

Isolation of Mannanase-producing Bacteria, *Bacillus subtilis* WL-6 and WL-11, and Cloning and Characterization of Mannanase

Ki-Hong Yoon*

Food Science & Biotechnology Major, Woosong University, 17-2, Jayang-dong, Dong-gu, Daejeon 300-718, Korea

Received July 15, 2016 / Revised August 4, 2016 / Accepted August 29, 2016

Two bacterial strains producing extracellular mannanase were isolated from doenjang, a traditionally fermented soybean paste in Korea. The isolates, WL-6 and WL-11, were identified as *Bacillus subtilis* on the basis of their 16S rRNA gene sequences, morphological, and biochemical properties. Two genes encoding the mannanase of both *B. subtilis* WL-6 and *B. subtilis* WL-11 were each cloned into *Escherichia coli*, and their nucleotide sequences were determined. Both mannanase genes consisted of 1,086 nucleotides, encoding polypeptides of 362 amino acid residues. The deduced amino acid sequences of the two WL-6 and WL-11 mannanases, designated Man6 and Man11, respectively, differed from each other by eight amino acid residues, and they were highly homologous to those of mannanases belonging to the glycosyl hydrolase family 26. The 26 amino acid stretch in the N-terminus of Man6 and Man11 was a predicted signal peptide. Both Man6 and Man11 were localized at the level of 94 - 95% in an intracellular fraction of recombinant *E. coli* cells. The enzymes hydrolyzed both locust bean gum and manno-oligosaccharides, including mannotriose, mannotetraose, mannopentaose, and mannohexaose, forming mannobiose and mannotriose as predominant products. The optimal reaction conditions were 55° C and pH 6.0 for Man6, and 60° C and pH 5.5 for Man11. Man11 was more stable than Man6 at high temperatures.

Key words : Activity, *Bacillus subtilis*, cloning, comparison, mannanase

서 론

β -1,4-Mannanase (mannanase)는 mannan 다당류에 속하는 β -mannan, glucomannan, galactomannan과 galactoglucomannan의 기본 구성당인 mannose간의 β -1,4-mannosyl 결합을 무작위적으로 분해하여 manno-oligosaccharide (MOS)로 전환시키며 바이오매스 자원의 당화, 커피 가공, 펄프 제조나 사료첨가용 효소로 산업적 활용성이 높다[2, 14]. 최근에는 MOS가 장관내 유익한 균총의 성장을 촉진하고 유해균의 성장을 억제하는 prebiotics로서 역할을 할 뿐 아니라 장관의 치료 효과도 알려지면서 여러 종류의 식물성 mannan 다당류를 mannanase로 분해하여 MOS를 생산하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[15, 24].

Mannanase는 *B. subtilis* WL-7 [6]과 *B. pumilus* GBSW19 [23] 유래의 효소와 같이 활성 domain 만으로 구성되거나 *Bifidobacterium animalis* [10]와 *Clostridium thermocellum* [4]이 생산하는 효소와 같이 carbohydrate binding domain을 비롯

한 여러 기능영역으로 포함한 것이 있다. 이들의 활성 영역은 대부분 glycosyl hydrolase (GH) family 5와 26에 속하며 GH26 mannanase에는 *Aspergillus nidulans*가 생산하는 효소도 있지만[17] 세균성 효소가 대부분을 차지하고[4, 6] GH5의 효소로는 곰팡이 유래 또는 세균 유래 효소가 두루 포함되어 있다[10, 11, 23]. 최근에는 GH113에 속하는 *Alicyclobacillus*속 균주의 mannanase [19]와 GH134에 속하는 *A. nidulans*의 mannanase [13]가 보고되었다. 한편 GH5와 GH113에 속하는 mannanase는 GH26의 mannanase와는 달리 당 전이활성을 보이는 것으로 알려졌다[11, 19]. *Bacillus*속 균주로부터 여러 종류의 mannanases에 대한 반응특성, 구조 및 그 유전자가 밝혀졌으며, 대장균을 비롯하여 *B. subtilis*, *B. brevis* [25], *Pichia pastoris* [8] 등의 다양한 균주를 숙주균으로 하여 *Bacillus* 유래의 mannanase를 생산하는 재조합 균주가 개발되었다. 외래 숙주로부터 생산되는 mannanase는 균체내 또는 균체의 효소로 생산되는 비율에 차이가 있는 것으로 보고되었다[6, 16, 20, 21]. 또한 효소 생산을 위한 배지 및 배양조건에 대한 연구도 활발히 수행되었으며 활용에 적합한 특성을 갖도록 mannanase 성능을 개량하기 위해서 각종 변이효소가 개발되고 있다[3, 20].

세균 유전체의 염기서열을 기반으로 유추된 아미노산 배열의 유사성이 매우 높은 mannanase에 대한 정보는 많아지고 있는데 비해 이들 효소의 특성에 대한 보고는 많지 않다. 본 연구에서는 mannanase를 생산하는 *Bacillus*속 균주로 된장에

*Corresponding author

Tel : +82-42-630-9742, Fax : +82-42-630-9389

E-mail : ykh@wsu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 분리된 두 균주로부터 mannanase 유전자를 클로닝하고 재조합 대장균이 생산하는 mannanase의 반응특성을 비교하였다.

