

김치로부터 분리한 유산균과 효모 혼합 발효액의 제빵 최적화

신 언 환 · 정 성 제*

울산과학대학 호텔조리과, *경희대학교 식품공학과

Optimization of Bread Fermentation with Lactic Acid Bacteria & Yeast Isolated from Kimchi

Eon-Hwan Sihm and Sung-Je Jung*

Department of Hotel Culinary Arts, Ulsan College

*Department of Food Engineering, Kyunghee University

ABSTRACT

The studies were carried out to optimize a new starter for bread fermentation. Two strains of lactic acid bacteria and yeast were isolated from Kimchi. These strains showed good condition for quality bread fermented. The strains identified as *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces fermentati* and *Saccharomyces cerevisiae*. The mixed culture of four strains was due to the synergistic effect by interaction of these strains.

Key words : starter, lactic acid bacteria, mixed culture.

I. 서 론

스타터는 미생물을 이용한 식품의 제조, 가공시 첨가되는 생균체 또는 균복합체이다. 그러므로 starter라는 용어는 한가지로 사용되어도 적용되는 식품의 종류에 따라 그 균체의 조성 및 제조 방법은 상당히 다르다. 현대적 제빵공정은 발효과정에 효모가 주된 작용을 하고 있음을 밝혀낸 후로 제빵에 적합한 단일 효모(*S. cerevisiae*)만을 선별, 정제하여 사용하며 이러한 방법에 의해 생산 효율이 급격히 증가하는 효과를 얻게 되었다. 그러나 전통적인 제빵법에서 적용되는 자연발효 제법에는 여러 종류의 효모 및 유산균이 발효과정에 관여하여 다양한 종류의 생리활성 물질이 만들어질 뿐만 아니라 맛과 향을 대폭 개선할 수 있음이 보고된 후 유럽을 중심으로 각 나라별 특징적인 자연 발효 종균을 개발하여 제품에 적용하고 있다. Galal⁷⁾ 등은 빵의 상업적 수명은 보통 2일로 알려져 있는데 유산균에 의하여 생성된 유기산들은 빵의 풍미에

미치는 영향이외에도 글루텐 단백질의 팽윤을 도와줘 가스 보유력을 높여 조직감이 좋고 체적이 큰 제품을 생산하며 노화가 억제되어 보존성 향상에 큰 효과가 있어 천연 제빵 개량제로서의 역할이 가능하다고 알려져 있다. 유산균 발효는 영양소의 양과 이용율, 소화율, 동화율을 증가시킴으로써 식품의 영양가를 개선시킨다. 또한 많은 생리 활성 물질로서의 역할을 가진 유산균은 효과가 인정되기 때문에 빵 제조에 이용한다면 제빵개량제로서의 역할 이외에도 생리 활성적인 면에서도 이점을 가질 것으로 생각된다.

우리나라의 제빵 산업은 자생적인 것이 아니라 '50년대 이후 무상 원조된 밀가루의 도입으로부터 시작되었기에 제빵용 이스트가 개발되기 이전 단계인 자연발효 제법 자체가 없이 현대적 대량, 신속 생산 제법만 소개되었고 공법의 발전 없이 생산량의 증가만을 기록하는 양적인 성장만을 해왔다. 제빵 시장이 포화 상태로 접어든 현재 일부 제빵 업체가 제품의 고급화를 위해 이에 주목하고 있으나 수입된 종균의 경우 제빵 산업 현장에서 다루기가 쉽지 않으며 신 맛의 강도 조절이 어렵다는 문제를 갖고 있다. 따라서 우리의 입맛에 잘 맞고 우리의 제빵 현실에 적합한 자연발효 종균을 개발하려면 빵 반죽의 자연 발효에 관여하는 1~2종의 자연 효모와 5~10종에 이르는 유산균의 최적 조합 및 최적 배양조건을 찾아 관능적으로 검증되어야 하는 복합적 연구 과제를 수행하여야 한다. 또한 현재의 생산 효율을 고려하여 현실적으로 적용 가능한 자연발효 제법의 개발도 동시에 개발되어야 한다. 한국적 자연 발효종균이 개발되면 제빵의 건강, 기능성 및 고급화를 구현할 수 있고 세계적으로도 우리의 독특한 자연 발효빵을 특화 상품으로 소개할 수 있을 것으로 전망된다. 아울러 자연효모 및 유산균 복합체의 발효 과정에 대한 조사중 배지 조성에 따른 기능성 성분의 변화에 대한 기술이 축적되어 관련이 있는 식품 가공분야로 확대가 가능하다. 본 실험은 한국의 전통 식품인 김치로부터 유산균과 효모를 분리하여 분리균주의 혼합 배양액을 이용하여 제빵 공정의 최적화에 관하여 연구하였다.

