

돈분에서 분리한 *Candida utilis*의 생균제로서의 특성

조진국 · 최진영 · 유숙진 · 허강철*

국립한경대학교 낙농학과

서 론

최근 웰빙 바람을 타고 청정한 고기생산과 위생적인 축산식품개발에 관심이 일고 있으며 유기축산물의 생산을 위하여 사육시부터 항생물질 사용을 줄이고 생균제를 급여하는 농가가 늘고 있다⁽¹⁾. 생균제의 사용은 질병 예방 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 과학적인 근거없이 무분별하게 행해지고 있는 것이 현실이다. 이를 개선하기 위하여는 생균제의 사용 균주의 probiotic 특성을 사육과 관련하여 정확하게 규명할 필요가 있으며, 생리활성이 우수한 새로운 균주의 개발노력이 필요하다⁽²⁾. 생균제에 이용되는 균주는 내담즙산능과 내산성 및 내열성이 강하며 xylanase 및 cellulase 등의 효소생산성이 높은 균주를 요구한다⁽³⁾. 본 연구는 생균제(direct fed microbials)에 이용할 수 있는 균주개발을 목적으로 돈분에서 *Candida sp.*를 분리동정하였고 나아가 이의 배양조건과 기본적인 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

*Candida sp.*를 얻기 위해 돈분 분뇨를 PDA(Potato dextrose agar)에 streaking하여 균주를 분리한 후 분리 동정하였다.

2. 실험방법

*Candida sp.*는 3~4회 걸친 계대배양으로 활성화하여 배양시는 PDB(Potato dextrose broth)를 사용하여 37℃에서 200rpm으로 진탕배양기에서 배양하거나 glycerol stock법으로 보존하며 실험에 이용하였다.

균수의 측정은 미국보전협회의 분석방법(4)에 따라 콜로니 형성 단위(colony forming unit)를 측정하여 계산하였다.

*Candida sp.*의 분리 동정을 위하여 먼저 배양된 *Candida sp.*를 PDA배지에 3분법 방법으로 도말하여 특징적인 균락을 임의로 선발하였다. 이어서 PDA 액상배지에 1%접종하고 37℃에서 1일간 배양한 다음 PDA배지에 도말하였다. 37℃에서 2일간 배양한 후 우수한 균

주를 선택하여 API Kit를 이용하여 색변화를 관찰하여 동정하였다⁽⁵⁾.

*Candida sp.*의 성장곡선은 PDB 배지와 산업용배지를 이용하여 Jar Fermenter에서 pH 조절없이 37℃, 소포제를 처리하여 2일간 배양하며 균수를 측정하였다.

*Candida sp.*의 효소분비 여부 실험은 *Candida sp.*를 1% Starch, 2% skim milk, 1% C.M.C, 1% xylan, phytate를 첨가한 PDA 한천배지에 streaking하여 37℃에서 2일간 배양한 후 clear zone 형성을 확인하여 효소 분비 여부를 조사하였다. Protease와 xylanase는 배양 후 바로 clear zone 확인이 가능하였다. Cellulase의 경우는 0.2% congo red액으로 염색한 후 1M NaCl로 씻어내어 clear zone을 확인하였으며, amylase의 경우 0.2% I2와 2% KI를 함유한 용액으로 염색하여 clear zone 생성여부를 확인하였다. pH 내성은 특정 성장배지에서 0.1N HCl를 사용하여 pH를 조정한 다음 30분 정치 후, 잔존 미생물의 수를 조사하였다.

결과 및 고찰

*Candida utilis*의 분리·동정

최종적으로 선발된 균주는 현미경관찰에서 타원형으로 나타났으며 (Fig. 1), API Kit 분석에서 Table 1과 같은 당발효 결과를 얻었으며, 이 결과와 Bergey's manual을 비교하여 *Candida utilis* (99.5%)인 것으로 확인되었다.

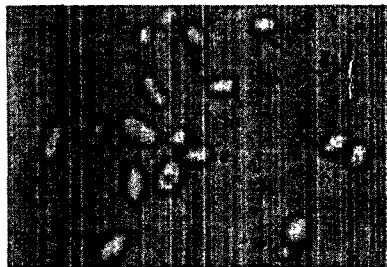


Fig. 1. Microscope profile of the isolated *Candida utilis* from pig feces.

Table 1. Sugar fermentation of the isolated *Candida utilis* on API 20C AUX kit.

Sugar substrate	result	Sugar substrate	result
Control	-	SORbitol	-
GLUcose	+	α -Methyl-D-Glucoside	-
GLYcerol	+	N-Acetyl-D-Glucosamine	-
2-Keto-D-Gluconate	-	CELlobiose	+
L-ARAbinose	-	LACTose	-
D-XYLose	+	MALtose	+
AO Dnitol	-	SACcharose/Sucrose	+
XyLiTol	-	TREhalose	-
GALactose	-	MeLeZitose	+
INOsitol	-	RAFfinose	+

Candida utilis 의 성장곡선

PDA배지를 이용하여 *Candida utilis*의 최적의 성장조건을 구하기 위해서 2일간 배양하여 균수를 측정 한 결과 Fig. 2와 같이 PDB배지에서는 18시간 배양시 6.5×10^9 로 가장 활력이 우수한 것으로 나타났다.

