

*Aspergillus ficuum*의 Phytase의 정제와 Anti-phytase 항체생산

김 근*

수원대학교 유전공학과

Purification of Phytase from *Aspergillus ficuum* and Production of Anti-phytase Antibody

Keun Kim*

Department of Genetic Engineering, The University of Suwon, Suwon P. O. Box 77, Korea

ABSTRACT: Phytase(myo-inositol-hexakis phosphate 3-phosphohydrolase, E C 3.1.3.8) sequentially hydrolyzes phytate to myo-inositol and inorganic phosphate. Phytase of *Aspergillus ficuum* was purified to homogeneity using ultrafiltration, cation exchange column and anion exchange column. It's molecular weight is estimated as around 90,000 by SDS-PAGE. Antibody against the phytase was produced by immunizing mice with the purified phytase. The titer of the antibody was determined to be 1/25,000.

KEYWORDS: Phytase, *Aspergillus ficuum*, Purification, Molecular weight, Antibody

Phytate(myo-inositol hexakis phosphate)는 식물조직에 통상적으로 존재하는 구성성분들이며 식물로부터 유래하는 모든 사료물질의 인의 저장고로서의 역할을 한다(Graf, 1986).

Phytate는 anti-nutritional factor로 여겨지고 있는데, 그 이유는 chelation에 의해 단백질(Zyta, 1992)과 미네랄(Erdman, 1979)의 bioavailability를 감소시키기 때문이다. Phytate에 들어있는 인은 단위동물(monogastric animal)의 위나 장내에 이를 분해하는 효소가 없기 때문에(Cromwell, 1979; Nelson, 1967) phytate phosphorus는 그대로 축분에 포함되어 하천, 호수 등지로 흘러들어가 부영양화(eutrophication)를 일으키게 된다 (Cromwell and Coffey, 1991).

Acid phosphatase의 일종인 phytase는 phytate를 단계적으로 분해하여 여러 myo-inositol phosphate 중간물을 형성하면서 myo-inositol과 phosphoric acid로 분해시키는 효소이다. Phytase는 식물, 미생물 그리고 어떤 동물의 조직 내에도 존재한다(Han *et al.*, 1987; Gibson and Ulah, 1990). Phytase를 생산하는 미생물로는 *Schwanniomyces castelli* (Segueilha, 1992), *Aspergillus niger* (Shieh and Ware, 1968), *A. terreus* (Yamada *et al.*, 1968), *A. ficuum* (Gibson, 1987), ruminal microorganism (Cheng *et al.*, 1997), *Bacillus* sp. (Kim *et al.*, 1998) 등이 알려져 있다.

여러 생물들 중에서 *A. ficuum*이 가장 활성있고 열내성도 좋은 extracellular phytase를 생산한다(Shieh and Ware, 1968; Wodzinski and Ullah, 1996). *A. ficuum*은 3가지 extracellular acid phosphatase를 생산한다. 이들 중 2가지는 phytin을 가수분해하는데(Shieh *et al.*, 1969; Ehrlich *et al.*, 1993), 2개

의 최적 pH(2.5와 5.0)를 갖는 mesoinositol-hexaphosphate phosphohydrolase(E.C. 3.1.3.8)(Phyt A)(Shieh *et al.*, 1969; Ullah and Gibson 1987), 그리고 최적 pH 2.0(Shieh *et al.*, 1969)에서 2.5(Ullah and Cummins, 1987)인 non-specific phosphomonoesterase(E.C. 3.1.3.2)(Phyt B)가 바로 이들이다. *A. ficuum*은 또한 최적 pH 6.0인 non-specific phosphomonoesterase(Pase)를 생산하는데, 이 효소는 phytate를 가수분해하지 않는다(Ullah and Cummins, 1988).

위에서 언급된 3가지의 분비성 acid phosphatase 중에서 Phyt A만이 phytate로부터 인을 단계적으로 분리하여 영양가를 높여주기 때문에 기초과학자나 응용과학자들에게 연구대상이 되어왔다.

