

보 문

Cellulosimicrobium sp. YB-43에 의해 생산되는 2종류 β -mannanase의 특성분석

윤기홍*

우송대학교 바이오식품과학전공

Characterization of two β -mannanases from *Cellulosimicrobium* sp. YB-43

Ki-Hong Yoon*

Food Science and Biotechnology Major, Woosong University, Daejeon 34606, Republic of Korea

(Received August 5, 2015; Accepted September 4, 2015)

ABSTRACT: A bacterial strain producing extracellular mannanases was isolated from soil of chestnut tree farm located in Gongju city of Korea by enrichment culture using Avicel as a carbon source. 16S rDNA sequence of the isolate YB-43 was highly homologous to those of genus *Cellulosimicrobium* strains with sequence similarities of above 99.6%. Mannanase productivity was significantly increased when the *Cellulosimicrobium* sp. YB-43 was grown in the presence of locust bean gum (LBG) or konjac. The mannanases were partially purified to be mannanase A (ManA) and mannanase C (ManC) by DEAE-Sepharose column and Q-Sepharose column chromatography from the culture filtrate of *Cellulosimicrobium* sp. YB-43 grown in LB medium supplemented with 0.7% LBG for 24 h. The partially purified ManA showed the highest activity at 55°C and pH 6.5, while ManC activity was optimal at 65°C and pH 7.5. ManA was stable up to 40°C for 1 h, but ManC activity decreased significantly even after 1 h at 20°C. ManA and ManC showed difference from each other according to their substrate specificities and predominant products resulting from the mannanase hydrolysis for manno oligosaccharides. As a result, *Cellulosimicrobium* sp. YB-43 was found to produce two different kinds of mannanases.

Key words: *Cellulosimicrobium* sp. YB-43, mannanases, productivity, property

β -1,4-Endo-mannanase (mannanase)는 β -mannan 다당류에서 mannose간의 β -1,4-mannosyl 결합을 무작위적으로 분해하여 manno oligosaccharide (MOS)로 전환시키며, mannan 다당류의 가수분해에 관여하는 효소 중 가장 중요한 역할을 담당한다. Mannanase는 펄프와 제지의 표백, 바이오매스 자원의 당화, 커피 추출물의 점도 저감, 석유 시추시 잔유를 회수하기 위해 투입한 guar gum의 제거, 올리고당 생산, 식기 세척 및 사료효율 개선을 위한 효소로 이용되고 있다(Dhawan and Kaur, 2007; You *et al.*, 2015). Mannanase에 의해 가수분해되는 물질인 mannan 다당류는 식물 세포벽, 콩과식물 종자의 배유와 일부 비두과류 식물의 완숙한 종자나 덩이식물의 줄기에

존재하며 구성당에 따라 mannan, glucomannan, galactomannan 과 galactoglucomannan으로 분류된다. Mannan은 cellulose 및 xylan과 함께 식물 세포벽을 이루는 주요 성분이지만, cellulose와 xylan을 분해하는 효소에 비해 mannan을 분해하는 효소에 대한 연구는 미비한 형편이었다.

대체에너지로 바이오 에탄올 생산을 위해 곡물이 사용되면서 사료 곡물의 품질은 저하됨에 따라 mannanase는 xylanase와 함께 사료 곡물의 이용능을 향상시키는 효소로 관심을 받게 되었고(Mok *et al.*, 2013), 최근에는 MOS가 장내 유익한 미생물의 성장을 촉진하고 장관의 치료효과를 보이는 것으로 알려지면서(Srivastava and Kapoor, 2014; Zhang *et al.*, 2014) mannanase에 대한 연구는 크게 활성화되고 있다. 내열성을 비롯하여 호냉성, 산성과 알칼리성 및 내염성을 포함한 다양한 특성을 갖는 mannanase를 생산하는 미생물이 탐색되었으며

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

(Huang *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2013; Vijayalaxmi *et al.*, 2013; You *et al.*, 2015), 이들은 대부분 균체의 분비 효소이며 활성 영역의 아미노산 배열이 glycosyl hydrolase (GH) family 5와 26에 속하는데, 특이하게 균체내 효소로 GH113에 속하는 mannanase도 보고되었다(Zhang *et al.*, 2008). 또한 Mannanases는 활성 영역만으로 구성되거나 cellulose 결합영역과 같은 다른 기능성 영역도 함께 포함하는 것으로 알려져 있다(Kweun *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011a). Mannanase의 생산성은 배지조성에 따라 크게 영향을 받으므로 배양조건을 최적화하거나 유전자 재조합 균주를 이용하여 생산성을 높이기 위한 시도가 활발히 진행되고 있다(Yoon and Lim, 2007; Huang *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2013).

