pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 5, pp. 375~382 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.5.375

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

조랭이 떡에 존재하는 자연균총 유전자 군집분석 및 천연유래 프로피온산 생성능 분석

박희대 · 채정규 · 하상도*
중앙대학교 식품공학과 식품안전연구실

Genetic Analysis of Natural Microflora in the Stored *Joraengyi* Rice Cake and Their Capability of Propionic Acid Production

Hee-Dae Park, Jung-Kyu Chae, and Sang-Do Ha*
Department of food science technology, Advanced Food Safety Research Group, Brain Korea 21 Plus, Chung-Ang University, Ansung, Korea
(Received August 24, 2018/Revised September 6, 2018/Accepted September 17, 2018)

ABSTRACT - This study was conducted to analyze the microbial community and propionic acid production ability of natural microflora in the rice cakes. Genetic analysis of natural microflora in *Jorangyi* rice cake was performed to select propionic acid - producing bacteria. Selected propionic acid-producing bacteria were cultivated in TSB (tryptic soy broth) supplemented with glucose, and growth characteristics were analyzed by temperature and production of propionic acid was analyzed by gas chromatography (GC-FID). Linearity, detection limit, quantitative limit, and recovery rate were measured to verify propionic acid assay. A total of 98 microbial strains were detected from microflora of *Joraengyi* rice cake that grew after expiration of shelf life. *Lactobacillus casei* group accounted for 50.48% and *Lactobacillus buchneri* was 29.60%. Propionic acid - producing bacteria were *Propionibacterium thoenii, P. cyclohexanicum, Propionibacterium*_uc, *P. jensenii,* and *P. freudenreichii.* Natural bacteria and *Lactobacillus* spp. did not produce propionic acid during 14 days but *P. cyclohexanicum, P. freudenreichii* subsp. Shermanii, *P. thoenii* and *P. jesenii* produced 263.47 μg/mL, 338.90 μg/mL, 325.43 μg/mL and 222.17 μg/mL during 4 days and 2,462.02 and 2,904.78, 2,220.64, 3,519.17 μg/mL during 14 days. As a result of this study, it was affirmed that the natural microflora of *Joraengyi* rice cake during storage can produce propionic acid from natural sources even if a high concentration of propionic acid is not intentionally added. Because of characteristics of rice cake composed of starch and glucose. This study will be used as a recognition criterion to detect natural preservatives such as propionic acid in starchy foods such as rice cakes and as reference standard safety management data.

Key words : Propionic acid, *Joraengyi* rice cake, Natural microflora, GC-FID

국내 소비자들의 생활 및 의식수준의 증가로 식품의 안전성과 건전성에 대한 요구는 날로 증가하고 있다[1]. Jin 등[2]이 소비자 3,590명을 대상으로 실시한 설문조사에서 14.4%(517명)가 식품첨가물을 가장 우려하는 식품 위해요소라고 응답하였고, 중금속/환경호르몬(20.7%, 744명), 잔류농약(18.9%, 680명), 식중독균(12.1%, 433명), 항생제(7.2%, 257명) 등의 순서로 조사되었다.

식품첨가물은 「식품위생법」 제7조 제1항[3]에 따라 식품첨가물의 제조・가공・사용・보존 방법에 관한 기준과 성분에 관한 규격을 정하고 있다. 이는 식품첨가물의 안전한 품질을 확보하고, 식품에 안전하게 사용하도록 하여 국민 보건에 이바지함을 목적으로 한다. 식품첨가물은 보존료, 감미료, 고결방제 등 용도에 따라 분류되고 식품공전 및 식품첨가물공전에 따라 지정된 사용기준에 따라 관리되고 있다[4]. 소브산, 안식향산, 프로피온산 등 일부 보존료는 의도적으로 첨가하지 않았음에도 불구하고 식품원료에 천연적으로 함유돼 있거나 발효 및 숙성과정에서 미생물의 대사산물로 자연스레 생성되어 식품에서 검출될 수 있다[5-12].

프로피온산은 세계보건기구(WHO)[13]에서는 식용 지방이

*Correspondence to: Sang-Do Ha, School of Food Science & Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-4831, Fax: 82-31-675-4853
E-mail: sangdoha@cau.ac.kr

나 기름의 구성물로 분류되지는 않지만, 지방산의 산화에 의해 중간 대사산물로 발생한다고 하였고, 미국 환경청(EPA)[14]에서는 프로피온산이 생체 내에서 일반적인 중간 대사산물로서 여러 아미노산이 분해되면서 생성되는 대사산물 중 하나라고 보고하였다. Howard 등[15]은 β-alanine상에서 배양한 *Clostridium propionicum*의 추출물이 프로피온산으로의 전환을 매개한다고 밝힌 바 있다. Gobbetti와 Corsetti[16]는 이탈리아 sourdough의 발효 시 *Lactobacillus sanfrancisco*에 의한 발효과정 중 프로피온산이 생성됨을 밝혀냈다. Kaori 등[17]은 *Propionibacterium* spp.는 D-glucose, D-fructose, D-mannos 등을 이용하여 프로피온산을 생성한다고 밝혔다.

