

항효모성 물질 생산을 위한 *Rahnella aquatilis* AY2000 균주의 생육특성

강민정 · 이복규¹ · 김광현*

동의대학교 자연과학대학 생명응용학과, ¹동의대학교 자연과학대학 분자생물학과

Characteristics of *Rahnella aquatilis* Strain AY2000 for an Anti-Yeast Substance Production. Kang, Min-Jung, Bok-Kyu Lee¹, and Kwang-Hyeon Kim*. Department of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ¹Department of Molecular Biology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea - *Rahnella aquatilis* AY2000 has an unique characteristic which produces an anti-yeast substance (AYS). The AYS of the strain AY2000 was always secreted on agar plate, however, its activity in liquid culture was labile upon storage of the medium. In this paper, cultural conditions of the strain AY2000 for the AYS production were investigated in liquid culture, and minimal inhibitory concentration (MIC) against *Saccharomyces cerevisiae* was determined for the AYS activity. MIC of the AYS cultured in PYG broth at 25°C for 24 hr was 23.5 µg/mL, however, that in MYCS (pH 5.5) broth at the same condition was 15.5 µg/mL. The activity of the AYS had increased rather in MYCS broth excluded NH₄-citrate than in the same broth contained NH₄-citrate, and MIC of the AYS produced in MYCS broth without NH₄-citrate was 15.5 µg/mL. When the strain AY2000 was maintained in MYCS broth without NH₄-citrate but added 100 µM FeCl₃, the activity of the AYS had increased and its MIC was 7.8 µg/mL. MIC of the AYS was 7.8 µg/mL after the strain AY2000 was cultured in MYCS broth containing 100 µM FeCl₃ without NH₄-citrate, however, its MIC was 31.3 µg/mL after 48-60 hr culture in the same broth.

Key words: Anti-yeast substance, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rahnella aquatilis*, growth inhibitor, MIC, liquid culture

서 론

*Rahnella*속의 균은 *Enterobacteriaceae*(장내세균과)에 속하는 그람음성 간균이다. 이 *Rahnella*속의 균들은 자연에 널리 분포되어 있지만, Gavini 등[8]에 의해 처음으로 보고되었으며, 그 후에 많은 *Rahnella*속의 균주들이 토양[24]이나 물[3, 20]에서 분리되었다. 일반적으로 *Rahnella*속의 균들은 식물의 뿌리 근처에 존재하고[2, 7, 9, 12, 15, 23] 있다고 알려져 있지만, 식물의 여러 부위 즉 잎[11]이나 열매[18]와 종자[4, 13] 등에서도 발견되었다. *Rahnella*속의 균은 가끔 식품에서도 발견되며 낮은 온도에서 식품을 부패시킬 수도 있고[12, 14, 17, 21], 인체 감염은 거의 일어나지 않지만 극소수의 예가 보고되어 있다[5]. 또한, *Rahnella* 속의 균들은 질소고정[12]이나 hydroxyapatite를 용해[15]하여 식물이 이용할 수 있는 인산으로 전환시킬 수 있으며, 농업에 유용한 미생물자원으로 IAA(indole-3-acetic acid)생산[18, 24]과 식물병원균인 *Erwinia amylovora*와 *Xanthomonas campestris* [6, 16]에 대해 효과가 있는 길항세균(antagonists)으로도 알

려져 있다.

본인 등이 분리한 *R. aquatilis* AY2000균주는 *Rahnella*속의 균들 중에서 지금까지 보고된 적이 없는 항효모 활성을 가지는 독특한 특성을 가지고 있다[22]. 그러나 AY2000균주가 생산하는 항효모성 물질(Anti-yeast substance; AYS)은 고체배지에서는 항상 안정한 항효모 활성을 가졌지만, 액체배지에서는 배양조건에 따라 항효모 활성이 나타나지 않는 경우가 종종 있었으며, 또한 시료의 보관 중에도 항효모 활성이 급격히 약화되는 경향이 있었다. 이런 현상은 AY2000균주가 생산한 AYS 자체가 불안정한 물질인 경우와 AY2000균주의 생리적인 특성을 잘 모르기 때문에 액체배양에서 AYS를 생산하는 조건에 문제가 있을 경우가 있다고 생각하였다. 따라서 본 실험에서는 우선 AY2000균주가 액체배양에서 항상 항효모 활성을 가진 AYS를 생산할 수 있도록 여러 가지 배양조건을 달리하여 *S. cerevisiae*에 대한 최소생육저해농도(minimal inhibitory concentration)를 측정함으로써 항효모 활성이 있는 AYS생산을 위한 최적조건을 검토하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-1533, Fax: 82-51-890-1532;

