

대장균에서 *Bacillus subtilis*의 Mannanase 유전자 과잉발현

권민아¹ · 손지영¹ · 윤기홍^{1,2*}

우송대학교, ¹응용식품 · 영양학부, ²생물소재응용연구센터

High-Level Expression of A *Bacillus subtilis* Mannanase Gene in *Escherichia coli*. Kweun, Min A¹, Ji Young Shon¹, and Ki-Hong Yoon^{1,2*}. ¹School of Applied Food and Nutritional Science, ²Bioresource and Application Research Center, Woosong University, 17-2, Jayang-dong, Dong-gu, Daejeon 300-718, Korea – The gene coding for mannanase from *Bacillus subtilis* WL-7, a number of glycosyl hydrolase family 26, was hyperexpressed in *Escherichia coli*. Two recombinant plasmids, pE7MAN and pENS7, were constructed by introducing the complete mannanase gene and the mature mannanase gene lacking *N*-terminal signal peptide region into an expression vector pET24a(+), respectively. The level of mannanase produced by *E. coli* BL21 (DE3) carrying pENS7, which included the mature mannanase gene, was considerably higher than that by *E. coli* BL21 (DE3)/pE7MAN. Almost mannanase produced by the recombinant *E. coli* carrying pENS7 at growth temperature of 37°C existed as inactive enzyme of insoluble form. Growth at temperature below 31°C increased the soluble fraction of mannanase having catalytic activity in the recombinant *E. coli* cells. The highest productivity of active mannanase was observed in cell-free extract of the recombinant *E. coli* grown at growth temperature ranging from 25°C to 28°C, while mannanase activity per soluble protein of the cell-free extract was highest in the cells grown at 31°C.

Key words: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, high expression, mannanase, signal peptide

Mannan 다당류는 xylan과 함께 목재의 hemicellulose를 이루는 주요 구성물질이며, 다수의 콩과식물 종자의 배유와 일부 비두과류 식물의 완숙한 종자에 존재한다. 이러한 자연계의 mannan성 물질은 구성 당 사이에 β -1,4 결합이 직쇄결합을 이루며 당의 종류에 따라 다음의 4 가지로 구분된다. 상아 야자나무의 열매에서 존재하는 순수 mannan은 직쇄결합이 오직 mannose로 구성되며, 끈약의 glucomannan은 직쇄결합이 mannose와 일정량의 glucose로 이루어져 있다. Galactomannan은 순수 mannan에 galactose가 측쇄로 결합되어 있고 콩과식물의 종자에 많이 존재하며, 연질목의 주성분인 galactoglucomannan은 glucomannan에 galactose가 각각 측쇄로 결합되어 있다[3]. 이들 β -mannan성 다당류는 구성 당의 종류와 양에 차이는 있지만 물에 대한 강한 결합력을 가지고 있어 높은 점성을 가진다[16].

β -Mannan 다당류의 분해에 관여하는 효소로는 내부를 무작위적으로 절단하여 mannobiose와 mannooligomer를 생산하는 반응을 촉매하는 β -1,4-mannanase(β -mannanase)와 β -mannanase 분해산물을 기질로 하여 mannose를 생산하는 β -1,4-mannosidase 및 galactose 측쇄결합을 절단하는 α -galactosidase가 있다. 이들 효소중에서 β -mannanase

(mannanase)는 mannan 다당류를 분해하는데 있어서 중요한 역할을 담당한다. Mannanase는 고등식물, 동물과 미생물에서 발견되고 있지만, 미생물의 효소가 산업적 응용면에서 주목을 받고 있다. 현재까지 *Bacillus*[12], *Clostridium*[14], *Cellulomonas*[20] 등을 포함하는 15 속의 세균 균주들과 *Trichoderma*[9], *Aspergillus*[7] 등을 포함하는 5속의 곰팡이 균주들로부터 mannanase 유전자가 크로닝되어 그 염기서열이 결정되었다. 이들의 염기서열에서 추론되는 아미노산 배열의 상동성에 따라 glycosyl hydrolase family 5 또는 26에 속하며, 가수분해 활성을 갖는 하나의 domain으로 구성된 효소와 활성 domain과 함께 다른 기능을 갖는 domains로 구성된 효소가 있다. *Bacillus*속에서는 mannanase를 생산하는 여러 균주가 분리되었으며 이들은 locust bean gum(LBG)이나 끈약과 같은 mannan 다당류에 의해 효소 생산성이 증가된다. 분리균의 대부분이 *B. subtilis*로 알려져 있으며[17], 호알칼리성 *Bacillus*속 균주도 보고되었다[2].