재료 및 방법

Mannanase 생산균의 분리과 동정

된장으로부터 분리된 균주 중 mannanase를 생산하는 미생물을 탐색하기 위해서 0.5% locust bean gum (LBG)이 첨가된 nutrient 평판배지(beef extract, 3 g; bacto-peptone, 5 g; agar, 15 g; water, 1 liter)에서 하룻밤 배양한 후 congo red로 염색하여 집락 주변의 분해현을 관찰하였다. Mannanase 생산균을 동정하기 위해서는 API 50 CHB kit (Biomereux사, France)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 균 현탁액을 접종한 후 37°C에서 배양하면서 1일과 2일째 당 이용능을 관찰하였다. 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열 8~27)과 5'-GGTACCTGTTACGACTT-3' (*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열 1492~1510)을 primers로 사용하여 분리균의 16S rDNA를 증합효소 연쇄반응(PCR)으로 증폭한 후 이를 정제하고 그 염기서열을 결정하였다.

Mannanase 유전자 클로닝

Mannanase를 생산하는 두 균주를 LB 액체배지(yeast extract, 5 g; tryptone, 10 g; NaCl, 5 g; water, 1 liter)에 각각 접종하여 37°C에서 8배양 동안 배양한 후 Genomic DNA prep kit (Solgent, Korea)를 사용하여 회수한 균체로부터 총 유전체 DNA를 분리하였다. Mannanase 유전자를 클로닝하기 위해 분리된 염색체 DNA를 제한효소 *Pst*I로 절단하고 2.0 kb 이상의 DNA 단편을 분획하여 이를 동일효소로 절단된 pUC19와 ligation한 후 *E. coli* DH5α에 도입하였다. Mannanase 활성을 갖는 형질전환주를 탐색하기 위해서는 0.5% LBG를 첨가한 LB 평판배지에 배양하여 LBG 분해현을 보이는 균을 선발하였다.

Mannanase 조효소액 제조

재조합 대장균이 생산하는 mannanase의 조효소액을 제조하기 위해서는 재조합 대장균을 ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 배양온도를 37°C로 하고 12시간 동안 진탕 배양한 후 균체를 회수하여 10 mM 구연산 완충용액(pH 6.0)으로 현탁하였으며 초음파로 균체를 파쇄한 후 15,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 채취하였다.

Mannanase 활성 측정

Mannanase 활성은 LBG을 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3, 5-dinitrosalicylic acid 방법으로 다음과 같이

정량 함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁 시킨 1%(w/v) LBG 용액 0.5 ml와 200 mM sodium citrate 완충용액(pH 5.5 또는 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 하여 작성된 검량곡선으로 효소 반응으로 생성된 환원당을 결정하였고 mannanase 활성도 1.0 unit은 위의 조건에서 LBG를 분해하여 1분 동안 1 μmol의 mannose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 반응 pH에 따른 mannanase 활성을 조사하기 위해서는 반응온도를 50°C로 하고 반응액 pH를 달리하여 반응을 수행하였으며, 완충용액으로는 50 mM sodium citrate (pH 4.0-6.0)와 50 mM sodium phosphate (pH 6.0-8.0)가 사용되었다. 반응온도가 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 반응 pH를 최적이 되도록 고정하고 반응온도를 달리하여(30~70°C) 효소활성을 측정하였다. 단백질의 농도는 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Bradford 방법으로 정량하였다[1].

반응산물 분석

Mannanase에 의한 LBG와 MOS의 가수분해 산물을 분석하기 위해서는 기질이 0.5% 첨가된 반응액에 과량의 mannanase를 첨가하여 40°C에서 5시간 동안 효소반응을 수행하고 95°C에서 3분 동안 열 처리한 후 원심 분리하여 단백질 침전물을 제거하였다. 반응 상등액을 2 μl를 취해 silica gel-precoated thin layer plate (Merck Kiesegel, No. 5748)에 점적한 후 n-propanol:nitromethane:water [7:1:2, (v/v)] 혼합용액을 전개용액으로 하여 박층 크로마토그래피를 수행하였으며 사용된 n-propanol과 nitromethane은 Sigma-Aldrich Co. (USA)의 ACS 시약이다. 전개된 물질은 9 ml ethanol, 0.5 ml *p*-anisaldehyde, 0.5 ml sulfuric acid와 glacial acetic acid 몇 방울을 혼합한 발색제 용액을 뿌린 후, 120°C에서 10분간 방치하여 발색하였다.

결과 및 고찰

Mannanase 생산균의 분리과 동정 및 특성

된장을 0.85% NaCl 용액에 현탁하고 희석한 후 이를 nutrient 평판배지에 도말하여 얻은 집락을 LBG가 첨가된 nutrient 평판배지에 접종하였다. 약 20시간 배양한 후 콜로니 주변의 LBG 분해하는 2주의 mannanase 생산균을 선발하였다. Mannanase 생산균으로 분리된 WL-6과 WL-11 균주가 mannanase 외에 고분자 물질 가수분해 효소도 생산하는지 확인하기 위해 CMC, skim milk, potato starch, oat spelt xylan과 tributyrin의 분해능을 관찰한 결과 이들 기질을 모두 분해하는 것으로 나타났으므로 두 분리균은 cellulase, protease,

amylase, xylanase와 esterase의 활성도 갖고 있음을 알 수 있었다.

