

Bacillus subtilis WL-8의 Mannanase 유전자 클로닝과 특성분석

윤기홍

우송대학교 식품생물학과

Cloning and Characterization of Mannanase Gene from *Bacillus subtilis* WL-8

Ki-Hong Yoon

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

(Received May 10, 2010/Accepted June 9, 2010)

A bacterium producing the extracellular mannanase was isolated from Korean soybean paste. The isolate WL-8 has been identified as *Bacillus subtilis* on the basis on its 16S rRNA sequence, morphology and biochemical properties. The mannanase productivity of strain WL-8 was increased in LB broth by addition of wheat bran. The maximum mannanase productivity was reached to approximately 20 U/ml in LB medium supplemented with 6% wheat bran. A gene encoding the mannanase of WL-8 was cloned into *Escherichia coli* and its nucleotide sequence was subsequently determined. The mannanase gene consisted of 1,086 nucleotides encoding a polypeptide of 362 amino acid residues. The deduced amino acid sequence was highly homologous with those of several mannanases from *B. subtilis* belonging to GH family 26. Reaction temperature and pH profiles were investigated using the culture filtrate and cell-free extract of the recombinant *E. coli* carrying a WL-8 mannanase gene, respectively. Optimal conditions for the two fractions occurred at pH 5.5 and 60°C. The cell-free extract showed higher mannanase activity than the culture filtrate at above 60°C.

Keywords: *B. subtilis*, cloning, identification, mannanase, reaction property

β -1,4-Mannanase (mannanase)는 β -mannan 다당류의 기본 구성당인 mannose간의 β -1,4-mannosyl 결합을 무작위적으로 분해하여 manno oligosaccharides로 전환시키며, 이것은 β -1,4-mannosidase (mannosidase)에 의해 mannose로 분해된다. Mannosidase 보다는 mannanase의 효소가 그 크기가 작고, 식품가공, 사료효율 증대, 펄프 가공공정등의 산업적 분야에 활용성이 높아 최근 들어 mannanase에 대해 급격히 많은 연구가 이루어지고 있다.

세균 유래의 mannanase는 *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Caldibacillus*, *Caldicellulosiruptor*, *Caldocellulosiruptor*, *Caldocellum*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Clostridium*, *Dictyoglomus*, *Flavobacterium*, *Prevotella*, *Pseudomonas*, *Rhodothermus*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermomonospora*, *Thermotoga*, *Vibrio*와 *Streptomyces* 등을 포함한 20속 이상의 균주로부터 그 생산성, 유전자, 효소특성 등이 보고된바 있으며, 그 중에서도

Bacillus 속 균주 유래의 효소가 많이 연구되었고 실제 *Bacillus* 속 균주로부터 생산된 효소가 상품화되었다. 곰팡이 유래의 mannanase로는 *Trichoderma*, *Aspergillus*와 *Piromyces*에 속하는 균주의 효소와 효소생산성에 대한 연구가 다수 이루어졌다. Mannanase는 대부분이 glycosyl hydrolase (GH) family 5와 26에 속하며 GH26에는 주로 세균성 효소가 대부분을 차지하고, GH5의 효소로는 곰팡이 유래 또는 세균 유래 효소가 포함 되어 있다. 또한 mannanase는 cellulase 및 xylanase와 같이 활성 domain 만으로 구성된 것과 carbohydrate binding domain 을 비롯한 여러개 기능영역으로 구성된 것이 있는데, *B. subtilis* NM-39 (17), *B. subtilis* 168 (Z99107), *Bacillus* sp. 5H (9), *B. subtilis* WL-7 (13)과 *B. subtilis* WL-3 (22) 유래의 mannanases는 활성 domain만을 지니고 있는 반면에 *Paenibacillus* sp. BME-14 (7), *Vibrio* sp. MA-138 (21), *Bacillus* sp. JAMB-750 (2), *Clostridium thermocellum* (11), *Caldicellulosiruptor* sp. Rt8.B4 (8), *Cellulomonas fimi* (19)와 *Caldibacillus cellulovorans* (20) 유래의 mannanases는 2개 이

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

상의 domains로 구성된 것으로 알려졌다.