전통 발효식품인 된장으로부터 mannanase의 생산균으로 분리된 WL-7 균주는 형태적 특성, 생화학적 성질 및 16S rRNA 염기서열(GenBank accession No AY601722)에 따라 *Bacillus subtilis*로 동정되었으며[15], mannanase 유전자의 염기서열(GenBank accession No AY601725)도 *B. subtilis* 168의 유전자(GenBank accession No Z99107)와 유사도가 매우 높은 것으로 밝혀졌다. 본 연구에서는 대장균에서 *B. subtilis* WL-7 mannanase 유전자의 과잉 발현에 미치는

*Corresponding author

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

E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

signal peptide의 영향을 조사하고, 배양온도에 따른 발현량과 효소활성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주와 플라스미드 및 배양

B. subtilis WL-7은 유전자 제공원으로 사용되었고 유전자 조작을 위한 숙주균으로는 *E. coli* XL-1 blue(*hsdR17 supE44 recA1 endA1 gyrA46 relA1 thi lac F[proAB⁺ lac^f lacZΔM15::Tn10 (tet^r)*]), mannanase의 과잉발현을 위해서는 *E. coli* BL21(DE3)(F⁻ *ompT hadSB(r_B⁻ m_B⁻), gal dcm(DE3))를 각각 사용되었다. 플라스미드 pET24a(+)는 mannanase 유전자의 과잉발현을 위한 유전자 운반체로 사용되었다. 재조합 플라스미드를 함유한 *E. coli* BL21(DE3)로부터 mannanase를 과잉 발현하기 위해서는 kanamycin (50 μg/ml)을 첨가한 LB 액체배지(yeast extract, 5 g; tryptone, 10 g; NaCl, 5 g; water, 1 liter)를 사용하였으며, 평판배지에서 자란 콜로니를 항생제를 첨가한 LB에 접종하여 37°C에서 하룻밤 전배양한 후, 동일배지 100 ml을 함유한 baffled flask에 전배양액을 1%가 되도록 접종하고 흡광도(OD₆₀₀)가 0.5~0.6에 도달했을 때 IPTG를 0.5 mM이 되도록 첨가하여 배양하였다.*

DNA 분리과 조작

*E. coli*에서 플라스미드의 분리와 유전자 조작은 일반적인 방법에 준하여 행하였으며[19], *E. coli*의 형질전환은 Hanahan 방법에 의해 실시하였다[10]. Mannanase 유전자의 증합연쇄 반응(PCR)을 위해서는 *B. subtilis* WL-7의 총 염색체 DNA를 주형으로 하여 염기서열에 근거하여 제작한 primers를 사용하였다. PCR 반응액은 template DNA(30 ng), 10 mM Tris(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 30 pmol primers와 4 U Pfu DNA polymerase로 구성되었으며, 94°C에서 4분간 열처리한 후 95°C에서 60초, 58°C에서 30초, 72°C에서 3분간 반응을 30회 반복하고 최종적으로 72°C에서 10분간 방치하여 mannanase 유전자 단편을 증폭하였다.

Mannanase 활성 측정

Mannanase 활성은 LBG을 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3, 5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법[18]으로 다음과 같이 정량 함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1%(w/v) LBG 용액 0.5 ml와 200 mM sodium phosphate(pH 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 사용하여 동일 조건에서 발색시켜 조사한 흡광

도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit은 위의 조건에서 1분 동안 LBG로부터 1 μmol의 mannose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 단백질 정량을 위해서는 Bio-rad사의 protein assay kit를 사용하였다.

활성 염색

대장균 형질전환주의 균체 파쇄액을 SDS-PAGE한 후, polyacrylamide gel을 renaturation 완충용액(25% propanol, 50 mM sodium citrate(pH 6.0))으로 15분씩 3회 세척하여 SDS를 제거하였다. 이를 다시 50 mM sodium citrate(pH 6.0)로 15분씩 3회 세척한 후 polyacrylamide gel 위에 mannanase의 기질로 0.1% 곤낙과 효소 반응 완충용액 50 mM sodium citrate(pH 6.0)를 함유한 agarose gel을 중층하여 50°C에서 2시간 반응하였다[4]. 반응이 끝난 후 polyacrylamide gel은 단백질 염색을 하였으며, 중층한 agarose gel은 congo red 용액에 담구어 15분 염색한 후 1 M NaCl 용액으로 탈색하여 mannanase 활성 염색을 수행하였다.

