

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 *Lactobacillus plantarum*의 불활성화

신해헌 · 변유량

연세대학교 생명공학과 및 생물산업소재연구센터

Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by High Voltage Pulsed Electric Fields Treatment

Hae-Hun Shin and Yu-Ryang Pyun

Department of Biotechnology and Bioproducts Research Center, Yonsei University

Abstract

Lethal effects of high voltage pulsed electric fields (PEF) on suspensions of *Lactobacillus plantarum* cells in phosphate buffer solution were examined by using continuous recycle treatment system. Critical electric field strength and treatment time needed for inactivation of *L. plantarum* were 13.6 kV/cm and 16.1 μ s at room temperature, respectively. As decrease in frequency (decreasing pulse number), the degree of inactivation of *L. plantarum* was increased. A 2.5 log reduction in microbial population could be achieved with an electric field strength of 80 kV/cm, 300 Hz frequency and 2000 μ s treatment time. Survivability was decreased with increase in total treatment time (cycle number) and frequency at the same cycle number. As sterilization model of continuous recycle PEF treatment, $\log S = -N_m \log m + B$ and $N_m = k_1 P_n + k_2$ were established. This model was very well fitted to the empirical data. The rate of inactivation increased with increase in the processing temperature. The maximum reduction in survivability (5.6 log reduction) was obtained with 80 kV/cm electric field strength at 50°C for 1000 μ s treatment.

Key words: High voltage pulsed electric fields (PEF), *Lactobacillus plantarum*, inactivation

서 론

식품산업에서 열처리 기술은 유통기간의 연장과 식품의 안정성을 유지하기 위한 수단으로서 널리 사용되고 있다. 그러나 가열조작에서는 영양성분의 파괴, 텍스처의 변화, 향기성분의 손실 등이 발생되어 식품 품질의 감소를 가져오게 된다. 따라서 식품포장 및 가공조작에서 여러 가지 비열가공기술이 개발되고 있다. 현재 고전압 펄스전기장(high voltage pulsed electric fields, PEF), 진동전기장, 초고압 또는 이들의 병합 기술에 대해 많은 연구가 진행되고 있다^(1,2).

펄스전기장(PEF) 처리는 가열 살균조작에서 발생하는 풍미, 맛, 영양성분의 파괴를 일으키지 않으면서 미생물을 불활성화할 수 있다. 이는 미생물이 펄스폭이 약 1 μ s 정도의 매우 짧은 고전압 전기장에 놓이게 되면 세포막 사이에 전위차가 유도되고 전하를 띤 분자 사이의 반발력에 의하여 세포막에 pore가 생기게 되며 비가역적으로 교란이 일어나 사멸되는 것으로 알

려져 있다^(2,3). 미생물이 매우 짧은 처리시간 동안에 전기장 하에 놓이게 되면 electroporation에 의하여 막투과성이 변하며, transmembrane voltage가 1V 이하일 경우에는 전기장이 없어지면 본래 상태로 돌아가지만 1V 이상이면, 이러한 반응은 비가역적으로 일어나 미생물이 사멸하게 된다. Hamilton과 Sale 등⁽⁴⁾을 비롯한 많은 연구자들이 PEF를 이용하여 미생물 불활성화를 연구하였다. PEF에 의한 치사효과는 전기장세기와 처리시간^(5,7)과 밀접한 관계가 있으며, 처리액의 온도도 중요한 함수로 보고되고 있다^(3,6).

PEF 처리는 미생물을 불활성화시키는 효과적인 비열살균기술이지만, 장치면에서 최대전기장에 한계가 있기 때문에 2~5 log 만큼 균수를 감소시키는 것이 일반적이다⁽³⁾. 전기장 세기는 미생물을 불활성화 시키는 데 펄스폭(pulse duration) 보다 중요한 역할을 하기 때문에 전기장 세기를 증가시키고 펄스폭을 감소시키면 펄스에너지를 증가시키지 않고 보다 효과적으로 미생물을 불활성화시킬 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 자체 제작한 연속식 재순환 고전압 펄스전기장 장치를 이용하여 발효식품의 주요 산패

Corresponding author: Yu-Ryang Pyun, Department of Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

원인균인 젖산균(*Lactobacillus plantarum*)의 불활성화에 미치는 전기장 세기, 처리시간, 주파수, 처리온도 등의 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917이며, MRS lactobacill broth 55, sodium azide 0.2, bromocresol purple 0.1 g/L의 조성을 가진 선택배지를 사용하여 배양하였다. 배지 50 mL에 37 °C에서 24시간 동안 전배양한 균체를 200 mL 배지에 2% (v/v) 접종한 후 37°C에서 진탕배양하였다. 대수증식기의 균체를 사용하기 위하여 24시간 배양한 배양액(균수는 약 1×10^8 CFU/mL)을 8000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0.845/0.186 mM, pH 7.0, 전기전도도 $\sigma=180 \mu\text{S}/\text{cm}$)로 세척한 후 같은 완충액에 재현탁하여 실험에 사용하였다.

고전압펄스전기장(PEF) 발생장치

본 실험에서 사용한 PEF 장치는 저비용의 펄스 발생장치(pulse generator)와 treatment를 설계, 제작하였다. Pulse power 처리 장치는 25 kV D.C. high voltage generator와 static 또는 circular treatment chamber로 구성되어 있다(Fig. 1).

