

Galactomannan 이용에 관한 연구: Affinity Chromatography에 의한 지렁이 유래 α -Galactosidase의 정제 및 응용법

박귀근* · 정규훈 · 小林 秀行¹

경원대학교 공과대학 식품생물공학과, ¹일본 농림수산성 식품종합연구소 분자정보해석연구실

Purification and Application of Earthworm α -Galactosidase by Affinity Chromatography. Park, Gwi-Gun*, Gu-Hun Jung, and Hideyuki Kobayashi¹. Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Sungham 461-701, Korea, ¹National 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 earthworm 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 314 units/mg protein, representing an 122-fold 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 48,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The purified galactosidase was showed maximum activity at pH 4.5 and 40°C, and was stable in the pH and temperature ranges from 4.0 to 5.5 and 30 to 50°C, respectively. The enzyme activity was inhibited by Zn²⁺, Hg²⁺ and Co²⁺. When the purified α -galactosidase treated to guar gum for 6 hour, gel-promoting property was increased. It was clear that enzymatic elimination of galactose from guar gum by purified α -galactosidase would lead to a significant increase in gelation ability.

Key words : galactomannan, α -galactosidase, earthworm, gel-promoting ability, affinity chromatography

α -Galactosidase(α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3. 2. 1. 22)는 자연계에 넓게 분포되어 있으나[20] chromatography에 의한 정제는 최근에 보고되기 시작했으며[2-4, 17], 그들의 kinetics와 기질로서 이용하기 쉬운 oligosaccharide, polysaccharide의 부족으로 많은 연구는 진척되지 못하였다.

최근 coffee bean[6], vicia faba(broad bean)[3], coconut [1] 유래의 α -galactosidase의 정제기술이 발전하면서 많은 연구가 진행되고 있으며 고중합도의 manno oligomer의 조제를 행하기 위해서는 galactomannan에 α -galactosidase를 작용하여 galactose를 절단하는 것이 절대 필수적이며, galactomannan의 완전가수분해에 관여하는 3종류의 효소 즉 β -mannanase, β -mannosidase 및 α -galactosidase의 galactomanno oligosaccharides 가수분해산물의 동정에 대한 작용기 작이 불명료하여 우선적으로 각 효소에 대한 정제법이 해결해야 할 과제로 고려되고 있다. 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 자

연계에 극히 드물지만, 충분한 이용법은 개발되지 않고 있는 상태이다. 본 연구실에서는 미생물효소를 이용한 mannan의 유효 이용법에 관한 연구 및 manno oligosaccharides의 효율적인 조제방법을 연구하고 있으며[6-8, 12, 21], 또한 이의 조제과정에 관여하는 효소계의 생화학적 연구[13, 18, 19] 및 최근 affinity chromatography에 의한 해바라기 씨 유래 α -galactosidase의 정제법 및 성질을 보고 하였다 [15].

본 연구에서는 식품 신소재 개발의 일환으로 정제 α -galactosidase처리에 의한 galactomannan 이용 개발을 목적으로 affinity chromatography법에 의한 지렁이 유래 α -galactosidase의 완전하고 신속한 정제법을 구축하고, 정제 효소에 대한 효소화학적 성질 규명 및 정제효소의 응용법으로서 고가의 점도증가제인 locust bean gum의 대체자원으로서 생화학적 방법에 의한 galactomannan의 효율적 이용법을 주요목적으로 하고 있다.

재료 및 방법

재료 및 시약

지렁이는 모란시장에서 구입하여 실험에 사용하였고, *p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside(Sigma Chemical Co.) 및 기타 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

