

Bacillus safensis MA-01 유래 알파-만노사이드에이즈의 효소학적 특성

Characterization of α -D-mannosidase activity from *Bacillus safensis* MA-01

이보미, 김주원, 박제권*

Bo Mi Lee, Joo Won Kim, Jae Kweon Park*

가천대학교 바이오나노대학 생명과학과, 성남시, 경기도 461-701, 대한민국

Department of Life Sciences, Gachon University, Seongnamdaero 1342, Seongnam-si, Gyeonggi-do 461-701, Republic of Korea

(Received 15 June 2015, Revised 30 June 2015, Accepted 30 June 2015)

Abstract An extracellular alkaline α -D-mannosidase produced by a strain named as MA-01 was produced and its preliminary enzyme activity was characterized. Upon determining the 16S rDNA sequence and its homology search, the strain was identified to be one of species of the *Bacillus safensis*. Localization of enzyme was elucidated that α -D-mannosidase can be found in culture medium as an extracellular enzyme. In addition, partial enzyme activity of 63% compared with the extracellular enzyme activity was observed in membrane protein. The optimal pH and temperature of the α -D-mannosidase were pH 7.5 and 37°C, respectively. The K_m and V_{max} values of the α -D-mannosidase in crude enzyme toward *p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside were determined to be 455.6 μ M and 10.8 μ mole/min/mg of protein, respectively. To the best of our knowledge, this is the first report described the alkaline α -D-mannosidase from the family of *B. safensis*.

Keywords : *Bacillus safensis*, α -D-Mannosidase, 16S rDNA sequence, Membrane protein, *p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside

서 론

알파-만노사이드에이즈 (α -D-Mannosidase) 는 여러 다양한 미생물 중에서 발견되었는데 그 중에서도 대부분 *Bacillus* 종이 많은 것으로 확인되고 있다 [1-4]. 또한 이 특이 효소와 이와 유사한 효소들의 효율적 생산을 위한 유전자 클로닝과 유전자 발현에 따른 재조합 단백질의 특성 연구에 대한 보고도 매우 많다 [5-8]. 뿐만 아니라 구조적 특성 연구에 대한 결과

도 제시되어 효소학적 특성 규명에 유익한 정보를 제공하고 있다 [9]. 이전 연구에서도 제시한 바와 같이 [10] 해양환경에서 적조 유발 미세조류의 세포벽을 분해하는 활성을 지니고 있어 생물학적 적조 방제 가능성을 제시한 바 있다. 사실 넓은 해양 환경조건에 직접적인 응용은 무리가 있다고 사료되나, 이러한 특이 효소의 효율적이고 대량생산이 가능한다면 부분적인 적용이 가능할 것으로 판단된다. 따라서, 생물학적 방제 또는 적조유발 미세조류에의 길

* Corresponding author
Phone & Fax: +82-31-750-4763
E-mail: jkpark@gachon.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>)

조성을 갖는 매우 높은 효소활성을 지니는 새로운 효소원 탐색은 매우 가치 있는 연구 과제라 할 수 있다. 이에, 본 연구에서는 생물/생화학적, 해양 산업적 측면에서 매우 활용성이 높을 것으로 예상되는 알파-만노사이드이스 (α -D-Mannosidase) 를 효율적으로 생산하는 신규 종의 해양 미생물을 분리하는 과정에서 만노오스 다당체에 기질 특이성을 나타내는 효소를 생산하는 해양 미생물 분리, 동정, 효소학적 특성에 대하여 보고 하고자 한다. 효소의 활성 특성을 연구함에 있어서 기질 특이성 규명만큼이나 중요한 요소 중 하나가 바로 기질 분해 기작에 대한 연구로서 아마도 효소의 작용 기작에 따라 *endo*- 또는 *exo*-type의 효소 작용 방식으로 구분 되는데, 이는 기질의 분해 및 대사를 이해하는데 매우 중요한 요소이기 때문이다 [9-13].

효소활성을 나타내는 균주 MA-01은 인천 소래 인근 갯벌로부터 분리 하였다. 효소의 특이성을 판별하기 위해 다양한 기질에 대한 특이성을 확인하고, 분리 균의 동정을 위해 16S rDNA 염기서열 결정 및 상동성 비교에 따른 계통학적 분리, 효소 활성 측정 등을 통하여 배양조건에 따른 생산성 향상과 효소 활성간의 상호 관련성을 비교해 보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 분리, 동정한 해양미생물의 효소 활성을 조사하기 위해 여러 기질을 구입하여 사용하였다. 주요 기질로는, *p*-nitrophenyl-*b*-D-N-acetylglucosamides (*p*NP-(GlcNAc)_n, n=1-2,) 그리고 *p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside (*p*NP-mannose), *p*-nitrophenyl- α -D-fucoside (*p*NP-fucose) 를 Sigma (St. Louis, MO, USA) 사로부터 구입하였다. 미생물에 의한 당의 이용성을 확인하기 위하여 주요 단당 (glucose, galactose, xylose, mannose, glucosamine, & galactosamine) 들을 고순도제품으로 Sigma사로부터 구입하였다. Gram stain kits 은 Becton, Dickinson & Co. (Sparks, Maryland, USA)로부터 구입하였고, Yeast extract, Tryptone 은 Difco Lab. (Detroit, Michigan, USA)에 구입하여 사용하였다. 그 밖에 여러 기초화학 물질들은 고순도 물질로 구입하여 사용하였다.

