Korean Journal of Microbiology (2018) Vol. 54, No. 2, pp. 126-135
DOI https://doi.org/10.7845/kjm.2018.8019
Copyright ⓒ 2018, The Microbiological Society of Korea
pISSN 0440-2413
eISSN 2383-9902

Cellulosimicrobium sp. YB-43으로부터 mannanase C 유전자의 클로닝과 효소 특성

윤기홍*
우송대학교 바이오식품과학전공

Gene cloning of β-mannanase C from *Cellulosimicrobium* sp. YB-43 and characterization of the enzyme

Ki-Hong Yoon*
Food Science and Biotechnology Major, Woosong University, Daejeon 34606, Republic of Korea

(Received April 26, 2018; Revised June 2, 2018; Accepted June 4, 2018)

The characteristics of enzyme and gene for mannanase B had been reported from *Cellulosimicrobium* sp. YB-43 producing some kind of mannanase. A gene coding for the enzyme, named mannanase C (ManC), was expected to be located downstream of the *manB* gene. The *manC* gene was cloned by polymerase chain reaction and sequenced completely. From this nucleotide sequence, ManC was identified to consist of 448 amino residues and contain a carbohydrate binding domain CBM2 besides a catalytic domain, which was homologous to mannanase belonging to the glycosyl hydrolase family 5. The catalytic domain of ManC showed the highest amino acid sequence similarity of 55% with the mannanases from *Streptomyces* sp. SirexAA-E (55.8%; 4FK9_A) and *S. thermoluteus* (57.6%; BAM62868). The His-tagged ManC (HtManC) lacking N-terminal signal peptide with hexahistidine at C-terminus was produced and purified from cell extract of recombinant *Escherichia coli*. The purified HtManC showed maximal activity at 65°C and pH 7.5, with no significant change in its activity at pH range from 7.5 to 10. HtManC showed more active on konjac and locust bean gum (LBG) than guar gum and ivory nut mannan (ivory nut). Vmax and Km values of the HtManC for LBG were 68 U/mg and 0.45 mg/ml on the optimal condition, respectively. Mannobiose and mannotriose were observed on TLC as major products resulting from the HtManC hydrolysis of mannooligosacharides. In addition, mannobiose and mannose were commonly detected as the hydrolyzed products of LBG, konjac and ivory nut.

Keywords: *Cellulosimicrobium* sp. YB-43, cloning, mannanase C, purification

***For correspondence.** E-mail: ykh@wsu.ac.kr;
Tel.: +82-42-630-9742; Fax: +82-42-630-9389

Mannanase는 β-mannan, glucomannan, galactomannan과 galactoglucomannan으로 분류된 mannan 다당류를 구성하는 mannose 잔기간 β-1,4-mannosyl 결합을 무작위적으로 분해하는 효소로 β-mannosidase, α-galactosidase, β-glucosidase 및 acetyl mannan esterase와 함께 mannan의 분해에 관여하며 이들 효소 중 가장 주된 역할을 한다. 미생물뿐 아니라 동물과 식물에서도 생산되는 것으로 알려진 mannanase는 섬유물질의 가수분해에 관여하는 효소 중 cellulase와 xylanase에 비해 뒤 늦게 관심을 받았으며 1990년대 이후부터 그 특성이 다양한 미생물 유래의 효소를 중심으로 본격적인 연구가 이루어졌다. 펄프와 제지 표백공정, 바이오매스 자원의 당화공정, 커피와 과일음료 가공공정 및 석유채취 공정을 비롯하여 세제와 사료첨가용 효소로 mannanase의 산업적 용도가 주목을 받고 있다(Srivastava and Kapoor, 2017). Mannanase의 활용성을 높이기 위해 효소의 활성과 안정성을 개량하고자 분자진화와 구조기반의 합리적 설계를 통해 내열성, 내산성, 비활성이나

분해 효율이 개선된 변이 효소가 개발되고 있다(Walia *et al*., 2015).

Mannanase는 cellulase나 xylanase와 유사하게 활성영역으로만 구성되거나 또는 추가적으로 탄수화물 결합영역(cellulose binding domain; CBM), S-layer-homologous (SLH)이나 fibronectin (FN) 영역을 포함하고 있다(Kumagai *et al*., 2011; Takasuka *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2017). Mannanase의 활성영역은 아미노산 배열의 상동성에 따라 glycosyl hydrolase family (GH) 5, 26, 113과 134에 속하는 것으로 알려져 있으며 대부분은 GH5와 GH26의 효소에 해당한다. GH26의 mannanase는 활성 영역만으로 구성된 세균성 효소가 대부분인 반면에 GH5의 mannanase는 세균과 균류에서 두루 생산되며 활성 영역과 함께 다른 기능성 영역을 포함한 효소가 많다(Stoll *et al*., 1999; Dhawan and Kaur, 2007). 한편 미생물의 유전체 염기서열의 정보가 많아지면서 이로부터 추론되는 단백질의 아미노산 배열에 근거하여 매우 많은 mannanase의 존재가 알려지고 있으나 효소 특성이 조사된 것은 일부에 불과하다.

Cellulosimicrobium 속은 2001년에 16S rDNA 서열 및 세포벽과 세포막의 조성분에 따라 *Cellulomonas cellulans*가 *Cellulosimicrobium cellulans*로 재분류되어 제안되었다(Schumann *et al*., 2001). 기존에 다르게 분류된 균종들이 *Cellulosimicrobium* 속 균주로 재분류됨과 동시에 신균주들이 분리 동정되어 현재까지 *Cellulosimicrobium* 속으로 동정된 균종은 *C. aquatile*, *C. cellulans*, *C. funkei, C. terreum, C. arenosum*, *C. marinum* 과 *C. variabile* 등이 알려져 있다. *C. cellulans*은 curdlan을 1,3-β-glucan 올리고당으로 가수분해하는 β-1,3-glucanases를 비롯하여 xylanase, β-xylosidase, protease 등의 효소를 생산하는 균으로 보고 되었으며(Oda *et al*., 2018), 토양이나 동물의 장관에서 분리된 *Cellulosimicrobium* 속 균주들이 chitinase, β-glucosidase, cellulase, xylanase의 효소를 생산하는 것으로 알려졌다. Mannanase를 생산하는 *Cellulosimicrobium* 속의 균으로는 *C. cellulans*, *C. funkei* HY-13와 *Cellulosimicrobium* sp. YB-43가 분리되었고 이들은 한 종류 이상의 mannanase를 생산하는 것으로 알려졌다(Stoll *et al*., 1999; Kim *et al*., 2011a; Yoon, 2015). *Cellulosimicrobium* sp. YB-43의 mannanase 중에서 mannanase B (ManB)의 유전자는 클로닝되고 효소 특성이 밝혀진 바 있으며(Yoon, 2016), 본 연구에서는 이와는 다른 mannanase C (ManC)의 유전자를 클로닝하여 재조합 대장균으로부터 효소를 정제하고 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

Mannanase 유전자 클로닝

Cellulosimicrobium sp. YB-43의 *manB* 유전자 주변 염기서열(GenBank accession no. KX620013)과 *Cellulosimicrobium* sp. MM의 유전체 염기서열(NZ_JPQW01000295)을 참고하여 mannanase 유전자로 예상되는 DNA 단편을 증폭하기 위한 primer PCM2-3F (CATGAAGCGGTTCATTTGGGAGT)와 PCM2-3R (CTCACGCTCGACAAGGCGCTCTA)을 설계하였다. *Cellulosimicrobium* sp. YB-43의 유전체 DNA를 주형, PCM2-3F와 PCM2-3R을 primer로 하고 *Pfu*-X DNA polymerase을 사용하여 95°C에서 3분간 처리 후 95°C (25초), 60°C (40초), 72°C (2분)의 반응을 30회 반복하고 최종적으로 72°C에서 20분간 반응함으로써 얻은 유전자 단편을 pUC19에 도입하고 이를 *Escherichia coli* DH5α에 형질전환하였다. Mannanase 활성을 갖는 형질전환주는 0.5% locust bean gum (LBG), trypan blue (80 μg/ml)와 ampicillin (100 μg/ml)이 첨가된 LB 배지에서 콜로니 주변에 형성된 LBG 분해환을 관찰하여 선발하였다.