국내 가정에서 제조된 된장으로부터 mannanase 생산균으로 *Bacillus* 속 균주들이 분리되었는데, 그들은 균의 특성과 효소 생산성에 차이가 있는 것으로 확인되었고, *B. subtilis* WL-3 (18, 22)와 *B. subtilis* WL-7 (12, 13)의 효소 생산성과 유전자 및 효소 특성에 대해 보고된 바 있다. 본 연구에서는 이들 균과는 생리적 특성과 효소생산성이 차이가 있는 WL-8 분리균과 mannanase 특성을 비교·분석하였다.

재료 및 방법

시약, 미생물, 플라스미드와 배지

Mannanase를 생산하는 미생물을 분리하기 위해서 0.5% locust bean gum (LBG)이 첨가된 nutrient 평판배지(beef extract, 3 g; bacto-peptone, 5 g; agar, 15 g; water, 1 L)를 사용하였으며, 분리균의 mannanase 생산균의 효소 생산량 조사를 위한 기본배지로는 LB 액체배지(yeast extract, 5 g; tryptone, 10 g; NaCl, 5 g; water, 1 L)를 사용하였다. Mannanase 생산 분리균인 *B. subtilis* WL-8은 유전자 제공원으로, *Escherichia coli* XL-1 blue는 유전자조작을 위한 숙주균으로 각각 사용되었으며, 플라스미드 pUC19는 mannanase 유전자의 클로닝 vector로 사용되었다. 대장균 형질전환주의 선발과 배양을 위해서는 ampicillin (50 µg/ml)이 첨가된 LB 배지가 사용되었다.

분리균 동정

분리균의 생화학적 특성을 조사하기 위해 배양균체 현탁액을 API 50 CHB kit (bioMérieux, France)를 제조사의 지침에 따라 접종하고 37°C에서 배양하면서 1일과 2일째 각각 탄소원 이용능을 판별하였다. 분리균의 16S rRNA의 염기서열을 분석하기 위해서 분리균의 총 염색체 DNA를 주형으로 하고, 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 5'-TGCCAG CAGCCGCCCTA-3' (*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열의 515-531 지역), 5'-TTGTACACACCGCCCGTC-3' (*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열의 1389-1406 지역)을 프라이머로 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 구성되어 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 50초간 반응을 30회 반복하여 16S rRNA를 코딩하는 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 정제하여 dye terminator cycle sequencing kit와 373A automate DNA sequencer (Perkin Elmer Co., USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

Mannanase 활성 측정

Mannanase 활성은 LBG을 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3, 5-dinitrosalicylic acid 방법으로 다음과 같이 정량 함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁 시킨 1% (w/v) LBG 용액 0.5 ml와 200 mM sodium phosphate 완충용액(pH

6.0) 0.25 ml를 효소 용액 0.25 ml와 혼합하여 50°C에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Mannose를 표준시료로 사용하여 동일 조건에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit은 위의 조건에서 1분 동안 LBG로부터 1 µmol의 mannose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

DNA 분리와 조작

LB 액체배지에서 배양한 *B. subtilis* WL-8 균체로부터 총 염색체 DNA를 분리하기 위해서는 Genomic DNA prep kit (Solgent, Korea), 대장균으로부터 플라스미드 DNA를 분리하기 위해서는 Plasmid Mini-prep kit (Solgent)를 각각 제조사의 지침에 따라 사용하였다. Mannanase 유전자를 클로닝하기 위해 분리된 염색체 DNA를 *Pst*I로 절단하고 크기가 약 1.5 kb 이상인 DNA 단편을 아가로스겔에서 추출하였다. 이를 동일 효소로 절단된 pUC19와 ligation한 후 *E. coli* XL-1 blue에 형질 전환하였다. 대장균 형질전환주를 0.5% LBG를 첨가한 LB 평판배지에 옮겨 배양한 후 0.2% congo red 용액으로 1시간 염색하고 1 M NaCl 용액으로 탈색하여 형질전환주 집락 주변에 분해환을 관찰함으로써 mannanase 유전자가 클로닝된 형질전환주를 선별하였다. 염기서열은 클론된 유전자를 제한효소로 적절한 크기로 절단하여 얻은 단편을 pUC19에 도입함으로써 재조합 플라스미드를 제조한 후, 이를 주형 DNA로 하고 M13 universal primer와 reverse primer를 사용하여 dideoxy-chain termination 방법으로 결정하였다.

