

β-Mannanase를 생산하는 *Bacillus subtilis* JS-1의 분리 및 효소 생산성

임지수 · 정진우 · 이종수 · 강대경¹ · 김하근*
배재대학교 생명과학부, ¹이지바이오시스템 생물자원연구소

Optimization of β-mannanase Production from *Bacillus subtilis* JS-1. Yim, Jee-Soo, Jin-Woo Jung, Jong-Soo Lee, Dae-Kyung Kang¹, and Ha-Kun Kim*. Division of Life Science and BioMed RRC, Pai Chai University, Daejon 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 *Bacillus subtilis* by 16S rRNA sequence comparison and biochemical determinations. The optimum pH and temperature for the β-mannanase activity were 5.0 and 55°C, respectively. The zymogram technique revealed a single protein band exhibiting β-mannanase activity from the culture supernatant. The molecular mass of the enzyme was estimated at approximately 130 kDa. The addition of 0.5% lactose or 0.5% locust bean gum to the LB medium caused to increase significantly the β-mannanase productivity from *Bacillus subtilis* JS-1. The cells grown on LB medium supplemented with lactose produced maximal enzyme activity at the stationary phase. In contrast to this, the β-mannanase was induced at the logarithmic phase from the cells grown on LB medium supplemented with locust bean gum. The discrepancy in induction times suggests that β-mannanase was induced by different induction mechanisms depending on the carbon sources in *Bacillus subtilis* JS-1.

Key words: *Bacillus subtilis*, β-mannanase, zymogram, lactose induction

자연계에 풍부하게 많이 존재하는 다당류 중의 하나인 hemicellulose는 식물의 세포벽에서 cellulose와 lignin을 연결하는 linker 역할을 하고 있고, 중요한 hemicellulose로는 xylan과 mannan을 들 수 있다. Mannan의 구조는 mannose 잔기들이 β-1,4 결합되어 있는 것을 기본 골격으로 하고 있고 O-acetylgalactoglucomannan은 glucose가 mannose와 무작위로 β-1,4 결합되어 있고 mannose의 2, 3번째 hydroxyl기가 acetylation되어 있거나 galactose 가 mannose와 α-1,6 결합을 통해 연결되어 있다. 또한 galactomannan은 기본 골격을 이루는 mannose에 galactose가 α-1,6 결합을 통해 연결되어 있다. Mannan의 생물학적 분해는 β-mannanase의 작용에 의해 mannan polymer의 β-1,4 mannosidic linkage가 기수분해되어 짧은 길이의 올리고당이 생성된다. 생성된 올리고당은 β-mannosidase의 작용에 의해 더욱 짧은 길이의 당으로 전환된다[14, 15]. 지금까지 mannan을 분해하는 효소들의 생산이 여러 세균, 균류 및 식물 등에서 보고되고 있다. 특히 세균의 β-mannanase는 *Bacillus* sp., *Streptomyces lividans*, *Pseudomonas fluorescens* subsp. *celulosa*, *Caldibacillus cellulovorans* 등에서 유전자가 분리되어 이들의 염기서열 분석을 통해 이로부터 유추한 아미노산 서열의 비교에 의해 이들 효소들이 주로 glycosyl hydrolase 의 5번 family와 26번

family에 속한다는 것이 밝혀졌다[3, 4, 10, 16].

최근 생물 공학적으로 mannanase의 유용성이 pulp bleaching[17], 커피생산[2] 등의 분야에서 소개되고 있다. 이밖에도 콩과식물에서 유래한 사료자원 중 가축사료의 단백질원으로 가장 많이 사용되고 있는 대두박은 antinutritional factor로 작용하는 내열성 mannan을 함유하고 있어 사료 효율을 저하시키기 때문에 β-mannanase를 이용하여 galactomannan을 분해함으로써 사료효율을 증진시키는 사료첨가제로 사용되고 있다[8, 13].

