

*Aspergillus niger*에 의한 菌体外 Phytase 生産條件에 關한 研究

*金慶煥, *梁鎬錫, **崔瑢鎭, 梁漢喆

*(株)鍾根堂 中央研究所

**同德女子大學 食品營養學科

高麗大學校 食品工學科

(1982년 5월 14일 수리)

Studies on the Conditions of Extracellular Phytase Production by *Aspergillus niger*

Kyung-Hwan Kim,* Ho-Suk Yang,* Yong-Jin Choi and Han-Chul Yang**

Central Research Institute, Chong Kun Dang Corp.,*

Dept. of Food & Nutrition, Dong Duck Woman's College,**

Dept. of Food Technology, Korea University

(Received May 14, 1982)

Abstract

The distribution of acid phosphatase activity was investigated with 141 microorganisms from the type culture collection of Chong Kun Dang laboratory and the 41 strains isolated from natural sources.

The phytase activity was detected mainly with fungal strains. A fungus isolated from soil and identified as *Aspergillus niger* had shown the highest phytase activity.

The environmental conditions for the enzyme formation by the isolate and some properties of the enzyme were also studied. The results obtained were as follows:

- (1) The highest phytase production was observed when the fungus was cultivated at 28°C for 5 days in the corn starch based medium using the cells incubated at 34°C for 3 days as a seed.
- (2) The optimal initial pH of the culture medium was found to around 2 for the formation of phytase.
- (3) Sucrose was proved to be one of the most effective carbon sources tested for the enzyme production.
- (4) As an inorganic nitrogen source, potassium nitrate was found to give a good result in the production of phytase.
- (5) Synthesis of phytase was significantly increased by the supplement with 0.2% corn steep liquor to the basal medium as an organic nitrogen source.
- (6) At the concentration of 40-80 mg inorganic phosphate per liter of the culture medium, the enzyme formation revealed the highest level. But as the phosphate was increased above this optimum concentration the phytase activity was drastically decreased although the cell density showed to be still increasing.

序 論

1907年 Suzuki 등이 米糠에서 分離한 어떤 酵素가 phytic acid를 加水分解하여 inositol⁽¹⁻³⁾ 과 orthophosphoric acid를 生産하는 것을 發見하고 이 酵素를 phytase라고 命名하였다.

Phytase⁽⁴⁻⁶⁾는 주로 植物의⁽⁷⁻⁹⁾ 種子에 널리 分布되어 있으며, 곡물의 糊粉粒과 배아중에도 存在한다. 그러나 動物界에는 거의 發見되지 않고 있다. 한편 phytase의 基質인 phytic acid는 植物界에서 Ca, Mg, K 등의 混合塩⁽⁴⁻⁶⁾ 또는 단백질과 결합한 상태로 널리 分布되어 있으며 특히 곡류에 多量 含有되어 있다. 따라서 phytic acid는 동물의 영양과 매우 밀접한 관계를 가지고 있다고 하겠다. 또한 phytic acid는 EDTA이상으로 금속 chelating능력을 가지고 있어 藥用 및 醱酵助成劑, 통조림식품의 struvite 生成防止 및 腐蝕防止, 酸化防止作用, 물의 軟化劑, 금속의 防蝕作用, 금속피막생성 등 여러가지 용도⁽⁵⁾로 이용되고 있다고 한다.

Kamal 등은 多量の phytic acid를 含有한 飼料는 가축의 二價金屬 흡수를 방해하며, 또 P도 phytate phosphorus^(6,10-11) 형태로 존재 할 때는 잘 이용되지 않지만 phytase에 의해 선택적 가수분해를 받게되면 P의 흡수이용율이 높아진다고 한다. Phytase를 함유한 식물은 大豆⁽⁷⁾, 상치씨⁽⁸⁾, 밀⁽⁹⁾, 밀기울⁽¹²⁾, 감자⁽¹³⁾, 담배잎⁽¹⁴⁾ 등이 보고되었다. 한편 phytase生産能을 가진 미생물로서는 *Aspergillus* sp.,⁽¹⁵⁻²¹⁾ *Aerobacter aerogenes*,⁽²¹⁾ 반추동물의 장내세균,⁽²²⁾ *E. coli*,⁽²³⁻²⁵⁾ *Neurospora crassa*,⁽²⁶⁾ *Euglena*,⁽²⁷⁾ Baker's yeast⁽²⁸⁻³⁰⁾ 등이 알려져 있다.

포유류동물의 소화액에는 phytase가 없어 食物에 含有된 phytate는 장내세균이 분비한 phytase에 의하여 少量이 분해되고 있으나, 잡식동물과 육식동물은 섭취한 phytic acid의 대부분이 그대로 배설된다고 한다. 이와는 반대로 반추동물은 phytase를 분비하는 腸內菌種이 많을 뿐만 아니라 酵素作用에 必要한 時間이 충분하기 때문에 섭취한 phytic acid는 대부분 가수분해된다고 한다.

