

*Rhizoctonia solani*가 생산하는 Trehalase의 정제 및 특성

오태광 · 서영배 · 고영희*
한국과학기술연구원 유전공학연구소

Purification and Properties of Trehalase from *Rhizoctonia solani*

Oh, Tae-Kwang, Young-Bae Seu and Yung-Hee Kho*

Genetic Engineering Research Institute, KIST,
P.O. Box 17, Taedok Science Town, Daejeon 305-606, Korea

Abstract — Nonregulatory trehalase has been purified from mycelia of *Rhizoctonia solani*, a pathogen of rice sheath blight. Purification procedures involved sonification, gel filtration and fast protein liquid chromatography. Purity was confirmed by isoelectric focusing with silver staining. The purified trehalase was estimated to have a molecular weight of 54,000 and pI point of 5.1. Maximal activity was observed at pH 5.4 and temperature 45°C. The purified trehalase exhibited on apparent Km for trehalose of 3.11 mM and a Vmax of 105.3 $\mu\text{mol min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. Validamycin, a commercial antibiotics of rice sheath blight, was a non-competitive inhibitor of *Rhizoctonia solani* trehalase.

Trehalose는 두개의 glucose 분자가 α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside 형태로 결합된 비환원성 이당류로 조류, 박테리아, 곰팡이, 곤충, 효모 및 몇 가지 식물체(1) 등에 저장당으로 존재한다. 생물체 내에서의 trehalase의 역할은 저장당으로 포자발아(2, 3), 세포의 분화(4) 및 곤충의 비행 등의 energy reserve로 사용될 뿐만 아니라 고온(5), 저온(6) 및 건조(7, 8) 등의 물리적 압력의 보호제로 역할을 한다. Trehalose는 환경이 나쁜 anhydrobiotic한 상태(9)에서는 합성이 되는데 이때 작용하는 효소는 trehalose-6-phosphate synthetase(10)와 trehalose-6-phosphate phosphatase(11) 등이 알려졌고, rehydration, 세포분화 및 germination 등에서는 분해하는 효소인 trehalase(12), trehalose phosphorylase(13) 및 phosphotrehalase(14)가 관여하는 것으로 알려졌다. 곰팡이에서의 trehalose의 역할은 sporulation(8), 포자 발아(3) 및 영양세포 분화에 중요한 역할을 하고 trehalose 분해에 관여하는 효소는 trehalase(EC 3.2.1.

28) 하나만 존재하는 것으로 보고(12, 15)되고 있다. 곰팡이 trehalase는 cAMP, MgSO_4 및 ATP에 의해서 활성이 증가하는 중성의 조절 trehalase(16)와 cAMP 등에 의해서 활성변화가 없는 산성의 비조절 trehalase(17)가 존재한다. 비조절 trehalase는 곰팡이의 세포분화시(8), 조절 trehalase는 포자발아시(8) 중요한 역할을 한다. 따라서 trehalase는 곰팡이 생육 조절 에너지원(18) 및 당류의 active transport 등에 관여하기 때문에 곰팡이 trehalase를 저해하는 물질을 탐색하여 곰팡이 발아 및 생육저해제(19)로, 곤충의 체장(20)에 존재하면서 생육에 중요한 역할을 하는 것을 이용해서 살충제(21, 22)로 개발하려는 보고가 많이 되고 있다. 본 연구에서는 벼의 문고병에 대한 신규 항생농약을 탐색하기 위해서 벼의 문고병원균인 *Rhizoctonia solani*의 균사체에 존재하는 trehalase를 분리정제하여 효소적 특성을 구명하였다.

재료 및 방법

사용균주

효소생산균주는 우리나라 벼 재배지에서 병발된

Key words: Trehalase, *Rhizoctonia solani*, purification, characterization

*Corresponding author

문고병반에서 분리한 *Rhizoctonia solani*을 사용하였고 병원성을 부여하기 위해서 Potato Dextrose Agar(이하 PDA 표사)에서 균사체 형성 후 균사체 표면을 상처를 입힌 후 형광등에서 2일 동안 처리하여 포자를 형성시켜서 사용하였다.

효소생산용 배지조성 및 배양

최적 효소생산 배지 조성을 만들기 위해서 Potato infusion(50 g/l)에 당당류, 이당류 및 다당류 등을 첨가하여 효소활성이 가장 좋았던 0.5% trehalose 및 0.5% carboxyl methyl cellulose salt을 첨가한 배지 조성을 생산용 배지(pH 6.0)로 사용하였고 배양은 포자가 형성된 문고병원균을 Cork borer로 일정크기로 만든 후 접종하여 27°C, 150 strokes/min의 조건의 진탕배양기에서 균사체가 충분히 생육할 때까지 배양하였다.

조효소액 제조

효소분리정제의 전체적 단계는 Fig. 1에 나타난 바

와 같이 행했다. Trehalase는 균사체에 부착되어 있기 때문에 배양 후 5000g에서 20분간 원심하여 상정액을 제거한 후 0.1 M 초산완충용액(pH 5.4)로 2차례 세척한 후 균사체를 Ultra-turrax T25 마쇄기(IKA-Labortechnik, Deuchland)로 마쇄하였다. 마쇄액을 Sonic Dismembrator(Fisher, USA)로 3분간 초음파 처리 후 4°C, 8000g에서 30분간 원심한 상정액을 사용하였다. 상정액에는 trehalase를 저해하는 저분자물질이 존재하기 때문에 Sephadex G-10 column을 통과하여 얻어진 단백질 부분을 냉동건조하여 조효소로 사용하였다.

Sephadex G-100 column chromatography

Sephadex G-100(Pharmacia사, 입자크기, 40~120 μ)을 0.002% sodium azide가 포함된 0.1 M 초산완충용액(pH 5.0)에서 팽윤시키고 100°C 수조에서 1시간 활성화시킨 후 진공펌프로 공기를 제거시키고 28 mm Φ ×1230 mm의 유리관에 충전하였다. 조효소를 0.1 M 초산완충용액(pH 5.4) 20 ml에 녹여서 관상단에 가하여 20 cm의 수압하에서 20분에 10 ml/씩 분획 채취하였다.

Fast Protein Liquid Chromatography(이하 FPLC)

Sephadex G-100 column을 통과한 활성부위를 모아서 FPLC(Pharmacia사)을 행하였다. 초기에는 강한 음이온 교환수지인 Mono Q HR(10 mm Φ ×100 mm)을 사용하였는데 이때는 20 mM 인산완충용액(pH 6.5)을 초기 4분까지는 흡착되지 않은 단백질을 분리하였고 4분 이후는 0.5 M NaCl이 포함된 동일한 완충용액을 이용해서 linear gradient로 흡착단백질을 분리하였다. Flow rate는 1.0 ml/min의 속도로 detector는 Monitor UV-M을 사용하였다. 분획은 fraction collector FRAC-100을 이용해서 단백질 부분만 자동으로 채취하였다. 분리된 trehalase 활성부분은 탈염을 하기 위한 fast desalting column(10 mm Φ ×100 mm)을 사용하였고 용매는 3차 증류수를 사용하여 2 ml/min 속도로 단백질 부분만 분획하였고 분획 후 농축은 냉동건조기를 사용하였다. Mono Q에서의 trehalase 활성부위는 다시 강한 양이온 교환수지인 Mono S HR(10 mm Φ ×100 mm)로 분리하였다. 초기 4분간은 비흡착단백질을 4분 이후는 Mono Q와 동일한 방법으로 하였고 사용 완충용액은 20 mM 초산

