

Bacillus sp. 유래 β -Mannanase의 정제 및 Chromatography에 의한 Xanthan Gum 가수분해물의 분리

박 귀 근

경원대학교 생명공학부 분자·식품생명공학전공

Purification of *Bacillus* sp. β -Mannanase and Separation of Xanthan Gum Hydrolysate by Chromatography Methods

Gwi-Gun Park

Dept. of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Seoungnam 461-701, Korea

Abstract

A β -mannanase of *Bacillus* sp. was purified by DEAE Sephacel ion exchange column chromatography. The specific activity of the purified enzyme was 17.41 units/mg protein, representing an 84.74-folds purification of the original crude extract. For the separation of two types of hydrolysates by the action of purified β -mannanase, carbon column chromatography, sephadex G-25 column chromatography and thin layer chromatography were accomplished. Main hydrolysates were D.P value 5 and 7 containing of low D.P values. By the method of FACE (Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis), two types of hydrolysates were identified to homo type.

Key words: *Bacillus* sp., β -Mannanase, xanthan gum, FACE method

서 론

β -Mannanase[$(1\rightarrow4)$ - β -D-Mannan mannanohydrolase, endo- β -D-Mannanase, EC 3.2.1 78](1-3)는 copra의 내유, 상아야자의 견과, guar gum, locust bean gum, coffee, konjac의 뿌리 등과 같은 식물체에 존재하는 β -mannan의 β -1,4-mannosidic linkage를 가수분해하는 효소이다(4-7). 이러한 β -mannan의 대부분은 유화제, 농화제로서 제빵, 치즈, 아이스크림, 육류 충전제, 우유, 유제품, 섭식용 식품 등의 식품 산업에 이용되고 있지만(8,9), β -mannanase를 산업적으로 이용하는 것에 관해서는 거의 밝혀진 바가 없다. 최근에 manooligosaccharide가 인체의 정상적인 장내상태를 유지하는데 중요한 역할을 하는 *Bifidobacterium*의 좋은 에너지원으로서 유용하다는 것이 밝혀졌다(10). *Bifidobacterium*은 인체 장내 flora의 최우세 균주로서 인체에 유익한 각종 생리활성을 지니고 있지만 각종 질병(11)이나 연령(12)의 증가에 따라서 감소·소실된다는 것이 보고되어져 있으며, 그 때문에 오늘날에는 이들 균종의 장내의 균수를 높이는 연구가 소아과 영역을 비롯하여 임상면에서 널리 행해지고 있다(13,14). Kobayashi 등(10)은 천연의 비소화성 당질을 대상으로 *Bifidobacterium*의 증식촉진성 당질의 검사를 행하여 선택한 konjac manooligosaccharide와 soybean oligosac-

charide를 장내 flora 개선의 소재로서 이용할 목적으로 쥐 및 인체의 투여실험을 행한 후 장내 flora와 대변 및 뇨의 이화학적 성상을 조사한 바 있다. 이 결과에 의하면 konjac manooligosaccharide 및 soybean oligosaccharide를 쥐에 투여했을 경우 bifidus factor라고 알려져 있는 lactulose를 투여한 경우에 비하여 *Bifidobacterium*의 증식촉진효과가 현저히 증가함을 알 수 있었다(15-17).

이와 같은 사실로부터 manooligosaccharide의 투여에 의한 *Bifidobacterium*의 증가는 장내에서 발암관련 물질의 생성에 관여하는 세균의 저하를 초래함과 동시에 이것들의 생성억제, 분해촉진 등의 대사활성을 발현시킨다는 것을 충분히 추론할 수 있다(18,19). 그 외 oligo당으로 fructooligosaccharides, galactooligosaccharides도 *Bifidobacterium*의 증식인자로 작용하여 장내의 부패물질 및 유해물질을 생성시키는 세균을 억제하고, 변비의 개선, 생체내의 면역증강 등의 효과가 있기 때문에 식품첨가물 및 사료첨가물로서 검토되고 있다.

