

# Galactomannan 이용에 관한 연구

## I. Galactomannan에 대한 *Pichia guilliermondii* 유래 $\alpha$ -Galactosidase의 특이성

박 귀 근

경원대학교 식품생물공학과

### Specificity of *Pichia guilliermondii* $\alpha$ -Galactosidase toward Galactomannans

Gwi-Gun Park

Dept. of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Seongnam 461-701, Korea

#### Abstract

$\alpha$ -Galactosidase was partially purified from the culture filtrate of *Pichia guilliermondii* by Mannobiose-Sephrose affinity column chromatography. The galactosidase exhibited maximum activity at pH 4.5 and 40°C, and was stable in the pH and temperature ranges of 4 to 5.5 and 30 to 60°C, respectively. The enzyme was inhibited by  $Hg^{2+}$  and  $Ag^{2+}$ . 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  $Gal^3Man_3(6^3-\alpha-galactosyl-1,4-mannotriose)$  to galactose and mannotriose. On the contrary, it could not hydrolyze  $Gal^3Man_4(6^3-\alpha-galactosyl-1,4-\beta-mannotetraose)$ .

**Key words:**  $\alpha$ -galactosidase, *Pichia guilliermondii*, galactomannan

#### 서 론

Copra galactomannan은 mannose 함량이 풍부한 동시에 순도가 높은 mannan 자원으로 알려져 있으며 자연계에서는 극히 드물다. 현재까지 본 연구실에서는 미생물 효소를 이용하여 mannan의 유효 이용법에 관한 연구 및 manno oligosaccharides의 효율적인 조제방법이 연구되어 왔다(1-5). 또한 이의 조제 과정에 관여하는 효소계의 생화학적 연구도 진행되고 있다(6-8).

고중합도의 manno oligomer의 조제를 행하기 위해서는 galactomanno oligosaccharide 및 galactomannan에  $\alpha$ -galactosidase를 작용하여 galactose를 절단하는 것이 절대 필수적이며, galactomannan의 완전 가수분해에 관여하는 3종류의 효소 즉  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase 및  $\alpha$ -galactosidase의 galactomanno-oligosaccharides 가수분해산물의 동정에 대한 작용 기작이 불명료하여 해결해야 할 과제로 고려되고 있으며, Yeasts(9)에 의해 보고된 raffinose, melibiose, galactose를 자화하는 효소의 성질 중 특히 galactose(10), melibiose(11,12), raffinose(12), lactose(11)를 탄소원으로 하여  $\alpha$ -galactosidase를 유도 가능한 것으로 알려져 본 연구에

서는 식품소재 개발 및 응용에 관한 galactomannan 이용개발에 대한 효모 *Pichia guilliermondii* 유래  $\alpha$ -galactosidase의 galactosyl oligosaccharides에 대한 기질 특이성을 밝히는 것을 주요 목적으로 하고 있다.

#### 재료 및 방법

##### 사용 균주 및 기질

효모균주는 일본 쓰꾸바대학 식품생화학 연구실로부터 균주를 분양받아 실험에 사용하였고, 기질로서는 Raffinose(Gal  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 6Glc  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 2  $\beta$  Fru, Yakuri pure chemicals/Osaka Japan), Melibiose(Gal  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 6Glc, Yakuri pure chemicals/Osaka Japan),  $Gal^3Man_3(6^3-\alpha-Galactosyl-1,4-\beta-mannotriose)$ ,  $Gal^3Man_4(6^3-\alpha-Galactosyl-1,4-\beta-mannotetraose)$ 를 사용하였다.

##### 조효소액의 생산

500ml용 진탕배양 flask에 Table 1에서 나타낸 배지 조성을 함유하는 액체배지 100ml를 분주하고 autoclave에서 121°C, 15분간 가압멸균하여 냉각하고 *Pichia*

Table 1. Composition of media A and B

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

*guilliermondii*를 1백금이 식균하여 진탕배양기에서 30°C, 150rpm, 72시간 배양하였다. 배양 중 4~8시간 간격으로 효소액을 sampling하여 pH와 활성을 측정하였다. 배양이 끝난 효소액은 10,000rpm, 20분간 냉동원심분리기를 이용하여 상층액과 균체를 분리하고 균체의 효소를 조효소액으로 사용하였다.