Mannanase 유전자의 과잉발현 및 정제

Mannanase 유전자를 과잉발현 시키기 위해 pET23a의 T7 promoter 하단에 도입하여 재조합 플라스미드를 제조하였다. Mannanase의 signal peptide를 제거하고 카르복시 말단에 His-tag이 연결되도록 pET23a(+)의 *Nde*I과 *Xho*I 사이에 유전자를 도입하기 위해 2종류의 primer PCM2-3EF (GTCCATATGGACGAAGCGACCACGGACGG; 밑줄은 *Nde*I 위치)와 PCM2-3ER (AAACTCGAGGCTCGCCGAGCAGTCGACGA; 밑줄은 *Xho*I 위치)을 제조하였다. 이들 primer로 증폭된 유전자 단편을 *Nde*I과 *Xho*I으로 절단하여 동일한 효소로 처리한 pET23a(+)에 도입하여 재조합 플라스미드 pCME3을 제조하였다. 재조합 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus에 도입한 형질전환주를 이용하여 His-tagged ManC (HtManC)의 유전자를 과잉 발현 시키기 위해서는 평판배지에서 자란 콜로니를 항생제를 첨가한 LB에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕 배양한 후, 동일배지 300 ml을 함유한 baffled flask에 1%가 되도록 접종하고 37°C에서 진탕 배양하면서 흡광도(OD_{600})가 0.6에 도달했을 때 IPTG를 1.0 mM이 되도록 첨가하였다. 25°C에서 6시간 추가로 진탕 배양하고 배양액을 원심분리 하여 얻은 균체를 8 ml의 cell lysis buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 현탁하여 초음파 파쇄한 후 원심

분리하여 균체파쇄상등액을 회수하였다. 이를 동일한 완충액으로 평형화 시킨 Ni-NTA 컬럼에 주입한 후 washing buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)로 세척하였다. HtManC를 300 mM imidazole을 함유한 완충액으로 추출하고 각 분획의 mannanase 활성분석과 SDS-PAGE 분석을 통해 활성이 높고 단일 단백질이 포함된 분획을 골라 10 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)에서 투석하여 정제효소로 사용하였다.

Mannanase 반응특성 분석

Mannanase 활성을 측정하기 위해서는 0.5% LBG와 50 mM pH 완충액을 포함한 반응액에 효소를 혼합하여 총 부피를 1 ml로 하여 50°C에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 용액 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건에서 1분 동안 LBG로 부터 1 μmol의 mannose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소량으로 정의하였다. 기질 특이성을 조사하기 위해서 LBG, guar gum, oat spelt xylan과 carboxymethyl cellulose (CMC)는 Sigma-Aldrich Co., konjac glucomannan (konjac)와 ivory nut mannan (ivory nut)은 Megazyme으로부터 각각 구매하였다. 반응 온도와 pH가 효소 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 30–70°C와 pH 5.0–11.0의 범위에서 mannanase 활성을 각각 측정하였다. pH 안정성은 pH 3.0–12 범위에서 mannanase 효소액을 1 시간 동안 방치한 후 잔존활성을 조사하여 결정하였다. 금속이온과 화합물이 효소 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 이들의 최종농도가 5 mM이 되도록 반응액에 첨가하고 효소활성을 측정하였다.

반응산물의 분석

Mannan (0.5%) 또는 Megazyme으로부터 구입한 만노올리고당(MOS; 0.5%)과 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.5)이 포함된 반응액에 효소를 과량 첨가하여 40°C에서 5 시간 동안 반응을 수행한 후 95°C에서 3분 동안 열 처리하고 이를 원심분리하였다. 반응 상등액을 적정량 취해 n-propanol, nitromethane과 증류수[7:1:2, (v/v)] 혼합용액을 전개용액으로 하여 silica gel-precoated thin layer plate (Merck Kiesegel, No. 5748)에서 박층 크로마토그래피(TLC)를 수행한 후 가수분해 산물을 관찰하였다(Yoon, 2016).

결과 및 고찰

Mannanase 유전자 클로닝

Cellulosimicrobium sp. YB-43의 *manB* 유전자를 포함하여 주변 위치의 염기서열이 결정된 바 있으며 *manB* 유전자의 하부에 동일한 전사 방향으로 위치한 *orf*가 아미노 말단 지역을 포함하는 유전자의 일부로 추정되었다(KX620013). 완전한 *orf*는 아니지만 이로부터 예상되는 아미노산 배열이 다른 mannanase와 상동성을 보였을 뿐 아니라 YB-43의 배양상등액으로부터 부분 정제된 ManC의 아미노 말단 배열을 포함하고 있었다. ManC를 암호하는 유전자로 추측되는 *orf*를 클로닝하기 위해 중합효소 연쇄반응(PCR) 용도의 primer를 설계하였다. Upper primer PCM2-3F는 *manC* 유전자의 상부 지역으로 추정되는 *manB* 유전자의 하부 염기서열을 기반으로 제조하였으며, 카르복실 말단 지역의 해당하는 염기서열은 확인되지 않았으므로 *manB* 유전자를 포함하는 지역과 염기서열의 상동성이 높은 *Cellulomicrobium* sp. MM의 유전체 서열(NZ_JPQW01000295)을 기반으로 하여 lower primer PCM2-3R을 설계하였다. PCM2-3F와 PCM2-3R을 사용하여 PCR로 증폭된 유전자 단편을 정제하여 직접 염기서열을 결정하고 *Hin*cII로 절단된 pUC19에 도입하였다. 이를 대장균에 형질전환하여 LBG 분해활성을 갖는 형질전환주를 얻었다. 형질전환주로부터 추출한 재조합 플라스미드에 삽입된 단편의 염기서열을 결정한 결과 PCR로 증폭 단편을 사용하여 결정된 염기서열과 동일하여 클로닝된 *manC* 유전자는 PCR 증폭과정 중 변이가 없었음이 확인되었다.

클로닝된 유전자의 염기서열로부터 448 아미노 잔기로 구성된 ManC를 암호하는 1,347 bp 크기의 *manC* 유전자가 확인되었으며(Fig. 1), *manC*는 *manB*와 104개 nucleotide가 떨어져 존재하였다. *manC* 유전자 개시코돈으로부터 5 염기와 각각 떨어진 상부 지역에 리보좀 결합부위로 추정되는 GAAGGA의 서열이 존재하였다. SignalP 4.1 프로그램으로 ManC의 signal peptide를 조사한 결과 그람 양성균을 기준으로는 아미노 말단의 39개 잔기가 signal peptide로 예측되었고 그람 음성균을 기준으로 하였을 때는 34개 잔기의 signal peptide로 예측되어 서로 달랐다. YB-43의 배양상등액으로부터 부분 정제된 ManC의 아미노 말단 배열(DEATTDGLH)이 *manC* 유전자에서 예측된 ManC의 40~48 번째 아미노산 잔기에 해당하여 그람 양성균을 기준으로 39개 잔기의 아미노 말단이 signal peptide로 예측된 결과와 일치하였다(Yoon, 2015).

