

## 전통 누룩으로부터 분리된 Killer Toxin 생산 균주 *Pichia anomala* K15의 특성

정희경<sup>1</sup> · 박치덕<sup>1</sup> · 이기동<sup>1</sup> · 박승춘<sup>2</sup> · 박환희<sup>3</sup> · 홍주현<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>대구신기술사업단 바이오산업지원센터

<sup>2</sup>경북대학교 수의과대학

<sup>3</sup>하양주가

### Characteristics of *Pichia anomala* K15 Producing Killer Toxin Isolated from Traditional Nuruk

Hee-Kyoung Jung<sup>1</sup>, Chi-Duck Park<sup>1</sup>, Gee-Dong Lee<sup>1</sup>, Seung-Chun Park<sup>2</sup>,  
Hwan-Hee Park<sup>3</sup> and Joo-Heon Hong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Bio Industry Center, Daegu New Technology Agency, Daegu 704-230, Korea

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>3</sup>Hahyangjuga Co., Daegu 711-883, Korea

#### Abstract

In this study, killer yeasts were isolated from traditional Nuruk to improve storage and suppress contaminant in food industry. Among killer yeasts, yeast K15 showed strong killer toxin activity and inhibited growth of *Salmonella* Typhimurium and *Vibrio parahaemolyticus*. Killer yeast K15 was identified with *Pichia anomala* by the Microlog TM 4.0 identification system and homology of the ITS sequence. Killer toxin generated from *P. anomala* K15 was inactivated by pronase E and suggested to be a protein. Therefore killer toxin of *P. anomala* K15 was thought to be safe in human such as bacteriocin. *P. anomala* K15 was sufficient for growth in 50% glucose and could be used to prevent contaminant in initial stages of alcohol beverage fermentation.

**Key words:** Nuruk, killer toxin, *Pichia anomala* K15, isolation

#### 서 론

Killer yeast는 같은 속에 속하는 효모의 생육을 저해하는 효모를 말하며, 이들이 생산하는 항미생물 활성을 killer toxin이라고 한다(1). Bevan과 Makower(2)가 1963년 killer toxin 생산 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*를 처음 보고한 후 killer toxin은 활성범위에 따라 K1에서 K11까지 11가지로 분류되고 있다(3). Killer toxin은 주로 protein이나 glycoprotein으로 구성되어 있으며(4), linear double-strand DNA, chromosome, cytoplasmic double-strand RNA에 합성유전자가 encoding 되어있는 것으로 알려져 있다(5,6).

Yeast killer toxin은 일반적으로 22°C이내, pH 4~5에서 활성을 가지는 까닭에 활성범위가 좁은 것으로 보고되고 있다(7). 따라서 최근에는 배지에 gelatin을 첨가하여 killer toxin 안정성을 확보하고 분리에 용이하게 이용하고자 하는 시도도 있었다(8). Killer toxin 또는 killer yeast에 대한 국내의 연구로는 Choi 등(9)과 Chung 등(10)이 killer toxin을 생산하는 *Candida dattila*를 분리하였으며, 생산된 killer toxin

의 특성을 조사하였다. Rhee 등(11)은 에탄올 발효에 적합한 killer yeast인 *Saccharomyces cerevisiae* B15-1을 분리하고 에탄올 발효에 이용하여 발효 특성을 연구하였다. Killer yeast는 에탄올 발효뿐만 아니라 장류발효에 있어서도 널리 연구되어지고 있다. Lee 등(4)은 장류의 가스 발생을 방지하고자 재래식 메주로부터 killer 활성을 가지는 *Hansenula capsulata* S-13을 분리하여 생산조건을 검토하였다. 그 외에도 killer toxin을 생산하는 효모로는 *Saccharomyces*(5), *Debaryomyces*(6), *Pichia*(12,13) 등이 알려져 있다.

유전공학 및 분자생물학 연구가 활발히 진행됨에 따라 killer toxin 생산성 효모는 자연으로부터의 분리뿐만 아니라 효모를 융합하여 새로운 균주를 얻고자 하는 시도도 있었다. 또한 killer toxin 생산성이 있는 효모와 포도주 제조에 사용되는 효모를 융합하여 알코올 생성능과 함께 killer toxin 활성을 나타내는 다기능 killer yeast를 확보한 보고도 있으며(14), 분리된 killer yeast를 돌연변이시켜 killer toxin의 대량 생산에 이용한 연구도 있다(15).

