

Mannanase를 생산하는 *Bacillus* sp. WL-3 균주의 분리와 효소 생산성

오영필^{1,2} · 이정민¹ · 조기행³ · 윤기홍^{1,2,*}

우송대학교 ¹식품생명과학부, ²생물소재 응용연구센터, ³씨티씨바이오 중앙연구소

Isolation and Enzyme Production of a Mannanase-producing Strain, *Bacillus* sp. WL-3. Oh, Young Phil^{1,2}, Jung-Min Lee¹, Ki Haeng Cho³, and Ki-Hong Yoon^{1,2,*}. ¹School of Food Science & Biotechnology, ²BARC, Woosong University, 17-2, Jayang-dong, Dong-gu, Daejeon 300-718, ³R&D Center, CTCBIO Inc., Seoul 305-600, Korea – A bacterium producing the extracellular mannanase was isolated from Korean fermented food and has been identified as a member of the genus *Bacillus* from the result of the phylogenetic analysis based on partial 16S rRNA sequences. The isolate, named *Bacillus* sp. WL-3, was shown to be similar to *B. subtilis* strain on the basis of its biochemical properties. The mannanase of culture supernatant was the most active at 55°C and pH 6.0. The additional carbohydrates including α -cellulose, avicel, oat spelt xylan, guar gum and locust bean gum (LBG) increased the mannanase productivity. Especially, the maximum mannanase productivity was reached 65.5 U/ml in LB medium supplemented with 0.5% (w/v) LBG, which was 131-folds more than that in LB medium. It was suggested that the increase of mannanase production was owing to induction of mannanase biosynthesis by LBG hydrolysates transported following initial hydrolysis by extracellular mannanase during the cell growth. The molecular weight of WL-3 mannanase was estimated to approximately 38.0 kDa by zymogram on SDS-PAGE.

Key words: *Bacillus*, identification, locust bean gum, mannanase production

서 론

자연계의 식물에서 cellulose 다음으로 풍부하게 존재하는 다당류인 hemicellulose는 리그닌과 셀룰로오스 사이의 식물 세포벽에서 발견된다[8]. Mannan성 다당류는 xylan과 함께 hemicellulose를 이루는 주요 구성물질이며, 다수의 식물 종자나 해조류 등에 분포되어 있다. 이러한 자연계의 mannan성 물질은, 구성하는 당 사이에 β -1,4 결합이 직쇄결격을 이루며 당의 종류에 따라 다음의 4가지로 구분된다. 순수 mannan은 직쇄결격이 오직 mannose로 구성되며, glucomannan은 직쇄결격이 mannose와 일정량의 glucose로 이루어져 있고, galactomannan은 순수 mannan에 그리고 galactoglucomanan은 glucomannan에 각각 galactose가 측쇄로 결합되어 있다[3]. 이들 β -mannan성 다당류는 구성하는 당의 종류와 양에 차이는 있지만 물에 대한 강한 결합력을 가지고 있어 높은 점성을 가진다[14].

β -Mannan성 다당류의 분해에 관계하는 효소로는 내부를 무작위적으로 절단하여 mannobiose와 manno oligomer를 생산하는 반응을 촉매하는 beta-1,4-mannanase(β -mannanase)와 β -mannanase 분해산물을 기질로 하여 mannose를 생산하는