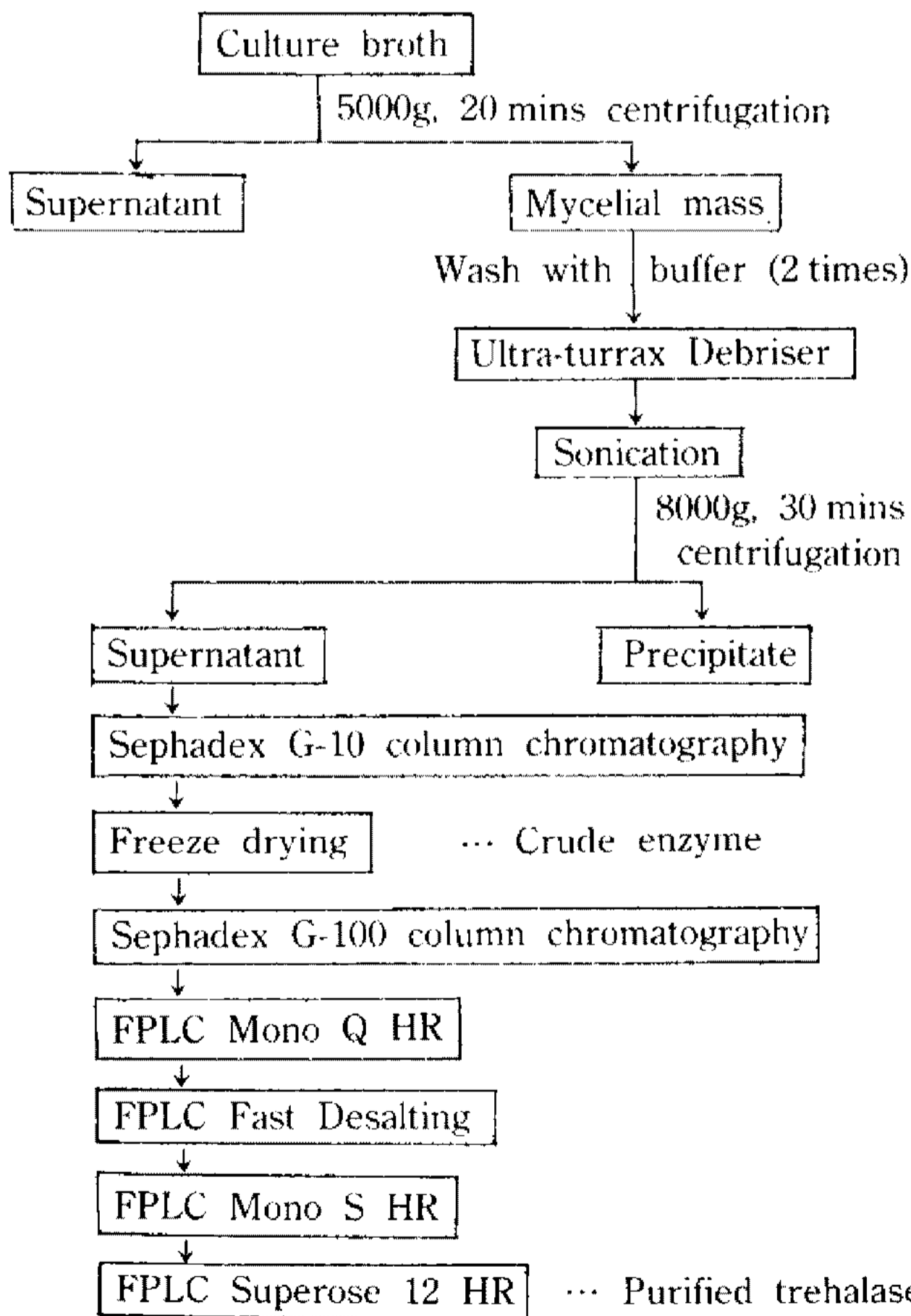


Fig. 1. Schematic diagram of purification steps for trehalase from *Rhizoctonia solani*.

완충용액(pH 4.8)로 사용하였다. 최종적인 분리는 Mono S HR column에서 얻어진 trehalase 활성부위를 분자량에 따라 분리하는 Superose HR12(10 mmΦ×300 mm)를 사용하여 0.1 M NaCl이 포함된 100 mM 초산완충용액(pH 5.4)으로 0.7 ml/min의 속도로 분획하였다.

효소역가 측정방법

효소역가 측정방법은 Horikoshi 방법(2)을 변형하여 측정하였다. 0.033 M trehalose가 포함된 0.1 M 초산완충용액(pH 5.4)을 기질로 하여 기질 0.6 ml와 효소 0.2 ml를 혼합하여 45°C 진탕수조에서 30분간 반응시킨 후 환원당을 정량하였다. 효소역가는 분당 1 μmole의 glucose을 생산하는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

효소의 분자량 및 pI 결정

분리된 효소의 분자량의 결정은 FPLC을 사용하여 표준단백질 분자량의 대수값과 FPLC에서 분획된 용량을 plotting하여 측정하는 Abbott 방법(23)을 사용하였고 단백질의 pI 결정은 오 등(24) 방법에 준하여 행하였다. Isoelectric focusing은 Phast system(Pharmacia사)을 사용하였고 pH gradient을 pH 4~6.5의 gel을 사용하였고 단백질 염색은 silver staining 방법을 사용하였다.

결과 및 고찰

Sephadex G-10 column chromatography

균사체를 마쇄 및 초음파처리하여 얻어진 배양효소액을 저분자 효소 저해제를 제거하기 위해서 Sephadex G-10 column chromatography한 결과 Fig. 2와 같이 5개의 280 nm에서 흡광도를 갖는 분획과 환원당 분획을 얻었고 이중 단백질분획과 효소활성 분획이 중첩되면서도 비교적 환원당이 적게 포함되어 있는 9~12분획을 동결건조하여 조효소액으로 사용하였다.

Sephadex G-100 column chromatography

Sephadex G-10을 통과하여 저분자 환원당 및 peptide가 제거된 trehalase 조효소를 Sephadex G-100 관에 가하여 gel filtration을 행한 결과 Fig. 3과 같이 3개의 단백질분획을 얻었고 이중 trehalase의 역가는 2번째 단백질 분획에서 활성을 나타내었다. 이렇게 분리된 trehalase 활성부분을 수차에 걸친 column chromatography을 행하여 양적으로 많이 모아서 FPLC을 행하였다.

