

보 문

프로바이오틱 유산균으로 제조한 사워도우의 미생물학적 및 이화학적 특성

임은서*

동명대학교 식품영양학과

Microbiological and chemical properties of sourdough fermented with probiotic lactic acid bacteria

Eun-Seo Lim*

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

(Received March 3, 2016; Revised March 16, 2016; Accepted March 17, 2016)

ABSTRACT: Isolates from Korean fermented soybean paste were identified as *Enterococcus faecium* SBP12, *Pediococcus halophilus* SBP20, *Lactobacillus fermentum* SBP33, *Leuconostoc mesenteroides* SBP37, *Pediococcus pentosaceus* SBP41, *Lactobacillus brevis* SBP49, *Lactobacillus acidophilus* SBP55, and *Enterococcus faecalis* SBP58 according to conventional morphological and biochemical characteristics, carbohydrate fermentation profiling, and 16S rRNA sequence comparison. Strain SBP20, SBP33, SBP49, and SBP55 showed very resistance to simulated gastric and intestinal juices with final populations exceeding 6 log CFU/ml, whereas cells of SBP12 and SBP58 after exposure to low pH were dramatically decreased within 2 h. Among 4 strains having good tolerance to gastrointestinal conditions, the high adhesive ability to HT-29 cells, antibiotic resistance, and antimicrobial activity against food-borne pathogens *Bacillus cereus* ATCC 11778 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 were observed with SBP49 and SBP55, therefore, these two strains were confirmed as putative probiotic candidates. There was no significant difference between the sourdoughs fermented with SBP49 and SBP55 with respect to the values of pH, total titratable acidity, and viable cell count. During sourdough fermentation, SBP49 strain produced significantly greater amounts of lactic acid than SBP55 strain, which secreted large quantities of hydrogen peroxide. SBP49 and SBP55 strains producing the antimicrobial substances such as lactic acid, hydrogen peroxide, and bacteriocin effectively inhibited *B. cereus* and *S. aureus* inoculated in the sourdough.

Key words: antimicrobial activity, bacteriocin, lactic acid, probiotic, sourdough

프로바이오틱(probiotic)은 우리 몸의 면역기능을 강화하고 항균물질 생산을 통해 대장 내에 염증이나 가스를 생산하는 유해 세균과 세포의 노화를 유발하는 활성산소와 혈관을 좁혀 심혈관계 질환을 유발하는 나쁜 콜레스테롤(Low Density Lipoprotein, LDL) 및 암 세포의 증식을 유발하는 돌연변이원 등을 제거할 수 있는 유익균으로써 장 기능을 개선시켜 건강을 이롭게 하는 살아있는 미생물, 일명 생균제이다(Fuller, 1989). 프로바이오틱 선발기준으로는 균주 자체가 독성이나 병원성을 나타내지 않는 안전성이 가장 우선 확보되어야 하고, 체내에 유입되어 위산이나 담즙 및 항생제에 대해 저항하

여 활성을 유지한 채로 장에 도달해야 한다. 또한 대장 상피세포에 부착하여 항균물질을 생산함으로써 유해세균의 부착과 증식을 억제할 수 있어야 하고, 항암, 항콜레스테롤 및 항산화 등 건강을 이롭게 하는 각종 생리활성을 발휘할 수 있어야 하며, 발효식품이나 건강보조식품 및 의약품에 적용될 때에도 활성과 기능성이 안정하게 유지될 수 있어야 한다(Saarela *et al.*, 2000).

프로바이오틱 균주로서는 건강에 유익한 것으로 널리 알려진 *Lactobacillus*, *Streptococcus* 및 *Bifidobacterium* 속 유산균들이 대부분이다. 프로바이오틱 유산균은 장내 유익한 정상 균총으로서 만성복통, 설사 및 변비 완화 등의 정상 작용이 타월하며, 아토피 피부염이나 알레르기 질환 제어에도 효과적인 것으로 보고되고 있다(Soccol *et al.*, 2010). 다양한 기능성을

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

보유한 유산균은 요구르트나 치즈와 같은 유제품을 비롯하여 침채류 제조에 필수적인 스타터로서 발효과정 중 당을 분해하여 다양한 유용 물질들을 생산한다(Heller, 2001). 발효 중 프로바이오틱 유산균은 당으로부터 유산, 초산, 아세트알데히드 및 알코올을 생성함으로써 발효식품에 독특한 풍미를 부여하고 조직감을 향상시킬 뿐만 아니라 식중독균이나 부패균들의 증식을 억제할 수 있는 유산, 과산화수소나 디아세틸을 비롯하여 천연 항균성 단백질인 박테리오파지를 생산함으로써 제품의 품질 개선 및 저장성 향상에도 기여한다(Ranadheera *et al.*, 2010). 서구화된 식습관으로 성인병 발병률은 날로 높아져 가고 생활수준 향상과 고령화 시대에 접어들면서 건강에 대한 소비자들의 관심이 점점 높아져 감에 따라 영양가 높고 안전한 먹거리를 추구하게 되므로 생리활성이 있는 프로바이오틱 유산균의 이용 범위는 점차 확대되고 있다.

한편, 천연 발효빵의 원료인 사워도우는 밀가루 혹은 호밀가루에 물, 설탕, 소금 등을 혼합 반죽하고 효모와 유산균을 이용하여 발효시켜 제조함으로써 빵의 부피, 조직감 및 향미 등의 물성과 관능학적 특성을 향상시키고 영양학적 가치를 높이며 곰팡이나 부패 세균의 증식을 억제시켜 제빵의 품질을 높일 수 있다(Vogel *et al.*, 1999; De Vuyst and Vancanneyt, 2007). 사워도우의 발효과정 중 원료 내 주요 당인 말토오스와 프락토오스 대사, 단백질 분해와 아르기닌 디아미나아제 경로의 활성화 및 향미와 항균물질을 생산하므로 유산균의 역할이 매우 중요하다(Gobbetti *et al.*, 2005; De Vuyst and Vancanneyt, 2007). 하지만, 도우를 전통적인 방식으로 제조할 때 원료나 환경에서 유래한 야생 효모나 유산균을 이용하게 되는 경우 잡균의 오염으로 인해 제빵 품질이 악화되는 경우가 흔하다(De Vuyst and Vancanneyt, 2007).

따라서 본 연구에서는 우리나라 전통 발효식품인 된장으로부터 프로바이오틱 선발 기준에 적합한 균주를 검색하고, 빵에서 주로 분리되는 식중독균에 대한 항균작용을 나타내는 유산균을 분리 동정하였다. 또한 선발된 유산균으로 사워도우를 제조한 후 미생물학적 및 이화학적 특성과 항균작용으로 인한 저장성 향상 효과를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

유산균 분리 동정

전통적인 방법으로 가정에서 발효시켜 제조한 재래식 된장(10종)을 무균적으로 10 g 채취한 다음 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.0) 90 ml를 가하여 약 3분간 균질화하여 시료용액을

얻었다. 십진법으로 희석한 용액은 1% (w/v) CaCO₃를 첨가한 Lactobacilli MRS agar 배지(Difco)에 도말하여 37°C, 48시간 호기적인 조건하에서 배양하였다. 배양하는 동안 유산에 의해 투명화를 생성하는 집락을 유산균으로 간주하여 무균적으로 채취한 다음 MRS agar 배지 상에서 순수분리 배양하였다. 분리된 균주들은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Mundt, 1986)에서 서술된 방법에 따라 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성을 조사하였고, API 50 CHL system (bioMérieux)을 이용하여 당 발효능을 확인하였다. 또한 유전자염기서열 분석을 위해 MRS broth 내에서 배양시킨 배양액으로부터 DNA extraction kit (Qiagen)를 사용하여 균주의 DNA를 추출한 후 정제하였다. DNA 증폭을 위한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 혼합물은 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') primer 50 pmole/μl, Taq DNA polymerase (5 U/μl) 0.2 μl, 10× buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl) 5.0 μl, dNTPs (각 5 mM) 1.0 μl, MgCl₂ (50 mM) 2.5 μl, glycerol (80%) 1.25 μl, DNA template 2.0 μl 및 멸균수 50 μl로 구성하였다. PCR Thermal cycler (Bio-Rad Laboratories Ltd.)를 이용하여 초기 변성(94°C, 5분), 변성(94°C, 30초), 풀림(56°C, 1분), 신장(72°C, 1분) 및 연장(72°C, 5분) 과정을 통해 DNA를 증폭시켰다. 반응 종료 후 PCR 산물은 1.5% (w/v) agarose gel로 전기영동하여 밴드를 확인한 후 PCR purification kit (Qiagen)로 정제하였다. 염기배열은 DNA sequencer (ABI Prism® 3730 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems)로 분석한 다음 미국립보건원 산하 생명공학정보센터(NCBI; The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST (Basic Local Align Search Tool) 프로그램(version 2.0.8.)을 이용하여 염기서열의 상동성(homology)을 조사하였다.

