

빵의 저장성 증진을 위한 종균배양 방법

국 승 욱

(주)삼립 G. F 기술연구소

Development of Starter Cultures for the Extension of the Shelf Life of Bread

Seung-Uk Kook

R & D Center, SamLip G. F. Co., Ltd., Siheung City, Kyungki Do 429-450, Korea

Abstract

Starter cultures were developed for the extension of the shelf life of bread. *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* were selected as the mixed culture with *Propionibacterium freudenreichii*. *P. freudenreichii* with *B. longum* and *L. plantarum* produced 2.261% and 1.715% total acid, and pH value of cultured solutions was near 3.95. Propionic acid was produced 14~16 mg/ml by *P. freudenreichii* with *L. plantarum* and *B. longum* during 17 days, which was more than that of *L. brevis*. The pH values of the bread were 4.83 and 4.89 in respect to *B. longum* and *L. plantarum* when the fermented products were used to make the bread. Mold was not found for 10 days of storage of the bread at room temperature when the fermented products of *B. longum* were used for making bread. 37°C, pH 6.0 and the lowest agitation were optimum conditions for the production of propionic acid in the scaled up fermentation.

Key words : bread, shelf life, starter culture

서 론

빵의 저장성 곰팡이와 박테리아의 번식으로 저장성이 저하되어 빵의 유통 기간을 단축시키고 있다. *Rhizopus*와 *Penicillium* 등의 곰팡이 포자는 칼이나 공중에서, *Bacillus* 등의 박테리아 포자는 식칼이나 절단 기구에서 오염되며, 내열성이 강하여 높은 온도에서 구워도 살아남아서 슬라이스나 빵깎질 표면에서 자라게 된다¹⁾.

종균배양 방법을 빵 제조에 적용하면 부패균이나 병원균의 성장은 제조 공정이나 저장중 상당히 지연시킬 수 있다. 그것은 종균박테리아가 자라면서 만들어 낸 산성조건에 의한 것이다. 그리고 종균배양에 의해서 만들어진 더 복잡한 시스템이 저해작용을 한다. 이런 시스템에는 과산화물, 항생물질, 기타 잘 알려지지 않은 저해대사가 관여한다²⁾. 제빵산업에서 박테리아 종균의 사용은 아직 초기 단계이나 여러 나라에서 개발하고 있으며, 밝은 전망을 보여주고 있다.

박테리아 발효 빵에는 European sour ryes, pumpernickel 등 몇 가지가 있으며, 가장 잘 알려진 것은

San Francisco Sour dough French bread 등으로 *Lactobacillus sanfrancisco*를 스타터(종균)로 사용하고 있다. 효모는 밀가루에 있는 글루코오스를 비롯한 많은 당을 발효시키지만 유당은 발효하지 못한다. 반면, *L. sanfrancisco*는 글루코오스를 발효시키지 못하지만 유당만은 발효시킨다. 따라서 *L. sanfrancisco*를 종균으로 사용, 효모가 이용하지 못한 유당을 이용하여 유산과 초산을 생산하여 풍미와 저장성을 높일 수 있다. 유산은 풍미와 영양을 높이며 동시에 산성조건을 형성하여 대부분의 박테리아 성장을 억제한다³⁾.

미생물 억제제로는 화학물질, 항생제, 산 등이 사용되어 왔으나, 건강에 대한 문제가 야기되면서 박테리아 종균을 이용한 천연산에 대한 관심이 높아지고 있다. 산 중에서는 소르빈산, 초산, 프로피온산이 미생물 억제제로 쓰여 왔으나, 프로피온산은 곰팡이와 박테리아에는 유효하지만 효모에는 효과가 없으므로, 빵의 저장성 증진용에는 프로피온산을 사용하는 것이 바람직하다^{5, 6)}. 프로피온산 생성균 중에서 *Propionibacterium freudenreichii*는 유해성이 없어서 치즈 숙성에 이용되고

있다. 그러나 단독으로 프로피온산을 생성하는 것이 아니라 유산 생성 균주와 함께 사용되며, 이 균주는 타균주가 생성한 유산을 이용하여 프로피온산을 생성한다.