Warden⁽²³⁾ 등은 *E. coli*가 生産한 bacterial phytase를 병아리사료에 첨가했을 때 phytate phosphorus이용성이 증대되어 병아리의 성장과

뼈의 발육이 빨랐다고 보고하였고, Nelson⁽³¹⁾ 등도 *Aspergillus ficuum* 등의 fungi가 분비한 phytase를 첨가한 大豆粉을 단백질원으로 사용하여 병아리를 사육하였을 때 phytate phosphorus 형태의 P도 이용되었으나, 무점가한 大豆粉은 무기인산만 이용하였다고 한다.

따라서 본 연구에서는 食品工業에 있어서 phytase의 利用性을 높이기 위한 목적으로 토양에서 phytase生産力이 높은 균을 분리 선별하여 phytase生産을 위한 배양조건을 검토하였다.

材料 및 方法

使用菌株

본 실험에 사용된 균주는 株式會社 鍾根堂 中央研究所 保存菌과 서울근교의 부식토에서 분리한 균주중에서 phytase 생산능이 높은 균주를 선별하여 시험균으로 사용하였다.

培 地

菌体外 phytase生産菌의 분리에 사용된 고체배지조성은 Table. 1과 같다.

一次 분리한 菌株의 酵素活性測定을 위한 액체배지조성은 Table. 2와 같다.

菌株分離

토양시료 1~2g 를 생리식염수에 넣어 3분 정도 vortex한 후 희석하여 calcium phytate가 0.5% (w/v) 함유된 고체배지 (Table. 1)에 도말, 28°C에서 3일간 배양한 후 calcium phytate 가수분해대의 크기로 colony를 선별하였다. 선별한 균주는 2~3회 반복하여 순수분리한 다음 가수분해대가 재확인된 균주를 액체배지를 이용한 酵素生産試驗에 시험균주로 하였다.

培養條件

곰팡이 : 前培養은 500ml baffled flask에 corn starch medium (Table. 2참조) 100ml을 넣고 試驗菌 slant에서 2백금이를 따서 接種한 다음

Table 1. Composition of Medium Used for the Primary Screening of Phytase Producers.

Ingredient	Quantity			
	1-1	1-2	1-3	1-4
Calcium phytate	5.0g	5.0g	5.0g	5.0g
NaNO ₃	2.0g	2.0g		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g	0.5g		
KCl	0.5g	0.5g		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01g	0.01g		
Agar	15.00	15.0g	15.0g	15.0g
Sucrose		30.0g		
Malt extract			3.0g	10.0
Yeast extract			3.0g	
Peptone			0.5g	10.0g
Glucose				
NaCl				5.0g
Distilled water	1.0L	1.0L	1.0L	1. L

pH : 6.8

Sterilization : 15 minutes at 121°C

Four different media containing 0.5% (W/V) calcium phytate were used for the plate screening method.

1-1. Czapeck's medium without phosphate and sucrose.

1-2. Czapeck's medium without phosphate.

1-3. Malt-yeast extract medium was used for fungi.

1-4. Nutrient medium was used for bacteria.

28°C, 진폭 5 cm, 회전수 220rpm의 rotary shaker에서 3 일간 배양했다.

본 배양은 corn starch medium 50ml에 전배양액 5 ml를 가해 접종하고 전배양과 동일조건에서 5 일간 배양했다.

세균과 효모 : malt-yeast extract broth (Table 2. 참조)를 사용하여 fungi와 동일한 배양조건하에서 전배양은 1 일, 본배양은 3 일간 배양했다.

ent 1 ml를 가하여 유리된 무기인을 발색시켜서 파장 660nm에서 比色定量하였다.

효소의 단위는 1 시간에 유리되는 무기인산의 mg수로 나타내었다.

乾燥菌体量 : 일정량의 배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 분리한 다음 INH₂SO₄ 용액으로 4 회 반복세척하고 증류수로 재차 2 회 세척, 여과하여 105°C dry oven에서 恒량이 될때까지 건조하여 重量을 秤量하였다.

Phytase의 活性測定

Phytase의 活性은 Fiske and Subbarow's method^(32, 33)에 따라 측정했다. 즉 0.05M calcium phytate가 함유된 0.2M HCl-KCl buffer (pH2) 0.9ml에 배양액 0.1ml를 가하여 37.5°C 恒温槽에서 15分間 反應시킨 후 10N H₂SO₄ 0.5 ml를 넣어 反應을 정지시켰다. 上記 反應液에 reagent

結果 및 考察

菌株의 選別

保存菌中 phytase生産菌의 選別 : 141株의 供試保存菌 (Table 3. 참조) 중에서 *Streptomyces* sp. 2株, *Rhodotorula* sp. 8株, *Saccharomyces*

Table 2. Basal Composition of the Medium for Preculture and Main Culture.