β -1,4-mannosidase 및 galactose 측쇄결합 절단하는 α -galactosidase가 있다. β -Mannanase는 mannan성 다당류를 분해하는데 있어서 중요한 역할을 하며 동물, 식물, 미생물에 다양하게 존재한다. Mannanase는 식품 중 mannan 물질에 의해 점질도가 높은 것을 낮추는 식품가공용 효소[9, 23], 가축의 곡류사료 소화흡수를 향상시키기 위한 사료 첨가제용 효소[12], 제지산업에서 xylanase와 함께 펄프의 가공공정용 효소[16] 및 세제용 효소 등으로 그 용도가 다양하여 개발되고 있다. 효소의 효율적 이용을 위해서는 용도에 부합되는 특성을 지니고 있어야 하는데, 현재 산업적 이용성이 높은 mannanase 생산균으로는 주로 *Aspergillus niger*[1], *A. awamori*[18], *A. oryzae*[11]등의 곰팡이와 *Bacillus* 속 세균이 주목을 받고 있다. 고온성 *Geobacillus stearothermophilus*에서 생산되는 mannanase는 70°C에서도 24시간 동안 안정하게 그 활성을 유지하고 있으며[20], 알칼리성 *Bacillus* sp. AM-001[2]로부터 생산되는 3종류의 mannanase는 pH 8.5~9.0에서 최대의 활성을 나타내 고온의 알칼리 조건에서 반응이 수행되는 펄프 가공공정의 효소로 그 가능성이 높다. 또한, *B. subtilis* 5H에서 생산되는 mannanase는 pH 7.0과 55°C에서 최적의 반응성[13]을 보여 생체내 조건에서 그 반응성이 높을 것으로 기대되어 사료첨가용 효소의 개발이 주목되고 있다. 한편 mannanase는 0°C에서도 서식하는 극저온 곰팡이[6], 온천의 열수구에서 분리한 초호열성 세균[10], 20% NaCl에서 생육이 가능한 극호염성 세균[22]등에서도 발견되었다.

*Corresponding author
Tel. 042-630-9742, Fax. 042-636-2676
E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

본 연구는 식품과 사료의 첨가하거나 가공하는데 사용할 수 있는 안전성이 있는 mannanase를 개발하기 위해 전통적인 장류 발효식품으로부터 mannanase를 생산하는 미생물을 분리하여 이를 동정하고 배지조성이 분리균의 mannanase 생산성에 미치는 영향과 효소의 반응특성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

Mannanase를 생산하는 미생물을 분리하기 위해서 0.5% locust bean gum(LBG)를 첨가한 nutrient 평판배지(beef extract, 3 g; bacto-peptone, 5 g; agar, 15 g; water, 1 liter)를 사용하였으며, mannanase 생산균의 효소 생산량 조사를 위한 기본배지로는 LB 액체배지와 Spizizen의 최소배지(SMM)을 사용하였다[19]. 16S rRNA의 유전자를 도입하기 위한 플라스미드로 pUC19, 숙주균으로 *E. coli* XL1-Blue를 각각 사용하였다.

Mannanase 생산균의 탐색

Mannanase를 생산하는 미생물 분리를 위해 전통 발효 식품 시료 1g을 0.85% NaCl 용액 10 ml에 현탁하고 현탁액의 적당량을 취하여 LBG를 첨가한 nutrient 평판배지에 도달한 후 37°C에서 배양하여 콜로니 주변에 LBG 분해환을 관찰함으로써 mannanase 생산균을 선별하였다[21]. 분리균의 형태적 관찰을 위해서는 그람염색과 포자염색을 실시하였고, 생화학적 특성을 조사하기 위해서는 API 50 CHB kit(API 50 CHB, Biomereux사, France)를 사용하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석

분리균의 16S rRNA 유전자 단편을 증합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭하기 위해 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 5'-TGCCAGCAGCCGCCCTA-3'(Escherichia coli 16S rRNA 유전자 염기서열의 515~531 지역), 5'-TTGTACACACCGCCCGTC-3'(E. coli 16S rRNA 유전자 염기서열의 1389~1406 지역)을 primers로 사용하였으며, Bacillus sp. WL-3으로부터 Rodriguez와 Tait[17]방법으로 분리한 총 염색체 DNA를 주형으로 사용하였다. PCR 반응액은 template DNA(20 ng), 10 mM Tris(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 50 pmol primers와 2.5 U Pfu polymerase로 구성되어 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 50초간 반응을 30회 반복하여 16S rRNA를 코드하는 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자 단편을 SmaI로 절단한 pUC19에 도입한 후 염기서열을 결정하였다.

