

## *Candida boidinii*에 의한 Alcohol-Oxidase의 생성

이명숙<sup>†</sup> · 김미은 · 고병호 · 김상현

부산수산대학교 미생물학과

### Synthesis of Alcohol-Oxidase in *Candida boidinii*

Myung-Suk Lee<sup>†</sup>, Mee-Eun Kim, Byeong-Ho Koh and Sang-Hyun Kim

Dept. of Microbiology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

#### Abstract

The synthesis of alcohol-oxidase[EC 1.1.3.13] was investigated in the yeasts, *Candida boidinii* CBS 8106 and *C. boidinii* CBS 2428, during growth on different carbon sources. Alcohol-oxidase was undetectable in all strains submitted to the test in the mineral salts medium containing 1.0% glucose, but its production was rapidly increased when the carbon source was changed glucose to 1.0% methanol after 48hrs of incubation. When cells were grown on the various carbon sources (glucose, xylose, lactose, glycerol, galactose, saccharose, sorbose, lactic acid or acetic acid), the alcohol-oxidase activity was undetected. These carbon sources together with methanol yielded far better synthesis of alcohol-oxidase than in the case of carbon sources alone. Alcohol-oxidase was active towards alcohol of shorter alkyl-chain length than Cs and unsaturated alcohols. Its affinity for these alcohols decreased with the increasing length of the alkyl-chain. The apparent Km values for the methanol of *Candida boidinii* CBS 8106 and *C. boidinii* CBS 2428 were 1.96 and 1.21, respectively.

**Key words :** alcohol-oxidase, *Candida boidinii*, carbon sources, Km values

#### 서 론

Alcohol-oxidase[EC 1.1.3.13]는 methanol 자화성이 있는 효모나 곰팡이에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다<sup>1,2</sup>. 곰팡이의 경우는 생산균주가 극히 제한되어 있고 그 생성량도 적은 반면 효모의 경우는 *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Candida boidinii*, 그리고 *Kluyveromyces fragilis* 등 생산균주도 다양하고 균체내 효소 생성량도 많은 것으로 보고<sup>3-7</sup>되고 있어 주로 효모를 대상으로 한 alcohol-oxidase의 생산에 관하여 많이 연구되고 있다.

효모의 경우, 배지중의 탄소원에 의해 효소합성이 상당히 영향을 받아 methanol을 탄소원으로 한 경우가 효소 생성능이 가장 좋은 반면 glucose의 경우는 catabolite repression 현상을 유발시켜 효소 생성이 저해된다고 보고<sup>8,9</sup>되고 있다. 그외 다양한 탄소원에 대한 연구나 catabolite repression 현상의 원인과 그 기구에 대

하여서는 거의 연구되지 않는 실정이므로 catabolite derepression을 일으켜 alcohol-oxidase의 합성을 증대시키기 위하여 methanol이외의 다양한 탄소원에 의한 효소 생성능을 비교할 필요가 있는 것으로 사료된다.

따라서 본 연구자는 효모 균체내에서 탄소원에 의한 catabolite repression 현상의 원인과 기구를 규명하여 alcohol-oxidase의 생성을 증가시키기 위한 전단계 실험으로 3종류의 *Hansenula polymorpha*와 2종류의 *Pichia pastoris*를 시험균으로 여러가지 탄소원에서의 배양시간에 따른 효소 생산성을 실험 보고<sup>8,9</sup>한 바 있다. 본 보고에서는 alcohol-oxidase의 생성이 양호하여 산업적 이용가치가 있다고 알려져 있으나 다양한 균종에 관한 연구가 진행되고 있지않은 *Candida boidinii*를 대상으로 여러가지 탄소원에서의 효소생성능을 실험하여 다른 효모와의 효소 생성능을 비교하였다.

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 균주는 *Candida boidinii* CBS 8106 과 *Candida boidinii* CBS 2428이었다.