결과 및 고찰

Mannanase 과잉발현을 위한 재조합 플라스미드 제조

B. subtilis WL-7의 mannanase는 균체외로 분비 생산되는 효소로 362 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, 아미노 말단 부분의 26 아미노산 잔기가 signal peptide로 작용한 것으로 알려진 *Bacillus* sp. 5H의 mannanase[12]와 아미노산 배열의 상동성이 95%로 알려졌다(GenBank accession No AY601725). *B. subtilis* WL-7의 mannanase 유전자를 함유한 대장균 형질전환주에서 균체외로 분비 생산된 mannanase는 *Bacillus* sp. 5H에서 정제된 효소와 동일한 아미노 말단 배열을 하고 있어 대장균에서 mannanase 분비시 signal peptide의 동일한 위치에서 절단이 일어나는 것으로 확인되었다(data not shown). *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*의 mannanase도 32 아미노산 잔기가 signal peptide이며 재조합 대장균에서 생산된 효소도 동일한 지점에서 절단되는 것으로 보고되었다[6]. 한편, 세포외로 분비되는 외래 효소 유전자를 대장균에서 발현시킬 때 signal peptide의 존재여부에 따라 발현량에 큰 차이가 있는 경우가 많은 것으로 알려져 있는데, *Pseudomonas diminuta*의 glutaryl 7-aminocephalosporanic acid(GL 7-ACA) acylase 유전자를 발현시킬 때 signal peptide를 제거할 경우 효소의 발현량이 매우 증가된 것으로 밝혀졌다[13].

따라서 WL-7의 mannanase 유전자를 대장균에서 과잉 발현시키기 위해 signal peptide의 존재에 따른 생산성 정도를 검토할 필요가 있으므로 signal peptide를 포함한 유전자와 포함하지 않은 유전자를 발현용 유전자 운반체인 pET24a(+)

에 도입하였다. WL-7의 mannanase 유전자 증폭하기 위해서 사용된 primers는 3가지이며 MP1 primer는 5'-TCTCAAGCTTAATGAATGGGGGAGTTGCATATG-3' (upper primer for pE7MAN: *Hind*III and *Nde*I sites; underlined), MP3 primer는 5'-TCATATGCATACTGTGTCGCCTGTGAA-3'(upper primer for pENS7: *Nde*I site; underlined), MP2 primer는 5'-GCACCTTCTAGATTGTGACATTACGGATTCA-3'(lower primer for pE7MAN and pENS7: *Xba*I site; underlined)의 염기서열로 각각 구성되었다. WL-7 mannanase 유전자의 개시코돈이 TTG로 보고 되었는데, MP1과 MP3 primers에는 개시코돈으로 ATG와 pET24a(+)⁺에 도입하기 위한 *Nde*I 절단위치를 갖는 염기서열을 각각 도입하였다. Signal peptide를 포함하는 유전자를 증폭하기 위해서는 MP1과 MP2 primers, signal peptide가 없는 유전자를 증폭하기 위해서는 MP3와 MP2 primers를 각각 사용하였으며, *Pfu* DNA polymerase로 PCR을 수행하였다. MP1과 MP2로 증폭된 DNA는 *Hind*III와 *Xba*I로 절단하여 동일한 효소로 절단된 pUC19에 도입하였으며, MP3와 MP2로 증폭된 DNA는 *Hinc*II로 절단된 pUC19에 도입하여 각각 재조합 플라스미드를 제조한 후 염기서열을 결정하여 예상되는 mannanase의 유전자가 도입된 것을 확인하였다. 이들 재조합 플라스미드를 각각 *Nde*I과 *Bam*HI로 절단하여 얻은 mannanase 유전자 단편을 동일한 효소로 절단한 pET24a(+)⁺에 최종적으로 각각 도입함으로써 Fig. 1에 보인바와 같이 재조합 플라스미드를 제조하였다. pE7MAN에는 signal peptide를 지닌 mannanase 유전자가

도입되었으며, pENS7에는 signal peptide가 없는 mannanase 유전자가 도입되었다.

