

## 토양으로부터 *Cryptococcus* sp. CS-2의 분리 및 균주가 분비하는 Polygalacturonase의 특성에 관한 연구

강희경 · 문명님 · 임채영 · 양영기\*  
조선대학교 자연과학대학 생물과학부

제주도 밀감 과수원의 토양으로부터 polygalacturonase 고생산 효모를 분리하였다. 분리된 strain CS-2의 생리화학적 실험을 수행한 결과 분리균주는 Diazonium blue B(DBB) color test와 urease test에서 양성반응, acetic acid, citrate acid 생성 시험, gelatin 분해시험, fat 분해시험에서는 음성반응을 나타냈고, 탄소원의 조사에서 galactose를 탄소원으로 이용할 수 없었고, 질소원은 모두 이용할 수 없었다. 또한 30 °C에서는 성장하는 반면, 35 °C 이상에서는 성장을 하지 못하였고 50% 이상의 glucose 농도, 0.01% cyclohexamide 그리고 1% acetic acid에서 성장을 하지 못하였다. 현미경을 이용한 형태학적 관찰 결과, 크기는 1.3×2.9 μm인 타원형으로 관찰되었다. multiple budding을 하며 ascospore는 존재하는 반면, pseudomycelium과 true mycelium은 존재하지 않았다. 이와 같은 결과를 종합하여 *Cryptococcus*속의 특징과 유사함을 알 수 있었다(*Cryptococcus* sp. CS-2라 명명). 분리된 *Cryptococcus* sp. CS-2의 polygalacturonase는 유도적으로 합성되어 catabolic repression에 의해 조절됨을 알 수 있었으며, 3일 배양시 가장 높은 활성도를 나타내었으며, 고유활성도는 2.50~2.55 units/mg으로 나타났다. 이러한 polygalacturonase를 SDS-PAGE, activity staining 그리고 단일 탄소원에 따른 단백질 양상의 변화를 비교하여 분자량 측정된 결과 약 46 KDa으로 나타났다.

KEY WORDS □ *Cryptococcus* sp. CS-2, identification, polygalacturonase

식물세포벽은 cellulose, hemicellulose 등의 섬유질 외에 middle lamella와 primary wall 사이에 pectin이란 탄수화물층을 공통적으로 가지고 있다. 이 pectin질은 C<sub>6</sub>위치에 methyl 잔기로 에스테르화된 D-polygalacturonic acid들을 포함하는 D-galacturonic acid의 α-1,4 결합의 골격을 가지는 heteropolysaccharide로서, 과육을 구성하는 주성분이고, 강한 gel 형성능을 가진다. Pectin질의 이러한 특성 때문에 화장품제조, 의약품제조 등 공업적 이용성이 매우 높은 것으로 알려져 있다(14).

이러한 pectin질을 분해하는 효소를 pectinase라 하며 주로 과즙 채취, 여과촉진제, 과즙의 혼탁제거제등 주로 식품공업에 사용하기 위해 생산(7)되었고, 근래에는 식품공업 외에도 olive oil의 제조공정 등의 식품가공 뿐만 아니라, 목재가공에도 응용(4)되고 있다. 현재까지 알려진 pectinase는 메틸화된 polygalacturonic acid(PGA) 사이의 당결합(glucosidic linkage)을 메틸에스터 잔기가 있는 쪽으로 절단하는 pectin lyase(PNL; EC 4.2.2.10), 탈에스테르화된 polygalacturonic acid에서 유리 카르복실 잔기(free carboxyl group) 방향의 결합을 절단하는 pectate lyase(PL; EC 4.2.2.2), 전혀 에스테르화 되지 않는 polygalacturonic acid(PGA)의 유리 카르복실 잔기쪽 결합을 절단하는 polygalacturonase(PG; EC 3.2.1.15), 메틸화된 pectin을 에스테르화 하는 pectin esterase(PE; EC 3.1.1.11) 등(16)으로 나누어진다.

이 중에서 polygalacturonase는 식물 세포벽의 주요 성분인 pectin을 분해하고, 몇몇 식물병원균(phathogen)과 상호작용을

하며 부패에 관여하는 미생물에 많이 존재하는 것으로 알려져 있다. 최근 식품, 의학산업에서의 polygalacturonase 생산(14), 식물세포의 protoplast 생산(6), 식물성 식품소재의 조제를 위한 단세포화(7) 등에 응용성을 가진다고 보고되어 왔으나 국내에서는 그 생산성이 미미한 실정이다.

