

## *Xylogone sphaerospora* 유래 정제 $\beta$ -Mannanase에 의한 *Picea abies* Galactosyl Glucomannan 가수분해물의 종합도별 *Bifidobacterium* spp. 생육활성 비교

이명석<sup>1</sup> · 박영서 · 박귀근\*

<sup>1</sup>레퍼런스바이오랩, 가천대학교 식품생물공학과

### Purification of $\beta$ -Mannanase from *Xylogone sphaerospora* and the Effect of *Picea abies* Galactosyl Glucomannan Hydrolysates on the Growth of *Bifidobacterium* spp.

Myung-Seok Lee<sup>1</sup>, Young-Seo Park, and Gwi-Gun Park\*

<sup>1</sup>Reference Biolabs

Department of Food Science & Biotechnology, Gachon University

#### Abstract

$\beta$ -Mannanase from *Xylogone sphaerospora* was purified by Sephadex G-100 column chromatography. The specific activity of the purified enzyme was 8.24 units/mL protein, representing an 58.86-fold purification of the original crude extract. The final preparation thus obtained showed a single band on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight was determined to be 42 kDa. *Picea abies* galactosyl glucomannan was hydrolyzed by the purified  $\beta$ -mannanase, and then the hydrolysates were separated by activated carbon column chromatography. The main hydrolysates were composed of D.P. (degree of polymerization) 7, 8, 12, and 13 galactosyl glucomanno-oligosaccharides. To investigate the effects of *Picea abies* galactosyl glucomanno-oligosaccharides on 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 a carbon source such as D.P. 7, 8, 12, and 13 galactosyl glucomanno-oligosaccharides. *B. longum* propagated 10.83-fold, 12.50-fold, 10.25-fold, and 9.25-fold more effectively by the treatment of D.P. 7, 8, 12, and 13 galactosyl glucomanno-oligosaccharides, respectively, compared to those of standard MRS medium. Especially, all four sorts of galactosyl glucomanno-oligosaccharides were more effective in promoting the growth of *B. longum* than *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, and *B. infantis*.

**Keywords:** galactosyl glucomanno-oligosaccharides, *Xylogone sphaerospora*,  $\beta$ -mannanase, *Bifidobacterium* spp.

## 서 론

혐기성 미생물의 배양기술이 향상되고 무균동물의 사육이 성공함에 따라 장내 미생물 균총의 구성과 이들 미생물이 숙주에 미치는 영향에 대해 하나씩 밝혀지기 시작하였다. 최근에 와서는 대표적 유용균인 *Bifidobacterium*을 숙주의 장내에 증식시키려는 노력이 집중적으로 이루어져 왔는데, 이러한 방법의 일환으로 *Bifidobacterium*이 첨가된 낙농제품과 기타 *Bifidobacterium*이 함유된 식품들이 국내

외적으로 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 섭취하는 것 이외에 장내에 상재하고 있는 *Bifidobacterium*의 성장을 촉진시키는 인자를 섭취하는 방향으로 많은 노력이 기울어지고 있다. 초기의 *Bifidobacterium* 성장촉진 인자로는 모유와 우유에서 발견된 *N*-acetylglucosamine과 lactulose 그리고 여러 당단백질 및 pantotheine이 보고되었다(Misra & Kulia, 1991). 난소화성 올리고당류인 fructo-oligosaccharide, galacto-oligosaccharide, malto-oligosaccharide 및 inulo-oligosaccharide 등에 대해서 많은 연구가 이루어지고 있으며(Hidaka et al., 1991), 올리고당은 난소화성으로 분해

\*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 March 28, 2013; revised May 9, 2013; accepted May 13, 2013

되지 않고 대장에 존재하는 *Bifidobacterium*과 같은 유익균에 의해 acetate, propionate와 같은 volatile fatty acid(VFA)로 전환되므로 칼로리가 거의 없으며, *Bifidobacterium* 증식 인자로 작용하는 반면 장내부패균의 증식을 억제한다(Ryu et al., 1998; Colombel et al., 1987; Fuller, 1992). 유아 시에는 *Bifidobacterium*이 우세하지만 이유기가 되면 *Bacteroides* 속 등 혐기성균이 출현해서 *Bifidobacterium*을 능가하고 이후 장내 세균총은 거의 변화가 없다. 그러나 노년기에는 건강한 성인에게서는 극히 적은 유해균이 많아져서 유해물질을 대량 생산하게 되어 노화현상을 일으킨다. 그 외에도 충치예방, 칼슘 흡수를 개선한다.

