

Bacillus sp. WS-42에 의한 β -Mannanase 생산배지의 최적화

김종화* · 이태규 · 양희천 · 오덕근
우석대학교 식품공학과

Optimization of Medium for β -Mannanase Production by *Bacillus* sp. WS-42. Jong-Hwa Kim*, Tae-Kyoo Lee, Hee-Cheon Yang and Deok-Kun Oh. Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Chonbuk 565-800, Korea - A strain of *Bacillus* sp. WS-14 was isolated from soil. Medium optimization for β -mannanase production by *Bacillus* sp. WS-14 was performed. Effect of various carbon sources on β -mannanase production was investigated and locust bean gum was the most effective for β -mannanase production. β -Mannanase activity and cell growth increased with increasing the concentration of locust bean gum, however, the amounts were not significant. Among nitrogen sources, soytone was the most effective for β -mannanase production. Inorganic compounds such as KH_2PO_4 , NaCl, Na_2CO_3 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on β -mannanase production were optimized for β -mannanase production. Locust bean gum of 10.0 g/l, soytone of 5.0 g/l, KH_2PO_4 of 2.0 g/l, NaCl of 10.0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ of 0.2 g/l, Na_2CO_3 of 2.0 g/l were selected as optimum content. Production of β -mannanase by using the optimum medium was carried out. The maximum β -mannanase activity of 20.8 unit/ml could be obtained after 14 h fermentation which corresponded to the productivity of β -mannanase of 1.48 unit/ml-h.

β -Mannanase는 세균, 곰팡이와 고등식물 등에서 넓게 분포되어 있고 이 중에서 미생물에 의한 생산은 *Bacillus* sp.(1, 2), *Bacillus stearothermophilus*(3), *Pseudomonas* sp.(4), *Aspergillus niger*(5), *Trichoderma harzianum*(6), *Trichoderma reesei*(7), *Tyromyces palustris*(8), *Streptomyces* sp.(9), *Caldocellum saccharolyticum*(10)와 *Aeromonas* sp.(11)에 의하여 생성된다는 보고가 있다.

다당류인 β -mannan은 mannopyranose의 기본 단위가 β -1,4 결합으로 이루어져있고 mannose의 기본구조외에 glucose의 잔기가 포함되어 있는 glucomannan과 galactose와 acetyl의 잔기가 포함되어 있는 galactomannan과 이것에 glucose의 잔기가 추가되어 galactoglucomannan으로 존재한다(12). β -Mannan은 mannose 기본골격을 공격하여 반응후 oligomannoside의 잔기가 생성되는 β -D-mannanase(1,4- β -D-mannan mannohydrolase; EC 3.2.1.78)와 mannose 형태로 완전 분해하는 β -D-mannosidase(β -D-mannoside mannohydrolase; EC 3.2.1.25)에 의하여 효소적으로 분해된다(2).

β -Mannan은 palm과 커피의 열매 및 konjak의 뿌리등 여러식물에 존재하고(13) 최근에는 다이어트 식품으로 많이 사용되고 있다. 그러나, 고점도 다당류이므로 가공할 때에 점도로 인한 어려움이 존재한다. 그러므로 β -

mannan을 가공할 때에 점도조절용으로 β -mannanase를 사용하면 이러한 문제점을 해결할 수 있다. 또한, β -mannan을 β -mannanase로 처리시 생성되는 mannooligosaccharide (MOS)는 인체내 대장의 유용균인 *Bifidobacterium* sp.와 *Lactobacillus* sp.의 좋은 성장원일 뿐 아니라 대장내의 유해 미생물의 증식을 저해하는 작용을 한다(14). 그러므로, 향후 MOS를 의약품 원료나 식품 첨가물로 사용할 가능성이 있다.

지금까지 *Bacillus* sp.에 의한 β -mannanase의 생산에 관한 논문들이 보고되었으나 그 역가가 낮은 단점이 있다. 그러므로, 본 연구에서는 β -mannanase의 생산 역가가 높은 균주를 토양으로 부터 선별하고 동정하고 이 균주를 이용하여 배지성분이 β -mannanase 생산에 미치는 영향을 살펴보고 β -mannanase의 생산성을 증가시키기 위하여 각 배지성분의 최적 농도를 구하고자 한다.

재료 및 방법

미생물 및 배지

본실험에서 사용한 균주는 토양에서 분리선별된 *Bacillus* WS-42이었다. 성장배지로는 glucose 10 g/l, peptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l로 구성된 배지를 사용하였고 β -mannanase 생산배지로는 탄소원으로 locust bean gum 10 g/l (또는 5-30 g/l) 질소원으로 soytone, 또한 무기염으로 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , NaCl로 구성된 배지를 사용하였고 각 성분의 양은 β -man-

*Corresponding author
Tel. 82-652-290-1469, Fax. 82-652-291-9312
E-mail: jhkimjh@woosuk.ac.kr
Key words: β -Mannanase, *Bacillus* sp., Medium optimization

nanase의 생산성을 높이기 위하여 변화시켰다.

배양조건

종배양은 agar 배지(성장배지+agar 15 g/l)의 colony를 pH가 6.0으로 조절된 성장배지 50 ml가 들어있는 250 ml 플라스크에 접종한후 진탕 배양기에서 240 rpm, 40℃로 약 14시간 동안 수행하였다. 본배양은 종배양액 0.5 ml를 β-mannanase 생산배지 50 ml가 들어있는 250 ml 플라스크에 접종하여 배양온도는 40℃, 초기 pH는 6.0, 교반속도는 240 rpm으로 하여 14시간 동안 수행하였다. 이때, 배양중 pH는 조절하지 않았다.

균체농도

균체농도는 탁도계를 이용하여 파장 600 nm에서 현탁도를 측정하여 미리 측정한 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 환산하였다.