*Corresponding author

Tel. 82-342-750-5383, Fax. 82-342-750-5383

E-mail: ggpark@mail.kyungwon.ac.kr

효소의 정제법

지령이 21.0 g에 pH 4.5, 0.05 M acetate buffer 50 mL를 가하고 4°C에서 12,000×g(Vision V1024), 3 min 동안 균질화시킨 후 다시 21,000×g(Vision V1012), 10 min 동안 원심 분리한 후 상층액에 chloroform 37.5 mL를 처리하고 10% (NH₄)₂SO₄로 처리 한 다음 21,000×g(Vision V1012), 10 min 동안 원심분리 후 상층액을 pH 4.5, 0.05 M acetate buffer에 투석하였다. 0°C, 21,000×g(Vision V1012), 10 min 원심분리 후 상층액 30 mL의 조효소액을 생산하였다. N-ε-aminocaproyl-α-D-galactopyranosylamine로 구성되는 특이적 흡착제의 합성과 sepharose에 대한 ligand의 coupling은 일본 농림수산성 식품종합연구소 분자정보해석연구실에서 Noam Hapraz의 방법[11]에 의해 수행하였고 본 연구실에서는 이의 담체를 공급받아 affinity chromatography를 수행하였다. 조제한 조효소액 10 mL를 2 mL/tube, 0.3 mL/min의 유속으로 affinity chromatography 하고 난 후에 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. 3-6)을 회수하여 정제를 완료한다.

단백질 농도 결정

UV-Vis spectrophotometer(Shimadzu Model 1201)에서 280 nm의 흡광도에서 1 mg/mL의 농도를 1.0이라고 가정하였고, Lowry의 방법[9]에 의해서도 단백질농도를 확인하였다.

효소 활성의 측정

α-Galactosidase의 활성측정은 Takahashi의 방법[18]에 따라 수행하였다. 40°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 Na₂HPO₄와 0.1 M citric acid의 혼합액) 0.4 mL를 test tube에 넣고 5분간 preincubation시켰다. 조제한 조효소액 0.1 mL를 가하여 정확히 10분간 반응시킨 후 0.2 M Na₂CO₃ 1 mL를 첨가하여 반응을 종결시키고 408 nm에서 흡광도를 측정하였다. pNP 용액의 농도와 408 nm에 있어서의 흡광도([A₄₀₈])의 관계는 pH 4.5에서 [A₄₀₈]×0.1143 = pNP(mM/2 mL)(단, [A₄₀₈] < 0.6)였다. 또한 α-galactosidase가 pNP-Gal을 가수분해하여 생성되는 pNP 양과 반응시간과의 관계는 10분간 반응에서 [A₄₀₈]가 0.6 이하를 나타낼 때 효소액과 비례적 관계를 나타내었다. 상기와 같은 결과로부터 반응 후의 [A₄₀₈]가 0.6 이하가 되도록 효소액을 희석하여 활성 측정을 하였다. pH 4.5, 55°C에서 1분간에 1 μM의 pNP를 pNP-Gal로부터 유리시키는 효소량을 1 unit로 정의하였다. 반응시간과 활성측정을 위해 사용한 효소의 양은 100 μl이므로 효소액을 D배 희석하여 활성을 측정하는 경우에

[A₄₀₈] = A라고 하면, 그 효소활성(unit/mL)은 ([A] - [B])×[D]×0.1143/[B]는 미리 0.2 M Na₂HPO₄를 가하여 반응종결시의 [A₄₀₈])이다.

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[10]에 준하였다.

효소화학적 성질

Affinity chromatography에 의해 정제된 효소를 이용하여 반응 최적 pH와 온도, pH 안정성과 열 안정성, 금속이온의 영향 등의 성질을 규명하였다. 반응 최적 pH는 정제효소액(8 units/mL)을 이용하여 40°C에서 pH 2부터 8까지 변환시키면서 효소활성을 측정하였고, 최적 온도는 상기에서 사용한 동일 효소액(8 units/mL)을 이용하여 pH 4.5에서 20°C에서 80°C까지의 범위에서 효소활성을 측정하였다. pH 안정성은 효소를 pH 2부터 8의 McIlvaine buffer를 이용하여 40°C에서 1시간 preincubation시킨 후, 효소의 온도를 일정하게 유지하기 위하여 ice box내에서 pH 4.5, 40°C에서 활성을 측정하였다. 또한 열 안정성실험은 효소액(8 units/mL)을 최적 pH의 완충 용액과 혼합하여 20~80°C, 1시간 preincubation시킨 후 효소의 온도를 일정하게 유지하기 위해 ice box내에서 pH 4.5, 40°C에서 활성을 측정하였다. 금속이온의 영향은 Table 2에서 열거한 금속이온을 처리시 농도가 1 mM이 되도록 정제효소액에 혼합하고 20°C, 1시간 처리후 pH 4.5, 40°C에서 잔존활성을 측정하였다.

