

Article

이상발효유산균과 내산성 효모와의 혼합배양이 사워도우의 저장성에 미치는 영향

임은서*

동명대학교 식품영양학과

Effect of the mixed culture of heterofermentative lactic acid bacteria and acid-tolerant yeast on the shelf-life of sourdough

Eun-Seo Lim*

Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University, Busan 48520, Republic of Korea

(Received November 30, 2016; Revised December 19, 2016; Accepted December 19, 2016)

ABSTRACT: The primary objective of this study was to investigate the effects of the bacteriocin-producing heterofermentative lactic acid bacteria (LAB) and acid-resistant yeast isolated from Mukeunji, a Korean ripened kimchi on shelf-life extension and quality improvement of sourdough. According to gene sequence analysis the heterofermentative LAB that showed the antimicrobial activity against bread-spoilage *Bacillus* strains were identified as *Leuconostoc mesenteroides* LAS112, *Lactobacillus brevis* LAS129, and *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LAB137. In addition, the yeasts that were able to grow at acidic pH were identified as *Pichia membranifaciens* YS05, *Pichia fermentans* YS19, and *Pichia anomala* YS26. During sourdough fermentation the levels of acetic acid and bacteriocin produced by *L. brevis* LAS129 strain were higher than those of *L. mesenteroides* LAS112 and *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LAS 137 strains, whereas LAS112 strain produced the highest levels of lactic acid. The maximum bacteriocin activity (640 AU/g) against *Bacillus subtilis* ATCC 35421 was obtained in sourdough fermented by mixed culture of *L. brevis* LAS129 and *P. membranifaciens* YS05 or *P. anomala* YS26. After 24 h of fermentation at 30°C, the viable cell counts of LAS129 (10^9 CFU/g) in sourdough were higher than those of the YS05 or YS26 (10^7 CFU/g). Meanwhile, the viable cells of bread-spoilage strain in sourdough fermented with these strains were significantly ($P < 0.05$) lower than the control group.

Key words: antimicrobial activity, bacteriocin, lactic acid bacteria, sourdough, yeast

빵의 부패와 관련된 대표적인 미생물로는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* 및 *Bacillus cereus* 등이 있으며, 이와 같은 *Bacillus*속의 일부 균종은 식중독을 유발하는 병원성균으로 알려져 있다(Collins *et al.*, 1991). *Bacillus* 속 세균은 원료(밀가루), 식품첨가물(밀가루 개량제, 팽창제) 및 제조 과정 중 환경으로부터 오염된다(Bailey and Von Holy, 1993). 이들의 포자는 내열성이므로 빵을 굽는 과정 중에도 생존 가능하며, 25~30°C 온도 하에서 수분활성도 0.95 이상이면 포자가 발아하여 점질물을 생성하게 된다. 영양세포로 전환된 세균은 빵에 이미와 이취 및 변색을 유발하고, 끈적임과 부스러짐 현상

이 발생하며, *Bacillus*균이 생성하는 전분이나 단백질 분해효소에 의한 유기물 분해와 세포 외(extracellular) 점질성 다당류의 생성에 의한 조직의 변화가 나타난다(Thompson *et al.*, 1993). *Bacillus* 속의 증식 억제 및 포자 발아를 지연시키기 위해 일반적으로 식품위생법 상에서 허용하는 합성 보존제인 프로피온산이나 초산 등을 주로 사용한다. 하지만 초산은 제빵류의 관능적 품질을 저하시키고 프로피온산은 일부 어린이에게 자극, 불안 초조, 집중력 저하 및 수면 장애를 동반하기도 한다고 알려져 있다(Dengate and Ruben, 2002). 게다가 칼슘과 결합한 형태인 프로피온산 칼슘을 과량 섭취한 경우 발암 유발 가능성이 높은 것으로 보고되고 있다(Rosenquist and Hansen, 1998).

따라서 화학 합성품을 대체할 수 있는 천연 항균제 개발이

*For correspondence. E-mail: limsm020@tu.ac.kr;
Tel.: +82-51-629-1714; Fax: +82-51-629-1709

절실히 요구되는 가운데 사워도우를 이용한 발효빵의 경우 유산균이 생산한 유기산으로 인해 pH가 낮아짐에 따라 부패균의 증식을 억제하여 빵의 저장 기간을 연장시키고 독특한 신맛을 부여함으로써 풍미를 향상시킨다(Katina *et al.*, 2006). 유산균은 유산, 초산, 이산화탄소, 디아세틸, 과산화수소 및 박테리오신 등의 다양한 대사산물을 생성하여 부패세균의 증식을 억제하는 항균활성을 나타낸다(Valerio *et al.*, 2008). 일부 유산균이 생산한 phenyllactic acid (PLA)와 ρ -OH-phenyllactic acid (OH-PLA) 등도 세균의 증식을 저해한다고 알려져 있다(Ohira *et al.*, 2004; Makras *et al.*, 2006).

한편, 박테리오신은 펩타이드성 물질로서 체내 소화효소에 의해서도 쉽게 분해되어 잔류성이 없고 부패균 및 식중독균 등 유해 미생물의 증식을 억제하는 천연 항균물질이며 오랜 기간 동안 발효식품 제조에 사용되고 있는 유산균이 생산하므로 안전성이 확보된 보존제로서 ‘Generally Recognized As Safe (GRAS)’ 물질로 등재되었다(Garneau *et al.*, 2002). 사워도우 발효 스타터로서 *Lactobacillus* 속 균주로 발효시킨 경우 박테리오신을 생산함으로써 곰팡이나 부패세균 등의 유해 미생물 증식을 억제하여 저장성을 향상시키고 빵의 조직과 향미를 개선시키며 노화를 지연시키는 등 품질을 향상시키는 것으로 보고된 바 있다(Mentes *et al.*, 2007). Corsetti 등(2004)도 사워도우 발효를 위해 박테리오신을 생산하는 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* M30을 사용한 결과, 도우의 품질 개선에 효과적이라고 하였다.

따라서 본 연구에서는 묵은지로부터 유산균을 분리하고 빵의 주요 부패균인 *Bacillus* 속에 대한 항균 활성이 있는 유산, 초산 및 박테리오신을 생산하는 이상발효유산균만을 선발 동정하였다. 분리된 유산균과의 혼합 배양으로 사워도우를 제조하기 위해 낮은 pH 환경하에서 증식 가능한 내산성 효모를 분리 동정하였고, 선발된 유산균과 효모를 이용하여 사워도우를 발효시킨 후 일정한 저장기간 동안 유산균, 효모 및 *Bacillus* 속의 균수 변화와 pH, 총산도 및 유기산 함량과 박테리오신의 활성 변화를 측정하였다.

재료 및 방법

이상발효유산균 분리 배양

가정에서 담근 후 1년 이상 숙성시킨 묵은지 시료(50 g)를 수집한 다음 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.0, 450 ml)을 가하여 약 3분간 균질화하였다. 심진 희석한 시료 용액은 1% (w/v) CaCO₃이 함유된 *Lactobacilli* MRS agar (Difco) 평판배

지에 도말한 후 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 유산 생성에 의해 집락 주변에 투명한 환을 생성하는 균주만을 모아 MRS agar 평판배지 상에서 순수분리하고 사면배지 상에서 계대 배양하였다. 유전자 염기서열 분석을 위해 전보(Lim, 2016)에 따라 DNA extraction kit (Qiagen)로 균주의 DNA를 추출 정제한 후 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 증합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 DNA를 증폭하였다. 반응 후 DNA sequencer (ABI Prism® 3730 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems)로 동정하여 이상발효 유산균주를 실험에 사용하였다.

