

## *Xylogone sphaerospora* 유래 $\beta$ -mannanase 정제 및 Konjac Glucomannan 가수분해 올리고당의 중합도별 *Bifidobacterium* spp.에 대한 증식활성

이희정 · 박귀근\*

경원대학교 공과대학 식품생물공학과

## Purification of *Xylogone sphaerospora* $\beta$ -mannanase and Growth Activity of *Bifidobacterium* spp. by Konjac Glucomannan Hydrolysates

Hee-Jung Lee and Gwi-Gun Park\*

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

Received August 4, 2008; Accepted August 22, 2008

*Xylogone sphaerospora*  $\beta$ -mannanase 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-folds 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. Konjac glucomannan 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) 3 and 4 glucomannooligosaccharides. For elucidate the structure of D.P 3 and 4 glucomannooligosaccharides, sequential enzymatic action was performed. D.P 3 and 4 were identified as M-G-M and M-M-G-M (G- and M- represent glucosidic and mannosidic linkages). To investigate the effects of konjac glucomannooligosaccharides 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. 3 and D.P. 4 glucomannooligosaccharides, respectively. *B. longum* and *B. bifidum* grew up 3.9-fold and 2.8-fold more effectively by the treatment of D.P. 4 glucomannooligosaccharides, compared to those of standard MRS medium. Especially, D.P. 4 was more effective than D.P. 3 glucomannooligosaccharide on the growth of *Bifidobacterium* spp.

**Key words:** *Bifidobacterium* spp.,  $\beta$ -mannanase, Konjac glucomannan

### 서 론

Mannan 계열의 oligosaccharide는 인체의 정상적인 장내상태를 유지하는데 중요한 역할을 하는 *Bifidobacterium*의 좋은 에너지원으로서 유용하다는 것이 밝혀졌다.<sup>1,3)</sup> *Bifidobacterium*속은 정상 작용으로서 설사와 변비를 방지하고 장암예방, 노화방지의 효과를 나타내며, 성장기의 발육촉진, 조혈작용, 피부미용에 도움을 주는 비타민 B군을 형성한다.<sup>4,5)</sup> 또한 칼슘의 흡수, 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 길

항효과를 발휘하며, 프로바이오틱 미생물은 항미생물 기작을 경유하여 장내 서식하고 있는 병원성 미생물에 대한 저항성을 증진시키기도 한다.<sup>6,7)</sup> 또한 우리 몸에 필요한 영양분, 비타민, 아미노산, 단백질 등의 합성, 면역강화, 소화촉진 등의 유익한 작용을 하는 것을 알려져 있다.<sup>8)</sup> 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<sup>9)</sup> 연령의<sup>10)</sup> 증가에 따라서 감소·소실되는 것이 보고돼 있으며, 그 때문에 오늘날에는 이들 균종의 장내의 균 수를 높이는 연구가 소아과 영역을 비롯하여 임상 면에서 널리 행해지고 있다. 본 연구실에서는 최근 *Bifidobacterium* spp. 및 *Lactobacillus* spp.의 성장배지인 MRS 배지에서 신규의 galactosyl mannoooligosaccharides를 탄소원으로 대체시킨 modified-MRS 배지에서의 생육활성을 비교한 결

\*Corresponding author

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

E-mail: ggpark@kyungwon.ac.kr

과, *Bacillus* sp. 유래 중합도 5와 7의 분지올리고당을 조제 및 동정하여 첨가된 조제배지에서 10배 정도의 높은 생육활성을 보고한바 있으며,<sup>11)</sup> *Trichoderma harzianum* 유래  $\beta$ -mannanase 정제법에 의한 konjac glucomannan 가수분해 올리고당은 homo type인 중합도 2와 hetero type인 중합도 3의 올리고당이 조제 및 동정되어 장내세균에 미치는 생육활성에 대해서도 보고하였다.<sup>12)</sup>

본 연구에서는 *Xylogone sphaerospora* 유래  $\beta$ -mannanase의 정제를 수행하여 konjac glucomannan 가수분해물을 분리·조제 회수하고 TLC에 의해 분리된 당가수분해물의 중합도를 결정하여, *Bifidobacterium*속(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. auglutum*, *B. breve*)에 대한 장내세균의 증식활성을 기존에 보고된 중합도별·구조별 올리고당의 활성과 비교함을 주요 목표로 하였다.

