

Trichoderma harzianum 유래 β -mannanase 에 의한 Locust Bean Gum Galactomannan 가수분해 올리고당의 중합도별 Bifidobacterium spp.에 대한 생육활성

박성은 · 이희정 · 김순옥^a · 강종백^b · 박귀근^{*}

경원대학교 공과대학 식품생물공학과, ^{*}(주)씨트리 중앙연구소, ^b경원대학교 자연과학대학 화학과

Growth Activity of *Bifidobacterium* spp. by D.Ps of Locust Bean Gum Galactomannan Hydrolysates from *Trichoderma harzianum* β -mannanase

Seong-Eun Park, Hee-Jung Lee, Soon-Ok Kim^{*}, Jong-Bac Kang^{**}, and Gwi-Gun Park

Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Seoungnam 467-701, Korea

^{*}C-TRI Central Research Center, Chem-Tech Research Incorporation, Suweon 445-743, Korea

^bDepartment of Chemistry, Kyungwon University, Seoungnam 467-701, Korea

Abstract

Locust bean gum galactomannan was hydrolyzed to degree of polymerization (D.P.) 2, 4, 7 galactosyl mannoooligosaccharides by the purified β -mannanase. 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*, and *B. breve*, *Bifidobacterium* spp. were cultivated individually on the modified-MRS medium containing carbon source such as D.P 2, 4 and 7 galactosyl mannoooligosaccharides, respectively. *B. longum* and *B. bifidum* grew up 9.0-fold and 6.6-fold more effectively by the treatment of D.P 4 galactosyl mannoooligosaccharide, compared to those of standard MRS medium. Especially, hetero type of D.P 4 and 7 were more effective than homo type of D.P 2 on the growth of *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus* spp.

Keywords: Locust bean gum galactomannan, β -mannanase, *Bifidobacterium* spp.

서 론

Hemicellulose로서 광범위하게 존재하고 있는 것으로는 mannan, xylan, galactan 등이 있으며, 이중에 mannan은 β -1,4-mannopyranoside 결합을 main chain으로 하는 다당이며, 특히 konjac glucomannan, locust bean gum galactomannan, guar gum galactomannan, copra 잔사인 white copra meal galactomannan 및 brown copra meal galacto-

mannan에 다량 함유하고 있다. Mannan 계열의 oligosaccharide는 인체의 정상적인 장내상태를 유지 하는데 중요한 역할을 하는 *Bifidobacterium*의 좋은 에너지원으로서 유용하다는 것이 밝혀졌다(Choi & Park, 2004a; Kobayashi et al., 1984; Hoffmann & Bircher, 1969; Gyrgy et al., 1954). *Bifidobacterium*은 정장 작용으로서 설사와 변비를 방지하고(Calrk & Martin, 1993; Tanaka & Shimosaka, 1982) 장암 예방, 노화방지의 효과를 나타내며, 성장기의 발육촉진, 조혈작용, 피부미용에 도움을 주는 비타민 B군을 형성한다(Mitsuoka, 1982; Mitsuoka, 1990; Modler et al., 1990). 또한 칼슘의 흡수, 혈당과 콜레스테롤의 수치를 낮추는 등 여러 이점을 갖고 있다. *Bifidobacterium* 속은 *Lactobacillus* 속과 더불어

Corresponding author: Gwi-Gun Park, Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Seoungnam 467-701, Republic of Korea.
Phone: 031-750-5383, Fax:
E-mail: ggpark@kyungwon.ac.kr