일반적으로 signal peptide의 절단 위치 앞이 A-X-A로 배열되어 있는 것으로 알려졌으며(Tjalsma and van Dijl, 2005), 그

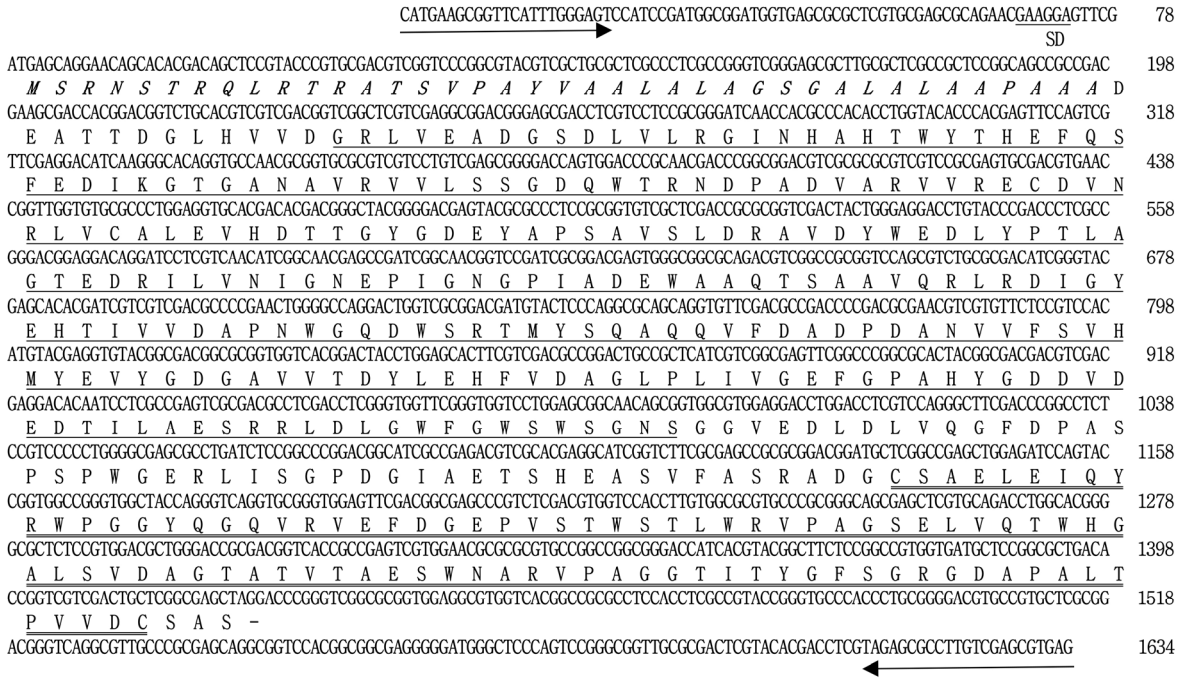

Fig. 1. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *manC* gene. The amino acid deduced from the open reading frame is shown with the one-letter code below the nucleotide sequence. Putative ribosome binding site (SD) is depicted below the underlines and amino acids corresponding to the signal sequence are italicized. The catalytic domain and CBM2 are represented by single underline and double underline, respectively. The upper and lower primers are indicated by arrows in the start and end positions of complete nucleotide sequence. The numbers at the end of each line correspond to the nucleotide positions.

람 양성균과 그람 음성균을 기준으로 각기 다르게 예측된 ManC의 signal peptide 절단 위치 앞 지점인 37~39번째와 32~34번째 배열이 A-A-A로 A-L-A로 각각 나타나 모두 A-X-A의 배열과 같았다. ManB의 경우도 SignalP 4.1 프로그램으로 그람 양성균과 그람 음성균을 기준으로 예측된 signal peptide의 길이가 달랐지만, 절단 위치 앞은 A-X-A로 배열되었으며 재조합 대장균에서 정제된 ManB의 아미노 말단 배열은 그람 음성균을 기준으로 예측된 일치한 것으로 보고되었다(Yoon, 2016). *C. fimi*의 mannanase는 모균과 재조합 대장균에서 생산되었을 때 아미노 말단 배열의 길이가 차이가 있었으며 재조합 대장균에서 생산된 효소의 아미노 말단 배열이 14 잔기를 더 포함한 것으로 알려졌다(Stoll *et al*., 1999). 이와는 달리 모균과 재조합 대장균으로부터 생산된 *Bacillus subtilis* WL-7의 mannanase는 아미노 말단 배열이 동일하였다(Kweun *et al*., 2004).

