

Galactomannan 이용에 관한 연구; Affinity Chromatography법에 의한 해바라기씨 유래 α -Galactosidase의 정제 및 성질

박귀근* · 김욱동 · 박영서 · 강종백¹ · 小林 秀行²
경원대학교 공과대학 식품생물공학과, ¹경원대학교 자연과학대학 화학과,
²일본 농림수산성 식품종합연구소 분자정보해석연구실

Purification and Properties of Sunflower Seed α -Galactosidase by Affinity Chromatography. Park, Gwi-Gun*, Wook-Dong Kim, Young-Seo Park, Jong-Back Gang¹, and Hideyuki Kobayashi². Department of Food Engineering and Biotechnology, ¹Department of Chemistry, Kyungwon University, Sungnam 461-701, Korea, ²National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries Mol. Func. Lab., Japan - An α -D-galactosidase (α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3. 2. 1. 22) from sunflower seed was purified by affinity chromatography using N- ϵ -aminocaproyl- α -D-galactopyranosylamine coupled to sepharose and its properties were examined. The specific activity of the purified enzyme, tested with *p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside as substrate, was 291.66 units/mg protein, representing an 115-folds purification of the original crude extract. The final preparation obtained from by Sephadex G-25 chromatography showed a single band on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight was determined to be 42,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The purified galactosidase showed maximum activity at pH 4.5 and 55°C, and was stable in the pH and temperature ranges of 4.0 to 5.0 and 30 to 55°C, respectively. The enzyme activity was inhibited by Ag²⁺, Hg²⁺ and Co²⁺. The enzyme activity was not affected considerably by treatment with other metal compounds. The enzyme liberated galactose from melibiose, raffinose, copra galactomannan, guar gum and locust bean gum by TLC, and also the hydrolysis rate of substrate was compared by HPLC.

Key words: galactomannan, α -galactosidase, sunflower seed, affinity chromatography

동남아시아에서의 주요 농산물인 copra meal은 40~50%의 galactomannan(gal:man=1:10~1:15)이 함유되어 있는데 이와 같이 mannose 함량이 풍부한 동시에 순도가 높은 mannan의 자원은 자연계에 극히 드물지만, 충분한 이용법은 개발되지 않고 있는 상태이다. 본 연구실에서는 미생물효소를 이용한 mannan의 유효 이용법에 관한 연구 및 manooligosaccharides의 효율적인 조제방법을 연구하고 있으며[4-6, 10, 17], 또한 이의 조제과정에 관여하는 효소계의 생화학적 연구도 진행하고 있다[11, 14, 15].

고중합도의 manooligomer의 조제를 행하기 위해서는 galactomannooligosaccharides 및 galactomannan에 α -galactosidase를 작용하여 galactose를 절단하는 것이 절대 필수적이며, galactomannan의 완전가수분해에 관여하는 3종류의 효소 즉 β -mannanase, β -mannosidase 및 α -galactosidase의 galactomannooligosaccharides 가수분해산물의 동정에 대한 작용기작이 불명료하여 우선적으로 각 효소에 대한 정제법이 해결해야 할 과제로 고려되고 있다. α -Galactosidase(α -D-galactoside galac-

tohydrolase, EC 3.2.1.22)는 자연계[16]에 넓게 분포되어 있으나 Affinity chromatography에 의한 정제는 최근에 보고되고 있으며 그들의 kinetics와 기질로서 이용하기 쉬운 oligosaccharide, polysaccharide의 부족으로 많은 연구는 진척되지 못하였다.

최근 coffee bean[13], vicia faba(broad bean)[2], coconut[1] 유래의 α -galactosidase의 정제기술이 발전하면서 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 식품 신소재 개발의 일환으로 정제 α -galactosidase처리에 의한 galactomannan 이용 개발 및 상기 분해 mechanism을 규명하기 위해 1차적으로 affinity chromatography법에 의한 α -galactosidase의 완전하고 신속한 정제법을 구축하고, 정제효소에 대한 효소화학적 성질 및 기질에 대한 분해 pattern을 비교 검토하여 galactosyl oligosaccharides에 대한 특이성을 밝히는 것을 주요 목적으로 하고 있다.

