

## Lactobacillus acidophilus로 발효시킨 밀가루 발효물의 특성

차욱진 · 이시경\* · 이정훈<sup>1</sup> · 조남지<sup>2</sup>

건국대학교 응용생물화학과, <sup>1</sup>안산공과대학 호텔조리과, <sup>2</sup>혜전대학 제과제빵과

### Characteristics of Flour Ferment Using Lactobacillus acidophilus as Starter

Wook-Jin Cha, Si-Kyung Lee\*, Jeong-Hoon Lee<sup>1</sup>, and Nam-Ji Cho<sup>2</sup>

Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University

<sup>1</sup>Department of Hotel Culinary Arts, Ansan College of Technology

<sup>2</sup>Department of Baking Technology, Hyejeon College

Growth of *Lactobacillus acidophilus* in flour was investigated for production of noodle and bread. *L. acidophilus* grew when fermented in flour, and growth continued upon fermentation with salt for 72 hr. pH of *L. acidophilus*-fermented flour with salt decreased up to 72 hr, reaching 3.06. Fermented flour with salt showed no decomposition as compared to that without salt. In flour fermented by *L. acidophilus*, amounts of lactic and acetic acids produced increased with incubation time, and reached, after 72 hr incubation, 6.821 and 0.191 mg/g, respectively, resulting in significantly higher production of lactic acid. Viscosity of fermented flour with salt increased, whereas that without salt decreased with incubation time. Results reveal *L. acidophilus*-fermented flour with salt could be applied as effective agent in noodle and bread productions.

**Key words:** *L. acidophilus*, wheat flour ferment, lactic acid

## 서 론

수분함량이 높은 생면은 저장성이 낮아 유통 중 많은 문제점이 발생하고 있다. 이들 면제품의 저장성을 연장시키기 위하여 여러 가지 방법을 사용하고 있다. 현행 우리 나라의 식품공전에 의하면 생면이나 숙면류의 성분 규격은 미생물학적인 인자로는 주로 총세균수와 대장균군 또는 대장균이 고려되는데 주정침지 제품의 경우 일반 세균수가  $1.0 \times 10^6$  cfu/g 이하이고 대장균은 음성으로 되어있다. 일본에서의 위생규범으로 정한 미생물 제어 목표치를 보면 면류 원료의 미생물 오염원은 면류의 주원료인 소맥분과 메밀분에 존재하는 세균과 진균 등의 미생물이다.

면류의 주원료인 소맥분의 오염세균수는  $10^3$ - $10^5$ cfu/g이 일반적이며 생면류의 세균제어 목표치는 일반 세균이  $3 \times 10^6$  cfu/g, *E. coli*는 100배 희석의 시료에서의 음성, 황색포도상 구균도 음성이어야 한다(1).

면류의 미생물 제어를 위하여 주로 과산화수소나 알콜 주정을 사용해 왔으나 과산화수소는 인체의 유해론이 제기되어 사

용이 금지됐고, 알콜의 경우 알콜취가 맛에 영향을 미치므로 새로운 보존법 개발이 업계의 지대한 관심사로 떠올랐다(2). 또한 면류 식품에 유기산류를 가해 pH를 산성으로 조정하는 방법은 많은 실용화가 되어 있다(3). 생면류의 품질 및 저장성에 관한 연구에서 Hanada 등(4)은 면의 저장성 증진을 위해 다양한 첨가물의 항균력을 조사한 결과 ethanol, glycine, propylene glycol, malic acid 등이 효과적임을 보고하였다. Hadanaga(5)는 미생물 살균 방식으로 가열살균, 초고압살균, 화학살균 등이 있고 증식 억제 방식으로 pH조정, 수분활성도 저하, 미생물 억제제, 식품첨가물 첨가, 보존온도 등의 다양한 방법을 보고하였다. Kanega(6)는 면류가 미생물에 이용, 분해되기 쉽고 특별한 항균인자를 가지고 있지 않기 때문에 오염, 잔존미생물은 급속하게 증식하여 빠른 속도로 면류의 변패를 일으킨다고 보고하였으며, 박 등(7)은 비살균 제품인 생면, 숙면을 대상으로 국수의 저장 수명이 저장온도가 10°C씩 낮아짐에 따라 약 2배 정도 증가하였다고 보고하였다. 또한 차 등(8)은 여러 유기산의 침지 방식을 통해 숙면의 저장성 효과를 확인하였고 Cai(9)는 10 kGy의 <sup>60</sup>Co- $\gamma$  ray를 조사한 결과 대부분의 세균이 사멸되었고 국수의 외관측정 저장성에서도 10일 동안 안정적이었다고 하였으며 김 등(10)은 감마선 조사 숙면의 미생물 및 일반 품질 특성 변화의 연구에서 10 kGy에서는 안정적으로 미생물의 생장이 억제되었다고 보고하였다. 또한 최근에 이 등(11)은 키토산 처리에 의한 빵과 면에서 연장효과를 확인 할 수 있었다고 보고하였다.

\*Corresponding author: Si-Kyung Lee, Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Kwangjin-ku, Seoul 143-701, Korea  
Tel: 82-2-450-3759  
Fax: 82-2-456-7183  
E-mail: lesikyung@kkucc.konkuk.ac.kr

유기산의 항균력은 산 자신이 보유하는 항균력과 pH의 저하 작용에 의해 미생물의 성장 억제와 산 분자 자체의 독성 효과 때문이다(12). 노(13)는 젖산균 *L. acidophilus*를 이용하여 화분 식품의 안정성을 보고하였고 가금류인 구이용 영계(broiler) 표면에 대한 젖산의 오염 방지 효과와 해산물인 껍질 벗겨 요리한 새우를 젖산의 농도와 시간을 달리 하여 처리했을 때 큰 효과를 가져다 준다고 하였다. Toshikuni(14)는 식초 및 초산의 세균, 곰팡이, 효모 등 미생물에 대한 항균력의 연구에서 세균에 대한 저항력은 저농도의 식초나 초산으로 생육억제를 한다고 보고했다.

