

고전장펄스를 이용한 약주의 연속 재순환 살균

김수연 · 목철균 · 변유량*

경원대학교 식품생물공학과 · *연세대학교 생명공학과

Continuously Recycling Sterilization of Yakju (Rice Wine) Using Pulsed Electric Fields

Su Yeon Kim, Chulkyoon Mok and Yu-Ryang Pyun*

Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University

*Department of Biotechnology, Yonsei University

Abstract

Yakju was sterilized with high-voltage pulses of short time of a continuous pulsed electric field (PEF) system. The initial microbial counts of Yakju were 2.2×10^5 CFU/mL for total aerobes. The pH, acidity and electric conductivity of Yakju were 3.82, 0.37% and 1.24 mS/cm, respectively. Yakju was treated with exponential-wave formed electric pulses of 100 Hz for 0~4000 μ s under the field strength of 20~35 kV/cm. The lethal effect of electric fields on microorganisms was resulted from the breakdown of the cell membrane induced by the transmembrane electric potential. The critical values of the external field for the sterilization were 16.0 kV/cm for total aerobes. Logarithmic survival rates decreased linearly at low electric field strength, but curvilinearly at high electric field strength with treatment time. The sterilization of Yakju was more largely affected by the electric field strength than by the treatment time. Any changes in pH, acidity, and the growth of microorganisms were not found in the PEF treated Yakju during the storage at both 4°C and 30°C.

Key words: Yakju, pulsed electric fields, sterilization, storage stability

서 론

식품산업에서 식품의 보존성을 향상시키기 위한 방법으로 대부분 가열조작 또는 건조, 냉동 등의 물리적 방법이나 식품 보존제의 첨가 등에 의한 화학적 방법을 사용하고 있다. 이중 열처리 기술이 식품의 보존성을 향상시키는 방법으로 널리 사용되고 있는데 가열 처리법은 열에 의한 성분의 파괴, 조직의 변성, 맛과 색의 변성, 영양소와 향기성분의 손실, 그리고 공유결합에 의한 새로운 화합물의 형성 등 식품의 품질 저하를 수반한다. 또한 냉동이나 건조의 경우, 저장기간에 따라 품질이 저하되어 소비자들의 기호 만족도를 감소시킨다. 식품의 보존성을 향상시키는 방법으로 많이 사용되고 있는 식품 보존제의 사용도 위해성 문제가 증가함에 따라 그 사용이 점차 줄어들고 있는 추세이다^(1,2). 이런 문제점들을 해결하기 위하여 기존의 방

법들을 대체할만한 여러 가지 신기술들이 연구되고 있다.

현재 식품산업에서 개발되고 있는 비열처리기술에는 고전압 펄스 전기장(high voltage pulsed electric field, PEF), 진동자기장(oscillating magnetic field), 초고압(high hydrostatic pressure)⁽³⁾, 광펄스(intense light pulses), 마이크로 웨이브(microwave)⁽⁴⁾, 이온화 조사(ionizing irradiation), 초음파(ultrasonication) 등을 이용한 물리적방법과 antimicrobials, bacteriocins, 양이온 다중 고분자와 같은 화학 물질 및 세포벽 분해효소 등을 이용하는 방법이 있다. 이와 같은 여러 가지 방법 중에서 고전압 펄스 전기장을 이용한 미생물의 불활성화는 처리 중 온도가 거의 상승하지 않고, 처리시간이 짧으며, 연속처리가 가능하고, 처리 후에 식품의 물리적, 화학적 및 영양학적 특성들이 거의 변하지 않기 때문에 최근 관심이 집중되고 있는 신기술이다⁽⁵⁻¹⁰⁾.

