

Copra cake galactomannan 가수분해 올리고당의 중합도별 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성

박귀근

경원대학교 공과대학 생명공학부 분자·식품생명공학과

Growth Activity of *Bifidobacterium* spp. by D.Ps (Degree of Polymerization) of Copra Cake Galactomannan Hydrolysates

Gwi-Gun Park

Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University

Abstract

Xylogone sp. β -mannanase was purified by DEAE-sephadex ion exchange column chromatography. The purified β -mannanase exhibited maximum activity at pH 6.0 and 60°C. Copra cake galactomannan was hydrolyzed by the purified β -mannanase, and then hydrolysates separated by activated carbon column chromatography. The main hydrolysates were composed of D.P(Degree of Polymerization) 4 and 6 galactomannooligosaccharides by TLC method. For elucidate the structure of D.P 4 and 6 oligosaccharides, methylation analysis was performed. D.P 4 and 6 were identified as M-M-M-M and M-M-M-M-M-G(G- and M- represent α -1,6-D-galactosidic and β -1,4-mannosidic linkages). To investigate the effects of copra cake galactomannooligosaccharides on the *in vitro* growth of *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, and *B. breve*, *Bifidobacterium* spp. were cultivated individually on the modified-MRS medium containing carbon source such as D.P 4 and 6 galactomannooligosaccharides, respectively. *B. longum* grew up 7.33-fold more effectively by the replacement of D.P 6 galactomannooligosaccharides as the carbon source in a comparison of standard MRS. Also, *B. bifidum* and *B. breve* grew up 5.74 and 3.42-fold slightly by the treatment of D.P 6 galactomannooligosaccharide.

Key words : *Xylogone* sp., β -mannanase, copra cake galactomannan

Mannooligosaccharide가 인체의 정상적인 장내상태를 유지하는데 중요한 역할을 하는 *Bifidobacterium* spp.의 좋은 에너지원으로서 유용하다는 것이 밝혀졌다(Gyrgy *et al.*, 1954; Hoffman *et al.*, 1969; Kobayashi *et al.*, 1984). 최근 건강을 추구하는 사회적 요구가 높아짐에 따라 장내균총 및 건강과 관련하여 특히 *Bifidobacterium* spp.가 주목을 받는 장내세균이 되었다. *Bifidobacterium* spp.은 인체 장내 flora의 최우세 균주로서 인체에 유익한 각종 생리활성을 지니고 있지만 각종 질병이나(Haenel *et al.*,

1975), 연령의(Mitsuoka *et al.*, 1972) 증가에 따라서 감소 또는 소실되는 보고가 있으며, 그 때문에 오늘날에는 이들 균종의 장내의 균수를 높이는 연구가 임상적 측면에서 널리 행해지고 있다. 또한 식품첨가물로서 개발되고 있는 각종 oligosaccharide가 감미료로서 뿐만 아니라 특정 장내 유익 세균의 생육을 촉진시킨다는 사실이 밝혀지면서, 그 이용성이 점차 확대되고 있다(Kim *et al.*, 2005). 또한 manooligosaccharides는 인체내 대장의 유용균인 *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp.의 좋은 성장원뿐만 아니라 대장내에 유해 미생물의 증식 저해작용을 나타내고 있어 면역기능 증진과 유해균 흡착을 통한 질병차단 및 유해균 증식에 필요한 영양공급 차단기능을 갖는다(Dekker, 1983). 이와같은 사실로부터 manooligosaccharides의 투여에 의한

Corresponding author: Gwi-Gun park, Professor, Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Sujungku, Songnam-si, 461-701, Republic of Korea.
Phone: 031-750-5383, Fax:
E-mail: ggpark@kyungwon.ac.kr

*Bifidobacterium*의 증가와 장내에서 식중독을 유발하는 유해미생물의 저하를 초래함과 동시에 이것들의 생성억제, 분해촉진등의 대사활성을 발현시킨다는것을 예측할수 있다. 특히 galactooligosaccharide 및 fructooligosaccharide도 *Bifidobacterium*의 증식인자로 작용하여 장내의 부패물질 및 유해물질을 생성시키는 세균을 억제하고(Mitsuoka, 1982; Mitsuoka, 1990), 변비 개선, 생체내의 면역증강 등의 효과가 인정되어 식품첨가물 및 사료첨가물로서 검토되고 있다(Min *et al.*, 1995).

