

# Trichoderma harzianum 유래 β-mannanase에 의한 Locust Bean Gum 가수분해 올리고당의 동정 및 Bifidobacterium spp.에 대한 생육활성

김유진 · 박귀근\*

경원대학교 공과대학 생명공학부 분자·식품생명공학전공

## Identification and Growth Activity to Bifidobacterium spp. of Locust Bean Gum Hydrolysates by Trichoderma harzianum β-mannanase

Yu-Jin Kim and Gwi-Gun Park\*

Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Seoungnam 461-701, Korea

Received August 23, 2005; Accepted October 20, 2005

This study was performed to elucidate substrate specificity to the locust bean gum galactomannan by *Trichoderma harzianum* β-mannanase. The medium composition for enzyme production were determined 3% cellulose, 3% corn steep liquor, 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and incubated for 115 hr at 28°C. The β-mannanase exhibited maximum activity at pH 4.5 and 60°C. Locust bean gum galactomannan was hydrolyzed by the β-mannanase, and then hydrolysates separated by activated carbon column chromatography. The main hydrolysates were composed of D.P 4 and 7 galactosyl mannoooligosaccharides by TLC. For the elucidate the structure of D.P 4 and 7 oligosaccharides, methylation analysis was performed. D.P 4 and 7 were identified as M-M-M-M and M-M-M-M-M (G- and M-represent α-1,6-D-galactosidic and β-1,4-mannosidic linkages, respectively).



To investigate the effects of locust bean gum galactosyl mannoooligosaccharides on the in vitro growth of *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, and *B. breve*, *Bifidobacterium* spp. were cultivated individually on the modified-MRS medium containing carbon source such as D.P 4 and 7 galactosyl mannoooligosaccharides, respectively. *B. longum* grew up 3.4-fold and 4.3-fold more effectively by the replacement of D.P 4 and 7 galactosyl mannoooligosaccharides as the carbon source in a comparison of standard MRS.

**Key words:** β-Mannanase, *Trichoderma harzianum*, locust bean gum

### 서 론

다당류인 β-mannan은 mannopyranose의 기본 단위가 β-(1→4) 결합으로 이루어져 있는 polysaccharide로서 mannose의 기본 구조 외에 glucose가 직쇄상 β-(1→4) 결합으로 있는 glucomannan과 galactose 잔기가 포함되어 α-(1→6)으로 있는 galactomannan (gal : man = 1 : 1)과 glucose의 잔기가 붙은 galactoglucomannan으로 copra, locust bean gum, guar gum, coffee, konjac의 뿌리 등 콩과 식물의 종자와 softwood에 다량 분포되어 있다.<sup>1,3)</sup>

고중합도 β-mannan의 가수분해에 관여하는 효소로는 β-mannanase, β-mannosidase(β-D-mannoside mannohydrolyase, EC 3.2.1.25)가 있고, 이들 효소이외에 galactomannan의 galactose 측쇄결합 절단결합 반응에 관계하는 α-galactosidase(α-D-galactoside galactohydrolyase, EC 3.2.1.22) 등이 있다. Galactomannan으로부터 oligosaccharides조제는 효소시스템에 의한 방법 이외에 효소의 자화성을 이용하여 white copra meal로부터 mannoooligosaccharide를 조제할 수 있고, 산가수분해법에 의해 고중합 oligosaccharides 조제가 가능한 것으로 보고되었다.<sup>4)</sup>

Mannoooligosaccharide가 인체의 정상적인 장내상태를 유지하는데 중요한 역할을 하는 *Bifidobacterium* spp.의 좋은 에너지 원으로서 유용하다는 것이 밝혀져<sup>5,7)</sup> 본 연구실에서는 최근 *Bifidobacterium* sp. *Lactobacillus* sp.의 성장 배지인 MRS에서

\*Corresponding author  
Phone: 82-31-750-5383, Fax: 82-31-750-5383  
E-mail: ggpark@kyungwon.ac.kr