미생물 분리/동정

인천 소래 근처 갯벌을 취해 아이스 박스에 보관, 운반하여 연구실내에서 해수에 현탁된 상태로 잘 흔들어 침전시킨 다음, 30분 방치하였다. 이후 상층액을 해수에 미리 준비한 LB-agar (1.5%) 고체 배지에 평판 도말한 다음 37°C에서 배양, 생육하는 미생물을 확인하였다. 성장한 여러 종의 미생물을 새로운 평판배지에 옮기는 과정에서 성장이 빠르고 콜로니 형성이 우수한 7 종의 미생물을 선별하여, 연속 배양을 수행하였다. 각각의 순수 분리한 미생물들이 갖고 있는 생물학적 특성 연구를 위해 우선 해수-LB 배지에 배양한 다음 배양 상층액에 포함된 효소활성을 측정하였다. 여러 기질에 대한 효소활성 측정 및 결과를 바탕으로 기질 특이성을 나타내는 균주를 확보하고, 생육 조건에 따른 활성 변화를 관찰하고자 하였다. 선별된 균주를 특정 짓기 위해 16S rDNA의 염기서열을 결정 ((주) 마이크로 아이디) 하고, 선행 연구에서 제시한 것처럼 유전자 상동성을 비교하여 생물 종을 분류 하였다 [14].

효소의 위치

기질에 대한 특이적 활성을 나타내는 효소의 위치를 파악하기 위해 배양 후 분리한 균체 (0.1 g/3 mL) 를 냉각 PBS로 2회 수세 한 다음, 여러 pH 완충액 (범위 4-10)에 현탁 시켰다. 이를 초음파 (40 kHz, 1분 x 3회) 처리와 소형 세포 파쇄기 (BioMasher-II, Optima, Japan)를 이용하여 10분간 파쇄한 다음 원심 분리 (13,000 rpm, 10 분) 하여 분리하였다. 최초 배양 상층액을 조효소로, 세포 파쇄 후 분리한 상층액은 세포 내 조효소(crude intracellular enzyme), 그리고 최종 분리된 세포 파쇄분을 막 단백질 (membrane protein)을 하여 기질과 반응시켜 상대적 효소활성을 측정 함으로서 효소의 위치를 확인하였다. 분리한 각각의 시료에 대한 단백질 함량은 bovine serum albumin (BSA) 를 표준 단백질로 하여 Bradford 방법에 따라 정량 하였다 [15].

효소활성 측정

기질 특이성에 따라 최종 선별된 미생물을 MA-01으로 우선 명명 하고, 이 균주가 생산하는 효소활성 측정을 위해 배양 상층액을 취해 조효소액(crude enzyme)으로 사용하였다. 해수에 포함된 염의 부가적

효과를 제거하기 위해 배양 상층액을 탈염 컬럼 (PD-10 columns, Sephadex G-25M, GE Healthcare, Burckinghamshire, UK) 을 이용하여 염을 제거하고, 이를 조효소원으로 제시한 여러 기질에 대한 효소활성을 측정하였다. 우선 해수-LB 배지에서 12 시간 동안 전배양 해둔 미생물 배양액을 전체 부피의 1/50 되도록 집중하여 24 시간 2차 배양을 수행하였다. 원심분리를 통해 균체 및 상층액을 분리하고, 상층액 내의 효소활성 측정을 위해 각각의 *pNP-mannose*, *pNP-GlcNAc*, *pNP-fucose* (1 mM) 기질 용액을 50 mM 인산 완충용액 (pH 7.0)을 이용하여 준비하고, 효소량, 반응시간, 기질 농도 의존적 특성을 확인하였다. 효소활성도 (Unit)는 상기의 조건에서 1 분 동안에 각각의 기질로부터 유리된 1 μmole 의 *p-nitrophenol*을 생성하는 효소의 양으로 정하고, 최소 3번의 반복실험을 통해 얻은 평균값을 결과로 취하였다.

기질에 대한 동력학적 특성

인공기질에 대한 효소활성을 확인한 다음, 그 결과를 바탕으로 기질 특이성에 따른 효소의 동력학적 특성을 확인하기 위하여 poly-mannan을 기질로 하여 효소활성을 측정하였다 [14]. 또한 시간변화에 따른 효소활성을 *pNP-mannose*에 대한 효소활성을 상대비교 하였으며, 분해산물을 이용한 효소활성 측정을 위해 환원당 정량법 (Somogyi-Nelson 법)을 이용하였다 [16]. 생산물의 정성적 분석을 위해 TLC (Silica gel 60/Kieselguhr F₂₅₄thin-layerplate)수행하고, UV 254/365 nm 조사 또는 당 검출용 수용액을 이용하여 분해산물 확인하고자 하였다. 전개용매로는 1-propanol, 25% NH₄OH, H₂O(7:1:2.v/v)로 준비한 용매를 사용하였으며, 당 검출용 수용액은 3% cupric acetate와 8% H₂PO₄로 구성된 용액을 사용하였다. 당 검출용 용매에 TLC를 적신 후 건조시킨 다음 열판을 이용하여 200°C에서 검출될 때까지 가열하여 분해 정도와 부산물의 크기를 확인하였다.