조 등(15)은 *Bifidobacteria bifidum*을 이용한 밀가루 brew의 제빵품질에 미치는 영향에서 젖산 생성으로 빵의 노화 지연 및 저장성 향상을 가져다 준다고 보고하였다. *Lactobacillus*(16)는 산 생성력이 강한 젖산균의 대표적인 속으로 non sporeforming의 gram 양성 간균이며, 일반적으로 편모가 없어 운동성이 없고, 통성 혐기적인 배양 특성 균으로 부패산물은 생성하지 않고, 포도당을 기질로 해서 최종산물이 DL-lactic acid를 생성하는 homofermentative lactic acid bacteria로 식품에 적합한 산미를 부여함과 동시에 부패균의 생육을 억제한다.

따라서 본 연구에서는 식품에 안전한 GRAS(Generally Recognized As Safe) class균으로 lactic acid의 생산에 주로 이용되는 정상 발효젖산균인 *Lactobacillus acidophilus*를 먼 제조에 이용하기 위하여 밀가루에 본 균을 발효시켜 발효산물 생성의 가능성과 액중 발효물의 특성을 파악하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

밀가루는 D사에서 2002년 2월에 생산된 중력 다목적용 밀가루로서 일반 성분은 수분 13.8%, 조단백질 9.5%(N×5.7), 회분 0.38% 이었다. 식염은 한주소금(순도 99%)을 사용하였고 plate count agar(Difco Labs, Detroit, Michigan, USA), Lactobacilli MRS broth(Difco Labs, USA), NaOH(Daejung Chemical & Metals Co. Ltd., Korea), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(Shiny Pure Chemicals Co., Osaka, Japan), lactic acid(Kanto Chemical Co., Japan), acetic acid(Tedia lot 506038, 99.88%, Japan), NaCl(Duksan Pure Chemical Co., Ltd, Korea), ethyl alcohol(Duksan Pure Chemical Co., Ltd, Korea)을 사용했다. 균주는 건국대학교 응용생물화학과에 보관중인 *Lactobacillus acidophilus*(KCTC 3145)를 사용하였다.

### 젖산균의 생육 측정

MRS broth 배지분말 55 g을 증류수 1 L에 10분간 용해시킨 후 500 mL의 메스플라스크에 200 mL씩 용해된 MRS 배지를 담아 밀봉한 후 자동멸균기에서 121°C, 15분간 살균한다. 살균 후 자연 냉각시킨 다음 무균 접종실에서 200 mL의 살균 배지에다 계대 배양시켜 보관 중인 *L. acidophilus*균 1 mL을 무균적으로 접종하였다. 생균수는 배양액 1 mL을 취한 다음 0.85% 식염수 9 mL가 들어 있는 시험관을 사용해서 10배씩 단계적으로 희석한 다음 각 농도의 희석액 1 mL 씩을 혼합하여 MRS 배지에 평균 도말하여 구하였다. 37°C에서 3일간 배양 후 나타나는 균락수를 측정하여 계산하였다(17). 또한 MRS broth의 pH 7.0로 조정된 후 중균을 1%씩 접종하고 37°C의 인큐베이터에서 정지 배양하면서 6시간 간격으로 Spectrophotometer(8452A DIODE ARRAY, Hewlett Packard Co. Ltd., USA)를 사용하여

660 nm에서 Optical Density(O.D.) 값을 측정하였다.

### pH, 총 적정 산도의 측정

젖산균을 MRS 배지에서 72시간 배양하면서 6시간마다 배양액 10 g을 취해 250 mL 비이커에 넣고 100 mL 증류수를 가해 균일하게 혼합하고 pH meter(Suntex sp-701, Taiwan)로 측정하였다. 산도의 측정은 AACC 02-31(18)에 따라 배양액 10 mL를 삼각 flask에 취하여 증류수 90 mL를 넣어 혼합 후 1.0% phenolphthalein-50% ethanol 지시약을 5방울 넣어 혼합하고 0.1 N-NaOH 용액으로 적정하여 소모 mL를 구했다. 발효물의 경우 배양 6시간마다 발효물 10 g을 취해 같은 방법으로 pH와 적정 산도를 측정하였다.

### 젖산균 발효물의 제조

중력분 100%, 소금 2%, 배양된 젖산균 1%, 증류수 160% 비율로 Vertical 배합기(Spar mixer, model 5MX, 1 P.H, Korea)에 먼저 중력분을 넣은 후 소금을 녹인 증류수에 계대 배양시킨 젖산균을 넣고 beater로 혼합시키면서 이것을 천천히 가하면서 60 rpm의 배합기 속도에서 10분간 혼합했다. 위의 비율로 혼합해서 만든 밀가루 혼합액을 멸균된 500 mL 삼각플라스크에 200 g씩 무균적으로 부어 담고 밀봉한 후 37°C 항온기에서 72시간 정지 배양시켜 밀가루 발효물로 사용했다.

### 발효물의 젖산균 변화 및 관찰

생균수는 발효액 1 g을 취한 다음 MRS 배지 9 mL가 들어 있는 시험관을 사용해서 10배씩 단계적으로 희석한 다음 각 농도의 희석액 1 mL씩을 MRS 배지에 평균 도말하여 구하였다. 37°C에서 3일간 배양 후 나타나는 균락수를 측정하여 계산하였다(19).

젖산균의 형태적 관찰은 24시간 배양한 밀가루 발효물을 10 g을 무균적으로 채취한 후 염수로 희석 한 후 MRS 액체 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 액을 무균적으로 0.2 μm membrane filter를 이용하여 여과시키고 0.1 M cacodylate buffer 완충액(pH 7.4)으로 조정된 karnovsky 고정액으로 36시간 전고정을 하고 난 후 0.1 M cacodylate buffer로 각 1시간씩 2회 수세 한 후 1% OsO<sub>4</sub>로 2시간동안 후고정을 하고 cacodylate buffer로 10분간 수세를 끝낸 시료는 저농도 alcohol로부터 고농도 alcohol 순으로 각각 10분씩 탈수 후 iso-amylacetate로 30분간 담가 치환시켰다. 치환 후 이산화 탄소로 임계점 건조(Critical Point Dryer, Hitachi, Japan)에서 건조하여, 시료대에 부착한 다음 ion coater(E-1010, Hitachi, Japan)에서 6 mA로 도금한 후 주사전자현미경(SEM S-800, Hitachi, Japan)으로 20 KV 조건 하에서 관찰하였다.