재료 및 방법

재료 및 시약

해바라기씨는 경동시장에서 구입하여 실험에 사용하였

*Corresponding author
Tel. 82-342-750-5383, Fax. 82-342-750-5383
E-mail: ggpark@mail.kyungwon.ac.kr

고, p-nitrophenyl α -D-galactopyranoside(Sigma Chemical Co.), melibiose(Wako Pure Chemical Industries, LTD.), raffinose(Sigma Chemical Co.) 및 기타 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

조효소액의 생산

Mixer를 이용하여 얻은 해바라기씨 분말 10.0 g을 acetone 67 mL로 처리하여 0°C, 10,000 rpm, 2 min, homogenized 후 이를 여과하여 oil과 acetone을 제거하고 acetone powder 5.5 g을 회수하였다. 4°C, pH 4.5, 0.05 M acetate buffer 36 mL에 acetone powder를 용해시켜, 12,000 rpm, 10 min 원심분리 후 상층액을 pH 4.5, 0.05 M acetate buffer에 투석하였다. 0°C, 12,000 rpm, 10 min 원심분리 후 상층액 33 mL의 조효소액을 생산하였다.

단백질 농도 결정

UV-Vis spectrophotometer(Shimadzu Model 1201)에서 280 nm의 흡광도에서 1 mg/mL의 농도를 1.0이라고 가정하였고, Lowry의 방법[8]에 의해서도 단백질 농도를 확인하였다.

효소 활성의 측정

α -galactosidase의 활성측정은 Kaneko의 방법[3]에 따라 수행하였다. 55°C의 수욕상(water bath)에서 2 mM pNP-Gal(p-nitrophenyl α -D-galactopyranoside, Sigma) 0.5 mL 및 McIlvaine buffer(pH 4.5, 0.2 M Na_2HPO_4 와 0.1 M citric acid의 혼합액) 0.4 mL를 test tube에 넣고 5분간 preincubation 시켰다. 조제한 조효소액 0.1 mL를 가하여 정확히 10분간 반응시킨 후 0.2 M Na_2CO_3 1 mL를 첨가하여 반응을 종결시키고 408 nm에서 흡광도를 측정하였다.

pNP 용액의 농도와 408 nm에 있어서의 흡광도($[A_{408}]$)의 관계는 pH 4.5에서 $[A_{408}] \times 0.1143 = \text{pNP}(\text{mM}/2 \text{ mL})$ (단, $[A_{408}] < 0.6$)였다. 또한 α -galactosidase가 pNP-Gal을 가수분해하여 생성되는 pNP 양과 반응시간과의 관계는 10분간 반응에서 $[A_{408}]$ 가 0.6이하를 나타낼 때 효소액과 비례적 관계를 나타내었다.

상기와 같은 결과로부터 반응 후의 $[A_{408}]$ 가 0.6 이하가 되도록 효소액을 희석하여 활성 측정을 하였다. pH 4.5, 55°C에서 1분간에 1 μM 의 pNP를 pNP-Gal로부터 유리시키는 효소량을 1 unit로 정의하였다. 반응시간과 활성측정을 위해 사용한 효소의 양은 100 μl 이므로 효소액을 D배 희석하여 활성을 측정하는 경우에는 $[A_{408}] = A$ 라고 하면, 그 효소활성(unit/mL)은 $([A]-[B]) \times [D] \times 0.1143$ ([B]는 미리 0.2 M Na_2HPO_4 을 가하여 반응종결시의 $[A_{408}]$)이다.

Affinity chromatography를 위한 특이적 흡착제의 합성법

N- ϵ -aminocaproyl- α -D-galactopyranosylamine로 구성되는 특이적 흡착제의 합성과 sepharose에 대한 ligand의 coupling은 일본 농림수산성 식품종합연구소 분자정보해석연구실에서 Noam Hapraz의 방법[9]에 의해 수행하였고 본 연구실에서는 이의 담체를 공급받아 affinity chromatography를 수행하였다.

전기영동법 및 분자량 결정

정제효소의 분자량은 10 kDa molecular weight marker(Life Technologies LTD., USA)를 이용하여 결정하였고, sodium dodecyl sulfate(SDS)/8% polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli의 방법[7]에 준하였다.

효소화학적 성질

Affinity chromatography에 의해 정제된 효소를 이용하여 최적 pH와 온도, pH 안정성과 온도 안정성, 금속이온의 영향 등의 성질을 규명하였다.

