

Mannobiose-Sepharose 담체합성 및 Affinity column chromatography에 의한 *Debaryomyces* sp. 유래 α -Galactosidase의 정제 및 기질 특이성

박 귀 근*

경원대학교 공과대학 생명공학부 분자·식품생명공학전공

Purification and Substrate Specificity of *Debaryomyces* sp. α -Galactosidase by Mannobiose-Sepharose Affinity Column Chromatography

Gwi-Gun Park*

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

Received May 25, 2006; Accepted September 11, 2006

α -Galactosidase was partially purified from the culture filtrate of *Debaryomyces* sp. by Mannobiose-Sepharose affinity column chromatography. The galactosidase exhibited maximum activity at pH 4.0 and 60°C, and was stable in the pH and temperature ranges of 3 to 4.5 and 30 to 50°C, respectively. The enzyme was inhibited by Hg²⁺ and Ag²⁺. The enzyme activity was not affected considerably by treatment with other metal compounds. The enzyme hydrolyzed melibiose to galactose and glucose, raffinose to galactose and sucrose, and Gal³Man₃ (6³- α -galactosyl-1,4-mannotriose) to galactose and mannitriose. On the contrary, it could not hydrolyze Gal³Man₄ (6³- α -galactosyl-1,4-mannotetraose).

Key words: α -galactosidase, *Debaryomyces* sp., mannobiose-sepharose affinity resin

서 론

Copra meal은 40~50%의 galactomannan(Gal:Man=1:10~1:15)이 함유되어 있으며 이와 같이 mannose함량이 풍부한 동시에 순도가 높은 mannan의 자원은 자연계에서 극히 드물다. 현재까지 미생물 효소를 사용하여 mannan의 유효이용법에 관한 연구가 진행되어오고 있으며, mannan 및 mannoooligosaccharides의 효율적 조제방법 및 효소계의 생화학적 연구도 진행되고 있다.¹⁻⁸⁾ 고중합도의 mannoooligomer의 조제를 행하기 위해서는 galactomanno-oligosaccharide 및 galactomannan으로부터 α -galactosidase로 galactose를 절단하는 것이 절대 필수적이나, galactomannan의 완전가수분해에 관여하는 β -mannanase, β -mannosidase 및 α -galactosidase의 작용양식에 대한 메카니즘이 규명되지 않고 있다. Kaneko는 galactomanno-oligosaccharides에 대한 *Mortierella vinacea*⁹⁾, *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus niger* 3종의 사상균 유래의 α -galactosidase의 기질특이성을 규

명하였다. 미생물유래의 β -mannanase와 관한 보고는 다수 있으나¹⁰⁾, 단지 *Streptomyces* sp. No.17¹¹⁾, *Leucaena glanca*¹²⁾, *Bacillus subtilis*¹²⁾로부터 생산된 3종류의 효소만이 galactomannan에 대한 효소의 기질특이성이 연구되었다. 현재까지 copra galactomannan(mannose:galactose=14:1)에 대한 방선균 β -mannanase의 기질특이성의 해명과¹²⁾, 또한 copra galactomannan에 대한 사상균 β -mannanase의 기질특이성 해명¹³⁾이 진행되어 왔다.

α -Galactosidase(α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3. 2. 1. 22)는 자연계에서 넓게 분포되어 있으나¹⁴⁾ chromatography에 의한 정제는 최근에 보고되기 시작했으며¹⁵⁻¹⁷⁾, 그들의 kinetics와 기질로서 이용하기 쉬운 oligosaccharide, polysaccharide의 부족으로 많은 연구는 진척되지 못하였다. 최근 α -galactosidase의 정제기술이 발전하면서 많은 연구가 진행되고 있다. 미생물 유래의 α -galactosidase에 대한 연구도 많이 있으나 효소의 기질 특이성이 밝혀진 것은 얼마되지 않는다¹⁸⁾. 효소의 기질 특이성을 규명하기 위해 α -galactosidase를 함유하는 여러종류의 oligosaccharides가 필요하나 기질조제의 어려움으로 큰 장애가 되고 있다.