Bacillus 속에 대한 박테리오신 생산 유산균 선발 및 동정

B. cereus ATCC 11778, *B. licheniformis* KCTC 1918, *Bacillus stearothermophilus* ATCC 10149 및 *B. subtilis* ATCC 35421 균주에 대한 분리된 유산균이 생산한 박테리오신의 항균활성은 microplate plate method (Hole *et al.*, 1991)로 측정하였다. 유산균은 MRS broth에 접종하여 37°C에서 24시간 호기적인 조건 하에서 배양 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 배양 상등액을 회수하였다. 유기산과 과산화수소의 영향을 배제하기 위해 1 N NaOH를 사용하여 배양 상등액의 pH를 6.5로 조정하고 다음 catalase (1 mg/ml, Sigma-Aldrich)를 처리하고 단백질을 침전시키기 위해 황산암모늄(60%, w/v)을 가하여 교반(4°C, overnight)하였다. 그런 다음 원심분리(12,000 × g, 30분, 4°C)하여 회수한 침전물은 20 mM PBS (pH 6.5)에 현탁시킨 후 투석(molecular weight cut-off = 1,000 Da, Spectrum Medical Industries, Inc.)하여 박테리오신 용액으로 사용하였다. 한편, *Bacillus* 속 균주들은 Nutrient broth (NB, Difco)에 접종한 후 30°C, 24시간 배양 후 얻은 배양액은 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포를 회수하고 PBS (pH 7.0) 내에서 1.0×10^5 CFU/ml로 조정하였다(Choi *et al.*, 2012). Microtiter plate well (Falcon)에 멸균된 BHI broth (900 μ l), *Bacillus* 속 세포 현탁액(50 μ l) 및 일정한 농도에 맞춘 박테리오신 용액(50 μ l)을 가한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액의 탁도는 580 nm에서 microplate reader (BioTek, Inc.)를 이용하여 측정하였고, 박테리오신의 항균 활성은 대조구(PBS 처리구) 혼탁도의 50% 이하를 나타내는 최대 희석배수의 역수를 취하여 arbitrary units (AU)로 나타내었다(Gerez *et al.*, 2009). 박테리오신 용액에 pepsin, protease 및 proteinase K (1 mg/ml, Sigma-Aldrich)를 가하여 37°C에서 3시간 배양한 후 80°C에서 약 2분간 가열하여 효소 반응을 정지시킨 다음 잔존하는 박테리오신 활성을 측정하여 단백질 성분임을 확인하였다.

내산성 효모 분리 동정

묵은지로부터 효모를 분리하기 위해 PBS (pH 7.0)를 가하여 균질화한 시료 1 ml를 채취하여 yeast glucose chloramphenicol (YGC) agar 평판배지 위에 도말 접종하여 25°C에서 72시간 배양하였다. 생성된 집락은 yeast extract peptone dextrose (YEPD) agar 배지 상에서 희석 접종하여 순수 분리하였고 동일한 배지에 계대 배양하였다. 분리된 효모는 YEPD broth에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포를 모으고 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)로 세척한 다음 세포수를 1.0 × 10⁶ CFU/ml로 조정하였다. 세포 현탁액은 pH 3.5에 맞춘 YM broth에 가하여 30°C에서 24시간 배양한 후 YEPD agar 상에서 균수를 측정하여 산성 하에서 증식이 가능한 내산성 효모를 선발하였다. 선발된 효모는 YEPD broth에 접종하여 배양하고 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)해서 얻은 세포는 TE buffer 내에서 현탁시키고 genomic DNA purification kit (Promega Co.)로 DNA를 추출하여 주형 DNA로 사용하였다. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 시 26S rDNA의 D1/D2 domain을 증폭시키기 위해 NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 과 NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primer, ITS1/5.8S rDNA/ITS2 domain은 ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') 과 ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primer를 사용하여 PCR Thermal cycler (Bio-Rad Laboratories Ltd.)로 반응(초기 변성은 94°C에서 3분, 변성은 94°C에서 2분, 풀림은 42°C에서 1분, 신장은 72°C에서 2분, 연장은 72°C에서 7분, 36회 반복)시켰다. PCR 산물은 purification kit (Qiagen)로 정제한 후 DNA 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 사용하여 26S rRNA 단편의 유전자염기 서열 상동성을 확인하고 동정하였다(Min *et al.*, 2012).

사워도우 제조

Choi 등(2012)의 방법을 일부 변형하여 선발된 이상발효유산균과 내산성 효모로 사워도우를 제조하였다. 즉, 분리된 유산균과 효모는 각각 MRS broth와 YM broth에 접종한 다음 37°C (유산균)와 30°C (효모)에서 각각 24시간 배양한 후 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 회수한 세포를 PBS (pH 7.0)로 2회 세척 및 현탁시켜 준비하였다. 밀가루(강력분; 수분 10.5%, 조단백 16.7%, 조지방 0.9%, 조회분 1.5%) 380 g, 물 210 g, 소금 5.3 g, 설탕 11.2 g 및 유산균(5.0 × 10⁶ CFU/g)과

효모(5.0 × 10⁵ CFU/g) 세포 현탁액 각각 5 g씩 접종한 후 약 5분간 반죽기(HM3000, Brown)를 이용하여 혼합하였다. 반죽한 시료는 멸균된 비이커에 담아 온도 30°C, 상대습도 80% 하에서 24시간 동안 발효시켜 사워도우를 제조하였다.

사워도우 내 물리 화학적 성분 변화

사워도우 제조 직후부터 30°C에서 5일간 보관하는 동안 pH, 총산도 및 항균물질(유산, 초산, 박테리오신) 함량 변화를 조사하였다. 사워도우의 pH는 시료(10 g)와 증류수(90 ml)를 혼합한 후 pH meter (Fisher Scientific)를 이용하여 측정하였다. 한편, 시료와 동량의 증류수를 혼합한 후 1% (w/v) phenolphthalein을 첨가한 다음 0.1 N NaOH 용액으로 적정 소비량을 계산하여 공식[산도 (%) = (0.1 N NaOH 소비량 × 0.1 N NaOH 역가 × 0.9) / 시료양]에 대입한 후 총산도를 측정하였다. 유기산 함량은 Alfonzo 등(2013)의 방법에 따라 시료(10 g)에 증류수(90 ml)를 가하여 균질기로 혼합한 시료 용액 10 ml를 취한 뒤 1 mM HClO₄ (5 ml)를 가하고 원심분리(4,000 × g, 15분) 하였다. 상등액을 회수하고 1 mM HClO₄를 가하여 pH 3.0으로 조정한 후 증류수를 가하여 25 ml로 정용하였다. 시료 용액을 약 30분간 냉각시킨 다음 여과 제균(0.22 μm membrane filter)하고 High-pressure liquid chromatography (HPLC, Shimadzu)의 이온 교환 컬럼(Aminex HPX-87 H, 300 × 7.8 mm, Bio-Rad Life Science Group) 온도 60°C에서 이동상(8 mM H₂SO₄)의 유속 0.7 ml/min의 조건 하에서 210 nm에서 UV detector로 분석하고 표준용액의 검량곡선으로부터 유기산 함량을 정량하였다. 박테리오신 함량 측정을 위해 시료(10 g)에 40% acetonitrile-0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (90 ml)를 가하여 균질화하여 소수성 물질을 추출한 다음 원심분리(15,000 × g, 10분) 하였다. 침전물을 모아 동결 건조시키고 50% (v/v) 알코올에 용해시킨 용액으로 *B. subtilis* ATCC 35421에 대한 항균 활성을 앞서 언급한 microtiter plate method에 따라 측정하였다. 박테리오신을 생산하지 않는 유산균을 대조구로 하여 용매에 의한 항균 활성을 배제하였다(Settanni *et al.*, 2005).

사워도우 내 미생물 균수 변화

제조 직후부터 4°C에서 5일간 저장하는 동안 사워도우 내에 함유된 유산균, 효모 및 *B. subtilis*의 균수 변화를 측정하였다. 시료(10 g)를 무균적으로 채취하고 PBS (pH 7.0, 90 ml)를 가하여 균질화한 후 곰팡이 및 효모의 증식을 억제하기 위해 cycloheximide (10 mg/L, Merck)를 첨가한 MRS agar 배지 상에서 37°C, 24시간 동안 배양하여 유산균수를 측정하였다. 이

때 유산균과 효모를 접종하지 않고 시료를 동일한 조건에서 배양하여 원료 자체에서 유래된 균수는 제외시켰다. 한편, 효모수는 균질화한 시료로부터 1 ml 취하여 YGC agar 배지 상에서 30°C, 24시간 동안 배양하여 표준한천평판배양법으로 측정하였다. 게다가 유산균과 효모로 발효시킨 사워도우 내 *B. subtilis*의 균수 변화를 조사하기 위해 BHI broth에서 30°C, 24시간 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하고 침전물은 PBS (pH 7.0)에 현탁시켜 세포수를 5.0×10^5 CFU/g으로 조정하여 접종하였다(Juodeikiene *et al.*, 2011). 발효 종료 후 저장하는 동안 일정 시간별 채취한 사워도우(10 g)는 PBS (pH 7.0)로 적당하게 희석한 후 Nutrient Agar (NA)상에서 37°C, 48시간 배양하여 표준한천평판배양법으로 잔존하는 균수를 측정하였다.

