

된장 분리균 *Bacillus* sp. YB-1401의 Mannanase 생산성과 효소특성

전호진, 윤기홍*
우송대학교 바이오식품과학전공

Received: March 17, 2014 / Revised: April 8, 2014 / Accepted: April 14, 2014

Production and Characterization of Mannanase from a *Bacillus* sp. YB-1401 Isolated from Fermented Soybean Paste

Ho Jin Joen and Ki-Hong Yoon*

Food Science & Biotechnology Major, Woosong University, Daejeon 300-718, Republic of Korea

A *Bacillus* strain capable of hydrolyzing locust bean gum was isolated as a producer of extracellular mannanase by way of an enrichment culture in an acidic medium from homemade soybean pastes. The isolate YB-1401 showed a biochemical identity of 61.1% with *Brevibacillus laterosporus*, while the nucleotide sequence of its 16S rDNA had the highest similarity with that of *Bacillus amyloliquefaciens*. The mannanase productivity of the *Bacillus* sp. YB-1401 was drastically increased by mannans. Particularly, maximum mannanase productivity was reached at approximately 265 U/ml in LB medium supplemented with konjac glucomannan (4.0%). The mannanase was the most active at 55°C and pH 5.5. Mannanase activity was completely maintained after pre-incubation at pH 3.5 to 11.0 for 1 h. The predominant products resulting from the mannanase hydrolysis were mannobiose and mannotriose for LBG, guar gum or mannooligosaccharides. A small amount of mannose was also detected in the hydrolyzates.

Keywords: *Bacillus* sp. enrichment culture, mannanase, productivity, property

서 론

Mannan 다당류는 mannose, glucose와 galactose의 결합으로 이루어져 있는데, 구성하고 있는 당의 종류에 따라 mannan, glucomannan, galactomannan과 galactoglucomannan으로 구분된다. 이들의 직쇄골격은 mannose 잔기끼리 또는 mannose와 glucose 잔기간에 β -1,4 결합으로 이루어지며 galactose는 mannose의 6번 탄소와 α -1,6 결합을 하여 측쇄로 존재한다.

β -1,4-Endo-mannanase (mannanase)는 β -mannan 다당류에서 mannose간의 β -1,4-mannosyl 결합을 무작위적으로 분해하여 mannooligosaccharides (MOS)로 전환시키며, 이것은 β -1,4-mannosidase에 의해 mannose로 분해되는데,

mannan을 mannobiose 단위로 절단하는 exo-mannanase의 존재도 *Bacteroides fragilis*로부터 보고되었다[7]. 그리고 mannose와 결합하여 측쇄로 존재하는 galactose는 α -galactosidase에 의해 분해된다. Mannan의 분해에 가장 중요한 역할을 하는 mannanase는 동물과 식물을 비롯한 미생물에서 두루 발견되었으며 펄프와 제지 표백공정, 바이오매스 자원의 당화공정, 커피 가공공정을 비롯하여 세제와 사료 첨가용 효소로 산업적 활용성이 높다[2]. 특히 곰팡이와 세균 유래의 mannanases는 그 특성이 다양하므로 산업적으로 활용하기 적합한 성질을 갖는 효소를 개발하기 위해 산성, 알칼리성, 내열성 또는 호냉성 효소가 탐색되거나[5, 13, 19, 26], 변이 효소로 제조되었으며[22], Ca^{2+} 이온이 *Clostridium thermocellum* [3], *Streptomyces thermolilacinus*과 *Thermobifida fusca* [9] 유래의 mannanases의 내열성을 증가시킨다는 보고도 있다. 알칼리성 효소는 세제나 펄프 제지 산업에서, 산성 효소는 식품과 사료산업에서 그 가치가 높으며 내열성은 공통적으로 요구되는 특성이다. 미생물에서 생

*Corresponding author

Tel: +82-42-630-9742, Fax: +82-42-636-2676

E-mail: ykh@wsu.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

산되는 mannanase는 대부분 균체외로 분비되며, glycosyl hydrolase (GH) family 5와 26에 속한다. GH26에는 주로 세균성 효소가 대부분을 차지하고, GH5에는 곰팡이 유래 또는 세균 유래 효소가 포함된 것으로 알려져 있다. 한편 균체 내 효소이며 GH113에 속하는 mannanase가 *Alicyclobacillus acidocaldarius*로부터 보고되었다[25].

최근에는 MOS가 장내 유익한 미생물의 성장을 촉진하고 장관의 치료효과를 보이는 것으로 알려지면서[1, 17, 24] glucomannan이나 galactomannan을 mannanase로 분해하여 MOS 또는 glucomannooligosaccharides를 생산하고자 하는 연구도 활발히 진행되고 있다[1, 3, 17].

