

Bacillus subtilis 분리균의 Mannanase와 Xylanase 생산성과 효소 특성

윤기홍*

우송대학교 외식조리영양학부

Received: July 14, 2015 / Revised: August 5, 2015 / Accepted: August 9, 2015

Production and Properties of Mannanase and Xylanase by a *Bacillus subtilis* Isolate

Ki-Hong Yoon*

Food Science & Biotechnology Major, Woosong University, Daejeon 300-718, Republic of Korea

A bacterial strain capable of hydrolyzing xylan and locust bean gum (LBG) was isolated from the Saemangeum tideland of Korea. Based on the biochemical properties and the 16S rRNA gene sequence, the isolate YB-30 was identified as *Bacillus subtilis*. Xylanase productivity was increased effectively when *B. subtilis* YB-30 was grown in the presence of wheat bran, while mannanase productivity was increased drastically when grown in the presence of konjac or LBG. Particularly, maximum mannanase and xylanase activities were detected in the culture filtrate of media containing 3.5% konjac and 1% wheat bran. Both enzyme productivities reached maximum levels in the stationary growth phase. The culture filtrate exhibited the highest activity at 60°C and pH 6.0 for mannanase and at 55°C and pH 5.5 for xylanase, respectively. Both enzymes were not stable at high temperatures and xylanase was less stable than mannanase. In addition, wheat bran was hydrolyzed to liberate reducing sugar to a greater extent than rice bran by the culture filtrate because the wheat bran contained more arabinoxylan than the rice bran. Hence, xylanase and mannanase produced by *B. subtilis* YB-30 have a potential use as feed additive enzymes.

Keywords: *Bacillus subtilis*, mannanase, xylanase, characterization

서 론

Hemicellulose는 식물의 세포벽을 구성하는 다당류로 리그닌과 cellulose 사이에 결합한 상태로 배열해 있고 xylan, mannan, arabinogalactan과 glucan 등의 다당류의 혼합물 이므로 한 종류의 구성 잔기로 이루어진 섬유소와는 달리 오탄당, 육탄당과 sugar acid에 속하는 여러 종류의 단량체로 구성되어 있다. Beechwood(31%), 쌀겨(24–33%), 나무껍질(30%), 목초(37%), 밀짚(24%), 옥수수대(25%), 벼짚(23–28%)의 hemicellulose 함량이 알려져 있으나 서로 차이가 있는 결과도 보고된 바 있다[10]. Hemicellulose의 주성분 다당류인 xylan과 mannan은 식물에 따라 그 종류와 구성비율

이 차이가 크며 경질목에는 acetyl-4-O-methylglucuronoxylan이 10–35%이고 glucomannan은 3–5% 수준으로 존재하는 반면에 연질목에서 galactoglucomannan의 함량이 15–25% 정도로 많으며 arabino-4-O-methylglucuronoxylan의 함량은 15–25%이다. 또한 mannan 다당류는 다수의 콩과식물 종자의 배유와 일부 비두과류 식물의 완숙한 종자에도 존재하며 사료로 사용되는 대두피(8%), palm kernel meal (30–35%)과 copra meal (25–30%)에는 많은 양이 함유되어 있다.

목재, 목초, 농작물 및 농산부산물에 포함되어 있는 hemicellulose는 섬유소 다음으로 가장 풍부한 재생가능 자원이므로 이를 소화 또는 발효가 가능한 당류로 전환함으로써 사료 원료의 이용효율을 높이거나 에탄올을 비롯한 발효산물의 생산에 활용하고 있다[23]. Xylan과 mannan의 분해에는 여러 종류의 효소가 관여하는데 이들 중 xylan의 기본 골격인 β -D-1,4-xylopyranosyl 결합과 mannan 다당류의 mannose간의 β -1,4-mannosyl 결합을 각각 무작위적으로 분해하여 중합도가 작은 올리고당으로 전환시키는 xylanase

*Corresponding author

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

E-mail: ykh@wsu.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

[16]와 mannanase [9]는 다당류의 분해에 가장 중요한 역할을 하는 효소이므로 산업적 유용성이 증가되고 있다. 곰팡이와 세균으로부터 다수의 xylanase와 mannanase가 발굴되었고 그 유전자에 대한 특성이 규명되었다. 또한 이들 효소는 산업적으로 생산되고 있으며, 효소의 특성과 생산성 개선을 위한 연구도 지속적으로 진행되고 있다.

Bacillus 속의 균은 protease, cellulase, amylase, xylanase와 mannanase 등과 같은 가수분해 효소를 분비 생산하는 특성을 지니고 있으며 여러 종류의 균주로부터 이들 유용 효소가 탐색되었다. Mannanase를 생산하는 균주로 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. halodurans*, *B. circulans*, *B. pumilus*를 포함한 다수의 *Bacillus* sp.가 보고되었으며[19], xylanase 생산균은 이보다 더 다양하여 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. halodurans*, *B. circulans*, *B. pumilus*, *B. aerophilus*, *B. mojavensis*, *B. alcalophilus*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. trypoxylicola*, *B. firmus*, *B. megaterium*, *B. agaradhaerens*, *B. lyticus*와 여러 특성을 갖는 *Bacillus* sp.가 알려졌다[15]. 또한 endoglucanase, xylanase, pectinase, mannanase를 효소 복합체로 생산하는 *B. licheniformis* SVD1이 보고된 바 있다[17]. 본 연구에서는 새만금 갯벌로부터 xylanase와 mannanase를 생산하는 *Bacillus* 균주를 분리하여 효소 특성과 생산성을 조사하였다.

