

## Trehalose에 의한 *Rahnella aquatilis* AY2000 균주가 생산하는 항효모성 물질의 활성보호

강민정 · 이종환<sup>1</sup> · 이복규<sup>2</sup> · 김광현\*

동의대학교 자연과학대학 생명응용학과, <sup>1</sup>동의대학교 공과대학 생명공학과,  
<sup>2</sup>동의대학교 자연과학대학 분자생물학과

**Trehalose Protects Activity of Anti-Yeast Substance Produced by *Rahnella aquatilis* Strain AY2000.** Kang, Min-Jung, Jong-Hwan Lee<sup>1</sup>, Bok-Kyu Lee<sup>2</sup>, and Kwang-Hyeon Kim\*. Department of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, <sup>1</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, <sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – *Rahnella aquatilis* strain AY2000 produces an anti-yeast substance (AYS), however activity of the AYS tends to be decreased by heat. To investigate whether trehalose can protect AYS activity against heat, comparative studies on the AYS with and without trehalose were performed. After heat treatment at high temperatures (50°C-70°C), the AYS with trehalose had higher activity than the AYS without trehalose had. In case of AYS with trehalose (0.3-0.9M), activity of the AYS could be determined at ranging from 7.8 µg/mL to 31.3 µg/mL on *S. cerevisiae* by MTT method. Consequently, activity of the AYS after heating was well maintained by trehalose.

**Key words:** Anti-yeast substance, *Rahnella aquatilis*, trehalose, heat protection. *Saccharomyces cerevisiae*

### 서 론

오늘날 사용되는 항진균제들은 그 수가 제한되어 있으며 [8, 13], 이들 또한 사용 빈도에 따라 내성균들의 출현이 야기되며, 진핵세포에 작용함으로 인체에도 많은 부작용이 유발[5, 12]되기 때문에 비교적 부작용이 적은 새로운 항진균제의 개발이 요구된다.

*Rahnella aquatilis*속의 균주는 그람음성 간균으로 25°C에서 생육이 잘 되지만, 37°C 이상의 온도에서는 생육이 안 되는 저온균으로 알려져 있다[1]. 본인 등이 분리한 *R. aquatilis* AY2000 균주는 산성에서 약알카리(pH 4.5-8.0)에 걸친 넓은 범위의 pH에서도 생육이 가능하지만, 이 균주를 산성에서 배양하면 균체 외로 분비하는 물질들 중에서 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Candida albicans*의 생육을 저해하는 항효모성 물질(Anti-yeast substance; AYS)이 함유되어 있다[9]. 한편, 이 AYS는 일종의 proteoglycan으로 구성된 고분자 물질로 추정되며 열에 불안정하여 항효모 활성이 크게 소실되는 특성이 있다[6]. 따라서 만일 AYS에 어떤 물질을 첨가하여 AYS가 열에 안정하게 되면 오늘날 흔히 사용하는 항진균제와는 다른 새로운 항진균제로 개발할 가능성이 있다. Trehalose는 세포를 보호하는 antifreezing agent로

서 효과[2] 뿐만 아니라 단백질에 대한 열보호 작용도 있다 [3, 11]. 본 연구는 trehalose의 열보호 작용이 열 불안정성을 나타내는 AYS를 안정화 시킬 수 있을 것인지를 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주, 배지 및 시약

본 연구실에서 분리한 *R. aquatilis* AY2000균주 [9]가 항효모성 물질(Anti-yeast substance; AYS)의 생산균주로 사용되었으며, AYS생산을 위해서는 MYCS 배지[7]가 사용되었다. 또한 AYS의 활성을 측정하기 위한 균주는 본 연구실에 보관중인 *S. cerevisiae* ATCC2120균주가 사용되었으며, 이때 사용된 배지는 YM배지[7]였다. Trehalose( $\alpha$ -D-glucopyranosyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside)는 Sigma사(Cat# Lot No. T9531)에서 구입하여 사용하였다.