입력전원 220 V A.C.를 high voltage transformer를 사용하여 전압을 올린 후 정류하였으며, D.C. high

voltage supply는 7.2 μF capacitor ($1800 \text{ pF} \times 4$)에 inductance를 통하여 resonance charging 하였다. Power source는 25 kV, 1000 A를 출력할 수 있도록 하였으며, capacitor는 corona와 arching을 방지하기 위하여 oil에 담았다. 고전압 펄스는 thyatron을 통하여 7.2 μF capacitor의 방전에 의하여 발생되며, 처리용기내의 전극 사이에 pulsed electric field (exponential decay pulse)를 생성시킨다.

펄스전기장(PEF) 처리

PEF 처리는 disposable electroporation cuvettes(Bio-Rad, USA)을 이용하여 실시하였으며, exponential decay pulse의 펄스폭(τ)은 1 μs 로 일정하게 하였다. Cuvettes는 전극간격(d)이 0.1 cm인 것과 0.2 cm인 것을 사용하였으며, 이때 cuvette내의 고전압전기장이 걸리는 전극부위의 부피(chamber)는 각각 0.072 및 0.504 mL이다. 전극간격 0.1 cm 전극에 걸어줄 수 있는 최대 전기장세기는 100 kV/cm이었으며, 본 실험에서는 80 kV/cm를 모든 실험에서 사용하였다.

균체 현탁액 12 mL를 시료저장용기에 넣은 후 peristaltic pump로 0.517 mL/sec의 속도로 PEF 처리 chamber로 흘러보내면서, 정해진 전기장과 주파수에서 일정한 시간동안 처리하였다. 시료 저장용기의 온도는 water bath를 이용하여 일정하게 유지하였다.

생존율의 측정

PEF 처리전후의 생균수를 한천평탄을 이용하여 pour plate method로 측정하여, CFU/mL로 나타낸 후

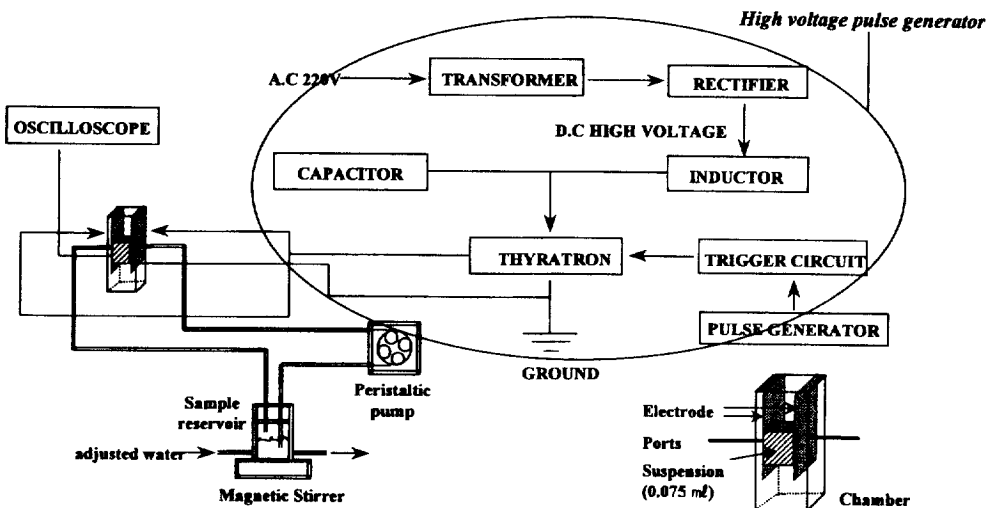


Fig. 1. Block diagram of high voltage pulsed power treatment system.

에 초기 균체수(N_0)와 PEF 처리후의 균체수(N)의 비로 생존율(S)은 나타내었다. 즉, $S=N/N_0$ 로 하였으며, 생존수를 측정할 때 한천평판상의 colony수가 10~200개가 나오도록 희석하였으며, 각 희석배수에서 3번 반복하여 측정하였다. 살균율(sterility)은 생존율의 역수로 나타내었다.

총처리시간의 계산⁽⁹⁾

연속식 재순환 처리장치에서의 PEF 총처리시간을 계산하기 위해서는 펄스수(P_n)와 한 사이클당 처리시간(t)을 먼저 계산해야 한다.

각 처리에서 한 사이클당 처리시간(reservoir내의 전해액이 chamber를 한 번 통과되는 시간)은 다음과 같이 주어진다.

$$t = \frac{P_n}{\tau}, \quad P_n = \frac{fV}{m} \tag{1}$$

여기서 t 는 한 사이클당 처리시간(μs)이며 P_n 은 한 사이클당 펄스수, f 는 주파수(Hz), τ 는 펄스폭(pulse duration time (μs)), V 는 chamber내의 부피(mL), m 는 유속(mL/sec)이다.

그러므로 m cycle동안의 총처리시간($T, \mu s$)은

$$T=mt \tag{2}$$

로 계산된다.

