

Escherichia coli WC7가 생산하는 Phytase의 효소특성과 그 유전자의 클로닝

최원찬 · 오병철 · 김형권 · 강선철¹ · 오태광*

한국생명공학연구원 미생물유전체 연구실, ¹대구대학교 공과대학 생물공학과

Characterization and Cloning of a Phytase from *Escherichia coli* WC7. Choi, Won-Chan, Byung-chul Oh, Hyung-Kwoun Kim, Sun-Chul Kang¹, and Tae-Kwang Oh*. *Microbial Genomics Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P. O. Box115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea, ¹Department of Biotechnology, Taegu University, Kyungsan 713-714, Korea* – Phytase from *Escherichia coli* WC7 was purified from cell extracts and its molecular mass was estimated to be 45 kDa by SDS-PAGE. Its optimum temperature and pH for phytate hydrolysis was 60°C and pH 5.0, respectively. The enzyme was stable up to 60°C and over broad pH range (pH 2-12). The enzyme had higher affinity for sodium phytate than *p*-nitrophenylphosphate (*p*NPP). That is, the apparent *K_m* value for sodium phytate and *p*NPP were 0.15 ± 0.02 mM and 2.82 ± 0.05 mM, respectively. The gene encoding the phytase was cloned in *E. coli* XL1-Blue. Sequence analysis showed an open reading frame of 1241 bp encoding a signal peptide (22 aa) and a mature enzyme (410 aa). WC7 phytase was expressed up to 17.5 U/ml in the transformed *E. coli* XL1-Blue/pUEP, which was 23-fold higher than the activity from wild strain.

Key words: Phytase, Histidine acid phosphatase, Phytate, *Escherichia coli*

Phytase(myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase)는 phosphatase의 한 종류로서 phytic acid를 분해하여 phosphate와 phosphate inositol 및 inositol을 만드는 효소이다[6,11]. Phytic acid는 가축의 사료로 사용하는 주요 곡물내 인 함량의 50-70%를 차지하는 매우 중요한 유기물질이다. 그러나 닭과 돼지 등의 단위가축은 소화관내에 phytic acid를 분해하는 phytase를 생산하지 못하며, 그로 인해 사료내 인의 이용률이 극히 낮은 것으로 밝혀졌다. 그리고 소화 흡수되지 못한 phytic acid는 상수원 등에 유입되어 소호수의 녹조, 바다의 적조현상을 유발하는 중요한 환경오염원으로 작용한다. 또한, phytic acid는 단위동물에 중요한 미량의 광물질(Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺), 아미노산, 비타민 등과 결합함으로써 이들 영양분의 동물체내로의 흡수를 막고 분뇨로 배출되게 한다. 이것도 또한 상수원에 유입되어 유해 미생물, 녹조 및 적조 등의 증식을 가속화하여 심각한 환경오염을 유발시킨다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 phytase를 사료 내에 첨가하여 단위동물에 급여하는 방법이 개발되고 있다. 이와 같이 phytase가 첨가된 사료를 사용함으로써 단위 동물이 사료내의 불용성 인을 이용할 수 있게 되고 그 결과로, 사료 중에 첨가하는 무기태인의 투여 양을 감소시킴으로써 경제적인 이익을 얻게 된다. 동시에 중요한 미량 생체활성물질의 이용성을 증

진시키며, 동물 분으로 배출되는 인의 함량을 감소 시킴으로써 환경오염을 방지하게 된다.

Phytase는 최적 작용 pH에 따라서 acid phytase와 alkaline phytase로 구분된다[9]. 지금까지 histidine acid phosphatase로 알려진 대부분의 효소들이 acid phytase와 동일한 효소기작을 갖는 것으로 밝혀지면서 phytase 효소그룹에 포함되었다. Acid phytase는 다시 그 작용 기작에 따라 3-phytase(EC 3.1.3.8)와 6-phytase(EC 3.1.3.26) 두 종류로 나누어지며 이는 phytase가 phytate의 인산 그룹 중 처음으로 분해하는 인의 위치에 의한 분류로 각각 미생물과 식물에서 주로 보고 되었다[5,6,10]. 이들 acid phytase 유전자가 암호화하고 있는 아미노산서열에 따르면 대부분의 phytase 단백질의 N-terminal 부위에는 RHGX₂RXP active site motif를 함유하고 있다[17].

