

Bifidobacterium longum BO-11을 이용한 김치의 제조

채명희 · 박은진 · 오태광¹ · 전덕영*

전남대학교 식품영양학과, 한국 생명공학연구원 미생물유전체 연구실¹

Preparation of Kimchi Containing *Bifidobacterium longum* BO-11

Myoung-Hee Chae, Eun-Jin Park, Tae-Kwang Oh¹, and Deok-Young Jhon*

Department of Food and Nutrition, and Human Ecology Research Institute, Chonnam National University

¹Microbial Genomics Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

Abstract Effect of *Bifidobacterium longum* BO-11 isolated from healthy adult feces on Baechu-kimchi made of chinese cabbage was evaluated. Upon enumeration of bifidobacteria using BS medium, microorganisms grew slowly in kimchi during fermentation at 4°C. Taste preference of bifidobacteria-added kimchi was higher than that of conventional kimchi without bifidobacteria.

Key words: *Bifidobacterium longum* BO-11, kimchi

서 론

*Bifidobacteria*는 장내 우점종으로 존재하여 인체 외부로부터 병원성균 또는 설사를 일으키는 장내 세균의 감염을 예방하여 장내 미생물의 균형을 유지시키며, 발암 예방, 콜레스테롤 감소, 면역력 증강 등의 역할 및 효능이 기대되어 발효유뿐만 아니라 유산균 식품, 의약품 분야 등에서 활발하게 사용되고 있다(1-5).

김치는 한국의 전통적인 채소 발효 식품이며, 김치는 g당 10⁹ cfu/g의 젖산균을 함유하고 있다(6). 김치를 섭취하는 동안 장내 젖산균이 증가하는 것으로 알려져 있다. 김치는 한국인에서 probiotics를 공급하는 주요 식품이며(7), 이러한 김치에 probiotics인 bifidobacteria를 적용시키고자 하는 노력이 있다(8,9). 김치에 사용되기 위하여는 내산소성, 내산성, 내염성의 bifidobacteria가 요구된다. 본 연구에서는 인체에 유익한 작용을 하는 bifidobacteria를 이용하여 기능성 있는 식품을 제조하기 위해 내산성, 내담즙성이 우수한 *B. longum* BO-11(10)을 첨가한 김치를 제조하고 김치 숙성 과정 중 bifidobacteria 및 여러 미생물의 변화 양상을 조사하였다. 또한, 김치 발효과정동안 화학적 특성을 대조군과 비교함으로써 bifidobacteria를 함유한 기능성 김치의 제조 가능성을 확인하였기에 이를 보고하고자 한다.

실험 재료 및 방법

사용 균주 및 *B. longum* BO-11의 배양

김치 제조에 사용된 균주로 *B. longum* BO-11을 사용하였다(10).

*Corresponding author: Deok-Young Jhon, Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, 300 Yongbongdong, Bukku, Gwangju 500-757, Korea

Tel: 82-62-530-1335

Fax: 82-62-530-1339

E-mail: dyjhon@chonnam.ac.kr

Received June 28, 2005; accepted January 18, 2006

균주는 0.05% L-cystein·HCl을 0.05% 함유한 MRS 액체 배지에서 48시간 배양하였다.

비피도박테리아를 함유한 김치의 제조

김치 제조를 위하여 배추는 일정한 크기(3×4 cm)로 잘라 젖산소금(0.25% 젖산 + 20% 소금)에 6시간 절인 후, 흐르는 물로 2회 행구고 6시간 탈수시켰다(11). 김치 제조시 사용된 부재료의 종류 및 배합비는 다음과 같이 절인 배추 100g당 무 10g, 고추가루 3g, 마늘 1.4g, 양파 1.5g, 파 2g, 생강 0.6g, 멸치젓 2g, 새우젓 1g, 찹쌀 풀 0.5g, 설탕 0.5g의 비율로 제조하였다. *B. longum* BO-11은 0.05% L-cystein·HCl을 0.05% 함유한 MRS 액체 배지에서 48시간 배양하여 원심분리(10,000 rpm, 15 min)한 후 생리 식염수(0.85% NaCl)로 2회 세척하여 김치를 담그기 직전 양념에 배합하여 배추와 함께 버무렸다. 김치 1g당 10⁶ cfu/g 수준으로 첨가하고 밀폐 용기에 200g씩 김치를 넣은 후 4°C에 보관하면서 실험하였다.