본 연구에서는 locust bean gum 분해효소를 생산하는 균주를 자연계에서 분리하였고 동정실험을 통하여 이를 *Bacillus subtilis*로 확인하였다. 지금까지 *Bacillus* 속이 생산하는 것으로 보고된 β-mannanase 효소들과 분자량이 다른 신규 β-mannanase 효소가 분리균주로부터 생산됨을 확인하였고, 또한 분리 균주인 *Bacillus subtilis* JS-1은 배지 조성 성분에 의해 영향을 받아 세포 외로 분비되는 β-mannanase의 생산성이 크게 달라짐을 관찰하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배양

자연계에서 β-mannanase를 생산하는 미생물을 분리하기 위해 토양시료 1 g을 중류수 10 ml에 혼탁하고 65°C에서 10 분간 열처리 후, 그 혼탁액 적당량을 0.5%의 locust bean gum을 첨가한 LB 평판 배지(bacto-tryptone, 10 g; yeast

*Corresponding author
Tel. 82-42-520-5389, Fax. 82-42-520-5385
E-mail: hakun@mail.pcu.ac.kr

extract, 5 g; NaCl, 10 g; locust bean gum, 5 g; Bacto-agar 15 g per liter, pH 7.0)에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 평판배지에 첨가한 locust bean gum을 분해하여 콜로니 주위에 투명환을 형성하는 세균을 선별하였다. 또한 분리 균주의 배양조건을 검토하기 위한 배지는 LB broth를 기본 배지로 사용하였고, 필요 시 탄소원을 따로 멸균하여 첨가하였다. 균주의 생육은 분광광도계(Shimadzu, UV-2401PC)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 조사하였다.

분리 균주의 동정

분리 균주의 동정은 분리 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 조사한 후 이를 기초로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 기술되어 있는 *Bacillus subtilis*의 형태적, 생화학적 특성들을 참조하여 수행하였다[5]. 분리균의 16S rRNA 유전자 단편을 PCR 반응으로 증폭하려고 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열을 primer로 합성하였다(9F, 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG; 926R, 5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGR TT). PCR 반응에 사용할 주형 DNA는 평판배지에서 형성한 콜로니를 이쑤시개로 취하여 균체를 직접 PCR 반응 튜브에 넣어 사용하였다. PCR 반응은 10 mM Tris(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP로 구성된 반응물 100 μl에 50 pmol primers와 Taq DNA polymerase 5U를 사용하여 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 2분으로 이루어진 과정을 30번 반복함으로써 16S rRNA의 유전자를 증폭하였다. PCR 반응물을 전기영동 하여 증폭된 DNA 단편을 QIAEXII gel extraction kit로 회수하였고 이를 주형으로 하여 PCR 반응에 이용한 primer들과 함께 DNA 염기서열 결정에 사용하였다.

주효소액의 조제 및 효소활성 측정

20 ml의 LB 액체배지에 여러 종류의 탄소원을 따로 별균하여 첨가한 배지에서 전 배양액 1%를 접종하여, 37°C에서 30시간동안 진탕 배양하였다. 배양액을 10,000×g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 배양 상등액을 β -mannanase 활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다. β -Mannanase의 효소 활성 측정은 50 mM 인산완충용액(pH 5.0)에 녹인 0.2%(w/v) locust bean gum 용액 0.99 ml에 0.01 ml의 조효소 액을 섞어 구성한 효소반응 혼합물을 55°C에서 30분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS 방법으로 측정하였다[11]. 효소 1 unit은 상기 반응 조건에서 1분간 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 6% 농도로 제조하여 사용하였다[9]. Nonreducing 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 실온에서 1시간동안 천천히 진탕하였다. 젤이 마르지 않도록 비닐 백에 넣어 37°C에서 30분 반응 후, 젤을 1% Congo Red 용액으로 15분간 염색하고 1 M NaCl로 젤을 닦아주어 mannan 분해 활성 단백질 밴드를 관찰하였다.