본 연구팀에서는 *Bifidobacterium*의 생육촉진활성에 효과를 보이는 gum 유래 galactosyl manno-oligosaccharide와 konjac 유래 glucosyl manno-oligosaccharide의 장내세균 생육활성(Lee & Park, 2008a) 및 최근에는 *Trichoderma harzianum* 유래 정제  $\beta$ -mannanase에 의한 *Picea abies* galactosyl glucomannan 가수분해 올리고당에 대한 장내세균 활성 연구를 보고하였다(Lee et al., 2013). Galactomannan이나 glucomannan 유래의 저중합도 올리고당보다 galactosyl glucomannan 유래 고중합도 올리고당이 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성이 높게 나타나는 결과가 확인되어 본 연구에서는 *Xylogone sphaerospora* 유래  $\beta$ -mannanase의 정제를 수행하여 *Picea abies* 유래 galactosyl glucomannan 가수분해물을 분리, 조제 회수하고, TLC, FACE법 및 Timell법에 의해 분리된 당가수분해물의 중합도를 결정하여, *Bifidobacterium* 속(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. auglutum*.)에 대한 장내세균의 생육활성을 기준에 보고된 중합도별 올리고당의 활성과 비교함을 주요 목표로 하였다.

## 재료 및 방법

### 기질 조제법

Galactosyl glucomannan 조제를 위해 Stlbrand et al.(2002)의 방법에 따라 최근에 보고된 조제법(Lee et al., 2013)으로 수행하였다.

### *Xylogone sphaerospora* 유래 $\beta$ -mannanase의 생산

*Xylogone sphaerospora* KCCM 60478은 한국중균협회에서 구입하여 실험에 사용하였으며 Lee & Park(2008b)의 방법에 따라 효소생산 액체배지 100 mL에 접종하여 33°C, 150 rpm, 72 시간 배양하여 4°C, 11,000 rpm, 15 분 원심분리(Beckman, rotor 14) 후 상층액을 효소액으로 사용하였다.

### $\beta$ -Mannanase의 활성 측정

효소 활성 측정은 Dinitrosalicylic acid(Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였고  $\beta$ -mannanase의 생산량은 DNS

환원당 정량법(Miller, 1959)에 의하여 수행하였으며 최근 보고된 방법(Lee et al., 2013)으로 측정하였다.

### 환원당의 정량

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

### 효소정제 및 SDS 전기영동법

Lee & Park(2008b)의 방법에 따라 Sephadex G-100을 0.2 M McIlvaine buffer solution(pH 6.0)으로 씻은 다음 column(2.5×42 cm)에 충전시켜서 0.2 M McIlvaine buffer solution(pH 6.0)으로 평형을 유지시켰다. 여기에 투석한 조효소를 용출시켜 fraction collector에 모아진 용출액은 단백질 양과 효소의 활성을 측정하여 비활성이 가장 높게 나오는 fraction을 분리 회수하여 전기영동으로 확인후 정제 효소액으로 사용하였다.

SDS-전기영동은 정제효소를 열로 변성시킨 후 분자량은 10 kDa molecular weight marker(Life Technologies LTD., USA)를 이용하여 결정하였고, Laemmli(1970)의 방법에 의해 denaturing(SDS) discontinuous gel electrophoresis를 수행하였다. 즉, 30% acrylamide / 0.8% bisacrylamide 6.00 mL와 4×Tris-Cl / SDS(pH 8.8) 3.75 mL, H<sub>2</sub>O 5.25 mL를 혼합하여 5분간 탈기하여 10% APS 0.05 mL와 TEMED 0.01 mL를 첨가한 후 Pasteur pipette을 사용하여 separating gel를 제조하였다. 30% acrylamide / 0.8% bisacrylamide 0.65 mL와 4×Tris-Cl / SDS(pH 6.8) 1.25 mL, H<sub>2</sub>O 3.05 mL를 혼합하여 5분간 탈기하여 10% APS 0.025 mL와 TEMED 0.005 mL를 첨가하여 시료 well comb를 설치하고 stacking gel를 제조하였다. 영동용 완충액으로 Buffer(1 L 증류수에 15.1 g의 Tris와 72 g의 glycine, 5 g의 SDS을 함유)를 사용하였다. 영동은 200V 정전압에서 행하였다. 전기영동완료 후 staining solution(1 L 증류수에 Coomassie brilliant blue R-250 0.05 mL, methanol 50 mL, acetic acid 10 mL, H<sub>2</sub>O 40 mL를 함유)에서 염색을 한 후, destaining solution(1 L 증류수에 methanol 5 mL, acetic acid 7 mL, H<sub>2</sub>O 88 mL를 함유)에서 탈색 후, gel을 건조시켰다.