본 연구에서는 식품소재 개발 및 응용에 관한 galactomannan

*Corresponding author

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

E-mail: ggpark@kyungwon.ac.kr

이용개발에 대한 효모 *Debaryomyces* sp. 유래 α-galactosidase의 Mannobiose-Sepharose affinity column chromatography에 의한 부분정제 효소의 galactosyl oligosaccharides에 대한 기질 특이성 규명을 주요 목적으로 하고 있다.

재료 및 방법

사용 균주 및 기질. 효모균주는 일본 쓰꾸바대학 식품생화학 연구실로부터 균주를 분양받아 실험에 사용하였고, 기질로서는 Melibiose(Gal-α-1 → 6Glc, Yakuri pure chemicals/Osaka Japan), Gal³Man₃(6³-α-Galactosyl-1,4-β-mannotriose), Gal³Man₄(6³-α-Galactosyl-1,4-β-mannotetraose)를 사용하였다.

조효소액의 생산. 500 ml용 진탕 배양 flask에 Table 1에서 나타낸 배지조성을 함유하는 액체 배지 100 ml를 분주하고 autoclave에서 121°C, 15분간 가압멸균하여 냉각하고 *Debaryomyces* sp.를 1백급이 식균하여 진탕배양기(shaking incubator, Dong yang science co.)에서 30°C, 150 rpm, 72시간 배양하였다. 배양 중 4-8시간 간격으로 효소액을 sampling하여 pH와 활성을 측정하였다. 배양이 끝난 효소액은 10,000 rpm, 20분간 냉동원심분리기를 이용하여 상층액과 균체로 분리하고 균체의 효소를 조효소액으로 사용하였다.

효소 활성의 측정. α-Galactosidase의 활성측정은 Kaneko방법에 따라 행하였다. 시험관(1.2 × 10 cm)에 PNP-Gal(p-Nitrophenyl α-D-Galactopyranoside, Sigma) 2 mM수용액 500 μl 및 McIlvaine buffer solution(pH 4.0, 0.2 M Na₂HPO₄와 0.1 M citric acid의 혼합용액) 400 μl을 넣어 교반하고 65°C, 3분간 water bath상에서 예열하였다. McIlvaine buffer solution으로 적당히 희석한 효소액 100 μl을 가하여 10분간 반응후 0.2 M Na₂CO₃ 1 ml을 가하여 반응을 종결하고 408 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 이미 작성해둔 검량선으로부터 유리된 p-nitrophenol (pNP)의 양을 산출하였다. β-Mannosidase 활성 측정의 경우에도 반응온도 65°C에서 동일한 방법에 의해 활성 측정을 하였다.

pNP 용액의 농도와 408 nm에 있어서의 흡광도([A408])의 관계는 pH 4.0에서 [A408] × 0.1143 = pNP(μmol/2 ml) 단, [A408] < 0.6)였다. 또한 α-galactosidase가 PNP-Gal을 가수분해하여 생성되는 pNP양과 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 4.0, 65°C(α-galactosidase, β-mannosidase)에서 1분간에 1 μmol의 pNP를 pNP-Gal로부터 유리시키는 효소량을 1 unit로 정의하였다. 반응 시간과 활성 측정을 위해 사용한 효소의 양은 100 μl이므로 효소액을 D배 희석하여 활성을 측정하는 경우에는 [A408] = [A]라고 하면, 그 효소농도(unit/ml)는 ([A]-[B]) × [D] × 0.1143, ([B]는 효소액대신 증류수를 사용하여 반응시 [A408]을 나타내었다.

담체함성 및 α-Galactosidase의 정제. Affinity gel 조제를 위해 Sepharose 4 M 75 ml를 증류수로 충분히 세척하고 2 M Na₂CO₃ 75 ml와 혼합하여 천천히 교반한다. 또한 25 g CNBr을 CH₃CN에 용해하여 3분간 교반하고 미리 냉각한 0.1 M NaHCO₃로 세척하여 활성화 Sepharose를 얻었다. 6 g

Table 1. Composition of media A and B

Medium A	
Galactose	1%
Peptone	3%
Yeast extract	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.05%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.01%
KCl	0.01%
pH 7.0	
Medium B	
Raffinose	0.5%
Melibiose	0.5%
Lactose	1.0%
Peptone	2%
Yeast extract	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.0%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.01%
KCl	0.01%
pH 7.0	