의 생육활성과 신규의 manooligosaccharides 및 galactosyl manooligosaccharides를 탄소원으로 대체시킨 modified-MRS 배지에서 생육활성을 비교한 결과, 중합도 5와 7인 oligosaccharides가 첨가된 조제 배지가 MRS 배지에 비해 10배 정도 높은 생육활성을 나타내었다.<sup>8)</sup> 또한 *Bacillus* sp. 유래  $\beta$ -mannanase에 의해 Gal<sup>3</sup>Man<sub>4</sub>(6<sup>3</sup>-mono- $\alpha$ -D-galacto-pyranosyl- $\beta$ -mannotetraose)를 조제하여 장내세균에 대한 생육활성을 보고한 바 있다.<sup>9)</sup> 또한 manooligosaccharides는 인체 내 대장의 유용균인 *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp.의 좋은 성장원뿐만 아니라 대장 내에 유해 미생물의 증식을 저해함이 보고되었다.<sup>10,11)</sup> 이와 관련하여 장내유해세균에 대한 manooligosaccharides의 항균활성을 비교한 결과, *Bacillus* sp. 유래  $\beta$ -mannanase 정제효소로 가수분해한 당기수분해물은 glucosyl manooligosaccharides 보다는 galactosyl manooligosaccharides가, 중합도 5보다는 7이 더 높은 항균성을 나타내었다.<sup>12)</sup>

본 연구에서는 *Trichoderma harzianum* 유래  $\beta$ -mannanase의 생산조건을 검토하여 locust bean gum galactomannan에 대한 가수분해 올리고당을 분리 조제하여, methylation method에 의해 구조를 동정하고 장내세균에 대한 생육활성을 기존의 보고된 중합도별·구조별 올리고당의 활성과 비교함을 주요 목표로 하였다.

## 재료 및 방법

***Trichoderma harzianum* 유래  $\beta$ -mannanase 생산.** *T. harzianum*는 한국미생물보존센터에서 분양받았으며 효소생산배지 cellulose 3%, C.S.L 3%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2%를 함유하는 액체배지 100 ml에 접종하여 28°C, 130 rpm, 120시간 배양하여<sup>13)</sup> 4°C, 11,000 rpm, 15 min 원심분리 후 상층액을 조효소액으로 사용하였다.

**효소 활성.**  $\beta$ -Mannanase의 생산량은 DNS 환원당 정량법<sup>14)</sup>에 의하여 수행하였다. 즉, 0.5 ml의 1% locust bean gum, 0.4 ml의 McIlvaine buffer(pH 4.5)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  $\beta$ -mannanase는 동일조건에서 1분당 생성되는 D-mannose에 해당하는 1 mg/ml의 환원당을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.

**$\beta$ -Mannanase의 효소화학적 성질.** 효소를 이용하여 최적 pH, 최적 온도 등의 성질을 규명하였다. 최적 pH는 정제효소를 이용하여 pH 2-9, 60°C에서, 최적 온도는 상기에서 사용한 동일 효소를 이용하여 pH 4.5, 20-80°C에서 효소활성을 측정하였다.

**$\beta$ -Mannanase 기질특이성.** 조효소액 5 ml에 기질 locust bean gum을 각각 0.5%로 하여 60°C에서 24시간 가수분해 반응을 진행하고, 5분간 실험시켜 양이온 수지(Sigma chemical Co., amberite IR-120)와 음이온 수지(Sigma chemical Co., amberite IRA-400)에 침지하였으며, 반응액의 당조성은 TLC에 의해 분석하였다.

**Thin layer chromatography(TLC).** TLC는 McCleary<sup>15)</sup>법에 따라 다음과 같은 조건하에서 전개 후 UV조사 및 spray

reagent로 분무하여 140°C에서 5분간 가열하여 당을 분석하였다.

TLC plate; 25 TLC plates 20×20 cm silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Germany), Developing Solvent; *n*-propanol : methanol : water = 5 : 2 : 3(v/v/v), Spray Reagent; 30% sulfuric acid-ethanol.

