

토양에서 분리한 *Aeromonas* sp.로부터 β -mannanase 유전자의 클로닝

박봉환 · 강대경¹ · 김하근*

배재대학교 생명과학부, ¹이지바이오시스템 생물자원연구소

Cloning of β -mannanase gene from *Aeromonas* sp. in *E. coli*. Park, Bong-Hwan, Dae-Kyung Kang¹, and Ha Kun Kim*. Division of Life Science and BioMed RRC, Pai Chai University, Taejon 302-735, Korea, ¹Easy Bio System Inc., Chungnam 330-820, Korea – A bacteria strain producing extracellular β -mannanase was isolated from soil and was identified as *Aeromonas* sp. A genomic DNA library constructed from *Aeromonas* sp. that secretes a β -mannanase was screened for mannan hydrolytic activity. Recombinant β -mannanase activity was detected on the basis of the clear zones around *Escherichia coli* colonies grown on a LB medium supplemented locust bean gum. *EcoRI* restriction analysis of plasmid prepared from recombinant *E. coli* which showed a β -mannanase activity revealed 10 kb DNA insert. The optimum pH and temperature for the activity of recombinant β -mannanase were 6.0 and 50°C, respectively, and were identical to those of the native enzyme.

Key words: *Aeromonas* sp., β -mannanase, zymogram, gene cloning

Hemicellulose는 자연계에 풍부하게 존재하는 다당류 중의 하나로서 식물의 세포벽에서 cellulose와 lignin을 연결하는 linker 역할을 한다. 중요한 hemicellulose로는 xylan과 mannan을 들 수 있다. 콩과식물의 종자와 세라토니아 속의 나무 열매에 존재하는 mannan은 기본 구조가 mannose 잔기만으로 구성되어 있는 homogeneous한 형태이고, softwood에서 주로 발견되는 O-acetylgalactoglucomannan은 mannose 잔기와 glucose 잔기가 혼재하여 이들이 β -1,4 결합을 이루는 heterogeneous한 형태의 mannan이다[10, 11]. Softwood를 구성하는 주요 hemicellulose로서 건조 중량의 약 25%를 차지하는 O-acetylgalactoglucomannan의 기본 골격은 mannose와 glucose가 약 3:1의 비율로 존재하며 glucose 잔기는 무작위 하게 분포되어 있다. galactose 잔기는 mannose 잔기에 α -1,6 결합을 통해 연결되어 있고 mannose 잔기의 2, 3번째 hydroxyl기는 acetylation 되어 있다. 따라서 O-acetylgalactoglucomannan을 효소를 이용하여 단량체로 분해하기 위해서는 endo- β -mannanase, β -mannosidase, β -glucosidase, α -galactosidase, 그리고 acetyl esterase 등이 함께 작용하여야 한다.

Phytelplus macrocarpa로부터 유래한 ivory nut mannan (INM)은 mannose로만 구성되어 있으며 불용성의 결정구조를 이루고 기본 골격이 cellulose와 유사하다. 기본 구조가 mannose 잔기만으로 구성되어 있는 INM을 가수분해하기 위해서는 endo- β -mannanase, β -mannosidase의 작용이 필요하

다.

*Ceratonia siliqua*에서 유래한 locust bean gum(LBG)은 INM과 유사하게 mannose가 기본 구조를 이루는 galactose가 α -1,6 결합을 통해 무작위로 mannose에 결합하고 있다. 따라서 galactose가 mannose에 결합되어 있는 LBG를 효율적으로 가수분해하기 위해서는 endo- β -mannanase, β -mannosidase의 작용이외에 α -galactosidase를 필요로 한다[5].

