

가열, 고압, 방사선 처리된 빙핵활성세균의 활성 및 물의 동결특성에 미치는 영향

김현정 · 박지용

연세대학교 생명공학과 및 생물산업소재연구센터

Ice Nucleating Activities of Ice Nucleation-Active Bacteria Sterilized with Heat, Pressure and Irradiation, and Their Thermophysical Effects on Water

Hyun-Jeong Kim and Jiyong Park

Department of Biotechnology and Bioproducts Research Center, Yonsei University

Abstract

Four ice nucleation-active bacteria (INA-bacteria), *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Escherichia coli* JM109/pEIN229 and *Gluconobacter oxydans*/pKIN230, were treated with heat, pressure and gamma-irradiation to compare viability and their ice nucleation activity (INA) after sterilization. Gamma-irradiated INA-bacteria showed the least decrease in T90 value (the temperature at which the 90% of drops are frozen). According to cumulative INA spectra, gamma-irradiated INA-bacteria showed little decrease in class A ice nuclei (nucleate H₂O at higher than -5°C), pressurized INA-bacteria showed more than 90% decrease in class A ice nuclei, and heat-treated INA-bacteria barely showed class A ice nuclei. Differential scanning calorimetry (DSC) was used to examine the effect of INA-bacteria on the thermophysical properties of water at freezing temperature. Freezing peaks were appeared at about 11~15°C higher on thermograms and enthalpies of phase change were decreased for the water containing INA-bacteria compared with the pure water, while melting peaks were not shifted. INA measured by DSC method were significantly correlated with INA measured by drop freezing method ($R^2 > 0.993$, $P < 0.0001$), indicating that DSC can be used as a new, simple and precise method for measuring INA.

Key words: ice nucleation-active bacteria, sterilization, differential scanning calorimeter, thermophysical properties

서 론

순수한 물은 통념과는 달리 0°C 이하의 과냉각된 상태에서 -35°C까지 안정한 액체 상태로 존재하는데, 이는 물에서 얼음으로의 상변화는 자유 에너지의 증가를 가져오므로 순간적으로 형성된 얼음 입자는 불안정하여 쉽게 녹아 버리기 때문이다. 그러나 순간적으로 형성되는 얼음 입자가 일정 크기 이상이 되면 물에서 얼음으로의 상변화는 자유 에너지를 감소시키게 되어 자발적으로 얼음 결정이 성장하게 된다. 이와 같이 얼음 성장을 유도하는 일정 크기 이상의 입자를 빙핵(ice nuclei)이라 한다^(1,2). 빙핵이 형성되는 과정은 3가지로 구분되는데, 과냉각된 순수한 물 자체에서 핵이 생성되는

균일빙핵형성(homogeneous ice nucleation), 외부로부터 침입한 이물(異物)의 도움으로 생성되는 불균일빙핵형성(heterogeneous ice nucleation), 그리고 작은 얼음 입자를 투입하여 빙핵을 생성시키는 2차빙핵형성(secondary ice nucleation)이 있다. 균일빙핵형성의 경우 -35°C 이하로 과냉각시켜야 하며, 2차빙핵형성은 0°C 이하의 어떤 온도에서도 일어날 수 있으나, 다른 과정으로 생성시킨 얼음 입자를 넣어 주어야 한다. 그러나 불균일빙핵형성의 경우 -2°C 정도의 비교적 높은 온도에서도 이러한 단점 없이 얼음이 형성될 수 있다⁽³⁾.

늦서리는 농작물의 새싹과 봉오리, 과일나무, 야채, 채소 등에 피해를 주며 이는 자연 현상으로 인식되었다. 그러나 순수한 물방울인 경우 -5°C 보다 높은 온도에서 동결되지 않으나, 식물의 잎에서는 물방울이 -2°C~3°C 정도의 비교적 높은 온도에서도 동결이 일

Corresponding author: Jiyong Park, Department of Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

어나는데 그 원인을 몰랐었다. 후에 과학자들에 의해 식물의 잎에서 *Pseudomonas*속, *Erwinia*속, *Xanthomonas*속 등의 세균이 분리되고, 이들 세균이 높은 빙핵활성을 가진다는 사실이 밝혀지면서, 상해(霜害)의 발생에는 빙핵활성 세균이 관여한다는 것을 알게 되었다. 이들 세균의 성분인 한 단백질이 서리를 형성시키는데 필수적인 물질이며 이 단백질이 빙핵으로서의 기능을 보유함을 알게 되어 이 단백질을 빙핵활성단백질(ice nucleation-active protein, INP)이라 칭하였다^(1,2).

빙핵활성세균은 INP를 생합성하기 위한 유전자를 가지고 있다. 이 유전자정보에 의해 생합성된 단백질의 일차구조는 크게 3개의 부분으로 구성되어 있다. 즉, N-terminal unique domain, Ala-Gly-Tyr-Gly-Ser-Thr-Leu-Thr의 반복적인 염기배열을 가진 repeating domain, C-terminal unique domain으로 구성된다. N-terminal unique domain은 소수성 아미노산으로 구성되어 있어 세포막과의 결합성이 높은 부위이며, repeating domain은 중성 및 수소결합 잔기가 풍부하게 존재하는 친수성 부위로 빙핵활성에 가장 중요한 역할을 한다. C-terminal unique domain은 산성 아미노산과 염기성 아미노산이 많이 존재하는 친수성 부위로 INP 집합체를 형성시켜 더 높은 활성을 나타내게 한다^(1,2).

INP는 얼음 형성 온도 범위에 따라 3가지 부류로 구분된다. 즉, $-2^{\circ}\text{C}\sim-5^{\circ}\text{C}$ 에서 얼음을 형성시키는 A부류, $-5^{\circ}\text{C}\sim-8^{\circ}\text{C}$ 에서 얼음을 형성시키는 B부류, -8°C 이하에서 얼음을 형성시키는 C부류의 3가지 부류가 있다. 여러 개의 INP가 단순히 모여서 C부류가 되고, glucose, mannose 등의 sugar residue가 부착되어 glycoprotein 형태의 B부류가 되며, lipid의 결합으로 발전된 형태가 A부류를 이룬다. 이렇게 translational modification에 의해 구조가 변형되면서 INP는 더 높은 온도에서 빙핵으로서 작용할 수 있다^(4,6). 이러한 INP는 세포 외막에 존재하며, 이 단백질을 생산하는 미생물로는 *Pseudomonas syringae*가 최초로 동정된 이후 *Pseudomonas*속, *Erwinia*속, *Xanthomonas*속 등 13개의 세균이 밝혀지고 있다.

INP는 비교적 높은 온도에서 결빙 작용을 일으켜 농작물 피해의 원인이 되지만, 산업적으로 이러한 현상을 거꾸로 이용할 수 있다. 인공 제설(製雪)시 INP를 첨가하면 더 높은 온도에서 더 많은 양의 눈을 생성시켜 에너지 절감 효과를 거둘 수 있을 뿐만 아니라, 양질의 눈을 생산할 수 있다. 이미 인공 제설에서는 산업화가 이루어져 스키장에서 사용되고 있으며 인공 제빙(製氷)에도 이용하려는 노력이 시도되고 있다. 또한, 이 INP는 매우 적은 양으로도 쉽고 비교적

정확하게 정량될 수 있으므로 방사성 동위원소를 대신하여 signal transmitter로 사용 가능하다^(2,7).

