

된장 분리균 *Bacillus subtilis* WL-7에 의한 Mannanase 생산

권민아^{1,2} · 김현숙¹ · 이미성³ · 최준호³ · 윤기홍^{1,2,*}

우송대학교, ¹식품생명과학부, ²생물소재 응용연구센터, ³씨티씨바이오 중앙연구소

Mannanase Production by a Soybean Isolate, *Bacillus subtilis* WL-7. Kweun, Min A^{1,2}, Hyun Suk Kim¹, Mi-Sung Lee³, Joon Ho Choi³, 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 soybean paste. The isolate WL-7 has been identified as *Bacillus subtilis* on the basis on its 16S rRNA sequence, fatty acid composition, morphology and biochemical properties. The mannanase of culture supernatant was the most active around 55°C and pH 6.0°C, and retained 90% of its maximum activity at range of pH 5.0~7.5 and 50~60°C. The additional carbohydrates including lactose, α -cellulose, avicel, locust bean gum (LBG), wheat bran and konjak increased dramatically the mannanase productivity of strain WL-7. Especially, the maximum mannanase productivity was reached to 224 U/ml in LB medium supplemented with both 0.5% LBG and 0.5% konjak, which was approximately 200-folds more than that in LB medium. It was suggested that the increase of mannanase production was owing to induction of mannanase biosynthesis by both LBG and konjak hydrolysates transported following initial hydrolysis by extracellular mannanase during the cell growth.

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

Mannan 다당류는 xylan과 함께 목재의 hemicellulose를 이루는 주요 구성물질이며, 다수의 식물 종자나 해조류 등에 분포되어 있다. 이러한 자연계의 mannan성 물질은 구성 당 사이에 β -1,4 결합이 직쇄결합을 이루며 당의 종류에 따라 다음의 4 가지로 구분된다. 순수 mannan은 직쇄결합이 오직 mannose로 구성되며, glucomannan은 직쇄결합이 mannose와 일정량의 glucose로 이루어져 있고, galactomannan은 순수 mannan에 galactose가 그리고 galactoglucomannan은 glucomannan에 galactose가 각각 측쇄로 결합되어 있다[4]. 이들 β -mannan성 다당류는 구성 당의 종류와 양에 차이는 있지만 물에 대한 강한 결합력을 가지고 있어 높은 점성을 가진다[15].

β -Mannan 다당류의 분해에 관계하는 효소로는 내부를 무작위적으로 절단하여 mannobiose와 mannooligomer를 생산하는 반응을 촉매하는 β -1,4-mannanase(β -mannanase)와 β -mannanase 분해산물을 기질로 하여 mannose를 생산하는 β -1,4-mannosidase 및 galactose 측쇄결합을 절단하는 α -galactosidase가 있다. 이들 효소중에서 β -mannanase는 mannan 다당류를 분해하는데 있어서 중요한 역할을 담당한다.

Mannanase는 두과 종자에서 오일의 추출공정이나 인스턴트

트 커피 제조시 커피 추출물의 점도를 감소시키는 식품가공용 효소[7, 8], 가축의 곡류사료 소화흡수율을 높이고 항영양 인자를 제거하는 기능의 사료 첨가제용 효소[9], 제지산업에서 펄프의 가공공정용 효소[18] 및 세제용 효소 등으로 그 용도가 다양하게 개발되고 있으며, 산업적 용도의 잠재력이 큰 효소로써 산업적 이용성을 높이기 위해서는 생산성의 개선이 필요하며 용도에 부합되는 특성을 지닌 mannanase의 개발이 필요하다. 따라서 *Aspergillus*속[1]과 *Trichoderma*속[3]에 속하는 균주를 포함하는 다양한 곰팡이들과 *Bacillus*속[2, 12, 13, 25]과 *Streptomyces*속[14, 18, 19]에 속하는 균주를 중심으로 많은 세균들이 mannanase 생산균으로 분리되었으며, 이들로부터 생산된 mannanases가 정제되고 그 특성이 밝혀졌다. *Bacillus*속 균주는 mannanase의 생산성이 우수하고, 균주에 따라 다양한 특성을 지닌 효소가 생산된다. *Bacillus lentus*는 mannanase 생산성이 매우 우수하여 현재 ChemGen Corp.에 의해 상품화 효소로 개발되었으며, 내열성[22] 또는 내알칼리성[2] 효소와 농업부산물 등을 이용하여 mannanase를 생산[6, 16]하는 *Bacillus*속 균주들이 활발히 연구되고 있다.

