

Bacillus sp. 유래 β -mannanase에 의한 Gal³Man₄(6³-mono- α -D-galacto-pyranosyl- β -mannotetraose) 조제 및 장내세균에 대한 생육활성

김상우¹ · 박귀근*

¹일본 오사카대학 단백질연구소, 경원대학교 공과대학 생명공학부

(2004년 11월 22일 접수; 2004년 12월 13일 수리)

Bacillus sp. 유래 β -mannanase의 brown copra meal에 대한 기질 특이성을 규명하기 위하여 정제효소 150 mg을 0.5% 기질에 50°C, 24 hrs 가수분해 후 TLC, FACE로 비교 검토한 결과 2종류의 galactosyl manooligosaccharide로 구성되어 1차 activated carbon column chromatography을 이용해 250 ml/hr 유속으로 tube당 50 ml씩 ethanol 0~30% linear gradient로 당을 분리하였다. Activated carbon column chromatography에 의한 당용액 0.2 ml와 5% phenol 0.2 ml를 가하여 혼합 후 Conc.H₂SO₄ 1 ml를 가하여 혼합한 후 20분간 방치하여 490 nm로 흡광도를 측정하여 TLC로 pattern을 검토한 후 Gal³Man₄ 및 DP 7의 galactosyl manooligosaccharide의 fraction을 회수하여 2차 activated carbon column chromatography를 이용해 1차와 동일한 조건에서 분리·회수하여 중합도 5는 Gal³Man₄(6³-mono- α -D-galactopyranosyl- β -mannotetraose)로 동정되었고, 중합도 7은 현재 동정중에 있다. *Bifidobacterium*속 균주(*B. longum*, *B. bifidum*)에 대한 생육활성을 비교 검토하기 위하여 MRS media에서 탄소원을 dextrose대신에 조제된 Gal³Man₄를 첨가후 측정된 결과 Gal³Man₄이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 생육촉진 활성을 보였다. 특히 *B. longum*에 대해서는 Gal³Man₄를 dextrose대체 탄소원으로 처리시 10배의 생육활성이 증가하였다.

Key words: Gal³Man₄(6³-mono- α -D-galactopyranosyl- β -mannotetraose)

서 론

동남아시아에서는 coconut이 주요생산물로서 coconut 제유공장에서 배출되는 착유잔사의 이용법 개발은 중요한 과제이다. 착유잔사 중에는 약 50%의 galactomannan이 함유되어 있고, 여기에는 mannose 함량이 높은 동시에 순도가 높은 자원이다. 산업폐기물의 효율적 이용이라는 관점에서 지금까지는 미생물효소를 이용하여 mannan의 유효이용에 관해 연구되어 mannose나 manno- oligosaccharide를 효율적으로 조제하는 방법¹⁻⁵이 연구되고 있으며 여기에 관련된 효소의 생화학적 연구도 수행되어 *Penicillium purpurogenum*이나 *Streptomyces*의 β -mannanase의 copra galactomannan에 대한 기질특이성 등의 효소화학적 성질이 보고되고 있다.⁶⁻⁸ 또한, McCleary⁹는 *Bacillus subtilis*의 β -mannanase의 기질특이성을 보고하였다.

β -Mannan의 대부분은 유화제, 농화제로서 제빵, 치즈, 아이스크림, 육류충전제, 우유, 유제품, 섭식용 식품 등의 식품산업에 이용되고 있다.¹⁰ 최근에 manooligosaccharide가 인체의 정상적인 장내상태를 유지하는데 중요한 역할을 하는 *Bifidobacterium* spp.의 좋은 에너지원으로서 유용하다는 것이 밝혀졌다.¹¹⁻¹³ 최근 건강을 추구하는 사회적 요구가 높아짐에 따라 장내균총과 건강의 관련성에 대하여 폭넓게 검토되고 있으며, 특히

Bifidobacterium spp.가 주목을 받는 장내세균이 되었다. *Bifidobacterium* spp.은 인체 장내 flora의 최우세 균주로서 인체에 유익한 각종 생리활성을 지니고 있지만 각종 질병이나,¹⁴ 연령의¹⁵ 가에 따라서 감소·소실된다는 것이 보고돼 있으며, 그 때문에 오늘날에는 이들 균종의 장내의 균 수를 높이는 연구가 소아과 영역을 비롯하여 임상 면에서 널리 행해지고 있다.