INP의 식품 산업에서의 이용 가능성은 매우 커서 냉동식품, 냉동건조식품, 동결농축, 동결조식화 등에 이용하려는 연구가 일본에서 활발히 진행 중이며^(8,11), 우리 나라에서는 이러한 움직임이 시작 단계에 있다. INP를 식품 산업에 이용하여 얻을 수 있는 장점 중 가장 큰 것은 에너지 절감 효과이다. 현재 동결농축 및 동결건조과정에서 온도를 $-20^{\circ}\text{C}\sim-30^{\circ}\text{C}$ 까지 내려주어야 하지만 INP를 이용할 경우 -5°C 이상의 온도에서도 결빙 작용을 하므로 그 온도 차이만큼 냉각에 필요한 에너지 소비를 감소시킬 수 있다. 또한, 동결농축에서 얼음 결정의 크기 및 모양이 용질과 얼음의 분리에 큰 영향을 미치는데 얼음 결정이 크고 둥근 모양일수록 용질인 고형분의 손실을 줄일 수 있다⁽¹²⁾. INP를 첨가할 경우 이러한 동결농축에 유리한 성질의 얼음 결정을 형성시킬 수 있다는 보고가 있다⁽¹³⁾. 한편, Watanabe 등^(14,17)은 INP를 식품가공단계에 적용하여 기존과 다른 물성을 가진 제품을 제조하였다.

INP를 식품에 직접 이용하기 위해서는 INP를 정제하거나 식품형 미생물로 전환시켜 사용해야 한다. 미생물을 직접 식품에 사용하는 방법으로 사용 전에 살균하거나 고정화시켜 동결후 분리해 내는 방법이 연구중이다^(6,10). Watanabe 등⁽⁷⁾은 빙핵활성세균을 초고압 처리하면 INP의 활성화에 영향을 주지 않고 살균효과를 얻을 수 있다고 보고하고 있다. 빙핵활성 단백질을 분리하여 사용할 경우 균체에 고정되어 있을 때와 비교해서 빙핵활성이 감소하며 산업적으로 대량으로 이용할 경우 복잡한 분리공정으로 인해 비용이 많이 드는 단점이 있다⁽⁸⁾.

그러므로, 본 연구에서는 빙핵활성을 갖는 4개의 균주를 선택하여 빙핵활성세균을 식품에 직접 사용하기 위한 전 단계로서 미생물을 완전 살균하면서 빙핵활성을 최대한 유지시키는 살균방법을 찾기 위하여 가열, 고압, 방사선으로 처리해 살균효과와 빙핵활성 정도를 비교하였다. 또한, 빙핵활성세균의 빙핵활성을 최대한 유지시키면서 완전 살균하는 살균법을 조사하고 이러한 조건에서 살균된 빙핵활성세균의 INP가 빙핵으로서 작용할 때의 열 물리학적 특성을 differential scanning calorimeter를 이용해 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 균주배양

빙핵활성 세균은 한국과학기술원 부설 생명공학연

구소에서 분양 받았으며 균주와 균주에 따른 배양 방법은 다음과 같다.

Pseudomonas syringae AL (KCTC 1832; *P. syringae*로 칭함): GLB 배지(3.3 g Bactopectone, 2.7 g Difco nutrient broth, 2.0 g yeast extract, 2.5 g glycerol/1 L, pH 7.2)로 23°C에서 24시간 배양하였다.

Xanthomonas campestris (*X. campestris*로 칭함): GLB 배지로 23°C에서 24시간 배양하였다.

Escherichia coli JM109/pEIN229 (KCTC 8610P; *E. coli*로 칭함): LB 배지 (1 g Bactopectone, 0.5 g yeast extract, 1 g NaCl/1 L, ampicillin 100 µg/mL, pH 7.3)로 30°C에서 전배양한 후 23°C에서 24시간 본배양하였다. 본배양시 흡광도가 0.4~0.6이 되었을 때 isopropyl thiogalactosidase 250 µM을 첨가하였다.

Gluconobacter oxydans/pKIN230 (KCTC 1091; *G. oxydans*으로 칭함): Mannitol 배지 (5 g yeast extract, 3 g Bactopectone, 25 g mannitol/1 L, kanamycin 50 µg/mL)로 23°C에서 24시간 배양하였다.

빙핵활성의 측정 및 분석

빙핵활성의 측정 및 분석은 Vali^(TM)에 의해 고안된 drop freezing method에 따라 실시하였다. 배양액을 cell 농도가 10⁸ cells/mL가 되도록 0.85% 멸균식염수로 희석한 후, 10⁸배까지 1:10 단계 희석하여 각 희석 단계별로 aluminum block에 5 µL의 drop을 각각 20 drop씩 떨어뜨린 다음 aluminum block의 온도를 분당 0.2°C씩 0°C에서 -12°C까지 낮추면서 각각의 과냉각된 상태에서 동결된 drop의 수를 계산하였다. Cumulative ice nuclei의 수는 아래와 같이 Vali의 공식에 적용하여 계산하였다.

$$N(T)=[\ln(1/F)]10^0/V$$

N(T): cumulative number of ice nuclei

F: fraction of droplets unfrozen at temperature T

V: volume of each droplet

D: number of dilution

또한, 배양액을 cell 농도가 10⁸ cells/mL가 되도록 0.85% 멸균식염수로 희석한 후 5 µL씩 20개의 drop을 떨어뜨린 다음 aluminum block의 온도를 -0.2°C/min 속도로 낮추면서 20개의 drop중 90%가 어는 온도를 T90으로 하여 측정하였다.

살균방법

가열처리: 배양액을 cell 농도가 10⁸ cells/mL가 되게 멸균식염수로 희석한 후, 내경 11 mm, 두께 1 mm, 길

이 98 mm의 시험관에 1 mL씩 넣고 shaking water bath (SW-90MW, Human Science Co., Korea)에서 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C에서 10분간 처리하였다.

초고압처리: 배양액을 cell 농도가 10⁸ cells/mL가 되게 멸균식염수로 희석한 후, polyethylene bag에 5 mL씩 넣고 초고압기(MFP-7000, Mitsubishi Co., Japan)로 1000 kg/cm², 2000 kg/cm², 3000 kg/cm², 4000 kg/cm²에서 각각 5분간 고압 처리하였다.

방사선처리: 배양액을 cell 농도가 10⁸ cells/mL가 되게 멸균식염수로 희석한 후, plastic tube에 1 mL씩 담아 Co⁶⁰으로 흡수선량이 0.2 kGy, 0.4 kGy, 0.6 kGy, 0.8 kGy, 1.0 kGy가 되도록 각각 0.5 kGy/h로 조사하였다.