Mannanase 조효소액 제조

Mannanase 유전자를 함유한 재조합 대장균을 ampicillin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 37°C에서 13시간 정도 진탕 배양한 후 배양액을 원심분리하여 배양상등액과 균체를 분리하였다. 균체는 20 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)에 현탁하고 Branson sonifier (Branson, USA)를 사용하여 균체를 파쇄한 후 15,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리함으로써 균체 파쇄상등액을 제조하였으며, 배양상등액은 polyethersulfone membrane (분자량 10 kDa; Millipore, USA)을 사용하여 5배 농축하였다. 이러한 과정을 거쳐 제조된 배양상등액과 균체 파쇄상등액을 효소 반응을 위한 조효소액으로 사용하였다.

반응 pH와 온도가 효소활성에 미치는 영향

Mannanase 반응속도에 미치는 반응 pH의 영향은 반응온도를 50°C로 하고 반응액 pH를 달리하여 mannanase 활성을 측정함으로써 조사하였으며, 이때 완충용액으로는 50 mM sodium citrate (pH 4.0-6.0)와 50 mM sodium phosphate (pH 6.0-8.0)가 사용되었다. 반응온도가 효소활성에 미치는 영향은 반응 pH를 5.5 (50 mM sodium citrate)로 고정하고 반응온도를 달리 하여(40-70°C) 효소활성을 측정함으로써 결정하였다.

결과 및 고찰

Mannanase 생산균의 분리와 동정 및 특성

Mannanase를 생산하는 미생물 분리를 위해 가정에서 제조된 된장 시료 1 g을 0.85% NaCl 용액 10 ml에 현탁하고 현탁액의 적당량을 취하여 LBG를 첨가한 nutrient 평판배지에 도달한 후 37°C에서 배양하여 콜로니 주변에 LBG 분해환을 관찰하였다. *B. subtilis* WL-3 (18), WL-7 (12)과 함께 mannanase 생산균을 선별된 WL-8 균주는 이들 균주와 집락 형태 및 전분, 탈지 우유와 tributyrin의 분해능의 특성은 유사하였으나, WL-3 및 WL-7과는 달리 carboxymethyl cellulose와 xylan의 분해능은 보이지 않았다.

분리균 WL-8을 동정하기 위해 형태적 특성을 조사한 결과, 그람양성 간균으로 균체 중앙에 포자를 지니고 있으며, 운동성을 지니고 호기성균으로 확인되었다. API 50 CHB kit로 조사한 탄수화물 이용능이 *B. subtilis*와 유사도가 99.7%로 가장 높게 나타났으며(Table 1), WL-3과는 8 종류(D-xylose, arbutin, lactose, melibiose, raffinose, starch, inulin, D-turanose), WL-7과는 5 종류(D-xylose, amygdalin, arbutin, glycogen, D-turanose) 탄수화물 이용성에 차이를 보였다. 또한 분리균의 16S rRNA를 PCR로 증폭하여 1,517 bp 크기의 염기서열을 결정하고 (GenBank accession no. HM149534) 이를 NCBI database에

서 다른 균주의 것과 비교한 결과, *B. subtilis*의 16S rRNA (AL009126)와 일치하였다. 이러한 특성으로 보아 분리균 WL-8은 *B. subtilis*에 속하는 균으로 판단되었다.

탄소원 종류에 따른 효소 생산성

미생물 유래의 다당류 분해효소는 배양액 중의 탄소원 성분에 의해 그 생산성이 영향을 받는 경우가 많으며, mannanase의 경우 다수의 세균에서 mannan 다당류를 첨가한 배지에서 효소 생산성이 증가된다는 사실이 보고되었다. 토양에서 분리된 *B. subtilis* BM9602는 탄소원으로 다당류를 사용하였을 때 mannanase를 생산하였으며 konjac (4%)을 첨가하였을 때 최대 효소생산성(96 U/ml)을 보였고(4), *Bacillus* sp. M50도 konjac (4%)을 첨가한 배지에서 mannanase 생산성이 330 U/ml에 이르는 것으로 보고되었다(3). 또한 *B. subtilis* 168은 0.4% galactomannan을 첨가한 배지에서 24시간 배양 후 효소 생산성이 17.5 U/ml로 최대에 이르렀다(5). 따라서 분리균 *B. subtilis* WL-8의 mannanase 생산성에 탄수화물이 미치는 영향을 조사하기 위해 LB 액체배지를 기본배지로 하여 부가 탄소원을 1% (w/v)가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 24시간 배양하여 배양상등액에 존재하는 mannanase 활성을 조사한 결과, Table 2에 보인 바와 같이 LBG를 첨가한 배지에서 효소 생산성이 약간 증가하였으며 밀기울에 의한 효소 생산성 증가

