KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 35, No. 5, pp. 924~927 (2003)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

*Bifidobacterium lactis*를 이용한 기능성 김치의 특성

김태운 · 박애경 · 김금란 · 이정민[1] · 정대균[1] · 김해영*
경희대학교 생명과학대학, [1](주)RNA

Characterization of Functional *Kimchi* Using *Bifidobacterium lactis*

Tae-Woon Kim, Ae-Kyung Park, Gum-Ran Kim, Jung-Min Lee[1], Dae-Kyun Chung[1] and Hae-Yeong Kim
College of Life Sciences, Kyung Hee University, [1]RNA Inc.

This study was conducted to investigate the application of bifidobacteria on *kimchi*. Among several *Bifidobacterium* species, we selected *Bifidobacterium lactis* (DSM 10140), which is resistant to oxygen, acid and salt. *Bifidobacterium lactis* was cultured in a supplemented deMan, Rogosa and Sharpe (SMRS) medium under aerobic conditions. Its acid-tolerance and salt-tolerance were pH 3.0 and 3.5% (NaCl), respectively. The viability of *Bifidobacterium lactis* added to *kimchi* was confirmed by PCR, using specific primers on *Bifidobacterium lactis*. In sensory evaluation, *kimchi* containing *Bifidobacterium lactis* showed similar scores in overall acceptability with the control *kimchi*. Consequently, these results showed that it would be possible to prepare functional *kimchi* using *Bifidobacterium*.

Key words: *kimchi*, *Bifidobacterium lactis*, salt-tolerance, oxygen-tolerance

서 론

비피더스균(bifidobacteria)은 인간에게 매우 유익한 대표적인 장내 미생물로서 정상인의 장내에서 초산과 젖산 등의 유기산을 생성하여 장내부패세균의 성장을 억제할 뿐 아니라 발암 물질의 분해, 체내의 면역기능 증강, 비타민의 생성 및 콜레스테롤 저하 등 인간의 건강 유지에 중요한 역할을 한다[1-6]. 유제품의 경우 이러한 비피더스균을 이용한 제품 개발이 활발하게 이루어지고 있으나, 김치의 경우 그 이용의 예가 많이 보고되지 않고 있다. Bifidobacteria 균주의 김치 제조에의 이용은 유제품을 통한 섭취와는 달리 일상 식생활에서 친숙하게 섭취할 수 있는 장점과 아울러 bifidobacteria 균주가 가지고 있는 여러 생리활성을 나타내는 새로운 고기능성 김치제품의 개발을 가능하게 할 것으로 생각된다. 이는 건강식품에 대한 선호도가 높은 소비자의 욕구를 충족시킴으로서 김치 판매량의 증대 및 부가가치의 제고를 이룰 수 있을 것이며 나아가서는 김치산업의 국제화 및 수출 상품화에 크게 기여할 것으로 생각된다.

*Corresponding author : Hae-Yeong Kim, College of Life Sciences, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea
Tel: 82-31-201-2660
Fax: 82-31-204-8116
E-mail: hykim@khu.ac.kr

비피더스균은 일반 유산균에 비해 혐기적인 배양조건을 필요로 하며 영양 요구성도 매우 까다롭기 때문에 호기적인 조건인 김치에 비피더스균을 이용하는 데는 많은 어려운 점들이 있다. 백 등[7]은 비피더스균이 첨가된 김치의 제조방법을 제시하고 있으나, 이들의 방법은 비피더스균이 공기가 있는 조건에서 생육하기 어렵기 때문에 김치를 제조한 후 알루미늄으로 라미네이트 시킨 고분자 파우치에 넣어 100 내지 250 mmHg의 압력하에서 진공 포장 등의 특별한 제조 방법을 필요로 하고 있다. 또한, 육[8] 등은 김치 발효에 적합한 특정의 호기성 비피더스균과 올리고당을 선정하여 김치를 제조하는 방법을 제시하고 있으나, 이 연구에서는 호기성 bifidobacteria 균주의 특성과 선발 과정이 명확하지 않고, 또한 선정한 호기성 bifidobacteria 균주를 첨가한 김치에서의 bifidobacteria의 생존여부가 불확실한 점 등이 있다. 이러한 문제점 등으로 인하여 비피더스균을 첨가한 김치의 제조 및 이용에 많은 제약을 받아 왔다.

