

## Kefir에서 분리한 *Candida Kefyr*의 생균제를 위한 특성

유숙진\* · 조진국\* · 하철규\*\*\* · 김창현\*\* · 허강철\*

국립한경대학교 낙농학과\*, 동물생명자원학과\*\*, 한양대학교 생화학 및 분자생물학과\*\*\*

## Probiotic Properties of the *Candida Kefyr* Isolated From Kefir

S. J. You\*, J. K. Cho\*, C. G. Ha\*\*\*, C. H. Kim\*\* and K. C. Heo\*

Dept. of Dairy Science\*, Dept. of Animal Life and Resources\*\*, Hankyong National University,  
Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Hanyang University\*\*\*

### ABSTRACT

To search direct fed microbials, we isolated a *Candida* sp. from kefir grain. The isolated *Candida* sp. strain showed 99.8% of identity to the species of *Candida kefir* by API 20C kit. Enzyme activity of *Candida kefir* was higher in amylase ( $0.33 \pm 1.12 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) than that in phytase ( $0.052 \pm 0.98 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) cellulase ( $0.051 \pm \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) and xylanase ( $0.011 \pm 0.98 \text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ). The maximum numbers of *Candida kefir* in growth curve were reached at 30 h fermentation. *Candida kefir* showed high resistances to acidic environment, which was not perfectly extincted even at pH 2.0. And it showed high tolerance to bile salt which had almost 97.2% of survival in the presence of 1.0% bile salt.

Especially, *Candida kefir* showed high heat stability which remained 10% of initial microorganisms at 60°C. *Candida kefir* was not generally inhibited by most of 11 antibiotic agent which contained tetracycline groups. These results suggest that the isolated *Candida kefir* has a useful properties as probiotics.

(Key words : Kefir, *Candida kefir*, Bile salt, Probiotics)

### I. 서 론

가축에 대한 항생제 사용에 따른 내성문제가 심각해지면서 전세계적으로 항생제에 대한 규제가 강화되고 있고, 무항생제적 생물학적 방법으로 생균제(Direct-fed microbials)가 항생제 대체물로 사용되고 있다(Fuller, 1989; Harris와 Webb, 1990; Lyons와 Jacques, 2000). 생균제는 미생물자체를 가지고 만든 일종의 미생물 첨가제로서 가축의 사료에 첨가하여 영양소를 만들어 주며, 유해한 세균을 억제하는 물질을 생산한다. 이들은 장내에서 성장하면서 정상적인 미생물 균형을 유지하여 건강을 증진시키며 사료효율 및 증체량 개선에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Martin과 Nisbet, 1992). 축산분야

에서는 생균제로서는 증식이 빠르며 내열성이 있고 유용한 소화 효소활성이 높고 위산과 담즙산이 있는 환경조건에서 살아남아야 한다(박등, 1996). 현재 생균제로는 주로 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 등이 연구되었으나 사람이나 동물에 상업적으로 사용되는 생균제는 *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* 등이 혼합된 형태로 제품화되고 있다(Gilliland, 1979).

한편, Kefir는 구소련의 코카서스(caucasus) 산악지대에서 유래된 발효유로 산과 알코올을 함유하고 있고 항암효과 및 면역증강작용 등 우수한 약리작용이 있는 것으로 밝혀지고 있다(Shiomi 등, 1982; Toba, 1987; Kroger와 Kumann, 1989; Itoh, 1990).

Corresponding author : K. C. Heo, Dept of Dairy Science, Hankyong National University, Seokjong-dong 67, Anseong-si, Kyonggi-do, 456-749, Korea.

Kandler와 Kunath(1983)는 Kefir grain에서 hetero형 유산균을 분리해서 *L. kefir*라고 새로운 명명을 하였으며, Bottazzi(1980)는 Kefir에서 막대 모양의 유산균과 여러 모양의 효모형태를 광학 현미경으로 관찰하였다.

