

Affinity chromatography에 의한 *Trichoderma reesei* 유래 α -galactosidase의 정제 및 gum류의 증점효과

박귀근

경원대학교 공과대학 생명공학부 분자·식품생명공학과

Gel Promoting Ability of Various Gums and Purification of *Trichoderma reesei* α -Galactosidase by the Affinity chromatography

Gwi-Gun Park

Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University

Abstract

α -Galactosidase was purified from the culture filtrate of *Trichoderma reesei* by N- ϵ -aminocaproyl- α -D-galacto-pyranosylamin-sepharose affinity column chromatography. The galactosidase exhibited maximum activity at 5.0 and 60°C, and was stable in the pH and temperature ranges of 3.0 to 6.0 and 20 to 60°C, respectively. The galactose/mannose ratio of guar gum(1:1.6), guar gum treated with purified α -galactosidase and locust bean gum(1:3.3) were investigated. The galactose /mannose ratio of guar gum was changed 1:3.2 by the treatment of purified enzyme for 24 hr. Gel-promoting property of enzyme-treated guar gum was increased when the galactose/mannose ratio was about 1:3.2. An the ratio was appeared when the guar gum was hydrolyzed by the purified enzyme for 24 hr. It is clear that enzymatic depletion of galactose from guar gum by purified α -galactosidase would lead to a significant increase in gelation ability. And also mixture of xanthan gum and guar gum, and xanthan gum, guar gum and enzyme-treated copra meal were investigated.

Key words : Gel promoting ability, α -galactosidase, *Trichoderma reesei*

서 론

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 mannooligosaccharides의 효율적인 조제방법을 연구하고 있으며(Suzuki. *et al.*, 1983; Suzuki. *et al.*, 1985;

Murakami. *et al.*, 1987; Murakami. *et al.*, 1990; Murakami. *et al.*, 1985), 또한 이의 조제과정에 관여하는 효소계의 생화학적 연구도 진행하고 있다(Murakami. *et al.*, 1987; Murakami. *et al.*, 1983; Suzuki. *et al.*, 1984).

고중합도의 mannooligomer의 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 galactohydrolase, EC 3.2.1.22)는 자연계(Wallenfels와 Malhotra., 1961)에 넓게 분포되

Corresponding author: Gwi-Gun Park, Professor, Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Seongnam-si, 461-701, Republic of Korea.
Phone: +031-750-5383, Fax: +031-750-5383
E-mail: ggpark@kyungwon.ac.kr

어 있으나 Affinity chromatography에 의한 정제는 최근에 보고되고 있으며 coffee bean(Petek와 Dong., 1961), vicia faba(broad bean)(Dey, P. M.와 Pridham., 1969), coconut(Pridham. *et al.*, 1974) 유래의 α -galactosidase의 정제기술이 발전하면서 많은 연구가 진행되고 있다.

Gum류는 햄, 소시지, 치즈, 스프, 빵, 아이스크림 등 식품첨가제로서 이용가능하며 연간 사용량은 수 천톤에 이르고 있다. locust bean gum은 guar gum에 비해 10배정도의 높은 가격으로 시판되고 있으며, locust bean gum가 비싼 이유로서는 다른 다당류와 혼합하는 경우 gel형성이 양호한 이유로 알려지고 있으나 guar gum은 이와같은 성질을 가지고 있지않다(Karr. *et al.*, 1967; Pridham. *et al.*, 1974; Beutler, E.와 Kuhl., 1972; Ciucanu, I.와 Kerek., 1984; Dey, P. M.와 Pridham., 1969). 또한 구조적 차이점으로서 locust bean gum은 galactose:mannose=1:4인 반면 guar gum은 galactose:mannose=1:2로 구성되는 유사한 hetero 구조를 하고 있으며 효소적 가수분해법(Dey, P. M.와 Pridham., 1972; Dey, P. M.와 Wallenfels., 1974; Puglisi. *et al.*, 1978; Kitahata. *et al.*, 1993; Murakami. *et al.*, 1990)으로 galactose잔기의 제거가 가능하여 구조적으로 부가가치가 높은 locust bean gum으로의 유도가 가능하다면 식품산업에서 널리 사용되고 있는 점도제의 대체자원으로서의 기대효과가 클 것으로 사료되고 있다. 따라서 본 연구에서는 N- ϵ -aminocaproyl- α -D-galacto-pyranosylamin로 구성되는 특이적 흡착제의 합성과 sepharose에 대한 ligand의 coupling법에 의한 affinity chromatography를 수행하여 효소정제법을 구축하고, locust bean gum의 증점 대체자원으로서 정제효소 처리에 의한 guar gum 및 xanthan gum, 그리고 천연유래 galactomannan으로서 BCM(brown copra meal)과 WCM(white copra meal)의 효율적 이용법을 주요 목적으로 하고 있다.