### 발효물의 유기산 분석

37°C에서 배양시킨 발효물을 발효기간에 따라 무균적으로 일정량을 취해 마개 튜브에 담아 -18°C 냉동고 넣어 발효를 중단시켜 보관한 후 분석 시 sample을 희석농도 10 mg/mL 되도록 증류수로 희석한 후 Millipore membrane filter(pore size, 0.45 μm)로 여과하여 HPLC(LC 1100 Series, Hewlett Packard Co. Ltd, USA)를 이용하여 분석하였다.

분석 컬럼은(Aminex HPX-87H ion exclusion type, L 300 mm×7.8 mm, USA)을 사용했으며 이동상은 40°C에서 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 0.6 mL/min의 속도로 흘러서 ADC(RI Detector)로 검출하였다.

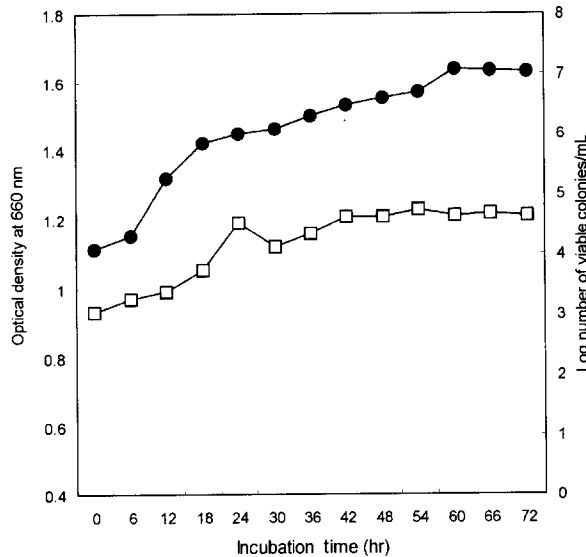


Fig. 1. Growth of *L. acidophilus* in MRS broth.  
-●-: Viable cells, -□-: Optical density.

#### 발효물의 점도 측정

발효과정에서 세포의 다당류의 생성을 측정하기 위하여 viscometer(RVDVII+, Brookfield Co. Ltd, USA)를 사용하여 젯산균 발효물의 점도를 측정하였다. 정(20)의 방법으로 Brookfield viscometer의 adaptor에 배양물 60 mL를 담아 #3 spindle로 6 rpm에서 30초 동안 회전시킨 다음 측정 환산하였다. 그때에 눈금값에 calibration factor를 곱하여 점도로 환산하였다.

### 결과 및 고찰

#### 총 생균수의 변화

*L. acidophilus*를 면 제조 시에 첨가할 목적으로 MRS broth 배지를 이용하여 37°C에서 3일 동안 배양시키면서 나타나는 생균수를 6시간 마다 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

그림에서와 같이 6시간 경과 후 생균수는  $2 \times 10^4$  cfu/mL, 12시간 후에  $1.8 \times 10^5$  cfu/mL, 24시간에  $1 \times 10^6$  cfu/mL, 48시간  $4 \times 10^6$  cfu/mL, 72시간에는  $2 \times 10^7$  cfu/mL으로 나타나 생균수가 18시간까지 급격하게 증가하였으나 그 후 배양 60시간까지는 완만하게 증식하고 그 이후 부터는 증식이 정체되는 경향을 나타내었다.

이 등(21)의 *L. acidophilus*(ATTC 9224)에 의한 보리 젯산균 음료의 조제 및 발효 과정중의 주요 화학 성분의 변화에 관한 연구에서 malt syrup, skim milk, mixed medium를 이용하여 최적 조건에서 생균수의 생육곡선은 16시간까지는 대수기이고 그 이후부터가 정상기임을 보고하였다. 이의 연구에서 생육 곡선이 본 연구의 결과와 시간의 차이는 있었지만 생균수 증가 추세가 거의 유사하게 나타났다. 그러나 이 등(22)은 탈지대두유를 배지로 해서 *L. acidophilus*(KFCC 12731)를 35°C에서 24시간 동안 발효시켰을 때 대수기가 12시간 까지였다고 한 내용과 본 실험결과와는 다소 차이를 나타내었다. 이는 사용된 조성 배지 및 균종의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

또한 MRS broth를 이용하여 35°C에서 정지 배양하면서 6시간 간격으로 72시간 동안의 *L. acidophilus*의 생육을 660 nm에서의 O.D.값을 측정하여 Fig. 1과 같이 균의 생균수와 유사한 경향을 나타내었다.

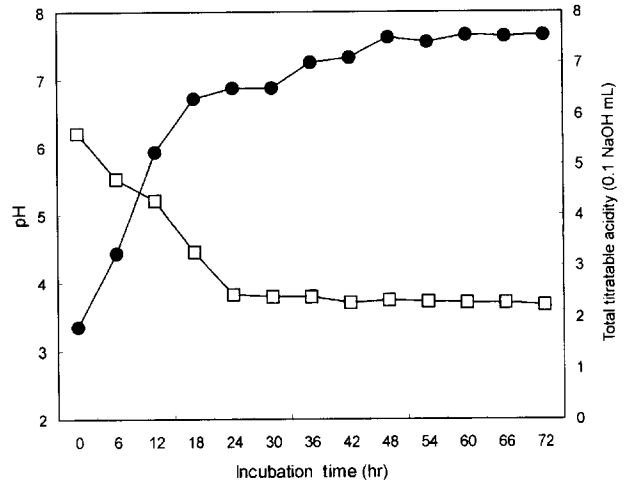


Fig. 2. Changes in pH and total titratable acidity during incubation in MRS broth at 37°C.

-□-: pH, -●-: Titratable acidity.