Polygalacturonase는 많은 미생물에 있어서 세포의 효소로 분비되는데 현재까지 알려진 polygalacturonase 고생산 균주는 세균류, 균류, 효모 등에서 알려져 있으며, 생성에 관한 연구도 여러 균주에서 확인되었다. 그리고, polygalacturonase 효소 단백질의 특성에 관한 연구로는 *Aspergillus* 속에서 다량 연구되어 왔다. 한편, 효모에 있어서 polygalacturonase에 관한 연구는 *S. cerevisiae*에서 exopolygalacturonase와 pectin methyl esterase 및 pectate lyase의 활성을 조사(2)하였다. 이러한 균주들은 polygalacturonase가 사상균류에서 세포의 효소가 분비될 경우 거의 복합효소계로써 분비되어 특정 단일효소의 생산에는 어려움이 있으나, 효모의 경우 단일효소의 분비체계가 가능하므로 추후 host-vector system의 구축과 진핵세포가 분비효소의 유전자 특성과 발현의 기초자료가 될 수 있을 것으로 생각되며, 아울러, polygalacturonase 우수 생산균 육종이 효모에서도 가능하며 공업적 이용 등 효과적인 기초연구를 수행할 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 polygalacturonase에 대한 연구는 세균과 사상균류의 경우에 이루어져 있으며, 효모에서는 그 연구가 극히 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 이러한 다양한 응용성을 가지고 있는 polygalacturonase를 다량 분비하는 *Cryptococcus* spp. CS-2를 선택적으로 분리·동정하였고, 효모의 배양조건 및 polygalacturonase 유도조건을 조사한 후, 조효소 용액을 제조하고

\*To whom correspondence should be addressed  
Tel : 062-230-6663, Fax : 062-230-6619  
E-mail : YGYang@mail.chosun.ac.kr

농축, 분리하여 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 분리 및 동정

Polygalacturonase 우수 생산균을 분리하기 위하여 제주도 북제주군 애월읍에 위치한 털감 괴수원의 토양을 채취하여 분리용 시료로 사용하였다. 토양 시료를 멸균증류수로 희석한 상등액을 YM 배지(dextrose 10 g, peptone 5 g, Bacto yeast extract 3 g, Bacto malt extract 3 g/l)에 접종하여 30 °C에서 허룻밤 배양한 후, 상등액을 YM 고체배지에 도말하고 30 °C에서 3~4일간 배양하였다. 그리하여 자란 colony들을 pectinase 유도배지(pectin 10 g, Yeast extract 3 g, ammonium sulfate 2.5 g, sodium chloride 2.5 g, magnesium sulfate 1 g, potassium phosphate, monobasic 1 g, ferric chloride 0.5 g, zinc chloride 0.5 g/l, pH 8.0)에 picking하고 30 °C에서 6일 배양하였다. 그런 다음 Congo red indicator solution을 첨가하고, 다시 1M NaCl을 부어 충분히 적신 다음 yellow halo zone이 크게 나타나 활성이 좋은 균들을 1차 선발하였다. 그리고 나서 polygalacturonase 유도배지에 replica하여 30 °C에서 10일 배양하고 1N HCl을 첨가하여 clear zone이 크게 나타나 활성이 좋은 균들을 2차 선발하였다. 여기서 선발된 균주들을 액체배양 후 배양여액의 효소활성을 측정하여 polygalacturonase 활성이 강한 효모를 최종 선발하고 이후 실험에 이용되었다. Polygalacturonase 생성이 우수한 효모의 동정은 형태학적, 배양학적, 생리생화적 특성을 조사하여 The yeast a taxonomic study(12)와 Yeast characteristics & identification(1)에 준하여 동정하였다.

### 배양 단계별 단백질의 양상변화

분리균주를 0.85% NaCl 용액으로 세척하여 배지 성분을 없앤 후  $1 \times 10^7$  cells/ml이 되도록 YM 배지에 접종시켜 30 °C에서 1일부터 6일간 배양하면서 관찰하였다. 이 때 균체의 성장은 Spectrophotometer를 사용하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

### 탄소원에 따른 효소의 유도효과

탄소원에 따른 polygalacturonase 유도효과를 알아보기 위해 기질이 되는 탄소원으로 polygalacturonic acid, pectin, glucose, galactose, glycerol를 각각 1%씩 첨가된 배지에 30 °C에서 3일간 배양하여 유도된 polygalacturonase의 활성을 측정하였다.