최적 pH는 정제효소액을 이용하여 55°C에서 pH 2부터 8까지 변환시키면서 효소활성을 측정하였고, 최적 온도는 상기에서 사용한 동일 효소액을 이용하여 pH 4.5에서 20°C에서 80°C까지의 범위에서 효소활성을 측정하였다. pH 안정성은 효소를 pH 2부터 8의 McIlvaine buffer를 이용하여 55°C에서 1시간 preincubation시킨 후, 효소의 온도를 일정하게 유지하기 위하여 ice box내에 방치하며 pH 4.5, 55°C에서 활성을 측정하였다. 또한 온도 안정성실험은 효소액을 최적 pH의 완충 용액과 혼합하여 20°C-80°C, 1시간 preincubation시킨 후 효소의 온도를 일정하게 유지하기 위해 ice box내에 방치하며 pH 4.5, 55°C에서 활성을 측정하였다. 금속이온의 영향은 Table 2에서 열거한 금속이온을 처리시 농도가 1 mM이 되도록 정제효소액에 혼합하고 20°C, 1시간 처리후 pH 4.5, 55°C에서 잔존활성을 측정하였다.

유리당의 분석

Thin layer chromatography(TLC): TLC는 Merck TLC plate silicagel 60에 sample을 spotting후 n-propanol:methanol:water(5:2:3)의 전개용매에서 행하였다. 전개 후 $\text{C-H}_2\text{SO}_4$ 로 분무하고 140°C에서 약 5분간 가열하여 당을 검출하였다.

HPLC(high performance liquid chromatograph, Dionex Co., USA): CarboPac PA1 Grand(10-32) Column(Dionex Co.)을 사용하였고 carrier gas로 N_2 gas, degassing용으로 helium gas를 이용하여 분획하였다. 이동상은 150 mM NaOH와 600 mM sodium ace-

tate를, 용매는 비저항값이 18 MΩ이상의 것을 사용하여 시료는 50 ppm이하로 희석하여 주입하였다.

결과 및 고찰

Affinity chromatography에 의한 정제

해바라기씨 유래의 조효소액을 30% (NH₄)₂SO₄ 처리한 후 10,000 rpm, 10분 원심분리하여 상층액을 투석하여 McIlvaine buffer solution(pH 4.5)으로 평형화시킨 affinity column(Pharmacia, 1×10 cm)에 5 mL를 처리하여 1 mL/min의 유속으로 chromatography를 행하였다. Fig. 1과 같이 단백질이 용출되지 않을 때까지 McIlvaine buffer solution(pH 4.5)으로 수세 후 fraction No. 21에서 동일 완충 용액에 대한 0.05 M pNP-Gal 5 mL를 column에 처리하여 동일 완충 용액으로 수세를 계속하였다. 효소적으로 유리된 p-nitrophenolate으로 인해 sharp한 yellow band가 column을 통하여 용출되어 지는데 바로 이 yellow band가 α-galactosidase의 위치를 가리킨다고 할 수 있다. 이의 yellow fraction(fraction No. 22-25)을 모아 저분자량의 galactose를 제거하기 위해 증류수로 평형화시킨 sephadex G-25 column(Pharmacia, 2×20 cm)에 빠른 유속으로 처리하여 void volume에서 용출되는 효소적 활성 fraction(fraction No. 2-7)를 회수하여 정제를 완료하였다(Fig. 2).

Affinity column chromatography에서 p-nitrophenyl

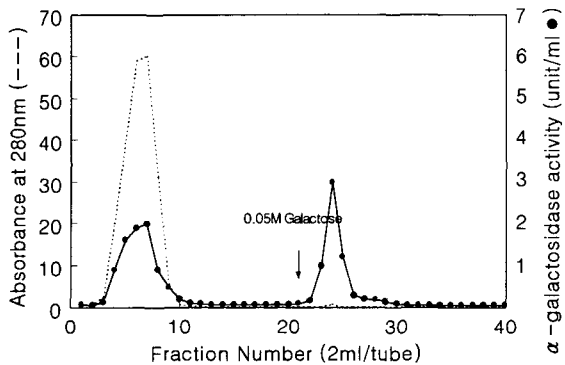


Fig. 1. Purification of α-galactosidase on a column of N-ε-aminocaproyl-N-ε-aminocaproyl-α-galactopyranosylamine-sepharose conjugate.

