

미꾸라지로부터 β -Mannosidase를 생산하는 *Chryseobacterium meningosepticum*의 분리

김현숙¹ · 윤기홍^{1,2*}

우송대학교¹응용식품·영양학부, ²생물소재 응용연구센터

Isolation of *Chryseobacterium meningosepticum* Producing β -Mannosidase from a Mudfish. Kim, Hyun Suk¹ and Ki-Hong Yoon^{1,2*}. ¹School of Applied Food and Nutritional Science, ²Bioresouce and Application Research Center, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea – A bacterium producing the β -mannosidase was isolated from intestine of fresh fish. The isolate YB-29 has been identified as *Chryseobacterium meningosepticum* on the basis on its 16S rRNA sequence, morphology and biochemical properties. The β -mannosidase activity was detected in both the culture filtrate and the cell extract of *C. meningosepticum* YB-29. The β -mannosidase of culture filtrate showed the maximum activity for hydrolysis of *para*-nitrophenyl- β -D-mannopyranoside at pH 5.0-6.0 and 55-60°C. The enzyme was able to hydrolyze the oligomeric substrates such as mannobiose and mannotriose with higher activity for mannotriose than mannobiose.

Key words: *Chryseobacterium meningosepticum*, identification, β -mannosidase, mudfish, reaction property

β -Mannosidase(β -D-mannoside mannohydrolase)는 mannose 가 β -1, 4 결합된 mannooligosaccharides(MOS)의 비환원성말단으로부터 D-mannose 잔기를 가수분해하는 exoglycosidase로, 고등동물에서 축적 또는 분비된 탄수화물과 당단백질에서 결합방식의 구조적 특성을 분석하는데 사용되고 있으며 [5], 유용성이 높은 MOS의 화학합성 방법을 대체하는데 이용될 수 있다[10].

현재 다수의 미생물, 식물 및 동물 세포에서 생산되는 β -mannosidase가 보고 되었으며, 이들로부터 생산된 효소가 정제되어 그 특성이 밝혀졌다. 국내에서는 토양으로부터 분리된 *Sporolactobacillus* sp. M201이 β -mannosidase를 생산하는 균주로 알려졌다[12]. β -Mannosidase 유전자는 *Aspergillus niger*[1]와 *Trichoderma reesei*[11]와 같은 곰팡이를 비롯하여, *Bacillus* sp. AM-001[3]과 *Pyrococcus furiosus*[4] 등 다양한 세균들로부터 분리되어 크로닝되었고, 최근의 경우 *Clostridium fimi*의 β -mannosidase 유전자에 돌연변이를 일으켜 개량된 효소가 개발되었다[18]. 아미노산 배열에 의하면 내열성 고세균인 *P. horikoshii*[9]와 *P. furiosus*[4]의 β -mannosidase가 glycosyl hydrolase(GH) family 1에 속하는 것으로 알려져 있고, *Thermotoga fusca* TM51과 *A. niger*를 비롯하여 현재까지 보고된 대부분의 β -mannosidase는 GH family 2에 속하는 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 국내

담수 어류의 소화기관 및 가정에서 제조된 된장, 간장으로 부터 분리된 1,184 균주의 균체를 이용하여 β -mannosidase의 활성을 보이는 균주를 탐색하였다.

β -Mannosidase 생산균의 분리과 동정

분리된 균주를 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 약 20 시간 진탕배양한 후 균체에 존재하는 β -mannosidase 활성을 측정하였다. 균체의 효소활성을 결정하기 위해서는 기질로 *para*-nitrophenyl- β -1,4-mannosylpyranoside(pNPM)의 가수분해능을 조사하였다. 20 mM 인산 완충용액(pH 6.0)에 현탁한 균체액을 0.5 mM pNPM과 50 mM 동일 완충용액을 포함한 반응액에 첨가하여 45°C에서 30분간 반응한 후, 1 M sodium carbonate 용액을 반응액의 2 배로 첨가하여 반응을 중지시켰다. 반응액을 원심분리 하여 얻은 반응상등액을 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 β -mannosidase 활성을 갖는 1 균주를 최종 선별하였다. 최종 분리균은 미꾸라지의 소화기관에서 분리된 것으로, 그람음성 간균이고 무포자균으로 확인되었다.

