

## Article

# *Cellulosimicrobium* sp. YB-43의 mannanase B 유전자 클로닝과 특성 분석

윤기홍\*

우송대학교 바이오식품과학전공

## Molecular cloning and characterization of $\beta$ -mannanase B from *Cellulosimicrobium* sp. YB-43

Ki-Hong Yoon\*

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

(Received August 1, 2016; Revised August 26, 2016; Accepted August 29, 2016)

**ABSTRACT:** A mannanase gene was cloned into *Escherichia coli* from *Cellulosimicrobium* sp. YB-43, which had been found to produce two kinds of mannanase, and sequenced completely. This mannanase gene, designated *manB*, consisted of 1,284 nucleotides encoding a polypeptide of 427 amino acid residues. Based on the deduced amino acid sequence, the ManB was identified to be a modular enzyme including two carbohydrate binding domains besides the catalytic domain, which was highly homologous to mannanases belonging to the glycosyl hydrolase family 5. The N-terminal amino acid sequence of ManB, purified from a cell-free extract of the recombinant *E. coli* carrying a *Cellulosimicrobium* sp. YB-43 *manB* gene, has been determined as QGASAASDG, which was correctly corresponding to signal peptide predicted by SignalP4.1 server for Gram-negative bacteria. The purified ManB had a pH optimum for its activity at pH 6.5~7.0 and a temperature optimum at 55°C. The enzyme was active on locust bean gum (LBG), konjac and guar gum, while it did not exhibit activity towards carboxymethylcellulose, xylan, starch, and *para*-nitrophenyl- $\beta$ -mannopyranoside. The activity of enzyme was inhibited very slightly by  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ , and  $Na^+$ , and significantly inhibited by  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , and SDS. The enzyme could hydrolyze mannoooligosaccharides larger than mannobiose, which was the most predominant product resulting from the ManB hydrolysis for mannoooligosaccharides and LBG.

**Key words:** *Cellulosimicrobium* sp. YB-43, cloning, mannanase, purification

Mannan 다당류는 기본 골격과 측쇄를 구성하는 당의 종류에 따라  $\beta$ -mannan, glucomannan, galactomannan과 galactoglucomannan으로 구분되며, 나무의 목질부 세포벽의 반섬유소를 비롯하여 식물의 종자나 뿌리 등에 존재하는 저장 다당류(McCleary, 1985) 및 조류의 세포벽과 저장 물질에서 두루 발견된다고 보고되었다(Chanzy *et al.*, 1984). Mannan 다당류의 분해에는 mannanase,  $\beta$ -mannosidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase와 acetyl mannan esterase가 관여하며(Malgas *et al.*, 2015) 이들 중 mannose 잔기인  $\beta$ -1,4-mannosyl 결합을 무작위적으로 분해하여 mannoooligosaccharide (MOS)로 전환시키는 mannanase가 주된 역할을 한다.

바이오매스 자원의 당화, 커피 가공, 펄프 표백, 올리고당 제조 및 사료첨가용 효소로 산업적 활용성이 높은 mannanase는 xylanase나 cellulase에 비해서는 연구가 적게 이루어졌지만 최근 들어 크게 주목을 받고 있는 효소이다(Dhawan and Kaur, 2007; Malgas *et al.*, 2015). MOS가 prebiotics의 기능과 장관의 치료 효과 및 항산화 활성을 보이는 것으로 확인되면서 원두커피 부산물을 비롯한 여러 종류의 mannan 다당류를 mannanase로 분해하여 MOS를 생산하기 위한 연구가 활발히 진행되었다(Srivastava and Kapoor, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Pangsri *et al.*, 2015). 또한 mannanase는 사료 곡물의 항영양인자로 존재하는 mannan 다당류를 분해하여 MOS로 전환시킴으로써 사료효율 개선과 함께 가축의 면역기능을 향상시키는 사료첨가용 효소로 효능이 입증되어(Mok *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2015) 상업화가 되었으며 최근에 전세

\*For correspondence. E-mail: ykh@wsu.ac.kr;  
Tel.: +82-42-630-9742; Fax: +82-42-630-9389

계적으로 강조되고 있는 무항생제 친환경 축산에 적합한 효소로 주목을 받고 있다.