살균 모델식

연속재순환 PEF 처리: 연속 재순환 처리에 의한 살균 모델식으로는 다음과 같이 생존율(S)을 사이클수(m)와 펄스수(P_n)의 함수로 표현하였다.

$$\log S = -N_m \log m + B' \tag{3}$$

여기서 N_m 은 사이클수 계수(coefficient of cycle number)로서 펄스수의 함수로서 기울기를 의미하며, 경계조건은 $m \leq 3$ 인 경우에 $S=S_m$ 이며 S_m 은 임계 사이클수($m_c=3$) 이하에서의 생존율을 의미한다. 절편인 B' 은 $m=3, S=S_m$ 일 때의 상수값이다.

기울기인 N_m 은 펄스수와 다음과 같은 관계를 나타낸다.

$$N_m = k_1 P_n + k_2 \tag{4}$$

여기서 k_1, k_2 는 펄스수 계수(coefficient of pulse number)이다.

전기장세기와 처리시간: 전기장세기에 대한 생존율은 일반적으로 다음 식을 사용하여 표현된다⁽⁷⁾.

$$\log S = B_E (E - E_c) \tag{5}$$

여기서 B_E 는 전기장 세기 계수로서 regression coefficient이며, E_c 는 임계전기장세기(kV/cm)이다.

또한 처리시간에 대한 의한 생존율은 다음과 같이 나타내어진다.

$$\log S = B_T \log \left(\frac{T}{T_c} \right) \tag{6}$$

여기서 B_T 는 처리시간 계수이며, T 는 처리시간, T_c 는 임계처리시간(μs)이다.

결과 및 고찰

전기장세기에 따른 살균율

*L. plantarum*을 pH 7.0의 phosphate 완충액에 현탁시킬 때 PEF 처리에 적합한 완충액의 농도를 결정하기 위하여 이온농도를 다르게 하여 실험한 결과, 0.2 M 농도(전기전도도는 12000 $\mu S/cm$)에서 PEF 처리 시에 spark가 전극 사이에서 발생되며 살균효과가 감소하였다. Jayaram 등⁽¹⁰⁾은 phosphate 완충액의 농도를 변화시켜 170~2230 $\mu S/cm$ 의 전기전도도 범위에서 실험하였을 때, 전기전도도가 감소함에 따라 살균효과가 증가하는 것으로 보고하였다. 따라서 phosphate 완충액에서 살균효과를 높이기 위해서 이후의 실험에서는 Jayaram등이 사용한 $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (0.845/0.186 mM, pH 7.0) 완충액을 사용하였으며 이때 전기전도도는 170 $\mu S/cm$ 였다.

일반적으로 PEF 처리에 의하여 미생물을 불활성화시킬 때 영향을 주는 인자는 전기장 세기(E)와 처리시간으로서 특히 전기장 세기가 큰 영향을 미친다고 보고⁽⁸⁾되었으며, 미생물의 크기가 클수록 그 효과는 큰 것으로 알려져 있다^(11,12). 이는 세포막의 전위차(transmembrane potential)가 미생물의 크기가 증가함에 따라 커져 미생물의 불활성화가 증대되는 것으로 설명하고 있다.

전기장 세기가 *L. plantarum*의 불활성에 미치는 효과를 검토하기 위하여, 주파수는 300 Hz, 총처리시간은 300 μs 로 고정시킨 후에 전기장세기를 변화시키면서 실험하여 Fig. 2에 나타내었다. 전기장 세기가 20 kV/cm 이하일 때에는 살균효과가 관찰되지 않았다. 식 (5)를 이용하여 *L. plantarum*이 살균되기 시작하는 최소 전기장세기인 임계전기장 세기(E_c)를 외삽한 결과 13.6 kV/cm였다. 이 이상의 전기장세기에서는 전기장의 세기가 증가할수록 지수적으로 살균효과는 증가하였으며 80 kV/cm의 전기장세기에서는 약 2 log

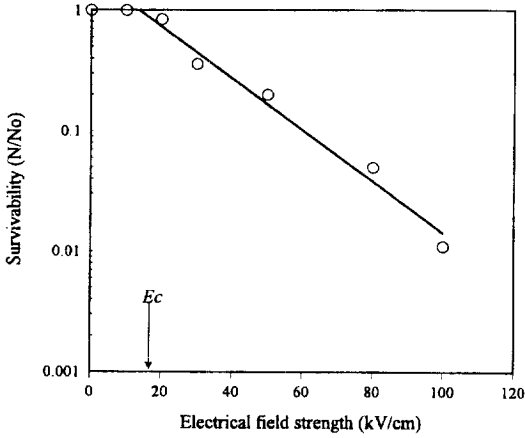


Fig. 2. Effect of electrical field strength on inactivation of *L. plantarum* suspended in phosphate buffer at 25°C using 1 μs pulse width. Frequency=300 Hz, treatment time=300 μs.

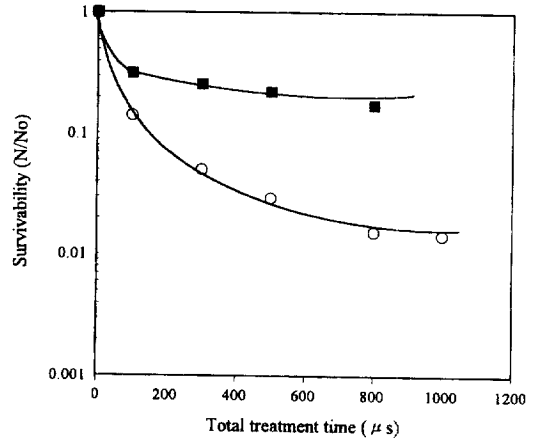


Fig. 3. Effect of total treatment time on inactivation of *L. plantarum* suspended in phosphate buffer under different electrical field strength. Frequency=300 Hz. ■—■: 30 kV/cm, ○—○: 80 kV/cm.