Ohtsuka등(Ohtsuka *et al.*, 1989)은 천연의 비소화성 당질을 대상으로 *Bifidobacterium*의 증식촉진성 당질의 검사를 행하여 선택한 konjac mannooigosaccharides와 soybean oligosaccharide를 쥐에 투여했을 경우 bifidus factor로 알려져 있는 lactulose를 투여한 경우에 비하여 *Bifidobacterium*의 증식촉진효과가 현저히 증가함을 알 수 있었다. konjac mannooigosaccharides 및 soybean oligosaccharide를 인체에 경구투여시 대변중 *Bacteroidaceae*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*등의 병원성 및 장내부패에 관여하는 세균의 수가 감소하며(Akino *et al.*, 1987; Akino *et al.*, 1998) 또한 konjac mannan이 쥐장관의 화학발암을 억제하며 장내 flora의 *Bifidobacterium*의 증가와 *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*의 수를 감소시킨다고 보고되고 있다(Marga *et al.*, 1996).

본 연구에서는 *Xylogone* sp. 유래 β -mannanase를 분리정제하고 copra cake galactomannan 가수분해물을 분리하여 methylation분석에 의해 구조식을 동정하고, 중합도별 당가수분해물의 *Bifidobacterium*속(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*)에 대한 미생물의 생육활성을 비교하였다.

재료 및 방법

Xylogone sp. 유래 β -mannanase의 생산

효소생산 배지조성은 locust bean gum 2.5%, peptone 1.2%, yeast extract 0.5%, KH_2PO_4 1.0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%를 함유하는 액체배지 150 ml에 접종하여 배양온도 33°C 및 교반기 속도 150 rpm에서 76시간 배양후 4°C, 11,000×g에서, 15분간 원심분리후 상층액을 효소액으로 사용하였다.

단백질 농도

UV-분광광도계(Shimadzu Model 1201)를 사용하여 단백질은 280 nm, 핵산은 260 nm에서 흡광도를 측정해 $1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260}$ 의 식을 이용하여 단백질 농도를 계산하였고, 정제 단계 중에는 Lowry 방법(Kobayashi *et al.*, 1984)을 사용하여 단백질농도를 확인하였다.

효소의 활성

β -Mannanase의 생산량은 DNS 환원당은 정량법(Miller, 1959)에 의하여 측정하였다. 즉, 0.5 ml의 1% locust bean gum, 0.4 ml의 McIlvaine buffer (pH 6.0)와 0.1 ml의 균체가 제거된 배양액을 섞어 60°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 mannose를 회색하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 D-mannose를 0.1~1.0 mg/ml를 사용하였고, 효소 1 unit의 β -mannanase는 동일조건에서 1분당 생성되는 D-mannose에 해당하는 1 mg/ml의 환원당을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.

효소의 정제 및 최적반응 조건

효소의 정제는 DEAE sephadex ion exchange column chromatography법에 의하여 저자가 보고한 방법(Choi, 2004a; Choi, 2004b)에 따라 수행하였으며, 정제효소의 SDS전기영동법은 열로 변성시킨 후 분자량은 10kDa molecular weight marker (Life Technologies LTD., U.S.A.)를 이용하여 결정하였고, Laemmli의 방법(Laemmli, 1970)에 의해 Denaturing discotinuous gel electrophoresis를 수행하였다. 정제 효소의 최적 pH는 반응온도 60°C에서 pH 2~8 범위, 최적 온도는 pH 6에서 반응온도 20~80°C 범위에서 효소활성도를 측정하여 구하였다.

