

고전압 펄스 전기장에 의한 *Saccharomyces cerevisiae*의 불활성화에 미치는 외부조건의 영향

손석민, 신정규*

호서대학교 식품생물공학과, *전주대학교 문화관광대학 전통음식문화전공

The Effect of Environmental Factors on Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by High Voltage Pulsed Electric Fields

Seok Min Son, Jung-Kue Shin*

Department of Food and Biotechnology, Hoseo University,

*Department of Traditional Food Culture, College of Culture & Tourism, Jeonju University

Abstract

The influence of high voltage pulsed electric fields (PEF) on inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* was investigated in varying pH, ionic strength, type of medium as well as the growth phase, growth temperature and initial concentration of *S. cerevisiae*. By lowering the pH and ionic strength in the medium, the inactivation of *S. cerevisiae* was increased when exposed to an electric fields of 50 kV/cm at 40°C. This phenomena showed more clearly under acidic or basic conditions rather than in the neutral pH. The inactivation rate of *S. cerevisiae* directly increased with the ionic strength of the medium such as Ca^{2+} or Mg^{2+} , causing change in the permeability of the cell membrane. The *S. cerevisiae* cultivated under optimum temperature condition or in the logarithmic phase showed to be more sensitive to inactivation than those cultivated in lower temperature or in the stationary phase when tested with high voltage pulsed electric fields. However, it was noted, the inactivation rate of *S. cerevisiae* under high voltage pulsed electric fields showed no significant effect on the initial cell concentration.

Key words: pulsed electric fields, pH, growth phase, ion strength, inoculum size

서 론

식품공업에서 현재 병원균이나 식품 부패 원인균을 사멸시키기 위해 널리 사용되고 있는 가열 살균은 살균 공정동안 열에 의해 색깔, 향과 맛 그리고 영양 등 품질의 열화(劣化)를 동반하게 된다(Kyzlink, 1990; Castro et al., 1993; Jayaram et al., 1992).

소비자들의 신선한 품질의 식품에 대한 요구가 급격히 증가하면서 최소한의 열이나 또는 열을 사용하지 않은 최소 가공 식품에 대한 관심이 커지고 있으며, 다양한 최소 가공법에 대한 연구가 더욱 활발히 진행되고 있다(Mertens & Knorr, 1992; Ray, 1996). 이러한 추세에 의해 연구 개발되고 있는 비열 살균 기술은 가열 살균과는 달리 물리적 처리에 의해서 미생물을 불활성화 시키는 것으로 이 중 고

전압 펄스 전기장(high voltage pulsed electric fields, PEF)은 주목받고 있는 비열 살균 기술 중 하나이다. 고전압 펄스 전기장 기술은 두 개의 전극 사이에 식품을 넣고 높은 전압(10~50 kV/cm)의 전기를 짧은 순간(1~10 μ s) 인가시켜 세포막에 손상을 주어 세포를 사멸 시키는 기술로서 식품의 품질과 직접적으로 관련이 있는 bacteria, 효모, 곰팡이 등의 영양 세포와 그리고 일부 효소등을 불활성화 시킬 수 있는 것으로 보고되고 있으며, 많은 연구자들이 다른 PEF system을 이용하여 식품이나 buffer 시스템에서 미생물의 불활성화에 대한 연구를 보고하고 있다(Sale & Hamilton, 1967; Castro et al. 1993; Qin et al., 1995; Shin & Pyun, 2000, Jayaram et al., 1993; Manas et al., 2001; Donsi et al., 2007; Kristina et al., 2005; Zhang et al., 1994). 고전압 펄스 전기장에서 전기장의 세기와 처리 시간은 공정상에 있어서 주요 변수로서 미생물의 사멸에 영향을 미친다(Castro et al., 1993; Kristina et al., 2001). 또한 이러한 주요 변수 이외에도 균체의 초기 농도, 세포의 생육 단계, 세포 배양 온도, 현탁액의 이온 종류나 이온 강도등도 주요한 환경 변수로 알려져 있다(Molinari et al.,

Corresponding author: Jung-Kue Shin, Department of Traditional Food Culture, College of Culture & Tourism, Jeonju University, Jeonju, Jeonbuk 560-759, Korea
Tel: +82-63-220-3081; Fax: +82-63-220-2736
E-mail: sorilove@freechal.com, sorilove@jj.ac.kr

2004; Kristina & Ulf, 2001). 이러한 환경 변수들은 실제 식품에 적용될 경우 식품의 pH, 식품내에 존재하는 무기염류, 미생물의 농도등에 의한 살균 효과를 예측하는데 매우 중요한 자료이나 지금까지는 주로 공정변수인 전기장의 세기와 처리 시간 그리고 처리온도에 대해서 연구가 되어져 왔고, 환경 변수에 대한 실험은 많이 연구되지 않았다.

본 연구는 연속 처리 용기를 이용하여 고전압 펄스 전기장에 의한 *S. cerevisiae*의 사멸 효과를 주요 환경 변수인 pH, 세포 생육 단계, 세포의 배양 온도, 세포 현탁액의 이온, 이온 강도, 균체의 초기 농도등에 대하여 연구하여 실제 식품에 적용될 때의 기초 자료로 활용하고자 하였다.

실험재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* 균주는 ATCC 4105로 한국중균협회(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)로부터 분양 받아 사용을 하였다. 균주 보관용 평판배양은 YM agar(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 사용하였으며, 사용전까지 0°C에 보관하였다. 실험 균주의 생리적 상태를 동일하게 유지하기 위하여 접종균은 균주보관용 평판배양으로부터 2~3백급이를 YM broth(0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% dextrose) 100 mL가 들어있는 250 mL 삼각 플라스크에 접종한 후 26°C에서 24시간 전배양하였다. 전배양액 2 mL를 취하여 200 mL YM broth가 들어 있는 500 mL 삼각 플라스크에 접종하여 같은 온도에서 16시간 배양하여 대수 증식기 후반의 균주를 실험에 사용하였다. 다만 균주의 배양온도나 생육단계의 영향을 살펴볼 때는 16°C에서는 32시간 배양(대수증식기 후반)하거나 26°C에서 32시간 배양(정상기)한 다음에 실험에 사용하였다. 배양한 배양액은 4°C에서 4000 rpm으로 원심분리(Sorvall RC2C plus, Dupont, USA)하여 살균 증류수 및 완충 용액(50 mM acetate buffer pH 4.0, pH 5.0; 50 mM phosphate buffer, pH 6.0, pH 7.0; 50 mM bicarbonate buffer, pH 8.0, pH 9.0)에 1회 세척한 후 현탁하여 사용하였다. 이 때 최종 균체 농도는 $2.0 \times 10^7 \sim 3.0 \times 10^7$ 수준이었으며, 본 실험에 사용된 모든 균 시료액은 같은 방법으로 매번 새로이 배양한 것을 사용하였다.

