Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 26, No. 3, 232–237 (1998)

Sporolactobacillus sp. M201 균주에 의한 β-Mannanase와 β-Mannosidase의 생산

박원식 · 김화영 · 최용진*
고려대학교 생명공학원

Production of β-Mannanase and β-Mannosidase from *Sporolactobacillus* sp. M201. Park, Won-Sik, Hwa-Young Kim, and Yong-Jin Choi*. *Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea* – A bacterial strain producing high levels of an extracellular β-mannanase and intracellular β-mannosidase and α-galactosidase was isolated from soil. The strain isolated was identified as a strain of *Sporolactobacillus* sp. and designated as *Sporolactobacillus* sp. M201. Synthesis of β-mannanase by *Sporolactobacillus* sp. M201 was induced by sucrose, maltose, or locust bean gum. The highest induction rate was obtained with 2% locust bean gum added to the culture medium as a sole carbon source. On the other hand, induction of β-mannosidase was observed only with locust bean gum. The optimal media for the enzyme production were established as follows: for β-mannanase; 2% locust bean gum, 0.5% peptone, 0.2% KH_2PO_4, 80 mg/*l* $MgSO_4$, and 8 mg/*l* $ZnSO_4$ (pH 6.0), and for β-mannosidase; 2% locust bean gum, 0.5% yeast extract, 0.2% KH_2PO_4, 80 mg/*l* $MgSO_4$, and 8 mg/*l* $ZnSO_4$ (pH 5.0). The optimal culture temperatures for production of β-mannanase and β-mannosidase were found to be 37℃ and 30℃, respectively. Under the optimal culture conditions, the production of β-mannanase and β-mannosidase reached the highest levels of 10.6 units/ml and 1.35 units/ml after 30 h and 24 h cultivation, respectively.

Key words: β-mannan, β-mannanase, β-mannosidase, *Sporolactobacillus* sp.

β-Mannan polymer는 xylan과 더불어 hemicelluose의 주요 성분으로 β-1,4 결합의 mannose 잔기로 구성된 주 골격을 가지고 있는 heteropolysaccharide로서 식물계 특히 콩과 식물의 종자와 softwood 등에 다량 분포되어 있다. 이와 같은 β-mannan polymer는 식품 및 의약품 등 산업적으로 매우 광범위한 용도를 가지고 있으며[7], 반대로 coffee 제조, biopulping 내지는 유전 및 가스개발 또는 mannose 및 mannooligo 당의 생산 등에서는 β-mannan의 효과적인 분해가 필수적인 공정으로 되어 있다[14].

한편 β-mannan의 생분해에 관계되는 효소로는 β-mannan 골격 내부를 무작위적으로 절단하여 mannobiose와 mannooligomer를 생산하는 반응을 촉매하는 β-1,4-mannanase(1,4-β-D-mannan mannohydrolase; EC 3.2.1.78)와 상기 β-mannanase 분해 산물을 기질로 하여 mannose를 생산하는 β-1,4-mannosidase(β-D-mannoside mannohydrolase; EC 3.2.1.25)가 있다. 또한 상기 가수분해 주효소외에도 galactomannan의 galactose 측쇄결합 절단 반응에 관계하는 α-galactosidase(α-D-galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.22) 등도 있으며 이들 분해효소는 세균[3, 5, 16], 곰팡이[6, 13, 20] 및 식물체[18] 등 다양한 출처로부터 분리되어 효소적 특성과 응용에 관한 연구가 다수 보고되고 있다[1, 2, 4, 7-11, 20]. 그러나, β-mannan 분해효소의 산업적 응용에는 대다수의 경우 열에 대한 안정성이 가장 중요한 요건 중의 하나인 것으로 평가 보고되고 있다[14].

따라서 본 연구에서는 내열성 β-mannan 분해효소를 다량 생산하는 우수균주 분리를 목적으로 광범위한 균주 검색 작업을 실시하여 그 결과를 보고한다.

