

재조합 대장균으로부터 생산된 *Bacillus* 속 균주 유래 Mannanases의 내산성과 열안정성 비교

전호진 · 윤기홍*

우송대학교 바이오식품과학전공

Comparison of Acidic pH and Temperature Stabilities between Two *Bacillus* Mannanases Produced from Recombinant *Escherichia coli*

Ho Jin Jeon and Ki-Hong Yoon*

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

(Received September 3, 2014 / Accepted September 29, 2014)

Two genes encoding the mannanase of *Bacillus* sp. YB-1401 and *B. amyloliquefaciens* YB-1402, which had been isolated at acidic pH as mannanase producers, were each cloned into *Escherichia coli*, and sequenced. Both mannanase genes consisted of 1,080 nucleotides, encoding polypeptides of 360 amino acid residues. The deduced amino acid sequences of the two mannanase genes differed by four amino acid residues different, and were highly homologous to those of mannanases belonging to the glycosyl hydrolase family 26. Comparison of two mannanases produced from recombinant *E. coli* indicated that His-tagged mannanase of YB-1402 (HtMAN1402) was more stable than that of YB-1401 at acidic pH and high temperature. In particular, HtMAN1402 retained more than 50% of its activity at pH 3.0 after 4 h of pre-incubation, suggesting the enzyme is a valuable candidate for use as a feed additive. In addition, thermostability of the two mannanases was found to be enhanced by Ca^{2+} ions.

Keywords: *Bacillus*, acidic pH, mannanase gene, stability

β -1,4-Endo-mannanase (mannanase)는 mannan, glucomannan과 galactomannan의 mannose간의 β -1,4-mannosyl 결합을 무작위적으로 분해하여 mannooligosaccharides (MOS)로 전환시키는 효소로 동물, 식물과 미생물에서 두루 발견되는 효소이며, 1990년대 이후부터 이에 대한 연구가 본격적으로 이루어지기 시작하였다. Mannanase는 펄프와 제지 표백공정, 바이오매스 자원의 당화공정, 올리고당 생산, 커피 가공공정을 비롯하여 세제와 사료첨가용 효소로 활용되고 있어 산업적 가치가 크다 (Dhawan and Kaur, 2007). 특히 곰팡이와 세균 유래의 mannanases는 특성이 다양하므로 산업적으로 활용하기 적합한 성질을 갖는 효소를 개발하기에 적합하며 산성, 알칼리성, 내열성 또는 호냉성 효소 등이 탐색되었다(Huang *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2013; Vijayalaxmi *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013). 현재까지 알려진 mannanases는 아미노산 배열의 유사성에 따라 glycosyl hydrolase family (GH) 5와 26에 속하는데, *Alicyclobacillus acidocaldarius*로부터 GH113에 속하는 mannanase가 보고되기도 하였다(Zhang *et al.*, 2008). GH26에는 주로 세균성 효소가 대부분을 차지하

고, GH5에는 진핵세포 유래 또는 세균 유래 효소가 포함된 것으로 알려져 있으며, 또한 mannanase는 활성 domain 만으로 구성된 것(Yoon and Lim, 2007)과 carbohydrate binding domain을 비롯한 여러 개의 기능영역이 함께 존재하는 것이 있다(Sunna, 2010). 최근에는 MOS가 장내 유익한 미생물의 성장을 촉진하고 장관의 치료효과를 보이는 것으로 알려지면서(Srivastava and Kapoor, 2014; Zhang *et al.*, 2014) glucomannan이나 galactomannan을 mannanase로 분해하여 MOS 또는 glucomannooligosaccharides를 생산하고자 하는 연구도 활발히 진행되고 있으며(Ghosh *et al.*, 2013), 또한 장관내에서 반섬유소 사료 성분을 분해하여 사료효율을 높이는 효과가 있어 양계와 양돈용 효소로서 활용이 증대되고 있다(Kim *et al.*, 2013). 식품가공과 사료 첨가용 효소로 활용되기 위해서는 산성조건에서 활성과 안정성이 우수한 것이 바람직하며 이러한 면에서 *Aspergillus*, *Trichoderma*와 *Penicillium*속 곰팡이 유래의 mannanase는 유익한 특성을 갖는 것으로 보고되었다(Morreira and Filho, 2008).

세균성 mannanase는 주로 중성 또는 약산성(pH 5.5-7.0)에서 활성이 높고 pH 5-11 범위에서 안정성이 높은 경우가 많으며(Jiang *et al.*, 2006; Summpunn *et al.*, 2011), 한편 알칼리 조건에서 활성과 안정성이 우수한 *Bacillus* 속 균주 유래의 mannanase

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

Table 1. Primers used for cloning mannanase genes

Names	Sequences	Restriction site
ManF1	5'-CACACCGTTWSI <u>CCCGTCAACCCAAAT</u> -3'	
ManR1	5'-CGTCAAGAACCCGCGTTCATATTC-3'	
MP11	5'-TTGTTTAAGAAACATACGATCTCTTT-3'	
MP21	5'-TCAACGATTGGCGTTAAAGAATCG-3'	
pmi-2	5'-CATRTGTTTCACWTTGWAAGGGGAG-3'	
Manaf-R	5'-GATTTCCCTTYAGGAAATCCGTCCT-3'	
ManEX-F	5'-CAACATATGCACACCGTTTATCCCGTCAACC-3'	<i>NdeI</i> (underlined)
ManEX-R11	5'-ATGCTCGAGTTCGCGTATCGGCGTCAAGGA-3'	<i>XhoI</i> (underlined)
ManEX-R20	5'-ATGCTCGAGTTCGCGGATCGGCGTCAAGGA-3'	<i>XhoI</i> (underlined)

도 보고되었다(Hatada *et al.*, 2005). 산성 조건에서 우수한 특성을 갖는 세균성 mannanase의 개발을 위해 내산성 균주의 탐색과 변이효소 개발이 진행되고 있으며, 최적 반응 pH가 산성쪽으로 변화하고 산성 pH에서 안정성이 증가된 *B. subtilis* B10-02 유래 mannanase의 변이체가 보고되었다(Xu *et al.*, 2013).