지금까지 mannan을 분해하는 효소들의 생산이 여러 세균, 균류 및 식물 등에서 보고되고 있다. 특히, mannan, galactomannan 혹은 glucomannan의 기본 골격을 이루는 β -1,4 mannosidic linkage를 무작위로 잘라주는 역할을 하는 β -mannanase는 *Bacillus stearothermophilus*, *Streptomyces lividans*, *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*, *Caldibacillus cellulovorans* 등에서 유전자가 분리되어 이들의 염기서열 분석을 통해 이로부터 유추한 아미노산 서열의 비교에 의해 이들 효소들이 주로 glycosyl hydrolase의 5번 family와 26번 family에 속한다는 것이 밝혀졌다[2-4, 12]. 최근 β -mannanase의 유용성이 pulp bleaching[13], coffee production[1] 등의 분야에서 소개되고 있다.

본 연구에서는 locust bean gum 분해효소를 생산하는 균주를 자연계에서 분리하였으며 이를 *Aeromonas* sp.로 동정하였다. 지금까지 그람 음성세균인 *Aeromonas* sp.의 mannan 분해효소에 관하여 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구는 *Aeromonas* sp.의 mannan 분해효소에 관한 상세한 특성을 조사하기 위한 전 단계로서 β -mannanase 유전자를 대장균으로 클로닝 하였다.

*Corresponding author

Tel. 82-42-520-5389, Fax. 82-42-520-5385

E-mail: hakun@mail.paichai.ac.kr

재료 및 방법

균주의 분리

β -Mannanase를 생산하는 세균을 분리하기 위해 대전 서구 정림동에서 채취한 토양시료를 사용하였다. 토양시료를 생리 식염수에 현탁시켜 선택배지(peptone, 1.0%; yeast extract, 0.5%; glycerol, 0.2%; NaCl, 0.3%; K_2HPO_4 , 0.2%; KH_2PO_4 , 0.2%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01%; locust bean gum, 0.5%; Bacto-agar, 1.5%)에 도달한 후 37°C에서 배양하였다[7]. 선택배지에 첨가한 locust bean gum을 분해하여 colony 주위에 투명환을 형성하는 세균을 선별하였다.

균주의 동정

최종 선별균의 동정은 BIOLOG사의 Bacteria and Yeast Identification System의 실험 결과를 토대로 Bergys Manual of Systematic Bacteriology에 기술되어 있는 세균의 특성을 비교하여 동정하였다[9].

조효소액의 조제

20 ml의 액체배지에서 37°C, 12시간동안 진탕 배양 후 10,000 × g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 배양 상등액을 세포 외 조효소액으로 사용하였다. 이 때 원심분리 과정에 의해 침전한 균체는 인산완충용액(50 mM, pH6.0)으로 2회 세척한 후 동일 완충용액 2 ml로 재 현탁시킨 후 Branson sonifier를 사용하여 균체를 파쇄하였다. 균체 파쇄액은 다시 10,000 × g에서 15분간 원심 분리하여 그 상등액을 세포 내 효소활성을 측정하기 위한 조효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정

β -Mannanase의 효소 활성 측정은 50 mM 인산완충용액(pH 6.0)에 녹인 0.2%(w/v) locust bean gum 용액 0.99 ml에 0.01 ml의 조효소 액을 섞어 구성된 효소반응 혼합물을 50°C에서 30분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS 방법으로 측정하였다[8]. 효소 1 unit은 상기 반응 조건에서 1 분간 1 μ mole의 mannose에 상응하는 환원당을 생산하는 효소 양으로 정의하였다.

Zymogram을 위한 polyacrylamide gel은 0.1%의 locust bean gum을 첨가하여 Laemmli 방법에 따라서 acrylamide를 중합시켜 10% 농도로 제조하여 사용하였다[6]. Non-reducing SDS-PAGE를 하기 위해 균체 배양 상등액 5 μ l를 dithiothreitol을 첨가하지 않은 2 × SDS gel-loading buffer (100 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)를 동일 부피로 넣어주어 전기영동을 하였다. Reducing SDS-PAGE를 하기 위하여 동일한 2 × SDS gel-loading buffer에 dithiothreitol을 최종 농도 100 mM로 첨가하였다. 전기영동을 마친 후 SDS를 제거하기 위해서 0.1 M 인산 완충용액(pH 6.0)에 젤을 담가 실온

에서 1시간동안 천천히 진탕하였다. 젤이 마르지 않도록 비닐 백에 넣어 37°C에서 30분 반응 후, 젤을 1% Congo Red용액으로 15분간 염색하고 1 M NaCl로 젤을 닦아주어 mannan 분해 활성 단백질 밴드를 관찰하였다.