Staphylococcus aureus, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* 및 *Clostridium perfringens* 등과 같은 병원성 미생물의 성장 시 길항효과를 발휘하며, 프로바이오틱 미생물은 항미생물 기작을 경유하여 장내 서식하고 있는 병원성 미생물에 대한 저항성을 증진시키기도 한다(Kim et al., 2002; Saavedra, 1999; Lee & Lee, 2001; Hughes & Hoover, 1991). 또한 우리 몸에 필요한 영양분, 비타민, 아미노산, 단백질 등의 합성, 면역강화, 소화 촉진 등의 유익한 작용을 하는 것을 알려져 있다(Goldin et al., 1980; Kaila et al., 1992; Marteau et al., 1990; Mitsuoka, 1980). 사람의 대장에는 대장 1 g당 3×10^{11} 이상의 세균이 존재하여 flora를 형성하고 있으며, 이중 *Bifidobacterium*의 점유상태가 생체건강의 중요한 factor로 작용하고 있다. 장내 flora의 구성에는 물론 개인차가 존재하나 일반적으로 섭취하는 식품, 감염상태, 스트레스, 기후에 따라 민감하게 변화한다. *Bifidobacterium*의 증식과 함께 생산된 대사산물(항균성인자, 유산, 유당분해효소 등)에 의해 직접, 간접적으로 위에 언급한 것과 같은 효과를 발휘하게 된다(Lee, 1996). 또한 사람의 장내균총을 정착시킨 랫트에게 *Bifidobacterium* 과 galactooligosaccharide를 연속적으로 혼합 투여하여 발암 관련 인자와 장내 부패 대사산물의 동태를 조사한 결과, 장관내용물 중의 nitroreductase, tryptophanase, urease 등의 미생물의 효소 활성과 부패산물인 인돌, 암모니아 함량이 저하하여 *Bacteroides*와 대장균군에 의한 장내 부패가 억제되는 것으로 나타났다고 보고되었으며(Heo, 1995), galactomannooligosaccharide와 glucomannooligosaccharide의 중합도 5와 7에서 *Bifidobacterium*의 생육 촉진 활성이 높게 나타난 바 있다. 특히 Gal³Man₄에서 *B. longum*이 비교군에 비해 10배의 증식 활성을 나타내었다(Choi & Park, 2004b).

따라서 본 연구에서는 *Trichoderma harzianum* 유래 β-mannanase에 의한 locust bean gum galactomannan 가수분해 oligosaccharides를 분리·조제하고, 중합도별 올리고당의 *Bifidobacterium* spp. 및 *Lactobacillus* spp.에 대한 생육활성을 비교검토하였다.

재료 및 방법

Trichoderma harzianum 유래 β-mannanase의 생산

효소생산의 배지조성은 cellulose 3.0%, corn steep

liquor 3.0%, KH₂PO₄ 1.0%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%의 액체배지 2 L에 종모배양액 10 mL을 접종하여 28°C, 130 rpm, 96시간 jar fermentor (KFC, KF-5 I) 로 배양하여 4°C, 11,000 rpm, 15분 원심분리(Beckman, rotor 14) 후 상층액을 효소액으로 사용하였다(Kim & Park, 2005).

단백질 농도

단백질량(280 nm)과 핵산량(260 nm)의 흡광도를 UV-spectrophotometer (Amersham Biosciences, Ultrospec 1100 pro)에서 측정해 $1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260}$ 의 식을 이용한 결과를 단백질 농도로 사용하였고, 정제 step중에는 Lowry의 방법(Lowry et al., 1951)을 사용하여 단백질농도를 확인하였다.

효소 활성

β-mannanase의 생산량은 DNS 환원당 정량법(Miller, 1959a)에 의하여 수행하였다. 즉 0.5 mL의 1% Locust bean gum, 0.4 mL의 McIlvaine buffer (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 unit의 β-mannanase는 동일조건에서 1분당 생성되는 D-mannose에 해당하는 1 mg/mL의 환원당을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.

Locust bean gum galactomannan 가수분해 올리고당의 분리 및 Thin layer chromatography (TLC)

효소액에 대해 0.5% locust bean gum을 60°C, 8시간 가수분해하여 TLC로 분해 양상을 검토하였다. activated carbon powder를 100°C 1시간 가열한 후 column (3×120 cm)에 충전시키고, 증류수를 이용하여 24시간 동안 평형화시킨 후 당용액을 주입하고, 100 mL/hr유속으로 tube당 20 mL씩 ethanol 0~50%의 linear gradient하여 활성탄 column chromatography를 이용하여 당을 분리하였다.

TLC는 McCleary법(McCleary, 1982)에 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 F₂₅₄ (Merck, Germany), Developing Solvent; n-propanol: methanol:water = 5:2:3:(v/v/v), Spray Reagent; 30% sulfuric acid ethanol.

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

*Bifidobacterium*속 균주 (*B. animalis* ATCC 25527, *B. bifidum* ATCC 15696, *B. breve* ATCC 15701, *B. infantis* ATCC 15697, *B. longum* ATCC 29521)와 *Lactobacillus*속 균주 (*L. casei* KCCM 12452, *L. plantarum* KCCM 40701, *L. reuteri* KCTC 40417)에 대한 생육촉진활성을 측정하기 위해 MRS 배지에서 탄소원을 포도당 대신에 조제된 올리고당을 각각 첨가한 후 측정하였다. 조제·분리된 올리고당을 회수하여 진공농축하여 121°C 15분간 autoclave한 후 DNS법(Miller, 1959b)을 이용하여 dextrose와 동일한 환원당량으로 조절 한 후 modified MRS 배지를 조제하여, 혐기적 조건하에서 37°C, 48시간 평판배양한 후 colony수를 비교하고, 동일한 조건으로 액체배양하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 총균수를 비교하였다.