정도의 살균효과를 나타내었다. Grah 등⁽⁷⁾은 *L. brevis*의 경우 sodium-alginate 배지내에서 임계전기장 세기는 12.1 kV/cm인 것으로 보고하였으며, Jayaram 등⁽⁸⁾은 phosphate buffer 배지에서 2.2~7.6 kV/cm인 것으로 보고한 것과 비교하여 볼 때 본 실험은 상대적으로 높은 임계 전기장세기를 나타내었다. 또한 기울기인 B_E 는 -0.0214 cm/kV 로 *L. brevis*⁽⁷⁾의 -0.348 cm/kV 에 비하여 매우 작은 값을 보여 전기장 세기의 증가가 미생물의 불활성화에 미치는 효과가 낮았다. 이는 미생물 군주가 다른데 기인할 뿐만 아니라 본 실험이 회분식 처리방식이 아닌 연속식 재순환 처리이기 때문인 것으로 판단되었다.

처리시간의 영향

처리시간에 따른 *L. plantarum*의 불활성화를 살펴 보기 위하여 주파수를 300 Hz로 고정시키고, 전기장 세기를 30과 80 kV/cm로 하여 시간에 따른 생존율을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 임계전기장의 세기보다 약간 높은 30 kV/cm에서는 처리시간 100 μs일 때 초기균수의 약 70%가 사멸되었으나 그 이상 처리하여도 생존율은 큰 차이를 보이지 않았다. 한편 전기장 세기가 80 kV/cm로서 높은 경우에는 처리시간 300 μs까지 비교적 급속히 생존수가 감소하였으나 그 이후 1000 μs까지는 완만히 감소하여 약 2 log 만큼 생존수가 감소하였다. Jayaram 등⁽⁸⁾은 처리시간의 영향을 검토한 결과 $\log\{\log(N/No)\}$ 는 처리시간에 비례한다고 보고하였다. 본 연구에서도 $\log(N/No)$ 와 $\log T$ 는 직선적으로 감소하여 식 (6)에 적용하여 임계처리시간

T_c 를 구한결과 16.09 μs였다. 또한 Fig. 2에 나타난 것처럼 $\log(N/No)$ 가 전기장 세기 E에 비례한 것과 비교하여 볼 때 균체 불활성에 미치는 전기장세기가 처리 시간 보다 영향이 크다는 것을 알 수 있다.

주파수 변화에 따른 살균효과

연속 재순환 살균 처리를 할 때 주파수의 영향을 살펴보기 위하여 전기장세기를 80 kV/cm로 고정시키고 주파수를 300에서 부터 1000 Hz로 변화시키면서 실험하였다. Fig. 4를 살펴보면 주파수가 작을수록 살균 효과가 증가하였다. 한편 각 주파수에서 처리시간이

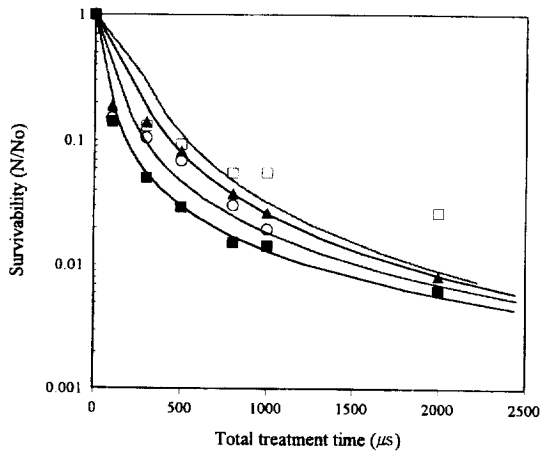


Fig. 4. Effect of pulse application number on inactivation of *L. plantarum* suspended in phosphate buffer at 80 kV/cm. Solid line is simulation data by equation (3). ■—■: 300 Hz, ○—○: 500 Hz, ▲—▲: 800 Hz, □—□: 1000 Hz.

Table 1. Changes in pH of *L. plantarum* suspension in phosphate buffer (pH 7.0) after pulsed electric field treatment under electric field strength is 80 kV/cm

Frequency (Hz)	Total treatment time (μs)	pH	Frequency (Hz)	Total treatment time (μs)	pH
300	100	7.03	800	100	7.09
	300	6.94		300	6.95
	500	6.84		500	6.87
	800	6.90		800	6.77
	1000	6.95		1000	6.94
	2000	7.00		2000	7.04
	3000	6.92		3000	7.01
500	100	6.85	1000	300	6.79
	300	6.84		500	6.69
	500	6.83		800	6.78
	800	6.79		1000	6.74
	1000	6.96		2000	6.88
	2000	7.04			
	3000	7.04			

증가함에 따라 생존율이 지수함수적으로 감소되어, 총처리시간이 300 μs이하에서는 생존율이 급격히 감소하다가 처리시간이 증가함에 따라 완만하게 감소하였으며, 주파수 300 Hz서 2000 μs 처리하였을 때 약 2.5 log의 생존수가 감소하였다(살균율>99.5%). 이와 같이 각 주파수에서 log(N/No)와 처리시간과의 관계가 직선이 아닌 것은 *L. plantarum*의 생존율에 대한 균체농도의 효과로 설명된다. 즉, 균체농도가 높으면, 균체표면의 전하에 의하여 큰 미생물 덩어리 형성이 용이하게 되며, 이에 따라 지름이 커지게 되어 임계 전위차(transmembrane voltage)가 작아지게 되어 살균율이 증가하게 되며, 표면 전하에 의하여 독립된 군보다는 전기적 파괴가 증가하게 된다⁽¹⁰⁾.

