

Trichoderma harzianum 유래 β -Mannanase의 정제 및 *Picea abies* Galactosyl Glucomannan 가수분해 올리고당의 종합도별 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성

이명석¹ · 박영서 · 박귀근*

¹레퍼런스바이오랩
가천대학교 식품생물공학과

Purification of β -Mannanase from *Trichoderma harzianum* and the Effect of *Picea abies* Galactosyl Glucomannan Hydrolysates on the Growth of *Bifidobacterium* spp.

Myung-Seok Lee¹, Young-Seo Park, and Gwi-Gun Park*

¹Reference Biolabs

Department of Food Science & Biotechnology, Gachon University

Abstract

Beta-mannanase from *Trichoderma harzianum* was purified by Sephadex G-100 column chromatography. The specific activity of the purified enzyme was 8.44 units/mL protein, representing an 56.27-fold purification of the original crude extract. The final preparation thus obtained showed a single band on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Its molecular weight was determined to be 52.5 kDa. *Picea abies* galactosyl glucomannan was hydrolyzed by the purified β -mannanase, and then the hydrolysates were separated by activated carbon column chromatography. The main hydrolysates were composed of D.P. (degree of polymerization) 6, 8, and 9 galactosyl glucomannooligosaccharides. To investigate the effects of *Picea abies* galactosyl glucomannooligosaccharides on in the *in vitro* growth of *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, and *B. auglutum*, *Bifidobacterium* spp. were cultivated individually on a modified-MRS medium containing carbon sources such as D.P. 6, 8, and 9 galactosyl glucomannooligosaccharides. *B. longum* grew up 14.3-fold and 9.4-fold more effectively after treatment with D.P. 6 and D.P. 8 galactosyl glucomannooligosaccharides compared to those with standard MRS medium. Especially, D.P. 6 was more effective than D.P. 9 galactosyl glucomannooligosaccharides with regard to the growth of *Bifidobacterium* spp.

Key words: galactosyl glucomannooligosaccharides, *Trichoderma harzianum*, β -mannanase, *Bifidobacterium* spp.

서 론

*Bifidobacterium*은 건강한 모유 영양아의 변에서 분리된 이래, 정장작용 및 장내균총의 정상화 등 인체에 유익함이 보고되었으며, 항암작용이나 면역부활작용 등 면역기능의 활성화의 측면에서 수많은 연구가 진행되고 있다(Hidaka & Eida, 1991). 이와 같은 중요한 생리학적 기능을 갖는 *Bifidobacterium*은 기능성 식품 소재의 하나로 중요시되어 일본을 비롯한 구미 및 국내에서 100 여 종 이상의 유제품

및 정장제 등에 이용되고 있다(Goh et al., 1982). 유산균 발효 유제품들은 구미 여러 나라에서 오래전부터 섭취되어 왔으며, 이들 발효 유제품의 섭취와 사람의 건강장수가 밀접한 관계가 있다는 연구보고들이 많이 발표되면서 이들 제품의 유용성에 대해 관심이 집중되었다(Lee & Shin, 1996).

최근에 대표적 유용균인 *Bifidobacterium*을 숙주의 장내에 증식시키려는 방법의 일환으로 *Bifidobacterium*이 첨가된 낙농제품과 *Bifidobacterium*이 함유된 식품들이 국내외적으로 증가하게 되었다(Laroia & Martin, 1990). 그러나 *Bifidobacterium*은 산소에 극히 민감하고 산성에 약해 이러한 제품들의 유통과정에서 그 생균수가 크게 감소하고 숙주의 장내에 정착하는 것이 용이하지 않아 그 유효성에 대한 의문이 대두되었다. 따라서 *Bifidobacterium* 생균을 섭

*Corresponding author: Gwi-Gun Park, Department of Food Science & Biotechnology, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea
Tel: +82-31-750-5383; Fax: +82-31-750-5383
E-mail: ggpark@gachon.ac.kr
Received February 1, 2013; revised February 17, 2013; accepted February 18, 2013

취하는 것 이외에 장내 *Bifidobacterium*의 성장을 촉진시키는 인자를 섭취하는 방향으로 많은 노력이 기울어지고 있다. 초기의 *Bifidobacterium* 성장 촉진 인자로는 모유와 우유에서 발견된 *N*-acetylglucosamine과 lactulose 그리고 여러 당 단백질 및 pantotheine이 보고되었다(Misra & Kulia, 1991). 그 이후에는 난소화성 올리고당류들, 즉 fructooligosaccharide, galactooligosaccharide, maltooligosaccharide 및 inulooligosaccharide 등에 대해서 많은 연구가 이루어지고 있다(Hidaka et al., 1991).