NH₂(CH₂)₆NH₂를 15 ml 증류수에 용해하고 6 M HCl로 pH 10으로 최종 조정된 30 ml을 75 ml Sepharose에 가하여 교반하며 반응시켰다. 2.5 l 0.5 M NaCl과 1.5 l 증류수로 세척하고 hexamethylene-diamine Sepharose를 얻었다. 75 ml hexamethylene-diamine Sepharose와 2.3 g mannobiose를 함유하는 0.2 M KH₂PO₄ 75 ml와 2.3 g NaCNBH₃와 혼합하여 교반하면서 실온에서 50시간 반응시켰다. 이 반응은 2회 반복하였다. 3 l 이상의 증류수로 세척하고 mannobiose의 환원말단이 특이적으로 Sepharose에 결합한 담체를 조제하였다.

20 mM phosphate buffer solution(pH 7.0)으로써 충분히 투석한 농축 효소액을 동일한 buffer solution으로 미리 평형화시켜 둔 affinity column(1.5 × 5 cm)에 유속 1 ml/10 min으로 흡착시켰다. Buffer solution으로 세척 후 0.5 M NaCl을 함유하는 동일 완충액으로 단백질을 용출시켜 정제를 수행하였다.

효소화학적 성질. *Debaryomyces* sp.가 생산하는 균체의 효소를 이용하여 최적 pH, 최적 온도, pH 안정성, 온도 안전성, 금속 이온의 영향등의 성질을 규명하였다. 최적 pH는 투석한 효소액을 이용하여 pH 2-8의 범위, 65°C에서 galactosidase활성을 측정하였다. 최적 온도는 상기에서 사용한 동일 효소를 이용하여 pH 4.0, 20-80°C에서 활성을 측정하였다. pH 안정성은 상기에서 사용한 동일 효소를 pH 2-8의 McIlvaine buffer solution을 이용하여 65°C에서 1시간 preincubation후 효소액의 온도를 일정하게 유지하기위해 ice-box내에 방치하고, pH 4.0, 65°C에서 활성을 측정하였다. 온도 안정성은 효소액을 최적 pH의 Buffer Solution과 혼합하여 20-80°C, 1시간 preincubation시킨후 효소의 온도를 일정하게 유지하기 위해서 ice-box내에 방치하며 pH 4.0, 65°C에서 잔존활성을 측정하였다. 금속이온의 영향은 Table 2에서 열거한 금속이온을 처리시 농도가 1 mM이 되도록 투석효소액을 혼합하고 20°C, 1시간 처리한 후 pH 4.0, 65°C에서 활성을 측정하였다.

Thin Layer Chromatography(TLC)법에 의한 기질특이성.

Table 2. Effect of various compounds on the galactosidase from *Debaryomyces* sp.

Compound	Relative Activity (%)
None	100
MnCl ₂	96
ZnCl ₂	89
CoCl ₂	91
HgCl ₂	46
BaCl ₂	97
CaCl ₂	99
SnCl ₂	112
AgNO ₃	15
NiCl ₂	102
AlCl ₃	85
CdCl ₂	97
FeCl ₂	101
CuSO ₄	97
EDTA	93

Concentration of compounds, 1.0×10^{-3} M

TLC는 Merck TLC plate Silicagel 60에 sample을 spotting 후 n-propanol : methanol : water (5 : 2 : 3, v/v)의 전개용매에서 행하였다. 전개 후 C-H₂SO₄로 분무하고 140°C에서 약 5분간 가열하여 당을 검출하였다.

