

## Koji를 이용한 seed mash의 이화학적 특성

이명구 · 박정길<sup>1</sup> · 이시경\*

전국대학교 응용생물화학과, <sup>1</sup>충주대학교 식품공학과

## The Physicochemical Properties of Seed Mash Prepared with Koji

Myung-Koo Lee, Jung-Kil Park<sup>1</sup>, and Si-Kyung Lee\*

Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University

<sup>1</sup>Department of Food Engineering, Chungju University

Physicochemical quality characteristics of seed mashes were investigated for development of new creative breadmaking in bakery. Acidity of seed mashes fermented with Koji, lactic acid bacteria, and baker's yeast was slightly lower than those fermented with Koji and yeast.  $\alpha$ -Amylase, saccharifying amylase, and acidic protease activities of seed mash composed of water (560 mL) and Koji (400 g) were 0.26 SKB, 36 SP, and 645 HUT/g, respectively. Reducing sugar content of seed mash made with Koji increased up to 13.04% after 36 hr fermentation, then decreased drastically thereafter, whereas that of seed mashes made with Koji, yeast, and lactic acid bacteria increased up to 6.5% at 6 hr, decreased to 1 to 2.5% at 12 hr, and remained less than 0.7% after 18 hr fermentation. Total organic acid contents were 10.4-12.25 mg/g. Flavor compounds including ethyl acetate, ethyl caprylate, isoamyl acetate, and *p*-vinyl guaiacol were detected in seed mash fermented with Koji, yeast, and *L. brevis*. These results show use of seed mash fermented with Koji, *S. cerevisiae*, and lactic acid bacteria enhances bread flavor.

**Key words:** seed mash, Koji, *Aspergillus kawachii*, lactic acid bacteria, flavour

### 서 론

외식 산업의 발전으로 최근 제빵 산업이 급속도로 발전하였을 뿐만 아니라 빵 소비가 증가하여 제품의 질적인 면과 영양적인 면이 강조되고 있다. 소비자는 신선한 오븐 후레시 제품을 선호하는데 기인하여 제빵 업체는 대량생산 체계에서 지역별로 소규모의 준 양산체제, window bakery 및 in-store bakery로 많은 변화를 가져왔을 뿐만 아니라 유통단계가 복잡한 대량 생산업체는 소비자에게 신선한 제품을 공급하는데 관심을 가지게 되었다.

사워도우(sour dough)빵은 유산균과 효모를 첨가하여 주로 호밀빵에 응용한 구미의 전통빵으로서, 최근에는 밀가루 빵에 적용하여 빵의 방향과 풍미를 증가시키고 노화속도를 지연시켜 빵의 저장기간을 연장시키는 장점을 가지고 있어서(1-3), 많은 연구가 이루어지고 있다.

이 사워도우 빵에는 대개 액체 발효법을 적용하는데, 액체발효법은 1950년대 이후 미국에서 식빵과 롤빵을 전통적인 중중법으로 생산하던 것을 간략히 변형하여 연속반죽공정으로 간

편하게 공정을 개편하여 생산하는 방법으로, 보통 식빵이나 햄버거, 롤빵에서 널리 이용되었고 특히 곡물 빵에서의 응용이 우수하였다(4,6).

일본에서는 청주 제조시 사용하는 *A. oryzae* 황국균을 이용하여 주종 발효액을 만들고 이 발효액을 이용해서 주종빵을 만들어 빵의 표피가 얇고, 부드러우며 청주 풍미가 나는 특징적인 제품을 생산하고 있다. 빵에서 국의 역할은 액화효소와 당화효소의 작용으로 발효성 당을 생산하고 단백질 가수분해 효소의 작용으로 아미노산을 생산하며, 또 국이 가지고 있는 무기질과 비타민 등을 효모에게 공급하여 주종 특유의 풍미성분을 생성한다(7). 한국은 오래전부터 전통주인 탁주를 첨가하여 증편을 만들어 왔는데 이것은 일본의 주종빵과 유사한 이용 방법의 하나이다(8).

본 연구에서는 제빵공업의 현장에서 새로운 독창적인 제빵법을 확립하여 궁극적으로 빵의 노화 억제와 풍미 개선에 기여하고자 한국 전통주인 탁주제조에 이용되고 있는 백국균(*A. kawachii*)을 증자한 밀가루에 접종하여 만든 밀가루 코지에 물을 가하여 seed mash를 만들어 이 seed mash의 특성을 비교 분석하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

효모로는 시판용 인스턴트 드라이 이스트를, 쇼트닝, 소금도

\*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@konkuk.ac.kr

시판용을 사용하였으며, 유산균은 *L. brevis*와 *Leu. cremoris*, *Str. lactis* subsp. *lactis*, *Str. lactis* subsp. *diacetylactis* 및 *Str. lactis* subsp. *cremoris*(Christian Hansen Co., Denmark)의 혼합균주를 사용하였다. 코지는 천등산 박달재 주조(주)(Chungju, Korea)에서 제조한 밀가루 입국을 사용하였으며 균수 측정을 위한 배지는 potato dextrose agar(Difco Labs, Detroit, Michigan, USA), 한천평판배지(Eiken Chemical Co., Japan)를 사용하였다.

### 실험기기

유기산 분석은 원심분리기(H50Q-8, Hanil Industrial Co., Seoul), Packed column(HaySep P80-100mesh, HaySep Separation Co., USA), HPLC(M501, Waters Co., USA)를 이용하여 측정하였고, 각 시료의 pH 측정은 pH meter(model 420A, Orion Co., USA)를 사용하였다.

