

야생 Killer 효모 *Candida dattila* 의 분리 및 동정

최언호* · 장해춘 · 정은영 · 정원철

서울여자대학교 식품과학과

Isolation and Identification of Wild Killer Yeasts *Candida dattila*

Choi, Eon-Ho*, Hae-Chun Chang, Eun-Young Chung and Won-Chul Chung

Department of Food Science, Seoul Woman's University, Seoul, Korea

This study was performed to isolate wild killer yeasts which might suppress the growth of contaminant yeasts during wine making. Seventeen strains of killer yeasts which were isolated from grapes in Korea showed different killing activity; higher with K109 and K112, and lower with K117 strain. There was no inhibition among the isolates by cross-reaction. Through the physiological, morphological and cultural test, the isolates were identified as a new killer yeast, *Candida dattila*, and then named *Candida dattila* K101-K117.

진핵세포에서의 killer system은 Bevan 등(1)이 1963년 *Saccharomyces cerevisiae* 가 같은 속의 효모를 죽인다는 것을 보고한 이래 *Torulopsis* (2), *Pichia* (3), *Debaryomyces* (4), *Hansenula* (5), *Kluyveromyces* (6), *Candida* (7) 속의 효모에서도 계속 발견되어 더욱 관심을 갖게 되었다(8). 그 후 Fink(9), Maule(10), Pilliskirk(11), Hara(12) 등에 의해 실험실 및 발효용 균주 중에 killer 효모들이 존재한다고 알려졌고, Stumm(13)은 과일, 버섯, 토양 등에 존재하는 야생효모 중에도 killer 효모가 있다고 보고하였다.

Killer 효모들이 발효과정 중에 오염되면 정상적인 발효를 저해하는 작용을 하게 된다. 특히 원료를 살균하지 않고 발효를 진행하는 포도주의 경우 포도 껍질에 존재하는 killer 효모들이 포도주의 이상발효를 초래할 수 있다. 이와 같이 killer 효모가 다른 효모의 생육을 억제하는 특성을 세포 융합이나 형질전환 등의 방법을 이용하여 다른 효모에 도입시켜 오염균주에 대하여 내성이 강하면서 발효율이 좋은 새로운 효모를 만들려는 데 관심을 갖게 되었다(6, 14, 15).

국내에서는 아직까지 야생 또는 발효액 중에 생육하는 killer 효모에 대한 보고를 찾을 수 없으며, 단지 최 등(14, 15)과 정(16) 등이 기존의 killer 효모를 이용하여 새로운 융합주를 개발한 보고가 있을 뿐이다. 본 연구에서는 새로운 killer 효모를 분리하여 오염균주에 내성이 강한 killer 특성을 새로운 균주개발에 이용하고자 하는 목적의 하나로서 일차적으로 새로운 killer 효모를 국내 포도껍질에서 분리하고 동정하였기에 이를 보고한다.

재료 및 방법

포도

1985년과 1986년 수확기에 각 지방에서 수확된 Cambell Early, Delaware, Tanored, Neo Muscat, 거봉, Red Millennium, Muscat of Alexander 등의 품종을 재배농장에서 직접 또는 시장에서 구입하여 사용하였다.

미생물 및 배지

Saccharomyces cerevisiae 5×47(killer sensitive)을 표준 감수성 균주로서, *Saccharomyces cerevisiae*

Key words: Killer yeast, wine yeast, killer plasmid, wine fermentation

*Corresponding author

1368 (super killer strain [K^+R^+ , K_1])을 super killer 균주로서 야생 killer 효모분리시 대조구로 사용하였다.

효모분리시에는 streptomycin (50 ppm)을 함유한 YPD (yeast extract-peptone-dextrose, 10-20-20 g/l) 한천배지를 사용하였으며, killer 활성의 확인에는 Pilliskirk (11)의 killer assay 배지인 MB (yeast extract-peptone-dextrose-citric acid- KH_2PO_4 -methylene blue-agar, 6-12-12-14-18.9-0.03-12 g/l, pH 4.2)를 사용하였다.

분리된 야생효모의 동정을 위하여는 Lodder (17), Barnette (18), Kreger-van Rij (19) 등의 방법에 의하여 배지 및 배양조건을 설정하여 수행하였다.