β-Mannanase의 생산량

β-Mannanase의 생산량은 0.5 ml의 10 g/l locust bean gum, 0.4 ml의 0.05 M phosphate buffer(pH 6.0)과 0.1 ml의 균체가 제거된 배양액을 섞어 50℃에서 5분간 반응시킨 후 생성된 mannose를 환원당 측정법인 DNS법으로 측정하였다(15). 1 unit의 β-mannanase는 상기의 조건에서 분당 생성되는 D-mannose에 해당하는 1 mmol의 환원당을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

β-Mannanase의 생산을 위한 균주분리

여러장소에서 수집된 토양을 멸균수에 희석한후 β-mannan agar 배지(locust bean gum 10.0 g/l, peptone 10.0 g/l, yeast extract 5.0 g/l, agar 15.0 g/l로 구성)에 도말하여 40℃에서 24-48 시간동안 배양하여 큰 투명한 이 가진 균주를 β-mannanase의 생산균주로 선별하였다. 선별된 균주 WS-42는 측정된 결과 여러균주 중에서 가장 높은 β-mannanase의 생산량을 보여주었고 이 균주의 형태적 생리적 특성을 살펴본 결과 Bacillus sp.로 규명되었다(Table 1).

탄소원의 농도가 β-mannanase의 생산에 미치는 영향

Soytone 5.0 g/l, KH₂PO₄ 1.0 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/l를 기본배지로 하여 여러 가지 탄소원이 균체성장과 β-mannanase의 역가에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2). Locust bean gum의 농도가 증가할수록 균체농도와 β-mannanase의 생산량은 증가하였으나 10 g/l 이상의 농도에서는 큰차이가 없었다. 이에 비하여 Bacillus sp. AM-001과 Bacillus sp. YA-14에서는 β-mann-

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the isolated strain WS-42.

1. Morphological characteristics	
Cell shape	Rods
Gram strain	+
Spore formation	+
Mobility	+
2. Physiological characteristics	
Casein hydrolysis	+
Starch hydrolysis	+
Gelatine hydrolysis	+
Catalase	+
Oxidase	+
Urease	-
Acid from glucose, fructose, maltose, mannose, sucrose, xylose, mannitol, arabinose	+
Gas from glucose, fructose, maltose, mannose, sucrose, xylose, mannitol, arabinose	-
Methyl red test	-
Vogas-proskauer reaction	+
Citrate utilization	+
pH for growth	3.0-8.0
Temperature	22-55℃
Oxygen relation	obligative aerobe

Table 2. Effect of various carbon sources on β-mannanase production.

Carbon source (g/l)	Cell mass (g/l)	β-mannanase production (unit/ml)
Locust bean gum	5	1.09
	10	1.27
	15	1.33
	20	1.40
	30	1.46
Konjak(crude)	10	1.33
Glucose	10	1.33
Mannose	10	1.35
Galactose	10	1.25
Soluble starch	10	1.27
Xanthan	10	0.60
Inulin	10	1.17
Pectin	10	0.15

anase의 생산이 locust bean gum의 농도가 10 g/l 이상에서 감소함을 보여주었다(1, 2). 다른 탄소원의 경우 β-mannanase의 생산량이 비교적 낮게 나타났고 이중 konjak의 경우 가장 높았고 glucose의 경우에는 Bacillus sp. YA-14에서는 약간의 β-mannanase가 생산되지만 (2) Bacillus sp. WS-42에서는 전혀 생산되지 않았다.