또한 효소의 활용성을 높이기 위해 내열성 mannanase 개발에 대한 연구도 진행되고 있다(Chauhan *et al.*, 2014). Cellulose binding module (CBM)은 *Aspergillus nidulans* 유래 mannanase의 내열성에 기여하며(Lu *et al.*, 2014), *Clostridium thermocellum* (Ghosh *et al.*, 2013), *Streptomyces thermolilacinus*과 *Thermobifida fusca* (Kumagai *et al.*, 2011) 유래의 mannanases는 Ca²⁺ 이온을 비롯한 2가 금속이온에 의해 내열성이 증가된다고 알려졌다. 그리고 Zn²⁺ 이온에 의해 내열성이 증가되는 *B. subtilis* Z-2 유래 mannanase의 Zn²⁺ 이온과 결합하는 아미노산 잔기가 확인된 바 있다(Yan *et al.*, 2008). 본 연구에서는 최근에 산성조건에서 된 장으로부터 분리된 2종류의 *Bacillus* 균주로부터 (Jeon and Yoon, 2014; Yoon, 2014) mannanase 유전자의 염기서열 및 재조합 대장균이 생산하는 mannanase의 내열성과 내산성을 비교하였다.

재료 및 방법

사용균주와 플라스미드 및 배양

된장으로부터 산성조건에서 성장하는 균으로 분리된 *Bacillus* sp. YB-1401과 *B. amyloliquefaciens* YB-1402가 mannanase 유전자 제공원으로 사용되었으며, 유전자 클로닝을 위해서는 *Escherichia coli* DH5α와 T-blunt vector (Solgent, Korea), mannanase 유전자의 과잉발현을 위해서는 *E. coli* BL21(DE3)과 pET23a(+)가 각각 사용되었다. Mannanase 유전자 증폭을 위해 사용된 primers는 Table 1에 나타낸 바와 같다. 균의 배양을 위해서는 LB 배지(yeast extract, 5 g; tryptone, 10 g; NaCl, 5 g; water, 1 L)가 사용되었고 형질전환주는 ampicillin (100 µg/ml)이 첨가된 LB 배지에서 배양하였다.

Mannanase 유전자의 클로닝

B. subtilis WL-3 (Yoon and Lim, 2007)과 WL-7 (Kweun *et al.*, 2004a) 유래 mannanases 구조유전자 내부의 개시와 말단 지역

부근에 해당하는 염기서열로 제작된 primers ManF1과 ManR1 및 MP11과 MP21을 *Bacillus* sp. YB-1401과 *B. amyloliquefaciens* YB-1402의 mannanase 유전자를 증폭하기 위해 사용하였고, 전체 구조유전자를 클로닝하기 위해서는 *B. subtilis* WL-3 유래 mannanase 구조유전자의 주변지역의 염기서열을 갖는 primers pmi-2와 Manaf-R을 사용하였다. Mannanase 유전자를 증폭하기 위해서 genomic DNA prep kit (Solgent)로 분리한 YB-1401과 YB-1402의 총 유전체 DNA를 주형으로 하고 primers MP11/MP21과 ManF1/ManR1 및 pmi-2/Manaf-R을 각각 사용하여 pfu-X DNA polymerase로 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 95°C에서 3분간 열처리한 후 95°C에서 30초, 57°C에서 40초, 72°C에서 1분간 반응을 30회 반복하고 최종적으로 72°C에서 10분간 방치하여 수행하였다. Primers pmi-2/Manaf-R로 증폭된 DNA는 T-blunt vector와 ligation 시킨 후 *Escherichia coli* DH5α에 도입하고 0.5% locust bean gum과 ampicillin (100 µg/ml)이 첨가된 LB 평판배지에서 배양한 후 0.2% congo red 용액으로 염색하여 분해환을 보이는 형질전환주를 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-tag가 연결되도록 pET23a(+)의 *NdeI*과 *XhoI* 사이에 유전자를 도입하기 위해 3종류의 primers를 제조하였다. Primers ManEX-F는 아미노 말단 부위에 해당하며 *NdeI* 절단위치를 포함하고, ManEX-R11과 ManEX-R20는 카르복시 말단 부분으로 *XhoI* 절단위치가 포함되었다. ManEX-F/ManEX-R11과 ManEX-F/ManEX-R20으로 YB-1401과 YB-1402의 mannanase 유전자를 각각 증폭한 후 *NdeI*과 *XhoI*으로 절단하여 얻은 DNA 단편을 동일한 효소로 처리한 pET23a(+)에 도입하여 재조합 플라스미드 pMSP11과 pMSP20을 각각 제조하였다. 이들 재조합 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)에 도입하여 얻은 형질전환주를 이용하여 mannanase 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 30°C에서 진탕 배양하면서 흡광도(OD₆₀₀)가 0.6에 도달했을 때 IPTG를 1.0 mM이 되도록 첨가하였다. 25°C

