

## *Candida dattila* K109 와 K112 균주의 Killer 특성

정원철 · 장해춘 · 최언호\*

서울여자대학교 식품과학과

### Killer Characteristics of *Candida dattila* K109 and K112 Strains

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

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

*Candida dattila* K109 and K112 isolated from grapes in Korea showed killer activity toward *Saccharomyces cerevisiae* 5×47, *S. cerevisiae* 1368, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, and *Brettanomyces*, and showed the most effective killer activity at 22-26°C and at pH 3.9-4.1. The killer activity of both toxins were remarkably decreased at higher temperature than 25°C and higher pH than pH 4.0. And the toxins were suggested to be glycoproteins inactivated by pronase E and pepsin. The killer activity was not cured by incubation at elevated temperature of 30-37°C, but cured by treatment with 0.0105-0.3 ppm cycloheximide.

Killer 효모는 killer 감수성 및 저항성 균주에 대한 활성과 killer 균주 상호간의 교차반응 등을 기준으로 분류되어 왔다(1). Wickner(2)는 균주의 사용용도에 따라서 K1-K3로 분류하기도 하였고, Bevan 등(3)은 killer 작용과 저항성 여부에 따라 4 군으로 분류하였다. 한편 Young 과 Yagi(4)는 killer 균주 상호간의 교차반응에 의하여 11 군으로 분류하였다.

Bevan(3), Nesterova 등(5)은 *Saccharomyces cerevisiae* 에 속하는 killer 효모의 세포에서 large double stranded(L ds) RNA 와 medium(M) ds RNA 를 발견하였고, 이들이 mitochondrial genome 과는 별도로 세포질 내에 존재하며 Mendel 의 유전법칙과 다르게 유전된다고 Al-Aidroos 등(6)이 보고하였다. 또한 *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Pichia* 속의 killer 효모에 대한 연구로서 killer toxin 의 작용기작, 안정성 등에 대한 여러 보고가 있다(7, 8).

저자 등이 포도에서 분리, 동정한 *Candida dattila* K109 및 K112 균주(9)는 지금까지 보고된 적이 없는

killer 효모로서 그 특성이 밝혀져 있지 않기에 이들 균주와 다른 속 효모들과의 상호작용, killer toxin 의 단백질 분해효소에 대한 작용, pH 및 온도의 효과 등을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 미생물 및 배지

저자 등이 포도에서 분리, 동정한 *Candida dattila* K109 와 K112 균주를 사용하였으며, *S. cerevisiae* 5×47 을 표준감수성 균주로서, *S. cerevisiae* 1368 을 super killer 균주로서 대조구로 사용하였으며, 여러 균주에 대한 killer 활성조사하기 위하여 연세대학교 종균 협회에서 효모들을 분양받아 각각 YPD(yeast extract-peptone-dextrose, 10-20-20 g/l) 배지에서 15 일 간격으로 계대보관하면서 사용하였다.

Killer 활성 측정 및 확인을 위하여는 Pilliskirk 와 Young(10)의 방법에 따라 MB 배지(yeast extract-peptone-dextrose-citric acid-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-methylene blue-agar, 6-12-12-14-18.9-0.03-12 g/l, pH 4.0)를 사용하였다.

### Killer 효모의 상호작용

YPD 액체배지에서 배양한 각 시험균주(seeded strain)를  $4 \times 10^5$  cells/ml로 조정하여 MB 배지에 도달하고 이에 YPD 사면배지에서 2일 이상 배양한 다른 시험균주(tested strain)들을 streak 하였다. 한편 각각의 시험균주가 도달된 MB 배지에 well(직경 0.6 cm) (11)을 놓고 여기에 YPD 액체배지에서 2일간 25°C로 진탕배양하여 membrane filter(0.45  $\mu$ m)로 여과한 여액(killer yeast culture filtrate)을 60  $\mu$ l 가하였다. 이들을 25°C에서 2일간 배양한 후 caliper로서 clear zone이나 blue zone의 직경을 측정하였다.