#### 효소활성의 측정

$\alpha$ -Galactosidase의 활성측정은 金子의 방법(13)에 따라 행하였다. 시험관(1.2×10cm)에 PNP-Gal(p-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-Galactopyranoside, Sigma) 2mM 수용액 500 $\mu$ l 및 McIlvaine buffer solution(pH 4.5, 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 0.1mole citric acid의 혼합용액) 400 $\mu$ l을 넣어 교반하고 40°C, 3분간 water bath상에서 예열하였다. McIlvanine buffer solution으로 적당히 희석한 효소액 100 $\mu$ l을 가하여 10분간 반응한 후 0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 1ml을 가하여 반응을 종결하고 408nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 이미 작성해둔 검량선으로부터 유리된 p-nitrophenol(pNP)의 양을 산출하였다.  $\beta$ -Mannosidase 활성 측정의 경우에도 반응온도 40°C에서 동일한 방법에 의해 활성 측정을 하였다.

pNP 용액의 농도와 408nm에 있어서의 흡광도([A-408])의 관계는 pH 4.5에서 [A408]×0.1143=pNP(mM/2ml)(단, [A408]<0.6)였다. 또한  $\alpha$ -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 이

하가 되도록 효소액을 희석하여 활성 측정을 하였다. pH 4.5 40°C( $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -mannosidase)에서 1분간에 1 $\mu$ M의 pNP를 pNP-Gal로부터 유리시키는 효소량을 1unit로 정의하였다. 반응시간과 활성 측정을 위해 사용한 효소의 양은 100 $\mu$ l이므로 효소액을 D배 희석하여 활성을 측정하는 경우에는 [A408]=A라고 하면, 그 효소농도(unit/ml)는 ([A]-[B])×[D]×0.1143. ([B]는 미리 0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 가하여 반응종결시의 [A408])이다.

#### $\alpha$ -Galactosidase의 부분정제

Affinity gel 조제를 위해 Sepharose 4B 75ml를 증류수로 충분히 세척하고 2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 75ml와 혼합하여 천천히 교반한다. 또한 25g CNBr을 CH<sub>3</sub>CN에 용해하여 3분간 교반하고 미리 냉각한 0.1M NaHCO<sub>3</sub>로 세척하여 활성화 Sepharose를 얻었다. 6g NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>를 15ml 증류수에 용해하고 6N HCl로 pH 10.0으로 최종 조정된 30ml를 75ml Sepharose에 가하여 교반하며 반응시켰다. 2.5liter 0.5M NaCl과 1.5liter 증류수로 세척하고 hexamethylene-diamine Sepharose를 얻었다.

75ml hexamethylenediamine Sepharose와 2.3g mannobiose를 함유하는 0.2M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 75ml와 2.3g NaCNBH<sub>3</sub>와 혼합하여 교반하면서 실온에서 50시간 반응시켰다. 이 반응은 2회 반복하였다. 3liter 이상의 증류수로 세척하고 mannobiose의 환원말단이 특이적으로 Sepharose에 결합한 mannobiose를 최종 얻었다.

$\beta$ -Mannosidase의 존재가 기질특이성 연구에 영향을 미치는 까닭에 다음과 같이 부분정제를 하였다.

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

#### 효소화학적 성질

*Pichia guilliermondii*가 생산하는 부분정제 효소를 이용하여 최적 pH와 온도, pH 안정성과 온도 안정성, 금속이온의 영향 등의 성질을 규명하였다.

최적 pH는 투석한 효소액을 이용하여 40°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 2~8의 McIlvaine buffer를 이용하여 40°C에서 1시간 preincubation시킨

후 효소의 온도를 일정하게 유지하기 위해 ice box내에 방치하며 pH 4.5, 40°C에서 활성을 측정하였고, 온도 안정성에서는 효소액을 최적 pH의 buffer solution과 혼합하여 20~80°C, 1시간 preincubation시킨 후 효소의 온도를 일정하게 유지하기 위해 ice box내에 방치하며 pH 4.5, 40°C에서 활성을 측정하였다. 금속이온의 영향은 Table 2에서 열거한 금속이온을 처리시 농도가 1mM이 되도록 투석효소액에 혼합하고 20°C, 1시간 처리 후 pH 4.5, 40°C에서 잔존 활성을 측정하였다.