#### 균주 배양법 및 AYS 조제

*R. aquatilis* AY2000균주에서 AYS를 생산하기 위한 배양법은 Kang 등[7]이 기술한 바와 같다. 즉, 먼저 MYCS 액체배지에 AY2000균주를 접종하고, 25°C에서 하룻밤 동안 전 배양시킨 후 전배양액을 다시 새로 조제한 MYCS 액체배지에 1% 농도로 접종하였다. 접종된 균주는 25°C에서 24시간 동안 진탕 배양하고, 배양된 액은 원심분리(12000 rpm, 10 min, 4°C)를 행하였다. 원심분리 후에 침전된 세포는 제거하고 AYS가 함유된 상층액은 모은 후 상층액에 2배량(V/

\*Corresponding author

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

E-mail: kimkh@deu.ac.kr

V)의 미리 냉각된 isopropanol을 가하여 4°C에서 침전시킨 후 형성된 침전물은 곧 바로 다시 냉각원심분리(8000 rpm, 5 min)를 행하였다. 이때 모여진 침전물은 미리 냉각된 증류수(4°C)에 적당히 녹인 다음 혼합된 isopropanol을 제거하기 위해 투석(SPECTRA/POR; MW cutoff 6,000-8,000, 4°C)을 행하고, 투석된 용액은 진공 동결 건조시켜서 -20°C에서 보관하면서 시료(AYS)로 사용하였다.

### AYS의 열처리 및 항효모 활성측정

AYS의 열처리는 전보[6]에서 기술한 바와 같이 고온(50-70°C)에서 2시간 동안 행하였다. 즉, 상기에서 기술한 isopropanol로 침전시킨 조정제 AYS시료(dry weight 20 mg)를 평량하여 멸균된 증류수(1 mL)에 용해시키고, 별도로 trehalose도 각각 알맞은 농도가 되도록 멸균된 증류수(1 mL)에 용해시켰다. 이들 두 용액을 동량(1:1)으로 혼합시킨 후 그 혼합액을 각 온도에서 2시간 동안 열처리를 행한 다음 잔존하는 AYS의 *S. cerevisiae*에 대한 항효모 활성을 측정하였다.

AYS의 활성측정은 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)에서 기술된 Micro-dilution법 [10]으로 행하였다. 즉, tetracycline(Tc) 5 µg/mL가 함유되도록 미리 멸균된 YM배지(2배 농축배지)를 조제하여 96-well microplate의 각 well에 100 µL씩 넣고, 처리된 AYS 시료 용액(dry weight 10 mg/mg) 100 µL를 잘 혼합시킨 후 미리 일정한 농도로 조제된 AYS 용액을 단계별로 2배씩 희석시켰다. 희석된 AYS시료가 함유된 각 well에 다시 100 µL YM배지를 가하여 200 µL/well이 되도록 한 후, 이 microplate의 각 well에 미리 배양(28°C, 24 h)된 *S. cerevisiae*효모( $10^5$  cells/mL)를 10 µL씩 접종하여 28°C에서 24시간 동안 배양시켰다. 이때 효모의 수는 Hemacytometer를 사용하여 현미경 상에서 계측하였고, 항효모 활성측정은 MTT방법 [4]으로 행하였으며, 효모가 배양된 microplate는 ELISA Reader로 흡광도( $A_{540}$  nm)를 측정하였다. 또한 AYS의 최소 생육저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)는 NCCLS[10]에서 기술한 바와 같이 효모생육이 전혀 일어나지 않는 가장 낮은 농도로 나타내었으며, 대조구로는 amphotericin B가 사용되었다.

## 결과 및 고찰

### AYS 활성에 대한 Trehalose의 영향

전보[6, 7]에서 기술한 바와 같이 AYS는 열에 불안정한 물질이며 비교적 고온(50°C, 2 hr)에서 열처리하면 항효모 활성이 단시간 내에 감소되었다. 한편 trehalose는 세포를 보호하는 antifreezing agent로서 효과[2] 뿐만 아니라 단백질에 대한 열보호 작용도 있다[3, 11]. 따라서 AYS의 열에 대한 불안정성을 trehalose를 사용함으로써 안정화시킬 수 있

**Table 1. Remaining activity of AYS after heating at 50°C for 2 hr.**

Sample treated		MIC (µg/mL)
Without heating	AYS only	23.5
Heating	AYS only	93.8
	AYS with 0.6M trehalose	23.5
	AYS with 0.13M trehalose & 0.1% BSA	46.9

The MIC of AYS was defined as the lowest AYS concentration of 100% growth inhibition. MIC was expressed as average values calculated from duplicate experiments.

