

구리 이온의 김치산패 억제작용에 관한 연구

채경연 · 유양자 · 경규항* · 박세원** · 김연순***

세종대학교 생활과학과, *식품공학과, **동해대학교 관광외식산업과, ***조선대학교 가정교육과

Effect of Copper Ions on Over-Acidification of kimchi

Kyung- Yeon Chae, Yang-Ja Yoo, Kyu Hang Kyung*, Se-Won Park**, Youn-Soon Kim***

Department of Human Life Science, Sejong University

*Department of Food Science, Sejong University

**Department of Tourism and Hospitality Industry, Donghae University

***Department of Home Economy Education, Chosun University

Abstract

Effect of copper ions (Cu^+ and Cu^{2+}) on the fermentation of kimchi, especially on their effect on the prevention of over-acidification of kimchi, was investigated. The effect of Cu^{2+} ion on the growth of individual lactic acid bacterium originally isolated from kimchi was also investigated. The addition of $\text{Cu}^+(\geq 4.0\text{mM})$ or $\text{Cu}^{2+}(\geq 3.0\text{mM})$ ions in kimchi effectively inhibited growth of lactic acid bacteria and maintained a titratable acidity of less than 1.0% for a periods of 14 days. *Leuconostoc mesenteroides* significantly decreased at the 10th day of fermentation in control kimchi, whereas the group with Cu^+ and Cu^{2+} showed 10^5 - 10^6 CFU/ml at the 14th day of fermentation. This indicates that the addition of Cu^+ and Cu^{2+} inhibited the production of excessive acids by inhibiting lactic acid bacteria, and allowed *Leu. mesenteroides* stay alive longer. Fe^{2+} and SO_4^{2-} ions did not have any effect on the fermentation of kimchi. Cu^{2+} inhibited growth of all lactic acid bacteria tested, such as *Leu. mesenteroides* 6, *Streptococcus faecalis* 12, *Lactobacillus plantarum* 14, *Lac. brevis* 15, *Leu. mesenteroides* LA 10, and *Lac. plantarum* LA 97.

Key words : copper ions, over-acidification of kimchi, lactic acid bacteria

1. 서 론

알맞게 익은 김치가 시간이 지남에 따라 시어지는 것은 김치중의 젖산균이 계속 자라면서 젖산을 비롯한 각종 유기산을 생성하기 때문이다. 이러한 김치의 산패를 억제시켜 가식기간을 늘리고자 하는 연구는 국내에서 가열살균방법¹⁾, 방사선조사법^{2,3)}, 포장과 통조림법⁴⁾, 보존료 첨가법⁵⁻⁹⁾, pH조정제의 이용 방법¹⁰⁾, 젖산균을 starter로 첨가하는 방법^{11,12)} 등이 보고되었고 외국에서는 김치는 아니지만 양배

추, 오이, 올리브, 완두콩 등의 저장성 향상을 위한 연구가 진행되었다^{13,14)}.

조선시대 「규합총서」 「고사십이집」에 김치의 신선함을 유지하기 위해 동전이나 녹그릇 닦은 수 세미를 사용하였다는 기록이 있다¹⁵⁾. Dunning 등¹⁶⁾은 Fe^{2+} 와 Cu^+ 가 hydroperoxides에 의한 구강연쇄균인 *Streptococcus mutants* GS-5의 사멸을 증진시켰으며 이때 Cu^+ , Cu^{2+} 및 Fe^{2+} 가 ATPase를 억제하고, 젖산균의 산내성을 감소시켜 산성조건에서 해당작용을 저해한다고 보고하였다. 그리고 최근에 Alexander 등¹⁷⁾의 보고에서 구리이온이 *Agrobacterium tumefaciens*와 *Rhizobium meliloti*의 VBNC(the viable but nonculturable) 유도물질로 작용한다고 하였으며 Grey와 Steck¹⁸⁾는 높은 농도의 구리이온이 *Escherichia coli*의 VBNC 상태로의 변화를 유발시킬

Corresponding author : Kyu Hang Kyung Sejong University 98,
Gunja-dong, Kwang jin-gu, Seoul, 143-747, Korea
Tel : 02-3408-3225
Fax : 02-3408-3569
E-mail : kyungkh@sejong.ac.kr

을 보고하였다. Sagripanti 등¹⁹⁾은 구리(Cupric)나 철(Ferric)이온의 바이러스 생육저해 효과를 보고하였는데 특히 구리(II)이온의 효과가 컸다고 하였다.

