

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ C12N 1/20	(45) 공고일자 1999년01월 15일	(11) 등록번호 특0169913
(21) 출원번호 특1996-006817	(24) 등록일자 1998년10월 13일	(65) 공개번호 특1997-065705
(22) 출원일자 1996년03월 14일	(43) 공개일자 1997년10월 13일	

(73) 특허권자	한국과학기술연구원 김은영 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1주식회사대성미생물연구소 이동규 경기도 의왕시 삼동 293번지
(72) 발명자	오태광 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 407동 602호 김형권 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 120동 701호 배경숙 대전광역시 서구 둔산동 크로바아파트 115동 1586호 박영서 대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 105동 703호 김영옥 부산광역시 금정구 장전1동 442-13 최양웅 서울특별시 강남구 도곡동 546-10 이동규 서울특별시 용산구 서빙고동 신동아아파트 7동 206호 이정기 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 407동 504호
(74) 대리인	허상훈

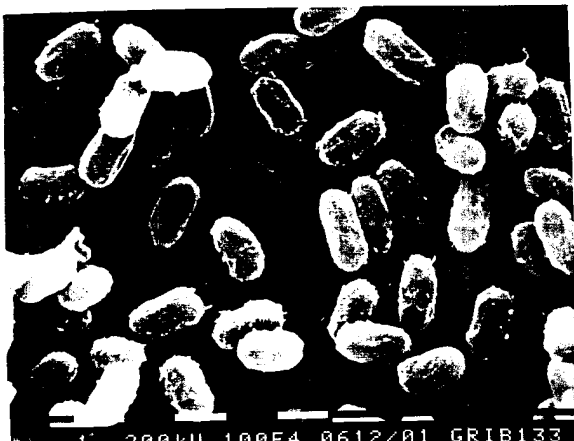
심사관 : 김형준

(54) 신규주 바실러스속 DS11과 이로부터 생산되는 신규 파이타아제

요약

본 발명은 신규주 바실러스속(Bacillus sp.) DS11(KCTC 0231BP)과 이로부터 생산되는 신규 파이타아제(Phytase)에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 신규주 바실러스속(Bacillus sp.) DS11과 단위가축에 급여하는 곡류내 인(P)의 체내 이용성을 높여주는 신규한 파이타아제 효소에 관한 것이다.

대표도



영세서

[발명의 명칭]

신균주 바실러스속(*Bacillus* sp.) DS11(KCTC 0231BP)과 이로부터 생산되는 신규 파이타아제(Phytase)

[도면의 간단한 설명]

제1도는 본 발명 신균주 바실러스속(*Bacillus* sp.) DS11(KCTC 0231BP) 균체의 전자현미경 사진(X 10,000)이고,

제2도는 본 발명 신균주 바실러스속(*Bacillus* sp.) DS11(KCTC 0231BP)이 생산하는 신규 파이타아제의 컬럼분석결과이며,

A: 아세톤 침전, B: 리소스 S, C: 슈퍼로오즈 12 HR 10/30

제3도는 본 발명 실험에 2에 따른 신균주 바실러스속(*Bacillus* sp.) DS11(KCTC 0231BP)가 생산하는 신규 파이타아제의 온도 안정성(3-1) 및 pH안정성(3-2)을 측정한 그래프이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 신균주 바실러스속(*Bacillus* sp.) DS11(KCTC 0231BP)과 이로부터 생산되는 신규 파이타아제(Phytase)에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 신균주 바실러스속(*Bacillus* sp.) DS11가 단위가축에 급여하는 곡류내 인(P)의 체내이용성을 높여주는 신규한 파이타아제 효소에 관한 것이다.

파이타아제는 피티크산(Phytic acid)을 분해하여 포스페이트(Phosphate)와 포스페이트 이노시톨(Phosphate inositol)을 만드는 효소이다. 여기서, 피티크산은 가축의 사료로 사용하고 있는 곡물의 인(P) 함량의 50-70%를 차지하지만, 닭, 돼지와 같은 단위가축은 생체내에 피티크산을 분해하는 파이타아제가 존재하지 않기 때문에 식물성 인의 이용률이 극히 낮다. 뿐만 아니라 소화되지 못한 피티크산(피티테인)은 상수원등에 방류되어 심각한 환경오염원으로 작용하여 소호수의 청조, 바다의 적조현상을 유발하는 중요요인으로 작용하고 있다. 또한, 피티크산은 단위동물에 중요한 미량광물질, 아미노산, 비타민 등과 킬레이팅하여 불용화되어 동물로 하여금 이를 이용할 수 없게 할 뿐만 아니라 분으로 배출되는 중요 생체활성화 물질이 상수원으로 배출되어 서 환경생태계를 변화시켜서 심각한 환경오염을 유발시킨다.