따라서 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 호기 조건인 김치 제조에 이용이 가능한 내산소성, 내산성 및 내염성 비피더스균을 여러 bifidobacteria 균주 중에서 선발하여 김치의 제조에 적용하고, 실제 김치에서의 장기간 비피더스균의 생존 상태를 확인하고 또한, 김치의 산도 및 염농도가 비피더스균의 생육에 미치는 영향을 파악하여 비피더스균을 이용한 고기능성 김치의 제조 가능성을 규명하여 산업화에 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 내산소성 균주 선발

김치의 제조에 적합한 호기적 조건에서 생육하는 균주를 선발하기 위하여 사용된 균주로는 *Bifidobacterium adolescentis* KCTC 3216, *Bifidobacterium breve* KCTC 3220, *Bifidobacterium infantis* KCTC 3249, *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3418, *Bifidobacterium longum* KCTC 3421, *Bifidobacterium longum* KCTC 3128, *Bifidobacterium longum* KCTC 3466, *Bifidobacterium catenulatum* KCTC 3358, *Bifidobacterium dentinum* KCTC 3361, *Bifidobacterium suis* KCTC 3375, *Bifidobacterium lactis* DSM 10140을 사용하였다. 각 균주를 L-cystein · HCl을 0.05% 함유한 MRS 액체배지에서 24시간 배양한 후 혐기 희석 액에 십진 희석하여 MRS 배지에 Na_2CO_3 0.02%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01%, L-cystein · HCl 0.05%를 첨가한 SMRS(Supplemented MRS) agar[9]에 즉시 도말하고 37°C에서 호기적으로 72시간 배양하였다. 배양 후 colony를 형성하는 균주를 내산소성을 지닌 균주로 판단하고 선발하였다.

*Bifidobacterium lactis*의 내산성 및 내염성

*Bifidobacterium lactis*의 내산성을 알아보기 위하여 0.05% sodium phosphate 용액을 염산으로 보정하여 만든 pH 3.0, pH 2.5 용액 속에 *Bifidobacterium lactis* 배양액을 5.0×10^6 CFU/mL의 초기 농도로 접종하였다. 위 용액을 37°C에서 혐기적으로 2시간 동안 정치 배양 한 후 일정량을 십진 희석한 후 생존 균수를 측정하였다. *Bifidobacterium lactis*의 내염성은 김치의 염농도가 *Bifidobacterium lactis*의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위해서 L-cystein · HCl을 0.05% 함유한 MRS 액체배지에 NaCl을 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3% 농도로 첨가한 후 내산성 실험과 같은 초기 농도로 접종하여 37°C에서 혐기적으로 24시간 배양하였다.

*Bifidobacterium lactis*의 배양 및 김치의 제조

*Bifidobacterium lactis*를 L-cystein · HCl을 0.05% 함유한 MRS 액체배지에 접종한 후 37°C에서 혐기적으로 24시간 배양하였다. 배양된 균수는 1.5×10^9 CFU/mL를 나타내었으며 이렇게 배양된 균주는 김치에 사용하기 위해서 원심분리를 하여 배지를 제거한 다음 pellet만을 모은 후 멸균 증류수로 2회 세척을 하였다. 김치 제조를 위하여 시료배추는 잘 다듬은 후 4-5 cm 크기로 썰어 배추 무게와 1 : 2 비율의 20%(w/v) 염수 용액에 1시간 절인 후 흐르는 물로 3회 헹구고 약 1시간 정도 탈수시켰다. 김치 제조시 사용된 부재료의 종류 및 배합비는 절임배추 100 g에 대하여 고춧가루 2 g, 마늘 1.5 g, 생강 0.5 g, 멸치액젓 2.0 g의 비율로 제조하였다. 위와 같이 제조된 김치에 *Bifidobacterium lactis* 균주 배양액을 김치 1 g당 10^8 CFU 정도 되도록 첨가하였다. 균주가 첨가되지 않은 김치는 대조군으로 사용하였다. 제조된 김치는 250 g 용량의 플라스틱 용기에 넣은 후 4°C에 보관하면서 3일 간격으로 채취하여 실험에 사용하였다.

김치에 첨가된 *Bifidobacterium lactis* 균주 분리 및 DNA 분리

균주분리를 위해서 시료김치 100 g를 취한 후 멸균 증류수 100 mL을 가하여 20분간 진탕시켰다. 멸균 거즈로 진탕 액을 여과한 후 얻어진 시료를 십진 희석법으로 희석한 다음 SMRS agar에 도말한 후 37°C에서 3일간 혐기배양을 하였다. 배양된 colony는 DNA 분리를 위해서 김 등[10]의 방법에 따라 멸균된 이쑤시개를 이용하여 30 μL의 멸균수에 현탁시킨 후 95°C에서 5분간 boiling 하여 PCR의 template DNA로 이용하였다.