현재까지 알려진 mannanase는 활성영역의 아미노산 배열에 따라 GH5, 26, 113과 134로 구별되는데 대부분은 GH5와 GH26에 속하며 GH113과 GH134에 속하는 mannanase는 *Alicyclobacillus*속 균주(Xia *et al.*, 2016)와 *Aspergillus nidulans*로부터(Shimizu *et al.*, 2015) 각각 보고되었다. 주로 세균으로부터 생산되는 GH26의 mannanase에는 *Cellulomonas fimi*의 mannanase와 같이 활성 영역 외에 다른 기능성 영역을 포함한 효소도 있지만 활성 영역만으로 구성된 효소가 대부분을 차지한다(Stoll *et al.*, 1999). 이에 비해 GH5의 mannanase는 세균과 균류에서 두루 생산되며 활성 영역외에 탄수화물 결합 영역(CBM)을 비롯한 다른 기능성 영역을 포함한 것이 많다(Dhawan and Kaur, 2007). 한편 *Aspergillus*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Thermobifida*와 *Trichoderma*를 포함한 여러 속의 많은 균주로부터 mannanase 유전자가 클로닝되어 그 특성이 확인되었고, *B. subtilis*와 *Pichia pastoris*에서 과잉 생산된 바 있다(Yoon and Lim, 2007; Zhou *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015).

*Cellulosimicrobium cellulans*는 16S rDNA 서열과 세포벽과 세포막의 조성분에 따라 *Cellulomonas cellulans*가 재분류된 것이며(Schumann *et al.*, 2001), *Cellulosimicrobium* 속의 균종은 *C. aquatilis*, *C. cellulans*, *C. funkei*와 *C. terreum* 등이 알려져 있다. Curdlan을 1,3- $\beta$ -glucan 올리고당으로 가수분해하는 endo-1,3- $\beta$ -glucanases, 밀집 펄프의 표백용 xylanase, protease 등의 효소를 생산하는 *C. cellulans* 뿐 아니라 chitinase,  $\beta$ -glucosidase, cellulase, xylanase의 생산균인 *Cellulosimicrobium* 속 균주들이 토양이나 동물의 장관에서 분리되었다. 특히 *C. funkei* HY-13로부터는 mannanases와 glucanase가 보고되었다(Kim *et al.*, 2011a, 2011b, 2016). 한편 밤 나무 농장의 토양으로부터 분리된 *Cellulosimicrobium* sp. YB-43의 배양상등액으로부터 2종류의 mannanases (mannanase A, ManA; mannanase C, ManC)가 부분 정제되었으며, 이들 효소는 최적 반응 조건을 비롯하여 열안정성, 기질 특이성 등이 서로 다른 것으로 보고되었다(Yoon, 2015). 본 연구에서는 *Cellulosimicrobium* sp. YB-43의 mannanase 유전자를 클로닝하여 재조합 대장균으로부터 효소를 정제하고 그 특성을 조사하여 ManA 및 ManC와 비교하였다.

## 재료 및 방법

### Mannanase 유전자 클로닝

유전자 분리원으로 사용한 *Cellulosimicrobium* sp. YB-43은 LB 액체배지에서 배양온도를 30°C로 하여 20시간 진탕 배양한 후 균체를 회수하여 Genomic DNA prep kit (Solgent)로 총 유전체 DNA를 분리하였다. Mannanase 유전자를 클로닝하기 위해 분리된 염색체 DNA를 *Sau3AI*으로 부분 절단하고 agarose gel 전기영동을 한 후 1.5 kb 이상인 DNA 단편을 추출하였다. 이를 *BamHI*으로 절단된 pUC19와 ligation한 후 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 도입하여 얻은 형질전환주를 0.5% LBG를 첨가한 LB 평판배지에 옮겨 하루밤 배양하였다. Congo red 용액(0.2%)으로 1시간 염색하여 형질전환주 집락 주변에 분해환을 관찰함으로써 mannanase 활성을 보이는 형질전환주를 선별하였다. 유전자 염기서열 결정을 위해서는 형질전환주로부터 분리된 재조합 플라스미드에 클론된 유전자를 제한효소로 적절한 크기로 절단하여 pUC19에 도입하고 이를 주형 DNA로 하고 M13 universal primer와 reverse primer를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

### Mannanase의 정제

*Cellulosimicrobium* sp. YB-43의 mannanase 유전자가 도입된 재조합 대장균을 LB 배지에 접종하여 37°C에서 13시간 동안 진탕 배양한 후 균체를 회수하고 10 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 현탁하였다. 균체를 파쇄하고 원심분리한 후 균체 파쇄상등액을 채취하여 ammonium sulfate (25-70%)로 침전하여 단백질을 분획하였다. 침전된 단백질을 20 mM Tris 완충용액(pH 8.0)으로 현탁하고 동일 완충액으로 투석하였다. 동일한 완충액으로 평형화한 DEAE-Sephadex column (Sigma-Aldrich Co.)에 효소액을 흡착시킨 후 NaCl의 농도를 0 M에서 2.0 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 컬럼(Sigma-Aldrich Co.)에 흡착시키고 NaCl의 농도를 0 M에서 1.0 M까지 농도구배를 주어 증가시킨 20 mM Tris 완충용액(pH 8.0)으로 용출하였다. 활성 분획을 모아 ultrafiltration으로 농축한 후 10 mM potassium phosphate 완충액(pH 7.0)으로 투석하고 동일한 완충액으로 평형화한 hydroxyapatite 컬럼으로 크로마토그래피를 수행하여 흡착되지 않고 용출된 단백질을 회수함으로써 mannanase를 정제하였다. 정제된 효소의 아미노 말단의 아미노산 배열을 결정하기 위해서는 기초과

학연구소 서울본원의 Procise 491 protein sequencer (Applied Biosystems)를 사용하였다.

