KOREAN J. FOOD & NUTR.
Vol. 13. No. 2, 158~163(2000)

Hansenular capsulata S-13의 변이주에 의한 Killer Toxin의 생산

김재호* · 김나미 · 이종수*
*배재대학교 바이오의약연구센터, 유전공학과, 한국인삼연초연구원

Production of Killer Toxin from a Mutant of *Hansenular capsulata* S-13

Jae-Ho Kim*, Na-Mi Kim and Jong-Soo Lee*
**Bio-medical Resources Research Center, Dept. of Genetic Engineering, Paichai University, Taejon 302-735, Korea*
Division of Products Development, Korea Ginseng & Tabacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

Abstract

Killer yeast, *Hansenular capsulata* S-13 were treated with heat, ethylmethane sulfonate and N-methyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine and a mutant(S13-E1), showing 2-fold higher killer toxin activity than that of parent strain to killer sensitive strain, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 38026 was obtained. *Hansenular capsulata* S13-E1 showed strong killer toxin activity to *Saccharomyces mellis* and *Saccharomyces salsus* and four strains of gas-producing yeasts from traditional *Doenjang* and *Kochujang*. The culture condition for killer toxin production by *Hansenular capsulata* S13-E1 was optimized to be 1.0% potato extract, each 0.5% of peptone and glucose, and 0.025% $MgSO_4$ with initial pH 4.5 at 30℃ and 36 hr of batch cultivation.

Key words : mutants, *Hansenular capsulata* S13-E1, killer toxin.

서 론

재래식 된장과 고추장의 산업화에서 문제가 되는 것 중의 하나는 저장 및 유통과정 중 발효성 효모의 2차 오염에 의한 괴오름 현상으로 이로 인하여 장류의 수송 및 유통과정 중 가스가 팽창하므로 국내 소비는 물론 수출에 큰 장애가 되고 있다[1].

이를 방지하기 위해 에탄올이나 유기산 첨가법, 건조법 및 열 살균법 등이 개발되었으나 품질저하 등의 문제점이 있어 새로운 생물공학적 방법의 개발이 절실이 요구되고 있다[2,3].

한편, killer 효모는 생육 중에 killer 독소를 세포외로 분비하여 같은 종 혹은 다른 종 효모의 생육을 저지시키는 효모로써 현재 약 16종이 알려져 있고 이들의 특성과 독성물질의 생리화학적 성질 등이 밝혀졌다[2].

Killer 효모가 알콜 발효과정 중에 오염되면 주 발효균의 생육을 억제시켜 이상발효를 초래하므로 발효율이 낮아지고 품질이 떨어지는 문제점이 있다. 그러나 이들 killer 독소는 이에 대한 내성이 없는 유해효모의 생육을 저지시킬 수 있으므로 유해효모에 의한 발효저해와 장류의 괴오름 등을 방지할 수 있을 것이며 따라서 발효제품의 품질과 저장성 향상에 매우 중요하게 응용될 것으로 생각한다[1,4~9].

본 연구에서는 강력한 killer 효모를 육성하고 값이 저렴한 배지에서 killer toxin을 대량 생산할 목적으로 재래식 메주에서 분리한 killer 효모 *Hansenular capsulata* S-13[7]을 돌연변이 시켜 *Hansenular capsulata* S13-E1을 얻고 이를 이용하여 발효산업 유용효모와 유해효모에 대한 길항성을 조사했으며 killer toxin 생산을 위한 최적 배양조건을 검토하였다.

실험재료 및 방법

1. 균주 및 배지

* Corresponding author : Jong-Soo Lee

전보[7]의 재래식 메주에서 killer 효모로 분리한 *Hansenular capsulata* S-13을 시험균주로 사용하였고 killer 활성 측정시 표준 감수성 균주로는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 38026을 한국생명공학연구소 균주은행에서 분양받아 사용하였다. 또한 변이주의 길항성 실험에는 *Zygosaccharomyces rouxii*와 *Zygosaccharomyces salsus* 등 13종의 효모들을 한국 생명공학연구소의 균주은행과 한국 종균 협회 부설 한국미생물 보존 센터로부터 분양받아 사용하였고, 저자 등이 변질 장류로부터 가스 발생 원인 효모로 분리한 8주의 효모에 대하여도 같은 실험을 실시하였다[1].