#### pH 및 총산도 변화

MRS broth를 이용하여 *L. acidophilus*의 성장중 배양액의 pH 변화를 조사하기 위하여 6시간 간격으로 배양된 배지의 pH를 측정하여 Fig. 2와 같다. 그림에서와 같이 배양 초기의 pH가 6.2에서 6시간 후 pH 5.53, 12시간 후 pH 5.21, 18시간 후 pH 4.45, 24시간 후 pH 3.83, 48시간 후 pH 3.74, 72시간 후 pH 3.67로 나타나 배양 시간의 경과에 따라 배양액의 pH는 감소하는 경향을 보였다.

그러나 배양 초기에서 24시간까지는 pH가 급격히 저하되었고 배양 24시간 이후는 완만하게 저하되었다. 배양 초기에는 균체 증식으로 산 생성이 다소 늦다가 18시간 이후 pH가 급격히 저하되는 것은 균의 증식속도가 높게 나타나 젯산균에 의한 산 생성이 높은 것에 기인하는 것으로 생각된다.

또한 MRS broth를 이용하여 *L. acidophilus*의 배양 기간 중 나타나는 총산도 변화는 Fig. 2에서와 같다. 배양시간이 증가함에 따라 NaOH의 소모량이 증가되고 있으며 이는 배양시간에 따른 배양액의 pH의 변화와 상반되는 결과를 보였다.

이상의 실험에서 총산도는 배양 18시간까지 급격히 증가하였으며 그 이후 산 생성 속도는 다소 늦어지나 지속적으로 산을 생성하였다. 이 등(21)의 연구에서 보리 젯산균 음료의 발효과정 중에 있어서의 malt syrup, skim milk, mixed medium을 이용시 *L. acidophilus*의 생육 및 산 생성 조건을 검토한 결과 최적 조건 하에서 16시간까지가 대수기이고 그 이후가 정상기임을 알 수 있었다. 또한 이들 실험에서 malt syrup의 당도에 따른 *L. acidophilus*의 젯산 생성량을 측정하여 10°Bx에 달할 때까지 산 생성이 급격히 증가하였으나 그 이상의 당도에 있어서는 큰 차이가 나타나지 않았다는 내용과 본 실험결과에서 약간의 차이를 나타내는 것은 배지조성 및 균종의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

#### 발효물에서의 젯산균 변화

중력분 100%, 배양된 젯산균 1%, 증류수 160%로 조성된 발효물에 밀가루 대비 2%의 식염을 넣은 발효물과 식염을 넣지 않은 발효물을 배양기간에 따른 젯산균수의 변화를 측정하여 Fig. 3과 같다.

식염을 2% 첨가한 발효물에서의 배양 초기의 총 젯산균수

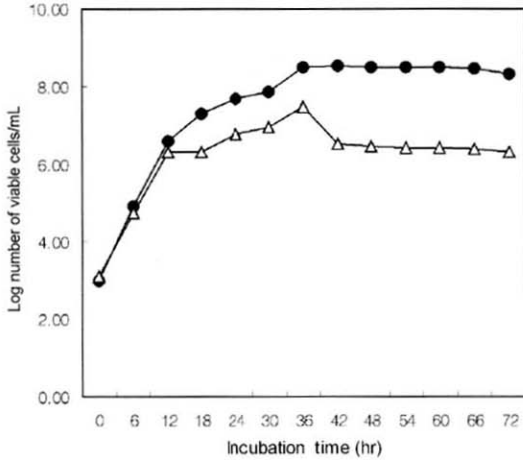


Fig. 3. Changes in total viable *L. acidophilus* cells in the flour ferments during incubation at 37°C for 72 hr.

-●-: Total viable cells in flour ferment with 2% salt, -△-: Total viable cells in flour ferment without salt.

는  $1.2 \times 10^5$  cfu/g에서 배양기간이 증가함에 따라 지속적으로 증가하였으며 배양 36시간에  $3.1 \times 10^8$  cfu/g로 최대값을 보였다. 그 이후에는 배양시간이 길어짐에 따라 증식 속도가 일정하게 되어 배양 42시간 후에는  $3 \times 10^8$  cfu/g로 큰 변화가 없이 발효물에 일정한 젖산균 수를 유지하였다.

한편 식염을 첨가하지 않은 발효물에서의 배양시간에 따른 총 젖산균 수는 배양 12시간까지는  $2.5 \times 10^6$  cfu/g으로 젖산균의 증식 속도가 식염을 첨가한 발효물에서와 비슷한 양상으로 증가하였지만 배양 18시간 이후 부터는 젖산균 수의 증가가 정체를 보였으며 배양 42시간 이후부터는 젖산균수가 오히려 감소하여  $2.2 \times 10^6$  cfu/g를 나타내어 식염을 2% 첨가한 발효물에서의 젖산균수의 변화와 차이가 있었다.

또한 식염을 첨가하지 않은 발효물의 배양상태를 육안으로 관찰하였을 때 발효물에서 gas가 생성되어 기포가 보이고, 갈변현상과 이취가 나타나 변질의 시초를 보였다. 이는 식염을 첨가하지 않은 발효물에서 다른 오염균의 혼입, 증식으로 인한 것에 기인되는 것으로 생각된다.

이상의 실험에서 밀가루 발효물 제조시 식염의 첨가는 젖산균 증식에 중요한 것으로 나타나 배양물에 2% 정도의 식염을 첨가하므로써 생육에 영향을 주어 생육 촉진 역할을 하였으며 다른 잡균 증식의 억제효과도 나타난 것으로 생각된다. 또한 식염 2% 첨가한 밀가루 발효물에서의 젖산균수가 식염을 첨가하지 않은 발효물에서의 젖산균수 보다 더 높게 나타났다.