통계처리

여러 실험을 통해 얻은 결과를 통계 처리 하기 위하여 최소 세 번의 결과로부터 계산된 값에 대한 표준편차 (means \pm S.D.) 로 나타내었으며, 유의차는 $P < 0.05$ 로 나타내었다.

결과 및 고찰

미생물 종 분리

본 연구에서는 최초 해양 미생물 유래의 유해 미세조류에 대한 길조성 (anti-microbial activity) 을 갖는 미생물 탐색을 목적으로 신규 종 미생물을 분리하고자 하였다. 이를 위해 탐색하는 과정에서 인천 소재 인근 갯벌로부터 해양미생물을 분리하였으며, 특이적 기질 분해 능력이 우수한 미생물 종을 분리하고, 특성을 파악하고자 하였다. 그 결과, MA-01으로 명명된 미생물은 사용한 세 가지 기질에 대한 효소활성을 나타내고 있는데, Fig. 1에 나타난 것처럼, *pNP-GlcNAc*에 대해 가장 강력한 효소활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. *pNP-(GlcNAc)₂*에 대한 효소활성은 나타나지 않아 매우 제한적인 키틴 분해관련 효소를 발현하고 있음을 예측해볼 수 있다. 일반적으로 *pNP-(GlcNAc)₂*는 키틴 분해효소 중 특히 *endo-type*의 분해특성을 갖는 효소 기질로 주로 이용되어, 미생물이 생산하는 효소의 일차적인 특성을 규명하는데 활용되어, 아마도 기본 배양법에 따른 배양 상층액내의 *endo-type* 효소활성은 기대할 수 없다 하겠다. 반면, *pNP-GlcNAc*에 대한 효소활성이 매우 유의적으로 나타나 *exo-type*의, 즉 저분자화된 키틴 분해산물의 비 환원 말단부터 하나 단위의 GlcNAc을 가수분해하는 특성을 지닌 효소를 발현하고 있음을 확인할 수 있었다. 대부분의 일반 미생물들은 glucose와 같은 단당을 주요 탄소원으로 사용하고, 여러 생물학적 특성을 갖는 구조적 특성 물질로 전환시킨다. 또한 GlcNAc 역시도 고분자 상태의 키틴 분해와 상관없는 미생물들의 탄소원으로 쓰이는 경우가 많이 확인된다. 하지만, 인공기질인 *pNP-GlcNAc*을 분해하는 활성을 지니는 미생물들은 지금까지 확인된 바로 모두 최소 효소활성을 지닌다. 결과를 바탕으로 고찰해보면, 해양 환경내의 게, 새우 껍질 등의 주요 키틴 소재의 분해, 탄소원/질소원으로의 활용이 가능한 미생물로부터 분해된 일부 산물을 *exo-type*의 효소를 이용하여 흡수/이용할 수 있는 미생물 종이 아닐까 사료된다. 하지만, data base (PubMed, NCBI, 국가과학기술정보센터 NDSL, National Digital Science Library)를 통한 분석결과, *B. safensis* 종이 생산하는 키틴분해 효소 (chitinase)에 대한 정보를 확인할 수 없어 키틴 분해 효소를 생산하는 신규 종 미생물로의

특성연구 또한 향후 수행할 가치가 높다 하겠다. 하지만, 본 연구에서는 기존의 많은 키틴 분해관련 미생물, 효소학적 특성, 분해 메커니즘 연구에 대한 보고가 있어, 또한 매우 낮은 효소활성이 pNP-fucose에 대한 나타났지만 상대적 유의성을 고려하여 이를 피하고 차기로 pNP-mannose에 대한 활성이 높은 부분에 착안하여 효소의 특성을 좀 더 살펴 보고자 하였다.

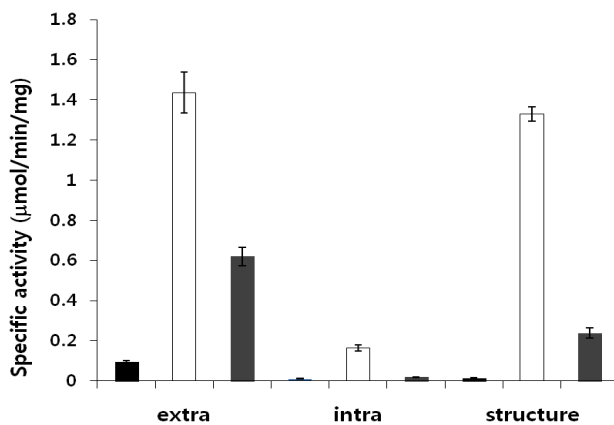


Figure 1. Determination of hydrolytic enzyme activity. Samples were prepared from the strain MA-01: extra; culture supernatant, intra; supernatant after cell lysis, structure; debris as membrane protein. For the determination of enzyme activity, pNP-fucose (closed), pNP-mannose (grey) and pNP-GlcNAc (opened) were used as the substrate. The reaction mixture was incubated for 24 h at 37°C.

