

## Saccharomyces cerevisiae CY 균주에 의한 Phytase의 생성과 반응특성

서성원 · 인만진<sup>1</sup> · 오남순\*

공주대학교 식품공학과, <sup>1</sup>청운대학교 식품영양학과

## Production and Reaction Properties of Phytase by *Saccharomyces cerevisiae* CY strain

Sung-Won Seo, Man-Jin In<sup>1</sup> and Nam-Soon Oh\*

Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 340-802, Korea  
<sup>1</sup>Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongseong 350-701, Korea

Received May 30, 2005; Accepted August 23, 2005

A yeast strain producing phytase, isolated from a mash of Korean traditional Yakju, was identified as a strain of *Saccharomyces cerevisiae* and designated as *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. Phytase was produced by CY strain both intracellularly and extracellularly. Total phytase activity by the shaking culture was about two times higher than that of the static culture. The portion of extracellular phytase to total phytase activity ranged between 23 and 49 percent, depending on the glucose concentration in the culture medium. Phytase production was reached at approximately 1 U/ml as total phytase activity and the maximum intracellular phytase activity was 0.17-0.19 U/mg-DCW at late logarithmic growth phase. The optimum reaction pH and temperature of intracellular phytase were 3.5 and 40°C, respectively. Over 95% of the phytate was degraded by growing cells after 36 hours yeast cell culture and about 90% of total phytate was effectively degraded by suspending the whole cell with the biomass of 0.4 mg-DCW/ml-reaction solution after 12 hours degradation reaction.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, phytase, phytate degradation

### 서 론

Phytate(myo-inositol hexakisphosphate)는 많은 식물의 종자에 서 발견되는 인의 주요 저장형태로 대략 총인 함량중 60-90% 를 차지한다.<sup>1)</sup> 이러한 형태의 인산 화합물은 phytase에 의해 촉 매되는 가수분해 반응에 의해 myo-inositol과 무기인으로 분해 된다. Phytate는 마그네슘, 철, 칼슘 등과 같은 무기원소와 결합 하여 쉽게 흡수될 수 없는 mineral-phytate 또는 protein-mineral-phytate 복합체를 형성<sup>2,3)</sup>하여 영양성분의 이용을 방해할 뿐 만 아니라 미분해 phytate의 배출은 하천의 부영양화를 유 발시키는 인자이기도 하다. 이러한 phytate의 분해는 가열처리, 침전, 투석 등의 물리적인 방법<sup>4)</sup>을 통하거나, 효소 또는 미생 물을 활용하는 생물학적인 방법<sup>5-8)</sup>으로 이루어진다. 생물학적 phytate 분해는 주로 세균, 곰팡이, 효모 등의 미생물<sup>9,10)</sup>을 직접 활용하거나 이들 미생물 기원의 상용화된 phytase를 이용하여

이루어지고 있다. 미생물을 이용한 phytase의 생성이나, 효소학 적 연구는 비교적 많이 이루어지고 있으며, 주로 세균, 곰팡이 에 관한 연구가 대부분이다. 최근에는 효모에 의한 phytase의 생성이나 효소적 특징에 관한 연구<sup>10-16)</sup>도 점차 증가하고 있다. 특히, 효모는 세균, 곰팡이에 비하여 배양관리가 용이하고, 빵 효모인 경우는 안전성에서 phytate 분해효소원으로 사용하는 타 미생물보다 장점을 갖고 있어서 향후 이에 대한 연구가 폭 넓 게 이루어질 것으로 생각된다. 본 연구는 전통 민속주의 술덧 으로부터 phytase를 생성하는 *Saccharomyces*속 효모균주를 분 리하였으며, 분리효모의 phytase 생성과 반응 특징 및 phytate 의 분해방법에 관한 연구결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

**실험균주.** 실험균주는 전통 민속주의 술덧에서 분리한 후, API 20C AUX 동정 Kit(BioMerieux사, France)를 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정하였으며, *Saccharomyces cerevisiae* CY 균주로 명명하여 본 연구에 사용하였다.

