

Conjugated linoleic acid(CLA) 생성균주를 starter로 이용한 기능성 김치의 제조

민승기 · 김정희* · 김소미¹ · 신흥식¹ · 홍근화² · 오덕근² · 김경남
풀무원, ¹케비젠, ²세종대학교 생명공학과

Manufactures of Functional Kimchi using *Bifidobacterium* Strain Producing Conjugated Linoleic Acid (CLA) as Starter

Sung-Gi Min, Jung-Hee Kim*, Somi Kim Cho¹, Hong Sig Shin¹, Gun-Hwa Hong²
Duk-Gun Oh² and Kyung-nam Kim

¹Pulmuone Corporation

¹Chebigen Corporation

²Department of Bioengineering, Sejong University

Conjugated linoleic acid (CLA), known to possess various beneficial effects such as anticarcinogenic, antioxidative, and cholesterol-depressing, has been used as a health supplementary food in Japan and the USA. Optimum condition for CLA production without causing changes in quality of kimchi was determined using *Bifidobacterium* sp., a CLA-producing microorganism, as a starter in culture broth, freeze-dried culture, and encapsulated culture. Results revealed encapsulation was most ideal for maintaining the ability of bacterium to produce CLA during kimchi fermentation. Exogenous linoleic acid (LA) which is a substrate for conversion to CLA was not added to kimchi since LA was already exists in red pepper. Changes in sensory properties of kimchi and production of CLA were measured after inoculation of the encapsulated starter. The optimum inoculation concentration of the encapsulated starter was 0.1% (w/w) for production of CLA without causing changes in kimchi taste.

Key words: conjugated linoleic acid (CLA), kimchi, *Bifidobacterium* sp.

서 론

우리나라의 대표적인 전통 발효식품인 김치는 소금에 절인 배추나 무, 오이등에 각종 채소와 향신료를 첨가하여 일정기간 숙성 발효시킨 식품으로 김치의 식이섬유 및 부재료의 성분들이 항암효과, 체지방저하등의 효과가 있는 것으로 보고되어 있다⁽¹⁻⁵⁾. 그리고 김치발효에서 중요한 역할을 하는 젖산균은 유기산, bacteriocin 등의 항균성 물질을 생산하여 김치발효에 유해한 세균들의 증식을 억제하고, 각종 향미성분을 생산하여 김치에 독특한 향미를 부여하지만 지나치게 시어지는 문제점도 야기시킨다⁽⁶⁻¹³⁾. 그러므로 김치가 산업적 규모에서 안정적으로 대량생산이 되기 위해서는 결국 미생물의 인위적인 조절을 통한 품질관리기술이 확립되어야 한다. 이러한 연구의 일환으로 김치 제조시 젖산균 스타터의 접종이 시도된

바 있으나 대부분 풍미향상이나 가식기간 연장에 초점이 맞추어져 큰 실효를 거두지 못하는 실정이다^(6,14). CLA는 자연적인 유지류에 존재하는 필수지방산인 linoleic acid가 cis-9, trans-11의 형태로 변형화된 생리활성 물질로서 동물실험 결과에서 CLA 섭취로 인하여 항암작용⁽¹⁵⁻¹⁷⁾, 체내지방저하⁽¹⁸⁾, 동맥경화증 치유⁽¹⁹⁾, 면역성분 강화⁽²⁰⁾에 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

이에 본 연구는 기능성강화라는 관점에서 접근하여 CLA를 생성하는 *Bifidobacterium* sp.를 김치에 배양액, 동결건조, 미세캡슐 형태로 첨가하고 김치 발효 중에 CLA 생성가능성과 김치 맛과의 상관관계를 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 김치재료는 (주)풀무원의 배합비에 의거 제조하였다. 김치의 starter-용 균주는 (주)케비젠에서 확보한 *Bifidobacterium* sp.을 사용하였다. 유산균 증식 및 보존은 MRS(Difco Lab., USA)매지를 사용하고, 총균수는 PCA(plate

