

## *Bacillus subtilis*의 mannanase에 의한 갈락토만난과 만노올리고당의 가수분해

권민아<sup>1</sup> · 윤기홍<sup>1,2\*</sup>

우송대학교 <sup>1</sup>응용식품 · 영양학부, <sup>2</sup>생물소재응용연구센터

**Hydrolysis of Galactomannan and Manno-oligosaccharides by A *Bacillus subtilis* Mannanase.** Kweun, Min A<sup>1</sup> and Ki-Hong Yoon<sup>1,2\*</sup>. <sup>1</sup>School of Applied Food and Nutritional Science, <sup>2</sup>Bioresource and Application Research Center, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea – Hydrolysis of manno-oligosaccharides and galactomannan was studied with the purified *Bacillus subtilis* WL-7 mannanase from recombinant *Escherichia coli*. The predominant products of hydrolysis were mannose, mannobiose and mannotriose. The enzyme could hydrolyze  $\beta$ -1,4-linked manno-oligosaccharides larger than mannobiose, but was not active on mannobiose. When the mannanase hydrolyzed manno-oligosaccharides of degree of polymerization(DP) 4-6, it was more active on the substrate of higher DP. Based on analysis of transient reaction products by TLC, the enzyme was found to have a preference for internal  $\beta$ -1,4-mannosidic linkages, which are the central mannosidic bond of mannotetraose and the two middle mannosidic bonds of mannopentaose. The  $\beta$ -1,4-mannosidic bonds situated at the second and fourth positions from the nonreducing end of mannohexaose were preferentially hydrolyzed by the mannanase. Locust bean gum(LBG) was enzymatically hydrolyzed with higher efficiency than guar gum, resulting that amount of reducing sugars was liberated more efficiently from LBG than guar gum with same activity of mannanase.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, galactomannan, hydrolysis, mannanase, manno-oligosaccharides

식물에 존재하는  $\beta$ -mannan 다당류는 당 사이에  $\beta$ -1,4 결합이 직쇄결격을 이루며 구성하고 있는 당의 종류에 따라 4가지로 구분된다. 상아 야자나무의 열매에서 존재하는 순수 mannan은 직쇄결격이 오직 mannose로 구성되며, 끈박의 glucomannan은 직쇄결격이 mannose와 일정량의 glucose로 이루어져 있다. Galactomannan은 순수 mannan에 galactose가 측쇄로 결합되어 있고 콩과식물의 종자에 많이 존재하며, 연질목의 주성분인 galactoglucomannan은 glucomannan에 galactose가 각각 측쇄로 결합되어 있다.  $\beta$ -Mannanase (mannanase)는  $\beta$ -mannan 다당류 내부의  $\beta$ -1,4 만노실 결합을 무작위적으로 절단하여 mannose와 manno-oligomers를 생산하는 반응을 촉매하는 효소로 고등식물, 동물과 미생물에서 두루 발견되었다. 미생물 유래의 mannanase는 식품가공용 효소, 사료 첨가용 효소, 펄프의 가공공정용 효소 및 세제용 효소 등으로 그 용도가 다양하게 개발되고 있으며, 산업적 용도의 잠재력이 큰 효소로 평가되고 있다. 따라서 *Bacillus*[1, 5, 7, 11], *Caldibacillus*[15], *Caldocellulosiruptor*[2], *Cellvibrio*[4], *Clostridium*[3, 6, 8, 17], *Enterococcus*[13], *Pseudomonas*[18], *Streptomyces*[16]속의 세균으로부터 다양

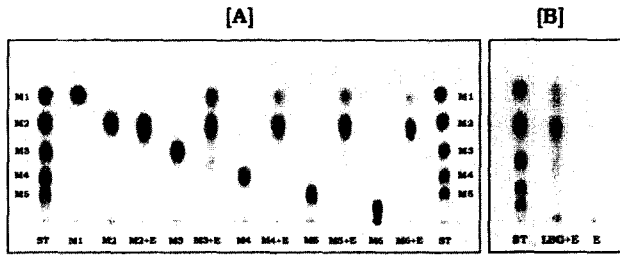
한 mannanases의 반응특성이 보고되었다. 또한 현재까지 밝혀진 미생물의 mannanase는 아미노산 배열의 상동성에 따라 glycosyl hydrolase family(GH) 5 또는 26에 속하며, 가수분해 활성을 갖는 하나의 domain으로 구성된 효소와 활성 domain과 함께 다른 기능을 갖는 domains로 구성된 효소로 알려졌다.

