

## Acid Phytase를 생산하는 *Pseudomonas fragi*의 분리와 phytase의 생산조건

김영진<sup>1</sup> · 장은석 · 인만진<sup>2</sup> · 오남순\*

<sup>1</sup>맥길대학교 도시공학 및 응용공학과, <sup>2</sup>청운대학교 식품영양학과, 공주대학교 식품공학과 및 식품과학연구소

(2003년 8월 27일 접수, 2003년 9월 24일 수리)

축산폐수가 방류되는 단위동물 밀집사육장 인근의 하천수로부터 phytase를 생산하는 세균들 중 활성이 가장 우수한 균주를 분리하여, *Pseudomonas fragi* Y9451로 동정, 명명하였다. 탄소원으로 fructose를 첨가할 경우에 phytase의 생산능이 가장 우수하였고, 배지에 7% 첨가할 경우에 72시간 배양 후 효소활성이 1,078 mU/ml로 최대의 phytase 생산능을 보였다. 또한, 질소원으로는 nutrient broth(NB)가 적합하였으며, NB를 3%의 농도로 첨가할 경우에 96시간 배양 후 효소활성이 1,425 mU/ml까지 향상되었다. 인산원인 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, phytate는 첨가 농도가 높을수록 phytase 생산은 억제되었으며, 무기염으로 MgSO<sub>4</sub>와 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하는 경우는 첨가농도와 상관없이 phytase의 생산을 현저히 억제하였다. 산업생산을 목적으로 하는 scale-up에 있어서의 통기교반 효과는 phytase의 생산량에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

**Key words:** *Pseudomonas fragi*, phytase, phytate

### 서 론

Phytate(myo-inositol hexakisphosphate)는 inositol에 6개의 인산기가 결합하고 있는 구조를 가지며, 주로 곡물류의 외피 층에 존재한다. Phytate는 소화계에서 Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, 그리고 Fe<sup>2+</sup>와 같은 영양적으로 중요한 다가의 금속과 킬레이트를 형성함으로써 무기질의 체내 흡수를 저해시키는 항영양인자로 작용하고<sup>1,2</sup>, protein-phytate와 같은 복합체를 형성하기 때문에 단백질의 용해도를 감소시켜 단백질 분해효소의 작용을 저해하고 단백질의 체내 흡수를 감소시키는 것<sup>3</sup>으로 알려져 있다. 한편, 돼지, 닭 등 단위동물(monogastric animal)의 소화관에는 phytate를 분해할 수 있는 효소의 활성이 미미하므로 곡물사료 중에 함유되어 있는 phytate는 분해되지 않고 대부분 체외로 배설된다. 배설된 phytate는 지하수 또는 빗물에 의해 하천이나 강으로 유입되며, 부영양화를 촉발시키는 환경오염의 원인을 제공하기도 한다<sup>4</sup>. 그러므로 사료에는 무기태의 인산이나 phytate를 분해할 수 있는 효소를 첨가하는 것이 필요하다. 이와 같은 농산 곡물에 함유되어 있는 phytate의 제거는 대상 곡물을 침지, autoclaving, 발아 등과 같은 방법<sup>5</sup>을 통하거나, 발효 또는 효소를 이용한 생물학적 방법<sup>6,7</sup>으로 이루어지며, 식품과 사료공업에서는 효소를 이용한 phytate 제거법이 효과적으로 사용되고 있다.<sup>8</sup> Phytase(myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase)는 phytate를 myo-inositol과 유리인산으로 가수분해하는 phosphatase로 식물과 미생물에서 발견되고 있으며, 미생물 기원의 phytase에 관한 많은 연구들이 보고되어 있다.<sup>9-25</sup> 특히, 자연계에 분포된 phytase 중에서 산성 pH에서 최적반응조건을 보이며 pH 안정성

이 우수한 phytase는 단위동물 소화관의 pH 조건에서 높은 활성을 유지할 수 있으므로 사료와 혼용하여 사용하는 경우 실용성이 크게 향상된다. 그러므로 acid phytase를 생산하는 미생물을 선별하거나, 기존 효소의 최적 pH조건을 산성영역으로 변화시키려는 연구가 진행되고 있다.<sup>26</sup>

본 연구에서는 단위동물 밀집 사육지역 하천의 미생물의 분포를 조사하는 과정에서 분리된 미생물 중 phytase 생산능이 우수한 균주를 동정하였으며, 분리균주가 갖는 phytase 생산특성에 대하여 조사하였다.

### 재료 및 방법

**Phytase 생산균의 분리.** 본 연구에 사용된 균주는 단위동물 밀집 사육지역 인근인 경기도 포천군 영평천 인근의 하천수에서 분리하였다. 균주 분리는 본 하천수 시료를 0.9% 식염수에 희석시킨 다음 phytase 생산균 선별배지인 PSM 평판배지(Ca-phytate 5 g/l, glucose 15 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/l, KCl 0.5 g/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 10 mg/l, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg/l, agar 20 g/l, pH 7.0)에 도말 하였다. 30°C에서 48시간동안 배양 후 콜로니 주위에 투명환이 형성된 균주를 선별하였다. 선별된 균주들을 PSM broth에 접종한 후 30°C에서 48시간동안 진탕 배양한 후 배양 상정액에서 phytase의 활성을 분석하여 효소활성이 가장 우수한 균주를 분리하였다.

