

Article

각두기로부터 분리된 유산균으로 제조한 사워도우의 기능성 평가

임은서^{1*} · 김영목² · 이은우³

¹동명대학교 식품영양학과, ²부경대학교 식품공학과, ³동의대학교 생명응용학과

Functional evaluation of sourdough containing lactic acid bacteria isolated from sliced radish kimchi

Eun-Seo Lim^{1*}, Young-Mog Kim², and Eun-Woo Lee³

¹Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University, Busan 48520, Republic of Korea

²Division of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

³Department of Life Science and Biotechnology, Dongeui University, Busan 47340, Republic of Korea

(Received June 7, 2017; Revised June 29, 2017; Accepted June 30, 2017)

The purpose of this study is to investigate the antioxidative and antimicrobial activities of sourdough fermented with the lactic acid bacteria (LAB) isolated from sliced radish kimchi. According to 16S rRNA gene sequence analysis, the isolated lactic acid bacteria were categorized as *Leuconostoc dextranicum* SRK03, *Lactobacillus brevis* SRK15, *Pediococcus halophilus* SRK22, *Lactobacillus acidophilus* SRK30, *Lactobacillus plantarum* SRK38, *Leuconostoc citreum* SRK 42, and *Lactobacillus delbrueckii* SRK60 with sequence similarity of 99%. After fermentation with *L. dextranicum* SRK03, *L. acidophilus* SRK30, *L. plantarum* SRK38 or *L. delbrueckii* SRK60 and *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7246 at 30°C for 24 h LAB and yeast in sourdough were present at levels of 10⁹ and 10⁷ CFU/g, respectively. In particular, the titratable acidity and ethanol and exopolysaccharide contents of sourdough fermented with *L. dextranicum* SRK03 were also significantly ($P < 0.05$) higher than those of sourdough fermented with *L. acidophilus* SRK30, *L. plantarum* SRK38, or *L. delbrueckii* SRK60. The sourdough fermented with *L. dextranicum* SRK03 and *L. acidophilus* SRK30 showed not only good DPPH radical-scavenging capacity but anti-lipid peroxidation activity. In addition, the viable counts of *Bacillus cereus* ATCC 11778 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 in sourdough during

storage for 5 days at 25°C were significantly ($P < 0.05$) lower than those of pathogenic bacteria in the control group due to the organic acids and bacteriocin produced by *L. acidophilus* SRK30 strain.

Keywords: antibacterial activity, antioxidant, exopolysaccharide, lactic acid bacteria, sourdough

빵은 상온에서 변질이 용이하므로 일반적으로 제조 과정 중에 방부제를 첨가해서 부패 미생물의 증식을 억제하지만, 화학적 보존제가 돌연변이나 발암 등을 유발한다는 사실이 알려지면서 건강에 관심이 높은 소비자들은 독성이 적은 천연물을 이용한 제빵을 선호하고 있다(Kocková *et al.*, 2011). 발효는 상하기 쉬운 식품들의 저장성 향상을 위해 역사적으로 오래 전부터 사용해오는 방법으로써 사워도우도 대표적인 발효 식품이다. 사워도우는 유산균과 효모를 100:1의 비율로 섞어 발효시킨 밀가루와 물로 구성된 혼합물로서 제빵에 주로 이용되는 천연물이다(Gobbetti, 1998). 사워도우 발효에 관여하는 유산균으로는 *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp., *Streptococcus* sp. 등이 있으며, 최근에는 *Lactobacillus sanfranciscensis*가 사워도우 내 우점종을 차지하고 있다고 보고된 바 있고, *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus fermentum* 등도 사워도우 제조 환경에서 흔히 분리되는 균종들이다(Robert *et*

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

al., 2006; Weckx et al., 2010). 한편, 효모로는 *Saccharomyces exiguous*, *Torulopsis holmii*, *Candida krusei*, *Pichia norvegensis* 및 *Hansenula anomala* 등이 주로 존재한다고 보고되고 있다 (Saeed et al., 2014).

사위도우 내에 함유된 유산균 및 밀이나 호밀 등 원료에 함유된 피타아제(phytase)는 아연, 철, 칼슘과 같은 2가 이온을 결합시키는 피트산(phytic acid)의 분해를 촉진시켜 이들 무기 이온의 생체 이용능을 높인다. 유산균의 단백질 분해효소 활성에 의해 밀 단백질을 가수분해함으로써 아미노산 함량을 증가시키는데 이는 유산균의 종류, 발효 시간 및 도우의 pH에 영향을 받는 것으로 보고되고 있다(Thiele et al., 2002). 특히, *Lactobacillus brevis linderi*, *L. sanfranciscensis* 및 *L. plantarum* 등은 지방족 화합물(aliphatic), 디카르복실(dicarboxylic) 및 히드록실(hydroxyl) 아미노산의 양을 증가시켜 체내 이용량을 높인다(Gobbetti et al., 1995). 또한 유산균과 효모는 단백질 및 지방 분해효소의 작용으로 향기 성분인 아세테이트, 에탄올, 디아세틸, 아세트알데히드, 3-methyl-1-butanol, 2-phenylethanol 등과 같은 향기성분을 생산한다(Kocková et al., 2011).

한편, 사위도우 제조 원료인 곡물에는 전분 및 베타글루칸(β -glucan), 폴리프루탄(polyfructan), 자일로오스(xylose) 및 아라비노오스(arabinose) 등의 비전분질 다당류 등이 함유되어 있다. 발효 과정 중 전분은 부분적으로 분해되는 반면, 일부 비전분질 다당류는 식이섬유로 작용한다. 밀이나 호밀가루는 니스토스(nystose), 케토오스(kestose) 및 기타 프락토올리고당(fructooligosaccharide)을 함유하며 이들은 프리바이오틱(prebiotic) 성분으로 잘 알려져 있다(Van Loo et al., 1999). 프리바이오틱스는 면역기능 강화, 항암 및 항산화 활성에 의해 장 건강 기능 개선 효과를 나타내는 프로바이오틱(probiotic) 유산균의 증식을 촉진하는 것으로 잘 알려져 있다(Modler, 1994). 게다가 *L. sanfranciscensis* 등의 일부 유산균은 세포 외 다당류(exopolysaccharide, EPS)를 생산함으로써 사위도우의 다당류 함량을 증가시키고 이는 활성산소 제거를 비롯하여 빵의 부피, 점도, 조직감 및 노화 지연 등 빵의 품질 향상에 도움을 준다(Leory and De Vuyst, 2004; Polak-Berecka et al., 2013).

또한 유산균은 당을 분해하여 유기산, 이산화탄소, 에탄올, 과산화수소, 디아세틸, 향진균성 물질, 박테리옌, 항생제(reutericyclin), 지방산 및 페닐락트산(phenyllactic acid) 등의 각종 향균물질을 생산함으로써 곰팡이 증식과 로프(rope) 형성 억제 등 빵의 저장성을 향상시키는데 효과적이다(Valerio et al., 2008). 특히 초산, 프로피온산 및 유산 등은 식후 혈당 수치를 감소시키고 인슐린 반응에도 중요한 역할을 한다(Saeed

et al., 2014). 사위도우에서 분리된 *Lactobacillus pentosus* 2MF8은 박테리옌을 생산하여 항균 활성을 발휘하였고, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M30이 생산한 박테리옌도 사위도우 내에서 강력한 항균 스펙트럼을 나타내었다고 보고하였다(Coresetti et al., 2004).

따라서 본 연구에서는 당 발효능과 염기서열 분석을 통해 깎두기로부터 분리한 유산균을 동정하고 선발된 균주를 사위도우 발효에 이용하여 미생물학적 및 이화학적 특성과 항산화 활성 및 향균물질 생성에 따른 저장성 평가를 실시하고자 한다.

재료 및 방법

유산균 분리 배양 및 동정

숙성된 깎두기 시료 30 g를 무균적으로 취하여 인산완충용액(phosphate buffer saline, PBS, pH 7.0) 270 ml를 가하고 난 다음 스토마커(3M)를 이용하여 약 2분간 균질화한 것을 시료 용액으로 하였다. 십진법으로 희석한 용액 1 ml는 1% (w/v) CaCO_3 이 첨가된 *Lactobacilli* MRS agar (Difco) 평판배지에 도말한 후 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 집락 주변에 투명한 환을 생성한 균주를 유산균으로 간주하여 MRS agar 평판배지에 희석 점중으로 순수분리하고 계대 배양하였다. 선발된 유산균은 API 50 CHL kit (bioMérieux Co.)를 이용하여 당 발효능을 조사하였다. 또한 DNA extraction kit (Qiagen)로 선발된 유산균의 DNA를 추출 정제한 다음 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTA CGACTT-3') primer를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 DNA를 증폭시키고 DNA sequencer (ABI Prism® 3730 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems)로 유전자 염기서열을 분석하여 동정하였다.