II. 재료 및 실험방법

1. 실험재료

1) 사용 균주

본 실험에 사용된 균주는 전북 순창 지역 전통 발효식품 제조업체에서 숙성 완료된 김치류 2종을 수집하여 저온 숙성 중 좋은 향과 적당한 유기산을 생성하는 김치에서 유산균과 효모를 분리하여 사용하였다.

2) 유산균 배양액의 제조

배양액의 제조는 Sugihara¹⁴⁾를 참고하여 사용하였다. 밀가루 10%의 물의 현탁액 (59g의 밀가루에 590ml의 물을 가함)에 밀가루 g당 1×10^7 의 유산균을 각각 또는 혼합 접종하여 액종을 만들었다(starter culture 20ml, powder form 0.5g). 이 배양액의 탄소원으로 10g/L glucose(Difco, U.S.A.), 질소원으로 3g/L의 peptone(Difco, U.S.A.), 3g/L의 yeast extract(Gist-brocades, Netherland), 3g/L의 beef extract(Difco, U.S.A.)를 사용하였고, 탄소원과 질소원의 복합적인 소재인 skim milk(서울우유)는 100g/L를 사용하였다. starter culture는 접종 전 30℃의 온탕에서 급속 해동한 후 사용하였고 배양액은 30~32℃의 배양기에서 16시간 발효시켰다. 발효 종점의 pH는 3.8 이었다.

3) 제빵 원료

제빵실험에 사용한 재료는 소맥분(삼양사 강력분 1등급), 생이스트(제니코), 정백당(삼양사), 쇼트닝(삼립웰가) 이스트후드(제니코), 탈지분유(서울우유) 및 정제염(삼한염업)이었다.

2. 균주의 분리 및 식별

저온성 LAB 분리 및 계수를 위해 1% peptone water를 사용하여 $10^1 \sim 10^8$ 농도로 희석하고 그 희석액 1ml를 취하여 plate count agar(PCA)로 평판 배양한 후 저온 숙성온도인 5~7℃에서 120시간 배양하여 나타난 colony의 수를 계수하여 저온성 총균수로 하였다. 총균수 측정을 위해 총균수 측정이 종료된 plate를 30℃에서 72시간 더 배양하여 추가로 나타나는 colony를 총균수로 하였다. 저온성 총균수 측정과 동일한 방법으로 MRS broth에 0.002% bromophenol blue를 첨가한 배지에 25℃에서 72시간 배양하여 나타난 colony를 관찰, 환이 없고 짙은 청색을 띄는 것을 *Leuconostoc*으로 계수하였고 환이 있거나 청색 또는 흰색을 띄는 colony를 *Lactobacillus*로 구분하여 계수하였다. m-entrococcus agar(Difco)를 사용하여 백색의 colony는 *Pediococcus*로, 적색은 *Streptococcus*로, 핑크색은 *Aerococcus*로 계수하였다. 이상의 작업은 3회 반복하여 평균치를 구하였다. 효모는 yeast-malt extract agar(YM)를 사용하여 LAB와 동일한 방법으로 계수하였다.

선별된 균주를 200ml의 MRS broth에 0.5g 접종하여 30℃에서 16~20시간 진탕 배양 증식시켰다. 완전히 증식된 MRS broth 10ml를 멸균 tube에 넣고 8000×g, 8min 원심분리하여 균체를 얻었다. 균체에 MRS broth : glycerol(5 : 1) 비율로 구성된 freezing media 5ml를 넣고 Vortex mixer로 잘 섞어 준 후 cryo tube에 넣어 즉시 -40℃로 냉동하였다(3min). 냉동된 균주는 이 후 유산균 접종을 위한 starter로 사용되었다.