Mannanase 활성 측정

Mannanase 활성은 LBG를 기질로 하여 효소 반응 후에

유리된 환원당을 3, 5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법[15]으로 다음과 같이 정량 함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1%(w/v) LBG 용액 0.5 ml와 200 mM sodium citrate(pH 6.0) 0.25 ml를 효소 용액 0.25 ml와 혼합하여 50°C에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Mannose를 표준시료로 사용하여 동일 조건에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit은 위의 조건에서 1분 동안 LBG로부터 1 μmol의 mannose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

활성 염색

Bacillus sp. WL-3의 배양상등액을 조효소액으로 사용하여 SDS-PAGE를 수행한 후, polyacrylamide gel을 renaturation 완충용액(25% propanol, 50 mM sodium citrate(pH 6.0))으로 15분씩 3회 세척하여 SDS를 제거하였다. 이를 다시 50 mM sodium citrate(pH 6.0)로 15분씩 3회 세척한 후 polyacrylamide gel 위에 mannanase의 기질로 0.3% konjac과 효소 반응 완충용액 50 mM sodium citrate(pH 6.0)를 함유한 agarose gel을 중층하여 50°C에서 2시간 반응하였다[5]. 반응이 끝난 후 polyacrylamide gel은 단백질 염색을 하였으며, 중층한 agarose gel은 congo red 용액에 담구어 15분 염색한 후 1 M NaCl 용액으로 탈색하여 mannanase 활성 염색을 수행하였다.

결과 및 고찰

Mannanase 생산균의 분리과 동정 및 특성

0.5% LBG를 첨가한 nutrient 평판배지를 사용하여 전통 발효식품에 존재하는 미생물 중 mannanase를 생산하는 미생물을 탐색한 결과 LBG의 분해환이 큰 미생물을 다수 획득하였다. 평판배지에서 LBG를 분해하는 것으로 탐색된 미생물을 액체배지에 배양하여 배양상등액을 조효소액으로 사용하여 LBG를 분해하는 mannanase 활성을 지니고 있는지 조사한 결과 평판배지에서 LBG를 분해하는 균은 그 활성에 차이는 있었지만 mannanase를 생산하는 것으로 확인되었다. 이들 분리균 중의 하나를 WL-3로 명명하고, mannan외에 다른 고분자 물질을 분해할 수 있는지 분석하기 위해 oat spelt xylan(0.5%), skim milk(1%), starch(0.2%), tributyrin(1%)와 carboxymethyl cellulose(0.5%)를 각각 첨가한 평판배지에서 배양하여 분해환을 조사한 결과 분리균 WL-3는 skim milk, starch, carboxymethyl cellulose와 tributyrin은 분해하였으나 oat spelt xylan은 거의 분해하지 못하는 것으로 확인되었다.

분리균 WL-3을 동정하기 위해 특성을 조사한 결과 호기성이며 그람양성 단간균으로 나타났으며, 포자를 형성하였

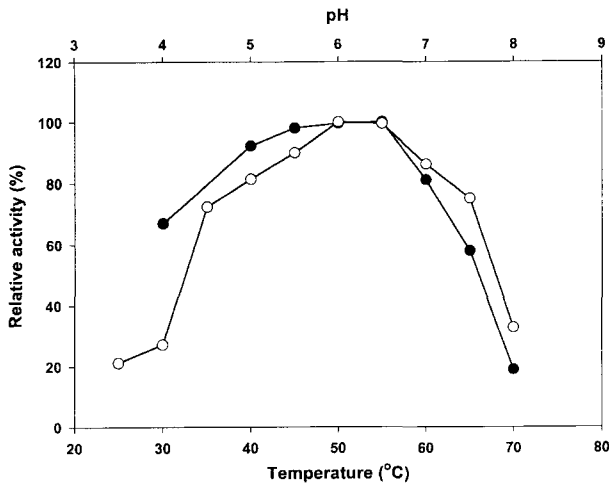


Fig. 1. Effects of reaction temperature and pH on the mannanase activity. Temperature profile (-●-) was obtained by measuring the mannanase activities at pH 6.0 and different temperatures. The reactions was done at 50°C and various pHs for determining the pH profile (-○-). The following buffer systems were used: pH 3.5 to 6.0, 50 mM citrate; pH 6.0 to 8.0, 50 mM sodium phosphate.

다. 그리고 API 50 CHB kit를 사용하여 탄수화물의 이용능을 조사한 결과 glycerol, L-arabinose, ribose, D-xylose, glucose, fructose, mannose, inositol, mannitol, sorbitol, α-methyl-D-glucoside, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, maltose, lactose, saccharose, trehalose는 이용하였으나, 다른 탄수화물은 이용하지 못하는 것으로 확인되었다. 위의 결과로 보아 분리균 WL-3은 *Bacillus* 속에 속하는 균으로 *B. subtilis* 및 *B. licheniformis*와 유사도가 높은 것으로 확인되었는데, *B. subtilis*와는 lactose, inulin, amidon, glycogen, gentiobiose의 이용성에서 *B. licheniformis*와는 amygdalin, amidon, glycogen의 이용성에서 각각 상반된 결과를 보였다.