### 조효소 용액의 제조

분리균주를 polygalacturonase 유도배지에서 30 °C, 3일간 배양하여 배양여액을 얻었다. 이 배양액을 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액에 50 mM calcium chloride를 첨가하고 얼음속에서 1시간 방치한 다음 원심분리(3,000 rpm, 5 min)하여 분해되지 않은 polygalacturonic acid를 제거하고 조효소 용액으로 이용하였다. 조효소 용액의 농축은 -20 °C에서 보관된 methanol을 4 °C에서 3.12 ml/min의 속도로 첨가

하고 -20 °C에서 12시간 방치한 후, 원심분리(12,000 rpm, 20 min)하고 1/10로 농축하여 사용(32)하였다.

### Polygalacturonase 활성 측정

Polygalacturonase 활성 측정은 Sakai 등의 방법(13)에 따라 polygalacturonic acid 10 mg과 50 µg/ml bovine serum albumin(BSA)을 함유한 40 µmol acetate buffer(pH 5.0) 2 ml을 혼합하여 37 °C, 10분간 방치한 후 0.5 ml의 조효소 용액을 첨가하여 37 °C, 30분간 반응시켰다. Control blank는 열처리하여 활성을 없앤 조효소 용액을 사용하였다. 반응이 끝난 후에 얼음에 방치하여 반응을 중지시키고 Toyo No. 2 filter paper를 이용하여 여과한 여과액 0.5 ml을 취한 다음 32N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 ml, 0.2% carbazole을 함유한 ethanol 용액 0.5 ml을 각각 첨가하여 80 °C, 20분간 열처리하여 실온에서 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성도 1unit는 37 °C, 30분간 반응혼합액의 ml당 1 µmol의 D-galacturonic acid를 유리시키는 효소의 양으로 정의하였다.

### 단백질 함량 측정

단백질 정량은 Lowry 방법(8)에 준하여 행하였으며, 표준 정량곡선을 작성하기 위해서 BSA(Sigma)를 사용하였다.

### 조효소 단백질의 전기영동 양상 분석

전기영동 양상의 분석을 위한 SDS-PAGE는 Laemmli 방법(5)에 의거하여 행하였다. 분자량 측정을 위한 표준 marker protein으로는 β-galactosidase(116 KDa), rabbit muscle phosphorylase b(97 KDa), bovine serum albumin(66 KDa), egg albumin(45 KDa), bovine erythrocytes carbonic anhydrase(29 KDa)를 사용하였다.

### 단일 탄소원에 따른 단백질 양상의 변화

Glucose를 단일 탄소원으로 하여 배양할 경우 catabolite repression이 있으므로 효모균체를 glycerol과 polygalacturonic acid를 각각 단일 탄소원으로 하는 최소배지에서 3일간 배양하여 배양여액을 만들어 methanol 침전법을 이용하여 농축한 후, SDS-PAGE를 행하여 이종의 탄소원에 따라 유도된 단백질 양상을 비교하였다.

### 활성염색

Polygalacturonase의 활성염색은 Thomas 방법(15)에 의거하여 행하였다. 즉, 0.67 mg/ml polygalacturonic acid와 100 µg/ml fibrinogen을 함유한 12% acrylamide 겔로 SDS-PAGE를 4 °C에서 행한 후, 20% isopropanol이 들어있는 0.01 M Tris-HCl buffer(pH 8.3)로 행구어 SDS를 완전히 제거하였다. 그리고, 0.01 M sodium acetate(pH 4.5)로 행구어 준 다음 0.05 M sodium acetate, 0.20 M sodium chloride (pH 4.5) 용액에 담겨 16시간 동안 상온에서 배양하였다. 배양이 끝난 후, Tris-HCl(pH 8.3)용액으로 행구어주고, 0.1% Toluidine Blue O로 염색하고 Tris-HCl 용액으로 탈색시켜 확인하였다. 활성염색된 부위는 Native gel에서 상응하는 부분을 도려내어 electroelution하여 단백질을 추출하였다.

