

원유내 내생성 미생물의 오염에 따른 유리 D-amino acid의 생성

김철현 · 송영민 · 백승천
서울우유 기술연구소

Production of Free D-amino Acids in Raw Milk Related to Psychrotrophic Bacterial Contamination

C. H. Kim, Y. M. Song and S. C. Baick
Institute of Dairy Food Research, Seoul Dairy Co-op

ABSTRACT

It is generally believed that amino acids occurring naturally in mammals are of the L-configuration. D-amino acid(DAA) are common in nature as constituents of bacterial cell walls and several antibiotics. Recent reports have demonstrated the presence of small amounts of free DAA in milk. The presence of free DAA may affect the food quality by decreasing the nutritional value. Our objective was to examine whether the free DAA came from psychrotrophic bacteria. Free DAA was produced by treating raw milk with *Pseudomonas* spp. The samples were extracted with sulphosalicylic acid and derivatized with AccQ-Tag™ reagent when the analysis was carried out by reverse-phase HPLC. We tested correlations of the content of free DAA with bacterial growth. Significant amounts of free D-alanine and D-proline have been found in the raw milk inoculated with *Pseudomonas* spp. The increase of D-alanine and D-proline appeared to be mainly related to the presence of *Pseudomonas fluorescens*. These results suggest that free DAA may be considered as an indicator of psychrotrophic bacterial milk contamination.

(Key words : D-amino acid, Psychrotrophic bacteria, HPLC)

I. 서 론

유단백질에서 유래된 아미노산은 주로 L-이성체의 형태로 존재하며, 이러한 아미노산들은 강한 열처리나 강산 또는 강염 처리에 의해 이 중결합이 생성되어 racemization이 일어남에 따라 단일의 이성체, 즉 L-이성체의 비대칭성이 소실되어 D-이성체로 변화하게 된다(Palla 등, 1989). 또한 연구자들에 의해 일부 미생물 세포벽의 구성 성분으로 D-amnio acid(DAA)가 존재하고 있는 것으로 보고 되고 있으며(Bruckner 등, 1994), 이로 인해 발효유제품 내 DAA의 생성에 관한 연구도 활발하게 이루어지고 있다(Bruckner 등, 1992).

내생성미생물은 우유의 살균처리 과정에서

대부분 사멸하지만 이들이 생산하는 내열성 효소와 포자들은 활력을 유지할 수 있고, 이로 인해 우유의 gelation, off-flavor, sweet-curdling 및 bitter taste 등의 원인 되는 것으로 보고 되고 있으며(Sorhaug와 Stepaniac, 1997; Rowe 등, 2001), 저온저장 중인 우유에서도 DAA가 증가 되는 것으로 나타나 DAA의 생성량이 내생성미생물의 오염정도를 판단할 수 있는 근거로 제시되고 있다(Gandolfi 등, 1992). 또한 DAA는 인체의 신장, 간 및 뇌조직내의 DAA oxidase에 의해 분해되는 것으로 알려져 있으나 고농도로 축적될 경우 인체에 매우 유해한 것으로 보고 되고 있다(Nagata와 Akino, 1990; Nagata 등, 1994).

따라서 이 연구는 유제품의 품질저하와 인체에

Corresponding author : S. C. Baick, Institute of Dairy Foods Research, Seoul Dairy Co-operative, 1059, Shingil-dong, Danwon-gu, Ansan city, Kyunggi-do 425-839, Korea. Tel: 82-31-491-3867, Fax: 82-31-491-9179. E-mail: Baicksc@seoulmilk.co.kr

유해한 영향을 끼칠 수 있는 DAA 생성과 내냉성 미생물과의 상관관계를 규명함으로써 품질관리 지표로서 적용가능성을 탐색하여 최적의 유제품 생산을 위한 기초 자료로 이용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 사용 균주

실험에 사용된 균주는 *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus* 로 이루어진 상업용 혼합 유산균주인 ABT-C (Rhodia Inc., U.S.A.)와 송 등(2002)이 원유에서 분리한 내냉성미생물 중 *Pseudomonas fluorescens*와 *Pseudomonas putida*를 사용하였으며, 내냉성미생물의 보존용 배지로 nutrient broth (Difco Lab., U.S.A.)를 사용하였다.

