

연속 처리 용기를 이용한 고전압 펄스 전기장에 의한 *Listeria innocua*의 불활성화

신정규

전주대학교 문화관광대학 전통음식문화전공

Inactivation of *Listeria innocua* by High Voltage Pulsed Electric Field Using Continuous Treatment Chamber

Jung-Kue Shin

Department of Korean Traditional Food Culture, Jeonju University

Abstract

Pulsed electric fields (PEF) is an emerging nonthermal processing technology used to inactivate microorganisms in liquid foods. PEF results in loss of cell membrane functionality that leads to inactivation of the microorganisms. The combination of different preservation factors, such as mild temperature and PEF, to control microorganisms should be explored. The objective of this research was to study the inactivation of *Listeria innocua* by PEF. The effect of electric field strength, treatment time and treatment temperature on the bactericidal effectiveness of high voltage pulsed electric fields (PEF) applied on *L. innocua* suspended in sodium phosphate buffer was investigated. Electric field intensity and treatment time were applied in the ranges of 30 - 60 kV/cm and 32 - 189 μ s, respectively. Studies treatment temperatures were ranged between 10 - 50°C. The application of PEF at higher temperatures proved to be more effective than either PEF at low temperature. A maximum bacterial inactivation of 5.2 log cycles was obtained by applying treatment time 189 ms and electric fields strength 60 kV/cm at 50°C. The electrical energy required to achieve 5.2 log cycles reduction for *L. innocua* was estimated to be about 1,500 J/L. The findings in this study suggest that PEF technology may effectively used as an enhanced mild thermal preservation method.

Keywords: High voltage pulsed electric field (HVPEF), *Listeria innocua*, nonthermal sterilization

서 론

고전압 펄스 전기장 기술은 고온 살균에서 일어나는 영양학적 손실이나 관능적 특성의 변화없이 액상 식품내에 존재하는 변태 또는 부패 미생물을 불활성화시킬 수 있는 비열 가공 기술로서 근래에 들어 많은 연구가 이루어 지고 있다. 이 기술은 아주 짧은 시간동안 높은 전기를 식품에 인가하여 열의 발생을 최소화할 수 있다.

고전압 펄스 전기장은 처리용기내의 두 개의 전극 사이에 놓은 식품에 높은 전기장을 인가함으로써 이루어지는데, 처리식품에 흐르는 전류에 의해 열이 발생하게 된다. 처리식품에 열을 발생시키는 전류의 세기는 처리식품의 종류와 PEF 처리장치의 특성에 따라 다르게 된다(Heinz et al., 2002). PEF 처리에 있어서 약간의 열처리는 PEF 처리 효과를 향상시킬 수 있는 방법으로 보고되고 있다(Hulshager et al., 1981; Dunn and Pearlman, 1987). PEF 처리시 높은 온도에서 처리하는 것은 바람직하지 않지만, 치사 온도 이하의 열처리 조건과 병합처리하는 것은 PEF의 반복 처리를 피할 수 있으며, PEF 이외의 다른 공정을 추가적으로 하지 않고도 효과적으로 식품을 처리할 수 있는 방법으로 보고되고

Corresponding author: Jung-Kue Shin, Assistant Professor, Department of Korean Traditional Food Culture, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea.
Phone: +82-63-220-3081, Fax: +82-63-220-2736
E-mail: sorilove@jj.ac.kr, sorilove@freechal.com

있다. PEF와 치사 이하의 온도와의 병합처리가 미생물의 불활성화 효과를 향상시키는 이유는 아직 명확히 보고되지 않고 있으나, 몇몇 보고에 의하면 높은 온도에 의해 세포 현탁액의 전기 전도도가 증가하여 미생물 세포벽에 전기 에너지의 축전 시간을 단축시키거나(Schwan, 1957), 세포막의 상(phase) 상태의 변화를 야기시키거나(Jayaram et al., 1992), 세포막 사이의 유전과외 전위차를 감소(Kinosita and Tsong, 1977; Zimmerman, 1986)시키기 때문으로 보고 있다.