최근 된장으로부터 mannanase를 생산하는 *B. subtilis* WL-7이 분리되었고[9], 분리균의 mannanase 유전자가 크로닝됨으로써 재조합 대장균이 생산하는 mannanase가 정제되어 그 특성이 보고되었으며[11], 대장균에서 mannanase 유전자의 과잉발현이 유도되었다[10]. 본 연구에서는 재조합 대장균에서 정제된 *B. subtilis* WL-7의 mannanase를 사용하여 galactomannan과 만노 올리고당의 가수분해 산물과 가수분해 양상을 조사하였다.

### 만노 올리고당과 galactomannan의 최종 가수분해 산물

Mannanase에 의한 최종 반응산물을 분석하기 위해 기질로 만노 올리고당과 locust bean gum(LBG) 및 guar gum을 기질로 하여 과량의 정제효소로 가수분해 반응을 수행하였다. 0.5%의 기질과 50 mM 인산염 완충용액을 함유한 반응액에 효소를 첨가한 후 50°C에서 4 시간 반응한 후 반응액을 끓는 물에서 3분간 방치하고 원심분리하였다. 1-propanol, nitromethane과 증류수(7:2:1, v/v)의 혼합용액을 전개용매로

\*Corresponding author  
Tel: 82-42-630-9742, Fax: 82-42-636-2676  
E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr



**Fig. 1. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of  $\beta$ -1,4-linked manno-oligosaccharides(A) and galactomannan(B) with purified mannanase.** The reaction mixture contained 1.5 U of purified mannanase and each manno-oligosaccharide or LBG in 50 mM sodium phosphate buffer[pH 6.0] at 50°C. ST, standard manno-oligosaccharides; M1 to M6, mannose to mannohexaose; E, purified mannanase.

하여 반응물 상등액을 TLC로 전개한 후 *para*-anisaldehyde (0.5 ml), conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(0.5 ml), 95% 에탄올(9 ml)에 3~4방울의 빙초산을 첨가한 발색시약을 TLC에 직접 분무하고 120°C에서 5~10분간 방치하였다. 그리하여 만노 올리고당인 mannotriose(M3), mannotetraose(M4), mannopentaose(M5), mannohexaose(M6)가 모두 mannanase에 가수분해 되어 최종 산물로 mannobiose(M2)와 mannose(M1) 및 소량의 M3가 생성되는 것이 확인되었다(Fig. 1A).

Mannanase의 가수분해 반응 양상은 만노 올리고당을 기질로 많이 조사되었는데, *Bacillus* sp. AM-001[1]과 *Streptomyces* sp. strain no. 17[16]는 M2를 분해하지 못하지만 M3 이상의 길이를 갖는 만노 올리고당은 분해하였으며, *Enterococcus casseliflavus* FL2121[13], *Clostridium cellulovorans*[17], *C. thermocellum*[3]과 *Pseudomonas* sp. PT-5[18]의 효소는 M2와 M3 모두 분해하지 못하고 M4 이상의 만노 올리고당을 분해하는 것으로 보고되었다. 그러므로 WL-7의 mannanase는 전자에 속하는 미생물의 mannanases와 유사한 가수분해 반응의 양상을 보이는 것을 알 수 있다. 한편 WL-7의 mannanase는 M2를 포함한 만노 올리고당을 M1으로 가수분해 할 수 있는  $\beta$ -mannosidase와는 달리 M2를 분해할 수 없는 것으로 보아 mannosidase 활성이 없다고 판단되며 이러한 결과는 이 효소가 *para*-nitrophenyl- $\beta$ -mannoside를 분해하지 못한다고 보고된 결과와 일치함을 알 수 있다.