본 연구는 *Propionibacterium freudenreichii* (*Propionibacterium shermanii*)와 혼합 이용되는 유산박테리아 중에 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus* 등을 이용하여 프로피온산을 생성한 결과로, 최근 건강식품에 많이 이용되고 있는 *Bifidobacterium longum*이 생산하는 산과 풍미를 비교 검토하여 저장성과 상품 가치를 높일 수 있는 종균을 선발하였다. 나아가, 배양 최적조건과 이들을 빵에 첨가한 후의 저장성도 시험하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 KCCM에서 분양받은 *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*와 KTCT에서 분양받은 *Propionibacterium freudenreichii*이다. 이들 균주의 전배양 배지는 *Bifidobacterium longum*은 PTY를 기타 균주들은 MRS를 사용하였다.

2. 배양방법

4개의 serum bottle에 생우유를 각각 100ml씩 넣은 후 공시험, *Bifidobacterium longum*과 *Propionibacterium freudenreichii*, *Lactobacillus plantarum*과 *Propionibacterium freudenreichii*, *Lactobacillus brevis*와 *Propionibacterium freudenreichii*를 접종하고 혐기적 조건을 위하여 질소로 치환하고 고무마개로 막은 뒤 알루미늄 마개로 봉하고 37°C 배양기에서 28일간 배양하였다. 배양 후 pH 및 총산(산도 측정)은 AOAC방법으로 정량하였다. pH는 pH 미터로 측정하였고, 산도는 0.1N NaOH용액으로 적정하여 유산을 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Lactic acid}(\%) = \frac{a \times F \times 0.009}{s} \times 100$$

F : 0.1 N NaOH factor

a : ml of 0.1 N NaOH

s : weight(volume) of sample

(0.009g lactic acid /1ml 0.1 N NaOH)

3. HPLC에 의한 산의 분석

배양기간 중 2일 간격으로 시료를 1ml씩 취하여 마이크로튜브에 넣고 원심분리하여 얻은 상정액에 0.005M H₂SO₄를 가하여 다시 원심분리, 여과한 후 HPLC로 유산, 초산, 프로피온산을 분석하였다. HPLC조건은 다음과 같다.

Pump ; Waters model 600E

Detector ; Waters R401 differential refractometer

Column : Aminex ion exclusion HPX-87H

Mobile phase ; 0.005 M H₂SO₄

Standard solution ; lactic acid, acetic acid, propionic acid solutions (10mg /ml)

Flow rate ; 0.6ml /min

4. 빵의 저장성 시험 및 pH 측정

하기 배합 원료를 삼성제빵기로 교반하여, 27°C에서 발효시킨 다음 구워서 빵을 제조하였다. 발효액을 첨가하지 않은 것을 대조구로 하였고, 혼합 균주 발효액을 첨가하여 제조한 빵을 비교 실험구로 하였다. 저장성 시험은 빵의 내부 부분을 일정한 크기로 잘라 페트리접시에 담아 폴리에틸렌 백으로 밀봉하여 상온에서 저장하면서 곰팡이의 번식을 관찰하였다.

pH 측정은 AOAC방법에 따랐다. 즉, 빵의 내부 부분 10g을 취하여 250ml 삼각플라스크에 담고, 미리 끓여서 식힌 증류수 100ml를 가하여 흔들어 주면서 1시간 동안 빵 내부의 산을 용해시킨 다음, pH 미터로 상정액의 pH를 측정하였다.

5. 혼합발효의 scale up

2개의 발효기에 생우유를 3,000ml씩 넣고, 혐기적 조건을 위하여 질소로 치환한 후 *Bifidobacterium longum*과 *Lactobacillus plantarum*을 각각 우유의 1%를 접종하고 37°C에서 13rpm으로 교반 배양하였다. 유산 생성으로 저하되는 pH는 NaOH로 pH 6.0 이상으로 조절하였다. 유산이 어느 정도 생성된 후 각각 *Propionibac-*

Table 1. Raw material content of bread

Ingredients	Amount
Wheat flour	330 g
Sugar	15 g
Defatted milk	20 g
Shortening	10 g
Yeast	4 g
Fermented product	50 ml
Water	210 ml

*terium freudenreichii*를 3% 접종하여 10일간 발효시켰다. 산은 HPLC로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. pH 및 총산 함량