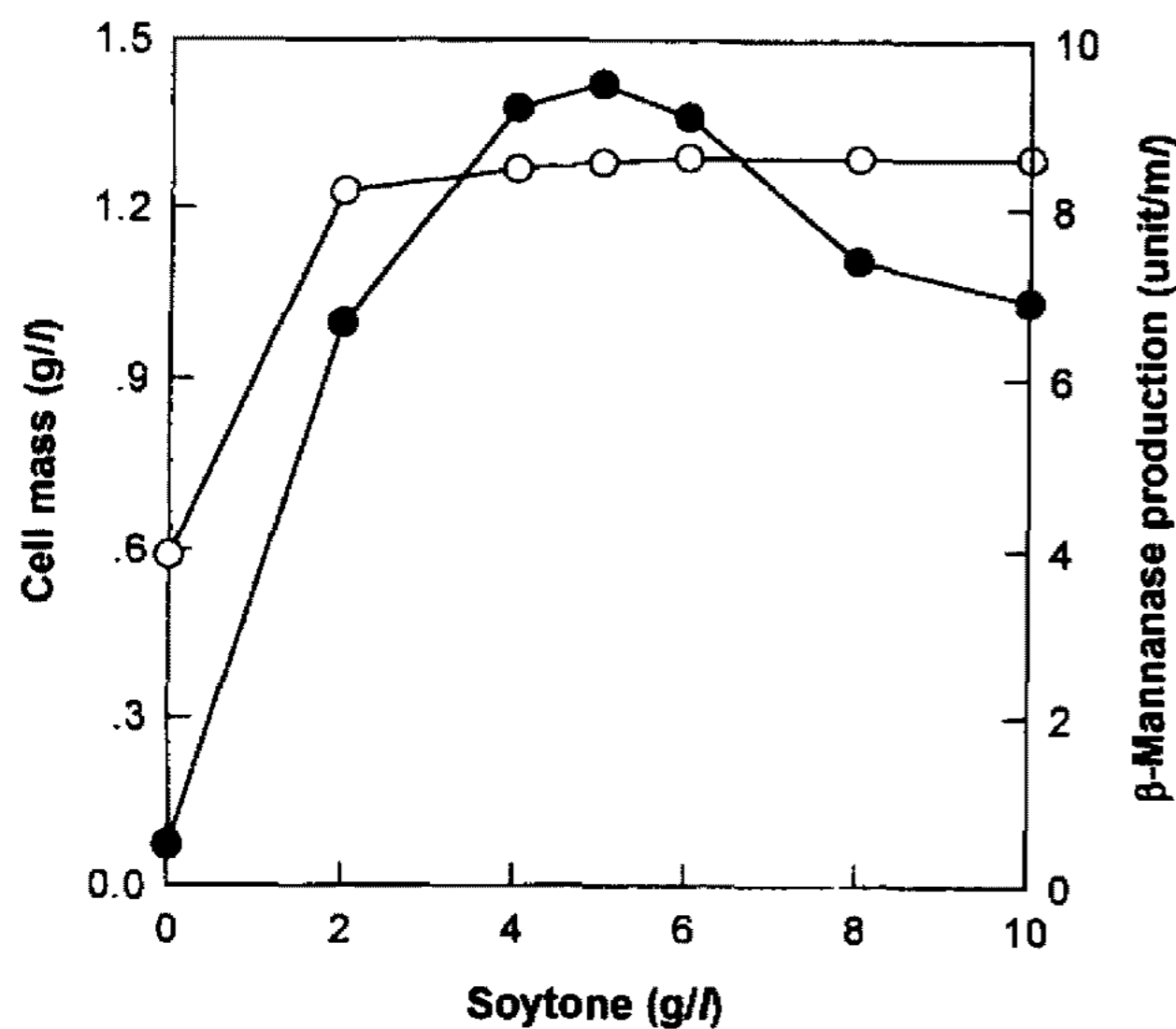
질소원이 β-mannanase의 생산에 미치는 영향

Locust bean gum 10.0 g/l, 질소원 5.0 g/l, KH₂PO₄ 1.0 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/l로 구성된 발효배지에서 여러

Table 3. Effect of various nitrogen sources on β -mannanase production.

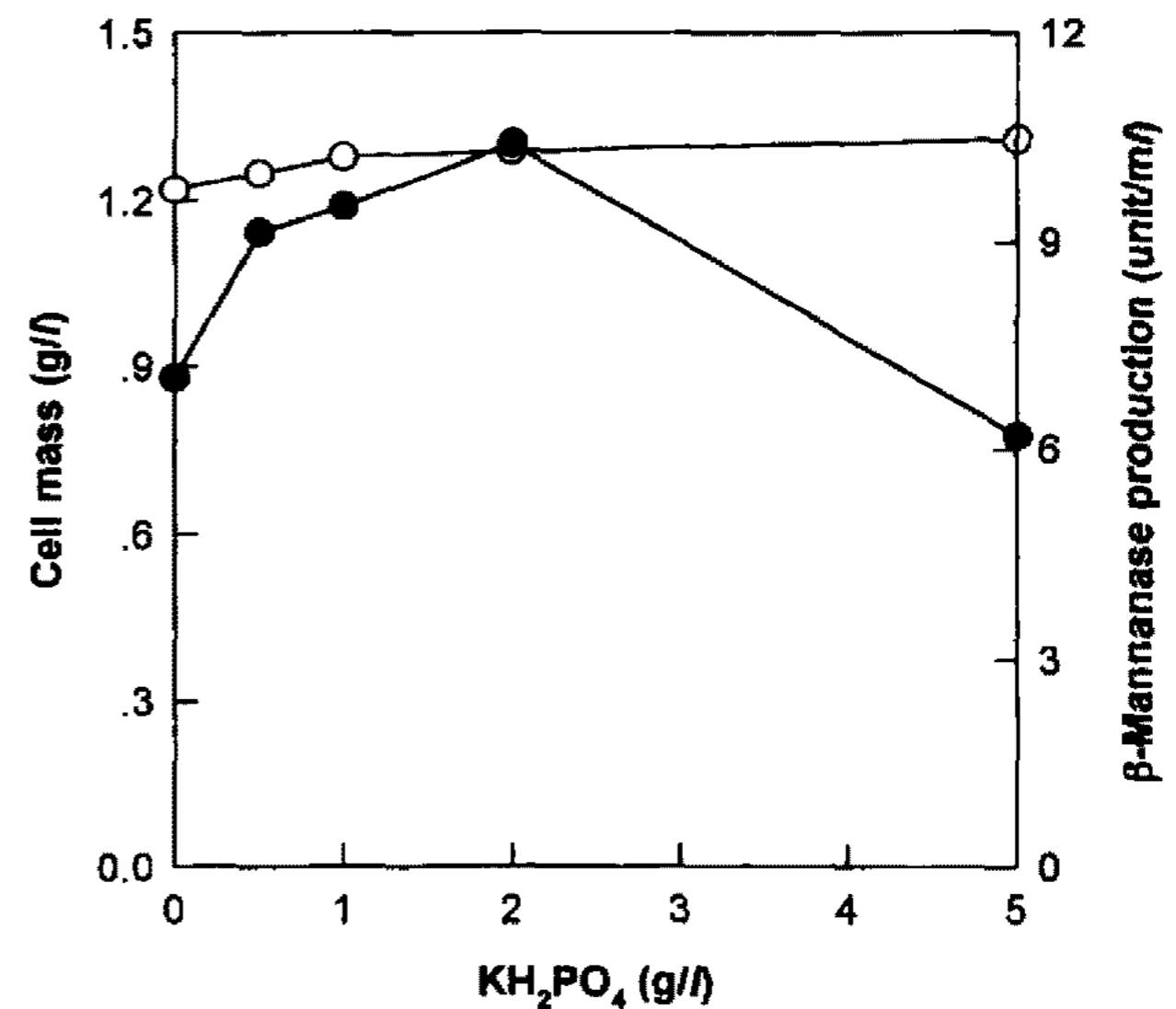
Nitrogen source*	Cell mass (g/l)	β -mannanase production (unit/ml)
Beef extract	1.21	5.41
Casamino acid	1.24	4.16
Peptone	1.03	6.08
Soytone	1.29	9.42
Tryptone	1.25	6.35
Yeast extract	1.30	6.02
Yeast nitrogen base	0.62	2.04
NH ₄ Cl	0.50	1.20
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.40	1.67
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.61	0.18

*The concentration was 5 g/l.