## 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.

**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 완충액(pH 6.0)와 0.1 ml의 균체가 제거된 배양액을 섞어 50°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 mannose를 희석하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 D-mannose를 0.1~1.0 mg/ml를 사용하였고, 효소 1 unit는 동일조건에서 1분당 생성되는 D-mannose에 해당하는 1 mg/ml의 환원당을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.

**효소의 정제.** Sephadex G-100을 0.2 M McIlvaine 완충액(pH 6.0)으로 씻은 다음 column(2.5×42 cm)에 충전시켜 0.2 M McIlvaine 완충액(pH 6.0)으로 평형을 유지시켰다. 여기에 투석한 조효소를 용출시켰다. 이때 용출속도는 20 ml/h로 하였고, 용출액은 5 ml씩 fraction collector에 모았고, 각 용출액은 단백질과 효소의 활성을 측정하여 정제 효소액으로 사용하였다.

**SDS 전기영동법.** 정제효소를 열로 변성시킨 후 분자량은 10 kDa molecular weight marker(Life Technologies LTD., USA)를 이용하여 결정하였고, Laemmli의 방법<sup>15)</sup>에 의해 Discontinuous denaturing gel electrophoresis를 수행하였다.

**Konjac glucomannan 가수분해 올리고당의 분리 및 Thin layer chromatography (TLC).** 0.5% konjac glucomannan을 함유하는 정제 효소액 300 ml를 가하여 60°C, 24시간 가수분해

하여 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 20 ml씩 ethanol 0~50%의 linear gradient하여 당을 분리하였다.

TLC는 McCleary법<sup>16)</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

**중합도별 가수분해 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 생육 촉진 활성능을 측정하기 위해 MRS 배지에서 탄소원을 포도당 대신에 분리 조제된 중합도별 glucomannooligosaccharide를 첨가 후 측정하였다. 중합도별 glucomannooligosaccharide를 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<sup>8</sup>으로 희석하여 혐기적 조건하에서 37°C, 48시간 평판배양 후 colony수를 비교하고,<sup>20)</sup> 동일한 조건으로 액체 배양하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 총균수를 비교하였다.

## 결과 및 고찰

**Sephadex G-100 chromatography에 의한 정제.** 20%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 냉장 상에서 효소액에 처리하여 4°C, 12시간 방치 후 원심분리하여 얻은 상정액을 투석막(cellulose tubing, 16 mm×30 cm, Sigma Chemical Co.)에 처리하여 4°C, 24시간 투석한 효소액을 sephadex G-100 chromatography(2.5×42 cm)에 처리하여 20 ml/h 유속으로 tube당 5 ml씩 용출하였으며 정제를 진행한 결과 분획 No. 25~32에서 활성분획이 나타났다(Fig. 1).

**정제  $\beta$ -mannanase의 순도.** 정제효소는 SDS-PAGE에 의해

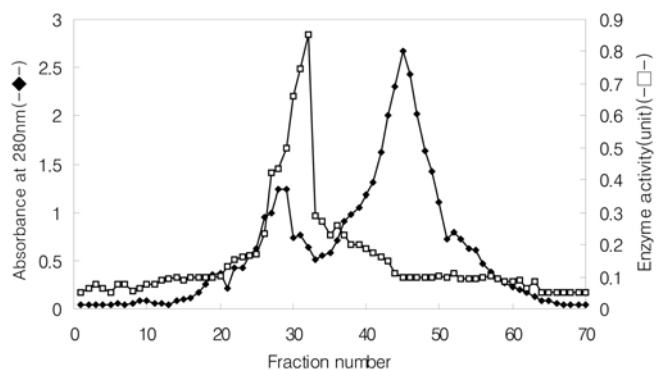


Fig. 1. Chromatogram of the  $\beta$ -mannanase from *Xylogone sphaerospora* by sephadex G-100 column.