### 당의 전기영동(Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis, FACE)

ANTS에 유도화한 당의 전기영동에서 사용되는 gel은 30-40%의 polyacrylamide gel을 사용하였다(Laemmli, 1970; Jackson, 1996; Shimokawa et al., 1997). 즉, acrylamide A(acrylamide 53.33%와 Bis 1.41% 함유) 5.6 mL와 Buffer A(1.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.8) 1.8 mL를 혼합하여 5분

간 탈기하고, acrylamide B(acrylamide 26.6%와 Bis 0.89% 함유) 2.8 mL와 Buffer A 1.8 mL를 혼합하여 탈기하여 각각 10% APS 18  $\mu$ L와 TEMED 6  $\mu$ L를 첨가한 후 Pasteur pipette을 사용하여 separating gel를 제조하였다. 다음은 acrylamide A 0.75 mL와 Buffer B(0.25 M Tris-HCl buffer, pH 6.8) 3.75 mL와 증류수 3.0 mL를 혼합하여 5분간 탈기하였다. 여기에 10% APS 20  $\mu$ L와 TEMED 7.5  $\mu$ L를 첨가하여 시료 well comb를 설치하고 stacking gel를 제조하였다. 전기영동용 완충용액으로 Buffer C(1 L 증류수에 30.3 g Tris와 144 g glycine을 함유)을 10 배 희석한 액을 사용하였다. 전기영동은 stacking gel은 100 V, separating gel은 400 V의 정전압에서 행한다. 전기영동 완료 후, 365 nm의 고파장 자외선하에서 사진을 촬영하였다.

**Galactosyl glucomannan 가수분해물의 분리 및 thin layer chromatography(TLC)**

올리고당의 분리에는 carbon activated powder(Wako Co. Japan)를 사용하였다. *Bifidobacterium*의 생육배지로 MRS broth(Difco, USA)를 사용하였으며 기타시약은 분석용 특급시약을 사용하였다. *Xylogone sphaerospora* 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°C에서 1 시간 가열한 후 column (4x90 cm)에 충전시키고, 증류수를 이용하여 24 시간 동안 평형화 시킨 후 당용액을 주입하고, 250 mL/h 유속으로 tube 당 50 mL씩 ethanol 0-30%의 linear gradient하여 당을 분리하였다.

TLC는 McCleary(1982)의 방법에 따라 당의 분석조건은 최근 보고된 방법(Lee et al., 2013)과 동일하게 수행하였다.

**Timell 방법에 따른 중합도 결정**

Total reducing sugar(TRS)을 direct reducing sugar(DRS)으로 나눈 값을 가수분해된 galactosyl glucomanno-oligosacchrides의 중합도로 결정하였으며(Timell et al., 1956) 최근에 보고된 방법(Lee et al., 2013)과 동일하게 수행하였다.

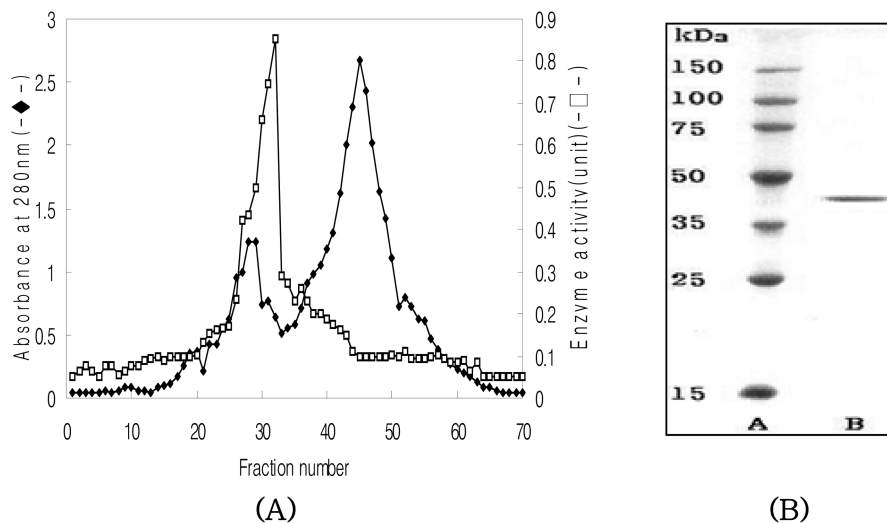
**중합도별 가수분해 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성**

*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. cauglutum* KCTC 3353)에 대한 생육촉진활성을 측정하기 위해 MRS배지에서 탄소원을 포도당 대신에 분리조제된 중합도별 galactosyl glucomanno-oligosaccharides를 회수하여 진공 농축시킨 후 DNS법(Miller, 1959)을 이용하여 dextrose와 동일한 환원당량으로 조절한 후 121°C, 15분간 멸균한 modified MRS 배지를 조제하여, 초기균수 10<sup>7</sup>으로 희석하여 혐기적 조건하에서 37°C, 48 시간 평판배양한 후 colony수를 비교하고(Deya et al., 1982), 동일한 조건으로 액체 배양하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 총균수를 비교하였다(Toba, 1985).