김치의 미생물학적 분석

김치를 담근 후 미생물 변화를 관찰하기 위하여 김치 국물을 취하여 호기성 미생물은 생리식 식염수에 십진희석하여 총균수는 PCA(Plate Count Agar, Merck, Dann stad, Germany) 배지를, *Lactobacillus* spp.의 경우는 LBS agar, *Leuconostoc* spp.은 phenyl ethyl alcohol sucrose agar를, 효모는 YM agar를 사용하여 30°C, 호기조건에서 배양하였다.

혐기성 미생물은 김치국물을 혐기 희석액(0.45% KH₂PO₄, 0.6% Na₂HPO₄, 0.05% L-cysteine·HCl, 0.05% Tween 80, 0.1% Bacto agar)에 십진희석하고 BS(Bifidobacteria selective) 배지에 도말하여 가스 팩 혐기성 발효조(Gas Pak anaerobic jar, BBL, USA)를 이용하여 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 본 실험에 사용된 배지는 Difco(Detroit, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다.

배지에 형성된 집락 중의 미생물을 현미경으로 검경하여 형태, 그람 염색성을 관찰하였다. 1차적으로 bifidobacteria 특징을 갖는

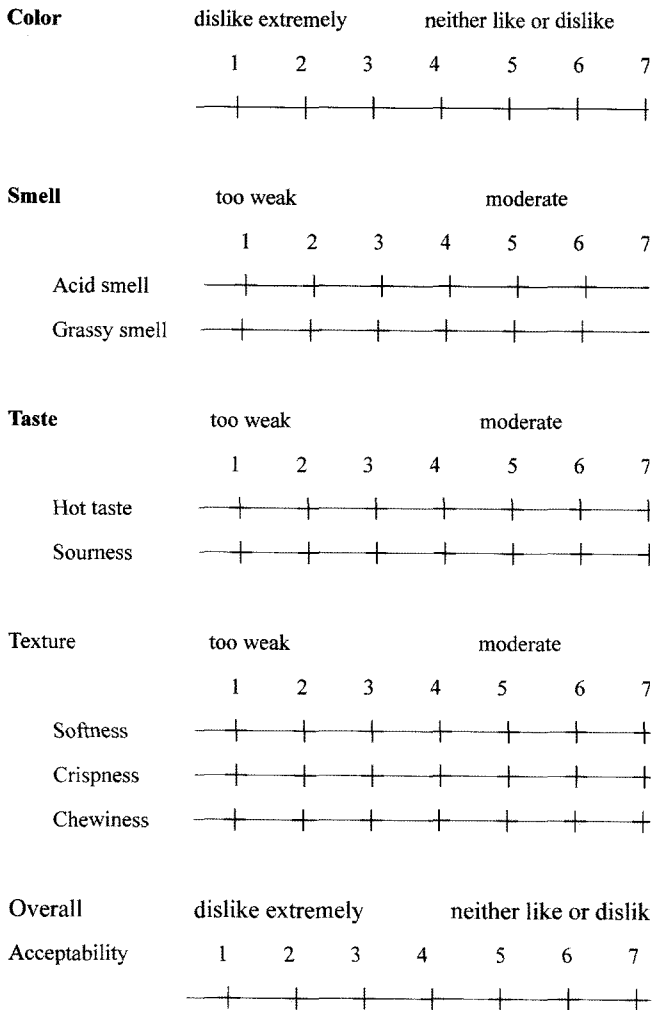


Fig. 1. Sensory test sheet.