계통학적 분리

상기의 특징 있는 효소활성이 확인됨에 따라, 분리 균주 MA-01을 계통학적으로 분류하고자 16S rDNA의 부분 염기서열을 결정하였다 [14]. 부분 결정된 16S rDNA 염기서열은 862-bp였으며, 이를 바탕으로 상동성 검색을 통해 종 분류를 수행하였다. 조사 결과, *Bacillus* 속에 속하는 세균으로 판단되는데, *Bacillus* 는 현재 268종, 7 아종 (2013년 7월 기준)이 존재하며, 이들 중 *B. safensis* 와 100%의 높은 유사도를 보였다. 이외에도 *B. pumilus*, *B. stratosphericus*, *B. altitudinis*, *B. aerophilus*, *B. idriensis* 등과 97% 이상의 높은 유사도를 보였다 (Table 1). 미생물 동정의 기준을 16S rDNA의 염기서열 97% 유사도로 인정하는 최근 학계의 추세에 따라 MA-01은 상기 균주들 중 한 종으로 판단된다. 한편, 862-bp의 염기서열을 사용한 계통수 분석에 의하면 (Fig. 2), MA-01은 *B. safensis* 표준 균주와 동일 가치를 형성하는 것으로 나타났으며, 또한 계통수 심화분석 (1000 bootstrap) 을 통해 *B. safensis*와 동일 가치를 형성하는 정도가 79%로 매우 유의적인 결과를 나타나 *B. safensis* MA-01으로 동정하였다.

Table 1. Determination of 16S rDNA sequence and its homology search.

Rank	Name/Title	Strain	Accession	Pairwise similarity	Diff/Total
1	<i>Bacillus safensis</i>	FO-036b(T)	AF234854	100.000	0/862
2	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061(T)	ABRX01000007	99.884	1/862
3	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a(T)	AJ831841	99.536	4/862
4	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b(T)	AJ831842	99.536	4/862
5	<i>Bacillus aerophilus</i>	28K(T)	AJ831844	99.536	4/862
6	<i>Bacillus idriensis</i>	SMC 4352-2(T)	AY904033	97.564	21/862
7	<i>Bacillus vallismortis</i>	DSM 11031(T)	AB021198	96.752	28/862

효소활성 최적 조건

B. safensis MA-01의 세포외 효소 활성 증가에 따른 배양 상층액 속의 단백질 증감은 배양 기간 변화 동안 유의적 차이가 확인 되지 않았다 (data not shown). 또한 상층액을 조효소액으로 이용하여 각각의 효소활성을 측정하여 보았으나, 배양 상층액내의 효소활성은 유의성이 높지 않아 (Fig. 3) 세포외 단백질에 대한 기본적인 활성 최적 조건을

확인하였다 (Fig. 4). 기질 pNP-mannose에 대한 최적 반응 온도와 pH는 37°C와 pH 7.5로 확인되었다. 하지만, 세포외 단백질, 미생물 체를 파쇄 후 얻은 세포 파쇄분 (debris)를 효소원으로 이용하는 만큼 정밀한 동력학적 특성을 밝히는 것은 노력/시간 투자 대비 가치가 높게 평가되지 않아 본 연구에서는 기본적인 특성을 밝히고 제시하는 정도로 마감하고자 한다.