Ingredient	Quantity	
	2-1	2-2
Malt extract	3.0g	
Yeast extract	3.0g	
Peptone	0.5g	
Glucose	10.0g	30.0g
Corn starch		80.0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.5g
KCl		0.5g
FeSO ₄ · 7H ₂ O		0.1g
NaNO ₃		8.6g
K ₂ HPO ₄		0.2g
Distilled water	1.0L	1.0L

pH : 6.8 2-1 5.0 2-2

Sterilization : 15 minutes at 121°C.

2-1. Malt-yeast extract broth was used for bacteria and yeasts.

2-2. Corn starch medium was used for fungi.

Table 3. Survey of Species for the Phytase Production by Various Type Cultures and Soil Isolates.

Species	No. of tested Strains	No. of extracellular phytase producers	
		Solid culture	Liquid culture
<i>Streptomyces</i> sp.	29	2	0
<i>Mycobacterium</i> sp.	10	0	0
<i>Rhodotorula</i> sp.	23	8	23
<i>Saccharomyces</i> sp.	35	32	23
<i>Sarcina lutea</i>	2	0	0
<i>E. coli</i> .	2	0	0
<i>Bacillus</i> sp.	12	3	3
<i>Staphylococcus</i> sp.	1	0	0
<i>Aspergillus</i> sp.	3	2	2
<i>Penicillium</i> sp.	24	3	12
Soil isolates (fungi)	31	10	10
Soil isolates (bacteria)	10	2	2
Total	182	62	55

sp. 32株, *Bacillus* sp. 3株, *Aspergillus* sp. 2株, *Penicillium* sp. 4株 등이 calcium phytate 0.5% (w/v) 함유된 고체배지 (Table 1, 참조) 에서 clear zone 을 나타내었다. Fig. 1과 Fig. 2는 각각 *Aspergillus* sp.와 *Penicillium* sp.에 의해 형성된 clear zone의 사진이다.

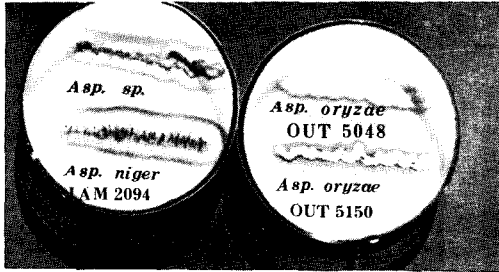


Fig. 1. Streak Petri Dishes of Molds were Incubated for 3 Days at 28°C

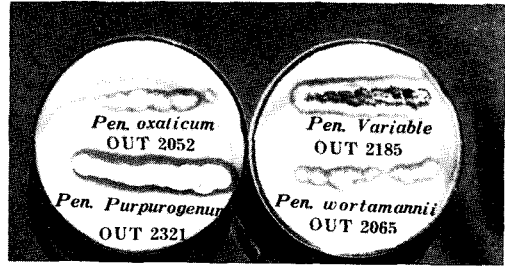


Fig. 2. Streak Petri Dishes of Molds were Incubated for 3 Days at 28°C

액체배지를 이용하여 일차 선별한 균주의 phytase生産能을 검토한 결과 Table 4에 表示되어 있는 바와같이 *Aspergillus niger*가 현저히 높은 phytase活性을 나타내었다.

토양중에서 선별 : 관악산 서울대학교 보호림 과 중근당 주변의 부식토에서 採取한 토양시료

Table 4. Species for Production of Extracellular Acid Phytase.

Species	*Activity (units/ml)
<i>Aspergillus oryzae</i> OUT 5048	0.03
<i>Aspergillus oryzae</i> OUT 5150	0
<i>Aspergillus niger</i> IAM 2094	0.65
<i>Penicillium oxalicum</i> OUT 2052	0.09
<i>Penicillium purpurogenum</i> OUT 2321	0.01
<i>Penicillium variabile</i> OUT 2185	0.50
<i>Penicillium wortmannii</i> OUT 2065	0.03
Mold - 1	0.22
Mold - 2	0.35
Mold - 3	0.95
Mold - 4	0.32
Mold - 5	0.15
Mold - 6	0.25
Mold - 7	0.20
Mold - 8	0.04
Mold - 9	0.16
Mold - 10	0.13
Bacteria 1	0.04
Bacteria 2 Soil isolates	0.05

*One unit of the enzyme activity was defined as the amount of enzyme that liberates 1mg of inorganic phosphate per hour.