E-mail: kimkh@deu.ac.kr

재료 및 방법

사용균주

본 연구실에서 분리한 *Rahnella aquatilis* AY2000균주 [22]가 항효모성 물질(Anti-yeast substance; AYS) 생산균주로 사용되었으며, 항효모 활성을 측정하기 위한 대상 효모는 본 연구실에 보관중인 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC2120균주가 사용되었다.

배지 및 배양방법

PYG 배지와 YM 배지의 조성은 전보[22]에서 기술한 바와 같고, Malt 배지는 1.5% malt extract(Difco사)에 0.5% sucrose가 첨가하여 사용하였으며, 또한 MYCS 배지[0.3% malt extract, 0.3% yeast extract, 0.5% NH₄-citrate, 1% sucrose; pH 5.4]가 사용되었다. 본 실험에 사용된 *R. aquatilis* AY2000균주는 특별한 언급이 없는 한 25°C에서 24시간 동안 배양을 행하였으며, 배양방법을 간단히 기술하면 다음과 같다. 즉, 먼저 100 mL용 삼각 flask에 20 mL의 액체배지를 넣고 AY2000균주를 1백금이 접종시킨 후 하룻밤 동안 28°C에서 전 배양을 행하였다. 전 배양된 AY2000균주는 미리 준비된 100 mL의 액체배지가 함유된 500 mL용 삼각 flask에 액체배지의 1.0%(v/v)가 되도록 접종하고 25°C에서 24시간 동안 진탕 배양하였다.

항효모성 물질의 조제

상기의 배지 및 배양방법에서 기술한 바와 같이 미리 하룻밤 동안 전배양한 AY2000균주는 액체배지가 함유된 삼각 flask에 접종하고, 본 배양을 행한 후에 균체를 제거하기 위해 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4°C)를 행하였다. 원심분리 후에 형성된 침전물은 멸균된 생리식염수로 2회 씻은 후 동결 건조시켜서 생육된 균체량을 측정하였다. 또한, 원심분리 후 상층액은 이전에 기술된 방법[22]과는 달리 곧바로 동결 건조하여, -20°C에 보관하면서 항효모성 물질(Anti-yeast substance; AYS)의 시료로 사용하였다.

항효모 활성 측정법

항효모 활성측정은 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 가이드라인[19]에 따라서 broth micro-dilution 법으로 *S. cerevisiae*에 대한 AYS의 최소생육저해농도(Minimal Inhibitory Concentration; MIC)로 나타내었으며, 이를 간단히 기술하면 다음과 같다. 즉, 96-well microplate의 각 well에 멸균된 YM배지(100 µL)를 넣고, 미리 조제된 10 mg/mL AYS(100 µL)을 가하여 단계별로 2배씩 AYS를 희석하였다. 이와 같이 희석된 AYS가 함유된 각 well(100 µL)에는 tetracycline(5 µg/mL)이 함유된 YM배지(100 µL)를 주입하였다. 별도로 미리 하룻밤 동안 배양시킨 *S. cerevisiae* 배양액(2×10^6 - 5×10^6 cells/mL)은 YM

배지가 함유된 각 well에 10 µL씩 접종하여 28°C에서 24시간 동안 생육시킨 후 그 생육의 정도는 Microplate Reader로 흡광도(650 nm)를 측정하였다. 이때 항효모 활성은 MIC로 나타내었으며, MIC는 *S. cerevisiae*가 100% 생육되지 않은 시료의 최소농도로 결정하였다. 또한 대조군으로 AYS가 전혀 함유되지 않은 그룹과 항효모 작용이 있는 amphotericin B(Sigma Co. A-4888)가 함유된 그룹과 비교하였으며, 모든 항효모 활성측정은 2반복 실험을 행하였다.