**Fig. 1. Effect of soytone concentration on β -mannanase production and cell growth of *Bacillus* sp. WS-42.**Cell mass (○), β -mannanase production (●).

가지 질소원을 달리 첨가하여 14시간 동안 배양한 후 질소원이 균체농도와 β -mannanase의 생산에 미치는 영향을 살펴보았다(Table 3). 균체농도와 β -mannanase의 생산량은 질소원 중에서는 soytone이 가장 높아 soytone을 질소원으로 선정하였다. 그러나, 무기질소원의 배지에서 균체농도와 β -mannanase의 생산량은 현저히 감소함을 보여주었다.

β -Mannanase의 생산량이 가장 좋게 나타난 질소원인 soytone을 선택하여 soytone의 농도가 균체농도와 β -mannanase의 생산량에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig. 1). Soytone 5.0 g/l 이내에서는 농도가 증가할수록 균체의 농도는 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 균체농도가 일정하였다. β -Mannanase의 생산량은 soytone을 첨가하지 않을 경우에는 매우 낮았으며 5.0 g/l를 첨가할 경우 최대값을 나타내었고 그 이상에서는 오히려 감소하여 soytone의 최적농도를 5.0 g/l로 결정하였다. *Bacillus*

**Fig. 2. Effect of KH₂PO₄ on β -mannanase production and cell growth of *Bacillus* sp. WS-42.**Cell mass (○), β -mannanase production (●).

sp. YA-14에서는 β -mannanase의 생산의 최적 질소원이 polypeptone이었고 그 농도가 10 g/l 이상에서 감소함을 보여주었다(2). 다른경우에도 과량의 질소원이 β -mannanase의 생산 감소를 초래하였으므로 최적 soytone의 농도가 5.0 g/l로 나타난 것으로 생각된다(1, 16).

무기염이 β -mannanase의 생산에 미치는 영향

Locust bean gum 10.0 g/l, soytone 5.0 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/l로 구성된 발효배지에 KH₂PO₄를 첨가하여 KH₂PO₄의 농도가 균체농도와 β -mannanase 생산량에 미치는 영향을 살펴보았다. Fig. 2에서 나타난 것처럼, 균체농도는 KH₂PO₄의 농도가 증가할수록 증가하였으나 큰 차이를 보여주지 않았다. β -Mannanase의 생산량은 KH₂PO₄의 농도가 2.0 g/l일 때 최대값을 나타내어 최적 KH₂PO₄의 농도는 β -mannanase의 생산성을 기준으로 하여 2.0 g/l로 결정하였다.

Bacillus sp.는 발아, 포자형성 및 성장에 NaCl을 필요로 한다는 것이 이미 보고되어있다(2). 그러므로 locust bean gum 10.0 g/l, soytone 5.0 g/l, KH₂PO₄ 2.0 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/l로 구성된 발효배지에 NaCl을 첨가하여 NaCl의 농도가 균체농도와 β -mannanase 생산량에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig. 3). 균체농도와 β -mannanase의 생산량은 NaCl의 농도가 10.0 g/l일 때 최대값을 나타내어 최적 NaCl의 농도를 10.0 g/l로 결정하였다. 이에 비하여 *Bacillus* sp. YA-14에서의 최적 NaCl 농도는 5 g/l이었다.

Locust bean gum 10.0 g/l, soytone 5.0 g/l, KH₂PO₄ 2.0 g/l, NaCl 10.0 g/l로 구성된 발효배지에 MgSO₄ · 7H₂O를 첨가하여 MgSO₄ · 7H₂O의 농도를 달리하여