김치 내 *Bifidobacterium lactis*의 생존성 측정

김치내에서 *Bifidobacterium lactis*가 생존하고 있음을 확인하기 위하여 PCR을 이용하였다. PCR에 사용된 primer는 16S rRNA와 16S-23S rRNA space region의 염기서열을 바탕으로 *Bifidobacterium lactis*에 특이성 있게 제작된 것을 사용하였다(forward: 5'-GTGGAGACACGGTTTCCC-3', reverse: 5'-CACACCACACAATCCAATAC-3')[11]. PCR 반응액은 위에서 전술한 방법으로 추출한 DNA 5 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.25 μM의 각 primer, *Taq* polymerase 1 unit을 사용하였다. PCR 증폭 조건은 94°C에서 1분간 denaturation 시키고 60°C에서 1분간 annealing 시킨 후 72°C에서 1분 동안 증폭하는 조건으로 총 30 cycle을 수행하였다. PCR 후 생성된 PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 결과를 확인하였다.

Bifidobacterium lactis 균이 첨가된 김치의 관능검사

*Bifidobacterium lactis*를 첨가하여 제조한 김치의 관능적 특성을 알아보고자 기호도 검사를 실시하였다. 평가항목으로는 외관(appearance), 향(odor), 조직감(texture), 맛(taste) 그리고 전반적인 기호도(overall acceptability) 항목을 평가 하였으며 9점 척도법을 이용하였다. 그 결과는 SAS(Statistical Analysis System) 통계 프로그램을 이용하여 각각 일원배치분산분석(One-way ANOVA)을 하였고, 시료간의 유의적인 차이는 Duncan's multiple range test(DMRT)를 통하여 유의수준 5%에서 검증하였다[12].

결과 및 고찰

내산소성 bifidobacteria 균주의 선발

Bifidobacteria를 호기 조건인 김치에 이용하기 위해서는 내산소성을 지녀야 한다. 각 균주의 내산소성을 알아본 결과는 Table 1과 같다. 호기 조건에서 colony를 형성시킨 균주로는 *Bifidobacterium lactis*이었으며 이 균주를 제외하고는 다른 모든 균주가 생육하지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 내산소성을 지닌 김치 적용 가능 균주로 *Bifidobacterium lactis*를 선발하였다.

Table 1. Viability of *Bifidobacterium* spp. under aerobic culture condition

Strains		Viability[1)]
Bifidobacterium adolescentis	KCTC[2)] 3216	-
Bifidobacterium breve	KCTC 3220	-
Bifidobacterium infantis	KCTC 3249	-
Bifidobacterium bifidum	KCTC 3418	-
Bifidobacterium longum	KCTC 3421	-
Bifidobacterium longum	KCTC 3128	-
Bifidobacterium longum	KCTC 3466	-
Bifidobacterium catenulatum	KCTC 3358	-
Bifidobacterium dentinum	KCTC 3361	-
Bifidobacterium suis	KCTC 3375	-
Bifidobacterium lactis	DSM[3)] 10140	+

[1)]+: viable, -: non-viable
[2)]KCTC: Korea Collection for Type Culture
[3)]DSM: Deutsche Sammlung von Mikrorganismen

Table 2. Effect of NaCl concentration on *Bifidobacterium lactis*

Concentration (%)	Viable count (CFU/mL)
0	1.5×10^9
1.0	1.4×10^9
1.5	1.4×10^9
2.0	1.3×10^8
2.5	7.0×10^7
3.0	8.4×10^6
3.5	2.2×10^6

*Bifidobacterium lactis*의 내산성 실험

*Bifidobacterium lactis*의 내산성을 알아보기 위하여 각각의 산성 조건에서 37°C에서 2시간동안 정치 배양한 후 그 생존율을 조사하였다. pH 3.0 조건에서는 초기 접종 농도를 유지하였으며 pH 2.5 조건에서도 50% 이상의 높은 생존율을 유지하였다. 저온발효 김치의 경우 발효 후기의 pH가 대부분 pH 4.0 전후인 것을[13,14] 감안할 때 *Bifidobacterium lactis*는 김치의 pH에 크게 영향을 받지 않을 것으로 생각되었다.