결과 및 고찰

효모 α -Galactosidase의 생산. 현재까지 8종의 효모에 대한 α -galactosidase^{19,24)}가 보고되어 있으며, 특히 469종의 효모 중 raffinose, melibiose, galactose 중 어느 하나의 당을 자화하는 효모는 56종, 탄소원으로 3개의 당 모두를 자화하는 효모는 27종이라고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 20주의 효모를 대상으로 하여 α -galactosidase screening 실험을 행하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 *Debaryomyces* sp., *Schwanmiomyces* sp., *Pichia guilliermondii*의 3주가 배지 A와 B에서 α -galactosidase를 생산하였다. 배지 A는 galactose를 탄소원으로 하여 본 실험에서 사용한 *Debaryomyces* sp.가 높은 galactosidase 활성을 유도한 반면 배지 B는 raffinose, melibiose, galactose를 탄소원으로 하여 *Schwanmiomyces* sp.를 포함하여 *P. guilliermondii*가 높은 활성을 유도하였다. 배지 A의 galactose 대신에 melibiose를 탄소원으로 하여 효소유도실험을 하였으나 melibiose의 단일 탄소원보다는 배지 B와 같은 탄소원이 효모에 적합한 것으로 시사되었다²⁵⁾.

Fig. 1은 배양시간별 효소활성 및 pH변화를 보여주고 있는데, 배양초기부터 활성이 증가추세를 보이고 있으나 40시간이후 부터 급격히 활성이 증가하고 있으며, 70시간에서 25.8 unit/ml의 최대활성을 나타내고 있다. 한편 배양초기 pH 6.0에서 시작되어 배양말기에는 pH 8을 나타내는 pH의 변화를 보이고 있다. 72시간 배양후 균체는 Buchner funnel을 이용한 Toyo-roshi No. 2 여과지로서 제거하며, 상층액을 투석하여 조효소액으로 사용하였다.

Schwanmiomyces sp.는 배양시간 20시간 이후부터 효소생산

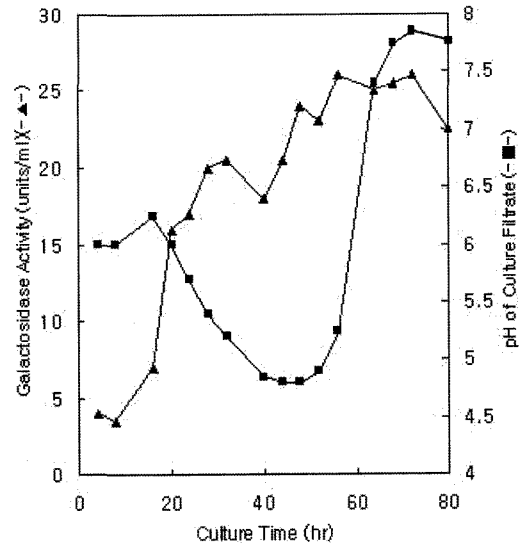


Fig. 1. Time course of the production of galactosidase from *Debaryomyces* sp.

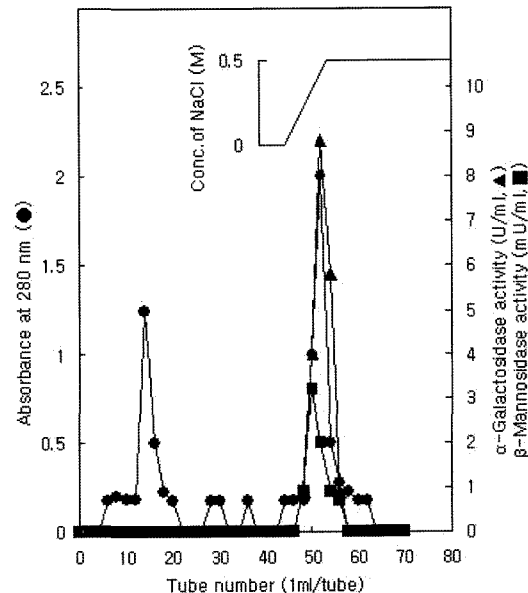


Fig. 2. Separation of enzyme of *Debaryomyces* sp. on a mannobiose-sepharose column.

증가를 보이고 있으며 72시간 배양에서는 18 unit/ml를 나타내고 있으며, *Pichia guilliermondii*는 72시간 배양말기에서 10 unit/ml로 *Debaryomyces* sp. 및 *Schwanmiomyces* sp.와 비교할 때 다소 낮은 활성을 나타내고 있음이 보고되고 있다²⁵⁾.