이처럼 프로피온산은 주로 발효과정 중 미생물에 의하여 발생한다. 현재 천연유래 프로피온산과 관련된 연구는 장류[18,19], 식초[19], 액젓[20] 등 발효숙성 과정 중 생성된 것을 연구한 것이 대부분이며 국수류[21], 쌀 및 곡류[22] 연구는 미흡하며 떡류에서 발생하는 천연유래 보존료 프로피온산 검출에 관한 보고는 아직 없으며 이들 관련 연구 또한 매우 미흡한 실정이다. 발효식품은 아니지만 전분으로 구성된 떡류에서도 *C. propionicum, L. sanfrancisco, Propionibacterium* spp. 등의 미생물이 존재한다면, 프로피온산이 생성될 수 있다. 본 연구에서는 떡류 중 조랭이떡을 선정하여 미생물의 생장특성 및 이들에 의해 발생할 수 있는 천연유래 보존료 프로피온산의 생성능을 조사하여 떡류에서 발생 가능한 프로피온산의 천연유래를 입증하고자 한다.

Materials and Methods

미생물 군집분석

Quality control

떡 g당 9 Log CFU 가량의 총균수가 검출된 유통기한 3개월이 지나 변패가 진행된 조랭이떡의 미생물 군집분석은 (주)천랩(Seoul, Korea)에 의뢰하여 분석하였다. DNA를 preparation하기 위해 FastDNA® Spin Kit for soil를 사용하였고 MPbiomedical사(USA)의 프로토콜을 따라 시행하였다. DNA는 1% 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 확인하고, Gel Doc 시스템(BioRad, Hercules, CA, USA)으로 가시화하였다. 증폭된 생성물은 CleanPCR (CleanNA)로 정제하였다. 정량은 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay kit (Invitrogen, USA)를 사용하였고, 정량의 DNA은 Epoch™ Spectrometer (BioTek, USA)을 사용하여 측정하였고, Table 1의 가이드라인을 따라 수행하였다.

미생물 군집 시퀀싱

PCR amplication은 추출된 DNA로 16S rRNA 유전자의 V3 내지 V4 영역을 표적으로 하는 프라이머를 사용하여 수행하였다. Bacterial amplication을 위해, 341F (5'-TCGTCGGCAGCGTC-AGATGTGTATAAGAGACAG-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'; 밑줄 친 서열은 표적 부위 프라이머를 나타낸다) 및 805R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')의 프라이머를 95°C에서 3 분 동안 initial denaturation, 95°C에서 30초 동안 denaturation, 55°C에서 30초 동안 anealing, 72°C에서 30초 동안 extension, 마지막으로 72°C에서 5 분 동안 elongation하였다. Illumina NexTera 바코드를 부착하기 위한 2차 증폭은 i5 정방향 프라이머(5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXX-TCGTCGGCAGCGTC-3'; X는 바코드 영역을 나타냄) 및 i7 역방향 프라이머(5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-XXXXXXXX-GTCTCGTGGGCTCGG-3')를 사용하였다. 2 차 증폭의 조건은 증폭 사이클을 8로 설정하는 것을 제외하고는 이전의 조건과 동일하였다. 동등한 농도의 정제된 생성물을 함께 모아 CleanPCR (CleanNA)을 사용하여 짧은 단편(비표적 생성물)을 제거했다. DNA 7500 칩을 사용하여 Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA)에서 품질 및 제품 크기를 평가하였다. 혼합된 amplicons을 모아 Illumina MiSeq Sequencing system (Illumina, USA)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 시퀀싱하였다.

미생물 생육실험

떡 g당 9 Log CFU 가량의 총균수가 검출된 유통기한 3개월이 지나 변패가 진행된 조랭이떡 제품[(주) 송학식품, Paju, Korea] 25 g을 0.1% Peptone water (PW, Oxoid, USA) 225 mL와 함께 Filter bag (Sigma Aldrich, USA)에 넣고 stomacher (Bagmixer 400, Interscience, France)로 균

Table 1. DNA quality standard guideline for sequencing

Sample Types		Concentrations		Volume	Total amount	A260/A280 ratio	Size
		Nanodrop	Picogreen				
Environmental samples	Soil/Powder	-	-	-	5 g	-	-
	Liquid	-	-	-	10 mL	-	-
DNA		≥ 20 ng/μL	-	≥ 20 μL	-	≥ 1.8	-
Amplicon (Dimer removal)		-	≥ 20 ng/μL	≥ 20 μL	-	≥ 1.8	500-600 bp