Hemicellulose로서 광범위하게 존재하고 있는 것으로는 mannan, xylan, galactan 등이 있으며, 이중에 mannan은 β -1,4-mannopyranoside 결합을 main chain으로 하는 다당이며, 특히 konjac glucomannan, copra 잔사인 white copra meal galactomannan 및 brown copra meal galactomannan에 다량 함유하고 있다. Mannan 계열의 oligosaccharide는 인체의 정상적인 장내상태를 유지하는데 중요한 역할을 하는 *Bifidobacterium*의 좋은 에너지원으로서 유용하다는 것이 밝혀졌다(Choi & Park, 2004a). *Bifidobacterium*은 정장 작용으로서 설사와 변비를 방지하고(Calrk & Martin, 1993) 장암예방, 노화방지의 효과를 나타내며, 성장기의 발육촉진, 조혈작용, 피부미용에 도움을 주는 비타민 B군을 형성한다(Mitsuoka, 1982). 또한 칼슘의 흡수 촉진, 혈당과 콜레스테롤의 수치를 낮추는 등 여러 이점을 갖고 있다. *Bifidobacterium* 속은 *Lactobacillus* 속과 더불어 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* 및 *Clostridium perfringens* 등과 같은 병원성 미생물의 성장 시 길항효과를 발휘하며, 프로바이오틱 미생물은 저항성을 증진시키기도 한다(Kim et al., 2002).

본 연구팀에서는 *Bifidobacterium*의 생육촉진활성에 효과를 보이는 gums유래 galactosyl manooligosaccharide와 konjac 유래 glucosyl manooligosaccharide의 장내세균 생육활성에 관한 보고를 하였으나(Lee & Park, 2008) galactosyl glucomannan 유래 가수분해 올리고당에 대한 연구를 보고한 바가 없어 본 연구에서는 *Trichoderma harzianum* 유래 β -mannanase의 정제를 수행하여 *Picea abies* 유래 galactosyl glucomannan 가수분해물을 분리, 조제 회수하고, TLC 및 Timell's method에 의해 분리된 당가수분해물의 중합도를 결정하여, *Bifidobacterium* 속(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. caughutum*.)에 대한 장내세균의 생육활성을 기존에 보고된 중합도별 올리고당의 활성과 비교함을 주요 목표로 하였다.

재료 및 방법

기질 조제법

기질로는 경기도 파주시 종묘원에서 *Picea abies* 무방부목을 구입하여 사용하였다. Galactosyl glucomannan 조제를 위해 Ståbrand et al.(2002)의 방법에 따라 가문비나무

(*Picea abies*)의 잔사를 증류수 100 mL에 포화시키고 NaOH(Duksan Co., Chungnam, ROK) 0.05%, H₂SO₄ (Duksan Co., Chungnam, ROK) 0.05%를 첨가하여 1 시간 반응시킨 후 건조하였다. 건조된 톱밥 9.1 g을 증류수 100 mL에 첨가하고 1 시간 물중탕을 가하여 Galactosyl glucomannan을 조제하였다.

Trichoderma harzianum 유래 β -mannanase의 생산

Trichoderma harzianum ATCC 32086은 한국종균협회에서 구입하여 실험에 사용하였으며 Kim & Park(2005)의 방법에 따라 cellulose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 3.0%, corn steep liquor(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 3.0%, KH₂PO₄(Duksan Co., Chungnam, ROK) 1.0%, (NH₄)₂SO₄(Duksan Co., Chungnam, ROK) 0.2%를 함유하는 액체배지 2 L에 종모배양액을 접종하여 28°C, 130 rpm, 96 시간 jar fermentor(KFC, KF-5L)로 배양하여 4°C, 11,000 rpm에서 15분간 원심분리(Beckman, rotor 14)한 후 상층액을 효소액으로 사용하였다.