재료 및 방법

재료 및 시약

활성측정 및 효소유도기질로서 pNP-Gal(p-nitrophenyl- α -D-galacto-pyranoside, Sigma chemical Co.)를 사용하였고, Gum류로서는 Locust bean gum(galactomannan polysaccharide from seeds of *Ceratonia siliqua*, Sigma Chemical Co.), Guar gum(Sigma Chemical Co.), Xanthan gum(produced

by fermentation of dextrose with *Xanthomonas campestris*, Sigma Chemicals Co.), brown copra meal (47.7% total sugar, Fuji oil Co.) 및 white copra meal (49.9% total suhar, Blue Bar Inc., Phillipines)를 사용하였다

단백질 농도

UV-분광광도계(Shimadzu Model 1201)를 사용하여 단백질은 280 nm, 핵산은 260 nm에서 흡광도를 측정해 $1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260}$ 의 식을 이용하여 단백질 농도를 계산하였고, 정제 단계 중에는 Lowry방법(Kobayashi *et al.*, 1984)을 사용하여 단백질 농도를 확인하였다.

α -Galactosidase 활성

α -Galactosidase의 활성측정은 Kaneko방법(Kaneko, R., 1991)에 따라 행하였다. 시험관(1.2×10 cm)에 PNP-Gal(p-Nitrophenyl α -D-Galactopyranoside, Sigma) 2 mM수용액 500 μ l 및 McIlvaine buffer solution (pH 4.0, 0.2 M Na_2HPO_4 와 0.1 M citric acid의 혼합용액) 400 μ l을 넣어 교반하고 65°C, 3분간 water bath상에서 예열하였다. McIlvaine buffer solution으로 적당히 희석한 효소액 100 μ l을 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 $[A408] \times 0.1143 = \text{pNP}(\mu\text{mol}/2 \text{ ml})$ 단, $[A408] < 0.6$ 였다. 또한 α -galactosidase가 PNP-Gal을 가수분해하여 생성되는 pNP양과 반응시간과의 관계는 10분간 반응에서 [A408]가 0.6이하를 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 μ mol의 pNP를 pNP-Gal로부터 유리시키는 효소량을 1 unit로 정의하였다. 반응시간과 활성 측정을 위해 사용한 효소의 양은 100 μ l이므로 효소액을 D배 희석하여 활성을 측정하는 경우에는 $[A408] = A$ 라고 하면, 그 효소농도(unit/ml)는 $([A] - [B]) \times [D] \times 0.1143$, ([B]는 효소액 대신 증류수를 사용하여 반응시 [A408])을 나타내었다.

Affinity chromatography법에 의한 효소정제

N-ε-aminocaproyl-α-D-galacto-pyranosylamin로 구성되는 특이적 흡착제의 합성과 sepharose에 대한 ligand의 coupling은 일본 농림수산성 식품종합연구소 분자정보해석연구실에서 Noam Hapraz의 방법 (Noam, H. *et al.*, 1973)에 의해 수행하였고 본 연구실에서는 이의 답체를 공급받아 affinity chromatography를 수행하였다.

증점력 측정

Guar gum, xanthan gum, guar gum + xanthan gum, locust bean gum 및 copra meal은 90°C의 수조에서 각각 0.5%씩 녹인후 상온에서 방냉시켜 gel을 형성하였다. 정제효소 처리에 의한 galactomannan의 점도증가를 측정하기 위해 0.1M sodium acetate buffer 5ml에 1% galactomannan을 용해 후 40units의 정제 α-galactosidase를 첨가하여 40°C 항온수조에서 반응시키면서 2, 6, 12시간반응 후 sampling을 하였다. Sampling한 반응액은 100°C 끓는물에 5분간 담근 후 상온에서 방냉시켜 gel화 하였다. 특히 copra meal의 경우 gum류와의 혼합에 의한 점도변화를 측정하기 위해 0.5% gum(xanthan gum, guar gum, xanthan gum + guar gum) 5 ml를 효소와 48시간 반응시킨 copra meal 5 ml와 혼합한후 90°C의 수조에서 1시간 agitation incubation후 실온에서 방냉하여, gel을 형성한 sample은 Brookfield Viscometer(Model DV-II)에 의해 23.7°C, spindle CP-52, 10rpm의 조건하에서 viscosity(mPa·s)를 측정하였다.