재료 및 방법

효소 생산균 분리 및 동정

서해안 새만금 갯벌시료를 채취하여 5% NaCl이 첨가된 nutrient 평판배지에 도달한 후 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 형성된 콜로니를 선별하여 0.5% oat spelt xylan (xylan)과 0.5% locust bean gum (LBG)을 함유한 평판배지에 각각 접종하였다. 하룻밤 배양한 후 congo red로 염색하여 xylanase와 mannanase를 동시에 생산하는 균주를 선별하였다. 분리균을 tryptic soy agar에 배양하여 얻은 콜로니를 McFarland standard 0.5가 되도록 멸균된 0.45% NaCl 용액에 현탁한 후 BAC card (Biomereux사, France)에 주입하고 이를 Vitek junior 기기에 장착하여 배양하면서 6-15 시간의 범위에서 판독된 생화학적 특성을 database와 비교하였다. 분리균의 총 유전체 DNA를 주형으로 하여 16S rRNA의 보존적 지역의 염기서열을 갖는 primers 27F와 1492R로 증폭된 중합효소 연쇄반응(PCR) 산물을 정제하여 16S rRNA 염기서열을 분석하였다.

효소 활성 측정

Mannanase 활성은 LBG를, xylanase 활성은 oat spelt xylan을 기질로 하여 각각 효소 반응 후에 유리된 환원당을

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1% (w/v) LBG 용액 또는 xylan 용액 0.5 ml와 200 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0 또는 pH 5.5) 0.25 ml를 효소 용액 0.25 ml와 혼합하여 적정온도에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 용액 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Mannose 또는 xylose를 표준물질로 사용하여 동일조건에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건에서 1분 동안 LBG 또는 xylan으로부터 1 μmol의 mannose 또는 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

활성염색

조효소액을 SDS-PAGE한 후 polyacrylamide gel에서 SDS를 제거하기 위해 25% isopropanol을 포함한 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)로 세척한 후 동일완충액에 15-30분간 방치하였다. Polyacrylamide gel을 꺼내어 동일한 완충용액에 0.2% oat spelt xylan 또는 0.2% LBG와 1.5% agar를 녹여 제조한 gel을 중층하여 비닐로 봉입한 후 40°C에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후 중층한 gel을 congo red로 염색하여 분해지역을 관찰하였다.

조효소액 제조와 반응특성 분석

분리균 *B. subtilis* YB-30을 효소 생산에 적합한 배지에서 약 18시간 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양상층액을 ammonium sulfate (30-70%)로 처리하여 침전된 단백질을 10 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)에 현탁하고 투석한 후 조효소액으로 사용하였다. 효소 활성에 미치는 반응 온도와 pH의 영향을 조사하기 위하여 30-65°C와 pH 4.0-8.0의 범위에서 각각 xylanase와 mannanase 활성을 측정하였다. 열 안정성을 조사하기 위하여 조효소액을 서로 다른 온도에서 60분간 방치한 후 그 잔존활성을 측정하였다.

농산부산물의 가수분해

농산부산물인 쌀기울(1%) 또는 밀기울(1%)과 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)를 포함하는 반응액에 효소량을 달리 첨가하여 최종 부피가 0.5 ml이 되도록 하고 45°C에서 반응하면서 일정 시간마다 반응액에 존재하는 환원당을 조사하였다.

결과 및 고찰

Mannanase와 xylanase의 생산균의 분리와 특성

새만금 갯벌 시료로부터 분리된 균주 중에서 oat spelt

xylan (0.5%)이나 LBG (0.5%)가 첨가된 LB 평판배지에서 xylan과 LBG를 동시에 분해하며 분해환이 큰 균주를 선발하고 이를 YB-30으로 명명하였다. 분리균 YB-30은 그람 양성 균으로 확인되어 *Bacillus*속 균주로 추정되었으므로, Vitek의 BAC card를 사용하여 29개 항목의 생화학적 특성을 조사하였다. 그 결과 YB-30은 20종류의 탄수화물 중 sucrose, glucose, arabinose, xylose, mannitol, salicin, inulin, ribose, maltose, trehalose, palatinose, sorbitol, N-acetyl-D-glucosamine을 탄소원으로 이용하였고, potassium thiocyanate, mandelic acid, polyamido-hydrostreptin와 같은 선택성이 높은 성장 저해제나 7% NaCl이 첨가된 배지에서 포도당을 발효하였으며 *B. subtilis*와 유사도가 99%로 나타났다. 또한 분리균의 16S rRNA를 PCR로 증폭한 후 1,516 bp 크기의 염기서열을 결정하였으며 이를 미국 NCBI의 BLAST 검색방법을 사용하여 세균들의 상응하는 염기서열과 비교한 결과 *B. subtilis* CE1 (Genbank accession No. JQ435698)와 *B. subtilis* 168 (CP010052)를 비롯한 여러 종의 *B. subtilis*와 그 서열이 일치하여 분리균 YB-30은 *B. subtilis*에 속하는 것으로 판단되었다. *B. subtilis* CE1는 작물의 뿌리 병원성균에 항균활성을 보이는 균으로 습지대에서 분리되었다[3].