1~2g을 생리식염수에 넣어 vortex한 후 10^{-4} ~ 10^{-7} 로 희석하였다. 희석시료액 일정량을 고체배지 (Table 1)에 도말하여 28°C에서 3일간 배양한 후 clear zone이 나타나는 41株를 선별하였다. 선별균을 순수분리한 다음 第二次選別過程을 거쳐 큰 phytate분해대를 나타낸 12菌株를 다시 선별하였다. 液体培地을 이용하여 上記 12菌株에 對한 phytase生産能을 검색한 結果 酵素活性이 월등히 높았던 mold-3을 선별 동정하였다. (Table 4참조) Fig. 3은 분리균mold-3이 形成한 clear zone을 나타낸 사진이다.

분리균의 同定

선별균주 mold-3은 calcium phytate 0.5% (w/v)을 含有한 malt-yeast extract medium (Table 2)을 사용, slide culture⁽³⁰⁾와 coverslip⁽³⁵⁾ method에 따라 배양하여 形態學의 特性을 調査하였다. Raper⁽³⁶⁾ 등이 분류한 方法에 準하여 mold-3菌株의 형태학적 特性을 검토한 結果 Table 5와 같았으며 以上の 제일차 동정시험결과로 mold-3은 *Aspergillus niger*에 속한다고 추정되었다.

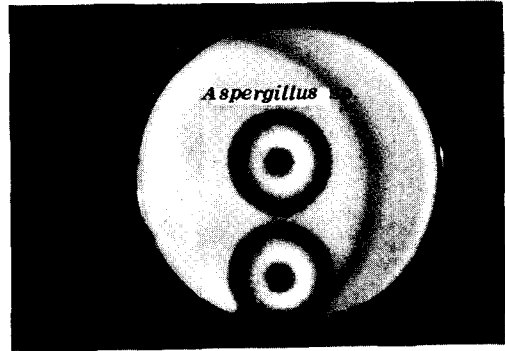


Fig. 3. Single Spore Isolation of Molds.

Aspergillus sp. colonies on the malt-yeast extract agar plate containing 0.5% (W/V) calcium phytate. Clear areas are where calcium phytate has been digested.
1:10⁷ dilution

Phytase 生産條件

溫度的 영향: 試驗菌株 mold-3을 25°C, 28°C, 34°C 및 40°C에서 배양하여 各各 溫度別로 phytase生産의 影響을 檢討한 結果 前培養은 34°C, 本培養은 28°C에서 배양했을 때 가장 높은 酵素

Table 5. Morphological Properties of Mold-3 Strain.

Outstanding characters	* <i>Aspergillus niger</i>	Mold-3
Conidial heads	greenish black brownish black or carbon black globose, radiate or split	black globose
Conidiophores	+	+
Vesicles	globose	globose
Sterigmata	one or two series	two series
Conidia	+	+
Foot cell	+	+
Hyphae	+	+
Septa	+	+

* A typical *Aspergillus niger*

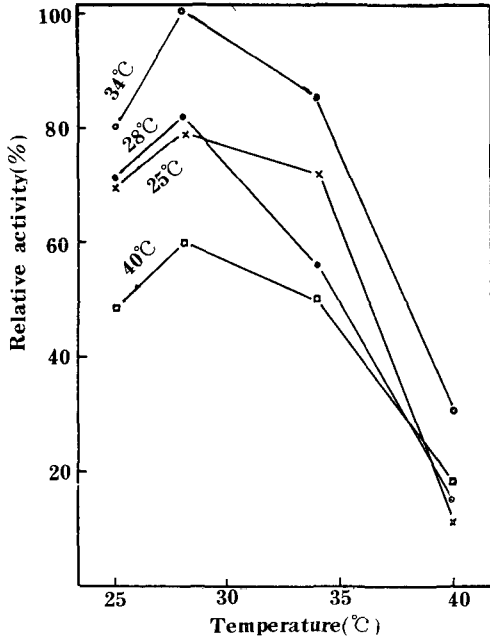


Fig. 4. Effect of Incubation Temperature on the Phytase Production.

Seed culture was carried out on a rotary shaker [220 rpm] for 3 days at the various temperatures in the figures.

Main culture was carried out on a rotary shaker [220 rpm] at the indicated temperatures for 5 days.

활성을 나타내었으나, 前培養 溫度가 40°C 일 때는 酵素生産量이 현저히 떨어짐을 보여주었다. (Fig. 4 참조)

초기 pH의 영향: 본 배양액의 초기 pH를 1 ~ 8 까지 변화시켜서 배양한 결과 菌体증식은 pH 3 以上에서 最大速度를 보인 反面 酵素活性은 pH 2 부근에서 가장 높았다 (Fig. 5 참조). 이 결과는 Shieh¹⁷⁾ 등이 fungi 류에 의한 phytase 生産에 사용한 corn starch medium의 초기 최적 pH가 약 5 부근이었다고 보고하고 있어 본 시험결과와 큰 差異를 보였다.