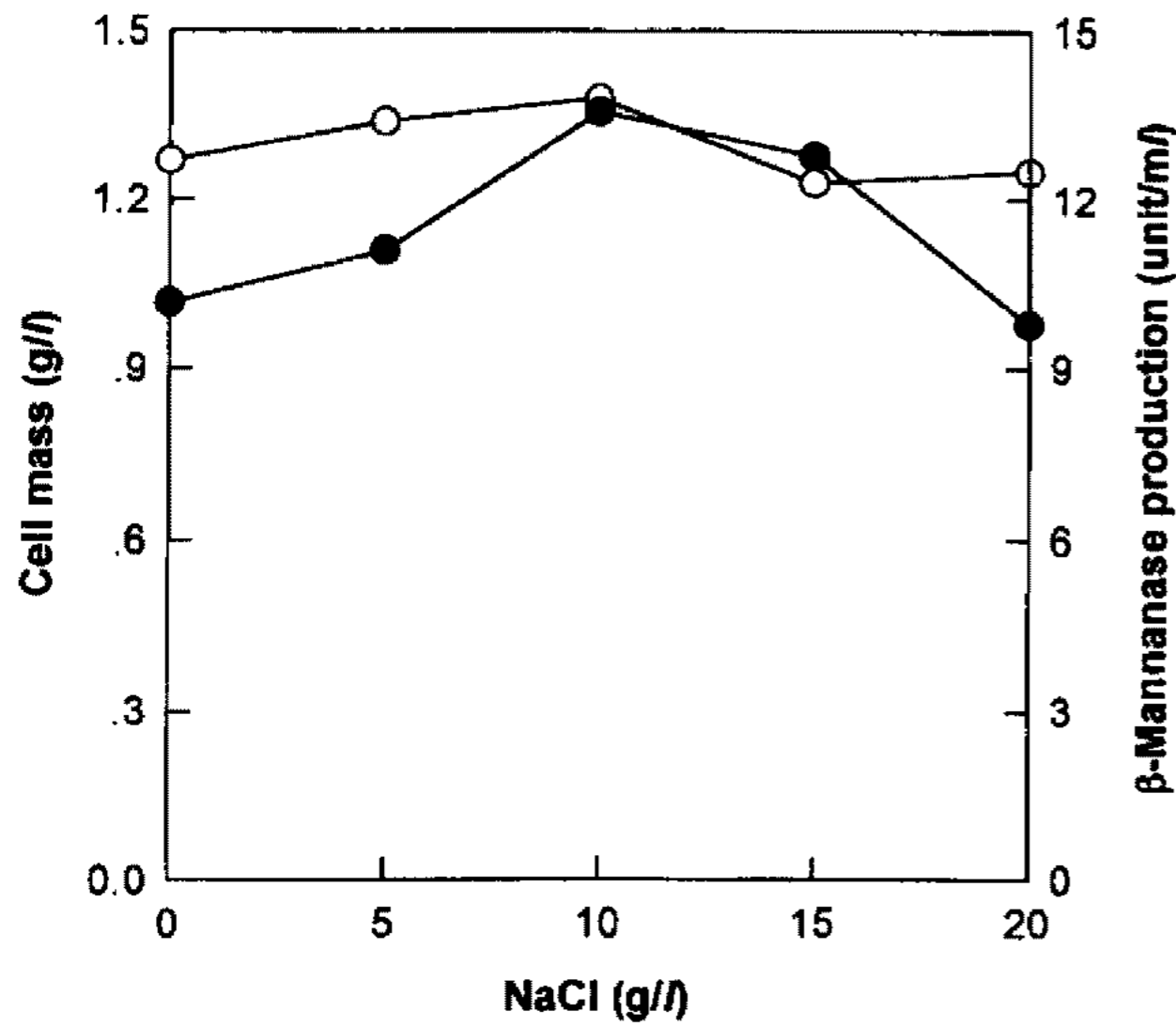


Fig. 3. Effect of NaCl on β -mannanase production and cell growth of *Bacillus* sp. WS-42.

Cell mass (○), β -mannanase production (●).

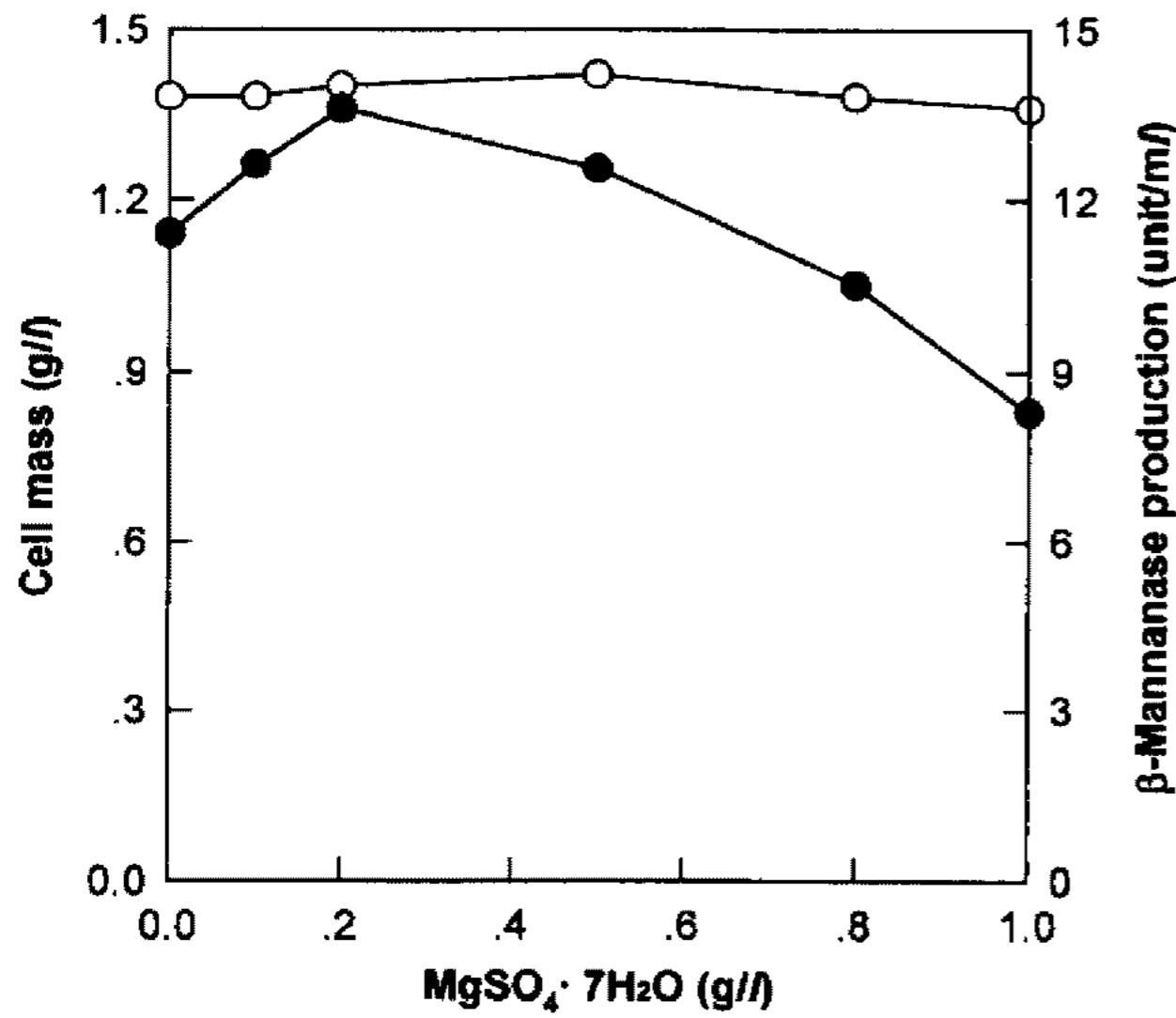


Fig. 4. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ on β -mannanase production and cell growth of *Bacillus* sp. WS-42.