3. 식빵의 제조

식빵 제조원료의 배합은 예비실험을 통하여 <Table 1>과 같이 결정하였다. 반죽은

〈Table 1〉 Recipe of standard bread

Ingredients	Flour basis(%)
Bread flour	100.0
Water	58.0
Fresh yeast	2.0
Sugar	8.0
Milk solid non fat	3.0
Butter	3.0
Salt	2.0
Preferment	25.0

spiral mixer (Maximat, Germany)에 전재료와 각각의 preferment를 투입하여 저속 1분, 고속 12분 반죽하여 글루텐을 완전히 형성시켰으며 이때 반죽온도는 27℃였다. 형성된 반죽은 온도와 상대습도를 27℃, 80%로 맞춘 1차 발효실에서 2시간 발효시킨 후 꺼내 생지를 300g씩 분할하여 파이롤러를 사용하여 개스를 뺀 다음 성형하여 2개 즉 600g을 팬에 넣고 38℃, 상대습도 85% 2차 발효실에서 40분 proofing시키고 전기오븐(대영, Korea)에 넣고 밑불 220℃, 윗불 200℃에서 30분간 구운 후 꺼내 실온에서 식힌 다음 PE film 봉지에 넣어 상온에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

4. 식빵 특성 분석

1) 유기산 함량

유기산 분석을 위하여 HPLC를 사용하였다. 이용된 이동상은 0.15% phosphoric acid를 사용하여 0.3ml/min 속도로 용출하였으며, 정량은 integrator에 계산된 시료의 peak 면적을 표준의 물질과 비교하여 결정하였다.

2) Softness

preferment의 종류를 달리하여 제조한 식빵의 crumb softness는 rheometer (Compac-100, Sun Scientific Co., LTD. Japan)를 사용하여 측정하였다. 측정 시료는 중앙의 50(H)×50(W)×50(D)mm 부위를 잘라 사용하였다. 원추형 플러그를 사용하였으며 설정값은 mode-2, scale-1kg, table speed 120mm/min, chart speed 60mm/min, set depth 70mm, Chart range 200×1(mv)로 하였다.

3) Volume

식빵의 부피는 loaf volumeter(National Cereal Chemistry Equipment, U.S.A.)를 사용하여 구하였다.

5. 관능검사

제품의 평가는 장⁴⁾의 방법을 기초로 숙달된 10명의 관능검사원이 5회 반복하여 평가한 후 그 평균을 내는 scoring test를 이용하여 외관(appearance), 조직(texture), 풍미(flavor), 맛(taste), 저작감(mastication)등으로 설정한 후 실시하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 전통 발효 식품으로부터 균주의 분리 및 선별

우리나라의 전통 발효식품은 장류 및 김치류로 대표되며 발효과정에 주로 작용하는 미생물 균을 살펴보면 장류는 효소활성이 높은 곰팡이류에 의하여 숙성이 진행되고 김치류는 유산균(lactic acid bacteria, 이하 LAB)에 의하여 숙성이 진행되는 특징을 갖고 있다. 특히 김치류는 저온에서 장시간 진행되는 발효과정을 통하여 독특한 맛과 향을 생성한다고 보고되어있다.^{1,2,5,6)} 특히 우리나라의 김치류에서 발견되는 LAB은 낙농제품에서 발견되는 LAB와는 동종간에도 상당히 다른 생리적 특성을 갖고 있는 것으로 보고³⁾되고 있다. 김치의 경우 산도와 pH의 영향으로 장류와는 달리 곰팡이류가 거의 검출되지 않았다. 우점종은 LAB로 나타났다(Table 2).

<Table 2> Cell number of LAB and yeast from ripening kimchi(CFU/ml)

Identification	Kimchi - 1	Kimchi - 2
<i>Lactobacillus</i> spp.	1×10 ⁶	1×10 ⁷
<i>Leuconostoc</i> spp.	1×10 ²	1×10 ⁴
<i>Pediococcus</i> spp.	1×10 ³	1×10 ²
<i>Streptococcus</i> spp.	1×10 ⁶	1×10 ⁷
<i>Aerococcus</i> spp.	ND*	1×10 ¹
Yeasts	1×10 ²	1×10 ⁴

* ND : not detect.