에서 5시간 추가로 진탕 배양하고 배양액을 원심분리 하였으며 배양균체를 8 ml의 cell lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 현탁하여 초음파 파쇄한 후 원심분리하여 균체파쇄상등액을 회수하였다. 이를 동일한 완충액으로 평형화 시킨 Ni-NTA 컬럼에 넣은 후 washing buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)로 세척하였다. His-tagged mannanase를 250 mM imidazole을 함유한 완충액으로 추출하고 각 분획의 mannanase 활성을 측정 후 활성이 높은 분획을 골라 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)에서 투석하여 효소액으로 사용하였다.

Mannanase의 안정성 분석

Mannanase 활성측정을 위해서는 LBG를 기질로 사용하였으며, 반응액 pH는 5.5, 반응온도는 55°C로 하여 15분 동안 반응을 수행한 후에 유리된 환원당을 3, 5-dinitrosalicylic acid 방법으로 정량함으로써 측정하였으며(Miller *et al.*, 1960), 효소 활성도 1.0 unit은 1분 동안 LBG로부터 1 µmol의 mannose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 온도가 mannanase의 안정성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 효소액을 51-55°C 범위에서 시간을 달리하여 방치한 후 잔존활성을 측정하였다. 또한 pH에 대한 효소 안정성은 pH 3.0-4.0 범위의 100 mM sodium citrate 완충액에 효소를 첨가한 후 시간을 달리하여 방치하면서 잔존활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Mannanase 유전자 클로닝과 염기서열

Bacillus sp. YB-1401과 *B. amyloliquefaciens* YB-1402가 생산하는 mannanase는 활성염색 결과 그 크기가 약 38 kDa 정도로 분석되었으며(Jeon and Yoon, 2014; Yoon, 2014), 이와 유사한 크기를 갖는 *B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens*를 비롯한 다수의 *Bacillus* 속 균주 유래 mannanases의 아미노산 배열간 상동성을 분석한 결과 *B. subtilis* WL-3과 *B. subtilis* WL-7 유래의 mannanases를 각각 포함하는 2개군에 속하는 것이 대부분으로 나타났다. 따라서 이들 균주 유래 mannanases 유전자의 염기서열에 근거하여 primers를 제조하였다. 우선 YB-1401과 YB-1402의 mannanase가 어느 것과 유사한지 알 수 없으므로 *B. subtilis* WL-7 mannanase 서열에 근거한 MP11/MP21과 *B. subtilis* WL-3 서열에 근거한 ManF1/ManR1으로 PCR을 수행한 결과 ManF1/ManR1을 사용하였을 때 YB-1401과 YB-1402 균주에서 모두 약 1.0 kb 크기의 DNA 단편이 증폭되었으나, MP11/MP21을 사용하였을 때는 증폭된 DNA가 없었다. 이로 보아 YB-1401과 YB-1402는 *B. subtilis* WL-3의 mannanase 유전자와 상동성이 높을 것으로 예측되었다.

이들 mannanases의 완전한 구조유전자를 클로닝 하기 위해 *B. subtilis* WL-3의 mannanase 주변 유전자의 서열에 따라 설계한 primers pmi-2와 Manaf-R을 사용하여 PCR을 수행함으로써 1.4 kb 크기의 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 DNA 단편을 직접 염기서열을 결정하고 동시에 T-blunt vector에 클로닝하였다.

그 결과 YB-1401과 YB-1402의 mannanase 구조유전자는 동일하게 360 아미노산 잔기의 효소를 코드하는 1,080 염기로 배열되어 있으며, stop codon은 TAA로 확인되었다. YB-1401의 mannanase (MAN1401)와 YB-1402의 mannanase (MAN1402) 간 유전자의 염기서열은 12개 잔기가 다른 것으로 확인되었으며, 여러 종류의 *B. amyloliquefaciens* (GenBank accession no. GQ859480, HG328253, CP006890, CP007244, GQ859481, CP000560, CP006845)와 *B. subtilis* (HQ902141, DQ167409) 균주의 mannanase 유전자와 염기서열 상동성이 98% 이상으로 나타났다. 클로닝된 유전자의 염기서열로부터 추론된 MAN1401과 MAN1402의 아미노산 서열은 4개 아미노산 잔기가 서로 다른 것으로 나타났으며, 유전체 분석으로 추정된 것은 제외하고 클로닝된 유전자로부터 유추된 다른 균주의 mannanase와 비교하였을 때 동일한 것은 없었지만, 95% 이상의 상동성을 보이는 경우가 많았다. 또한 아미노산 배열의 차이는 주로 signal peptide와 카르복시 말단 영역에서 나타났다(Fig. 1).