분리균 WL-6과 WL-11은 모두 그람 양성 간균으로 포자를 형성하였으며, API 50 CHB kit로 탄수화물 이용능을 조사한 결과 galactose, β-gentiobiose와 xylitol의 이용능을 제외하고는 두 균주의 당 이용능이 모두 동일하며 이들의 당 이용능을 Biomerieux의 API web (<https://apiweb.biomerieux.com/jsp/login.jsp>)에서 다른 균주와 비교하였을 때 WL-6과 WL-11은 *B. subtilis*와 유사도가 각각 97.4%와 94.6%로 가장 높게 나타났다. 또한 두 균주의 16S rDNA를 PCR로 증폭하여 1,524 bp (WL-6)와 1,517 bp (WL-11) 크기의 염기서열을 결정할 결과 두 균주간에는 1개 염기에 차이가 있었으며(Genbank accession no. DQ198162, KK446995), *Bacillus*속 표준 균주와 비교하였을 때 Fig. 1에 보인 바와 같이 모두 *B. subtilis*와 가장 유사도가 높았다. NCBI database에서 다른 균주의 것과 비교하였을 때도 *B. subtilis*에 속하는 여러 균주의 16S rDNA (CP015975, CP015004, CP014858, CP014166, CP011882)와 가장 높은 상동성을 보였다. 이로 보아 mannanase 생산균 WL-6과 WL-11은 동일하게 *B. subtilis*에 속하는 균으로 판단되었다.

Mannanase 유전자의 클로닝과 염기서열

재료 및 방법에서 언급한 방법으로 *B. subtilis* WL-6과 WL-11의 유전체 DNA로부터 mannanase 유전자를 클로닝하여 LBG 분해환을 보이는 형질전환주를 각각 선발하였다. 각각의 형질전환주로부터 플라스미드 DNA를 추출하여 제한효소로 절단한 결과 약 4.0 kb 크기의 DNA가 동일하게 삽입되었으며, 클론된 DNA의 mannanase 유전자 부분을 포함한 1.3 kb 크기의 염기서열을 결정하였다. 두 균주의 mannanase 구조유

전자는 개시코돈(TTG)과 종결코돈(TGA)이 동일하였으며 염기서열은 97%의 유사도를 보였고 362 아미노산 잔기로 구성된 단백질을 코딩하는 1,086 bp의 염기로 구성되었다. 개시코돈으로부터 6 nucleotides가 떨어진 부분에 ribosome 결합위치로 추정되는 서열(GGGGAG)도 동일하였다.

염기서열로부터 유추된 WL-6 (Man6)와 WL-11 (Man11)의 mannanase간에는 8개 아미노산 잔기 배열에 차이가 있었으며 SignalP 4.1 프로그램을 사용하여 분석한 결과 염기성 아미노산과 소수성 아미노산이 배열된 아미노 말단의 26개 아미노산 잔기가 signal peptide로 예측되었는데 이 부분에서는 한 개의 잔기만이 달랐다(Fig. 2). 이들을NCBI의 database에서 다른 단백질과 아미노산 잔기배열을 비교한 결과 Man11은 *B. subtilis* Z-2의 mannanase (AAV84100)와 동일하였고, Man6과 동일한 서열을 갖는 효소는 없었다. Man6은 수제미에서 분리된 *B. subtilis* SG6의 mannanase (AIX06292)와 2개 잔기가 다르고 상동성이 가장 높았다. *B. pumilus* Nsic-2의 mannanase (AGI16498)는 아미노 말단에 5개 아미노산 잔기가 추가되어 367개 잔기로 구성되어 있지만 이부분을 제외하면 Man6과 2개의 잔기만 다른 것으로 나타났다. 이외에도 3~6개 잔기가 다른 *B. subtilis*, *B. pumilus*와 *Bacillus* sp. 유래의 mannanases (BAI84100, AEO79931, GAK82422, CUB57299, AGT37255, AKE22413, OAZ66395, CUB26411, ERI41944, AEB98481, ACX94025, ACY00389)가 다수 확인되었으며 모두 GH26에 속하는 mannanase 활성영역만으로 구성되어 있다. 한편 *B. subtilis* E1의 유전체 서열로부터 추론된 glutamine aminotransferase class-II (CCU60887)가 Man6과 아미노산 배열이 2개만 다른 것으로 확인되었는데 이는 유전체 서열에 근거하여 추론한 ORF의 기능이 잘못 판단된 것으로 여겨진다.