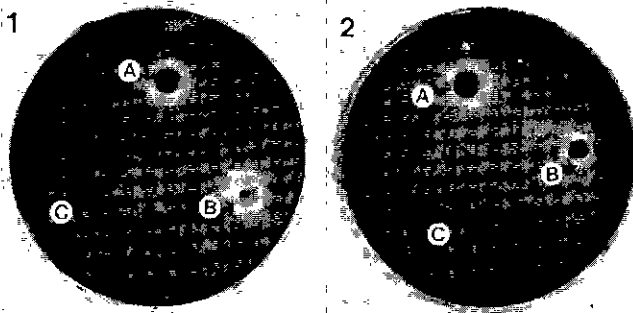


Fig. 1. Plate assay of a polygalacturonase from yeast strain CS-2. 1. pectinase activities on the medium containing 1% pectin; 2. polygalacturonase activities on the medium containing 1% polygalacturonic acid. A, isolated strain CS-2 ; B, *K. marxianus* var. *marxianus* 7155 ; C. *S. cerevisiae* 7913

**감자 조직 붕괴력 측정**

분리된 polygalacturonase에 의한 감자 조직 붕괴능을 알아 보기 위하여 Nakamura 등의 방법(10)을 변형하여 측정하였다. 즉 감자를 5 mm×8 mm×5 mm 입방 크기로 잘라 50 mM Tris-HCl(pH 9.5) buffer와 함께 효소액을 넣고 37 °C에서 16 시간 반응시킨 후 육안으로 붕괴정도를 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**균주의 선발 및 동정**

밀감 과수원의 토양시료로부터 plate assay를 통해 polygalacturonase를 분해하는 7균주를 분리하였다. 이 중에서 액체 배양을 통해 polygalacturonase 효소활성이 강한 한 종의 효모를 선발(Fig. 1)하여 이후 실험에 사용하였다. 분리 균주의 동정은 Polygalacturonase 고생산 효모인 CS-2를 malt extract 배지에 배양한 후 광학 현미경으로 관찰한 형태학적 특성을 조사한 결과, 타원형이며 크기는 1.3×2.9 μm로 multiple budding을 하며 ascospore는 존재하는 반면, pseudomycelium과 true mycelium은 존재하지 않았다(Fig. 2). YM 한천배지

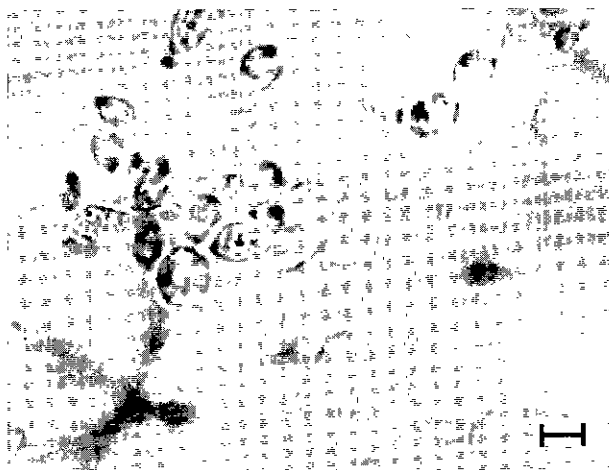


Fig. 2. Microphotography of isolated strain CS-2(X1000). Bar is 1 μm.

Table 1. Morphological and cultural characteristics of the isolated yeast CS-2

Characteristics	CS-2
Cell shape	ellipsoidal
Cell size(μm)	1.3 × 2.9
Vegetative reproduction	multiple budding
Ascospore	present (1 ~ 4)
Pseudomycelium	absent
True mycelium	absent
<b>Culture in YM</b>	
Pellicle	absent
Ring	absent
<b>Growth on YM agar</b>	
Form	regular
Edge	entire
Elevation	flat
Surface	pulvinate
Color	creamy
Texture	mucoid

+ positive, - negative

에 배양한 후 형성된 colony의 특성에 대하여 조사한 결과 colony는 원형으로 규칙적이고, 색깔은 cream색이었다. 분리균주의 생리화학적 특성을 조사한 결과 Diazonium blue B (DBB) color test와 urease test에서 양성반응을, acetic acid·citric acid 생성시험, starch test, ester 액화시험, gelatin 분해시험, fat 분해시험에서는 음성반응을 나타내었다. 그리고 탄소원의 조사에서는 galactose에 대해 음성반응을 나타냈으며, 질소원은 모두 음성반응을 나타내었다. 또한, 30 °C에서는 생존하였으나, 35 °C 이상의 온도, 50% 이상의 glucose 농도(w/w), 0.01% cyclohexamide, 그리고 1% acetic acid에서는 성장을 하지 못하였다(Table 1, 2).

이상의 형태학적, 배양학적, 생리화학적인 특성을 토대로하여 The yeasts taxonomic study(12)와 Yeast characteristics & identification(1)의 분리기준에 따라 *Cryptococcus* 속으로 동정되어 *Cryptococcus* sp. CS-2라 명명하였다.