본 논문에서는 구리 이온의 김치에 생육하는 젖산균의 생육저해효과와 김치에서 분리한 각각의 균주에 미치는 구리 이온의 영향을 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

배추(1포기 2.5~3.5 kg), 마늘(고흥산), 생강은 2001년 1월부터 2001년 3월까지 서울 광진구 소재 화양 시장에서 신선한 것을 구입하여 사용하였으며 저장이 가능한 고춧가루는 일시에 구입하여 냉동 보관하면서 사용하였다.

2. 사용 균주 및 배지

구리 이온에 의한 젖산균의 번식 저해 실험에 사용된 균주는 김치에서 분리한 *Leuconostoc mesenteroides* 6, *Streptococcus faecalis* 12, *Lactobacillus plantarum* 14, *Lactobacillus brevis* 15과 Fleming 박사(USDA/ARS, North Carolina State Univ. U.S.A)에게서 분양 받은 *Leuconostoc mesenteroides* LA 10, *Lactobacillus plantarum* LA 97로 세종대학교 식품공학과 미생물학 실험실에 냉동보관중인 균주를 사용하였다.

모든 실험에서 사용된 젖산균주는 *Lactobacilli* MRS 및 agar를 사용하여 배양하였으며 세균수의 측정을 위해 PCA(plate count agar)배지를 사용하였다.

3. 김치제조

배추는 겉잎과 뿌리부분을 제거한 후 세로로 3등분하여 4~5 cm 크기로 절단하고 배추 무게의 2.5배의 소금물(16% w/v)을 가하여 18°C에서 2시간 정도 절임한 후 3회 씻어서 40분 정도 탈수시켰다. 배추의 무게 500 g을 기준으로 파 4.5%, 마늘 2%, 생강 0.8%, 고춧가루 2%를 첨가하여 배추와 함께 골고루 섞어 김치를 제조한 후 각각을 담고 상부에 물주머니를 얹어 눌러주어 혐기적 상태를 유지하도록 하였다.

CuSO₄와 CuCl를 각각 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 및 5.0 mM 농도로 김치에 첨가하였고 이때 SO₄ 이온의 영향을 고려하여 FeSO₄도 같은 농도별로 첨가하여 잘 섞은 후 20°C에서 발효시키면서 첨가농도별 김치산패억제 효과를 비교하였다.

4. pH와 산도의 측정

발효중인 시료 김치즙액을 5 ml 취하여 pH는 pH/ion meter(DP 880M, DongWoo Medical System, Korea)를 사용하였으며 산도는 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.10 ± 0.05 까지 적정하여 소비된 알칼리의 ml 수를 젖산의 양(%)으로 환산하였다²⁰⁾.

5. 미생물수의 변화 측정

시료즙액을 1 ml 무균적으로 희석한 후 총균수는 plate count agar, 총젖산균수는 sodium azide-glucose 고체배지에 평판주법으로 접종하여 30°C에서 24~48시간 배양한 후 나타난 집락수를 Colony forming unit(CFU)/ml로 나타내었으며 *Leuconostoc* 속 젖산균수는 sodium azide-sucrose 고체배지에 거대 colony로 나타나는 집락수를 CFU/ml로 표시하였다.

6. 젖산균 생육에 미치는 구리 이온의 영향

젖산균 생육에 미치는 구리 이온의 영향을 알아보기 위하여 살균된 MRS 액체배지 10 ml에 CuSO₄를 농도별로 첨가한 후 종균 10 μl를 접종하여 20°C에서 0, 6, 12, 24, 36, 48시간째에 620 nm에서 흡광도(Spectrometer, Beckman DV[®] 650, U. S. A)를 측정하였다. 이때 종균은 *Leu. mesenteroides* 6, *Str. faecalis* 12, *Lac. plantarum* 14, *Lac. brevis* 15, *Leu. mesenteroides* LA 10, *Lac. plantarum* LA 97을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Cu²⁺ 첨가가 김치의 발효에 미치는 영향