Mannanase 발현에 미치는 signal peptide의 영향

Signal peptide가 mannanase 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 재조합 플라스미드 pE7MAN과 pENS7로 *E. coli* BL21(DE3)를 각각 형질전환하였다. 배양온도를 37°C로 하고 대장균 형질전환주를 LB배지에 배양하여 IPTG를 첨가하여 4시간 배양한 후 mannanase 생산성을 조사하였다. pE7MAN과 pENS7의 형질전환주의 배양상등액에 존재하는 효소활성은 각각 34.3 U/ml과 0.2 U/ml로 확인되었는데 이는 pE7MAN에는 signal peptide를 지니고 있는 mannanase 유전자가 도입되어 있어 효소의 일부가 균체외로 분비되나, pENS7에는 signal peptide 부분이 제거되어 균체외로 분비되지 않은 때문으로 판단된다. 균체 파쇄상등액의 활성은 pE7MAN과 pENS7의 형질전환주가 각각 37.3 U/ml과 74.8 U/ml로 나타났다. 따라서 signal peptide가 있는 경우에는 균체내와 균체외에 각각 50% 정도씩 존재하며, signal peptide가 없는 경우에는 생성된 mannanase의 대부분이 균체내에 존재하는 것을 알 수 있다. *Bacillus* sp. 5H의 mannanase를 함유한 재조합 대장균에서 생산된 mannanase의 97%가 periplasm에 존재하며 균체외에서는 효소활성이 탐지되지 않았고[12], 재조합 대장균에서 생산된 *Bacillus* sp. AM-001의 mannanase는 균체외(5%), periplasm(53%), cytoplasm(42%)에 각각 존재하는 것으로 보고되었다[1].

대장균 형질전환주가 생산하는 mannanase의 발현량을 분석하기 위해 IPTG를 처리한 후 2시간을 배양하고 배양상등액과 균체파쇄액을 SDS-PAGE로 조사하였다. 그 결과 배양상등액에는 pE7MAN과 pENS7의 형질전환주에 관계 없이 IPTG에 의해 유도발현된 mannanase 단백질이 양이 매우 적었다(data not shown). 균체파쇄액에는 pE7MAN의 경우 IPTG 첨가에 의해 유도발현된 mannanase 단백질량의 차이는 매우 미미하였으나, pENS7의 경우에 IPTG를 첨가하지 않았을 때보다 첨가한 후에 mannanase가 과량 존재하였다(Fig. 2).

B. stearothermophilus[8]와 *Pseudomonas fluorescens*[5]의 mannanase 유전자도 signal peptide를 제거하고 발현 vector에 도입하였을 때 재조합 대장균에서 IPTG에 의해 과잉 발현된 것으로 알려졌다. 또한, *P. fluorescens*의 mannanase는 signal peptide를 제거하지 않은 경우 재조합 대장균에서 생산된 mannanase 활성의 70% 정도가 periplasm에서 관찰되었으며 signal peptide를 제거하였을 경우에는 periplasm에서 98% 수준의 효소활성을 보인 것으로 나타났다. Signal peptide가 제거된 mannanase가 재조합 대장균에서 periplasm에 높은 활성으로 존재하는 것은 mannanase 단백질 내부의 소수성 잔기에 의해 α-나선구조

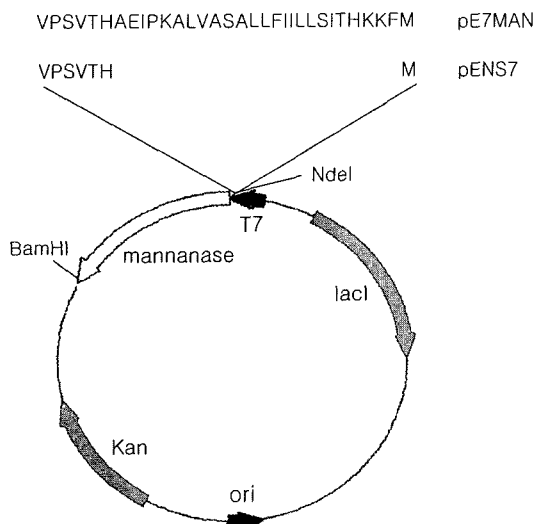


Fig. 1. Structure of expression plasmids pE7MAN and pENS7 containing the mannanase gene with or without N-terminal signal peptide region. The 5'-terminus of inserted gene on the recombinant plasmids was presented by the corresponding amino acid sequence. The restriction enzyme sites for introducing the mannanase gene into pET24a(+)⁺ were indicated only. The arrows indicate the direction of transcription.