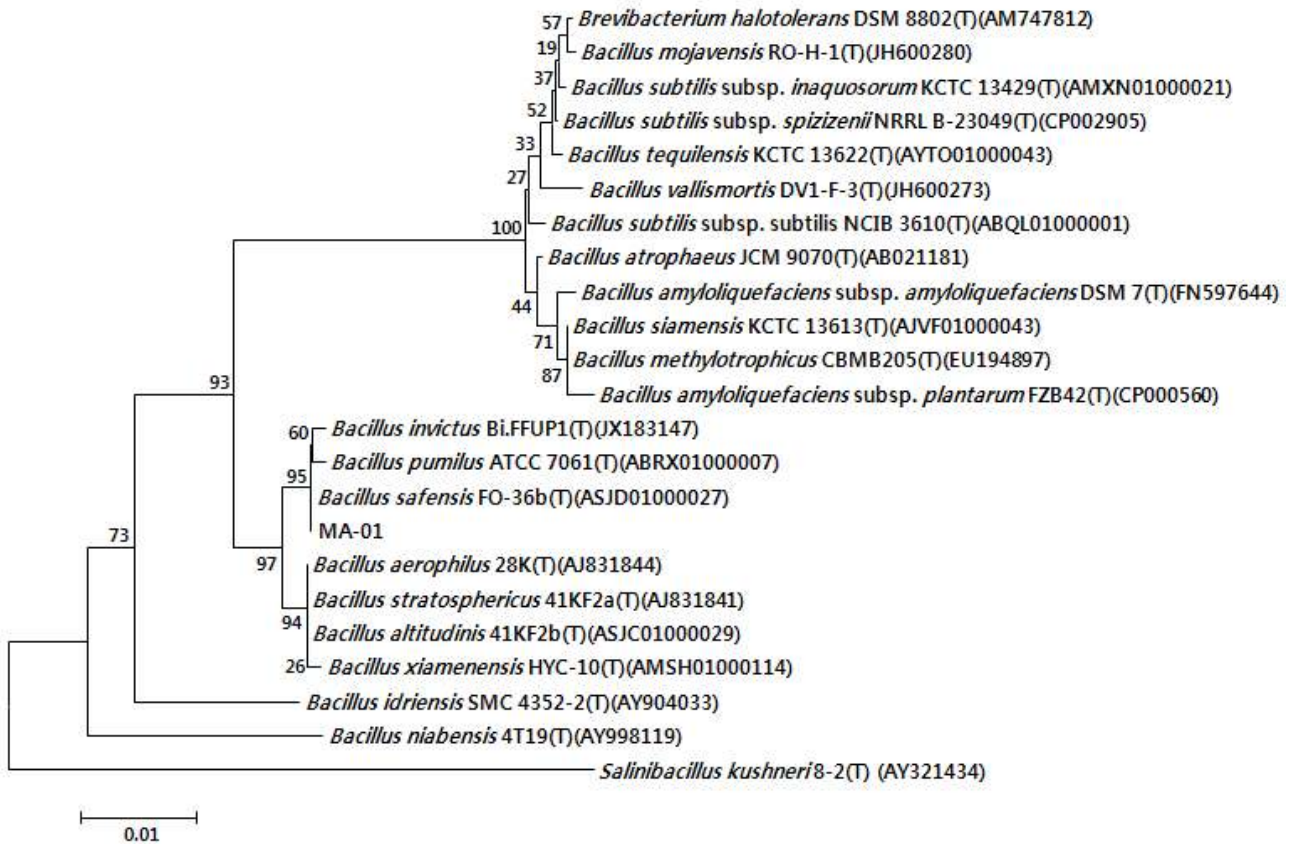


Figure 2. Phylogenetic tree analysis of the strain MA-01.

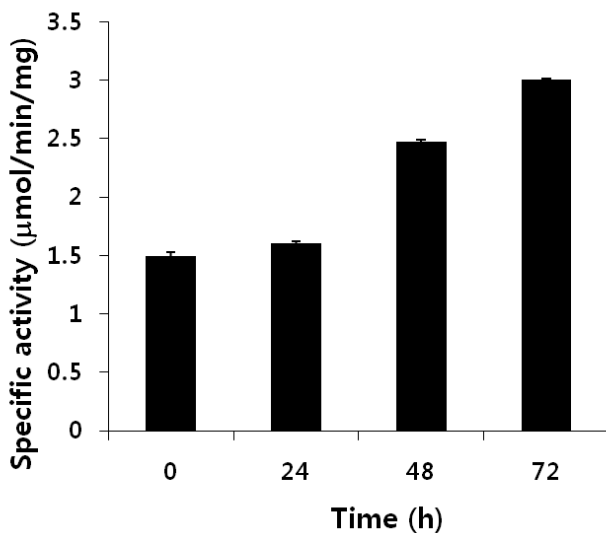


Figure 3. Measurement of poly-mannan degrading enzyme activity. A) 0.5% poly-mannan in culture medium was used as sole carbon substrate. Enzyme activity from the MA-01 in the supernatant of culture medium was measured by reducing assay.

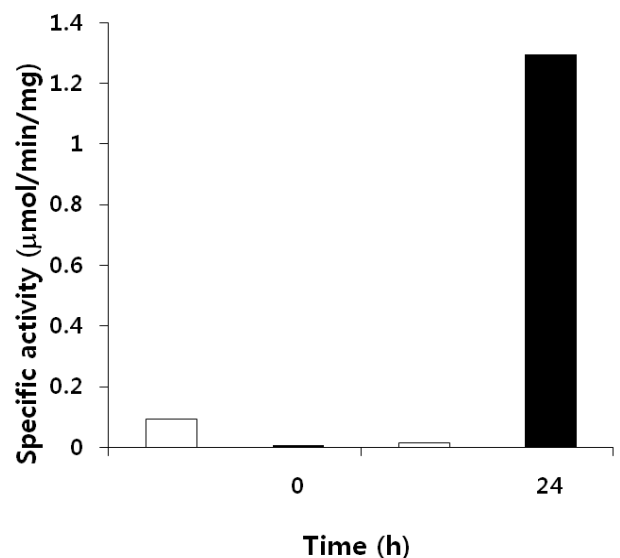


Figure 4. Comparison of enzyme activity. The strain MA-01 was pre-incubated for 12 h at 37°C in the presence of Poly-mannan. The supernatant was filtered using 0.22 µm filter, and its activity was determined by reducing sugar assay (opened). Pellet as the bacterial cell debris was used as membrane protein. pNP-mannose were used as substrate. The reaction mixture was incubated for 24 h at 37°C.