제빵용으로 분리하려는 주종균이 LAB와 Yeast이므로 이상에서 개략적으로 순수 분리된 LAB 20균주에 임시번호를 부여하였고 Yeast는 4종을 대상으로 제빵 실험시 유사한 환경으로 design된 modified sourdough 배지를 사용하여 제빵 적합성 여부를 판단한 후 적합하다고 판정된 균주를 세부적으로 분리 동정하였다. modified

sourdough 배지의 배양온도는 5℃, 16℃, 27℃, 38℃로 설정하였다. 5℃는 김치의 저온 숙성 온도, 16℃는 제빵 가공시 저온 발효에 최적이라는 보고¹⁰⁾에 따라 설정된 온도이며 27℃, 38℃는 각각 제빵 공정에서 표준 1차, 2차 발효 온도에 설정 근거를 두었다. 각 설정 온도별로 modified sourdough broth 5ml에 분리균주 1 백균이를 접종하고 5℃, 16℃에서 배양한 것은 120시간 / 27℃, 38℃에서 배양한 것은 72시간 배양 후 optical density(600nm) 측정으로 각 온도에서 모두 성장이 우수하다고 판단된 균주를 선발하였으며 이들중 LAB는 균속으로 분리된 균주를 대상으로 순수분리한 후 Gram 염색과 catalase 반응을 확인한 다음 API identification kit로 동정하였고 효모는 현미경 관찰로 형태를 확인한 후 vitek system yeast biochemical card를 이용하여 동정하였다. 결과는 <Table 3>과 같다.

제빵 환경에서 생육 조건이 좋은 것으로 나타난 저온 숙성 김치의 LAB는 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Lactobacillus brevis*의 2종이 선별되었고 Yeast는 *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces cerevisiae* 2종이 선별되었다. 선별된 LAB는 각각 200ml의 MRS broth에 접종하였고 Yeast는 YM broth에 각각 접종하여 30℃에서 16~20시간 진탕 배양 증식시켰다. 완전히 증식된 각각의 broth 10ml를 멸균 tube에 넣고 8000×g, 8min 원심분리하여 균체를 얻었다. 균체에 broth : glycerol(5 : 1) 비율로 구성한 freezing media 5ml를 넣고 Vortex mixer로 잘 섞어 준 후 cryo tube에 넣어 즉시 -40℃로 냉동하였다. 냉동된 균주는 이 후 실험을 위한 starter로 사용되었다.

2. 배양액 Formular 설정

일반 미생물 배양에 사용되는 배지를 직접 제빵 공정에 적용하기에는 소재의 식용 여부 문제와 가격 문제로 직접 적용이 불가능하므로 제빵공정에 맞도록 배양액의 성분 조성을 구성하여야 한다.

본 연구에서는 장시간 발효에 의해 만들어지는 salt'n cracker의 제조에서 LAB와 yeast의 혼합 배양 및 증식에 양호한 결과를 보여준 Sugihara¹⁴⁾의 방법을 기초로 하여 분리된 균주의 혼합 배양에 최적인 배양액 조성을 결정하였고 이 후 실험에 일관되게 적용하였다. 배양액 조성은 밀가루 10%의 물의 현탁액을 만들고 탄소원으로 10g/L glucose, 10g/L maltose, 탄소원과 질소원의 복합적인 소재인 skim milk(서울우유)는 100g/L를 사용하였다. 냉동 starter culture는 접종 전 30℃의 온탕에서 급속 해동한 후 밀가루 g당 1×10^7 을 각각 또는 혼합 접종하여 액종을 만들었다.

(냉동 culture 20g) 배양액은 30~32℃의 배양기에서 16시간 발효시켰다. 각각을 단독으로 배양하였을 경우와 혼합하여 배양하였을 경우의 성장 곡선은 <Fig. 1>과 <Fig. 2>와 같다. 단독 혼합 모두 최종 단계에서 균체별 증식 및 오염 여부를 검사하였을 경우 우점종으로서 양호한 증식 양상을 보여 주었다. 혼합 배양시에는 배양 시간에

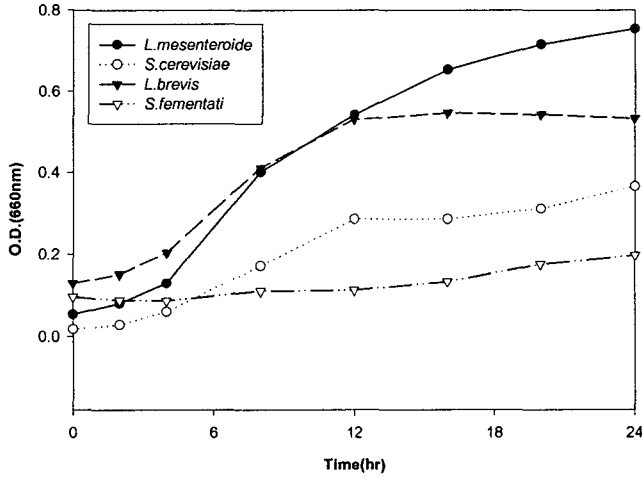
〈Table 3〉 Identification of strains and fitness of bread on temporary number