고전압 펄스 전기장 장치

고전압 펄스 전기장 시스템은 실험실용 용량으로 설계하여 제작하였으며, 그 사양은 Table 1과 같다. 실험 장치의 전체적인 개략도는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 전체적인 시스템은 크게 전원 공급부(power supply, Model JP-PS2550, Jaepae Hi-Tec, Inchon, Korea), 펄스발생기(pulse generator, Model JP-PGT50, Jaepae Hi-Tec, Inchon, Korea), 처리용기(treatment chamber)의 세가지로 구성되어 있다. 전원 공급

Table 1. Specification of High Voltage Pulsed Electric Fields System

Device	Specification
Power Supply	Input : AC 220 V, 60 Hz, 40 kW Output voltage 5~50 kV
Capacitor	1,800 pF/each, 64 pieces
Switch	Thyratron, 10 ⁹ /sec switching
Inductor	2 μH~20 μH, 3 pieces/each
Pulse Generator	Pulse rising time < 2nS/kV Pulse power variable Pulse duration 1~5 μs Pulse repetition rate 10~5,000 pps Charging time 100 μs Peak current 2,500 A

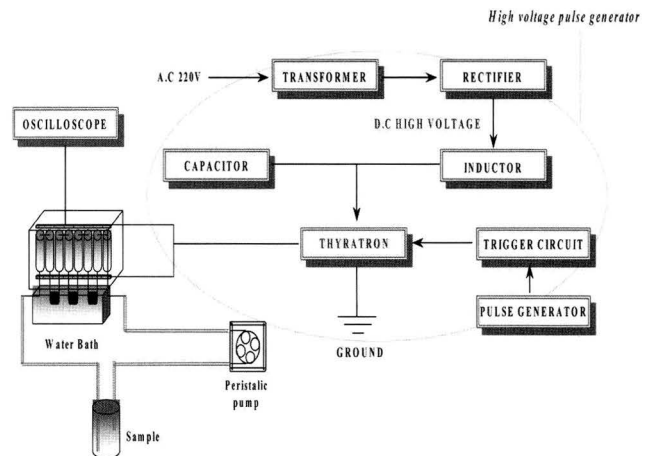


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental apparatus for high voltage pulsed electric fields treatment.

부는 220V AC의 입력 전원을 고전압 변압기를 통하여 승압하고 정류하여 최대 50 kV D.C. 전원을 발생시킬 수 있도록 하였으며 최대 허용치 전력은 50 kW이다. 펄스 발생기는 펄스를 구성할 수 있는 펄스 발생망(pulse forming network, PFN)과 고전압의 전기를 순간적으로 발생할 수 있는 스위치로 구성되어 있다. 펄스 발생망은 펄스의 형태와 길이를 결정하는 중요한 부분으로서 전원 공급부에서 공급된 전압을 충전하고 rising time을 결정하는 축전지(capacitor, 1800 pF/each), 펄스의 길이와 falling time을 조절하는 방전 지연 inductor(discharge delay inductor, 2 μH~20 μH)로 되어 있으며, exponential decay pulse와 square wave pulse를 발생시킬 수 있도록 구성되었다. 축전 방식은 resonance charging을 택하였으며, 축전지에 충전된 고전압을 순간적으로 방전하는 스위치로는 열음극 방전관(thyratron, 50 kV, 2500A)을 사용하였으며, 방전시에 발생하는 열을 식히기 위하여 cooling device를 사용하여 열을 방출하였다. 축전지는 corona와 arching을 방지하기 위하여

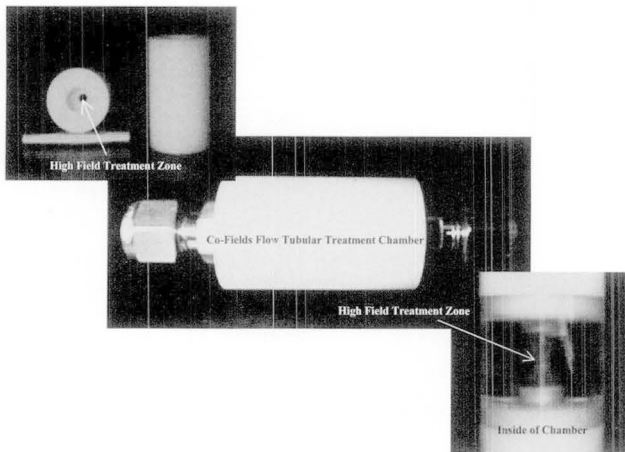


Fig. 2. Treatment chamber with co-fields concept for high voltage pulsed electric fields treatment.

절연유(제 1종 silicon oil)에 담았다. 처리 용기(treatment chamber, Fig. 2)는 co-fields 개념을 도입하여 시료가 전극과 직접 접촉하는 면적을 최소화하여 불균일한 전기장의 형성을 없애고 시료의 흐름에 edge를 제거하여 spark에 의한 유전파괴 현상이 일어나지 않도록 설계·제작하였으며, 전극 간격 2 mm, 2 mm의 전극 hole을 갖도록 하고 7개를 병렬로 연결하여 전체 처리 용적이 0.175 mL가 되도록 하였다. 처리 용기에 인가되는 전기장의 세기와 파형은 oscilloscope(Lecroy Digital Oscilloscope, Model 9300 AM, Dual 400 MHz, Switzerland)로, 전류는 전압-저항 converting을 이용하여 측정할 수 있도록 자체 제작하여 측정하였다. 처리 용기에 인가되는 square wave의 파형은 Fig. 3와 같다.