### 실험 방법

**Seed mash의 제조:** 전통주 제조기술의 방법에 따라서 증류수 560 g을 삼각 플라스크에 넣고 해당 균주들을 Table 1과 같이 효모와 유산균을 각각의 비율로 첨가하여 용해한 후 여기에 코지를 400 g씩 넣고 교반 후 각각의 시료를 25°C의 항온기에서 6시간 간격으로 교반하면서 3일간 배양하였다.

**$\alpha$ -amylase의 활성 측정:** AACC 방법(22-01)(9)에 따라 각각의 시료 10 g을 500 mL 삼각 플라스크에 넣은 후 0.5% NaCl 용액 200 mL를 가한 다음 30°C의 항온수조에서 15분마다 교반하면서 1시간 동안 추출한 후 15,000×g에서 10분 동안 원심분리한 다음 여과(Whatman No. 1)시킨 후 상등액 10 mL를 취한 다음 0.5% NaCl용액 10배 희석한 것을 효소활성 측정용 시료로 하였다. 역가 측정은 기질로서 초산염 완충용액에  $\alpha$ -amylodextrin을 녹인 용액 20 mL를 사용하였고 여기에 효소액 10 mL를 첨가한 다음 30°C에서 30분 동안 반응시킨 후 1 mL를 취하여 5 mL 요오드 용액에 첨가한 다음 비색계를 이용하여 측정하였다(9).

**Saccharifying amylase의 활성 측정:** 각각의 시료 10 g을 500 mL 삼각 플라스크에 넣은 후 증류수 200 mL를 가한 다음 30°C의 항온수조에서 15분마다 교반하면서 1시간 동안 효소를 추출한 후 15,000×g에서 10분 동안 원심분리한 다음 여과(Whatman No. 1)시킨 후 상등액을 효소활성 측정용 시료로 하였다. 역가 측정은 2% 전분수용액을 기질로 사용하였으며 기질 10

mL에 0.1 M 초산염 완충용액 6 mL를 가한 후 잘 흔든 다음 40°C의 항온수조에서 10분간 예열한 후 조효소액 2 mL를 가한 다음 잘 흔들어 섞은 후 40°C의 항온수조에서 60분간 반응시킨 다음 1 N NaOH 2 mL를 가하여 pH를 5.0으로 조절하여 반응을 정지시킨 후 Somogi변법에 의하여 환원당을 정량한 다음 글루코오스의 양으로서 환산하였다(10).

**산성 protease의 활성 측정:** 효소 활성은 Anson 개량법으로 측정하였다. 즉 pH 6.0의 casein(milk casein 2 g, 0.1 N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 13 mL, 0.5 M lactic acid 2 mL, pH 6.0 Mcllavain 완충액 25 mL를 넣고 만든 것) 1.5 mL에 효소액 0.5 mL를 넣은 다음 38°C에서 60분간 반응시켜 0.4 M TCA 용액 3 mL를 넣고 침전시킨 다음 여과하여 얻은 여과액 1 mL에 탄산나트륨과 페놀시약을 넣은 후 38°C에서 30분간 발색시킨 다음 600 nm(Spectrophotometer, Ultro SPC III, Pharmacia LKB Co., USA)에서의 흡광도를 측정 후 공시험에서 얻은 흡광도를 뺀 값을 이용하여 tyrosine양을 계산하였다(11).

**총 적정산도(TTA)의 측정:** 총 적정산도의 측정은 AACC 방법(02-31)(12)에 따라서 1.0%(w/v) phenolphthaleine 50% 에탄올 5방울을 넣어 혼합한 후 pH가 6.6에 도달할 때까지의 0.1 N NaOH 용액으로 적정한 mL로 나타내었다(12).

**환원당량의 측정:** 환원당량의 측정은 100 mL 삼각 플라스크에 A용액(Rochelle염 90 g,  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  225 g을 증류수 700 mL에 녹인 것에  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  30 g을 증류수 100 mL에 녹인 것을 가하고 다시  $\text{KIO}_3$  5 g을 소량의 증류수에 녹인 것을 가한 다음 증류수로 전량이 1 L되게 만든 것) 10 mL와 시료 당용액 10 mL 그리고 증류수 10 mL를 가한 다음 2분 이내 끓도록 가열하여 3분 동안 끓인 후 냉각시킨 다음, B용액( $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$  90 g과 KI 40 g을 증류수에 녹여 1 L로 만든 것) 10 mL와 C용액(2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  용액) 10 mL를 가한 후 흔들어 침전을 녹인 다음, D용액(0.05 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  용액)을  $\text{I}_2$ 의 갈색이 없어지고 녹색이나 청록색이 될 때까지 가한 후 1% 전분 용액 몇 방울을 가한 다음, 코발트색이 될 때까지 D용액으로 적정하는 Somogi변법으로 측정하였다(13). 공시험은 시료 당용액 대신에 증류수를 10 mL 가하여 동일하게 하였다.

**유기산 함량 측정:** 각각의 시료 50 g에 100 mL 증류수를 가하여 희석하고 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상층

Table 1. Formulas of seed mashes

(Unit: g)

Seed mash	Koji	Water	Yeast <sup>1)</sup>	<i>L. brevis</i> (L-62)	Lactic acid bacteria (CHN-22) <sup>2)</sup>
I	400	560	1	0	0
II	400	560	1	0.1	0
III	400	560	1	0	0.1
IV	400	560	1	0.05	0.05
V	400	560	0	0	0
VI	400	560	0	0.1	0
VII	400	560	0	0	0.1
VIII	400	560	0	0.05	0.05

<sup>1)</sup>*Saccharomyces cerevisiae* of high sugar fermentation type developed in Europe.

<sup>2)</sup>*Leuconostoc cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, and *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* (CHN-22).