결과 및 고찰

Locust bean gum galactomannan 가수분해 올리고당의 분리 및 조제

효소액 100 ml에 대해 0.5%(v/w) locust bean gum을 8시간 가수분해 하여 TLC로 pattern (Fig. 1-B)을 검토한 후 활성탄 column chromatography (3×120 cm)을 이용해 100 ml/hr유속으로 tube당 20 ml씩 ethanol 0~50% linear gradient법으로 당을 분리하였다. 활성탄 column chromatography에 의한 당 용액 0.2 ml와 5% phenol 0.2 ml를 가하여 혼합 후 Conc.-H₂SO₄ 1 ml를 가하여 혼합한 후 20분간 방치하여 490 nm로 흡광도를 측정한후 peak를 나타내는 각 fraction을 TLC로 pattern (Fig. 1)을 검토한 결과 fraction No. 16, 17에서 중합도 2, fraction No. 20, 21에서 중합도 4, fraction No. 35, 36에서 중합도 7의 galactosyl mannooligosaccharides를 회수하였다. 중합도 8로 추정되는 galactosyl mannooligosaccharide가 TLC상에서 확인되었으나 분리도 및 회수율이 낮아 중합도 8에 대한 연구는 현재 진행중에 있다(Fig. 2).

본 논문에서는 언급하지 않았으나 분리된 올리고당의 구조동정도 수행중에 있으며 분리된 중합도2는 mannose와 mannose가 β -1,4결합을 하고있는 β -1,4-mannobiose로, 중합도4는 β -1,4결합을 하고있는 β -1,4-mannotriose의 main chain의 환원말단으로 부터

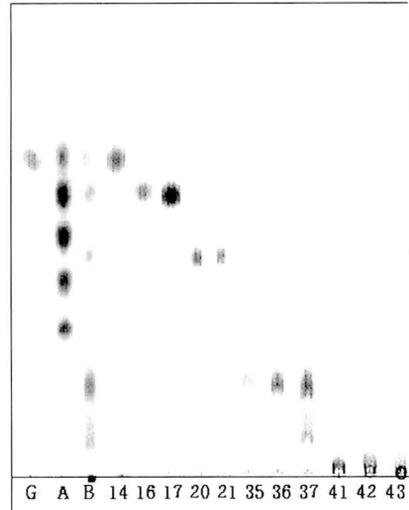


Fig. 1. TLC of locust bean gum hydrolysates by activated carbon column chromatography.

G : Galactose
A: Authentic mannose, manno-biose, manno-triose, manno-tetraose, and manno-pentose from top to bottom
B: Hydrolysates by the treatment of purified enzyme.
14-43: Fraction number

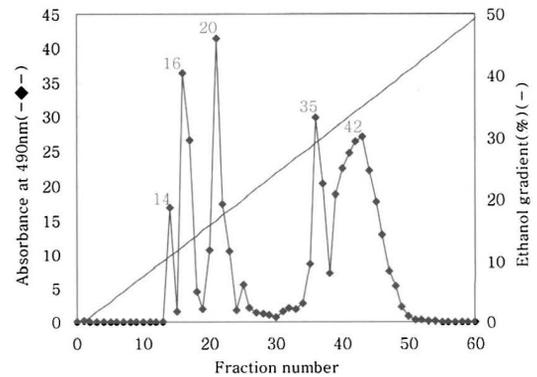


Fig. 2. Separation of locust bean gum hydrolysates by activated carbon column chromatography.

2번째 mannose에 galactose가 α -1,6결합을 하고있는 6²-mono-0- α -D-galactopyranosyl-4-0- β -D-mannotriose로, 중합도 7은 β -1,4결합을 하고있는 β -1,4-mannohexose의 main chain의 환원말단으로 부터 2번째 mannose에 galactose가 α -1,6결합을 하고있는 6²-mono-0- α -D-galactopyranosyl-4-0- β -D-mannohexaose의 구조로 동정되었다. 중합도 8로 예상되는 시료는 분리회수율이 낮아 구조동정을 수행중에 있다.