야생 killer 효모의 분리

포도 3, 4 개의 껍질을 5 ml의 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) 용액이 든 시험관에 넣고 vortex mixer를 이용하여 진탕하였다. 이 진탕액을 적절히 희석하여 streptomycin을 함유한 YPD 평판배지에 도말하거나 또는 killer 효모를 농축시키는 방법으로서 포도 껍질을 streptomycin을 함유한 YPD 액체배지에 넣고 25°C에서 하룻밤 진탕배양하였다. 이 액을 2×10^2 cells/ml 농도로 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 25°C에서 2일간 배양하여 나타난 colony를 *Saccharomyces cerevisiae* 5×47이 3시간 전에 미리 도말된 MB 배지에 toothpicking 또는 velvet replication하여 25°C에서 배양하고 clear zone이나 blue zone을 보인 균주를 순수분리하였다.

야생 killer 효모간의 상호작용

YPD 액체배지에서 배양한 각 시험균주 (seeded strain)를 4×10^6 cells/ml로 조정하여 MB 배지에 도말하고 이에 YPD 배지에서 2일 이상 배양한 다른 시험균주 (tested strain)들을 streak 하였다. 한편 각각의 시험균주가 도말된 MB 배지에 well (직경 0.6 cm) (20)을 놓고 여기에 YPD 액체배지에서 2일간 25°C로 진탕배양하여 membrane filter (0.45 μ m)로 여과한 여액을 60 μ l 가하였다. 이들을 25°C에서 2일간 배양한 후 caliper로서 clear zone이나 blue zone의 직경을 측정하였다.

야생 killer 효모의 동정

Killer 활성을 나타내고 그 활성이 가장 강한 K109와 K112 균주를 Barnette 등 (18)의 검색표에 의하여 생리학적 및 배양학적 특성을 검토하였고, Kreger-van