분리균의 정확한 동정을 위해서 WL-3 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 다른 균주와 비교하기 위해 세균의 16S rRNA 유전자 염기서열 중 보존 염기서열을 primers로 사용하여 분리균의 총염색체 DNA를 template로 하여 PCR을 수행함으로써 증폭된 DNA 단편의 염기서열을 결정하였다 (data not shown). 분리균으로부터 증폭된 DNA 단편인 892 bp 크기의 염기서열은 16S rRNA 유전자 염기서열의 일부에 해당되며, 이를 다른 균주의 것과 비교한 결과 *B. subtilis* 유전자의 염기서열과 가장 상동성이 높은 것으로 나타났다. 따라서 분리균은 *Bacillus*속 균주 중에서 *B. subtilis*와 가장 유사한 것으로 판단된다.

Mannanase의 반응특성

Bacillus sp. WL-3이 생산하는 mannanase의 반응특성을 조사하기 위해 배양상등액을 조효소액으로 사용하여 반응온도와 pH를 달리하여 mannanase 활성을 측정하였다. 그 결

Table 1. Effects of additional carbon sources on the mannanase production

Carbon	mannanase production (U/ml)	Relative productivity (fold)
None	0.5	1.0
Maltose	1.4	2.8
Sucrose	1.1	2.2
Lactose	1.6	3.2
Galactose	2.3	4.6
Mannose	1.0	2.0
Glucose	1.1	2.2
Xylose	2.3	4.6
Fructose	1.0	2.0
Xylan	5.0	10.0
α-cellulose	3.6	7.2
Rice straw	1.8	3.6
Wheat bran	2.4	4.8
Avicel	3.6	7.2
Guar gum	6.4	12.8
LBG	26.4	52.8

과 Fig. 1에 보인바와 같이 55°C와 pH 6.0에서 최고의 mannanase 활성을 보였으며 pH 4.5~7.5 범위에서 최대활성의 약 70% 이상에 해당하는 활성을 보였다. 특히 pH 6.0~7.0에서 그 활성이 높게 유지되어 *Bacillus* sp. WL-3이 생산하는 mannanase가 중성 pH에서 활성이 우수한 것으로 확인되었다. 또한 반응온도가 30~40°C 사이에서 최대활성의 약 65% 이상의 활성을 보이는 것으로 보아 기질의 소장 소 화조건인 pH 6.5와 37°C에서 반응성이 높을 것으로 판단되므로 옥수수나 대두분을 주 사료로 사용하는 양계와 양돈의 사료 첨가용 효소로 적합성이 있다고 판단된다.

탄소원의 종류에 따른 효소 생산성

미생물의 다당류 분해효소는 배양액 중의 탄소원과 탄수화물 성분에 의해 그 생산성이 영향을 받는 경우가 많으므로 탄소원이 *Bacillus* sp. WL-3의 mannanase 생산성에 미치는 영향을 조사하였다(Table 1). 이를 위해 LB 액체배지를 기본배지로 하여 부가 탄소원으로는 각각 멸균된 glucose, xylose, mannose, galactose, fructose, sucrose, maltose, lactose, oat spelt xylan, α-cellulose, avicel, CMC, rice straw, wheat bran, LBG 및 guar gum을 1%(w/v)가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 24 시간 배양하여 배양상등액에 존재하는 mannanase 활성을 조사한 결과 단당류나 이당류를 첨가하였을 때보다 고분자 탄수화물을 첨가하였을 때 mannanase 생산성의 증가정도가 높고 oat spelt xylan, α-cellulose 및 avicel를 첨가한 배지에서는 효소의 생산성이 약 7~10 배 증가되었으며, guar gum과 LBG를 첨가하였을 때는 효소 생산량이 각각 12.8배와 52.8배 상승되었음이 확인되었다. 이로보아 mannanase에 의해 가수분해되는 LBG나

