

(52) CPC특허분류

A21D 8/04 (2013.01)

C12R 1/225 (2013.01)

(72) 발명자

심상민

경기도 안양시 동안구 임곡로80번길 33, 116동
1401호 (비산동, 임곡주공아파트)

정문영

서울특별시 관악구 청룡5길 3, 204호 (봉천동)

송성봉

서울특별시 강남구 논현로34길 15, 1동 305호 (도
곡동, 영산빌리지)

김병철

서울특별시 동작구 장승배기로4길 9, 111동 104호
(상도동, 상도 더샵 아파트)

서진호

서울특별시 서초구 방배로 239, 101동 903호 (방배
동, 현대멤피스아파트)

한남수

충청북도 청주시 흥덕구 풍년로 56, 804동 1503호
(가경동, 뜨란채8단지아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

말토오스 대사 능력이 우수한 락토바실러스 센프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*) SPC-SNU 70-4 (KCTC 12779BP).

청구항 2

말토오스 대사 능력이 우수한 락토바실러스 센프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*) SPC-SNU 70-4 (KCTC 12779BP)를 밀가루에 첨가한 후 발효시켜 제조된 것을 특징으로 하는 제빵용 반죽물.

청구항 3

말토오스 대사 능력이 우수한 락토바실러스 센프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*) SPC-SNU 70-4 (KCTC 12779BP)를 밀가루에 첨가한 후 발효시키고, 베이킹(baking)하여 제조된 것을 특징으로 하는 빵.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 한국 전통 누룩으로부터 분리한 제빵용 신규의 토종 천연유산균에 관한 기술로서, 더욱 구체적으로는 한국 전통 누룩으로부터 분리한 신규의 토종 천연유산균인 락토바실러스 센프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*) SPC-SNU 70-4 (KCTC 12779BP)에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 사워도우(Sourdough)는 산성반죽이라고도 하며, 독특한 풍미가 있다. 사워도우를 이용한 발효법은 일반적으로 밀가루, 물 및 호밀가루를 섞어서 그 안에 내재된 미생물들을 활성화시켜 사워도우 스타터(Sourdough starter)를 만들고, 그 일부를 반죽에 사용하고 나머지는 다음 반죽 시 사용을 위해 보관해두는 과정을 반복하는 것이다. 이러한 사워도우를 이용한 발효법은 발효과정에서 효모와 유산균이 상호적으로 관여하며, 빵의 부피증가, 풍미향상, 유통기한 연장 등 제빵 특성에 여러 장점을 준다.

[0003] 한편, 사워도우의 발효는 미생물에 의해 큰 영향을 받으며, 특히 주 발효 미생물인 유산균과 효모가 단독 혹은 이 두 미생물 모두가 발효에 작용하여 사워도우가 만들어지는 것으로 알려져 있다. 신맛의 주원인은 유산균으로부터 생성된 젖산인데, 사워도우의 기본이 되고, 효모에 의한 알코올 발효 대사산물도 빵에 풍미를 부여하고, 기호성을 향상시킨다. 사워도우 발효와 관련 있는 유산균으로는 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*) 속, 페디오코쿠스(*Pediococcus*)속, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속, 엔테로코커스(*Enterococcus*) 속, 류코노스톡(*Leuconostoc*) 속, 마이셀라(*Weissella*) 속 등이 알려져 있다.

[0004] 한편, 자연 발효법에 의하여 제조되는 전통적인 사워도우 빵 (sourdough bread)은 다양한 종류의 효모와 세균으로 혼합되어 있다. 이에 따라, 적절치 못한 작업 환경에서는 종종 다른 미생물에 의한 오염으로, 풍미가 나빠지거나, 산패취 발생 등의 문제점이 발생한다. 또한, 공간과 시간적 차이에 의해 균등한 품질의 제품을 재현하는데에도 어려움이 있다.

[0005] 이와 같은 문제점을 해결하고자, 자연 발효빵의 오염 기회 회피와 균등한 수준의 제품 확보를 위하여, 기능성과 안정성이 확보된 미생물 스타터(starter)를 도우에 첨가하는 발효법이 개발되었다.

[0006] 한국의 일부 제빵 업체에서는 제품의 차별화와 고급화를 추구하기 위해 수입한 스타터(starter)를 사용하고 있다. 그러나, 수입된 종균은 계대 배양 도중, 균주 분포가 쉽게 변화하여, 제빵 산업 현장에서 다루기가 쉽지 않

으며, 유기산을 다량 생성하는 락토바실러스 센프란시스센시스(*L. sanfranciscensis*) 균주가 우점종으로 포함되어 있어, 신맛 강도 조절의 어려움 등 현실적인 여러 문제를 가지고 있다. 또한, 수입한 스타터의 경우에는 생산국의 기후와 제빵 특성에 맞게 선발되었기 때문에, 국내 제빵 현실에 적합하지 않은 품질 특성을 갖고 있기도 하다. 따라서, 한국인의 기호도에 적합하면서도, 제빵현장에 안정적으로 사용할 수 있는 스타터의 개발이 필요한 실정이다.

[0007]

선행기술문헌

특허문헌

[0008]

(특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제1074340호 (등록일자: 2011.10.11)에는, 거봉 유래의 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) JKK091002 (기탁번호: KCCM 11056P) 및 이를 함유하는 제빵용 반죽에 대한 기술이 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제1410244호 (등록일자: 2014.06.16)에는, 글 유래의 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) OKK110427(기탁번호: KCCM11256P) 및 이를 함유하는 제빵용 반죽에 대한 기술이 기재되어 있다.

(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제1273268호 (등록일자: 2013.06.04)에는, 락토바실러스 플렌탄엄 또는 락토바실러스 브레비스를 탈지유에 배양하여 탈지유 젖산균 배양액을 제조하는 단계; 및 상기 탈지유 젖산균 배양액을 밀가루와 보릿가루를 혼합한 혼합가루, 물 및 활성이스트를 포함하는 혼합물에 접종하여 18 내지 22℃의 온도로 발효시키는 단계를 포함하는 보리사워도우의 제조방법에 대한 기술이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009]

본 발명은 한국 전통 누룩으로부터 분리한 신규한 천연유산균을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010]

상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 제1형태로, 락토바실러스 센프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*) SPC-SNU 70-4 (KCTC 12779BP)를 제공하는 것을 특징으로 한다. 상기 락토바실러스 센프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*) SPC-SNU 70-4 (KCTC 12779BP)는 누룩으로부터 분리한 신규한 천연유산균으로서, 산을 적게 생산하고, 말토오스 이용능이 우수하다. 이에 따라, 상기 유산균이 적용된 빵은 산미가 적당하며, 기호도가 우수하다.

[0011]

한편, 본 발명은 제2형태로, 락토바실러스 센프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*) SPC-SNU 70-4 (KCTC 12779BP)를 밀가루에 첨가한 후 발효시켜 제조된 것을 특징으로 하는 제빵용 반죽물을 제공한다. 누룩으로부터 분리한 신규한 천연유산균인 락토바실러스 센프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*) SPC-SNU 70-4 (KCTC 12779BP)가 첨가된 밀가루 반죽은 유산균의 성장 및 대사가 활발하여 발효시간이 짧고, 가스 발생력이 우수하여 제빵용으로 적합하다.

[0012]

한편, 사워도우(sour dough)를 제조함에 있어서, 유산균이 지나치게 증식하게 되면 유산균은 젖산을 과량 생산하여 산미가 강해질 뿐만 아니라, 효모균의 증식에 필요한 영양원을 먼저 사용함으로써 효모의 생육을 억제한다. 반면, 초기 효모수가 지나치게 많으면 유산균 첨가에 의한 효과는 낮아진다. 따라서, 기호도가 우수한 사워도우를 제조하기 위해서는 발효 중 적절한 수준의 효모 및 유산균의 생균수 확보가 매우 중요하다. 이를 위해서는 경쟁관계의 효모와 유산균보다는 공생적으로 성장하는 효모와 유산균 균주를 평균적으로 사용하는 것이 필요하다.

[0013]

본 발명의 누룩으로부터 분리한 신규한 천연유산균인 락토바실러스 센프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*) SPC-SNU 70-4 (KCTC 12779BP)는 산 생성량이 적고 말토오스 이용능이 우수하여 생장이 빠르

다는 특징이 있다. 상기와 같은 특징이 있는 상기 천연유산균을 반죽에 적용하면 효모와 유산균이 공생적으로 성장하여, 비용적이 크고, 식감이 좋으며 우수한 풍미를 가지는 빵을 제조할 수 있다. 즉, 우리나라 전통의 누룩으로부터 분리된 유산균을 이용함으로써, 기존의 수입 종균을 이용한 경우보다 한국인의 입맛에 적합한 빵을 제조할 수 있는 것이다.

[0014] 한편, 본 발명은 제3형태로, 락토바실러스 센프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*) SPC-SNU 70-4 (KCTC 12779BP)를 밀가루에 첨가한 후 발효시키고, 베이킹(baking)하여 제조된 것을 특징으로 하는 빵을 제공한다. 상기와 같이 제조된 빵은 비용적이 크고, 경도가 낮으며 노화 속도가 느려 저장성이 우수하다. 또한, 부드럽고, 달콤한향, 버터향, 과일향, 마일드한 향 등 기호도가 우수한 향기 성분을 발산하여 풍미가 좋으며, 기호도가 우수하다.

[0015] 상기 본 발명의 제3형태에 있어서, 상기 베이킹(baking)은 굽는 것을 의미한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 한국 전통 누룩으로부터 분리한 신규의 토종 천연유산균인 락토바실러스 센프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*) SPC-SNU 70-4 (KCTC 12779BP)를 제공한다.

[0017] 상기 신규한 천연유산균을 이용한 제빵용 반죽물은 적정한 수준의 효모 및 유산균의 생균수가 확보되어 가스 발생력이 우수하다. 또한, 상기 신규한 천연유산균이 첨가된 밀가루 반죽으로 제조된 빵은 비용적이 크고, 경도가 낮으며, 부드러워 식감이 우수하고, 기호도가 우수한 향기 성분을 발산하여 한국인의 입맛에 적합하다.

[0018]

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 누룩, 밀가루, 천연종 및 호밀로부터 분리한 미생물들의 동정결과를 보여준다.

도 2는 천연종으로부터 분리한 균주들에 대해, 락토바실러스 센프란시스센시스에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동한 결과이다.

도 3은 천연종으로부터 분리한 균주들에 대해, 락토바실러스 브레비스에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동한 결과이다.

도 4는 분리한 효모들에 대해, 사카로마이세스 세레비지에에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동한 결과이다.

도 5는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 센프란시스센시스 균주들의 최대 젖산 생성량 비교 그래프이다.

도 6은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 센프란시스센시스 균주 중 그룹 1의 발효 프로파일이다.

도 7은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스의 내산성을 확인한 결과이다.

도 8은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스의 말토오스 이용능을 확인한 결과이다.

도 9는 천연종으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 01435의 산 종류에 따른 내산성을 확인한 결과이다.

도 10은 대조군 (상업적 이스트가 적용된 빵) 및 분리효모 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 01435가 적용된 빵의 사진이다.

도 11은 천연종으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 01435가 첨가된 본종의 가스 발생력을 확인한 그래프이다.

도 12는 천연종으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 01435가 적용된 빵의 노화 속도를 확인한 결과이다.

도 13은 천연종으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 01435가 적용된 빵의 향기성분을 정량적 수치로 비교한 결과이다.

도 14는 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. curvatus* KCCM40715)가 적용된 빵, 분리균주 (*L.*

curvatus 104)가 적용된 빵의 사진이다.

도 15는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 104가 적용된 본종의 가스 발생력을 확인한 결과이다.

도 16은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 104가 적용된 빵의 노화 속도를 확인한 결과이다.

도 17은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 104가 적용된 빵의 향기성분을 정량적 수치로 비교한 결과이다.

도 18은 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. brevis* KACC 11433)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. brevis* 149)가 적용된 빵의 사진이다.

도 19는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) 149가 적용된 본종의 가스 발생력을 확인한 결과이다.

도 20은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) 149가 적용된 빵의 노화 속도를 확인한 결과이다.

도 21은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) 149가 적용된 빵의 향기성분을 정량적 수치로 비교한 결과이다.

도 22는 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. sanfranciscensis* KACC 12431)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. sanfranciscensis* 142)가 적용된 빵의 사진이다.

도 23은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 샌프란시스센시스(*L. sanfranciscensis*) 142가 적용된 본종의 가스 발생력을 확인한 결과이다.

도 24는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 샌프란시스센시스(*L. sanfranciscensis*) 142가 적용된 빵의 노화 속도를 확인한 결과이다.

도 25는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 샌프란시스센시스(*L. sanfranciscensis*) 142가 적용된 빵의 향기성분을 정량적 수치로 비교한 결과이다.

도 26은 상업적 이스트만 적용된 빵 (control), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 커바투스 104 (E set)가 적용된 빵, 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 브레비스 149 (F set)가 적용된 빵, 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 샌프란시스센시스 142 (G set)가 적용된 빵, 사카로마이세스 세레비지에 01435, 락토바실러스 커바투스 104, 락토바실러스 브레비스 149 및 락토바실러스 샌프란시스센시스 142 (H set)가 적용된 빵의 사진이다.

도 27은 상업적 이스트만 적용된 본종 (control), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 커바투스 104 균주가 적용된 본종 (E set 적용 본종), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 브레비스 149 균주가 적용된 본종 (F set 적용 본종), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 샌프란시스센시스 142 균주가 적용된 본종 (G set 적용 본종), 사카로마이세스 세레비지에 01435, 락토바실러스 커바투스 104 균주, 락토바실러스 브레비스 149 균주 및 락토바실러스 샌프란시스센시스 142 균주가 적용된 본종 (F set 적용 본종)의 가스 발생력을 확인한 결과이다.

도 28은 상업적 이스트만 적용된 빵 (control), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 커바투스 104 균주가 적용된 빵 (E set 적용 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 브레비스 149 균주가 적용된 빵 (F set 적용 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 샌프란시스센시스 142 균주가 적용된 빵 (G set 적용 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435, 락토바실러스 커바투스 104 균주, 락토바실러스 브레비스 149 균주 및 락토바실러스 샌프란시스센시스 142 균주가 적용된 빵 (F set 적용 빵)의 노화 속도를 확인한 결과이다.

도 29는 상업적 이스트만 적용된 빵 (control), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 커바투스 104 균주가 적용된 빵 (E set 적용 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 브레비스 149 균주가 적용된 빵 (F set 적용 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 샌프란시스센시스 142 균주가 적용된 빵 (G set 적용 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435, 락토바실러스 커바투스 104 균주, 락토바실

러스 브레비스 149 균주 및 락토바실러스 샌프란시스코시스 142 균주가 적용된 빵 (F set 적용 빵)의 향기성분을 정량적 수치로 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명의 구성을 하기 실시예를 통해 구체적으로 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0021] 한편, 본 발명에서는 하기 실험을 통해 분리된 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 01435를 '*Saccharomyces cerevisiae* SPC-SNU 70-1'의 이름으로 명명한 후, 기탁하여 기탁번호 'KCTC 12776BP'를 부여 받았다. 또한, 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 104 균주를 '*Lactobacillus curvatus* SPC-SNU 70-3'의 이름으로 명명한 후, 기탁하여 기탁번호 'KCTC 12778BP'를 부여받았다. 또한, 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) 149 균주를 '*Lactobacillus brevis* SPC-SNU 70-2'의 이름으로 명명한 후, 기탁하여 기탁번호 'KCTC 12777BP'를 부여받았다. 또한, 락토바실러스 샌프란시스코시스(*L. sanfranciscensis*) 142 균주를 '*Lactobacillus sanfranciscensis* SPC-SNU 70-4'의 이름으로 명명한 후, 기탁하여 기탁번호 'KCTC 12779BP'를 부여 받았다.

[제조예 1: 누룩이 첨가된 천연종 (누룩을 첨가한 한국형 사워도우) 제조]

[0022] 누룩으로부터 미생물을 추출하기 위해, 누룩 50 g에 급수 450 g을 가한 후 온도 22℃, 습도 83% 배양기에서 4시간 배양하고 100 mesh 크기의 체를 이용하여 누룩의 밀기울 성분을 제거하여 스타터 추출여액을 제조하였다.

[0023] 천연종을 제조하기 위한 제1공정으로 실온의 가열냉각수 650 g에 스타터 추출여액 400 g, 밀가루 950 g, 호밀가루 100 g을 균일하게 섞어 온도 25℃, 습도 85%에서 48시간 발효시켜 스타터를 배양하여 스타터 배양액을 제조하였다.

[0024] 천연종 제조 제2공정(천연종 제조 및 계대배양)으로 가열냉각수 1050 g에 상기 제조된 스타터 배양액 700 g에 밀가루 950 g, 호밀가루 100 g을 균일하게 섞어 낱상온도를 26℃로 맞추었으며, 온도 12℃ 배양기에서 15시간 발효시켜 천연종을 제조하였다. 보관은 2~4℃ 냉장고에서 실시하였다. 계대배양을 위해서는 가열냉각수 1050 g에 상기 냉장 보관중인 천연종 700 g에 밀가루 950 g, 호밀가루 100 g을 균일하게 섞어 낱상온도를 26℃로 맞추었으며, 온도 12℃ 배양기에서 15시간 발효시켜 천연종을 제조하였고, 본 공정을 계속적으로 반복 실시하여 계대배양하였다.

[실시예 1: 미생물 분리 및 동정]

[0025] 누룩, 호밀, 밀가루, 천연종 (제조예 1)으로부터 미생물을 분리하고자 하였다. 각각의 원료 10 g, 0.85% NaCl 90 ml를 여과포(filter bag)에 담아 스톨마커(stomacher)를 이용해 3분간 균질화 하였다. 이를 다시 0.85% NaCl로 단계적 희석을 하여 적절한 농도로 희석한 후, 유산균은 0.01% 시클로헥사미드(cycloheximide)가 첨가된 MRS(de Man Rogosa and Sharpe, Difco), SDB (2% Maltose, 0.3% Yeast extract, 1.5% Fresh yeast extract, 0.03% Tween 80, 0.6% Casein peptone, pH 5.6) 고체배지에 도말하여 분리하였고, 효모는 0.35% 프로피온산나트륨(Sodium Propionate)이 첨가된 YM(Yeast Malt extract), PDA(Potato Dextrose Agar) 고체배지에 도말하여 분리하였다.

[0026] 상기 MRS는 37℃, SDB, YM 및 PDA배지는 30℃에서 모두 정치배양 하였다. 이후 단일 콜로니를 얻기 위해 각각의 콜로니들을 3~4차례 계대배양하였고, 세포 형태 관찰, 그람염색을 거쳐 박테리아는(유산균) 16s rRNA, 효모는 ITS 서열분석을 통해 동정하였다.

[0027] 실시결과, 누룩에서는 유산균으로, 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*), 페디오코커스 펜토사시우스(*P. pentosaceus*), 락토바실러스 사케이(*L. sakei*), 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*), 페디오코커스 악시딜락티시(*P. acidilactici*)가 분리되었고, 효모로는, 토루라스포라 델브루키(*T. delbrueckii*), 피치아 아노말라(*P. anomala*), 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), 칸디다 크루세이(*C. krusei*), 칸디다 펠리쿨로사(*C. pelliculosa*)가 분리되었다.