을 것인지를 알아보기 위하여 trehalose를 AYS와 혼합하여 열처리(50°C, 2 hr)를 행하였다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 trehalose를 함유하지 않은 AYS의 경우는 항효모 활성이 크게 약화되었으나, trehalose(0.6 M)가 함유된 AYS의 경우에는 열처리(50°C, 2 hr)를 행하였어도 항효모 활성이 잘 유지되었으며, trehalose(0.13 M)과 0.1% BSA가 함유된 AYS의 경우에도 AYS만 열처리한 그룹 보다 항효모 활성이 높게 나타났다. 또한 대조구로 amphotericin B에 대한 MIC는 0.47 µg/mL 였으며, 0.6 M trehalose 단독으로는 효모생육에 영향을 미치지 않았다. 따라서 AYS에 trehalose를 첨가하여 열처리를 행하면 AYS의 항효모 활성이 감소되는 현상을 방지시킬 수 있다고 생각된다.

Nguyen 등[11]은 0.13 M trehalose와 0.1% BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 ELISA(Enzyme linked Immunoassay)측정을 행한 결과 오래 동안 항체가 안정성을 유지하였다고 기술하였으며, Carninci 등[3]은 0.6 M trehalose를 열에 불안정한 효소에 사용한 결과 열에 안정한 효소로 작용하였다고 기술하고 있다. 전보[6]에서 기술한 바와 같이 AYS는 1) 열에 불안정하며, 2) thiol reagent에 의한 활성소실 및 3) 이온교환수지에 의한 glycan 다량 함유부분과 단백질 다량 함유부분의 분리에 의한 항효모 활성의 소실 등의 특징을 가지고 있다. 또한 AYS는 Sephacryl S400 gel filtration을 행하면 항효모 활성을 나타내는 분획이 곧바로 용출되었으며 당과 단백질이 약 3:1로 구성된 일종의 proteoglycan 으로 추정되었다[6]. 뿐만 아니라 최근 연구에 의하면 AYS는 여러 가지 당 가수분해효소(cellulose, inulinase, pectinase, invertase) 처리로는 항효모 활성에 변화가 없었으나, 단백질 분해효소(proteinase K) 처리로 항효모 활성이 소실되었다(data 미제출). 따라서 AYS의 항효모 활성에 직접 관련된 물질은 단백질 일 가능성이 있다.

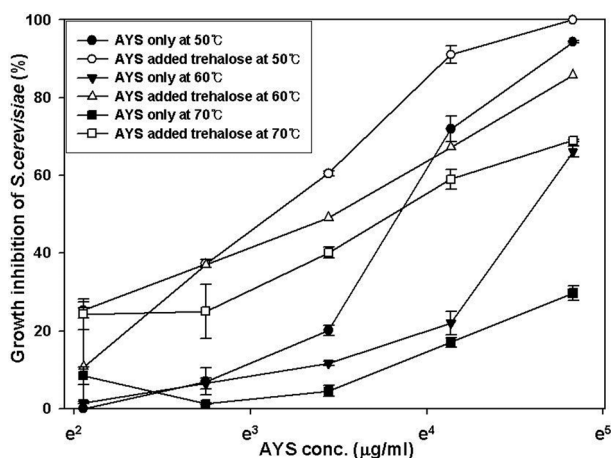
### Trehalose 농도에 따른 AYS의 열안정성

상기에서 기술한 바와 같이 trehalose가 AYS의 항효모 활성을 열처리로부터 보호하는데 trehalose의 적정농도를 측정하기 위해 AYS에 첨가한 trehalose의 농도를 달리하여 AYS

