

## Hemicellulose계열 올리고당 탐색 및 탄소원 대체에 의한 장내세균 생육활성용 신규 MRS배지의 조제

이희정 · 박귀근\*

경원대학교 공과대학 식품생물공학과

## Screening of Hemicellulose Oligosaccharides and Preparation of the Recipe for Modified MRS Medium by the Replacement of Carbon Source

Hee-Jung Lee and Gwi-Gun Park\*

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

Received October 14, 2008; Accepted November 3, 2008

Purification and some properties of *Xylogone sphaerospora*  $\beta$ -mannanase were reported previous paper.<sup>1)</sup> Locust bean gum galactomannan was hydrolyzed by the purified  $\beta$ -mannanase, and then the hydrolysates was separated by activated carbon column chromatography. The main hydrolysates were composed of D.P. (Degree of Polymerization) 4 and 6 galactosyl mannoooligosaccharides. For elucidate the structure of D.P 4 and 6 galactosyl mannoooligosaccharides, sequential enzymatic action was performed. D.P 4 and 6 were identified as Gal<sup>2</sup>Man<sub>3</sub> (6<sup>2</sup>-mono-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-4-O- $\beta$ -D-mannotriose) and Gal<sup>2</sup>Man<sub>5</sub> (6<sup>2</sup>-mono-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-4-O- $\beta$ -D-mannopentaose). To investigate the effects of locust bean gum galactosyl mannoooligosaccharides on *in vitro* growth of *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. auglutum* and *B. breve*. *Bifidobacterium* spp. were cultivated individually on the modified-MRS medium containing carbon source such as D.P. 4 and D.P. 6 galactosyl mannoooligosaccharides, respectively. *B. longum* and *B. bifidum* grew up 10-fold and 6.6-fold more effectively by the treatment of D.P. 6 galactosyl mannoooligosaccharides, compared to those of standard MRS medium. Especially, D.P. 6 was more effective than D.P. 4 galactosyl mannoooligosaccharide on the growth of *Bifidobacterium* spp.

**Key words:** *Bifidobacterium* spp., galactosyl mannoooligosaccharides, gum galactomannan,  $\beta$ -mannanase

### 서 론

*Bifidobacterium*속은 파스퇴르연구소의 Tisser에 의해 건강한 모 유영양아의 변에서 분리된 이래, 정장작용 및 장내균총의 정상화 등 인체에 유익함이 보고되었으며,<sup>2)</sup> 항암작용이나 면역부활 작용 등 면역기능의 활성화의 측면에서 수많은 연구가 진행되고 있다.<sup>3)</sup> 이와 같은 중요한 생리학적 기능을 갖는 *Bifidobacterium*속은 기능성 식품 소재의 하나로 중요시되어 일본을 비롯한 구미 및 국내에서 100여종 이상의 유제품 및 정장제 등에 이용되고 있다.<sup>4)</sup> 유산균 발효 유제품들은 구미 여러 나라에서 오래전부터 섭취되어 왔으며, 이들 발효 유제품의 섭취와 사람의 건강장수가 밀접한 관계가 있다는 연구보고들이 많이 발표되면서 이들 제품들의 유용성에 대해 관심이 집중되었다.<sup>5)</sup>

Starch 및 cellulose를 대표로 하는 다당은 식품으로서 뿐만 아니라 인류 사회생활에 필수적의 주요 소재로서 예로부터 이용되어지고 있다. 특히 hemicellulose 및 목재는 재생산이 가능한 생물자원이므로 최근 고도 이용법이 중요시되고 있다. Hemicellulose로서 광범위하게 존재하고 있는 것으로는 mannan, xylan, galactan 등이 있으며, 이중에 mannan은  $\beta$ -1,4-mannopyranoside 결합을 main chain으로하는 다당이며, 특히 konjac glucomannan, locust bean gum galactomannan, guar gum galactomannan, copra 잔사인 white copra meal galactomannan 및 brown copra meal galactomannan에 다량 함유하고 있다. Mannan 계열의 올리고당은 인체의 정상적인 장내상태를 유지하는데 중요한 역할을 하는 *Bifidobacterium*속의 좋은 에너지원으로서 유용하다는 것이 밝혀졌다.<sup>6,7)</sup> *Bifidobacterium*속은 정장 작용으로서 설사와 변비를 방지하고<sup>8,9)</sup> 장암예방, 노화방지의 효과를 나타내며, 성장기의 발육촉진, 조혈작용, 피부미용에 도움을 주는 비타민 B군을 형성한다.<sup>10,11)</sup> 또한 갈습의 흡수 촉진, 혈당과 콜레스테롤의 수치를 낮추는 등 여러 이점을 갖고 있다.