Table 2. Effects of LBG amounts on the mannanase production

Amount (%)	Mannanase production (U/ml)	Relative productivity (fold)
None	0.5	1.0
0.1	22.5	45.0
0.3	28.9	57.8
0.5	35.6	71.2
0.7	35.7	71.4
1.0	26.4	52.8

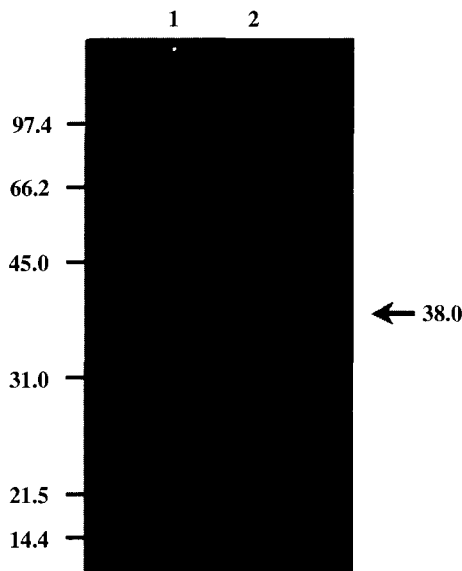


Fig. 2. Zymogram of mannanase produced by *Bacillus sp.* WL-3. After SDS-PAGE of the culture supernatants of *Bacillus sp.* WL-3 grown for 24 h at 37°C in LB medium (lane 1) and LB medium supplemented with 0.5% LBG (lane 2), respectively, protein exhibiting mannanase activity was analyzed by activity staining. An arrow indicates the position at which LBG in the gel was hydrolyzed by the WL-3 mannanase. Molecular size was indicated to the left side of gel.

guar gum이 배지내에 존재할 때 효소 생산성이 크게 증가함을 알 수 있다.

탄수화물 첨가량에 따른 효소 생산성

상기 실험에서 효소 생산성을 증가시키는 정도가 높은 탄수화물 중 oat spelt xylan, α -cellulose, guar gum 및 LBG의 첨가량을 다르게 혼합하여 첨가한 LB 배지에서 배양한 후 mannanase의 생산성을 조사하였으나 LBG만 1%(w/v) 첨가 하였을 때 보다도 생산성이 향상되지 않아 첨가된 탄수화물에 의한 효소 생산성의 상승효과가 없는 것으로 밝혀졌다(data not shown). 따라서 LBG가 효소 생산성 향상에 미치는 영향이 가장 우수하므로 LBG 첨가량을 달리한 LB 액체배지에서 *Bacillus sp.* WL-3를 24시간 배양한 후 mannanase 생산성을 조사하였다. 그 결과 LBG를 0.5%(w/v)

와 0.7%(w/v) 첨가하였을 때 mannanase 생산성이 각각 35.6과 35.7 U/ml에 도달하여 가장 높았으며, 소량의 LBG (0.1% (w/v))를 첨가한 경우에도 mannanase 생산성이 급격히 증가한 것으로 밝혀졌다(Table 2). 또한 *Bacillus* 속 균주의 최소배지인 SMM 액체배지에 LBG를 0.5%(w/v) 첨가하여 배양하였을 때 약 40 U/ml의 생산성을 보였다(data not shown).

Bacillus sp. WL-3의 mannanase 효소의 활성밴드를 관찰하고자 LB 액체 배지와 0.5%(w/v) LBG를 함유한 LB 액체 배지에서 얻은 배양상등액의 효소를 이용하여 glucomannan인 konjac을 기질로 사용하여 mannanase의 활성염색을 실시하였다. 그 결과 LBG를 함유한 배지의 배양 상등액에서 분자량이 약 38.0 kDa 정도로 추정되는 단백질이 mannanase 활성을 강하게 보였으나 LB 배지의 배양 상등액에서는 mannanase 활성도가 매우 미약한 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 Table 2에 나타난 효소 생산성의 결과와 일치하는 것임을 알 수 있다. 또한 예상되는 WL-3의 mannanase 분자량은 *B. subtilis* 5H의 mannanase와 유사하며[13], SDS-PAGE에서 분자량이 73.0 kDa인 *G. stearothermophilus*의 mannanase와는 큰 차이가 있다[20].