김치에 CuSO₄를 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 및 5.0 mM 농도별로 각각 첨가하여 제조한 후 20°C에서 저장하면서 발효 14일째까지 김치의 발효 경향을 비교하였다(Fig. 1). 발효가 진행됨에 따라 총생균수와 젖산균수의 변화는 같은 경향을 나타내었으며 CuSO₄의 첨가농도에 따른 차이를 보여 발효 2일째부터 10일째까지 CuSO₄ 첨가농도가 높을수록 낮은 균수를 보였다. 발효 2일째 대조군의 경우 8.9~9.9 × 10⁸ CFU/ml로 발효 전기간을 통해 가장 높은 균수를 보였고 총생균수와 젖산균수의 최고치를 보이는 시기가 일치하였다. 반면 CuSO₄ 3.0 mM과 4.0 mM 첨가군은 발효 4일째 균수가 3.1~4.2 × 10⁷과 2.6~4.1 × 10⁷ CFU/ml로 가장 높은 값을 나타내었으며 CuSO₄ 5.0 mM 첨가군은 발효 7일째 1.1~4.0 × 10⁷ CFU/ml로 가장 높은 균수를 보였다. *Leuconostoc* 속 젖산균수도

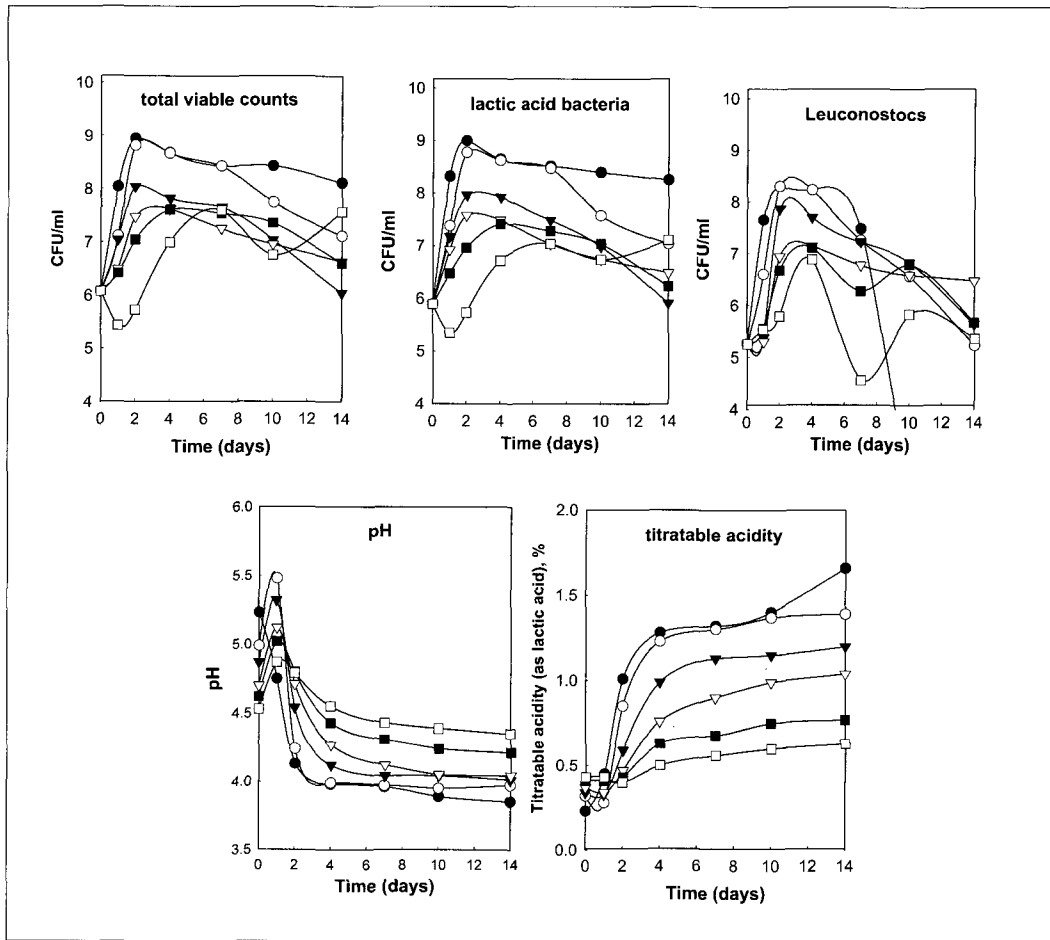


Fig. 1. Effect of Cu²⁺ on kimchi fermentation at 20°C
 ● : Control, ○ : Cu²⁺ 1.0 mM, ▼ : Cu²⁺ 2.0 mM,
 ▽ : Cu²⁺ 3.0 mM, ■ : Cu²⁺ 4.0 mM, □ : Cu²⁺ 5.0 mM

