

Phytase를 생산하는 *Enterobacter cloacae*의 분리 및 효소 생산의 배지 최적화

김영훈 · 양시용 · 김대영 · 김창원¹ · 정원형¹ · 권문남 · 송민동*
건국대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹건국대학교 동물자원연구센터

Isolation of *Enterobacter Cloacae* Producing Phytase and Medium Optimization of Its Production. Kim, Young-Hoon, Si-Yong Yang, Dae-Young Kim, Chang-Won Kim¹, Won-Hyung Jung¹, Moon-Nam Gwon, and Min-Dong Song*. Division of Life Science, College of Natural Sciences, Konkuk University, Chung-Ju, 380-701, Korea, ¹Animal Resources Research Center, Konkuk University, Seoul, 143-701, Korea - Phytase (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase: EC 3.1.3.8) hydrolyzes phytic acid (*myo*-inositol hexakisphosphate) to *myo*-inositol and monophosphates. In order to obtain phytase producing bacteria, many samples were collected from various soils. Among thirty-five phytase-producing strains, YH100 showed the highest phytase activity. In order to identify the selected YH100 strain, the morphological and physiological characteristics were examined according to the method of Bergey's manual by 16S rRNA sequence, cellular fatty acids profile, G+C contents and physiological test using API 20E kit. The strain YH100 identified to be a genus of *Enterobacter cloacae* and was named as *Enterobacter cloacae* YH100. Optimum medium for the phytase production by the *Enterobacter cloacae* YH100 was composed of 2.0%(w/v) glucose, 1.0%(w/v) peptone, 1.0%(w/v) beef extract, 0.1%(w/v) KCl, and 0.1%(w/v) sodium phytate.

Key words: *Enterobacter cloacae*, Phytase, 16S rRNA, G+C contents

Phytase(*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase)는 phosphatase의 한 종류로 phytic acid(*myo*-inositol hexakisphosphate)를 분해하여 *myo*-inositol과 무기태 인을 형성하게 하는 효소로서 식물, 동물의 장관 및 미생물 등에 존재하는 것으로 알려져 있다[1,2,4,5,8,9,10,11,12].

Phytase는 3-phytase(EC 3.1.3.8), 6-phytase(EC 3.1.3.26) 두 종류로 나누어지는데 이는 phytase가 처음으로 분해하는 인의 위치에 의한 분류이다. 3-phytase는 미생물에서, 6-phytase는 식물에서 보여지고 있다[9,16].

Phytic acid는 모든 식물성 사료원료의 인 저장원으로서 1~3% 가량 함유되어 있으며, 사료원료 내 함유된 총 인 함량의 대부분(60~70%)을 차지한다[10,14]. 반추가축에서는 반추위 내 미생물들에 의해 대부분 분해되어 이용되지만, 단위가축(돼지, 닭, 어류)에 있어서 항 영양인자로 간주되는 데[11,21], 이는 phytic acid가 음전하 성질을 가지므로 칼슘, 아연, 마그네슘, 철 등과 같은 양이온들과 결합하여 불용성 화합물인 chelates 화합물을 형성하고[6,16], 이와 같은 화합물은 장관에서의 무기물 흡수를 방해하여 필수 무기물의 생체 이용률을 감소시킨다. 또한 phytic acid는 산성

pH에서 단백질과 결합하기 쉬워 phytate-protein complexes 를 형성한다. Phytic acid는 결과적으로 단위가축 내에서 단백질과 영양적으로 매우 중요한 무기물질들의 이용성을 감소시킨다[21].

Phytic acid 상태의 인은 단위가축의 장관에서 거의 분해 이용되지 못하고 분변으로 배설되는데 대장에서 일부 분해되어지는 하나 대부분의 인이 소장내에서 흡수되기 때문에 이용되어지지 못한다[13,14]. 또한 인 공급을 위해 별도로 사료에 첨가된 인의 경우도 대부분 과도하게 첨가되어 일부가 분변으로 배설된다. 이렇게 배설된 인은 환경오염의 주요 원인으로 작용, 호수의 부영양화 등을 초래하게 되는데 세계적으로 규모가 커지는 축산업을 고려할 때 심각한 문제점으로 지적되고 있다[5,16].