효소 유도 및 효소 활성

상기 기술한 바와 같이 *B. safensis* MA-01는 세포의 pNP-mannose를 분해하는 효소를 발현하고 있음을 확인하였다. 아직 상세한 poly-mannan 분해 메커니즘 기작과 관여효소들의 특징이 밝혀지지 않았지만, *B. safensis* MA-01는 어쩌면 이들 메커니즘 연구에 대한 생물학적으로 중요한 대상이 될 수 있을 것으로 판단된다. 따라서, 보다 많은 효소원 확보를 위해 poly-mannan을 배양액에 1% 되게 주요 기질로 첨가하여 배양하였고 그에 따른 효소의 유도 또는 발현 정도와 효소의 동태학적 위치를 파악해보았다. Fig. 3에 나타낸 것처럼, poly-mannan을 주요 기질로 첨가하여 배양한 결과, 배양 상층액에 포함된 poly-mannan 분해산물 생산에 대한 효소의 상대적 활성이 증가함을 평가해 볼 수 있었다. 즉 배양 시간이 오래 경과함에 따라 환원당 법으로 정량한 경우 분해산물의 양이 서서히 증가 함으로서 효소활성의 정도를 파악할 수 있었는데, 유도된 효소량과 상관성이 있는지 여부와는 별도로 단위 환원당 생산량이 증가함을 확인 함으로서 기질에 따른 효소활성이 유도되는 것으로 판단한다. 여기서 흡광도 단위로 나타내어 상대활성을 비교하였으나, 정량적으로 계산하면 단위 효소량, 단위시간당 효소활성으로 나타내면 최대 값으로서 약 10.8 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 계산되었다. 또한 분해산물을 TLC 분석으로 확인한 결과, 배양 개시 이후 보다 72시간 배양 이후 분해산물의 이동이 다소 나타나 보이지만, 환원당 함량 변화가 크게 나타나지 않음을 고려하여 보면 분해하여 저분자화 시킨 산물은 영양분으로 활용하고 부분적 가수분해산물이 약하게나마 위로 이동함에 따라 효소활성이 매우 약하지만 분명 poly-mannan을 분해하고 있음을 확인할 수 있었다 (data not shown). 따라서, 상기 Fig. 1과 3의 결과를 바탕으로 고찰해보면, *endo*-type의 효소활성보다 *exo*-type의 효소활성이 다소 높게 나타나는 것으로 평가할 수 있다. 하지만, 효소활성과 분해산물의 대사에 이르기까지 동시에 비교하기는 매우 어려운 일로서, poly-mannan 존재 하에 배양한 미생물체를 회수하고, 배양 상층액과 세포의 효소활성을 비교한 결과, Fig. 4에 나타난 것처럼, 오히려 debris로 표기한 미생물 자체의 세포외(membrane protein) 효소활성이 매우 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 Fig. 1에 나타낸 결과와 비교했

을 때, 세포외 효소활성이 상대적으로 높은 활성이 확인됨에 따라 poly-mannan 첨가에 의한 효소의 유도/발현이 진행되었을 것으로 추측할 수 있다. 상대활성은 흡광도 0.94에 해당하는 효소활성은 비특이활성 (specific activity)으로 약 10.8 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 에 해당되므로 정량적 비교가 충분히 가능하다. 이러한 결과를 바탕으로 약 50% 정도의 세포외 (extra로 표기)로 표기된 효소활성은 아마도 효소유도물질의 차이 또는 긴 배양 시간 동안 자연스럽게 파쇄된 세포내 (intra로 표기) 효소활성이 아닐까 생각된다. 이는 유전자 발현에 따른 전사단계에서의 성숙한 효소활성도 포함시킬 수 있어서 Fig. 4에 나타낸 결과를 바탕으로 정리하자면, poly-mannan에 의한 발현된 효소는 주로 세포외 단백질로, *endo*-와 *exo*-type 두 형태의 효소활성을 갖는 미생물로 분류할 수 있다.

기질 특이성

기초 배양 배지로 해수에 poly-mannan을 유일한 탄소원으로 제공하고 여기에 배양 함으로서 생육 정도와 이에 따른 효소 활성을 측정할 수 있었다. Fig. 5(a)에 나타낸 것처럼, poly-mannan에 대한 세포외 효소의 활성은 반응 초기 3 시간 정도까지는 큰 변화 없이 매우 서서히 증가함이 확인되었으며, 이후 9 시간 반응에 이르기까지 반응 시간 대비 효소 활성이 반응 시간에 따라 비례적으로 증가함을 확인 할 수 있었다. 하지만, 10 시간 반응에서는 하향선을 나타내어 생성물에 의한 되먹임 저해가 나타난 것으로 추측할 수 있다. 이는 매우 일반적인 결과로, 연속적 반응법에 따른 분해-생성물을 지속적으로 제거하지 않는 이상 효소의 활성 저해를 확인할 수 있다. 반면, Fig. 5b에 나타낸 것처럼 pNP-mannose를 기질로 사용하여 여러 농도 범위에서 9 시간 반응 시킨 다음 효소의 최대 활성값을 결정하여 보았다. 기질의 농도가 높아짐에 따라 효소활성이 매우 유의적으로 변화함을 확인 할 수 있으며 (Fig. 5b), 이를 바탕으로 최대 효소 활성값 (V_{max})와 K_m 값을 계산한 결과, 10.8 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 과 455.6 μM 로 결정되었다 (Fig. 5c). Poly-mannan (0.5%)에 대해서는 초기 반응속도가 매우 낮아 최대 효소 활성값 (V_{max})와 K_m 값을 구하기에 고려해야 할 변수가 많아 pNP-mannose에 대한 정량적 계산을 선행 연구