김치 중의 미생물을 MRS(0.05% 시스테인 함유) 액체 배지에서 배양후 프럭토오스-6-포스페이트 포스포케톨라아제(Fructose-6-phosphate phosphoketolase, F6PPK) 효소 실험으로 2차적으로 확인하였다(12).

김치의 이화학적 분석

김치 100 g을 취하여 믹서로 갈아 4겹 거즈로 걸렀다. 얻어진 김치 시료를 원심분리(12,000 rpm, 1 hr)하여 상층액을 회수하고 0.45 μm 멸균된 주사기와 C₁₈ Sep-Pak cartridge(Millipore Co., USA)로 여과 후 사용하였다.

김치의 pH는 pH meter(Jenco Electronics, Taiwan)를 사용하여 측정하였다.

유기산은 시료를 HPLC(컬럼: Aminex HPLC-87H(300 mm×7.8 mm, Bio-Rad), 용매: 4 mM sulfuric acid, 유속: 0.6 mL/min, 검지기: UV detector-206 nm)로 분석하여 acetic acid와 lactic acid의 생성량을 조사하였다.

환원당은 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid, Sigma Chemical Co., USA)법으로 측정하였다(13).

김치의 관능평가

B. longum BO-11를 첨가하여 제조한 김치와 기존의 김치를 다 음의 관능검사를 통해 비교 조사하였다. 조사항목은 색깔, 냄새,

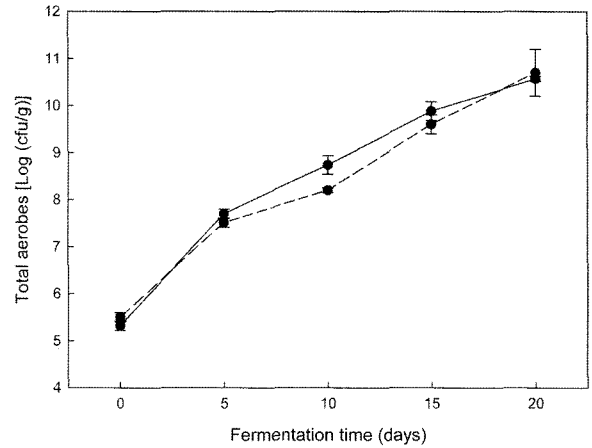


Fig. 2. Changes in total aerobes counts of kimchi during fermentation at 4°C. Dotted and solid lines indicate conventional kimchi and kimchi containing *B. longum* BO-11.

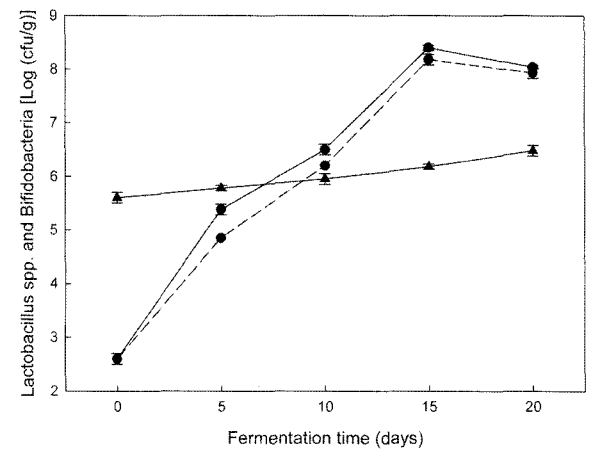


Fig. 3. Changes in Lactobacillus spp. and *Bifidobacterium longum* BO-11 of Kimchi during fermentation at 4°C. Dotted and solid lines indicate conventional kimchi and kimchi containing *B. longum* BO-11. Symbols: ●, lactic acid bacteria; ▲, bifidobacteria.