**Phytase 생산균의 동정.** 균주의 생화학적 특성은 API 20 NE kit(Biomérieux, France)를 이용하여 조사하였고, 균주의 지방산 조성을 확인하기 위하여 다음과 같은 방법을 수행하였다. 표준 지방산으로는 Calibration standard kit을 사용하였으며, 균주를 Sabouraud's agar 배지를 사용하여 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 균체를 시험관에 취한 다음 saponification, methylation, extraction, washing 과정을 거친 후

\*연락처

Phone: 82-41-330-1485; Fax: 82-41-333-9610

E-mail: nsqh@kongju.ac.kr

NaCl 용액 500  $\mu$ l를 첨가하여 층분리를 하여 gas chromatography로 분석하였으며, MIDI사의 동정 프로그램인 Sherlock(Version 3.10)을 통하여 동정하였다. 또한, 분리균주는 16S rDNA 유전자 단편을 증합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭하기 위해 세균의 16S rDNA 유전자의 염기서열이 각각 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG인 27F와 5'-TACGTACCTTGTTACGACTT인 1492R primer를 사용하였으며, Wizard genomic DNA prep kit(Promega, USA)를 이용하여 DNA 주형을 얻었다. PCR 조건은 2  $\mu$ l template DNA, 2.5  $\mu$ l 27F(10 pmol/ $\mu$ l), 2.5  $\mu$ l 1492R(10 pmol/ $\mu$ l), 4  $\mu$ l dNTPs(2.5 mM each), 10  $\mu$ l 10 $\times$  PCR buffer, 1  $\mu$ l Taq DNA polymerase(4 units/ $\mu$ l, Bioneer, Korea), 78  $\mu$ l 증류수를 넣고 최종 반응 부피를 100  $\mu$ l로 조절하였다. 94°C에서 5분간 반응시킨 다음, 94°C에서 denaturation 1분, 60°C에서 annealing 1분 30초, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하였고, 최종적으로 72°C에서 30분간 extension을 실시하였다. PCR 반응은 minicycler(MJ Research)를 이용하였고, PCR 반응물은 1% agarose gel, TAE buffer(40 mM tris-acetate, 1 mM EDTA)에서 100 V, 30 mA로 40분간 전기영동하였다. EtBr 용액에서 10분간 염색시켜 확인하고, PCR purification kit(Nucleogen Inc.)를 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA를 pGEM-T easy vector(Promega)에 ligation 한 후 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환 시켰다. X-gal 함유 배지에 도말한 후 흰색의 colony를 분리하여 Wizard plus SV miniprep DNA purification system을 이용하여 recombinant 클론을 선별하였다. Sequencing 반응은 PCR법에 기초한 dye-terminator 반응을 이용하였다. 반응액은 template DNA 400 ng, BigDye 1  $\mu$ l (ABI), buffer 2  $\mu$ l, T7 및 SP6 primer를 각각 5 pmol 첨가하여 최종적으로 20  $\mu$ l로 조절하였다. PCR cycle은 95°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분, 50 cycles 수행하였다. PCR 반응물의 정제는 HV filter plate(Millipore)에서 Sephadex G-50-50(Sigma)을 이용하여 dye, 미반응 dNTP, primer와 template를 제거하였다. 염기분석기 투입시료는 PCR 정제시료와 formamide를 1:1로 섞어서 10  $\mu$ l로 만들어 사용하였다. 염기서열은 자동염기분석기(ABI3700, Applied Biosystems Inc., USA)를 사용하여 분석했으며 벡터에 있는 M13 forward, reverse 그리고, 530F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGG), 1100R(5'-GGGTTGCGCTCGTTG) primer등 4곳에서 읽어서 전체 약 1500 bp의 염기서열을 결정하였다. 분석된 염기서열은 Advanced blast program(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 통하여 Genbank database에 등록된 염기서열과 비교하여 동정하였다.

**Phytase 생산균주의 배양.** Phytase 생산을 위한 기본 배지는 16 g nutrient broth(NB), 50 g fructose를 증류수에 첨가하여 1 l로 맞추고 멸균 후의 pH가 7.0이 되도록 0.5 M KOH로 조정 후 121°C에서 10분간 멸균하여 사용하였다. 종균배양은 분리균주를 Tryptone Dextrose Extract 사면배지에서 24시간 배양하여 활성화시킨 후 종균배지(nutrient broth 0.8%)에 1 백금이 접종하여 30°C, 150 rpm에서 12시간동안 진탕 배양하였다. 증균된 종균은 탄소원, 질소원, 인산원, 무기염류 등의 영양원을 달리한 배지에 2%(v/v) 접종하여 30°C, 150 rpm으로 120시간동안 진탕 배양하면서 phytase의 활성을 측정하였다.

**Phytase 활성 측정.** Phytase 활성측정은 Shimizu<sup>9)</sup>의 방법을 변형하여 이용하였다. 미생물 기원의 phytase 활성 측정을 위한 반응용액은 보통 CaCl<sub>2</sub>를 포함하지만, 본 연구의 phytase는 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하는 경우 오히려 효소활성을 저해(미발표 논문)하기 때문에 반응용액에 CaCl<sub>2</sub>를 제외시켰다. 즉, 기질인 Naphytate를 100 mM acetate buffer(pH 4.5)에 용해하여 농도가 2 mM이 되도록 하였으며, 기질용액 0.9 ml에 조효소 0.1 ml을 첨가하고 50°C에서 10분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 1 ml을 첨가하여 효소반응을 정지시켰다. 그후 발색시약 1.5 ml을 첨가하여 10분 발색시킨 후 분광광도계를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하여 활성도를 계산하였다. 발색시약은 5.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 녹여 만든 1.5%(w/v) ammonium molybdate와 증류수에 용해하여 제조한 2.7%(w/v) ferrous sulfate를 4:1로 혼합시켜 제조하였다. 표준시약인 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 각 농도별로 제조한 후 동일한 방법으로 수행하여 얻은 표준곡선의 흡광도와 비교하여 유리된 인산량을 구하였다. Phytase 효소 1 unit는 1분 동안 유리된 1  $\mu$ mole의 phosphorus의 양으로 정의하였다.