결과 및 고찰

배지조성에 따른 AYS의 생산

전보 [22]에서 기술한 바와 같이 AY2000균주에서 AYS생산을 위한 액체배지는 PYG나 YM배지가 사용되었다. 본 실험에는 AY2000균주의 AYS의 생산성과 항효모 활성의 증가를 위해 이들 2종의 배지 외에도 MYCS배지와 Malt배지가 사용되었다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 Malt 배지는 AY2000균체의 증식이 좋지 않아서 항효모 활성이 가장 약하였으나, MYCS배지는 AY2000균주의 생육도 양호하였으며, *S. cerevisiae*에 대한 MIC의 값도 PYG나 YM배지에 비하여 15.6 µg/mL로 가장 강하였고, AYS의 양도 PYG나 YM배지에서 보다 많이 생성되었다.

Table 1. MIC against *S. cerevisiae* of AYS produced in various cultural broth.

Cultural broth (pH 5.4)	AYS weight (g)	Cell mass (mg)	MIC (µg/mL)
MYCS	1.36	68	15.6-15.6
PYG	0.95	73	31.3-31.3
YM	0.94	78	15.6-31.3
Malt	1.62	14	62.5-62.5

The strain AY2000 was maintained at 25°C for 24 hr for AYS production. This experiment was measured in duplicate. Data (AYS weight & cell mass) given in table 1 are averages of these measurements. The anti-yeast activity was expressed as MIC against *S. cerevisiae*, after the yeast cells were grown in a 96-well microplate. The MIC of AYS was defined as the lowest concentration that inhibits 100% of growth compared with a drug-free control at 28°C for 24h. Amphotericin B (Sigma Co. A-4888) was used as the positive control in this experiment.

배양온도에 따른 AYS의 생산

MYCS배지에 AY2000균주를 접종하고 배양온도를 달리 하여 24시간 동안 배양시킨 후 생산된 AYS의 활성과 생산량을 조사하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 20°C에서는 세포생육과 AYS의 양이 적었으며, 25°C에서 AYS의 활성이 가장 강하였고, 30°C에서는 균체량은 증가되었으나 AYS의 활성이 약화되었으며, 35°C에서는 AYS의 활성이 전혀 나타나지 않았다. 이는 전보[22]에서 기술한 바와 같이

AY2000균주가 *R. aquatilis*에 속하는 그람 음성균으로 37°C에서는 전혀 생육이 이루어지지 않는 특성을 가지고 있어, 35°C에서는 세포의 생육이 불량하여 AYS 생산에도 영향을 끼쳤다고 생각된다. 따라서 AY2000균주는 25°C에서 배양하는 것이 가장 높은 AYS의 활성을 나타낼 수 있었다.

Table 2. MIC against *S. cerevisiae* of AYS produced and cultural temperature of strain AY2000.

Cultural temp. (°C)	AYS weight (g)	Cell mass (mg)	MIC (µg/mL)
20	1.25	57	31.3-31.3
25	1.50	70	15.6-15.6
30	1.75	72	62.5-62.5
35	1.25	25	500 >

The strain AY2000 was maintained for 24 hr in MYCS broth (pH 5.5). This experiment was measured in duplicate. Data (AYS weight & cell mass) given in table 2 are averages of these measurements. The MIC of AYS was defined as the lowest concentration that inhibits 100% of growth compared with a drug-free control at 28°C for 24 hr. Amphotericin B (Sigma Co.) was used as the positive control in this experiment.

배양pH에 따른 AYS의 생산

AY2000균주가 MYCS배지에서 배양될 때 배양초기에 pH를 조절함으로써 AYS의 생산과 활성에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다. 그 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 배지의 pH를 5.5로 조정하여 배양된 배지에서 생산된 AYS의 MIC의 값이 15.6 µg/mL로 가장 강한 항효모 활성을 나타내었으며, 그 다음은 pH 4.5였고, pH 6.5 이상에서는 AYS의 MIC의 값이 125.0 µg/mL로 항효모 활성이 가장 약하였다. 일반적으로 세균은 중성에서 생육이 양호한 경우가 대부분이지만, 본 AY2000균주는 pH 4.5에서 생육은 다소 떨어지는 하지만 산성과 중성에 걸쳐 비교적 넓은 pH 범위에서도 잘 생육하였다. 그러나, AY2000균주의 AYS는 산성배지 (pH 4.5와 pH 5.5)에서 배양된 AYS가 pH 6.5 이상의 중성배지에서 배양된 AYS보다 더욱 강한 항효모 활성을 나타내었다. 따라서 AY2000균주가 강한 항효모 활성을 가진 AYS를 생산하기 위해서는 MYCS배지의 초기배양 pH를 5.5로 조정해야 한다는 결론에 도달하였다.