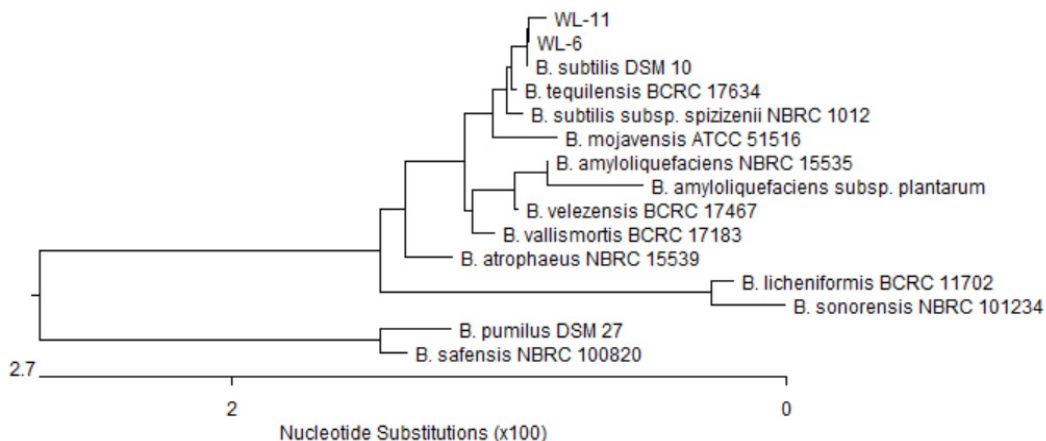


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence comparisons indicating the position of isolated strains, WL-6 and WL-11, and related type species of the genus *Bacillus*. The tree was constructed using the neighbor-joining method with Clustal V. Nucleotide sequences used for sequence comparisons are originated from AB325583 (NBRC 15535), KC510187 (Plantarum), AB363731 (NBRC 15539), EF433410 (BCRC 11702), AB021191 (ATCC 51516), AY456263 (DSM 27), AB681259 (NBRC 100820), AB681416 (NBRC 101234), AJ27635 (DSM 10), AB325584 (NBRC 101239), HQ223107 (BCRC 17634), AB021198 (BCRC 17183) and EF433407 (BCRC 17467).

WL6	---- <u>MFKKHTISLLIIFLLASAVLAKPIEAHTVSPVNPNAQQTTKAVMNL</u> AHLPLNRTENRVLSGAFGGYSHDTFVSAEADRI ^S RSATGQSPA ^I Y	90
WL11	-----*****L*****T*****M*****	90
WL7	-----*****T*****M*****	90
WL8	-----*****M*****	90
168	-----*****T*****M*****	90
B102	-----*****T*****M*****	90
AG11	MGELHL*****M*V*****	95
AIX0	-----*****A*****M*****	90
OAZ6	-----*****A*****M*****	90
WL6	GCDYARGWLETAKIEDSIDVSCNGDLISYWKNGGIPQISLHLANPAFQSGHFKTPITNDQYK ^K ILDSSTAEGKRLNAML ^S KIADGLQEL ^E ENQGV ^P	185
WL11	*****N*****S*****M*****	185
WL7	*****N*****M*****	185
WL8	*****M*****	185
168	*****N*****M*****N*****A*****	185
B102	*****N*****M*****N*****A*****	185
AG11	*****M*****	190
AIX0	*****M*****	185
OAZ6	*****M*****	185
WL6	VLFRPLHEMNGEWF ^W WGLTSYNQKDNERISLYKQLYK ^K IHYHMTDTRGLDHLI ^W VVSPDANRDFK ^T DFY ^P GASYVDI ^V GLDAYFQDAYSINGYD ^Q	280
WL11	*****M*****	280
WL7	*****M*****	280
WL8	*****M*****	280
168	*****M*****	280
B102	*****M*****	280
AG11	*****M*****	285
AIX0	*****M*****	280
OAZ6	*****M*****	280
WL6	LTALNKPF ^A FTVEG ^P Q ^P ANGSFDYSLFINAIKQKYPKTIYFLAWNDEWSPAVNKGASALYHDSWTLNKGELI ^W NGDSLTPIVE	362
WL11	*****T*****R*****	362
WL7	*****T*****	362
WL8	*****T*****V*****	362
168	*****T*****A*****	362
B102	*****T*****A*****D*****	362
AG11	*****T*****	367
AIX0	*****T*****	362
OAZ6	*****T*****S*****	362

Fig. 2. Amino acid sequence comparison of the Man6 and Man11 with other mannanases. The amino acid sequences of nine mannanases from *B. subtilis* strains WL6 (WL6), WL7 (WL7), WL8 (WL8), WL11 (WL11), 168 (168), B10-02 (B102), SG6 (AIX0), SRCM101280 (OAZ6), and *B. pumilus* Nsic-2 (AG11) are indicated by the one-letter code. Residues identical to the amino acid sequence of the WL-6 mannanase are indicated by asterisks in other sequences. Underlined amino acids indicate the signal peptide. Numbers at the end of each line correspond to the amino acid position in the mannanases.