*Corresponding author: Jung-Hee Kim, R&D center, Pulmuone Corp., Seoul 120-600, Korea
Tel: 82-2-3277-8478
Fax: 82-2-3277-8503
E-mail: unify@pulmuone.co.kr

Table 1. Raw materials of kimchi

Materials	Weight ratio (%)
Chinese cabbage	80
Radish	13
Fermented anchovy soup	2.5
Dried red pepper	2
Garlic	1
Green onion	1
Ginger	0.5
Starter	0.1~1%
Salt ¹⁾	

¹⁾Final salt content of kimchi is 2.5%.

counting agar, Difco Lab., USA) 배지를 사용하였다. 기타 분석시약은 모두 특급으로 사용하였다.

김치의 제조 및 발효

본 실험에 사용된 배추는 2002년도에 생산된 통배추로서 서울시 신촌동 현대백화점에서 중량 2~3 kg인 것만 선별하여 김치를 제조하는 당일에 구입하였다. 배추는 2등분하고, 10°C, 15%의 NaCl (80% 천일염) 용액에 침지하여 배추조직 내의 NaCl 함량이 약 3%정도 될 때까지 염지 시킨 후, 흐르는 물에 3회 세척하여 물빼기를 한 다음 5 cm정도로 잘게 절단하여 양념을 Table 1의 비율로 혼합하여 김치를 제조하였다. 시료김치는 500 g씩 starter를 첨가하지 않은 대조군과 starter를 첨가한 김치군으로 나누어 aluminum pouch에 담고 잘 밀봉하여 10°C에서 30일간 숙성 발효시키면서 일정기간 간격으로 샘플링하여 분석에 사용하였다.

균주 동결건조 및 미세캡슐처리

동결건조는 MRS broth에서 48시간 배양한 액을 0.45 μm membrane filter(Satorius, Germany)를 이용하여 농축한 뒤 부형제로 NaCl, 탈지분유 등을 첨가하여 급속냉동 후 동결건조기(Ilshin, Korea)에서 건조하였고, 미세캡슐은 찰옥수수전분과 agar를 사용하여 각각 0.25%의 농도로 용해하여 수용액내의 친수성 유화제인 sorbitan monolaurate(Sigma, USA)을 2%되게 첨가하여 전체수용액을 가열시킨 후, 40~50°C로 유지되는 항온실에서 보관하였다. 상기 수용액 500 g에 *Bifidobacterium* sp. 배양액 500 g을 첨가하여 혼합기를 사용하여 균질의 유화액을 제조한 다음, 상기 유화액을 멸균수 10 L에 직접 고압분무시켜 다당류 물질로 미세캡슐화된 균체를 함유한 혼탁액을 제조하였다. 김치에 첨가되는 starter(배양액, 동결건조, 미세캡슐)의 젖산균수는 5~6×10⁸ CFU/g로 일정하게 조정하였다.

김치의 일반성분 분석

시료김치를 waring blender로 마쇄한 후 거즈로 걸러 그 여액을 일정량 취하여 pH는 pH meter(IQ Scientific, USA)로 측정하였으며, 산도는 AOAC의 방법⁽²¹⁾에 의하여 10 mL 김치여액을 중화시키는데 소비된 0.1 N NaOH의 양을 lactic acid의 양으로 환산하였다. NaCl 농도 측정은 염도계(Atago, Japan)를 사용하였다.

GC에 의한 지방산 분석

김치 500 g을 5분간 마쇄하여 거즈로 여과한 김치즙액을 12,000 rpm 으로 10분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상등액은 2배 부피의 isopropyl alcohol(Daejung, Korea)을 첨가하여 2분간 혼합하고, 다시 1.5배 부피의 hexane(Daejung, Korea)을 첨가하여 혼합한 후 hexane층 만을 분리해내고, 감압증류로 완전 건조시켰다. 1 N NaOH/methanol 2 mL, BF₃ methanol(Sigma, USA) 2 mL, 내부표준물질로서 heptadecanoic acid가 함유되어 있는 hexane 용액 2 mL을 가하여 각각 10 분, 5분, 1분 동안 중탕 가열하여 methyl ester화한 후 이를 gas chromatograph(GC)로 분석하였다.

