

## Cannula를 장착한 돼지에서 *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 Phytase와 *Aspergillus ficuum* Phytase의 역가 비교

장범수 · 박승준\* · 윤효인<sup>1</sup>

충남대학교 수의과대학 약리독성학실험실

\*경북대학교 수의과대학 약리독성학실험실

### Comparative Enzymatic Hydrolysis of *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 Phytase and *Aspergillus ficuum* Phytase in the Cannulated Pigs

Beom-su Jang, Seung-chun Park\* and Hyo-in Yun<sup>1</sup>

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Taejon 305-764

\*College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Taegu 702-701

**Abstract :** In this study, we assessed the efficacy of a novel *B. amyloliquefaciens* DS11 phytase (DS11 phytase) and that of a commercial *Aspergillus ficuum* phytase (AF phytase) through their bioavailabilities of phytin-phosphorus and -calcium in the diet using cannulated pigs. For the purpose of evaluating the efficacy of the phytases in pigs, we determined phosphorous concentrations from serum and feces, in addition to ingesta obtained from the cannula at the terminal ileum. As results, phosphorus concentration was lower in feces from DS11 group and BASF group by 17% and 10%, and higher in serum from the respective groups by 34% and 20%, as compared to the control group. Both phytases are evaluated to enhance phosphorus availability to the great extent. Calcium concentration of feces were lower in DS11 group and BASF group by 31% and 10%, than that in the control. Calcium concentration of serum was higher in DS11 phytase group by 4% but lower in AF phytase group by 3%, than that in the control group.

**Key words :** *Bacillus amyloliquefaciens*, phytase, pigs, cannulation, calcium.

## 서 론

단위동물의 위장관에서는 phytase가 극히 소량 존재하므로 단위동물사료의 주원료인 곡류나 그 부산물 또는 박류 등에 존재하는 phytate를 효과적으로 분해할 수 없기 때문에, 단위 동물은 사료에 포함되어 있는 인을 제한적으로밖에 이용할 수 없다. 따라서 사료에 여분의 무기인을 첨가함으로써 그 요구량을 보충하고 있는 실정이다.

그러나 사료에 첨가되고 있는 무기인과 분해되지 않은 phytate의 많은 부분은 동물체내에 흡수되지 못하고 배설물에 다량 함유하게 된다<sup>13</sup>. 인이 함유된 배설물은 토양 및 지표수를 오염시키고 조류 (algae)와 수서 식물의 생장을 촉진시켜 하천의 BOD 및 COD를 증가시키게 된다<sup>12,2</sup>. 그러므로 이러한 무기인의 첨가는 사료비의 증가와 함께 환경오염을 부추기는 이중의 부담을 갖게 한다. 축산 폐기물은 막대한 처리경비가 소요되며 또한 환경오염을 유발하기 때문에, 가축의 소화율을 증가시켜 배설량을 줄이거나 사료내 인 등의 첨가량을 줄여 배설물 중 인 등의 오염인자를 감소시키는 방법 등이 시도되고 있다<sup>14</sup>.

Phytate로부터 인산을 유리시키는 효소인 phytase는 대부분의 식물종자 내에 존재하고 있으며 곰팡이나 박테리아, 효모와 같은 미생물에 의해서 생산되기도 한다. 이들 phytase의 pH 안정성을 보면 최대의 활성을 나타내는 pH가 그 유래에 따라 차이를 보이는데, 식물 유래 phytase에서는 5이며 pH 2.5에서는 완전히 불활화되는 반면에 곰팡이 유래 phytase는 pH 2.5와 5에서 활성 영역을 갖고 있어 사료 첨가시 산성조건인 위를 경유해야 하므로 식물유래 phytase에 비해 효과가 큰 것으로 알려져 있다<sup>6</sup>.