점도력 측정

정제효소 처리에 의한 galactomannan의 점도증가를 측정하기 위해 0.1 M sodium acetate buffer 5 mL에 1% galactomannan을 용해 후 40 units의 정제 α-galactosidase를 첨가하여 40°C 항온수조에서 2, 6, 12시간반응 후 sampling을 하였다. Sampling한 반응액은 100°C 끓는물에 5분간 담근 후 상온에서 방냉시켜 gel화 하였다. Gel을 형성한 sample은 Brookfield Viscometer(Model DV-II)에 의해 23.7°C, spindle CP-52, 10 rpm의 조건하에서 viscosity(mPa·s)를 측정하였다.

결과 및 고찰

Affinity chromatography에 의한 정제

Fig. 1과 같이 단백질이 용출되지 않을 때까지 McIlvaine buffer solution(pH 4.5)으로 수세 후 fraction No. 51에서 동일 완충 용액에 대한 0.05 M galactose 10 mL를 column에 주입하고 동일 완충 용액으로 수세를 계속하였다. 효소

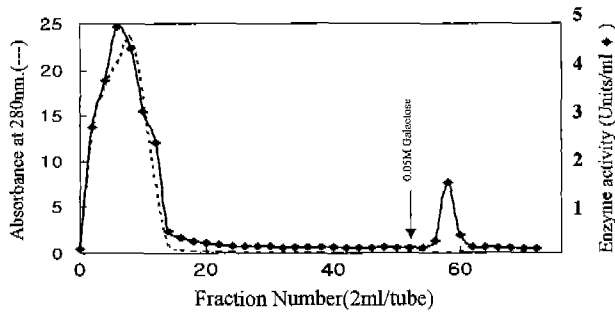


Fig. 1. Purification of α -galactosidase on a column of *N*- ϵ -aminocaproyl- α -D-galactopyranosylamine-Sepharose conjugate.

활성이 인정되는 fraction(No.56-60)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. 3-6)을 회수하여 정제를 완료하였다(Fig. 2).

Affinity column chromatography에서 galactose 대신에 *p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside(pNP-Gal)를 처리하여 효소를 용리할 수도 있으나 본 정제에서는 pNP-Gal 보다는 galactose의 효소 용리능력이 커서 galactose를 처리하였고, 해바라기씨 유래 α -galactosidase의 정제법에서도 galactose로 효소를 유도하는 공통점이 있었다[15]. Coffee bean 유래의 affinity chromatography에서는 pNP-Gal로 효소를 유도하는 상이점이 있었다[11]. 또한 평형화에 사용된 McIlvaine buffer solution(pH 4.5)보다 pH가 높은 6.0으로 최종적으로 column에 과량(120 mL) 용출시킴으로써 단백질 peak 를 유도하는 점이 상이하였고, 용출용매(pH 4.5)에서는

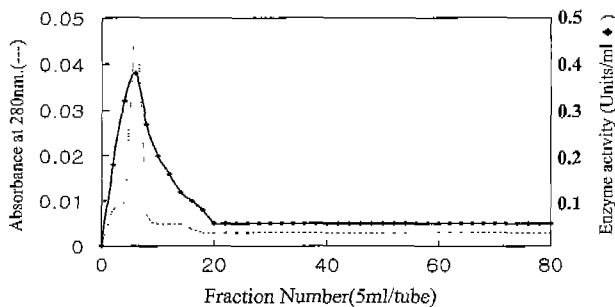


Fig. 2. Chromatography of the α -galactosidase on a column of Sephadex G-25.

