J. Appl. Biol. Chem. **53**(2), 71-76 (2010)

Article

재조합 대장균으로부터 생산된 *Bacillus licheniformis* WL-12의 Mannanase 특성

윤 기 홍*

우송대학교 식품생물과학과

Characterization of the *Bacillus licheniformis* WL-12 Mannanase from a Recombinant *Escherichia coli*

Ki-Hong Yoon*

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

Received April 19, 2010; Accepted May 3, 2010

A gene encoding the mannanase of *Bacillus licheniformis* WL-12, which had been isolated from Korean soybean paste, was cloned into *Escherichia coli* and nucleotide sequence of the mannanase gene was subsequently determined. The mannanase gene consisted of 1,080 nucleotides encoding a polypeptide of 360 amino acid residues. The deduced amino acid sequence was identical to that of putative mannanase from *B. liceniformis* DSM13 belonging to GH family 26. The mannanase was partially purified from cell-free extract of the recombinant *Escherichia coli* carrying a WL-12 mannanase gene by ammonium sulfate fractionation and DEAE-Sepharose column chromatography. Optimal conditions for the partially purified enzyme occurred at pH 6.0 and 65°C. The enzyme showed higher activity on locust bean gum (LBG) galactomannan and konjac glucomannan than on guar gum galactomannan. The predominant products resulting from the mannanase hydrolysis were mannose, mannobiose and mannotriose for LBG or mannooligosaccharides. The enzyme could hydrolyze mannooligosaccharides larger than mannobiose.

Key words: *Bacillus lichenifromis* WL-12, mannanase, reaction property, recombinant *Escherichia coli*

Mannan 다당류는 식물 세포벽의 hemicellulose를 구성하는 주요 구성물질이며, 다수의 콩과식물 종자의 배유와 일부 비두과류 식물의 완숙한 종자에도 존재한다. Mannan 다당류를 구성하는 기본 당은 mannose이고 식물에 따라 구성 당의 종류와 함량에 차이가 있으며 크게 manann, glucosmannan, galactomannan과 galactoglucomannan으로 구분된다. 이들 성분을 함유한 식물은 식품 및 사료용 원료로 사용될 뿐만아니라, 바이오매스 자원인 목질계 hemicellulose는 풍부한 재생가능 자원 중 하나이므로 이들의 효과적인 이용을 위해 mannan 성분을 분해하는 효소의 활용성과 기대성이 높아지고 있다.

Mannan다당류의 기본 골격인 mannose간의 β-1,4 결합을 가수분해하기 위해서는 mannanase와 β-mannosidase의 작용이 요구되며, 특히 mannanase는 mannose 간의 결합을 무작위로 절단하여 mannan의 점도를 저하시키므로 커피, 차의 가공이나, 사료첨가용 효소 및 펄프가공 효소로 활용되고 있다[Dhawan과 Kaur, 2007]. 최근들어 바이오에너지 개발에 대한 전세계적 관심이 높아지면서 목재자원의 효율적 당화를 위해 cellulase, xylanase와 함께 mannanase에 대해서도 연구도 활발히 이루어지고 있으며[Beukes 등, 2008; Jorgensen 등 2010], 사료작물이 바이오에너지 개발에 이용되면서 초래된 가축사료의 가격상승과 사료 품질저하 등의 문제를 해결하기 위해서도 사료내 항영양인자로 작용하는 비전분성 다당류를 분해하는 효소로써 mannanase의 유용성이 높아지고 있다[Yoon 등, 2010].

Mannanase는 동물과 식물을 비롯하여 다양한 미생물에서 발견되었으며, 현재까지 20속 이상의 세균이 mannanase를 생산하는 것으로 보고되었다. 이들 대부분은 균체외로 mannanase를 분비 생산하는데, 최근에 균체내 mannanase를 생산하는 고온호산성 *Alicyclobacillus acidocaldarius*가 보고되었다[Zhang, 2008]. Mannanase는 cellulase, xylanase와 유사하게 섬유소물질을 분해하는 효소이지만 cellulase나 xylanase에 비해 연구가 많이 이루어지지는 않았으며, 1990년대에 들어서야 그 유전자와 효소의 특성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재까지 알려진 mannanases는 대부분이 glycosyl hydrolase family 5