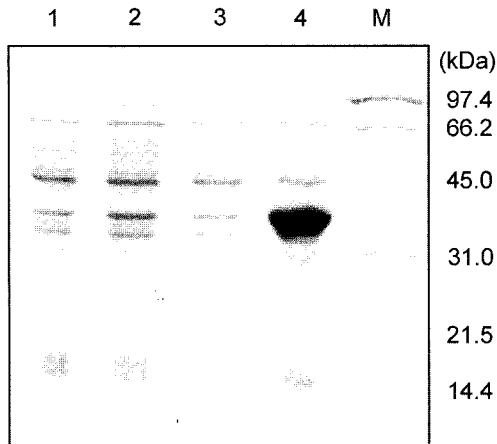


Fig. 2. SDS-PAGE of the cell extracts of *E. coli* BL21 (DE3) carrying pE7MAN or pENS7. The recombinant cells carrying pE7MAN (lane 1 and 2) and pENS7 (lane 3 and 4) were grown at 37°C for 0 h (lane 1 and 3) and 2 h (lane 2 and 4), respectively, after inducing the mannanase gene with 0.5 mM IPTG. A mixture of standard proteins was run in flanking lane M. The molecular mass was represented to the right side of the gel.

가 형성되어 세포내막을 통과한 때문인 것으로 보고되었다. 그러므로 pE7MAN의 형질전환주에서 생산된 mannanase가 pENS7의 형질전환주와는 달리 균체외부에 존재하는 효소 활성이 높은 것은 재조합 대장균에서 생산된 효소 중 periplasm에 존재하는 효소의 일부가 원심분리하는 과정에서 배양상등액으로 누출된 때문일 수도 있지만, 균체내 효소활성이 높은 pENS7의 형질전환주에서는 동일한 조건으로 원심분리하여 얻은 배양상등액에 효소활성이 거의 관찰되지 않은 것으로 보아 pE7MAN를 함유한 재조합 균주의 배양상등액에서 관찰된 효소활성은 periplasm에 존재하는 효소의 누출에 의한 것으로 볼 수 없다. 그러나 현 단계의 실험결과로는 이에 대한 정확한 결론을 내릴 수 없을 것으로 여겨진다.

한편 SDS-PAGE로 볼 때 pENS7의 형질전환주에서는 IPTG에 의해 발현된 mannanase 단백질량은 매우 많은 양인데 비해 효소활성은 이에 상응할 정도로 높지 않으므로 pENS7의 형질전환주에서 생산된 mannanase가 모두 활성을 갖는 효소는 아닐 것으로 판단되어 균체파쇄액으로부터 수용성 단백질과 불용성 단백질을 SDS-PAGE로 분석하였다. 그 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 IPTG에 의해 과잉발현된 mannanase는 주로 불용성 단백질이며 수용성 단백질로 존재하는 것이 매우 소량으로 확인되었다. 이로써 signal peptide가 없을 경우 mannanase의 발현량은 높으나 불용성 형태로 존재하여 생성된 단백질량에 비해 효소 활성은 낮은 것으로 판단된다.

배양온도에 따른 mannanase의 생산성

pENS7을 함유한 *E. coli* BL21(DE3)에서 mannanase 발현량이 높으나 불용성 단백질량이 많으므로 mannanase의 수

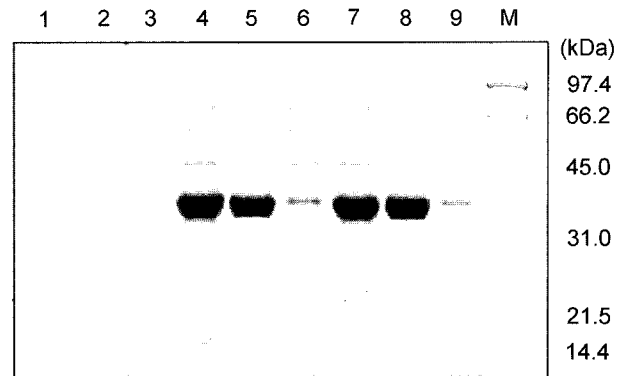


Fig. 3. SDS-PAGE of the cell extracts of *E. coli* BL21 (DE3) carrying pENS7 grown at 37°C. The total (lane 1, 4, and 7), insoluble (lane 2, 5, and 8), and soluble (lane 3, 6, and 9) fractions of cell extracts were prepared from recombinant *E. coli* cells grown for 0 h (lanes; 1~3), 2 h (lanes; 4~6), and 4 h (lanes; 7~9) after induction of mannanase gene with IPTG. A mixture of standard proteins was run in flanking lane M. The molecular mass was represented to the right side of the gel.