Table 1. Sugar utilization of *B. subtilis* WL-8

Sugars	Utilization by <i>B. subtilis</i>			Sugars	Utilization by <i>B. subtilis</i>		
	WL-8	WL-3	WL-7		WL-8	WL-3	WL-7
Control	-	-	-	Esculin	+	+	+
Glycerol	+	+	+	Salicine	+	+	+
Erythritol	-	-	-	Cellobiose	+	+	+
D-Arabinose	-	-	-	Maltose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	Lactose	-	+	-
Ribose	+	+	+	Melibiose	+	-	+
D-Xylose	-	+	+	Sucrose	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	Trehalose	+	+	+
Adonitol	-	-	-	Inulin	+	-	+
Methyl-β-D-xylopyranoside	-	-	-	Melezitose	-	-	-
Galactose	-	-	-	Raffinose	+	-	+
Glucose	+	+	+	Starch	+	-	+
Fructose	+	+	+	Glycogen	-	-	+
Mannose	+	+	+	Xylitol	-	-	-
Sorbose	-	-	-	Gentiobiose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	D-Turanose	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-
Inositol	+	+	+	D-Tagatose	-	-	-
Mannitol	+	+	+	D-Fucose	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	L-Fucose	-	-	-
Methyl-α-D-mannopyranoside	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-
Methyl-α-D-glucoside	+	+	+	L-Arabitol	-	-	-
N-Acetyl-glucosamine	-	-	-	Gluconate	-	-	-
Amygdalin	-	-	+	2-Keto-gluconate	-	-	-
Arbutin	-	+	+	5-Keto-Gluconate	-	-	-

Table 2. Mannanase production of *B. subtilis* WL-8 according to additional carbon sources

Carbon sources	Mannanase production (U/ml)	Relative productivity (fold)
None	1.9	1.0
Oat spelt xylan	4.3	2.3
α -Cellulose	3.7	1.9
Rice straw	3.8	2.0
Wheat bran	5.7	3.0
Starch	3.1	1.6
Avicel	2.6	1.4
Konjac	3.4	1.8
Locust bean gum	3.0	1.6

가 가장 높은 것으로 나타났는데, 이는 LBG 혹은 konjac을 첨가하였을 때 mannanase 생산량이 크게 증가한 다른 *Bacillus*의 효소 생산성 증가양상과는 차이가 있는 것을 알 수 있다. 한편 *B. subtilis* 168은 밀기울(3.5%), 팜종자분(1%)를 함유한 배지에서 배양시 galactomannan을 함유한 배지에서 보다 효소 생산성이 증가되는 것으로 보고되었다(6).

Mannanase 생산성을 가장 많이 증가시킨 밀기울의 첨가량을 1-10% 범위로 달리 첨가한 배지에서 배양한 후 효소 생산성을 조사하였을 때 밀기울 6%를 첨가한 배지에서 효소 생산성이 가장 높은 것으로 확인되었다. 따라서 밀기울을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 24시간 동안에 배양하면서 배양시간별 효소 생산성을 조사하였다. 그 결과 밀기울을 첨가하지 않은 LB 배지에서는 24시간 배양 후 약 2.5 U/ml의 효소 생산성을 보였으나 밀기울을 첨가한 배지에서는 이보다 8배 정도 높은 20 U/ml 수준의 생산성을 보였다(Fig. 1). 그러나 이러한 효소 생산성은 LBG 또는 konjac을 첨가한 LB 배지에서 WL-3 (65 U/ml)이나 WL-7 (220 U/ml)에 비하면 WL-8의 효소 생산성이 낮은 수준이며 WL-3과 WL-7은 배양시간이 약 13시간에 도달하였을 때 최대 생산성을 보인데 비해 WL-8의

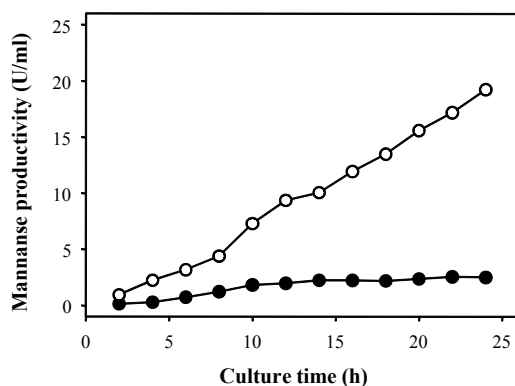


Fig. 1. Mannanase production of *B. subtilis* WL-8. *B. subtilis* WL-8 was grown respectively in LB broth (-●-) and LB broth supplemented with 6% wheat bran (-○-) at 37°C with shaking speed of 200 rpm. Mannanase activities were determined with the culture filtrates. Error ranges were within 10% for each activity.