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

본 연구실에서는 최근 *Bifidobacterium* spp. 및 *Lactobacillus* spp.의 성장배지인 MRS배지에서 신규의 glucosyl manooligosaccharides를 탄소원으로 대체시킨 modified-MRS배지에서의 생육활성을 비교한 결과, *Xylogone sphaerospora* 유래 중합도 3과 4의 올리고당을 조제 및 동정하여 첨가된 조제배지에서 2.7배, 3.9배의 높은 생육활성을 보고한바 있으며,<sup>1)</sup> *Trichoderma harzianum* 유래  $\beta$ -mannanase정제법에 의한 konjac glucomannan 가수분해 올리고당은 homo type인 중합도 2와 hetero type인 중합도3의 올리고당이 조제 및 동정되어 장내세균에 미치는 생육활성에 대해서도 보고하였다.<sup>12)</sup>

본 연구에서는 이미 보고된<sup>1)</sup> *Xylogone sphaerospora* 유래 효소법에 의한 konjac glucomannan 가수분해 올리고당의 장내세균에 미치는 영향과 비교·검토하기 위하여 동일균주로 부터  $\beta$ -mannanase의 정제를 수행하고 locust bean gum galactomannan 가수분해물을 분리·조제 회수하여 TLC법 및 정제법 및 기질 특이성이 규명되어 보고<sup>16)</sup>된 *A. niger* 5-16 유래 정제  $\beta$ -mannosidase와 *P. purpurogenum* 유래 정제  $\alpha$ -galactosidase의 enzymatic sequential action법에 의해 분리된 당가수분해물의 구조를 결정하고, *Bifidobacterium* 속(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. auglutum*, *B. breve*)에 대한 장내세균의 증식활성을 기준에 보고<sup>1)</sup>된 glucosyl manooligosaccharides의 활성과 비교하였으며, 최종적으로 hemicellulose계열 올리고당 탐색 및 탄소원 대체에 의한 저가의 신규 MRS배지의 제품화와 관련하여 가장 유리한 탄소원 대체소재를 결정하였고 향후 scale-up 공정시스템 구축을 추진할 예정으로 있다.

## 재료 및 방법

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

*Xylogone sphaerospora* 균주(KCCM 60478)는 한국미생물보존센터로부터 분양받았으며 효소생산 배지조성은 locust bean gum 2.5%, peptone 1.2%, yeast extract 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%를 함유하는 액체배지 150 ml에 접종하여 33°C, 150 rpm, 76시간 배양하여 4°C, 11,000 rpm, 15 min 원심분리(Beckman, rotor 14) 후 상정액을 효소액으로 사용하였다.

**단백질 농도.** 단백질량(280 nm)과 핵산량(260 nm)의 흡광도를 UV-분광광도계(Shimadzu Model 1201)에서 측정해  $1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260}$ 의 식을 이용한 결과를 단백질 농도로 사용하였고, 정제 단계 중에는 Lowry 방법<sup>13)</sup>에 의해서 bovine serum albumin을 standard로 하여 단백질농도를 확인하였다.

**효소의 정제.** 보고된 기존의 방법<sup>1)</sup>과 동일하게 수행하였으며 각 용출액은 단백질과 효소의 활성을 측정하여 정제 효소액으로 사용하였다.

**Locust bean gum galactomannan 가수분해 올리고당의 분리.** 0.5% locust bean gum galactomannan을 함유하는 정제 효소액 300 ml를 가하여 60°C, 24시간 가수분해하여 TLC로 pattern을 검토한 후 activated carbon column chromatography를 이용해 당을 분리하였다. Activated carbon powder를 100°C, 1시간 가열한 후 column(3×120 cm)에 충전시키고, 증류수를

이용하여 24시간 동안 평형화시킨 후 당용액을 주입하고, 100 ml/hr 유속으로 tube당 25 ml씩 ethanol 0~50%의 linear gradient하여 당을 분리하였다. TLC는 McCleary법<sup>15)</sup>에 따라 다음과 같은 조건하에서 전개 후 UV 조사 및 분무시약으로 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), Spray Reagent; 30% sulfuric acid-ethanol.