사위도우 제조

Choi 등(2012)의 방법을 일부 변형하여 사위도우를 제조하였다. 선발된 유산균(MRS broth, 37°C, 24시간)과 Korean Collection for Type Cultures (KCTC)로부터 분양 받은 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7246 (YM broth, 30°C, 24시간)을 각각 최적의 조건에서 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 모은 세포는 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하여 준비하였다. 한편 밀가루(BaekSul, 강력분; 수분 10.5%, 조단백 16.7%, 조지방 0.9%, 조회분 1.5%) 380 g, 물 210 g, 소금 5.3 g 및 설탕 11.2 g의 혼합물에 PBS (pH 7.0)에 현탁한 유산균(1.0×10^6 CFU/g)

과 효모(1.0×10^4 CFU/g)를 각각 5 g 접종하고 난 다음 약 5분 간 반죽기(HM3000, Brown)를 이용하여 사워도우 재료를 혼합하였다. 혼합한 반죽은 멸균한 비이커에 담아서 온도 30°C, 상대습도 80% 하에서 24시간 동안 발효시켜 사워도우를 제조하였다. 이때 유산균과 효모 배양액을 인위적으로 접종하지 않고 원료 혼합만으로 발효시킨 사워도우를 대조구로 사용하였다.

사워도우 내 미생물수 및 대사산물 양 측정

발효 종료 직후 시료 10 g을 무균적으로 채취한 후 PBS (pH 7.0) 90 ml와 혼합하고 균질화한 다음 적당한 단계까지 연속 심진희석 하였다. 곰팡이와 효모의 증식을 억제하기 위해 cycloheximide (Merck) 10 ppm 을 첨가한 MRS agar 평판배지에 접종 후 37°C, 48시간 배양하여 시료 내에 존재하는 유산균 수를 측정하였다. 또한 심진 희석한 시료 용액을 10% tartaric acid를 첨가한 Potato Dextrose Agar (Difco) 상에서 25°C, 48시간 배양하여 효모 균수를 측정하였다. 시료 10 g을 증류수 90 ml와 혼합 균질화한 후 pH meter (Fisher Scientific)를 이용하여 pH를 측정하였다. 산도는 시료 (10 g)에 동량의 증류수를 가하고 1% (w/v) phenolphthalein을 첨가한 다음 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 소비량을 측정한 후 계산 [산도 (%) = (0.1 N NaOH 소비량 \times 0.1 N NaOH 역가 \times 0.9) / 시료양] 하였다.

사워도우 내 에탄올 함량은 Paramithotis 등(2005)의 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 즉, 시료(10 g)는 25 mM PBS (pH 5.6, 90 ml)와 혼합 후 4°C에서 2시간 동안 150 rpm속도로 교반하였다. 현탁액은 원심분리(20,000 \times g, 10분, 4°C)하여 얻은 상등액은 50 μ l perchloric acid (70%, v/v)로 혼합한 후 4°C에서 24시간 방치하고 침전된 단백질을 제거하기 위해 원심분리(12,000 \times g, 60분, 4°C)해서 모은 상등액은 0.22 μ m syringe filter로 여과 제균하였다. 시료 용액(20 μ l)은 high-pressure liquid chromatography (HPLC)의 이온 교환 컬럼 (Aminex HPX-87 H, 300 \times 7.8 mm, Bio-Rad Life Science Group) 온도 35°C에서 이동상(5 mM H₂SO₄)의 유속 0.5 ml/min의 조건 하에서 refractive index detector로 분석하고 표준용액의 검량곡선으로부터 에탄올과 당 함량을 측정하였다. 사워도우 내 EPS함량 측정은 Choi 등(2012)의 방법에 따라 측정하였다. 사워도우 시료 중량의 9배에 해당하는 증류수를 가하여 4°C에서 2시간 동안 진탕(150 rpm)시켜 수용성 EPS를 추출하고 원심분리(20,000 \times g, 10분, 4°C) 하였다. 상등액을 회수하고 4% trichloroacetic acid를 가하고 4°C에서 2시간 배양하였다. 원심분리(20,000 \times g, 10분, 4°C)하여 침전물을 제거하고 상등액의 2배에 해당하는 95% 냉알코올을 첨가하여 4°C에서

15시간 배양하였다. 원심분리(20,000 \times g, 10분, 4°C)하여 모은 침전물은 증류수에 용해시키고 4°C에서 8시간 동안 증류수 내에서 투석(molecular weight cut-off 12,000 Da; Sigma-Aldrich)하고 난 다음 동결 건조한 상태로 EPS 농도를 phenol-sulphuric acid로 측정하였다.

항산화 활성 측정

사워도우의 항산화 활성은 Coda 등(2012)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 우선 사워도우(10 g)에 50 mM Tris-HCl (pH 8.8, 30 ml)를 가하여 4°C에서 1시간 동안 교반한 후 원심분리(20,000 \times g, 20분)하여 얻은 상등액(수용성/염용성 추출물, water/salt-soluble extract, WSE)을 동결 건조하고 시료 내 펩타이드의 농도는 o-phthalaldehyde (OPA) 방법(Church et al., 1983)에 따라 측정하였다.

WSE의 라디칼 소거능 측정을 위해 시료의 펩타이드 농도 1 mg/ml가 되도록 취하여 0.1 M PBS (pH 7.0)에 용해한 시료(2 ml)는 95% 알코올에 용해된 0.1 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, 2 ml)를 가하여 10초간 진탕 혼합한 후 상온에서 30분간 방치하였다. 시료 용액의 흡광도(UV-1601, SHIMAZU)를 517 nm에서 측정하고 라디칼 소거능(%) = [(blank absorbance - sample absorbance) / blank absorbance]을 계산하였다.

한편, 동결 건조된 시료(1 g)는 0.1 M PBS (pH 7.0, 1 ml)로 용해한 후 무수알코올에 용해시킨 50 mM 리놀레산(linoleic acid, 1 ml)을 첨가하였다. 시험관 입구를 단단히 막고 60°C, 5일간 암실에서 배양하였다. 산패 정도는 ferric thiocyanate value로 측정하기 위해 시료(100 μ l)는 75% (v/v) 알코올(4.7 ml), 30% (w/v) 티오시안산암모늄(0.1 ml), 1 M HCl에 용해시킨 0.02 M 염화제일철(0.1 ml)과 혼합하고 3분 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. Butylated hydroxytoluene (BHT)과 α -tocopherol (1 mg/ml)은 라디칼 소거능 및 유지 자동산화 억제능 측정을 위한 양성 대조구로 사용하였다.

항균물질 함량 측정

사워도우 내 유산 및 초산 함량은 Alfonzo 등(2013)의 방법을 일부 변형하여 시료(1 g)에 15.5 M nitric acid (100 μ l)와 0.01 M sulfuric acid (2 ml)를 가한 다음 원심분리(14,000 \times g, 30분, 4°C)하여 단백질을 침전시켰다. 회수한 상등액은 여과제균(0.22 μ m membrane filter)한 후 HPLC의 Aminex HPX-87 H (300 \times 7.8 mm) 컬럼으로 온도 60°C, 이동상(8 mM H₂SO₄) 유속 0.7 ml/min, 210 nm에서 UV detector로 분석하고 표준용액의 검량곡선을 이용하여 유산과 초산 함량을 정량하였다.

박테리옌 함량 측정을 위해 Settanni 등(2005)에 따라 사워

도우(10 g)에 항균물질의 소수성을 고려하여 40% acetonitrile-0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (90 ml)를 가한 후 약 2분간 균질화한 다음 원심분리(15,000 × g, 10분, 4°C) 하였다. 침전물을 동결 건조시킨 다음 50% (v/v) 알코올(4 ml)에 용해시켜 *Bacillus cereus* ATCC 11778과 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538에 대한 항균활성을 microplate well assay (Hole *et al.*, 1991)에 따라 측정하였다. *B. cereus* ATCC 11778과 *S. aureus* ATCC 6538은 Brain Heart Infusion (BHI) broth (Difco)에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포를 회수하고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척한 다음 1.0×10^5 CFU/ml로 조정하였다. Microtiter plate (BD Falcon)의 well에 멸균된 BHI broth (900 µl), *Bacillus* sp. 세포 현탁액(50 µl) 및 1/2배씩 단계적으로 희석한 항균물질(50 µl)을 가한 후 37°C에서 12시간 배양한 후 580 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항균물질 대신 PBS (pH 7.0)를 처리한 대조군 혼탁도의 50% 이하를 나타낸 최대 희석배수의 역수를 취하여 arbitrary units (AU)로 나타내었다. 박테리옌 추출 과정 중에 사용한 알코올에 의한 항균 활성이 확인되면 이를 배제하였다.

저장성 평가

BHI broth에 *B. cereus* ATCC 11778과 *S. aureus* ATCC 6538을 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하여 얻은 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하였다. 세포를 회수하고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척한 다음 1.0×10^3 CFU/ml에 맞춘 세포 현탁액(5 g)을 사위도우 원료 반죽과정 중에 인위적으로 접종하여 발효 종료 직후와 25°C에서 5일간 저장한 후 시료 내 잔존하는 균수를 측정하였다. 사위도우 시료(10 g)에 PBS (pH 7.0, 90 ml)를 가하여 균질화한 다음 십진 희석한 시료 용액 내 *B. cereus*는 Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar (Difco),

*S. aureus*는 *Staphylococcus* 110 medium (Difco)상에서 37°C, 48시간 배양하여 균수를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 항목별로 각각 3회 실시한 후 얻어진 측정값은 평균 ± 표준편차로 나타내었다. Statistical Package for Social Science (SPSS) 프로그램의 일원배치 분석분석(one-way ANOVA)을 이용하여 실험구의 유의적 차이를 유의수준 $P < 0.05$ 하에서 Tukey's multiple range test를 통해 검증하였다.

