

콩과 옥수수 가루의 발효과정에서의 Phytase 생산균과
그들의 발효에 미치는 영향
— Phytase 생산균의 분리와 효소생산조건 —

강성구·강성국·정희종*

전남대학교 농과대학 식품공학과

**Phytase-producing Microorganisms and Their Effects on the
Fermentation of Soybean and Corn Meals
—Isolation of Phytase-producing Microorganisms
and Conditions for Enzyme Production—**

Kang, Seong-Koo, Seong-Kook Kang, and Hee-Jong Chung*

*Department of Food Science and Technology, Chonnam
National University, Kwangju 500-757, Korea*

Two isolates of C-7 and S-34, which were identified as *Bacillus licheniformis* and *Enterobacter cloacae*, were shown the highest phytase productivities among the 23 and 44 strains isolated from the fermenting corn and soybean meals, respectively. The phytase productivity with *B. licheniformis* was maximized at pH 6.0, 30°C after 5 days of incubation and *E. cloacae* was maximized at pH 7.0, 35°C after 5 days of incubation. The bacterial phytase productivity with each bacterium was significantly increased or decreased by the addition of various concentrations of 6 carbon and 7 nitrogen sources including glucose, sucrose, KNO₃, and NH₄Cl.

Phytic acid(*myo*-inositol hexakisphosphate)는 (1) 식물체에 널리 분포되어 total phosphorus의 주된 저장형태로 (2-4) 식품의 영양학적 이용에 큰 영향을 미치는 영양저해물질로 알려져 있다. 6개의 인산기를 갖는 고리형 화합물인 phytic acid는 2가 또는 3가 금속이온(Zn⁺⁺, Ca⁺⁺, Co⁺⁺, Mg⁺⁺, Fe⁺⁺, Fe⁺⁺⁺ 등)과 결합하거나 단백질과 결합하여 불용성의 phytate-mineral salt를 형성함이 밝혀졌고(5), Erdman(6)은 protein-phytate-mineral 화합물을 형성하여 생물학적 이용률을 제한시킨다고 보고하였다. 이처럼 식품중에 많이 함유되어 항영양인자로 작용하는 phytic acid의 효소적 분해 즉 phytase(7)에 의한 phytic acid의 감소 또는 제거가 절실히 요구되어 많은 연구가(8-11) 진행되고 있으나 phytic acid 분해균의 곡물발효에 미치는 영향에 관한 보고가 미흡하다.

본 연구에서는 콩과 옥수수 가루의 발효과정에서 phytic acid를 분해하는 미생물을 분리하여 동정하였으며 phytase 생산을 위한 최적조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에 사용한 균주는 콩과 옥수수 가루를 각각 수도물과 1:4(w/v)의 비율로 혼합하여 30°C에서 5일동안 발효시키면서 24시간마다 시료 5m/씩을 취하여 멸균된 0.85% NaCl 용액 10m/에 희석한 다음 nutrient agar plate에 도말접종하여 순수분리하였다. 분리된 균주는 phytate broth (beef extract 3g; bacto-peptone 5g; Na-phytic acid 1.5g; pH 7.0 per liter)를 사용하여 phytic acid 분해 정도에 의한 phytase 생산성이 우수한 균주만을 선별하여

Key words: Phytase producing microorganism, phytase production

* Corresponding author

nutrient agar slant에 옮겨 4°C에 보관하면서 본 실험의 stock culture로 사용하였다.

선별균주의 동정

Phytase 생산성이 우수한 균주는 “Bergey’s Manual”(12)과 “Manual of Methods for General bacteriology”(13)에 준하여 동정하였다.

전배양

전배양을 시험관에 nutrient broth 10 ml를 취한 다음 사용균주를 접종하여 30°C에서 24시간마다 새로운 배지에 옮겨 정치배양하였으며 이를 3회 반복하였다.