Bacillus sp. WL-3의 성장과 mannanase 생산

Mannanase 생산성을 가장 증가시키는 것으로 확인된 LBG가 효소 생산성과 미생물의 성장정도와의 관계를 자세히 조사하기 위해 부가 탄수화물을 첨가하지 않은 LB 액체배지와 0.5%(w/v)의 LBG를 첨가한 LB 액체배지 200 ml을 포함한 1-liter baffled 플라스크에 미리 LB 액체배지에서 배양된 *Bacillus sp.* WL-3 배양액을 1%(v/v)가 되도록 접종하여 37°C에서 진탕배양하면서 일정 시간마다 균의 성장과 효소 생산성의 관계를 조사하였다. 균의 성장을 조사하기 위해서는 배지내에 첨가된 LBG가 불용성 성분을 지니고 있어 흡광도를 측정할 경우 부정확하므로 배양액의 일부를 채취하여 LB 평판배지에 희석 도말하여 생균수를 측정하였고, mannanase의 생산성은 배양상등액을 조효소액으로 하여 결정하였다.

Bacillus sp. WL-3은 배지에 LBG를 첨가하거나 첨가하지 않았을 때 모두 약 5시간만에 최대 성장을 보여 매우 빠른 성장도를 보였다. 정지기에 들어선 후에는 배양시간에 따라 생균수가 서서히 감소하는 것으로 나타났는데, LBG를 첨가한 배지에서는 이를 첨가하지 않았을 때보다 최대 성장도가 높고 생균수의 감소도가 낮은 것으로 확인되었다. Galactomannan인 LBG는 고분자 물질이므로 WL-3 균주가 이를 직접 탄소원으로 이용할 수는 없지만 배양 중 생산되는 mannanase에 의해 배지내에 존재하는 LBG가 분해되어 생성되는 물질 중 mannose와 같은 당당류나 이당류 등이 이용되어 성장과 생존도에 영향을 준 것으로 예상된다.

한편 균의 성장이 중기 대수기에 이르는 배양시간이 4시

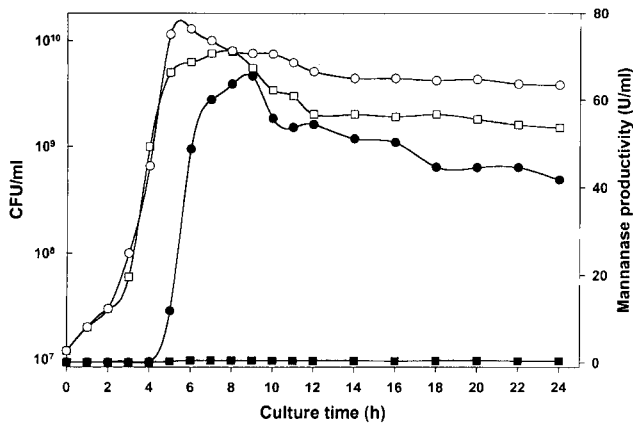


Fig. 3. Growth and mannanase production of *Bacillus* sp. WL-3. *Bacillus* sp. WL-3 was grown respectively in LB broth (squares) and LB broth supplemented with 0.5% locust bean gum (circles) at 37°C with vigorous shaking. The cell growth (open symbols) was determined by measuring cfu of the cell culture. Mannanase activities (closed symbols) were determined with the culture supernatants.

간일 때까지는 LBG의 첨가와 관계없이 mannanase 생산성에 차이가 없고 그 생산성도 매우 낮았으나 균의 성장이 최대에 이르는 5시간부터 LBG를 첨가한 배지에서 효소 생산이 증가하여 최대 생산성에 약 15% 정도의 효소를 생산하였으며 특히 배양시간이 5~6 시간 사이에서 효소 생산성이 약 50 U/ml로 급격히 증가하여 최대 생산성의 75% 수준 이상에 이르렀다. 배양시간이 7시간 이후부터는 효소 생산성의 소폭으로 증가하며 9시간 배양하였을 때 mannanase 생산성이 65.5 U/ml로 최대 생산성을 보여 LBG를 첨가하지 않았을 때와 비교하면 mannanase 생산성이 131배 이상이 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 3). Table 1의 결과에서 보면 glucose나 mannose를 첨가한 배지에서 효소 생산성이 약 2배 정도 증가하였는데 이것은 이들이 탄소원으로 이용되어 균의 성장이 증가함으로써 효소 생산성이 증가된 것으로 판단되며, LBG의 경우는 이들과 비교해 볼 때 효소 생산성 증가가 훨씬 높으므로 mannanase에 의한 LBG의 가수분해 산물 중의 일부가 균의 성장을 증진시킬 수는 있겠지만 효소 생산성의 증가정도가 균의 성장에 기인한 것보다 LBG의 가수분해 산물 중에 *Bacillus* sp. WL-3의 mannanase 생산을 유도하는 물질이 있는 것으로 판단된다.