재조합 대장균의 Mannanase의 생산성

Mannanase 유전자와 함께 동일한 주변지역의 염기서열을 포함하는 2.8 kb 크기의 DNA가 pUC19의 *Pst*I과 *Hind*III 위치에 *lac* promoter와 동일한 방향으로 삽입된 재조합 플라스미드를 *E. coli* DH5a에 도입하였다. 재조합 대장균을 ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 12 시간 동안 진탕 배양한 후 배양상등액과 균체파쇄 상등액의 효소활성을 측정된 결과 균체 파쇄상등액에서 Man6과 Man11은 13.3 U/ml과 426.5 U/ml의 활성을 보였으며 균체외로 분비된 활성은 Man6과 Man11이 각각 0.8 U/m과 19.3 U/ml로 나타났다. 이로 보아 Man6은 94.3%, Man11은 95.7%가 균체내 효소로 확인되어 이들은 매우 적은 양으로 분비된 것을 알 수 있다. Man6와 5개와 6개 아미노산이 각각 다른 *B. subtilis* WL-7과 *B. subtilis* WL-8의 mannanase는 재조합 대장균에서 약 50% 정도가 균체의 효소로 분비된 것으로 알려졌다[6, 21]. 그런데 이들 효소간에 signal peptide

의 아미노산 잔기 배열은 동일한데도 불구하고 분비 효소량에 차이가 큰 것은 mature protein의 아미노산 배열의 차이에 의해 균체의 분비 효율의 차이가 발생하였거나 재조합 대장균의 배양조건의 차이에 의한 것으로 판단된다. 또한 *B. subtilis* B10-02의 mannanase 유전자를 *B. subtilis* 168에 도입한 형질 전환주와 *B. subtilis* B10-02에 의해 생산된 mannanase는 균체외로 53.9%와 80.2%가 각각 분비되어 모 균주인 *B. subtilis* B10-02보다 *B. subtilis* 168의 형질전환주에서 생산된 효소가 균체내에 더 많이 존재하는 것으로 밝혀졌으며[20], Man6와 아미노말단의 길이가 5개 더 길고 mature protein의 아미노산 잔기가 3개 다른 *B. pumilus* Nsic2 균주의 mannanase 유전자를 함유한 재조합 *E. coli* BL21 (DE3)에 의해 생산된 mannanase는 균체내에 존재하고 반면에 *B. subtilis* WB800N 형질 전환주에서는 균체외로 분비되었다[16]. 최근에는 재조합 *Lactobacillus plantarum*에 의해 생산된 *B. lichniformis* man-

nanase의 83.7%가 균체외로 분비 생산된 바 있으며[12], *P. pastoris* 재조합 균주로부터 *B. subtilis* BS5의 mannanase가 균체외로 892 U/ml이 생산되었다[8].

한편 재조합 대장균에서 Man6과 Man11의 생산성은 큰 차이가 있었는데 균 성장 정도의 차이 때문인지 확인하기 위해 균체과쇄 상등액의 단백질량을 기준으로 생산성을 비교한 결과 Man6은 27.2 U/mg, Man11은 710.8 U/mg로 약 26배의 차이를 보여 균 성장 정도와 관련성은 없다고 하겠다. 그러므로 Man6과 Man11의 유전자가 pUC19의 동일한 위치에 같은 방향으로 각각 삽입된 재조합 플라스미드를 동일한 숙주균에 도입하여 동일한 조건으로 배양하였음에도 불구하고 균체과쇄 상등액에서 mannanase 활성이 26배 차이가 발생한 것은 mannanase의 promoter 지역의 염기서열이 달라 mannanase 유전자 발현량의 차이가 발생하였거나 또는 두 효소간 아미노산 잔기의 차이에 의해 비활성이 다른 때문일 것으로 추정된다. 한편 *B. subtilis* WL-7과 WL-8의 mannanase는 서로간에 3개의 잔기만 다른데, 이들을 LB 배지에 배양하였을 때는 효소 생산성이 유사하지만 LBG 또는 konjac을 첨가한 배지에서는 10배 이상의 차이가 나는 것으로 보고되어 유전자 발현에 의해 생산성이 차이가 발생한 것으로 추정된 바 있다[21].

Mannanase의 활성과 열안정성

균체과쇄 상등액을 효소액으로 하여 Man6과 Man11의 활성에 미치는 반응온도와 pH의 영향을 조사하였다(Fig 3). 반응온도와 반응 pH를 달리하고 LBG의 가수분해 활성을 조사했을 때 Man6과 Man11은 최적 반응조건에 차이를 보였다. Man6의 경우는 55°C와 pH 6.0, Man11은 60°C와 pH 5.5에서 각각 최대활성을 보였으며 Man6은 pH 5.0~7.0, Man11은 pH 5.0~6.5 범위에서 최대활성의 90% 이상의 활성을 나타냈다.