경우는 24시간 배양할 때까지 효소 생산성이 느린 속도로 계속 증가하는 것으로 나타났다. Mannanase 생산성이 낮은 균으로 배지를 최적화하였을 때 최대생산성이 21 U/ml인 *Bacillus* sp. WS-42 (10)와 8 U/ml인 *B. subtilis* NM39 (15)이 보고된 바 있다.

Mannanase 유전자의 클로닝과 염기서열

B. subtilis WL-8의 염색체 DNA로부터 재료 및 방법에서 언급한 방법으로 mannanase 유전자를 클로닝한 결과 LBG 분해환을 보이는 형질전환주를 1주 선발하였다. 대장균 형질전환주에서 플라스미드를 분리하고 클로닝된 DNA 단편(4 kb) 중 mannanase 유전자를 포함하는 1,373 bp 길이의 DNA 염기서열을 결정된 후 ORF를 조사하였다. 그 결과 개시코돈을 TTG로 하며 362 아미노산 잔기로 구성된 단백질을 코딩하는 1,086 bp의 mannanase 유전자가 발견되었으며 개시코돈으로부터 6 nucleotides가 떨어진 부분에 ribosome 결합위치로 추정되는 GGGGAG가 존재하였다(GenBank accession no. HM149533).

염기서열로부터 유추되는 아미노산 잔기배열을 다른 mannanases와 비교한 결과 *B. subtilis* CICC 10260의 mannanase (ACX94030)와 동일한 서열을 보였고, 이 유전자도 TTG를 개시코돈으로 사용하는 것으로 확인되었다. *B. subtilis* 168 (Z99107)과 *B. subtilis* WL-7 (13)의 mannanase 유전자 개시코돈도 TTG로 WL-8과 동일함데, *B. subtilis* WL-3 (22), *Bacillus* sp. 5H (9), *B. subtilis* NM-39 (17)와 *B. subtilis* HB002 (AF324506)의 유전자 개시코돈은 ATG로 알려졌다. 한편 *B. subtilis* WL-3과 WL-7의 mannanases와는 각각 73%와 99% 정도의 상동성을 나타냈다. 이들 mannanase는 모두 GH family 26에 속하는 mannanase 활성영역(아미노산서열 위치 32-350)만을 지니며 탄수화물 결합영역은 포함하지 않고 있다. *B. subtilis* WL-8 mannanase와 WL-7 mannanase는 362 아미노산 잔기 중 3잔기만 다르고, LB 배지에서 효소 생산성도 유사한 수준(1-2.5 U/ml)임에도 불구하고 이들 균주간에 최대 효소생산성이 10배 이상 차이가 큰 것은 LB 배지에 첨가된 LBG이나 konjac에 의한 mannanase 유전자 발현량의 차이 때문으로 추측된다.

Mannanase의 반응특성

B. subtilis WL-8 mannanase 유전자를 함유한 재조합 대장균이 생산하는 mannanase의 반응특성을 조사하기 위해 LB 배지에서 13시간 배양한 후 배양상등액과 균체과쇄상등액의 효소활성을 측정된 결과 균체내외에 존재하는 효소량이 거의 유사하였다. *Bacillus* sp. AM-011의 mannanase를 함유한 재조합 대장균에서 생산되는 mannanase의 58% 정도가 균체외와 periplasm에 존재한다고 보고된 바가 있으며(1), WL-7의 mannanase를 signal peptide 없이 대장균에서 발현시켰을 때는 균체외로 분비되는 효소가 없으며 signal peptide를 제거하지 않았을 때는 약 50% 정도가 균체의 효소로 존재하는 것이 보고되었다(14). 이로 보아 재조합 대장균에서 WL-8 mannanase의 signal peptide가 작용하여 균체외로 일정부분 분비시킨 것