본 연구는 국내 토양으로부터 phytase활성이 우수한 균주를 선발하여 동정하고 phytase효소를 분리 정제하여 그 특성을 살펴보았다. 또한 분리 정제된 효소의 N-terminal 아미노산 분석을 통해 분리된 효소가 *E. coli* acid phosphatase인 것으로 추측하였으며 이 유전자를 PCR로 클로닝하여 분석하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

Phytase 활성이 있는 균주를 탐색하기 위하여, 전국 각지의 토양 시료 1 g을 5 ml의 생리 식염수에 현탁하고 일정

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4370, Fax. 82-42-860-4595

E-mail: otk@mail.kribb.re.kr

시간 방치한 다음 상층액 0.1 ml을 1.5% agar을 함유한 PSM 배지(0.5% calcium phytate, 0.5% NH_4NO_3 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% KCl, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)에 도말하여 37°C에서 2일간 배양한 후 자라난 균락 부위에 투명환이 생기는 균주를 phytase 활성을 갖는 균주로 1차 선별하였다. 1차 선별한 균주들을 10 ml의 PSM배지에 접종하여 37°C의 진탕 배양기에서 24시간 배양한 후 배양액을 원심 분리하고 상층액과 균체를 분리한 후, 상층액의 phytase활성과, 균체를 초음파처리하고(20 kHz, 10분) 원심분리하여 세포파쇄물을 제거한 상층액의 phytase 활성을 측정하여 활성이 높은 균주를 최종 선별하였다.

분리 선별한 균의 동정은 형태학적, 생화학적 성질을 검토하여 Bergey's manual of Determinative Bacteriology [8]에 제시되어 있는 방법에 준하여 수행하였다.

Phytase의 분리 및 정제

Escherichia coli WC7 균주를 phytase 생산 배지인 HI 배지(2.5% heart infusion broth, 0.5% glucose, 0.5% yeast extract, pH 5.5, 16 Liter)에 접종하고 37°C에서 24시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 10,000 × g에서 10분간 원심 분리하여 균체를 취하고 50 mM sodium acetate(pH 5.0) 완충액에 현탁하여 초음파로 처리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액을 20-70%(w/v) 황산암모늄 침전을 수행하여 단백질을 회수하였다. 회수한 단백질용액에 1.5 M의 황산암모늄을 첨가하고 Phenyl Sepharose(Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA) 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 황산암모늄의 역농도구배(1.5-0 M)를 통해 용출된 phytase 활성 부분 단백질을 모아 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액에서 DEAE Sepharose(Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA) 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. NaCl 농도구배(0-0.5 M)를 가하여 용출된 phytase 활성부분 단백질을 모아 20 mM sodium acetate(pH 5.5) 완충액에 투석한 후, CM Sepharose(Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA) 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. phytase 활성부분 단백질을 모아 동일한 완충액에서 Resource S(Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA) 컬럼과 Mono S HR5/5 (Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA) 컬럼을 통과시킴으로써 순수한 phytase 단백질을 분리하였다.

Phytase 활성 측정 및 단백질 정량

Phytase의 활성은 Kim[6]등의 방법을 이용하여 무기인의 양을 측정하였다. 일정비율로 희석한 100 μl 의 효소용액에 400 μl 의 기질용액(2 mM sodium phytate in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0)을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 500 μl 의 5% TCA 용액을 가하고 0°C에 10분간 방치하여 반응을 정지시켰다. 대조 표준값을 구하기 위해 효소 용액에 TCA용액을 넣고 효소를 불활성화 시킨 다음 기질

용액을 첨가하여 방치하였다. 효소반응이 정지된 용액에 4 ml의 reagent A (1:1:1:2 ratio of 6 N H_2SO_4 / 2.5% ammonium molybdate/ 10% ascorbic acid/ H_2O)을 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 820 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 효소의 1 unit는 1분 동안에 1 μmole 의 phosphate를 방출시키는 효소량으로 정의하였다. Acid phosphatase의 활성은 *p*-nitrophenylphosphate 용액(25 μmol pNPP, 0.25 M glycine/HCl)을 이용하여 410 nm에서 측정하였다[2,4].

단백질 농도는 Bradford 방법[1]을 이용했다. Bio-Rad사의 protein assay kit를 사용하여 595 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, bovine serum albumin(Sigma Chem. Co.)를 표준 단백질로 사용하였다. 한편 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 단백질을 분리하는 과정에서는 280 nm에서의 흡광도로써 단백질량을 정량하였다.