질화하고, 고형물을 제외한 100 μL를 취하여 Tryptic soy broth (TSB, BD, USA) 10 mL에 접종 후 37°C에서 24시간 동안 배양하여 이를 자연균총으로 스탁으로 제조하여 사용하였다. 이 때 만들어진 스탁의 균을 자연균총(Natural bacteria, NB)으로 사용하였다. (주) 천랩에 의뢰하여 분석한 유통기한이 지나 미생물이 많이 자란 조랭이떡의 미생물 군집 분석 결과는 Fig. 2와 같다. 미생물 조성 중 상위 2종인 *Lactobacillus casei* group, *Lactobacillus buchneri* group과, 프로피온산 생성균 4종 *Propionibacterium thoenii, P. cyclohexanicum, P. jensenii, P. freudenreichii* group (Table 3)은 생물자원센터(KCTC; Korean collection for type cultures)에서 표준균주를 분양 받아 생장특성과 프로피온산 생성능 실험에 사용하였다.

각각의 균주는 0.1% PW를 이용하여 5 Log CFU/mL 수준의 농도로 희석하고 100 μL를 취하여 포도당 10 g/L를 첨가한 TSB 10 mL에 접종하였다. 자연균총과 *L. casei* KCTC 13086*, L. buchneri* KCTC 13089*, P. cyclohexanicum* KCTC 5755은 37°C에서, *P. freudenreichii* subsp. shermanii KCTC 5753, *P. thoenii* KCTC 5343, *P. jensenii* KCTC 5340는 각각 생육 최적온도인 30°C에서 anaerobic jar를 사용하여 0, 1, 2, 4, 7, 10, 14일 동안 배양하였다. 이를 0.1% PW로 희석하여 자연균총은 TSA에 분주 후 도말하여 37°C에 24 h 배양하였고, KCTC 13086와 KCTC 13089는 MRS 배지(BD, USA)에 분주 후 도말하여 37°C에 48 h 배양하였다. KCTC 5755와 KCTC 5753, KCTC 5343, KCTC 5340는 agar powder(대정화금, Korea) 14.5 g/L를 첨가한 RCM배지(Reinforced clostridial medium, BD, USA)에 분주 후 도말하여 KCTC 5755는 37°C에 KCTC 5753, KCTC 5343, KCTC 5340는 각각 30°C에 48h 배양하였다.

프로피온산 분석

시약 및 표준품

실험에 사용된 물은 비저항치가 18.2 Ω.cm인 3차 증류수를 이용하였다. 표준물질인 propionic acid (99.5%)와 trans-crotonic acid (98%)는 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, USA) 제품을 사용했다. 그 외 분석에 사용되는 acetone (for HPLC, GC and residue analysis, 99.9%)과 sodium chloride (99%)는 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, USA) 제품을 사용했고, 인산(85%)은 Wako사 (Japan) 제품을, ethyl ether는 대정화금사(Shiheung, Korea) 제품을 사용하였다.

표준용액 조제

표준용액은 프로피온산 약 0.2 g을 정확히 취하여 아세톤 100 mL에 녹여 표준원액으로 하고, 이를 5, 15, 30, 60, 120, 240, 480, 960 mg/L 수준이 되도록 아세톤으로 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 내부표준물질로는 trans-crotonic acid를 사용하였고, 표준용액 중 내부표준물질의 최종농도가 100 mg/L 수준이 되도록 조제하여 사용하였다.

Table 2. The analytical conditions of the GC-FID for propionic acid

Instruments	GC (HP 7890B, USA) with FID
Column	HP-FFAP (30.0 m × 320 μm × 0.25 μm)
Injector Temperature	180°C
Detector Temperature	230°C
Oven Temperature	80°C → 10°C↑ → 150°C(5min) → 20°C↑ → 230°C
Injection Volumn	1 μL
Carrier gas flow rate	1 mL/min(N_2)
Split ratio	5:1

시험용액 조제 및 기기분석

프로피온산 분석은 Son 등[20]의 방법을 일부 수정하여, 시료 5 mL를 conical tube에 정밀히 취하고, 0.05 M 인산 10 mL, NaCl 2 g, 내부표준물질 trans-crotonic acid (2000 mg/L) 1 mL를 가한 후 30분간 초음파 처리하고10분간 voltexing 하였다. 여기에 ethyl ether 20 mL를 가한 후 2분간 voltexing하여 추출하였다. 층 분리가 완료된 후 ethyl ether 층을 취하여 0.2 μm PVDF filter (Agilent technologies, Santa Clara, California, USA)로 filtering 한 후 이를 시험용액으로 하였다. 기기분석에는 Agilent 7890B GC-FID (Gas chromatograph flame ionization detector)를 사용하였는데, 그 분석조건은 Table 2와 같다.

회수율시험

회수율 시험은 포도당 10 g/L를 첨가한 TSB에 대해 수행하였으며, 기기분석법과 동일한 방법으로 3회씩 수행하여 비교하였다. 포도당 10 g/L를 첨가한 TSB 5 mL 표준용액 2,000 mg/L을 첨가하여 각각 프로피온산 30, 120, 240 mg/L 세 가지 농도로 만들어 기기분석법과 동일한 방법으로 수행하였다.