Ham 등(1999)은 몽고산 쿠미스에서 젖산균인 *L. plantarum* 과 효모인 *Candida kefir*를 분리하여 약 10<sup>8</sup>의 *L. plantarum*과 10<sup>6</sup>의 *Candida kefir*를 격일로 육계에 급여시 32일 후 체중이 1,433.9 g에 도달하여 대조구 1,274.0g에 비해 유의적으로 높았으며, 분변 내 효모의 수가 다른 군에 비해 높은 경향을 나타내었다고 보고하였다. 효모는 소장내에서 산소를 이용하기 때문에 산소를 필요로 하는 장내 유해 미생물의 증식을 억제하고 장내 혐기성 유산균의 증식을 촉진시켜 가축의 생산성을 향상시킬 수 있다고 보고 되었다(Stark와 Wilkinson, 1989).

본 연구는 Kefir에서 *Candida kefir*균을 분리하여 내열성 및 내산성을 비교하고 각종 효소 활성과 항생제 내성 등을 측정하여 가축용 생균제로서의 이용가능성을 판단하기 위하여 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

Kefir는 러시아의 슈퍼마켓에서 구입한 것과 건국대학교 유가공 실험실에서 분양 받은 것을 사용하였고, *S. cerevisiae* (KCTC 7004)는 한국

유전자은행의 표준균주를 사용하였다. PD(potato dextrose) broth는 Difco (USA)에서 구입하였고, 항생제는 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 효모의 분리 및 동정

Kefir는 시유 500ml에 Kefir grain을 10% 수준으로 접종한 후 23℃의 incubator에서 48시간 계대배양 하여 시료로 이용하였다(Otle와 Cagindi, 2003; Koroleva, 1988). 배양한 kefir중의 효모균을 10% tartaric acid를 포함한 PD agar plate에 도말하여 1차적으로 선발하였고, 이중 효소분비 능력과 생육이 뛰어난 효모를 분리하였다. 분리된 효모는 API 20 C AUX kit (Biomereux, France)의 당 발효실험을 이용하여 동정하였고, PD broth 액체 배지에 접종하여 37℃에서 48시간 배양이 끝난 것을 4℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 3. 미생물 성장곡선 및 균수 측정

효모의 성장곡선은 jar fermenter(Kobiotech, Korea)를 이용하여 각각 PD broth 배지에 pH 조절 없이 32℃에서 72시간 배양하였다. 총균수는 배양액을 0.85% NaCl 용액에 10배씩 연속적으로 희석시킨 다음 평판배지에 0.1 ml 씩 분주하여 도말한 후, 최적온도에서 배양하고 콜로니 형성 단위(colony forming unit)를 측정하여 계산하였다(APHA. Standard Methods. 1985).

Table 1. Screening media and dyes used for the detection of various enzyme activities

Enzyme	Substrate (basal medium:PDA <sup>1)</sup> )	Dye	Identification
Protease	2% skim milk		clear zone
Cellulase(CMCCase)	1% CMC <sup>2)</sup>	0.2% congo red sol.	clear zone
Amylase	1% soluble starch	0.2% I <sub>2</sub> + 2% KI sol.	clear zone
Xylanase	1% oat spelt xylan		clear zone
Phytase	Ca-Phytate(5), NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (5) MgSO <sub>4</sub> (0.5), KCl(0.5), FeSO <sub>4</sub> (0.01), MnSO <sub>4</sub> (0.01), Dextrose(15) at g/L		clear zone

<sup>1)</sup> Potato Dextrose Agar(4% potato starch , 2% dextrose , 1.5% agar).

<sup>2)</sup> Carboxymethyl cellulose(medium viscosity).