[0028] 또한, 천연종에서는 유산균으로, 페디오코커스 펜토사시우스(*P. pentosaceus*), 락토바실러스 브레비스(*L.*

brevis), 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*), 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*), 락토바실러스 사케이(*L. sakei*), 락토바실러스 크루스토룸(*L. crustorum*), 락토바실러스 샌프란시스코시스(*L. sanfranciscensis*)가 분리되었고, 효모로는, 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), 칸디다 크루세이(*C. krusei*), 칸디다 펠리쿠로사(*C. pelliculosa*)가 분리되었다.

[0031] 또한, 밀가루에서는 페디오코쿠스 펜토사시우스(*P. pentosaceus*)가, 호밀에서는 페디오코쿠스 펜토사시우스(*P. pentosaceus*) 및 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*)가 분리되었다.

[0032] 도 1은 누룩, 밀가루, 천연종 및 호밀로부터 분리한 미생물들의 동정결과를 보여준다.

[0033] **[실시예 2: 천연종으로부터 락토바실러스 샌프란시스코시스(*L. sanfranciscensis*) 분리]**

[0034] 본 실시예에서는 천연종 (누룩을 첨가한 한국형 사위도우)으로부터 락토바실러스 샌프란시스코시스(*L. sanfranciscensis*)를 분리하고자 하였는데, 이를 위해 락토바실러스 샌프란시스코시스 특이적 PCR을 디자인하였다.

[0035] 락토바실러스 샌프란시스코시스는 2011년에 전체 유전체 서열이 밝혀졌으며 (Rudi F Vogel, Melanie Pavlovic, Matthias A Ehrmann1, Arnim Wiezer, Heiko Liesegang, Stefanie Offschanka, Sonja Voget, Angel Angelov, Georg BoWolfgang Liebl (2011) Genomic analysis reveals Lactobacillus sanfranciscensis as stable element in traditional sourdoughs. Microbial Cell Factories. 10(Suppl 1):S6), 이를 이용하여 락토바실러스 샌프란시스코시스 TMW 1.1304의 게놈 지도 및 유전자 데이터베이스 안에서 다른 균주들과 겹치지 않는 유전자를 탐색하였고, 이 중 LSA_02510 하이포세티칼 단백질(hypothetical protein)을 선별하였다.

[0036] 다른 균주의 유전자에서는 증폭되지 않도록 PCR 프라이머를 디자인하였고, 프라이머 sanhyp1 : 5'GGAGGAAA ACTCATGAGTGTAAAG3'(24mer)과 sanhyp2 : 5'CAAAGTCA-AGAAGTTATCCATAAACAC (27mer)를 이용하여, '94℃ 5분 pre-denaturation, 94℃ 30초, 63℃ 30초, 72℃ 1분으로 30 사이클, 72℃ 7분 파이널 익스텐션'의 조건으로 PCR을 수행하였다.

[0037] 천연종으로부터 분리한 68개의 단일 콜로니에서 genomic DNA를 분리하였고, 이들을 각각 주형으로 하여 락토바실러스 샌프란시스코시스 특이적 PCR을 수행한 후, 전기영동하였다.

[0038] 실시결과, 68개 중 39개의 샘플에서 957bp의 밴드가 형성되는 것을 알 수 있었고, 나머지는 밴드가 관찰되지 않았다. 밴드가 형성된 39개의 샘플은 모두 16s rRNA 시퀀싱 분석을 수행하였고, 그 결과 락토바실러스 샌프란시스코시스로 동정되었다.

[0039] 도 2는 천연종으로부터 분리한 균주들을 락토바실러스 샌프란시스코시스에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동한 결과이다.

[0040] **[실시예 3: 천연종으로부터 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 분리 - *L. curvatus*-specific PCR]**

[0041] 본 실시예에서는 천연종 (누룩을 첨가한 한국형 사위도우)으로부터 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*)를 분리하고자 락토바실러스 커바투스 특이적 PCR을 디자인 하였다.

[0042] NCBI Blast search를 통해 다른 유산균과 상동성이 거의 없는 유전자를 탐색하였고, 'CRL 705 contig 00107'을 선별하였다. 다른 균주의 유전자에서는 증폭되지 않도록 하여 PCR 프라이머를 디자인 하였고, 프라이머 F'-CUR 5'-GACCCATGCCTT AATACGCATAG-3'과 R'-CUR 5'-CTGAAATAACCACTATAGCCACCCC-3'를 이용하여 '94℃ 5분 pre-denaturation, 94℃ 30초, 61.5℃ 30초, 72℃ 1분으로 40 사이클, 72℃ 7분 final extention'의 조건으로 PCR을 수행하였다.

[0043] 한편, 천연종에서 분리한 68개의 단일 콜로니에서 genomic DNA를 분리하였고, 이들을 각각 주형으로 하여 락토바실러스 커바투스 특이적 PCR을 수행한 후, 전기영동하였다.

[0044] 실시결과, 35개의 샘플에서 129 bp의 밴드가 형성되는 것을 알 수 있었고, 나머지는 밴드가 관찰되지 않았다. 밴드가 형성된 35개의 샘플은 모두 16s rRNA 시퀀싱 분석을 수행하였고, 그 결과 락토바실러스 커바투스로 동정되었다.

- [0045] **[실시예 4: 천연종으로부터 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) 분리 - *L. brevis*-specific PCR]**
- [0046] 본 실시예에서는 천연종 (누룩을 첨가한 한국형 사워도우)으로부터 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*)를 분리하고자 하였는데, 이를 위해 락토바실러스 브레비스 특이적 PCR을 디자인하였다.
- [0047] (1) 선택 배지 제조 및 배양 조건
- [0048] 천연종 (누룩을 첨가한 한국형 사워도우)으로부터 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*)를 분리하기 위하여 mMRS-BPB 선택배지를 사용하였다. mMRS-BPB는 기존의 MRS 배지에 시스테인하이드로클로라이드(Cysteine-HCl) 0.2 g/400ml, 브로모페놀블루(Bromophenol-blue) 8 mg/400ml를 첨가한 후, 121°C의 온도에서 15분 동안 오토클레이브(autoclave)하고, 사이클로헥사미드(cycloheximide) 20 mg/ml D.W를 여과하여 2 ml/400ml 기준으로 첨가하였다. 브로모페놀블루(Bromophenol-blue)는 유산균이 생성하는 산에 의하여 콜로니의 색이 변하는 특성을 이용하여 균주를 선택적으로 선별하기 위하여 첨가하였으며, 사이클로헥사미드(cycloheximide)는 진균류 억제를 위하여 사용하였다. 배양조건은 37°C 에서 24시간 동안 혐기 배양하였다.
- [0049] (2) 유산균 분리
- [0050] 천연종 5 g과 0.85% NaCl 45 ml를 섞고 스토마커를 이용하여 균질화한 후, 0.85% NaCl을 이용하여 1×10^{-6} 까지 희석하고 mMRS-BPB 배지에 100 μ l를 도말하였다. 이를 37°C에서 24시간 동안 혐기 배양하였고, 민무늬의 얼은 하늘색을 띄는 콜로니를 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) 후보 균주로 간주하고 순수배양 하였다.
- [0051] (3) 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) 분리 - *L. brevis* specific PCR
- [0052] 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*)에 특이적인 프라이머는 백현욱의 논문(Hyun-wook Baek, 2014, Thesis, SNU, Investigation of microbial diversity in Korean sourdough and its monitoring by real-time quantitative PCR)을 참조하여 디자인된 BRE-F (5'-CAGTAACTTTTGCAGTCAGCAG-3')와 BRE-R (5'-CGTCAGGTTCCCCACATAACTC-3')을 이용하였으며, 증폭 사이즈는 162bp이고, '95°C 10분 pre-denaturation, 95°C 30초, 61.5°C 30초, 72°C 20초로 30 사이클, 72°C 20초 final extention'의 조건으로 콜로니 PCR을 수행한 후, 전기영동하였다.
- [0053] 실시결과, 7개의 샘플에서 162bp의 밴드가 형성되는 것을 확인할 수 있었고, 밴드가 형성된 샘플은 모두 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*)로 동정되었다.
- [0054] 도 3은 천연종으로부터 분리한 균주들을 락토바실러스 브레비스에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동한 결과이다.
- [0055] **[실시예 5: 천연종으로부터 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 분리 및 동정]**
- [0056] 본 실시예에서는 천연종으로부터 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)를 분리하고자 하였는데, 이를 위해 사카로마이세스 세레비지에 특이적 PCR을 디자인하였다.
- [0057] (1) 효모 분리 및 배양 조건
- [0058] 초기 천연종, 후기 천연종 (안정화된 상태), 파네토네종, 샌프란시스코 사워종으로부터 효모를 분리하기 위해, 상기 각 원료 10 g과 90 ml의 0.85% NaCl을 여과포(filter bag)에 담은 후 스토마커(stomacher)를 이용하여 3분간 균질화 하였다. 이를 다시 0.85% NaCl에서 단계적 희석을 통해 적절한 농도로 희석한 후, 효모를 특이적으로 분리하기 위하여 0.35% 프로피온산 나트륨(Sodium Propionate)이 첨가된 YPM (1% Yeast Extract, 2% Peptone, 2% Maltose) 고체배지에 도말하였다. 배양조건은 30°C에서 정치배양 하였다. 이후 단일 콜로니를 얻기 위해 각각의 콜로니들을 3~4차례 계대배양을 하였고, 분리된 단일 콜로니들은 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에 특이적인 프라이머(primer)를 이용하여 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 후보 균주들

을 선별하였다.

- [0059] (2) 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 선별- *S. cerevisiae* 특이적 PCR
- [0060] 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)에 특이적인 프라이머는 장호원 등의 논문(Ho-Won Chang, Young-Do Nam, Youlboong Sung, Kyoung-Ho Kim, Seong Woon Roh, Jung-Hoon Yoon, Kwang-Guk An, Jin-Woo Bae, 2007, Quantitative real time PCR assays for the enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* and the *Saccharomyces sensu stricto* complex in human feces, Journal of Microbiological Methods, Vol. 71, Issue 3)을 참조하여 디자인된 SCDF (5'-AGG AGT GCG GTT CTT TG-3')와 SCDR (5'-TAC TTA CCG AGG CAA GCT ACA-3')을 이용하였다. 상기 프라이머는 사카로마이세스 세레비지에의 D1/D2 region 을 310 bp의 크기로 정량하며, 다른 효모의 유전자는 증폭시키지 않는 특이적인 프라이머로 보고되어 있다.
- [0061] 상기 (1)에서 분리한 사카로마이세스 세레비지에 후보 균주들을 SCDF, SCDR 프라이머를 이용하여 '94℃ 5분 pre-denaturation, 94℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 1분으로 30 사이클, 72℃ 7분 final extention'의 조건으로 콜로니 PCR을 수행한 후, 전기영동하였다.
- [0062] 실험결과, 도 4에서 보듯이 초기 천연종, 후기 천연종 (안정화된 상태), 파네토네종, 샌프란시스코 사워종으로부터 분리된 미생물 45개 중 36개의 샘플에서 310 bp에서 밴드가 형성됨을 확인할 수 있었다. 도 4는 분리한 효모들을 사카로마이세스 세레비지에에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동한 결과이다. 이때, 파네토네종과 샌프란시스코 사워종 샘플에서는 밴드가 증폭되지 않는 샘플도 있음을 확인할 수 있었다.
- [0063] **[실시에 6: 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 샌프란시스센시스(*L. sanfranciscensis*) 중 스타터(starter)로서 우수한 균주 선별 - 산 생성 정도 및 말토오스 이용성 확인]**
- [0064] 본 실시예에서는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 샌프란시스센시스(*L. sanfranciscensis*) 중 스타터로서 우수한 균주를 선별하고자, 락토바실러스 샌프란시스센시스 균주들의 산 생성능 및 말토오스(maltose) 이용능을 비교해 보았다.
- [0065] -80℃에서 보관한 균주를 10 ml mMRS (1L 기준, polypeptone 10 g, Meat extract 10 g, Yeast extract 5 g, Tween80 1 ml, K₂HPO₄ 2 g, Sodium acetate 5 g, Ammonium citrate 2 g, MgSO₄ 0.2 g, MnSO₄ 0.05 g, maltose 또는 glucose 20 g, pH 5.4, 당은 따로 오토클레이브 함) 브로스(broth)에 30℃의 온도로 24시간 동안 전배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 (4℃, 10,000rpm)하여 회수한 후, 이를 100 ml mMRS 브로스(broth)에 초기 O.D.(at 600 nm) 0.1로 접종하여 30℃, 90 rpm으로 배양하며, 3~4시간 간격으로 시료를 채취하였다.
- [0066] 유기산 측정은 HPLC (Agilent 1100 series, USA)를 이용하여 수행하였다. HPLC조건으로는 이동상은 0.001N 황산용액을 유속 0.6 ml/min으로 흘려주었고, 60℃로 가열된 유기산 분석용 컬럼(Rezex ROA-organic acid, Phenomenex, USA)과 RI detector를 이용하였다.
- [0067] 실시결과, 젖산(Lactic acid)의 생성이 적은 상위 6개 균주는 ss 131, ss 136, ss 135, ss 142, ss 161이었으며 (group 1), 그 다음 상위 5개의 균주는 ss 204, ss 194, ss 121, ss 205, ss 223임 (group 2)을 확인할 수 있었다 (도 5). 도 5는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 샌프란시스센시스 균주들의 최대 젖산 생성량 비교 그래프이다.
- [0068] 상기 그룹 1의 균주들의 특징을 비교하여 젖산을 적게 생성하면서도 말토오스의 대사 능력이 가장 우수한 균주를 선정하고자 하였다.
- [0069] 선정 결과, ss 142 균주가 말토오스의 대사도 완전히 이루어지고 젖산의 생성량이 적음을 확인할 수 있었다 (도 6). 상기와 같은 결과로부터 ss 142 균주가 스타터(starter)로 가장 적합한 특징을 가짐을 확인할 수 있었다. 도 6은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 샌프란시스센시스 균주 중 그룹 1 균주들의 발효 프로파일이다.
- [0070] 한편, 락토바실러스 샌프란시스센시스(*L. sanfranciscensis*) ss 142 균주를 '*Lactobacillus sanfranciscensis* SPC-SNU 70-4'의 이름으로 명명한 후, 기탁하여 기탁번호 'KCTC 12779BP'를 부여 받았다.
- [0071] **[실시에 7: 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 중 스타터(starter)로서 우수한 균주**

선별 - pH별 내산성 및 말토오스 이용성 확인]

- [0072] 본 실시예에서는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 중 스타터로서 우수한 균주를 선별하고자, 락토바실러스 커바투스 균주들의 pH별 내산성 및 말토오스(maltose) 이용능을 확인하였다.
- [0073] (1) 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스의 pH별 내산성 확인
- [0074] 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스 35종 균주 (100, 104, 106, 109, 112, 114C, 114SS, 116, 120, 122, 127, 130, 132, 134, 138, 140N, 140SS, 144, 146, 156N, 156SS, 159, 171N, 172, 183N, 206N, 206SS, 216N, 238, 241N, 241SS, 249N, 250N, 253SS, 253N)의 내산성을 확인하기 위하여 각각 pH를 6.8, 4.6, 4.4, 4.2로 조절한 MRS broth에 상기 각 균주를 1%씩 접종하고 24시간 후, 600 nm에서 흡광도를 측정하여 성장 곡선(growth curve)를 작성하였다.
- [0075] 실시결과, pH4.2에서 높은 흡광도 값을 가진 균주는 249N, 250N, 206SS, 104이였으며, 각각 1.540, 1.501, 1.446, 1.403 값을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 공시균주 (*L. curvatus* KCCM 40715)와 흡광도 차이는 각각 0.207, 0.168, 0.113, 0.070이었다.
- [0076] (2) 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스의 말토오스 이용성 확인
- [0077] 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스 35종 (100, 104, 106, 109, 112, 114C, 114SS, 116, 120, 122, 127, 130, 132, 134, 138, 140N, 140SS, 144, 146, 156N, 156SS, 159, 171N, 172, 183N, 206N, 206SS, 216N, 238, 241N, 241SS, 249N, 250N, 253SS, 253N)의 말토오스(maltose) 이용성을 확인하기 위하여 MRS broth 배지 조성에서 텍스트로스(dextrose)를 제외하고 2% 말토오스(maltose)를 첨가한 배지를 만든 후, 이에 상기 각 균주를 1%씩 접종하고 24시간 배양 후, 600 nm에서 흡광도를 측정하여 성장 곡선(growth curve)을 작성하였다.
- [0078] 실시결과, 천연종으로부터 분리한 모든 락토바실러스 커바투스는 공시균주 (*L. curvatus* KCCM 40715)보다 말토오스(maltose)를 잘 이용함을 확인할 수 있었다. 특히, 104, 114C, 156SS, 183N가 다른 균주들에 비해 우수한 말토오스(maltose) 이용능을 보였는데, 흡광도 값은 각각 1.498, 1.501, 1.523, 1.528을 나타내었다. 상기 값들은 공시균주보다 0.253, 0.256, 0.278, 0.283 높음을 확인할 수 있었다.
- [0079] 상기 실험을 통해 내산성 및 말토오스 이용능이 공히 높게 나타난 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 104 균주를 '*Lactobacillus curvatus* SPC-SNU 70-3'의 이름으로 명명한 후, 기탁하여 기탁번호 'KCTC 12778BP'를 부여받았다.
- [0080] **[실시예 8: 천연종로부터 분리한 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) 중 스타터(starter)로서 우수한 균주 선별 - pH별 내산성 및 말토오스 이용성 확인]**
- [0081] 본 실시예에서는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) 중 스타터로서 우수한 균주를 선별하고자, 락토바실러스 브레비스의 pH별 내산성 및 말토오스 이용능을 확인하고자 하였다.
- [0082] (1) 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스의 pH별 내산성 확인
- [0083] 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스 균주 중 1차적으로 마이크로플레이트(microplate) 배양을 통해 pH 4와 pH 3.5에서의 세포 성장 속도를 측정하여 비교하였다. 이 중 가장 높은 생육 정도를 보이는 균주로 111, 149, T30 균주를 선발하였다.
- [0084] 그 후, pH 4와 pH 3.5로 조절한 MRS broth에 상기 각 균주를 1%씩 접종하고 24시간 배양 후, 600 nm에서 흡광도를 측정하여 성장 곡선(growth curve)을 작성하였다.
- [0085] 실시결과, 111, 149, T30 균주 모두 공시균주 (*L. brevis* KCCM 11433)와 비슷한 생육속도를 보였으며, 이 중 111, 149 균주의 경우 공시균주보다 높은 생육속도를 보임을 확인할 수 있었다. 특히, 가장 생육 속도가 높은 149 균주가 스타터로서 가장 적합함을 확인할 수 있었다 (도 7). 도 7은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스의 내산성을 확인한 결과이다.

[0086] (2) 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스의 말토오스 이용능 확인

[0087] 하기 표 1과 같은 조성을 가지는 2% 말토오스 함유 MRS broth 배지(medium)를 만든 후, 111, 149, T30 균주를 각각 1%씩 접종하고 24시간 배양한 후, 600 nm에서 흡광도를 측정하여 성장 곡선(growth curve)을 작성하였다.