프로바이오틱 균주로서의 가능성 탐색

인공 위액 및 담즙액에 대한 내성은 Maragkoudakis등(2006)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 분리 동정한 유산균은 MRS broth 내에서 37°C, 24시간 동안 배양한 다음 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포만을 모으고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. 인공 위액은 PBS 내에 0.3% (w/v) pepsin (Sigma-Aldrich)을 첨가하고 pH 2.5로 맞춰 제조하였고, 인공 담즙액은 PBS에 NaCl (6.58 g), KH₂PO₄ (0.66 g), KCl (0.043 g), MgCl₂ (0.17 g), CaCl₂ (0.060 g), pancreatin (2.25 g) 및 bile salts (1.5 g)를 첨가하고 난 후 pH 8.0으로 조정하여 제조하였다. 유산균 세포수는 1.0 × 10⁸ CFU/ml로 조정된 다음 인공 위액과 인공 담즙액에 각각 접종한 후 37°C에서 2시간 및

3시간 동안 배양하였다. 각각의 조건에서 배양한 후 배양액을 채취하여 MRS agar 평판배지 상에서 37°C, 48시간 동안 배양한 다음 잔존하는 생균수를 측정하였다.

인체 상피세포에 대한 분리균의 부착능을 측정하기 위해 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양받은 HT-29 세포는 56°C에서 30분간 가열 처리한 10% (v/v) fetal bovine serum (FSB, Gibco), 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin 및 0.1 mg/ml streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Sigma-Aldrich)에 접종하고 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 배양 플라스크로부터 세포를 떼어내고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. FBS와 항생제를 첨가하지 않은 DMEM 배지 내에 세포수를 1.0×10^5 cells/ml로 맞춘 다음 6-well plate (Flacon)에 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 24시간 동안 배양하였다. 한편, MRS broth 내에서 37°C, 24시간 동안 배양한 유산균 배양액은 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포만을 회수한 다음 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. DMEM 배지 내에 유산균수를 1.0×10^8 CFU/ml로 맞추고 HT-29 monolayer가 형성된 plate의 well에 접종하였다. 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 부착되지 않은 세포는 제거하고 부착된 세포는 trypsin-EDTA 용액으로 탈착시켜 PBS (pH 7.0)로 세척한 다음 MRS agar 평판배지 상에서 배양하여 유산균수를 측정하였다(Tuomola and Salminen, 1998).

분리된 유산균의 항생제에 대한 내성은 Bauer 등(1966)의 disc diffusion method에 따라 측정하였다. 즉, 실험균은 MRS broth 내에서 37°C, 24시간 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포만을 회수하고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척한 다음 세포수를 1.0×10^7 CFU/ml로 조정하였다. 45°C 정도로 식힌 MRS 반고체 배지(agar 1% 함유) 20 ml에 세포 현탁액 200 µl를 접종한 후 평판에 분주하고 상온에서 약 30분간 방치하여 배지를 응고시켰다. 평판 위에 올린 paper disk (φ8 mm)에 항생제(ampicillin, erythromycin, kanamycin, penicillin G, streptomycin, tetracycline 및 vancomycin 각각 10 µg/ml, Sigma-Aldrich) 용액 50 µl를 loading하고 난 후 37°C, 24시간 동안 배양한 다음 disc 주변에 생성된 저해환을 관찰하여 항생제에 대한 내성을 resistant (R, 저해환 0 mm), intermediate susceptibility (I, 저해환 1-5 mm) 및 susceptibility (S, 저해환 > 5 mm)로 표시하였다.

항균물질 제조 및 항균활성 측정

실험균주는 MRS broth의 배양액으로부터 원심분리(7,000 ×

g, 10분, 4°C)하여 배양상등액을 회수하고, HClO₄ (1 M)을 첨가하여 단백질을 침전시키고 난 다음 0.22 µm membrane filter (Millipore Corp.)로 여과제균한 후 high-pressure liquid chromatography (HPLC, Shimadzu)로 유산 함량을 측정하였다. Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm: Bio-Rad) 컬럼 온도 35°C를 유지하였고, 이동상은 H₂SO₄ (5 mM)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 분석하였다. Refractive index (GBC Scientific Equipment Pty Ltd.) 검출기로 220 nm의 파장에서 측정하여 표준용액의 검량곡선으로부터 유산 함량을 정량하였다(Sgouras *et al.*, 2004). 한편, 유산균의 과산화수소 생성 여부는 Otero와 Nader-Macias (2006)의 방법에 따라 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)-MRS agar 평판배지 상에서 확인하였다. 실험균주는 1 mM TMB와 2 U/ml peroxidase가 첨가된 MRS agar 평판배지에 접종하여 혐기적인 조건 하에서 37°C, 48시간 배양하였다. 배양 후 공기 중에 20분 노출시킨 후 집락의 색깔을 관찰하여 과산화수소 생성 정도(청색, +++; 진한 갈색, ++; 연한 갈색, +; 백색, -)를 확인하였다. 실험균주 배양상등액의 항균활성 측정을 위해 American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 빵의 부패에 주로 관여하는 지시균주(*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538)를 분양 받은 후 Brain Heart Infusion broth (BHI, Difco)에서 37°C, 24시간 배양하였다. 배양액은 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포만을 모으고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척한 다음 BHI broth에 세포수 1.0×10^6 CFU/ml로 맞춰 접종한 후 유산균 배양상등액 5% (v/v)를 첨가하였다. 37°C에서 24시간 배양하고 난 후 배양액을 채취하여 희석한 다음 BHI agar 상에서 평판배양법을 이용하여 잔존하는 세포수를 측정하고 초기 균수에 대한 저해율(%)로 환산하였다.

실험균주의 박테리옌 생산능과 항균활성을 측정하고자 배양상등액을 준비한 후 유산의 영향을 제거하기 위해 배양상등액의 pH는 1 N NaOH를 이용하여 6.5로 맞추고 과산화수소의 영향을 배제하기 위해 catalase (1 mg/ml, Sigma-Aldrich)를 처리하였다. 그런 다음 50% (w/v) 황산암모늄을 첨가한 후 4°C에서 overnight 동안 교반하여 단백질을 침전시키고 원심분리(12,000 × g, 30분, 4°C)하여 침전물만을 회수하고 20 mM PBS (pH 6.5)에 현탁시켰다. 현탁액은 4°C, 24시간 동안 동일한 buffer 내에서 투석막(molecular weight cut-off = 1,000 Da, Spectrum Medical Industries, Inc.)을 이용하여 투석시킨 후 초박테리옌 용액을 조제하였다. 박테리옌 용액의 항균활성은 Hole 등(1991)에 의한 microtiter plate method로 측정하였다. 즉, 앞서 언급한 지시균주는 BHI broth 내에서 37°C, 24시간 배양 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포만을 모아

PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. BHI broth에 지시균주 세포 현탁액(1.0×10^5 CFU/ml)과 일정한 농도로 맞춘 박테리오신 용액을 각각 microtiter plate well (Falcon, Franklin Lakes) 내에 첨가한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. Microplate reader (BioTek, Inc.)를 이용하여 흡광도(600 nm)를 측정하고 박테리오신 용액 대신 PBS (pH 7.0)를 처리한 대조구에 비해 배양액의 혼탁도가 50% 저해된 최대 희석배수의 역수를 박테리오신 활성(arbitrary units, AU)으로 계산하였다.

사워도우 제조 및 배양학적 특성 조사

분리된 유산균과 Korean Collection for Type Cultures (KCTC)로부터 분양 받은 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7246 효모 균주를 이용해서 Choi 등(2012)의 방법을 일부 변형하여 사워도우를 제조하였다. 선발된 유산균은 MRS broth에 접종한 다음 37°C에서 24시간 배양하였고, 효모는 Yeast Mold (YM) broth (Difco)에 접종한 후 30°C에서 24시간 배양하여 얻은 각각의 배양액은 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포를 모은 후 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 동일한 buffer에 현탁시켰다. 사워도우는 밀가루(강력분; 수분 10.5%, 조단백 16.7%, 조지방 0.9%, 조회분 1.5%) 380 g, 물 210 g, 소금 5.3 g, 설탕 11.2 g 및 유산균(1.0×10^8 CFU/g)과 효모(1.0×10^6 CFU/g) 세포 현탁액을 각각 5 g 접종하고 난 후 약 5분간 반죽기(HM3000, Brown)를 이용하여 혼합하였다. 혼합한 반죽은 유리 용기에 담아서 온도 30°C, 상대습도 80% 하에서 24시간 동안 발효시켜 사워도우를 제조하였다. 발효 종료 후 사워도우의 유산균수, pH, 산도 및 항균물질 함량을 측정하였다. 시료 10 g을 무균적으로 채취한 후 PBS (pH 7.0) 90 ml와 혼합 균질화한 후 적당한 단계로 희석한 다음, 곰팡이와 효모의 증식을 억제하기 위해 cycloheximide 10 ppm (Merck)을 첨가한 MRS agar 배지상에서 37°C, 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다. 또한 유산균 배양액을 접종하지 않은 대조구로부터 원료 자체에 함유된 유산균의 생균수를 조사하여 실험구에서 얻어진 균수는 이를 배제한 다음 유산균수를 나타내었다. 한편, 시료 10 g을 증류수 90 ml와 혼합 균질화한 후 pH meter (Fisher Scientific)를 이용하여 pH를 측정하였다. 총산도는 시료에 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 × 0.1 N NaOH 역가 × 0.9) / 시료양] 하였다. 사워도우 내 함유된 유산 함량은 Shah와 Ravula (2002)의 방법에 따라 측정하였다. 시료(1 g)에 15.5 M nitric acid (100 μl)와 0.01 M sulfuric acid (2 ml)를 첨가한 다음 원심분리(14,000 × g, 30분)하여 단백질을 침전시켰다.