배양시간의 영향: 34°C에서 3 일간 배양한 전 배양액 10% (v/v)를 seed로 하여 본 배양을 하여 培養時間에 따른 酵素生産의 영향을 조사한 결과 phytase 生産은 배양 5 일째 最高에 達했으나 그 이후는 菌体量과 더불어 酵素活性이 急激히 떨어졌다 (Fig. 6 참조). 이 결과는 fungi 를 사용

한 Shieh¹⁷⁾ 등의 시험결과와 잘 일치하였다.

탄소원의 영향: 여러종류의 탄소원 11%를 사용하여 phytase 生産에 미치는 영향을 조사해본

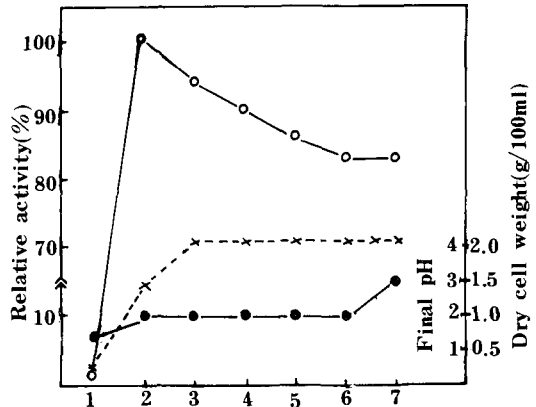


Fig. 5. Effect of Initial pH on the Phytase Production.

Initial pH was corrected by using NaOH or H₂SO₄ solution.

○—○ : Relative activity

●—● : Final pH

×---× : Dry cell weight

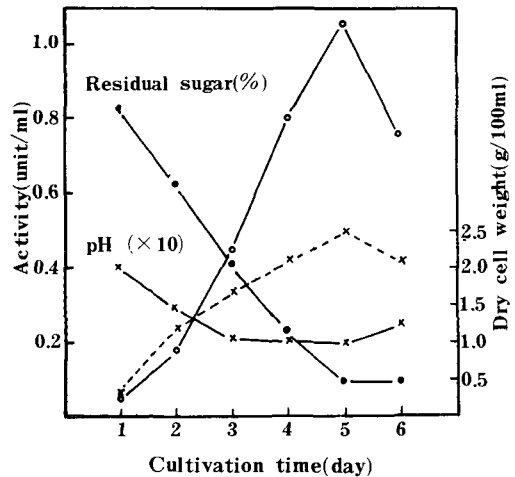


Fig. 6. Time Course of Phytase Production.

Cultivation was carried out on a rotary shaker [220 rpm] at 28°C for 6 days.

○—○ : Phytase activity

×---× : Dry cell weight

●—● : Residual sugar

×—× : pH

결과에 의하면 Table 6에 表示되어 있는 바와 같이 sucrose와 dextrin이 특히 좋은 효과를 보였다. 이에 반해 Shieh⁽¹⁷⁾ 등은 starch 8%, glucose 3%를 탄소원으로 사용하였을 때 phytase활성이 가장 높았으며 특히 *Aspergillus ficuum*은 탄소원으로 glucose 또는 sucrose만 사용하였을 때 배양중 菌体の pellet이 형성되고 효소활성이 떨어졌다고 보고하고 있다. 反面 저인산배지에서는 corn starch와 dextrin을 사용하였을 때 높은 효소활성을 나타내었다는 결과는 본 실험의 결과와 일치하였다.

질소원의 영향: 여러종류의 무기질소원을 사용하여 phytase生産효과를 조사한 결과 N-so-

urce로되 KNO_3 를 첨가했을 때 현저한 효과를 얻었다(Table 7참조).

또한 NO_3^- 태 질소원이 NH_4^+ 태의 질소원보다 phytase生産에 더 효과적인 경향을 나타내었으며 무기인산 함량이 많은 인산암모늄을 첨가했을 때 효소의 활성이 현저히 저하하였다. 이는 고인산배지에서 phytase合成이 저해를 받는다는 많은 보고^(15, 17, 19, 27)와 일치되는 결과라고 하겠다.

각종 유기질소원의 첨가효과를 검토한 결과 yeast extract, corn steep liquor, cotten seed meal 등이 phytase生産에 좋은 효과를 보였으며 (Table 8. 참조) 이들의 적정농도는 Table 9에서 보는 바와같이 yeast extract : 0.3%, corn

Table 6. Effects of Carbohydrates on the Phytase Production.