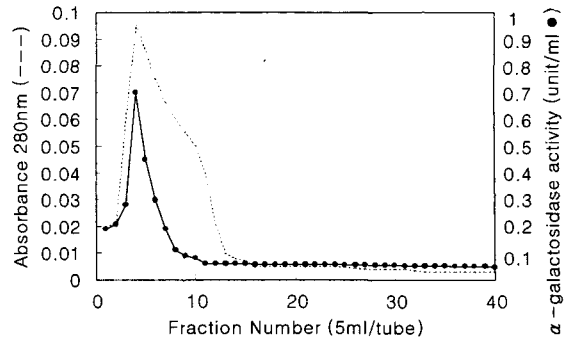


Fig. 2. Chromatography of the α-galactosidase on a column of Sephadex G-25.

α-D-galactopyranoside(pNP-Gal)대신에 galactose를 처리하여 효소를 유도할 수도 있다. 그러나 본 정제에서는 galactose보다는 pNP-Gal의 효소 유도능력이 커서 pNP-Gal을 처리하였고, coffee bean 유래의 affinity chromatography에 의한 α-galactosidase의 정제법[9]에서도 pNP-Gal로 효소를 유도하는 공통점이 있었다. 평형화에 사용된 McIlvaine buffer solution(pH 4.5)보다 pH가 높은 6.0으로 최종적으로 column에 과량(120 mL) 용출시킴으로서 단백질 peak를 유도하는 점이 상이하였고, 용출용매(pH 4.5)에서는 pNP-Gal(50 mM)처리 시 어떠한 효소도 용출되지 않았다.

박[12]에 의해 보고된 *Pichia guilliermondii* 유래 α-galactosidase의 특이성 연구에서 정제법으로서 man-nobiose-sepharose의 담체를 조제하여 부분정제에 대해 보고하였으나, 본 연구에서 사용된 N-ε-aminocaproyl-α-D-galactopyranosylamine 흡착제의 합성과 sepharose에 대한 coupling method는 일본 농림수산성 식품 종합연구소에서 공급한 담체를 이용하여 정제를 수행하였다.

Table 1은 정제에 따른 비활성의 증가와 수득률을 나타낸 것으로 기질 p-nitrophenyl α-D-galactopyranoside에 대한 정제효소의 비활성은 291.66 units/mg, 정제배율은 115배를 나타내었다.

분자량 결정

정제효소는 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 single band를 나타내었으며(Fig. 3), 분자량은

Table 1. Summary of purification of α-galactosidase from sunflower seed

| Step | Total activity (units) | Total protein (mg) | Specific activity (units/mg) | Fold | Yield (%) |
|---|------------------------|--------------------|------------------------------|-------|-----------|
| Crude enzyme | 938 | 370 | 2.53 | 1.0 | 100 |
| 30% (NH ₄) ₂ SO ₄ | 722 | 271 | 2.66 | 1.05 | 77.0 |
| Affinity chromatography | 106 | 1.3 | 81.53 | 32.22 | 11.3 |
| Sephadex G-25 column chromatography | 105 | 0.36 | 291.66 | 115.0 | 11.2 |

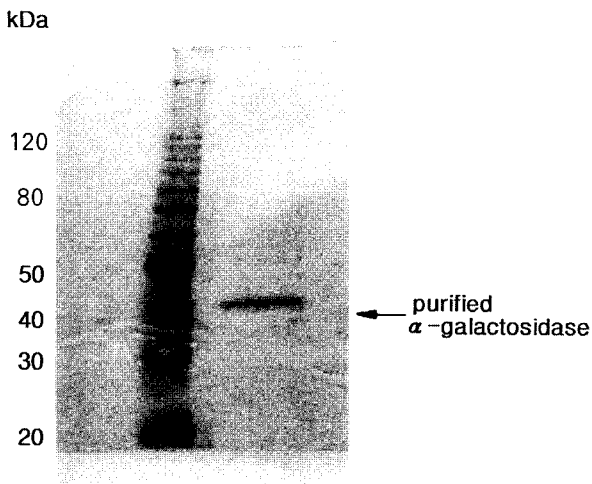


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified α -galactosidase.

42,000으로 추정되었다(Fig. 4).

α -Galactosidase활성에 미치는 pH, 온도의 영향

정제효소에 의한 pNP-Gal분해에 미치는 pH와 온도의 영향을 검토하였다. Fig. 5-A는 효소반응에 미치는 pH의 영향, Fig. 5-B는 효소반응에 미치는 온도의 영향, Fig.