생균수 측정

*P. syringae*와 *X. campestris*는 GLB 배지에 도말하여 24°C에서 24시간 배양하였고, *E. coli*는 LB 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였으며, *G. oxydans*은 Mannitol 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양 후 생균수를 측정하였다.

Differential scanning calorimetry (DSC)

배양액을 cell 농도가 10⁵ cells/mL이 되도록 멸균식염수로 희석한 뒤, 흡수선량이 *G. oxydans*와 *E. coli*는 0.8 kGy, *P. syringae*와 *X. campestris*는 1.0 kGy가 되게 Co⁶⁰으로 조사하여 살균하였다. 방사선 조사된 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거하고 증류수 1 mL를 넣었다. Sample 3~7 mg을 gold pan (지름 4 mm, 높이 2 mm)에 담아 캡슐화한 다음 differential scanning calorimeter (DSC-12160, Polymer Laboratory Thermal Science, U.K.)의 sample chamber로 옮기고, chamber를 액체질소가스를 이용해 10°C/min로 -40°C까지 냉각시킨 후 5분간 온도를 유지하여 완전히 결정을 형성시킨 후, 같은 속도로 다시 상온까지 가열하였다. 이때 분석기 내부는 기체질소가스를 흘려보내어 수분 등에 의한 영향이 배제되도록 했다. Reference로 빈 sample pan을 사용하였고, 냉각 및 가열과정의 온도를 자동으로 기록하였다. DSC thermogram으로 부터 어는점(Tf), 녹는점(Tm) 등을 구하는 방법을 Fig. 1에 나타내었다.

결과 및 고찰

빙핵활성세균의 빙핵활성능 비교

빙핵활성능(ice nucleation activity; INA)은 배양온도, 배지의 조성, 배양시간, genotype 등에 따라 변한

다고 보고되고 있다^(20,21). 빙핵활성능은 빙핵의 수와 밀접하게 관련되며, 이는 빙핵활성단백질의 양과 빙핵활성능이 서로 비례관계가 있음을 의미한다. 일반적으로 낮은 온도에서의 배양이 INP의 합성을 유도한다고 알려지는데, 본 실험에서도 더 많은 빙핵을 생산하기 위해서 배양온도를 생육 최적 온도보다 10°C 이상 낮은 23°C에서 배양하였다.

Fig. 2은 4종류의 빙핵활성세균의 빙핵활성을 cumulative INA spectrum으로 나타낸 것이다. -5°C 이상에서 빙핵으로 작용하는 A부류는 mL당 *E. coli*가 10⁴개 정도, *X. campestris*와 *P. syringae*가 10⁶개 정도, *G. oxydans*의 경우 10⁸개 정도가 존재하며, -8°C 이상에서 빙핵으로서 작용하는 B부류는 *E. coli*와 *G. oxydans*가 10⁶~10⁷개, *P. syringae*, *X. campestris*가 10⁷~10⁸개가 존재하였다. -8°C 이하에서 빙핵으로서 작용하는 C부류는 *E. coli*와 *G. oxydans*는 10¹⁰개 정도, *P. syringae*와 *X. campestris*는 10⁹개 정도가 존재하였다. *E. coli*와 *G. oxydans*는 INP유전자를 가지고 있는 plasmid가 각각 transformation과 conjugation된 것으로 유전자 재조합 기술을 통해 높은 빙핵활성을 가지도록 하였다. 각 균주의 cumulative INA spectrum을 살펴본 결과, *E. coli*가 가장 많은 A부류의 빙핵을 생산하였으며, 안정된 빙핵활성을 보여 주었다.

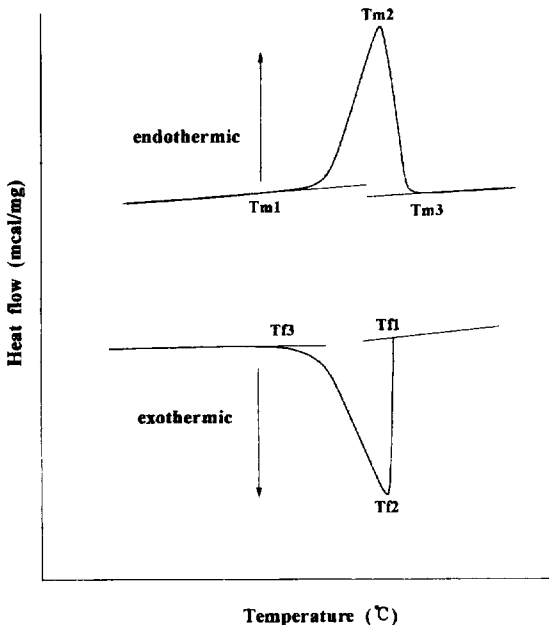


Fig. 1. Temperature determination from DSC curve. T1: temperature at which DSC curve leaves the baseline, T2: peak temperature, T3: temperature at end of peak.

가열에 의한 빙핵활성세균의 살균

살균방법으로 흔히 쓰이는 것이 열처리에 의한 것인데, 열처리가 빙핵활성세균의 사멸 및 빙핵활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 미생물의 배양액을 시험관에 담은 후 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C에서 10분간 열처리한 후 생균수 및 INA를 측정하였다 (Fig. 3). INA는 T90값으로 나타내었으며, 초기의 생균수를 10⁸ cells/mL로 조정하였다. 열처리 전 T90값은 균주에 따라 -3°C~-4°C의 범위에서 존재하였다. 처리한 온도가 증가할수록 생균수와 T90값은 감소하여 4종류의 균 모두 70°C에서 10분간 열처리한 결과 사멸되었고 이때의 T90값은 *P. syringae*의 경우 -10.9°C, *X. campestris*의 경우 -7.4°C, *E. coli*의 경우 -9.7°C, 그리고 *G. oxydans*의 경우 -9.4°C였다. 이것은 열처리전과 비교해 볼 때, -4°C~-7°C정도가 감소한 것으로 열처리에 의하여 단백질인 INP가 크게 변성하여 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 살균되는 지점에서 활성이 가장 높은 *X. campestris* 경우에도 T90값이 -3.7°C에서 -7.4°C로 3.7°C가 감소된 것을 보아, 가열에 의한 살균방법은 INP의 활성을 유지시키려는 목적에서 볼 때 적합하지 않은 것을 알 수 있다.

초고압에 의한 빙핵활성세균의 살균

비가열적 살균방법으로 최근 주목받고 있는 것이 초고압살균이다. 1980년대에 식품가공에 이용할 수 있는 초고압기의 제조가 가능해지면서, 압력을 이용한 식품의 조리, 살균 및 보존성을 연장시키기 위한 연구가 활발히 진행 중이다. 초고압 살균원리는 여러 요소의 복합적인 작용에 의한 것으로 여겨지는데, 가

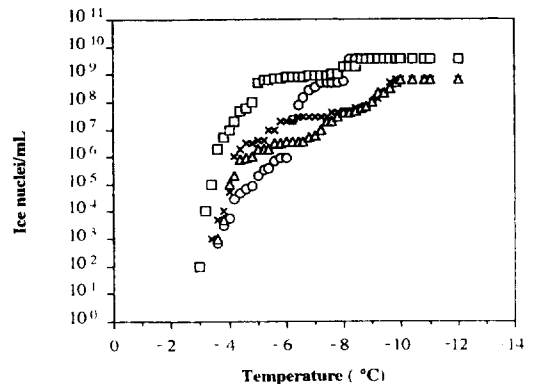


Fig. 2. Comparison of cumulative ice nucleation activity spectrum of four ice nucleating bacteria. □-□: *E. coli*, ×-×: *P. syringae*, △-△: *X. campestris*, ○-○: *G. oxydans*.