더구나 LBG가 고분자 물질이므로 직접 세포내로 흡수되지 못하고 가수분해 산물 중의 일부가 흡수되어 mannanase 생산을 유도하였을 것으로 예상되는데 이는 5시간 배양하였을 때 배지내 mannanase의 활성이 약 10 U/ml로 되어 배지내의 LBG를 상당량 가수분해 할 것이다. 이로 인해 생겨난 LBG 가수분해 산물은 세포내로 유입[7] 되어 배양시간 5시간에서 6시간 사이에서 1시간만에 35 U/ml에 해당하는 mannanase의 생산을 유도한 것으로 보이며, 이러한 증가량

은 전체 효소 생산량의 50%를 상회하는 값이다. Cellulase나 xylanase 생산균에서도 cellulose나 xylan 또는 이와 유사한 고분자 탄수화물을 첨가한 배지하였을 때 효소 생산성이 증가되는 경우가 많은데 *Bacillus* sp. 79-23[24]은 밀기울의 존재하에서 cellulase 생산성이 유도되며 *Aspergillus awamori*[18]와 *Streptomyces* sp. QG-11-3[4]은 xylan에 의해 xylanase 생산성이 유도되는 것으로 보고되었다. 이들의 경우도 cellulose나 xylan이 직접 균체내로 흡수되어 효소 생산을 유도한 것이 아니라 이들의 가수분해 산물이 효소생산성을 유도한 것으로 추정되고 있다.

한편 *Streptomyces ipomoea*[16]에서는 배양 중 생산된 mannanase가 배양시간에 따라 배양 상등액의 protease에 의해 가수분해되어 여러 개의 단백질로 분해되는 것으로 밝혀졌는데, 이와는 달리 배양시간에 따라 WL-3의 배양상등액에 존재하는 mannanase를 활성염색으로 조사한 결과 활성도의 차이는 보였으나 배양시간에 관계 없이 Fig 2의 결과와 같은 한 개의 단일 활성단백질만 관찰되었다. 이로보아 WL-3 균주가 생산하는 mannanase는 배양기간 동안 protease에 의해 분해되지 않거나 또는 분해되었을 경우는 분해된 단백질은 완전히 활성을 상실하여 분해되지 않은 단백질만이 활성을 보여 활성염색에서 배양시간에 관계없이 한 종류의 활성 단백질만이 존재하는 것으로 여겨진다.

