한국농화학회지 Vol. 30, No. 1, Mar. 1987
J. Korean Agricultural Chemical Society

豆乳에 첨가된 Methionine이 유산균의 생육과 산생성에 미치는 영향

高 榮 泰

덕성여자대학 식품영양학과

(1986년 8월 4일 수리)

Effects of Methionine Supplemented to Soy Milk on Growth and Acid Production by Lactic Acid Bacteria

Young-Tae Ko

Department of Foods and Nutrition, Duksung Women's College, Seoul, Korea

Abstract

Soy milk prepared from soy protein concentrate was fermented with each of the following lactic acid bacteria: *Lactobacillus acidophilus* KFCC 12731, *L. acidophilus* AKU 1122, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Streptococcus lactis*. The effects of methionine supple mented to soy milk on the growth and acid production by each organism were investigated. L-methionine reduced the acid production by two strains of *L. acidophilus* while it had no apparent effects on the other test cultures. The inhibitory effects of L-methionine on *L. acidophilus* KFCC 12731 was greater than on *L. acidophilus* AKU 1122. The acid production by *L. acidophilus* KFCC 12731 was also reduced substantially by DL-methionine supplemented to soy milk while it was not affected by D-methionine. Supplementation of L-cysteine to soy milk resulted in slight reduction of acid production by *L. acidophilus* KFCC 12731.

緖 論

大豆는 단백질, 지방 등의 영양가가 풍부하고 가격이 저렴하지만 소화율이 낮고 특유의 콩비린내(beany flavor)가 있으므로 그 이용이 제한을 받고 있다. 대두 요구르트는 대두의 소화율을 높이고 콩비린내를 감소시키기 위하여 시도된 가공법 가운데 하나이다. 대두 단백질은 우유의 casein과 그 性狀이 여러가지 면에서 유사하여 대두의 유산균 발효, 즉 대두 요구르트의 제조는 매우 흥미있는 연구과제라고 하겠다. 그런데 대두 단백질은 methionine과 같은 含유황아미노산의 함량이 낮으므로 대두 요구르트의 영양가를 높이기 위하여 methionine의 첨가를 고려할 수가 있다. 대두 요구르트의 제조에 관하여 지금까지 국내외에서 많은 연구가 이루어졌으나 含유황아미노산의 첨가효과에 관한 연구는 극히 제한되어 있는 실정이다. 김등[1]은 0.036%의 methionine이 첨가된 두유에 *Lactobacillus acidopilus*를 접종하여 생육과 산생성을 조사한 결과, methionine 非첨가시료에 비하여 생육과 산생성이 촉진되었다고 보고하였다. 그러나 유등[2]은 농축대두단백으로 제조된 두유에 L-methionine을 0~0.07%까지 첨가하여 접종된 *L. acidophilus*의 생육과 산생성을 조사한 결과, L-methionine의 첨가에 의하여 유산균의 산생성이 감소하였으며 그 감소의 정도는 L-methionine의 첨가량에 비례하였다고 보고하였다. 한편 이등[3]도 탈지대두로 만든 두유에 L-methionine을 0~0.05%의 농도로 첨가하여 두유에 접종된 *L. acidophilus*에 미치는 영향을 조사하였는데 L-methionine의 첨가로 유산균의 산생성이 감소하였다

고 보고하였다. 이상의 세 연구의 내용을 검토하여 보면, 김등[1]의 연구에서는 두유에 첨가된 methionine이 *L. acidophilus*의 생육과 산생성을 촉진시켰다고 보고되었으나, 유등[2], 이등[3]의 연구에서는 methionine의 첨가에 의하여 같은 *L. acidophilus*의 생육에 아무런 영향이 없을 뿐만 아니라 오히려 산생성이 억제되었다고 보고되어 서로 相反되는 결과를 보였다. 따라서 본 연구에서는 대두 요구르트의 영양 강화를 위하여 두유에 첨가된 methionine이 *L. acidophilus*를 비롯한 6종의 유산균의 생육과 산생성에 미치는 영향(촉진 또는 억제 효과)을 보다 상세히 관찰하여 그 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 사용균주

본 실험실에 보존되어 있는 여러 種의 유산균 가운데 두유에서 생육이 비교적 우수한 *Lactobacillus acidophilus* (KFCC 12731), *Lactobacillus acidophilus* (AKU 1122), *Lactobacillus bulgaricus* (AKU 1125), *Lactobacillus casei* (IFO 3425), *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 9135), *Streptococcus lactis*(ML 8)의 6균주를 선택하여 사용하였다. 유산균주의 보존용 배지로는 *Lactobacillus*와 *Leuconostoc*의 경우는 MRS 한천배지 (Oxoid Limited), *Streptococcus*의 경우는 Elliker's agar (Difco Laboratories)를 사용하였다.