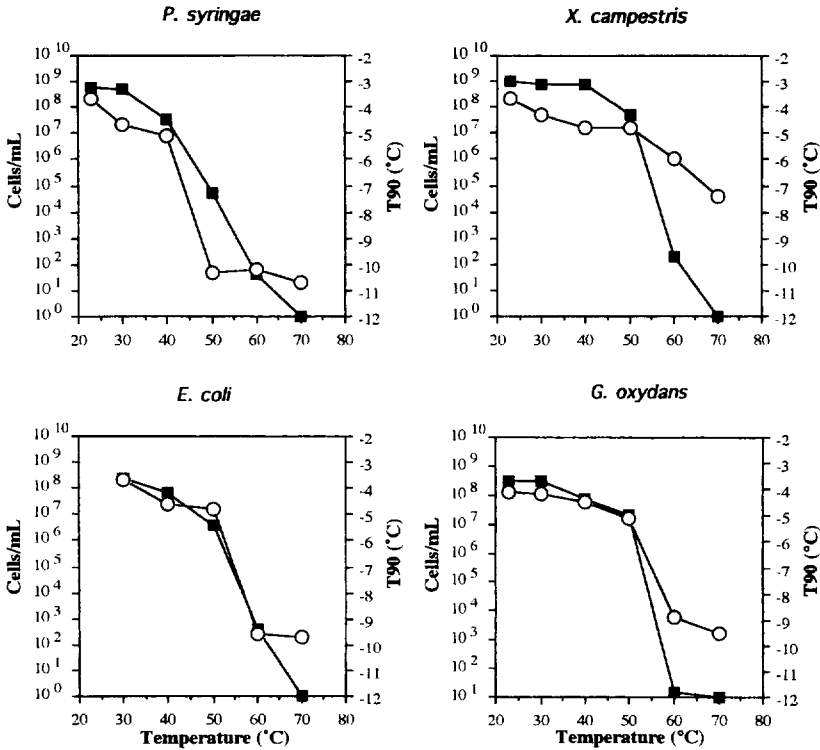


Fig. 3. Viabilities (cells/mL) and ice nucleation activities (T90) of four ice nucleating bacteria after heat treatment. ■—■: Viability (cells/mL), ○—○: T90 (°C).

장 중요한 영향은 세포막 투과성의 변화에 의한 것이다. 즉, 압력에 의한 세포막의 부분파괴와 잇따른 세포 내 물질의 유출에 의해 세포가 사멸된다고 본다^(22,23). 이러한 초고압 처리에 의해 균이 사멸되는 정도와 그에 따른 빙핵활성의 변화를 알아보기 위해 1000, 2000, 3000, 4000 kg/cm²에서 각각 5분간 처리한 후 생균수 및 INA (T90)를 측정하였다(Fig. 4).

균주에 따라 살균점과 활성감소 정도에 차이를 보여 *P. syringae*와 *X. campestris*는 3000 kg/cm² 이상에서 5분 처리시, *E. coli*와 *G. oxydans*은 4000 kg/cm² 이상에서 5분 처리시 완전히 사멸되었다. 같은 처리조건을 고려할 때 *E. coli*와 *G. oxydans*이 압력에 대해 *X. campestris*와 *P. syringae*에 비해 저항성이 크다고 할 수 있다. T90값은 -4.5°C~-5°C의 범위에 분포하였는데 이것은 처리전과 비교해 0.5°C~1°C정도 감소한 값으로 T90값으로 빙핵활성을 나타내었을 때 초고압처리가 빙핵활성세균의 살균방법으로 사용 가능하다는 것을 보여주었다.

방사선 조사에 의한 빙핵활성세균의 살균

비가열 살균 방법으로 향신료, 육류, 과일류 등의 식

품보존에 방사선 조사가 사용된다. 방사선은 세포의 DNA나 RNA에 직접 작용하여 분자파괴를 일으키거나, 세포성분 중에서 큰 부분을 차지하고 있는 물을 전리에 의해 분자수준의 변화를 일으키고 그로 인해 염색체를 만드는 물질에 유해한 화학물을 생성시킨다. 이 유해작용은 세포의 구조 및 기능에 변화를 일으켜 세포분열 및 유지를 불가능하게 하여 균을 사멸시킨다^(24,25).

본 실험에서는 빙핵활성세균의 방사선 조사를 통한 살균가능성을 알아보기 위해 감마선에 의한 식품조사시 가장 흔히 사용되는 Co⁶⁰을 source로 하여 흡수선량이 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 kGy가 되도록 조사한 후 생균수 및 INA (T90)를 측정하였다(Fig. 5). 균주에 따라 차이를 보여 *X. campestris*와 *P. syringae*는 흡수선량이 1.0 kGy가 될 때 모두 사멸되었으며, *E. coli*와 *G. oxydans*은 흡수선량이 0.8 kGy가 될 때 모두 사멸하였다. 각 살균점에서의 T90값은 -4.1°C~-4.4°C에 분포하였으며, 이는 처리전과 비교할 때 0.3°C~0.7°C정도 감소한 값이다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 세 가지 살균방법 중 방사선 조사에 의한 살균시 T90값으로 빙핵활성을 나타내었을 때 빙핵활성의 감소가 처

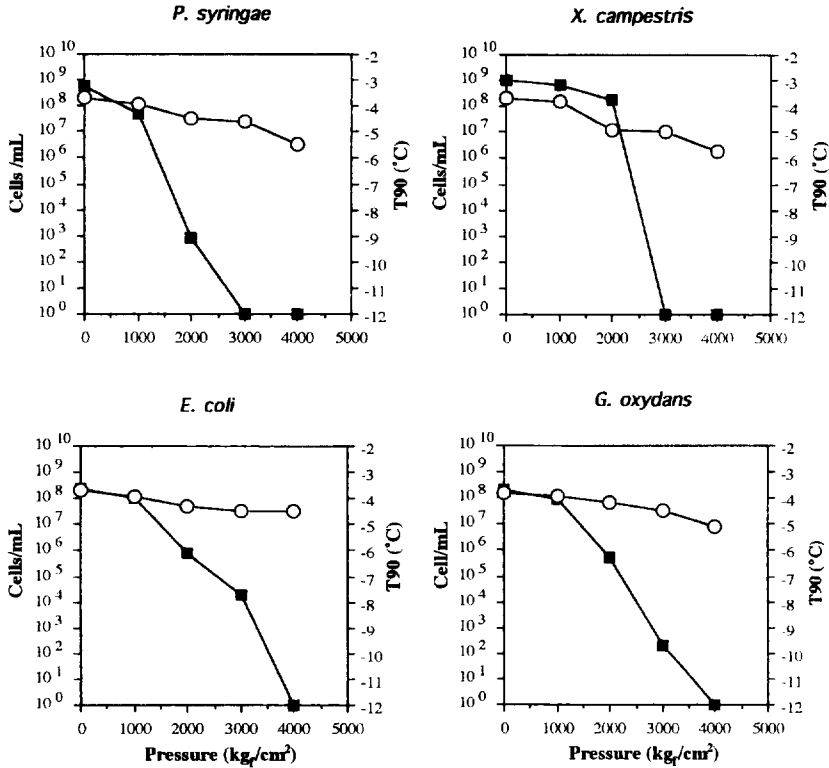


Fig. 4. Viabilities (cells/mL) and ice nucleation activities (T90) of four ice nucleating bacteria after pressure treatment. ■—■: Viability (cells/mL), ○—○: T90 (°C).