본 연구는 축사와 하수처리장에서 얻은 토양으로부터 phytase 활성이 우수한 균주를 선발하여 생화학적 test, 16S rRNA 서열 분석, 지방산 분석 등을 통한 균주의 동정 및 phytase 생산을 위한 최적 배양조건을 검토하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선발

Phytase 생산 균주의 분리를 위해 충청북도 월악산 주변, 축사주위의 흙, 하수종말처리장의 물과 흙 등의 시료를 수

*Corresponding author

Tel. 043-840-3621, Fax. 043-851-4169

E-mail: minds@kku.ac.kr

집하였다. 수집한 시료 1g을 0.1%의 Tween 80를 함유한 멸균 생리식염수 9 ml에 희석하여 균질화 시킨 후 멸균 생리식염수를 사용하여 희석하였다. 희석한 시료를 BHI agar에 도말한 후 37°C에서 48시간동안 배양하여 colony를 형성 시킨 후, 각각의 colony를 phytase screening 배지(Table 1)에 streaking하여 37°C에서 배양하여 12시간마다 clear zone 형성 유무와 크기를 관찰하여 높은 phytase 활성(clear zone)을 나타내는 균주를 1차적으로 선별하였다. 1차로 분리된 균주들을 BHI broth 배지에 37°C, 180 rpm으로 24시간 배양한 후 배양상등액의 phytase 활성을 측정하여 활성이 가장 우수한 균주를 최종 선별하였다.

선발 균주의 동정

최종 분리된 균주는 형태적, 생리 및 생화학적 특성을 조사한 후 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 [7] 준하여 동정하였다.

형태학적 특성 - 분리 균주의 크기와 형태는 그람염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 분리균주를 정밀 관찰하기 위하여 주사전자현미경(scanning electron microscope)을 이용하였다. 주사전자현미경 촬영을 위한 시료의 전처리 과정으로 stationary phase에 도달하기 전의 균을 pH 7.0의 0.1 M phosphate buffer saline(PBS)을 사용하여 세척한 후 균체를 회수하였다. 1차 고정으로 단백질을 고정시키기 위해 2.5% glutaraldehyde solution을 첨가하여 1시간 동안 방치시킨 후 원심분리를 하고 PBS로 균체를 세척하였다. 2차 고정으로 지질을 고정시키기 위해 1.0% osmium tetraoxide solution을 첨가한 후 1시간 동안 방치한 다음 원심분리를 하고, 50-100% 알코올을 사용하여 단계적으로 시료로 사용할 균체를 탈수시켰다. Hexamethyl-disilazane을 첨가 20분간 방치시키는 전조과정을 2회 반복한 후 도금단계를 거쳐 8,000배로 확대촬영 하였다.

생리학적 특성 - 분리 균주의 생리적 특성 파악을 위해 API 20E kit(Bio-Merieux, France)를 이용하여 oxidase와 catalase 생산능, gelatin 액화력, indole 생성능, H₂S 생산능, Voges-Proskauer시험, 당발효성 등을 조사하였다.

생화학적 특성 - 분리 균주의 화학적 특성 파악을 위해 DNA 염기조성(G+C mol%), cellular fatty acids profile, 16S rRNA sequence 분석을 실시하였다. DNA 염기조성은 Tamaoka 등의[20] 방법에 따라 정량하였으며, 지방산 분석 및 16S rRNA 분석은 Chun등[3]의 방법에 따라 실시하였다.

균주 성장 및 phytase 활성 측정

분리균주의 성장과 효소활성을 측정하기 위해 BHI broth에 접종하여 37°C, 180 rpm으로 진탕 배양시키면서 6시간 간격으로 균주성장과 phytase 활성을 측정하였다. 균주 성장은 BHI agar를 이용하여 생균수(CFU/ml)를 측정하였다.

