

Killer 효모 융합주 FWKS 260이 분비하는 Killer Toxin의 정제

정기택 · 방광웅¹ · 우철주 · 정용진 · 김재근² · 송형익³

경북대학교 농과대학 식품공학과

¹경북전문대학 식품가공과

²계명전문대학 식품영양과

³대구공업전문대학 식품공업과

원형질체 융합을 통하여 육성한 killer 효모 융합주 FWKS 260의 killer toxin을 ammonium sulfate fractionation, Amicon PM 10 concentration, Sephadex G-200 및 Sephadex G-75 column chromatography를 행하여 정제한 결과 단일 단백질 band를 보여 순수하게 정제되었음을 알 수 있었고, 단백질 분해효소를 처리한 결과 killer 활성이 소실되어 killer toxin의 단백질 부분이 killer 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 그리고 이 toxin은 20°C에서는 거의 안정하였으나, 온도가 증가함에 따라 점차 활성이 소실되었고, pH 2.0-5.0에서 비교적 안정하였다. 한편, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis결과 분자량은 약 13,000 임을 알 수 있었고, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 행한 후 Schiff's reagent로 염색한 결과 붉은 단일 band를 보여 정제된 killer toxin은 glycoprotein임을 확인 할 수 있었다.

KEY WORDS □ Killer yeast fusant, Killer toxin, Glycoprotein toxin

효모들 중에는 단백질 혹은 glycoprotein으로 구성된 이른바 "killer toxin"을 분비하여 동종 또는 이종의 감수성 효모를 치사시키는 현상은 이미 잘 알려져 있다(12). 이미 killer 균주들은 그들의 교차 반응 양상에 의거하여 4군(TOX1-TOX4)으로 (11), 또는 10군(14)으로 분류되고 있다. 이 때 glycoprotein성분의 TOX 1군은 주로 *Saccharomyces cerevisiae*의 실험실 보관 균주에서 발견되며, 분자량 11,500 정도인 단백질 부분이 killer 활성을 나타내고, 야생효모 및 양조 오염균주에서 발견되는 TOX 2군은 TOX 1군의 killer 효모를 치사시키는데, 이 TOX 1군의 균주를 K₁ killer라 하고, TOX 2군의 균주를 K₂ killer라 하는데, K₁과 K₂ 균주는 상호간의 toxin에서 감수성을 가지며 또 다른 형태인 K₃ 균주도 있어 K₂ 이외로 균주를 치사시키며, K₂와 K₃의 형질을 K₁ 균주에 이전하면 교차 면역성을 나타낸다고 하는데, killer toxin에 대한 분리 및 특성은 여러 균주에서 밝혀지고 있다. Wood와 Bevan (13)은 *S. cerevisiae*에서 추출한 toxin 성분이 단백질이라 추정하였고, Palfree와 Bussey (9)도 정제한 toxin이 분자량 11,470 정도인 단백질임을 밝혔는데, *S. cerevisiae* (1), *Torulopsis glabrata* (2), *Pichia kluveri* (8) 및 *S. cerevisiae* (10)에서는 glycoprotein인 것으로 알려지고 있다. 이미 저자들은 야생의 killer 효모를 분리하여 기존의 alcohol 발효 효모와의 원형질체 융합을 통하여 killer 형질을 도입시킴으로서 새로운 killer 균주를 육성한 바 있다 (4-6). 본 논문에서는 융합주가

분비하는 killer toxin을 정제하여 그 특성을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 융합주 FWKS 260으로서 전보(4-6)에 기술한 방법에 의하여 융합하고 선별된 균주이며 배지는 전보와 동일한 조성으로 제조하여 사용하였다.

Killer 활성 측정

Killer 활성은 Chung 등(4-6)의 방법에 따라 'well test' 법으로 측정하였다.

단백질 분해효소의 처리

단백질 분해효소인 pronase E와 pepsin의 역가를 결정하기 위하여 1% casein 용액을 기질로 사용하였다 (3). 즉, 여러 농도의 pronase E와 pepsin 용액 1 ml에 0.1 M citrate-phosphate 완충액(pH 4.7) 1.5 ml와 1% casein 용액 1.5 ml를 잘 혼합하고 20°C로 조절하여 20시간 반응시킨 후 4% trichloroacetic acid 5 ml를 가하여 반응을 중지시키고, 이것을 Whatman No. 1 filter paper를 통과시켜 얻은 여액의 흡광도를 280 nm에서 측정한 결과 pronase E는 1.20 mg/ml가, pepsin은 0.95 mg/ml가 적당한 효소 농도라고 결정하였다. 한편, killer toxin 정제액 3 ml에 상기 효소액 1 ml를 가하여 잘 혼합하고 20°C에서 20 시간 반응시킨 후 membrane filter(0.45 μm)로 여과