pNP-Gal(50 mM)처리시 어떠한 효소도 용출되지 않았다. 박 [14]에 의해 보고된 *Pichia guilliermondii* 유래 α -galactosidase의 특이성 연구에서 정제법으로서 mannoibiose-sepharose의 담체를 조제하여 부분정제에 대해 보고하였으나, 본 연구에서 사용된 *N*- ϵ -aminocaproyl- α -D-galactopyranosylamine 흡착제의 합성과 Sepharose에 대한 coupling method는 일본 농림수산성 식품종합연구소에서 공급한 담체를 이용하여 정제를 수행하였다.

Table 1은 정제에 따른 비활성의 증가와 수득률을 나타낸 것으로 기질 *p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside에 대한 정제효소의 비활성은 314 units/mg, 정제배율은 122배를 나타내었다.

분자량 결정

정제효소는 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 single band를 나타내었으며(Fig. 3), 분자량은 48,000으로 추정되었다(Fig. 4). 박[15]에 의해 보고된 해바라기씨 유래 정제 α -galactosidase의 분자량은 42,000으로서 동물·식물 유래의 정제효소의 분자량은 대략 6,000 정도의 차이가 있는 것으로 사료되었다.

α -Galactosidase 활성에 미치는 pH, 온도의 영향

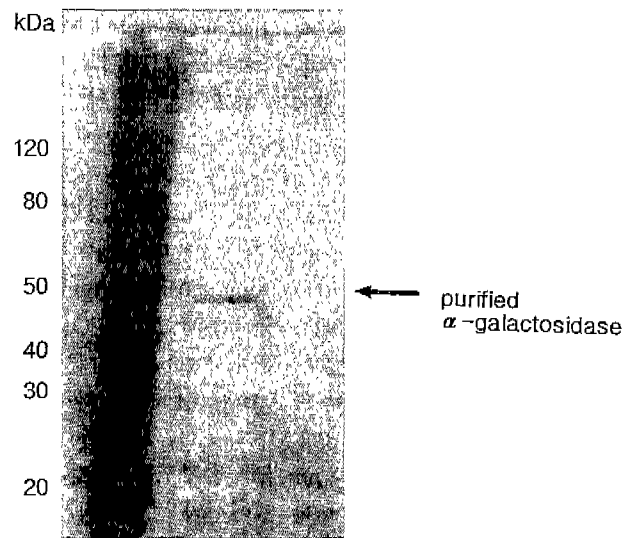


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified α -galactosidase.

Table 1. Summary of purification of α -galactosidase from earthworm

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	564	230	2.58	1.0	100
30% (NH ₄) ₂ SO ₄	440	190	2.31	0.89	74.0
Affinity chromatography	138	1.03	134	51.9	23.2
Sephadex G-25column chromatography	75.6	0.24	314	122	12.7

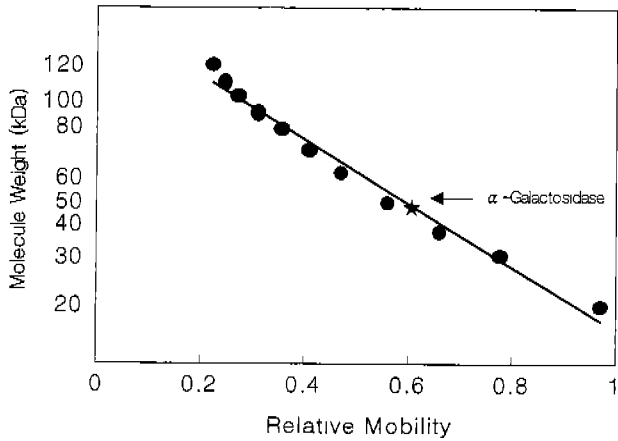


Fig. 4. Estimation of molecular weight of the α -galactosidase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