*Listeria*는 그람 양성균으로 포자를 형성하지 않으며, 길이 500 - 2000 nm, 폭 400 - 500 nm의 짧은 막대 형태의 coryneform bacteria이다. *Listeria monocytogenes*는 psychotolerant 병원성균으로 사람에게 리스테리아병을 일으킨다(Doyle, 1988; Farber et al., 1989). 그러므로 PEF에 의한 *Listeria*의 불활성화 또는 항생물질이나 치사 이하의 온도등과 PEF 처리와의 병합처리등은 식품 산업에 있어서 중요한 식품 저장기술이다. 본 실험에 사용된 *Listeria innocua*는 비병원성 미생물로서 병원성 미생물인 *L. monocytogenes*와 비슷한 특징들을 가지고 있어 *L. monocytogenes*를 대신하기 위한 연구 대상으로 유용하다.

이 연구의 목적은 고전압 펄스 전기장 처리의 기본 변수인 전기장의 세기와 처리시간이 *L. innocua*의 불활성화에 미치는 영향, 치사온도 이하의 열 병합 처리 효과 및 불활성화와 전기 에너지와의 관계를 연구함으로써, 고전압 펄스 전기장에 의한 병원성 미생물인 *L. innocua*의 불활성화 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용된 균주는 *Listeria innocua*(DSM 20649)로 DSM(Deutsche. Sammlung von Mikroorganismen)으로부터 분양을 받아 사용하였다. *L. innocua*는 배양액으로 0.6% yeast extract가 포함된 tryptic soy broth(Difco, Kansas MO, USA) 배지(TSBYE)를 사용하였다. TSBYE 100 mL가 들어있는 250 mL 삼각 플라스크에 37°C에서 18시간 전 배양한 후 이를 TSBYE 400 mL가 들어있는 1 L 삼각 플라스크에 3%(v/v) 접종하여 같은 온도에서 225 rpm으로 18시간 배양, 대수 증식기 후반까지 배양하였다. 배양한 배양액을 50 mL cornical

tube(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 40 mL씩 분주한 후, 4°C에서 8,000rpm으로 원심분리(Sorvall RC2C plus, Dupont, USA)하여 살균한 0.85% 생리 식염수로 1회 세척하였다. 세척한 균체에 완충 용액(50mM sodium phosphate buffer pH 6.8) 40 mL를 넣고 재현탁한 후, 현탁액을 살균한 1 L 병에 붓고 완충 용액을 첨가하여 최종 부피를 1 L가 되게 하였다. 이 때 최종 균체 농도는 1.0×10^6 cfu/mL 수준이었다.

고전압 펄스 전기장 장치

고전압 펄스 전기장 처리 장치는 크게 전원 공급부(power supply, Model JP-PS2550, Jaepae Hi-Tec, Incheon, Korea), 펄스 발생기(pulse generator Model JP-PGT50, Jaepae Hi-Tec, Incheon, Korea), 처리용기로 구성되어 있다(Fig. 1). 전원공급부는 200 V의 AC 입력전원을 고전압 변압기를 통하여 승압하고 정류하여 최대 50 kV DC 전원을 발생시킬 수 있도록 하였다. 펄스 발생기는 출력 파형을 square wave pulse로 구성할 수 있는 펄스 발생망(pulse forming network, PFN)과 고전압의 전기를 순간적으로 발생할 수 있는 스위치로 구성되어 있다. 펄스 발생망은 펄스의 형태와 길이를 조절하는 중요한 부위로서 전원 공급부에서 공급된 전압을 충전 및 rising time을 결정하는 축전지, 펄스의 길이와 falling time을 조절하는 방전 지연 inductor로 구성되어 있다. 고전압 펄스 전기장 처리는 자체 제작한 처리 용기를 사용하여 실시하였다. PEF 처리 용기는 co-field 개념을 도입한 것으로 시료가 전극에 직접 접촉하는 면적을 최소화 하였으며, 불균일한 전기장의 형성을 없애고 시료의 흐름에 edge가 없도록 설계하였으며, 전극 간격 2 mm, 처리 부피 0.025 mL의 아세탈 재질의 용기 7개를 연속으로 연결하여 처리용적이 0.175 mL가 되도록 하였다. 처리 용기에 인가되는 전기장의 세기와 파형은 oscilloscope(Lecroy, 9310 AM, Dual 400 MHz, Switzerland)를 이용하여 측정하였으며, 자체 제작한 probe(100 W)을 이용하여 전압-저항 converting을 하여 전류를 측정하였다.

