

Cloning a Mannanase 26AT Gene from *Paenibacillus woosongensis* and Characterization of the Gene Product

Ki-Hong Yoon*

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

Received May 15, 2017 / Revised August 3, 2017 / Accepted September 5, 2017

An open reading frame coding for mannanase predicted from the partial genomic sequence of *Paenibacillus woosongensis* was cloned into *Escherichia coli* by polymerase chain reaction amplification, and completely sequenced. This mannanase gene, designated *man26AT*, consisted of 3,162 nucleotides encoding a polypeptide of 1,053 amino acid residues. Based on the deduced amino acid sequence, Man26AT was identified as a modular enzyme, which included a catalytic domain belonging to the glycosyl hydrolase family 26 and two carbohydrate-binding modules, CBM27 and CBM11. The amino acid sequence of Man26AT was homologous to that of several putative mannanases, with identity of 81% for *P. ihumii* and identity of less than 57% for other strains of *Paenibacillus*. A cell-free extract of recombinant *E. coli* carrying the *man26AT* gene showed maximal mannanase activity at 55°C and pH 5.5. The enzyme retained above 80% of maximal activity after preincubation for 1 h at 50°C. Man26AT was comparably active on locust bean gum (LBG), galactomannan, and kojic glucomannan, whereas it did not exhibit activity on carboxymethylcellulose, xylan, or *para*-nitrophenyl- β -mannopyranoside. The common end products liberated from manno oligosaccharides, including mannotriose, mannose, mannopentaose, and mannohexaose, or LBG by Man26AT were mannose, mannobiose, and mannotriose. Manno oligosaccharides larger than mannotriose were found in enzymatic hydrolyzates of LBG and guar gum, respectively. However, Man26AT was unable to hydrolyze mannobiose. Man26AT was intracellularly degraded into at least three active proteins with different molecular masses by zymogram.

Key words : Characterization, cloning, mannanase, *Paenibacillus woosongensis*

서론

Mannan 다당류는 구성성분에 따라 mannan, glucomannan, galactomannan과 galactoglucomannan으로 구별된다. Mannan은 mannose 잔기가 β -1,4 결합으로 이루어져 있으며 상아야자나 커피 종자의 배유에 존재하고, glucomannan은 mannose와 함께 glucose 잔기가 β -1,4 결합으로 포함되어 있으며 식물의 구근이나 괴경에 많고 konjac glucomannan이 잘 알려져 있다. β -1,4 결합의 mannose에 galactose가 α -1,6 측쇄 결합한 galactomannan은 두과식물 종자 배유에 존재한다. 나무 세포벽의 반섬유소 구성물질로 연결목에 풍부하게 존재하는 galactoglucomannan은 glucomannan의 mannose 잔기에 galactomannan과 같이 galactosyl 잔기가 α -1,6 결합을 하고 있으며 acetyl 잔기 측쇄도 함유하고 있다[20].

β -1,4-Mannanase (mannanase)는 mannose간의 β -1,4-mannosyl 결합을 무작위적으로 분해하는 효소로 mannan 다당류의 분해에 중요한 역할을 한다. 그러므로 mannanase는 mannan 다당류를 함유한 식물자원을 여러가지 용도로 활용하는데 필요한 효소로 알려져 있으며, 기능성 올리고당 제조, 목재 펄프 가공, 바이오매스 자원의 당화 등의 목적이나 사료 첨가용 효소로 사용되고 있다[15, 19, 20].

Mannanase는 미생물뿐 아니라 동물과 식물에서도 발견되었으며, 미생물 유래의 효소가 산업적 응용성이 높으므로 다양한 미생물로부터 mannanase의 생산성, 반응특성, 구조와 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[19, 20]. Mannanase는 xylanase나 cellulase와 유사하게 활성영역(catalytic domain; CD)만으로 구성되거나 활성영역과 함께 효소에 추가적인 기능을 부여하는 탄수화물 결합영역(cellulose binding domain; CBM)이나 S-layer-homologous (SLH) 영역을 포함하고 있다[6,24]. 그러므로 mannanase는 크기가 서로간에 매우 큰 차이가 있고, 활성영역의 아미노산 배열의 상동성에 따라 glycosyl hydrolase family (GH) 5, 26, 113과 134에 속하는 효소가 알려져 있으며[14, 18] 대부분은 GH5와 GH26의 효소에 해당한다[6, 24]. 한편 미생물의 유전체 염기서열의 정보가 많아지면서 이로부터 추론되는 단백질의 아미노산 배열에 근

*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.

거하여 다양한 mannanases의 존재가 알려지고 있으나 그 특성이 실험적으로 조사된 것은 일부이다.