정제효소에 의한 pNP-Gal 분해에 미치는 pH와 온도의 영향을 검토하였다. Fig. 5-A는 효소반응에 미치는 pH의 영향, Fig. 5-B는 효소반응에 미치는 온도의 영향, Fig. 5-C는 효소의 pH 안정성, Fig. 5-D는 효소의 열 안정성을 나타내고 있다. 정제효소에 의한 pNP-Gal 분해의 최적 pH는 4.5, 최적 온도는 40°C이며, pH 4~5.5에서 100%의 잔존활성을 나타내었다. 열 안정성에서는 30~50°C에서 90% 이상의 잔존활성을 나타내었고 80°C에서는 34%의 잔존활성을 나타내었다. 박[15]에 의해 보고된 해바라기씨 유래 정제 α -galactosidase의 pNP-Gal 분해의 최적 pH는 4.5, 최적 온도는 55°C이며, pH 4~5에서 100%의 잔존 활성을

나타낸 반면 pH 8에서는 20%의 급격한 감소를 나타내었고, 열 안정성에서는 50°C에서 90% 이상의 잔존 활성을 나타내었으며 80°C에서는 20%의 잔존 활성을 나타내었다. 본 지렁이 유래효소는 해바라기씨 유래 효소와 비교하여 최적 pH와 pH 안정성에 있어서 유사하였으나 최적 온도에 있어서는 차이를 보이며 열 안정성은 다소 높은 경향을 나타냈다.

금속이온의 영향

Table 2에서 나타낸 것과 같이 지렁이 유래의 정제 α -galactosidase는 Co^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} 에 의해 70% 저해가 되었고, Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{2+} , Ni^{2+} 에 의해 65%의 저해효과를

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

Compound ^a	Relative Activity (%)
NONE	100
CaCl_2	81.6
ZnCl_2	29.9
HgCl_2	27.1
CoCl_2	29.9
FeCl_2	121
MnCl_2	35.3
CuSO_4	34
AgNO_3	32
NiCl_2	36
BaCl_2	61.9
CdCl_2	39.4
SnCl_2	51

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

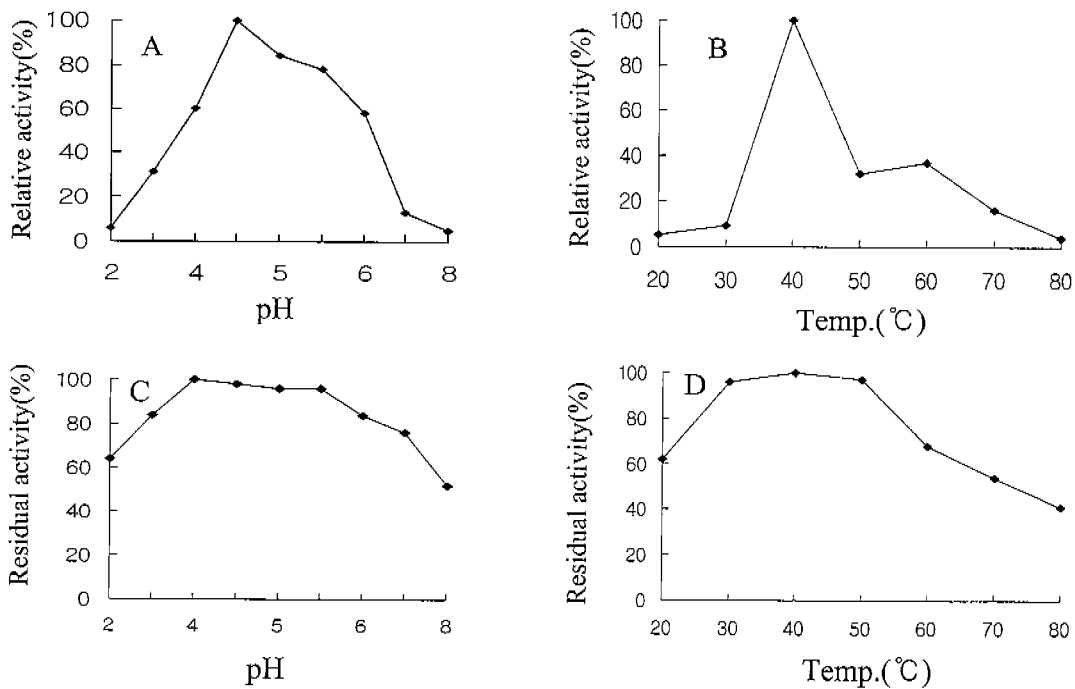


Fig. 5. Effect of pH and temperature on the purified α -galactosidase. A, B: Effect of pH and temperature on the purified α -galactosidase activity, C, D: Effect of pH and temperature on the purified α -galactosidase stability.