FPLC을 이용한 trehalase 정제

Sephadex G-100 관에서 분리한 trehalase 활성부위를 강한 음교환수지인 Mono Q HR을 통과시킨

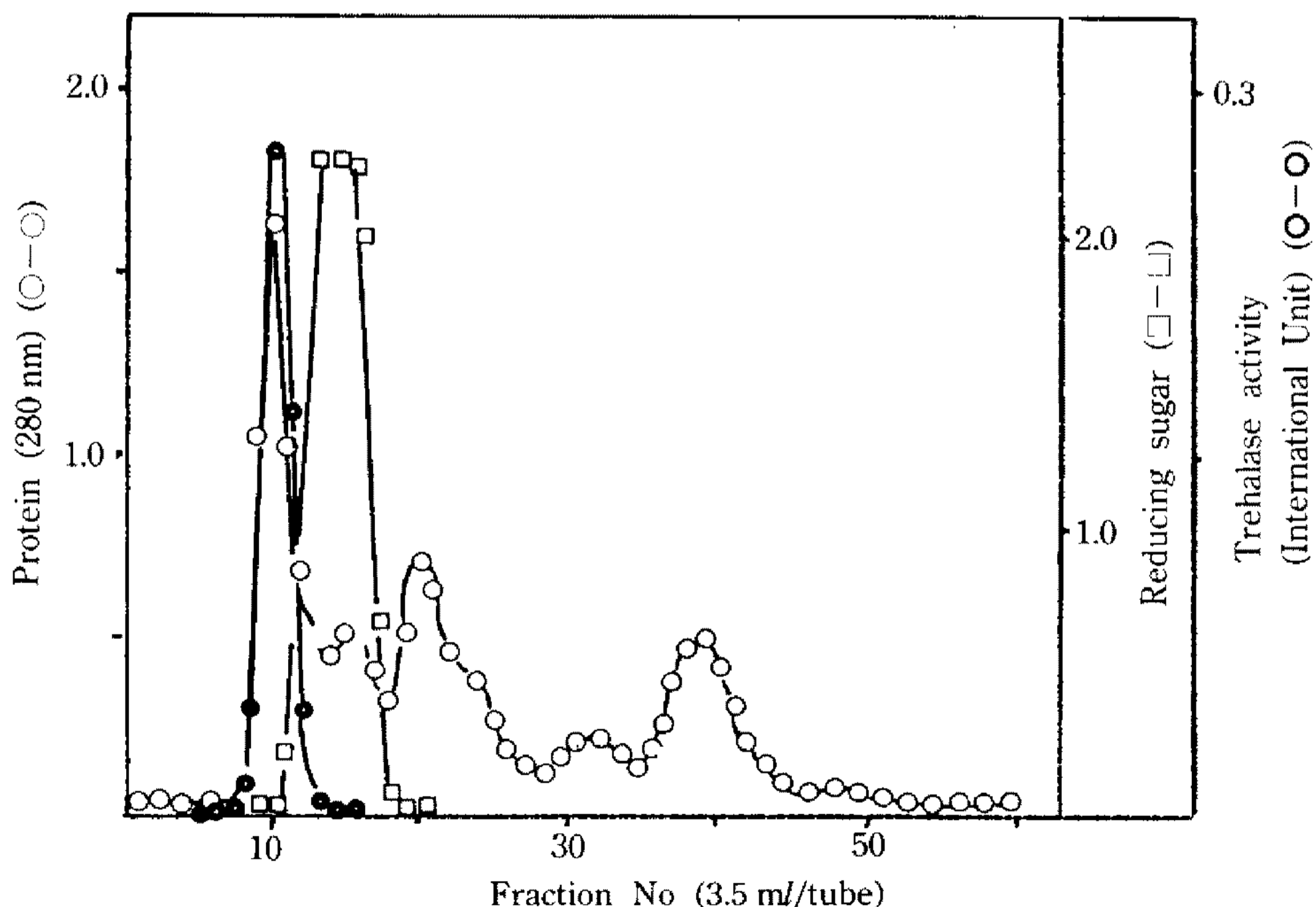


Fig. 2. Gel filtration on Sephadex G-10 of the crude enzyme from *Rhizoctonia solani*.

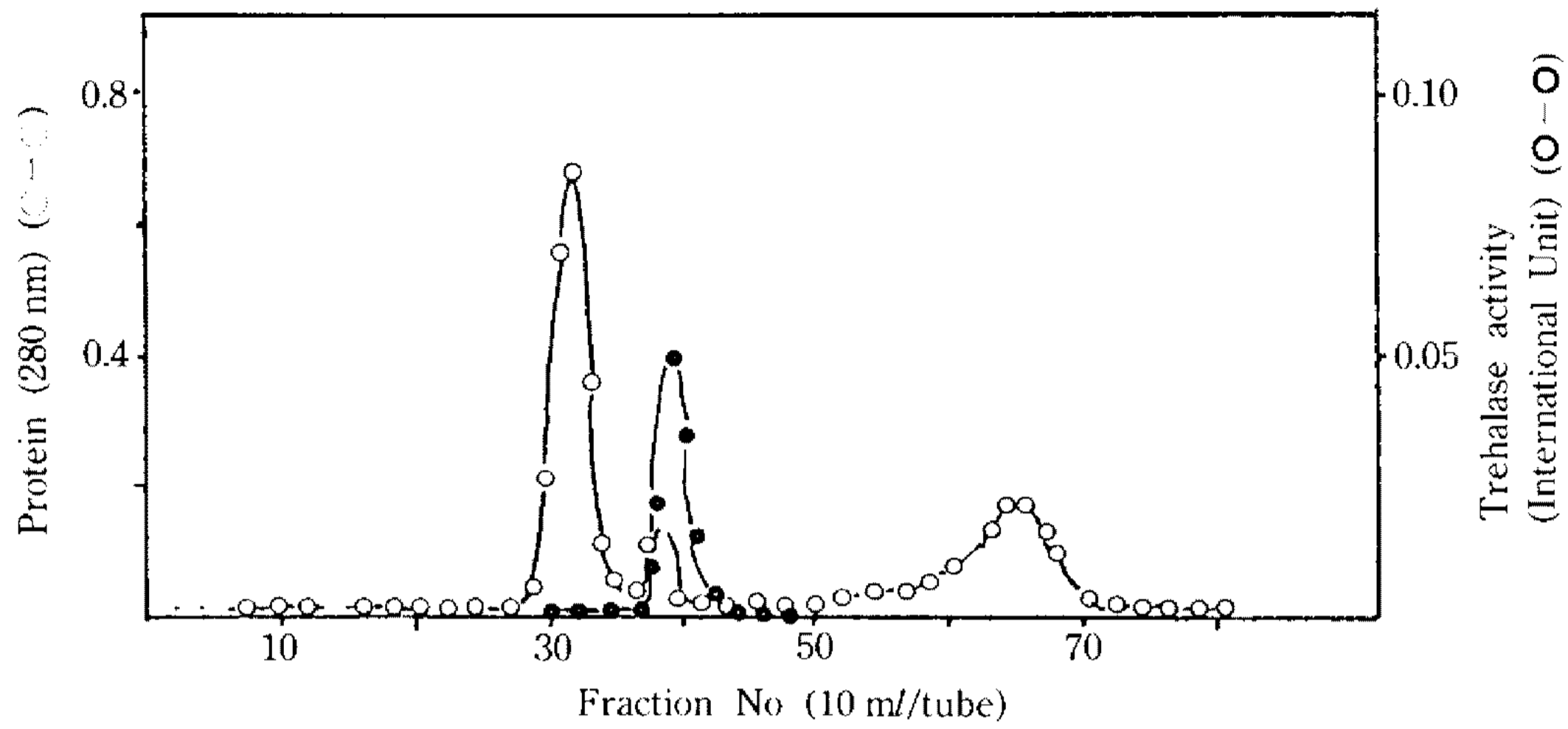


Fig. 3. Gel filtration on Sephadex G-100 of the pooled fraction from the Sephadex G-10 column.

