



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월21일
(11) 등록번호 10-1780229
(24) 등록일자 2017년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
C12N 9/2402 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0113693
(22) 출원일자 2016년09월05일
심사청구일자 2016년09월05일
(56) 선행기술조사문헌
KR100477456 B1
J. Biol. Macromol., Vol.4, pp.67-74(2004.)
Enzyme Microb. Technol., Vol.92,
pp.76-85(Epub.2016.06.29.)*
PLUS ONE, Vol.6, No.1(2011.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
유진철
광주광역시 서구 송풍로 30 에스케이뷰아파트
102-502
최윤희
광주광역시 서구 상무공원로 114 해광한신아파트
101-1103
최윤석
광주광역시 남구 노대실로 89 송화마을휴먼시아7
단지아파트 709-603
(74) 대리인
김충호, 박희영, 최성용

전체 청구항 수 : 총 2 항

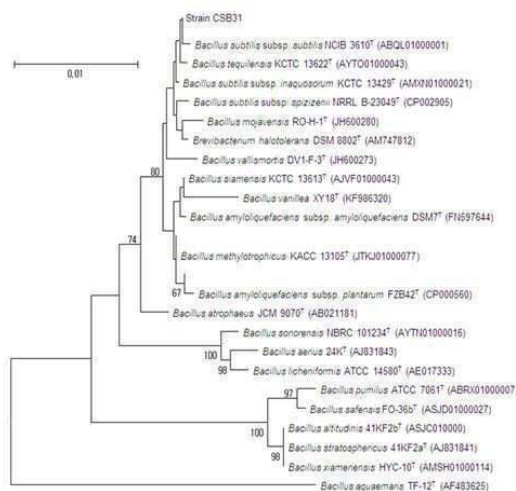
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 한국 전통 발효 식품인 김치로부터 분리한 바실러스 섭틸리스 CSB31 유래의 극 알칼리성 만난 분해효소 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 발효 음식 김치로부터 분리된 바실러스 섭틸리스 아종인 아쿠오소룸 CSB31 유래의 극 알칼리성 만난 분해효소 및 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 MnB31은 무 셀룰로오스성이고 그의 농업 폐기물을 부가가치 생성물로의 재순환시키는 능력은 저비용 및 무공해 환경을 유지시키는 잠재적 능력의 측면에서 매우 유망하다. 그의 할로-관용성, 우레아 내성 및 프로테아제 안정성은 농업 폐기물이 생분해에 있어서 그의 용도를 지원한다. MnB31은 만난에 대해 높은 특이성을 가지므로, 식품 및 제약산업에서 프리바이오틱으로서 고도로 유용하고, 농업 폐기물의 적절한 이용뿐만 아니라, 제지 및 펄프산업에서 바이오-표백, 바이오연료 및 식물 산업 등의 몇몇 바이오기술 및 산업적 용도에 아주 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12R 1/125 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545011293
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원
 연구사업명 농생명산업기술개발
 연구과제명 국내 토착 미생물 유래 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 개발 및 응용
 기 여 율 1/3
 주관기관 조선대학교 산학협력단
 연구기간 2015.12.18 ~ 2016.12.17

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345240995
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공학개인지초연구지원
 연구과제명 신규 미생물 효소를 이용한 펙틴 올리고머 연구
 기 여 율 1/3
 주관기관 조선대학교
 연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711031645
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 중견연구자지원
 연구과제명 다제내성균 제어능을 지닌 고분자 펩타이드 항생제 개발
 기 여 율 1/3
 주관기관 조선대학교
 연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

한국 전통 발효 식품인 김치로부터 분리되고, 로커스트 빈 겔을 포함하는 배지에서 만난 분해효소 MnB31를 생산하며, 한국생명공학 연구원에 기탁번호 KCTC18484P로 기탁된 것이고,

상기 만난 분해효소는 SDS-PAGE 및 자이모그래피에 의해서 결정된 분자량은 ~47 kDa이고, 60℃ 및 pH 12.5에서 최적 활성(KCl/NaOH 완충액, pH 12.5)을 가지며, 65℃의 온도 및 pH 5.8 ~ 12.5에서 안정하고, N-말단 서열은 ALYETIFALX이며, Co^{2+} , Mn^{2+} , Na^{+} , 및 K^{+} 에 의해 강하게 활성화되고, Zn^{2+} , Ni^{2+} , 및 Mg^{2+} 에 의해 억제되고, 가수분해 최종 생성물은 만노비오스 및 만노트리오스이며, 기질로서 로커스트 빈 겔을 사용하여 시험한 Michaelis-Menten 상수(K_m) 및 최대 속도(V_{max}) 값은 각각 0.03885 mgml⁻¹ 및 1019.33 ± 4.509 Umg⁻¹이며, 기질 분해를 위한 활성화 에너지(E_a)는 31.36 kJmol⁻¹이고, 가수분해 패턴으로 엔도-타입 효소인 것을 특징으로 하는 바실러스 섭틸리스 아종 인아쿠오소룸(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*) 균주 CSB31.

청구항 2

삭제

청구항 3

a) 바실러스 섭틸리스 아종 인아쿠오소룸 균주 CSB31을 0.4% 소고기 엑스, 0.1% 효모 엑스, 0.4% 펩톤 및 0.25% NaCl을 포함하는 침지 배지 중에 접종시키는 단계;

b) 상기 접종물을 250 mL Erlenmeyer 플라스크 중에서 37℃에서 120 rpm으로 48 시간 동안 배양시키는 단계;

c) 상기 배양물을 1.5% (w/v) 로커스트 빈 겔(LBG), 0.5% (w/v) 효모 엑스, 0.5% (w/v) 소고기 엑스, 0.05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 % K_2HPO_4 , 0.07% KH_2PO_4 및 0.05% NaCl을 함유하는 갈락토만난 배지로 옮겨서 37℃에서 60 시간 동안 인큐베이션시키는 단계;

d) 세포들을 4℃, 10000 x g에서 30분 동안 원심분리시켜 제거하고, 맑은 상층액에 암모늄 설페이트를 30~80% 포화도로 첨가하고, 밤새 보관하는 단계;

e) 혼합물을 10000 x g에서 50분 동안 4℃에서 원심분리하는 단계;

f) 얻어진 펠릿들을 10 mM Tris/HCl 완충액(pH 7) 중에서 현탁시키고, 동일한 완충액에 대하여 12 시간 동안 투석한 후, 농축시키는 단계;

g) 효소 용액을 10mM Tris/HCl 완충액(pH 7.0)으로 예비 평형시킨 DEAE sepharose 패스트 플로우에 부하시키고, 결합 단백질을 0 내지 1 M KCl을 함유하는 동일한 완충액을 사용하여 30 mL/h의 유속으로 용출시키는 단계; 및

h) 만난 분해효소 활성을 나타내는 분획들을 모으고, 농축한 후 10 mM Tris/HCl(pH 7)로 예비 평형시킨 세파로오스-CL-6B 컬럼(37 cm x 1.2 cm)에 부하하여 전개시킨 활성 분획들을 모으고, 농축하는 단계;를 포함하고,

상기 바실러스 섭틸리스 아종 인아쿠오소룸 CSB31은 한국생명공학 연구원에 기탁번호 KCTC18484P로 기탁된 것이고,

상기 만난 분해효소는 SDS-PAGE 및 자이모그래피에 의해서 결정된 분자량은 ~47 kDa이고, 60℃ 및 pH 12.5에서 최적 활성(KCl/NaOH 완충액, pH 12.5)을 가지며, 65℃의 온도 및 pH 5.8 ~ 12.5에서 안정하고, N-말단 서열은 ALYETIFALX이며, Co^{2+} , Mn^{2+} , Na^{+} , 및 K^{+} 에 의해 강하게 활성화되고, Zn^{2+} , Ni^{2+} 및 Mg^{2+} 에 의해 억제되고, 가수분해 최종 생성물은 만노비오스 및 만노트리오스이며, 기질로서 로커스트 빈 겔을 사용하여 시험한 Michaelis-Menten 상수(K_m) 및 최대 속도(V_{max}) 값은 각각 0.03885 mgml⁻¹ 및 1019.33 ± 4.509 Umg⁻¹이며, 기질 분해를 위

한 활성화 에너지(E_a)는 31.36 kJmol^{-1} 이고, 가수분해 패턴으로 엔토-타입 효소인 것을 특징으로 하는 바실러스 섭틸리스 아종 인아쿠오소룸 CSB31로부터 만난 분해효소 MnB31의 정제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 한국 전통 발효 식품인 김치로부터 분리한 바실러스 섭틸리스 CSB31 유래의 극 알칼리성 만난 분해효소 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 자연계에서 가장 풍부한 재활용 자원인 리그노셀룰로오스의 생물학적 분해 및 이들의 산업적 응용 잠재력에 상당한 관심이 주목되고 있다[참조문헌: 1]. 헤미셀룰로오스는 식물 세포벽에 존재하며, 주된 재사용가능한 바이오매스 자원 중 하나이다. 몇몇 효소들이 이 복잡한 이종의 중합체를 분해하는데 필요하다[참조문헌: 2]. 만난은 침엽수의 헤미셀룰로오스의 주된 성분으로, 만난-분해 효소 시스템은 헤미셀룰로오스 잔기의 전환에 있어서 필수적인 역할을 한다. 이들 시스템은 주로 다음을 포함한다: 엔도-1,4- β -만난 분해효소(EC 3.2.1.78), 엑소- β -만노시다아제(EC 3.2.1.25), 알파-갈락토시다아제(EC 3.2.1.22) 및 아세틸 만난 에스테라아제(EC 3.1.1.6) 등이 측쇄 제거 효소[참조문헌: 2, 3].

[0003] 대량의 리그노셀룰로오스성 폐기물이 바이오산업 공정을 통하여 발생되고, 임업 및 농업적 처리 공정절차에 의하여 환경오염 문제가 야기된다. 그러나 생산된 리그노셀룰로오스성 폐기물은 잠재적으로 다양한 부가 가치의 생산물로 전환될 수 있다. 만난 분해 효소는 펄프 및 제지 산업, 식품 및 사료 산업, 셀룰로오스성 섬유 가공 산업, 원유 시추, 제약산업 및 세제 산업 등 다양한 바이오산업 공정에 널리 적용된다[참조문헌: 3]. *Aspergillus niger* ATCC 20114[참조문헌: 4], *Aspergillus niger* ATCC46890 [참조문헌: 5], *Aspergillus niger* FTCC 5003 [참조문헌: 6], *Aspergillus niger* UAM-GS1 [참조문헌: 7], *Aspergillus oryzae* CECT2094 [참조문헌: 7], *Aspergillus tamari* IP 1017-10 [참조문헌: 8], *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 [참조문헌: 9], *Bacillus amyloliquefaciens* 10A1 [10], *Bacillus circulans* M-21 [참조문헌: 11], *Bacillus circulans* NT 6.7 [참조문헌: 12], *Bacillus sp.* MSJ-5 [참조문헌: 13], *Bacillus stearothermophilus* ATCC 266 [참조문헌: 14], *Bacillus subtilis* NM-39 [참조문헌: 15], *Bacillus subtilis* WY34 [참조문헌: 16], *Bacteroides ovatus* 0038-1 [참조문헌: 17], *Bacillus pumilus* ATCC 72 [참조문헌: 18], *Paenibacillus sp.* DZ3 [참조문헌: 19], *Paenibacillus oxalicum* SO [참조문헌: 20], *Trichoderma harzianum* T4 [참조문헌: 21], *Trichoderma reesei* C-30 [참조문헌: 22], 및 *Trichoderma reesei* [참조문헌: 23]를 포함하는 다양한 천연 미생물들이 만난 분해효소 생산자로서 보고되었다. 이들 중 바실러스 섭틸리스는 안전성, 빠른 성장 및 생산 배지 내로의 상당량의 효소 생산 능력으로 인하여 만난 분해효소 생산자로서 높이 평가된다[참조문헌: 15, 24].