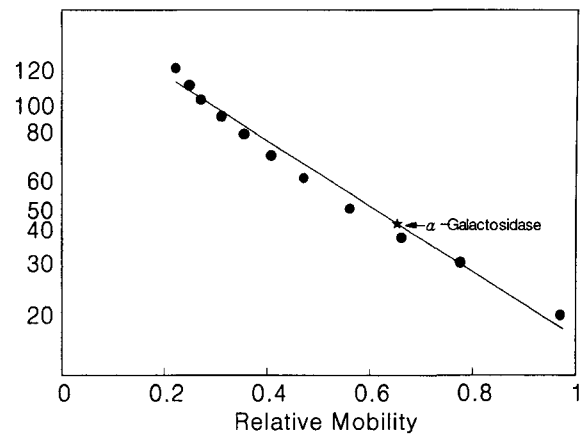


Fig. 4. Estimation of molecular weight of the α -galactosidase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

5-C는 효소의 pH 안정성, Fig. 5-D는 효소의 온도 안정성을 나타내고 있다.

정제효소에 의한 pNP-Gal분해의 최적 pH는 4.5, 최적 온도는 55 $^{\circ}$ C이며, pH 4-5에서 100%의 잔존활성을 나타내 반면 pH 8에서는 20%의 급격한 감소를 나타내었다. 온도 안정성에서는 30-55 $^{\circ}$ C에서 90%이상의 잔존활성을 나타내었고 80 $^{\circ}$ C에서는 20%의 잔존활성을 나타내었다.

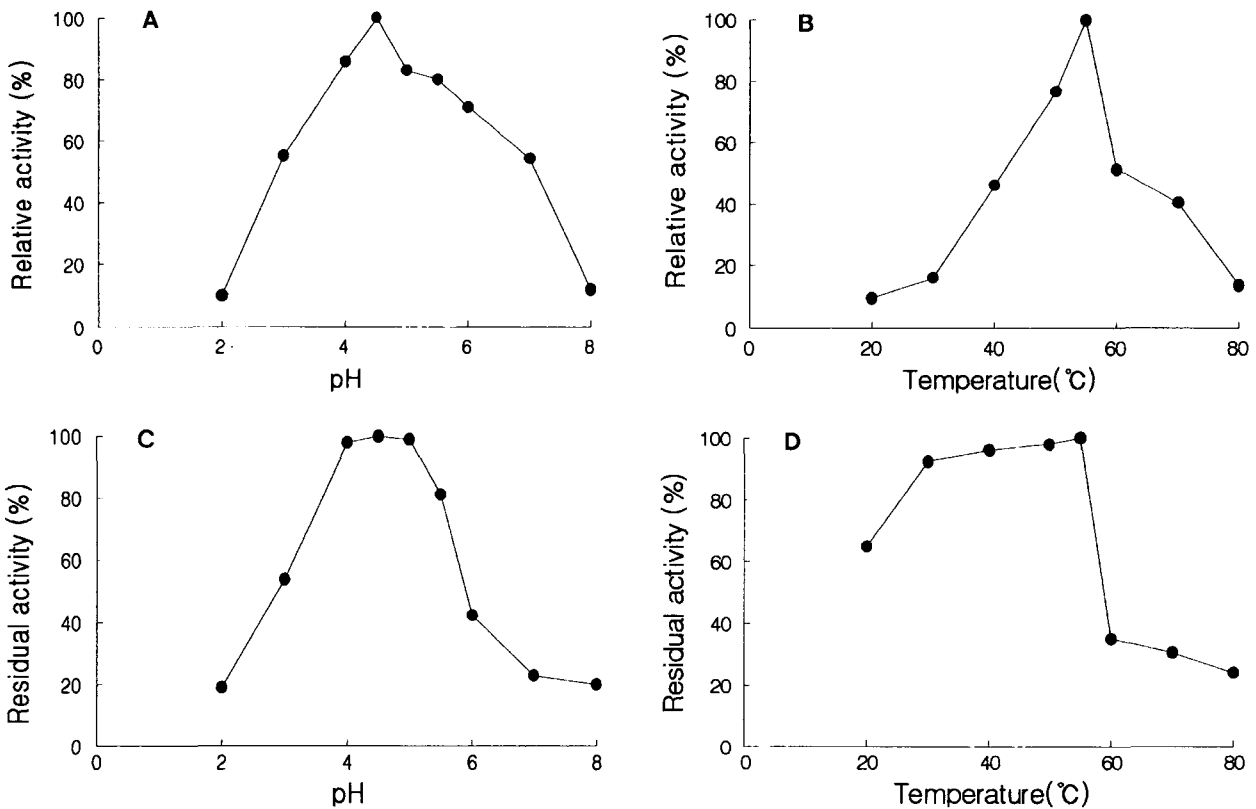


Fig. 5. Effects of pH and temperature on the purified α -galactosidase.