**Phytate 분해능 확인방법.** CY 효모균주의 phytate 분해능은

\*Corresponding author  
Phone: +82-41-330-1485; Fax: +82-41-333-9610  
E-mail: nsoh@kongju.ac.kr

PSM 배지에서 생육하는 동안 형성되는 투명환으로 phytase 생성균주임을 확인하였다. PSM 배지는 Lambrechts 등의 방법<sup>11)</sup>을 변형한 배지로 0.5% Ca-phytate, 1% galactose, 0.3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05% KCl, 0.01%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.01%  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 와 2%의 agar는 혼합하여 용해한 후 autoclave에서 살균하고, Ca-pantothenate(20 mg/l), thiamine (20 mg/l), inositol(20 mg/l), pyridoxine(20 mg/l), nicotinic acid (5 mg/l), biotin(0.2 mg/l)은 membrane filter로 별도로 제균한 후 혼합배지의 pH가 5.5가 되도록 제조하여 phytate 분해능 측정 배지로 사용하였다.

**균주배양.** CY 효모균주는 YM 배지에 30°C에서 6-8시간 동안 진탕배양한 종균 1 m/를 포도당의 농도를 5%로 조정된 YM 배지 50 m/에 접종하고 30°C에서 48시간 동안 200 rpm으로 진탕배양하면서 phytase의 활성도를 조사하였다. 효모균주의 생육도는 600 nm에서의 흡광도로 나타내거나 또는 건조균체량(dry cell weight, DCW)으로 나타냈다. 건조균체량의 측정은 배양액 1 m/를 0.8% NaCl 멸균용액으로 2-3회 세척한 후 membrane filter(0.20  $\mu\text{m}$ )로 여과하여 microwave oven에서 2분간 건조시켜 측정하였다.

**Phytase 활성의 측정.** Phytase의 활성도는 Quan<sup>12)</sup>과 Shimizu<sup>17)</sup>의 방법을 변형하여 분석하였으며, 세포외 phytase 활성(extracellular phytase activity)과 세포내 phytase 활성(intracellular phytase activity)을 각각 측정하였다. 세포외 phytase 활성은 배양액의 상정액을 조효소액으로 사용하여 측정하였고, 세포내 phytase 활성은 배양액을 원심분리하여 효모균체를 수확한 후 0.8% NaCl 용액으로 2-3회 세척하고 0.2 M acetate 완충용액(pH 3.5)에서 효모세포의 phytase 활성을 측정하였다. 세포내 phytase 활성은 단위 배양액이 함유하는 세포의 효소활성을 용량을 기준(mU/m/)으로 표현하거나, 건조균체량을 기준(mU/mg-DCW)으로 표현하였다. 총 phytase 활성은 세포외 활성과 용량을 기준으로 한 세포내 효소활성의 합으로 나타내었다. 기질로 사용한 2 mM의 sodium phytate 용액 0.9 m/를 37°C에서 충분히 예열시킨 후 0.1 m/의 조효소액 또는 균체 현탁액을 첨가하여 10 분간 반응시킨 후 10% TCA 1 m/를 첨가하여 효소활성을 중지시킨다. 이 반응완료액에 발색시약 1.5 m/(5.5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 에 1.5%가 되도록 ammonium molybdate를 녹인 용액과 2.7% ferrous sulfate를 증류수에 녹인 용액을 4:1로 혼합하여 조제한 용액)를 첨가하여 10분간 발색시킨 후 유리된 인산의 양을 700 nm에서 측정하여 phytase의 활성도로 나타냈다. 효소활성도 1 unit는 1분 동안에 phytate에서 1  $\mu\text{mole}$ 의  $\text{PO}_4^{3-}$ 로 전환시키는 효소량으로 정의하였다.

**Phytate의 분석.** Haug와 Lantzsch의 방법<sup>18)</sup>에 따라 시료 0.5 m/에 1 m/의 ferric 용액(0.2 g ammonium iron(III) sulfate  $\cdot$  12 $\text{H}_2\text{O}$ 를 30% TCA 100 m/로 용해한 후 증류수로 1 l로 맞춘 용액)을 첨가한다. 그 후 뚜껑을 덮고 끓는 수욕중에서 30분 동안 반응시킨 다음 얼음물로 15분 동안 냉각하여 원심분리(12,000 rpm, 15분)하였다. 상정액 1 m/에 1.5 m/의 bipyridine 용액(10 g의 2,2'-bipyridine에 10 m/의 thioglycolic acid를 첨가하여 증류수로 1 l로 맞춘 용액) 1.5 m/와 반응시켜 519 nm에서 흡광도를 측정하여 phytate를 분석하였다.