## 결과 및 고찰

**Phytase 생산균의 분리과 동정.** 경기도 포천군 영평천 일대는 돼지, 닭 등 단위동물을 집약적으로 사육하는 지역으로 사료에 함유된 phytate가 축산폐수와 함께 토양 또는 하천으로 유입될 가능성이 높으며, 동시에 다양한 phytate 분해 미생물이 분포될 수 있다. 이러한 환경의 하천수를 분리원으로 하여 phytase 생산도가 가장 높은 균주를 선발하고 동정하였다. 우선 시료를 PSM 고체배지에 도말한 후 콜로니 주변에 생기는 투명환의 크기로 phytase 생산능이 우수한 균주를 최종적으로 1주 분리하여 Y9451로 명명하였다. 분리된 Y9451 균주의 형태적 특징과 생화학적 반응 특징은 Table 1과 같으며, arginine dihydrolase, urease에 대해서 양성반응을 보인 반면, 질산염 환원, indole기 생산,  $\beta$ -glucosidase, protease,  $\beta$ -galactosidase, cytochrome oxydase는 음성반응을 보였다. glucose, arabinose, mannose, gluconate, caprate, malate, citrate와 같은 화합물을

**Table 1. Morphological and biochemical characteristics of strain Y9451**

Characteristics	Strain Y9451
Shape	rod
Gram staining	-
Spore formation	-
Nitrate reduction	-
Indole production	-
Arginine dihydrolase	+
Urease	+
$\beta$ -Glucosidase	-
Gelatin hydrolysis	-
$\beta$ -Galactosidase	-
Cytochrome oxidase	-
Utilization of glucose, arabinose, mannose, gluconate, caprate, malate, citrate	+

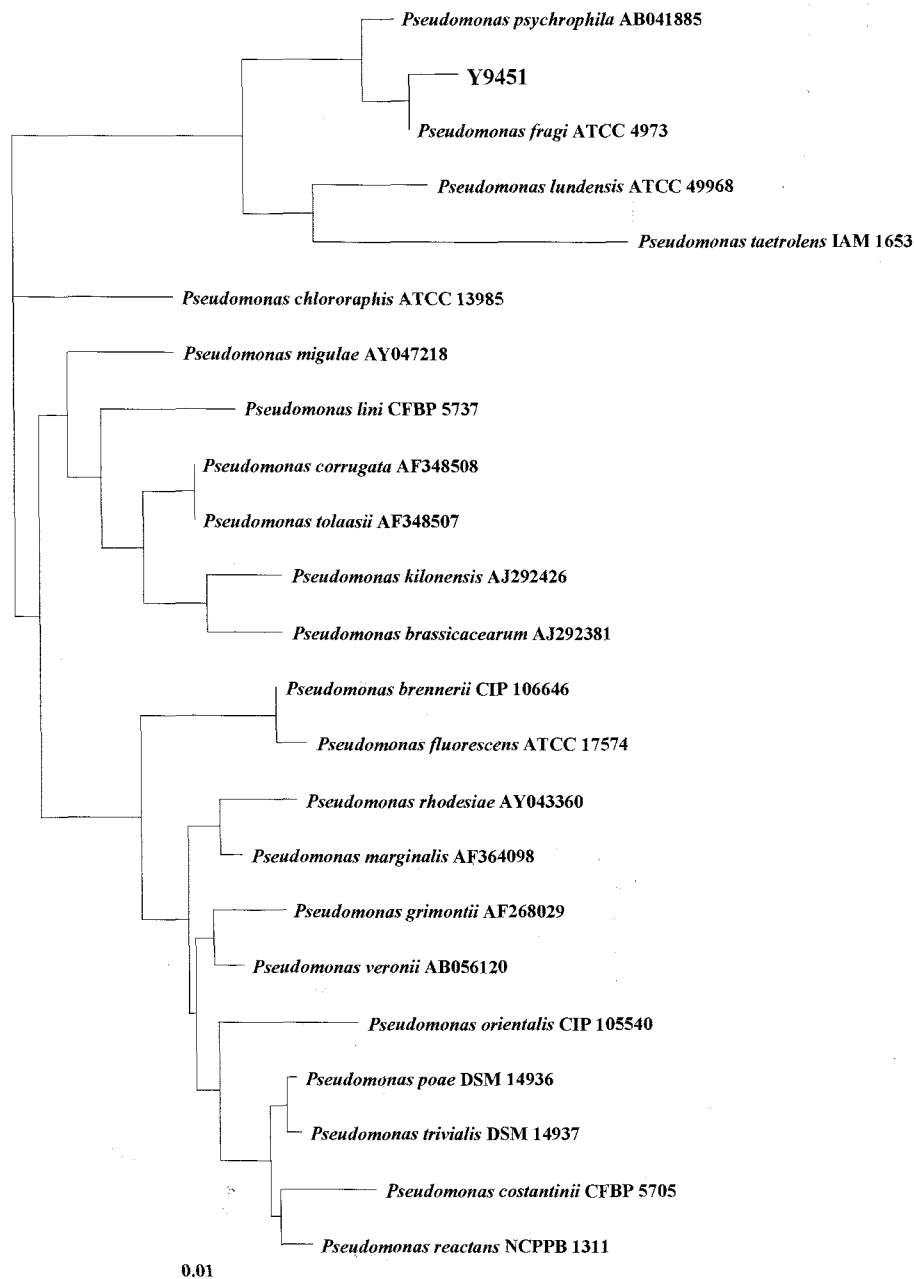
+, positive; -, negative.