리 전에 비해 가장 적었다.

각 살균점에서 본 cumulative INA spectrum

살균법에 따른 빙핵활성을 좀 더 자세히 비교해 보기 위해 각 살균점에서의 빙핵활성을 cumulative INA spectrum으로 나타내었다(Fig. 6). 균주에 따라 각 살균처리방법에 의해 변화되는 빙핵활성은 차이를 나타내었는데, 높은 온도(-5°C 이상)에서 빙핵으로 작용하여 에너지 절감을 목적으로 식품산업에 이용할 때 중요하게 여겨지는 A부류(-5°C 이상에서 빙핵으로 작용)를 기준으로 살펴보면, *E. coli*의 경우는 방사선 조사에 의해 그 빙핵활성이 감소되지 않았고 초고압처리에 의해 빙핵수가 mL당 10⁸에서 10⁷개로 99%정도 감소하였다. *X. campestris*의 경우 방사선 조사에 의해 mL당 10⁸개에서 10⁷개로 90%정도 감소하였고, 초고압처리 후 10⁴개로 크게 감소하였다. *G. oxydans*의 경우 방사선 조사에 의한 빙핵활성에 감소는 없었고, 초고압에 의해 10⁵개에서 10⁴개로 90%가 감소하였다. *P. syringae*의 경우 방사선조사에 의해 mL당 10⁸개에서 10⁷개로 90%가 감소하였고, 초고압처리에 의해 10³개

로 크게 감소하였다. 전체적으로 방사선조사에 의한 활성감소가 가장 적었고, 초고압에 의해 90% 이상 활성이 감소되었으며, 열처리에 의해 A부류의 빙핵은 거의 존재하지 않았다.

B부류(-5°C~8°C에서 빙핵으로서 작용)의 빙핵수는 *E. coli*의 경우 방사선 및 초고압처리에 의해 감소되지 않았으며, *X. campestris*의 경우 방사선조사에 의한 빙핵수의 감소는 없었고, 초고압처리에 의해 99% 이상 빙핵수가 감소하였다. *P. syringae* 경우 역시 방사선조사에 의한 빙핵수의 감소는 없었지만 초고압처리에 의해 90% 이상 빙핵수가 감소하였다. *G. oxydans*는 초고압, 방사선처리에 의해 모두 90% 정도 빙핵수가 감소하였다. 한편, 열처리에 의해 *E. coli*의 경우 99% 정도 감소하였고 *X. campestris*, *P. syringae*, *G. oxydans*의 경우에는 거의 존재하지 않게 되었다(0~10¹개).

C부류는 *E. coli* 및 *G. oxydans*의 경우 가열, 초고압, 방사선처리에 의해 감소되지 않았고, *X. campestris*와 *P. syringae*는 살균 방법에 따라 빙핵수가 90~99%가 감소하였다.

이와 같이 A와 B부류의 빙핵은 열에 대해 매우 불

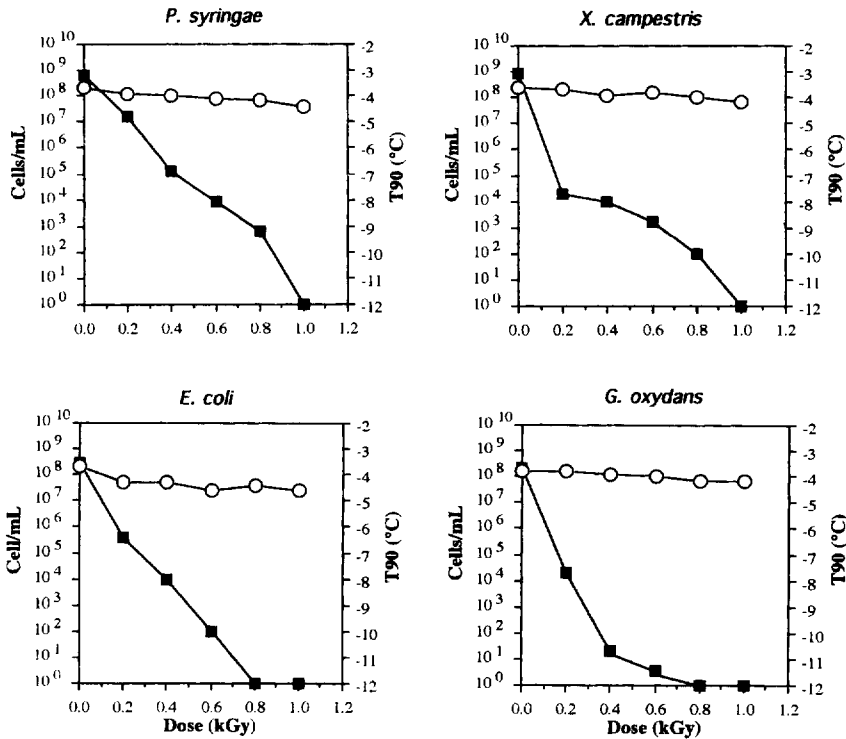


Fig. 5. Viabilities (cells/mL) and ice nucleation activities (T90) of four ice nucleating bacteria after gamma-irradiation. ■—■: Viability (cells/mL), ○—○: T90 (°C).

안정하며, 방사선 및 초고압에 의해 다소 영향을 받지만, C부류의 빙핵은 이러한 처리과정에 대해 비교적 안정하여 방사선 및 초고압 뿐만 아니라 열처리 후에도 처리전과 비교해 다른 부류에 비해 큰 차이가 없었다. 또한, 살균처리 후 A와 B부류 빙핵수의 감소가 큰 경우에도 -8°C 이하에서 cumulative ice nuclei의 수가 같아지는 것으로 보아 A와 B부류 빙핵이 처리과정에서 C부류로 구조가 전환됨을 알 수 있다.

빙핵활성세균을 산업적으로 이용하기 위해서는 높은 온도(-5°C 이상)에서 빙핵으로 작용하는 A부류의 빙핵수가 중요한데, 위의 결과를 종합해 볼 때 *E. coli*를 방사선 처리한 경우 10⁷ ice nuclei/mL으로 가장 빙핵수가 많았다. 그러므로 산업적으로 빙핵활성세균을 대량 생산하여 식품산업에 이용하기 위해서는 *E. coli*를 배양하여 방사선 조사를 통해 살균하여 사용하는 것이 가장 효율적이라 여겨진다.