Copro cake galactomannan 가수분해 올리고당의 분리

0.5% copra cake galactomannan을 함유하는 정제 효소액 300 ml를 가하여 24시간 가수분해해 TLC로 pattern을 검토한 후 activated carbon column chromatography을 이용해 250 ml/hr 유속으로 tube당 50 ml씩 ethanol 0~50% linear gradient법으로 당을 분리하였다. Activated carbon column chromatography에 의한 당용액 0.2 ml와 5% phenol 0.2 ml를 가하여 혼합 후 진한 H_2SO_4 1 ml를 가하여 혼합한 후 20분간 방치하여 490 nm로 흡광도를 측정

하여 TLC로 분리도를 확인하였다.

Thin layer chromatography(TLC)

TLC는 McCleary법(Zama *et al.*, 1985)에 따라 다음과 같은 조건하에서 전개 후 UV조사 및 spray reagent로 분무하여 140°C에서 5분간 가열하여 당의 전개형태를 분석하였다.

TLC plate; 20×20 cm silica gel 60 F₂₅₄(Merck, Germany), 전개용매; n-propanol : methanol:water = 5:2:3(v/v), 발색시약; 30% sulfuric acid-ethanol.

당구조 분석

중합도별 분리된 oligosaccharides 및 표준 oligosaccharides를 포함하는 sugar sample은 Ciucanu (Ciucanu *et al.*, 1984)가 보고한 methylation분석법에 의해 동정되었다. Methylated sugar는 100°C, 2 시간동안 10% trifluoro acetic acid에 의해 가수분해하여, alditol acetate 유도체와 함께 다음과 같이 Kusakabe method(Kusakabe *et al.*, 1987)에 의한 gas liquid chromatography (GLC)에 의해 분석하였다.

측정장치 : HP6890series GC system (Hewlett Packard CO.,USA), Column : HP-1 100 m×0.25 mm×0.5 um(Hewlett Packard CO.,USA), Detector : FID, Column 온도 :180°C, Injection 및 검출기 온도 : 250°C, Carrier gas : Helium

중합도별 가수분해 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성

Bifidobacterium 속 균주(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*)에 대한 생육촉진 활성능을 측정하기 위해 MRS 배지에서 탄소원을 포도당 대신에 분리 조제된 중합도별 galactomannooligosaccharide를 첨가 후 측정하였다. 중합도별 galactomannooligosaccharide를 회수하여 진공 농축시킨후 121°C 15분간 멸균한 후 DNS법을 이용하여 동일한 환원당량으로 조절한 후 변형된 MRS 배지를 조제하여, 10⁸으로 희석한 후 혐기

적 조건하에서 37°C, 48 시간 평판배양한 후 colony 수를 비교하고, 동일한 조건으로 액체 배양하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 총균수를 비교하였다.

결과 및 고찰

효소 정제 및 효소화학적 성질

Table 1은 효소의 정제에 따른 비활성의 증가와 수율을 나타낸 것으로 기질 copra cake galactomannan에 대한 정제효소의 비활성은 20.39 units/mg, 정제배율은 84.95배를 나타냈으며 이는 기존의 DEAE-sephacel ion exchange chromatography 수행 시 기질에 대한 비활성인 16.11 units/mg와 정제배율 73.12보다 높은 수치로 DEAE-sephadex가 β -mannanase의 정제용 수치로서 보다 적합한 것으로 나타났다. 특히 DEAE sephadex ion exchange chromatography(2.5×42 cm)에 의한 정제법은 평형화된 column에 효소를 처리하여 30 mL/hr유속으로 tube당 5 mL씩 용출하였으며 0~1 M NaCl linear gradient 농도구배법에 의해 정제를 진행한 결과로서 정제효소는 SDS-PAGE에 의해 단일밴드를 나타내었으며, β -mannanase의 분자량은 34 kDa으로 추정되었다. *Penicillium purpurogenum* No. 618 유래의 정제 β -mannanase는 57 kDa, *As-pergillus niger*에서는 42 kDa, *Tyromyces palustris*에서는 61 kDa, *Streptomyces* sp. No. 17에서는 43 kDa, *Bacillus subtilis*에서는 22 kDa의 분자량이 Choi와 Park등 (Park *et al.*, 1998)에 의해 보고되고 있다.

