

재래식 메주로부터 야생 Killer 효모의 분리 및 Killer Toxin의 생산

†이 중 수 · 이 성 훈 · 김 재 호 · ¹유 진 영

배재대학교 유전공학과

¹한국식품개발연구원 식품생물공학 이화학연구본부

(접수 : 1999. 5. 12., 게재승인 : 1999. 7. 14.)

Isolation of Wild Killer Yeast from Traditional Meju and Production of Killer Toxin

Jong-Soo Lee†, Sung-Hun Yi, Jae-Ho Kim, and Jin-Young Yoo¹

Dept. of Genetic Engineering, Paichai University, Taejeon 302-735, Korea

¹Division of Food Biotechnology and Chemistry, Korea Food Research Institute, Seongnam 463-420, Korea

(Received : 1999. 5. 12., Accepted : 1999. 7. 14.)

A wild yeast S-13 which has excellent killer toxin activity to gas-producing yeasts of traditional *Doenjang* and *Kochujang* was selected among forty seven strains of *Meju* yeasts and identified as *Hansenula capsulata* S-13 by investigation of the morphological, cultural and physiological properties. The optimal conditions for the production of killer toxin were investigated. *H. capsulata* S-13 showed the highest killer toxin activities when it was cultured up to the late-log phase of 36 hr in YEPD medium (pH4.5) at 25°C. *H. capsulata* S-13 showed killer toxin activities to seven strains of *Meju* yeasts including *Saccharomyces spp.* OE-2 and three strains of industrial yeasts such as *S. cerevisiae*, *C. versatilis* and *P. membranaefaciens*.

Key Words : killer yeast, killer toxin activity, traditional *Meju*

서 론

Bevan등(1)에 의해 처음으로 알려진 killer 효모는 생육 중에 독성물질을 생성하여 같은 종이나 다른 종의 효모 생육을 억제시키는 효모로서 killer 표현형에 따라 K₁-K₁₁로, resistance 표현형에 따라 R_a-R_k로 분류되며 같은 속이나 종의 효모라도 killer 형질이 다르면 생육 억제현상이 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다(2, 3).

Killer 효모가 생성하는 killer toxin은 대부분 분자량 11,000 Da의 순수 단백질(2) 혹은 분자량 16,000 Da의 당단백질(4)로서 등전점은 pH 4.4~4.5이고(4) killer 표현형에 관계되는 유전자는 세포질 내에서 바이러스와 유사한 particle로 존재하는 M-dsRNA임이 밝혀졌다(2, 5). 또한 killer toxin의 작용기작은 ATP와 세포내 K 이온의 누출로 인한 세포내 거대분자물질의 합성저해, adenylate cyclase 활성저해에 따른 G1 arrest 등으로 알려져있다(3, 6).

지금까지 killer 효모로는 주로 실험실이나 발효용 효모 및 과일, 버섯, 토양 등으로부터 *Saccharomyces*속, *Torulopsis*속, *Debaryomyces*속, *Pichia*속, *Hansenula*속, *Kluyveromyces*속 및 *Candida*속 등 약 14종이 분리되어 보고되었고(3) 국내에서

도 포도 껍질과 알콜 생산공장에서부터 *Candida dattila* K101, K-117(7)과 *Saccharomyces cerevisiae* B15-1 및 *Hansenula anomala* Y-33등이 분리되어 killer toxin 생산조건(8)과 에탄올 발효특성(9)이 조사되어 보고되었다. 또한 세포용합 등에 의한 새로운 특성을 갖는 killer 효모가 육종되어 알콜 발효공업 등에 응용성이 검토되었다(10-13).

한편, 알콜 발효나 장류 발효과정 중에 killer 효모가 오염되어 증식하면 정상적인 발효를 저해한다. 특히 포도주나 탁주 제조에서와 같이 원료를 살균하지 않거나 무균적으로 발효시키지 않는 경우 이들이 오염되어 이상발효를 초래하므로 발효율이 낮아지고 품질이 떨어지는 문제점이 있다(7). 그러나 이들의 항균 특성을 알콜 발효나 장류 및 김치 발효 등에 응용하면 발효과정 중 killer toxin에 대한 내성이 없는 유해효모의 생육을 억제시킬 수 있으므로 이들에 의한 발효저해(9)와 효모의 2차 오염에 의한 장류의 가스 발생(14)을 방지할 수 있을 것이며 따라서 발효제품의 품질과 저장성 향상에 매우 중요하게 응용될 수 있을 것으로 생각한다.