최근에 국내토양으로부터 단위동물의 위장관에서 강력하게 활성을 보이는 phytase가 선별되어 *B. amyloliquefaciens* DS11으로 명명되었다<sup>8</sup>. DS11 phytase는 pH 7에서 최대 활성을 나타내며 pH 4에서 8까지의 비교적 넓은 범위에서 안정하며 칼슘이온을 첨가할 때 보다 넓은 pH 범위 (pH 2-10)에서 활성을 유지할 뿐만 아니라 열저항성도 증가되는 것으로 보고된 바 있다<sup>9</sup>. 그러므로 기존의 곰팡이 유래 phytase는 위에서만 국소 작용하는 것에 비하여 본 phytase는 위 및 장관에서 효소의 작용을 나타낼 수 있을 것으로 예견할 수 있다. 최근 DS11 phytase을 이용한 비육돈시험에서 그 효과가 입증되었으나<sup>6</sup>, 위장관내에서 효소활성에 관한 연구는 이루어지지 않고 있어 본 연구에서는 신규효소인 DS11 phytase와 현재 응용되고 있는 곰팡이 유래의 phytase

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : hiyun@cnu.ac.kr

에 대한 비육돈에서의 위장관 활성을 검정하고자 시도하였다.

## 재료 및 방법

### Phytase의 준비

DS11 phytase는 한국과학기술원 생명공학연구소에서 제공 받아 사용하였다. 제조는 생명공학연구소 미생물효소실에서 LB 배지 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)의 5 리터 배양기를 이용하여 얻어진 농축 발효 효소액을 제공 받아 시험에 사용하였다. 이 때 배양조건은 37°C에서 12시간 동안 성장시킨 후 phytase의 유도를 위하여 lactose (8 mM)를 첨가한 후 12시간 후 배양하여 얻어진 배양액을 6,000 rpm으로 원심분리하여 세균을 제거하고 상층액만 수거하여 농축한 후 48시간 동안 동결건조하였다. 농축 효소의 phytase의 활성은 Fiske 등의 방법<sup>5</sup>을 이용하여 무기인 양의 측정에 의해 산출하였다. 일정 비율로 희석한 100 µl의 효소 용액에 400 µl의 기질용액 (2 mM sodium phytate in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.0 containing 2 mM CaCl<sub>2</sub>)을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 500 µl의 5% TCA 용액을 가하고 0°C에 10분간 방치하여 반응을 정지시켰다. Blank는 효소용액에 TCA 용액을 넣고 효소를 불활성화시킨 다음 기질용액을 가하여 방치하였다. 4 ml의 시약 (6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/2.5% ammonium molybdate/ 10% ascorbic acid/H<sub>2</sub>O, 1:1:1:2)을 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 효소반응 용액과 blank 액의 흡광도 차이를 820 nm에서 측정하였다. 효소 역가 1 PU (phytase unit)는 효소가 1분 동안에 1 nmol의 phosphate를 방출시키는 양으로 정의하였다. 이 때 농축된 효소의 역가는 2,000 PU/mg로 계산되었다. AF phytase는 시중에서 사용되고 있는 제품을 구입하여 사용하였다.

### 시험사료 및 시험동물

1주일간의 순화기간에는 시판 축협육성돈사료를 제공하였으며 시험기간 중에는 시판 축협육성돈사료 중 무기인과 칼슘을 제외한 처방으로 제조된 주문 사료에 사료 kg당 500 PU의 곰팡이 유래 phytase와 DS11 phytase를 각각 첨가한 사료를 제공하였으며 음용수는 상수도를 사용하여 자유급여시켰다. 충남 논산시 소재의 양돈장에서 사육하고 있는 Yorkshire-Landrace 교잡종 돼지 중 임상적으로 건강하다고 판단되는 20마리 (22.5±2.5 kg)를 구입하여 일주일간의 순화기간을 거친 후 시험에 사용하였다. 순화기간 및 시험 전 기간 동안 개별 돈사에서 음수와 사료는 각각 제한없이 자유급여 시켰으며 온도 (21±2°C), 습도 (55±5%), 점등 시간 (12시간) 등은 동물실험실 기준에 맞추어진 상태에서 동일한 사육조건이 유지되도록 관리하였으며 시험결과에 유의성을 나타낼 임상증상을 나타내지 않아 전 개체에 대해 케놀라 장착술을 실시하였다(Fig 1). 1주일간 순화과정을 거친 돼지를 수술 1일 전에 절식 및 절수시켰다. 전마취제로 azaperone (Stressnyl, Janssen, Belgium; 40 mg/ml)을 체중

