

김치에서 분리한 *Lactobacillus brevis*의 성장 특성에 관한 연구(I) - Sourdough 배지의 영양 조성 최적화 -

신 언 환[†]

울산과학대학 호텔조리과

Studies on Growth Characteristics of *Lactobacillus brevis* Isolated from Kimchi - Optimization of Nutrient Composition in Sourdough Media -

Eon-Hwan Sihn[†]

Department of Hotel Culinary Arts, Ulsan Collage

Abstract

Growth characteristics of sourdough lactic acid bacteria was investigated to obtain basic informations for sourdough starter. The optimum temperature and pH on bacterial growth and lactic acid production of *Lactobacillus brevis* UC-22 in sourdough broth were 35°C and around pH 5.5, respectively. And the optimum concentrations of the carbohydrate sources added to the broths was 2% maltose. The acidity significantly increased during growth by *Lactobacillus brevis* UC-22 for 18 hours while pH significantly decreased during growth.

Key words : sourdough, lactic acid bacteria, *Lactobacillus brevis*.

서 론

Sourdough는 산업적으로 효모가 만들어지기 전에 인위적으로 효모를 넣지 않고 공기 중에 존재하는 wild yeast와 유산균에 의해서 자연적으로 발효된 발효 반죽을 말하며 유산균에 의해 생성되는 젖산과 아세트산에 의한 신맛과 독특한 향미가 있어 전통적인 유럽 빵의 제조에 이용되고 있다. Sourdough 제법을 적용한 빵류의 장점은 풍부한 향, 독특한 맛, 기타 장시간 발효에 따른 유산 및 다양한 풍미를 지니는 미량물질을 합성함으로써 기존의 제품보다 향상된 풍미를 지니며 유기산 등에 의한 빵의 조직 및 노화를 억제하며 pH를 낮추어 곰팡이의 생육을 억제하므로 유통 기한을 연장할 수 있다는 것 등 dough의 특성을 증진시킨다는 보고가 있다¹⁾. Sourdough 제조 방법에 따라 세 가

지 형태로 나뉘어진다. 첫 번째 형태의 sourdough는 주위 온도(20~30°C)에서 지속적으로 전달되는 열에 의해 유지되는 전통적인 dough로서 대부분이 전통적인 3단계 발효 공정이 사용되어진다²⁾. 이러한 dough에 주로 이용되어지는 유산균은 *Lactobacillus brevis*, *Lb. pontis*이다³⁾. 또한 *Lb. fructivorans*, *Lb. fermentum* 그리고 *Lb. sanfrancisco*도 일부 dough에서 발견되어진다. 첫 번째 형태와는 반대로 두 번째 형태의 sourdough 발효는 dough에 빵 효모를 첨가함으로 나타내어진다. 이것은 두 번째 형태의 dough가 30°C 이상 온도에서 시간 소모가 덜한 단계의 발효 공정으로 이루어질 수 있기 때문에 중요하다. 대부분의 산업 공정에 이용되는 dough는 두 번째 형태의 dough이다. 여기에 사용되어지는 유산균은 *Lb. panis*, *Lb. pontis*, *Lb. reuteri*^{2,3)}, *Lb. johnsonii*, *Lb. sanfrancisco*²⁾, *Lb. fermentum*,

[†] Corresponding author : Eon-Hwan Sihn

Lb. delbrueckii, *Lb. acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lb. brevis*, *Lb. amylovorus*³⁾이다. 세 번째 방법은 분말 형태의 starter를 직법 투입하는 제조 방법이다²⁾. 이것은 냉동 건조, roller spray drying에 의한 수분을 제거한 전통적인 sourdough 발효에 의해 만들어진다⁴⁾. 따라서 우리나라에서 sourdough 제법을 적용한 제빵 법을 도입하려면 일반적 제조 공정에 쉽게 적용할 수 있도록 제조 공정을 개발하는 것과 향미가 좋은 유산균 종을 선택하는 것이 우선적으로 검토되어야 한다. 최근 소비자들의 건강 지향적이고 자연 친화적인 제품 구매 양상을 고려할 때 천연 물질을 이용하여 제품 품질을 개선시키는 것이 바람직하다. 천연 물질을 이용한 품질 개선 방법은 α -amylase를 이용한 제품 품질 개선 연구와⁵⁾ sourdough에서 빵의 품질을 향상시키는 유산균을 분리 동정하여 사용하는 비전통적인 발효에 의한 품질 개선 연구가 보고되고 있다^{6~10)}.