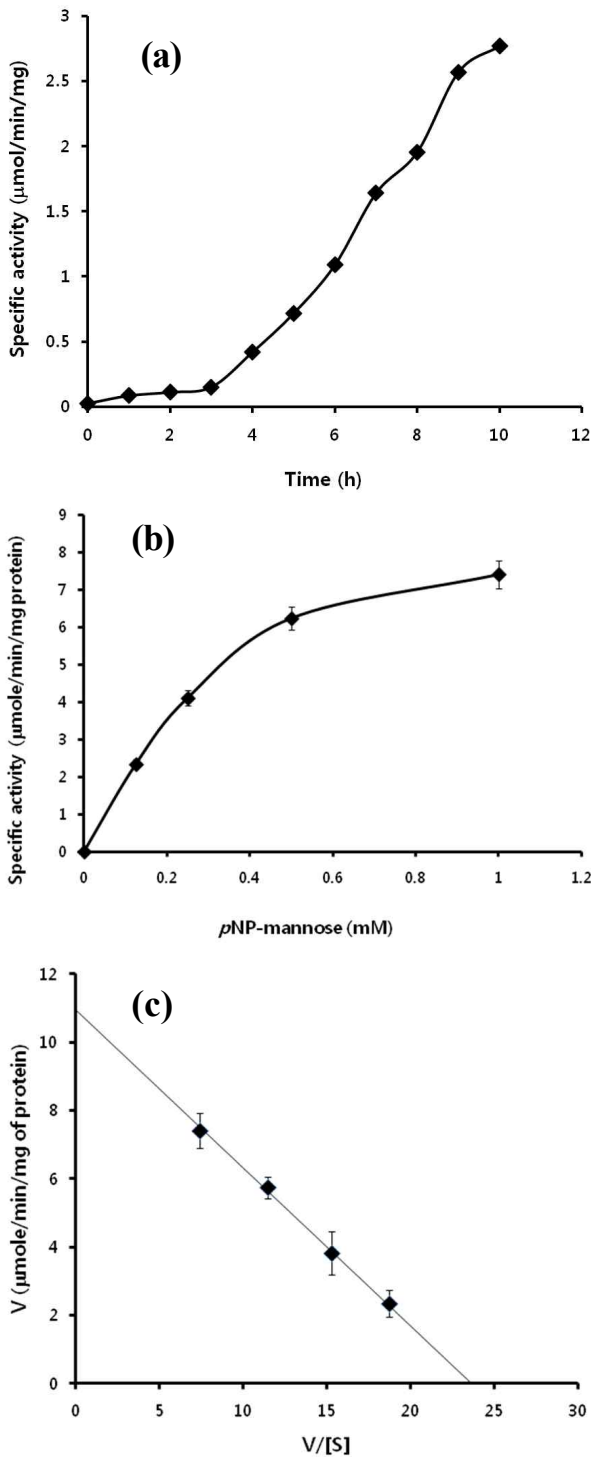


Figure 5. Kinetic properties of membrane protein from MA-01. Enzyme activity was determined using poly-mannan as substrate at the following conditions: at 37°C and pH 7.5 (a). Kinetics toward pNP-mannose were determined using different concentration of the substrate ranging from 0 to 1 mM at 37°C and pH 7.5 (b), which were determined using Woolf-Augustinsson-Hofstee plot (c) [14].

에서 제시했던 방법으로 나타내었다 [14]. 각각의 기질에 대한 효소의 특이 활성을 비교하기 위한 연구는 일반적으로 분리 정제 후 수행하지만, 상기 결과에서 기술 한 바와 같이 세포외 단백질의 분리 정제는 매우 어렵다. 따라서 이에 앞서 고려해 봐야 할 사항은, 효소 특이성과 기대효과에 따라 진행될 사항으로 판단된다. 따라서, 본 연구에서 제공하고 자 하는 연구결과에는 포함시키지 않았다. 타당성과 산업성 또는 더 큰 학술적 가치를 지닌다면, 향후 효소의 분리 정제 및 효소동력학적 특성 연구는 별도의 연구결과로 보고 하고자 한다. 여기서는 기본적인 효소의 기질 특이성만을 기술하였다.