B. subtilis WL-8의 mannanase는 Man11보다 Man6과 아미노산 배열의 유사도가 높았으나 Man11과 동일하게 60°C와 pH 5.5에서 최대활성을 나타냈으며[21], Man6보다 Man11과 아미노산 배열의 유사도가 높은 *B. subtilis* WL-7의 mannanase는 최적반응 조건이 55°C와 pH 6.0로 Man6과 동일한 것으로 보고되었다[6]. *B. subtilis* BS5와 *B. subtilis* G1의 mannanase가 *P. pastoris* 재조합 균주에서 생산된 바 있는데 *B. subtilis* BS5의 효소는 50°C와 pH 6.0 [8], *B. subtilis* G1의 효소는 45°C와 pH 6.5에서 최대활성을 보여[18] *B. subtilis* G1의 효소는 대부분의 *Bacillus* 유래의 효소보다는 최적온도가 낮은 것으로 보고되었다. 한편 *Bacillus* sp. N16-5의 mannanase는 GH5에 속하는 효소로 70°C와 pH 9.5의 고온의 알칼리 조건에서 최대 활성을 보여 GH26에 속하는 Man6 및 Man11과는 차이가 큰 것으로 나타났다[9].

열안정성을 조사하기 위해서 여러 온도범위에서 효소액을 30 분간 열처리한 후 잔존활성을 측정된 결과 두 효소는 40°C 이하에서는 모두 안정하였으며, 50°C 이상에서는 열안정성에 차이를 보였다(Fig. 4). Man11은 50°C에서도 약 98%의 활성을 유지하였지만 Man6은 약 75%를 유지하였으며, 55°C에서는 Man6과 Man11은 각각 31%와 92%의 잔존활성을 나타내 Man11이 Man6보다 열에 안정하였다. Man6와 8개 아미노산 배열이 다른 *B. subtilis* B10-02 mannanase는 55°C와 pH 6.5에서 최대 활성을 보이며 60°C에서 60분간 방치하였을 때 약 82% 활성을 유지하여 Man6과 Man11 보다 열안정성이 높았다[20].

Man6과 Man11에 의한 MOS와 LBG의 가수분해 산물을 조사하기 위해 동일한 활성도의 효소를 사용하여 중합도가 2~6인 MOS와 LBG 를 기질로 하여 효소 반응을 실시한 후 가수분해 산물을 TLC로 분석하였다. 그 결과 두 효소는 Fig. 5에 나타난 바와 같은 반응 산물을 동일하게 보였으며 두 효소 모두

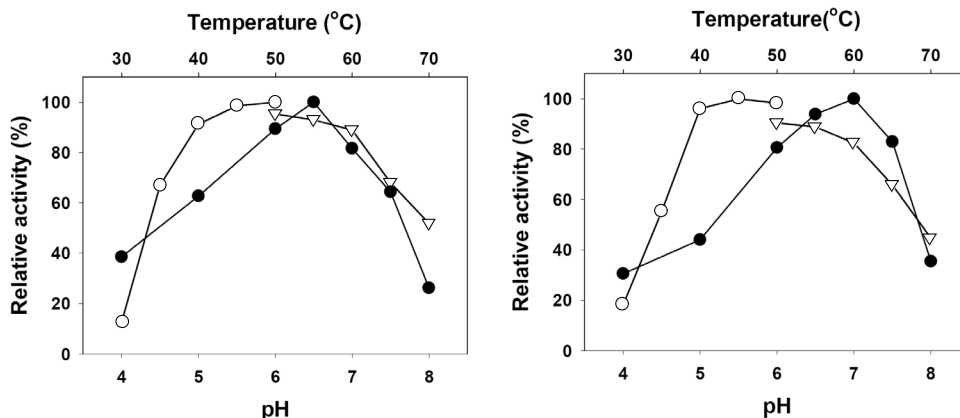


Fig. 3. Effects of reaction temperature and pH on both Man6 and Man11 activities of cell-free extract of recombinant *E. coli*. Temperature profiles (●) were obtained by measuring the mannanase activities at different temperatures with fixed pH 6.0 for Man6 (left) or pH 5.5 for Man11 (right). The pH profiles were obtained by measuring the mannanase activities at various pH's with a constant temperature of 50°C. Buffers (50 mM) used were as follows: sodium citrate (○), and sodium phosphate (▽). Each curve represents the average of three independent experiments within standard errors of 2% between them.

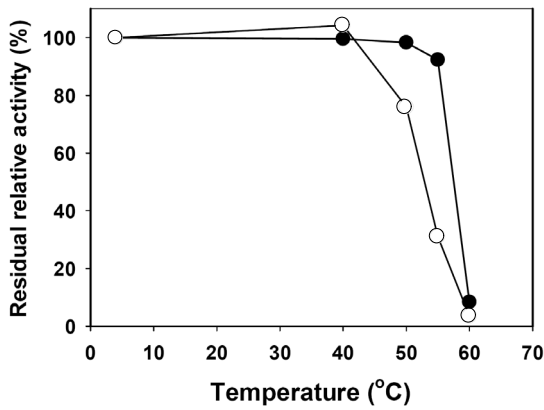


Fig. 4. Thermostability of the Man6 and Man11 in cell-free extract of recombinant *E. coli*. Thermostability was determined by measuring the residual activities of Man6 (-○-) and Man11 (-●-) after pre-incubations for 30 min at the different temperatures. Each curve represents the average of three independent experiments within standard errors of 2% between them.

mannobiose를 분해하지 못하였고 mannotriose는 매우 소량 분해하였다. 중합도가 큰 MOS와 LBG는 가수 분해되어 최종 산물로 mannotriose와 mannobiose가 다량 생성되었으며 동시에 mannose도 소량 생성되었다.