#### 4. 효소분비능력과 효소활성 검사

효소분비 여부는 효모를 생리적 식염수(0.85% NaCl)로 적당히 희석한 다음 Table 1에 제시한 효소들에 필요한 기질성분을 PD agar 제조시 첨가하였고 phytase는 기질성분을 배지에 도말하였다. 37℃에서 48시간 배양한 후 screening 배지용 염색액을 분무하여 나타나는 투명환의 크기를 확인하여 효소분비 여부를 조사하였다. 효소활성 측정은 효모의 배양액을 4℃, 150 rpm으로 20분간 원심분리하여 균체를 회수하고 생리식염수를 균체 무게의 2배 비율로 가하여 glass homogenizer로 세포를 파쇄한 후, 균체를 1,500 rpm으로 20분간 원심 분리하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다. xylanase 및 amylase, cellulase 활성은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(Khasin 등, 1993)을 이용하였다. 즉 상기의 조효소액 50 $\mu$ l를 취하여 각각 950 $\mu$ l의 0.5% substrate solution(xylan, starch, carboxymethylcellulose,)를 포함하는 0.1M Tris-HCl 효소반응액(pH 7.0)과 혼합하여 37℃의 water bath에서 10분간 반응시켰다. 1 ml DNS solution을 첨가하여 반응을 정지시키고 100℃에서 5분간 발색하여 ice water로 즉시 냉각시켰다. 8 ml의 증류수를 첨가하여 spectrophotometer(UV-1601 PC, Shimadzu, Japan)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성을 계산하기 위하여 xylanase는 10 mM xylose solution을 cellulase와 amylase는 10 mM glucose solution을 희석하여 표준곡선을 작성하여 계산하였다. DNS 용액은 3,5-dinitrosalicylic acid 5 g 과 NaOH 8 g 그리고 sodium potassium tatarate 150 g 을 500 ml 증류수에 녹여 제조하였다.

phytase 활성은 Shimizu(1992)의 방법에 따라 2 mM Na-phytate를 함유한 0.5 M sodium acetate 효소반응액 (pH4.0) 300 $\mu$ l에 75 $\mu$ l 효소액을 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 10% trichloroacetic acid용액 375 $\mu$ l를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 750 $\mu$ l의 발색시약(2.5% ammonium molybdate 용액 + 10% ascorbic acid 용액 + 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액, 1:1:3 비율의 혼합액)을 첨가하여 45℃에서 20분간 발색시켜 820 nm에서의 흡광

도를 측정하였다. 효소활성은 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 희석하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

#### 5. 단백질 농도 측정

단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 하여 Bradford 방법(Bradford, 1976)으로 측정하였다.

#### 6. 내산성 분석

내산성 평가는 (Kobayashi, 1974) 방법을 수정하여 다음과 같이 수행하였다. 분리한 PD broth를 0.1N HCl로 pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0로 조정된 *Candida kefyr* 균주를 첨가하여 30분 정치 후 잔존한 미생물수를 측정하였다.

#### 7. 내담즙산성 분석

내담즙성의 분석을 위하여 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0%(w/v)의 bile salt를 함유한 각각의 PD broth에 *Candida kefyr*와 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를  $1.0 \times 10^{10}$  CFU/ml 되도록 접종하여 37℃로 6시간 동안 방치한 후 PD agar plate에 도말하여 배양한 후 다음 식에 의해 내산성 또는 내담즙성을 나타내기 위한 생존율(%)을 계산하였다.

$$\text{생존율(\%)} = (\text{cell number in PD broth containing bile salt} \div \text{cell number in PD broth without bile salt}) \times 100$$

#### 8. 열안정성

열안정성은 30℃, 60℃, 80℃, 100℃로 조정된 항온수조에 10분간 정치 후 잔존하는 미생물 수를 조사하였다.

#### 9. 항생제 내성

가축사료에 법적허용수준으로 첨가되는 여러 가지 항생제에 대한 균주 저항성을 검사하기 위하여 minimum inhibition concentration(MIC)

test 방법으로 항생제 내성을 검사하였다. 항생제는 chlortetracycline, bambamycin, maduramycin, diclazuril, avilamycin, lincomycin, tylosin, oxytetracycline, neomycin, clopidol, supertia, sulfathiazole, collistin 등을 각각의 ppm 농도가 되도록 PD broth배지에 첨가한 후, 각각 균종을 접종하고 37°C에서 2일간 배양하여 *Candida kefyr*의 수를 계수하여 성장 여부를 조사하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 분리균주의 동정결과

최종적으로 선발된 균주는 배지상의 colony 형태, 냄새, 현미경 관찰 및 내생포자 형성 등의 관찰한 결과를 Bergey's Manual에 따라 비교하였고(data not shown), Table 2에 나타난 바와 같이 API 20 C AUX kit(Bio mericux Vitex, Inc.)를 이용하여 분석한 결과 *Candida kefyr*와 99.8%의 상동성이 나타났다.