Mannanase 유전자와 단백질

유전자 염기서열로부터 예측된 아미노산 배열에 의해 ManC는 GH5에 속하는 mannanase의 활성영역(52~304)과 CBM2 (352~445)과 높은 상동성으로 배열되어 ManB와 유사하게 다영역 효소로 확인되었으며, ManB는 CBM2 대신 2개의 CBM10을 포함하는 것이 차이가 있었다. ManC의 아미노산 배열을 미국 NCBI database에 등록된 다른 효소와 비교한 결과 *Cellulosimicrobium* sp. MM (96%; WP_034656387)과 *C. cellulans* (94%; ARU50407)의 단백질과 가장 높은 상동성을 보였으며, 이외에는 *Oerskovia* sp. Root918 (KRD35857), *C. funkei* (KLN36010), *Isoptericola dokdonensis* DS-3 (ANC31527)과 *Nocardiopsis dassonvillei* (WP_061081109)의 단백질과는 60% 이하의 상동성을 나타냈다. 그러나 이들은 모두 유전체 염기서열에서 유추된 단백질에 해당한 것으로 효소 활성에 대한 연구는 보고된 바가 없다. 기능이 보고된 효소 중 ManC의 활성영역과 상동성이 높은 단백질의 아미노산 배열을 비교한 결과 *Streptomyces* sp. SirexAA-E (55.8%; 4FK9_A), *S. thermoluteus* (57.6%; BAM62868), *S. lividans* 1326 (48.8%; AAA26710), *S. thermolilacinus* (55.4%; BAK26781), *C. funkei* HY-13 (47.8%; AEE43708), *Thermobifida fusca* (56.3%; 1BQC_A)와 *Cellulosimicrobium* sp. YB-43 (47%; KX620013)의 mannanase와 47~58%의 상동성을 보였다(Fig. 2). 이들 중 *S. thermoluteus* (StManII)와 *S. thermolilacinus* (StMan)의 mannanase는 ManC와 같이 CBM2를 포함하였으며, 이외에도 FN3 영역을 추가적으로 함유하였다(Kumagai *et al*., 2011, 2013a). 그러나 ManC

```
 52 GRLVEADGSDLVLRGINHAHTWYTHEFQSFEDIKGTGANAVRVVLSSGDQWTRNDPADVARVVVRECDVNRLVCALEVHDTTGYGDEYAPS  ManC
  9 GRLYEANGQEFIIRGVSHPHNWYPQHTQAFADIKSHGANTVRVVLSNGVRWSKNGPSDVANVISLCKQNRLICMLEVHDTTGYGEQ--SG  1BQC_A
 29 GRLVEGNGNDFVMRGINHAHTWYPGETQSLADIKATGANTVRVVLSDGYRWSENSPEDVASIIARCKAERLICVLEVHDTTGYGED--AA  4FK9_A
 45 GRVVEGNGSAFVMRGVNHAYTWYPDRTGSIADIAAKGANTVRVVLSSGGRWTKTSASEVSALIGQCKANKVICVLEVHDTTGYGKD--GA  AAA26710
 37 GRIYDANGNRFVPVGVNHAHAWYPSQTQSFADIRAAGANTVRVVLS-GGRYGTSSAADVSAVVERCKQNQLVCILENHDTTGYGED--GS  AEE43708
 59 GRLLEGNGNDFVMRGVNHAHTWYPGQTRSLADIKALGANTVRVVLSDGHRWTRNGPADVAAVIDRCKANRLICVLEVHDTTGYGEE--PA  BAK26781
 44 GRLLEASGNDFVMRGVNHAHTWYADRLDALDHIKAKGANTVRVVLSSGDRWTRNDTADVANVVAQCKRNRLICVLEVHDTTGYGEQ--SG  BAM62868
 37 GKIYDANGNQFVPVGVNHAHAWYPSQTQSFADIRAAGANTVRVVLS-GGRYGTSSASDVSAVIERCKQNQLVCILENHDTTGYGED--GS  KX620013

142 AVSLDRAVDYWEDLYPTL-AGTEDRILVNIGNEPIGNGPIA-DEWAAQTSAAVQRLRDIGYEHTIVVDAPNWGQDWSRTMYSQAQQVFDA  ManC
 97 ASTLDQAVDYWIELKSVL-QGEEDYVLINIGNEPYGNDSATVAAWATDTSAAIQRLRAAGFEHTLVVDAPNWGQDWTNTMRNNADQVYAS  1BQC_A
117 AGTLDHAADYWIGLKDVL-DGEEDYVVINIGNEPWGN--ADPAGWTAPTTAAIQKLRAAGFAHTIMVDAPNWGQDWEGVMRADARSVYDA  4FK9_A
133 -TSLDQAGDYWVGVKSAAWRAQEDYVVVNIGNEPFGN--TNYAAWTDATKSAIGKLRGAGLGHALMVDAPNWGQDWSGTMRSNAASVFAS  AAA26710
124 ARSLASAAQYWTSIASVLR-GQERYVMINIGNEPFGN--SGFQSWTTDTIAAIRTLRAAGLDHTLVVDAPNWGQDWSFTMRDNAPTV--A  AEE43708
147 AGTLDHAADYWISLMDVL-AGQEDYVIVNIGNEPWGN--TDPAGWTAPTIAAVKKLRAAGLAHTLMIDAPNWGQDWQGVMRADARSVYEA  BAK26781
132 AVTLSRAADYWIEVRDAL-AGQEDYVIVNIGNEPHGN--TDYTRWTADTKAAVQKLRAAGFGHTLMVDAPNWGQDWAFTMRDNAASVFAA  BAM62868
124 ARSLASAAQYWTSIASVLR-GQERYVMINIGNEPFGN--SGFQSWTTDTIAAIQTLRGAGLAHTLVVDAPNWGQDWSFTMRDNAPTV--A  KX620013

230 DPDANVVFSVHMYEVYGDGAVVTDYLEHFVDAGLPLIVGEFGPAHYG-DDVDEDTILAESRRLDLGWFGWSWSGNS 302  ManC
186 DPTGNTVFSIHMYGVYSQASTITSYLEHFVNAGLPLIIGEFGHDHSD-GNPDEDTIMAEAERLKLGYIGWSWSGNG 260  1BQC_A
204 DPTGNLIFSIHMYSVYDTAAKVTDYLNAFVDAGLPLLIGEFGGPADQYGDPDEDTMMATAEELGLGYLAWSWSGNT 279  4FK9_A
220 DPDRNTVFSIHMYGVYDTAAEVRDYLNAFVGNGLPIVVGEFGDQHSD-GNPDEDAIMATAQSLGVGYLGWSWSGNG 294  AAA26710
209 AADGNVVFSVHMYGVFDTGAEVRAYLDSFTSRGLPIMVGEFGDNHSD-GNPDEDATIMSYTRSQGIGMLGWSWSGNG 283  AEE43708
234 DPTGNLLFSIHMYSVFDTAAEIDDYLEAFVDAGLPLVIGEFGGPPDQWGDPDEDTMLAAAERLRLGYLAWSWSGNT 309  BAK26781
219 DPDANTVFSIHMYGVFDTAAEVSDYLGRFVAAKLPVVVGEFGHDHSD-GNPDEDAILSVTRQLGIGYLGWSWSGNG 293  BAM62868
209 AADGNVVFSVHMYGVFDTGAEVRAYLDSFTSRGLPIMVGEFGDNHSD-GNPDEDATIMSYTRSQGIGMLGWSWSGNG 283  KX620013
```

Fig. 2. Comparison of amino acid sequences in catalytic domains between ManC and other mannanases. The amino acid sequences of catalytic domains from eight mannanases including ManB (KX620013) and ManC (ManC) of *Cellulosimicrobium* sp. YB-43, *Thermomonospora fusca* mannanase (1BQC_A), *S. lividans* 1326 ManA (AAA26710), *C. funkei* HY-13 ManH (AEE43708), *S. thermolilacinus* StMan (BAK26781), and *S. thermoluteus* StManII (BAM62868) are aligned to maximize similarities with gaps (hyphens) by Clustal W method. Eight strictly conserved residues of GH5 mannanase for catalytic reaction are bold, and the boxed sequence indicates the putative calcium binding residues. Numbers at the beginning of each line correspond to the amino acid position in each mannanase.

의 CBM2의 아미노산 배열은 이들 효소와 25% 수준의 낮은 상동성을 보였다.

GH5 mannanase의 아미노산 배열 중 보존적으로 보고된 8개 잔기가 ManC에서 Arg93, His129, Asn172, Glu173, His240, Tyr242, Glu269와 Trp298로 확인되었으며 이들 중 Glu173와 Glu269는 각각 산염기 작용 활성잔기와 친핵성 활성잔기에 해당한다(Hilge *et al*., 1998). ManC의 280~282 번째 아미노산 잔기 배열(DED)은 *Streptomyces* sp. SirexAA-E (Takasuka *et al*., 2014), *S. thermoluteus* (Kumagai *et al*., 2013a), *S. lividans* 1326 (Arcand *et al*., 1993) 및 *Thermomonospora fusca* (Hilge *et al*., 1998)의 mannanase와 같이 StMan의 Ca^{2+}과 결합하는 아미노산 잔기로 보고된 Asp285, Glu286, Asp287 잔기 배열과 동일하였다(Kumagai *et al*., 2012, 2013b). 그러나 ManB 및 *C. funkei* HY-13 mannanase H (ManH)의 배열은 차이가 있었다.

재조합 대장균이 생산하는 mannanase의 정제

manC 유전자를 재조합 대장균에서 과잉발현 하기 위해 signal peptide 영역에 해당하는 부분을 제거한 유전자를 pET23a의 T7 promoter 하단에 도입하였으며, 이와 동시에 효소의 정제 과정을 간편화하기 위해 종결코돈을 제거하고 카르복시 말단에 His tag이 융합되도록 하였다. 이렇게 제조된 재조합 플라스미드 pCME3을 *E. coli* BL21 (DE3)과 희소 tRNA 유전자가 도입된 *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus에 각각 형질전환하여 IPTG로 HtManC의 유전자를 과잉 발현한 결과 *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus의 형질전환주에서 mannanase 생산성이 높았으나, 다른 단백질의 과잉발현 정도에 비해 낮았다. 이는 *manC* 유전자의 GC 함량이 70% 이상이므로 대장균에서 ManC의 생합성 효율이 낮기 때문으로 추정된다. 또한 IPTG 첨가 후 37°C에서 배양하였을 때는 발현된 단백질이 대부분 불용성 단백질로 존재하였으며, IPTG를 첨가한 후 25°C로 배양하였을 때는 수용성 단백질로 발현된 mannanase의 양이 증가한 것으로 나타났다.