### 단백질 분해효소의 처리

단백질 분해효소인 pronase E와 pepsin의 역할을 결정하기 위하여 1% casein 용액을 기질로 사용하였다(12). 즉, 여러 농도의 pronase E와 pepsin을 증류수에 용해시키고 그 액 1 ml에 1.5 ml의 0.1 M sodium citrate buffer(pH 4.2)와 1.5 ml의 casein 용액(1% w/v)을 잘 혼합하여 20°C로 유지시켰다. 20시간 후 5 ml의 trichloroacetic acid(4% w/v)를 가하여 반응을 중지시키고 이것을 Watman filter paper No.1을 통과시켜 여기서 얻은 여액의 흡광도를 280 nm에서 측정한 결과 pronase E는 1.15 mg/ml가, pepsin은 0.95 mg/ml가 적당한 효소농도라고 결정하였다. 한편 killer 균주배양물의 여액 3 ml에 상기 효소액 1 ml를 가하여 잘 혼합하고 20°C에서 20시간 유지시킨 후 membrane filter(0.45  $\mu$ m)로 여과하고 여액 120  $\mu$ l를 well test를 사용하여 남아 있는 killer 활성을 조사하였다. 이 때 대조구로서는 105°C에서 15분간 가압 열처리하여 불활성화시킨 효소용액을 사용하였다.

### 온도에 따른 killer 활성의 측정

YPD 액체배지에서 25°C, 3일간 배양한 killer 균주배양물의 여액을 2시간 동안 20, 25, 30, 35, 40°C로 유지시키면서 20분 간격으로 50  $\mu$ l씩 취하여 well test로써 killer 활성을 측정하였다(11).

### pH에 따른 killer 활성의 측정

Killer 균주 배양물의 여액에 0.5 N NaOH와 0.5 N HCl을 가하여 pH를 2.0-6.0으로 조정하여 4°C와 20°C로 각각 12시간, 24시간 유지시킨 후 pH를 다시 4.2로 조정하여 well test로써 killer 활성을 측정하였다(11).

### Killer 특성의 curing

Fink와 Styles(13)의 방법에 의하였다. 즉, killer 균주를 YPD를 액체배지에서 25°C, 24시간 동안 배양한 후 0.6 M KCl로 세포의 농도를  $10^2$  cells/ml로 조정하고 cycloheximide를 0.0105-0.3 ppm 함유한 YPD 평판배지에 도달하여 25°C에서 48시간 배양하였다. 이 때 나타난 colony를 velvet replication법으로 MB 배지에 옮기고 25°C에서 2일간 배양하여 killer 활성을 확인하였다. 이를 반복실험한 후 cycloheximide를 함유한 배지에서 자란 균주와 killer activity를 가지지 않는 균주의 비로서 curing비를 나타내었다. 또한 가온에 의한 curing 여부를 확인하기 위하여 YPD 평판배지에 균주를  $10^2$  cells/ml로 조정하여 도달한 다음 30, 35, 37°C에서 각각 2일간 정온시킨 후 velvet replication하여 MB 배지에서 killer 활성을 나타내는지 조사하여 YPD에서 나타난 균수와 MB 배지에서 killer 활성을 가지지 않는 균수의 비로서 curing비를 나타내었다.

### Gel chromatography

균주를 25°C에서 3일간 배양한 후 4°C, 10,000 $\times$ g에서 원심분리한 상등액에 ammonium sulfate를 60% 되게 가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 10,000 $\times$ g에서 25분간 원심분리하였다. 침전물을 0.05 M sodium citrate buffer(pH 4.2)에 녹여서 4°C에서 하룻밤 투석시키고 arabic gum을 이용하여 120 배로 농축시켰다. 이 액 1 ml를 Sephadex G-150 column(1.9 cm $\times$ 25 cm)에 걸어 유속을 30 ml/hr로 조정하여 0.1 M sodium acetate buffer(pH 4.2)로 용출시켰다. 각 fraction의 단백질을 280 nm에서 정량하고(14) 480 nm에서 가용성 전당을 정량(15)하였으며 동시에 각 fraction의 killer 활성을 well test(11)로써 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Killer 효모의 상호작용

포도에서 분리하여 동정한 *C. dattila* K109와 K112 균주가 *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Brettanomyces*, *Candida* 등의 효모에 대해 Killer 활성을 가지는가를 조사한 결과는 Table 1과 같다. K109와 K112 분리균주와 *S. cerevisiae* 1368을 제외한 균주들은 *S. cerevisiae* 5 $\times$ 47에 대한 killer 활