*Corresponding author
Tel. 82-2-3290-3417, Fax. 82-2-923-9923
E-mail: choiyj@kuccnx.korea.ac.kr

재료 및 방법

토양시료 및 시약

β-Mannan 분해 효소 생산 세균 분리를 위해 사용한 토양 시료는 주로 서울 인근지역에서 채취한 약 300여점이었으며 locust bean gum, ρ-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside 및 ρ-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside 등의 시약은 Sigma사(미국) 제품, 그리고 기타 일반 시약은 시판 1급 이상의 분석용 시약을 구입 사용하였다.

균주 분리

분리 배지 균주 분리용 배지는 1 *l* 중에 5.0 g locust bean gum, 1.5 g $(NH_4)_2SO_4$, 3.5 g $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$, 80 mg $MgSO_4$, 8 mg $ZnSO_4$ 및 20 g agar가 포함되어 있으며 초기 pH는 7.0이었다.

균주 선별 토양시료 현탁액 0.1~0.2 ml를 분리용 배지에 도말하고 37℃에서 48시간 배양하여 탄소원으로 첨가한 locust bean gum의 분해에 의해 형성되는 colony 주위에 투명환의 크기를 기준으로 하여 β-mannan 분해 균주를 선별하였다. 1차 선별된 균은 같은 조성의 배지에서 37℃, 24시간 액체 배양하여 β-mannanase와 β-mannosidase의 활성을 측정, 두 효소의 활성이 가장 높았던 균주를 최종 선별하였다.

균주 동정

최종 선별균의 동정은 'Bergeys Manual of Systematic Bacteriology'[18]에 기술되어 있는 세균 동정과 관련된 각종 실험을 실시함과 동시에 BIOLOG사의 Bacteria and yeast identification system을 이용한 실험 과정을 거쳐 동정하였다. 또한 최종 선별균세포의 전자현미경촬영은 0.2% phosphotungstic acid(pH6.5)로 고정한 다음 SEM 515(네덜란드)로 촬영하였다.

조효소액의 조제

액체 배지에서 37℃, 24시간 진탕 배양한 분리균주 배양액을 원심분리하여(10,000 g, 10 min) 분리된 배양 상층액을 세포외 조효소액으로 사용하였다. 또한 세포내 조효소액은 배양액 10 ml를 원심분리하여 얻은 균체를 phosphate buffer(0.05M, pH 7.0)로 3회 세척한 다음 동일완충용액 3.0 ml에 현탁시켰다. 다음 균체 현탁액을 sonication(200 Hz, 20 sec, 3회)한 다음 균체 파쇄액을 원심분리(15,000 rpm, 20 min), 침전물을 제거한 상등액을 세포내 조효소액으로 사용 하였다.

효소활성 측정

β-Mannanase활성 0.5 ml의 0.25% locust bean gum용액, 0.45 ml의 0.05M phosphate buffer(pH 7.0) 및 0.05 ml의 균체외 조효소액으로 구성된 효소반응 혼합물을 60℃, 30분 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS법[15]으로 측정하였다. 효소 1unit는 상기 반응 조건에서 1분간 1 mmole의 mannose에 상응하는 환원당을 생산하는 효소량으로 표시하였다.

β-Mannosidase 활성 10 mM ρ-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside phosphate buffer용액(pH 7.0) 0.1 ml에 세포내 조효소액 0.1 ml 첨가하고 60℃에서 10분간 반응시킨 다음 0.8 ml의 0.2M Na_2CO_3를 첨가, 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정하였다. 상기 조건하에서 1분 동안에 1 μmole의 ρ-nitrophenol을 생성 할 수 있는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

α-Galactosidase활성 10 mM ρ-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside phosphate buffer용액(pH 7.0) 0.1 ml에 0.1 ml 세포내 조효소액을 첨가, 60℃, 10분간 반응시킨후 0.8 ml 0.2M Na_2CO_3를 첨가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. α-Galactosidase 1 unit는 상기 조건하에서 1분 동안에 1 μmole의 ρ-nitrophenol을 생성하는 효소량으로 표시하였다.

균체 증식 측정

균체 증식도는 590 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다.

