상황을 고려하였기 때문이다. 그러므로 본 과제의 개량 내열성·내산성 phytase의 시장성을 넓히기 위해서 과제 종료 이후에 자돈을 대상으로 한 추가 동물시험이 필요할 것으로 판단된다. 그런데, 본 과제 연구의 산란계 동물시험 결과에 비추어 보면 본 과제의 내열성·내산성 phytase는 산란계 뿐만 아니라 육계 및 양돈사료에 첨가하여도 질소와 인의 소화율을 증가시켜 질소와 인의 배설량을 줄여줄 것으로 기대된다.

제 2절 타연구에의 응용

본 과제 연구를 통하여 주관연구기관에서 독자적으로 개발한 분자진화기술을 적용하여 내열성 phytase의 내산성을 획기적으로 증진시킨 바가 있다. 이와 같이, 본 과제 연구를 통하여 확립된 분자진화기술에 의한 효소개량 기술은 산업적으로 유용한 많은 효소·단백질의 개량에 적용가능하기 때문에 그 파급효과가 막대할 것으로 기대된다. 특히, 분자진화기술은 모든 유전자 (또는 DNA)의 개량에 적용 가능하기 때문에 화학공업, 의약품 단백질

질, 농업, 환경산업 등 생물산업 전반에 걸쳐서 적용이 가능하다.

21세기에는 환경문제가 중요하게 부각되어 모든 산업분야에서 환경친화적인 기술 개발이 가속화될 것으로 전망된다. 특히 기존의 화학공정을 자연친화적인 생물전환공정으로 대체하려는 노력이 폭 넓게 시도될 전망이다. 화학공업 제품의 시장규모는 1998년에 8천억 불이었는데 10~20년 내에 약 2천억불 정도가 발효나 생물축매에 의한 생물공정으로 대체될 것으로 예상된다. 특히, 미국 정부는 최근에 향후 50년 내에 미국에서 생산되는 화학제품의 50%를 생물공학기술로 생산토록 하는 정책을 통과시켜 효소를 이용하는 생물전환기술 개발의 기폭제 역할을 한 바가 있다. 그러나 현재 생물공정에 사용되는 효소는 그 효소의 특성(효소활성과 안정성 등)이 기존 화학공정 조건에 적합하지 않은 경우가 많기 때문에 화학공정에 적합한 특성을 지닌 효소의 개발이 생물전환공정의 중요한 관건이 될 전망이다. 생물전환공정에 적합한 효소를 개발하기 위해서 지금까지 자연계에 존재하는 효소의 탐색과 돌연변이를 통한 효소개량 등이 이루어져 왔으나 화학공정을 대체할 수 있을 정도로 반응특성이 우수한 효소를 개발한 예가 매우 적다. 그러나 분자진화기술을 이용하면 목적하는 화학공정에 적합한 맞춤형 효소를 단기간 내에 개발하는 것이 가능하기 때문에 연 8천억불에 이르는 화학제품의 상당부분을 생물공정으로 전환하는데 있어서 획기적인 전환점이 될 것으로 전망된다.

재조합 의약품 단백질의 시장규모는 1997년에 170억불이었고 2000년에는 190억불에 이를 것으로 추정된다. 그런데 기존의 재조합 의약품 단백질을 대량생산하는데 있어서 현재의 기술로는 수율 및 생산원가의 한계에 이르렀을 뿐만 아니라 기존 단백질보다 효능이 개선 또는 강화된 새로운 단백질의 개발 필요성이 강력히 제기되고 있는 실정이다. 따라서 분자진화기술을 통하여 의약품 단백질(항체, Growth factors, Cytokines 등)을 개량하여 그 기능을 극대화시킴으로써 효능과 안정성 등이 우수한 새로운 의약품 단백질의 개발이 가속화될 전망이다. 또한 백신 시장규모는 1998년에 40억불을 넘어섰고 2000년에는 100억불을 초과할 것으로 전망된다. 그런데 분자진화기술은 의료용 단백질의 개량뿐만 아니라 DNA 백신 개발, 유전자 치료용 벡터 개발 등에도 적용이 가능하기 때문에 분자진화기술의 활용범위와 그 가치가 매우 크다고 할 수 있다. 또한 현재 전세계적으로 진행되고 있는 유전체 연구의 결과로 동일한 생리활성을 담당하는 생체내 다양한 유전자군이 선별될 것이다. 그렇게 되면 이들 유전자들의 다양성을 이용한 유전자 진화기술은 Post- Genomics의 핵심기술로 생물 의약품 산업에서 더욱 각광받을 것으로 전망되며, 분자진화기술을 활용한 생물 의약품의 시장규모는 급속하게 증대될 것으로 기대된다.

유전자 변형 농작물의 시장규모는 현재 10억불 정도로 추정하고 있는데 2005년에는 60억불 정도로 증대될 것으로 예상하고 있다. 분자진화기술을 적용하여 특정 유전자를 개량함으로써 농작물의 특성을 변형시켜 농작물의 품질 개선, 수확량 증대 및 내성증가 등의 목적을 이루고자 농업분야에도 유전자 진화기술이 확대 적용되고 있다. 그리고 분자진화기술을 이용하여 빠른 속도의 효소 개량 및 혁신적 초기능 효소의 제조가 가능함에 따라 식품산업, 환경산업 등 유전자 진화기술의 새로운 응용분야가 급속히 확대될 전망이다.

제 3절 기업화 추진방안

본 과제의 사료첨가용 phytase 개발에 따른 기술 및 자원을 본 연구에 참여하고 있는 기업체인 아미코젠(주)에서 산업화를 추진하여 외국 거대기업으로의 기술이전을 우선적으로 추진하고 이후에 국내생산을 도모하고자 한다.

지금까지 대부분 곰팡이 유래의 phytase가 사료첨가제용 효소제로서 개발되어 상용화되었다. 특히, Novo Nordisk사는 *Aspergillus niger* subsp. *ficuum* phytase의 효소 및 유전자에 관한 특허를 보유하고 있을 뿐만 아니라 곰팡이 phytase를 공업적으로 생산하여 세계 시장의 약 50%를 선점하고 있다. 이러한 Novo phytase를 공급받은 BASF사는 이지바이오(주)를 통하여 국내 사료회사에 전량 공급하고 있다. 그러나 BASF사의 Natuphos 등 기존에 개발된 곰팡이 유래의 phytase 효소제는 내산성은 뛰어나지만 내열성이 떨어지고 곡물 중의 phytate에 대한 분해력이 다소 떨어지는 등의 문제가 있는 등 지금까지 국내를 포함한 전 세계에서 최적의 phytase를 생산하지 못하고 있는 실정이다. 따라서 외국의 많은 기업들은 단위동물을 위한 사료첨가제 용도로 더욱 적합한 phytase 유전자원을 지속적으로 발굴·개발하고자 하는 노력이 진행되고 있다. 그런데, 상기에서 설명한 바와 같이 본 과제의 개량 phytase는 내열성, 내산성, 중성 pH 및 중온에서의 높은 비활성, 단백질분해효소에 대한 저항성 등 사료첨가제로서 갖추어야 할 우수한 반응특성을 지니고 있다. 따라서 본 과제의 내열성·내산성 phytase 유전자원의 외국 거대기업으로의 기술이전을 과제 종료 후 1년 이내에 우선적으로 추진하고자 한다.

대부분의 사료첨가용 효소제는 사료 곡물 등의 소화율을 증가시켜 저가의 사료 곡물의 효용성을 높이고 가축 생산성을 높이고자 하는 것이다. 즉, 기존 가축사료에 효소제를 첨가하여 사용하는 것이다. 그러나 phytase의 경우에는 사료 내 곡물 중의 phytate를 분해

하여 유리되어 나오는 인을 흡수하여 단위동물이 이용토록 하고 따라서 분변으로 배출되는 인 함량을 낮추어 환경규제에서 벗어나고자 하는 목적에서 사료첨가제로 사용되고 있다. 결국, phytase는 다른 사료첨가용 효소제와는 달리 기존 사료에 첨가하고 있는 인 공급원 대신에 phytase로 대체하여 사용하는 것이다. 그러므로 phytase 효소제의 효능이 낮거나 불균일 등의 문제가 발생하면 단위동물에서 중요한 영양원인 인의 결핍으로 인하여 가축 생산성 저하로 직결된다. 이와 같은 이유로 다양한 phytase가 사료첨가제로 개발되지 못하고 소수의 phytase 효소제가 시장을 독점하고 있는 이유 중의 하나이다. 그러므로 phytase 효소제의 경우에는 효소특성이 매우 중요하다고 할 수 있다. 본 과제 내열성·내산성 phytase는 사료첨가용 효소제로서 갖추어야 할 우수한 반응특성을 가지고 있으므로 본 과제 내열성·내산성 phytase 유전자원을 거대기업으로 이전할 수 있는 가능성이 크다고 판단되며, 이를 통해서 국내는 물론 세계시장으로 본 과제 phytase의 시장성을 넓히고자 한다.