본 연구에서는 *Bacillus* sp. 유래 β -mannanase의 정제를 수행하고, carbon column chromatography, sephadex G-25 column chromatography, thin layer chromatography, FACE (Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis)법에 의해 정제효소처리에 의한 xanthan gum 가수분해물을 검

도하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

Bacillus sp.는 일본 Tsukuba 대학 응용생화학 연구실로부터 분양받아 실험에 사용하였다. FACE 전기영동법에서는 acrylamide(Sigma Chemical Co., USA), SDS(sodium dodecyl sulfate, Bio Rad Laboratories, USA), Tris(Hydroxymethylaminomethane, Bio Rad Laboratories, USA), Glycine(Bio Rad Laboratories, USA), ANTS(8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid, disodium salt, Molecular Probes, USA)를 사용하였고, 효소정제 수지로는 DEAE Sephacel[®](Pharmacia Biotech, USA)를 사용했고, 가수분해물 분리에는 Carbon Activated Powder(藥理化學工業株式會社, Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd., Japan), TLC(Merck TLC plate silicagel 60, Germany) Sephadex G-25(Pharmacia Biotech., USA)를 사용하였다

단백질 농도 결정

UV-Vis spectrophotometer(Model 1201, Shimadzu, Japan)에서 280 nm의 흡광도에서 1 mg/mL의 농도를 1.0이라고 가정하였고, Lowry방법(20)에 의해서도 bovine serum albumin을 standard로 하여 단백질농도를 확인하였다.

효소 활성측정

β -Mannanase의 생산량은 DNS 환원당 정량법(21)에 의하여 수행하였다. 즉, 0.5 mL의 1% gum, 0.4 mL의 McIlvaine buffer pH 6.0)와 0.1 mL의 균체가 제거된 배양액을 섞어 50 °C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 mannose를 회색하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 D-mannose를 0.1~10 mg/mL를 사용하였고, 효소 1 unit의 β -mannanase는 동일조건에서 1분당 생성되는 D-mannose에 해당하는 1 mg/nL의 환원당을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.

DEAE Sephacel ion exchange chromatography에 의한 정제

DEAE Sephacel은 0.2 M McIlvaine buffer solution(pH 6.0)으로 씻은 다음 column(2.5×42 cm)에 충전시켜서 0.2 M McIlvaine buffer solution(pH 6.0)으로 평형을 유지시켰다. 여기에 투석한 조효소 30 mL를 0~1 M NaCl로 linear gradient하여 용출시켰다. 용출속도는 30 mL/hr로 하였고, 용출액은 5 mL씩 fraction collector에 모았고, 각 용출액은 단백질과 효소의 활성을 측정하고 정제도를 확인한 후 효소액으로 사용하였다.

Thin layer chromatography (TLC)

TLC는 McCleary법(22)에 따라 다음과 같은 조건하에서 전개 후 UV조사 및 spray reagent로 분무하여 140°C에서 5분간 가열하여 당을 분석하였다.

- ① TLC plate; 25 TLC plates 20×20 cm silica gel 60 F₂₅₄(Merck, Germany)
- ② Developing solvent; n-propanol : methanol : water = 5 : 2 : 3(v/v/v)
- ③ Spray Reagent; 30% sulfuric acid-ethanol

Column chromatography에 의한 분리

효소액 300 mL에 대해 0.5% gum을 24시간 가수분해해 TLC로 pattern을 검토한 후 carbon column chromatography를 이용해 250 mL/hr 유속으로 ethanol 0~30%의 gradient method로 당을 분리하여, Sephadex G-25 column chromatography를 이용해 0.05 M-NaCl로 용출시킨 당용액 0.2 mL와 5% phenol 0.2 mL를 가하여 혼합후 conc.-H₂SO₄ 1 mL를 가하여 혼합한 후 20분간 방치하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

FACE (Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis)

ANTS 유도체화한 당의 전기영동은 30%의 polyacrylamide gel을 이용했다. 즉, acrylamide A, acrylamide B, buffer A를 혼합해, 5분간 탈기한 후 10% APS와 TEMED를 첨가해 separating gel을, acrylamide a, Buffer B와 증류수를 혼합해 5분간 탈기한 후 10% APS와 TEMED를 첨가해 stacking gel을 제조해 buffer C를 영동용 완충용액으로 하여 stacking gel은 100 V, separating gel은 300 V로 전기영동을 수행하였다.