재조합 대장균에서 생산된 HtManC를 Ni-NTA 컬럼 크로마토그래피로 정제한 결과 분자량이 약 49 kDa로 확인되었다

(Fig. 3). *manC* 유전자의 염기서열로부터 예상되는 HtManC의 분자량은 융합된 6개의 His을 합쳐서 45.2 kDa로 추정되었으나 정제된 HtManC는 SDS-PAGE에서는 이보다 큰 분자량을 보였다. 재조합 대장균 균체에서 정제된 ManB도 예상되는 분자량은 41.5 kDa였지만 SDS-PAGE에서 약 45 kDa로 관찰된 바 있다(Yoon, 2016). 한편 *C. funkei* HY-13 의 배양 상등액으로부터 정제된 mannanase K (ManK)의 아미노 말단 배열(DEATTDGLHVVDD)이 보고되었으며 이는 *manC* 유전자로부터 예측된 ManC 아미노 말단의 아미노산 잔기 배열 DEATTDGLHVVDG에 해당하며 한 개 잔기만을 제외하고 일치하는 것으로 나타났다(Kim *et al*., 2011b). ManK의 유전자에 대한 보고는 없으나 ManK의 아미노 말단의 잔기배열이 ManC와 거의 동일한 것으로 보아 이들 효소간에 유사도가 매우 높을 것으로 예상되는데 ManK의 분자량은 35 kDa로 밝혀져 차이가 매우 컸다. 이러한 분자량의 차이는 유전자의 차이일 수도 있지만 생산된 단백질이 분해되어 카르복실 말단 부위가 절단된 상태로 정제되었을 수도 있다고 추측된다(Takasuka *et al*., 2014).

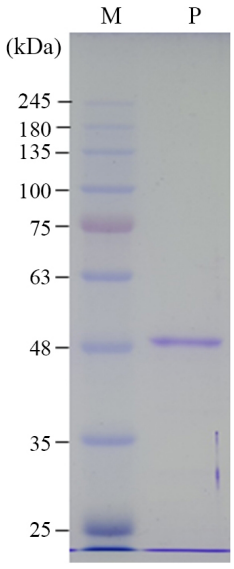

Fig. 3. SDS-PAGE of the purified HtManC from recombinant *E. coli*. Lanes: P, the purified enzyme; M, the molecular weight markers.

정제된 HtManC를 사용하여 반응 온도와 pH가 효소활성에 미치는 영향을 조사한 결과 pH 7.5에서 활성이 가장 높았으며 사용된 완충용액의 종류에 따라 활성에 차이를 보였지만 pH 7.5~10 범위에서 거의 활성에 차이가 없이 최대활성을 보였다(Fig. 4A). pH 11에서도 최대활성의 50% 이상의 활성을 보여 알칼리 조건에서 활성이 높은 것이 확인되었으며 pH 6.0에서는 최대활성의 50% 수준의 활성을 보이고 pH 5.0에서는 활성이 15% 이하로 급격히 감소하였다. HtManC의 최적반응 온도는 65°C로 나타났으며(Fig. 4B), 이는 YB-43으로부터 생산된 ManC의 최적반응 조건인 65°C와 pH 7.5의 결과와 일치하였고(Yoon, 2015) 55°C와 pH 6.5~7.0에서 최대활성을 보이는 ManB와는 차이가 있었다. ManH는 50°C와 pH 6.0, ManK는 50°C와 pH 7.0에서 최대활성을 나타내어 HtManC와는 차이가 있었다(Kim *et al*., 2011a, 2011b).

pH 3.0~12 범위에서 HtManC를 1시간 방치한 후에 잔존활성을 조사한 결과 pH 5.0~11의 범위에서는 전혀 감소되지 않고 활성을 유지하였으며 pH 4에서는 매우 미약하게 실활되었다(Fig. 4A). 또한 pH 11.5에서는 94.6% 잔존활성을 보여 pH 4.0~11.5 범위에서 안정하게 유지하였으며 이는 YB-43의 배

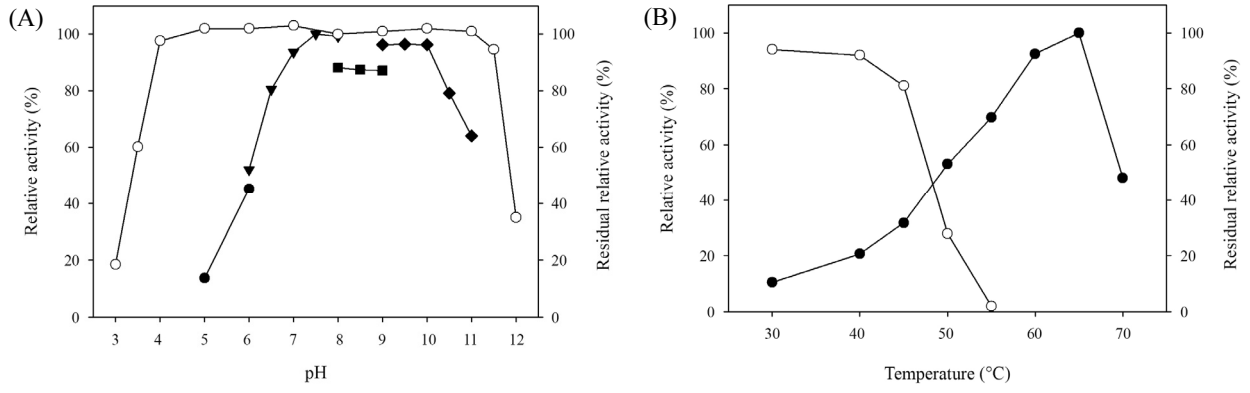

Fig. 4. pH and temperature profiles for activity and stability of the purified HtManC. (A) The pH profiles were obtained by measuring the mannanase activities at various pH's with a constant temperature of 55°C. pH stability (-○-) was determined by measuring the residual activities after pre-incubation for 1 h at 4°C. Buffers (50 mM) used were as follows: sodium citrate (-●-, pH 5–6), sodium phosphate (-▼-, pH 6–8), Tris (-■-, pH 8–9), KCl-borate (-◆-, pH 9–11), and NaOH-sodium phosphate. (B) Temperature profiles (-●-) were obtained by measuring the mannanase activities at different temperatures with a fixed pH 7.5. Thermostability (-○-) was determined by measuring the residual activities after pre-incubation for 30 min at different temperatures. Each curve represents the average of three independent experiments within standard errors of 2% among them.

양상등액에서 부분정제된 ManC와 유사하였다. HtManC보다 알칼리 조건에서 활성이나 안정성이 우수한 효소로 알려진 *B. halodurans* PPKS-2의 mannanase는 pH 11과 70°C에서 최대활성을 보였으며(Vijayalaxmi *et al*., 2013), *Streptomyces* sp. CS428의 mannanase는 pH 12.5와 60°C에서 최대활성을 보이고 pH 5~12.5 범위에서 24시간 방치하였을 때 89% 이상의 잔존활성을 유지하였다(Pradeep *et al*., 2016).