또한, 소수의 phytase 효소제가 시장을 독점하고 있는 이유 중의 하나가 효소제 가격이다. Phytase 효소제도 결국 사료첨가제이므로 사료 원가에 큰 영향을 미치지 않도록 저가로 공급할 수 있는 효소생산 기술이 중요하다. 아래의 경제성 분석에서 설명한 바와 같이 사료첨가용 효소 생산을 위해서는 대규모 설비와 고생산성 균주 및 대량배양 기술이 필수적이다. 그러므로 본 연구팀에서는 phytase 유전자원의 거대 외국기업으로의 기술이전을 우선적으로 추진하고 이후에 과제 종료 후 후속화 연구를 수행한 후에 phytase 효소제의 국내생산을 도모하고자 한다. 이를 위해서는 후속 연구를 통해 개발될 phytase 생산균주의 효소생산성이 중요한 판단근거가 될 것으로 여겨진다. 효소 생산성이 100~500 U/ml 수준이면 대규모 배양설비를 갖추고 있는 국내 대기업의 설비를 이용하여 국내생산을 도모할 계획이고, 효소 생산성이 적어도 500 U/ml 수준 이상이면 참여기업인 아미코젠(주)에서 향후 10톤 규모의 발효기 및 정제시설을 증설하여 phytase를 비롯한 유용 효소제를 사업화 시킬 계획이다.

■ 경제성 분석

- 생산규모: 50 톤/년 (국내시장의 50%)
- 규격: 5×10^6 U/Kg (BASF의 Natuphos 수준)
 - Phytase 생산성 : $100 \text{ U/mL} = 1 \times 10^5 \text{ U/L} = 1 \times 10^8 \text{ U/KL}$
 - 배양시간: 48 hr → 3일/Cycle → 110 Cycle/년
 - 정제수율: 80%

- 발효조 working volume = 70%
- 발효조 규모 :
 $(50,000 \text{ Kg/년}) \times (5 \times 10^6 \text{ U/Kg}) \div (1 \times 10^8 \text{ U/KL}) \div 110 \text{ Cycle/년} \div 0.8 \div 0.7$
 = 40.6 KL
- 필요설비: 50 KL 발효조 1기 및 회수설비 (설비투자비 = 20억원)

· 제조원가 추정 (단위: 원/Kg)

항 목	원단위 (Kg/Kg)	단가 (원/Kg)	금액 (원/Kg)	비고
원재료(원당)	6.3	360	2,268	100 g/L
부재료			2,268	원재료의 100%
Utility			2,268	재료비의 50%
인건비	8명	25백만원/인/년	4,000	
감가상각비		20억원	8,000	5년 균등상각
제조원가			18,804	
일반관리비			5,641	제조원가의 30%
총원가			24,445	※판가: 40,000원/Kg

- 연간 매출액 : 50 톤 × 40,000원/Kg = 20 억원
- 생산경비 = 50톤 × 24,445원/Kg = 12.2 억원
- 연간 이익금 = 20 - 12.2 = 7.8 억원
- ROI = 20/7.8 = 2.6년

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1절 축산 폐기물의 감소 방안

세계적으로 축산 폐기물로 인한 환경오염 문제는 매우 심각하게 거론되어 왔으며, 특히 네덜란드, 덴마크, 영국 등과 같은 축산 선진국에서의 연구는 매우 심도 있게 이루어져 왔다. 우리나라의 경우도 최근 들어 축산업이 대규모로 전업화 혹은 기업화되면서 가축이 배설하는 분뇨가 심각한 수질 및 토양 오염의 됴에 따라, 정부에서도 폐수를 억제하기 위한 일환으로 환경 시행법을 제정할 움직임을 보이고 있다. 또한, 농림부는 축산시설 개선과 축산 폐수의 처리를 위한 시설 지원에 많은 노력을 기울이고 있다. 특히, 환경부나 환경관련 단체의 활동이 강화되면서 일반 국민의 수질오염에 대한 관심이 고조되고 있는 가운데 이에 부응하는 축산인들의 자체 노력이 가세하여 축산 폐기물로 인한 수질오염에 대한 경각심은 크게 고조되고 있다. 가드 등에 의하면 영국의 경우 liquid slurry로 양돈 폐기물을 살포할 경우 비용은 총 생산비의 약 6.1%를 차지하며 liquid slurry를 부분적으로 처리하여 살포할 경우에는 처리 정도에 따라 총 생산비의 9.2%-16.8%를 차지한다고 하였다. 폐기물의 처리비용이 증가되면 영국에서는 다른 나라에 비하여 양돈 산업의 경제성이 크게 감소할 것이라 하였으며, 사료의 개선으로부터 축산 폐기물과 폐수를 줄이려는 노력은 매우 중요한 과제라고 하였다. 그러므로, 축사로부터 방출되는 폐수량을 줄이기 위해서는 급여되는 사료의 소화율을 높이는 방법과 분뇨와 함께 방출되는 폐수의 효율적인 처리 및 이용 방법을 개발하는 것이 필요하다.

축사로부터 방출되는 폐수의 양을 줄이는 첫 번째 방법은 먼저 소화율을 높여서 근원적으로 분의 배설량 자체를 줄여야 하는데, 가드 등은 사료의 이용성을 향상시킬 수 있는 소화촉진제의 사용은 사료를 절감시키는 효과 외에도 분뇨의 배설량을 줄이는 효과가 있으므로 소화촉진제를 사용하지 않는 것은 환경적 측면에서 범죄라고 까지 규정하였다. 가드 등은 체중이 70kg인 비육돈이 하루에 배설하는 분뇨의 양은 4-5kg정도로서 사람의 성인 배설량에 비해 약 4배의 배설량이므로 모돈 500두에 평균체중 40kg인 자돈 4,600두를 사육할 때 배출되는 폐수량은 사람 12,000명이 배출하는 생활 폐수와 거의 맞먹는 양이라고 하였다.

둘째로는 배설되는 분에 함유된 성분 가운데 수질오염의 주 원인이 되는 질소와 인의 배설량을 줄이는 방법인데, 질소의 배설량을 줄이기 위해서는 단백질 소화율을 개선할 수 있는 소화 효소제나 미생물 제제, 효소 효모제를 사용하면 분 배설량이나 분 중의 질소의 배설량을 감소시킬 수 있으며, 가축의 성장과 유지에 필요한 단백질을 공급 시에 아미노산의 균형을 맞추어 줌으로써 단백질 공급량을 감소시킬 수 있으므로 결과적으로 질소 배설량을 줄일 수 있다. 인의 배설량을 줄이기 위한 방법으로는 대부분의 곡류사료에 다량으로 포함되어 있으나 단위 가축의 소화 효소에 의해 거의 분해되지 않는 phytate phosphorus의 소화 이용률의 증가에 초점을 맞추고 있다 (69).

셋째로는 대기로 휘발하여 악취의 원인이 되거나 대기 오염원이 되는 암모니아 등의 발생량을 줄이는 것인데 Lyons 등은 Yucca 추출물의 상용이나 Deodorase 의사용이 암모니아의 발생을 효율적으로 감소시킬 수 있다고 하였으며, Miner 등도 돈사로부터 악취를 제거하는 여러 가지의 실질적인 방법들을 제시하였다. 이외에도 메탄가스의 이용과 돈 분의 고액분리후 고형 분은 발효 건조시켜 이용하고 액비는 발효후 작물 포에 살포하거나 폐수처리를 하는 방법들에 대한 연구와 실용화가 이루어지고 있다.