**Table 2. Chemical composition of wheat flour Koji**

(Unit: %)

Moisture	Protein	Carbohydrate	Reducing sugar	Fat	Fiber	Ash	pH
21.1	8.2	68.5	10.9	1.4	0.4	0.4	3.56

**Table 3. Content of organic acids in wheat flour Koji**

(Unit: mg/Koji g)

Organic acids	Lactic acid	Citric acid	Acetic acid	Propionic acid	Malic acid	Succinic acid	Total
Content	8.5	3.95	2.55	4.55	1.4	2.4	23.35

액을 Sep-pak(C18) 처리하고 나서 Millipore filter(0.45  $\mu$ m)로 여과한 후 HPLC 주입용 시료로 사용하였다. 유기산 분석은 HPLC로 분석하였다. 이때 컬럼은 Supelco gel C-610H(30 cm $\times$ 7.8 mm)를 사용하였으며 1 mL의 flow rate로 흘러보냈으며, Waters 441 UV detector를 사용하였다.

**향기성분 분석:** 각각의 시료의 향기성분의 포집은 SPME를 이용한 headspace법을 이용하였다. Headspace volatiles를 추출하기 위한 SPME fiber는 100  $\mu$ m polydimethyl siloxane(PDMS)를 이용하였다. Seed mash를 약 15 mL 취하여 50 mL headspace glass vial에 넣고 밀봉한 후 내부온도 40°C에서 약 30분간 SPME fiber를 노출시켜 흡착시킨 후 1분 동안 탈착하였다. GC 분석에 의하여 분리된 각 peak 성분의 확인은 각 성분의 mass spectra와 문헌상의 mass spectral database(14)의 mass spectra를 비교하여 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### Seed mash의 효소활성

빵 제조시 반죽을 만들 때 첨가할 seed mash를 제조하기 위한 *A. kawachii*를 증자한 밀가루에 접종하여 만든 코지의 화학적 조성은 Table 2와 같다. Table에서와 같이 탄수화물이 68.5%로 가장 높았으며 단백질과 지방이 각각 8.2%, 1.4% 함유되어 있었다. 탄수화물 함량이 높은 것은 코지에 첨가되어 있는 밀가루에 기인한 것으로 생각된다. 또한 코지의 pH는 3.56이었으며 환원당은 10.9%이었고 코지에 함유되어 있는 유기산함량은 Table 3에서와 같이 젖산이 8.5 mg으로 가장 높았으며 프로피온산이 4.55 mg, 구연산이 3.95 mg, 호박산이 2.4 mg, 사과산 1.4 mg 순으로 나타났다.

증류수 560 mL에 코지 400 g을 첨가하여 25°C에서 72시간 동안 배양된 seed mash에서 생성된  $\alpha$ -amylase, saccharifying amylase 및 산성 protease의 활성을 측정한 결과는 Table 4와 같다. Table에서와 같이  $\alpha$ -amylase 효소활성은 seed mash g당 0.26 SKB를, 당화효소인 saccharifying amylase는 36 SP를, 산성 protease는 648 HUT의 효소활성을 나타냈다.

$\alpha$ -Amylase와 glucoamylase는 코지와 밀가루 발효액중에서 손상전분을 가수분해하여, 당을 첨가하지 않고 발효할 때 효모와 유산균의 에너지원을 공급하는 역할을 한다. *A. kawachii*가 생산하는  $\alpha$ -amylase의 활성도는 일반적으로 *A. oryzae*나 *Rhizopus* 속보다는 약하고, glucoamylase의 활성은 *A. oryzae* 보다는 강하다.  $\alpha$ -Amylase는 빵의 노화를 지연시켜주고 부드러운 조직감을 갖게 하는 역할을 함으로서 제빵에 긍정적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다(15). 산성 단백질 가수분해효소(acidic protease)의 활성은 *A. oryzae*의 경우 3674 HUT/Koji g이었으나 *A. kawachii*는 그 보다 낮은 값을 나타냈다(15,16). 산성단백질 가수분해 효소는 곡류 입자 속에 함유한 protein bodies를 가수

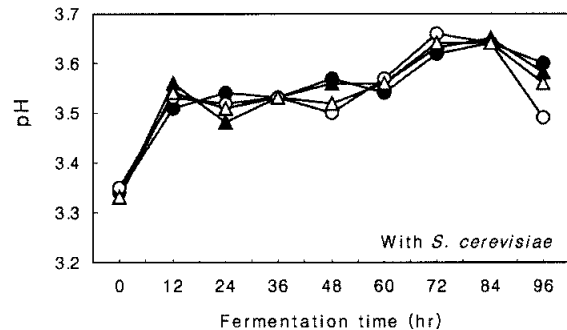
**Table 4. Enzyme activities in final seed mash fermented by Koji for 72 hr at 25°C**

(Unit/seed mash g)

Enzyme	Activity
$\alpha$ -Amylase	0.26 SKB
Saccharifying amylase	36 SP
Acidic protease	648 HUT

SP: Saccharogenic power.

HUT: Hemoglobin units on tyrosine basis.

**Fig. 1. Changes in pH of seed mashes prepared with Koji, lactic acid bacteria and *S. cerevisiae* during fermentation at 25°C with time.**

●: Seed mash prepared with Koji and *S. cerevisiae*, ○: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, and *L. brevis*, ▲: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, and Lactic acid bacteria (CHN-22\*), △: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, *L. brevis*, and Lactic acid bacteria (CHN-22). CHN-22\*: *Leuconostoc cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, and *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris*.