열안정성을 조사하기 위해 30~55°C 범위에서 30분간 방치한 후에 잔존활성을 조사하였다. 30°C에서도 5% 이상 실활되었으며, 50°C 이상에서는 급격히 실활되었다(Fig. 4B). 45°C와 50°C에서 시간을 달리하여 방치한 후 잔존활성을 조사한 결과 45°C에서는 60분 방치하였을 때 57% 잔존활성을 보였으며, 50°C에서 20분 방치하였을 때 44%의 잔존활성을 보였다(결과 미제시). ManB의 경우 50°C에서 30분간 방치 후에도 60% 이상의 활성을 유지하는 것으로 보고되었는데 이로보아 ManC는 ManB에 비해 열안정성이 낮은 것을 알 수 있었다. *S. lividans* 66의 mannanase는 38°C 이하에서는 안정하고 42°C에서 반감기가 약 4시간이며 58°C에서 15분내에 실활되어 HtManC와 유사한 수준으로 판단되었다(Arcand *et al*., 1993).

금속이온을 비롯한 여러 화합물을 5 mM로 첨가한 상태에서 HtManC의 활성을 분석한 결과 EDTA, Fe^{3+}와 Cu^{2+}에 의해 활성이 10~20% 정도 감소하였으며 Ca^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+}와 Na^{+}에 의해서도 약간 감소하였다. Fe^{2+}, Zn^{2+}, K^{+}를 포함하여 SDS와 dithiothreitol (DTT)에 의해서 활성이 증가하였으며 특히 DTT에 의해 HtManC의 활성이 1.7배 수준으로 크게 증가하였다(Table 1). SDS와 DTT의 농도를 0~20 mM (2.5, 5.0, 10, 15, 20 mM) 범위로 하여 활성을 조사한 결과 2.5 mM의 농도에서 SDS는 약 1.2 배, DTT는 약 1.8배로 각각 HtManC의 활성을 가장 높게 증가시켰으며, 첨가량이 증가할수록 활성의 증가정도는 감소하는 경향을 보였다. SDS의 경우 20 mM을 첨가하였을 때 HtManC의 활성이 SDS를 첨가하지 않았을 때보다 미약하게 증가하였고 DTT는 20 mM 첨가한 상태에서도 약 1.7배 증가하였다. HtManC는 4개의 cysteine 잔기를 포함하고 있는데 DTT가 cysteine 잔기간에 disulfide 결합의 형성을 방지하거나 또는 HtManC가 다량체로 응집되지 않도록 하여 활성이 증진되었을 가능성이 있다. *Trichoderma harzianum*의 mannanase는 DTT (20 mM)에 의해 약 3.2배 활성이 증가하여 HtManC 보다 높은 증가율을 보였다(Ferreira and Filho, 2004). 한편 SDS는 단백질 형태를 변화시켜 대부분의 효소에서 활성을 감소시키는 효과를 보이지만, 일부의 효소는 일정한 농도의 SDS가 존재해도 단백질의 2차 구조가 변화하지 않고 외부 표면에 결합된 SDS에 의해 단백질 형태에 제한적으로 미세한 변화가 일어남으로써 효소 활성이 증가하는 것으로 밝혀졌다(Moore and Flurkey, 1990). HtManC의 활성이 SDS에 의해 증가된 것도 이러한 현상과 관련이 있을 것으로 추정된다.

금속이온이 효소 활성에 미치는 영향은 효소에 다양한 양상을 보이는데, ManB의 활성은 Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} 이온과 EDTA 및 SDS에 의해 활성이 크게 감소하였으며 SDS에 의해 활성이 감소한 정도는 35% 이상으로 HtManC와는 크게 달랐다. ManH도 Cu^{2+}, Zn^{2+}와 EDTA에 의해 크게 저해되었으며, ManK는 SDS에 의한 결과는 없었으나 Tween 80 (0.5%)과 Triton X-100 (0.5%)에 의해 약간 증가하는 것으로 보고되었다(Kim *et al*., 2011b). 재조합 대장균으로부터 정제된 StMan은 HtManC와는 다르게 EDTA에 의해 활성이 대부분 저해되며 Ca^{2+}과 Mg^{2+}이 효소 활성에 필요하였으며(Kumagai *et al*., 2011), *Streptomyces* sp. CS147의 mannanase는 Ca^{2+}에 의해 크게 활성이 증진되지만 Mg^{2+}에 의해서는 저해되는 것으로 보고되었다(Yoo *et al*., 2015).

최적 반응조건에서 LBG를 기질로 하여 1.7~6.7 mg/ml의 농도 범위에서 HtManC의 초기 반응속도를 구해 Lineweaver-Burk plot에서 Vmax와 Km 값을 결정한 결과 68.0 U/mg과 0.45 mg/ml로 측정되었다. 다른 효소들과 비교하였을 때 최대

Table 1. Effects of metal ions and other reagents on the HtManC activity

Effector (5 mM)	Relative activity (%)	Effector (5 mM)	Relative activity (%)
None	100 ± 0.2	$HgCl_2$	0.0 ± 0.0
KCl	106.2 ± 0.2	$MnCl_2$	88.6 ± 1.0
NaCl	92.5 ± 0.9	$MgCl_2$	96.2 ± 1.4
$CaCl_2$	90.2 ± 0.2	$NiCl_2$	98.6 ± 0.3
$CoCl_2$	94.2 ± 0.9	$ZnCl_2$	108.4 ± 0.7
$CuCl_2$	83.2 ± 0.1	Dithiothreitol	177.8 ± 0.7
$FeCl_2$	105.2 ± 0.4	EDTA	81.8 ± 0.3
$FeCl_3$	84.3 ± 1.0	SDS	117.0 ± 2.0

반응속도는 StMan 보다 약간 높았으나 그 외의 효소에 비해서 낮았으며 기질친화도는 비교적 높은 것으로 나타났다(Table 2).

기질특이성과 최종 가수분해 산물

기질 특이성을 비교하기 위해 여러 다당류를 기질로 하여 반응을 실시한 결과 HtManC는 mannan을 분해하였으며 CMC와 *para*-nitrophenyl-β-mannopyranoside를 분해하지 못하였고 oat spelt xylan은 매우 미약하게 분해하였다. Table 3에 보인 바와 같이 HtManC는 ManB 및 StManII와 유사하게 konjac glucomannan에 대한 활성이 가장 높았으며, guar gum에 대한 활성은 LBG에 비해 54.2% 수준으로 YB-43의 배양상등액에서 부분 정제된 ManC (57%) 및 StManII와 유사하였고 ManK와 *Paenibacillus* sp. CH-3의 mannanase B 보다는 낮았다(Zhang *et al*., 2017). Ivory nut에 대한 활성은 StManII와 유사한 수준으로 나타났다(Kumagai *et al*., 2013a). 한편 LBG를 기질로 하였을 때 HtManC (48.9 U/mg)의 비활성은 ManH (8,498 U/mg), ManK (7,109 U/mg)와 *Streptomyces* sp. S27의 Man5S27 (2,107 U/mg)에 비해 매우 낮았으며(Shi *et al*., 2011), StMan (61 U/mg)과 *Thermobifida fusca*의 mannanase (TfMan; 114 U/mg)에 비해서도 낮았다(Kumagai *et al*., 2011). 특히 HtManC의 아미노 말단이 ManK와 유사한 것으로 확인되었는데도 불구하고 비활성에는 매우 큰 차이를 보였다.