**Table 1. Killing action of *Candida dattila* K109 and K112 toward different strains.**

Tested strain	Seeded strain											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K112	K109
<i>S. cerevisiae</i> 1368	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida dattila</i> K109	+	+	+	+	-	+++	+++	+	-	+	-	-
<i>Candida dattila</i> K112	+	+	+	+	-	+++	+++	-	+	-	-	-

- A : *Saccharomyces cerevisiae* 1368
- B : *Saccharomyces cerevisiae* 5×47
- C : *Kluyveromyces fragilis* KFCC 32007
- D : *Kluyveromyces fragilis* KFCC 35458
- E : *Candida tropicalis* KFCC 32008
- F : *Hansenula anomala* var. *anomala*
- G : *Debaryomyces hansenii* YUFE 1522 (KFCC 11662)
- H : *Torulopsis colliculosa* (Hartmann) Saccardo KFCC 32587
- I : *Pichia membranaefaciens* KFCC 32592
- J : *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et van Laer KFCC 11281

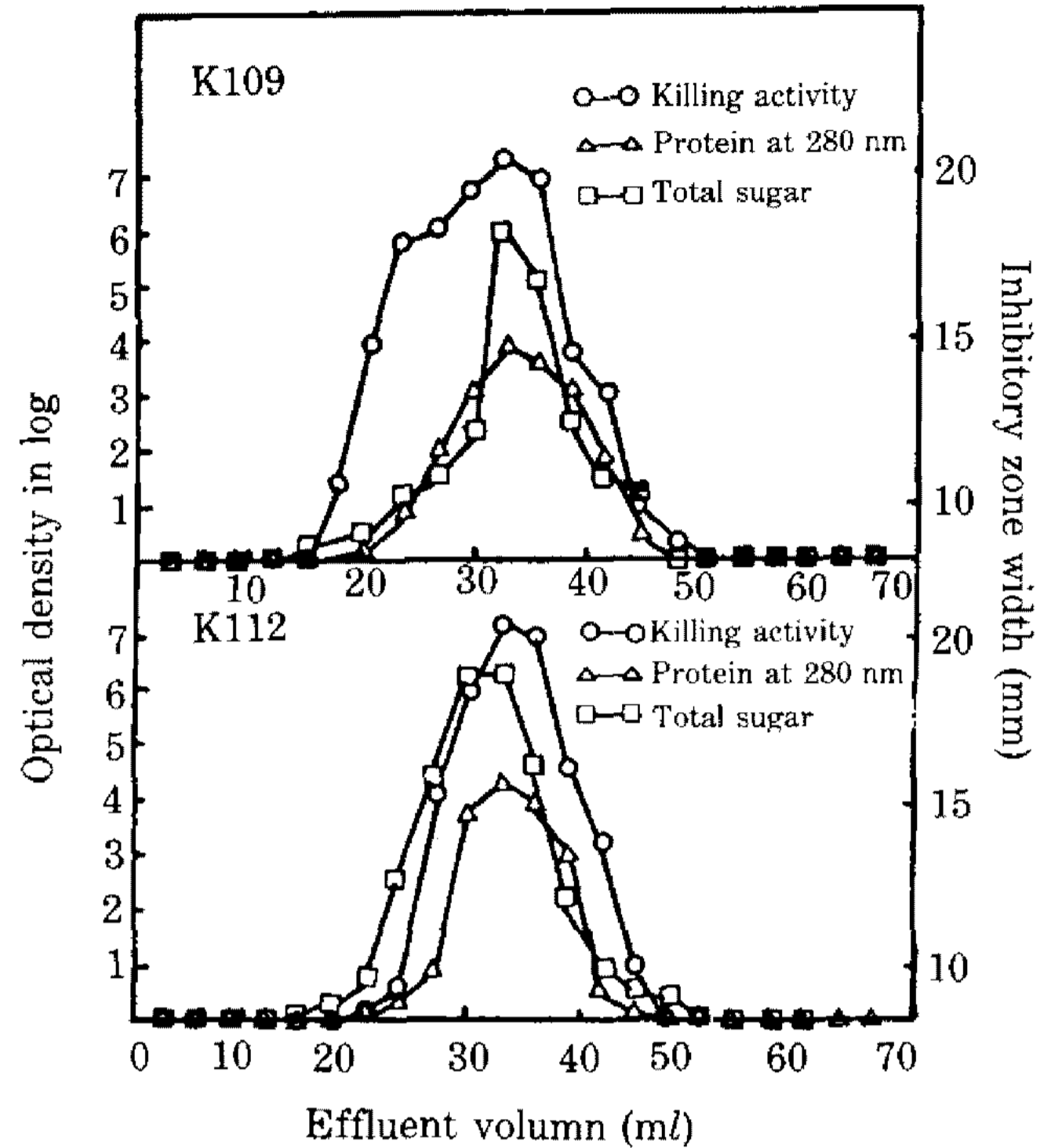
**Table 2. Effect of proteolytic enzymes on killing action of killer yeast culture filtrates.**