한편 *B. subtilis* YB-30 균주가 갯벌에서 분리 되었으므로 *B. subtilis* 168과 내염성을 비교하였다. NaCl의 농도가 1-10% 범위에서 달리 첨가된 LB 평판배지와 액상배지에서 16시간 배양하여 성장 정도를 비교한 결과 액상배지에서 NaCl이 7% 이상 첨가된 배지에서는 두 균주가 모두 성장이 약한은 저해되었으나 10% NaCl을 첨가한 배지도 성장이 일어났다. 평판배지에서는 NaCl의 농도가 높아질수록 콜로니 크기가 작아지면서 10% NaCl 첨가배지는 비정상적인 형태를 보였으나 두 균주간에 차이가 거의 없었다. 이로 보아 분리균은 갯벌에서 분리되었지만 내염성과는 관련이 없음을 알 수 있었다.

부가탄소원에 따른 효소 생산성

Mannanase와 xylanase는 배지에 포함된 탄수화물 종류와 함량에 의해 생산성에 큰 영향을 받으며, mannan이나 xylan이 함유된 배지에서 그 분해효소 생산이 증가되는 것으로 보고된 바가 있다[8, 15]. 따라서 YB-30의 효소 생산성에 미치는 탄수화물의 영향을 조사하기 위해 LB 액체배지를 기본배지로 하여 단당류와 이당류는 1%, 고분자성 탄소원은 0.5% (w/v)가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 진탕 배양하였다. 배양시간은 LB 배지를 기준으로 하여 효소 생산성이 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타난 15시간으로 결정하고 배양상등액에 존재하는 효소 활성을 측정하였다.

분리균 YB-30의 xylanase의 생산성은 부가 탄소원에 의

Table 1. Effects of additional carbon sources on the mannanase and xylanase production of *B. subtilis* YB-30.

Additional carbon sources	Mannanase productivity (U/ml)	Xylanase productivity (U/ml)
None	0.5	0.5
Glucose	0.5	1.1
Mannose	0.5	1.4
Lactose	2.6	0.5
Maltose	0.6	1.4
Sucrose	0.6	1.6
Mannitol	0.5	0.4
Fructose	0.5	0.9
Xylose	1.3	1.2
Galactose	1.3	1.3
α -Cellulose	3.1	0.5
Locust bean gum	44.0	1.2
Guar gum	11.3	0.8
Konjac	129.4	1.8
Oat spelt xylan	1.3	1.0
Rice straw	2.7	1.9
Wheat bran	2.9	2.3

해 큰 영향을 받지 않는데 비해 mannanase 생산성은 영향을 크게 받는 것으로 나타났다(Table 1). 밀기울이 첨가된 배지에서 xylanase 생산성이 4.6배 정도 증가하였으나, oat spelt xylan에 의해서는 2배 정도 수준으로 증가하여 다른 탄소원에 비해 크게 xylanase 생산성을 증가시키지 않았다. Mannanase의 생산성은 konjac, LBG와 guar gum 등과 같은 mannan 다당류가 첨가된 배지에서 크게 증가하였으며, 특히 konjac에 의한 생산성 증가는 가장 높아 LBG를 첨가하였을 때보다 3배 수준에 해당하였다. 한편 단당류나 이당류가 xylanase와 mannanase 생산성에 미치는 영향은 약간의 차이를 나타내었으며, glucose, mannose, maltose, sucrose를 함유한 배지에서는 mannanase 생산성은 변화가 거의 없었으나 xylanase 생산성은 2배 이상 증가하였고 lactose가 첨가된 배지에서는 xylanase 생산성이 변화하지 않았으나 mannanase 생산성이 약 5배 정도 증가하였다. Xylose와 galactose 첨가 배지에서는 두 효소의 생산성이 모두 2.5배 정도 수준으로 증가되었다.

Xylanase와 mannanase의 생산성을 증가시키는 효과가 높은 밀기울과 konjac을 각각 0.1-5% 범위로 첨가된 배지에서 효소 생산성을 조사하였다. 밀기울의 첨가량이 많아질수록 xylanase의 생산성이 증가하여 4%에서는 생산성이 최대에 도달하였다(Table 2). 밀기울 성분 중 어떤 성분이 효소 생산성을 증가시키는지 확인하기 위해 밀기울을 종류수에 현

Table 2. Effects of additional amounts of wheat bran or konjac on mannanase or xylanase production.