Table 3. MIC against *S. cerevisiae* of AYS produced and initial pH of MYCS broth.

Initial pH	pH after culture	AYS weight (g)	Cell mass (mg)	MIC (µg/mL)
4.5	4.7	1.26	58	62.5-62.5
5.5	5.8	1.52	68	15.6-31.3
6.5	6.5	1.45	65	125.0-125.0
7.5	7.0	1.30	72	125.0-125.0

The strain AY2000 was maintained in MYCS broth at 25°C for 24 hr. This experiment was measured in duplicate. Data (AYS weight & cell mass) given in table 3 are averages of these measurements.

NH₄-citrate 농도에 따른 AYS의 생산

MYCS배지는 질소원으로 NH₄-citrate가 0.5%가 함유되어 있으며, NH₄-citrate 이외에 몇 가지 다른 질소원을 MYCS 배지에 가하여 AY2000균주가 생산한 AYS의 활성을 조사하였다. 그 결과 Table 4에서 보는바와 같이 무기염류 (NaNO₃나 NaNO₂)나 peptone이 질소원으로 사용된 경우 보다 NH₄-citrate가 질소원으로 사용된 경우가 AY2000균주로부터 AYS의 항효모 활성이 더욱 강하였다. 특히 peptone이 사용된 경우는 NH₄-citrate가 질소원으로 사용된 경우 보다 균체의 생육은 증가되었으나, 생산된 AYS의 활성은 오히려 저하되었다. 따라서 MYCS배지에 NH₄-citrate 농도를 증가시켜서 AY2000균주를 배양하면 AYS의 활성이 증가되는지를 조사하였다. 흥미롭게도 MYCS배지에 NH₄-citrate농도가 증가됨에 따라 오히려 AYS의 항효모 활성이 감소하였으며, NH₄-citrate가 2.0% 이상이 배지에 첨가되면 항효모 활성은 전혀 나타나지 않았다(Table 5). 또한 MYCS배지에서 질소원이 완전히 배제된 경우에도 0.5% NH₄-citrate가 함유된 MYCS배지에서 생산된 AYS의 항효모 활성 보다 같거나 그 이상의 활성을 나타내었다. 이 현상은 MYCS배지에는 기본적으로 yeast extract가 함유되어 있어, NH₄-citrate가 제거되어도 AY2000의 생육과 AYS생산에 필요한 질소 공급에는

Table 4. MIC against *S. cerevisiae* of AYS produced and nitrogen source in MYCS broth.

N-source (0.5%)	AYS weight (g)	Cell mass (mg)	MIC (µg/mL)
None	1.15	62	15.6-15.6
NH ₄ -citrate	1.27	65	15.6-31.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.25	63	31.3-31.3
peptone	1.51	70	31.3-62.5
NaNO ₃	1.23	50	500>
NaNO ₂	1.22	20	500>

The strain AY2000 was maintained in MYCS broth without NH₄-citrate at 25°C for 24hr. This experiment was measured in duplicate. Data (AYS weight & cell mass) given in table 4 are averages of these measurements.

Table 5. MIC against *S. cerevisiae* of AYS produced and concentration of NH₄-citrate in MYCS broth.

NH ₄ -citrate conc. (%)	AYS weight (g)	Cell mass (mg)	MIC (µg/mL)
None	1.18	62	15.6-15.6
0.5	1.24	73	15.6-31.3
1.0	1.16	78	62.5-125.0
1.5	1.20	82	125.0-125.0
2.0	1.17	65	500>

The strain AY2000 was maintained in MYCS broth without NH₄-citrate at 25°C for 24 hr. This experiment was measured in duplicate. Data (AYS weight & cell mass) given in table 5 are averages of these measurements.

문제가 없다고 생각되었다. 특히 peptone은 단순히 질소 공급원으로만 작용하지만, yeast extract는 질소 공급원 이외에도 비타민 등이 포함되어 있어 AY2000균주의 AYS생성과 관련된 대사에도 영향을 주었을 것이라고 생각된다. 따라서 MYCS배지에 peptone의 첨가는 과잉의 질소원으로 AY2000균주의 생육은 양호하였으나 생산된 AYS의 활성은 오히려 저하되었다고 생각된다. 한편 Bergey's manual[1]에 의하면 *R. aquatilis*속의 균들은 질산을 아질산으로 환원시키는 작용이 있다고 기술되어 있다. 따라서 AY2000균주도 *R. aquatilis*속[22]이기 때문에 배지에 NaNO_3 나 NaNO_2 의 첨가는 탈질작용으로 균체생육이 불량하였을 가능성이 있다고 생각된다.