Proteolytic enzymes	Killer strains	
	K109	K112
<b>Pronase E:</b>		
Autoclaved	+	+
Not autoclaved	-	-
<b>Pepsin:</b>		
Autoclaved	+	+
Not autoclaved	-	-

성이 없는 균주였다. Table 1에서 보는 바와 같이 K109와 K112 균주는 *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Brettanomyces* 속 균주에 대하여 killer 활성을 가졌으며 특히 *Hansenula*와 *Torulopsis*에 대해서는 그 활성이 매우 높아서 clear zone이 크고 뚜렷하게 나타났다.

**Killer toxin의 분리 및 특성**

*C. dattila* K109와 K112 균주의 배양액을 membrane filter로 여과한 액에 pepsin과 pronase E를 처리한 결과 Table 2와 같이 모두 killer 활성이 불활성화되었다. 이것은 killer 활성을 나타내는 toxin이



**Fig. 1. Gel filtration of crude preparations of *Candida dattila* K109 and K112 killer toxin on Sephadex G-150.**

pepsin과 pronase E에 의해 영향을 받아 불활성화되는 단백질로 구성되어 있음을 반영해주는 결과로서 Woods와 Bevan(16)의 보고와 일치하고 있다. 이에 비해 Kagiya 등(8)은 *Hansenula anomala*에서 분리된 Kh-1 toxin은 papain에 대해서는 불활성화되었으나 pepsin, chymotrypsin A에 대해서는 불활성화되지 않았고 Kh-2 toxin은 pepsin, papain, chymotrypsin A에 의해 불활성화되지 않았다고 보고한 바 있다. 또한 이들은 *Aspergillus sojae*에서 얻은 조단백 분해효소를 처리하였을 때에는 Kh-1과 Kh-2 toxin의 활성이 40% 남아 있었다고 보고하였다.

K109와 K112의 toxin을 Sephadex G-150 gel chromatography를 행한 결과는 Fig.1과 같이 protein 함량이 33 ml fraction에서 가장 많았고, 이 fraction에서 당의 함량도 가장 많았으며 killer 활성도 가장 강하였다. 그러므로 본 실험에서 분리된 toxin의 구성분은 당을 함유한 glycoprotein이라 추정되며 이러한 결과는 *S. cerevisiae*, *S. capensis*, *Hansenula saturnus* 등의 toxin의 조성구성과 유사한 것이었다(3, 4).