**결과 및 고찰**

**Sephadex G-100 chromatography에 의한 정제 및 순도**

20%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 냉장상에서 효소액에 처리하여 4°C에서 24 시간 동안 방치한 후 원심분리하여 얻은 상층액을 투석막(cellulose tubing, 16 mmx30 cm, Sigma Chemical Co.)에 처리하여 4°C에서 12 시간 투석한 효소액을 Sephadex G-100 chromatography(2.5x42 cm)에 처리하여 20 mL/h의 유속으



**Fig. 1. Chromatography of the  $\beta$ -mannanase from *Xylogone sphaerospora* by Sephadex G-100 column (A) and analysis of the purified enzyme by SDS-PAGE (B). A, Marker; B, purified  $\beta$ -mannanase.**

로 tube당 5 mL씩 용출하였으며 정제를 진행한 결과 분획 No. 25-30에서 활성분획이 나타났다(Fig. 1-A). 정제효소는 SDS-PAGE에 의해 단일밴드를 나타내었으며(Fig. 1-B),  $\beta$ -mannanase의 분자량은 42 kDa으로 추정되었다. Sephadex G-100에 의해 정제를 한 *T. harzianum* 유래  $\beta$ -mannanase의 경우 비활성이 8.44 units/mg, 정제배율이 56.27 배, 수득률이 73.39%로(Park, 2007) *X. sphaerospora* 유래  $\beta$ -mannanase의 정제배율은 조금 높게, 수득률은 조금 낮은 것으로 나타났으며, DEAE sephadex ion exchange chromatography에 의해 정제를 한 *Bacillus* sp. 유래  $\beta$ -mannanase의 경우 비활성이 21.57 units/mg, 정제배율이 95.33 배, 수득률이 66.58%로(Choi & Park, 2004b) *X. sphaerospora* 유래  $\beta$ -mannanase의 정제배율이 *Bacillus* sp. 유래  $\beta$ -mannanase보다 낮은 반면 수득률은 높은 것으로 나타났다. *Bacillus* sp. 유래  $\beta$ -mannanase의 경우 38.9 kDa이며(Choi & Park, 2004a), *Trichoderma harzianum*은 52.5 kDa(Park, 2007), *Trichoderma reesei*는 53 kDa(Matti et al., 1993), *Thermotoga neapolitana* 5068(Park et al., 1998)은 65 kDa, *Aspergillus aculeatus*는 45 kDa으로 미생물 유래에 따라  $\beta$ -mannanase의 분자량이 다양하게 나타났다.

*Picea abies* 유래 galactosyl glucomannan 가수분해 올리고당의 분리 및 중합도 결정

*Xylogone sphaerospora* 유래 효소액 90 mL에 대해 10 mL *Picea abies* 유래 galactosyl glucomannan을 24 시간 가수분해해 FACE로 pattern을 검토한 후 activated carbon column chromatography을 이용해 250 mL/h 유속으로 tube당 50 mL씩 ethanol 0-30% linear gradient법으로 당을 분리하였다. Activated carbon column chromatography에 의한 당용액 0.2 mL와 5% phenol 0.2 mL를 가하여 혼합 후 conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mL를 가하여 혼합한 후 20분간 방치하여 570 nm로 흡광도를 측정 후 peak를 나타내는 각 fraction을 FACE로 pattern을 검토한 후 중합도별로 4 종류의 galactosyl

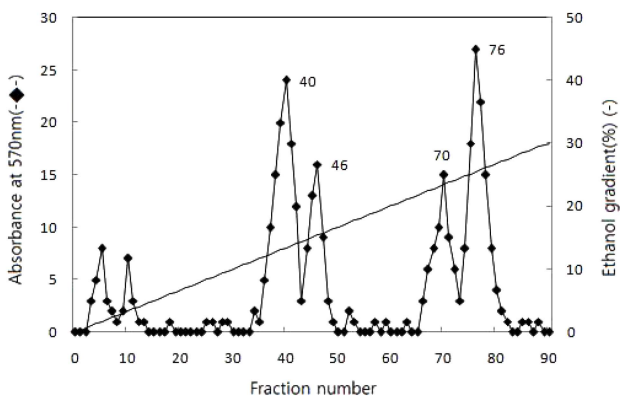


Fig. 2. Separation of galactosyl glucomannan hydrolysates by *Xylogone sphaerospora*  $\beta$ -mannanase using activated carbon column chromatography.