**Gum류 가수분해 올리고당의 분리 및 조제.** Activated carbon column chromatography를 이용한 분리; 효소액 300 ml(10 units)에 대해 0.5% locust bean gum galactomannan을 60°C, 24시간 가수분해 후 TLC로 pattern을 검토한 후 activated carbon column chromatography를 이용해 당을 분리하였다. 즉 activated carbon powder를 100°C 2시간 가열한 후 냉각 후 activated powder를 column(4×90 cm)에 충전시키고, 증류수를 이용하여 24시간 평형화시킨 후 당용액을 주입하고, 250 ml/hr 유속으로 tube당 20 ml씩 ethanol 0~50%의 gradient법으로 당을 분리하였다.

**Methylation분석.** 중합도별 분리된 oligosaccharides 및 original oligosaccharides를 포함하는 sugar sample은 Ciucanu<sup>16)</sup>가 보고한 methylation 분석법에 의해 동정되었다. Methylated sugar는 100°C, 2시간동안 10% trifluoro acetic acid에 의해 가수분해하여, alditol acetate유도체와 함께 gas liquid chromatography에 의해 분석하였다.

**중합도별 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성.** *Bifidobacterium*속 균주(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*)에 대한 생육촉진 활성을 측정하기 위하여 MRS media에서 탄소원을 dextrose대신에 조제된 중합도별 올리고당을 각각 첨가한 후 측정하였다. 중합도별 올리고당을 회수하여 진공농축시킨 후 120°C, 15분간 autoclave 후 DNS법을 이용하여 동일한 환원당량으로 조절한 후 modified MRS media를 조제하여, 10<sup>8</sup>으로 희석한 후 혐기적 조건하에서 37°C, 48시간 평판 배양 후 colony수를 비교하였다.

## 결과 및 고찰

***T. harzianum* 유래  $\beta$ -mannanase의 생산.** *Trichoderma harzianum*이 생산하는  $\beta$ -mannanase의 최적 효소생산 배지조성은 3.0% cellulose, 3.0% C.S.L, 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 결정되어 28°C, 130 rpm, 진탕배양법으로 조효소액을 생산하였으며<sup>13)</sup>, 배양시간별 pH변화와 활성과의 관계는 Fig. 1과 같다. pH는 배양시간 40시간 이후 pH 4.12에서 6.5로 변했고, 효소액 활성은 80시간부터 점차 증가하다가 120시간에서 최고치를 보였다. 본 연구실에서 보고한 *Bacillus* sp. 유래<sup>9)</sup>  $\beta$ -mannanase는 배양시간 24시간, pH 6에서 최대활성치를 나타내었으며, *Xylogone sphaerospora* 유래<sup>17)</sup>  $\beta$ -mannanase는 배양시간 76시간, pH 7.2에서 최대활성치를 나타내었다.

$\beta$ -Mannanase의 효소화학적 성질. Fig. 2(A)는 효소반응에 미치는 온도의 영향, Fig. 2(B)는 효소반응에 미치는 pH의 영향을 나타내었다. 최적 온도는 60°C, 최적 pH는 4.5로 나타났다. *Bacillus* sp. 유래<sup>9)</sup> 효소는 최적 온도 50°C, 최적 pH는 6.0으로, *Xylogone sphaerospora* 유래<sup>17)</sup>  $\beta$ -mannanase는 최적 온도 60°C, 최적 pH는 6.0으로 보고되어 본 연구에서 취급한 *T. harzianum*

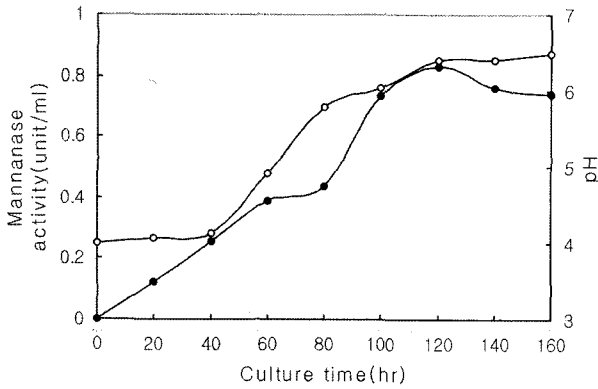


Fig. 1. Time course of the production of *T. harzianum*  $\beta$ -mannanase. ●-:  $\beta$ -mannanase activity, ○-: pH.