Phytase 생산성의 측정

Phytase 생산성은 균이 생산하는 phytase activity에 의해 유리되는 인(P)을 정량하여 측정했는데 유리된 인의 양이 최대일 때의 phytase 생산성을 100으로 하여 relative phytase productivity (%)로 나타냈다. 인은 Fiske와 Subbarow의 방법(14)에 따라 0.15% Na-phytic acid를 함유한 Nutrient broth에 전배양액 0.5 ml를 접종하여 pH 7.0, 30°C에서 5 일동안 본 배양한 후 배양액 5 ml(단 인의 표준곡선의 경우는 표준용액 5 ml)를 취하고 증류수를 가하여 10 ml가 되게 하였다. 여기에 reagent 1 ml를 첨가하여 정확히 15분간 반응시킨 다음 흡광도(640 nm)를 측정하여 미리 구성된 인의 표준곡선으로부터 phytase에 의해 유리된 인의 양을 계산하였다. 이때 배지 자체에 함유되어 있거나 배지멸균시 열에 의해 감소된 인의 함량은 제외된 것이다. 또 phytase 생산성과 균체중식과의 상호관계를 비교하기 위하여 효소생산성을 측정할 때 사용한 본 배양

액 3 ml를 취하여 흡광도(550 nm)를 측정하였다.

결과 및 고찰

우수균주의 분리

콩과 옥수수 가루의 발효에 관여하는 미생물을 순수분리한 결과 44균주와 23균주를 각각 얻었다. 이들 순수분리한 균주들중 phytase 생산성이 우수한 균주를 선별하기 위하여 0.15% Na-phytic acid 기

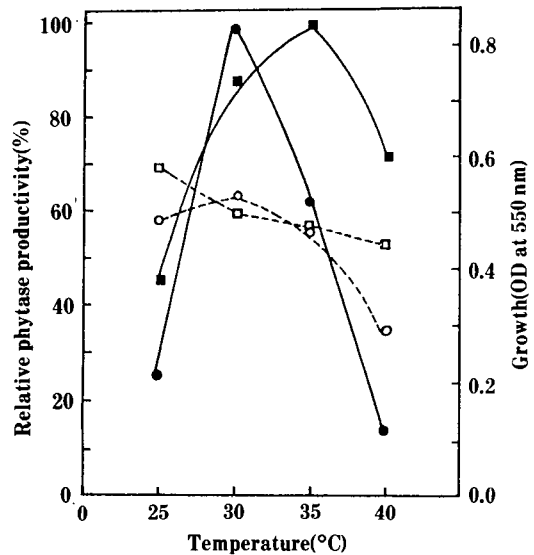


Fig. 1. Effect of temperature on the production of phytase and the growth of isolates from fermented soybean and corn meals. *B. licheniformis*; phytase production(●), growth(○), *E. cloacae*; phytase production(■), growth(□). Relative phytase productivities were calculated, based on 100% of the highest productivity.

Table 1. Phytase production of some bacterial isolates from fermented corn and soybean meals

Isolate	Released Phosphorus(ug/ml)	Relative phytase* productivity(%)	Isolate	Released Phosphorus(ug/ml)	Relative phytase* productivity(%)
C-1	8.0	39.0	S-1	17.0	85.0
C-5	1.6	7.8	S-3	13.0	65.0
C-6	9.2	44.9	S-5	11.0	55.0
C-7	20.5	100.0	S-16	11.4	57.0
C-10	9.2	44.9	S-17	12.8	64.0
C-12	4.4	21.5	S-34	20.0	100.0
C-14	8.0	39.0	S-37	9.8	49.0
C-17	0.4	1.9	S-42	8.4	42.0

*Relative phytase productivities were calculated, based on 100% of C-7 and S-34 which were the strains shown the highest phytase productivities.

본배지에 접종하여 30°C에서 5일간 배양한 후 phytase 생산성을 측정된 결과 Table 1과 같이 C-7 균주와 S-34균주가 가장 높았다.

