

Bacillus sp. 유래 β -Mannanase 정제 및 Guar Gum 가수분해 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 증식활성

최준영 · 박귀근*

경원대학교 공과대학 생명공학부 분자·식품생명공학전공

Purification of *Bacillus* sp. β -Mannanase and the Growth Activity of *Bifidobacterium* spp. by Guar Gum Hydrolysates. Choi, Jun Young and Gwi Gun Park*. Dept. of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Seoungnam 461-701, Korea – *Bacillus* sp. β -mannanase was purified by DEAE-sephadex ion exchange column chromatography. The specific activity of the purified enzyme was 21.57 units/ml protein, representing an 95.33-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 38.9 kDa. Guar gum galactomannan was hydrolyzed by the purified β -mannanase, and then the hydrolysates was separated by activated carbon column chromatography and Sephadex G-25 gel filtration. The main hydrolysates were composed of D.P. (Degree of Polymerization) 5 and 7 galactomannooligosaccharides. To investigate the effects of guar gum galactomannooligosaccharides 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. 5 and D.P. 7 galactomannooligosaccharides, respectively. *B. longum* and *B. bifidum* grew up 10-fold and 9.8-fold more effectively by the treatment of D.P. 5 galactomannooligosaccharides, compared to those of standard MRS medium. Especially, D.P. 5 was more effective than D.P. 7 galactomannooligosaccharide on the growth of *Bifidobacterium* spp.

Key words: Guar gum, β -mannanase, *Bifidobacterium* spp.

Mannooligosaccharides가 인체의 정상적인 장내상태를 유지하는데 중요한 역할을 하는 *Bifidobacterium*의 좋은 에너지원으로서 유용하다는 것이 최근에 밝혀졌다[1-2, 13]. 건강을 추구하는 사회적 요구가 높아짐에 따라 장내 균총과 건강의 관련성에 대하여 폭넓게 검토되고 있으며, 특히 *Bifidobacterium*가 주목을 받는 장내세균이 되었다. *Bifidobacteria*은 인체 장내 flora의 최우세 균주로서 인체에 유익한 각종 생리활성을 지니고 있지만 각종 질병이나, 연령의 증가에 따라서 감소된다는 것이 보고되어져 있으며 [4, 6], 그 때문에 오늘날에는 이들 균종의 장내의 균수를 높이는 연구가 소아과 영역을 비롯하여 임상면에서 널리 행해지고 있다. 그러나 *Bifidobacterium*를 직접 섭취할 경우 소화관을 통과하면서 HCl, pepsin, lysozyme 그리고 bile acid의 영향에 의해 사멸할 가능성이 높기 때문에 장내에 정착되어 있는 *Bifidobacteria*의 성장촉진에 관심이 높아졌다. 따라서 식품첨가물로서 개발되고 있는 각종 oligosaccharide가 감미료로서 뿐만 아니라 특정 장내 유익세균의 생육을 촉진시킨다는 사실이 밝혀지면서, 그 이용성이 점차 확대되고 있

고, 그러한 oligosaccharide를 섭취하였을 경우 어느 정도 장내 유익세균의 증식촉진 효과를 나타내는지에 대한 연구보고도 많아지고 있다[14].

Kobayashi 등은 천연의 비소화성 당질을 대상으로 *Bifidobacterium*의 증식촉진성 당질의 검사를 행하여 선택한 konjac manooligosaccharide와 soybean oligosaccharide를 쥐에 투여했을 경우 bifidus factor라고 알려져 있는 lactulose를 투여한 경우에 비하여 *Bifidobacterium*의 증식촉진 효과가 현저히 증가함을 알 수 있었다[9, 16, 18-20]. 이것은 *Bifidobacterium*의 서식부위인 소화관 하부에 이들 oligosaccharide 공급량의 증가와 더불어 *Bifidobacterium*이 이들을 에너지원으로 이용하여 증식하며 장관상부에 우세하게 서식하는 균종들에 의해 소비되어지는 lactulose와 같은 강한 경합이 생기지 않기 때문으로 추측되고 있다. 또한 manooligosaccharides는 인체 내 대장의 유용균인 *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp.의 좋은 성장원뿐만 아니라 대장내에 유해 미생물의 증식 저해작용을 나타내고 있어 일본 태양화학[3]에서는 면역기능증진과 유해균 흡착을 통한 질병차단 및 유해균 증식에 필요한 영양공급차단 기능을 갖는 manooligosaccharides를 개발하기도 하였다.