김치의 염농도에 의한 *Bifidobacterium lactis*의 생육 영향 조사

NaCl 농도가 *Bifidobacterium lactis*의 생육에 미치는 영향을 나타낸 결과는 Table 2와 같다. *Bifidobacterium lactis*는 NaCl 농도 3.5%에서도 초기 접종 균수가 큰 변화 없이 사멸하지 않았으며 2.5%이하에서는 증식하는 경향을 나타내었다. 일반적으로 김치의 염도는 2~3%의 범위에서 제조되고 있는 실정이며[15,16] 김치 Codex 규격에도 염(염화나트륨)함량은 1~4%로 설정되어 있다. 따라서 *Bifidobacterium lactis*는 내염성을 지닌 균주로 김치의 제조에 적합한 균주로 판단되었다.

Table 3. Sensory evaluation of *kimchi* added with *Bifidobacterium lactis* and control *kimchi*.

Characteristics \ Samples	Control	*B. lactis kimchi*
Appearance	5.9[a1)]	6.1[a]
Odor	6.2[a]	6.3[a]
Taste	5.6[a]	5.8[a]
Texture	6.0[a]	6.2[a]
Overall acceptability	5.8[a]	5.9[a]

[1)]Means with the same letter are not significantly different ($P<0.05$). The higher scores indicate the higher preference.

김치에 첨가된 *Bifidobacterium lactis*의 생존성

*Bifidobacterium lactis*의 16S rRNA와 16S-23S rRNA space region의 염기서열을 바탕으로 제작된 primer는 *Bifidobacterium lactis*에서만 약 680 bp 크기의 DNA 단편을 특이적으로 증폭시킴으로써 김치 내 *Bifidobacterium lactis*의 생존성을 확인하는데 효율적으로 이용할 수 있었다. *Bifidobacterium lactis*를 첨가한 김치에서 3일 간격으로 균주를 분리한 다음 PCR을 수행한 결과 초기에 김치에 첨가된 균수가 15일 동안 큰 변화 없이 김치에서 생존하고 있음을 확인할 수 있었다. Fig. 1은 김치에 첨가된 *Bifidobacterium lactis*의 생존성을 확인한 결과로 발효 6일 된 김치에서 분리한 균주를 PCR 방법을 이용하여 확인한 결과 lane 2~8에서 보듯이 *Bifidobacterium lactis*가 생존하고 있음을 확인 할 수 있었다. 따라서 이 균주는 고기능성 김치 제조에 적절 할 것으로 판단되었다.

*Bifidobacterium lactis*가 첨가된 김치의 관능적 특성

*Bifidobacterium lactis*를 첨가하여 제조한 비피더스 김치와

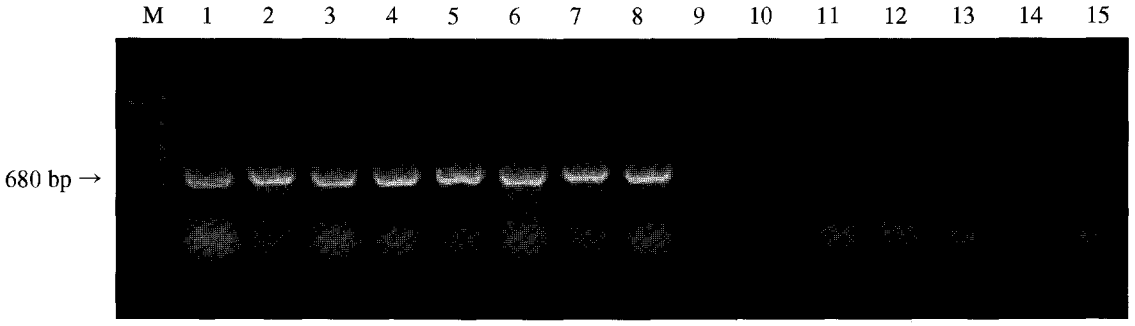

Fig. 1. PCR products obtained from amplification of type strain and isolates from *kimchi* during fermentation for 6 days at 4°C.
Lanes: M, 100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA); 1, *B. lactis* DSM 10140; 2-15, isolates from *kimchi*. Lanes 2~8 detected for *B. lactis*.

균주를 첨가하지 않은 대조군 김치간의 관능적 특성을 비교하기 위하여 기호도 검사를 실시하였다. 관능검사 결과는 Table 3에서 보듯이 대조군 김치와 비피더스 김치간의 외관이나 냄새, 맛, 조직감에 있어서 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그리고 전체적인 기호도에 있어서도 유의적인 차이는 없었다. 또한, 비피더스 김치에서 일반 김치보다 새콤한 맛, 새콤한 냄새가 조금 더 나타났으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이는 내산소성, 내산성 및 내염성 균주인 *Bifidobacterium lactis*를 이용하여 김치를 제조할 경우 김치의 품질에는 별다른 영향 없이 비피더스균주가 가지고 있는 유익한 생리활성을 지닌 고기능성 김치의 제조가 가능할 것으로 판단되었다.