Results and Discussion

미생물 군집 분석

Quality control

유통기한이 지나 미생물이 많이 자란 조랭이떡에 존재하는 미생물의 DNA 정량 결과는 농도 35.24 ng/μL, 부피 26 μL, A260/A280 비율이 2.07로 기준(Table 1)에 부합한 것으로 나타났다. 추출한 DNA 1 μL와 대조군 10 ng을 1% Agarose gel (1X TAE buffer)을 이용하여 100 V에서 25분간 전기영동 한 결과는 Fig. 1과 같다.

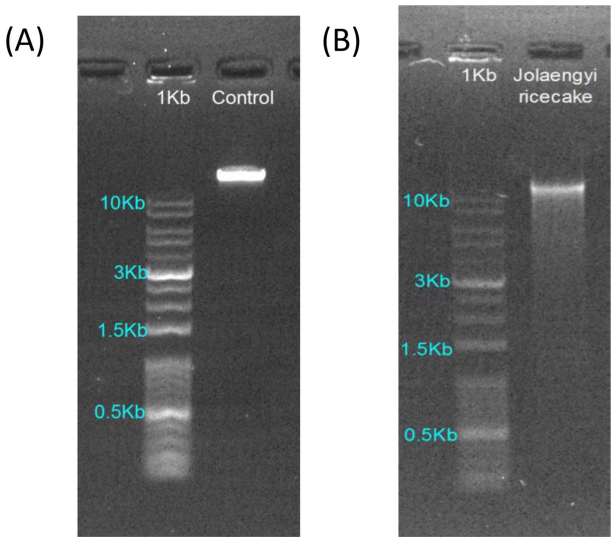

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of natural bacteria in the stored *Joraengyi* rice cake after shelf life. For 25 min at 100 V, (A) 10 ng of control and (B) 1 μL of sample were loaded.

미생물 군집 시퀀싱

유통기한이 지나 미생물이 많이 자란 조랭이떡의 미생물 군집 분석 결과 총 98종의 균이 검출되었는데, 그 중 상위 44종의 분포를 Fig. 2에 나타내었다. 그 중 가장 많은 비중을 차지하는 우점종은 *L. casei* group으로 50.48%의 조성을 보였고, 다음은 *L. buchneri* group으로 29.60%를 차지해 조랭이떡의 미생물 군집의 대부분은 *Lactobacillus* 속으로 이루어진 것으로 나타났다. 프로피온산 생성균은 *P. thoenii, P. cyclohexanicum, Propionibacterium*_uc, *P. jensenii, P. freudenreichii* group으로 나타났다[16,23-30]. *Propionibacterium*_uc는 *Propionibacterium*속에 속하나 유전정보가 등록되어 있지 않은 균이고 조랭이 떡 중 차지하는 비중이 낮아 이후 프로프온산 생성능 실험에서는 제외하였다.

Table 3. The top two species and the propionic acid producing strains among the microorganism composition in the stored *Joraengyi* rice cake after shelf life

Bacterial composition	Ratio (%)	Number of bacteria (CFU/g)
Total bacteria	100.0000	2.0495×10^9
Lactobacillus casei group	50.4793	1.0346×10^9
Lactobacillus buchneri group	29.5927	6.0651×10^8
Propionibacterium thoenii	1.5283	3.1323×10^7
Propionibacterium cyclohexanicum	0.8340	1.7093×10^7
*Propionibacterium*_uc[1)]	0.1297	2.6583×10^6
Propionibacterium jensenii	0.0509	1.0432×10^6
Propionibacterium freudenreichii group	0.0120	2.4595×10^5

[1)]uc is a bacterium that has no registered gene information.

미생물 성장 및 프로피온산 분석

시험법 유효성 검증 결과

프로피온산 표준용액의 머무름 시간(retention time)은 GC-FID 크로마토그램 상에서 7.1분으로 확인되었고, 프로피온산의 직선성은 상관계수(R^2) 값이 0.9998로 우수한 직선성을 나타내었다. 검출한계와 정량한계는 각각 0.27 μg/mL, 0.80 μg/mL로 측정되었다. 회수율은 90.19-126.13%로 양호한 결과로 보였다(Table 4). 이러한 결과는 본 연구에서 사용한 분석법이 타당하다는 증거가 된다. 분석결과 중 불검출은 정량한계에 희석배수를 곱한 값을 적용하였는데, 희석배수 4배를 적용하여 3.21 μg/mL이하를 불검출(not detected, ND)로 처리하였다.