Galactomannan을 함유한 콩의 발효식품은 우리나라를 비롯한 대부분의 아시아 국가뿐 아니라 아프리카 지역에서도 고유식품으로 이용되고 있으며, 이로부터 여러 종류의 *Bacillus*속 미생물이 비전분성 다당류의 분해효소를 생산하는 균주로 분리되고 그 효소의 특성이 연구되었다[10, 15, 21]. 본 연구에서는 산성조건에서 된장 발효미생물을 증균하여 이로부터 mannanase를 생산하는 *Bacillus*속 균주를 분리하고 효소 생산성과 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

Mannanase를 생산하는 내산성 균주의 탐색

가정에서 제조된 된장 25점을 수집하여 pH를 4.5로 조절된 LB 배지에 접종하고 37°C에서 2일간 진탕 배양한 후 동일한 배지에 3일 간격으로 3회 계대 배양을 추가적으로 실시하였다. pH가 4.5로 조절된 LB 평판배지(yeast extract, 5 g; tryptone, 10 g; NaCl, 5 g; agar, 15 g; water, 1 liter)에 계대 배양액을 도말하여 37°C에서 2일간 배양한 후 형성된 콜로니를 0.5% locust bean gum (LBG)이 첨가된 중성의 LB 평판배지에 접종하여 하룻밤 배양하고 congo red 용액(0.2%)으로 염색하여 LBG 분해환을 생성하는 미생물을 mannanase 생산균으로 선발하였다.

분리균주의 동정

분리균의 형태적 관찰을 위해서는 그람염색과 포자염색을 실시하였으며, 배양된 균체 현탁액을 제조사의 지침에 따라 API 20E와 API 50 CHB kits (Biomérieux사, France)에 접종하고 37°C에서 배양하면서 1일과 2일째 각각 관찰하여 탄수화물 이용능과 생화학적 특성을 판별하였다. 분리균의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하기 위해서 분리균의 총 염색체 DNA를 주형으로 하고, 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열을 primers로 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시함으로써 얻은 PCR 산물을 정제하여 그 염기서열을 결정하였다[10].

Mannanase 조효소액 제조

*Bacillus*속 분리균을 LB 배지에서 전배양한 후 4.0% 곤약이 첨가된 LB 배지에 1% (v/v)가 되도록 접종하여 24시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 배양상등액을 ammonium sulfate (30-75%)로 처리한 후, 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리함으로써 상등액을 제거하였다. 단백질을 침전물을 10 mM citrate 완충용액(pH 5.5)에 현탁하여 동일한 완충용액으로 투석한 후 이를 원심분리하고 상등액을 취해 mannanase 조효소액으로 사용하였다.

Mannanase 활성 측정과 반응특성 분석

Mannanase 활성은 0.5% LBG와 50 mM sodium citrate 완충액(pH 5.5)을 포함한 반응액에 효소를 첨가하여 50°C에서 15분간 반응을 실시한 후 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid 방법[14]으로 측정하였으며, 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건에서 1분 동안 LBG로부터 1 μmol의 mannose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. Mannanase 활성에 미치는 반응 온도와 pH의 영향을 조사하기 위하여 30-65°C와 pH 4.0-8.0의 범위에서 각각 효소 활성을 측정하였다. 효소 내열성은 30-60°C에서 mannanase 조효소액을 1시간 동안 방치한 후 잔존활성을 측정하여 결정하였고, pH 안정성을 조사하기 위해서는 pH 3.0-12.0 범위의 완충용액을 최종농도가 50 mM이 되도록 조효소액과 혼합하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 mannanase 잔존활성을 측정하였다. 이때 pH를 조절하기 위해서 citrate 완충용액(pH 3.0-6.0), phosphate 완충용액(pH 6.0-8.0), Tris 완충용액(pH 8.0-9.0), KCl-borate 완충용액(pH 9.0-10.0), carbonate 완충용액(pH 10.0-11.0)과 phosphate/NaOH 완충용액(pH 11.0-12.0)이 각각 사용되었다. Mannanase에 의한 가수분해 산물을 분석하기 위해서는 0.5% 함량의 LBG, guar gum 또는 중합도가 2-6인 MOS를 각각 기질로 사용하였으며, 이들 기질과 20 mM citrate 완충액(pH 5.5)을 포함한 반응액에 과량의 효소를 첨가하여 45°C에서 5시간 반응시킨 후 95°C에서 5분간 열처리하고 원심분리한 다음 상등액을 적정량 취해 chloroform, acetic acid와 증류수(4.3 : 5 : 0.7, (v/v)) 혼합용액을 전개용액으로 하여 silica gel-precoated thin layer plate (Merck, Kiesegel, No. 5748)에서 박층 크로마토그래피를 수행하였다. 전개된 물질을 발색시키기 위해서는 ethanol 9 ml, *p*-anisaldehyde 0.5 ml, sulfuric acid 0.5 ml와 glacial acetic acid 몇 방울을 혼합한 발색제를 뿌린 후, 120°C에서 10분간 방치하였다.