표 1

조성	합량
프로테오스 펩톤 No.3	10.0 g
비프 추출물	10.0 g
이스트 추출물	5.0 g
말토오스	20.0 g
폴리소르베이트 80	1.0 g
시트르산 암모늄	2.0 g
소듐 아세테이트	5.0 g
마그네슘 설페이트	0.1 g
망가니즈 설페이트	0.05 g
디포타슘 포스페이트	2.0 g
증류수	1 L

[0089] 실시결과, 149 균주와 T30 균주가 공시균주보다 말토오스(maltose) 배지에서의 생육 속도가 빨랐으며, 이중 149 균주가 가장 높은 생육 속도를 보임을 확인할 수 있었다. 상기와 같은 결과로부터 149 균주가 스타터로서 가장 적합함을 확인할 수 있었다 (도 8). 도 8은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스의 말토오스 이용능을 확인한 결과이다.

[0090] 한편, 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) 149 균주를 '*Lactobacillus brevis* SPC-SNU 70-2'의 이름으로 명명한 후, 기탁하여 기탁번호 'KCTC 12777BP'를 부여 받았다.

[0091] [실시에 9: 천연종으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 중 스타터로서 우수한 균주 선별 - pH별 내산성 확인]

[0092] 본 실시에에서는 천연종으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 중 스타터로서 우수한 균주를 선별하고자 하였다.

[0093] 우선, 초기 천연종(early sourdough, 초기 사워중)에서 분리된 사카로마이세스 세레비지에 01434, 후기 천연종(mature sourdough, 후기 사워중)에서 분리된 사카로마이세스 세레비지에 01435로 실험을 진행하였다. 실험은 96 마이크로 웰 플레이트(micro well plate)에서 수행하였고, 1개의 웰(well)에 토탈 부피(total volume) 250 μ l로 하여 YP 배지에 20 g/L 말토오스를 넣고, 초기 OD₆₀₀ 0.2로 접종하였다. 내성 테스트에 이용된 산의 종류는 사워도우에서 가장 많이 생성되는 젖산과 초산을 이용하여 pH 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5 로 진행하였다.

[0094] 실시결과, 사카로마이세스 세레비지에 01434는 초산 pH 3.5에서 거의 자라지 못하였고, pH 4.0에서는 늦게 성장하였으며, pH 4.5부터 5.5에서는 큰 차이 없이 성장하였다. 이와는 달리 젖산에서는 산도에 관계없이 거의 잘 자라는 것을 확인할 수 있었는데, 특히 pH 5.5에서의 생장이 우수하였다. 상기와 같은 결과로부터, 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 01434는 젖산보다는 초산에 대한 내성이 낮으며, 초산 pH 4.5 이하에서는 생장이 저해됨을 확인할 수 있었다.

[0095] 또한, 초기 천연종 분리한 효모와 후기 천연종에서 분리한 효모의 산내성은 비슷한 수준임을 알 수 있었고, 후기 천연종에서 분리한 사카로마이세스 세레비지에 01435가 미미하지만 좀 더 나은 내성을 갖는 것을 확인할 수 있었다 (도 9). 도 9는 천연종으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에 01435의 내산성을 확인한 결과이다.

[0096] 한편, 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 01435를 '*Saccharomyces cerevisiae* SPC-SNU 70-1'의 이름으로 명명한 후, 기탁하여 기탁번호 'KCTC 12776BP'를 부여 받았다.

[0097] **[실시예 10: 천연종으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)의 제빵 적용]**

[0098] 본 실시예에서는 천연종 (누룩이 첨가된 한국형 사위도우)으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 균주 중 제빵용 스타터로서 가장 우수한 균주로 선발된 사카로마이세스 01435(*S. cerevisiae* 01435)와 상업적 이스트 (르사프로(프랑스), 수분 28%)를 각각 제빵에 적용하고, 그 특성을 비교하고자 하였다.

[0099]
[0100] **(1) 빵 제조**

[0101] 하기 표 2에 기재된 중종의 조성성분을 믹서 (제품명: SK101S MIXER, 일본)에 투입하고, 2단에서 2분, 3단에서 1분 동안 반죽한 후, 반죽의 최종온도가 25℃가 되도록 더욱 혼합하였다. 그 후, 실온에서 30분간 방치한 다음 6℃ 발효기에 넣어 16시간 동안 1차 발효시켜 중종을 제조하였다.

[0102] 그 후, 하기 표 2에 기재된 본종의 조성성분 (강력분, 정제염, 정백당, 전지분유, 이스트, 정제수)을 믹서 (제품명: SK101S MIXER, 일본)에 투입하고 1단에서 1분간 반죽한 후, 상기 중종을 첨가하여 2단에서 3분, 3단에서 2분간 혼합하였다. 그 후, 버터를 첨가하고 2단에서 3분, 3단에서 3분간 반죽하여 반죽의 최종 온도가 27℃가 되도록 하여 본종을 제조하였다.

[0103] 상기 본종은 27℃, 상대습도 85%인 발효기에 넣어 30분간 중간 발효를 시킨 후 상기 반죽을 일정한 크기로 분할한 다음 둥글리기를 하여 27℃, 상대습도 85%인 발효기에 넣어 15분간 숙성하였다. 숙성 후, 성형하여 식빵 케이스에 넣었다. 그 후, 상기 식빵 케이스에 넣은 반죽을 37℃, 상대습도 85%의 분위기에서 50분 동안 발효시켜 식빵 생지를 제조하였다. 상기 식빵 생지를 오븐에 넣고, 윗불 170℃, 아랫불 210℃에서 35분간 구웠다. 그 후, 실온에서 내부 온도가 32℃가 될 때까지 냉각하였다.

[0104] 상기의 과정으로부터 제조된 사카로마이세스 세레비지에 01435와 상업적 이스트가 첨가된 식빵의 사진은 도 10과 같았다 (도 10). 도 10은 대조군 (상업적 이스트가 적용된 빵) 및 분리효모 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 01435가 적용된 빵의 사진이다.

표 2

[0105]

	조성성분	대조군 (상업적 이스트 적용 빵)	분리효모 (<i>S. cerevisiae</i> 01435) 적용 빵
중종	강력분	70	70
	상업적 이스트	0.7	-
	분리 효모	-	1.6
	리멀소프트	0.3	0.3
	급수	42	42
본종	강력분	30	30
	정제염	1.8	1.8
	정백당	7	7
	전지분유	3	3
	버터	10	10
	상업적 이스트	0.6	-
	분리 효모	-	1.4
급수	23	22	

[0106] (단위: g)

[0107] **(2) 빵의 물성 측정**

[0108] 사카로마이세스 세레비지에 01435와 상업적 이스트가 각각 적용된 빵의 물성을 측정하고자였다.

[0109] pH 측정은 250 ml 비이커에 증류수 100 ml, 시료 15 g을 넣고 균질화한 후, pH 미터(pH meter)로 측정하였다.

[0110] 총적정 산도(total titrable acid; TTA)는 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 pH 6.6과 pH 8.5에 이를 때까지의 NaOH 용액 소비량 (ml)으로 정의하였다.

[0111] 색도 측정은 빵을 약 20 mm 두께로 잘라낸 시료를 색도계 (CR-400, KONIKA MINOLTA사)를 이용하여 측정하였다. 색도 측정은 명도 L값, 색도는 a(적~녹)값, b(황~청)값으로 나타내었다.

[0112] 빵의 pH, 총적정 산도, 색도 측정 결과는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

		대조군 (상업적 이스트 적용 빵)	분리효모 (<i>S. cerevisiae</i> 01435) 적용 빵
pH		5.53	5.46
TTA (6.6/8.5)		2.27/4.87	2.43/4.91
수분함량		41.67%	41.73%
2차 발효시간		55분	55분
비용적(Specific volume)		4.92	4.98
hunter lab color values	L	85.11	84.11
	a	-2.06	-2.02
	b	17.92	17.52

[0114] 실시결과, 사카로마이세스 세레비지에 01435가 적용된 빵은 상업적 이스트가 적용된 빵보다 pH가 낮고, 수분함량이 높으며, 비용적이 큼을 확인할 수 있었다.

[0115] (3) 반죽의 가스 발생력 확인

[0116] 사카로마이세스 세레비지에 01435가 적용된 본종과 상업적 이스트가 적용된 본종의 가스 발생력을 비교확인하고자 하였다.

[0117] 가스 발생력 측정은 반죽 25 g을 취하여 가스 발생력 측정기(Fermometer)를 이용하여 30℃에서 10시간 동안 측정하였다.

[0118] 실시결과, 두 종류의 본종에서 전반적으로 가스 발생력이 유사하게 나타났다. 다만, 초기에는 사카로마이세스 세레비지에 01435가 적용된 본종의 가스 발생력이 다소 높음을 확인할 수 있었다 (도 11). 도 11은 천연종으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지가 적용된 본종의 가스 발생력을 확인한 그래프이다.

[0119] (4) 빵의 노화도 측정

[0120] 사카로마이세스 세레비지에 01435가 적용된 빵과 상업적 이스트가 적용된 빵의 경도 및 시간에 따른 노화 속도를 비교하고자 하였다.

[0121] 빵을 상온에서 3시간 정도 둔 후, 약 20 mm 두께로 잘라 시료를 준비한 후, 물성측정기(Texture analyser, Stable Micro Systems사)를 이용하여 경도를 측정하고, 시간에 따른 경도를 비교하여 노화 속도를 측정하였다. 경도 측정 결과는 하기 표 4에 나타내었고, 노화 속도는 도 12에 나타내었다.

표 4

1일차 (19시간 경과)	
샘플	경도 (Hardness)
대조군 (상업적 이스트 적용 빵)	181.322
분리효모 (<i>S. cerevisiae</i> 01435) 적용 빵	156.43
3일차 (63시간 경과)	
샘플	경도
대조군 (상업적 이스트 적용 빵)	260.353
분리효모 (<i>S. cerevisiae</i> 01435) 적용 빵	222.876
4일차 (87시간 경과)	
샘플	경도
대조군 (상업적 이스트 적용 빵)	281.774
분리효모 (<i>S. cerevisiae</i> 01435) 적용 빵	241.639

[0123]

[0124]

실시결과, 사카로마이세스 세레비지에 01435가 적용된 빵은 상업적 이스트가 적용된 빵보다 전반적으로 경도가 낮아 부드러움이 우수함을 확인할 수 있었다.

[0125]

하지만, 시간에 따른 경도를 비교하여 노화 속도를 측정된 결과, 전반적인 노화 속도는 비슷한 것을 확인할 수 있었다 (도 12). 도 12는 천연종으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에 01435가 적용된 빵의 노화 속도를 확인한 결과이다.

[0126]

(5) 빵의 향기 성분 분석

[0127]

사카로마이세스 세레비지에 01435가 적용된 빵과 상업적 이스트가 적용된 빵의 풍미 성분을 비교하기 위하여 GC/MS 시스템을 이용하여 향기 성분을 분석하였다.

[0128]

시료 1 g에 대하여 분석을 실시하였고, GC/MS 분석 조건은 하기 표 5와 같았다. GC/MS 분석 후, 알코올(alcohol), 알데하이드(aldehyde), 케톤(ketone), 에스테르(ester), 산(acid) 류에 대한 전체적인 정략적 수치를 비교하고 (도 13), 하기 표 6에 대표적 향기 성분 22종에 대하여 각 성분의 상대적 비율을 백분율로 나타내었다.

표 5

[0129]

분석시스템	운영조건
GC/MS analysis	· GC Model name : Agilent 7890A · Inlet temperature : 230℃ · Column : DB-WAX (60 m×250 μm×0.25 μM) · Carrier gas : helium · Flow rate : 1 mL/min · Oven temperature program : from 40℃ (5 min) → 8℃/min → 230℃ (10min) · MS detector : Agilent 5975C MSD (EI mode)
SPME analysis	· Fiber : DVB/Carboxen/PSME (Supelco Co.) · Sample equilibration time - incubation temp. 85℃ - incubation time 30 min

표 6

[0130]

향기 성분		대조군 (상업적 이스트 적용 빵)에 함유된 향기 성분의 함량 비율 (%)	분리효모 (<i>S. cerevisiae</i> 01435) 적용 빵에 함유된 향기 성분의 함량 비율 (%)
알코올	Ethyl alcohol	59.89	43.46
	1-Propanol	0.55	0.47
	2-methyl-1-propanol	3.55	2.46
	Isoamyl alcohol	15.89	15.68
	1-hexanol	0.71	1.24
	2-phenyl ethyl alcohol	9.52	23.04
알데하이드	hexanal	0.33	0.61
	nonanal	0.56	0.57
	furfural	0.16	0.36
	Benzaldehyde	1.53	2.25
케톤	2-heptanone	0.50	0.87
	acetoin	1.38	3.10
	2-Nonanone	0.56	0.75

에스테르	ethyl hexanoate	1.00	4.34	1.03	4.29
	ethyl octanoate	2.69		2.33	
	ethyl decanoate	0.31		0.35	
	Isoamyl lactate	0.34		0.57	
산	octanoic acid	0.22	0.32	0.33	0.33
	acetic acid	0.10		0.00	
	hexanoic acid	0.00		0.00	
기타	alpha-limonene	0.20	0.20	0.52	0.21
합계		100	100	100	100

[0131] 휘발성 향기성분(alcohol, aldehyde, ketone, ester, acid 류)의 전체적인 정량적 수치를 비교한 결과, 사카로마이세스 세레비지에 01435가 적용된 빵에서 케톤 류가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다. 케톤 류는 부드럽고 마일드한 취를 나타내는 향기 성분으로, 본 발명의 분리효모가 적용된 빵은 풍미가 부드럽고 마일드함을 확인할 수 있었다. 특히, 버터향의 부드러운 풍미를 나타내는 케톤 류 중 아세트산의 함량이 높음을 확인할 수 있었다. 또한, 사카로마이세스 세레비지에 01435가 적용된 빵은 대조군 대비 풋내를 일으키는 에틸 알코올(ethyl alcohol)의 함량이 적음을 확인할 수 있었다.

[0132] 한편, 상업적 이스트가 적용된 빵은 알코올 류, 에스테르 류가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다. 알코올 류 및 에스테르 류는 향이 가볍고 강한 취를 나타내는 향기 성분으로, 상업적 이스트가 적용된 빵은 본 발명 분리효모에 비해 풍미 스펙트럼이 좋지 못함을 알 수 있었다 (도 13). 도 13은 천연종으로부터 분리된 사카로마이세스 세레비지에 01435가 적용된 빵의 향기성분을 정량적 수치로 비교한 결과이다.

[0133] [실시에 11: 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*)의 제빵 적용]

[0134] 본 실시예에서는 천연종 (누룩이 첨가된 한국형 사위도우)으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 104 균주와 공시균주인 락토바실러스 커바투스 KCCM 40715 균주를 각각 제빵에 적용하고, 그 특성을 확인하고자 하였다.

[0135] (1) 유산균 발효 반죽의 제조 및 분석

[0136] 강력분 100 g, 유산균수 2×10^{10} cfu/g, 가열 냉각수 100 g을 혼합한 후, 30℃의 발효기에서 발효시켜 유산균 발효 반죽을 제조하되, 반죽의 pH가 pH 4.2±0.2가 도달했을 때, 냉각한 후 유산균 발효 반죽의 pH, TTA 및 균수를 측정하였다.

[0137] 한편, 본 실시예에서 사용한 유산균은 MRS broth에서 30℃의 온도로 22±2시간 동안 배양한 후, 원심분리하여 수득한 균체를 생리식염수로 세척한 것을 이용하였고, 최초 균 접종량은 반죽 1 g 당 1×10^8 cfu가 되도록 접종하였다.

[0138] 실시결과는 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

분리균주 (<i>L. curvatus</i> 104) 적용 반죽			
pH	TTA (15 g 기준, ml)		균수 (cfu/g)
	pH 6.6	pH 8.5	
4.36	6.89	11.09	1.3×10^9
공시균주 (<i>L. curvatus</i> KCCM 40715) 적용 반죽			
pH	TTA (15 g 기준, ml)		균수 (cfu/g)
	pH 6.6	pH 8.5	
4.38	8.48	11.99	1.4×10^9

[0139]

[0140] 측정결과, 분리균주 (*L. curvatus* 104) 적용 반죽 및 공시균주 (*L. curvatus* KCCM 40715) 적용 반죽의 발효시간은 3시간 정도 소요되었으며, 상기 표 7에서 보듯이, 분리균주 적용 반죽은 공시균주 적용 반죽과 비슷한 균수를 함유하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0141] (2) 빵 제조

[0142] 하기 표 8과 같이 증종 조성성분을 믹서 (제품명: SK101S MIXER, 일본)에 투입하고, 2단에서 2분, 3단에서 1분 동안 반죽한 후, 반죽의 최종온도가 25℃가 되도록 더욱 혼합하였다. 그 후, 실온에서 30분간 방치한 다음 6℃ 발효기에 넣어 16시간 동안 1차 발효시켜 증종을 제조하였다.

[0143] 그 후, 하기 표 8에 기재된 본종 조성성분 (강력분, 정제염, 정백당, 전지분유, 이스트, 정제수 및 유산균 발효반죽)을 믹서 (제품명: SK101S MIXER, 일본)에 투입하고 1단에서 1분간 반죽한 후, 상기 증종을 첨가하여 2단에서 3분, 3단에서 2분간 혼합하였다. 그 후, 버터를 첨가하고 2단에서 3분, 3단에서 3분간 반죽하여 반죽의 최종온도가 27℃가 되도록 하여 본종을 제조하였다.

[0144] 상기 본종은 27℃, 상대습도 85%인 발효기에 넣어 30분간 중간 발효를 시킨 후 상기 반죽을 일정한 크기로 분할한 다음 둥글리기를 하여 27℃, 상대습도 85%인 발효기에 넣어 15분간 숙성하였다. 숙성 후, 성형하여 식빵 케이스에 넣었다. 그 후, 상기 식빵 케이스에 넣은 반죽을 37℃, 상대습도 85%의 분위기에서 50분 동안 발효시켜 식빵 생지를 제조하였다. 상기 식빵 생지를 오븐에 넣고, 윗불 170℃, 아랫불 210℃에서 35분간 구웠다. 그 후, 실온에서 내부 온도가 32℃가 될 때까지 냉각하였다.

[0145] 제조된 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. curvatus* KCCM40715)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. curvatus* 104)가 적용된 빵의 사진은 도 14와 같았다 (도 14). 도 14는 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. curvatus* KCCM40715)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. curvatus* 104)가 적용된 빵의 사진이다.

표 8

	조성성분	대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	공시균주 (<i>L. curvatus</i> KCCM40715) 적용 빵	분리균주 (<i>L. curvatus</i> 104) 적용 빵
증종	강력분	70	70	70
	상업적 이스트	0.7	0.7	0.7
	리멀소프트	0.3	0.3	0.3
	정제수	42	42	42
본종	강력분	30	20	20
	정제염	1.8	1.8	1.8
	정백당	7	7	7
	전지분유	3	3	3
	버터	10	10	10
	상업적 이스트	0.6	0.6	0.6
	정제수	23	13	13
	유산균 발효반죽	-	20	20

[0147] (단위 : g)

[0148] (3) 빵의 물성 측정

[0149] 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. curvatus* KCCM40715)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. curvatus* 104)가 적용된 빵의 물성 (pH, 총적정 산도, 색도)을 측정하고자 하였다. pH, 총적정 산도, 색도 측정 방법은 상기 실시예 10에 기재된 방법과 동일한 방법을 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

[0150]		대조군 (상업적 이스트 적용 빵)	공시균주 (<i>L. curvatus</i> KCCM40715) 적용 빵	분리균주 (<i>L. curvatus</i> 104) 적용 빵
	pH	pH 5.53	pH 5.41	pH 5.39
	TTA (6.6/8.5)	2.27/4.87	2.51/5.22	2.55/5.39
	수분 함량	41.67 %	41.70%	41.71%
	2차 발효시간	55분	52분	52분
	비용적(Specific volume)	4.92	4.98	5.01
	Hunter lab color values	L	85.11	84.11
		a	-2.06	-2.66
		b	17.92	17.03
				16.55

[0151] 실시결과, 분리균주가 적용된 빵은 공시균주가 적용된 빵보다 pH가 높고, 비용적이 큼을 확인할 수 있었다.