분해하여 저분자화 함으로서  $\alpha$ -amylase가 protein bodies에 흡착되는 것을 방지하여 주고,  $\alpha$ -amylase의 작용을 도와줌으로서 당화 속도와 당화 율을 높여 발효미생물이 필요로 하는 에너지원을 공급해 주는 역할을 함과 동시에 가수분해한 아미노산은 protein matrix를 얇게 하여 부드럽고 팽창률을 높여주며 빵의 풍미와 crust 색의 형성에 도움을 줄 것으로 생각된다.

### Seed mash의 pH 변화

빵 제조시 첨가할 seed mash를 제조하기 위하여 증류수 560 mL에 코지 400 g을 가하고 첨가 균주를 달리하여 25°C에서 배양하였다. 배양시간에 따른, 각기 다른 균주를 첨가한 seed mash의 pH 변화를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 코지, 효모 및 유산균을 달리하여 첨가한 seed mash의 배양직후 pH는 3.33-3.35로 차이가 없었으며 12시간 까지 급격히 증가한 후 배양 60시간까지는 pH의 변화가 없이 모든 seed mash에서 유사한 결과를 보였으나 코지, 효모, *L. brevis*를 첨가한 seed mash에서 다소 낮았다.

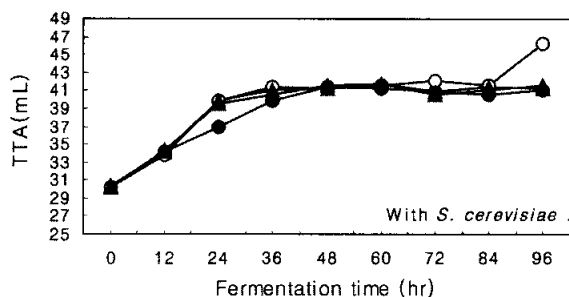


Fig. 2. Changes in TTA of seed mashes prepared with Koji, lactic acid bacteria, and *S. cerevisiae* during fermentation at 25°C with time.

●: Seed mash prepared with Koji and *S. cerevisiae*, ○: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, and *L. brevis*, ▲: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, and Lactic acid bacteria (CHN-22\*), △: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, *L. brevis*, and Lactic acid bacteria (CHN-22). CHN-22\*: *Leuconostoc cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, and *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Seed mash의 초기 pH가 낮은 것은 *A. kawachii* 및 미생물이 생성하는 코지에 함유되어 있는 다양한 유기산에 기인하는 것으로 생각된다. 또한 효모를 배양하여 seed mash를 제조시 12시간 발효시키까지는 pH가 급격히 증가하였으나, 이후 72시간 동안 발효하면서 pH는 서서히 증가하는 경향을 보인 결과는 효모를 첨가한 seed mash는 처음 12시간 동안 코지 내의 단백질 가수 분해 효소가 작용하여 아미노산을 생성하여 유기산을 중화시킴으로써 pH가 상승한 것으로 생각된다. Rocken 등(1)은 효모는 유산균이 필요로 하는 생육인자를 생산하고 유산균에 의하여 생산된 유기산들은 다른 잡균의 생육을 억제하는 역할을 한다고 보고하였다.

### Seed mash의 TTA 변화

배양시간에 따른 seed mash의 균주별 총산도의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 코지, 유산균, 효모를 첨가한 seed mash의 배양시간에 따른 총산도의 변화는 배양 직후 seed mash의 각 균주별 총산도는 별 차이가 없었으며 12시간 후 다소 증가함을 보였다. 48시간 이후에는 첨가 균주에 따른 총산도의 변화가 거의 없었으며, 72시간 후에는 코지와 유산균 *L. brevis* (L-62), 효모를 혼합 발효한 seed mash의 총산도가 다소 높은 값을 나타냈다.

이상에서와 같이 코지와 유산균에 효모를 첨가한 seed mash에서는 배양 36시간 까지 산도가 증가한 후 그 이후에는 큰 차이가 없었으나 72시간 발효 후 유산균 *L. brevis*(L-62) 첨가한 seed mash에서 총산도 42.1 mL로 나타나 산 생성이 다소 높았다. 이상의 실험에서 seed mash 제조시 코지와 유산균 *L. brevis* (L-62)와 효모를 배양시 산 생성량이 많은 것으로 나타났으며 또한 seed mash의 pH 변화와 총산도가 역의 관계가 나타나지 않은 것은 생성되는 산의 종류와 정도의 차가 있으며, seed mash 내의 단백질의 분해로부터 생성되는 아미노산 등에 의한 완충작용에 기인하는 것으로 생각된다.

유산균 *L. brevis*(L-62) 균주는 sour dough 내에서 내산성균으로 pH가 3.6 이하에서도 유기산을 생성하며 탁주제조(17), 사위도우빵 제조(3,18) 및 발효액종(19) 제조에서 발효초기에 pH가 증가할 경우 TTA 감소가 일어나지 않고 계속 증가하는 것으로 나타나 본 실험과 유사한 경향을 나타내었다. 이와 같이

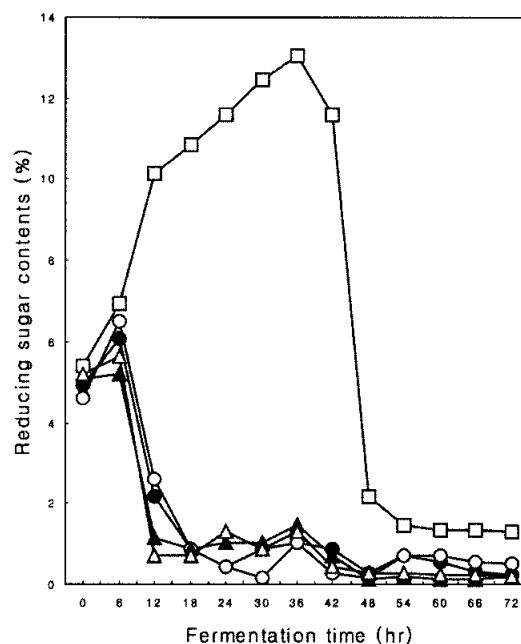


Fig. 3. Changes in content of reducing sugar in seed mashes prepared with *S. cerevisiae*, Koji and lactic acid bacteria during fermentation at 25°C.