미생물의 생육에 따른 프로피온산 생성

조랭이떡 자연균총과 *L. casei, L. buchneri*는 14일 배양에서도 프로피온산을 생산하지 않았다. 그러나 *P. cyclo-*

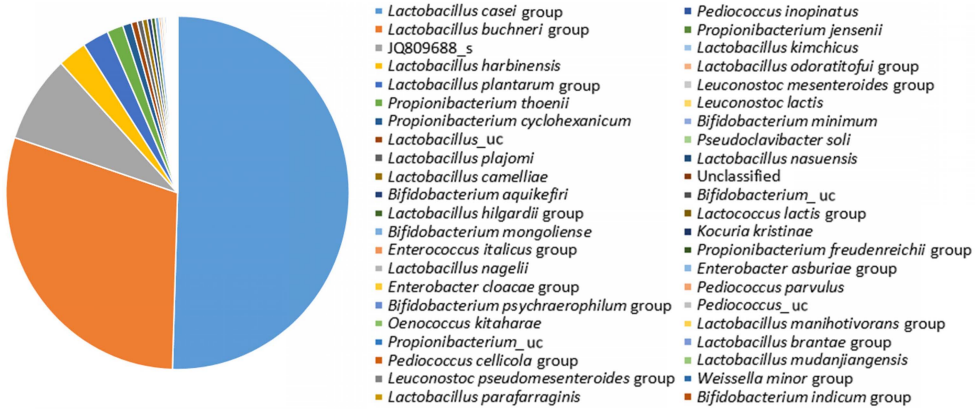

Fig. 2. Genetic analysis of the microorganisms isolated from the stored *Joraengyi* rice cake after shelf life - the top 44 species among 98 species detected in the detected microorganisms.

Table 4. Linearity (R^2), limit of detection (LOD)[1)], limit of quantification (LOQ)[2)], recovery and precision of propionic acid analysis

Sample	R^2	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)	Added propionic acid (μg/mL)	Founded propionic acid (μg/mL)	Recovery (%) ± %RSD[3)]
TSB	0.9998	0.27	0.80	30	37.84 ± 0.13	126.13 ± 0.33
				120	108.22 ± 3.12	90.19 ± 2.88
				240	238.43 ± 2.57	99.35 ± 1.08

[1)]LOD = 3.3σ/S.
[2)]LOQ = 10σ/S.
σ = Standard deviation of the response.
S = Slope of the calibration curve.
[3)]RSD (%): Relative standard deviation.