No. ^{*1)}	Temp. ^{*2)}				Identification
	5℃	16℃	27℃	38℃	
L-1	-	-	-	-	
L-2	+	+	+	+	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
L-3	-	-	+	+	
L-4	+	+	+	+	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
L-5	-	-	-	-	
L-6	-	-	-	-	
L-7	-	-	-	-	
L-8	-	-	-	-	
L-9	+	+	+	+	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
L-10	-	-	-	-	
L-11	-	-	-	-	
L-12	-	-	-	-	
L-13	-	-	-	-	
L-14	-	-	-	-	
L-15	-	-	-	+	
L-16	+	+	+	+	<i>Lactobacillus brevis</i>
L-17	+	+	+	+	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
L-18	+	+	+	+	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
L-19	-	-	-	+	
L-20	-	+	+	+	<i>Lactobacillus brevis</i>
Y-1	-	+	+	+	<i>Saccharomyces fermentati</i>
Y-2	-	+	+	+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y-3	-	-	+	+	
Y-4	-	-	-	-	

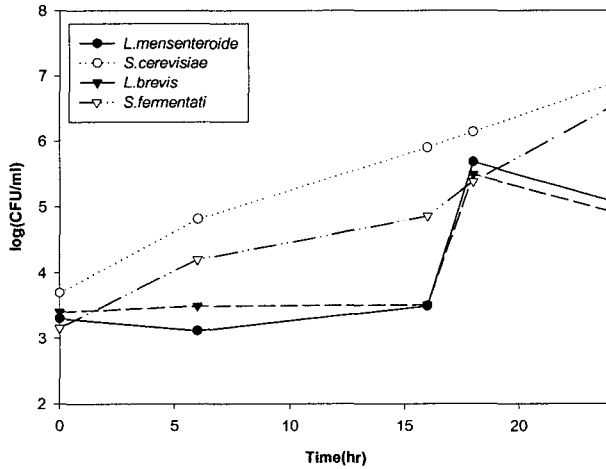
*1) L-No.: LAB, Y-No.: Yeast

*2) Temp. : incubation temperature of modified sourdough medium.

따라 일정하게 증식하는 yeast와는 달리 LAB는 일정 시간(약 16시간) 후 급격하게 증식하는 것으로 나타났다. 이것은 yeast와 LAB의 co-work system에 의한 것으로 보인다. 여러 sourdough 연구에 따르면 *S. exiguus*와 *L. sanfrancisco*의 조합은 Sanfrancisco french bread¹³⁾, Panettone⁸⁾에서 대표적이며 *S. cerevisiae*와 *L. sanfrancisco*의 조합은 gluten-free sourdough, 연속 발효 sourdough system에서도 유사한 경우를 볼 수 있다.^{12),16)} *L. sanfrancisco*와 우점종 sourdough 효모(*S. exiguus* 또는 *S. cerevisiae*)간의 영양적 관계는 양쪽의 협동적 배양 model system으로 알려져 있다.



<Fig.1> Growth curve of single culture on the strains.



<Fig. 2> Growth curve of mixed culture on the strains.

이 경우 협동적 co-work system의 주요 사항은 *L. sanfrancisco*의 증식을 위해 Yeast에 의해 생성된 특정 amino acid, small-peptide가 필요하다는데 있다. 알코올 음료에서도 *S. cerevisiae*는 증식중이거나 자가분해가 촉진될 때의 일환으로 이러한 질소원을 방출한다고 보고되어 있다.^{11,15)} 효모에 의한 아미노산의 방출은 처음 필수 아미노산(valine, isoleucine)이 부족한 배지에 있던 LAB의 증식을 가능하게 해준다.⁹⁾ 따라서 본 실험을 통해 선별된 LAB와 Yeast의 조합도 자연 발효에 충분히 이용될 수 있음을 추정할 수 있다.

3. 제빵 적성 검사

실험에서 얻어진 혼합 발효액으로 제빵 적성을 측정하기 위해 배양액의 유기산 함량, 식빵의 softness, volume을 조사하였다(Table 4). 대조군보다는 유기산 함량은 32% 정도 감소하였고 softness도 감소함을 보이고 부피는 증가함이 관찰되었다. <Table 5>에 나타난 관능검사결과 대부분 혼합 배양액으로 제조된 식빵의 점수가 대조군에 비해 좋게 나오는 것으로 보아 LAB + Yeast의 혼합 발효액의 제빵적성은 양호한 것으로 판단된다.