*Corresponding author
Phone: +82-42-630-9742; Fax: +82-42-636-2676
E-mail: ykh@wsu.ac.kr

doi:10.3839/jabc.2010.013

(GH5) 또는 GH26에 속하는 것으로 알려져 있다. *B. licheniformis* WL-12[Yoon, 2006] 는 cellulase와 mannanase를 생산하는 균으로 *B. subtilis* WL-3[Oh 등, 2002], *B. subtilis* WL-7[Kweun 등, 2003]과 함께 국내 가정에서 제조된 된장으로부터 분리되었으며, WL-3과 WL-7균주와는 달리 37°C에서 보다 60°C에서 성장이 우수한 고온성균으로 밝혀졌다. *B. subtilis* WL-3[Yoon과 Lim, 2007; Yoon 등, 2008]과 WL-7[Kweun 등 2004]의 mannanase유전자와 효소 특성에 대해서는 이미 보고된 바 있으며, 본 연구에서는 이들과 함께 분리된 *B. licheniformis* WL-12의 mannanse특성을 조사하였다.

재료 및 방법

시약, 미생물, 플라스미드와 배지. 효소반응의 기질로 사용된 locust bean gum(LBG), guar gum, CMC, oat spelt xylan, birchwood xylan과 *para*-nitrophenyl-β-mannoside(pNP-β-mannoside)는 Sigma(St. Louis, MO, U.S.A.), mannooligosaccharides는 Megazyme(Wicklow, Ireland)의 제품을 각각 사용하였다. *B. licheniformis* WL-12는 유전자 제공원으로, *Escherichia coli* XL-1 blue는 유전자조작을 위한 숙주균으로 각각 사용되었으며, 플라스미드 pUC19는 mannanase 유전자의 크로닝 vector로 사용되었다. 사용된 미생물은 LB 배지(5 g yeast extract, 10 g bacto-tryptone, 5 g NaCl per liter)로 배양하였으며, 대장균 형질전환주의 선발을 위해서는 배지에 ampicillin(50 μg/mL)이 첨가된 LB 배지가 사용되었다. Mannanase 유전자를 함유한 대장균 형질전환주 선발을 위해서는 0.5% LBG와 70 mg/L tryphan blue를 첨가한 LB 평판배지를 사용하였다.

DNA 분리와 조작. LB 액체배지에서 배양한 *B. licheniformis*의 균체로부터 총 염색체 DNA를 분리하기 위해서는 Genomic DNA prep kit(Solgent, Deajeon), 대장균으로부터 플라스미드 DNA를 분리하기 위해서는 Plasmid Mini-prep kit(Solgent, Daejeon)를 이용하였다. 염기서열은 크론된 유전자를 제한효소로 적절한 크기로 절단하여 얻은 단편을 pUC19에 도입함으로써 재조합 플라스미드를 제조한 후, 이를 주형 DNA로 하고 universal primer와 reverse primer를 사용하여 dideoxy-chain termination 방법으로 결정하였다.

Mannanase 조효소액 제조. Mannanase 유전자를 함유한 재조합 대장균을 ampicillin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕 배양한 후 배양액을 원심분리하여 회수한 균체를 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 현탁하고 초음파로 균체를 파쇄한 후 15,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리함으로써 균체 파쇄상등액을 제조하였다. 균체 파쇄상등액에 ammonium sulfate를 첨가하여 30~70%(w/v)로 분획한 침전물을 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 현탁하여 동일한 완충용액으로 투석을 한 후, DEAE-Sepharose 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. NaCl(0~0.8 M)로 추출하여 얻은 활성분획을 모아 20 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)로 투석하였다. 이러한 과정을 통해 얻은 부분정제 효소액을 mannanase 특성 조사에 사용하였다.