Man6과 Man11이 mannobiose를 분해하지 못하는 것은 대부분의 mannanase와 동일하며 MOS의 가수분해 산물이 *B. subtilis* WL-3의 효소와 유사하지만, Man6과 Man11의 LBG 주된 가수분해 산물로 mannotriose와 mannobiose가 관찰된 것에 비해 WL-3 효소의 LBG 가수분해 산물로 mannobiose와 mannose가 생성된 것은 차이가 있었다[22]. 또한 WL-7의 mannanase는 Man6이나 Man11과는 달리 mannotriose 분해

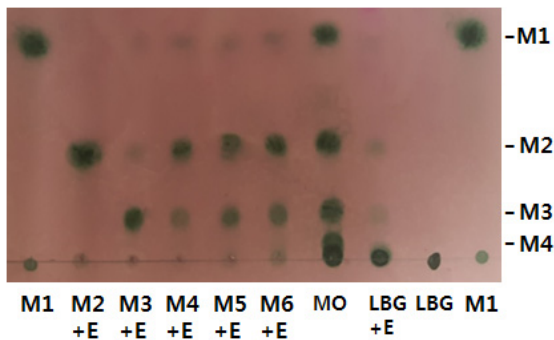


Fig. 5. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of β -1,4-linked manno-oligosaccharides and LBG galactomannan with Man6. The reaction mixtures containing the purified mannanase and manno-oligosaccharides or LBG in 50 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) were incubated for 5 hr at 40°C. M1 to M6 represent mannose to mannohexaose; E, Man6; MO, manno-oligosaccharides with a degree of polymerization 1-6.

력이 높을 뿐 아니라 MOS와 LBG의 주된 가수분해 산물로 mannobiose와 mannose가 생성된 것으로 보고되었다[7]. Man6이나 Man11과 같이 mannotriose 이상의 중합도를 갖는 MOS를 분해하는 *B. pumilus* GBSE29의 효소는 LBG를 분해하여 mannobiose, mannotriose와 mannopentaose를 주된 반응 산물로 생산하며[23], *A. nidulans*가 생산하는 GH134의 mannanase는 β -mannan이나 mannohexaose를 분해하여 mannobiose, mannotriose와 mannotetraose를 생성하였다[13]. 한편 *B. subtilis* WY3의 mannanase는 Man6이나 Man11과는 달리 mannotriose는 분해하지 못하고 mannotetraose 이상의 중합도를 갖는 MOS를 분해하는 것으로 알려졌다[5]. 이로써 28개 아미노 잔기로 구성된 signal peptide에서 1개 아미노산 잔기가 다르고 mature protein에서는 7개 잔기가 다른 Man6과 Man11은 반응온도와 pH에 따른 활성 및 열안정성에 있어서 서로간 차이가 있으나 LBG와 MOS는 동일한 양상으로 가수분해하는 것을 확인하였다.

References

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Dhawan, S. and Kaur, J. 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit. Res. Biotechnol.* **27**, 197-216.
- Dong, Y. H., Li, J. F., Hu, D., Yin, X., Wang, C. J., Tang, S. H. and Wu, M. C. 2016. Replacing a piece of loop-structure in the substrate-binding groove of *Aspergillus usanii* β -mannanase, AuMan5A, to improve its enzymatic properties by rational design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 3989-3998.
- Ghosh, A., Luis, A. S., Bras, J. L., Fontes, C. M. and 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.
- Jiang, Z., Wei, Y., Li, D., Li, L., Chai, P. and 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.
- Kweun, M. A., Lee, M. S., Choi, J. H., Cho, K. H. and Yoon, K. H. 2004. Cloning of a *Bacillus subtilis* WL-7 mannanase gene and characterization of the gene product. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 1295-1302.
- Kweun, M. A. and Yoon, K. H. 2004. Hydrolysis of Galactomannan and Manno-oligosaccharides by A *Bacillus subtilis* Mannanase. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 347-351.
- Li, R. K., Chen, P., Ng, T. B., Yang, J., Lin, J., Yan, F. and Ye, X. Y. 2015. Highly efficient expression and characterization of a β -mannanase from *Bacillus subtilis* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **62**, 64-70.
- Ma, Y., Xue, Y., Dou, Y., Xu, Z., Tao, W. and Zhou, P. 2004.