Cellulosimicrobium 속의 주요 균종은 *C. cellulans*, *C. funkei* 과 *C. terreum*으로 알려져 있으며, 식물 성장촉진이나 식물병원성 진균류에 대한 길항효과를 갖거나(Nabti *et al.*, 2014) 유용한 효소를 생산하는 균주들이 탐색되었다. 효모와 곰팡이 세포벽 분해하는 endo-1,3-β-glucanase와 chitinase의 생산균(Fleuri *et al.*, 2009; Tanabe and Oda, 2011), 인삼의 ginsenosides의 전환활성을 갖는 β-glucosidase 생산균(Yuan *et al.*, 2015), cellulase, xylanase의 생산균이 토양이나 동물의 장관에서 분리되었다(Kim *et al.*, 2009; Song and Wei, 2010). 땅강아지 장관에서 분리된 *Cellulosimicrobium* sp.로부터 xylanase의 유전자와 효소특성이 보고되었으며(Oh *et al.*, 2008), 특히 *Cellulosimicrobium* sp. HY-13로부터는 2종류의 mannanases가 확인되었다(Kim *et al.*, 2011a, 2011b). 본 연구에서는 밤 나무 농장의 토양으로부터 분리된 *Cellulosimicrobium* 속 균주가 생산하는 2종류 mannanases의 반응 특성을 비교하였다.

재료 및 방법

증균배양을 이용한 미생물 탐색과 동정

공주시 정안면에 소재한 밤 나무 농장의 토양시료를 채취하여 Avicel (0.5%; Sigma-Aldrich Co.)이 첨가된 SMM 배지 [0.2% (NH₄)₂SO₄, 1.4% K₂HPO₄, 0.6% KH₂PO₄, 0.1% trisodium citrate·H₂O, 0.02% MgSO₄·7H₂O]에 접종하여 30°C에서 약 4일간 진탕 배양하고 동일한 배지에 3-4일 간격으로 4회 계대 배양을 실시하였다. 계대 배양액을 동일성분의 평판배지에도 말하여 30°C에서 콜로니가 형성될 때까지 배양하면서 Avicel 분해균을 분리하였다. 분리균의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하기 위해서 분리균의 총 염색체 DNA를 주형으로 하고, 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열을 5'-

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열 8-27), 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열 1492-1510)을 primers로 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하였다. PCR 반응액의 조성은 주형 DNA (20 ng), 10 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 50 pmol primers와 2.5 U *Pfu* polymerase로 구성하여 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 50초간 반응을 30회 반복하여 16S rRNA를 코딩하는 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 정제하여 ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing kit와 373A automatic DNA sequencer (Perkin Elmer Co.)를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

Mannanase의 부분 정제

Cellulosimicrobium sp. YB-43을 LB 배지에 접종하여 30°C에서 하룻밤 진탕 배양한 후 0.7% LBG가 첨가된 LB 배지에 1% (v/v)가 되도록 접종하여 24시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 원심분리하고 배양상등액을 한외여과막(Amicon PM30, Millipore)으로 농축한 후 ammonium sulfate (20-70%)로 침전하여 단백질을 분획하였다. 침전된 단백질을 20 mM Tris 완충용액(pH 8.0)으로 현탁하고 동일 완충액으로 투석하여 조효소액을 제조하였다. 동일한 완충용액으로 평형화한 DEAE-Sepharose CL-6B column (2.5 × 20 cm; Sigma-Aldrich Co.)에 조효소액을 흡착시킨 후 NaCl의 농도를 0 M에서 1.0 M까지 농도구배를 주어 증가시킨 20 mM Tris 완충용액(pH 8.0)으로 1분당 1 ml의 용출속도로 흡착된 효소를 추출하였다. Mannanase 활성을 갖는 분획을 따로 모아 다시 20 mM Tris 완충용액(pH 8.0)으로 투석한 후 Q-Sepharose column (2.5 × 15 cm; Sigma-Aldrich Co.)에 흡착시키고 NaCl의 농도를 0 M에서 0.6 M까지 농도구배를 주어 증가시킨 20 mM Tris 완충용액(pH 8.0)으로 용출하여(1 ml/min) mannanase 활성을 갖는 분획만을 모음으로써 mannanase를 부분 정제하였다. 부분 정제된 효소액은 최종적으로 20 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)으로 투석하여 효소 반응에 사용하였다.

Mannanase 반응특성 분석

Mannanase 활성을 측정하기 위해서는 0.5% locust bean gum (LBG), 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 측정

하였다. Mannose를 표준시료로 사용하여 동일조건에서 발색 시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건에서 1분 동안 LBG로부터 1 μ mol의 mannose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 기질특이성을 조사하기 위해서는 LBG와 함께 사용된 guar gum, yeast mannan은 Sigma-Aldrich Co., konjac은 Megazyme International Ireland로부터 각각 구입하여 사용하였다. Xylanase 활성의 측정에는 mannanase 활성 측정과정과 동일하게 실시하였으며 오직 반응액 성분 중에서 mannanase 기질로 사용된 LBG 대신 oat spelt xylan (Sigma-Aldrich Co.)을 기질로 사용하였다. 반응 온도와 pH가 효소 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 30-75°C와 pH 3.5-10.0의 범위에서 mannanase 활성을 각각 측정하였다. 이때 pH 3.5-6.0의 범위에서는 citrate 완충용액, pH 6.0-8.0에서는 phosphate 완충용액, pH 8.0-10의 범위에서는 KCl-borate 완충용액을 각각 사용하였다. 열안정성은 20-60°C, pH 안정성은 pH 3.5-10.0의 조건에 mannanase를 1시간 동안 방치한 후 잔존활성을 측정하여 결정하였다. Mannanase에 의한 MOS의 분해산물을 분석하기 위해서는 Megazyme International Ireland로부터 구입한 MOS (0.5%)와 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.5, pH 7.5)을 함유한 반응액에 부분 정제된 효소를 과량 첨가하여 40°C에서 5시간 반응한 후 반응액을 95°C에서 3분 동안 열 처리하였다. 이를 원심분리하여 단백질 침전물을 제거하고 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 크로마토그래피를 수행하였다. 전개된 물질을 발색시키기 위해서는 9 ml ethanol, 0.5 ml p-anisaldehyde, 0.5 ml sulfuric acid와 glacial acetic acid 몇 방울을 혼합한 발색제 용액을 뿌린 후, 120°C에서 10분간 방치하였다.