당의 종류에 따른 AYS의 생산

MYCS배지에는 탄소원으로 설탕 1%가 첨가되어있어, 설탕 이외에 다른 탄소원을 사용하였을 때 AYS의 량과 그 활성을 비교 조사하였다. 그 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 포도당과 설탕이 함유된 배지에서 AY2000균을 배양하면 거의 동일하게 항효모 활성을 강하게 나타내어 MIC가 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 측정되었으나, 그 이외의 탄소원은 탄소원을 가하지 않은 그룹 보다 오히려 항효모 활성이 감소되는 경향이 있었다.

Table 6. MIC against *S. cerevisiae* of AYS produced in various carbon source.

Carbon source	AYS weight (g)	Cell mass (mg)	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
None	1.18	52	15.6-31.3
Sucrose	1.21	75	15.6-15.6
Glucose	1.18	78	15.6-15.6
Lactose	1.13	62	62.5-62.5
Soluble-starch	1.12	63	31.3-31.3
Ethyl alcohol	1.13	60	500>

The strain AY2000 was maintained in MYCS broth contained 1.0% carbon source at 25°C for 24 hr. This experiment was measured in duplicate. Data (AYS weight & cell mass) given in table 6 are averages of these measurements.

금속이온의 종류에 따른 AYS의 생산

MYCS배지에 여러 가지 금속이온을 첨가하였을 때 AY2000균이 생성하는 AYS의 항효모 활성을 조사하였다. 그 결과 Table 7에서 보는바와 같이 금속이온들 중에서 FeCl_3 가 함유된 배지에서 가장 항효모 활성(MIC는 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)이 강하였다. 이때 사용된 금속이온들은 모두 10 mM을 MYCS배지에 첨가하였으나, CuSO_4 , ZnSO_4 및 FeCl_3 는 배지성분과 침전이 형성되지 않는 농도의 범위를 정한 후 각각 1 mM, 1 mM 및 0.1 mM을 첨가하여 사용하였다. 또한 배지에 함유된 금속염 자체가 효모의 생육에 영향을 줄 가능성을 생

각하여 대조군으로 각각의 금속염이 함유된 배지를 사용하여 시료를 조제하고 항효모 활성을 조사하였다. 그 결과 대조군으로 조제된 시료들 모두 *S. cerevisiae*에 대한 생육억제 현상은 없었다(data 미제출). 또한 사용된 금속염류들 중에 CoCl_2 , CuSO_4 및 ZnSO_4 의 경우에 AYS활성이 나타나지 않는 것은 AY2000균주의 생육저하로 인해 AYS의 생성에도 영향을 미쳤을 것이라고 생각된다. 그러나, FeCl_3 의 경우는 AY2000균주가 FeCl_3 를 함유하지 않은 MYCS배지에서 생성된 AYS의 활성(MIC; 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 비해 FeCl_3 가 함유된 MYCS 배지에서 생성된 AYS의 활성(MIC; 7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)이 더욱 강하게 나타났다. 일반적으로 철 이온은 환원력에 의해 유기물의 산화나 침전물 형성으로 오히려 AYS의 항효모 활성을 약화시킬 가능성이 있기 때문에 배지 조성물과 철 이온에 의한 침전물이 형성되지 않도록 소량의 FeCl_3 가 사용되었으며, 본 실험의 대조군에서도 0.1 mM FeCl_3 는 항효모 활성에 전혀 영향을 끼치지 못하였으며(data 미제출), 오히려 0.1 mM FeCl_3 를 MYCS배지에 첨가하면 AYS의 활성이 증가시켰다. 따라서 이에 대한 이유는 현재로서는 알 수 없지만 장차 AY2000균주의 AYS생성에 관여하는 메커니즘에 대해 보다 상세한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 FeCl_3 의 농도를 달리하여 MYCS배지에 첨가한 후 AY2000균주의 배양액에서 항효모 활성을 측정해 본 결과 Table 8에서 보는 바와 같이 100 μM FeCl_3 는 첨가하고 NH_4 -citrate는 제외한 MYCS배지에서 AY2000균주를 배양한 경우는 생성된 AYS의 MIC가 7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 강하였으나, 그 이하의 농도로 FeCl_3 가 첨가된 경우는 FeCl_3 를 첨가하지 않은 경우와 같이 MIC가 15.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 나타내었다. 따라서 MYCS배지에 100 μM FeCl_3 가 첨가시켜서 AY2000균

Table 7. MIC against *S. cerevisiae* of AYS produced and metal salts addition in MYCS broth.