Added amount (%) of wheat bran	Xylanase productivity (U/ml)	Added amount (%) of konjac	Mannanase productivity (U/ml)
None	0.6	None	0.7
0.1	2.3	0.1	44.9
0.3	4.0	0.3	80.5
0.5	5.7	0.5	121.9
1.0	10.2	1.0	164.5
1.5	12.8	1.5	180.4
2.0	14.1	2.0	183.8
2.5	16.2	2.5	203.5
3.0	20.2	3.0	236.9
3.5	20.5	3.5	236.0
4.0	22.5	4.0	232.2
4.5	22.5	4.5	212.2
5.0	22.2	5.0	185.1

Table 3. Effects of mixture of konjac and wheat bran on mannanase and xylanase production.

Amount of wheat bran (%) added with 3.5% konjac	Xylanase productivity (U/ml)	Mannanase productivity (U/ml)
0	19.4	234.0
1	22.0	291.9
2	18.2	164.1
3	16.5	162.6
4	18.8	156.6

탁한 후 원심 분리하여 불용성 물질과 수용성 물질로 분리하고 이를 밀기울 4% 기준으로 LB 배지에 각각 첨가한 배지에서 xylanase 생산성을 조사한 결과 수용성 물질이 함유된 배지(4.5 U/ml)에서 보다 불용성 물질을 함유한 배지에서 효소 생산성이 높았다(17.7 U/ml). 불용성과 수용성으로 구분하지 않고 밀기울이 그대로 첨가된 배지에서는 xylanase 생산성이 20.9 U/ml로 나타났는데 이는 불용성물질과 수용성 물질이 따로 첨가된 배지에서 각각 생산된 효소 활성의 합계와 유사한 수준이었으며, 이들 결과로 보아 밀기울의 불용성 성분이 xylanase의 생산을 유도하는 주된 역할을 하는 것으로 추측된다.

한편 mannanase는 소량의 konjac이 첨가된 배지에서도 생산성이 급격하게 증가하였으며, 3-3.5%를 첨가하였을 때 mannanase 생산성이 최대에 이르렀다. Xylanase와 mannanase의 생산성을 동시에 증가시키기 위해서 3.5% konjac과 동시

Table 4. Growth and enzyme production of YB-30 according to incubation time.

Culture time (h)	Xylanase productivity (U/ml)	Mannanase productivity (U/ml)	Cell growth (cfu/ml)
12	15.0	121.46	4.6×10^8
15	18.3	198.9	3.2×10^9
18	21.5	213.4	5.7×10^9
21	18.8	220.13	5.6×10^9
24	17.3	222.8	5.7×10^9

에 밀기울의 첨가량을 달리하여 제조한 배지에서 효소 생산성을 조사한 결과 밀기울 첨가량이 1%일 때 두 효소의 생산성은 모두 최대로 나타났으나, 2% 이상에서는 두 효소의 생산성이 모두 감소하였고 특히 mannanase 생산성이 크게 감소하였다.

Konjac (3.5%)과 밀기울(1%)을 동시에 첨가한 배지에서 배양시간에 따라 효소 생산성의 변화를 조사하였다. 배양 초기에는 첨가된 konjac에 의해 배양액의 점도가 너무 높아 배양액을 채취하기에 적합하지 않았으며 점성이 감소된 12시간을 배양한 후부터 배양액의 효소 활성과 생균수를 조사하였다. 그 결과 Table 4에 나타낸 바와 같이 배양시간이 18시간 이후에는 생균수가 더 이상 증가하지 않았으며, xylanase는 18시간에 최대 생산성을 보이고 이후에는 약간씩 감소하였으나 mannanase는 18시간 이후에도 생산성이 약한 수준으로 증가하였다. 그러므로 효소 생산성은 정지기에 이르렀을 때 최대로 생산되었음을 알 수 있는데, *B. halodurans* PPKS도 YB-30과 유사하게 균의 성장과 연계하여 xylanase의 생산성이 증가하고 정지기에는 최대에 도달하는데 비해[13] *B. amyloliquefaciens*의 mannanase는 생육이 정지기에 도달하였을 때부터 생산되기 시작하여 정지기 기간 중 계속 증가하는 것으로 보고되었다[21].

또한 mannanase와 xylanase를 모두 생산하는 *B. halodurans* PPKS02는 옥수수피, 쌀기울, 밀기울을 1% 첨가한 배지에서 xylanase 생산성이 증가하며 특히 옥수수피를 첨가한 배지에서 85 U/ml의 가장 높은 생산성을 보였고[13], 탈지된 코코아 아자박을 첨가한 배지에서는 mannanase 생산성이 크게 증가하는 것으로 나타나[18] YB-30의 효소와 같이 서로 다른 물질에 의해 효소 생산성이 증대되었다. *B. pumilus*는 *B. subtilis* YB-30과 같이 밀기울이나 xylan에 의해 생산성이 증가하였고[12], *Bacillus* sp.와 *B. amyloliquefaciens*는 xylan이 첨가된 배지에서 xylanase 생산성이 28 U/ml와 10.5 U/ml로 각각 보고되었다[2, 15]. 또한 xylose를 첨가하였을 때도 분리균과 같이 *Bacillus* sp.와 *Microbacterium* sp.의 xylanase 생산성도 증가하는 현상을 보인 바 있다. 한

편 목화밭에서 분리된 *B. mojavensis*는 밀기울 보다 귀리기울에서 생산성이 높으며, 2%일 때 최대 생산성을 보였다[1].