결과 및 고찰

농후배양을 통한 mannanase 생산균의 탐색

섬유소 물질의 가수분해에 관여하는 효소의 생산균을 분리하기 위해서 불용성 섬유소 분말인 Avicel이 탄소원으로 첨가된 SMM 합성 배지에 토양을 접종하고 30°C에서 진탕 배양하면서 일정기간 마다 동일배지에 계대 배양하였다. 계대 배양액을 동일한 성분의 평판배지에 도말한 후 3일간 배양하였을 때 콜로니 주변에 Avicel의 분해환이 명확하게 보이는 균과 함께 분해환은 있지만 명확도가 낮은 콜로니도 관찰되었다.

Avicel이 유일 탄소원으로 첨가된 배지에서 증균 배양된 균 중에서 Avicel의 분해환이 약한 균이 다른 섬유소 물질인 반섬유소의 분해능을 조사하기 위해 0.5% oat spelt xylan 또는 0.5% LBG가 첨가된 LB 평판배지에 접종하여 2일간 배양한 후 분해환을 관찰한 결과 Avicel의 분해환이 약한 분리균 YB-43은 xylan과 LBG를 모두 분해하였으며 배양상등액에서 xylanase와 mannanase의 활성이 관찰되었다.

분리균 YB-43은 그람 양성의 무포자 단간균이며 1,484 bp 크기의 16S rDNA 염기서열을 결정하여(GenBank accession No. GU012422) 미국 NCBI의 BLAST 검색방법을 사용하여 기존에 등록된 세균들의 상응하는 염기서열과 비교한 결과, 1개의 염기가 다른 것으로 확인된 *Cellulosimicrobium cellulans* DSM 43879 (NR_119095)와 가장 상동성이 높았으며, 야채 부속물에서 단백질 분해균으로 분리된 *Cellulosimicrobium* sp. TUT1242 (AB188222)와는 4개, 폐물 분해균으로 분리된 *Cellulosimicrobium* sp. CH6 (HQ619223)과는 5개 염기가 각각 차이가 있었고 대부분의 *Cellulosimicrobium* 속 균주와 유사한 것으로 나타나 분리균은 *Cellulosimicrobium* 속 균으로 판단되었다. 한편 YB-43은 16S rDNA 염기서열의 상동성이 99.6% 이상인 이들 균주와 동일균일 가능성도 있으므로 그 특성을 비교할 필요가 있다고 하겠다.

반섬유소가 풍부한 밀기울, palm kernel meal (PKM)과 같은 농산부산물이나 guar gum을 탄소원으로 사용하여 토양 미생물을 증균 배양함으로써 galactomannan의 분해능이 우수한 *Cellulosimicrobium*과 *Enterobacter* 속 균주가 탐색된 바 있다(Yoon, 2011; You *et al.*, 2015). 그런데 섬유소인 Avicel을 유일 탄소원으로 하여 증식한 경우에도 반섬유소 효소의 생산능이 있는 *Cellulosimicrobium* sp. YB-43이 분리된 것으로 보아 섬유소 분해능이 있는 균은 섬유소와 유사 물질인 반섬유소의 분해 효소도 동시에 생산하는 것으로 추정된다. 한편 지렁이 장관에서 분리된 *Cellulosimicrobium* sp. HY-13도 xylanase와 mannanase를 생산하는 것으로 보고되었다(Oh *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011b).

부가탄소원에 따른 mannanase 생산성

Guar gum galactomannan은 LBG galactomannan 보다 galactosyl 측쇄가 많이 함유되어 LBG에 비해 mannanase에 의한 분해 효율이 저조하다(Kweun *et al.*, 2004). *Cellulosimicrobium* sp. HY-13의 mannanase K는 guar gum의 분해활성이 LBG의 70% 수준인 것으로 보고되어 galactosyl 측쇄가 많은 galactomannan의 효율적 분해에 적합한 효소로 판단된다(Kim *et al.*, 2011b). 그러므로 분리균 *Cellulosimicrobium*

Table 1. Effects of additional carbon sources on the mannanase production of *Cellulosimicrobium* sp. YB-43