Table 2. Effects of various compounds on the purified α -galactosidase from sunflower seed

| Compound ^a | Relative Activity (%) |
|-----------------------|-----------------------|
| NONE | 100 |
| CaCl ₂ | 82 |
| ZnCl ₂ | 102 |
| HgCl ₂ | 16 |
| CoCl ₂ | 32 |
| FeCl ₂ | 94 |
| MnCl ₂ | 75 |
| CuSO ₄ | 84 |
| AgNO ₃ | 30 |
| NiCl ₂ | 81 |
| BaCl ₂ | 93 |
| CdCl ₂ | 80 |
| SnCl ₂ | 71 |

^aConcentration of compounds is 1.0×10^{-3} M.

금속이온의 영향

Table 2에서 나타낸 것과 같이 해바라기씨 유래의 정제 α -galactosidase는 Hg²⁺, Ag²⁺에 의해 84%, 74% 저해가 되었으며, 특히 조효소에 대한 Co²⁺의 영향에서는 rela-

tive activity가 93%로 크게 저해되지 않았으나, 정제효소에 대해서는 특이적으로 70%의 저해효과를 나타내었다.

α -Galactosidase의 기질특이성

해바라기씨가 생산하는 효소를 다음과 같은 galactosyl oligosaccharides 및 galactomannan에 대하여 가수분해 반응을 진행하였다. melibiose, raffinose, copra galactomannan 각각 1%를 함유하는 당용액 1 mL에 정제효소액 1 mL를 가하여 55℃에서 24시간 가수분해 반응을 진행하고, 5분간 비등에 의해 반응을 정지시킨 후 양이온 수지(Sigma Chemical Co., amberlite IR-120)와 음이온 수지(Sigma chemical Co., amberlite IRA-400)에 침지하여 반응액의 당조성을 TLC 및 HPLC에 의해 분석하였다. TLC 결과에서 melibiose는 가수분해가 진행되어 24시간 반응후 galactose, glucose 및 분해되지 않고 남아있는 일부의 melibiose의 spot이 남아있는 반면(Fig. 6), raffinose의 경우에는 24시간 반응 후 galactose와 sucrose(Fig. 7)로 분해되었음을 확인할 수 있으며, 각 기질에 대한 galactose를 유리하는 분해속도를 분석하기 위해 HPLC(Dionex Co., USA)로 분석한 결과,

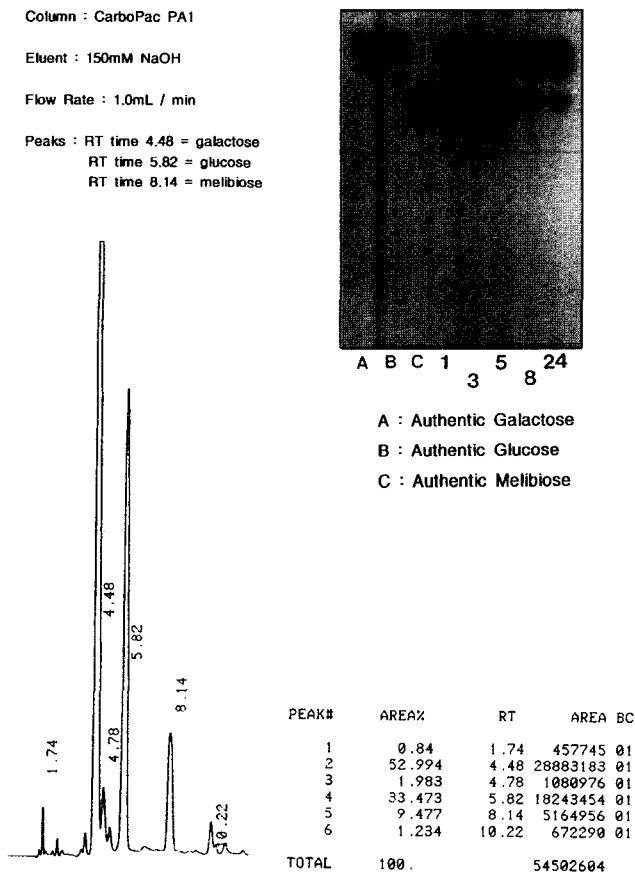


Fig. 6. Thin-layer chromatograms and Bio-LC of hydrolysates of melibiose with the α -galactosidase.