유래 효소의 최적 pH는 약산성영역으로 나타났으며, 온도영역은 50~60°C로 유사하였다. 한편 *Trichoderma harzianum* strain T418) 유래  $\beta$ -mannanase의 최적온도는 65°C로서 유사하였으나 최적pH는 2.6으로 강산성을 나타내었다.

**$\beta$ -Mannanase 기질특이성.** 0.5% locust bean gum을 함유하는 효소액을 60°C에서 24시간 가수분해 반응을 진행하고, 5분간 실활시킨 후 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. 3에서와 같이 locust bean gum은 가수분해가 진행되어 반응초기부터 반응말기까지 주요 반응생성물로서 단당류, 중합도 4와 7의 올리고당으로 구성되어 있음을 R<sub>f</sub> value상으로 확인할수 있었다. *Bacillus* sp. 유래  $\beta$ -mannanase 유래 효소의 가수분해물 pattern은 중합도 5와 7의 올리고당으로 구성되어 중합도 5의 구조식은 Gal<sup>3</sup>Man<sub>4</sub>(6<sup>3</sup>-mono- $\alpha$ -D-galacto-pyranosyl- $\beta$ -mannotetraose)로 동정되어 보고하였으며<sup>8)</sup>, *Xylogone sphaerospora* 유래<sup>17)</sup>  $\beta$ -mannanase는 copra cake galactomannan을 가수분해하여 최종 생성물로 중합도 4와 6을 생산하였다. 따라서 본 연구실에서는 각각의 미생물이 생산하는  $\beta$ -mannanase의 galactomannan에 대한 기질특이성의 차이점에 따라 생산되어지는 중합도별, homo/hetero type에 따른 구조별 장내세균에 대한 생육활성을 비교하기 위하여 각각의 올리고당의 구조를 1차적으로 동정하는 것은 매우 중요한 과제로 사료되어 본 연구에서는 특히 분

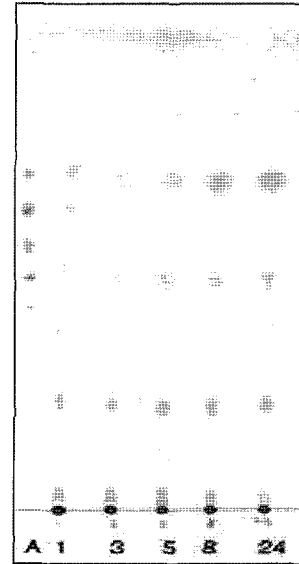


Fig. 3. Action of *T. harzianum*  $\beta$ -mannanase on locust bean gum. A: Authentic mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetraose, and mannopentose from top to bottom. 1, 3, 5, 8, 24 are reaction time (h).

리회수한 각각의 가수분해산물에 대한 구조동정을 수행하게 되었다.

**Gum류 가수분해 올리고당의 분리 및 중합도 결정.** 효소액 300 ml에 대해 0.5% locust bean gum을 3시간 가수분해하여 250 ml/hr 유속으로 tube당 20 ml씩 ethanol 0~50% linear gradient법으로 activated carbon column chromatography를 수행하여 당을 분리하였다. Activated carbon column chromatography에 의해 분리된 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 490 nm로 흡광도를 측정된 결과 F1, F2, F3에서 peak를 나타내었다(Fig. 4). F1, F2, F3 fraction의 분리도를 확인하기 위하여 각 fraction별 농축하여 TLC pattern을 검토한 결과 F1은 단당류, F2은 중합도 4 및 F3은 중합도 7의 가수분해 올리고당으로 구성되어 있음이 standard R<sub>f</sub> value상으로 확인되었다(Fig. 5). 또한 정확한 중합도 및 구조를 확인하기 위하여 methylation method에 의하여 다음과 같이 재확인하였다.