Affinity resin 합성법에 의한 α -Galactosidase의 정제. *Debaryomyces* sp.가 생산하는 조효소액을 투석하여 효소액을 affinity column chromatography를 행하였다. Column에 처리하기 전 G/M(galactosidase/mannosidase)는 650이었으나, 용출한 fraction No. 50~53의 G/M은 2495이었으며 이를 효소반응에 사용하였는데, chromatogram의 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. β -Mannosidase를 제거하기 위하여 mannobiose-sepharose column에 의한 완전정제가 진행 중에 있으며, *Debaryomyces* sp.

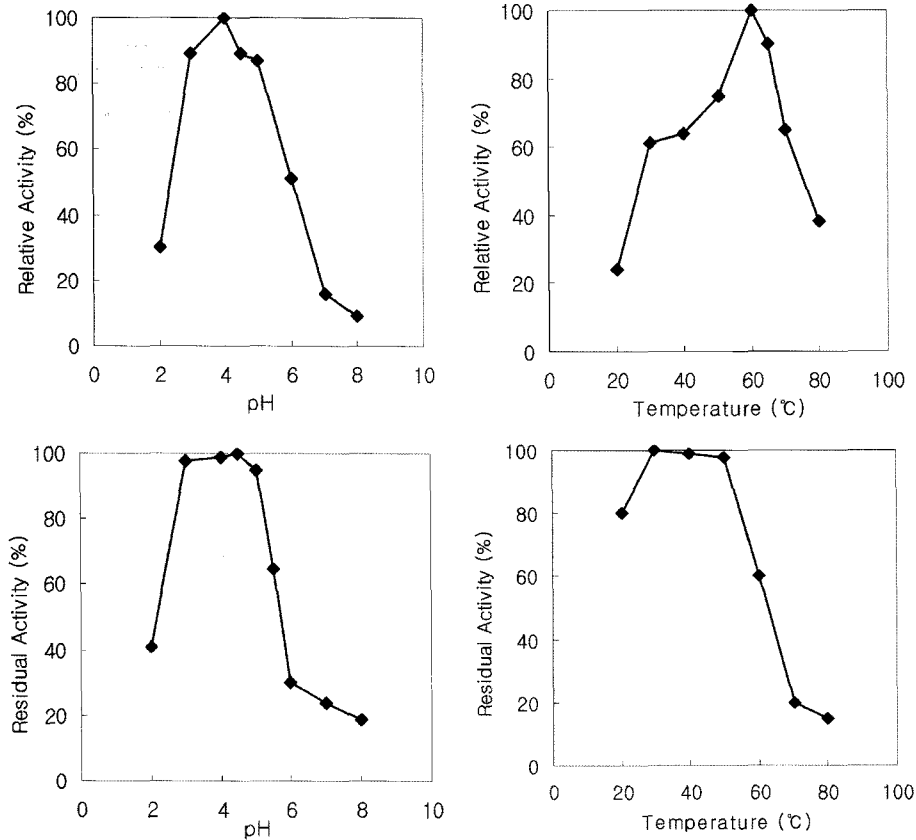


Fig. 3. Effect of pH, temperature, pH stability, and temperature stability on galactosidase activity of *Debaryomyces* sp. A, Optimum pH; B, Optimum temperature; C, pH stability; D, Temperature stability.

의 경우 β-mannosidase와 α-galactosidase의 분리가 불충분하였으나 결과적으로 G/M의 비가 기질 특이성 실험에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었다.

Galactosidase 활성에 대한 pH와 온도의 영향. 효소에 의한 PNPG 분해에 대한 pH와 온도의 영향을 검토하였다. 효소반응에 대한 pH의 영향(Fig. 3-A), 효소반응에 대한 온도의 영향(Fig. 3-B), pH에 대한 효소안정성(Fig. 3-C), 온도에 대한 효소의 안정성(Fig. 3-D)을 나타내었다.

효소에 대한 PNPG분해의 최적 pH는 4.0, 최적온도는 60°C이며 pH 3~4.5에서 100%의 잔존활성을 나타낸 반면 pH 8.0에서는 20%로 급격히 감소하였고, 온도안정성에서 30~50°C에서는 100%의 잔존활성을 나타내었으나 70°C 이상에서는 20%이하의 잔존활성을 나타내었다.