Table 1. Phytase production of *S. cerevisiae* CY strain by shaking and static culture

Enzyme and biomass production	Shaking culture	Static culture
Biomass (mg-DCW/m/-broth)	6.8	3.4
Extracellular activity (mU/m/-broth)	236	107
Intracellular activity <sup>1)</sup> (mU/m/-broth)	787	487
Maximum Intracellular activity <sup>2)</sup> (mU/mg-DCW)	173	143

<sup>1)</sup>Phytase activity by biomass contained in 1 ml culture broth.

<sup>2)</sup>Maximum phytase activity per 1 mg biomass as DCW (dry cell weight).

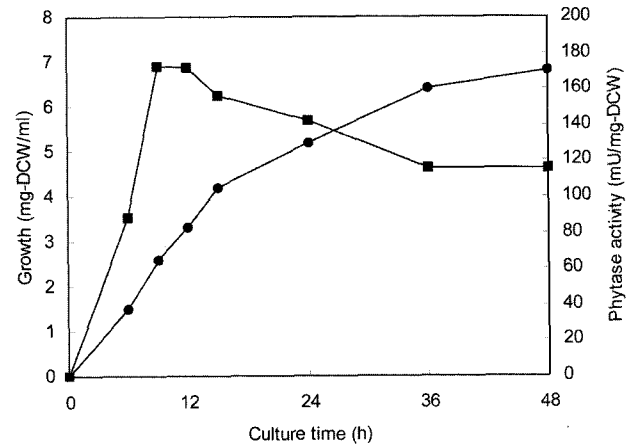


Fig. 1. Profile of intracellular phytase activity (■) and cell growth (●) of *S. cerevisiae* CY strain.

**Phytate 분해방법.** 효모균주에 의한 phytate의 분해경향을 조사하기 위하여 YM 배지(5% 포도당 함유)에 sodium phytate (phytic acid dodecasodium salt)의 농도가 4.3 mM이 되도록 하고, CY 균주를 접종한 후 30°C에서 진탕배양하면서 성장하는 효모세포에 의한 phytate의 분해도를 측정하였다. 또 다른 phytate의 분해방법으로 배양된 CY 균체를 직접 분해반응액에 현탁하여 phytate를 분해시키는 방법으로 0.2 M acetate buffer (pH 3.5)에 sodium phytate가 4.3 mM이 되도록하고 수확된 세척 효모균체를 완충액에 현탁시켜 30°C에서 반응시키면서 phytate의 분해도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

**S. cerevisiae CY 균주에 의한 phytase의 생성.** 본 연구에 사용된 *S. cerevisiae* CY 균주는 전통 민속주의 술덧으로부터 분리한 효모로 보통 정치배양으로 수행되는 알코올 발효효모이다. 포도당 농도가 5%인 YM배지에서 48시간 동안 진탕배양한 경우는 건조균체량(DCW)이 6.8 mg/m/로 정치배양에 비하여 2 배의 균체수율을 보였으며, 세포외 phytase 활성과 세포내 phytase 활성을 합한 총 phytase 활성도는 진탕배양인 경우가 1,023 mU/m/로 정치배양에서의 총 활성도인 594 mU/m/에 비하여 높은 활성을 보였다(Table 1). 건조균체를 기준으로 나타낸 세포내 phytase 활성은 생육기에 따라 달랐으며, 지수성장기 말기 무렵에서 173 mU/mg-DCW로 최대 활성을 보인 이후 배양