Vitek(bioMerieux사)의 그람음성균 동정용 카드(GNI+)를 사용하여 분리균 YB-29의 생화학적 특성을 조사하였다. 이를 위해 분리균을 LB 액체배지에서 하룻밤 진탕배양한 균 배양액을 0.4% NaCl 용액으로 600 nm에서 흡광도가 0.3 정도가 되도록 희석한 후 GNI+ 카드에 주입하여 12시간 배양하였다. 그 결과 분리균은 glucose, rhamnose, arabinose, raffinose, sorbitol, sucrose, inositol, adonitol 등을 발효하지 못하는 것으로 나타났으며, glucose, maltose, mannitol 등을

*Corresponding author
Tel: 82-630-9742, Fax: 82-42-636-2676
E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

산화하여 유기산을 생성하는 것으로 나타났다. VITEK GNI+ database와 분리균의 생화학적 특성을 비교한 결과, 분리균 YB-29는 *Chryseobacterium meningosepticum*과 98%의 유사도를 보인 것으로 확인되었다.

분리균의 16S rRNA의 염기서열을 분석하기 위해서 16S rRNA 유전자 단편을 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭하였다. 중합연쇄 반응은 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(염기서열 위치 9~27 지역), 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'(염기서열 위치 1523~1542 지역)을 primers로 사용하였으며, 분리균 YB-29로부터 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 정제하여 dye terminator cycle sequencing kit와 373A automate DNA sequencer(Perkin Elmer Co., USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열(GenBank accession No. AY683476)은 미국 NCBI의 BLAST 검색방법을 사용하여 기존에 등록된 다양한 세균들의 상응하는 염기서열과 비교하여 높은 상동성을 나타내는 세균 그룹을 1차적으로 선별하였다. 분리균의 정확한 계통학적 분석을 위해서 CLUSTAL

W software[17]를 사용하여 선별된 균주들의 16S rRNA 염기서열과 비교하고, 5', 3'의 gap을 제거하거나 적절히 수정한 후, 분자계통학적 계통수의 작성은 PHYLIP 프로그램 패키지를 사용하여 수행하였다[6]. 분자진화거리는 DNADIST 프로그램속의 Jukes & Cantor[8]의 알고리즘을 이용하여 계산하였고 최종적인 계통수는 NEIGHBOR 프로그램 속의 neighbor-joining method[15]에 기초해서 작성하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 분리균의 16S rRNA는 *C. meningosepticum*과 가장 유사도가 높았고, 이러한 결과는 생화학적 특성의 결과와 일치하였으므로 분리균을 *C. meningosepticum* YB-29로 명명하였다. 한편, *C. meningosepticum*은 토양과 하천에 존재하며 미생물로 염소를 처리한 상수도에서도 발견되는 균주로 미숙아, 신생아, 화상환자, 극히 면역이 저하된 환자에서 심한 감염을 유발할 수 있으며 특히 신생아의 뇌막염, 패혈증 원인균으로 알려져 있다[16]. 이와 같은 병원성균이 미꾸라지의 소화기관내에서 분리되었다는 것은 주목할 필요가 있다고 여겨진다.

분리균이 생산하는 β -mannosidase의 반응특성

분리균이 생산하는 효소의 반응특성을 조사하기 위해 *C. meningosepticum* YB-29를 LB 배지에 접종하여 37°C에서 20시간 동안 진탕배양 하였다. 배양액을 원심분리한 후 배양상등액과 균체의 초음파 파쇄상등액으로 pNPM의 가수분해 활성을 조사한 결과 배양상등액에 존재하는 효소활성이 더

