

人蔘抽出物로부터 分離한 *Candida parapsilosis*의 生育特性

梁宰源 · 劉太鍾* · 金永培*

韓國人蔘煙草研究所
*高麗大學校 食品工學科
(1985년 10월 2일 수리)

Growth Characteristics of *Candida parapsilosis* Isolated from Deteriorated Ginseng Extract

Jai Won Yang, Tae Jong Yu and Young Bae Kim

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute
*Dept. of Food Technology, Korea University, Seoul
(Received October 2, 1985)

We investigated the growth parameters of *Candida parapsilosis* isolated from spoiled red ginseng extract. The optimum pH range for *C. parapsilosis* was 6.0, whereas the minimum and maximum pH values that permitted growth were 3.0 and 11.0, respectively. For cells grown in PG medium plus 0 and 60% sucrose, the optimum water activity (Aw) values were 0.98 and 0.97, respectively. The optimum temperature for *C. parapsilosis* were 30°C at an Aw of 0.90 in 4.8% potato dextrose broth with 18% sucrose (PGS). Cations inhibiting the growth of *C. parapsilosis* were Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{+2} , K^+ in decreasing order, while anions were SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^- .

꿀, candy, jams, jelly, soy mash, dried fruit, chocolate syrup 등을 부패시키는 주요 미생물의 하나인 내삼투압성 효모의 생리적 특성이나 기타 성질에 대한 많은 연구가 보고되었다⁽¹⁻⁴⁾. 특히 *Saccharomyces*와 *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, 및 *Debaryomyces* 속의 osmophilic yeast의 생리적 특성 등에 대하여는 많은 연구결과가 밝혀졌다^(5,6). 그러나 꿀, syrup 등과 물성 등이 유사한 농축인삼 추출물을 부패시키는 미생물에 대한 연구는 찾을 수 없는 실정이다. 저자 등은 전보⁽⁷⁾에서 최근 함유 45% 농축인삼추출물로부터 부패원인균인 *Candida parapsilosis*를 분리, 동정하여 보고하였다.

*Candida parapsilosis*는 Lodder⁽⁸⁾에 의하여 기본 생리적 특성이 밝혀졌고 Birgita, N.⁽⁹⁾ 그리고

Kim, Y. B.와 Rehm, H. J.⁽¹⁰⁾ 등도 몇가지의 생리적 특성을 조사, 보고하였다. 본 연구에서는 농축인삼추출물의 부패원인균인 *Candida parapsilosis*의 생육특성을 밝히고 농축인삼추출물의 부패를 방지하기 위한 기본자료로서 수분활성도와 생육온도와 의 관계, 최적 pH, 무기염이온과 생육과의 관계를 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 기본배지

전보⁽⁷⁾에서 보고한 바와 같이 부패된 홍삼추출물로부터 분리, 동정한 *Candida parapsilosis* 균주를 Table 1 과 같은 배지에 보존하고 월 2 회 정기적으

Table 1. Composition of medium for isolating microorganism from spoiled red ginseng extract.

Ingredients	Content % (w/v)
Dextrose	1.0
Peptone	0.5
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
Agar	1.2

로 계대 배양하면서 사용하였다. 생육최적 pH 조사를 위한 배지 (Table 1)의 pH 조정은 멸균된 HCl 및 NaOH 용액을 이용하였고 PG 배지는 potato dextrose broth (Difco사 제품) 4.8%, glucose 12%의 비율로 첨가조제하였고 PGS 배지는 potato dextrose broth 4.8%, glucose 12%, sucrose 18%의 비율로 첨가조제하였다.

배양조건 및 균속측정

항온 shaking incubator (New Brunswick, Scientific Co.)를 이용하여 pH 등의 조건을 변경하면서 PG 배지에서의 배양은 30°C, PGS 배지에서의 배양은 32°C에서 회전속도 200 rpm의 조건으로 배양하였다. 배지의 volume은 100 ml의 삼각 flask에 30 ml의 배지를 충전하였다. 세포의 증식은 배양과정중 일정시간 간격으로 배양액을 취하여 Spectrophotometer (UV-200s, Shimadzu Co. Japan)로 660 nm에서 흡광도 (O. D.)를 측정하였다. 직접균수 측정은 10배 희석법을 이용하여 Thoma's haematometer (Depth 0.1 mm, improved double)를 사용하여 계산하였다. 세포증식의 비교는 cell growth curve, 대수증식기의 Specific growth rate (μ : 비증식속도), generation time 혹은 maximum growth cell ratio 등으로 비교하였다.