상등액은 0.22 μm membrane filter로 여과 제균한 다음 HPLC의 이온 교환 컬럼(Aminex HPX-87 H, 300 × 7.8 mm, Bio-Rad)을 이용하여 65°C에서 0.01 M H₂SO₄의 이동상 유속 0.6 ml/min의 조건 하에서 분석하고 유산의 함량은 표준곡선으로부터 구하였다. 사워도우 내에 함유된 과산화수소의 함량을 측정하기 위해 시료(10 g)를 pH 4.5로 맞추고 0.1 M acetate buffer (2 ml)를 첨가한 다음 멸균수를 더하여 최종 20 ml로 맞춰 약 2분간 균질화하였다. 여과지(Whatman No. 2)로 여과시킨 다음 얻어진 여액(5 ml)은 1% o-dianisidine (100 μl)과 horseradish peroxidase (0.01 mg, Fisher Scientific)를 넣은 멸균된 시험관에 분주하고 상온에서 약 10분간 반응시켰다. 4 N HCl (200 μl)를 첨가하여 반응을 종료하고, 흡광도(400 nm)를 측정하여 과산화수소의 함량(μg/ml)은 표준곡선으로부터 계산하였다 (Gilliland, 1969). 사워도우 내의 박테리오신 함량은 Settanni 등 (2005)의 방법에 따라 측정하였다. 시료(10 g) 내 소수성 항균물질 추출하기 위해 40% acetone-0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (90 ml)를 처리하고 균질화한 다음 15,000 × g, 10분간 원심분리 하였다. 얻어진 침전물을 동결 건조시킨 다음 50% (v/v) 알코올(4 ml)에 용해시켜 박테리오신 용액을 제조한 다음 *B. cereus* ATCC 11778과 *S. aureus* ATCC 6538을 지시균주로 하여 앞서 언급한 microtiter plate method으로 박테리오신의 활성을 측정하였다. 이때 박테리오신을 생산하지 않는 유산균으로 제조한 사워도우를 대조구로 하여 용매에 의한 항균력은 배제한 다음 항균활성을 나타내었다.

저장기간 중 사워도우 내 식중독균수 변화

사워도우 제조 시 식중독균을 인위적으로 접종하여 발효시킨 후 균수 변화를 조사하였다. *B. cereus* ATCC 11778과 *S. aureus* ATCC 6538은 BHI broth에 각각 접종하여 37°C, 24시간 배양한 후 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포만을 모으고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. 세포수를 1.0×10^6 CFU/g으로 조정하여 세포 현탁액 5 g을 사워도우 원료 혼합물에 각각 접종하였다. 사워도우 발효 직후 시료 10 g을 채취하여 PBS (pH 7.0) 90 ml와 혼합 균질화한 후 적당한 단계로 희석한 다음 *B. cereus*은 Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar (Difco), *S. aureus*는 *Staphylococcus* 110 medium (Difco) 상에서 37°C, 48시간 배양하여 균수를 측정하였다. 발효 종료된 사워도우는 4°C에서 7일간 보관하는 동안 식중독균수의 변화를 관찰하였다.

통계처리

항목별 총 3회 실험하여 얻어진 측정값은 평균 ± 표준편차로

나타내었고, Statistical Package for Social Science (SPSS)을 이용하여 유의수준은 $P < 0.05$ 에서 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)의 Duncan's multiple range test를 통해 각 군별 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

재래식 발효 된장에서 분리된 유산균 동정

재래식 발효 된장으로부터 분리된 유산균의 형태학적 및 배양학적 특성과 당 발효능 및 염기배열분석을 통한 동정 결과는 Table 1과 같다. 1% CaCO₃가 첨가된 MRS agar 평판배지 상에서 투명한 환을 생성하는 균주를 유산균으로 간주하고 그람 염색한 결과 모두 그람 양성 세균이었으며, SBP12, SBP20, SBP37, SBP41 및 SBP58은 구균이었으나, SBP33, SBP49 및 SBP55는 간균의 형태를 나타내었다. 한편, SBP20, SBP37 및 SBP41은 catalase를 생성하지 못한 반면, 그 외의 균주들은 catalase 양성반응을 나타내었다. 분리된 8균주들의 정확한 동정을 위해 API 50 CHL kit를 이용하여 당 발효능과 16S rRNA sequencing을 조사한 결과, *Enterococcus faecium* SBP12, *Pediococcus halophilus* SBP20, *Lactobacillus fermentum* SBP33, *Leuconostoc mesenteroides* SBP37, *Pediococcus pentosaceus* SBP41, *Lactobacillus brevis* SBP49, *Lactobacillus*

acidophilus SBP55 및 *Enterococcus faecalis* SBP58로 동정되었다.

Jeong 등(2014)이 메주와 된장 내 분포하는 세균을 조사한 결과, 우점종으로서 고농도의 염 농도 하에서도 견딜 수 있는 *Bacillus saiamensis*와 *Bacillus licheniformis* 등의 포자형성균과 *E. faecalis*, *E. faecium*, *Weissella cibaria* 및 *Tetragenococcus halophilus* 등의 유산균이 숙성기간 동안 산 생성에 주로 관여한다고 하였다. 특히, *Enterococcus*속은 된장의 주요 인공 단백질 분해와 풍미 형성 등에 중요한 역할을 하며, *T. halophilus*는 고농도의 염에서 내성이 강하고, lipase를 생성하여 지방을 분해시키며 풍미 형성에도 중요하다고 하였다. Cho와 Seo (2007)는 된장 내에 bacilli의 균수보다 유산균수가 더 많이 존재하였으며, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 *L. mesenteroides*, *Lactobacillus sakei* 및 *T. halophilus* 등의 유산균을 분리 동정하였다.

프로바이오틱 균주로서의 적합성

분리 동정된 균주들의 프로바이오틱 유산균으로서의 적합성을 확인하기 위해 인공 위액과 담즙액 내에서의 생존율, HT-29 세포에 대한 부착율 및 항생제에 대한 저항성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. Pepsin이 첨가된 pH 2.5 하에서 초기 균수 10⁸ CFU/ml을 37°C, 2시간 배양한 결과, *P. halophilus* SBP20, *L. fermentum* SBP33, *L. brevis* SBP49 및 *L. acidophilus*

Table 1. Identification by physiological and biochemical characteristics, carbohydrate fermentation ability, and 16S rRNA gene sequencing of lactic acid bacteria isolated from Korean fermented soybean paste

Strain	Physiological and biochemical characteristics			Carbohydrate fermentation ability		16S rRNA sequence		Identification
	Gram staining	Cell shape	Catalase	Species affiliation	Confidence (%)	Related strain in NCBI (Accession No.)	Similarity (%)	
SBP12	+	Cocci	+	<i>Enterococcus faecium</i>	99.1	<i>Enterococcus faecium</i> JS (KT180319)	99.7	<i>Enterococcus faecium</i> SBP12
SBP20	+	Cocci	-	<i>Pediococcus halophilus</i>	99.9	<i>Pediococcus halophilus</i> JCM5888 (NR113252)	99.9	<i>Pediococcus halophilus</i> SBP20
SBP33	+	Rod	+	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99.0	<i>Lactobacillus fermentum</i> DM29 (KT780434)	99.5	<i>Lactobacillus fermentum</i> SBP33
SBP37	+	Cocci	-	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> T3 (KT924430)	99.9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SBP37
SBP41	+	Cocci	-	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P146b (KR010911)	99.8	<i>Pediococcus pentosaceus</i> SBP41
SBP49	+	Rod	+	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.9	<i>Lactobacillus brevis</i> PLA33(KJ722781)	99.2	<i>Lactobacillus brevis</i> SBP49
SBP55	+	Rod	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	99.6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> EMBS081 (JX255677)	99.9	<i>Lactobacillus acidophilus</i> SBP55
SBP58	+	Cocci	+	<i>Enterococcus faecalis</i>	98.1	<i>Enterococcus faecalis</i> EF1102 (KC511551)	99.0	<i>Enterococcus faecalis</i> SBP58

Table 2. Screening and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria using *in vitro* test

Strain	Viable cell count (CFU/ml)			Antibiotic resistance						
	Gastric juice	Intestinal fluid	HT-29 cell	Ampicillin	Erythromycin	Kanamycin	Penicillin	Streptomycin	Tetracycline	Vancomycin
<i>Enterococcus faecium</i> SBP12	2.5±0.3×10 ^{2a}	6.2±1.1×10 ^{5a}	5.3±1.7×10 ^{5a}	R	S	R	S	IS	S	S
<i>Pediococcus halophilus</i> SBP20	7.1±3.1×10 ^{7b}	2.6±1.5×10 ^{8b}	3.2±2.1×10 ^{4a}	S	R	R	IS	R	IS	R
<i>Lactobacillus fermentum</i> SBP33	4.1±1.6×10 ^{6b}	5.2±1.3×10 ^{7a}	2.8±0.4×10 ^{7b}	IS	R	R	IS	S	R	R
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SBP37	1.7±1.2×10 ^{5a}	5.6±4.5×10 ^{8b}	6.6±1.4×10 ^{6a}	IS	S	R	R	R	R	R
<i>Pediococcus pentosaceus</i> SBP41	3.5±1.0×10 ^{4a}	3.8±2.2×10 ^{6a}	4.1±2.1×10 ^{4a}	S	R	IS	S	IS	IS	S
<i>Lactobacillus brevis</i> SBP49	8.5±1.9×10 ^{7b}	9.4±7.0×10 ^{8b}	3.3±0.9×10 ^{7bc}	R	R	IS	R	R	S	S
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SBP55	6.2±3.1×10 ^{7b}	8.2±2.2×10 ^{7a}	4.7±2.5×10 ^{7c}	S	IS	R	R	R	R	R
<i>Enterococcus faecalis</i> SBP58	5.5±0.1×10 ^{3a}	5.7±4.6×10 ^{6a}	6.4±2.9×10 ^{4a}	IS	R	R	IS	R	R	R

Data are means ± standard deviation from triplicate determinations and means with the different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

R, resistant (inhibition zone size: 0 mm); IS, intermediate susceptibility (inhibition zone size: 1-5 mm); S, susceptibility (inhibition zone size: > 5 mm).