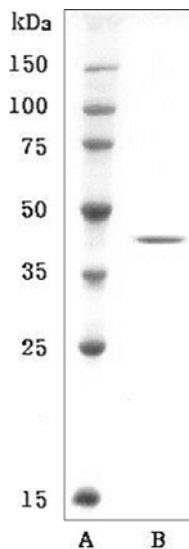


Fig. 2. Analysis of the purified enzyme by SDS-PAGE. A: Marker, B: Purified  $\beta$ -mannanase.

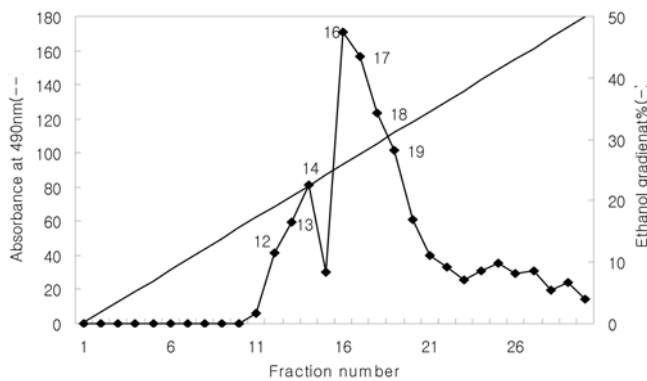


Fig. 3. Separation of konjac glucomannan hydrolysates by activated carbon column chromatography.

단일밴드를 나타내었으며(Fig. 2),  $\beta$ -mannanase의 분자량은 42 kDa으로 추정되었다. *Penicillium purpurogenum* No. 618 유래의 정제  $\beta$ -mannanase는 57 kDa, *Aspergillus niger*에서는 42 kDa, *Tyromyces palustris*에서는 61 kDa, *Streptomyces* sp. No. 17에서는 43 kDa, *Bacillus subtilis*에서는 22 kDa, *Trichoderma harzianum*에서는 52.5 kDa의 분자량이 보고되고 있다.<sup>11,17,18)</sup>

**Konjac glucomannan 가수분해 glucomannooligosaccharides 분리 및 동정.** 효소액 100 ml에 대해 0.5% konjac glucomannan을 24시간 가수분해 해 TLC로 pattern을 검토한 후 activated carbon column chromatography을 이용해 100 ml/hr 유속으로 tube당 20 ml씩 ethanol 0~50% linear gradient법으로 당을 분리하였다. Activated carbon column chromatography에 의한 당 용액 0.2 ml와 5% phenol 0.2 ml를 혼합하여 conc.-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml를 혼합한 후 20분간 방치하여 490 nm로 흡광도를 측정 한 후 각 fraction을 TLC로 pattern을 검토한 결과 fraction No. 12~14에서 hetero type의 중합도 3, Fraction No. 16~19에서 hetero type의 중합도 4의 glucosylmannooligosaccharides를 회수하였다(Fig. 3). 분리도 및 중합도를 확인하기 위하여

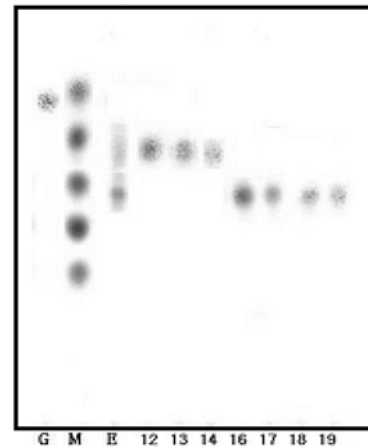


Fig. 4. TLC of konjac glucomannan hydrolysates by activated carbon column chromatography. G: Authentic glucose, M: Authentic mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetrose, and mannopentose from top to bottom, E: Enzymatic hydrolysates, 12~19: Fraction number.