*Paenibacillus*는 포자를 형성하는 세균이며 식물성 성장을 촉진하는 근권세균, 항균제 생산균, 유용효소 생산균 뿐 아니라 병원성 균으로 다양한 환경에서 분리되었다[7]. *Paenibacillus* 속 균주가 생산하는 효소로 xylanase, cellulase, pectinase, chitinase와 같은 고분자 물질 가수분해 효소와 α -galactosidase, β -galactosidase를 포함한 glycosidase가 다수 보고되었다. 특히 *P. barcinonensis*, *P. campinasensis*, *P. curdolanolyticus*와 *P. polymyxa*를 포함하여 다수의 *Paenibacillus* 속 균주로부터 xylanase의 연구가 활발히 진행되고 있다[13]. 그러나 xylan과 함께 목재의 반섬유소를 구성하는 주요 성분인 mannan의 분해 효소에 대해서는 *P. cookie* [21], *P. thiaminolyticus* [5], *P. polymyxa* A-8 [1], *P. polymyxa* GS01 [3, 4], *P. curdolanolyticus* B-6 [12], *Paenibacillus* sp. HY-8 [9], *Paenibacillus* sp. CH-3 [24]와 *Paenibacillus* sp. BME-14 [6]의 효소에 불과한 실정이다. 한편 xylan 분해균으로 분리된 *P. woosongensis*는 mannan 다당류의 분해에 관여하는 mannanase, β -mannosidase, α -galactosidase를 생산하는 것으로 알려졌다[22]. 본 연구에서는 *P. woosongensis*로부터 mannanase로 유추되는 유전자를 클로닝하고 효소 반응특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주와 플라스미드

유전자 제공원으로 사용된 *P. woosongensis* YB-45 (KCTC 3953)은 tryptic soy broth (TSB; 17 g of tryptone, 3 g of soytone, 2.5 g of dextrose, 5 g of NaCl, 2.5 g of K_2HPO_4 per liter, pH 7.2)를 사용하여 37°C에서 배양하였다[10]. 유전자 조작을 위한 숙주와 vector로는 *Escherichia coli* DH5a와 플라스미드 pUC19를 사용하였다.

Mannanase 유전자 클로닝

TSB액체배지에서 20시간 동안 진탕 배양한 *P. woosongensis* 균체로부터 Genomic DNA prep kit (Solgent, Deajeon)를 사용하여 총 염색체 DNA를 분리하였다. 부분적으로 결정된 *P. woosongensis*의 유전체 염기서열로부터 mannanase 유전자로 유추되는 DNA 단편을 증폭하기 위한 primers YB45C67-3F (AAAGCATGCATGCTAAATGGTCAGCCGCTG; 밑줄은 *SphI* 위치)와 YB45C70-57R (CGGICTAGATTAATAAGGAAA TATCATCAATGTAC; 밑줄은 *XbaI* 위치)을 설계하였다. *P. woosongensis*의 유전체 DNA를 주형, YB45C67-3F와 YB45C67-3R을 primers로 하고 *pfu-X* DNA polymerase를 사용하여 95°C에서 3분간 처리 후 95°C(25초), 57°C(40초), 72°C(2분 30초)의 반응을 25회 반복하고 최종적으로 72°C에서 20분간 반응함으로써 mannanase 유전자를 증폭하였다. 증폭된 DNA

단편은 제한 효소로 절단하여 pUC19에 도입하고 이를 *E. coli* DH5a에 형질전환하였다. Mannanase 활성을 갖는 형질전환주를 탐색하기 위해서는 0.5% locust bean gum (LBG), trypan blue (80 μ g/ml)와 ampicillin (100 μ g/ml)이 첨가된 LB 배지에서 LBG 분해환을 보이는 콜로니를 선발하였다.

Mannanase 활성 측정

Mannanase 유전자를 함유한 재조합 대장균을 ampicillin이 첨가된 LB 배지(10 g of tryptone, 5 g of yeast extract, 5 g of NaCl per liter, pH 7.0)에서 18시간 동안 진탕 배양한 후 균체를 회수하여 10 mM 인산 완충용액(pH 6.0)으로 현탁하였으며 초음파로 균체를 파쇄한 후 원심분리하여 균체 파쇄상등액을 채취하였다. Ammonium sulfate (30-70%)로 처리하여 침전된 단백질을 10 mM sodium phosphate (pH 6.0) 완충액으로 투석하여 조효소액을 제조하고 효소 반응에 사용하였다. Mannanase 활성은 LBG을 기질로 하여 적절한 반응온도와 pH 조건에서 15분 동안 반응한 후에 유리된 환원당을 3, 5-dinitrosalicylic acid 방법으로 정량함으로써 측정하였다. Mannose를 표준시료로 하여 작성된 검량곡선으로 효소 반응으로 생성된 환원당을 결정하였고 mannanase 활성도 1.0 unit은 LBG를 분해하여 1분 동안 1 μ mol의 mannose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 효소 활성에 미치는 반응 pH의 영향을 조사하기 위해서는 반응온도를 50°C로 고정하고 pH 4.5-9.0의 범위에서 반응을 수행하여 mannanase 활성을 각각 측정하였다. 이때 pH 4.5-6.0의 범위에서는 citrate 완충용액, pH 6.0-8.0에서는 phosphate 완충용액, pH 8.0-9.0의 범위에서는 Tris 완충용액을 각각 사용하였다. 반응온도가 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 반응 pH를 최적이 되도록 고정하고 30-65°C 범위로 반응온도를 달리하여 효소활성을 측정하였다. Mannanase에 의한 mannan과 manno oligosaccharides (MOS)의 가수분해 산물을 분석하기 위해서 기질이 0.5% 첨가된 반응액에 과량의 mannanase를 첨가하여 40°C에서 5시간 동안 반응한 후 95°C에서 3분간 열처리하고 원심분리하여 얻은 상등액을 적정량 취해 박층 크로마토그래피(TLC)를 수행하였다[23].