활성염색

조효소액을 SDS-PAGE한 후 polyacrylamide gel에서 SDS를 제거하기 위하여 25% isopropanol을 포함한 50 mM

phosphate 완충액(pH 6.0)으로 세척한 후 동일완충액에 15-30분간 방치하였다. Polyacrylamide gel을 꺼내어 동일한 완충용액에 0.2% LBG와 1.5% agar를 녹여 제조한 gel을 중층하여 비닐로 봉입하고 50°C에서 4시간 반응시킨 후 중층한 gel을 congo red로 염색하여 분해된 부분을 관찰하였으며 polyacrylamide gel은 Coomassie brilliant blue 용액으로 염색하여 단백질을 관찰하였다.

결과 및 고찰

증균 배양을 이용한 mannanase 생산균의 탐색과 분리균의 특성

된장으로부터 mannanase를 생산하는 내산성 *Bacillus*속 균주를 분리하기 위하여 pH를 4.5로 조절된 LB 액체배지에 충청도 지역의 가정에서 각각 제조된 25점의 된장 시료를 각각 접종하여 진탕 배양한 후 추가로 3회 계대 배양을 실시하였다. 그 결과 마지막 계대 배양액 중에서 오직 1점의 시료에서만 균의 성장을 나타냈다. 이를 LB 평판배지(pH 4.5)에 도말하고 37°C에서 2일간 배양함으로써 2종류의 콜로니가 분리되었는데, 이로 보아 된장에 존재하는 내산성 세균의 종류가 적은 것으로 판단되었으며 이로 인하여 된장 시료 25점 중 오직 1점 시료의 접종액에서만 균의 성장을 보였던 것으로 추측된다. 한편 분리된 2개의 균주 중 YB-1401로 명명한 한 개의 균주가 LBG를 분해하는 균주로 판명되어 이를 mannanase 생산균으로 선발하였다.

분리균 YB-1401의 형태적 특성을 조사한 결과 포자를 형성하는 그람 양성 간균으로 확인되어 API 50 CHB와 20E kit를 사용하여 생화학적 특성을 조사하였다. Table 1에 보인 바와 같은 YB-1401의 생화학적 특성을 Biomérieux의 API

web (<https://apiweb.biomerieux.com/jsp/login.jsp>)에서 다른 균주와 비교한 결과 *Brevibacillus laterosporus*와 유사도(61.1%)가 가장 높았으며, *Bacillus subtilis* 및 *B. amyloliquefaciens*와는 26.9%, *B. pumilus*와는 11%의 유사도를 보였다.

또한 분리균 YB-1401의 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭한 후 1,496 bp 크기의 염기서열을 결정하고 (GenBank accession no. KJ57222) 이를 미국 NCBI의 BLAST 검색방법으로 16S rDNA database와 비교하였다. 그 결과 *B. amyloliquefaciens* FZB42 (NR_075005)와 가장 유사도가 높았으며 비교된 1,493개 염기중 1개 염기가 달랐고 *B. subtilis* 168 (NR_102783)과는 4개 염기가 다른 것으로 확인되었다. 그러나 분리균과 생화학적 특성의 유사도가 가장 높았던 *B. laterosporus*의 16S rDNA 염기서열(AB112720)과는 89% 수준의 낮은 유사도를 보였다. 그러므로 현재의 결과로는 분리균이 *Bacillus*속의 어느 균종에 속한다고 판단할 수 없다고 하겠다. 한편 된장이나 청국장으로부터 *B. licheniformis*가 β -glucanase [4]와 α -amylase [11]의 생산균으로 분리되었으며, mannanase를 생산하는 *B. subtilis*도 분리된 바 있으나[10, 15], mannanase를 생산하는 *B. laterosporus* 또는 *B. amyloliquefaciens*는 보고되지 않았다.

YB-1401은 된장을 pH 4.5의 조건에서 증균한 후 분리된 것이므로 산성조건에서 균의 성장도를 조사하기 위해 pH가 4.0과 4.5로 조절된 LB 액체 배지에서 16시간 동안 플라스크 배양을 하면서 배양액의 흡광도를 조사하였다. 그 결과 YB-1401은 pH 4.0 배지에서는 전혀 성장하지 못하였고 pH 4.5 배지에서는 배양초기에 균의 성장이 매우 느렸지만 배양시간이 10시간 정도에 이르렀을 때부터 빠른 성장을 보였다. 한편 된장에서 *B. subtilis*에 속하는 균주가 mannanase 생산균으로 분리된 바가 있어[10, 15] *B. subtilis* 중 실험균으

Table 1. Characteristics of the isolate YB-1401.

| Sugar utilization | Results | Characteristics | Results |
|---|---------|-----------------------------|---------|
| ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, mannitol, methyl- α -D-glucoside, arbutin, esculin, salicine, cellobiose, trehalose, glycogen, sucrose | + | β -Galactosidase | - |
| | | Arginine dihydrolase | - |
| | | Lysin decarboxylase | - |
| | | Ornithine decarboxylase | - |
| | | Citrate utilization | - |
| | | H ₂ S production | - |
| | | Urease | - |
| | | Tryptophane deaminase | - |
| | | Tryptophanase | - |
| | | Acetoin production | + |
| glycerol, erythritol, D-arabinose, L-arabinose, D-xylose, L-Xylose, adonitol, methyl- β -D-xylopyranoside, galactose, sorbose, rhamnose, dulcitol, inositol, sorbitol, methyl- α -D-mannopyranoside, N-acetyl-glucosamin, amygdalin, maltose, lactose, melibiose, inulin, melezitose, raffinose, starch, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-Arabitol, L-Arabitol, Gluconate, 2-keto-gluconate, 5-keto-gluconate | - | Gelatinase | + |
| | | Nitrate reduction | - |

로 널리 사용되고 있는 *B. subtilis* 168를 pH 4.5 배지에서 배양한 결과 전혀 성장하지 못하여 분리균 YB-1401과는 큰 차이를 나타냈다(결과 미제시).