요 약

전통 발효식품인 장류로부터 분리된 균으로 mannan의 분해능이 우수한 *Bacillus* sp. WL-3는 형태적 특성, 생화학적 성질과 16S rRNA의 염기서열 등이 *Bacillus subtilis*와 유사성이 높은 것으로 확인되었다. 분리균이 생산하는 mannanase는 55°C와 pH 6.0에서 최대활성을 보였으며 중성 pH에서 활성도가 높았다. 배지내에 α -cellulose, avicel, oat spelt xylan, guar gum 및 locust bean gum(LBG)과 같은 고분자성 탄수화물을 첨가할 경우 mannanase 생산성이 증가되었으며, 특히 LBG를 0.5% 함유한 LB 배지에서 9 시간 배양하였을 때 배양상등액내의 효소 활성이 65.5 U/ml로 최대 효소 생산성을 나타내 LBG를 첨가하지 않은 배지에서 보다 효소 생산성이 131배 이상이 증가하였다. 균이 성장하는 동안 생성된 LBG 가수분해 산물이 mannanase의 생합성을 유도하는 것으로 판단된다. 활성염색을 통하여 *Bacillus* sp. WL-3의 mannanase를 분석한 결과 배양상등액에는 분자량이 약 38.0 kDa으로 추정되는 한 종류의 mannanase만이 존재하였다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 공통핵심기술개발 과제로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Ademark, P., A. Varga, J. Medve, V. Harjunpaa, T. Drakenberg, F. Tjerneld, and H. Stalbrand. 1998. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a beta-mannanase. *J. Biotechnol.* **63**: 199-210.
2. Akino, T., N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1988. Characterization of three β -mannanases of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 773-779.
3. Avigad, G. and P. M. Dey. 1997. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrate, pp. 143-204. In P. M. Dey and J. B. Harborne (eds.), *Plant Biochemistry*, Academic Press, San Diego and London.
4. Beg, Q. K., B. Bhushan, M. Kapoor, and G. S. Hoondal. 2000. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 396-402.
5. Beguin, P. 1983. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using Congo red-stained agar replicas. *Anal. Biochem.* **131**: 333-336.
6. Bradner, J. R., R. K. Sidhu, M. Gillings, and K. M. H. Nevalainen. 1999. Hemicellulase activity of antarctic microfungi. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 366-370.
7. Chhabra, S. R., K. R. Shockley, D. E. Ward, and R. M. Kelly. 2002. Regulation of endo-acting glycosyl hydrolases in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* grown on glucan- and mannan-based polysaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 545-554.
8. Dekker, R. F. H. 1985. Biodegradation of the hemicelluloses, pp. 505-533. In T. Higuchi (ed.), *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, Academic Press, Orlando.
9. Dekker, R. F. H. 1979. The hemicellulase group of enzymes, pp. 93-108. In J. M. V. Blanshard and J. R. Mitchell (eds.), *Polysaccharides in food*, Butterworths, London.
10. Gibbs, M. D., R. A. Reeves, A. Sunna, and P. L. Bergquist. 1999. Sequencing and expression of a β -mannanase gene from the extreme thermophile *Dictyoglomus thermophilum* Rt56B.1, and characteristics of the recombinant. *Curr. Microbiol.* **39**: 351-357.
11. Hashem, A. M., A. M. Ismail, M. A. El-Refai, and A. F. Abdel-Fattah. 2001. Production and properties of beta-mannanase by free and immobilized cells of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488. *Cytobios.* **105**: 115-30.
12. Hossain, M. Z., J. Abe, and S. Hizukuri. 1996. Multiple forms of β -mannanase from *Bacillus* sp. KK01. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 95-98.
13. Khanongnuch, C., K. Asada, H. Tsuruga, T. Ooi, S. Kinoshita, and S. Lumyong. 1998. β -Mannanase and xylanase of *Bacillus subtilis* 5H active for bleaching of crude pulp. *J. Ferment. Bioeng.* **86**: 461-466.
14. McCleary, B. V. 1998. β -D-mannanases. *Methods Enzymol.* **160**: 596-610.
15. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
16. Montiel, M. D., M. Hernandez, J. Rodriguez, and M. E. Arias. 2002. Evaluation of an endo-beta-mannanase produced by *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 for the biobleaching of pine kraft pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 67-72.
17. Rodriguez, R. L. and R. C. Tait. 1983. *Recombinant DNA Techniques - An introduction*. pp. 45-46. Addison-Wesley Pub. Co.
18. Siedenberg, D., S. R. Gerlach, K. Schugerl, M. L. F. Giuseppin, and J. Humik. 1998. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures. *Process Biochem.* **33**: 429-433.
19. Spizizen, J. 1958. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **44**: 407-408.
20. Talbot, G. and J. Sygusch. 1990. Purification and characterization of thermostable β -mannanase and α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3505-3510.
21. Torrie, J. P., D. J. Senior, and J. N. Saddler. 1990. Production of β -mannanases by *Trichoderma harzianum* E58. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 303-307.
22. Waino, M. and K. Ingvotsen. 1999. Production of halostable β -mannanase and β -mannosidase by strain NN, a new extremely halotolerant bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 675-680.
23. Ward, O. P. and M. Moo-Young. 1989. Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides, pp. 237-274, In G. G. Stewart and I. Russell (eds.), *Critical reviews in biotechnology*, Vol. 8, CRC Press, Boca Raton, FL.
24. Yoon, K. -H., K. H. Jung, and S. -H. Park. 1997. Isolation and enzyme production of a cellulase-producing *Bacillus* sp. 79-23. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 546-551.

(Received May 17, 2002/Accepted Aug. 5, 2002)