

혼합 젖산균을 이용한 밀가루 용액의 반복 유가식 발효

김상용 · 노봉수* · 오덕근**

동양제과(주) 기술개발연구소, *서울여자대학교 식품·미생물공학과,
**우석대학교 식품공학과

Repeated Fed-Batch Fermentation of Wheat Flour Solution by Mixed Lactic Acid Bacteria

Sang-Yong Kim, Bong-Soo Noh* and Deok-Kun Oh**

R&D Center, Tong Yang Confectionery Co.

*Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University

**Department of Food Science and Technology, Woosuk University

Abstract

Effect of culture conditions on the fermentation of wheat flour solution by mixed lactic acid bacteria of *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum* and *L. plantarum* was investigated. The optimum temperature for the fermentation of wheat flour solution was 35°C because pH decreased the lowest value and TTA (total titrable acidity) increased the highest value at this temperature. In aerobic condition, fermentor was purged with air at 1.0 vvm and was purged with nitrogen gas at 1.0 vvm in anaerobic condition. The decrease of pH and the increase of TTA in aerobic condition were higher than those in anaerobic condition. In aerobic condition, the optimum condition of oxygen supply was found to be oxygen transfer rate coefficient of 60 hr⁻¹ which corresponded to agitation speed of 250 rpm in a 5 L fermentor. Repeated fed-batch cultures were performed using pH-stat in order to increase the productivity of fermented wheat flour. With increasing the repeated fraction of culture volume, mean cycle time increased but maximum operation time decreased. However, the volume of produced broth per culture volume per time and total volume of produced broth per culture volume were maximum at the repeated fraction of culture volume of 20%. In a repeated fed-batch fermentation of wheat flour solution using mixed lactic acid bacteria, the culture condition was optimum at temperature of 35°C, aeration rate of 1.0 vvm, oxygen transfer rate coefficient of 60 hr⁻¹, and repeated fraction of culture volume of 20%.

Key word: wheat flour fermentation, mixed lactic acid bacteria, repeated fed-batch culture

서 론

크래커(cracker)는 젖산균이 주를 이루는 미생물을 밀가루 용액에 접종하여 발효시켜서 얻은 발효된 밀가루(sponge) 반죽의 일정량을 주반죽(dough)에 넣어 다른 구성물과 섞어 제조한다⁽¹⁾. 크래커의 밀가루 용액에서 분리된 균주로는 *Lactobacillus*속의 *acidophilus*, *casei*, *brevis*, *delbrueckii*, *leichmannii*, *fermentum*, *plantarum*, *sanfrancisco*, *Leuconostoc*속의 *lactis*, *mesenteroides*, *Propionibacterium*속의 *freudenreichii*, *thronii*과

*Streptococcus*속의 *diacetylactics*, *thermophilus*과 *Lactococcus lactis* 등이 보고되어 있는데, 이 중에서 주종을 이루는 것은 *Lactobacillus*속이다^(2,3). 또한, 이러한 밀가루 반죽의 발효에 관여하는 주요 미생물 균주들을 순수배양에 의하여 분리한 미생물을 starter로 이용하면 그 제조공정이 보다 단축되며 품질관리도 보다 향상될 수 있다고 한다⁽⁴⁾.

크래커 제조를 위한 밀가루용액 발효과정 중에는 복잡한 화학적, 물리화학적 변화가 일어나며 이것은 크래커의 독특한 조직과 풍미를 이룬다. 발효 중에 일어나는 변화는 효소의 복합적인 작용에 의해 일어난다. 밀가루 발효 중에 관여되는 효소는 밀가루 중에 자연적으로 존재하는 맥아 또는 젖산균의 표면에서

Corresponding author: Sang-Yong Kim, R&D Center, Tong Yang Confectionery Co., Monbai-dong, Yongsan-gu, Seoul 140-715, Korea

유래한다. 발효에 의하여 생산된 산성 부산물들은 특정 화학 반응을 일으키는데⁽¹⁰⁾, 예를 들면 밀가루 단백질인 gluten의 peptide 결합을 무작위로 절단하는 proteolytic action을 들 수 있다. Gluten의 절단반응은 밀가루에 자연적으로 존재하는 specific protease에 의해서도 일어날 수 있다. 그러나, 이러한 효소 작용의 결과로 gluten막은 파괴되지 않아 크랙커의 반죽에 적당한 성형적성(sheeting properties)을 주어 크랙커가 소성 oven에서 소성되어 질 때 크랙커 특유의 탄성과 질감을 부여한다⁽¹¹⁾.