Mannanase 활성 측정. Mannanase 활성은 LBG를 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 다음과 같이 정량 함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁 시킨 1%(w/v) LBG 용액 0.5 mL와 200 mM sodium phosphate (pH 6.0) 0.25 mL을 효소 용액 0.25 mL과 혼합하여 50°C에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3 mL을 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Mannose를 표준시료로 사용하여 동일 조건에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit은 위의 조건에서 1분 동안 LBG로 부터 1 μmol의 mannose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

반응산물 분석. LBG와 mannooligosaccharides를 반응기질로 하여 효소반응을 수행하고 반응액을 95°C에서 3분 동안 열 처리한 후 원심 분리하여 단백질 침전물을 제거하고 상등액을 적정량 취해 n-propanol, nitromethane과 증류수(7:1:2, (v/v)) 혼합용액을 전개용액으로 하여 silica gel-precoated thin layer plate(Merck Kiesegel, No. 5748)에서 박층 크로마토그래피를 수행하였다. 전개된 물질을 발색시키기 위해서는 9 mL ethanol, 0.5 mL *p*-anisaldehyde, 0.5 mL sulfuric acid와 glacial acetate 몇 방울을 혼합한 발색제 용액을 뿌린 후, 120°C에서 10분간 방치하였다.

결과 및 고찰

Mannanase 유전자의 크로닝과 염기서열. *B. licheniformis* WL-12의 염색체 DNA를 *Sau3A*I으로 부분 절단하고 크기가 약 1.5 kb 이상인 DNA 단편을 agarose gel에서 추출하였다. 이를 *BamH*I으로 절단하고 CIP처리된 pUC19와 ligation한 후 *E. coli* XL-1 blue에 도입하여 얻은 형질전환주 중에서 LBG 분해환을 보이는 형질전환주를 1주 선발하였다. 대장균 형질전환주에서 플라스미드를 분리하고 크로닝된 DNA 단편 중 일부를 여러 제한효소로 절단하여 pUC19에 도입하고 총 1,461 bp의 염기서열을 결정한 후 ORF를 조사한 결과 개시코돈을 GTG 로 하며 360 아미노산 잔기로 구성된 단백질을 코드하는 1,080 bp의 mannanase 유전자가 발견되었다(결과미제시). 이로부터 유추되는 아미노산 잔기배열을 다른 mannanases와 비교한 결과 *B. licheniformis* DSM13의 총유전체로부터 유추된 mannanase와 동일한 서열을 보였고(GenBank accession No. AAU39670), *B. lichenifromis* CICC 10266(ACX94051), CICC 10181(ACX 94049), CICC 10375(ACX94054)의 mannanase와는 1개, 18개, 19개 잔기가 각각 다르며, 온천에서 분리된*Bacillus* sp. CM3.1의 효소(ABQ81811)와는 2개 잔기가 달랐는데 이들 유전자는 모두 GTG를 개시코돈으로 사용하는 것으로 확인되었다. 한편 WL-12와 함께 가정에서 제조된 된장시료에서 중온성균으로 분리된 *B. subtilis* WL-3(AAZ95239)와 WL-7(AAT27435)의 mannanases와는 각각 73%와 79% 정도의 상동성을 나타냈다. 한편 유전자 서열에서 예측되는 mannanase는 GH family 26에 속하는 mannanase 활성영역(아미노산서열 위치 30-348)만을 지니며 탄수화물 결합영역은 포함하지 않고 있다.

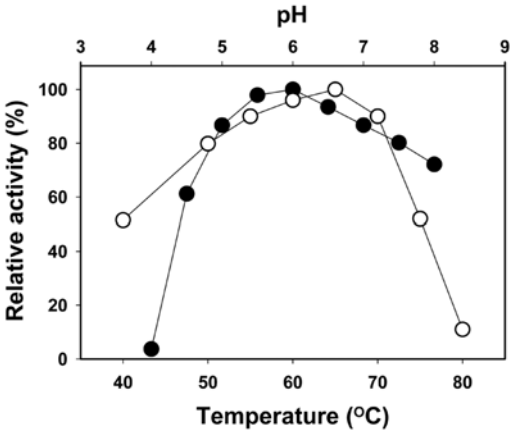

Fig. 1. Effects of reaction temperature and pH on the mannanase activity. Temperature profile (-○-) was obtained by measuring the mannanase activities at pH 6.0 and different temperatures. The pH profile (-●-) was obtained by measuring the mannanase activities at various pH's and at a constant temperature of 50°C. Buffers (50 mM) used were as follows: sodium citrate (pH 4-6) and sodium phosphate (pH 6-8).