사료에 phytase를 첨가하면 인의 이용성이 높아지고 돼지나 닭 등의 축분으로의 인의 분비를 줄일 수 있다(Jongbloed *et al.*, 1992). Phytase 첨가사료는 동물생장에 필수적인 영양물인 무기인을 따로 넣어주지 않아도 되고, 사료 내의 미네랄, 단백질등과 같은 영양분의 bioavailability가 높다는 장점이 있다.

이상에 나타난 바와 같이, phytase는 환경 및 산업적으로 그 유용성이 크다. 따라서 만일 효소를 유전자 재조합법에 의하여 과량발현하거나 단백질공학적인 방법을 활용하여 효율을 높여 경제적으로 생산한다면, 동물사료에 phytase를 첨가하여 활용할 수 있게 될 것이다. 이를 위하여, 우선 효소를 정제하여 확보하는 일이 필요하다. 본 연구에서는 *A. ficuum*으로부터 phytase A의 효소를 순수정제하였고, 이 정제된 효소를 가지고 anti-phytase 항체생산을 시도하였다. 이 항체는 phytase cDNA library로부터 immunological screening에 의한 phytase cDNA clone의 동정과 재조합

*Corresponding author <E-mail: kkim@mail.suwon.ac.kr>

phytase 단백질의 발현확인 등에 사용될 수 있다.

재료 및 방법

균주 및 배양

균주로는 *A. ficuum* NRRL 3135을 사용하였으며, PDA 배지(39 g/l)에서 0.05% Tween 80 용액 100 ml에 포자를 현탁시켜 2.5 l의 Jar fermentor(한국발효기)에 접종하였다. Jar fermentor의 운전조건은 pH 5.5, 온도 30°C, 교반속도 250 rpm, 그리고 통기율은 1 vvm이었다. 배지는 1% dextrose, 2.5% corn starch 용액, 0.2% NaNO₃, 0.1% sodium phytate, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, 0.02% KCl, 0.0001% K₂HPO₄이다. Corn starch 용액은 1 l의 증류수에 50 g의 corn starch를 녹여 교반기로 저어주면서 100°C까지 열을 가한 후 곰팡이용 α-amylase(Termamyl 120 l, Novo Co.)를 5 ml 처리하여 사용하였다.

Phytase 활성도 측정

Phytase 활성도는 sodium phytate로부터 분리되는 Pi의 양을 측정하여 결정하였다(Ullah and Gibson, 1987). 여기서 조건은 pH 5.5와 58°C이었으며, 단백질의 정량은 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용한 Lowry assay를 변형한 방법(Miller, 1959)에 의하였다. 효소 1 unit(U)는 1 mg의 효소 단백질이 1분당 phytate로부터 1 nmole의 무기인산을 유리시키는 활성으로 정의하였다.

Phytase의 정제

Phytase activity가 가장 좋은 시기에 균의 배양을 멈추고 2 l의 배양액에서 균사체를 제거하기 위해서 멸균된 Whatman #2 여과지로 여과를 했다. 배양여과액 1,750 ml를 다시 4°C에서 40분간 10,000 rpm으로 원심분리한 후(Sorval 원심분리기, GSA roter), 상등액을 Centriprep 10 concentrator (Amicon)로 ultrafiltration하였다. 이 농축액을 4°C에서 30분간 5,000 rpm으로 원심분리하였다. 원심분리된 상등액 500 ml를 Spectrum사의 Molecular Porous Membrane을 사용하여 투석하였는데, 4 l의 10 mM sodium acetate 완충용액(pH 4.5)로 4시간, 8시간, 16시간 그리고 24시간으로 총 4번 실시하였다. 투석된 용액을 4°C에서 30분간 10,000 rpm으로 원심분리하여 pellet을 제거하고 상등액을 조효소 용액으로 사용하였다.