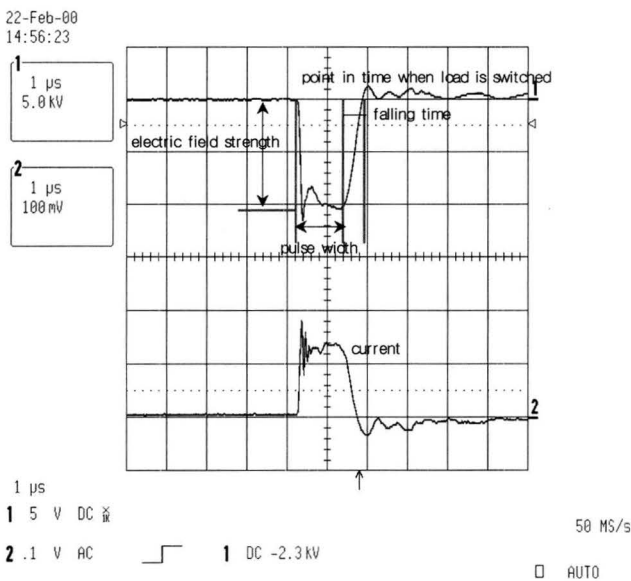


Fig. 3. Generated wave-form from pulse generator for high voltage pulsed electric fields treatment. This wave is square wave with 1 pulse width.

고전압 펄스 전기장 처리

배양액 200 mL를 시료 용기에 넣고 밀봉한 다음 연동 펌프(peristaltic pump)를 사용하여 시료를 처리 라인에 채웠다. 처리 라인은 일정한 온도(20~40°C)로 유지한 항온 수조에 담겨 시료의 온도를 일정하게 유지시켰다. 시료의 온도가 일정한 온도에 도달하게 하고, 전원 공급부에 전원을 공급하고 power supply의 변수를 조정하여 맞추었다. 미리 계산된 처리 시간에 따라 주파수와 시료의 유속을 조정하고 처리하고자 하는 전압까지 전원을 공급하여 처리 용기내에 전기장을 형성시켜 시료를 처리한다. 일정 시간 시료를 처리한 후 처리 line에서 나오는 시료를 일정량 수거하여 다음 분석을 위해 사용하였다.

생균수의 측정

고전압 펄스 전기장 처리를 마친 효모 현탁액을 멸균된 생리 식염수(0.85% NaCl) 수용액에 단계별로 희석한 후 potato dextrose agar(PDA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA; potatoes 20%, dextrose 2%, agar 1.5%)에 0.1 mL씩 도말하였다. 이를 26°C에서 48시간동안 평판 배양한 다음 생성된 colony를 계수하여 생균수를 측정하였다(Lin et al., 1993). 고전압 펄스 전기장 처리에 따른 균체의 생존율은 초기 생균수(N_0)에 대한 처리 후 생균수(N)의 비율로 표시하였으며, 최소 3회 이상의 반복 실험 결과를 평균하여 나타내었다.

통계처리

본 실험은 3회 반복 실시하여 그 평균값을 사용하였으며, 선형 회귀법(linear regression)을 사용하여 상관관계를 비교하였다.

결과 및 고찰

pH의 영향

전기장의 세기, 처리 시간, 처리 온도등 공정 변수 이외에 세포 현탁액의 pH, 현탁액의 구성 성분현탁액의 전기전도도, 현탁액 내의 이온등 외부 조건과 균의 종류, 생육 조건 및 생육 단계 등 미생물학적 요인등은 고전압 펄스 전기장 처리시 미생물의 사멸 효과에 큰 영향을 미치는 주요 변수가 될 수 있다. 특히 이러한 변수들 가운데 세포 현탁액의 pH와 현탁액의 전기전도도, 현탁액내의 이온, 구성 성분등은 미생물의 사멸에 미치는 영향이 매우 크다.

미생물 세포들은 외부 환경에 관계없이 proton pump에 의하여 cytoplasmic pH를 중성에 가깝게 유지한다(Vega-Mercado et al., 1996). 고전압의 전기장이 세포에 인가되면 세포공(pore)이 형성되면서 세포막의 투과성이 증가하게 되고, 세포는 삼투압의 불균형을 일으켜 세포내로의 H^+ 이온의 유입 속도가 커지게 된다. Proton의 유입에 의해 cytoplasmic

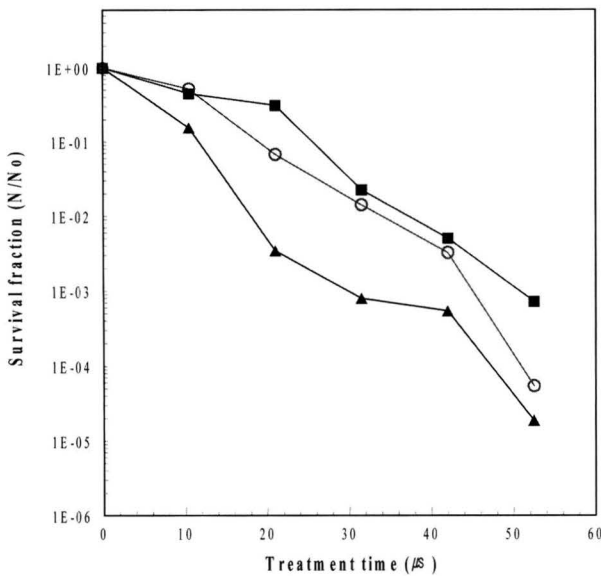


Fig. 4. Effects of medium pH on inactivation of *S. cerevisiae* cells. High voltage pulsed electric fields treatments were carried out at 50 kV/cm and 40°C.

○ pH 4.0, ■ pH 7.0, ▲ pH 9.0

pH가 감소되고 심할 경우 DNA나 ATP와 같은 세포 기본 구성 물질의 화학적 변화를 일으키게 된다(Wiggins, 1975; Dolowy, 1975). 세포 현탁액이 산성화되면서 세포 내부로 유입된 H⁺를 세포외로 배출하기 위하여 H⁺-ATPase를 작동 시키게 되는데, 이러한 미생물의 'proton motive force'(PMF)에 의한 pH 항상성(homeostasis) 유지에는 다량의 에너지가 소모되어 결국에는 다른 대사 활동에 지장을 초래하여 외부 충격에 저항성이 감소된다(Hong, 1997; Padan et al., 1981; Booth, 1985; McDonald et al., 1990)

고전압 펄스 전기장 처리시 미생물 현탁액의 초기 pH에 따른 *S. cerevisiae*의 사멸정도를 Fig. 4에 나타내었다. 50 mM acetate 완충액(pH 4.0, 5.0), 50 mM phosphate 완충액(pH 6.0, 7.0), 50 mM carbonate 완충액(pH 8.0, 9.0) 등에 균체를 현탁하여 40°C, 50 kV/cm에서 고전압 펄스 전기장 처리하였을 경우 중성에서 산성쪽으로 갈수록, 중성에서 알칼리성쪽으로 갈수록 사멸 효과가 현저하게 증가하였다. Acetate 완충액(pH 4.0)에서는 사멸 속도가 0.088로 phosphate 완충액(pH 7.0)에서의 사멸 속도(0.056)보다 빨랐다(Fig. 5). 4 log를 사멸시키는데 걸리는 시간은 pH 7.0에서는 60 μs 이상인 반면에 pH 4.0과 9.0에서는 53 μs와 46 μs로 중성에서 멀어질수록 짧은 처리 시간안에 사멸되었다. 이 결과로 보아 고전압 펄스 전기장 기술이 산성 식품(오렌지 주스, 당근 주스등)의 살균에 적용하는 것이 보다 효율적일 것으로 예상된다.

