

## *Paenibacillus woosongensis*의 만난분해 효소활성

윤기홍

우송대학교 식품생물학과

### Mannanolytic Enzyme Activity of *Paenibacillus woosongensis*

Ki-Hong Yoon

Department of Food Science and Biotechnology, Woosong University, Daejeon 300-718, Republic of Korea

(Received November 11, 2010/Accepted November 24, 2010)

The activities of mannanase,  $\beta$ -mannosidase, and  $\alpha$ -galactosidase were detected in culture filtrate of *Paenibacillus woosongensis* showing mannanolytic activity for locust bean gum. Optimal conditions occurred at pH 5.5 and 60°C for mannanase toward locust bean gum, pH 6.5 and 50°C for  $\beta$ -mannosidase toward *para*-nitrophenyl- $\beta$ -D-mannopyranoside, and pH 6.0-6.5 and 50°C for  $\alpha$ -galactosidase toward *para*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside in the culture filtrate, respectively. The mannanolytic enzyme of culture filtrate hydrolyzed mannobiose as well as manno-oligosaccharides including mannotriose, mannotetraose, mannopentaose and mannohexaose. It could also hydrolyze  $\alpha$ -1,6 linked galacto-oligosaccharides such as melibiose, raffinose and stachyose to liberate galactose residue. From these results, it is assumed that *P. woosongensis* produces three enzymes required for the complete decomposition of galactomannan.

**Keywords:**  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -mannosidase, mannanase, *P. woosongensis*

Mannan 다당류는 xylan과 함께 목재의 hemicellulose를 이루는 주요 구성물질이며, 다수의 콩과식물 종자의 배유와 일부 비두과류 식물의 완숙한 종자에도 존재한다. 그 구성당의 성분과 결합형태에 따라 mannan, glucomannan, galactomannan과 galactoglucomann으로 구별되며 이들 중 galactomannan은 생산량이 가장 많고 식품이나 사료산업에서 이용되는 guar gum, locust bean gum (LBG), tara gum, soybean meal, palm kernel meal, copra meal 및 sesame meal에 존재한다.  $\beta$ -1,4 결합의 mannose 다당류에  $\alpha$ -1,6 결합형 galactose가 측쇄로 구성되어 있는 galactomannan은 그 종류에 따라 mannose 대비 galactose 함량이 1~5.3 비율로 서로 다르다. 목재의 세포벽이나 작물에 존재하는 galactomannan을 단당류 또는 저당류로 전환할 경우 미생물이나 동물이 이용할 수 있게 되어 바이오매스로부터 바이오에너지 생산이나 사료효율을 향상시키는 효과를 가져온다(14). Galactomannan의 분해에 관계하는 효소로는 내부를 무작위적으로 절단하여 mannobiose와 manno-oligosaccharides로 전환하는 반응을 촉매하는  $\beta$ -1,4-mannanase (mannanase)와 mannanase 분해산물을 기질로 하여 mannose를 생산하는  $\beta$ -1,4-mannosidase 및 galactose 측쇄의 결합을 절단하는  $\alpha$ -galactosidase가 있다. Galactomannan에 존재하는

galactose 측쇄는 mannanase의 가수분해 반응에 영향을 미치므로(15) galactomannan의 효과적인 분해를 위해서는 mannose 간의  $\beta$ -1,4 결합을 분해하는 mannanase와  $\beta$ -1,4-mannosidase 뿐 아니라  $\alpha$ -galactosidase도 중요한 역할을 한다.