Mannanase 생산성은 *B. subtilis* BS5 경우에는 konjac 분말을 첨가한 배지에서 9시간만에 최대 생산성에 도달하며 약 1,241 U/ml의 생산성을 보여[6] 분리균 YB-30보다 생산성이 높았으며, 된장에서 분리된 *B. amyloliquefaciens* YB-1402는 분리균 YB-30과 유사하게 LBG 보다 konjac을 첨가한 배지에서 mannanase 생산성이 높은 것으로 알려졌다 [21].

효소 특성

배양상등액에 존재하는 mannanase와 xylanase를 확인하기 위해서 SDS-PAGE를 수행한 후 활성염색을 실시한 결과 크기가 약 26 kDa와 33 kDa로 추정되는 위치에 xylanase와 mannanase 활성을 보이는 단일한 밴드가 각각 관찰되었다 (Fig. 1). YB-30의 xylanase는 22-23 kDa인 *B. firmus* [4]와 *B. halodurans* PPKS-2 [18]의 xylanases 보다는 크며, mannanase는 대부분이 38 kDa인 *Bacillus* 유래의 mannanases [6]에 비해 작고 *B. circulans* [11]의 mannanase (31 kDa) 보다는 큰 것으로 확인되었다. 그리고 활성 염색된 단백질이 한군데에서만 확인된 것으로 보아 분리균 YB-30은 xylanase와 mannanase를 각각 한 종류씩 생산하는 것으로 추정되며, mannanase의 활성이 매우 미약하게 나타난 것은 SDS-

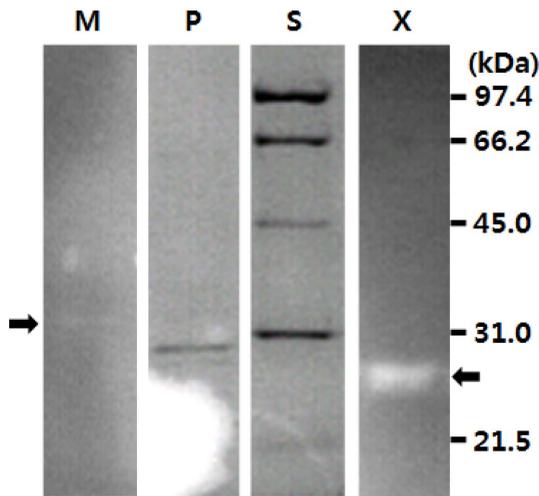


Fig. 1. SDS-PAGE and enzyme zymograms of the culture filtrate of *B. subtilis* YB-30. After SDS-PAGE of the filtrate of *B. subtilis* YB-30 cultures grown in LB broth supplemented with konjac (3.5%) and wheat bran (1%) for mannanase and xylanase production, proteins exhibiting mannanase (lane M) or xylanase (lane X) activity were analyzed by activity staining with LBG or oat spelt xylan as substrates, and indicated by arrows, respectively. Lane P represents gel stained by Coomassie blue. Molecular size of standard proteins (lane S) is shown in kilodaltons to the right side of the gel.

PAGE 과정 중 실활 후 활성 염색과정 중에 활성의 회복율이 낮은 때문으로 여겨진다.

배양상등액을 ammonium sulfate로 처리하여 제조한 조효소액을 사용하여 반응 pH와 온도가 효소활성에 미치는 영향을 조사한 결과 mannanase는 60°C와 pH 6.0, xylanase는 55°C와 pH 5.5에서 각각 최대 활성을 보였다(Fig. 2). *B. halodurans* PPKS-2의 mannanase [18]와 xylanase [13]는 모두 pH 11과 70°C에서 최대활성을 보여 분리균의 효소와