따라서, 파이타아제를 단위가축에게 급여할 경우 인의 이용성 증가로 무기태 인의 급여량을 줄일 수 있어 경제적인 이익을 가져옴과 동시에 미생물의 에너지원인 인과 중요한 미량 생체활성물질의 이용성을 높게 하고 동물분으로 배출되는 인의 양을 줄여 이로인한 환경오염을 감소시킬 수가 있다. 특히, 1996년부터는 방류되는 동물폐수내 인의 함량을 규제하도록 입법예고가 되어 있을 뿐 아니라, 유럽에서는 단위동물의 사료에 파이타아제를 의무적으로 첨가하도록 되어 있어서 파이타아제의 동물 이용성은 무한히 크다고 할 수 있다. 또한, 파이타아제를 첨가하는 경우 음이온을 띠는 피티테인과 결합하여 이용성이 저하되는 칼슘, 아연이온 등의 미량광물질과 비타민, 아미노산 등의 생리활성물질의 이용성을 증가시켜서 가축의 생산성을 크게 향상시킬 수 있다. 이와같이 파이타아제를 사료에 첨가하여 단위가축에게 급여할 경우 사료의 이용성을 증가시키고 생산성 제고를 통한 경제적 이익 뿐만 아니라 환경오염을 감소시킬 수 있다.

상기와 같은 잇점으로 인하여 지금까지 유럽을 중심으로 파이타아제의 연구(A.H.J.Ullah 등, 1994, K.C.Ehrich, 1994, C.S.Piddington, 1993)가 진행되어 왔고, 파이타아제의 동물에 대한 효과연구(L.G.Young 등, 1993, X.G. Lei 등, 1994, Z. Mroz 등, 1994) 등이 진행되어 왔지만, 파이타아제가 잘라주는 인의 갯수가 한정적일 뿐만 아니라, 이들 대부분이 곰팡이에서 생산되기 때문에 생육기간이 길어서 경제적인 생산에 난점이 있다. 그리고, 단위동물의 생리에 잘 맞지 않아서 단위동물의 첨가제로의 한계성을 가지고 있다.

따라서, 본 발명자들은 미생물이 생산하는 파이타아제, 특히 종래의 파이타아제와 비교하여 효소역가가 뛰어나거나 생산기간을 단축시킬 수 있는 파이타아제를 얻기 위하여 전국 각지의 토양, 나무들로부터 얻은 곰팡이, 방선균, 세균 등 수백종의 균주 중에서 신규 파이타아제를 생산하는 신규 미생물을 동정하였는 바, 이 신규 미생물은 효소의 역가가 뛰어날 뿐만 아니라 생산된 효소의 제반특성이 종래의 효소에 비하여 단위동물에 사용하기 적합하다고 판단되고 효소가 신규성이 있다고 판단하여 본 발명을 완성하였다.

본 발명은 신균주 바실러스속(*Bacillus* sp.) DS11(KCTC 0231BP)과 이로부터 생산되는 단위동물에 사용하기 적합하고 그 특성이 우수할 뿐만 아니라 생산기간이 짧은 신규 파이타아제를 제공하는 데 그 목적이 있다.

이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 신균주 바실러스속(*Bacillus* sp.) DS11(KCTC 0231BP)에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 상기 미생물이 생산하는 최적온도가 65℃이고 최적 pH가 7.0이며, 분자량이 43,000 달톤이고, 등전점이 5.6이며 N-말단아미노산 서열이 [서열표1]로 표시되는 신규 파이타아제에 관한 것도 포함한다.

그리고, 본 발명은 상기 미생물을 사료첨가제로 사용하는 방법에 관한 것도 포함한다.

이와같은 본 발명을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 신균주 바실러스속(*Bacillus* sp.) DS11(KCTC 0231BP)과 이로부터 생산되는 신규 파이타아제에 관한 것으로서, 본 발명의 신규 미생물의 분리 및 동정과정은 다음과 같다.