용화 정도를 높이기 위해 여러 배양온도에서 IPTG에 의해 발현된 mannanase의 단백질량과 효소활성을 조사하였다. pENS7의 형질전환주를 37°C, 34°C, 31°C, 28°C, 25°C, 21°C에서 배양하면서 각각 IPTG첨가 후 4시간 동안 배양하여 얻은 균체파쇄액과 균체파쇄액의 수용성 단백질과 불용성 단백질을 각각 SDS-PAGE로 분석하였다(Fig. 4). 배양온도가 낮아질수록 수용성 단백질에 존재하는 mannanase의 양이 증가하는 것으로 나타났으며 28°C 이하에서는 불용성 단백질에 존재하는 mannanase의 양이 급격히 감소하였다. 활성염색 결과 mannanase 활성 단백질이 배양온도 34°C, 37°C에서는 균체파쇄액의 불용성 단백질부분이 수용성 부분보다 많았으나, 31°C 이하에서는 수용성 단백질에서 mannanase 활성정도가 높아졌다.

배양시간에 따른 균체파쇄액의 수용성 단백질에 존재하는 효소활성을 조사한 결과 배양시간에 따라 mannanase 활성이 증가하였는데, 25°C~28°C의 배양온도에서 가장 높은 활성을 보여 IPTG 처리 후 4시간에 배양액 부피 기준으로 약 600 U/ml의 생산성을 나타냈다(Fig. 5). 이와 같은 재조합 대장균의 mannanase 생산성은 LBG가 첨가된 LB 배지에서 배양하였을 때 확인된 *B. subtilis* WL-7의 최대 효소생산성인 224 U/ml에 비해[15] 약 2배 이상 높았다. 이러한 결과로 보아 signal peptide를 제거하고 적정온도(25°C~28°C)에서 과잉발현을 유도할 경우 활성을 갖는 mannanase를 대량으로 얻을 수 있음이 확인되었다. *Cellvibrio japonicus*의 mannanases 유전자를 함유한 재조합 대장균도 30°C에서 배양하였을 때 IPTG에 의해 과잉발현된 것으로 나타났다[11].

한편 IPTG를 첨가하고 4시간 배양한 후 균체파쇄액의 수용성 단백질량을 기준으로 mannanase 비활성을 조사하였을 때는 배양온도 31°C에서 가장 비활성이 높은 것으로 나타났

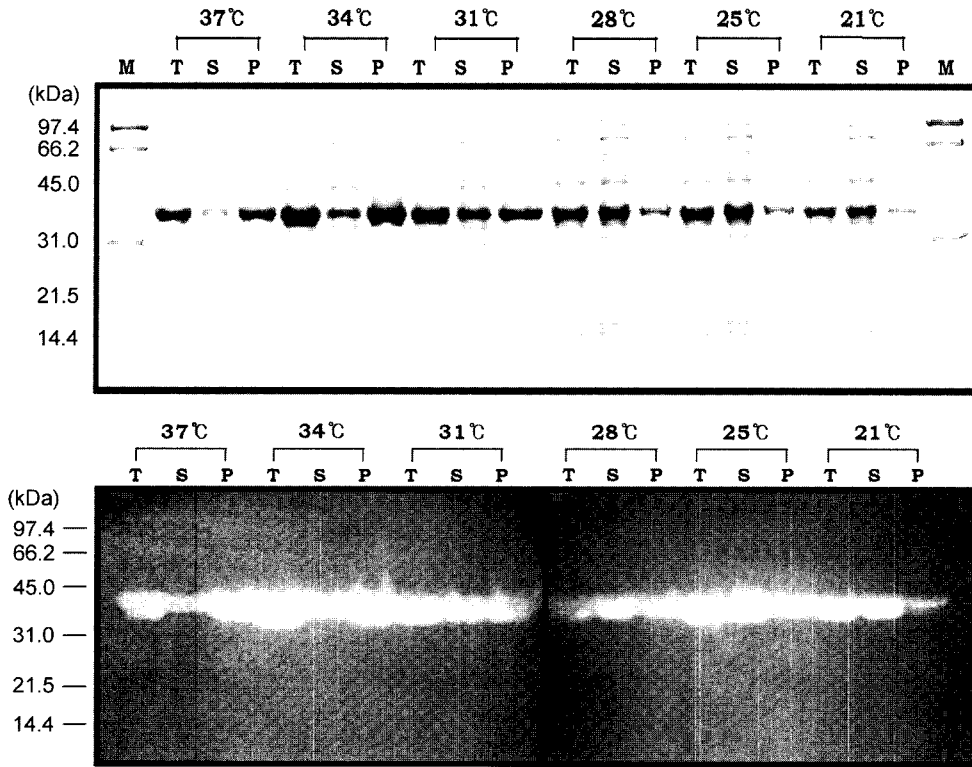


Fig. 4. SDS-PAGE (upper) and mannase zymogram (lower) of the cell extracts of recombinant *E. coli* BL21 (DE3)/pENS7. The total (lane T), soluble (lane S), and insoluble (lane P) fractions of cell extracts were prepared from recombinant *E. coli* cells grown at different growth temperatures for 4 h after induction of mannase gene with IPTG. Molecular size of standard proteins (lane M) was indicated to the left side of gel.

