

축산 사료용 효소제의 생산에 관한 연구

이효구 · 정수현* · 서형주*

(공주대학교 식품공학과, *고려대학교 병설 보건전문대학 식품영양과)

Studies on the production of animal-feed enzyme from micro-organism

Hyo-Ku Lee · Soo-Hyun Chung* · Hyung-Ju Suh*

Dept. of Food Technology, Kongju National University, 340-800 Yesan, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, College of Allied Health Sciences, Korea University, 136-703 Seoul, Korea

적 요

사료용 원료로 사용되는 곡류와 두류에는 phytate가 인의 주된 저장형태로서 존재한다. Phytate는 protein-phytate-mineral complex를 형성하여 영양소의 생물학적 이용률을 제한시키는 항영양인자로 알려져 있다. 또한 단위동물은 소화관 내에 phytate를 분해하는 효소를 갖고 있지 않아 phytate에 결합되어 있는 인을 이용할 수 없다. 따라서 축산 사료용 원료곡물에 함유된 phytate는 대부분이 이용되지 못하고 방출되므로 식사료중의 phytate는 인에 의한 환경오염의 원인이 된다. 외국에서는 이러한 문제의 해결을 위하여 phytase를 이용하여 가축사료중의 phytic acid의 감소 또는 제거에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구는 메주에서 분리한 *Bacillus* 속들중 phytate 분해능이 강하며, 내열성 phytase를 생산하는 균주를 선별하고 생산효소를 정제하여 이를 축산사료용 효소생산에 이용하고자 그 효소적 특성을 조사하였다. *Bacillus* 속 TN-2 균주가 생산하는 phytase를 정제한 결과, 배양액으로부터 DEAE-Sepharose column chromatography까지의 purification fold는 32.4였고, 이 때의 수율(recovery)은 22.1%이었으며, sodium phytate에 대한 specific activity는 0.615 U/mg 이었다. 정제 효소의 최적 반응 pH와 온도는 각각 pH 6.5와 60℃였으며, pH 5~11와 50℃에서도 거의 실패하지 않아 높은 pH 및 온도 안정성을 나타내었다. 정제 효소의 기질특이성은 sodium phytate에 대하여 특히 높은 것으로 나타났다.

I. 서 론

곡류와 두류 등의 식물 종자에서 phytate는 인의 주된 저장형태로서 총 인의 대부분(18 ~ 88%)이 phytate의 형태이다¹⁾. 인산기 6개를 갖는 phytic acid(myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate)는 구리, 아연, 코발트, 마그네슘, 철 및 칼슘 등의 필수 미량금속, 단백질 또는 비타민과 결합하여 phytate-mineral 또는 protein-

phytate-mineral complex를 형성하여 이들 영양소의 체내 흡수를 크게 감소시킴으로써 영양소의 생물학적 이용률을 제한시키는 항영양인자로 알려져 있다^{2,3)}. 또한 단위동물은 소화관내에 phytate를 분해하는 효소를 갖고 있지 않아 phytate에 결합되어 있는 인을 이용할 수 없다⁴⁾. 따라서 축산 사료용 원료곡물에 함유된 phytate는 대부분이 이용되지 못하고 방출되므로 식사료중의 phytate는 인에 의한 환경오염의 원인이 된다. 이처럼 식품중에 다량 함유되는 phytic acid의 생물학적 이용률을 높이고 환경오염 부하를 줄이기

위한 방법으로 phytic acid 분해효소의 이용에 대한 연구가 진행되어 왔다. Phytase(EC 3.1.3.8)는 myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate를 가수분해하여 인산기를 유리시키는 효소로서 Suzuki 등에 의하여 쌀겨(rice bran)로부터 처음 분리되었으며, 여러 식물 및 동물 조직 등에 존재하고 미생물에 의하여 생산되는 것으로 알려져 있다^{5,6)}.