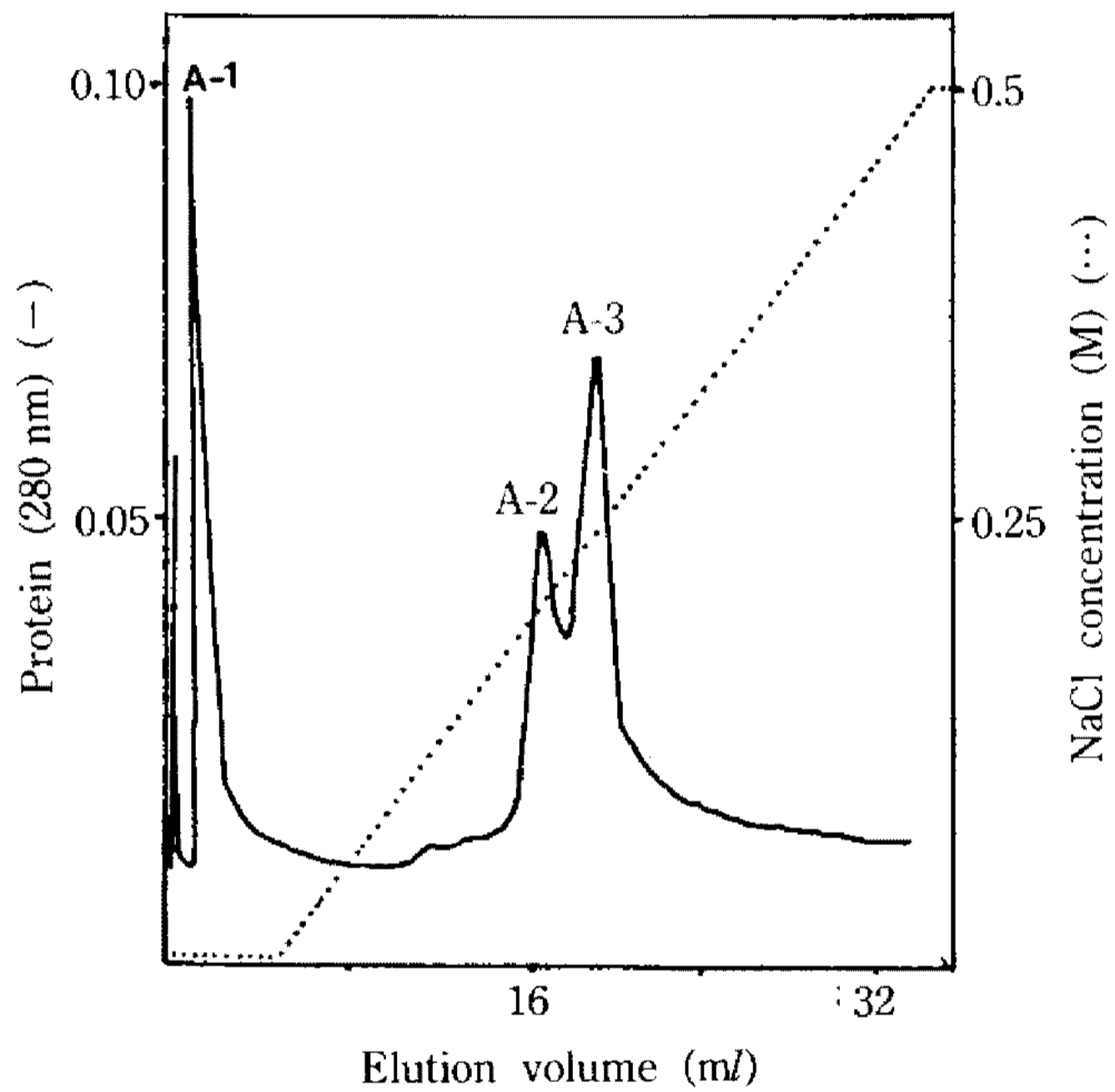


Fig. 4. FPLC on Mono Q of the pooled fraction from the Sephadex G-100 column.

Column: Mono Q HR 10/10, Buffer: 20 mM phosphate buffer (pH 6.5), Gradient: 0~0.5 M NaCl linear gradient, Flow rate: 1.0 ml/min.

결과 Fig. 4에서와 같이 흡착되지 않은 단백질 A-1과 0.2 M NaCl 농도에서 용출된 A-2 및 0.24 M NaCl 농도에서 용출된 A-3의 3개의 단백질 분획을 얻었고 이렇게 얻어진 단백질 분획에 대해서 trehalase의 활성을 측정한 결과 흡착되지 않은 A-1의 분획에서 활성을 나타내었다. 다시 A-1의 효소활성부위를 FPLC로 탈염시킨 후 양이온 교환수지인 Mono S HR column에 가하여 분리한 결과 Fig. 5에서와 같이 비흡착된 C-1 분획과 흡착 후 용출된 C-2, C-3의 3개의 단백질 분획을 얻었고, 이 세개의 분획을 모아서 효

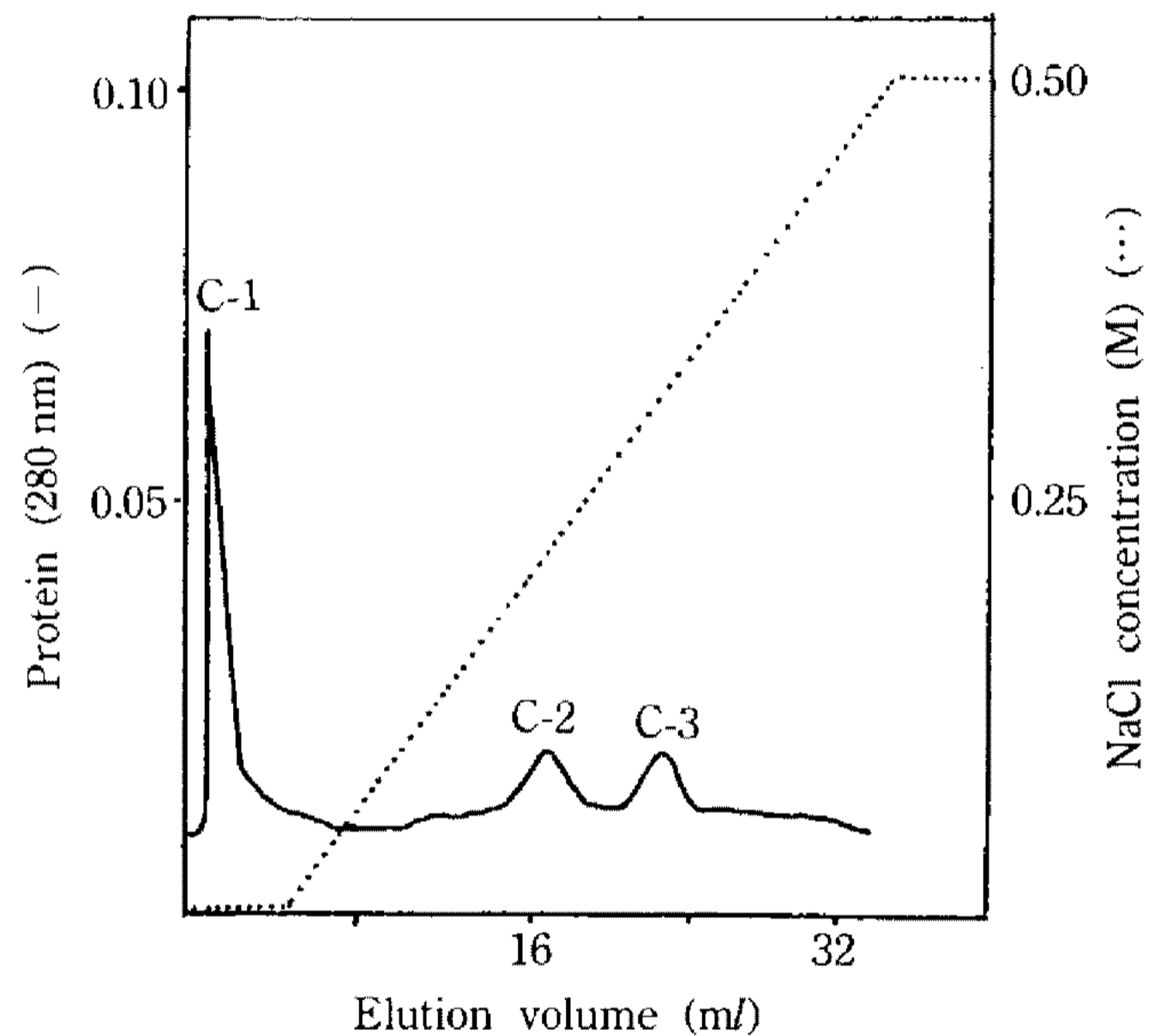


Fig. 5. FPLC on Mono S of the pooled fraction from the Mono Q column.

Column: Mono S HR 10/10, Buffer: 20 mM acetate buffer (pH 4.8), Gradient: 0~0.5 M NaCl linear gradient, Flow rate: 1.0 ml/min.