Carbon sources	Dry cell weight (g/100ml)	Activity (units/ml)	Relative activity (%)
Sucrose	2.29	1.15	147
Dextrin	1.69	1.09	140
Soluble starch	1.70	0.97	124
Potato starch	1.55	0.94	121
Fructose	1.51	0.84	108
Glucose	1.60	0.81	96
Control	1.55	0.78	100
Crude starch	1.50	0.75	96
Maltose	1.78	0.73	94
Lactose	1.39	0.58	74
Galactose	0.83	0.20	26

★ Glucose 3%+crude starch 8%

Table 7. Effect of Inorganic Nitrogen Sources on the Phytase Production.

Nitrogen sources	Dry cell weight (g/100ml)	Activity (units/ml)	Relative activity (%)
$NaNO_3$ [8.6g/1]	2.55	0.67	100
NH_4NO_3 [8.1g/1]	3.66	0.70	104
NH_4Cl [5.41g/1]	2.95	0.64	96
$[NH_4]_2SO_4$ [6.7g/1]	3.37	0.42	63
KNO_3 [10.2g/1]	2.84	0.91	136
$Ca(NO_3)_2$ [8.3g/1]	4.06	0.83	124
$[NH_4]_2HPO_4$ [6.7g/1]	3.49	0.07	11

Table 8. Effect of Organic Nitrogen Sources Added to Basal Composition Medium on the Phytase Production.

Organic nitrogen sources added[0.3%]	Dry cell weight [g/100ml]	Activity [units/ml]	Relative activity (%)
Yeast extract	1.74	1.19	112
Corn steep liquor	1.70	1.19	112
Cotton seed meal	2.34	1.18	111
Blood meal	1.77	1.10	104
Peanut meal	2.13	1.08	102
Soy bean meal	1.68	1.07	101
None	1.90	1.06	100

Table 9. Effect of the Concentration of Yeast Extract, Corn Steep Lipuor and Cotton Seed Meal Added to Dasal Compostion Medium.

Concentration % [W/V]		Dry cell weight [g/100ml]	Activity [units/ml]	Relative activity [%]
Yeast ext.	None	1.89	0.83	100
	0.05	2.14	0.83	100
	0.1	2.19	0.84	101
	0.2	2.79	0.91	110
	0.3	2.42	0.98	118
	0.5	1.75	0.92	111
	C. S. L.	None	1.89	0.84
0.05		1.99	1.00	119
0.1		2.08	1.03	123
0.2		1.22	1.21	144
0.3		1.86	1.15	137
0.5		1.37	1.14	136
C. S. M.		None	1.36	0.88
	0.05	1.38	1.03	117
	0.1	1.82	1.09	124
	0.2	1.82	1.11	126
	0.3	1.99	1.19	135
	0.5	1.83	1.11	126

steep liquor : 0.2%, cotten seed meal : 0.3%로 나타났다.

Phytase生産에 미치는 유기태 질소원에 대해서는 Casida⁽¹⁵⁾가 yeast extract : 0.1%를 첨가하여 시험하였을 뿐 corn steep liquor와 cotten seed meal의 効果에 대한 報告는 없는것 같다. 본 실험에서 저렴한 유기태 질소원으로 그 우수성이 인정되었을 뿐만아니라 배지중 무기인 함량을 조절하면 더 좋은 效果가 기대된다.

무기염류의 영향: KCl과 MgSO₄를 0 ~ 1g/l 濃度로 培地에 첨가하여 酵素生産에 미치는 영향을 검토한 결과 (Fig. 7참조) 양자 共히 0.25g/l의 濃度로 첨가했을 때 가장 높은 효소활성을 나타내어 뚜렷한 첨가효과를 인정할 수 있었으며 또한 첨가농도에 예민한 반응을 보여 고농에서는 오히려 효소생성에 저해효과를 나타내었다. 한편 Shieh⁽¹⁷⁾ 등의 보고에 의하면 KCl과 MgSO₄를 동량혼합하여 사용하였으므로 본 실험에서도 KCl과 MgSO₄를 0~1g/l 농도를 혼합첨가하였을 때 Fig. 8과 같이 0.5g/l 농도에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 각각을 0.25g/l 첨가한 Fig. 7보다 절대역가도 증가하여 이들의 상승효과가 인정되었다.

무기인산의 영향: 배지중 무기인산 함량이 균체증식 및 phytase生産에 미치는 영향을 검토하여 본 결과 Fig. 9에 表示된 바와 같이 무첨가시에도 균체증식은 적었으나 phytase는 상당량

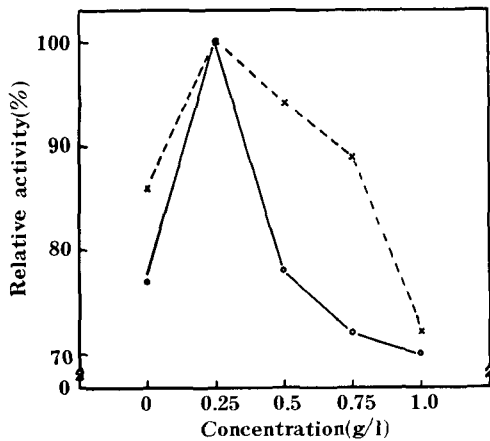


Fig. 7. Effect of Inorganic salt Concentration on the Phytase Production.