조 등(15)은 제빵용으로 밀가루 brew와 탈지분유 배지에서 배양 실험에서 젖산균 bifidobacteria 생균수의 변화는 탈지분유 배지에서 생균수가 초기  $6.9 \times 10^6$  cfu/g에서 배양 8시간까지 지속적으로 증가하여  $1.3 \times 10^8$  cfu/g로 최대값을 보였고 그 후 배양시간이 길어짐에 따라 서서히 감소하여 20시간 후에는  $5.9 \times 10^7$  cfu/g로 변화가 없었다고 하였다. 밀가루 brew에서는 초기 생균수는  $1.8 \times 10^6$  cfu/g을 나타냈으며 배양 12시간과 24시간에 각각  $3.9 \times 10^6$  cfu/g와  $2.1 \times 10^6$  cfu/g의 생균수를 보여 배양 24시간 동안 bifidobacteria 생육이 일정하게 유지되어 사멸되지 않는 것으로 나타났다. 이러한 실험의 결과는 본 실험 결과와 유사한 양상이나 시간 차이가 생기는 것은 배지조성과 배양 조건 및 균의 특성에 기인하는 것으로 생각된다.

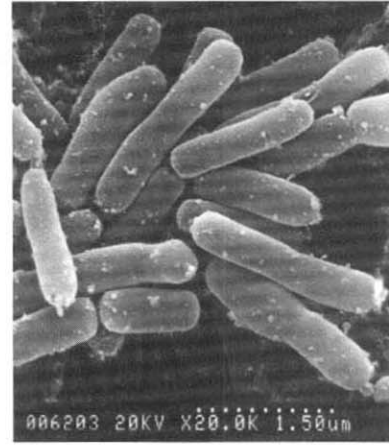


Fig. 4. Scanning electron micrographs of *L. acidophilus* cultured in the MRS medium at 37°C for 24 hr.

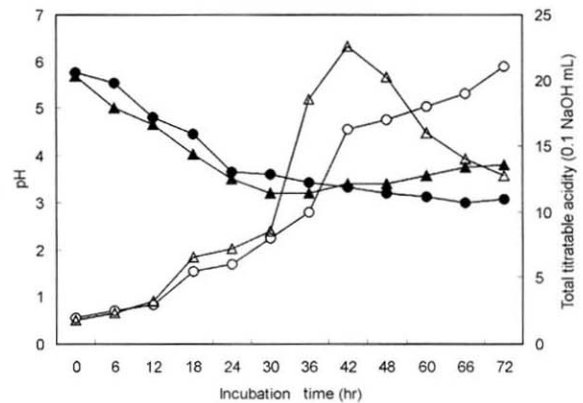


Fig. 5. Changes in pH and total titratable acidity (TTA) of the flour ferment with salt and without salt.

-●-: pH of the flour ferment with salts, -▲-: pH of the flour ferment without salts, -○-: Total titratable acidity of the flour ferment with salts, -△-: Total titratable acidity of the flour ferment without salts.

한편 본 실험에서 *L. acidophilus*를 밀가루에 배양 시 24시간 배양한 밀가루 발효물을 10g을 무균적으로 채취한 후 염수로 희석 한 후 MRS 액체 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 것을 주사전자현미경(SEM S-800, Hitachi, Japan)으로 20KV조건 하에서 2만배 확대하여 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 그림에서와 같이 형태적 관찰에서 발효물에서 생존하고 있는 미생물은 *L. acidophilus*의 전형적인 간균 형태를 보이고 있음을 알 수 있었다.

**발효물의 pH 및 총산도의 변화**

중력분 100%, 소금 2%, 배양된 젖산균 1%, 증류수 160% 비율로 혼합해서 37°C에서 배양시킨 발효물을 6시간 간격으로 배양시간에 따른 pH의 변화를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 2%의 식염을 첨가한 발효물과 식염을 첨가하지 않은 발효물의 배양기간에 따른 pH 변화를 비교하여 식염에 대한 영향을 조사하였다. 식염을 첨가하지 않은 발효물은 배양 30시간까지는 pH가 지속적으로 3.2까지 저하되었으나 그 이후부터는 pH가 배양 30시간과 36시간에서는 3.2에서 정체를 보이고 배양 48시간 이후부터는 오히려 3.4로 pH가 상승하기 시작하여 72시간에서는

**Table 1. Changes in volatile organic acids in the flour ferments with *L. acidophilus* with time**

Acids	Changes in volatile organic acid (mg/g) at the following time (hr)			
	0	24	48	72
Lactic acid	N.D. <sup>1)</sup>	4.7986	5.7605	6.8218
Acetic acid	N.D.	0.1068	0.1491	0.1913

<sup>1)</sup>N.D: Non detected.

3.8까지 상승했다. 그러나 식염을 첨가한 발효물의 pH는 배양 시간에 따라 지속적으로 감소하여 배양 72시간에 pH 3.06을 나타내었다.

이상의 실험에서 식염을 첨가하지 않은 발효물에서 pH의 감소가 느리며, 또한 일정시간 이후에 pH가 상승하는 것은 오염된 미생물 또는 미생물이 생성하는 대사물질에 의해서 pH가 상승하는 것으로 생각된다. 이는 육안적, 관능적으로 이미 36 시간부터 발효물에 기포현상과 gas 팽창과 더불어 부패취를 유발하면서 변질이 된 것을 관찰 할 수 있었던 것과 일치한다. 식염을 첨가한 발효물에서는 식염을 첨가하지 않은 발효물에서와 같은 부패현상이 없었고 오히려 보존성에 유효한 산미와 산취를 가진 발효물로서 인식되어 식염첨가가 변질 억제에 큰 영향을 주는 것으로 생각된다. 이는 Fig. 3의 발효물에서의 젖산균 생균수 변화와의 관계와 유관한 것으로 생각된다. 이상의 실험결과에 따라 이 후의 실험에서 사용되는 발효물의 배합율에서는 2% 식염을 첨가하였다.