2. 접종 및 배양

각각 원유 200mL를 90℃에서 10분간 살균한

후 30℃ 및 40℃로 냉각하고 혼합 유산균주는 40℃ 냉각 원유에 0.02%(v/w) 첨가하였다. 또한 *P. fluorescens*와 *P. putida*는 30℃에서 48시간 배양하여 각각의 균수가 2.1×10^8 CFU/mL, 3.2×10^8 CFU/mL일 때 배양액에서 각각 1mL씩 취하여 30℃로 냉각된 원유에 접종 후 시간대별로 DAA를 측정하였다.

3. 유리 D-amino acid 분석

(1) 표준용액의 조제

표준시료는 유해 아미노산이며 내냉성미생물과 주로 연관되어 보고된 D-alanine, D-aspartic acid, D-glutamic acid, D-proline 및 D-serine 등 5종의 D-amino acid 및 내부 표준용액 α -aminobutyric acid(Sigma Chem. Co., U.S.A.)를 0.1M HCl(Shinyo Pure Chemicals Co., Japan)에 각각 2.5mM의 농도로 조제한 후, 이를 각각 40 μ l를 취하여 증류수 960 μ l를 첨가하여 사용하였다.

Table. 1. Instrument and operating conditions of HPLC for the analysis of free D-amino acid

▶ Instrument	Alliance M2690XE system(Waters Co., U.S.A.)		
▶ Detector	Fluorescence(5 μ l cell Vol.), Ex : 250 nm, Em : 390nm		
▶ Column	AQC-Tag C ₁₈ , 3.9 × 150mm(Waters Co., U.S.A.)		
▶ Mobile Phase	A ; AQC-Tag eluent concentrate A 100 mL : water 900mL(v/v) B ; 60% acetonitrile(v/v)		
▶ Oven Temp.	37℃		
▶ Flow rate	1mL/min.		
▶ Injection vol.	5 μ l		
▶ Gradient table			
	Flow rate(mL/min)	Time(min)	Flow rate(%)
			A B
		Initial	100 0
		0.5	98 2
		15	93 7
		19	90 10
	1	32	67 33
		33	67 33
		34	0 100
		37	0 100
		38	100 0
		40	100 0

(2) 유리아미노산의 전처리

유리아미노산의 전처리는 Liu(1994)의 AQC-precolumn derivatization 방법으로 다음과 같이 실시하였다. 시료 5g에 증류수 5mL을 첨가한 후 혼합액에 1g의 sulphosalicylic acid를 첨가하고 4°C에서 1시간 방치한 후 1,940 × g에서 15분간 원심분리한 후 그 상정액을 0.45µm filter로 여과하여 이를 유도체화 하였다.

(3) 시료의 유도체화

시료의 유도체화는 Waters사(Water Co., U.S.A.)의 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC), 0.2M borate buffer 및 DNA grade acetonitrile로 구성된 유도체화 시약 kit을 구입하여 다음과 같이 실시하였다. AQC에 acetonitrile 1mL를 첨가한 후 55°C에서 10분간 가온하며 용해하여 사용하였다. 내부표준용액 및 전처리 시료를 각각 10µl 취하여 0.2M borate buffer 70 µl를 첨가하고 수초간 잘 혼합하고 여기에 AQC용액 20µl를 첨가한 후 실온에서 1분간 방치하고 55°C에서 10분간 반응시킨 후 분석하였으며 HPLC 조건은 Table 1에 나타낸 바와 같다.

III. 결과 및 고찰

1. HPLC에 의한 free D-amino acid 분석

DAA의 분석은 주로 L-isomer 분석과 동시에 screening 하는 방법이 주로 사용되어 왔으며, chiral column을 이용한 gas chromatography 방법, thin layer chromatography(Palla 등, 1989), 방법 등이 HPLC 방법과 더불어 이용되어 왔으나, 아미노산의 구조적 특징과 유도체와 과정 및 다양한 아미노산의 동시 screening 등을 고려할 때 HPLC에 의한 방법이 주로 사용되고 있으며(Bruckner 등, 1992) HPLC에 의한 방법은 σ -phthalaldehyde(OPA), 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate(AQC) 등과 같은 시약을 이용한 pre-column derivatization 방법과 ion-exchange separation mechanism을 이용한 ninhydrin post-column derivatization 방법

이 있다(Bruckner 등, 1994; Liu, 1994). 그러나 post-column derivatization 방법의 경우 pre-column derivatization 방법에 비해 감도와 분석 시간 등에 있어 효율적이지 못한 것으로 보고되고 있다. 또한 pre-column derivatization 방법 중 시료의 유도체화에 있어 OPA 시약에 비해 AQC 시약이 좀더 안정한 형광물질로 전환되어 시료의 보존성이 뛰어나며 가수분해 후 6-aminoquinolin으로 전환되어 분석에 영향을 끼치지 않는 장점이 있다(Liu, 1994). 따라서 이 실험에서는 pre-column derivatization 방법 중 AQC를 이용한 유도체화 방법을 이용하여 유리 DAA를 분석하였으며 표준 chromatogram은 Fig. 1에 나타난 바와 같다.