수분활성도의 조절

Restaino 등⁽³⁾의 실험결과를 이용하여 배지의 수분활성도를 Table 2와 같이 조절하여 *C. parapsilosis*를 접종하였다. 이때 *C. parapsilosis*의 전배양 조건에 따른 최적수분활성도의 차이를 비교하기 위하여 PG (pH 6.0) 배지와 PG 배지에 60% sucrose를 첨가한 배지에서 각각 4회 계대배양하여 stationary phase에 도달한 균을 공시하였다.

Aw와 생육온도와의 관계

PGS 배지에 전배양한 *C. parapsilosis*를 Aw가 Table 2와 같이 조정된 배지에 접종, 배양하면서 specific growth rate (μ : 비증식속도)를 비교하였다.

Table 2. Changes in water activities with different concentrations of PDB, glucose and sucrose.

PDB* (%)	Glucose (%)	Sucrose (%)	Aw**
4.8	12.0	0	>0.995
4.8	12.0	6.0	0.995
4.8	12.0	12.0	0.99
4.8	12.0	18.0	0.98
4.8	12.0	23.0	0.97
4.8	12.0	27.0	0.96
4.8	12.0	30.0	0.95
4.8	12.0	40.0	0.92
4.8	12.0	50.0	0.90

* Potato dextrose broth (dehydrated)

** The water activities were taken from the experimental data of L. Restaino⁽⁶⁷⁾

The media were sterilized by autoclaving at 121°C for 15 min after pH adjusting to 6.0.

무기염류이온과 생육과의 관계

Onishi⁽¹¹⁾ 등의 방법과 같이 PG 배지에 NaCl, Na₂SO₄, NaNO₃, KCl, CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·2H₂O, LiCl 등의 염류농도가 0~4.0 mol이 되도록 배지를 조제하여 *C. parapsilosis*를 배양하면서 일정시간 간격으로 흡광도 (O. D.)를 측정, 비교하였다.

결과 및 고찰

pH의 영향

pH가 *C. parapsilosis* 생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 대체로 pH 3.0에서 11.0의 범위에서 균증식이 이루어지며 최적 pH는 6.0이었으나 4.0~7.0의 pH 범위에서도 생장이 좋은 편이었다.

최적 pH 외에서는 generation time이 점차 늘어나 pH 4.0 이하와 8.0 이상에서는 세포증식이 현저하게 억제됨을 보였다. Birgita⁽⁹⁾가 바닷물에서 분리한 *C. parapsilosis*의 pH 영향에 대한 보고와도 유사한 결과이었다. 이와같은 비교적 넓은 생육 pH 범위로 보아 홍삼농축추출물에서 분리한 *C. parapsilosis* 균은 pH가 다양한 여러가지 종류의 식품속에서 생육할 수 있을 뿐 아니라 홍삼추출물의 pH가 4.0~4.3으로 pH 조건만을 생각한다면 홍삼추출물에서도 충분히 생육이 가능함을 알 수 있었다.

Aw의 영향

배지의 수분활성도에 따른 생육의 차이를 비교하

Table 3. Growth response of *C. parapsilosis* at different pH levels in media(Table 1).

pH	Response of inoculum grown
2.0	-
3.0	+ (20.4)
4.0	++ (3.7)
5.0	++ (3.4)
6.0	++ (3.0)
7.0	++ (3.7)
8.0	+ (7.3)
9.0	+ (17.3)
10.0	+ (17.3)
11.0	+ (21.7)
12.0	-

Symbols : normal growth(++) ; poor growth(+); no growth(-) Numbers within parentheses are generation time (hours)