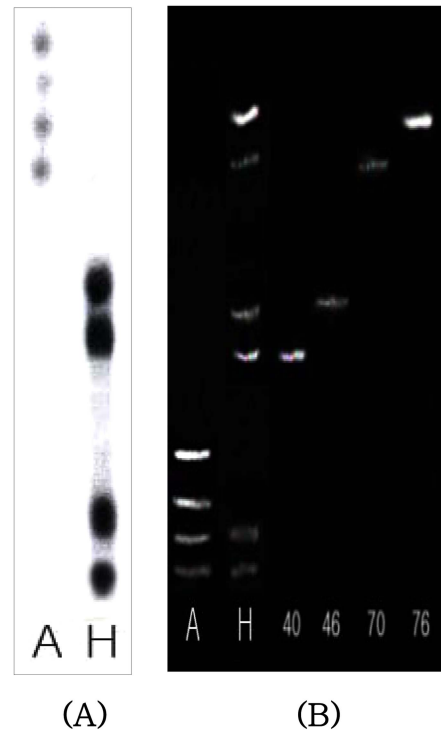
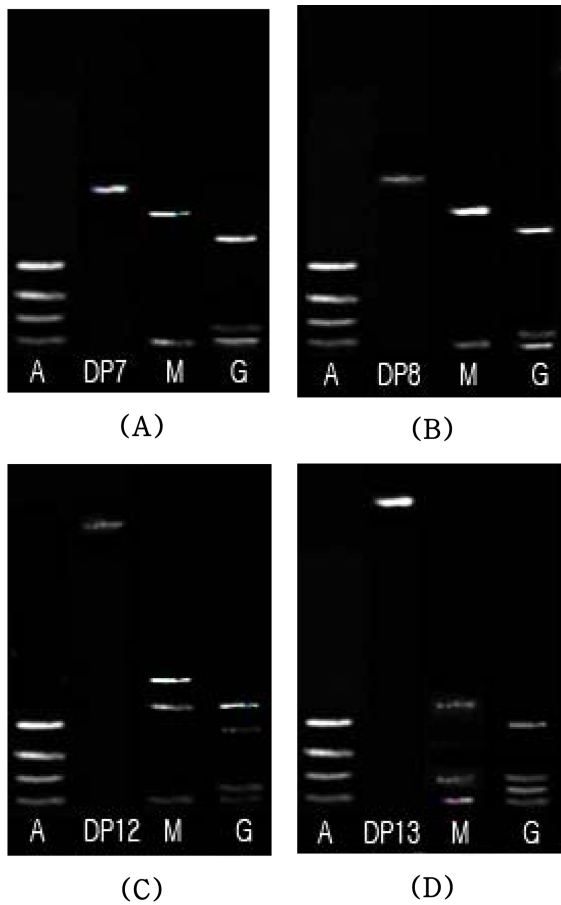


Fig. 3. TLC (A) and FACE (B) of galactosyl glucomannan hydrolysates by *Xylogone sphaerospora*  $\beta$ -mannanase. A, Authentic mannose, mannobiose, mannotriose and mannotetraose from top to bottom; H, galactosyl glucomannan hydrolysates.

glucomanno oligosaccharides을 분리 회수하였다(Fig. 2). TLC에 의한 가수분해 pattern을 검토한 결과 네 종류의 중합도별 galactosyl glucomanno-oligosaccharides로 가수분해된 것을 확인할 수 있었으며 FACE에 의해 중합도별 galactosyl glucomanno-oligosaccharides가 분리된 것을 확인할 수 있었다. 분리도 및 중합도를 확인하기 위하여 TLC(Fig. 3-A) 및 FACE(Fig. 3-B)를 이용하여 분리도를 확인할 수 있었으며, 중합도 결정을 위해 Timell et al.(1956)의 방법에 의해 분석한 결과 Fig. 2에서 각각 분리된 fraction No. 40 가수분해 올리고당의 TRS는 15.56, DRS는 2.139, TRS/DRS는 7.274로 나타났으며 fraction No. 46 가수분해 올리고당의 TRS는 17.89, DRS는 2.113, TRS/DRS는 8.467로 나타났다. Fraction No. 70 가수분해 올리고당의 TRS는 26.97, DRS는 2.168, TRS/DRS는 12.440으로 나타났으며 fraction No. 76 가수분해 올리고당의 TRS는 28.31, DRS는 2.124, TRS/DRS는 13.329로 나타났다. 이에 fraction No. 40 가수분해 올리고당은 중합도 7, fraction No. 46 가수분해 올리고당은 중합도 8, fraction No. 70 가수분해 올리고당은 중합도 12, fraction No. 76 가수분해 올리고당은 중합도 13으로 밝혀졌다.

구조유추를 위해 본 연구실에서 확보하고 있는 기질특이성이 규명된 *Penicillium purpurogenum* 유래 정제  $\beta$ -mannanase



**Fig. 4.** FACE of galactosyl glucomannan hydrolysates by the sequential action of *Penicillium purpurogenum* enzymes. A, Authentic mannose, mannobiose, mannotriose, and mannotetraose from bottom to top; DP7, D.P.7 galactosyl glucomanno oligosaccharide; DP8, D.P.8 galactosyl glucomanno-oligosaccharide; DP12, D.P.12 galactosyl glucomanno-oligosaccharide; DP13, D.P.13 galactosyl glucomanno-oligosaccharide; M, Patterns of hydrolysates by the treatment of *Penicillium purpurogenum*  $\beta$ -mannanase; G, Patterns of hydrolysates by the treatment of *Penicillium purpurogenum*  $\alpha$ -galactosidase.