PEF 처리전후의 pH 변화를 측정한 결과(Table 1) 거의 변화가 없었으며, 1000 Hz에서도 0.3 이하의 변화를 보였다. Potter⁽¹³⁾는 전극부근에서 buffer 등의 전기분해에 의한 pH 변화가 균체사멸에 중요한자라고 설명하고 있으나, Jayarama 등의 실험⁽⁸⁾에서와 본 실험에서도 pH는 거의 변화되지 않아서 *L. plantarum*의 불활성화와의 관계가 없음을 나타내고 있다. 또한 pH 변화가 적기 때문에 PEF 처리시에 전기분해물에 의한 오염이 발생되지 않았음을 알 수 있었다.

동일한 시간 처리했을 때 주파수가 작을수록 살균 효과가 큰 것으로 나타나 각 주파수에서 세포현탁액의 재순환 사이클수(m)에 따른 생존율을 실험하였다(Fig. 5). 사이클 수가 5 이하인 경우에는 주파수에 따른 차이가 나타나지 않지만, 사이클수가 증가함에 따라 주파수가 증가할수록 살균율이 증가하였다. 이는 같은 현상은 주파수가 커지게 되면, 펄스수가 증가하여(식 (1)) 결과적으로 총처리시간이 증가하게 됨으로

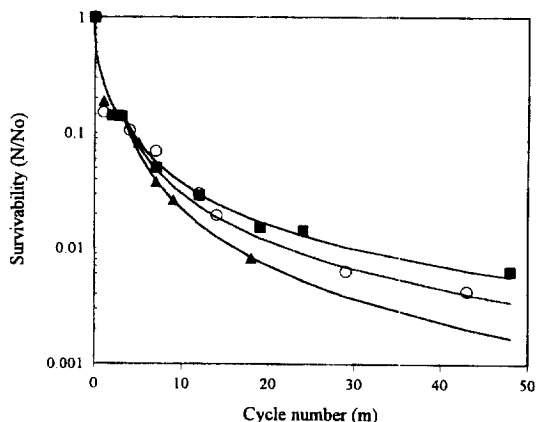


Fig. 5. Effect of cycle number on inactivation of *L. plantarum* suspended in phosphate buffer at different pulse application number (frequency). Solid line is simulation data by equation (3) and (7). ■—■: 300 Hz, ○—○: 500 Hz, ▲—▲: 800 Hz.

써, 살균율이 증가되는 것이다. 또한, 같은 총처리시간 일 때 주파수가 증가할수록 살균효과가 감소하는 것은 펄스전기장에 노출되는 시간은 동일하지만, 사이클 당 처리시간(t)은 주파수가 증가함에 따라 커지게 된다. 즉, 주파수가 큰 것은 전기적 처리를 상대적으로 주파수가 작은 것에 비하여 연속적으로 받는 효과를 가지게 된다. 따라서, *L. plantarum*의 살균효과는 펄스 전기장에 연속적으로 노출되는 것보다는 약간의 시간 간격을 두고 노출되는 것이 효과가 있음을 나타내고 있다.

이러한 효과를 설명하기 위하여, 동일한 처리시간에서, 펄스수에 따른 생존율을 나타내었다(Fig. 6). 그

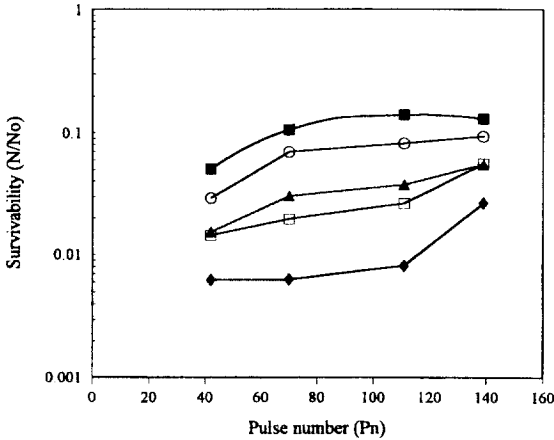


Fig. 6. Effect of pulse application number on inactivation of *L. plantarum* suspended in phosphate buffer for different treatment time at 80 kV/cm. Treatment time: ■—■: 300 μ s, ○—○: 500 μ s, ▲—▲: 800 μ s, □—□: 1000 μ s, ◆—◆: 2000 ms.