P. guilliermondii 유래의 효소는 PNP-Gal분해의 최적 pH는 4.5, 최적온도는 40°C였으며, pH 4~5.5에서 100%의 잔존활성을 나타내었으나 pH 8에서는 30%로 급격히 감소하였고, *Schwanniomyces* sp.의 경우 최적 pH는 4.0, 최적온도는 65°C이며 pH 5~7에서 100%의 잔존활성을 나타낸 반면 pH 8.0에서는 60%로 감소하였고, 온도안정성에서 30~50°C에서는 100%의 잔존활성을 나타내었으나 80°C에서는 완전히 실활하였다.²⁵⁾

금속이온의 영향. Table 2에서 나타낸 것과 같이 *Debaryomces* sp.가 생산하는 α-galactosidase는 Hg²⁺에 의해서 54%, Ag²⁺에 의해서는 85%로 저해되었으며, 그 이외의 이온에

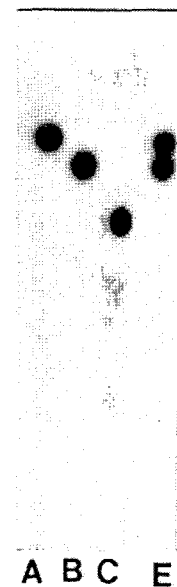


Fig. 4. Actions of *Debaryomyces* sp. α-galactosidase on melibiose. A, Glucose; B, Galactose; C, Melibiose; E, Extracellular.

대해서는 큰 영향을 받지 않았다. *Schwanniomyces* sp. 및 *P. guilliermondii* 유래의 효소도 Hg²⁺에 의해서 45%, 48%, Ag²⁺에 의해서는 62%, 44%로 저해되어¹⁹⁾ 효모 3균주 모두 Hg²⁺

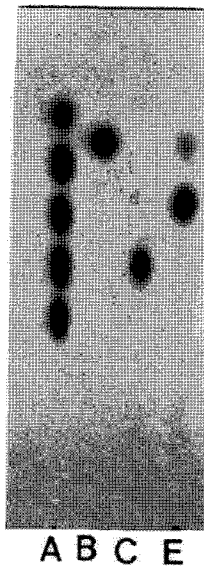


Fig. 5. Actions of *Debaryomyces* sp. α -galactosidase on Gal^3Man_3 . A, Mannose to mannopentaose from top to bottom; B, Galactose; C, Gal^3Man_3 (63- α -galactosyl-1,4-mannotriose); E, Extracellular.

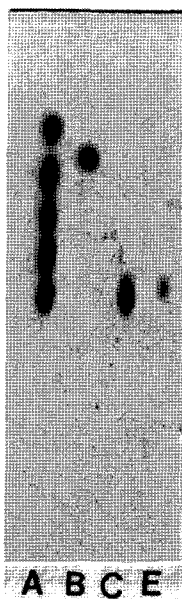


Fig. 6. Actions of *Debaryomyces* sp. α -galactosidase on Gal^3Man_4 . A, Mannose to mannopentaose from top to bottom; B, Galactose; C, Gal^3Man_4 (63- α -galactosyl-1,4-mannotetraose); E, Extracellular

및 Ag^{2+} 이온에 의해 저해되는 공통점을 나타내었다.

α -Galactosidase 기질특이성. Melibiose, Gal^3Man_3 , Gal^3Man_4 의 경우는 1%의 기질농도를 함유하는 당액 1 ml에 효소액 1 ml (13.5 units/ml)를 40°C, 12시간 반응시켰다. 반응개시후 0, 0.5, 1, 3, 5, 8, 12시간 반응액을 각각 100 μl 씩 sampling하여 5분간 비등에 의해 반응을 정지시켰다. 각 반응에 대한 당조성은 TLC에 의해 분석하였다. *Debaryomyces* sp. 유래 α -galactosidase는 24시간 반응 후 melibiose, Gal^3Man_3 를 완전 가수분해 하여 각각 galactose와 glucose(Fig. 4), galactose와 mannotriose(Fig. 5)로 분해되었다. 한편, Gal^3Man_4 에 대해서는 12시간 반응시켜