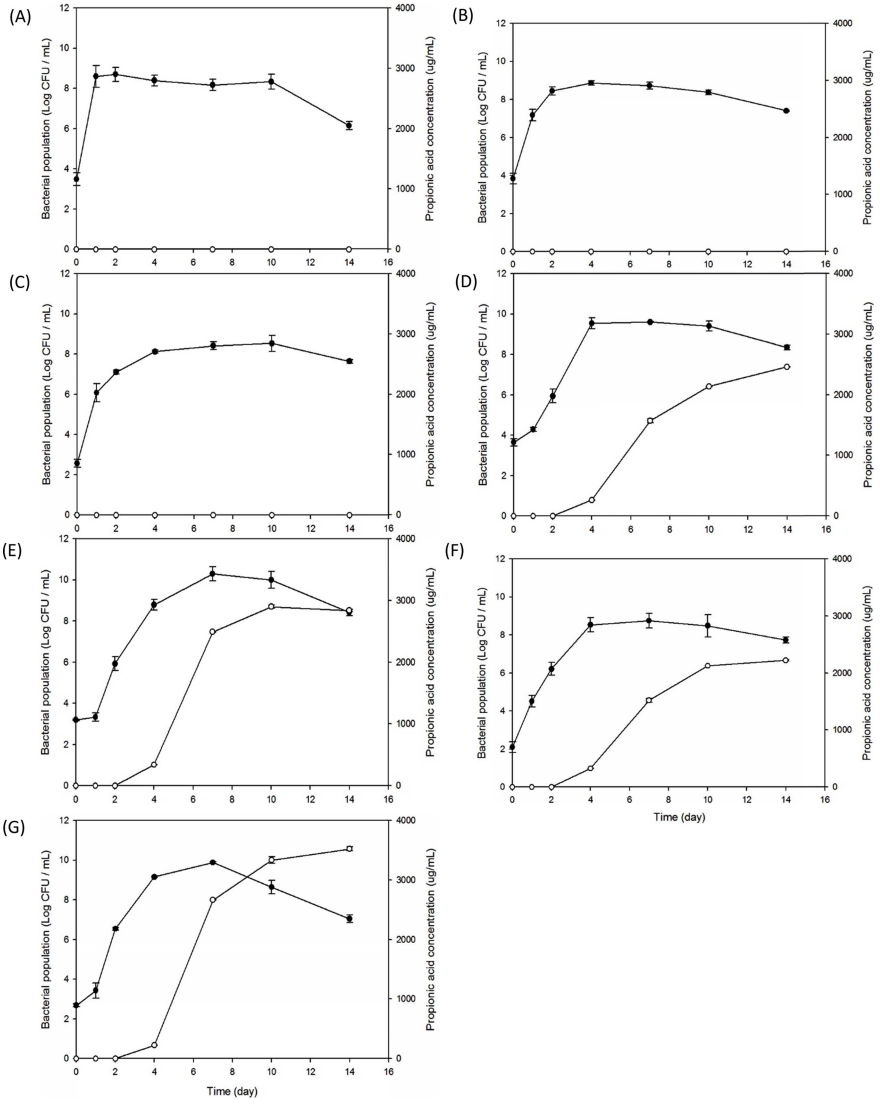

Fig. 3. The production of propionic acid and bacterial growth of microorganisms in the stored *Joraengyi* rice cake after shelf life. Different strains of (A) Natural bacteria, (B) *L. casei*, (C) *L. buchneri*, (D) *P. cyclohexanicum*, (E) *P. freudenreichii* subsp. shermanii, (F) *P. thoenii*, (G) *P. jesenii* were incubated in TSB supplemented with 10 g/L glucose. Bacterial populations (—●—) were monitored by measuring Log CFU/mL. Propionic acid concentrations (—◇—) were monitored by measuring μg/mL using GC-FID. The data represent the mean ± SD of double experiment.

hexanicum, P. freudenreichii subsp. shermanii, *P. thoenii*, *P. jesenii*는 4일차부터 프로피온산을 각각 263.47, 338.90, 325.43, 222.17 μg/mL 생산하였고, 7일차에는 1,572.78, 2,496.63, 1,519.65, 2,660.41 μg/mL로 프로피온산 생성량

Table 5. Bacterial growth of microorganisms in the stored *Joraengyi* rice cake after shelf life

Strains	Bacterial populations (Log CFU/mL ± SD)						
	Time (day)						
	0	1	2	4	7	10	14
Natural bacteria	3.48 ± 0.33	8.59 ± 0.55	8.70 ± 0.35	8.39 ± 0.27	8.17 ± 0.29	8.33 ± 0.36	6.16 ± 0.21
L. casei KCTC 13086	3.84 ± 0.27	7.18 ± 0.31	8.45 ± 0.21	8.86 ± 0.11	8.72 ± 0.17	8.38 ± 0.12	7.41 ± 0.04
L. buchneri KCTC 13089	2.58 ± 0.19	6.08 ± 0.45	7.11 ± 0.10	8.13 ± 0.08	8.42 ± 0.19	8.54 ± 0.39	7.64 ± 0.09
P. cyclohexanicum KCTC 5755	3.65 ± 0.18	4.28 ± 0.10	5.94 ± 0.34	9.54 ± 0.26	9.60 ± 0.02	9.40 ± 0.24	8.35 ± 0.11
P. freudenreichii subsp. shermanii KCTC 5753	3.20 ± 0.04	3.35 ± 0.20	5.94 ± 0.34	8.80 ± 0.27	10.30 ± 0.34	10.01 ± 0.41	8.43 ± 0.15
P. thoenii KCTC 5343	2.10 ± 0.28	4.51 ± 0.30	6.21 ± 0.34	8.53 ± 0.37	8.75 ± 0.39	8.48 ± 0.59	7.73 ± 0.15
P. jesenii KCTC 5340	2.68 ± 0.08	3.42 ± 0.38	6.53 ± 0.07	9.15 ± 0.05	9.87 ± 0.04	8.86 ± 0.33	7.04 ± 0.19

[1)]SD: standard deviation.

Table 6. Production of propionic acid by microorganisms in the stored *Joraengyi* rice cake after shelf life

Strains	Propionic acid concentrations (μg/mL ± SD)						
	Time (day)						
	0	1	2	4	7	10	14
Nature Bacteria	ND[2)]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L. casei KCTC 13086	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L. buchneri KCTC 13089	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. cyclohexanicum KCTC 5755	ND	ND	ND	263.47 ± 4.75	1572.78 ± 32.81	2137.75 ± 6.52	2462.02 ± 5.06
P. freudenreichii subsp. shermanii KCTC 5753	ND	ND	ND	338.89 ± 2.16	2496.42 ± 6.67	2904.78 ± 28.86	2843.16 ± 15.63
P. thoenii KCTC 5343	ND	ND	ND	325.43 ± 0.18	1519.65 ± 33.59	2125.18 ± 3.42	2220.64 ± 12.53
P. jesenii KCTC 5340	ND	ND	ND	222.17 ± 0.45	2660.41 ± 2.95	3333.25 ± 56.03	3519.16 ± 32.68

[1)]SD: standard deviation.
[2)]ND: non-detective (< 3.21 μg/mL).