Killer yeast는 단지 식품에만 응용되는 것이 아니며, killer

\*Corresponding author. E-mail: betabio@empal.com  
Phone: 82-53-602-1823, Fax: 82-53-602-1898

toxin이 효모뿐만 아니라 fungi의 생육도 저해한다는 보고와 함께 농업에서는 biocontrol agent로도 이용을 시도하고 있다(16,17). 따라서 killer toxin 생산 효모는 다양하게 생물 산업에 이용되고 있으며, 그 가치가 큰 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 주정 발효 및 장류 발효과정 중에 정상적인 발효를 저해하는 오염균들의 생육을 방지하고 발효식품의 저장기간을 연장하기 위하여 미생물 유래 천연 항균성 물질인 killer toxin을 이용하고자 전통누룩으로부터 killer toxin 생산 효모를 분리 동정하고 killer toxin의 항균성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 누룩으로부터 효모의 분리 및 선발

대구광역시 달성군 유가지역의 전통주인 하향주 제조에 이용되는 누룩으로부터 killer toxin 생산 효모를 분리하고자 분쇄한 누룩 1 g에 멸균증류수 10 mL를 첨가하고 충분히 혼합한 후 10배 희석한 희석액 100  $\mu$ L를 yeast malt extract agar(agar 2%, glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 3%, malt extract 3%, pH 6.0)에 도말하였다. 24시간 동안 28°C에서 배양시킨 후 생성된 집락을 분리하였으며 분리된 효모는 사면 배양하여 4°C에서 보관하면서 실험에 이용하였다.

### Killer toxin 생산 효모 분리

Killer toxin 활성 측정을 위한 표준 감수성 균주로는 *S. cerevisiae* KCTC 7930을 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에서 분양받아 이용하였다. Yeast malt extract broth(glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 3%, malt extract 3%, pH 6.0)에 *S. cerevisiae* KCTC 7930을 한 백금이 접종하여 28°C에서 12시간 전 배양하였다. *S. cerevisiae* KCTC 7930의 전배양액 100  $\mu$ L를 5 mL YM soft agar(agar 0.8%, glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 3%, malt extract 3%, pH 6.0)에 첨가한 후 YM agar에 중층하고 누룩으로부터 분리된 효모를 toothpick 접종하여 28°C에서 24시간 배양 후 생성되는 clear zone을 육안 상 관찰하였다.

### 일반 병원성 세균 및 효모에 대한 길항성 조사

병원성 균주는 영남대학교 미생물 유전학 연구실에서 보관중인 *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria minocytogenesis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *Candida albicans*를 분양받아 사용하였다. 병원성 균주에 대한 길항능을 조사하기 위하여 *B. cereus*, *V. parahaemolyticus*, *L. minocytogenesis*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7은 luria broth(yeast extract 0.5%, NaCl 1%, tryptone 1%, pH 7.0)에 한 백금이 접종하고 37°C에서 8시간 진탕배양한 배양액을 LB/YM soft agar(agar 0.8%, glucose 0.5%, peptone 0.25%, yeast extract 1.75%, malt extract 1.5%, NaCl 0.5%,

tryptone 0.5%, pH 6.0)에 첨가한 후 LB/YM agar에 중층하고 toothpick을 이용하여 killer toxin 생산 효모를 접종하여 30°C에서 18시간 배양 후 생성되는 clear zone을 육안 상 관찰하였다.

또한 yeast malt extract broth(glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 3%, malt extract 3%, pH 6.0)에 28°C에서 12시간 전 배양한 *C. albicans* 배양액을 YM soft agar(agar 0.8%, glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 3%, malt extract 3%, pH 6.0)에 첨가한 후 YM agar에 중층하고 toothpick 접종하여 killer toxin 생산 효모를 접종한 다음 30°C에서 20시간 배양 후 생성되는 clear zone을 육안 상 관찰하였다.