*Propionibacterium freudenreichii*와 혼합배양에 사용되는 유산 박테리아 중에 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*를 실험한 결과, *Lactobacillus bulgaricus*는 냄새가 좋지 않고 산 생성량이 적어 균주 선발에서 제외시켰다. 대신 최근 건강 증진용으로 많이 이용되고 있는 *Bifidobacterium longum*을 다시 첨가하여 실험하였다. 이 3균주들은 *Propionibacterium freudenreichii*와 혼합 배양시킨 경우의 pH 및 총산 함량은 Table 2와 같다. 균주를 접종하지 않은 대조구의 pH인 5.98, 6.01보다 pH도 낮고 산 생성량도 많아 저장성이 높아지나, *Lactobacillus brevis* 배양구의 pH는 4.51 및 4.46으로 *Bifidobacterium longum*의 4.07, 3.82, *Lactobacillus plantarum*의 3.97, 3.96보다 높고 산 생성량도 적어서 저장성 증진에 이용하기 힘든 것으로 나타났다. 또한 유산으로 환산한 총산 함량도 대조구는 0.225%로 산이 적게 생산된 반면, *Bifidobacterium longum*은 1.926%, 2.597%, *Lactobacillus plantarum*은 1.674%, 1.755%로 많이 생성되었다. 이들의 pH는 3.9근처로 서로 비슷하나 총산함량에 차이가 나는 것은 이들 균주들이 생성하는 산의 종류가 다르기 때문인 것으로 생각된다.

2. 산 분석

배양 기간중에 생성된 산의 HPLC 결과는 Fig. 1과 같다. 산은 배양에 따라 Fig. 2, 3, 4와 같이 모두 증가하였다. *Lactobacillus plantarum*은 16일간 배양하였을 때 프로피온산이 14~16mg/ml 생성되었고, 유산도 상당량 생성되었다(Fig. 2). *Lactobacillus brevis*는 프로피온산을 12~16mg/ml 생성하였으나, *Lactobacillus plantarum*에 비하여 유산이나 초산 생성량이 저조하였다(Fig. 3). 한편 *Bifidobacterium longum*은 *Lactobacillus brevis*를 사용했을 때보다 프로피온산, 유산,

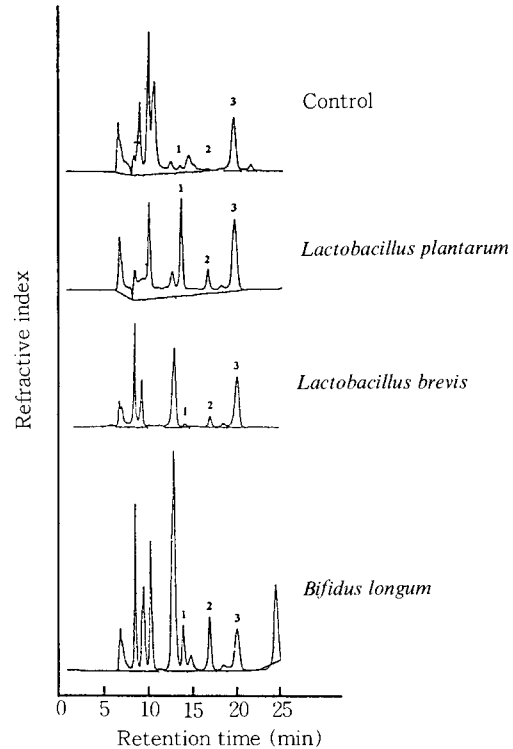


Fig. 1. HPLC chromatograms of acids produced by mixed cultures. 1 : Lactic acid, 2 : Acetic acid, 3 : Propionic acid.

초산 생성량이 많고, *Lactobacillus plantarum*을 사용한 경우와 비슷하였다(Fig. 4).

이들 결과는 프로피온산을 비롯한 유산, 초산을 많이 생성하는 종균배양으로 *Bifidobacterium longum*과 *Lactobacillus plantarum*이 *Lactobacillus brevis*보다 유리한 것을 보여주고 있다. 따라서, *Bifidobacterium longum*과 *Lactobacillus plantarum*을 종균배양용으로 선택하고 그들의 혼합 균주 발효산물을 빵에 첨가하여 빵을 저장하는데 사용하였다.