Mannanase 활성 염색

조효소액으로 사용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 수행한 후, polyacrylamide gel을 25% isopropanol과 50 mM sodium phosphate (pH 6.0)를 함유한 용액에 담귀 15분씩 3회 세척하여 SDS를 제거하였다. 추가적으로 50 mM sodium phosphate (pH 6.0)로 15분씩 3회 세척한 후 polyacrylamide gel 위에 0.3% LBG와 50 mM sodium phosphate (pH 6.0)를 함유한 agarose gel을 증착하여 50°C에서 2시간 반응하였다. 반응 종료 후 polyacrylamide gel은 단백질 염색을 하였으며, 증착한

agarose gel은 0.2% congo red 용액에 담구어 20분 동안 염색하고 1 M NaCl 용액으로 탈색함으로써 LBG 분해 단백질을 관찰하였다.

결과 및 고찰

Mannanase 유전자의 클로닝과 염기서열

부분적으로 결정된 *P. woosongensis* 유전체 염기서열로부터 mannanase의 유전자로 유추되는 *orf* 중 *Bacillus* sp. JAMB750의 mannanase [8]와 상동성이 높은 유전자가 발견되어 이를 PCR로 증폭하여 클로닝하였다. 증폭된 유전자를 pUC19의 *lac* promoter와 일치되도록 삽입하기 위해 upper primer YB45C67-3F와 lower primer YB45C67-3R에 *SphI* 과 *XbaI* 절단서열을 각각 도입하였다. PCR을 수행하여 증폭된 약 3.2 kb DNA 단편을 *SphI* 과 *XbaI*으로 절단하여 동일한 제한효소로 처리한 pUC19에 클로닝하여 재조합 플라스미드 pMY673을 제조하였다. 플라스미드 pMY673으로 형질전환된 *E. coli* DH5a는 LBG를 첨가한 평판배지에서 투명한 분해환을 생성하여 mannanase를 생산하는 것으로 확인되었다. 클론된 DNA 단편의 염기서열을 결정한 결과 1,053 아미노산 잔기의 단백질을 코딩하는 3,162 bp 크기의 mannanase 유전자가 확인되었다. 이를 *man26AT*로 명명하고 염기서열에서 유추된 아미노산 잔기 배열을 NCBI database의 다른 단백질과 상동성을 비교한 결과 *P. ihumii* (GenBank accession no. WP_055105071; 1,425 잔기), *P. stellifer* (WP_038694566; 1,427 잔기), *Paenibacillus* sp. BIHB4019 (ANY66447; 1,570 잔기), *P. curdolanolyticus* YK9 (EFM11693; 1,555 잔기)등 다수의 *Paenibacillus*속 균주 및 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (WP_045409449; 1,410 잔기), *Bacillus* sp. FJAT-26390 (OBZ11287; 1,385 잔기)과 *Bacillus* sp. JAMB750 (BAE80444; 997 잔기) 유래의 mannanases 와 48-81% 수준의 상동성을 보였다. 이들은 모두 활성 domain과 함께 CBM등의 domain으로 구성된 modular 효소이다. 클로닝된 *P. woosongensis man26AT (pwman26AT)* 유전자 산물의 크기는 활성영역의 상동성이 높은 *Bacillus* sp. JAMB750의 Man26A (BaMan26A)와는 유사하지만[8], 이외로 상동성이 높은 다른 단백질은 아미노 말단 지역에 SLH 영역을 포함하는 약 350-500 아미노 잔기를 더 함유한 것으로 나타났다. 더구나 *pwman26AT* 유전자의 개시코돈 상부 지역에 리보솜 결합위치에 해당하는 염기서열이 관찰되지 않았으며, 아미노 말단에 signal peptide로 예측되는 지역도 존재하지 않는 것으로 보아 클로닝된 유전자는 아미노 말단의 SLH 영역이 포함되지 않은 유전자로 판단되었다. 한편 BaMan26A를 제외하고는 모든 유전체 서열로부터 유추된 것으로 그 활성이 보고된 바 없다.

Paenibacillus 속 균주의 mannanase로 유전자와 효소 특성이 보고된 것은 *Paenibacillus* sp. CH-3의 ManB (PaManB) [24],

Paenibacillus sp. BME-14의 Man26B (PaMan26B) [6]와 *P. polymyxa* GS01의 Cel44C-Man26A [3, 4]가 있다. 이들 중 CBM6-GH26CD로 구성된 PaMan26B와 GH44CD-Fn3-GH26 CD-CBM로 구성된 Cel44C-Man26A의 활성 영역은 BaMan26A와 같이 GH26에 속하며 탄수화물 결합영역도 포함하고 있는 다영역 효소이고 PcManB는 GH5에 속하며 단일영역 효소이다. PwMan26AT는 GH26과 상동성이 높은 활성영역과 CBM27과 CBM11을 포함하고 있으며 활성영역의 아미노산 배열의 상동성을 조사한 결과 BaMan26A와는 55.5%의 높은 상동성을 보였으나 PaMan26B 및 Cel44C-Man26A와는 20% 이하의 낮은 상동성을 보였다(Fig. 1).