통계처리

항목별 모든 실험은 총 3회 실시하였고, 측정값은 평균±표준편차로 나타내었고, 통계분석을 위해 Statistical Package for Social Science 12.0 software (SPSS) 프로그램을 이용하였다. 실험구와 대조구의 유의적 차이는 Student's t-test를 통해 유의수준 $P < 0.05$ 에서 그룹 간 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

묵은지로부터 분리된 이상발효유산균의 동정 및 *Bacillus*속에 대한 항균활성

묵은지로부터 분리된 균주 중 염기서열 분석을 통해 이상발효유산균주만을 선별하여 *Bacillus* 속에 대한 박테리옌의 항균활성을 측정하는 결과는 Table 1과 같다. 9종의 시료로부터 분

리된 유산균 총 23종 중에서 편성(obligately) 이상발효유산균은 7종으로 확인되었으며, 염기서열 분석 결과 *Lactobacillus fermentum* LAS105, *Leuconostoc mesenteroides* LAS112, *Lactobacillus brevis* LAS129, *Leuconostoc citreum* LAS134, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* LAS137, *Leuconostoc inhae* LAS148 및 *Weissella koreensis* LAS152로 동정되었고 이들은 NCBI에 등재된 균주들과 98-100%의 상동성을 나타내었다. 분리 동정된 이상발효유산균 7종을 대상으로 *Bacillus* 속에 대한 박테리옌 생성능을 확인한 결과, LAS105, LAS134, LAS148 및 LAS152는 *Bacillus* 속에 대한 항균활성이 있는 박테리옌을 생산하지 않았으나, *L. mesenteroides* LAS112가 생산한 박테리옌의 항균활성은 *B. stercorophilus*와 *B. subtilis*에 대해 각각 2,560 및 640 AU/ml로 나타났다. 또한 *L. brevis* LAS129는 *B. subtilis*에 대해 항균활성을 나타내었고, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LAS137도 *B. cereus*, *B. licheniformis* 및 *B. subtilis*에 대한 항균활성을 나타낸 박테리옌을 생산하였다. 한편, LAS112 유산균의 박테리옌은 pepsin 및 protease의 처리에 의해 항균활성이 일부 소실되었고, LAS129 유산균의 박테리옌은 pepsin 처리에 의해 항균활성이 완전히 소실되었으며, LAS137 유산균의 박테리옌은 protease와 proteinase K 처리에 의해 항균활성이 감소되었음을 확인하여 이들 박테리옌은 단백질 성분임을 확인하였다(결과 미제시).

김치로부터 분리된 유산균으로는 *L. mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *L. citreum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *W. koreensis*, *Weissella kimchi*, *Weissella pramsenteroides* 및 *Streptococcus faecalis* 등이 보고된 바 있어 본 연구에서 분리된 유산균과 일부 균종이 일치하였다(Cheigh and Park, 1994). 유산균 중에는 원료 내

Table 1. 16S rRNA gene sequence analysis and bacteriocin activity of heterofermentative lactic acid bacteria isolated from Mukeunji, a Korean ripened kimchi

Strain	16S rRNA sequencing		Identification	Bacteriocin activity (AU/ml)			
	Related strain in NCBI (Accession No.)	Similarity (%)		<i>B. cereus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. stercorophilus</i>	<i>B. subtilis</i>
LAS105	<i>Lactobacillus fermentum</i> DM29 (KT80434)	99.9	<i>Lactobacillus fermentum</i> LAS105	ND	ND	ND	ND
LAS112	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KNUC03 (AY264850)	100.0	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LAS112	ND	ND	2,560	640
LAS129	<i>Lactobacillus brevis</i> BFE 8266 (EU147302)	99.9	<i>Lactobacillus brevis</i> LAS129	ND	ND	ND	1,280
LAS134	<i>Leuconostoc citreum</i> 20043 (KU899044)	100.0	<i>Leuconostoc citreum</i> LAS134	ND	ND	ND	ND
LAS137	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NCFB 529 (NR040817)	99.5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> LAS137	160	320	ND	80
LAS148	<i>Leuconostoc inhae</i> AS-73 (KR857386)	99.3	<i>Leuconostoc inhae</i> LAS148	ND	ND	ND	ND
LAS152	<i>Weissella koreensis</i> HB (KU363029)	98.0	<i>Weissella koreensis</i> LAS152	ND	ND	ND	ND

에 함유된 당으로부터 유산을 생산하는 정상(homo) 발효유산균은 김치 숙성 과정 중 이취(off-flavor)를 유발하고, 반면 유산, 초산, 이산화탄소 및 에탄올을 생산하는 이상(hetero) 발효유산균은 신선한 맛과 탄산에 의한 청량감을 부여한다(Cheigh and Park, 1994). Kim 등(2016)은 김치로부터 이상발효유산균인 *W. koreensis*, *Lactobacillus graminis* 및 *Weissella cibaria* 등을 분리·동정하였다.

한편, 유산균은 유기산을 비롯하여 단쇄지방산, 과산화수소, 박테리오신 및 저분자 화합물 등과 같이 다양한 항균물질을 생산하는 것으로 알려져 있다(Choi et al., 2012). 유산균종에 따라 항균 활성과 항균 스펙트럼의 범위는 다양하다. 김치로부터 분리된 박테리오신 생산 유산균은 *Escherichia coli*, *B. cereus*, *Clostridium perfringenes*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus* 등의 증식을 억제하는 것으로 보고된 바 있다(Park et al., 1983). 특히, 빵 부패의 주요 원인균인 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Bacillus megaterium* 및 *B. cereus* 등은 세포 외 험막 성분인 점질물을 생성하므로 수분 함량이 많은 빵을 변질시키고, 로프(rope)를 형성하여 완숙 파인애플과 같은 달콤한 과일향을 내고 변색 및 크럼(crumb)으로 인한 연부(softening)를 유발하는데(Thompson et al., 1993), 이에 대해 *Lactobacillus sakei* KTU05-6이 생산하는 유기산과 박테리오신은 *B. subtilis* subsp. *subtilis*와 *B. subtilis* subsp. *spizizenii*의 증식을 저해하였고 *Pediococcus acidilactici* KTU05-7과 *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 및 KTU05-10의 항균 물질에 의해서도 *B. subtilis* 증식 억제 효과를 나타내었다고 보고된 바 있으나(Cizeikiene et al., 2013), 본 연구 결과에서는 *L. mesenteroides* LAS112, *L. brevis* LAS129 및 *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LAS137이 *B. subtilis*에 대해 항균활성을 나타내는 박테리오신을 생산하여 기존의 결과에서 밝혀진 유산균종과는 다소 차이가 있었다. Corsetti 등(1996)은 사워도우로부터 분리된 총 232종의 유산균 중에서 33% 정도가 *B. subtilis*에 대한 항균활성을 나타내었다고 보고하였다. 한편, *L. sakei* KTU05-6, *P. acidilactici* KTU05-7과 *P. pentosaceus*

KTU05-8, KTU05-9 및 KTU05-10가 생산하는 박테리오신은 proteinase K, trypsin, pepsin 및 chymotrypsin의 처리에 의해 항균활성이 완전히 파괴되었다고 하였으며(Cizeikiene et al., 2013), LAS112, LAS129 및 LAS137 균주가 생산하는 박테리오신의 항균활성도 일부 단백질분해효소에 의해 저해되었다.