미생물이 생산하는 phytic acid 분해효소에 관해서는 주로 *Aspergillus terreus*⁷⁾, *A. oryzae*⁸⁾, *A. ficuum*⁹⁾, *A. niger*¹⁰⁾ 등의 곰팡이가 생산하는 phytase가 대부분이며, 외국에서는 *A. ficuum*의 phytase가 효소제로 시판되고 있고 이를 이용한 가축사료중의 phytic acid의 감소 또는 제거에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 그러나 최근에는 곰팡이를 이용한 효소의 생산에는 많은 비용이 필요하고 효소생산 수율이 낮음으로 인해 장애가 되고 있어 최근에는 *Bacillus* 속 세균의 phytase에 관한 연구가 진행되고 있으며, Vishnu 등¹¹⁾과 Shimizu¹²⁾는 inositol phosphates에 대한 기질특이성이 높은 phytase를 *Bacillus* 속으로부터 분리·정제하여 그 효소적 특성을 보고한 바 있다.

Bacillus 속은 증자한 곡류와 두류에서 흔히 발견되는 세균으로, 특히 이들 기질에서는 특별한 영양원의 첨가 없이도 잘 증식하는 종류로 우리나라의 전통 발효식품인 메주의 주발효균이다. 메주는 콩과 쌀 등이 주원료인데, 쌀(현미)에는 0.89%, 콩에는 1.00 ~ 1.47%의 비교적 많은 양의 phytate가 함유되어 있으며¹¹⁾, 이런 조건에서 분리된 균주는 높은 phytase 활성을 가질 것으로 기대된다. 또한 현재의 축산사료는 대부분 압출성형기를 이용하여 pellet 형태로 생산되며, 이 과정은 보통 고온·고압의 공정조건에서 수행된다. 따라서 사료의 효율적인 이용을 위해서는 사료에 첨가하는 phytase의 내열성이 요구되어 진다. 본 연구에서는 메주에서 분리한 *Bacillus* 속들중 phytate 분해능이 강하며, 내열성 phytase를 생산하는 균주를 선발하고 생산효소를 정제하여 그 효소적 특성을 조사하였으며, 이를 축산사료용 효소생산의 기초자료로 이용하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주

본 실험에 사용한 균주는 국내에서 수집한 메주 24점으로부터 분리하였다. 각 메주시료를 분쇄하여 1 g씩을 생리식염수 100 ml에 가하고 85℃에서 30분간 열처리한 후 희석하여 nutrient agar plate에 도말접종하였으며, 한 시료당 5균주씩 순수분리하였다. 분리된 균주는 phytate broth (beef extract 5 g, peptone 3 g, yeast extract 5 g, Na-phytic acid 2.0 g per liter; pH 7.0)를 사용하여 5일 배양후 유리된 인(P)을 정량하여 10 균주를 1차 선발하였다. 이 선발균주들을 대상으로 하여 nutrient broth를 사용하여 37℃에서 1일씩 3회 순수배양하였다. 최종 배양액은 한외여과장치를 이용하여 50배로 농축하고 이를 조효소액으로 사용하여 phytase 활성을 측정하여 최종적으로 가장 효소활성이 높은 균주를 선정하였으며, 이를 효소생산에 사용하였다.

2. 효소생산과 정제

선발 균주에 의한 효소생산은 1 L erlenmeyer flask의 phytase broth 500 ml에 nutrient broth에서 24 시간 배양한 전배양액을 1 ml를 접종하고 37℃, 200 rpm의 rotary shaking incubator에서 5일간 배양한 후 배양액을 원심분리(10,000 rpm, 30 min)하여 상등액을 얻었으며, 이를 조효소로 사용하였다. 조효소액 250 ml을 Diaflo YM3 membrane(Amicon Co.)을 사용하여 한외여과하여 농축하였다. 한외여과 농축액은 다시 원심분리(12,000 rpm, 10 min)하여 상등액만을 취하여 이를 5 ml 되도록 정용한 후 다음과 같이 정제하였다. 한외여과 농축액 2.5 ml을 DEAE-Sepharose column(2 x 45 cm)에서 2 mM의 CaCl₂가 포함된 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0)를 사용하여 용출시켰다. 용출용매의 유속은 0.3 ml/min으로 조절하여 3 ml씩 분획하였으며, NaCl을 0 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM의 농도로 단계적으로 용출하였다.