Mannanase의 활성과 열 안정성

조효소액을 사용하여 PwMan26AT의 반응특성을 조사하기 위해서 pMY673을 함유한 *E. coli* DH5a 배양 균체를 초음파로 파쇄하고 ammonium sulfate로 분획한 단백질을 조효소액으로 사용하였다. 반응온도와 pH가 PwMan26AT의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 2A에 보인 바와 같이 55°C와 pH 5.5에서 최대 활성을 보였으며, 반응온도 50-60°C에서 최대활성의 80% 이상, 반응 pH 5.5-6.0 범위에서 95% 이상에 해당하는 활성을 나타냈다. PaMan26B는 60°C와 pH 4.5 [6], Cel44C-Man26A는 50°C와 pH 5.0 [3], *P. cookii*의 mannanase (PcMan)는 60°C와 pH 5.0 [21], PaManB는 45°C와 pH 7.0 [24], *Paenibacillus* sp. HY-8의 ManP (PaManP)는 55°C와 pH 7.0 [9], *P. thiaminolyticus*의 mannanase (PtMan)는 60°C와 pH 6.0 [5]에서 각각 최대 활성을 보여 최적 반응조건이 차이를 보였다. 한편 활성영역의 상동성이 가장 높은 BaMan26A는 55°C와 pH 10에서 최대활성을 보여 최적 pH가 PwMan26AT와 큰 차이를 보이는 것으로 알려졌다[8, 16].

열 안정성 조사를 위해 조효소액을 30-60°C 범위의 온도에서 60분간 열처리한 후 잔존활성을 측정하여 40°C 이하에서는 안정하였으며 50°C에서는 81% 정도의 활성을 유지하였고 55°C 이상에서는 급격히 실패되었다(Fig. 2B). BaMan26A는 40°C에서 60분간 활성이 안정하게 유지되었으며 50°C와 60°C에서 반감기가 117분과 65분으로 나타났고, PcMan은 62°C에서 반감기가 30분간으로 나타나 PwMan26AT 보다 열 안정성이 높았다. 특히 PtMan은 55°C에서 2시간 동안 열처리해도 실패되지 않았고 65°C에서 2시간 후에도 80% 잔존활성을 보여 열 안정성이 매우 높은 것으로 보고되었다[5]. 한편 PaManB는 55°C에서 30분간 열처리하였을 때 완전히 실패되고, PaManP는 45°C와 50°C에서 60분간 열처리하였을 때 20%와 50% 이상의 실패가 일어나며, PaMan26B는 20°C에서도 30분간 열처리하였을 때 45% 실패되는 것으로 알려져 PwMan26AT는 이들 효소보다 열 안정성이 높았다. 특이하게 PaMan26B의 경우 CBM을 제거한 상태의 활성영역으로만 이루어진 단백질은 열 안정성이 크게 증가하여 70°C, 80°C, 90°C

Pw	ADAQATDSTRSLFAYLQEIIRGKHILFGHQHPTDEVLPSTPPG-Q---PKSETYSAVGDYPAMFGWDTLSLEGFEKPGSLTNTPPQNRDNL	86
Ba	V*SN*STL*K**Y****DTS*RQ*****AV**G*TLTYS*DRVGSTQ**VKN*****I*****D*Y****NEK*SQA***A*V	90
Pp	TNPN**VEAKA*MN**VDQY**NM*S*QEEINEIDWLQANV*-----KKP*IAALDLIDYSPSRAEH*LSSTEAEKAIADWKQGGI	81
Pa	VNPD*SSVAQ**YN**RSEY*Q***S*Q*TLA*ANWIHSTL*-----KKP**LGLDL*DYSPSRIER*TVSTDIEHAIWDAGGGI	81
Pw	VASMKEAYKLGVLSSLAHMPNFVTGGDFYDTSGNVVSHILPGDGKHEVDYNAFLDRIADFAHHLKDENS-NLIPVIFRPFH E QNGGWFWW	175
Ba	*Q**RTVHE***IIA**M*PE*****NQYN****D**KN**D*SH**VF**W**N**A***E*T*QSTGE*****	180
Pp	*TFAWHWNAPK*LIDT--QGKEWWR*---AD*TTFDIEYAMNPES**KLLIRD*DVI*GQ**KLQD-AKV**L***L**AE*K****	166
Pa	*TFAWHWNAPKDLIDQ--PGKEWWR*---TEATTFDIEYAMSHPEQ**QLLIRDMDAI*VQ**RLQQ-ED***LW**L**AE*****	166
Pw	GAPYTTKEQYIEIYRYTVEYLRDEKGVNRFYAFSPGSPFNSEATFLKTYPGDDYVDILGFDTYDGNQ-----AWFEAVVDDAKL	258
Ba	**QT**ASE*KAL*****D***V***N*****NA**DGNLTQY*R****Q****F*L*Q*DNKA*AG---QATFLNGLTQ*LAM	288
Pp	**K--GP*PVKKL*ILMHDR*TNVHKLN*LIIWVNSVA*-----DW***E*****S**S*PQAGDYSQIAKYEDLV*L GK*K**	275
Pa	**K--GP*PAK*L*QLMYDRFTNFH*LD*LIIWVNSEN*-----AW****P****ISV*S*PGAG*YGPVSSRYENLKT*N*Q*I	275
Pw	ISQIADA-----RGKVAAF E FGYSNVKPTGTAD-LHFFTKLSAALQSDPDAKRMAYMLTWANFN	317
Ba	**KL**E-----K**I*****Y***PQGFNE*GNY*QWY*AVLE*IKK**N*S*I***Q*****G	326
Pp	VAMSENGPIPDPLMKAYQ*HWSW*ATWYGDFVRDQ--QNSLEHLKVVYNH*NVI TLDELP*NLKTY	311
Pa	*ALTENGPIDPDLQAYH*DWSW*VTWSGEFIRDGV--QNS*QHLTKVYNS*YVITLDELPD*K*EY	311