β -Mannanase 유전자의 클로닝

Aeromonas sp.로부터 염색체 DNA를 분리하여 제한 효소 *EcoRI*으로 절단하였다[7]. 전기영동 후 2-10kb 크기의 DNA 절편들을 회수하고, 이 DNA 절편 3 μ g과 *EcoRI*과 calf intestinal phosphatase를 처리한 pBluescriptSK(+) (Stratagene Co.) 1 μ g을 ligation 시켰다. *E. coli* XL1-Blue에 ligation mixture를 electroporation 방법을 사용하여 형질전환 시키고 100 μ g/ml의 앰피실린을 첨가한 선택배지 (tryptone, 1.0%, yeast extract 0.5%, NaCl 1.0%, locust bean gum 0.5%, Bacto-agar 1.5%)에 도달하였다.

결과 및 고찰

균주 분리 및 동정

자연계에서 mannan을 분해할 수 있는 능력을 갖는 세균을 분리하기 위해, 토양시료를 희석하여 선택배지에서 도달함으로써 선택배지에 첨가한 locust bean gum을 분해할 수 있는 세균을 선별하였다. 선택배지에 첨가한 locust bean gum이 미생물의 작용에 의해 분해됨에 따라서 배지 굴절율에 차이가 생겨 colony 주위에 육안으로 확인할 수 있는 투명 환을 형성하는 미생물을 선별하였다. 3종의 선별된 균주 중 가장 명확하게 투명 환을 형성하는 미생물을 선택하여 BIOLOG사의 Bacteria and Yeast Identification System을 이용하여 동정하였다. 그 결과 분리한 균주는 *Aeromonas caviae*와 86% 유사한 것으로 판단되었다. 이 결과에 근거하여 Bergys Manual에 기술되어 있는 *Aeromonas*의 형태적, 생화학적 특성들을 조사하여 본 결과 분리된 균주는 *Aeromonas* sp.로 동정하였다.

Aeromonas sp.에서 mannan 분해 효소의 생산

배양시간에 따른 *Aeromonas* sp.의 β -mannanase 효소 생산량의 변화를 조사하였다. 37°C에서 진탕 배양하면서 각 시간별로 배양액을 원심 분리하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하여 β -mannanase 효소 활성을 측정하였다. 대수성장기 동안 효소활성이 점차 증가하여 본 배양을 시작한 후 12시간에서 1.5 U/ml로서 효소활성이 최대이었고, 이후 효소 활성은 점차 감소하여 30시간 이후에서는 0.5 U/ml의 효소 활성을 보였다(Fig. 1).

Aeromonas sp.의 β -mannanase 효소 생산에 탄소원이 미치는 영향을 조사하였다. LB 배지에 탄소원으로 locust bean gum, carboxymethyl cellulose, glucose, mannose, 그리고 galactose 등을 각각 0.2%농도로 배지에 첨가하여

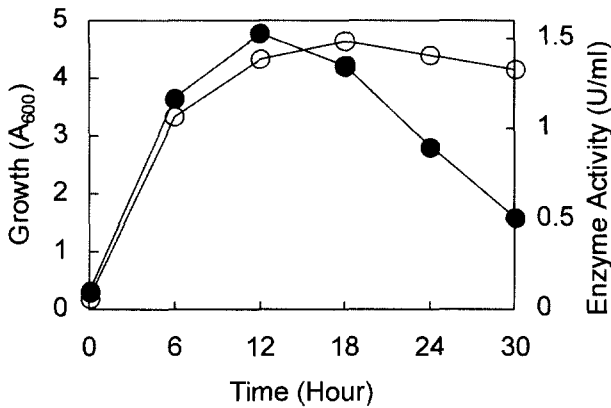


Fig. 1. Time courses of cell growth and β-mannanase activity by *Aeromonas* sp. during cultivation at 37°C in LB medium. For the determination of β-mannanase activity, culture supernatant was used as the source of enzyme.
○; optical density at 600 nm, ●; enzymatic activity.