결과 및 고찰

β-Mannanase 생산균주의 분리 및 동정

자연계에서 β -mannanase 활성이 우수한 세균을 분리하기 위해, 토양시료를 희석하여 열처리 후 locust bean gum이 들어 있는 평판배지에 도말하여 콜로니 주위에 투명환을 형성하는 세균을 탐색하였다. 분리한 세균의 동정을 위해 16S rRNA 유전자의 일부분을 PCR 반응으로 증폭하여 DNA 염기서열을 결정하였다(Fig. 1). 분리균의 16S rRNA 염기서열의 일부분을 NCBI의 BLAST 프로그램을 사용하여 상동성을 조사하여 본 결과 *Bacillus* 속에서 보고된 염기서열과 높은 상동성을 보였다. 비교한 840개의 염기 중 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*와 838개의 염기가 일치하여 99.0%의 상동성을 보였다(data not shown). 분리 균주는 그 탐양성이었고, catalase, Voges-Proskauer, citrate 이용 능력, pH 5.7의 Sabouraud dextrose agar에서의 성장 등에서 양성 반응을 나타냈다. 분리 균주의 cellulase와 amylase 분비 능력을 확인하기 위해 LB 배지에 0.5% carboxymethyl cellulose 와 0.5% starch를 첨가한 배지에서 각각 배양하여 확인한 결과 분리 균주는 starch를 분해하였으나 carboxymethyl cellulose는 분해하지 못하였다. 또한 API 50 CHB kit를 이용하여 당분해능을 조사한 결과 glycerol, L-arabinose, ribose, D-

Fig. 1. Nucleotide sequence of the partially amplified 16S rRNA gene from *Bacillus subtilis* JS-1 by PCR.

xylose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, mannositol, sorbitol, α -methyl-D-glucoside, amygdalin, arbutine, esculine, salicine, cellobiose, maltose, melibiose, sucrose, trehalose, inuline, D-raffinose, starch, glycogen, D-turanose 등을 이용할 수 있었으며, 이 결과는 *Bacillus subtilis*의 특성과 매우 유사하였고 따라서 분리 균주는 *Bacillus subtilis*로 동정되었다[5].

탄소원이 β -mannanase 생산성에 미치는 영향

*Cellulomonas fimi*의 β -mannanase 생산이 mannose, galactose, xylan 그리고 glycerol 등에 의해 저하되고[15], 내염성 *Bacillus* sp. NN에서 locust bean gum에 의해 효과적으로 효소 합성이 유도되었으나 mannose, galactose, 그리고 glycerol 등의 탄소원은 β -mannanase 생산에 비효율적이라는 보고들이 있다[19]. 따라서 *Bacillus subtilis* JS-1이 성장하는 동안 탄소원이 β -mannanase 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 LB 액체배지를 기본배지로 하여 galactose, glucose, mannose, mannositol, lactose, sucrose, maltose, carboxymethyl cellulose, locust bean gum, starch 등을 0.5%(w/v) 농도가 되도록 첨가하여 *Bacillus subtilis* JS-1 전 배양액을 1% 접종하여 37°C에서 30시간 진탕 배양하여 배양상등액의 β -mannanase 효소 활성을 측정하였다(Table 1). 이 때 단당류와 이당류 탄소원들은 LB 액체 배지와 분리하여 따로 멀균하여 첨가하였다. 부가 탄소원들은 *Cellulomonas fimi*에서 보고된 바와는 달리 galactose, glucose, mannose, mannositol, sucrose, maltose 등은 *Bacillus subtilis* JS-1의 β -mannanase 생산성에 큰 영향을 미치지 않았다. 그러나 이당류인 lactose를 첨가하였을 때 배양 상등액의 효소 활성은 대조구에 비해 12.5배(30 U/ml) 증가하였고, locust bean gum에 의해서는 약 18배(43.2 U/ml) 증가함을 발견하였다. 효소 생산성이 lactose에 크게 증가되는 현상이 lac repressor에 의한 negative control의 영향에 의해 이루어질 가능성을 확인하기 위해 배지에 1 mM의 isopropyl-

thio- β -D-galactopyranoside를 넣어 30시간 배양 후 효소활성을 측정한 결과 효소 활성은 2.4 U/ml로 대조구와 차이가 없었다. 분리균주는 API 50 CHB kit를 이용하여 당 분해 능력을 조사하였을 때 lactose를 이용하지 못하는 것으로 판정이 났음에도 불구하고, lactose가 분리균주에서 효율적으로 β -mannanase 생산성을 증가시키는 현상은 유전자 클로닝 등의 실험을 통해 프로모터 분석 등의 좀더 상세한 연구가 이루어져야 설명할 수 있을 것이다.