[신규 미생물의 분리]

전국 각지의 토양 및 축사주변의 시료로부터 얻은 수천종의 균주들 중에서 파이타아제 스크린 플레이트(D-글루코오스 15g, 칼슘파타이테이트 5g, NH₄NO₃ 5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, KCl 0.5g, FeSO₄·7H₂O 0.01g,

MnSO₄·4H₂O 0.01g, 아가 15g, pH 7.0/1)에서 분해능이 뛰어난 미생물을 분리하였다.

[신규 미생물의 동정]

상기에서 분리된 균주의 형태학적 특징은 다음과 같다.

1) 형태학적 특성

최적 생육배지에서 배양한 균주를 그람염색(Gram's Staining)을 행한 결과 그람양성균으로 나타났고, 첨부도면 제1도에 나타낸 바와 같이 전자현미경으로 조사한 결과 세포의 크기가 0.8~1.8 μ m 크기의 간상(rod)형으로 관찰되었다. 세포를 80℃에서 열불활화하여 생육시험을 행한 결과 생육하는 성질로 보아 내열성 포자를 가졌고, 카탈라아제(Catalase) 실험결과 양성반응을 보이는 특성으로 보아 바실러스속(*Bacillus* sp.)이 갖는 형태학적 특징과 일치한다.

상기에서 분리된 균주의 생리학적 특징은 다음과 같다.

2) 생리학적 특징

미생물의 균체 생리적 특성을 조사한 결과는 다음 표 1에 나타낸 바와 같다.

표 1의 결과로부터 호기 및 혐기성 상태에 모두 생육하는 편성 호기성균(facultative)미생물이고, pH 5.7에서와 50℃ 온도에서 생육 가능한 특징이 바실러스 판토텐니쿠스(*Bacillus pantotheniticus*)와 차이가 있어서 이 균주의 변종으로 추정된다.

[표 1]

특 성		바실러스 판토텐니쿠스 (<i>Bacillus pantotheniticus</i>)	본 발명 균주
카탈라아제		+	+
혐기 배양		+	+
브이퍼 시험(Vp. test)		-	-
산생성	글루코오스	+	+
	L-아라비노스	-	-
	D-자일로오스	-	-
	D-만니톨	-	-
가수분해	카제인	d	+
	젤라틴	+	+
	전분	+	+
합성	인돌	-	-
	디하이드로아세톤	-	-
생육 pH	6.8	+	+
	5.7	-	+
생육염분농도 (NaCl에서)	2%	+	+
	5%	+	+
	7%	+	+
	10%	+	+
생육온도	5℃	-	-
	10℃	-	-
	30℃	+	+
	40℃	+	+
	50℃	-	+

(주) + : 양성, - : 음성, d : 종(species)에 따라 차이

상기에서 분리된 균주의 균체화학적 특징은 다음과 같다.

3) 균체화학적 특징

균체를 수확하여 균체내의 G+C의 함량, 지방산 조성, 유레인 형(Murein Type) 및 주요 멜라퀴논(Main meloquinone)을 조사한 결과는 다음 표 2에 나타낸 바와 같다.

표 2의 결과로부터 G +C 함량, 유레인 형태 및 주요 멜라퀴논은 바실러스 판토텐니쿠스(*Bacillus*

pantotheniticus)의 변종으로 판단된다.

[표 2]

특성		바실러스 판토텐니티쿠스 (<i>Bacillus pantotheniticus</i>)	본 발명 균주
G + C 함량		36.9	36.7
퓨레인 형		메조-DAP	메조-DAP
주요 펩타이드		MK-7	MK-7
균체 지방산(%)	14 : 0 ISO	4.71	1.96
	14 : 0	1.50	1.21
	15 : 0 ISO	19.34	18.72
	15 : 0 ANTEISO	37.95	38.51
	16 : 0 ISO	10.01	6.16
	16 : 0	9.77	9.77
	17 : 0 ISO	4.37	9.02
	17 : 0 ANTEISO	12.00	11.20
	18 : 0	x	2.03

상기 형태학적 특징, 생리적 특징 및 균체화학적 특징을 종합한 결과 본 발명 균주는 바실러스속 (*Bacillus* sp.)에 속하는 미생물임을 Bergy's Manual of Systemic Bacteriology Vol. 2(Williams Wilkins Co., 1989)에서 확인하였다.

따라서, 분리된 미생물을 바실러스속(*Bacillus* sp.) DS11로 명명하고, 1996년 2월 1일자로 대한민국 특허 균주 기탁기관인 한국과학기술연구소 생명공학연구소내 유전자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC 0231BP를 부여받았다.