크랙커 제조의 밀가루 발효는 전통적으로 회분식 배양을 하는데 이 방법은 대량생산시 각 회분작업마다 품질이 일정하지 않고, 젖산균이 phage 등의 오염에 의한 plaque 형성 가능성이 크고, 많은 현장 작업인원, 시설투자와 장시간의 작업시간(대개 72~80시간) 등의 단점이 있다. 그러므로, 본 연구에서는 이러한 단점을 개선하기 위하여 전통적인 회분식 발효방법이 아닌 연속적인 반복 유가식 발효방법을 제안하였다. 또한 밀가루 용액의 발효에 영향을 주는 인자인 온도와 산소공급 조건 등에 대하여도 살펴보았다.

재료 및 방법

미생물 및 사용배지

본 실험에 사용된 균주는 여러 가지 *Lactobacillus* 균주 중에 이취가 없고 총적정산도(TTA; total titrable acidity)가 높은 균주를 선별하고 선별된 균주를 조합하여 최종적으로 선택한 *L. brevis* (KCTC 3102), *L. fermentum* (KCTC 3112)과 *L. plantarum* (KCTC 3099)의 혼합젖산균이었으며⁽¹²⁾, 성장배지로는 MRS배지를 사용하였다. 밀가루 용액의 발효배지로는 300 g/L의 중력밀가루(신한제분), 10 g/L의 NaCl로 구성된 밀가루 용액을 사용하였다.

배양조건

종배양은 동결건조된 젖산균 균주를 MRS배지 10 mL가 들어있는 시험관에 접종하여 incubator를 이용하여 35°C에서 정지배양을 하였으며 12시간 배양한 후, MRS배지 50 mL가 들어있는 250 mL의 플라스크에 접종하여 35°C에서 180 rpm으로 12시간 동안 진탕배양하였다. 이 배양액을 5,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 균체를 밀가루 용액의 발효에 사용하였다.

밀가루 발효는 밀가루 용액 3 L가 들어있는 5 L의 발효조(한국발효기(주))에 3%의 혼합젖산균을 접종하여 배양온도 20~40°C, 통기량 1.0 vvm과 교반속도

100~400 rpm으로 24시간 동안 배양하였다.

반복 유가식 배양에서는 밀가루 용액 3 L가 들어있는 5 L의 발효조에 3%의 혼합젖산균을 접종한 후 배양온도 35°C, 통기량 1.0 vvm과 교반속도 250 rpm으로 하여 pH가 특정값(pH 3.2~3.5) 이하로 감소하면 일정한 배양액을 제거한 후 같은 양의 배지를 첨가하는 pH-stat (한국발효기) 방법으로 배양하였다.

총적정산도 및 pH의 측정

총적정산도는 APHA⁽¹³⁾의 방법에 따라서 밀가루 발효액 10 mL를 conical flask에 취하여 물 90 mL를 첨가한 후, 0.2% 페놀프탈레인 지시약을 4~5방울 첨가하고, 0.1N NaOH로 적정하여 그 소모량으로부터 계산하였으며, pH는 pH meter (TOA, Japan)을 사용하여 측정하였다.

산소전달속도상수의 측정

산소전달속도상수(kLa)는 배지가 담겨 있는 발효조에 질소가스를 공급하여 용존산소의 농도가 zero가 되도록 한 다음 일정한 속도로 통기하여 용존산소의 변화를 측정하고 측정된 용존산소의 농도를 dynamic법으로 계산하였다⁽¹⁵⁾.