부가 탄소원 중 효소 생산성을 증가시키는 효과가 가장 높은 lactose와 locust bean gum의 농도를 0.1%부터 2%까지 변화시켜 이들 당 농도 변화에 따른 *Bacillus subtilis* JS-1의 β -mannanase 생산성을 조사하였다(Table 2). 30시간 배양 후 배양상등액의 효소 활성을 측정하였을 때 lactose와 locust bean gum 모두 0.5%에서 최대 효소생산성을 보였다. 액체 배지에 locust bean gum의 농도가 1.0% 이상 되면 locust bean gum의 점도가 높아져서 gel 상태를 보이는데, 2.0%의 locust bean gum을 첨가한 배지에서도 분리균주의 성장이 이루어짐에 따라 점도가 감소하므로 분리균주는 locust bean gum을 효율적으로 분해하는 것으로 판단된다.

Bacillus subtilis JS-1이 생산하는 β -mannanase 효소의 특성

세균이 생산하는 β -mannanase의 분자량은 다양하여 *Bacillus subtilis*[10], *Bacillus* sp. KK01[7], *Streptomyces lividans* 66[3], *Vibrio* sp.[18] 등에서 40 kDa 근처의 효소들이 보고되어 있고, *Bacillus stearothermophilus*로부터는 74 kDa[6], 또한 이들과 달리 137 kDa과 142 kDa의 비교적 분자량이 큰 효소가 *Enterococcus casseliflavus*에서 보고되어 있다[12]. 따라서 *Bacillus subtilis* JS-1이 생산하는 β -mannanase의 분자량과 isozyme 존재 유무를 확인하기 위해 배양 상등액을 전기영동한 후 zymogram 분석방법으로 β -mannanase 효소활성을 보이는 단백질을 확인하였다. Zymogram 분석을 위해 LB 배지에 탄소원으로 lactose, locust bean gum을 각각 0.2% 농도로 배지에 첨가하여 37°C에서 진탕 배양하고 30시간 후 원심 분리하여 얻은 배양 상등액을 전기영동 하였다. 탄소원의 종류와 상관없이

Table 1. Effects of various carbon sources on the β -mannanase production from *Bacillus subtilis* JS-1.

Carbon sources (0.5%)	Enzyme activity (U/ml)	Relative activity (fold)
none	2.4	1
galactose	2.2	0.91
glucose	2.1	0.88
mannitol	1.8	0.76
mannose	2.2	0.94
lactose	30	12.5
maltose	2.3	0.97
sucrose	1.6	0.67
carboxymethyl cellulose	4.3	1.80
locust bean gum	43.2	18.0
starch	2.5	1

Table 2. Effects of variation in carbon concentration on the β -mannanase production from *Bacillus subtilis* JS-1.

concentrations	Relative activity (fold)	
	lactose	locust bean gum
none	1	1
0.1	9.8	14.4
0.3	10.0	14.1
0.5	12.5	18.6
0.7	11.0	18.0
1.0	10.9	16.6
2.0	9.5	16.7

zymogram 결과 분리균주의 상동액에서 동일한 130 kDa 크기의 단일 β -mannanase 단백질만이 관찰되었다(Fig. 2). 또한 전기영동에 사용한 sample loading buffer에 환원제인 dithiothreitol을 첨가하였을 때도 활성이 있는 β -mannanase 단백질의 크기가 변화하지 않는 것으로 미루어 보아 *Bacillus subtilis* JS-1은 *Bacillus* sp. KK01[7]에서 보고 된 것처럼 isozyme이 아닌 단일 종류의 β -mannanase를 생산하며 이 효소는 monomer 구조로써 locust bean gum 기질에 대한 효소활성을 나타내는 것으로 판단된다.