Phytase 활성 측정은 배양액을 원심분리한 상등액을 37°C, pH 7.0 조건에서 기질(2.0mM sodium phytate, pH 7.0)과 30분간 반응시킨 후 5% trichloroacetic acid용액으로 반응을 정지시키고, 색갈반응시약(1:1:1:2 비율의 6N H₂SO₄, 2.5% ammonium molybdate, 10% ascorbic acid, H₂O)을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응 후, 파장 820 nm에서 흡광도를 측정하여 유리되어지는 무기인의 양을 대조구와 비교 측정하였다. 1 unit는 1분간 1 μM의 무기태인을 유리시키는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

Phytase 생산을 위한 배지 최적화

Phytase 생산을 위한 배지 최적화를 위해 glucose 2.0%, peptone 1.0%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, sodium phytate 0.1%를 기본배지로 하여 탄소원, 질소원, 무기물의 조성을 달리하여 37°C, 180rpm으로 배양하여 균주가 가장 높은 활성을 나타내는 36시간에 각 영양소에 따른 효소활성을 가장 높은 활성을 100으로 하여 상대적으로 비교 측정하였다. 이때 사용한 탄소원으로 glucose, fructose, mannose, maltose, sucrose, lactose과 soluble starch이고, 질소원으로 pep-tone, malt extract, beef extract, peptone, malt extract, pep-tone과 beef extract이고, inorganic salts로는 CaCl₂, NaCl, KCl, FeSO₄, MnSO₄이었다.

결과 및 고찰

Phytase 생산 균주의 분리

축사 하수처리장에서 채취한 시료를 0.1% Tween 80을 함유한 멸균 생리식염수에 균질하게 희석하여 BHI agar 배지에 도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양하여 일차적으로 240개의 colony를 얻었고, 각 colony를 phytase screening 배지(Table 1)를 이용하여 clear zone을 형성하는 35개의 phytase 생산균을 분리하였다. 35개의 분리 균주를 BHI broth에 접종하여 배양 후 배양 상등액의 효소활성을 측정한 결과 가장 높은 phytase 활성을 나타낸 YH100 균주를 최종 선별하였다.

Table 1. Composition of phytase screening medium

Ingredient	Contents (g/L)
Glucose	15
Phytic acid, calcium salt	5
NH ₄ NO ₃	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
KCl	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.01
Agar	20

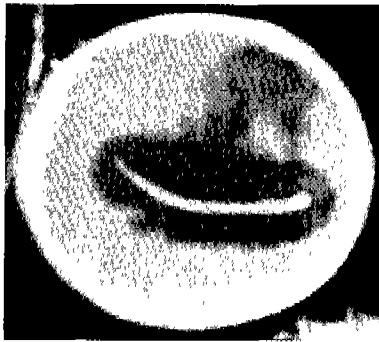


Fig. 1. Phytase activity of strain YH100.

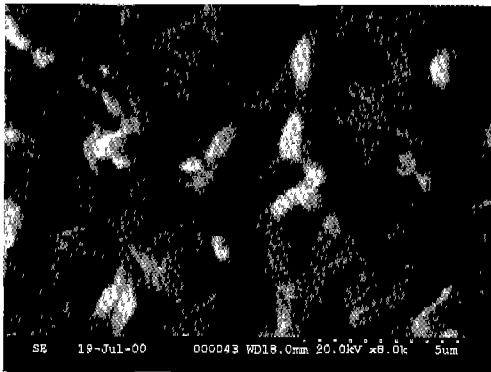


Fig. 2. Scanning electron microscopic observation of strain YH100.

Table 2. Morphological characteristics of the strain YH100

Characteristics	YH100
Gram reaction	-
Cell-shape	rod
Motility	+
Flagella	peritrichous
Size	0.6-1.0 μm wide × 1.5-3.0 μm long
Colony	round form

분리균주의 동정

형태학적 특성 - 분리균주 YH100의 형태학적 특성을 관찰한 결과 그람음성 간균(0.6-1.0 × 1.5-3.0 μm)의 형태이며, 편모는 peritrichous 형을 하고있고 운동성이 관찰되었다 (Table 2, Fig. 2). 또한 colony 형태는 round form이었다.