한편, Watanabe 등⁽¹⁷⁾은 초고압처리시 빙핵활성세균의 INA 감소가 거의 없다고 보고하였는데, 본 실험에서는 초고압처리에 의해 빙핵활성세균의 INA가 90% 이상 감소하는 결과를 나타냈다.

Differential scanning calorimetry (DSC)

Fig. 7은 농도가 10⁵ cells/mL인 빙핵활성세균을 흡수선량이 0.8 kGy (*G. oxydans*와 *E. coli*의 경우)와 1.0 kGy (*P. syringae*와 *X. campestris*의 경우)가 되도록 방사선 살균한 후 DSC를 이용해 thermogram을 측정하여 비교한 것이다. 냉각시 얼음이 형성되면서 일어나는 발열반응과 가열시 얼음이 녹으면서 일어나는 흡열반응으로 인해 두 개의 peak가 생성되었는데, 시료의 종류에 따라 peak의 생성 온도와 형태가 다르게 나타났다. 냉각시 빙핵활성세균을 넣은 증류수의 경우 순수한 증류수보다 11°C~15°C 정도 높은 온도에서 넓은 범위에서 완만하게 열이 방출되었지만, 가열시에는 시료간의 peak의 생성 온도 및 형태의 차이가 적었다. 일반적으로 액체의 고형분이 증가할수록 peak의 폭이 넓어지는 현상이 나타나는데^(26,27) 이것과 같은 현상으로 빙핵활성세균이 증류수에 첨가되어 고형분과 같은 역할을 하여 나타나는 결과라 할 수 있다.

시료에 따라 peak가 생성되기 시작하는 온도(T1), peak가 최대가 될 때의 온도(T2), peak가 소멸될 때의 온도(T3), 발열량(ΔHf) 및 흡열량(ΔHm)을 Table 1에

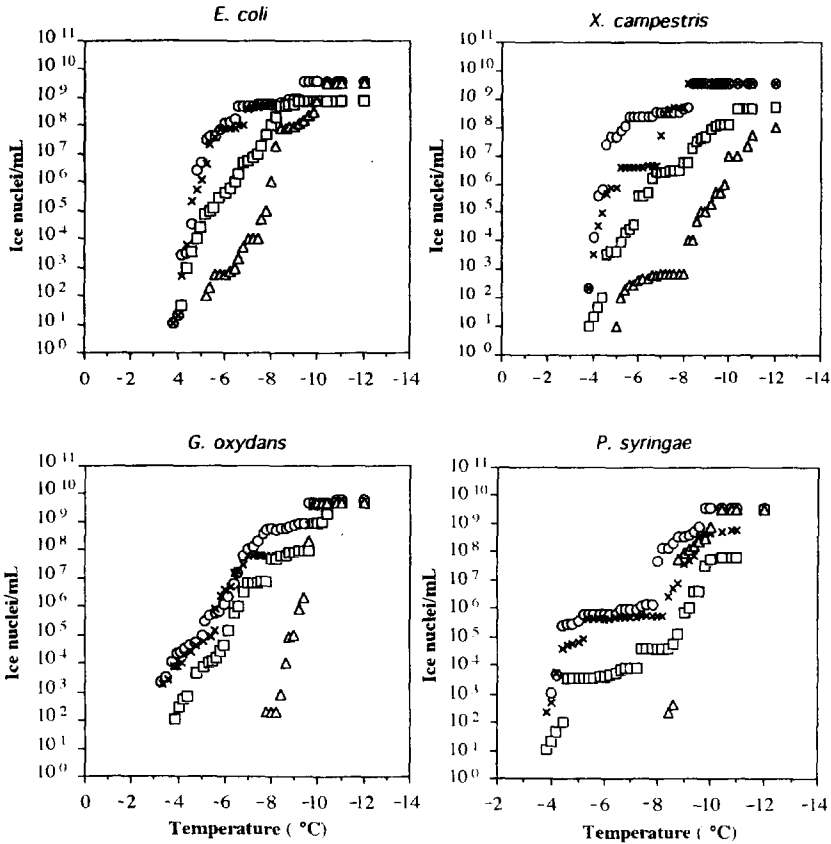


Fig. 6. Comparison of cumulative ice nucleation activity spectrum of four ice nucleating bacteria after heat, pressure, and gamma-irradiation treatment. ○—○: control, ×—×: gamma-irradiation (0.8 kGy for *E. coli* and *G. oxydans*; 1.0 kGy for *P. syringae* and *X. campestris*), □—□: pressure (3000 kg/cm² for *P. syringae* and *X. campestris*; 4000 kg/cm² for *E. coli* and *G. oxydans*), △—△: heat (70°C).

Table 1. Effect of four ice nucleating bacteria on the thermogram of water

Sample	Freezing				Melting			ΔHm ⁸⁾ (mcal/mg)
	Tf1 ¹⁾ (°C)	Tf2 ²⁾ (°C)	Tf3 ³⁾ (°C)	ΔHf ⁴⁾ (mcal/mg)	Tm1 ⁵⁾ (°C)	Tm2 ⁶⁾ (°C)	Tm3 ⁷⁾ (°C)	
<i>P. syringae</i>	-0.0	-1.8	-8.5	63.5	-2.5	9.0	20.6	57.0
<i>X. campestris</i>	-1.8	-2.1	-8.6	63.8	0.6	9.4	19.9	59.1
<i>G. oxydans</i>	-4.8	-4.6	-13.9	67.6	-1.2	1.6	21.2	61.6
<i>E. coli</i>	-0.8	-1.5	-10.9	57.4	0.4	10.4	20.7	50.7
Water	-15.6	-16.0	-29.3	70.3	1.9	8.0	12.3	68.2

¹⁾Temperature at which exothermic curve appears.

²⁾Peak temperature of the exothermic curve.

³⁾Temperature at which exothermic curve disappears.

⁴⁾Enthalpy change of freezing.

⁵⁾Temperature at which endothermic curve appears.

⁶⁾Peak temperature of the endothermic curve.

⁷⁾Temperature at which endothermic curve disappears.

⁸⁾Enthalpy change of melting.