연구에서는 *Bacillus* sp. 유래 정제 β -mannanase를 이용하여 copra cake가수분해 올리고당중 Gal³Man₄(6³-mono- α -D-galactopyranosyl- β -mannotetraose)을 분리 조제하고, 미생물유래 효소의 기질특이성의 차이점을 이용하여 구조를 동정하였으며, *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성을 기존의 MRS배지내 탄소원과 Gal³Man₄(6³-mono- α -D-galacto-pyranosyl- β -mannotetraose) 대체탄소원의 활성을 비교검토하였다.

재료 및 방법

Brown copra meal과 β -1,4-mannooligosaccharides. Copra의 oil 추출 부산물인 brown copra meal은 Fuji Oil Co., Ltd (Japan)으로부터 공급을 받았으며, Copra meal은 72% H₂SO₄로 30°C, 30분간 가수분해하였으며, total sugar 및 component sugar는 Somogyi법과 gas liquid chromatography에 의해 분석하였다. Copra meal은 66.0% mannose, 5.8% galactose, 22.5% glucose, 4.0% arabinose 및 1.7% xylose로 구성된 47.7% total sugar를 함유한다. β -1,4-mannooligosaccharides는 이미 보고된 방법¹⁶과 같이 *Streptomyces* sp. No. 493유래 β -

*연락처

Phone: 82-31-750-5383, Fax: 82-31-750-5383

E-mail: ggpark@mail.kyungwon.ac.kr

mannanase에 의한 copra mannan의 가수분해산물로 조제되었다.

효소액의 생산. 효소생산 배지조성 및 방법과 효소정제법은 저자에 의해 보고된 방법¹⁷⁾에 의하여 효소액을 생산하였다.

환원당의 정량. DNS 환원당 정량법에¹⁸⁾ 의하여 수행하였다. 즉, mannose를 함유한 가수분해물 0.1 ml와 DNS시약 1.0 ml를 혼합하여 10 min간 물증탕을 하여 냉각시킨 후 희석하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 D-mannose를 0.1~1.0 mg/ml를 사용하였다.

Thin layer chromatography(TLC). TLC는 McCleary법¹⁹⁾에 따라 다음과 같은 조건하에서 전개 후 UV조사 및 spray reagent로 분무하여 140°C에서 5분간 가열하여 당을 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.

당의 전기영동(Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis, FACE). 당을 전기영동하여 분석하기 위해서 Jackson의 방법^{19,21)}에 따라 ANTS에 의한 유도체를 한다. 당용액 50 µl을 동결건조한 후 15% acetic acid에 0.15 M로 조제한 ANTS용액을 5 µl와 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 1.0 M로 조제한 Sodium cyanoborohydride(NaCNBH₃)용액 5 µl을 첨가해 혼합한다. 이 혼합액을 37°C에 15시간 반응시킨 후, 원심농축을 해서 20% glycerol 50 µl에 용해한다. 이것을 전기영동용 시료로 하여 10 µl을 전기영동을 하였다.

Brown copra meal 가수분해 oligosaccharides의 분리, 조제 및 동정. 효소액 300 ml에 대해 0.5% brown copra meal을 24시간 가수분해하여 TLC 및 FACE로 pattern을 검토한 후 1차 activated carbon column chromatography을 이용해 250 ml/hr 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. H₂SO₄ 1 ml를 가하여 혼합한 후 20분간 방치하여 490 nm로 흡광도를 측정하여 TLC 및 FACE로 pattern을 검토한 후 Gal³Man₄을 포함하는 당용액을 회수하여 2차 activated carbon column chromatography을 이용해 250 ml/hr 유속으로 tube당 8 ml씩 용출하였으며 ethanol 0~30%의 gradient method로 Gal³Man₄(6³-mono-α-D-galactopyranosyl-β-mannotetraose) fraction을 최종 분리·회수하여 TLC의 R_f value level 및 FACE법에 의한 중합도의 크기 및 band위치에 따른 homo, hetero type을 결정하고, 최종적으로 *P. purpurogenum*; *A. niger* 및 *M. vinacea* 유래 α-galactosidase의 Gal³Man₄에 대한 기질 특이성 차이점을 이용하여 구조를 동정하였다.