Fig. 1. Comparison of amino acid sequence in catalytic domains between PwMan26AT and other mannanases. The amino acid sequences of catalytic domains from four mannanases including *P. woosongensis* Man26AT (Pw), *Bacillus* sp. JAMB750 Man26A (Ba), *P. polymyxa* GS01 Cel44C-Man26A (Pp) and *Paenibacillus* sp. BME-14 man26B (Pa) are aligned to maximize similarities with gaps (hyphens) by Clustal W method. Residues identical to the amino acid sequence of the PwMan26AT are indicated by asterisks in other sequences. Two glutamic acid residues of putative catalytic site are marked by box. Numbers at the end of each line correspond to the amino acid position in the mannanases.

에서 각각 30분간 열처리한 후에도 90%, 80%, 60%의 잔존활성을 보였으며, 최적 반응조건도 60°C와 pH 4.5에서 55°C와 pH 5.0으로 변화된 것으로 보고되었다[6].

기질에 따른 반응성을 조사한 결과 PwMan26AT는 konjac과 LBG에 대한 분해활성은 유사하였으며 guar gum에 대한 분해활성은 LBG 대비 약 53.8% 수준으로 나타났다(Table 1).

PaManP는 guar gum의 분해능이 LBG 분해능 대비 64.7%로 나타났으며 PaManB는 konjac의 분해능이 가장 높고 LBG에 대한 활성은 guar gum의 분해능 대비 76%로 확인되어 guar gum에 대한 분해활성 보다 낮았다. Guar gum은 LBG와 동일하게 galactomannan 이지만 mannose에 α-1,6 결합의 측쇄로 존재하는 galactose 함량이 LBG 보다 많아 mannanase가 작용

Table 1. Comparison of hydrolyzing activity for mannans between PwMan26AT and others

Substrates	Relative activity (%) of				
	PwMan26AT ^a	BaMan26A ^b	PaManB ^c	PcMan ^d	PaManP ^e
LBG	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Konjac	103.4	100.0	143.1	70.3	64.7
Guar gum	53.8	30.0	131.1	1.6	ND

ND, not determined.

^a; Man26AT of *P. woosongensis* in this study, ^b; Man26A of *Bacillus* sp. JAMB-750 [16], ^c; ManB of *Paenibacillus* sp. CH-3 [24], ^d; mannanase of *P. cookii* [21], ^e; ManP of *Paenibacillus* sp. HY-8 [9].

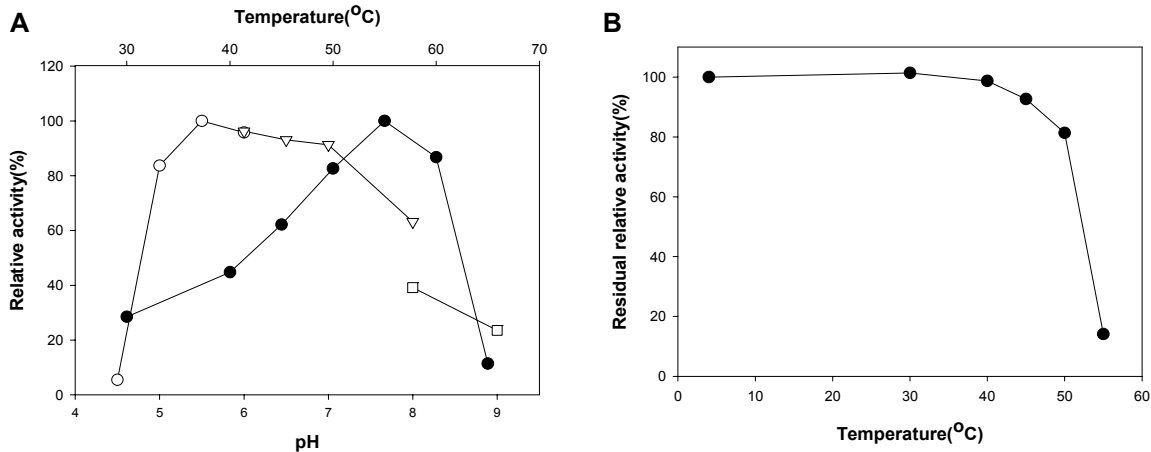


Fig. 2. The optimum temperature and pH of PwMan26AT, and its thermo-stability. In panel A: Temperature profile (closed symbols) was obtained by measuring the mannanase activity at different temperatures with fixed pH 5.5 for LBG. The pH profile (open symbols) was obtained by measuring the enzyme activities at various pHs with constant temperatures of 55°C. Buffers (50 mM) used were as follows: sodium citrate (-○-), sodium phosphate (-▽-), and Tris (-□-). In panel B: Thermostability was determined by measuring the residual activities after pre-incubation for 1 hr at different temperatures. Each curve represents the average of three independent experiments.