Killer 활성 측정에는 전보[7]에서와 같이 YPD-MB 배지를 사용하였고 starter 배양실험에서는 corn meal, potato extract, corn steep liquor 등의 천연 탄소원 물질들을 단독 혹은 YEPD와 YM배지에 혼합하여 사용하였다.

변이제로는 Aldrich사의 N-methyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine(NTG)와 Sigma사의 ethyl methane sulfonate(EMS)를 사용하였고 기타 시약들은 분석용 특급을 사용하였다.

2. Killer 활성 측정

Killer 활성은 전보[7]와 같이 Well test로 측정하였다.

3. 돌연변이의 유도 및 변이주의 선발

대수기 중기까지 배양한 *Hansenular capsulata* S-13을 원심분리하여 균체를 회수하고 100mM 인산완충용액(pH 6.5)으로 세척한 후 5ml의 세포 현탁액을 65℃에서 1, 3, 5분간 각각 열처리하여 돌연변이를 유도시켰다. 또한 세포 현탁액 5ml을 petri dish에 분주하고 254nm파장에서 1.9 W/m^{2}의 광량으로 10초, 20초, 30초 동안 자외선을 조사하여 돌연변이를 유도시켰다. 한편 5ml 균체 현탁액에 NTG는 2mg/ml 농도로 첨가하여 37℃에서 5, 10, 20분간씩, EMS는 100mM 농도로 첨가하여 60, 120, 180분 처리하였다[10~13].

위와 같이 각각 처리한 균체들을 triphenyl tetrazolium chloride(TTC)를 함유한 YEPD 배지에 도말한 후 30℃에서 배양하여 친주와 다른 TTC 정색 반응을 보이는 균주들을 변이주로 1차 선발하였다. 이들 선별 균주들을 YEPD 배지에 배양한 후 위와 같이 killer 활성을 측정하여 우수 변이주를 최종 선발하였다.

4. 발효기를 이용한 변이주의 배양

발효기를 이용한 변이주의 회분배양은 먼저 발효조(한국발효기, KFM-7)에 killer toxin 생산 최적배지를 넣어 살균한 후 종 배양액 5%(v/v)을 접종하여 30℃에서 일정시간 배양하였으며 이때 공기 유입속도는 1VVM으로, 교반속도는 90rpm으로 유지시켰다. 유가식 배양(fed-batch-culture)은 회분배양시 배지의 탄소원(glucose)이 거의 소모되는 배양 6시간에 glucose가 0.5% 유지되도록 조업 부피의 10%를 주기적으로 발효조에 첨가하면서 회분배양과 같은 방법으로 배양하였다.

결과 및 고찰

1. 돌연변이주의 선별

Killer 효모 *H. capsulata* S-13을 위와 같이 열처리, 자외선 조사 및 EMS 처리 등으로 변이시킨 후 우수 균주를 선발한 결과 EMS를 처리하여 얻은 변이주 S13-E1이 killer 표준 감수성 균주에 대하여 친주보다[7] 약 2배 높은 killer 활성(12mm 생육저해대)을 보여 최종적으로 선별하였으며 선별된 균주를 *H. capsulata* S13-E1으로 명명하였다.

2. 변이주 *H. capsulata* S13-E1의 항균성

발효공업에 유용하거나 유해하다고 알려져 있는 몇 종의 효모에 대한 변이주 *H. capsulata* S13-E1의 항균성을 조사한 결과 Table 1과 같이 *Zygosacch. rouxii*와 장류공업의 유해 효모로 알려진 *Zygosacch.. mellis*와 *Zygosacch.. salsus* 등에 대하여 8.0~12.0mm의 생육

Table 1. Killer activities of toxin from *H. capsulata* S13-E1 to industrial yeasts

Yeasts	Killer toxin activities(mm)*
Zygosaccharomyes rouxii	8.0
Zygosaccharomyes mellis	12.0
Zygosaccharomyes salsus	10.0
Saccharomyes cerevisiae	-
Saccharomyes pastorianus	-
Candida tropicalis	-
Candida versatilis	-
Candida krusei	-
Kluyveromyces lactis	-
Kluyveromyces fragilis	-
Kluyveromyces apiculata	-
Pichia membranaefaciens	-
Hansenular anomala	-

* Size of inhibitory zone in Well-test

저해대를 보여 비교적 강한 항균성을 보였으나 여타의 효모에 대해서는 항균성이 없었다. 이는 친주인 *H. capsulata* S-13이 *S. cerevisiae*와 *C. versatilis*에 대하여 각각 15.0mm와 12.0mm의 생육저해대로 비교적 강한 항균 활성[7]을 보인 것과는 비슷하거나 다소 낮은 활성이었다.