효소의 일반특성 분석

효소활성 최적온도는 20-70°C 범위에서 10°C 간격으로 효소활성을 측정하였고, 온도를 20°C부터 70°C까지 10°C 간격으로 10분간 가열처리하면서 효소의 잔여 활성을 측정하는 방법을 이용하여 효소의 열안정성을 측정하였다. 효소 활성 최적 pH는 KCl 완충액(pH 2-3), glycine 완충액(pH 3-4), sodium acetate 완충액(pH 4-6), Bis/Tris 완충액(pH 6-8), Tris 완충액(pH 7-9), borate 완충액(pH 9-10) 및 sodium bicarbonate 완충액(pH 10-12)을 사용하여 결정하였다.

아미노말단 서열 분석

정제된 효소에 대해 SDS-PAGE를 수행하고, 젤 상의 단백질을 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane에 옮긴 후, Applied Biosystems model 476A protein/peptide sequencer를 이용하여 단백질 N-말단의 아미노산 서열을 분석하였다.

클로닝 및 염기서열분석

E. coli phytase 유전자를 함유한 DNA 단편을 PCR을 이용하여 증폭하였다. Forward primer로 Pre-EcoRI (5' *agggaattc*acactgttccccttgtg3')를 사용하였고, reverse primer로 Cter-BamHI (5' *agtggatc*cttacaaactgcacgccggtatg3')을 사용하였으며 이들은 *E. coli* pH 2.5 acid phosphatase 유전자(*appA*, GeneBank Accession number 145283) 염기배열을 토대로 합성되었다.

PCR 반응은 *E. coli* WC7 chromosomal DNA 50 ng을 template로 사용하였고, primer는 각각 20 pmol을 사용하였으며 TaKaRa사의 Taq polymerase(TaKaRa Co., Japan)를 사용하였다. 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후, 94°C에서 1분간, 40°C에서 1분간, 72°C에서 3분간의 단계로 30회 반복하여 증폭한 후, 72°C에서 7분간 최종증폭 하였다. PCR산물을 pUC19 벡터에 도입하여 클로닝한 후,

pBluescript SK(+) 벡터를 이용한 subcloning을 통하여 염기서열을 분석하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

토양 샘플에서 미생물 82 균주를 분리한 후 PSM Agar 배지에서 phytase 분해능이 우수한 균주 7 균주를 선별하였으며, 이를 HI 배지에서 액체 배양하여 phytase 활성이 가장 높게 나타난(0.73 U/ml) 균주 WC7를 최종적으로 선

별하였다. 균주 WC7은 그람음성균이고 catalase 양성반응을 나타냈으며, 혐기적 조건에서도 성장할 수 있었다. 그밖의 생화학적 특성을 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 따라서 조사한 결과, *Escherichia coli* 균주의 특성과 일치하였다(Table 1). 이러한 생화학적 특성의 결과로부터 균주 WC7를 *E. coli*로 동정하였으며, 분리된 균주를 *E. coli* WC7로 명명하였다.

E. coli WC7 phytase의 분리 및 정제

E. coli WC7는 intracellular phytase activity를 보였으며 37°C에서 12시간 동안 배양한 1.7 리터의 균체로부터 phytase 효소 분리를 시작하였다. 먼저 초음파를 처리하여 39,100 unit의 조효소액을 조제하고 앞서 언급한대로 황산암모늄 분획침전(20-70%), Phenyl-Sepharose, DEAE-Sepharose, CM-Sepharose, Resource S 그리고 Mono S HR5/5 컬럼 크로마토그래피를 거쳐 순수한 WC7 phytase를 정제하였다(Table 2).

정제효소의 수율은 30%이며 조효소 용액에 비해 약 1,200배 비활성이 증가된 정제된 효소(642 U/mg)를 얻었다. SDS-PAGE를 통해서 정제된 WC7 phytase는 분자량이 45 kDa 단백질을 알게 되었다(Fig. 1). WC7 phytase 단백질의 분자량은 Greiner[4] 등이 보고한 *E. coli* 유래의 phytase(42 kDa)와 Kim[6] 등이 보고한 *Bacillus* 유래의 phytase(44 kDa)의 분자량과 유사하였으나 *Aspergillus terreus* phytase(214 kDa)[18], *A. ficuum* phytase(85-100 kDa)[3] 및 *A. niger* phytase(200 kDa)[13] phytase와는 큰 차이를 보였다.