본 연구는 식품과 사료산업에서 사용할 수 있도록 안전성이 있는 mannanase 효소제를 개발하기 위해 장류 발효식품으로부터 mannanase를 생산하는 미생물을 분리하여 이를 동정하고 배지조성이 분리균의 mannanase 생산성에 미치는 영향과 효소의 반응특성을 검토하였다.

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

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

Mannanase를 생산하는 미생물을 분리하기 위해서 0.5% locust bean gum(LBG)이 첨가된 nutrient 평판배지(beef extract, 3 g; bacto-peptone, 5 g; agar, 15 g; water, 1 L)를 사용하였으며, mannanase 생산균의 효소 생산량 조사를 위한 기본배지로는 LB 액체배지 (yeast extract, 5 g; tryptone, 10 g; NaCl, 5 g; water, 1 L)를 사용하였다. LB 배지에 첨가하는 탄수화물은 단당과 소당류의 경우 개별 여과멸균하여 첨가하였으며, 고분자 탄수화물이나 불용성 탄수화물은 LB 배지와 함께 멸균하여 사용하였다.

Mannanase 생산균의 탐색과 특성

Mannanase를 생산하는 미생물 분리를 위해 가정에서 제조된 된장 시료 1 g을 0.85% NaCl 용액 10 ml에 현탁하고 현탁액의 적당량을 취하여 LBG를 첨가한 nutrient 평판배지에 도말한 후 37°C에서 배양하여 콜로니 주변에 LBG 분해환을 관찰함으로써 mannanase 생산균을 선별하였다. 분리균의 형태적 관찰을 위해서는 그람염색과 포자염색을 실시하였으며, 생화학적 특성을 조사하기 위해서는 API 50 CHB kit(API 50 CHB, Biomereux사, France)를 사용한 당 이용성의 분석을 실시하였다.

지방산 분석

균주의 세포 지방산 분석을 위해 tryptic soy 평판배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양된 균체의 지방산을 Microbial Identification System(MIDI; Microbial ID)의 지침에 의해 추출하여 분석하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석

분리균의 16S rRNA 유전자 단편을 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭하기 위해 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(염기서열 위치 9~27 지역), 5'-AGAAAGGAGGTGATC-CAGCC-3'(염기서열 위치 1523~1542 지역)을 primers로 사용하였으며, *B. subtilis* WL-7으로부터 Rodriguez와 Tait [21]방법으로 분리한 총 염색체 DNA를 주형으로 사용하였다. PCR 반응액은 template DNA(10 ng), 10 mM Tris(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 30 pmol primers와 5 U Taq polymerase로 구성되어 95°C에서 60초, 60°C에서 30초, 72°C에서 90초간 반응을 30회 반복하여 16S rRNA를 코딩하는 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자 단편을 정제한 후 dye terminator cycle sequencing kit와 373A automate DNA sequencer를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

Mannanase 조효소액 제조

B. subtilis WL-7을 0.5% LBG가 첨가된 LB 배지에서 하룻밤 배양한 후 배양액을 1%(v/v)가 되도록 동일 성분의 본 배양액에 집중하고 37°C에서 baffled flask를 사용하여 18시간 동안 진탕배양 하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 ammonium sulfate(30~70%)로 처리한 후, 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 한 후 침전물을 취하여 20 mM Na-phosphate 완충용액(pH 6.0)에 녹이고 이를 동일한 완충용액에 투석하였다.

Mannanase 활성 측정

Mannanase 활성은 LBG을 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법[17]으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1%(w/v) LBG 용액 0.5 ml와 200 mM sodium phosphate(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.