이 급격히 증가하였다. 이후에도 프로피온산 검출량의 증가폭은 감소하였지만 지속적으로 증가하여 14일차에서는 각각 2,462.02, 2,904.78, 2,220.64, 3,519.17 μg/mL가 검출되었다. 조랭이떡 자연균총은 *Prpionibacerium* 속의 균주들 보다 빨리 성장해 하루 만에 대수기를 지나 사멸기에 도달하였다. 4종의 *Propionibacterium*은 다소 늦은 성장을 보였는데, 나흘 만에 대수기를 지나 사멸기에 도달했고, 4일차부터 프로피온산을 생성하기 시작했다. 이 결과를 살펴볼 때 자연균총 중에는 *Propionibacterium* 속의 균주들보다 빠르게 성장하는 균주가 많이 포함돼 있어 *Propionibacterium* 속 균들의 성장을 억제해 프로피온산 생성이 늦어진 것으로 판단된다(Fig. 3). 각 균들의 배양기간별 생육곡선과 프로피온산 생성량은 Table 5와 Table 6에 나타내었다. Kaori 등[17)]의 연구처럼 *Propionibacterium* 속 균들은 포도당을 탄소원으로 사용하여 프로피온산을 생성할 수 있기 때문에 당이 풍부한 액체배지에서 충분한 양의 프로피온산을 생성하였다.

국문요약

본 연구는 조랭이떡에 존재하는 미생물 군집분석과 자연균총의 프로피온산 생성능을 분석하였다. 조랭이떡의 자연균총을 유전자 분석을 통하여 군집분석을 수행해 프로피온산 생성균을 선별하였다. 선별된 프로피온산 생성균을 포도당이 첨가된 액체배지(TSB)에 배양해 온도별 생장특성을 분석하고 가스 크로마토그래피(GC-FID)를 이용하여 프로피온산 생성량을 분석하였다. 에테르로 용매 추출하는 전 처리 방법을 확립하였고, 직선성, 검출한계, 정량한계, 회수율을 측정해 프로피온산 분석법을 검증하였다. 유통기한이 지나 미생물이 많이 자란 조랭이떡의 미생물 군집 분석 결과 총 98종의 균이 검출되었고 그 중 가장 큰 비중을 차지하는 우점종은 *Lactobacills casei* group으로 50.48%를 차지했고, *Lactobacillus buchneri*가 29.60%였다. 프로피온산 생성균은 *Propionibacterium thoenii*, *P. cyclohexanicum*, *Propionibacterium*_uc, *P. jensenii*, *P. freudenreichii* 등으로 나타났으며, 전체 자연균총의 약 2.4%를 차지했다. 조랭이떡 자연균총과 *Lactobacillus* 속은 14일 배양에서도 프로피온산을 생산하지 않았으나 *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii* subsp. Shermanii, *P. thoenii*, *P. jesenii*는 4일차부터 프로피온산을 각각 263.47, 338.90, 325.43, 222.17 μg/mL를 생산하였고, 7일차에는 1,572.78, 2,496.63, 1,519.65, 2,660.41 μg/mL, 14일차에는 각각 2,462.02, 2,904.78, 2,220.64, 3,519.17 μg/mL로 프로피온산 생성량이 급격히 증가하였다. 본 연구의 결과로 살펴볼 때 전분과 포도당으로 구성된 떡류의 특성상 저장중 자연균총 미생물의 성장으로 높은 농도의 프로피온산이 천연유래로 생성될 수 있음을 알 수 있다. 본 연구는 떡류 등 전분질 식품의 프로피온산 등 천연유래 보존료 검출의 인정 및 기준규격 등 안전관리 자료로 활용될 것이다.