하는데 공간적으로 저해를 일으켜 LBG에 비해 분해능이 크게 낮다. 그러므로 *Bacillus* 속 유래 mannanase는 대부분이 LBG 분해능에 비해 guar gum 분해능은 약 10-15% 수준에 이르는 것으로 보고된 바 있는데[23], 이에 비해 *Paenibacillus* 속이 생산하는 mannanase는 guar gum에 대한 활성이 높은 것을 알 수 있으며 특히 PaManB는 LBG 보다 guar gum의 분해능이 높은 것은 특이하다고 하겠다. 한편 PcMan은 LBG 분해활성에 비해 guar gum의 분해활성이 1.6% 수준으로 매우 낮으며 konjac의 분해능도 70.3% 수준으로 다른 *Paenibacillus* 효소와 큰 차이가 있었다[21]. BaMan26A는 PwMan26AT와 유사하게 LBG와 konjac의 분해활성이 유사하며 guar gum에 대한 분해활성은 30%로 PwMan26AT보다는 낮지만 *B. subtilis*의 mannanase에 비해 높았다[16]. 또한 PwMan26AT는 대부분의 mannanase와 유사하게 carboxymethylcellulose, xylan 다당류 및 *para*-nitrophenyl-β-mannopyranoside, *para*-nitrophenyl-β-xylopyranoside, *para*-nitrophenyl-β-galactopyranoside와 *para*-nitrophenyl-β-glucopyranoside를 분해하지 못하였다(자료 미제시).

PwMan26AT에 의한 mannans과 MOS의 분해산물을 조사하기 위해 과량의 효소를 사용하여 중합도가 2-6인 MOS와 LBG 및 guar gum을 기질로 하여 각각 가수분해 반응을 실시한 후 TLC로 분석하였다(Fig. 3). 그 결과 mannobiose를 분해하지 못하였고 mannotriose 이상의 중합도를 갖는 올리고당을 분해하였을 때는 mannobiose, mannose와 mannotriose의 순서의 양으로 최종산물을 생성하였다. 또한 LBG와 guar gum의 분해산물로 mannobiose, mannotriose와 더 중합도가 높은 MOS가 관찰되었으며, LBG로부터는 mannose가 생성되었으나, guar gum 분해산물에서는 mannose가 관찰되지 않았

다. PwMan26AT의 guar gum에 대한 분해활성이 LBG에 비해 50% 이상이며 분해산물을 조사하는 반응에 과량의 효소를 처리한 점을 감안해 볼 때 LBG에 비해 guar gum의 분해산물에서 중합도가 4이하인 분해산물이 매우 적게 관찰된 것은 guar gum의 분해되지 않았다고 보다는 중합도가 높은 MOS가 최종 분해산물로 생산되어 TLC에서 관찰되지 못한 것으로 추정된다.

한편 PwMan26AT와 아미노산 상동성이 가장 높았던 BaMan26A는 mannobiose 뿐 아니라 mannotriose도 분해하지 못하였으며 mannotetraose의 분해능도 매우 낮았고, man-

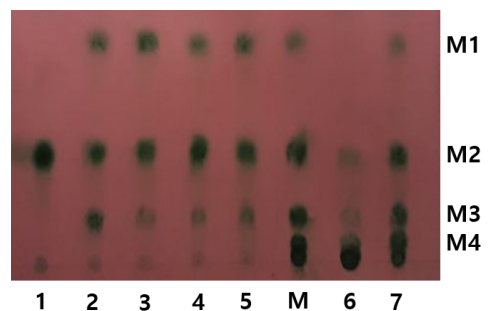


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of β-1,4-linked MOS, LBG and guar gum with PwMan26AT. The reaction mixtures containing the crude PwMan26AT and MOS or mannans in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) were incubated for 5 hr at 40°C. Lanes 1 to 7 represent hydrolysates of mannobiose (M2), mannotriose (M3), mannotetraose (M4), mannopentaose (M5), mannohexaose (M6), guar gum and LBG, respectively. Lane M stands for authentic MOS with a degree of polymerization 1-6. Mannose is indicated by M1.

notetraose, mannopentaose와 mannohexaose의 분해산물로 mannobiose와 mannose를 미량 생산하여 PwMan26AT와 큰 차이를 보였다. 또한 BaMan26A는 LBG의 최종 분해산물로 mannotriose 이상의 중합도를 갖는 MOS를 다량 생성하였으며 mannose는 매우 소량 생성하였고 guar gum의 분해산물로는 mannopentaose 보다 큰 MOS가 소량 검출된 것으로 보고되었다[16]. PaManP는 PwMan26AT와는 달리 mannobiose를 미약하게 분해하였으며, LBG 분해시 mannopentaose와 mannohexaose가 주된 산물로 관찰된 바 있었다[9]. PtMan의 경우는 LBG와 guar gum으로부터 mannobiose 이상의 중합도를 갖는 MOS를 생성하였으며[5], 특이하게 *P. azotofixans* YUPP-5의 cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)는 galacomannan과 glucomannan을 분해하며 glucomannan으로부터 mannobiose와 mannotriose, 그리고 galactomannan으로부터 중합도 2-5의 MOS를 각각 생성하였다[25]. PwMan26AT 뿐 아니라 대부분의 mannanase가 중합도가 낮은 mannobiose와 mannotriose에 대해 가수분해 활성이 없거나 미약한 것은 기질의 분해지점 주변에 mannanase와 결합할 수 있는 당 잔기의 부족 때문으로 판단되었다.