**올리고당의 구조 동정.** 분리된 galactosyl manooligosaccharides은 TLC를 이용하여 그 분리도 및 중합도를 확인한 후, 정제법 및 기질특이성을 규명하여 보고<sup>16)</sup>된 *Aspergillus niger* 5-16 유래 정제  $\beta$ -mannosidase와 *Penicillium purpurogenum* 유래 정제  $\alpha$ -galactosidase의 enzymatic sequential action 즉, *A. niger* 5-16 유래  $\beta$ -mannosidase 정제효소액에 대하여 분리된 galactomannooligosaccharides 1%를 첨가하여 60°C에서 12시간 가수분해시킨후 TLC상에서 가수분해 pattern을 검토 및 시료를 회수하고, main chain에 branching하고 galactose의 위치를 규명하기 위해 회수된 시료에 정제  $\alpha$ -galactosidase를 처리를 반복하여 각 과정별 TLC 상에서의 가수분해 pattern을 검토하여 당의 구조를 유추하였다. 현재 정확한 구조식을 동정하기 위해 Methylation method<sup>12)</sup>에 의해 수행중에 있다.

### 구조별 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성.

*Bifidobacterium*속 균주(*B. longum* KCCM 11953, *B. bifidum* KCCM 12096, *B. infantis* KCCM 11207, *B. adolescentis* KCCM 11206, *B. animalis* KCCM 11209, *B. auglutum* KCTC 3353, *B. breve* KCCM 11208)에 대한 생육촉진 활성능을 측정하기 위해 MRS 배지에서 탄소원 dextrose를 제거하고 대체 탄소원으로 분리조제된 중합도별 galactosyl manooligosaccharide를 첨가 후 측정하였다. 중합도별 galactosyl manooligosaccharide를 회수하여 진공 농축시킨 후 DNS법<sup>14)</sup>을 이용하여 dextrose와 동일한 환원당량으로 조절한 후 121°C 15분간 멸균한 modified MRS 배지를 조제하여, 초기균수  $10^8$ 으로 희석하여 혐기적 조건하에서 37°C, 48시간 평판배양 후 colony수를 비교하고, 동일한 조건으로 액체 배양하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 총균수를 비교하였다.

## 결과 및 고찰

**효소의 정제 및 순도.** 기준에 보고된 방법<sup>1)</sup>으로 동일하게 수행하였으며 20 ml/h 유속으로 tube당 5 ml씩 용출하였으며 활성분획을 수거하여 전기영동으로 purity를 확인하고 locust bean gum galactomannan 가수분해 반응에 사용하였다.

**Locust bean gum galactomannan 가수분해 올리고당의 분리.** 효소액 100 ml에 대해 0.5% locust bean gum galactomannan을 24시간 가수분해 해 TLC로 pattern을 검토한 후 activated carbon column chromatography를 이용해 100 ml/hr 유속으로 tube당 25 ml씩 ethanol 0~50% linear gradient법으로 당을 분리하였다. Activated carbon column chromatography에 의한 당용액 0.2 ml와 5% phenol 0.2 ml를 혼합하여 conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 ml를 혼합한 후 20분간 방치하여 490

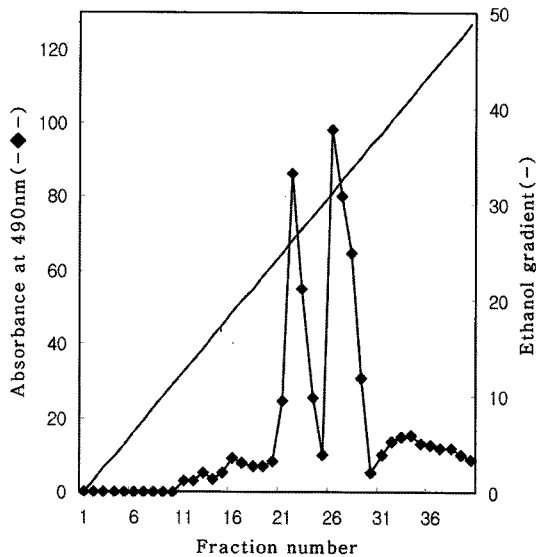


Fig. 1. Separation of locust bean gum galactomannan hydrolysates by activated carbon column chromatography.

nm로 흡광도를 측정된 후 각 fraction을 TLC로 pattern을 검토한 결과 fraction No. 22~23에서 hetero type의 중합도 4, Fraction No. 26~28에서 hetero type의 중합도 6의 galactosyl mannoooligosaccharides를 회수하였다(Fig. 1). 분리도 및 중합도를 확인하기 위하여 TLC(Fig. 2)를 이용하여 Rf value에 의한 pattern을 비교·검토한 결과, 분획 No. 22~23에서 중합도(D.P.) 4와 분획 No. 26~28에서 중합도 6의 hetero type 올리고당임을 확인할 수 있었다.