**배양단계별 단백질의 양상변화**

성장율은 polygalacturonase가 polygalacturonic acid에 의해 유도되는 효소이기 때문에 성장시 어느 시점에서 유도가 시작되는지를 확인하였다. Polygalacturonase가 lag phase 말기에 유도되리라는 가정하에 성장율을 측정한 결과 배양 3~4일째에 높은 활성을 나타내었으며 특히 3일째 가장 좋은 활성을 나타내었고, 그 이후 활성이 급격히 감소함을 알 수 있다. 배양시간별 단백질의 양은 0.72~3.23 mg/ml의 수준으로 나타났으며, 배양 3일째 가장 높은 단백질 양을 나타내었다. 또한 배양시간별 polygalacturonase의 활성을 비교한 결과 3일째 9.2 units/ml로 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 *S. cerevisiae*에서 30 °C로 4일간 배양하였을 때 가장 높은 활성을 보였다는 보고(2) 보다는 짧았으나, *N. crassa*에서 30°C로 3일간 배양하였을 때 가장 높은 활성을 나타내었다는 보고(15)와 유사하였다.

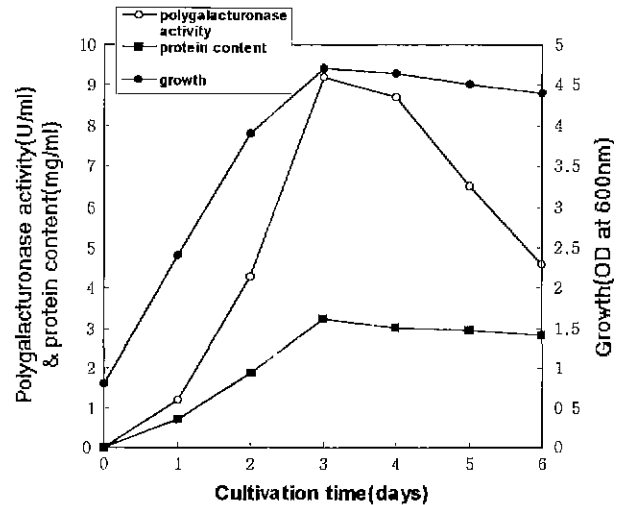
**Table 2.** Physiological characteristics of the isolated strain CS-2

Characteristics	CS-2
<b>Assimilation of carbon sources</b>	
Galactose	-
Xylose	+
Sucrose	+
D-Maltose	+
D-Trehalose	+
Cellobiose	+
Melibiose	+
D-Lactose	+
Raffinose	+
myo-Inositol	+
Dulcitol	+
Dextrose	+
<b>Assimilation of nitrogen sources</b>	
Nitrate	-
Nitrite	-
L-Lysine	-
<b>Growth at</b>	
25°...	+
30°...	+
35°...	-
37°...	-
42°...	-
<b>Growth with</b>	
0.01%(w/v) Cyclohexamide	-
0.1%(w/v) Cyclohexamide	-
40% Glucose	+
50% Glucose	-
60% Glucose	-
1% acetic acid	-
<b>Additional characteristics</b>	
Diazonium blue B color test	+
Starch formation	-
Ester production	-
Acetic acid production	-
Citric acid production	-
Urease activity	+
Gelatin liquefaction	+
Splitting of fat	-

+: positive, -: negative

**탄소원에 따른 효소의 생성**

일반적으로 polygalacturonase는 구성적으로 합성하는 것과 유도적인 것 모두가 보고되어 있으며, 유도적으로 생성되는 것 들은 catabolic repression에 의해 조절을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서, *Cryptococcus* sp. CS-2의 탄소원에 따른 polygalacturonase 유도효과를 보면 polygalacturonic acid와 pectin 첨가시 각각 6.1 units/ml, 5.9 units/ml로 높은 활성을 나타내었다. Polygalacturonic acid와 glucose를 그리고 pectin과 glucose를 같이 첨가한 경우 활성이 각각 단독으로 처리했을 때 보다 절반으로 떨어지는 것으로 보아 catabolite repression 이 있음을 알 수 있었다. 또 galactose를 단일 탄소원으로 하여 배양할 경우 3.42 units/ml로 비교적 좋은 활성을 나타내었으나 glycerol의 경우에는 0.09 units/ml로 polygalacturonase 활성이 거의 없음을 알 수 있었다.



**Fig. 3.** Growth rate, protein content and polygalacturonase activity of *Cryptococcus* sp. CS-2. Growth rate of *Cryptococcus* sp. CS-2 in YM media was determined OD 600 nm. Time course of protein and polygalacturonase from *Cryptococcus* sp. CS-2 cultivation was carried out 30 °C for 6 days using polygalacturonase inducing medium.