고전압 펄스 전기장 처리

균 현탁액 200 mL를 250 mL 용량의 시료 용기에 넣고 밀봉한 다음 peristaltic pump를 사용하여 처리 라인에 순환시키면서 frequency 300 Hz, 펄스 폭 1 μ s, 처리시간 32 - 189 μ s, 전기장의 세기 30

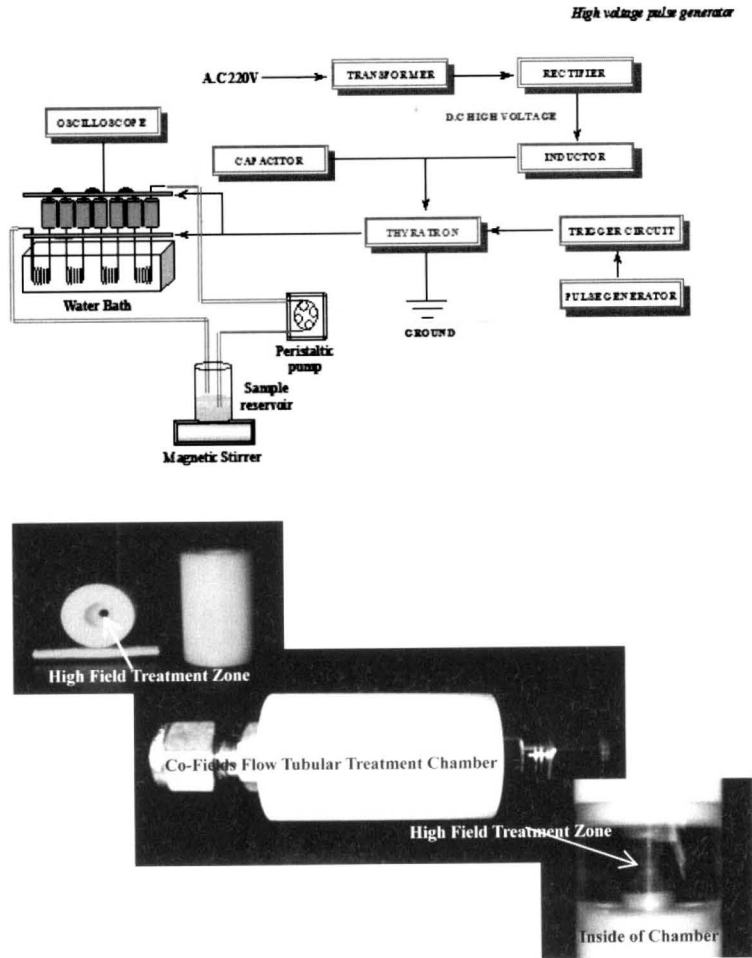


Fig. 1. Schematic diagram of continuous PEF processing system and Continuous treatment chamber

- 60 kV/cm로 변화시키면서 처리하였다. 시료의 처리시간의 계산은 다음에 의한다.

$$t = n\tau, n = fV/m \tag{1}$$

t: 1cycle 되는 동안의 처리시간 (sec)

τ: 펄스의 폭 (sec)

n: 고전압 전기장 펄스의 수

f: 고전압 전기장 펄스의 주파수 (Hz)