맛, 숙성도, 조직감, 종합적인 기호도를 9점 평가법으로 평가하였다(Fig. 1). 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, SAS 프로그램의 Student's *t*-test를 통하여 *p* < 0.05의 수준에서 유의성을 검정하였다(14).

결과 및 고찰

김치의 미생물학적 분석

B. longum BO-11이 probiotics로서 김치 제조에 이용될 수 있는 가능성을 조사하였다. 김치 g당 *B. longum* BO-11를 1.6×10^6 cfu/g로 첨가하고 4°C에서 20일간 발효하는 동안 bifidobacteria 첨가가 김치 숙성 과정 중 미생물의 증식에는 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 미생물의 변화를 측정하였다.

Fig. 2는 bifidobacteria를 첨가한 군과 대조군 김치를 4°C에서 저장하면서 총균수의 변화를 저장 기간별로 측정된 결과이다. 두 처리군 모두 증감 양상은 비슷하였으나 발효 10일째에 bifidobacteria 첨가군이 약간 높았다. 이는 김치 제조시 첨가된 bifidobacteria에 의해 미생물 성장이 촉진되었기 때문으로 생각된다(15,16). 담금 직후 3.6×10^5 cfu/g이던 것이 발효 20일까지 점차 증가하여

1.2×10^{10} cfu/g로 증가하였다.

Lactobacillus spp.의 양상은 두 김치균 모두에 있어서 발효 전 과정 중 유사하였다(Fig. 3) 담금 직후 미생물의 수는 2.0×10^2 cfu/g였으며 적숙기로 판단한 발효 15일째에 *Lactobacillus* spp.의 수는 2.2×10^8 cfu/g였다. 발효 초기에 *B. longum* BO-11을 첨가한 균의 *Lactobacillus* spp.의 수가 유의적으로($p < 0.05$) 높은 경향을 나타냈으며, 이는 bifidobacteria가 *Lactobacillus* spp.의 생육을 촉진하기 때문으로 생각된다(15,16).

김치 발효 동안 *B. longum* BO-11의 생존성은 Fig. 3과 같다. 김치에 첨가된 *B. longum* BO-11은 김치 발효 과정 중 우수한 생존력을 나타내어 발효 적숙기인 15일째에는 1.0×10^6 cfu/g을 나타내고 발효 20일까지 서서히 증가(1.2×10^6 cfu/g)하였다. Bifidobacteria는 편성 혐기성균으로 식품 제조적성이 우수하지 않다고 보고되었으나(17), 본 연구에서는 bifidobacteria의 생육을 촉진시키기 위해 배추 절입시 젖산 소금을 사용하여 최적의 pH를 제공하므로써 bifidobacteria가 성장되었을 것으로 생각된다. 이는 배추 김치에 *B. longum* BO-11을 probiotics로서 이용가능함을 보여준다.

Lee 등(9)은 2% 염 농도의 물김치에 *B. longum* JK-2을 10^8 cfu/mL 첨가하여 김치를 제조하고 4°C에서 10일 발효 후 10^7 cfu/mL을 나타냈다고 보고했다. Kim 등(8)은 *B. lactis*를 첨가한 김치에서 4°C 발효 6일 후에도 bifidobacteria가 존재함을 PCR 방법으로 확인하였다.

*Leuconostoc*은 발효 초기에 2.3×10^5 cfu/g였다가 김치 발효 10일에 5.3×10^8 cfu/mL-김치 최고로 증가하였다가 점차 감소하였다(Fig. 4). 따라서 *leuconostoc*은 bifidobacteria가 첨가된 김치에서도 발효 초기에는 증가하지만 후기에는 감소함을 나타냈다. *Leuconostoc mesenteroides*는 김치의 숙성 및 맛에 관여하는 주요 미생물로 알려져 있다. 두 김치균에 있어서 *leuconostoc*의 변화 양상은 비슷하나, bifidobacterium 첨가 김치에서 전 기간동안 미생물의 수가 유의적으로 높게 나타났다. 이는 비피도박테리아가 젖산균 뿐만 아니라 *leuconostoc*의 생육도 촉진했기 때문으로 생각된다(15,16).