Galar 등¹¹⁾은 빵의 상업적 수명은 보통 2일로 알려져 있는데 젖산균에 의하여 생성된 유기산들은 빵의 풍미에 미치는 영향 이외에도 글루텐 단백질의 팽윤을 도와 주므로써 가스 보유력을 높여 조직감이 좋고 체적이 큰 제품을 생산하며 노화가 억제되어 보존성 향상에 큰 효과가 있어 천연 제빵 개량제로서의 역할이 가능하다고 알려져 있다. 젖산균 발효는 영양소의 양과 이용율, 소화율, 동화율을 증가시킴으로써 식품의 영양가를 개선시킨다.

또한 많은 생리 활성 물질로서의 역할을 가진 유산균은 효과가 인정되기 때문에 빵 제조에 이용한다면 천연 제빵제로서의 역할 이외에도 생리 활성적인 면에서도 이점을 가질 것으로 생각된다. 따라서 본 연구는 우리나라 전통적인 발효식품인 김치로부터 분리한 유산균을 sourdough starter로 사용하기 위해 유산균의 배양 특성 및 최적 성장조건을 조사하였다.

실험 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배지

균주는 한경대학교 식품연구소에서 김치로부터 분리한 *Lactobacillus brevis* UC-22를 사용하였고 사용한 배지는 sourdough 배지¹²⁾이며 배지 조성은 Table 1에 나타내었다. 배양 방법은 sourdough 액체 배지 100ml에 24시간 동안 호기적으로 배양한 균주 배양액 5%를 접종하여 사용하였다.

2. 유산균주의 배양 특성

Lactobacillus brevis UC-22의 증식에 미치는 배양은

Table 1. Composition of sourdough media

Components	Concentration (g/L)
Maltose	20.0
Yeast extract	3.0
Tween 80	0.3
Peptone	6.0

Final pH was 5.6.

도와 초기 pH의 영향을 알아보기 위하여 sourdough broth에 균주를 접종하여 25°C, 35°C, 45°C에서 각각 배양하였고 pH의 영향은 sourdough 배지의 pH를 0.1N HCl로 4.5, 5.5, 6.5로 조정하여 균의 증식과 pH 변화를 측정하였다. 배양 조건은 35°C, 100rpm의 진탕 배양기에서 24시간 배양하였다. 그리고 maltose의 함유량(0~2%)에 따른 유산균의 배양특성도 35°C, 100rpm의 진탕 배양기에서 24시간 배양하여 시간대별로 측정하였다. 이때 균의 증식은 spectrophotometer(Shimadzu Co. UV-1201)를 이용하여 흡광도 660nm에서 관찰하였다.

3. pH 및 적정 산도

1) pH 측정

Sourdough 액체 배지 100ml에 균주 배양액 5%를 접종하여 24시간 동안 35°C, 100rpm의 진탕 배양기에서 배양하면서 시간대별로 pH meter(Corning 345)를 이용하여 배양액의 pH를 조사하였다.

2) 적정 산도

시료 10ml를 취하여 증류수로 희석한 후, 0.1N-NaOH로 적정하여 산도를 산출하였다. 지시약으로는 페놀프탈레인(0.15% in 70% ethyl alcohol)을 사용하였다. 산도는 다음 식에 의하여 lactic acid의 percentage로 환산하였다.

$$\text{Lactic acid(\%)} = \frac{\text{ml of 0.1N-NaOH} \times 0.009}{\text{Weight of sample(g)}} \times 100$$

1ml 0.1N NaOH = 0.0090g lactic acid

4. 생균수 측정

Sourdough 배지에 접종균을 2차 계대 배양한 후 배양액 5%를 접종하여 균주를 35°C에서 24시간 배양하면서 시간대별로 시료를 단계적으로 10배수 희석하여

희석된 시료를 sourdough 한천배지에 도말하여 35°C에서 24시간 배양한 후 형성된 집락을 계수하였다.

결과 및 고찰

1. 유산균주의 배양 특성

Sourdough broth의 초기 pH를 5.6으로 조절하여 *Lactobacillus brevis* UC-22를 접종하여 35°C, 100rpm에서 24시간동안 진탕 배양하면서 균의 성장 정도와 pH 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 배양 4시간부터 대수 증식기에 접어들어 16시간 후에 최대 증식을 나타내었으며, 이때 pH는 산의 생성으로 3.5 정도로 저하되었다. 즉, pH는 균 접종후 16시간까지는 약 3.8까지 급격한 감소를 보인 후 큰 변화는 없었으며 흡광도는 접종 후 16시간까지 대수기이며 그 이후에는 일정한 양상을 나타내었고 이에 병행하여 산 생성량도 균주의 대수