Metal salt	AYS weight (g)	Cell mass (mg)	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
None	0.98	58	15.6-31.3
CaCl_2	1.21	78	62.5-62.5
KCl	1.22	68	62.5-62.5
K_2MoO_4	1.18	63	500>
CoCl_2	1.20	22	500>
MnSO_4	1.02	52	15.6-31.3
FeCl_3	1.09	78	7.8-15.6
NaCl	1.06	72	62.5-125.0
MgSO_4	1.24	67	31.3-62.5
CuSO_4	1.18	32	500>
ZnSO_4	1.29	47	500>

The strain AY2000 was maintained in MYCS broth contained each metal salts at 25°C for 24hr Each metal salts used in this experiment was 10 mM, however, ZnSO_4 , CuSO_4 and FeCl_3 was used 1 mM, 1 mM and 0.1 mM, respectively. This experiment was measured in duplicate. Data (AYS weight & cell mass) given in table 7 are averages of these measurements.

Table 8. MIC against *S. cerevisiae* of AYS produced and concentration of FeCl₃ added in MYCS broth.

FeCl ₃ conc. (μM)	AYS weight (g)	Cell mass (mg)	MIC (μg/mL)
0	0.90	76	15.6-15.6
10	1.01	71	15.6-15.6
50	1.70	72	15.6-15.6
100	1.05	78	7.8-7.8

The strain AY2000 was maintained in MYCS broth without NH₄-citrate at 25°C for 24hr. This experiment was measured in duplicate. Data (AYS weight & cell mass) given in table 8 are averages of these measurements.

주를 배양하면 가장 강한 활성을 가진 AYS를 생산할 수 있다는 결론을 얻었다.

배양시간에 따른 AYS의 생산

이상의 결과에서 NH₄-citrate는 제거하고, 100 μM FeCl₃를 첨가한 MYCS배지(pH 5.5)에 AY2000균주를 접종하고 25°C에서 24시간 동안 배양하면 항효모 활성이 가장 강한 AYS를 얻을 수 있었다. 그러나, 배양이 끝난 후 배양액에는 여러 가지 효소들이 함유되어 있으므로 생산된 AYS의 활성이 유지되는 기간을 검토하고자 배양시간을 늘여서 배양시킨 후 AYS에 대한 MIC를 측정하였다. 그 결과 Table 9에서 보는 바와 같이 배양 12-24시간 동안에 가장 항효모 활성이 강하게 나타났으며(MIC; 7.8 μg/mL), 그 이후에는 오히려 항효모 활성이 감소하였다. 또한 AY2000균주의 생육 곡선을 조사해서 비교분석해 본 결과 배양 12시간에는 정지기에 도달하였으며(data 미제출), AY2000균주의 항효모성 물질의 생성은 정지기에 도달하여 배양 24시간까지 그 활성이 유지되었으나(MIC는 7.8 μg/mL), 배양 24시간 이후에는 항효모 활성(MIC는 31.3 μg/mL)이 다소 떨어져서 배양 60시간까지 그대로 항효모 활성을 유지하였다. 따라서 전보[22]에서 기술한 바와 같이 항효모 활성은 다른 *Rahnella*속의 균주들에서는 알려지지 않은 AY2000균주의 특성이며, 본 연

Table 9. MIC against *S. cerevisiae* of AYS produced during cultural periods.

Cultural time (hr)	pH after culture	AYS weight (g)	Cell mass (mg)	MIC (μg/mL)
0	5.5	1.22	-	>500
12	6.1	0.91	62	7.8-7.8
24	7.3	0.87	78	7.8-7.8
36	7.3	1.18	80	15.6-31.3
48	7.3	1.18	76	31.3-31.3
60	7.8	0.66	75	31.3-31.3

The strain AY2000 was maintained at 25°C in MYCS broth without NH₄-citrate but added 100 μM FeCl₃. This experiment was measured in duplicate. Data (AYS weight & cell mass) given in table 9 are averages of these measurements.