최근에 mannan 다당류를 분해하는 효소 중 mannanase에 대한 연구가 활발히 진행되고 있어 세균과 곰팡이에서 다수의 효소와 그 유전자에 대한 특성이 규명되었고 산업적으로 생산되는 단계에 진입하였으며 주로 사료효율을 높이기 위해 사용되고 있다(14).  $\alpha$ -Galactosidase도 다수의 미생물에서 분리되었으며 산업적으로 생산되고 있는데 제당산업에서 당밀에 함유된 raffinose를 제거하여 sucrose의 회수율을 높이는 효과가 있으며(4), 두과류에 존재하는 raffinose와 stachyose를 분해하므로 콩을 원료로 사용하는 식품이나 사료에 활용되는 효소이다(7). 이에 비해  $\beta$ -1,4-mannosidase에 대한 연구는 곰팡이와 초고온성 세균 등 제한된 미생물에서 이루어졌다(5, 12). *Paenibacillus*는 1993년도에 새로운 속으로 분류된 미생물로 현재까지 100 종 이상이 알려져 있으며 이들 중 다수의 균종이 섬유계 물질 분해능을 갖는 것으로 보고되었다. *P. woosongensis* KCTC 3953 (DSM 16972)은 xylan 분해능을 갖는 신규주로 분리되었으며 xylan 분해효소뿐 아니라 cellulose와 mannan의 분해능도 보이는 것으로 확인되었다(11). *Paenibacillus* 속의 균주 중 mannan 분해효소에 대한 연구로는 *Paenibacillus* sp. BME-

\* For correspondence. E-mail: ykh@wsu.ac.kr; Tel: +82-42-630-9742; Fax: +82-42-636-2676

14와 *P. polymyxa* GS01의 mannanase에 관한 것만이 보고되었다(1, 3). 본 연구에서는 *P. woosongensis*의 배양액에 존재하는 mannan 분해에 관여하는 효소들의 활성을 조사하였다.

### *P. woosongensis*가 생산하는 mannan 분해효소

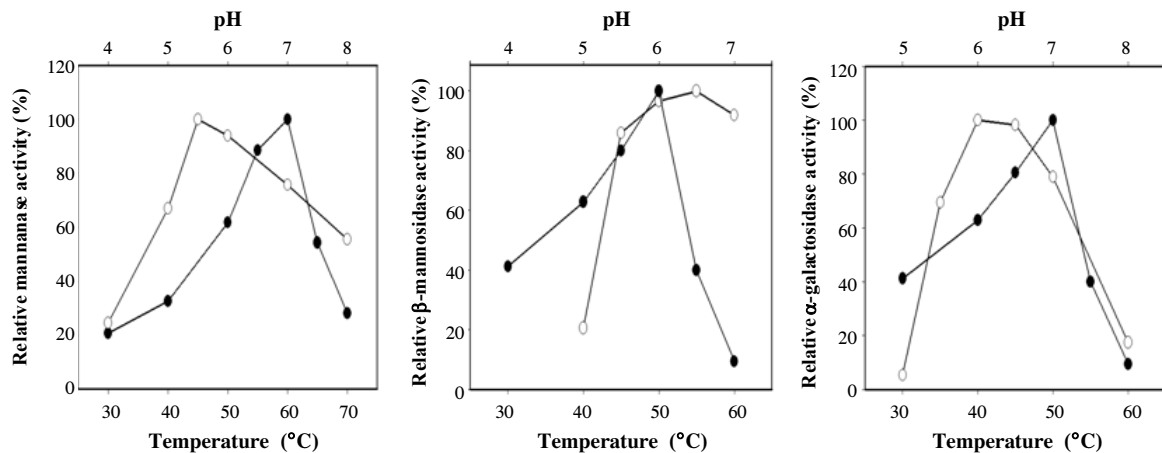
*P. woosongensis*는 LB 배지에서는 성장이 저조하며 tryptic soy broth (TSB)에서 성장이 우수하다. 배지에 mannan 다당류를 첨가하였을 때 mannanase의 생산성이 증가된다고 보고된 바 있으므로(10) *P. woosongensis*가 생산하는 mannan 분해에 관여하는 효소를 조사하기 위해 guar gum과 LBG를 TSB에 첨가하여 배양한 결과 *Bacillus* 속 균주는 달리 LBG를 첨가하였을 때 보다 guar gum을 첨가하였을 때 mannan 분해효소의 생산능이 높은 것으로 나타나 guar gum (0.4%)을 첨가한 배지를 사용하여 37°C에서 24시간 진탕배양한 후 배양상등액을 회수하였다. 배양상등액을 ammonium sulfate (25%-80%)로 처리하여 침전된 단백질을 10 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)에 현탁한 후 이를 동일 완충용액에 투석하고 효소반응의 조효소액으로 사용하였다. 효소반응의 기질로 mannanase는 LBG,  $\alpha$ -galactosidase는 *para*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (pNP $\alpha$ G) 그리고  $\beta$ -mannosidase는 *para*-nitrophenyl- $\beta$ -D-mannopyranoside (pNP $\beta$ M)를 각각 사용하였다. Mannanase 활성은 증류수에 현탁 시킨 1% (w/v) LBG 용액 0.5 ml와 적정 pH의 50 mM 완충용액 및 조효소액을 포함하는 반응액(1 ml)을 적정 온도에서 15분 동안 반응시킨 후 3, 5-dinitrosalicylic acid시약 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하고 540 nm에서 흡광도를 측정하여 방출된 환원당을 결정함으로써 측정하였다(15).  $\alpha$ -Galactosidase와  $\beta$ -mannosidase 활성은 0.5 mM 기질과 적정 pH의 50 mM 완충용액을 포함한 반응액에 효소를 첨가하여 적정온도에서 10분간 반응시킨 후 반응액의 2배 부피의 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 첨가하여 반응을 종결시키고 405 nm에서 흡광도를 측정