본 연구에서는 *Bacillus* sp. 유래 β -mannanase의 정제를 수행하여 guar gum galactomannan 가수분해물을 분리·조

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

제 회수하고 TLC 및 FACE에 의해 분리된 당가수분해물의 중합도를 결정하여, *Bifidobacterium* 속(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*)에 대한 미생물의 증식활성을 비교하였다.

재료 및 방법

Bacillus sp. 유래 β -mannanase의 생산

효소생산의 배지조성은 locust bean gum 2.5%, peptone 1.2%, yeast extract 0.5%, KH_2PO_4 1.0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%를 함유하는 액체배지 150 ml에 *Bacillus* sp. YA-14 균주를 접종하여 35°C, 170 rpm, 24시간 배양하여 4°C, 11,000 rpm, 15 min 원심분리(Beckman, rotor 14) 후 상층액을 효소액으로 사용하였다[12].

단백질 농도

단백질량(280 nm)과 핵산량(260 nm)의 흡광도를 UV-분광광도계(Shimadzu Model 1201)에서 측정해 $1.5 \times \text{A}_{280} - 0.75 \times \text{A}_{260}$ 의 식을 이용한 결과를 단백질 농도로 사용하였고, 정제 단계 중에는 Lowry 방법[8]을 사용하여 단백질 농도를 확인하였다.

효소 활성

β -Mannanase의 생산량은 DNS 환원당 정량법[11]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 회색하여 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

DEAE Sephadex은 0.2 M MacIlvaine 완충액(pH 6.0)으로 씻은 다음 column(2.5 × 42 cm)에 충전시켜 0.2 M MacIlvaine 완충액(pH 6.0)으로 평형을 유지시켰다. 여기에 투석한 조효소 30 ml를 0~1 M NaCl로 linear gradient하여 용출시켰다. 이때 용출속도는 45 ml/h로 하였고, 용출액은 5 ml씩 fraction collector에 모았고, 각 용출액은 단백질과 효소의 활성을 측정하여 정제 효소액으로 사용하였다.

SDS 전기영동법

정제효소를 열로 변성시켜 후 분자량은 10 kDa molecular weight marker(Life Technologies LTD., U.S.A.)를 이용하여 결정하였고, Laemmli의 방법[7]에 의해 Denaturing(SDS) discontinuous gel electrophoresis를 수행하였다.

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

1st activated carbon column chromatography; 효소액 300 ml(10 units)에 대해 0.5% guar gum을 50°C, 24시간 가수분해하여 TLC로 분해 양상을 검토한 후 activated carbon column chromatography를 이용해 당을 1차 분리하였다.

2nd Sephadex G-25 gel filtration; Activated carbon column chromatography에서 분리한 분획중 phenol-sulfuric acid법에 의해서 총 당함량을 측정하였다.

TLC는 McCleary법[10]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 F254(Merck, Germany), Developing Solvent; n-propanol : methanol : water = 5 : 2 : 3(v/v), Spray Reagent; 30% sulfuric acid-ethanol.

FACE(Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis)

당용액 50 μ l을 동결건조한 후 15% acetic acid에 0.15 M로 조제한 ANTS용액을 5 μ l와 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 1.0 M로 조제한 Sodium cyanoborohydride (NaCNBH_3)용액 5 μ l을 첨가해 혼합한다. 이 혼합액을 37°C에 15시간 반응시킨 후, 원심농축을 해서 20% glycerol 50 μ l에 용해한다. ANTS에 유도화한 당의 전기영동은 Jackson의 방법[5]에 따라 4~30%의 polyacrylamide gel을 사용하였다.