□: Seed mash prepared with Koji, ●: Seed mash prepared with Koji and *S. cerevisiae*, ○: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, and *L. brevis*, ▲: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, and Lactic acid bacteria (CHN-22\*), △: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, *L. brevis*, and Lactic acid bacteria (CHN-22). CHN-22\*: *Leuconostoc cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, and *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris*.

pH와 TTA에 다소 상이한 결과를 나타내는 것은 생성되는 유기산과 아미노산 등이 복합적으로 작용하는 완충작용으로 생각된다.

### Seed mash의 환원당 변화

증류수 560 mL에 코지 400 g을 첨가하고 첨가 균주를 달리 하여 25°C에서 배양하면서 배양시간에 따른 seed mash의 균주별 환원당의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다.

효모를 첨가하지 않고 코지만을 단독으로 발효시킨 seed mash의 환원당은 배양 시간의 경과에 따라 점점 증가하여 36시간 후 13.04%의 값을 나타내었으며, 42시간 후부터는 다소 감소하기 시작하여 11.59%를 나타내었다. 이러한 결과는 효모와 유산균을 첨가하여 배양한 경우에 비해 월등히 높은 결과였다. 이는 seed mash의 배양시간에 따라 코지에 함유되어 있는 전분 분해 효소에 의해 전분이 분해되었으며, 후에 감소하는 것은 코지에 함유되어 있는 다양한 미생물이 성장함에 따라 이들 환원당을 이용한 것에 기인하는 것으로 생각된다.

환원 코지와 유산균, 효모를 이용한 seed mash는 배양 직후에 환원당이 4.63-5.21%이었으며 6시간 후에는 5.21-6.08%로 다소 증가하였고 그 이후부터 18시간까지는 급격히 감소하였다. 즉, 코지와 효모를 혼합 발효시킨 경우와 코지와 유산균 *L. brevis*(L-62), 효모를 혼합 발효시킨 경우, 그리고 코지와 혼합유산균 (CHN-22), 효모를 혼합 발효시킨 경우와 코지와 유산균 *L. brevis*(L-62), 혼합유산균(CHN-22), 효모를 혼합 발효시킨 경우 모두 감소되어 42시간 후에는 각각 0.86%, 0.28%, 0.72%,

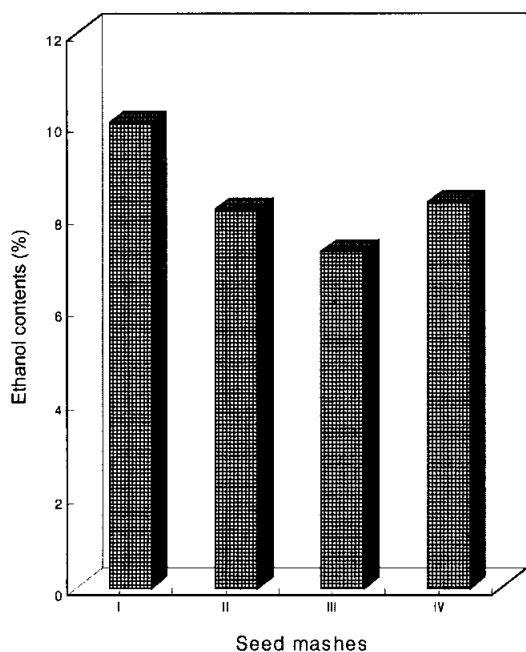


Fig. 4. Ethanol contents in seed mashes fermented for 72 hr at 25°C.

I: Seed mash prepared with Koji and *S. cerevisiae*, II: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, and *L. brevis*, III: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, and Lactic acid bacteria (CHN-22\*), IV: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, *L. brevis*, and Lactic acid bacteria (CHN-22).

\*CHN-22: *Leuconostoc cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, and *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris*.

0.43%를 나타내었다. 48시간 이후부터는 코지만을 단독 배양시킨 경우를 제외하고는 각 시험구 모두 환원당이 소비되어 0.28%, 0.14%, 0.1%, 0.29%로 거의 남아 있지 않는 것으로 나타나 코지와 유산균, 효모를 혼합 발효시 코지에 존재하는 아밀라아제가 손상 전분을 분해하고, 분해된 환원당을 효모와 유산균이 충분히 이용하고 있는 것으로 생각된다. 또한 코지와 효모를 혼합 발효시킨 경우와 코지와 유산균, 그리고 효모를 혼합 발효시킨 경우 잔여 환원당의 양에는 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 이상의 실험결과는 seed mash를 첨가한 발효액종을 이용할 때 인위적으로 당을 첨가하지 않고 반죽을 하여도, 밀가루 속에 존재하는 손상전분을 분해하여 발효에 필요한 당을 공급해 줄 것으로 생각된다. Kim 등(20)은 일본 주종빵 제조시 주종에 사용하고 있는 국인 *A. oryzae*에 의해서 생산된 액화 효소와 당화 효소가 쌀 전분질을 당화하며 효모가 알코올 발효를 할 수 있는 기질인 당을 공급하고 효모의 증식과 발효를 촉진하는 무기질과 비타민 등을 공급하여 제빵성을 좋게 한다고 하였다.