DNS 환원당 정량법에 의하여 온도와 pH의 영향을 검토하였다. Fig. 1(A)는 효소반응에 미치는 온도의 영향, Fig. 1(B)는 효소반응에 미치는 pH의 영향을 나타내고 있으며, 최적 온도는 60°C, 최적 pH는 6.0을 나타내었다.*Trichoderma harzianum* 유래 β -mannanase의 경우 최적 pH와 온도는 각각 4.5 및 60°C로, *Penicillium* sp.유래 β -mannanase는 각각 5.5 및 55°C로 나타나 공통적으로 약산성 영역과 55~60°C의 영역에서 최대활성을 보였다(Kim *et al.*, 2005).

Table 1. Summary of purification of β -mannanase from *Xylogone* sp.

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	1211	5055	0.24	1.0	100
20% (NH ₄) ₂ SO ₄	998	3955	0.25	1.04	82.41
DEAE sephadex ion exchange column chromatography	775	38	20.39	84.95	63.99

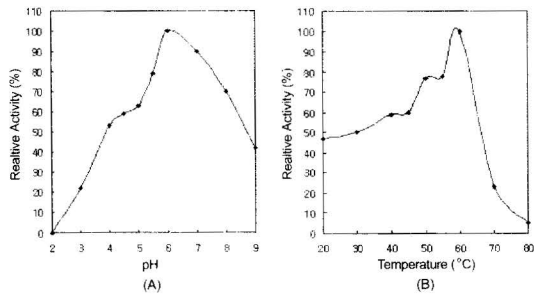


Fig. 1. Effect of pH and temperature on β -mannanase from *Xylogone* sp. A : Optimum pH, (B) Optimum temperature.

β -mannanase의 기질 특이성

0.5% copra cake을 함유하는 효소액을 가하여 60 °C에서 24시간 가수분해 반응을 진행하고, 5분간 가 열하여 효소활성을 불활성화 시키고 양이온 수지 (Sigma Chemical Co., amberlite IR-120)와 음이온 수지(Sigma Chemical Co., amberlite IRA-400)에 침지하여 반응액의 당조성을 TLC에 의해 분석하였다(Fig. 2). 그 결과 표준 mannotetraose와 유사한 Rf 값을 갖는 중합도 4의 spot와 함께 중합도 6의 spot이 나타났다. *Trichoderma harzianum* 유래 β -mannanase에 의한 gum galactomannan의 가수분해 결과 단당류를 포함한 중합도 4와 7의 3종류의 올리고당으로 분리되었다. 또한 *Penicillium* sp. 유래의

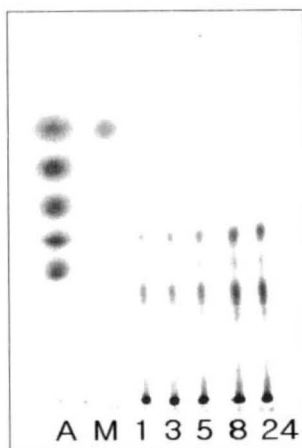


Fig. 2. TLC pattern of copra cake hydrolysates by *Xylogone* sp. β -mannanase. A : Authentic mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetraose and mannopentose from top to bottom. M : Standard galactose. 1, 3, 5, 8, 24 : Reaction time(hr).

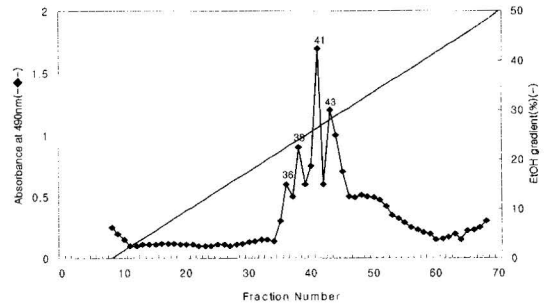


Fig. 3. Separation of oligosaccharides by activated carbon column chromatography.

β -mannanase의 copra cake에 대한 가수분해물로는 중합도의 2,3,4,5,7의 5종류의 올리고당이 분리되었음이 보고되고 있다(Kim *et al.*, 2005).