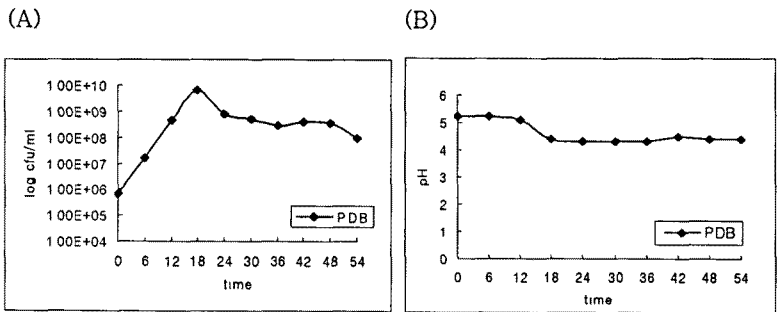


Fig. 2. Growth curve (A) of *Candida utilis* cultured in PDB broth and its pH profile (B).

Candida utilis 의 효소활성

*Candida utilis*는 Fig. 3과 같이 amylase, protease, cellulase, xylanase, phytase의 활성을 포함하고 있는 것으로 나타났으며, 특히 phytase와 cellulase활성이 높은 것으로 확인되었다.

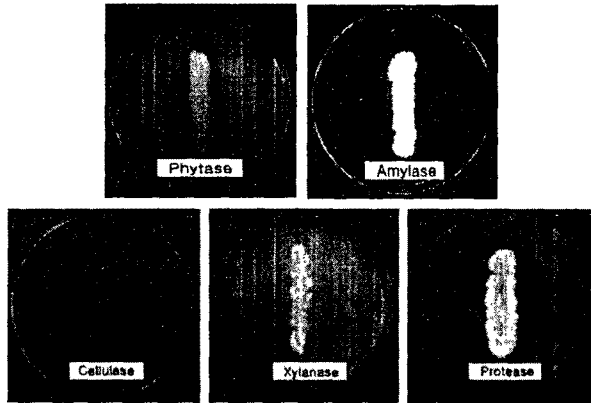


Fig. 3. Amylase, protease, cellulase, and phytase activities of *Candida utilis* on PDB agar plates.

*Candida utilis*의 pH내성과 내열성

*Candida utilis*의 미생물수는 pH 5에서는 6×10^7 cfu/ml이었고, pH 1.5에서는 1.34×10^7 cfu/ml으로 pH이 강한 것으로 나타났다(Fig. 3). 또, 30℃, 60℃, 80℃, 100℃에서 10분간 정치 후 미생물 수를 측정하였을 때, 60℃이상의 고온에서는 쉽게 사멸하였으나 정상적인 생체온도에서는 열 안전성이 있는 것으로 나타났다.

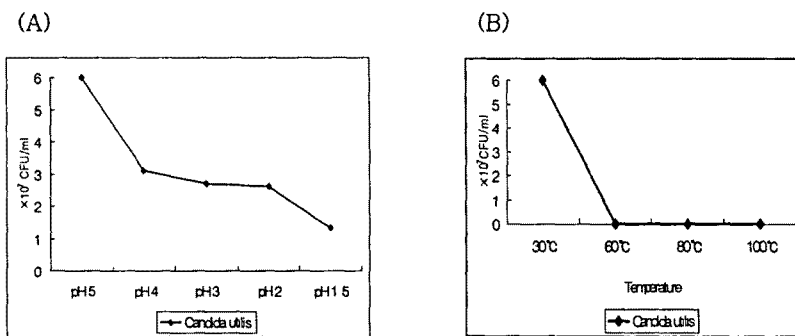


Fig. 3. pH resistance (A) of at various pH from 5.0 to 1.5, and heat stabilities (B) of *Candida utilis* at various temperature from 30℃ to 100℃.

요 약

본 연구는 생균제로 이용할 수 있는 균주개발을 목적으로 돈분에서 성장능력과 내산성이 우수한 *Candida sp.* 를 분리하였고, API kit를 이용하여 동정하였을 때 *Candida utilis*로 확인되었다. *Candida utilis*는 cellulase, phytase활성이 높은 것으로 관찰되었으며, PDB배지에서 18시간 배양시 6.5×10^9 cfu/ml로 최대로 성장하는 것으로 나타났다. 또, pH 1.5에서도 약 22%의 미생물수(1.34×10^7 cfu/ml)가 잔존하여, 내산성이 강한 것으로 나타났다. 또, 60℃이상의 고온에서는 사멸하였으나 정상적인 생체온도에서는 열 안전성이 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 분리한 *Candida utilis*는 생균제 및 단세포단백질 생산에 충분히 이용가치가 있는 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Chung, W. H. et al. (2003) *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 383-388.
2. Chang, Y. H. et al. (2000) *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 8-13.
3. Campbell, G. L. and Bedford. M. R. (1992) *Can. J. Anim. Sci.* 72, 449-453.
4. A.P.H.A. (1993) Standard methods fro the examination of dairy products. 17th ed., Washington D.C.
5. Williams and Wilkins (1986) *Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2.* Waverly press, Baltimore, U. S. A.