묵은지로부터 내산성 효모 분리 동정

묵은지로부터 분리된 효모의 내산성과 염기서열 분석을 통한 동정 결과는 Table 2와 같다. YEPD 배지의 pH를 조정하지 않은 상태에서 24시간 배양 후 분리된 효모들의 균수는 $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml에 이르렀으나, pH 3.5로 조정된 배지 내에서 YS05, YS26 균주는 10^7 CFU/ml, YS19는 10^6 CFU/ml 및 YS14와 YS21 균주는 10^5 CFU/ml로 측정되었다. 분리 효모 중 YEPD 배지에 초기 균수 1.0×10^6 CFU/ml으로 접종한 후 24시간 만에 균수가 증가된 것은 YS05, YS19 및 YS26의 *Pichia* 속 균주로서 이들은 내산성이 강한 균주로 간주하였다. 한편, NCBI의 BLAST 상동성 검색을 통해 *Pichia membranifaciens* YS05, *Debaryomyces hansenii* YS14, *Pichia fermentans* YS19, *Candida tropicalis* YS21 및 *Pichia anomala* YS26으로 동정되었고 이들은 주로 산막효모들이었다.

김치로부터 분리된 효모로는 *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Citeromyces*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* 및 *Torulopsis* 속 등으로 알려져(Kim et al., 1996) 본 연구에서 분리된 균종과 일부 일치하였다. 사워도우에서 주로 분리되거나 발효에 이용되는 효모로는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Torulopsis holmii*, *Pichia saitoi*, *Candida stellate*, *Saccharomyces exiguous*, *Saccharomyces inusitatus*, *Candida guillermundii*, *Hansenula anomala*, *Torulopsis delbrueckii* 등의 효모가 있다고 보고되어(Gobbetti, 1998; Chavan and Chavan, 2011) 묵은지로부터 분리된 내산성 효모인 *Pichia* 속 사워도우 제조에 이용될 수 있는 것으로 보여진다.

효모는 pH 2.0~11.0의 범위 내에서 증식 및 생존이 가능하

Table 2. 26S rRNA gene sequence analysis of yeasts isolated from Mukeunji, a Korean ripened kimchi and the growth of the strains at low pH

Strain	26S rRNA sequencing		Identification	Viable cell count (CFU/ml)	
	Related strain in NCBI (Accession No.)	Similarity (%)		YEPD (control)	YEPD (pH 3.5)
YS05	<i>Pichia membranifaciens</i> IFO 10215 (AB019215)	98.5	<i>Pichia membranifaciens</i> YS05	$1.7 \pm 1.5 \times 10^9$	$2.9 \pm 1.6 \times 10^7$
YS14	<i>Debaryomyces hansenii</i> D139 (HM627097)	97.9	<i>Debaryomyces hansenii</i> YS14	$5.3 \pm 2.2 \times 10^8$	$3.8 \pm 2.4 \times 10^5$
YS19	<i>Pichia fermentans</i> NRRL Y-1619 (EF550234)	97.8	<i>Pichia fermentans</i> YS19	$5.5 \pm 0.9 \times 10^9$	$7.1 \pm 2.3 \times 10^6$
YS21	<i>Candida tropicalis</i> HND-1 (EU822494)	99.6	<i>Candida tropicalis</i> YS21	$6.0 \pm 3.5 \times 10^9$	$8.1 \pm 3.0 \times 10^5$
YS26	<i>Pichia anomala</i> CTSP F5 (EU862177)	98.2	<i>Pichia anomala</i> YS26	$9.9 \pm 3.7 \times 10^8$	$4.5 \pm 2.9 \times 10^7$

여 세균보다 낮은 pH값에서 내성이 더 강하여 피클이나 과일 등 pH가 낮은 식품에서 흔히 분리된다. 특히 *S. cerevisiae*의 성장 가능한 pH는 2.35~8.6인 것으로 알려져 있으며(Beales, 2004), *S. cerevisiae*에 대한 초산과 유산의 최소증식억제농도는 각각 0.6% (100 mM)와 2.5% (278 mM)이며, 초산 0.05~0.1%와 유산 0.2~0.8% 농도 하에서 효모 세포는 스트레스로 인해 증식 속도가 감소되고 유기산의 농도가 증가할수록 포도당의 소비 속도, 알코올 생산량은 감소되는 것으로 알려져 있는데(Narendranath *et al.*, 2001), 묵은지로부터 분리된 *D. hansenii* YS14와 *C. tropicalis* YS21은 pH 3.5하에서 증식하지 못하는 것으로 확인되었다.

저장 기간 동안 사워도우의 물리화학적 성분 변화

*B. subtilis*에 대한 항균활성을 나타내는 박테리옌 생산 균주인 *L. mesenteroides* LAS112, *L. brevis* LAS129 및 *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LAS137 유산균과 내산성 효모인 *P. membranifaciens* YS05, *P. fermentans* YS19 및 *P. anomala* YS26을 혼합 배양하여 발효시킨 사워도우의 pH, 총산도, 유산 및 초산 생산량과 박테리옌 활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. LAS112 단독으로 발효시킨 사워도우의 pH는 4.19±0.10, 총산도는 1.30±0.20%, 유산량은 69.5±5.5 mM, 초산량은 43.8±5.8 mM, 박테리옌 활성은 320 AU/ml로 나타났다. LAS112 단독으로 발효시킨 경우 물리화학적 특성은 YS05와 혼합 배양 시에는 유의한 차이가 없었으나, YS19 및 YS26과 혼합 배양한 경우에는 pH가 유의하게 높았고 총산도, 유기산 생성량 및 박테리옌 활성은 낮았다.

LAS129 단독으로 발효시킨 사워도우의 pH는 3.60±0.09, 총산도는 1.60±0.20, 유산량은 61.4±3.3 mM, 초산량은 89.2±2.0 mM, 박테리옌 활성은 640 AU/ml로 나타나 LAS112 단독 배양일 때보다 많은 양의 초산을 생산하고 박테리옌 활성도 높게 나타났다. LAS129 단독으로 발효시킨 사워도우의 물리화학적 특성은 YS05 및 YS26과 혼합 배양에 의해서 유의한 수치 변화가 없었으나, YS19와 혼합 배양 시에는 박테리옌 활성이 50% 수준으로 나타났다. LAS137 단독으로 발효시킨 사워도우의 pH는 4.00±0.22, 총산도는 1.46±0.30, 유산량은 55.1±3.1 mM, 초산량은 60.4±4.4 mM, 박테리옌 활성은 80 AU/ml로 나타나 LAS112 혹은 LAS129 단독 배양일 때보다 박테리옌 활성은 매우 낮게 나타났으며, YS05, YS19 및 YS26 효모와 혼합 배양했을 때의 물리화학적 특성과는 큰 차이가 없었다.

사워도우의 pH가 낮을수록 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 증식 저해 효과가 더 높게 나타났고(Mentes *et al.*, 2007), *Lactobacillus* 속이 생산하는 박테리옌의 항균 활성도 pH 3.0~4.0에서 가장 높았으므로 산도는 항균 활성뿐만 아니라 항균 물질 생산에도 영향을 주는 것으로 확인되었다(Corsetti *et al.*, 1996). 시판되고 있는 사워도우의 pH는 3.81~4.77 정도였으며 pH가 감소할수록 총산도는 증가하였고, 유산은 1.97±0.05~9.41±0.48 mg/g, 초산은 0.36±0.02~1.46±0.09 mg/g 정도에 이른다(Ventimiglia *et al.*, 2015). Choi 등(2012)에 따르면 유기산으로 산성화한 대조구 도우의 pH (4.5 전후) 및 총산도 (1.35% 내외)는 발효 24시간 동안 거의 일정한 값을 유지한 반면, 김치로부터 분리한 *L. citreum* HO12 혹은 *W. koreensis*

Table 3. Physico-chemical properties of sourdough fermented with heterofermentative lactic acid bacteria as a mono-culture and co-culture with acid-resistant yeast

Microorganisms for cultures	pH	Titribility (%)	Lactic acid (mM)	Acetic acid (mM)	Bacteriocin activity (AU/g)
Control (LAS112)	4.19±0.10	1.30±0.20	69.5±5.5	43.8±5.8	320
LAS112+YS05	4.12±0.16	1.38±0.05	67.2±7.1	45.2±1.4	320
LAS112+YS19	4.74±0.07*	1.02±0.16*	44.6±3.9*	28.6±7.3*	160
LAS112+YS26	4.60±0.12*	1.09±0.16*	49.1±6.0*	30.5±2.9*	160
Control (LAS129)	3.60±0.09	1.60±0.20	61.4±3.3	89.2±2.0	640
LAS129+YS05	3.72±0.06	1.49±0.21	59.2±1.8	78.1±5.9	640
LAS129+YS19	4.09±0.11*	1.27±0.14*	40.8±8.2*	66.0±7.6*	320
LAS129+YS26	3.85±0.16	1.34±0.07	62.1±4.9	80.4±5.0	640
Control (LAS137)	4.00±0.22	1.46±0.30	55.1±3.1	60.4±4.4	40
LAS137+YS05	4.05±0.12	1.33±0.13	62.4±4.8	59.6±7.0	40
LAS137+YS19	4.16±0.09	1.40±0.22	57.4±7.7	67.5±6.3	40
LAS137+YS26	4.20±0.18	1.39±0.19	66.0±9.6	49.9±10.4	40

Data are means±standard deviation from triplicate determinations.