를 열처리(50°C, 2 hr)시킨 후 그 잔존 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 trehalose를 첨가하지 않은 AYS에 비해 trehalose가 첨가된 AYS의 저농도(7.8 µg/mL-31.3 µg/mL)에서 뚜렷한 활성의 차이를 나타내었으나, trehalose 농도(0.3-0.9 M)에 따른 AYS의 활성차이는 뚜렷하게 나타나지 않는 경향을 나타내었다. 특히, trehalose를 첨가하지 않은 AYS경우는 AYS의 농도가 31.3 µg/mL 이하에서 모두 항효모 활성이 나타나지 않았지만, trehalose를 첨가한 AYS 경우는 AYS의 농도가 7.8-31.3 µg/mL에서도 AYS에 의한 항효모 활성이 농도 의존적이었다. 따라서 이는 AYS가 저농도인 경우에는 열에 의해 항효모 활성 소실이 더욱 커서 효모의 저해율을 측정하기가 어렵지만, trehalose를 첨가한 AYS인 경우에는 저 농도에서도 그 활성이 유지되어 AYS에 의한 효모의 생육 저해율을 측정하기가 용이하다고 생각된다.

**열처리 온도에 따른 AYS의 안정성**

상기에서 기술한 바와 같이 0.6M trehalose가 첨가된 AYS는 열처리를 50°C에서 70°C까지 행한 후 잔존하는 AYS의 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 70°C 열처리에서도 trehalose 함유 AYS는 trehalose를 함유하지 않은 AYS에 비해 *S. cerevisiae*에 대한 항효모 활성이 남아 있음을 확인하였다. 특히 50°C 열처리에서 trehalose 함유 AYS는 고농도에서 보다 저농도에서 AYS의 잔존활성이 trehalose를 함유하지 않은 AYS에 비해 크게 차이를 나타내었으며(약 30%의 차이), 60°C 이상에서도 trehalose 함유 AYS의 항효모 활성에 대한 잔존활성이 trehalose를 함유하지 않은 AYS의 잔존 활성 보다 비교적 높게 나타나는 경향이 있었다. 결론적으로 AYS의 열처리에서 trehalose가 함유

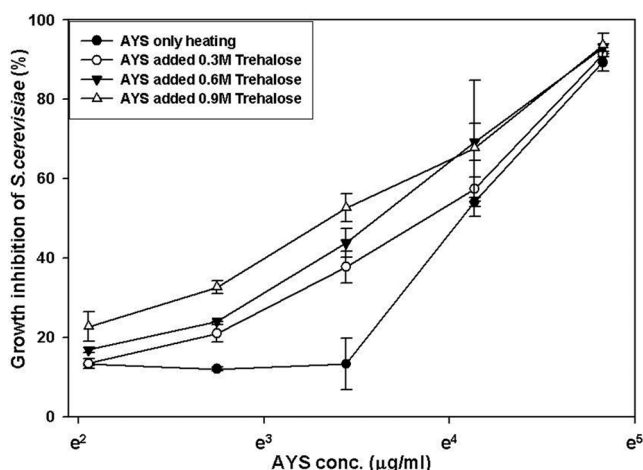


**Fig. 1. Activity of AYS contained different concentrations of trehalose by heat treatment.** Remaining activity of each sample on *S. cerevisiae* was detected after all sample were heated at 50°C for 2 hr. AYS only means that AYS without trehalose was also heated at 50°C for 2 hr.

된 AYS는 trehalose가 함유되지 않은 AYS에 비해 항효모 활성이 높았으므로 AYS에 trehalose의 첨가는 열에 대한 AYS의 항효모 활성을 유지하는데 효과가 있다고 생각된다. 장차 본인 등은 AYS를 완전히 정제하여 AYS의 항효모 활성과 관련된 성분을 더욱 명확히 조사하고, AYS의 효모에 대한 메커니즘도 규명해야 할 과제라고 생각한다.

**열처리 시간에 따른 AYS의 안정성**

AYS의 열처리를 50°C에서 시간 별로 행하여 잔존하는 항효모 활성을 측정하였다. 즉, trehalose(0.6 M)가 첨가된 AYS와 trehalose가 첨가되지 않은 AYS를 각각 50°C에서 1-3시간까지 시간 별로 열처리를 행한 후 잔존하는 AYS의 활성을 측정하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 trehalose가 함유되지 않은 AYS의 MIC값이 trehalose가 함유된 AYS에 비해 높게 나타났으므로 trehalose는 AYS에 열 보호 작용을 나타낸다고 생각된다.