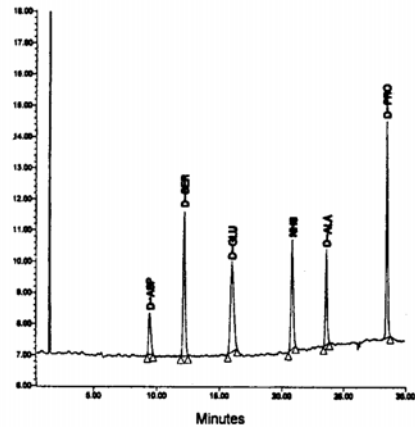


Fig. 1. HPLC chromatogram of standard free D-amino acids.

2. 유산균에 의한 free D-amino acid의 생성

L. acidophilus, *B. longum*, *S. thermophilus*로 이루어진 상업용 혼합 유산균주인 ABT-C를 접종하여 발효시간대별로 free D-amino acid를 분석하였으며 결과는 Fig. 2와 Table 2에 나타난 바와 같다. DAA는 미생물의 세포벽의 일부로 미량 존재하는 것으로 보고되어 왔으며 (Gandolfi 등, 1992), Bruckner 등(1992)은 *L. acidophilus*, *Nectria ochroleuca* 등의 세포벽내 DAA를 분석한 결과 D-Asp, D-Ala, D-Glu 등이

주로 존재하고 본 실험과는 달리 D-pro는 존재하지 않고 함량도 매우 낮은 것으로 보고하였는데 이는 미생물 균체만을 전처리 하였기 때문으로 생각된다. 또한 Gouda cheese내 DAA의 함량을 조사한 결과 본 실험에 비해 2~10배 이상 높게 나타난 것으로 보고하였으며, 본 실험에서 DAA의 생성량이 다른 연구자들의 보고에 나타난 바와 같이 균체 또는 원유 처리구보다 일부 높게 나타난 Palla등(1989)의 보고와 같이 유산균 접종 전 살균을 위한 열처리 시 thermal racemization에 의해 DAA 함량이 미량 증가 되었기 때문으로 사료된다. 그러나 이 실험 결과 전체적인 DAA 함량은 매우 낮은 수준이고, 특히 발효시간대별 변화가 크게 없어 유산균의 증식에 의한 DAA의 생성은 매우 미미

한 것으로 나타났으며, 또한 일부 L-amino acid의 경우 유산균의 생육에 이용되는데(김 등, 1999) DAA의 경우 발효시간대별 함량이 큰 변화가 없는 것으로 보아 유산균의 이용성은 거의 없는 것으로 사료된다.

3. 내냉성미생물에 의한 free D-amino acid의 생성

*P. fluorescens*와 *P. putida*를 접종하여 배양시간대별로 free D-amino acid를 분석하였으며 결과는 Fig. 3, 4와 Table 3에 나타난 바와 같다.

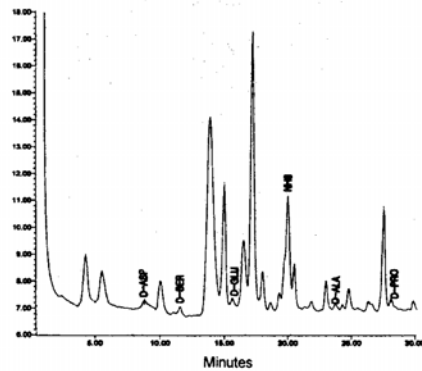


Fig. 2. HPLC chromatograms of free D-amino acids in yogurt fermented with ABT-C.

Table 2. Changes of free D-amino acids concentration acids in yogurt fermented with ABT-C

D-amino acid	(µg/mL)		
	Fermentation time(h)		
	0	4	8
D-aspartic acid	0.932	0.951	1.093
D-serine	0.916	0.952	0.929
D-glutamic acid	0.938	1.318	0.985
D-alanine	1.011	0.989	1.051
D-proline	0.925	0.887	0.968

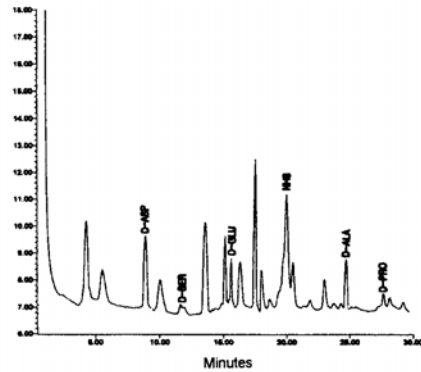


Fig. 3. HPLC chromatograms of free D-amino acids in milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens*.