* The difference between the means of the two groups (such as an experiment vs. control group) is statistically significant ($P < 0.05$).

HO20로 제조한 사워도우의 pH가 6.38에서 4.39로 급격하게 감소됨에 따라 총산도는 증가되었다. 특히, *L. citreum* HO12로 발효시킨 사워도우의 총산도는 12시간 후 *W. koreensis* HO20보다 높게 나타났으나 16시간 이후부터는 거의 비슷한 수준을 유지하였다. 이들 유산균으로 제조한 사워도우의 pH와 총산도는 유의적인 차이가 없었으나 유산과 초산의 비율과 양에는 현저한 차이를 보였다. 특히 유산의 함량은 *W. koreensis* HO20 (63.0±0.2 mM)으로 제조한 사워도우에서 더 높게 검출된 반면, 초산의 양은 *L. citreum* HO12 (32.0±0.4 mM)로 발효시킨 사워도우에서 높게 나타났다. *S. cerevisiae* 단독 배양으로 제조한 사워도우의 pH는 4.86으로 감소되었고 이에 적정 산도는 2.4 정도로 나타났다. *L. sanfranciscensis*, *L. brevis*, *W. cibaria*, *P. pentosaceus*, *Enterococcus faecium*, *L. paralimentarius* 등의 유산균 단독으로 제조한 경우 pH는 3.46~3.87이었고, 적정 산도는 6.4~10.9 정도였으나, 효모와 유산균의 혼합 배양 시 pH는 3.46~3.99, 적정 산도는 6.2~10.9 정도로 나타났다. 또한 유산균 단독 배양 시 유기산 생산량은 0.04~0.09 mM/g이었으나, *S. cerevisiae*와 *L. paralimentarius*의 혼합 배양한 경우는 다른 유산균에 비해 약간 높은 0.11 mM/g의 유산을 생산하였다. 게다가 이들 유산균 단독으로 배양했을 때 초산은 극히 소량 생산하였으나, 효모와 혼합 배양한 경우 *L. sanfranciscensis*와 *L. brevis*는 각각 0.01 mM/g, *W. cibaria*는 0.02 mM/g의 초산을 생산하였다고 보고하였다(Paramithiotis et al., 2006). 기존의 보고된 결과와 본 연구 결과에서 볼 때 사워도우의 pH, 총산도 및 유기산 생산량은 유산균과 효모의 종류 및 발효조건에 따라 상이한 것을 알 수 있었다.

사워도우 내 효모는 발효 과정 중 이산화탄소를 생산하여 빵의 부피가 증가시키며, 관능학적 특성과 조직감, 식용가치 및 종합적 기호도 향상에 기여하는 것으로 알려져 있다(Li et al., 2015). 또한 유산균에 의한 가용성 당의 이용성에 따른 에너지 이용 효율과 유기산 생산량은 당의 종류와 혼합 배양에 사용된 효모에 따라 영향을 받는다. 사워도우 발효 초기 단계에서 산도와 pH는 일정하다가 중반부에 이르면 효모가 유산균의 증식을 촉진하여 산도는 급격하게 증가된다고 보고된 바 있으나(Chavan and Chavan, 2011), YS19 및 YS26 효모가 LAS112 혹은 LAS129 유산균의 증식을 방해하여 대사산물의 생산량이 유산균 단독일 때보다 감소된 것으로 추정된다.

Pepe 등(2003)은 118종의 유산균 중에서 *L. sakei* T56, *L. planatrum* E5, *L. sanfranciscensis* M207, *Weissella paramesenteroides* A51, *L. mesenteroides* A27 및 *E. faecium* A86 등 15종(12.7%)의 배양 상등액으로 로프 형성균인 *B. subtilis*에 대한 항균력을 agar well diffusion method로 측정

결과, 저해환을 5~7 mm 형성하였으나, 상등액을 중화시켰을 때 항균력이 소실되었으므로 유기산에 의한 저해효과가 나타났다고 보고하였다. Rosenquist와 Hansen (1995)은 nisin을 생산하는 유산균은 well diffusion assay에 의해 *Bacillus* 속의 증식을 억제하였으나, 4,000 IU/ml 농도의 nisin을 빵에 첨가한 경우 로프를 형성하는 *Bacillus* 속의 발아와 증식 억제에는 유의한 효과가 없었다고 하였다. 한편, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 증식을 효과적으로 저해하는 유기산으로는 프로피온산과 초산이었으며, 빵에 첨가한 경우에도 6일 동안 *Bacillus* 속의 증식을 억제하였다고 하였다. Voysey와 Hammond (1993)는 초산 0.15~0.16% 혹은 프로피온산 0.2%을 제빵 도우에 첨가한 경우 *Bacillus* 속에 의한 부패를 효과적으로 억제하였고, Rosenquist와 Hansen (1998)은 로프를 형성하는 *B. subtilis*의 증식을 억제할 수 있는 최대 pH 범위는 4.69라고 제안하였다. 본 연구에서는 *L. mesenteroides* LAS112, *L. brevis* LAS129 및 *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LAS137이 생산하는 박테리오신은 *Bacillus* 속에 대한 항균 활성을 나타내었으므로 균주에 따라 항균 효과가 다양함을 알 수 있다.

한편, *L. mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 및 *L. brevis*가 생산하는 박테리오신의 항균활성은 액체 배지 내에서보다 사워도우 내에서 더 낮게 나타났다. 기존 연구 결과에 따르면, *In vitro* 상에서 *Bacillus* 속에 대한 박테리오신의 항균활성이 탁월해도 사워도우 내에서 활성이 감소하거나 나타나지 않는 경우, 이는 도우의 입자와 표면에 박테리오신이 결합하거나, 제어 대상 미생물의 수가 많을수록 박테리오신의 활성이 감소되는 것으로 보고된 바 있다(Rosenquist and Hansen, 1998). 박테리오신을 생산하는 유산균에 의한 항균활성은 온도, pH 및 산소 등의 배양조건과 배지 성분의 대사과정에 영향을 받는다(Corsetti et al., 2004). 게다가 식품 성분에 대한 박테리오신의 결합, 단백질 분해효소에 의해 불활성화, 용해성 변화 및 박테리오신의 전하 및 부패 세균의 세포외피 변화 등의 요인들은 식품 내의 박테리오신 항균 활성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Gänzle et al., 1999).