효소가 작용하는데 있어서 반응최적온도를 조사하였다. 배양 상동액을 40°C부터 65°C의 다른 온도에서 반응시켰을 때 55°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3). *Bacillus subtilis* JS-1이 생산하는 β -mannanase 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 pH 3.0에서 8.0까지의 완충용액을 이용하여 효소 활성을 측정하였다(Fig. 4). 호알카리성 *Bacillus*를 제외하고는 대부분의 세균 유래 β -mannanase 효소는 중성 혹은 약산성 조건에서 최대 활성을 보인다[1]. 분

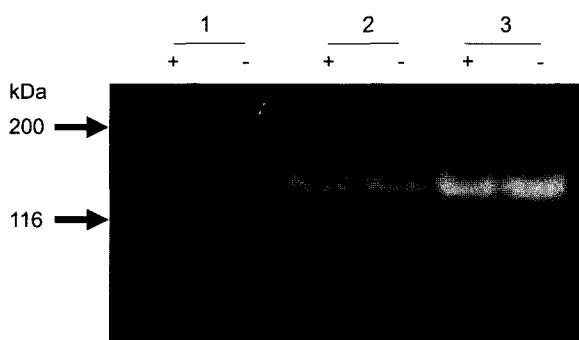


Fig. 2. β -Mannanase from *Bacillus subtilis* JS-1 analyzed by nonreducing SDS-PAGE using zymogram of culture supernatants. The cultures were grown in LB for 30 hrs at 37°C with no addition (lane 1) or supplemented with 0.5% lactose (lane 2), 0.5% locust bean gum (lane 3). Symbol (-) denotes the absence and (+) denotes the presence of 0.1 M dithiothreitol in gel loading buffer.

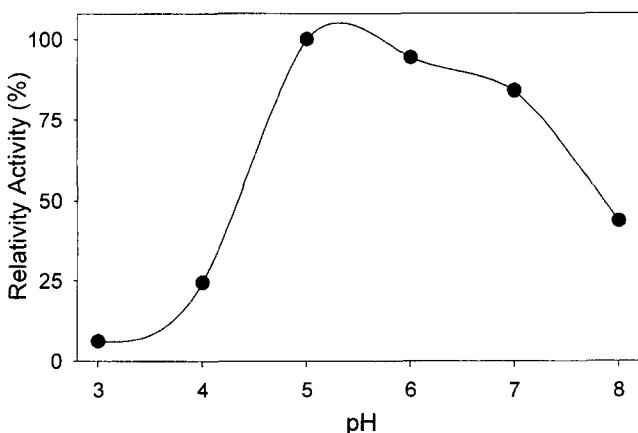


Fig. 3. Effects of reaction pH on the mannanase activity. The reaction was done at 55°C and various pHs for determining the pH profile.

리 균주가 생산하는 효소활성은 pH 5.0에서 가장 높은 효소 활성을 나타내었고 pH 4.0에서는 최대 효소 활성의 약 25%를 보였으나 중성에서는 85% 이상의 높은 활성을 나타내어 다른 중온성 세균이 생산하는 효소의 특성과 유사하였다.

배양시간에 따른 균체의 성장 및 효소 생산량 변화

Bacillus subtilis JS-1을 진탕 배양하였을 때 배양시간별 균체 성장과 이에 따라 합성된 β -mannanase 활성을 조사하였다. 전 배양액 1%를 배지에 접종하여 37°C에서 진탕 배양하면서 일정 시간별로 미생물을 취하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 미생물의 성장을 관찰하였고, 배양 상동액의 β -mannanase 효소활성을 측정하여 효소 생산성을 조사하였다. 균체의 생육은 탄소원을 첨가하지 않은 LB액체 배지와 0.5%의 lactose를 첨가한 액체배지에서 큰 차이를 보이지 않고 유사하게 이루어져 배양 시작 21시간 전후에서 $OD_{600} = 4.5$ 에 이르는 최대 흡광도를 보였다(Fig. 5A). 그러나 0.5%의 locust bean gum을 첨가한 배지에서는 36시간에서도 성장이 계속 이루어져서 $OD_{600} = 6.0$ 이상을 나타내었다(data not shown). 이는 분리균주가 locust bean gum을 계속적으로 분해하여 에너지원으로 사용하기 때문인 것으로 판단된다.