요 약

비피더스 균주가 가지고 있는 여러 생리 활성을 나타내는 부가가치를 부여한 새로운 고기능성 김치 제품을 개발하기 위해 편성 혐기성 미생물인 비피더스균 가운데 산소에 내성이 있는 *Bifidobacterium lactis*를 선발하여 김치 제조에 적용하였다. 이 균주의 내산성과 내염성을 각각 알아본 결과 pH 3.0에서는 별다른 영향을 받지 않았으며 pH 2.5에서도 50% 이상의 생존율을 나타내었다. 그리고 NaCl 농도 3.5%에서도 사멸하지 않는 것으로 나타나 일반적인 김치의 pH와 염농도를 고려할 때 김치에 적용 가능한 것으로 판단되었다. 첨가된 *Bifidobacterium lactis*가 김치 내에서 생존함을 확인하기 위해서 PCR을 이용하여 확인한 결과 15일 이상 생존하고 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 관능평가의 경우 *Bifidobacterium lactis* 첨가 김치가 전체적인 기호도에서 균주를 첨가하지 않은 대조군 김치와 유사한 특성을 나타냄으로써 *Bifidobacterium lactis*를 이용한 고기능성 김치의 제조가 가능할 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료지원사업에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다(01-PJ1-PG4-01PT04-0010).

문 헌

1. Modler, H.W., Mckellar, R.C. and Yaguchi, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. J. Inst. Sci. Technol. Aliment. 23: 29-41 (1990)
2. Gibson, G.R. and Wang, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. J. Appl. Bacteriol. 77: 412-420 (1994)
3. Pei, R., Boch, C.L., Cheng, C. and Ya, H.C. Antimutagenic activity of several probiotic bifidobacteria against benzo(a)pyrene. J. Biosci. Bioeng. 94: 148-153 (2002)
4. Orrhage, K. and Nord, C.E. Bifidobacteria and lactobacilli in human health. Drug. Exp. Clin. Res. 26: 95-96 (2000)
5. Noda, H., Akasaka, N. and Ohsugi, M. Biotin production by bifidobacteria. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 40: 181-188 (1994)
6. Tahri, K., Crociani, J., Ballongue, J. and Schneider, F. Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. Lett. Appl. Microbiol. 21: 149-151 (1995)
7. Paek, W.H., Park, K.H. and Lee, S.K. Preparation of *kimchi* using Bifidobacteria. Korean Patent 10-0082056-0000 (1995)
8. Wouk, C., Kim, J.R., Yu, B.H., Yang, S.Y. and Byen, G.S. Effect of oligosaccharide on *kimchi* fermentation. Korean Patent 10-0102117-0000 (1996)
9. Shin, S.Y. and Park, J.H. Changes of oxidative enzymes and fatty acid composition of *Bifidobacterium adolescentis* and *B. longum* under aerobic and aerated conditions. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 7-14 (1998)
10. Kim, T.W., Min, S.K., Choi, D.H., Jo, J.S. and Kim, H.Y. Rapid identification of *Lactobacillus plantarum* in *kimchi* using polymerase chain reaction. J. Microbiol. Biotechnol. 10: 881-884 (2000)
11. Ventura, M., Reniero, R. and Zink, R. Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2760-2765 (2001)
12. SAS Institute Inc. SAS User's Guide, Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.(1990)
13. So, M.H. and Kim, Y.B. Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from *kimchi*. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 4 495-505 (1995)
14. Choi, S.Y., Kim, Y.B., Yoo, J.Y., Lee, I.S., Chung, K.S. and Koo, Y.J. Effect of temperature and salts concentration on kimchi manufacturing on storage. Korean J. Food Sci. Technol. 22: 707-710 (1990)
15. Cho, E.J., Park, K.Y. and Rhee, S.H. Standardization of ingredients ratios of Chinese cabbage *kimchi*. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 1228-1235 (1997)
16. Moon, G.S., Song, Y.S., Lee, C.G., Kim, S.K., Ryu, B.M. and Jeon, Y.S. The study on the salinity of *kimchi* and subjective perception of salinity in Pusan area. Korean J. Soc. Food Sci. 13: 179-184 (1997)

(2003년 5월 23일 접수; 2003년 8월 19일 채택)