나타내었다. 첨가한 균주에 따라 값에 차이를 보였는데, Tf1(냉각중 peak가 생성되는 온도)값의 경우 *P. syringae*와 *E. coli*가 각각 0.0°C, -0.8°C로 상대적으로

높은 값을 나타내었고, *X. campestris*가 -1.8°C, *G. oxydans*가 -4.8°C로 가장 낮은 온도에서 peak가 나타나기 시작했다. 이 값은 앞 실험에서 cumulative INA

spectrum으로 나타난 INA의 경향과 일치하는 것으로, cell 농도를 일정하게 조정하였을 때(예비실험을 통해 균주간 활성의 차이를 가장 잘 나타내는 농도를 10^5 cells/mL로 정함) A부류 빙핵의 수가 가장 적었던 *G. oxydans*이 가장 낮은 온도에서 발열을 시작하였다. 한편, 빙핵활성세균을 포함하지 않은 증류수의 경우 Tf1값이 -15.6°C 으로 가장 높은 Tf1값과 비교해 볼 때 15.6°C 의 차이를 보였다. 완전히 얼음을 생성시킨 후 다시 같은 속도로 가열하였을 때 모두 0°C 부근에서 ($-2.5^{\circ}\text{C}\sim 1.9^{\circ}\text{C}$) 흡열을 시작하였다. Tf값에 비해 Tm 값은 첨가된 빙핵활성세균의 종류에 따라서 큰 차이 ($-2.5^{\circ}\text{C}\sim 0.6^{\circ}\text{C}$)를 나타내지 않았고, 빙핵활성세균의 첨가여부에 따라 두 집단으로 나누어 t-test를 한 결과 t값이 0.98로 두 집단간의 Tm1(가열시 peak가 생성되기 시작하는 온도)의 차이는 없었다. 즉, 통계적으로 빙핵활성세균의 첨가는 물의 녹는점에는 큰 영향을 주지 않았다. 발열량(ΔHf)과 흡열량(ΔHm)은 빙핵활성세균을 포함하지 않은 증류수의 경우 각각 70.3 mcal/mg 과 68.2 mcal/mg 이었고, 빙핵활성세균을 포함한 경우 모두 이 보다 낮은 값을 나타내었다. 앞서 언급하였듯이 빙핵활성세균이 증류수에 첨가되어 고형분의 역할을 하는데, 고형분의 함량이 증가할수록 발열량 및 흡열량이 감소한다^(27,28). 또한 발열온도와 흡열온도가 다르고 발열량 측정후 다시 흡열량을 측정하는 과정에서 일부 수분의 손실로 인해 흡열량이 발열량과 동일하지 않고 작은 값을 나타내었다고 여겨진다.

Thermogram을 측정한 시료와 동일한 시료의 T50 및 T90값을 측정하였다(Table 2). T90값과 T50값은 DSC로 측정한 Tf1값과 비교할 때 $2^{\circ}\text{C}\sim 3^{\circ}\text{C}$ 낮았으며 T90값과 T50값의 차이는 $0.2^{\circ}\text{C}\sim 0.6^{\circ}\text{C}$ 였다. Tf1, T50

Table 2. Ice nucleation activities¹⁾ of four ice nucleating bacteria measured by two different methods (DSC and drop freezing method)

Sample	Tf1 ²⁾ ($^{\circ}\text{C}$)	T50 ³⁾ ($^{\circ}\text{C}$)	T90 ⁴⁾ ($^{\circ}\text{C}$)
<i>P. syringae</i>	-0.0 ± 0.0	-3.3 ± 0.1	-3.7 ± 0.1
<i>X. campestris</i>	-1.7 ± 0.2	-4.7 ± 0.1	-5.3 ± 0.3
<i>G. oxydans</i>	-4.5 ± 0.3	-6.7 ± 0.1	-7.1 ± 0.1
<i>E. coli</i>	-0.7 ± 0.2	-3.5 ± 0.1	-3.9 ± 0.1
Water	-15.1 ± 0.9	-17.7 ± 0.3	-18.1 ± 0.3

¹⁾Average value \pm standard error of mean.
²⁾Temperature at which exothermic curve appear in thermogram measured by DSC.
³⁾Temperature at which 50% of drops are frozen in drop freezing method.
⁴⁾Temperature at which 90% of drops are frozen in drop freezing method.

및 T90값은 균주에 따라 다양하게 나타났지만 각 균주에 따라 3가지 값이 비슷한 경향을 나타냄을 알 수 있다. Tf1과 T50 및 T90의 상관관계를 알아보기 위해 R^2 값을 구한 결과 Tf1과 T50은 0.9945 ($P<0.0001$), Tf1과 T90은 0.9938 ($P<0.0001$)로 매우 높은 상관 관계를 가

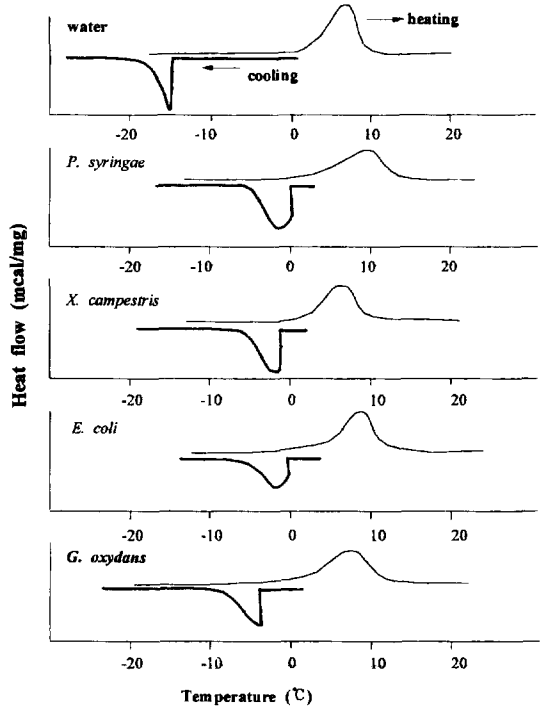


Fig. 7. Effects of four ice nucleation-active bacteria on thermogram of water.

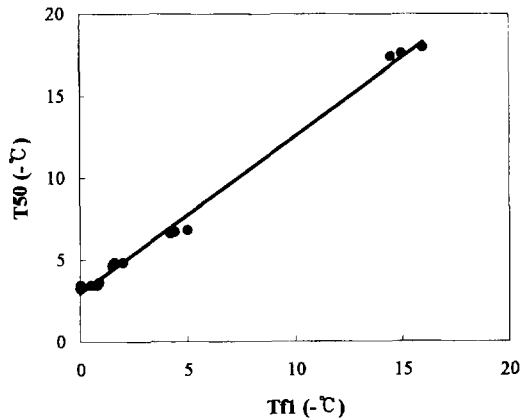


Fig. 8. Relationship between Tf1 (the temperature at which exothermic curve appears) and T50 (the temperature at which 50% of drops are frozen) of the four ice nucleation-active bacteria and water.

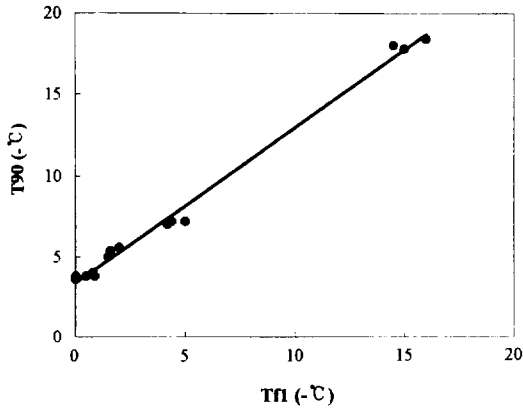


Fig. 9. Relationship between Tfl (the temperature at which exothermic curve appears) and T90 (the temperature at which 90% of drops are frozen) of the four ice nucleation-active bacteria and water.