**Polygalacturonase 활성도 및 단백질 함량 측정**

*Cryptococcus* sp. CS-2의 polygalacturonase 생성능을 알아 보기 위하여 효소 활성도와 단백질의 양을 측정한 결과 고유 활성도가 2.50~2.55 units/mg로 *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*와 *Saccharomyces cerevisiae* 보다 높은 활성을 나타내었다. Polygalacturonic acid plate assay에서 활성 *Cryptococcus* sp. CS-2의 활성이 강한 halo zone을 나타내어 *K. marxianus* var. *marxianus*와 *S. cerevisiae*에 비해 높음을 알 수 있었다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 조효소의 효소활성도가 *N. crassa*의 경우 5.32 units/mg(11)보다는 낮았으나, *Bacterioides thetaiotaomicron*의 경우 0.67 units/mg(9) 보다는 높은 편이었다.

**조효소 단백질의 전기영동 양상 분석**

polygalacturonase가 세포외로 분비되는 단백질이기 때문에 미생물의 성장과정 중에 배지내로 분비가 된다. 배지내로 분비된 polygalacturonase를 모아 1/10로 농축시켜 SDS-PAGE를 실시한 결과 95 KDa, 42 KDa, 40 KDa, 35 KDa, 26 KDa 그리고 23 KDa에서 두드러진 밴드를 형성하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 이것은 *A. niger*의 경우 68 KDa, 45 KDa, 그리고 30 KDa에서 강한 밴드를 보였다는 보고(10)와는 차이가 있었다. 이러한 차이는 각 균주의 단백질 생성 및 분비기작에 따른 차이인 것으로 생각된다.

**단일 탄소원에 따른 단백질 양상의 변화**

*Cryptococcus* sp. CS-2를 glycerol과 polygalacturonic acid를 각각 단일 탄소원으로 하는 최소배지에 배양한 다음 배지내로 분비된 polygalacturonase를 농축시켜 SDS-PAGE를 실시하여 이종의 탄소원에 따라 유도된 단백질의 양상을 조사한 결과 약 46 KDa에 상응하는 부분의 밴드가 glycerol 배지에서는 관찰되지 않아 이 밴드가 polygalacturonic acid에 의해 유도되는 polygalacturonase의 단백질이라고 생각된다(Fig. 4).

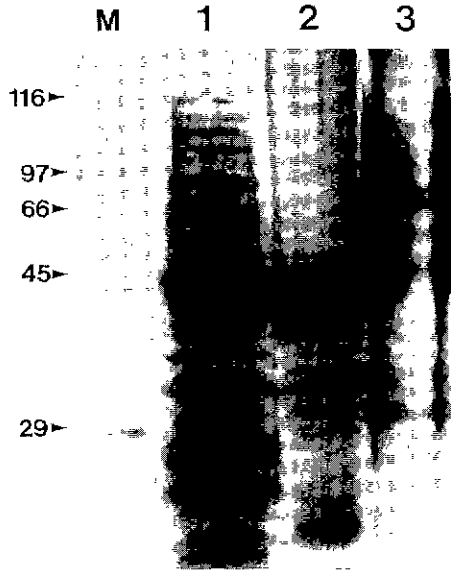


Fig. 4. Pattern of total soluble proteins in extracellular extract of *Cryptococcus* sp. CS-2 Lane M, molecular weight marker; 1, extracellular extract from 1% polygalacturonic acid containing media; 2, extracellular extract from 1% glycerol containing media; 3, purified pectinase from *Aspergillus niger*.

활성염색

활성염색은 Toluidine blue O의 염색으로 polygalacturonic acid에 결합하는 반면, polygalacturonase에 의해 기질이 분해된 곳은 clear zone이 형성되는 원리를 이용한 것이다.

활성염색 결과 농축한 조효소 용액은 약 45~66 KDa에 상응하는 부분의 밴드를 관찰할 수 있었는데, 이는 정제되지 않

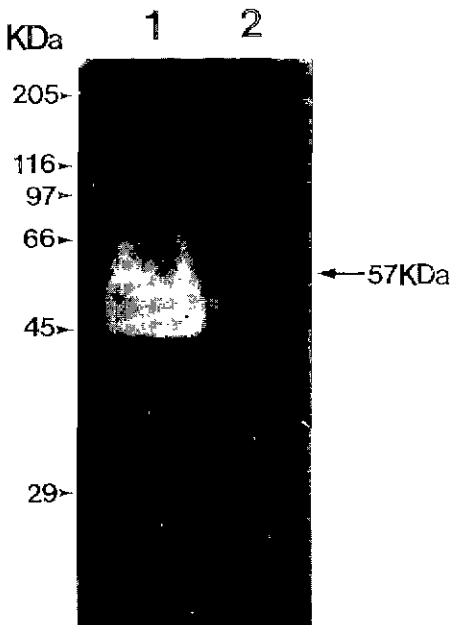


Fig. 5. Activity staining of polygalacturonase from *Cryptococcus* sp. CS-2 Lane 1, polygalacturonase from *Cryptococcus* sp. CS-2; 2, purified pectinase from *Aspergillus niger*.