SBP55 균주는 10⁶ CFU/ml 이상의 균수가 생존하여 위액에 대한 저항성이 높았다. 반면, *E. faecium* SBP12, *L. mesenteroides* SBP37, *P. pentosaceus* SBP41, *E. faecalis* SBP58 균주들은 10⁵ CFU/ml 이하의 균수가 검출되어 저항성이 비교적 낮게 나타났다. SBP20, SBP37 및 SBP49 균주는 bile salts 존재 하에서 3시간 동안 초기 균수를 거의 유지할 수 있었던 반면, SBP12, SBP41 및 SBP58의 생균수는 2 log cycle 이상 감소되었다. HT-29 세포에 대한 부착능을 측정한 결과, SBP33, SBP49 및 SBP55의 균수는 10⁷ CFU/ml 이상 부착되어 다른 균주들에 비해 유의하게 높은 부착능을 나타내었다. 7종의 항생제에 대한 저항성을 확인한 결과, SBP12와 SBP41 균주는 ampicillin 과 kanamycin을 제외한 비교적 많은 종류들의 항생제에 저해되었다. 반면, SBP20과 SBP33은 공통적으로 erythromycin, kanamycin 및 vancomycin에 대해 저항하였으며, SBP37, SBP55 및 SBP58은 5종 이상의 항생제에 저항성이 높게 나타났다. 하지만 SBP41은 erythromycin을 제외하고 대부분의 항생제에 민감한 것으로 나타났다. 따라서 된장에서 분리된 총 8종의 유산균 중 프로바이오틱 균주로서는 *L. brevis* SBP49와 *L. acidophilus* SBP55가 선발 기준을 충족하는 것으로 확인되었다.

프로바이오틱 균주는 식도, 위장 및 십이지장을 통과하는 동안 살아 있는 상태로 장에 도달하여 대장 상피세포에 부착한 다음 항균물질을 생산함으로써 유해세균의 증식을 억제하는 등의 건강에 유익한 작용을 발휘한다. 유산균의 산에 대한 저항 메커니즘은 아미노산의 탈탄산 반응을 통해 외부 환경의 pH를 높이거나, ATP를 이용하여 F₀F₁-ATPase 양성자 펌프를 가동시켜 세포질로부터 과도한 양성자들을 펌핑하여 세포 내 pH 항상성을 유지한다(Lorca *et al.*, 2001). Ehrmann 등(2002)

에 따르면, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius* 및 *Lactobacillus animalis* 등은 pH 3 하에서 4시간 동안 생존가능하며, 산에 대한 저항력은 균주에 따라 다양하다고 하였다. 장관 내 담즙산염의 농도는 보통 0.3% 정도이나, 섭취한 음식물의 성분에 따라 다소 차이가 있으며, 다양한 분리원에서 얻어진 *Lactobacillus*속 9종 대부분 담즙산염에 대한 저항성이 높은 것으로 보고된 바 있다(Shokryazdan *et al.*, 2014). 우리나라 전통주인 오메기술로부터 분리된 *P. pentosaceus* SW01과 *Pediococcus acidilactici* SW05는 pH 2.0, 2.5 및 3.0 하에서 3시간 동안 노출된 후에 10⁹ CFU/ml 이상의 균수를 유지하였고, 1%의 담즙산 하에서 24시간 동안에도 90% 이상의 균수가 생존하였으므로 본 연구에 사용된 SBP20과 SBP41 균주 보다는 월등히 높은 저항성을 나타내었다(Oh and Jung, 2015). Cebrian 등(2012)에 따르면, *E. faecalis* UGRA10은 pH 3.0에서 1시간만에 균수가 급감하여 1 log cycle 이하만이 남아 산에 대한 내성이 매우 약한 반면, 담즙산 가수분해효소를 생산하지 않음에도 불구하고 40%의 담즙 하에서도 증식할 수 있다고 하였다. 발효시킨 올리브에서 분리된 *L. mesenteroides* 17종은 pH 2.5 하에서 3시간 배양한 결과, 1종은 약 1-3 log cycle 정도 생균이 잔존하였으나, 나머지 16종은 1 log cycle 이하만이 남아 이들은 위액에 저항성이 매우 약하다고 하였는데 SBP37은 이들 보다는 높은 생존율을 나타내었다(Argyri *et al.*, 2013).

프로바이오틱 유산균은 다양한 항생제에 대한 내성을 나타낸다. *Lactobacillus rhamnosus*와 *Lactobacillus casei*는 vancomycin에 저항하고, 대부분의 bifidobacteria는 nalidixic acid, neomycin, polymyxin B, kanamycin, gentamycin, streptomycin 및 metronidazole 등의 항생제에 영향을 받지 않는다고 알려져 있다(Saarela *et al.*, 2000). 프로바이오틱 유산균 187

종 중에서 약 79%가 kanamycin에 대해 저항하였고, 65% 정도는 vancomycin에 견딜 수 있었으며, tetracycline에는 26%, penicillin G는 23%, erythromycin 16% 및 chloramphenicol은 11%가 내성을 나타내었다(Ashraf and Shah, 2011). Oh and Jung (2015)이 보고한 *Pediococcus*속 2종과 *Lactobacillus*속 5종 모두 ampicillin에 저항한다고 하였으나, *Lactobacillus pentosus* SW02는 단백질 합성 저해 항생제인 chloramphenicol, kanamycin, streptomycin 및 tetracycline에 의해 저해되었다. 유산균들은 본질적으로 kanamycin 및 streptomycin과 같은 aminoglycoside 항생제들에 대한 내성을 나타낸다고 보고한 바 있어 본 연구에서도 유사한 결과를 나타내었다. 한편, 치즈로부터 분리된 *E. faecalis* UGRA10은 vancomycin에 대해 민감하였으나, *E. faecalis* SBP58은 이에 저항하는 것으로 나타났다(Cebrian *et al.*, 2012). Argyri 등(2013)은 올리브로부터 분리된 *L. mesenteroides* 17종 대부분은 ampicillin, penicillin, erythromycin 및 tetracycline에 대해 민감한 반면, vancomycin, kanamycin 및 streptomycin 등에 대해선 비교적 저항성이 강하다고 하여 이와 동일한 균종인 SBP37의 항생제 저항성과 부분적으로 일치하였다.

한편, 프로바이오틱 유산균의 장내 상피세포에 대한 부착능은 세포 표면에 존재하는 부착과 관련된 특이한 성분인 당과 단백질과 관련 있다(Velez *et al.*, 2007). 상피세포에 대한 유산균의 부착은 세포 간에 전기화학적 및 소수성 상호결합, 입체적이거나 수동적인 인력, lipoteichoic acid, exopolysaccharide 및 세균 세포의 외부 구조물에 의해 이루어진다(Servin and Cocconnier, 2003). 상피세포에 부착한 유산균은 면역 반응에 관여하는 림프 조직과의 접촉을 촉진하는 점막 표면과 상호반응을 한다. 그러므로 부착능이 높은 프로바이오틱스는 면역 반응을 효과적으로 유도하고 장관 내 점막을 안정화시킨다(Salminen *et al.*, 1996). 유산균의 부착능은 세균수, buffer 구성 성분, 배양 시간, 배지 성분, 장내 정상 균총의 종류 및 섭취된 음식물의 성분에 따라 좌우된다(Ouweland and Salminen, 2003). 외부 환경에 대한 저항성과 부착능이 높아 프로바이오틱균으로 이미 알려진 *Lactobacillus*속 균종으로는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. brevis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus lactis*, *L. fermentum*, *L. plantarum* 및 *L. reuteri* 등이 있다(Ali, 2010). *P. pentosaceus* SW01과 *P. acidilactici* SW05는 HT-29 세포에 65% 이상 부착되어 SBP20과 SBP41 보다 다소 높은 부착능을 보여준 반면, 오메기솔로부터 분리된 총 7종의 유산균 중에서 *L. pentosus* SW02의 부착능이 53.96%로 가장 낮았다고 하였는데 본 연구에서 보여준 *Lactobacillus*속들은 이보다는 높은 부착능을 나

타내었다. 이와 같이 *Lactobacillus*속들의 부착능은 균종과 매트릭스에 의존한다고 보고된 바 있다(Oh and Jung, 2015). *E. faecalis* UGRA10은 Caco-2 세포에 약 13.89%, HeLa 229 세포에는 21.65% 부착하여 *L. plantarum* Mc45보다 월등히 높게 나타났고, SBP12 및 SBP58의 *Enterococcus*속보다도 높았으며, 이로 인해 *Listeria*속과 같은 병원균의 부착을 저해하는데 효과적이라고 보고하였다(Cebrian *et al.*, 2012).