기 위하여 PG 배지에 sucrose를 60% 첨가한 배지와 sucrose를 첨가하지 않은 PG 배지에서 수회 계대배양하여 2가지 조건에서 전배양된 각각의 *C. parapsilosis*를 Aw가 0.90부터 0.995 이상까지 조절된 배지에 배양하면서 generation time을 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. Sucrose를 첨가하지 않은 PG 배지에서 generation time이 가장 짧았고 sucrose를 60% 첨가한 PG 배지에서 전배양한 효모는 Aw가 0.97인 배지에서 가장 빨랐다. 이것은 동일한 효모일지라도 전배양 조건이 다르면 생육최적 수분활성도가 약간의 차이를 보일 수 있음을 설명하여 주고 있다. Anand와 Brown⁽⁴⁾과 Restaino 등⁽³⁾은 최적수분활성도의 약간의 변화가 배지의 조건, 경미한 유전적변이, 전배양조건등의 상호복합적인 요인에 의해서 일어날 수 있다고 주장한 바와 같이 본 실험의 최적 수분활성도의 차이는 전배양할때 배지의 sucrose 함량차이 때문으로 생각된다. 따라서 공시효모는 낮은 Aw에서 생육하는 중 적응되어 최적 Aw가 낮아진 것으로 보인다.

최적생육온도

수분활성도와 *C. parapsilosis*의 생육온도와의 관계를 조사하기 위하여 배지의 Aw를 Table 2와 같이 0.90에서 0.995 이상까지 조절하여 배양하면서 specific growth rate를 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. Aw가 0.995 이상은 30℃, 0.98, 0.95, 0.92는 32℃, 0.90은 34℃에서 specific growth rate가 가

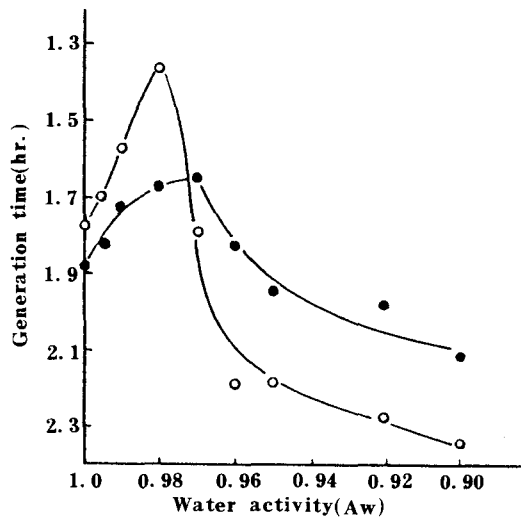


Fig. 1. Optimum Aw levels for *C. parapsilosis* cells preconditioned in 0 or 60% sucrose.

Cells were grown to stationary phase in PG medium (4.8% potato dextrose broth + 12% glucose) plus 0% (-○-) or 60% (-●-) sucrose.

장 높았다. 즉 배지의 Aw가 낮을수록 최적 생육온도도 높아졌다.

Optimum Temp를 기준으로 하여 최적온도보다 낮은 온도조건보다는 높은온도 조건에서 specific growth rate가 급격히 감소하였고 특히 Aw 0.95 이상에서 감소경향이더 심하였다. 40℃에서는 Aw 0.90, 0.92의 배지에서의 growth rate가 각각 0.25, 0.22이었으나 Aw 0.95는 0.11에 불과했고 0.98, 0.995

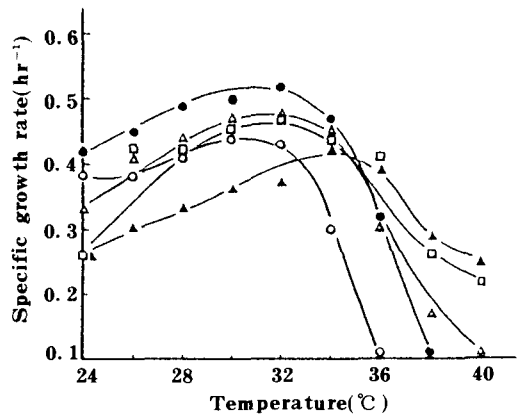


Fig. 2. Effect of Aw level on the optimum temperature for *C. parapsilosis* cells.

Cells were grown to stationary phase in PGS medium. Aw were 0.995 (-○-), 0.98 (-●-), 0.95 (-△-), 0.92 (-□-) and 0.90 (-▲-).