구에서는 AY2000균주가 생산한 AYS의 연구에서 많은 보완해야 할 문제점들 중에서 적어도 액체 배양에서 안정적으로 AYS를 생산 하는 조건을 알 수 있었다. 현재 이 조건에서 생성된 AYSmf 부분정제하고 그 안정성 및 AYS의 이화학적 특성에 대한 지속적인 연구가 진행되고 있다.

결론적으로 AYS균주로부터 액체배양을 행하여 항효모 활성을 가진 AYS를 안정적으로 생산하기 위해서는 NH₄-citrate가 제거되고, 100 μM FeCl₃가 첨가된 MYCS배지(pH 5.5)를 조제하여 25°C에서 12-24시간 동안 AY2000균주를 진탕 배양하면 *S. cerevisiae*에 대해 가장 높은 활성(MIC; 7.8 μg/mL)을 가지는 AYS를 생산할 수 있었다.

요 약

본인 등이 분리한 *Rahnella aquatilis* AY2000균주는 *S. cerevisiae*나 *C. albicans*에 대한 항효모 작용이 있다. 그러나, AY2000균주는 한천이 함유된 고체배지에 배양하면 항효모 작용을 항상 관찰할 수 있었으나, 액체배양에서는 AYS의 활성이 불안정하여, AYS의 생산과 저장 동안에 그 활성이 소실되곤 하였다. 따라서 AY2000균주가 액체배양에서 안정된 AYS를 생산하도록 배지조성의 변화와 배양조건을 검토하기 위해 항효모 활성을 중심으로 실험을 행하였다. 그 결과 AY2000균주를 YM배지에 배양시킨 AYS의 MIC는 23.5 μg/mL이었으나, MYCS배지에 AY2000균주를 배양시킨 AYS의 *S. cerevisiae*에 대한 MIC는 15.6 μg/mL였다. 또한 AY2000균주를 MYCS배지를 사용하여 배양온도에 따라 항효모 활성을 측정한 결과 25°C와 MYCS배지의 초기 pH를 5.5로 조정하였을 때 MIC는 15.6 μg/mL로 유지되었으나, 그 외에는 항효모 활성이 약화되었다. MYCS배지에서 탄소원으로 포도당이나 설탕을 사용하면 MIC가 15.5 μg/mL로 다른 탄소원에 비해 항효모 활성이 강하였다. 또한 MYCS배지에 사용된 질소원으로 NH₄-citrate는 농도가 증가 될수록 AYS의 항효모 활성이 저하되었으며 오히려 NH₄-citrate를 배지에서 제거하는 편이 항효모 활성이 양호하였다. 반면에 금속이온으로 FeCl₃를 NH₄-citrate가 제외된 MYCS배지에 100 μM을 첨가하여 AY2000균주를 배양하면 AYS의 *S. cerevisiae*에 대한 MIC는 7.8 μg/mL로 강한 항효모 활성을 나타내었다. 또한 AY2000균주는 NH₄-citrate가 제거되고 100 μM FeCl₃를 첨가한 MYCS배지(pH 5.5)에서 배양하면 12-24시간 동안에는 MIC가 7.8 μg/mL을 유지하였으나, 그 후 48-60시간 동안에는 MIC가 31.3 μg/mL로 항효모 활성이 감소되었다.

REFERENCES

- Bauman, P., D. J. Brenner, J. J. Farmer, W. Frederiksen, and J. M. Shewan. 1984. Facultatively anaerobic Gram-negative