2. 두유 및 대두 요구르트의 제조

미국 ADM Foods의 농축대두단백(soy protein concentrate : Table 1)을 구입하여 고형분 함량이 6.3%(W/W)가 되도록 두유를 만들고, 여기에 포도당 5%(W/W)를 가한 두유 100ml를 95°C에서 30분간 가열살균한 후 실온까지 냉각시켰다. 여기에 L-methionine (Merck, reagent grade), DL-methionine (Sigma Chemical Co., grade 1) 또는 D-methionine (Sigma Chemical Co., Sigma grade)을 고농도의 stock solution을 이용하여 두유 100 ml에서 최종 농도가 각각 0~0.1%가 되도록 첨가하였다. methionine의 stock solution은 멸균수에 methionine을 첨가하여 만들었으며 가열에 의하여 유산균의 생육을 저해할 수 있는 물질의 생성을 방지하기 위하여 가열살균하지 않고 접종 직전에 두유에 첨가하였다. methionine이 첨가된 두유 100 ml에 MRS broth 또는 Elliker's broth에서 24시간 배양한 유산균 배양액을 2.5%(V/V)의 비율로 접종하여 40°C (*Lactobacillus*와 *Leuconostoc*) 또는 30°C (*Streptococcus*)의 항온기에서 24시간 배양하였다.

Table 1. Composition of soy protein concentrate[4]

Protein (as is)	67.0%
Moisture	6.0%
Fat	0.5%
Ash	5.3%
Fiber	3.5%
Carbohydrates (by difference)	17.7%
(Microbiological data)	
Standard plate count	50,000/gm.max.
E. coli	No fecal coli present
Salmonella	Negative

3. 유산균의 생육과 산 생성량의 측정

1) 유산균수

일정량의 시료를 취하여 멸균 peptone 수에 의한 10배 희석법으로 희석하여 *Lactobacillus*와 *Leuconostoc*은 tomato juice agar에서 40°C, 72시간 배양하고 *Streptococcus*는 Elliker's agar에서 30°C 72시간 배양한 후에 colony 수가 30~300개가 나타나는 평판을 선택하여 유산균수를 산출하였다.

2) 적정산도

시료 10ml를 취하여 2배로 희석시킨 후 0.1N NaOH로 적정하여 산도를 산출하였다.

3) pH

pH는 Hanna micro computer pH meter(model HI 8424)로 측정하였다.

結果 및 考察

1. L-methionine이 유산균의 생육과 산 생성에 미치는 영향

Methionine은 가열로 분해되어 methyl mercaptan, H_2S, methional, sulfoxide 등의 물질을 생성할 수 있으며, 이들 黃化物은 유산균의 생육을 저해할 가능성이 있으므로[5,6], 본 실험에서 두유에 첨가된 모든 mehthionine은 가열살균하지 않고 두

Table 2. Effects of L-methionine on the growth and acid production by *L. acidopihlus* (KFCC 12731) in soy milk*

Concentration of L-methionine(%)	pH	Titratable acidity		Viable count (per ml)
		% as lactic acid	% of control	
0	4.0	0.91	100	5.7×10^9
0.001	4.0	0.85	93	5.6×10^9
0.005	4.1	0.75	82	3.4×10^9
0.01	4.15	0.72	79	3.0×10^9
0.05	4.20	0.70	77	2.1×10^9
0.1	4.20	0.68	75	2.5×10^9

* Blank test showed that L-methionine added to soy milk did not affect pH and acidity of soy milk.
Values are mean of five trials.

유에 첨가되었다.

Table 2는 농축대두단백으로 만든 두유에 첨가된 L-methionine이 *L. acidophilus* (KFCC 12731)의 생육과 산생성에 미치는 효과를 보여주고 있다. L-methionine의 농도를 0.001%에서 0.1%로 증가시킴에 따라 유산균에 의한 산생성이 非첨가시료의 93%에서 75%까지 감소하였고 pH는 점차적으로 증가되는 경향을 보였다. 생균수는 산도의 변화처럼 확실하지는 않았으나 L-methionine의 농도가 증가됨에 따라 다소 감소되는 경향을 보였다.