최종 반응산물을 조사하기 위해 과량의 HtManC를 사용하여 mannan과 MOS를 가수분해한 후 반응액을 TLC로 분석하였다. Figure 5A에 보인 바와 같이 HtManC는 mannobiose (M2)를 분해하지 못하였으며 mannotriose (M3)를 소량만 분해하였다. Mannotetraose (M4) 이상의 중합도를 갖는 MOS의 주된 분해산물은 M2와 M3로 확인되었으며 적은 양의 mannose가 생성되었다. 한편 ManB는 HtManC와 동일하게 M2를 분해하지 못하며 M3의 이상의 중합도를 갖는 MOS의 분해능이 높았으나 주된 반응산물로 M2가 생성되었으며 미량의 mannose와 M3가 생성되어 HtManC와 차이가 있었다. ManH는 MOS의 주요분해 산물로 M2와 M3를 생성하며 mannose도 미량 생성하여 HtManC와 유사하였으며 이와 더불어 당 전이활성을 갖는 것으로 보고되었다(Kim *et al*., 2011a). 그러나 ManK는 M3을 분해하지 못하였고 M4와 mannopentaose (M5)의 분해산물로 M2와 M3 및 M4가 관찰되었고 mannose는 생성되지 않아 HtManC와는 달랐다(Kim *et al*., 2011b).

HtManC에 의한 LBG, konjac과 ivory nut의 분해산물로 M2와 소량의 mannose가 공통적으로 관찰되었으며, LBG에

Table 2. Kinetic parameters of mannanase for LBG

Mannanases	Vmax (U/mg)	Km (mg/ml)	References
Cellulosimicrobium sp. YB-43 (HtManC)	68	0.45	This study
S. lividans 66	207	0.77	Arcand *et al*. (1993)
S. thermolilacinus (StMan)	63	2.2	Kumagai *et al*. (2011)
Streptomyces sp. S27 (Man5S27)	3,739	0.16	Shi *et al*. (2011)
Streptomyces sp. CS147	294	0.13	Yoo *et al*. (2015)
Streptomyces sp. CS428	5,029	1.01	Pradeep *et al*. (2016)
T. fusca RC14071 (TfMan)	111	1.3	Kumagai *et al*. (2011)

Table 3. Comparison of hydrolyzing activity for mannans between HtManC and others

Substrates	Relative activity (%) of					
	HtManC[a]	ManB[b]	ManH[c]	ManK[d]	PaManB[e]	StManII[f]
LBG	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Konjac	104.1	107.1	ND	ND	143.1	128.6
Guar gum	54.2	45.2	11.4	72.6	131.1	52.7
Ivory nut	43.4	ND	173.1	ND	ND	40.3

ND, not determined.
[a] HtManC of *Cellulosimicrobium* sp. YB-43 in this study
[b] ManB of *Cellulosimicrobium* sp. YB-43 (Yoon, 2016)
[c] ManH of *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 (Kim *et al*., 2011a)
[d] ManK of *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 (Kim *et al*., 2011b)
[e] ManB of *Paenibacillus* sp. CH-3 (Zhang *et al*., 2017)
[f] StManII of *S. thermoluteus* (Kumagai *et al*., 2013a)

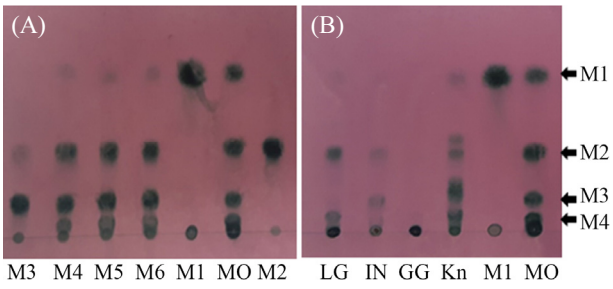

Fig. 5. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of β-1,4-linked mannooligosaccharides and mannans with the purified HtManC. The reaction mixtures containing the purified HtManC and MOSs or mannanas, in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) were incubated for 5 h at 40°C, respectively. MO of (A) and (B) stands for a standard mixture of mannose (M1) and MOSs consisting of mannobiose (M2), mannotriose (M3), mannotetraose (M4), mannopentaose (M5), and mannohexaose (M6). (A) Lanes M2 to M6 represent each hydrolyzate of mannobiose to mannohexaose. (B) LG, IN, GG and Kn stand for hydrolyzates of locust bean gum, ivory nut, guar gum and konjac, respectively.

서는 M4, ivory nut에서는 M3가 추가적으로 관찰되었다(Fig. 5B). Konjac의 가수분해산물 중에는 mannose, M2 뿐 아니라 여러 종류의 올리고당이 관찰되었는데 이는 konjac이 glucose와 mannose가 β-1,4 결합을 하고 있으며 HtManC가 mannose 간의 결합만을 가수분해하기 때문에 glucose와 mannose로 구성된 다양한 올리고당이 생성된 때문으로 보인다. 한편 guar gum에 대한 활성도가 LBG에 비해 54% 수준에 이르는데도 불구하고 guar gum의 분해산물이 TLC에서 거의 관찰되지 않았는데 이는 guar gum 분해산물의 중합도가 높아 TLC에서 해리될 수준으로 이동하지 못한 때문으로 판단되며 이러한 현상은 ManB의 가수분해 산물에서도 동일하게 나타난 바 있다. 한편 ManH에 의한 LBG 분해산물로는 M5가 가장 많았으며 mannohexaose (M6)와 mannoheptaose도 상당량 존재하였으며, ivory nut의 분해산물로는 M3~M6가 다량 생성되었으며 M4가 가장 많은 것으로 보고되었다. ManK는 LBG로부터 M2와 M5를 주로 생성하였으며, ManB는 LBG의 분해산물로 다량의 M2와 소량의 mannose 및 M6와 이동도가 유사한 MOS도 생성하였다. StMan과 TfMan에 의한 LBG의 가수분해 산물에서도 M2가 다량 존재하였으며 이외에 StMan에 의해 다량의 M3와 함께 M4와 M5도 생성되었으나 mannose는 생성되지 않았고, TfMan에 의해서는 M3, M5와 함께 매우 적은 양의 mannose가 생성되었다(Kumagai *et al*., 2013a).

본 연구를 통해 밝혀진 ManC의 아미노산 배열은 기능이 보고된 기존의 mannanase와 상동성이 50% 미만의 수준으로 낮았다. 또한 재조합 대장균에서 생산된 HtManC의 반응 특성과 안정성 및 가수분해 산물을 비교하였을 때 HtManC는 YB-43의 배양상등액으로부터 정제된 ManC와 유사한 것으로 확인되었고 YB-43의 또 다른 mannanase인 ManB와는 차이가 있었으며, 아미노 말단의 서열이 유사한 *C. funkei* HY-13의 ManK와는 반응특성의 유사성이 높지 않은 것으로 밝혀졌다.