Mannanase의 반응특성과 안정성. 최근에 *B. licheniformis* DSM13의 총유전체 서열에 근거하여 mannanase 유전자로 추정된 *YdhT* 의 signal peptide 부분을 대장균 OmpA의 signal peptide로 대체하고 카르복실 말단에 6×His-tag을 융합한 형태로 대장균에서 발현하여 그 특성이 조사되었다[Songsiriritthigul 등, 2010]. 본 연구에서는 *B. lichemiformis* WL-12 mannanase 유전자를 변형시키지 않고 재조합 대장균에 도입하여 mannanase를 생산함으로써 효소 특성을 조사하였다. 재조합 대장균이 생산하는 mannanase는 대부분이 균체내에 존재하였으므로 균체 파쇄상등액으로부터 ammonium sulfate fractionation과 DEAE 컬럼 크로마토그래피 과정을 거쳐 부분정제된 mannanase를 얻었다. 이를 효소액으로 사용하여 온도와 pH 가 효소의 활성과 안정성에 미치는 영향을 조사하였다. 반응온도(40-80°C)와 반응 pH(4.0-8.0)를 달리하고 LBG의 가수분해 활성을 조사한 결과 65°C와 pH 6.0에서 최고의 효소 활성을 보였으며 pH 5.5-6.5 범위에서는 90% 이상의 활성을 보였다(Fig. 1). 이러한 반응특성은 Songsiriritthigul 등이 보고한 His-tagged mannanase와 비교하였을 때 반응 pH는 유사하였으나, 반응온도에 대한 활성 양상은 His-tagged mannanase의 경우 50°C에서 최대활성을 보이는 것으로 나타나 큰 차이가 있음을 알 수 있다. 또한 WL-12의 mannanase는 된장에서 중온성 균으로 분리된 WL-3[Yoon 등, 2008]와 WL-7[Kweun 등, 2004]의 mannanases와 최적반응 pH가 동일하지만, 최적반응온도는 약간 높은 것이 확인되었다. 한편 *B. subtilis* WY34의 mannanase와는 반응 최적 pH와 온도가 일치함을 보였지만[Jiang 등, 2006], WL-12 mannanase는 WY34 mannanase에 비해 pH가 7-8인 조건에서 활성이 더 높은 것으로 확인되었다. 한편 다수의 *Bacillus*속 균주가 생산하는 mannanases는 50-70°C 범위에서 최대활성을 보이는데, pH는 차이가 있어 pH 5.0-6.5[Mendoza 등, 1994; Yosida 등, 1997], pH 9-10[Ma 등, 2004; Hatada 등, 2005], pH 4.5[Fu 등, 2010]에서 각각 최대활성을 나타내는 것으로 보고되었다.

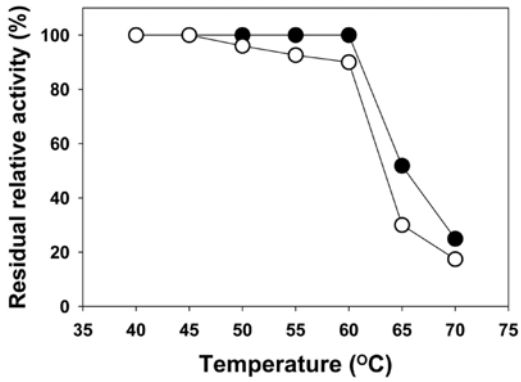

Fig. 2. Thermostability of the partially purified mannanase. Thermostability was determined by measuring the residual activities after pre-incubation at different temperatures for 30 min (-●-) and 60 min (-○-). Error ranges were within 5% for each residual activity.