림에서 동일한 펄스수에서는 처리시간이 증가할수록 생존율은 감소하였으며, 같은 처리시간에서는 펄스수가 증가할수록 생존율이 증가하였다. 펄스수 P_n 은 주파수와 처리 양에 비례하고, 유속(m)에 반비례하게 되므로(식 (1)), 본 실험에서는 처리부피와 유속을 고정시켰기 때문에 펄스수는 주파수에 비례하게 된다. 즉, 주파수 증가에 따라 생존율은 증가하는 것이다(Fig. 4). 회분식 처리 시는 펄스수가 곧 총처리시간이 되므로, 처리시간이 증가함에 따라 살균율이 증가되는 현상인 반면에, 연속식 재순환 처리 시에는 사이클당 처리시간은 펄스수에 비례하지만(식 (1)), 총처리시간(T)은 사이클수(m)와 t의 곱이므로(식 (2)), 펄스수와 처리시간은 정비례하지 않게 되어 다른 현상을 나타내는 것으로 판단되었다.

펄스수의 효과를 관찰하기 위하여 같은 주파수와 같은 총처리시간에서 전극간격을 0.1, 0.2 cm로 변화시켜 실험하였다. 이는 전극간격이 증가하면, 전기적 처리를 받는 부피(V)가 0.072에서 0.504 cm^3 으로 7배 증가하며, 이에 따라 펄스수가 증가하게 된다. 예로 300 Hz의 경우에 전극간격이 0.1에서 0.2 cm로 증가하게 되면 펄스수는 42에서 292로 증가하게 된다. 또한 동일한 총처리시간에서도 전극간격이 크면 사이클수는 감소하게 된다.

Fig. 7에서 동일한 주파수임에 불구하고, 전극간격이 2배로 증가되면, 살균율은 급격히 감소하여 1 log 이상의 차이를 나타내었다. 따라서, Fig. 5에서 주파수 변화에 따른 살균율의 차이는 펄스수의 차이에 의한

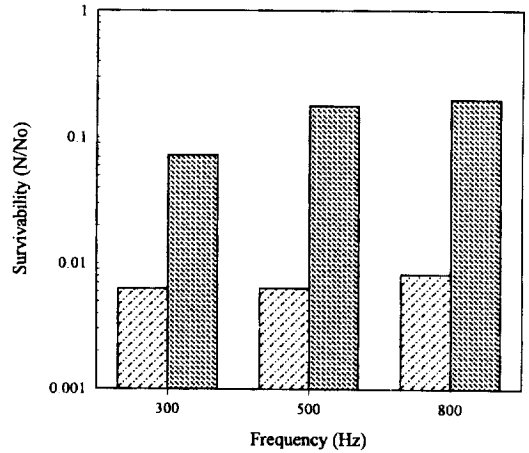


Fig. 7. Comparisons of inactivation of *L. plantarum* suspended in phosphate buffer between different electrode distance. ▨: 0.1 cm, ▩: 0.2 cm ($E=80$ kV/cm, treatment time=2000 μ s).

것으로 판단되었다.

살균 모델식

연속재순환 PEF에 의한 *L. plantarum*의 생존율은 Fig. 4와 같이 주파수에 의해 차이를 보이며, 이는 펄스수 차이에 의한 것으로 설명하였다(Fig. 7). 따라서 연속식 PEF 처리에 의한 *L. plantarum*의 살균모델을 제안하고자 사이클수(m)에 log를 취하여 나타낸 결과(Fig. 8) 사이클수가 3인 점에서부터 시작하여 사이클수가 증가함에 따라 생존율(S)이 직선적으로 감소하였으며, 주파수 증가에 따라 기울기(N_m)가 증가하였

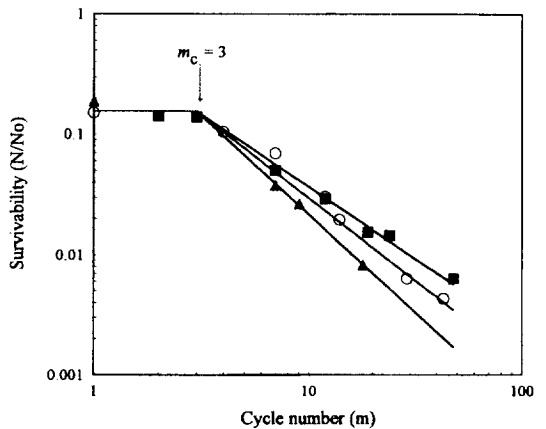


Fig. 8. Survivability of *L. plantarum* suspended in phosphate buffer as a function of cycle number. Solid line is simulation data of equation (4) m_c is critical cycle number. Frequency: ■—■: 300 Hz, ○—○: 500 Hz, ▲—▲: 800 Hz.

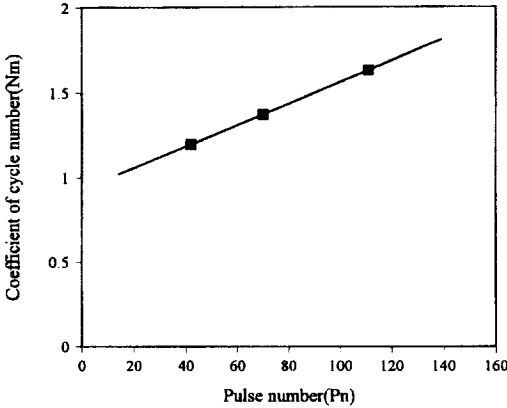


Fig. 9. Relationship of pulse number and coefficient of cycle number by equation (7).