생리 및 생화학적 특성 - 분리 균주 YH100의 생리 및 생화학적 특성은 Table 3에 나타난 바와 같다. 본 균주는 cytochrome oxidase, nitrate의 환원성, urease, ONPG(β-galactosidase), H₂S, indole 생성, VP 시험은 음성을 나타냈으며, catalase, arginine dihydrolase, ornithine decarboxylase, citrate 이용성, gclatin 엑화력은 양성을 나타냈다. 당의 발효성 시험에서 glucose, mannitol, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose, amygdalin 및 arabinose로부터 산을 생성하였다. 또한 DNA의 염기조성 함량(G+C content)은 50 ± 2%(48-

Table 3. Physiological and biochemical characteristics of the strain YH100

Characteristics	Strain YH100
Cytochrome-oxidase	-
Catalase	+
NO ₂ production	-
Reduction to N ₂ gas	+
ONPG (β-galactosidase)	+
Arginine dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	+
Citrate utilization	+
H ₂ S production	-
Urease	-
Tryptophane deaminase	-
Indole production	-
VP test(Acetoin production)	-
Gelatinase	+
Acid produced from:	
glucose	+
mannitol	+
inositol	-
sorbitol	+
rhamnose	+
sucrose	+
melibiose	+
amygdalin	+
arabinose	+
G+C mol%	50 ± 2%(48-52%)

+: positive, -: negative

Table 4. Major cellular fatty acids of the strain YH100

Fatty acids	%
C12:0	4.40
C14:0	7.06
C15:0	4.00
C14:0 3OH	8.44
C16:1 w7c	13.98
C16:0	25.90
C17:0 cyclo	15.39
C18:1 w7c	13.83

52%)로 나타났다. Holt[7] 등에 의하면 *Enterobacter* sp.의 염기조성 함량은 대부분 50-60%라고 하였으며, Yoon[21] 등이 분리한 *Enterobacter* sp.의 경우 60.95%로서 본 연구의 YH100 균주의 경우 *Enterobacter* sp.의 일반적인 특성을 갖는 것으로 파악된다. 세포내 구성 지방산 함량은 Fig. 3 과 Table 4에 나타난 바와 같이 C16:1 w7c가 가장 높고, C17:0 cyclo, C16:1 w7c, C18:1 w7c 등의 함량이 높았다.

16S rRNA 유전자 분석을 행한 결과 1410 bp.의 염기 서열을 결정하고 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 이를 근

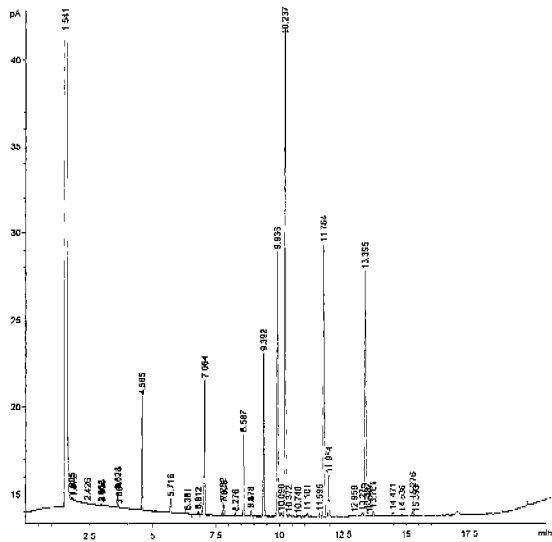


Table 5. Effect of carbon sources on the phytase activity

Carbon Sources	Relative activity (%)
0.5% glucose	22
1.0% glucose	48
1.5% glucose	78
2.0% glucose	100
0.5% fructose	14
1.0% fructose	56
1.5% fructose	37
2.0% fructose	23
1.0% sucrose	18
1.0% mannose	4
1.0% maltose	16
1.0% lactose	12
1.0% soluble starch	20