저자 등은 재래식 메주로부터 생리기능성을 가진 효모를 분리하여 이들을 산업에 이용하고자 전국 각지의 재래식 메주로부터 47주의 효모를 분리하여 동정한 후 생육조건을 검토하였고(15), 이들의 각종 산업용 효소 활성과 기능성 등을 조사하여 보고(16)하였다. 본 연구에서는 이들 재래식 메주 효모 47주 가운데 killer 표준 감수성 효모에 대하여 killer 활성을 갖고 있으면서 장류의 가스 발생 원인 효모에 대하여 강한 killer 활성을 가진 S-13 효모를 선별하여 동정하고 killer toxin 생산조건을 검토하였다.

† Corresponding Author : Department of Genetic Engineering, Paichai University, Taejeon 302-735, Korea
Tel : 042-520-5388, Fax : 042-520-5388
e-mail : biotech8@woonam.paichai.ac.kr

재료 및 실험방법

균주, 배지 및 시약

전보(15)의 재래식 메주에서 분리한 47주의 효모 가운데 killer 표준 감수성 균주에 대하여 killer 활성을 갖고 있으면서 장류의 가스 발생 원인 효모(14)에 대하여 비교적 강한 항균력을 보인 S-13 효모를 사용하였다.

Killer toxin 생산조건 검토 시 killer 활성 측정에는 표준 감수성 균주로 *S. cerevisiae* ATCC 38026을 한국 생명공학연구소 균주은행(KTCC)에서 분양 받아 사용하였고(16), 시험균주와의 길항성 조사에는 저자 등이 변질 장류로부터 가스발생 원인 효모로 분리한 8주의 효모(14)와 재래식 메주에서 분리한 47주의 효모(15) 및 발효산업에 유용하거나 유해하다고 알려진 몇종의 효모들을 한국중균협회(KMCC)와 균주은행(KTCC)등으로부터 분양 받아 사용하였다.

한편, S-13 효모의 동정을 위한 생리적 특성 실험에는 주로 Difco사(미국)의 YM배지를 사용하였고 toxin 생산 기본 배지로는 YEPD 배지를 사용하였으며 killer 활성 측정에는 killer assay 배지인 YPD-MB배지(yeast extract 0.6%, peptone 1.2%, dextrose 1.2%, citric acid 1.4%, KH₂PO₄ 1.8%, methylene blue 0.003%, pH4.2)를 사용하였다(16).

또한 triphenyltetrazolium chloride와 cycloheximide는 Wako 화학사(일본) 제품을 사용하였고 기타 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

Killer 효모 S-13의 동정

S-13의 각종 형태학적, 생화학적 특성과 당 이용성 등을 효모의 분류동정법(17)에 따라 조사한 후 전보(15)의 각종 미생물학적 특성과 종합하여 The Yeast, a taxonomic study(18)로 동정하였다.

Killer 활성 측정

Killer 활성은 전보(16)와 같이 well test로 측정하였다(8). 즉 S-13 균주를 YEPD 배지(pH 4.5)에 접종하여 30℃로 일정시간 배양한 다음 8000rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 얻고 이 상등액 200μl를 표준 감수성 효모 혹은 여타의 시험효모가 미리 도말 되어 있는 killer assay 배지 위의 직경 10mm 홈에 가하여 30℃에서 48시간 배양한 후 나타나는 생육저해대의 크기를 측정하여 killer 활성으로 표시하였다.

결과 및 고찰

Killer 효모의 선정 및 동정

재래식 메주에서 분리한 47주 효모 가운데 S-13 효모는 killer 표준 감수성 균주인 *S. cerevisiae* ATCC 38026에 대한 killer 활성이 6.5mm(생육저해대) 이었고 장류의 가스 발생 원인 효모들에 대한 killer 활성은 15-25mm로 비교적 우수하였으므로(Table 1) 시험 균주로 선정하였다.

S-13 killer 효모는 spherical형으로 출아 증식하였고 포자와 의균사를 형성하였다. 또한 YM배지에서 액체배양 하였을 때 피막을 형성하였고 질산염을 자화 시켰으며 에스터를 생성하였다. Glucose, galactose, sucrose, raffinose, xylose 등을 자화시켰

으나 glucose만을 발효시켰고 생육인자로 비타민을 요구하지 않았다(Table 2, 3).