Fig. 4는 효모의 변화를 저장 기간별로 측정된 결과이다. 효모는 김치 숙성에 관여하는데 알코올을 생성하여 향미에 관여하기도 하지만 산막효모는 김치의 외관과 텍스처를 손상시킨다. 담금 직후 효모 수는 1.0×10^3 cfu/g였다가 두 김치에서 효모는 발효

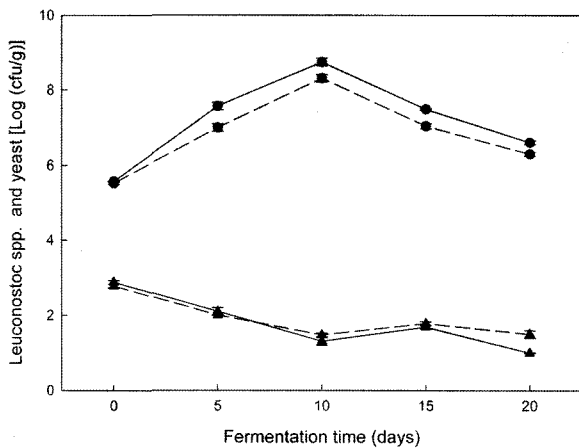


Fig. 4. Changes in *Leuconostoc* spp. and yeast of kimchi during fermentation at 4°C. Dotted and solid lines indicate conventional kimchi and kimchi containing *Bifidobacterium longum* BO-11. Symbols: ●, *Leuconostoc* spp.; ▲, yeast.

진행동안 점차 감소하며 특히 발효 10일째에 현저한 감소(2.2×10 cfu/g)를 보였다. 효모는 두 김치균에서 비슷한 양상으로 감소되었으나 특히 발효 20일 김치에서 bifidobacteria 첨가 김치에서 유의적으로 낮았다. 이는 발효 후기에 축적된 유기산에 의한 것으로 생각된다. Shin 등(18)은 5°C에서 발효한 김치에서 초기 효모의 수는 10^3 cfu/mL이었다가 발효 진행동안 감소했다고 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다.

김치의 이화학적 분석

Bifidobacteria를 첨가하여 제조한 김치의 pH(Fig. 5) 및 유기산의 농도를 발효과정 동안 측정하였다.

대조군 김치는 담금 직후 pH 4.6이었다가 발효 5일째에 약간 증가하고 이후에 점차 감소하는 경향을 나타내었으며 발효 15일째에는 pH 4.4를 나타내었다. Bifidobacteria 첨가 김치는 발효 5일 이후부터 대조군 김치보다 pH가 많이 감소하여 발효 15일째 4.23으로 감소하였다. 일반 배추 김치의 담금 직후 pH는 5.5-6.0이며, 발효 초기에 pH 6부근으로 상승했다가 점차 감소한다고 알려져 있다(19). 본 연구에서는 배추 절입시 젖산 소금을 첨가하여 초기 김치의 pH가 다른 연구 보고보다 낮고, 발효 초기 pH

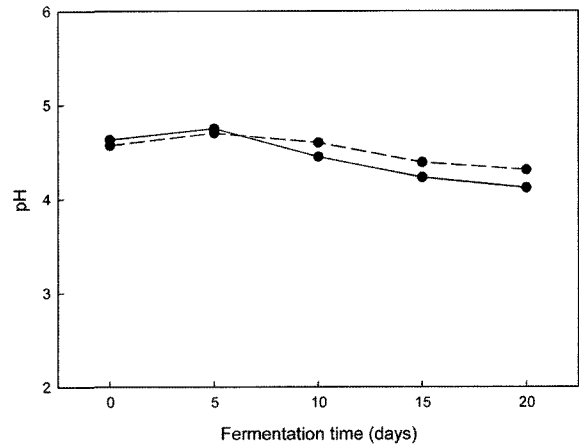


Fig. 5. Changes in pH of kimchi during fermentation 4°C. Dotted and solid lines indicate Conventional kimchi and kimchi containing *Bifidobacterium longum* BO-11.