#### 2. 효소분비능력과 효소활성 검사

각 효소의 기질을 첨가하여 굳힌 PDA 평판에 분리한 *Candida kefyr*를 일직선으로 도말하여 37°C에서 배양하였을 때, Fig. 1에 나타난 바와 같이 균체 주위에 투명환을 형성하였다.

투명환의 크기로 보아 특히 phytase 와 amylase 활성이 높은 것으로 관찰되었고 cellulase와 xylanase, protease 활성은 낮게 나타났다.

투명환이 형성이 잘되지 않고 낮은 활성을 나타내는 효소는 균체내 효소일 가능성이 있기 때문에 균체를 homogenization하여 과쇄하고 조효소활성을 측정하였다. Table 3에 나타난 바와 같이, *Candida kefyr*의 specific activity는 amylase가  $0.339 \pm 1.12 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  으로 가장 높게 나타났으며, phytase와 cellulase 활성이  $0.052 \pm 0.88$ ,  $0.051 \pm 0.78$  그리고 xylanase 활성은  $0.011 \pm 0.98 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 나타났다.

Table 2. Sugar-fermentation of the isolated *Candida kefyr* on API 20 C AUX Kit

Sugar	Result	Sugar	Result
Control	-	SORbitol	-
GLUcose	+	$\alpha$ -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	-

+: Positive -: Negative

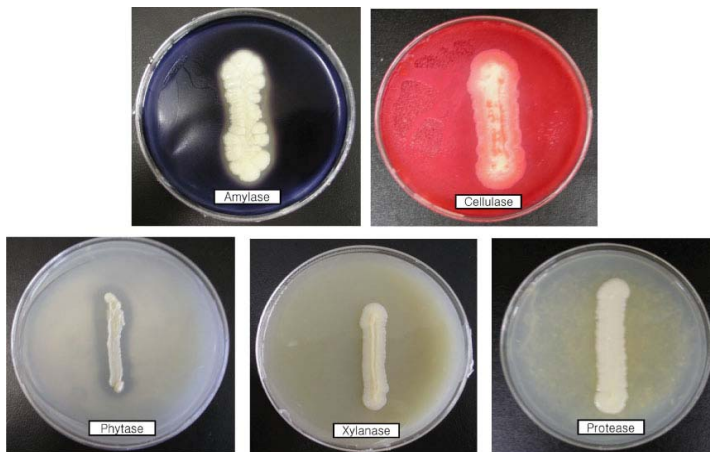


Fig. 1. Protease, cellulase, xylanase, phytase and amylase activities of *Candida kefyr*.

Table 3. Enzyme activities of the extracted fraction from *Candida kefyr*

Class	Protein conc. (ug/ml)	Total activity (μmol/ml)				Specific activity (μmol/min/mg)			
		Amylase	Cellulase	Xylanase	Phytase	Amylase	Cellulase	Xylanase	Phytase
<i>Candida kefyr</i>	59 ± 0.72	0.3 ± 0.12	0.04 ± 0.1	0.01 ± 1.2	0.046 ± 0.81	0.339 ± 1.12	0.051 ± 0.78	0.011 ± 0.98	0.052 ± 0.88

Values are mean ± SD.

### 3. *Candida kefyr*의 성장곡선

*Candida kefyr*의 최적의 성장곡선을 구하기 위해서 PD broth 배지에 48시간 배양하여 균수를 측정하였다 Fig. 2와 같이 30시간 배양시  $1.4 \times 10^{10}$  CFU/ml로 나타났으며, 660 nm에서 흡광도를 측정한 결과 12시간 후부터 급격하게 증가하였다.