### Mannanase 반응특성 분석

Mannanase 활성을 측정하기 위해서는 0.5% locust bean gum (LBG)과 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 측정하였다. Mannose를 표준시료로 사용하여 동일조건에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건에서 1분 동안 LBG로부터 1  $\mu$ mol의 mannose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 기질특이성을 조사하기 위해서 LBG와 함께 사용된 guar gum, yeast mannan, oat spelt xylan, carboxymethyl cellulose는 Sigma-Aldrich Co.로부터 구입하였다. 반응 온도와 pH가 효소 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 40–65°C와 pH 4.5–10.0의 범위에서 mannanase 활성을 각각 측정하였다. 이때 pH 4.5–6.0은 citrate 완충용액, pH 6.0–8.0은 sodium phosphate 완충용액, pH 8.0–9.0은 Tris 완충용액 및 9.0–10.0 범위에서는 KCl-borate 완충액을 각각 사용하였다. 열안정성은 20–55°C 범위의 온도에서 mannanase 효소액을 30분 동안 방치한 후 잔존활성을 측정하여 결정하였다. 금속이온과 화합물이 효소 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 최종 농도가 5 mM이 되도록 반응액에 첨가하고 효소활성을 측정하였다.

### 반응산물의 분석

Megazyme International Ireland로부터 구입한 MOS (0.5%) 나 LBG (0.5%) 또는 guar gum (0.5%)과 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)을 함유한 반응액에 정제된 효소를 과량 첨가하여 40°C에서 4시간 동안 반응을 수행한 후 95°C에서 3분 동안 열 처리하고 이를 원심분리하였다. 반응 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

### Mannanase 유전자와 단백질

제한효소 *Sau3AI*으로 절단된 *Cellulosimicrobium* sp. YB-43의 유전체 단편을 pUC19에 삽입한 후 이를 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 도입함으로써 얻은 형질전환주 중에서 mannanase 활성을 보이는 형질전환주를 선발하였으며 이로부터 플라스미드를 분리하고 클론된 DNA의 염기서열을 결정하였다. 그 결과 mannanase 유전자(*manB*)를 포함한 2,202 bp 크기의 염기서열이 확인되었고, 이로부터 427 아미노산 잔기로 구성된 단백질을 코드하며 1,284 bp로 구성된 *manB*의 구조유전자가 밝혀졌다. 개시코돈(ATG)으로부터 7 nucleotides가 떨어진 부분에 ribosome 결합위치로 추정되는 염기서열(GGGAGG)이 존재하였으며, PePPER webserver (<http://pepper.molgenrug.nl>)를 이용하여 promoter로 예측되는 지점이 개시코돈 상부의 131–159번째 염기서열에서 관찰되었다(GenBank accession no. KX620013).

유전자 염기서열로부터 예측된 아미노산 배열에 따르면 YB-43의 ManB는 GH5에 속하는 mannanase와 상동성이 높은 활성영역(41–283)과 2개의 CBM10 (343–372, 392–420)이 배열된 다영역 효소로 확인되었다. ManB의 아미노산 배열을 미국 NCBI database에 등록된 다른 효소와 비교한 결과 지렁이 장 내에서 발견된 *Cellulosimicrobium* sp. HY-13의 mannanase H (ManH; AEE43708)와 상동성이 94%로 가장 높았다(Kim *et al.*, 2011a). 이외에는 히말라야 온천에서 분리된 *Cellulosimicrobium* sp. MM (92%; KFD42617), *Microbacterium* sp. 292MF (73%; WP\_040570217), *Streptomyces* sp. DI166 (65%; SBT88962), *S. exfoliates* (66%; WP\_037635509), *S. toyocaensis* NRRL 15009 (63%; KES07834)와 *S. aureus* (61%; WP\_055598919)의 mannanase와 상동성이 높았으나 이들은 모두 유전체 염기서열에서 유추된 단백질에 해당하는 것으로 효소 활성에 대한 연구는 보고된 바가 없다(Fig. 1).