결과 및 고찰

깍두기로부터 분리된 유산균 동정

숙성된 깍두기로부터 유산균으로 추정되는 집락을 순수분리한 후 API 50 CHL kit를 이용하여 당 분해능을 확인하고 16S rRNA 유전자 염기서열분석을 통해 동정한 결과는 Table 1과 같다. 총 28종 중에서 MRS broth 상에서 37°C, 24시간 배양 후 10^9 CFU/ml 이상의 균수에 도달하여 증식 속도가 빠르고, MRS agar 평판배지 상에서 서로 다른 형태와 크기의 집락을 형성하는 7종을 선발하였다. 당 분해능을 통해 SRK03, SRK15, SRK22, SRK30, SRK38, SRK42 및 SRK60는 각각 *Leuconostoc dextranicum* (99.0%), *L. brevis* (99.5%), *Pediococcus halophilus* (98.7%), *L. acidophilus* (99.2%), *Lactobacillus pentosus* (97.0%), *Leuconostoc mesenteroides* (95.2%) 및 *Lactobacillus delbrueckii* (99.0%)로 동정되었다. 한편, 16S rRNA 유전자 염기서열분석을 통해 SRK03, SRK15, SRK22, SRK30 및 SRK60 균주는 당 분해능과 동일하게 동정되었으나, SRK38은 *L. plantarum* (99.9%) 및 SRK42는 *Leuconostoc citreum* (99.9%)로 확인되었다. 따라서 선발된 7종의 균주는 최종 *L. dextranicum* SRK03,

Table 1. Identification of lactic acid bacteria isolated from sliced radish kimchi by API 50 CHL kit and 16S rRNA gene sequencing

Strain	Sugar utilization		16S rRNA gene sequence		
	Species affiliation	Confidence (%)	Related strain in NCBI (Accession No.)	Similarity (%)	Identification
SRK03	<i>Leuconostoc dextranicum</i>	99.0	<i>Leuconostoc dextranicum</i> LH6 (KT719225)	99.9	<i>Leuconostoc dextranicum</i> SRK03
SRK15	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.5	<i>Lactobacillus brevis</i> LM17 (KY643651)	99.8	<i>Lactobacillus brevis</i> SRK15
SRK22	<i>Pediococcus halophilus</i>	98.7	<i>Pediococcus halophilus</i> KL33 (KJ699142)	99.5	<i>Pediococcus halophilus</i> SRK22
SRK30	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	99.2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> MS1 (KP987308)	99.9	<i>Lactobacillus acidophilus</i> SRK30
SRK38	<i>Lactobacillus pentosus</i>	97.0	<i>Lactobacillus plantarum</i> SLC21 (KX943327)	99.9	<i>Lactobacillus plantarum</i> SRK38
SRK42	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	95.2	<i>Leuconostoc citreum</i> FT671 (KM207810)	99.0	<i>Leuconostoc citreum</i> SRK 42
SRK60	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	99.0	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> KT1 (KC404974)	99.7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> SRK60

L. brevis SRK15, *P. halophilus* SRK22, *L. acidophilus* SRK30, *L. plantarum* SRK38, *L. citreum* SRK 42, *L. delbrueckii* SRK60 으로 명명하였다.

김치 발효 과정 중에는 세균, 효모 및 곰팡이 등 다양한 미생물이 관여하며 특히 김치에서 분리되는 유산균으로는 *Leuconostoc mesenteroides*, *L. dextranicum*, *L. citreum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* 및 *Enterococcus faecalis* 등이 김치의 조직감을 연화시키고 풍미 향상에도 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있는데(Cheigh and Park, 1994) 이는 본 연구에서 사용된 깍두기에서 분리된 균종과 거의 일치하는 것으로 확인되었다. 헤테로형 유산균(hetero-fermentative LAB)은 원료에 함유된 당을 유산, 초산, 이산화탄소 및 에탄올로 전환시키고 그 중에서 유기산과 이산화탄소는 김치의 숙성 초기에는 아삭한 식감과 탄산 맛을 부여하나, 숙성기간이 경과할수록 호모형 유산균(homo fermentative LAB)과 효모의 증식에 따라 풍미가 저하되는 것으로 알려져 있는데(Cheigh and Park, 1994) 본 연구의 3개월 이상 숙성된 깍두기 시료에는 헤테로형 뿐만 아니라 호모형 유산균도 분리되었다.

유산균은 오래 전부터 각종 발효식품 스타터로 이용되어 식품에 독특한 풍미 부여, 저장기간 연장 및 질병 발생 위험 감소 등 건강 개선을 위한 유용한 기능이 밝혀지고 있다. 발효 과정 중에 다양한 항균물질을 생산하고 장관 상피세포에 대해 유해균의 부착을 경쟁적으로 배제하는 등 병원성 식중독균을 제어하는 생물학적 보존제 역할을 하며, 숙주의 면역을 강화하고 장내 미생물의 균형을 맞춰 장 기능 개선 효과를 발휘하는 프로바이오틱 균주로도 잘 알려져 있다(Ali, 2010). 유산균을 이용한 발효식품으로는 김치와 같은 침채류를 비롯하여 유제품, 알코올 음료, 육류 및 어류 가공품 등 다양한 형태의 식품에 이용되어 향미 성분 생산에 따른 관능학적 가치를 향상시키고 단백질과 비타민의 이용능을 증가시켜 영양학적 가치를 높인다(Scott and Sullivan, 2008). 특히, 독성 유발 위험이 높은 화학적 식품첨가물을 대체할 수 있는 천연물로 발효시킨 사위도우에도 유산균을 이용함으로써 항균물질 생산에 의한 빵의 부패와 노화를 억제할 뿐만 아니라 당 중합체, 감미 성분, 방향족 화합물, 비타민, 효소 등을 생산함으로써 빵의 품질과 영양가를 높여 건강에 이롭다는 연구 결과도 있다(Saeed et al., 2014).

사위도우 시 원료인 곡분은 살균하지 않은 채 사용하므로 세균, 곰팡이 및 효모수는 $10^4 \sim 10^6$ CFU/g에 이르나, 발효 과정 중에 미생물 종류와 수가 변화하여 우점종을 차지하는 다양한 종의 유산균들의 균수가 점진적으로 증가된다. 사위도우 내 유산균의 종류는 발효 방식, 원료에 함유된 미생물간의 상호작용,

밀가루 종류, 영양성분의 이용능 및 제조 환경에 따라 상이하며 유산균은 영양성분의 동화 및 이화능력이 탁월하고 환경 변화에 대해서도 적응력이 높기 때문에 사위도우 내에서 다양한 유산균종이 증식한다. 사위도우 발효 동안 유산균은 빵의 저장 기간 연장, 알레르기를 유발하는 성분의 가수분해, 통곡물(whole grain), 섬유질이 풍부하거나 글루텐 프리(gluten-free) 제품의 조직감과 맛 개선, 생리활성물질 양 증가 및 무기질의 생체이용률 강화에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Arendt et al., 2007). 사위도우에서 분리된 유산균은 50여 종 이상으로 다양한 유산균이 이용되고 있으며 이들의 유용한 생리활성이 빵의 품질 향상에 기여하는 것으로 알려져 있어 본 연구에서는 깍두기에서 분리된 유산균이 사위도우의 품질과 기능성에 미치는 영향을 확인하였다.

사위도우 내 발효 미생물수 및 대사산물 생성량

유산균을 접종하지 않고 발효시킨 대조구와 선발된 유산균을 접종하여 발효시킨 사위도우 내 유산균 및 효모수, pH, 총산도, 에탄올 및 EPS 생성량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 대조구 내에 존재하는 유산균과 효모수는 각각 $4.4 \pm 0.6 \times 10^4$ CFU/g 및 $3.6 \pm 2.1 \times 10^3$ CFU/g으로 나타났으나, *L. dextranicum* SRK03, *L. acidophilus* SRK30, *L. plantarum* SRK38 및 *L. delbreckii* SRK60의 유산균수는 10^9 CFU/g 이상이었으나, *L. brevis* SRK15, *P. halophilus* SRK22 및 *L. citreum* SRK42의 유산균수는 10^8 CFU/g 이상을 유지하였다. SRK22를 제외한 그 외의 유산균과 *S. cerevisiae*의 혼합 배양 시 효모수는 10^7 CFU/g 이상 검출되었다. 대조구의 pH와 총산도는 각각 5.84 ± 0.25 , $0.27 \pm 0.05\%$ 인 반면, 제조된 사위도우의 pH 범위는 $4.21 \pm 0.11 \sim 4.96 \pm 0.15$ 이고 총산도의 범위는 $0.42 \pm 0.04 \sim 1.00 \pm 0.13$ 으로 측정되어 사위도우 내 유산균수가 많을수록 pH는 낮고, 총산도는 높게 나타났다. 헤테로형 유산균인 *L. dextranicum* SRK03 (1.10 ± 10 g/kg), *L. brevis* SRK15 (0.94 ± 0.09 g/kg) 및 *L. citreum* SRK 42 (1.23 ± 15 g/kg)은 대조구보다 유의할만한 수준의 에탄올을 생성한 반면, 호모형 유산균인 SRK22, SRK30, SRK38 및 SRK60은 에탄올을 생성하지 않았다. 대조구의 EPS 함량은 유산균을 접종하여 발효시킨 사위도우 내 EPS 함량보다 유의하게 낮은 수준이었으며, SRK03 (26.0 ± 0.8 g/kg), SRK30 (25.4 ± 1.4 g/kg) 및 SRK60 (20.5 ± 1.9 g/kg)은 다른 유산균에 비해 훨씬 많은 양의 EPS를 생산하였다.