효소의 일반적인 성질

효소활성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과 Fig. 2 (B)와 같이, 본 효소는 넓은 범위의 pH 구간(pH 2-pH 12)에서도 안정하였고, pH 5.0에서 최적 효소활성을 나타내었다. pH 7.0 이상의 조건에서는 효소활성이 없었으며 이러한 최적효소활성은 *E. coli* phytase[4]와 *A. niger* phytase PhyA[13]와 유사하였다. 또한 효소의 최적온도는 Fig. 2(A)에서와 같이 60°C였다. 현재까지 보고된 phytase의 최적온도는 *Enterobacter* sp.4[19]가 50-60°C, *Bacillus subtilis*(natto) N-77[14]이 60°C, 그리고 fungal phytase[18]가 58°C였다.

Table 1. Biological characteristics of strain WC7

Characteristic	Result
ONPG (β -galactosidase)	+
ADH (arginine dehydrolase)	-
LDC (lysine decarboxylase)	+
ODC (ornithine decarboxylase)	+
CIT (citrate utilization)	-
H ₂ S production	-
Urease production	-
TDA (tryptophan deaminase)	-
IND (indole production)	+
VP reaction	-
GEL (gelatin liquefaction)	-
Acid from glucose	+
mannitol	+
inositol	-
sorbitol	+
rhamnose	+
sucrose	+
melibiose	+
amygdalin	-
arabinose	+
Oxidase	-
Catalase	+

Table 2. Purification summary of phytase from *E. coli* WC7

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Cell extract	77200	39100	0.51	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precip	37200	32000	0.86	1.7	82
Phenyl Sepharose	15000	27700	1.85	3.6	71
DEAE Sepharose	2270	25400	11	11.2	65
CM Sepharose	166	23600	142	280	60
Resource S	87	15500	178	350	40
Mono S HR 5/5	19	12200	642	1260	31

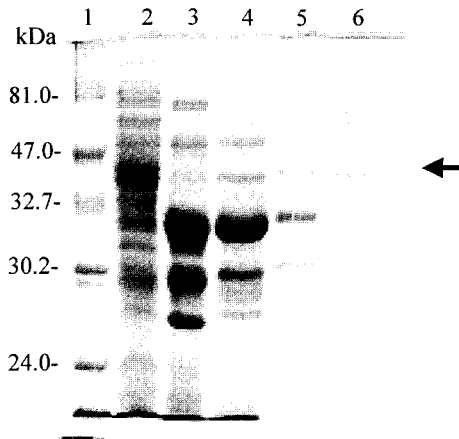


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified phytase from *E.coli* WC7. Lane 1, molecular weight standard including bovine serum albumin (81 kDa), ovalbumin (47 kDa), carbonic anhydrase (32.7 kDa), soybean trypsin inhibitor (30.2 kDa), and lysozyme (24 kDa); lane 2, Phenyl Sepharose CL-4B; lane 3, DEAE-Sepharose CL-6B; lane 4, CM Sepharose CL-6B; lane 5, Resource S; lane 6, Mono S HR 5/5.

한편 정제효소는 55°C까지 안정하였으나 60°C에서 급격한 효소활성의 감소를 보였다. 60°C에서의 잔존활성은 약 30%로 나타났으며, 이 수치는 *Aspergillus* 유래의 phytase의

경우와 유사하였다[3,13,18].

Phytase 효소의 Na-phytate기질에 대한 K_m 값은 Lineweaver-Burk plot을 통해 0.15 ± 0.02 mM로 계산이 되었고 acid phosphatase의 기질인 pNPP에 대한 K_m 값은 2.82 ± 0.05 mM로 나타났다(unpublished data). 이는 *E. coli* acid phosphatase에서 보고된 pNPP에 대한 K_m 값 (2.77 mM)과 유사하였다[15].

NH₂-말단 서열결정

정제된 phytase의 NH₂-말단 아미노산 잔기를 분석한 결과는 Table 2에 나타내었다. 분석한 13개의 아미노산은 기존에 보고된 *E. coli* pH 2.5 acid phosphatase[15]의 것과 일치하였고 *E. coli* phytase P2[4, 12]와는 아미노말단에서 열번째 아미노산인 Ser이 Ala으로 바뀌어져 있었다. 그러나, *Aspergillus* sp.의 phytase[16]의 경우 유사한 효소특성을 보였으나 아미노말단서열에서 많은 차이를 보였으며 *Bacillus* sp.의 DS11 phytase[7]와는 전혀 다른 결과였다.