결과 및 고찰

온도가 밀가루용액의 발효에 미치는 영향

혼합젖산균에 의한 밀가루 발효에 관여하는 여러 가지 인자 중에 pH는 통상적으로 식품인 크랙커의 제조에는 조절하지 않는다. 그러므로, 주요 인자인 온도와 산소가 혼합젖산균에 의한 밀가루 발효에 미치는 영향을 살펴보았다. 온도변화 실험은 20~40°C 범위에서 *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*과 *L. plantarum*의 혼합젖산균을 사용하여 밀가루 발효액의 pH의 변화를 살펴보았다(Fig. 1). 20~35°C범위에서는 온도가 증가할수록 pH가 비례적으로 감소하였으나 그 차이는 비교적 적었다. 그러나 40°C에서는 pH가 적게 감소하여 배양 24시간 후에 pH 4.8을 보여주었다. 35°C에서는 pH의 감소가 가장 크게 나타났고 최종 pH는 3.2를 나타냈다. 온도에 따른 밀가루 발효정도의 기준이 되는 총적정산도(TTA; total titrable acidity)를 살펴본 결과 pH의 감소가 클수록 높게 나타났다(Fig. 2). 총적정산도의 최고값도 35°C에서 1.3을 보여주었다. 그러나 40°C에서는 총적정산도가 크게 증가되지 않아 발효 24시간 후에 약 0.4를 보여주었다.

그러므로 밀가루 용액의 발효에서 최적온도는 pH

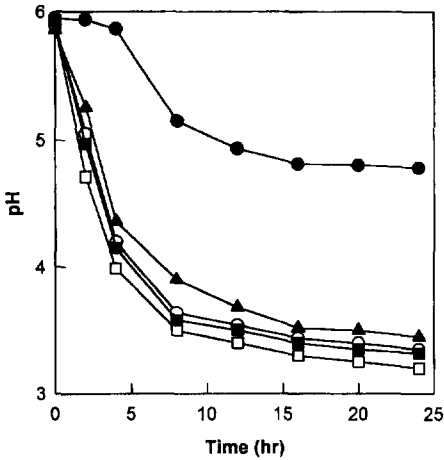


Fig. 1. Effect of temperature on pH during wheat flour fermentation by mixed lactic acid bacteria. ▲—▲: 20°C, ○—○: 25°C, ■—■: 30°C, □—□: 35°C, ●—●: 40°C.

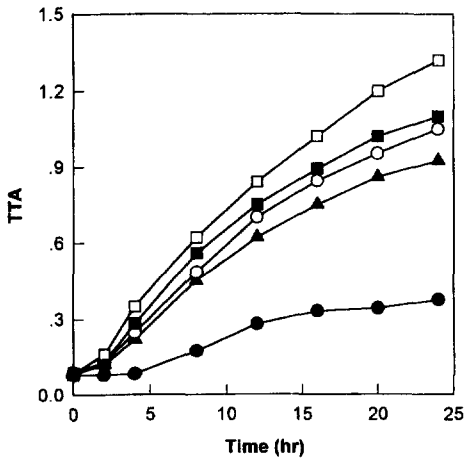


Fig. 2. Effect of temperature on TTA during wheat flour fermentation by mixed lactic acid bacteria. ▲—▲: 20°C, ○—○: 25°C, ■—■: 30°C, □—□: 35°C, ●—●: 40°C.

의 감소와 총적정산도의 증가가 가장 크게 나타난 35°C이었다.

산소가 밀가루용액의 발효에 미치는 영향

혼합젖산균에 의한 밀가루 용액을 배지로 하여 발효를 진행하였을 때 공기가 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 5 L 발효조에서 통기량을 1.0 vvm하고 교반속도를 250 rpm으로 한 호기적 조건과 통기를 공기대신 질소가스로 1.0 vvm으로 하고 교반속도를 150 rpm으로 한 혐기적 조건으로 비교실험을 하여 pH와 총적정산도의 변화를 살펴보았다. Fig. 3에서 보여주

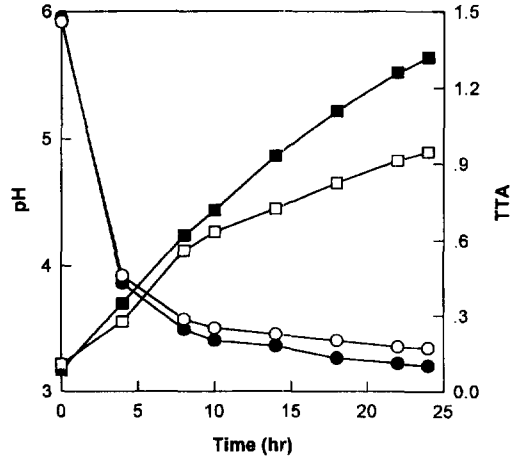


Fig. 3. In aerobic and anaerobic conditions, pH and TTA changes during wheat flour fermentation by mixed lactic acid bacteria. ●—●: pH by purging with air, ○—○: pH by purging with nitrogen gas, ■—■: TTA by purging with air, □—□: TTA by purging with nitrogen gas.