제 2절 인 배설이 환경에 미치는 영향

환경오염 예방에 대한 인식이 고조되면서 토양이나 물 속에 인의 축적량이 늘어나서 부영양화가 더욱 촉진되어 생태계가 파괴되고 수질오염이 더욱 악화되는 현상은 세계적인 공해 문제로까지 대두되고 있다. 수질의 부영양화는 질소와 인산의 함량이 높아져서 플랑크톤이 과다하게 성장함으로써 일어난다. 가축의 사료 중에서 소화되지 않는 질소와 인 성분 때문에 가축이 필요로 하는 양 이상의 질소와 인이 포함되어 있으며 가축의 배설물 중에는 다량의 질소와 인이 함유되어 이것이 물 속으로 흘러들어 갈 때 수질오염의 심각한 원인이 되기도 한다. 그러나 질소는 토양과 물 속에 거의 무제한으로 존재하기 때문에 질소는 플랑크톤의 과다성장을 제한하는데 결정적인 요소가 되지 못하지만 인산의 경우에는 물 속에 과다하게 포함될 수 있는 원인이 되는 요소들만 제한하면 플랑크톤의 과다 성장을 억제할 수 있기 때문에 수질오염 방지를 위해서는 특히 인의 제한이 더욱 중요하다.

Isermann 등은 토양 속으로 유입되는 총 인의 73%가 비료로부터 유래하며 26%가 사료에서 유래된다고 하였으며, 토양으로 유입되는 인의 35%는 식물에 이용되지만 65%는 토양 속에 축적되며 토양 속에 축적된 인의 89%는 토양에 남아 있고 11%는 물 속으로 들

어간다고 하였다. 이러한 인산의 과다 축적은 돼지나 닭과 같이 곡류사료 중의 인을 충분히 분해할 수 없는 단위동물의 경우 사양 밀도가 증가하면 더욱 급격하게 증가한다. 1994년도 우리나라의 양돈, 산란계 및 육계의 사료 생산량은 각각 448만 톤, 228만 톤 및 121만 톤으로 사료생산량은 매년 증가하는 추세에 있고, 양돈장이나 양계장의 대규모화가 급속히 진행되고 있어서 분뇨의 처리 시설 및 자원화에 대한 대책이 없으면 수질오염은 보다 심각해질 전망이다. 우리나라의 경우, 미개간산지 토양 속의 인산 함량이 평균 10 ppm 수준으로써 작물이나 초지 재배에 적절한 100 ppm 이상 수준에는 크게 미치지 못하기 때문에 가축 분뇨를 퇴비로 이용하는 것은 사실상 국토의 보존을 위해서도 매우 중요하다. 그러나 현실적으로 우리나라 경작지의 대부분은 논이며 가축의 분뇨를 살포할 수 있는 밭이나 초지는 매우 제한되어 있으므로 가축 분뇨가 토양으로 환원되는 비율이 28%에 불과한 실정이다. 정부의 지속적인 지원과 1991년에 제정된 분뇨 및 축산 폐기물 처리법과 현재 진행 중인 환경농업 육성법 등을 통하여 축산폐기물에 대한 규제를 강화하고 있으나 아직도 많은 양의 가축 분뇨가 물 속으로 바로 흘러 들어가서 오염시키는 원인으로 지적되고 있다.

제 3절 Phytate phosphorous

Phytate는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 cyclic alcohol inositol이 최대 6개의 인군과 함께 esterification 함으로써 만들어진 물질로서, 여기에 칼슘, 마그네슘, 철, 아연 등과 같은 무기물이 함께 결합되어 있다. 이렇게 phytate 내의 결합된 형태로 존재하는 인을 phytate phosphorus라 한다. Phytate는 거의 모든 식물종자에서 인의 주 저장형태로서 식물종자가 성숙되는 과정동안에 빠르게 축적되며, 발아 시에는 인의 방출로 인하여 빠르게 분해된다. Mayr 등은 자연계 내의 inositol 이성체들의 존재와 그 중요성에 관한 고찰에서 식물종자 내에서 phytate의 주 저장 부위는 콩과 옥수수의 경우는 배아이며 밀과 같이 맥류는 호분층이라고 하였으며, 그 기능은 잘 익은 종자의 발아와 생육에 필요한 인과 주요 양이온들의 저장 수단이라고 하였다. 곡물 속에서 인이 phytate 형태로 존재할 때는 Ca, Zn, Mg 및 Fe와 결합하여 영양적으로 불용성화 된다.

자연 사료 내에 함유된 인의 형태는 인의 이용효율에 영향을 미친다. 일반적으로 곡류나 그 부산물 및 유실유 종자에 함유된 인의 약 60-75%가 phytate 형태로 결합되어 있기 때문에 돼지에서는 이용성이 상당히 낮다 (92). 곡류의 종류에 따라서도 그 이용성에는 차이가 있어 옥수수에서는 인 이용률이 15% 이하이지만 밀에서 거의 50% 까지 이용된다.

Phytate 인의 소화율은 다양한 영양적 요소에 의해서도 결정된다. 가금 사료에 칼슘 함량이 많으면 불용성 calcium phosphate 가 형성되므로 써 phytate 인의 이용률이 감소한다고 보고되었다. McCuaig 등도 높은 수준의 Mg과 칼슘의 첨가는 닭의 소장에서 phytase 와 alkaline phosphatase 의 활성도를 감소시키지만 인의 함량이 높을 경우에는 상관이 없다고 하였다.

Jongbloed 등은 육성돈으로 측정된 보리, 밀, 밀기울 및 연맥의 phytin태 인의 이용률은 각각 12, 40, 34 및 1% 이었으나, 옥수수과 대두박의 phytin태 인은 총 인의 소화율을 오히려 감소시키는 경향이 있다고 하였다. 옥수수와 대두박은 가축의 배합사료 제조시 에너지와 단백질의 주 공급원으로써 전 세계적으로 가장 많이 사용되는 식물성 사료인 옥수수나 대두박에 있는 인은 대부분 phytate 형태로 존재하므로 phytate 형태의 인은 phytate 분자로부터 ortho-phosphate를 분해할 수 있는 phytase가 부족하기 때문에 비반추가축에 있어서는 그 이용률이 극히 낮다. NRC와 Cromwell 등은 돼지와 같은 단위가축은 옥수수 내에 있는 인은 단지 10-15% 만이 이용 가능하며 대두박의 인은 25%만이 이용 가능하다고 하였다 (92). 그러나 반추가축에 있어서는 반추위 내의 미생물들 가운데 phytases를 생산하는 미생물군이 충분히 있어서 phytate phosphorus를 이용할 수 있다.

소화관 내에서 분해가 된 인은 소장에서 흡수되는데, 이 흡수는 Vitamin D₃에 의해 촉진되며, 또한 흡수되는 인의 양도 소장의 부위에 따라서 달라진다. McHardy 등은 쥐를 이용한 *in vivo* 시험에서 인의 흡수는 ileum보다는 jejunum에서 높다고 하였으며, Harrison 등은 vitamin D₃는 duodenum과 ileum에서의 흡수율을 감소시키고 jejunum에서의 흡수를 최대화한다고 하였다. Gueguen 등 및 Partridge 등은 인이 돼지의 대장에서는 거의 흡수가 되지 않는다고 하였으며, 돼지에 고 인산 사료를 급여하였을 때에는 다소의 차이가 있는데 이때에도 vitamin D의 효과는 거의 없고 능동적인 확산에 의한 인 흡수가 일부 이루어지는 것이 관찰되었다고 하였다.

제 4절 Phytase 3차 구조

Kostrewa 등은 X-ray crystallography를 이용하여 *A. niger* NRRL 3135 phytase 의 phyA 단백질 구조 (Fig. 39a)를 결정하고 분석하였다 (81). 그들은 phyA 단백질은 α/β domain과 α domain으로 구성되었고, 또 다른 histidine acid phosphatase인 rat acid phosphatase 단백질 구조 (85) (Fig. 39b)와 비교할 때 α/β domain에 존재하는 RHG와 HD

motif가 phosphoester 결합의 가수분해에 있어서 결정적이라고 하였다.

Lim 등은 active site mutant를 이용하여 *E. coli* phytase의 단백질 구조를 밝혔다 (86). *E. coli* phytase-phytate 복합체를 보면 active site의 주위에 대부분 positive charge를 띤 아미노산 그룹이 있어서 negative charge를 띤 phytate와 쉽게 binding 할 수 있다고 하였다. 또한, metal-phytate 복합체는 electrostatic repulsion 때문에 phytase와 쉽게 binding 할 수 없고 오직 metal-free phytate만이 가수분해할 수 있다고 하였다 (Fig. 39c).