우수균주의 동정

콩과 옥수수 가루의 발효과정에서 분리한 균주중 phytase 생산성이 가장 우수한 C-7과 S-34균주는 각각 *Bacillus licheniformis*와 *Enterobacter cloacae*로 동정되었다.

효소생산성에 미치는 온도의 영향

분리된 *B. licheniformis*와 *E. cloacae*에 의한 phytase 생산성에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위하여 각 균주의 전배양을 접종한 후 각각 25, 30, 35 및 40°C에서 5일동안 본배양한 결과(Fig. 1), *B. licheniformis*의 효소생산성은 온도에 아주 민감함을 알 수 있었고 30°C에서 최대의 생산성을 나타냈다. 반면에 균체농도는 25°C와 30°C에서 별다른 변화가 없었으나 35°C 이상에서는 현저하게 낮아짐을 알 수 있었다. *E. cloacae*는 35°C에서 phytase 생산성이 최고에 달하였고 균체농도는 25°C에서 오히려 가장 높았으며 온도가 증가함에 따라 점차 감소하는 경향을 보였다.

따라서 두 균주의 균체농도와 phytase 생산성의

관계를 볼 때 *B. licheniformis*의 최적균체농도를 나타내는 온도에서 효소생산성도 최고에 달하였으나 *E. cloacae*의 경우는 최적균체농도의 온도에서 오히려 효소생산성이 가장 둔화됨으로서 균체농도와 효소생산성이 일치하지 않음을 나타냈다.

초기 pH의 영향

배양액의 초기 pH를 1.0에서 8.0까지 1.0간격으로 달리하여 초기 pH가 phytase 생산성과 균증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

*B. licheniformis*는 pH5.0까지는 거의 증식이 억제되다가 pH6.0에서 현저한 증식과 함께 phytase 생산성도 크게 증가하여 최적 pH임을 보였고 *E. cloacae*는 pH4.0까지 약간의 증식은 있었지만 phytase 생산성은 거의 나타나지 않았으며 pH5.0에서 균체증식과 phytase 생산성은 급격한 증가를 보이다가 pH7.0에서 최대에 달하였다. 이처럼 두 균주는 최대의 균체증식과 phytase 생산성을 나타내는 pH가 일치함을 알 수 있었다.

배양시간의 영향

Fig. 3에서와 같이 *B. licheniformis*의 최적배양조건인 pH6.0과 30°C에서 배양했을 때 배양 2일후에

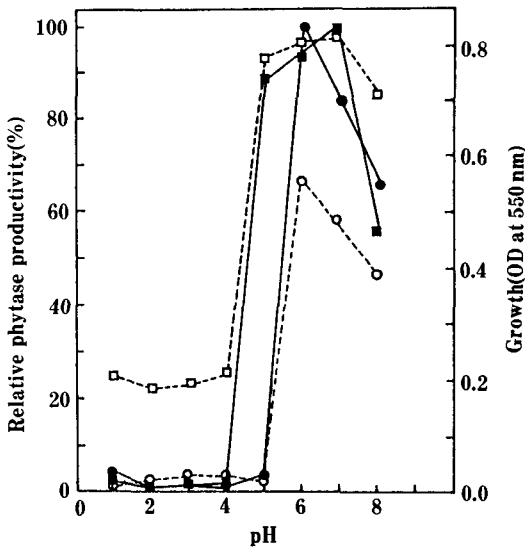


Fig. 2. Effect of initial pH on the production of phytase and the growth of isolates from fermented soybean and corn meals.

B. licheniformis; phytase production(●), growth(○), *E. cloacae*; phytase production(■), growth(□). Relative phytase productivities were calculated, based on 100% of the highest phytase productivity.