소역가를 측정한 결과 역시 비흡착단백질인 C-1 분획에서만 강하게 효소역가를 가졌다. 이와같이 2번에 걸친 이온교환수지를 통해서 흡착되는 불순 단백질을 제거할 수 있었다. 이온교환수지를 통과하고 난후 효소활성부위를 다시 FPLC Superose 12 HR column에 가하여 분리해 본 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 elution volume이 15분에서 단일한 단백질 peak을 보여주고 효소활성을 나타내는 것으로 trehalase가 분리되었음을 알 수 있었다. 정제된 trehalase는 pI값을 결정하기 위해서 isoelectric focusing 행한 결과 silver staining했을시도 단일 peak을 가

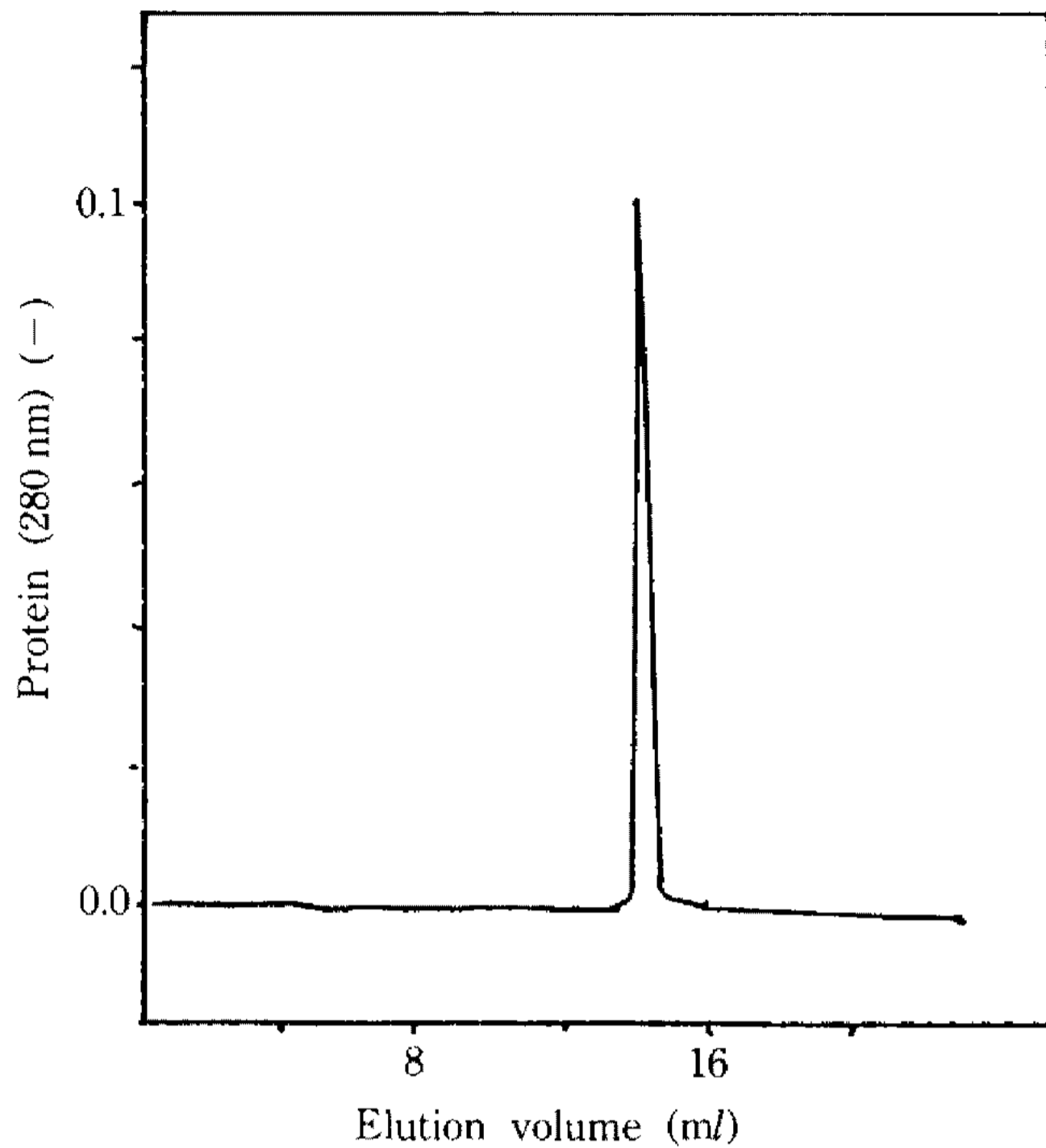


Fig. 6. Fast protein liquid chromatogram of purified trehalase on Superose 12 HR 10/30 column. Buffer: 100 mM acetate buffer (pH 5.4), Flow rate: 0.7 ml/min.

지는 것으로 보아 순수한 단백질(Fig. 8 참조)로 추정할 수 있었다.

분리된 trehalase의 특성

분리된 trehalase의 최적 반응조건은 Fig. 7에서와 같이 최적반응 pH는 5.4, 최적온도는 45°C로 나타났다. 산성 trehalase(17)의 경우는 최적 pH 4.5, 온도 37°C로 나타났고 중성 trehalase(16)의 경우는 최적 pH 6.8, 온도 37°C로 보고되고 있어서 최적온도와 최적 pH가 약간 다르게 나타나지만, 빵효모의 trehalase의 경우는 pH 5.6, 45°C로 나타나서 *Rhizoctonia solani*에서 분리한 trehalase와 비슷함을 알 수 있었다. 분리된 trehalase의 분자량은 Fig. 8에 나타난 바와 같이 약 54,000으로 나타났고 pI값은 Fig. 9에서와 같이 5.1로 나타났다. Trehalase의 분자량에 대한 보고는 *Trichoderma reesei*의 경우(15), 88000과 5.7, 효모의 중성 trehalase(16)의 경우는 80000, 4.7, 효모의 산성 trehalase(17)의 경우는 218,000, 4.7로 나타나서 *Rhizoctonia solani*에서 분리한 trehalase는 분자량은 다른 보고에서 보다 작게 나타났고 pI값 근처에서 최적반응 pH를 가지며 다른 근원의 trehalase에 비해서 고온에서 반응하고 분자량은 적은 것으로 나타났다. 또한,