Additional carbon sources	Cell growth (OD ₆₀₀)	Mannanase productivity (U/ml)
None	5.3	0.14
Glucose	4.6	-
Mannose	3.7	-
Lactose	3.8	0.19
Maltose	6.2	0.17
Xylose	3.6	-
Galactose	5.4	0.34
α-Cellulose	ND	0.21
Locust bean gum	ND	11.43
Guar gum	ND	5.75
Konjac	ND	10.64
Oat spelt xylan	ND	0.15
Avicel	ND	0.35
Rice straw	ND	0.26
Wheat bran	ND	0.24

-, not detected; ND, not determined.

sp. YB-43가 생산하는 mannanase의 특성을 조사하기 위해 우선 mannanase에 대한 생산성에 적합한 배지성분을 검토하였다. 세균의 mannanase 생산성은 xylanase나 cellulase에 비해 배지내 탄수화물 종류에 따라 매우 큰 차이를 나타내므로 (Kataoka and Tokiwa, 1998; Kim *et al.*, 2011b) LB 액체배지를 기본배지로 하고 단당류나 이당류는 1% (w/v), 다당류와 농산부산물물은 0.5%가 되도록 각각 첨가하여 YB-43을 20시간 진탕 배양하여 배양상등액에 존재하는 mannanase 활성을 각각 조사하였다. Table 1에 보인 바와 같이 glucose, mannose와 xylose를 첨가하였을 때는 배양액 중에 mannanase의 활성이 관찰되지 않았고 다른 단당류나 이당류는 효소 생산성에 큰 영향을 미치지 못하였다. 한편 mannan 다당류에 속하는 LBG, konjac이나 guar gum을 첨가한 배지에서 mannanase 생산성이 크게 증가되었으며 LBG와 konjac을 첨가한 배지에서 유사한 수준으로 가장 생산성이 우수하였다. Mannan 다당류나 이를 함유한 농산 부산물이 첨가된 배지에서 mannanase의 생산성이 증가된 경우는 다수의 균주 등에서 보고된 바 있다 (Kansoh and Nagieb, 2004). 또한 YB-43 균주와 같이 대부분의 미생물에서는 guar gum 보다 LBG에 의한 mannanase 생산성 증가 정도가 훨씬 높는데 비해 특이하게도 *Clostridium tertium* KT-5A는 LBG 보다는 guar gum에 의해 mannanase 생산성이 더 크게 증가하였다(Kataoka and Tokiwa, 1998).

LBG와 konjac을 0.1%~3.0% 범위로 달리 첨가한 LB 배지

Table 2. Effects of various amounts of LBG or konjac on mannanase production

Additional amount (%) of LBG	Mannanase productivity (U/ml)	Additional amount (%) of konjac	Mannanase productivity (U/ml)
None	0.14		
0.1	4.42	0.1	7.82
0.5	10.97	0.2	11.51
0.7	12.12	0.4	10.70
1.0	11.18	0.6	8.04
1.2	10.83	0.8	7.62
1.5	5.54	1.0	7.61

에서 mannanase 생산성은 LBG 첨가량이 0.7%, konjac 첨가량이 0.2%일 때 가장 높은 것으로 확인되었다(Table 2). 한편 LBG와 konjac의 첨가량이 많으면 효소 생산성이 감소하였으며 특히 konjac이 2% 이상 첨가된 배지에서는 0.2 U/ml 이하의 생산성을 나타냈다(결과 미제시). LBG와 konjac을 혼합하여 첨가할 때 효소 생산성이 증가하는 효과를 조사하기 위해 LBG 첨가량을 0.7%로 하고 konjac의 첨가량을 0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.25%, 0.3%로 달리 첨가한 배지에서 mannanase 생산성을 조사한 결과 konjac 첨가량이 0.1%일 때 약간 증가하였으나 0.15% 이상부터 생산성이 감소하였으며, 0.3%를 첨가하였을 때는 최대 생산성의 약 30% 수준에 해당하는 생산성을 보였다. Konjac만을 첨가하였을 때는 0.2%에서 효소 생산성이 가장 높았으나, LBG와 동시에 첨가하였을 때는 감소하는 현상을 보인 것으로 보아 LBG나 konjac이 직접 mannanase의 생산성을 유도하는 것은 아니고 균이 성장하면서 소량 생산하는 mannanase에 의해 배지내 LBG와 konjac이 분해되어 저당류가 생성되면 이들이 효소 생산성을 유도하는 것으로 추측된다. 또한 LBG와 konjac의 첨가량이 많아질수록 배지의 점도가 높아져 균의 성장이 낮아지게 되면서 효소 생산성이 감소하는 것으로 여겨진다.

Mannanase의 부분정제와 반응특성

LBG를 첨가한 LB 배지에서 YB-43을 24시간 배양하여 얻은 배양상등액을 ammonium sulfate (25%~70%)로 처리하여 침전된 단백질을 투석하여 제조한 조효소액을 사용하여 반응 pH와 온도가 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 1). 그 결과 mannanase의 최적반응 pH는 6.5로 나타났으나 반응 온도가 55°C와 65°C에서 효소 활성이 증가하는 것으로 확인되었다. 그러므로 YB-43에 의해 생산되는 mannanase는 2종류 이상일 것으로 판단되어 컬럼 크로마토그래피를 수행하여