이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 상세히 설명하면 다음과 같은 바, 본 발명이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[신규 파이타아제의 생산]

파이타아제를 생산하기 위하여 밀기울 6%, NH_4NO_3 0.04%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, 카제인 1.0%, KH_2PO_4 0.05%, KH_2PO_4 0.04%, CaCl_2 0.2%를 포함한 배지를 pH를 6.5로 조정하고 121°C에서 15분간 멸균한 후 동일한 배지 조성으로 미리 37°C에서 12시간 동안 플라스크에서 배양한 종배양액을 1% 접종하여 효소를 생산하였다.

생산된 효소의 역가의 측정은 pH 7.0의 0.5 M 트리스($\text{Tris}^{\text{®}}$) 완충액에 2mM의 피턱산나트륨염이 함유된 용액을 기질로 하여 37°C에서 30분간 반응한 후 생성된 인산의 양을 측정하는 방법으로 하였고, 이때 효소의 역가는 1분당 1 μmol 의 무기인을 분해하는 효소량을 1단위로 하였다. 측정결과 신규 효소는 단백질 mg당 0.3 단위의 효소역가를 가졌다. 발효는 50 ℓ 발효로(Fermenter)에서 30 ℓ 를 작동부피(working volume)로 공기 유입량 0.8 vvm, 교반속도 150rpm으로 37°C에서 48시간 배양했을 때 최고의 효소량을 얻었고, 이때 최고 효소 생산량은 0.6 unit/mg를 얻을 수 있었다. 이는 아스퍼질루스 화이쿰(*Aspergillus ficuum*) 유래 파이타아제 효소의 경우 96시간 배양시 0.3 unit/mg의 효소 생산량을 얻었던 바[Donna M. Gibson, 1987], 본 발명의 신규 미생물이 2배의 생산량을 가짐을 알 수 있다.

[실험예]

[신규 파이타아제의 분자량 측정]

상기 실시예에 따라 얻어진 신규주의 배양액 12,000g 15분간 원심분리한 상등액을 50% 아세톤으로 포화시켜서 단백질을 침전시킨 후 투석막을 통한 조효소액을 페닐세파로오즈(phenyl sepharose) CL-4B, 리소스(Resource) S, 슈퍼오즈 12 HR 10/30(이상, pharmacia 제품, 스웨덴) 컬럼을 사용하여 파이타아제 효소만을 순수 분리하였다. 컬럼 분석 결과는 첨부도면 제2도에 나타낸 바와 같다.

이에 대하여 에스디에스-페이지 전기영동법(SDS-PAGE Electrophoresis)을 실시하였으며, 그 결과 신규주로부터 생산된 파이타아제의 분자량은 43,000 달톤이고, 등전점은 5.6이었다.

또한, 분리된 효소 단백질은 단백질/펩티드 시퀀서(Protein/peptide Sequencer)(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 N-말단 아미노산 서열을 결정된 결과는 다음[서열표]에 나타낸 바와 같다.

[서열표]의 서열번호 1은 본 발명 신규주로부터 생산된 파이타아제의 N-말단 아미노산 서열이고, 서열번호

호 2는 에스케리키아 콜라이(E. coli)로부터 생산된 파이타아제[Arch. Biophys. 303(1993)]의 N-말단 아미노산 서열이며, 서열번호 3은 아스커질루스 화이쿰(Aspegillus ficuum)유래의 파이타아제[Prep. Biochem. 18(1988)]의 N-말단 아미노산 서열이다.

[서열표]의 결과로부터 본 발명의 바실러스속(Bacillus sp.) DS11(KCTC 0231BP)이 생산하는 파이타아제 효소는 신규 효소임을 알 수 있다.

[실험예 2]

[신규 파이타아제의 열과 pH에 대한 활성 및 안정성]

상기 실험예 1과 같은 방법으로 분리된 효소를 이용해서 최적온도를 조사한 결과 최적온도는 65℃로 나타났다. 열에 대한 안정성을 측정하기 위해 각 온도에서 10분간 방치한 후 잔존 활성을 측정한 결과는 첨부도면 제3도(3-1)에 나타난 바와 같이 칼슘이온(Ca^{2+})을 첨가하지 않은 경우는 40℃부터 활성이 감소되기 시작하였으나, 5mM의 칼슘이온 첨가시는 70℃까지 안정하였으며, 75℃에서도 50%의 활성을 유지하였다.