고전압 펄스 전기장에 의한 미생물의 처사효과에 미치는 가장 직접적인 영향인자는 전기장의 세기와 처리시간(펄스수×펄스폭)이다. 이밖에 보조인자로서

Corresponding author: Chulkyoon Mok, Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, San 65 Bokjung-Dong, Sujung-Gu, Sugnam, Kyunggi-Do, Korea

처리온도, pH, 이온강도, 처리 시료의 전기전도도, 미생물의 종류, 미생물의 증식 정도에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다⁽¹¹⁾.

현재 고전압 발생장치를 통해 일반적으로 사용되고 있는 파형은 exponential decay 파와 square 파가 있으며, square 파는 주어진 일정 시간내에 0 V에서 최대치까지 전압이 상승한 뒤 일정시간 유지 후 바로 0 V로 감소하는 파형을 말한다. 반면 exponential decay 파의 경우는 전기장이 걸린 시초점부터 최대전압의 63%까지 감소하는 구간에서만 전기적인 영향을 줄 수 있고, 그 후부터는 열에너지로 손실된다. 따라서 square 파는 system의 에너지가 열로 전환되는 것을 최소화할 수 있을 뿐만 아니라 미생물을 불활성화시키는데 있어서 exponential decay 파보다 더 효과적이라 할 수 있다⁽¹²⁾.

고전압 펄스 전기장 처리에 의하여 세포막이 손상되는 기작은 비가역적인 electroporation이다^(13,14). Electroporation 기작은 완전히 밝혀지지는 않았지만, 세포막의 압축(compression)에 의한 가설이 일반적으로 받아들여지고 있다⁽¹⁵⁾. 세포에 고전압 전기장을 걸어주면 세포막 표면에 반대전하가 발생하고 따라서 두 전하 사이에 인력이 작용하여 세포막을 압축시키고 막의

두께를 감소시키게 된다. 이때 전기장의 크기가 임계 전기장 세기(E_c , critical electric field strength)를 넘게 되면 세포막에 비가역적인 세공(pore)이 형성되어 투과성이 증가되고 세포는 사멸하게 된다⁽¹⁶⁾.

본 연구에서는 고전장 펄스를 우리의 전통주인 약주의 살균에 적용하여 살균효과를 관찰하고 관능적 품질이 양호하고 저장성이 있는 약주살균에 알맞는 조건을 최적화하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 시료

본 연구에서 사용한 약주는 K양조공사에서 제조한 것으로 소맥분, 옥수수전분, 중국을 사용한 이양주로써 상온에서 일주일 이상 숙성하여 압착 여과한 후 균조토로 여과한 비살균 약주를 실험재료로 사용하였다.

고전압 펄스 전기장(high voltage pulsed electric field, PEF) 발생장치

본 연구에서 사용한 PEF 장치는 Fig. 1과 같이 크게 고전압 펄스를 발생시키는 펄스 발생기(pulse generator)와 실질적으로 시료가 전기적 처리를 받는