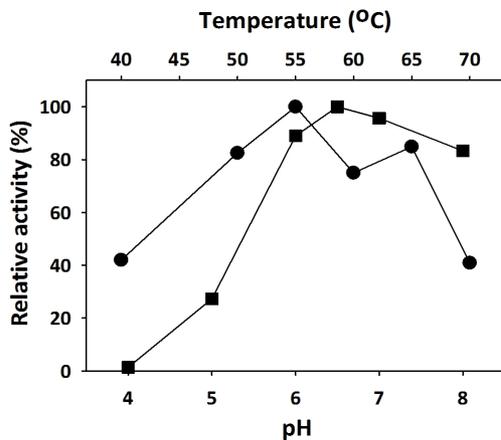


Fig. 1. Effects of reaction temperature and pH on the crude enzyme activities. The pH profile (-■-) was obtained by measuring the mannanase activities at various pH's and at a constant temperature of 50°C. Buffers (50 mM) used were as follows: sodium citrate (pH 3-6), and sodium phosphate (pH 6-8). Temperature profile (-●-) was obtained by measuring the mannanase activities at pH 6.5 and different temperatures. Each curve represents the average of three independent experiments.

효소를 부분 정제하였다. Mannanase 조효소액을 DEAE-Sephacel 컬럼 크로마토그래피를 수행한 결과 NaCl의 농도 구배에 따라 3개 활성 peaks가 나타났으나 중간의 peak의 분획은 다른 peak의 분획과 겹쳐질 수 있어 앞과 뒤 peaks에 해당하는 mannanase 활성 분획만을 따로 모아 Q-Sepharose 컬럼 크로마토그래피로 각각 정제를 하였다. 앞 peak의 분획 효소액에서는 NaCl의 농도가 0.06-0.17 M, 뒤 peak의 분획 효소액에서는 0.25-0.46 M일 때 mannanase가 각각 용출되었다. NaCl의 농도가 낮은 지역에서 용출된 효소를 mannanase A (ManA), 높은 지역에서 용출된 것을 mannanase C (ManC)로 명명하고 각 효소액을 SDS-PAGE로 분석한 결과 단일한 단백질이 아니고 부분 정제된 상태로 확인되었다(결과 미제시).

부분 정제된 ManA와 ManC가 서로 다른 효소인지 확인하기 위해 반응특성을 비교하였다. 반응 온도를 50°C로 고정하고 여러 pH에서 mannanase 활성을 측정할 결과 ManA는 pH 6.5에서 최대 활성을 보이고 pH 6.0-7.0 범위에서 최대활성의 90% 이상의 활성을 나타냈다(Fig. 2). ManC는 pH 7.5에서 활성이 가장 높았으며 pH 10에서도 최대활성의 80% 이상의 활성을 보여 ManA 보다 알칼리 pH에서 활성이 높은 것으로 확인되었다. 반응온도에 따른 효소활성을 조사하기 위해 ManA와 ManC 반응액의 pH를 6.5와 7.5로 각각 달리하고 여러 온도에서 반응을 실시한 결과 ManA는 55°C, ManC는 65°C에서 최대활성을 보였다(Fig. 2). ManA와 ManC를 여러 온도에서 1시간 동안 방치한 후에 잔존 효소활성을 측정하여 열안정성을 조사한 결과 ManA는 40°C 이하에서는 실패하지 않았으며

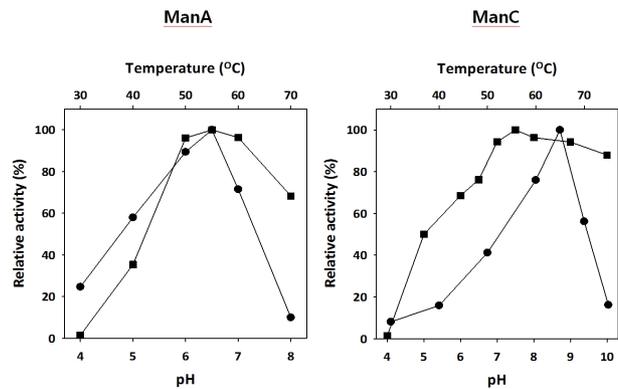


Fig. 2. Temperature and pH optima of the partially purified mannanases, ManA and ManC. The pH profiles (-■-) were obtained by measuring the mannanase activities at various pH's and at a constant temperature of 50°C. KCl-borate buffer (50 mM) was used for pH 8-10. Temperature profiles (-●-) were obtained by measuring the mannanase activities at pH 6.5 for ManA or 7.5 for ManC and different temperatures. Each curve represents the average of three independent experiments.