Table 3은 L-methionine이 *L. acidophilus* (AKU 1122)의 생육과 산생성에 미치는 효과로서, L-methionine의 농도를 0.1%까지 증가시킴에 따라 산도는 다소 감소하는 경향을 보였고 pH는 다소 증가하는 경향을 보였으나, 산도 감소 또는 pH 증가의 정도는 Table 2의 *L. acidophilus* (KFCC 12731)에 비하여 매우 완만하였다.

Table 4, Table 5는 두유에 첨가된 L-methionine이 *L. bulgaricus*와 *L. casei*에 미치는 영향을 각각 보여주는데, 두 경우 다 L-methionine에 의하여 산생성량과 생균수가 거의 영향을 받지 않았다.

Table 6, Table 7은 L-methionine이 *Leuconostoc mesenteroides*와 *S. lactis*에 미치는 효과로서 L-methionine의 첨가로 두 유산균의 생육과 산생성은 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. (*Leuconostoc mesenteroides*는 본 실험에서 사용된 다른 5종의 유산균과는 달리 이상발효 유산균이며 유산 이외에 다른 유기산도 상당량 생산하므로 본 실험에서 사용된 유산을 측정하는 적정산도법은 이 유산균의 경우에는 다소 적합하지 않을 것으로 생각된다).

이상의 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 즉 두유에 첨가된 L-methionine은 본 실험에서 사용된 6종의 유산균 가운데 4종(*L. bulgaricus, L. casei, Leuconostoc mesenteriodes, S. lactis*)의 생육과 산생성에 거의 영향을 미치지 않았으나 *L. acidophilus* 2종의 산생성을 억제 시켰으며, 같은 *L. acidophilus* 중에서도 KFCC 12731은 AKU 1122보다 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 따라서 유산균의 種(species)에 따라 L-methionine에 대한 감수성에 차이가 있을뿐만 아니라, 같은 種가운데서도 strain에 따라서 L-methionine에 대한 감수성이 서로 다른 것으로 생각된다.

미생물의 배지중에 어떤 특정한 아미노산이 정상적인 농도보다 높은 양으로 존재할 때, 이 특정 아미노산은 (i)미생물에게 필요한 다른 아미노산의 흡수를 억제시키며(amino acid imbalance), (ii)feed back inhibition과 같은 작용에 관여하여 미생물의 생육을 저해한다고 알려져 있는데[7], 본 실험에서 두유에 첨가된 L-methionine이 *L. acidophilus* 2종의 산생성을 억제시킨 것도 amino acid imbalance나 feedback inhibition과 관계가 있을 것으로 생각된다.

김등[1]은 두유에 0.036%의 농도로 첨가된 methionine(L型인지는 不明)이 *L. acidophilus*의 생육과 산생성을 촉진시켰다고 보고 하였는데, 그들이 사용한 유산균의 strain과 실험조건(두유의 원료, 살균조건등)이 본 실험과 동일하지 않으므로 서로 다른 결과가 나왔을 가능성이 있다.

Table 3. Effects of L-methionine on the growth and acid production by *L. acidophilus* (AKU 1122) in soy milk*

Concentration of L-methionine(%)	pH	Titratable acidity		Viable count (per ml)
		% as lactic acid	% of control	
0	4.0	0.72	100	2.4×10^9
0.001	4.0	0.71	99	2.5×10^9
0.005	4.0	0.69	96	2.7×10^9
0.01	4.05	0.66	92	2.2×10^9
0.05	4.05	0.66	92	2.5×10^9
0.1	4.05	0.67	93	2.5×10^9

* Values are mean of five trials.

Table 4. Effects of L-methionine on the growth and acid production by *L. bulgaricus* in soy milk*

Concentration of L-methionine(%)	pH	Titratable acidity		Viable count (per ml)
		% as lactic acid	% of control	
0	3.55	1.33	100	2.2×10^9
0.001	3.50	1.31	98	1.7×10^9
0.005	3.55	1.32	99	1.3×10^9
0.01	3.55	1.32	99	2.2×10^9
0.05	3.50	1.30	98	1.9×10^9
0.1	3.55	1.31	98	1.5×10^9

* Values are mean of five trials.

Table 5. Effects of L-methionine on the growth and acid production by *L. casei* in soy milk*

Concentration of L-methionine(%)	pH	Titratable acidity		Viable count (per ml)
		% as lactic acid	% of control	
0	3.75	1.09	100	1.5×10^9
0.001	3.70	1.07	98	1.7×10^9
0.005	3.70	1.04	95	1.0×10^9
0.01	3.75	1.06	97	1.6×10^9
0.05	3.75	1.05	96	1.5×10^9
0.1	3.70	1.05	96	1.5×10^9

* Values are mean of five trials.