3. 유리 인의 정량과 효소활성 측정

배양액의 인 함량은 배양액에 발색시약(1.5% ammonium molybdate soln. - 2.7% ferrous sulfate soln. (4:1, V/V)) 2 ml를 가하여 15분간 상온에 방치한 후 생성된 phosphomolybdate의 양을 spectrophotometer를 사용하여 700 nm에서 측정하였으며, 효소활성은 Shimizu

방법¹²⁾에 준하여 측정하였다. 효소활성은 1분간 유리 인 (Pi) 1M 생성에 필요한 효소의 양을 1 unit로 정하였으며, 효소 비활성은 단백질 1 mg에 해당되는 효소활성으로 나타내었다.

4. pH와 온도가 효소의 안정성과 활성에 미치는 영향

정제된 효소를 사용하여 최적 pH, 최적 온도 및 효소의 안정성에 대한 실험을 수행하였다. 각 pH에서의 효소의 안정성은 효소액 0.1 ml를 glycine-HCl buffer(pH2~3), formic acid-NaOH buffer(pH4~6.5), Tris-HCl buffer(pH7~8) 및 glycine-NaOH buffer(pH9~11) 0.9 ml에 가한 후 25℃, 24시간 정지시킨 후 효소의 활성을 측정하였으며, 각 buffer를 사용하여 최적 pH를 구하였다. 효소의 온도 안정성은 효소액 0.1 ml를 Tris-HCl buffer(pH 7.0) 0.9 ml를 가한 후 20 ~ 80℃의 각 온도에서 반응 후 효소의 잔존활성을 측정하였으며, 최적 온도는 반응온도를 각각 달리하여 측정하였다.

5. 효소의 기질특이성

효소의 기질특이성을 조사하기 위하여 기질로서 sodium phytate, sodium p-nitrophenylphosphate, sodium tripolyphosphate 및 sodium glycerophosphate를 사용하여 기질특이성을 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

우수균주의 분리

국내에서 수집한 메주시료 24점을 85℃에서 30분간 열처리한 후 한 시료당 5균주씩 순수분리하여 모두 120 균주를 얻었다. 이들 분리균주들을 각각 phytate broth에서 5일 배양하여 배양액에 유리된 인 (Pi)을 정량하여 phytase 생산성이 높은 10 균주를 1차 선발하였다. 이 선발균주들을 각각 nutrient broth에서 3회 순수배양한 후 최종 배양액을 한외 여과하여 50배로 농축하고 이를 조효소액으로 사용하여 phytase 활성을 측정한 결과는 Table 1과 같이 TN-2 균주가 가장 높았다. TN-2 균주는 포자를 형성하는 Gram 양성

균 및 catalase 양성으로 호기적으로 성장하여 *Bacillus* 속의 균주임을 알 수 있었다.

효소생산과 정제

Phytase 생산능이 우수한 선발균주 TN-2를 phytase broth에서 5일간 배양한 후 배양액을 원심분리하여 상등액을 얻었으며, 이를 한외여과 후 DEAE-Sephacryl column chromatography를 행하여 효소를 정제하였다. 각 정제단계에서의 효소활성, 비활성 및 정제율은 Table 2와 같다. 배양액으로부터 DEAE-Sephacryl column chromatography까지의 purification fold는 32.4였고, 이 때의 수율 (recovery)은 22.1%로 나타났다. 정제효소의 sodium phytate에 대한 효소 비활성 (specific activity)은 0.615 U/mg 이었다. DEAE-Sephacryl column chromatography의 결과 (Fig. 1), phytase 활성은 두 개의 분획에서 나타났다. 각 분획의 단백질함량은 처음 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 의해서 용출된 분획의 최고 peak가 0.11 mg/ml로서 100 mM NaCl을 첨가한 용매에 의하여 용출된 분획의 최고 peak의 0.03 mg/ml보다 높은 함량을 보였으나 phytase 활성은 100 mM NaCl을 첨가한 용매에 의하여 용출된 분획의 활성이 더 높았다. Wang 등¹⁴⁾과 Shimizu¹²⁾는 *Aspergillus oryzae* 배양액의 DEAE-Sephacryl column chromatography에서 본 실험의 결과와 같이 phytase 활성을 나타내는 두 개의 분획이 나타났고 이를 각각 acid phosphatase와 phytase로 보고하였다. 본 실험에서는 두 분획중 phytase 활성이 높은 100 mM NaCl에서 용출된 분획을 사용하여 효소의 특성을 검토하였다.