**Table 2. Effects of glucose concentration on the phytase production**

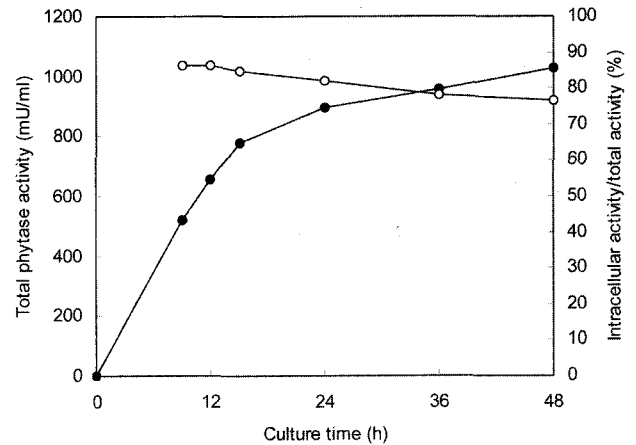
Enzyme and biomass production	Glucose concentration (%)			
	1	5	10	20
Biomass (mg-DCW/ml-broth)	4.9	6.8	4.0	3.6
Extracellular activity (mU/ml-broth)	437	236	250	178
Intracellular activity (mU/ml-broth)	464	787	656	604
Maximum Intracellular activity (mU/mg-DCW)	114	173	193	168

*S. cerevisiae* CY yeast cells were cultured for 48 h at various glucose concentrations.

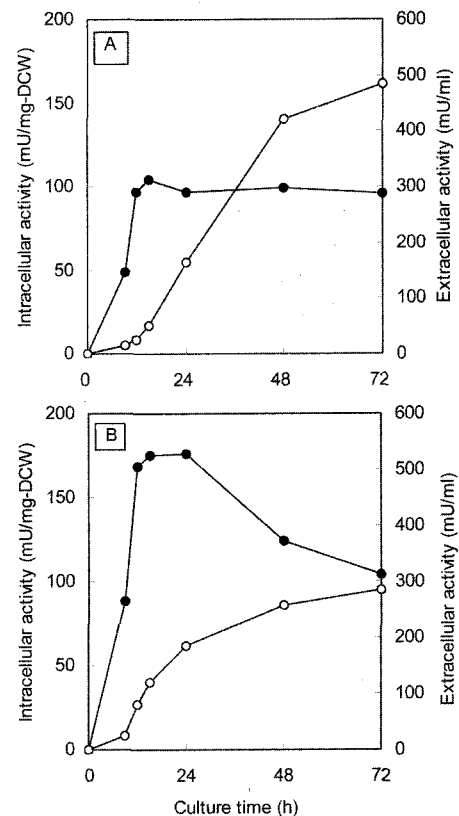
시간의 경과에 따라 점차적으로 감소하였다(Fig. 1). 이러한 세포내 phytase 활성 감소는 *Pichia anomala*<sup>13)</sup>에서의 활성 감소 경향과 유사하였으며, 이러한 현상은 영양성분의 고갈이나 배양환경의 열화에 의한 세포의 노화현상에서 기인되는 것으로 생각되고 있다. 또한, CY 균주에 의한 세포내 phytase 활성은 *Pichia anomala*의 연구에서 보고된 세포외 phytase 활성도인 68 mU/mg-DCW 보다 약 2.5배 높은 활성을 보였다.<sup>13)</sup>

**Phytase의 생성과 분포에 대한 포도당 농도의 영향.** YM 배지에 포도당의 농도를 달리하면서 CY 균주를 48시간 동안 배양한 후 phytase 생성도를 조사하여 Table 2에 나타냈다. 본 실험조건에서 효모 균체량은 포도당 농도가 5%인 경우가 6.8 mg/m로 제일 높은 생육을 보였으며, 그 이상의 농도에서는 생육이 억제되었다. 포도당의 전 농도범위에서 총 phytase의 활성은 782-1,023 mU/m의 범위를 보였으며, 포도당 농도가 5%인 경우 가장 높은 활성을 보였다. 세포내 phytase의 최대 활성은 배지의 포도당 농도가 5% 이상인 경우는 170-190 mU/mg-DCW 이었으나, 배지중 포도당 농도가 1%인 경우는 세포내 phytase의 최대활성이 114 mU/m로 낮게 나타났다. 한편, 총 phytase 활성중 세포외 phytase 활성이 차지하는 비율은 포도당 농도가 5% 이상인 경우는 약 23-28%의 범위를 차지하였으나 포도당 농도가 1%로 저농도의 배지에서는 세포외 phytase 활성과 세포내 phytase 활성 비율이 거의 1:1의 유사한 비율로 분포되었다. 포도당 농도에 따른 세포내 및 세포외 활성의 차이는 영양원의 조기 고갈에 의한 세포노화에 기인되어 세포내 활성이 낮았으며 상대적으로 세포외로 분비된 세포외 phytase 활성이 높게 나타나는 특징을 보이는 것으로 생각된다. 이러한 phytase의 세포내 또는 세포외 분포는 세균인 *Enterobacter* sp.에서도 다르게 나타나는데 총 phytase 활성 중 세포외 활성 분포비율이 약 82%를 차지하고 나머지 18% 정도가 세포내 활성을 나타낸다고 보고하고 있다.<sup>19)</sup>