결과 및 고찰

Mannanase 생산균의 분리와 동정 및 특성

0.5% LBG를 첨가한 nutrient 평판배지를 사용하여 가정에서 제조된 된장에 존재하는 미생물 중 mannanase를 생산하는 미생물을 탐색하여 LBG의 분해환이 큰 균주들 중 하나인 WL-7을 분리하였다. 분리균 WL-7은 37°C에서 생육도가 높았으며, 55°C까지는 정상적인 성장을 하는 것으로 나타났다. 60°C 이상에서는 성장하지 못하였다. WL-7이 mannan외에 다른 고분자 물질을 분해할 수 있는지 분석하기 위해 0.5% oat spelt xylan, 1% skim milk, 0.2% potato starch, 1% tributyrin과 0.5% carboxymethyl cellulose(CMC)를 각각 첨가한 평판배지에서 하룻 밤 배양하여 분해환을 조사한 결과, skim milk, starch, CMC, oat spelt xylan과 tributyrin 모두 분해하는 것으로 확인되었으며, 다른 mannanase 생산균주인 *Bacillus* sp. WL-3 [20]과는 xylan 분해능에서 차이가 있었다.

분리균 WL-7을 동정하기 위해 형태적 특성을 조사한 결과, 그람양성 간균으로 균체 중앙에 포자를 지니고 있으며, 운동성을 지니고 호기성균으로 확인되었다. 생화학적 특성을 조사한 결과, Table 1에 나타낸 바와 같이 탄수화물 이용능이 *B. subtilis*와 유사도가 95.2%로 가장 높게 나타났으며,

Table 1. Characteristics of the isolate WL-7.

Analysis	Characteristics	Results
Biochemical properties	Catalase	+
	Tryptophanase	-
	Methyl-Red test	-
	Voges-Prokauer test	+
	Urease	-
	Gelatin hydrolysis	+
	D-glucose, D-fructose, D-mannose, glycerol L-arabinose, inositol, mannitol, sorbitol maltose, ribose, esculin, salicin inulin, sucrose, raffinose, D-xylose, melibiose, cellobiose	+
Fatty acid composition	L-xylose, galactose, rhamnase, lactose erythritol, gluconate, D-arabitol, D-lyxose D-tagatose, 2-keto-gluconate, D-arabinose, xylitol, gentiobiose	-
	Iso-C _{14:0}	1.31 %
	Iso-C _{15:0}	19.27 %
	Anteiso-C _{15:0}	45.11 %
	Iso-C _{16:0}	3.56 %
	n-C _{16:1} 11c	2.18 %
	n-C _{16:0}	4.01 %
	Iso-C _{17:1} 10c	1.57 %
	Iso-C _{17:0}	8.59 %
	Anteiso-C _{17:0}	13.28 %

단지 gentiobiose의 이용성만이 차이가 있었고 다른 탄수화물의 이용성은 *B. subtilis*와 동일하였다. 또한, *B. atrophaeus*와 *B. subtilis*의 지방산 조성과 각각 0.729와 0.630의 유사도 값을 보여 분리군의 정확한 동정을 위해서 16S rRNA 유전자 염기서열을 조사하였다. PCR로 증폭된 DNA 단편의 염기서열을 결정하여 얻은 1,495 bp 크기의 염기서열을 다른 균주의 것과 비교한 결과, *B. subtilis*의 16S rRNA와 완전히 일치하였으며 *B. atrophaeus* JCM 9070(GenBank accession No. AB021181)과는 12 염기가 서로 다른 것으로 확인되었다(data not shown). 상기 특성으로 보아 분리군 WL-7은 *B. subtilis*에 속하는 균으로 판단되었다.

탄소원 종류에 따른 효소 생산성

미생물 유래의 다당류 분해효소는 배양액 중의 탄소원과 탄수화물 성분에 의해 그 생산성이 영향을 받는 경우가 많으며, mannanase의 경우 다수의 세균에서 mannan 다당류를 첨가한 배지에서 효소 생산성이 증가된다는 사실이 보고되었다[6, 11, 14, 20, 23, 25]. 분리군 *B. subtilis* WL-7의 mannanase 생산성에 탄수화물이 미치는 영향을 조사하기 위해 LB 액체배지를 기본배지로 하여 부가 탄소원을 1% (w/v)가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 18 시간 배양하여 배양상등액에 존재하는 mannanase 활성을 조사한 결과, Table 2에 보인 바와 같이 단당류나 소당류를 첨가하였을 때보다 고분자 탄수화물을 첨가하였을 때 mannanase 생산성의 증

Table 2. Effects of additional carbon sources on the mannanase production.