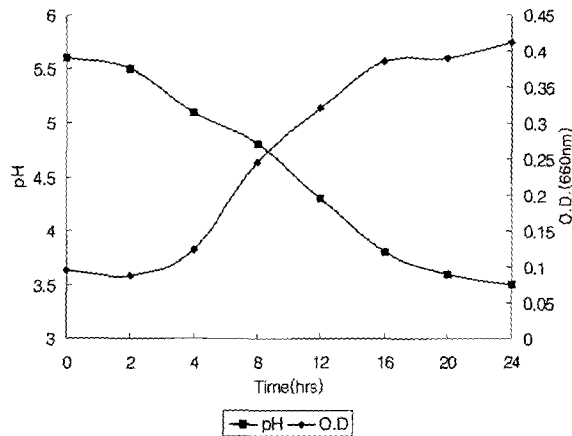


Fig. 1. Cell growth and change of pH by *Lactobacillus brevis* UC-22 in sourdough medium.

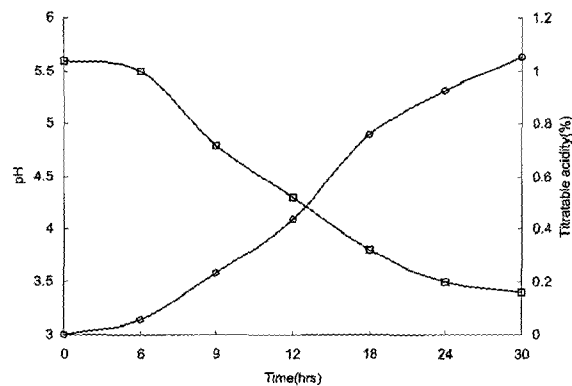


Fig. 2. Changes of pH and acidity of the *Lactobacillus brevis* UC-22 in sourdough medium.

증식기에서 활발하게 분비되는 것을 알 수 있었다. 즉, 18시간에 0.8% 정도로 적정 산도를 나타내었다(Fig. 2). 장 등¹³⁾에 의하면 이상 발효를 하는 *Lactobacillus brevis*가 산 생성량이 가장 많았다고 보고하고 있으며 Lonner 등¹⁴⁾은 sourdough 라이맥빵에 이용되는 유산균 중 이상 발효균이 sourdough 빵의 품질에 영향을 미친다고 발표하였다. 따라서 이상 발효균인 *Lactobacillus brevis* UC-22의 pH가 낮게 나타나고 산 생성량도 증가한 것은 젖산 이외에 초산을 생성하여 pH가 저하된 것으로 사료된다.

2. 온도, pH 및 당농도에 따른 유산균의 배양 특성

Lactobacillus brevis UC-22의 배양온도를 25°C, 35°C, 45°C로 조절하여 균의 증식에 미치는 온도의 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 35°C에서 배양한 것이 pH의 저하 및 증식이 가장 양호하였으며 다음은 25°C, 45°C의 순으로 나타났다. Fig. 4는 sourdough broth의 pH를 4.5, 5.5, 6.5로 조절하여 균주를 접종하여 35°C에서 배양하면서 균 증식에 의한 성장 정도를 나타내었다. 배지의 pH가 4.5에 비해서 pH 5.5와 pH 6.5일 때 증식이 우수하게 나타났다.

Fig. 5는 탄소원으로서 maltose와 glucose를 사용하였을 때 나타난 성장곡선이다. 두 가지의 탄소원을 sourdough 배지에 각각 2%를 첨가하여 나타난 성장곡선은 glucose를 탄소원으로 첨가한 배지에서 약간 높은 성장 정도를 보였지만 많은 차이는 보이지 않았다. *Lactobacillus brevis* 균주에서 maltose를 탄소원으로 이용하는 것이 매우 효과적이며 glucose에 억제를 받지 않는다. Neubauer 등¹⁵⁾에 의해 분석된 것은 *Lactobacillus brevis*는 maltose를 섭취하고 glucose를 내놓는

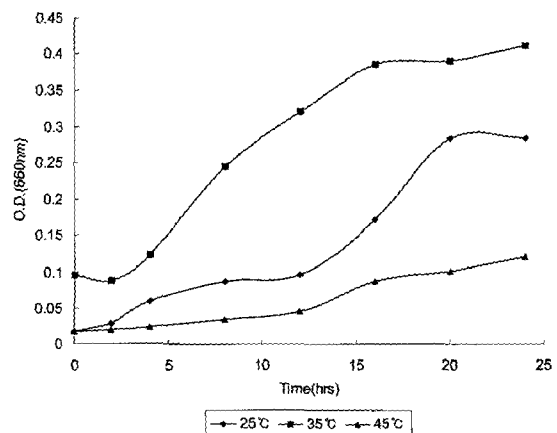


Fig. 3. Effect of incubation temperature on growth of *Lactobacillus brevis* UC-22.