β -Mannanase의 활성 측정

효소 활성 측정은 Dinitrosalicylic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였고 β -mannanase의 생산량은 DNS 환원당 정량법(Miller, 1959)에 의하여 수행하였다. 즉, 0.5 mL 1% locust bean gum, 0.4 mL의 McIlvaine buffer pH 4.5와 0.1 mL의 균체가 제거된 배양액을 섞어 55°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 mannose를 희석하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 D-mannose를 0.1-1.0 mg/mL를 사용하였고, β -mannanase 효소 1 unit은 동일조건에서 1 분당 생성되는 D-mannose에 해당하는 1 mg/mL의 환원당을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.

환원당의 정량

DNS 환원당 정량법(Miller, 1959)에 의하여 수행하였다. 즉 mannose를 함유한 가수분해물 0.1 mL와 DNS시약 1.0 mL를 혼합하여 10분간 물중탕을 하여 냉각시킨 후 희석하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 D-mannose를 0.1-1.0 mg/mL를 사용하였다.

효소정제

효소정제 수지로는 Sephadex G-100(GE-healthcare Co., Berkshire, England), DEAE Sephadex(GE-healthcare Co., Berkshire, England)를 사용했고 Kim & Park (2005)의 방법에 따라 Sephadex G-100을 0.2 M McIlvaine buffer solution(pH 4.5)으로 세척한 다음 column(2.5×42 cm)에 충전시켜서 0.2 M McIlvaine buffer solution(pH 4.5)으로 평형을 유지시켰다. 여기에 투석한 조효소를 용출시켰다. 이

때 용출속도는 20 mL/h로 하였고, 용출액은 5 mL씩 fraction collector에 모았고, 각 용출액은 단백질양과 효소의 활성을 측정하여 정제 효소액으로 사용하였다.

SDS 전기영동법

정제효소를 열로 변성시킨후 분자량은 10 kDa molecular weight marker(Life Technologies LTD., NY, USA)를 이용하여 결정하였고, Laemmli(1970)에 의해 Discontinuous denaturing gel electrophoresis를 수행하였다.

Galactosyl glucomannan 가수분해 올리고당의 분리 및 thin layer chromatography(TLC)

Oligosaccharides의 분리에는 carbon activated, powder (Wako Co., Osaka, Japan)를 사용하였다. *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*의 생육배지로 MRS broth(Difco Co., Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하였으며 기타시약은 분석용 특급 시약을 사용하였다. *Trichoderma harzianum* 효소액 90 mL (10 units)에 대해 기질용액 10 mL을 55°C, 24 시간 가수분해하여 TLC로 pattern을 검토한 후 activated carbon column chromatography를 이용해 당을 분리하였다. Activated carbon powder를 100°C 1 시간 가열한 후 column(4×90 cm)에 충전시키고, 증류수를 이용하여 24 시간 동안 평형화 시킨 후 당 용액을 주입하고, 250 mL/h 유속으로 tube당 50 mL씩 ethanol 0-30%의 linear gradient하여 당을 분리하였다.

TLC는 McCleary(1982)의 방법에 따라 다음과 같은 조건하에서 전개한 후 UV 조사 및 분무시약으로 분무하여 140°C에서 5분간 가열하여 당을 분석하였다: TLC plate; 20×20 cm silicagel 60 F254(Merck, Germany), Developing Solvent; *n*-propanol:methanol:water=5:2:3(v/v), Spray Reagent;

30% sulfuric acid-ethanol.

Timell 방법에 따른 중합도

가수분해된 galactosyl glucomannooligosaccharides 1 mL에 8% H₂SO₄ 1 mL를 100°C에서 2 시간 동안 가수분해 후 9% NaOH, 페놀프탈레인 용액을 2 방울 가하여 DNS 환원당 정량법으로 total reducing sugar(TRS)의 양을 구하고 가수분해된 galactosyl glucomanno oligosaccharides를 DNS 환원당 정량법으로 direct reducing sugar(DRS)의 양을 구하였다. TRS값을 DRS값으로 나눈 값을 가수분해된 galactosyl glucomannooligosaccharides의 중합도로 결정하였다(Timell et al., 1956).