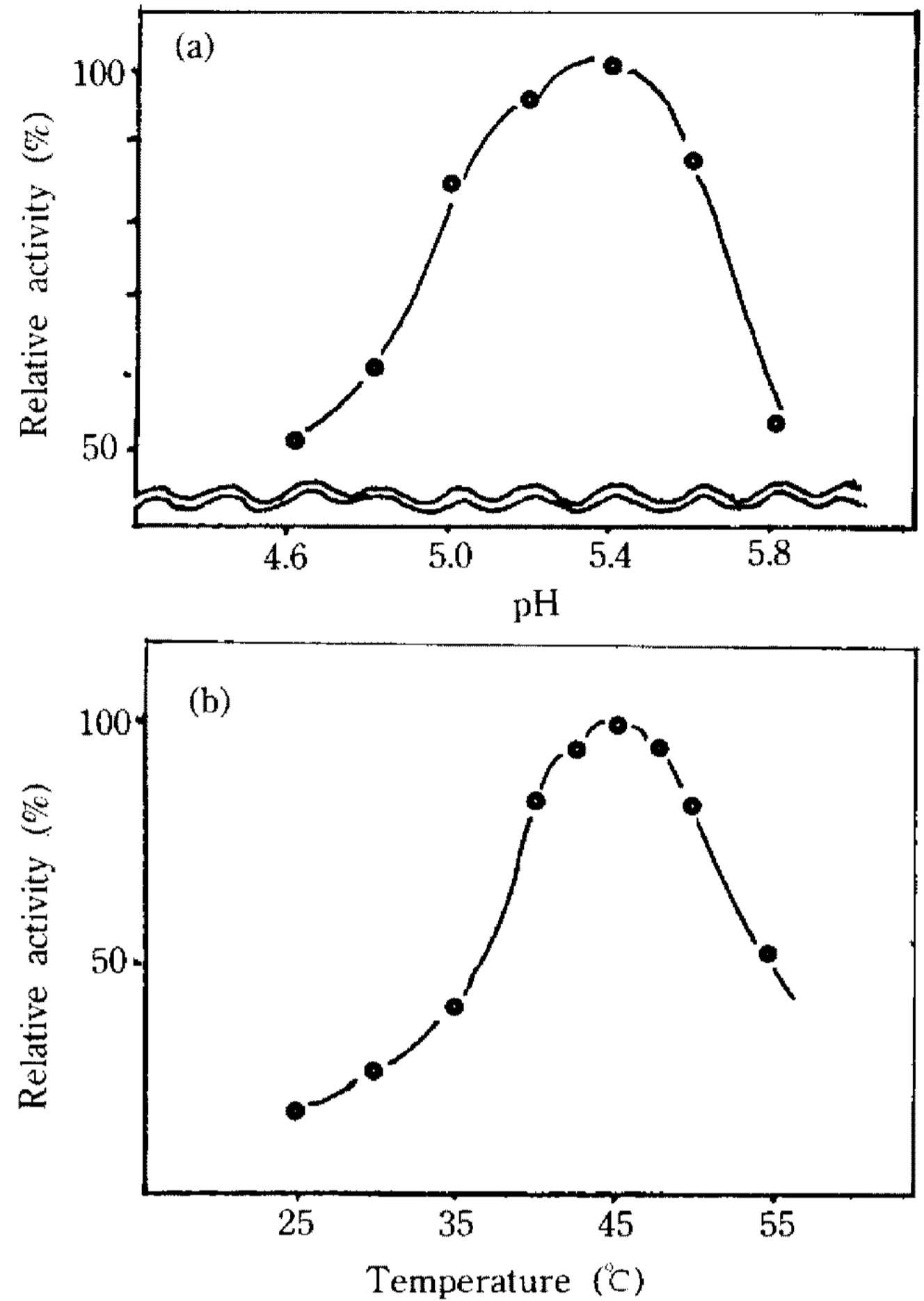


Fig. 7. pH- (a) and temperature- (b) enzyme activity curves of the purified trehalase from *Rhizoctonia solani*.

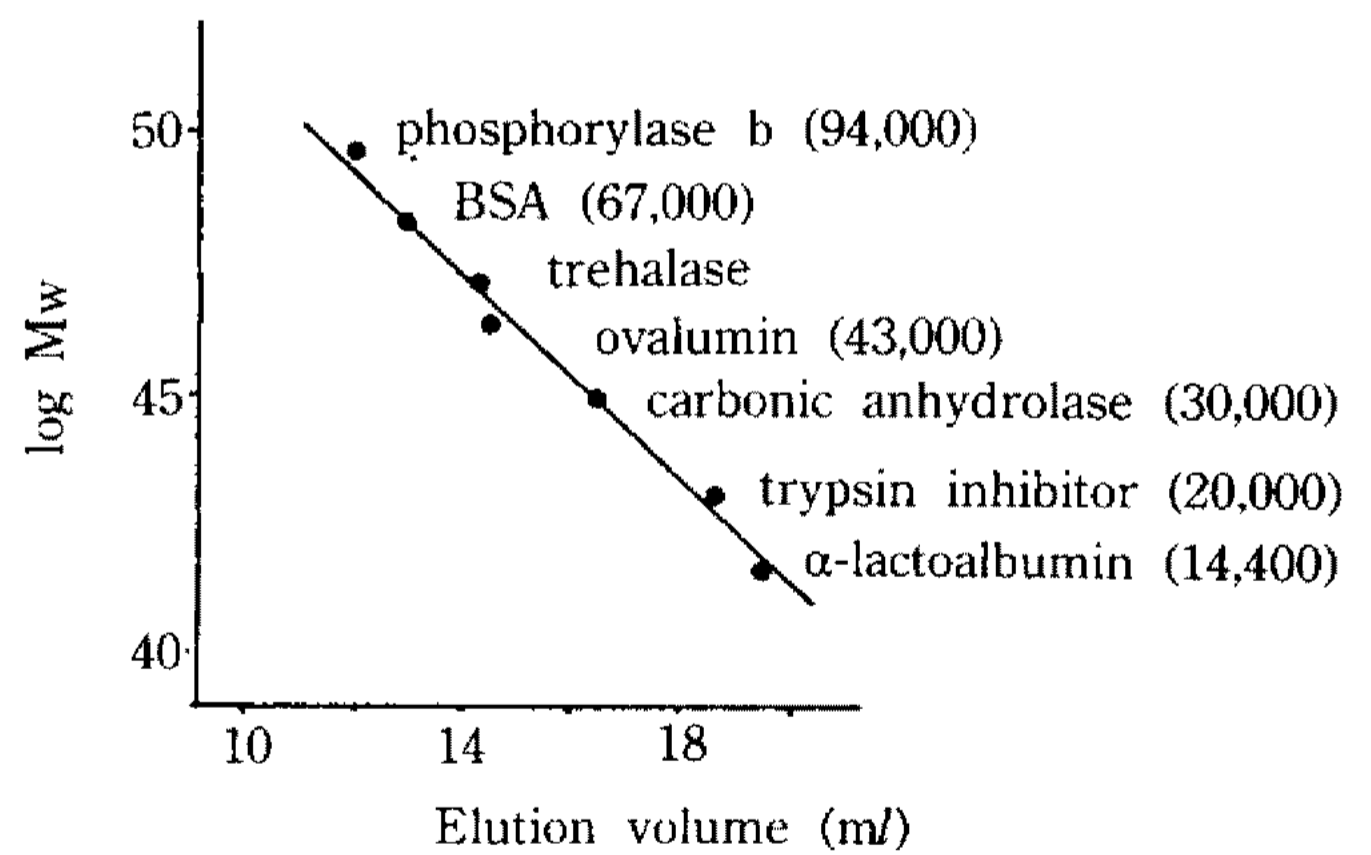


Fig. 8. Estimation of molecular weight of *Rhizoctonia solani* trehalase by FPLC gel filtration.

Column: Superose 12 HR 10/30 column, Buffer: 100 mM acetate buffer (pH 5.4), Flow rate: 0.7 ml/min.

분리된 trehalase는 Table 1에서 보는 바와 같이 cAMP, ATP 등에 의해서 활성이 증대하지 않은 것으로 보아 비조절(8) trehalase임을 알 수 있었다.