50°C에서는 약 60%의 활성을 유지하였다(Fig. 3). 그러나 최적 반응온도가 ManA에 비해 10°C가 높은 ManC는 기질이 없는 상태에서는 매우 불안정한 것으로 확인되어 20°C에서 40% 이상 실패하여 ManA와 큰 차이를 보였다. ManC는 배양온도인 30°C에서도 1시간 방치하였을 때 50% 이상이 실패하는 것으로 나타났는데 이로 보아 30°C에서 배양 중에도 생산된 ManC는 실패하여 그 활성이 거의 상실될 것으로 예측되지만 배양상등액으로부터 ManC가 부분정제된 것은 배지에 첨가된 LBG가 배양 중에 온도에 의한 ManC의 실패를 방지한 때문으로 판단된다. 여러 pH 완충액에서 효소를 1시간 동안 방치하였을 때 ManC는 pH 5-10에서는 90% 이상의 활성을 유지하였으나 pH 4.0에서는 완전히 실패하였고, ManA는 pH 10에서

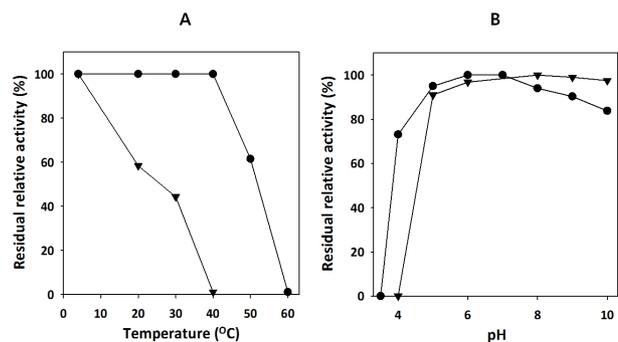


Fig. 3. Thermostability (A) and pH stability (B) of the partially purified mannanases, ManA and ManC. Thermostabilities were determined by measuring the residual activities after pre-incubation for 1 h at different temperatures. pH Stabilities were determined by measuring the residual activities after pre-incubations in various buffers for 24 h at 4°C. -●-, ManA; -▼-, ManC. Each curve represents the average of three independent experiments.

84% 수준으로 ManC 보다는 안정성이 낮았으나, pH 4.0에서는 73%의 활성을 유지하여 ManC에 비해 알칼리에서는 약간 불안정하나 산성에서는 안정한 것을 알 수 있다(Fig. 3).

토양에서 분리된 *Cellulosimicrobium* sp. YB-1107의 배양 상등액에서는 반응 온도 55°C와 pH 6.5에서 mannanase 활성이 가장 높은 것으로 보고되었는데(Yoon, 2011), YB-43의 조효소액은 이와 동일하나 65°C에서도 활성이 높아졌다는 점이 다르다고 하겠다. *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 유래의 mannanase H (Kim *et al.*, 2011a)는 50°C와 pH 6.0, mannanase K (Kim *et al.*, 2011b)는 50°C와 pH 7.0에서 최대활성을 보여 ManA와 유사하였으며 mannanase H는 30°C에서는 1시간 동안 열처리하여도 실활되지 않으나 50°C에서는 잔존활성이 20% 미만인데 비해 mannanase K는 50°C에서 1시간 열처리하였을 때 50% 활성을 유지하였으며 ManA와 유사하였다. 한편 *Streptomyces* sp. S27의 mannanase는 pH 7.0과 65°C에서 최대활성을 보여 ManC와 유사하였으며(Shi *et al.*, 2010), guar gum을 탄소원으로 하여 증균 배양하여 분리된 *Enterobacter* sp. N18의 mannanase는 pH 7.5와 50°C에서 최대활성을 보였다(You *et al.*, 2015). 40°C에서 반감기가 15분으로 열에 불안정한 *Sphingomonas*의 mannanase (Zhou *et al.*, 2012)는 최적 반응온도도 40°C로 낮은 것과 같이 열안정성이 낮으면 최적 반응온도도 낮아지는데 열에 매우 불안정한 ManC의 최적 반응온도가 65°C로 나타난 것은 반응 중 기질인 LBG와 결합할 경우 열안정성이 크게 증가하여 반응온도가 높아져도 쉽게 실활되지 않아 최적 반응온도가 크게 상승한 것으로 판단된다

기질특이성과 최종 가수분해 산물

기질 특이성을 비교하기 위해 기질로 LBG, konjac, guar gum과 yeast mannan을 사용하여 활성을 측정하였다. ManA

Table 3. Substrate specificities of the partially purified mannanases

Substrates	Relative activity (%) of		
	Crude enzyme	ManA	ManC
Locust bean gum galactomannan	100.0	100	100
Konjac glucomannan	206.0	92.0	112.9
Guar gum galactomannan	69.4	60.2	57.3
Yeast mannan	1.2	ND	<0.1

ND, not detected.

와 ManC는 guar gum의 분해활성이 LBG와 대비하였을 때 약 60% 정도로 비슷한 수준으로 나타났으며, konjac에 대한 활성은 ManC가 더 높았다(Table 3). 한편 컬럼 크로마토그래피를 수행하기 전의 조효소액에서는 konjac에 대한 가수분해 활성이 LBG에 비해 2배 이상 높았는데 이는 mannanase 뿐 아니라 조효소액에 존재하는 cellulase에 의해서도 konjac이 분해된 때문으로 판단된다. 또한 조효소액이 guar gum과 yeast mannan에 대한 분해활성이 ManA와 ManC 보다 높은 것으로 보아 부분 정제과정 중에 회수할 수 없었던 또 다른 mannanase가 존재할 가능성이 높다고 여겨진다. 여러 종류의 *Bacillus* 속 균주 유래의 mannanase는 guar gum에 대한 활성이 LBG에 비해 10-15% 수준이며(Yoon and Lim, 2007), *Cellulosimicrobium* sp. HY-13의 mannanase H도 약 11%로 보고되어 ManA와 ManC의 활성과는 차이가 큰 것으로 나타났다. 그러나 *Cellulosimicrobium* sp. HY-13의 mannanase K와 *C. tertium*의 mannanase는 guar gum 분해활성이 약 72%와 46%로 각각 보고되었으며(Kataoka and Tokiwa, 1998; Kim *et al.*, 2011b), 이는 ManA와 ManC의 특성과 유사하다고 하겠다.

