

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 *Saccharomyces cerevisiae*의 생리적 변화

박희란^{1,3} · 윤소정^{1,3} · 박한설^{1,3} · 신정규^{2,3*}

¹전주대학교 전통식품산업학과, ²전주대학교 한식조리학과, ³전주대학교 식품산업연구소

Physiological Changes of *Saccharomyces cerevisiae* by High Voltage Pulsed Electric Field Treatments

Hee Ran Park^{1,3}, So Jung Yoon^{1,3}, Han-Sul Park^{1,3}, and Jung-Kue Shin^{2,3*}

¹Department of Traditional Food Industry, JeonJu University,

²Department of Korean Cuisine, JeonJu University, ³Food Industry Research Institute, JeonJu University

Abstract High voltage pulsed electric fields (PEF) treatment is a promising non-thermal processing technology that can replace or partially substitute for thermal processes. The aim of this research was to investigate the microbial inactivation mechanisms by PEF treatment in terms of physiological changes to *Saccharomyces cerevisiae*. PEF was applied at the electric field strength of 50 kV/cm, treatment time of 56 μ s and temperature of 40°C. The microbial cells treated with PEF showed loss of salt tolerance on the cell membrane and collapse of the relative pH gradient on in-out of cells. Cell death or injury resulted from the breakdown of homeostasis, decreased H⁺-ATPase activity, and loss of glycolysis activity.

Keywords: high voltage pulsed electric fields, physiological changes, inactivation mechanisms, *Saccharomyces cerevisiae*

서 론

식품산업에서 일반적으로 사용되는 가열공정을 대체하고 가열 처리가 불가능하거나 어려운 식품의 안전성을 확보하기 위한 가공 공정의 개발이 끊임없이 요구되고 있다. 이러한 요구에 따라 온도, 수분활성, pH, 산화-환원 전위, 보존제 및 길항 관계의 식물체 균과 같이 여러 인자들을 적절히 조합하여 식품의 안전성을 얻고자 하는 hurdle technology가 도입되고 있으며, 이에는 식물체 혹은 미생물 유래 항균제와 같은 천연 보존 시스템과 식품의 비가열 살균 분야가 주 연구 대상이 되고 있다. 비가열 살균 방법에는 물리적인 방법으로 고전압 펄스 전기장, 진동 자기장, 이온화 조사, 광 펄스, 초고압, 초음파 등이 있으며, 화학적인 방법으로는 이산화탄소, 양이온 다중 고분자, 세포벽 분해 효소, 항균제 또는 항균성 효소의 이용 등이 있다(1-3).

고전압 펄스 전기장(high voltage pulsed electric field, PEF) 기술은 식품의 처리 중 거의 온도가 상승하지 않고, 처리 시간이 짧으며, 연속 처리가 가능하고, 처리 후에도 식품의 물리적, 화학적 및 영양학적인 특성들이 거의 변하지 않는 기술로서 미생물의 비열 살균 뿐만 아니라 식품이나 미생물로부터 유효 성분의 추출 및 회수, 식품 가공의 전처리 등에 적용되고 있다(4-9).

물리적 비가열 살균 방법 중 고전압 펄스 전기장 처리에 의한

미생물의 살균은 지금까지 많은 연구가 이루어지고 있으며, 그 기작으로는 미생물 세포에 수만 volt 이상의 전압을 순간적으로 인가하여 세포막 사이에 일정 이상의 전위차를 유도시켜 세포막을 파괴시켜 세포의 기능적 손상을 일으키는 것으로 보고(10-12)되고 있지만, SEM, TEM에 의한 세포 형태의 변화, 염색 시약에 의한 세포의 염색, 미생물의 사멸 정도 등을 확인하는 물리적 수준에서 그 기작을 확인하는 정도에 그치고 있다(13-16).

본 연구에서는 일상 식품이나 alcohol 음료 등에 널리 분포되어 있는 효모를 대상으로하여 고전압 펄스 전기장 처리에 따른 내염성 변화, 세포 내외의 pH 구배 변화, 해당활성의 변화, H⁺-ATPase 활성 변화, 효모가 생산하는 효소의 활성 변화 등에 대한 연구를 통해 고전압 펄스 전기장에 의한 효모의 생리적 변화에 대해 상세히 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* 균주는 ATCC 4105로 한국중균협회(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)로부터 분양받아 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 평판배지로부터 2-3 백급이를 YM broth 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. 배양한 배양액은 4°C에서 4,000 rpm으로 원심분리(Sorvall RC2C plus, Dupont, Newtown, CT, USA)하