발효 7일째까지는 총생균수, 젖산균수의 경향과 같이 CuSO₄ 첨가에 따라 균수가 감소하였다. 대조군의 경우 발효 10일째부터 *Leuconostoc* 속 젖산균수가 급속히 감소하는 것으로 나타났다. 이것은 젖산균의 대사에 의한 젖산의 분비로 산도가 증가함으로써 *Enterobacteraceae*와 함께 산에 민감한 이상젖산발효균인 *Leu. mesenteroides*가 사멸하기 때문이다^{21,22}. 반면 CuSO₄ 첨가농도가 높은 경우 산생성이 저해되어 *Leuconostoc* 속 젖산균수의 감소경향이 완만하게 진행되고 김치의 최고 적숙 기간이 연장되는 것으로 생각된다.

김치숙성 중 pH와 산도는 대조군의 경우 구 등²³)이 김치의 적절한 가식기간의 범위로 보고한 pH 4.0의 구간까지 도달하는 데 4일이 걸린 반면

CuSO₄ 2.0 mM 농도 이상 첨가군은 14일이 걸리는 것으로 나타나 CuSO₄ 첨가농도에 따른 대조군과의 뚜렷한 차이를 보였다. 산도에 있어서는 발효 2일째 대조군의 경우 1.01%인 반면 CuSO₄ 1.0 mM 첨가군은 0.85%였으며 2.0, 3.0, 4.0 및 5.0 mM 첨가군은 각각 0.59%, 0.47%, 0.43% 및 0.40%를 나타내어 CuSO₄ 2.0 mM 이상의 모든 첨가군에서 0.60%이하로 나타났다. Mheen과 Kwon²⁴)이 적정한 산도 범위로 보았던 0.6%까지 이르는 시간의 경우도 대조군과 CuSO₄ 1.0 mM 첨가군은 1~2일, 2.0, 3.0, 4.0 및 5.0 mM은 각각 2일, 3일, 4일 및 10일로 나타났으며 이는 CuSO₄ 첨가농도가 높을수록 젖산생성의 억제효과가 크게 나타나 pH와 산도의 변화를 늦추었기 때문으로 생각된다.