MOS를 ManA와 ManC로 각각 분해하여 최종 분해산물을 TLC로 분석하였다(Fig. 4). 두 효소는 모두 mannobiose를 분

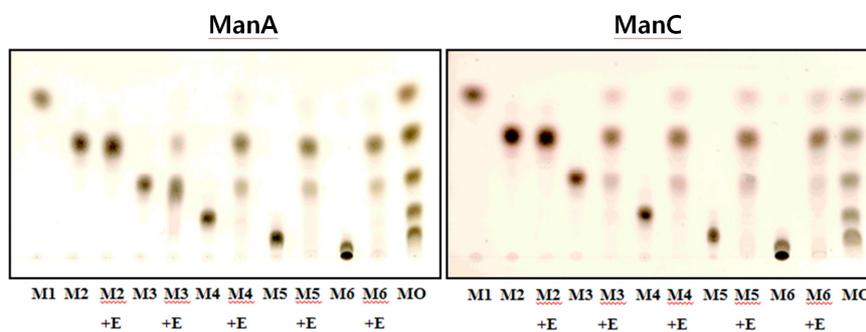


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of β -1,4-linked manno-oligosaccharides with partially purified ManA and ManC. The reaction mixtures containing the partially purified mannanases and manno-oligosaccharides or LBG in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5 for ManA or 7.5 for ManC) were incubated for 4 h at 50°C. M1 to M6 represent mannose to mannohexaose; E, partially purified mannanase. MO stands for manno-oligosaccharides including mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetraose, mannopentaose, and mannohexaose.

해하지 못하였으며 mannotriose 이상의 중합도를 갖는 MOS는 분해하는 공통점은 보였으나, MOS의 가수분해 산물은 차이가 있었다. Mannotriose의 가수분해 산물을 비교할 때 ManA의 반응액에서는 분해되지 않은 mannotriose가 ManC에서 보다 많이 관찰된 것으로 보아 ManA는 ManC보다 mannotriose의 분해능이 낮았다. ManA와 ManC에 의한 MOS의 가수분해 산물에서 mannobiose와 mannotriose가 주된 반응산물로 나타났으며, ManA의 반응산물에서는 mannose가 관찰되기 어려운 수준으로 존재하는데 비해 ManC의 반응산물에는 mannose도 다량 존재하였다. *Cellulosimicrobium* sp. HY-13의 mannanase H는 ManA와 ManC 효소와 유사하게 mannobiose보다 중합도가 큰 MOS를 분해하여 mannobiose를 가장 많은 양 생성하고 mannose는 미량 생성하였다. 그러나 mannanase K는 mannobiose 뿐 아니라 mannotriose도 분해하지 못하였으며, mannotetraose의 분해산물로는 mannobiose, mannotriose와 mannotetraose가 비슷한 양으로 존재하였고 mannopentaose를 기질로 사용하였을 경우에는 mannotetraose의 분해산물과 함께 mannopentaose도 다량 관찰되어 ManA와 ManC의 MOS 가수분해능과는 차이가 있었다. 한편 mannanase의 종류에 따라서는 mannotriose 이상의 중합도를 갖는 MOS를 가수분해할 수 있거나(Kweun *et al.*, 2004), mannotetraose 이상의 중합도를 갖는 MOS를 가수분해하는 것으로 보고되었다(Jiang *et al.*, 2006).

Cellulosimicrobium sp. YB-43의 배양상등액으로부터 부분 정제된 ManA와 ManC는 최적 반응조건, 열안정성, 기질특이성과 MOS의 가수분해 산물이 서로 다른 효소인 것으로 확인되었을 뿐 아니라, *Cellulosimicrobium* 속 균주 중에서 현재까지 유일하게 그 특성이 보고된 *Cellulosimicrobium* sp. HY-13의 mannanase H 및 mannanase K와도 차이를 보여 이들 효소와 다른 mannanases일 것으로 추정된다. 또한 컬럼 크로마토그래피를 수행하기 전 단계의 조효소액이 ManA와 ManC에 비해 guar gum과 yeast mannan의 분해능이 높았던 점으로 볼 때 *Cellulosimicrobium* sp. YB-43은 ManA와 ManC 외에도 다른 종류의 mannanase를 생산할 가능성이 있다고 여겨진다.