- Rods, pp. 506-513. In N. R. Krieg and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore/London.
2. Berge, O., T. Heulin, W. Achouak, C. Richard, R. Bally, and J. Balandreau. 1991. *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. *Can. J. Microbiol.* **37**: 195-203.
 3. Brenner, D. J., H. E. Müller, A. G. Steigerwalt, A. M. Whitney, C. M. O'Hara, and P. Kämpfer. 1998. Two new *Rahnella* genomospecies that cannot be phenotypically differentiated from *Rahnella aquatilis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 141-149.
 4. Cankar, K., H. Kraigher, M. Ravnkar, and M. Rupnik. 2005. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS Microbiol. Lett.* **244**: 341-345.
 5. Carinder, J. E., J. D. Chua, R. B. Corales, A. J. Taege, and G. W. Procop. 2001. *Rahnella aquatilis* bacteremia in a patient with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Scand. J. Infect. Dis.* **33**: 471-473.
 6. El-Hendawy, H. H., M. E. Osman, and N. M. Sorour. 2005. Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas compestris* pv. *vescatoria* by *Rahnella aquatilis*. *Microbiol. Res.* **160**: 343-352.
 7. Evguenivieva-Hackenberg, E., and S. Selenska-Pobell. 1995. Genome analysis of five soil bacterial isolates named formally *Enterobacter agglomerans*. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 49-60.
 8. Gavini, F., C. Ferragut, B. Lefebvre, and H. Leclerc. 1976. Étude taxonomique d'entérobactéries appartenant ou apparentées au genre *Enterobacter*. *Ann. Microbiol. (Paris)* **127B**: 317-335.
 9. Hamilton-Miller, J. M. T., and S. Shah. 2001. Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **18**: 81-83.
 10. Hamze, M., J. Margaert, H. J. J. van Vuuren, F. Gavini, A. Beji, D. Izard, and K. Kersters. 1991. *Rahnella aquatilis*, a potential contaminant in lager beer breweries. *Int. J. Food Microbiol.* **13**: 63-68.
 11. Hashidoko, Y., E. Itoh, K. Yokota, T. Yoshida, and S. Tahara. 2002. Characterization of five phyllosphere bacteria isolated from *Rosa rugosa* leaves, and their phenotypic and metabolic properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 2474-2478.
 12. Heulin, T., O. Berge, P. Mavingui, L. Gouzou, K. P. Hebbar, and J. Balandreau. 1994. *Bacillus polymyxa* and *Rahnella aquatilis*, the dominant N₂-fixing bacteria associated with wheat rhizosphere in French soils. *Eur. J. Soil Biol.* **30**: 35-42.
 13. Iimura, K., and A. Hosono. 1996. Biochemical characteristics of *Enterobacter agglomerans* and related strains found in buck-wheat seeds. *Int. J. Food Microbiol.* **30**: 243-253.
 14. Jensen, N., P. Varelis, and F. B. Whitfield. 2001. Formation of guaiacol in chocolate milk by the psychrotrophic bacterium *Rahnella aquatilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 339-343.
 15. Kim, K. Y., D. Jordan, and H. B. Krishnan. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**: 273-277.
 16. Laux, P., Ö. Baysal, and W. Zeller. 2002. Biological control of fire blight by using *Rahnella aquatilis* Ra39 and *Pseudomonas* spec. R1. *Acta Hort.* **590**: 225-229.
 17. Lindberg, A.-M., Å. Ljungh, S. Ahmé, G. Molin, and S. Löfdahl. 1998. Enterobacteriaceae found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and presence of toxin encoding genes. *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 11-17.
 18. Lindow, S. E., C. Desurmont, R. Elkins, G. McGourty, E. Clark, and M. T. Brandl. 1998. Occurrence of indole-3-acetic acid-producing bacteria on pear trees and their association with fruit russet. *Phytopathol.* **88**: 1149-1157.
 19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Tentative Standard M27-T*. NCCLS, Vilanova, PA.
 20. Niemi, R. M., M. P. Heikkilä, K. Lahti, S. Kalso, and S. I. Niemelä. 2001. Comparison of methods for determining the numbers and species distribution of coliform bacteria in well water samples. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 850-858.
 21. Paludan-Müller, C., P. Dalgaard, H. H. Huss, and L. Gram. 1998. Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5°C. *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 155-166.
 22. Ryu, E. -J., H. -W. Kim, B.-W. KIM, H. -J. Kwon, and K.-H. Kim. 2006. *Rahnella aquatilis* strain AY2000 produces an anti-yeast substance. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 1597-1604.
 23. Tallgren, A. H., U. Airaksinen, R. Weissenberg, H. Ojamo, J. Kuusisto, and M. Leisola. 1999. Exopolysaccharide-producing bacteria from sugar beets. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 862-864.
 24. Vasanthakumar, A., and P. S. McManus. 2004. Indole-3-acetic acid-producing bacteria are associated with cranberry stem gall. *Phytopathol.* **94**: 1164-1171.

(Received April 28, 2008/Accepted Aug. 8, 2008)