이상은 균의 증식이 불가능했다. Restaino⁽¹⁾등도 chocolate syrup으로부터 분리한 *Sacch. rouxii*의 최적온도를 조사하여 이와 유사한 연구결과를 보고하였으며 Corry^(12,13), Gibson⁽¹⁴⁾은 이와같은 원인을 효모와 기타 미생물의 대사에 있어서 세포자체내에 용질의 농도가 높아짐에 따라 일종의 방어적 기능을 발휘하기 때문이라고 주장하였다. 또 Brown⁽¹⁵⁾은 용질의 농도가 높아짐에 따라 *Sacch. rouxii*의 세포내 arabitol같은 polyols이 생성되고 그 생성된 polyols은 compatible solute(어떤 효소를 효과적으로 작용할 수 있도록 도와주는 물질)로서 작용하여 효모에 생육억제 혹은 효소의 불활성 작용으로부터 보호기능을 한다고 하였다. Onishi⁽¹⁷⁾는 *C. parapsilosis*도 glucose를 배지에 증량 투여하면 10.3%의 compatible solute의 기능을 발휘하는 polyols(D-arabitol, glycerol)이 생성되고 생성된 polyols의 작용에 의하여 억제 혹은 불활성 작용을 받지 않고 효소가 활성화된 까닭에 생육 최적온도가 증가한다고 하였다. 본 실험 결과 Aw가 낮아지면 생육최적온도가 높아지는 것은 높은 온도에 의하여 활성화된 효소작용과 열변성으로부터 보호되는 polyols등의 물질이 높은 용질의 조건에서 생성되어 나타난 것으로 생각된다. 그러나 최적온도에서의 최대생장

은 Aw 0.98에서 나타났다.

무기염이온의 영향

CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·7H₂O, NaCl, Na₂SO₄, NaNO₃, KCl, LiCl등 고농도의 염류가 *C. parapsilosis*의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 growth curve, total growth, time lag등을 비교한 결과는 Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5와 같다. 이들 무기염의 첨가는 생육을 뚜렷하게 촉진시키는 경우는 없었고 무첨가시와 거의 같거나 오히려 생육저해 효과를 나타내었다. 약 110시간의 배양과 정중 염이온이 *C. parapsilosis*의 생육억제에 미치는 영향을 growth curve로 비교하여 보면 (Fig. 3) potassium chloride 첨가구는 무처리구에 비하여 가장 농도가 높은 3.0 mol의 농도에서도 세포증식을 보여 저해작용이 가장 적었고 다음이 NaCl, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, LiCl순으로 저해하였다.

무처리구의 maximum growth와 처리구의 maximum growth의 비율 즉 maximum growth ratio를 비교검토하여 본 결과 (Fig. 4), KCl이 제일 높고 다음이 NaCl, NaNO₃, MgSO₄·7H₂O, Na₂SO₄, CaCl₂·2H₂O, LiCl순이었다. 즉 maximum growth ratio가 높은 것은 무처리구 생육정도에 접근한 것으로 이 ratio가 높을수록 저해를 덜 받았다는 것을 의미한다.