37°C에서 진탕 배양하고 12시간 후 원심 분리하여 얻은 상등액을 전기영동 후 β-mannanase 효소활성을 보이는 단백질 밴드를 zymogram 방법을 이용하여 확인하였다. LB배지에서 배양한 균체의 상등액을 사용하여 전기영동하였을 때 200, 145, 120, 52 kDa크기의 4종류의 단백질 밴드가 관찰되었다(Fig. 2). 탄소원으로서 locust bean gum, carboxymethyl cellulose, mannose, 그리고 galactose 등을 각각 0.2% 농도로 LB배지에 첨가하여 배양한 배양액을 이용한 zymogram에서는 LB배지에서 배양한 균체의 상등액에서 관찰되는 것과 유사한 형태의 β-mannanase 단백질 밴드를 관찰할 수 있었다. 그러나 glucose를 첨가하여 배양한 균체의 상등액에서는 β-mannanase 활성을 나타내는 단백질 밴

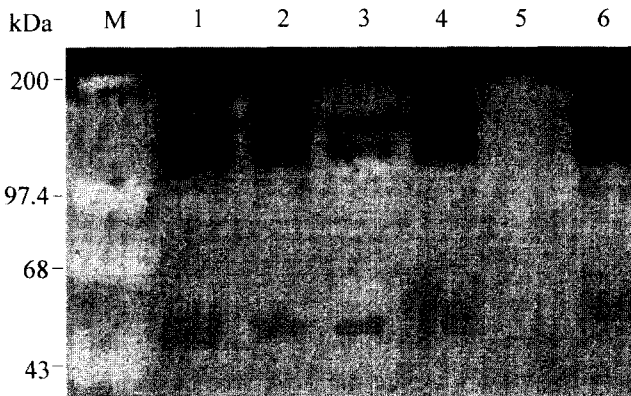


Fig. 2. β-Mannanases from *Aeromonas* sp. analyzed by nonreducing SDS-PAGE using zymogram of culture supernatants. The cultures were grown in LB for 12 hrs at 37°C with no addition (lane 1) or supplemented (0.2%) with LBG (lane 2), CMC (lane 3), galactose (lane 4), glucose (lane 5), and mannose (lane 6). Prestained molecular weight standards are shown in lane M.

드를 관찰 할 수 없었다. 이는 *Aeromonas* sp가 glucose에 의해 β-mannanase 생산이 저해된다고 판단된다. Stoll 등은 mannose, galactose, xylan 그리고 glycerol 등을 배지에 첨가할 때 *Cellulomonas fimi*에서 β-mannanase 생산이 저해된다고 보고하였다[11].

β-Mannanase 유전자의 클로닝

Aeromonas sp의 β-mannanase 유전자를 클로닝하기 위해 *Aeromonas* sp의 염색체 DNA를 제한효소 *EcoRI*으로 절단 후 동일제한효소와 calf intestinal phosphatase를 처리한 Stratagene사의 pBluescriptSK(+)와 ligation을 하였다. *E. coli* XL1-Blue에 ligation mixture를 electroporation 방법으로 형질전환 시킨 후 100 μg/ml의 암피실린과 0.5%의 locust bean gum을 첨가한 LB배지에 도말하였다. 형질전환 후 18시간이 지나서 선택배지에서 locust bean gum을 분해하여 대장균 주위에서 투명환을 형성하는 콜로니를 선별할 수 있었다. 형질전환되어 선택배지에서 투명환을 형성하는 대장균으로부터 재조합 플라스미드를 분리하여 *EcoRI* 제한효소를 처리한 결과 10 kb의 *Aeromonas* sp. 염색체 DNA가 pBluescriptSK(+) 플라스미드에 삽입되어 있음을 확인하였고, 재조합 플라스미드를 pSK-Man10으로 명명하였다(Fig. 3). 분리한 재조합 플라스미드 pSK-Man10을 대장균에 재 형질전환하였을 때, locust bean gum이 들어있는 선택배지에서 형질 전환 된 대장균 주위에서 투명 환을 형성하게 함으로써 pSK-Man10 플라스미드에 삽입되어 있는 10kb 크기의 *Aeromonas* sp. 염색체 DNA는 mannanase 유전자를 포함하고 있음을 재확인하였다.