이상의 각종 미생물학적 특성을 종합하여 The Yeast, a taxonomic study(18)로 동정한 결과 S-13은 *Hansenular capsulata*와 근연의 균으로 추정되었다.

지금까지 보고된 killer 효모중 *Hansenular* 속군(Barnett 등은 *Williopsis*속군으로 분류, 19)으로는 *H. mrakii* LKB169, *H. saturnus*, *H. saturnus* var. *subsufficiens*, *H. beijerinckii* 등이 있으며(6, 20, 21) 이 가운데 *H. mrakii* LKB169는 killer toxin K-I 과 K-II를 생성하고 K-I은 여타의 toxin과 비슷한 성상이지만 K-II는 분자량이 약 8900Da으로 다른 것보다 작

Table 1. Killer activities of toxin from the S-13 strain to gas-producing yeasts.

Yeasts*	Killer toxin activities (inhibitory zone : mm)
<i>Saccharomyces</i> sp.	
D-6	20
D-30	-
K-8	15
K-34	15
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.	
D-211	25
K-23	-
K-181	20
<i>Pichia</i> sp.	
D-13	15

* Yeasts were isolated from traditional *Doenjang*(D) and *Kochujang*(K) as gas-producing yeasts(14).

Table 2. Microbiological characteristics of the S-13 strain.

Classification	Characteristics*
Cell shape	spherical
Cell size (μm)	3.8
Vegetative reproduction	budding
Ascospore	present(1-4)
Pseudomycelium	present
Growth : 50% glucose/YEA	+
20%(5%) NaCl/YEPD	-(+)
1% acetic acid	-
Culture in YM : pellicle	present
ring	present
Colour on growth of YM agar	creamy
Vitamine requirement	-
Resistance ; cycloheximide (1000ppm)	+
ethanol(10%)	+
KNO ₃ assimilation	+
Urease activity	-
TTC colorization test	pink
G+C content(mol%)	34.0

* + or - means positive or negative, respectively.

Table 3. Assimilation and fermentability of carbon sources by the S-13 strain.

Carbon sources	Assimilation*	Fermentability
Glucose	+	+
Galactose	+	-
Fructose	-	-
Sucrose	+	-
Lactose	-	-
Maltose	+	-
Raffinose	+	-
Soluble starch	-	-
Xylose	+	-
Ribose	-	-
Sorbitol	+	-
Inositol	-	-

* + ; good and - ; not assimilable or fermentable

으나 열에 매우 안정하고 비교적 넓은 pH영역에서 안정한 killer toxin임이 보고되었다(6).

Killer toxin 생산조건

배양온도 : 시험균주를 YEPD 배지에 접종하여 각각의 온도에서 48시간 배양한 후 상등액의 killer 활성을 표준 감수성 균주인 *S. cerevisiae* ATCC 38026을 이용하여 측정된 결과 Figure 1과 같이 *H. capsulata* S-13을 25°C에서 2일간 배양하였을 때 가장 많은 killer toxin이 생성되어 6.2mm의 생육 저해대를 보였고 15°C에서도 어느 정도 killer toxin이 생성되었지만 35°C 이상에서는 생성되지 않았다.

이와 같이 35°C 이상에서 killer toxin을 생성하지 못하는 것은 Chung등(8)과 Wickner(22) 및 Young등(23)이 보고한 것 같이 30°C 혹은 35°C 이상의 온도에서는 killer toxin이 생성되자마자 불활성화 되며 killer toxin을 생성하고 분비하는데 관여하는 M-dsRNA(12)가 30°C 이상에서는 소실되거나 변이 되기 때문인 것으로 추정된다.

배지의 초기 pH : killer toxin 생성을 위한 배지의 최적 pH를 조사한 결과 시험균주를 pH 4.5로 조정된 배지에서 25°C로 48시간 배양하였을 때 가장 많은 killer toxin을 생성하였고 pH 3.0이하와 5.0이상에서는 toxin을 분비하지 못하였다(Figure 2).