#### 박층 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography)

TLC는 Merck TLC plate Silicagel 60에 sample을 spotting 후 n-propanol : methanol : water(5 : 2 : 3, v/v)의 전개용매에서 행하였다. 전개 후 C-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 분무하고 140°C에서 약 5분간 가열하여 당을 검출하였다.

### 결과 및 고찰

#### 효모 $\alpha$ -galactosidase의 생산

현재까지 8종의 효모에 대한  $\alpha$ -galactosidase(14-20)가 보고되어 있으며, 특히 Barnett 등(9)에 의하면 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  $\alpha$ -galactosidase screening 실험을 행하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 *Pichia guilliermondii*, *Debarymyces nephalensis*, *Suchaniomyces occidentalis var. occidentalis*의 3주가 배지 A와 B에서  $\alpha$ -ga-

lactosidase를 생산하였다. 배지 A는 galactose를 탄소원으로 하여 *D. nephalensis*가 높은 galactosidase 활성을 유도한 반면 배지 B는 melibiose, lactose, raffinose를 탄소원으로 하여 본 실험에서 사용한 *P. guilliermondii*를 포함하여 *S. occidentalis var. occidentalis*가 높은 활성을 유도하였다. 배지 A의 galactose 대신에 melibiose를 탄소원으로 하여 효소유도실험을 하였으나 melibiose의 단일 탄소원보다는 배지 B와 같은 탄소원이 효모에 적합한 것으로 시사되었다.

Fig. 1은 배양시간별 효소활성 및 pH의 변화를 보여주고 있는데, 배양시간 40시간 이후부터 효소생산의 증가를 보이고 있으며 72시간에서 최대 활성을 나타내고 있다. 한편 pH변화는 배양초기의 4.8에서 72시간의 배양말기에서는 pH 7.8의 변화를 나타내었다. 72시간 배양 후 균체는 Buchner funnel을 이용한 Toyo-roshi No. 2 여과지로 제거하였으며, 상층액을 투석하여 조효소액으로 사용하였다.

#### Galactosidase의 부분정제

*Pichia guilliermondii*가 생산하는 조효소액을 투석하여 효소액(24.3units/18ml)을 Affinity column chromatography를 행하였다. Column에 처리하기 전 G/M(galactosidase/mannosidase)는 749이었으나, 용출한 Fraction No.50~52의 G/M은 2480이었으며 이를 효소 반응에 사용하였는데, Chromatogram의 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 한편, *D. nephalensis*와 *S. occidentalis var. occidentalis*에서는  $\beta$ -mannosidase를 제거하기 위하여 mannobiose-Sepharose column에 의해 정제가 진행 중에 있으며, *P. guilliermondii*의 경우  $\beta$ -man-

Table 2. Effect of various compounds on the galactosidase from *Pichia guilliermondii*

Compound	Relative activity(%)
None	100
MnCl <sub>2</sub>	91
ZnCl <sub>2</sub>	92
CoCl <sub>2</sub>	95
HgCl <sub>2</sub>	52
BaCl <sub>2</sub>	94
CaCl <sub>2</sub>	110
SnCl <sub>2</sub>	102
AgNO <sub>3</sub>	56
NiCl <sub>2</sub>	105
AlCl <sub>2</sub>	98
CdCl <sub>2</sub>	89
FeCl <sub>2</sub>	82
CuSO <sub>4</sub>	96
EDTA	105

Concentration of compounds,  $1.0 \times 10^{-3}M$

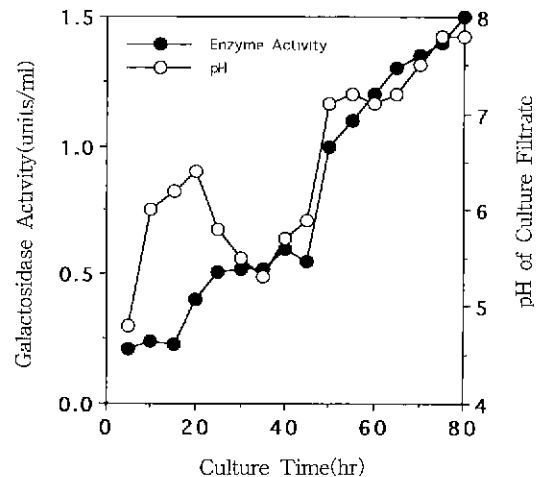


Fig. 1. Time course of the production of galactosidase from *Pichia guilliermondii*.