Cation exchange column SP-Sepharose(Pharmacia)를 bed volume 이 40 ml되도록 충전하여 사용하였다. 단백질을 loading하기 전에 column의 3배 부피의 10 mM sodium acetate 완충용액(pH 4.5)으로 씻어주었다. 단백질을 loading하고, UV detector로 단백질이 검출되지 않을 때까지 충분히 씻어준 다음, 0에서 1 M까지의 0.1 M 완충용액에 녹아있는 NaCl로 gradient를 주어 용출하였다. Fraction은 1 ml씩 120개를 받았고, 이중에서 phytase 활성이 있는 분획을 모았다. 모은 용액 20 ml를 다시 500 ml의 10 mM

sodium acetate 완충용액(pH 4.5)로 3번 투석하였고 Centriprep #10으로 20 ml에서 10 ml로 농축하였다.

Anion exchange column 농축액 10 ml를 anion exchange column(Q-Sepharose, Pharmacia)에 loading 하였다. 용출방법은 cation exchange column chromatography의 경우와 동일하며, 1 ml씩 60개의 fraction을 수집하고 이 중 phytase activity가 있는 fraction을 취합하여 Centricon 10 (Amicon)으로 농축하였다.

SDS-PAGE 정제된 단백질을 12.5% SDS-PAGE로 확인하였다(Laemmli, 1970). 표준단백질로는 Low range standards (Biorad)를 사용하였으며 여기에는 97.4 kDa rabbit muscle phosphorylase b, 66.2 kDa bovine serum albumin, 45 kDa hen egg white ovalbumin, 21.5 kDa soybean trypsin inhibitor 그리고 14.4 kDa hen egg white lysozyme 등이 포함되어 있다. 영동 후 염색용액(0.05% Coomassie blue R-250, 25% methanol, 그리고 18% 초산)에서 12 hr 염색하였고, 탈색용액(20% methanol과 10% 초산)으로 band가 선명하게 보일 때 까지 탈색하였다.

Phytase 항체 생산

SDS-PAGE slab gel(12.5%)을 사용하여 전기영동한 후 20분간 염색하였으며, 다시 30분간 탈색하였고 찬 증류수로 여러번 씻어 준 다음 마지막으로 찬 증류수에 넣고 4°C에서 철야 보관하였다. 찬 증류수에 있는 gel을 꺼내 원하는 phytase band를 면도칼로 잘라 gel 조각을 잘게 부순 다음, 동량의 Freund's adjuvant를 넣고 18 gauge 주사바늘에서 흡입 및 분출을 수차례 반복하여 분쇄하였다. 한 mouse당 50 µg의 단백질을 4마리에게 10일 간격으로 5번 주사하였으며 처음에는 Freund's incomplete adjuvant를 나머지 4번은 Freund's complete adjuvant를 섞어 주사하였다. 마지막 주사 후 5일 후에 혈액을 채취하였으며 혈액 채취 후 상온에서 30분 정도 방치시켜 응고시켰다. 응고된 혈액을 상등액에 0.05%(w/v)의 sodium azide를 넣어 4°C에 보관하였다.

Western blot hybridization에 의한 항체확인

Sample을 12.5% SDS-PAGE로 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 150 mA, 90분간 electrotransfer하였다. Nitrocellulose membrane을 blocking 완충용액(0.2% bovine serum albumin, 0.05% Tween 20, 5 mM NaNO₃ in TBS, pH 7.5)으로 10분간 세 번 세척한 후 다양한 농도로 희석된 일차 항체와 하룻밤 반응시켰다. Membrane을 blocking 완충용액으로 세 번 세척한 후 alkaline phosphatase(AP)-conjugate된 anti-mouse IgG(Promega)와 90분간 반응시킨 후 X-phosphate 및 nitroblue tetrazolium를 AP의 기질로 이용한 발색 반응으로 band를 확인하였다.