분석된 값은 표준 CLA(Sigma, USA)와의 retention time과 비교하여 동정하고, peak의 면적비는 내부표준물질인 heptadecanoic acid를 사용하여 계산하였다⁽²²⁾.

관능평가

관능평가는 풀무원 기술연구소의 김치관능에 경험이 있는 10명의 연구원으로 구성하였다. 관능검사 평가는 김치에서 느낄 수 있는 색택, 냄새, 맛, 조직감, 전체적인 기호도인 5 개항목으로 구분하였으며 평가척도는 9점 체점법으로 실시하였다. 결과에 대한 통계처리는 일원배치 분산분석하고 ANOVA의 다중비교에 의하여 각 평균치간의 유의성을 검정하였다⁽²³⁾.

결과 및 고찰

김치내 linoleic acid 및 CLA 분석

김치 발효시 본 연구에 사용된 starter의 활성을 증가시키기 위하여 기질로 사용되는 linoleic acid의 첨가여부를 결정하기 위해 김치내 부재료의 지방산 성분을 분석하였다.

먼저 linoleic acid와 cis-9, trans-11 linoleic acid의 retention time은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 각각 10.83, 13.50분이었다. 그리고 부재료에서의 linoleic acid의 양은 원료 g당 멸치젓 0.05 mg, 새우젓 0.01 mg, 생강 1.02 mg, 마늘 0.66 mg, 양파 0.26 mg, 고추가루 242.46 mg으로 측정되었다 (Fig. 2). 이는 김치 제조시 100 g당 400~500 mg에 해당하는 양으로 본 실험에서는 김치제조시 별도로 기질인 linoleic acid를 첨가하지 않고 수행하였다.

균체 첨가방법

Starter로서 김치 내 CLA생성을 유도하기 위하여 균체 첨가조건을 달리하여 CLA생성량을 Table 2과 같이 분석하였다. 예비실험에서 균주배양농축액을 starter로 사용했을 경우는 적은 양을 첨가했을 경우에도 김치의 색상과 맛을 저하시켜 실험구에서 배제하였으며, 균주를 동결건조하여 첨가하는 방법과 미세캡슐하여 첨가하는 방법으로 김치에 적용을 하여 CLA생성과 관능적인 부분을 비교하여 첨가방법의 효율성을 검토하였다. Table 2의 결과와 같이 동결건조된 균체와 미세캡슐 균체를 예비실험 조건에서 임의적으로 선정된 접종량인 김치 g당 10⁶ CFU로 동량씩 첨가하였을 때 숙성 후 CLA함량은 미세캡슐의 경우가 약 9배 높았으며, 김치의 색상과 외관도 더 우수하였다. 이 결과로 김치에 첨가되는