Gal³Man₄(6³-mono-α-D-galacto-pyranosyl-β-mannotetraose)의 Bifidobacterium longum 및 B. bifidum에 대한 생육활성. *B. longum*, *B. bifidum*에 대한 생육활성을 비교하기 위하여 MRS media에서 탄소원을 dextrose 대신에 조제한 중합도 5의 Gal³Man₄를 첨가한 후 측정하였다.²²⁾ 중합도 5의 galactomannooligosaccharide를 회수하여 진공농축시킨 후 121°C, 15분간 autoclave한 후 DNS법을 이용하여 동일한 환원당량으로 조절 한 후 modified MRS media를 조제하여, 108으로 희석한 후 혐기적 조건하에서 37°C, 48 hr 평판배양한 후 colony수를 비교하였다.^{23,24)}

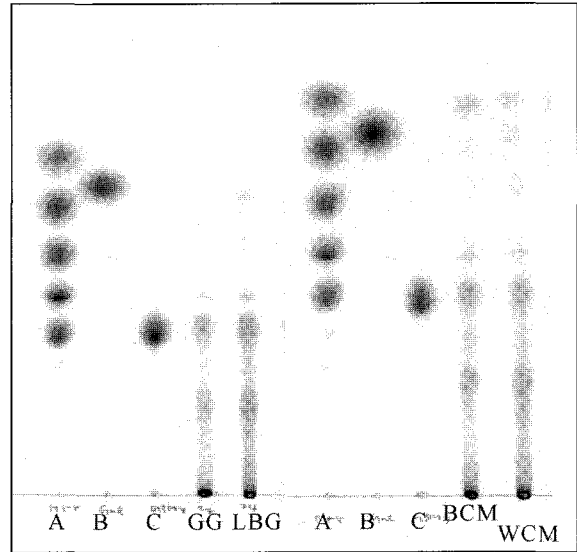


Fig. 1. TLC of degradation products of various galactomannans by the action of *Bacillus* sp. β -mannanase. A: Authentic mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetraose, and mannopentose from top to bottom, B: Authentic galactose, C: Authentic Gal³Man₄, GG: Enzyme treated guar gum, LBG: Enzyme treated locust bean gum, BCM: Enzyme treated brown copra meal, WCM: Enzyme treated white copra meal.

결과 및 고찰

정제 β -mannanase의 기질 특이성. 0.5% brown copra meal을 함유하는 효소액을 가하여 50°C에서 24시간 가수분해 반응을 진행하고, 5분간 비등에 의해 반응을 정지시킨 후 양이온수지(USA amberlite IR-120, Sigma Chemical Co.)와 음이온수지(USA amberlite IRA-400, Sigma Chemical Co.)에 침지하여 반응액의 당조성을 TLC에 의해 분석하였다(Fig. 1).

TLC 및 FACE(자료미제시) 결과에서 gum류 및 copra meal의 가수분해 pattern을 비교해본 결과 locust bean gum은 가수분해가 진행되어 24시간에 Gal³Man₄와 β -1,4-mannobiose, DP 7인 galactomannooligosaccharide로 가수분해되었고, guar gum은 24시간에 Gal³Man₄와 DP 7인 galactomannooligosaccharide로 가수분해 되었으며, copra meal은 가수분해가 진행되어 24시간에 소량의 mannose와 주요 가수분해산물은 중합도 5와 7인 galactosyl mannoooligosaccharide로 구성되었다. 기질로서 사용된 locust bean gum과 guar gum은 구조적으로 유사하여(locust bean gum은 galactose : mannose = 1 : 4, guar gum은 galactose : mannose = 1 : 2) 주요 가수분해 올리고당이 중합도 5와 7로 공통점을 보이고 있으나, copra cake유래 기질(galactose : mannose = 1 : 14)은 가수분해가 더 진행되어 단당류를 포함하는 가수분해의 차이점을 보이고 있다. 공통적으로 gum류와 copra meal의 galactomannan의 가수분해 pattern으로서는 주요 생성물이 중합도 5와 7로 구성되어 있음이 확인되었다.