Copra cake galactomannan 가수분해 올리고당의 분리

Figure 3에서 409 nm로 흡광도를 측정한 결과 fraction No. 36, 38, 41, 43에서 peak를 나타내었다. 각각의 fraction을 TLC pattern을 검토한 결과 fraction No. 36에서 38까지 주요 가수분해 올리고당은 중합도 4가 주축을 이루고 있으며, fraction No. 41에서 43까지는 중합도 6의 올리고당으로 분리되었음이 Rf value상으로 확인 되었다(Fig. 4).

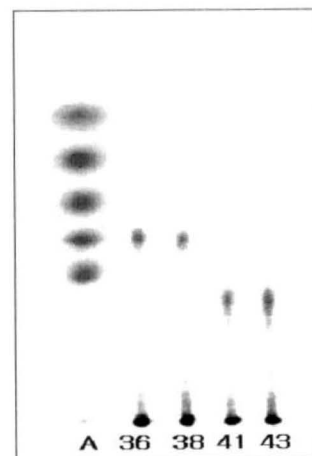


Fig. 4. TLC of D.P 4 and 6 separated by activated carbon column chromatography. A : Authentic mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetraose and mannopentose from top to bottom. 36, 38, 41 and 43 were fraction number at Fig. 3.

Table 2. Methylation analysis of the oligosaccharides and their hydrogenated derivatives isolated from the enzymatic hydrolysates of copra cake.

Alditol actate		1,2,3,5,6-Penta-O-Me-D-Mannitol	2,3,4,6-Tetra-O-Me-D-Man	2,3,4,6-Tetra-O-Me-Gal	2,3,6-Tri-O-Me-D-Man	2,3-Di-O-Me-D-Man	
Retention time(min)		1.8	5.5	7	12.7	30.6	
reference sample	Gal ¹ M _{4,1}	A		+	+	++	+
		B	+	+	+	+	+
	Gal ¹ M _{5,1}	A		+	+	+++	+
		B	+	+	+	++	+
	Gal ² M _{5,1}	A		+	++	++	++
		B	+	+	++	+	++
	Gal ² M _{6,1}	A		+	++	+++	++
		B	+	+	++	++	++
	D.P 6	A		+	+	+++	+
		B	+	+	+	++	+

A: original sugar, B: after hydrogenation with NaBH₄, +: 1 mol, ++: 2 mol, +++: 3 mol

당구조 분석

Copra cake의 효소적 가수분해산물로부터 분리 조제된 올리고당중 중합도 4는 Fig. 4와 같이 Rf value상으로 β-1,4-mannotetraose로 사료되었고, homo type인지 hetero type인지를 확인하기 위하여 *Aspergillus niger* 5-16유래의 정제 β-mannosidase와 *Penicillium purpurogenum* β-mannanase(Park et al., 1992)를 이용하여 효소적 가수분해한 결과 24시간 반응에서 mannose만으로 유리되는 TLC결과로 보아 mannose만으로 구성된 β-1,4-mannotetraose임이 입증되었다.

중합도 6의 methylation 분석결과 Table 2와 같이 1,2,3,5,6-Me-Mannitol(1 mol), 2,3,4,6-Me-Man(2 mol), 2,3,4,6-Me-Gal(2 mol), 2,3,6-Me-Man(2 mol)을 나타내었으며, NaBH₄처리 후에는 1,2,3,5,6-Me-Mannitol(1 mol), 2,3,4,6-Me-Man(1 mol), 2,3,4,6-Me-Gal(2 mol), 2,3,6-Me-Man(1 mol), 2,3-Me-Man(2 mol)로 나타났다. 따라서 mannose결합에 galactose 잔기가 branching하고 있는 구조로서 mannopentaose의 main chain에 환원말단에서 1번째 mannose에 galactose가 α-1,6 결합하고 있는 Gal¹Man₅(6¹-mono-α-D-galacto-pyranosyl-β-mannopentaose)의 구조로 동정되었다. *Trichoderma harzianum* 유래 β-mannanase에 의한 gum galactomannan의 가수분해 결과 단당류를 포함한 중합도 4와 7의 올리고당의 구조는 β-1,4-mannotetraose와 mannose 5개의 mannopentaose main chain에 환원말단부터 2번과 4번 사이에 galactose가 α-1,6-결합하고 있는 것으로 동정되었으나 blanchin하고 있는 정확한 위치는 아직 규명이 되지않은 상태이며, *Penicillium* sp.유래 5개의 올리

고당의 구조에 대한 정확한 동정도 현재 진행중에 있다.