항균물질 생성능 및 항균 활성

유산균이 생산하는 항균물질로 알려진 유산, 과산화수소 및 박테리오신의 생성능과 지시균주인 *B. cereus* ATCC 11778과 *S. aureus* ATCC 6538에 대한 유산균의 배양상등액과 박테리오신 용액의 항균활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 실험 균주 중 *L. acidophilus* SBP55는 가장 많은 양의 유산(134.6±5.8 mM)을 생성하였고, *P. halophilus* SBP20과 *L. brevis* SBP49도 120 mM 이상의 유산을 생성하였다. 하지만, *E. faecium* SBP12, *L. mesenteroides* SBP37 및 *E. faecalis* SBP58은 다른 균주들에 비해 유의하게 낮은 유산을 생성하였다. SBP20, SBP37 및 SBP41은 과산화수소를 생성하지 못한 반면, SBP55는 실험 균주 중에서 가장 많은 양의 과산화수소를 생성하였다. 유산균의 배양액으로부터 얻은 배양상등액 내에 함유된 항균물질에 의한 *B. cereus*와 *S. aureus*의 저해율을 조사한 결과, SBP49, SBP55 및 SBP58의 배양상등액 5% 처리에 의해 *B. cereus* 균수를 16.9–32.1% 감소시켰으나, SBP12, SBP20, SBP33 및 SBP41의 배양상등액에 의해선 10% 이하의 저해율을 나타내었다. *S. aureus*는 SBP49의 배양상등액에 의해 약 30% 정도 감소되었으나, SBP12, SBP20 및 SBP41 균주의 배양상등액에 의해선 5% 이하 정도로만 저해되었다. 한편, SBP12, SBP20, SBP33, SBP41 균주는 *B. cereus*와 *S. aureus*의 증식을 억제할 수 있는 박테리오신을 생성하지 못했으나, SBP37, SBP49 및 SBP55는 이들 지시균주에 대한 항균활성을 나타내는 박테리오신을 생산하였다. 특히 *B. cereus*에 대하여 SBP49의 박테리오신 활성은 512 AU/ml로 가장 높았고, SBP55와 SBP58의 박테리오신 활성도 각각 128 AU/ml와 256 AU/ml로 나타났다. *S. aureus*에 대해선 SBP37의 박테리오신 활성은 32 AU/ml이고 SBP49는 64 AU/ml로 나타났는데 SBP55의 박테리오신 활성(256 AU/ml)은 이들 보다 더 높게 나타났다. 한편, 박테리오신을 생산하는 유산균은 사워도우 제조에 이용되는 *S. cerevisiae* KCTC 7246에 대해선 항균활성을 나타내지 않았다(결과 미제시).

프로바이오틱 유산균은 장관 내에서 면역 기능을 강화시키고 제한된 영양원을 두고 유해균들과 경쟁하며 병원성 세균들

Table 3. Contents and potential activities of antimicrobial substances produced by the tested strain

Strain	Content		Antimicrobial activity			
	Lactic acid (mM)	Hydrogen peroxide	Inhibition by CFCS (%)		Bacteriocin (AU/ml)	
			<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
<i>Enterococcus faecium</i> SBP12	98.9±4.1 ^a	+	3.6±0.7 ^a	5.2±1.0 ^a	ND	ND
<i>Pediococcus halophilus</i> SBP20	120.7±3.8 ^c	-	4.2±1.2 ^a	4.9±1.4 ^a	ND	ND
<i>Lactobacillus fermentum</i> SBP33	111.5±2.6 ^b	++	6.8±2.0 ^{ab}	10.5±3.0 ^b	ND	ND
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SBP37	99.0±5.9 ^a	-	13.2±4.8 ^{bc}	16.1±3.1 ^c	128	32
<i>Pediococcus pentosaceus</i> SBP41	106.8±7.0 ^{ab}	-	2.9±0.5 ^a	4.3±0.5 ^a	ND	ND
<i>Lactobacillus brevis</i> SBP49	126.8±4.7 ^{cd}	++	32.1±7.4 ^d	29.8±5.2 ^d	512	64
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SBP55	134.6±5.8 ^d	+++	16.9±2.3 ^c	15.0±2.2 ^{bc}	128	256
<i>Enterococcus faecalis</i> SBP58	101.5±6.1 ^a	+	18.1±5.2 ^c	17.9±3.6 ^c	256	ND

Data are means ± standard deviation from triplicate determinations and means with the different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

CFCS, cell-free culture supernatant.

-, White; +, light brown; ++, Dark brown; +++, Blue.

ND, Not detected.

이 점막 상피세포에 부착하지 못하도록 하거나 각종 항균물질을 생산하여 병원균을 사멸시킨다. 유산균이 배지 내 6탄당을 발효하는 과정 중에 정상발효유산균은 유산만을 생성하고 이상발효유산균은 유산, 초산, 알코올, 이산화탄소, 포름산, 아세트인, 아세트알데히드 및 디아세틸 등 다양한 항균물질을 생산하며, 균종이나 성장용 배지의 구성성분에 따라 생산량은 다르다(Suško^{vi}ć *et al.*, 2010). 유산균의 대사산물 중 유기산이 가장 광범위한 항균활성을 나타내는데 발효 과정 동안 생산된 유기산의 양과 형태에 따라 항균 활성에 차이가 있다(Suško^{vi}ć *et al.*, 2010). 유기산의 항균력은 비헤리된 분자에 의해 주로 유발되는데 이런 분자들은 세포막을 통해 확산되어 세포질 내 pH를 감소시켜 세포막 전위를 방해하고 세포 내 필수적인 대사 기능을 파괴하며 능동수송을 저해함으로써 항균 효과를 발휘하게 된다(Kashket, 1987).

과산화수소의 항균력은 세포에 대한 강력한 산화 작용과 세포 단백질의 분자적 구조를 파괴시켜 나타난다. 즉, 산소의 존재 하에서 발생하는 과산화수소가 분해되지 못하고 세포 내에 축적되면 세포막의 지질과 단백질이 산화되어 결국 세포는 죽게 된다(Suško^{vi}ć *et al.*, 2010). 분자량이 작은 항균물질인 과산화수소나 유기산 및 2차 대사산물은 *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium* 및 *Helicobacter* 등 유해세균에 대한 광범위한 항균활성을 나타낸다(Saarela *et al.*, 2000). *L. acidophilus*의 배양상등액은 *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Enterobacter*속의 증식을 억제하는 효과가 있다고 보고된 바 있다(Saarela *et al.*,

2000).

박테리옌은 유산균의 리보솜에 의해 합성되는 단백질로서 세포 외로 분비되는 항균물질이며, 항균작용은 박테리옌 생산 균주와 유사한 균종에 한해서 항균효과를 나타내는 것과 그람양성 및 음성의 부패세균이나 식중독균에 이르기까지 다양한 미생물의 증식을 억제할 수 있는 광범위한 스펙트럼을 보여주는 종류도 있다(Caplice and Fitzgerald, 1999). 박테리옌은 효소 활성을 저해하고 포자의 과도한 증식을 방해하며, 세포막에 존재하는 음이온 지질과 상호 반응하여 막에 구멍을 뚫어 양성자구동력(proton motive force)을 약화시킨다. 또한 세포막 전위 소실 및 ATP와 같은 세포 내 유용 물질을 유출시켜 항균작용을 나타낸다. 박테리옌은 체내 단백질 분해 효소에 의해 쉽게 분해되어 잔류성 없이 항균력을 나타내므로 건강에 도움을 주는 의약품 원료나 식품 제조에 이용함으로써 저장성을 연장시키고 품질을 향상시키는데 효과적인 천연물질이다. 박테리옌을 생산하는 유산균에 의해 대표적인 식중독균인 *L. monocytogenes*, *Salmonella*와 *S. aureus* 등을 제어할 수 있으며, 산이나 고압 하에서 병용 처리하게 되면 박테리옌의 항균효과를 상승시킬 수 있으므로 식품 산업에 있어 hurdle technology기법에도 널리 이용 가능하다(Vesković Moračanin *et al.*, 2014).

사위도우의 미생물학적 및 이화학적 특성

분리된 유산균을 이용하여 사위도우를 제조한 다음 발효 종료 후 도우 내 유산균수, pH, 산도 및 항균물질의 함량을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 사위도우 1 g당 *P. halophilus*

Table 4. Viable cell count, pH, titability, and antimicrobial substance content in sourdough after 24 h fermentation

Strains	Viable cell count (CFU/g)	pH	Total titratable acidity (%)	Lactic acid (mM)	Hydrogen peroxide ($\mu\text{g/ml}$)	Bacteriocin activity (AU/g)	
						<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
<i>Enterococcus faecium</i> SBP12	$6.7 \pm 1.2 \times 10^{8a}$	4.35 ± 0.07^d	0.71 ± 0.10^a	75.1 ± 4.7^a	2.4 ± 0.5^a	ND	ND
<i>Pediococcus halophilus</i> SBP20	$2.4 \pm 0.5 \times 10^{9ab}$	3.80 ± 0.13^{ab}	1.20 ± 0.06^b	114.0 ± 8.0^{de}	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus fermentum</i> SBP33	$4.3 \pm 0.2 \times 10^{9bc}$	3.84 ± 0.11^{ab}	1.18 ± 0.20^b	105.6 ± 3.4^{bcd}	5.9 ± 0.4^b	ND	ND
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SBP37	$2.5 \pm 1.1 \times 10^{9ab}$	3.75 ± 0.20^{ab}	1.29 ± 0.20^b	108.5 ± 5.9^{cd}	ND	64	16
<i>Pediococcus pentosaceus</i> SBP41	$3.0 \pm 3.4 \times 10^{9abc}$	3.90 ± 0.08^{bc}	1.08 ± 0.17^b	100.9 ± 1.4^{bc}	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus brevis</i> SBP49	$5.0 \pm 0.9 \times 10^{9bc}$	3.66 ± 0.05^a	1.33 ± 0.10^b	119.0 ± 0.9^c	6.7 ± 0.3^c	256	16
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SBP55	$6.1 \pm 3.5 \times 10^{9c}$	3.71 ± 0.13^{ab}	1.30 ± 0.04^b	97.5 ± 5.7^b	11.9 ± 0.4^d	128	128
<i>Enterococcus faecalis</i> SBP58	$9.7 \pm 2.6 \times 10^{8a}$	4.09 ± 0.06^c	0.82 ± 0.18^a	80.4 ± 4.9^a	3.1 ± 0.2^a	32	ND

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 Duncan's multiple range test.