결과 및 고찰

균주 분리 및 동정

약 300여점의 토양 시료를 사용하여 β-mannan 분해 균주 선별과정을 거쳐 colony 주위에 비교적 큰 투명환을 형성하는 7주의 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주는 분리용 배지에 37℃, 24시간 액체 배양한 다음 세포내외 조효소액을 조제하고 β-mannanase와 β-mannosidase생산량을 측정, 비교 분석하여 가장 높은 효소생산량을 나타낸 M201균주를 최종 선별하고 이후 연구의 시험 균주로 사용하였다.

최종 선별균은 Table 1에 표시되어 있는 형태적 내지는 생화학적 특성, 그리고 전자 현미경 촬영에 의한 균체 모양(Fig. 1) 등의 결과를 종합 분석하여 *Sporolactobacillus* 속의 세균으로 동정하였다. 따라서 본 분리균을 *Sporolactobacillus* sp. M201로 명명하였다.

β-Mannan 분해 효소의 세포내외 분포량

Sporolactobacillus sp. M201분리균을 2% locust bean gum을 첨가한 분리용 배지에서 37℃, 24시간 배양하여

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the isolated strain M201

Factor	Characteristics
Type and size	rod (1×3 μm)
Gram staining	positive
Motility	positive
Endospore	forming
Mycelium	not forming
Colony on agar plate	circular
Oxygen requirement	positive
Citrate utilization	negative
Catalase production	negative
Oxidase test	positive
H_2S production	negative
Gelatin liquifaction	negative
Nitrate reduction	negative
Indole production	negative
Acetoin production	negative
Urease	negative

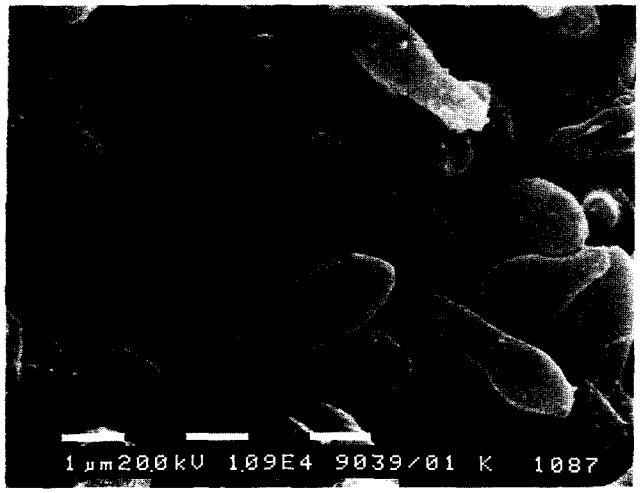

Fig. 1. Scanning micrograph of *Sporolactobacillus* sp. M201
(Philips, SEM 515, 20 kV, Netherland, The bar represents 1 μm)

Table 2. Cellular localization of β-mannan-degrading enzymes from *Sporolactobacillus* sp. M201

Enzymes	Extracellular activity (unit/ml)	Intracellular activity (unit/ml)
β-Mannanase	4.32	0.80
β-Mannosidase	0.09	0.65
α-Galactosidase	0.08	0.27

분리균이 생산하는 것으로 확인된바 있는 β-mannanase, β-mannosidase 및 α-galactosidase의 세포내외의 활성을 측정, 비교 분석하여 β-mannan 분해 효소의 세포내외의 분포량을 조사 하였다. Table 2에 표시되어 있는 바와 같이 본 분리균이 생산하는 β-mannanase는 세포외 효소 그리고 β-mannosidase와 α-galactosidase는 세포내 효소로 분류 할 수 있었다. 이와 같은 β-mannan 분해 효소의 세포내외의 분포 경향은 현재까지 보고 되고 있는 다른 대다수의 세균의 일반적인 경향인 것으로 조사되었다[3, 7, 12, 16]. 그러나 Talbot 등의 보고에 의하면 특이적으로 *Bacillus stearothermophilus*가 생산하는 β-mannanase와 α-galactosidase는 세포외로 배출 된다고 한다[19].