세포 생육 단계의 영향

고전압 펄스 전기장 뿐만아니라 일반적인 열 살균에 있

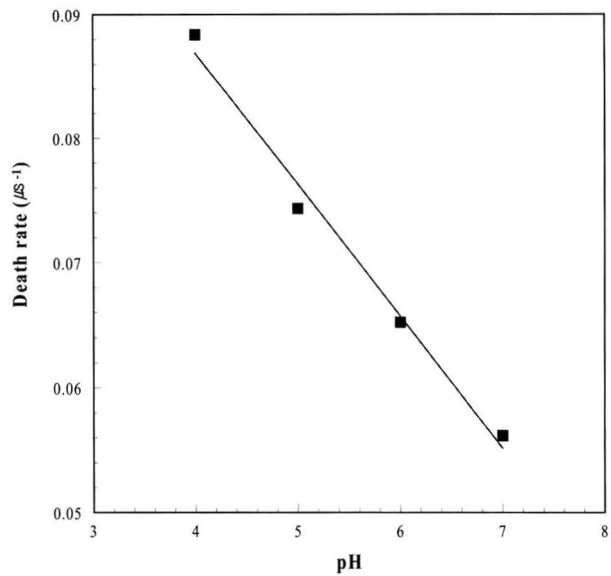


Fig. 5. Effect of medium pH on death rate of *S. cerevisiae* cells by high voltage pulsed electric fields treatment.

어서도 미생물의 생장 조건이나, 생육 단계, 배지 조성등 환경인자에 의해 살균 효과는 큰 차이가 난다. 일반적으로 정지기의 세포(완숙 세포)보다는 증식기의 세포(미숙 세포)가 외부 환경의 변화에 보다 민감하게 반응하고, 포자보다는 영양세포가 쉽게 사멸된다(Yiping, 1996; Marquez et al., 1997; Raso et al., 1998). *S. cerevisiae*를 26°C에서 배양 하면서 대수 증식기 후반(16시간)에 수거한 미숙 세포와 정지기(32시간)에서 수거한 완숙 균체로 구분하여 40°C, 50 kV/cm로 고전압 펄스 전기장 처리하였을 때의 사멸 곡선은 Fig. 6에 나타내었다. 대수 증식기의 세포는 53 μs 처리하였을 때 약 5 log 정도 사멸되었으나, 정지기의 세포는 같은 시간 처리하였을 경우 약 3.5-4 log 정도의 사멸율을 얻었다. 사멸 속도에 있어서도 대수 증식기의 세포는 0.11($r^2=0.997$), 정지기의 세포는 0.082($r^2=0.986$)로 많은 차이를 나타내었다. 일반적으로 세포는 정지기에 접어들면 온도의 상승이나 산화, 고염도등의 외부적 요인에 의한 스트레스에 대해 스스로를 방어하기 위하여 새로운 단백질을 합성하여 세포 표면에 층을 형성하게 된다(Kolter, 1993). 따라서 정지기의 세포는 대수 증식기의 세포에 비하여 외부 스트레스에 큰 저항성을 갖게되어 고전압 펄스 전기장 처리에 의해서도 대수 증식기 세포에 비하여 낮은 민감성을 나타내게 된다.

세포 배양 온도의 영향

미생물의 생육 조건이 고전압 펄스 전기장 처리시 살균 효과에 미치는 영향을 살펴보고자 *S. cerevisiae* 세포를 최적 온도인 26°C와 최적 온도보다 낮은 16°C에서 대수기 후반까지 배양하여 생균수의 감소를 측정하였다. 최적 온도인 26°C에서는 16시간, 16°C에서는 약 32시간동안 배양

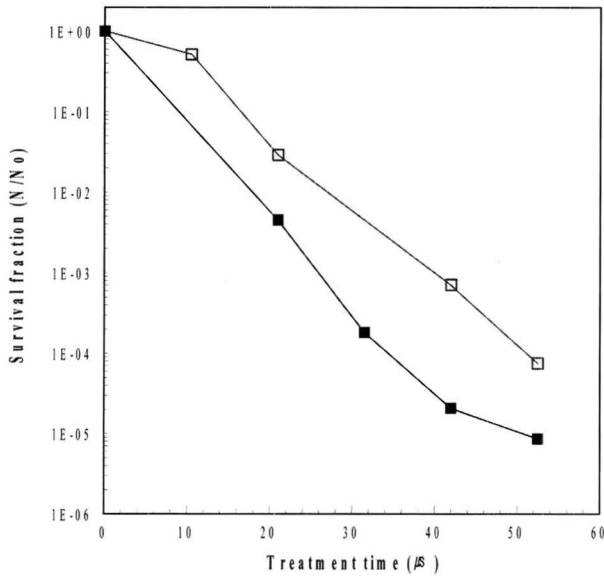


Fig. 6. Inactivation of *S. cerevisiae* cells at different growth phase. High voltage pulsed electric fields treatments were carried out at 50 kV/cm and 40°C.
 □ Stationary phase, ■ Log phase

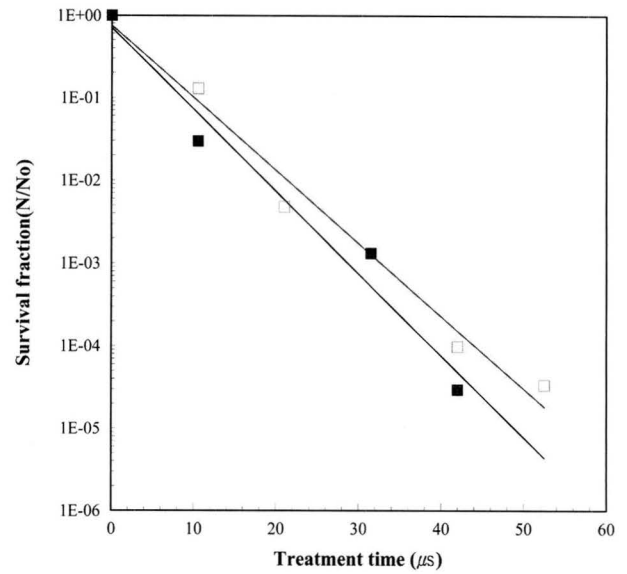


Fig. 7. Inactivation of *S. cerevisiae* cells cultivated at different temperatures by high voltage pulsed electric fields treatments at 40°C and 50 kV/cm.
 □ 16°C; ■ 26°C