Brown copra meal 가수분해 올리고당의 분리·조제 및 동정. 효소액 300 ml에 대해 0.5% brown copra meal을 24시간 가수분해해 TLC로 pattern을 검토한 후 1차 activated carbon column chromatography을 이용해 250 ml/hr 유속으로 tube당 50

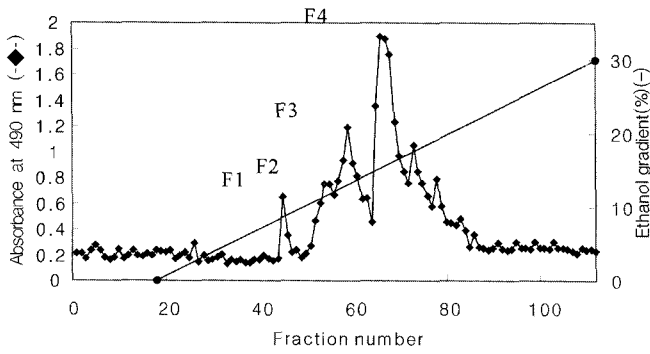


Fig. 2. Separation of oligosaccharides by 1st activated carbon column chromatography.

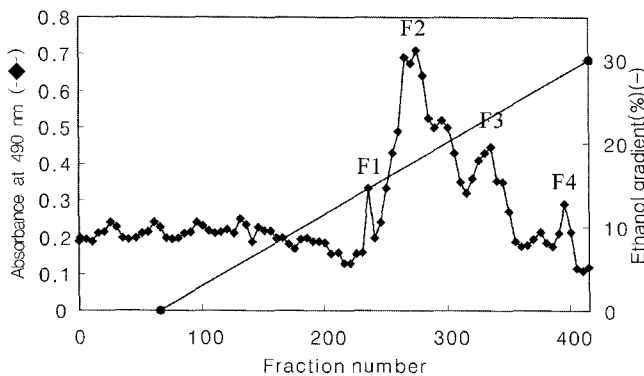


Fig. 3. Separation of Gal³Man₄ by 2nd activated carbon column chromatography.

m²씩 ethanol 0~30% linear gradient법으로 당을 분리하였다 (Fig. 2). Activated carbon column chromatography에 의한 당용액 0.2 ml와 5% phenol 0.2 ml를 가하여 혼합 후 conc.H₂SO₄ 1 ml를 가하여 혼합한 후 20분간 방치하여 490 nm로 흡광도를 측정하여 TLC로 pattern을 검토한 후 Gal³Man₄의 fraction(F3)을 회수하여 2차 activated carbon column chromatography을 이용해 250 ml/hr유속으로 tube당 8 ml씩 용출하였으며 ethanol 0~30%의 gradient method로 Gal³Man₄(6³-mono- α -D-galactopyranosyl- β -mannotetraose)을 분리하였다(Fig. 3).

분리회수된 당용액(F2 fraction)의 구조를 확인하기 위하여 본 연구에서는 *P. purpurogenum*, *A. niger* 및 *M. vinacea* I 유래 α -galactosidase의 기질특이성 차이점을 이용하였다. *P. purpurogenum* 및 *A. niger* 유래 효소는 환원말단에서 3번째 위치한 mannose에 결합되어 있는 galactose를 가수분해하여 TLC 상에서 galactose의 spot이 출현되지만, *M. vinacea* I 유래 효소는 galactose를 유리하지 못하여 galactose spot이 출현되지 않는 기질특이성 차이점을 이용하였다(자료미제시). 2차적으로는 FACE에 의해 authentic manno oligosaccharides의 band와 비교해볼때 homo type과는 달리 hetero type에서 나타나는 특징적 band가 homo type의 authentic 중합도 4 mannotetraose와 중합도 5 mannopentaose사이에 나타남으로써 hetero type의 중합도 5의 올리고당임이 입증되었다(Fig. 4). 본 연구에서 분리조제된 중합도 5의 구조식은 상기 미생물유래 효소의 특이성의 차이점, TLC 및 FACE의 결과에 따라 Gal³Man₄(6³-mono- α -D-