**온도 및 pH에 따른 killer toxin의 안정성**

20-40°C에서 배양한 K109와 K112 균주배양 여액의

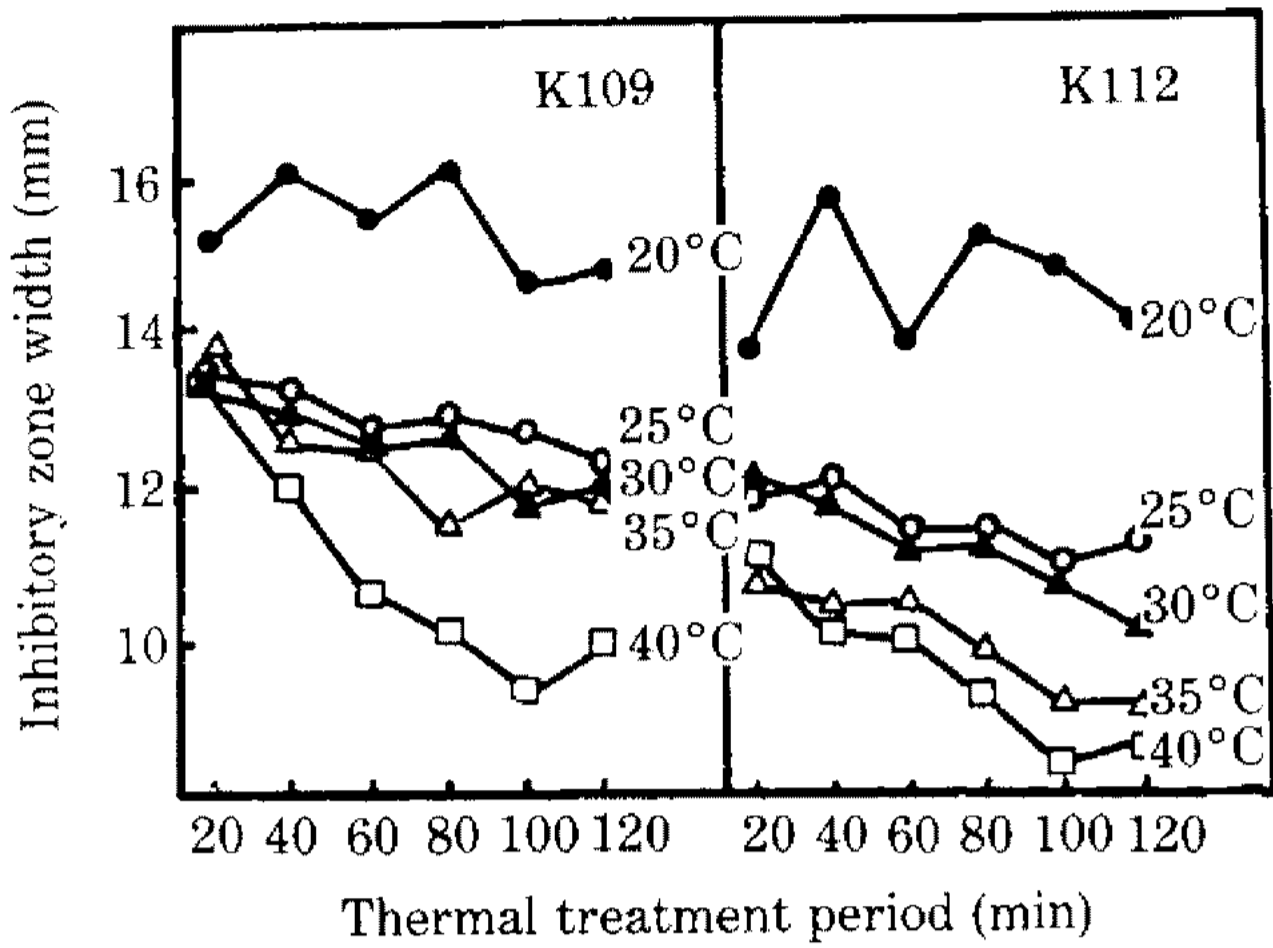


Fig. 2. Thermal stability of toxin activity of *Candida dattila* K109 and K112 culture filtrates.