중합도별 가수분해 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성

Bifidobacterium 속 균주(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*)에 대한 생육촉진 활성능을 측정하기 위해 MRS 배지에서 탄소원을 포도당 대신에 분리 조제된 중합도별 galactomannooligosaccharide를 첨가 후 측정하였다. 중합도별 galactomannooligosaccharide를 회수하여 진공 농축시킨후 121°C 15분간 멸균한 후 DNS법을 이용하여 동일한 환원당량으로 조절한 후 modified MRS 배지를 조제하여, 108으로 희석한 후 혐기적 조건하에서 37°C, 48시간 평판배양한 후 colony수를 비교하고, 동일한 조건으로 액체 배양하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 총균수를 비교하였다.

결과 및 고찰

DEAE Sephadex ion exchange chromatography에 의한 정제

30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 냉장 상에서 효소액에 처리하여 4°C,

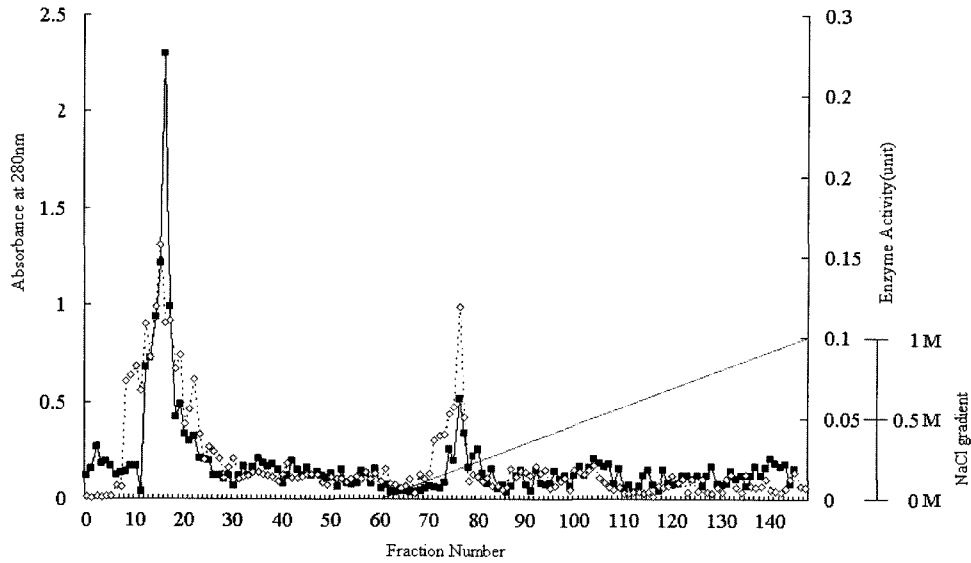


Fig. 1. Chromatography of the β -mannanase from *Bacillus* sp. by DEAE- Sephadex colum.
 -■-: Absorbance at 280 nm, —: NaCl gradient, --◇--: Enzyme Activity(unit).

12시간 방치 후 원심분리하여 얻은 상층액을 투석막(cellulose tubing, 16mm, 30cm, Sigma Chemical Co.)에 처리하여 4°C, 24시간 투석한 효소액 30 ml(100 units)를 DEAE-sephadex ion exchange chromatography(2.5 × 42 cm)에 처리하여 30 ml/h 유속으로 tube당 5 ml씩 용출하였으며 0~1 M NaCl linear gradient 농도구배법에 의해 정제를 진행한 결과 분획 No. 70~77에서 활성분획이 나타났다(Fig. 1).

정제 β -mannanase의 순도

정제효소는 SDS-PAGE에 의해 단일밴드를 나타내었으며 (Fig. 2), β -mannanase의 분자량은 38.9 kDa으로 추정되었

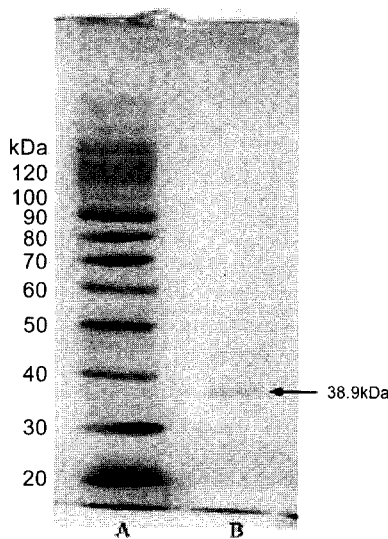


Fig. 2. Analysis of the purified β -mannanase by SDS-PAGE.
 A: Marker, B: purified β -mannanase

다. *Penicillium purpurogenum* No. 618 유래의 정제 β -mannanase는 57 kDa, *Aspergillus niger*에서는 42 kDa, *Tyromyces palustris*에서는 61 kDa, *Streptomyces* sp. No. 17에서는 43 kDa, *Bacillus subtilis*에서는 22 kDa의 분자량이 보고되고 있다[15].