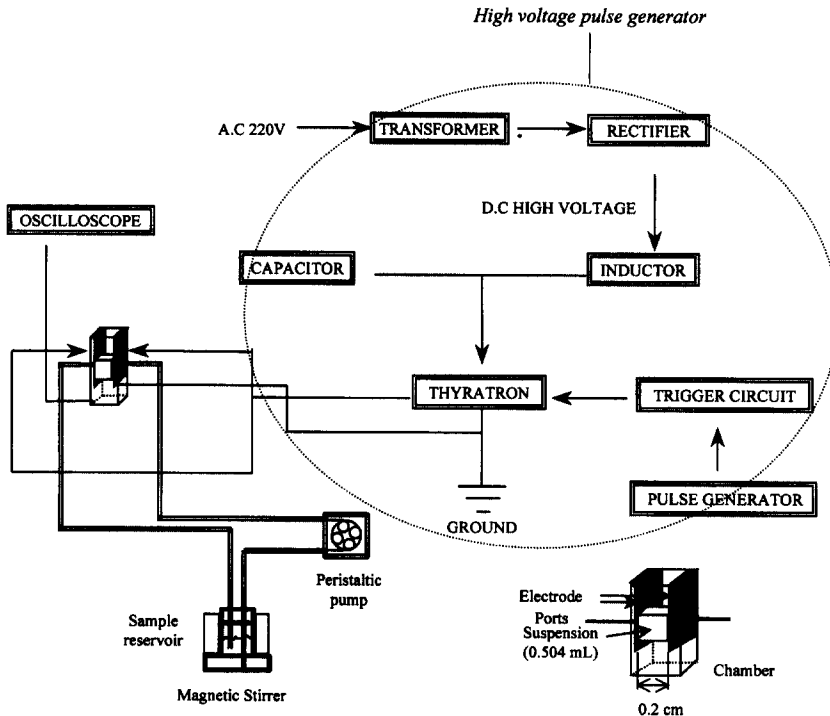


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental set-up.

처리용기(treatment chamber) 그리고 처리 용기내에 형성되는 파형의 관측과 전기장의 세기를 관측할 수 있는 oscilloscope (Lecroy Digital Oscilloscope, Model 9300, U.S.A.)로 구성되어 있다.

입력 전원 220 V 교류를 high voltage transformer를 사용하여 전압을 올린 후 정류하였으며, 직류 high voltage supply는 7.2 μ F capacitor (1800 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 장치하였다. 고전압 펄스는 thyatron을 통하여 7.2 μ F capacitor의 방전에 의하여 발생시켰으며, 처리용기내의 전극 사이에 pulsed electric field (exponential decay pulse)를 부여하였다.

펄스전기장 처리용기(treatment chamber)

처리용기는 Fig. 1과 같이 disposable electroporation cuvette (Bio-rad, U.S.A.)을 이용하여 연속 재순환식으로 제작하였으며 이때 실제로 고전압 전기장이 걸리는 부위의 전극 간격은 2 mm, 처리 부피는 0.504 mL였다. 약주를 연속 재순환식으로 처리용기내로 주입하기 위하여 peristaltic pump를 이용하였으며 약주의 유량은 0.5 mL/s로 하였다. 또한 고전장펄스를 이용하여 처리할 경우 처리 용기내의 온도상승을 막기 위해서 순환 line 중간에 tube-type heat exchanger를 설치하여 고전장펄스 처리를 실행하였다.

총처리시간의 계산

처리 용기의 부피, 유량, 주파수의 변화에 따른 PEF 처리를 하기 위해서는 총처리시간의 계산이 필요하다.

약주가 순환식 용기를 한 번 순환하는데 걸리는 시간을 t 라고 할 때,

$$t = n \cdot \tau \quad (1)$$

$$n = (f \cdot V) / \dot{m} \quad (2)$$

라고 나타낼 수 있다. 여기서,

n =펄스수, f =주파수(1/s), V =용기의 부피(mL), \dot{m} =유량(mL/s), τ =펄스폭(μ s)이다.

결국, i 회 순환하는데 필요한 처리시간(T)은 식 (3)과 같다.

$$T = i \cdot t \quad (3)$$

본 연구에서는 exponential decay 파를 사용하여 100 Hz의 주파수에서 처리 전기장의 세기와 시간을 25~35

kV/cm와 0~4000 μ s의 범위에서 약주의 살균효과를 관찰하였다.

생존율의 측정

PEF 처리를 한 약주와 처리하지 않은 약주의 미생물수를 한천평판을 이용하여 평판도말법⁽¹⁷⁾으로 측정하여, Colony Forming Unit (CFU)/mL로 나타낸 후 초기미생물수(N_0)에 대한 PEF 처리 후의 미생물수(N)의 비로 생존율(s)을 계산하는 식은 식 (4)와 같다.

$$s = N/N_0 \quad (4)$$

미생물수는 시료를 plate count agar (Difco, U.S.A.)에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 colony 수를 측정하였다.