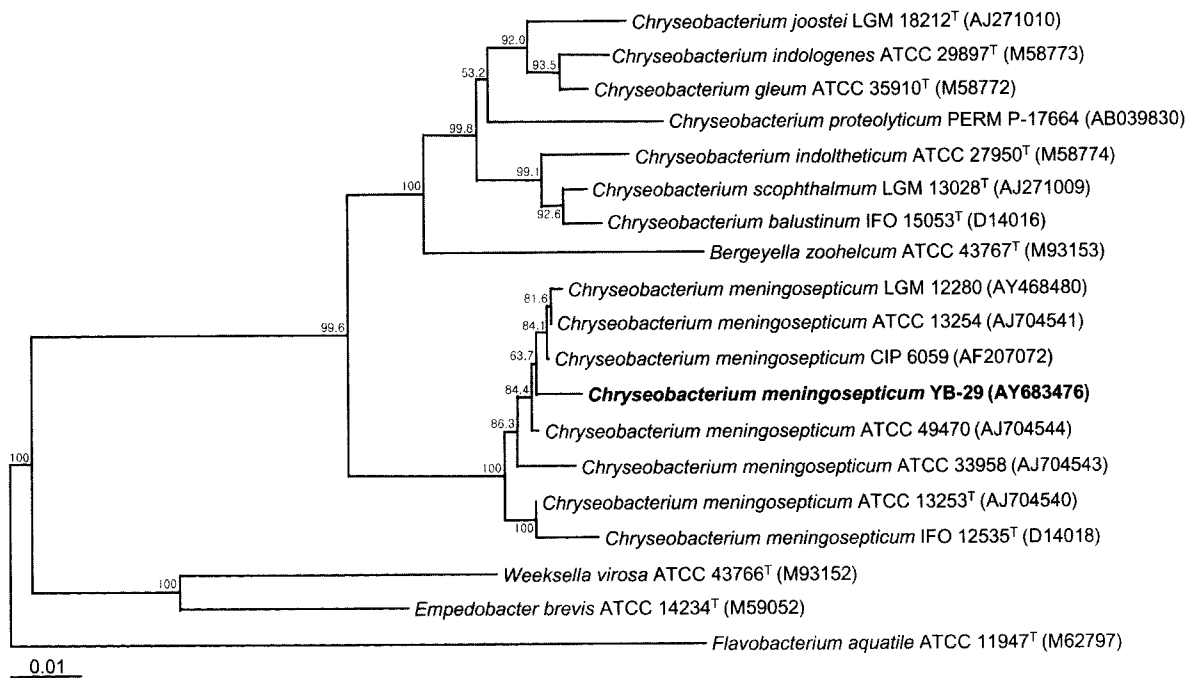


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships based on 16S rRNA sequences of *Chryseobacterium meningosepticum* YB-29 and other related strains belonging *Chryseobacterium* genus. Bootstrap values are shown in percentages of 1000 replicates. *Flavobacterium aquatile* ATCC 1194^T was used as an out group. The scale bar is equal to 0.01 changes per nucleotide position.

높았다. 이로써 YB-29는 균체내·외에서 모두 β-mannosidase를 생성함이 확인되었고, 균체내보다는 균체외에 존재하는 효소활성이 높은 것으로 확인되었다. 따라서 균체외에 존재하는 β-mannosidase의 반응특성을 조사하기 위해 배양상등액을 ammonium sulfate(20~80%)로 처리하고, 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리한 후 침전물을 20 mM 인산 완충용액(pH 6.0)에 녹이고 이를 동일한 완충용액에 투석한 후 이를 조효소액으로 사용하였다. 반응특성을 분석하기 위해서 반응온도와 반응 pH를 달리하면서 조효소액에 존재하는 β-mannosidase 효소활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에 보인 바와 같이 반응온도 55~60°C, 반응 pH 5.0~6.0에서 최대 활성을 보이는 것으로 나타났다. 한편, 내열성 고세균인 *P. furiosus*[4]는 105°C와 pH 7.4, *Thermotoga neapolitana*와 *T. maritima*[13]는 90°C와 pH 7.0, *A. niger*[1]는 70°C에서 최대의 효소활성을 보였으며, pH 2.5에서 pH 5까지의 범위에서 90%이상의 활성을 보이는 것으로 보고 되었다. *T. reesei*[11]의 효소는 균체외로 분비된다고 알려져 있지만, 대부분의 β-mannosidase는 균체내에 존재하는 효소로 알려져 있다[4, 13]. *C. meningosepticum* YB-29의 배양상등액에서 확인된 β-mannosidase 활성은 배양 중 균체의 파괴에 의한 것인지의 여부는 확인되지 않았다.

β-Mannosidase와 동일하게 MOS의 mannose간 β-1,4 결합을 분해하는 mannanase는 *Bacillus* sp. AM-001[2]의 효소와 같이 mannotriose(M3) 이상의 중합도를 지닌 MOS를 가수분해할 수 있는 효소와 *C. thermocellum*[7]와 같이 M3는 분해하지 못하고 mannotetraose(M4) 이상의 MOS를 분