결과 및 고찰

*A. ficuum*의 최적 배양시간

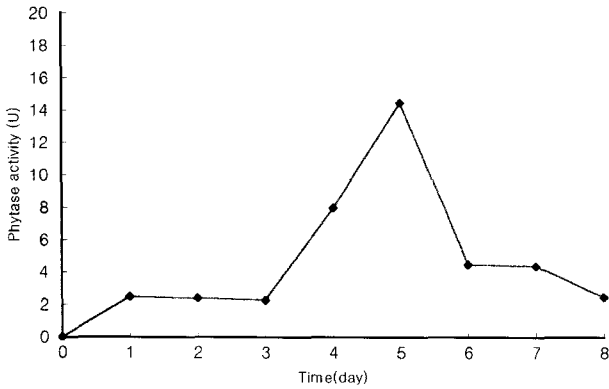


Fig. 1. The time course of phytase production by *Aspergillus ficuum*.

*A. ficuum*의 배양액에서의 phytase 활성 증가는 처음 3일 동안에는 매우 저조하였고, 3일 후부터 증가하기 시작하여 5일째에 13 unit의 활성을 보여 최대치를 보인 후 다시 감소하였다(Fig. 1). 이러한 phytase 생산의 변화 양상은 Ullah and Cummins(1988)의 결과와 유사하였다.

Phytase의 정제

Table 1은 효소의 각 정제 단계에 따른 phytase activity의 변화를 나타낸 것인데 이 정제과정을 거쳐 배양액에서의 phytase는 최종의 anion exchange column 단계 후 4.2%의 효율로 12.6배 농축되었음을 보여 주었다. Cation exchange column을 먼저 사용하였는데 fraction은 1 ml씩 120개를 받았다. 이들 fraction의 protein의 양과 phytase activity를 측정하였고 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 여기서 단백질과 phytase activity의 분리형태가 비슷한 것으로 보아 대부분

Table 1. Purification of *Aspergillus ficuum* phytase

Purification Stage	Protein (mg)	Activity (U)	Specific activity (U/mg)	Fold purification	Yield (%)
Culture filtrate	357.3	23,562	66	1.0	100
Ultrafiltration	102.1	16,626	163	2.5	70.6
Cation	13.6	6,664	490	7.4	28.3
Anion	1.2	1,000	833	12.6	4.2

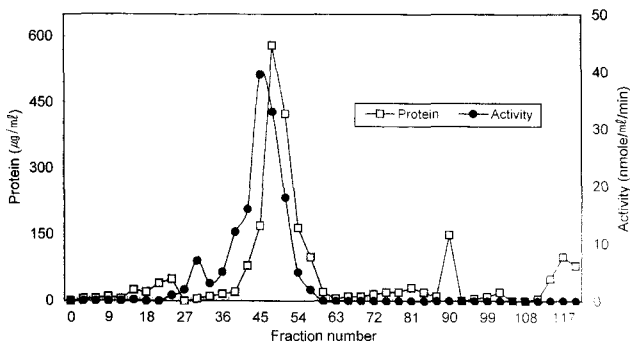


Fig. 2. Purification of phytase by chromatography on a SP-Sephacel cation exchange column.

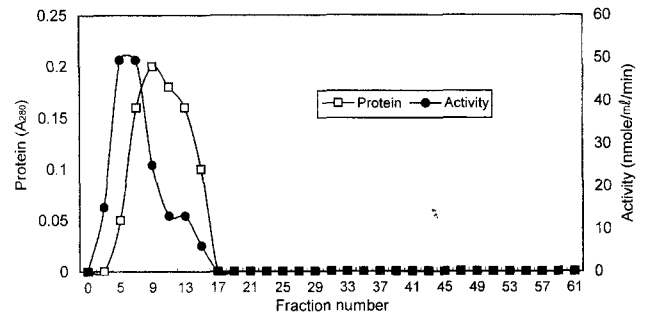


Fig. 3. Purification of phytase by chromatography on a Q-Sepharose anion exchange column.

의 단백질이 phytase인 것으로 보인다. Cation exchange column을 통과한 fraction 37번에서 57번까지를 수집하였다. Anion exchange column에서는 1 ml씩 60개의 fraction을 받았는데 단백질의 양과 phytase activity를 측정 한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 4번에서 14번까지의 fraction을 모아 Centricon-10을 사용하여 1 ml로 농축하였다.