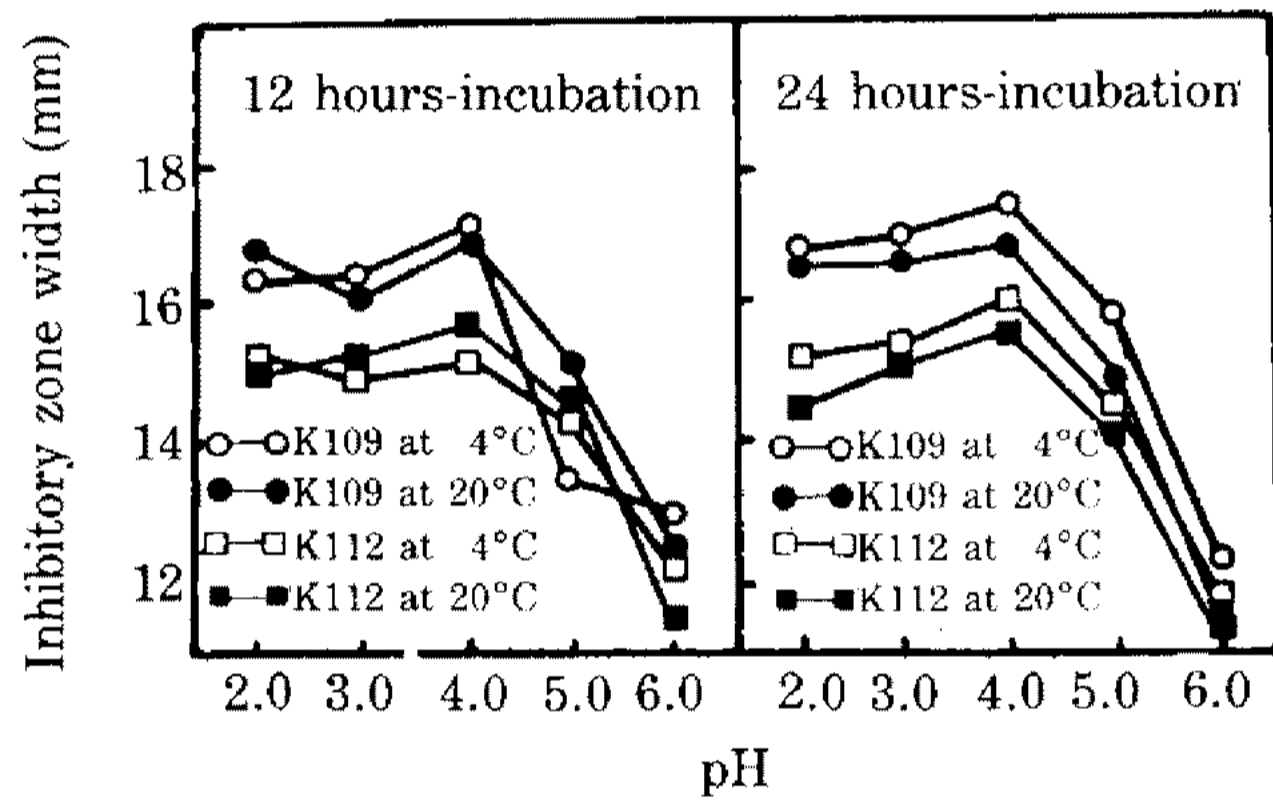


Fig. 3. pH stability of killer yeast culture filtrates after 12 and 24 hours-incubation.

killer 활성을 조사한 바 Fig.2에서 보는 바와 같이 온도가 상승함에 따라 그 활성이 저하되는 것으로 나타났으며 이러한 경향은 배양시간이 길어짐에 따라 보다 확실하게 나타났다. K109와 K112 균주의 killer 활성이 20°C에서 120분 동안에도 거의 안정하였으나 25°C부터는 저하되어 K112 균주의 경우 40°C에서는 그 활성이 거의 없어졌고 K109 균주는 약간 활성이 남아 있는 정도였다.

pH에 따른 killer toxin의 안정성은 Fig.3과 같다. K109와 K112 균주의 toxin 모두가 pH 2.0-4.0에서 안정하였으나, pH가 4.0보다 높을 경우에는 활성이 급격히 저하되어 pH 6.0 부근에서는 거의 실활됨을 알 수 있었다. Philliskirk와 Young(10)은 *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis* 속의 killer 효모에서 얻은 toxin의 pH 안정성에 따라 group I-group IV로 나누었는데, K109와 K112의 toxin의 pH 안정성은 group II의 최적 pH가 4.1-4.5

Table 3. Curing of killer character by treatment of cycloheximide.

Cycloheximide conc. (ppm)	Curing frequency (%)	
	<i>Candida dattila</i> K109	<i>Candida dattila</i> K112
0.0105	17.6	28.1
0.021	24.1	34.6
0.042	34.3	37.1
0.084	48.7	42.0
0.126	50.3	59.3
0.300	70.2	88.8

이고 pH 4.9에서는 활성이 극히 적으며 pH 5.4에서는 실활된다고 한 보고와 유사하나 좀더 낮은 pH 2.0-3.0 범위에서도 안정성을 보였다. K109와 K112 균주의 toxin이 낮은 pH에서도 안정성을 가지므로 발효액의 pH가 3.0 이하로 내려가는 포도주 제조공정에서도 안정하게 killer의 특성을 나타낼 수 있다고 생각된다.