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) El-Naggar, M. Y., El-Aassar, S. A., Youssef, A. S., El-Sersy, N. A., & Beltagy, E. A. (2006). Extracellular β -mannanase production by the immobilization of the locally isolated *Aspergillus niger*. International Journal of Agriculture & Biology, 8, 57-62.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 농업 폐기물을 효율적으로 활용하기 위한 방안을 찾기 위하여 예의 연구한 결과, 후술하는 바와 같이 한국의 전통 음식인 김치에서 분리한 신규 바실러스속 균주가 농업 폐기물의 적절한 이용, 제지 및 펄프 산업에서 바이오 표백, 바이오연료 및 직물 산업, 동물 사료 산업 등의 다양한 바이오기술에 아주 유용하게 사용될 수 있는 유용한 만난 분해효소를 생산할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

- [0006] 따라서, 본 발명의 목적은, 일면에 있어서, 발효 음식 김치로부터 분리하고, 로커스트 빈 검을 포함하는 배지에서 극 알칼리성 만난 분해효소(MnB31)를 생산하는 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*) 균주 CSB31를 제공하는데에 있다.
- [0007] 본 발명의 추가의 목적은, 다른 일면에 있어서,
- [0008] 상기 만난 분해효소는 SDS-PAGE 및 자이모그래피에 의해서 결정된 분자량은 ~47 kDa이고, 60℃ 및 pH 12.5에서 최적 활성(KCl/NaOH 완충액, pH 12.5)을 가지며, 65 ℃의 온도 및 pH 5.8 ~ 12.5에서 안정하고, N-말단 서열은 ALYETIFALX이며, Co^{2+} , Mn^{2+} , Na^{+} , 및 K^{+} 에 의해 활성이 증가하고, Zn^{2+} , Ni^{2+} , 및 Mg^{2+} 에 의해 억제되고, 가수분해 최종 생성물은 만노비오스 및 만노트리오스이며, 기질로서 로커스트 빈 검을 사용하여 시험한 Michaelis-Menten 상수(K_m) 및 최대 속도(V_{max}) 값은 각각 $0.03885 \text{ mgml}^{-1}$ 및 $1019.33 \pm 4.509 \text{ Umg}^{-1}$ 이며, 기질 분해를 위한 활성화 에너지(E_a)는 31.36 kJmol^{-1} 이고, 가수분해 패턴으로 엔토-타입 효소인 것을 특징으로 하는 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*) CSB31를 제공하는 데에 있다.
- [0009] 본 발명이 해결하려는 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다

발명의 효과

- [0010] 본 발명에 따른 MnB31은 무 셀룰로오스성이고 그의 농업 폐기물을 부가 가치 생성물로의 재순환시키는 능력은 저비용 및 무공해 환경을 유지시키는 잠재적 능력의 측면에서 매우 유망하다. 그의 할로-관용성, 요소 내성 및 프로테아제 안정성은 농업 폐기물이 생분해에 있어서 그의 용도를 지원한다. MnB31은 만난에 대해 높은 특이성을 가지므로, 식품, 제약 및 사료 산업에서 프리바이오틱으로서 유용하며, 농업 폐기물의 적절한 이용뿐만 아니라, 제지 및 펄프산업에서 바이오표백, 바이오연료 및 직물 산업 등의 몇몇 바이오테크놀로지 및 산업적 용도에 아주 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 균주 CSB31 및 밀접하게 연관된 다른 바실러스 속 균주와의 관계를 나타내는 16S rRNA 유전자에 기초한 계통수를 나타내는 도면이다.
- 도 2는 MnB31 유래 만난 분해효소의 세파로오스 CL-6B 컬럼을 통한 용출 프로파일이다.
- 도 3은 바실러스 속 균주인 CSB31로부터 정제된 만난 분해효소의 12.5% (w/v) SDS-PAGE (a) 및 자이모그래피 (b)이다.
- 도 4는 바실러스 속 균주의 만난 분해효소의 최적 pH 및 pH 안정성을 나타내는 그래프도이다.
- 도 5는 바실러스 속 균주의 만난 분해효소의 최적 온도 및 온도 안정성을 나타내는 그래프도이다.
- 도 6은 탄소원으로서 다양한 농업 폐기물을 사용 후 만난 생산 변화를 나타내는 그래프도이다.
- 도 7은 로커스트 빈 검으로 처리한 후 만난 분해를 나타내는 그래프도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은, 일면에 있어서, 발효 음식 김치로부터 분리하고, 로커스트 빈 검을 포함하는 배지에서 만난 분해효소(MnB31)를 생산하는 바실러스 썩틸리스 아종 인아쿠오소룸 CSB31(*Bhacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*) CSB31(KCTC18484P)를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 추가의 목적은, 다른 일면에 있어서, 상기 만난 분해효소는 SDS-PAGE 및 자이모그래피에 의해서 결정된 분자량은 ~47 kDa이고, 60℃ 및 pH 1.5에서 최적 활성(KCl/NaOH 완충액, pH 12.5)을 가지며, 65 ℃의 온도 까지 열안정하며, pH 5.8-12.5에서 안정하고, N-말단 서열은 ALYETIFALX이고, Co^{2+} , Mn^{2+} , Na^{+} , 및 K^{+} 에 의해 활성이 증가하고, Zn^{2+} , Ni^{2+} , 및 Mg^{2+} 에 의해 억제되고, 주된 가수분해 최종 생성물은 만노비오스 및 만노트리오스

이며, 기질로서 로커스트 빈 검을 사용하여 시험한 Michaelis-Menten (K_m) 및 최대 속도(V_{max}) 값은 각각 $0.03885 \text{ mgml}^{-1}$ 및 $1019.33 \pm 4.509 \text{ Umg}^{-1}$ 이며, 기질 분해를 위한 활성화 에너지(E_a)는 31.36 kJmol^{-1} 이고, 가수분해 패턴으로 엔토-타입 효소인 인 것을 특징으로 하는 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* CSB31)을 제공한다.

- [0014] 본 발명은, 추가의 다른 일면에 있어서,
- [0015] a) 바실러스 썩틸리스 (*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* CSB31)를 0.4% 소고기 추출물, 0.1% 효모 추출물, 0.4% 펩톤 및 0.25% 염화나트륨을 포함하는 배지에 접종시키는 단계;
- [0016] b) 상기 접종물을 250 mL Erlenmeyer 플라스크 중에서 37℃에서 120 rpm으로 48 시간 동안 배양시키는 단계;
- [0017] c) 상기 배양물 1.5% (w/v) 로커스트 빈 검(LBG), 0.5% (w/v) 효모 추출물, 0.5% (w/v) 소고기 추출물, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03% K_2HPO_4 , 0.07% KH_2PO_4 및 0.05% 염화나트륨을 함유하는 배지로 옮겨서 37℃에서 60 시간 동안 배양시키는 단계;
- [0018] d) 세포들을 4℃, 10000 x g에서 30분 동안 원심분리 후 제거하고, 맑은 상층액에 황산암모늄을 30~80% 포화도로 첨가하고, 밤새 교반하는 단계;
- [0019] e) 혼합물을 10000 x g에서 50 분 동안 4℃에서 원심분리하는 단계;
- [0020] f) 얻어진 침전물을 10 mM Tris/HCl 완충액(pH 7) 중에서 현탁시키고, 동일한 완충액에 대하여 12 시간 동안 투석한 후, 농축시키는 단계;
- [0021] g) 효소 용액을 10mM Tris/HCl 완충액(pH 7.0)으로 예비 평형시킨 DEAE sepharose 패스트 플로우에 부하시키고, 결합 단백질을 0 내지 1 M KCl을 함유하는 동일한 완충액을 사용하여 30 mL/h의 유속으로 용출시키는 단계; 및
- [0022] h) 만난 분해효소 활성을 나타내는 분획들을 농축 후 10 mM Tris/HCl(pH 7)로 예비 평형시킨 세파로오스-CL-6B 컬럼(37 cm x 1.2 cm)에 부하하여 전개시킨 활성 분획들을 모으고, 농축하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 바실러스 썩틸리스 아종 인아쿠오소룸(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* CSB31)으로부터 만난 분해효소(MnB31)의 정제 방법을 제공한다.
- [0023] 이하, 본 발명에 따른 바실러스 썩틸리스 아종 인아쿠오소룸(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*) CSB31로부터 극 알칼리성 만난 분해효소(MnB31)의 분리, 스크리닝 및 정제에 관하여 기술한다. 그의 생화학적 및 열역학적 특성은 이것이 다양한 바이오 기술 공정에 유용하게 이용될 수 있는 것으로 나타났다. 또한, 그의 가수분해 특성 및 분해 산물은 이것이 제약, 식품 및 사료 산업에 있어서 프리바이오틱 및 많은 다른 바이오산업적 공정에 이용될 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0024] 효율적이고 산업적으로 친숙한 로커스트 빈 검 분해 효소를 발효 음식으로 부터 분리하고 분석하였다. MnB31을 생산하고 정제하여 생화학적 및 열역학적으로 특성화하였다. 본 균주가 생산하는 극 알칼리성 및 열안정성을 보이는 만난 분해효소 효소는 기존에 보고 되지 않은 신규한 것이다. 이 효소는 60℃의 최적 온도를 가졌고, 65℃의 온도까지 열안정하였다. MnB31은 KCl/NaOH 완충액(pH 12.5)에서 최대 활성도를 가졌고, 넓은 범위의 pH (5.8 ~ 12.5)에 안정하였다. 그의 효소 활성은 Co^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , 및 K^+ 에 의해 활성화되고, Zn^{2+} , Ni^{2+} , 및 Mg^{2+} 에 의해 억제되었다. 만난 분해효소 활성은 EDTA 및 EGTA 등의 킬레이트제에 의해 현저하게 영향을 받았는데, 이는 이것이 금속-단백질임을 의미한다. MnB31은 무 셀룰로오스성이고 그의 농업 폐기물을 부가 가치 생성물로의 재순환시키는 능력은 저비용 및 무공해 환경을 유지시키는 잠재적 능력의 측면에서 매우 유망하다. 그의 할로-관용성, 요산 내성 및 프로테아제 안정성은 농업 폐기물이 생분해에 있어서 그의 용도를 지원한다.
- [0025] 일반적으로, 효소의 열 불활성화는 두 단계로 일어난다: 1) 천연 효소가 폴딩되지 않은 불활성화 효소로 전환되는데, 이는 가역적 단계이고, 2) 폴딩되지 않은 불활성화 효소가 불활성화 효소로 전환되는데, 이는 비가역적 단계이다. 효소의 안정성은 상이한 온도 및 pH에서 반응 시 단백질의 가역적 변성(denaturation)에 의존한다. 열적 불활성화는 활성화의 엔탈피(ΔH)에서 증가와 수반되어 관찰된다. 엔트로피에서 증가(ΔS)는 효소 구조의 개방을 나타낸다. MnB31의 보다 낮은 H 값은 효소-기질 사이의 활성화된 복합체의 형성이 매우 효율적임을 나타낸다.
- [0026] 본 연구에 있어서, 촉매 작용을 위한 S는 음성이었는데, 이는 전이 상태 동안의 효소-기질이 효소-기질 복합체

보다 더 정연함을 의미한다. MnB31의 낮은 ΔG 값은 전이 복합체의 생성물 내로의 전환이 자발적임을 나타낸다. 효소적 화학 반응의 가능성 및 정도는 E-S 복합체의 생성물로의 전환인 기질 분해에 대한 Gibbs 유리 에너지(ΔG)에 있어서 변화에 직접 관계된다. 에너지 변화가 낮을수록, 반응 가능성이 더 높는데 반응물의 생성물로의 전환이 자발적임을 의미한다. Q_{10} 은 10℃의 온도 증가에 기인한 효소 반응속도의 온도 감수성이다. 2.0 ~4.0의 Q_{10} 값에서 성능은 온도가 올라감에 따라 최대 성능 수준으로 급격히 증가되고, 1.0 ~1.5의 Q_{10} 에서 열적 의존성을 나타낸다. 이러한 열적 변수의 결과는 높은 가수분해 효율 및 효소 반응의 가능성을 가진 생성물의 자발적인 형성을 지지하는데, 이는 효소의 안정화에 매우 유용하다. 로커스트 빈 검의 효소적 가수분해에서 만노비오스 및 만노트리오스 등의 주된 최종 생성물의 형성은 식품 및 제약산업에서 프리바이오틱으로서 고도로 유용하다.