사위도우 내 유산균수는 10^8 CFU/g 이상을 차지하며 주로 원료나 발효스타터, 내재적 및 외재적 인자에 영향을 받는다. 내재적 인자는 사위도우의 화학적 및 미생물학적 구성성분에 영향을 받고 외재적 인자는 발효 온도 및 산화환원전위 등의

해 주로 결정되는 것으로 알려져 있으며 이외에도 수분활성도, 소금 첨가량, 스타터의 양과 구성성분 및 발효 시간 등에 따라 유산균수에 차이가 난다. 발효가 진행될수록 유산균수가 급증하면서 원료 자체 및 제빵 환경에 오염된 잡균의 증식을 억제하는 것으로 보고된 바 있는데(De Vuyst and Neysens, 2005) 본 연구 결과에서도 대조구보다 인위적으로 스타터를 접종하여 발효시킨 사워도우에서 유의하게 많은 유산균과 효모수가 검출되었으며 유산균종에 따라서 유산균과 효모의 균수에 차이가 있었다. 본 연구의 대조구 사워도우에서 분리된 유산균과 효모를 동정하지 않았지만, 기존 연구 결과에 의하면 사워도우에서 가장 흔히 발견되는 유산균은 *Lactobacillus* sp. 이고 *Leuconostoc* sp., *Weissella* sp. 및 *Pediococcus* sp. 등이 있으며 lactococci, enterococci 및 streptococci 등도 드물게 발견된다고 알려져 있다. 우점종 효모로는 *Saccharomyces* sp., *Candida* sp., *Pichia* sp. 및 *Hansenula* sp. 등이며, 곡분의 종류, 발효 온도, 사워도우 저장 온도 등에 영향을 받아 효모 종류가 다양하다고 알려져 있다(De Vuyst and Neysens, 2005).

De Vuyst와 Neysens (2005)에 따르면, 사워도우 발효 중에 유산균과 효모의 균수 비율이 100:1 정도이며, 이들 미생물은 대사적 상호작용, 발효 온도, pH 및 유기산에 의해 서로 안정된 관계를 유지한다고 하였다. 유산균과 효모의 혼합 배양에 의한 사워도우 발효 시 효모는 아미노산, 펩타이드 및 비타민을 생산하고 이를 유산균이 이용함으로써 효모는 유산균의 증식을 자극한다. 따라서 사워도우 발효 중에 순수한 유산균만을 스타터로 이용하는 것보다 유산균과 효모의 혼합 배양은 빵의 풍미와 영양학적 측면에서 상승효과를 나타내고 기질의 이용능을 향상시키고 미생물간의 성장을 서로 촉진할 수도 있

다. 반면 유산균과 효모는 특정 당 성분을 두고 경쟁하여 유산균의 증식을 억제하고 그로 인해 산 생성량을 감소시키기도 하므로 주요 탄소원에 대해 비경쟁적 환경이 미생물들의 정상적인 증식에 필수적인 요건이다(Gereková *et al.*, 2011). 즉, 사워도우 내 미생물은 유산균과 효모의 대사적 상호작용에 의해 안정된 관계를 형성하며, 사워도우 유산균의 생화학적 및 생리학적 특성은 빵의 물성(부피, 부서짐성, 가공성), 관능학적 및 영양학적 특성(산미, 방향성분, 피트산 가수분해)에 영향을 미친다. 특히, 사워도우 제조는 헤테로형 유산균이 유용한데 이는 유산 이외에 초산을 생산함으로써 최종 제품에 독특한 신맛을 부여하게 되고 피트산 분해효소(피타아제, phytase)를 활성화시켜 이용할 수 있는 영양분의 양을 증가시킨다. 게다가 유산균에 의한 사워도우 발효는 호밀의 펜토산(pentosan)의 용해성을 촉진하고 도우의 수분 보유력을 강화시킨다. 유산균의 단백질 분해효소에 의해 밀가루 단백질을 분해되고 휘발성 방향족 화합물이나 방향성분의 전구체 생산 및 아르기닌 대사 경로를 거치는 동안 풍미가 향상된다. 또한 유산균은 항균 및 항진균성 물질 및 EPS 생산과 로프 형성 억제를 통해 빵의 조직감, 노화 및 저장성에도 효과적이다(De Vuyst and Neysens, 2005).

Ventimiglia 등(2015)은 인위적으로 유산균을 접종하지 않은 대조구의 사워도우 내에서 검출된 유산균수는 배양 8시간만에 1.62 ± 0.01 Log CFU/g, 21시간 배양 후에는 2.99 ± 0.00 Log CFU/g으로 나타났는데 본 연구의 대조구 내 균수보다는 낮은 수준이었다. 또한 *L. planatrum* PON100148과 *L. sanfranciscensis* LMG17498 혼합 배양에 의해 제조한 사워도우 내에서는 8.71 ± 0.03 Log CFU/g의 유산균수가 검출되었다고 하여 본 연

Table 2. Microbiological and physicochemical properties of sourdough fermented with lactic acid bacteria isolated from sliced radish kimchi

Strain	Viable cell counts (CFU/g)		pH	Total titratable acidity (%)	Ethanol (g/kg)	EPS (g/kg)
	LAB ^A	Yeast ^B				
Control	$4.4 \pm 0.6 \times 10^{4a}$	$3.6 \pm 2.1 \times 10^{3a}$	5.84 ± 0.25^c	0.27 ± 0.05^a	0.43 ± 0.08^a	5.4 ± 1.1^a
<i>Leuconostoc dextranicum</i> SRK03	$2.4 \pm 1.0 \times 10^{9bc}$	$2.4 \pm 1.7 \times 10^{7c}$	4.72 ± 0.09^b	0.62 ± 0.04^c	1.10 ± 0.10^{bc}	26.0 ± 0.8^d
<i>Lactobacillus brevis</i> SRK15	$6.4 \pm 1.7 \times 10^{8b}$	$4.1 \pm 1.2 \times 10^{7c}$	4.85 ± 0.08^b	0.52 ± 0.05^{bc}	0.94 ± 0.09^b	10.4 ± 3.0^{ab}
<i>Pediococcus halophilus</i> SRK22	$4.6 \pm 0.7 \times 10^{8b}$	$1.1 \pm 3.5 \times 10^{6b}$	4.95 ± 0.12^b	0.48 ± 0.05^{bc}	ND	12.3 ± 2.9^b
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SRK30	$3.3 \pm 1.0 \times 10^{9cd}$	$6.6 \pm 1.3 \times 10^{7cd}$	4.67 ± 0.11^b	0.61 ± 0.07^c	ND	25.4 ± 1.4^d
<i>Lactobacillus plantarum</i> SRK38	$6.7 \pm 1.5 \times 10^{9e}$	$4.7 \pm 3.3 \times 10^{7cd}$	4.64 ± 0.14^b	0.65 ± 0.07^c	ND	18.7 ± 2.5^c
<i>Leuconostoc citreum</i> SRK 42	$8.2 \pm 1.4 \times 10^{8bc}$	$5.3 \pm 6.1 \times 10^{7cd}$	4.96 ± 0.15^b	0.42 ± 0.04^{ab}	1.23 ± 0.15^c	15.5 ± 1.5^{bc}
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> SRK60	$5.3 \pm 1.2 \times 10^{9de}$	$3.3 \pm 5.5 \times 10^{7c}$	4.21 ± 0.11^a	1.00 ± 0.13^d	ND	20.5 ± 1.9^{cd}

^{A,B}Sourdough was prepared by inoculating lactobacillus (1.0×10^6 CFU/g) and yeast (1.0×10^4 CFU/g) into a mixture of wheat flour and other ingredients and then fermenting at 30°C for 24 h. After fermentation, the viable cell counts of LAB and yeast in sourdough counts were measured by pour plate method.

Data are Means \pm SD from triplicate determinations and means with the different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Turkey's multiple range test.

(LAB, lactic acid bacteria; EPS, exopolysaccharides; ND, Not detected.)

구에서 사용된 *L. brevis* SRK15, *P. halophilus* SRK22 및 *L. citreum* SRK42는 이와 비슷한 수준의 균수가 확인되었다. 또한 *L. plantarum*, *Lactobacillus curvatus* 및 *Lactobacillus graminis* 등으로 발효시킨 사워도우 내는 8시간만에 pH 4.7 이하로 떨어지고 72시간 후에는 3.65 이하로 나타났는데 이는 유산 혹은 초산의 생산 때문이라고 보고하였다. 한편, *S. cerevisiae*와 *L. sanfranciscensis*, *L. brevis*, *Lactobacillus paralimentatrius*, *Weissella cibaria* 및 *P. pentosaceus* 등의 유산균을 조합하여 발효시킨 경우 유산균은 효모의 증식에 영향을 미치지 않았으나, *L. brevis*와 *W. cibaria* 등은 *L. sanfranciscensis*의 증식을 촉진하는 결과를 얻었으며, 사워도우의 pH는 3.57~3.85이고 총산도는 10.0~12.5 정도로 나타났다고 하였는데 본 연구에서 사용된 사워도우는 이들보다 유의하게 높은 pH와 낮은 산도로 측정되었다. 또한 이들 유산균은 에탄올과 글리세롤(glycerol)을 생산하지 못하고 *S. cerevisiae*가 주로 이들 대사산물을 생산하였다고 하였으나(Paramithiotis et al., 2005), *L. dextranicum* SRK03, *L. brevis* SRK15 및 *L. citreum* SRK42는 에탄올을 생성하였다.