3. 발효액을 첨가하여 제조한 빵의 저장성 및 pH

발효액을 첨가하여 빵을 제조한 후 10일간 저장하여 생성된 곰팡이의 번식 결과는 Fig. 5와 같다. 발효액을

Table 2. pH and acidity of various cultured solutions

	Control	<i>B. longum</i> + <i>P. freudenreichii</i>	<i>L. plantarum</i> + <i>P. freudenreichii</i>	<i>L. brevis</i> + <i>P. freudenreichii</i>
pH	6.00	3.95	3.96	4.49
Total acid (% lactic acid)	0.225	2.261	1.715	1.301

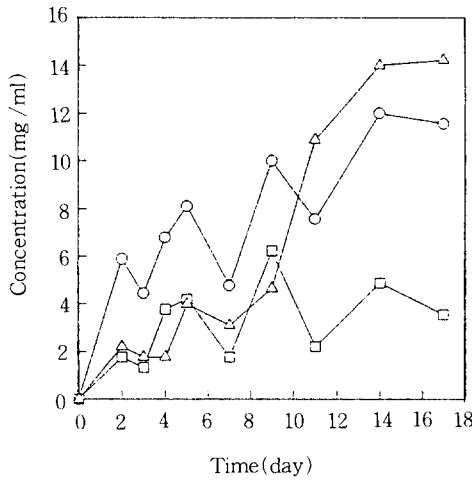


Fig. 2. Production of various acids by the mixed culture with *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium freudenreichii*. -○- Lactic acid -□- Acetic acid -△- Propionic acid.

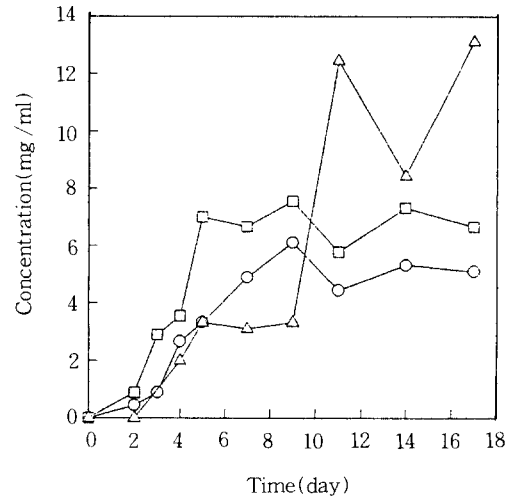


Fig. 4. Production of various acids by the mixed culture with *Bifidus longum* and *Propionibacterium freudenreichii*. -○- Lactic acid -□- Acetic acid -△- Propionic acid.

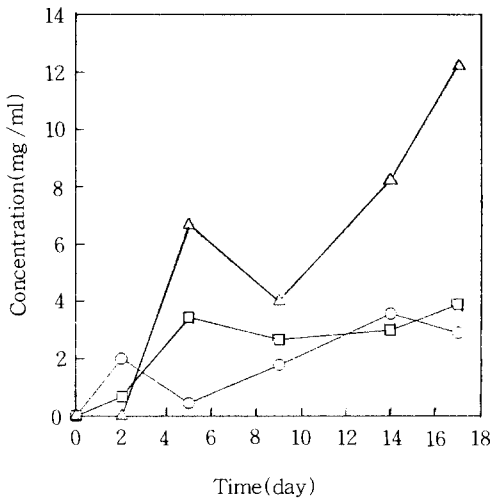


Fig. 3. Production of various acids by the mixed culture with *Lactobacillus brevis* and *Propionibacterium freudenreichii*. -○- Lactic acid -□- Acetic acid -△- Propionic acid.

첨가하지 않은 대조구는 혼합 균주 발효액을 첨가하여 제조한 빵보다 곰팡이가 훨씬 더 많이 번식하였다. 특히 *Bifidobacterium longum* 이용 발효액을 첨가한 비교구는 10일간 저장하여도 곰팡이가 생성되지 않아서 대조구나 *Lactobacillus plantarum* 이용 발효산물을 첨가한 비교구보다 곰팡이 생성 억제에 효과적이었다.