적 요

탄소원으로 Avicel이 첨가된 배지에서 공주에 소재한 밤나무 농장의 토양 미생물을 중균 배양하여 mannanase를 생산하는 미생물을 분리하였다. 분리균 YB-43의 16S rDNA 서열은

Cellulosimicrobium 속 균주와 유사도가 99.6% 이상으로 가장 높게 나타났다. Locust bean gum (LBG)이나 konjac이 첨가된 배지에서 분리균의 mannanase 생산성이 크게 증가하였다. 0.7% LBG가 첨가된 LB 배지에서 *Cellulosimicrobium* sp. YB-43이 균체외로 생산한 mannanase를 DEAE-Sepharose와 Q-Sepharose 컬럼 크로마토그래피로 부분 정제하여 mannanase A (ManA)와 mannanase C (ManC)로 분획하였다. ManA는 55°C와 pH 6.5, ManC는 65°C와 pH 7.5에서 최대활성을 보였으며, ManA는 40°C 이하에서 1시간 동안 실활되지 않았으나 ManC는 20°C에서도 상당량 실활되었다. 또한 ManA와 ManC는 기질특이성과 mannooligosaccharides의 최종 분해산물에도 차이가 있는 것으로 나타났다. 이로 보아 *Cellulosimicrobium* sp. YB-43은 특성이 서로 다른 2종류 mannanases를 생산하는 것으로 판단된다.

References

- Dhawan, S. and Kaur, J. 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit. Res. Biotechnol.* **27**, 197-216.
- Fleuri, L.F., Kawaguti, H.Y., and Sato, H.H. 2009. Production, purification and application of extracellular chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *Braz. J. Microbiol.* **40**, 623-630.
- Huang, J.L., Bao, L.X., Zou, H.Y., Che, S.G., and Wang, G.X. 2012. High-level production of a cold-active β -mannanase from *Bacillus subtilis* BS5 and its molecular cloning and expression. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* **4**, 14-17.
- 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.
- Kansoh, A.L. and Nagieb, Z.A. 2004. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie van Leeuwenhoek* **85**, 103-114.
- Kataoka, N. and Tokiwa, Y. 1998. Isolation and characterization of an active mannanase-producing anaerobic bacterium, *Clostridium tertium* KT-5A, from lotus soil. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 357-367.
- 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.
- Kim, D.Y., Han, M.K., Lee, J.S., Oh, H.W., Park, D.S., Shin, D.H., Bae, K.S., Son, K.H., and Park, H.Y.** 2009. Isolation and characterization of a cellulase-free endo- β -1,4-xylanase produced by an invertebrate-symbiotic bacterium, *Cellulosimicrobium* sp. HY-13. *Proc. Biochem.* **44**, 1055–1059.
- Kweon, 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.
- 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.
- Mok, C.H., Lee, J.H., and Kim, B.G.** 2013. Effects of exogenous phytase and β -mannanase on ileal and total tract digestibility of energy and nutrient in palm kernel expeller-containing diets fed to growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **186**, 209–213.
- Nabti, E., Bensidhoum, L., Tabli, N., Dahel, D., Weiss, A., Rothballer, M., Schmid, M., and Hartmann, A.** 2014. Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium* sp. strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. *Eur. J. Soil Biol.* **61**, 20–26.
- Oh, H.W., Heo, S.Y., Kim, D.Y., Park, D.S., Bae, K.S., and Park, H.Y.** 2008. Biochemical characterization and sequence analysis of a xylanase produced by an exo-symbiotic bacterium of *Gryllotalpa orientalis*, *Cellulosimicrobium* sp. HY-12. *Antonie van Leeuwenhoek* **93**, 437–442.
- Shi, P., Yuan, T., Zhao, J., Huang, H., Luo, H., Meng, K., Wang, Y., and Yao, B.** 2010. Genetic and biochemical characterization of a protease-resistant mesophilic β -mannanase from *Streptomyces* sp. S27. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 451–458.
- Song, J.M. and Wei, D.Z.** 2010. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. *Biomass Bioenerg.* **34**, 1930–1934.
- 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**, 392–417.
- Tanabe, Y. and Oda, M.** 2011. Molecular characterization of endo-1,3- β -glucanase from *Cellulosimicrobium cellulans*: Effects of carbohydrate-binding module on enzymatic function and stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 1713–1719.
- 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.
- Yoon, K.H.** 2011. Production and properties of hemicellulases by a *Cellulosimicrobium* sp. isolate. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 252–258.
- 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.
- You, J., Liu, J.F., Yang, S.Z., and Mu, B.Z.** 2015. Low-temperature-active and salt-tolerant β -mannanase from a newly isolated *Enterobacter* sp. strain N18. *J. Biosci. Bioeng.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.06.001> (Article in press).
- Yuan, Y., Hu, Y., Hu, C., Leng, J., Chen, H., Zhao, X., Gao, J., and Zhou, Y.** 2015. Overexpression and characterization of a glycoside hydrolase family 1 enzyme from *Cellulosimicrobium cellulans* sp. 21 and its application for minor ginsenosides production. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **120**, 60–67.
- Zhang, C., Chen, J.D., and Yang, F.Q.** 2014. Konjac glucomannan, a promising polysaccharide for OCDDS. *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., et al.** 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, J., Zhang, R., Gao, Y., Li, J., Tang, X., Mu, Y., Wang, F., Li, C., Dong, Y., and Huang, Z.** 2012. Novel low-temperature-active, salt-tolerant and proteases-resistant endo-1,4- β -mannanase from a new *Sphingomonas* strain. *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 568–574.