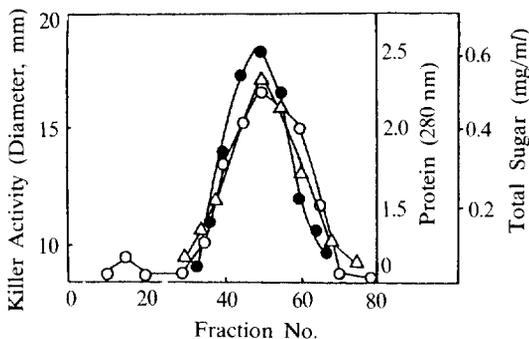


Fig. 1. Gel filtration of the FWKS 260 killer toxin on a Sephadex G-200 column. The conditions for the column chromatography are given in "Results and Discussion." Absorbance at 280 nm (○), killer activity (●), and concentration of total sugars (△).

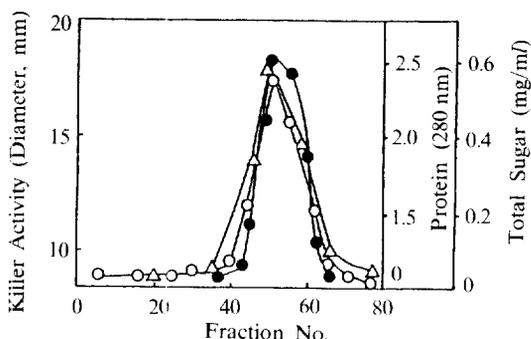


Fig. 2. Gel filtration of the FWKS 260 killer toxin on a Sephadex G-75 column. The conditions for the column chromatography are given in "Results and Discussion." Absorbance at 280 nm (○), killer activity (●), and concentration of total sugars (△).

하고 여액 200 μ l를 well test하여 잔존하는 killr 활성을 조사하였다. 이때 대조구로서 105°C에서 15분간 가압 열처리하여 불활성화시킨 효소용액을 사용하였다.

전기영동

정제된 killer toxin의 순도확인 및 분자량 측정은 Laemmli 법(7)에 따라 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 행하였고, glycoprotein의 염색은 fuchsin-sulphite(Schiff's reagent)로 Zacharius 등의 방법 (15)에 따라 행하였다. 이 때 표준 단백질은 lysozyme (MW 14,300), β -lactoglobulin(18,400), trypsinogen(24,000), pepsin(34,700), egg albumin (45,000), bovine serum albumin(66,000)을 사용하였다.

결과 및 고찰

Killer toxin의 정제

용합주 FWKS 260을 25°C에서 24시간 배양한 후, 4°C, 10,000 rpm(Hitachi, 20PR-52D)에서 원심분리한 상등액에 ammonium sulfate를 80%되게 가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 침전물을 소량의 0.05 M citrate-phosphate buffer(pH 4.7)에 녹여서 동일 buffer로 하룻밤 투석시키고 membrane filter(Amicon PM 10)로 농축시켰다. 농축액 2 ml를 미리 0.05 M citrate-phosphate buffer(pH 4.7)로 평형화 시킨 Sephadex G-200 column(1.5 cm×80 cm)에 주입하여 동일 완충액을 사용하여 8 ml/hr의 속도로 2.8 ml/fraction 씩 순차적으로 용출시켰다. Fig. 1에 나타난 것처럼 killer 활성을 나타내는 분획을 농축(Amicon PM10)하여 다시 Sephadex G-75 column(2.3 cm×50 cm)에 주입하여 8 ml/hr의 속도로 3 ml/fraction씩 용출시킨 결과 Fig 2에서 처럼 fraction No. 50에서 단백질과 당 함량이 가장 많았고 killer 활성도 가장 강하였다.

Table 1. Effect of proteolytic enzymes on killing action of the purified killer toxin.

Proteolytic enzymes	Killing action
Pronase E:	
Autoclaved	+
Not autoclaved	-
Pepsin:	
Autoclaved	+
Not autoclaved	-

+ or - means that the killing action wer existed or not, respectively. Detailed descriptions are given in "Materials and Methods".

이로 미루어 분리된 killer toxin의 주성분은 당을 함유한 glycoprotein이라 추정되며 이러한 결과는 *S. cerevisiae*, *S. capensis*, *Hansenula saturnus* 등의 toxin 조성과 유사한 것이었다 (14).