저장 기간 동안 사워도우 내 미생물 군수 변화

L. mesenteroides LAS112, *L. brevis* LAS129 및 *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LAS137 유산균 단독 배양과 *P. membranifaciens* YS05, *P. fermentans* YS19 및 *P. anomala* YS26를 혼합 배양 시 인위적으로 접종하여 사워도우를 제조하고 저장하는 동안 *B. subtilis*의 군수 변화를 측정한 결과는 Table 4와 같다. 사워도우에 *B. subtilis* (5.0×10^6 CFU/g)만을 접종하여 배양한 경우 24시간 만에 $8.5 \pm 2.1 \times 10^7$ CFU/g에 이르렀으나, LAS112로

Table 4. Changes in the viable cell counts of lactic acid bacteria, yeast, and *Bacillus subtilis* in sourdough fermented with heterofermentative lactic acid bacteria as a mono-culture and co-culture with acid-resistant yeast during storage at 4°C for 5 days

Microorganism for mixed cultures	Viable cell counts (CFU/ml)											
	LAB				Yeast				<i>Bacillus subtilis</i>			
	0	1	3	5	0	1	3	5	0	1	3	5
Control (<i>B. subtilis</i>)									8.5±2.1×10 ⁷	9.0±1.4×10 ⁷	2.7±3.0×10 ⁸	1.0±2.7×10 ⁸
LAS112+ <i>B. subtilis</i>	5.5±1.1×10 ⁸	9.5±2.2×10 ⁸	7.7±0.5×10 ⁸	6.9±3.7×10 ⁸					3.0±2.3×10 ⁸ *	5.1±2.9×10 ⁸ *	3.3±0.4×10 ⁸ *	3.2±0.5×10 ⁸ *
LAS112+YS05+ <i>B. subtilis</i>	6.9±0.8×10 ⁸	5.8±1.8×10 ⁸	8.0±2.4×10 ⁸	7.2±1.8×10 ⁸	5.1±1.3×10 ⁷	3.7±0.4×10 ⁷	3.6±1.0×10 ⁷	4.2±1.4×10 ⁷	4.5±2.0×10 ⁸ *	3.6±0.2×10 ⁸ *	5.1±0.7×10 ⁸ *	4.7±0.6×10 ⁸ *
LAS112+YS19+ <i>B. subtilis</i>	2.1±1.9×10 ⁸	1.1±3.4×10 ⁸	3.0±0.5×10 ⁸	1.1±0.2×10 ⁸	6.7±2.5×10 ⁷	6.1±2.0×10 ⁷	5.7±1.7×10 ⁷	2.9±0.2×10 ⁷	9.6±0.6×10 ⁸ *	7.5±0.9×10 ⁸ *	8.1±2.6×10 ⁸ *	9.8±1.1×10 ⁸ *
LAS112+YS26+ <i>B. subtilis</i>	1.3±2.4×10 ⁸	2.0±1.9×10 ⁸	2.2±3.1×10 ⁸	3.0±1.4×10 ⁸	7.2±2.7×10 ⁷	5.3±0.6×10 ⁷	4.6±2.0×10 ⁷	3.6±1.4×10 ⁷	8.9±3.5×10 ⁸ *	9.9±1.4×10 ⁸ *	7.1±1.9×10 ⁸ *	9.5±0.6×10 ⁸ *
LAS129+ <i>B. subtilis</i>	9.4±1.1×10 ⁸	1.2±0.5×10 ⁹	8.6±3.5×10 ⁸	1.5±2.0×10 ⁹					6.2±1.3×10 ⁸ *	4.6±1.7×10 ⁸ *	4.1±0.8×10 ⁸ *	8.3±2.4×10 ⁸ *
LAS129+YS05+ <i>B. subtilis</i>	1.7±0.9×10 ⁹	2.2±0.5×10 ⁹	3.1±4.0×10 ⁹	1.3±0.6×10 ⁹	7.5±3.1×10 ⁷	5.2±0.9×10 ⁷	2.6±0.7×10 ⁷	4.1±1.6×10 ⁷	5.4±2.4×10 ⁸ *	3.5±0.3×10 ⁸ *	5.2±2.7×10 ⁸ *	5.5±1.5×10 ⁸ *
LAS129+YS19+ <i>B. subtilis</i>	5.0±3.8×10 ⁸	3.6±1.6×10 ⁸	2.2±1.6×10 ⁸	5.6±1.3×10 ⁸	6.2±3.0×10 ⁷	4.2±3.1×10 ⁷	4.5±1.7×10 ⁷	1.3±0.2×10 ⁷	3.1±0.9×10 ⁸ *	2.4±0.7×10 ⁸ *	3.0±1.8×10 ⁸ *	4.3±0.6×10 ⁸ *
LAS129+YS26+ <i>B. subtilis</i>	2.0±1.6×10 ⁹	3.3±1.4×10 ⁹	3.4±0.5×10 ⁹	1.6±1.2×10 ⁹	8.0±2.4×10 ⁷	6.3±0.9×10 ⁷	6.2±1.6×10 ⁷	5.5±0.4×10 ⁷	7.0±4.7×10 ⁸ *	5.9±2.0×10 ⁸ *	6.8±2.2×10 ⁸ *	4.6±0.3×10 ⁸ *
LAS137+ <i>B. subtilis</i>	9.2±2.5×10 ⁷	8.7±3.5×10 ⁷	1.1±2.4×10 ⁸	1.3±3.4×10 ⁸					1.2±2.1×10 ⁵	4.4±1.2×10 ⁵ *	3.6±0.4×10 ⁵ *	3.9±0.5×10 ⁵ *
LAS137+YS05+ <i>B. subtilis</i>	8.8±3.6×10 ⁷	2.2±0.1×10 ⁸	7.4±4.8×10 ⁷	2.0±1.0×10 ⁸	4.2±1.9×10 ⁷	4.8±2.2×10 ⁷	8.0±3.5×10 ⁷	6.0±0.8×10 ⁷	2.2±0.9×10 ⁵	5.3±1.8×10 ⁵ *	5.1±1.7×10 ⁵ *	4.1±0.5×10 ⁵ *
LAS137+YS19+ <i>B. subtilis</i>	1.5±3.5×10 ⁸	1.0±2.6×10 ⁸	2.3±0.8×10 ⁸	8.6±2.5×10 ⁷	7.6±1.3×10 ⁷	4.1±0.3×10 ⁷	4.4±2.0×10 ⁷	4.1±0.3×10 ⁷	1.5±3.4×10 ⁵	4.9±0.2×10 ⁵ *	2.6±0.9×10 ⁵ *	2.3±0.4×10 ⁵ *
LAS137+YS26+ <i>B. subtilis</i>	2.5±3.0×10 ⁸	5.3±3.0×10 ⁷	1.5±2.2×10 ⁸	6.5±4.2×10 ⁷	4.6±0.7×10 ⁷	5.8±0.9×10 ⁷	7.2±3.0×10 ⁷	5.6±3.0×10 ⁷	1.8±2.7×10 ⁵	5.3±0.8×10 ⁵ *	3.3±0.6×10 ⁵ *	5.0±0.9×10 ⁵ *

Data are mean±standard deviation from triplicate determinations.

* The difference between the means of the two groups (such as an experiment vs. control group) is statistically significant ($P < 0.05$).

발효시킨 사워도우 제조 직후 유산균수는 10⁸ CFU/g, *B. subtilis*의 균수는 대조구보다 3 log cycle 이상 적은 균수가 검출되었고 이는 YS05와 혼합 배양한 경우도 이와 유사한 수준이었다. 하지만 효모와 혼합 발효시킨 사워도우 내 효모수는 10⁷ CFU/g에 이르렀고, YS05 효모와 혼합 배양했을 때는 YS19 혹은 YS26와 혼합 발효한 사워도우보다 *B. subtilis* 균수가 낮게 나타났다. LAS129 유산균은 LAS112와 LAS137 보다 더 높은 *B. subtilis*에 대한 항균 효과를 나타내었고 대조구보다 약 4 log cycle 이상 낮은 균수를 유지하였다. 특히 LAS129 유산균은 YS19와 혼합 배양했을 때 YS05나 YS26 효모와의 혼합 배양보다 항균활성이 다소 낮았으나, LAS137은 단독 및 효모와의 혼합 배양 시 비슷한 수준의 항균활성을 나타내었다. 또한 4°C에서 5일간 저장하는 동안 유산균, 효모 및 *B. subtilis*의 균수는 유의할 만한 변화가 없었다. 한편, 선발된 3종의 유산균은 과산화수소를 생성하지 않는 것으로 확인되었으며, LAS112, LAS129 및 LAS137 유산균의 배양 상등액(10%)을 처리하여 24시간 배양 후 *B. subtilis*의 균수 변화를 관찰한 결과, LAS129는 초기 균수(5.0 × 10⁶ CFU/g)를 약 0.4 log cycle 감소시켰고, LAS112 및 LAS137에 의해서 증식 속도 지연 효과가 나타났으므로(결과 미제시) 이들 유산균의 항균활성은 유기산과 박테리오신에 기인하는 것으로 추정되었다.