V: 처리 용기의 부피 (ml)

method로 plating한 후, 최적 생육 온도인 37°C에서 18시간 배양하고 생성된 colony 수를 측정하여 cfu/mL로 나타내었다. 가열처리와 고전압 펄스 전기장 처리에 따른 균체의 생존율은 초기 균체수(N₀)와 PEF 처리후의 균체수(N)의 비로 생존율(S)을 나타내었다. 이 때 plate내의 균체수는 30 - 300개 이내로 나오도록 희석하였으며 각 희석배수에서 3개의 plating을 하여 그 평균값을 생균수로 하였다.

결과 및 고찰

생균수 측정

가열 처리 전후와 고전압 펄스 전기장 처리 전후의 생균수를 TSBYE를 이용하여 pour plating

전기장 세기와 처리시간의 영향

일반적으로 고전압 펄스 전기장 처리시 전기장의 세기와 처리시간은 미생물의 불활성화와 밀접한 관

계를 가지고 있다. 미생물 세포의 세포막 전위차는 인가되는 전기장의 세기가 커짐에 따라 비례하여 증가한다. Fig. 2는 전기장의 세기에 따른 *L. innocua*의 생존수 감소를 나타내었다. 그림에서 보듯이 50°C에서 고전압 펄스 전기장을 30~60 kV/cm로 증가시키에 따라서 사멸 속도가 점차 증가하여 전체적인 균체 사멸율이 현저하게 증가하고, 임계 처리 시간(사멸 지연 시간)은 약 9 μs로 관찰되었으며, 처리시간에 따라 직선적으로 사멸하는 경향을 나타내었다. 기존의 실험 결과에 의하면 *L. innocua*는 임계 처리 시간이 없거나 10 ms 이내의 임계 처리 시간을 갖는 것으로 보고 되고 있다 (Sepulveda et al., 2005; Picart et al., 2002; San Martin et al., 2006). 기존의 실험 결과에 의하면 *L. innocua*는 5 - 12 kV/cm의 임계 전기장을 갖는 것으로 알려져 있다(Aronsson et al., 2005).

전기장의 세기와 사멸속도와의 관계를 Fig. 3에 나타내었다. 전기장의 세기가 커짐에 따라 효모의 사멸 속도는 직선적으로 증가하므로, 전기장의 세기, 처리시간과 사멸 속도간에 다음과 같은 관계식이 성립한다.

$$\log s = k_E \cdot (t - t_c) \quad (2)$$

s 는 survival fraction(N/N_0), k_E 는 사멸 속도로서 전기장의 세기와 비례하는 값으로 $5.42 \times 10^4 E - 2.62$

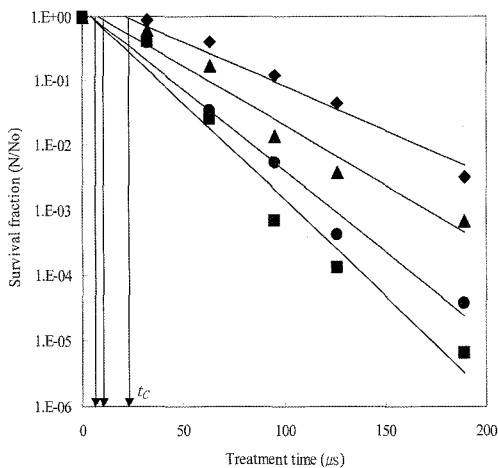


Fig. 2. Inactivation of *Listeria innocua* by applying high voltage pulsed electric fields of approximately 1 ms pulse width as a function of electric field intensity. Samples were treated at 50°C.
◆ 30 kV/cm, ▲ 40 kV/cm, ● 50 kV/cm, ■ 60 kV/cm