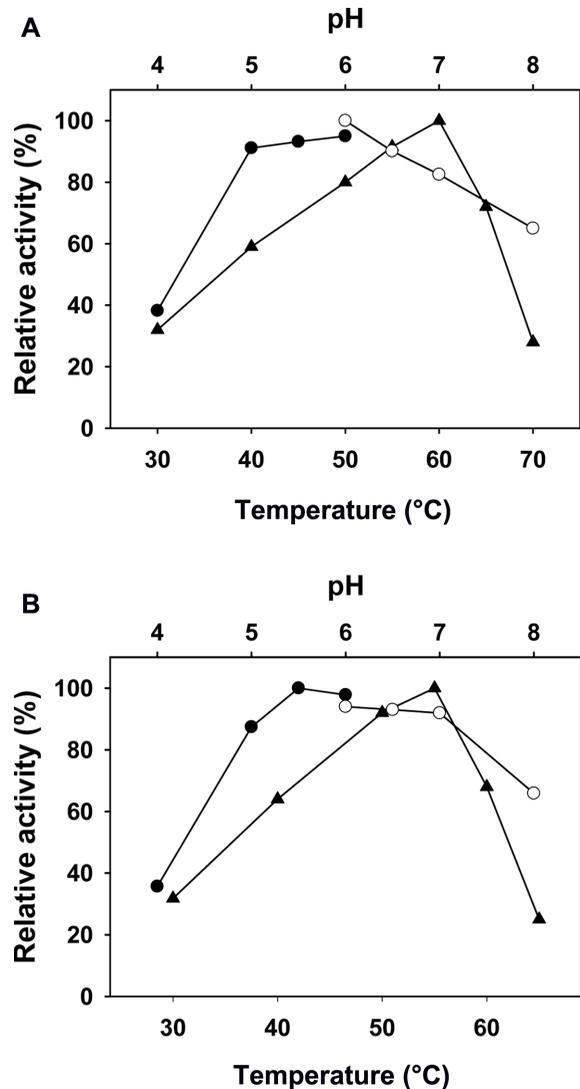


Fig. 2. Effects of reaction temperature and pH on the enzyme activities. Temperature profiles (triangles) were obtained by measuring the mannanase activity (A) with a fixed pH 6.0 and xylanase activity (B) with a fixed pH 5.5 at different temperatures. The pH profiles (circles) were obtained by measuring the enzyme 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; -○-).

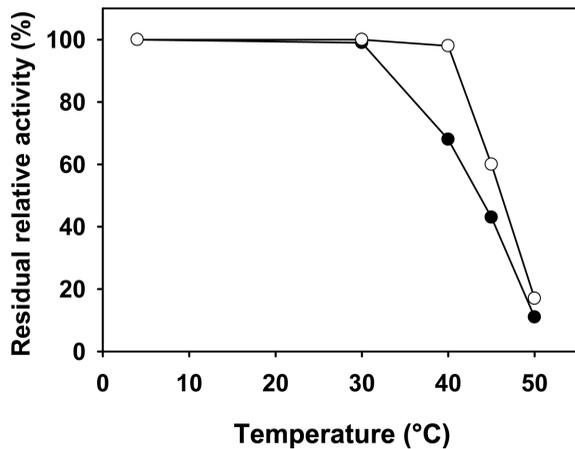


Fig. 3. Thermostability of the crude enzyme. Thermostability was determined by measuring the residual activities of mannase (-○-) and xylanase (-●-) after pre-incubation at different temperatures for 1 h.

크게 달랐으며, *B. circulans* CGMCC 1416의 mannase는 pH 7.6와 58°C [11], *B. subtilis* WL-3의 mannase [22]는 pH 6.0과 55°C에서 각각 최대활성을 보여 YB-30의 mannase와 유사하였다. YB-30의 효소보다는 낮은 온도와 낮은 pH에서 최대활성을 갖는 mannase도 *B. subtilis* BS5로부터 확인되었다[6]. *B. subtilis* B10의 xylanase (pH 6.0, 50°C) [5]는 분리균의 효소와 유사한 조건에서 최대활성을 보이는 반면에 *B. amyloliquefaciens* XR44A의 xylanase [2]는 pH 7-9와 70°C, *Bacillus* sp. xylanase [15]는 pH 8.0과 60°C에서 각각 최대활성을 갖는 것으로 알려졌다.

열안정성을 조사하기 위해서 조효소액을 여러 온도에서 1시간 방치한 후에 잔존활성을 측정한 결과 40°C에서 방치되었을 때는 mannase의 활성이 유지되었으나 이보다 높은 온도에서는 급격하게 실활되었고, xylanase는 30°C 이하에서는 안정하였으며 40°C에서는 약 20% 이상 실활되었다 (Fig. 3). *B. mojavensis* AG137 xylanase는 45-55°C에서 1시간 방치하였을 때 잔존활성이 68-50% [1]으로 분리균의 효소보다 약간 높았으며, 65°C에서 1시간 방치하여도 실활되지 않는 *Bacillus* sp.의 xylanase [15]와 70°C에서 3시간 방치 후에도 안정한 *B. halodurans* PPKS-2의 mannase와 xylanase에 비해 YB-30에 의해 생산되는 효소는 열안정성이 낮았다.