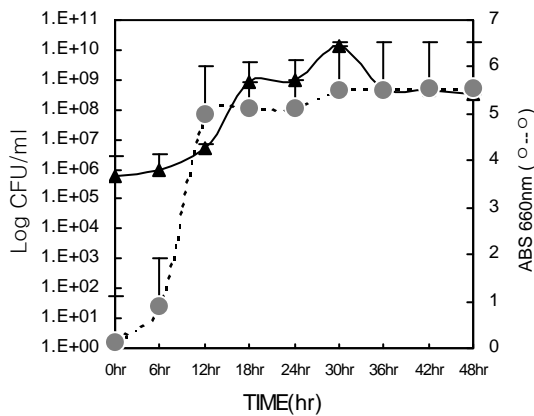


Fig. 2. Growth curve of *Candida kefyr* cultured in PD Broth. Values are mean ± SD (bar).

### 4. 내산성

가축 장내에서의 내산성을 조사하기 위하여 여러 pH에서의 효모의 생존율을 측정하여 Fig 3에 나타내었다. *Candida kefyr*는 대조구로 이용한 *Saccharomyces cerevisiae*가 pH5 와 pH2에서 각각  $7.8 \times 10^8$  CFU/ml 와  $1 \times 10^6$  CFU/ml의 미생물수 보인 반면, *Candida kefyr*는  $8 \times 10^9$  CFU/ml 와  $1 \times 10^8$  CFU/ml로 나타났다. *Candida kefyr*는 pH2에서 초기균수의 0.7%로 감소되나 완전 사멸하지는 않고 *Saccharomyces cerevisiae* 보다는 약 100배 정도 높게 생존하는 것으로 나타나 내산성이 비교적 강한 것으로 판단되었다. 생

균제로서 작용하기 위하여는 우선 소화관내에서의 균의 생존성을 높여야 하는데(박 등, 1994), *Candida kefyr*는 이런 면에서 매우 유용한 조건을 갖추고 있다고 사료된다.

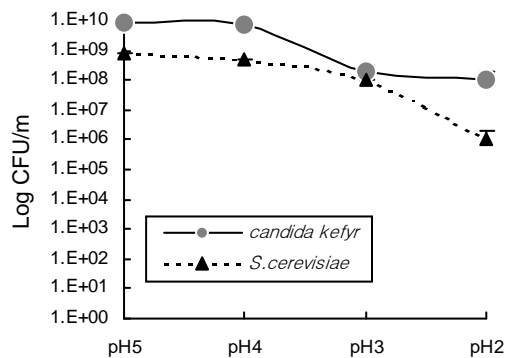


Fig. 3. pH resistance of *Candida kefyr* at different initial pH. Values are mean±SD (bar).

### 5. 내담즙성

십이지장에서 분비되는 담즙에 대한 내성을 시험하기 위하여 담즙산의 다양한 농도(0.1~1.0%)에서의 생존율을 측정한 결과를 *Saccharomyces cerevisiae*와 비교하여 Table 4에 나타내었다. *Candida*

Table 4. Bile salt-tolerance of *Candida kefyr* at different concentration of bile salts

Bile salts(%)	Viability(%) <sup>a</sup>	
	<i>Candida kefyr</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
0.1	99.8 ± 3.9	99.8 ± 3.7
0.3	99.3 ± 4.9	91.3 ± 5.1
0.5	98.5 ± 4.5	89.2 ± 5.5
1.0	97.2 ± 5.3	86.1 ± 7.3

Viability(%)<sup>a</sup> = (cell number in PD broth containing bile salt ÷ cell number in PD broth without bile salt) × 100