**올리고당의 구조 동정.** 본 연구에서의 D.P. 4와 6의 예상되는 구조는 본 연구실에서 확보하고 있는 standard galactosyl mannoooligosaccharides에 의한 TLC에서 나타나는 Rf value상으로 1차적으로 확인하고, *A. niger* 5-16 유래 정제  $\beta$ -mannosidase와 *P. purpurogenum* 유래 정제  $\alpha$ -galactosidase를 단계적으로 반복 처리하여 가수분해 pattern을 TLC로 해석한 결과(Fig. 3) D.P. 4의 구조식은 비환원말단 mannose로부터 2번째에 1분자의 galactose가 결합하고 있는 hetero type의 구조인 Gal<sup>2</sup>Man<sub>3</sub>(6<sup>2</sup>-mono-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-4-O- $\beta$ -D-mannotriose)로, D.P. 6의 구조식은 비환원말단 mannose로부터 4번째에 1분자의 galactose가 결합하고 있는 hetero type의 구조인 Gal<sup>2</sup>Man<sub>5</sub>(6<sup>2</sup>-mono-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-4-O- $\beta$ -D-mannopentaose)로 유추하고 있으며, 현재 Methylation method<sup>12</sup>에 의해 정확한 구조식 동정을 수행중에 있다. 기존에 보고<sup>11</sup>된 동일 균주로부터의 동정된 konjac glucomannan 가수분해 올리고당의 D.P. 3과 4의 예상되는 구조는 D.P. 3의 구조식은 비환원말단 mannose로부터 2번째에 1분자의 glucose가 결합하고 있는 hetero type의 구조(M-G-M)로, D.P. 4의 구조식은 비환원말단 mannose로부터 3번째에 1분자의 glucose가 결합하고 있는 hetero type의 구조(M-M-G-M, G- and M- represent glucosidic and mannosidic linkages)로 동정되었다.

**구조별 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성 및 신규 MRS 배지 대체 탄소원 결정.** *Bifidobacterium*속 균주(B.

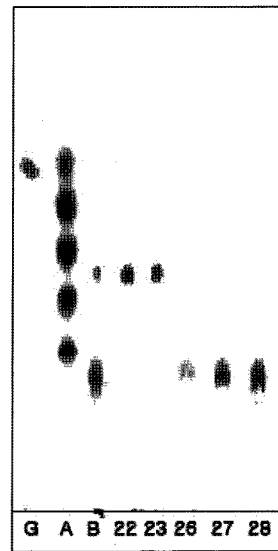


Fig. 2. TLC of locust bean galactomannan hydrolysates by activated carbon column chromatography. A: Authentic mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetrose, and mannopentose from top to bottom, G: Authentic galactose, B: Enzymatic hydrolysates, 22~28: Fraction number.

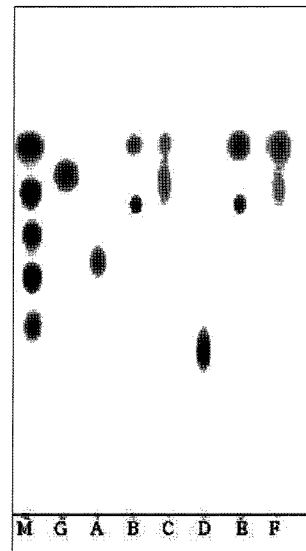


Fig. 3. TLC of hydrolysates obtained by alternating action of the purified  $\beta$  mannanase and the purified  $\alpha$ -galactosidase on locust bean gum galactomannan. M: Authentic mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetrose, and mannopentose from top to bottom, G: Authentic galactose, A: D.P 4 galactosyl mannoooligosaccharide, B: Hydrolysis pattern of D.P 4 galactosyl mannoooligosaccharide by the treatment of purified  $\beta$ -mannosidase, C: Hydrolysis pattern of B by the treatment of purified  $\alpha$ -galactosidase, D: D.P 6 galactosylmannooligosaccharide, E: Hydrolysis pattern of D.P 6 galactosyl mannoooligosaccharide by the treatment of purified  $\beta$ -mannosidase, F: Hydrolysis pattern of E by the treatment of purified  $\alpha$ -galactosidase.

*longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. auglutum*, *B. breve*)에 대한 생육촉진 활성능을 측정하기 위해 MRS media에서 탄소원을 dextrose대신에 조제된 D.P. 4와 6 galactosyl mannoooligosaccharides를 첨가 후 측정된 결과 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 양호한 생육촉진

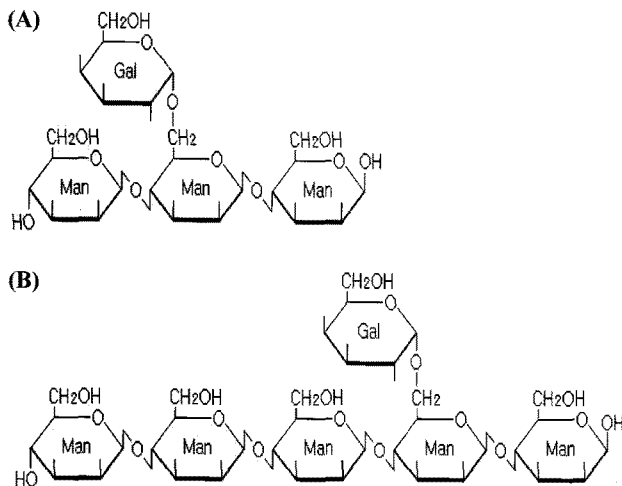


Fig. 4. Proposed Structures of locust bean gum galactomannan hydrolysates. A: Structure of D.P 4 galactomannooligosaccharide, B: Structure of D.P 6 galactosyl mannoooligosaccharide.

활성을 보였다. *B. longum*에서는 D.P 6 galactosyl mannoooligosaccharide를 탄소원으로 대체한 평판배양과 액체배양(data not shown)의 경우 표준 MRS배지와 비교하여 10배의, D.P. 4을 처리한 경우에도 7.6배의 상대 활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타냈었으며, *B. bifidum*에 있어서는 D.P. 6의 경우 6.6배의, D.P. 4을 처리한 경우에도 4.8배의 상대 활성을 나타내었으며, *B. animalis*의 경우에서도 D.P 6에서 3.8배, D.P 4에서 2.6배의 활성을 나타내었다. *Bifidobacterium* 7균주 모두에 대해서 중합도 6의 올리고당이 중합도 4의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다(Table 1).

특히 본 연구실에서는 hemicellulose계열 올리고당 탐색 및 탄소원 대체에 의한 저가의 신규 MRS배지의 제품화와 관련하여 다양한 galactomannan 및 glucomannan 가수분해 올리고당에 대하여도 연구를 수행하고 있는바, *Trichoderma harzianum* 유래 galactomannan 가수분해 올리고당인 mannobiose, Gal<sup>2</sup>Man<sub>3</sub>, Gal<sup>2</sup>Man<sub>6</sub>를 각각 탄소원으로 대체후 평판배양과 액체배양을 수행하여 측정된 결과 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 높은 생육촉진 활성을 보였다. 특히 *B. longum*에 대해서는 mannobiose, Gal<sup>2</sup>Man<sub>3</sub>, Gal<sup>2</sup>Man<sub>6</sub>가 각각 6배, 9배, 7배의, *B. bifidum*에 대해서는 4.2배, 6.6배, 4.4배의 우수한 생육촉진 활성을 나타내었다. Homo type인 mannobiose보다는 galactose가 branching하고 있는 hetero type의 Gal<sup>2</sup>Man<sub>3</sub>와 Gal<sup>2</sup>Man<sub>6</sub>의 생육촉진 활성이 더 우수하게 나타났으며, glucomannan 가수분해 올리고당인 KG2와 KG3(중합도 2와 3의 글루코만노 올리고당)을 탄소원으로 대체후 평판배양과 액체배양을 측정된 결과, *B. longum*에 대해서는 KG2와 KG3가 각각 1.4배, 4.3배, *B. bifidum*에 대해서는 2.2배, 2.5배의 다소 약한 활성을 나타내어 konjac glucomannan 가수분해 올리고당이 locust bean gum galactomannan 가수분해 올리고당보다 생육촉진활성이 다소 떨어지는 특징을 나타내었다.<sup>18)</sup>