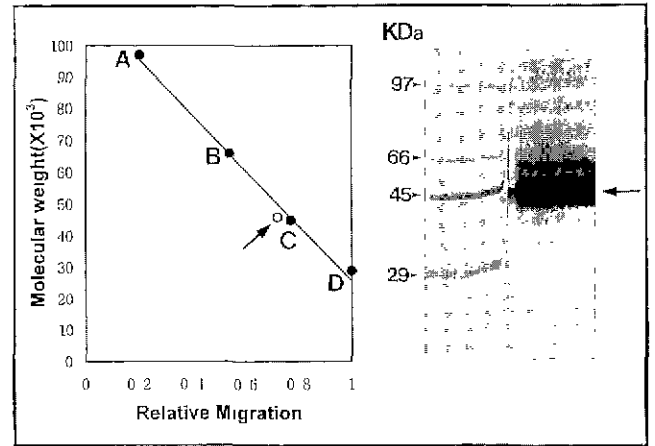


Fig. 6. Electrophoretogram determination of molecular weight of *Cryptococcus* sp. CS-2 polygalacturonase by SDS-PAGE. A, rabbit muscle phosphorylase b(MW 97,000); B, bovine serum albumin(MW 66,000), C, egg albumin(MW 45,000); D, bovine erythrocytes carbonic anhydrase(MW 29,000)

은 단백질이기 때문이라고 생각된다. 그리고  $8 \times 10^{-5}$  units (5 ng)에 해당하는 정제된 *A. niger*의 pectinase는 약 57 KDa에 상응하는 부분의 밴드를 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 따라서 poly-galacturonic acid에 의해 유도되는 polygalacturonase로

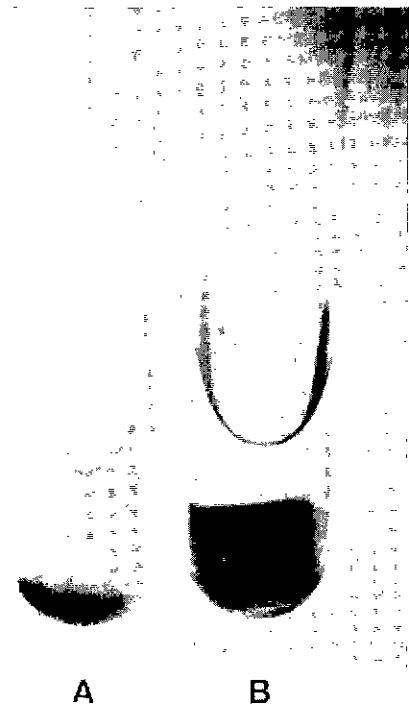


Fig. 7. Potato partial macerating activity of the polygalacturonase produced by *Cryptococcus* sp. CS-2. Potato partial was soaked in 50 mM Tris-HCl(pH 9.5) with A, diluted enzyme solution; B, denaturated enzyme solution. After standing incubation 16hours at 37°C, each test tube was shaken gently. The unit was expressed as the amount of enzyme which give OD 525 nm equivalent to 1.0 μmol of D-galacturonic acid in 30minute at 30°C

으므로 이 부분을 electroelution하여 SDS-PAGE를 한 후 marker protein과 비교한 결과 46 KDa으로 추정되었다(Fig. 6). 이는 사상균류에서 SDS-PAGE에 의해 결정된 분자량인 경우 *N. crassa*에서 36.6~37 KDa이었다는 보고(11)와 유사하였다.

#### 감자 조직 붕괴력 측정

분리된 polygalacturonase가 식물체의 조직을 붕괴시킬 수 있는가를 알아보기 위해 감자를 절단한 단편에 농축한 효소를 가해 본 결과 흐물흐물하게 붕괴시킨 것을 볼 수 있었다(Fig. 7). 일반적으로 식물 병원균들이 식물체에 침입할 때 세포벽 성분을 구성하고 있는 pectin 층을 공격하는 미생물 효소의 하나임을 입증한 Higashi 등(3)이 보고한 식물병원균의 polygalacturonase와 같은 맥락에서 *Cryptococcus* sp. CS-2 또한 식물 병원균일 가능성이 높다고 생각된다.