Table 3. Substrate specificities of fungal and yeast α -galactosidase toward galactosyl manno oligosaccharides

	Gal^3Man_3	Gal^3Man_4
<i>M. vianace</i>	↓ Gal-M-M-M	Gal →→ M-M-M-M
<i>A. niger</i> 5-16	↓ Gal-M-M-M	Gal → M-M-M-M
<i>P. purpurogenum</i>	↓ Gal-M-M-M	Gal → M-M-M-M
<i>D. nepalensis</i>	Gal → M-M-M	Gal →→ M-M-M-M

→, linkages rapidly hydrolyzed; →→, linkages not hydrolyzed

도 기질로부터 galactose 유리가 불가능함이 확인되었다(Fig. 6).

P. guilliermondii 및 *Schwanniomyces* sp. 유래 효소는 *Debaryomyces* sp. 유래 효소와 동일하게 melibiose, Gal^3Man_3 에 대해서 완전 가수분해 하여 각각 galactose와 glucose, galactose와 mannotriose로 분해되었으며, Gal^3Man_4 에 대해서도 12시간 반응시켜도 기질로부터 galactose가 유리되지 않음이 확인되어 3가지 기질에 대한 3가지 효소의 작용양식이 동일함을 확인할 수 있었다²⁵⁾.

이와 같은 결과를 이미 보고된 곰팡이 유래의 효소에 대한 기질특이성과 비교해 볼 때 Table 3과 같이 *Mortierella vinacea*, *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus niger* 3가지 곰팡이의 경우 기질 Gal^3Man_3 에 대해서 *Aspergillus niger*를 제외한 *Mortierella vinacea*, *Penicillium purpurogenum*는 효모 3균주의 특이성과 같이 Gal^3Man_3 의 비환원말단에 결합하고 있는 galactose를 유리시키는 공통점이 있었다. Gal^3Man_4 에 대해서는 *Mortierella vinacea*만이 효모 3균주와 동일하게 galactose를 유리시키지 못하였으나. *Aspergillus niger*와 *Penicillium purpurogenum*이 생산하는 α -galactosidase는 galactose를 분해하는 상이한 특이성을 나타내었다.

초 록

본 연구는 *Debaryomyces* sp.가 생산하는 α -galactosidase의 mannobiose-sepharose 담체합성법에 의한 affinity column chromatography를 수행하여 효소정제, 효소 화학적 성질 및 galactosyl manno oligosacchrides에 대한 기질특이성 규명을 주요 목적으로 하였다. 배양시간별 활성과 pH의 변화에서 배양 시간 40시간부터 활성이 증가하고 있으며, 70시간에서 25.8 unit/ml의 최대활성을 나타내고 있으며, 배양초기 pH 6.0에서 시작되어 배양말기에는 pH 8을 나타내는 pH의 변화를 보였다. 최적 pH는 4.0, 최적온도는 60°C이며 pH 3~4.5에서 100%의 잔존활성을 나타낸 반면 pH 8.0에서는 20%로 급격히 감소하였

고. 온도안정성에서 30~50°C에서는 100%의 잔존활성을 나타내었으나 70°C 이상에서는 20% 이하의 잔존활성을 나타내었다. Hg^{2+} 에 의해서 54%, Ag^{2+} 에 의해서는 85%로 저해되었으며, 그 이외의 이온에 대해서는 큰 영향을 받지 않았다. *Debaryomyces* sp. 유래 α -galactosidase는 24시간 반응 후 melibiose, Gal³Man₃를 완전 가수분해 하여 각각 galactose와 glucose, galactose와 mannotriose로 분해되었으나 Gal³Man₄에 대해서는 12시간 반응 시켜도 기질로부터 galactose 유리가 불가능함이 확인되었다.