유전자의 클로닝 및 발현

WC7 phytase의 N말단 13개 아미노산이 *E. coli* pH 2.5 acid phosphatase와 일치하였기 때문에 WC7 phytase 유전자의 클로닝과 발현을 위해 *E. coli* pH 2.5 acid

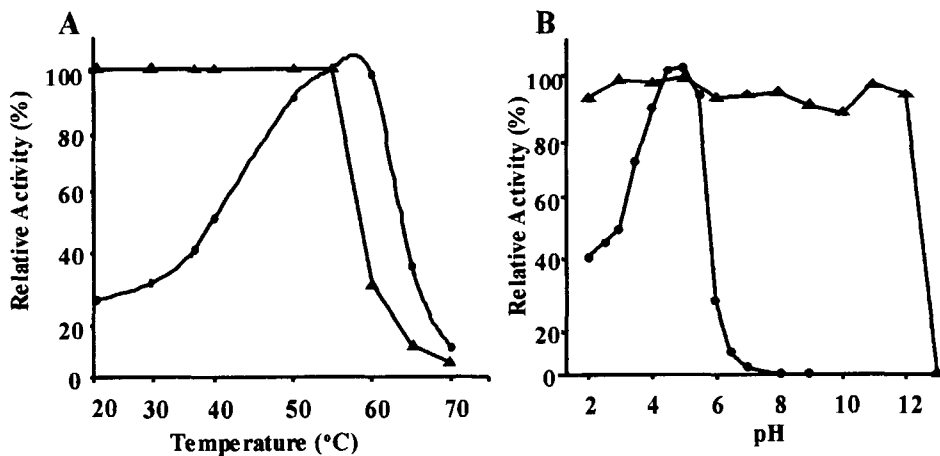


Fig. 2. Effects of pH and temperature on phytase activity (●) and stability (▲). The enzyme was assayed at various pHs and temperatures. For the pH stability, the enzyme was preincubated at various pH buffers for 12 h at 4°C and for the thermal stability, the enzyme was preincubated at various temperatures for 10 min, and the remaining activity was measured at 37, pH 5.0.

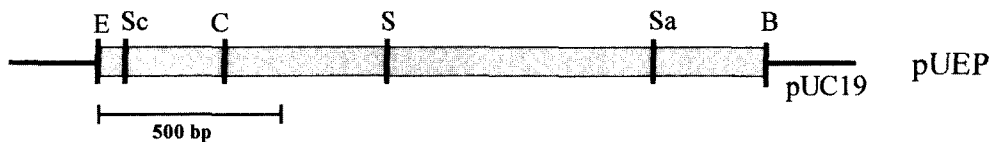


Fig. 3. Restriction map of pUEP containing *E. coli* WC7 acid phytase gene in pUC19. The shaded line (*EcoRI/BamHI*) represents the 1.7 kb PCR-product for WC7 acid phytase. B, *BamHI*; C, *ClaI*; E, *EcoRI*; S, *Sall*; Sa, *Sacl*; Sc, *ScaI*.

Table 3. Comparison of N-terminal amino acid sequences of *E. coli* WC7 phytase with other phytases.

Origin	N-terminal Amino Acid Sequences
This study	Ser-Glu-Pro-Glu-Leu-Lys-Leu-Glu-Ser-Val-Val
<i>E. coli</i> pH 2.5 acid phosphatase	Ser-Glu-Pro-Glu-Leu-Lys-Leu-Glu-Ser-Val-Val
<i>E. coli</i> phytase	Ser-Glu-Pro-Glu-Leu-Lys-Leu-Glu-Ala-Val-Val
DS11 phytase	Ser-Asp-Pro-Tyr-His-Phe-Thr-Val-Asn-Ala-Ala-X-Glu
<i>A. ficuum</i> phytase	Pro-Ala-Ser-Arg-X-Gin-Ser-Ser-Cys-Asp-Thr-Val