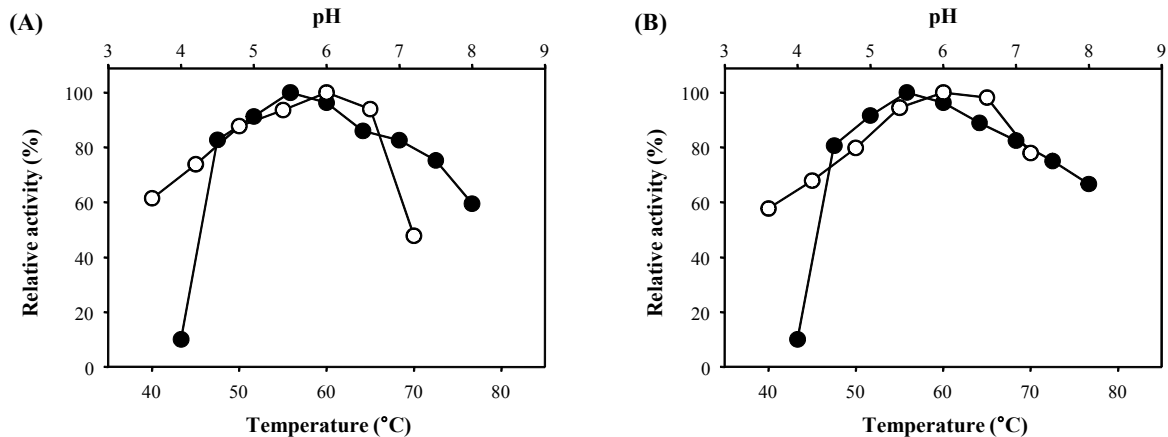


Fig. 2. Effects of reaction temperature and pH on the mannanase activity both of culture filtrate (A) and cell-free extract (B) of recombinant *E. coli*. Temperature profile (-○-) was obtained by measuring the mannanase activities at pH 5.5 and different temperatures. The pH profile (-●-) was obtained 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 4-6) and sodium phosphate (pH 6-8). Error ranges were within 10% for each activity.

으로 여겨진다.

균체내 효소와 분리된 효소의 반응특성을 비교하기 위해 배양상등액과 균체파쇄상등액을 효소액으로 각각 사용하여 온도와 pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 반응온도(40-70°C)와 반응 pH(4.0-8.0)를 달리하고 LBG의 가수분해 활성을 조사했을 때 두 분획의 mannanase는 모두 반응온도 60°C에서 최대활성을 보였으나 균체내 효소분획인 균체파쇄상등액에서는 70°C에서 최대활성의 80% 정도의 활성이 있었으나 배양상등액의 경우는 70°C에서 약 50% 정도 수준의 효소 활성을 보여 고온에서 반응성의 차이가 큰 것으로 확인되었다. 반응 pH는 두 분획이 모두 pH 5.5에서 최대활성을 보이고 반응온도와는 달리 반응 pH에 의한 효소활성의 차이는 두 분획간에 유의할 차이를 보이지는 않았다. 그러므로 WL-8 mannanase는 WL-3과 WL-7의 효소와 동일하게 50-70°C와 pH 5.0-6.5에서 최대활성을 보이는 다수의 *Bacillus* 속 균주 유래의 mannanase와 유사한 반응특성을 보이는 것으로 확인되었다(16, 23).

적요

전통 발효식품인 된장으로부터 mannanase의 생산균으로 분리된 WL-8 균주는 형태적 특성, 생화학적 성질 및 16S rRNA의 염기서열에 근거하여 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. *B. subtilis* WL-8은 locust bean gum 보다는 밀기울이 첨가된 LB 배지에서 mannanase 생산성이 높았으며, 24시간 배양하였을 때 약 20 U/ml에 이르렀다. 분리균 WL-8의 mannanase 유전자를 클로닝하여 그 염기서열을 결정된 결과 mannanase 유전자는 362 아미노산으로 구성된 단백질의 코딩하며 1,086 뉴클레오티드로 이루어졌다. 아미노산 잔기배열을 분석한 결과 WL-8의 mannanase는 GH family 26에 속하며 *B. subtilis*의 mannanases와 매우 상동성이 높았다. *B. subtilis* WL-8의

mannanase 유전자를 함유한 재조합 대장균의 배양상등액과 균체파쇄상등액을 사용하여 반응특성을 조사한 결과 pH 5.5와 60°C에서 최대 반응활성을 보였으며, 60°C보다 높은 온도에서 배양상등액보다는 균체파쇄상등액에 존재하는 mannanase가 더 높은 활성을 보였다.