#### Seed mash의 에탄올 함량

코지와 효모, 유산균을 이용하여 25°C에서 72시간 배양한 seed mash의 에탄올 함량은 Fig. 4와 같다.

그림에서와 같이 코지와 효모를 혼합 발효한 경우 에탄올 함량이 10.03%로 가장 높은 값을 나타냈으며 코지와 유산균 *L. brevis*(L-62), 효모를 혼합 발효한 경우는 8.16%, 코지와 혼합유산균(CHN-22), 효모를 혼합 발효한 경우는 7.23%, 코지와 유산균 *L. brevis*(L-62), 혼합유산균(CHN-22), 효모를 혼합 발효한

Table 5. Content of organic acids in final seed mashes fermented by Koji, *S. cerevisiae* and lactic acid bacteria for 72 hr at 25°C (Unit: mg/seed mash g)

Organic acids	I	II	III	IV
Lactic acid	2.88	3.97	3.69	3.96
Citric acid	1.25	1.16	1.23	1.19
Acetic acid	1.06	1.83	1.24	1.62
Propionic acid	3.49	3.52	3.64	3.73
Malic acid	0.81	0.84	0.74	0.84
Succinic acid	0.93	0.82	0.96	0.91
Total	10.42	12.14	11.5	12.25

I: Seed mash prepared with Koji and *S. cerevisiae*.

II: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, and *L. brevis*.

III: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, and Lactic acid bacteria (CHN-22\*).

IV: Seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae*, *L. brevis*, and Lactic acid bacteria (CHN-22).

\*CHN-22: *Leuconostoc cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, and *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris*.

경우는 8.32%로 유산균 첨가구에서 에탄올 함량의 차이는 크지 않았다. 본 실험의 결과 코지와 효모를 혼합 발효한 경우 에탄올 함량이 10.03%인데 비해 코지와 유산균, 효모를 혼합 발효한 경우 에탄올 함량이 7.23-8.32%로 나타나 유산균을 첨가하지 않은 seed mash에서 다소 높은 에탄올 함량을 나타내었다. 이는 유산균 첨가로 인하여 생성된 젖산이 효모에 의한 에탄올 생성을 저해하였으며(21), 또한 유산균을 첨가한 seed mash에서 알코올 함량이 낮은 것은 환원당을 유산균이 이용하는 것에 기인하는 것으로 생각된다.

Narendranath 등(22)은 밀가루 발효액에 *Lactobacillus* 균주와 효모를 혼합 배양하였을 때 효모의 단독 배양한 경우보다 에탄올 함량이 약 2% 정도 적게 생성되었고 또한 발효 pH가 낮은 경우에 에탄올 함량이 적었으며 이는 효모가 유산균에 의해서 생성된 유기산에 의해서 대사 저해를 받기 때문이라고 하였다. 이는 본 연구 결과와 일치하는 경향이였다.

#### 유기산 함량의 측정

증류수 560 mL에 코지 400 g을 첨가하고 첨가 균주를 달리 하여 25°C에서 72시간 배양한 seed mash의 유기산 함량을 측정된 결과는 Table 5와 같다.

코지와 유산균 *L. brevis*(L-62), 혼합유산균(CHN-22), 효모를 혼합 발효한 경우는 seed mash g당 젖산이 3.96 mg, 프로피온산이 3.73 mg, 아세트산이 1.62 mg, 구연산이 1.19 mg 검출되어 총 유기산이 12.25 mg 생성되어 가장 높았다.

코지와 유산균 *L. brevis*(L-62), 효모를 혼합 발효한 경우 젖산이 3.97 mg으로 가장 높았으며 프로피온산이 3.52 mg, 아세트산과 구연산이 각각 1.83 mg과 1.16 mg 검출되었다. 코지와 혼합유산균(CHN-22), 효모를 혼합 발효한 경우도 젖산이 3.69 mg, 프로피온산 3.64 mg, 아세트산 1.24 mg, 구연산 1.23 mg이 검출되었다. 그러나 본 실험에서 코지와 효모만을 발효한 경우는 총 유기산 함량이 10.4 mg으로 가장 낮았다.

이상에서와 같이 seed mash 모두 젖산과 프로피온산이 가장 많이 검출되었고 다음으로 아세트산과 구연산이 많이 검출되었다. 이러한 결과는 본 실험에 사용된 *A. kawachii*를 이용한 코지에 함유되어 있는 산의 종류에 따른 경향과 일치하였다.

**Table 6. Flavour components in final seed mash prepared with Koji, *S. cerevisiae* and *L. brevis* for 72 hr at 25°C (Unit: % of total)**

Components	Contents
Ethyl acetate	3.79
Ethanol	40.9
Propanol	0.89
Isobutyl alcohol	0.85
Isoamyl acetate	6.66
Isoamyl alcohol	14.2
Ethyl caproate	1.14
Acetoin	-
Ethyl caprylate	7.47
Acetic acid	0.40
Ethyl caprate	5.11
Phenyl ethyl acetate	1.89
Ethyl laurate	0.77
Phenyl ethyl alcohol	12.8
<i>p</i> -Ethyl guaiacol	-
Ethyl myristate	-
<i>p</i> -Vinyl guaiacol	0.51
Ethyl pamate	1.76
Ethyl linoleate	0.74
Others	0.17

코지와 유산균에 의해 생성되는 유기산은 빵의 풍미에 기여하며 또한 빵의 풍미는 유산균에 의해 단백질이 가수분해되어 생성되는 아미노산에 의해서도 큰 영향을 받는다(23,24). 이러한 사실을 고려할 때 seed mash에 유산균을 첨가하는 것은 유기산의 생성과 더불어 빵의 풍미에 좋은 영향을 줄 것으로 생각된다. 이상의 실험에서 효모에 의해 단독 배양한 대조구보다도

유산균과 혼합 배양한 seed mash에서 유기산 생성량이 많았다. 이는 Hansen 등(18)의 wheat sour dough에서 연구한 결과와 일치하는 경향을 나타내었으며 또한 이는 빵 제조시 조직감에도 좋은 영향을 줄 것으로 생각된다.