중합도별 locust bean gum galactomannan 가수분해 올리고당의 *Bifidobacterium* spp. 및 *Lactobacillus* spp.에 대한 생육활성

*Bifidobacterium*속 균주(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. breve*) 및 *Lactobacillus*속 균주(*L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*)에 대한 생육활성을 측정하기 위해 MRS 배지에서 탄소원을 포도당 대신에 조제된 중합도 2, 4, 7 올리고당 시료를 각각 첨가 후 평판배양과 액체배양을 하여 측정된 결과 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 생육촉진 활성을 보였다. 특히 *B. longum*은 중합도2가 6.0배, 중합도4가 9.0배, 중합도7이 7.0배로 가장 우수한 생육활성을 나타내고 있으며, *B. bifidum*에서도 중합도4와7이 각각 6.6배, 4.3배의 우수한 생육촉진 활성을 보이고 있다(Table 1). Homo type인 중합도2보다는 galactose가 branching하고 있는 hetero type의 중합도 4와7의 올리고당이 생육촉진 활성이 더 우수하게 나타났다.

*Lactobacillus*속 균주에 대해서는 *Bifidobacterium* spp.보다는 낮은 생육활성을 보였으나 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 높은 생육촉진 활성을 보였으며 특히 *L. casei*에서는 중합도 4와 7

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

<i>Bifidobacterium</i> sp.	Medium	CFU/ml	Relative activity(%)
<i>B. animalis</i>	Standard MRS	3.4×10 ⁸	100
	MRS + D.P 2	7.9×10 ⁸	232
	MRS + D.P 4	8.3×10 ⁸	244
	MRS + D.P 7	9.6×10 ⁸	282
<i>B. bifidum</i>	Standard MRS	1.3×10 ⁸	100
	MRS + D.P 2	5.5×10 ⁸	423
	MRS + D.P 4	8.6×10 ⁸	662
<i>B. breve</i>	MRS + D.P 7	5.7×10 ⁸	438
	Standard MRS	2.4×10 ⁸	100
	MRS + D.P 2	6.0×10 ⁸	250
	MRS + D.P 4	1.1×10 ⁹	458
<i>B. infantis</i>	MRS + D.P 7	8.7×10 ⁸	363
	Standard MRS	1.8×10 ⁸	100
	MRS + D.P 2	3.8×10 ⁸	211
	MRS + D.P 4	4.2×10 ⁸	233
<i>B. longum</i>	MRS + D.P 7	5.2×10 ⁸	289
	Standard MRS	3×10 ⁷	100
	MRS + D.P 2	1.8×10 ⁸	600
	MRS + D.P 4	2.7×10 ⁸	900
	MRS + D.P 7	2.1×10 ⁸	700

Table 2. Summary of growth activity of *Lactobacillus* spp. by the locust bean gum galactomannan hydrolysates.

<i>Lactobacillus</i> sp.	Medium	CFU/ml	Relative activity(%)
<i>L. casei</i>	Standard MRS	4×10 ⁷	100
	MRS + D.P 2	8×10 ⁷	200
	MRS + D.P 4	1.2×10 ⁸	300
	MRS + D.P 7	2.2×10 ⁸	550
<i>L. plantarum</i>	Standard MRS	4.8×10 ⁸	100
	MRS + D.P 2	5.6×10 ⁸	117
	MRS + D.P 4	6.0×10 ⁸	125
	MRS + D.P 7	8.7×10 ⁸	181
<i>L. reuteri</i>	Standard MRS	2.3×10 ⁸	100
	MRS + D.P 2	2.2×10 ⁸	96
	MRS + D.P 4	1.9×10 ⁸	83
	MRS + D.P 7	4.2×10 ⁸	183

이 각각 3.0배, 5.5배의 생육촉진 활성을 나타내었으며 *Bifidobacterium*속 균주와 공통적으로 hetero type인 고중합도 올리고당이 homo type인 저중합도 올리고당보다 생육활성이 높게 나타나는 것으로 사료되었다(Table 2).