한편 필자 등[1]이 변질 장류로부터 유통과정 중 괴오름의 원인 효모로 분리하여 보고한 8종의 효모에 대한 항균성을 조사한 결과 고추장 가스 생성 원인 효모인 *Saccharomyces* sp. K-8, K-34와 *Zygosaccharomyces* sp. K-181, 된장 괴오름 원인 효모 *Zygosaccharomyces* sp. D-211 등에 대하여 강력한 항균성을 보였다(Table 2).

이를 친주의 항균성과 비교하여 볼 때 *Zygosaccharomyces* sp. D-11에 대하여는 약 2.7배, *Zygosaccharomyces* sp. K-181에 대해서는 1.5배 높은 항균

Table 2. Killer activities of toxin from *H. capsulata* S13-E1 to gas-producing yeasts from *Doenjang* and *Kochujang*

Yeasts*	Killer toxin activities(mm)**
Saccharomyces sp. D-6	-
D-30	-
K-8	15.0
K-34	20.0
Zygosaccharomyces sp. D-211	65.0
K-23	-
K-181	35.0
Pichia sp. D-13	-

* Yeasts were isolated from traditional *Doenjang*(D) and *Kochujang*(K) as gas-producing yeast[1]

** Size of inhibitory zone in Well test

Table 3. Killer activities of toxin from *H. capsulata* S13-E1 to *Meju* yeasts

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

성을 보였으나 *Pichia* sp. D-13과 *Zygosaccharomyces* sp. D-6에 대해서는 오히려 항균성이 낮았다[7]. 이 결과는 장류의 유통과정 중 가스 생성 원인 효모에 의한 괴오름을 방지할 수 있는 생물공학적 방법의 개발에 매우 유용한 자료로 활용될 것으로 기대된다.

한편 변이주 *H. capsulata* S13-E1은 재래식 메주에서 필자 등이 분리한 47주의 효모 중[9]12주의 효모에 대하여 killer 활성을 보였다(Table 3).

3. *H. capsulata* S13-E1의 starter 배양조건

1) 배지조성

경제성을 고려하여 값이 비교적 저렴한 각종 천연물들이 변이균주의 생육과 killer toxin 생산에 미치는 영향을 표준 감수성 균주인 *S. cerevisiae* ATCC 38026을 이용하여 조사한 결과 Table 4와 같이 0.3% potato extract를 함유한 PEPD 배지에서 균 생육이 제일 좋았고 killer toxin이 제일 많이 생산되었다.

또한 시험균주의 생육과 killer toxin 생산에 미치는 peptone과 glucose의 영향을 조사한 결과 균 생육은 peptone과 glucose의 첨가농도가 높아질수록 좋았으나 killer toxin은 오히려 1% potato extract에 0.5% peptone, 0.5% glucose, 0.025% $MgSO_4$를 첨가하였을 때 가장 많이 생산되었다(Table 5).

2) 배양방법

위의 killer toxin 생산 최적 조건(배지조성: 1% potato extract, 0.5% peptone, 0.5% glucose, 0.025% $MgSO_4$, 배지의 초기 pH: 4.5, 배양온도: 30℃)으로

Table 4. Effect of natural media on the growth and killer toxin production of *H. capsulata* S13-E1

Media[1)]	Growth (A_{660})[2)]	Killer toxin activies (inhibitory zone:mm)
YM	2.03	10.0
CSL+ME	0.67	10.0
CM+ME	0.57	10.0
YE+CSL	0.37	10.1
YE+CM	0.66	10.4
YE+PE	0.38	10.0
ME+PE	0.68	10.0
YEPD	2.51	20.0
ME+PD	2.31	30.5
CSL+PD	2.35	20.2
PE+PD	2.28	40.0
CM+PD	1.34	20.0

[1)] CLS (corn steep liquor), CM (corn meal) and PE (potato extract) were added 0.3%, PD(peptone and glucose) were added 0.5%, respectively.

[2)] Growth was determined after incubation at 30℃ for 2 days.