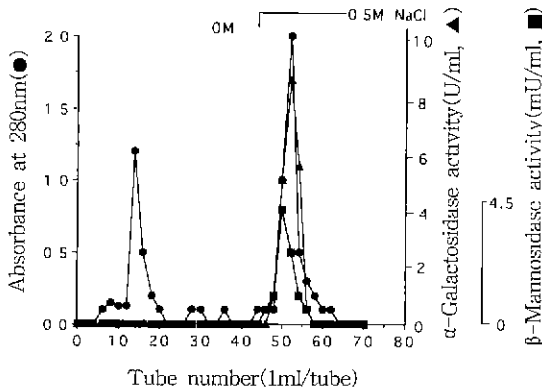


Fig. 2. Separation of enzyme of *Pichia guilliermondii* on a mannobiose-sepharose column.

nosidase와  $\alpha$ -galactosidase의 분리가 불충분하였으나 결과적으로 G/M의 비가 기질특이성 실험에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었으며,  $\beta$ -mannosidase와  $\alpha$ -galactosidase의 완전 정제는 앞으로의 과제로 남아있다.

Galactosidase 활성에 미치는 pH와 온도의 영향

효소에 의한 pNP-Gal 분해에 미치는 pH와 온도의 영향을 검토하였다. Fig. 3은 효소반응에 미치는 pH의 영향, Fig. 4는 효소반응에 미치는 온도의 영향, Fig. 5는 효소의 pH 안정성, Fig. 6은 효소의 온도 안정성을 각각 나타내고 있다.

효소에 의한 pNP-Gal 분해의 최적 pH는 4.5, 최적 온도는 40°C이며, pH 4~5.5에서 100%의 잔존 활성을 나

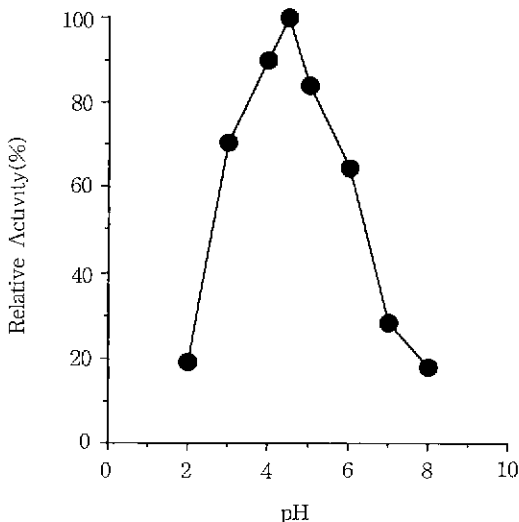


Fig. 3. Effect of pH on galactosidase activity of *Pichia guilliermondii*.

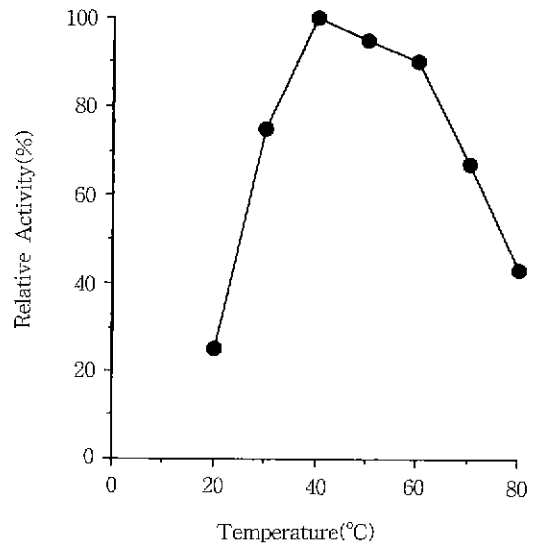


Fig. 4. Effect of temperature on galactosidase activity of *Pichia guilliermondii*.