미생물 현미경 관찰

PEF 처리에 의한 미생물 형태 변화를 관찰하기 위하여 현미경(Nikon DIAPHOTO 300, Japan)에 연결된 화상분석기(BMI plus, US)를 사용하여 분석하였다.

약주의 저장성 평가

PEF 처리한 약주를 4°C와 30°C에 저장하면서 저장 기간동안의 pH와 적정산도, 미생물수를 관찰하였다. pH는 pH meter (Orion, 520-A, U.S.A.)를 사용하였으며, 적정 산도는 시료를 10 mL 취하여 지시약(0.1% phenolphthalein)을 사용하여 0.1 N NaOH로 적정하여 식 (5)에 의거하여 산출하였다.

$$\text{적정산도} = \frac{0.1N\text{-NaOH 적정량(mL)} \times f \times 0.009}{\text{시료량(mL)}} \quad (5)$$

여기서 f 는 NaOH의 factor이다.

결과 및 고찰

약주의 일반 특성

PEF 처리에 사용한 약주의 일반 특성은 Table 1과 같다. 약주의 초기 미생물수는 세균 2.2×10^5 CFU/

Table 1. Initial physicochemical and microbial properties of Yakju

| Properties | Values |
|-------------------------|--------------------------|
| pH | 3.49 |
| Acidity (% lactic acid) | 0.37% |
| Conductivity | 1.20~1.27 mS/cm |
| Total aerobes | 2.2×10^5 CFU/mL |

mL고 전기전도도는 1.24 mS/cm이었으며 pH와 산도는 각각 3.49, 0.37%이었다.

PEF 처리에 의한 미생물 사멸

PEF 처리가 약주 미생물의 형태변화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 전기장의 세기 17 kV/cm를 25 μs동안 처리하여 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다.

그림에서 처리전의 균은 완전한 형태의 모양과 세포막을 가졌으나, PEF 처리후에는 화살표와 같이 세포막의 손상이 관찰되었다. 전기장의 크기가 임계 전기장 세기(E_c , critical electric field strength)를 넘게 되면 세포막에 비가역적인 세공(pore)이 형성되어 투과성이 증가되고 세포는 사멸하게 된다⁽¹⁰⁾는 연구결과와 비교하여 볼 때 동일한 결과를 확인하였다.

PEF처리에 따른 살균율 변화

고전압 처리가 약주 내의 미생물의 불활성에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 주파수를 100 Hz로 고정시키고 총처리시간과 전기장의 세기를 변화시키면서 실험하여 생존율을 측정하였다. 총균의 경우 전기장의 세기를 고정시켜놓고 500~4000 μs의 범위에서 총처리시간을 증가시키면서 고전압 처리한 결과 동일한 전기장의 세기에서 총처리시간이 증가함에 따라 직선에 가까운 완만한 곡선으로 미생물의 생존율이 감소하는 것을 관찰하였다(Fig. 3). 또한 총처리시간을 동일하게 고정시킨 후 전기장의 세기를 20~35 kV/cm의 범위에서 처리하였을 경우 전기장의 세기가 증가함에 따라 미생물의 생존율이 감소하였다. 미생물의 불활성화에 영향을 미칠 수 있는 최소 임계전기장의 세기(E_c)는 Fig. 4과 같이 전기장세기에 따른 생존율을 의삽하여 측정하였으며, 총균의 경우 16 kV/cm이었다.

이상의 결과를 종합할 때, 처리시간이 증가함에 따

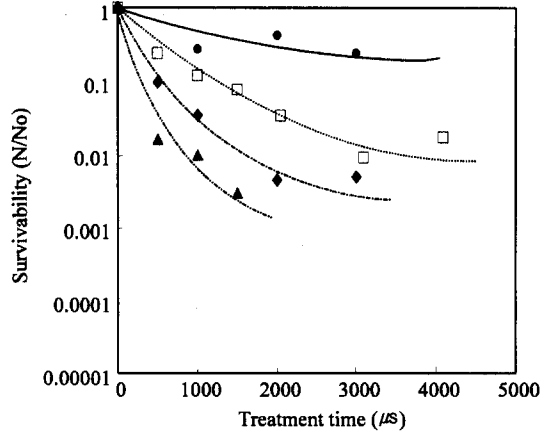


Fig. 3. Effect of electric field strength on survivability of total aerobes in Yakju. ●: 20 kV/cm, □: 25 kV/cm, ◆: 30 kV/cm, ▲: 35 kV/cm.