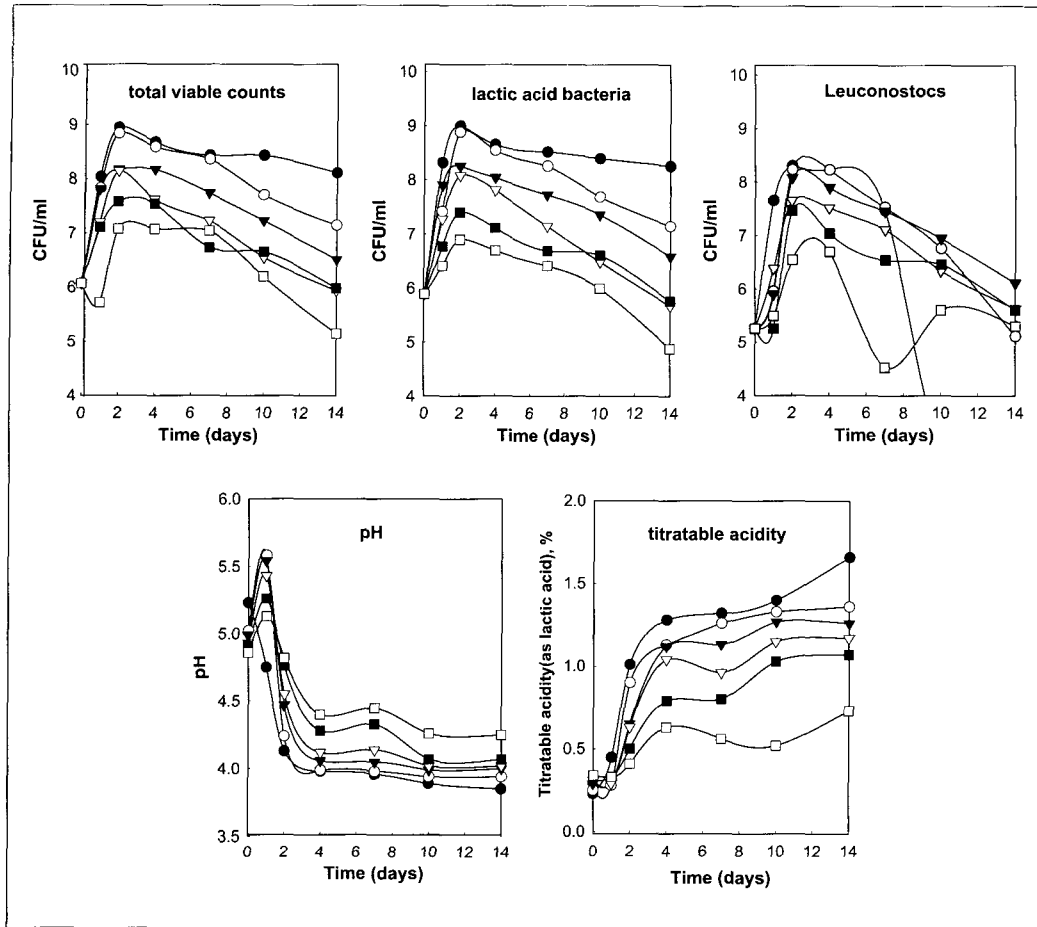


Fig. 2. Effect of Cu^+ on kimchi fermentation at 20°C
 ● : Control, ○ : Cu^+ 1.0 mM, ▼ : Cu^+ 2.0 mM,
 ▽ : Cu^+ 3.0 mM, ■ : Cu^+ 4.0 mM, □ : Cu^+ 5.0 mM

2. Cu^+ 첨가가 김치의 발효에 미치는 영향

김치에 $CuCl$ 을 농도별로 첨가하여 제조한 후 20°C에서 14일째까지 김치의 발효경향을 비교하였다 (Fig. 2).

총생균수와 젖산균수는 모두 발효 2일째 대조군의 경우 $8.9\sim 9.9 \times 10^8$ CFU/ml로 발효 전기간동안 가장 높은 균수를 보였으며 $CuCl$ 의 첨가에 따른 뚜렷한 차이를 보여 $CuCl$ 4.0 mM과 5.0 mM 첨가군은 각각 10^7 과 10^6 CFU/ml를 나타내었다. *Leuconostoc* 속 젖산균수는 발효 1일째부터 7일째까지 $CuCl$ 첨가농도가 높을수록 낮은 균수를 보였다. 발효 10일째 대조군의 경우 균이 급속히 감소하였는데 이것은 Frazier와 Westhoff²⁵⁾의 Sauerkraut 발효에서 *Leu. mesenteroides*는 젖산이나 식초산 같은 대사물을 생

산하여 채소류를 산성화시키고 산에 저항성이 높은 *Lac. plantarum*과 *Lac. brevis*가 나타나서 그 세균자식은 도태된다는 것과 관련이 있는 것으로 생각된다. 반면 $CuCl$ 첨가군은 *Leuconostoc* 속 젖산균수가 발효 14일째에도 $10^5\sim 10^6$ CFU/ml을 나타내었다.