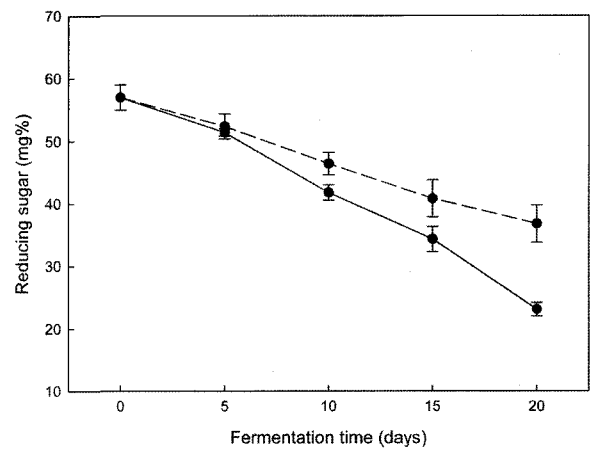


Fig. 6. Changes in reducing sugar of kimchi during fermentation at 4°C. Dotted and solid lines indicate conventional kimchi and kimchi containing *Bifidobacterium longum* BO-11.

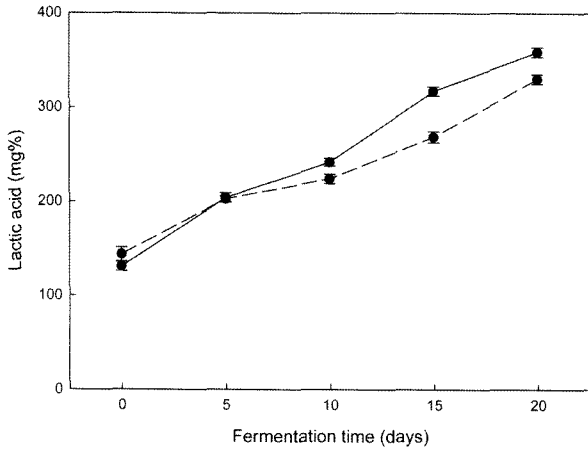


Fig. 7. Changes in lactic acid of kimchi during fermentation at 4°C. Dotted and solid lines indicate conventional kimchi and kimchi containing *B. longum* BO-11.

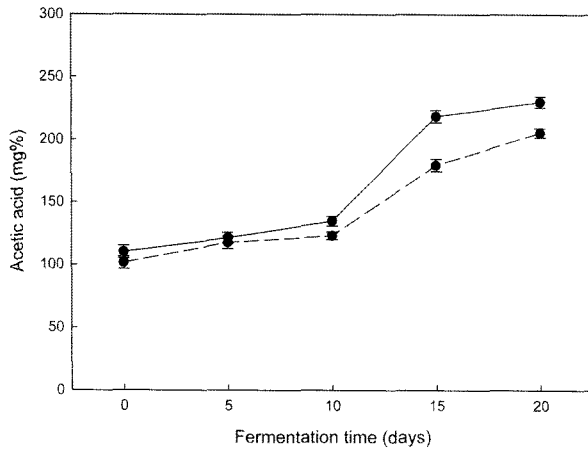


Fig. 8. Changes in acetic acid of kimchi during fermentation at 4°C. Dotted and solid lines indicate conventional kimchi and kimchi containing *B. longum* BO-11.

의 변화도 적게 일어났다고 생각된다. 발효 과정동안 bifidobacteria 첨가 김치에서 더 낮은 pH를 보였으며 이는 젖산균과 bifidobacteria가 생성하는 산에 의한 것으로 생각된다(20).