### Killer toxin 생산 효모의 동정

Killer toxin 생산능이 우수한 효모의 동정을 위하여 우선 현미경상 형태적 특성을 조사한 후 미생물의 탄소원 이용능을 바탕으로 한 Biolog사의 동정시스템(Microlog TM4.0)으로 미생물의 생리적 특성을 조사한 후 효모의 ITS(internal transcribed spacer) sequence의 상동성을 분석하여 최종 동정하였다. 즉 분리된 효모 배양액으로부터 Wizard Genomic DNA Purification kit(Promega, WI, USA)을 이용하여 genomic DNA를 정제한 후 universal primer인 ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 및 ITS 4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 이용하여 PCR 증폭하고 증폭된 ITS partial sequence인 PCR product를 솔젠트사에 의뢰하여 DNA 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 NCBI(NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 blast search를 수행한 후 bioedit 프로그램과 Cluster W를 이용하여 align 조사한 다음 Mega2 Program으로 phylogenetic tree를 작성하였다.

### Killer toxin 조정제액 제조

Killer toxin 조정제액은 killer toxin 생산 효모 전배양액을 50 mL YM broth에 0.1%(v/v)되게 접종하고 72시간 배양한 다음 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 배양 상등액을 회수하고 이를 동결건조한 후 멸균증류수 10 mL에 용해하여 사용하였다.

### Proteolytic enzyme의 영향

Killer toxin은 일반적으로 단백질로 알려져 있으므로 누룩으로부터 분리된 효모가 생산하는 killer toxin이 단백질성 물질인지 확인하고자 단백질 분해효소인 pronase E(1.20 mg/mL, Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 용액 1 mL에 0.1 M citrate phosphate 완충액(pH 4.7) 1.5 mL와 killer toxin 조정제액 3 mL를 가하여 20°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 pronase가 처리된 killer toxin과 처리하지 않은 killer toxin을 각각 *S. cerevisiae* KCTC 7930 전배양액 10  $\mu$ L를 접종한 YM broth 5 mL에 첨가하고 30°C에서 18시간 배양한

다음 *S. cerevisiae* KCTC 7930 생육도를 측정하여 잔존하는 killer toxin 활성을 조사하였다.

**알코올 및 당 내성 측정**

선발된 killer toxin 생산 효모의 주조시 이용가능성을 타진하기 위하여 알코올 및 당 내성을 조사하였다. 우선 선발 효모의 당 내성은 glucose 1% 대신 glucose를 40%, 50% 첨가한 YM broth에 24시간 동안 28°C에서 진탕배양시킨 후 spectrophotometer(Ultraspec 2100, Amercham Biosciences Co., Sweden)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 생육을 통해 당 내성을 조사하였다. 알코올에 대한 내성은 YM broth에 5%, 10%, 15% 농도로 에탄올을 첨가하고 28°C에서 5일간 배양 후 상기와 동일하게 균주 생육을 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**Killer toxin 생산 효모 분리**

전통 누룩으로부터 killer toxin 생산 균주를 분리하고자 표준감수성 균주인 *S. cerevisiae* KCTC 7930에 대한 생육 저해능을 조사한 결과, 효모 K3, K5, K11, K12, K15는 YM agar 상에서 *S. cerevisiae* KCTC 7930의 생육을 억제하는 생육 저지대 환인 clear zone이 형성됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 또한, killer toxin 생산성을 가지는 상기 5균주의 *S. cerevisiae* KCTC 7930에 대한 생육 저해환인 clear zone이 형성되는 거리를 측정한 결과, K15가 생육 저지대 거리 측정에서 3 mm로 분석되어 *S. cerevisiae* KCTC 7930에 대한 강력한 생육 저해능을 나타내었으며 killer toxin 생산성이 가장 높음을 확인하였다(Fig. 2).

일반적으로 효모는 산업적으로 이용시 자연에서 분리한 후 세포융합(7)이나 변이주(15)로 개량하여 발효식품의 생

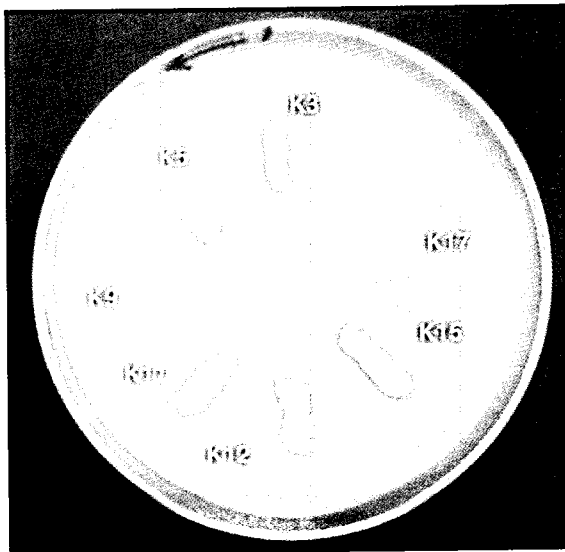


Fig. 1. Inhibitory effect on growth of *S. cerevisiae* KCTC 7930 by yeasts isolated from traditional Nuruk.