$CuCl$ 의 첨가농도가 높을수록 pH는 높게 산도가 낮게 나타났다. 전반적으로 대조군과 $CuCl$ 1.0 mM 첨가군은 발효가 진행됨에 따라 pH가 계속 저하되다가 pH 4.0 근처에서 변화속도가 둔화되었고 발효 10일째까지 총산도의 변화도 유사한 경향을 보였는데 김치의 최적 pH인 4.0²³⁾을 기준으로 볼 때 대조군은 1~2일, $CuCl$ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 및 5.0 mM 첨가군은 각각 2일, 3일, 4일, 7~10일 및 14일 이상이 걸린 것으로 나타났다. 산도에 있어서는 발효 2일째 대조군의 경우 1.01%였으나 $CuCl$ 2.0 mM 이상 첨

가균은 0.65% 이하로 나타나 CuCl 의 첨가에 따른 뚜렷한 차이를 보였다.

Sagripanti 등¹⁹⁾이 Cu^{2+} 가 Cu^+ 보다 특히 미생물 사멸효과가 컸다는 보고를 하였고 Dunning 등¹⁶⁾은 Cu^+ 이 Cu^{2+} 보다 구강연쇄구균인 *Str. mutans* GS-5의 사멸을 증진시켰다고 서로 다른 보고를 하였는데 본 연구 실험에서는 Cu^+ 와 Cu^{2+} 은 모두 비슷한 미생물 생육저해 효과가 있는 것으로 나타났다.

3. FeSO_4 첨가가 김치발효에 미치는 영향

Cu^{2+} 첨가에 따른 젖산균의 생육억제효과로 CuSO_4 의 영향을 확인할 수 있었는데 이때 SO_4 의 영향을 알아보기 위해 FeSO_4 를 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 및 5.0 mM 농도로 첨가하여 제조한 김치의 발효 경향을 비교하였다(data not known). 발효 전기간

에 걸쳐 pH, 산도가 대조군과 FeSO_4 첨가군 간에 차이를 나타내지 않았는데 이러한 결과는 Dunning¹⁶⁾이 보고한 바처럼 Fe^{2+} 이온은 bacteria의 유형에 따라 생육 억제 작용이 제한되기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 SO_4^{2-} 이온은 물론 Fe^{2+} 은 김치 발효에 관여하는 젖산균에 대한 생육 저해작용이 없음을 알 수 있다.

4. 각 젖산균에 대한 Cu^{2+} 이온의 생육저해작용

Leu. mesenteroides 6, *Str. faecalis* 12, *Lac. plantarum* 14, *Lac. brevis* 15과 *Leu. mesenteroides* LA 10, *Lac. plantarum* LA 97를 선택하여 Cu^{2+} 이온에 의한 생육저해효과를 실험하였다. 6가지 젖산균 모두 CuSO_4 를 첨가했을 때 생육이 저해되었다(Fig. 3).