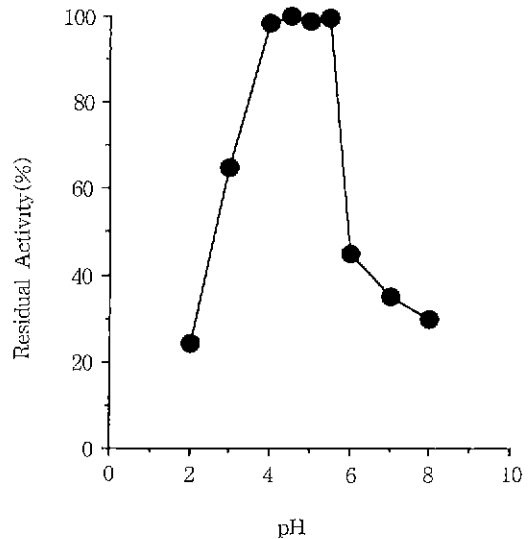


Fig. 5. pH stability of *Pichia guilliermondii* galactosidase.

타면 반면 pH 8에서는 30%로 급격히 감소하였다. 온도 안정성에서는 30~60°C에서 100%의 잔존 활성을 나타내었고 70°C 이상에서는 20% 이하의 잔존 활성을 나타내었다. *Penicillium purpurogenum*(14) 유래  $\alpha$ -galactosidase의 최적 pH와 온도가 pH 4.5, 55°C이며 pH 2~5의 범위에서 안정성을 갖고 있는 결과와 비교해 볼 때, *P. guilliermondii*는 *P. purpurogenum* 유래의 곰팡이 효소와 동일한 최적 pH를 나타내었으며, 좁은 pH 안정

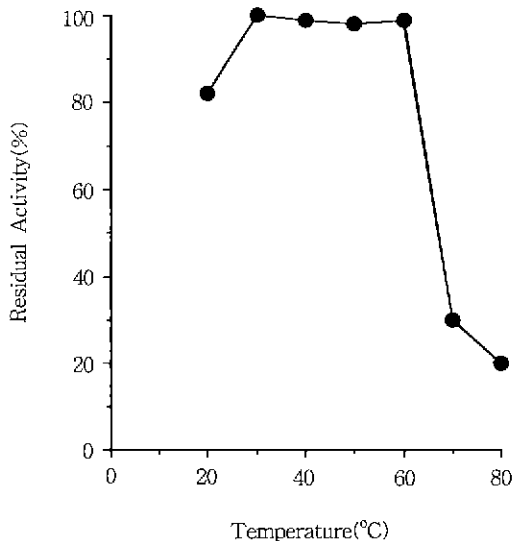


Fig. 6. Thermal stability of *Pichia guilliermondii* galactosidase.

성 범위를 갖고 있는 것으로 검토되었다.

#### 금속이온의 영향

Table 2에서 나타낸 것과 같이 *Pichia guilliermondii*가 생산하는  $\alpha$ -galactosidase는  $Ag^{2+}$ 와  $Hg^{2+}$ 에 의해 각각 44%와 48% 저해가 되었으며 그 이외의 이온에 의해서는 큰 영향을 받지 않았다. 한편 *P. purpurogenum*(14) 유래 효소의 경우도 *P. guilliermondii*와 같이  $Ag^{2+}$ 와  $Hg^{2+}$ 에 의해 95%와 90% 저해되었으며 다른 이온에 의해서도 영향을 받지 않는 공통점을 나타내었다.

#### $\alpha$ -Galactosidase의 기질특이성

*P. guilliermondii*가 생산하는 효소를 다음과 같은 galactosyloligosaccharides에 대하여 가수분해 반응을 진행하였다. Melibiose, raffinose  $Gal^3Man_3$ ,  $Gal^3Man_4$  각각 1%를 함유하는 당용액 1ml에 효소액 1ml를 가하여 60°C에서 12시간 반응을 진행하였고, 12시간 반응액을 5분간 비등에 의해 반응을 정지시킨 후 반응액의 당 조성을 TLC에 의해 분석하였다. 이 결과에서 12시간 반응 후 melibiose, raffinose,  $Gal^3Man_3$ 을 완전히 가수분해하여 각각 galactose와 glucose(Fig. 7), galactose와 sucrose(Fig. 8), galactose와 mannose(Fig. 9)로 분해한 반면에  $Gal^3Man_4$ 에 대해서는 galactose를 유리시키지 못하였다(Fig. 10). 현재까지 보고된 곰팡이 유래 galactosidase(10,11)의 기질특이성을 Table 3에 나타내었다.  $Gal^3Man_3$ 을 기질로 사용했을 때 *Aspergillus*



Fig. 7. Action of *Pichia guilliermondii* galactosidase on melibiose.