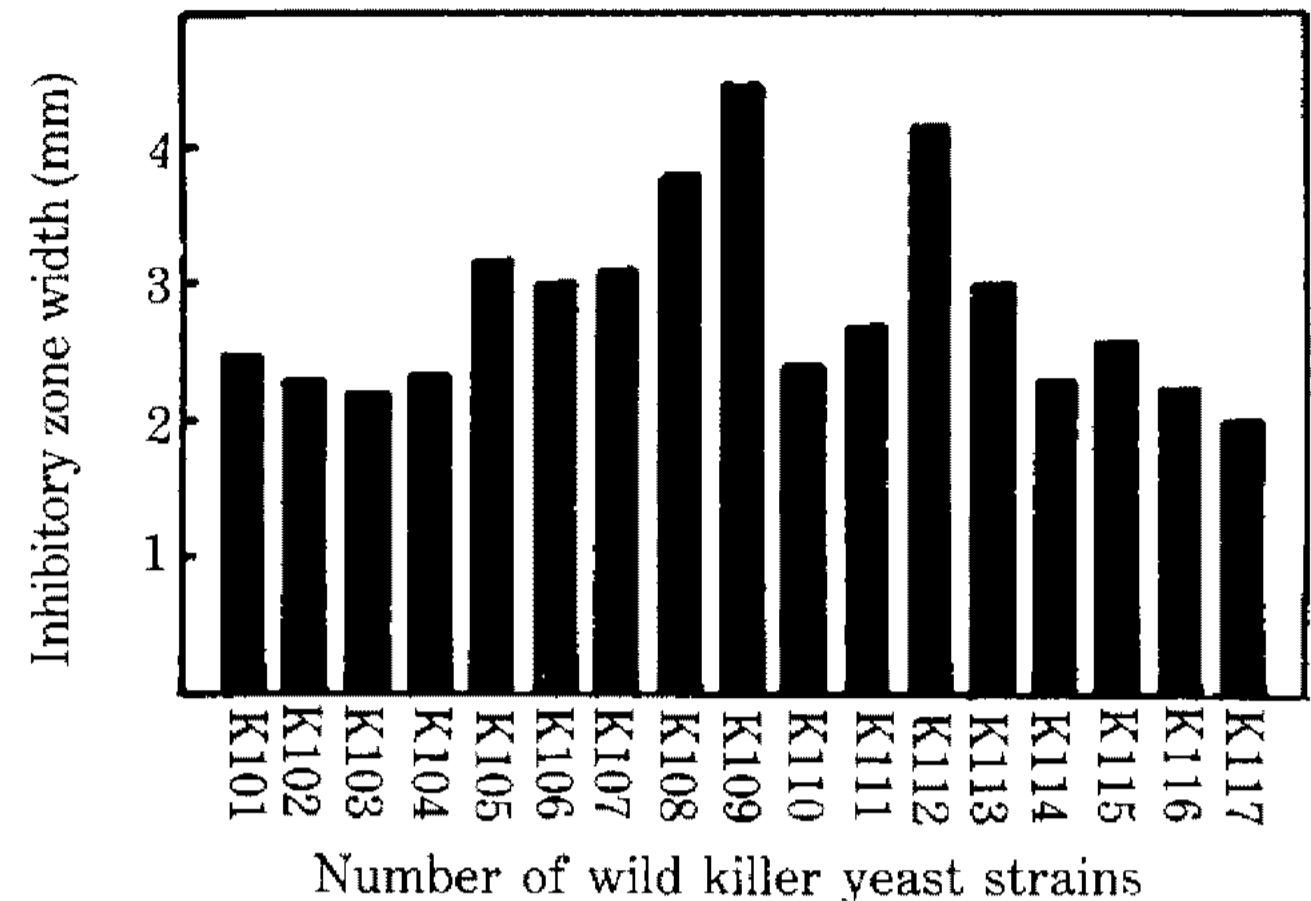


Fig. 1. Inhibitory effect of wild killer yeast strains isolated from Korean grapes against a killer sensitive strain, *Saccharomyces cerevisiae* 5×47.

Rij (19)와 Lodder 등 (17)의 방법에 의하여 확인하였다.

결과 및 고찰

야생 killer 효모의 분리

Saccharomyces cerevisiae 5×47을 감수성 균주로 사용하여 killer 활성을 가지는 균주를 선발하고자 포도 껍질 진탕액을 희석하여 streptomycin을 함유한 YPD 평판배지에 도말하여 배양 후 velvet replication하여 colony의 killer 활성을 조사하였으나 killer 효모를 발견할 수 없었다. 포도껍질에 야생 killer 효모의 분포가 극히 낮은 것으로 보고 killer 효모가 다른 감수성 균주의 생육을 억제하는 성질을 이용하여 streptomycin을 함유한 YPD 액체배지에 포도껍질을 넣고 25°C에서 하룻밤 집적배양한 후 killer 활성을 가진 효모를 조사하였다. 이러한 방법에 의하여 평원농장에서 수확된 Tanored 품종의 포도에서 17개의 killer 활성을 가지는 균주 (K101-K117)를 얻었다. 이 때 YPD 배지에서 생육한 colony가 720개이었고 그 중 17개 균주가 killer 활성을 가졌다.

분리된 효모의 killer 활성과 상호작용

분리된 17개의 균주를 가지고 killer 감수성 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* 5×47에 대하여 killer 활성을 측정한 결과는 Fig.1과 같다. 그림에서와 같이 K109와 K112 균주가 특히 killer 활성이 강하여 K109는 4.45 mm, K112는 4.14 mm의 저해대 (inhibitory zone)를 나타내었다.

*Saccharomyces cerevisiae*는 같은 *Saccharomyces*

Table 1. Morphological and cultural characteristics of killer strains (K101, K105, K108, K109, K112, K113, K117) isolated from grapes.

Shape of cell	Oval and elongate
Cell size	(3.0-4.0) × (5.0-7.5) μm
Cell volume	24-42 μm ³
Vegetative reproduction	Multilateral budding
Ascospore	Not observed
	on Gorodkova agar
	Acetate agar
	V8 agar
Pseudomycelium	Present
True mycelium	Not observed
Colony form	Irregular
Colony edge	Undulate
Surface	Slightly rough
Color	Cream

속의 효모에 대해 killer 작용이 있고, *Saccharomyces cerevisiae* K1 형질의 killer 효모는 K2 형질의 killer 효모의 생육을 저해하는 성질을 가지는 등 동일 속, 종의 균주라도 killer 형질이 다르면 상호작용에 의한 서로의 생육저해 현상이 다르게 나타난다(4).

본 실험에서 분리된 17개의 균주는 서로의 생육을 저해하는 현상을 보이지 않았다. 이러한 특성과 분리된 균주들이 농축배양시 하룻밤 YPD 배지에서 배양된 균주라는 점을 고려할 때 17개의 균주가 한 개 또는 몇 개의 killer 효모가 배양 중 번식된 것으로서 효모의 속이나 killer 형질이 같거나 유사한 균주라고 추정된다.

야생효모의 동정

Young 등(4)에 의하면 killer 상호교차반응이 동일한 균의 효모에도 다른 종이나 다른 속의 균주가 있을 수 있다고 하였다. 이에 본 실험에서는 분리된 균주 중 K101, K105, K108, K109, K112, K113, K117의 생리학적, 배양학적 특성을 검토하였으며, 그 결과는 Table 1-4와 같다.