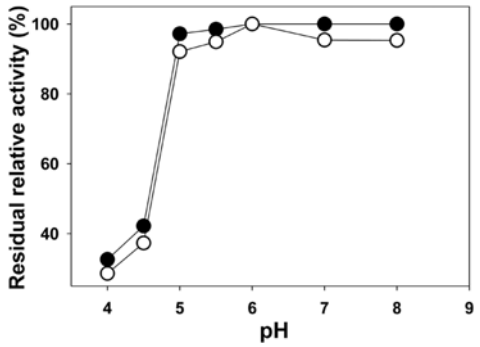

Fig. 3. pH Stability of the partially purified mannanase. pH stability was determined by measuring the residual activity after pre-incubation for 1 h (-●-) and 3 h (-○-) at different pHs at 4°C. Error ranges were within 5 % for each residual activity.

열안정성을 조사하기 위해 기질을 첨가하지 않고 40-70°C의 온도범위에서 30분과 60분간 효소를 방치한 후 잔존활성을 조사한 결과 60°C까지 안정성이 있었으며 65°C 이상에서는 급격히 실활되는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 이는 WL-7의 mannanase 보다는 열안정성이 있지만, WL-3과 WY-34의 mannanases와는 유사한 수준이다. His-tagged mannanase의 경우 내열성도 WL-12의 효소에 비해 매우 낮아 60°C에서 급격히 실활되는 것으로 보고되었는데, 최적반응 온도와 열안정성의 이러한 차이는 6×His tag이 융합된 때문으로 판단된다. 따라서 *B. lichemiformis* mannanase의 활용성을 확보하기 위해서는 His-tag을 결합시키지 않는 것이 바람직 할 것이다. pH에 의한 영향을 조사하기 위해 pH 4-8 범위의 완충용액에 효소를 첨가하여 1시간, 3시간 각각 방치한 후 잔존활성을 측정한 결과 pH 5.0-8.0 범위에서는 3시간 방치후에도 90% 이상의 활성을 유지하였으며 방치시간이 1시간일 때 보다 3시간일 때 약간 더 실활되었다(Fig. 3). 그러나 pH 4.5 이하에서는 급격히 실활되는 것으로 나타났는데 pH 4.5에서도 1시간 방치후에도 약 80% 이상의 효소활성이 유지되는 WL-7의 mannanase에 비해 산성에서 안정성이 낮은 편이며, Hig-tagged mannanase와는 유사한 안정성을 보였다.

기질특이성. 여러가지 기질을 사용하여 가수분해 활성을 조사

Table 1. Substrate specificity of the partially purified mannanase

Substrates	Relative activity (%)
Locust bean gum galactomannan	100
Konjac glucomannan	92
Guar gum galactomannan	12
Oat spelt xylan	ND
Carboxymethylcellulose	ND
pNP-β-mannoside	ND

ND, not detected.

하였는데, galactomannan인 LBG와 guar gum 및 glucomannan인 konjac에 대해서는 가수분해능을 보였으나, oat spelt xylan, CMC에 대한 가수분해능은 관찰되지 않았다(Table 1). LBG (mannose/galactose ratio, 4:1)를 기질로 사용하였을 때 가장 많은 환원당이 발생하였으며, konjac(mannose/glucose ratio, 1.5:1)에 대해서도 LBG와 유사한 수준의 환원당을 발생하였다. 그러나 guar gum(mannose/galactose ratio, 2:1)에 대해서는 가수분해된 환원당이 LBG에 비해 12% 정도 수준에 불과하였다. LBG에 비해 guar gum에 대해 가수분해 활성이 낮은 것은 guar gum에 측쇄로 존재하는 α-galactose의 수가 LBG의 것보다 많아 mannose간 1,4 결합을 가수분해하는 활성을 저해하기 때문인 것으로 추측되고 있다. *B. circulans*[Yosida 등, 1997], *B. stearothermophilus*[Talbot와 Sygusch, 1990], *B. subtilis* WY34와 *B. subtilis* WL-7의 mannanases도 LBG에 비해 guar gum에 대한 가수분해 활성이 9.8-15% 정도 수준인 것으로 보고된바 있다. 한편 *Caldibacillus cellulovorans*[Sunna 등, 1999], *C. tertium*[Kataoka와 Tokiwa, 1998]의 mannanases는 konjac의 분해능은 낮지만 guar gum의 분해능은 LBG 수준인 것으로 확인되었다. Konjac은 glucomannan 다당류로 구성되어 있는데 cellulase의 경우 glucose 잔기간의 결합을 분해하고 mannanase의 경우는 mannose 잔기간의 결합을 분해할 수 있다. 따라서 WL-12 mannanase가 CMC를 분해하지 못하면서 konjac의 분해능을 보이는 것은 mannanase 활성에 의한 것임을 알 수 있다. 한편 konjac의 분해능이 높은 *Bacillus* sp. MSJ-5의 mannanase [Zhang 등, 2009]는 konjac을 분해하여 당 중합도가 2-6인 올리고당을 다량 생산하는 것으로 확인되어 mannanase를 이용한 prebiotics 생산의 가능성이 제시되었다.