결과 및 고찰

DEAE Sephacel ion exchange chromatography에 의한 정제

Fig. 1는 DEAE Sephacel ion exchange chromatography (2.5×42 cm)에 의해 *Bacillus* sp. 유래 β -mannanase의 정제

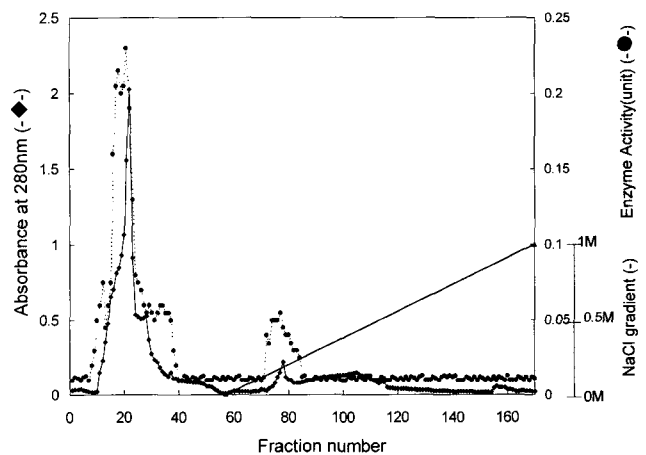


Fig. 1. Chromatogram of the β -mannanase from *Bacillus* sp. by DEAE Sephacel column chromatography.

Table 1. Summary of purification of β -mannanase from *Bacillus* sp.

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	1038	5052	0.21	1.0	100
30% (NH ₄) ₂ SO ₄	954	4224	0.23	1.1	91.91
DEAE Sephacel ion exchange column chromatography	585	33.6	17.41	84.74	56.36

를 수행한 것으로 평형화된 column에 효소액 30 mL를 투여해 30 mL/hr 유속으로 tube당 5 mL씩 용출하였으며 0~1 M NaCl linear gradient로 농도구배법에 의해 용출한 결과 fraction No. 18~20와 70~86에서 두 개의 peak가 나타났으며 이 중 활성이 인정되는 main peak는 NaCl gradient 농도구배를 fraction No. 60부터 진행한 이후에 나타나는 fraction No. 70~86이 인정되었다.

30% ammonium sulfate를 처리한 후 DEAE Sephacel ion exchange chromatography를 수행한 후의 정제효소의 비활성은 17.41 units/mg로서 정제배율은 84.74배를 나타내었다 (Table 1).

Column chromatography에 의한 xanthan gum 가수분해물 분해 pattern

Carbon column chromatography을 이용해 xanthan gum을 0~50%의 ethanol gradient method로 분리한 결과 fraction number 40~45 및 50~60사이에서 broad한 2개 peak의 가수분해물 pattern을 나타내고 있으며 (Fig. 2), 가수분해물의 분리도를 확인하기 위하여 Fig. 3과 같이 TLC를 수행한 결과 fraction No. 40~44에서는 중합도 5에 해당하는 가수분해물이 주축을 이루고 있는 반면 fraction No. 50~55에서는 중합도 7의 가수분해물이 주축을 이루고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 fraction No. 40~45사이에서는 일부 소량의 저중합도 2와 3의 가수분해물이 포함되어 있으며 fraction No. 50~60사이에서는 고중합도 7이상의 가수분해물 일부가 포함되어 있어 주요 가수분해물의 중심을 이루고 있는 중합도 5와 7의 분리를 위해 다음 단계에서 fraction No. 40~55를 모아 농축하여 gel filtration method에 의한 분리를 시도하였다.

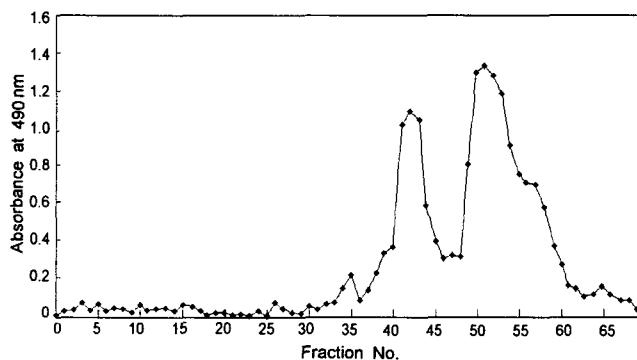


Fig. 2. Separation of xanthan gum hydrolysates by carbon column chromatography.



Fig. 3. Thin-layer chromatogram of xanthan gum hydrolysates by carbon column chromatography.

A: Standard mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetraose and mannopentaose from top to bottom. B: Hydrolysate of xanthan gum by the enzyme treatment. Numbers represent fraction numbers.