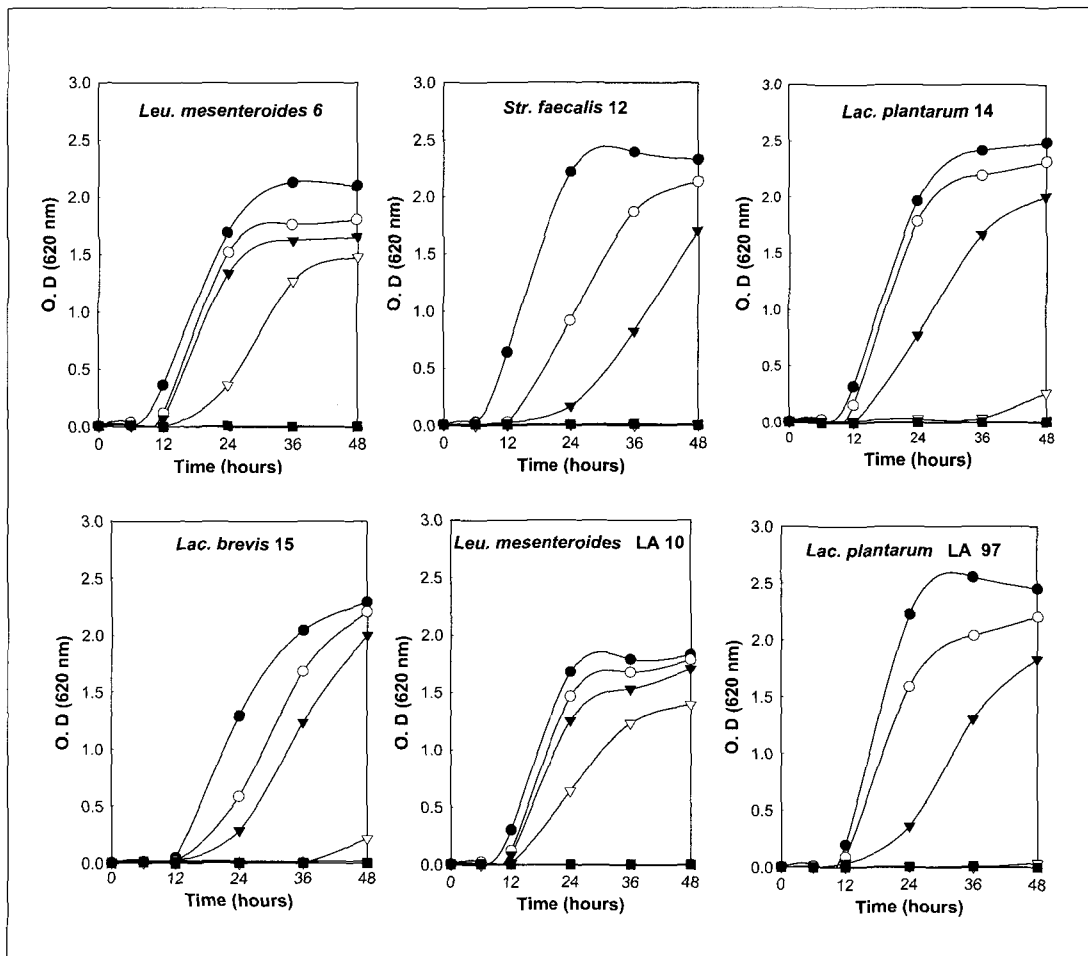


Fig. 3. Growth curve of lactic acid bacteria in the presence of Cu^{2+}

● : Control, ○ : Cu^{2+} 0.5 mM, ▼ : Cu^{2+} 1.0 mM, ▽ : Cu^{2+} 2.0 mM, ■ : Cu^{2+} 5.0 mM

V. 요약

김치에 Cu^+ 와 Cu^{2+} 을 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 및 5.0 mM 농도로 첨가하여 20°C에서 김치의 발효경향을 살펴 보고 또한 젖산균 생육에 미치는 구리 이온의 영향을 알아보았다.

CuSO_4 와 CuCl 의 첨가는 김치에 생육하는 총생균, 젖산균의 생육을 저해하고 김치의 산도를 유지하는데 효과가 있었다. 또한 *Leu. mesenteroides*의 경우 발효 10일째 대조군의 급격한 감소와는 다르게 발효 14일째에 $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml를 유지하였다. 따라서 Cu^+ 와 Cu^{2+} 의 첨가는 김치의 숙성에 관여하는 주 발효균인 *Leu. mesenteroides*의 생육기간을 연장시키고 과도한 산의 생성을 억제함으로써 김치의 산패를 지연시킬 수 있는 것으로 생각된다. Fe^{2+} 와 SO_4^{2-} 이온은 김치발효에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