**Fig. 2. Activity of AYS contained trehalose treated with heat at different temperatures.** Remaining activity of each sample on *S. cerevisiae* was detected after AYS was heated at each temperature for 2 hr. Trehalose concentration was 0.6 M in AYS solution.

**Table 2. Remaining activity of AYS after heating at 50°C during indicated times.**

Sample	Heating time (hr) at 50°C	MIC (µg/mL)
AYS only	0	23.5
	1	31.3
	2	93.8
	3	187.5
AYS with 0.6 M trehalose	0	23.5
	1	23.5
	2	46.9
	3	93.8

The MIC of AYS was defined as the lowest AYS concentration of 100% growth inhibition. MIC was expressed as average values calculated from duplicate experiments.

## 요 약

AYS(Anti-yeast substance)는 열에 의해 항효모 활성이 쉽게 약화되는 물질로서 trehalose의 사용이 AYS의 열에 대한 불안정성을 어느 정도 극복할 수 있을 것인지를 조사하기 위해 trehalose가 첨가된 AYS와 trehalose가 첨가되지 않은 AYS에 대한 항효모 활성을 비교 측정하였다. 그 결과 trehalose가 첨가된 AYS는 고온(50-70°C)에서 단시간(2 hr) 동안 열처리한 경우에 trehalose가 함유되지 않은 AYS에 비해 그 활성이 비교적 잘 유지되었다. 따라서 trehalose를 AYS에 첨가하면 열처리 후에도 AYS의 항효모 활성을 다소 보호할 수 있다.

## REFERENCES

1. 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*, 9<sup>th</sup> Ed. Williams and Wilkins, Baltimore/London.
2. Branca, C., S. Magazu, G. Maisano, P. Migliardo, E. Tettamanti. 1999. On the bioprotectiveness of trehalose: ultrasonic technique, Raman scattering and NMR investigations. *J. Mol. Struct.* **480-481**: 133-140.
3. Carninci, P., Y. Nishiyama, A. Westover, M. Y. Itoh, S. Nagaoka, N. Sasaki, Y. Okazaki, M. Muramatsu, and Y. Hayashizaki. 1998. Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 520-524.
4. Clancy, C. J. and M. H. Nguyen. 1997. Comparison of a photometric method with standardized methods of antifungal susceptibility testing of yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2878-2882.
5. Cohen, B. E. 1998. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *Int. J. Pharm.* **162**: 95-106.
6. Kang, M. J., B. K. Lee, E. W. Lee and K. H. Kim. 2008. Physicochemical properties of an anti-yeast substance produced by *Rahnella aquatilis* strain AY2000. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 285-290.
7. Kang, M. J., B. K. Lee, and K. H. Kim. 2008. Characteristics of *Rahnella aquatilis* strain AY2000 for an anti-yeast substance production. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 215-220.
8. Kirchgessner, M., DVM. 2008. Therapeutic review amphotericin B. *J. Exotic Pet Medicine.* **17**: 54-56.
9. 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.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 2nd ed. NCCLS document M27-A2, Wayne, PA, USA.
11. Nguyen, V. K., N. Leulerc, C.-M. Wolff, P. Kennel, P. Fonteneau, R. Deyes, J.-M. Warter, and P. Poindron. 1999. Protection of immunoreactivity of dry immobilized proteins on microtitration plates in ELISA: application for detection of autoantibodies in *Myasthenia gravis*. *J. Biotech.* **72**: 115-125.
12. Menegola, E., M. L. Broccia, F. D. Renzo, and E. Giavini. 2006. Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphic effects. *Reprod. Toxicol.* **22**: 186-195.
13. Patton, L. L., DDS, A. J. Bonito, PhD, and D. A. Shugars, DDS, PhD, C. Hill, NC. 2001. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Radiol. Endod.* **92**: 170-179.

(Received June 15, 2009/Accepted Sep. 24, 2009)