배지 및 배양조건

균체의 증식은 mineral salts medium<sup>9</sup>에 1.0% glucose를 첨가한 배지를, 효소생성은 탄소원으로 1.0% methanol을 첨가하여 사용하였다. 각 배지의 pH를 7.5로 조정하여 500ml용 삼각 flask에 250ml씩 분취 멸균한 다음 균체를 접종한 다음 30°C, 250rpm으로 조정된 진탕배양기(WTR, Infors)에서 일정 시간 배양하였다.

조효소액의 조제 및 비활성 측정

전보<sup>6</sup>의 방법에 따라 조제한 조효소액의 비활성은 alcohol-oxidase가 methanol을 분해하여 생성한 과산화수소를 peroxidase의 첨가로 분해시켜서 생성된 산소에 의한 ABTS[2,2'-azino-di(3-ethyl benz thiazoline 6-sulfonic acid)]의 산화정도를 spectrophotometer로 측정하는 방법<sup>10</sup>에 따라 그 활성을 측정하였다. 즉 ABTS 3 $\mu$ moles, peroxidase 10IU, methanol 0.5mM, 조효소액 그리고 인산완충액(10mM, pH 7.5)을 첨가하여 최종용량을 3ml로 조정하여 30°C에서 30분간 반응시킨 다음 410nm에서 흡광도(Unikon, 860)를 측정하였다. 이 때 표준곡선은 과산화수소 표준용액으로 흡광도를 측정하여 나타내었고 효소의 비활성은 단백질 1mg당 1분동안 생성된 과산화수소의  $\mu$ mole수로 표시

하였다. 여기서 단백질량은 Lowry법<sup>11</sup>에 따라 정량하였다.

결과 및 고찰

배양시간에 따른 alcohol-oxidase의 생성

배양시간에 따른 효소의 생성은 2단계 배양법<sup>7,8</sup>으로 행하였다. 즉 mineral salt medium에 1%의 glucose를 첨가하여 정상기까지 배양한 다음 균체를 무균적으로 분리, 세척한 다음 1%의 methanol이 함유된 새로운 배지에 재접종하여 효소생성을 유도하였다. 동시에 methanol과 glucose만을 탄소원으로 한 경우의 배양법으로 비교 실험하였다. 두 균주의 실험결과를 Fig. 1(*Candida boidinii* CBS 8106)과 Fig. 2(*Candida boidinii* CBS 2428)에 각각 나타내었다.

두 균주 모두 2단계 배양법이 다른 경우보다 월등히 효소 생성능이 좋아 methanol배지에 재접종 후 48시간만에 최대 활성(1.46 $\mu$ moles/min/mg, 1.32 $\mu$ moles/min/mg)을 나타낸 후 서서히 감소하였다. 한편 glucose만을 탄소원으로 배양한 경우는 전 배양기간을 통하여 효소는 생성되지 않았고 methanol의 경우는 배양 70시간만에 두 균주 모두 최대활성에 도달한 후 서서히 감소하였다.

두 균주에 의해 생성된 균체량과 효소활성을 Table 1에 상세히 나타내었다.

두 균주 모두 methanol 배지에 배양한 경우보다 2단계 배양한 경우에 효소 총 생성량이 약 2.5배 정도 좋았다. *Hansenula polymorpha* CBS 4732와 *Pichia pastoris* CBS 2612를 동일한 조건으로 실험한 결과 methanol배지에 배양한 경우의 alcohol-oxidase의 최대 활

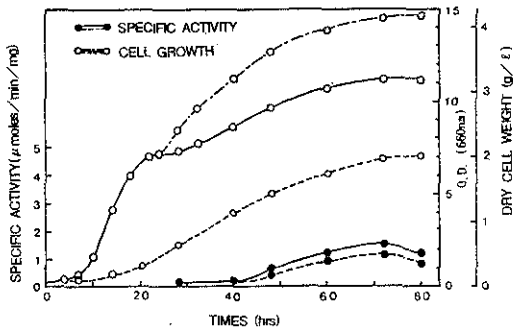


Fig. 1. Growth of cells and production of the alcohol-oxidase of *Candida boidinii* CBS 8106 in mineral salts medium containing glucose or methanol.

Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose and later transferred to the medium containing 1.0% methanol (○—○, ●—●). Cells were cultivated in the medium containing 1.0% methanol (○- -○, ●- -●) or 1.0% glucose (○---○).

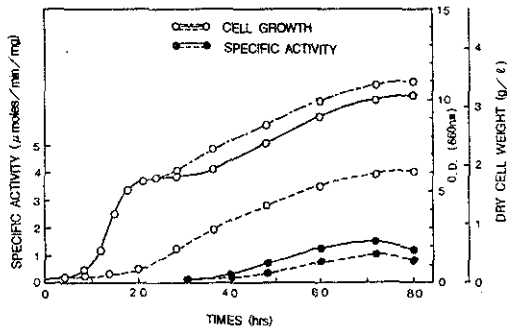


Fig. 2. Growth of cells and production of the alcohol-oxidase of *Candida boidinii* CBS 2428 in mineral salts medium containing glucose or methanol.

Refer to the footnote in Fig. 1.

Table 1. Comparison of the maximum production of the alcohol-oxidase in *Candida boidinii*

	<i>Candida boidinii</i> CBS 8106		<i>Candida boidinii</i> CBS 2428	
	I	II	I	II
Specific activity ( $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ )	1.46	1.05	1.32	1.05
Dry cell weight (g/L)	3.15	1.95	3.12	1.88
Amount of protein (mg/g)	86	72	87	70
Total activity (units/L)	396	147	350	138

I : Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose and later transferred to the medium containing 1.0% methanol

II : Cells were cultivated in the medium containing 1.0% methanol

Table 2. Influence of the methanol for the production of alcohol-oxidase in *Candida boidinii*

Microorganism	Substrate		Induction time (hrs)		
			30	48	72
<i>C. boidinii</i> CBS 8106	Methanol	0.5% (v/v)	0.98*	1.15	0.95
		1.0% (v/v)	1.20	1.46	1.10
		2.0% (v/v)	0.47	0.63	0.57
<i>C. boidinii</i> CBS 2428	Methanol	0.5% (v/v)	0.91	1.18	0.92
		1.0% (v/v)	1.08	1.32	1.02
		2.0% (v/v)	0.38	0.45	0.40

\*Specific activity ( $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ )

성은 각각 3.02와 2.67  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 이었고, 2단계 배양한 경우는 각각 4.10과 3.45  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 이었다<sup>7,8)</sup>. 이상의 결과로 alcohol-oxidase 생성 효모중 *Candida boidinii*가 효소 생성량이 제일 적은 것으로 나타났고 *Candida boidinii*에 의한 효소 생성량을 증가시키기 위해서 자외선 처리한 변이주(*Candida boidinii* S2)를 분리 사용하였으나 큰 효과는 없었다고 보고된 바도 있다<sup>12)</sup>.

#### 탄소원에 따른 alcohol-oxidase의 생성

본 항목에서는 균체를 glucose 배지에서 정상기까지 배양한 다음 methanol이나 그외 다른 여러가지 탄소원이 함유된 유도배지에 재접종, 배양하면서 alcohol-oxidase의 생성능을 실험하였다.

직쇄 alcohols : 지금까지 연구 보고<sup>13,14)</sup>된 바에 의하면 methanol이 alcohol-oxidase생성에 가장 좋은 탄소원으로 알려져 있다. 따라서 먼저 methanol농도별 생성능을 비교하여 Table 2에 나타내었다.

두 균주 모두 1.0% 농도에서 배양 48시간만에 최대 활성을 나타내었다. 한편 0.5%의 경우는 효소생성능이 약간 감소하였는데 비해 2.0%의 경우는 효소 생성능이 상당히 감소됨을 알 수 있었다.