김치로부터 분리된 *L. citreum* HO12 및 *Weissella koreensis* HO20을 사워도우 제조용 스타터로 이용한 경우 25°C에서 24시간 배양 후 유산균수는 10^9 CFU/g에 이르렀고 초기 pH는 6.38에서 4.39로 감소되었으며, 유산균수와 pH는 유산균종에 따라 유의한 차이는 나타나지 않았다. 또한 배양 시간이 경과함에 따라 pH는 감소된 반면 총산도는 증가되었고, 이때 *L. citreum* HO12의 총산도가 *W. koreensis* HO20에 비해 다소 높게 나타났다고 하여 본 연구의 사워도우와 미생물학적 및 이화학적 특성이 유사하였다. 한편, 유산균을 접종하지 않은 대조구 사워도우 내에서는 24시간 배양 후 유기산이 거의 검출되지 않아 밀가루 내에 존재하는 내재적 미생물은 사워도우의 산성화에 거의 영향을 미치지 않았다고 한 반면 본 연구의 대조구는 원료 자체에 함유되었거나 발효과정 중에 혼입된 유산균에 의한 산도가 측정되었다. 하지만 *L. citreum* HO12와 *W. koreensis* HO20으로 제조한 사워도우에서는 유의한 양의 유산과 초산이 검출되었다. 두 균주 모두 이형 유산균일지라도 *W. koreensis* HO20은 유산의 생성량이 많은 반면, *L. citreum* HO12는 초산의 생성량이 더 많았다. 초산에 대한 유산의 비율을 나타내는 발효지수(fermentation quotient, FQ)는 일반적으로 2.0~2.7가 최적 범위인데 이는 빵의 관능학적 특성과 저장성에도 유리한 것으로 알려져 있으며 *W. koreensis* HO20가 최적의 FQ를 생성하는 것으로 확인되었다. 게다가 *W. koreensis* HO20 (4.7 mM/kg)은 *L. citreum* HO12 (3.3 mM/kg)보다 에탄올 생성량이 많았다. *L. citreum* HO12와 *W. koreensis* HO20을 접

종하여 24시간 배양한 사워도우 내 EPS 생성량은 5 g/kg 정도에 이르렀고, 유산균을 인위적으로 접종하지 않은 대조구 사워도우 내에서는 약 3.6 g/kg 정도였는데(Choi et al., 2012), 본 연구에 사용한 유산균으로 제조한 사워도우 내 EPS 함량은 이들 보다 월등히 높았다.

EPS는 고분자량 및 생분해성 중합체로서 유산균을 비롯한 다양한 세균에 의해 생합성된다. 종류는 동형(homopolysaccharides)과 이형(heteropolysaccharides)으로 구분되며 동형은 한 종류의 단당류로 구성된 고분자인 반면 이형은 반복 단위의 중합체 형태이다. 세균이 생산한 EPS는 식품첨가물로서 증점제, 안정화제, 유화제 및 겔화 또는 보수제 등으로 이용될 뿐만 아니라 암 세포 증식 억제, 면역 자극 활성 및 혈중 콜레스테롤을 저하 등의 기능도 확인된 바 있다(Sanalibaba and Cakmak, 2016). 파네토노(panettone, 효모로 발효시킨 이탈리아 빵)를 비롯한 다양한 빵 제조 시 텍스트란(dextran)과 같은 하이드로콜로이드(hydrocolloid)성 화학적 첨가물을 산업적으로 많이 활용하고 있다. 다양한 생리활성을 가진 프로바이오틱 유산균이 생산한 EPS의 일종인 레반(levan)은 사워도우나 빵의 조직감, 수분 보유력 및 부피감 개선에 효과적이므로 하이드로콜로이드 첨가물을 대체할 수 있다고 하여(Patel et al., 2010) EPS 생산량이 많은 유산균을 사워도우 제조에 이용한다면 물성 향상에 도움이 될 것으로 사료된다.

사워도우의 항산화 활성

선발된 유산균으로 제조한 사워도우의 DPPH 라디칼 소거능과 리놀레산 과산화 억제능을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 대조구의 DPPH 라디칼 소거능과 리놀레산 과산화 억제능은 각각 $11.5 \pm 3.4\%$ 및 1.05 ± 0.05 수준이었으나, 유산균을 접종하여 발효시킨 사워도우의 항산화능은 대조구에 비해 유의할만한 수준으로 높게 나타났다($P < 0.05$). 비록 양성대조군인 BHT와 α -tocopherol에 비해선 낮은 수준이지만 *L. dextranicum* SRK03, *L. brevis* SRK15, *L. acidophilus* SRK30 및 *L. plantarum* SRK38의 DPPH 라디칼 소거능은 25~40% 정도로 나타났다. 게다가 유지 과산화에 대해서도 *L. dextranicum* SRK03, *L. acidophilus* SRK30 및 *L. plantarum* SRK38은 상당히 높은 억제능을 나타낸 반면, *L. citreum* SRK42 및 *L. delbrueckii* SRK60의 억제 효과는 다소 낮게 나타났다.

비만에 의해 유도된 산화적 스트레스는 자유 라디칼 연쇄 반응 메커니즘에 의해 추가 손상을 유발할 수 있는 활성산소종(reactive oxygen species)을 생성하는데 이러한 활성산소종은 세포막의 다가불포화 지질에 유해한 영향을 미쳐 세포 구조에 손상을 초래하고 아울러 지질 과산화에 의해 생성되어 DNA와

단백질에 독성을 나타내는 말론디알데히드(malondialdehyde)도 세포에 손상을 준다. *Lactobacillus* sp. 등의 일부 유산균은 말론디알데히드 농도를 감소시킬 뿐만 아니라 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione (GSH) 등의 항산화 방어 시스템을 강화시켜 산화적 스트레스로부터 인체를 보호하는 역할을 한다(Girotti, 1998). *In vitro* 및 *in vivo* 상에서 프로바이오틱스 유산균은 산화적 손상, 자유 라디칼 소거능 및 항산화 효소의 활성을 감소시킬 수 있다고 알려져 있다(Mishra *et al.*, 2015).

Afify 등(2012)에 의하면 프로바이오틱 균주들을 대상으로 항산화력을 측정 한 결과, *Probiobacterium freudenreichii*의 DPPH 라디칼 소거능은 97.75%로 비타민 C 및 BHT 보다도 유의하게 높았고, 그 다음으로는 *Lactobacillus reuteri* (96.74%)에서 높게 나타났다고 하였는데 본 연구에서 사용된 유산균의 DPPH 라디칼 소거능은 이보다 낮은 수준이었다. 한편, 요구르트로부터 분리된 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* SY13과 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ에 의해 리놀레산의 과산화는 62.95%와 66.16% 억제되어 이들 균주들은 탁월한 슈퍼옥사이드 음이온(superoxide anion) 및 히드록실 라디칼(hydroxyl radical)과 DPPH 라디칼 소거능이 나타나 항산화력이 높은 것으로 확인되었다(Zhang *et al.*, 2011).

L. delbrueckii ssp. *bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*의 혼합 배양과 *L. acidophilus*, *L. casei* 및 *Bifidobacterium bifidus*의 단독 배양으로 발효유를 제조한 결과 발효하지 않은 우유에 비해 훨씬 높은 항산화력이 나타났고 그 중에서 *L. acidophilus*의 자유 라디칼 소거능은 54.86%, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*와 *S. thermophilus*의 혼합 배양에 의한 라디칼 소거능은 45.17%로 나타났다고 보고된 바 있는데(Gjorgievski *et al.*, 2014) 이는 *L. acidophilus* SRK30와 비슷한 수준이었다.

한편, 호밀 사워도우의 항산화 활성은 발효에 사용된 유산

균과 효모의 종류 및 발효 방법에 따라 상이하다고 알려져 있으며(Banu *et al.*, 2010), 사워도우의 주원료인 곡물에 함유된 페놀산(phenolic acid)은 우리 체내에 축적된 자유 라디칼 소거, 유지의 자동산화 억제 등을 통한 탁월한 항산화 활성과 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Karrar, 2014). 게다가 사워도우 제조에 이용되는 유산균의 강력한 항산화 활성도 많은 연구 결과에서 보고되고 있다(Coda *et al.*, 2012). Coda 등(2012)의 보고에 따르면, 합성 항산화제인 BHT (1 mg/ml)는 10분 만에 약 65%의 소거능을 나타내었으나, 산성도우의 DPPH 라디칼 소거능은 $3.0 \pm 0.2\%$ ~ $5.5 \pm 0.2\%$ 정도로만 측정되었다. 하지만 사워도우 WSE의 라디칼 소거능은 산성도우에 비해 유의하게 높았으며, 특히 통밀, 카무트(kamut), 귀리 및 호밀을 첨가한 사워도우의 라디칼 소거능은 35~48%로 현저하게 높았다고 하였다. 한편, 사워도우는 리놀레산의 자동산화를 저해하는데 효과적이었으며, 라디칼 소거능이 높은 곡물을 첨가한 사워도우는 지질의 과산화 억제능도 뛰어나다고 보고한 바 있어 항산화력이 뛰어난 유산균과 곡물을 이용하여 제조한 사워도우는 활성산소 제거에 따른 세포 노화 지연에 효과적일 것으로 판단된다.