효소 생산 최적 배양 조건 확립

탄소원의 영향 *Sporolactobacillus* sp. M201 분리균에 의한 β-mannanase와 β-mannosidase의 생산 최적 조건을 확립하기 위해 재료 및 방법에 상술된 배지에 각종 탄소원 1.0%을 첨가하고 분리균주를 접종하고 37℃에서 24시간 진탕 배양하여 균체 증식과 β-mannan 분해 효소 생산량을 측정하여 Table 3과 같은 결과를 얻었다. 지금까지 보고되고 있는 다른 β-mannan 분해효소 생산 균주[3, 12, 16]와 마찬가지로 본 분리균에 의한 β-mannanase와 β-mannosidase 생합성 역시 locust bean gum 첨가로 크게 유도됨을 보였으며 2.0% 농도로 첨가했을 때 각각 7.8 units/ml과 0.92 units/ml의 가장 높은 효소 생산량을 나타내었다. 또한 sucrose, 혹은 maltose에 의해서도 β-mannanase의 효소 역가가 높게 나타나는 매우 특이한 현상을 보여주었다. 앞으로 탄소원 종류에 의한 β-mannanase 생합성 유도기작(induction mechanism) 관련 연구는 매우 흥미로운 과제가 될 것으로 생각한다.

Table 3. Effect of carbon sources on production of β-mannanase and β-mannosidase

Carbon sources (1%, w/v)	Growth (A_{590})	β-Mannanase (unit/ml)	β-Mannosidase (unit/ml)
None	0.01	0	0
Glucose	0.22	1.5	0
Galactose	0.39	1.0	0
Mannose	0.31	1.3	0
Fructose	0.12	0.0	0
Sucrose	0.40	5.0	0
Maltose	0.27	3.5	0
Lactose	0.26	0	0
Pectin	0.06	0	0
Xylan	0.46	0	0
Locust bean gum (0.5%)	0.42	4.4	0.65
(1%)	0.47	6.5	0.88
(2%)	0.48	7.8	0.92
Soluble starch	0.23	0	0

One loopful of the bacterial cells was inoculated to a 20 ml of the selective medium in a 250 ml flask, and cultivated on a rotary shaker (200 rpm) at 37℃ for 24 h. This preculture broth was transferred with the inoculum size of 1.0% to a 20 ml of the culture medium. Cultivation was carried out at 37℃ and 200 rpm for 24 h.

질소원의 영향 2% locust bean gum을 첨가한 분리용 배지[$(NH_4)_2SO_4$는 제외]에 유기 질소원을 중심으로 한 각종 질소원 0.5%를 첨가하여 질소원 종류에 따른 효소 생산에 미치는 효과를 조사하였다(Table 4). β-Mannanase생산은 0.5% peptone을 질소원으로 첨가했을 때 효소 생산량이 가장 높았으나 β-mannosidase의 경우는 0.5% yeast extract를 사용했을 때 가장 효과적이었다. 이와 같은 질소원 효과는 생산균주에 따라 약간의 차이는 있으나[3, 12, 16] 전체적으로 볼 때 공통적인 경향이라고 할 수 있겠다.

KH_2PO_4의 영향 2% locust bean gum과 0.5% peptone 또는 0.5% yeast extract를 첨가한 분리용 배지[$(NH_4)_2SO_4$는 제외]에 Table 5에 표시되어 있는 각 농도의 KH_2PO_4를 첨가하여 효소 생산에 미치는 인산의 효과를 살펴 본 결과 β-mannanase와 β-mannosidase 두 효소가 다같이 인산염을 0.2% 농도로 첨가했을 때 가장 효과적이었다.

이상의 β-mannan 분해효소 생산에 미치는 주요 배지

Table 4. Effect of nitrogen sources on production of β-mannanase and β-mannosidase

Nitrogen sources (0.5 %, w/v)	Growth (A_{590})	β-Mannanase (unit/ml)	β-Mannosidase (unit/ml)
None	0.17	1.2	0.06
Yeast extract (0.5%)	0.53	6.8	1.02
(1%)	0.60	–	0.69
(2%)	0.62	–	0.57
Peptone (0.5%)	0.60	8.5	0.45
(1%)	0.80	6.9	–
(2%)	0.87	6.5	–
Malt extract	0.45	2.5	0.08
Tryptone	0.78	5.2	0.25
Casamino acid	0.70	7.0	0.59

Cultivation was carried out as described in the legend of Table 3 at 37℃ for 24 h except that the indicated nutrients replaced the nitrogen sources in the selective medium containing 2% locust bean gum.