- Characterization and gene cloning of a novel β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *Extremophiles* **8**, 447-454.
10. Morrill, J., Kulcinskaja, E., Sulewska, A. M., Lahtinen, S., Stalbrand, H., Svensson, B. and Hachem, A. M. 2015. The GH5 1,4- β -mannanase from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bl-04 possesses a low-affinity mannan-binding module and highlights the diversity of mannanolytic enzymes. *BMC Biochem.* **16**, 26.
 11. Rosengren, A., Reddy, S. K., Sjoberg, J. S., Aurelius, O., Logan, D. T., Kolenova, K. and Stalbrand, H. 2014. An *Aspergillus nidulans* β -mannanase with high transglycosylation capacity revealed through comparative studies within glycosidase family 5. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 10091-10104.
 12. Sak-Ubol, S., Namvijitr, P., Pechsrichuang, P., Haltrich, D., Nguyen, T. H., Mathiesen, G., Eijsink, V. G. and Yamabhai, M. 2016. Secretory production of a β -mannanase and a chitosanase using a *Lactobacillus plantarum* expression system. *Microb. Cell Fact.* **15**, 81.
 13. Shimizu, M., Kaneko, Y., Ishihara, S., Mochizuki, M., Sakai, K., Yamada, M., Murata, S., Itoh, E., Yamamoto, T., Sugimura, Y., Hirano, T., Takaya, N., Kobayashi, T. and Kato, M. 2015. Novel β -1,4-mannanase belonging to a new glycoside hydrolase family in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **290**, 27914-27.
 14. Shukor, H., Abdeshahian, P., Al-Shorgani, N. K., Hamid, A. A., Rahman, N. A. and Kalil, M. S. 2016. Saccharification of polysaccharide content of palm kernel cake using enzymatic catalysis for production of biobutanol in acetone-butanol-ethanol fermentation. *Bioresour. Technol.* **202**, 206-213.
 15. Srivastava, P. K. and 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.
 16. Tang, J., Guo, S., Wang, W., Wei, W. and Wei, D. 2015. Alkaline-adapted β -mannanase of *Bacillus pumilus*: gene heterologous expression and enzyme characterization. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **55**, 1445-1457.
 17. von Freiesleben, P., Spodsberg, N., Blicher, T. H., Anderson, L., Jorgensen, H., Stalbrand, H., Meyer, A. S. and Krogh, K. B. 2016. An *Aspergillus nidulans* GH26 endo- β -mannanase with a novel degradation pattern on highly substituted galactomannans. *Enzyme Microb. Technol.* **83**, 68-77.
 18. Vu, T. T., Quyen, D. T., Dao, T. T. and 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.
 19. Xia, W., Lu, H., Xia, M., Cui, Y., Bai, Y., Qian, L., Shi, P., Luo, H. and Yao, B. 2016. A novel glycoside hydrolase family 113 endo- β -1,4-mannanase from *Alicyclobacillus* sp. strain A4 and insight into the substrate recognition and catalytic mechanism of this Family. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 2718-2727.
 20. Xu, M., Zhang, R., Liu, X., Shi, J., Xu, Z. and Rao, Z. 2013. Improving the acidic stability of a β -mannanase from *Bacillus subtilis* by site-directed mutagenesis. *Proc. Biochem.* **48**, 1166-1173.
 21. Yoon, K. H. 2010. Cloning and characterization of mannanase gene from *Bacillus subtilis* WL-8. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 207-212.
 22. Yoon, K. H., Chung, S. and Lim, B. L. 2008. Characterization of the *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **46**, 344-349.
 23. Zang, H., Xie, S., Wu, H., Wang, W., Shao, X., Wu, L., Rajer, F. U. and Gao, X. 2015. A novel thermostable GH5_7 β -mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in manno-oligosaccharides (MOS) production. *Enzyme Microb. Technol.* **78**, 1-9.
 24. Zhang, C., Chen, J. D. and Yang, F. Q. 2014. Konjac glucomannan, a promising polysaccharide for OCDDS. *Carbohydr. Polym.* **104**, 175-181.
 25. Zhou, H., Yang, Y., Nie, X., Yang, W. and Wu, Y. 2013. Comparison of expression systems for the extracellular production of mannanase Man23 originated from *Bacillus subtilis* B23. *Microb. Cell Fact.* **12**, 78.

초록 : *Bacillus subtilis* 분리균 2주 유래 mannanases의 특성 비교

윤기홍*

(우송대학교 바이오식품과학전공)

우리나라의 전통 발효 된장으로부터 균체의 효소로 mannanase를 생산하는 세균 2주가 분리되었다. 분리균 WL-6과 WL-11은 형태적 특성, 생화학적 성질 및 16S rDNA의 염기서열에 따라 *Bacillus subtilis*로 확인되었다. 이들 두 균주로부터 각각 mannanase 유전자를 대장균에 클로닝하여 염기서열을 결정된 결과 mannanase 유전자는 362 아미노산으로 구성된 단백질을 코드하며 1,086 뉴클레오티드로 동일하게 이루어졌다. WL-6과 WL-11 mannanase (Man6, Man11)의 아미노산 잔기 배열은 서로 8개 잔기가 다르며 GH family 26에 속하는 *B. subtilis*의 mannanases와 매우 상동성이 높았다. Man6과 Man11의 아미노 말단의 26개 아미노 잔기가 signal peptide로 예측되었다. 재조합 대장균로부터 각각 생산된 Man6과 Man11은 94~95% 정도가 균체내에 존재하였고, manno-triose, mannotetraose, mannopentaose, mannohexaose와 같은 만노올리고당과 locust bean gum을 유사하게 분해하여 주된 반응산물로 mannobiose와 mannotriose를 생성하였다. Man6는 55°C와 pH 6.0, Man11은 60°C와 pH 5.5에서 각각 최대 반응활성을 보였으며, Man11이 Man6에 비해 열안정성이 높았다.