또한 정제된 killer toxin에 pronase E와 pepsin을 처리한 결과 Table 1과 같이 모두 killer 활성을 나타내는 toxin이 이들 단백질 분해효소에 의해 실패되는 단백질로 구성되어 있음을 나타내고 있는 결과라 생각되어 진다.

Killer toxin의 안정성

정제된 killer toxin을 2시간 동안 20, 25, 30, 35 및 40°C로 유지시키면서 20분 간격으로 200 μ l씩 취하여 killer 활성을 측정한 결과, Fig. 3에서 처럼 온도가 상승함에 따라 그 활성이 저하되는 것으로 나타났으며, 이러한 경향은 처리시간이 길어질수록 뚜렷하여 20°C에서는 2시간 후에도 거의 안정하였으나, 25°C부터 저하되기 시작하여 40°C에서는 그 활성이 거의 없어졌다.

또한 pH에 대한 안정성은 정제된 toxin에 0.1 N NaOH와 0.1 N HCl을 가하여 pH를 2.0-6.0으로 조

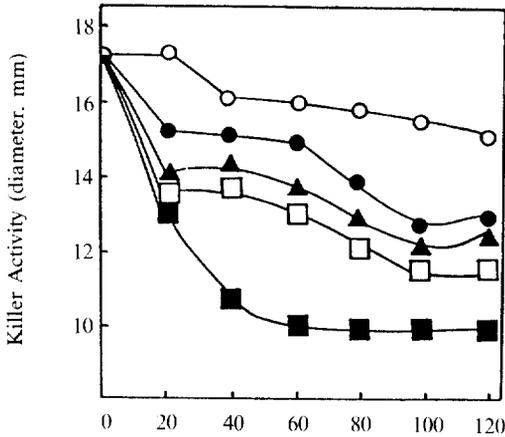


Fig. 3. Thermal stability of the killer toxin from FWKS 260. The killer toxin in 0.05 M citrate-phosphate buffer (pH 4.7) was incubated at the indicated temperatures 20 (○), 25 (●), 30 (△), 35 (□), and 40°C (■) for 2 hrs. Then the residual activities were assayed by the 'well test'.

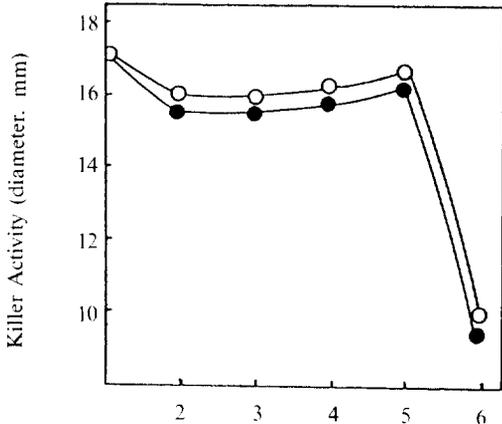


Fig. 4. pH stability of the killer toxin from FWKS 260. The killer toxin was incubated in the indicated pH with 0.1 N NaOH or 0.1 N HCl ranged from pH 2.0 to 6.0 at 4°C for 12 (○) and 24 hrs (●). Then the residual activities were assayed by the 'well test'.

정하여 4°C에서 각각 12시간 및 24시간 유지시킨 후 다시 pH 4.7로 조절하여 활성을 측정함 결과 Fig. 4에서와 같이 처리 시간에 관계없이 pH 2.0-5.0에서 안정하였으나, pH가 5.0보다 높은 경우에는 활성이 급격히 저하되어 pH 6.0 부근에서는 거의 실패됨을 알 수 있었다.

분자량 측정

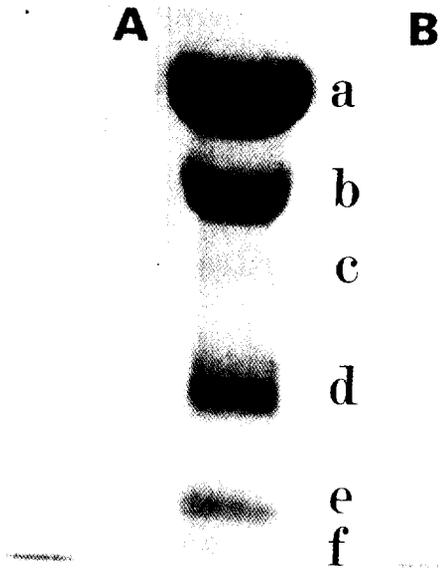


Fig. 5. (A), SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified killer toxin of FWKS 260 and calibration proteins: A, bovine serum albumin (MW 65,000); B, egg albumin (45,000); C, pepsin (34,700); D, trypsinogen (24,000); E, β -lactoglobulin (18,400); F, lysozyme (14,300). (B) Detection of the carbohydrate moiety of the killer toxin of FWKS 260 by staining with Schiff's reagent after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동 결과 Fig. 5(A)에서처럼 단일 단백질 band를 보여 순수하게 정제되었음을 알 수 있었고, 이 band의 Rf치는 0.98로서 lysozyme (MW 14,300)과 유사하여 분자량은 약 13,000으로 추정되었다.