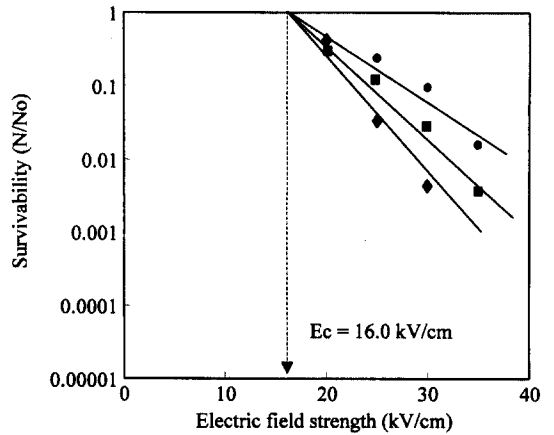


Fig. 4. Critical electric field strength against total aerobes in Yakju. ●: 500 μs, ■: 1000 μs, ◆: 2000 μs.

라 직선에 가까운 완만한 곡선을 그리면서 살균효과가 증가하는 것으로 나타났으며 2000 μs 이상에서 6000 μs까지 더 많은 시간을 처리하였을 경우에는 살균효과가 증가하지 않았다. 이는 처리시간을 길게한다고 해서 미생물의 사멸이 계속해서 일어나는 것이 아님을 보여주고 있으며 PEF 처리에 의한 미생물 살균효과는 전기장 세기가 처리시간보다 더 큰 영향을 미치는 인자임을 보여주며 Shin 등⁽¹⁸⁾과 Jayaram 등⁽¹⁴⁾에 의해 보고된 결과와 동일하였다.

PEF 처리 후 약주의 저장성

약주 내의 미생물의 불활성화를 최대로 증진시킬 수 있는 PEF처리 조건을 설정하여 연속살균시스템에

Fig. 2. Micrographs (×600) of cells in Yakju before (A) and after (B) PEF treatment; arrows indicate the damaged cells by PEF treatment. Bar indicate 10 μm.

서 30 kV/cm에서 6000 μ s 처리한 약주의 저장성을 온도를 달리하여 4°C와 30°C에서 저장하면서 pH, 적정산도 그리고 미생물수의 변화를 9주 동안 살펴보았다.

PEF 처리한 약주의 초기 pH는 3.57로 비처리구의 pH 3.49와 비교하여 큰 차이를 보이지 않았으며 Shin 등⁽⁸⁾의 실험에서도 PEF 처리전후의 pH 변화를 측정 한 결과 거의 변화가 없었던 것으로 보아 PEF 처리가 pH에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 적정산도의 경우에도 PEF 처리한 약주의 적정산도가 0.492%로 비처리구 0.536과 큰 차이를 보이지 않았다. 저장 온도 4°C에서는 저장 중 PEF 처리한 약주와 비처리 약주의 pH는 커다란 변화가 관찰되지 않은 반면 저장

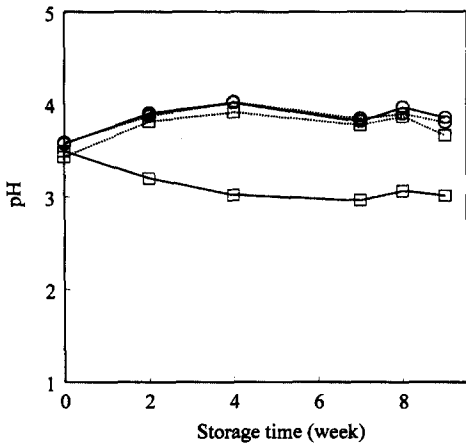


Fig. 5. Changes in pH of Yakju during storage at 4°C and 30°C. □: Control, ○: 30 kV/cm, 6000 μ s, 4°C, —: 30°C.