Sephadex G-25 column chromatography에 의한 xanthan gum 가수분해물 분리

1차 TLC상에서의 결과에서는 저중합도의 가수분해물도 일부 포함되어 있어, 중합도별 가수분해물의 분리도를 높이기 위해 2차로 Sephadex G-25 column chromatography를 이용한 결과 fraction No. 12~15에서 중합도 7의 올리고당과 fraction No. 77~80에서 중합도 5의 가수분해물을 분리할 수 있었고 (Fig. 4), 가수분해물의 분리도를 확인하기 위해 2차 TLC를 수행한 결과는 Fig. 5에서 나타내고 있다. Fraction No. 12~15에서는 중합도 7이 주축을 이루고 있으나 일부 소량의 고중합도 가수분해물이 공존하고 있는 것으로 사료되며, fraction No. 77~80에서는 분리능이 높게 중합도 5의 가수분해물이 분리된 것으로 사료된다.

FACE (Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis)법에 의한 xanthan gum 가수분해물 분리 및 동정

Buffer A, B, C, 20% glycerol, acrylamide, ANTS화 시약, APS, TEMED를 이용하여 separation gel과 stacking gel을 만들어 Sephadex G-25 column chromatography에서 분리

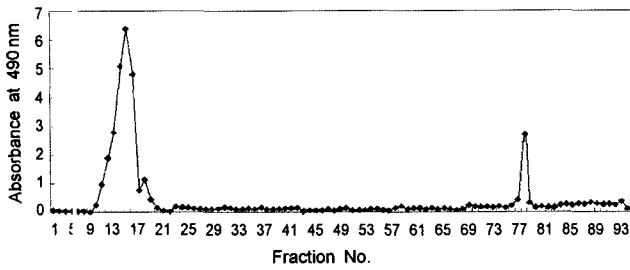


Fig. 4. Separation of D.P (Degree of Polymerization) value 5 and 7 by Sephadex G-25 column chromatography.

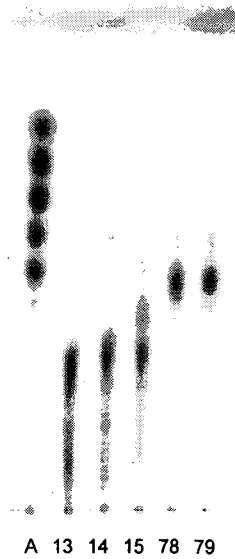


Fig. 5. Thin-layer chromatogram of Separation of D.P value 5 and 7 by Sephadex G-25 column chromatography. A: Standard mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetraose and mannopentaose from top to bottom. Numbers represent fraction numbers.

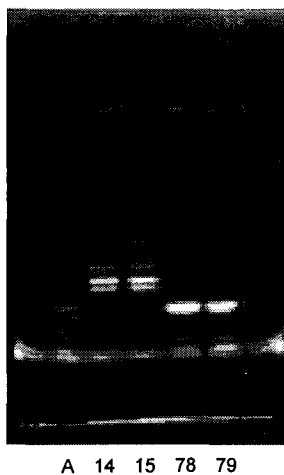


Fig. 6 Identification of xanthan gum Hydrolysate by FACE method. A: Standard mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetraose and mannopentaose from bottom to top. Numbers represent fraction numbers.

된 fraction No. 12~15, 77~80을 동결건조시킨 후 ANTS-Labeled하여 Fig. 6과 같이 전기영동한 결과로서 fraction No. 12~15에서는 중합도 7이 main band로, fraction No. 77~80에서는 중합도 5의 main band를 확인할 수 있었다. 이와 같이 분리된 2개의 fraction은 homo type의 가수분해물로 사료된다. 이와같은 type의 결정은 차후 가수분해물 구조동정에 매우 유리한 자료로 활용될 것이다. 현재 본 연구실에서는 분리된 중합도 5과 7의 순도 및 수득율을 높혀 구조식을 규명하는 연구를 수행중에 있다.