재조합 대장균이 생산하는 mannanase의 정제

*B. subtilis*의 mannanase 유전자의 signal peptide를 제거한 상태에서는 T7 promoter하에서 IPTG에 의해 과잉 발현이 유도되지만 signal peptide 부분을 제거하지 않았을 때 발현율이 매우 낮은 것으로 알려졌다(Kweun *et al.*, 2004b). 그러므로 MAN1401과 MAN1402의 유전자를 재조합 대장균에서 과잉발현을 하기 위해 signal peptide 영역에 해당하는 부분을 제거한 유전자를 pET23a의 T7 promoter 하단에 도입하였으며, 동시에 생산된 효소의 정제과정을 단순화하기 위해 카르복시 말단에 His tag이 연결되도록 pET23a에 도입하여 재조합 플라스미드를 제조하였다. MAN1401과 MAN1402과 유사도가 높은 *B. subtilis* NM-39의 mannanase는 아미노 말단의 24개 잔기가 signal peptide로 확인된 바 있으며(Mendoza *et al.*, 1995), 유사도가 낮은 *B. subtilis* WL-7 (Kweun *et al.*, 2004a)의 mannanase는 26개 잔기가 signal peptide로 알려졌다. 따라서 아미노 말단의 24개 아미노산을 제외한 상태로 PCR을 수행하기 위해 ManEX-F primer를 제조하였으며 이 서열에 부분은 MAN1401과 MAN1402의 유전자 서열이 동일하다. 그러나 카르복시 말단의 유전자는 차이가 있으므로 ManEX-R11과 ManEX-R20를 각각 제조하였다. MAN1401의 유전자는 ManEX-F/ManEX-R11, MAN1402의 유전자는 ManEX-F/ManEX-R20으로 각각 증폭이 가능하였으며, 최종적으로 제조된 재조합 플라스미드 pMSP11과 pMSP20으로 *E. coli* BL21(DE3)를 형질전환하였다.

E. coli BL21(DE3) 형질전환주를 배양하여 IPTG로 mannanase 유전자의 과잉발현을 유도한 결과 배양온도를 37°C로 하였을 때는 발현된 단백질이 대부분 불용성 단백질로 존재하였으며, IPTG를 첨가한 후 25°C로 배양하였을 때는 수용성 단백질로 발현된 mannanase의 양이 증가한 것으로 나타났다(결과 미제시). 이러한 현상은 T7 promoter를 이용하여 외래 유전자를 과잉 발현시킬 때 많이 나타나는 현상으로 보고된 바 있다(Kweun *et al.*, 2004b). 재조합 대장균에서 생산된 His-tagged MAN1401 (HtMAN1401)과 His-tagged MAN1402 (HtMAN1402)는 Ni-NTA 컬럼 크로마

토그래피를 통해 정제하여 효소 안정성을 비교 조사하였다.

재조합 대장균이 생산하는 mannanase의 pH 안정성 비교

Bacillus sp. YB-1401과 *B. amyloliquefaciens* YB-1402의 배양상등액을 ammonium sulfate로 처리하여 얻은 조효소액으로 mannanase의 열안정성과 pH 안정성을 분석하였을 때 MAN1402가 MAN1401보다 산성 pH에서 안정성과 열안정성이 높은 것으로 보고되었다(Jeon and Yoon, 2014; Yoon, 2014). 특히 pH 3.0에서 1시간 동안 방치하였을 때 MAN1402는 실패되지 않은 반면 MAN1401은 약 50% 이상이 실패되는 것으로 알려졌다. 이들 효소간의 안정성의 차이는 Fig. 1에 보인 바와 같이 오직 4개 잔기만의 차이에서 유래된다고 할 수 있다.

재조합 대장균으로부터 생산된 HtMAN11과 HtMAN20은

pH 4.0에서 4시간 동안 방치하였을 때 활성을 100% 유지하였으며 이는 MAN11과 MAN20의 결과와도 일치한다(Fig. 2). pH 3.5에서 HtMAN1402는 4시간 방치 후에 약 80%의 활성을 유지하였으며 HtMAN1401은 방치시간에 따라 상당량이 실패되어 2시간 방치하였을 때 약 50%, 4시간 방치 후에는 약 40% 활성을 유지하였다. 또한 pH 3.0에서는 방치시간에 따라 HtMAN1401이 급격히 실패되어 40분만에 잔존활성이 약 50%, 1시간 후에는 약 39% 정도를 유지하였다. 반면에 HtMAN1402는 pH 3.0에서 1시간 후에는 85% 이상, 4시간 방치 후에도 50% 이상의 잔존활성을 보였다. 이로 보아 카르복실 말단에 6개 His 잔기가 융합되어 있지만 HtMAN1402는 HtMAN1401보다 산성에서 안정성이 높은 것은 기존에 *Bacillus* 균주에서 생산된 MAN1402가 MAN1401보다 내산성이 높은 결과와 일치한다고 하겠다. 이로