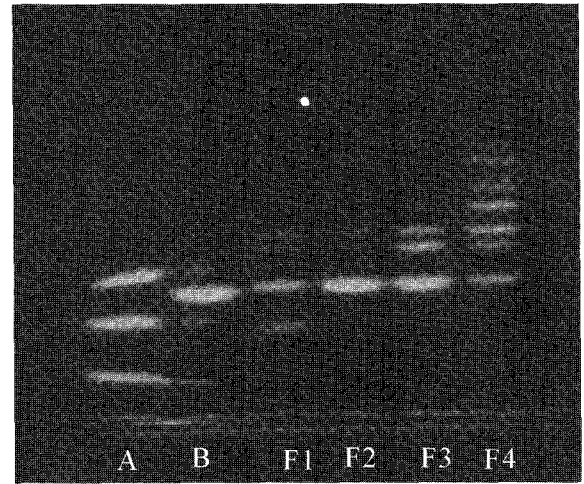


Fig. 4. FACE of separation of Gal³Man₄ by 2nd activated carbon column chromatography. A: Authentic mannose, mannotetraose, and mannopentaose from bottom to top, B: Authentic Gal³Man₄, F1, F2, F3 and F4 is fractions of 2nd activated carbon column chromatography.

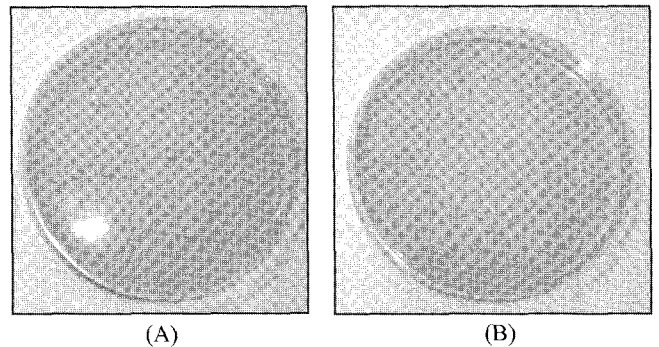


Fig. 5. Comparison of growth activity of *Bifidobacterium longum* by the treatment of Gal³Man₄. A: Control (MRS), B: Gal³Man₄.

galactopyranosyl- β -mannotetraose)로 동정되었다. 본 연구실에서는 현재 중합도 7의 galactosylmannooligosaccharides의 구조를 동정중에 있으나 Gal²⁻³Man₅, Gal³⁻⁴Man₅, Gal²⁻⁴Man₅중 하나로 추정되고 있다.

Gal³Man₄의 Bifidobacterium spp.에 대한 생육활성. *Bifidobacterium*속 균주(*B. longum*, *B. bifidum*)에 대한 생육활성을 비교 검토하기 위하여 MRS media에서 탄소원을 dextrose 대신에 조제된 Gal³Man₄를 첨가후 측정된 결과 Gal³Man₄이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 생육촉진 활성을 보였다. 특히 *B. longum*(Fig. 5)에서는 Standard MRS medium에서 1.2×10⁹ cfu/ml로서 Relative activity 100%로 가정할 때 Gal³Man₄를 dextrose대체 탄소원으로 처리시 1.2×10¹⁰ cfu/ml로서 relative activity가 1000%로서 10배의 생육활성이 증가하였으며, *B. bifidum*(Fig. 6)에서는 Standard MRS medium에서 7×10⁸ cfu/ml로서 relative activity 100%로 가정할 때 Gal³Man₄를 처리시 6.9×10⁹ cfu/ml로서 relative activity 990%로서 9.9배의 높은 활성이 나타나 *B. longum*, *B. bifidum*에 대해서는 우수한 생육촉진 활성을 나타내는 탄소원으로 확인되었다. 이외에도 *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis* 및 *B. breve*에 대한 생육