**Table 2. Major cellular fatty acids of strain Y9451**

Fatty acids	Content (%)
C10:0 3OH	5.62
C12:0	4.80
C12:0 2OH	6.38
C12:0 3OH	6.82
C16:0	30.75
C17:0 cyclo	19.60
C18:1 w7c	5.46

탄소원으로 이용하였다. Y9451 균주의 세포막을 구성하는 주요 지방산 조성과 함유율(Table 2)을 조사하여 동정의 참고자

료로 활용하였으며, 최종적으로는 rDNA의 염기서열을 분석하여 동정하였다. 분리균주인 Y9451의 genomic DNA를 template로 증폭한 PCR 산물을 cloning하여 염기서열을 결정하고 Blast program을 이용하여 Genbank database에 등록된 16S rDNA 염기서열 정보와 상동성의 검색으로 동정하여 *Pseudomonas fragi*의 16S rDNA 염기서열과 99% 상동성을 보이는 것으로 나타났다. Y9451의 16S rDNA 염기서열을 이용한 phylogenetic tree(Fig. 1)로부터 Y9451은 *Pseudomonas fragi*와 유연관계가 상당히 가깝다는 것을 알 수 있었다. 따라서, phytase를 생산하는 Y9451 균주는 *Pseudomonas fragi*로 동정되었고 *Pseudomonas fragi* Y9451로 명명하여 본 연구의 실험 균주로 사용하였다.



**Fig. 1.** Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the position of *P. fragi* Y9451. The scale bar represents 0.01 substitutions per base position.

Table 3. Comparison of bacterial phytase properties

Strain	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Producing type	Molecular weight	References
<i>Pseudomonas fragi</i> Y9451	4.5	70	extracellular	-	This work
<i>Bacillus subtilis</i> (natto) N-77	6.0-6.5	60	extracellular	36-38 kDa	Shimizu (1992)
<i>Bacillus</i> sp. DS11	7.0	70	extracellular	44 kDa	Kim <i>et al.</i> (1998)
<i>Pseudomonas</i> sp.	5.5	40	extracellular	-	Irving and Cosgrove (1997)
<i>Pseudomonas</i> sp. YH40	7.0	40	extracellular	-	Kim <i>et al.</i> (2002)
<i>Klebsiella</i> sp. No. PG-2	6.0	37	intracellular	112 kDa	Shah and Parekh (1990)
<i>Klebsiella oxytoca</i> MO-3	5.5	55	intracellular	-	Jareonkitmongkol <i>et al.</i> (1997)
<i>Klebsiella terrigena</i>	5.0	58	intracellular	40 kDa	Greiner <i>et al.</i> (1997)
<i>E. coli</i>	4.5	55	intracellular	42 kDa	Greiner <i>et al.</i> (1993)
<i>Enterobacter</i> sp. 4	7.0-7.5	50	extracellular	-	Yoon <i>et al.</i> (1996)

-: No data available.

Table 4. Effect of carbon sources on the phytase production by *P. fragi* Y9451

Carbon sources	Growth <sup>1)</sup> (Abs. at 600 nm)	Activity (mU/ml)	Relative activity (%)
Control	2.600	30	17
Glucose	2.483	20	12
Galactose	2.909	128	74
Fructose	3.036	173	100
Mannose	2.815	57	33
Inositol	2.519	33	19
Sucrose	3.132	98	57
Maltose	2.464	65	38
Lactose	2.455	56	32
Starch	2.509	37	21

<sup>1)</sup>Growth was determined by absorbance at 600nm. Basal medium (as control); 1.6% nutrient broth.

**Phytase의 반응조건.** *P. fragi* Y9451 균주가 생산하는 phytase는 최적 작용 pH는 4.5이었으나, pH 범위가 4.0-6.0에서는 최적 pH의 80% 이상의 활성을 보였으며, 최적 반응온도는 *Pseudomonas* 균주를 대상으로 한 연구<sup>20,22)</sup>들에서 보였던 최적온도인 40°C보다 높은 70°C이었다.<sup>27)</sup> Table 3에서 보는 바와 같이 *P. fragi* Y9451 균주의 phytase는 세포외로 배출하는 다른 세균 기원의 phytase와 비교하여 비교적 산성 영역인 pH 4.5에서 최적 반응조건을 보였다. Kim 등<sup>22)</sup> 연구한 동종 세균인 *Pseudomonas* sp.인 경우 최적반응 pH는 7.0, 온도는 40°C이었으며, Irving과 Cosgrove<sup>20)</sup>의 *Pseudomonas* sp.는 pH 5.5, 온도 40°C에서 최적반응 조건을 보여 본 연구의 실험균주인 *P. fragi* Y9451과는 다른 효소반응 특징을 보였다.