YB2	<u>MLKKLAVCLSI</u> VL LL LLGAA SP ISAHTVYPVNPNAQQTTKDIMNWL LA HLN PR NS EN RVMSGAFGGYSDVTF SM TEENRLK NA TGQSPAIYGC	66
YB1	*****	66
SB4	***** <u>I</u> *** <u>IS</u> * <u>R</u> ***** <u>V</u> *****	66
CC6	*****	66
CC1	*** <u>R</u> *****	66
KC6	***** <u>L</u> *****	66
NT7	***** <u>T</u> *****	66
SP2	*****	66
TC8	*** <u>R</u> *****	66
NM3	*****	66
YB2	<u>DYGRGWLETADIT</u> DSIDYSCNSSLI SY W KS GGLPQVSLHLANPAFP SG NYKTAISNSQYKNILDPSTVEGKRLEALLSKIADGLTQLK NQ	156
YB1	*****	156
SB4	***** <u>S</u> ***** <u>H</u> ***** <u>N</u> ***** <u>R</u> *****	156
CC6	***** <u>T</u> *****	156
CC1	***** <u>N</u> *****	156
KC6	***** <u>T</u> *****	156
NT7	***** <u>E</u> * <u>T</u> *****	156
SP2	***** <u>T</u> *****	156
TC8	*****	156
NM3	***** <u>T</u> * <u>C</u> *****	156
YB2	<u>GVTVLF</u> RPLHEMNGEWF FW GLTGY N QKDN ER ISLYKELYK KI RYMTE T RGLDNL L WVYSPDANRDFK T DFYPGSSYVDITGLDAY F TDP	246
YB1	***** <u>T</u> *****	246
SB4	***** <u>T</u> *****	246
CC6	***** <u>S</u> *****	246
CC1	***** <u>T</u> *****	246
KC6	***** <u>T</u> *****	246
NT7	*****	246
SP2	***** <u>T</u> *****	246
TC8	*****	246
NM3	*****	246
YB2	<u>Y</u> AISGYDEMLSLK KP FAFAE T GPSGNIGSFDYAAF I NAIRQKYPETTY F L T WDEQLSPAANLGAQALYQNSW T LNKGEI W NGGSL T PIAE	336
YB1	***** <u>Q</u> *** <u>S</u> ***** <u>T</u> *****	336
SB4	***** <u>V</u> ***** <u>Q</u> *** <u>S</u> ***** <u>M</u> * <u>V</u> *****	336
CC6	***** <u>Q</u> * <u>A</u> ***** <u>Q</u> *** <u>S</u> *****	336
CC1	***** <u>Q</u> *** <u>S</u> ***** <u>T</u> *****	336
KC6	***** <u>N</u> ***** <u>Q</u> *** <u>S</u> *****	336
NT7	***** <u>P</u> ***** <u>Q</u> * <u>A</u> ***** <u>K</u> *** <u>S</u> *****	336
SP2	***** <u>S</u> ***** <u>Q</u> *** <u>S</u> *****	336
TC8	***** <u>Q</u> *** <u>HS</u> ***** <u>D</u> *****	336
NM3	***** <u>Q</u> *** <u>Q</u> *** <u>S</u> *****	336

Fig. 1. Comparison of the MAN1401 and MAN1402 with others. The amino acid sequences of ten mannanases from *Bacillus* sp. strains YB-1401 (YB1), YB-1402 (YB2), and 102 (SP2; GenBank accession no. AFK29761), *B. subtilis* strains NM-39 (NM3; P55278), K-C-6 (KC6; ADX59560), and SDBZ4 (SB4; ACV70134), *B. amyloliquefaciens* strains TrigoCor1448 (TC8; AHK51082), CICC 23260 (CC6; ACX94041), and CICC 23281 (CC1; ACX94042), and *B. circulans* NT6.7 (NT7; AEO19987) are indicated by the one-letter code. Residues identical to the amino acid sequence of the YB-1402 mannanase are indicated by asterisks in other sequences. Underlined amino acids indicate the signal peptide. Numbers at the end of each line correspond to the amino acid position in the mature protein of mannanases.

보아 MAN1402은 산성조건에서 안정성이 우수하므로 사료첨가용 효소로 잠재력이 우수한 효소이다. 곰팡이 유래의 mannanase는 pH 3.0에서 안정성이 있는 것으로 보고된 것이 다수 있으나 (Morreira and Filho, 2008), *Bacillus* 속 균주 유래의 mannanase는 대부분 4.0 이하에서는 급격히 활성을 상실하는 것이 대부분이다 (Jiang *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2013).

한편 MAN1402의 경우 pH 3-4 범위에서 1시간 방치하였을 때 거의 실활되지 않았으나, HtMAN1402의 경우 pH 3과 pH 3.5에서 1시간만에 약 15%와 5% 수준의 실활이 일어난 것으로 나타났는데 이는 카르복시 말단에 His tag이 융합된 때문일 수 있다. MAN1401도 pH 3.5에서는 1시간 동안 방치하여도 거의

실활되지 않는 것으로 보고되었으나, HtMAN1401은 약 15% 정도가 실활되는 것으로 나타났다.

재조합 대장균이 생산하는 mannanase의 열안정성 비교

MAN1402는 50°C 이하에서 1시간 방치하였을 때 실활되지 않았으며, MAN1401은 45°C 이하에서 1시간 동안 방치하였을 때 실활되지 않았으나, 50°C 이상에서는 실활되기 시작하는 것으로 보고되었다. 두 효소간의 열안정성의 비교하기 위해 51-54°C 범위의 온도에서 시간을 달리하여 방치한 후 효소의 잔존활성을 조사하였다 (Fig. 3). 그 결과 MAN1402가 MAN1401에 비해 열안정성이 높은 것으로 보고된 것과 같이 HtMAN1402는