Key words: α -galactosidase, *Debaryomyces* sp., mannobiose-sepharose affinity resin

참고문헌

- Zama, M., Kusakaba, I. and Murakami, K. (1985) Enzymatic preparation of crysryalline mannose from copra mannan. *Japan. J. Trop. Agr.* **29**, 221-224.
- Kusakabe, I., Takahashi, R., Murakami, K., Maekawa, A. and Suzuki, T. (1983) Preparation of crystalline β -1,4-Mannooligosaccharides from copra mannan by smannanase from *Streptonmyces*. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2391-2397.
- Kusakabe, I., Takahashi, R., Maruyama, K., Murakami, K., Maekawa, A. and Suzuki, T. (1985) Studies on the mannanase of *Streptomycetes*. *Japan. J. Trop. Agr.* **29**, 167-172.
- Kusakabe, I., Zama, M., Park, G. G., Tubake, K. and Murakami, K. (1987) Preparation of β -1,4-mannobiose from *Penicillium purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2825-2826.
- Park, G. G., Kusakabe, I., Yasui, T. and Murakami, K. (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.
- Takahashi, R., Kusakabe, I., Maekawa, A., Suzuki, T. and Murakami, K. (1983) Studies on mannanase of *Actinomyces*. *Japan. J. Trop. Agr.* **27**, 140-148.
- Takahashi, R., Kusakabe, I., Kobayashi, H., Murakami, K., Maekawa, A. and Suzuki, T. (1984) Purification and some properties of β -mannanase from *Streptomycetes*. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2189-2195.
- Park, G. G., Kusakabe, I., Komatsu, Y., Kobayashi, H., Tasui, T. and Murakami, K. (1987) Purification and some properties of β -mannanase from *Penicillium purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2709-2716.
- Kaneko, R., Kusakabe, I., Yasui, T., Sakai, Y. and Murakami K. (1990) Substrate Specificity of β -Galactosidase *Mortierella vinacea*. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 237-245.
- Tipson, R. S. and Horton, D. (1979) *Advanced in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press Inc., New York and London. Vol. 32, pp. 300-301.
- Kusadabe, I., Zamora, A. F., Kusama, S., Feranandez, W. L. and Murakami, K. (1986) *Japan. J. Trop. Agr.* **30**, 264-271.
- Tipson, R. S. and Horton, D. (1976) *Advanced in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press Inc. New York and London. Vol. 32, pp. 315.
- Park, G. G. (1992) *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 2, No. 3, 2004-2008.
- Wallenfels, K. and Malhotra, O. P. (1961) Biochemistry of galactosidase. *Adv. Carbohydrate Chem.* **16**, 239-298.
- Dey, P. M. and Pridham, J. B. (1969) α -Galactosidase from the yeast *Candida javanica*. *J. Biol. Chem.* **133**, 49-55.
- Dey, P. M. and Wallenfels, K. (1974) Characteric features of an α -Galactosidase from mung beans. *Eur. J. Biol. Chem.* **50**, 107-112.
- Suzuki, H., Li, S. C. and Li, Y. T. (1970) The α -Galactosidase from *Mortierella vinacea* crystallization and properties. *J. Biol. Chem.* **245**, 781-786.
- Dey, P. M. and Pridham, J. B. (1972) *Advanced in Enzymology*. Academic Press, New York. **36**, 91-130.
- Park, G. G., Lee, S. Y., Park, B. K., Ham, S. S. and Lee, J. H. (1991) Characteristic features of an α -galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. *J. Microbio. Biotech.* **1**, 90-97.
- Kaneko, R., Kusakabe, I., Ida, E. and Murakami, K. (1991) Substrate specificity of α -galactosidase from *Aspergillus niger* 5-16. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 109-117.
- Dey, P. M. and Pridham, (1972) Biochemistry of α -galactosidase. *Adv. Enzymol.* **36**, 91-97.
- Ferrero, I., Rossi, C., Landini, M. P. and Puglisi, P. P. (1978) Role of the mitochondrial protein sythesis in the catabolite repression of Petite-negative yeast, *K. laticis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 340-347.
- Marconi, W., Pasolli, P. and Zaffaroni, P. (1988) Hydrolysis of raffinose by immobilized cells of *Saccharomyces oleaceus*. *J. Mol. Catal.* **43**, 281-288.
- Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M. and Kitahata, S. (1993) Purification and someproperties of α -galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 372-381.
- Park, G. G. (1997) Specificity of *Pichia guilliermondii* α -galactosidase toward galactomannans. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 844-850.