**Killer 효모의 curing**

Killer 효모들은 저농도의 cycloheximide 처리나 가온에 의하여 killer factor가 실활(curing)되어 killer 활성을 잃는 경우가 있다(2, 17). Table 3에서와 같이 cycloheximide 농도가 0.0105-0.3000 ppm의 범위에서 그 농도가 높아질수록 curing율이 높아서 0.0105 ppm 처리구에서 K109 균주는 17.6%, K112 균주는 28.1%가 curing되었고, 0.3000 ppm 처리시에는 K109 균주가 70.2%, K112 균주가 88.8% curing되었다. Fink와 Styles(13)가 보고한 *S. cerevisiae* killer 균주의 경우 cycloheximide가 plate당 3.3-13.3 μg 함유시 4-9% curing된 것에 비하여 cycloheximide에 대하여 민감한 균주임을 알 수 있었다. Kagiya 등(8)은 효염성 *H. anomala* 균주에서 killer 활성을 발견하였으며 이 균주는 cycloheximide 처리에 의하여 curing되지 않았고 그 toxin의 특성이 Young와 Yagi(4)의 K1-K11 균과 다름을 알아내었다.

K109와 K112 균주는 30-37°C의 가온처리에 의하여 killer 활성이 남아 있어서 가온에 의하여는 curing이 되지 않음을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서 분리된 *C. dattila* K109와 K112 균주는 cycloheximide 처리에 의하여는 curing되는 특성이 강하나, 가온에 의하여는 curing되지 않는 것이 기존의 보고된(4, 9-17) killer 효모와 다소 다른 새로운 균주임을 알 수 있었

다.

## 요 약

포도에서 분리하여 동정한 *Candida dattila* K109 와 K112 균주는 *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Brettanomyces* 속 효모에 대해 killer 활성을 가졌으며, 이들 균주의 최적 pH는 3.9-4.0 이고, 최적 온도는 22-26°C였다.

*Candida dattila* K109 와 K112 균주의 toxin은 단백질 분해효소인 pronase E와 pepsin에 의해 killer 활성이 없어졌으며, 20°C에서는 비교적 안정하였으나 25°C 이상에서는 killer 활성이 급격히 감소하였으며, pH 2.0-4.0 범위에서 비교적 안정하였고 그 이상의 pH에서는 급격히 활성이 저하되었다. 이들 균주의 killer toxin은 gel filtration에 의하여 단백질과 당을 확인하였다.

*Candida dattila* K109 와 K112 균주는 0.0105-0.3 ppm cycloheximide 처리에 의하여 처리농도가 높을수록 killer 활성이 소멸되는 비율이 증가하였으며, 30-37°C의 가온처리에 의하여는 killer 활성이 소멸되지 않는 등 기존의 killer 효모의 특성과 다소 다른 특성을 나타냈다.

## 참고문헌

1. Puhalla, J.E.: *Genetics*, **9**, 140 (1973).

2. Wickner, R.B.: *Bacteriol. Rev.*, **40**, 757 (1976).
3. Bevan, E.A. and J.M. Somers: *Genet. Res.*, **14**, 71 (1969)
4. Young, T.W. and M. Yagiu: *Antonie van Leeuwenhoek*, **44**, 483 (1978).
5. Nesterova, G.F., J. Soom and P. Perevozchikov: *Mol. Biol.*, **10**(4), 930 (1976).
6. Al-Aidroos, K., J.M. Somers and H. Bussey: *Mol. Gen. Genet.*, **122**(4), 323 (1973).
7. Gunge, N., K. Murata and K. Sakaguchi: *J. Bacteriol.*, **151**(1), 462 (1982).
8. Kagiya, S., T. Aiba, K. Kadowaki and K. Mogi: *Agric. Biol. Chem.*, **52**(1), 1 (1988).
9. 최언호, 장해춘, 정은영, 정원철: 한국산업미생물학회지 **18**(1), 1 (1990).
10. Philliskirk, G. and T.W. Young: *Antonie van Leeuwenhoek*, **41**, 147 (1975).
11. Wilkins, W.H.: *Annu. Appl. Biol.*, **36**, 257 (1949).
12. Hull, M.E.: *J. Dairy Sci.*, **30**, 881 (1947).
13. Fink, G.R. and C.A. Styles: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**(10), 2846 (1972).
14. Citti, E., W.E. Sandine and P.R. Elliker: *J. Dairy Sci.*, **46**, 337 (1963).
15. Dubois, M., K.A. Gilles, W.K. Hamilton, P.A. Rober and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
16. Woods, D.R. and E.A. Bevan: *J. Gen. Microbiol.*, **51**, 115 (1968).
17. Wickner, R.B.: *J. Bacteriol.*, **117**(3), 1356 (1974).

(Received November 28, 1989)