Gum류의 유동성 측정

유동성 측정은 Carri-Med Rheometer (CSL²100, TA Instruments Inc., DE, USA)의 cone and plate system (angle = 2°, diameter = 4.00×10⁻²m)을 사용하여 1000.0 μm의 gap으로 25°C에서 실험하였으며, 전단속도 (shear rate) 0.01~100 s⁻¹의 범위에서 얻은 전단응력 (shear stress)으로 부터 Power law 모델식에 의하여 유동지수(flow behavior index, n), 점조도 지수(consistency index, K)를 구하였다.

$$\text{Power law 모델} : \sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

여기서 $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(s⁻¹), σ 는 전단응력(Pa), K 는 점조도지수(Pa·secn), n은 유동성지수이다. 겔보 기점도 (apparent viscosity, $\eta_{a,10}$)는 전단속도 10s⁻¹에서 $\eta_a = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$ 로부터 결정되었다.

결과 및 고찰

Affinity chromatography에 의한 α-Galactosidase 정제

Trichoderma reesei 유래의 조효소액을 30% (NH₄)₂SO₄ 처리한 후 10,000 rpm, 10분 원심분리하여 상층액을 투석하여 McIlvaine buffer solution(pH 5.0)으로 평형화시킨 affinity column(Pharmacia, 1×10 cm)에 10ml를 처리하여 1 ml/min의 유속으로 chromatography를 행하였다. Fig. 1과 같이 단백질이 용출되지 않을 때까지 McIlvaine buffer solution(pH 5.0)으로 수세 후 fraction No. 45에서 동일 완충 용액에 대한 0.05 M Galactose 10 ml를 column에 처리하여 동일 완충 용액으로 수세를 계속하였다. 효소활성 fraction No. 55-65을 모아 저분자량의 galactose를 제거하기 위해 McIlvaine buffer solution (pH 5.0)로 평형화 시킨 sephadex G-25 column (Pharmacia, 2×20 cm)에 처리하여 void volume에서 용출되는 효소적 활성 fraction No. 8-12를 회수하여 정제를 완료하였다(Fig. 2).

Affinity column chromatography에서 galactose대신에 p-nitrophenyl α-D-galactopyranoside (pNP-Gal)를 처리하여 효소를 유도할 수도 있다. 그러나 본 정제에서는 pNP-Gal 보다는 galactose의 효소 유도능력이 커서 galactose을 처리하였으며, coffee bean 유래의 affinity chromatography에 의한 α-galactosidase의 정제법(Noam *et al.*, 1973)에서는 pNP-Gal로 효소를 유도하였다. 평형화에 사용된 McIlvaine buffer solution(pH 5.0)보다 pH가 높은 6.0으로 최종적으로 column에 과량(120 ml) 용출시킴으로서 단백질 peak를 유도하는 점이 상이하였고, 용출용

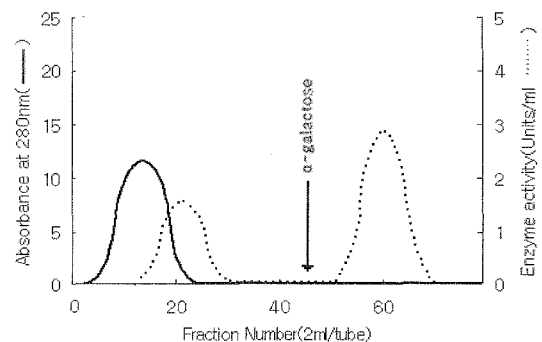


Fig. 1. Purification of α-galactosidase on a column of N-ε-aminocaproyl-α-galactopyranosylamine-Sepharose conjugate.

매(pH 5.0)에서는 pNP-Gal(50 mM)처리시 어떠한 효소도 용출되지 않았다. 박(Park, 1997)에 의해 보고된 *Pichia guilliermondii* 유래 α -galactosidase의 특이성 연구에서 정제법으로서 mannobiose-sepharose의 담체를 조제하여 부분정제에 대해 보고하였으나, 본 연구에서는 gum류에 효소처리에 따른 구성당의 비율 변화 및 증점효과를 비교하기 위해서는 완전정제가 필수적이므로 N- ϵ -aminocaproyl- α -D-galactopyranosylamine 흡착제의 합성과 sepharose에 대한 coupling method에 의한 담체를 일본 독립행정법인 식품종합연구소에서 제공받아 수행하게 되었다.