한 세포 배양액을 원심분리하여 균체만을 수거한 후 phosphate 완충액(pH 7.0)에 재현탁하여 50 kV/cm, 40°C로 고전압 펄스 전기장 처리하였을 때의 사멸 효과를 Fig. 7에 나타내었다. 그림에서 보듯이, 26°C에서 배양하였을 경우 보다 16°C에서 배양한 세포가 고전압 펄스 전기장 처리에 민감하였다. 이는 고압 처리시 27°C 보다 10°C에서 배양한 *L. dextranicum*이 더 민감하다는 Lin et al.(1993)의 보고와 동일하다. 이처럼 배양 온도에 따라 미생물 세포가 외부 stress에 반응하는 정도의 차이를 보이는 것은 세포막이나 세포벽을 구성하는 지방산의 조성차이 때문인 것으로 생각된다. 일반적으로 세포는 배양 온도가 증가하면 세포막을 구성하는 지방산 중 불포화지방산의 함량이 감소한다(Uchida, 1975). 즉, 저온에서 배양하면 미생물의 세포막 지질 구조는 유동성이 증가하며, 지방산의 사슬 길이가 짧아지고 불포화 지방산의 비율이 높아진다(Hong, 1997; Sinensky, 1974; Kaneda, 1991). 세포막의 견고성은 세포막을 구성하는 지방산의 종류에 따라 달라질 수 있는데 일반적으로 포화 지방산은 직선의 탄소 사슬이 서로 강하게 상호 반응하기 때문에 포화 지방산의 함량이 많을수록 세포막이나 벽은 견고한 상태가 된다(Stryer, 1988). 따라서 저

온에서 배양한 *S. cerevisiae* 세포가 고전압 펄스 전기장 처리에 민감한 것으로 추정된다.

세포 현탁액의 이온 영향

고전압 펄스 전기장 처리시 현탁액 내에 존재하는 이온들이 미생물의 사멸에 미치는 영향을 조사하였다. 현탁액 내의 이온만의 영향을 알아보기 위하여 동일한 전기 전도도를 갖도록 이온의 농도를 조절한 용액에 만든 후 세포를 현탁하였다. 현탁액의 이온들은 전하의 전달체로서 각각의 전하량에 따라 전류의 흐름이나 저항성에 많은 영향을 미친다. 또한 H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺와 같은 이온들은 배양 중이나 배양 후 세포 현탁액 내에 존재할 경우 세포막의 투과성에 큰 영향을 미치고, 세포막의 손상등에도 관여한다(Tedeschi, 1993; Wang et al., 1979; Schubert, 1987). 실험에 사용된 이온은 1가 이온으로 Na⁺, K⁺, 2가 이온으로는 Ca²⁺, Mg²⁺를 사용하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 2가 이온을 포함한 현탁액 내의 세포가 1가 이온을 함유한 현탁액에 있는 세포보다 약 1 log 이상 큰 사멸율을 보였다. 또한 직선적으로 감소하는 부분의 기울기로부터 사멸 속도를 비교하면 2가 이온들이 1가 이온에 비해 현격한 사멸 상승

Table 2. Effect of ion species on inactivation of *S. cerevisiae* by high voltage pulsed electric fields treatment.

Ion species	Initial cell concentration (CFU/ml)	Final cell concentration (CFU/ml)	Death rate (μs ⁻¹)
K ⁺ (KCl)	(1.16±0.20)×10 ⁷	(1.66±0.15)×10 ⁴	0.0466±0.0021
Na ⁺ (NaCl)	(9.27±3.01)×10 ⁶	(1.70±0.07)×10 ⁴	0.0485±0.0014
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	(7.82±2.62)×10 ⁶	(1.03±0.15)×10 ³	0.0827±0.0082
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	(8.30±2.25)×10 ⁶	(5.77±1.29)×10 ³	0.0741±0.0054

효과를 보였다. Hutkins and Nannel(1993)에 의하면 세포 외액에 Ca^{2+} 나 H^+ 이온이 세포 내의 농도보다 높은 농도로 존재할 경우 세포는 쉽게 세포내로 이들 이온을 유입하여 세포내의 Ca^{2+} , H^+ 농도를 상승시키게 되며 이로 인하여 세포막에 손상을 주게 된다. 또한 Mg^{2+} 이온 등은 세포막의 유동성을 증가시키는 역할을 하기도 한다(Wang et al., 1979). 따라서 고전압 펄스 전기장 처리 시에도 이들이 양이온들이 세포막의 유동성에 변화를 일으키거나 손상을 일으켜 고전압 펄스 전기장에 크게 영향을 받은 것으로 생각된다. 그러나 같은 1가 이온과 2가 이온들간에는 서로 간에 큰 영향을 찾아 볼 수 없었으며, 이는 electropermeation시 현탁액내의 같은 전하량을 갖는 이온들에 의해 영향을 받지 않는다는 Ho & Mittal(1996)의 보고와도 일치하였다.

이온 강도(전기 전도도)의 영향

고전압 펄스 전기장 처리에 있어서 현탁액의 이온 강도(ionic strength)는 다른 환경적 요인과 함께 사멸율을 좌우하는 매우 중요한 인자이다. 현탁액의 이온 강도는 전기 전도도와 밀접한 관련이 있어, 이온 강도가 커질수록 전기 전도도는 커지게 된다. 이러한 전기 전도도는 고전압 펄스 전기장 처리시에 처리액내의 전기장의 형성, 전류의 흐름 등에 영향을 주어 미생물 사멸에 많은 영향을 미친다. Electroporation이나 electrofusion 등과 같이 생물에 전기적 조작을 가하였을 경우나, 효소의 불활성화 등의 보고에 의하면, 일정 범위까지는 전기 전도도가 증가할수록 효율이 증가한다(Saraiva et al., 1996; Gaskova et al., 1996). 그러나 일정 이상으로 이온 강도가 증가하여 전기 전도도가 더욱 커지게 되면 미생물 사멸율은 오히려 감소하게 된다(Hulshager et al, 1981; Mizuno & Hori, 1988; Jayaram et al., 1993; Vega-Mercado et al., 1996).