중합도별 가수분해 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성

*Bifidobacterium*속 균주(*B. animalis* ATCC 25527, *B. bifidum* ATCC 15696, *B. breve* ATCC 15701, *B. longum* ATCC 29521, *B. infantis* ATCC 15697, *B. adolescentis* KCCM 11206, *B. auglutum* KCTC 3353)에 대한 생육촉진 활성을 측정하기 위해 MRS 배지에서 탄소원을 포도당 대신에 분리조제된 중합도별 galactosyl glucomannooligosaccharides를 회수하여 진공 농축시킨 후 DNS법(Miller, 1959)을 이용하여 dextrose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)와 동일한 환원당량으로 조절한 후 121°C, 15분간 멸균한 modified MRS 배지를 조제하여, 초기균수 10⁷으로 희석하여 혐기적 조건하에서 37°C, 48 시간 평판배양한 후 colony 수를 비교하고(Deya et al., 1982), 동일한 조건으로 액체 배양하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 총균수를 비교하였다(Toba, 1985).

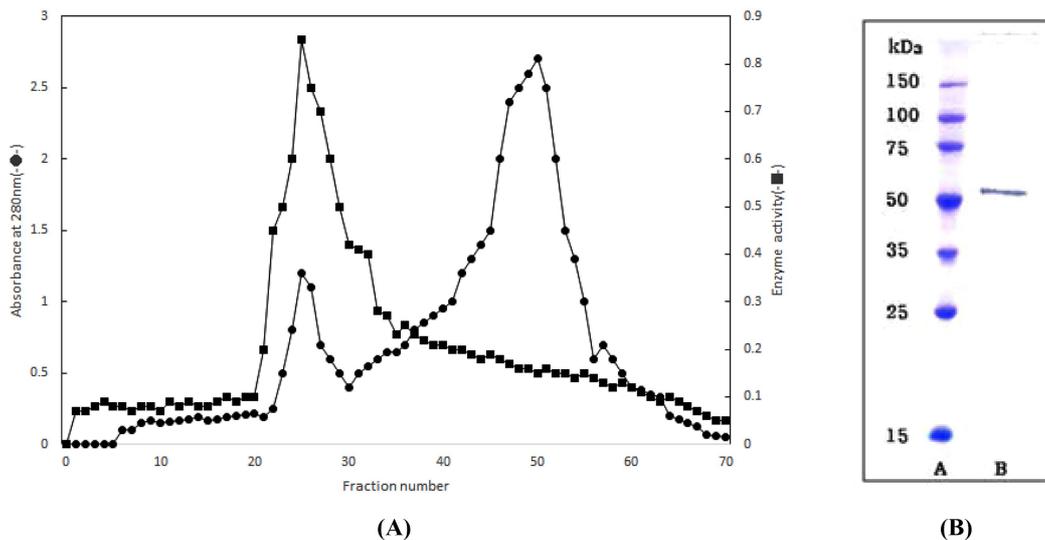


Fig. 1. Chromatography of the β -mannanase from *Trichoderma harzianum* by Sephadex G-100 column (A) and Analysis of the purified enzyme by SDS-PAGE (B). A, Marker; B, purified β -mannanase.

결과 및 고찰

Sephadex G-100 chromatography에 의한 정제 및 순도

10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 냉장상에서 효소액에 처리하여 4°C에서 12 시간 동안 방치한 후 원심분리하여 얻은 상층액을 투석막(cellulose tubing, 16 mm×30 cm, Sigma Chemical Co.)에 처리하여 4°C에서 24 시간 투석한 효소액을 Sephadex G-100 chromatography(2.5×42 cm)에 처리하여 20 mL/h의 유속으로 tube당 5 mL씩 용출하였으며 정제를 진행한 결과 분획 No. 22-30에서 활성분획이 나타났다 (Fig. 1-A). 정제효소는 SDS-PAGE에 의해 단일밴드를 나타내었으며(Fig. 1-B), β -mannanase의 분자량은 52.5 kDa으로 추정되었다. *Penicillium purpurogenum* No. 618 유래의 정제 β -mannanase는 57 kDa, *Aspergillus niger*에서는 42 kDa, *Tyromyces palustris*에서는 61 kDa, *Streptomyces* sp. No. 17에서는 43 kDa, *Bacillus subtilis*에서는 22 kDa의 분자량이 보고되고 있다(Choi & Park, 2004b; Park et al., 1991).