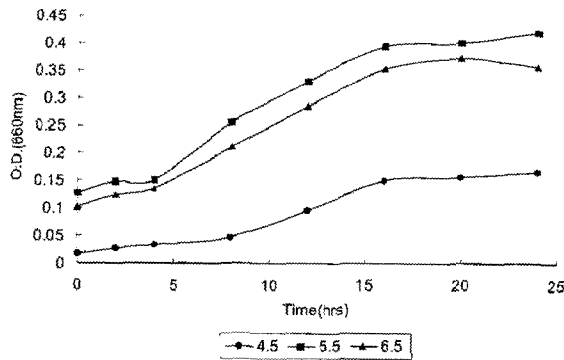


Fig. 4. Effect of pH on growth of *Lactobacillus brevis* UC-22.

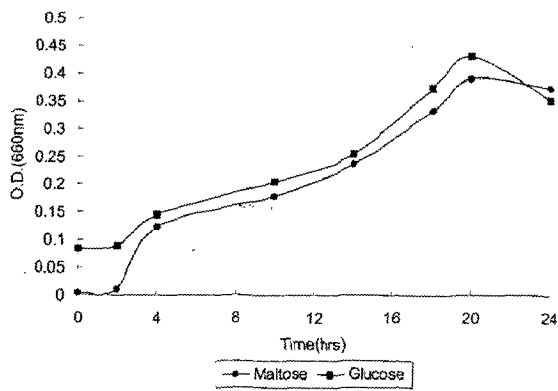


Fig. 5. Effect of carbohydrate source on growth of *Lactobacillus brevis* UC-22.

다고 보고했다. 그리고 이 유산균은 maltose를 분해하여 대략적으로 maltose와 glucose를 1:1 비율로 배지에 축적시킨다. Maltose가 결핍이 되면 배지 내로 내어놓은 glucose를 소비하기 시작한다. 이것은 sourdough 발효시 glucose의 배설은 *S. exiguus*와 같은 균주가 사용하든지 아니면 glucose repression에 의한 maltose 사용으로부터 경쟁적인 관계를 피하기 위한 *Lb. brevis*의 생태학적인 장점이다.

Fig. 6은 maltose 농도에 따른 젖산균수의 변화를 보면 maltose 첨가에 따라 젖산균수가 증가하는 경향이 있었고 2%의 maltose를 첨가하였을 때 가장 높은 생균수를 보였다. *Lb. brevis* UC-22의 경시적인 변화를 보면 접종 후 5시간부터 log phase가 시작되어 17시간까지 지속된 후 균수가 점차로 감소함을 보였다.

Hansen 등¹⁶⁾은 이상 발효균인 *lactobacilli*를 이용한 sourdough 발효는 동종 발효균인 *lactobacilli*의 발효보다 높은 산 생성량과 아세트산 그리고 양호한 공생관계와 기타 발효 생산물을 만들어낸다고 하였다. 따라서 우리나라 전통적인 발효식품인 김치로부터 분리한

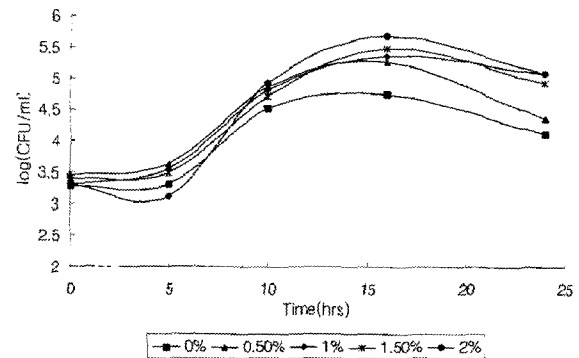


Fig. 6. Effect of concentration of maltose on growth of *Lactobacillus brevis* UC-22.

Lb. brevis UC-22의 경우 sourdough starter의 주 종균으로의 활용이 가능하였다.