세포 현탁액의 이온 강도가 고전압 펄스 전기장 처리시 살균 효과에 미치는 영향을 살펴 보자 *S. cerevisiae*를 배양한 후 각기 다른 농도의 phosphate buffer(0.005 M, 0.01 M, 0.025 M, 0.05 M, 0.1 M, pH 7.0)에 현탁하여 50 kV/cm, 40°C에서 고전압 펄스 전기장 처리를 하였을 때 이온의 농도가 증가할수록 사멸율은 증가하였다(Table 3).

Table 3. Death rate of *S. cerevisiae* as a function of ionic strength

Phosphate concentration (M)	Death rate (μs^{-1})	r^2
0.005	0.01911±0.0011	0.997
0.01	0.02945±0.0042	0.996
0.025	0.04154±0.0066	0.996
0.05	0.08394±0.0031	0.979
0.1	0.1088±0.0094	0.998

Electric fields strength : 50 kV/cm

Fig. 8에서 보는 바와 같이 50 kV/cm에서 53 μs 처리하였을 경우 0.1 M의 세포 현탁액은 약 6 log 가까운 사멸율을 나타내었으나, 5 mM의 세포 현탁액은 단지 1 log만큼 사멸되었다. 같은 결과로 40°C에서 전기장의 세기를 달리 하여 53 μs 씩 동일하게 처리하였을 경우에도 0.1 M의 경우 50 kV/cm에서는 6 log 정도 생존수가 감소된 반면에

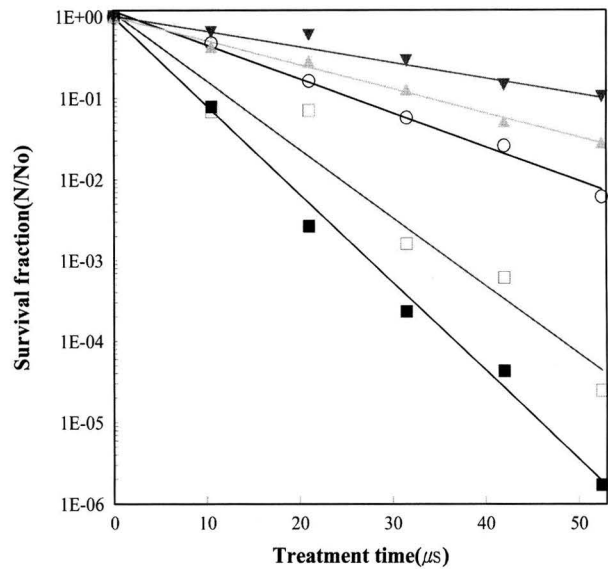


Fig. 8. Inactivation of *S. cerevisiae* cells by high voltage pulsed electric fields treatment as a function of treatment time at different ionic strength.

▼ 0.005 M ($R^2=0.9965$), ▲ 0.010 M ($R^2=0.9964$), ○ 0.025 M ($R^2=0.9962$), □ 0.050 M ($R^2=0.9786$), ■ 0.100 M ($R^2=0.9980$)

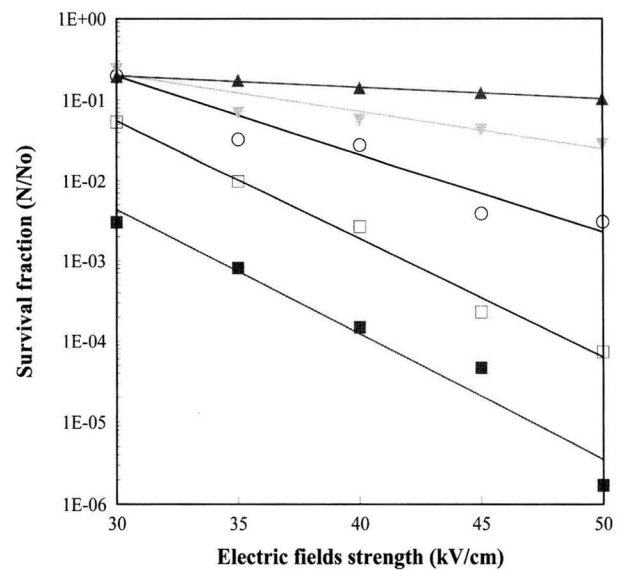


Fig. 9. Inactivation of *S. cerevisiae* cells by high voltage pulsed electric fields treatment as a function of electric fields strength at different ionic strength.

▲ 0.005 M ($R^2=0.9963$), ▼ 0.010 M ($R^2=0.9981$), ○ 0.025 M ($R^2=0.9778$), □ 0.050 M ($R^2=0.9947$), ■ 0.100 M ($R^2=0.9795$)

30 kV/cm에서는 2.5 log 감소되었다(Fig. 9). 일반적으로 현탁액 내의 이온 강도가 감소하면 저항치가 증가하여 내부 발열이 커지게 된다. 이러한 이유로 인하여 대부분의 경우 이온 강도가 감소하면서 미생물의 사멸율이 증가하게 된다. 따라서 본 실험에서도 발열량을 측정하기 위하여 처리 용기 내의 전류를 측정하였다. 전류는 저항과 마찬가지로 처리 용기내에 발열량에 영향을 미치는 중요한 인자의 하나이다. 실험시 전류를 측정 한 결과 0.005 M-1.5 A, 0.01 M-4 A, 0.025 M-5 A, 0.05 M-14 A, 0.1 M-20 A로 이온 강도가 증가함에 따라 전류값이 커짐을 알 수 있었다. 즉 외부의 온도는 40°C로 고정하여 조절하였으나, 처리 용기내에서 순간적으로 일어나는 급격한 온도 상승이나 전류의 흐름이 커져서 세포의 사멸율에 영향을 주었음을 알 수 있다.