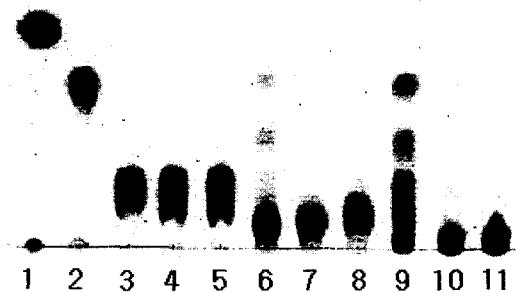
Mannanase에 의한 LBG의 주요 가수분해 산물은 M2이며 M1과 M3도 소량 생성되었다(Fig. 1B). 그러나 guar gum에 대한 가수분해능이 약하여 TLC로는 최종 가수분해산물이 관찰되기 어려웠다(data not shown). WL-7의 mannanase와 아미노산 잔기배열의 상동성이 95%로 확인된 *Bacillus* sp. 5H[7]의 mannanase에 의한 LBG의 최종 가수분해산물은 WL-7의 효소에 의한 반응산물과 유사한 것으로 보고되었고, *Sclerotium rolfsii*의 mannanase는 커피 추출액을 기질로 반응하였을 때 M1, M2, M3를 생성하는 것으로 알려졌다[14]. *Bacillus* sp. KK01의 mannanase는 LBG의 최종 가수분해

산물로 M2, M3와 M4를 생성하였으나, M1을 생성하지 않는 점에서는 WL-7의 효소와 차이가 있었다[5].

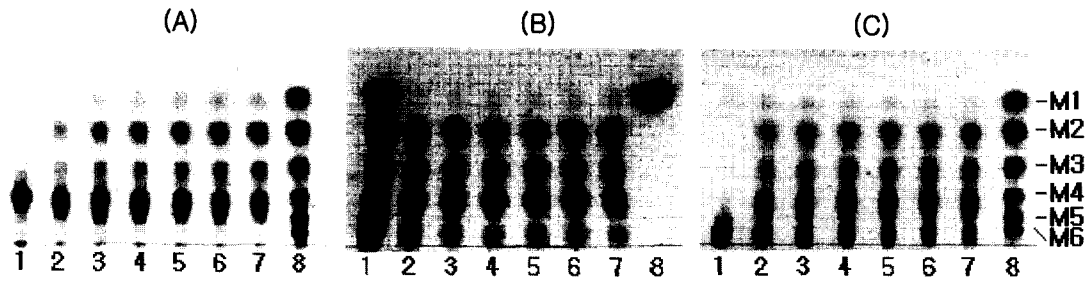
**만노 올리고당의 종류에 따른 가수분해 양상**

Mannanase에 의해 M4~M6가 가수분해되는 과정에서 생성되는 중간 산물을 분석하기 위해서 효소량과 반응시간을 달리하여 반응을 수행한 후 TLC로 반응산물을 조사하였다. 우선 기질에 따른 mannanase의 가수분해 활성을 비교하기 위해 반응시간을 고정하고 M4~M6를 각각 동량 함유한 반응액에 효소첨가량을 달리하여 반응하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 동일한 효소활성에서 M6의 가수분해가 가장 많이 일어났으며, M4는 사용된 효소량의 범위에서는 거의 분해되지 않았다. 이로 보아 *B. subtilis* WL-7의 mannanase는 M4~M6 올리고당 중에서는 중합도가 높을수록 효과적으로 가수분해하는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 M3의 가수분해능이 낮으나, 중합도가 큰 만노 올리고당에 대한 가수분해능이 높은 *Clostridium thermocellum mannanase*의 특성과 일치하였다[8]. 한편, *Cellvibrio japonicus*가 생산하는 4 종류의 mannanases(Man5A, Man5B, Man5C, Man26B)는 M3~M6의 가수분해능에 차이를 보였다[4]. 이들은 M3에 대해서는 분해능이 없거나 매우 낮으며, Man5B는 M5, Man5A와 Man26B는 M6의 가수분해능이 가장 높고, Man5C는 M5와 M6의 가수분해능이 비슷한 수준으로 높은 것으로 보고된 것으로 보아 mannanase 종류에 따라서는 중합도가 높은 만노 올리고당에 대한 가수분해 효율이 항상 높은 것은 아님을 알 수 있다.

만노 올리고당의 종류에 따라 mannanase의 가수분해 활성이 차이가 있으므로 반응 중간산물을 분석하기 위해서는 기질에 따라 효소량을 달리 사용할 필요가 있다. 따라서 M4



**Fig. 2. Hydrolysis patterns of manno-oligosaccharides by various amounts of mannanase.** Manno-oligosaccharides of 20  $\mu$ g were used as substrate for hydrolysis reaction, respectively. Reaction was performed for 30 min at 50°C with various amounts of mannanase. Authentic standards: lane 1, mannose; lane 2, manno-biose. Mannotetraose hydrolyzates by mannanase of; lane 3, 6.4 mU; lane 4, 0.64 mU; lane 5, 0.064 mU. Mannopentaose hydrolyzates by mannanase of; lane 6, 6.4 mU; lane 7, 0.64 mU; lane 8, 0.064 mU. Manno-hexaose hydrolyzates by mannanase of; lane 9, 6.4 mU; lane 10, 0.64 mU; lane 11, 0.064 mU.