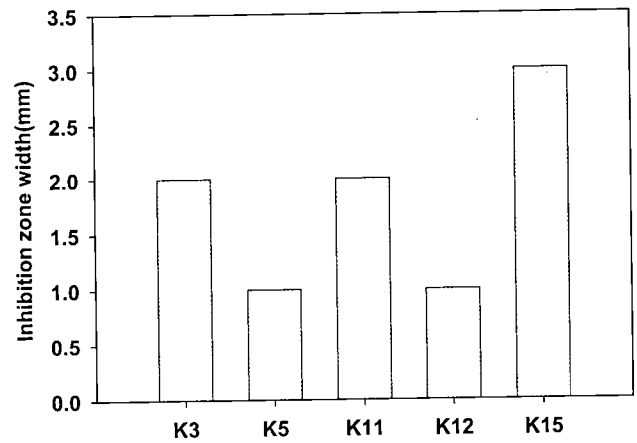


Fig. 2. Inhibition activity of *S. cerevisiae* KCTC 7930 by killer toxin produced from yeasts.

산시 오염균을 방지하고 발효효율을 높이기 위해 사용되고 있다. 따라서 상기에 분리된 효모는 주조용 누룩으로부터 분리되었으므로 알코올 내성이 우수한 발효 효모에 융합한다면 양조시 잡균의 제어를 통해 이상발효를 충분히 제어할 수 있다고 사료된다.

**일반 병원성 세균 및 효모에 대한 길항성 조사**

Killer toxin 생산 효모는 일반적으로 같은 속의 효모에 길항작용을 갖는 것으로 알려져 있으나(11), 장내병원성 세균인 *Escherichia coli*, *Shigella* 및 *Salmonella*에 대해 항균 효과를 나타낸다는 보고도 있다(18). 따라서 본 연구에서도 전통 누룩으로부터 분리한 killer toxin 생산 효모를 이용하여 일반 병원성 세균 및 효모에 대한 생육 저해능을 tooth-pick 방법으로 조사하였다. 그 결과, *S. Typhimurium*에 대해서는 K3, K5, K11, K12, K15가 모두 생육 저해능을 나타내었으며, 이들 중 특히 K15가 *S. Typhimurium* 생육을 강력히 저해하였다. 또한 분리된 효모 K12, K15는 *V. parahaemolyticus* 생육도 저해시켜 clear zone을 형성시켰으나 (Table 1), *B. cereus*, *L. minocytogenesis*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 및 *C. albicans*에 대한 길항능은 없는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 분리된 killer toxin 생산성 균주인 K12, K15는 yeast 뿐만 아니라 *S. Typhimurium*과 *V. para-*

Table 1. Effect of yeasts isolated from traditional Nuruk on growth of various pathogenic bacteria

Strains	Killer toxin activities				
	K3	K5	K11	K12	K15
<i>Bacillus cereus</i>	- <sup>1)</sup>	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	+	+
<i>Listeria minocytogenesis</i>	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	+	+	+	+	++
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup>+: growth inhibition, -: no inhibition.

*haemoliticus*에 대한 길항능도 나타내어 넓은 항균범위를 가지고 있으며, 식품산업에 특히 유용할 것으로 사료되어진다. 장내 병원성 세균에 대한 yeast의 길항능은 yeast 표면에 enterobacteria나 enterotoxin이 결합하여 mannose-sensitivity interaction을 유도하여 생기는 것으로 보고되어지고 있으며(18), 본 연구에서 분리한 killer toxin 생산 효모의 장내세균에 대한 항균기작에 대해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

**Killer toxin 생산 효모 선발**

본 연구는 식품산업의 이상발효를 방지하거나 저장성 연장을 위해 killer toxin 생산 균주를 확보하고자 하였다. 이에 상기 결과를 바탕으로 전통 누룩으로부터 분리된 killer toxin 생산 균주 중 K15는 *S. cerevisiae* KCTC 7930에 대하여 강하게 생육을 저해하였으며, *S. Typhimurium*과 *V. parahaemoliticus*에도 길항능을 나타내어 다양한 산업적 응용이 가능한 killer toxin 고 생산 균주로 선발하였다.