배양 상동액의 β -mannanase 효소활성유도는 lactose를 첨가한 배지에서는 배양 상동액의 β -mannanase 효소활성은 대수성장기가 끝나고 정지기에 이르는 시점인 27시간에서 30 U/ml로 최대를 나타내고 이후 36시간까지 유사한 활성을 보였다(Fig. 5B). 이외는 달리 locust bean gum을 첨가한 배지에서 대수성장기인 6시간부터 본격적으로 이루어지기 시작하여 30시간 전후에서 약 45 U/ml로 최대치를 보였으나 효소 활성은 배양 전 과정을 통해 유사한 활성을 보였다(data not shown). 따라서 β -mannanase 효소의 기질인 locust bean gum과 분리균주가 분해하지 못하는 이당류인 lactose에 의해 β -mannanase 가 유도되는 기작은 다를 것으로

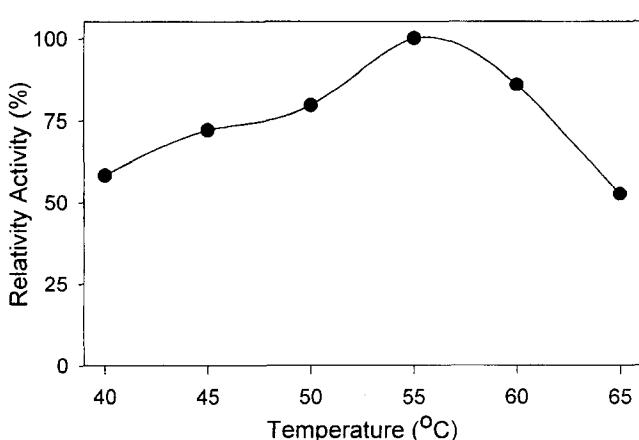


Fig. 4. Effects of reaction temperature on the mannanase activity. The reaction was done at pH 5.0 and different temperatures.

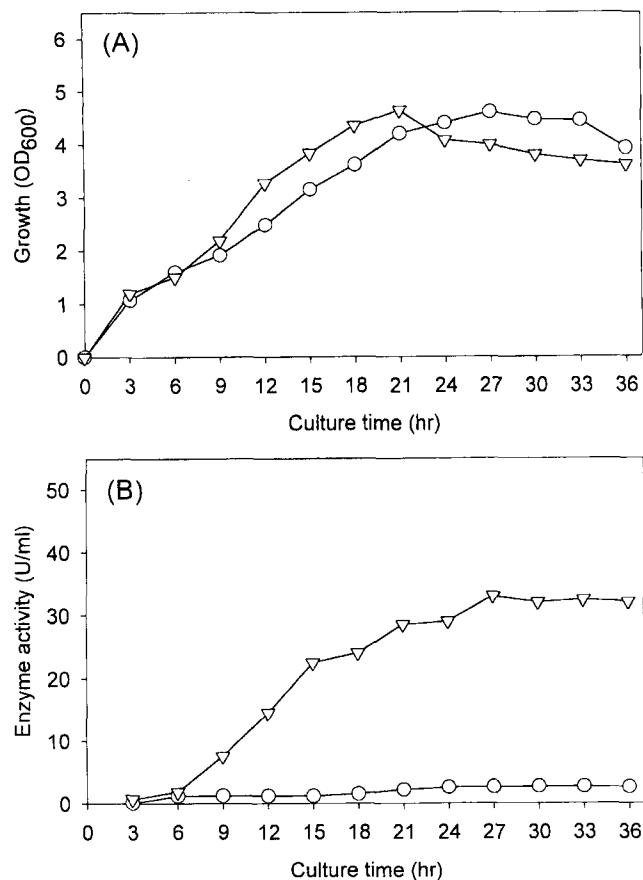


Fig. 5. Growth (A) and mannanase production (B) of *Bacillus subtilis* JS-1. *Bacillus subtilis* JS-1 were grown respectively in LB broth (-▽-) and LB broth supplemented with 0.5% lactose (-○-) at 37°C with vigorous shaking. The cell growth was determined by measuring the absorbance of the cell cultures at 600 nm. Mannanase activities were determined with the culture supernatants.

로 추정되고, 상세한 유도 기작은 추가적인 연구를 필요로 한다.