함으로써 결정하였다(9). 효소활성도는 1분 동안 1  $\mu$ mol의 반응산물을 생산하는 효소량을 1 unit로 결정하였다.

반응온도와 pH를 달리하여 조효소액 중에 존재하는 효소활성을 조사한 결과 조효소액에서 mannanase,  $\beta$ -mannosidase와  $\alpha$ -galactosidase 활성이 모두 관찰되어 이들 효소가 모두 균체 외로 분비되는 효소로 추정되지만, 배양 중 균체가 파괴되어 배양액에 존재할 수도 있으므로 균체의 효소라고 확신할 수는 없다. 실제 미생물 유래 mannanases는 대부분 균체의 분비효소로 알려져 있는데 비해  $\alpha$ -galactosidase (13)와  $\beta$ -mannosidase (5)의 경우는 곰팡이에서는 균체외로 분비 생산되는 경우가 많지만 세균에서는 균체내 또는 균체에 결합된 상태로 존재하는 경우가 다수인 것으로 보고되었다(8, 12). 조효소액의 mannanase는 pH 5.5와 60°C,  $\beta$ -mannosidase는 pH 6.5와 50°C 그리고  $\alpha$ -galactosidase는 pH 6.0-6.5, 50°C에서 최대 반응활성을 나타냈다(Fig. 1). 조효소액의 mannanase는 pH 4.5에서 최대 활성을 보이는 *Paenibacillus* sp. BME-14의 mannanase와 최적반응 온도가 동일하며, 50°C-70°C와 pH 5.0-6.5에서 최대활성을 보이는 다수의 *Bacillus* 속 균주 유래의 mannanase와 유사한 반응특성을 보였다(15).  $\beta$ -Mannosidase 활성은 초고온성 세균이나(12) 곰팡이(5) 유래의  $\beta$ -mannosidases에 비해 최적반응 온도가 낮은 중온에서 높으며,  $\alpha$ -galactosidase 활성도 동일한 특성을 보였다. 이와 같은 중온성 효소로는 *C. meningosepticum* YB-29 (9)의  $\beta$ -mannosidase 및 *Carnobacterium piscicola* (2)의  $\alpha$ -galactosidases가 알려졌다.

### 반응산물의 분석

조효소액에서 3가지 효소활성이 관찰되었는데, mannanase의 경우는 실제 기질이 사용되었지만,  $\beta$ -mannosidase와  $\alpha$ -galactosidase의 경우는 합성기질을 사용하였으므로 이들의 실제 기질에 대한 분해능이 있는지 조사하였다.  $\alpha$ -Galactosidase의 기질로 melibiose, raffinose와 stachyose,  $\beta$ -mannosidase의

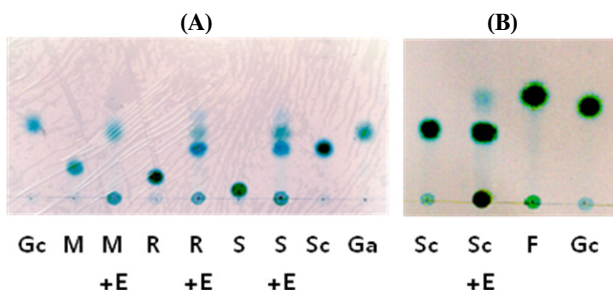


**Fig. 1.** Effects of reaction temperatures and pHs on mannanase (left),  $\beta$ -mannosidase (center) and  $\alpha$ -galactosidase (right) activities of crude enzyme in culture filtrate of *P. woosongensis*. Temperature profiles (●) were obtained by measuring the mannanase activities at pH 6.0 and different temperatures. The pH profiles (○) were obtained by measuring the mannanase activities at various pH's with the optimal temperatures for each enzyme. Buffers (50 mM) used were as follows: sodium citrate (pH 4-6), and sodium phosphate (pH 6-8). Error ranges were within 10% for each activity.