[0027] 결론적으로, MnB31은 농업 폐기물의 적절한 이용뿐 아니라, 제지 및 펄프산업에서 바이오-표백, 바이오연료, 식물 산업 및 사료산업 등의 몇몇 바이오기술 및 산업적 용도에 아주 유용하게 사용될 수 있다.

[0028] <실시예>

[0029] 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의하여 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[0030] 후술하는 실시예에서, 로커스트 빈 검(LBG; galactomannan polysaccharide, gum, locust bean, mannon-galactan from *Ceratonia siliqua* seeds), 콩고 레드, 너도밤나무 자일란, 새우 껍질 추출 키틴, 아라비아 검, 사과 펙틴, 시그마 셀룰로오스 타입 20, 및 만노오스는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. 만노비오스 및 만노트리오스는 Megazyme (Ireland), 효모 추출물 및 펩톤은 Neogen corp. (USA), 소고기 추출물은 Becton, Dickinson and Company (USA)로 부터 구매하였다. DEAE Sepharose 패스트 플로우 및 sepharose Cl-6B는 Amersham BioSciences(Uppsala, Sweden), 박층 크로마토그래피 실리카 겔 플레이트는 Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구매하였다. 모든 시약 및 화학약품은 유용한 최상의 분석 등급의 것을 사용하였다.

[0031] **실시예 1: 미생물 균주의 분리, 효소 생산 및 정제**

[0032] 세균 균주는 한국의 전통 음식 김치로부터 분리하였다. 간단히 설명하자면, 김치 1 g을 0.85% NaCl 9 ml과 혼합한 후 37 ℃에서 24 시간 동안 배양 후 분리하였다. 배양 후 혼합물을 증류수를 사용하여 10^7 배까지 희석하고 희석된 시료를 Mueller-Hinton 아가 플레이트에 접종시켜 37 ℃에서 24 시간 동안 배양하였다. 균주 동정을 형태학적, 생화학적 및 유전학적으로 수행하였다. 일차 스크리닝은 배양물 염색 및 탈색법에 의해 분리한 87개의 균주에 대하여 수행하였다.

[0033] 간단히 설명하자면, 세균 균주들을 1.5% (w/v) 로커스트 빈 검(LBG), 0.5% (w/v) 효모 추출물, 0.5% (w/v) 소고기 추출물, 0.05 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03 % K_2HPO_4 , 0.07% KH_2PO_4 , 0.05% 염화나트륨 및 1.5% 아가를 함유하는 LBG 아가 배지 상에서 스크리닝하였다. 30 시간 동안 인큐베이션 시킨 후, 충분히 성장한 세균을 0.5% 콩고 레드(Congo red)로 20 분 동안 염색하고, 1M 염화나트륨 용액으로 15-20 분 동안 탈색시켰다. 이 균주들은 20% 배지를 함유하는 500 mL Erlenmeyer 플라스크 중에서 37 ℃에서 120 rpm으로 5일 동안 배양시켰다. 배양액은 10,000 x g에서 30 분 동안 원심분리한 후, 맑은 상층액을 사용하여 효소 활성을 시험하였다. 분리한 78 개의 미생물 중 뛰어난 활성을 나타낸 균주를 선별하고 CSB31이라 명명하였다.

[0034] 상기 균주는 한국생명공학연구원에 2016년 08월 05일자로 기탁되어 기탁번호 KCTC18484P를 부여받았다.

[0035] **실시예 2: 조효소 정제**

[0036] 글루코오스가 첨가되지 않은 배지(0.4% 소고기 추출물, 0.1% 효모 추출물, 0.4% 펩톤 0.25% 염화나트륨)에서 전 배양한 CSB31의 배양액을 2000 mL Erlenmeyer 플라스크 중의 400 mL 갈락토만난 배지로 접종하여 배양하였다. 37℃에서 60 시간 동안 인큐베이션 시킨 후, 세포들을 원심분리(4 ℃, 10000 x g, 30분)에 의해 제거하였다. 상층액을 모아 다음의 실시예에 사용하였다.

[0037] **실시예 3: 효소 정제**

[0038] 모든 정제 과정은 달리 언급하지 않으면 4 ℃에서 수행하였다. 조효소인 맑은 상층액을 황산암모늄 침전법을 이용하여 정제하였다. 황산암모늄을 30-80% 포화도로 배양 상층액에 첨가하고, 혼합물을 지속적인 혼합 상태로 밤새 교반하였다. 혼합물을 10000 x g에서 50 분 동안 4 ℃에서 원심분리하였고, 얻어진 침전물들을 10 mM Tris/HCl 완충액(pH 7) 중에서 현탁시키고, 동일한 완충액에 대하여 12 시간 동안 투석한 후, 50 kDa의 원심 농

축기(Vivascience, USA)로 농축시켰다. 이어서 용액을 10mM Tris/HCl 완충액(pH 7.0)으로 예비 평형시킨 DEAE sepharose 패스트 플로우(12 cm x 2.5 cm)컬럼에 부하시키고, 0 에서 1 M KCl을 함유하는 동일한 완충액을 사용하여 30 mL/h의 유속으로 용출시켰다. 다음 만난 분해효소 활성을 나타내는 분획들을 모아 농축한 후 10 mM Tris/HCl(pH 7)로 예비 평형시킨 세파로오스-CL-6B 컬럼(37 cm x 1.2 cm)에 부하하여 순수한 효소로 정제하였다. 이후의 실시예에서는 이 순수한 효소를 이용하여 수행하였다.

[0039] 분리한 미생물은 갈락토만난 배지 상에서 만난 이용 및 효소 생산을 토대로 선별한 CSB31 균주는 형태학적, 생화학적 및 분자적 특성에 기초하여 바실러스 속(*Bacillus*)으로 동정되었다. 16S rRNA 서열로 부터 구축된 계통수는 도 1에 나타내었다. 도 1은 균주 CSB31 및 밀접하게 연관된 다른 바실러스 속 사이의 관계를 나타내는 16S rRNA 유전자에 기초한 계통수를 나타내는 도면이다. 참고 서열은 균주 지정 후 괄호에 표시된 입수 번호로부터 GenBank에서 검색하였다.

[0040] 16S rRNA 서열은 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*-KCTC 13429(T)(accession no. AMXN01000021)및 *Bacillus tequilensis*-KCTC 13622(T)(accession no. AYT001000043)와 99.93% 상동성, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*- NCIB 3610(T)(accession no. ABQL01000001)와 99.86% 상동성 및 *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*- NRRL B-23049(T)(accession no. CP002905)와 99.80%의 상동성을 나타내었다.

[0041] CSB31 균주의 효소 생산은 배양 후 24 시간 지나서 시작되었고, 60 시간에 최대치를 기록하였다. CSB31에 의해 생산된 만난 분해효소를 MnB31로 정의하였다.

[0042] **실시예 4: 효소 활성의 결정**

[0043] 만난 분해효소 활성은 10 mM KCl/NaOH 완충액(pH 12.5)에 희석시킨 0.1 mL 효소를 1% LBG를 함유하는 0.1 mL 기질에 혼합함으로써 결정하였다. 효소 및 기질 혼합물은 60 °C의 항온조에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후, 1% DNS 0.1 mL를 혼합물에 가하고, 10 분 동안 끓인 다음 냉각시킨 후 방출된 환원당은 DNS 방법 [참조문헌: 25]을 사용하여 측정하였다. 만난 분해효소 활성 1 유닛은 표준 에세이 조건하에서 분당 만노오스 1 μmol 에 해당하는 당 말단 기를 환원시키는 효소의 양으로 정의한다. 만난 분해효소 활성은 또한 표준 에세이 조건하에서 자일란, 키틴, 펙틴 및 셀룰로오스 같은 보조 기질로도 수행하였다.

[0044] **실시예 5: 단백질 결정**

[0045] 단백질 농도는 단백질 표준으로써 소 혈청 알부민을 사용하여 Bradford 방법[참조문헌: 26]에 따라 결정하였다. 모든 정제 및 전개된 크로마토그래프는 595 nm에서 흡광도를 측정함으로써 수행하였다.

[0046] CSB31로 부터 만난 분해효소의 정제는 여러가지 단계로 수행하였다. MnB31은 21.51%의 회수율로 17.92-배로 정제되었다. 만난 분해효소 활성을 보유한 배양 상층액(750 mL)은 암모늄 설페이트 침전, 원심분리 농축기, 2 단계 크로마토그래피 분리 기술(이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피)을 사용하여 균질하게 정제하였다. 활성 부분(15 mL)은 30-80% 암모늄 설페이트 침전 후에 투석하고, 이어서 50 kDa 원심분리 농축기를 사용하여 농축하였다. 만난 분해효소 활성을 보유한 시료를 DEAE 세파로오스 패스트 플로우 및 세파로오스-CL-6B 컬럼 크로마토그래피에 연속하여 부하하여 단일 활성 피크를 얻었는데, 17.92-배의 정제효율, $1796.13 \text{ U mg}^{-1}$ 의 특이 활성 및 21.51%의 회수율로 얻었다. MnB31의 단백질 용출 프로파일은 도 2에 나타내었다. 도 2는 MnB31 유래 만난 분해효소의 세파로오스-CL-6B 컬럼을 통한 용출 프로파일이다. MnB31 정제 결과는 표 1에 나타내었다.

표 1

Purification steps	Total Protein (mg)	Total Activity (U)	Sp. Activity (U/mg)	Yield (%)	Purity Fold
Crude Broth	152.50	15282.37	100.21	100	1
A. Sulfate	21.56	7887.67	365.79	51.61	3.65
DEAE Sepharose fast flow	5.39	6370.81	1181.76	41.69	11.79
Sepharose CL-6B	1.83	3286.53	1796.13	21.51	17.92

[0047]

[0048] 실시예 6: PAGE

[0049] 정제 효소의 분자량은 12.5 % (w/v) 폴리아크릴아마이드 분리 겔을 사용하여 Laemmli [참조문헌: 27]에 의해 기술된 바와 같이 SDS-PAGE에 의해 결정하였다. 전기영동 후, 겔들을 Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250로 염색하고, 탈염색시켰다. 분자량은 참고 단백질(MBI, Fermentas)의 상대적인 이동성에 의해 측정하였다.