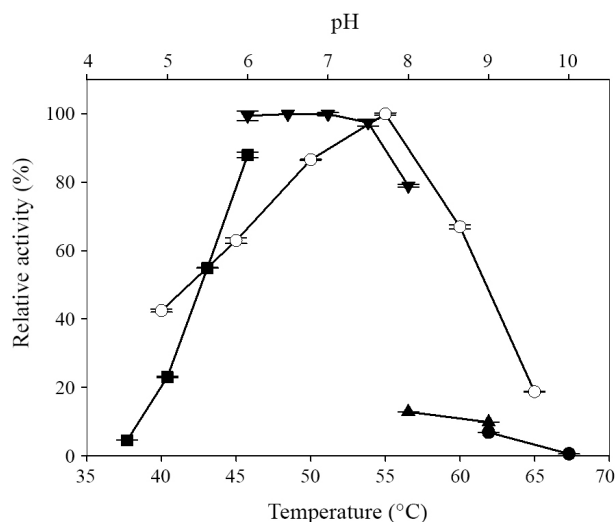
활성 잔기를 비롯하여 구조와 기능에 관한 다수의 정보가 알려진 *S. thermophilus*의 mannanase (StMan)는 GH5에 속하는 활성영역과 CBM2로 구성되어 있는데(Kumagai *et al.*, 2011), StMan과 ManB의 활성영역 아미노산 배열은 58% 상동성을 보였다. StMan의 활성 영역은 62–308 번째 아미노산 배열 지역으로 Asp285, Glu286, Asp287이 Ca<sup>2+</sup>과 결합하는 잔기이며(Kumagai *et al.*, 2012, 2013), Glu273은 친핵성 활성 잔기, Trp281은 기질 친화력에 관여하는 잔기로 보고되었다(Kumagai *et al.*, 2015). ManB는 Ca<sup>2+</sup>과 결합하는 StMan의 아미노산 잔기에 상응하는 서열이 259–261 번째의 D-E-A 배열





산된 것과 모균주에서 생산된 효소의 아미노 말단이 차이가 있었으며 대장균에 의해 생산된 효소의 아미노 말단 서열이 14 잔기를 더 포함하는 것으로 밝혀진 바 있다(Stoll *et al.*, 1999). 그러나 재조합 대장균으로부터 생산된 *B. subtilis* WL-7의 mannanase는 signal peptidase로 절단되는 위치가 *Bacillus* 균주와 동일하였다(Kweun *et al.*, 2004). 한편 ManB와 유사성이 가장 높은 것으로 보고된 *Cellulosimicrobium* sp. HY-13의 ManH는 SignalP3.0 프로그램을 사용하였을 때 24개 아미노 말단 잔기가 signal peptide로 예측되었으며 절단 위치가 A-Q-G 배열의 다음인 것으로 보고되어 ManB와는 차이가 있었다(Kim *et al.*, 2011a). ManB와 ManH는 아미노 말단의 27개 잔기 배열 중 4개 잔기가 차이가 있었으며 특히 27번째 잔기가 서로 다른데, 이러한 차이 때문에 ManB와 ManH의 signal peptide가 서로 다르게 예측되었을 수 있다. SignalP3.0 보다 SignalP4.0 프로그램에 의해 예측된 절단 위치의 정확도가 높다고 보고된 바 있다(Petersen *et al.*, 2011).

정제된 ManB를 사용하여 반응 온도와 pH가 효소활성에 미치는 영향을 조사한 결과 pH 6.5-7.0과 55°C에서 최대 활성을 보였다(Fig. 2). 이러한 결과는 YB-43의 배양상등액으로 부분 정제된 mannanases 중에서 55°C와 pH 6.5에서 최대 활성을 보이는 ManA와 유사하였으며 65°C와 pH 7.5에서 최대 활성을 보이는 ManC와는 차이가 있었다(Yoon, 2015). 한편

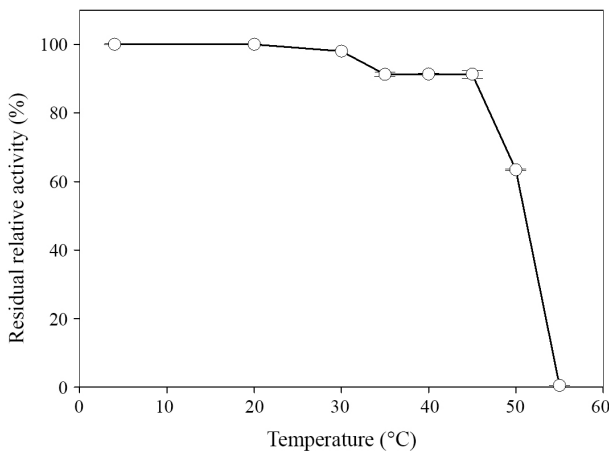


**Fig. 2.** Temperature and pH optima of the purified ManB. The pH profiles were obtained by measuring the mannanase activities at various pH's with a constant temperature of 50°C. Buffers (50 mM) used were as follows: sodium citrate (—■—, pH 4.5-6), sodium phosphate (—▼—, pH 6-8), Tris (—▲—, pH 8-9), and KCl-borate (—●—, pH 9-10). Temperature profiles (—○—) were obtained by measuring the mannanase activities at different temperatures with a fixed pH 6.5. Each curve represents the average of three independent experiments with error bars showing the standard deviation.