**Killer toxin 생산 효모의 동정**

선발된 killer toxin 고 생산 균주 K15를 Biolog사의 동정 시스템(Microlog TM4.0)으로 1차 동정한 결과, *Pichia anomala*에 98%의 상동성을 나타내었다. 또한 ITS 1 primer(5'-TCCGT AGG TGAACCTGCGG-3'), ITS 4 primer(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 이용하여

PCR 증폭 후 partial 18Sr DNA sequence를 이용하여 NCBI의 blast search를 수행한 결과, *Pichia anomala*에 99% 상동성을 나타내어 *Pichia anomala* K15로 명명하였다(Fig. 3, 4).

**Proteolytic enzyme에 대한 영향**

*P. anomala* K15의 배양 상등액을 pronase E로 처리한 후 *S. cerevisiae* KCTC 7930에 대한 생육 저해능을 조사한 결과, pronase E 처리시 killer toxin 활성은 실험되어 *S. cerevisiae* KCTC 7930의 생육이 억제되지 않았다. 따라서 *P. anomala* K15가 생산하는 killer toxin은 일반적으로 보고되어진 것(5)과 같이 protein으로 구성되어진 것으로 확인되었다(Table 2).

*P. anomala* K15가 생산하는 killer toxin은 단백질 분해효소에 의해 분해되므로 소화기관에서 쉽게 분해되어 bacteriocin(19)과 같이 인체에 무독성이며, 잔독성이 없어 장류나 각종 알코올 발효에 조정제 수준의 killer toxin으로 활용할 다면, 유통 중에 생기는 각종 발효식품에서 효모의 2차 오염에 대한 괴오름 현상 등을 방지할 수 있는 안전한 항균성 식품 소재로 충분한 이용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

**Killer toxin 생산 균주 K15의 에탄올 및 당 내성**

선발된 killer toxin 생산 효모인 K15의 주조시 이용가능성을 확인하기 위하여 알코올 및 당 내성을 조사한 결과, *P. anomala* K15는 50%의 glucose 농도에서도 충분한 생육