부가탄소원에 따른 mannanase 생산성

곰팡이와 세균 유래의 mannanase는 mannan 다당류를 함유한 물질에 의해 그 생산성이 크게 증가하는 경우가 많다. *B. subtilis* BS5 [5], *B. subtilis* WL-7 [10]과 *B. subtilis* WY34 [6]는 곤약, *Aspergillus niger* BCC4525 [16]와 *B. halodurans* PPKS-2 [19]는 copra meal에 의해 mannanase 생산성이 증가하는 것으로 보고되었다. 그러므로 부가 탄소원이 *Bacillus* sp. YB-1401의 mannanase 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 여러 종류의 탄수화물이 0.5% (w/v)가 되도록 각각 첨가된 LB 배지에서 배양온도를 37°C로 하여 24시간 동안 진탕 배양한 후 배양상등액에 존재하는 mannanase 활성을 조사하였다. 그 결과 곤약이 첨가된 배지에서 효소 생산성이 가장 높았으며, 이외에도 mannan 다당류를 함유한 LBG와 guar gum에 의해서도 그 생산성이 크게 증가하였다. 그러나 mannan 다당류를 함유한 농산부산물인 palm kernel meal에 의한 효소 생산량의 증가정도는 높지 않은 것으로 나타났다(Table 2). 또한 곤약의 첨가량을 달리하였을 때 그 함량이 높을수록 효소 생산량이 크게 증가하여 4% 곤약을 첨가하였을 때 최대 생산성을 보였다. 이는 곤약을 첨가한 LB 배지에서 곤약의 함량이 0.5%일 때 mannanase 생산성이 최대이고 그 이상의 함량을 첨가해도 mannanase 생산성이 더 이상 증가하지 않은 *B. subtilis* WL-7에 비해 크게 다른 점이라고 할 수 있다[10]. *B. subtilis* WY34도 2% 곤약을 첨가한 배지에서 mannanase 생산성이 가장 높은 것으로 알려졌다[6]. 실제 곤약이 첨가된 LB 배지

는 점도가 높아지고 특히 2% 이상을 첨가하였을 때는 배양 초기에 액체배지가 제대로 진탕이 되지 않았으며, 4% 곤약을 첨가한 배지는 agar를 첨가하지 않았지만 거의 고형의 상태였다. 그러나 배양이 진행되면서 분리균이 생산하는 mannanase에 의해서 곤약이 분해됨으로써 배양 중기부터는 배지의 점질도가 급격하게 저하되고 24시간 배양 후에는 배양액에 점질도가 없었다.

배양시간에 따른 mannanase 생산성을 조사하기 위해 곤약 (4%)을 첨가하거나 첨가하지 않은 LB 배지에서 36시간 동안 배양하면서 mannanase 생산성과 성장도를 조사한 결과, 곤약을 첨가하지 않은 LB 배지에서 9시간 배양 후에 균의 성장이 최대에 이르렀으나 효소 생산성은 1 U/ml 미만으로 매우 낮았다. 곤약을 첨가한 배지에서는 배양시간이 9시간이 되었을 때 mannanase 생산성이 10.2 U/ml이었으나, 12시간에서는 155.7 U/ml로 급격하게 증가되었고 18시간 이후에는 약 265 U/ml 수준의 최대 생산성을 보였으며 36시간까지 그 생산성이 유지되었다(Fig. 1). 한편 LB 배지에서 측정된 배양균액의 흡광도가 12시간 이후부터는 지속적으로 감소하는 것으로 보아 사멸기에 이른 것으로 판단되었는데, 곤약을 첨가한 배지에서는 배지의 점도가 너무 높아 배양초기에 균이 원활하게 성장하지 못하였을 것을 감안하면 사멸기에 이르는 시간이 LB 배지에서 보다 오래 걸릴 것

Table 2. Effects of additional carbon sources on the mannanase production of *Bacillus* sp. YB-1401.

| Additional carbon sources (0.5%) | Mannanase productivity (U/ml) | Additional amount (%) of konjac glucomannan | Mannanase productivity (U/ml) |
|----------------------------------|-------------------------------|---|-------------------------------|
| None | 0.2 | 0.3 | 11.3 |
| Glucose | 0.3 | 0.5 | 12.1 |
| Xylose | 0.7 | 1.0 | 16.1 |
| α -Cellulose | 0.9 | 1.5 | 20.1 |
| Locust bean gum | 8.4 | 2.0 | 36.9 |
| Guar gum | 4.6 | 2.5 | 41.4 |
| Konjac glucomannan | 12.2 | 3.0 | 113.0 |
| Palm kernel meal | 1.3 | 3.5 | 128.7 |
| Wheat bran | 0.4 | 4.0 | 217.8 |