[0050] 갈락토만난 활성은 Z. Jiang et al. [참고문헌: 16]에 기술된 자이모그래피를 약간 변형하여 수행하였으며, 간단히 설명하면 다음과 같다. 자이모그램은 효소를 0.25% (w/v) LBG 기질을 함유하는 12.5%(v/v) 폴리아크릴아마이드 겔을 통하여 전기영동하여 수행하였다. 전기영동이 끝난 후, 겔을 증류수로 2회 세척하고, 가볍게 흔들면서 25% (v/v) 이소프로판올 중에 담귀 SDS를 제거한 후, 겔 내부의 단백질을 재생시켰다. 이어서 겔을 4℃에서 10 mM KCl/NaOH (pH 12.5)로 3 회 세척하였다. 그 후, 겔들을 60℃에서 30 분 동안 인큐베이션시키고, 자이모그램을 Congo red 용액(0.1%, w/v)으로 잔여 탄수화물에 대해 염색하고, 1 M NaCl로 탈염색한 후, 0.5% (v/v) 초산으로 고정시켰다. 활성 밴드들은 맑은 무색 영역으로 관찰되었다.

[0051] 최종 만난 분해효소 제제는 SDS-PAGE 및 갈락토만난 자이모그래피에 의해 순수한 것으로 확인되었다. MnB31은 전기영동에 의해 균질하였고, 47 kDa의 분자량을 가졌다. 도 3은 바실러스 속 균주 CSB31로 부터의 정제 만난 분해효소의 12.5% (w/v) SDS-PAGE (a) 및 자이모그래피(b)이다. 레인은 Mr, 단백질 분자량 마커(Fermentas); lane A. sulf, 30-80% 암모늄 설페이트 침전 분획; lane pure, 세파로오스-CL-6B 컬럼에 의한 크로마토그래피 분리 후 정제된 만난 분해효소를 나타낸다.

[0052] 도 3a 및 b에 나타난 바와 같이 콩고 레드 염색에 의해 노출시켰을 때 명확한 자이모그램 겔 상의 밴드로 나타나 활성인 것으로 확인되었다. 47 kDa 단일체 단백질을 탄소원으로서 로커스트 빈 검을 함유하는 배지에서 성장시킨 후 바실러스 균주(*Bacillus* strain) CSB31의 배양 브로쓰로 부터 분리하였다. 보조 기질로서 로커스트 빈 검을 사용한 만난 분해효소 생산은 배양 후 60 시간이 지나서 최대화되었는데, 이는 다른 바실러스 균주들(*Bacillus* strains)에 필적하였다. MnB31의 분자량은 다양한 바실러스 균주 유래의 만난 분해효소의 범위에 속하였다.

[0053] 바실러스 만난 분해효소는 일반적으로 30 - 55 kDa [참조문헌: 11, 13, 15, 16, 18] 범위의 분자량을 갖는 반면, 일부 보고서에 의하면 *Bacillus* sp strain JAMB-750 [참조문헌: 31] 유래의 정제 만난 분해효소는 130 kDa의 분자량을, *Bacillus stearothermophilus* ATCC 266 [14] 유래의 것은 162 kDa의 분자량을 갖는 것으로 보고되었다. *Bacteroides ovatus* 0038-1 만난 분해효소 [참조문헌: 17]은 190 kDa의 가장 높은 분자량을 갖는 것으로 알려졌다. *Paenibacillus* 만난 분해효소는 18-39 kDa [참조문헌: 19, 20]의 범위에 걸쳐있다.

[0054] 균류의 만난 분해효소 분자량은 더 다양하다. *Asperigillus* 만난 분해효소는 40 - 110 kDa [5, 7, 8, 9]의 범위인 반면, *Trichoderma* 의 것은 32-53 kDa [21, 22, 23]의 범위이다.

[0055] 실시예 7: MnB31의 활성 및 안정성에 관한 pH의 영향

- [0056] MnB31 활성의 최적 pH는 표준 실험 에세이 조건하에서 다양한 pH 값 (3.0 ~ 13.5)에서 결정되었다. 각각 10 mM의 적절한 완충액, 시트르산-인산 나트륨(pH 2-7.0), Tris-HCl (pH 7.0-9.5), 중탄산 나트륨-NaOH (pH 9.5-11), 및 KCl-NaOH (pH 11-13.5)) 중의 LBG 기질(1% w/v)을 사용하여 만난 분해효소 활성을 60 °C에서 30분 동안 측정하였다. MnB31 안정성은 MnB31을 4 °C에서 24 시간 동안 인큐베이션시킨 후 동일한 완충액을 사용하여 3.0 ~ 13.5의 범위에서 결정하였다. 그 후, 잔류 효소 활성을 표준 에세이 조건하에서 평가하였다.
- [0057] **실시예 8: MnB31의 활성 및 안정성에 관한 온도의 영향**
- [0058] MnB31의 최적 온도는 10 mM KCl/NaOH 완충액(pH 12.5) 중에서 40 내지 80 °C의 온도에서 표준 실험 에세이에 의해 평가하였다. MnB31의 열 안정성은 효소 시료들을 10 mM KCl/NaOH 완충액(pH 12.5) 중에서 다양한 온도(40 ~ 80 °C)에서 60 분 동안 예비배양시키고, 잔여 활성을 표준 에세이 조건하에서 계산하였다.
- [0059] 도 4는 바실러스 속 균주의 만난 분해효소의 최적 pH 및 pH 안정성을 나타내는 그래프도이다. 만난 분해효소 활성 및 안정성에 관하여 온도 및 pH는 주목할 만한 영향을 미쳤다. MnB31 활성은 KCl/NaOH 완충액에 노출시켰을 때 pH 12.5에서 최대였다. 이 효소는 5.8-12.5의 넓은 범위의 pH에 걸쳐서 안정되었는데 각각의 pH 및 4 °C에서 24 시간 동안 배양하였을 때 그의 활성의 60% 이상을 보유하였다(도 4 참조). 활성은 표준 시험 조건하에서 pH 5.8 이하에서 급격히 감소하였고, pH 13.4에서 완전히 상실하였다.
- [0060] 지금까지 알려진 바로 MnB31은 바실러스 종(*Bacillus* sp.)으로 부터 분리된 것 중 극 알칼리성 조건(pH 12.5)에서 최적의 pH 및 넓은 범위의 안정성을 나타내는 최초의 효소이다. 그러나, 바실러스 종으로 부터 분리된 만난 분해효소 중에서 최적 pH는 5.0-9.0의 범위에서 현저하게 다양한 것으로 보인다[참조문헌: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16]. 균류의 만난 분해효소는 *Aspergillus* 유래의 것 [참조문헌: 4, 5, 6, 7, 8, 9] 및 *Trichoderma* 균주 [참조문헌: 21, 22, 23] 유래의 것들을 포함하여 3.5 - 6.0의 범위에서 최적 pH를 보인다.
- [0061] 도 5는 바실러스 속 균주의 만난 분해효소의 최적 온도 및 온도 안정성을 나타내는 그래프도이다. 40 - 80 °C의 온도 범위에서 수행한 정제된 MnB31의 효소적 촉매작용 반응은 최적 온도를 나타내었고, 60 °C에서 최고의 효소적 반응을 나타냈다. 이 효소는 1 시간 동안 인큐베이션 시켰을 때 65°C까지 완전히 안정된 것으로 밝혀졌다(도 5 참조). MnB31의 넓은 범위의 안정성은 단백질 구조를 영구히 변경시킴에 있어서 비효율적일 수 있는 다양한 pH 레벨에서 인큐베이션을 제공하는 인자인 가역적 단백질 변성에 기인하는 것일 수 있다. 온도의 측면에서, MnB31은 *Aspergillus flavus* gr [참조문헌: 32], *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 [참조문헌: 9], *Penicillium oxalicum* SO [참조문헌: 20], *Paenibacillus* sp. DZ3 [참조문헌: 19] 유래의 만난 분해효소에 비교할만한 것으로 밝혀졌다. 더욱이, 다양한 바실러스 속 균주[참조문헌: 10, 11, 12, 13, 15, 33] 유래의 만난 분해효소 보다 더 높은 온도에서 더 양호한 활성을 보였다. 그러나, *Bacillus subtilis* WY34 [참조문헌: 16], *Bacillus subtilis* SA -22 [참조문헌: 34] 유래의 만난 분해효소 등과 같이 일부는 60°C 이상에서 더 양호한 만난 분해효소 활성을 보였다.
- [0062] 대부분의 바이오 기술적 산업 공정은 극단의 pH 및 상승된 온도에서 작동한다. 따라서, 효소는 그러한 적대적인 조건에서 오랜 기간을 견딜 수 있어야 한다. MnB31은 알칼리 성질의 측면에서 *Bacillus* 만난 분해효소 중에서 신규하다. 그의 넓은 범위의 pH, 열안정성 및 상당히 높은 최적 온도에 대한 관용성은 만난 가수분해, 바이오-표백 또는 산업용 바이오촉매 등의 바이오 기술 산업에의 잠재적인 응용성을 지지한다.
- [0063] **실시예 9: MnB31의 N-말단 아미노산 서열 결정**
- [0064] MnB31의 N-말단 아미노산 서열은 Procise Model 492 protein sequencer(Applied Biosystems, CA. USA)를 사용하여 Edman degradation법에 의해 결정하였다.
- [0065] 얻어진 N-말단 아미노산 서열은 A-L-Y-E-T-I-F-A-L-X이었다. 이 서열은 BLAST(basic local alignment search tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 사용한 National Centre for Biotechnology Information (NCBI) 단백질 데이터베이스에서 입수 가능한 서열과 비교하였다. BLAST 조사 결과, MnB31의 N-말단 아미노산 서열과 상이한 소스로 부터의 밀접하게 관련된 만난 분해효소를 정렬하였을 때 어느 정도의 유사성이 있었다. 이를 표 2에 요약하였다.

표 2

Enzyme	N-terminal amino acid	Identity (%)	Reference
MnB31	ALYETIFALX	100	Current study
mannanase [<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054]	TLYETIFPKL	60	¹ XP_001386988.2
beta-mannanase-like protein [<i>Dyadobacter fermentans</i> DSM 18053]	ESFETIFNRK	40	² ACT94258.1
alpha-1,6-mannanase [<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> yFS275]	ALYEQACNG	40	¹ XP_002173907.1
beta-mannanase [<i>Bacillus licheniformis</i>]	NIVCSIFALL	40	² ACX94044.1
mannanase [<i>Bacillus</i> sp. CM3.1]	NIVCSIFALL	40	² ABQ81811.1
mannanase [<i>Bacillus</i> sp. BT1B_CT2]	NIVCSIFALL	40	² EFV71684.1

¹NCBI reference sequence

²GenBank

[0066]

[0067]

실시예 10: 금속 이온의 영향

[0068]

순수한 MnB31을 일가의 (Na^+ 및 K^+) 및 2가의 (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , 및 Fe^{2+}) 금속 이온들로 각각 5% 및 5mM의 최종 농도에서 인큐베이션시켰다. 상대 효소 활성은 540 nm에서 표준 에세이 조건하에서 측정하였고, 첨가제가 없는 대조군을 100% 활성으로 하여 표준 프로토콜 하에 비교 결정하였다.

[0069]

실시예 11: MnB31에 미치는 용매의 영향

[0070]

만난 분해효소 활성에 미치는 상이한 용매의 영향은 아세톤, 클로로포름, 디메틸설폭시드, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 1-부탄올, 톨루엔, 디에틸 에테르 및 트리클로로아세트산 등의 다양한 용매를 2.5% 최종 농도로 첨가하여 확인하였다. 상대 활성은 표준 실험 에세이 조건하에서 결정하였고 첨가제가 없는 대조군(100% 활성으로 간주함)에 비교하였다.