정제 α -Galactosidase 처리시간에 따른 기질의 점도 변화

효소처리에 의한 guar gum의 점도증가를 측정하기 위해 0.1M sodium acetate buffer 5 mL에 1% guar gum을 녹인 후 40units의 α -galactosidase를 첨가하여 50°C 항온수조에서 반응시키면서 2, 6, 12, 24시간 마다 sampling하였다. Sampling한 반응액은 100°C 끓는물에 5분간 담근 후 상온에서 방냉시켜 gel을 형성하였다. 시간별 sampl을 Brookfield Viscometer(Model DV-II)를 이용하여 측정한 결과 반응시간이 2시간, 6시간, 12시간, 24시간으로 증가할수록 230.2mP·s, 400.5mP·s, 505.3mP·s, 907.2mP·s로 점도가 증가함을 알수 있었으며 특히 24시간 반응시 locust bean gum 증점력의 88.91%로 확인되었다(Fig. 3). 해바라기씨유래 정제효소를 이용하여 측정한 결과에 의하면 반응시간이 2시간일때 865mP·s, 6시간일때 1199mP·s, 12시간일때 294.9 mP·s로 6시간 되었을때 locust bean gum 점도력의 85.3%임이 확인되었다(Park, 1999)

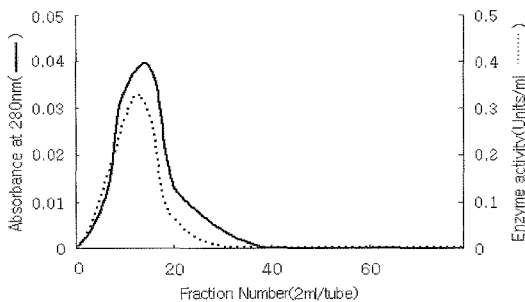


Fig. 2. Chromatography of the α -galactosidase on a column of Sephadex G-25.

가수분해 반응시간별 Mannose/Galactose 비율

효소처리 하지않은 guar gum 및 locust bean gum, 정제 α -galactosidase로 가수분해한 guar gum을 시간별 sampling하여, galactose/mannose 비율을 검토한 결과 2시간 처리시 1:2.0, 6시간 처리시 1:2.2, 12시간 처리시 1:2.8로 당구성 비율이 변화되었으며, 특히 24시간 처리시에는 1:3.2로 locust bean gum 자신의 구성비율인 1:3.3으로 근접하게 변화되는 결과를 나타내었다.(Table 1) 이 결과는 24시간 가수분해 반응에서 locust bean gum이 갖는 당구성 비율로 전환됨에 따라 점도변화도 증가하는 것으로 사료되고 있다.

다른 gum류와의 gelation ability비교

Guar gum에 대한 정제효소의 gelation ability를 Brookfield Viscometer(Model DV-II)를 이용하여 측정하고 guar gum 및 locust bean gum과 비교한 결과 정제 α -galactosidase 5 ml(40units)를 첨가하여 60°C, 24시간 효소처리한 1.0%(w/v) guar gum 5 ml의 유동특성은 locust bean gum과 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 3). Brown copra meal, white copra meal의 copra cake galactomannan의 경우 galactose와 mannose의 비율이 1:10~1:15로 효소처리에 따른 증점효과도 검토하였으나 gel 형성 능력이 크지 않음을 확인할수 있었다(Fig. 4). 그러나 xanthan gum과 guar gum과의 mixture를 측정한 결과 효소처리만 된 copra cake 점도에 비해 3배정도의 증점효과를 나타내었다(Fig. 5). 해바라기씨유래의 정제효소의 경우에도 white copra meal에 대한 효소처리 효과를 검토하였으나 gel형성능력이 없음을 확인할수 있었고, xanthan gum과 guar gum을 혼합하여 점도를 측정한 결과 효소처리된 copra cake 점도에 비해 2배정도의 증점효과를 나타내고 있음이 보고되었다(Park, 1999). 따라서 다른 gum류와의 혼합을 통해 식품산업에서의 고가의 증점제인 locust bean gum

Table 1. Gal / Man ratios of guar gum, guar gum treated with α -galactosidase and locust bean gum.