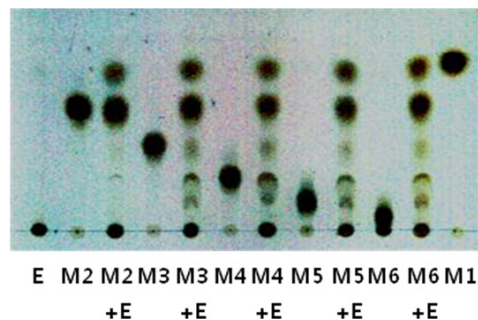
기질로는 manno-oligosaccharides가 각각 0.5%가 되도록 사용되었다. 효소반응은 효소의 열변성을 방지하기 위해 40°C에서 실시하였으며, 반응액의 pH는 6.5로 하여 4시간 반응을 수행하였다. 반응 후에 반응액을 3분 동안 95°C에서 열처리한 후 원심 분리하여 단백질을 침전물을 제거하고 상등액을 적정량 취해 chloroform, acetic acid와 증류수[4.3:5:0.7, (v/v)] 혼합용액을 전개용액으로 하여 silica gel-precoated thin layer plate (Merck Kieselgel, No. 5748)에서 박층 크로마토그래피를 수행하였다. 전개된 물질을 발색시키기 위해서는 9 ml ethanol, 0.5 ml *p*-anisaldehyde, 0.5 ml sulfuric acid와 glacial acetate 몇 방울을 혼합한 발색제 용액을 뿌린 후, 120°C에서 10분간 방치하였다. 그 결과 galactose와 glucose가  $\alpha$ -1,6 결합을 이루고 있는 melibiose는 galactose와 glucose로 완전히 분해되었고, galactose와 sucrose의 glucose 잔기간에  $\alpha$ -1,6 결합을 이루고 있는 삼당류인 raffinose도 galactose와 sucrose로 완전히 가수분해되었다. 또한 galactose가 raffinose의 galactose 잔기에  $\alpha$ -1,6 결합을 하고 있는 stachyose도 반응 후 완전히 분해되어 최종 반응산물로 galactose와 sucrose가 생성되었으며 특히 raffinose에 비해 galactose의 양이 많이 생성되었다. 이는 stachyose가 raffinose에 비해 galactose 잔기를 1개 더 보유하므로 이것이 분해되어 생성되었기 때문이다. 따라서 *P. woosongensis*가 생산하는  $\alpha$ -galactosidase는 galactose와 glucose간의  $\alpha$ -1,6 결합 뿐만 아니라 galactose간의  $\alpha$ -1,6 결합도 완전히 가수분해한다는 것을 알 수 있다(Fig. 2A). 이에 비해 *C. josui* (8)에 의해 생산된  $\alpha$ -galactosidases는 melibiose, raffinose, stachyose를 가수분해하지만 완전히 가수분해하지는 못하는 것으로 보고되었다. 한편 raffinose와 stachyose의 분해산물 중 galactose와 sucrose 외에 한 개의 반응산물이 적은 양으로 존재하였는데 이는  $\alpha$ -galactosidase에 의해 생성된 sucrose가 조효소액에 존재하는 다른 효소에 의해 더 분해되어 생성된 물질인 것으로 판단되므로 sucrose를 동일조건에서 조효소액으로 가수분해한 후 반응산물을 조사한 결과 대부분의 sucrose가 분해되지 않았으나 fructose와 유사한 이동도를 보이는 반응산물이 적은 양 관찰되었다(Fig. 2B). 이로 보아 stachyose와 raffinose의 분해물에

서 관찰된 소량의 물질은  $\alpha$ -galactosidase에 의해 분해되어 생성된 sucrose가 조효소액에 존재하는 다른 효소에 의해 fructose로 분해되는 것임을 알 수 있다. 그러나 sucrose 분해산물로 fructose와 함께 glucose가 관찰되어야 하는데 특별히 관찰되지 않은 것은 분해산물의 양이 적고 fructose와 glucose의 이동도 차이가 크지 않아 TLC 상에서 두 당의 구분되기 어려웠기 때문으로 여겨진다.