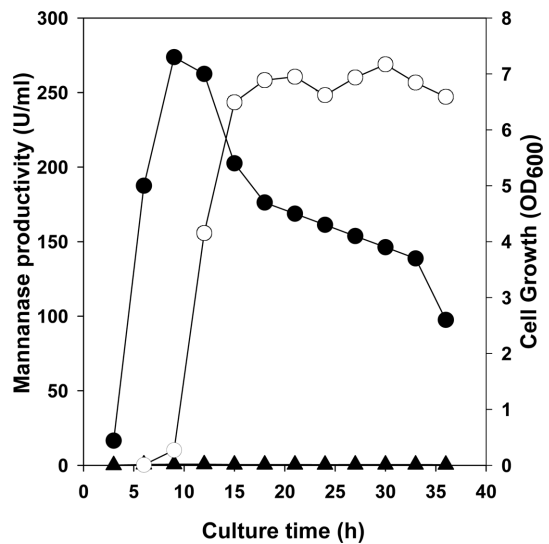


Fig. 1. Production of mannanase by *Bacillus* sp. YB-1401 and its growth. The isolate was grown respectively in LB broth supplemented with or without konjac glucomannan (4%) for mannanase production. Cell growth (closed circles) and mannanase productivity (closed triangles) were observed in the media without additional carbon source. Culture medium containing konjac glucomannan was used for mannanase production (open circles). Enzyme activities in the culture filtrates were determined in the reaction condition of pH 5.5 and 50°C. Each curve represents the average of three independent experiments.

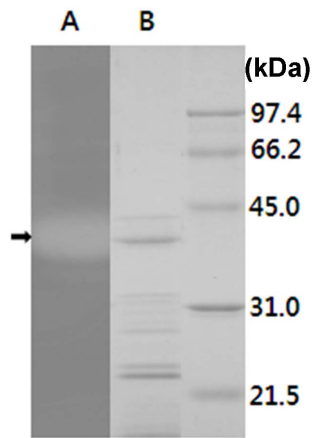


Fig. 2. Zymogram (A) and SDS-PAGE (B) of the crude enzyme produced by *Bacillus* sp. YB-1402. After SDS-PAGE of the concentrated culture filtrate of isolate YB-1401 grown in LB broth containing konjac glucomannan (4%), protein exhibiting mannanase activity, which was indicated with arrow, was analyzed by activity staining with LBG as substrates. Molecular size is shown in kilodaltons to the right side of the gel.

으로 여겨졌다.

배양 상등액을 ammonium sulfate로 처리하여 제조한 조효소액을 사용하여 SDS-PAGE를 수행한 후 활성염색을 실시한 결과 Fig. 2에 보인 바와 같이 분자량이 약 38.0 kDa 정도로 추정되는 mannanase 활성 단백질이 관찰되었으며 이는 SDS-PAGE에서 38-40 kDa의 분자량을 보인 *B. subtilis* WY34 [6], *B. subtilis* BCC41051 [18]과 *B. subtilis* WL-3 [15]의 mannanases와 유사하다고 하겠다.

Mannanase의 반응특성

조효소액을 사용하여 반응 pH와 온도가 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 반응온도를 50°C로 고정하고 여러 pH에서 mannanase 활성을 측정된 결과 pH 5.5에서 최대 활성을 보였으며 pH 5.0-6.5 범위에서 최대활성의 70% 이상의 활성을 나타내었다(Fig. 3). 또한 반응액의 pH를 5.5로 하고 반응 온도에 따른 효소의 활성을 조사한 결과 55°C에서 활성이 가장 높게 나타났다(Fig. 4). 따라서 YB-1401의 mannanase는 반응온도 50-70°C, 반응 pH 5.0-7.0의 범위에서 최대활성을 보이는 대부분의 *Bacillus*속 균주 유래 mannanases [10, 15, 18, 26]와 유사한 것을 알 수 있다. 반면 *B. subtilis* BS5 [5], *B. subtilis* G1 [20]과 *B. halodurans* PPKS-2 [19]로부터 유래된 mannanases는 최적 반응온도가 낮거나 알칼리 조건에서 최대 활성을 보이는 것으로 각각 보고되었다.