[0152] (4) 반죽의 가스 발생력 확인

[0153] 대조군 (상업적 이스트만 적용된 본종), 공시균주 (*L. curvatus* KCCM40715)가 적용된 본종, 분리균주 (*L. curvatus* 104)가 적용된 본종의 가스 발생력을 비교확인하고자 하였다. 가스 발생력 측정을 위해, 반죽 25 g을 취하여 가스 발생력 측정기(Fermometer)를 이용하여 30℃에서 10시간 동안 측정하였다.

[0154] 실시결과, 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)과 비교하여 유산균주 (공시균주, 분리균주)를 적용한 빵의 경우 가스발생력이 더 우수함을 확인할 수 있었다. 다만, 분리균주와 공시균주간의 차이는 거의 나타나지 않음을 확인할 수 있었다 (도 15). 도 15는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스 104(*L. curvatus* 104)가 적용된 본종의 가스 발생력을 확인한 결과이다.

[0155] (5) 빵의 노화도 측정

[0156] 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. curvatus* KCCM40715)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. curvatus* 104)가 적용된 빵의 경도 및 시간에 따른 노화 속도를 비교하고자 하였다.

[0157] 경도 및 시간에 따른 노화 속도의 측정 방법은 상기 실시예 10에 기재된 방법과 동일하였으며, 경도에 대한 값은 하기 표 10에 나타내었고, 시간에 따른 노화 속도의 결과는 도 16에 나타내었다.

표 10

[0158]	1일차 (19 시간 경과)	
	샘플	경도(Hardness)
	대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	181.322
	공시균주 (<i>L. curvatus</i> KCCM40715) 적용 빵	172.441
	분리균주 (<i>L. curvatus</i> 104) 적용 빵	162.7
	3일차 (63 시간 경과)	
	샘플	경도
	대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	260.353
	공시균주 (<i>L. curvatus</i> KCCM40715) 적용 빵	252.077
	분리균주 (<i>L. curvatus</i> 104) 적용 빵	234.832
	4일차 (87 시간 경과)	
	샘플	경도
	대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	281.774
	공시균주 (<i>L. curvatus</i> KCCM40715) 적용 빵	274.799
	분리균주 (<i>L. curvatus</i> 104) 적용 빵	254.512

[0159] 실시결과, 유산균주 (공시균주, 분리균주)를 적용한 빵은 경도가 낮아 부드러운 것을 확인할 수 있었다. 특히, 본 발명의 분리균주 (*L. curvatus* 104)가 적용된 빵은 가장 낮은 경도 값을 나타내 가장 부드러운 것으로 확인

할 수 있었다. 또한, 시간에 따른 노화속도도 경도와 비슷한 결과를 나타냄을 확인할 수 있었다 (도 16). 도 16은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스 104(*L. curvatus* 104)가 적용된 빵의 노화 속도를 측정된 결과이다.

[0160] (6) 빵의 향기 성분 분석

[0161] 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. curvatus* KCCM40715)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. curvatus* 104)가 첨가된 빵과 상업적 이스트가 첨가된 빵의 풍미 성분 발현을 비교하기 위하여 GC/MS 시스템을 이용하여 향기 성분을 분석하였다.

[0162] 시료 1 g에 대하여 분석을 실시하였고, GC/MS 분석 조건은 상기 표 5와 같았다. GC/MS 분석 후, 알코올 (alcohol), 알데하이드(aldehyde), 케톤(ketone), 에스테르 (ester), 산(acid) 류에 대한 전체적인 정량적 수치를 비교하고 (도 17), 하기 표 11에 대표적 향기 성분 22종에 대하여 각 성분의 상대적 비율을 백분율로 나타내었다.

표 11

향기 성분		대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)에 함유된 향기 성분의 함량 비율 (%)		분리균주 (<i>L. curvatus</i> 104) 적용 빵에 함유된 향기 성분의 함량 비율 (%)		공시균주 (<i>L. curvatus</i> KCCM 40715) 적용 빵에 함유된 향기 성분의 함량 비율 (%)	
알코올	Ethyl alcohol	55.45	85.69	42.22	83.37	44.03	84.84
	1-Propanol	0.73		0.71		0.00	
	2-methyl-1-propanol	4.31		4.12		3.78	
	Isoamyl alcohol	10.49		22.39		21.47	
	1-hexanol	1.01		1.74		1.29	
	2-phenyl ethyl alcohol	13.71		12.20		14.26	
알데하이드	hexanal	0.47	3.80	0.62	4.57	0.52	3.99
	nonanal	0.85		0.91		0.91	
	furfural	0.28		0.52		0.61	
	Benzaldehyde	2.20		2.52		1.95	
케톤	2-heptanone	0.42	2.84	0.86	4.17	0.70	3.81
	acetoin	1.59		2.26		2.05	
	2-Nonanone	0.82		1.04		1.05	
에스테르	ethyl hexanoate	1.70	6.36	1.62	5.88	1.68	5.85
	ethyl octanoate	4.04		3.41		3.85	
	ethyl decanoate	0.62		0.27		0.33	
	Isoamyl lactate	0.00		0.58		0.00	
산	octanoic acid	0.51	0.87	1.34	1.57	0.40	1.51
	acetic acid	0.36		0.23		0.19	
	hexanoic acid	0.00		0.00		0.92	
기타	alpha-limonene	0.44	0.44	0.44	0.44	0.00	0.00
합계		100	100	100	100	100	100

[0164] 휘발성 향기성분(alcohol, aldehyde, ketone, ester, acid 류)의 전체적인 정량적 수치를 비교한 결과, 분리균주 (*L. curvatus* 104)가 적용된 빵에서 케톤 류가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다. 케톤 류는 부드럽고マイル드한 취를 나타내는 향기 성분으로, 본 발명의 분리균주를 함유하는 빵은 풍미가 부드럽고マイル드함을 확인할 수 있었다.

[0165] 한편, 유산균 (분리균주, 공시균주)가 적용된 빵은 산(acid) 류가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다.

[0166] 그런데, 상업적 이스트만 적용된 빵은 알코올 류, 에스테르 류가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다. 알코올 류 및 에스테르 류 향이 가볍고 강한 취를 나타내는 향기 성분으로, 상업적 이스트만 적용된 빵은 풍미 스펙트럼이 좋지 못함을 확인할 수 있었다.

[0167] 도 18은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus* 104)가 적용된 빵의 향기성분을 정량적 수

치로 비교한 결과이다.

[0168] 한편, 대표적 향기 성분 분석 결과, 상기 표 11에서 확인되는 바와 같이 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵) 대비 유산균 (분리균주, 공시균주)가 적용된 빵은 풋내를 일으키는 에틸 알코올(ethyl alcohol)의 함량이 적음을 확인할 수 있었다. 또한, 시트러스(citrus), 페티(fatty)향 (pleasant flavor)을 나타내는 노나날(nonanal)과 카라멜, 캔디, 아몬드 향은 나타내는 푸르푸랄(furfural)은 유산균 (분리균주, 공시균주)이 적용된 빵에서 높게 나타났다. 특히, 캔디향 같은 달콤함 풍미를 나타내는 벤잘디하이드(benzaldehyde)와 버터향의 부드러운 풍미를 나타내는 케톤 류 중 아세트인은 분리균주 (*L. curvatus* 104)에서 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 또한, 공시균주 (*L. curvatus* kccm 40715)가 적용된 빵은 달달한 향취를 나타내는 1-프로판올(1-propanol) 및 오렌지 향을 나타내는 알파-리모넨(alpha-limonene)이 검출되지 않음을 확인할 수 있었다.

[0169] [실시에 12: 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*)의 제빵 적용]

[0170] 본 실시예에서는 천연종 (누룩이 첨가된 한국형 사위도우)으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) 149 균주와 공시균주 (*L. brevis* KACC 11433)를 각각 제빵에 적용하고, 그 특성을 확인하고자 하였다.

[0171] (1) 유산균 발효 반죽의 제조 및 분석

[0172] 강력분 100 g, 유산균수 2×10^{10} cfu/g, 가열 냉각수 100 g을 혼합한 후, 30℃의 발효기에서 발효시켜 유산균 발효 반죽을 제조하되, 반죽의 pH가 pH 4.2±0.2가 도달했을 때, 냉각한 후 유산균 발효 반죽의 pH, TTA 및 균수를 측정하였다.

[0173] 한편, 유산균주는 MRS broth에서 30℃의 온도로 22±2시간 동안 배양한 후, 원심분리하여 수득한 균체를 생리식염수로 세척한 것을 이용하였고, 최초 균 접종량은 반죽 1 g 당 1×10^8 cfu가 되도록 접종하였다.

[0174] 측정결과는 하기 표 12에 나타내었다.

표 12

[0175]

분리균주 (<i>L. brevis</i> 149) 적용 반죽			
pH	TTA (15 g 기준, ml)		균수 (cfu/g)
	pH 6.6	pH 8.5	
4.42	7.25	9.75	1.1×10^9
공시균주 (<i>L. brevis</i> KACC 11433) 적용 반죽			
pH	TTA (15 g 기준, ml)		균수 (cfu/g)
	pH 6.6	pH 8.5	
4.42	5.34	7.47	6.1×10^8

[0176] 측정결과, 분리균주 (*L. brevis* 149) 적용 반죽의 발효시간은 6시간이었고, 공시균주 (*L. brevis* KACC 11433) 적용 반죽의 발효시간은 8시간이었다.

[0177] 또한, 상기 표 12에서 보듯이, 분리균주가 적용된 반죽은 공시균주가 적용된 반죽보다 약 1.8배 높은 균수를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0178] (2) 빵 제조

[0179] 하기 표 13과 같이 증종의 조성성분을 믹서 (제품명: SK101S MIXER, 일본)에 투입하고, 2단에서 2분, 3단에서 1분 동안 반죽한 후, 반죽의 최종온도가 25℃가 되도록 더욱 혼합하였다. 그 후, 실온에서 30분간 방치한 다음 6℃ 발효기에 넣어 16시간 동안 1차 발효시켜 증종을 제조하였다.

[0180] 그 후, 하기 표 13에 기재된 본종의 조성성분 (강력분, 정제염, 정백당, 전지분유, 이스트, 정제수 및 유산균 발효 반죽)을 믹서 (제품명: SK101S MIXER, 일본)에 투입하고 1단에서 1분간 반죽한 후, 상기 증종을 첨가하여

2단에서 3분, 3단에서 2분간 혼합하였다. 그 후, 버터를 첨가하고 2단에서 3분, 3단에서 3분간 반죽하여 반죽의 최종 온도가 27℃가 되도록 하여 본종을 제조하였다.

[0181] 상기 본종은 27℃, 상대습도 85%인 발효기에 넣어 30분간 중간 발효를 시킨 후 상기 반죽을 일정한 크기로 분할한 다음 둥글리기를 하여 27℃, 상대습도 85%인 발효기에 넣어 15분간 숙성하였다. 숙성 후, 성형하여 식빵 케이스에 넣었다. 그 후, 상기 식빵 케이스에 넣은 반죽을 37℃, 상대습도 85%의 분위기에서 50분 동안 발효시켜 식빵 생지를 제조하였다. 상기 식빵 생지를 오븐에 넣고, 윗불 170℃, 아랫불 210℃에서 35분간 구웠다. 그 후, 실온에서 내부 온도가 32℃가 될 때까지 냉각하였다.

[0182] 제조된 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. brevis* KACC 11433)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. brevis* 149)가 적용된 빵의 사진은 도 18과 같았다 (도 18). 도 18은 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. brevis* KACC 11433)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. brevis* 149)가 적용된 빵의 사진이다.

표 13

	조성성분	대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	공시균주 (<i>L. brevis</i> KACC11433) 적용 빵	분리균주(<i>L. brevis</i> 149) 적용 빵
중종	강력분	70	70	70
	상업적 이스트	0.7	0.7	0.7
	리멀소프트	0.3	0.3	0.3
	정제수	42	42	42
본종	강력분	30	20	20
	정제염	1.8	1.8	1.8
	정백당	7	7	7
	전지분유	3	3	3
	버터	10	10	10
	상업적 이스트	0.6	0.6	0.6
	정제수	23	13	13
	유산균 발효반죽	-	20	20

[0184] (단위 : g)

[0185] (3) 빵의 물성 측정

[0186] 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. brevis* KACC 11433)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. brevis* 149)가 적용된 빵의 물성 (pH, 총적정 산도, 색도)을 측정하고자 하였다. pH, 총적정 산도, 색도 측정 방법은 상기 실시예 10에 기재된 방법과 동일한 방법을 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 14에 나타내었다.

표 14

		대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	공시균주 (<i>L. brevis</i> KACC 11433) 적용 빵	분리균주 (<i>L. brevis</i> 149) 적용 빵
	pH	5.53	5.25	5.29
	TTA (6.6/8.5)	2.27/4.87	3.65/6.86	3.54/6.61
	수분 함량	41.67 %	42.45%	42.39%
	2차 발효시간	55분	56분	56분
	비용적(Specific volume)	4.92	5.12	5.15
Hunter lab color values	L	85.11	84.19	85.92
	a	-2.06	-2.12	-2.35
	b	17.92	17.09	16.55

[0188] 실시결과, 분리균주가 적용된 빵은 공시균주가 적용된 빵보다 pH가 높고, 비용적이 큼을 확인할 수 있었다.

(4) 반죽의 가스 발생력 확인

대조군 (상업적 이스트만 적용된 본종), 공시균주 (*L. brevis* KACC 11433)가 적용된 본종, 분리균주 (*L. brevis* 149)가 적용된 본종의 가스 발생력을 비교확인하고자 하였다. 가스 발생력 측정은 반죽 25 g을 취하여 가스 발생력 측정기(Fermometer)를 이용하여 30℃에서 10시간 동안 측정하였다.

실시결과, 대조군 (상업적 이스트만 적용된 본종)보다 유산균주 (공시균주, 분리균주)가 적용된 본종의 가스 발생력이 우수함을 확인할 수 있었다. 다만, 분리균주와 공시균주간의 차이는 거의 나타나지 않음을 확인할 수 있었다 (도 19). 도 19는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스(*L. brevis* 149)가 적용된 본종의 가스 발생력을 확인한 결과이다.

(5) 빵의 노화도 측정

대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. brevis* KACC 11433)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. brevis* 149)가 적용된 빵의 경도 및 시간에 따른 노화 속도를 비교하고자 하였다.

경도 및 시간에 따른 노화 속도의 측정 방법은 상기 실시예 10에 기재된 방법과 동일하게 하였으며, 경도에 대한 값은 하기 표 15에 나타내었고, 시간에 따른 노화 속도의 결과는 도 20에 나타내었다.

표 15

1일차 (19 시간 경과)	
샘플	경도(Hardness)
대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	181.322
공시균주 (<i>L. brevis</i> KACC11433) 적용 빵	159.055
분리균주 (<i>L. brevis</i> 149) 적용 빵	155.287
3일차 (63 시간 경과)	
샘플	경도
대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	283.548
공시균주 (<i>L. brevis</i> KACC11433) 적용 빵	267.551
분리균주 (<i>L. brevis</i> 149) 적용 빵	243.507
4일차 (87 시간 경과)	
샘플	경도
대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	288.54
공시균주 (<i>L. brevis</i> KACC11433) 적용 빵	275.595
분리균주 (<i>L. brevis</i> 149) 적용 빵	253.402

실시결과, 유산균주 (공시균주, 분리균주)를 적용한 빵은 경도가 낮아 부드러운 것을 확인할 수 있었다. 특히, 분리균주 (*L. brevis* 149)가 적용된 빵은 가장 낮은 경도 값을 나타냄을 확인할 수 있었다.

한편, 시간에 따른 노화속도를 분석한 결과, 대조군 대비 유산균 적용 빵의 노화 속도가 느리며, 특히 분리균주가 적용된 빵의 노화 속도가 가장 느린 것을 확인할 수 있었다 (도 20). 도 20은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스(*L. brevis* 149)가 적용된 빵의 노화 속도를 확인한 결과이다.

(6) 빵의 향기 성분 분석

대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. brevis* KACC11433)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. brevis* 149)가 적용된 빵의 풍미 성분을 비교하기 위하여 GC/MS 시스템을 이용하여 향기 성분을 분석하였다.

시료 1 g에 대하여 분석을 실시하였고, GC/MS 분석 조건은 상기 표 5와 같았다. GC/MS 분석 후, 알코올(alcohol), 알데하이드(aldehyde), 케톤(ketone), 에스테르(ester), 산(acid) 류에 대한 전체적인 정략적 수치를 비교하고 (도 21), 하기 표 16에 대표적 향기 성분 22종에 대하여 각 성분의 상대적 비율을 백분율로 나타내었다.

표 16

향기 성분		대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)에 함유된 향기 성분의 비율 (%)		분리균주(<i>L. brevis</i> 149) 적용 빵에 함유된 향기 성분의 비율 (%)		공시균주 (<i>L. brevis</i> KACC 11433) 적용 빵에 함유된 향기 성분의 비율 (%)	
알코올	Ethyl alcohol	59.89	90.11	51.23	85.90	51.77	87.24
	1-Propanol	0.55		0.56		0.54	
	2-methyl-1-propanol	3.55		3.39		3.56	
	Isoamyl alcohol	15.89		16.91		16.97	
	1-hexanol	0.71		0.78		0.78	
	2-phenyl ethyl alcohol	9.52		13.03		13.62	
알데하이드	hexanal	0.33	2.58	0.50	2.76	0.43	2.71
	nonanal	0.56		0.83		0.65	
	furfural	0.16		0.41		0.32	
	Benzaldehyde	1.53		1.01		1.31	
케톤	2-heptanone	0.50	2.45	0.41	2.73	0.35	2.63
	acetoin	1.38		1.57		1.65	
	2-Nonanone	0.56		0.75		0.63	
에스테르	ethyl hexanoate	1.00	4.34	1.53	6.72	1.50	6.06
	ethyl octanoate	2.69		4.12		4.07	
	ethyl decanoate	0.31		0.50		0.49	
	Isoamyl lactate	0.34		0.58		0.00	
산	octanoic acid	0.22	0.32	0.46	1.70	0.30	1.18
	acetic acid	0.10		0.45		0.24	
	hexanoic acid	0.00		0.79		0.64	
기타	alpha-limonene	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19	0.19
합계		100	100.00	100	100	100	100

[0202] 휘발성 향기성분(alcohol, aldehyde, ketone, ester, acid 류)의 전체적인 정량적 수치를 비교한 결과, 유산균 (분리균주, 공시균주)이 적용된 빵에서 케톤 류, 알데하이드 류, 에스테르 류가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다. 케톤 류, 알데하이드 류, 에스테르 류는 부드럽고 마일드한 취를 나타내는 향기 성분으로, 본 발명의 분리균주 (*L. brevis* 149)가 적용된 빵은 풍미가 부드럽고 마일드함을 확인할 수 있었다. 또한, 유산균 (분리균주, 공시균주)가 적용된 빵은 산 (acid)류가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다.