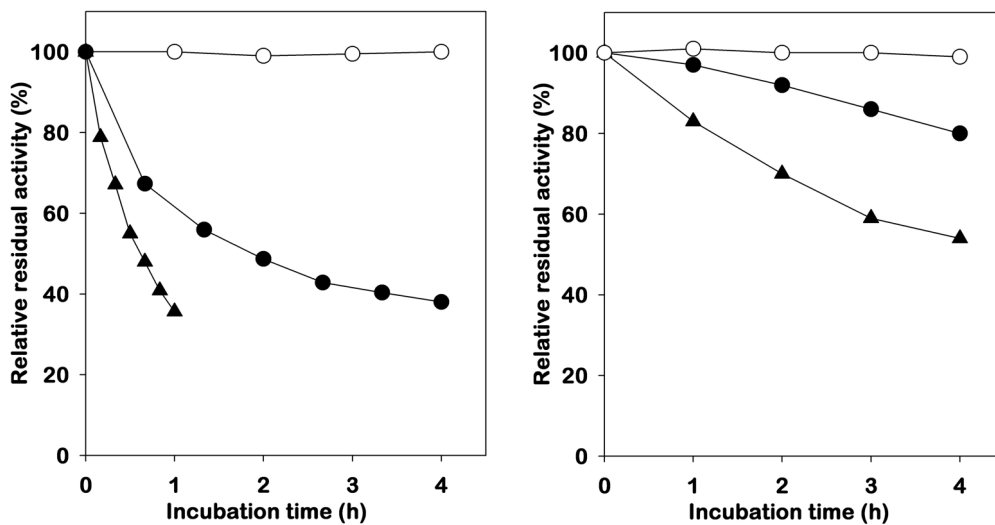


Fig. 2. Acidic pH stabilities of the purified HtMAN1401 (left) and HtMAN1402 (right). Sodium citrate buffer (100 mM) ranging from pH 3 to pH 4 were used to adjust pHs of the enzyme solution. pH Stability was determined by measuring the residual activities after pre-incubations for various times in pH 3 (▲), pH 3.5 (●) and pH 4.0 (○) pHs at 4°C. Each curve represents the average of three independent experiments.

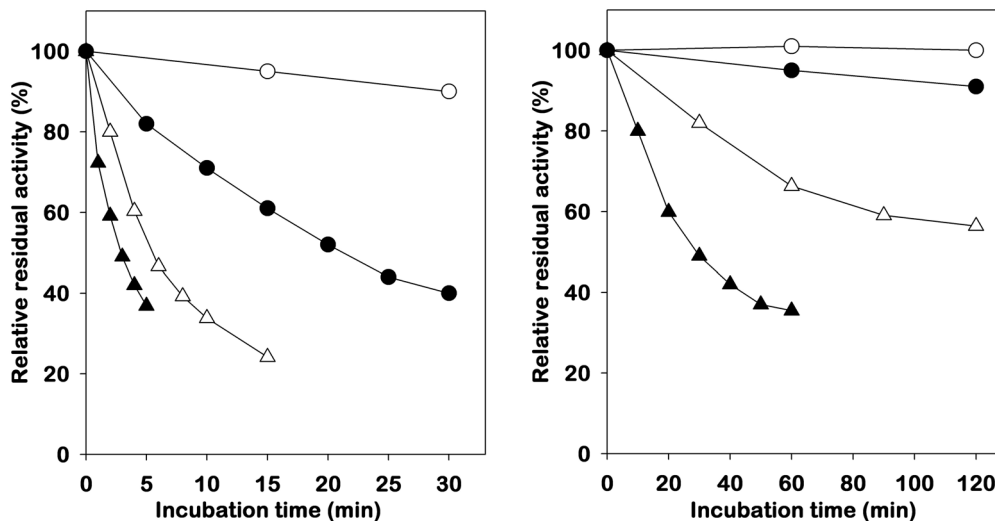


Fig. 3. Thermostabilities of the purified HtMAN1401 (left) and HtMAN1402 (right). Thermostability of the enzymes was determined by measuring the residual activities after pre-incubation for various times at 51°C (○), 52°C (●), 53°C (△), and 54°C (▲). Each curve represents the average of three independent experiments.

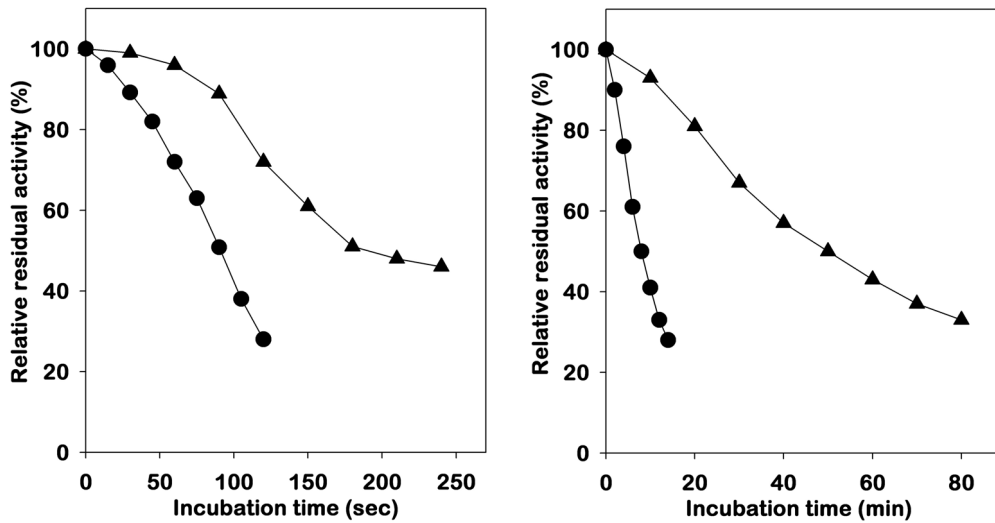


Fig. 4. Thermostabilities of the purified HtMAN1401 and HtMAN1402 in the absence (left) and presence (right) of bivalent calcium ion. Thermostability was determined by measuring the residual activities of HtMAN1401 (-●-) and HtMAN1402 (-▲-) after pre-incubation for various times at 55°C with or without 2 mM CaCl₂. Each curve represents the average of three independent experiments.