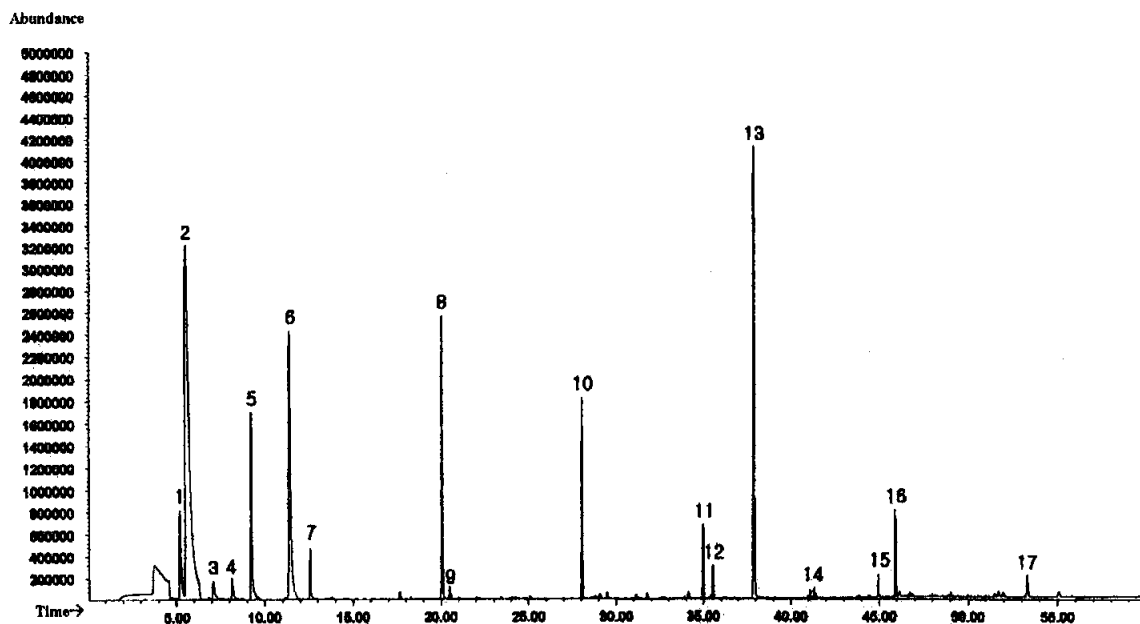
일반적으로 *Bifidobacteria*의 경우는 포도당을 분해해서 아세트산과 젖산의 물비가 3:2의 비율이 되도록 유기산을 생성하는 것으로 알려져 있다(3,18). 그러나 본 실험에서 코지와 유산균 *L. brevis*(L-62), 효모를 혼합 발효한 경우 약 4:2의 비율로 나타났으며, 코지와 유산균 *L. brevis*(L-62), 혼합유산균(CHN-22), 효모를 혼합 발효한 경우도 약 4.5:2의 비율로 나타났다.

#### Seed mash의 향기성분 분석

증류수 560 mL에 코지 400 g을 첨가하고 유산균 *L. brevis*(L-62)와 효모를 이용하여 25°C에서 72시간 배양한 seed mash의 향기성분 분석결과는 Table 6 및 Fig. 5와 같다.

Table에서와 같이 검출된 향기성분 함량을 100으로 보았을 때 에탄올이 40.9% 이소아밀알코올 14.2%, 페닐에틸알코올 12.8%, 에틸카프릴레이트 7.47%, 이소아밀아세테이트 6.66% 순으로 검출되었다. 이상의 실험에서 seed mash에서 향기 성분 중 에탄올이 많이 검출되었으며 향기성분을 부여하는 에스테르 화합물도 많이 생성되었음을 알 수 있었다.

과일과 꽃의 향을 나타내는 에스테르 화합물인 에틸아세테이트, 에틸카프레이트, 에틸라우레이트, 에틸미리스테이트, 에틸팔미테이트, 에틸리놀리에이트 등 각종 에스테르 성분이 효모와 유산균 *L. brevis*(L-62)를 첨가한 seed mash에서 다른 향에 비해 상대적으로 많이 생산되었고, 향기성분인 *p*-vinyl guaiacol도 생성된 것으로 나타났다. 이는 빵의 관능 검사결과 유산균 *L. brevis*(L-62)와 혼합 유산균(CHN-22)을 첨가하여 배양시킨 seed mash를 이용하여 제조한 시험구의 빵에서 향이나 조직에 우수함을 보였던 결과와 일치하였다(16).



**Fig. 5. GC/MSD chromatogram of flavour components in final seed mash fermented with Koji, *S. cerevisiae*, and *L. brevis* for 72 hr at 25°C.**

Peak identification: 1. ethyl acetate 2. ethanol 3. propanol 4. isobutyl alcohol 5. isoamyl acetate 6. isoamyl alcohol 7. ethyl caproate 8. ethyl caprylate 9. acetic acid 10. ethyl caprate 11. phenyl ethyl acetate 12. ethyl laurate 13. phenyl alcohol 14. ethyl myristate 15. *p*-vinyl guaiacol 16. ethyl palmitate 17. ethyl linoleate.