[0203] 하지만, 상업적 이스트만 첨가된 빵은 알코올 류가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다. 알코올 류는 향이 가볍고 강한 취를 나타내는 향기 성분으로, 상업적 이스트만 적용된 빵은 풍미가 좋지 못함을 확인할 수 있었다.

[0204] 도 21은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 브레비스(*L. brevis* 149)가 적용된 빵의 향기성분을 정량적 수치로 비교한 결과이다.

[0205] 한편, 대표적 향기 성분 분석 결과, 상기 표 16에서 확인되는 바와 같이 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)보다 유산균 (분리균주, 공시균주)이 적용된 빵이 풋내를 일으키는 에틸 알코올(ethyl alcohol)의 함량이 적음을 확인할 수 있었다. 또한, 바나나, 서양배의 달달한 향취를 나타내는 이소아밀 알코올(isoamyl alcohol), 옥수수의 달콤한 향취를 내는 2-페닐 에틸 알코올(2-phenyl ethyl alcohol) 및 버터향의 부드러운 풍미를 나타내는 케톤 류 중 아세토인은 유산균 첨가 빵에서 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 또한, 시트러스(citrus), 패티(fatty)향 (pleasant flavor)을 나타내는 노나날(nonanal)과 카라멜, 캔디, 아몬드 향을 나타내는 푸르푸랄(furfural), 달달한 향을 내는 에스테르 류의 물질은 전체적으로 분리균주(*L. brevis* 149)가 적용된 빵에서 높게 나타남을 확인할 수 있었다.

[실시예 13: 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 샌프란시스코시스(*L. sanfranciscensis* 142)의 제빵 적용]

[0207] 본 실시예에서는 천연종 (누룩이 첨가된 한국형 사위도우)으로부터 분리한 락토바실러스 샌프란시스코시스(*L. sanfranciscensis*) 142 균주와 공시균주 (*L. sanfranciscensis* KACC 12431)를 각각 제빵에 적용하고, 그 특성을 확인하고자 하였다.

[0208] (1) 유산균 발효 반죽의 제조 및 분석

[0209] 강력분 100 g, 유산균수 2×10^{10} cfu/g, 가열 냉각수 100 g을 혼합한 후, 30°C의 발효기에서 발효시켜 유산균 발효 반죽을 제조하되, 반죽의 pH가 pH 4.2±0.2가 도달했을 때, 냉각한 후 유산균 발효 반죽의 pH, TTA 및 균수를 측정하였다. 이때, pH, TTA 측정은 상기 실시예 10에 기재된 방법을 이용하여 측정하였다.

[0210] 한편, 유산균주는 MRS broth에서 30°C의 온도로 22±2시간 동안 배양한 후, 원심분리하여 수득한 균체를 생리식염수로 세척한 것을 이용하였고, 최초 균 접종량은 반죽 1 g 당 1×10^8 cfu가 되도록 접종하였다.

[0211] 측정결과는 하기 표 17에 나타내었다.

표 17

분리균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 반죽			
pH	TTA (15 g 기준, ml)		균수 (cfu/g)
	pH 6.6	pH 8.5	
4.41	6.41	9.17	1.4×10^9
공시균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> KACC 12431) 적용 반죽			
pH	TTA (15 g 기준, ml)		균수 (cfu/g)
	pH 6.6	pH 8.5	
4.47	6.53	9.26	1.2×10^9

[0212]

[0213] 측정결과, 분리균주 (*L. sanfranciscensis* 142) 적용 반죽의 발효시간은 6시간이었고, 공시균주 (*L. sanfranciscensis* KACC 12431) 첨가 반죽의 발효시간은 8시간으로, 분리균주가 공시균주보다 2시간 더 빠른 것으로 확인할 수 있었다.

[0214] 또한, 상기 표 17에서 보듯이, 분리균주가 적용된 반죽의 균수는 공시균주가 적용된 반죽보다 보다 많음을 확인할 수 있었다.

[0215] (2) 빵 제조

[0216] 하기 표 18과 같이 중종의 조성성분을 믹서 (제품명: SK101S MIXER, 일본)에 투입하고, 2단에서 2분, 3단에서 1분 동안 반죽한 후, 반죽의 최종온도가 25°C가 되도록 더욱 혼합하였다. 그 후, 실온에서 30분간 방치한 다음 6°C 발효기에 넣어 16시간 동안 1차 발효시켜 중종을 제조하였다.

[0217] 그 후, 하기 표 18에 기재된 본종의 조성성분 (식빵전용분, 정제염, 정백당, 전지분유, 이스트, 정제수 및 유산균 발효 반죽)을 믹서 (제품명: SK101S MIXER, 일본)에 투입하고 1단에서 1분간 반죽한 후, 상기 중종을 첨가하여 2단에서 3분, 3단에서 2분간 혼합하였다. 그 후, 버터를 첨가하고 2단에서 3분, 3단에서 3분간 반죽하여 반죽의 최종 온도가 27°C가 되도록 하여 본종을 제조하였다.

[0218] 상기 본종은 27°C, 상대습도 85~90%인 발효기에 넣어 30분간 중간 발효를 시킨 후 상기 반죽을 일정한 크기로 분할한 다음 둥글리기를 하여 27°C, 상대습도 85~90%인 발효기에 넣어 15분간 숙성하였다. 숙성 후, 성형하여 식빵 케이스에 넣었다. 그 후, 상기 식빵 케이스에 넣은 반죽을 37°C, 상대습도 85~90%의 분위기에서 50~60분 동안 발효시켜 식빵 생지를 제조하였다. 상기 식빵 생지를 오븐에 넣고, 윗불 170°C, 아랫불 210°C에서 35분간 구웠다. 그 후, 실온에서 내부 온도가 32°C가 될 때까지 냉각하였다.

[0219] 제조된 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. sanfranciscensis* KACC 12431)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. sanfranciscensis* 142)가 적용된 빵의 사진은 도 22와 같았다 (도 22). 도 22는 대조군 (상업적 이스트)만 적용된 빵, 공시균주 (*L. sanfranciscensis* KACC 12431)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. sanfranciscensis* 142)가 적용된 빵의 사진이다.

표 18

	조성성분	대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	공시균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> KACC 12431) 적용 빵	분리균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵
중종	강력분	70	70	70
	상업적 이스트	0.7	0.7	0.7
	리멀소프트	0.3	0.3	0.3
	정제수	42	42	42
본종	강력분	30	20	20
	정제엽	1.8	1.8	1.8
	정백당	7	7	7
	전지분유	3	3	3
	버터	10	10	10
	상업적 이스트	0.6	0.6	0.6
	정제수	23	13	13
	유산균 발효반죽	-	20	20

(3) 빵의 물성 측정

대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (분리균주 (*L. sanfranciscensis* KACC 12431)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. sanfranciscensis* 142)가 적용된 빵의 물성 (pH, 총적정 산도, 색도)을 측정하고자 하였다.

pH, 총적정 산도, 색도 측정 방법은 상기 실시예 10에 기재된 방법과 동일한 방법을 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 19에 나타내었다.

표 19

	대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	공시균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> KACC 12431) 적용 빵	분리균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵	
pH	5.53	5.29	5.19	
TTA (6.6/8.5)	2.27/4.87	3.55/6.15	4.56/7.57	
수분 함량	41.67 %	41.25%	41.28%	
2차 발효시간	55분	54분	53분	
비용적(Specific volume)	4.92	5.01	5.03	
Hunter lab color values	L	85.11	84.32	85.01
	a	-2.06	-2.19	-2.21
	b	17.92	17.11	16.88

실시결과, 분리균주가 적용된 빵은 공시균주가 적용된 빵보다 pH가 높고, 비용적이 큼을 확인할 수 있었다.

(4) 반죽의 가스 발생력 확인

대조군 (상업적 이스트만 적용된 본종), 공시균주 (*L. sanfranciscensis* KACC 12431)가 적용된 본종, 분리균주 (*L. sanfranciscensis* 142)가 적용된 본종의 가스 발생력을 비교확인하고자 하였다. 가스 발생력 측정은 반죽 25 g을 취하여 가스 발생력 측정기(Fermometer)를 이용하여 30℃에서 10시간 동안 측정하였다.

실시결과, 대조군 (상업적 이스트만 적용된 본종)보다 유산균주 (공시균주, 분리균주)가 적용된 본종의 가스발생력이 더 우수함을 확인할 수 있었다. 다만, 분리균주와 공시균주 간의 차이는 거의 나타나지 않음을 확인할 수 있었다 (도 23). 도 23은 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 센프란시스센시스(*L. sanfranciscensis*) 142가 적용된 본종의 가스 발생력을 확인한 결과이다.

(5) 빵의 노화도 측정

[0230] 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. sanfranciscensis* KACC 12431)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. sanfranciscensis* 142)가 적용된 빵의 경도 및 시간에 따른 노화 속도를 비교하고자 하였다.

[0231] 경도 및 시간에 따른 노화 속도의 측정 방법은 상기 실시예 10에 기재된 방법과 동일하였으며, 경도에 대한 값은 하기 표 20에 나타내었고, 시간에 따른 노화 속도의 결과는 도 24에 나타내었다.

표 20

[0232]

1일차 (19 시간 경과)	
샘플	경도 (Hardness)
대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	181.322
공시균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> KACC 12431) 적용 빵	166.204
분리균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵	161.019
3일차 (63 시간 경과)	
샘플	경도
대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	260.548
공시균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> KACC 12431) 적용 빵	252.32
분리균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵	251.052
4일차 (87 시간 경과)	
샘플	경도
대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	288.54
공시균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> KACC 12431) 적용 빵	277.873
분리균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵	275.314

[0233] 실시결과, 유산균주 (공시균주, 분리균주)가 적용된 빵은 경도가 낮아 부드러운 것을 확인할 수 있었다. 특히, 분리균주 (*L. sanfranciscensis* 142)가 첨가된 빵은 가장 낮은 경도 값을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0234] 한편, 시간에 따른 노화속도를 분석한 결과, 대조군 대비 유산균 적용 빵의 노화 속도가 더 느린 것을 확인할 수 있었다 (도 24). 도 24는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 셴프란시스센시스(*L. sanfranciscensis*) 142가 적용된 빵의 노화 속도를 확인한 결과이다.

[0235] (6) 빵의 향기 성분 분석

[0236] 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 공시균주 (*L. sanfranciscensis* KACC 12431)가 적용된 빵, 분리균주 (*L. sanfranciscensis* 142)가 적용된 빵의 풍미 성분을 비교하기 위하여 GC/MS 시스템을 이용하여 향기 성분을 분석하였다.

[0237] 시료 1 g에 대하여 분석을 실시하였고, GC/MS 분석 조건은 상기 표 5와 같았다. GC/MS 분석 후, 알코올(alcohol), 알데하이드(aldehyde), 케톤(ketone), 에스테르(ester), 산(acid) 류에 대한 전체적인 정략적 수치를 비교하고 (도 25), 하기 표 21에 대표적 향기 성분 22종에 대하여 각 성분의 상대적 비율을 백분율로 나타내었다.

표 21

[0238]

향기성분		대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)에 함유된 향기 성분의 비율 (%)		분리균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵에 함유된 향기 성분의 비율 (%)		공시균주 (<i>L. Sanfranciscensis</i> KACC 12431) 적용 빵에 함유된 향기 성분의 비율 (%)	
알코올	Ethyl alcohol	59.89	90.11	52.03	86.60	51.18	86.28
	1-Propanol	0.55		0.51		0.52	
	2-methyl-1-propanol	3.55		3.66		3.91	
	Isoamyl alcohol	15.89		18.26		19.08	
	1-hexanol	0.71		0.89		1.08	
	2-phenyl ethyl alcohol	9.52		11.25		10.52	

알데하이드	hexanal	0.33	2.58	0.47	2.68	0.45	2.73
	nonanal	0.56		0.54		0.59	
	furfural	0.16		0.38		0.51	
	Benzaldehyde	1.53		1.29		1.18	
케톤	2-heptanone	0.50	2.45	0.36	2.40	0.34	2.42
	acetoin	1.38		1.43		1.48	
	2-Nonanone	0.56		0.60		0.59	
에스테르	ethyl hexanoate	1.00	4.34	1.68	7.42	1.83	7.36
	ethyl octanoate	2.69		4.71		4.73	
	ethyl decanoate	0.31		0.48		0.47	
	Isoamyl lactate	0.34		0.55		0.32	
산	octanoic acid	0.22	0.32	0.33	0.59	0.00	0.95
	acetic acid	0.10		0.26		0.00	
	hexanoic acid	0.00		0.00		0.95	
기타	alpha-limonene	0.20	0.20	0.31	0.31	0.26	0.26
합계		100	100	100	100	100	100

- [0239] 휘발성 향기성분(alcohol, aldehyde, ketone, ester, acid 류)의 전체적인 정량적 수치를 비교한 결과, 유산균(분리균주, 공시균주)이 적용된 빵에서 에스테르 류가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다. 에스테르 류는 부드럽고マイル드한 취를 나타내는 향기 성분으로, 본 발명의 분리균주 (*L. sanfranciscensis* 142)가 적용된 빵은 풍미가 부드럽고マイル드함을 확인할 수 있었다. 또한, 유산균(분리균주, 공시균주)가 적용된 빵은 산(acid) 류가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다
- [0240] 하지만, 상업적 이스트만 적용된 빵은 알코올 류가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다. 알코올 류는 향이 가볍고 강한 취를 나타내는 향기 성분으로, 상업적 이스트만 첨가된 빵은 풍미 스펙트럼이 좋지 못함을 확인할 수 있었다.
- [0241] 도 25는 천연종으로부터 분리한 락토바실러스 센프란시스센시스(*L. sanfranciscensis*) 142가 적용된 빵의 향기 성분을 정량적 수치로 비교한 결과이다.
- [0242] 한편, 대표적 향기 성분 분석 결과, 상기 표 21에서 확인되는 바와 같이 대조군(상업적 이스트만 적용된 빵)보다 유산균(분리균주, 공시균주)이 적용된 빵이 꽃내를 일으키는 에틸 알코올(ethyl alcohol)의 함량이 적음을 확인할 수 있었다. 또한, 바나나, 서양배의 달달한 향취를 나타내는 이소아밀 알코올(isoamyl alcohol), 옥수수 등의 달콤한 향취를 내는 2-페닐 에틸 알코올(2-phenyl ethyl alcohol), 카라멜, 캔디, 아몬드 향은 나타내는 푸르푸랄(furfural), 버터향의 부드러운 풍미를 나타내는 케톤 류 중 아세토인, 달달한 향을 내는 에스테르 류의 물질은 유산균이 적용된 빵에서 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 또한, 공시균주가 적용된 빵은 대조군 및 분리균주가 적용 빵과는 다른 산(acid) 류 조성을 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [0243] [실시에 14: 천연종로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*Sac. cerevisiae*), 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*), 락토바실러스 브레비스 (*L. brevis*), 락토바실러스 센프란시스센시스 (*L. sanfranciscensis*)가 적용된 빵의 관능평가 및 특성 확인]
- [0244] 본 실시예에서는 천연종(누룩이 첨가된 한국형 사워도우)으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*Sac. cerevisiae*), 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*), 락토바실러스 브레비스 (*L. brevis*), 락토바실러스 센프란시스센시스 (*L. sanfranciscensis*)가 첨가된 빵의 관능평가 및 특성을 확인하고자 하였다.
- [0245] 상기 실시예에서 제조된 각 빵을 시식하게 한 후, 식감 및 풍미에 대하여 관능평가를 실시하였다. 관능평가의 결과는 식감 및 풍미에 대하여 9점 척도법을 이용하였다 (9-매우 우수, 1-매우 나쁨).
- [0246] 또한, 각 빵에 대한 비용적, pH, TTA, 수분함량의 측정방법은 상기 실시예 10에 기재된 방법과 동일하였다.
- [0247] 관능평가 및 특성에 대한 결과는 하기 표 22에 나타내었다.

표 22

[0248]

항목	적용 제품 관능평가 및 제품 특성							
	대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	분리효모 (<i>Sac. cerevisiae</i> 01435) 적용 빵	공시균주 (<i>L. curvatus</i> KCCM 40715) 적용 빵	분리균주 (<i>L. curvatus</i> 104) 적용 빵	공시균주 (<i>L. brevis</i> KACC 11433) 적용 빵	분리균주 (<i>L. brevis</i> 149) 적용 빵	공시균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> KACC 12431) 적용 빵	분리균주 (<i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵
비용적	4.92	4.98	4.98	5.01	5.12	5.15	5.01	5.03
*식감	7.5	8.0	7.8	7.9	7.2	7.7	7.2	7.9
*풍미	7.5	8.0	8.1	8.2	7.6	7.6	7.4	7.4
pH	5.53	5.46	5.41	5.39	5.25	5.29	5.29	5.19
TTA (6.6/8.5)	2.27/4.87	2.43/4.91	2.51/5.22	2.55/5.39	3.65/6.86	3.54/6.61	3.55/6.15	4.56/7.57
수분함량 (%)	41.67	41.73	41.70	41.71	42.45	42.39	41.25	41.28

[0249]

실시결과, 분리효모 (*Sac. cerevisiae* 01435)가 적용된 빵은 대조군 (상업적 이스트)이 적용된 빵보다 부드러운 식감이 우수하고, 가스취가 적어 풍미가 마일드하여 우수한 식감 및 풍미 점수를 받음을 확인할 수 있었다.

[0250]

락토바실러스 커바투스 분리균주 (*L. curvatus* 104)가 적용된 빵은 대조군 (상업적 이스트)이 적용된 빵보다 식감 및 풍미 점수가 우수함을 확인할 수 있었다. 분리균주와 공시균주 (*L. curvatus* KCCM 40715)간의 큰 차이는 없었다.

[0251]

락토바실러스 브레비스 분리균주 (*L. brevis* 149)가 적용된 빵은 대조군 (상업적 이스트) 및 공시균주 (*L. brevis* KACC11433)보다 식감 및 풍미 점수가 우수함을 확인할 수 있었다. 분리균주가 적용된 빵은 식감이 부드러운 반면, 공시균주가 적용된 빵은 다소 딱지는 식감을 나타내 좋은 평가를 받지 못하였다.

[0252]

락토바실러스 샌프란시스코 분리균주(*L. sanfranciscensis* 142)가 적용된 빵은 대조군 (상업적 이스트) 및 공시균주 (*L. sanfranciscensis* KACC 12431)보다 식감이 우수함을 확인할 수 있었다. 분리균주가 적용된 빵은 식감이 부드러운 반면, 공시균주가 적용된 빵은 다소 딱지는 식감을 나타내 좋은 평가를 받지 못하였다.