Carbon sources	Mannanase production (U/ml)	Relative productivity (fold)
None	0.9	1.0
Maltose	2.2	2.4
Mannose	1.8	2.0
Glucose	2.1	2.3
Arabinose	1.7	1.9
Sucrose	2.3	2.6
Mannitol	2.5	2.8
Fructose	2.0	2.2
Lactose	14.6	16.2
Xylose	2.1	2.3
Galactose	3.3	3.7
Trehalose	1.9	2.1
Oat spelt xylan	8.0	8.9
α-Cellulose	16.6	18.4
Rice straw	8.9	9.9
Wheat bran	9.1	10.1
Starch	2.3	2.6
Avicel	9.8	10.9
Locust bean gum	50.6	56.2

가정도가 높은 현상을 보였지만, lactose의 경우도 mannanase 생산성에 미치는 영향이 큰 것으로 확인되었다. Lactose에 의해 mannanase 생산이 유도되는 현상은 *Bacillus* sp. WS-42에서도 유사한 것으로 보고 되었으나[13], *Bacillus* sp. WL-3에서는 효소 생산성이 크게 증가하지 않는 것으로 알려졌다[20]. 또한 고분자 탄수화물 중에서 starch를 제외하고는 밀기울, avicel, α-cellulose 및 LBG이 첨가된 배지에서는 모두 mannanase 생산성이 10배 이상 증가되었으며, 특히 LBG를 첨가한 배지에서 가장 생산성이 높은 것으로 확인되었다. 이와 같이 배지내 LBG에 의해 mannanase 생산이 효율적으로 유도되는 현상은 *Streptomyces*속[14, 18, 19]과 *Bacillus*속 [13, 25]에 속하는 다수의 균주에서 발견되었다.

탄수화물 첨가량에 따른 효소 생산성

상기 실험에서 mannanase 생산성을 증가시키는 정도가 높은 탄수화물 중 이당류인 lactose와 다당류인 LBG를 대상으로 하여 배지내 첨가량을 달리하였을 때의 mannanase 생산성을 검토하였다. LB 배지에 1~10% (w/v) lactose를 각각 첨가하여 WL-7 균주를 배양한 결과, 3% lactose를 첨가하였을 때 mannanase 생산성이 약 20 U/ml로 가장 높은 생산성을 보였으며, 3% 이상을 첨가하였을 때도 이와 유사한 생산성을 보였다(data not shown). Mannanase 생산성 향상에 미치는 영향이 가장 우수한 것으로 나타난 LBG를 0.1~1% 범위로 첨가량을 달리한 LB 액체배지에서의 mannanase 생산성을 조사한 결과, LBG를 0.5%와 0.7%가 되게 첨가하였을 때 70 U/ml 이상의 mannanase 생산성을 보였으며, 소량

의 LBG(0.1% (w/v))를 첨가한 경우에도 mannanase 생산성이 급격히 증가한 것으로 밝혀졌다(Table 3). 한편 LBG외에도 mannan 다당류인 guar gum이 *Clostridium tertium*[11]과 *Flavobacterium* sp.[27]에서 mannanase의 생산성을 증가시키며, *Vibrio* sp. MA-138[23]은 konjak에 의해 가장 효소 생산성이 증가되는 것으로 알려져 있다. 따라서 konjak과 guar gum을 각각 LB 배지에 첨가하여 배양한 후 mannanase 생산성을 검토한 결과 guar gum에 의한 mannanase 생산성의 증가는 낮은 것으로 나타났으나(data not shown), konjak을 첨가한 배지에서는 효소 생산성의 증가정도가 LBG를 첨가하였을 때보다 높았다(Table 3)

LBG만을 첨가하였을 때 0.5% 첨가시 효소 생산성이 가장 높았으므로 0.5% LBG와 함께 konjak의 첨가량을 달리한 배지에서 18시간 배양한 후 WL-7의 배양상등액에 존재하는 효소 활성을 측정된 결과 Table 4에 보인바와 같이 0.5% LBG만을 첨가하였을 때보다 konjak을 함께 첨가하였을 때 mannanase 생산성이 증가되었으며, 0.5% konjak을 첨가하였을 때 최고의 생산성을 보여 LBG만을 첨가하였을 때보다 2배 이상의 증가도를 나타냈다. LBG와 동시에

Table 3. Effects of various amounts of LBG and Konjak on the mannanase production.