L. plantarum C88 배양액으로부터 분리하고 이온 교환 및 겔 투과 크로마토그래피로 정제하여 얻은 EPS를 LPC-1로 명명하고 분자량은 약 1.15×10^6 Da이고, 갈락토스와 글루코오스는 1:2의 몰비로 구성되었음을 확인하였다. 특히 LPC-1는 DPPH 라디칼 소거능에 의한 항산화 활성과 과산화수소에 의해 유도된 Caco-2 세포의 산화 손상에 대한 보호 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다. 또한 LPC-1은 말론디알데히드의 생성을 억제시키고, superoxide dismutase 및 총 항산화제 활성은 LPC-1 함량에 의존적으로 증가되었다. 따라서 *L. plantarum* C88의 EPS에 의해 활성산소종의 소거, 효소 및 비 효소 항산화 활성의 상향 조절 및 지질 과산화의 감소 등 항산화 활성을

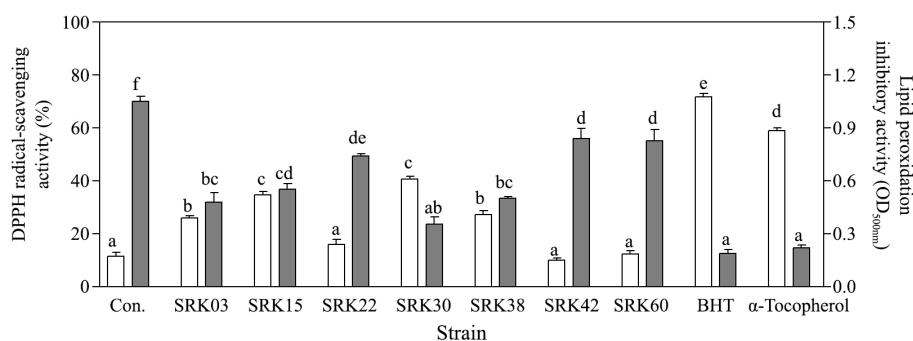


Fig. 1. Free-radical scavenging capacity (□) and antioxidant property (■) of sourdough fermented with lactic acid bacteria isolated from sliced radish kimchi. Data are Means ± SD from triplicate determinations and means with the different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Turkey's multiple range test. BHT, Butylated hydroxytoluene; Con., Control.

나타나는 것으로 보고된 바 있으므로(Zhang et al., 2013), EPS 생성량이 비교적 높은 *L. dextranicum* SRK03과 *L. acidophilus* SRK30의 항산화능도 다소 높게 나타났다.

사워도우 내 유산균의 항균물질 생성량

분리된 유산균으로 제조한 사워도우 내 유산과 초산 및 박테리오신의 생성량을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 대조구 내 유산과 초산의 함량은 각각 19.3 ± 1.5 mM 및 11.6 ± 3.6 mM으로 나타났으나, 유산균을 접종하여 제조한 사워도우 내 유기산의 함량은 대조구보다 유의하게 많은 양이 검출되었다($P < 0.05$). *L. dextranicum* SRK03 (48.7 ± 2.0 mM), *L. acidophilus* SRK30 (48.2 ± 1.8 mM), *L. plantarum* SRK38 (49.6 ± 2.5 mM) 및 *L. delbrueckii* SRK60 (68.5 ± 2.1 mM)에 의해 유산의 생성량이 유의하게 높았다. 초산은 동형 유산균에 의해 검출되지 않은 반면, 이형인 *L. dextranicum* SRK03 (19.1 ± 1.7 mM), *L. brevis* SRK15 (13.6 ± 1.2 mM) 및 *L. citreum* SRK42 (15.9 ± 2.9 mM)에 의해 생성되었으며 이는 대조구보다는 유의하게 많은 양이었다($P < 0.05$). 한편, *B. cereus* ATCC 11778에 대한 박테리오신은 *L. brevis* SRK 15 (32 AU/g), *L. acidophilus* SRK 30 (64 AU/g) 및 *L. plantarum* SRK 38 (16 AU/g)가 생산하였고, *S. aureus* ATCC 6538에 대한 박테리오신은 *L. acidophilus* SRK 30 (32 AU/g) 및 *L. plantarum* SRK 38 (128 AU/g)가 생산하였다.

빵의 오염은 제조 후 유통 및 보관 중에 주로 발생하며 공중 낙하세균이나 곰팡이 포자 등에 의해 빵 변질이 유발된다. 이로 인해 경제적 손실뿐만 아니라 곰팡이 독소에 의한 소비자의 건강 위협 등의 심각한 문제를 초래한다(Chavan and Chavan, 2011). *Bacillus* sp.는 빵 표면에 점질물과 로프를 형성하는 세

포 외 협막(capsule) 성분을 생산함으로써 수분 함량이 많은 빵을 변질시키는 주요 원인균이다(Petruláková et al., 2009). 밀로 만든 빵에 로프를 형성하여 변질시키는 미생물은 *B. subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* 및 *Bacillus licheniformis* 등이 있다. 이들은 산도가 낮거나 당, 지방 및 과일의 함량이 높은 빵에서 주로 잘 증식하고 당이나 단백질 분해효소 및 점질성 다당류 등을 생성하여 빵에 불쾌취, 변색, 점질물, 부스러기 등을 유발한다(Messens and De Vuyst, 2002). 특히 이들의 균수가 10^5 CFU/g 이상 존재할 경우 식중독의 발생 위험이 큰 것으로 알려져 있다. 첨가물을 사용하지 않고 로프 형성을 억제하기 위해 방법 중에 하나로 사워도우를 사용함으로써 변질 미생물의 증식을 억제하여 저장성을 연장시키고 풍미를 향상시키는데 도움을 준다(Thompson et al., 1993). 사워도우에 활용된 유산균은 유기산, 이산화탄소, 에탄올, 과산화수소, 디아세틸, 지방산 및 루테린(reuterin) 등의 향미생물체를 생산함으로써 병원성 식중독균의 증식을 억제한다(Chavan and Chavan, 2011). 유기산의 항균 활성은 소수성의 비해리형 산의 농도에 의존한다. pH가 낮을수록 친유성의 비해리형의 농도가 증가하기 때문에 대부분의 유기산은 pH가 낮을수록 항균 활성이 높다. Ventimiglia 등(2015)이 보고한 *L. plantarum*, *L. curvatus* 및 *L. graminis*로 제조한 사워도우 내 유산의 함량은 0.31~0.81 mg/g이고 초산은 0.10~0.17 mg/g으로 측정되었으며 이들이 효과적인 항균 활성을 나타내었다고 하였는데 본 연구 결과와 종합해 볼 때 유산균 중에 따라 생성하는 유기산의 종류와 양은 상이함을 알 수 있었다.

Nisa 등(2016)은 *L. casei*, *L. brevis* 및 *Candida humilis*의 혼합에 의해 발효시킨 사워도우 내에 생성된 유산과 초산 함량은 각각 0.013~0.46 g/100 g 및 0.001~0.17 g/100 g 정도이며

Table 3. Content of organic acids and antibacterial activities of bacteriocin produced by the lactic acid bacteria in sourdough

Strains	Lactic acid (mM)	Acetic acid (mM)	Bacteriocin activity (AU/g)	
			<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
Control	19.3 ± 1.5^a	11.6 ± 3.6^a	ND	ND
<i>Leuconostoc dextranicum</i> SRK03	48.7 ± 2.0^c	19.1 ± 1.7^b	ND	ND
<i>Lactobacillus brevis</i> SRK15	35.1 ± 1.3^b	13.6 ± 1.2^{ab}	32	ND
<i>Pediococcus halophilus</i> SRK22	33.6 ± 2.8^b	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SRK30	48.2 ± 1.8^c	ND	64	32
<i>Lactobacillus plantarum</i> SRK38	49.6 ± 2.5^c	ND	16	128
<i>Leuconostoc citreum</i> SRK 42	34.3 ± 3.8^b	15.9 ± 2.9^{ab}	ND	ND
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> SRK60	68.5 ± 2.1^d	ND	ND	ND

Data are Means \pm SD from triplicate determinations and means with the different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Turkey's multiple range test.

ND, Not detected.

대조구에 비해 유의하게 많은 양이 측정되었다고 하였다. 발효 스타터의 유산 생성량은 사위도우의 물성학적 특성, 산성화 및 대사활성에 영향을 받고 초산의 생성량도 밀가루의 종류, 스타터 균종 및 발효 조건에 따라 상이하다. 사위도우 발효 과정에서 유산균은 탄수화물을 분해하여 유산을 형성함으로써 반죽의 당도를 낮추므로 사위도우를 이용한 빵은 혈당치를 일정하게 유지하여 당뇨병 예방에도 효과적이다. 또한 사위도우 발효에 의해 생산된 유산은 전분 소화율을 감소시킴에 따라 거대 분자를 변형시키는 능력이 있으며, 초산과 프로피온산은 음식물의 위 배출 속도를 지연시키는 효과도 있다. 게다가 헤테로형 유산균이 생산한 초산은 비해리형 친유성이고 세포막 확산이 가능하여 높은 항균 활성을 발휘한다(Corsetti and Settanni, 2007). 특히, 유산, 초산 및 프로피온산을 생산하는 이형 유산균은 유산만을 생산하는 동형 유산균에 비해 유해균 증식에 더 효과적이다. 사위도우 유산균은 빵에 로프를 형성하는 변질균인 *Bacillus* sp.의 증식을 효과적으로 저해하는데 이는 유기산 및 기타 항균물질에 기인하는 것으로 확인된 바 있다(Chavan and Chavan, 2011).