변이균주를 플라스크 배양하면서 경시적으로 균 생육과 killer 활성을 측정한 결과(Fig. 1), 배양 6시간 이후부터 48시간까지 균의 생육이 왕성하다가 그 후로 정지되었고 killer toxin 생산은 배양 48시간의 정지기에 제일 많이 생산되었다.

발효조를 이용하여 회분배양을 하였을 때 친주[7]에서와 같이 배양 36시간의 대수기 말기에 killer toxin이

Table 5. Effect of peptone and glucose on the growth and killer toxin production of *H. capsulata* S13-E1

Media		Growth(A_{660})	Killer toxin activities (inhibitory zone:mm)
PE 1%, $MgSO_4$ 0.025%			
Peptone 0.5%+Glucose	0.5%	1.36	45.0
	1.0%	1.58	35.0
	2.0%	1.65	30.0
Peptone 1.0%+Glucose	0.5%	1.50	20.0
	1.0%	1.73	20.2
	2.0%	2.01	20.0
Peptone 2.0%+Glucose	0.5%	1.74	20.0
	1.0%	1.96	20.4
	2.0%	2.10	20.1
	5.0%	2.32	35.0

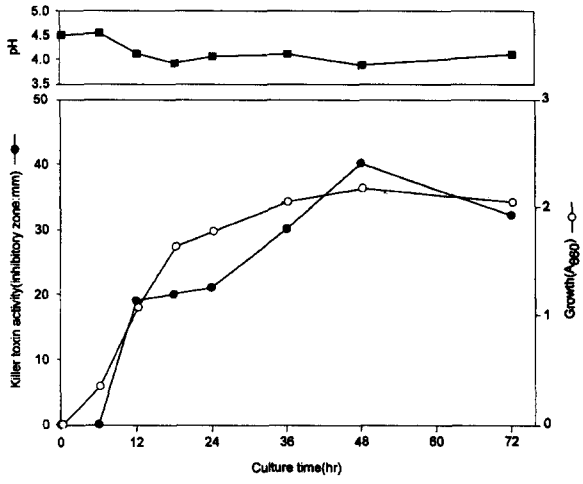

Fig. 1. The growth and killer toxin production of *H. capsulata* S13-E1 in flask culture.

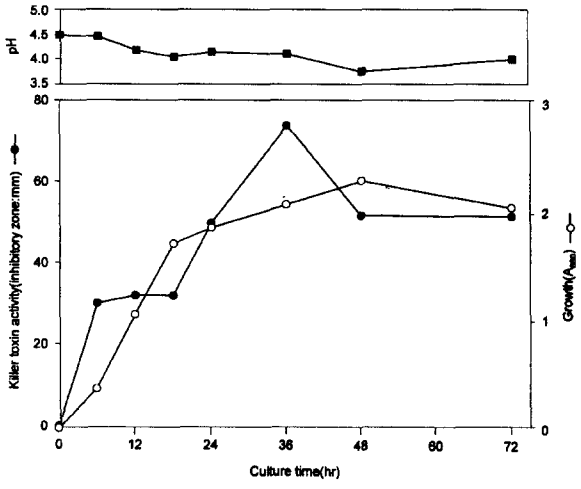

Fig. 2. The growth and killer toxin production of *H. capsulata* S13-E1 in batch culture.

제일 많이 생산되었고 그 생산량도 플라스크 배양보다는 1.5배 많았다(Fig. 2).

또한 회분배양에서 배지 중의 glucose가 거의 대부분 소모되었을 때(배양 6시간 후)부터 0.5% glucose를 몇 차례 주입하면서 균 생육과 killer 활성을 조사한 결과 균 생육과 killer 활성 모두 회분배양과 비슷하였다(Fig. 3).

따라서 시험균주의 최적 starter 배양을 위해서는 1.0% potato extract, 0.5% peptone, 0.5% glucose, 0.025% $MgSO_4$(pH 4.5) 조성의 PEPD 배지에 시험균주를 접종하여 발효조로 30℃에서 36시간 회분배양하는 것이 제일 적합한 것으로 생각된다.