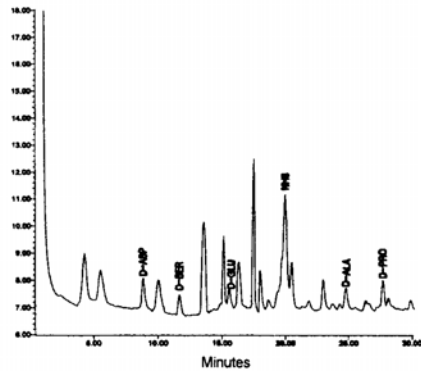


Fig. 4. HPLC chromatograms of free D-amino acids in milk inoculated with *Pseudomonas putida*.

Table 3. Changes of free D-amino acids concentration in milk inoculated with psychrotrophic bacteria

D-amino acids	Incubation time(h)					
	A ¹⁾			B ²⁾		
	0	4	8	0	4	8
D-aspartic acid	3.922	4.273	5.591	4.292	4.350	6.287
D-serine	1.962	2.082	2.762	2.254	2.834	3.625
D-glutamic acid	2.423	3.331	4.475	3.157	3.691	4.942
D-alanine	2.641	2.817	3.166	3.628	4.385	6.253
D-proline	3.625	4.118	5.127	2.467	2.480	2.591

¹⁾ Inoculated with *Pseudomonas putida*.

²⁾ Inoculated with *Pseudomonas fluorescens*.

실험결과 두 처리구 모두 배양시간에 따라 DAA의 생성이 증가되는 경향을 나타내었으며, *P. putida*의 경우 *P. fluorescens*에 비해 D-Pro의 증가량이 상대적으로 높게 나타났으나 나머지 4종은 *P. fluorescens*에 의한 생성량이 더욱 높게 나타났고, 특히 유해성이 높은 것으로 보고된 D-Asp 및 D-Ala의 함량이 매우 높게 나타났다. Gobbetti 등(1993)은 *P. fluorescens* ATCC 948에서 분리한 peptidase를 우유에 첨가하여 반응시킨 후 DAA를 측정한 결과 D-Ala는 1~9 µg/mL, D-Asp는 0.1~5.2µg/mL, D-Glu는 0.1~28µg/mL 및 D-Ser은 0.7~3.7µg/mL로 각각 보고하였는데, 본 실험결과와 같이 D-Ala의 함량이 상대적으로 높았으며 D-Asp의 함량은 다른 DAA보다 상대적으로 낮아 본 실험과는 다르게 나타났다. 이러한 결과는 균종에 따른 효소의 특성차와 열처리 방식 등의 차이에서 기인된 것으로 생각된다. 또한 내열성효소에 의한 유제품의 품질저하에 가장 큰 영향을 주는 것으로 보고된 *P. fluorescens*는 *P. putida*에 비해 전체적으로 DAA의 생성능이 높게 나타났다.

Gandolfi 등(1992)은 원유를 4℃에서 저장하였을 때 D-Ala의 함량이 유의적으로 증가하여 D-Ala를 냉장저장 중 유제품내 내냉성미생물의 오염지표로 사용할 것을 제안하였다. 본 실험결과 역시 두 처리구 모두에서 배양시간이 증가함에 따라 5종의 DAA의 생성량이 전체적으로 증가하는 것으로 나타났다.

일부 연구자들의 보고에 의하면 DAA는 신장, 간, 혈액, 뇌조직 및 폐와 같은 인체 조직 내에 일정하게 50nmol/mL의 저농도로 존재하나 특히 D-Ala과 D-Asp이 외인성 요인에 의해 축적이 되면 독성이 유발되고(Nagata와 Akino, 1990), D-Ala의 경우 L-Ala과 함께 0.1%의 농도로 식수를 통해 DAA oxidase 결핍 생쥐에게 2주간 급여한 결과 상기 조직에 약 60~110배 이상 축적이 되어 생쥐는 폐사하였으며 이 때 L-Ala의 농도는 정상적으로 유지된 것으로 보고 되었다(Nagata 등, 1994). 따라서 DAA는 품질저하 뿐만 아니라 인체의 유해성에 대한 위험성을 배제하는 차원에서도 매우 중요하게 인식되어야 할 것으로 사료된다.