ND, Not detected.

SBP20, *L. fermentum* SBP33, *L. mesenteroides* SBP37, *P. pentosaceus* SBP41, *L. brevis* SBP49 및 *L. acidophilus* SBP55의 균수는 10^9 CFU인 반면, *E. faecium* SBP12와 *E. faecalis* SBP58의 균수는 10^8 CFU으로 나타났다. 발효 전 사워도우의 pH는 6.02-6.28, 산도는 0.25-0.42%이었으나(결과 미제시), 발효 종료 후 균수가 10^9 CFU/g 이상 검출된 균주의 사워도우 pH는 4.00 이하로 나타났고 산도는 1.0% 이상으로 측정되었다. 사워도우 내 유산의 함량은 SBP20 및 SBP49로 발효시킨 경우 100 mM 이상 검출되어 다른 균주가 생산한 양보다 유의하게 높았다. 과산화수소의 함량을 측정했을 때 SBP55에 의해 발효시킨 경우 $11.9 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ 로 가장 높게 나타났으며, SBP33과 SBP49에 의해 발효된 경우는 이보다 다소 낮게 나타났다. 한편, SBP37로 발효시킨 사워도우 내 박테리오신의 활성은 *B. cereus*와 *S. aureus*에 대해서 각각 64 AU/g과 16 AU/g으로 나타났고, SBP49에 의해 발효된 경우는 각각 256 AU/g과 16 AU/g으로 나타났다. 또한 SBP55에 의해 생성된 박테리오신은 지시균주 모두에 대해 128 AU/g의 활성을 나타내었고, SBP58 균주의 박테리오신은 *S. aureus*에 대해 저해 효과를 나타내지 않았으나, *B. cereus*에 대해선 32 AU/g의 활성을 나타내었다. 이상과 같은 결과에서 볼 때, 사워도우 발효에 이용된 경우 유산균수가 많을수록 pH는 낮고, 산도는 높았으며, 생성된 항균물질의 양도 유의하게 높았다. 하지만 항균물질의 생산량과 항균활성은 MRS broth의 배양액으로부터 얻어진 양보다는 다소 적게 나타났으며, 이에 따라 항균활성도 비교적 낮은 것으로 확인되었다.

사워도우의 발효에 이용되는 유산균으로는 *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* 및 *Weissella* 속 등이

있으며, 이 중에서도 우점종은 *Lactobacillus*속으로써 발효 과정 동안 생성된 많은 양의 유산으로 인해 도우를 산성화시켜 독특한 향을 부여하고 유해균의 증식을 억제한다(Corsetti and Settanni, 2007). *Lactobacillus*속 중에서 편성 혹은 통성혐기성의 정상 및 이상 발효유산균들로 *Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. planatum* 및 *L. brevis* 등의 균종들이 사워도우 제조에 주로 이용된다(Gobbetti, 1998). 한편, 사워도우 발효에 관여하는 효모로는 *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Saturnispora*, *Torulaspora* 및 *Debaryomyces*속 등이 있고, 도우의 수화정도, 곡물의 양과 종류, 발효 온도에 따라 효모의 종류와 균수가 다양하다(Chavan and Chavan, 2011). 사워도우 제조 시 효모와 유산균 접종량은 1:100의 비율로 주로 이용되며, 제빵의 원료가 되는 사워도우의 관능학적 및 영양학적 가치는 발효스타터인 유산균과 효모의 생리활성에 의존한다(Gobbetti, 1998). 유산균은 영양요구성이 까다로운 균으로써 증식을 위해 다양한 영양원을 요구한다. 효모와 유산균의 혼합 발효에 의한 사워도우 제조 시 발효 과정 동안 효모가 원료로부터 아미노산, 펩타이드 및 각종 비타민류 등을 유리시킴으로써 유산균의 증식을 촉진한다(Gobbetti, 1998).

Hammes 등(2005)에 의하면, 일반적으로 발효가 끝난 사워도우 내 유산균수는 $1.0 \times 10^9 - 3.0 \times 10^9$ CFU/g 정도에 이르며, 효모 균수는 $1.0 \times 10^6 - 5.0 \times 10^7$ CFU/g 정도 검출된다고 하였다. 한편, 자연발효에 의해 제조된 사워도우로부터 분리된 유산균수는 $1.8 \times 10^4 - 10^8$ CFU/g인 반면, 효모수는 $1.0 \times 10^1 - 2.3 \times 10^2$ CFU/g 정도로 측정되었고, 사워도우의 pH는 3.36-3.52로 나타났다(Luangsakul et al., 2009). Arendt 등(2007)은 사워도우의 pH가 3.5-4.3 정도인데 pH는 사워도우 제조과

정 및 사용한 스타터 종류에 따라 다양하다고 하였다. *Kluyveromyces marxianus*와 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 혹은 *Lactobacillus helveticus*로 사워도우를 제조한 경우 유산의 농도는 사워도우 1g 당 3.5g 정도였고, 유산균을 혼합한 경우에는 이보다 더 많은 양의 유산이 생성되었다(Plessas *et al.*, 2008). 한편, 김치로부터 분리된 *Leuconostoc citreum* HO12와 *Weissella koreensis* HO20을 이용하여 사워도우를 제조한 결과, 발효 초기 pH 6.38에서부터 24시간 발효 직후 pH 4.39로 감소되었고, 산도는 12시간 후부터 급격하게 증가되었다. pH는 20시간 이후부터 거의 일정하게 유지되었으나, 산도는 26시간까지 꾸준히 증가되었다. 유산균 초기 균수 6.4 log cycle에서부터 발효 종료 직후 *L. citreum*은 9.2 log cycle이고, *W. koreensis*는 9.4 log cycle까지 증가되었다(Choi *et al.*, 2012).

Paramithiotis 등(2006)은 사워도우 스타터 효모로 *S. cerevisiae*와 각종 유산균으로 발효시켰을 때, *L. brevis* ACA-DC 3366은 효모와의 혼합 배양에 의해 최종 균수와 최대 증식속도가 감소된 반면, *L. sanfranciscensis* ACA-DC 3366의 증식속도는 유의하게 증가하였다. 또한 *E. faecium* ACA-DC 3397과 *Lactobacillus paralimentarius* ACA-DC 3414는 혼합 배양 시 유산균의 증식이 단독 배양에 비해 다소 감소되었고, *W. cibaria* ACA-DC 3385와 *P. pentosaceus* ACA-DC 3391의 증식에는 유의할 만한 변화가 없었다. 한편, 사워도우 원료 혼합 후 초기 pH와 산도는 각각 5.99와 1.4%였고, 효모 단독 배양 시의 pH와 산도는 4.86과 2.4%로 나타났다. 하지만 유산균과 혼합 배양 시 pH는 급격하게 감소하여 3.46-3.87에 이르렀고, 산도는 6.4-10.9%로 측정되었다. 게다가 유산균 단독 배양 시 유산의 생산량을 측정된 결과, *E. faecium*은 0.04 mM/g, *L. sanfranciscensis*, *L. brevis* 및 *L. paralimentarius*는 0.09 mM/g 정도였으며, 효모와의 혼합 배양 시 유산의 생산량은 대부분의 유산균에 의해 유의한 변화가 없었으나, *S. cerevisiae*와 *L. paralimentarius*의 혼합 배양 시에는 다소 증가되어 0.11 mM/g으로 나타났다. *Torulopsis holmill*은 *L. sanfranciscensis*와 혼합 배양 시 도우 산성화를 개선시킬 수 있었던 반면, *S. cerevisiae*는 *L. sanfranciscensis*와 *L. plantarum*에 의해 산 생성량이 증가되었다(Spicher *et al.*, 1981).

사워도우 원료인 곡물가루 내 함유된 가용성 당으로부터 유산균은 에너지를 생산하며, 사워도우 내 유산균수, pH, 산도 및 유산의 생산량은 스타터인 균종과 원료 내에 함유된 당의 종류에 영향을 받는다. 유산균 발효 과정을 거치는 동안 낮은 pH와 높은 산도에 의해 사워도우의 가스 생성능이 높아지고 부피 유지 능력이 향상되는 것으로 알려져 있다(Rocha and

Malcata, 2012). 유산균으로 발효시킨 사워도우는 제빵의 가공성과 피틴산 가수분해를 통한 영양학적 가치를 높이고, 빵의 부피, 부스러짐 정도 및 독특한 풍미 생성으로 인한 관능학적 품질도 향상될 뿐만 아니라 특히 이상발효유산균은 부패균이나 식중독균을 제어할 수 있는 항균물질도 다양하게 생산하여 빵의 저장성도 연장된다(De Vuyst and Neysens, 2005).