<Table 4> Characteristics of mixed fermentation culture

	Organic acid ($\mu\text{g/ml}$)	Softness (g/cm^4)	Volume (ml)
Control	164	120	782
LAB + Yeast	112	105	825

<Table 5> Sensory score of the bread added with mixed strains

Characteristics	Perfect score	Control	LAB + Yeast
External			
Volume	10	8	9
Color of crust	8	6	7
Symmetry of form	3	2	3
Evenness of baking	3	3	3
Break and shred	3	3	3
Character of crust	3	3	3
Internal			
Grain	10	8	9
Color of crumb	10	9	8
Aroma	10	7	8
Taste	15	12	13
Mastication	10	7	8
Texture	15	11	12
Total score	100	79	86

IV. 요약

김치로부터 유산균과 효모를 분리하여 분리균주의 혼합 배양액을 이용하여 제빵

공정의 최적화에 관하여 연구하였다. 김치로부터 젖산박테리아(lactic acid bacteria)를 분리하여 제빵 환경에서 생육 조건이 좋은 것으로 나타난 저온 숙성 김치의 젖산균은 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Lactobacillus brevis*의 2종이 선별되었고, yeast는 *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces cerevisiae* 2종이 선별되었다. 분리된 4종의 균주를 적절하게 혼합배양시 co-work system을 형성하여 발효촉진의 효과를 보여주었다.

참고문헌

1. 김현옥, 이혜수 (1975) : 숙성온도에 따른 김치의 비휘발성 유기산에 관한 연구. *한국식품과학회지*, 7, 74.
2. 민태익, 권태완 (1984) : 김치발효에 미치는 온도 및 식염농도의 영향. *한국식품과학회지*, 16, 443.
3. 소명환, 김영배 (1995) : 김치에서 분리한 저온성 젖산균의 배양특성. *한국식품과학회지*, 27(4), 506.
4. 장건형 (1987): 식품의 기호성과 관능검사, 개문사, 서울.
5. 조영, 이혜수 (1991a) : 젖산균과 온도가 김치발효에 미치는 영향(I), *한국조리과학회지*. 7(1), 15.
6. 조영, 이혜수 (1991b) : 젖산균과 온도가 김치발효에 미치는 영향(II), *한국조리과학회지*. 7(2), 89.
7. Galal AM, Johnson JA and Varriano-Marston E (1977) : Lactic acid volatile (C2-C5) organic acids of Sanfrancisco sourdough french bread. *Cereal Chem*, 55. pp.461-468.
8. Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J, La Rosa F and De Vincenzi S. (1994a) : Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeast from wheat sourdoughs of central Italy. *Ital J Food Sci* 1, 85-94.
9. Gobbetti M, Corsetti A and Rossi J (1994b) : The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. *World J Microbiol Biotechnol* 10, 276-279.
10. Kazuko Hosomi, Nishio K and Matsumoto H (1992) : Studies of frozen dough baking. 1. Effects of egg yolk and sugar ester. *Ceral Chem*. 69(1):89-92.
11. Lyons TP and Rose AH (1977) : Whisky. In *Alcoholic Beverages* pp.635-692. London Academy Press.
12. Spicher G, Rabe E and Sommer R (1982) : Communication on the behaviour of heterofermentative sourdough bacteria and yeast in mixed culture. *Z. Lebensm.*

Unters. Forsch. 174, pp.222-227.

13. Sugihara TF, Kline L and McCready LB (1970) : Nature of the SanFrancisco sour dough french bread process. II. Microbiological aspects. *Bakers digest.* 44, 51-56
14. Sugihara TF (1978) : *J of Food Protection* 41(12), pp.980-982.
15. Thorne, RS (1967) : Brewers' yeast. In *Yeast* (Ed Roman, W.) pp.79-113, The Hague, Junk.
16. Włodarczyk M, Jezynska B and Warzywoda A (1993) : Associated cultures of lactic acid bacteria and yeast as starters in gluten-free bakers leavens. *Polish J Food Nutr Sci* 2/43(1), pp.83-91.

(접수일: 2003년 8월 3일 / 채택일: 2003년 8월 25일)