효소의 최적 pH와 pH 안정성

정제한 효소의 최적 pH와 pH 안정성을 시험한 결과는 Fig. 2와 같다. 효소활성은 pH 5.5~6.5에서 큰 차이 없이 높은 수준을 보였으며, 효소활성의 최적 pH는 6.5로 나타났다. 또 효소의 pH 안정성은 pH 2~11의 buffer에서 25℃, 24시간 후의 효소활성을 측정한 결과, pH 5~10에서는 효소 활성이 비슷한 수준으로 유지되었으며, pH 11에서 80.1%로 조금 낮아졌으나 큰 차이는 없었다. 따라서 본 효소는 pH 5~11의 비교적 넓은 범위의 pH에서 안정한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *Bacillus subtilis*가 생산하는 phytase¹²⁾의 pH 특성과 비슷한 결과였다.

효소의 최적 반응온도와 온도 안정성

정제한 효소의 최적 온도와 온도 안정성을 시험한 결과는 Fig. 3과 같다. 효소활성은 60℃에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 37℃에서의 효소활성보다 1.54배 높았다. 효소의 온도 안정성은 50℃까지 안정하게 유지되었으며, 60℃에서는 47%의 활성을 보였고 70℃ 이상에서는 거의 실활되는 것으로 나타났다. 이 결과도 *Bacillus subtilis*가 생산하는 phytase¹²⁾의 최적 반응온도 및 온도 안정성과 비슷한 결과였다.

효소의 기질 특이성

효소의 기질특이성을 조사하기 위하여 기질로서 sodium phytate, sodium p-nitrophenylphosphate, sodium tripolyphosphate 및 sodium glycerophosphate를 사용하여 효소의 활성을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 본 실험에서 분리·정제한 *Bacillus* TN-2 균주의 phytase는 sodium p-nitrophenylphosphate를 기질로 하였을 때의 효소활성이 sodium phytate를 기질로 하였을 때의 6.2%였다. Sodium p-nitrophenylphosphate는 acid phosphatase에

특이성이 높은 기질로 알려져 있다. 이외에도 sodium tripolyphosphate와 sodium glycerophosphate를 기질로 사용한 경우에는 각각의 효소활성이 23.4%와 3.1%로 나타나 본 효소는 sodium phytate에 대한 기질 특이성이 높은 phytase로 생각된다.

IV. 결 론

메주에서 분리한 *Bacillus* TN-2 균주의 phytase는 pH 6.5, 60℃에서 높은 활성을 보이며, pH 5~11의 넓은 범위의 pH에서 안정성이 유지되었다. 또한 본 효소는 50℃까지의 온도에서는 거의 실활되지 않아 높은 온도 안정성을 나타내었다. 이러한 효소의 특성은 본 효소를 사료제조에 첨가할 경우 사료제조 공정중의 알칼리처리와 압출성형조작중에도 높은 안정성을 유지할 것으로 기대된다. 또한 sodium phytate에 대한 기질특이성이 특히 높아 사료중의 phytic acid 분해 및 감소에 효과적인 효소로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 1. Phytase production of some bacteria isolates

Isolates	Relative phytase activity (%)	Isolates	Relative phytase activity (%)
BS-1	58.9	MN-1	83.9
M2-2	62.5	TA-1	16.3
M11-2	62.4	TA-5	53.4
M11-5	67.7	TN-1	64.0
MA-6	64.3	TN-2	100

Table 2. Summary of purification of TN-2 phytase

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)
Culture supernatant	14.5	763.3	0.019	1
Ultrafiltration	7.6	191.2	0.041	2.2
DEAE-Sepharose CL-6B	3.2	5.2	0.615	32.4