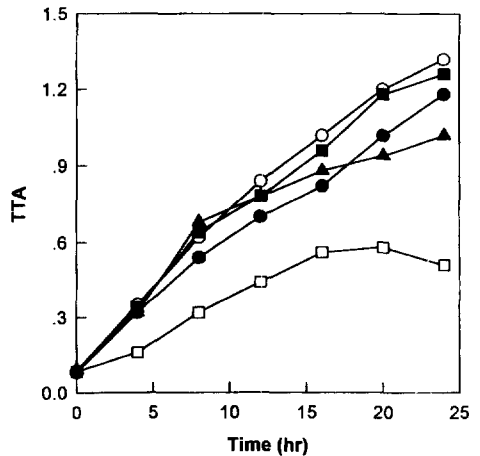


Fig. 4. Effect of oxygen transfer coefficient on pH and TTA during wheat flour fermentation by mixed lactic acid bacteria. ●—●: $k_{1a}=20 \text{ hr}^{-1}$ (100 rpm); ■—■: $k_{1a}=45 \text{ hr}^{-1}$ (200 rpm); ○—○: $k_{1a}=60 \text{ hr}^{-1}$ (250 rpm); ▲—▲: $k_{1a}=85 \text{ hr}^{-1}$ (300 rpm); □—□: $k_{1a}=120 \text{ hr}^{-1}$ (400 rpm).

듯이 혐기적 조건보다 호기적 조건에서 pH의 감소와 총적정산도의 증가가 더 크게 나타났다. 이것은 aerotolerant anaerobes인 *Lactobacillus*의 경우 과량이 아닌 적당량의 산소공급은 오히려 유기산의 생성을 촉진할 수 있다는 것을 보여주는 결과이다.

최적 산소공급 조건을 찾기 위하여 통기량을 1.0 vvm으로 고정하고 교반속도를 달리하여 산소전달속도상수(k_{1a})의 변화에 따른 pH와 총적정산도의 변화

를 살펴보았다(Fig. 4). 발효조의 교반속도는 100, 200, 250, 300, 400 rpm으로 하였고 이때 각각의 교반속도에서 산소전달속도상수는 20, 45, 60, 85, 120 hr⁻¹이었다. 20 hr⁻¹에서 60 hr⁻¹사이의 조건에서는 산소전달속도상수가 증가할수록 총적정산도가 증가하였지만 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 60 hr⁻¹ 이상에서는 오히려 산소전달속도상수가 증가할수록 감소하여 120 hr⁻¹에서는 총적정산도의 증가가 약 0.6으로 비교적 낮게 나타났다. 이것은 과량의 산소공급 역시 유기산 생성을 저해한다는 것을 보여준 결과이다.

밀가루 발효에 있어서는 적당량의 산소를 필요로 하는데 이때 최적 산소전달은 250 rpm에 해당되는 산소전달속도상수 60 hr⁻¹됨을 보여주었다.

반복적 유가식 방법에 밀가루 용액의 발효

생산성을 증가시키기 위하여 밀가루 용액의 발효에서 일정량의 밀가루 발효액을 그대로 남겨두고, 일부만 제거해주고 같은 양의 밀가루 용액을 첨가하는 것을 일정량씩, 일정간격으로 반복해서 일정 작업부피를 유지하는 반복 유가식 배양을 수행하였다. 반복 유가식 배양법은 한국발효기에서 제작한 pH-stat를 사용하여 수행하였다. pH-stat는 발효과정 중에 밀가루의 pH가 정해진 pH (3.2~3.5)이하로 감소하면 자동적으로 일정시간동안 pump가 작동되어 밀가루 발효액의

일정량이 제거된 후 다른 pump가 작동하여 같은 양의 밀가루 용액을 첨가하는 방법이다.