Table 1과 같이 세포의 모양은 모두 계란형 및 다소 긴 모양이고 크기는 3.0-7.5 μm로 작은 편이었다. 다극성 출아법에 의하여 번식하고 potato-dextrose agar에서 mycocandida 형의 외균사(pseudomycelium)를 형성하고 진균사는 형성하지 않는 등 모든 균주가 같은 형태학적 특성을 나타냈다. 배양학적 특성을 보면 모든 균주들이 흰색에 가까운 cream 색의 colony를 형성하

Table 2. Assimilation of carbon and nitrogen sources of killer yeast strains isolated from grapes.

	Isolates						
	K101	K105	K108	K109	K112	K113	K117
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Melizitose	+	+	+	+	+	+	+
Sorbose	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	-	-
2-Keto-D-gluconate	-	-	-	-	-	-	-
Lactate	-	-	-	-	-	-	-
Succinate	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	-	-	-	-	-	-	-
Nitrite	-	-	-	-	-	-	-
Cadaverin	+	+	+	+	+	+	+
L-lysine	-	-	-	-	-	-	-

+: Assimilated, -: Not assimilated

였고, 그 표면이 약간 거칠며 colony가 다소 퍼지는 모양에 주위가 파상인 특징들이 모두 동일하게 나타났다.

당발효성은 Table 2와 같이 7개 균주가 모두 glucose에 대하여 발효성이 강하였으며 K101, K105, K108, K109, K112 균주는 galactose, maltose, sucrose, lactose, trehalose, melibiose, raffinose에 대하

Table 3. Sugar fermentation of killer strains isolated from grapes.

	Isolates						
	K101	K105	K108	K109	K112	K113	K117
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	+w
Maltose	-	-	-	-	-	+w	+w
Sucrose	-	-	-	-	-	+w	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-

+: Fermented, -: Not fermented, w: Weakly fermented

여 발효성이 없었고, K117 균주는 galactose와 maltose를 발효하였으나 발효력은 매우 낮고 약하였다. K113 균주의 경우 maltose와 sucrose를 발효시켰다.

탄소원에 대한 자화능은 Table 3에서와 같이 7개의 균주가 유사하여 glucose, fructose, maltose, sucrose, glycerol, melizitose를 자화할 수 있었으며, 특히 K117은 다른 6개의 균주가 자화하지 못하는 galactose에 의한 자화성이 있는 것으로 나타났다. 질소원에 대한 자화능 조사 결과는 Table 3과 같이 모든 균주가 nitrate에서는 극히 약한 생육상태를 나타내 nitrate를 첨가하지 않은 carbon base 대조구와 구별이 힘든 생육상태였다. Cadaverin에 대해 자화성이 매우 강한 것으로 나타났고 nitrite, L-lysine은 자화하지 못하였다.

Table 4에서와 같이 vitamin 요구성, cycloheximide 저항성 등 모든 생리학적 특성이 동일한 것으로 나타났으며, 0.5% calcium carbonate를 함유한 glucose-chalk agar 배지상에서 배양하였을 때 streak culture 주위에 clear zone을 나타내었고, 2% calcium carbonate를 함유한 glucose-chalk agar 배지상에서도 배양기간이 길어지면 clear zone을 나타내었으므로 산 생성능이 있는 균주임을 알 수 있었다.

앞에서 논의되었듯 분리된 killer 효모들은 다극출아 (multilateral budding)에 의하여 번식하고, V8 agar, Gorodkova agar, acetate agar 등의 sporulation 배지에서 2개월 동안 ascospore를 형성하지 않았으며, glucose 발효능이 강하였다. 또한 0.5%와 2% calcium carbonate를 함유한 glucose-chalk agar 배지

Table 4. Some physiological characteristics of killer strains isolated from grapes.