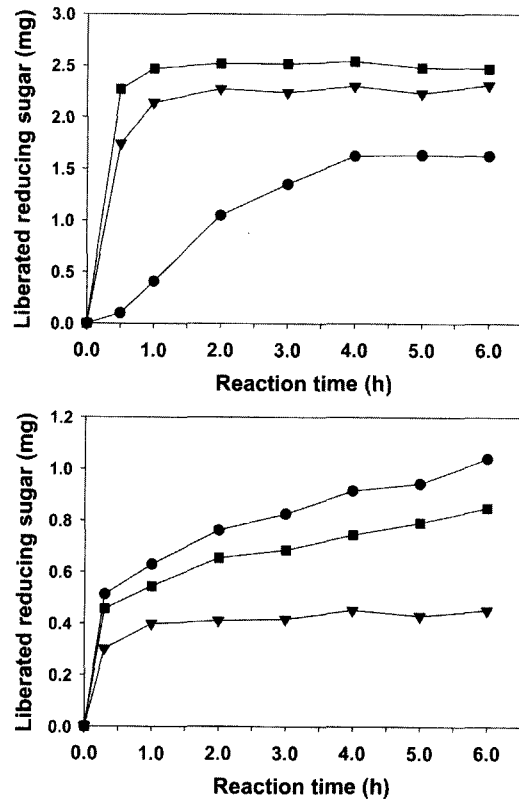
**Fig. 3. Hydrolysis patterns of  $\beta$ -1,4-linked manno-oligosaccharides including mannotetraose(A), mannopentaose(B) and mannohexaose(C) by mannanase according to reaction times.** Manno-oligosaccharides of 0.2 mg were used as substrates for hydrolysis reaction, respectively. Authentic standards: Mannotetraose(lane 1 of panel A), mannohexaose(lane 1 of panel B), mannose(lane 8 of panel B), and mixture of M1~M6(lane 8 of panel A and C, lane 1 of panel B) were used as authentic standards. Panel A: Mannotetraose hydrolyzates by mannanase(1.6 U) for reaction times of; lane 2, 5 min; lane 3, 10 min; lane 4, 15 min; lane 5, 20 min; lane 6, 25 min; lane 7, 30 min. Panel B: Mannopentaose hydrolyzates by mannanase(320 mU) for reaction times of; lane 2, 5 min; lane 3, 10 min; lane 4, 15 min; lane 5, 20 min; lane 6, 25 min; lane 7, 30 min. Panel C: Mannohexaose hydrolyzates by mannanase(80 mU) for reaction times of; lane 2, 5 min; lane 3, 10 min; lane 4, 15 min; lane 5, 20 min; lane 6, 25 min; lane 7, 30 min.

에 대해서는 많은양, M6에 대해서는 가장 적은양의 효소로 가수분해 하면서 반응시간에 따른 반응산물의 변화를 조사 하였다. 반응 초기부터 M4의 가수분해 산물로 M1, M2, M3 가 모두 존재하는 것으로 보아 mannanase에 의해 M4내의 mannose간의  $\beta$ -1,4 결합이 모두 가수분해된다는 것을 알 수 있으며, 중간산물로 M2가 M1과 M3의 양보다 많이 존재하므로 M4에서 중앙에 위치하는  $\beta$ -1,4-만노실 결합이 다른 부위보다 mannanase에 의해 좀더 선호적으로 분해되는 것으로 판단된다(Fig. 3A).