균체 초기 농도의 영향

고전압 펄스 전기장에 영향을 미치는 또 다른 인자로는 초기 균체량을 들 수 있다. Zimmermann(1986)은 세포 현탁액에 전기장이 형성되면 세포들이 표면에 전하를 띠게 되게 이러한 전하를 띤 세포들은 정전기적 인력에 의하여 서로 응집되어 pearl chain을 형성한다고 하였다. 또한 Cho et al.(1995)의 실험 결과를 보면 *E. coli*나 *S. cerevisiae*에 전기장을 가하면 각 세포가 전기장의 전류 흐름에 따라 정렬하게 되는 것을 알 수 있다. 본 실험에서도 초기 제작한 아주 작은 규모의 연속 chamber에 균체를 흘려 보내면서 실시간으로 현미경 관찰을 한 결과 전기장이 가해지면서 세포들이 일정한 방향으로 정렬하고 시간이 흐름에 따라 군락(cluster)을 형성하고 심지어는 발아하는 세포들이 독립적 개체로 떨어져 나가지 못하고 융합이 일어나고 pearl chain을 형성하는 것을 볼 수 있었다. Oshima et al.(1995)이나 Matsumoto et al.(1991)은 전기장이 형성되었을 때 발생할 수 있는 세포 사이에 형성되는 군락이 사멸에 영향이 있는지를 알아보기 위해 처리할 균체 현탁액을 연속적으로 전기장 처리하면서 하나는 교반을 하고, 다른 하나는 교반을 하지 않으면서 고전압 펄스 전기장 처리를 하였다. 이럴 경우 교반을 한 시료의 사멸율이 교반하지 않은 것에 비해 약 1~1.5 log 정도 높음을 알 수 있었다.

본 실험에서는 균체의 초기 농도를 각각 결과를 확인하기 위하여 초기 균체량을 10^7 , 10^6 , 10^5 로 조정하여 교반을 하면서 50 kV/cm, 40°C에서 고전압 펄스 전기장을 가하여 균체의 사멸율을 살펴 보았다. Fig. 10에서 보는 바와 같이 세포의 사멸율은 초기 균체량이 감소함에 따라 약간씩 증가하는 경향을 보였으나, 그 차이가 매우 작았다(Table 4). Zhang et al.(1994)은 초기의 균체량을 10^6 , 10^5 , 10^4 CFU/ml로 하여 고전압 펄스 전기장 처리하였을 경우 초기 균체량이 적을수록 사멸율이 크다고 하였으나 다른 실험에서 다시 Zhang et al.(1995)에서는 초기 균체량이 세포의 사멸

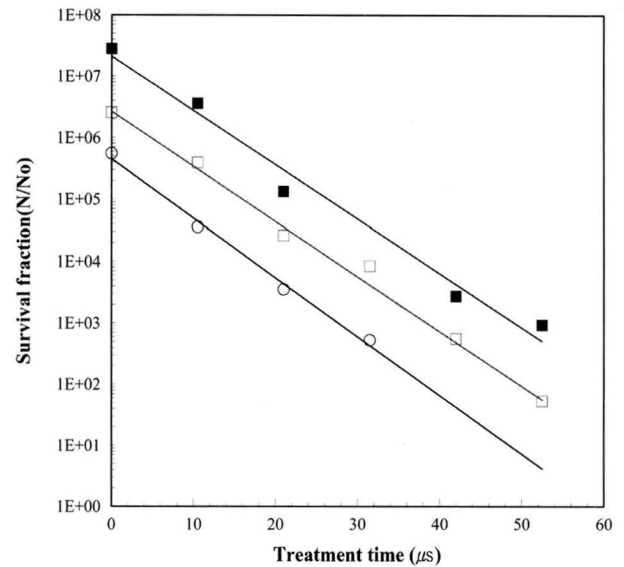


Fig. 10. Influence of initial cell concentration on the inactivation of *S. cerevisiae* cells by high voltage pulsed electric fields treatments. Treatment conditions : Initial cell concentration (3 ± 0.35) $\times 10^7$ CFU/ml (■), (3 ± 0.25) $\times 10^6$ CFU/ml (□), (5 ± 0.5) $\times 10^5$ CFU/ml (○); Phosphate buffer of pH 7.0 and 6 mS/cm.

Table 4. Death rate of *S. cerevisiae* at different initial cell concentration by high voltage pulsed electric fields

Initial cell concentration (CFU/ml)	Death rate (μs^{-1})	r^2
10^7	0.0879 ± 0.0033	0.982
10^6	0.0892 ± 0.0015	0.998
10^5	0.0960 ± 0.0045	0.994

정도에 영향을 미치지 않는다고 하였다. 본 실험의 결과로에서도 초기 균체량이 세포의 사멸율에 미치는 영향은 미미하였으나, 고농도인 경우와 저농도인 경우만을 비교한다고 하면 앞서 언급한 여러 가지 영향으로 인하여 세포의 사멸율에 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상된다.

요 약

본 연구는 고전압 펄스 전기장 처리시 주요 환경변수인 pH, 이온 강도, 이온의 종류, 세포 생육 단계, 세포의 초기 농도가 *Saccharomyces cerevisiae*의 사멸에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 전기장 세기 50 kV/cm, 처리온도 40°C의 동일한 조건하에서 고전압 펄스 전기장 처리를 하였을 경우, 세포 현탁액의 pH가 중성일 때 보다는 산성과 알칼리성일 경우 높은 민감성을 나타냈으며, pH가 낮아질수록 높은 사멸 속도를 나타내었다. 또한 현탁액의 전기전도도(이온강도)가 증가할수록 사멸효과가 증가하는 경향을 보였으며, Ca^{2+} 나 Mg^{2+} 와 같은 2가 이온들은 세포막의 투과성을 변화시켜 고전압 펄스 전기장 처리시 사멸율을 증가시

키는 효과를 나타냈다. 정지기에 있는 세포보다는 대수 증식의 세포가 보다 높은 사멸율을 보였으며, 최적 배양 온도에서 생육한 세포가 낮은 온도에서 배양한 세포보다 PEF 처리에 민감하게 반응하였다. 그러나 현탁액 내 세포의 초기 농도는 사멸속도에 큰 영향을 주지는 않았다. 이러한 실험 결과로 볼 때 고전압 펄스 전기장 처리가 낮은 pH(산성식품), 칼슘이나 마그네슘 등 2가 이온이 포함된 식품의 살균에 더욱 효과적일 수 있음을 알 수 있다.