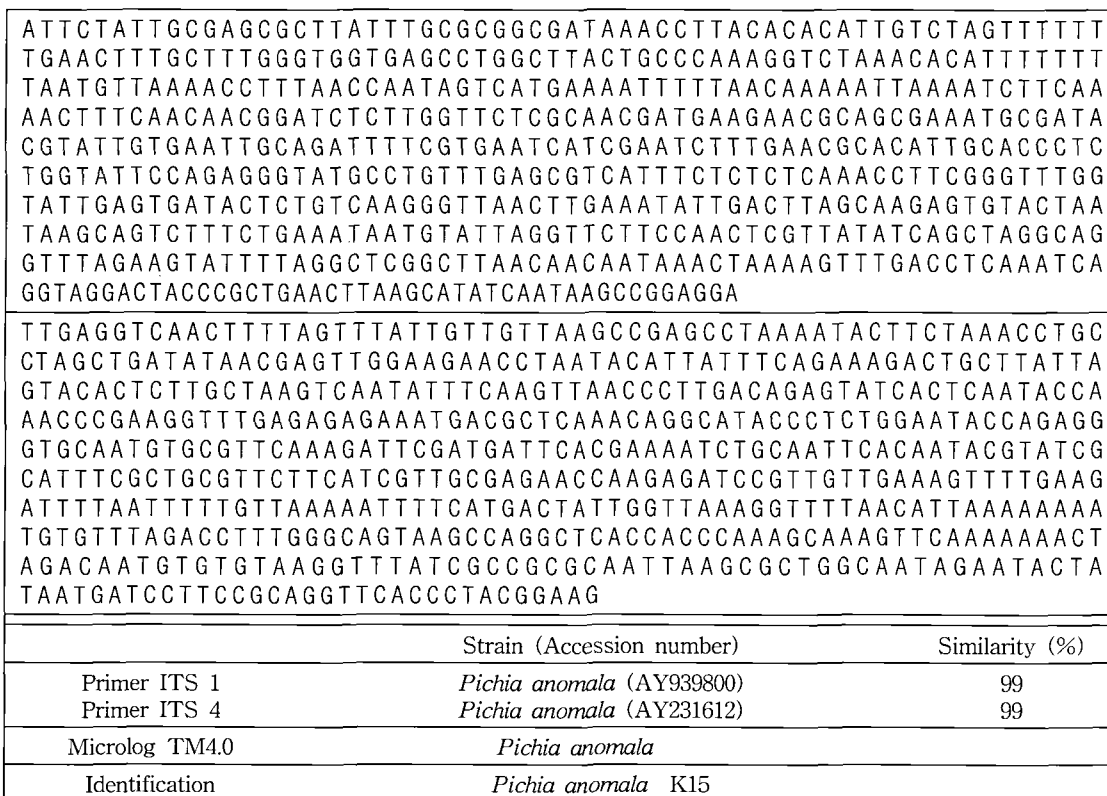


Fig. 3. Result of blast searching with the ITS sequence (up 585 bp amplified with primer ITS 1, down; 573 bp amplified with primer ITS 4 from genomic DNA of yeast K15).

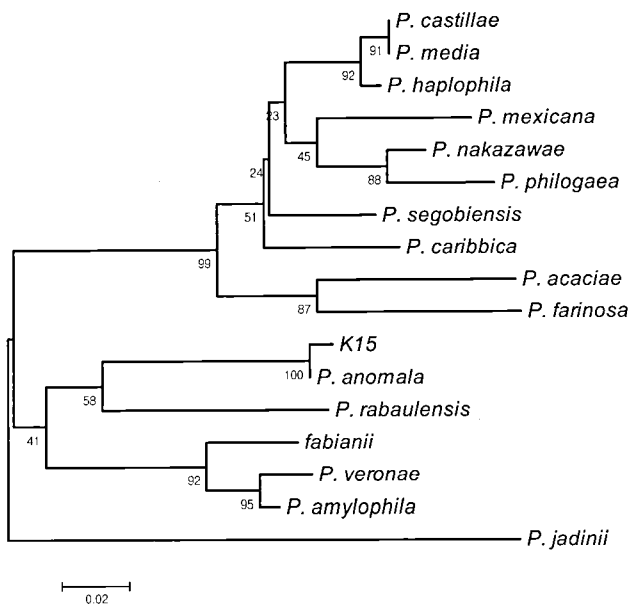


Fig. 4. Phylogenetic tree of *Pichia anomala* K15 with related species.

Neighbor-joining tree was based on ITS region sequence (internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2). The marker bar denoted the relative branch length. Bootstrap values, expressed as percentages of 1,000 replications, were given at branch points.

Table 2. Effect of proteolytic enzyme on killer toxin activity of *P. anomala* K15

Treatment	Cell growth <sup>1)</sup>	Killer activity <sup>2)</sup>
Pronase E	0.035	-
None	1.893	+

<sup>1)</sup>Cell growth was measured with spectrophotometer at 600 nm. <sup>2)</sup>+: positive, -: no activity.

을 나타내었다(Table 3). 그러나 10%의 에탄올 농도에서 생육이 급격하게 저하되어 에탄올에 대한 내성은 약하였다. 주조시 초기 발효단계에서는 발효액의 당 농도는 높으며, 알코올 농도는 일반적으로 낮은 편이다. 따라서 본 killer toxin 생산 균주는 고농도의 당에서 충분히 생육이 가능하므로 주모용 효모의 생육을 저해하지 않는다면, 주모의 생육이 약한 발효초기 단계에 투입하여 타 효모의 생육 방지는 물론 이상발효를 막을 수 있을 것으로 사료되어진다. 또한 주모가 우점화됨에 따라 잡균 오염의 위험이 낮은 발효기간에 발효액의 알코올 농도가 증가되어 K15의 생육은 급격히 저하되므로 주조의 품질에는 큰 영향을 주지 않을 것으로 생각되어

Table 3. Effect of ethanol and glucose on the growth of *P. anomala* K15

Ethanol concentration (%)				Glucose concentration (%)		
0	5	10	15	2	40	50
2.043 <sup>1)</sup>	1.966	0.222	0.034	2.572	1.862	1.81

<sup>1)</sup>Cell growth was measured with spectrophotometer at 600 nm.