전통적 방법에 의한 발효의 수행시 이전 작업에 사용했던 발효된 밀가루 반죽의 일정량을 다시 starter로 사용해야 하며, 이때 접종해주는 발효된 밀가루 반죽의 임계량을 결정하여야 하고, 이 임계량은 작업시간, 작업조건 등에 의하여 결정된다. 전통적 방법의 임계량은 밀가루의 반복 유가식 배양에서 반복적으로 제거와 첨가되는 비율인 반복비율에 해당된다. 밀가루 발효의 전통 방법은 발효된 밀가루 반죽을 일정시간 보관한 후 사용하는 일종의 회분식 배양이다. 이에 비하여 반복 유가식 배양에서는 항상 일정량의 발효된 밀가루 용액이 존재하여 생산성 및 젖산균의 활성이 더 높다. 그러므로, 반복 유가식 배양에서 반복비율이 밀가루 용액의 평균 추가 간격시간과 밀가루 발효의 최대 작동시간에 미치는 영향을 살펴보았다 (Table 1). 반복비율이 증가할수록 밀가루 용액의 추가 간격시간은 증가하여 반복비율이 50%일 때 추가간격시간은 3.1 시간까지 증가하였다. 그러나, 반복비율이 감소할수록 밀가루 발효의 최대 작동시간은 증가하였다. 특히, 반복비율이 10%일 때 최대 작동시간은 80일로 증가하였다.

최적 반복비율을 결정하기 위하여 단위시간당 배양부피 당 교체되어 생산되는 밀가루 발효액의 부피와 최대가동시간 동안 배양부피 당 생산된 총 밀가루 발효액의 부피를 살펴보았다(Fig. 5). 단위시간당 배양부피 당 교체되어 생산되는 밀가루 발효액의 부피는 20%의 반복비율에서 최대값을 보여주었지만 20~40%의 반복비율에서는 큰 차이가 없었다. 20% 이상의 반복비율에서 단위시간 당 배양부피 당 교체되어 생산되는 밀가루 발효액의 부피가 감소하는 것은 반복비율이 증가할수록 발효액의 pH가 3.2~3.5 이하로 감소되는 추가 간격시간이 오래 걸려 일어난 결과로 생각된다. 최대가동시간동안 배양부피 당 생산된 총 밀가

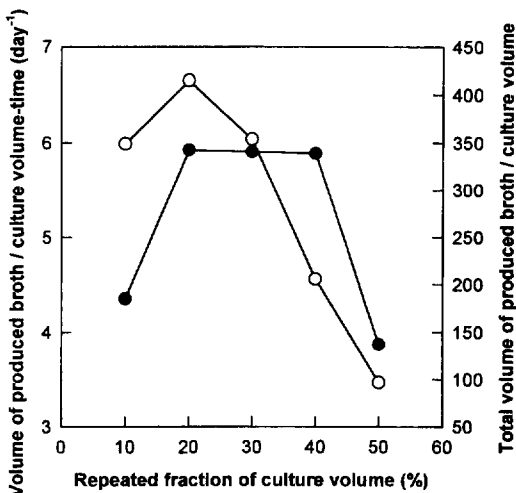


Fig. 5. Effect of repeated fraction of culture volume on volume of produced broth per culture volume per time and total volume of produced broth per culture volume during wheat flour fermentation by mixed lactic acid bacteria. ●—●: volume of produced broth per culture volume per time, ○—○: total volume of produced broth per culture volume.

Table 1. Effect of repeated fraction of culture volume on mean cycle time and maximum operation time during wheat flour fermentation by mixed lactic acid bacteria

Repeated fraction of culture volume (%)	Mean cycle time (hr)	Maximum operation time (day)
10	0.55	80
20	0.81	70
30	1.22	60
40	1.63	35
50	3.10	25

루 발효액의 부피는 단위시간 당 배양부피 당 교체되어 생산되는 밀가루 발효액의 부피에 최대가동시간을 곱하여 얻어진 결과로 이것 역시 20%의 반복비율에서 최대값을 보여주었고 그 이상의 비율에서는 급격히 감소하였다. 10%의 반복비율에서는 비록 최대가동시간이 가장 길었으나 상대적으로 단위시간 당 배양부피 당 교체되어 생산되는 밀가루 발효액의 부피가 적어 배양부피 당 생산된 총 밀가루 발효액의 부피가 적게 나타났고, 20%의 반복비율 이상에서는 반복비율은 증가하였으나 단위시간 당 배양부피 당 교체되어 생산되는 밀가루 발효액의 부피와 최대가동시간이 감소하여 배양부피 당 생산된 총 밀가루 발효액의 부피가 적게 나타났다. 단위시간당 배양부피 당 교체되어 생산되는 밀가루 발효액의 부피와 최대가동시간 동안 배양부피 당 생산된 총 밀가루 발효액의 부피를 조사한 결과 20%의 반복비율에서 최대값을 나타내서 생산성이 최대인 20%의 반복비율이 최적 반복 유가식 배양조건임을 알았다.