*Corresponding author: Jung-Kue Shin, Department of Korean Cuisine, College of Culture and Tourism, JeonJu University, Jeonju, Jeonbuk 560-759, Korea
Tel: 82-63-220-3081
Fax: 82-63-220-3264
E-mail: sorilove@jj.ac.kr
Received February 13, 2013; revised June 22, 2013;
accepted June 22, 2013

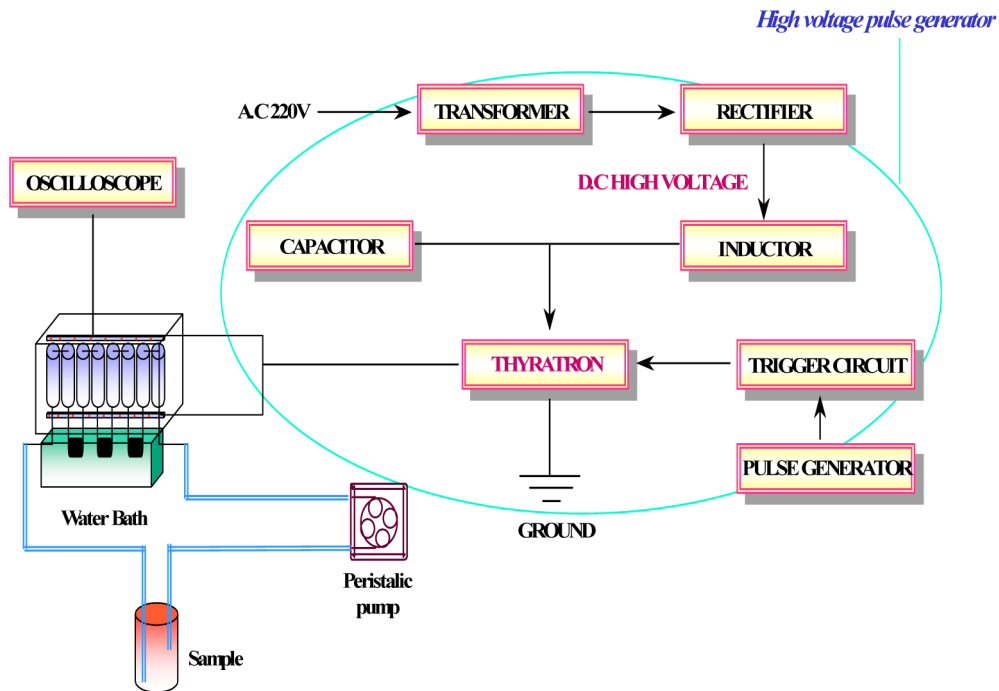


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental apparatus for high voltage pulsed electric field treatments.

여 살균 증류수 및 완충용액에 1회 세척한 후 현탁하여 사용하였다. 이 때 최종 균체 농도는 $2.0\text{-}3.0 \times 10^7$ 수준이었으며, 본 실험에 사용된 모든 균 시료액은 같은 방법으로 매번 새로이 배양한 것을 사용하였다.

고전압 펄스 전기장 시스템

고전압 펄스 전기장 시스템은 실험실용 용량으로 설계하여 제작하였으며, 실험 장치의 전체적인 구성 및 개략도는 Fig. 1과 같다. 전체적인 시스템은 크게 전원 공급부(power supply, Model JP-PS2550, Jaepae Hi-Tec, Incheon, Korea), 펄스발생기(pulse generator, Model JP-PGT50, Jaepae Hi-Tec, Incheon, Korea), 처리용기(treatment chamber)의 세가지로 구성되어 있다. 전원 공급부는 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 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. 충전 방식은 resonance charging을 택하였고, 축전지에 충전된 고전압을 순간적으로 방전시키는 switch로는 열음극 방전관(thyratron, 50 kV, 2500A)을 사용하였으며, 방전시 에 발생되는 열을 식히기 위하여 수조 cooling device를 사용하여 열을 방출하였다. 축전지는 corona와 arching을 방지하기 위하여 절연유(제1종 silicon oil)에 담았다. 처리 용기는 전극간격 2 mm의 처리용기를 7개 병렬 연결하여 전체 처리 용적이 0.175 mL가 되도록 하였으며, 처리용기에 인가되는 전기장의 세기와 파형은 oscilloscope (Lecroy Digital Oscilloscope, Model 9300 AM, Dual 400 MHz, Geneva, Switzerland)로,

전류는 전압-저항 converting을 이용하여 측정할 수 있도록 자체 제작하여 측정하였다. 처리 용기는 co-field형으로서 시료가 전극과 직접 접촉하는 면적을 최소화하고 불균일한 전장의 형성을 없애고 시료 흐름에 edge를 제거하여 spark에 의한 유전파괴 현상이 일어나지 않도록 제작되었다. 처리 용기에 인가되는 square wave의 파형은 Fig. 2와 같다.