이와같은 결과로부터 가축의 체내온도에서 높은 활성을 보일 것으로 판단되어 사료제조 공정에서 75℃이상으로 펠렛팅하거나 익스트류전시키는 등의 가공사료로 이용하는 것이 바람직하다고 판단된다.

파이타아제의 활성을 pH를 달리하면서 측정한 결과는 첨부도면 제3도(3-2)에 나타난 바와 같으며, 최적 pH는 7.0으로 나타났다. 그리고, pH에 대한 안정성을 측정하기 위하여 여러가지 pH에서 1시간 동안 방치한 후 파이타아제의 잔존활성을 측정한 결과 pH 4이하의 산성 조건하에서도 상당량의 효소활성을 가지는 것으로 나타났으며, 이로부터 위내 산성조건에서도 상당히 안정하리라 판단된다.

상기와 같은 온도 및 pH 실험결과 본 발명의 신규 파이타아제는 단위 동물의 사료첨가제로 사용하기에 적합한 것으로 판단된다.

[실험예 3]

[금속이온과 저해제가 효소활성에 미치는 영향]

금속이온과 저해제가 효소활성에 미치는 영향은 다음 표 3에 나타난 바와 같다.

다음 표 3의 결과로부터 EDTA는 1mM 첨가시에 대부분의 효소활성에 저해를 가져왔으며, 구리이온(Cu^{2+}), 아연이온(Zn^{2+}), 마그네슘이온(Mg^{2+})을 5mM 증도로 첨가시 50% 정도 효소 활성의 감소를 가져왔다.

[표 3]

첨가제	농도	
	1 mM	5mM
무첨가	100	100
CuCl ₂	63	43
ZnCl ₂	87	47
MgCl ₂	95	49
MnCl ₂	65	20
LiCl ₂	95	100
HgCl ₂	83	62
CaCl ₂	99	116
RbCl ₂	103	102
EDTA	7.5	7.6
PMSF	86	88

[실험예 4]

[육계 사료에서 신규 파이타아제 사용이 환경오염에 미치는 영향]

육계에 급여하여 인의 이용성과 배출량에 대한 영향을 비교, 파악하기 위하여 신규 파이타아제 급여군, 대두에서 추출한 식물성 파이타아제 급여군, 시판 공팡이 파이타아제(시그마제품, Sigma사) 급여군의 3군으로 나누어 갓 부화된 아바에이커 브로일러 병아리 수컷을 각각 200수씩 공시하여 시험하였다. 시료는 신규 파이타아제 급여군에 있어 배양액을 한외여과를 통해 농축한 후 저온 진공농축시켜 동결건조기로 건조하여 각각 사료 kg 당 500 단위에 해당하는 양을 첨가하였으며, 대두 파이타아제 및 시판공팡이 파이타아제를 동일한 단위만큼 첨가하여 시험한 결과를 다음 표 4에 나타내었다.

[표 4]

항목	식물성(대두) 파이타아제	시판곰팡이 파이타아제	신규 파이타아제
사료내 인 함량(g/kg)	5.5	5.5	5.5
총 사료 섭취량(g/kg)	2.7	2.7	2.7
인 섭취량(g/두)	15.1	15.2	15.1
인 축적량(g/두)	7.1	7.8	8.8
인 배출량(g/두)	8.0	7.4	6.3
인 흡수율(%)	47	51	58

상기 표 4의 결과로부터 신규 파이타아제를 단위가축에게 급여할 경우 대두 파이타아제 및 곰팡이 파이타아제를 급여한 군에 비해 인의 이용율이 높아 배출되는 인의 함량이 더 낮다는 것을 알 수 있는데, 이는 내산성 및 산성조건하에서 활성이 좋으며 가축의 장내에서 효율적으로 작용하는 것과 관련지어 좀 더 유효하게 곡류내 피틴태인을 분해하기 때문으로 판단된다.

[서열표]

서열번호 : 1

서열의 길이 : 15

서열의 형 : 아미노산

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 단백질

서열

Ser-Asp-Pro-Tyr-His-Phe-Thr-Val-Asn-Ala-Ala-Xaa-Glu-Thr-Glu

서열번호 : 2

서열의 길이 : 11

서열의 형 : 아미노산

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 단백질

서열

Ser-Glu-Pro-Glu-Leu-Lys-Leu-Glu-Ala-Val-Val

서열번호 : 3

서열의 길이 : 15

서열의 형 : 아미노산

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 단백질

서열

Phe-Ser-Tyr-Gly-Ala-Ala-Ile-Pro-Gln-Ser-Thr-Gln-Glu-Lys-Gln

(57) 청구의 범위

청구항 1

신균주 바실러스속(Bacillus sp.) DS11(KCTC 0231BP).