[0253]

[실시에 15: 천연종으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*), 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*), 락토바실러스 샌프란시스코(*L. sanfranciscensis*) 및 혼합균주의 제빵 적용]

[0254]

본 실시예에서는 천연종 (누룩이 첨가된 한국형 사워도우)으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) 01435, 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 104 균주, 락토바실러스 브레비스 (*L. brevis*) 149 균주, 락토바실러스 샌프란시스코(*L. sanfranciscensis*) 142 균주 및 혼합균주 (*S. cerevisiae* 01435, *L. curvatus* 104, *L. brevis* 149, *L. sanfranciscensis* 142)를 각각 제빵에 적용하고, 그 특성을 확인하고자 하였다.

[0255]

(1) 유산균 발효 반죽의 제조 및 분석

[0256]

락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 104, 락토바실러스 브레비스 (*L. brevis*) 149, 락토바실러스 샌프란시스코(*L. sanfranciscensis*) 142, 혼합유산균 (*L. curvatus* 104, *L. brevis* 149, *L. sanfranciscensis* 142)이 적용된 유산균 발효 반죽을 제조한 후, 특성을 분석하고자 하였다.

[0257]

강력분 100 g, 유산균수 2×10^{10} cfu/g, 가열 냉각수 100 g을 혼합한 후, 30℃의 발효기에서 발효시켜 유산균 발효 반죽을 제조하되, 반죽의 pH가 pH 4.2±0.2가 도달했을 때, 냉각한 후 유산균 발효 반죽의 pH, TTA 및 균수를 측정하였다. 이때, pH, TTA 측정은 상기 실시예 10에 기재된 방법을 이용하여 측정하였다.

[0258]

이때, 유산균주는 MRS broth에서 30℃의 온도로 22±2시간 동안 배양한 후, 원심분리하여 수득한 균체를 생리식

염수로 세척한 것을 이용하였고, 최초 균 접종량은 반죽 1 g 당 1×10^8 cfu가 되도록 접종하였다.

[0259] 또한, 혼합 분리균주가 적용된 유산균 발효 반죽은 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 104, 락토바실러스 브레비스 (*L. brevis*) 149, 락토바실러스 샌프란시스코시스 (*L. sanfranciscensis*) 142가 각각 적용된 유산균 발효 반죽을 동량으로 혼합하여 제조하였다.

[0260] 실시결과는 하기 표 23에 나타내었다.

표 23

분리균주 반죽	발효 시간	pH	TTA (15 g 기준, ml)		균수 (cfu/g)
			pH 6.6	pH 8.5	
<i>L. curvatus</i> 104	3	4.38	4.27	5.81	2.1×10^9
<i>L. brevis</i> 149	6	4.40	5.72	7.32	1.4×10^9
<i>L. sanfranciscensis</i> 142	6	4.30	5.38	7.00	2.3×10^9
<i>L. curvatus</i> 104+ <i>L. brevis</i> 149+ <i>L. sanfranciscensis</i> 142	-	4.34	4.30	5.95	1.7×10^9

[0262] 표 23에서 보듯이, 각 반죽간의 pH는 큰 차이가 없었으며, 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*) 104가 적용된 반죽의 균수는 2.1×10^9 cfu/g, 락토바실러스 브레비스 (*L. brevis*) 149가 적용된 반죽의 균수는 1.4×10^9 cfu/g, 락토바실러스 샌프란시스코시스 (*L. sanfranciscensis*) 142가 적용된 반죽의 균수는 2.3×10^9 cfu/g, 혼합 분리균주 (*L. curvatus* 104, *L. brevis* 149, *L. sanfranciscensis* 142)가 적용된 반죽의 균수는 1.7×10^9 cfu/g임을 확인할 수 있었다.

[0263] (2) 빵 제조

[0264] 하기 표 24와 같이 분리효모와 분리균주를 조성한 후, 각각 E-H set라고 지칭하였다. 그 후, 각각 빵에 적용하여 조성에 따른 특성을 확인하였다.

[0265] 빵의 제조는, 하기 표 25와 같이 중종의 조성성분 (강력분, 이스트, 리멀소프트, 정제수)을 믹서 (제품명: SK101S MIXER, 일본)에 투입하고, 2단에서 2분, 3단에서 1분 동안 반죽한 후, 반죽의 최종온도가 25℃가 되도록 더욱 혼합하였다. 그 후, 실온에서 30분간 방치한 다음 6℃ 발효기에 넣어 16시간 동안 1차 발효시켜 중종을 제조하였다.

[0266] 그 후, 하기 표 25에 기재된 본종의 조성성분 (강력분, 정제염, 정백당, 전지분유, 이스트, 정제수 및 유산균 발효 반죽을 믹서 (제품명: SK101S MIXER, 일본)에 투입하고 1단에서 1분간 반죽한 후, 상기 중종을 첨가하여 2단에서 3분, 3단에서 2분간 혼합하였다. 그 후, 버터를 첨가하고 2단에서 3분, 3단에서 3분간 반죽하여 반죽의 최종 온도가 27℃가 되도록 하여 본종을 제조하였다.

[0267] 상기 본종은 27℃, 상대습도 85%인 발효기에 넣어 30분간 중간 발효를 시킨 후 상기 반죽을 일정한 크기로 분할한 다음 둥글리기를 하여 27℃, 상대습도 85%인 발효기에 넣어 15분간 숙성하였다. 숙성 후, 성형하여 식빵 케이스에 넣었다. 그 후, 상기 식빵 케이스에 넣은 반죽을 37℃, 상대습도 85%의 분위기에서 50분 동안 발효시켜 식빵 생지를 제조하였다. 상기 식빵 생지를 오븐에 넣고, 윗불 170℃, 아랫불 210℃에서 35분간 구웠다. 그 후, 실온에서 내부 온도가 32℃가 될 때까지 냉각하였다.

[0268] 제조된 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 커바투스 104 균주가 적용된 빵, 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 브레비스 149 균주가 적용된 빵, 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 샌프란시스코시스 142 균주가 적용된 빵, 사카로마이세스 세레비지에 01435, 락토바실러스 커바투스 104 균주, 락토바실러스 브레비스 149 균주 및 락토바실러스 샌프란시스코시스 142 균주가 적용된 빵의 사진은 도 26과 같았다 (도 26). 도 26은 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 커바투스 104 균주가 적용된 빵, 사카로마이세스 세레비지에

01435 및 락토바실러스 브레비스 149 균주가 적용된 빵, 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 셴프란시스센시스 142 균주가 적용된 빵, 사카로마이세스 세레비지에 01435, 락토바실러스 커바투스 104 균주, 락토바실러스 브레비스 149 균주 및 락토바실러스 셴프란시스센시스 142 균주가 적용된 빵의 사진이다.

표 24

구분	실험군
대조군	상업적 이스트
E set	<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. curvatus</i> 104
F set	<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. brevis</i> 149
G set	<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. sanfranciscensis</i> 142
H set	<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. curvatus</i> 104 + <i>L. brevis</i> 149 + <i>L. sanfranciscensis</i> 142

[0269]

표 25

중종	조성성분	대조군	E set	F set	G set	H set
중종	강력분	70	70	70	70	70
	상업적 이스트	0.7	-	-	-	-
	분리효모	-	36	36	36	36
	리멀소프트	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	급수	42	42	42	42	42
본종	강력분	30	20	20	20	20
	정제염	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
	정백당	7	7	7	7	7
	전지분유	3	3	3	3	3
	버터	10	10	10	10	10
	상업적 이스트	0.6	-	-	-	-
	분리효모	-	31	31	31	31
	급수	23	13	13	13	13
유산균 발효반죽	-	20	20	20	20	

[0270]

(단위: g)

(3) 빵의 물성 측정

[0271]

[0272]

대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), E set가 적용된 빵, F set가 적용된 빵, G set가 적용된 빵, H set가 적용된 빵의 물성 (pH, 총적정 산도, 색도)을 측정하고자 하였다. pH, 총적정 산도, 색도 측정 방법은 상기 실시예 10에 기재된 방법과 동일한 방법을 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 26에 나타내었다.

[0273]

표 26

	대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	E set가 적용된 빵	F set가 적용된 빵	G set가 적용된 빵	H set가 적용된 빵	
pH	5.53	5.27	5.26	5.31	5.29	
TTA (6.6/8.5)	2.27/4.87	3.37/5.24	3.41/5.31	3.21/5.13	3.29/5.21	
수분 함량	41.67%	41.42%	41.51%	41.49%	41.57%	
2차 발효시간	55분	55분	54분	55분	55분	
비용적 (Specific volume)	4.92	4.94	4.94	4.90	4.98	
Hunter lab color values	L	85.11	84.54	84.92	85.01	84.91
	a	-2.06	-2.31	-2.11	-2.18	-2.17
	b	17.92	17.42	17.23	17.31	17.29

[0274]

[0275] 실시결과, 분리균주 (E, F, G, H set)가 적용된 빵은 대조군보다 pH가 낮음을 확인할 수 있었다. 또한, H set (*S. cerevisiae* 01435 + *L. curvatus* 104 + *L. brevis* 149 + *L. sanfranciscensis* 142)가 적용된 빵은 다른 빵에 비하여 비용적이 다소 큼을 확인할 수 있었다.

[0276] **(4) 반죽의 가스 발생력 확인**

[0277] 대조군 (상업적 이스트만 적용된 본종), E, F, H set가 각각 적용된 본종의 가스 발생력을 비교확인하고자 하였다. 가스 발생력 측정은 반죽 25 g을 취하여 가스 발생력 측정기(Fermometer)를 이용하여 30℃에서 10시간 동안 측정하였다.

[0278] 실시결과, E, F, H set가 적용된 본종의 경우 대조군과 전반적으로 비슷하였으나, 초기에는 E, F, H set가 적용된 본종의 가스 발생력이 다소 높음을 확인할 수 있었다 (도 27). 도 27은 상업적 이스트만 적용된 본종 (control), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 커바투스 104 균주가 적용된 본종 (E set 적용 본종), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 브레비스 149 균주가 적용된 본종 (F set 적용 본종), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 셴프란시스센시스 142 균주가 적용된 본종 (G set 적용 본종), 사카로마이세스 세레비지에 01435, 락토바실러스 커바투스 104 균주, 락토바실러스 브레비스 149 균주 및 락토바실러스 셴프란시스센시스 142 균주가 적용된 본종 (F set 적용 본종)의 가스 발생력을 확인한 결과이다.

[0279] **(5) 빵의 노화도 측정**

[0280] 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), E, F, H set가 각각 적용된 빵의 경도 및 시간에 따른 노화 속도를 비교하고자 하였다.

[0281] 경도 및 시간에 따른 노화 속도의 측정 방법은 상기 실시예 10에 기재된 방법과 동일하였으며, 경도에 대한 값은 하기 표 27에 나타내었고, 시간에 따른 노화 속도의 결과는 도 28에 나타내었다.

표 27

[0282]

1일차 (19 시간 경과)	
샘플	경도 (Hardness)
대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	165.972
E set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. curvatus</i> 104) 적용 빵	196.242
F set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. brevis</i> 149) 적용 빵	170.435
G set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵	197.895
H set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. curvatus</i> 104 + <i>L. brevis</i> 149 + <i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵	182.766
3일차 (63 시간 경과)	
샘플	경도
대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	260.353
E set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. curvatus</i> 104) 적용 빵	249.482
F set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. brevis</i> 149) 적용 빵	248.281
G set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵	238.799
H set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. curvatus</i> 104 + <i>L. brevis</i> 149 + <i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵	253.967
4일차 (87 시간 경과)	
샘플	경도
대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	281.774
E set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. curvatus</i> 104) 적용 빵	269.967

F set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. brevis</i> 149) 적용 빵	275.289
G set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵	264.063
H set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. curvatus</i> 104 + <i>L. brevis</i> 149 + <i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵	268.063

[0283] 실시결과, E, F, G, H set가 적용된 빵은 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)보다 경도가 낮아 부드러운 것을 확인할 수 있었다.

[0284] 한편, 시간에 따른 노화속도를 분석한 결과, 모든 빵의 노화 속도가 유사함을 확인할 수 있었다 (도 28). 도 28은 상업적 이스트만 적용된 빵 (control), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 커바투스 104 균주가 적용된 빵 (E set 적용 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 브레비스 149 균주가 적용된 빵 (F set 적용 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 셴프란시스센시스 142 균주가 적용된 빵 (G set 적용 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435, 락토바실러스 커바투스 104 균주, 락토바실러스 브레비스 149 균주 및 락토바실러스 셴프란시스센시스 142 균주가 적용된 빵 (H set 적용 빵)의 노화 속도를 확인한 결과이다.

[0285] (6) 빵의 향기 성분 분석

[0286] 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵), E, F, H set가 각각 적용된 빵의 풍미 성분 발현을 비교하기 위하여 GC/MS 시스템을 이용하여 향기 성분을 분석하였다.

[0287] 시료 1 g에 대하여 분석을 실시하였고, GC/MS 분석 조건은 상기 표 5와 같았다. GC/MS 분석 후, 알코올 (alcohol), 알데하이드(aldehyde), 케톤(ketone), 에스테르(ester), 산(acid) 류에 대한 전체적인 정량적 수치를 비교하고 (도 31), 하기 표 28에 대표적 향기 성분 22종에 대하여 각 성분의 상대적 비율을 백분율로 나타내었다.

표 28

[0288]

향기 성분		대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)에 함유된 향기 성분 비율 (%)		E set가 적용된 빵에 함유된 향기 성분 비율 (%)		F set가 적용된 빵에 함유된 향기 성분 비율 (%)		G set가 적용된 빵에 함유된 향기 성분 비율 (%)		H set가 적용된 빵에 함유된 향기 성분 비율 (%)	
알코올	Ethyl alcohol	55.53	87.38	43.87	86.79	41.01	83.80	43.17	83.49	48.32	86.26
	1-Propanol	0.52		0.39		0.47		0.48		0.40	
	2-methyl-1-propanol	0.31		3.05		2.51		2.47		2.79	
	Isoamyl alcohol	18.05		21.16		19.70		18.77		19.40	
	1-hexanol	1.24		1.48		1.48		1.64		1.50	
	2-phenyl ethyl alcohol	11.72		16.85		18.63		16.96		13.85	
알데하이드	hexanal	0.64	3.45	0.56	3.95	0.67	3.70	0.72	3.89	0.65	3.50
	nonanal	0.82		0.87		1.35		1.26		0.81	
	furfural	0.60		0.89		0.57		0.70		0.64	
	Benzaldehyde	1.38		1.63		1.11		1.22		1.40	
케톤	2-heptanone	0.47	2.33	0.48	3.65	0.57	4.38	0.59	4.80	0.80	4.25
	acetoin	1.33		2.54		2.85		3.27		2.86	
	2-Nonanone	0.54		0.63		0.96		0.93		0.59	

에스테르	ethyl hexanoate	1.31	6.18	1.61	4.63	1.73	5.90	1.68	5.70	1.33	4.54
	ethyl octanoate	3.81		2.39		3.38		3.15		2.17	
	ethyl decanoate	0.42		0.27		0.35		0.33		0.22	
	Isoamyl lactate	0.64		0.35		0.44		0.54		0.82	
산	octanoic acid	0.42	0.42	0.00	0.80	0.42	1.99	0.21	1.84	0.00	1.15
	acetic acid	0.00		0.25		0.48		0.51		0.54	
	hexanoic acid	0.00		0.55		1.09		1.12		0.60	
기타	alpha-limonene	0.24	0.24	0.18	0.18	0.24	0.24	0.29	0.29	0.30	0.30
	합계	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

[0289] 휘발성 향기성분(alcohol, aldehyde, ketone, ester, acid 류)의 전체적인 정량적 수치를 비교한 결과, E, F, G, H set가 적용된 빵에서 부드럽고 마일드한 취를 나타내는 케톤 류가 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)에 비하여 다량 검출되었으며, 그 중 H set가 적용된 빵에서 가장 많은 케톤 류가 검출됨을 확인할 수 있었다. 또한, 부드럽고 마일드한 취를 나타내는 알데하이드 류는 E set가 적용된 빵에서 다량으로 검출되었다. 또한, E, F, G, H set가 적용된 빵이 대조군이 적용된 빵에 비하여 산 (acid) 류가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다.

[0290] 하지만, 대조군은 가볍고 강한 취를 나타내는 에스테르 류가 다량 검출되어 풍미 스펙트럼이 좋지 못함을 확인할 수 있었다.

[0291] 도 29는 상업적 이스트만 적용된 빵 (control), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 커바투스 104 균주가 적용된 빵 (E set 적용 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 브레비스 149 균주가 적용된 빵 (F set 적용 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435 및 락토바실러스 샌프란시스코센시스 142 균주가 적용된 빵 (G set 적용 빵), 사카로마이세스 세레비지에 01435, 락토바실러스 커바투스 104 균주, 락토바실러스 브레비스 149 균주 및 락토바실러스 샌프란시스코센시스 142 균주가 적용된 빵 (F set 적용 빵)의 향기성분을 정량적 수치로 비교한 결과이다.

[0292] 한편, 대표적 향기 성분 분석 결과, 상기 표 28에서 확인되는 바와 같이 E, F, G, H set를 적용한 빵은 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵) 대비 풋내를 일으키는 에틸 알코올(ethyl alcohol)의 함량이 적음을 확인할 수 있었다. 또한, 바나나, 서양배의 달달한 향취를 나타내는 이소아밀 알코올(isoamyl alcohol), 옥수수의 달콤한 향취를 내는 2-페닐 에틸 알코올(2-phenyl ethyl alcohol)은 E, F, G, H set를 적용한 빵에서 다량 검출되었고, 시트러스(citrus), 패티(fatty)향 (pleasant flavor)을 나타내는 노나날(nonanal)은 F set 및 G set를 적용한 빵에서 높게 나타났다. 또한, 버터향의 부드러운 풍미를 나타내는 케톤 류 중 아세트산은 E, F, G, H set를 적용한 빵이 대조군 대비 전반적으로 높은 함량을 나타내었다. 또한, 산 (acid) 류는 E, F, G, H set를 적용한 빵에서 대조군 대비 전반적으로 높은 함량을 나타내었고, 그 중 F set 및 G set를 적용한 빵에서 다량으로 검출됨을 확인할 수 있었다.

[0293] [실시에 16: 천연종으로부터 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*S. cerevisiae*), 락토바실러스 커바투스(*L. curvatus*), 락토바실러스 브레비스 (*L. brevis*), 락토바실러스 샌프란시스코센시스 (*L. sanfranciscensis*) 및 혼합균주가 적용된 빵의 관능평가 및 특성 확인]

[0294] 본 실시예에서는 대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵) 및 E set (*S. cerevisiae* 01435 + *L. curvatus* 104), F set (*S. cerevisiae* 01435 + *L. brevis* 149), G set (*S. cerevisiae* 01435 + *L. sanfranciscensis* 142), H set (*S. cerevisiae* 01435 + *L. curvatus* 104 + *L. brevis* 149 + *L. sanfranciscensis* 142)가 각각 적용된 빵의 관능평가 및 특성을 확인하고자 하였다.

[0295] 상기 실시예에서 제조된 각 빵을 시식하게 한 후, 식감 및 풍미에 대하여 관능평가를 실시하였다. 관능평가의 결과는 식감 및 풍미에 대하여 9점 척도법을 이용하였다 (9-매우 우수, 1-매우 나쁨).

[0296] 또한, 각 빵에 대한 비용적, pH, TTA, 수분함량의 측정방법은 상기 실시예 10에 기재된 방법과 동일하였다.