HtMAN1401에 비해 열안정성이 높았다. 온도를 증가시킬수록 잔존활성은 낮아졌으며 HtMAN1401의 반감기는 52°C에서 약 23분, 53°C에서 5-6분, 54°C에서는 2분 30초로 나타났고 53°C 이상에서는 급격하게 실활되는 것을 알 수 있다. HtMAN1402는 52°C에서 2시간 후에도 90% 이상의 활성을 유지할 뿐 아니라 53°C에서도 반감기가 2시간 이상이며, 54°C에서는 약 29분인 것으로 나타났다.

한편 Ca²⁺ 이온에 *Bacillus* 속 균주 유래 mannanase의 열안정성 증가된 예는 없지만, Zn²⁺ 이온이 열안정성의 증가에 관여한다고 보고된 바 있다(Yan *et al.*, 2008). 그러나 Ca²⁺ 이온이 α-amylase의 열안정성을 증가시킬 뿐 아니라 mannanase의 열안정성을 증진시킨다고 알려져 있다(Kumagai *et al.*, 2011; Ghosh *et al.*, 2013). 따라서 CaCl₂를 2 mM이 되도록 효소액에 첨가하고 HtMAN140과 HtMAN1402이 모두 급격하게 활성이 상실되는 55°C에서 열안정성을 조사하였다. 그 결과 Ca²⁺ 이온을 첨가하지 않았을 때 HtMAN1401과 HtMAN1402의 반감기는 약 90-100초와 약 3분으로 매우 짧았으나, Ca²⁺ 이온을 첨가하였을 때는 HtMAN1401과 HtMAN1402의 반감기가 8분과 50분 정도로 각각 증가되었으며 Ca²⁺ 이온에 의한 열안정성 증가정도는 HtMAN1402가 더 높았다(Fig. 4). 이로써 Ca²⁺ 이온이 *Bacillus* 속 균주 유래 mannanase의 열안정성 증진에도 관여한다는 것이 확인되었다.

상기의 결과들로 볼 때 MAN1401과 MAN1402의 209, 332, 336, 359번째의 아미노산 잔기의 차이에 의해(Fig. 1) 열안정성과 내산성에 차이가 발생한 것을 알 수 있으며, 특히 332Q와 336S 잔기는 다른 mannanases 간에는 동일하나 MAN1402만 332L와 336A로 나타났다. 이들 효소들의 pH 안정성에 대한 결과가 보고된 바가 없어 예측할 수는 없으나, MAN1402와 MAN1401 간에도 332와 336 번째 잔기의 차이가 있는 것으로 보아 이들 잔기가 pH 안정성에 관여할 가능성도 있다고 추정된다. 그러나 이

에 대한 입증 을 위해서는 이들 잔기를 변이한 효소를 제조하여 그 안정성을 조사할 필요가 있다. 또한 Ca²⁺ 이온에 의해 2개 효소가 모두 열안정성이 증가하는 것으로 보아 209, 332, 336, 359 번째 아미노산 잔기는 Ca²⁺과 결합하는데 관여하지 않을 것으로 여겨진다.

적 요

산성 배지에서 성장하며 mannanase를 생산하는 균으로 분리된 *Bacillus* sp. YB-1401과 *B. amyloliquefaciens* YB-1402로부터 mannanase 유전자를 각각 클로닝하고 그 염기서열을 분석한 결과 2개 유전자는 동일하게 360 아미노산으로 구성된 단백질을 코딩하며 1,080 뉴클레오티드로 구성되어 있다. 아미노산 잔기 배열의 유사성을 분석한 결과 이들 mannanases는 서로 4개의 잔기가 다르며 glycosyl hydrolase family 26에 속하는 mannanase와 상동성이 높았다. 재조합 대장균이 생산하는 YB-1402 유래의 His-tagged mannanase (HtMAN1402)가 YB-1401 유래의 His-tagged mannanase (HtMAN1401)에 비해 열안정성과 산성 pH에서 안정성이 높았다. 특히 HtMAN1402는 pH 3.0에서 4시간 방치 후에도 약 50% 이상의 잔존활성을 보여 사료첨가용 효소로 사용되기에 적합한 특성을 보였다. 또한 이들 효소는 Ca²⁺ 이온에 의해 열안정성이 증가하는 것으로 확인되었다.

References

- Chauhan, P.S., Sharma, P., Puri, N., and Gupta, N. 2014. A process for reduction in viscosity of coffee extract by enzymatic hydrolysis of mannan. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **37**, 1459-1467.
- Dhawan, S. and Kaur, J. 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit. Res. Biotechnol.* **27**, 197-216.
- Ghosh, A., Luis, A.S., Bras, J.L., Fontes, C.M., and Goyal, A. 2013.