Galactomannan samples	Galactose / Mannose ratio
guar gum	1 / 1.6
enzyme treated guar gum 2.0hr	1 / 2.0
enzyme treated guar gum 6.0hr	1 / 2.2
enzyme treated guar gum 12.0hr	1 / 2.8
enzyme treated guar gum 24.0hr	1 / 3.2
locust bean gum	1 / 3.3

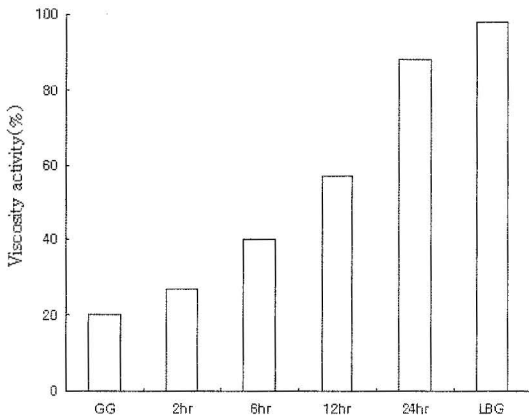


Fig. 3. Gel-promoting ability with the lapse of enzyme treatment. G : guar gum, L : locust bean gum, 2, 6, 12, 24 : time of enzyme treatment to guar gum.

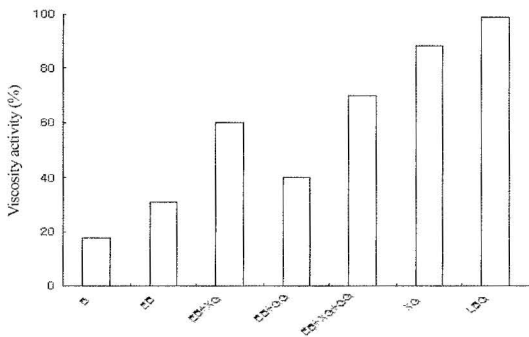


Fig. 4. Gel-promoting ability by the enzyme and xanthan gum treatment to brown copra galactomannan. B : brown copra meal, X : xanthan gum, G : guar gum, L : locust bean gum, EB : enzyme treatment to brown copra meal.

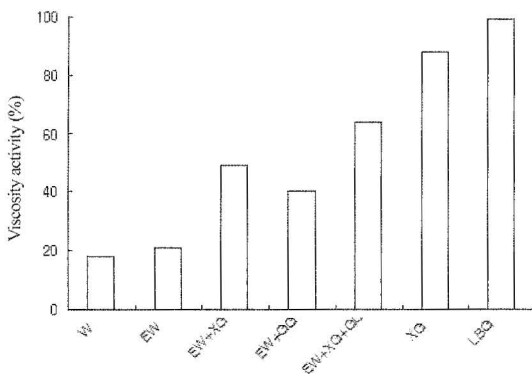


Fig. 5. Gel-promoting ability by the enzyme and xanthan gum treatment to white copra galactomannan. W : white copra meal, X : xanthan gum, G : guar gum, L : locust bean gum, EW : enzyme treatment to white copra meal.

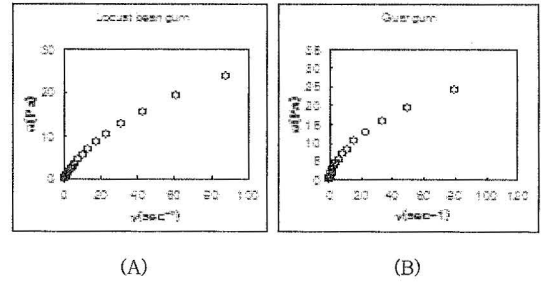


Fig. 6. Gelation change of locust bean gum and guar gum by purified enzyme. A : Gelation change of locust bean gum, B : Gelation change of guar gum by the treatment of purified enzyme.

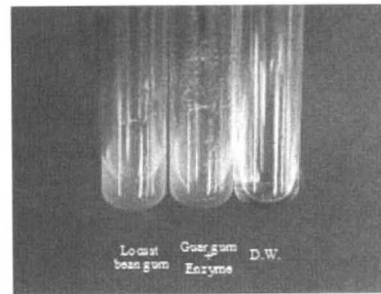


Fig. 7. Gel promoting ability of locust bean gum, enzyme-treated guar gum and distilled water.

대체자원으로서 copra cake의 경제적 기대효과가 있을 것으로 사료된다.