pH 3-12의 범위에서 mannanase의 안정성을 조사한 결과 pH 3.5-10에서 1시간 동안 방치하였을 때 실활되지 않았

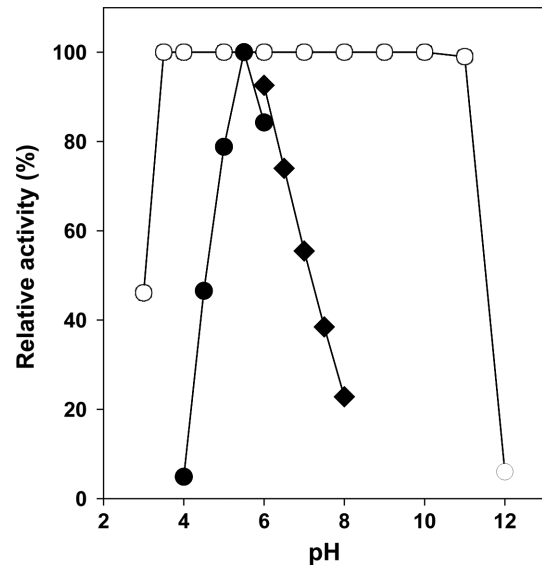


Fig. 3. pH Optimum and pH stability of the crude enzyme. Buffers (50 mM) used were as follows: sodium citrate (pH 3-6), sodium phosphate (pH 6-8), Tris (pH 8-9), KCl-borate (pH 9-10), sodium carbonate (pH 10-11), and sodium phosphate/NaOH (pH 11-12). Mannanase activity (closed symbols) was assayed at pH 4-8 using sodium citrate (circles) and sodium phosphate (diamonds) buffers with constant temperature of 50°C. pH Stability (open symbols) was determined by measuring the residual activities after pre-incubations for 1 h in various pHs at 4°C. Each curve represents the average of three independent experiments.

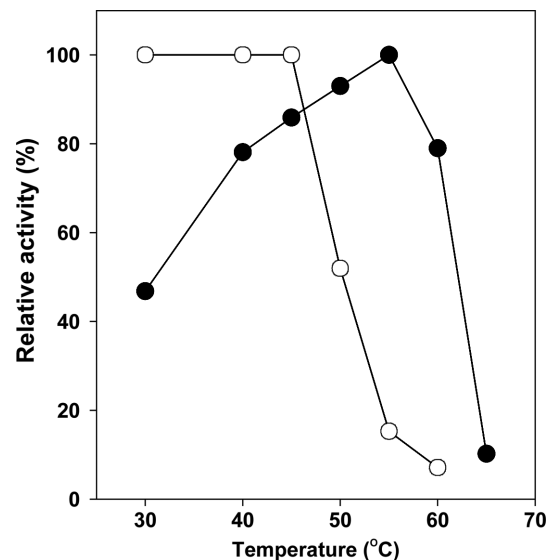


Fig. 4. Temperature optimum and thermostability of the crude enzyme. The enzyme reaction was performed at various temperatures (closed symbols) for 15 min in 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.5). Thermostability (open symbols) was determined by measuring the residual activities after pre-incubation for 1 h at different temperatures. Each curve represents the average of three independent experiments.

며, pH 11.0에서도 99%의 잔존활성을 보였다(Fig. 3). 이로 보아 내산성 균주로 분리된 YB-1401가 생산하는 mannanase는 최적 반응 pH는 *Bacillus*속 균주 유래 mannanases들과 유사하였지만, pH 4-9의 범위내에서 안정한 것으로 알려진 *B. subtilis* B23 [26]과 *B. subtilis* G1 [20]의 mannanases보다 산성 뿐 아니라 알칼리성의 pH 범위에서도 그 안정성이 우수한 것으로 확인되었다. 그러나 YB-1401의 mannanase는 pH 3.0에서는 1시간 방치하였을 때 잔존활성이 46% 수준을 유지하여 pH 3-10의 범위에서 안정한 것으로 보고된 *Thielavia arenaria* XZ7 유래의 곰팡이 효소보다는 산성 조건에서 안정성이 낮은 것으로 나타났다[13]. Mannanase의 열안정성을 조사한 결과 45°C 이하에서 1시간 동안 방치하였을 때 실활되지 않았으나, 50°C 이상에서는 실활되기 시작하여 50°C에서는 52%, 55°C에서는 15% 정도의 잔존활성을 보였다. 이로 보아 YB-1401의 mannanase는 *B. subtilis* BCC41051 [18], *B. subtilis* G1 [20]과 *B. subtilis* WL-3 [23]을 포함한 다수의 *Bacillus*속 균주 유래 mannanases에 비해서 열에 대한 안정성이 낮았으며, *B. subtilis* BS5 [5]나 *Sphingomonas*속 균주[27] 유래의 mannanases 보다는 열에 안정하였다.