한편, 사위도우 유산균에 의해 생산된 항균 및 항진균 대사 사산물인 박테리옌이 잘 알려져 있으며, 박테리옌의 주성분은 단백질로서 열에 안정하고 당이나 지방 분해효소에 의해 파괴되지 않아 여러 부패균에 대한 항균 활성을 나타내며, 섭취 시 체내 단백질 분해효소에 의해 쉽게 분해되어 잔류 독성이 없으므로 가공식품 제조 시 천연 보존제로 이용 가치가 높다(Gobbetti, 1998). 박테리옌은 항균 기작으로서 감수성 균주의 세포막에 구멍을 뚫어 양성자의 유입으로 세포 내 pH의 감소를 비롯하여 막 전위차의 소실과 효소 반응 저해 등을 유발한다. 특히 유입된 나트륨 이온은 세포에 유해하고 양성자 동력(proton motive force)의 소실과 ATP 유출로 에너지 대사에 문제를 초래한다(Corsetti and Settanni, 2007).

사위도우 유산균이 생산한 박테리옌으로는 *L. bavaricus* MI401이 생산한 bavaricin A, *L. plantarum* ST31이 생산한 plantaricin ST31 및 *L. sanfranciscensis* C57이 생산한 BLIS C57 등이 보고된 바 있는데 본 연구에서 사용된 *L. plantarum* SRK 38 균주도 *B. cereus*와 *S. aureus*에 대한 항균 활성을 나타내는 박테리옌을 생산하였다. BLIS C57은 사위도우 발효 스타터를 제외한 대부분의 부패균에 대해 항균 활성을 나타내었고, 다양한 유기산(acetic, caproic, formic, propionic, butyric, n-valeric acid)들의 혼합물은 *L. sanfranciscensis* CB1의 *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* 및 *Monilia* 등에 대한 항진균 활성을 상승시키는 효과를 나타내었다(Gobbetti, 1998).

사위도우 내에 생성된 항균물질의 식중독균 제어 효과

사위도우 원료 배합 시 *B. cereus* ATCC 11778과 *S. aureus* ATCC 6538의 균수를 1.0×10^3 CFU/g 접종하여 발효시킨 직후 식중독균수와 25°C에서 5일간 저장 후 잔존 균수를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 발효 직후 대조구 내의 *B. cereus* 균수는 6.7 Log CFU/g에 이르렀으나, 유산균을 접종하여 제조한 사위도우 내에서는 대조구 보다 유의하게 낮은 균수가 검출되었다($P < 0.05$). 하지만 25°C에서 5일간 저장하는 동안 균수는 서서히 증가되어 대조구에서는 9.1 Log CFU/g에 도달하였지만, 유산균을 접종한 사위도우 내에서는 이보다 낮은 수준이었고, 특히 *L. brevis* SRK15와 *L. plantarum* SRK38을 접종한 사위도우에서는 7 Log CFU/g 이하로 다른 사위도우 보다 적은 수의 균이 검출된 것은 유기산뿐만 아니라 박테리옌 생성에 기인하는 것으로 추정된다. *S. aureus*의 경우도 대조구에서는 발효 직후 6.1 Log CFU/g이었으나 25°C에서 5일간 저장 후에는 8.7 Log CFU/g로 증가되었다. 하지만 *L. acidophilus* SRK30, *L. plantarum* SRK 38 및 *L. delbrueckii* SRK60으로 제조한 사위도우는 다른 유산균에 비해 항균 효과가 유의하게 높았는데 이는 박테리옌과 유기산의 영향인 것으로 판단된다.

*B. subtilis*의 초기 접종량인 10^2 CFU/g은 30°C에서 3일 저장 후 10^8 CFU/g 이상 증식되어 빵의 부패가 유발된 반면, *L. plantarum*, *P. pentosaceus*, *L. brevis* 등의 유산균은 저장 7일 동안에도 로프 형성균인 *Bacillus* sp.의 포자 증식 및 발아를 억제하여 빵의 저장성 향상에 도움을 준다(Katina et al., 2002). Menteş 등(2007)은 *L. plantarum* LMO25와 *Lactobacillus alimentarius* LMO7로 pH 3.5-4.0으로 조정된 사위도우는 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*에 의한 로프 발생을 유의하게 감소시켰으나, pH 4 이상에서는 *Bacillus* sp.의 증식을 억제하는데 효과적이지 않았다고 하여 로프 발생 억제는 유산균이 생산한 유기산에 기인하는 것으로 보고하였다. 사위도우 발효 스타터로 사용된 *L. citreum* HO12 및 *W. koreensis* HO20의 항균 활성은 pH에 민감한 영향을 보였으나, 가열이나 단백질 분해효소 처리에 의해선 항균 활성에 거의 변함이 없었으므로 빵 변질 곰팡이(*Aspergillus niger* 및 *Penicillium roqueforti*)와 로프 형성 세균(*B. subtilis*)에 대한 이들 유산균의 항균 활성은 유기산에 기인하는 것을 확인되었다(Choi et al., 2012). 유산균에 의해 생산된 유기산에 의해 사위도우의 pH가 4.8 이하에서 *B. subtilis*의 증식을 효과적으로 억제된다는 연구 결과도 있으나, 한편으로는 *Bacillus* sp.의 균수 감소는 초기 포자수와 유산균이 생산한 유산과 초산의 비율에 의존하는 것으로 알려진 바 있다(Rosenquist and Hansen, 1998).

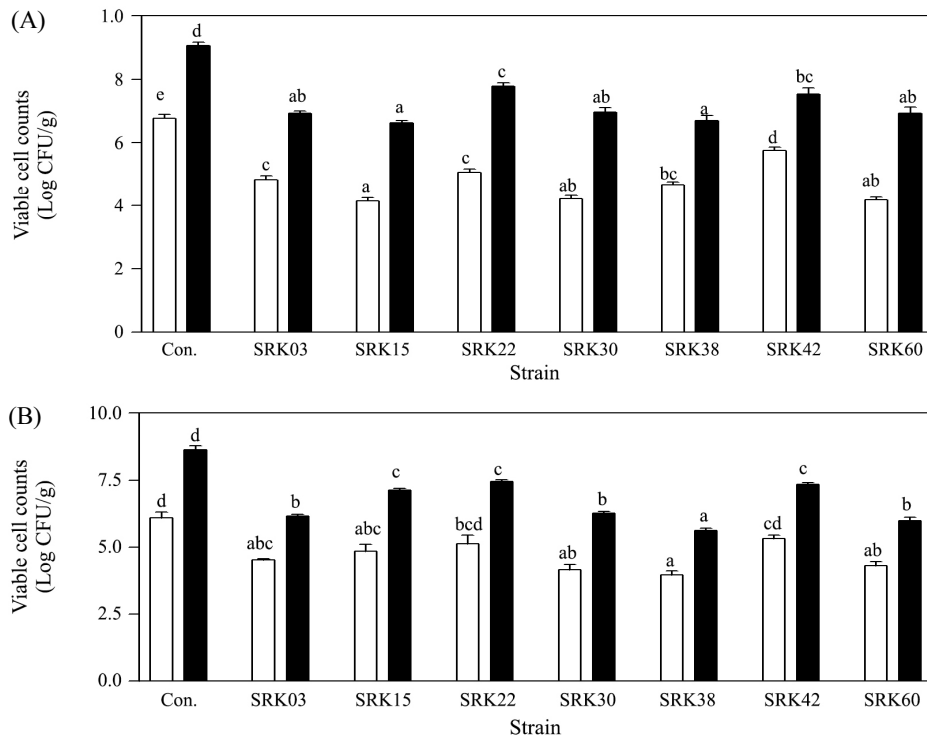


Fig. 2. Viable counts of *Bacillus cereus* ATCC 11778 (A) and *Staphylococcus aureus* ATCC6538 (B) in sourdough immediately after fermentation (□) and after storage at 25°C for 5 days (■). Data are means \pm standard deviation from triplicate determinations and means with the different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Turkey's multiple range test. Con., Control.

L. reuteri LTH3584가 생산한 reutericyclin은 *S. aureus* LTH1493에 대해 항균 효과를 나타내었고, *B. subtilis* 포자의 발아를 저해한다고 알려져 있다(Messens and De Vuyst, 2002). 일반적으로 유산균의 박테리옌은 대부분 그람 양성균에 대해 광범위한 항균 활성을 나타내는 반면, 그람 음성균은 세포외막에 투과하기 어려운 장벽이 있어 그람 양성균에 비해 저항성이 강하며, 유산균이 생산한 박테리옌은 효모나 곰팡이에 대한 항균 활성은 극히 낮다고 알려져 있다(Caplice and Fitzgerald, 1999). Messens와 De Vuyst (2002)에 따르면, *Bacillus*는 BLIS C57, reutericyclin 및 plantaricin ST31에 의해 선택 저해되었으나, bavaricin A에 의해 영향을 받지 않았고 *Staphylococci*는 reutericyclin과 plantaricin ST31에 의해서만 저해되었다고 하였다. 사위도우 제조 시 박테리옌이나 초산 생산 균주를 이용한 경우 로프 형성균인 *Bacillus*의 증식을 억제하여 빵의 변질을 막는데 효과적이다(Messens and De Vuyst, 2002).