M5의 중간 반응산물은 M1, M2, M3, M4가 모두 나타났으며, 반응시간이 길어질수록 M2와 M3의 증가량이 M1과 M4보다는 높은 것으로 보아 M5의 비환원 말단으로부터 첫번째와 네번째에 위치한  $\beta$ -1,4 결합보다는 2번째와 3번째 위치한 결합이 효율적으로 가수분해됨을 알 수 있다(Fig. 3B). M6의 가수분해 산물은 M2, M3, M4가 주로 관찰되었으며, 이에 비해 M1과 M5는 거의 존재하지 않았다. 또한 반응초기에 M2와 M4가 M3에 비해 많은 양 존재하였으며 반응시간이 15분 이상에서는 더 이상 반응산물이 증가되지 않는 것으로 나타났다. 그러므로 WL-7의 mannanase는 M6 기질의 중간에 위치하는  $\beta$ -1,4 결합보다는 비환원 말단으로부터 2번째와 4번째에 위치한 결합을 선호적으로 분해하였다고 판단된다. 한편 *Clostridium cellulovorans*의 mannanase에 의한 가수분해 산물로 M4로부터 M3와 M1이 생성되나 M2는 생성하지 못하며, M5로부터는 M3와 M1이 M4와 M2보다 많이 생성하였고, M6를 가수분해 하여 M3를 가장 많이 생성하는 것으로 알려져 WL-7의 mannanase와는 차이가 많은 것으로 보고된 바 있다[17].

**Mannan 다당류의 가수분해 효율**

LBG와 guar gum의 galactomannans에는 모두 galactose가 측쇄로 연결되어 있으며 mannose에 대한 galactose의 함량비율이 LBG보다 guar gum이 높다. LBG에 대한 *B.*



**Fig. 4. Amounts of reducing sugar liberated from LBG (upper panel) and guar gum(lower panel) by mannanase.** For enzymatic reaction, galactomannans of 7.5 mg were used as substrates in a reaction volume of 1.5 ml, respectively. Reaction was performed for various times at 50°C with different amounts of mannanase. Used amounts of mannanase were 0.25 U(●-), 2.5 U(▼-) and 25 U(■-) for LBG, and 2.5 U(▼-), 25 U(■-) and 50 U(●-) for guar gum. Amounts of the liberated reducing sugar were determined by DNS method.

*subtilis* WL-7와 *Caldocellulosiruptor saccharolyticus*(formerly "*Caldocellum saccharolyticum*") [2]의 mannanase 비활성은

guar gum 보다 높은데 비해, *Caldibacillus cellulovorans*[15]와 *Clostridium tertium*[6]의 효소는 guar gum을 LBG와 유사한 활성으로 가수분해 한다고 보고되었다. 이는 측쇄로 결합된 galactose의 양에 따라 mannanase 가수분해 효율성의 차이 때문으로 판단된다. WL-7의 mannanase에 의한 LBG와 guar gum의 가수분해 정도를 측정하기 위해 각 기질을 7.5 mg 함유한 반응액에 효소량을 첨가하여 50°C에서 6시간 반응을 수행하면서 일정 시간마다 반응액에 존재하는 환원당의 양을 DNS 방법으로 측정하였다[12]. 그 결과 LBG는 2.5 U와 25 U의 효소를 사용하였을 때 반응 후 2시간부터는 환원당량이 거의 증가하지 않는 것으로 보아 더 이상의 가수분해가 일어나지 않는 것을 알 수 있고, 25 U의 mannanase를 사용하였을 때 최종분해된 환원당량은 약 3 mg이었으며 2.5 U를 사용하였을 때보다 약 0.5 mg 정도 많은 것으로 나타났다. 0.25 U의 효소를 사용하였을 때는 반응시간에 따라 환원당의 양이 약간씩 증가하였으며 약 2.1 mg의 환원당량이 생성되었다(Fig. 4A).

Guar gum의 경우는 효소를 2.5 U 사용하였을 때 0.4 mg 이하의 환원당이 발생하였고, 25 U과 50 U를 사용하였을 때는 약 0.85 mg과 1.0 mg 이상의 환원당이 발생하여 LBG보다 가수분해되어 방출된 환원당량이 낮았다. 한편 LBG를 기질로 하였을 때와는 달리 guar gum은 효소량을 많이 첨가하였을 때 반응시간에 따라 지속적으로 약간의 환원당이 방출되었으며, 2.5 U를 첨가하였을 때는 1시간 반응후부터는 환원당의 양이 증가하지 않아 더 이상의 가수분해가 일어나지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4B). 2.5 U의 mannanase를 기준으로 하여 최종적으로 생성된 환원당의 양을 비교해보면 LBG는 7.5 mg으로부터 약 2.5 mg의 환원당이 생성되어 33% 정도가 분해되었으며, 동량의 guar gum으로 부터는 0.38 mg의 환원당이 생성되어 5% 정도가 분해되었다. 이로써 WL-7의 mannanase는 guar gum 보다 LBG를 신속하면서도 높은 수율로 가수분해한다고 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부의 2004년도 원자력연구기반확충사업으로 이루어졌음.