또한 각각의 젖산균의 생육에 미치는 Cu^{2+} 이온의 영향을 보기 위하여 각 젖산균마다 CuSO_4 를 농도별로 첨가한 후 흡광도를 측정하여 결과 *Leu. mesenteroides* 6, *Str. faecalis* 12, *Lac. plantarum* 14, *Lac. brevis* 15, *Leu. mesenteroides* LA 10, *Lac. plantarum* LA 97의 6가지 젖산균은 Cu^{2+} 첨가농도에 따른 균주마다 내성의 차이를 보였으나 각각의 균주 모두 Cu^{2+} 첨가에 따라 균의 생육이 저해되었다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 조선대학교 연구비 지원(김연순)에 의해 수행된 연구결과로서, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 이남진, 전재근 : 김치의 순간살균방법, 한국농화학회지, 25(4), 197~200 (1982)
- 차보숙, 김우정, 변명우, 권중호, 조한옥 : 김치의 저장성 연장을 위한 Gamma선 조사, 한국식품과학회지, 21(1), 109~119 (1989)
- Shin, J. K., and Pyun, Y. R. : Inactivation of *Lactobacillus Plantarum* by pulsed-microwave irradiation, *J. Food Sci.*, 62(1), 163~166(1997)
- 임번삼, 김양수, 이병현, 장근우, 임한백 : 보존성이 연장된 김치류 및 김치통조림의 제조방법, 특허공보 1701, 공고번호 89-4895 (1989)
- 신영희, 조성환 : 김치의 보존성 증진을 위한 천연항균제의 개발, 2000년도 추계 연합심포지엄 학술발표회 논문발표집, P4-08, 266 (2000)
- 이신희, 조옥기, 박나영 : 김치 숙성중에 미치는 단삼과 감초의 혼합 효과, 한국식품영양과학회지, 27(5), 858~863 (1998)
- Choi, W. Y., and Park, K. Y. : Increased preservative and antimutagenic activities of kimchi with addition of green tea leaves, *J. Food Sci. Nutr.*, 5(4), 189~193 (2000)
- 손유미, 김광옥, 전동원, 정규항 : Chitosan과 다른 보존제 첨가에 따른 김치의 저장성 향상, 한국식품과학회지, 28(5), 888~895, (1996)
- 문광덕, 변정아, 김석중, 한대성 : 김치의 선도 유지를 위한 천연보존제의 탐색, 한국식품과학회지, 27(2), 257~263 (1995)
- 김순동, 김미향, 김미경, 김일두 : 김치에 첨가한 계집질 분말의 중화 및 완충효과, 한국식품영양과학회지 26(4), 569~574 (1997)
- 유형근, 김기현, 윤선 : 김치의 저장성에 미치는 발효성당의 영향과 Shelf-Life 예측모델, 한국식품과학회지, 24(2), 107~110 (1992)
- 최신양, 이인선, 유진영, 정건섭, 구영조 : 김치발효에 대한 Nisin의 저해효과, *Kor. J. Appl. Microbial Biotechnol.*, 18(6), 620~623 (1990)
- Fleming, H. P., and McFeeters, R. F. : Storage stability of vegetable fermented with pH control, *J. Food Sci.*, 48(3), 975-981 (1983)
- Chen, K. H., McFeeters R. F., and Fleming, H. P. : Complete heterolactic acid fermentation of green beans by *Lactobacillus Cellobiosus*, *J. Food Sci.*, 48(3), 967-971 (1983)
- 조재선 : 김치의 연구, 유림문화사, 60~75 (2000)
- Dunning, J. C., Ma, Y., and Marquis, R. E. : Anaerobic killing of oral *Streptococci* by reduced, transition metal cations, *Appl. Environ. Microbiol.*, 4(1), 27~33 (1998)
- Alexander, E., Pham, D., and Steck, T. R. : The viable but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3754-3756 (1999)
- Grey, B., and Steck, T. R. : Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(11), 5325-5327 (2001)
- Sagripani, J. L., Routson, L. B., and Lytle, D. : Virus inactivation by copper or iron alone and in the presence of peroxide, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(12) 4374-4376 (1993)
- AOAC. Official Methods of Analysis, 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, 37(1), 37 (1995)
- Fleming, H. P. and McFeeters, R. F. : A fermentor for study during of Sauerkraut fermentation, *Biotechnol. Bioengineer.*, 31, 189~197 (1988)
- Harris, L. G., Fleming, H. P., and Klaenhammer, T. R. : Novel paired starter culture system for Sauerkraut, consisting of a nisin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* strain and a nisin-producing *Lactococcus Lactis* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(5), 1484~1489 (1992)

23. 구경형, 강근욱, 김우정 : 김치의 발효과정 중 품질 변화, *한국식품과학회지*, 20(4), 476~482 (1988)
24. Mheen, T. I., and Kwon, T. W. : Effect of temperature and salt concentration kimchi fermentation, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 16(4), 443~450 (1984)
25. Frazier, W. C. and Westhoff, D. C. : *Food Microbiology*. McGraw-Hill Book Co., Singapore, 355~356 (1988)
-
- (2002년 1월 8일 접수, 2002년 2월 20일 채택)