대다수의 mannanases가 WL-12와 같이 CMC와 xylan에 대해 분해능을 보이지 않으나, WL-3과 *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1[Gibbs 등, 1999] mannanases의 경우 CMC를 분해하지 않지만 xylan은 낮은 활성으로 분해한다고 보고되었으며, 특히 *B. subtilis* WY34는 mannan과 함께 전분, CMC, xylan을 분해하는 것으로 알려졌다. 특이하게도 DSM13의 His-tagged mannanase는 WL-12의 mannanase와 동일한 효소임에도 불구하고 guar gum을 분해하지 못하며, konjac에 대한 분해활성은 LBG에 비해 2배 이상으로 나타나 기질특이성에 큰 차이를 보이는 것으로 확인되었다.

Mannanase 가수분해 산물. Mannanase에 의한 LBG와 만노올리고당의 최종 가수분해산물을 분석하기 위해 부분정제된 효소로 반응을 실시한 후 박층 크로마토그래피를 실시하였다(Fig. 4). LBG, mannotriose, mannotetraose, mannopentaose와 mannohexaose는 mannanase에 의해 가수분해되어 mannose, mannobiose와 mannotriose가 생생되었는데, 특히 mannobiose와 mannose가 주된 반응산물로 확인되었다. *B. subtilis* NM-39 [Mendoza 등, 1994], WL-3과 WL-7의 mannanases는 LBG를 가수분해하여 mannose를 생산하지만, *Bacillus* sp. KK01 [Hossain 등, 1996]와 *B. subtilis* WY34 효소는 LBG 분해산물에서 mannose가 관찰되지 않는 수준으로 존재하였다.

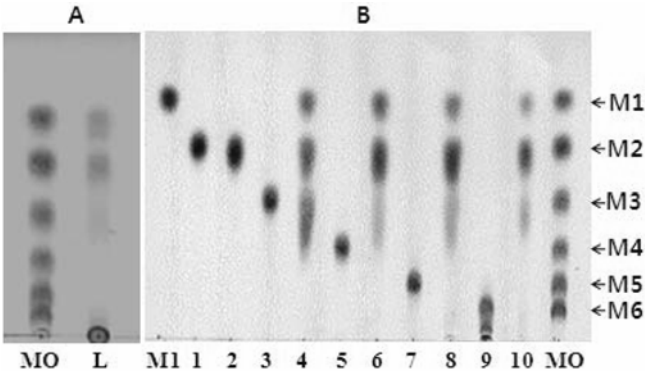

Fig. 4. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of LBG galactomannan (A) and β-1,4-linked manno-oligosaccharides (B) with mannanase. The reaction mixtures containing the partially purified mannanase and mannooligosaccharides or LBG in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) were incubated for 4 h at 55°C. MO in panels A and B stands for standard mannooligosaccharides including mannose (M1), mannobiose (M2), mannotriose (M3), mannotetraose (M4), mannopentaose (M5) and mannohexaose (M6). In panel A, L stands for hydrolysate of LBG galactomannan. X1 to X5 represent xylose to xylopentaose; E, purified xylanase. In panel B, lanes 1, 3, 5, 7 and 9 stand for M2, M3, M4, M5 and M6, respectively, before reaction and lanes 2, 4, 6, 8 and 10 indicate the hydrolysates of M2, M3, M4, M5 and M6 by mannanase, respectively.