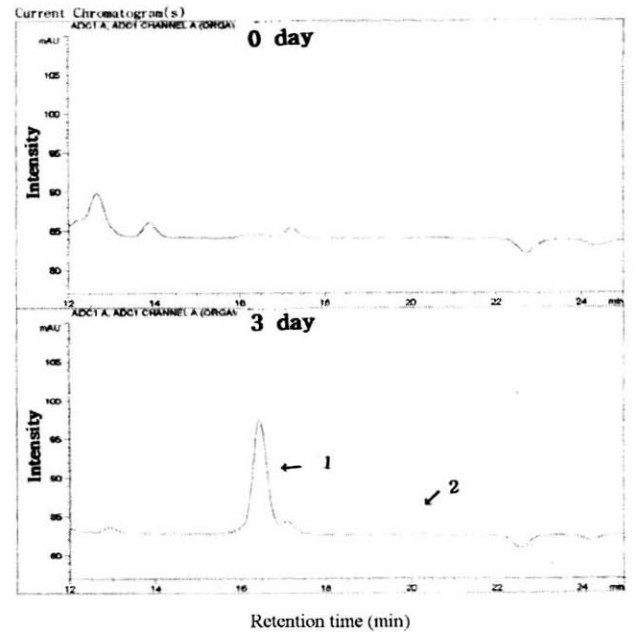
제면에서는 식염을 전통적으로 각종 제면 가공에 첨가되어 광범위하게 사용되며, 식염은 밀가루에 작용하여 제면 공정에서 gluten 조직을 조이고, 면대에 탄력성을 주는 직접적인 효과 외에 발효의 정지, 효소활성의 억제, 기온차의 조정효과도 있다. 식염의 농도는 면의 종류, 계절, 가수량, 밀가루 종류 등에 의해 가감되나 중화면은 밀가루 대비 1-2%, 건면은 3-6%를 사용하고 있다(12).

Kojima 등(23)은 면 제조시 가수량과 식염의 첨가량은 최종 제품인 숙면에서 물성을 결정할 뿐만 아니라 제면의 가공 적성에도 긴밀한 관계를 가지고 있으며 특히 식염은 발효억제, 효소 활성의 억제 등 중요한 역할을 한다고 보고했다. 조 등(15)의 연구에서 *bifidobacteria*를 탈지분유 배지에서 배양시킬 경우 초기의 pH 6.5에서 배양 8시간까지 직선적으로 낮아졌으며, 그 이후에는 완만한 감소를 보여 배양 12시간에 4.13, 배양 24시간 후에는 3.81을 나타내었다고 보고하였다. 그러나 *bifidobacteria*를 첨가한 밀가루 brew의 경우 배양시간에 따른 pH는 초기 5.80에서 배양 4시간 후 5.51로 다소 감소하였으나 배양 12시간 후에 3.60, 배양 24시간 후에는 3.48을 나타내었다. 또한 탈지분유 배지에서의 pH 감소는 배지에 존재하는 생균수의 변화와 밀접한 관계를 보였다.

이상의 결과는 본 실험의 결과와 유사하여 밀가루 배지에서의 *Lactobacillus*와 *Bifidobacteria* 젖산균 생육 배양에서는 비슷한 성질을 가지는 것으로 생각된다.

한편 밀가루 배합율을 일정하게 하고 식염을 첨가한 발효물과 식염을 첨가하지 않은 발효물의 배양과정에서 배양시간에 따른 총산도의 변화를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다.

그림에서와 같이 식염을 첨가한 발효물과 첨가하지 않은 발효물의 총산도 값은 배양 36시간까지는 거의 유사한 비율로 증가되었으나, 식염을 첨가 안 한 발효물의 경우 배양 36시간 이후 급격히 산도가 증가되었다가 48시간 이후부터는 급격히 감소되었다. 이는 pH의 감소율이 둔화된 후 오히려 pH가 올라간



**Fig. 6. HPLC chromatogram of volatile organic acids in the flour ferments.**

1: Chromatogram of lactic acid, 2: Chromatogram of acetic acid.

시점과 거의 일치하고 있었다.

이상의 실험에서 식염을 첨가하지 않은 발효물에서 산도가 감소되고 pH가 상승하는 점이 변질의 시점인 것으로 생각된다. 또한 젖산균에 의한 산 생성으로 인한 부패균의 억제능력과 병행해서 식염 첨가에 의한 다른 부패균의 억제 능력에서 식염 그 자체가 부패균의 생육억제 효과가 큰 것으로 나타났다.

조 등(15)은 밀가루 brew 경우 적정 산도는 초기 0.14에서 배양 12시간에 0.56, 배양 24시간 후에는 0.67을 나타내었으며 pH 감소 폭이 가장 컸던 12시간 배양에서 적정 산도의 변화폭도 가장 컸으나 그 이후 완만한 증가를 나타내었다고 하였다.

#### 발효물 중의 유기산 분석

*L. acidophilus*를 이용하여 배양한 밀가루 발효물을 배양하면서 배양기간에 따른 발효물에서의 유기산의 생성을 HPLC를 이용하여 측정된 결과는 Table 1과 같다. 표에서와 같이 배양 24시간 후 4.7986 mg/g의 젖산을, 초산은 0.1068 mg/g, 48시간 후에는 젖산은 5.7605 mg/g, 초산은 0.1491 mg/g, 72시간 후에는 6.8218 mg/g의 젖산과 0.1913 mg/g의 초산 생성을 보여 발효물의 배양기간 중 초산 생성이 젖산 생성에 비해 양적으로 월등히 적었으며, 젖산과 초산의 생성은 배양 72시간까지 다소 증가되는 경향을 보였다. 이를 Fig. 6의 HPLC chromatogram으로 확인한 결과 발효물에서 검출된 젖산량은 초산에 비해 상당히 많은 양이 생성하였으나 초산은 거의 무시할 정도로 미

량 감지되었다.

발효 0일과 3일 후의 배양물의 유기산 peak를 비교할 때 좌측에 나타난 다른 peak는 소멸되어 젖산 생성에 이용되는 것으로 생각된다. *L. acidophilus*는 젖산균 중에서 내산성이 강하고 sucrose, glucose, fructose, galactose, lactose, maltose, mannose 등 다양한 당류의 이용성이 높고 산생성력이 강력한 젖산균의 대표적인 속의 하나로 당으로부터 EMP경로에 따라서 젖산만을 생성하는 homo-lactic fermentation에 속하는 젖산균이다(24).