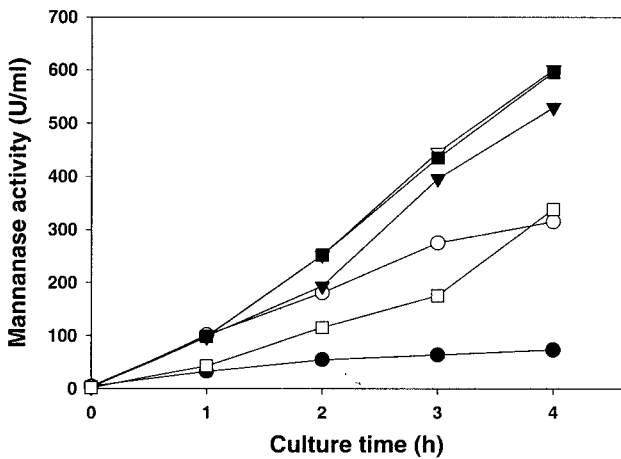


Fig. 5. Mannanase productivity of *E. coli* BL21 (DE3) carrying a recombinant plasmid pENS7. The enzyme productivity was determined by measuring mannase activity of cell extracts of the recombinant *E. coli* incubated for various times at growth temperatures such as 21°C (-□-), 25°C (-■-), 28°C (-▽-), 31°C (-▼-), 34°C (-○-), and 37°C (-●-). The incubation times were counted after addition of IPTG into the culture.

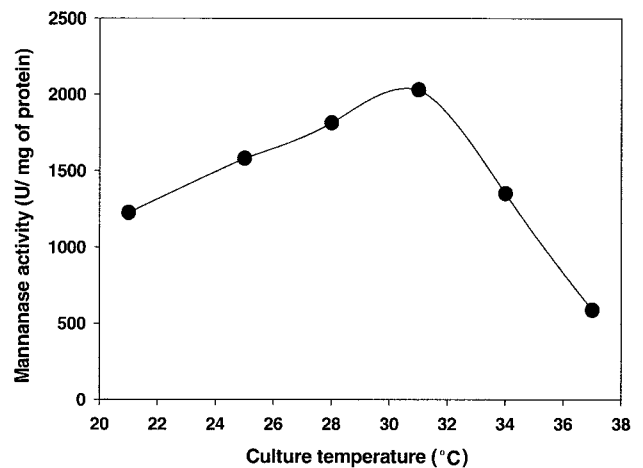


Fig. 6. Effects of growth temperature on mannase productivity of *E. coli* BL21 (DE3) carrying pENS7. The enzyme productivity was determined by measuring mannase activity according to total amount of proteins in cell-free extracts of recombinant *E. coli* grown at different growth temperatures for 4 h after inducing the mannase gene with 0.5 mM IPTG.

는데, 이는 상대적으로 31°C에서 배양된 균체과쇄액에 수용성 단백질량이 적었기 때문이다(Fig. 6). 31°C의 배양온도에서 25°C나 28°C 배양온도에서 보다 수용성 단백질량이 적

은 것은 IPTG를 처리한 후 mannase의 과잉발현에 따라 균의 성장정도가 25°C와 28°C보다 31°C에서 더 많은 저해를 받은 때문으로 판단되며, 34°C와 37°C에서 배양된 균체

과색의 수용성 단백질의 양도 25°C와 28°C에서 배양된 것에 비해서 적은 것으로 나타났다. *P. diminuta*의 GL 7-ACA acylase도 signal peptide를 제거하여 IPTG로 발현시켰을 때 재조합 대장균의 배양온도를 31°C로 하였을 때 가장 높은 비활성을 갖는 것으로 알려졌다[13].