Mannooligosaccharides를 기질로 하였을 때 mannanase는 endo 형이 효소이므로 중합도가 큰 올리고당에 대한 활성이 더 높다. *B. subtilis* WL-7와 *Bacilluis* sp. AM-001[Akino 등, 1988]은 mannose 중합도가 3 이상인 올리고당을 분해할 수 있지만, *B. subtilis* WY34와 *Enterococcus casseliflavus* FL2121 [Oda 등, 1993]의 mannanases는 중합도가 4 이상인 올리고당을 분해할 수 있으며 따라서 mannotriose는 분해하지 못하는 것으로 보고되었다. WL-12의 mannanase는 mannotriose 이상의 중합도를 갖는 올리고당은 분해하였으나, pNP-β-mannoside와 mannobiose 를 분해하지 못하는 것으로 보아 β-mannosidase 활성이 없는 endo형의 mannanase로 확인되었다. 한편 His-tagged mannanase는 LBG를 분해하였을 때 생성되는 당이 WL-12의 mannanase와 유사하였으나, mannooligosaccharides에 대한 분해능은 큰 차이를 보였으며, mannobiose 뿐 아니라 mannotriose, mannotetraose를 분해하지 못하였고, mannohexaose의 주된 분해산물도 mannobiose, mannotriose와 함께 mannotetraose인 것으로 확인되었고, mannose는 거의 생성되지 않는 것으로 보고되었다.

초 록

가정에서 제조된 된장으로부터 분리된 *Bacillus licheniformis* WL-12의 mannanase 유전자를 크로닝하여 그 염기서열을 결정한 결과 mannanase 유전자는 360 아미노산으로 구성된 단백질을 코드하며 1,080 뉴클레오티드로 이루어졌다. 아미노산 잔기 배열을 분석한 결과 WL-12의 mannanase는 GH family 26에 속하는 *B. licheniformis* DSM13의 mannanase와 동일하였다. *B. licheniformis* WL-12의 mannanase 유전자를 함유한 재조합 대장균의 균체파쇄상등액으로부터 부분정제된 효소를 사용하여 반응특성을 조사하였다. pH 6.0과 65°C에서 최대 반응활성을 보였으며, locust bean gum (LBG)과 konjac의 분해능은 높으나 guar gum의 분해능은 낮았다. Mannanase로 LBG와 manno-oligosaccharides를 분해하였을 때 mannose, mannobiose와 mannotriose가 주된 최종 반응산물로 관찰되었으며 mannobiose는 분해하지 못하였으나 이보다 중합도가 큰 mannooligo-saccharides은 분해하였다.

Key words: *Bacillus licheniformis* WL-12, mannanase, reaction property, recombinant *Escherichia coli*

참고문헌

Akino T, Nakamura N, and Horikoshi K (1988) Characterization of three β-mannanases of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric Biol Chem* **52**, 773-779.

Beukes N, Chan H, Doi RH, and Pletschke BI (2008) Synergistic associations between *Clostridium cellulovorans* enzymes XynA, ManA and EngE against sugarcane bagasse. *Enzyme Microb Technol* **42**, 492-498.

Dhawan S and Kaur J (2007) Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit Res Biotechnol*. **27**, 197-216.

Fu X, Huang X, Liu P, Lin L, Wu G, Li C, Feng C, and Hong Y (2010) Cloning and Characterization of a novel mannanase from *Paenibacillus* sp. BME-14. *J Microbiol Biotechnol* **20**, 518-524.

Gibbs MD, Reeves RA, Sunna A, and Bergquist PL (1999) Sequencing and expression of a β-mannanase gene from the extreme thermophile *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, and characteristics of the recombinant enzyme. *Curr Microbiol* **39**, 351-357.

Hatada Y, Takeda N, Hirasawa K, Ohta Y, Usami R, Yoshida Y, Grant WD, 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.

Hossain MZ, Abe J, and Hizukuri S (1996) Multiple forms of β-mannanase from *Bacillus* sp. KK01. *Enzyme Microb Technol* **18**, 95-98.