Cell mass (○), β -mannanase production (●).

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 균체농도와 β -mannanase의 생산에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig. 4). 균체농도는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도에 무관하게 비교적 일정하였지만 β -mannanase의 생산량은 0.2 g/l 일 때 최대값을 보여주어 최적 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도를 0.2 g/l로 선정하였다.

Bacillus sp.를 이용하여 β -mannanase를 생성할 때 Na_2CO_3 가 β -mannanase의 생성 증가를 일으킨다는 보고가 있어(1, 2) Locust bean gum 10.0 g/l, soytone 5.0 g/l, KH_2PO_4 2.0 g/l, NaCl 10.0 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l로 구성된 발효배지에 Na_2CO_3 를 첨가하여 Na_2CO_3 의 농도가 균체농도와 β -mannanase의 생산량에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig. 5). Na_2CO_3 의 농도가 증가 할수록 균체농도는 현저하게 감소하였다. β -Mannanase 생산량

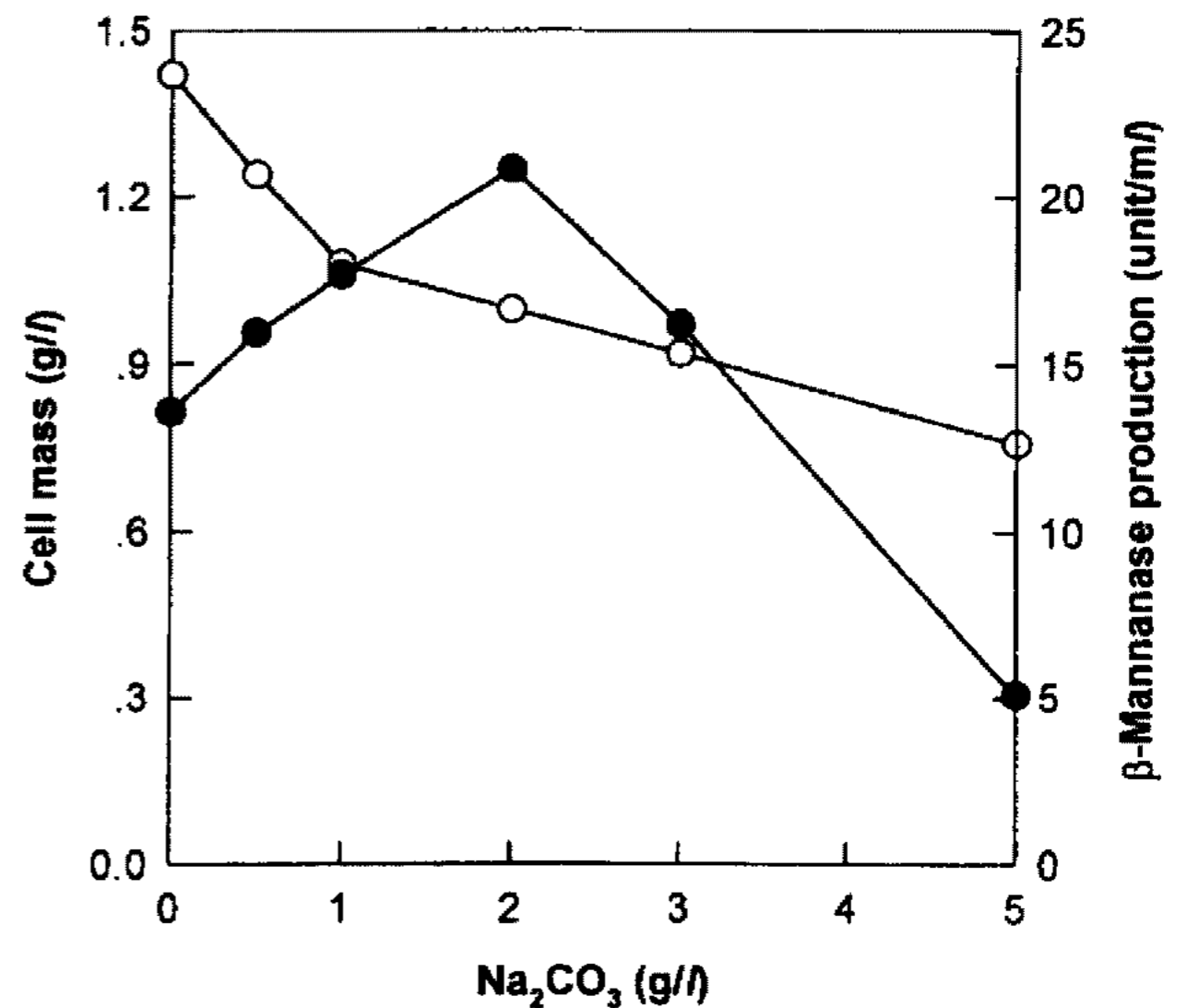


Fig. 5. Effect of Na_2CO_3 on β -mannanase production and cell growth of *Bacillus* sp. WS-42.

Cell mass (○), β -mannanase production (●).