Picea abies 유래 galactosyl glucomannan 가수분해 올리고당의 분리 및 중합도 결정

효소액 100 mL에 대해 0.5% *picea abies* galactosyl glucomannan을 24 시간 가수분해하여 TLC로 pattern을 검토한 후 activated carbon column chromatography을 이용해 150 mL/h의 유속으로 tube당 20 mL씩 ethanol 0-30% linear gradient법으로 당을 분리하였다. Activated carbon column chromatography에 의한 당용액 0.2 mL와 5% phenol 0.2 mL를 혼합하여 conc.- H_2SO_4 1 mL를 혼합한 후 20분간 방치하여 490 nm로 흡광도를 측정한 후 각 fraction을 TLC로 pattern을 검토한 결과 fraction No. 31에서 중합도 6, fraction No. 41에서 중합도 8, fraction No. 48에서 중합도 9의 galactosyl glucomannooligosaccharides를 회수하였다(Fig. 2).

Picea abies 유래 galactosyl glucomannooligosaccharides의 분리도 및 중합도를 정확하게 정의하기 위해 TLC를 이용하여 Rf value에 의한 분리도를 확인할 수 있었으며 (Fig. 3), 중합도 결정을 위해 TLC pattern과 함께 Timell et al.(1956)의 방법에 의해 분석한 결과 Fig. 2에서 각각 분리된 Fraction No. 31 가수분해 올리고당의 TRS는 10.02, DRS는 1.59로서 TRS/DRS는 6.31로, Fraction No. 41 가수분해 올리고당의 TRS는 17.23, DRS는 2.06로서 TRS/DRS는 8.37로, Fraction No. 48 가수분해 올리고당의 TRS는 22.93, DRS는 2.45로서 TRS/DRS는 9.35로 나타났다. 이에 Fraction No. 31 올리고당은 중합도 7, Fraction No. 41 올리고당은 중합도 8, Fraction No. 48 올리고당은 중합도 9로 규명하였다.

구조유추를 위해 본 연구실에서 확보하고 있는 기질 특이

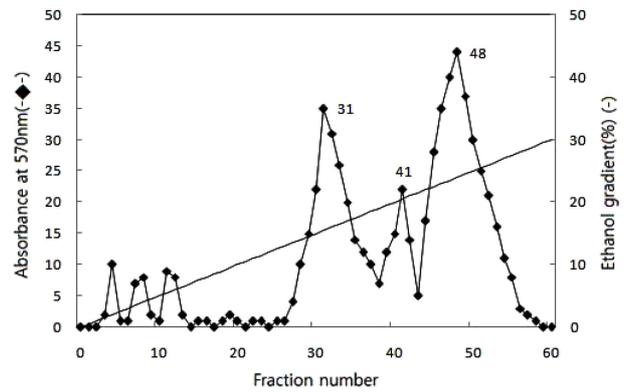


Fig. 2. Separation of galactosyl glucomannan hydrolysates by *Trichoderma harzianum* β -mannanase by activated carbon column chromatography.



Fig. 3. TLC of galactosyl glucomannan hydrolysates by *Trichoderma harzianum* β -mannanase. A, Authentic mannose, mannosiose, mannotriose and mannotetraose from top to bottom; H, galactosyl glucomannan hydrolysates.

성이 규명된 *Penicillium purpurogenum* 유래 정제 β -mannanase와 α -galactosidase를 이용하여 enzymatic sequential action에 의해 중합도 6은 β -mannanase 처리후 mannose, hetero type의 중합도 4로 가수분해된 시료에 순차적으로 정제 α -galactosidase를 처리한 결과 중합도 4는 galactose와 hetero type 중합도 3의 올리고당으로 가수분해되는 pattern을 나타내었으며, 중합도 8은 β -mannanase 처리에 의해 mannose, hetero type 중합도 3, hetero type 중합도 7로 가수분해되었으며, 순차적으로 정제 α -galactosidase를 처리한 결과 mannose, galactose, hetero type 중합도 3, hetero type 중합도 6의 올리고당으로 가수분해 되었다. 중합도 9는 β -mannanase 처리에 의해 mannose, hetero type 중합도 5, hetero type 중합도 6으로 가수분해되었고 α -galactosidase를 처리한 결과 mannose, galactose, hetero type 중합도 4,

Table 1. Determination of D.P value by the Timell's method.