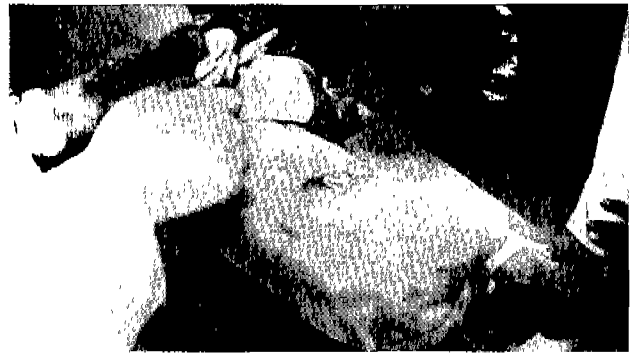


Fig 1. Pig equipped with ileal T-cannulas for sampling of ileal digesta from terminal ileum.

kg당 3 mg으로 이정맥 투여하여 진정시킨 후 ketamine (Ketalar, 유한양행; 50 mg/ml)을 체중 kg당 15 mg으로 이정맥으로 투여하여 마취시켰다. 마취된 돼지를 좌횡외위 자세로 보정한 후, Morz 등<sup>10</sup>의 방법과 Cho 등의 방법에 착안하여 시술하였다. 우측 고관절 전방 부위에서 척추와 수직으로 절개창을 내고 이를 통해 회맹 결합부를 확인한 후 회장 말단부를 절개하여 케놀라를 장착하였다. 돼지 기립시 케놀라의 전방부가 아래쪽으로, 그리고 후방부가 위쪽으로 위치하도록 척추 주위에 고정하여 회장 내용물이 케놀라에 부착된 시료 주머니에 중력에 의해 자연적으로 배출될 수 있도록 하였다. 사용한 케놀라는 acetal homopolymer resin의 재질로 제작되었다. 체온 저하를 방지하기 위하여 수술시에 항온 수술대와 전기히터를 이용하였고 수술 후에는 전기히터를 사용하여 보온하였다.

### 시험군의 분리 및 시료채취

케놀라 장착시술 후 2일부터 전 시험동물에 대하여 2일간 시판 축협육성돈사료를 공급한 후 자유급여시켜 회장내용물, 분변 및 혈액을 채취하였다. 그 후 시험동물을 각각 4마리씩 세 개 군으로 나누어 대조군은 시판 축협육성돈사료 중 무기인과 칼슘을 제외한 처방으로 급여를 하고 시험군에는 사료 kg당 500 PU의 곰팡이 유래 phytase를 첨가한 사료로, 그리고 다른 한 시험군에는 사료 kg당 500 PU의 DS11 phytase를 첨가한 사료로 전환시켜 2일간 공급한 후 각 동물에서 회장 내용물, 분변, 혈액을 채취하였다. 각각의 동물에서 사료가 교체 공급된 뒤 2일째에 케놀라를 통하여 회장 소화물과 분변 시료를 채취하였고 경정맥에서는 혈액시료를 채취하였다. 채취한 시료는 혈액의 경우 원심분리하여 혈청을 수거하였고, 나머지 시료는 초저온 냉동고 (-80°C)에 분석 전까지 보관하였다. 분석 전처리로 회장 내용물 및 분변은 풍건한 후 dry oven을 이용하여 완전 건조시켰다.