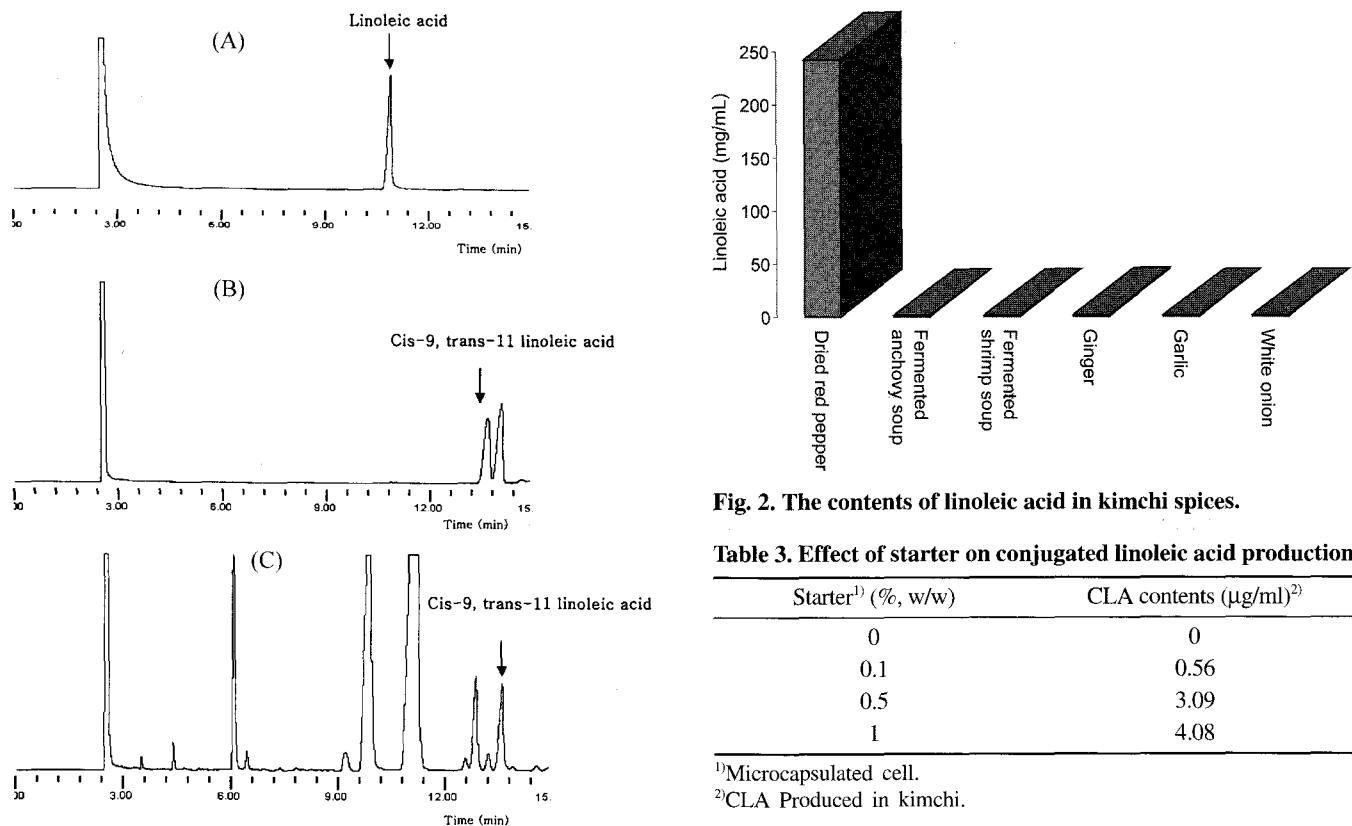


Fig. 2. The contents of linoleic acid in kimchi spices.

Table 3. Effect of starter on conjugated linoleic acid production

Starter ¹⁾ (% w/w)	CLA contents (μg/ml) ²⁾
0	0
0.1	0.56
0.5	3.09
1	4.08

¹⁾Microencapsulated cell.²⁾CLA Produced in kimchi.

Fig. 1. Gas chromatograms of standard linoleic acid methyl ester (A), standard cis-7,trans-11 linoleic acid methyl ester (B), and cis-7, trans-11 linoleic acid methyl esters in kimchi (C).

균체는 미세캡슐로 처리하는 방법이 가장 효율적인 것으로 나타났다.