2. DL-methionine과 D-methionine이 유산균의 생육과 산 생성에 미치는 영향

인간에 있어서 단백질 합성에 필요한 아미노산은 L型이지만 methionine의 경우는 D型, L型 어느 것이나 이용될 수 있다고 하는데, D-methionine은 생체내에서 脫아미노반응에 의하여 keto 화합물이 되고 이 keto 화합물이 다시 아미노기 전이반응에 의하여 L型으로 전환된다고 알려져 있다.[8,9] 따라서 본 연구에서는 6종의 유산균 가운데

Table 6. Effects of L-methionine on the growth and acid production by *Leuconostoc mesenteroides* in soy milk*

Concentration of L-methionine(%)	pH	Titratable acidity		Viable count (per ml)
		% as lactic acid	% of control	
0	3.55	1.17	100	1.4×10^9
0.001	3.55	1.17	100	1.0×10^9
0.005	3.55	1.15	98	8.6×10^8
0.01	3.55	1.15	98	9.3×10^8
0.05	3.55	1.13	97	9.0×10^8
0.1	3.55	1.15	98	9.3×10^8

* Values are mean of five trials.

Table 7. Effects of L-methionine on the growth and acid production by *S. lactis* in soy milk*

Concentration of L-methionine(%)	pH	Titratable acidity		Viable count (per ml)
		% as lactic acid	% of control	
0	4.25	0.52	100	2.0×10^9
0.001	4.25	0.52	100	1.8×10^9
0.005	4.25	0.53	102	1.5×10^9
0.01	4.25	0.53	102	1.8×10^9
0.05	4.25	0.53	102	1.9×10^9
0.1	4.25	0.54	104	1.6×10^9

* Values are mean of five trals.

두유에 첨가된 L-methionine에 의하여 산생성이 현저하게 영향을 받는 *L. acidophilus* (KFCC 12731)을 선택하여 DL-methionine 또는 D-methionine이 첨가된 두유에 접종하여 생육과 산생성을 조사하였다.

Table 8은 DL-methionine이 *L. acidophilus* (KFCC 12731)의 생육과 산생성에 미치는 효과로서, DL-methioine의 농도를 0.001%에서 0.1%로 증가시킴에 따라 산생성이 非첨가시료의 96%에서 77%까지 감소하였고 pH는 점차적으로 증가하였으며 생균수는 다소 감소하는 경향을 보였다.

Table 9는 D-methionine이 *L. acidophilus* (KFCC 12731)에 미치는 효과로서, D-methionine의 농도를 0.1%까지 증가시켜도 유산균의 생육과 산생성에는 아무런 변화가 없었다.

이상의 결과(Table 8, Table 9)와 Table 2의 결과로 보건데, methionine 가운데 L型과 DL型은 *L. acidophilus* (KFCC 12731)의 산생성에 현저한 영향을 미치지만 D型은 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. DL型의 아미노산은 L型의 아미노산과 함께 미생물의 배지에 널리 이용되고 있으므로[10] 본 실험에서 DL-methionine이 L-methionine과 유사한 효과를 보인 것은 예상하였던 결과지만, 인간에 있어서 이용 가능하다고 알려진 D-methionine이 *L. acidophilus* (KFCC 12731)의 생육과 산생성에 아무런 영향을 미치지 않는 점에 대해서는 앞으로 보다 상세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

3. L-cysteine이 유산균의 생육과 산 생성에 미치는 영향

본 연구에서는 methionine 이외에도 含유황아미노산의 하나인 L-cysteine을 두유에 첨가하여 *L. acidophilus* (KFCC 12731)에 미치는 영향을 조사하였는데, 첨가농도는 methionine과 mole 농도를 같도록 하기 위하여 0.001~0.1% 대신 0.0008~0.08%를 사용하였다.

Table 10에 나타난 바와 같이 L-cysteine을

Table 8. Effects of DL-methionine on the growth and acid production by *L. acidophilus*(KFCC 12731) in soy milk*

Concentration of DL-methionine(%)	pH	Titratable acidity		Viable count (per ml)
		% as lactic acid	% of control	
0	3.95	0.91	100	6.1×10^9
0.001	3.95	0.87	96	5.8×10^9
0.005	4.05	0.79	87	4.7×10^9
0.01	4.15	0.76	84	3.9×10^9
0.05	4.15	0.71	78	3.3×10^9
0.1	4.20	0.70	77	2.7×10^9

* Blank test showed that DL-methionine added to soy milk did not affect pH and acidity of soy milk.
Values are mean of five trials.