최근에 *Bacillus* 유래의 내열성 phytase인 *Bacillus amyloliquefaciens* DS11에서 생산되는 phytase (Ts-phy) 단백질 구조가 결정되었다 (80). Ts-phy 단백질은 six-bladed-propeller식 접힘구조를 하고 있으며, β propeller는 5개의 4-stranded propeller와 1개의 5-stranded propeller가 역평행의 β 병풍구조를 하고 있다고 하였다 (Fig. 39d). 다른 β propeller 구조와 달리 Ts-phy β strand에는 반복된 conserved sequence가 없다. Ts-phy 단백질분자에는 모두 7개의 칼슘이온이 binding하여 있는데, 그중 2개 (Ca_1 , Ca_2)는 단백질 외면에, 1개 (Ca_3)는 중심에, 나머지 4개 (Ca_4 , Ca_5 , Ca_6 , Ca_7)는 분자 꼭대기에 존재하였다. Active한 Ts-phy phytase에는 모두 6개의 칼슘이온이 binding되어 있고 inactive한 단백질에는 단백질분자의 꼭대기에 있는 3개 (Ca_4 , Ca_5 , Ca_6)의 칼슘이온이 없는 것을 보아 active site인 것으로 추정된다. 즉, Ts-phy 단백질에는 6개의 칼슘 binding site가 존재하는데 그 중에서 Ca_1 , Ca_2 , Ca_3 는 high-affinity site로서 phytase의 열안정성에 관여하고, 나머지 Ca_4 , Ca_5 , Ca_6 는 효소의 활성화에 관여한다고 하였다. Tye 등은 *B. subtilis* VTT E-68013 (*phyC*), *B. subtilis* 168 (*168phyA*), *B. amyloliquefaciens* (*TS-phy*), *B. licheniformis* (*phyL*)의 아미노산을 비교해 본 결과, 6개의 칼슘 binding site를 구성하는 25개의 아미노산 중에서 *168phyA*에서 1개 (60L→V), *phyL*에서 3개 (60L→V, 339I→T, 340D→E)를 제외하고 나머지는 모두 같았다고 하였다. 이들 중에서 60번 잔기는 high-affinity site인 Ca_2 site에 속하고 339와 340번 잔기도 high-affinity site인 Ca_3 site에 속하여 phytase 열 안정성에 관련된다고 하였다.

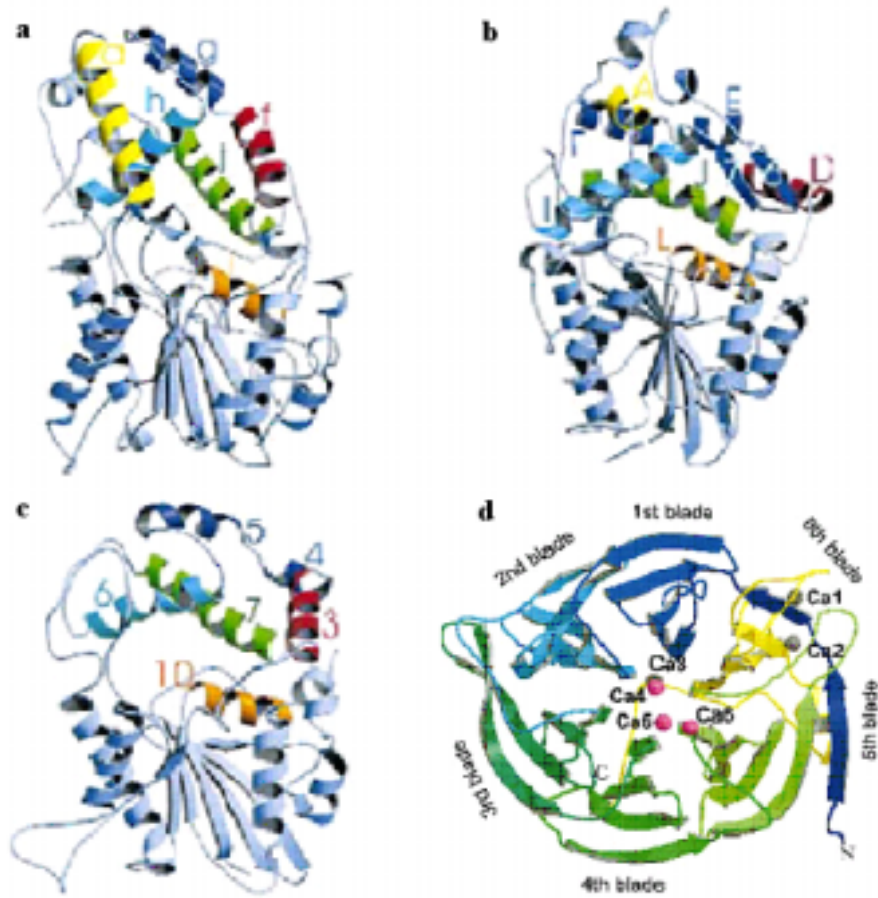


Fig. 39. The structure of the *Aspergillus niger* phytase (a), rat prostatic acid phosphatase (b), *E. coli* phytase (c), and *Bacillus amyloliquefaciens* phytase (d).

제 5절 Phytase 특성 연구

1. 최적 pH와 최적온도

다양한 종류의 phytase의 최적 pH와 최적온도를 종합하면 Table 21에 정리한 바와 같다. 대부분의 곰팡이에서 생산되는 phytase의 최적 pH는 4.5에서 5.6 사이에 있다. 그중 *A. fumigatus* phytase는 다른 곰팡이 phytase와는 달리 pH 4.0에서 7.3까지의 범위에서

Table 21. pH and temperature optima of various phytases

Phytase source	Temperature (°C)	pH
<i>A. niger</i> NRRL 3135	58	2.2; 5.0–5.5
<i>A. niger</i> ATCC 9142	65	5.0
<i>A. terreus</i>	70	4.5
<i>A. carneus</i>	40	5.6
<i>A. oryzae</i>	50	5.5
<i>A. fumigatus</i>	58	5.0
<i>A. nidulans</i>	55	5.5
<i>Penicillium caseoicolum</i>	45	3.0
<i>Rhizopus oligosporus</i>	55	4.5
<i>Peniophora lycii</i>	58	5.0
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	65	6.0
<i>Schwanniomyces castelii</i>	77	4.4
<i>B. Subtilis</i> (natto)	60	6.0–6.5
<i>B. Subtilis</i> 168	55	7.0
<i>B. Subtilis</i> VTT E-68013	55	7.0
<i>B. Licheniformis</i>	65	7.0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	70	7.0
<i>Bacillus</i> SP. KHU-10	60	6.0–9.5
<i>Echerichia coli</i>	55	4.5
<i>Klebsiella aerogenes</i>	60–70	4.5, 5.2
<i>K. terrigena</i>	58	5.0
<i>K. oxytoca</i>	55	5.0–6.0
<i>Pseudomonas</i> sp.	–	5.0
<i>Enterobacter</i> sp.	–	7.0–7.5
<i>Citrobacter freundii</i>	52	2.7, 5.0
Maize, germinated	55	4.8
Soybean seeds	55	4.5–4.8
Legume seeds	–	8.0
<i>Typha latifolia</i> , pollen	–	8.0
Rat, intestinal mucosa	–	7.5

80% 이상의 활성을 유지하는 넓은 pH 범위를 갖고 있다. Bacterial phytase에서 *Bacillus* 유래의 phytase는 중성 pH인 6.5-7.5에서 가장 높은 활성을 나타내고 있었다.

대부분 phytase의 최적 온도는 45~77°C로서 곰팡이 유래의 phytase는 보통 *Bacillus* 유래의 phytase보다 비교적 낮은 온도에서 최적의 활성을 나타낸다. 동물사료의 pelleting은 높은 온도 (65~80°C)에서 가공되기 때문에 사료에 첨가되는 phytase는 열에 안정하여야 한다. 지금까지 밝혀진 곰팡이 유래의 phytase 중 *A. fumigatus* phytase가 열에 안정하여 100°C에서 20분간 방치하여도 90% 정도의 잔존활성을 유지하고 (54), 나머지 곰팡이 유래의 phytase는 구조의 불안정성으로 높은 온도에서 쉽게 실활한다 (52, 55). 이와 반대로 *Bacillus* 유래의 phytase는 대부분 열에 안정하다. *Bacillus licheniformis* 유래의 *phyL* phytase는 90°C에서 15분간 방치하여도 61%의 잔존활성을 나타냈고 (56), *Bacillus amyloliquefaciens* 유래의 *TS-phy* phytase는 90°C에서 10분간 방치하였을 때 50%의 잔존활성을 나타냈다 (39). 하지만 *Bacillus* 유래의 phytase는 calcium-free 상태에서는 극히 불안정하여 상온에서도 쉽게 실활하는 것으로 보아 칼슘이온이 phytase의 열 안정성에 아주 중요한 작용을 한다는 것을 알 수 있다.