SDS-PAGE에 의한 Phytase 분자량 결정

정제된 phytase에 대하여 SDS-PAGE를 실시하였고 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 여기서 90 kDa 정도의 단백질 band를 확인할 수 있었다. 다른 미생물로부터 생산된 phytase의 분자량은 작은 경우 *Bacillus*의 44,000(Kim et al., 1998)이고 큰 경우가 *Schwaniomyces castelli*의 490,000이다(Segueilha et al., 1992). Phytase의 분자량은 *S. castelli*의 경우는 4개의 subunit를 가진 tetrameric structure를 가지고 있어서 분자량이 컸고(Segueilha et al., 1992) 일반적으로

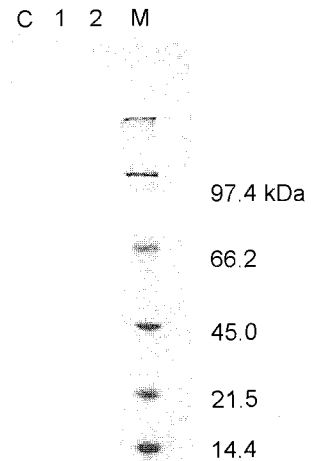


Fig. 4. The SDS PAGE of purified phytase. Proteins were separated on 12.5% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue.

Lane C: Crude cultrue filtrate, Lane 1: Cation exchange column, Lane 2: Anion exchange column, Lane M: Standard marker.

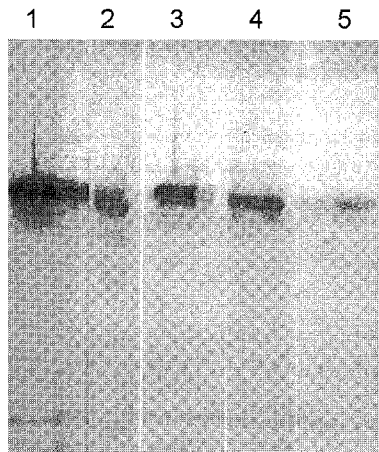


Fig. 5. Western blot hybridization of crude culture filtrate containing phytase using prepared antibody.

Lane 1: Primary Ab 1/5,000 diluted, Lane 2: Primary Ab 1/10,000 diluted, Lane 3: Primary Ab 1/15,000 diluted, Lane 4: Primary Ab 1/20,000 diluted, Lane 5: Primary Ab 1/25,000 diluted.

다른 phytase는 monomer(Ullah and Gibson, 1987)로서 분자량은 100,000 이하인 것으로 보고되었다(Gibson and Ullah, 1990; Dvorakova *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998). 한편, *Aspergillus*에서 분리된 phytase는 glycoprotein으로서 glycosylation rate는 27.3%인 것으로 보고되었다(Gibson and Ullah, 1990).

Antibody의 생산 및 확인

Phytase에 대한 antibody의 titer를 결정하기 위해서 균의 배양액을 가지고 western blot hybridization을 실시하였다(Fig. 5). 실험 결과 antibody는 잘 만들어졌음을 확인하였고 titer는 1/25,000로 정하였다. 이 antibody는 phytase cDNA library로부터 phytase cDNA clone의 identification과 재조합 phytase 단백질의 발현 확인 등에 사용될 수 있다.

적 요

*Aspergillus ficuum*이 발효조의 배양액에서 phytase를 가장 많이 분비 생산하는 시간은 5일째였다. 이 phytase를 ultrafiltration, cation exchange column, 그리고 anion exchange column으로 최종 정제하여 SDS-PAGE로 분석하여 본 결과 단일 band로 약90,000의 분자량을 가진 것으로 나타났다. 정제된 phytase를 사용하여 phytase에 대한 항체를 생산하였고 titer는 1/25,000로 결정하였다.

감사의 글

본 연구는 교육부 및 학술진흥재단의 "1997년도 유전공학 학술 연구 조성비" 지원에 의해 수행되었고, 연구비 지원에 대해 감사드립니다.