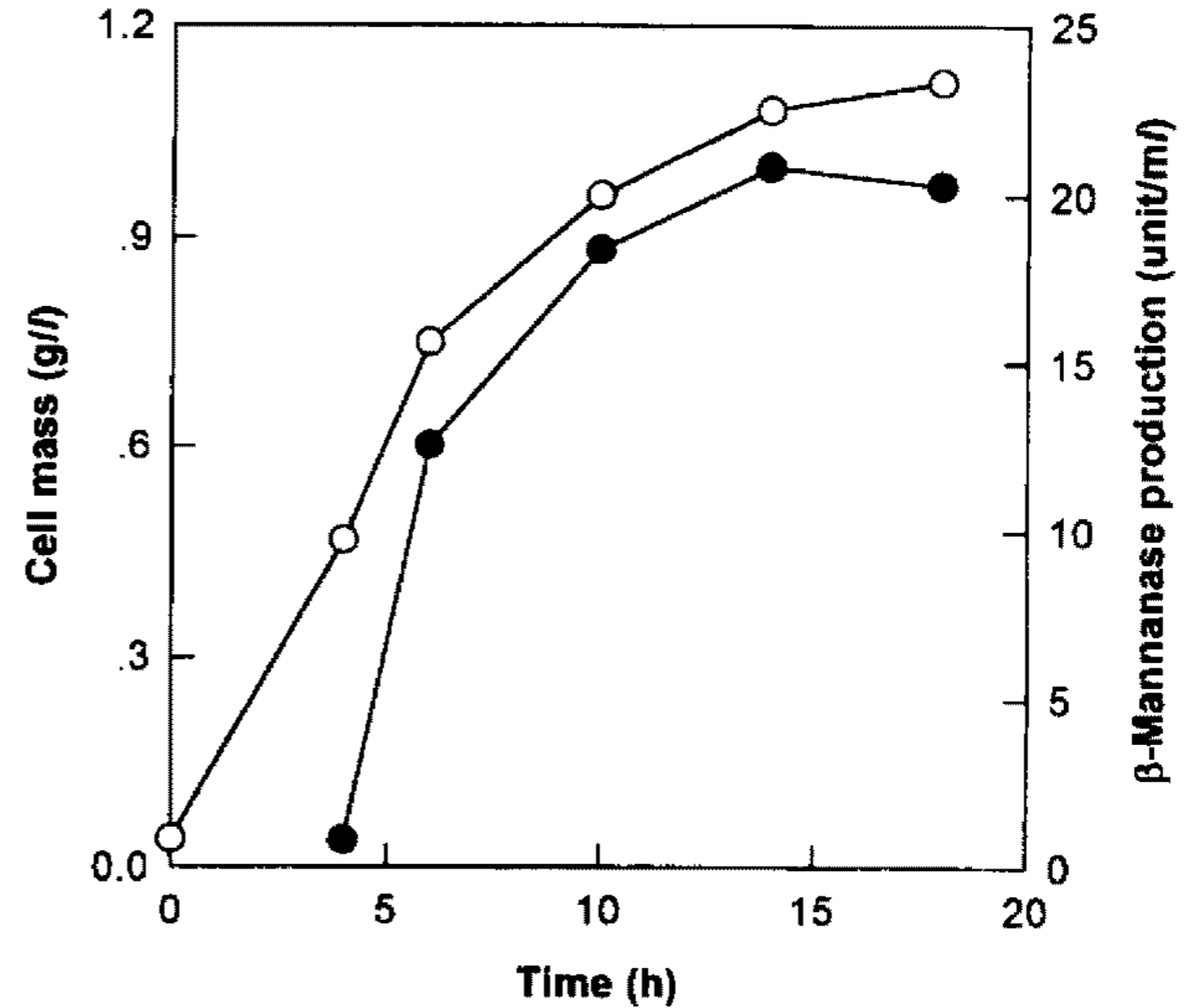


Fig. 6. Cultivation for β -mannanase production in the optimal medium by *Bacillus* sp. WS-42.

Cell mass (○), β -mannanase production (●).

은 Na_2CO_3 의 농도에 크게 영향을 받아 Na_2CO_3 의 농도 2.0 g/l보다 증가하거나 감소할 때 현저히 감소하였다. 그러므로 Na_2CO_3 의 최적농도를 2.0 g/l로 결정하였다. *Bacillus* sp. AM-001에서는 β -mannanase의 생산의 Na_2CO_3 의 최적농도는 5.0 g/l이었고 *Bacillus* sp. YA-14에서는 Na_2CO_3 의 최적농도는 5.0 g/l이었다(1, 2).

최적배지로 locust bean gum 10.0 g/l, soytone 5.0 g/l, KH_2PO_4 2.0 g/l, NaCl 10.0 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l, Na_2CO_3 2.0 g/l를 선정하였으며 최적배지에서 β -mannanase의 생산량은 약 20 unit/ml이었다.

최적배지에서 균체증식 및 β -mannanase의 생산
최적배지를 사용하여 40°C에서 시간 경과에 따른 균체

Table 4. β -Mannanase production by *Bacillus* sp. WS-42, *Bacillus* sp. YA-14, *Trichoderma harzianum*, and *Aspergillus oryzae*.