β-Mannanase 효소의 세포 내 외 분포량

Aeromonas sp.와 *E. coli*(pSK-Man10)에서 생산된 β-

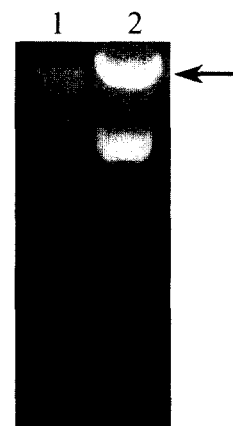


Fig. 3. *EcoRI*-restriction enzyme digestion of the plasmid prepared from halo-forming *E. coli* transformant. Lane 1, 1 kb plus DNA ladder as a size markers; Lane 2, 10 kb *Aeromonas* sp. chromosomal DNA insert indicated by arrow.

Table 1. β -Mannanase activities of *Aeromonas* sp. and recombinant *E. coli* (pSK-Man10)

Bacterial strains	Extracellular activity (U/ml)	Intracellular activity (U/ml)
<i>Aeromonas</i> sp.	1.50	0.01
<i>E. coli</i> (pSK-Man10)	0.42	0.02

mannanase의 세포 내외 분포를 조사하였다. *Aeromonas* sp.는 그람 음성세균임에도 *Aeromonas* sp.에서 생성되는 β -mannanase 효소의 98%는 세포 외로 분비되고 있었고, 또한 대장균에서 발현된 β -mannanase 효소도 *Aeromonas* sp.와 유사한 양상으로 96%가 세포 외로 분비되었다 (Table 1). 이 때 대장균에서 세포 외로 분비된 β -mannanase 효소의 활성은 0.45 U/ml로서 *Aeromonas* sp.의 β -mannanase 유전자가 대장균에서 높은 copy number를 갖는 pBluescriptSK(+) 플라스미드에서 발현됨에도 불구하고 *Aeromonas* sp.의 1.5 U/ml 보다 효소활성이 낮은 것으로 측정되었다. 이는 *Aeromonas* sp.에서 유래한 유전자가 발현 기작의 상이성 때문에 대장균에서 발현이 효율적으로 이루어지지 않기 때문인 것으로 추정된다.

앞으로 진행될 β -mannanase 유전자 염기서열 분석에 의해 β -mannanase에 존재하는 signal sequence의 구조를 밝힐 수 있을 것으로 기대된다. 이를 근거로 대장균의 세포 외로 단백질을 효율적으로 분비할 수 있는 단백질 분비 vector의 개발 등에도 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

Nonreducing SDS-PAGE를 이용한 β -mannanase의 활성 확인

LB 배지에서 배양한 *Aeromonas* sp.의 상등액과 *E. coli* (pSK-Man10)의 상등액을 전기영동 하여 전개한 후 β -

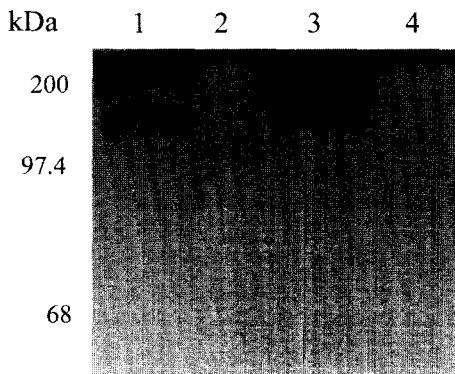


Fig. 4. Effect of dithiothreitol on β -mannanases from *Aeromonas* sp. and *E. coli* (pSK-Man10). Culture supernatants of *Aeromonas* sp. and *E. coli* (pSK-Man10) were resolved by 10% SDS-PAGE in the absence (lane 1, *Aeromonas* sp., lane 3, *E. coli* (pSK-Man10)) and the presence (lane 2, *Aeromonas* sp.; lane 4, *E. coli* (pSK-Man10)) of 0.1 M DTT.