이상의 실험에서 빵 제조시 코지, 효모와 더불어 유산균 *L. brevis*(L-62)을 첨가하거나 유산균 *L. brevis*(L-62)과 혼합유산균 (CHN-22)첨가하여 배양시킨 seed mash를 이용할 경우 반죽과 빵의 물성과 향에 도움을 줄 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구는 제빵 산업의 현장에서 제빵적성 향상을 위한 제빵법을 확립하기 위하여 백국균을 이용한 밀가루 코지, 유산균, 효모를 혼합 배양하여 seed mash를 만들어 그 특성을 분석하였다. 증류수 560 mL와 코지 400 g을 혼합하여 25°C에서 72 시간 배양한 seed mash의 효소 활성을 측정된 결과는  $\alpha$ -amylase는 0.26 SKB/g, saccharifying amylase 활성이 36 SP/g, 그리고 산성 protease 활성은 648 HUT/g을 나타냈다. 코지, 유산균, 효모를 배양하여 제조한 seed mash의 pH는 코지와 효모만을 배양하여 제조된 seed mash보다 다소 낮았다. 배양기간에 따른 환원당의 변화는 코지만을 이용한 seed mash의 경우 36시간까지 배양기간이 증가함에 따라 증가하였으며, 그 이후 감소하였다. 그러나 유산균과 효모를 첨가한 seed mash에서의 환원당은 배양 6시간까지 증가하다 그 이후 급격히 감소하였다. Seed mash에서 생성된 총산의 양은 10.4-12.25 mg/mL로 유산균을 첨가시 다소 높았다. 코지, 효모, *L. brevis*로 배양한 seed mash에서 ethyl acetate, ethyl caprylate, isoamyl acetate, ethyl caprate, *p*-vinyl guaiacol 등의 향기 성분이 검출되었다.

## 문 헌

1. Rocken W, Voysey PA. Sour-dough fermentation in bread-making. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 38-48 (1995)
2. Vollmar A, Meuser F. Influence of starter cultures consisting of lactic acid bacteria and yeasts on the performance of a continuous sourdough fermenter. *Cereal Chem.* 69: 20-27 (1992)
3. Martínez-Anaya MA, Pitarch B, Bayarri P, De Barber B. Microflora of the sourdoughs of wheat flour bread. *Cereal Chem.* 67: 85-91 (1990)
4. Stuteville BJG, Ponte JG, Faubion JM, Kulp K. Comparison of white and whole wheat flour brews in the liquid ferment bread-making process. *Cereal Foods World* 33: 434-438 (1988)
5. Bastetti G. Breads produced in Italy. Part I: Sour preferments and starters. *Tech. Bull.* 23: 1-8 (2001)
6. Kulp K. Influence of liquid ferments on quality characteristics of white pan bread. *Tech. Bull.* 8: 1-9 (1986)
7. Akinaga A. New making bread (Basic technic). pp. 42-45. In: Bakery I. Fujimisha Co., Tokyo, Japan (1999)
8. Lee JM. Properties of Jeung-Pyun made with different methods. *Miwon res. inst. Korean foods diet. culture* 26: 209-247 (1990)
9. AACC. Approved methods of AACC. 8th ed. Method 22-01. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA. (1983)
10. Chai SK. Food Analysis. JiguMunhwa Sa Co., Seoul, Korea. pp. 397-399 (1997)
11. AACC. Approved methods of AACC. 8th ed. Method 22-63. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA. (1983)
12. AACC. Approved methods of AACC. 8th ed. Method 22-01. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA. (1983)
13. David P. The Chemical Analysis of Foods. Church Livingstone Co., New York, NY, USA. pp. 128-129 (1976)
14. National Bureau of Standards (NBS). Registry of Mass Spectra Data. Wiley Science Co., New York, NY, USA. pp. 89-91 (1989)
15. Yaseen AAE, Shouk AA, Sadowska J, Fornal J, Jelinski T. Effect of pectin and alpha-amylase on the microstructure and staling of bread. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 10:19-25 (2001)
16. Lee MK. Quality characteristics of frozen dough bread prepared with flour ferments containing wheat flour Koji and lactic acid bacteria. PhD thesis, Konkuk University, Seoul, Korea (2003)
17. Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. Quality characteristics in mash of Takju prepared by using different nuruk during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 555-562 (1997)
18. Hansen A, Hansen B. Volatile compounds in wheat sourdoughs produced by lactic acid bacteria and sourdough yeasts. *Z Lebensm Unters Forsch.* 198: 202-209 (1994)
19. Kulp K, Chung H, Martinez-Anaya MA, Doerry W. Fermentation of water ferments and bread quality. *Cereal Chem.* 62: 55-59 (1985)
20. Kim HS, Hyun JS, Kim J, Ha HP, Yu DS. Research trends of nuruk molds. *Bioindustry* 10: 27-32 (1997)
21. Klaus L. Sourdough processes methodology and biochemistry. *Baker's Digest* Feb. 32-36 (1981)
22. Narendranath, NV, Hynes SH, Thomas KC, Lngledew WM. Effect of *Lactobacilli* on yeast-catalyzed ethanol fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4158-4163 (1997)
23. Galal AM, Johnson JA, Varriano-Marston E. Volatile (C2-C5) organic acids of Sanfrancisco sourdough french bread. *Cereal Chem.* 55: 461-468 (1977)
24. Collar C, Mascaros AF, Prieto JA. Changes in free amino acids during fermentation of wheat doughs started with pure culture of lactic acid bacteria. *Cereal Chem.* 68: 66-72(1991)

(2005년 2월 25일 접수; 2005년 3월 28일 채택)