**탄소원의 영향.** 탄소원의 종류 및 첨가농도가 phytase의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 단당류인 glucose, fructose, galactose, mannose, inositol과 이당류인 sucrose, maltose, lactose, 다당류인 starch를 각각 1%가 되도록 phytase 생산배지에 첨가하여 균주의 생육과 phytase의 생산량을 조사하였다(Table 4). Fructose를 첨가한 경우에 효소 생산량이 173 mU/ml로 phytase 생산에 가장 우수한 탄소원이었다. Sucrose는 균주의 생육에는 효과적이었으나, 효소 생산량은 fructose의

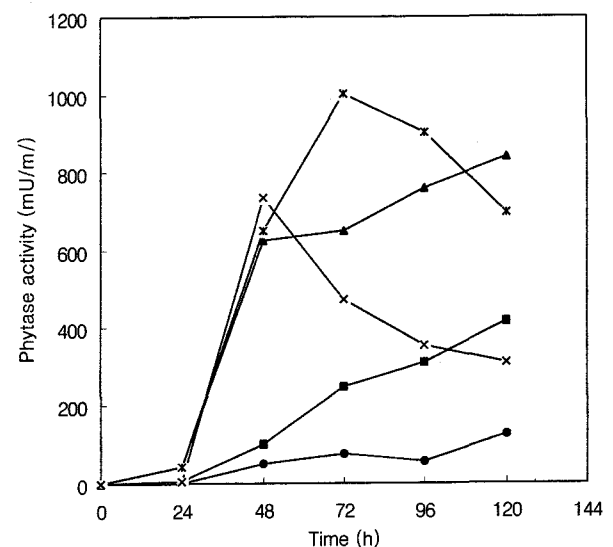


Fig. 2. Effect of fructose concentration on the phytase production by *P. fragi* Y9451. Fructose concentration; 1% (●), 3% (■), 5% (▲), 7% (\*), 10% (×). Basal medium; 1.6% nutrient broth.

57%밖에 되지 않았다. Fructose의 농도에 따른 효소생산은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 fructose 농도에 비례하여 증가하였으며, fructose를 7% 사용한 배지에서 72시간 배양한 결과 효소활성이 1,078 mU/ml까지 증가하였고, 이후 활성이 서서히 감소되는 경향을 보였다. 그러나, fructose를 고농도로 첨가하는 경우에는 균주 생육이 불량(자료 미제시)하였으며, 효소생산도 억제되었다. 이러한 결과는 기질농도가 높은 배지에서 세균을 회분식으로 배양할 때 일어나는 일반적인 현상이며, 곰팡이 기원의 phytase 생산에 관한 연구<sup>12)</sup>에서도 탄소원의 첨가 농도가 높아 질수록 효소생산량은 증가하나, 그 농도가 5% 이상인 경우에는 오히려 생산량이 저하됨을 볼 수 있다.

**질소원의 영향.** 질소원의 종류를 달리하여 균주를 배양한 후 생육도와 phytase 생산량을 조사하였다(Table 5). 질소원으로 nutrient broth(NB)를 사용한 경우가 phytase 생산량이 가장 많았으며, NB배지에 비교하여 beef extract를 사용한 경우는 약 40%, beef extract와 peptone을 혼용한 경우는 48% 정도의 생산량을 보였다. 한편, yeast extract는 균주의 생육에는 효율적

Table 5. Effect of nitrogen sources on the phytase production by *P. fragi* Y9451

Nitrogen sources	Growth (Abs. at 600 nm)	Activity (mU/ml)	Relative activity (%)
1.6% nutrient broth	3.331	1,085	100
1.6% tryptone	3.313	107	10
1.6% peptone	1.533	32	3
1.6% soytone	3.490	13	1
1.6% beef extract	3.302	435	40
1.6% yeast extract	3.884	265	24
1.6% malt extract	0.481	25	2
1.6% soybean flour	0.640	0	0
1.6% casamino acid	1.041	95	9
1.0% peptone+0.6% malt extract	2.551	76	7
1.0% peptone+0.6% yeast extract	3.579	107	10
1.0% peptone+0.6% beef extract	2.736	517	48

Medium; 5% fructose and nitrogen sources.

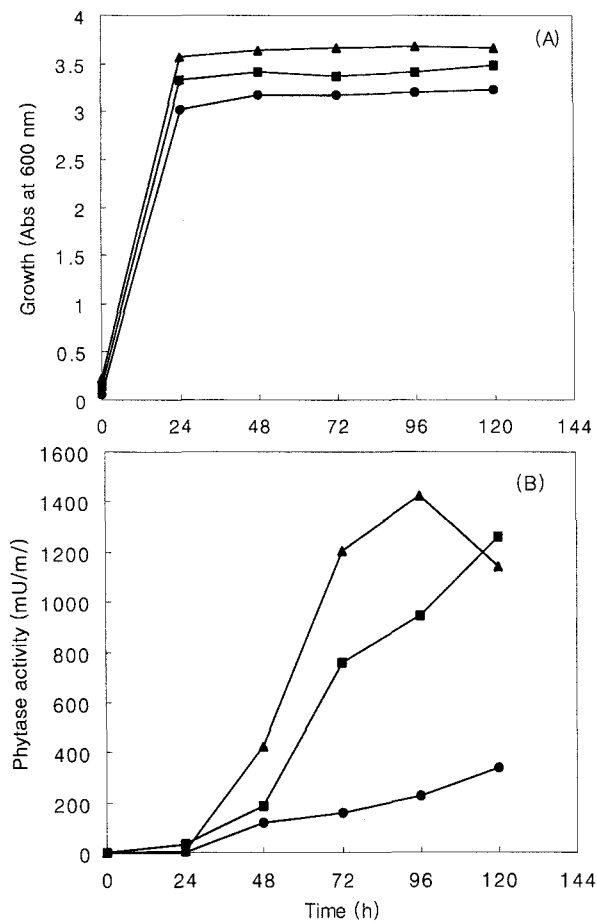


Fig. 3. Effect of nutrient broth (NB) concentration on the growth (A) and phytase production (B) by *P. fragi* Y9451. NB concentration; 1% (●), 2% (■), 3% (▲). Basal medium; 1.6% nutrient broth, 5% fructose.