### 시료내 인 및 칼슘농도 측정

시료 100 g에 900 µl의 5% TCA에 넣어 100°C에서 1시간 동안 끓인 후 15,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층

액 500 μl을 취하였다. 상층액 500 μl에 3차 증류수 500 μl을 가하여 총 1 ml이 되도록 조정후 reagent A (20% 6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40% 증류수, 20% ammonium molybdate, 20% ascorbic acid), 4 ml을 가하여 37°C에서 30분 반응 후 820 nm에서 흡광도를 측정후 표준곡선에 외삽하여 시료 내 인의 함량을 측정하였다. 칼슘의 분석은 시료 1 g을 켈달 분해법에 의해 perchloic acid 50 ml로 2시간에 걸쳐 완전히 회화시켜 3차 증류수 100 ml로 정용한 후 시료의 농도에 따라 적당량 희석하여 원자흡광분광기 (Analab-9199A, Sumil)를 이용하여 423 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

**통계처리**

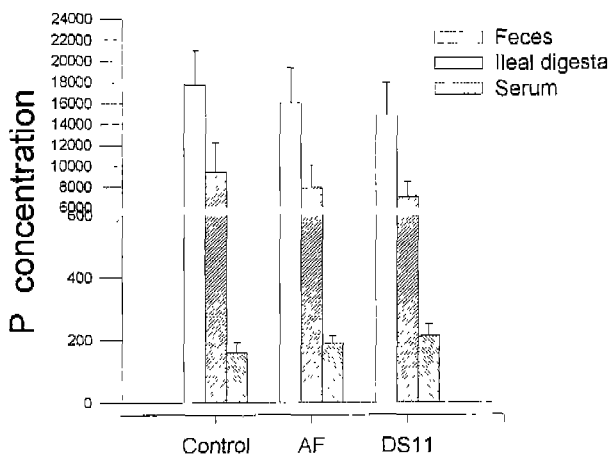
대조군과 시험물질 투여군 사이, 그리고 시험물질 투여간의 상호 비교는 Student의 t 검정에 의하였으며 p<0.05의 경우 유의한 차이가 있다고 판단하였다.

**결과 및 고찰**

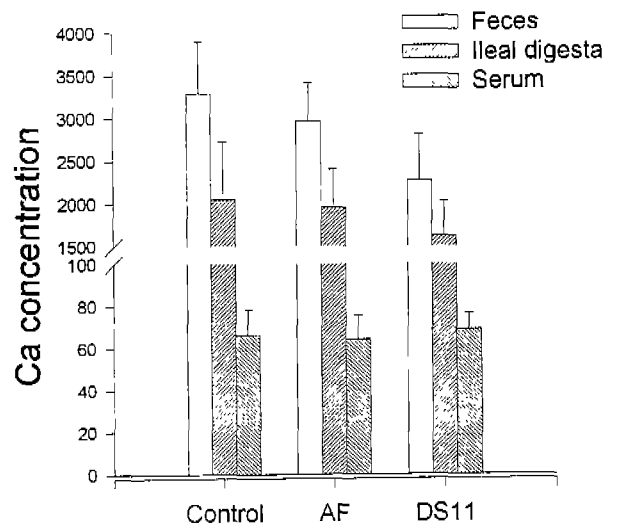
**시료내 인 농도 측정 결과**

대조군, AF phytase 투여군 그리고 DS11 phytase 투여군의 회장 소화물, 분변, 혈액시료 중 인 농도 측정 결과는 Fig 2와 같다. AF phytase 투여군 및 DS11 phytase 투여군의 분변 중의 인 농도는 투여 전의 그것과 비교할 때, 10% 및 17% 감소하였으며, 회장내용물 중의 인 농도는 각각 16% 및 25% 감소됨으로써 두 종류의 phytase 모두 인 배출 감소 효과가 인정되었다. AF phytase 투여군 및 DS11 phytase 투여군의 혈청 중 인 농도에 미치는 효과를 보면 각각 대조군에 비하여 20%와 34% 증가하였으므로 이 두 종의 phytase 모두 혈청에서 통계학적으로 유의한 인 함량을 증가시키는 효과를 나타냄을 알 수 있었다 (p<0.05).