○—○ : Concentration of KCl [g/l]
 ×---× : Concentration of MgSO₄ [g/l]

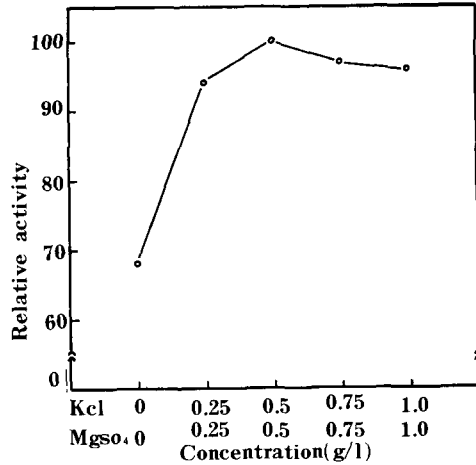


Fig. 8. Effect of Inorganic Salt Concentration on the Phytase Production.

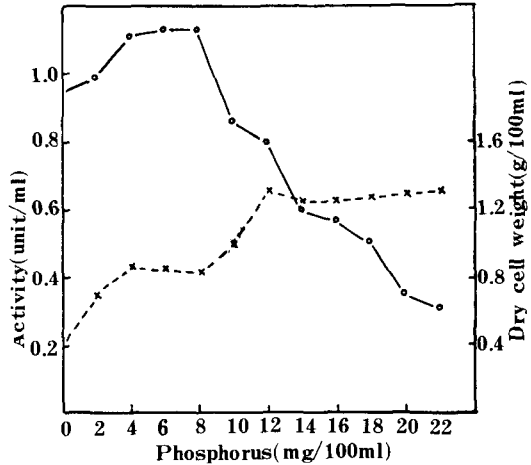


Fig. 9. Effect of Phosphorus Content on Growth and Production of Phytase by *Aspergillus* sp..

Basal medium contained [per liter] :
 Glucose, 30g; corn starch, 80g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.5g; KCl 0.5g; FeSO₄, 0.1g;
 NaNO₃, 8.6g; phosphorus was added as K₂HPO₄; pH 5.0

○—○ : Phytase activity
 ×---× : Dry cell weight.

이 생산되었으며 인산농도가 40~80mg/l 일 때 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 한편 最適濃度以上の 인산농도에서는 균체증식은 多少 증가하는 反面 phytase生産은 급격히 감소됨을 보였다.

따라서 고인산배지에서는 균체증식은 빠르나 효소생산은 저해되고, 반대로 저인산배지에서는 균체증식은 느리나 효소생산은 촉진된다는 결론을 얻게되어 배지중 인산의 농도가 phytase 생산에 매우 큰 영향을 주는 인자라고 생각되었다. 한편 Shieh³⁷⁾ 등도 고농도의 무기인산이 배지속에 존재하면 phytase 합성을 저해한다고 보고하였다. 즉 *Aspergillus ficuum*은 무기인산 함량이 20~30 mg/l 일 때 급소활성이 가장 높게 나타났으나, 60 mg/l 이상에서 현저히 활성이 떨어지기 시작하여 140 mg/l 농도에 달하면 phytase를 거의 생산하지 않는다고 보고하였다. *Euglena*³⁷⁾도 phosphate와 arsenate에 의하여 phytase 합성이 저해된다고 보고하였으므로 본 연구결과와 대체로 일치한다.

要 約

保存菌 141株와 토양분리균 41株의 균체와 phytase 生産能力을 조사한 결과 일반적으로 곰팡이류가 높은 효소활성을 나타내었으며 이 중에서 효소활성이 가장 높은 균주를 선별하여 그 형태학적 특성을 조사한 결과 *Aspergillus* sp.로 동정되었다. 아울러 분리균주의 효소생산을 위한 배양조건을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 34°C에서 3일간 전배양한 종균으로 28°C에서 5일간 본배양하였을 때 최고의 효소활성을 나타내었다.

2. Phytase 생산배지의 초기 최적 pH는 2부근이었다.

3. 탄소원으로는 일반적으로 galactose를 구성단위로 가진 당류는 非効果의인 反面 glucose를 가진 당류가 더욱 効果的이었다. 특히 sucrose가 가장 양호한 결과를 나타내었다.

4. 무기질소원으로는 KNO₃가 가장 적합하였으며, 무기인산함량이 많은 인산암모늄이 가장 불량하였다.

5. 유기질소원은 0.2%의 corn steep liquor를 첨가했을 때 가장 効果적이었다.