mannanase의 효소 활성을 zymogram 으로 확인하였다. *E. coli*(pSK-Man10)의 상등액에 의해 locust bean gum의 분해능을 보이는 단백질 밴드는 *Aeromonas* sp.의 상등액에서 확인되는 것과 유사한 양상을 보였다(Fig. 4). 대장균에 클로닝된 *Aeromonas* sp.의 염색체 DNA는 10 kb로서 사이즈가 크지만, 10 kb 크기의 염색체 DNA에 의해서 zymogram 분석에 의해 보이는 크기의 단백질들을 모두 생산할 가능성은 없는 것으로 판단된다. 따라서 *Aeromonas* sp.와 *E. coli* (pSK-Man10)의 상등액에서 관찰되는 다양한 크기의 mannan 분해 활성을 보이는 단백질 밴드들은 β -mannanase isozyme들일 가능성보다는 한 종류의 β -mannanase가 서로 결합하여 multimer를 형성한 형태이거나 또는 이들 multimer가 protease의 작용을 받아 부분적으로 분해된 산물일 가능성이 크다. 단백질이 multimer 형태로 존재하지 못하도록 sample loading buffer에 dithiothreitol을 100 mM 농도로 첨가하여 reducing SDS-PAGE 조건에서 전기영동을 수행하면 *Aeromonas* sp.와 *E. coli*(pSK-Man10) 균체 배양 상등액 모두 β -mannanase의 효소활성을 갖는 단백질 밴드를 관찰 할 수 없는 것으로 보아 위와 같은 추측을 가능케 한다. 따라서 *Aeromonas* sp.의 β -mannanase는 monomer로서는 작용을 하지 못하고 dimer

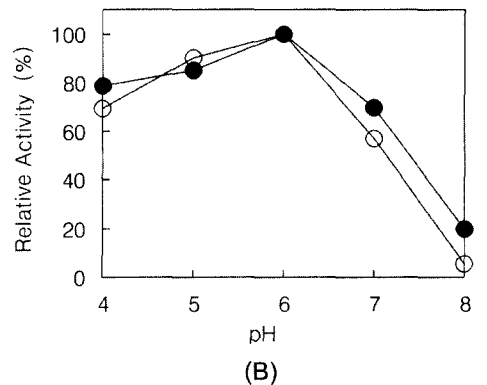
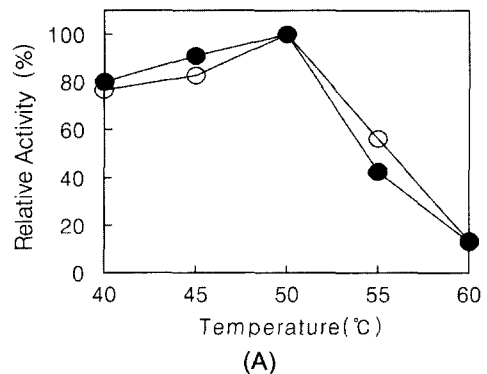


Fig. 5. Effects of temperature (A) and pH (B) on the β -mannanase activities produced in *Aeromonas* sp. (○) and *E. coli* (pSK-Man10) (●).

혹은 그 이상의 multimer를 구성할 때만 작용하는 것으로 판단된다. 이 결과는 추 후 진행될 β-mannanase 유전자의 subcloning 실험과 염기서열 결정실험 그리고 이 정보를 이용한 대장균에서 β-mannanase 단백질의 발현 실험 등에 의해 명확히 밝혀질 것으로 예상된다.