참고문헌

- Cheng, K. J., Selinger, L. B., Yanke, L. J., Bae, H. D., Zhon, L. and Forsberg, C. W. 1997. New nucleic acid encoding phytase of a ruminal microorganism and related enzyme. WPI-NO: WO-9748812.
- Cromwell, G. L. 1979. Availability of phosphorus in feed stuffs for swine. Proc. Distillers Feed Research Conf. pp. 40-52. Distillers Feed Research Council, DesMoines, IA.
- Cromwell, G. L. and Coffey, R. D. 1991. Phosphorus, a key essential nutrient, yet a possible major pollutant-its central role in animal nutrition. In: Biotechnology in the Feed Industry (T.P. Lyons, ed) pp. 134-145. Alltech Technical Publications, Nicholasville, KY.
- Dvorakova, J., Volfova, O. and Kopecky, J. 1997. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger* 6-phytase production, purification and characterization. *Folia Microbiol.* **42**: 349-352.
- Ehrlich K. C., Montalbano, B. G., Mullaney, E. J., Dischinger, H. C. and Ullah, A. H. J. 1993. Identification and cloning of a second phytase gene (Phyt B) from *Aspergillus niger (ficuum)*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**: 53-56.
- Erdman, J. W. 1979. Oilseed phytase: nutritional implications. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **56**: 736-741.
- Gibson, D. M. 1987. Production of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum* on starch media. *Biotechnol. Lett.* **9**: 205-310.
- Gibson, D. M. and Ullah, A. B. J. 1990. Phytases and their action on phytic acid, p. 77-92. In: Inositol Metabolism in Plants, Wiley-Liss.
- Graf, E. (ed.). 1986. Phytic acid. Chemistry and applications. Pillsbury Co., Pilatus Press, Minneapolis.
- Han Y. W. and Gallagher, D. J. 1987. Phosphatase production by *Aspergillus ficuum*. *J. Ind. Microbiol.* **1**: 295-301.
- Jongbloed, A. W., Mroz, Z. and Kemme, P. A. 1992. The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorous and phytic acid in different sections of the alimentary tract. *J. Anim. Sci.* **70**: 1159-1168.
- Kim, Y. O., Kim, H. K., Bal, K. S. and Oh, T. K. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Technol.* **22**: 2-7.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Miller, G. L. 1959. Protein determination for large number of samples. *Analytical Chem.* **31**: 964.
- Nelson, T. S. 1967. The utilization of phytate phosphorus by poultry a review. *Poult. Sci.* **46**: 862-871.
- Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G. and Galzy, P. 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 7-11.
- Shieh, T. R. and Ware, J. H. 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.*

- 16:** 1348-1351.
- Shieh, T. R., Wodzinski, R. J. and Ware, J. H. 1969. Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. *J. Bacteriol.* **100**: 1161-1165.
- Ullah, A. H. J. and Cummins, B. J. 1987. Purification, *N*-terminal amino acids sequence and characterization of pH 2.5 optimum acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*. *Prep. Biochem.* **17**: 397-422.
- Ullah, A. H. J. and Gibson, D. M. 1987. Extracellular phytase from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: Purification and characterization. *Prep. Biochem.* **17**: 63-91.
- Ullah, A. H. J. and Cummins, B. J. 1988. *Aspergillus ficuum* extracellular pH 6.0 optimum phosphatase: Purification, *N*-terminal amino acid sequence, and biochemical characterization. *Prep. Biochem.* **18**: 37-65.
- Wodzinski, R. J. and Ullah, A. H. J. Phytase. 1996. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**: 263-302.
- Yamada, K., Minoda, Y. and Yamamoto, S. 1968. Phytase from *Aspergillus terreus*. *Agr. Biol. Chem.* **32**: 1275-1282.
- Zyta, K. 1992. Mould phytases and their applications in the food industry world. *J. Microbial. Biotechnol.* **8**: 467-472.