일반적으로 killer toxin이 순수 단백질인지 당 단백질인지에 따라 생성 최적 pH와 온도가 다르다고 알려져 있고 본 실험 결과는 killer toxin K-1이 pH 4.0-4.6에서 비교적 많이 생성되나 pH 5.0 이상에서는 불활성화 되었다는 최 등(11), Young 등(23)의 보고들과 *S. cerevisiae* B15-1이 pH 4.7에서 killer toxin이 가장 많이 생성되었다는 Chung 등의 보고(8)와 유사한 결과이었다.

또한, 이와 같은 결과로 볼 때 필자(24) 등이 재래식 메주를 이용하여 제조한 된장의 경우, 숙성 120일에 pH 6.5(봄 메주 된장), pH 7.0(가을 메주 된장), 고추장은 pH 5.0 이었으므로 본 killer 효모를 재래식 장류의 저장성 연장에 응용하기 위해서는 숙성 후거나 제품화 단계에서 이들의 pH를 4.5 내외로 조절해야 할 것으로 사료된다.

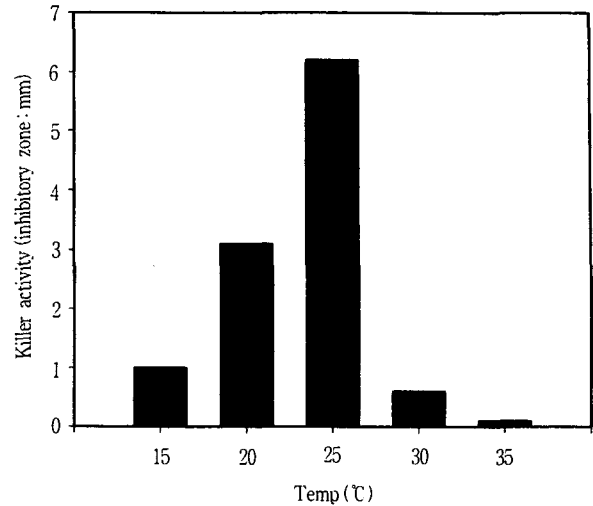


Figure 1. Effect of culture temperature on the production of killer toxin.

The strain S-13 was grown in YEPD medium for 48 hours at indicated temperature. The killer toxin activities to *Sacch. cerevisiae* ATCC 38026 were expressed as diameter of inhibitory zone on the MB lawn (pH 4.5) for 48 hours at 25°C by well test.

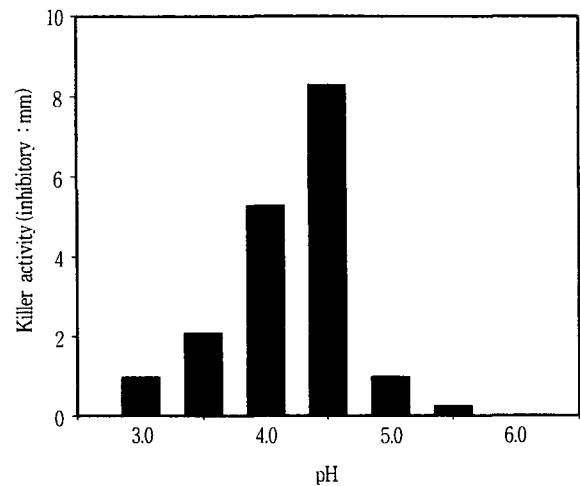


Figure 2. Effect of initial pH of medium on the production of killer toxin.

The strain S-13 was grown in YEPD medium for 48 hours at 25°C at the indicated pH. The determination of killer activity are described in Figure 1 and the Material and Method.

배양시간 : 시험균주를 YEPD 배지(pH 4.5)에 접종하여 25°C에서 배양하면서 경시적으로 *S. cerevisiae* ATCC 38026에 대한 killer 활성을 측정된 결과 Figure 3과 같이 배양 12시간부터 toxin이 생성되기 시작하여 배양 36시간의 대수기 말기에 killer toxin의 생성이 최고에 달하여 10.2mm의 생육 저해대를 보였다.