Pre-EcoRI
GAATTCACGCTGTTCCCTTTTGTCATGCCGTCAAGCGTGAGTCCGATCTCCAGCCTGACGTTGTTGGGACAGTACTCCAGTCAGCTGACG 90
 CTGAGCATTATGTTGGTAATCGTGCTGATATTTTGGCCATTGTGTGCTTACACTCTCTGGAGTACTACAAAATGTTGGGGCCGATG 180
 ACAACAGAAACTCTCCGCCGTAACGAAACGAGTTGTAAGGAGCAGAAACAATGTTGTTTACTTTGGTTCGTCGGCATTGTTGTTG 270
 ATGTTGTCGCTCTCCACCTTGTGTTGGTATGGCTGGACCCGCTGAAAAGTTAACGAACTAGGCTGATCGCGGCATTAGCATCG 360
 CATCAGGCAATCAATAATGTCAGATATGAAAAGCGGAAACATATCGATGAAAGCGATCTTAATCCCATTTTATCTCTTCTGATCCGTT 450
 M K A I L I P F L S L L I P L 15
 AACCCCGCAATCTGCATTCGCTCAGAGTGAGCCGAGCTGAAGCTGAAAAGTGTGGTATTGTCAGTCGTCATGGTGTGGCTGCTCCAAC 540
 T P Q S A F A Q S E P E L K L E S V V I V S R H G V R A P T 45
 CAAGGCCACGCAACTGATGCAGGATGTACCCAGACGCATGGCAACCCTGGCCGTAACAACTGGGTTGGCTGACACCGCGCGGTGGTGA 630
 K A T Q L M Q D V T P D A W P T W P V K L G W L T P R G G E 75
 GCTAATCGCTATCTCGACATTACCAACGCCAGCGTCTGGTAGCCAGGATTGCTGGCGAAAAGGGCTGCCGCGAGTCTGGTCAGGT 720
 L I A Y L G H Y Q R Q R L V A D G L L A K K G C P Q S G Q V 105
 CGCGATTATTGCTGATGTCGACGAGCGTACCCGTAACAGCGGAAGCCCTTCGCCGCGGGCTGGCACTGACTGTGAATAACCGTACA 810
 A I I A D V D E R T R K T G E A F A A G L A P D C A I T V H 135
 TACCCAGGAGATACGTCAGTCCCGATCCGTTATTTAATCTCTAAAACTGGCGTTTGCCTCACTGGATAACCGGAACGTGACTGACGC 900
 T Q A D T S S P D P L F N P L K T G V C Q L D N A N V T D A 165
 GATCCTCAGCAGGGCAGGAGGTC AATGCTGACTTTACCGGGCATCGGCAACGGCGTTTCGCGAACTGGAACGGGTGCTTAATTTTC 990
 I L S R A G G S I A D F T G H R Q T A F R E L E R V L N F P 195
 GCAATCAAACTTGTGCCTTAAACGTGAGAAACAGGACGAAAGCTGTTCAATTAACGAGGCAATTACATCGAACTCAAGTGAGCGCCGA 1080
 Q S N L C L K R E K Q D E S C S L T Q A L P S E L K V S A D 225
 CAATGTCATTAACCGGTGCGGTAAGCCTCGCATCAATGCTGACGAGATATTTCTCTGCAACAAGCACAGGGAATGCCGGAGCCGG 1170
 N V S L T G A V S L A S M L T E I F L L Q Q A Q G M P E P G 255
 GTGGGAAGGATCACCGATTACACAGTGAACACCTTGCTAAGTTTGATTAACGCGCAATTTTATTGCTACAACGCACGCCAGAGGT 1260
 W G R I T D S H Q W N T L L S L H N A Q F Y L L Q R T P E V 285
 TGCCCGCAGCGCGCCACCCCGTTATTAGATTTGATCAAGACAGCGTTGACGCCCATCCACCGCAAAAACAGCGGTATGGTGTGACATT 1350
 A R S R A T P L L D L I K T A L T P H P P Q K Q A Y G V T L 315
 ACCCACTTCAGTGTGTTTATCGCCGACACGATACTAATCTGGCAAACTCTCGCGGGCGCACTGGAGCTCAACTGGACGCTTCCCGGTCA 1440
 P T S V L F I A G H D T N L A N L G G A L E L N W T L P G Q 345
 GCGGATAACACGCCCGCAGGTGGTGAACGTTGTAACGCTGGCGTGGCTAAGCGATAACAGCCAGTGGATTTCAGTTTCGCTGGT 1530
 P D N T P P G G E L V F E R W R R L S D N S Q W I Q V S L V 375
 CTCCAGACTTTACAGCAGATGCGTGATAAAACCGCGTGTCAATTAACGCGCCCGGAGAGGTGAACTGACCTGGCAGGATGTGA 1620
 F Q T L Q Q M R D K T P L S L N T P P G E V K L T L A G C E 405
 AGAGCGAAATGCGCAGGCATGTTTCGTTGGCAGGTTTACGCAAATCGTGAATGAAGCACGCATACCGGCGTGCAGTTTGTAAATGCAT 1710
 E R N A Q G M C S L A G F T Q I V N E A R I P A C S L * 432