참고문헌

- Castro A., Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. 1993. Microbial inactivation of food by pulsed electric field. *J. Food Proc. Preser.*, 17: 47-73.
- Cho HY, Zhang QH, Yousef AE, Sastry SK. 1995. Visualizing lethal effect of pulsed electric fields to *E. coli* and *S. cerevisiae*, *AICHE Conf. Food Eng.*, Chicago, Nov. 1
- Donsi G, Ferrari G, Pataro G. 2007. Inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields in a batch treatment chamber: The effect of electric field unevenness and initial cell concentration. *J. Food Engineer.* 78: 784-792.
- Dolowy K. 1975. Uniform hypothesis of cell behaviour movement, contact inhibition of movement, adhesion, chemotaxis, phagocytosis, pinocytosis, division, contact inhibition of division, fusion, *J. Theo. Biol.* 52(1): 83-97.
- Gaskova D, Sigler K, Janderova B, Plasek J. 1996. Effect of high-voltage electric pulses on yeast cells: factors influencing the killing efficiency. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 39: 195-202.
- Ho SY, Mittal GS. 1996. Electroporation of cell membrane: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.* 16: 349-362.
- Hong SI. 1997. Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide, Ph.D. Thesis, Yonsei University, Korea.
- Hulshager H, Potel J, Niemann EG. 1981. Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiat. Environ. Biophys.* 22: 149-162.
- Hutkins RW, Nannen NL. 1993. pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J. of Dairy Sci.*, 76: 2354-2365.
- Jayaram S, Castle GSP, Margaritis A. 1992. Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* by the application of high voltage pulses. *Biotech. Bioeng.* 40(11): 1412-1402.
- Jayaram S, Castle GSP, Margaritis A. 1993. The effects of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *Lactobacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 117-122.
- Kaneda T. 1991 Iso- and Anteiso-fatty acids in bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* 55(2): 288-302.
- Kolter R. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 855-874.
- Kristina A, Martin L, Bengt RJ, Ulf R. 2001. Inactivation of microorganisms using pulsed electric fields: the influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* 2: 41-54.
- Kristina A, Ulf R. 2001. Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* 2: 105-112.
- Kristina A, Ulf R, Elisabeth B. 2005. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing, *Intl. J. Food Microbiol.* 99: 19-32.
- Kyzlink V. 1990. Principles of food preservation. Elsevier, New York.
- Lin HM, Yang Z, Chen LF. 1993. Inactivation of *Leuconostoc dextranicum* with carbon dioxide under pressure. *Chem. Engin. J.* 52: B29-B34.
- Manas P, Barsotti L, Cheftel JC. 2001. Microbial inactivation by pulsed electric fields in a batch treatment chamber: Effect of some electrical parameters and food constituents. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* 2: 249-249.
- Marquez VO, Mittal GS, Griffiths MW. 1997. Destruction and inhibition of bacterial spores by high voltage pulsed electric field. *J. Food Sci.* 62(2): 1-4.
- Matsumoto Y, Shioji N, Satake T, Sakuma A. 1991. Inactivation of microorganisms by pulse high voltage application. *IEEE Conf. Rec. Ind. Appl. Soc. Anu.* 652-659.
- McDonald LC, Fleming HP, Hassan HM. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(7): 2120-2124.
- McLaggan D, Stephen J, Booth IR. 1998. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Prin. Med. Biol.* 9(1): 65-77.
- Mertens B, Knorr D. 1992. Development of nonthermal processes for food preservation. *Food Technol.* 46(5): 124-129.
- Mizuno A, Hori Y. 1998. Destruction of living cells by pulsed high-voltage application. *IEEE Trans. Ind. Applications* 24(3): 387-394.
- Mliinari P, Pilosof AMR, Jagus RJ. 2004. Effect of growth phase and inoculum size on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in fruit juices, by pulsed electric fields. *Food Res. Intl.*, 37: 793-798.
- Padan E, Zilberstein D, Schuldiner S. 1981. pH homeostasis in bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, 650: 151-166.
- Qin BL, Chang FJ, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. 1995. Nonthermal inactivation of *S. cerevisiae* in apple juice using pulsed electric fields. *Food Sci. Technol.* 28: 564-568.
- Oshima T, Sato M, Saito M. 1995. Selective release of intracellular protein using pulsed electric field. *J. Electrostatics.* 35: 103-112.
- Raso J, Calderon M, Gongora M, Barbosa-Canovas G, Swanson BG. 1998. Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juices by pulsed electric fields. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 31: 668-672.
- Ray B. 1996. Control by new nonthermal methods, In *Fundamental food microbiology*, CRC Press, New York, 441.
- Sale AJH, Hamilton WA. 1967. Effects of high electric fields on micro-organisms I. Killing bacteria and yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 148: 129-138.
- Saravia J, Oliviera JC, Lemos A, Hendrickx M. 1996. Analysis of the kinetic patterns of horseradish peroxidase thermal inactivation in sodium phosphate buffer solutions of different ionic strength. *Intl. J. Food Sci. Technol.* 31: 223-231.
- Shin JK, Pyun YR. 2000. Sterilization of food by high voltage pulsed electric fields, *Korea Food Industry* 33(2): 27-35.
- Sinensky M. 1974. Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71(2): 522-525.
- Stryer L. 1998. *Biochemistry* (3rd ed.) W.H. Freeman & Company, New York.
- Tedeschi H. 1993. The cell membranes. In *cell physiology - molecular dynamics* (2nd), Wm. C. Brown Publishers, Oxford, England.
- Uchida K. 1975. Effects of cultural conditions on the cellular fatty

- acid composition of *Lactobacillus heterohiochii*, an alcoholophilic bacterium. *Agr. Biol. Chem.* 39(4): 837-842.
- Vega-Mercado H, Pothakamury UR, Chang F, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. 1996. Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles. *Food Res. Intl.* 29(2): 117-121.
- Wang DIC, Cooney CL, Demain AL, Dunnill P, Humphrey AE, Lilly MD. 1979. *Fermentation and Enzyme Technology*, John Wiley & Sons, New York.
- Schubert D. 1987. Biophysical approaches to the study of biological membranes. In *Biological membranes - a practical approach*, edited by Findlay, J.B.C. and Evans, W.H., IRL Press, Oxford University.
- Wiggins PM. 1975. Cellular functions of a cell in a metastable equilibrium state. *J. Theo. Biol.* 52(1): 99-111.
- Yiping S. 1996. Inactivation of *Bacillus* spore. In Progress Report, Ohio State University.
- Zhang QH, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. 1995. Inactivation of *E. coli* for food pasteurization by high-strength pulsed electric fields. *J. Food Pro. Preserv.* 19: 103-188.
- Zhang QH, Monsalve-Gonzalez A, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. 1994. Inactivation of *S. cerevisiae* in apple juice by square-wave and exponential-decay pulsed electric fields. *J. Food Proc. Engineer.* 17: 469-478.
- Zimmermann U. 1986. Electrical breakdown, electroporation and electrofusion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 105: 176-250.

(접수 2008년 4월 25일, 수정 2008년 6월 18일, 채택 2008년 6월 30일)