**Methylation.** Locust bean gum의 효소적 가수분해산물로부터

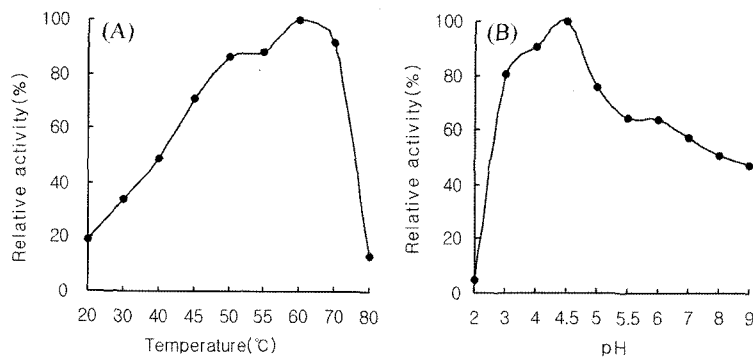


Fig. 2. Effect of pH and temperature on purified  $\beta$ -mannanase activity from *T. harzianum*. A: Effect of temperature on  $\beta$ -mannanase activity, B: Effect of pH on  $\beta$ -mannanase activity.

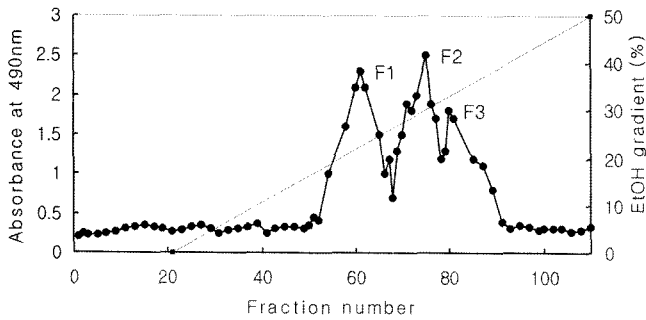


Fig. 4. Separation of LBG galactomannan hydrolysates by activated carbon column chromatography.

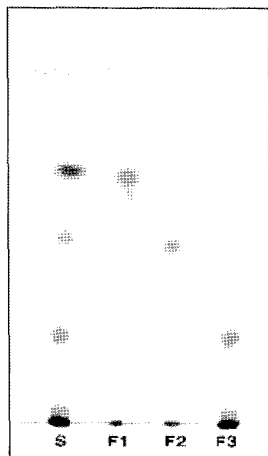


Fig. 5. TLC of LBG galactomannan hydrolysates by activated carbon column chromatography. S: Enzymatic Hydrolysates, F1~F3: Fractions separated by activated carbon column chromatograph.

분리 조제된 올리고당 중 중합도 4는 Fig. 3과 같이 R<sub>f</sub> value 상으로 β-1,4-mannotetraose로 사료되었고, homo type인지 hetero type인지를 확인하기 위해 *Aspergillus niger* 5-16 유래의 정제 β-mannosidase와 *Penicillium purpurogenum* β-mannanase<sup>19)</sup>를 이용하여 효소적 가수분해한 결과 24시간 반응에서 mannose만으로 유리되는 TLC 결과(Data not shown)로 보아 mannose만으로 구성된 β-1,4-mannotetraose임이 입증되었다.

Table 2. Growth activity of *Bifidobacterium* spp. by the locust bean gum galactomannan hydrolysates

<i>Bifidobacterium</i> spp.	Medium	CFU/ml	Relative activity (%)
<i>B. longum</i>	standard MRS	1.7×10 <sup>9</sup>	100
	MRS +D.P 4	45.8×10 <sup>9</sup>	340
	MRS +D.P 7	77.3×10 <sup>9</sup>	430
<i>B. bifidum</i>	standard MRS	5.5×10 <sup>8</sup>	100
	MRS +D.P 4	46.6×10 <sup>8</sup>	120
	MRS +D.P 7	76.05×10 <sup>8</sup>	110
<i>B. infantis</i>	standard MRS	3.4×10 <sup>8</sup>	100
	MRS +D.P 4	46.3×10 <sup>8</sup>	185
	MRS +D.P 7	74.7×10 <sup>8</sup>	140
<i>B. breve</i>	standard MRS	1.4×10 <sup>9</sup>	100
	MRS +D.P 4	43.1×10 <sup>9</sup>	224
	MRS +D.P 7	72.6×10 <sup>9</sup>	190