요 약

Sourdough 빵을 생산하기 위해 사용되는 유산균종 *Lb. brevis*는 높은 산 생성율과 단백질 분해 활성과 sourdough 발효중 발생되는 휘발성 화합물의 합성에 뚜렷하게 기여를 하여 많이 사용되고 있다. 따라서 본 실험은 김치에서 분리한 유산균을 sourdough starter로 사용하기 위한 첫 번째 단계로서 *Lactobacillus brevis* UC-22의 배양 특성 및 최적 성장조건을 조사하였다.

온도에 따른 증식은 35°C에서 배양한 것이 pH의 저하 및 증식이 가장 양호하였으며 이에 병행하여 산 생성량도 균주의 대수 증식기에서 활발하게 분비되는 것을 알 수 있었다. 배지내의 pH에 따른 균의 생장은 pH 5.5와 pH 6.5일 때 증식이 우수하게 나타났다. *Lb. brevis*의 특징적인 탄소원 이용은 glucose보다는 오히려 maltose를 더 선호하는 경향이 있다고 하였으나 본 실험에 사용된 *Lactobacillus brevis* UC-22는 maltose와 glucose의 첨가에 따른 성장 정도는 큰 차이점을 보이지 않았다.

감사의 말

본 연구는 2001년 산학연 컨소시엄 연구비 지원에 의하여 이루어졌으며 울산과학기술대학 산학연 컨소시엄 관계자 여러분에게 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Corsetti, A., Gobbetti, M., Balestrieri, F., Paoletti, F., Russi, L. and Rossi, J. : Sourdough lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling. *J. Food Sci.*, **63**(2), 347~351 (1998a).
2. Hammes, W. P. and Gänzle, M. G. : Sourdough breads and related products. In: Woods, B. J. B. (Ed), *Microbiology of Fermented Foods*, vol. 1. Blackie Academic and Professional, London, 199~216 (1998).
3. Vogel, R. F., Knorr, R., Müller, M. R. A., Steudel, U., Gänzle, M. G. and Ehrmann, M. : Non-dairy lactic fermentations: the cereal world. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76**, 403~411 (1999).
4. Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J. and Damiani, P. : Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 253~256 (1998b).
5. Chamberlain, N., Collins, T. H. and McDermott, E. E. : α -amylase and bread properties. *J. Food Tech.*, **16**, 127~152 (1981).
6. Kline, L. and Sugiharha, T. F. : Microorganism of the Sanfrancisco sourdough process. II. Isolation and characterization of underscribed bacterial species responsible for the souring activity. *Appl. Microbiol.*, **1**, 459~465 (1971).
7. Sugiharha, T. F. and Kline, L. and McCready, L. B. : Nature of the Sanfrancisco sourdough French bread process. II. Microbiological aspects. *Bakers Digest*, **44**, 51~57 (1970).
8. Sugiharha, T. F. and Kline, L. : Microorganism of the Sanfrancisco sourdough process. I. Yeast responsible for the leavening action. *Appl. Microbiol.*, **21**, 456~458 (1971).
9. Sugiharha, T. F. : Microbiology of the soda cracker process. I. Isolation and identification of microflora. *J. Food Protection.*, **41**, 977~979 (1978).
10. Martinez-amaya, Pitarch, B., Bayarri, P. and Benedito de barber, C. : Microflora of the sourdoughs of wheat flour bread. X. interactions between yeast and lactic acid bacteria in wheat doughs and their effects on bread quality. *Cereal Chem.*, **67**, 85~91 (1990).
11. Galal, A. M., Johnson, J. A. and Varriano-Marston, E. : Lactic acid volatile(C2~C5) organic acids of Sanfrancisco sourdough french bread. *Cereal Chem.*, **55**, 461~468 (1977).
12. Kline, L. and Sugihara, T. F. : Microorganism of the Sanfrancisco sour dough process. II. Isolation and characterization of underscribed bacterial species responsible for the souring activity. *Appl. Microbiol.*, **1**, 459 (1971).
13. 장준영, 안재범 : 빵의 품질에 미치는 유산균의 영향, *한국식품영양학회지*, **9**(4), 509 (1996).
14. Lonner, L. and Preve-Akesson, K. : Effects of lactic acid bacteria on the properties of sourdough bread, *Food Microbiol.*, **6**, 19 (1989).
15. Neubauer, H., Glaasker, E., Hammes, W. P., Poolman, B. and Konings, W. N. : Mechanism of maltose uptake and glucose excretion in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J. Bacteriol.*, **176**, 3007~3012 (1994).
16. Hansen, A., Lund, B. and Lewis, M. J. : Flavour production and acidification of sourdoughs in relation to starter culture and fermentation temperature. *Lebensm. Wiss. u. Technol* **22**, 145~149 (1989).

(2002년 7월 2일 접수)