한편, *Xylogone sphaerospora* 유래 glucomannan 가수분해 올리고당인 D.P. 3와 4 glucosyl mannoooligosaccharides를 첨가후 측정된 결과 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해

Table 1. Summary of growth activity of *Bifidobacterium* spp. by the locust bean gum galactomannan hydrolysates

<i>Bifidobacterium</i> spp.	Medium	CFU/mL	Relative activity (%)
<i>B. adolescentis</i>	Standard MRS	$3.0 \times 10^{11}$	100
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>5</sub>	$4.0 \times 10^{11}$	133
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>3</sub>	$4.0 \times 10^{11}$	133
<i>B. animalis</i>	Standard MRS	$6.0 \times 10^{11}$	100
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>5</sub>	$1.6 \times 10^{12}$	267
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>3</sub>	$2.3 \times 10^{12}$	383
<i>B. aughutum</i>	Standard MRS	$5.0 \times 10^{11}$	100
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>5</sub>	$6.0 \times 10^{11}$	120
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>3</sub>	$7.0 \times 10^{11}$	140
<i>B. bifidum</i>	Standard MRS	$5.0 \times 10^{11}$	100
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>5</sub>	$2.4 \times 10^{12}$	480
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>3</sub>	$3.3 \times 10^{12}$	660
<i>B. breve</i>	Standard MRS	$3.0 \times 10^{11}$	100
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>5</sub>	$6.0 \times 10^{11}$	200
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>3</sub>	$8.0 \times 10^{11}$	267
<i>B. infantis</i>	Standard MRS	$4.0 \times 10^{11}$	100
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>5</sub>	$7.0 \times 10^{11}$	175
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>3</sub>	$7.0 \times 10^{11}$	175
<i>B. longum</i>	Standard MRS	$3.0 \times 10^{11}$	100
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>5</sub>	$2.3 \times 10^{12}$	767
	MRS+Gal <sup>2</sup> Man <sub>3</sub>	$3.0 \times 10^{12}$	1000

양호한 생육촉진 활성을 보였다. *B. longum*에서는 D.P 4 glucosyl mannoooligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 3.9배의, D.P. 3을 처리한 경우에도 2.7배의 상대 활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타냈었으며, *B. breve*의 경우에서도 D.P 4에서 2.47배, D.P 3에서 2.08배의 활성을 나타내었으며 이 외에도 *B. bifidum*에 있어서는 D.P. 4의 경우 2.8배의 상대활성을 나타내었다. *Bifidobacterium* 7균주 모두에 대해서 중합도 4의 올리고당이 중합도 3의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다.<sup>1)</sup>

따라서 hemicellulose계열 올리고당 탐색 및 탄소원 대체에 의한 저가의 신규 MRS배지의 제품화와 관련하여 가장 유리한 탄소원 대체소재는 기존에 보고<sup>17)</sup>된 *Bacillus* sp. 유래 galactosyl mannoooligosaccharide 인 Gal<sup>2</sup>M<sub>4</sub>가 가장 유리한 소재로 결정되어 현재 시판되고 MRS 배지의 탄소원인 dextrose 20 g를 Gal<sup>2</sup>M<sub>4</sub> 1 g로 대체하여 meat peptone 10 g, beef ex. 10 g, sodium acetate 5 g, disodium phosphate phosphate 2 g, ammonium citrate 2 g, tween 80 1 g, magnesium sulfate 0.1 g, manganese sulfate 0.05 g(Approx. Formula/L)를 구성하는 신규 배지의 scale-up 공정을 구축중에 있다.

## 초 록

정제효소에 의해 locust bean gum galactomannan을 가수분해하여 activated carbon column chromatography에 의해 당가수분해물을 분리 회수하여 TLC에 의해 주요 당가수분해물은 중합도 4와 6의 hetero type으로 확인되었으며 D.P. 4의 구조식은