한편, 곰팡이 유래의 phytase는 *Bacillus* 유래의 phytase보다 열 안정성이 떨어지는 반면 낮은 pH에서는 아주 안정하다. *A. terreus* 유래의 phytase는 pH 1.2~9.0의 서로 다른 완충용액에 섞은 후 4°C에서 40시간 방치한 후에도 거의 100%의 잔존활성을 나타냈다 (57). Bacterial 유래의 phytase 중 *E. coli* phytase는 pH 2.0~10.0에서 안정한 활성을 유지한다 (58). 하지만 *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* VTT E-68013 유래의 bacterial phytase는 중성부근의 pH에서는 아주 안정하였으나 pH 4.0 이하의 낮은 pH에서는 급격히 실활하였다.

2. 기질 특이성

대부분의 phytase는 비교적 넓은 기질 특이성을 갖고 있다. Phosphate ester 결합을 함유한 기질 중에서 ADP, ATP, p-nitrophenyl phosphate, phenyl phosphate, fructose 1,6-bisphosphate, glucose 6-phosphate, α -, β -glycerophosphate 및 3-phosphoglycerate는 구조적으로 phytate와 많이 다르지만 곰팡이 유래의 phytase에 의해 가수분해된다. 오직 *Bacillus* 유래의 phytase를 포함한 몇가지 종류의 phytase만이 phytate에 대한 높은 특이성이 있어서 다른 phosphate를 함유한 기질은 전혀 가수분해할 수 없다. *A. niger* NRRL3135는 pH 5.0 optimum *phyA*와 pH 2.5 optimum *phyB*, pH 6.0 optimum acid phosphatase

(API)를 생산한다. 이 세가지 효소의 *myo*-inositol hexa-, penta-, tetra-, triphosphate에 대한 K_{cat}/K_m value를 조사한 결과 phyA와 phyB는 *myo*-inositol hexaphosphate를 선택적으로 잘 분해하였기 때문에 이 두가지 효소를 phytase로 명명하였다 (87). API 효소는 *myo*-inositol phosphate에 대하여 아주 낮은 친화력을 갖는데 K_{cat}/K_m 에 준해서, phyA를 100%로 비교시 phytate의 분해율이 0.06%에 불과하였다 (88). 따라서, 이 효소는 acid phosphatase임이 분명하다. *E. coli* 유래의 phytase는 K_{cat}/K_m 가 $4.78 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 로서 phytate에 대하여 높은 친화력을 갖고 있다 (89). Phytase의 specific activity를 조사해 본 결과, 곰팡이 유래의 phytase 즉 *A. niger*는 103Umg^{-1} , *A. terreus*는 198Umg^{-1} 로서 비교적 높았지만 bacterial phytase 중 *E. coli* 유래의 phytase가 811Umg^{-1} 인 것을 제외하고 *Bacillus* 유래의 phytase는 $8.7 \sim 36.9 \text{Umg}^{-1}$ 로서 비교적 낮았다. 여러 가지 종류의 phytase의 K_m value와 specific activity를 종합하면 Table 22에 정리된 바와 같다.

Table 22. Km values (for phytic acid) and specific activities of various phuyases

Phytase source	Km (μM)	Specific activity (U mg^{-1})
<i>Aspergillus niger</i>	< 5	103
<i>A. terreus</i> 9A1	11	142
<i>Bacillus subtilis</i> (natto)	500	8.7
<i>B. amyloliquefaciens</i>	550	20
<i>B. licheniformis</i>	-	23.6
<i>B. subtilis</i> VTT E-68013	-	29
<i>B. subtilis</i> 168	-	36.9
<i>Escherichia coli</i>	130	811
<i>Klebsiella</i> sp.	2000	62.5
<i>K. terrigena</i>	300	205
<i>Rhizopus oligosporus</i>	150	9.47
Rat adult	213	-
<i>Typha latifolia</i> , pollen	17	0.1

제 6절 가축에 있어서 phytase 의사용 효과

1. 돼지

대체로 옥수수과 대두박에서 돼지의 인 요구량을 충족시킬 수 있을 정도로 충분한 인이 들어 있지만 인의 대부분이 phytate 형태로 존재하기 때문에 효과적으로 이용할 수 없다. 그러나 Nelson 등 (90)이 미생물에서 추출한 phytase의 첨가로 육계 사료에서 옥수수과 대두박의 인 이용률이 증가하였다는 보고를 한 이래 돼지와 닭에 있어서 phytase이용에 관한 연구가 활발하게 수행되었다.

체중 15-35kg의 육성 돈에서 측정된 인의 생물학적 이용률을 보면, 옥수수에 함유된 인은 15%, 탈피대두박에 함유된 인은 25%정도였다 (92). 따라서 소화되지 않은 양의 인이 분으로 배설되는데, 이러한 현상은 환경문제와 연관시켜 볼 때 수자원과 토양이 충분하지 못하고, 가축의 사육밀도가 높은 여러 지역에서 환경오염 문제를 발생시키기에 충분한 조건이 된다. 돼지를 비롯한 대부분의 단위동물들의 소장 내에는 무시해도 좋을 만큼 적은 양의 phytase가 존재하며 (91), 따라서 phytase를 첨가하면 인의 이용률을 크게 증가된다. Ketaren 등도 육성 돈에 있어서 대두박 내 인의 진정 소화율은 42%로 낮았으나 1,000 FTU의 phytase를 첨가한 경우 인의 진정 소화율이 69%로 크게 향상되었다고 하였다. 비록 phytase 활성화에 대한 연구 결과가 쥐, 브로일러, 그리고 사람에서 보고된 바 있지만, 소화관내에 존재하는 phytase로는 인의 이용률이 매우 낮아서 phytate 인의 사용은 매우 한정되어 있다. 따라서 식물성 phytase의 이용이나 장내 phytase의 이용보다도 활력이 훨씬 높은 미생물 배양에 의한 phytase의 제조 및 이용에 대한 연구가 최근에 많이 시도되고 있다.

Cromwell 등은 옥수수-대두박 위주사료에서 인의 요구량을 NRC 요구량 보다 20%와 40%를 감소시켜 급여한 결과, 증체량과 골 강도가 모두 감소하였는데 500 FTU의 phytase를 첨가한 결과 증체량은 대조구와 비슷하였고 골 강도는 phytase를 첨가하지 않았을 때보다는 증가하였으나 대조구보다 낮았다고 하였으며, phytase 첨가 수준을 250 FTU, 500 FTU, 1,000 FTU로 증가시켰을 때의 성장률과 골 강도는 직선적으로 증가하였다고 보고하였다. Young 등은 5주령에 평균체중 10-21kg 되는 자돈에게 미생물에서 추출한 phytase의 첨가는 증체율, 사료효율을 증가시켰고, 혈청인 함량이 증가되었으며 metatarsol의 회분함량과 인의 함량이 증가되었으며 phytase 첨가에 대한 효과는 calcium phosphate로부터 인을 1.7 g/kg 이나 추가 급여하는 효과와 비슷하다고 하였다.