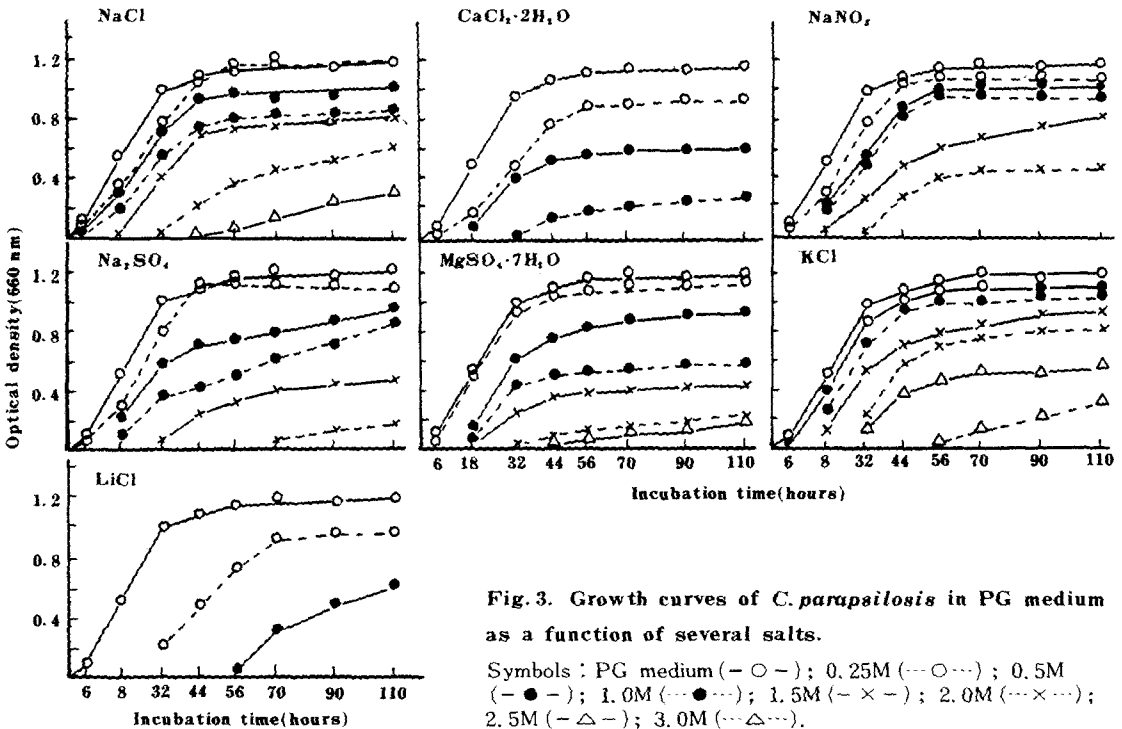


Fig. 3. Growth curves of *C. parapsilosis* in PG medium as a function of several salts.

Symbols : PG medium (—○—); 0.25M (---○---); 0.5M (—●—); 1.0M (---●---); 1.5M (—×—); 2.0M (---×---); 2.5M (—△—); 3.0M (---△---).

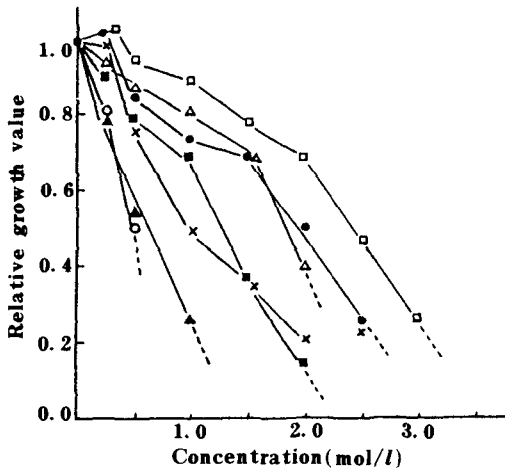


Fig. 4. Relative growth values of *C. parapsilosis* in PG medium as a function of the concentration of several salts.

Symbols : KCl (-□-); NaCl (-●-); MgSO₄·7H₂O (-×-); CaCl₂ (-▲-); LiCl (-○-); Na₂SO₄ (-■-); NaNO₃ (-△-).

$$\text{Relative growth value} = \frac{\text{No. of max. growth cell of treatment}}{\text{No. of max. growth cell of control}}$$

마찬가지로 lag time을 비교한 결과 (Fig. 5) 역시 각 염류의 3.0 mol 농도 이하에서의 대부분의 처리구는 LiCl, CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·7H₂O, NaNO₃, NaCl, KCl 순으로 lag time이 길었으며 또 농도가 높을수록 생육저해 정도가 심하였다.

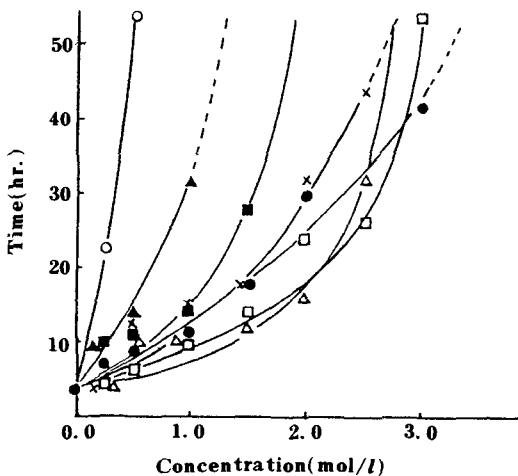


Fig. 5. Lag time of *C. parapsilosis* as a function of the concentration of several salts.