	Isolates						
	K101	K105	K108	K109	K112	K113	K117
Growth:							
in 0.01% cycloheximide	-	-	-	-	-	-	-
in 0.1% cycloheximide	-	-	-	-	-	-	-
in 50% glucose	-	-	-	-	-	-	-
in 60% glucose	-	-	-	-	-	-	-
at 20°C	+	+	+	+	+	+	+
at 35°C	+	+	+	+	+	+	+
at 37°C	+	+	+	+	+	+	+
at 42°C	-	-	-	-	-	-	-
in vitamin free medium*	-	-	-	-	-	-	-
in w/o niacin*	+	+	+	+	+	+	+
in w/o thiamine	+	+	+	+	+	+	+
in w/o pyridoxine	+	+	+	+	+	+	+
in w/o biotin*	+	+	+	+	+	+	+
in w/o myo-inositol*	+	+	+	+	+	+	+
Urease activity	-	-	-	-	-	-	-
Acid production	w	w	w	w	w	w	w

w: Weak, +: Positive, -: Negative

에서 glucose를 기질로 산 생성능이 있었다. 따라서 Kreger-van Rij(19)의 검색표에 의하여 *Candida* 속의 균주임이 확인되었다. Barnette(18) 등과 Lodder(17)에 의하여 탄소원 자화능과 질소원 자화능 등의 특성이 *Kluyveromyces thermotolerans*의 asexual state인 *Candida dattila*나 그 근연균으로 동정되었다.

*Candida dattila*의 killer 작용은 지금까지 보고되지 않았으며, 따라서 새로운 killer 효모들을 각각 *Candida dattila* K101, K105, K108, K109, K112, K113, K117로 명명하고 이들 효모의 특성에 관하여 계속 조사 중이다.

요 약

본 연구는 야생 killer 효모에 의한 포도주의 이상발효를 방지하고 오염균주에 내성이 강한 killer 특성을 이용하는 전 단계로서 국내 포도에서 생육하는 야생

killer 효모를 분리하고자 수행되었다. 그 결과 17 개의 killer 효모 균주를 분리하였고 그 중 K109와 K112의 killer 활성이 가장 강하였으며, K117 균주의 killer 활성이 가장 약하였다. 분리된 17 개의 균주는 서로의 상호작용에 의하여 생육을 억제하는 특성을 보이지 않았으며, 생리학적 및 배양학적 특성을 조사한 결과 지금까지 killer 효모로서 보고된 적이 없는 *Candida dattila*로 동정되었다. 이에 각 균주를 *Candida dattila* K101-K117로 명명하였다.

참고문헌

1. Bevan, E.A. and M. Makower: *Proc. Int. Congr. Genetic.*, The Hague, ed., Georts. S.J., **11**, 127 (1963).
2. Bussey, H. and N. Skipper: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **9**, 352 (1972).
3. Middelbeek, E.J., C. Stumn and G.D. Vogel: *Antonie van Leeuwenhoek*, **45**, 437 (1980).
4. Young, T.W. and M. Yagju: *Antonie van Leeuwenhoek*, **44**, 59 (1978).
5. Ohta, Y., Y. Tsukada, T. Sugimori, K. Kitano and S. Hara: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2953 (1983).
6. Gunge, N., K. Murata and K. Sakaguchi: *J. Bacteriol.*, **151**, 462 (1982).
7. Tipper, D.J. and K.A. Bostian: *Microbol. Rev.*, **48**, 125 (1984).
8. Rogers, D. and E.A. Bevan: *J. Gen. Microbiol.*, **105**, 199 (1978).
9. Fink, G.R. and C.A. Styles: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2846 (1972).
10. Maule, A.P. and P.D. Thomas: *J. Inst. Brew (London)*, **79**, 137 (1973).
11. Philliskirk, G. and T.W. Young: *Antonie van Leeuwenhoek*, **41**, 147 (1975).
12. Hara, S.: *J. Ferment. Technol.*, **62**(5), 325 (1984).
13. Stumn, C., J.M.H. Hermans, E.J. Middelbeek, A.F. Croes and G.J.M. Vries: *Antonie van Leewenhoek*, **43**, 125 (1977).
14. 최언호, 정은영, 정원철: *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, **31**(1), 1 (1988).
15. Seki, T., E.H. Choi and E. Ryu: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**(5), 1211 (1985).
16. 정은영: 서울여자대학교 대학원 논문 (1987).
17. Lodder, J.: *The Yeast Taxonomy Study*, North-Holland Publ. Co., (1971).
18. Barnett, J.A. and R.J. Pankhurst: *The Yeast*, Amer. Elsevier Pub. Co., Inc., N.Y. (1974).
19. Kreger-van Rij, N.J.W: *The yeast - A taxonomy study*. 3th ed. Elsevier Eciencs Publishers. B.V. - Amsterdam (1984).
20. Wilkins, W.H.: *Annu. Appl. Biol.*, **36**, 257 (1949).

(Received November 28, 1989)