- Thermostable recombinant β -(1 \rightarrow 4)-mannanase from *C. thermocellum*: biochemical characterization and manno-oligosaccharides production. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 12333–12344.
- 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.
- Huang, J.L., Bao, L.X., Zou, H.Y., Che, S.G., and Wang, G.X.** 2012. High-level production of a cold-active B-mannanase from *Bacillus subtilis* BS5 and its molecular cloning and expression. *Mol. Gen. Microbiol. Virusol.* **4**, 14–17.
- Jeon, H.J. and Yoon, K.H.** 2014. Production and characterization of mannanase from a *Bacillus* sp. YB-1401 isolated from fermented soybean paste. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 99–105.
- Jiang, Z., Wei, Y., Li, D., Li, L., Chai, P., and Kusakabe, I.** 2006. High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydr. Polym.* **66**, 68–96.
- Kim, J.S., Ingale, S.L., Lee, S.H., Kim, K.H., Kim, J.S., Lee, J.H., and Chae, B.J.** 2013. Effects of energy levels of diet and β -mannanase supplementation on growth performance, apparent total tract digestibility and blood metabolites in growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **186**, 64–70.
- Kumagai, Y., Usuki, H., Yamamoto, Y., Yamasato, A., Arima, J., Mukaiharu, T., and Hatanaka, T.** 2011. Characterization of calcium ion sensitive region for β -mannanase from *Streptomyces thermolilacinus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1814**, 1127–1133.
- Kweon, M.A., Lee, M.S., Choi, J.H., Cho, K.H., and Yoon, K.H.** 2004a. Cloning of a *Bacillus subtilis* WL-7 mannanase gene and characterization of the gene product. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 1295–1302.
- Kweon, M.A., Shon, J.Y., and Yoon, K.H.** 2004b. High-level expression of a *Bacillus subtilis* mannanase gene in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 212–217.
- Lu, H., Luo, H., Shi, P., Huang, H., Meng, K., Yang, P., and Yao, B.** 2014. A novel thermophilic endo- β -1,4-mannanase from *Aspergillus nidulans* XZ3: functional roles of carbohydrate-binding module and Thr/Ser-rich linker region. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 2155–2163.
- Lu, H., Zhang, H., Shi, P., Luo, H., Wang, Y., Yang, P., and Yao, B.** 2013. A family 5 β -mannanase from the thermophilic fungus *Thielavia arenaria* XZ7 with typical thermophilic enzyme features. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 8121–8128.
- Mendoza, N.S., Arai, M., Sugimoto, K., Ueda, M., Kawaguchi, T., and Josen, L.M.** 1995. Cloning and sequencing of β -mannanase gene from *Bacillus subtilis* NM-39. *Biochim. Biophys. Acta.* **1243**, 552–554.
- Miller, M.L., Blum, R., Glennon, W.E., and Burton, A.L.** 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* **2**, 127–132.
- Morreira, L.R. and Filho, E.X.** 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**, 165–178.
- Srivastava, P.K. and Kapoor, M.** 2014. Cost-effective endo-mannanase from *Bacillus* sp. CFR1601 and its application in generation of oligosaccharides from guar gum and as detergent additive. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **44**, 39–417.
- Sumpunn, P., Chaijan, S., Isarangkul, D., Wiyakrutta, S., and Meevootisom, V.** 2011. Characterization, gene cloning, and heterologous expression of β -mannanase from a thermophilic *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol.* **49**, 86–93.
- Sunna, A.** 2010. Modular organisation and functional analysis of dissected modular β -mannanase CsMan26 from *Caldicellulosiruptor* Rt8B.4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 189–200.
- Vijayalaxmi, S., Prakash, P., Jayalakshmi, S.K., Mulimani, V.H., and Sreeramulu, K.** 2013. Production of extremely alkaliphilic, halotolerant, detergent, and thermostable mannanase by the free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* PPKS-2. Purification and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171**, 382–395.
- 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. *Process Biochem.* **48**, 1166–1173.
- Yan, X.X., An, X.M., Gui, L.L., and Liang, D.C.** 2008. From structure to function: insights into the catalytic substrate specificity and thermostability displayed by *Bacillus subtilis* mannanase BCman. *J. Mol. Biol.* **379**, 535–544.
- Yoon, K.H.** 2014. Production and properties of mannanase by a *Bacillus amyloliquefaciens* isolate. *Kor. J. Microbiol.* **50**, 158–163.
- Yoon, K.H. and Lim, B.L.** 2007. Cloning and strong expression of a *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase gene in *B. subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1688–1694.
- Zhang, C., Chen, J.D., and Yang, F.Q.** 2014. Konjac glucomannan, a promising polysaccharide for OCDSDS. *Carbohydr. Polym.* **104**, 175–181.
- Zhang, Y., Ju, J., Peng, H., Gao, F., Zhou, C., Zeng, Y., Xue, Y., Li, Y., Henrissat, B., Gao, G. F., and Ma, Y.** 2008. Biochemical and structural characterization of the intracellular mannanase AaManA of *Alicyclobacillus acidocaldarius* reveals a novel glycoside hydrolase family belonging to clan GH-A. *J. Biol. Chem.* **283**, 31551–31558.
- Zhou, H., Yang, Y., Nie, X., Yang, W., and Wu, Y.** 2013. Comparison of expression systems for the extracellular production of mannanase Man23 originated from *Bacillus subtilis* B23. *Microb. Cell Fact.* **12**, 78.