Table 5. Effect of KH_2PO_4 on the production of β-mannanase and β-mannosidase

KH_2PO_4 (%)	β-Mannanase		β-Mannosidase	
	Growth (A_{590})	Activity (unit/ml)	Growth (A_{590})	Activity (unit/ml)
0.0	0.35	6.0	0.40	0.79
0.2	0.49	9.2	0.53	1.05
0.4	0.50	7.9	0.41	0.78
0.8	0.41	1.0	0.39	0.07
1.6	0.03	0.0	0.02	0.00

Cultivations were carried out as described in the legend of Table 3 at 37℃ for 24 h in the production media containing 0.5% peptone for β-mannanase production and 0.5% yeast extract for β-mannosidase production, respectively.

성분 효과의 분석 결과를 종합하여 *Sporolactobacillus* sp. M201 균주에 의한 β-mannan 분해효소 생산을 위한 최적 배지조성으로는 β-mannanase의 경우에는 20 g/*l* locust bean gum, 5 g/*l* peptone, 2 g/*l* KH_2PO_4, 80 mg/*l* $MgSO_4$ 및 8 mg/*l* $ZnSO_4$로 결정하였으며 β-mannosidase의 생산에는 질소원으로 peptone 대신 0.5% yeast extract를 첨가한 상기 배지로 결정하고 이후 다음 실험에는 이 배지들을 사용하였다.

Table 7. Effect of temperature on production of β-mannanase and β-mannosidase

Temperature (℃)	β-Mannanase		β-Mannosidase	
	Growth (A_{590})	Activity (unit/ml)	Growth (A_{590})	Activity (unit/ml)
25	ND	ND	0.30	0.75
30	0.46	7.9	0.41	1.20
37	0.50	9.8	0.56	1.08
45	0.33	6.5	0.30	0.65

ND: not determined. Cultivations were carried out as described in the legend of Table 3 at appropriate temperatures for 24 h in the optimal production media.

배지의 최적 pH 효소생산에 미치는 배지의 초기 pH 효과를 조사한 결과 β-mannanase의 경우는 pH 6.0부근 그리고 β-mannosidase생산에는 pH 5.0부근의 약산성 배지에서 가장 높은 효소 생산량을 보였다(Table 6). 이와같은 배지의 초기 pH 영향은 효소생산 최적 pH가 9.0부근의 내 알칼리성 *Bacillus* sp 균주[3, 16]를 제외한 다른 β-mannan 분해효소 생산 세균과는 비슷한 양상이었다.

배양 최적 온도 β-Mannanase와 β-mannosidase 생산을 위한 배양 최적 온도는 Table 7에 표시되어 있는 바와 같이 β-mannanase 생산에는 37℃, β-mannosidase 경우에는 30℃로 측정되었다.

효소 생산 최적 배양조건

이상의 각 효소생산 최적배지와 최적 배양조건에서 *Sporolactobacillus* sp. M201 균주를 48시간 진탕 배양하면서 배양 시간에 따른 균체증식과 효소생산량 등을 측정하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 균체증식은 배양 12시간 전후부터 급격히 증가되어 배양 30시간 전후에서 정체기를 나타내면서 그 이후부터는 약간의 증식도의 저하 현상을 보였다. 한편 β-mannanase와 β-mannosidase의 생산은 각각 배양 30시간과 24시간에서 최고치를

Table 6. Effect of culture pH on production of β-mannanase and β-mannosidase

Inintial pH	β-Mannanase			β-Mannosidase		
	Final pH[a]	Growth (A_{590})	Activity (unit/ml)	Final pH	Growth (A_{590})	Activity (unit/ml)
4.0	4.02	0.36	3.0	4.98	0.44	0.80
5.0	4.74	0.44	7.0	4.80	0.63	1.10
6.0	4.76	0.45	9.8	4.75	0.62	0.90
7.0	4.95	0.53	8.7	5.09	0.59	0.79
8.0	5.80	0.42	7.5	5.67	0.47	0.26
9.0	6.00	0.35	3.5	6.25	0.39	0.07

[a]pH after cultivation. Cultivations were carried out as described in the legend of Table 3 at 37℃ for 24 h in the optimal production media.