Table 9. Effects of D-methionine on the growth and acid production by *L. acidophilus* (KFCC 12731) in soy milk*

Concentration of D-methionine(%)	pH	Titratable acidity		Viable count (per ml)
		% as lactic acid	% of control	
0	3.95	0.85	100	6.3×10^9
0.001	3.95	0.83	98	5.8×10^9
0.005	3.95	0.84	99	6.0×10^9
0.01	3.95	0.83	98	5.7×10^9
0.05	4.00	0.83	98	5.2×10^9
0.1	3.95	0.84	99	6.0×10^9

* Blank test showed that D-methionine added to soy milk did not affect pH and acidity of soy milk.
Values are mean of five trials.

Table 10. Effects of L-cysteine on the growth and acid production by *L. acidophilus* (KFCC 12731) in soy milk*

Concentration of L-cysteine(%)	pH	Titratable aoidity		Viable count (per ml)
		% as lactic acid	% of ccntrol	
0	3.95	0.87	100	6.1×10^9
0.0008	3.95	0.86	99	6.0×10^9
0.004	3.95	0.86	99	6.0×10^9
0.008	3.95	0.85	98	4.8×10^9
0.04	3.95	0.84	97	3.7×10^9
0.08	3.95	0.83	95	3.7×10^9

* L-cysteine (Junsei Chemical, GR) added to soy milk was not heat treated. Blank test showed that L-cysteine added to soy milk did not affect pH and acidity of soy milk.
Values are mean of five trials.

0.08%까지 첨가시키자 유산균에 의한 산생성이 약 5% 정도 감소하였는데 이러한 효과는 L-methionine에 비하여 매우 완만한 것이었다. 그런데 L-cysteine은 두유에 첨가했을 때 유황 냄새가 너무 강하여 飮用을 목적으로 하는 대두 요구르트의 제조에 사용하기에는 적합하지 않을 것으로 생각된다.

抄 錄

본 연구는 농축대두단백으로 만든 두유에 L-methionine을 여러가지 농도로 첨가하여 6종의 유산균 (*Lactobacillus* 4종, *Leuconostoc* 1종, *Streptococcus* 1종)의 생육과 산생성에 미치는 영향을 조사하고 아울러 DL-methionine, D-methionine 또는 L-cysteine이 *L. acidophilus*에 미치는 영향을 조사한 것으로서 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

두유에 첨가된 L-methionine은 6종의 유산균 가운데 4종 (*L. bulgaricus, L. casei, Leuconostoc mesentreoides, S. lactis*)의 생육과 산생성에 거의 영향을 미치지 않았으나 *L. acidophilus* 2종의 산생성을 억제시켰으며, 같은 *L. acidophilus* 중에서도 KFCC 12731은 AKU 1122보다 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 두유에 첨가된 DL-methionine은 L-methionine과 동일하게 *L. acidophilus* (KFCC 12731)의 산생성을 현저하게 억제시켰으나, D-methionine은 높은 농도에서도 생육과 산생성에 전혀 영향을 미치지 않았다. 한편 L-cysteine에 의하여 *L. acidophilus* (KFCC 12731)의 산생성이 다소 억제되었으나 그 정도는 L-methionine에 비하여 매우 완만한 것이었다.

參 考 文 獻

1. 김오섭, 김창한 : 산업미생물학회지, 7 : 205 (1979).
2. 유지창, 임숙자, 고영태 : 한국식품과학회지, 16 : 143 (1984).
3. 이정숙, 고영태, 백정기 : 한국농화학회지, 27 : 7 (1984).
4. ADM Foods: Technical Data, ADM Foods, Decatur, Illinois (1982).
5. Borenstein, B.: In "Handbook of Food Additivs", T. Furia (ed.), 2nd Ed., p. 109, CRC Press, Cleveland, Ohio (1972).
6. Angeles, A. and Marth, E.: J. Milk and Food Technol., 34(2) : 63 (1971).
7. Brock, T., Smith, D. and Madigan, M.: In "Biology of Microorganisms", 4th Ed., p. 172, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J. (1984).
8. Munro, H. and Crim, M.: In "Modern Nutrition in Health and Disease", R. Goodhart and M. Shils (ed.), 6th Ed., p. 53, Lea & Febiger, Philadelphia (1980).
9. Windholz, M.: In "The Merck Index", M. Windholz (ed.), 10th Ed., p. 5849, Merck & Co., Inc., Rahway, N.J. (1983).
10. Nakayama, K.: In "The Microbial Production of Amino Acids", K. Yamada (ed.), p. 369, Kodansha Ltd., Tokyo (1972).