[0297] 관능평가 및 특성에 대한 결과는 하기 표 29에 나타내었다.

표 29

[0298]

항목	적용 제품 관능평가 및 제품 특성				
	대조군 (상업적 이스트만 적용된 빵)	E set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. curvatus</i> 104) 적용 빵	F set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. brevis</i> 149) 적용 빵	G set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵	H set (<i>S. cerevisiae</i> 01435 + <i>L. curvatus</i> 104 + <i>L. brevis</i> 149 + <i>L. sanfranciscensis</i> 142) 적용 빵
비용적	4.92	4.94	4.94	4.90	4.98
*식감	7.5	7.8	7.4	7.4	7.5
*풍미	7.5	7.9	7.5	7.5	7.6
pH	5.53	5.27	5.26	5.31	5.29
TTA(6.6/8.5)	2.27/4.87	3.37/5.24	3.41/5.31	3.21/5.13	3.29/5.21
수분함량(%)	41.67%	41.42%	41.51%	41.49%	41.57%

[0299]

실시결과, 분리효모와 분리균주 (E, F, G, H set)가 적용된 빵은 대조군 (상업적 이스트)이 적용된 빵보다 부드러워 식감이 우수하고, 가스취가 적어 풍미가 마일드하여 우수한 식감 및 풍미 점수를 받음을 확인할 수 있었다.

수탁번호

[0300]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원
 수탁번호 : KCTC12776BP
 수탁일자 : 20150327

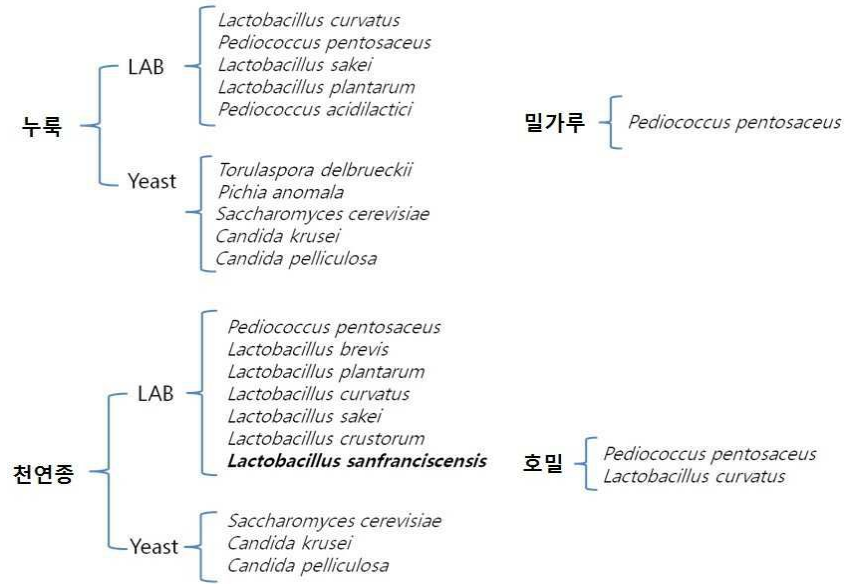
기탁기관명 : 한국생명공학연구원
 수탁번호 : KCTC12777BP
 수탁일자 : 20150327

기탁기관명 : 한국생명공학연구원
 수탁번호 : KCTC12778BP
 수탁일자 : 20150327

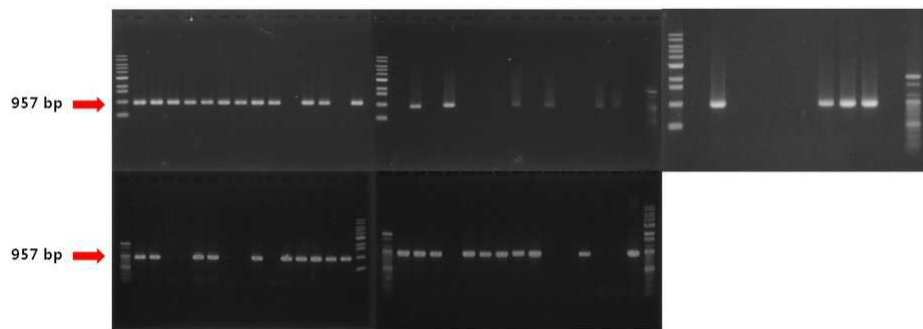
기탁기관명 : 한국생명공학연구원
 수탁번호 : KCTC12779BP
 수탁일자 : 20150327

도면

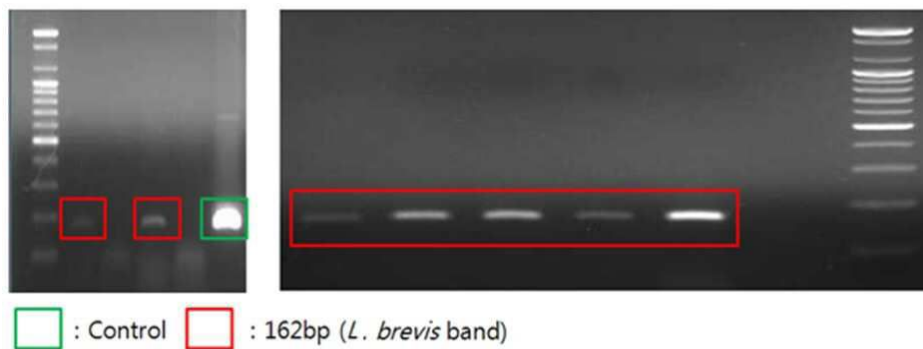
도면1



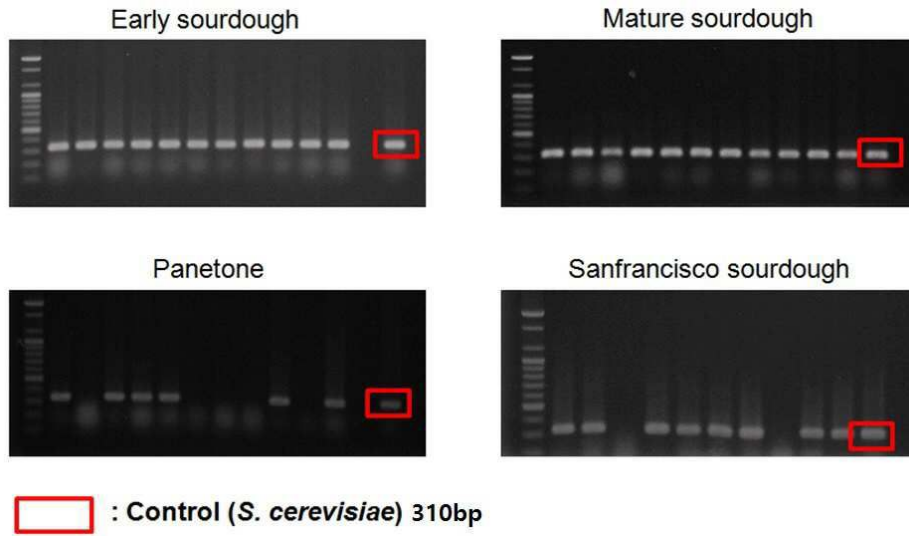
도면2



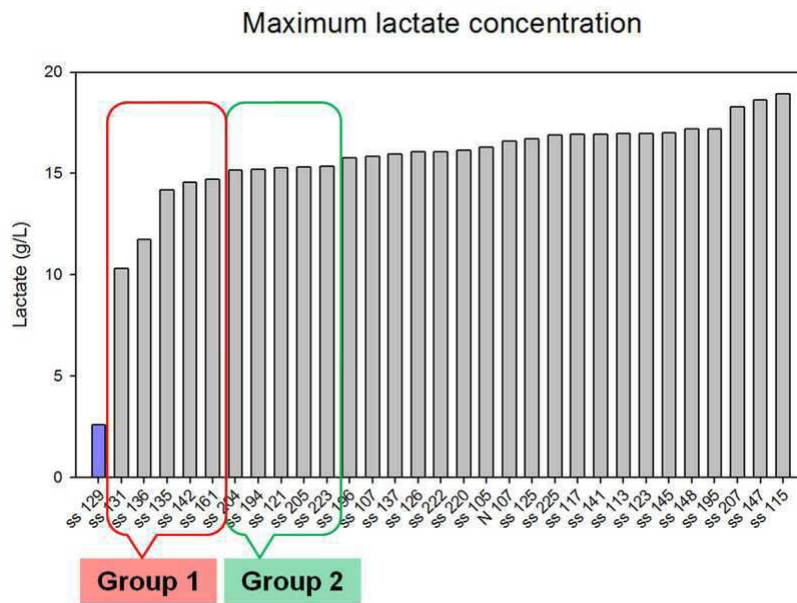
도면3



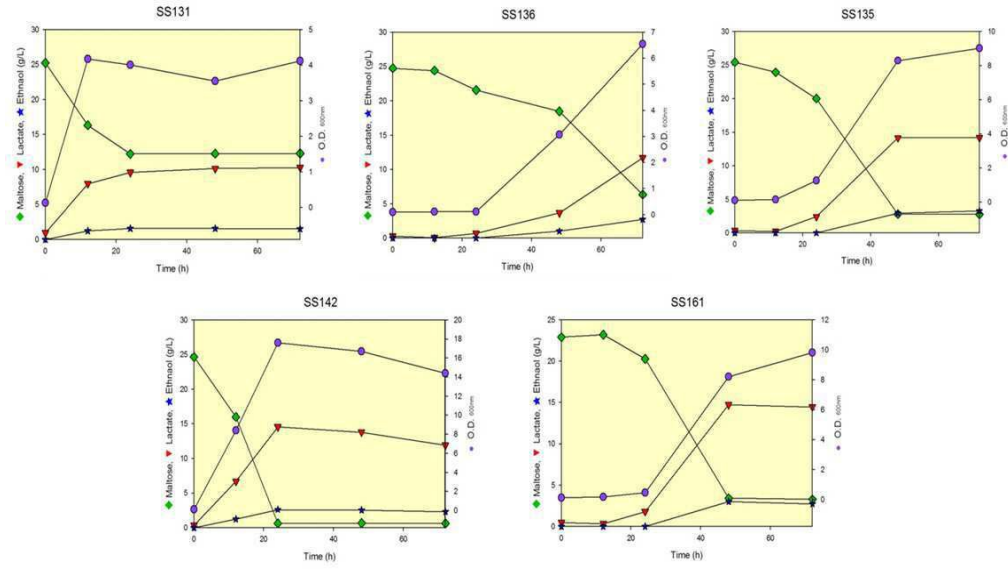
도면4



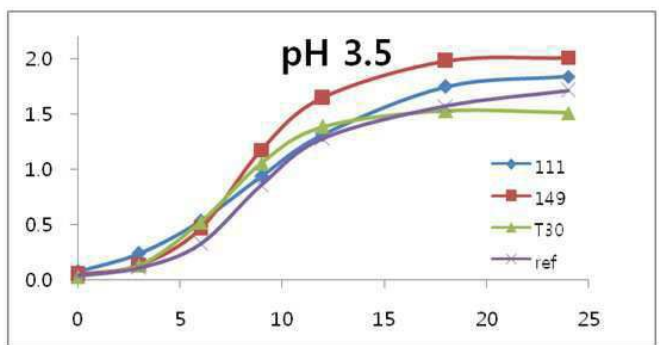
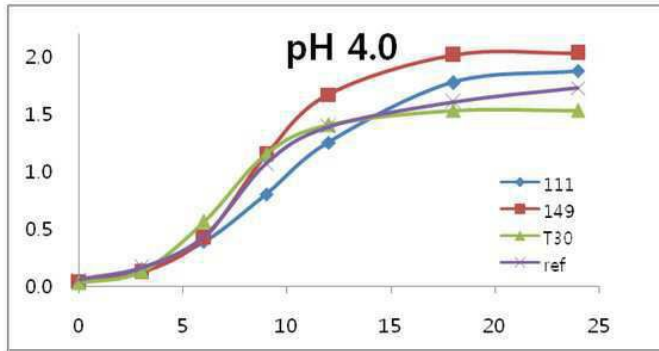
도면5



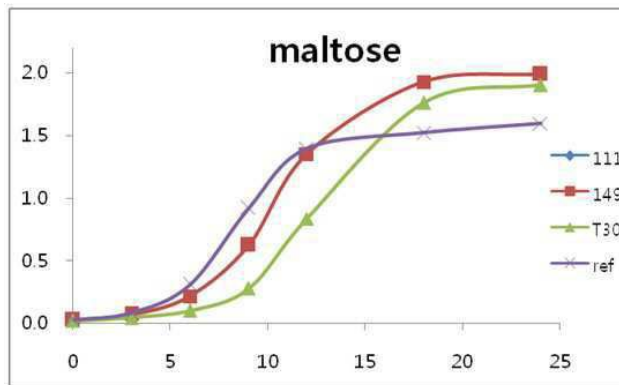
도면6



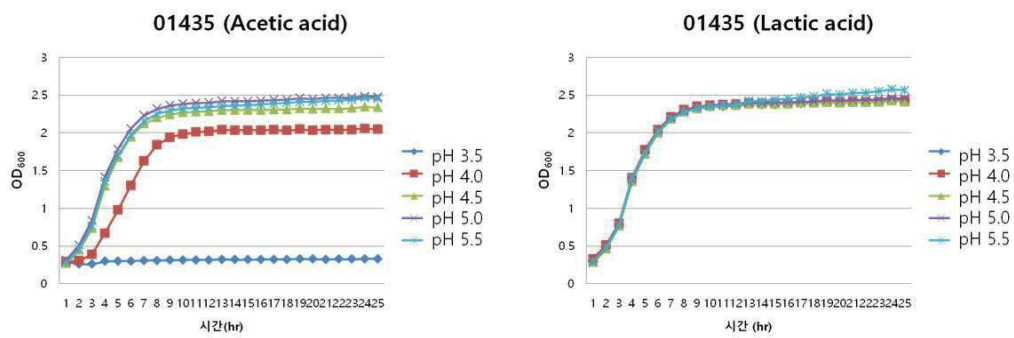
도면7



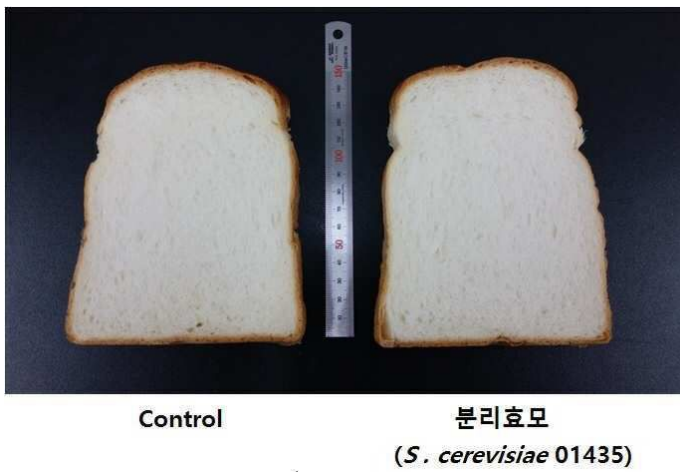
도면8



도면9

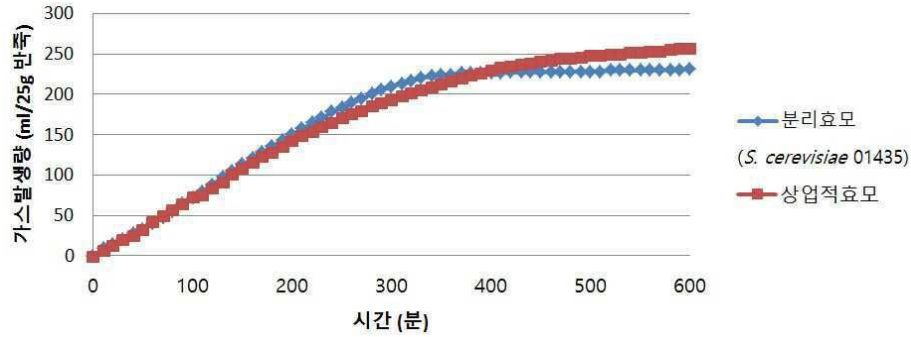


도면10

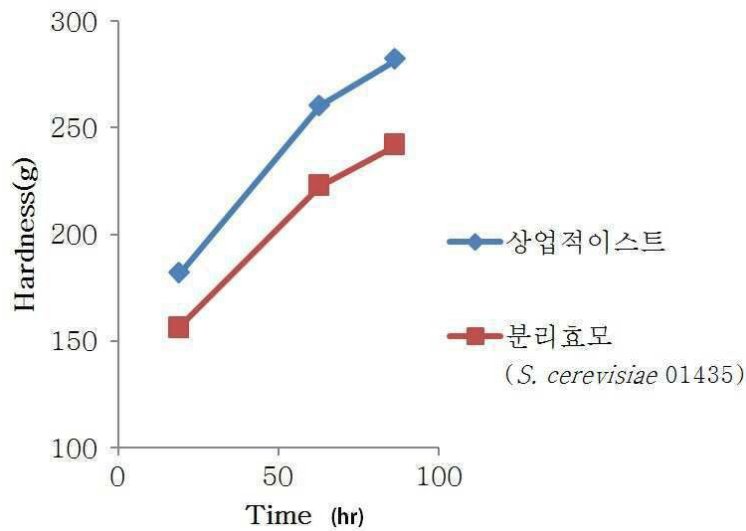


도면11

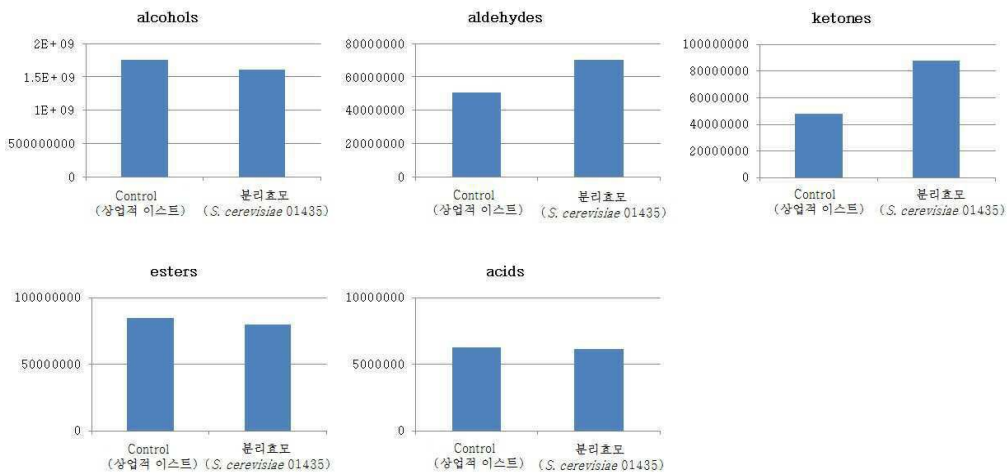
제빵 반죽 가스 발생력 (본종)