사워도우 유산균 중에서 박테리오신을 생산하는 균종으로는 *Lactobacillus bavaricus* MI401 (bavaricin A), *L. plantarum* ST31 (plantaricin ST31) 및 *L. sanfranciscensis* C57 (BLIS C57) 등이 알려져 있다(Gobbetti *et al.*, 2005). Corsetti 등(2004)은 70종의 사워도우로부터 437종의 유산균을 분리하였고, 이 중에서 박테리오신을 생산하는 5균주(*L. pentosus* 2MF8, 8CF, *L. plantarum* 4DE, 3DM 및 *Lactobacillus* sp. CS1)를 동정하였다. 게다가 발효식품에서 분리된 *Lactobacillus amylovorus* DCE 471과 *L. lactis* M30도 사워도우 제조에 유용한 박테리오신을 생산하는 유산균이다. 이들이 생산하는 박테리오신은 열이나 산에서 견딜 수 있고 *Bacillus*, *Staphylococcus* 및 *Listeria* 속 유해세균의 증식 저해에도 효과적이다(Corsetti *et al.*, 2004). Settanni 등(2005)의 보고에 따르면, *L. lactis* ssp. *lactis* M30은 lacticin 3147이라는 박테리오신을 생산하는 것으로 확인되었고, 이 균주를 사워도우 제조 시 이용한 결과, 80 AU/ml의 박테리오신으로 *L. plantarum* 20의 증식을 억제할 수 있었던 반면, *L. lactis* Q13의 사워도우 스타터의 증식에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 한편, SBP37, SBP49, SBP55 및 SBP58 균주들이 사워도우 내에 생산한 박테리오신은 친수성 용매 보다는 유기 용매에서 활성이 나타났으므로 이들은 소수성 박테리오신으로 추정되며, Kawai 등(1994)도 *Lactobacillus gasseri* LA39가 소수성이 강한 박테리오신(gasserin A)을 생산한다고 보고한 바 있다.

저장기간 동안 사워도우 내 식중독균수 변화

사워도우 제조 시 *B. cereus* ATCC 11778과 *S. aureus* ATCC 6538의 초기 균수를 10^6 CFU/g에 맞춰 각각 접종한 후 발효시킨 다음 4°C에서 7일간 저장하는 동안 식중독균수 감소율을 나타낸 결과는 Table 5와 같다. 사워도우 제조 직후 *B. cereus*에 대한 항균력은 *L. brevis* SBP49에 의해 $47.2 \pm 3.3\%$ 로 가장 높게 나타났으며, *E. faecalis* SBP58에 의해선 $30.1 \pm 5.1\%$, *L. acidophilus* BP55에 의해선 $25.8 \pm 4.0\%$ 로 저해되었다. 게다가 *S. aureus*에 대해서도 SBP49의 항균효과($56.7 \pm 4.7\%$)가 유의하게 높았으며, SBP55와 SBP58 균주에 의해서도 30% 이상 저해되었다. 한편, 4°C에서 7일간 저장하는 동안 *B. cereus*와 *S. aureus*의 균수는 유의한 변화 없이 거의 일정하게 유지되

Table 5. Inhibition of *Bacillus cereus* ATCC 11778 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 in sourdough containing antimicrobial substances obtained from the tested strains

Strain	Indicator microorganism	Inhibition (%)				
		Storage time (days)				
		0	1	3	5	7
<i>Enterococcus faecium</i> SBP12	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	2.9±0.5 ^a	3.0±0.4 ^a	3.2±1.2 ^a	2.3±0.7 ^a	3.9±1.0 ^a
<i>Pediococcus halophilus</i> SBP20		1.6±0.4 ^a	2.4±0.5 ^a	1.9±1.1 ^a	2.8±0.9 ^a	3.3±1.2 ^a
<i>Lactobacillus fermentum</i> SBP33		7.1±2.4 ^a	9.1±1.4 ^a	10.0±2.4 ^a	8.8±4.1 ^a	11.7±5.3 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SBP37		20.4±3.6 ^a	18.5±4.4 ^a	16.6±8.0 ^a	22.4±3.3 ^a	23.7±5.0 ^a
<i>Pediococcus pentosaceus</i> SBP41		1.4±0.2 ^{ab}	0.9±0.1 ^a	1.9±0.5 ^{ab}	2.1±0.8 ^b	1.7±0.3 ^{ab}
<i>Lactobacillus brevis</i> SBP49		47.2±3.3 ^{ab}	42.1±1.6 ^a	50.1±4.2 ^b	49.2±2.8 ^b	52.8±5.4 ^b
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SBP55		25.8±4.0 ^a	28.5±5.1 ^a	29.7±0.8 ^a	23.1±1.6 ^a	29.0±5.0 ^a
<i>Enterococcus faecalis</i> SBP58		30.1±5.1 ^{ab}	26.7±1.3 ^a	29.4±2.3 ^{ab}	28.2±3.0 ^{ab}	33.1±2.8 ^b
<i>Enterococcus faecium</i> SBP12		6.4±1.2 ^a	8.2±2.0 ^a	7.6±3.1 ^a	10.4±1.6 ^a	8.1±2.8 ^a
<i>Pediococcus halophilus</i> SBP20		3.7±0.8 ^a	2.6±0.5 ^a	4.4±1.9 ^a	5.0±2.1 ^a	3.6±1.7 ^a
<i>Lactobacillus fermentum</i> SBP33	12.8±3.4 ^a	15.4±1.6 ^{ab}	13.5±0.9 ^a	18.4±2.5 ^b	15.1±1.3 ^{ab}	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SBP37	29.4±5.0 ^a	25.2±4.2 ^a	26.7±1.6 ^a	26.8±1.1 ^a	30.9±1.7 ^a	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> SBP41	5.8±0.6 ^{ab}	4.1±0.3 ^a	3.5±1.1 ^a	6.9±1.5 ^b	7.2±2.4 ^b	
<i>Lactobacillus brevis</i> SBP49	56.7±4.7 ^a	60.9±4.4 ^a	57.1±3.6 ^a	61.4±3.7 ^a	59.7±4.6 ^a	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SBP55	37.1±5.9 ^a	39.5±4.5 ^a	42.5±6.3 ^a	41.1±0.9 ^a	38.7±2.4 ^a	
<i>Enterococcus faecalis</i> SBP58	34.3±2.2 ^a	31.5±0.5 ^a	30.8±1.6 ^a	29.8±8.1 ^a	33.5±4.5 ^a	

Data are means ± standard deviation from triplicate determinations and means with the different letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

었다.

일반적으로 빵은 부패세균이나 곰팡이에 오염되기 쉽다. 항균이나 항곰팡이 활성을 가진 유산균으로 사워도우를 이용하여 빵을 발효시킬 경우 부패를 억제하여 빵의 저장성을 향상시키는데 효과적일 뿐만 아니라 빵에 사용되는 방부제의 사용량을 줄여 보존료로 인한 독성 발생 위험을 감소시킬 수 있다(Messens and De Vuyst, 2002). Spicher와 Mastik (1988)는 사워도우 유산균이 밀가루 내 부패세균의 증식을 저해한다고 보고한 바 있다. 특히, 정상발효유산균은 이상발효유산균에 비해 대장균의 저해효과가 더 뛰어나다고 하였으며(Barber and Baguena, 1989), Gänzle 등(2000)은 *L. reuteri* LTH 2584로부터 항균물질을 분리정제 하였고, *Bacillus subtilis*와 같은 곡물에서 주로 유래하는 식품 부패세균의 증식을 억제한다고 보고하였다. 대표적인 사워도우 제조용 유산균인 *L. sanfranciscensis*도 사워도우 효모의 증식에는 영향을 주지 않은 반면, *B. subtilis*의 증식을 저해하는 것으로 알려졌다(Corsetti et al., 1996). *L. sanfranciscensis* CB1은 *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* 및 *Monelia*와 같은 빵의 부패에 관여하는 곰팡이에 대한 항진균효과가 있는 것으로 밝혀졌다(Corsetti et al., 1998). 유기산의 항균효과는 비해리된 산의 양

과 소수성에 의존하며 친유성의 비해리된 형태의 양은 pH가 감소할수록 증가하기 때문에 대부분의 유기산은 pH가 낮을수록 항균효과가 커진다(Theron and Lues, 2010). Katina 등(2002)은 *L. plantarum* VTT E-78076, *P. pentosaceus* VTT E-90390 및 *L. brevis*는 *Bacillus*속의 포자 증식과 발아 억제 효과가 있어 산도가 높은 사워도우를 제조하여 7일간 저장하는 동안 빵의 부패를 효과적으로 억제할 수 있었다고 하였다. 김치로부터 분리하여 사워도우 스타터로 이용된 *W. koreensis* HO20의 *B. subtilis* ATCC 6051에 대한 항균작용을 조사한 결과, 대표적인 빵 부패균인 *B. subtilis*을 효과적으로 저해하였다(Choi et al., 2012). Messens과 De Vuyst (2002)는 사워도우 유산균이 생산하는 항균물질을 확인하였고, 식품의 가공 및 저장상태나 식품의 성분에 의해 항균효과 저하되지 않고 활성을 유지할 수 있어야 한다고 하였다. Corsetti와 Settanni (2007)에 의하면, 빵을 만드는 동안 환경이나 원료에서 유래한 bacilli와 clostridia와 같은 세균에 의해 주로 오염되며, 이들은 높은 산도 하에서 증식이 억제된다. 특히 *Bacillus*속은 빵에 로프(rope)를 형성하여 부패시키거나, 균수가 10^5 CFU/g 이상 되면 식중독을 유발할 수도 있으므로 부패를 억제시키기 위해 일반적으로 프로피온산류의 보존제를 사용하게 된다. 화학적

합성품의 보존료를 과량 사용하게 되면 독성 유발 가능성이 높으므로 부패에 관여하는 유해세균을 제어할 수 있는 유산균으로 사워도우를 제조하여 제빵에 이용할 경우 부패균의 증식을 막아 저장성을 향상시킬 수 있을 것이다. 특히 위산이나 담즙산염 및 항생제에 대한 내성이 강하고 장내 상피세포에 대한 부착능이 높으며 다양한 항균물질 생산으로 인해 광범위한 항균 스펙트럼을 나타내는 프로바이오틱 유산균을 이용한다면 그 이용가치는 더욱 더 높아질 것이다. 본 연구에서는 프로바이오틱 균주로의 이용 가능성이 높은 *L. brevis* SBP49와 *L. acidophilus* SBP55를 스타터로 활용한 경우 사워도우 내 높은 산도와 박테리옌을 생산함으로써 빵에서 주로 유래하는 식중독균인 *B. cereus*와 *S. aureus*를 제어하는데 효과적임을 확인하였다.