xylanase와 mannanase를 동시에 생산하는 균으로 작물 토양으로부터 분리된 *Cellulosimicrobium* sp. YB-1107의 mannanase는 ManB와 최적 반응온도와 pH가 동일한 것으로 보고되었다(Yoon, 2011). *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 유래의 ManH (Kim *et al.*, 2011a)는 50°C와 pH 6.0, ManK (Kim *et al.*, 2011b)는 50°C와 pH 7.0에서 최대활성을 보여 ManB와는 차이를 보였다. 특히 ManB는 ManC 또는 ManK와는 달리 pH 8의 sodium phosphate 완충액을 사용하였을 때에 비해 Tris 완충액을 사용하였을 때 활성이 크게 낮아졌다.

금속이온을 비롯한 화합물이 ManB 활성에 미치는 영향을 분석한 결과  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  이온과 EDTA 및 SDS에 의해 활성이 크게 감소하였으며  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ 과  $\text{Na}^{+}$  이온에 의해서는 미약하게 감소한 것으로 나타났다. SDS에 의해 활성이 감소한 정도는 40% 미만으로 *B. subtilis* WL-7의 mannanase와 유사하였다(Kweun *et al.*, 2004). *Cellulosimicrobium* sp. HY-13의 ManH는 ManB와 같이  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ 와 EDTA에 의해 크게 저해되나  $\text{Mn}^{2+}$ 에 의해서는 활성이 증가되어 ManB와 차이가 있었다. ManK의 경우는 금속 이온에 의해 활성에 큰 변화가 없는 것으로 나타났으며 ManB와는 전혀 다른 것으로 확인되었다. 재조합 대장균으로부터 정제된 *S. thermophilus* NBRC14274의 StMan은 EDTA를 첨가하였을 때 거의 활성을 보이지 않으며  $\text{Ca}^{2+}$ 과  $\text{Mg}^{2+}$  이온이 효소 활성에 필요한 것으로 보고되었다(Kumagai *et al.*, 2011).

ManB의 열안정성을 조사하기 위해 정제 효소를 여러 온도에서 30분 동안 방치한 후에 잔존 활성을 측정하였다. 그 결과 35-45°C 범위의 낮은 온도에서도 약 9% 정도 활성이 감소하였으나 이 온도 범위에서는 방치 온도와 관계없이 거의 유사한 잔존활성을 보였으며, 50°C에서는 약 63%의 활성을 유지하였다(Fig. 3). 아미노산 배열의 유사도가 높은 ManH는 ManB와 같이 30°C에서는 실활되지 않았으나 45°C와 50°C에서 30분간 열처리시 잔존활성이 약 80%와 40%로 나타나 ManB보다 열안정성이 낮은 것으로 나타났다. YB-43의 부분 정제효소 ManA는 40°C 이하에서는 1시간 동안 실활되지 않았으며 50°C에서도 1시간 처리 후 약 60%의 활성을 유지하여 ManB보다 열안정성이 높았으며 ManC는 ManB보다 열안정성이 낮았다(Yoon, 2015). 한편 StMan는 5 mM EDTA와  $\text{Ca}^{2+}$  이온이 각각 첨가된 상태에서 열처리하였을 때 46°C와 61°C에서 반감기가 30분으로 나타나  $\text{Ca}^{2+}$  이온에 의해 열안정성이 증가되었고(Kumagai *et al.*, 2011)  $\text{Mg}^{2+}$ 과  $\text{Mn}^{2+}$  이온에 의해서도 열안정성이 증가는 것으로 밝혀졌다. 이들 금속이온은 StMan의 285-287 번째 아미노산(D-E-D)과 결합하여 열안정성을 증진시키고 이들 잔기 중 Glu286 잔기가  $\text{Ca}^{2+}$  이온과 직접 결합



**Fig. 3. Thermostability of the purified ManB.** Thermostabilities were determined by measuring the residual activities after pre-incubation for 30 min at different temperatures. Each curve represents the average of three independent experiments with error bars showing the standard deviation.

에 관여하는 것으로 보고되었는데(Kumagai *et al.*, 2012, 2013), ManB는 이에 상응하는 아미노산 배열이 E-D-A로 3번째 잔기가 달라  $\text{Ca}^{2+}$  이온에 의한 내열성 증가여부를 조사할 필요가 있다.