**배양시간별 phytase의 활성.** *Schwanniomyces castellii*,<sup>14)</sup> *Arxula adenivorans*<sup>15)</sup> 등 효모의 phytase는 세포외로 분비하는 특징의 효소로 보고되고 있으며, *Candida krusei*,<sup>12)</sup> *Pichia anomala*<sup>13)</sup> 등은 세포내 효소활성이 높은 균주로 알려지고 있다. *Saccharomyces cerevisiae*의 phytase는 세포내 효소로 존재하며 극히 일부만이 세포외로 분비되는 것으로 알려져 있지만<sup>20)</sup>, 본 연구의 *S. cerevisiae* CY 균주의 phytase는 세포외 분비능이 배양조건에 따라 현저히 다르게 나타났다. 전술한 바와 같이 CY 균주의 phytase는 세포외 분비성과 세포내 효소의 특징을 함께 갖고 있으며, 배양액으로 분비된 세포외 효소활성보다 세



**Fig. 2. The ratio of intracellular phytase activity (○) and total phytase activity (●) during culture period.**



**Fig. 3. Intracellular (●) and extracellular (○) phytase activity in the YM medium with different glucose concentrations. YM medium with 1% glucose (A) and 5% glucose (B).**

포 내부에 함유된 세포내 활성이 총 phytase 활성중 차지하는 비율이 더 높게 나타났다(Fig. 2). 배양기간 동안 세포내 효소 활성이 차지하는 비율이 약 77-87%에 이르렀으며, 나머지가 세포외 효소 활성으로 측정되었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 배지에 첨가한 포도당의 농도에 따라서 phytase의 세포내 활성과 세포외 활성이 다르게 나타나고 있음을 보여주고 있다. Fig. 3(A)는 포도당 농도가 1%인 배지에서 phytase의 세포내 및 세포외 활성을 나타내었으며, 세포내 phytase 활성은 104 mU/mg-DCW으로 최대를 보인 후 배양 72시간 동안 거의 일정하

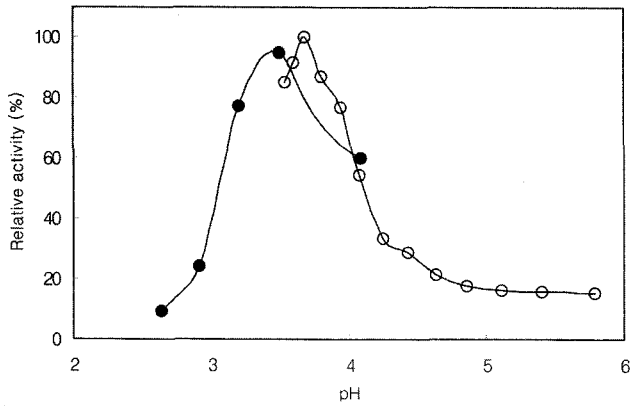


Fig. 4. Effect of pH on the intracellular phytase activity. 0.2 M glycine-HCl buffer (●) and 0.2 M acetate buffer (○).

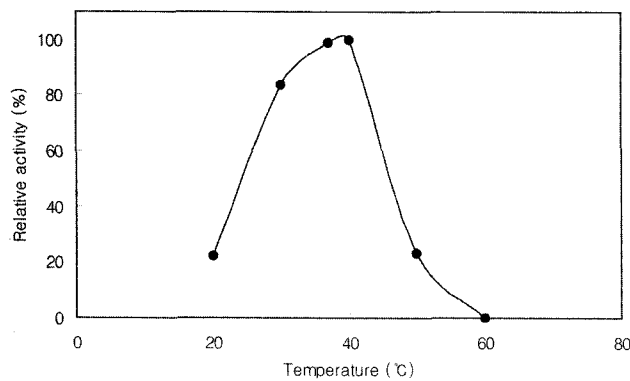


Fig. 5. Effect of temperature on the intracellular phytase activity.