이상의 결과에서 볼 때 깎두기에서 분리된 특정 유산균의 항균물질은 *B. cereus* 및 *S. aureus* 등의 병원성 식중독균의 증식을 억제하는 능력이 뛰어나 저장기간 연장이 가능하고 이러한 항균물질 생산능이 있는 유산균을 발효스타터로 이용하거

나 유기산 및 박테리옌을 식품보존제로 이용한다면 소비자들에게 안전한 가공식품을 공급할 수 있고, 독성 유발 가능성이 높은 화학적 식품첨가물의 사용량을 줄일 수 있게 될 것이다. 또한 유기산, 에탄올 및 EPS 생성능과 항산화 활성이 있는 유산균으로 발효시킨 사위도우는 제빵에 풍미 부여 및 물성 개선을 비롯하여 활성산소 제거 및 유지의 자동산화 억제 효과가 있는 기능성 식품으로서 이용 가치가 높을 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 깎두기로부터 분리한 유산균으로 발효시킨 사위도우의 항산화 및 항균 활성을 조사하였다. 염기서열 분석을 통해 분리 균주는 99%의 상동성을 가진 *Leuconostoc dextranicum* SRK03, *Lactobacillus brevis* SRK15, *Pediococcus halophilus* SRK22, *Lactobacillus acidophilus* SRK30, *Lactobacillus plantarum* SRK38, *Leuconostoc citreum* SRK 42 및 *Lactobacillus delbrueckii* SRK60으로 동정되었다. *L. dextranicum* SRK03, *L. acidophilus* SRK30, *L. plantarum* SRK38 혹은 *L. delbrueckii*

SRK60과 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7246을 혼합하여 30°C에서 24시간 발효시킨 사워도우의 유산균과 효모수는 각각 10^9 및 10^7 CFU/g이었으며, 특히 *L. dextranicum* SRK03으로 제조한 사워도우는 *L. acidophilus* SRK30, *L. plantarum* SRK38 및 *L. delbreckii* SRK60 보다 유의하게 높은 총 산도와 에탄올 및 세포 외 다당류 함량을 나타내었다. *L. dextranicum* SRK03 및 *L. acidophilus* SRK30으로 제조한 사워도우는 DPPH 라디칼 소거능과 유지의 과산화 억제능도 높았다. 게다가 *L. acidophilus* SRK30이 생산한 유기산과 박테리오신의 의해 25°C에서 5일간 저장하는 동안 사워도우 내 *Bacillus cereus* ATCC 11778과 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538의 균수는 유의하게 낮은 수준을 유지되었다.

References

- Afify, A.E.M., Romeilah, R.M., Sultan, S.I.M., and Hussein, M.M. 2012. Antioxidant activity and biological evaluations of probiotic bacteria strains. *Int. J. Acad. Res.* **4**, 131-139.
- 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.
- Ali, A.A. 2010. Beneficial role of lactic acid bacteria in food preservation and human health: A review. *Res. J. Microbiol.* **5**, 1213-1221.
- Arendt, E.K., Ryan, L.A.M., and Bello, D.F. 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol.* **24**, 165-174.
- Banu, I., Vasilean, I., and Aprodu, I. 2010. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant capacity of rye sourdough and bread. *Food Sci. Technol. Res.* **6**, 571-576.
- Banu, I., Vasilean, I., and Aprodu, I. 2012. Quality evaluation of the sourdough rye breads. *AUDJG-Food Technol.* **35**, 94-105.
- Caplice, E. and Fitzgerald, C.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **50**, 131-149.
- Chavan, R.S. and Chavan, S.R. 2011. Sourdough technology—A traditional way for wholesome foods: a review. *Com. Rev. Food Sci. Food Safety* **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.C., Kim, Y.W., Hwang, I.Y., Kim, J.H., 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.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., and Catignani, G.L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* **66**, 1219-1227.
- Coda, R., Rizzello, C.G., Pinto, D., and Gobbetti, M. 2012. Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1087-1096.
- 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. Technol.* **16**, 43-56.
- Gereková, P., Kocková, M., Hybenová, E., Brindzová, L., Juríková, N., and Valík, L. 2011. Interactions between lactobacilli and yeasts and their impact on sourdough properties. Proceeding of the 6th International Congress Flour-Bread '11. 8th Croatian Congress of Cereal Technologists, Opatija, Croatia, 12-14 October.
- Girotti, A.W. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* **39**, 1529-1542.
- Gjorgievski, N., Tomovska, J., Dimitrovska, G., Makarijoski, B., and Shartiat, M.A. 2014. Determination of the antioxidant activity in yogurt. *J. Hy. Eng. Design* **12**, 88-92.
- Gobbetti, M. 1998. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci. Technol.* **9**, 267-274.
- Gobbetti, M., Simonetti, M.S., Corsetti, A., Santinelli, F., Rossi, J., and Damiani, P. 1995. Volatile compound and organic acid productions by mixed wheat sour dough starters: influence of fermentation parameters and dynamics during baking. *Food Microbiol.* **12**, 497-507.
- 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.
- Karrar, E.M.A. 2014. A review on: Antioxidant and its impact during the bread making process. *Int. J. Nutr. Food Sci.* **3**, 592-596.
- Katina, K., Sauri, M., Alakomi, H.L., and Mattila-Sandholm, T. 2002. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. *LWT-Food Sci. Technol.* **35**, 38-45.
- Kocková, M., Gereková, P., Petuláková, Z., Hybenová, E., Šturdík, E., and Valík, L. 2011. Evaluation of fermentation properties of lactic acid bacteria isolated from sourdough. *Acta. Chimica Slovaca.* **4**, 78-87.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. Functional lactic bacteria starter cultures for the food fermentation industry. *Trend Food Sci. Technol.* **15**, 67-78.
- Menteş, Ö., Ercan, R., and Akcelik, M. 2007. Inhibitor activities of two *Lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope-forming *Bacillus* strains. *Food Cont.* **18**, 359-363.

- Messens, W. and De Vuyst, L.** 2002. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs- a review. *Int. J. Food Microbiol.* **72**, 31-43.
- Mishra, V., Shah, C., Mokalsh, N., Chavan, R., Yadav, H., and Prajapati, J.** 2015. Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3615-3626.
- Modler, H.W.** 1994. Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. *Int. Dairy J.* **4**, 383-407.
- Nisa, Z.U., Rehman, S.U., Huma, N., and Shahid, M.** 2016. Impact of mixed lactic acid bacterial (LAB) culture on flavoring profile and quality attributes of spring wheat sourdough bread. *Pak. J. Agri. Sci.* **53**, 225-231.
- Paramithiotis, S., Chouliaras, Y., Tsakalidou, E., and Kalantzopoulos, G.** 2005. Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. *Process Biochem.* **40**, 2813-2819.
- Patel, A.K., Michaud, P., Singhanian, R.R., Soccol, C.R., and Pandey, A.** 2010. Polysaccharides from probiotics: new developments as food additives. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 451-463.
- Petruláková, Z., Hybenová, E., Gereková, P., Kocková, M., and Šturdík, E.** 2009. Lactobacilli as natural bread preservatives. Proceeding of the 5th International Congress Flour-Bread '09. 7th Croatian Congress of Cereal Technologists, Opatija, Croatia, 21-23 October.
- Polak-Berecka, M., Waško, A., Szwajgier, D., and Choma, A.** 2013. Bifidogenic and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N cultivated on different carbon sources. *Polish J. Microbiol.* **62**, 161-189.
- Robert, H., Gabriel, V., Lefebvre, D., Rabier, P., Tayssier, Y., and Foutagré-Faucher, C.** 2006. Study of the behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. *LWT-Food Sci. Technol.* **39**, 256-265.
- 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**, 621-623.
- Saeed, M., Yasmin, I., Khan, M.I., Pasha, I., Khan, M.R., Shabbir, A., and Khan, W.A.** 2014. Lactic acid bacteria in sourdough fermentation; a safe approach for food preservation. *Pak. J. Food Sci.* **24**, 211-217.
- Sanalibaba, P. and Cakmak, G.A.** 2016. Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Open Access* **2**, 1-5.
- Scott, R. and Sullivan, W.C.** 2008. Ecology of fermented foods. *Res. Human Ecol.* **15**, 25-31.
- 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.
- Thiele, C., Ganzle, G., and Vogel, R.F.** 2002. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. *Cereal Chem.* **79**, 45-51.
- Thompson, J.M., Dodd, C.E.R., and Waites, W.M.** 1993. Spoilage of bread by *Bacillus*. *Int. Biodeter. Biodegr.* **32**, 55-66.
- Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S.L., Visconti, A., and Lavermicocca, P.** 2008. Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in breadmaking to prevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* **122**, 328-332.
- Van Loo, J., Coussement, P., De Leenheer, L., Hoebregs, H., and Smits, G.** 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**, 525-552.
- 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.
- Weckx, S., Van Der Meulen, R., Maes, D., Scheirlinck, I., Huys, G., Vandamme, P., and De Vuyst, L.** 2010. Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. *Food Microbiol.* **27**, 1000-1008.
- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z., and Li, S.** 2013. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *Int. J. Biol. Macromol.* **54**, 270-275.
- Zhang, S., Su, L.L.Y., Li, H., Sun, Q., Liang, X., and Lv, J.** 2011. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. *Af. J. Microbiol. Res.* **5**, 5194-5201.