Jiang Z, Wei Y, Li D, Li L, Chai P, and Kusakabe I (2006) High-level production, purification and characterization of a thermostable β-mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydrate Polymers* **66**, 68-96.

Jorgensen H, Sanadi AR, Felby C, Lange NE, Fischer M, and Ernst S (2010). Production of ethanol and feed by high dry matter hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake. *Appl Biochem Biotechnol* **161**, 318-332.

Kataoka N and Tokiwa Y (1998) Isolation and characterization of an active mannanase-producing anaerobic bacerium, *Clostridium tertium* KT-5A, from lotus soil. *J Appl Microbiol* **84**, 357-367.

Kweun MA, Kim HS, Lee MS, Choi JH, and Yoon KH (2003) Mannanase production by a soybean isolate, *Bacillus subtilis* WL-7. *Kor J Microbiol Biotechnol* **31**, 277-283.

Kweun MA, Lee MS, Choi JH, Cho KH, and Yoon KH (2004) Cloning of a *Bacillus subtilis* WL-7 mannanase gene and characterization of the gene product. *J Microbiol Biotechnol* **14**, 1295-1302.

Ma Y, Xue Y, Dou Y, Xu Z, Tao W, and Zhou P (2004) Characterization and gene cloning of a novel β-mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *Extremophiles* **8**, 447-454.

Mendoza NS, Arai M, Kawaguchi T, Yoshida T, and Joson LM (1994) Purification and properties of mannanase from *Bacillus subtilis*. *Wor J Microbiol Biotechnol* **10**, 551-556.

Oda Y, Komaki T, and Tonomura K (1993) Purification and properties of extracellular β-mannanases produced by *Enterococcus casseliflavus* FL2121 isolated from decayed konjac. *J Ferment Bioeng* **76,** 14-18.

Oh YP, Lee JM, Cho KH, and Yoon KH (2002) Isolation and enzyme production of a mannanase-producing strain, *Bacillus* sp. WL-3. *Kor J Microbiol Biotechnol* **30**, 247-252.

Songsiriritthigul C, Buranabanyat B, Haltrich D, and Yamabhai M (2010) Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4-β-mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Microb Cell Factories* doi:10.1186/1475-2859-9-20.

Sunna A, Gibbs MD, Chin CWJ, Nelson PJ, and Bergquist PL (1999) A gene encoding a novel mutidomain β-1,4-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp. *Appl Environ Microbiol* **66**, 664-670.

Talbot G and Sygusch J (1990) Purification and characterization of thermostable β-mannanase and α-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **56**, 3505-3510.

Yoon KH (2006) Cloning and expression of a *Bacillus licheniformis* cellulase gene. *Kor J Microbiol* **42**, 313-318.

Yoon KH, Chung S, and Lim BL (2008) Characterization of the *Bacillus subtilis* W-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli*. *The J Microbiol* **46**, 344-349.

Yoon KH and Lim BL (2007) Cloning and strong expression of a *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase gene in *B. subtilis*. *J Microbiol Biotechnol* **17**, 1688-1694.

Yoon SY, Yang YX, Shinde PL, Choi JY, Kim JS, Kim YW, Yun K, Jo JK, Lee JH, Ohh SJ, Kwon IK, and Chae BJ (2010) Effects of mannanase and distillers dried grain with solubles on growth performance, nutrient digestibility, and carcass characteristics of grower-finisher pigs. *J Anim Sci* **88**, 181-191.

Yosida S, Sako Y, and Uchida A (1997) Purification, properties, and N-terminal amino acid sequences of guar gum-degrading enzyme from *Bacillus circulans* K-1. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 251-255.

Zhang M, Chen XL, Zhang ZH, Sun CY, Chen LL, He HL, Zhou BC, and Zhang YZ (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.

Zhang Y, Ju J, Peng H, Gao F, Zhou C, Zeng Y, Xue Y, Li Y, Henrissat B, Gao GF, and Ma Y (2008) Biochemical and structural characterization of the intracellular mannanase AaManA of *Alicyclobacillus acidocaldarius* reveals a novel glycoside hydrolase family belonging to clan GH-A. *J Biol Chem* **283**, 31551-3158.