이는 *S. cerevisiae* B15-1이 대수기 중기부터 killer toxin이 생성되기 시작하여 대수기 말기에 제일 많이 생성되었다는 Chung 등(8)의 실험 결과와는 같았으나 대수기 중기에 제일 많

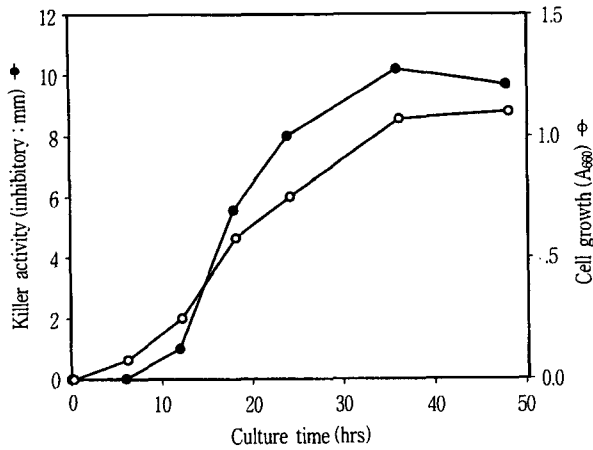


Figure 3. Time courses on the production of killer toxin. The strain S-13 was grown in YEPD in medium(pH 4.5) at 25°C for the indicated time. The determination of killer activity are described in Figure 1 and the "Material and Method" The growth was expressed as OD at 660nm.

이 toxin이 생성되고 대수기 말기 혹은 정지기에는 toxin 분비가 미약하였다는 Palfree 등 (25)의 결과와는 다른 결과이었다.

재래식 메주 효모와 각종 발효산업 효모에 대한 길항성

위의 최적조건으로 시험균주를 배양하여 얻은 killer toxin을 이용하여 저자 등이 재래식 메주에서 분리한 47주의 효모(15)에 대한 killer 활성을 측정 한 결과 *Saccharomyces* 속균 등 7주의 메주 효모에 대하여 killer 활성을 보였다(Table 4).

또한 발효산업에 유용하거나 유해하다고 알려진 몇 종의 효모에 대하여 killer 활성을 조사한 결과 *S. cerevisiae* 와 *C. versatilis* 및 *P. membranaefaciens*에 대하여 길항성을 보였다 (Table 5).

일반적으로 재래식 된장과 고추장의 숙성 중에는 *Bacillus* 속 균과 *Aspergillus* 속 및 *Mucor* 속균 등이 관여하여 각종 amylase와 protease를 생성하므로 이들의 고유향미에 관여하지만 *S. cerevisiae*, *S. rouxii* 등의 일부 효모도 관여하여 가스생성에 의한 괴오름을 유발시키므로 품질을 저하시키고 저장성을 단축시키는 것으로 알려져 있다(24, 15, 16).

Table 4. Killer activities of toxin from the *H. capsulata* S-13 to traditional *Meju* yeasts.

Yeasts	Killer toxin activities*	Yeasts	Killer toxin activities
<i>R. glutinis</i> OE-1	-	<i>R. glutinis</i> S-1	-
<i>Saccharomyces</i> spp. OE-2	+	<i>S. spp.</i> S-2	-
<i>R. glutinis</i> OE-3	-	<i>S. spp.</i> S-3	-
<i>Deb. castellii</i> OE-4	-	<i>Kluyveromyces</i> spp. S-4	-
<i>S. exiguus</i> OE-5	-	<i>Zygosacch. rouxii</i> S-5	-
<i>H. capsulata</i> OE-6	-	Unidentification S-6	-
<i>Rhodotoula</i> spp. OE-7	-	<i>Kluyveromyces</i> spp. S-7	-
<i>Kluyveromyces</i> spp. OE-8	+	<i>C. incommunis</i> S-8	-
<i>R. glutinis</i> OE-9	+	<i>Hansenula</i> spp. S-9	-
<i>S. cerevisiae</i> OE-10	+	<i>Zygosacch. rouxii</i> S-10	-
<i>P. stipitis</i> OE-11	-	<i>Hansenula</i> spp. S-11	-
<i>Candida</i> group III OE-12	-	<i>Zygosaccharomyces</i> spp. S-12	-
<i>Zygosacch. rouxii</i> OE-13	-	<i>H. capsulata</i> S-13	*
<i>Zygosaccharomyces</i> spp. OE-14	+	<i>K. maxianus var. latis</i> S-14	-
<i>R. glutinis</i> OE-15	-	<i>R. glutinis</i> S-15	+
<i>S. cerevisiae</i> OE-16	-	<i>Zygosacch. spp.</i> S-16	-
<i>C. edax</i> OE-17	-	<i>Candida incommunis</i> S-17	-
<i>R. glutinis</i> OE-18	+	<i>S. kluyveri</i> C-1	-
<i>Zygosacch. rouxii</i> OE-19	-	<i>Candida</i> group III C-2	-
<i>K. maxianus var. latis</i> OE-20	-	<i>H. holstii</i> C-3	-
<i>Candida</i> spp. (group III) OE-21	-		
<i>Candida</i> spp. (group III) OE-22	-		
<i>Candida</i> spp. (group III) OE-23	-		
<i>Candida</i> spp. (group III) OE-24	-		
<i>Candida</i> spp. (group III) OE-25	-		
<i>Candida</i> spp. (group III) OE-26	-		
<i>Candida</i> spp. (group III) OE-27	-		