사워도우 내 유산균수는 1 × 10⁹~3 × 10⁹ CFU/g, 효모수는 1 × 10⁶~5 × 10⁷ CFU/g에 이르는 것으로 Hammers 등(2005)은 보고하였고, Corsetti 등(2001)은 유산균과 효모수의 비율은 1000:1 내지 10:1 정도라고 하였는데 본 연구에서 제조한 사워

도우 내 유산균과 효모의 균수는 혼합 균주에 따라 다소 차이가 있었으나 대개 10:1 정도의 비율로 나타났다. 사워도우 제조 시 *S. cerevisiae*와 유산균을 혼합 배양했을 때, *L. brevis*의 최대 증식 속도를 유의하게 감소시킨 반면, *L. sanfranciscensis*는 유의하게 증가되었고, *E. faecium*와 *L. paralimentarius*의 증식 속도 변화는 극히 미미했으며, *W. cibaria*와 *P. pentosaceus*의 속도에는 거의 변화가 없었다(Paramithiotis et al., 2006). Gobbetti 등(1995)은 이상발효유산균과 혼합한 경우 효모의 증식 속도가 빨라진 반면 *L. plantarum* DC400 및 *L. farciminis* CF3 등의 정상발효유산균과 혼합 배양한 경우 효모의 증식 속도는 다소 느리나 CO₂ 생산량은 더 많은 것으로 나타났다고 하였다. Gobbetti 등(1994)은 *L. brevis* subsp. *lindneri* 혹은 *L. planatrum* 유산균과 *S. cerevisiae* 혹은 *S. exiguous* 효모를 혼합 배양한 결과, 단독 배양에 비해 효모의 수율에는 유의한 변화가 없었으나, 유산균의 증식 속도와 유산이나 초산 등 최종 대사산물의 수율은 더 높게 나타났다고 보고하였다. 또한 유산균의 증식에 필수적인 발린(valine)이나 루신(leucine)이 첨가되지 않은 배지 내에서 유산균이 증식 가능한 것은 효모가 이들 아미노산을 생성하기 때문인 것으로 추정하였으나, 본 연구에 사용된 효모는 사워도우 내에서 유산균의 증식에 유의할 만한 영향을 주지 않았고, 특히 YS19와 YS26은 LAS112의 증식을 오히려 방해하였다. Paramithiotis 등(2006)에 따르면, *L. brevis*의 최대 증식 속도의 감소는 효모와의 혼합 배양 시 맥아당 이용을 위한 효모와의 길항작용에 기인한다고 보고하여 본 결과와 유사한 경향을 보였다.

한편, *S. cerevisiae*와 *L. plantarum* DM616을 혼합하여 사워도우를 발효시킨 결과 24시간 동안에는 이들 두 균주의 균수는 비교적 안정적이었으나, 그 이후에는 유산균이 효모의 증식을 방해하여 효모 균수가 급격하게 감소하였는데 이는 주 영양원인 탄소원 이용을 위해 서로 경쟁하고 유산균의 유기산 생성에 의해 pH가 감소되어 효모의 증식이 억제되는 것으로 분석하였다(Li *et al.*, 2015). 유산균은 효모의 균중 및 혼재하는 미생물의 수에 의존하여 효모의 증식에 영향을 준다고 알려져 있다(Li *et al.*, 2015). 김치로부터 분리된 *L. citreum* HO12와 *W. koreensis* HO20으로 발효시킨 사워도우 내 유산균의 초기 균수는 약 6.4 Log CFU/g 정도였으나, 24시간 발효 후에는 각각 9.2 및 9.4 CFU/g으로 증가되었다고 하였는데 본 연구에 사용된 LAS112, LAS129 및 LAS137 균주는 이들보다는 다소 낮은 균수가 검출되었다. 한편, 이들 유산균은 빵의 부패 미생물인 *B. subtilis*와 *Aspergillus niger* 및 *Penicillium roqueforti* 등의 포자 발아를 억제하는데 효과적이었으며, 항균활성은 유기산에 기인한다고 보고하였다(Choi *et al.*, 2012). 유기산의 항균활성은 소수성과 비헤리된 산의 농도에 의존하며 pH가 감소할수록 친유성의 비헤리형의 농도가 증가하기 때문에 대부분의 유기산은 pH가 낮을수록 항균효과가 증가하게 된다(Choi *et al.*, 2012).

유산균은 영양요구성이 까다로운 균으로서 발효과정 동안 사워도우 내에 존재하는 효모가 아미노산, 펩타이드 및 비타민 등을 공급함으로써 유산균의 증식이 촉진되는 것으로 밝혀졌다. 반면 유산균의 유기산 생성에 영향을 주는 탄수화물을 두고 효모와 유산균은 서로 경쟁하므로 주요 당 성분에 대해 비경쟁적 환경을 조성하는 것이 미생물의 증식을 위해 필요하다(Gobbetti, 1998). 시리얼 가공품에 함유된 당, 단백질, 무기질, 지질 및 유리지방산이나 각종 효소 등의 내재적 인자와 발효온도와 시간, 도우 수율, 산소 및 원료에 함유된 미생물 균수 등은 사워도우 내 발효 미생물의 증식과 발효빵의 형태에 영향을 주는 중요한 인자들이다(Chavan and Chavan, 2011). 항균 및 항진균성 물질을 생산하는 *L. sanfranciscensis*는 사워도우 내에서 우점종 유산균이고 효모의 증식을 보호하여 안정된 사워도우 제품 생산에 기여하므로 유용한 유산균과 효모의 혼합 발효 식품은 발효 스타터에 의한 자체 품질 향상 기능을 발휘한다고 알려져 있다(Gobbetti, 1998).

유산균을 이용하여 제조한 사워도우는 빵의 향미, 조직감, 저장기간 연장 및 영양학적 가치 향상 등의 유용한 특성을 부여한다. 빵 제조 시 사용하는 보존제는 부패 세균이나 곰팡이에 의한 빵의 변질과 경제적 손실을 억제하기 위해 주로 사용하며 장기간 광량 섭취 시 독성 유발 가능성이 알려지면서 소

비자들은 보존료 사용을 기피한다. 대체물질로서 항균 및 항진균 활성이 있는 유산균의 대사산물을 이용하여 사워도우로 빵을 제조하면 보존제 무첨가 제품을 선호하는 소비자들의 욕구를 충족시키며 항로프(anti-rope) 활성은 빵의 저장기간을 연장시키고 천연물질로서 독성 유발 가능성도 낮다(Corsetti and Settanni, 2007). 사워도우는 빵 제조 시 도우의 기계가공성을 향상시키고, 피트산의 가수분해를 통한 영양학적 특성, 빵의 부피감, 부드러운 조직감, 독특한 풍미 등의 관능학적 특성 및 저장기간 연장에 따른 품질 특성에 대해 중요한 역할을 한다. 사워도우 유산균은 호밀 펜토산(pentosane)의 용해성을 증가시켜 도우의 수분 결합력을 향상시키며, 단백질 분해, 휘발성 방향족 화합물 및 전구체의 형성, 빵의 향미를 개선하는 아르기닌 대사 및 빵의 조직, 노화와 저장기간에 영향을 주는 항균 및 항진균 물질, 항로프 활성, exopolysaccharide 등의 생산에 영향을 미친다(De Vuyst and Neysens, 2005).

이상의 결과를 요약하면, 빵의 부패균에 대하여 항균 활성을 나타내는 유산균과 효모를 이용하여 사워도우를 발효시키는 동안 미생물의 당 이용능, 혼합 배양에 따른 두 균주간의 편리 혹은 상호 공생이나 경합 등에 따라 발효 종료 직후 최종 균수에 유의한 차이가 있었으며, 유산균의 균수가 증가할수록 박테리오신 생산량이 증가되어 *B. subtilis*에 대한 항균 효과가 높게 나타난 것으로 추정된다. 따라서 박테리오신이나 유기산 등의 항균물질을 생산하는 유산균을 사워도우 제조에 이용하면 빵의 부패균으로 잘 알려진 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* 및 *B. cereus* 등을 제어하여 빵의 부패지연으로 인한 품질 향상 및 식중독 발생 위험을 억제할 수 있으며, 화학합성 보존료의 사용을 감소시켜 독성 발생 위험을 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