Table 3. Substrate specificity of TN-2 phytase

Substrate (2 mM)	Relative activity (%)
Sodium phytate	100
Sodium p-nitrophenylphosphate	6.2
Sodium tripolyphosphate	23.4
Sodium glycerophosphate	3.1

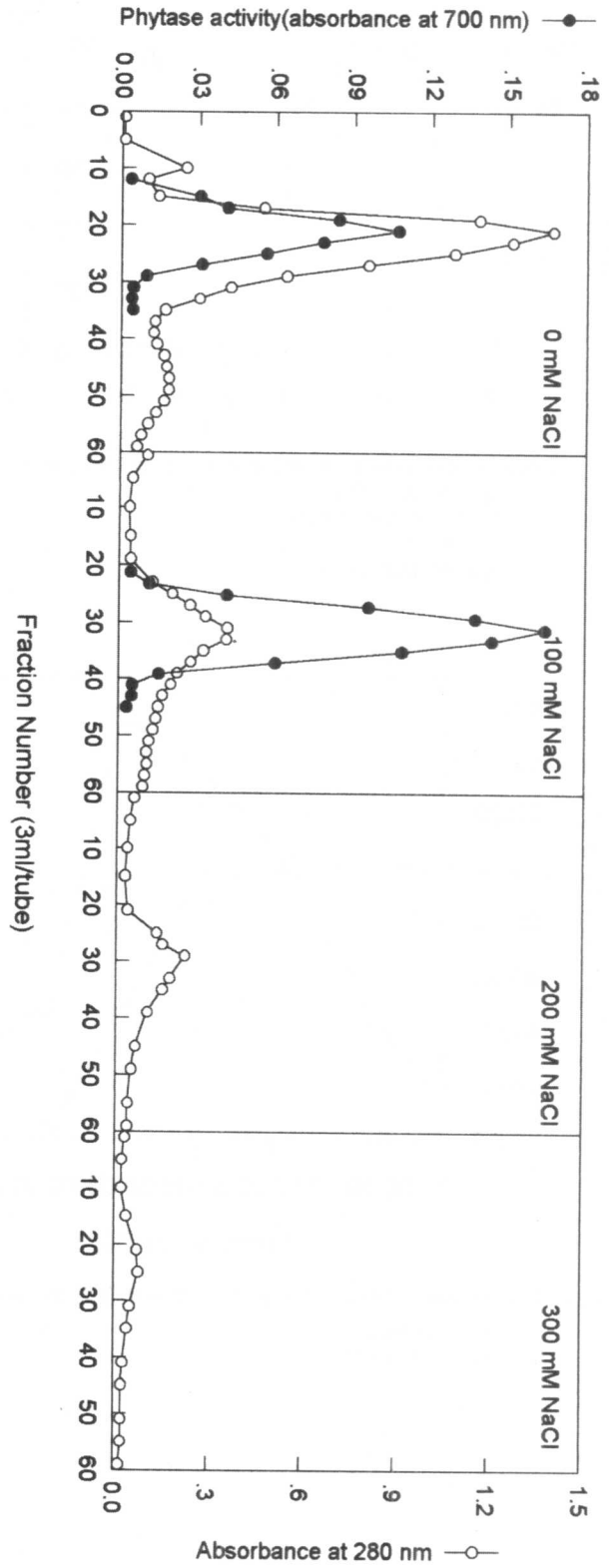


Fig. 1. Chromatogram of UF filtration on DEAE-Sephadex column.