제품 빵의 pH는 혼합 균주 발효액을 첨가하지 않은 대조구의 경우는 pH 5.75로 혼합 균주 발효액을 첨가

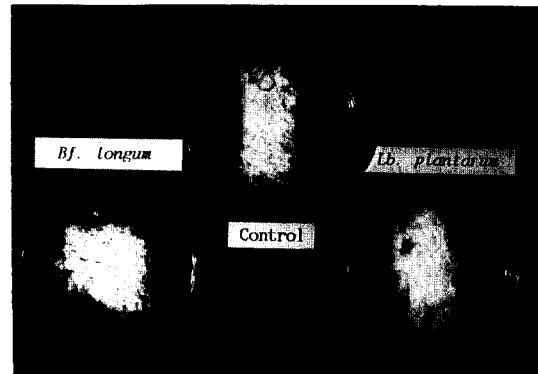


Fig. 5. Observation of molds produced during the storage for 10days at room temperature in the bread with and without fermented products.

한 빵의 4.89(*Lactobacillus plantarum*), 4.83(*Bifidobacterium longum*)보다 높았다. *Bifidobacterium longum*을 이용한 발효액을 첨가한 비교구는 대조구보다 pH가 훨씬 더 낮으나, *Lactobacillus plantarum* 이용 발효액을 첨가한 비교구보다는 약간 더 낮았다.

이상의 결과, *Bifidobacterium longum*의 발효액이 *Lactobacillus plantarum*의 발효액보다 저장성에 더 큰 효과가 있는 것으로 나타났다. 그래서 비피더스박테리아속은 발효로 천연산을 생성, pH를 저하시켜 곰팡이 번식을 억제하여 저장성을 증진시키는 것으로 나타났다. 그러나, *Bifidobacterium longum* 발효액을 지나치게

첨가하면 생성된 초산이 신맛을 내기 때문에 첨가량은 조절해야 한다. 비피더스박테리아속은 장내의 건강을 향상시키는 효과뿐 아니라 빵의 저장성 증진작용도 하여 제빵의 품질 향상에 큰 역할을 할 것으로 보인다.

4. 대량 혼합발효

5l 발효조로 혼합발효 양을 증가시켜 생성된 산을 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 6 및 7과 같다. Fig. 6과 같이 *Lactobacillus plantarum*과 *Propionibacterium freudenreichii*의 혼합 발효에서는 발효 5일까지 초산 생성이 급격히 증가하다가 감소되었으며, 5일 이후에는 다시 서서히 증가하였다. 발효 10일째 프로피온산은 약 15mg/ml, 유산은 8.5mg/ml 생성되어 소규모 혼합 발효와 거의 비슷하였다. 한편 Fig. 7의 *Bifidus longum*과 *Propionibacterium freudenreichii*의 혼합발효에서도 3일째에 유산의 생성량이 급격히 증가하였고, 프로피온산 증가와 함께 유산의 양이 감소되었다. 이는 *Bifidus*가 젖산을 이용하여 프로피온산을 생성하는 것을 의미하며, 발효 11일째 프로피온산은 약 10mg/ml 생성되었다. *Lactobacillus*와의 차이는 초기부터 초산이 많이 생성되어 발효 3일째에 11mg/ml가 생성되었고, 11일째에도 약 12mg/ml가 생성된 것으로 나타나 초산은 대부분 발효초기에 대부분이 생성된다는 점이다. 프로피온산이 *Lactobacillus*보다 적게 생성된 것은 *Bifidus*의 생육시간이 *Lactobacillus*보다 길기 때문이다. Fig. 7과 같이 발효 11일째까지 프로피온산의 생성량이 많아졌다

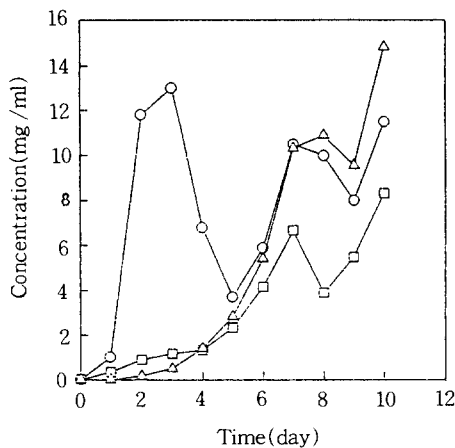


Fig. 6. Production of various acids by the mixed culture of *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium freudenreichii* in the scaled up fermentation. -○- Lactic acid -□- Acetic acid -△- Propionic acid.