고전압 펄스 전기장 처리

배양액 200 mL를 시료용기에 넣고 밀봉한 다음 연동 펌프를 사용하여 시료를 처리라인에 순환시켰다. 처리라인은 일정한 온도로 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 처리하였다. 일정 시간 시료를 처리한 후 처리 라인에서 나오는 시료를 일정량 수거하여 다음 분석을 위해 사용하였다.

생균수의 측정

고전압 펄스 전기장 처리를 마친 효모 현탁액을 멸균된 생리 식염수 수용액에 단계별로 희석한 후 potato dextrose agar (PDA, Difco Laboratories)에 0.1 mL씩 도말하였다. 이를 26°C에서 48시간 동안 평판 배양한 다음 생성된 균락수를 계수하여 생균수를 측정하였다. 고전압 펄스 전기장 처리에 다른 균체의 생존율은 초기 생균수(N_0)에 대한 처리 후 생균수(N)의 비율로 표시하였으며, 최소 3회 이상의 반복 실험 결과를 평균하여 나타내었다.

내염성의 변화 측정

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 미생물 세포의 내염성 변화는 생균수 측정에 사용한 균체 시료액을 PDA에 3% NaCl을 첨

가한 배지(PDAS)에 동일한 방법으로 도달하여 평판 배양한 다음 생성된 균락수를 계수하여 비교하였다.

세포 내외의 상대적 pH 구배 측정

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 효모 세포의 세포벽 또는 세포막의 손상을 추정할 수 있는 방법으로 세포 내외의 상대적인 pH 구배를 Slavik(17)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 세포 배양액을 원심분리하여 멸균 증류수에 1회 세척한 다음 완충액에 현탁하여 시료액을 준비하고 고전압 펄스 전기장 처리를 하였다. 임의의 시간의 처리된 시료액과 처리하지 않은 시료액을 동일하게 다시 원심 분리한 다음 1 mM MgCl₂를 포함한 150 mM KCl 용액에 20 mg/cells dry weight/mL의 농도로 현탁하였다. 이들 현탁액의 초기 pH를 측정하여 초기 pH (pH_i)로 정하고, *n*-butanol을 5% (v/v) 첨가하여 세포막을 파손시켜 세포내 내용물이 완전히 유출되어 더 이상의 pH 변동이 없을 때를 최종 pH (pH_f)로 정의하였다. 균체의 상대적 pH 구배는 이와같이 결정된 pH 값의 차이(최종 pH-초기 pH, pH_f-pH_i)를 상대적 pH 구배인 ΔpH로 나타내었다.

해당활성 측정

미생물 세포의 기본적인 대사과정인 해당활성을 측정하여 세포의 생리적 변화 여부를 측정하였다(18,19). Hong과 Pyun(19)의 방법에 따라 세포 배양액을 원심 분리하여 탈이온수에 1회 세척한 후 1 mM MgCl₂를 함유한 20 mM phosphate 완충액(pH 7.0)에 현탁하고 26°C에서 1시간 배양하여 세포질 내의 대사산물을 제거하였다. 이를 다시 원심분리하여 1 mM MgCl₂와 0.1%의 glucose를 함유한 50 mM phosphate 완충액(pH 7.0)에 현탁한 다음 고전압 펄스 전기장 처리를 하였다. 시간별로 처리를 마친 균체 현탁액을 26°C에서 2시간 동안 재배양한 후 즉시 원심분리하여 상등액을 얻고, glucose 진단 시약(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하여 소모되지 않은 잔존 glucose 농도를 측정하였다. 균체의 해당활성 변화를 소모된 glucose 양을 초기 함량에 대한 백분율로 나타내었다.