이를 배양한 밀가루 발효물은 gas를 생성하지 않으므로 배양물의 조직이 매끈하게 끈기가 있고 점조성이 있는 상태이다. 또한 밀가루 발효물에 별도의 발효당을 첨가하지 않은 상태에서도 많은 양의 젖산을 생성할 수 있는 것은 밀가루 자체 내에 존재하는 유리당으로도 산 생성에 이용될 당이 존재함을 알 수 있었다. 이는 당을 첨가하지 않은 발효물내에서 젖산균의 성장에서 확인한 결과와 같다.

김(25)의 실험에서 밀가루 성분 분석 결과를 보면 밀가루의 총 아미노산은 7549.76 mg%이었는데 그 조성은 glutamic acid 3443.00 mg%, proline 794.13 mg%, leucine 475.09 mg%, phenylalanine 351.26 mg%, serine 342.29 mg%, valine 269.73 mg%, aspartic acid 272.5 mg%, threonine 177.88 mg 등으로 되어 있으며 전체적으로 glutamic acid와 proline의 함량은 각각 3443.00 mg%와 795.13 mg%로 높은 것으로 나타났다. 밀가루의 영양 성분 및 제빵, 제면 적성에 있어 중요한 인자는 아미노산 성분이다. 밀가루에 함유되어 있는 glutamic acid는 글루텐을 이루는 주된 아미노산으로 반죽 내에서 약 95%가 mono amide 상태인 glutamine으로 존재하므로 다른 아미노산과 수소결합을 이루어 점성 및 탄력성을 증가시켜 반죽 형성에 큰 역할을 한다. 밀가루 내의 유리당<sup>(25)</sup>은 sucrose 117.35 mg%, maltose 36.39 mg%, glucose 28.54 mg%, fructose는 7.65 mg%으로 밀가루에 함유된 당은 발효제품에 발효성 당으로 이용될 수 있는 것으로 제빵 및 발효식품에서 중요한 역할을 한다.

### 발효물의 점도 변화

*L. acidophilus*를 배양한 밀가루 발효물의 배양기간에 따른 발효물의 점도를 12시간 간격으로 측정 한 결과는 Fig. 7과 같다. 그림에서와 같이 배양기간에 따른 발효물의 점도 변화에서 초기 배합직후의 밀가루 혼합물의 점도는 646 cp였으나 배양 24시간 경과후에는 753 cp, 48시간 경과 후 971 cp, 72시간 경과 후 964 cp로 나타나 배양기간이 경과함에 따라 발효물의 점도가 점차 증가하였다.

식염을 첨가한 발효물과 첨가하지 않은 발효물의 점도 변화를 비교하였을 때 식염을 첨가한 발효물의 점도가 배양기간에 따라 점차 증가하였고 무첨가 발효물은 초기에 식염 첨가 발효물의 점도와 유사하였으나 하루만에 635 cp에서 621 cp로 나타나 식염첨가 발효물에서 점도가 계속 증가되는 것과 달리 발효물의 점도가 저하되었다. 또한 식염 첨가구는 달리 배양 시간이 지나갈수록 점도차이가 심했다. 이는 pH, 총산도의 변화에서와 마찬가지로 배양 24시간 이후부터 변질이 시작되면서 점도가 감소하고 발효물의 gas생성과 발효물이 변질되면서, 변질에 의한 분해과정으로 인해 점도가 급격히 떨어지는 것에 기인되는 것으로 생각된다.

Wilkinson(26)은 세포의 다당류는 균의 생육과 세포 분열이 종식된 후에도 계속해서 분비되며 다당류가 합성되는 속도는 균체생육의 대수기에서 가장 빠르며 그 후로 점차 감소하게 된다고 하였다. 그러나 대부분 다당류의 생성은 대수기 이후에

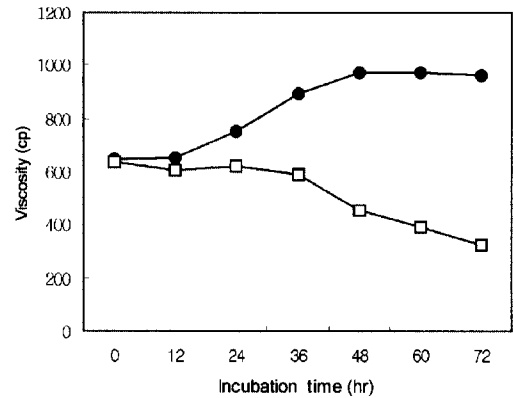


Fig. 7. Changes in viscosity of the flour ferment at 37°C during incubation for 72 hr.

-●-: Viscosity in flour ferment with salts, -□-: Viscosity in flour ferment without salts.

발생하는데 이는 대수기 후기에 잔재해 있는 과량의 탄소원이 정지기 동안에 다당류의 합성에 이용되는 것으로 알려져 있다.

정(27)의 보고에서 MRS배지에서 성장시킨 젖산균 *L. bulgaricus*, *L. casei*, *S. faecalis*, *S. thermophilus*균을 10% 탈지유에 배양하면서 다당류의 생성에 의한 우유 배양액의 점도 변화에서 *S. thermophilus*가 가장 높은 점도를 나타내어 41°C에서 배양 5일째 5000 cp로서 다른 균에 비해 높게 나타났다. 배양온도의 증가에 따라 점도는 증가하고 41°C에서 최고 점도를 나타냈으나 45°C에서는 오히려 점도가 낮게 나타났다고 보고하였다. Pace 등(28)은 다당류를 중성 다당류와 산성 다당류로 대별하였으며 구성당과 그 결합양식에 따라 세분했다. Vuyst 등(29)은 젖산균에서 얻는 다당류를 EPS(Exopolysaccharides)라고 하며 homopolysaccharide와 heteropolysaccharides로 나눌 수 있고, *L. acidophilus*는 thermophilic 균주로 heteropolysaccharides를 생성하는 것으로 이러한 다당류의 상업적 이용성은 물리적 특성에 근거를 두었는데 다당류용액은 전형적으로 점도가 높으며 비 Newton 유체로서 의가소성(擬可塑性)의 유동양식을 나타내는데 조직 및 식감에 중요한 역할을 한다고 보고하였다.