[0071]

실시예 12: 세제의 영향

[0072]

순수한 MnB31을 0.25% 최종 농도의 Triton X-100, Tween-20, Tween-80, 테옥시콜린산, SDS, 및 CHAPS로 인큐베이션시켰다. 상대 활성은 표준 실험 에세이 조건하에서 결정하였고 첨가제가 없는 대조군(100% 활성으로 간주함)에 비교하였다.

[0073]

실시예 13: 모듈레이터의 영향

[0074]

MnB31 활성에 미치는 산화 환원제의 영향은 과산화수소, 소듐 퍼보레이트 및 β -머캅토에탄올을 첨가하여 조사하고, 에틸렌 글리콜 테트라아세트산(EGTA) 및 에틸렌 디아민 테트라아세트산(EDTA) 등의 킬레이트제의 만난 분해효소 활성에 관한 영향은 5 mM의 최종 농도에서 조사하였다. 모든 조건하에서, 상대적 효소 활성은 첨가제가 없는 대조군(100% 활성으로 간주함)에 비교하였다. MnB31의 활성에 미치는 금속 이온의 영향은 표 3에 나타내었다.

표 3

Reagents	Concentration	Relative Activity (%) [*]
Ca ²⁺	5mM	78.6 ± 0.034
Mg ²⁺	5mM	11.8 ± 0.007
Co ²⁺	5mM	123.0 ± 0.086
Cu ²⁺	5mM	82.8 ± 0.051
Ni ²⁺	5mM	33.2 ± 0.008
Zn ²⁺	5mM	28.5 ± 0.009
Mn ²⁺	5mM	116.1 ± 0.027
Fe ²⁺	5mM	57.2 ± 0.040
Ba ²⁺	5mM	65.2 ± 0.008
Na ⁺	5.00%	111.5 ± 0.027
K ⁺	5.00%	125.6 ± 0.103

[0075]

[0076]

만난 분해효소 활성은 Co²⁺ (123.0%), Mn²⁺ (116.1%), Na⁺ (111.5%), 및 K⁺ (125.6%)에 의하여 강하게 활성화되었다. *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 [참조문헌: 35]로 부터의 만난 분해효소 활성은 Co²⁺ 및 Mn²⁺에 의해 증가되었다. 더욱이, 만난 분해효소 활성은 *Vibro* sp. 균주 MA-138 [참조문헌: 36]에서는 Na⁺ 및 K⁺에 의해 증가되었다. MnB31 활성은 Zn²⁺ (28.5%), Ni²⁺ (33.2%), 및 Mg²⁺ (11.8%)에 의해 강하게 억제되었고, 만난 분해효소 활성의 상당한 손실이 Fe²⁺ 및 Ba²⁺의 존재하에서 발견되었고, 40% 이상의 손실이 최종 농도 5 mM의 2가 금속 이온 및 5% 1가 금속 하에서 관찰되었다. *Paenibacillus* sp. DZ3 유래 만난 분해효소 활성은 Zn²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, EDTA 및 SDS [참조문헌: 19]에 의해 억제되었다.

[0077]

더욱이, *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 [참조문헌: 35] 유래의 만난 분해효소 활성은 EDTA, Zn²⁺, Ni²⁺ 및 Fe²⁺에 의해 억제되었고, 또한, *Bacillus subtilis* WY34 [16] 유래의 효소 활성도 마찬가지로 EDTA, Zn²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, 및 Mg²⁺에 의해 억제되었는데 이는 본 발명의 결과와 유사하다.

[0078]

효소는 MnB31의 활성에서 다양한 첨가제와 인상적인 상호작용을 보였고, 이를 표 4에 요약하였다.

표 4

Reagents	Concentration	Relative Activity (%) [*]
Hydrogen Peroxide ^a	5mM	55.3 ± 0.010
Sodium Perborate ^a	5mM	67.8 ± 0.041
Beta-mercaptoethanol ^b	5mM	66.8 ± 0.048
EDTA ^c	5mM	5.3 ± 0.005
EGTA ^c	5mM	6.5 ± 0.006
Triton X-100 ^d	0.25%	59.1 ± 0.009
Tween-20 ^d	0.25%	67.6 ± 0.011
Tween-80 ^d	0.25%	67.5 ± 0.013
Deoxycholic Acid ^d	0.25%	79.6 ± 0.014
SDS ^d	0.25%	73.2 ± 0.014
CHAPS ^d	0.25%	83.8 ± 0.034
Acetone ^e	2.50%	112.7 ± 0.058
Chloroform ^e	2.50%	103.2 ± 0.028
Dimethyl Sulfoxide ^e	2.50%	103.7 ± 0.022
Methanol ^e	2.50%	104.3 ± 0.027
Ethanol ^e	2.50%	114.9 ± 0.017
2-propanol ^e	2.50%	110.2 ± 0.028
1-Butanol ^e	2.50%	111.1 ± 0.021
Toluene ^e	2.50%	112.4 ± 0.055
DiEthyl Ether ^e	2.50%	117.1 ± 0.083
Tri Chloroacetic Acid ^e	2.50%	5.4 ± 0.007

^{*}Results are presented as mean ± standard deviation (n=3)

^aOxidizing agents

^bReducing agents

^cChelating agents

^dDetergents

^eSolvents/chemicals

[0079]

[0080] 세제, 모듈레이터 및 기타 첨가제에 의한 효소적 활성의 영향의 중요성은 활성 부위의 구조 및 작용 메커니즘에 관한 연구에 달려있다. 이 효소는 과산화수소, 소듐 퍼보레이트 및 β-머캅토에탄올에 의해 5 mM의 농도에서 30% 이상 억제되었다.

[0081] 그러나, 만난 분해효소 활성은 2.5%의 농도에서 효소 활성을 거의 완벽하게 억제한 트리클로로아세트산을 제외하고는 시험된 모든 화학약품/용매에 의해 활성화되었다. 이 효소를 세제, Triton X-100, Tween-20, Tween-80, 테옥시콜린산, SDS, 및 CHAPS을 0.25%의 농도로 처리했을 때, 효소의 활성은 60-80% 이상을 보유하였다. 만난 분해효소 활성은 EDTA 및 EGTA 등의 킬레이트화제에 의해 현저하게 영향을 받았는데 이는 MnB31이 금속성 단백질임을 의미한다.

[0082] 이 효소는 이들의 촉매적 효율을 발휘하기 위해서 전형적으로 모듈레이터를 요한다. 따라서, 보조인자-매개 활성화는 일반적으로 산업적 공정에 이용되어 촉매력을 증대시킨다. 따라서, 이들 결과는 산업적 적용에 포함되거나 배제되어야 할 금속이온, 세제, 용매 및 모듈레이터의 선택을 안내할 것이다.

[0083] 실시예 14: NaCl의 영향

[0084] 정제된 MnB31 활성화에 미치는 NaCl (5.0-30%, w/v)의 효과는 pH 12.5 및 60 °C에서 결정하였다. 안정성은 효소를 37°C에서 60 분 동안 NaCl (5.0-30%, w/v)로 인큐베이션시켜 측정하였다. 잔여 효소 활성은 표준 에세이 조건하에서 결정하였다.

[0085] 실시예 15: 우레아의 영향

[0086] MnB31 효소 활성화에 미치는 우레아의 영향은 효소를 상이한 농도의 우레아(1-5 M)에 37 °C에서 60 분 동안 인큐

베이션시킴으로써 결정하였다. 잔여 효소 활성은 표준 에세이 조건하에서 결정하였다.

[0087] **실시예 16: 프로테아제의 영향**

[0088] 프로테아제에 대한 내성은 정제된 MnB31을 트립신 및 프로테아제 K와 함께 0.1: 1 [만난 분해효소:프로테아제, w/w]의 비율로 37℃에서 60 분 동안 인큐베이션시킴으로써 결정하였다. 잔여 효소 활성은 표준 에세이 조건하에서 결정하였다.

[0089] 만난 분해효소 활성에 미치는 NaCl, Urea 및 프로테아제의 영향은 표준 에세이 조건하에서 연구하였다.

[0090] MnB31은 5-10% NaCl (w/v)의 농도에서 70% 이상의 내염성을 나타내었다. 효소 활성은 그 이상의 염농도에서는 점차로 감소하였다. 15% NaCl (w/v)에서 보유 활성은 $48.56 \pm 0.015\%$ 이었고, 20% NaCl (w/v)에서 단지 $29.94 \pm 0.010\%$ 의 효소 활성이 남았다. MnB31은 *Bacillus halodurans* [참조문헌: 37] 및 *Bacillus sp* MG-33 [참조문헌: 38] 유래의 만난 분해효소에 비교할 만한 내염성을 나타내었다. 정제된 MnB31은 3M 이하의 우레아에서 69% 이상의 효소 활성을 보였고, 4M 우레아 농도에서는 $53.29 \pm 0.006\%$ 활성을 보였다.

[0091] *Bacillus sp.* MG-33 [참조문헌: 38]는 본 발명에 비교할만한 우레아 내성을 나타내었다. 정제 MnB31은 0.1: 1 [mannanase: protease, w/w]의 비율에서 트립신 및 프로테이나아제 K 분해에 가장 높은 내성을 가졌다. *Bispora sp.* MEY-1 [참조문헌: 39], *Humicola insolens* Y1 [참조문헌: 40], 및 *P. pinophilum* [참조문헌: 41] 등의 다양한 미생물 유래의 만난 분해효소는 프로테아제에 내성을 나타내었으나, *Bacillus circulans* [참조문헌: 42]는 프로테아제에 대하여 부분적인 감수성(sensitivity)을 나타내었다.

[0092] 본 발명자들의 결과는 MnB31이 펄프의 바이오-표백(Na^+ 및 Cl^- 이온이 매우 높은 경우), 농업 폐기물 생분해(우레아가 유기 비료로 사용되고, 농도가 높은 경우의 농업 분야에서), 세제 산업 및 식품에서 프리바이오틱에 사용되는 것으로 강제되는 효소임을 의미한다.

[0093] **실시예 17: 농업 폐기물을 사용한 효소 생산**

[0094] 밀기울, 바나나껍질, 감귤 껍질, 옥수수대, 보리 껍질 등의 다양한 농업 폐기물을 만난 분해효소의 생산을 위한 탄소원으로 이용하였다. 모든 이들 경우에 있어서, 단지 로커스트 빈 검만을 상기 농업 폐기물로 대체하여 교체하고 효소 생산을 위한 다른 조건을 변화시키지 않았다.

[0095] 도 6은 탄소원으로서 다양한 농업 폐기물을 사용한 만난 생산을 나타내는 그래프도이다. 그 결과, 상당량의 만난 분해효소 생산이 감귤 껍질, 바나나 껍질, 밀기울, 옥수수대 및 보리 껍질 등의 농업 폐기물을 사용하여 관찰되었다. 효소의 최대 생산은 사용된 모든 단독 탄소원에 따라 다양하였다. 생산은 사용된 다른 탄소원에 비하여 밀기울에서 120 시간에 233.85 Uml^{-1} 으로 최대였다(도 6 참조). 따라서, 이는 농업 폐기물이 재순환될 수 있기 때문에 고도로 응용가능하고, 어느 정도까지는 상업적 만반이 가공될 수 있다.

[0096] 이 발견은 CSB31의 기질로서 농업 폐기물을 사용하여 잠재적인 만난 생성자로서의 용도를 지지하는 강력한 증거를 제공한다. 또한, 다양한 바이오산업 공정에 있어서 주된 인자이다.