와  $\alpha$ -galactosidase를 이용한 enzymatic sequential action에 의해 중합도 7은 올리고당 용액 0.1 mL에 *Penicillium purpurogenum* 유래 정제  $\beta$ -mannanase 효소액 0.9 mL(20.5 units/mg)를 55°C, 12시간 가수분해한 후 mannose, hetero type의 중합도 6의 당으로 가수분해되었으며, 상기 반응액 0.1 mL에 *Penicillium purpurogenum* 유래 정제  $\alpha$ -galactosidase 효소액 0.9 mL (11.2 units/mg)를 동일한 조건에서 가수분해한 결과 mannose, galactose, hetero type의 중합도 5의 당이 나타나는 것으로 확인하였다(Fig. 4-A). 중합도 8, 12, 13 올리고당 시료도 상기 중합도 7과 동일한 방법과 조건으로 *Penicillium purpurogenum* 유래 정제  $\beta$ -mannanase와  $\alpha$ -galactosidase의 sequential action에 의한 가수분해 pattern을 FACE법으로 확인한 결과 중합도 8은 정제  $\beta$ -mannanase 처리 시 mannose, hetero type의 중합도 7의 당과 정제  $\alpha$ -

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

Fraction No.	D.P value
Fraction No. 40 of galactosyl glucomanno-oligosaccharides hydrolysates	7
Fraction No. 46 of galactosyl glucomanno-oligosaccharides hydrolysates	8
Fraction No. 70 of galactosyl glucomanno-oligosaccharides hydrolysates	12
Fraction No. 76 of galactosyl glucomanno-oligosaccharides hydrolysates	13

galactosidase 처리 시 mannose, galactose, hetero type의 중합도 6의 당으로(Fig 4-B), 중합도 12는 정제  $\beta$ -mannanase 처리 시 mannose, hetero type의 중합도 5, hetero type의 중합도 6의 당과 정제  $\alpha$ -galactosidase 처리 시 mannose, galactose, hetero type의 중합도 4, hetero type의 중합도 5의 당으로(Fig. 4-C), 중합도 13은 정제  $\beta$ -mannanase 처리 시 mannose, mannobiose, hetero type의 중합도 5의 당과 정제  $\alpha$ -galactosidase 처리 시 mannose, mannobiose, galactose, hetero type의 중합도 4의 당으로 가수분해되는 pattern(Fig. 4-D)을 시사하였다.

기질특이성이 규명된 *Penicillium purpurogenum* 유래 정제  $\beta$ -mannanase와  $\alpha$ -galactosidase를 이용한 enzymatic sequential action 방법에 의해서는 mannose와 mannose사이에 switching 하고 있는 glucose의 위치 유추는 불가능하여 현재 *Penicillium purpurogenum* 유래의 효소의 기질특이성과 상이한 *Aspergillus niger* 5-16유래  $\beta$ -mannanase와  $\alpha$ -galactosidase를 정제하여 enzymatic sequential action에 의한 구조해석을 병행하고 있으며, 정확한 구조식 동정을 위해 Methylation법(Ciucanu & Kerk, 1984)를 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. adolescentis*, *B. auglutum*)에 대한 생육촉진활성을 측정하기 위해 MRS medium에서 탄소원을 dextrose 대신에 조제된 D.P. 7, 8, 12, and 13 galactosyl glucomanno-oligosaccharides을 첨가한 후 평판배양을 하여 측정된 결과 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 생육 촉진 활성을 보였다. *B. longum*에서는 D.P. 7 galactosyl glucomanno-oligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 10.8 배, D.P. 8에서 12.5 배, D.P. 12에서 10.2 배, D.P. 13에서 9.2 배의 상대활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타내었으며, *B. bifidum*의 경우에서도 D.P. 7에서 3.0 배, D.P. 8에서 3.3 배, D.P. 12에서 3.7 배, D.P. 13에서 5.7 배의 활성을 나타내었다(Table 2).

본 연구실에서는 hemicellulose계열 올리고당 탐색 및 탄

**Table 2. Summary of growth activity of *Bifidobacterium* spp. by D.P. 7, 8, 12 and 13 galactosyl glucomannooligosaccharides.**