반응산물

Mannanase에 의한 가수분해 산물을 조사하기 위해 중합도가 2-6인 MOS, LBG 와 guar gum을 기질로 하여 효소 반응을 실시한 후 가수분해 산물을 TLC로 분석한 결과 Fig. 5

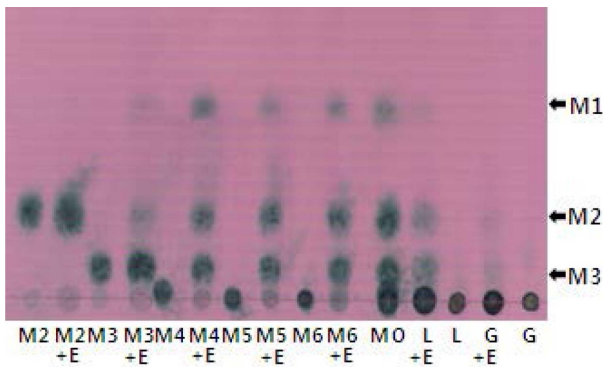


Fig. 5. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of β -1,4-linked mannoooligosaccharides (MOS), locust bean gum (LBG) and guar gum with the crude enzyme. The reaction mixtures containing the crude enzyme and mannoooligosaccharides, LBG or guar gum in 20 mM sodium citrate buffer (pH 5.5) were incubated for 5 h at 45°C. MOS and mannans used as substrates for hydrolysis reaction were indicated in the lanes with crude enzyme (E) as follows: M2, mannobiose; M3, mannotriose; M4, mannotetraose; M5, mannopentaose; M6, mannohexaose, L, LBG; G, guar gum. Lane MO stands for standard MOS with a degree of polymerization 1-6.

에 나타난 바와 같이 mannobiose는 가수분해 되지 않았으며 이보다 중합도가 큰 MOS는 가수분해 되어 최종 산물로 mannotriose와 mannobiose가 다량 생성되었고 동시에 mannose도 소량 생성되었다. 그러나 mannotriose는 이보다 중합도가 큰 MOS에 비해 가수분해 정도가 미약한 것으로 확인되었으며 이러한 결과는 *B. subtilis* WL-3 [23]과 *Bifidobacterium adolescentis* [8]의 효소와 유사하였다. 한편 *B. subtilis* WY34 [6]의 mannanase는 mannotriose는 분해하지 못하고 mannotetraose 이상의 중합도를 갖는 MOS를 분해한다고 알려졌다.

LBG를 mannanase로 가수분해하였을 때도 mannotriose와 mannobiose가 주된 반응산물이며 mannose는 소량 생성되었는데 guar gum의 가수분해 산물로는 매우 미량의 mannotriose와 mannobiose만 관찰되었다. Guar gum과 LBG는 galactomannan이지만 mannose와 측쇄 결합한 galactose의 양에 차이가 있으며, guar gum에서 galactose의 함량이 많은 것으로 알려져 있다. Mannanase가 galactomannan의 직쇄골격인 mannose간의 β -1,4 결합을 가수분해할 때 mannose에 측쇄 결합된 galactose가 반응을 저해하게 되어 galactose 함량이 높은 guar gum의 가수분해 산물이 LBG의 분해 산물에 비해 적게 관찰된 것으로 판단된다. 이러한 현상은 대부분의 mannanase가 LBG에 대한 활성이 guar gum에 대한 활성보다 약 4-10배 정도 높다는 사실에서도 알 수 있다[12, 23].

요 약

가정에서 제조된 된장을 산성조건에서 계대 배양한 후 균체의 mannanase를 생산하는 *Bacillus* sp. YB-1401를 분리하였다. 분리균의 당이용능을 비롯한 생화학적 특성은 *Brevibacillus laterosporus*와 유사도(61.1%)가 가장 높은 반면에 16S rRNA 유전자의 염기서열은 *B. amyloliquefaciens*와 유사도가 가장 높았다. 분리균 YB-1401의 mannanase 생산성은 mannans에 의해 급격하게 증가하였으며, 특히 곤약(4%)이 첨가된 배지에서 약 265 U/ml로 최대 생산성을 보였다. 분리균의 mannanase는 55°C와 pH 5.5 반응조건에서 최대활성을 보였으며 pH 3.5-11.0의 범위에서 1시간 방치하였을 때 실활이 거의 일어나지 않았다. 또한 LBG와 guar gum 및 mannoooligosaccharides를 mannanase로 분해하였을 때 주된 반응산물로 mannobiose와 mannotriose가 생성되었으며 mannose도 소량 생성되었다.