K15는 주조시에 이용가치가 높을 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 발효식품의 저장기간을 연장하거나 이상 발효를 방지하기 위해 미생물 유래의 천연 항균성 물질인 killer toxin 생산 균주인 K3, K5, K11, K12, K15를 전통누룩으로부터 분리하였다. 분리된 killer toxin 생산 균주 중 식중독의 원인균인 *Salmonella* Typhimurium 및 장염비브리오의 원인균인 *Vibrio parahaemolyticus*의 생육을 저해하며, killer toxin 활성이 가장 우수한 K15를 최종 선발하고 이를 Biolog사 동정시스템과 ITS영역의 염기서열 homology를 조사하여 동정한 결과, *Pichia anomala*에 99% 상동성을 나타내어 *Pichia anomala* K15로 명명하였다. *P. anomala* K15가 생산하는 killer toxin은 단백질 분해효소에 의해 불활성화 되므로 인체에서 단백질 분해효소에 의해 쉽게 분해가 가능한 안전한 항균물질임을 확인할 수 있었다. 또한 *P. anomala* K15는 에탄올 내성은 약하나 고농도의 당에서 저항성이 크므로 주조 발효초기 환경에서의 이상발효를 방지할 수 있을 것으로 사료되어진다.

## 감사의 글

본 연구는 산업자원부 지역산업기술개발사업(과제번호: 1002441)의 연구비 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Teturo Y, Tamio H, Hajime H, Mitsunobu I, Hideyo Y. 1986. Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. *FEBS Letters* 197: 50-54.
- Bevan EA, Makower M. 1963. The physiological basis of the killer character in yeast. *Proceeding of the 11th International Conference on Genetics*. Vol 1, p 203.
- Faith I, Demet A, Tolga A. 2006. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo-β-1,3-glucanase activity. *Enzyme Microb Tech* 39: 669-676.
- Lee JS, Yi SH, Kim JH, Yoo JY. 1999. Isolation of wild killer yeast from traditional meju and production of killer toxin. *Korean J Biotechnol Bioeng* 14: 434-439.
- Fatih Z, Demet A, Yasemin D. 2004. Immunization of the industrial fermentation starter culture strain of *Saccharomyces cerevisiae* to a contaminating killer toxin-producing *Candida tropicalis*. *Food Microbiol* 21: 635-640.
- Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Polonelli L. 1997. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* 10: 369-400.
- Choi EH, Chung EY, Chung WC. 1998. Construction of killer yeasts by spheroplast fusion. *J Korean Agri Chem Soc* 31: 26-32.
- Baek SY, Chung WC, Choi EH. 2000. Effect of mutagens and stabilizing agents on the killing activity of *Candida*

- dattila* and isolation of the killer toxin by gel filtration. *J Natural Science SWINS* 12: 63-69.
9. Choi EH, Chang HC, Chung EY, Chung WC. 1990. Isolation and identification of wild killer yeasts *Candida dattila*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 18: 1-5.
  10. Chung WC, Chang HC, Choi EH. 1990. Killer Characteristics of *Candida dattila* K109 and K112 strains. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 18: 26-30.
  11. Rhee CH, Woo CJ, Lee JS, Chung KT, Park HD. 1996. Characteristics of ethanol fermentation by a killer yeast, *Saccharomyces cerevisiae* BI5-1. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 24: 331-335.
  12. Roland K, Daniel J, Raffael S, Friedhelm M. 2002. Genome organization of the linear *Pichia etchellsii* plasmid PE1A: evidence for expression of an extracellular chitin-binding protein homologous to the  $\alpha$ -subunit of the *Kluyveromyces lactis* killer toxin. *Plasmid* 47: 224-233.
  13. Izgu F, Altinbay D, Yucelis A. 1997. Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. *Food Microbiol* 14: 125-131.
  14. Chung WC, Choi EH. 1990. Protoplast fusion between *Candida dattila* K109 and wine yeast. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 18: 121-125.
  15. Kim JH, Kim NM, Lee JS. 2000. Production of killer toxin from a mutant of *Hansenular capsulata* S-13. *Korean J Food & Nutr* 13: 158-163.
  16. Santos A, Sánchez A, Marquina D. 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiol Res* 159: 331-338.
  17. Santos A, Marquina D. 2004. Killer toxin of *Pichia membrifaciens* and its possible use of a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology* 150: 2527-2534.
  18. Mogens J, Judy N. 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int Dairy Journal* 6: 755-768.
  19. Lyu HS, Lee HS, Im JH, Kim JL, Kim SD. 2004. Isolation and identification of *Sphingomonas sanguis* from wild pheasant and production of antagonistic substance against fowl typhoid causing *Salmonella gallinarum*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 27-32.

(2007년 5월 28일 접수; 2007년 6월 28일 채택)