<i>Bifidobacterium</i> spp.	D.P. Medium	7		8		12		13	
		CFU/mL	Relative activity(%)	CFU/mL	Relative activity(%)	CFU/mL	Relative activity(%)	CFU/mL	Relative activity(%)
<i>B. animalis</i>	Standard MRS	4×10 <sup>7</sup>	100	4×10 <sup>7</sup>	100	4×10 <sup>7</sup>	100	4×10 <sup>7</sup>	100
	MRS +D.Ps	6×10 <sup>7</sup>	150	4×10 <sup>7</sup>	100	8×10 <sup>7</sup>	200	1.3×10 <sup>8</sup>	325
<i>B. bifidum</i>	Standard MRS	3×10 <sup>7</sup>	100	3×10 <sup>7</sup>	100	3×10 <sup>7</sup>	100	3×10 <sup>7</sup>	100
	MRS +D.Ps	9×10 <sup>7</sup>	300	1×10 <sup>8</sup>	333	1.1×10 <sup>8</sup>	367	1.7×10 <sup>8</sup>	567
<i>B. breve</i>	Standard MRS	2.1×10 <sup>8</sup>	100	2.1×10 <sup>8</sup>	100	2.1×10 <sup>8</sup>	100	2.1×10 <sup>8</sup>	100
	MRS +D.Ps	4.8×10 <sup>8</sup>	229	5.3×10 <sup>8</sup>	252	7.4×10 <sup>8</sup>	352	5.8×10 <sup>8</sup>	276
<i>B. infantis</i>	Standard MRS	1.3×10 <sup>8</sup>	100	1.3×10 <sup>8</sup>	100	1.3×10 <sup>8</sup>	100	1.3×10 <sup>8</sup>	100
	MRS +D.Ps	1.4×10 <sup>8</sup>	108	1.6×10 <sup>8</sup>	123	1.2×10 <sup>8</sup>	92	1.6×10 <sup>8</sup>	123
<i>B. longum</i>	Standard MRS	1.2×10 <sup>8</sup>	100	1.2×10 <sup>8</sup>	100	1.2×10 <sup>8</sup>	100	1.2×10 <sup>8</sup>	100
	MRS +D.Ps	1.3×10 <sup>9</sup>	1083	1.5×10 <sup>9</sup>	1250	1.23×10 <sup>9</sup>	1025	1.11×10 <sup>9</sup>	925
<i>B. adolescentis</i>	Standard MRS	3×10 <sup>7</sup>	100	3×10 <sup>7</sup>	100	3×10 <sup>7</sup>	100	3×10 <sup>7</sup>	100
	MRS +D.Ps	9×10 <sup>7</sup>	300	8×10 <sup>7</sup>	267	1.1×10 <sup>8</sup>	367	1×10 <sup>8</sup>	333
<i>B. auglutum</i>	Standard MRS	7×10 <sup>7</sup>	100	7×10 <sup>7</sup>	100	7×10 <sup>7</sup>	100	7×10 <sup>7</sup>	100
	MRS +D.Ps	1.4×10 <sup>8</sup>	200	1.7×10 <sup>8</sup>	243	3.1×10 <sup>8</sup>	443	4×10 <sup>8</sup>	571

소원 대체에 의한 저가의 신규 MRS배지의 제품화와 관련 하여 galatomannan과 glucomannan 가수분해 올리고당에 대하여도 연구를 수행하고 있는 바, *Xylogone sphaerospora* 유래 정제  $\beta$ -mannanase에 의한 konjac glucomannan 가수분해 올리고당의 경우 탄소원을 dextrose 대신에 분리 조제된 D.P. 3와 4 glucomanno-oligosaccharides를 첨가 후 측정된 결과 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 양호한 생육촉진 활성을 보였다. 특히 *B. longum*에서는 D.P. 4 glucomanno-oligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 3.9 배의, D.P. 3을 처리한 경우에도 2.7 배의 상대 활성을 나타내어 우수한 생육활성을 나타냈었으며, *B. breve*의 경우에서도 D.P. 4에서 2.47 배, D.P. 3에서 2.08 배의 활성을 나타내었으며 이 외에도 *B. bifidum*에 있어서는 D.P. 4의 경우 2.8 배의 상대활성을 나타내었다. *Bifidobacterium* 7균주 모두에 대해서 중합도 4의 올리고당이 중합도 3의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다. *Bacillus* sp. 유래 정제  $\beta$ -Mannanase에 의한 가수분해 올리고당의 경우 konjac glucomannan 가수분해 올리고당을 이용하여 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성도에 대한 결과도 보고(Choi, 2004b) 하였으나 특히 *B. longum*에서는 중합도 5 galactosyl manno-oligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 standard MRS와 비교하여 10 배의, 중합도 7을 처리한 경우에도 7.5 배의 상대활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타내었다. *B. bifidum*의 경우에서도 중합도 5에서 9.8 배, 중합도 7에서 7.7배의 우수한 생육활성을 나타내었으며 이외에도 *B. breve*, *B. animalis*, *B. infantis*에 있어서는 중합도 5의 경우 2.9-5.7배의 상대 활성을 나타내었으나, *B. infantis*에 대한 중합도 7의 경우에는 standard MRS와 비교하여 0.62 배로 감소하였다. galactosyl manno-oligosaccharides의 경우 중합도 5의 올리고당이 중합도 7의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하

는 것으로 나타났으나, glucosyl manno-oligosaccharides의 경우에는 중합도별 큰 유의적 차이를 보이지 않았으며 galactosyl manno-oligosaccharides 보다는 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성도에 대한 영향이 작은 것으로 비교되었다. 동일한 중합도를 갖는 hetero type 올리고당이 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성의 차이는 구조적인 측면에서 galactosyl manno-oligosaccharides는 galactose가 mannose main chain에 branching하고 있는 구조로서, mannose와 mannose사이에 glucose가 위치하는 konjac glucomanno-oligosaccharides보다 미생물 생육활성에 영향을 더 미치는 것으로 추론하고 있다.