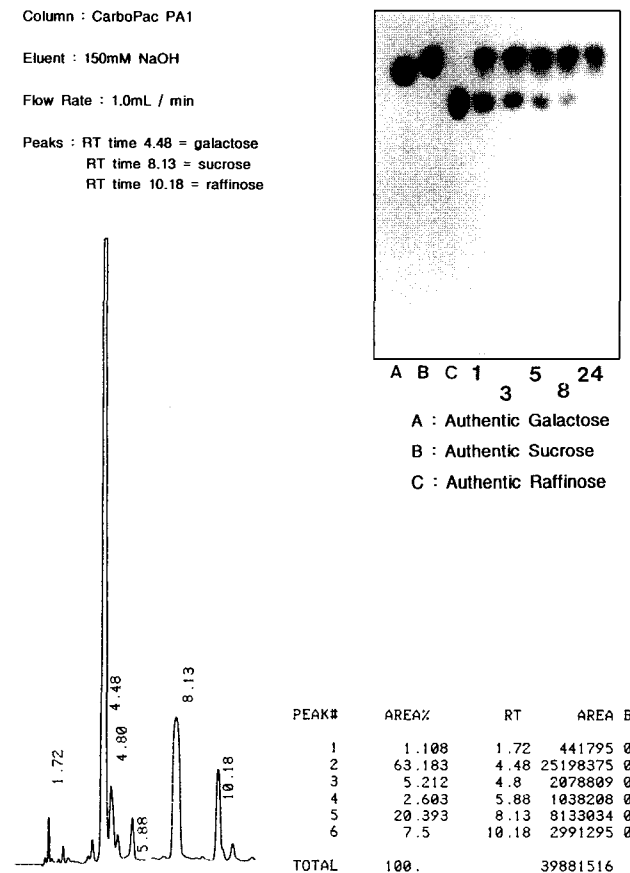


Fig. 7. Thin-layer chromatograms and Bio-LC of hydrolysates of raffinose with the α -galactosidase.

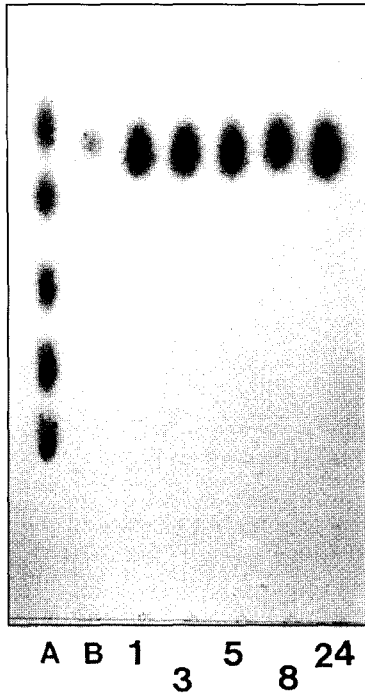


Fig. 8. Thin-layer chromatogram of hydrolysates of copra galactomannan with the α -galactosidase.

A: authentic mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetraose and mannopentaose from top to bottom.

B: authentic galactose.

raffinose로부터 유리된 galactose의 함량은 63.2%(Fig. 7), melibiose로부터는 53.0%(Fig. 6)로 나타나 raffinose에 보다 기질특이성을 갖는 것으로 나타났다. 이의 결과는 TLC에서 나타나는 분해 pattern과 유사하였다. Copra galactomannan(Fig. 8), locust bean gum(data not shown) 및 guar gum(data not shown)에 대한 가수분해 pattern에서는 반응초기에서부터 반응말기에 이르기까지 β -1,4-mannosyl계열의 main chain에 branching을 하고 있는 galactose를 유리하였다. 특히 guar gum의 경우 정제효소로 가수분해 되어 유도되는 gum산물은 galactose가 제거된 1,4-mannosyl polysaccharides의 점도력이 증가되어 현재 xanthan gum에 효소처리된 guar gum가수분해물을 적당 비율로 혼합하여 locust bean gum이 지니고 있는 점도력과 비교하는 연구를 추진중에 있으며 식품 신소재 개발의 일환으로 추진되고 있는 일련의 galactomannan 이용개발에 관한 연구는 경제적 점도 증가제의 개발과 관련하여 크게 기대되고 있다.