	D.P value
GGM hydrolysates by <i>Trichoderma harzianum</i> fraction No. 31	6
GGM hydrolysates by <i>Trichoderma harzianum</i> fraction No. 41	8
GGM hydrolysates by <i>Trichoderma harzianum</i> fraction No. 48	9

hetero type 중합도 5로 가수분해되어 branching 하고있는 galactose의 위치 등은 유추 가능하였으나(결과 미제시), mannose와 mannose사이에 swiching하고 있는 glucose의 위치 유추는 불가능하여 현재 *Penicillium purpurogenum* 유래의 효소의 기질특이성과 상이한 *Aspergillus niger* 5-16을 정제하여 enzymatic sequential action에 의한 구조를 해석하고 있으며, 정확한 구조식 동정을 위해 Methylation method (Ciucanu & Kerk, 1984)를 병행하여 수행할 예정으로 있다.

중합도별 galactosyl glucomannan 가수분해 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성

*Bifidobacterium*속 균주(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. adollesentis*, *B. auglutum*)에 대한 생육촉진활성을 측정하기 위해 MRS medium에서 탄소원을 dextrose 대신에 조제된 D.P. 6, 8, 9 galactosyl glucomannooligosaccharides을 첨가한 후 평판배양을 하여 측정된 결과 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 생육 촉진 활성을 보였다. *B. longum*에서는 D.P. 6 galactosyl glucomannooligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 14.3 배, D.P. 8에서 9.42 배, D.P. 9에서 8.0 배의 상대활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타내었으며, *B. breve*의 경우에서도 D.P. 6에

Table 2. Growth activity of *Bifidobacterium* spp. by the D.P 6 galactosyl glucomannooligosaccharide.

	Medium	CFU/mL	Relative activity(%)
<i>B. animalis</i>	Standard MRS	4×10 ⁷	100
	MRS+D.P 6	5×10 ⁷	125
<i>B. bifidum</i>	Standard MRS	3×10 ⁷	100
	MRS+D.P 6	7×10 ⁷	233
<i>B. breve</i>	Standard MRS	2.1×10 ⁸	100
	MRS+D.P 6	1.58×10 ⁹	752
<i>B. infantis</i>	Standard MRS	1.3×10 ⁸	100
	MRS+D.P 6	1.5×10 ⁸	115
<i>B. longum</i>	Standard MRS	1.2×10 ⁸	100
	MRS+D.P 6	1.72×10 ⁹	1433
<i>B. adollesentis</i>	Standard MRS	3×10 ⁷	100
	MRS+D.P 6	5×10 ⁷	167
<i>B. auglutum</i>	Standard MRS	3×10 ⁷	100
	MRS+D.P 6	2×10 ⁷	67

Table 3. Growth activity of *Bifidobacterium* spp. by the D.P 8 galactosyl glucomannooligosaccharide.

	Medium	CFU/mL	Relative activity(%)
<i>B. animalis</i>	Standard MRS	4×10 ⁷	100
	MRS+D.P 8	6×10 ⁷	150
<i>B. bifidum</i>	Standard MRS	3×10 ⁷	100
	MRS+D.P 8	4×10 ⁷	133
<i>B. breve</i>	Standard MRS	2.1×10 ⁸	100
	MRS+D.P 8	1.72×10 ⁹	819
<i>B. infantis</i>	Standard MRS	1.3×10 ⁸	100
	MRS+D.P 8	1.1×10 ⁸	85
<i>B. longum</i>	Standard MRS	1.2×10 ⁸	100
	MRS+D.P 8	1.13×10 ⁹	942
<i>B. adollesentis</i>	Standard MRS	3×10 ⁷	100
	MRS+D.P 8	3×10 ⁷	100
<i>B. auglutum</i>	Standard MRS	3×10 ⁷	100
	MRS+D.P 8	2×10 ⁷	67

Table 4. Growth activity of *Bifidobacterium* spp. by the D.P 9 galactosyl glucomannooligosaccharide.

	Medium	CFU/mL	Relative activity(%)
<i>B. animalis</i>	Standard MRS	4×10 ⁷	100
	MRS+D.P9	9×10 ⁷	225
<i>B. bifidum</i>	Standard MRS	3×10 ⁷	100
	MRS+D.P9	7×10 ⁷	233
<i>B. breve</i>	Standard MRS	2.1×10 ⁸	100
	MRS+D.P9	1.45×10 ⁹	690
<i>B. infantis</i>	Standard MRS	1.3×10 ⁸	100
	MRS+D.P9	1.0×10 ⁸	77
<i>B. longum</i>	Standard MRS	1.2×10 ⁸	100
	MRS+D.P9	9.7×10 ⁸	808
<i>B. adollesentis</i>	Standard MRS	3×10 ⁷	100
	MRS+D.P9	5×10 ⁷	167
<i>B. auglutum</i>	Standard MRS	3×10 ⁷	100
	MRS+D.P9	3×10 ⁷	100

서 7.52 배, D.P. 8에서 8.19 배, D.P. 9에서 6.9 배의 활성을 나타내었다.