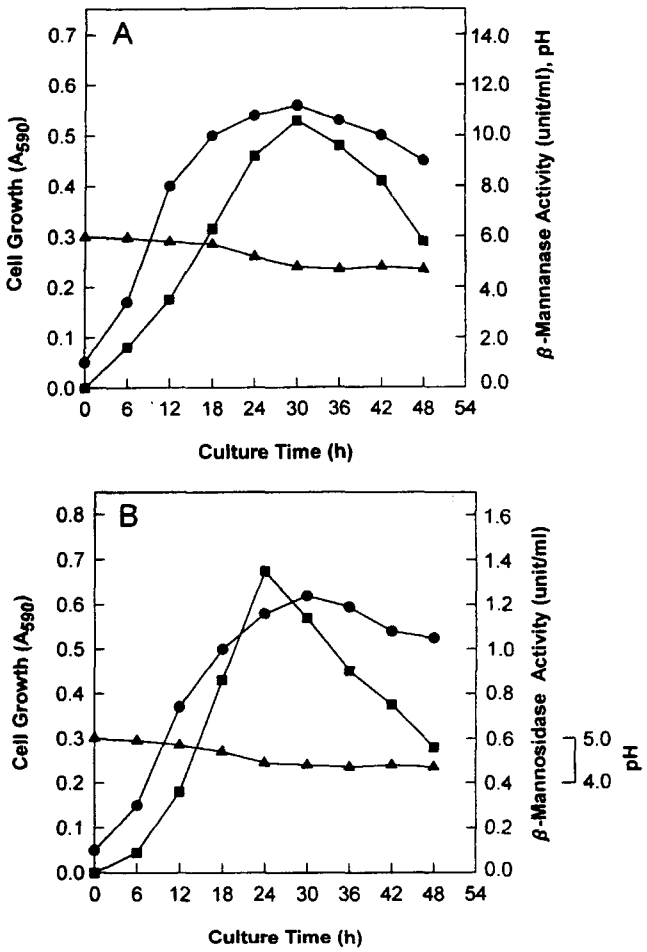

Fig. 2. Time courses of β-mannanase (A) and β-mannosidase (B) production by *Sporolactobacillus* sp. M201.
Cultivations were carried out as described under the legend of Table 3 for 48 h at 37℃ for β-mannanase production and at 30℃ for β-mannosidase production, respectively, in 200 ml optimal production media of 2 L flask. ●; cell growth, ■; enzyme activity, ▲; pH.

나타내면서 각각 10.6 unit/ml과 1.35 unit/ml 값으로 계산되었다. 이와 같은 β-mannanase 생산량은 *Bacillus* sp. WS-42(12)의 20.8 unit/ml에 비해서는 다소 낮은 값이나 기타 세균 및 곰팡이의 생산량에 비해서는 훨씬 높은 생산량에 해당 된다. 이에 비해 β-mannosidase의 생산량은 지금까지 보고 되고 있는 다른 균종에 비해 월등히 높았다[3, 7].

요 약

β-Mannan polymer 분해 효소를 다량 생산하는 균주를 토양으로부터 분리하고 분리균의 형태적 내지는 생화학적 특성을 조사 분석하여 *Sporolactobacillus* sp. M 201로 동정하였다. *Sporolactobacillus* sp. M201 분리균은 locust bean gum을 탄소원으로 사용, 배양했을 때 세포외 β-mannanase 그리고 세포내 β-mannosidase와 α-galactosidase을 다량 생산하는 것으로 확인되었다. 효소 생산 최적 배지와 최적 배양 조건은 β-mannanase 생산에는 2.0% locust bean gum, 0.5% peptone, 0.2% KH_2PO_4, 80 mg/*l* $MgSO_4$ 및 8 mg/*l* $ZnSO_4$ 배지(pH 6.0)와 37℃이었고 그리고 β-mannosidase 생산은 질소원으로 peptone 대신 0.5% yeast extract를 첨가한 상기 배지(pH 5.0)와 30℃에서 배양했을 때 가장 높았다. 이상의 각 효소의 최적 생산 조건에서 각각 30시간과 24시간 진탕배양 했을때 β-mannanase(10.6 units/ml)와 β-mannosidase(1.35 units/ml)의 최고 생산량을 나타내었다.