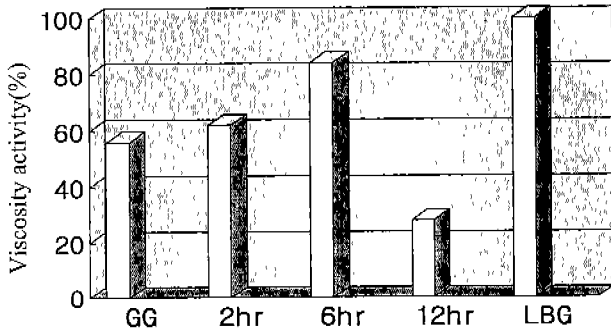


Fig. 6. Viscosity comparison of guar gum and locust bean gums treated with α-galactosidase.

GG: guar gum, LBG: locust bean gum, 2, 6, 12: time of enzyme-treated at guar gum.

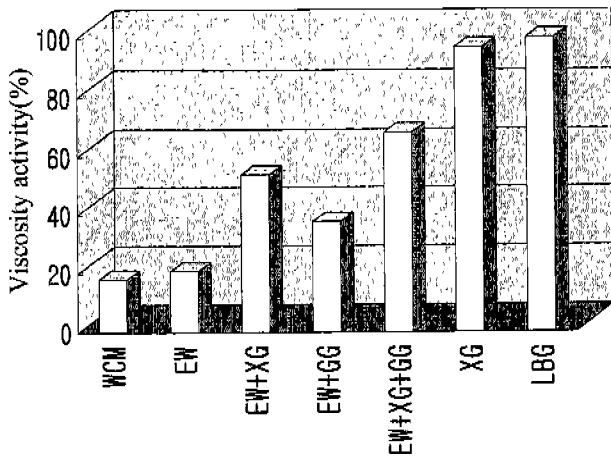


Fig. 7. Viscosity comparison of various gums treated with α-galactosidase.

WCM: white copra meal, XG: xanthan gum, GG: guar gum, LBG: locust bean gum, EW: treated with enzyme white copra meal.

나타내었다. 박[15]에 의해 보고된 해바라기씨 유래의 정제 α-galactosidase는 Hg²⁺, Ag²⁺, Co²⁺에 의해 84%, 74%, 70% 저해가 되어 동식물유래의 효소는 Hg²⁺, Ag²⁺, Co²⁺에 의해 저해되는 공통점이 있었고, 해바라기씨 유래의 경우 Mn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺에 의해 약 20% 저해가 되었으나 지렁이 유래의 경우는 특이적으로 큰 저해효과를 나타냈다.

α-Galactosidase 처리에 따른 galactomannan의 점도 변화

Brookfield Viscometer(Model DV-II)를 이용하여 측정된 결과 반응시간이 2시간일 때 865 mP·s, 6시간일 때 1199 mP·s, 12시간일 때 294.9 mP·s로 6시간이 되었을 때 locust bean gum 점도력의 85.3%임을 확인할 수 있어 (Fig. 6) locust bean gum 대체자원으로서 이용가치가 기대되며 white copra meal에 대한 효소처리 효과도 검토하였으나 gel 형성능력이 없었고, xanthan gum과 guar gum

을 혼합하여 점도를 측정된 결과 효소처리 된 copra meal의 점도에 비해 3배 정도의 점도증가를 나타냄에 따라 다른 gum류와의 혼합을 통해 식품점도증가제의 대체자원으로서 copra meal의 경제적 기대효과가 있을것으로 사료된다 (Fig. 7).