Carbon sources	Amount (%)	Mannanase production (U/ml)	Relative productivity (fold)
None	0.0	0.9	1.0
	0.1	45.4	50.4
	0.3	51.2	56.9
	0.5	74.4	82.7
	0.7	71.5	79.4
Konjak	0.05	29.1	32.3
	0.1	35.6	39.6
	0.2	72.4	80.4
	0.3	100.1	111.2
	0.4	111.3	123.7
	0.5	119.8	133.1

Table 4. Effects of various amounts of konjak and 0.5% LBG on the mannanase production.

Carbon	Additional Konjak amount (%)	Mannanase production (U/ml)	Relative productivity (fold)	
None	0.00	0.9	1.0	
	0.00	87.0	95.6	
	0.05	107.3	119.2	
	0.10	117.1	130.1	
	LBG (0.5%)	0.20	147.4	157.1
		0.30	170.4	189.3
		0.40	190.8	212.0
		0.50	209.8	233.1
		1.00	201.8	224.2

konjak을 첨가하였을 때 mannanase 생산성 증가에 상승효과가 나타난 것은 LBG와 konjak이 mannan 다당류이지만 LBG는 galactomannan이고 konjak은 glucomannan이므로 mannanase 생산성의 증가에 미치는 이들 성분은 다를 것으로 판단된다.

B. subtilis WL-7의 성장과 Mannanase 생산

B. subtilis WL-7의 mannanase 생산성을 가장 증가시키는 것으로 확인된 LBG와 konjak에 대한 효소 생산성과 미생물의 성장정도와의 관계를 자세히 조사하기 위해 부가 탄소화물을 첨가하지 않은 LB 액체배지와 0.5% LBG와 0.5% konjak을 동시에 첨가한 LB 액체배지상에서의 균의 성장과 효소 생산성의 관계를 조사하였다. 이 때 균의 성장을 조사하기 위해서는 배지내에 첨가된 LBG와 konjak이 불용성 성분을 지니고 있어 흡광도를 측정할 경우 부정확하므로 배양액의 일부를 채취하여 LB 평판배지에 희석 도말하여 생균수를 측정하였고, mannanase의 생산성은 배양상등액을 조효소액으로 하여 결정하였다.

B. subtilis WL-7은 배지에 LBG와 konjak을 첨가하거나 첨가하지 않았을 때 모두 빠른 성장을 하여 접종후 6~7시간만에 정지기에 이르렀으며 24시간까지는 생균수가 일정하게 유지되었다. 균의 최대성장도는 LBG와 konjak을 첨가한 배지에서 약간 높은 것으로 나타났다. LBG와 konjak은 고분자 물질이므로 WL-7 균주가 이를 직접 탄소원으로 이용할 수는 없지만 이들이 배양 중 생산되는 mannanase에 의해 분해되어 생성되는 mannose, glucose와 같은 단당류나 이당류 등을 탄소원으로 이용하여 성장도에 차이가 있는 것으로 예상된다. Mannanase의 생산은 두 배지 사이에서 현격한 차이를 나타내었는데 konjak과 LBG를 첨가한 경우 배양시간이 13~14시간에 이르렀을 때 224 U/ml의 최대 생산성을 나타냈다. 그러나 부가 탄소원이 없는 LB 배지에서는 배양시간에 따른 활성증가도 미약하여 최대 생산성이 1.1 U/ml로 나타났다. 따라서 konjak과 LBG가 각각 0.5%씩 동시에 첨가된 배지에서는 이들을 첨가하지 않은 배지에 비해 *B. subtilis* WL-7의 mannanase 생산성이 약 200 배가 증가하는 것으로 최종 확인되었다. 따라서 기존에 보고된 다른 균주들에 의한 mannanase 생산성, 즉 *S. lividans* 재조합 균주 (115 U/ml)[14], *Bacillus* sp. WL-3(65 U/ml)[20], *B. subtilis* JS-1(45 U/ml)[25], *Bacillus* sp. WS-42(21 U/ml)[13], *B. subtilis* 168(100 U/ml)[6], *B. subtilis* NM39(8 U/ml)[16]와 비교해 볼 때 *B. subtilis* WL-7의 mannanase 생산성은 매우 우수하였다.