특히 본 연구실에서는 hemicellulose계열 올리고당 탐색 및 탄소원 대체에 의한 저가의 신규 MRS배지의 제품화와 관련하여 galatomannan 가수분해 올리고당에 대하여도 연구를 수행하고 있는 바, *Bacillus* sp. 유래 정제효소에 의한 galactomannan 가수분해 올리고당의 경우 *B. longum*에서는 D.P. 5 galactomannooligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 10 배의, D.P. 7을 처리한 경우에도 7.5 배의 상대 활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타내었다. *B. bifidum*의 경우에서도 D.P. 5에서 9.8 배, D.P. 7에서 7.7 배의 우수한 생육활성을 나타내었으며 이외에도 *B. breve*, *B. animalis*, *B. infantis*에 있어서도 D.P. 5의 경우 2.9-5.7 배의 상대활성을 나타내었으나, *B. infantis*에 대한 D.P. 7의 경우에서는 표준 MRS배지와 비

교하여 0.62 배로 감소하였다. 또한 중합도 5의 올리고당이 중합도 7의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다(Choi & Park, 2004b). Guar galactomannan과 konjac glucomannan 가수분해 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성을 비교하기 위하여 guar galactomannan과 konjac glucomannan으로부터 생성된 D.P. 5와 7과 KG5, KG7(konjac glucomannooligosaccharides의 중합도 5와 7)의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육 활성을 평판한천배지상의 colony의 수를 비교한 결과 Konjac glucomannan 유래 올리고당에 비해 guar galactomannan 유래 올리고당이 생육 활성이 높게 나왔으며, 특히 D.P. 5 galactomannooligosaccharide의 생육활성이 가장 높게 나왔다(Park et al., 2007). 또한 *Bacillus* sp.는 천연유래 galactomannan 중 mannose와 galactose의 비율이 14:1로 존재하는 coconut 야자열매의 부산물인 copra cake와 gum류 중에서 mannose와 galactose의 비율이 4:1 및 2:1로 존재하는 locust bean gum과 guar gum 및 konjac glucomannan에 대한 가수분해 최종산물은 중합도 5와 7의 올리고당으로 가수분해되는 공통된 특징을 나타내고 있으며, 동일한 중합도를 갖는 hetero type 올리고당이 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성의 차이는 구조적인 측면에서 galactomannooligosaccharides는 galactose가 mannose main chain에 분지하고 있는 구조로서, mannose와 mannose사이에 glucose가 위치하는 konjac glucomannooligosaccharides보다 미생물 생육활성에 영향을 더 미치는 것으로 추정하고 있다.

요 약

Sephadex G-100 column chromatography에 의해 *Trichoderma harzianum* 유래 β -mannanase의 정제를 수행하여 비활성 8.44 units/mL 정제배율 56.27 배를 나타내었다. SDS-PAGE에 의한 단일밴드를 확인하였고, 분자량은 52.5 kDa으로 결정되었다. 정제효소에 의해 *Picea abies* Galactosyl glucomannan을 가수분해하여 activated carbon column chromatography에 의해 당가수분해물을 분리 회수하여 TLC 및 Timell's method에 의해 중합도 6, 8, 9로 결정되었으며, *Penicillium purpurogenum* 유래 정제 β -mannanase와 α -galactosidase를 이용한 enzymatic sequential action에 의해 3 가지 가수분해산물 모두 hetero type galactosyl glucomannooligosaccharides로 확인되었다. *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. auglutum*의 생육활성에 대한 중합도 6, 8, 9의 영향을 검토하기 위하여 modified-MRS 배지상에 탄소원으로 중합도 6, 8, 9를 대체하여 생육활성을 비교한 결과 *B. longum*에서는 D.P. 6 galactosyl glucomannooligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 14.3 배, D.P. 8에서 9.42 배, D.P. 9에서 8.0 배의 상대활성을 나타내어 가장

우수한 생육활성을 나타내었으며, *B. breve*의 경우에서도 D.P. 6에서 7.52 배, D.P. 8에서 8.19 배, D.P. 9에서 6.9 배의 높은 활성을 보인 반면, *B. bifidum*에 대해서는 D.P. 6에서 2.33 배, D.P. 8에서 1.33 배, D.P. 9에서 2.33 배의 낮은 생육활성을 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 가천대학교 교내연구비 지원에 의한 결과임(GCU-2013-R024).