해할 수 있는 효소로 분류할 수 있다. 그러나 이들 mannanases는 모두 mannobiose(M2)와 pNPM의 분해능이 없다고 알려졌다. 따라서 분리균 YB-29가 생산하는 효소가 MOS를 가수분해 하는지 조사하기 위해 M2와 M3에 대한 가수분해능을 조사하였다. M2와 M3를 각각 반응기질로 하여 50°C에서 3시간동안 효소반응을 수행한 후에 반응액을 95°C에서 3분 동안 열처리한 후 원심 분리하여 상등액을 적정량 취해 최종반응 산물을 TLC로 분석하였다. 전개용매로는 1-propanol, nitromethane과 증류수(7:1:2, v/v) 혼합용액을 사용하였고, TLC를 수행한 후, 9.5 ml ethanol과 0.5 ml sulfuric acid를 혼합한 발색제 용액을 분무하고 120°C에서 10분간 방치함으로써 전개된 물질을 발색시켰다. 그 결과, M2와 M3가 모두 분리균의 효소에 의해 가수분해 되는 것으로 나타났으며 mannose가 반응산물로 생성되었다. 그리고 M2보다는 M3에서 생성된 mannose의 양이 많은 것으로 확인되었으나, 다량의 M2가 분해되지 않은 상태로 존재하였는데 이는 효소활성이 낮아 완전히 가수분해되지 않은 때문으로 판단된다. 이로써 분리균이 생산하는 효소는 pNPM과 M2를 동시에 가수분해하는 활성을 지닌 β-mannosidase임이 확인되었다.

T. reesei[11]의 β-mannosidase는 MOS의 중합도가 높을수록 가수분해능이 감소하여 M3의 경우 M2보다 효소활성이 약 10배 감소하는 것으로 알려졌으며, 알칼리성 균주인 *Bacillus* sp. AM-001[3]의 효소는 약 24시간 반응 후 M2와 M3를 mannose로 완전히 가수분해 하는 것으로 보고 되었

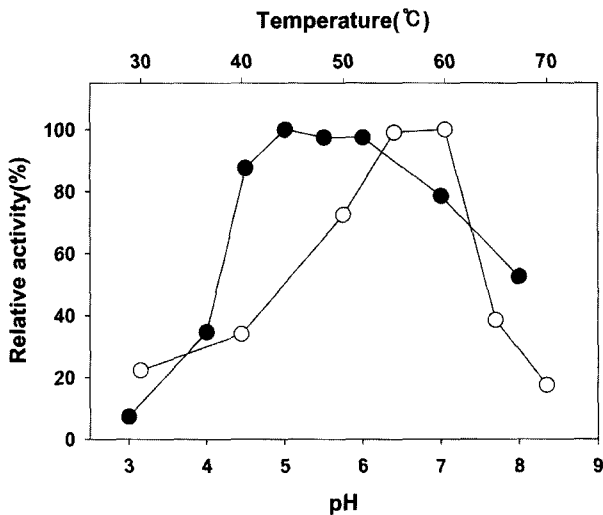


Fig. 2. Effects of reaction temperature and pH on the β-mannosidase activity. Temperature profile (○-○) was obtained by measuring the β-mannosidase activities at pH 5.0 and different temperatures. The reactions were done at 50°C and various pHs for determining the pH profile (●-●). The following buffer systems were used; pH 3.0 to 6.0, 50 mM citrate; pH 6.0 to 8.0, 50 mM sodium phosphate.

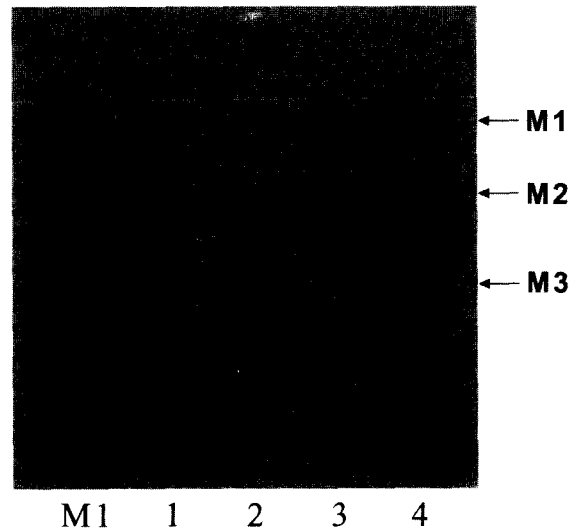


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of mannobiose, mannotriose with extracellular enzymes. Reactions were done using mannobiose (lane 1 and 3), mannotriose (lane 2 and 4) as substrates at 50°C for 3 h, respectively. Reaction products were analyzed from reaction mixtures before (lane 1 and 2), and after reactions (lane 3 and 4). Mannose (M1), mannobiose (M2) and mannotriose (M3) were indicated by arrows to the right side of the TLC plate.