Trehalase 활성의 저해물질

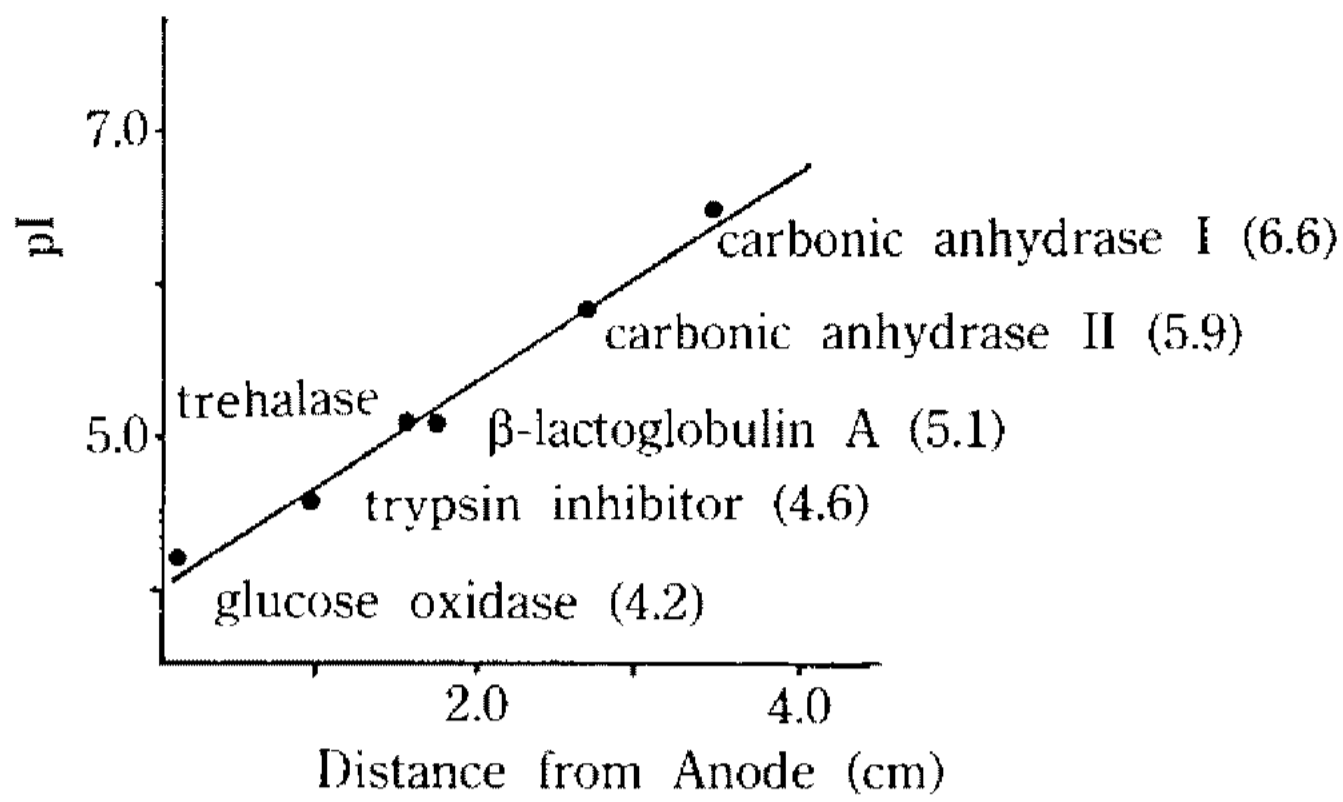


Fig. 9. Determination of pI of the *Rhizoctonia solani* by isoelectric focusing with standard protein.

Table 1. Effect of cyclic AMP and ATP on trehalase activity

Treatment	Trehalase activity (IU)
Trehalase	0.250
Trehalase + cAMP (10 μ M)*	0.247
Trehalase + ATP (0.1 mM)*	0.251

*After incubation with cAMP or ATP for 5 min, and then assayed for trehalase activity

기존 항생물질로서 Gram 양성, Gram 음성 및 항곰팡이성 역가를 가진 16가지 항생제에 대해서 *Rhizoctonia solani* trehalase 활성의 저해 여부를 조사한 결과 Table 2에서와 같이 Gram 양성 및 Gram 음성에 작용하는 항생제 뿐만 아니라 항균농약 등 항생제 blasticidin, polyoxine 및 kasugamycin에서도 trehalase 저해역가가 없었다. 하지만 벼문고병 농용항생제인 validamycin의 경우는 강하게 저해하는 것으로 나타났다. 이와같은 결과는 Iwasa(25) 등, Roboson(19) 등, Asano(21) 등, Ando(22) 등이 validamycin이 *Rhizoctonia solani*을 저해하고 trehalase을 저해한다는 결과와는 일치하지만, 본 연구에서 trehalase을 근원이 *Rhizoctonia solani*에서 정제하여 사용한 것이 다르고 실제, 기존 항생제에 시험시 trehalase 근원에 따라 저해여부가 다르게 나타났다.

Trehalase 및 Validamycin의 반응 kinetics

Trehalase 반응 kinetics과 validamycin이 trehalase 반응을 저해하는 kinetic을 조사하기 위해서 Lineweaver-Burk plot한 결과 Fig. 10에서와 같이 trehalase에 대한 대략적인 K_m 치는 3.11 mM, V_{max} 가 105.3

Table 2. Inhibitory effect of various antibiotics on *Rhizoctonia solani* trehalase

Antibiotics	Trehalase inhibition	Antibiotics	Trehalase inhibition
Kanamycin	-	Blasticidin	-
Penicillin	-	Ventunicidin	-
Tyrosin	-	Polyoxine	-
Streptomycin	-	Nystatin	-
Lincomycin	-	Kasugamycin	-
Gentamycin	-	Cycloheximide	-
Tetracyclin	-	Mutanolysin	-
Bacitracin	-	Validamycin	+