## REFERENCES

- Akino, T., N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1988. Characterization of three  $\beta$ -mannanases of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 773-779.
- Bicho, P. A., T. A. Clark, K. Mackie, H. W. Morgan, and R. M. Daniel. 1991. The characterization of a thermostable endo- $\beta$ -1,4-mannanase cloned from "*Caldocellum saccharolyticum*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 337-343.
- Halstead, J. R., P. E. Vercoe, H. J. Gilbert, K. Davidson, and G. P. Hazlewood. 1999. A family 26 mannanase produced by *Clostridium thermocellum* as a component of the cellulosome contains a domain which is conserved in mannanases from anaerobic fungi. *Microbiol.* **145**: 3101-3108.
- Hogg, D., G. Pell, P. Dupree, F. Goubet, S. M. Martin-Orue, S. Armand, and H. J. Gilbert. 2003. The modular architecture of *Cellvibrio japonicus* mannanases in glycoside hydrolase families 5 and 26 points to differences in their role in mannan degradation. *Biochem. J.* **371**: 1027-1043.
- Hossain, M. Z., J. Abe, and S. Hizukuri. 1996. Multiple forms of  $\beta$ -mannanase from *Bacillus* sp. KK01. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 95-98.
- Kataoka, N. and Y. Tokiwa. 1998. Isolation and characterization of an active mannanase-producing anaerobic bacterium, *Clostridium tertium* KT-5A, from lotus soil. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 357-367.
- Khanongnuch, C., K. Asada, H. Tsuruga, T. Ooi, S. Kinoshita, and S. Lumyong. 1998.  $\beta$ -Mannanase and xylanase of *Bacillus subtilis* 5H active for bleaching of crude pulp. *J. Ferment. Bioeng.* **86**: 461-466.
- Kurokawa, J., E. Hemjinda, T. Arai, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2001. Sequence of the *Clostridium thermocellum* mannanase gene man26B and characterization of the translated product. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 548-554.
- Kweun, M. A., H. S. Kim, M. -S. Lee, J. H. Choi, and K. -H. Yoon. 2003. Mannanase production by a soybean isolate, *Bacillus subtilis* WL-7. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 277-283.
- Kweun, M. A., J. Y. Shon, and K. -H. Yoon. 2004. High-level expression of a *Bacillus subtilis* mannanase gene in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 212-217.
- Kweun, M. A., M. -S. Lee, J. H. Choi, K. H. Cho, and K. -H. Yoon. 2004. Cloning of a *Bacillus subtilis* WL-7 mannanase gene and characterization of the gene product. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 1295-1302.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Oda, Y., T. Komaki, and K. Tonomura. 1993. Purification and properties of extracellular  $\beta$ -mannanases produced by *Enterococcus casseliflavus* FL2121 isolated from decayed konjac. *J. Ferment. Bioeng.* **76**: 14-18.
- Sachslehner, A., G. Foidl, N. Foidl, G. Gubitz, and D. Haltrich. 2000. Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*. *J. Biotechnol.* **80**: 127-134.
- Sunna, A., M. D. Gibbs, C. W. J. Chin, P. J. Nelson, and P. L. Bergquist. 1999. A gene encoding a novel mutidomain  $\beta$ -1,4-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 664-670.
- Takahashi, R., I. Kusakabe, H. Kobayashi, K. Murakami, A. Maekawa, and T. Suzuki. 1984. Purification and some properties of mannanase from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 2189-2195.

17. Tamaru, Y. and R. H. Doi. 2000. The *engL* gene cluster of *Clostridium cellulovorans* contains a gene for cellulosomal ManA. *J. Bacteriol.* **182**: 244-247.
18. Yamaura, L., T. Matsumoto, M. Funatsu, and Y. Funatsu. 1990. Purification and some properties of endo-1,4- $\beta$ -D-mannanase from *Pseudomonas* sp. PT-5. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2425-2427.

**(Received Sep. 06, 2004/Accepted Oct. 10, 2004)**