환원당은 두 김치균에서 발효가 진행됨에 따라 지속적으로 감소되었다(Fig. 6). 이러한 당류 성분의 감소는 미생물의 영양원으로 이용되면서 유기산 등의 물질로 전환된 것으로 판단되고 있다(21). 환원당 함량은 김치 담금 직후 55 mg/mL였으며, 발효 5 일째부터 급격히 감소하였다. 발효 기간동안 bifidobacteria 첨가 김치에서 환원당 감소가 전반적으로 높은 이유는 첨가된 bifidobacteria와 젖산균의 생육으로 당 소모가 높았기 때문으로 생각된다.

발효김치의 주요 유기산인 젖산은 20일 발효하는 동안 약 2배로 증가하였으며 초산도 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 7-8). 김치의 적숙기로 알려진 발효 10-15일째에 bifidobacteria 김치에서 젖산과 초산 생성이 유의적으로 높게 나타났으며 이는 젖산균과 bifidobacteria가 생성하는 산에 의한 것으로 생각된다. Bifidobacteria는 젖산과 초산을 2:3의 mol 비로 생산하고, lactic acid bacteria의 생육을 촉진한다고 보고되었다(20).

김치의 관능평가

B. longum BO-11 첨가 김치와 대조군 김치의 기호도를 비교하

Table 1. Sensory score of kimchi with *Bifidobacterium longum* BO-11 during fermentation at 4°C

Attributes	A ¹⁾	B
Color	5.38 ± 2.13 ²⁾	6.00 ± 1.00
Smell		
Acid smell	3.25 ± 1.03 ³⁾	6.71 ± 1.38 ^a
Grassy smell	4.75 ± 1.39 ^a	3.00 ± 2.16 ^b
Taste		
Hot taste	3.63 ± 1.19	4.71 ± 1.25
Sourness	3.12 ± 0.83 ^b	6.00 ± 1.73 ^a
Texture		
Softness	4.75 ± 1.58	4.29 ± 1.70
Crispness	5.38 ± 1.51	6.00 ± 1.00
Chewiness	5.00 ± 2.00	5.14 ± 1.86
Overall acceptability	4.25 ± 1.28 ^b	5.71 ± 0.49 ^a

¹⁾A: Conventional Kimchi, B: Kimchi containing *B. longum* BO-11.

²⁾Mean ± SD, Data were analyzed by Student's *t*-test.

³⁾Significant difference between the values in the same row (*p* < 0.05).

기 위하여 발효 적숙기인 15일째에 관능평가를 실시하였으며 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 두 김치는 색과 조직감의 기호도에 있어서 전체 발효기간 동안 유의적인 차이가 없었다. 신내, 신맛은 bifidobacteria 김치에 있어서 대조군보다 유의적으로 높게 평가되었는데 이는 발효 과정 중 bifidobacteria 김치에서는 첨가된 bifidobacteria와 bifidobacteria에 의해 생육 촉진된 lactobacillus에 의한 산 생성이 높았기 때문으로 생각된다. 전체적인 기호도는 상대적으로 높은 산 생성에도 불구하고 bifidobacteria 첨가 김치가 우수하게 평가되었다.

결과적으로 적숙기의 bifidobacteria 김치는 보통 김치보다 더 좋은 소비자의 기호도를 갖게 되어 bifidobacteria를 첨가한 김치 제조가 일반 김치의 품질 향상에 도움이 될 것으로 생각된다.