References

1. Al-Ghazzewi FH, Tester RF. 2012. Efficacy of cellulase and

- mannanase hydrolysates of konjac glucomannan to promote the growth of lactic acid bacteria. *J. Sci. Food Agric.* **92**: 2394-2406.
- Dhawan S, Kaur J. 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit. Res. Biotechnol.* **27**: 197-216.
 - Ghosh A, Luis AS, Bras JL, Fontes CM, Goyal A. 2013. Thermostable recombinant β -(1 \rightarrow 4)-mannanase from *C. thermocellum*: biochemical characterization and manno-oligosaccharides production. *J. Agric. Food Chem.* **61**: 12333-12344.
 - Hwang JS, Yoo HJ, Kim SJ, Kim HB. 2008. Characterization of β -1,4-glucanase activity of *Bacillus licheniformis* B1 in chungkookjang. *Korean J. Microbiol.* **44**: 69-73.
 - Huang JL, Bao LX, Zou HY, Che SG, Wang GX. 2012. High-level production of a cold-active β -mannanase from *Bacillus subtilis* BS5 and its molecular cloning and expression. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* **4**: 14-17.
 - Jiang Z, Wei Y, Li D, Li L, Chai P, Kusakabe I. 2006. High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydr. Polym.* **66**: 68-96.
 - Kawaguchi K, Senoura T, Ito S, Taira T, Ito H, Wasaki J, et al. 2014. The mannobiose-forming exo-mannanase involved in a new mannan catabolic pathway in *Bacteroides fragilis*. *Arch. Microbiol.* **196**: 17-23.
 - Kulcinskaja E, Rosengren A, Ibrahim R, Kolenova K, Stalbrand H. 2013. Expression and characterization of a *Bifidobacterium adolescentis* β -mannanase carrying mannan-binding and cell association motifs. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 133-140.
 - Kumagai Y, Usuki H, Yamamoto Y, Yamasato A, Arima J, Mukaihara T, et al. 2011. Characterization of calcium ion sensitive region for β -mannanase from *Streptomyces thermolilacinus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**: 1127-1133.
 - Kweun MA, Kim HS, Lee MS, Choi JH, Yoon K-H. 2003. Mannanase production by a soybean isolate, *Bacillus subtilis* WL-7. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 277-283.
 - Lee EJ, Yoon K-H. 2012. Thermostable α -amylase of *Bacillus licheniformis* YB-1234 isolated from fermented soybean of Korean buddhist temple. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 296-302.
 - Li Y, Yang P, Meng K, Wang Y, Luo H, Wu N, et al. 2008. Gene cloning, expression, and characterization of a novel beta-mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 160-166.
 - Lu H, Zhang H, Shi P, Luo H, Wang Y, Yang P, et al. 2013. A family 5 β -mannanase from the thermophilic fungus *Thielavia arenaria* XZ7 with typical thermophilic enzyme features. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 8121-8128.
 - Miller ML, Blum R, Glennon WE, Burton AL. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* **2**: 127-132.
 - Oh YP, Lee J-M, Cho KH, Yoon K-H. 2002. Isolation and enzyme production of a mannanase-producing strain, *Bacillus* sp. WL-3. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 247-252.
 - Sornlake W, Matetaviparee P, Rattanaphan N, Tanapongpipat S, Eurwilaichitr L. 2013. β -Mannanase production by *Aspergillus niger* BCC4525 and its efficacy on broiler performance. *J. Sci. Food Agric.* **93**: 3345-3351.
 - Srivastava PK, Kapoor M. 2014. Cost-effective endo-mannanase from *Bacillus* sp. CFR1601 and its application in generation of oligosaccharides from guar gum and as detergent additive. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **44**: 392-417.
 - Summpunn P, Chaijan S, Isarangkul D, Wiyakrutta S, Meevootisom V. 2011. Characterization, gene cloning, and heterologous expression of β -mannanase from a thermophilic *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol.* **49**: 86-93.
 - Vijayalaxmi S, Prakash P, Jayalakshmi SK, Mulimani VH, Sreeramulu K. 2013. Production of extremely alkaliphilic, halotolerant, detergent, and thermostable mannanase by the free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* PPKS-2. Purification and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171**: 382-395.
 - Vu TT, Quyen DT, Dao TT, Nguyen Sle T. 2012. Cloning, high-level expression, purification, and properties of a novel endo- β -1,4-mannanase from *Bacillus subtilis* G1 in *Pichia pastoris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 331-338.
 - Wongputtisin P, Khanongnuch C, Khongbantad W, Niamsup P, Lumyong S. 2012. Screening and selection of *Bacillus* spp. for fermented corticate soybean meal production. *J. Appl. Microbiol.* **113**: 798-806.
 - Xu M, Zhang R, Liu X, Shi J, Xu Z, Rao Z. 2013. Improving the acidic stability of a β -mannanase from *Bacillus subtilis* by site-directed mutagenesis. *Proc. Biochem.* **48**: 1166-1173.
 - Yoon K-H, Chung S, Lim B-L. 2008. Characterization of the *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **46**: 344-349.
 - Zhang C, Chen J-D, Yang F-Q. 2014. Konjac glucomannan, a promising polysaccharide for OCDDS. *Carbohydr. Polym.* **104**: 175-181.
 - Zhang Y, Ju J, Peng H, Gao F, Zhou C, Zeng Y, et al. 2008. Biochemical and structural characterization of the intracellular mannanase AaManA of *Alicyclobacillus acidocaldarius* reveals a novel glycoside hydrolase family belonging to clan GH-A. *J. Biol. Chem.* **283**: 31551-31558.
 - Zhou H, Yang Y, Nie X, Yang W, Wu Y. 2013. Comparison of expression systems for the extracellular production of mannanase Man23 originated from *Bacillus subtilis* B23. *Microb. Cell Fact.* **12**: 78.
 - Zhou J, Zhang R, Gao Y, Li J, Tang X, Mu Y, et al. 2012. Novel low-temperature-active, salt-tolerant and proteases-resistant endo-1,4- β -mannanase from a new *Sphingomonas* strain. *J. Biosci. Bioeng.* **113**: 568-574.