Guar gum 가수분해 galactomannooligosaccharides 분리 및 조제

효소액 300 ml에 대해 0.5% guar gum을 24시간 가수분

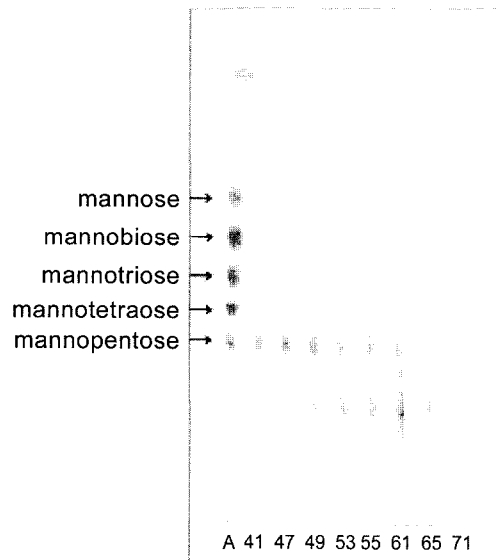


Fig. 3. TLC of guar gum hydrolysates on 1st activated carbon column chromatography. A: Authentic mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetraose, and mannopentose from top to bottom. From 41 to 71 are fraction numbers on 1st activated carbon column chromatography.

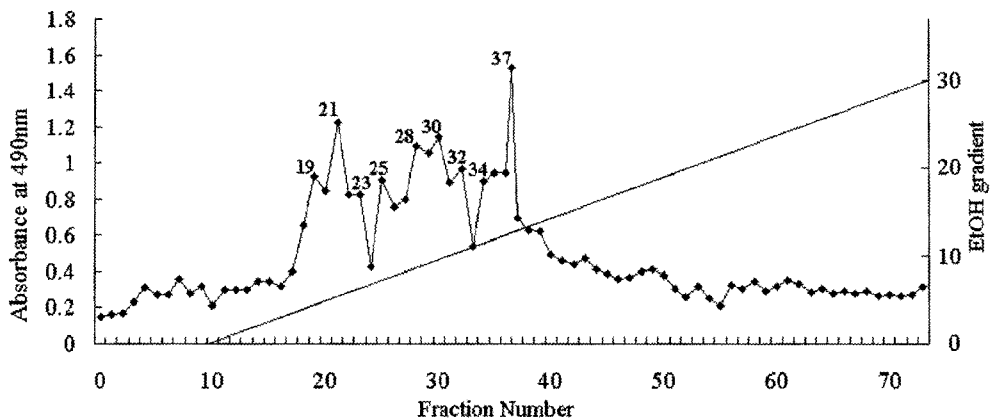


Fig. 4. Separation of guar gum hydrolysates by 2nd Sephadex G-25 gel filtration. —■—: Absorbance at 490 nm, —: Ethanol gradient

해해 TLC로 pattern을 검토한 후 activated carbon column chromatography을 이용해 250 ml/h 유속으로 tube당 50 ml 씩 ethanol 0~30% linear gradient법으로 당을 분리하였다. 1차 activated carbon column chromatography에 의해 부분적으로 분리된 당용액 0.2 ml와 5% phenol 0.2 ml를 가하여 혼합 후 H₂SO₄ 1 ml를 가하여 혼합한 후 20분간 방치하여 490 nm로 흡광도를 측정하였고, peak를 나타내는 각 분획을 TLC로 분해양상을 검토한 후(Fig. 3) 중합도별 galactomannooligosaccharide를 회수하여 2차 Sephadex G-25(2×100 cm)를 이용한 gel filtration을 수행하였다. 150 ml/h 유속으