본 연구에서는 묵은지로부터 분리된 박테리오신을 생산하는 이상발효 유산균 및 내산성 효모가 사워도우의 저장기간 연장과 품질 개선에 미치는 영향을 조사하였다. 유전자 염기서열 분석 결과 빵 부패세균인 *Bacillus* 속에 대한 항균활성을 나타낸 이상발효 유산균은 *Leuconostoc mesenteroides* LAS112, *Lactobacillus brevis* LAS129 및 *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LAB137으로 동정되었고, 산성 pH 하에서 증식 가능한 효모는 *Pichia membranifaciens* YS05, *Pichia fermentans* YS19 및 *Pichia anomala* YS26으로 확인되었다. 사워도우 발효에 사용된 *L. brevis* LAS129는 *L. mesenteroides*

LAS112 및 *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LAS 137 보다 더 많은 양의 초산과 박테리오신 활성을 나타내었으나, LAS112 는 가장 많은 양의 유산을 생산하였다. *Bacillus subtilis* ATCC 35421 에 대한 최대의 박테리오신 활성(640 AU/g)은 *L. brevis* LAS129와 *P. membranifaciens* YS05 혹은 *P. anomala* YS26 으로 혼합 발효시킨 사워도우 내에서 관찰되었다. 30°C에서 24시간 발효 후 사워도우 내 LAS129의 균수(10^9 CFU/g)는 YS05 혹은 YS26의 효모 균수(10^7 CFU/g)보다 높게 검출되었다. 한편, 이들 균주들을 이용하여 발효시킨 사워도우 내에 존재하는 빵 부패균의 균수는 대조구 보다 유의하게($P < 0.05$) 낮은 수준으로 나타났다.

감사의 말

이 논문은 2016학년도 동명대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음(과제번호 2016F057).

References

- Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Corona, O., Di Gerlando, R., Gaglio, R., Francesca, N., Moschetti, G., and Settanni, L. 2013. Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. *Food Microbiol.* **36**, 343-354.
- Bailey, C.P. and Von Holy, A. 1993. *Bacillus* spore contamination associated with commercial bread manufacture. *Food Microbiol.* **10**, 287-294.
- Beales, N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **3**, 1-20.
- Chavan, R.S. and Chavan, S.R. 2011. Sourdough technology-a traditional way for wholesome foods: a review. *Compr. Rev. Food Sci.* **10**, 170-183.
- Cheigh, H.S. and Park, K.Y. 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **34**, 175-203.
- Choi, H., Kim, Y.W., Hwang, I., Kim, J., and Yoon, S. 2012. Evaluation of *Leuconostoc citreum* HO12 and *Weissella koreensis* HO20 isolated from kimchi as a starter culture for whole wheat sourdough. *Food Chem.* **134**, 2208-2216.
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., and Bartkiene, E. 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganisms isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control* **31**, 539-545.
- Collins, N.F., Kirshner, L.A.M., and Von Holy, A. 1991. A characterization of *Bacillus* isolates from rony bread, bakery equipment and raw material. *S. Afr. J. Sci.* **87**, 62-66.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., and Smacchi, E. 1996. Antimicrobial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiol.* **13**, 447-456.
- Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., and Gobbetti, M. 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 95-104.
- Corsetti, A. and Settanni, L. 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res. Int.* **40**, 539-558.
- Corsetti, A., Settanni, L., and Van Sinderen, D. 2004. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their *in vitro* and *in situ* activity. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 521-534.
- De Vuyst, L. and Neysens, P. 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 43-56.
- Dengate, S. and Ruben, A. 2002. Controlled trial of cumulative behavioral effects of a common bread preservative. *J. Paediatr. Child H.* **38**, 373-376.
- Gänze, M.G., Weber, S., and Hammes, W.P. 1999. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* **46**, 207-217.
- Gameau, S., Martin, N.I., and Vederas, J.C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* **84**, 577-592.
- Gerez, C.L., Torino, M.I., Roll, G., and Font de Valdez, G. 2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* **20**, 144-148.
- Gobbetti, M. 1998. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci. Technol.* **9**, 267-274.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., and Rossi, J. 1994. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 275-279.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., and Rossi, J. 1995. Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in sourdough using a rheofermentometer. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 625-630.
- Hammers, W.P., Brandt, M.J., Francis, K.L., Rosenheim, M., Seitter, F.H., and Vogelmann, S. 2005. Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 4-11.
- Hole, H., Nilssen, O., and Nes, I.F. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* **173**, 3879-3887.
- Juodeikiene, G., Salomskiene, J., Eidukonyte, D., Vidmantiene, D., Narbutaite, V., and Vaiciulyte-Funk, L. 2011. The impact of novel fermented products containing extruded wheat material on the quality of wheat bread. *Food Technol. Biotechnol.* **49**, 502-510.
- Katina, K., Heimiö, R.L., Autio, K., and Poutanen, K. 2006. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture

- of wheat bread. *LWT Food Sci. Technol.* **39**, 1189–1202.
- Kim, H.Y., Bong, Y.J., Jeong, J.K., Lee, S.B., Kim, B.Y., and Park, K.Y.** 2016. Heterofermentative lactic acid bacteria dominate in Korean commercial kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* **25**, 541–545.
- Kim, H.J., Lee, C.S., Kim, Y.C., Yang, C.B., and Kang, S.M.** 1996. Identification of yeasts isolated from kimchi for kimchi starter. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 430–438.
- Li, Z., Li, H., Deng, C., Bian, K., and Liu, C.** 2015. Effect of *Lactobacillus plantarum* DM616 on dough fermentation and Chinese steamed bread quality. *J. Food Process. Pres.* **39**, 30–37.
- Lim, E.S.** 2016. Microbiological and chemical properties of sourdough fermented with probiotic lactic acid bacteria. *Korean J. Microbiol.* **52**, 84–97.
- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servin, A., and De Vuyst, L.** 2006. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res. Microbiol.* **157**, 241–247.
- Mentes, Ö., Ercan, R., and Akcelik, M.** 2007. Inhibitor activities of two *Lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope-forming *Bacillus* strains. *Food Control* **18**, 359–363.
- Min, J.H., Hyun, S.H., Kang, M.G., Lee, H.B., Kim, C.M., and Kim, H.K.** 2012. Isolation and identification of yeasts from wild flowers of Daejeon city and Chungcheongnam-do in Korea. *Korean J. Mycol.* **40**, 141–144.
- Narendranath, N.V., Thomas, K.C., and Ingledew, W.M.** 2001. Effects of acetic and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 171–177.
- Ohira, I., Shinsuke, K., Morita, H., Suzuki, T., Omita, S., Hisamatsu, S., Sonori, S., and Shinoda, S.** 2004. Identification of 3-phenyllactic acid as a possible antibacterial substance produced by *Enterococcus faecalis* TH10. *Biocontrol Sci.* **9**, 77–81.
- Paramithiotis, S., Gioulatos, S., Tsakalidou, E., and Kalantzopoulos, G.** 2006. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochem.* **41**, 2429–2433.
- Park, Y.H., Kwon, J.J., Jo, D.H., and Kim, S.I.** 1983. Microbial inhibition of lactic acid bacteria strains isolated from kimchi. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **26**, 35–40.
- Pepe, O., Blaiotta, G., Moschetti, G., Greco, T., and Villani, F.** 2003. Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2321–2329.
- Rosenquist, H. and Hansen, A.** 1995. Contamination profiles and characterization of *Bacillus* species in white bread and raw materials of bread production. *Int. J. Food Microbiol.* **26**, 353–363.
- Rosenquist, H. and Hansen, A.** 1998. The antimicrobial effect of organic acids, sourdough and nisin against *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* isolated from wheat bread. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 621–631.
- Settanni, L., Massitti, O., Van Sinderen, D., and Corsetti, A.** 2005. *In situ* activity of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain. Influence on the interactions between lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 670–681.
- Thompson, J.M., Dodd, C.E.R., and Waites, W.M.** 1993. Spoilage of bread by *Bacillus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **32**, 55–66.
- Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S.L., Visconti, A., and Lavermicocca, P.** 2008. Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* **122**, 328–332.
- Ventimiglia, G., Alfonzo, A., Galluzzo, P., Corona, O., Francesca, N., Caracappa, S., Moschetti, G., and Settanni, L.** 2015. Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Food Microbiol.* **51**, 57–68.
- Voysey, P.A. and Hammond, J.C.** 1993. Reduced-additive breadmaking technology. In *Technology of Reduced Additive Foods* ed. Smith, J. pp. 80–94. London: Blackie Academic and Professional.