한편, 정제된 killer toxin이 glycoprotein인가를 확인하기 위하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 후 fuchsin-sulphite로 염색한 결과 Fig. 5와 같이 붉은 단일 band를 보여 정제된 killer toxin은 glycoprotein인 것으로 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구는 1990년도 교육부 자유과제 학술연구조성비 지원에 의해 수행된 연구의 일부분이며 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Bussey, H., 1972. Effects of yeast killer factor on

- sensitive cells. *Nature*, **325**, 73-75.
2. **Bussey, H. and N. Skipper**, 1975. Membrane-mediated killing of *Saccharomyces cerevisiae* by glycoproteins from *Torulopsis glabrata*. *J. Bacteriol.*, **124**, 476-483.
 3. **Choi, E.H.**, 1990. Killer characteristics of *Candida dentata* K 109 and 112. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**, 126-130.
 4. **Chung, K.T., K.W. Bang, S.G. Chung, H.I. Song and J. K. Kim**, 1989a. Isolation of the killer yeasts and its characteristics. *Korea. J. Microbiol.*, **27**, 415-421.
 5. **Chung, K.T., K.W. Bang, H.I. Song, J.K. Kim and Y. J. Jung**, 1989b. Conditions for protoplast formation and fusion of the killer yeast. *Kor. J. Microbiol.*, **27**, 422-429.
 6. **Chung, K.T., K.W. Bang, J.K. Kim, H.I. Song and Y.J. Jung**, 1990. Characterization of protoplast fusant between killer yeast and alcohol-fermenting yeast. *Kor. J. Microbiol.*, **28**, 55-64.
 7. **Laemmli, U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-685.
 8. **Middelbeek, E.J., J.M.H. Hermans, and C. Stumm**, 1979. Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.*, **45**, 437-450.
 9. **Palfree, R. and H. Bussey**, 1979. Yeast killer toxin: Purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **93**, 487-493.
 10. **Pfeiffer, P. and F. Radler**, 1982. Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 2699-2706.
 11. **Rogers, D. and E.A. Bevan**, 1978. Group classification of killer yeasts based on cross-reactions between strains of different species and origin. *J. Gen. Microbiol.*, **105**, 199-202.
 12. **Tipper, D.J. and K.A. Bostian**, 1984. Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. *Microbiol. Rev.*, **48**, 125-156.
 13. **Wood, H.A. and E.A. Bevan**, 1968. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **51**, 115-126.
 14. **Young, T.W. and M. Yagiu**, 1978. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **44**, 59-77.
 15. **Zacharius, R.M., T.E. Zell, J.H. Morrison and J.J. Woodlock**, 1969. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *J. Anal. Biochem.*, **30**, 148-152.

(Received February 11, 1992)

(Accepted March 3, 1992)

ABSTRACT: Purification of Killer Toxin from Killer Yeast Fusant FWKS 260

Chung, Ki Taek, Kwang Woong Bang¹, Chul Joo Woo, Yong Jin Jung, Jae Keun Kim² and Hyung Ik Song³ (Department of Food Engineering, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea, ¹ Department of Food Processing, Kyungpook Junior College, ² Department of Food and Nutrition, Keimyung Junior College, ³ Department of Food Technology, Taegu Technical Junior College)

Killer toxin from killer yeast fusant FWKS 260 developed by protoplast fusion between the wild killer yeast and alcohol-fermenting yeast was purified by ammonium sulfate fractionation, Amicon PM 10 concentration, Sephadex G-200 and Sephadex G-75 column chromatography. The purified killer toxin showed a single band by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The protein part of killer toxin was active site, which was found by treating the proteolytic enzyme such as pronase E and pepsin to killer toxin. The killer toxin was stable at pH 2.0-5.0 and 20°C, but inactivated with increasing temperature. The molecular weight was determined to be approximately 13,000 according to the results obtained from the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. It was confirmed that the purified killer toxin is glycoprotein by showing a red single band after staining with Schiff's reagent.