Microorganism	Production (unit/ml)	Productivity (unit/ml-h)	Time (h)	Referance
<i>Bacillus</i> sp. WS-42	20.8	1.48	14	In this study
<i>Bacillus</i> sp. YA-14	7.0	0.44	16	(3)
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.7	0.004	192	(7)
<i>Aspergillus oryzae</i>	9.7	0.36	27	(16)

증식 및 β -mannanase의 생산에 대하여 살펴보았다 (Fig. 6). 균체농도는 배양 18시간에 1.12 g/l까지 증가하였다. 초기 유도기에서 β -mannanase의 생산량은 낮았지만 배양 4시간 이후로 급격히 상승하여 배양 14시간에는 최대값인 20.8 unit/ml을 보여주었다. 이것은 β -mannanase의 생산성 1.48 unit/ml-h에 해당하는 것이다. 여러 가지 균주의 β -mannanase의 생산성을 살펴본 결과 Table 4에 나타내었다. 세균인 *Bacillus* sp. YA-14(2)는 발효시간 16시간에 최대 β -mannanase의 생산량 7 unit/ml를 나타내어 생산성으로 환산하면 0.44 unit/ml-h 이었다. 곰팡이인 *Trichoderma harzianum*(6)의 경우는 8일간 배양하여 β -mannanase의 생산량 0.7 unit/ml를 보여주어 생산성 0.004 unit/ml-h 이었다. *Aspergillus oryzae*에 경우(16)는 27시간 배양하여 β -mannanase의 생산량 9.7 unit/ml를 얻었다. 이때, 생산성은 0.36 unit/ml-h 이었다. 그러므로, 선별한 *Bacillus* sp. WS-42는 다른 균보다 최종 β -mannanase의 생산량이 더 높고 배양 시간도 짧은 장점이 존재하여 산업적 적용 가능성이 높은 균주라고 할 수 있다.

요 약

토양에서 선별분리한 *Bacillus* sp. WS-42를 사용하여 β -mannanase의 생산에 영향을 주는 배지성분을 최적화 하였다. 여러 가지 탄소원중에 locust bean gum이 β -mannanase의 생산량이 가장 높게 나왔다. Locust bean gum의 농도를 달리하여 발효를 수행한 결과 농도가 증가할수록 β -mannanase의 생산량과 균체농도가 증가하였으나 그 정도는 비교적 적었다. Locust bean gum 10 g/l 배지에서 여러 가지 질소원이 β -mannanase의 생산에 미치는 영향을 살펴본 결과 β -mannanase의 생산량은 soytone이 가장 높아 soytone을 질소원으로 선정하였다. 또한 여러 가지 무기염의 최적화를 수행한 결과 특히 Na_2CO_3 가 β -mannanase의 생산에 중요한 인자임을 알 수 있었다. 배지최적화를 통하여 최적배지로 locust bean gum 10.0 g/l, soytone 5.0 g/l, KH_2PO_4 2.0 g/l, NaCl 10.0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/l, Na_2CO_3 2.0 g/l를

선정하였으며 최적배지에서 14시간 배양하여 20.8 unit/ml의 β -mannanase 생산량을 얻었다. 이때, β -mannanase의 생산성은 1.48 unit/ml-h 이었다.

참고문헌

1. Akino, T., N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1987. Production of β -mannosidase and β -mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 323-327.
2. Min, D. S., Y. J. Chung, D. H. Bai, and J. H. Yu. 1995. Production of β -mannanase by an alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14. *Foods Biotechnol.* **4**: 285-289.
3. Talbot, G. and J. Sygusch. 1990. Purification and characterization of thermostable β -mannanase and β -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3505-3510.
4. Yamaura, I., T. Matsumoto, M. Funatsu and Y. Funatsu. 1990. Purification and some properties of endo-1,4- β -D-mannanase from *Pseudomonas* sp. PT-5. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2425-2427.
5. Tsujisaka, Y., K. Hiyama, S. Takenishi, and J. Fukumoto. 1972. Purification and some properties of mannanase from *Aspergillus niger* var *Tieghem* sp. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **46**: 155-161.
6. Torrie, J. P., D. J. Senior, and J. N. Saddler. 1990. Production of β -mannanases by *Trichoderma harzianum* E58. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 303-307.
7. Arisan-Atac, I., R. Hodits, D. Kristufek, and C. P. Kubicek. 1993. Purification and characterization of a β -mannanase of *Trichoderma reesei* C-30. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 58-62.
8. Ishihara, M. and K. Shimizu. 1980. Hemicellulases of the brown rotten fungus *Tyromyces palustris*. IV. purification and some properties of an extracellular mannanase. *Mokuzai Gakkaish.* **26**: 811-818.
9. Takahashi, R., I. Kusakabe, H. Kobayashi, K. Murakami, A. Maekawa, and T. Suzuki. 1984. Structure of glucomannan oligosaccharides from the hydrolytic products of konjak glucomannan produced by a β -mannanase from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 2943-2950.
10. Bicho, P. A., T. A. Clark, K. Mackie, H. W. Morgan, and R. M. Daniel. 1991. The characterisation of a thermostable endo- β -1,4-mannanase cloned from *Caldocellum saccharolyticum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 337-343.
11. Araki, T. and M. Kitamikado. 1988. Exo- β -1,4-mannanase from *Aeromonas hydrophila*. *Methods Enzymol.* **160**: 583-589.
12. Dekker, R. F. H. 1983. Bioconversion of hemicellulose: aspect of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymatic saccharification of hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 1127-1146.
13. Akino, T., W. Nakamura, and K. Horikoshi. 1988. Char-

- acterization of three β -mannanases by an alkalophilic *Bacillus sp.* *Agric. Biol. Chem.* **52**: 773-779.
14. Tohyama, K., Y. Kobayashi, T. Kan, K. Yazawa, T. Terashima, and M. Futai. 1981. Effect of lactobacillus on urinary indican excretion in gnotobiotic rats and man. *Microbiol. Immunol.* **26**: 101-112.
15. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
16. 오덕근, 김종화, 이태규. 1996. *Aspergillus oryzae*에 의한 β -mannanase 생산배지의 최적화. *한국생물공학회지* **11**: 510-516.

(Received 3 December 1996)