이었으나, 효소 생산량은 NB배지를 질소원으로 사용한 경우에 비해 24% 밖에 되지 않았다. 그 외의 질소원인 경우는 균주의 생육과 상관없이 phytase의 생산은 거의 이루어지지 않거나 10% 이하의 낮은 생산량을 나타내어, phytase 생산을 위한 질소원으로 NB가 가장 우수한 것으로 판단되었다. NB 첨가농도

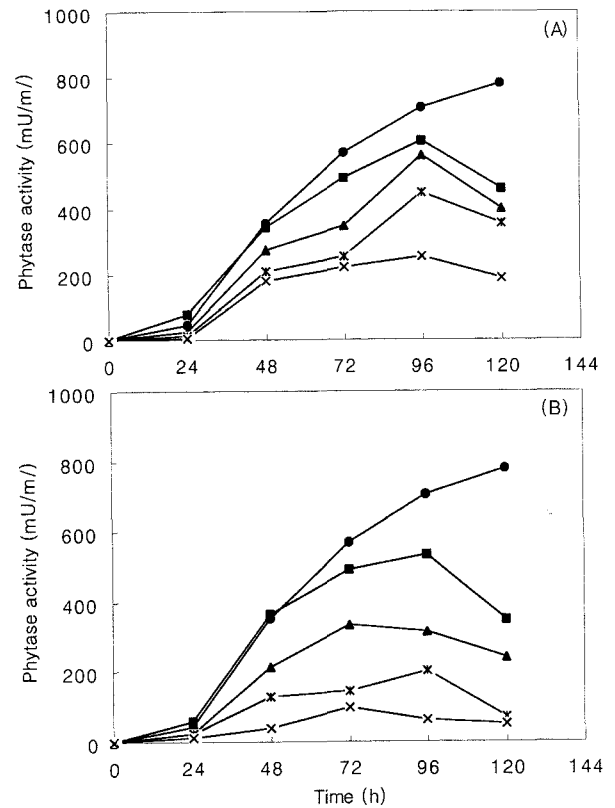


Fig. 4. Effect of concentrations of  $KH_2PO_4$  (A) and phytate (B) as phosphorus sources on the phytase production by *P. fragi* Y9451. Concentrations of  $KH_2PO_4$  and phytate; No treatment (●), 0.01% (■), 0.02% (▲), 0.05% (\*), 0.10% (×). Basal medium; 1.6% nutrient broth, 5% fructose.

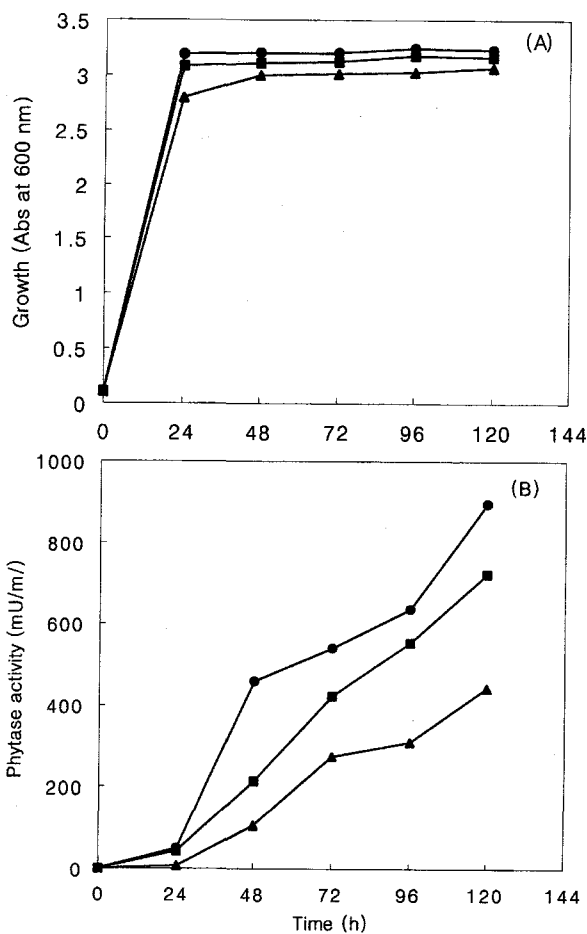
에 따른 phytase 생산을 비교한 결과(Fig. 3), 생육은 배양 24시간 이내에 정지기에 도달하였으며, phytase의 생산은 생육이 정지기에 도달된 24시간 후에 시작되었다. 균주의 생육과 효소의 생산은 NB의 농도에 비례적으로 증가하였으며, NB를 3.0% 사용한 경우에 배양 96시간에서 1,425 mU/ml로 최대의 효소 생산량을 보였고, 이후 효소 활성이 감소하였다.