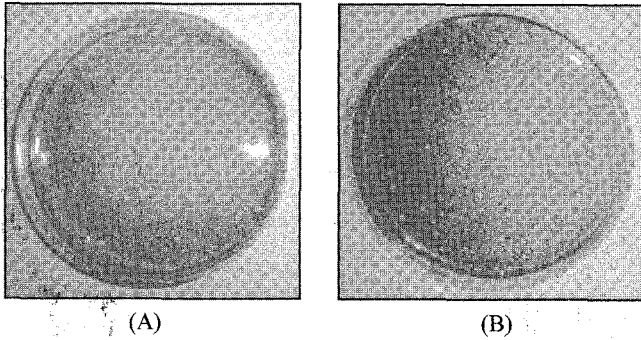


Fig. 6. Comparison of growth activity of *Bifidobacterium bifidum* by the treatment of Gal³Man₄. A: Control (MRS), B: treatment of Gal³Man₄.

활성은 이미 보고된 논문¹⁷⁾에서의와 같이 5.8배, 1.3배, 3.0배, 2.9배의 높지않은 활성을 보이고 있다. 본 연구실에서는 brown copra meal가수분해 올리고당중 중합도 7에 해당하는 올리고당을 purity 및 yield가 높은 방법으로 회수하여 정확한 구조식을 동정중에 있으며 차후 동정된 중합도 7의 올리고당이 *Bifidobacterium*속 균주에 미치는 영향을 비교검토할 예정으로 있다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 2002년도 지역대학 우수과학자 지원연구사업(과제번호: R05-2002-000-01034-0)의 일환으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Zama, M., Kusakabe, I. and Murakami, K. (1985) Specificity of β -mannanase from *Penicillium purpurogenum* for konjac glucomannan. *Japan J. Trop. Agr.* **29**, 221-230.
- Kusakabe, I., Takahashi, R., Murakami, K., Maekawa, A. and Suzuki, T. (1983) Preparation of crystalline β -1,4-mannooligosaccharides from copra mannan by a mannanase from streptomyces. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2391-2392.
- Kusakabe, I., Takahashi, R., Murakami, K., Murakami, K., Maekawa, A. and Suzuki, T. (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., Zama, M., Park, G. G., Tubaki, K. and Murakami, K. (1987) Preparation of β -1,4-mannobiose from white copra meal by a mannanase from *Penicillium purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2825-2826.
- Park, G. G., Kusakabe, I., Yasui, T. and Murakami, K. (1998) A new method for the preparation of β -1,4-mannotriose from brown copra meal using the crude enzyme from *Penicillium purpurogenum*. *Japan J. Trop. Agr.* **32**, 208-215.
- Takahashi, R., Kusakabe, I., Maekawa, A., Suzuki, T. and Murakami, K. (1983) Preparation of β -1,4-mannotriose from white copra meal using the crude enzyme from *Penicillium purpurogenum*. *Japan J. Trop. Agr.* **27**, 140-147.
- Takahashi, R., Kusakabe, I., Kobayashi, H., Murakami, K., Maekawa, A. and Suzuki, T. (1984) Purification and some properties of mannanase from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2189-2195.
- Park, G. G., Kusakabe, I., Komatsu, Y., Kobayashi, H., Yasui, T. and Murakami, K. (1987) Purification and some Propertise of β -mannanase from *Penicillium Purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2709-2716.
- McCleary, B. V. (1979) Modes of action of β -mannanase enzymes of diverse origin on legume seed galactomannan. *Phytochemistry* **18**, 757-763.
- Hartman, W. E. (1966) Application of mannan in the food industry. *Food Technol.* **20**, 42-54.
- Kobayashi, Y., Echizen, R. and Mutai, M. (1984) Intestinal flora and dietary factors. Processings of the 4th RIKEN symposium on intestinal flora. Japan Scientific Societies press. Tokyo, DD. pp. 69-78.
- Hoffman, K. and Bircher, J. (1969) Ver nderungen der bakteriellen Darmbesidlung nach Lactulose-gaben. *Schweiz Med Wschr.* **99**, 608-613.
- Gyrgy, P., Norris, R. F. and Rose, C.S. (1954) Bifidus factor. I. Avariant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **4**, 193-198.
- Haenel, H. and Bending, J. (1975) In *Progress in food and nutrition science*. Growth effect of branched oligosccharides on principal intestinal bacteria. Pergamon Press, Oxford, New York. Vol 1, pp. 21-27.
- Mitsuoka, T. and Hayakawa, K. (1972) Recent trends in research on intestinal flora. *Zbl. Bakteriol. Hyg., I. Abt. Orig. A.* **233**, 333-342.
- Takahashi, R., Kusakabe, I., Kobayashi, H., Murakami, K., Maekawa, A. and Suzuki, T. (1984) Purification and some properties of mannanase from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2189-2195.
- Chio, J. Y., Park, G. G. (2004) The growth activity of *bifidobacterium* spp. by the gum hydrolysates. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 117-122.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- McCleary, B. V. (1982) Purification and properties of a mannoside mannohydrolase from guar. *Carbohydr. Res.* **101**, 74-92.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of struture protein during the assembly of head bacteriophage TA. *Nature* **227**, 680-685.
- Jackson, P. (1996) Carbohydrate electrophoresis methods by the induced ANTs. *Mol. Biotechnol.* **5**, 101-123.
- Rhew, B. K., Lee, J. W., Lee, C. S., Hyun, S. H., Park, Y. J., Ahn, J. B., Yang, C. K. and Yoon, S. W. (2002) Effects of xylooligosaccharides on the growth of intestinal microflora. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 380-387.
- Deya, M., Amaya, K. and Igarashi, S. (1982) Studies on the application of galactosyl lactose for infant formula. *Yukijirushi Nyugyo Giiyatsu Kenkyusho Hokoku.* **79**, 19-26.
- Roy, D. (1988) Characterization of dairy-related bifidobacteria and development of a fermented dairy product. *The 8th Int. symposium on lactic acid bacteria and Human Health. Korean Public health Association.* Seoul, pp. 26-46.