게 유지되었고, 세포의 효소활성은 배양시간의 경과에 따라 지속적으로 증가하여 약 484 mU/m<sup>2</sup>에 도달하였다. Fig. 3(B)는 포도당 농도가 5%인 배지에서의 phytase 활성을 나타낸 것이다. 세포내 phytase 활성은 176 mU/mg-DCW으로 최대에 도달한 후 배양시간의 경과에 따라 지속적으로 감소하였으며, 세포의 phytase 활성은 285 mU/m<sup>2</sup>로 포도당 농도가 1%인 배지와 비교할 때 세포의 활성이 낮았다. 이는 전술한 바와 같이 영양원과 배지환경의 변화에 기인한 세포노화와 투과성의 차이로 세포내 및 세포의 효소활성이 다르게 나타나는 것으로 생각된다.

**Phytase의 최적반응 pH.** 완충용액에 현탁된 효모세포의 pH 영역별 phytase 활성도를 조사하였다. 세포내 효소인 phytase의 최적반응 pH는 3.4-3.6으로 나타났으며, pH 3.0 이하와 pH 5.0 이상의 조건에서는 상대활성도가 20% 이하가 되었다. 일반적으로 세균의 phytase는 pH 6.5-7.5의 영역에서 최적반응을 나타내고, 곰팡이와 효모 기원의 많은 phytase는 4.0-5.0의 pH 영역에서 최적반응 pH를 갖는 산성 phytase이다. 효모의 phytase는 온도에 따라 최적 pH 영역이 달라지는 것은 한 종류 이상의 phytase를 생성하거나, 온도에 따른 효소의 구조변화에 기인되는 것으로 판단하고 있다. *Pichia anomala*<sup>13)</sup>인 경우 효소의 최적 pH는 4.0이었으며, phytase가 세포벽에 존재하는 *Candida krusei*<sup>12)</sup>의 경우는 최적반응 pH가 2.5와 5.5로 두 영역에서 최적을 보였다. 반응온도가 50-60°C인 경우 효모 phytase의 최적반응 pH가 4-5이었으나, 37°C에서는 최적반응 pH가 3-4 영역

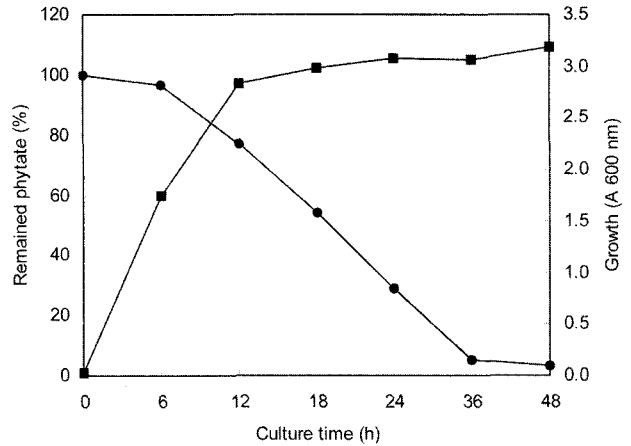


Fig. 6. Degradation of phytate by growing yeast cells in the culture broth. Yeast cells were grown in YM medium with both 5% glucose and 4.3 mM phytate in shaking flask. Symbols: remained phytate (●) and cell growth (■).