### 기질특이성과 최종 가수분해 산물

기질 특이성을 비교하기 위해 여러 다당류를 기질로 하여 반응을 실시한 결과 ManB는 CMC, xylan과 전분은 분해하지 못하였고 LBG, konjac과 guar gum과 같은 mannan 다당류에 대해 높은 활성을 보였다(Table 1). ManB는 konjac에 대한 활성이 가장 높았으며, guar gum에 대한 활성은 LBG에 비해 45% 수준인 것으로 나타나 ManA (60%), ManC (57%)와 ManK (72%)에 비해 guar gum의 분해활성은 약간 낮았으며 *C. tertium*의 mannanase (46%)와는 유사하였다(Kataoka and Tokiwa, 1998). Guar gum galactomannan은 LBG galactomannan 보다 galactosyl 측쇄가 많아 mannanase에 의한 가수분해 효율이 낮다. 실제 다수의 *Bacillus* 속 균주 유래의 mannanase는 guar gum에 대한 활성이 LBG에 비해 10–15% 수준이며(Yoon and Lim, 2007), ManH는 ManB와 상동성이 높음에도 불구하고 guar gum에 대한 활성이 약 11%로 ManB 보다 훨씬 낮은 것으로 보고되었다.

대부분의 mannanase는 mannotriose (M3)를 분해하지 못하거나(Jiang *et al.*, 2006) 분해능이 매우 낮으며(Kweun *et al.*, 2004), mannotetraose (M4) 이상의 중합도를 갖는 MOS의 분해능은 높은 것으로 알려졌다. 또한 LBG와 MOS의 분해산물로 mannobiose (M2)와 M3 또는 mannose를 생성한다. ManB

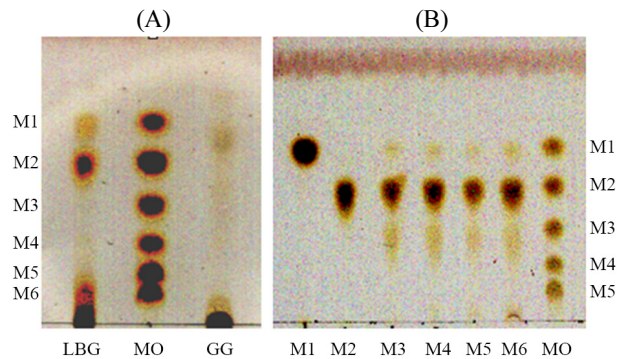
**Table 1. Substrate specificities of the purified ManB**

Substrates	Relative activity (%) of		
	ManB <sup>a</sup>	ManA <sup>b</sup>	ManC <sup>b</sup>
Locust bean gum galactomannan	100.0	100	100
Konjac glucomannan	107.1	92.0	112.9
Guar gum galactomannan	45.2	60.2	57.3
Yeast mannan	<0.1	ND	<0.1
Carboxymethyl cellulose	ND	NT	NT
Oat spelt xylan	ND	NT	NT
Starch	ND	NT	NT
Para-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside	ND	NT	NT

ND, not detected; NT, not tested.

<sup>a</sup> Specific activity of the purified ManB was 1,733 U/mg under the optimal reaction condition.

<sup>b</sup> Mannanases purified partially from culture filtrate of *Cellulosimicrobium* sp. YB-43 (Yoon, 2015).



**Fig. 4. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of β-1,4-linked mannooligosaccharides and mannans with purified ManB.** The reaction mixtures containing the purified ManB and mannooligosaccharides, locust bean gum (LBG) or guar gum (GG) in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) were incubated for 4 h at 40°C, respectively. MO of panel (A) and (B) stands for standard mannooligosaccharides indicated by M1 (mannose), M2 (mannobiose), M3 (mannotriose), M4 (mannotetraose), M5 (mannopentaose), and M6 (mannohexaose) at left or right sides of both panels. In panel (A), LBG and GG stand for hydrolyzates of locust bean gum and guar gum, respectively. Lanes M2 to M6 represent each hydrolyzate of mannobiose to mannohexaose in panel (B).

에 의한 최종 분해산물을 조사하기 위해 과량의 ManB를 사용하여 LBG와 guar gum 및 MOS를 가수분해하여 완전히 분해한 후 반응액을 TLC로 분석하였다(Fig. 4). 그 결과 ManB는 M2를 분해하지 못하였으며 M3 이상의 중합도를 갖는 MOS를 분해하여 주된 반응산물로 M2가 생성되었으며, 이와 함께 적은 양의 mannose와 M3이 관찰되었다. 또한 LBG의 분해산물로도 다량의 M2와 소량이 mannose가 생성되었고, mannohexaose (M6)와 이동도가 유사한 MOS도 상당량 관찰되었다. Mannohexaose를 기질로 하여 반응하였을 때 ManB

에 의해 완전히 분해된 것으로 보아 LBG의 분해산물 중 M6과 이동도가 유사한 물질은 M6이 아니고 galactosyl 측쇄를 갖는 MOS일 것으로 추측된다. Guar gum의 분해산물은 M2 보다 이동도가 크거나 M6 보다 이동도가 작은 물질만이 적은 양 관찰되었다. ManB가 guar gum에 대한 활성도가 LBG에 비해 45% 수준인 것을 감안하면 관찰된 분해산물의 양이 적는데, 이는 guar gum의 분해산물이 중합도가 높아 TLC에서 해리될 수준으로 이동하지 못한 때문으로 판단된다.