요 약

N- ϵ -aminocaproyl- α -D-galactopyranosylamine-sepharose를 담체로 하는 affinity chromatography에 의한 해바라기씨 유래 α -galactosidase(α -D-galactoside

galactohydrolase EC 3. 2. 1. 22)의 정제방법과 정제효소에 대한 효소화학적 성질을 규명하였다. N- ϵ -aminocaproyl- α -D-galactopyranosylamine의 흡착제를 합성하여 sepharose에 coupling하였다. 기질 p-nitrophenyl α -D-galactopyranoside에 대한 정제효소의 비활성은 291.66 units/mg였고, 조효소와 비교하여 115배의 정제 배율을 나타내었다. 정제효소의 순도는 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법에 의해 단일 band를 나타내었으며, 분자량은 42,000으로 추정되었다. 정제효소의 최적 pH와 온도는 4.5, 55 $^{\circ}$ C이며, pH 4-5, 30-55 $^{\circ}$ C의 범위에서 pH와 온도 안정성을 나타내었다. 또한 정제효소는 Ag^{2+} , Hg^{2+} , CO^{2+} 의 금속에 의해 70%이상의 저해효과를 나타내었다. 정제효소는 melibiose, raffinose 및 copra galactomannan에 대한 galactose의 유리를 TLC에 의해 확인하였고, 각 기질에 대한 galactose의 가수분해 속도를 HPLC에 의해 비교하였다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 한국학술진흥재단 국제협력연구 과제(2차년도) 연구비에 의해 수행된 연구로서 이에 감사드립니다. 또한 affinity column chromatography를 위한 담체를 제공해주신 일본 농림수산성 식품종합연구소 분자정보해석연구실 연구팀들에게도 감사드립니다.

REFERENCES

- Balasubramaniam, K., P. M. Dey, and J. B. Pridham. 1974. Purification and identification of an α -galactosidase from the coconut. *Biochem. Soc. Trans.* **2**: 1128-1130.
- Dey, P. M. and J. B. Pridham. 1969. α -Galactosidase from the yeast *Candida javanica*. *J. Biol. Chem.* **113**: 49-55.
- Kaneko, R. 1991. The study of galactomannan hydrolysate. *Tsukuba Univ. Master's Thesis*.
- Kusakabe, I., R. Takahashi, K. Murakami, A. Maekawa, and T. Suzuki. Preparation of crystalline β -1,4-mannooligosaccharides from copra mannan by a mannanase from *Streptomyces*. 1983. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2391-2392.
- Kusakabe, I., R. Takahashi, K. Maruyama, K. Murakami, A. Maekawa, and T. Suzuki. 1985. Studies on the mannanase of *Streptomyces*. *Japan. J. Trop. Agr.* **29**: 167-172.
- Kusakabe, I., M. Zama, G. G. Park, K. Tubake, and K. Murakami. 1987. Preparation of β -1,4-mannobiose from *Penicillium purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2825-2826.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure protein dur-

- ing the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
8. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Fan, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-271.
 9. Noam, H., M. F. Harold, and S. Nathan. 1973. Purification of coffee bean α -galactosidase by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta.* **67157**: 213-221.
 10. Park, G. G., I. Kusakabe, T. Yasui, and K. Murakami. 1988. A new method for the preparation of β -1,4-mannotriose from brown copra meal using the crude enzyme from *Penicillium purpurogenum*. *Japan. J. Trop. Agr.* **32**: 208-211.
 11. 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.
 12. Park, G. G. 1997. Specificity of *Pichia guilliermondii* α -galactosidase toward galactomannans. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**(5): 844-850.
 13. Petek, F. and T. Dong. 1961. Purification and properties of an α -galactosidase from the coffee bean. *Enzymologia* **23**: 133-142.
 14. Takahashi, R., I. Kusakabe, A. Maekawa, T. Suzuki, and K. Murakami. 1983. Studies on mannanase of *Actinomyces*. *Japan. J. Trop. Agr.* **27**: 140-148.
 15. Takahashi, R., I. Kusakabe, H. Kobayashi, K. Murakami, A. Maekawa, and T. Suzuki. 1984. Purification and some properties of β -mannanase from *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 2189-2192.
 16. Wallenfels, K. and O. P. Malhotra. 1961. Biochemistry of galactosidase. *Adv. Carbohydrate Chem.* **16**: 239-298.
 17. Zama, M., I. Kusakabe, and K. Murakami. 1985. Enzymatic preparation of crystalline mannose from copra mannan. *Japan. J. Trop. Agr.* **29**: 221-225.

(Received May 30, 1998)