로 tube당 8 ml씩 ethanol 0~30% linear gradient로 당을 용출시킨 후 동일한 방법으로 흡광도를 측정한 후(Fig. 4), peak를 나타내는 각 분획을 회수하였다. 분리도 및 중합도를 확인하기 위하여 TLC(Fig. 5)와 FACE(Fig. 6)를 이용하여 Rf value에 의한 pattern을 비교·검토한 결과, 분획 No. 32~37에서 중합도(D.P.) 5와 분획 No. 19~23에서 중합도 7의 올리고당임을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 D.P. 5와 7의 구조식은 동정되지 않은 상태이나 본 연구실에서 확보하고 있는 standard galactomannooligosaccharides에 의한 TLC 및 FACE에서 나타나는 Rf value상으로 D.P. 5의 구조식은 mannose가 4분자의 main chain에 비환원 말단 mannose부터 2번째에 1분자의 galactose가 결합되어 있는 hetero type의 Gal³M₄로 예상되

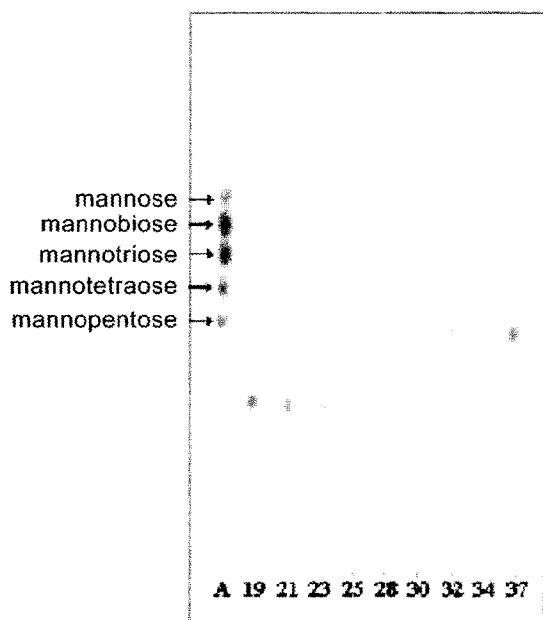


Fig. 5. TLC of guar gum hydrolysates on 2nd Sephadex G-25 gel filtration. A: Authentic mannose, manno-biose, manno-triose, manno-tetraose and, manno-pentose from top to bottom. From 19 to 37 are fraction numbers on 2nd Sephadex G-25 gel filtration.

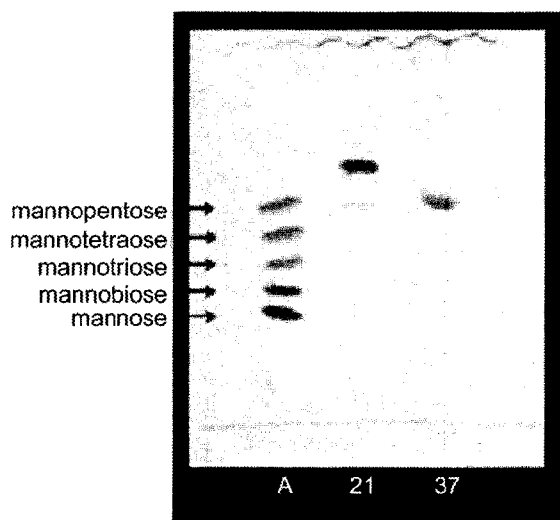


Fig. 6. FACE of guar gum hydrolysates on 2nd Sephadex G-25 gel filtration. A: Authentic mannose, manno-biose, manno-triose, manno-tetraose, and manno-pentose from bottom to top. 21 and 37 are fraction numbers on 2nd Sephadex G-25 gel filtration.

어지며(data not shown), D.P. 7의 구조식은 mannose 5분자의 main chain에 비환원말단과 환원말단을 제외한 mannose 잔기에 galactose잔기가 2분자 결합하고 있는 Hetero type의 구조식으로 예상하고 있다. 현재 Methylation method[21] 및 *Aspergillus niger* 5-16 유래 β-mannosidase[22]와 *Penicillium purpurogenum* 유래 α-galactosidase[17]의 sequential action에 의해 정확한 구조식 동정을 수행 중에 있다.