위 실험의 발효물이 점성을 가지게 되는 이유는 밀가루의 주성분인 전분과 단백질이 수화에 의한 고유 점성을 나타내고, 세포외적으로 생성된 유기산 주로 젖산에 의해 pH 감소로 인한 성분의 변화와 젖산균 증식에 따라 세포벽에 부착되지 않은 slime 형태의 다당류가 일부 분비되고 이때 합성되는 다당류는 대부분이 실모양의 길다란 형태를 취하면서 배양액의 점도에 영향을 주는 것으로 생각된다.

이상의 실험에서 *L. acidophilus*를 배양한 밀가루 발효물을 빵이나 제면에 이용한다면 제품의 품질 특성에 좋은 영향을 줄 것으로 생각되어 이에 관한 연구를 진행 중에 있다.

## 요 약

*L. acidophilus*를 면 제조 시에 첨가할 목적으로 MRS broth 배지를 이용하여 37°C에서 3일 동안 배양시킨 후 면의 주원료인 밀가루, 물, 소금의 혼합액에 *L. acidophilus*를 선택 접종시켜 72시간 배양 발효시킨 결과 발효물에 젖산이 6.821 mg/g, 초산이 0.191 mg/g 생성되어 발효물에서 젖산의 함량이 높았다. 배양기간 중 발효물의 pH는 저하되며 총산도가 증가되었다. 식염첨가 발효물의 점도는 발효시간의 경과에 따라 증가되었으

나, 식염을 첨가하지 않은 발효물의 점도는 감소하였다. 한편 식염을 첨가하지 않은 발효물은 변질이 되어 식염이 보존성에 미치는 효과를 알 수 있었고 형태적 관찰에서 발효물에서 *L. acidophilus*의 전형적인 간균 형태를 보이고 있음을 확인할 수 있었다.

## 문 헌

1. JFS. Code of Hygienic Practice for Fresh Noodles. pp. 12-20. Japan Food Sanitation Association, Tokyo, Japan (2000)
2. Brown MH, Booth IR. Food Preservatives 3. AVI Van Nostrand Reinhold Co., New York, NY, USA (1991)
3. Kojima H, Shinnizi O. Effect on foods in treatment of pH control. New Food Ind. 40: 50-63 (1998)
4. Hanada M, Uchida S. A study of antimicrobial additives in noodle. Japan Food Ind. 21: 345-350 (1974)
5. Hadanaga K. Food microbiological control and treatment. Japan Food Ind. 32: 134-181 (1985)
6. Kanega JL. Test of noodles. Japan Food Pack. 3: 85-90 (1987)
7. Park HJ, Yu LS, Kim SK, Lee YS, Kim YB. Prediction of shelf-life of noodles by bacterial count. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 557-560 (1994)
8. Cha WJ, Kim KH. Effects of some organic acids on shelf life and textural properties of cooked noodle. J. Agric. Chem. and Biotechnol. 41: 166-174 (1998)
9. Cai J. Preservation of fresh noodle by irradiation. Radiat. Phys. Chem. 2: 35-38 (1998)
10. Kim DH, Yook HS, Ahn HJ, Cho CH. Changes of microbiological and general quality characteristic of gamma irradiated half-cooked noodle. J. Fd. Hyg. Safety 15: 256-261 (2000)
11. Lee JW, Lee HH, Rhim JW. Shelf life extension of white rice cake and wet noodle by the treatment with chitosan. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 828-833 (2000)
12. Nagai J. Technology of U-dong. Food Press Co., Tokyo, Japan. pp. 90-91 (1953)
13. Noh KH. A study on pollen-food safety applied with lactic acid bacteria (LAB) *L. acidophilus*. PhD thesis, Kyungpook National University, Daegu, Korea (1997)
14. Toshikuni S. Functionality of fruit acid. Flavor 9: 91-111 (1992)
15. Cho NJ, Lee SK, Kim SK, Joo HK. Effect of wheat flour brew with *Bifidobacterium bifidum* on rheological properties of wheat flour dough. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 832-841 (1998)
16. Morichi T. Characteristic and utilization of lactic acid bacteria; Progress in recent researches. Milk Sci. 46: 1-20 (1997)
17. Kim JH. Development of a new production process for rice yogurt using *Lactobacillus amylovorus*. Gyeong Sang National Univ., DaeSan Rep. 3: 265-271 (1995)
18. AACC. Approved Method of the AACC. 8th ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA. pp. 2-195 (1983)
19. Prescott SC, Dunn CG. Industrial Microbiology. McGraw-Hill Book Co., Columbus, OH, USA. pp. 370-392 (1959)
20. Jung HK. Studies on optimum cultural conditions for the production of extracellular polysaccharide by lactic acid bacteria. PhD thesis, Sung Kyun Kwan University, Seoul, Korea (1986)
21. Lee SK, Kim KC. Lactic acid fermentation of barley malt syrup by *Lactobacillus acidophilus* J. Korean Agri. Chem. Soc. 31: 255-260 (1988)
22. Lee JS, Ko YT, Paik JK. Effects of defatted soy milk on the growth of *L. acidophilus*. J. Korean Agri. Chem. Soc. 27: 7-13 (1984)
23. Kojima M, Togawa T, Murase M. Effects of addition of water and sodium chloride on microstructure and reological properties of noodle. Nippon skukuhin Kakaku Kaishi 42: 899-906 (1995)
24. Peter HA, Nicolas MS, John GHR. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, USA. pp. 1209-1234 (1986)
25. Kim YH. A study on the functional bread making by the supplementation with sericultural products. PhD thesis, Yung Nam University, Kyungsan, Korea (2000)
26. Wilkinson JF. The extracellular polysacchrides of bacteria. Bacteriol. Rev. 22: 46-73 (1958)
27. Jung HK. Studies on optimum cultural conditions for the production of extracellular polysaccharide by lactic acid bacteria. PhD thesis, Sung Kyun Kwan University, Seoul, Korea (1986)
28. Pace GW, Righelato RC. Production of extracellular microbial polysaccharides. Adv. Biochem. Eng. 15: 41-70 (1984)
29. Vuyst LD, Bart D. Heteropolysaccharide from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 23: 153-177 (1999)

(2003년 12월 15일 접수; 2004년 1월 29일 채택)