Mannanase 활성염색

아미노산의 상동성을 비교하였을 때 PwMan26AT는 아미노 말단의 SLH 영역이 포함되지 않았을 가능성이 있는 것으로 추정되었는데 재조합 대장균에서 균체내 효소로 생산된

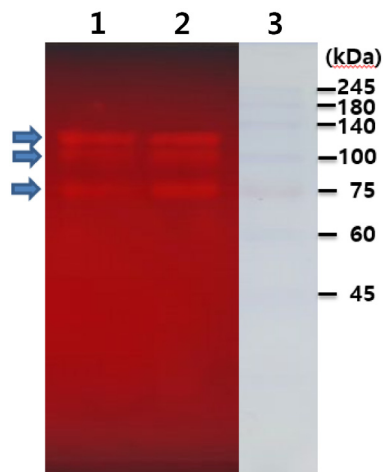


Fig. 4. Locust bean gum (LBG) zymogram by PwMan26AT produced from recombinant *E. coli*. After SDS-PAGE of the cell-free extract (lane 1) and ammonium sulfate fraction (lane 2) of recombinant *E. coli* carrying a *man26AT* gene from *P. woosongensis*, protein exhibiting mannanase were analyzed by activity staining with LBG as substrates. Three arrows indicate the position at which LBG in the gel was hydrolyzed by PwMan26AT. Lane 3 represents the standard proteins as size markers with molecular size indicated to the right side of gel.

PwMan26AT는 활성영역을 포함하고 있어 mannans과 MOS를 가수분해 반응 특성을 확인할 수 있었다. 재조합 대장균이 생산된 PwMan26AT의 분자량을 조사하기 위해 균체 파쇄상등액과 ammonium sulfate 분획 효소액을 SDS-PAGE 하고 활성염색을 실시하였다. 그 결과 Fig. 4에 보인 바와 같이 polyacrylamide gel에서 3개 이상의 활성 bands가 관찰되었으며 이들 중 활성이 강한 단백질은 그 크기가 약 120 kDa, 100 kDa와 75 kDa로 각각 추정되었다. 클로닝된 *pwman26AT* 유전자의 염기서열로부터 유추되는 단백질의 분자량은 115.6 kDa이므로 재조합 대장균에서 생산된 PwMan26AT는 균체내에서 가수분해되거나 분해되지 않은 형태로 동시에 존재하는 것을 알 수 있었다.

이와 같이 재조합 대장균에서 생산된 외래 단백질이 균체내에서 분해되는 경우는 *Bacteroides succinogenes*과 *Clostridium thermocellum*의 endoglucanase에서 각각 알려졌으며[2, 17], 또한 1,472 아미노 잔기로 구성된 *Paenibacillus* sp. DG-22의 xylanase C도 재조합 대장균에서 크기가 다른 3개의 활성 단백질로 분해되어 생산된 것으로 보고된 바 있다[11].

References

- Bai, X., Hu, H., Chen, H., Wei, Q., Yang, Z. and Huang, Q. 2014. Expression of a β -mannosidase from *Paenibacillus polymyxa* A-8 in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *PLoS One* **9**, e111622. doi: 10.1371/journal.pone.0111622.
- Beguín, P., Cornet, P. and Millet, J. 1983. Identification of the endoglucanase encoded by the *celB* gene of *Clostridium thermocellum*. *Biochimie* **65**, 495-500.
- Cho, K. M., Hong, S. Y., Lee, S. M., Kim, Y. H., Kahng, G. G., Kim, H. and Yun, H. D. 2006. A *cel44C-man26A* gene of endophytic *Paenibacillus polymyxa* GS01 has multi-glycosyl hydrolases in two catalytic domains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 618-630.
- Cho, K. M., Math, R. K., Hong, S. Y., Asrafal Islam, S. M., Kim, J. O., Hong, S. J., Kim, H. and Yun, H. D. 2008. Changes in the activity of the multifunctional β -glycosyl hydrolase (Cel44C-Man26A) from *Paenibacillus polymyxa* by removal of the C-terminal region to minimum size. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1061-1068.
- Dhawan, S., Singh, R., Kaur, R. and Kaur, J. 2016. A β -mannanase from *Paenibacillus* sp.: Optimization of production and its possible prebiotic potential. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **63**, 669-678.
- Fu, X., Huang, X., Liu, P., Lin, L., Wu, G., Li, C., Feng, C. and Hong, Y. 2010. Cloning and characterization of a novel mannanase from *Paenibacillus* sp. BME-14. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 518-524.
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A. and Yuan, Z. C. 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb. Cell Fact.* **15**, 203.
- Hatada, Y., Takeda, N., Hirasawa, K., Ohta, Y., Usami, R.,