* The *H. capsulata* S13 was grown in YEPD medium (pH 4.5) for 48 hours at 25°C and the determination of killer toxin activity were performed by well test described in the Materials and Methods.

Table 5. Killer activities of toxin from the *H. capsulata* S-13 to industrial yeasts.

Yeasts	Killer toxin activities (inhibitory zone : mm)
<i>S. cerevisiae</i>	+(15.0)
<i>S. pastorianus</i>	-
<i>H. anomala</i>	-
<i>C. tropicalis</i>	-
<i>C. versatilis</i>	+(12.0)
<i>C. krusei</i>	-
<i>K. fragilis</i>	-
<i>K. lactis</i>	-
<i>P. membranaefaciens</i>	+(10.0)
<i>K. apiculata</i>	-

비록 위와 같은 *H. capsulata* S-13의 killer toxin 생성조건이 이미 발표된 다른 속균의 killer toxin 생성조건과 큰 차이가 없었지만(8, 11, 22, 23) 장류의 가스생성 효모와 발효산업에 유해한 것으로 알려진 몇 종의 효모에 대하여 강한 killer 활성을 갖고 있었으므로 장류의 유통 및 저장성 연장을 위한 생물공학적인 방법의 개발에 유용하게 응용 될 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 위의 최적조건에서 *H. capsulata* S-13으로부터 killer toxin을 대량 생산한 후 한외여과와 이온 교환 크로마토그래피 등(4)으로 정제하여 성질을 조사한 결과 시험균주가 생성하는 killer toxin은 분자량 15,000 Da 정도의 당단백질이며 등전점이 pH 4.3이었다. 또한, 작용조건과 안정성 등이 이미 발표된 killer toxin과 다른 성질을 갖고 있는 새로운 형태의 toxin으로 추정되어 현재 추가의 생화학적 특성을 조사하여 다른 미생물들로부터 생산된 killer toxin의 생화학적 특성과 비교하고 있다.

요 약

재래식 메주로부터 생리 기능성이 우수한 효모를 분리하여 이들을 발효산업에 이용하고자 전국 각지의 재래식 메주에서 분리한 47주의 효모중 killer 감수성 균과 장류의 가스 생성 효모에 대하여 killer 활성이 강한 S-13 효모를 선별하여 동정한 후 killer toxin 생산 최적 조건을 검토하였다. S-13의 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성 등을 조사한 결과 *Hansenula capsulata*로 추정되었고 *H. capsulata* S-13을 YEPD 배지(pH 4.5)에 접종하여 25°C에서 36시간 대수기 말기까지 배양하였을 때 가장 많은 killer toxin이 생성되었다. 또한, *H. capsulata* S-13은 재래식 메주에서 분리된 *Saccharomyces spp.* OE-2 등 7주의 메주효모와 *S. cerevisiae* 등 3주의 발효산업 관련 효모에 대하여 killer 활성을 보였다.