6. KCl, MgSO₄ 및 무기인의 최적농도는 각각 0.5g/l, 0.5g/l 및 40~80mg/l 였다. 한편 고인산배지에서는 균체증식은 현저히 증가되나 酵素合成은 현저히 감소됨을 보였다.

參 考 文 獻

- 1) Anderson, R. J., *J. Biol. Chem.* : **20**, 326 (1915)
- 2) Anderson, R. J., *J. Biol. Chem.*, : **20**, 475 (1915)
- 3) Courtois, J., and M, Masson : *Bull. Soc. Chem. Biol.*, **32**, 326 (1950)
- 4) Jean Courtois : *生化學*, **26**, 85 (1954)
- 5) 木材午郎 : *有機合成化協誌*, **25**, 167 (1967)
- 6) Nelson T. S. : *Poultry Sci.*, **46**, 862 (1967)
- 7) Mayer, F. C., R. E. Compbell, A. K. Smith, and L. L. Mckinney : *Biochem, Biophys.*, **94**, 301 (1961)
- 8) Mayer, A. M., : *Enzymologia*, **19**, 1 (1956)
- 9) Peers, F. G., : *Biochem. J.*, **53**, 102 (1953)
- 10) Common, R. H., : *Analyst*, **65**, 79 (1940)
- 11) Taylor, T. G., : *Proc. Nutr. Soc.*, **24**, 105 (1965)
- 12) Nagai, Y., and S. Funahashi ; *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 794 (1962)
- 13) Hsu, R. Y., W. W. Cleland, and I. Anderson : *Biochemistry*, **5**, 799 (1966)
- 14) Shaw, J. G. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 1 (1966)
- 15) Casida, L. E., Jr. : *Soil Sci.*, **87**, 305 (1959)
- 16) Dox, A. W., and R. Golden : *J. Biol. Chem.*, **10**, 183 (1911)
- 17) T. R. Shieh and J. H. Ware : *Appl. Microbiol.*, **16**, 1348 (1968)
- 18) Dorn Gordon L. : *J. Biol. Chem.*, **343**, 33500 (1968)
- 19) Ohta, Yoshiyuki Katsusiko Ikeda, and Seinosuke Ueda : *Appl. Microbiol.*, **16**, 973 (1968)
- 20) Ohta, Y., S. Sumie, and S. Ueda : *Straeke*, **19**, 327 (1967)
- 21) Greaves, M. P., G. Anderson, and D. M. Webley : *Biochim. Biophys. Acta.*, **132**, 412 (1967)
- 22) Raun, A., E. Chang, and W. Burroughs : *J. Agr. Food Chem.*, **4**, 809 (1956)

- 23) Warden, W. K., and P. J. Schaible : *Poultry Sci.*, **41**, 725 (1962)
- 24) Hofsten, B. : *Biochim. Biophys. Acta.*, **48**, 171 (1961)
- 25) Toriani, A. : *Biochim. Biophys. Acta.*, **38**, 460 (1960)
- 26) Nyc, J. F., R. J. Kadner, and B. J. Crocken : *J. Biol. Chem.*, **241**, 1468 (1966)
- 27) A. Bennum and J. J. Blum : *Biochim. Biophys. Acta.*, **128**, 106 (1966)
- 28) Heredia, C. F., F. Yen, and A. Sols : *Biochim. Biophys. Res Commun.*, **10**, 14 (1963)
- 29) Rothstein, A., and R. Meier : *J. Cellular Comp. Physiol.*, **34**, 97 (1949)
- 30) Schmidt, G. D. Seraidarian, L. M. Greenbaum M. D. Hickey, and S. J. Thanhauser : *Biochim. Biophys. Acta.*, **20**, 135 (1956)
- 31) T. S. Nelson, T. R. Shieh, R. J. Wodzinski and J. H. Ware : *Poultry Sci.*, **47**, 1842 (1968)
- 32) Fiske, C. H., and Subbarow : *J. Biol. Chem.*, **66**, 376 (1925)
- 33) Colowink Sidney P. and Nathan O. Kaplan: "Methods in *Enzymology*" Vol. III, Academic Press, New York, P. 843-844 (1957)
- 34) Colowick, Sidney P. and Nathan O. Kaplan : "Methods in *Enzymology*" Vol. I, Academic Press, New York, P. 138-146 (1955)
- 35) Booth, C. "Methods in *Microbiology*" Vol. 4, Academic Press, P. 20, P. 320 (1971)
- 36) Raper, K. B. and D. I. Fennel : "The *Genus Aspergillus*," Robert E. Krieger Publishing Company, New York, P. 293 (1973)
- 37) Shieh, T. R. R. J. Wodzinski, and J. H. Ware : *J. Bacteriol.*, **100**, 1161 (1969)