ManA와 ManC는 MOS의 최종 분해산물로 ManB와 동일하게 M2를 다량 생성하였으나, ManA의 분해산물에서는 mannose가 관찰되지 않아 ManB와 달랐으며 ManC는 ManB와 유사하게 mannose를 생성하였다. 한편 ManH는 ManB와 유사하게 M2 보다 중합도가 큰 MOS를 분해하여 M2를 가장 많은 양 생성하고 mannose는 미량 생성하였다(Kim *et al.*, 2011a). 그러나 ManK는 M3을 분해하지 못하였으며, ManB에 의해 생성된 분해산물과 달랐다(Kim *et al.*, 2011b). *S. thermophilus*의 StMan와 *Thermobifida fusca*의 mannanase (TfMan)로 분해된 LBG의 가수분해 산물에서도 M2가 다량 존재하였다. 이외에 StMan에 의해서는 다량의 M3와 함께 M4와 M5도 생성되었으나 mannose는 생성되지 않았고, TfMan는 M3, M5와 함께 매우 적은 양의 mannose를 생성하였다(Kumagai *et al.*, 2013).

이와 같이 반응 온도와 pH를 비롯한 반응 특성과 열안정성 및 가수분해 산물을 비교하였을 때 ManB는 *Cellulosimicrobium* YB-43의 배양상등액에서 정제된 두 종류의 mannanases (ManA, ManC)와 달랐으며, 아미노산 배열의 상동성이 높은 *Cellulosimicrobium* HY-13의 ManH와도 효소 특성이 일치하지 않은 것으로 확인되었다.

## 적 요

두 종류의 mannanases를 생산하는 *Cellulosimicrobium* sp. YB-43로부터 mannanase 유전자를 클로닝하고 그 염기서열을 결정하였다. Mannanase 유전자는 *manB*로 명명되었으며, 427 아미노 잔기로 구성된 단백질을 코딩하는 1,284개 염기로 구성되었다. ManB는 추론된 아미노산 배열에 근거해서 glycosyl hydrolase family 5에 속하는 mannanase와 상동성이 높은 활성영역과 함께 2개의 탄수화물 결합영역을 포함하고 있는 다영역 효소로 확인되었다. *Cellulosimicrobium* sp. YB-43의 *manB* 유전자를 함유한 재조합 대장균의 균체 파쇄상등액으로부터 정제된 ManB의 아미노 말단 배열이 QGASAASDG로

결정되었으며 이는 SignalP4.1 server로 그람 음성균을 기준으로 예측된 signal peptide의 결과와 정확하기 일치하였다. 정제된 ManB의 최적 반응조건은 55°C와 pH 6.5-7.0이며 locust bean gum (LBG), konjac과 guar gum을 가수분해 하였으며, 셀룰로스, 자일란, 전분과 *para*-nitrophenyl- $\beta$ -mannopyranoside에 대해서는 분해활성이 없었다. ManB의 활성은  $Mg^{2+}$ ,  $K^{+}$ 와  $Na^{+}$ 에 의해 약간 저해되었으며  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ 과 SDS에 의해서는 크게 저해되었다. 또한 이 효소는 mannobiose 보다 큰 중합도를 갖는 만노올리고당을 가수분해하였으며, LBG와 만노올리고당을 가수분해하였을 때 mannobiose가 가장 많은 양으로 생성되었다.

## References

- Chanzy, H.D., Grosrenaud, A., Vuong, R., and Mackie, W. 1984. The crystalline polymorphism of mannan in plant cell walls and after recrystallization. *Planta* **161**, 320-329.
- Dhawan, S. and Kaur, J. 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit. Res. Biotechnol.* **27**, 197-216.
- Jiang, Z., Wei, Y., Li, D., Li, L., Chai, P., and Kusakabe, I. 2006. High-level production, purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydr. Polym.* **66**, 68-96.
- 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  $\beta$ -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- $\beta$ -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., Lee, M.J., Cho, H.Y., Lee, J.S., Lee, M.H., Chung, C.W., Shin, D.H., Rhee, Y.H., Son, K.H., and Park, H.Y. 2016. Genetic and functional characterization of an extracellular modular GH6 endo- $\beta$ -1,4-glucanase from an earthworm symbiont, *Cellulosimicrobium funkei* HY-13. *Antonie van Leeuwenhoek* **109**, 1-12.
- Kumagai, Y., Kawakami, K., Mukaiharu, T., Kimura, M., and Hatanaka, T. 2012. The structural analysis and the role of calcium binding site for thermal stability in mannanase. *Biochimie* **94**, 2783-2790.
- Kumagai, Y., Kawakami, K., Uraji, M., and Hatanaka, T. 2013. Effect of the binding of bivalent ion to the calcium-binding site