한편 배양시간이 3시간일 때 균의 성장이 초기 대수기에 이르는데 이때까지는 LBG와 konjak의 첨가와 관계없이 mannanase 생산성에 차이가 없었고, 4시간 배양 후 부터 LBG와 konjak을 첨가한 배지에서 효소 생산이 증가하기 시작하여 균의 생육이 정지기에 도달한 배양시간 6~7시간에는 mannanase의 생산성이 최대 생산성의 약 50% 수준에 이르

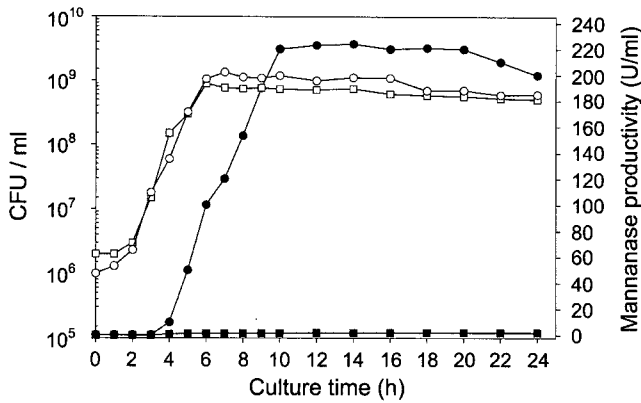


Fig. 1. Growth and mannanase production of *B. subtilis* WL-7. *B. subtilis* WL-7 was grown respectively in LB broth (squares) and LB broth supplemented with both 0.5% locust bean gum and 0.5% konjak (circles) at 37°C with vigorous shaking. The cell growth (open symbols) was determined by measuring colony forming units of the cell culture. Mannanase activities (closed symbols) were determined with the culture supernatants.

는 것으로 나타났다. 생육정지기 이후에도 배양시간 10시간 까지 효소 생산성이 지속적으로 증가하여 최대에 이르렀다. 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 판단된다. 그러나 LBG와 konjak을 첨가한 경우는 이들과 비교해 볼 때 효소 생산성 증가가 훨씬 높으므로 mannanase에 의한 LBG의 가수분해 산물 중의 일부가 균의 성장을 증진시킬 수는 있겠지만 급격한 mannanase 생산성의 증가정도가 균의 성장에 전적으로 기인한 것이라기 보다 LBG와 konjak의 가수분해 산물 중에 *B. subtilis* WL-7의 mannanase 생산을 유도하는 물질이 균체내로 흡수되어 mannanase 생산을 유도하였을 것으로 예상된다. 특히, 4시간 배양재 배지내 mannanase의 활성이 약 10 U/ml로 되어 배지내의 LBG와 konjak의 가수분해가 활발히 일어날 것으로 추측되며 이로 인해 생겨난 가수분해 산물은 세포내로 유입[5] 되어 4시간 배양이후에 mannanase 생산성의 급격한 증가를 유도한 것으로 보인다.

Mannanase 반응특성

B. subtilis WL-7이 생산하는 mannanase의 반응특성을 조사하기 위해 배양상등액으로부터 제조된 조효소액을 사용하여 반응온도와 pH를 달리하여 mannanase 활성을 측정하였다. 그 결과, Fig. 2에 나타난 바와 같이 55°C와 pH 6.0 부근에서 최고의 효소 활성을 보였으며, pH 5.0에서 pH 7.5까지의 범위에서 90% 이상의 활성을 나타냈다. *Bacillus* sp. WL-3 [20], *C. tertium* [11], *B. subtilis* NM39 [16], *B. subtilis* 5H [12]의 mannanase도 WL-7의 효소와 유사한 최적 반응조건을 갖는 것으로 알려져 있으며, 내열성 *Bacillus*