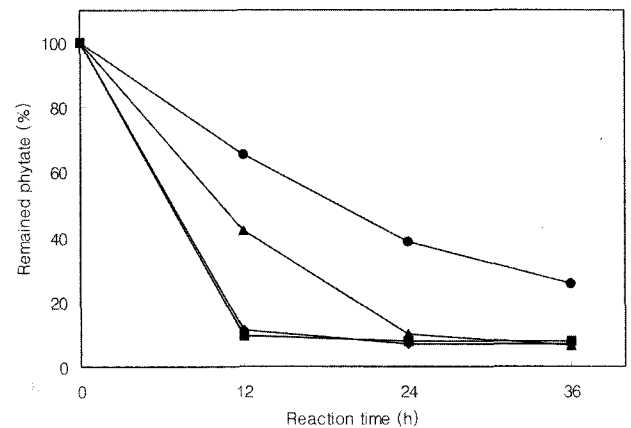


Fig. 7. Degradation of phytate by suspended yeast cells in the buffer solution. Reaction mixtures comprising of suspended yeast cells and 4.3 mM phytate as substrate dissolved in acetate buffer (0.2 M, pH 3.5) were incubated at 30°C. Yeast cells were added after washing in buffer with different biomass(as dry cell weight) concentration as follows; 0.1 mg/ml (●), 0.2 mg/ml (▲), 0.4 mg/ml (■) and 1 mg/ml (◆).

으로 이동하여 본 연구의 최적반응 pH 범위와 유사하였다.

**Phytase의 최적반응 온도.** Phytase의 최적반응 온도는 미생물 군중에 따라서 차이가 있으며, *B. subtilis*,<sup>17)</sup> *Enterobacter*,<sup>19)</sup> *Pseudomonas fragi*<sup>21)</sup> 등의 세균은 50-70°C, *Aspergillus*속, *Rhizopus*속 등의 곰팡이<sup>9)</sup>에서는 40-70°C, 효모<sup>15,16)</sup>인 경우에도 군중에 따라서 다르나 대략 60-75°C에서 최적반응 온도를 보여 미생물 기원의 phytase는 주로 고온 영역에서 최적반응 온도를 보이는 것으로 생각된다. 본 연구에 사용된 CY 균주의 경우 현탁세포의 phytase 활성은 효소가 세포내에 존재하기 때문에 비교적 높은 온도에서 최적 반응온도를 보일 것으로 기대하였으나 기존에 보고된 효모 균주들의 최적반응 온도보다 낮은 37-40°C로 나타났다. 또한, 20°C 이하와 50°C 이상의 온도에서는 상대적 효소활성이 20% 이하의 수준으로 감소되어 효모의 phytase에 관한 기존의 연구<sup>15,16)</sup>와 비교할 때 낮은 온도에서 최적 반응온도를 보였다. 이러한 낮은 최적반응 온도는 오히려 생균상태의 효모를 식품이나 사료에 적용될 경우는 생체내 phytate

분해반응에는 긍정적 효과를 미칠 것으로 생각된다.

**S. cerevisiae CY 균주에 의한 Phytate의 분해.** 효모세포에 의한 phytate의 분해를 두가지 방법으로 수행하여 비교하였다. 즉, phytate가 함유된 영양배지에서 성장하는 효모에 의한 phytate의 분해와 배양효모를 수확한 후 원충용액에 현탁된 효모세포(whole cell)에 의한 phytate의 분해를 수행하였다. Fig. 6에 성장하는 효모세포에 의한 phytate의 경시적 분해율을 나타냈다. 5%의 포도당과 4.3 mM의 phytate가 함유된 배지에 효모를 접종하여 48시간 동안 진탕배양한 결과 배양 후 36시간째 첨가된 phytate의 약 95%가 분해되었다. 한편, 동일한 농도의 phytate를 함유한 원충용액에 효모세포를 농도별로 첨가하여 현탁한 후 phytate의 분해를 측정하였다(Fig. 7). 반응용액 1 ml당 0.1 mg의 건조균체에 해당하는 효모세포를 첨가한 경우는 반응 후 36시간째 약 75%가 분해되었고, 0.2 mg-DCW/ml 첨가한 경우는 24시간째 90%가 분해되었다. 0.4 mg-DCW/ml의 농도 이상을 첨가하는 경우는 12시간째 첨가한 phytate의 약 90%를 분해하였으나 분해율은 반응시간이 경과하여도 그 이상 증가하지 않았다. 포도당이 5% 첨가된 YM 배지에서 효모균주를 48 시간 동안 배양하는 경우 약 6.8 mg-DCW/ml의 효모가 증식한다. 즉, 현탁세포를 이용하여 phytate를 분해시키는 방법은 성장하는 효모에 의한 분해방법보다 더 효과적인 것으로 판단되었다. YM 배지에서 배양된 효모세포의 약 6% 정도의 균체량(0.4 mg-DCW/ml)을 사용하면서, 성장하는 효모에 의한 분해방법보다 짧은 시간 내에 phytate의 약 90% 이상을 분해시킬 수 있다.