Fig. 4. Nucleotide sequence of the WC7 acid phytase gene and its deduced amino acid sequence. The underlined arrow sequences are the primers used to amplify WC7 phytase gene. The N-terminal amino acid of purified WC7 phytase are underlined. The putative conserved regions related to the enzymatic activity sites are boxed.

phosphatase 유전자 서열을 근거로 primer를 제조하였다. 특히 forward primer는 pH 2.5 acid phosphatase 유전자의 프로모터를 포함시키기 위해서 -400 bp 부위의 DNA 서열을 근거로 제조하였다. 이를 이용하여 PCR을 수행함

으로써 약 1.7 kb 크기의 증폭단편을 얻게 되었다. *E. coli* WC7 phytase 유전자의 염기서열 분석을 위해 pUC19 벡터에 클로닝하여(이때의 클로닝 벡터를 pUEP라 명명) 제한 효소지도를 작성하였다(Fig. 3). 제한효소지도를 작성한 후

염기서열 결정을 위해 pBluescript SK(+) 벡터에 subcloning 후 sequencing 하여 DNASTAR program(DNASTAR, Inc., USA)으로 분석하였다. 그 결과 1241 bp의 coding region의 ORF를 확인하였고 432개의 아미노산으로 이루어진 분자량 44,716 Da의 단백질을 확인하였다(Fig. 4). *E. coli* WC7 phytase 유전자의 아미노산 서열의 상동성을 조사한 결과 예상된 대로 pH 2.5 acid phosphatase 유전자인 *E. coli* appA gene과 일치하였으며 *E. coli* appA2 gene과는 95% 상동성을 보였고 *Bacillus* sp. DS11 phytase gene과는 11%의 상동성을 보였다[7]. 또한 대부분의 acid phosphatase [2] 효소들의 active site라고 추정되는 RHGXRRP motif가 NH₂-말단쪽에 존재하고 C-말단쪽에 HD motif가 존재하고 있어서 histidine acid phosphatase 계열의 효소임을 확인하게 되었다.

한편, pH 2.5 acid phosphatase는 이미 오래 전에 보고되었지만 효소의 비활성 및 pH 안정성 측면에서 높은 산업적 이용가능성에도 불구하고 원 균주상에서의 발현양이 충분하지 못하며, pET 시스템을 이용한 고발현시 inclusion body로 합성되어 효소 확보의 문제점이 있었다. 본 연구에서는 WC7 phytase 유전자를 함유한 pUEP를 이용하여 *E. coli* XL1-Blue에서 phytase를 발현시켰을 때 효소의 생산량이 17.5 U/ml로서 원균주의 23배 활성을 보였다. 이것은 WC7 phytase 유전자의 coding region 뿐만 아니라 프로모터부위까지 재조합 벡터에 클로닝 되었기 때문이라고 생각된다. 따라서 본 연구를 통해 산업적 이용가능성이 큰 WC7 phytase의 고발현이 가능하게 되었으며 앞으로 WC7 phytase의 사료첨가제 효소로의 개발을 기대할 수 있을 것이라 판단된다.

요 약

토양으로부터 phytate 분해능이 뛰어난 phytase를 생산하는 균주를 분리 동정한 결과 *Escherichia coli*로 동정되었고, *E. coli* WC7으로 명명하였다. 이 균주가 생산하는 phytase를 ammonium sulfate 침전, Phenyl-Sepharose, DEAE-Sepharose, CM-Sepharose, Resoure S, Mono S 컬럼 크로마토그래피를 이용한 분리정제를 수행하여 정제도 1,250 배, 수율 30%로 정제하였고 640 Unit/mg의 비활성을 얻었다. 또한 정제된 phytase는 SDS-PAGE에서 분자량 45 kDa인 단일 subunit로 이루어진 단일효소임을 확인하였다. *E. coli* WC7 phytase의 최적 pH는 5.0, 최적 온도는 60°C였으며, pH 2.0-12까지 안정하였다. 열안정성에서는 60°C 이상에서 급격한 활성의 감소를 보여 초기 활성의 20% 활성만을 나타내었다. Phytase의 N-말단 아미노산 서열은 Ser-Glu-Pro-Glu-Leu-Lys-Leu-Glu-Ser-Val-Val이었으며 이는 *E. coli* 유래의 pH 2.5 acid phosphatase와 아주 큰 유사성을 보였다.