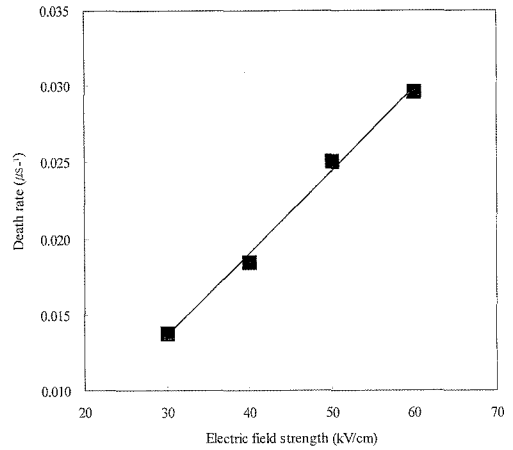


Fig. 3. Dependence of the death rate of *L. innocua* by high voltage pulsed electric fields treatment on electric fields strength.

$\times 10^3$ 이고, t 는 처리 시간, t_c 는 임계 처리시간으로 본 실험에서는 $t_c = 9 \mu s$ 이다. 관계식에 의해 예측한 살균 정도를 Fig. 4에 나타내었다.

온도의 영향

전기장의 세기가 일정한 상태에서 미생물의 사멸율은 처리 온도에 따라 크게 변한다. 고전압 펄스 전기장 처리시 세포 현탁액의 온도는 미생물 세포벽의 유연성과 밀접한 관계가 있다. 낮은 온도에서 세포벽 또는 세포막 구성 요소인 phospholipids는 견

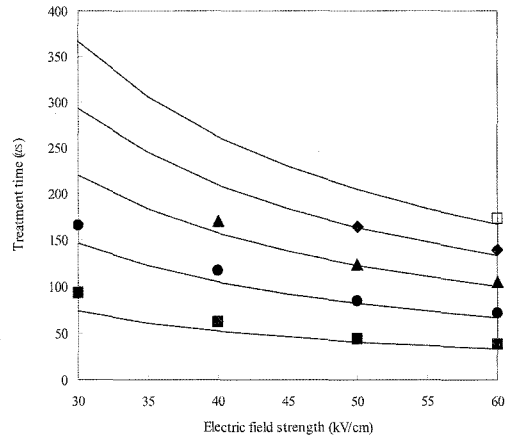


Fig. 4. Estimation of the electric field strength and treatment time required for log cycle inactivation of *L. innocua* at 50°C.
■, ●, ▲, ◆, □ : Experiment data, - : estimated value

고한 gel 구조로 촘촘하게 압축된 형태를 갖는 반면 높은 온도에서는 덜 정돈된 liquid crystalline 구조를 갖게 된다. Gel 구조에서 liquid crystalline 구조로의 상(phase)의 변화는 온도와 큰 상관 관계가 있으며, 따라서 온도의 변화는 세포막의 물리적 안정성에 영향을 준다. 온도가 상승하면 세포막 구성 성분이 liquid의 측면 확산 속도(lateral diffusion rate)가 증가되고 gel 구조에서 liquid crystalline 구조로 변하는 것으로 알려져 있다(Zimmerman, 1986; Jayaram et al., 1992). Fig. 5에서 보는 것처럼 *L. innocua*의 사멸율은 일정한 전기장 세기에서 세포 현탁액의 온도가 높아짐에 따라 증가하는 양상을 보였다. 즉, 전기장의 세기가 일정할 경우(60 kV/cm) 1 log의 생존수 감소를 얻기 위해서는 20°C에서는 200 μs 이상의 처리시간이 필요했지만 30°C에서는 80 μs, 40°C에서는 65 μs, 50°C에서는 50 μs의 처리 시간만이 필요했다.