지고 있음을 나타내었다(Fig. 8과 Fig. 9). 따라서, INA를 drop freezing 방법 대신 DSC를 이용하여 간편하고 정확하게 측정할 수 있다는 것을 알 수 있다.

요 약

INP를 포함한 빙핵활성세균을 식품 가공 단계에 직접 이용하기 위해 빙핵활성을 최대한 유지시키면서 완전 살균하는 방법을 찾기 위해 가열, 고압, 방사선으로 처리한 후 생균수 및 빙핵활성을 측정하였다. 균주는 *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*와 INP유전자를 포함한 plasmid가 재조합된 *Escherichia coli JM109/pEIN229*, *Gluconobacter oxydans/pKIN230*를 사용하였다. 빙핵활성을 T90 (drop의 90%가 어는 온도)으로 나타내었을 때 방사선 조사시 0.3°C~0.7°C, 초고압 처리시 1°C~2°C, 가열 처리시 4°C~7°C가 감소하여 방사선 조사에 의한 살균시 빙핵활성의 감소가 가장 적은 것으로 나타났다. 각 살균점에서의 cumulative ice nucleation activity spectra를 측정한 결과 A부류의 빙핵(-5°C 이상에서 빙핵으로 작용)의 수는 방사선처리시 거의 감소가 없었으며 초고압처리시 90% 이상 감소하였으며 가열처리시 존재하지 않았다. 증류수에 방사선조사로 살균된 빙핵활성세균을 첨가한 후 DSC를 이용해 thermogram을 얻었다. 빙핵활성세균을 첨가하지 않은 증류수보다 11°C~15°C 정도 높은 온도에서 발열 피크가 형성되기 시작했으나 흡열 피크는 큰 차이를 보이지 않았으며, 발열량 및 흡열량은 감소했다. 한편, DSC를 이용해 측정된 빙핵활성은 drop freezing method에 의해 측정된 값과 높은 연관성($R^2 >$

0.993, $P < 0.0001$)을 보여 간편하고 정확한 빙핵활성 측정법으로의 사용 가능성을 제시했다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 생명공학연구소의 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

문 헌

- Hew, C.L. and Yang D.S.C.: Protein interaction with ice. *Eur. J. Biochem.*, **203**, 33 (1992)
- Wolber, P.K.: Bacterial ice nucleation. *Adv. Microbial Physiol.*, **34**, 203 (1993)
- Maki, L.R. and Willoghby K.J.: Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei. *J. Appl. Meteorol.*, **17**, 1049 (1973)
- Turner, M.A., Arellano, F. and Kozloff, K.M.: Three separate classes of bacterial ice nucleation structures. *J. Bacteriol.*, **172**(5), 2521 (1990)
- Kajaya, A.V. and Lindow, S.E.: A model of the three dimensional structure of proteins. *J. Mol. Biol.* **232**, 709 (1993)
- Govindarajan, A.G. and Lindow, S.E.: Size of bacterial ice-nucleation sites measured in situ by radiation inactivation analysis. *Biochem.*, **85**, 1334 (1988)
- Gurian-Sherman, D. and Lindow, S.E.: Ice nucleation and its application. *Current Opinion in Biotechnology*, **3**, 303 (1992)
- Watanabe, M. and Arai, S.: Freezing of water in the presence of the ice nucleation active bacterium, *Erwinia ananas*, and its application for efficient freeze-drying of foods. *Agric. Biol. Chem.*, **51**(2), 557 (1987)
- Honma, K., Makino, T. Kumeno, K., and Watanabe, M.: High-pressure sterilization of ice nucleation-active *Xanthomonas campestris* and its application to egg processing. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(7), 1091 (1993)
- Watanabe, M. and Arai, S.: Bacterial ice-nucleation activity and its application to freeze concentration of fresh foods for modification of their properties. *J. Food Eng.*, **22**, 453 (1994)
- Arai, S. and Watanabe, M.: Freeze texturing of food materials by ice-nucleation with the bacterium *Erwinia ananas*. *Agric. Biol. Chem.*, **50**(1), 169 (1986)
- Hartel, R.W. and Espinel, L.A.: Freeze concentration of skim milk. *J. Food Eng.*, **20**, 101 (1993)
- Kawahara, H., Mano, Y. and Obata, H.: Purification and characterization of extracellular ice-nucleating matter from *Erwinia uredovora* KUIN-3. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(9), 1429 (1993)
- Watanabe, M., Kumeno, K., Nakahama, N. and Arai, S.: Heat-induced gel properties of freeze-concentrated egg white produced using bacterial ice nuclei. *Agric. Biol. Chem.*, **54**(8), 2055 (1990)
- Kumeno, K., Nakahama, N., Honma, K., Makino, T. and Watanabe, M.: Production and characterization of a

- pressure-induced gel from freeze-concentrated milk. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(5), 750 (1993)
16. Watanabe, M., Arai, E., Kumeno K. and Honma, K.: A new method for producing a non-heated jam sample: The use of freeze-concentration and high-pressure sterilization. *Agric. Biol. Chem.*, **55**(8), 2175 (1991)
 17. Watanabe, M., Makino, T., Kumeno, K. and Arai, S.: High-pressure sterilization of ice nucleation-active bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, **55**(1), 291 (1991)
 18. Watanabe, S., Hirata, K.A., Emori, Y., Watanabe, M. and Arai, S.: Large-scale production and purification of an *Erwinia ananas* ice nucleation protein and evaluation of its ice nucleation activity, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(4), 603 (1993)
 19. Vali, G.: Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquid. *J. Atmospheric Sci.*, **28**, 402 (1971)
 20. Yankofsky, S.A., Levin, Z., Bertold T. and Sandlerman, N.: Some basic characteristics of freezing nuclei. *J. Appl. Meteorol.*, **20**, 1013 (1981)
 21. Obata, H., Nakai, T., Tanishita, J. and Tokuyama, T.: Identification of an ice-nucleating bacterium and its ice nucleation properties. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**(3), 143 (1989)
 22. Mertens B. and Knorr, D.: Developments of nonthermal process for food preservation. *Food Technol.*, **46**(5), 124 (1992)
 23. Metrick, C., Hoover, D.G. and Forkas, D.F.: Effect of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive of *Salmonella*. *J. Food Sci.*, **54**(6), 1547 (1989)
 24. Ito, H. and Abu, M.Y.: Study of Microflora in malaysian dried fishes and their decontamination by gamma radiation. *Agric. Biol. Chem.*, **49**(4), 1047 (1985)
 25. 정운혁 편 : 방사선 동위원소 및 방사선 취급기술, 청문각 (1994)
 26. Lau, A.K., March, A.C., Lo K.V. and Cumming, D.B.: Physical properties of celery juice, *Can. J. Agric. Eng.*, **34**(1), 105 (1992)
 27. Lovric, T., Pilizota, V. and Janekovic, A.: DSC study of the thermophysical properties of aqueous liquid and semi-liquid foodstuffs at freezing temperatures, *J. Food Sci.*, **52**(3), 772 (1987)

(1996년 10월 16일 접수)