중합도별 galactomannaooligosaccharides의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성

*Bifidobacterium*속 균주(*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*)에 대한 생육촉진활성능을 측정하기 위해 MRS media에서 탄소원을 dextrose대신에 조제된 D.P. 5와 7 galactomannooligosaccharides를 첨가 후 측정된 결과 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 양호한 생육촉진 활성을 보였다. 특히 *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 나타냈었다. *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 있어서도 D.P. 5의 경우 2.9~5.7배의 상대활성을 나타내었으나, *B. infantis*에 대한 D.P. 7의 경우에서는 표준 MRS배지와 비교하여 0.62배로 감소하였다. 또한 중합도 5의 올리고당이 중합도 7의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다(Table 1). Guar galactomannan과 konjac glucomannan 가수분해 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성을 비교하기 위하여 guar galactomannan과 konjac glucomannan으로부터 생성된 D.P. 5와 7(guar galactomannooligosaccharides의 중합도 5와 7)와 KG5, KG7(konjac glucomannooligosaccharides의 중합도 5와 7)의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육 활성을 평판천배지상의 colony의 수를 비교하였다. Konjac glucomannan 유래 올리고당에 비해 guar galactomannan 유래 올리고당이 생육활성이 높게 나왔으며, 특히 D.P. 5 galactomannooligosaccharide의 생육활성이 가장 높게 나왔다(Table 2). 본 연구에서 사용된 *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 구성되는 공통된 특징을 나타내고 있다. 동일한 중합도를 갖는 hetero type올리고당이 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성의 차이는 구조적인 측면에서 galactomannooligosaccharides는 galactose가 mannose main chain에 branching하고 있는 구조로서, mannose와 mannose

Table 1. Comparison of growth activity of *Bifidobacterium* spp. by the guar gum hydrolysates.

<i>Bifidobacterium</i> sp.	Medium	CFU/ml	Fold
<i>B. longum</i>	Standard MRS	1.2×10 ⁹	1.0
	MRS + D.P 5	1.2 ×10 ¹⁰	10.0
	MRS + D.P 7	9.1×10 ⁹	7.6
<i>B. bifidum</i>	Standard MRS	7 ×10 ⁸	1.0
	MRS + D.P 5	6.9×10 ⁹	9.9
	MRS + D.P 7	5.4×10 ⁹	7.7
<i>B. breve</i>	Standard MRS	1.2×10 ⁹	1.0
	MRS + D.P 5	3.5×10 ⁹	2.9
	MRS + D.P 7	2.7×10 ⁹	2.3
<i>B. animalis</i>	Standard MRS	3 ×10 ⁸	1.0
	MRS + D.P 5	9 ×10 ⁸	3.0
	MRS + D.P 7	3 ×10 ⁸	1.0
<i>B. infantis</i>	Standard MRS	4 ×10 ⁸	1.0
	MRS + D.P 5	2.3×10 ⁹	5.8
	MRS + D.P 7	6 ×10 ⁸	1.5
<i>B. adolescentis</i>	Standard MRS	8 ×10 ⁸	1.0
	MRS + D.P 5	1.0×10 ⁹	1.3
	MRS + D.P 7	5 ×10 ⁸	0.6

Table 2. Comparison of growth activity of guar gum and konjac glucomannan hydrolysates against *Bifidobacterium* spp.

<i>Bifidobacterium</i> sp.	Standard MRS	Number of colony			
		guar galactomannan		konjac glucomannan	
		D.P. 5	D.P. 7	KG 5	KG 7
<i>B. longum</i>	12	120	91	56	64
<i>B. bifidum</i>	7	69	54	92	8
<i>B. breve</i>	12	35	27	29	16
<i>B. animalis</i>	3	9	3	5	3
<i>B. infantis</i>	4	23	6	2	1
<i>B. adolescentis</i>	7	10	5	ND*	ND

* ND : not detect

사이에 glucose가 위치하는 konjac glucomannooligosaccharides보다 미생물 생육활성에 영향을 더 미치는 것으로 추론하고 있다.