E. coli WC7 phytase의 유전자를 확보하기 위해 *E. coli* acid phosphatase의 DNA sequence를 바탕으로 한 primer들을 이용하여 PCR 클로닝을 수행하였으며 증폭된 PCR fragment를 pUC19 벡터에 클로닝 하고 DNA 염기서열을 결정하였다. 그 결과 1.2 kbp의 WC7 phytase 유전자의 ORF를 확인하였으며 432개의 아미노산으로 이루어진 분자량 44,716 Da의 단백질을 확인 할 수 있었다. 대부분의 acid phosphatase 효소들의 active site라고 추정되는 active site motif인 RHGXRRP가 N-terminal 쪽에 존재하고 있었다.

pUEP를 이용하여 *E. coli* XL1-Blue에서 phytase를 발현시켰을 때 효소의 생산량이 17.5 U/ml로서 원균주의 23배 활성을 가졌으며, 효소의 비활성 및 pH 안정성 측면에서 높은 산업적 이용가능성을 볼 때 사료첨가제 효소로의 개발을 기대할 수 있을 것이라 판단된다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부 선도기술개발사업으로 수행된 연구결과 중의 일부이며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Elie Dassa, M. C. and P.L. Boquet. 1982. The acid phosphatase with optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **257**: 6669-6676.
- Gibson, D. 1987. Production of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum* on starch media. *Biotechnol. Lett.* **9**: 305-310.
- Greiner, R., U. Konietzny, and K. D. Jany. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* **303**: 107-113.
- Kim, Y. -H., S. Y. Yang, D. Y. Kim, C. W. Kim, W. H. Jung, M. N. Gwon, and M. D. Song. 2001. Isolation of *Enterobacter cloacae* producing phytase and medium optimization of its production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 78-83.
- Kim, Y. O. and H. K. Kim. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp DS11. *Enzym. Microb. Technol.* **22**: 2-7.
- Kim, Y. O., J. K. Lee, H. K. Kim, J. H. Yu, and T. K. Oh. 1998. Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **162**: 185-191.
- Krieg, N. R. and J. G. Halt. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

9. Oh, B. C., B. S. Chang, K. H. Park, N. C. Ha, H. K. Kim, and T. K. Oh. 2001. Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochemistry* **40**: 9669–9676.
10. Powar, V. K. and V. Jagannathan. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **151**: 1102–1108.
11. Rackis, J. J. and R. L. Anderson. 1977. Mineral availability in soy protein products. *Food. prod. Dev.* **11**: 38.
12. Rodriguez, E., Y. Han, and X. G. Lei. 1999. Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon. *Biochem Biophys Res Commun* **257**: 117–123.
13. Shieh, T. R. and J. H. Ware. 1968. Survey of microorganism for the production of extracellular phytase. *Appl Microbiol* **16**: 1348–1351.
14. Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 1266–1269.
15. Touati, E., A. Danchin. 1987. The structure of the promoter and amino terminal region of the pH 2.5 acid phosphatase structural gene (appA) of *E. coli*: a negative control of transcription mediated by cyclic AMP. *Biochimie* **69**: 215–221.
16. Ullah, A. H. and H. C. Dischinger, Jr. 1995. *Aspergillus ficuum* phytase active site: involvement of Arg and Trp residues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **750**: 51–57.
17. Wodzinski, R. J. and A. H. Ullah. 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**: 263–302.
18. Yamada, K., Y. Minoda, and K. Yamada. 1968. Phytase from *Aspergillus terreus*. Part 1. Production, purification, and some general properties of the enzyme. *Agric. Biol. Chem.* **32**: 1275–1283.
19. Yoon, S. J. and Y. J. Choi. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* **101**: 449–454.

(Received Nov. 3, 2001/Accepted Jan. 28, 2002)