요 약

Lactobacillus brevis, *L. fermentum*과 *L. plantarum*의 혼합젖산균을 사용하여 배양조건이 밀가루 용액의 발효에 미치는 영향을 살펴보았다. 온도변화에 따른 pH와 총적정산도의 변화를 살펴본 결과 pH의 감소와 총적정산도의 증가가 가장 크게 나타난 35°C를 밀가루 발효의 최적온도로 선정하였다. 5 L 발효조에서 질소가스를 1.0 vvm으로 첨가한 혐기적 조건보다 공기를 첨가한 호기적 조건에서 총적정산도의 증가와 pH의 감소가 더 크게 나타났다. 최적 산소공급 조건을 찾기 위하여 통기량을 1.0 vvm으로 고정하고 교반속도를 달리하여 밀가루 용액의 발효한 결과 총적정산도가 가장 크게 나타난 교반속도 250 rpm에 해당되는 산소 전달속도상수 60 hr⁻¹에서 최적이었다. 선정된 최적 배양조건에서 밀가루 발효액의 생산성을 높이기 위하여 반복비율을 변화시키면서 pH-stat를 이용한 반복 유가식 배양을 수행하였다. 반복비율이 증가할수록 반복간격시간은 증가하였으나 밀가루 발효의 최대 작동시간은 감소하였다. 최적 반복비율을 결정하기 위하여 단위시간 당 배양부피 당 생산된 밀가루 발효액의 부

피와 최대가동시간 동안 배양부피 당 생산된 총 밀가루 발효액의 부피를 살펴본 결과 20%의 반복비율에서 최대값을 나타내었다. 혼합젖산균을 이용한 밀가루 용액의 유가식 배양에서 최적조건은 배양온도 35°C, 통기량 1.0 vvm, 산소전달속도 60 hr⁻¹, 반복비율 20%로 나타났다.

문 헌

1. Voysey, P.R.: A problem for bakers *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 25 (1989)
2. Sugihara, T.F.: Non-Traditional Fermentations in the production of baked goods. *Baker's Digest.* **Oct.**, 76 (1977)
3. Kline, L., Sugihara, T.F. and McCready, L.B.: Nature of the San Francisco sour dough French bread process. I. Mechanics of the process. *Baker's Digest.* **44**(2), 48 (1970)
4. Wolffin, A.: Bakteriologische und chemische Studien über die Sauerteiggärung *Archiv für Hygiene.* **21**, 268 (1984)
5. Schulz R.N., Peppler, J.H.: Basic principles of saltine production. *Baking Ind.* **135**(5), 69 (1971)
6. Hoseney, R.C.: *Principles of Cereal Science and Technology*, AACC, St. Paul, Minnesota, p.143 (1986)
7. Sugihara, T.F., Kline, L. and Miller, M.W.: Microorganism of the San Francisco sour dough bread process I. Yeasts responsible for the leavening action. *Appl. Microbiol.* **21**(3), 456 (1971)
8. Jackel, S.S.: Techniques to determine flavor factors in bread. *Proc. Amer. Soc. Bak.*, 60 (1963)
9. Fields, M.L., Hoseney, R.C. and Varriano, E.: Microbiology of Cracker Sponge Fermentation. *Amer. Assoc. Cere. Chem.*, **59**(1), 23 (1982)
10. Henry N.G.: Factors Affecting Organic Acid Production by Sourdough Bacteria. *Appl. Microbiol.* **23**(6), 1153 (1972)
11. Hesseltine, C.W. and Graves, R.R.: Microbiology of flours. *Econ. Bot.* **20**, 156 (1966)
12. 김상용, 이병돈, 김정민, 임동준, 오덕근: 소다 크래커의 최적 스펀지 발효를 위한 혼합젖산균의 선별. *한국식품과학회* **29**, 150 (1997)
13. APHA: *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 16th ed., American Public Health Association, Washington D.C. (1993)
14. Banyopadhyay, B. and Humphrey, A.E.: Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnol. Bioeng.* **9**, 533 (1967)

(1996년 12월 30일 접수)