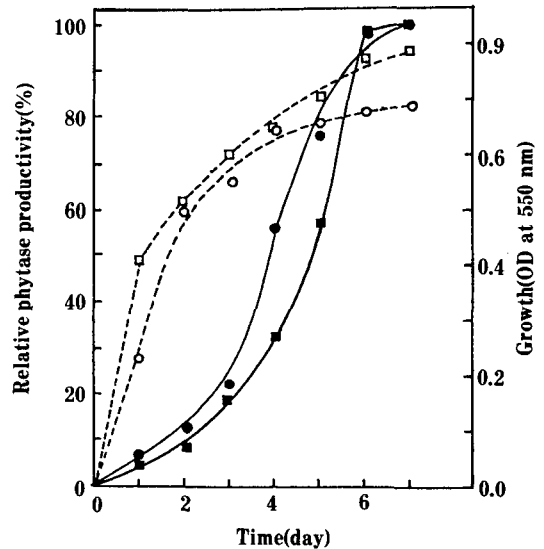


Fig. 3. Effect of incubation time on the production of phytase and the growth of isolates from fermented soybean and corn meals.

E. licheniformis; phytase production(●), growth(○), *E. cloacae*; phytase production(■), growth(□). Relative phytase productivities were calculated, based on 100% of the highest phytase productivity.

Table 2. Effect of various carbon sources added to basal medium on the production of phytase of *B. licheniformis* from fermented com meal

Carbon sources added	Amount of carbon sources used(%)	Relative phytase productivity(%)
None (Control)	—	100
Soluble starch	3.0	143
Glucose	3.0	150
Lactose	0.1	95
Maltose	0.1	108
Sucrose	3.0	124
Na-citrate	1.0	76

Table 3. Effect of various carbon sources added to basal medium on the production of phytase of *E. cloacae* from fermented soybean meal

Carbon sources added	Amount of carbon sources used (%)	Relative phytase productivity(%)
None (Control)	—	100
Soluble starch	0.1	170
Glucose	0.1	180
Lactose	0.1	209
Maltose	0.1	204
Sucrose	0.1	207
Na-citrate	0.1	142

활발한 균체증식을 보이는 전형적인 세균의 증식곡선을 나타냈다. Phytase 생산성은 배양 3일째까지 약간씩의 증가만을 보이다가 배양 4일째부터 급격한 증가를 보여 7일째에 최대의 생산성을 보였으나 6일째에 비하여 유의성을 인정할 정도의 증가를 보이지 못했다. 또 *E. cloacae*의 경우 pH 7.0과 온도 35°C의 최적조건에서 배양한 결과 균체증식은 배양 24시간 이후부터 기하급수적으로 이루어져 coliform bacteria의 전형적인 특성을 나타냈으며 phytase 생산성은 배양 3일째까지 서서히 증가하다가 4일째부터 6일째까지 급격히 증대되었으나 배양 7일째에는 거의 변화가 없었다.

탄소원의 영향

6가지 탄소원을 각각 0.05%에서 0.5%까지 농도별로 첨가했을 때의 phytase 생산성에 미치는 검토한 결과 최대의 생산성을 보인 각각의 탄소원의 농도를 보면 Table 2 및 3과 같다.

*B. licheniformis*는 기본배지에 탄소원을 첨가하

Table 4. Effect of various nitrogen sources added to basal medium on the production of phytase of *B. licheniformis* from fermented corn meal

Nitrogen sources added	Amount of nitrogen sources used(%)	Relative phytase productivity(%)
None (Control)	—	100
NaNO ₃	1.0	100
KNO ₃	3.0	174
NH ₄ NO ₃	2.0	101
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	105
NH ₄ Cl	1.0	92
Urea	0.1	81
Peptone	0.5	183

Table 5. Effect of various nitrogen sources added to basal medium on the production phytase of *E. cloacae* from fermented soybean meal

Nitrogen sources added	Amount of nitrogen sources used (%)	Relative phytase productivity(%)
None (Control)	—	100
NaNO ₃	0.1	136
KNO ₃	0.1	29
KH ₄ NO ₃	0.1	188
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0	218
NH ₄ Cl	0.1	209
Urea	0.1	31
Peptone	0.1	81

지 않은 control과 비교할 때 3%의 glucose를 첨가함으로써 phytase 생산성이 가장 높았으며 *E. cloacae*는 이당류인 maltose, lactose 및 sucrose를 0.1% 정도 첨가했을 때 2배 이상까지 효소생산성이 증가하였다.