적 요

여러 종류의 mannanase를 생산하는 *Cellulosimicrobium* sp. YB-43으로부터 mannanase B를 암호하는 *manB* 유전자와 효소의 특성이 보고된 바 있다. Mannanase C (ManC)로 명명한 효소의 유전자가 *manB* 유전자의 하류에 위치한 것으로 예상되어 이를 중합효소 연쇄반응으로 클로닝하여 *manC* 유전자의 염기서열을 결정하였다. ManC는 448 아미노산 잔기로 구성된 것으로 확인되었으며 glycosyl hydrolase family 5에 속하는 mannanase와 상동성이 높은 활성영역과 탄수화물 결합영역(CBM2)이 존재하였다. ManC의 활성영역은 *Streptomyces* sp. SirexAA-E (55.8%; 4FK9_A) 및 *S. thermoluteus* (57.6%; BAM62868)의 mannanase와 아미노산 배열의 상동성이 55% 이상으로 가장 높았다. Signal peptide 영역이 제거되고 카르복실 말단에 hexahistidine이 연결되도록 제조한 His-tagged ManC (HtManC)의 유전자를 재조합 대장균에서 발현하여 균체 파쇄액으로부터 HtManC를 정제하였다. HtManC은65°C와 pH 7.5에서 최대 활성을 보였으며 pH 7.5~10범위에서 활성에 큰 변화가 없었다. HtManC는 locust bean gum (LBG)과 konjac에 대한 분해 활성이 guar gum과 ivory nut mannan (ivory nut)에 비해 높았다. 최적 반응조건에서 LBG를 기질로 하여 반응 동력학적 계수를 측정한 결과 Vmax와 Km이 68 U/mg과 0.45 mg/ml로 나타났다. HtManC에 의한 만노올리고당(MOS)과 mannan의 분해산물을 TLC로 관찰한 결과 mannobiose 보다 중합도가 큰 MOS로부터 mannobiose와 mannotriose가 주된 분해산물로 생성되었다. 또한 LBG, konjac과 ivory nut의 분해산물로 mannobiose와 소량이 mannose가 공통적으로 관찰되었다.

감사의 말

이 연구는 2018년도 우송대학교 교내 학술연구조성비 지원에 이해 이루어진 것임.

References

Arcand, N., Kluepfel, D., Paradis, F.W., Morosoli, R., and Shareck, F. 1993. β-Mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme. *Biochem. J.* **290**, 857–863.

Dhawan, S. and Kaur, J. 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit. Res. Biotechnol*. **27**, 197–216.

Ferreira, H.M. and Filho, E.X.F. 2004. Purification and characterization of a β-mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. *Carbohydr. Polym*. **57**, 23–29.

Hilge, M., Gloor, S.M., Rypniewski, W., Sauer, O., Heightman, T.D., Zimmermann, W., Winterhalter, K., and Piontek, K. 1998. High-resolution native and complex structures of thermostable β-mannanase from *Thermomonospora fusca* - substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. *Structure* **6**, 1433–1444.

Kim, D.Y., Ham, S.J., Lee, H.J., Cho, H.Y., Kim, J.H., Kim, Y.J., Shin, D.H., Rhee, Y.H., Son, K.H., and Park, H.Y. 2011a. Cloning and characterization of a modular GH5 β-1,4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13. *Bioresour. Technol.* **102**, 9185–9192.

Kim, D.Y., Ham, S.J., Lee, H.J., Kim, Y.J., Shin, D.H., Rhee, Y.H., Son, K.H., and Park, H.Y. 2011b. A highly active endo-β-1,4-mannanase produced by *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13, a hemicellulolytic bacterium in the gut of *Eisenia fetida*. *Enzyme Microb. Technol.* **48**, 365–370.

Kumagai, Y., Kawakami, K., Mukaihara, T., Kimura, M., and Hatanaka, T. 2012. The structural analysis and the role of calcium binding site for thermal stability in mannanase. *Biochimie* **94**, 2783–2790.

Kumagai, Y., Kawakami, K., Uraji, M., and Hatanaka, T. 2013a. Binding of bivalent ions to actinomycete mannanase is accompanied by conformational change and is a key factor in its thermal stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 301–307.

Kumagai, Y., Kawakami, K., Uraji, M., and Hatanaka, T. 2013b. Effect of the binding of bivalent ion to the calcium-binding site responsible for the thermal stability of actinomycete mannanase: Potential use in production of functional mannooligosaccharides. *J. Mol. Cataly. B*: *Enzym.* **94**, 63–68.

Kumagai, Y., Usuki, H., Yamamoto, Y., Yamasato, A., Arima, J., Mukaihara, T., and Hatanaka, T. 2011. Characterization of calcium ion sensitive region for β-mannanase from *Streptomyces thermolilacinus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 1127–1133.

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.

Moore, B.M. and Flurkey, W.H. 1990. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem*. **265**, 4982–4988.

Oda, M., Inaba, S., Kamiya, N., Bekker, G.J., and Mikami, B. 2018. Structural and thermodynamic characterization of endo-1,3-β-glucanase: Insights into the substrate recognition mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1866**, 415–425.

Pradeep, G.C., Cho, S.S., Choi, Y.H., Choi, Y.S., Jee, J.P., Seong, C.N., and Yoo, J.C. 2016. An extremely alkaline mannanase from *Streptomyces* sp. CS428 hydrolyzes galactomannan producing series of mannooligosaccharides. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **32**, 84.

Schumann, P., Weiss, N., and Stackebrandt, E. 2001. Reclassification of *Cellulomonas cellulans* (Stackebrandt and Keddie 1986) as *Cellulosimicrobium cellulans* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **51**, 1007–1010.

Shi, P., Yuan, T., Zhao, J., Huang, H., Luo, H., Meng, K., Wang, Y., and Yao, B. 2011. Genetic and biochemical characterization of a protease-resistant mesophilic β-mannanase from *Streptomyces* sp. S27. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **38**, 451–458.

Srivastava, P.K. and Kapoor, M. 2017. Production, properties, and applications of endo-β-mannanases. *Biotechnol. Adv*. **35**, 1–19.

Stoll, D., Stalbrand, H., and Warren, R.A. 1999. Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi*. *Appl. Environ. Microbiol*. **65**, 2598–2605.

Takasuka, T.E., Acheson, J.F., Bianchetti, C.M., Prom, B.M., Bergeman, L.F., Book, A.J., Currie, C.R., and Fox, B.G. 2014. Biochemical properties and atomic resolution structure of a proteolytically processed beta-mannanase from cellulolytic *Streptomyces* sp. SirexAA-E. *PLoS One* **9**, e94166.

Tjalsma, H. and van Dijl, J.M. 2005. Proteomics-based consensus prediction of protein retention in a bacterial membrane. *Proteomics* **5**, 4472–4482.

Vijayalaxmi, S., Prakash, P., Jayalakshmi, S.K., Mulimani, V.H., and Sreeramulu, K. 2013. Production of extremely alkaliphilic, halotolerent, detergent, and thermostable mannanase by the free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* PPKS-2. Purification and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **171**, 382–395.

Walia, A., Mehta, P., Guleria, S., and Shirkot, C.K. 2015. Modification in the properties of paper by using cellulase-free xylanase produced from alkalophilic *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 in biobleaching of wheat straw pulp. *Can. J. Microbiol*. **61**, 671–681.

Yoo, H.Y., Pradeep, G.C., Lee, S.K., Park, D.H., Cho, S.S., Choi, Y.H., Yoo, J.C., and Kim, S.W. 2015. Understanding β-mannanase from *Streptomyces* sp. CS147 and its potential application in lignocellulose based biorefining. *Biotechnol. J.* **10**, 1894–1902.

Yoon, K.H. 2015. Characterization of two β-mannanases from *Cellulosimicrobium* sp. YB-43. *Korean J. Microbiol*. **51**, 263–270.

Yoon, K.H. 2016. Molecular cloning and characterization of β-mannanase B from *Cellulosimicrobium* sp. YB-43. *Korean J. Microbiol*. **52**, 336–343.

Zhang, J.X., Chen, Z.T., Meng, X.L., Mu, G.Y., Hu, W.B., Zhao, J., and Nie, G.X. 2017. Gene cloning, expression, and characterization of a novel β-mannanase from the endophyte *Paenibacillus* sp. CH-3. *Biotechnol. Appl. Biochem*. **64**, 471–481.