[0097] **실시예 18: 동력학적 변수의 결정**

[0098] 기질로서 LBG를 사용하여 Michaelis-Menten 동력학적 변수, K_m , V_{max} 및 K_{cat} 을 결정하였다. 동력학적 에세이는 다섯가지 농도의 LBG (0.6-10 mg/mL) 및 0.01 mg의 효소 농도를 사용하여 수행하였다. 반응은 60 °C 및 pH 12.5에서 수행하였다. 분석은 표준 최적 조건하에서 수행하였다. Michaelis constant (K_m) 및 최대 반응 속도 (V_{max})는 Lineweaver Burk 방정식을 사용하여 결정하였다. 그 결과를 표 5에 나타내었다.

표 5

Substrate	Relative activity %
Chitin from shrimp shells	7.5 ± 0.003
Beech wood xylan	39.2 ± 0.018
Gum arabic from acacia tree	9.3 ± 0.005
Pectin from apple	17.2 ± 0.005
Locust bean gum	100.0 ± 0.010
Sigma cell cellulose, Type 20	9.3 ± 0.004
Carboxymethyl cellulose	10.6 ± 0.002
Avicel	13.2 ± 0.003
Paranitrophenyl D-cellobioside (pNPC)	5.4 ± 0.002
Paranitrophenyl-β-D-glycopyranoside (pNPG)	14.3 ± 0.006

[0099]

[0100]

MnB31의 기질 로커스트 빈 검 갈락토만난에 대한 K_m , V_{max} 및 K_{cat} 값은 LBG (0.6-10 mg/mL)을 사용하여, 각각 0.03885 mgml⁻¹, 1019.33 ± 4.509 Umg⁻¹, 및 152.8995 x 10⁴ sec⁻¹로 밝혀졌다. K_m 값은 다른 만난 분해효소 중에서 가장 낮았고 다음의 K_m 값을 가졌다: 1.05 mgml⁻¹ *Paenibacillus* sp. DZ3 [참조문헌: 19]; 1.3 mgml⁻¹, *Trichoderma harzianum* strain T4 [21]; 7.6 mgml⁻¹, *Bacillus subtilis* WY34 [16]; 0.16 mgml⁻¹, *Streptomyces* sp. S27 [참조문헌: 43]; and 1.5 mgml⁻¹, *Bacillus stearothermophilus* [참조문헌: 14]. 0.03885 mgml⁻¹ 값을 갖는 K_m 은 가장 낮은 기질 농도에서 최대 촉매적 효율을 입증한다. MnB31의 V_{max} 값은 *Paenibacillus* sp. DZ3 (714 Umg⁻¹) [참조문헌: 19] 및 *Bacillus subtilis* WY34 (970.3 ± 10.3 Umg⁻¹) [참조문헌: 16] 유래의 만난 분해효소에 대한 V_{max} 값에 비교할 만하였으나, *Bacillus stearothermophilus* (455 ± 60 Umg⁻¹) [참조문헌: 14] 유래의 만난 분해효소 보다는 높았다. V_{max} 는 만난 분해효소의 턴오버 값을 나타내는데, 이는 만난 분해효소가 기질로 완전히 포화될 때 단위 시간에 있어서 만난 분해효소에 의해 가수분해되는 기질 분자의 수이다. K_{cat} 은 *Bacillus subtilis* WY34 (640.40 sec⁻¹) [참조문헌: 16] 유래의 만난 분해효소의 것 보다 더 높았다. 이러한 높은 K_{cat} 값은 그의 높은 가수분해 효율을 나타내는데, 이는 단위 시간 당 기질을 생성물로 전환시키는 각 효소 부위의 횟수이다. 이들 발견은 MnB31이 다른 미생물 유래의 만난 분해효소 보다 더 촉매적으로 효율적임을 의미한다.

[0101]

실시예 19: 기질 특이성의 결정

[0102]

정제된 MnB31 효소의 기질 특이성은 표준 에세이 조건하에서 만난 분해효소 활성의 결정을 위하여 새우 껍질의 키틴, 너도밤나무 자일란, 아카시아 나무의 아라비아검, 사과 유래 펙틴, 로커스트 빈 검, 시그마 셀 셀룰로오스 타입 20, 카복시메틸셀룰로오스, 아비셀, 파라니트로페닐 D-셀로비오시드(pNPC), 및 파라니트로페닐-β-D-글리코피라노시드(pNPG) 등 다양한 기질을 사용하여 각각 1% (w/v)의 농도에서 시험하였다.

[0103] 다양한 다당류 기질에 대한 MnB31의 상대 활성은 표 5에 나타내었다. MnB31은 LBG에 대하여 가장 높은 활성을 나타내었고, 100%의 상대 활성으로 간주하였다. MnB31은 또한 너도밤나무 자일란을 $39.2 \pm 0.018\%$ 의 낮은 활성으로 가수분해시킨 반면, 다른 시험된 기질에 대한 가수분해 활성은 관찰되지 않았다.

[0104] 바이오 표백에 유용하도록 되기 위해서 만난 분해효소는 고온 및 알칼리 조건에서 활성이고 안정하여야 하고, 가장 중요하게는 셀룰로오스 섬유를 공격함으로써 펄프 품질을 손상시키지 않아야 한다. 펄프 섬유 분해를 방지하고 펄프의 품질을 보증하기 위해서는 이기능성 효소를 피할 필요가 있다[참조문헌: 44]. MnB31은 후속 화학적 표백 공정 동안 리그닌 함유 펄프의 표면에서 만난 장벽의 문제를 경감시킨다.

[0105] 이들 결과는 MnB31이 고온 및 알칼리 상태에서 무셀룰로오스 만난 분해효소임을 의미한다. 또한, 이들은 펄프 및 제지 산업에 있어서 바이오표백제로서의 그의 용도를 강력하게 지지한다.

[0106] 실시예 20: 가수분해 실험

[0107] 정제 만난 분해효소(0.4 mg/mL)를 10 mM KCl/NaOH 완충액(pH 12.5) 중의 0.25% (w/v) LBG와 혼합하였다. 반응 혼합물을 60 °C에서 인큐베이션시켰다. 반응액을 0, 10, 30, 45, 60, 90, 및 120 분의 간격으로 제거하였다. 반응은 10 분 이상 끓임으로써 정지시켰다. 가수분해물은 박층 크로마토그래피(TLC)에 의해 분석하였다[참조문헌: 28]. 이동상에 사용된 용매는 각각 클로로포름, 아세트산 및 물을 6: 10: 3 ratio (v: v: v)을 함유하였다. 시료(4 μ l)를 실리카겔 플레이트(60F 254, E. Merck, Germany)에 가하고, 전개 용매 시스템 중에 전개시켰다. 이어서 플레이트를 메탄올 및 황산 혼합물(95: 5, v: v)으로 전개시키고, 150 °C에서 가열하였다. 만노오스(Mn1), 만노비오스(Mn2), 및 만노트리오스(Mn3) (10 mg/mL)로 이루어진 만노오스 올리고과당류의 혼합물을 표준으로 사용하였다. 올리고과당류 생산은 표준에 대응하여 갈색 점으로 나타났다.

[0108] 도 7은 로커스트 빈 검으로 처리한 후 만난 분해를 나타내는 그래프도이다.

[0109] 기질의 경시적 효소 가수분해된 생산물은 만노비오스(Mn2) 및 만노트리오스(Mn3) 이었다(도 7 참조). 정제 MnB31와의 반응을 위하여, 과당류들은 효소의 누적 작용에 의해 기질로부터 방출되었다.

[0110] 이 결과는 정제 MnB31의 엔도-작용 성질을 의미하는데, 이는 *Aspergillus niger* ATCC46890 [참조문헌: 5] 유래의 만난 분해효소와 유사하였다. MnB31은 만난을 가수분해하여 만노비오스 및 만노트리오스를 생산하였으나, 로커스트 빈 검 갈락토만난의 가수분해에 의하여 만노오스는 생산하지 않았다.

[0111] 그러나, 만노오스는 *Bacillus subtilis* 5H [참조문헌: 45] 및 *Bacillus sp.* MG-33 [참조문헌: 38] 유래의 만난 분해효소에 의한 로커스트 빈 검 갈락토만난의 가수분해 생성물로서 관찰되었다. 만노-과당류들은 일반적으로 동물 사료에 첨가되어 소화성을 증진시키고 장내 상태를 유지시킨다[참조문헌: 46, 47, 48]. 이들 만노-과당류들은 닭의 건강을 증진시키도록 보충된다[참조문헌: 49]. 만노-과당류들은 인간의 음식 첨가제로 사용되어 유익한 장내 미생물의 선택적 성장을 촉진한다[참조문헌: 16]. 또한, 만난 분해효소는 액상 커피 엑스에 존재하는 갈락토만난을 가수분해하는데 사용되어 인스턴트 커피의 동결-건조 동안 겔 형성을 억제한다[참조문헌: 50]. MnB31의 이러한 특성들은 이것이 제약 산업에 적용되고, 식품의 프리바이오틱으로 그리고 기타 다른 바이오산업 공정에 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0112] 실시예 21: 자일란 가수분해의 열역학적 특성

[0113] 기질 로커스트 빈 검 가수분해에 대한 열역학적 변수는 전이 상태 이론으로 부터 유도한 Eyring의 절대 속도 방정식에 의하여 계산하였다[참조문헌 29].

$$k_{cat} = \frac{k_b T}{h} e^{(\frac{-\Delta H}{RT})} e^{(\frac{-\Delta S}{RT})}$$

[0114] 턴오버값, (I) (여기서, k_b 는 Boltzmann 상($1.38 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$)수이고, T 는 절대 온도(K)이며, h 는 Planck 상수($6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$) 이고, R 은 기체 상수 = $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ 이다)

[0115] 활성화 엔탈피, $\Delta H = E_a - RT$ (II)

$$\Delta G = -RT \ln \frac{k_{cat} h}{K_b T}$$

[0116] 활성화 유리에너지, (III)

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}$$

[0117] 활성화의 엔트로피, (IV)

[0118] 기질 결합 (ΔG_{E-S})의 유리 에너지 및 전이 상태 형성(ΔG_{E-T})의 유리 에너지는 다음의 방정식을 사용하여 결정하였다;

$$\Delta G_{E-S} = -RT \ln K_a$$

[0119] (V)

[0120] (여기서, $K_a = 1/K_m$)

$$\Delta G_{E-T} = -RT \ln \frac{k_{cat}}{K_m}$$

[0121] (VI)

[0122] 반응 속도에 미치는 온도의 영향은 10 °C의 온도에서 상승에 기인하여 증가되는 속도에 의한 인자인 온도(Q_{10}) 몫으로써 계산하였다. Q_{10} 은 Dixon and Webb의 방정식을 재배열하여 계산하였다[참조문헌: 30]

$$Q_{10} = \text{antilog} \frac{E_a \times 10}{RT^2}$$

[0123] (VII)

[0124] 만난 가수분해의 활성화를 위한 엔탈피(ΔH), Gibb's 유리 에너지(ΔG), 및 엔탈피(ΔS)의 측면에서 정제 MnB31의 열역학적 특성(5.8 ~ 12.5의 넓은 pH 범위에서 고도로 안정함, 및 60 °C에서 KCl/NaOH(pH 12.5)의 존재하에서 가장 높은 활성)은 각각 28.59, 42.45, 및 -41.60 kJmol⁻¹이었다.