균체 최적첨가농도

김치의 관능과 연계하여 CLA를 생성하기 위한 최적의 농도를 결정하기 위하여 미세캡슐한 균체를 농도별로 첨가하여 김치의 CLA함량과 그에 따른 관능결과를 비교 분석하였

다. Table 3에서 보는 바와 같이 starter 첨가량이 높을수록 생성되는 CLA함량도 높았으나, Table 4에서와 같이 그에 따른 이미, 이취도 높게 감지되어 대조구(균체 무첨가)에 비해 관능이 저하되어 CLA생성을 유도하면서도 관능에 큰 영향을 미치지 않는 농도는 0.1%이하로 평가되었다. starter가 0.1%이상 첨가되었을 때 이미, 이취가 발생하는 것은 증가된 균체와 미세캡슐에 사용되는 부형제에 기인하는 것으로 추측된다.

이와 같이 본 연구에서는 CLA를 생산하는 *Bifidobacterium* sp.을 미세캡슐화하여 starter로 사용함으로써 CLA가 함유된

Table 2. Effect of addition method of starter on conjugated linoleic acid production

Addition Methods	Inoculated cell conc. in kimchi	Initial kimchi CLA (ug/ml)	Ripened kimchi CLA (ug/ml)
Freeze dried cell	10 ⁶ CFU/kimchi g	ND ¹⁾	0.716
Microencapsulated cell	10 ⁶ CFU/kimchi g	ND	6.08

¹⁾ND: not detected

Table 4. Statistical analysis of ripened kimchi fermented with starter

Starter ¹⁾ (% w/w)	Color ²⁾	Odor ²⁾	Taste ²⁾	Texture ²⁾	Preference ²⁾
0	6.13 ^a	5.89 ^a	6.32 ^a	6.12 ^a	6.15 ^a
0.1	6.14 ^a	5.85 ^a	6.30 ^a	6.23 ^a	6.10 ^a
0.5	6.02 ^a	5.36 ^b	5.87 ^b	6.14 ^a	5.7 ^b
1	5.89 ^b	5.34 ^b	5.65 ^b	6.10 ^a	4.2 ^b

¹⁾Microencapsulated cell.²⁾Data are means rated by 10 panels based on the 9 point scale: like extremely (9) ~dislike extremely (1).a,bMeans with the same letter are not significantly different ($P<0.05$).

기능성김치를 제조할 수 있었으나, 미세캡슐로 처리된 균체 0.1%가 첨가된 시료는 김치 100 g당 약 408 µg의 CLA가 생성되어 미국 건강보조식품으로 판매되고 있는 CLA정제의 권장섭취량인 200 mg에 비해 그 양이 미비하였다^[24]. 따라서 관능적으로 적합하고 CLA생성이 보다 효과적으로 유도되는 최적의 조건에 대한 실험들이 추가적으로 필요하다고 판단된다.

요 약

공역리놀레산(CLA)은 항암, 항산화작용, 콜레스테롤저하 등의 효과를 지닌 물질로 알려져 있으며, 일본과 미국에서는 건강보조식품으로 널리 이용되고 있다. 본 연구에서는 CLA 생산능력이 있는 미생물을 김치제조 시에 스타터로 첨가하여 김치의 맛에는 변화를 가져오지 않으면서 CLA를 생산하는 최적조건을 밝히기 위해 혼기성 스타터 비피도박테리아를 배양액상태, 냉동건조된 상태, 캡슐화된 상태 등의 세가지 형태로 접종하였다. 이를 세가지 접종 방법 중 캡슐화된 상태로 스타터를 접종 시에 김치발효 중의 박테리아의 CLA 생산능력이 최적상태로 유지되었다. 김치 제조시에 부재료로 첨가되는 고추에는 상당량의 리놀레산(LA)이 함유되어 있음이 확인되어 추가로 LA를 첨가하지 않았다. 캡슐화된 비피도박테리아 스타터를 접종한 후 김치의 맛과 CLA생산 추이를 살펴본 결과 김치 맛에 영향을 끼치지 않고 CLA를 생산할 수 있는 최적의 접종량은 0.1%(w/w)임이 밝혀졌다.