Lei 등은 phytase나 인산칼슘제를 첨가한 사료와 첨가하지 않은 사료를 섭취한 돼

지에서 칼슘과 인의 균형을 조사하였는데 (93), 인의 경우에 있어서 phytase 첨가구는 대조구와 일당 사료 섭취량은 비슷하였으나 인의 이용률은 50%나 높게 측정되었고, 배설량은 42%나 적게 측정되었다. 또한 급여량에 대한 이용률을 보면 phytase 첨가구 대 대조구의 외관상 소화율에 있어서 비율이 각각 68% 대 28%로 phytase 첨가구가 대조구에 비해 40%나 더 높은 것으로 나타났다. 인산칼슘제 첨가구의 섭취량은 대조구보다 44%나 높은 것으로 나타났다. 그러나 인산칼슘제 첨가구는 phytase 첨가구에 비해 분과 뇨로 배설되는 인의 양이 각각 2.1배, 7.2배나 높아 인의 체내 축적률은 단지 7% 높은 것으로 나타났다. 섭취량 중 흡수율은 phytase 첨가구에 비해 15%, 섭취량 중 체내 축적률을 18% 적게 나타났다. 일일 칼슘 섭취량은 phytase 첨가구와 대조구 사이에는 차이가 없는 것으로 나타났고, 이용률은 대조구가 phytase 첨가구의 50% 수준이었다. Plasma 인의 농도도 처리간에 차이가 있었으나 칼슘은 차이가 없었다고 하였다. 또한 다른 연구자에 의하면 인산 함량이 낮은 옥수수-대두박 위주사료에 각각 750, 1,050, 및 1,350 PU/g의 phytase를 공급한 결과 1,050 PU/g 이상의 phytase 공급은 일당증체량, 사료섭취량, 사료요구율 및 plasma 인의 활력에 영향을 미치지 못하였으며 1,050 PU/g의 phytase를 급여한 경우의 증체량은 0.33%의 무기인을 첨가한 대조구 사료에 비해서 차이가 없었다고 하였다. Simons 등 (69)은 옥수수-대두박 위주 사료에 1,000 FTU의 phytase를 넣고 인과 칼슘의 소화율을 조사한 결과, 인 소화율이 약 26%정도 증가하였다고 하였으며 또한 돼지에서 phytate 소화율을 증가시키기 위한 미생물 phytase 첨가 시험의 결과, 인의 진정 소화율은 24% 증가하였고 배설되는 인의 양은 35% 감소하였다고 하였다.

칼슘 이용률 역시 phytase를 급여해 줌으로써 개선 효과를 가져왔다. 또한 다른 광물질 Mg, Cu, Fe, 그리고 Zn 역시 옥수수-대두박 위주사료 내의 phytate와 관련이 있으며, 이들 광물질의 이용률 역시 phytase의 첨가에 의해 개선된다고 하였다. 그러나 대개의 경우 광물질들은 phytase의 효과를 기대하기에는 너무 높은 비율로 혼합되어 있기 때문에 일관성 있는 결과를 얻기는 어렵다.

돼지의 경우에 phytase를 첨가하면 인의 배설량이 분명히 적어지는 데, Simons 등 (69)은 70%, Pallauf 등은 48%, Lantzsch와 Wjst는 58% 그리고 Beers와 Jongbloed는 55% 정도의 인배설량을 줄이는데 기여하며, Hoppe 등은 56±9% 정도의 인을 줄일 수 있을 것이라고 하였다.

2. 육계와 산란계

Simons 등 (69)은 인 함량이 낮은 병아리 사료에 375-2,000units/kg 수준의 phytase를 첨가하면 증체율이 개선된다고 하였다. 반면에, Edward (83)는 인이 결핍된 사료와 낮은 수준의 phytase 첨가는 오히려 이익이 되지 못한다고 하였다. Perney 등 (84)에 의하면 phytase의 첨가로 인의 요구량을 NRC 요구량보다 16% 정도까지 낮출 수 있다고 했으며, 발톱과 경골회분의 함량을 증가시켰다고 하였다. Mohammed 등은 브로일러에 phytase를 첨가한 사료를 급여한 결과, plasma 인과 경골 인 또는 경골회분 함량간에 정의 상관관계가 있었다고 하였으며, Nelson 등도 phytase의 첨가로 발톱, 경골 및 뼈의 회분 함량이 증가했다고 보고하였는데, 이러한 결과는 소화기 내의 phytase가 phytate분자로부터 무기태 인과 칼슘을 유리시켜서 그 이용율을 증가시켰고 뼈에도 광물질 축적을 촉진시켰기 때문이라고 하였다.

Perny 등 (84)은 phytase를 첨가한 사료를 급여하여 7-10일령 브로일러의 인 섭취량, 인 배설량, 골격 내 인 축적량에 미치는 영향을 조사하였는데, 급여되는 사료 내 인 함량이 증가할수록 인 섭취량이 증가하였으며, 인 배설량은 유효인과 phytase의 상호작용에 의해서 직선적인 감소 효과를 가져왔다. 인의 배설량에 있어서는 유효인이 0.33%와 0.44% 함유된 사료에서 phytase 첨가량이 증가할수록 배설량의 감소 효과가 뚜렷하게 나타났다. 인 축적율에 있어서 유효인의 함량이 증가할수록 그 축적율이 증가하였으나, phytase에 의한 효과는 없는 것으로 보였으며, 유효인의 함량이 0.32%인 사료에 phytase를 첨가하지 않은 구에서 인의 결핍에 의한 구루병 증상을 보였다고 하였다. Scheideler 등 (71)은 브로일러 사료에 인 함량을 NRC 요구량의 1/3 이하로 제한시킨 인 결핍사료에 phytase를 첨가하면 증체량, 사료요구율 및 생존율이 개선되었으며 구루병의 발생은 감소되었다고 하였으며, Martin과 Farrell (72)도 이와 비슷한 결과를 보고하였다.

Simons 등 (69)은 브로일러에서 phytate 인의 이용율을 증가시키기 위해 미생물 phytase를 첨가한 결과, 인의 진정 소화율은 60% 이상 증가하였고 배설되는 인의 양은 50%가 감소하였다고 하였으며, phytase를 750 units/kg 정도로 사료에 첨가하에서 급여하면 인의 축적률이 40%정도 개선된다고 하였으며 이로 인해 인의 배설량도 그만큼 줄어들게 되어 저공해성 사료 개발에 도움을 준다고 하였다. Phytase의 첨가로 칼슘에 대한 이용 효과와 칼슘-인의 흡수 경합에 있어서도 사료의 칼슘 수준을 정상 수준보다 낮출 수 있다고 보고하였으며, phytase를 첨가하는 경우 칼슘의 요구량은 0.6% 정도가 적당하며 0.75% 이상은 오히려 그 활성을 떨어뜨린다고 하였다.

Summers 등은 옥수수-대두박 위주사료와 canola meal 15%를 넣은 산란계 사료에 칼슘 수준을 3%와 5%로 맞추고 phytate를 0.2% 첨가한 시험에서 canola meal 첨가구의 섭취량이 유의적으로 감소하였으며, 옥수수-대두박 위주사료에 비하여 canola meal 구가, 칼슘 5% 구에 비해 3%구가, phytate를 넣지 않은 구에 비해 phytate를 넣은 구에서 난각의 질이 나빠졌다고 하였다.

Schoner와 Hoppe는 인의 함량을 대조구에 비해 18% 감소시켜도 500 FTU의 phytase를 첨가하면 인의 이용률이 약 10-15%증가하여 인의 축적률에는 차이가 없었다고 하였다. Schoner 등에 의하면 브로일러에서 실시한 많은 시험에서 인 이용률에 있어서 다소의 차이는 있지만 무기태 인의 이용률은 $47\pm 4\%$ 정도였고 여기에 phytase를 첨가할 경우 $64\pm 4\%$ 로 증가하여 약 17%의 이용률 증가가 있었다고 하였다. 따라서 인의 배설량은 더욱 감소하여 phytase 첨가를 하지 않은 구에 비하여 첨가의 경우 인 배설량을 약 50% 수준으로 줄일 수 있었다고 하였다 (79). 산란계에 있어서도 Klis 등 (80)은 옥수수-대두박 위주사료에 kg당 3 g의 인을 공급하되 이 가운데 2.5 g을 phytate로 공급한 시험에서 500 FTU의 phytase첨가로 인의 이용률을 증가시켜서 분으로 배설되는 인의 양을 약 절반 수준 이하로 감소시켰다고 하였다. Simons 등도 유기태인이 함유된 사료에 1.2 g의 무기태인을 첨가하거나 450 FTU의 phytase를 첨가하면 산란율, 나중, 사료요구율이 개선되었다고 하였다. Perney 등 (84)은 phytase의 첨가는 plasma내 무기태 인, 골회분, 골 강도 등에서 인의 이용률을 높이고, 또한 인의 배설량도 줄여 주며 성장과 인 대사를 개선시켜 주는 효과가 있으므로, 무기태 인으로 급여해 주던 사료에서 phytase와 이와 관련된 다른 영양소를 적절한 수준으로 배합해서 급여하는 사료로의 전환이 바람직하다고 하였다.