References

1. Shin, J.W., Kim, J.B., Moon, I.S., Kim, H.J., Lee, S.G.: Contents monitoring of natural preservatives in raw materials of functional foods, Ministry of food and drug safety (MFDS) research report (2013).
2. Jin, H.J., Lim, J.Y., Lee, K.I.: The sentiment index of consumers about food safety and analysis for influential factors, *Consumer Problem Research*, **45**(2), 1-21 (2014).
3. Korean food sanitation act, Law No. 14022 (Notice 2016. 2. 3).
4. Ministry of food and drug safety (MFDS): Korean food additives codes, Standards and specifications of food additives. (Notice 2016-32).
5. Mensah, P.: Fermentation—the key to food safety assurance in Africa?, *Food Control*. **8**, 271-27 (1997).
6. Kim, J.K., Kim, C.S.: The taste components of ordinary Korean soy sauce. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **23**, 89-105 (1980).
7. Lee, S.H., Lee, M.Y., Lim, S.R., Bae, J.H.: Determination of amounts of benzoic acid and propionic acid in fermented soybean products. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **45**(5), 565-570 (2013).
8. Pihlsgard, P., Larsson, M., Leufven, A., Lingnert, H.: Volatile compounds in the production of liquid beet sugar. *Agric. Food Chem.*, **48**, 4844-4850 (2000).
9. Kanavouras, A., Gazouli, M., Tzouvelekis Leonidas, L., Petrakis, C.: Evaluation of black table olives in different brines. *Grasasy Aceites*, **56**(2), 106-115 (2005).
10. Thierry, A., Maillard, M., Hervee, C., Richoux, R., Ortal, S.: Varied volatile compounds are produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Emmental cheese. *Food Chem.*, **87**, 439-446 (2004).
11. Manolaki, P., Katsiari, M.C., Alichanidis, E.: Effect of a commercial adjunct culture on organic acid contents of low-fat Feta-type cheese. *Food Chem.*, **98**, 658-663 (2006).
12. Park, E.R., Lee, S.K., Hwang, H.S., Mun, C.S., Gwak, I.S., Kim, O.H., Lee, K.H.: Monitoring of natural preservative levels in food products, *J. Korean Soc. food Sci. Nutr.* **37**(12), 1640-1646 (2008).
13. World health organization (WHO): Propionic acid and its calcium, potassium and sodium salts, Food additives series 5 (1974).
14. United states environmental protection agency (EPA): Reregistration eligibility document propionic acid and salts list D case 4078 (1991).
15. Goldfinet, H., Stadtman, E.R.: Propionic acid metabolism. *The Journal of Biological Chemistry.* **235**(8), 2238-2245 (1960).
16. Gobbetti, M., Corsetti, A.: *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium. A Review. *Food Microbiol.*, **14**, 175-187 (1997).
17. Kaori, K., Hideko, Y., Motohiro, N., Kazuhide, Y.: *Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov., a new acid-tolerant ω-cyclohexyl fatty acid-containing *Propionibacterium* isolated from spoiled orange juice, *Int. J. Systematic Bacterial.*, **47**(3), 825-831 (1997).
18. Lee, S.H., Lee, M.Y., Lim, S.R., Bae, J.H.: Determination of amounts of benzoic acid and propionic acid in fermented soybean products, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **45**(5), 565-570 (2013).
19. Lee, H.J., Ahn, H.J., Kang, C.S., Choi, J.C, Choi, H.J., Lee, K.G., Kim, J.I., Kim, H.Y.: Naturally occurring propionic acid in foods marketed in South Korea, *Food Control,* **21**, 217-220 (2010).
20. Son, Y.J., Chang, M.S., Jung, S.Y., Shin, J.M., Kim, N.Y., Lee, J.I., Kim, B.S., Lee, S.M., Kim, J.H., Chae, Y.Z.: Monitoring of naturally occurring propionic acid in fermented food products, *Report of S.I.H.E.*, **47**, 3-10 (2011).
21. Jang, Y.M., Cho, W.J., Chung, Y.J., Shin, Y.W., Lee, S.M., Lee, C.H., Jang, M.R., Yoo, H.J., Won, S.R.: The naturally occurring levels of food preservatives in raw materials and fermented foods, MFDS research report (2010).
22. Kim, M.K., Choi, J.C., Lee G.Y., Lim, H.S., Park, S.J., Choi, H.J., Yun, S.S. Lim, D.Y., Lee S.J.: Monitoring of preserva-

tives produced naturally in cereal grains, nuts and seeds, MFDS research report (2016).
23. Delwiche, E.A.: Mechanism of propionic acid formation by *Propionibacterium pentosaceum*. *J. Bacteriol.*, **56**(6), 811 (1948).
24. Gonzalez-Garcia, R.A., McCubbin, T., Navone, L., Stowers, C., Nielsen, L.K., Marcellin, E.: Microbial propionic acid production. *Fermentation*, **3**(2), 21 (2017).
25. Ahmadi, N., Khosravi-Darani, K., Mortazavian, A.M.: An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. *Electronic J. Biotechnol.*, **28**, 67-75 (2017).
26. Barbirato, F., Chedaille, D., Bories, A.: Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, **47**(4), 441-446 (1997).
27. Macy, J.M., Ljungdahl, L.G., Gottschalk, G.: Pathway of succinate and propionate formation in *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.*, **134**(1), 84-91 (1978).
28. Scheifinger, C.C., Wolin, M.J.: Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of *Bacteroides succinogenes* and *Selenomonas ruminantium*. *Applied Microbiol.*, **26**(5), 789-795 (1973).
29. Zhang, C., Brandt, M.J., Schwab, C., Gänzle, M.G.: Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food Microbiol.*, **27**(3), 390-395 (2010).
30. Ray, B., Bhunia, A. Fundamental food microbiology (4th edition), Bioscience, Inc. p. 73 (2013).
31. World health organization (WHO): Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. WHO FOOD ADDITIVES SERIES NO.5 (1974).
32. International agency for research on cancer (IARC): Available from: http://monographs.iarc.fc/ENG/Classification.
33. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS): Korean Food Codes. (Notice 2016-72).
34. Chunlab Co., Ltd.: MC_Illumina Miseq_Material and Method. (http://www.chunlab.com/)