비환원말단 mannose로 부터 2번째에 1분자의 galactose가 결합하고 있는 hetero type의 구조인 Gal<sup>2</sup>Man<sub>3</sub>(6<sup>2</sup>-mono-O-α-D-galactopyranosyl-4-O-β-D-mannotriose)로, D.P. 6의 구조식은 비환원말단 mannose로부터 4번째에 1분자의 galactose가 결합하고 있는 hetero type의 구조인 Gal<sup>2</sup>Man<sub>5</sub>(6<sup>2</sup>-mono-O-α-D-galacto-pyranosyl-4-O-β-D-mannopentaose)로 유추하고 있다. *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. auglutum*, *B. breve*의 생육활성에 대한 중합도 4와 6의 영향을 검토하기 위하여 modified-MRS 배지 상에 탄소원으로 중합도 4와 6를 대체하여 생육활성을 비교한 결과 *B. longum*에서는 D.P 6 galactomannooligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 10배의, D.P. 4를 처리한 경우에도 7.6배의 상대 활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타냈었으며, *B. bifidum*의 경우에서도 D.P 6에서 6.6배, D.P 4에서 4.8배의 활성을 나타내었으며 *B. animalis*에 있어서는 D.P. 6의 경우 3.8배의 상대활성을 나타내었다. *Bifidobacterium* 7균주 모두에 대해서 중합도 6의 올리고당이 중합도 4의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다. 신규 MRS 배지의 제품화와 관련하여 가장 유리한 탄소원 대체소재는 *Bacillus* sp. 유래 galactosyl mannoooligosaccharide 인 Gal<sup>3</sup>M<sub>4</sub>가 가장 유리한 소재로 결정되어 신규 배지의 scale-up 공정을 구축중에 있다.

**Key words:** *Bifidobacterium* spp., galactosyl mannoooligosaccharides, gum galactomannan, β-mannanase

### 참고문헌

- Lee, H. J. and Park, G. G. (2008) Purification of Xylogone sphaerospora β-mannanase and growth activity of *Bifidobacterium* spp. by konjac glucomannan hydrolysates. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **51**, in press.
- Hidaka, H. and Eida, T. (1991) Proliferation of *Bifidobacteria* by oligosaccharides and their useful effect of human health. *Bifidobacteria and Microflora* **10**, 65-72.
- Goh, J. S., Yang, B. K. and Ahn, J. K. (1982) Studies on the manufacture of semi-solid type set yogurt. *Korean J. Dairy Sci.* **4**, 129-137.
- Lee, J. H. (1996) *Bifidobacterium* spp. as the functional foods. *Food Sci. Biotechnol.* **29**, 70-74.
- Lee, S. H. and Shin, H. K. (1996) Analysis of mugwort oligosaccharides utilized by *Bifidobacteria*. *Food Sci. Biotechnol.* **28**, 28-33.
- 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.
- Kobayashi, Y., Echizen, R. and Mutai, M. (1984) Intestinal flora and dietary factors. Processings of the 4th RIKEN symposium on intestinal flora. Tokyo, *Japan Scientific Societies Press* **7**, 69-75.
- Calrk, P. A. and Martin, J. H. (1993) Selection of *Bifidobacteria* for use dietary adjuncts in cultured dairy food tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult. Dairy Prod. J.* **8**, 11-14.
- Tanaka, R. and Shimosaka, K. (1982) Investigation of the stool frequency in elderly who are bed ridden and its improvements by ingesting of bifidus yogurt. *Jpn Geriart.* **19**, 577-581.
- Mitsuoka, T. (1982) Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria and Microflora* **1**, 3-5.
- Modler, H. W., McKellar, R. C. and Yaguchi, M. (1990) *Bifidobacteria* and bifidogenic factors. *J. Inst. Sci. Technol. Aliment.* **23**, 29-41.
- Kim, Y. J. and Park, G. G. (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.
- Lowry, O., H. Rosebrough, H., Fan, N. J. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 271-275.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-431.
- McCleary, B. V. (1982) Purification and properties of a mannoside mannohydrolase from guar. *Carbohydr. Res.* **101**, 74-79.
- Shibuya, H., Kobayashi, H., Park, G. G., Komatsu, Y., Sato, T., Kaneko, R., Nagasaki, H., Yoshida, S., Kasamo, K. and Kusakabe, I. (1995) Purification and some properties of α-galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 2333-2335.
- Choi, J. Y. and Park, G. G. (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.
- Park, S. E., Lee, H. J., Kim, S. O., Kang, J. B. and Park, G. G. (2007) Growth activity of *Bifidobacterium* spp. by D.Ps of locust bean gum galactomannan hydrolysates from *Trichoderma harzianum* β-mannanase. *Food Engineering Progress* **11**, 279-283.