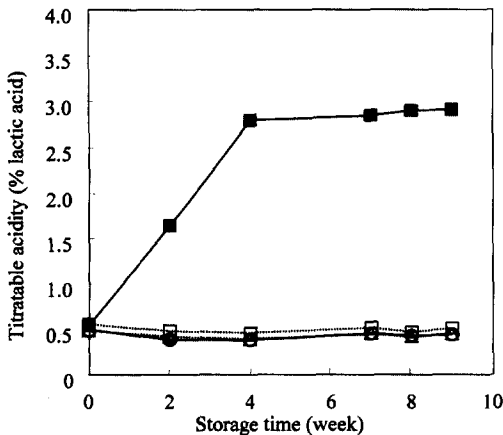


Fig. 6. Changes in titratable acidity of Yakju during storage at 4°C and 30°C. 30°C: ■ Control, ⊖ 30 kV/cm, 6000 μ s. 4°C: □ Control, △ 30 kV/cm, 6000 μ s.

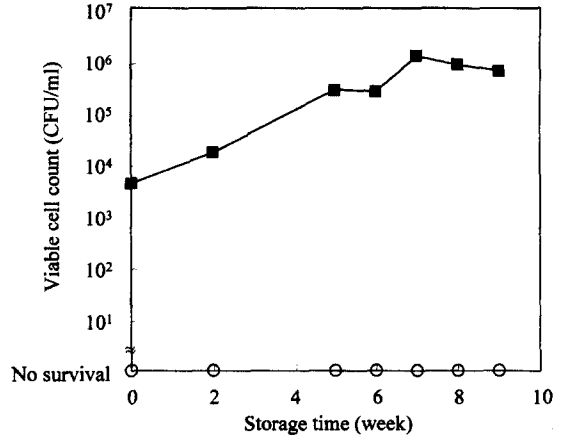


Fig. 7. Changes in total aerobes of Yakju during storage at 4°C. ■: Control, ○: 30 kV/cm, 6000 μ s.

온도인 30°C에서는 비처리 약주의 pH는 감소하였으나 PEF 처리군의 pH는 일정하게 유지되었다(Fig. 5).

저장기간동안 적정산도의 변화를 살펴본 결과 4°C에서 저장한 경우 PEF 처리한 약주와 비처리 약주 모두 저장 초기의 적정산도를 유지하면서 커다란 변화를 보이지 않았으나 30°C에 저장한 비처리 약주의 산도는 저장기간이 길어짐에 따라 급격하게 증가하는 반면 PEF처리한 약주의 경우 큰 변화가 없이 초기산도를 그대로 유지하였다(Fig. 6).

미생물의 경우 저장기간동안 비처리 약주의 경우 저장기간이 증가함에 따라 생균수가 증가하는 경향을 보였으나 PEF 처리한 약주는 저장기간 9주 동안 미생물의 생육을 전혀 보이지 않아 우수한 저장성을 나타내었다(Fig. 7).

요 약

고전장 펄스를 사용하여 전통 약주의 살균에 미치는 영향을 조사하였다. 약주 미생물 살균에 필요한 최소 임계전기장의 세기는(Ec)는 총균의 경우 16.0 kV/cm이었다. 임계전기장의 세기이상의 전기장의 세기에서 미생물은 세포막이 붕괴되어 사멸하였으며 전기장의 세기가 증가할수록 약주 미생물의 살균효과는 증가하는 것으로 나타났다. 처리시간이 증가함에 따라 살균효과가 증가하는 것으로 나타났으며 처리시간 2000 μ s 이상에서 6000 μ s까지 더 많은 시간을 처리 하였을 경우에는 살균효과가 증가하지 않았다. 저장 실험 기간동안 대조구의 pH는 저장기간에 따라 감소 하였으며 산도는 증가하였다. 대조구의 산도가 4°C에