요 약

DEAE Sepahcel ion exchange chromatography(2.5×42 cm)에 의해 *Bacillus* sp. 유래 β -Mannanase정제를 수행하였다. 정제효소의 비활성은 17.41 units/mg로서 정제배율은 84.74배를 나타내었다. Carbon column chromatography를 이용하여 0~50%의 ethanol gradient법으로 xanthan gum의 가수분해물을 분리한 결과 fraction number 40~45 및 50~60사이에서 broad한 2개 peak의 가수분해물 pattern을 나타내었다. 가수분해물의 분리도를 확인하기 위하여 TLC를 수행한 결과 fraction No. 40~44에서는 Rf value상 중합도 5에 해당하는 가수분해물이 주축을 이루고 있는 반면 fraction No. 50~55에서는 중합도 7의 가수분해물이 주축을 이루고 있음을 확인할 수 있었다. 중합도별 가수분해물의 분리도를 높이기 위해 2차 Sephadex G-25 column chromatography를 수행한 결과 fraction No. 12~15에서 중합도 7의 올리고당과 fraction No. 77~80에서 중합도 5의 가수분해물을 분리할 수 있었고, 가수분해물의 분리도를 확인하기 위해 2차 TLC를 수행한 결과 fraction No. 12~15에서는 중합도 7이 주축을 이루고 있으나 일부 소량의 고중합도 가수분해물이 공존하고 있는 것으로 사료되며, fraction No. 77~80에서는 분리능이 높게 중합도 5의 가수분해물이 분리되었다. 이와 같이 분리된 2개의 fractions은 FACE법에 의해 Homo type가수분해물로 동정되었다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 경원대학교 학술연구비 지원을 받아 수행되었기에 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Park GG, Chang HG. 1992. Separation and preparation of galactosylmanno-oligosaccharides from copra galactomannan by mannanase from *Penicillium purpurogenum*. *J Microbiol Biotechnol* 2: 204-208.
2. Kim JH, Lee TK, Yang HC, Oh DK. 1997. Optimization of medium for β -mannanaseproduction by *Bacillus* sp. WS-42. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 212-217.

3. Park GG. 1994. Production of mannoooligosaccharides by the *Penicillium purpurogenum* mannanase. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 509-514.
4. Tipson RS, Horton D. 1976. β -1,4-Mannosidic linkage of mannan. In *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. Academic Press, New York. Vol 32, p 299-301.
5. Tsujisaka Y, Hiyama K, Fukumoto. 1972. Guar gum hydrolyzing enzyme in plant. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 43: 155-160.
6. Hishimoto Y, Fukumoto J. 1969. β -1,4-Mannosidic linkage of konjak. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 43: 317-319.
7. Takahashi R, Kusakabe I, Maekawa A, Suzuki T, Murakami K. 1983. Studies on mannanase of *Actinomycetes*. *Japan J Trop Agr* 27: 140-147.
8. Dekker RFH, Richard GN. 1976. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. Hemicellulases: Their occurrence, purification, properties and mode of action* 32: 300-301.
9. Isao K, Rihei T, Satoru K, Yoshio S, Kazuo M, Akio M, Takao S. 1985. Structure of the glucomannooligosaccharides resulting from the hydrolysis of konjac glucomannan produced by a β -mannanase from *Streptomyces* sp.. *Report of Research Projecton Tropical Agricultural Resorces* 4: 151-161.
10. Kobayashi Y, Echizen R, Mutai M. 1984. Intestinal flora and dietary factors. *Processings of the 4th RIKEN Symposium on Intestinal flora*. Japan Scientific Press, Tokyo. p 69-70.
11. Haenel H, Bending J. 1975. Bifidobacterium role of intestinal flora. In *Progresses in Food and Nutrition Science*. Pergam Press p 1: 21.
12. Shin SJ. 1988. Emerging foodborne pathogenes of public health importance. The challenge and prospects for the 21st century in verterinary science 38: 77-83.
13. Doyle MP, Roman DJ. 1992. Recovery of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from inoculated foods by selective enrichment. *Appl Environ Microbiol* 43: 1343-1349.
14. Tauxe RV, Hargrett-Bean N, Patton CM, Wachsmuth IK. 1988. *Campylobacter* isolates in the United States, 1982-1986. *Morbid Weekly Report* 37: 1-13.
15. Shin SY, Park JH. 1997. Activities of oxidative enzymes related with oxygen tolerance in *Bifidobacterium* sp. *J Microbiol Biotechnol* 7: 356-359.
16. Lemke M, Churchill PF, Wetzel RG. 1995. Effect of substrate and cell surface hydrophobicity on phosphate utilization in bacteria. *Appl Environ Mirobiol* 61: 913-919.
17. Steeg RF, Hellemons JC, Kok AE. 1999. Synergistic actions fnisin, sublethal ultrahigh pressure, and reduced temperature on bacteria and yeast. *Appl Environ Microbiol* 65: 4148-4154.
18. Park GG, Jung GH, Kobayashi H. 1999. Purification and application of earthworm α -galactosidase by affinity chromatography. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27: 298-307.
19. Park GG, Lee SY, Park BK, Ham SS, Lee JH. 1991. Characteristic features of a galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. *J Microbiol Biotechnol* 1: 90-97.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Fan AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-271.
21. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
22. McCleary BV. 1982. Purification and properties of a mannoside mannohydrolase from guar. *Carbohydr Res* 101: 74-92.

(2003년 2월 24일 접수; 2003년 6월 10일 채택)