Manno-oligosaccharides도 조효소액에 의해 분해 되어 최종 분해산물에서 mannose가 관찰되었다(Fig. 3). Mannobiose의 분해산물로 monnose가 생성되었지만 상당량의 monnobiase가 분해되지 않고 잔존하였는데 이는 효소활성이 낮거나 반응시간이 충분하지 않은 때문일 수 있으며 최종반응 산물인 mannose가 분해반응을 저해하기 때문일 수도 있다. Mannanase는 pNP  $\beta$ M을 분해하지 못할 뿐 아니라 mannobiose의 분해능이 없으므로 mannobiose의 분해산물로 생성된 mannose는 조효소액 중에 존재하는  $\beta$ -mannosidase에 의한 것으로 판단된다. Mannotriose, mannotetraose, mannopentaose와 mannohexaose의 가수분해 산물에서는 기질로 사용된 각 저당류가 분해되지 않고 남아 있는 양이 매우 적으며 대부분이 mannobiose와 mannose로 분해되는 것으로 나타났다. 이들 기질은 mannanase에 의해서도 분해될 수 있는 것으로 알려져 있는데, mannanase의 종류에 따라 중합도가 낮은 mannotriose의 분해력이 없거나 매우 낮으며 이에 비해 중합도가 높은 manno-oligosaccharides의 분해능이 우수하다(15). 따라서 이들 저당류의 분해에는  $\beta$ -mannosidase 뿐 아니라 mannanase도 관여하였으리라 여겨진다. 또한 mannotriose의 분해산물에서 mannotetraose 및 mannopentaose와 동일한 이동도를 갖는 물질이 관찰되었고 mannotetraose의 분해산물에서도 mannopentaose가 관찰되었으며 mannobiose 분해산물에서는 mannotriose와 mannotetraose로 판단되는 물질이 매우 적은 양 존재하였다. 이들 반응산물은 반응에 사용된 기질보다 중합도가 높으므로 *P. woosongensis*가 생산하는 mannanase 또는  $\beta$ -mannosidase에 의한 당전이 반응의 산물로 추측된다. 이러한 당 전이반응은 mannanase에 다수 보고되었다(6). 본 연구를 통해 *P. woosongensis*가 생산하는 효



**Fig. 2.** Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of  $\alpha$ -galactooligosaccharides (A) and sucrose (B) with crude enzyme of the culture filtrate. The reaction mixtures containing the crude enzyme and sugars such as melibiose, raffinose, stachyose and sucrose in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) were incubated for 4 h at 40°C. In both panels, Gc, Ga, M, R, S and Sc stand for glucose, galactose, melibiose, raffinose, stachylose, and sucrose, respectively.



**Fig. 3.** Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of  $\beta$ -1,4-linked manno-oligosaccharides with crude enzyme of the culture filtrate. The reaction mixtures containing the crude enzyme and manno-oligosaccharides in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) were incubated for 4 h at 40°C. M1 to M6 represent mannose to mannohexaose; E, crude enzyme.

소를 정제하지는 않았지만, 배양상등액에서 galactomannan의 분해에 관여하는 3종류의 효소활성이 모두 관찰되었으며, 특히  $\beta$ -mannosidase와  $\alpha$ -galactosidase의 효소 활성은 *Paenibacillus* 속 균주에서 처음 보고된 것이다.