다. 따라서 연속재순환 처리시에는 최소한 3번 이상 처리액이 chamber를 통과하여야만 살균효과가 나타남을 의미하고 있으며, 사이클수가 3이하에서의 생존율(S_m)은 15.5%를 보이고 있다. 위와 같은 결과로부터 사이클수 3이상의 경우 연속재순환 PEF 처리에 의한 살균모델로 다음과 같은 식을 적용할 수 있다.

$$\log S = -N_m \log m + B' \quad (3)$$

또한 기울기인 N_m 은 주파수인 펄스수(P_n)에 따라 다음과 같은 관계를 나타내었다(Fig. 9).

$$N_m = 0.006307 P_n + 0.931471 \quad (R^2 = 0.99994) \quad (7)$$

식 (7)을 이용하여 각 펄스수(P_n)에서의 N_m 을 계산하고, 식 (3)에 대입하여 사이클수에 따른 생존율을 Fig. 8에 실선으로 나타낸 결과 실험결과와 잘 일치하였으며, 또한 사이클수로 부터 총처리시간을 계산하여(식 (1)) 생존율을 계산하여 Fig. 4에 실선으로 표시하였다. 그림에서 1000 Hz의 경우에는 예측값과 많은 차이를 보이는 데 이는 높은 주파수에서는 에너지의 많은 반복처리로 인하여 bubble과 열의 발생으로 인하여 살균율이 이론값에 비하여 낮은 값을 보이는 것으로 판단되었다⁽⁹⁾.

이상의 모델식을 이용하여 연속식 PEF처리에 의한 *L. plantarum*의 생존율에 미치는 펄스수와 처리시간과의 관계를 3차원으로 표현하여 Fig. 10에 나타내었다.

처리온도에 따른 효과

PEF 처리에 의한 미생물의 불활성화 연구에서 전기장세기 및 처리시간이 중요한 인자이지만, 이외에 pH와 처리온도 등을 결합하여 처리하여 그 효율을 높이

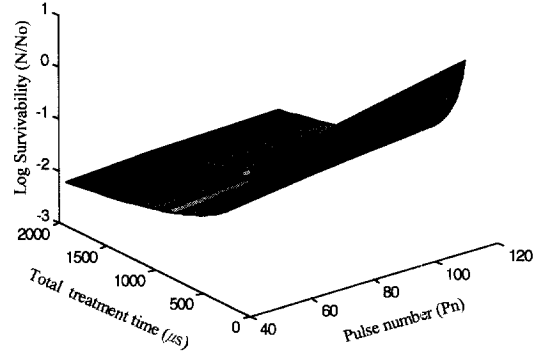


Fig. 10. Survivability of *L. plantarum* suspended in phosphate buffer as functions of total treatment time and pulse number at 80 kV/cm.

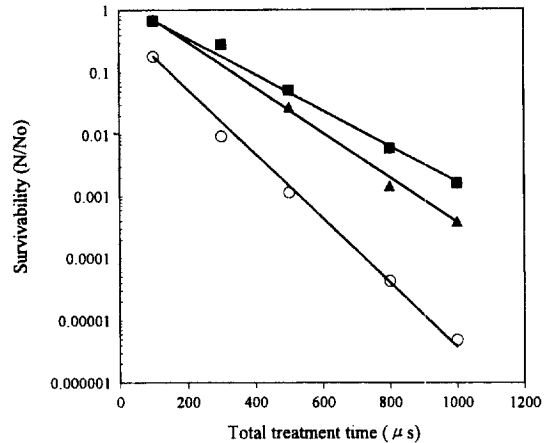


Fig. 11. Effect of temperature on inaction of *L. plantarum* suspended in phosphate buffer. E=80 kV/cm, frequency=300 Hz. ■—■: 30°C, ▲—▲: 40°C, ○—○: 50°C.

는 연구가 보고⁽¹⁴⁾되고 있다. pH의 경우 알칼리보다는 산성에서, 그리고 온도는 증가될수록 그 효과가 증가된다^(3,14,15). 본 실험에서도 처리온도의 효과를 보기 위하여 전기장세기와 주파수를 고정시키고, 열에 의한 치사효과를 배제하기 위하여 처리온도를 치사온도 이하인 30, 40, 50°C로 변화시키면서 PEF 처리를 하여 *L. plantarum*의 생존율을 측정하였다(Fig. 11). 그 결과 온도가 상승함에 따라 생존율이 감소하여 50°C, 1000 µs 처리 시에 5.6 log까지 생존수가 감소되었다. 이는 온도증가에 따라 균체 사멸속도가 증가된 다른 보고^(6,15)와 동일한 결과이다. 즉, 50°C에서의 사멸속도(k)가 0.0052 µs⁻¹로 30, 40°C의 0.0029, 0.0036 µs⁻¹ 보다 약 2배 이상 큰 값을 보이고 있어, PEF 처리 시에 전기장세기, 처리시간 이외에 온도를 증가시키므로서 균체