*kefyri* 균주는 0.1~1.0% 담즙산의 어느 범위에 서도 강한 생존율이 나타났다. 특히 *Candida kefyri*는 1.0%의 담즙산의 존재하에서도 초기 균 수의 약 97.2%를 유지하는 것으로 나타났으며, 이는 86.1%인 *Saccharomyces cerevisiae*보다 내담즙산 성질이 강한 것으로 평가되었다. 담즙산은 십이지장에서 분비되는 물질로서 세균의 성장을 억제하는 기능을 지니고 있으며 특히 장내 유래세균이 아닌 경우에는 담즙산이 함유된 배지에서는 자랄 수 없다고 알려져 있다 (Gilliand와 Speck, 1977). 이는 박 등(1996)이 보고한 0.3%에서도 생육이 불가능한 일반적인 유산균들에 비하여 강한 담즙산 내성을 가진 것으로 생균제로서 적합한 성질을 가진 것으로 해석이 된다. 담즙산 함량이 높은(0.5%이상 함량) 배지에서는 colony 형태가 pinpoint형 인 것으로 보아 이는 분리된 균주가 담즙산에 의해 사멸되지는 않고 성장이 둔화되는 것으로 추측되어 진다.

6. 열 안정성

30℃, 60℃, 80℃, 100℃에서 10분간 정치 후 조사한 *Candida kefyri*의 열 안정성은 Fig 4에 나타내었다. 대조구인 *Saccharomyces cerevisiae*는 30℃에서  $8.0 \times 10^9$  CFU/ml, 60℃에서  $5.0 \times 10^8$

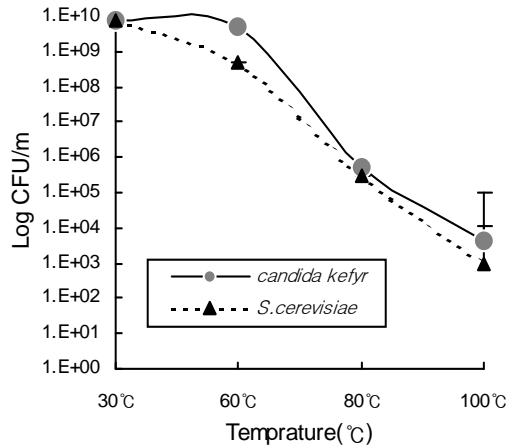


Fig. 4. Heat stabilities of *Candida kefyri*. Values are mean ± SD (bar).

CFU/ml 정도로 잔존 하였으나, *Candida kefyri*는 30℃에서  $8.3 \times 10^9$  CFU/ml, 60℃에서  $5.0 \times 10^9$  CFU/ml 정도가 잔존하여(약 35.7%) *Saccharomyces cerevisiae* 보다는 10배 이상 높은 균수를 유지하였다. 그러나 60℃ 이상에서는 두 균주가 같은 경향으로 사멸하기 시작하여 100℃에서는 약  $10^3$  CFU/ml 정도가 잔존하였다. 일반적으로 효모는 열에 약한 편이나 *Candida kefyri*는 열에 강한 편으로 펠렛형 사료의 제조시에 유산균 및 기타 효모들보다 이용가치가 있는 것으로 사료된다.

Table 5. Minimum inhibition concentrations of various antibiotics for *Candida kefyri*

Antibiotics	Reaction of <i>Candida kefyri</i> against various antibiotics				
CTC	+++ (0 ppm)	+++ (50 ppm)	+++ (100 ppm)	+++ (200 ppm)	+++ (300 ppm)
Bambermycin	+++ (0 ppm)	++ (1 ppm)	+++ (3 ppm)	+++ (5 ppm)	+++ (7 ppm)
Maduramycin	+++ (0 ppm)	++ (1 ppm)	+++ (3 ppm)	+++ (5 ppm)	+++ (7 ppm)
Diclazuril	+++ (0 ppm)	++ (1 ppm)	+++ (3 ppm)	+++ (5 ppm)	+++ (7 ppm)
Avilamycin	+++ (0 ppm)	++ (5 ppm)	+++ (10 ppm)	+++ (20 ppm)	+++ (30 ppm)
Lincomycin	+++ (0 ppm)	+++ (50 ppm)	+++ (80 ppm)	+++ (110 ppm)	+++ (150 ppm)
Tylosin	+++ (0 ppm)	+++ (50 ppm)	+++ (80 ppm)	+++ (100 ppm)	+++ (200 ppm)
OTC	+++ (0 ppm)	+++ (50 ppm)	+++ (100 ppm)	+++ (200 ppm)	+++ (300 ppm)
Neomycin	+++ (0 ppm)	- (10 ppm)	- (50 ppm)	- (110 ppm)	- (200 ppm)
Clopidol	+++ (0 ppm)	+++ (50 ppm)	+++ (100 ppm)	+++ (200 ppm)	- (500 ppm)
Supertia	+++ (0 ppm)	+++ (20 ppm)	+++ (50 ppm)	+++ (65 ppm)	+++ (100 ppm)
Sulfathiazole	+++ (0 ppm)	+++ (50 ppm)	+++ (100 ppm)	+++ (200 ppm)	+++ (300 ppm)
Collistin	+++ (0 ppm)	++ (2 ppm)	+++ (5 ppm)	+++ (10 ppm)	+++ (20 ppm)