적 요

재래식 된장으로부터 분리된 유산균은 형태학적, 생화학적 특성과 당 발효능 및 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 *Enterococcus faecium* SBP12, *Pediococcus halophilus* SBP20, *Lactobacillus fermentum* SBP33, *Leuconostoc mesenteroides* SBP37, *Pediococcus pentosaceus* SBP41, *Lactobacillus brevis* SBP49, *Lactobacillus acidophilus* SBP55 및 *Enterococcus faecalis* SBP58로 동정되었다. SBP20, SBP33, SBP49와 SBP55 균주는 인공 위액과 담즙액 내에서 6 log cycle 이상 생존을 유지하였으나, SBP12와 SBP58은 낮은 pH 하에서 2시간만에 균수가 급격하게 감소되었다. 특히, SBP49와 SBP55는 HT-29 세포에 대한 부착능이 높고, 항생제에 대한 저항성이 크며, *Bacillus cereus* ATCC 11778과 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538의 식중독균에 대한 항균활성을 나타내었으므로, 이 두 균주는 프로바이오틱 선발 기준에 적합한 것으로 추정된다. 게다가 SBP49와 SBP55를 이용하여 사워도우를 제조한 결과, 발효 직후 도우 내 pH, 산도 및 유산균수에는 유의한 차이가 없었으나, SBP49는 많은 양의 유산을 생산한 반면, SBP55는 과산화수소를 더 많이 생산하였다. SBP49와 SBP55 유산균은 유산과 과산화수소뿐만 아니라 박테리옌 등의 항균물질을 생산하므로 사워도우 내 존재하는 식중독균 저해에 효과적이었다.

References

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 Dal Bello, F. 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol.* **24**, 165-174.

Argyri, A.A., Zoumpoulou, G., Karatzas, K.A.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z., and Tassou, C.C. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.* **33**, 282-291.

Ashraf, R. and Shah, N.P. 2011. Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *Int. Food Res. J.* **18**, 837-853.

Barber, S. and Bagnuena, R. 1989. Microflora of the sourdough of wheat flour bread. XI. Changes during fermentation in the microflora of sourdoughs prepared by multi-stage process and of bread doughs. *Rev. Agroquim. Technol. Aliment.* **29**, 478-491.

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**, 493-496.

Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **50**, 131-149.

Cebrian, R., Baños, A., Valdivia, E., Perez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., and Maqueda, M. 2012. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiol.* **30**, 59-67.

Chavan, R.S. and Chavan, S.R. 2011. Sourdough Technology- a traditional way for wholesome foods: a review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **10**, 170-183.

Cho, K.M. and Seo, W.T. 2007. Bacterial diversity in Korean traditional soybean fermented foods (doenjang and ganjang) by 16S rRNA gene sequence analysis. *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 320-324.

Choi, H.J., 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.

Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., and Damiani, P. 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CBI. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 253-256.

Corsetti, A., Gobbetti, M., and Smacchi, E. 1996. Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiol.* **13**, 447-456.

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.
- De Vuyst, L. and Vancanneyt, M.** 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **24**, 120–127.
- Ehmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J., and Vogel, R.F.** 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 966–975.
- Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365–378.
- Gänzle, M.G., Hölzel, A., Walter, J., Jung, G., and Hammes, W.P.** 2000. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4325–4333.
- Gilliland, S.E.** 1969. Enzymatic determination of residual hydrogen peroxide in milk. *J. Dairy Sci.* **52**, 321–324.
- Gobbetti, M.** 1998. The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci. Technol.* **9**, 267–274.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., and Di Cagno, R.** 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 57–59.
- Hammes, W.P., Brandt, M.J., Francis, K.L., Rosenheim, M., Seitter, F.H., and Vogelmann, S.** 2005. Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 4–11.
- Heller, J.K.** 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 374S–379S.
- 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.
- Jeong, D.W., Kim, H.R., Jung, G.S., Han, S.H., Kim, C.T., and Lee, J.H.** 2014. Bacterial community migration in the ripening of Doenjang, a traditional Korean fermented soybean food. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 648–660.
- Kashket, E.R.** 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 233–244.
- 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.
- Kawai, Y., Saito, T., Toba, T., Samant, S.K., and Itoh, T.** 1994. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1218–1221.
- Lorca, G.L., Wadstrom, T., Valdez, G.F., and Ljungh, A.** 2001. *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* in vitro. *Curr. Microbiol.* **42**, 39–44.
- Luangsakul, N., Keeratipibul, S., Jindamorakot, S., and Tanasupawat, S.** 2009. Lactic acid bacteria and yeasts isolated from the starter doughs for Chinese steamed buns in Thailand. *LWT-Food Sci. Technol.* **42**, 1404–1412.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Christos, M., Kalantzopoulos, G., Pot, B., and Tsakalidou, E.** 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolates from dairy products. *Int. Dairy J.* **16**, 189–199.
- Messens, W. and De Vuyst, L.** 2002. Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs – a review. *Int. J. Food Microbiol.* **72**, 31–43.
- Mundt, J.O.** 1986. *Lactobacillus*, pp. 577–592. In Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, MS, USA.
- Oh, Y.J. and Jung, D.S.** 2015. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolation from Omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea. *LWT-Food Sci. Technol.* **63**, 437–444.
- Otero, M.C. and Nader-Macias, M.E.** 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **96**, 35–46.
- Ouwehand, A.C. and Salminen, S.** 2003. *In vitro* adhesion assays for probiotics and their *in vivo* relevance: a review. *Microb. Ecol. Health D.* **15**, 175–184.
- Paramithiotis, S., Gioulatos, S., Tsakalidou, E., and Kalantzopoulos, G.** 2006. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochem.* **41**, 2429–2433.
- Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Marchant, R., and Banat, I.M.** 2008. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresource Technol.* **99**, 5951–5955.
- Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K., and Adams, M.C.** 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* **43**, 1–7.
- Rocha, J.M. and Malcata, F.W.** 2012. Microbiological profile of maize and rye flours, and sourdough used for the manufacture of traditional Portuguese bread. *Food Microbiol.* **31**, 72–88.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T.** 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* **84**, 197–215.
- Salminen, S., Isolauri, E., and Salminen, E.** 1996. Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* **5**, 53–56.
- Servin, A.L. and Coconnier, M.H.** 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**, 741–754.
- 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.
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martine-Gonzalez, B., Eriotou E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., and Mentis, A.** 2004. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strains Shirota. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 518–526.
- Shah, N.P. and Ravula, R.R.** 2002. Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt

- and probiotic bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.* **55**, 127-131.
- Shokryazdan, P., Sieo, C.C., Kalavathy, R., Liang, J.B., Alitheen, N.B., Jahromi, M.F., and Ho, Y.W.** 2014. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed. Res. Int.* **2014**, 1-16.
- Soccol, C.R., De Souza Vandenberghe, L.P., Spier, M.R., Medeiros, A.B.P., Yamaguichi, C.T., De Dea Lindner, J., Pandey, A., and Thomaz-Soccol, V.** 2010. The potential of probiotics: a review. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 413-434.
- Spicher, G. and Mastik, G.** 1988. Interactions between the lactobacilli of sourdough and flour microflora. *Getreide Mehl. Brot.* **42**, 338-342.
- Spicher, G., Rabe, E., Sommer, R., and Stephan, H.** 1981. The microflora of sourdough. XIV. Communication: About the behavior of homofermentative sourdough bacteria and yeasts in mixed culture. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **173**, 291-296.
- Šuškovič, J., Kos, B., Beganovič, J., Pavunc, A.L., Habjanič, K., and Matošič, S.** 2010. Antimicrobial activity-the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 296-307.
- Theron, M.M. and Lues, J.F.R.** 2010. Mechanisms of microbial inhibition, pp. 117-150. In *Organic acids and food preservation*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Tuomola, E.M. and Salminen, S.J.** 1998. Adhesion of some probiotic and diary *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **41**, 45-51.
- Velez, M.P., De Keersmaecker, S.C., and Vanderleyden, J.** 2007. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**, 140-148.
- Veskovič Moračanin, S., Dukič, D.A., and Memiši, N.R.** 2014. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria-a review. *APTEFF* **45**, 271-283.
- Vogel, R.F., Böcker, G., Stolz, P., Ehrmann, M., Fanta, D., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., Schleifer, K.H., and Hammes, W.P.** 1999. Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* **44**, 223-229.