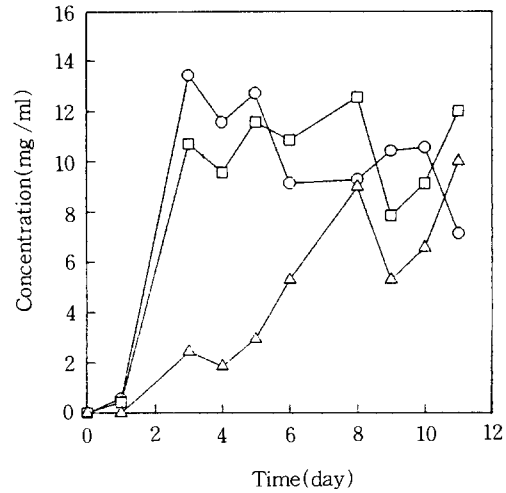


Fig. 7. Production of various acids by the mixed culture of *Bifidus longum* and *Propionibacterium freudenreichii* in the scaled up fermentation. -○- Lactic acid -□- Acetic acid -△- Propionic acid.

만 유산도 많이 남아 더 발효시키면 프로피온산을 더 많이 만들 수 있을 것이다. 그러므로 산생성량을 증가시키기 위해서는 *Bifidus*의 발효기간을 늘여야 할 필요가 있다. 산생성 최적 조건은 발효조는 최소로 교반하면서 온도는 37°C로 하고, 생성산에 의하여 낮아진 pH는 NaOH로 중화시켜 pH 6.0을 유지하면 *Propionibacterium*가 잘 성장하여 산이 많이 생성된다. 이들 결과는 더 큰 대형 발효조를 이용한 혼합발효에도 그대로 이용할 수 있으므로 제빵산업에 이를 적용하여 빵의 저장성 증진에 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

빵의 저장성을 증진시키기 위한 종균배양 방법을 개발하였다. *Propionibacterium freudenreichii*와 혼합 배양하여 사용하는 유산 생산 박테리아로 *Lactobacillus plantarum*과 *Bifidobacterium longum*을 선정하였다.

1. 총산은 *B. longum*이 1.926 %, 2.597 %, *L. plantarum*이 1.674 %, 1.755 %을 생성하였으며, pH는 둘 다 3.9 정도로 *L. brevis*에 비해 매우 낮은 pH를 보였다.
2. 16일 배양 후 *L. plantarum*은 프로피온산을 14~16mg/ml 생성하였고 유산도 상당량 생성하였다. *B. longum*도 비슷한 결과를 나타냈다.

3. 발효액 첨가 빵의 pH는 *B. longum* 발효액을 첨가한 것은 4.83, *L. plantarum* 발효액을 첨가한 것은 4.89로서 대조구의 5.75보다 훨씬 낮았다. *B. longum*의 경우 10일간 저장하여도 곰팡이는 생성되지 않아 대조구나 *L. plantarum*보다 곰팡이의 생성이 억제된 것으로 나타났다.
4. 산생성 최적 조건은 5l 발효조로 발효량을 증가시켰을 때, 최소로 교반하면서 37℃로 유지시키고 생성산에 의해 낮아진 pH를 NaOH로 중화하여 pH를 6.0으로 유지하는 것이 *propionibacterium*의 성장에 가장 좋은 조건으로 가장 많은 산이 생성되었다.

참고문헌

1. Ayer, C. J. : *Microbiology of Foods*, W. H. Freeman and Company, p.187~190(1980).
2. Gilliland, S. E. : *Bacterial Starter Cultures for Foods*, CRC press, Inc., p.175~185(1985).
3. Sugihara, T. F. and Kline, L. : Microorganisms of the San Francisco Sour Dough Bread Process, *Appl. Microbiol.* 21, 456(1971).
4. Sugihara, T. F. : *Bacterial Starter Cultures for Foods*, CRC press, Inc., p.119~125(1985).
5. Grosch, W. and Belitz, H. D. : *Food Chemistry*, Springer-Verlag Berlin, p.340~344(1987).
6. Desrosier, N. W. : *The Technology of Food Preservation*, AVI publishing Co., Inc., p.279~312(1970).

(1996년 8월 7일 접수)