다른 직쇄 alcohol 즉 1.0%의 ethanol, propanol, butanol 그리고 pentanol을 실험한 결과 모두 효소 생성능

을 관찰 할 수 없었고 methanol 0.5%와 다른 직쇄 alcohol을 0.5% 혼합한 경우도 마찬가지로의 결과이어서 여기에 표로써 나타내지 않았다. 이러한 결과는 다른 종류의 *Candida boidinii*의 경우에도 보고된 바 있으며<sup>15,16)</sup> 다른 균주 즉 *Hansenula polymorpha* CBS 4732와 *Pichia pastoris* CBS 2612의 경우는 다른 직쇄 alcohol을 단독 사용한 경우 효소생성은 되지 않았지만 methanol과 혼합 사용한 경우는 약간의 효소활성이 나타났으나 무시 할 수 있을 정도의 미량이었다<sup>7,8)</sup>. 이상의 결과로 미루어 효모는 methanol이외의 직쇄 alcohols에 의해 alcohol-oxidase의 합성은 catabolite repression을 받아 효소생성이 되지 않는 것을 알 수 있었다.

여러가지 탄소 화합물 : 효소 유도 탄소원으로 여러가지 탄소화합물을 사용한 경우 alcohol-oxidase의 생성능을 Fig. 3에 나타내었다. 탄소화합물을 단독으로 사용한 경우 lactic acid에서만 미량의 효소가 생성되었을 뿐이었다. 위의 탄소화합물들을 methanol과 혼합 사용한 경우는 효소생성량이 월등히 증가하였는데 특히 lactose, glycerol, galactose, saccharose 그리고 lactic acid의 경우는 methanol 단독 사용시 보다 오히려 증가 하였다. 이런 현상은 여러가지 탄소원에 의해 catabolite repression 현상이 일어나 효소합성이 억제되어 있다가 균체가 이런 탄소원을 완전히 이용, 소모시키고 나면 methanol에 의해 효소합성이 진행되는 것으

로 추정되어진다.

Candida boidinii가 생성한 alcohol-oxidase의 기질 특이성

본 시험균이 생성한 alcohol-oxidase의 기질 특이성

과 이를 비교하기 위하여 본 연구자 등에 의해 실험된 균주 등 alcohol-oxidase의 생성능이 가장 우수한 것으로 나타난 Hansenula polymorpha CBS 4732의 기질 특이성을 비교하여 Table 3에 나타내었다.

Alcohol-oxidase의 활성은 기질 alcohols의 탄소쇄

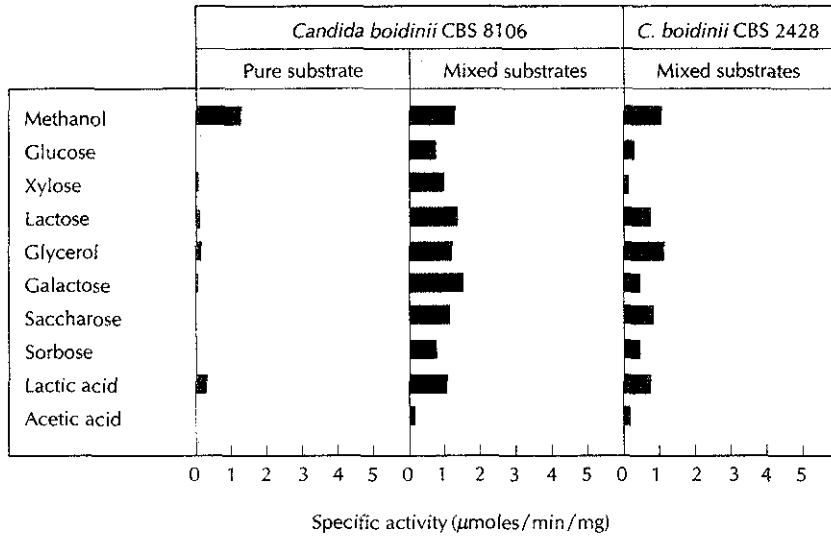


Fig. 3. Comparison of the production of alcohol-oxidase activity on various substrates in Candida boidinii. Pure substrate : 1.0% of substrate, mixed substrates : 0.5% of methanol + 0.5% of the other substrates.