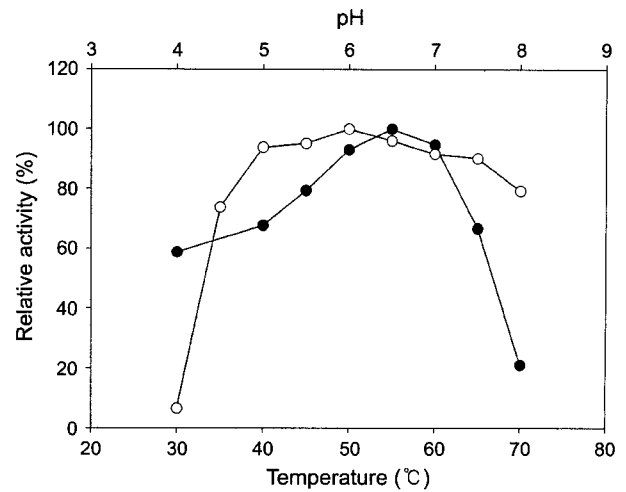


Fig. 2. Effects of reaction temperature and pH on the mannanase activity. Temperature profile (●-) was obtained by measuring the mannanase activities at pH 6.0 and different temperatures. The reactions was done at 50°C and various pHs for determining the pH profile (○-). The following buffer systems were used: pH 3.5 to 6.0, 50 mM citrate; pH 6.0 to 8.0, 50 mM sodium phosphate.

sp. NN[24]은 70°C와 pH 7.6, *B. circulans*[26]는 64°C와 pH 6.9, 호알칼리성 *Bacillus* sp.는 60°C와 pH 9.0 및 65°C와 pH 8.5에서 각각 최대활성을 보이는 mannanase를 생산하는 것으로 보고되었다.

한편 WL-7의 mannanase는 동물의 장내 온도인 37°C에서 최고 효소활성의 60% 이상의 반응성을 나타내어 *B. subtilis* WL-7 균주가 생산하는 mannanase는 생리적 조건인 중성부근의 pH와 중성온도에서 우수한 반응성을 지니는 것으로 확인되었다. WL-7의 mannanase가 사료첨가용 목적에 적합한지를 조사하기 위해서 양돈과 양계의 주사료 성분인 대두분과 옥수수분을 기질로 하여 효소반응을 실시하였다. 대두분과 옥수수분 각각 1g을 취해 mannanase를 40 U/ml이 되도록 첨가하고 반응조건은 단위동물의 소장의 생리적 조건인 pH 6.5, 반응온도 37°C로 하여 6시간동안 처리하였다. 그 결과 Table 5에 나타난 바와 같이 반응시간에 따라

Table 5. Hydrolysis of soybean meal and corn meal by the WL-7 mannanase.

Reaction* time (h)	Reducing sugar amount (μmol) liberated from	
	Soybean meal	Corn meal
0	0	0
1	34	42
2	37	58
3	38	62
4	40	64
5	39	71
6	39	70

*Reaction was done at 37 with shaking.

대부분과 옥수수분이 분해되어 반응액에 존재하는 환원당의 양이 증가하는 것으로 나타났으며 특히 반응시간이 1시간내에서 환원당 발생량이 많은 것으로 관찰되었다. 실제 대두분과 옥수수분내에 존재하는 mannan 다당류는 곡류의 소화효율을 저하시키는 항영양인자로 작용하게 되므로 mannanase를 사용하여 이를 가수분해 할 경우 사료 이용율과 소화효율을 개선할 수 있는 것으로 알려져 있다[10]. 특히 된장 유래의 *B. subtilis* WL-7은 mannanase의 생산성이 높을 뿐만 아니라 생산된 효소가 사료첨가제로 이용시 안정성에 문제가 없을 것이므로 그 유용성이 높을 것으로 판단된다.

요 약

전통 발효식품인 된장으로부터 mannanase의 생산균으로 분리된 WL-7 균주는 형태적 특성, 생화학적 성질 및 16S rRNA의 염기서열에 근거하여 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. *B. subtilis* WL-7의 배양상등액으로 제조한 조효소액을 이용하여 mannanase 활성을 측정된 결과, 55°C와 pH 6.0에서 최대활성을 보였으며, 반응온도 50~60°C와 반응 pH 5.0~7.5에서 최대활성의 90% 이상의 활성을 나타냈다. 분리균 WL-7의 mannanase 생산성을 높이기 위해 LB 배지에 소당류와 고분자 탄수화물을 첨가하여 배양한 결과, lactose, 밀기울, avicel, α -cellulose, locust bean gum(LBG), konjak 등에 의해 mannanase 생산성이 상당량 증가되었다. 특히 0.5% LBG와 0.5% konjak이 동시에 첨가된 LB 배지에서 10시간 배양하였을 때 배양상등액의 효소 활성이 224 U/ml로 최대 효소생산성을 보였으며, 이는 LBG와 konjak을 첨가하지 않은 배지에서 보다 효소 생산성이 200배 이상이 증가하였다. LBG와 konjak을 첨가하였을 때 *B. subtilis* WL-7의 최대성장도가 약간 증가한 것에 비해 mannanase 생산성은 현저히 증가된 것으로 보아 배양액 중의 LBG와 konjak의 가수분해 산물이 mannanase의 생합성을 유도한 것으로 판단된다.