- : none, + : 30% or less microorganism, ++ : 30~60% microorganism, +++ : microorganism above 60%  
 CTC : chlortetracycline, OTC : oxytetracycline.

## 7. 항생제 내성

*Candida kefir*를 MIC test 방법에 따라 아래의 13개 사료용 항생제를 각각의 농도에서 배양 후 성장 여부를 관찰한 결과를 Table 5에 나타냈다.

*Candida kefir*의 성장 여부를 관찰한 결과 10ppm neomycin 이상의 농도에 높은 감수성을 나타내어 성장이 억제되었고, 500 ppm 이상의 clopidol에서도 억제되었다. 그러나, 이들 항생제를 제외한 기타의 11가지의 항생제에 대하여는 법적 첨가허용수준일 경우 성장이 억제되지 않아 항생제에 강한 내성을 갖는 것으로 고찰되었다. 특히 우리나라에서 가장 많이 사용되는 tetracycline계 항생물질에 대해서도 강한 편이었다.

이상의 결과로부터 새로 분리한 *Candida kefir*는 내열성, pH 내성이 우수하며, 소화와 관련된 효소활성이 높고 항생제 내성이 뛰어나므로 가축용 생균제로 충분한 활용 가치가 있는 것으로 사료 되었다.

## IV. 요약

Kefir로부터 1차적으로 평판배양법을 이용하여 성장이 가장 우수한 효모를 분리하였고, 이 균은 API 20C kit를 이용한 당발효성 결과에서 99.8%의 상동성을 가진 *Candida kefir*로 동정되었다. *Candida kefir* 균주는 효소기질을 첨가하여 굳힌 PDA 평판 실험에서 특히 phytase와 amylase의 분비능력이 높은 것으로 관찰되었고 cellulase와 xylanase, protease 활성은 낮게 나타났다. 균체를 균질화하여 효소활성을 측정하였을 때, amylase와 phytase, cellulase 활성이  $0.339 \pm 1.12$ ,  $0.052 \pm 0.88$ ,  $0.051 \pm 0.78$   $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 로 비교적 높은 활성을 보였다. *Candida kefir*는 pH2에서 초기균수의 0.7%로 감소되는 것으로 보이나 *Saccharomyces cerevisiae*보다는 약 100배 정도 높게 생존하는 것으로 나타나 내산성이 비교적 강한 것으로 판단되었다. *Candida kefir*는 1.0%의 bile salt의 존재하에서도 초기균수의 약 97.2%를 유지하는 것으로 나타났다.

며, 이는 86.1%인 *Saccharomyces cerevisiae* 보다 내담즙산에 강한 것으로 나타났다. 열 안정성을 측정한 경우는 *Candida kefir*는 60°C에서  $5.0 \times 10^9$  CFU/ml 정도로 약 35.7%가 잔존하는 것으로 조사되었으며 *Saccharomyces cerevisiae* 보다는 10배 이상 높은 내열성을 유지하였다. 13가지의 항생제중 *Candida kefir*의 항생제 내성을 측정한 경우는 10 ppm neomycin과 150 ppm 이상의 clopidol에서는 억제되었으나 11가지 항생제에는 억제되지 않는 내성을 보였다. 이상의 결과로부터 본 연구에서 분리된 *Candida kefir* 균주는 강한 내산성 및 내열성과 항생제 내성을 나타냈으며 소화관련 효소의 활성들도 높게 나타나 가축용 생균제로 충분히 유용성이 있는 것으로 사료되었다.