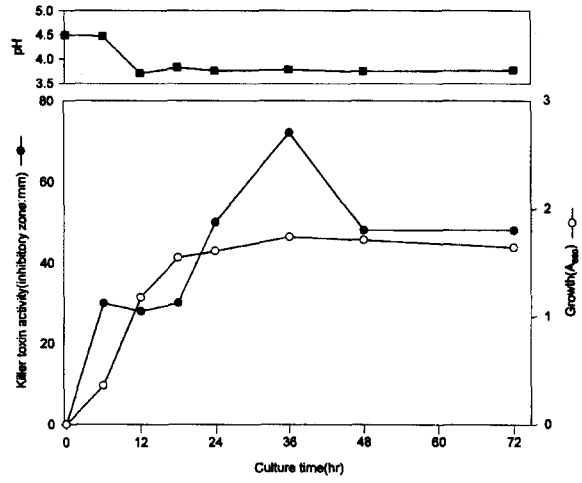

Fig. 3. The growth and killer toxin production of *H. capsulata* S13-E1 in fed-batch culture.

요 약

재래식 메주에서 분리된 killer 효모 *H. capsulata* S-13에 EMS 등의 변이제를 처리하여 친주보다 2배 killer 활성이 증대된 변이 균주 *H. capsulata* S13-E1을 얻고 이를 이용하여 각종 효모에 대한 길항성을 조사한 결과 장류 발효에 유해한 효모인 *Zygosacch. mellis*와 *Zygosacch. salsus* 등과 장류의 가스 발생 원인 효모인 *Saccharomyces* sp. K-8과 K-34, *Zygosaccharomyces* sp. K-181과 D-211 등에 대하여 강한 항균 특성을 보였다. 또한 *H. capsulata* S13-E1을 potato extract 1.0%, peptone과 glucose를 각각 0.5%, $MgSO_4$ 0.025%(초기 pH 4.5)를 함유한 PEPD 배지에 접종하여 30℃에서 36시간 발효조로 회분배양 하였을 때 killer toxin이 제일 많이 생산되었다.

참고문헌

1. Lee, J. S., Choi, Y. J., Kwon, S. J., Yoo, J. Y. and Chung, D. H. : Screening and characterization of osmotolerant and gas-producing yeast from traditional *Doenjang* and *Kochujang*. *Food and Biotechnol.*, 5(1), 54~59 (1996).
2. Rose, A. H. and Harrison, J. S. : The Yeast and The Environment. Vol. 2, Academic Press, p. 131~161 (1987).
3. 정성원, 곽한식, 이종수 : 각종 유기산과 killer 효모가 재래식 장류에서 분리한 가스 생성 효모의 생육에 미치는

영향. *배재대 대학원 논문집*, 1(1), 53~58 (1996).
4. 최언호, 장해춘, 정은영, 정원철 : 야생 killer 효모 *Candida dattila*의 분리 및 동정. *한국산업미생물학회지*, 18(1), 1~6 (1990).
5. Sohn, H. Y. and Seu. J. H. : Screening and characterization of thermotolerant alcohol-producting yeast. *J. Microbiol. Biotech.*, 4, 215~221 (1994).
6. 이창호, 우철주, 이종수, 정기택, 박희동 : Killer 효모 *S. cerevisiae* B15-1의 에탄올 발효 특성. *한국산업미생물학회지*, 24(3), 339~344 (1996).
7. 이종수, 이성훈, 김재호, 유진영 : 야생 killer 효모의 분리 및 killer toxin 생산. *한국생물공학회지*, 14(4) : 434~439 (1999).
8. 이종수, 이성훈, 권수진, 안 철, 유진영 : 재래식 메주에서 분리한 효모들의 각종 효소 활성과 기능성. *한국산업미생물학회지*, 25(5), 448~453 (1996).
9. 이종수, 이성훈, 권수진, 안 철, 유진영 : 재래식 메주로부터 효모의 분리, 동정 및 배양조건. *한국미생물학회지*, 25(5), 435~441 (1997).
10. 최언호, 정은영, 정원철 : 포도주용 killer yeast의 개발. *한국농화학회지*, 31(1), 32~38 (1998).
11. Wei, W., Wang, S., Zhu, X. and W. Wan : Isolation of a mutant of *Kluyveromyces* sp. Y-85 resistant to catabolite repression. *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 816~820 (1999).
12. 김재식, 김진욱, 심원, 민병철, 김정완, 박관화, 백운화 : 리보핵산을 다량으로 함유하는 *Saccharomyces cerevisiae* 균주의 개발. *한국식품과학회지*, 31(2) : 465~474 (1999).
13. Charistopher, W. L. : Classical mutagenesis techniques. *Methods Enzymol.*, 194, 273~281 (1991).

(2000년 4월 11일 접수)