Cultivation was carried out at 37°C for 36 hour in the medium (pH 7.0) consisting of 2.0% peptonc, 0.01% MgSO₄·7H₂O and 0.1% sodium phytate

Table 6. Effect of nitrogen sources on the phytase activity

Nitrogen Sources	Relative activity (%)
1.0% peptone	18
1.0% malt extract	0
1.0% beef extract	11
2.0% beef extract	13
1.0% peptone + 0.5% malt extract	21
1.0% peptone + 1.0% malt extract	48
1.0% peptone + 0.5% beef extract	64
1.0% peptone + 1.0% beef extract	100

Cultivation was carried out at 37 for 36 hour in the medium (pH 7.0) consisting of 2.0% glucose, 0.01% MgSO₄·7H₂O and 0.1% sodium phytate.

Table 7. Effect of inorganic sources on the phytase activity

Inorganic Sources	Relative activity (%)
None	64
0.05% CaCl ₂	67
0.10% CaCl ₂	82
0.05% NaCl	32
0.10% NaCl	27
0.05% KCl	75
0.10% KCl	100
0.05% FeSO ₄	32
0.10% FeSO ₄	37
0.05% MnSO ₄	0
0.10% MnSO ₄	0

Cultivation was carried out at 37°C for 36 hour in the medium (pH 7.0) consisting of 2.0% glucose, 1.0% peptone, 1.0% beef extract, 0.01% MgSO₄·7H₂O and 0.1% sodium phytate

여 주었을 때 가장 높은 phytase 활성을 나타냈었다. 배지 최적화를 통하여 *Enterbacter cloacae* YH100의 phytase

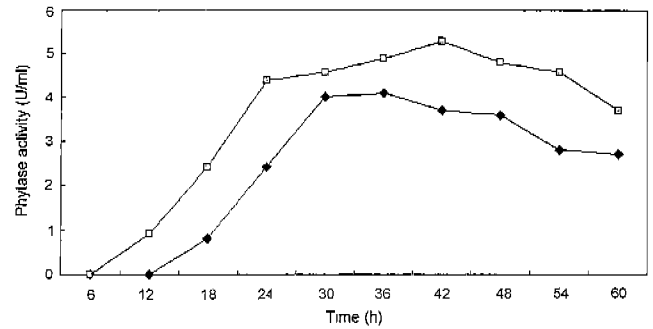


Fig. 7. Time course of enzyme activity of Enterobacter cloacae YH100.

◆: BHI medium, ■: optimal medium (2.0% glucose, 1.0% peptone, 1.0% beef extract, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 0.1% sodium phytate and 0.1% KCl).

생산을 위한 최적 효소생산 배지조건을 glucose 2.0%, peptone 1.0%, beef extract 1.0%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, sodium phytate 0.1%, KCl 0.1%이라는 것을 확립하였다. 새로운 조건의 액상배지에 *Enterbacter cloacae* YH100을 배양하여 시간별 효소활성을 측정된 결과 BHI 배지에 배양할 때보다 약 20% 정도 효소활성이 증가하였다(Fig. 7).

요 약

본 연구는 phytic acid를 myo-inositol과 무기태인으로 분해시키는 효소인 phytase 생산균주의 분리 및 효소생산의 배지최적화에 관한 것이다. 1차로 calcium phytate를 기질로 함유한 phytase screening 배지를 이용하여 phytase 생산을 나타내는 균주 35가지를 이용하여 분리한 후, sodium phytate를 기질로 하여 재현성 있는 phytase 활성을 나타내는 균주 12가지를 선발하였다.