중합도 7의 methylation 분석결과는 Table 1과 같이 2,3,4,6-Me-Man(1 mol), 2,3,4,6-Me-Gal(2 mol), 2,3,6-Me-Man(2 mol), 2,3-Me-Man(2 mol)을 나타냈었으며, NaBH<sub>4</sub>처리 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 mannose의 결합에 galactose 잔기가 branching하고 있는 구조로서, 3종류의 galactosyl manno oligosaccharides의 구조로 예상할 수 있으나, galactose가 환원말단부터 몇 번째 mannose에 결합하고 있는지에 대한 구조적 연구는 현재 수행 중에 있다.

***Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성.** *Bifidobacterium*속 균주(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*)에 대한 생육활성을 측정하기 위해 MRS media에서 탄소원을 dextrose 대신에 조제된 중합도 4와 7의 올리고당을 첨가 후 측정된 결과 *B. longum*의 경우 특징적으로 각각 3.4, 4.3배의 우수한 생육활성을 나타내었다. 또한 *B. breve*에 대해서는 중합도 4의 manno oligosaccharide를 처리 시 2.24배의 생육활성을 나타내었으나 *B. bifidum*과 *B. infantis*에 대해서는 중합도 4와 7의 올리고당을 탄소원으로 대체 시 낮은 활성을 나타내었다(Table 2). 저자는 *Bacillus* sp. 유래 β-mannanase의 copra cake 가수분해

Table 1. Methylation analysis of the oligosaccharides and their hydrogenated derivatives isolated from the enzymatic hydrolysates of locust bean gum

Alditol acetate		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-D-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 <sup>1</sup> M <sub>5</sub> -I	A		+	+	++
		B	+	+	+	+
	Gal <sup>1</sup> M <sub>5</sub> -I	A		+	+	+++
		B	+	+	+	++
	Gal <sup>2</sup> M <sub>5</sub> -IA	A		++	++	++
		B	+	+	++	+
F3	Gal <sup>2</sup> M <sub>6</sub> -I	A		+	++	+++
		B	+	+	++	++
F3	A		+	++	++	++
	B	+	+	++	+	++

A, original sugar; B, after hydrogenation with NaBH<sub>4</sub>; +, 1 mol; ++, 2 mol; +++, 3 mol.

올리고당을 이용하여 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성도에 대한 결과도 보고하였으나 특히 *B. longum*에서는 중합도 5 galactomannooligosaccharides를 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 나타났다.<sup>12,20</sup> 이미 보고된 *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 gum에 대한 가수분해 최종산물은 중합도 5와 7의 올리고당으로 구성되는 공통된 특징을 나타내고 있으나, 본 연구에서의 *Trichoderma harzianum* 유래 효소의 경우 동일한 기질인 locust bean gum에 대하여 중합도 4와 7의 올리고당으로 구성되었다. 차후 본 연구실에서는 각각의 미생물이 생산하는  $\beta$ -mannanase의 galactomannan 가수분해 올리고당이 장내세균에 미치는 영향을 정량적·정성적으로 해석하기 위하여 기질가수분해 올리고당의 중합도별 구조를 동정하여 중합도별·구조별 장내세균 생육활성과의 상관관계를 규명할 예정이다.