서 저장했을 때 보다 30°C에서 저장하였을 경우 더욱 빠른 변화를 나타낸 반면 PEF 처리구는 산도의 감소가 없었다. 미생물의 경우 대조구에서는 저장기간에 따라 미생물수가 증가하였으나 PEF 처리한 시료는 저장 9주 동안 미생물의 생육을 전혀 보이지 않았다.

감사의 글

본 연구는 농림수산 특정기술개발사업(과제명: 전기·물리적 비열 식품가공기술개발, 세부과제명: PEF 기술에 의한 액체식품의 냉살균 기법 개발)의 지원에 의하여 진행되었으며 지원에 감사드립니다.

문헌

- Mertens, B. and Knorr, D.: Development of nonthermal processes for food preservation. *Food Technol.*, **46**, 124-133 (1992)
- Cho, H.Y., Shin, J.K. and Pyun, Y.R.: Nonthermal Food Process Technology by High Voltage Pulsed Electric Fields (in Korean). *Food Sci. Ind.*, **29**(3), 28-36 (1996)
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C.P. and Ray, B.: Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbio.*, **60**, 4174-4177 (1994)
- Shin, J.K. and Pyun, Y.R.: Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed-microwave irradiation. *J. Food Sci.*, **62**, 163-166 (1997)
- H Isheger, H., Potel, J. and Niemann, E.G.: Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiat. Environ. Biophys.*, **20**, 53-64 (1981)
- Pothakamury, U.R., Vega, H., Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G. 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**, 1167-1171 (1996)
- H Isheger, H., Potel, J. and Niemann, E.G.: Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiat. Environ. Biophys.*, **22**, 149-162 (1983)
- Zhang, Q., Qin, B.L., Barbosa-Cánovas, G. and Swanson, B.G.: Inactivation of *E. coli* for food pasteurization by high-strength pulsed electric fields. *J. Food Proc. Preserv.*, **19**, 103-118 (1995)
- Castro, A.J., Barbosa-Cánovas, G. and Swanson, B.G.: Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields. *J. Food Proc. Preserv.*, **17**, 47-73 (1993)
- Qin, B.L., Pothakamury, U.R., Barbosa-Cánovas, G. and Swanson, B.G.: Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *Cirt. Rev. Food Sci. Nutr.*, **36**, 603-627 (1996)
- Wataru, T., Masafumi, M. and Tomoo, F.: The relationship between electroporability and growth phase in a suspension of yeast cells, *Saccharomyces cerevisiae*. *Nippon Nogeikagaku Kassi.*, **70**, 563-568 (1996)
- Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G. and Swanson, B.G.: Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *J. Food Eng.*, (in press)
- Arthur, E.S.: Mechanisms of electroporation and electrofusion. In Guide to electroporation and electrofusion, Donald, C.C., Bruce, M.C., James, A.S. and Arthur, E.S. (Ed.), Academic Press, Inc., p.119 (1992)
- 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**, 1412-1420 (1992)
- Mazurek, B., Lubicki, P. and Staroniewicz, Z.: Effect of short HV pulses on bacteria and fungi. *IEEE Trans. on Dielectrics and Electrical Insulation*, **2**, 418-425 (1995)
- Gáskova, D., Siger, K., Janderova, B. and Plasek, J.: Effect of high-voltage electric pulses on yeast cells: factors influencing the killing efficiency. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **39**, 195-202 (1996)
- Ministry of Health and Welfare: Official Book of Foods, Experimental Methods. Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea. p.94 (1997)
- Shin, H.H. and Pyun, Y.R.: Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high voltage pulsed electric fields treatment (in Korean). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 1175-1183 (1997)

(1998년 11월 13일 접수)