본 시험에서 DS11 phytase와 AF phytase 모두 인 이용율을 개선시켜 혈청 중 인 농도를 증가시키고 분변중 인 농도를 감소시켰는데, Lei 등<sup>9</sup>이 phytase 첨가시 인 이용율은



**Fig 2.** Phosphorous concentration (µg/ml) of samples obtained from feces, ileal digesta and serum.



**Fig 3.** Calcium concentration (µg/ml) of samples obtained from feces, ileal digesta and serum.

50% 상승되고 배설량이 42%나 감소하였다는 보고와 유사한 결과로 해석되었다.

본 시험은 단기에 걸쳐 시행되었기 때문에 phytase의 증체 효과에 대한 효과를 검토하지 않았지만, Young등<sup>6</sup>이 평균체중이 10~21 kg 되는 5주령 자돈에 phytase를 사료에 첨가하여 급여할 때 증체 및 사료효율의 개선을 보고한 것과, Cromwell 등<sup>5</sup>이 NRC인 요구량보다 40% 감소시켜 급여하더라도 phytase를 투여할 경우 증체율과 골 강도의 감소가 일어나지 않았다고 보고한 사실 등을 종합할 때 DS11 phytase도 증체 효과가 있을 것으로 기대된다.

**시료내 칼슘 농도 측정 결과**

대조군, AF phytase 투여군 그리고 DS11 phytase 투여군의 회장소화물, 분변, 혈액시료중 칼슘농도 측정 결과는 Fig 3과 같다. 분변 중 칼슘농도는 DS11 phytase 투여군과 AF phytase 투여군에서 31%와 10% 감소한 결과를 나타내었다. 회장 소화물 중의 칼슘 함량의 변화는 AF phytase 투여군에서는 5% 감소한 것으로 나타났고 DS11 phytase 투여군에서는 21% 감소 경향을 보였다. 혈장 중의 칼슘 농도는 AF phytase 투여군은 대조군에 비하여 칼슘 함량의 3% 감소를 나타내었으며 DS11 phytase 투여군에서는 4% 증가를 나타내었다. 시험사료 제조시 칼슘 및 인을 첨가하지 않았음을 고려할 때 이러한 변화는 phytase가 사료 중에 포함되어 있는 칼슘의 이용율을 증가시켰다는 것으로 해석할 수 있었고, 또 혈액 중 칼슘농도가 크게 변화되지 않았다는 사실은 생체의 칼슘대사 항상성에 의해 적절한 체내 칼슘농도가 유지되었음을 반영하고 있다고 사료되었다. Phytase의 칼슘이용율 개선효과는 Lei 등<sup>9</sup>에 의해 보고된 바 있다. 한편 phytase가 인 및 칼슘 이외의 다른 생체내 주요 이온인 마그네슘, 구리, 철, 아연 등의 이용율도 개선시키는 것으로 알려져 있는데<sup>11</sup>, 본 시험물질인 DS11 phytase도 이러한 효

과가 있을 것으로 생각되어 추후 이에 대한 시험이 기대된다.

## 결 론

본 시험에서는 새로운 DS11 phytase와 AF phytase의 효능을 검증하기 위하여 cannula가 장착된 돼지에서 무기인 및 칼슘을 첨가하지 않은 사료에 이들 phytase를 첨가하였을 때 혈중 인 및 칼슘농도의 변화를 분변, 회장내용물 및 혈장에서 측정하였다. 그 결과 돼지 사료첨가시의 DS11 phytase와 AF phytase는 회장내용물의 인농도가 대조군과 비교시 각각 25%와 16% 감소하였고, 분변중 인농도는 17%와 10% 감소하였으며, 혈청중 인 농도는 34%와 20%가 증가한 것으로 나타났다. 칼슘농도의 측정 결과에서는 DS11 phytase와 AF phytase 투여군을 대조군과 비교할 때 분변 중 칼슘 농도는 각각 31%와 10% 감소한 결과와 혈청 중의 칼슘 농도 또한 DS11 phytase에서는 4% 증가와 AF phytase 투여군에서는 3% 감소한 결과를 보여주었다.