## 요 약

Sephadex G-100 column chromatography에 의해 *Xylogone sphaerospora* 유래  $\beta$ -mannanase의 정제를 수행하여 비활성 8.24 units/mL 정제배율 58.86 배를 나타내었다. SDS-PAGE에 의한 단일밴드를 확인하였고, 분자량은 42 kDa으로 결정되었다. 정제효소에 의해 *Picea abies* Galactosyl glucomannan을 가수분해하여 activated carbon column chromatography에 의해 당가수분해물을 분리 회수하여 TLC와 FACE법 및 Timell's method에 의해 중합도 7, 8, 12 and 13으로 결정되었으며, *Penicillium purpurogenum* 유래 정제  $\beta$ -mannanase와  $\alpha$ -galactosidase를 이용한 enzymatic sequential action에 의해 4 가지 가수분해산물 모두 hetero type galactosyl glucomanno-oligosaccharides로 확인되었다. *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. auglutum*의 생육활성에 대한 중합도 7, 8, 12 and 13의 영향을 검토하기 위하여 modified-MRS 배지상에 탄소원으로 중합도 7, 8, 12 and 13을 대체하여 생육활성을 비교한 결과 *B. longum*에서는 D.P. 7 galactosyl glucomanno-oligosaccharide를 탄소원

으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 10.8 배, D.P. 8에서 12.5 배, D.P. 12에서 10.2 배 D.P. 13에서 9.2 배의 상대활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타내었으며, *B. bifidum*의 경우에서도 D.P. 7에서 3.0 배, D.P. 8에서 3.3 배, D.P. 12에서 3.7 배 D.P. 13에서 5.7 배의 활성을 보였다.

## 감사의 글

이 논문은 2013년도 가천대학교 교내연구비 지원에 의한 결과임(GCU-2013-R089).

## 참고문헌

- 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.  $\beta$ -mannanase and the growth activity of *Bifidobacterium* spp. by guar gum hydrolysates. J. Microbiol. Biotechnol. 32: 117-122.
- Ciucanu I, Kerk F. 1984. Methylation analysis of oligosaccharides. Carbohydr. Res. 131: 209-217.
- Colombel JF, Cortot A, Neut C, Romond C. 1987. Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin induced gastrointestinal effect. Lancet 2: 43-48.
- 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.
- Fuller R. 1992. Probiotics-The Scientific Basis. 1st ed. Chapman & Hall, London. 31: 355-376.
- Hidaka H, Hirayama M, Yamada K. 1991. Fructooligosaccharides enzymatic preparation and biofunction. J. Carbohydr. Chem. 10: 509-522.
- Jackson P. 1996. The analysis of fluorophore-labeled carbohydrates by polyacrylamide gel electrophoresis. Mol. Biotechnol. 5: 101-123.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structure 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. 2008a. Purification of *Xylogone sphaerospora*  $\beta$ -mannanase and growth activity of *Bifidobacterium* spp. by konjac glucomannan hydrolysates. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 51: 159-163.
- Lee HJ, Park GG. 2008b. Screening of hemicellulose oligosaccharides and preparation of the recipe for modified MRS medium by the replacement of carbon source. J. Appl. Biol. Chem. 51: 272-276.
- Lee MS, Park YS, Park GG. 2013. Purification of  $\beta$ -mannanase from *Trichoderma harzianum* and the effect of *Picea abies* galactosyl glucomannan hydrolysates on the growth of *Bifidobacterium* spp. Food Eng. Prog. 17: 62-68.
- Matti SA, Maija T, Liisa V. 1993. Purification and characterization of two  $\beta$ -mannanase from *Trichoderma reesei*. J. Biotechnol. 29: 229-242.
- McCleary BV. 1982. Purification and properties of a mannoside mannohydrolase from guar, Carbohydr. Res. 101: 74-79.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination 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.
- 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*  $\beta$ -mannanase. Food Eng. Prog. 11: 279-283.
- Park WS, Kim HY, Choi YJ. 1998. Production of  $\beta$ -mannanase and b-mannosidase from *Sporolactobacillus* sp. M201. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 232-237.
- Ryu BH, Cho SH, Ha SW, Park KM, Kang KH. 1998. Changes of the intestinal microflora and fecal properties by intake of yoghurt added capsulated or uncapsulated *Bifidobacteria*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 221-225.
- Shimokawa T, Toshida S, Kusakabe I. 1997. Isolation and quantification of alginate-derived oligouronic acids by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. Carbohydr. Res. 299: 95-98.
- Stlbrand 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.  $\beta$ -galactosidase-its application to lactose hydrolysis and galactooligo-saccharides product. Japan J. Dairy Food Sci. 34: 169-182.