Gum류의 유동성 측정

유동성 측정은 Carri-Med Rheometer(CSL2100, TA Instruments Inc., DE, USA)의 cone and plate system (angle = 2°, diameter = 4.00×10⁻²m)을 사용하여 1000.0 μm의 gap으로 25°C에서 실험하였으며, 전단속도 (shear rate) 0.01~100 s⁻¹의 범위에서 얻은 전단응력 (shear stress)으로 부터 Power law 모델식에 의하여 유동지수(flow behavior index, n), 점조도 지수(consistency index, K)를 구한 결과는 Fig. 6에서 나타내고 있으며 실제적으로 유동특성을 비교하기 위한 사진은 Fig. 7에서 제시하였다.

요 약

N-ε-aminocaproyl-α-D-galactopyranosylamine의 흡착제를 합성하여 sepharose에 coupling하였으며 N-ε-aminocaproyl-α-D-galactopyranosylamine-sepharose를 담체로 하는 affinity chromatography에 의해

Trichoderma reesei 유래 α -galactosidase의 완전정제를 수행하였다. 정제효소의 최적 pH와 온도는 5.0, 60°C이었으며, pH 3~6, 20~60°C범위에서 pH와 온도 안정성을 나타내었다. 정제 α -Galactosidase로 가수분해한 guar gum을 시간별 sampling하여, galactose/mannose 비율을 검토한 결과 2시간 처리시 1:2.0, 6시간 처리시 1:2.2, 12시간 처리시 1:2.8로 당구성 비율이 변화 되었으며, 특히 24시간 처리시에는 1:3.2로 locust bean gum 자신의 구성비율인 1:3.3으로 근접하게 변화되는 결과를 나타내었다. Brown copra meal, white copra meal의 copra cake galactomannan의 경우 galactose와 mannose의 비율이 1:10~1:15로 효소처리에 따른 증점효과도 검토하였으나 gel 형성 능력이 크지 않음을 확인할수 있었다. 그러나 xanthan gum과 guar gum과의 mixture를 측정 한 결과 효소처리만 된 copra cake 점도에 비해 3배정도의 증점효과를 나타내었다.

참고문헌

- Albersheim, P.D. J. Nevins, P. D. English and A. Karr. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* **5**: 340-345.
- 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.
- Beutler, E. and W. Kuhl. 1972. Purification and properties of an α -D-galactoside galactohydrolase from the seeds of *Trifolium repens*. *J. Biol. Chem.* 7195-7200
- Ciucanu, I. and F. Kerek. 1984. *Carbohydrate. Res.* **131**: 209-217.
- Dey, P. M. and J. B. Pridham. 1969. α -Galactosidase from the yeast *Candida javanica*. *J. Bio. Chem.* **113**: 49-55
- Dey, P. M. and J. B. Pridham. 1972. *Advanced in Enzymology.* Academic Press, New York. **36**: 91-130
- Dey, P. M and K. Wallenfels. 1974. Characteric features of an α -Galactosidase from mung beans. *Eur. J. Biochem.* **50**: 107-112
- Ferrero, I., C. Rossi, M. P. Landini and P. P. Puglisi. 1978. Role of the mitochondrial protein synthesis in the catabolite repression of the Petite-negative yeast, *K. lactis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**: 340.
- Hasimoto, H., C. Katayama, M. Goto and S. Kitahata. 1993. Purification and some properties of α -galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404. *Biosci. Biotech. biochem.* **57**: 372
- Kaneko, R., I. Kusakabe, T. Yasui, Y. Y. Sakai and K. Murakami. 1990. Substrate specificity of α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Agric. Bio. Chem.* **54**: 237.
- 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.
- 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.
- 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.
- Noam, H., M F. Harold, and S. Nathan. 1973. Purification of coffee bean α -galactosidase by affinity chromatography. *BBA.* **67157**: 213-221.
- Park, G. G 1999. Development of Economic Gel Promoting Agents in the Food Industry. The Cooperative Research Center of Industry, Academia and Research Institute. **99**: 184.
- 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.
- Petek, F. and T. Dong. 1961. Purification and Properties of an α -Galactosidase from the Coffee Bean. *Enzymologia.* **23**: 133-142.
- Takahashi, R., I. Kusakabe, A. Maekawa, T. Suzuki, and K. Murakami. 1983. Studies on mannanase of *Actinomyces*. *Japan. J. Trop. Agr.* **27**: 140.
- 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.
- Zama, M., I. Kusakabe, and K. Murakami. 1985. Enzymatic preparation of crystalline mannose from copra mannan. *Japan. J. Trop. Agr.* **29**: 221.