질소원의 영향

7가지 질소원을 0.01%에서 5.0%까지 농도별로 각각 첨가했을 때 phytase 생산성에 미치는 영향을 검토한 결과 각 질소원의 최적농도를 보면 Table 4 및 5에서와 같다.

각각의 질소원에서 최대의 phytase 생산성을 보인 농도만을 control과 비교검토하였는데 *B. licheniformis*는 3%의 KNO₃와 0.5%의 peptone을 첨가했을 때 phytase 생산성이 증가되었으며 *E. cloacae*의 경우는 *B. licheniformis*와는 달리 3%의 (NH₄)₂SO₄와 0.1%의 NH₄Cl과 NH₄NO₃를 첨가했을 때 phytase 생산성이 거의 2배로 증가하였다. 이

는 *B. licheniformis*와 *E. cloacae*가 질소원의 종류에 따라 phytase 생산성에 있어서 큰 차이를 나타낼 수 있었다.

요 약

콩과 옥수수 가루의 천연발효과정에서 분리한 균주들중 phytase 생산성이 우수한 균주는 *Bacillus licheniformis*와 *Enterobacter cloacae*로 동정되었으며 그들의 최적배양조건과 최적 phytase 생산조건을 검토한 결과는 다음과 같다. *B. licheniformis*는 초기 pH 6.0, 온도 30°C에서 5일간 배양하였을 때 phytase 생산성이 최대에 달하였고 탄소원은 3%의 glucose를, 질소원으로는 0.5%의 peptone을 첨가하였을 때 최대에 달하였다. *E. cloacae*의 경우는 pH 7.0, 온도 35°C에서 5일간 배양하였을 때 최대의 phytase 생산성을 보였으며 탄소원의 첨가는 이당류인 lactose, maltose 및 sucrose를 각각 0.1%, 질소원은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 0.1% 첨가했을 때 최대의 생산성을 보였다.

사 사

본 연구는 1986년도 후반기 한국과학재단의 신진연구비 지원에 의해 수행한 연구의 일부임.

참고문헌

1. IUPAC-IUB The nomenclature of cyclitols: *Er. J.*

- Biochem.*, 1 (1968).
2. O'Dell, B.L., J.E. Savage: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **103**, 304 (1968).
3. Maga, J.A.: *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1 (1982).
4. Fardiaz, D. and P. Markakis: *J. Food Sci.*, **46**, 862 (1967).
5. Reinhold, J.G.: *J. Am. Dietet. Assoc.*, **66**, 38 (1975).
6. Erdman, J.W.: *J. Am. Oilchem. Soc.*, **56**, 736 (1979).
7. Nelson, T.S.: *Poult. Sci.*, **46**, 862 (1967).
8. Peer, F.G.: *Biochemical J.*, **53**, 102 (1953).
9. Chang, R., S. Schwimmer and H.K. Burr: *J. Food Sci.*, **42**(4), 1098 (1977).
10. Matheson, N.K. and S. Strother: *Phytochemistry*, **8**, 1349 (1968).
11. Lolas, G.M. and P. Makakis: *J. Food Sci.*, **42**(4), 1094 (1969).
12. Buchanan, R.E., Gibbons, S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, A.W. Niven and R.Y. Stanier(Eds): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland (1974).
13. Eds. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips: *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology. Washington, DC. (1981).
14. Fiske, C.H. and Subbarow, The Colorimetric Determination of Phosphorus, *J. Biol. Chem.*, **66**, 376 (1925).

(Received September 1, 1988)