요 약

토양으로부터 β -mannanase 활성이 우수한 균주를 분리하여 형태학적, 생화학적 동정과정을 거쳐 *Bacillus subtilis* JS-1으로 동정하였다. 분리균이 생산하는 β -mannanase 효소의 최적활성은 55°C와 pH 5.0이었다. 탄소원이 다른 배지에서 배양한 분리 균주의 상동액을 전기영동하여 효소활성을 관찰한 결과 탄소원에 상관없이 분자량 130 kDa에 해당하는 단일 단백질만이 효소 활성을 나타내었다. *Bacillus subtilis* JS-1은 탄소원으로 lactose와 locust bean gum이 존재할 때 β -mannanase 생산성이 크게 증가하는 것으로 나타났으며, lactose와 locust bean gum이 각각 0.5 % 존재할 때 배양 상동액의 β -mannanase 활성은 30U/ml과 45U/ml로 탄소원이 없는 대조구에 비해 최대 18배 정도 생산성이 증가하였

다. 배지에 locust bean gum을 첨가하였을 때 효소 생산성뿐만 아니라 균체의 성장도 함께 증가하는 것으로 보아 분리균주는 locust bean gum을 분해하여 에너지원으로 이용하는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 배재대 지역협력연구센터(Bio-Med RRC, Pai Chai University) 과제로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Akino, T., Nakamura, N., and Horikoshi, K. Characterization of three β -mannanase of an alkalophilic *Bacillus* sp. 1988. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 773-779.
- 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.
- Arcand, N., D. Kluepfel, F. W. Paradis, R. Morosoli, and F. Sharek. 1993. β -Mannanase of *Sreptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequencing of the *manA* gene and characterization of the enzyme. *Biochem. J.* **290**: 857-863.
- 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 fluorescens* subsp. *cellulosa* is a retaining glycosyl hydrolase in which E12 and E320 are the putative catalytic residues. *Biochemistry* **35**: 16195-16204.
- Claus, D. and R. C. W. Berkeley 1986. Genus *Bacillus*, pp. 1105-1139. In Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergy's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Ethier, N., G. Talbot, and J. Sygusch. 1998. Gene cloning, DNA sequencing, and expression of thermostable β -mannanase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4428-4432.
- Hossain, M. Z., J. Abe, and S. Hizukuri. 1996. Multiple forms of β -mannanase from *Bacillus* sp. KK01. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 95-98.
- Jackson, M. E., D. W. Fodge, and H. Y. Hsiao. 1999. Effects of β -mannanase in corn-soybean meal diets on laying hen performance. *Poult. Sci.* **78**: 1737-1741.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- 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.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for

- determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- 12. Oda, Y., T. Komaki, and K. Tonomura. 1993. Purification and properties of extracellular β -mannanase produced by *Enterococcus casseliflavus* F12121 isolated from decayed konjac. *J. Ferment. Bioeng.* **76**: 14-18.
 - 13. Odetallah, N. H., P. R. Ferket, J. L. Grimes, and J. L. McNaughton. 2002. Effect of mannan-endo-1,4- β -mannosidase on the growth performance of turkeys fed diets containing 44 and 48% crude protein soybean meals. *Poult. Sci.* **81**: 1322-1331.
 - 14. Park, B. H., D. K. Kang, and H. K. Kim. 2001. Cloning of β -mannanase gene from *Aeromonas* sp. in *E. coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 201-205.
 - 15. Stoll, D., H. Stalbrand, and R. A. J. Warren. 1999. Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2598-2605.
 - 16. Sunna, A., M. D. Gibbs, W. J. Chin, P. J. Nelson, and P. L. Bergquist. 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.
 - 17. 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.
 - 18. Tamuru, Y., T. Araki, T. Morishita, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 1997. Cloning, DNA sequencing, and expression of the β -mannanase gene from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *J. Ferment. Bioeng.* **78**: 205-211.
 - 19. Waino, M., and K. Ingvorsen. 1999. Production of halostable β -mannanase and β -mannosidase by strain NN, a new extremely halotolerant bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 675-680.

(Received Oct. 25, 2002/Accepted Jan. 30, 2003)