밀기울과 쌀기울의 분해능

밀기울과 쌀기울은 가격이 저렴하여 사료로 많이 사용되고 있으며[20] 영양성분으로 단백질, 지방, 전분과 함께 비전분성 다당류를 포함하고 있다. 비전분성 다당류의 함량은 각각 45-50%와 18-23%로 밀기울에 많이 존재하며 xylan과

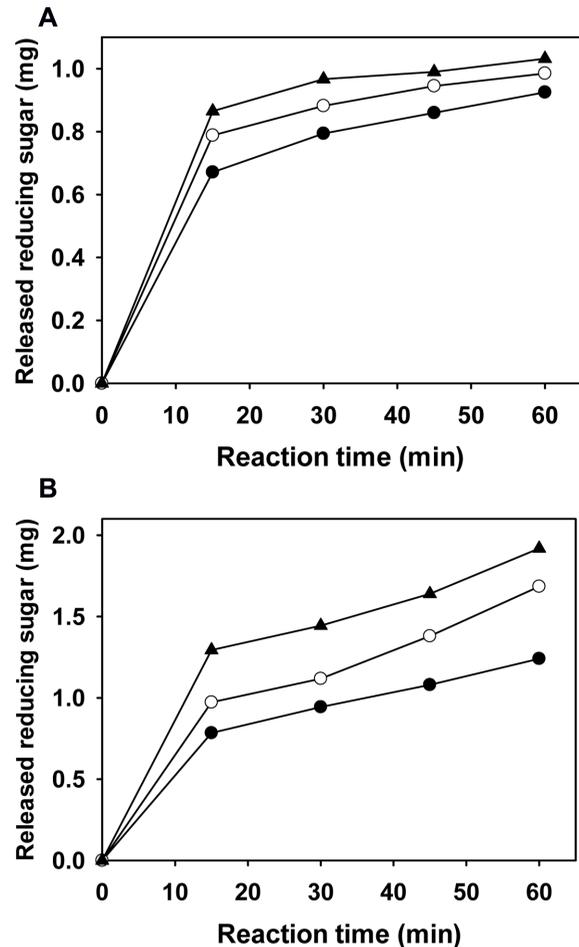


Fig. 4. Amounts of the reducing sugar liberated from rice bran (A) and wheat bran (B) by crude enzyme of *B. subtilis* YB-30. For enzymatic reaction, reaction mixtures consisting of rice bran (1%) or wheat bran (1%) used as substrate and 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) were supplemented with 10 µl (-●-), 20 µl (-○-) and 40 µl (-▲-) of crude enzyme, followed by incubating at 45°C for 15 min. Amounts of the liberated reducing sugar were determined by DNS method.

mannan은 비전분성 다당류에 속한다. *B. subtilis* YB-30의 효소에 의한 밀기울과 쌀기울의 분해능을 조사하기 위해 조효소액을 사용하여 밀기울과 쌀기울을 가수분해하였다. 조효소액에 존재하는 탄수화물 가수분해 효소로는 xylanase (77.4 U/ml), mannase (1,571.5 U/ml)와 함께 CMCase (1.1 U/ml) 및 amylase (107.5 U/ml)의 활성이 관찰되었다. 밀기울(1%)이나 쌀기울(1%)을 포함한 반응액에 조효소액 첨가량을(0.01-0.04 ml) 다르게 하여 반응하였을 때 효소 사용량과 반응시간에 따라 환원당의 양이 증가하였으며 쌀기울보다 밀기울을 기질로 하였을 때 많은 환원당이 생성되었다 (Fig. 4). 또한 쌀기울은 반응시간이 진행됨에 따라 효소량에 따른 생성된 환원당량의 차이가 줄어드는 경향이 있지만, 이

에 비해 밀기울은 60분간 반응 후에도 사용된 조효소량에 따라 생성되는 환원당량의 차이가 크게 유지되었다. 이러한 현상으로 밀기울에 존재하는 arabinoxylan의 함량이 32% 수준으로 많은 반면에 쌀기울에는 10% 미만의 arabinoxylan이 포함되어 있으므로 [7, 14] 조효소의 xylanase에 의해 생성된 환원당량의 차이가 일어난 때문이라 할 수 있다.

한편 밀기울에 포함된 전분의 함량은 쌀기울보다는 적거나 유사하므로 쌀기울 보다 밀기울로부터 환원당이 더 많이 생성되는 것이 조효소에 존재하는 amylase의 작용이라고 할 수 없으며 더구나 이들 전분은 분해가 어려운 저항성 전분으로 알려져 있다. 밀기울과 쌀기울의 mannan 함량은 1% 이하로 매우 소량 존재하므로 조효소의 mannanase는 환원당 생성에 크게 관여하지 못하였을 것으로 판단된다. 그러므로 *B. subtilis* YB-30으로부터 생산된 xylanase는 밀기울과 같이 xylan의 함량이 높은 곡물이나 그 부산물의 이용 효율을 높이며, 동시에 mannanase는 mannan의 함유량이 높은 copra meal, palm kernel meal과 대두피의 이용 효율을 높일 수 있을 것으로 판단되므로 *B. subtilis* YB-30은 여러 종류의 곡물을 혼합한 가축사료에 발효 생균제나 효소 생산균으로 사용되기 적합할 것으로 보인다.