불활성화를 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

Jayaram 등⁽⁸⁾은 *L. brevis*의 온도에 대한 영향을 검토하고 시료의 온도가 상승하면 시료의 전기전도도가 증가하여 펄스폭이 감소하며 그 결과 전기장에 노출되는 시간이 감소하게 된다. 이와 같은 영향으로 24~45°C 범위에서 살균율은 온도에 큰 영향을 받지 않았으며, 온도가 증가하면 오히려 살균율이 약간 감소하는 경향을 보였다고 보고하였다. 그러나 30 kV/cm 이하의 비교적 낮은 전기장 세기에서는 전기전도도의 감소효과가 상대적으로 큰 영향을 미치나 본 연구와 같이 높은 전기장 세기 조건에서는 온도에 의한 세포막에 미치는 영향이 더욱 큰 것으로 생각된다. 즉 균체 현탁액 시료의 온도는 균체막의 유동성에 큰 영향을 미친다. 저온에서는 세포막의 인지질은 밀집하게 충전된 rigid gel 구조를 가지고 있으나 온도가 높아지면 세포막은 약간 느슨한 구조의 liquid crystalline 구조를 가진다. 또한 온도가 상승하면 지방의 측면 확산 속도가 증가하게 되어 세포막 이중층의 두께가 감소하게 되고 따라서 고온에서는 상대적으로 세포막은 파괴되기 쉬어진다. 즉 고온에서 막의 이와 같은 변화는 고전압 전기장에서는 세포막 지질층의 구조적 변화를 촉진하여 결과적으로 비가역적 전기적 파괴를 가져오고 따라서 osmotic shock을 받아서 세포의 사멸이 촉진된다.

요 약

발효식품의 산패 주원인인 *Lactobacillus plantarum*을 비열 살균 기술인 고전압 펄스전기장(High Voltage Pulsed Electric Fields, PEF) 처리에 의하여 불활성 시키고자 연속재순환 처리가 가능한 장치를 이용하여 *L. plantarum*의 불활성에 미치는 전기장 세기, 주파수, 처리시간, 온도 등에 관하여 연구하였다. *L. plantarum*의 불활성화에 필요한 최소 전기장세기인 임계전기장 세기(E_c)는 13.6 kV/cm, 최소처리시간(T_c)은 16.1 μ s이었다. 전기장 세기 80 kV/cm에서 생균수의 불활성화율은 주파수 작을수록, 즉 펄스수가 작을수록 증가하여 300 Hz, 2000 μ s처리하여 2.5 log의 생균수 감소를 가져왔다. 또한 총처리시간인 재순환 사이클수가 증가할수록 생존율은 감소하였으며, 동일한 사이클수에서는 주파수가 증가할수록 불활성화율이 증가하였다. 즉 동일한 살균시간에서도 펄스전기장에 매우 짧은시간 연속적으로 노출되는 것보다 적절한 시간간격이 필요한 것으로 판단되었다. 처리온도의 경우에는 온도가 증가할수록 *L. plantarum*의 사멸속

도가 증가하여 50°C에서 80 kV/cm, 1000 μ s처리하여 5.6 log의 균체량 감소를 가져왔다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 학술진흥재단의 국내 Post-Doc. 연수비 지원, 연세대학교 Post-Doc. 지원비 및 첨단농업기술개발과제의 지원에 의하여 진행되었기에 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Qin, B.L., Pothakamury, U.R., Vega, H., Martin, O., Barbosa-C novas, G.V. and Swanson, B.G.: Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technol.*, **49**(6), 55 (1995)
2. 조형용, 신정규, 변유량: 고전압 펄스 전기장 비열 가공 기술. *식품과학과 산업*, **29**(3), 28 (1996)
3. Qin, B.L., Pothakamury, U.R., Barbosa-C novas, G.V. and Swanson, B.G.: Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Sci. Nutrition*, **36**(6), 603 (1996)
4. Hamill, W.A. and Sale, A.J.H.: Effects of high electric fields on microorganisms II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochim. Biophys. Acta.*, **148**(3), 789 (1967)
5. Hülsheger, H., Potel, J. and Niemann, E.G.: Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiat. Environ. Biophys.*, **22**, 149 (1983)
6. Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G.V. and Swanson, B.G.: Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *J. Food Eng.*, **25**(2), 261 (1994)
7. Grahl, T. and Märkl, H.: Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 148 (1996)
8. Jayaram, S., Castle, G.S.P. and Margaritis, A.: Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of voltage pulses. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**(11), 1412 (1992)
9. Su, Y.: Inactivation of bacterial spores using high voltage electric fields as a nonthermal sterilization process. In: Quarterly Progress Report, Ohio State Univ., Columbus, OH., January, p.1 (1996)
10. Jayaram, S., Castle, G.S.P. and Margaritis, A.: The effects of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *Lactobacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 117 (1993)
11. Mazurek, B., Lubicki, P. and Staroniewicz, Z.: Effect of short HV pulses on bacteria and fungi. *IEEE Trans. on Dielectrics and Electrical Insulation*, **2**(3), 418 (1995)
12. Gäsková, D., Siger, K., Janderova, B. and Plásek, J.: Effect of high-voltage electric pulses on yeast cells; factors influencing the killing efficiency. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **39**, 195 (1996)
13. Potter, H.: Electroporation in biology: methods, applications and instruments. *Anal. Biochem.*, **174**, 361 (1988)
14. Vega-Mercado, H., Pothakamury, U.R., Chang, F.J.,

Barbosa-Cánovas, G.V. and Swanson, B.G.: Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric field hurdles. *Food Res. Int.*, **29**(2), 117 (1996)

G.V. and Swanson, B.G.: Effect of growth stage and processing temperature on the inactivation of *E. coli* by pulsed electric fields. *J. Food Prot.*, **59**(11), 1167 (1996)

15. Pothakamury, U., Vega, H., Zhang, Q., Barbosa-Cánovas,

(1997년 8월 19일 접수)