12개의 균주 중 BHI broth에서 배양한 조효소액의 phytase 활성이 가장 우수한 것으로 나타난 YH100을 선발하여 주사현미경 관찰, 16S rRNA sequence 분석, GC content(mol%) 조성, 지방산 분석, API 20E kit를 이용한 test 결과 *Enterobacter cloacae*로 동정되어, 이 균주를 *Enterobacter cloacae* YH100이라 명명하였다. *Enterobacter cloacae* YH100에 의한 phytase 생산을 위한 최적 배지 조성을 파악한 결과 glucose 2.0%(w/v), peptone 1.0%(w/v), beef extract 1.0%(w/v), KCl 0.1%(w/v), sodium phytate 0.1%(w/v)로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 1999년도 전국대학교 학술진흥 연구비 지원에 의하여 수행된 결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Anagnostopoulous, C. and A. Lino. 1958. Unspecific phospho transferase activity and phytase activity in the grains of wheat and in *Escherichia coli*. *Bull. Soc. Chem. Biol.* **40**: 1045–1057.
2. Bartnick, M. and J. Szafranska. 1987. Change in phytate content and phytase during the germination of some cereals. *J. Cereal Sci.* **5**:23–28.
3. Chun, J. Y., I. H. Ryu, S. U. Lee, and K. S. Lee. 2000. Isolation and identification of novel alkalophilic *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827 with anticaries microbe *Streptococcus mutans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 243–250.
4. Erdman, J. W. 1979. Oilseed phytates: Nutritional implications. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **56**: 736–741.
5. Gibson, D. M. and A. H. J. Ullah. 1988. Purification and characterization of phytase from cotyledons of germination soybean seed. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**: 503.
6. Graf, E. 1983. Calcium binding to phytic acid. *J. Agric. Food Chem.* **31**: 851–855.
7. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD: 9th ed.
8. Howson, S. J. and R. P. Davis. 1983 Production of phytate hydrolyzing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **5**: 377–382.
9. Kim, Y. O., H. K. Kim, K. S. Bae, J. H. Yu, and T. K. Oh. 1998. Purification and properties of thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Technol.* **22**: 2–7.
10. Laboure, A. M., J. Gangnon, and A. M. Lescure. 1993. Purification and characterization of a phytase (*myo*-inositol-hexakisphosphate phospho-hydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochem. J.* **295**: 413–419.
11. Lantzsch, H. J., S. Wist, and W. Drochner. 1995. The effect of dietary calcium on th efficacy of microbial phytase in rations for growing pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **73**: 192–195.
12. Lolas, G. M., and P. Markakis. 1977. Phytase of navy beans. *J. Food Sci.* **42**: 1094–1097.
13. Nelson, T. S., T. R. Shieh, R. J. Wodzinsky, and J. H. Ware. 1971. Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *J. Nutr.* **101**: 1289–1294.
14. Pasamontes, L., M. Haiker, W. Markus, and T. Michel. 1997. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1696–1700.
15. Powar, V. K. and V. Jagannathan. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriology.* **151**: 1102–1108.
16. Reddy, N. R., S. K. Sathe, and D. K. Saluckhe. 1982. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* **28**: 1–92.
17. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406–425.
18. Shieh, T. R., R. J. Wodzinski, and J. H. Ware. 1969. Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. *J. Bacteriology.* **100**: 1161–1165.
19. Singh, B. and N. R. Reddy. 1977. Phytic acid and mineral composition of triticales. *J. Food Sci.* **42**: 1077–1083.
20. Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**: 125–128
21. Taylor, T. G. 1966. The availability of the calcium and phosphorus of plant material for animals. *Proc. Nutr. Soc.* **24**: 105–112.
22. Yoon, S. J., Y. J. Choi, H. K. Min, K. K. Cho, J. W. Kim, S. C. Lee, and Y. H. Jung. 1996. Isolation and identification of phytase producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4 and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 449–454.
23. Ullah, A. H. J. and B. J. Cummins. 1988. *Aspergillus ficuum* extracellular phytase: immobilization on glutaraldehyde activated silicate. *Ann. NY Acad. Sci.* **542**: 102–106.

(Received Jan. 20, 2001/Accepted Mar. 12, 2001)