## 참 고 문 헌

1. Cho SB, Kim JH, Yang JS, Moon HK, Chae BJ, Han IK. Apparent digestibility of amino acids, energy and proximate nutrients in grain sources and tapioca for young pigs. *Asian-Australasian J Anim Sci*. 1997; 10: 635-642.
2. Cole, DJA. Pig Production: managing maximum feed efficiency with minimum pollution. In: *Biotechnology in Feed Industry*, 1st ed. New York. 1998: 43-56.
3. Cromwel GL, Stahly TS, Coffey RD, Monegue HJ, Randolph JH. Efficacy of phytase in improving the bioavailability of phosphorous in soybean meal and corn-soybean meal diets for pigs. *J Anim Sci* 1993; 71: 1831-1840.
4. Cromwell GL, Stahly TS, Coffey RD, Monegue HJ, Randolph JH. Efficacy of phytase in improving the bioavailability of phosphorous in soybean meal and corn-soybean meal diets for pigs. *J Anim Sci* 1993; 71: 1831-1840.
5. Fiske CH, Subbarow YP. The colorimetric determination of phosphorus. *J Bio Chem* 1925; 68: 375-379.
6. Irving GCI. Phytate. In: *Inositol phosphate*. 2th ed. Amsterdam. 1998; 85-127, 1980.
7. Ketaren PP, Batterham ES, Dettmann EB, Farrell DJ. Phosphorus studies in pigs. 3. Effect of phytase supplementation on the digestibility and availability of phosphorus in soya-bean meal for grower pigs. *Brit J Nutr* 1993; 70: 289-311, 1993.
8. Kim YO, Lee JK, Kim HK, Yu JH, Oh TK. Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 162: 185-91.
9. Lei XG, Ku PK, Miller ER, Yokoyama MT. Supplementing corn-soybean meal diets with microbial phytase linearly improves phytate phosphorus utilization by weanling pigs. *J Anim Sci* 1993; 71: 3359-3367.
10. Morz Z, Jongbloed AW, Kemme PA. Apparent digestibility and retention of nutrients bound to phytate complexes as influenced by microbial phytase and feeding regimen in pig. *J Anim Sci* 1994; 72: 126-132.
11. Nasi M. Microbial phytase supplementation for improving availability of plant phosphorus in the diet of the growing pigs. *J Agri Sci Finl* 1990; 62: 435-442.
12. Pettigrew JE. Pig and poultry: waste management and pollution control. In: *Biotechnology in Feed Industry*, 1st ed. New York. 1998: 165-170.
13. Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe, DK. Phytates in legumens and cereals., *Advances in food Research*, 1982; 28: 1-92.
14. Young LG, Leunissen M, Atkinson JL. Addition of microbial phytase to diets of young pigs. *J Anim Sci* 1993; 71: 2147-2150.
15. 권 관, Phytase가 단위기축의 성장능력 및 인의 이용성에 미치는 영향, 서울대학교 대학원 박사학위논문, 1995.
16. 권관, 권찬호, 정홍우, 유문일, 손광수, 현영, 박승춘. 미생물 phytase의 첨가 육성돈과 비육돈의 성장에 미치는 효과, *한국축산학회지* 1999; 40: 645-654.
17. 장범수, 윤효인, 박승춘, 김민규, 최양용, 오태광. *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 phytase의 육계 위장관에서 인 농도에 미치는 효과, *한국수의공중보건학회지* 1999; 23: 45-52.