청구항 2

바실러스속(*Bacillus* sp.) DS11(KCTC 0231BP)을 사료첨가제로 사용하는 방법.

청구항 3

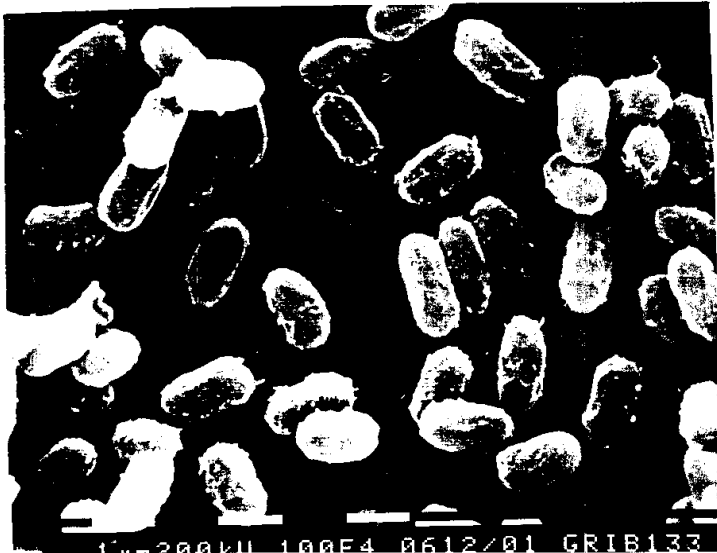
최적온도가 65℃이고, 최적 pH가 7.0이며, 분자량이 43,000 달톤이고, 등전점이 5.6이며, N-말단 아미노산 서열이 [서열표]의 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 바실러스속(*Bacillus* sp.) DS11(KCTC 0231BP)이 생산하는 신규한 효소 파이타아제(Phytase).

청구항 4

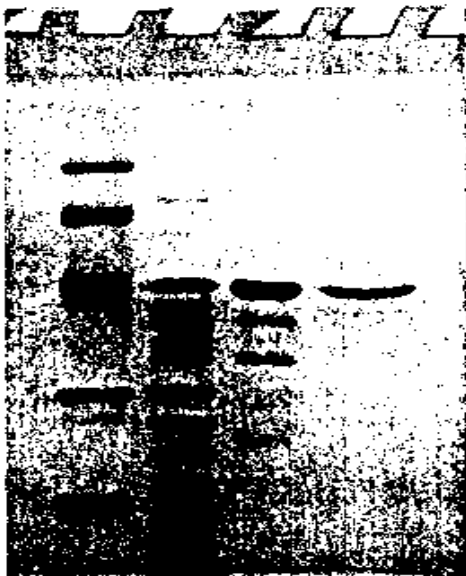
상기 제3항의 파이타아제를 사료첨가제로 사용하는 방법.

도면

도면1



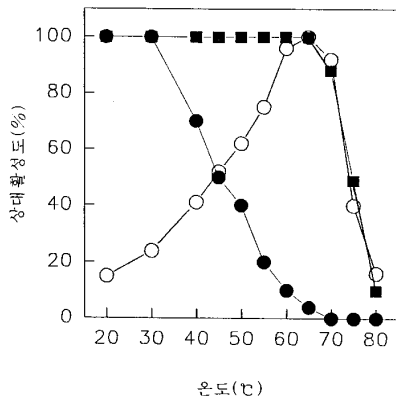
도면2



A B C

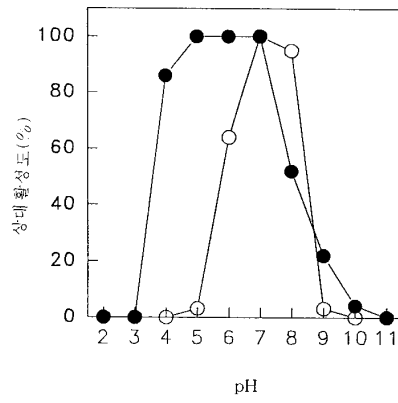
도면3

3-1



- : 최적 온도
- : 칼슘첨가 없이 안정성
- : 5 mM 칼슘첨가 후 안정성

3-2



- : 최적 pH
- : 안정성