[0125] 활성화 에너지(E_a)는 31.36 kJmol⁻¹이었고, K_{cat} (효소가 단위 시간 당 기질을 생성물로 전환하는 배수)는 152.8995 x 10⁴ sec⁻¹의 값이었는데, 이는 그의 높은 가수분해 효율을 나타낸다. ΔG 상의 효소 반응 릴레이의 존재는 효소-기질 복합체의 생성물로의 전환을 나타낸다. MnB31의 기질 결합(ΔG_{E-S})의 유리 에너지 및 전이 상태의 형성을 위한 유리 에너지(ΔG_{E-T})는 각각 -8.974 및 -48.41 kJmol⁻¹이었다. 따라서, 본 발명자들의 결과는 자발적인 생성물 형성을 확인한다. ΔG_{E-S} 및 ΔG_{E-T} 의 음의 값은 기질 결합 후 생성물의 자발적인 형성이 있음을 의미한다. 효소 반응의 속도 또는 매 10°C 온도 증가에 기인한 생리학적 과정은 온도 몫(Q_{10})으로 알려진 온도 감수성의 척도이다. 본 연구에 있어서 Q_{10} 은 1.40이었다. 대부분의 효소 분자가 겹쳐진 상태인 최적 온도가 Q_{10} 을 설정하는데 사용된다. 그러나, 이 온도를 넘어서 반응 속도는 펼쳐지는 효소의 분획의 증가에 기인하여 하강하기 시작하는데, 온도 증가에 따라 만난 분해효소의 형태가 변화되기 때문이다. 이는 화학적 속도에 있어서 증가가 효소의 불활성화보다는 60 °C까지는 더 크다는 것을 의미한다. MnB31의 열역학적 변수들은 다른 균주 유래의 만난 분해효소에 비하여 생성물의 자발적 형성, 더 높은 가수분해 효율 및 효소 반응의 실현성을 입증한다(표 6 참조)

표 6

Thermodynamic parameters	Mannanase from <i>Sphingobacterium</i> sp. GN25 [51]	Mannanase from <i>Bacillus</i> sp. CFR1601 [52]	MnB31 (Current study)
Activation energy (E_a) kJmol ⁻¹	36.0	45.18	31.36
Enthalpy of activation (ΔH) kJmol ⁻¹	33.5	362.75	28.59
Gibb's free energy (ΔG) kJmol ⁻¹	77.7	101.21	42.45
Entropy of activation (ΔS) Jmol ⁻¹ K	-143.7	779.47	-41.60
Temperature quotient (Q_{10})	1.6	-	1.40
K_{cat} value Sec ⁻¹	0.4	-	152.8995×10 ⁴
K_m value mgml ⁻¹	4.2	-	0.03885
V_{max} value Umg ⁻¹	0.6	-	1019.33 ± 4.509

[0126]

[0127] 참고 문헌 목록:

- [0128] 1. El-Naggar, M. Y., El-Aassar, S. A., Youssef, A. S., El-Sersy, N. A., & Beltagy, E. A. (2006). Extracellular β -mannanase production by the immobilization of the locally isolated *Aspergillus niger*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 8, 57-62.
- [0129] 2. Moreira, L. R. S., & Filho, E. X. F. (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 165-178.
- [0130] 3. Dhawan, S., & Kaur, J. (2007). Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27, 197-216.
- [0131] 4. Mohamad, S. N., Ramanan, R. N., Mohamad, R., & Ariff, A. B. (2011). Improved mannan-degrading enzymes' production by *Aspergillus niger* through medium optimization. *New Biotechnology*, 28, 146-152.
- [0132] 5. Ademark, P., Varga, A., Medve, J., Harjunpää, V., Torbjörn, D., Tjerneld, F., & Stalbrand, H. (1998). Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a β -mannanase. *Journal of Biotechnology*, 63, 199-210.
- [0133] 6. Abdeslahian, P., Samat, N., Hamid, A. A., & Yusoff, W. M. W. (2010). Utilization of palm kernel cake for production of β -mannanase by *Aspergillus niger* FTCC 5003 in solid substrate fermentation using an aerated column bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37, 103-109.
- [0134] 7. Regalado, C., Garcia-Almendarez, B. E., Venegas-Barrera, L. M., Tellez-Jurado, A., Rodriguez-Serrano, G., Huerta-Ochoa, S., & Whitaker, J. R. (2000). Production, partial purification and properties of α -mannanases obtained by solid substrate fermentation of spent soluble coffee wastes and copra paste using *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1343-1350.
- [0135] 8. Civas, A., Eberhard, R., Le Dizet, P., & Petek, F. (1984). Glycosidases induced in *Aspergillus*

tamarii. Secreted α -D-galactosidase and β -D-mannanase. *Biochemical Journal*, 219, 857-863.

- [0136] 9. Puchart, V., Vrsanska, M., Svoboda, P., Pohl, J., Ogel, Z. B., & Biely, P. (2004). Purification and characterization of two forms of endo- β -1, 4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674, 239-250.
- [0137] 10. Mabrouk, M. E. M., & El Ahwany, A. M. D. (2008). Production of 946-mannanase by *Bacillus amylolequifaciens* 10A1 cultured on potato peels. *African Journal of Biotechnology*, 7, 1123-1128.
- [0138] 11. Mou, H., Zhou, F., Jiang, X., & Liu, Z. (2011). Production, purification and properties of α -mannanase from soil bacterium *Bacillus circulans* M-21. *Journal of Food Biochemistry*, 35, 1451-1460.
- [0139] 12. Phothichitto, K., Nitisinprasert, S., & Keawsompong, S. (2006). Isolation, screening and identification of mannanase producing microorganisms. *Kasetsart J (Nat Sci)*, 40(Suppl), 26-38.
- [0140] 13. Zhang, M., Chen, X.-L., Zhang, Z.-H., Sun, C.-Y., Chen, L.-L., He, H.-L., Zhou, B.-C., & Zhang, Y.-Z. (2009). Purification and functional characterization of endo- β -mannanase MAN5 and its application in oligosaccharide production from konjac flour. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 865-873.
- [0141] 14. Talbot, G., & Sygusch, J. (1990). Purification and characterization of thermostable beta-mannanase and alpha-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3505-3510.
- [0142] 15. Mendoza, N. S., Arai, M., Kawaguchi, T., Cubol, F. S., Panerio, E. G., Yoshida, T., & Joson, L. M. (1994). Isolation of mannan-utilizing bacteria and the culture conditions for mannanase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 51-54.
- [0143] 16. 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. *Carbohydrate Polymers*, 66, 88-96.
- [0144] 17. Gherardini, F. C., & Salyers, A. A. (1987). Purification and characterization of a cell-associated, soluble mannanase from *Bacteroides ovatus*. *Journal of Bacteriology*, 169, 2038-2043.
- [0145] 18. Araujo, A., & Ward, O. P. (1990). Mannanase components from *Bacillus pumilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1954-1956.
- [0146] 19. Chandra, M. R. S., Lee, Y.-S., Park, I.-H., Zhou, Y., Kim, K.-K., & Choi, Y. L. (2011). Isolation, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from *Paenibacillus* sp. DZ3. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54, 325-331.
- [0147] 20. Kurakake, M., Sumida, T., Masuda, D., Oonishi, S., & Komaki, T. (2006). Production of galactomanno-oligosaccharides from guar gum by β -mannanase from *Penicillium oxalicum* SO. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7885-7889.
- [0148] 21. Ferreira, H. M., & Ferreira Filho, E. X. (2004). Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. *Carbohydrate Polymers*, 57, 23-29.
- [0149] 22. Arisan-Atac, I., Hodits, R., Kristufek, D., & Kubicek, C. P. (1993). Purification, and characterization of a β -mannanase of *Trichoderma reesei* C-30. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 58-62.
- [0150] 23. Stalbrand, H., Siika-aho, M., Tenkanen, M., & Viikari, L. (1993). Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 29, 229-242.
- [0151] 24. Zakaria, M. M., Yamamoto, S., & Yagi, T. (1998). Purification and characterization of an endo-1, 4- β -mannanase from *Bacillus subtilis* KU-1. *FEMS Microbiology Letters*, 158, 25-31.
- [0152] 25. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing

sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

- [0153] 26. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- [0154] 27. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- [0155] 28. Ninawe, S., Kapoor, M., & Kuhad, R. C. (2008). Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology*, 99, 1252-1258.
- [0156] 29. Eyring, H., & Stearn, A. E. (1939). The application of the theory of absolute reaction rates to proteins. *Chemical Reviews*, 24, 253-270.
- [0157] 30. Dixon, M., & Webb, E.C. (1979). *Enzyme Kinetics*. (Vol. 182). New York: Academic Press.
- [0158] 31. Takeda, N., Hirasawa, K., Uchimura, K., Nogi, Y., Hatada, Y., Usami, R., Yoshida, Y., Grant, W.D., Ito, S., & Horikoshi, K. (2004). Purification and enzymatic properties of a highly alkaline mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750. *Journal of Biological Macromolecules*, 4, 67-74.
- [0159] 32. Naganagouda, K., Salimath, P. V., & Mulimani, V. H. (2009). Purification and characterization of endo-beta-1, 4 mannanase from *Aspergillus niger* gr for application in food processing industry. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 1184-1190.
- [0160] 33. Cui, F., Shi, J., & Lu, Z. (1999). Production of neutral beta-mannanase by *Bacillus subtilis* and its properties. *Acta microbiologica Sinica*, 39, 60-63.
- [0161] 34. Yu, H. Y., Sun, Y. M., Wang, W. J., Yang, Y.-S., & Yang, Y. H. (2003). Purification and properties of *Bacillus subtilis* SA22 Endo-1, 4-β-D-mannanase. *Chinese Journal of Biotechnology*, 19, 327-331.
- [0162] 35. Ham, S.-J., Lee, H. J., Cho, H.-Y., Kim, J.-H., Kim, Y.-J., Shin, D.-H., Rhee, Y. H., Son, K. H., & Park, H.-Y. (2011). Cloning and characterization of a modular GH5 β-1, 4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13. *Bioresource Technology*, 102, 9185-9192.
- [0163] 36. Tamaru, Y., Araki, T., Amagoi, H., Mori, H., & Morishita, T. (1995). Purification and characterization of an extracellular beta-1, 4-mannanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4454-4458.
- [0164] 37. Vijayalaxmi, S., Prakash, P., Jayalakshmi, S. K., Mulimani, V. H., & 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. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 382-395.
- [0165] 38. Meenakshi, M., Singh, G., Bhalla, A., & Hoondal, G. S. (2010). Solid state fermentation and characterization of partially purified thermostable mannanase from *Bacillus* sp. MG-33. *Bioresource*, 5, 1689-1701.
- [0166] 39. Luo, H., Wang, Y., Wang, H., Yang, J., Yang, Y., Huang, H., Yang, P., Bai, Y., Shi, P., Fan, Y., & Yao, B. (2009). A novel highly acidic β-mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 453-461.
- [0167] 40. Luo, H., Wang, K., Huang, H., Shi, P., Yang, P., & Yao, B. (2012). Gene cloning, expression, and biochemical characterization of an alkali-tolerant β-mannanase from *Humicola insolens* Y1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39, 547-555.