요 약

Locust bean gum galactomannan 가수분해 올리고당의 분리는 효소액에 대해 0.5%의 locust bean gum을 가수분해 하여 TLC로 pattern을 검토한 후 활성탄 column chromatography을 이용해 ethanol linear gradient로 당을 분리하였다. 분리된 당용액은 phenol-H₂SO₄법을 이용하여 측정 후, TLC로 pattern을 검토한 결과, locust bean gum galactomannan 가수분해 올리고당은 중합도 2, 4, 7로 분리되었다. *Bifidobacterium*속과 *Lactobacillus*속 균주에 대한 생육촉진 활성을 비교하기 위해 MRS 배지에서 포도당 대신 분리된 올리고당을 첨가한 modified MRS 배지를 조제한 후, 혐기적 조건하에서 37°C, 48시간 액체배양하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 총균수를 측정하고, 동일한 배지 조성의 평판배지에 도말하여 colony의 수를 비교하였다. 특히 *B. longum*은 중합도2가 6.0배, 중합도4가 9.0배, 중합도7이 7.0배로 가장 우수한 생육활성을 나타내고 있으며, *B. bifidum*에서도 중합도4와 7이 각각 6.6배, 4.3배의 우수한 생육촉진 활성을 보이고 있다. Homo type인 중합도2보다는 galactose가 branching하고 있는 hetero type의 중합도 4와 7의

올리고당이 생육촉진 활성이 더 우수하게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 경원대학교 지원에 의한 결과로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Calrk PA and Martin JH. 1993 Selection of *Bifidobacteria* for use dietary adjuncts in cultured dairy food. H Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult. Dairy Prod. J* **8**: 11-14
- Choi JY and Park GG. 2004b Purification of *Bacillus* sp. β -Mannanase and the growth activity of *Bifidobacterium* spp. by guar gum hydrolysates. *Kor. J. Microbial, Biotechnol* **32**: 117-122
- Goldin BR, Swenson L, Dwyer J, Sexion M and Gorbach SL. 1980 *J. Nat. Cancer* **40**: 255-261
- Gyrgy P, Norris RF and Rose CS. 1954 *Bifidus* factor. I. A variant of *Lactobacillus* and *Bifidus* requiring a special growth factor. *Arch. Biochem. Biophys* **48**: 193-196
- Heo KT. 1995 Characteric features of oligosaccharides. *Food Sci. Biotechnol* **28**: 24-28
- Hoffmann K and Bircher J. 1969 Ver nderungen der bakteriellen darmbesiedlung nach Lactulose-gaben. *Schweiz. Med. Wschr* **99**: 608-611
- Hughes DB and Hoover DG. 1991 *Bifidobacteria*, their potential for use in American dairy products. *Food Technol* **54**: 74-83
- Kaïla ME, Isolaura E, Virtanen S, Laine E and Soppi H. 1992 Arvilommi. *Pediat. Res* **32**: 141-144
- Kim JD, Kim MY and Kong JY. 2002 The growth promoting effect of enterobacteria *Bifidobacterium infantis* KCTC 3270 by combination of natural products bearing antioxidative capacity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr* **31**: 931-938
- Kim YJ and Park GG. 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(4)**: 364-369
- Kobayashi Y, Echizen R and Mutai M. 1984 Intestinal flora and dietary factors. Processing of the 4th RIKEN symposium on intestinal flora. Tokyo. Japan Scientific Societies press **7**: 69-75
- Lee JE and Lee SY. 2001 Growth characteristics of *Bifidobacteria* and quality characteristics of soy yogurt prepared with different proteolytic enzymes and starter culture. *Food Sci. Biotechnol* **33**: 603-610
- Lee JH. 1996 *Bifidobacterium* spp. of the functionl foods.. *Food Sci. Biotechnol* **29**: 70-74
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Fan AL and Randall RJ. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* **193**: 271-276
- Marteau P, Pochart P and Flourie B. 1990 *Am J. Chem. Nutri* **52**: 685-688
- McCleary BV. 1982 Purification and properties of a mannoside mannohydrolase from guar. *Carbohydr. Res* **101**: 74-92
- Miller GL. 1959a Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem* **31**: 426-428
- Miller GL. 1959b Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem* **31**: 426-431
- Mitsuoka T. 1980 *Zonaisaikinno Sekai. Sobunsha* **21**: 1-34
- Mitsuoka T. 1982 Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria and Microflora* **1**: 3-5
- Mitsuoka T. 1990 *Zonaisaikingaku. Asakurashyoten. Tokyo* **7**: 12-17
- Modler HW, McKellar RC and Yaguchi M. 1990 *Bifidobacteria* and bifidogenic factors. *J. Inst. Sci. Technol. Aliment* **23**: 29-41
- Saavedra JM. 1999 Probiotics plus antibiotics. *The Journal of Pediatrics.* **135**: 535-537
- 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. *Japan. Geriart* **19**: 577-581

(접수 2007년 10월 3일, 채택 2007년 10월 26일)