요 약

N-ε-aminocaproyl-α-D-galactopyranosylamine-Sepharose를 담체로 하는 affinity chromatography에 의한 지렁이 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 314 units/mg였고, 조효소와 비교하여 122배의 정제 배율을 나타내었다. 정제효소의 순도는 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법에 의해 단일 band를 나타내었으며, 분자량은 48,000으로 추정되었다. 정제효소의 최적 pH와 온도는 4.5, 40°C이며, pH 4~5.5, 30~50°C의 범위에서 pH와 온도 안정성을 나타내었다. 또한 정제효소는 Zn²⁺, Hg²⁺, CO²⁺의 금속에 의해 70% 이상의 저해효과를 나타내었다. 정제효소의 응용에서 guar gum에 효소를 6시간 처리한 결과 locust bean gum의 85.3%의 점도력을 나타내었다. 이는 정제효소 처리에 의한 guar gum내의 galactose유리에 기인되어 gel화에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 한국학술진흥재단 국제협력연구과제(3차년도) 연구비에 의해 수행된 연구로서 이에 감사드립니다. 또한 affinity column chromatography를 위한 담체를 제공해주신 일본 농림수산성 식품종합연구소 분자정보분석 연구실 연구팀들에게도 감사드립니다.

REFERENCES

1. 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.
2. Beutler, E. and W. Kuhl. 1972. Purification and properties of an α-D-galactoside galactohydrolase from the seeds of *Trifolium repens*. *J. Biol. Chem.* **207**: 7195-7200.
3. Dey, P. M. and J. B. Pridham. 1969. α-Galactosidase from the yeast *Candida javanica*. *J. Biol. Chem.* **113**: 49-55.
4. Dey, P. M. and K. Wallenfels. 1974. Characteristic features of an α-galactosidase from mung beans. *Eur. J. Bio-chem.* **50**: 107-112.
5. Kaneko, R. 1991. The study of galactomannan hydrolysate. Master's Thesis, Tsukuba University.

6. Kusakabe, I., R. Takahashi, K. Murakami, A. Maekawa, and T. Suzuki. 1983. Preparation of crystalline β -1,4-mannooligosaccharides from copra mannan by a mannanase from *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2391–2395.
7. 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**: 167–169.
8. 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**: 2825–2827.
9. 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.
10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of head of bacterio phage T4. *Nature* **227**: 680–685.
11. Noam, H., M. F. Harold, and S. Nathan. 1973. Purification of coffee bean α -galactosidase by affinity chromatography. *BBA*. **67157**: 213–221.
12. 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.
13. 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**: 2709–2712.
14. Park, G. G., 1997. Specificity of *Pichia guilliermondii* α -galactosidase toward galactomannans. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**(5): 844–850.
15. Park, G. G., W. D. Kim, Y. S. Park, J. B. Gang, and H. Kobayashi. 1998. Purification and properties of sunflower seed α -galactosidase by affinity chromatography. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**(4): 316–322.
16. Petek, F. and T. Dong. 1961. Purification and properties of an α -galactosidase from the coffee bean. *Enzymologia* **23**: 133–142.
17. Suzuki, H., S. C. Li, and Y. T. Li. 1970. The α -galactosidase from *Mortierella vinacea* crystallization and properties. *J. Biol. Chem.* **245**: 781–786.
18. Takahashi, R., I. Kusakabe, A. Maekawa, T. Suzuki, and K. Murakami. 1983. Studies on mannanase of *Actinomycetes*. *Japan J. Trop. Agr.* **27**: 140–148.
19. 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.
20. Wallenfels, K. and O. P. Malhotra. 1961. Biochemistry of galactosidase. *Adv. Carbohydrate Chem.* **16**: 23–298.
21. Zama, M., I. Kusakabe, and K. Murakami. 1985. Enzymatic preparation of crystalline mannose from copra mannan. *Japan J. Trop. Agr.* **29**: 221–225.

(Received April 22, 1999)