Preparation of Gal³Man₄(6³-mono- α -D-galacto-pyranosyl- β -mannotetraose) by *Bacillus* sp. β -mannanase and Growth Activity to Intestinal Bacteria

Sang-Woo Kim¹ and Gwi-Gun Park (¹*Institute of Protein Engineering, University of Osaka, 1-1 Yamadaoka Suita, Osaka 565-0871, Japan; Dept. of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Seoungnam 461-701, Korea*)

Abstract: For the elucidation of substrate specificity to the brown copra meal by *Bacillus* sp. β -mannanase., the enzymatic hydrolysate after 24 hr of reaction was heated in a boiling water bath for 10 min, and then centrifuged to remove the insoluble materials from hydrolysates. The major hydrolysates composed of D.P 5 and 7 galactosyl mannoooligosaccharides. For the separate of galactosyl mannoooligosaccharides, the supernatant solution of 150 ml was put on a first activated carbon column. The column was then washed with 5 l of water to remove mannose and salts. The oligosaccharides in the column were eluted by a liner gradient of 0~30% ethanol, at the flow rate of 250 ml per hour. The sugar composition in each fraction tubes was examined by TLC and FACE analysis. The combined fraction from F3 was concentrated to 30 ml by vacuum evaporator. Then put on a second activated carbon column. The oligosaccharides in the column were eluted by a liner gradient of 0~30% ethanol (total volume: 5 l), at the flow rate of 250 ml per hour. The eluent was collected in 8 ml fraction tubes, and the total sugar concentration was measured by method of phenol-sulfuric acid. The major component of F2 separated by 2nd activated carbon column chromatography were identified Gal³Man₄(6³-mono- α -D-galactopyranosyl- β -mannotetraose). To investigate the effects of brown copra meal galactomannoooligosaccharides on growth of *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum* were cultivated individually on the modified-MRS medium containing carbon source such as Gal³Man₄, compared to those of standard MRS medium.

Key words: Gal³Man₄(6³-mono- α -D-galactopyranosyl- β -mannotetraose)

*Corresponding author