**인산원의 영향.**  $KH_2PO_4$ 와 phytate를 인산원으로 사용하였으며, 각각의 농도를 0.01-0.10%의 범위로 첨가한 배지에서

**Table 6. Effect of inorganic salts on the phytase production by *P. fragi* Y9451**

Inorganic salts	Growth (Abs. at 600 nm)	Activity (mU/ml)	Relative activity (%)
Control	3.221	1,053	100
0.025% MgSO <sub>4</sub>	3.485	95	9
0.05% MgSO <sub>4</sub>	3.492	76	7
0.1% MgSO <sub>4</sub>	3.511	38	4
0.2% MgSO <sub>4</sub>	3.545	19	2
0.025% CaCl <sub>2</sub>	3.428	101	10
0.05% CaCl <sub>2</sub>	2.902	32	3
0.1% CaCl <sub>2</sub>	3.082	25	2
0.2% CaCl <sub>2</sub>	3.075	19	2

Basal medium(as control); 1.6% nutrient broth, 5% fructose.



**Fig. 5. Effect of working volume as an aeration indicator on the microbial growth (A) and phytase production (B) by *P. fragi* Y9451.** Working volume; 100 ml (●), 200 ml (■), 400 ml (▲).

phytase의 생산에 대한 인산원의 종류와 농도에 따른 영향을 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 또는 phytate의 첨가농도가 높을수록 phytase 생산은 억제되었으며, 인산원을 첨가하지 않은 phytase 생산배지에서 가장 높은 효소생산량을 보였다. 이러한 결과는 배양액 중 인산원의 농도를 증가시킬 경우에 생육은 잘 이루어지나 phytase의 생산은 억제된다는 보

고<sup>11,12,18)</sup>와 유사한 경향을 보였다. 그러나, 본 연구의 사용균주와 동종인 *Pseudomonas* sp.을 이용한 연구<sup>22)</sup>에서는 phytate, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 등의 인산원을 각각 0.5%까지 배지에 첨가한 경우에도 phytase의 생산을 강하게 억제하지는 않았다.

**무기염의 영향.** Phytase 생산배지에 MgSO<sub>4</sub>과 CaCl<sub>2</sub>를 0.025-0.20% 범위의 농도에서 첨가하여 배양한 후 이들 무기염이 phytase 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Table 6에서 보는 바와 같이 무기염을 첨가하지 않은 배지에서의 phytase 생산량에 비하여 MgSO<sub>4</sub>와 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 배지에서는 첨가농도에 관계없이 phytase 생산량이 현저히 줄었다. 한편, *Bacillus subtilis* N-77,<sup>16)</sup> *Bacillus* sp. KHU-10,<sup>18)</sup> *Pseudomonas* sp. YH40<sup>22)</sup> 등을 이용하여 수행된 연구에서 Mg<sup>2+</sup> 또는 Ca<sup>2+</sup>의 첨가가 phytase의 생산을 촉진시킨다는 결과와는 본 연구 결과가 상반된 경향을 보였으나, *Aspergillus* 속<sup>9,10)</sup>곰팡이를 이용하여 phytase를 생산하는 경우, 배지에 무기염을 첨가하면 phytase의 생산이 저해된다는 보고와는 유사한 경향을 보였다.

**배양용량의 영향.** Phytase의 생산에 영향을 미치는 통기교반의 효과는 일정용량의 flask에서 배양용량을 달리하여 조사하였다. 배양배지는 phytase 생산배지를 사용하였으며, 1l 용량의 삼각 진탕 flask에 배지를 각각 100 ml, 200 ml, 400 ml씩 충전한 후 120시간 동안 배양하면서 phytase의 생산량을 측정하였다(Fig. 5). 배양용량이 100 ml인 경우에는 균주의 생육이 가장 양호하였으나, 배양용량에 따른 생육도의 차이는 크지 않았다. 그러나 phytase의 생산량은 배양용량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 이는 일정한 배양용기에서 용량을 달리하여 배양할 경우에 통기 및 교반에 대한 장애가 산소의 공급을 제한시키기 때문이며, 호기성 균주를 대상으로 한 상기 Sumino 등<sup>28)</sup>의 배양용량에 관한 연구결과와 유사한 경향으로 생각할 수 있다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 공주대학교 자원재활용 신소재 연구센터의 지원에 의한 것입니다. 감사드립니다.

### 참고문헌

- Sandberg, A.-S. (1994) Antinutrient effects of phytate. *Ernährung/Nutrition* **18**, 429-432.
- Erdman, J.W. and Poneross-Schneider, A. (1989) Phytic acid interactions with divalent cations in foods and in the gastrointestinal track. *Adv. Exp. Med. Biol.* **249**, 161-171.
- Chang, C. W. (1967) Study of phytase and fluoride effects in germinating corn seeds. *Cereal Chem.* **44**, 129-132.
- Schwarz, G. and Hoppe, P. P. (1992) Phytase enzyme to curb pollution from pigs and poultry. *Feed magazine* 22-26.
- Ahn, B. and Yang, C. B. (1985) Effects of soaking, germination, incubation and autoclaving on phytic acid in seeds. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **17**, 516-521.
- Jung, J. H., Kang, S. G., Kim, Y. S. and Chung, H. J. (1990) Degradation of phytic acid in *Chungkookjang* fermented with phytase producing bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*