감사의 말씀

본 연구는 과기부 지원에 의한 G-7 신기능 생물 소재 사업중(2단계) "전통 장류용 메주 생산의 산업화 연구"의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Bevan, E. A. and M. Makower (1963), The Physiologic Basis of the Killer-Character in Yeast, Proceeding of the 11th International Congress of Genetics. 1, 203.
2. 최언호 (1985), 포도주 양조에서 유전공학 기술의 응용, 식품과학, 18, 20-24.
3. Rose, A. H. and J. S. Harrison (1987), The Yeast and the Environment, Vol. 2, pp. 131-161, Academic Press.
4. Pfeiffer, P. and F. Radler (1982), Purification and Characterization of Extracellular and Intracellular Killer Toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Strain 28, *J. of General Microbiol.* 128, 2699-2706.
5. Bastian, K. Al, J. E. Hopper., D. T. Rogers and D. T. Tipper (1980), Translational Analysis of the Killer-associated Virus-like Particle dsRNA Genome of *S. cerevisiae* : M-dsRNA Encodes Toxin, *Cell*, 19, 403-414.
6. Ashida, S., T. Shimazaki, K. Kitano and S. Hara (1983), New Killer Toxin of *Hansenula mrakii*, *Agric. Biol. Chem.* 47, 2953-2955.
7. 최언호, 장혜춘, 정은영, 정원철 (1990), 야생 Killer 효모 *Candida dattila*의 분리 및 동정, *한국산업미생물학회지*, 18, 1-5.
8. Chung, K. T., K. W. Bang, S. G. Chung, H. I. Song and J. K. Kim (1989), Isolation of Killer Yeasts and its Characteristic, *Kor. J. Microbiol.* 27, 415-421.
9. 이창호, 우철주, 이종수, 정기택, 박희동 (1996), Killer 효모 *Saccharomyces cerevisiae* B15-1의 에탄올 발효 특성, *한국산업미생물학회지*, 24, 331-335.
10. Chung, K. T., K. W. Bang, H. I. Song, J. K. Kim and Y. J. Jung (1989), Conditions for Protoplast Formation and Fusion of the Killer Yeast, *Kor. J. Microbiol.* 27, 422-429.
11. 최언호, 정은영, 정원철 (1988), 포도주용 Killer Yeast의 개발, *한국농화학회지*, 31, 26-32.
12. Seki, T., E. H. Choi and D. Ryu (1985), Construction of Killer Wine Yeast Strain, *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1211-1215.
13. Shimoda, M., H. Mizoguchi and E. Fuzita (1984), Breeding of Killer-resistant Sake Yeasts Using the Miniprotoplast Fusion Method, *J. Brew. Soc. Japan.* 79, 349-354.
14. Lee, J. S., Y. J. Choi, S. J. Kwon, J. Y. Yoo and D. H. Chung (1996), Screening and Characterization of Osmotolerant and Gas-producing Yeast from Traditional *Daenjang* and *Kochujang*, *Food and Biotechnol.* 5, 54-58.
15. 이종수, 이성훈, 권수진, 안철, 유진영 (1997), 재래식 메주로부터 효모의 분리, 동정 및 배양조건, *한국산업미생물학회지*, 25, 435-441.
16. 이종수, 이성훈, 권수진, 안철, 유진영 (1997), 재래식 메주에서 분리한 효모들의 각종 효소 활성과 기능성, *한국산업미생물학회지*, 25, 448-453.
17. 長谷川武治 (1984), 微生物の分類と同定, 學會出版 center,

- 東京, p153-254.
18. Kreger van Fij (1984), *The Yeast, a taxonomic study*, 3rd ed. p165-213 Elsevier Science, Amsterdam.
 19. Barnett, J. A., R. W. Payne and D. Yarrow (1990). *Yeasts, P.1-1002. Characteristics and Identification*, 2nd ed. Cambridge Univ., Press, Cambridge.
 20. Kimura, T., N. Kitamoto, Y. Ohta, Y. Kito and Y. Imura (1995), Structural Relationship among Killer Toxins Secreted from the Killer Strains of the Genus *Williopsis*, *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 85-87.
 21. Kimura, T., N. Kitamoto, K. Matuoka, K. Nakamura, Y. Imura and Y. Kito (1993). Isolation and Nucleotide Sequences of the Genus Encoding Killer Toxins from *H. mrakii* and *H. saturnus*, *Gene*, **137**, 265-270.
 22. Wickner, R. B. (1974), "Killer Character" of *Saccharomyces cerevisiae* ; Curing by Growth at Elevated Temperature, *J. Bacteriol.* **117**, 1356-1357.
 23. 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.
 24. 이종수, 권수진, 정성원, 최영준, 유진영, 정동효 (1996), 한국재래식 된장과 고추장의 숙성중 미생물, 효소 활성 및 주요 성분의 변화, *한국산업미생물학회지*, **24**, 247-253.
 25. Palfree, R. and H. Bussey (1979), Yeast Killer Toxin ; Purification and Characterization of the Protein Toxin from *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.* **93**, 437-451.