IV. 요약

유단백질에서 유래된 아미노산은 주로 L-이성체의 형태로 존재하나 일부 미생물 세포벽의 구성성분과 일부 항생물질내 D-amino acid(DAA)가 존재하고 있는 것으로 보고 되고 있으며 이는 유제품의 품질저하와 연관된다. 따라서 이 연구는 내냉성미생물 *P. fluorescens*와 *P. putida*에 의한 DAA 생성에 관해 실험하였다. 상업용 혼합 유산균주인 ABT-C를 접종하여 발효시간 대별로 free D-amino acid를 분석하였으며, 실험결과 전체적인 DAA 함량은 매우 낮은 수준이고, 특히 발효시간대별 변화가 크게 없어 유산

균의 증식에 의한 DAA의 생성은 매우 미미한 것으로 나타났고, 또한 일부 L-amino acid의 경우 유산균의 생육에 이용되는데 DAA의 경우 발효시간대별 함량이 큰 변화가 없는 것으로 보아 유산균의 이용성 역시 매우 낮은 것으로 생각된다.

원유에서 분리한 *P. fluorescens*와 *P. putida*를 접종하여 배양시간대별로 free D-amino acid를 분석하였으며 실험결과 두 처리구 모두 배양시간에 따라 DAA의 생성이 증가되는 경향을 나타내었으며, *P. putida*의 경우 *P. fluorescens*에 비해 D-Pro의 증가량이 상대적으로 높게 나타났으나 나머지 4종은 *P. fluorescens*에 의한 생성량이 더욱 높게 나타났고, 특히 유해성이 높은 것으로 보고된 D-Asp 및 D-Ala의 함량이 매우 높게 나타났다.

따라서 DAA는 내냉성미생물에 의한 품질저하 지표로서 이용가능성과 더불어 인체의 유해성에 대한 위험성을 배제하는 차원에서도 매우 중요하게 인식되어야 할 것으로 사료된다

V. 인 용 문 헌

1. Bruckner, H., Haasmann, S., Langer, M., Westhauser, T. and Witter, R. 1994. Liquid chromatographic determination of D- and L-amino acids by derivatization with σ -phthalaldehyde and chiral thiols. *J. Chromatography A*, 666:259-273.
2. Bruckner, H., Jack, P., Langer, M. and Godel, H. 1992. Liquid chromatographic determination of D-amino acids in cheese and cow milk. *Amino Acids*, 22:271-284.
3. Gandolfi, I., Palla, G., Delprato, L., De Nisco, F. and Salvadori, C. 1992. D-amino acids in milk as related to heat treatment and bacterial activity. *J. Food Sci.*, 57(2):377-379.
4. Gobetti, M., Magnarino, C., Rossi, J., Cossignani, L. and Damiani, P. 1993. Free D- and L-amino acids from hydrolyzed milk proteins by *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948. *J. Dairy. Sci.*, 76: 2500-2506.
5. Liu, H. J. 1994. Determination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and HPLC with UV detection. *J. Chromatography A*, 670:59-66.
6. Nagata, Y. and Akino, T. 1990. D-amino acids in mouse tissues are not of microbial origin. *Experientia*, 46:466-468.
7. Nagata, Y., Konno, R. and Niwa, A. 1994. Amino acid levels in D-alanine administered mutant mice lacking a D-amino acid oxidase. *Metabolism*, 43(9):1153-1157.
8. Palla, G., Marchelli, R., Dossena, A. and Casnati, G. 1989. Occurrence of D-amino acids in food. *J. Chromatography*, 475:45-53.
9. Rowe, M. T., Dunstall, G., Kilpatrick, D. and Wisdomm, G. B. 2001. A study of changes in the psychrotrophic microflora of raw milk during refrigerated storage. *Milchwissenschaft*. 56(5):247-250.
10. Sorhaug, T. and Stepaniak, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Sci. & Tech.*, 8: 35-42.
11. 김철현, 신용국, 백승천, 김수광. 1999. 혼합균주를 이용한 대두유의 발효에 따른 당 및 유리아미노산의 변화. *한국식품과학회지*. 31(3):739-745.
12. 송영민, 김철현, 백승천. 2002. 세포내 지방산 조성 분석방법을 이용한 psychrotrophic bacteria의 동정에 관한 연구. *서울우유기술연구지*. 13(1):33-39. (접수일자 : 2003. 11. 19. / 채택일자 : 2004. 1. 27.)