- Yoshida, Y., Grant, W. D., Ito, S. and Horikoshi, K. 2005. Sequence of the gene for a high-alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750, its expression in *Bacillus subtilis* and characterization of the recombinant enzyme. *Extremophiles* **9**, 497-500.
9. Kim, D. Y., Chung, C. W., Cho, H. Y., Rhee, Y. H., Shin, D. H., Son, K. H. and Park, H. Y. 2017. Biocatalytic characterization of an endo- β -1,4-mannanase produced by *Paenibacillus* sp. strain HY-8. *Biotechnol. Lett.* **39**, 149-155.
 10. Lee, J. C. and Yoon, K. H. 2008. *Paenibacillus woosongensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 612-616.
 11. Lee, S. H. and Lee, Y. E. 2014. Cloning and characterization of a multidomain GH10 xylanase from *Paenibacillus* sp. DG-22. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1525-1535.
 12. Pason, P., Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K. 2006. *Paenibacillus curdolanolyticus* strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2483-2490.
 13. Sermsathanaswadi, J., Baramée, S., Tachaapaikoon, C., Pason, P., Ratanakhanokchai, K. and Kosugi, A. 2016. The family 22 carbohydrate-binding module of bifunctional xylanase/ β -glucanase Xyn10E from *Paenibacillus curdolanolyticus* B-6 has an important role in lignocellulose degradation. *Enzyme Microb. Technol.* **96**, 75-84.
 14. 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.
 15. Srivastava, P. K. and Kapoor, M. 2017. Production, properties, and applications of endo- β -mannanases. *Biotechnol. Adv.* **35**, 1-19.
 16. Takeda, N., Hirasawa, K., Uchimura, K., Nogi, Y., Hatada, Y., Usami, R., Yoshida, Y., Grant, W. D., Ito, S. and Horikoshi, K. 2004. Purification and enzymatic properties of a highly alkaline mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750. *J. Biol. Macromol.* **4**, 67-74.
 17. Taylor, K. A., Crosby, B., McGavin, M., Forsberg, C. W. and Thomas, D. Y. 1987. Characteristics of the endoglucanase encoded by a *cel* gene from *Bacteroides succinogenes* expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 41-46.
 18. 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.
 19. 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.
 20. Yamabhai, M., Sak-Ubol, S., Srila, W. and Haltrich, D. 2016. Mannan biotechnology: from biofuels to health. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 32-42.
 21. Yin, L. J., Tai, H. M. and Jiang, S. T. 2012. Characterization of mannanase from a novel mannanase-producing bacterium. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 6425-6431.
 22. Yoon, K. H. 2010. Mannanolytic enzyme activity of *Paenibacillus woosongensis*. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 397-400.
 23. Yoon, K. H., Chung, S. and Lim, B. L. 2008. Characterization of the *Bacillus subtilis* W-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **46**, 344-349.
 24. Zhang, J. X., Chen, Z. T., Meng, X. L., Mu, G. Y., Hu, W. B., Zhao, J. and Nie, G. X. 2016. Gene cloning, expression, and characterization of a novel β -mannanase from the endophyte *Paenibacillus* sp. CH-3. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **64**, 471-481.
 25. Zhou, Y., Lee, Y. S., Park, I. H., Sun, Z. X., Yang, T. X., Yang, P., Choi, Y. R. and Sun, M. 2012. Cyclodextrin glycosyltransferase encoded by a gene of *Paenibacillus azotofixans* YUPP-5 exhibited a new function to hydrolyze polysaccharides with β -1,4 linkage. *Enzyme Microb. Technol.* **50**, 151-157.

초록 : *Paenibacillus woosongensis*로부터 Mannanase 26AT 유전자의 클로닝과 유전자 산물의 분석

윤기홍*

(우송대학교 바이오식품과학전공)

*Paenibacillus woosongensis*의 유전체 부분 염기서열로부터 mannanase를 코딩하는 것으로 유추되는 open reading frame을 중합효소연쇄반응으로 증폭하여 대장균에 클로닝하고 염기서열을 결정하였다. Mannanase 유전자는 *man26AT*로 명명하였으며 1,053 아미노산으로 구성된 단백질을 코딩하는 3,159 뉴클레오티드로 이루어졌다. 아미노산 잔기배열을 분석한 결과 Man26AT는 glycosyl hydrolase family 26의 mannanase와 상동성이 높은 활성영역, 탄수화물 결합영역 CBM27과 CBM11로 구성되어 있었다. Man26AT의 아미노산 배열은 *P. ihumii*의 유추된 mannanase와 상동성이 81%이고 다른 *Paenibacillus* 속 균주의 여러 mannanases와 57% 이하의 상동성을 보였다. *man26AT* 유전자를 함유한 재조합 대장균의 균체 파쇄상등액은 55°C와 pH 5.5에서 최대의 mannanase 활성을 보였고, 50°C에서 1시간 열처리한 후에 80% 이상의 잔존활성을 보였다. Man26AT는 locust bean gum (LBG) galactomannan과 konjac glucomannan에 대한 분해활성이 유사하였으며, carboxymethylcellulose, xylan과 *para*-nitrophenyl- β -mannopyranoside는 분해하지 못하였다. Man26AT에 의해 mannotriose, mannotetraose, mannopentaose와 mannohexaose 등의 만노올리고당이 LBG로부터 공통의 최종 가수분해 산물로 mannose, mannobiose와 mannotriose가 생성되었다. 또한 mannotriose 보다 큰 만노올리고당이 LBG와 guar gum의 분해산물로 각각 생성되었다. 그러나 Man26AT는 mannobiose를 분해하지는 못하였다. 활성염색을 통해 Man26AT는 균체 내에서 3개 이상의 크기가 다른 활성 단백질로 분해된 것이 확인되었다.