한편 김 등은 *B. lactis*를 첨가한 김치가 김치의 품질에 영향을 미치지 않는다고 하였다(8). 따라서 bifidobacteria는 그 종류에 따라 김치의 품질을 좌우할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

건강한 성인의 분변에서 분리한 내산성 및 내담즙성이 우수한 *B. longum* BO-11을 김치 제조용 스타터로 이용하여 그 생존 능력과 김치 발효에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 발효과정 중 bifidobacteria의 계수는 BS 배지를 사용하였으며 20일의 저장 기간 동안 균수가 약간 증가하였다. 일반 미생물은 bifidobacteria 비첨가군과 비슷하였으며 bifidobacteria 첨가군의 경우 산의 생산이 더 많았다. 김치 맛은 일반 김치보다 bifidobacteria 첨가 김치가 더 우수하였다. 이러한 결과는 bifidobacteria를 이용한 기능성 김치의 상업화 가능성을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 21C 프론티어 미생물유전체 활용기술 개발 사업단의 연구지원비에 의하여 수행되었으며 연구지원에 감사 드립니다.

문 헌

1. Ballongue J. Bifidobacteria and probiotic action. pp. 357-428. In:

- Lactic acid bacteria. Salminen S, von Wright A (eds). Marcel Dekkers, Inc., New York, NY, USA (1993)
2. Gomes AMP, Malcata FX. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Sci. Technol. 10: 139-157 (1999)
 3. Kim HY, Yang JO, Ji GE. Effect of bifidobacteria on production of allergy-related cytokines from mouse spleen cells. J. Microbiol. Biotechnol. 15: 265-268 (2005)
 4. Om AS, Park SY, Hwang IK, Ji GE. Comparison of nitric oxide, hydrogen peroxide, and cytokine production in RAW 264.7 cells by bifidobacterium and other intestinal bacteria. J. Microbiol. Biotechnol. 9: 98-105 (1999)
 5. O'Sullivan D, Kullen MJ. Tracking of probiotic bifidobacteria in the intestine. Int. Dairy J. 8: 513-525 (1998)
 6. Cho JS. Chemical characteristics of kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 21: 25-30 (1988)
 7. Lee KE, Choi UH, Ji GE. Effects of Kimchi intake on the composition of human large intestinal bacteria. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 981-986 (1996)
 8. Kim TW, Park AK, Kim GR, Lee JM, Chung DK, Kim HY. Characterization of functional Kimchi using *bifidobacterium lactis*. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 924-927 (2003)
 9. Lee SK, Ji GE, Park YH. The viability of bifidobacteria introduced into kimchi. Lett. Appl. Microbiol. 28: 153-156 (1999)
 10. Oh TG, Choi KS, Kim HK, Kim DH, Jhon DY. Acid-tolerant and bile acid-tolerant *Bifidobacterium longum* BO-11 and its use. Korean Patent 10-0398063 (2003)
 11. Choi KS, Sung CK, Kim MH, Oh TK. Fermentation methods of kimchi using halophilic *Lactobacillus* sp. HL-48 and lactic acid. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 246-251 (1999)
 12. Jones D, Collins MD. Irregular non-sporing Gram-positive rods. Vol. 2, pp. 1261-1434. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds). The Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1986)
 13. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428 (1959)
 14. SAS Institute, Inc. SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA (1990)
 15. Wang YC, Yu RC, Chou CC. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. Food Microbiol. 19: 501-508 (2002)
 16. Murti TW, Bouillanne C, Landon M, Desmazeaud MJ. Bacterial growth and volatile compounds in yogurt-type products from soymilk containing *Bifidobacterium* spp. J. Food Sci. 58: 153-156 (1993)
 17. Fuller R. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378 (1989)
 18. Shin DH, Kim MS, Han JS, Lim DK, Bak WS. Changes of chemical composition and microflora in commercial Kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 137-145 (1996)
 19. Mheen TI, Kwon TW, Lee CH. Traditional fermented food products in Korea. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. 9: 253-261 (1981)
 20. Modler HW, McKellar RC, Goff HD, Mackie DA. Using icecream as a mechanism to incorporated bifidobacteria and fructooligosaccharides into the human diet. Cult. Dairy Prod. J. 25: 4-6 (1990)
 21. Steinkraus KH, Cullen RE, Peterson CS, Neils LF, Gavitt BK. Handbook of indigenous fermented foods. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp. 99-131 (1983)