β-Mannanase 효소의 최적 온도 및 최적 pH

Aeromonas sp.에서 생산된 β-mannanase와 *E. coli*(pSK-Man10)에 의해 생산된 β-mannanase의 최적 반응 온도 및 pH를 이들 미생물의 배양 상등액을 조효소액으로 사용하여 비교 검토하였다(Fig. 5). 모균인 *Aeromonas* sp.와 형질전환된 *E. coli* 에서 만들어진 β-mannanase의 최적 반응 온도 및 최적 pH는 동일한 양상을 보였으며, 이들의 값은 각각 50°C와 pH 6.0이었다.

요 약

자연계로부터 locust bean gum이 들어 있는 선택배지에서 투명환을 형성하는 mannan 분해능을 갖는 미생물을 스크리닝 하였고 이를 *Aeromonas* sp.로 동정하였다. *Aeromonas* sp.로부터 염색체 DNA를 분리하여 *EcoRI*로 절단하여 대장균에 형질전환한 후 대장균 콜로니 주위에서 locust bean gum을 분해하여 투명환을 형성하는 대장균을 찾아냈다. 형질전환된 대장균으로부터 플라스미드를 분리하여 동일한 제한효소를 처리하여 확인한 결과 10kb의 *Aeromonas* sp. 염색체 DNA에 β-mannanase 유전자가 존재하였다. 대장균에서 발현된 β-mannanase의 최적 반응 pH와 최적 반응온도는 각각 6.0과 50°C로서 모균인 *Aeromonas* sp.와 동일하였다.

감사의 말

본 연구는 2001년 배재대학교 교내연구비에 의해 수행된 과제로 연구비지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Araujo, A. and O. P. Ward. 1990 Hemicellulases of *Bacillus* species: preliminary comparative studies on production and properties of mannanase and galactanase. *J. Appl. Bacteriol.* **68**: 253-261.
 2. Arcand, N., D. Kluepfel, F. W. Paradis, R. Morosoli, and F. Sharek. 1993. β-Mannanase of *Sreptomycetes lividans* **66**:

cloning and DNA sequencing of the *manA* gene and characterization of the enzyme. *Biochem. J.* **290**: 857-863.
 3. Bolam, D. N., N. Hughesw, R. Virden, J. H. Lakery, G. P. Hazlewood, B. Henrissat, K. L. Braithwaite, and H. J. Gilbert. 1996. Mannanase A from *Pseudomonas fluorescense* subsp. *cellulosa* is a retaining glycosyl hydrolase in which E12 and E320 are the putative catalytic residues. *Biochemistry* **35**: 16195-16204.
 4. Ethier, N., G. Talbot, and J. Sygusch. 1998. Gene cloning, DNA sequencing, and expression of thermostable -mannanase from *Bacillus stearothermophilus* *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4428-4432.
 5. Halstead, J. R., M. P. Fransen, R. Y., Eberhart, A. J. Park, H. J. Gilbert, and G. P. Hazlewood. 2000. α-Galactosidase A from *Pseudomonas fluorescense* subsp. *cellulosa*: cloning, high level expression and its role in galactomannan hydrolysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**: 197-203.
 6. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 7. Lee, J. K., Y. O. Kim, H. K. Kim. Y. S. Park, and T. K. Oh. 1996. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Thermoactinomyces* sp. E79 and the DNA sequence of the encoding gene. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 840-846.
 8. Miller, G. L. 1959. use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 9. Popoff, M., 1984. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1 Krieg, N. R., and J. G. Holt (ed.), Williams and Wilkins, Baltimore, p. 545-548.
 10. Puls, J. and J. Schuseil. 1996. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis, p. 1-28. In Coughlan M. P., and G. P. Hazlewood (ed.), *Hemicelluloses and hemicellulases*. Portland Press, London, England.
 11. Stoll, D., H. Stalbrand, and R. A. J. Warren. 1999. Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2598-2605.
 12. Sunna, A., Gibbs, M. D., Chin, W. J., Nelson, P. J., and Bergquist, P. L. 2000. A gene encoding a novel multidomain β-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 664-670.
 13. Talbot, G., and J. Sygusch. 1990. Purification and characterization of thermostable β-mannanase and α-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3505-3510.

(Received Sep. 22, 2001/ Accepted Oct. 24, 2001)