다. 한편 *C. meningosepticum*에 대한 연구는 이 균이 생산하는 β -lactamase와 균에 의한 질환을 중심으로 대부분 이루어졌으며[14, 16], β -glucosidase, alkaline phosphatase의 효소활성에 대한 일부 보고만이 있을 뿐이다. 따라서 본 연구를 통해 분리된 YB-29가 생산하는 β -mannosidase의 활성은 *C. meningosepticum* 균주에서 새롭게 밝혀진 사실이라 하겠다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 2004년도 특정기초연구사업으로 이루어졌음.

REFERENCES

- Ademark, P., R. P. de Vries, P. Hagglund, H. Stalbrand, and J. Visser. 2001. Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding an α -galactosidase and a β -mannosidase involved in galactomannan degradation. *Eur. J. Biochem.* **268**: 2982-2990.
- Akino, T., N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1988. Characterization of three β -mannanases of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 773-779.
- Akino, T., N. Nobuyuki, and H. Koki. 1988. Characterization of β -mannosidase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1459-1464.
- Bauer, M. W., E. J. Bylina, R. V. Swanson, and R. M. Kelly. 1996. Comparison of a beta-glucosidase and a beta-mannosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* **271**: 23749-23755.
- Elbein, A., S. Adya, and Y. Lee. 1977. Purification and properties of a β -mannosidase from *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* **252**: 2026-2031.
- Felsenstein, J. 2002. PHYLIP(phylogeny inference package), version 3.6a, Seattle: Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- Halstead, J. R., P. E. Vercoe, H. J. Gilbert, K. Davidson, and G. P. Hazlewood. 1999. A family 26 mannanase produced by *Clostridium thermocellum* as a component of the cellulosome contains a domain which is conserved in mannanases from anaerobic fungi. *Microbiol.* **145**: 3101-3108.
- Jukes, T. H. and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. pp. 21-132. In H. N. Munro. (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York.
- Kaper, T., H. H. van Heusden, B. van Loo, A. Vasella, J. van der Oost, W. M. de Vos. 2002. Substrate specificity engineering of beta-mannosidase and beta-glucosidase from *Pyrococcus* by exchange of unique active site residues. *Biochem.* **41**: 4147-4155.
- Kobata, A. 1993. Glycobiology: an expanding research area in carbohydrate chemistry. *Acc. Chem. Res.* **26**: 319-324.
- Kulminkaya, A. A., E. V. Eneiskaya, L. S. Isaeva-Ivanova, A. N. Savel'ev, I. A. Sidorenko, K. A. Shabalin, A. M. Golubev, and K. N. Neustroev. 1999. Enzymatic activity and β -galactomannan binding property of β -mannosidase from *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.* **25**: 372-377.
- Park, W. S., H. Y. Kim, and Y. J. Chol. 1998. Production of β -mannanase and β -mannosidase from *Sporolactobacillus* sp. M201. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 232-237.
- Parker, K. N., S. R. Chhabra, D. Lam, W. Callen, G. D. Duffaud, M. A. Snead, J. M. Short, E. J. Mathur, and R. M. Kelly. 2001. Galactomannanases Man2 and Man5 from *Thermotoga* species: Growth physiology on galactomannans, gene sequence analysis, and biochemical properties of recombinant enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* **75**: 322-333.
- Samuel, B., P. Laurent, N. Thierry, G. Delphine, and N. Patrice. 2000. Genetic -biochemical analysis and distribution of the ambler spectrum cephalosporin resistance in *Chryseobacterium(Flavobacterium) meningosepticum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1-9.
- Sautou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Siegmán-Igra, Y., D. Schwartz, G. Soferman, and N. Konforti. 1987. *Flavobacterium* group IIb bacteremia: report of a case and review of *Flavobacterium* infections. *Med. Microbiol. Immunol.* **176**: 103-111.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Zechel, D. L., S. P. Reid, D. Stoll, O. Nashiru, R. A. Warren, and S. G. Withers. 2003. Mechanism, mutagenesis, and chemical rescue of a beta-mannosidase from *Cellulomonas fimi*. *Biochem.* **42**: 7195-7204.

(Received Nov. 20, 2004/Accepted Dec. 6, 2004)