- [0168] 41. Cai, H., Shi, P., Luo, H., Bai, Y., Huang, H., Yang, P., & Yao, B. (2011). Acidic β -mannanase from *Penicillium pinophilum* C1: cloning, characterization and assessment of its potential for animal feed application. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112, 551-557.
- [0169] 42. Li, Y., Yang, P., Meng, K., Wang, Y., Luo, H., Wu, N., Fan, Y., & Yao, B. (2008). Gene cloning, expression, and characterization of a novel beta-mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 160-166.
- [0170] 43. Shi, P., Yuan, T., Zhao, J., Huang, H., Luo, H., Meng, K., Wang, Y., & Yao, B. (2011). Genetic and biochemical characterization of a protease-resistant mesophilic beta-mannanase from *Streptomyces* sp. S27. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 451-458.
- [0171] 44. Gubitz, G. M., Lischig, T., Stebbing, D., & Saddler, J. N. (1997). Enzymatic removal of hemicellulose from dissolving pulps. *Biotechnology Letters*, 19, 491-495.
- [0172] 45. Khanongnuch, C., Asada, K., Tsuruga, H., Ooi, T., Kinoshita, S., & Lumyong, S. (1998). β -Mannanase and xylanase of *Bacillus subtilis* 5H active for bleaching of crude pulp. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86, 461-466.
- [0173] 46. Spring, P., Wenk, C., Dawson, K. A., & Newman, K. E. (2000). The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry Science*, 79, 205-211.
- [0174] 47. Naughton, P. J., Mikkelsen, L. L., & Jensen, B. B. (2001). Effects of non digestible oligosaccharides on *Salmonella enterica* serovar typhimurium and non pathogenic *Escherichia coli* in the pig small intestine In Vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3391-3395.
- [0175] 48. Waldroup, P. W., Fritts, C. A., & Yan, F. (2003). Utilization of Bio-Mos mannan oligosaccharide and Bioplex copper in broiler diets. *International Journal of Poultry Science*, 2, 44-52.
- [0176] 49. Sundu, B., Kumar, A., & Dingle, J. (2006). Response of broiler chicks fed increasing levels of copra meal and enzymes. *International Journal of Poultry Science*, 5, 13-18.
- [0177] 50. Sachslehner, A., Foidl, G., Foidl, N., Gubitz, G., & Haltrich, D. (2000). Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology*, 80, 127-134.
- [0178] 51. Zhang, R., Zhou, J., Gao, Y., Guan, Y., Li, J., Tang, X., Xu, B., Ding, J., & Huang, Z. (2015). Molecular and biochemical characterizations of a new low-temperature active mannanase. *Folia Microbiologica*, 60, 483-492.
- [0179] 52. Srivastava, P., Rao, A. R. A., & Kapoor, M. (2014). Structural insights into the thermal stability of endo-mannanase belonging to family 26 from *Bacillus* sp. CFR1601 (580.2). *The FASEB Journal*, 28(1 Supplement), 580-582.

수탁번호

[0180]

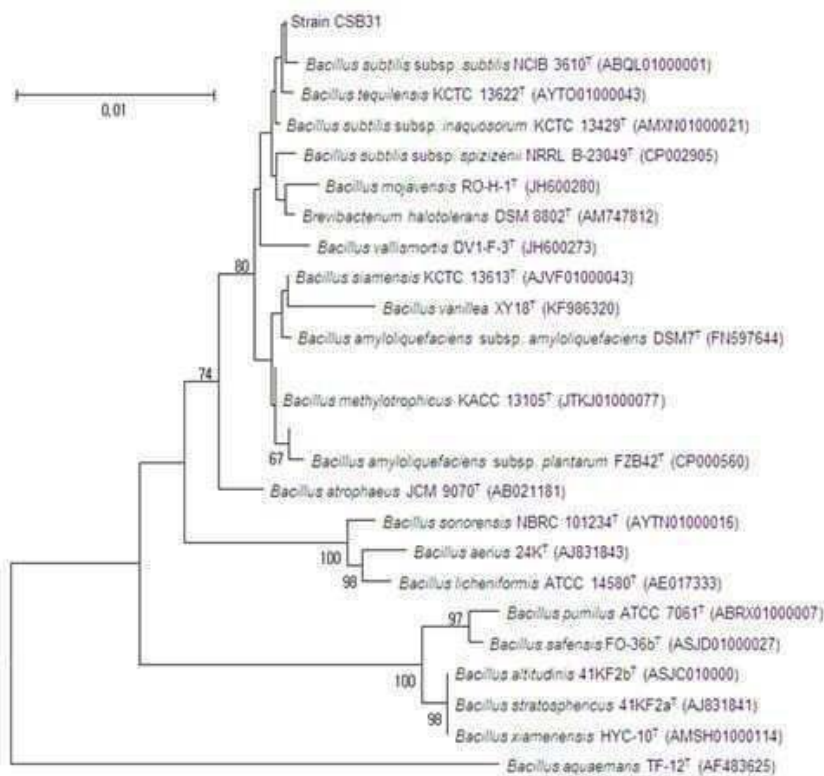
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18484P

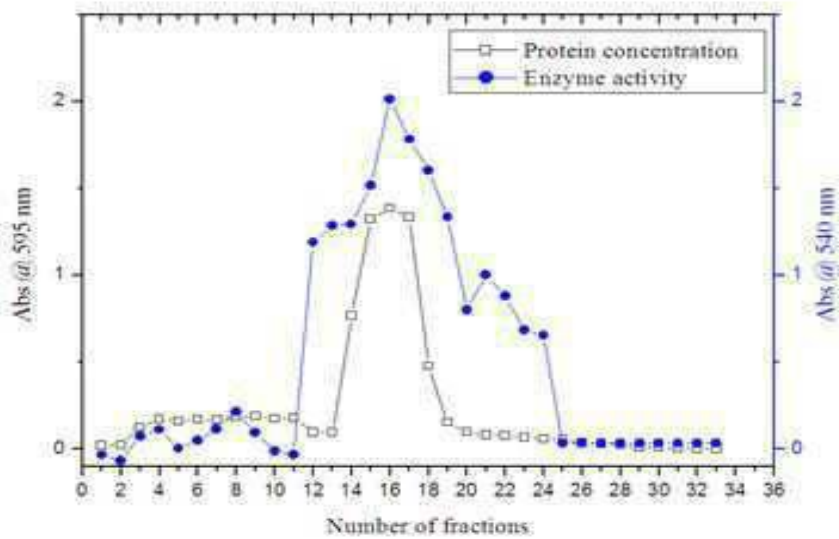
수탁일자 : 20160801

도면

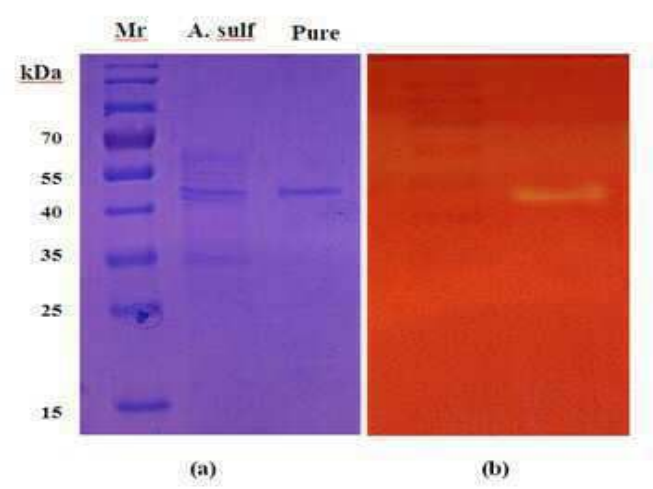
도면1



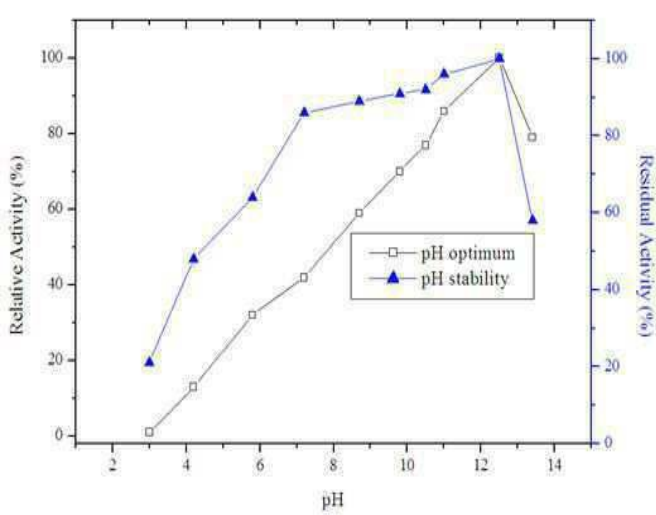
도면2



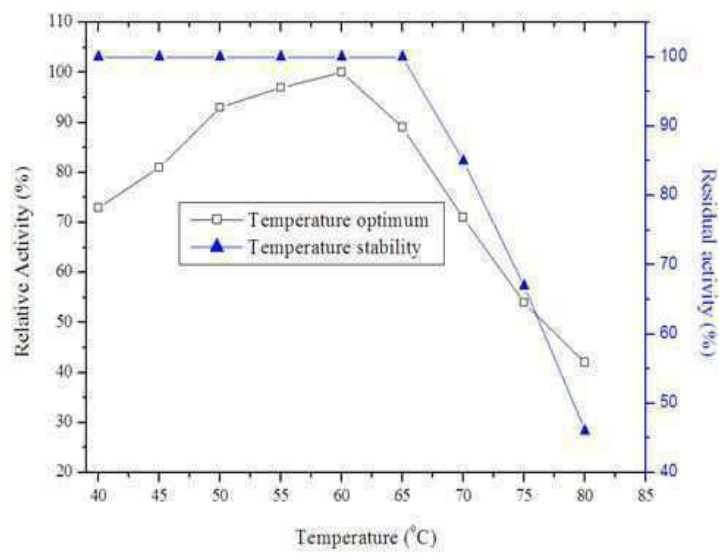
도면3



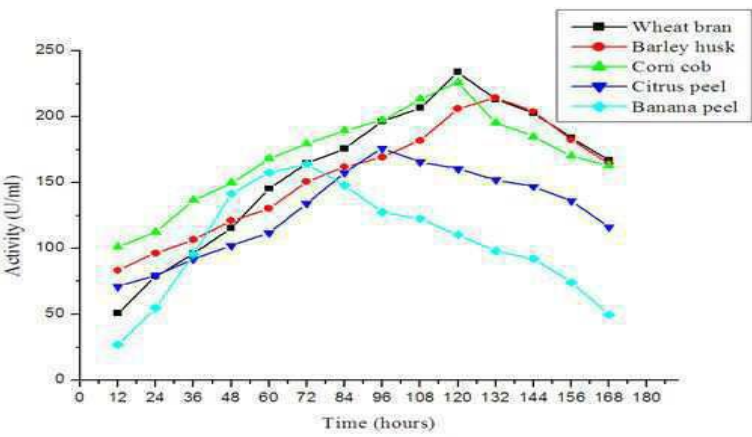
도면4



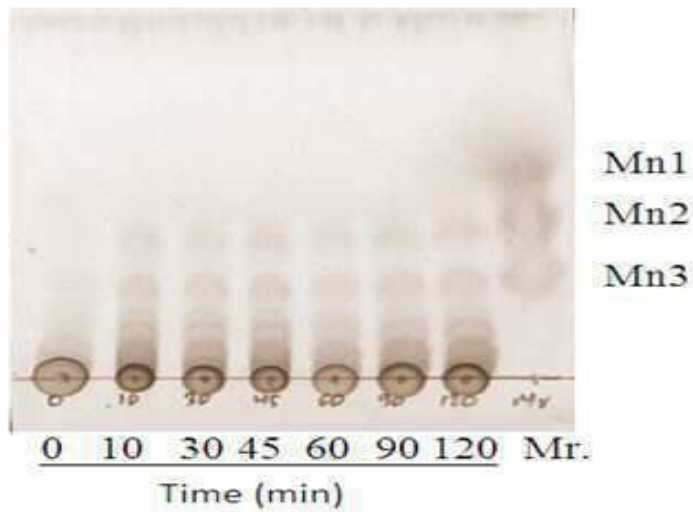
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> Extremely alkaline mannanase from *Bacillus subtilis* subsp.
inaquosorum CSB31 isolated from fermented food Kimchi and the use
thereof
- <130> ISP-1549
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> *Bacillus subtilis*
- <400> 1

Ala Leu Tyr Glu Thr Ile Phe Ala Leu Xaa

1 5 10