## 초 록

*Trichoderma harzianum*이 생산하는  $\beta$ -mannanase의 최적 사면배지조성은 2.0% malt extract, 2.0% glucose, 0.1% peptone, 2.0% agar로, 효소생산 배지조성은 3.0% cellulose, 3.0% C.S.L, 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 결정되어 28°C, 130 rpm, 진탕배양법으로 조효소액을 생산하였다.  $\beta$ -mannanase의 최적 pH와 최적온도는 pH 4.5, 60°C에서 최대 상대활성을 나타내었다. Locust bean gum에 대한 효소적 가수분해 pattern을 TLC에 의해 검토한 결과 반응초기부터 반응말기까지 주요 생성물은 단당류, 중합도 4와 7의 올리고당으로 확인되었다. 중합도별 올리고당을 조제하기 위하여 activated carbon column chromatography에 250 ml/hr 유속으로 tube당 20 ml씩 ethanol 0~50%의 gradient법으로 분리 회수하였고, 분리된 각각의 올리고당 중 중합도 4는 TLC  $R_f$  value 상으로  $\beta$ -1,4-mannotetraose로, 중합도 7은 Methylation method에 의해 M-M-M-M-M 구조로



동정되었다. (G와 M-은 각각  $\alpha$ -1,6-D-galactosidic,  $\beta$ -1,4-mannosidic 결합을 나타냄). *Bifidobacterium longum*에 대한 생육활성을 기존의 MRS media와 탄소원으로 중합도 4와 7의 올리고당으로 대체하였을 때 3.4배, 4.3배의 생육활성이 증가하였고, *Bifidobacterium bifidum*에 대해서는 1.2배, 1.1배의 낮은 활성을 나타내었다.

**Key words:**  $\beta$ -Mannanase, *Trichoderma harzianum*, locust bean gum

## 참고문헌

- 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.
- Tipson, R. S., Horton, D. In *Advances in Carbohydrate chemistry and Biochemistry*. Academic Press, New York, 299.
- Tsujiyaka, Y., Hiyama, K. and Fukumoto, A. (1972) *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **43**, 155.
- Park, G. G. (1995). A new method for preparation of mannitriose from white copra meal using the enzyme system and yeast fermentation. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 1020-1025.
- Gyrgy, P., Norris, R. F. and Rose, C. S. (1954) Bifidus factor. I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **4**, 193-198.
- Hoffmann, K. and Bircher, J. (1969) Veränderungen der bakteriellen Darmbesiedlung nach Lactulose-gaben. *Schweiz. Med. Wschr.* **99**, 608-613.
- 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. p. 69.
- Choi, J. Y. and Park, G. G. (2004) The growth activity of *Bifidobacterium* spp. by the gum hydrolysates. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 117-122.
- Kim, S. S. and Park, G. G. (2004) Preparation of Gal<sup>3</sup>Man<sub>4</sub> by *Bacillus* sp.  $\beta$ -mannanase and Growth Activity to Intestinal Bacteria. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 379-383.
- 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. Ind. Microbiol.* **6**, 263-269.
- Choi, J. Y. and Park, G. G. (2004) Purification of *Bacillus* sp.  $\beta$ -mannanase and the Growth Activity of *Bifidobacterium* spp. by Guar Gum Hydrolysates. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 117-122.
- Torrie, J. P., Senior, D. J. and Saddler, J. N., (1990) Production of  $\beta$ -mannanase by *Trichoderma harzianum* E58. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 303-307.
- 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. *Carbohydrate. Res.* **101**, 74-92.
- Ciucanu, I. and Kerk, F. (1984) Methylation Analysis of Oligosaccharides. *Carbohydrate. Res.* **131**, 209-217.
- Shin, S. H. and Park, G. G. (In Press) Separation, Preparation and Identification of Copra Cake Hydrolysates by *Xylogone sphaerospora*  $\beta$ -mannanase. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*
- Paula, F. F., Humberto M. F. and Edivaldo, K. F. F. (2004) Production and characterization of hemicellulase activities from

- Trichoderma harzianum* Strain T4. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **40**, 255-259.
19. Park, G. G. and Jang, H. K. (1992) Separation and preparation of galactosyl-mannooligosaccharides from copra galactomannan by mannanase from *Penicillium purpurogenum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 204-208.
20. Choi, J. Y. and Park, G. G. (2004) Metabolism Activity of *Bifidobacterium* spp. by D.Ps of Konjac Glucomannan Hydrolysates. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* **33**, 1186-1191.