#### 참고문헌

- Barnett, J.A., R.W. Payne, and D. Yarrow. 1990. Yeasts: Characteristics and Identification, second edition. Cambridge University press.
- Crueger, W. and A. Crueger. 1989. Biotechnology - a textbook of industrial microbiology, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. 206-207.
- Higashi, K., T. Yoshimura, T. Ishiyama, and Y. Okimoto. 1988. Studies on plant tissue macerating enzyme from *Cladosporium fulvum*. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa Univ.* **28**, 57-70.
- Kim, E.H., J.S. Oh, and B.M. Jo. 1992. Biotechnology in the pulp and paper industry. *Mockchae Konghak.* **20**, 89-103
- Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leal, D.P., M.I. Isla, M.A. Vattuone, and A.R. Sampietro. 1994. Production of plant protoplasts by enzymes from selected wood-destroying fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 58-61.
- Lee, S.C., H.G. Yuk, and Y.I. Hwang. 1997. Recovery yields of protopectinase depending on treatments of organic solvents. *Agricultural Chemistry and Biotechnology.* **40**(2), 107-111.
- Lowry, O.N., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-260.
- Mccarthy, R.E., S.F. Kotarski, and A.A. Salyers. 1985. Location and characteristics of enzymes involved in the breakdown of polygalacturonic acid by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.* **161**(2), 493-499.
- Nakamura, T., R. Hours, and T. Sakai. 1995. Enzymatic macerating of vegetable with protopectinase. *J. Food Sci.* **60**(3), 468.
- Polizeli, M.L.T.M., J.A. Jorge, and H.F. Terenzi. 1991. Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification & biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *Journal of General Microbiology* **137**, 1815-1823.
- Rij, N.J.W. 1984. The yeasts - a taxonomic study, third revised & enlarged edition. Elsevier Science Publishers B. V.
- Sakai, T., and M. Okushima. 1980. Microbial production of pectin from citrus peel. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 908-912.
- Sakai, T., T. Sakamoto, J. Hallaert, and E.J. Vandamme. 1993. Pectin, pectinase, and protopectinase; production, properties, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* **39**, 213-294.
- Thomas, A.M. 1988. Activity stain for polygalacturonase. *Journal of Chromatography.* **455**: 376-381.
- Turecek, P.L., E. Buxbaum, and F. Pittner. 1989. Quantitative de-termination of pectic substances as an example of rhamnopolysaccharide assay. *J. Biochem. Biophysical Methods* **19**, 215-222.

(Received May 13, 1999/Accepted June 2, 1999)

#### ABSTRACT : Isolation and Characterization of *Cryptococcus* sp. CS-2 Secreting Polygalacturonase from Soil

Hee-Kyoung Kang, Myeng-Nim Moon, Chae-Young Limm, Young-Ki Yang\* (Department of Biological Science, College of Natural Science, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea)

A polygalacturonase-producing yeast was isolated from Cheju soil by selective enrichment media. One strain which has the highest activity of polygalacturonase was selected. The characteristics of the strain CS-2 were as follows: CS-2 utilized xylose, sucrose, maltose, trehalose, cellobiose, melibiose, lactose, raffinose, inositol, dulcitol, and dextrose, but did not utilize galactose, nitrate, nitrite, and lysine. Growth of CS-2 was inhibited by cyclohexamide, 1% acetic acid, and high concentration (over 50%) of glucose. It grew at 30 °C but did not at 35 °C. The cell size of the strain CS-2 was 2.9 µm in length and 1.3 µm in diameter. Vegetable reproduction was multiple budding and ascospore was present 1 to 4. Pseudomycelia or true mycelium formation were not observed in any of the cultures. These results suggest that strain CS-2 is most likely a strain related *Cryptococcus* spp. (*Cryptococcus* spp. CS-2). When polygalacturonase of the yeast was induced by addition of polygalacturonic acid, polygalacturonase activity was detected in culture supernatant. There was a peak of specific activity at the mid-stationary phase (3 days culture) of growth. Polygalacturonase specific activity of *Cryptococcus* sp. CS-2 was 2.96 units/mg. The molecular weight of polygalacturonase was shown to be 46 KDa by both SDS-PAGE and activity staining.