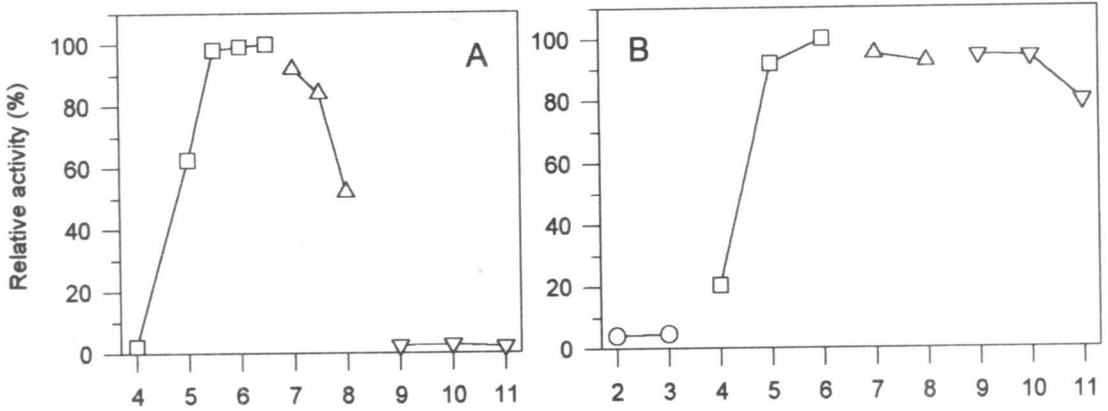


Fig. 2. Effect of PH on activity (A) and stability (B) of TN-2 phytase.

- glycine-HCl buffer
- formic acid-NaOH butter
- △ Tris-HCl buffer
- ▽ glycine-NaOH buffer

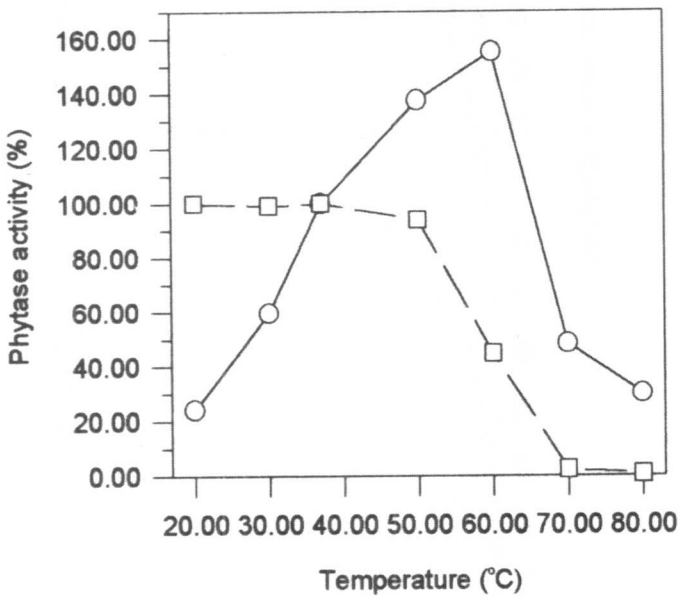


Fig. 3. Effect of temperature on activity and stability of TN-2 phytase

- Relative activity
- Residual activity

참고문헌

1. Reddy, N.R., S.K.Sathe, and D.K.Salunkhe. 1982. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.*, 28, 1-92.
2. Reinhold, J.G. 1975b. Zinc and mineral deficiencies in man: The phytate hypothesis. In "Review of Basic Knowledge", A. Chavez, H. Bourges, and S. Basta, eds., p. 115. Karger, Base.
3. Erdman, J.W., Jr. 1979. Oilseed phytates: Nutritional implications. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56, 736.
4. Bitar, K., and J.B. Reinhold. 1972. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosa of rat, chicken, calf and man. *Biochem. Biophys. Acta*, 268, 442
5. Nagai, Y. and S. Funahashi. 1962. Phytase from wheat bran. Part I. Purification and substrate specificity. *Agric. Biol. Chem.*, 26, 794
6. Powar, V.K. and V. Jagannathan. 1967. Phytase from *Bacillus subtilis*. *Indian J. Biochem.* 4, 184.
7. Yamata, K., Y. Minoda and S. Yamamoto. 1968. Phytase from *Aspergillus terreus*. Part I. Production, purification and some general properties of the enzyme. *Agric. Biol. Chem.*, 32, 1275.
8. Shimizu, M. 1993. Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1364.
9. Han, Y.W. and D. Gallagher. 1987. Phytase production by *Aspergillus ficuum*. *J. Ind. Microbiol.* 1, 295.
10. Scowronski, T. 1978. Some properties of partially purified phytase from *Aspergillus niger*. *Acta Microbiol. Pol.*, 27, 41.
11. Vishnu, K.P. and V. Jagannathan. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 151, 1102.
12. Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1266.