Table 3. Oxidation of various substrates by the alcohol-oxidase produced in yeasts

Substrates	C. boidinii <sup>a</sup> CBS 8106			C. boidinii <sup>a</sup> CBS 2428			H. polymorpha <sup>b</sup> CBS 4732		
	S.A	(R.A)	Km (mM)	S.A	(R.A)	Km (mM)	S.A	(R.A)	Km (mM)
Methanol	1.46	(100)	1.96	1.32	(100)	1.21	4.10	(100)	1.39
Ethanol	1.03	(70.5)	3.33	0.94	(71.1)	4.08	1.33	(32.4)	5.26
Propanol	0.29	(20.1)	10.01	0.28	(21.3)	8.33	0.30	(7.24)	11.11
Butanol	0.20	(13.7)	19.24	0.16	(12.4)	16.95	0.12	(2.92)	105
Pentanol	0.11	(7.32)		0.47	(3.58)		0.023	(0.62)	
Hexanol	-			-			-		
Heptanol	-			-			-		
Octanol	-			-			-		
Allyl alcohol	0.87	(59.6)	5.12	0.59	(44.7)	3.70	0.21	(5.12)	10.13
Crotyl alcohol	0.55	(37.7)	6.84	0.43	(32.6)	5.88	0.20	(4.78)	12.82
Chloro ethanol	0.18	(12.3)		0.16	(12.1)		0.11	(2.71)	
Bromo ethanol	0.15	(10.3)		0.11	(8.31)		0.055	(1.32)	
Ethylene glycol	-			-			-		
Phenyl ethanol	-			-			-		
Isoamyl alcohol	-			-			-		
isobutyl alcohol	-			-			-		
2-propanol	-			-			-		
2-butanol	-			-			-		
Neo-pentylalcohol	-			-			-		

S.A. : specific activity (μmoles/min/mg)

R.A. : relative activity (%) : specific activity on tested substrate/specific activity on methanol

<sup>a</sup>Candida boidinii

<sup>b</sup>Hansenula polymorpha

가 길어질수록 감소하였고 Km치는 증가하였는데 이는 효소가 탄소쇄가 긴 alcohol에 affinity가 감소됨을 나타내었다. *H. polymorpha*와 *Candida boidinii*의 비활성을 비교하면 methanol을 제외한 다른 기질에 대한 비활성은 거의 비슷한 것으로 나타났다. 일반적으로 효모가 생성한 alcohol-oxidase는 탄소수 5개 이하인 직쇄 alcohols과 일부 불포화 alcohols에만 그 활성을 나타낸다고 알려져 있는데<sup>17,18)</sup> 이는 본 실험 결과와 잘 일치되고 있다.

## 요 약

*Candida boidinii* CBS 8106과 *Candida boidinii* CBS 2428의 배양조건과 탄소원에 따른 alcohol-oxidase의 생성능과 생성된 효소의 기질 특이성을 실험하였다. 배양조건에 따른 효소 생성은 glucose를 첨가한 mineral salt medium에서 균체를 정상기까지 배양한 뒤 methanol이 첨가된 배지에서 재배양하는 2단계 배양법이 가장 효율적이었고 이 때 효소 최대 생성치는 *Candida boidinii* CBS 8106과 *Candida boidinii* CBS 2428 각각 1.46 $\mu$ moles/min/mg과 1.32 $\mu$ moles/min/mg을 나타내었다. 효소 생성시 탄소원으로는 1.0%의 methanol이 가장 좋았고 기타 탄소 화합물의 경우, 단독 사용한 경우에는 효소생성을 볼 수 없었으나 methanol과 혼합 사용한 경우는 lactose, galactose, glycerol 그리고 saccharose의 경우는 methanol 단독 사용시 보다 오히려 효과가 좋았다. *C. boidinii*가 생성한 alcohol-oxidase는 기질로써 methanol을 가장 잘 이용하였고 탄소쇄가 길어질수록 이용율을 감소하여 탄소수 5개까지의 직쇄 alcohols과 일부 불포화 alcohol에만 활성을 나타내었다.