중합도별 galactomannaooligosaccharides의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성

*Bifidobacterium*속 균주(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*)에 대한 생육촉진활성능을 측정하기 위해 MRS media에서 탄소원을 dex-trose대신에 조제된 중합도 6 galactomannaooligosaccharides를 첨가후 측정된 결과 *B. longum*의 경우 특징적으로 7.33배의 우수한 생육활성을 나타내었다. 또한 *B. bifidum* 및 *B. breve*에 대해서는 중합도 6 galactomannaooligosaccharide를 처리시 5.74배, 3.42배의 생육활성을 나타내었으나 중합도 4의 처리시에는 생육활성에 큰 영향을 미치지 못하였다. *B. infantis*와 *B. adolescentis*에 대해서는 중합도 4와 6의 올리고당을 탄소원으로 대체시 오히려 생육활성이 현저히 감소되었다(Table 3). 저자는 *Bacillus* sp. 유래 효소에 의한 guar galactomannan가수분해 올리고당중 MRS media에서 탄소원을 dextrose대신에 조제된 D.P. 5와 7 galactomannaooligosaccharides를 첨가 후 측정된 결과 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 양호한 생육촉진 활성을 보였다. 특히 *B. longum*에서는 D.P 5 galactomannaooligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 10배의, D.P. 7을 처리한 경우에도 7.5배의 상대 활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타냈었다. *B. bifidum*의 경우에서도 D.P. 5에서 9.8배, D.P. 7에서 7.7배의 우

Table 3. Summary of growth activity of *Bifidobacterium* spp. by the copra cake galactomannan hydrolysates.

<i>Bifidobacterium</i> sp.	Medium	CFU/mL	Relative activity(%)
<i>B. longum</i>	Standard MRS	1.4×10 ⁹	100
	MRS+D.P4	2.5×10 ⁹	181
	MRS+D.P6	1.9×10 ¹⁰	733
<i>B. bifidum</i>	Standard MRS	6×10 ⁹	100
	MRS+D.P4	1.6×10 ¹⁰	264
	MRS+D.P6	3.4×10 ¹⁰	574
<i>B. breve</i>	Standard MRS	1.3×10 ⁹	100
	MRS+D.P4	2.0×10 ⁹	155
	MRS+D.P6	4.4×10 ⁹	342
<i>B. animalis</i>	Standard MRS	2×10 ⁸	100
	MRS+D.P4	2.3×10 ⁸	114
	MRS+D.P6	3.8×10 ⁸	193
<i>B. infantis</i>	Standard MRS	3.5×10 ⁸	100
	MRS+D.P4	1.1×10 ⁸	32
	MRS+D.P6	2.3×10 ⁸	67
<i>B. adolescentis</i>	Standard MRS	7×10 ⁸	100
	MRS+D.P4	7×10 ⁷	11
	MRS+D.P6	1.8×10 ⁸	26

수한 생육활성을 나타내었으며 이외에도 *B. breve*, *B. animalis*, *B. infantis*에 있어서도 D.P. 5의 경우 2.9~5.7배의 상대활성을 나타내었으나, *B. infantis*에 대한 D.P. 7의 경우에는 표준 MRS배지와 비교하여 0.62배로 감소하였다. 또한 중합도 5의 올리고당이 중합도 7의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다(Choi, 2004a).