참고문헌

1. Akino, T., C. Kato, and K. Horikoshi. 1989. The cloned β -mannanase gene from alkaliphilic *Bacillus* sp. AM-001 produces two β -mannanases in *Escherichiacoli*. *Arch. Microbiol.* 152, 10-15.
2. Akita, M., N. Takeda, K. Hirasawa, H. Sakai, M. Kawamoto, M. Yamamoto, W.D. Grant, Y. Hatada, S. Ito, and K. Horikoshi. 2004. Crystallization and preliminary X-ray study of alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60, 1490-1492.
3. Chen, Y., J. Long, L. Liao, Y. Zhang, and J. Yang. 2000. Study on the production of β -mannanase by *Bacillus* M50. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 40, 62-68.
4. Cui, F., J. Shi, and Z. Lu. 1999. Production of neutral β -mannanase by *Bacillus subtilis* and its properties. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 39, 60-63.
5. El-Helow, E.R. and A.A. Khattab. 1996. The development of a *Bacillus subtilis* 168 culture condition for enhanced and accelerated beta-mannanase production. *Acta Microbiol. Immunol. Hung* 43, 289-299.
6. El-Helow, E.R., S.A. Sabry, and A.A. Khattab. 1997. Production of β -mannanase by *B. subtilis* from agro-industrial by-products: screening and optimization. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 189-193.
7. Fu, X., X. Huang, P. Liu, L. Lin, G. Wu, C. Li, C. Feng, and Y. Hong. 2010. Cloning and characterization of a novel mannanase from *Paenibacillus* sp. BME-14. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 518-524.
8. Gibbs, M.D., A.U. Elinder, R.A. Reeves, and P.L. Bergquist. 1996. Sequencing, cloning and expression of a β -1,4-mannanase gene, *manA*, from the extremely thermophilic anaerobic bacterium, *Caldicellulosiruptor* Rt8B.4. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 37-43.

9. Khanongnuch, C., T. Ooi, and S. Kinoshita. 1999. Cloning and nucleotide sequence of β -mannanase and cellulase genes from *Bacillus* sp. 5H. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 249-258.
10. Kim, J.H., T.K. Lee, H.C. Yang, and D.K. Oh. 1997. Optimization of medium for β -mannanase production by *Bacillus* sp. WS-42. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 212-217.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Mendoza, N.S., M. Arai, T. Kawaguchi, F.S. Cubol, E.G. Panerio, T. Yoshida, and L.M. Joson. 1994. Isolation of mannan-utilizing bacteria and the culture conditions for mannanase production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 51-54.
16. Mendoza, N.S., M. Arai, T. Kawaguchi, T. Yoshida, and L.M. Joson. 1994. Purification and properties of mannanase from *Bacillus subtilis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 551-556.
17. Mendoza, N.S., M. Arai, K. Sugimoto, M. Ueda, T. Kawaguchi, and L.M. Joson. 1995. Cloning and sequencing of β -mannanase gene from *Bacillus subtilis* NM-39. *Biochim. Biophys. Acta* 1243, 552-554.
18. Oh, Y.P., J.M. Lee, K.H. Cho, and K.H. Yoon. 2002. Isolation and enzyme production of a mannanase-producing strain, *Bacillus* sp. WL-3. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 247-252.
19. Stoll, D., A. Boraston, H. Stalbrand, B.W. McLean, D.G. Kilburn, and R.A.J. Warren. 2000. Mannanase Man26A from *Cellulomonas fimi* has a mannan-binding module. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 265-269.
20. Sunna, A., M.D. Gibbs, C.W.J. Chin, P.J. Nelson, and P.L. Bergquist. 1999. A gene encoding a novel mutidomain β -1,4-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 664-670.
21. Tanaka, M., Y. Umemoto, H. Okamura, D. Nakano, Y. Tamaru, and T. Araki. 2009. Cloning and characterization of a beta-1,4-mannanase 5C possessing a family 27 carbohydrate-binding module from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 109-116.
22. Yoon, K.H. and B.L. Lim. 2007. Cloning and strong expression of a *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase gene in *B. subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1688-1694.
23. Yosida, S., Y. Sako, and A. Uchida. 1997. Purification, properties, and N-terminal amino acid sequences of guar gum-degrading enzyme from *Bacillus circulans* K-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 251-255.