## 적요

만난의 분해활성을 갖는 *Paenibacillus woosongensis*의 배양 상등액으로부터 mannanase,  $\beta$ -mannosidase와  $\alpha$ -galactosidase 활성이 관찰되었다. 배양상등액 내의 locust bean gum를 분해하는 mannanase는 pH 5.5와 60°C, *para*-nitrophenyl- $\beta$ -D-mannopyranoside를 분해하는  $\beta$ -mannosidase는 pH 6.5, 50°C, *para*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside를 분해하는  $\alpha$ -galactosidase는 pH 6.0-6.5와 50°C에서 각각 최대활성을 보였다. 배양상등액의 만난 분해효소는 mannotriose, mannopentaose, mannopentaose, mannohexaose와 같은 만노올리고당을 분해할 뿐 아니라 mannobiose도 분해하였다. 또한 melibiose, raffinose, stachyose 등의  $\alpha$ -1,6 결합형 galacto-oligosaccharides를 분해하여 galactose를 생성하였다. 이러한 결과로 보아 *P. woosongensis*는 galactomannan을 완전히 분해하는데 필요한 3종류 효소를 모두 생산하는 것으로 판단된다.

## 참고문헌

1. Cho, K.M., S.Y. Hong, S.M. Lee, Y.H. Kim, G.G. Kahng, H. Kim, and H.D. Yun. 2006. A cel44C-man26A gene of endophytic *Paenibacillus polymyxa* GS01 has multi-glycosyl hydrolases in two catalytic domains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 618-630.
2. Coombs, J. and J.E. Brenchley. 2001. Characterization of two new glycosyl hydrolases from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* strain BA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5094-5099.
3. Fu, X., X. Huang, P. Liu, L. Lin, G. Wu, C. Li, C. Feng, and Y. Hong. 2010. Cloning and characterization of a novel mannanase from *Paenibacillus* sp. BME-14. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 518-524.
4. Ganter, C., A. Bock, P. Buckel, and R. Mattes. 1988. Production

- of thermostable recombinant  $\alpha$ -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. *J. Biotechnol.* 8, 301-310.
5. Gomes, J., K. Terler, R. Kratzer, E. Kainz, and W. Steiner. 2007. Production of thermostable  $\beta$ -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: Isolation, partial purification and characterization of the enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 969-975.
6. Harjunpaa, V., J. Helin, A. Koivula, M. Siika-aho, and T. Drakenberg. 1999. A comparative study of two retaining enzymes of *Trichoderma reesei*: transglycosylation of oligosaccharides catalysed by the cellobiohydrolase I, Cel7A, and the L-mannanase, Man5A. *FEBS Lett.* 443, 149-153.
7. Irish, G.G., G.W. Barbour, H.L. Classen, R.T. Tyler, and M.R. Bedford. 1995. Removal of the  $\alpha$ -galactosides of sucrose from soybean meal using either ethanol extraction or exogenous  $\alpha$ -galactosidase and broiler performance. *Poult. Sci.* 74, 1484-1494.
8. Jindou, S., K. Shuichi, F. Emi, F. Tsuchiyoshi, H. Hidenori, K. Tetsuya, S. Kazuo, and O. Kunio. 2002.  $\alpha$ -Galactosidase Aga27A, an enzymatic component of the *Clostridium josui* cellulosome. *J. Bacteriol.* 184, 600-604.
9. Kim, H.S. and K.H. Yoon. 2004. Isolation of *Chryseobacterium meningosepticum* producing  $\beta$ -mannosidase from a mudfish. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 371-374.
10. 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.
11. Lee, J.C. and K.H. Yoon. 2008. *Paenibacillus woosongensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 612-616.
12. Parker, K.N., S.R. Chhabra, D. Lam, W. Callen, G.D. Duffaud, M.A. Snead, J.M. Short, E.J. Mathur, and R.M. Kelly. 2001. Galactomannanases Man2 and Man5 from *Thermotoga* species: Growth physiology on galactomannans, gene sequence analysis, and biochemical properties of recombinant enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 75, 322-333.
13. Shankar, S.K. and V.H. Mulimani. 2007.  $\alpha$ -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 98, 958-961.
14. Wang, H., H. Luo, J. Li, Y. Bai, H. Huang, P. Shi, Y. Fan, and B. Yao. 2010. An  $\alpha$ -galactosidase from an acidophilic *Bispora* sp. MEY-1 strain acts synergistically with  $\beta$ -mannanase. *Bioresour. Technol.* 101, 8376-8382.
15. Yoon, K.H., S. Chung, and B.L. Lim. 2008. Characterization of the *Bacillus subtilis* W-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* 46, 344-349.