REFERENCES

- 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.
- Akino, T., N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1988. Characterization of three β -mannanase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 773-779.
- Arisan-Atac, I., R. Hodits, D. Kristufek, and C. P. Kubicek. 1993. Purification and characterization of a β -mannanase of *Trichoderma reesei* C-30. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 58-62.
- 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.
- 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.
- El-Helow, E. R., S. A. Sabry, and A. A. Khattab. 1997. Production of β -mannanase by *B. subtilis* from agro-industrial by-products: screening and optimization. *Antonie van Leeuwenhoek.* **71**: 189-193.
- Godfrey, T. 1983. Eatable oils, pp. 424-427. In T. Godfrey and J. Reichelt (eds.) *Industrial Enzymology*, Nature Press, New York.
- Hashimoto, Y. 1971. Studies on the enzyme treatment of coffee beans. *V. Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **45**: 147-151.
- Hossain, M. Z., J. Abe, and S. Hizukuri. 1996. Multiple forms of β -mannanase from *Bacillus* sp. KK01. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 95-98.
- Jackson, M. E., D. W. Fodge, and H. Y. Hsiao. 1999. Effects of β -mannanase in corn-soybean meal diets on laying hen performance. *Poultry Sci.* **78**: 1737-1741.
- Kataoka, N. and Y. Tokiwa. 1998. Isolation and characterization of an active mannanase producing anaerobic bacterium, *Clostridium tertium* KT-5A, from lotus soil. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 357-367.
- 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.
- Kim, J. -H., T. -K. Lee, H. -C. Yang, and D. -K. Oh. 1997. Optimization of medium for β -mannanase production by *Bacillus* sp. WS-42. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 212-217.
- Marga, F., C. Ghakis, C. Dupont, R. Morosoli, and D. Kluepfel. 1996. Improved production of mannanase by *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4656-4658.
- McCleary, B. V. 1998. β -D-mannanases. *Methods Enzymol.* **160**: 596-610.
- Mendoza, N. S., M. Arai, T. Kawaguchi, F. S. Cubol, E. G. Panerio, T. Yoshida, and L. M. Josen. Isolation of mannan-utilizing bacteria and the culture conditions for mannanase production. *Wor. J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 51-54.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- 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.
- Montiel, M. D., J. Rodriguez, M. I. Perez-Leblic, M. Hernandez, M. E. Arias, and J. L. Copa-Patino. 1999. Screening of mannanases in actinomycetes and their potential application in the biobleaching of pine kraft pulps. *Appl. Microbiol.*

- Biotechnol.* **52**: 240-245.
20. Oh, Y. P., J. -M. Lee, K. H. Cho, K. -H. Yoon. 2002. Isolation and enzyme production of mannanase-producing Strain, *Bacillus* sp. WL-3. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 247-252.
 21. Rodriguez, R. L. and R. C. Tait. 1983. *Recombinant DNA Techniques - An introduction*. pp. 45-46. Addison-Wesley Pub. Co.
 22. 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.
 23. Tamaru, Y., T. Araki, H. Amagoi, H. Mori, and T. Morishita. 1995. Purification and characterization of an extracellular β -1,4-mannanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4454-4458.
 24. 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.
 25. Yim, J. -S., J. -W. Jung, J. -S. Lee, D. -K. Kang, and H. -K. Kim. 2003. Optimization of β -mannanase production from *Bacillus subtilis* JS-I. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 57-62.
 26. Yoshida, S., Y. Sako, and A. Uchida. 1998. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for an enzyme from *Bacillus circulans* K-1 that degrades guar gum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 514-520.
 27. Zakaria, M. M., M. Ashiuchi, S. Yamamoto, and T. Yagi. 1998. Optimization for β -mannanase production of a psychrophilic bacterium, *Flavobacterium* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 655-660.

(Received May 29, 2003/Accepted Sep. 4, 2003)