- responsible for the thermal stability of actinomycete mannanase: Potential use in production of functional mannoooligosaccharides. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **94**, 63–68.
- Kumagai, Y., Usuki, H., Yamamoto, Y., Yamasato, A., Arima, J., Mukaiharu, T., and Hatanaka, T. 2011. Characterization of calcium ion sensitive region for  $\beta$ -mannanase from *Streptomyces thermolilacinus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1814**, 1127–1133.
- Kumagai, Y., Yamashita, K., Tagami, T., Uraji, M., Wan, K., Okuyama, M., Yao, M., Kimura, A., and Hatanaka, T. 2015. The loop structure of Actinomycete glycoside hydrolase family 5 mannanases governs substrate recognition. *FEBS J.* **282**, 4001–4014.
- 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.
- Li, R.K., Chen, P., Ng, T.B., Yang, J., Lin, J., Yan, F., and Ye, X.Y. 2015. Highly efficient expression and characterization of a  $\beta$ -mannanase from *Bacillus subtilis* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **62**, 64–70.
- Liu, J., Xu, Q., Zhang, J., Zhou, X., Lyu, F., Zhao, P., and Ding, Y. 2015. Preparation, composition analysis and antioxidant activities of konjac oligo-glucomannan. *Carbohydr. Polym.* **130**, 398–404.
- Malgas, S., van Dyk, J.S., and Pletschke, B.I. 2015. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase and  $\alpha$ -galactosidase. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 1167–1175.
- McCleary, B.V. 1985. The fine structure of carob and guar galactomannans. *Carbohydr. Res.* **139**, 237–260.
- Mok, C.H., Lee, J.H., and Kim, B.G. 2013. Effects of exogenous phytase and  $\beta$ -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.
- Pangsri, P., Piwpankaew, Y., Ingkakul, A., Nitisinprasert, S., and Keawsompong, S. 2015. Characterization of mannanase from *Bacillus circulans* NT 6.7 and its application in mannoooligosaccharides preparation as prebiotic. *Springerplus* **4**, 771.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. 2011. SignalP4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **8**, 785–786.
- Sakakibara, Y., Tsutsumi, K., Nakamura, K., and Yamane, K. 1993. Structural requirements of *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase signal peptide for efficient processing: *in vivo* pulse-chase experiments with mutant signal peptides. *J. Bacteriol.* **175**, 4203–4212.
- Schumann, P., Weiss, N., and Stackebrandt, E. 2001. Reclassification of *Cellulomonas cellulans* (Stackebrandt and Keddie 1986) as *Cellulosimicrobium cellulans* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1007–1010.
- Shimizu, M., Kaneko, Y., Ishihara, S., Mochizuki, M., Sakai, K., Yamada, M., Murata, S., Itoh, E., Yamamoto, T., Sugimura, Y., et al. 2015. Novel  $\beta$ -1,4-mannanase belonging to a new glycoside hydrolase family in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **290**, 27914–27927.
- 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.
- Stoll, D., Stalbrand, H., and Warren, R.A. 1999. Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2598–2605.
- Tjalsma, H. and van Dijk, J.M. 2005. Proteomics-based consensus prediction of protein retention in a bacterial membrane. *Proteomics* **5**, 4472–4482.
- Xia, W., Lu, H., Xia, M., Cui, Y., Bai, Y., Qian, L., Shi, P., Luo, H., and Yao, B. 2016. A novel glycoside hydrolase family 113 endo- $\beta$ -1,4-mannanase from *Alicyclobacillus* sp. strain A4 and insight into the substrate recognition and catalytic mechanism of this family. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 2718–2727.
- Yoon, K.H. 2011. Production and properties of hemicellulases by a *Cellulosimicrobium* sp. isolate. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 252–258.
- Yoon, K.H. 2015. Characterization of two  $\beta$ -mannanases from *Cellulosimicrobium* sp. YB-43. *Korean J. Microbiol.* **51**, 263–270.
- 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 OCDDS. *Carbohydr. Polym.* **104**, 175–181.
- 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.
- Zou, Y., Lin, J., Bu, X., Jiang, L., Chen, Z., and Ge, X. 2015. Characterization of  $\beta$ -1, 4-mannanase from *Bacillus pumilus* and heterologous expression in *Lactobacillus casei*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **55**, 1576–1583.