일정한 전기장의 세기(60kV/cm)에서 온도와 사멸 속도와의 상관관계를 Fig. 6에 나타내었다. 처리 온도가 증가함에 따라 *L. innocua*의 사멸 속도는 직선적으로 증가하게 되며, 처리 시간, 처리 온도와 사멸 속도간에 다음과 같은 관계식이 성립한다.

$$\log s = -k_T \cdot (t-t_c) \quad (3)$$

s는 survival fraction(N/N₀), k_T는 사멸 속도로서

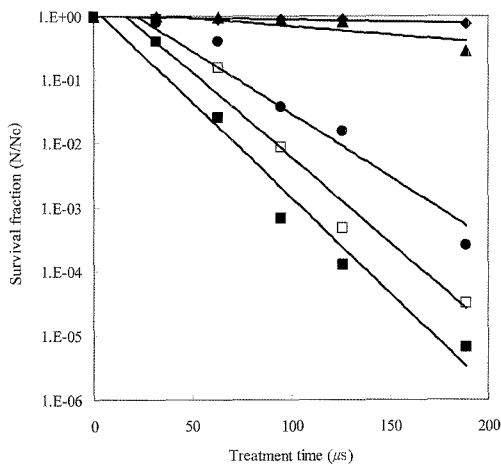


Fig. 5. Inactivation of *Listeria innocua* by applying high voltage pulsed electric fields of approximately 1 ms pulse width as a function of treatment temperature. Samples were treated at 60 kV/cm. ◆ 10°C, ▲ 20°C, ● 30°C, □ 40°C, ■ 50°C

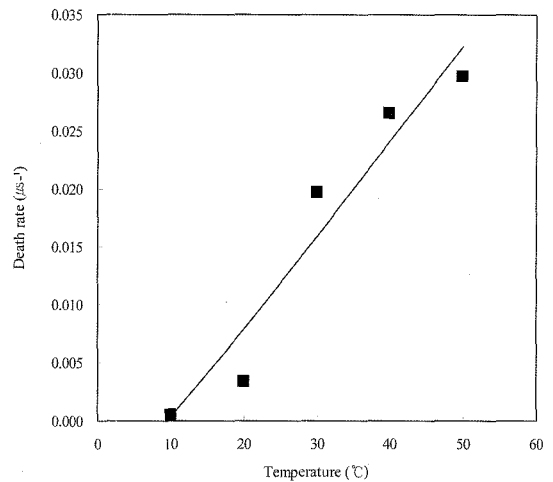


Fig. 6. Dependence of the death rate of *L. innocua* by high voltage pulsed electric fields treatment on treatment time.

전기장의 세기와 비례하는 값으로 $8.14 \times 10^{-4} T - 8.47 \times 10^{-3}$ 이고, t는 처리 시간, t_c는 임계 처리시간으로 본 실험에서는 t_c = 9 μs이다. 관계식에 의해 예측한 살균 정도를 Fig. 7에 나타내었다.

에너지 효율

고전압 펄스 전기장 연속 처리장치를 이용한 미생물의 불활성화에 소비된 에너지는 다음 식으로 구할 수 있다.

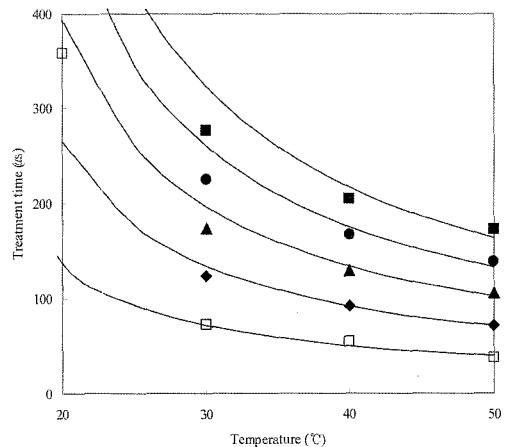


Fig. 7. Estimation of the treatment temperature and treatment time required for log cycle inactivation of *L. innocua* at 60 kV/cm
■, ●, ▲, ◆, □ : Experiment data, - : estimated value

$$t = n \cdot \tau \quad (4)$$

$$n = (V \cdot f) / m \quad (5)$$

$$E = vIt \quad (6)$$

여기서, E 는 에너지(J), t 는 총 처리시간(μ s), n 은 펄스수, τ 는 펄스폭(ms), f 는 주파수(1/s), V 는 처리 용기의 부피(mL), m 는 유속(mL/s), v 는 전기장의 세기, I 는 전류의 세기이다(Zhang, 1998).