A: Glucose B: Galactose  
C: Melibiose E: Enzymatic hydrolysate



Fig. 8. Action of *Pichia guilliermondii* galactosidase on raffinose.

A: Sucrose B: Galactose  
C: Raffinose E: Enzymatic hydrolysate

*niger* 5-16을 제외하고는 모두 galactose를 유리시키는 공통점이 있었고  $Gal^3Man_4$ 에 대해서는 *Aspergillus niger* 5-16과 *Penicillium purpurogenum*은 galactose를 유리시킨 반면 *Mortierella vinacea*와 본 실험에서 사용한 *Pichia guilliermondii*는 galactose를 유리시키지 못하는 공통점이 확인되었다.



Fig. 9. Action of *Pichia guilliermondii* galactosidase on Gal<sup>3</sup>Man<sub>3</sub>.  
 A: Mannose to mannopentaose from top to bottom  
 B: Galactose  
 C: Gal<sup>3</sup>Man<sub>3</sub>(6<sup>3</sup>- $\alpha$ -galactosyl-1,4-mannotriose)  
 E: Enzymatic hydrolysate



Fig. 10. Action of *Pichia guilliermondii* galactosidase on Gal<sup>3</sup>Man<sub>4</sub>.  
 A: Mannose to mannopentaose from top to bottom  
 B: Galactose  
 C: Gal<sup>3</sup>Man<sub>4</sub>(6<sup>3</sup>- $\alpha$ -galactosyl-1,4-mannotetraose)  
 E: Enzymatic hydrolysate

요 약

*Pichia guilliermondii*가 생산하는  $\alpha$ -galactosidase를 Mannobiose-Sepharose affinity column chromatography에 의해 부분정제하였다. 효소의 최적 pH와 최적

Table 3. Substrate specificities of fungal and yeast galactosidase toward galactomanno-oligosaccharides

Galactosidase source	Gal <sup>3</sup> Man <sub>3</sub>	Gal <sup>3</sup> Man <sub>4</sub>
<i>Mortierella vinacea</i>	Gal <sup>1</sup> -M-M-M	Gal → M-M-M-M
<i>Aspergillus niger</i> 5-16	Gal <sup>1</sup> -M-M-M	Gal → M-M-M-M
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Gal <sup>1</sup> -M-M-M	Gal → M-M-M-M
<i>Pichia guilliermondii</i>	Gal <sup>1</sup> -M-M-M	Gal → M-M-M-M

→, linkages rapidly hydrolyzed, →, linkages not hydrolyzed  
 M-,  $\beta$ -1,4 linked mannosyl residues; Gal,  $\alpha$ -1,6 linked galactosyl residues

온도는 각각 4.5, 40°C이었으며, pH 4~5.5, 30~60°C의 범위에서 pH 및 온도 안정성을 나타내었다. 효소활성은 Hg<sup>2+</sup> 및 Ag<sup>2+</sup>에 의해 저해되었으나 다른 금속에 대해서는 영향을 받지 않았다. 본 효소는 Gal<sup>3</sup>Man<sub>4</sub>(6<sup>3</sup>- $\alpha$ -galactosyl-1,4- $\beta$ -mannotetraose)에 대해 galactose를 유리하지 못하였으나, melibiose, raffinose 및 Gal<sup>3</sup>Man<sub>3</sub>(6<sup>3</sup>- $\alpha$ -galactosyl-1,4-mannotriose)에 대해서는 galactose를 유리하는 특이성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 한국학술진흥재단의 국제협력 연구과제 연구비에 의해 수행된 연구의 일부로서 이에 감사드립니다. 또한 균주분양 및 기질(Gal<sup>3</sup>Man<sub>3</sub>, Gal<sup>3</sup>Man<sub>4</sub>)을 제공해주신 일본 쓰쿠바대학 식품생화학 연구실 Kusakabe Isao 교수와 일본 식품종합연구소 분자정보해석연구실 Kobayashi Hideyuki 박사에게도 감사드립니다.