제 7 장 참고문헌

1. IUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature) (1977). Nomenclature of phosphorus containing compounds of biochemical importance. *Eur. J. Biochem.* 79, 1-9.
2. Johnson, L. and Tate, M. (1969). The structure of *myo*-inositol pentaphosphates. *Ann. A. N. Acad. Sci.* 165, 526-535.
3. Blank, G.E., Pletcher, J. and Sax, M. (1971). The structure of *myo*-inositol hexaphosphate, dodecasodium salt octahydrate: a single crystal x-ray analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 319-325.
4. Kim, Y.O., Kim, H.K., Bae, K.S., Yu, J.H. and Oh, T.K. (1998). Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microbiol. Technol.* 22, 2-7.
5. Costello, A.J.R. and Glonek, T. and Myers, T.C. (1976). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance-pH titration of hexaphosphate (phytic acid). *Carbohydr. Res.* 46, 156-171.
6. Ready, N.R., Pierson, M.D., Sathe, S.K. and Salunkhe, D.K. (1989). Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
7. Beers, S. and Jongbloed, A.W. (1992). The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on their performance and phosphorus digestibility; 44. Tagung der Ges. F. Ernährungs physiologie in *Gie Ben. Anim. Prod.* 55, 425-430.
8. Berridge, M.J., Robin, F.I. (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315.
9. Boitano, S., Dirksen, E.R. and Sanderson, M.J. (1992). Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science*, 258, 292-295.
10. Allbritton, N.L., Meyer, T. and Stryer, L. (1992). Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Sci.* 258, 1812-1815.
11. Thompson, L.U. (1986). In "Phytic acid: Chemistry and Application." (E. Graf, ed.), pp. 173-194. Pilatus Press, Minneapolis, MN.

12. Sabin, R. (1988). U.S. Patent No. 4, 758, 430, July 19
13. Graf, E., Empson, K.L. and Eaton, J.W. (1987). Phytic acid. *J. Biol. Chem.*, 262, 11647-11650.
14. Sabin, R. (1992). U.S. Patent No. 5, 112, 814, May 12.
15. Graf, E. (1986). Chemistry and application of phytic acid: an overview. In: Phytic acid: Chemistry and Application (E. Graf, ed.), pp. 1-21, Mineapolis: Pilatus Press.
16. Erdman, J.W. and Forbes, R.M. (1977). Mineral bioavailability from phytate containing foods. *Food. Prod. Dev.* 11, 46.
17. Ellis, R., and Morris, E.R. (1981). Relation between phytic acid and trace metals in wheat btan soybean Cereal. *Chem.* 58, 850.
18. Elwood, P.C., Newton, D.J., Eakins, D. and Brown, D.A. (1968). Absorption of iron from bread. *Am. J. Clin. Nutr.* 21, 1162.
19. Simons, P.C.M., versteegh , H.A.J., Jongbloed, A.W., Kemme, P.A., Slump, P., Bos, K.D., Wolter, M.G.E., Beudeker, R.F., and Verschoor, G.J. (1990). Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broiler and pigs. *Brit. J. Nutr.* 64, 525.
20. Saylor, W.W., Bartnikovski, A., and Spencer, T.L. (1991). Improved performance of broiler chicks fed diets containing phytase. *Poul. Sci.* 70(Suppl. 1), 104
21. International Union of Biochemistry. Enzyme Nomenclature: Recommendations 1978 of the Nomenclature Committee of the international Union of Biochemistry. (1979). pp. 242-247. *Akademic Press, New York.*
22. Shieh, T.R. and Ware, J.H. (1968). Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.* 16, 1348-1351.
23. Peers, F.G. (1953). The phytase of wheat. *Biochem. J.*, 53, 102.
24. Mayr, G.W. (1988). Inositol phosphate: Structural Components, Regulator and Signal Transducers of the Cell-a Review. Topics in Biochemistry No. 7-1-18, Boehringer, Mannheim.
25. Gibbins, L.N. and Norris, F.W. (1963). Phytase and acid phosphatase in dwarf bean, phaselous Vularis. *Biochem. J.* 86, 67.
26. BASF. (1992). Phytase: Interasting facts about Natuphos. BASF, Edition 29.

27. Suzuki, U.K., Yoshimura and Takaishi, M. (1907). *Bull. Coll. Agric. Tokyo Imp. Univ.* 7, 495-512 (cited from Mellanby, 1956)
28. Bewley, J.D. and Black, M. (1982). Physiology and biochemistry of seeds. In relation to germination. Volume 1. Springer-Verlag.
29. Bitar, K. and Reinhold, J.G. (1972). Phytase and Alkaline phosphatase activities in intestinal mucose of rat, chicken, calf, and man. *Biochim. Biophys. Acta* 268, 442-452.
30. Copper, J.R. and Gowing, H.S. (1983). Mammalian small intestine phytase. *Br. J. Nutr.* 50, 673-678.
31. Yang, W.J., Matsuda, Y., Sano, S., Masutani, H. and Nakagawa (1991). Purification and characterization of phytase from rat intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 1075, 75-82.
32. Chi, H., Tiller, G.E., and Dasouki, M.J. (1999). Multiple inositol polyphosphate phosphatase: evolution as a distinct group within the histidine phosphatase family and chromosomal localization of the human and mouse genes to chromosomes 10q23 and 19. *Genomics* 56, 324-336.
33. Williams, P.J. and Taylor, T.G. (1985). A comparative study of phytase hydrolysis in the gastrointestinal track of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the laboratory rat. *Br. J. Nutr.* 54, 429-435.
34. Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M. Tessier, M. and Van Loon, A.P.G.M. (1997). *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1696-1700.
35. Mitchell, D.B., K. Vogel, B.J. Weimann, L. Pasamontes, and A.P.G.M. Van Loon. (1997). The phytase subfamily of histidine acid phosphatase: isolation of genes for two novel phytases from the fungi: *Aspergillus terreus* and *Myceliphthora thermophlia*. *Microbiology* 143, 245-252.
36. Ehrlich, K.C.,B.G. Montalbano, E.J. Mullaney, H.C. Dischinger, and A.H.J. Ullah. (1993). Idetification and cloning of a second phytase gene (*phyB*) from *Aspergillus niger (ficuum)*. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 195, 53-57.
37. Piddington, C.S., C.S. Houston, M. Paloheimo, M. Cantrell, A. Micttineu-Oinonen, H. Nevalainen, and J. Rambos. (1993). The cloning and sequences of the genes

- encoding phytase (*phy*) and pH 2.5-optimum acid phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Gene*, 133, 55–62.
38. Tye, A.J., Siu, F.K.Y., Leung, T.Y.C., and Lim, B.L. (2002). Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 190–197.
 39. Ha, N.C., Oh, B.C., Shin, S.J., Kim, H.J., Oh, T.K., Kim, Y.O., Choi, K.Y. and Oh, B.H. (2000). Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. *Nat. Biotechnol.* 7, 147–153.
 40. Dassa, J., Marck, C. and Boquet P.L. (1990). The complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene *appA* reveals significant homology between pH 2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. *J. Bacteriol.* 172, 5497–5500.
 41. Mullaney, E.J. and Ullah, A.H. (1998). Identification of a histidine acid phosphatase (*phyA*)-like gene in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 252–255.
 42. Craxton, A, Caffrey, J.J., Burkhart, W., Safrany, S.T. and Shear, S.B. (1997). Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Biochem J.* 328, 75–81.
 43. Maugenest, S., Martinez, I. and Lescure, A.M. (1997). Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seedling phytase. *Biochem. J.* 322, 511–517.
 44. Hegeman C.E. and Grabau, E.A. (2001). A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiol.* 126, 1598–1608.
 45. Mullaney, E.J. and Ullah, A.H. (1998). Conservation of the active site motif in *Aspergillus niger* (*ficuum*) pH 6.0 optimum acid phosphatase and kidney bean purple acid phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 471–473.
 46. Schenk, G., Guddat, L.W., Ge, Y., Carrington, L.E., Hume, D.A., Hamilton, S. and Jersey J.D. (2000). Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. *Gene.* 250, 117–125.
 47. Uppenberg, J., Lindqvist, F., Svensson, C., EK-Rylander, B. and Andesson, G. (1999). Crystal structure of a mammalian purple acid phosphatase. *J. Mol. Biol.* 290,

201-211.

48. Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N. and Apajalahti, J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2079-2085.
49. Kim, Y.O., Lee, J.K., Yu, J.H. and Oh, T.K. (1998). Cloning of the thermostable phytase gene (*phy*) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 162, 185-191.
50. Tambe, S.M., G.S. Kaklij, S.M. Kelkar, and L.J. Parekh. (1994). Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: Evidence for unusually small active enzyme peptide. *J. Ferment. Bioeng.* 77, 123-127.
51. Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M. and van Loon, A.P.G.M. (1999). Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 367-373.
52. Wyss, M., Pasamontes, L., Remy, R., Kohler, J., Kuszniir, E., Gadiant, M., Muller, F. and van Loon, A.P.G.M. (1998). Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH 2.5 acid phosphatase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4446-4451.
53. Powar, V.K. and Jagannathan, V. (1982). Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bact.*, 151, 102-108.
54. Pasamontes, L., Haiker, M., Henriquez-Huecas, M., Mitchell, D.B. and van Loon, A.P.G.M. (1997). Cloning of the phytases from *Emerricella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1353, 217-223.
55. Berka, R.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.* 4423-4427.
56. Shimizu, M., (1992). Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(8), 1266-1269.
57. Yamata, K., Minoda, Y. and Yamamoto, S. (1968). Phytase from *Aspergillus terreus*.

- production, purification and some general properties of the enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 32, 1275–1282.
58. Golovan, S.P., Wang, G., Zhang, J. and Forsberg, C.W. (2000). Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can J. Microbiol.* 46, 59–71.
 59. Nelson, T.S., Shiet, 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.
 60. Hoppe, P.P. (1992). Review of the biological effects and the ecological importance of phytase in pigs. The 4th BASF animal nutrition forum. Ed. 30, 3–15.
 61. Jung, K.H. and Pack, M.Y. (1993). Expression of a *Closteridium thermocellum* xylanase gene in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Lett.* 15, 115–120.
 62. A.O.A.C. (1990). Official Methods of Analysis (15th Ed). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
 63. SAS Institute, Inc. (1985). SAS[®] User's Guide: Statistics. Version 6 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC.
 64. Duncan, D.B., (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1–12.
 65. Wyss, M., Pasamontes, L., Friedlein, A., Remy, R., Tessier, M., Kronenberger, A., Middendorf, A., Lehmann, M., Schnoebelen, L., Rothlisberger, U., Kuszniir, E., Wahl, G., Muller, F., Lahm, H.W., Vogel, K. and van Loon, A.P. (1999). Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 359–366.
 66. Kerovuuo, J., Rouvinen, J. and Hatzack, F. (2000). Analysis of *myo*-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism. *Biochem. J.* 352, 623–628.
 67. Shin, S., Ha, N.C., Oh, B.C., Oh, T.K. and Oh, B.H. (2001). Enzyme mechanism and catalytic property of β propeller phytase. *Struct.* 9, 851–858.
 68. National Research Council. (1994). Nutrient Requirements of Poultry. 9th. rev. ed. National academy Press, Washington, DC.

69. Simons, P. C. M., H. A. J. Versteegh, A. W. Jongbloed, P. A. Kemme, P. Slump, K. D. Bos, M. G. E. Wolter, R. F. Beudeker and G. J. Verschoor. (1990). Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broiler and pigs. *Br. J. Nutr.* 64: 525-540.
70. Schoner, F. J. and P. P. Hoppe. (1992). Micobial phytase, a tool to alleviate environmental phosphorus pollution from broiler production. *Proc of the XIX World's poultry Congress, Amsterdam, vol. 3, 429.*
71. Schiedeler, S.R., S.I. Ivusic and H. Al-Batshan. (1992). Effect of phytase supplementation on mature weight broilers. *Poultry Sci.* 71(suppl. 1):176.
72. Martin, E. and D. J. Farrell. (1992). phytase addition to duckling diets. *Poultry Sci.* 71(Suppl. 1):62.
73. Roberson, K. D. and H. M. Edwards. (1994). Effects of 1,25-Dihydroxycholecalciferol and phytase on zinc utilization in broiler chick. *Poultry Sci.* 73:1312-1326.
74. Peter, W. (1992). Investigations on the use of phytase in the feeding of laying hens. *Proc of the XIX World's Poultry Congress, Amsterdam, Vol. 3, 627.*
75. 권순관, 김성권, 안병기, 양문목, 남기택, 강창원, 강석진. 2002. 사료내 식물성 phytase(Phytazyme) 첨가가 산란계의 생산성 및 인 이용성에 미치는 영향. *동물자원지* 44(1):55-60.
76. Um, J. S., I. K. Paik, M. B. Chang and B. H. Lee. 1999. Effects of microbial phytase supplementation to diets with low non-phytate phosphorus levels on the performance and bioavailability of nutrients in laying hens. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 12(2): 203-208.
77. 권관, 한인규, 김진동, 신인수, 권찬호, 손광수. 1995. 옥수수-대두박 위주의 사료에 phytase의 첨가가 산란계의 성장, 영양소 이용율 및 인 배설량에 미치는 영향. *한축지* 37(5):529-538.
78. 손중천, 김인호, 김영길. 미생물 phytase의 첨가가 산란계의 생산성에 미치는 영향. 1999. *한축지* 41(2):175-182.
79. Van der Klis, J. D. and H. A. J. Versteegh. 1991. Ileal absorption of P in lightweight white laying hens using microbial phytase and various calcium contents in laying hen feed. *Shelderholt Pub. No. 663. Het Spelderholt, Wageningen, The Netherlands.*

80. Klis, J. D. van der and H.A. J. Versteegh. 1991. De ileale absorptie von fosfor in lichte witte leghennen bij toepassing van microbiell fytase en verschillende calcium gehaltes in legehennenvoer. Spelderholt Uitgave No. 563.
81. Kostrewa, D., Gruninger-Leitch, F., D'Arcy, A., Broger, C., Mitchell, D. and van Loon, A.P (1997) Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5Å resolution. *Nat. struct. Biol.* 4, 185-190.
82. Saylor, W.W., A. Bartnikovski and T.L. Spencer, 1991. Improved performance of broiler chicks fed diet containing phytase. *Poul. Sci.*70(suppl.1):104.
83. Eardaman. J. W. Jr. 1979. Oil seed phytates: nutritional implications. *J. Intern. Med.* 77: 760-764.
84. Perney, K. M., A. H. Cantor, N. L. Strau and K. L. Herkelman. 1993. the effect of dietary phytase on growth performance and phosphorus utilization of broiler chickens. *Poult. Sci.* 72: 2106-2114.
85. Schneider, G., Lindqvist, Y. and Vihko, P. (1993) Three-dimensional structure of rat acid phosphatase. *Embo J*, 12, 2609-2615.
86. Lim, D., Golovan, S., Forsberg, C.W. and Jia, Z. (2000) Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nat. Struct. Biol.* 7, 108-113.
87. Kenneth, C.E., Montalbano, B.G., Mullaney, E.J., Disching, H.C. and Ullah, A.H.J. (1994) An acid phosphatase from *Aspergillus ficuum* has homology to *Penicillium chrysogenum* pHOA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 63-68.
88. Ullah, A.H.J. and Cummins, B.J. (1988) *Aspergillus ficuum* extracellular pH 6.0 optimum acid phosphatase: Purification, N-terminal amino acid sequence, and biochemical characterization. *Prep. Biochem.* 18, 37-65.
89. Greiner, R., Konietzny, U. and Jany, KI-D. (1993). Purification and characterization of two phytase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 107-113.
90. Nelson, T. S., T. R. Shieh, R. H. Wodzinski and J. H. Wore. 1971. Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *J. Nutr.* 101: 1289-1294.
91. Pointillart., A. 1993. Importance of phytases and cereal phytases in the feeding of pigs. *Enzymes in Animal Nutrition.* pp.192-198. Proceedings of the 1st Symposium.,

Kartause, Ittingen, Switzerland.

92. National Research Council. 1984. Nutrient Requirements of Poultry. 8th. rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
93. Lei. X. G., P. K. Ku. E. R. Miller, D. E. Ullrey and M. T. Yokoyama. 1993. Supplemental microbial phytase improves bioavailability of dietary zinc to weanling pigs. J. Nutr. 3: 1117-1123.
94. Jongbloed, A. W. 1987. Phosphorus in the feeding of pigs. Effect of diet on the absorption of phosphorus by growing pigs. Thesis, IVVO, Lelystad.
95. Cromwell. G. L. 1980. Biological availability of phosphorus in feedstuffs for swine. Feedstuffs 52(9): 38-42.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.