- 18, 423-428.
7. Anno, T., Nakanishi, K. and Matsuno R. (1985) Enzymatic elimination of phytate in soybean milk. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **32**, 174-180.
8. Zyta, K. (1992) Mould phytases and their application in the food industry. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 467-472.
9. Howson, S. J. and Davis, R. P. (1983) Production of phytate hydrolyzing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb. Tech.* **5**, 377-382.
10. Ullah, A. H. J. and Cummins, B. J. (1988) *Aspergillus ficuum* extracellular phytase: immobilization on glutaraldehyde activated silicate. *Ann. NY Acad. Sci.* **542**, 102-106.
11. Han, Y. W., Gallagher, D. J. and Wilfred, A. G. (1987) Phytase production by *Aspergillus ficuum* on semisolid substrate. *J. Ind. Microbiol.* **2**, 195-200.
12. Ebune, A., Asheh, A. S. and Duvnjak, Z. (1995) Effects of phosphate, surfactants and glucose on phytase production and hydrolysis of phytic acid in canola meal by *Aspergillus ficuum* during solid-state fermentation. *Bioresource Technol.* **54**, 241-247.
13. Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G. and Galzy, P. (1992) Utilization of phytate by some yeasts. *Biotechnol. Lett.* **14**, 61-66.
14. Sano, K., Fukuhara, H. and Nakamura, Y. (1999) Phytase of the yeast *Arxula adeninivorans*. *Biotechnol. Lett.* **21**, 33-38.
15. Shah, V. and Parekh, L. J. (1990) Phytase from *Klebsiella* sp. No. PG-2: purification and properties. *Indian J. Biochem. Biophys.* **27**, 98-102.
16. Shimizu, M. (1992) Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1266-1269.
17. Kim, Y-O., Kim, H-K., Bae, K-S., Yu, J-H. and Oh, T. K. (1998) Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Tech.* **22**, 2-7.
18. Choi, Y. M., Noh, D. O., Cho, S. H., Lee, H. K., Suh, H-J. and Chung, S-H. (1999) Isolation of a phytase producing *Bacillus* sp. KHU-10 and its phytase production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 223-226.
19. Yoon, S. J., Choi, Y. J., Min, H. K., Cho, K. K., Kim, J. W., Lee, S. C. and Jung, Y. H. (1996) Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb. Tech.* **18**, 449-454.
20. Irving, G. C. J. and Cosgrove, D. J. (1997) Inositol phosphate phosphatase of microbiological origin. some properties of a partially purified bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Aust. J. Biol. Sci.* **24**, 547-557.
21. Richardson, A.E. and Hadobas, P. A. (1997) Soil isolates of *Pseudomonas* sp. that utilize inositol phosphate. *Can. J. Microbiol.* **43**, 509-516.
22. Kim, Y. H., Gwon, M-N., Yang, S-Y., Park, T-K., Kim, C-G., Kim, C-W. and Song, M-D. (2002) Isolation of phytase-producing *Pseudomonas* sp. and optimization of its phytase production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 279-285.
23. Jareonkitmongkol, S., Ohya, M., Watanabe, R., Takagi, H. and Nakamori, S. (1997) Partial purification of phytase from a soil isolate bacterium, *Klebsiella oxytoca* MO-3. *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 393-394.
24. Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U. and Jany, K. D. (1997) Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch. Biochem. Biophys.* **341**, 201-206.
25. Greiner, R., Konietzny, U. and Jany, K. D. (1993) Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 107-113.
26. Tomschy, A., Brugger, R., Lehmann, M., Svendsen, A., Vogel, K., Kostrewa, D., Lassen, S. F., Burger, D., Kronenberger, A., van Loon, A., P., G., M., Pasamontes, L. and Wyss, M. (2002) Engineering of phytase for improved activity at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1907-1913.
27. Jang, E. S. (2003) Production and characterization of phytase from *Pseudomonas fragi* Y9451. MS Thesis, Kongju National University, Kongju, Korea.
28. Sumino, Y., Sonoi, K. and Doi, M. (1993) Scale-up of purine nucleoside fermentation from a shaking flask to a stirred-tank fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 581-585.

---

**Isolation of Phytase Producing *Pseudomonas fragi* and Optimization of its Phytase Production**

Young-Jin Kim<sup>1</sup>, Eun-Seok Jang, Man-Jin In<sup>2</sup> and Nam-Soon Oh\* (<sup>1</sup>*Department of Civil Engineering and Applied Mechanics, McGill University, Montreal, Quebec H3A 2K6, Canada;* <sup>2</sup>*Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongsung 350-701, Korea;* *Department of Food Science and Technology, and Food Science Research Institute, Kongju National University, Yesan 340-802, Korea*)

**Abstract:** A bacterial strain producing a high level of an extracellular phytase was isolated from livestock waste water, identified as a strain of *Pseudomonas fragi* and designated as *Pseudomonas fragi* Y9451. Under the phytase production medium, the activity of phytase reached the highest level after 120 hours of incubation. On the effect of carbon sources on the phytase production, the most favorable carbon source for phytase production was fructose. As for the effect of nitrogen sources, high levels of phytase activity were detected in the medium containing nutrient broth as the nitrogen source. Free  $\text{PO}_4^{3-}$  inhibited phytase production with increasing concentration of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and phytate in the media. The addition of  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgSO}_4$  also resulted in the inhibition of phytase production. To investigate the effect of aeration on the phytase production, different volumes of culture broth in Erlenmeyer flasks were incubated in rotary shaker at the speed of 200 rpm. As a result, a high level of phytase activity was detected at small volume of culture broth as compared to larger volume because of its more aerobic condition.

---

Key words: *Pseudomonas fragi*, phytase, phytate

\*Corresponding Author