결론

신규 해양미생물을 분리 동정하여 16S rDNA 염기서열 결정에 따른 생물종 분석을 바탕으로 *B. safensis* MA-01라 명명하였으며, 배양조건에 따른 특이효소 유도 특징으로 세포 외 활성 효소를 생산하는 것으로 확인되었다. 액체 배양 시 유의적 효소활성이 확인되지 않는 특징을 확인하였으며, 본 연구에서 분리한 *B. safensis* MA-01은 poly-mannan과 pNP-mannose을 분해하는 *endo-*와 *exo-*type의 두 가지 서로 다른 효소활성을 지닌 새로운 *B. safensis*의 한 종으로 분류되었다. 물론 *B. safensis* 유래 만노사이드이스 (α -D-Mannosidase)에 대한 선행연구결과는 보고된 바 없지만 *Bacillus* 종 유래 다양한 mannan 분해 효소들에 대한 특성이 밝혀져 [3,4,7,12], 향후 효소의 구조적 특성과 생물학적/동력학적 특성 비교에 대한 연구의 귀추가 주목된다. 결론적으로, 본 연구에서는 새로운 해양미생물을 분리 동정하는 과정에서 알파-만노사이드이스 (α -D-Mannosidase)를 효율적으로 생산하는 신규 종의 해양 미생물을 분리, 또한 만노오스 다당체인 poly-mannan에 대해서도 효소 활성이 높은 생물화학적 특성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 해양수산부의 재원으로 해양생명공학기술개발사업 (Marine Biotechnology Program funded by Ministry of Oceans and Fisheries, Korea) 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Li, Y. N., Meng, K., Wang, Y. R., and Yao, B. 2006. A beta-mannanase from *Bacillus subtilis* B36: purification, properties, sequencing, gene cloning and expression in *Escherichia coli*. *Z Naturforsch. C.* **61**, 840-846.
2. Ma, Y., Xue, Y., Dou, Y., Xu, Z., Tao, W., and Zhou, P. 2004. Characterization and gene cloning of a novel beta-mannanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* N16-5. *Extremophiles.* **8**, 447-454.
3. Maruyama, Y., Nakajima, T., and Ichishima, E. 1994. A 1,2-alpha-D-mannosidase from a *Bacillus sp.*: purification, characterization, and mode of action. *Carbohydr Res.* **251**, 89-98.
4. Yang, P., Li, Y., Wang, Y., Meng, K., Luo, H., Yuan, T., Bai, Y., Zhan, Z., and Yao, B. 2009. A novel beta-mannanase with high specific activity from *Bacillus circulans* CGMCC1554: gene cloning, expression and enzymatic characterization. *Appl Biochem Biotechnol.* **159**, 85-94.
5. Hatada, Y., Takeda, N., Hirasawa, K., Ohta, Y., Usami, R., Yoshida, Y., Grant, W. D., Ito, S., and Horikoshi, K. 2005. Sequence of the gene for a high-alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* strain JAMB-750, its expression in *Bacillus subtilis* and characterization of the recombinant enzyme. *Extremophiles.* **9**, 497-500.
6. Li, Y., Yang, P., Meng, K., Wang, Y., Luo, H., Wu, N., Fan, Y., and Yao, B. 2008. Gene cloning, expression, and characterization of a novel beta-mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. *J Microbiol Biotechnol.* **18**, 160-166.
7. Nankai, H., Hashimoto, W., and Murata, K. 2002. Molecular identification of family 38 alpha-mannosidase of *Bacillus sp.* strain GL1, responsible for complete depolymerization of xanthan. *Appl Environ Microbiol.* **68**, 2731-2736.
8. Yoon, K. H., Chung, S., and Lim, B. L. 2008. Characterization of the *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli*. *J Microbiol.* **46**, 344-349.
9. Yan, X. X., An, X. M., Gui, L. L., and Liang, D. C. 2008. From structure to function: insights into the catalytic substrate specificity and thermostability displayed by *Bacillus subtilis* mannanase BCman. *J Mol Biol.* **379**, 535-544.
10. Park, J. K. 2013. Purification and characterisation of a novel alkaliphilic α -D-mannosidase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biocont Sci Technol.* **23**, 1324-1335.
11. Feng, Y. Y., He, Z. M., Song, L. F., Ong, S. L., Hu, J. Y., Zhang, Z. G., and Ng, W. J. 2003. Kinetics of beta-mannanase fermentation by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett.* **25**, 1143-1146.
12. Zhang, M., Chen, X. L., Zhang, Z. H., Sun, C. Y., Chen, L. L., He, H. L., Zhou, B. C., and Zhang, Y. Z. 2009. Purification and functional characterization of endo-beta-mannanase MAN5 and its application in oligosaccharide production from konjac flour. *Appl Microbiol Biotechnol.* **83**, 865-873.
13. Zhao, Y., Zhang, Y., Gao, F., Xue, Y., Zeng, Y., and Ma, Y. 2008. Crystallization and preliminary X-ray study of alkaline beta-mannanase from the alkaliphilic *Bacillus sp.* N16-5. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **64**, 957-959.
14. Goo, B. B., Hwang, Y. J., and Park, J. K. 2014. *Bacillus thuringiensis*: a specific gamma-cyclodextrin producer strain. *Carbohydr Res.* **386**, 12-17.
15. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **7**, 248-254.
16. Smogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J Biol Chem.* **195**, 19-23.