Symbols : KCl (-□-); NaCl (-●-); MgSO₄·7H₂O (-×-); CaCl₂ (-▲-); Na₂SO₄ (-■-); NaNO₃ (-△-); LiCl (-○-).

이상의 결과를 종합해보면 각 염류이온은 Li⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺ > Na⁺ > K⁺ 순으로 또 SO₄²⁻ > NO₃⁻ > Cl⁻ 순으로 생육저해를 미치는 것으로 판단된다. Onishi⁽¹⁷⁾는 *Zygosaccharomyces major*의 생육에 대한 염류이온의 저해함도 Li⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺ > Na⁺ > K⁺와 또 NO₃⁻ > SO₄²⁻ > Cl⁻ 순이었다고 보고하였는데 본 실험결과와 거의 유사하였다. 또한 *C. parapsilosis*는 110시간 배양시 LiCl은 0.5, CaCl₂·2H₂O는 1.0, MgSO₄·7H₂O는 2.5, NaCl은 2.5, Na₂SO₄와 NaNO₃는 2.0, KCl은 4.0 mol 농도까지 생육이 가능하였다.

요 약

인삼추출물에서 분리한 *Candida parapsilosis*의 생육특성을 비교검토한 결과 생육최적 pH는 6.0이었고 pH 4~7에서 정상적 생육을 보였다. 최적 Aw는 0.89이었고 배양조건에 따라 차이가 있어 전배양시에 Aw가 낮을 경우 최적 Aw도 낮아졌으며 이때 내삼투압성은 증가되었다.

일반적으로 배지의 Aw가 낮아지면 최적생육온도는 높아지는 경향을 보여 Aw가 0.995 이상은 30℃, 0.98, 0.95, 0.92에서는 32℃, 0.90 이상에서는 34℃에서 비증식속도가 가장 높았다.

*C. parapsilosis*의 무기염류에 의한 생육저해는 양이온의 경우 Li⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺ > Na⁺ > K⁺의 순이었고 음이온의 경우는 SO₄²⁻ > NO₃⁻ > Cl⁻의 순으로 나타났다.

사 사

본 연구가 수행되도록 여러가지 여건을 마련해주신 한국인삼연조연구소 성현순 부장님과 제품연구실 연구원 여러분께 감사드립니다.

참고문헌

1. Pitt, J. I., J. H.B. Christian.: *Appl. Microbiol.*, **16**(12), 1853.
2. Duckworth, R.B.: Academic press, New York, 273-307 (1974)
3. Restaino, L., S. Bills, K. Tscherneff and L.M. Lenovich : *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**(5) 1614 (1983)
4. Anand, J.C. and A.O. Brown: *J. Gen. Microbiol.*, **52**, 205 (1958)
5. Scott, W. J.: *Adv. Food Res.*, **7**, 83 (1973)

6. Onishi, H.: *Adv. Food Res.*, **12**, 53 (1963)
7. 梁宰源, 金永培, 劉太鍾 : 한국산업미생물학회지 **13**(4), 1985
8. Lodder, The Yeast, (A taxonomix study, 2nd ed.), North Holland Pub. (1971)
9. Birgita, N.: *Archiv. Für Mikrobiologie*, **54**, 374 (1966)
10. Kim, Y. B and H.J. Rehm,: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 105 (1982)
11. Onishi, H.: *Bull. Agr. Chem. Soc.*, **21**(3), 137 (1957)
12. Corry, J. E.L.: *J. Appl. Bact.*, **40**, 269 (1976)
13. Corry, J. E.L.: *J. Appl. Bact.*, **37**, 31 (1973)
14. Gibson, B.: *J. Appl. Bact.*, **36**, 365 (1973)
15. Brown, A.D. and J.R. Simpon: *J. Gen. Microbiol.*, **75**, 589 (1972)
16. Onishi, H.: *Bull. Agr. Chem. Soc.*, **24**(2), 131 (1960)