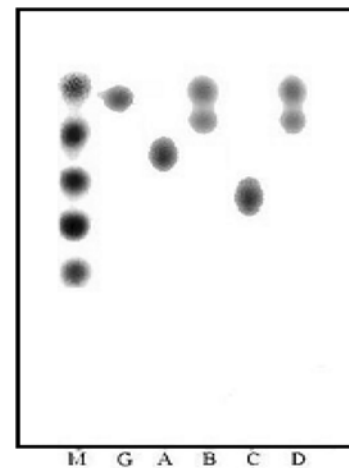


Fig. 5. TLC of identified konjac glucomannan hydrolysates. M: Authentic mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetrose and mannopentose from top to bottom. G: Authentic glucose, A: D.P 3 glucomannooligosaccharide, B: D.P 3 glucomannooligosaccharide by the treatment of purified  $\beta$ -mannosidase, C: D.P 4 glucomannooligosaccharide, D: D.P 4 glucomannooligosaccharide by the treatment of purified  $\beta$ -mannosidase.

TLC(Fig. 4)를 이용하여 Rf value에 의한 pattern을 비교·검토한 결과, 분획 No. 12~14에서 중합도(D.P.) 3와 분획 No. 16~19에서 중합도 4의 hetero type 올리고당임을 확인할 수 있었다.

본 연구에서의 D.P. 3과 4의 예상되는 구조는 본 연구실에서 확보하고 있는 standard glucomannooligosaccharides에 의한 TLC에서 나타나는 Rf value상으로 1차적으로 확인하고, *Aspergillus niger* 5-16 유래 정제  $\beta$ -mannosidase<sup>19)</sup>를 단계적으로 처리하여 가수분해 pattern을 TLC로 해석한 결과(Fig. 5) 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)로 예상

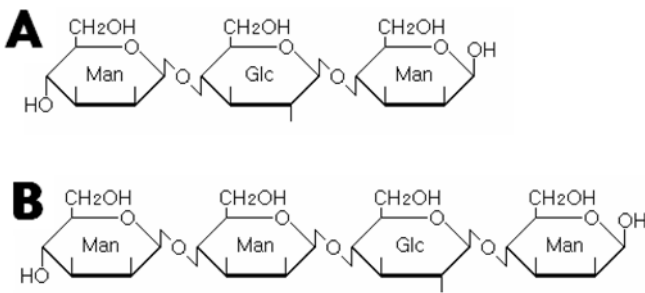


Fig. 6. Proposed Structures of konjac glucomannan hydrolysates. A: Structure of D.P 3 glucomannooligosaccharide, B: Structure of D.P 4 glucomannooligosaccharide.

하고 있으며(Fig. 6), 현재 Methylation method<sup>12)</sup>에 의해 정확한 구조식 동정을 수행중에 있다.

중합도별 glucomannaoligosaccharides의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성. *Bifidobacterium*속 균주(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. auglutum*, *B. breve*)에 대한 생육촉진활성능을 측정하기 위해 MRS media에서 탄소원을 dextrose대신에 조제된 D.P. 3와 4 glucomannooligosaccharides를 첨가 후 측정된 결과 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 양호한 생육촉진 활성을 보였다. *B. longum*에서는 D.P 4 glucomannooligosaccharide를 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(Table 1).

특히 본 연구실에서는 hemicellulose계열 올리고당 탐색 및 탄소원 대체에 의한 저가의 신규 MRS배지의 제품화와 관련하여 galactomannan 가수분해 올리고당에 대하여도 연구를 수행하고 있는바, *Bacillus* sp. 유래 정제효소에 의한 galactomannan 가수분해 올리고당의 경우 *B. longum*에서는 D.P 5 galactomannooligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 10배의, D.P. 7을 처리한 경우에도 7.5배의 상대 활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타내었다. *B. bifidum*의 경우에서도 D.P. 5에서 9.8배, D.P. 7에서 7.7배의 우수한 생육활성을 나타내었으며 이외에도 *B. breve*, *B. animalis*, *B. infantis*에 있어서는 D.P. 5의 경우 2.9~5.7배의 상대활성을 나타내었으나, *B. infantis*에 대한 D.P. 7의 경우에는 표준 MRS배지와 비교하여 0.62배로 감소하였다. 또한 중합도 5의 올리고당이 중합도 7의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다.<sup>11)</sup> 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 비교