감사의 글

본 논문 투고료의 일부는 고려대학교 식품가공 핵심기술 연구센터의 지원을 받았습니다(98026).

참고문헌

1. Ajisaka, K., I. Matsuo, M. Isomura, H. Fujimoto, M. Shirakabe, and M. Okawa. 1995. Enzymatic synthesis of mannobioses and mannotrioses by reverse hydrolysis using α-mannosidase from *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.* **270**: 123–130.
2. Akino, T., N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1988. Characterization of β-mannanase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agri. Biol. Chem.* **52**: 773–779.
3. Akino, T., N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1987. Production of β-mannosidase and β-mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 323–327.
4. Akino, T., N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1988. Characterization of β-mannosidase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agri. Biol. Chem.* **52**: 1459–1464.
5. Araki, T. and M. Kitamikado. 1988. Exo-β-1,4-mannanase from *Aeromonas hydrophila*. *Methods Enzymol.* **160**: 583–589.
6. Arcand, N., D. Kluepfel, F. W. Paradis, R. Morosori, and F. Shareck. 1993. β-Mannanase of *Streptomyces lividans* 66: Cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme. *Biochem. J.* **290**: 857–863.
7. Duffaud, G. D., C. M. Mccutchen, P. Leduc, K. N. Parker, and R. M. Kelly. 1997. Purification and characterization of extremely thermostable β-mannanase, β-mannosidase, and α-galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 169–177.
8. Elbein, A. D., S. Adya, and Y. C. Lee. 1997. Purification and properties of a β-mannosidase from *Aspergillus niger*.

J. Biol. Chem. **252**: 2026–2031.
9. Fujimoto, H., M. Isomura, and K. Ajisaka. 1997. Synthesis of alkyl β-1,4-linked oligosaccharides using β-mannosidase from *Rhizopus niveus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 164–165.
10. Gibbs, M. D., D. J. Saul, E. Luthi, and P. L. Bergqust. 1992. The β-mannanase from *Caldocellum saccharolyticum* is part of a multidomain enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3864–3867.
11. Hashimoto, H., C. Katayama., M. Goto, and S. Kitahata. 1993. Purification and some properties of α-galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 372–378.
12. Kim, J. H., T. K. Lee, H. C. Yang, and D. K. Oh. 1997. Optimization of medium for β-mannanase production by *Bacillus* sp. WS-42. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 212–217.
13. Kremnicky, L. and P. Biely. 1997. β-Mannanolytic system of *Aureobasidium pullulans*. *Arch. Microbiol.* **167**: 350–355.
14. Marga, F., C. Ghakis, C. Dupont, R. Morosoli, and D. Kluepfel. 1996. Improved production of mannanase by *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4656–4658.
15. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426–428.
16. Min, D. S., Y. J. Chung, D. H. Bai, and J. H. Yu. 1995. Production of β-mannanase by an alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14. *Foods Biotechnol.* **4**: 285–289.
17. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 1104–1141. Willians and Wilkins Press, Baltimore.
18. Still, D. W., P. Dahal, and K. J. Bradford. 1997. A single-seed assay for endo-β-mannanase activity from tomato endosperm and radicle tissues. *Plant Physiol.* **113**: 13–20.
19. 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.
20. Zeilinger, S., D. Kristufek, I. Arisan-Atac, R. Hodits, and C. P. Kubicek. 1993. Conditions of formation, purification, and characterization of an α-galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1347–1353.

(Received February 10, 1998)