## 초 록

*Saccharomyces cerevisiae* CY 균주에 의한 phytase의 생성은 진탕배양인 경우가 정지배양에 비하여 약 2배의 생성도를 보였다. CY 균주의 phytase는 세포내 효소활성이 세포의 효소활성에 비하여 약 3-4배 높게 나타났으나, 포도당이 1%로 저농도로 첨가된 배지에서는 세포내 효소활성과 세포외 효소활성의 분포비율이 1:1 정도로 유사한 비율로 나타났다. 세포내외로 생성된 총 phytase 활성은 포도당의 첨가농도에 상관없이 대략 1,000 mU/m<sup>2</sup>에 이르렀으며, 건조균체당 효소활성은 지수성장 말기에 170-190 mU/mg-DCW 범위에서 최대활성을 보였다. CY 균주의 세포내 효소의 최적 반응pH는 3.5이었으며, 최적 반응온도는 37-40°C이었다. 배양액에 존재하는 phytate는 성장하는 CY 균주에 의하여 배양 36시간째 4.3 mM phytate의 약 95%가 분해되었으며, 0.4 mg-DCW/ml의 균체농도를 갖는 현탁균체 반응액에서는 분해반응 12시간째 phytate의 약 90% 이상이 효율적으로 분해되었다.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, phytase, phytate degradation

## 참고문헌

- Reddy, N. R., Sathe, S. K. and Salunkhe, D. K. (1982) Phytates in legumes and cereals. *Advances in Food Research* **28**, 1-92.
- Sandberg, A. S. (1994) Antinutrient effects of phytate. *Nutrition* **18**, 429-432.
- Erdman, J. W. and Ponerros-Schneier, A. (1989) Phytic acid interactions with divalent cations in foods and in the gastrointestinal track. *Adv. Exp. Med. Biol.* **249**, 161-171.
- 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.
- Anno, T., Nakanishi, K. and Matsuno, R. (1985) Enzymatic elimination of phytate in soybean milk. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **32**, 174-180.
- Zyta, K. (1992) Mould phytases and their application in the food industry. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 467-472.
- Howson, S. J. and Davis, R. P. (1983) Production of phytate hydrolyzing enzyme by some fungi. *Erz. Microbiol. Technol.* **5**, 377-382.
- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A. and Soccol V. T. (2001) Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technol.* **77**, 203-214.
- Vohra, A. and Satyanarayana, T. (2003) Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **23**, 29-60.
- Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G. and Galzy, P. (1992) Utilization of phytate by some yeasts. *Biotechnol. Lett.* **14**, 61-66.
- Quan, C., Zhang, L., Wang, Y. and Ohta, Y. (2001) Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 154-160.
- Vohra, A. and Satyanarayana, T. (2001) Phytase production by the yeast, *Pichia anomala*. *Biotechnol. Lett.* **23**, 551-554.
- Lambrechts, C., Boze, H., Segueilha, L., Moulin, G. and Galzy, P. (1993) Influence of culture conditions on the biosynthesis of *Schwanniomyces castellii* phytase. *Biotechnol. Lett.* **15**, 399-404.
- Sano, K., Fukuhara, H. and Nakamura, Y. (1999) Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. *Biotechnol. Lett.* **21**, 33-38.
- 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.
- Shimizu, M. (1992) Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1266-1269.
- Haug, W. and Lantzsch, H.-J. (1983) Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agric.* **34**, 1423-1426.
- 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. *Erz. Microb. Technol.* **18**, 449-454.
- Bartnik, M., Jakubczyk, T. and Wrzeciono, A. (1987) Phytase activity in fermentative microflora of dough. *Acta Alimentaria Polonica.* **13**, 67-73.
- In, M. J., Jang, E. S., Kim, Y. J. and Oh, N. S. (2004) Purification and properties of an extracellular acid phytase from *Pseudomonas fragi* Y9451. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 1004-1008.