식 (4) - (6)를 이용하여 처리온도 10 - 50°C, 60 kV/cm 조건에서 처리시간에 따라 가해지는 전기 에너지의 양과 생존율과의 관계를 Fig. 8에 나타내었다. 처리시간이 길어짐에 따라 소비된 에너지가 거의 비례적으로 증가하였고 소비된 에너지가 증가함에 따라 사멸율이 대수적으로 증가하는 것을 볼 수 있다.

치사 온도 이하의 열과의 병합 처리 실험에서 처리 온도와 전기장의 세기가 증가하면, 그 효과가 더 향상되는 것을 확인하였는데 Fig. 8에서 같은 전기 에너지가 가해지더라도 처리 온도가 높아짐에 따라 사멸효과가 현저히 차이가 나는 것과 연관지어 보면 열에너지와 전기에너지의 합이 미생물 세포막을 불활성화시킬 수 있는 최소 에너지 즉, 임계 에너지를 초과하였을 때 미생물의 사멸속도가 대수적으로 증가하는 것으로 생각된다. *L. innocua*를 가열 살균하는데 소모되는 에너지에 대한 직접적인 보고

는 없으나, 우유를 138 - 149°C에서 미생물을 살균 하였을 때, 직접식은 전체 살균공정을 운전하는 데 547.8 - 697.6 kJ/kg의 에너지가 소요되며, 간접식은 357.9 - 436.8 kJ/kg 정도의 에너지가 필요하다고 보고하고 있다(Biziak *et al.*, 1985). 또한 UHT나 HTST법으로 우유를 살균 처리할 경우에는 많게는 573 - 667 kJ/kg에서 적게는 217 - 228 kJ/kg 정도의 에너지가 소요된다고 보고했다(Chandarana *et al.*, 1984). 이러한 결과들과 비교해보면 고전압 펄스 전기장을 이용한 *L. innocua*의 불활성화에 필요한 에너지는 약 400 - 1500 J/L정도로 가열 살균보다 에너지 절약 효과가 매우 크다는 것을 알 수 있다.

요 약

고전압 펄스 전기장 기술은 액상 식품내의 미생물을 불활성화 시키는데 매우 효과적인 비열 살균 기술로서 본 연구에서는 사람에게 listeriosis를 일으키는 병원성 미생물인 *Listeria monocytogenes* 대신에 비병원성인 *Listeria innocua*를 이용하여 *Listeria*의 불활성화에 대해 연구하였다. *L. innocua*를 전기장의 세기 30 - 60 kV/cm, 처리시간 32 - 189 μ s 그리고 처리온도 10 - 50°C의 범위에서 처리를 한 결과 전기장의 세기가 증가함에 따라 미생물의 사멸 속도가 점차 증가하였으며, 전체적인 균체 사멸율이 현저하게 증가하였다. 또한 처리 온도가 증가함에 따라 미생물의 사멸 속도는 직선적으로 증가하였다. 실험범위 내에서 최대의 사멸효과는 50°C, 60 kV/cm에서 189 μ s 처리한 결과로서 약 5.2 log cycles의 감소를 보였다. 또한 고전압 펄스 전기장 처리에 의한 에너지의 소비량은 기존의 가열 살균에 비해 매우 적은 에너지로도 충분한 사멸효과를 거둘 수 있을 것으로 예측되었으며, 실험범위내의 최대 사멸효과인 5.2 log cycle의 감소를 얻는데 대략 1500 J/L 정도였다. 이 연구 결과로 보아 고전압 펄스 전기장 기술은 치사 이하의 낮은 온도에서 병원성 미생물인 *Listeria*를 사멸시키는데 효과적일 것으로 생각된다.