요 약

새만금 갯벌로부터 xylan과 locust bean gum (LBG)을 분해하는 미생물을 분리하여 그 생화학적 특성과 16S rRNA 서열을 조사한 결과 *Bacillus subtilis*로 확인되었다. 분리균 YB-30은 konjac이나 LBG가 존재한 상태에서 배양할 경우 mannanase의 생산성이 급격하게 증가되며, 밀기울이 존재 하에서는 xylanase의 생산성이 증가되었다. Konjac (3.5%) 과 밀기울(1%)이 동시에 첨가된 배지에서 균의 성장이 정지 기에 진입하였을 때 mannanase와 xylanase의 생산성이 최고 수준에 도달하였다. 배양상등액의 mannanase와 xylanase는 60°C와 pH 6.0, 55°C와 pH 5.5에서 각각 최대 활성을 보였다. 고온에서는 두 효소 모두 안정하지는 않았으며 xylanase가 mannanase보다 안정성이 낮았다. 밀기울은 쌀기울보다 많은 양의 arabinoxylan을 함유하고 있으므로 배양상등액으로 분해하였을 때 밀기울로부터 생성되는 환원당의 양이 더 많은 것으로 확인되었으며, 이로 보아 *B. subtilis* YB-30에 의해 생산되는 xylanase와 mannanase는 사료첨가용 효소로 활용 가능성이 높다고 여겨진다.

References

1. Akhavan Sepahy A, Ghazi S, Akhavan Sepahy M. 2011. Cost-effective production and optimization of alkaline xylanase by indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 fermented on agricultural Waste. *Enzyme Res.* **2011**: 593624. doi: 10.4061/2011/593624.
2. Amore A, Parameswaran B, Kumar R, Birolo L, Vinciguerra R, Marcolongo L, et al. 2015. Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **90**: 573–581.
3. Cavaglieri L, Orlando J, Rodriguez MI, Chulze S, Etcheverry M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Res. Microbiol.* **156**: 748–754.
4. Chang P, Tsai WS, Tsai CL, Tseng MJ. 2004. Cloning and characterization of two thermostable xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**: 1017–1025.
5. Huang J, Wang G, Xiao L. 2006. Cloning, sequencing and expression of the xylanase gene from a *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* **97**: 802–808.
6. Huang JL, Bao LX, Zou HY, Che SG, Wang GX. 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.
7. Izydorczyk MS, Biliaderis CG. 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* **28**: 33–48.
8. Jiang Z, Wei Y, Li D, Li L, Chai P, 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.
9. Jorgensen HA, Sanadi R, Felby C, Lange NE, Fischer M, Ernst S. 2010. Production of ethanol and feed by high dry matter hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **161**: 318–332.
10. Koullas DP, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ, Koukios EG. 1992. Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic-hydrolysis of straw. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 113–116.
11. Li Y, Yang P, Meng K, Wang Y, Luo H, Wu N, et al. 2008. Gene cloning, expression, and characterization of a novel β -mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 160–166.
12. Nagar S, Gupta VK, Kumar D, Kumar L, Kuhad RC. 2010. Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. *J. Ind. Microbiol.* **37**: 71–83.
13. Prakash P, Jayalakshmi SK, Prakash B, Rubul M, Sreeramulu K. 2012. Production of alkaliphilic, halotolerant, thermostable cellulase free xylanase by *Bacillus halodurans* PPKS-2 using agro waste: single step purification and characterization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 183–192.
14. Ralet MC, Thibault JF, Della Valle G. 1990. Influence of extrusion-cooking on the physicochemical properties of wheat bran. *J. Cereal Sci.* **11**: 793–812.
15. Saleem M, Aslam F, Akhtar MS, Tariq M, Rajoka MI. 2012.

- Characterization of a thermostable and alkaline xylanase from *Bacillus* sp. and its bleaching impact on wheat straw pulp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 513–522.
16. Subramaniyan S, Prema P. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **22**: 33–64.
 17. van Dyk JS, Sakka M, Sakka K, Pletschke BI. 2010. Identification of endoglucanases, xylanases, pectinases and mannanases in the multi-enzyme complex of *Bacillus licheniformis* SVD1. *Enzyme Microb. Technol.* **47**: 112–118.
 18. Vijayalaxmi S, Prakash P, Jayalakshmi SK, Mulimani VH, 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.
 19. Wongputtisin P, Khanongnuch C, Khongbantad W, Niamsup P, Lumyong S. 2012. Screening and selection of *Bacillus* spp. for fermented corticate soybean meal production. *J. Appl. Microbiol.* **113**: 798–806.
 20. Xie X, Cui SW, Li W, Tsao R. 2008. Isolation and characterization of wheat bran starch. *Food Res. Int.* **41**: 882–887.
 21. Yoon K-H. 2014. Production and properties of mannanase by a *Bacillus amyloliquefaciens* Isolate. *Korean J. Microbiol.* **50**: 158–163.
 22. Yoon K-H, Chung S, Lim B-L. 2008. Characterization of the *Bacillus subtilis* W-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **46**: 344–349.
 23. Zangiabadi H, Torki M. 2010. The effect of a β -mannanase-based enzyme on growth performance and humoral immune response of broiler chickens fed diets containing graded levels of whole dates. *Trop. Anim. Health Prod.* **42**: 1209–1217.