## V. 사 사

본 연구는 2005년도 고품질친환경농축산물생산기술연구센터(GRRC)의 연구비 지원으로 일부 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## VI. 인용 문헌

1. APHA. 1985. Standard methods for the examination of dairy products, 15th ed. American Public Health Association, Washington. D. C.
2. Bottazzi, V. 1980. A note on scanning electron microscopy of microorganisms associated with the kefir granule. J. Applied Bacteriol. 48:265-268.
3. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
4. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66(5):365-378.
5. Gilliland, S. E. 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. J. Food Prot. 42:164-167.
6. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. Appl.

- Environ. Microbiol. 33:15-18.
7. Ham, J. S., Jeong, J. Y., Jeong, S. G., Ahn, J. N., Ahn, Y. Y., Kim, S. K. and Kim, H. U. 1999. Effects of feeding with *Lactobacillus plantarum* and *Candida kefyr* Isolated from Mongolian Koumiss on the growth and fecal microflora of broilers. Korean J. Dairy Sci. 21(3):241-246.
  8. Harris, B. and Webb, D. W. 1990. The effect of feeding a concentrated yeast culture product to lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 73:266-272.
  9. Itoh, K. 1999. Lactic acid bacteria and intestinal microflora, The 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Human Health, Seoul, Korea. pp. 23-25.
  10. Kandler, O. and Kunathm, P. 1983. *Lactobacillus kefyr* sp. nov., A component of the microflora of kefir. Systematic and Applied Microbiology. 4: 286-294.
  11. Kobayashi, Y., Tohyaman, K. and Terashima, T. 1974. Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*. II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance-strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. Japan. J. Microbiol. 29:691-697.
  12. Khasin, A., Alchanati, I. and Shoham, Y. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. Appl. Environ. Microbiol. 59:1725-1730.
  13. Koroleva, N. S. 1988. Technology of kefir and kumys. Internation Dairy Federation Bulletin. 227: 96-99.
  14. Kroger, M. and Kurmann, J. A. 1989. Fermented milks-past. present and future. Food Technol. 43: 92-99.
  15. Lyons, T. P. and Jacques, K. A. 2000. Biotechnology in the feed industry, Proceedings of Alltech's 16th Annual Symposium, Nottingham University Press.
  16. Martin, S. A. and Nisbet, D. J. 1992. Effect of Direct fed microbials on rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 75:1736-1744.
  17. Otle's, S. and Cagindi, O. 2003. Keir; A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. Pakistan J. nutrition. 2(2):54-59.
  18. Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis*(natto) N-77. Biosci. Biotech. Biochem. 56:1266-1273.
  19. Shiomi, M. K., Sakai, M., Murofushi, M. and Aibara, K. 1982. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. Jpn J. Med. Sci. Biol. 35(2):75-80.
  20. Stark, B. A. and Wilkinson, J. M. 1989. Probiotics; Theory and Applications. Chalcombe Publications Berks England.
  21. Toba, T. 1987. Symposium Reports on Advance of Dairy Science and Technology in Japan. Jpn. J. Dairy and Food Science. 36(6):A235-A243.
  22. 박소영, 고영태, 정후길, 양진오, 정현서, 김영배, 지근익. 1996. 유산균들의 콜레스테롤 저하성, 내산성, 내담즙산성, 항생제 내성 비교. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24(3):304-310.
  23. 박형룡, 한인규, 허기남. 1994. Yeast culture의 첨가가 육계의 생산성과 장내 Yeast colony에 미치는 영향. 한국영양사료학회지. 18:346-352.
- (접수일자 : 2005. 12. 13. / 채택일자 : 2006. 2. 20.)