Table 1. Summary of growth activity of *Bifidobacterium* spp. by the konjac glucomannan hydrolysates

<i>Bifidobacterium</i> spp.	Medium	CFU/mL	Relative activity (%)
<i>B. adolescentis</i>	Standard MRS	$1.1 \times 10^{11}$	100
	MRS+D.P 3	$1.7 \times 10^{11}$	155
	MRS+D.P 4	$1.9 \times 10^{11}$	173
<i>B. animalis</i>	Standard MRS	$3.0 \times 10^{11}$	100
	MRS+D.P 3	$5.0 \times 10^{11}$	167
	MRS+D.P 4	$5.0 \times 10^{11}$	167
<i>B. auglutum</i>	Standard MRS	$2.04 \times 10^{11}$	100
	MRS+D.P 3	$2.79 \times 10^{11}$	135
	MRS+D.P 4	$3.71 \times 10^{11}$	182
<i>B. bifidum</i>	Standard MRS	$5.0 \times 10^{11}$	100
	MRS+D.P 3	$9.0 \times 10^{11}$	180
	MRS+D.P 4	$1.4 \times 10^{12}$	280
<i>B. breve</i>	Standard MRS	$1.5 \times 10^{11}$	100
	MRS+D.P 3	$2.5 \times 10^{11}$	208
	MRS+D.P 4	$3.7 \times 10^{11}$	247
<i>B. infantis</i>	Standard MRS	$9.0 \times 10^{11}$	100
	MRS+D.P 3	$1.5 \times 10^{12}$	167
	MRS+D.P 4	$1.6 \times 10^{12}$	178
<i>B. longum</i>	Standard MRS	$3.0 \times 10^{11}$	100
	MRS+D.P 3	$8.1 \times 10^{11}$	270
	MRS+D.P 4	$1.17 \times 10^{12}$	390

한 결과 Konjac glucomannan 유래 올리고당에 비해 guar galactomannan 유래 올리고당이 생육활성이 높게 나왔으며, 특히 D.P. 5 galactomannooligosaccharide의 생육활성이 가장 높게 나왔다.<sup>18)</sup> 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 추론하고 있다.

## 초 록

Sephadex G-100 column chromatography에 의해 *Xylogone sphaerospora* 유래  $\beta$ -mannanase의 정제를 수행하여 비활성 8.44 units/ml, 정제배율 56.27을 나타내었다. SDS-PAGE에 의한 단일밴드를 확인하였고, 분자량은 42 kDa으로 결정되었다. 정제 효소에 의해 konjac glucomannan을 가수분해하여 activated carbon column chromatography에 의해 당가수분해물을 분리 회수하여 TLC에 의해 주요 당가수분해물은 중합도 3과 4의 hetero type으로 확인되었으며 D.P. 3과 4의 예상되는 구조는 본

연구실에서 확보하고 있는 standard glucomannooligosaccharides에 의한 TLC에서 나타나는 Rf value 상으로 1차적으로 확인하고, *Aspergillus niger* 5-16 유래 정제  $\beta$ -mannosidase를 단계적으로 처리하여 가수분해 pattern을 TLC로 해석한 결과 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)로 예상하고 있다. *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. auglutum*, *B. breve*의 생육활성에 대한 중합도 3과 4의 영향을 검토하기 위하여 modified-MRS 배지 상에 탄소원으로 중합도 3과 4를 대체하여 생육활성을 비교한 결과 *B. longum*에서는 D.P. 4 glucomannooligosaccharide를 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 *B. bifidum*에 있어서는 D.P. 4의 경우 2.8배의 상대 활성을 나타내었다. *Bifidobacterium* 7균주 모두에 대해서 중합도 4의 올리고당이 중합도 3의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다.