문 헌

- Han, H.U., Lim, C.R. and Park, H.K. Determination of microbial community as an indicator of kimchi fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 22: 26-32 (1990)
- Lee, C.H., Ko, C.H. and Ha, D.M. Microfloral change of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 102-106 (1992)
- Kang, S.M., Yang, W.S., Kim, Y.C., Joung, E.Y. and Han, Y. G. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for kimchi fermentation and effect of starter. Korean J. Appl. Mircobiol. Biotechnol. 23: 461-471 (1995)
- Kim, H.J., Kang, S.M. and Yang, C.B. Effects of yeast addition as starter on fermentation of kimchi. Korean J. Food. Sci. Technol. 27: 404-411 (1989)
- Chem, K.H., Mcfeeters, R.F., Daeshel, M.A., and Fleming, H.P. A differential medium for enumeration of homofermentative lactic acid bacteria. J. Food Sci. 53:1382-1389 (1987)
- So, M.H., Shin, M.Y. and Kim, Y.B. Effects of psychrotrophic lactic acid bacterial starter on kimchi fermentation. Korean J. Food. Sci. Technol. 28: 806-812 (1996)
- Ha, J.H. Analysis of volatile organic compounds in kimchi absorbed in SPME by GC-AED and GC-MSD. J. Korean Soc.

- Food Sci. Nutr. 31: 543-545 (2002)
- Lee, J.Y., Park, Y.S., Kim, Y.S. and Shin, D.H. Antimicrobial characteristics of metabolites of lactic acid bacteria isolated from feces of newborn baby and from *dongchimi*. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 472-479 (2002)
- Park, Y.H. and Song, H.J. Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* Lp-2 Isolated from kimchi. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 637 (1991)
- Song, H.J. and Park, Y.H. Effect of lactic acid bacteria in the growth of yeast from Mul-kimchi. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 219-224 (1992)
- Mheen, T.I. and Kwon, T.W. Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 16: 443-450 (1984)
- Choi, K.S., Sung, C.S., Kim, M.H. and Oh, T.K. Fermentation method of kimchi using halophilic *Lactobacillus* sp. HL-48 and lactic acid. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 27: 246-251 (1999)
- Park, W.P., Park, K.D., Cheong, Y.J. and Lee, I.S. Effect of calcium powder addition in the quality characteristics of kimchi. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31: 428-434 (2002)
- Lee, S.H., Park, N.Y. and Choi, W.J. Changes of the lactic acid bacteria and selective inhibitory substances against homo and hetero lactic acid bacteria isolated from kimchi. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 410-414 (1999)
- Ha, Y.L., Grimm, N.K. and Pariza, M.W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. Carcinogenesis 8: 1881-1887 (1987)
- Devery, R.A. and Miller, C.S. Conjugated linoleic acid and oxidative behavior in cancer cells. Biochem Soc. Trans. 9: 341-344 (2001)
- Pariza, M., Park, Y. and Cook, M. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. Prog. Lipid Res. 40: 283-298 (2001)
- Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L. and Pariza, M.W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. J. Food Compos. Anal. 5: 185-197 (1992)
- Nicolas, R.J., Rogers, E.J., Kritchevsky, D., Scimeca, J.A. and Huth, P.J. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. Artery 22: 266-277 (1997)
- Miller, C.C., Park, Y., Pariza, M. W. and Cook, M.E. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. Biochem. Biophys. Res. Commun. 198: 1107-1112 (1994)
- AOAC. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1990)
- Lin, T.Y. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic culture and additives. Food Chem. 69: 27-31 (2000)
- Lee, I.S., Son, M.G., Gi, Y.H. and Park, J.S. Experimental Statistics. Hakmunsa, Seoul (1981)
- DeLany, J.P., Blohm, F., Truett, A.A., Scimeca, J.A. and West, D.B. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. Am. J. Physiol. Apr. 276-278 (1999)

(2002년 12월 26일 접수; 2003년 2월 12일 채택)