참고문헌

- Calrk PA, Martin JH. 1993. Selection of *Bifidobacteria* for use dietary adjuncts in cultured dairy food: H Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult. Dairy Prod. J.* 8: 11-14.
- Choi JY, Park GG. 2004a. Metabolism Activity of *Bifidobacterium* spp. by D.Ps of konjac glucomannan hydrolysates. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 1186-1191.
- Choi JY, Park GG. 2004b. 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, Ferk F. 1984. Methylation analysis of oligosaccharides. *Carbohydrate. Res.* 131: 209-217.
- Deya MA, Nojiri K, Igarashi S. 1982. Studies on the application of galactosyl lactose for infant formula. *Yukijirushi Nyugyo Giiyatsu Kenkyusho Hokoku* 79: 19-26.
- Goh JS, Yang BK, Ahn JK. 1982. Studies on the manufacture of semi-solid type set yogurt. *Korean J. Dairy Sci.* 4: 129-137.
- Hidaka H, Eida T. 1991. Proliferation of *Bifidobacteria* by oligosaccharides and their useful effect of human health. *Bifidobacteria Microflora* 10: 65-72.
- Hidaka H, Hirayama M, Yamada K. 1991. Fructooligosaccharides enzymatic preparation and biofunction. *J. Carbo. Chem.* 10: 509.
- Kim JD, Kim MY, Kong JY. 2002. The growth promoting effect of enterobacteria *Bifidobacterium infantis* KCTC 3270 by combination of natural products bearing antioxidative capacity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 931-938.
- Kim YJ, Park GG. 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.
- Laemmler UK. 1970. Cleavage of struture protein during the assembly of head bacteriophage TA. *Nature* 227: 680-685.
- Laroia S, Martin JH. 1990. *Bifidobacteria* as possible dietary products-A review. *Cul. Dairy Products J.* 18: 132-139.
- Lee HJ, Park GG. 2008. Purification of *Xylogone sphaerospora* β -mannanase and growth activity of *Bifidobacterium* spp. by konjac glucomannan hydrolysates. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 51: 159-163.
- Lee SH, Shin HK. 1996. Analysis of mugwort oligosaccharides utilized by *Bifidobacteria*. *Food Sci. Biotechnol.* 28: 28-33.
- McCleary BV. 1982. Purification and properties of a mannoside mannohydrolase from guar. *Carbohyd. Res.* 101: 74-79.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determina-

- tion of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426.
- Misra AK, Kulia RK. 1991. Intensified growth of *Bifidobacterium* and preparation of *Bifidobacterium bifidum* for a dietary adjunct. Cul. Dairy Products J. 4: 46-51.
- Mitsuoka T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. Bifidobacteria Microflora 1: 3-5.
- Park GG, Lee SY, Park BK, Ham SS, Lee JH. 1991. Characteristic features of an α -galactosidase from *Penicillium purpurogenum*, J. Microbiol. Biotechnol. 2: 90-98.
- Park SE, Lee HJ, Kim SO, Kang JB, Park GG. 2007. Growth activity of *Bifidobacterium* spp. by D.Ps of locust bean gum galactomannan hydrolysates from *Trichoderma harzianum* β -mannanase. Food Eng. Prog. 11: 279-283.
- Rhew BK, Lee JW, Lee CS, Hyun SH, Park YJ, Ahn JB, Yang CK, Yoon SW. 2002. Effects of xylooligosaccharides on the growth of intestinal microflora. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 30: 380-387.
- Stålbrand H, Lundqvist J, Teleman A. 2002. Isolation and characterization of galactoglucomannan from spruce. Carbohydr. Polymers 48: 29-39.
- Timell TE, Glaudemans CPJ, Currie AL. 1956. Spectrophotometric method for determination of sugars. Anal. Chem. 28: 1916-1920.
- Toba T. 1985. β -galactosidase-its application to lactose hydrolysis and galacto oligosaccharides product. Japan J. Dairy Food Sci. 34: 169-182.