## 문 헌

1. Fukuda, D. S. and Brannon, D. R. : Oxidation of alcohols by *Botrytis cinerea*. *Appl. Microbiol.*, **21**, 550 (1971)
2. Fujii, T. and Tonomura, K. : Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by a *Candida* species. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2297 (1972)
3. Bringer, S., Sprey, B. and Sahm, H. : Purification and properties of alcohol-oxidase from *Poria contigua*. *Eur. J. Biochem.*, **101**, 563 (1979)
4. Allais, J. J. and Baratti, J. : A new methanol-assimilating thermotolerant yeast with a high cell yield. *J. Ferment. Technol.*, **61**, 339 (1983)
5. Wagner, F. : Alcohol-oxidase and catalase in peroxisomes of methanol grown *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.*, **59**, 231 (1975)
6. Eggeling, L. and Sahm, H. : Derepression and partial insensitivity to carbon catabolite repression of the methanol dissimilating enzymes in *Hansenula polymorpha*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 197 (1978)
7. Eraso, P. and Gancedo, J. M. : Catabolite repression in yeasts is not associated with low levels of c-AMP. *Eur. J. Biochem.*, **41**, 195 (1984)
8. 이명숙, 장동석, 최위경 : 여러가지 탄소원에 의한 *Hansenula polymorpha*의 alcohol-oxidase 합성. *산업 미생물학회지*, **17**, 461 (1989)
9. 이명숙, 허성호 : 여러가지 탄소원에 의한 *Pichia pastoris*의 alcohol-oxidase 생성. *한국영양식량학회지*, **18**, 435 (1989)
10. Majkic-Singh, N. and Berkes, I. : Spectrophotometric determination of ethanol by an enzymatic method with 2,2'-azino-di(3-ethylbenz thiazoline-6-sulfonate). *Anal. Chem. Acta*, **115**, 401 (1980)
11. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
12. Sakai, Y. and Tani, Y. : Formaldehyde production by cells of a mutant of *Candida boidinii* S<sub>2</sub> grown in methanol limited chemostat culture. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2615 (1986)
13. Fujii, T., Murakami, T., Ando, A. and Yabuki, M. : Effect of methanol concentration on levels of methanol dissimilating enzymes in *Candida* sp. N-16. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1913 (1984)
14. Allais, J. J., Loukitibi, A. and Baratti, J. : Effect of dilution rate and substrate concentration on the synthesis of methanol oxidizing enzymes in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Ferment. Technol.*, **61**, 425 (1983)
15. Hill, D. J., Han, A. C. and Lloyd, D. : Degradative inactivation of the peroxisomal enzyme, alcohol-oxidase during adaptation of methanol grown *Candida boidinii* to ethanol. *Biochem. J.*, **232**, 743 (1985)
16. Jenkins, R. O., Cartledge, T. G. and Lloyd, D. : Subcellular fractionation of *Candida boidinii* after growth on glucose or methanol. *J. General Microbiol.*, **131**, 335 (1985)
17. Kato, N., Tani, Y. and Ogata, K. : Enzyme systems for methanol oxidation yeasts. *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 675 (1974)
18. Van Dijken, J. P., Veenhuis, M., Van Rij, N. J. K. and Harder, W. : Microbodies in methanol assimilating yeasts. *Arch. Microbiol.*, **102**, 41 (1975)

(1993년 9월 5일 접수)