요 약

Glycosyl hydrolase family 26에 속하는 *Bacillus subtilis* WL-7 mannanase를 코딩하는 유전자를 대장균에서 과잉 발현하였다. 아미노 말단의 signal peptide를 포함하거나 포함하지 않은 mannanase 유전자를 각각 pET24a(+)에 도입하여 재조합 플라스미드 pE7MAN과 pENS7를 제조하였다. 이들 플라스미드를 함유하는 *Escherichia coli* BL21(DE3)에서 mannanase를 발현시킨 결과 signal peptide가 제거된 mannanase 유전자의 발현량이 매우 높았다. 그러나 배양온도 37°C에서 pENS7를 함유한 재조합 대장균에서 과잉 발현된 mannanase는 대부분이 불활성 형태로 존재하였으며, 배양온도를 31°C이하로 하였을 때 수용화 형태의 효소량이 증가하면서 효소활성이 높아졌다. IPTG에 의해 발현된 재조합 대장균의 균체과색 상층액 중에 존재하는 mannanase 활성은 배양온도 25°C~28°C에서 가장 높았으며, 전체 단백질량을 기준으로 볼 때는 배양온도 31°C에서 비활성이 가장 높은 것으로 확인되었다.

REFERENCES

1. Akino, T., C. Kato, and K. Horikoshi. 1989. The cloned β -mannanase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. AM-001 produces two β -mannanases in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **152**: 10-15.
2. Akino, T., N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1988. Characterization of three β -mannanases of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 773-779.
3. Avigad, G. and P. M. Dey. 1997. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrate, pp. 143-204. In P. M. Dey and J. B. Harborne (eds.), *Plant Biochemistry*, Academic Press, San Diego and London.
4. Beguin, P. 1983. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using congo red-stained agar replicas. *Anal. Biochem.* **131**: 333-336.
5. Bolam, D. N., N. Hughes, R. Virden, J. H. Lakey, G. P. Hazlewood, B. Henrissat, K. L. Braithwaite, and H. J. Gilbert. 1996. Mannanase A from *Pseudomonas fluorescens* spp. cellulosa is a retaining glycosyl hydrolase in which E212 and E320 are the putative catalytic residues. *Biochem.* **35**: 16195-16204.
6. Cann, I. K., S. Kocherginskaya, M. R. King, B. A. White, and R. I. Mackie. 1999. Molecular cloning, sequencing, and expression of a novel multidomain mannanase gene from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*. *J. Bacteriol.* **181**: 1643-1651.
7. Christgau, S., S. Kauppinen, J. Vind, L. -V. Koffod, and H. Dalboge. 1994. Expression cloning, purification and characterization of a β -1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **33**: 917-925.
8. Ethier, N., G. Talbot, and J. Sygusch. 1998. Gene cloning, DNA sequencing, and expression of thermostable β -mannanase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4428-4432.
9. Hagglund, P., T. Eriksson, A. Collen, W. Nerinckx, M. Claeysens, and H. Stalbrand. 2003. A cellulose-binding module of the *Trichoderma reesei* β -mannanase Man5A increases the mannan-hydrolysis of complex substrates. *J. Biotechnol.* **101**: 37-48.
10. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
11. Hogg, D., G. Pell, P. Dupree, F. Goubet, S. M. Martin-Orue, S. Armand, and H. J. Gilbert. 2003. The modular architecture of *Cellvibrio japonicus* mannanases in glycoside hydrolase families 5 and 26 points to differences in their role in mannan degradation. *Biochem. J.* **371**: 1027-1043.
12. Khanongnuch, C., T. Ooi, and S. Kinoshita. 1999. Cloning and nucleotide sequence of β -mannanase and cellulase genes from *Bacillus* sp. 5H. *Wor. J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 249-258.
13. Kim, D.-W. and K.-H. Yoon. 2001. Cloning and high expression of glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase gene from *Pseudomonas diminuta*. *Biotechnol. Lett.* **23**: 1067-1071.
14. Kurokawa, J., E. Hemjinda, T. Arai, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2001. Sequence of the *Clostridium thermocellum* mannanase gene man26B and characterization of the translated product. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 548-554.
15. Kweun, M. A., H. S. Kim, M. -S. Lee, J. H. Choi, and K. -H. Yoon. 2003. Mannanase production by a soybean isolate, *Bacillus subtilis* WL-7. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 277-283.
16. McCleary, B. V. 1998. β -D-mannanases. *Methods Enzymol.* **160**: 596-610.
17. Mendoza, N. S., M. Arai, T. Kawaguchi, T. Yoshida, and L. M. Josen. 1994. Purification and properties of mannanase from *Bacillus subtilis*. *Wor. J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 551-556.
18. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
19. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
20. Stoll, D., A. Boraston, H. Stalbrand, B. W. McLean, D. G. Kilburn, and R. A. J. Warren. 2000. Mannanase Man26A from *Cellulomonas fimi* has a mannan-binding module. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**: 265-269.

(Received Aug. 10, 2004/Accepted Sep. 6, 2004)