**Key words:** *Bifidobacterium* spp.,  $\beta$ -mannanase, Konjac glucomannan

## 감사의 글

본 연구는 2006년도 경원대학교 지원에 의한 결과로서 이에 감사드립니다

## 참고문헌

- 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. Japan Scientific Societies press, Tokyo. p 69.
- Hoffman, K. and Bircher, J. (1969) Veränderungen der bakteriellen Darmbesiedlung nach Lactulose-gaben. *Schweiz Med Wschr.* **99**, 608-613.
- 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.
- Moon, J. W., S. H. Choi, Y. K. Shin, S. W. Lee, and K. H. Kang. (1998) Effect on the growth of *Bifidobacterium* spp. by transgalactooligosaccharides produced with  $\beta$ -galactosidase. *Kor. J. Dairy Sci.* **20**, 283-289.
- Ohtsuka K., Y. Benno, Y. K. Endo, H. Ueda, O. Ozawa, and T. Mitsuoka. (1989) Effect of 4'-galactosyllactose intake on human fecal microflora. *Bifidus* **2**, 143-149.
- Shimizu, K. and M. Ishihara. (1983) Isolation and Characterization of oligosaccharides from the hydrolyzate of larch wood glucomannan with endo- $\beta$ -D-mannanase. *Agr. Biol. Chem.* **47**, 949-955.
- Shimokawa, T., S. Toshida, I. Kusakabe, T. Takenchi, and K. Murata. (1997) Isolation and quantification of alginate-derived oligouronic acids by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Carbohydr. Res.* **299**, 95-98.
- 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.
- Duffand, G. D., C. M. McCutchen, P. Leduc, K. N. Parker, and R. M. Kelly. (1997) Purification and characterization of extremely thermostable  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase, and  $\alpha$ -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 169-177.
- Kusakabe, I., R. Takahashi, S. Kusama, K. Murakami, A. Maekawa, and T. Suzuki. (1985) Structure of the glucomannooligosaccharides resulting from the hydrolysis of konjac glucomannan produced by a  $\beta$ -mannanase from *Streptomyces* sp., *Agic. Biol. Chem.* **48**, 2943-2950.
- Choi, J. Y. and G. G. Park. (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.
- Kim, Y. J. and G. G. Park. (2005) Identification and growth activity to *Bifidobacterium* spp. of locust bean gum hydrolysates by *Trichoderma harzianum*  $\beta$ -mannanase. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 364-369.
- Lowry, O., H. Rosebrough, N. J. Fan, A. L. and R. J. Randall. (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.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of struture protein during the assembly of head bacteriophage TA. *Nature* **227**, 680-685.
- McCleary, B. V. (1982) Purification and properties of a mannoside mannohydrolase from guar, *Carbohydr. Res.* **101**, 74-79.
- Park, G. G., S. Y. Lee, B. K. Park, S. S. Ham, and J. H. Lee. (1991) Characteristic features of an  $\alpha$ -galactosidase from *Penicillium purpurogenum*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 90-98.
- Park, S. E., H. J. Lee, S. O. Kim, J. B. Kang, and G. G. Park. (2007) Growth activity of *Bifidobacterium* spp. by D.Ps of locust bean gum galactomannan hydrolysates from *Trichoderma harzianum*  $\beta$ -mannanase. *Food Engineering Progress.* **11**, 279-283.
- Zama, M., I. Kusakabe, G. G. Park, K. Tubaki, and K. Murakami. (1988) Specificity of  $\beta$ -mannanase from *Penicillium purpurogenum* for konjac glucomannan, *Agric. Biol. Chem.* **52**, 519-524.
- Deya, A. M., K. Nojiri, and S. Igarashi. (1982) Studies on the application of galactosyl lactose for infant formula. *Yukijirushi Nyugyo Giyatsu Kenkyusho Hokoku.* **79**, 19-26.