konjac glucomannan 가수분해 올리고당을 이용하여 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성도에 대한 결과도 보고(Choi, 2004b) 하였으나 특히 *B. longum*에서는 중합도 5 galactomannooligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 standard MRS와 비교하여 10배의 중합도 7을 처리한 경우에도 7.5배의 상대활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타내었다. *B. bifidum*의 경우에서도 중합도 5에서 9.8배, 중합도 7에서 7.7배의 우수한 생육활성을 나타내었으며 이외에도 *B. breve*, *B. animalis*, *B. infantis*에 있어서도 중합도 5의 경우 2.9~5.7배의 상대활성을 나타내었으나, *B. infantis*에 대한 중합도 7의 경우에는 standard MRS와 비교하여 0.62배로 감소하였다. galactomannooligosaccharides의 경우 중합도 5의 올리고당이 중합도 7의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났으나, glucomannooligosaccharides의 경우는 중합도별 큰 유의적 차이를 보이지 않았으며 galactomannooligosaccharides보다는 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성도에 대한 영향이 적은 것으로 비교되었다. 동일한 중합도를 갖는 hetero type 올리고당이 *Bifidobacterium* spp.에 대

한 생육활성의 차이는 구조적인 측면에서 galactomannooligosaccharides는 galactose가 mannose main chain에 branching하고 있는 구조로서, mannose와 mannose사이에 glucose가 위치하는 konjac glucomannooligosaccharides보다 미생물 생육활성에 영향을 더 미치는 것으로 추론하고 있다.

요 약

DEAE-sephadex ion exchange column chromatography에 의해 *Xylogone* sp. 유래 β -mannanase를 분리정제한 결과 비활성 20.39 units/ml, 정제배율 84.95을 나타내었다. SDS-PAGE에 의한 단일밴드를 확인하였고, 분자량은 34 kDa으로 결정되었다. 정제효소에 의해 guar gum galactomannan을 가수분해하여 activated carbon column chromatography에 의해 당가수분해물을 분리 회수하여 TLC에 의해 주요 당가수분해물을 분석한 결과 중합도 4와 6으로 확인되었다. 분리된 올리고당의 구조식은 Methylation법에 의해 M-M-M-M 및 M-M-M-M-M-G (G and M-represent α -1,6-D-galactosidic and β -1,4-mannosidic linkages)로 확인되었다. *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis* 및 *B. breve*의 생육활성에 대한 중합도 4와 6의 영향을 검토하기 위하여 변형 MRS 배지 상에 탄소원으로 중합도 4와 6을 대체하여 생육활성을 비교한 결과 *B. longum*에서는 hetero type인 중합도 6 galactomannooligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경

우 Standard MRS와 비교하여 7.33배의 상대 활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타내었다. *B. bifidum*의 경우에서도 중합도 6에서 5.74배, 이외에도 *B. breve*에 있어서 3.42배의 상대 활성을 나타내었으나, homo type인 중합도 4의 경우는 생육활성에 기여하지 못하였으며 오히려 *B. infantis*와 *B. adolescentis*에 대해서는 활성이 크게 감소하였다.