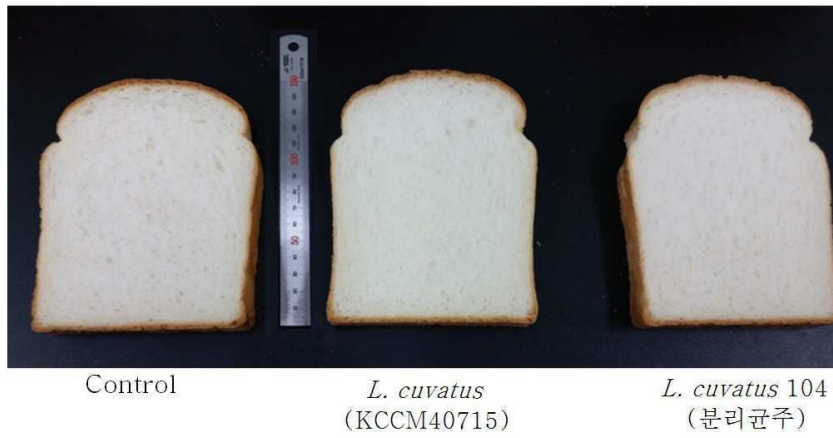
도면12



도면13

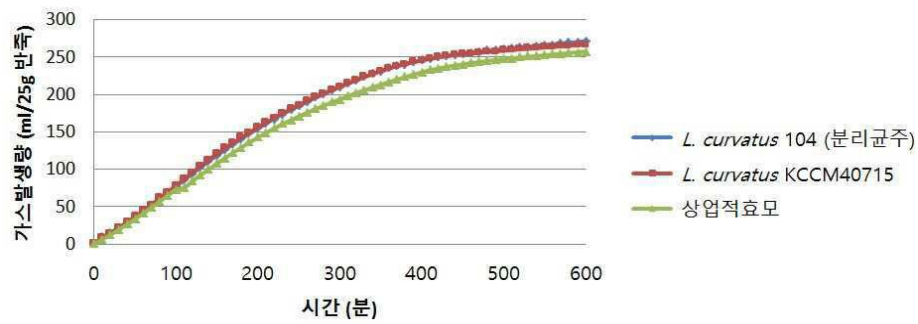


도면14

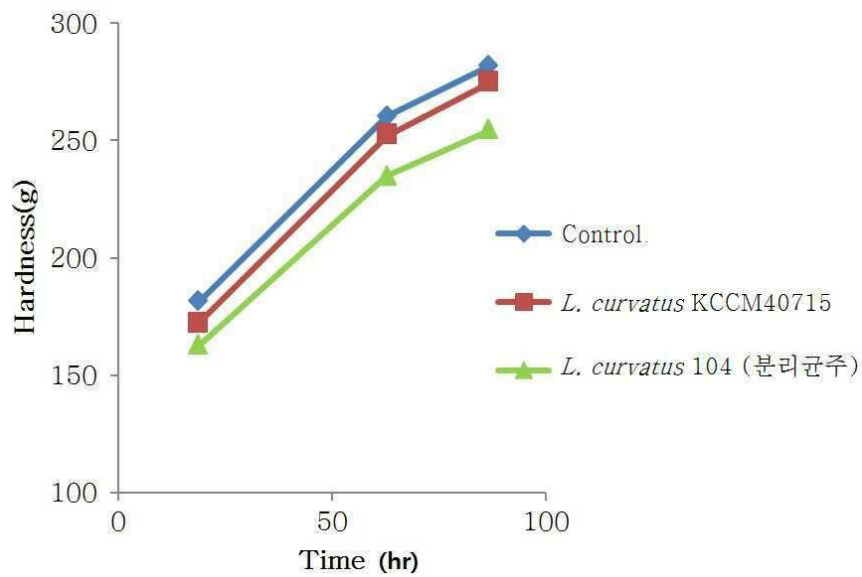


도면15

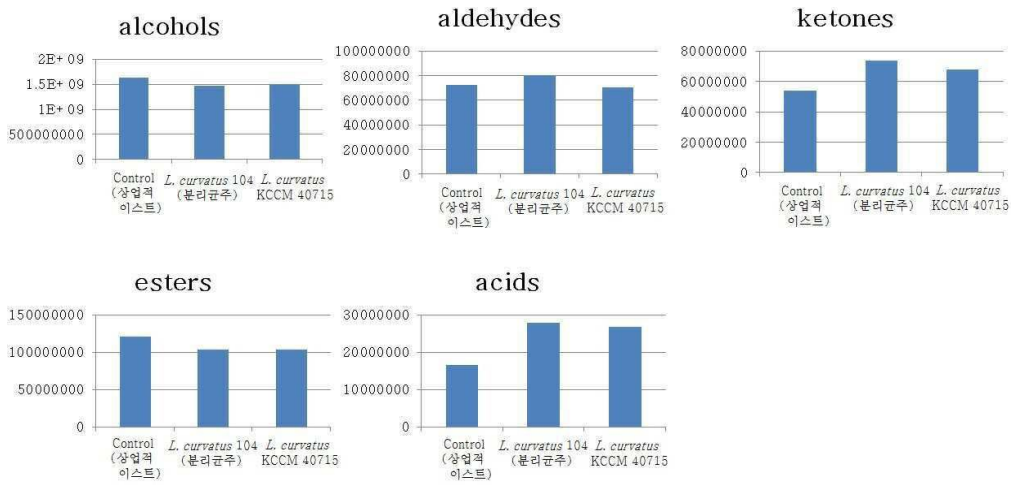
제빵 반죽 가스 발생력 (본종)



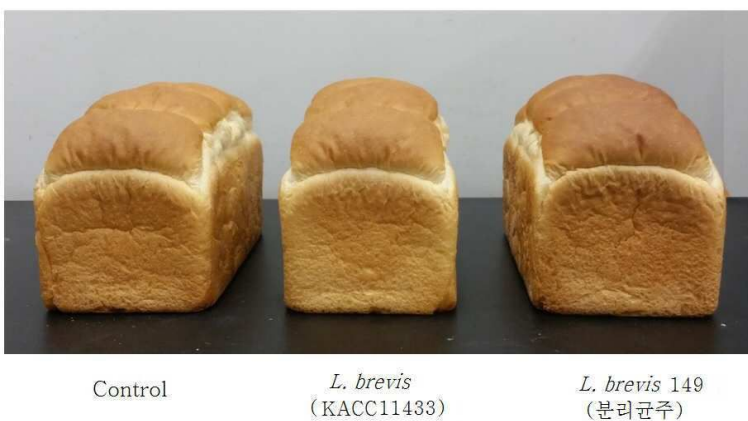
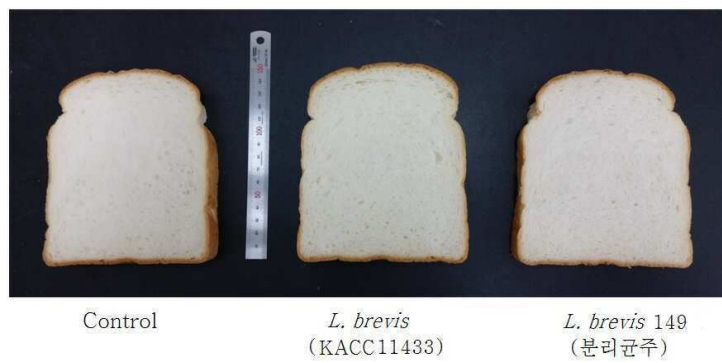
도면16



도면17

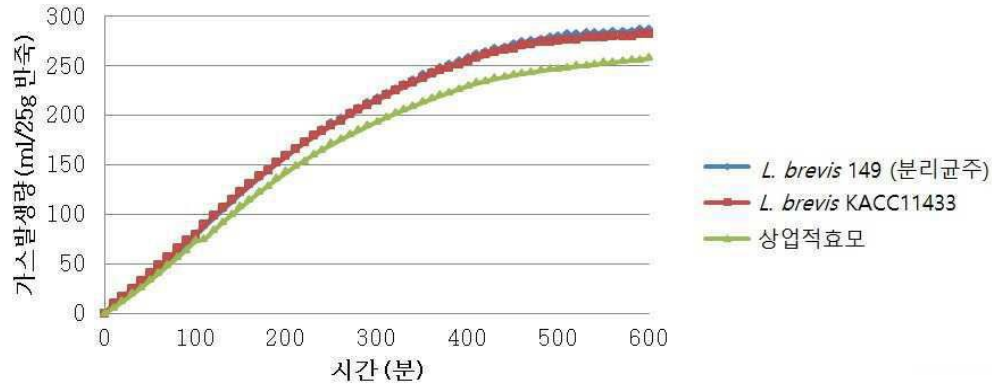


도면18

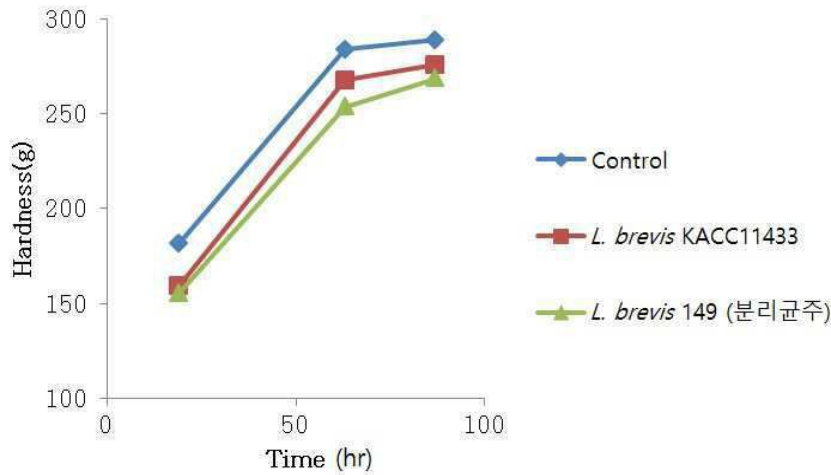


도면19

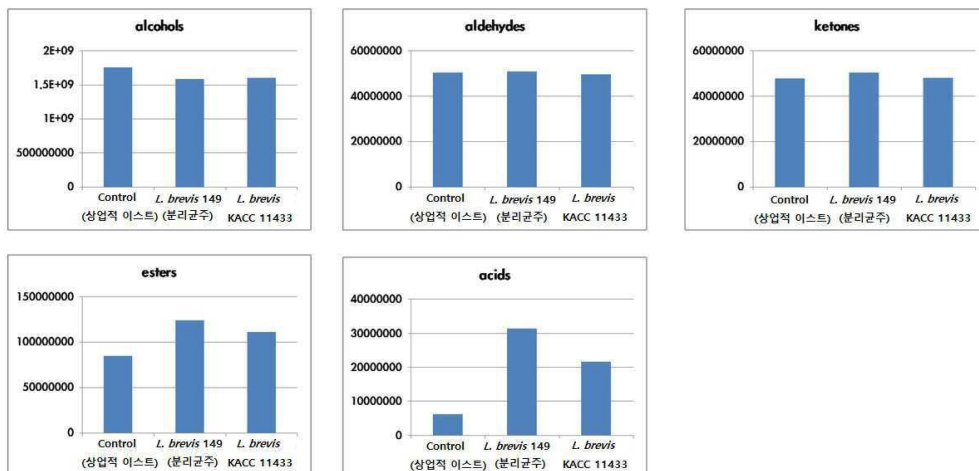
제빵 반죽 가스 발생력 (본종)



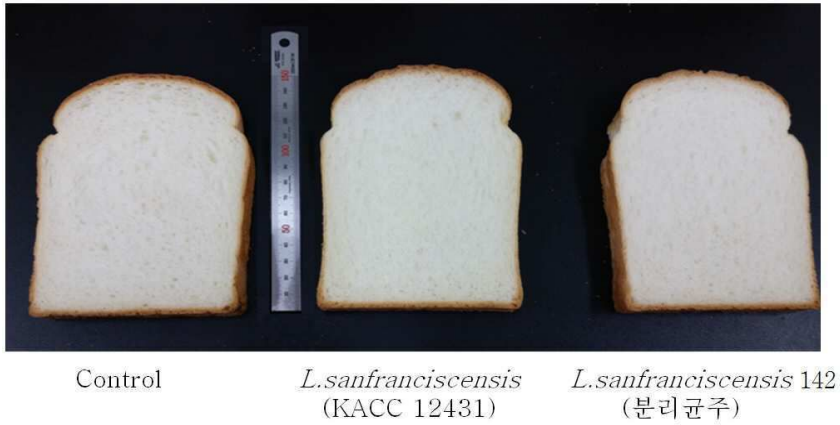
도면20



도면21

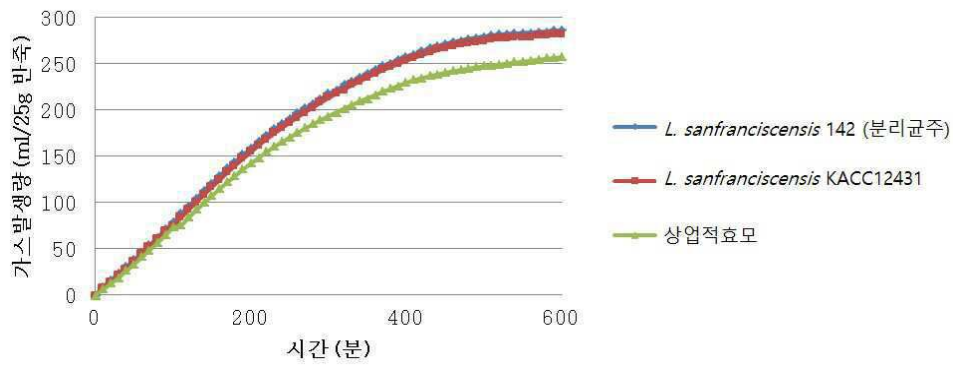


도면22

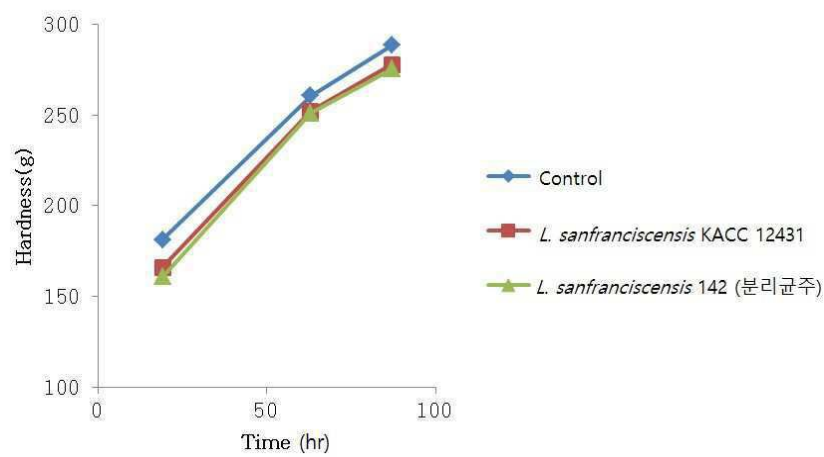


도면23

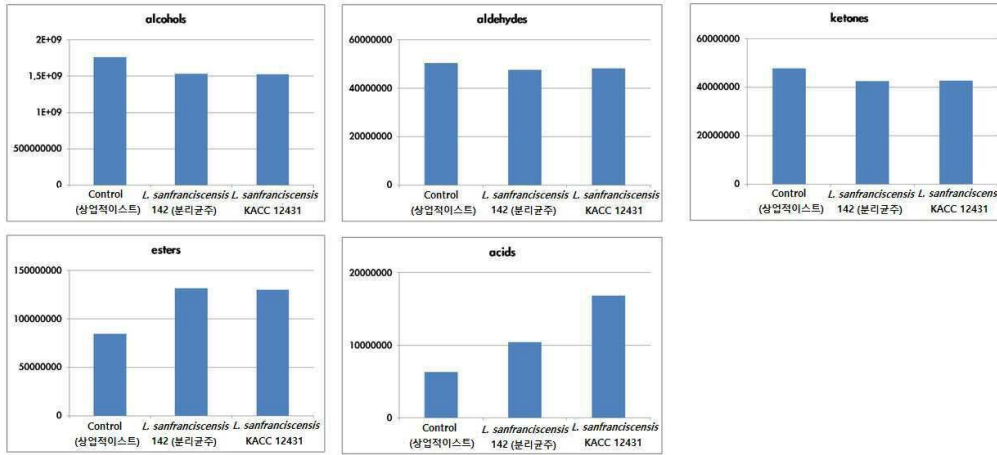
제빵 반죽 가스 발생력 (본종)



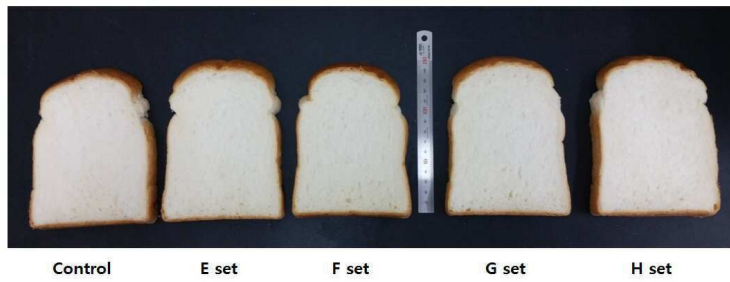
도면24



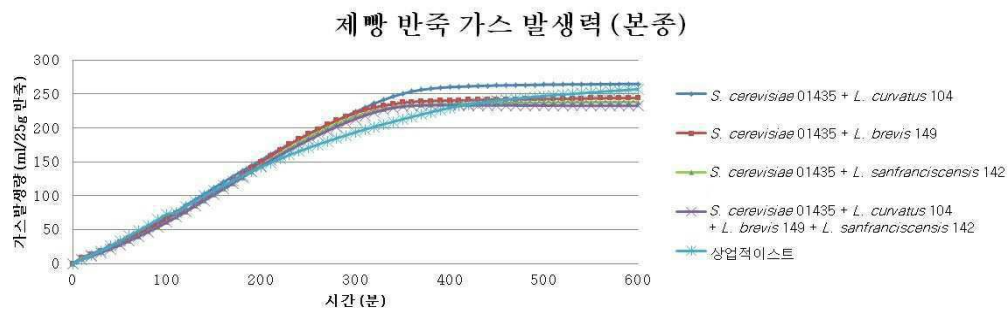
도면25



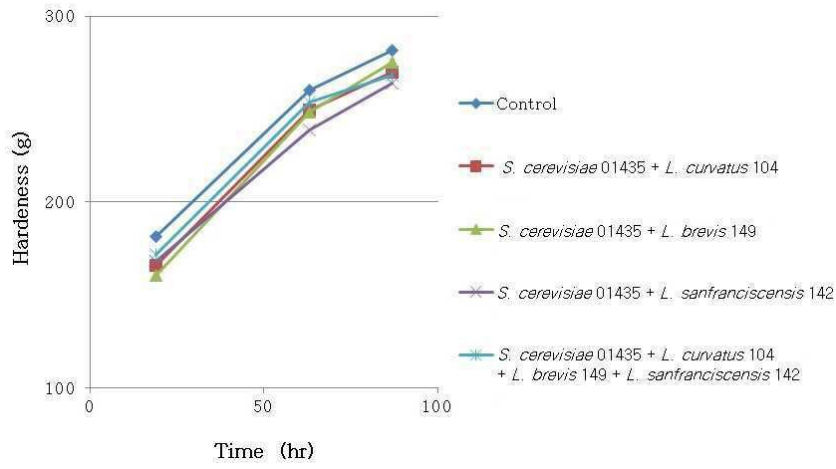
도면26



도면27



도면28



도면29