문 헌

- 1 Zama, M., Kusakabe, I. and Murakami, K. ' Enzymatic preparation of crystalline mannose from copra mannan. *Japan. J. Trop Agr.*, 29, 221(1985)
- 2 Kusakabe, I., Takahashi, R., Murakami, K., Maekawa, A. and Suzuki, T. ' Preparation of crystalline  $\beta$ -1,4-mannooligosaccharides from copra mannan by a mannanase from *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2391(1983)
- 3 Kusakabe, I., Takahashi, R., Maruyama, K., Murakami, K., Maekawa, A. and Suzuki, T. : Studies on the mannanase of *Streptomyces*. *Japan. J. Trop. Agr.*, 29, 167(1985)

4. Kusakabe, I., Zama, M., Park, G. G., Tsubaki, K. and Murakami, K. : Preparation of  $\beta$ -1,4-mannobiose from *Penicillium purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2825(1987)
5. Park, G. G., Kusakabe, I., Yasui, T. and Murakami, K. : A new method for the preparation of  $\beta$ -1,4-mannotriose from brown copra meal using the crude enzyme from *Penicillium purpurogenum*. *Japan. J. Trop. Agr.*, **32**, 208(1988)
6. Takahashi, R., Kusakabe, I., Maekawa, A., Suzuki, T. and Murakami, K. : Studies on mannanase of *Actinomyces*. *Japan. J. Trop. Agr.*, **27**, 140(1983)
7. Takahashi, R., Kusakabe, I., Kobatashi, H., Murakami, K., Maekawa, A. and Suzuki, T. : Purification and some properties of  $\beta$ -mannanase from *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2189(1984)
8. Park, G. G., Kusakabe, I., Komatsu, Y., Kobayashi, H., Yasui, T. and Murakami, K. : Purification and some properties of  $\beta$ -mannanase from *Penicillium purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2709(1987)
9. Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yeasts, Y. D. : Characteristics and Identification. First ed., Cambridge University Press, Cambridge(1983)
10. Lazo, P. S., Ochoa, A. G. and Santiago, G. :  $\alpha$ -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur. J. Biochem.*, **77**, 375(1977)
11. Church, F. C. and Meyers, S. P. :  $\alpha$ -Galactosidase from *Pichia guilliermondii*. *Mycologia*, **72**, 279(1980)
12. Cavazzoni, V., Adami, A. and Craveri, R. :  $\alpha$ -Galactosidase from the Yeast *Candida Javanica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 555(1987)
13. 金子 令治 : Galactomannan의 酸素加水分解에 關する 研究. Tsukuba Univ. 食品生化學研究室 平成2年度 修士論文(1991)
14. Park, G. G., Lee, S. Y., Park, B. K., Ham, S. S. and Lee, J. H. : Characteristic features of an  $\alpha$ -galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. *J. Microbiol. Biotech.*, **1**, 90(1991)
15. Kaneko, R., Kusakabe, I., Yasui, T., Sakai, Y. and Murakami, K. : Substrate specificity of  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinecea*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 237(1990)
16. Kaneko, R., Kusakabe, I., Ida, E. and Murakami, K. : Substrate specificity of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger* 5-16. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 109(1991)
17. Dey, P. M. and Pridham : Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidase. *Adv. Enzymol.*, **36**, 91(1972)
18. Ferrero, I., Rossi, C., Landini, M. P. and Puglisi, P. P. : Role of the mitochondrial protein synthesis in the catabolite repression of the Petite-negative yeast, *K. lactis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 340(1978)
19. Marconi, W., Pansolli, P. and Zaffaroni, P. : Hydrolysis of raffinose by immobilized cells of *Saccharomyces oleaceus*. *J. Mol. Catal.*, **43**, 281(1988)
20. Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M. and Kitahata, S. : Purification and some properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 372(1993)

(1997년 7월 4일 접수)