참고문헌

- 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.
- Akino, T, W. Nakamura and K. Horikoshi 1998. Characterization of three β -mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric Biol Chem* **52**: 773-779.
- Choi, J.Y and G.G Park 2004. Metabolism Activity of *Bifidobacterium* spp. by D.Ps of Konjac Glucomannan Hydrolysates. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol* **33**: 1186-1191.
- Choi, J.Y and G.G Park 2004. Purification of *Bacillus* sp. β -mannanase and the Growth Activity of *Bifidobacterium* spp. by Guar Gum Hydrolysates. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol* **32**: 117-122.
- Ciucanu, I. and F. Ker 1984. Methylation analysis of oligosaccharides. *Carbohydrate. Res.* **131**: 209-217.
- Dekker, R. F. H. 1983. Bioconversion of hemicellulose; aspect of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymatic saccharification of hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 1127-1146.
- Gyrgy, P., R. F. Norris and C. S. Rose. 1954. Bifidus factor. I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **4**: 193-198.
- Haenel, H. and J. Bending. 1975. Growth effect of branched oligosaccharides on principal intestinal bacteria. *Progress in food and nutrition science.* **1**: 21-27.
- Hartman, W.E. 1966. Application of mannan in the Food Industry. *Food. Technol.* **20**: 42.
- Hoffman, K. and J. Bircher. 1969. Veränderungen der bakteriellen Darmbesiedlung nach Lactulose-gaben. *Schweiz. Med. Wschr.* **99**: 608-613.
- Kim, Y. J. and G. G. Park. 2005. Identification and growth activity to *Bifidobacterium* spp. of locust bean gum hydrolysates by *Trichoderma harzianum* β -mannanase. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**: 364-369.
- Kobayahi, Y., R. Echizen, and M. Mutai. 1984. Intestinal flora and dietary factors. from Processings of the 4th RIKEN symposium on intestinal flora. Scientific Societies Press, Tokyo Japan.
- Kusakabe, I., R. Takahashi, K. Murakami, A. Maekawa, and T. Suzuki. 1985. Structure of the glucomannooligosaccharides resulting from the hydrolysis of konjac glucomannan produced by a β -mannanase from *Streptomyces* sp. Japan. *J. Trop. Agr.* **29**: 167-175.
- Kusakabe, I., M. Zama, G. G. Park, K. Tubaki, and K. Murakami. 1987. Preparation of β -1,4-mannobiose from white copra meal by a mannanase from *Penicillium purpurogenom.* *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2825-2826.
- Kusakabe, I., R. Takahashi, K. Murakami, A. Maekawa, and T. Suzuki. 1983. Preparation of crystalline β -1,4-mannooligosaccharides from copra mannan by a mannanase from *streptomyces.* *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2391-2392.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of head bacteriophage TA. *Nature.* **227**: 680-685.
- Marga F, C Ghakis, C Duport, R Morosoli and D Kluefel. 1996. Improved production of mannanase by *Streptomyces liv-idans.* *Appl Environ Microbiol* **62**: 4656-4658.
- McCleary, B. V. 1979. Modes of action of β -mannanase enzymes of diverse origin on legume seed galactomannan. *Phytochemistry.* **18**: 757-763.
- McCleary, B. V. 1982. Purification and properties of a mannoside mannohydrolase from guar. *Carbohydr. Res.* **101**: 74-92.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- 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 Biothchnol* **4**: 285-292.
- Mitsuoka, T. and K. Hayakawa. 1972. Recent trends in research on intestinal flora. *Zbl. Bakteriol. Hyg. I. Abt. Orig. A.* **233**: 333.
- Mitsuoka T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora* **1**: 3-11.
- Mitsuoka T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *J In Microbiol* **6**: 263-269.
- Ohtsuka K.Y., Y.K. Benno, H Endo, OT Ueda, T Mitsuoka and H Kobayashi. 1989. Effect of 4'-galactosyllactose intake on human fecal microflora. *Bifidus* **2**: 143-149.
- Park, G. G. and H. K. Jang. 1992. Separation and preparation of galactosyl mannoooligosaccharides from copra galactomannan by mannanase from *Penicillium purpurogenum.* *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 204-208.
- Park, G. G., I. Kusakabe, T. Yasui, and K. Murakami. 1998. A new method for the preparation of β -1,4-mannotriose from brown copra meal using the crude enzyme from *Penicillium purpurogenom.* *Japan. J. Trop. Agr.* **32**: 208-215.
- Park, G. G., I. Kusakabe, Y. Komatsu, H. Kobayashi, T. Yasui and K. Murakami. 1987. Purification and some Properties of β -mannanase from *Penicillium Purpurogenum.* *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2709-2716.
- Takahashi, R., I. Kusakabe, A. Maekawa, T. Suzuki and K. Murakami. 1983. Preparation of β -1,4-mannotriose from white copra meal using the crude enzyme from *Penicillium purpurogenum.* *Japan. J. Trop. Agr.* **27**: 140.
- Takahashi, R., I. Kusakabe, H. Kobayashi, K. Murakami, A.

Maekawa and T. Suzuki. 1984. Purification and some properties of mannanase from *Streptomyces* sp.. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 2189-2195.

Zama, M., I. Kusakabe, and K. Murakami. 1985. Specificity of β -mannanase from *Penicillium purpurogenum* for konjac glucomannan. *Japan. J. Trop. Agr.* **29**: 221-230.