Positive: + Negative: -

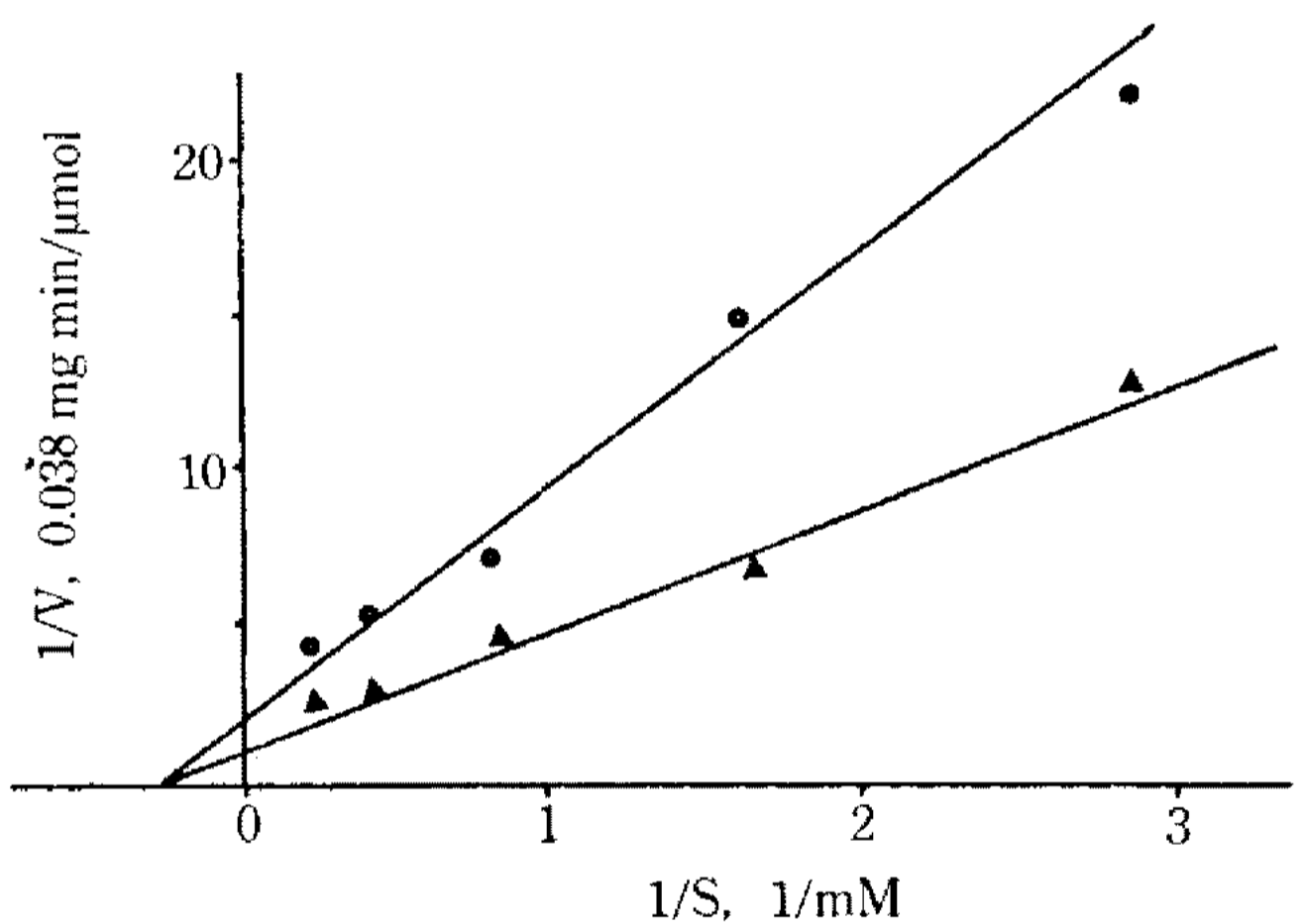


Fig. 10. Line weaver-Burk plot of initial rate of trehalase activity with (●-●) or without validamycin (▲-▲).

$\mu\text{mol min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ 로 나타났다. 산성 trehalase(17)의 경우 K_m 치 4.7 mM, V_{max} 가 $99 \mu\text{mol min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ 으로 나타났고, neutral trehalase(16)의 경우는 K_m 치가 34.5 mM로 나타나서, *Rhizoctonia solani*에서 분리한 trehalase가 기질특이성과 반응성이 더 높은 것으로 나타났다. Validamycin이 trehalase을 저해하는 기작은 Fig. 10에서와 같이 Non-competitive 저해 기작을 갖는데 비해서 validoxylamine의 경우(21)는 competitive inhibition을 하는 것으로 보고되고 있다. 따라서, 벼의 문고병원균에서 분리된 trehalase는 이미 보고된 것과 다른 종류의 trehalase임을 알 수 있었고 문고병 농용항생제인 trehalase을 저해하는 것으로 보아 본고에서 분리된 trehalase을 이용해서 저해물질을 찾는다면 문고병용 신규항생제를 탐색할 수 있는 좋은 방법이라 판단된다.

요 약

벼 문고병원균인 *Rhizoctonia solani*의 균사체에서 비조절 trehalase을 초음파처리, gel filtration 및 Fast protein liquid chromatography을 통해서 분리하여 단일 단백질임을 확인하였다. 분리된 trehalase는 분자량이 54000, pI가 5.1인 단백질로 최대 역가가 pH 5.4, 45°C에서 나타났다. Trehalase에 대한 Km치는 3.11 mM, Vmax는 105.3 $\mu\text{mol min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ 로 나타났다. 벼 문고병 농용항생제인 validamycin은 trehalase에 대해서 non-competitive inhibition을 하였다.

참고문헌

1. Elbein, A.D. 1974. The metabolism of α,α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **30**: 227-256.
2. Horikoshi, K., and Y. Ikeda. 1966. Trehalase in Conidia of *Aspergillus oryzae*. *J. Bacteriol.* **9**(5): 1883-1887.
3. Thevelein, J.M., J.A. den Hollander, and R.G. Shulman. 1982. Changes in the activity and properties of trehalase during early germination of yeast ascospores. *PNAS, U.S.A.* **79**: 3503-3507.
4. Catley, B.J., and P.J. Kelly. 1975. Metabolism of trehalose and pullulan during the growth cycle of *Aureobasidium pullulans*. *Biochem. Soc. Trans.* **3**: 1079-1081.
5. Virgilio, C.D., U. Simmen, T. Hottiger, T. Boller and A. Wiemken. 1990. Heat shock induces enzymes of trehalose metabolism, trehalose accumulation and thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*, even in the presence of cycloheximide. *FEBS Lett.* **273**(1, 2): 107-110.
6. Rudolph, A.S., and J.H. Crowe. 1985. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology.* **22**: 367-377.
7. Crowe, J.H. and J.S. Clegg. 1978. Dry biological system. Academic Press, New York.
8. Thevelein, J.H. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi *Microbiol. Rev.* **48**(1): 42-59.
9. Crowe, J.H., L.M. Crowe, and D. Chapman. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose science. **223**: 701-703.
10. Londesborough, J. and O. vuorio. 1991. Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex from baker's yeast: purification of a proteolytically activated form. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 323-330.
11. Francois, J., M-J. Nerves and H-G. Hers. 1991. The control of trehalose biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a catabolite inactivation and repression of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase. *Yeast.* **7**: 575-587.
12. Herzog, R.M., E.A. Galinski and H.G. Truper. 1990. Degradation of the compatible solute trehalose in *Ectothiorhodospira halochloris*: isolation and characterization of trehalase. *Arch Microbiol.* **153**: 600-606.
13. Marechel, L.R., and E. Belocopitow. 1972. Metabolism of trehalose in *Euglena gracilis*. I. Partial purification and some properties of trehalose phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **247**: 3223-3228.
14. Bhumiratana, A., R.L. Anderson and R.N. Costilow. 1974. Trehalose metabolism by *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* **119**: 484-493.
15. Vijayakumer, P., W. Ross and E.T. Rheese. 1978. α,α -trehalase of *Trichoderma viride*. *Can. J. Microbiol.* **24**: 1280-1283.
16. App, H. and H. Holzer. 1989. Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS, mutant. *J. Biol. Chem.* **264**(29): 17583-17588.
17. Mittenbuhler, K. and H. Holzer. 1988. Purification and characterization of acid trehalase from the yeast suc 2 Mutant. *J. Biol. Chem.* **263**(17): 8537-8543.
18. Winkler, K., I. Kienle, M. Burgert, J-C. Wagner and H. Holzer. 1991. Metabolic regulation of the trehalose content of vegetative yeast. *FEBS Lett.* **291**(2): 269-272.
19. Robson, G.D., P.J. Kuhn and A.P.J. Trinci. 1988. Effect of validamycin A on the morphology, growth and sporulation of *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium culmorum* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 3187-3194.
20. Hayakawa, Y., A.P. Jahagirdar, M. Yaguchi, and R.G.H. Downer. 1989. Purification and characterization of trehalase inhibitor from hemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Biol. Chem.* **264**(27): 16165-16169.
21. Asano, N., M. Takeuchi, Y. Kameda, K. Matsui and Y. Kono. 1990. Trehalase inhibitors, validoxylamine A and relative compounds as insecticides. *J. Antibiotics.* **43**(6): 722-726.
22. Ando, O., H. Satake, K. Itoi, A. Sato, M. Nakajima, S. Takahashi, H. Haruyama, Y. Ohhuma, T. Kinoshita and R. Enokita. 1991. Trehazolin,

- a new trehalase inhibitors. *J. Antibiotics* **44**(10): 1165-1168.
23. Abbott, S.D. 1989. Size exclusion chromatography in the characterization of polymers. Pp. 515-525 in J.C.M. Donald (ed.), *HPLC Instrumentation and application*. International Scientific Communications, Inc. U.S.A.
24. 오태광, 박관화. 1988. *Trichoderma viride*가 생산하는 cellobiohydrolase의 분리 및 특성. 한국산업미생물 학회지. **16**(3): 219-225.
25. Panek, A. and N.O. Souza. 1964. Purification and properties of baker's yeast trehalase. *J. Biol. Chem.* **239**(6): 1671-1673.
26. Iwasa, T., E. Higashide, H. Yamamoto, and M. Shibata. 1971. Studies on validamycins, new antibiotics. *J. Antibiotics*. **24**: 107-113.

(Received December 23, 1991)