참고문헌

Arronsson, K., U. Ronner and E. Borch. 2005. Inactivation of *Esherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to

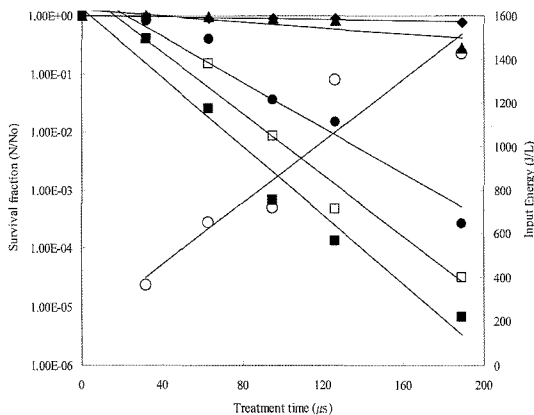


Fig. 8. Effect of electrical input energy on survival fraction of *L. innocua* by applying high voltage pulsed electric fields at 60 kV/cm.

Electrical input energy : ○
Survival fraction : ◆ 10°C, ▲ 20°C, ● 30°C, □ 40°C, ■ 50°C

- pulsed electric field processing, *International Journal of Food Microbiology*, **99**: 19-32
- Barbosa-Canovas, G.V., M. Gongora-Nieto, U. Pothakamury, and B.G. Swanson. 1999. *Preservation of foods with pulsed electric fields*, San Diego, CA, Academic Press
- Biziak, R.B., K.R. Swartzel and V.A. Jones. 1985. Energy Use for Continuous Thermal Processing of Milk, *Journal of Food Science*, **50**: 1607-1614
- Chandarana, D.I., B.C. Frey, L.E. Stewart and J.F. Mattick, 1984. UHT Milk Processing Effect on Process Energy Requirements, *Journal of Food Science*, **49**: 977-978
- Doyle, M.P. 1988. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*, **43**: 169-171
- Farber, J.M., G.W. Sandders and M.A. Johnston. 1989. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species, *Journal of Protection*, **52(7)**: 456-458
- Dunn, J. and J. Pearlman. 1987. Methods and apparatus for extending the shelf life of fluid food products. US Patent 4,695,472
- Kinosita, K. and T. Tsong. 1977. Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes, *Biochimica et Biophysica Acta*, **411**: 227-242
- Heinz, V., I. Alvarez, A. Angersbach and D. Knorr. 2002. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields - basic concepts for process design. *Trends in Food Science and Technology*, **12**: 103-111
- Hulsheger, H., J. Pottel and E. Niemann. 1981. Killing of bacteria with electric field pulses of high field strength, *Radiation and Environmental Biophysics*, **20**: 53-65
- Jayaram, S., G.S.P. Castle and A. Margartis. 1992. Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses., *Biotech. Bioeng.*, **40**, 1412-1420
- Picart, L., E. Dumay, J.C. Cheftel. 2002. Inactivation of *Listeria innocua* in dairy fluids by pulsed electric fields : influence of electric parameters and food composition, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **3**: 357-369
- San Martin, M.F., D.R. Sepulveda, B. Altunakar, M.M. Congora-Nieto, B.G. Swanson and G.V. Barbosa-Canovas. 2006. Evaluation of selected mathematical models to predict the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol. in press*
- Schwan, H., 1957. Electrical properties of tissue and cell suspensions, *Advances in Biological and Medical Physics*, **5**: 147-209
- Sepulveda, D.R., M.M. Gongora-Nieto, M.F. San-Martin and G.V. Barbosa-Canovas. 2005. Influence of treatment temperature on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **38**: 167-172
- Zhang, Q. 1996. Inactivation of bacterial spores using high voltage electric fields as a nonthermal sterilization process, *In. Quarterly Progress Report*, Ohio State Univ., Columbus, OH., January
- Zimmermann, U. 1986. Electrical breakdown, electro-permeabilization and electrofusion. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, **105**: 176-250