요 약

DEAE-sephadex ion exchange column chromatography에 의해 *Bacillus* sp. 유래 β-mannanase의 정제를 수행하여 비활성 21.57 units/ml, 정제배율 95.33을 나타내었다. SDS-PAGE에 의한 단일밴드를 확인하였고, 분자량은 38.9 kDa으

로 결정되었다. 정제효소에 의해 guar gaum galactomannan 을 가수분해하여 1차 activated carbon column chromatography 와 2차 Sephadex G-25 gel filtration에 의해 당기수분해물을 분리 회수하여 TLC 및 FACE에 의해 주요 당기수분해물은 중합도 5와 7로 확인되었다. *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, and *B. breve*의 생육 활성에 대한 중합도 5와 7의 영향을 검토하기 위하여 modified-MRS 배지 상에 탄소원으로 중합도 5와 7을 대체 하여 생육활성을 비교한 결과 *B. longum*에서는 중합도 5 galactomannooligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 Standard MRS와 비교하여 10배의, 중합도 7을 처리한 경우 에도 7.5배의 상대 활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타냈었다. *B. bifidum*의 경우에서도 중합도 5에서 9.8배, 중 합도 7에서 7.7배의 우수한 생육활성을 나타내었으며 이외에 도 *B. breve*, *B. animalis*, *B. infantis*에 있어서도 중합도 5의 경우 2.9-5.7배의 상대 활성을 나타내었으나, *B. infantis*에 대 한 중합도 7의 경우에는 Standard MRS와 비교하여 0.62배 로 감소하였다. 또한 중합도 5의 올리고당이 중합도 7의 올 리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다.

감사의 글

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

REFERENCES

- Akino, T., N. Nakamura, and K. Horikoshi. 1987. Production of β -mannosidase and β -mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 323-327.
- Akino, T., W. Nakamura, and K. Horikoshi. 1998. Characterization of three β -mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 773-779.
- 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 thermostablemannanase, β -mannosidase, and α -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 169-177.
- Jackson, P. 1996. Carbohydrate electrophoresis methods by the induced ANTs. *Mol. Biotechnol.* **5**: 101-123.
- 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 β -mannanase from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 2943-2950.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of head Bacteriophage TA. *Nature* **227**: 680-685.
- 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.
- Marga, F., C. Ghakis, C. Duport, R. Morosoli, and D. Kluefel. 1996. Improved production of mannanase by *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4656-4658.
- McCleary, B. V. 1982. Purification and properties of a mannoside mannohydrolase from guar, *Carbohydr. Res.* **101**: 74-79.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-431.
- Min, D. S., Y. J. Chung, D. H. Bai, and J. H. Yu. 1995. Production of β -mannanase by an alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14. *Foods Biothchnol.* **4**: 285-289.
- 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 β -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.
- Park, G. G., S. Y. Lee, B. K. Park, S. S. Ham, and J. H. Lee. 1991. Characteristic features of an α -galactosidase from *Penicillium purpurogenum*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 90-98.
- Park, G. G., I. Kusakabe, Y. Komatsu, H. Kobayashi, T. Tasui, and K. Murakami. 1987. Purification and some properties of β -mannanase from *Penicillium purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2709-2716.
- Park, G. G. and H. K. Jang. 1992. Separation and preparation of galactosylmannooligosaccharides from copra galactomannan by mannanase from *Penicillium purpurogenum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 204-208.
- Shimahara, H., H. Suzuki, N. Sugiyama, and K. Nisizawa. 1975. Isolation and characterization of oligosaccharides from an enzymic hydrolysate of konjac glucomannan. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 293-299.
- Shimizu, K. and M. Ishihara. 1983. Isolation and Characterization of oligosaccharides from the hydrolyzate of larch wood glucomannan with endo- β -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.
- Yamaura, I., T. Matsumoto, M. Funatsu, and Y. Funatsu. 1990. Purification and some properties of endo-1,4- β -mannanase from *Pseudomonas* sp. PT-5. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2425-2427.
- Zama, M., I. Kusakabe, G. G. Park, K. Tubaki, and K. Murakami. 1988. Specificity of β -mannanase from *Penicillium purpurogenum* for konjac glucomannan, *Agric. Biol. Chem.* **52**: 519-524.

(Received Feb. 25, 2004/Accepted June 8, 2004)