H⁺-ATPase 분리 및 활성 변화 측정

일반적으로 모든 세포는 pH 항상성을 유지하여 세포의 생리적 상태를 일정하게 유지하려 한다. 이러한 pH 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 H⁺-ATPase를 분리하여 활성을 측정하였다(20-22) 세포막의 분리를 위하여 배양액(2.8 mL)을 10,000×g에서 10분 동안 원심분리하고 살균 증류수로 2회 세척한 후 상등액은 버리고, pellet을 50 mM Tris-maleate buffer (pH 7.4)에 재현탁하였다. 현탁액에 lysozyme (0.1%, Sigma Chemical Co., L6867)을 첨가하고 37°C에서 30분간 배양한 후 ice-water를 함유한 ependorf-tube에 넣어서 3분간 sonication (power setting 4; 40% pulsed duty cycle, Sonicator, Misonix INC, NY, USA)하였다. 처리된 시료액을 10,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 침전물(파괴되지 않은 세포와 파쇄된 세포의 큰 부분)을 제거한 후, 상등액을 4°C에서 100,000×g로 1시간 동안 초원심분리(Ultracentrifuge, Centrikon T-1080, Kontron Instrument, UK)하여 세포막 단편(membrane vehicles)을 회수하였다. 회수된 세포막 단편을 100 mM Tris-maleate buffer (pH 7.4)에 재현탁하였다. 시료는 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다. 일반적으로 ATPase활성은 -70°C에서 수개월 동안 유지되는 것으로 보고되었다(22).

ATPase 활성은 ATP로부터 inorganic phosphate가 유출되는 것으로 측정한다(23). 앞에서 분리한 세포막 현탁액 100 μL를 50

mM MgCl₂, 50 μL와 100 mM Tris-maleate buffer (pH 7.4) 300 μL를 포함한 반응액에 첨가한 후 ATPase 활성 최적 온도인 55°C에서 5분 동안 배양한 다음 30 mM ATP (Sigma Chemical Co., A7699) 50 μL를 첨가하여 20분 동안 반응시키고 10% (w/v) trichloroacetic acid 250 μL를 넣어 반응을 종결하였다.

반응이 종결된 시료액에 증류수 3.85 mL를 첨가한 후 2,500×g에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 깨끗한 tube에 옮긴 후 5% (w/v) ammonium molybdate 200 μL, amidol reagent (2,4-diaminophenol) 0.5 g을 함유한 20% (w/v) sodium sulphate 200 μL를 첨가하고 잘 섞는다. 이 시료를 80°C에서 2분 동안 배양한 후 급냉시킨 후, 830 nm에서 흡광도를 측정한다. 세포막 단백질 함량은 변형된 Lowry법(24)을 이용하여 측정하였다(25). Bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., A3059)을 standard protein으로 사용하였으며, ATPase 비활성(specific activity)은 1 mg의 세포막 단백질에 대해 1분 동안 ATP로부터 유리된 무기질 phosphate의 nmol로서 계산하였으며, H⁺-ATPase 활성 변화는 처리하지 않은 시료의 ATPase 활성에 대한 백분율로서 나타내었다.

효소활성 변화 측정

APIZYM kit (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, France)를 사용하여 고전압 펄스 전기장 처리에 따른 효모의 활성 변화를 측정하였다(26). 40°C, 50 kV/cm의 고전압 펄스 전기장으로 53 μs 처리한 균체 시료액과 무처리 시료액을 APIZYM kit에 접종하여 37°C에서 4시간 배양한 다음 ZYM A와 B 시약을 첨가하여 발색된 정도(marker 0-5)에 따라 해당 효소의 활성을 측정하였다. 그리고 색차계(CT-210, Minolta Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 처리된 시료와 무처리 시료에 대한 kit상의 색깔 변화를 L, a, b 값으로 측정하고 이들의 상대적인 색의 차이를 각 효소의 활성 변화로 정의하여 초기값에 대한 백분율로 표시하였다.

결과 및 고찰

내염성의 변화

일반적으로 미생물(세균 및 세포)은 적당한 외부 환경의 변화나 스트레스에 적응하여 자신의 대사 활동을 유지할 수 있도록 되어 있다. 그러나 치명적인 외부환경에 놓이게 되면 미생물은 사멸하거나 손상(injury)을 입게 되는데, 손상이란 정상적인 세포가 생육이 가능한 조건에서 생육능력에 이상이 발생한 상태를 의미한다(27,28). 대부분 미생물의 손상 정도를 파악하기 위해서는 정상적이 세포는 생육이 가능하지만 손상된 세포는 자라지 못하는 최소 배지(minimal medium)나 선택 배지를 사용한다.

손상된 세포를 구분하기 위해 사용하는 방법 중 가장 간단하고 널리 사용하는 방법이 내염성의 측정이다(29,30). 대부분의 미생물은 약 20 atm 정도의 매우 높은 내부 삼투압을 가지고 있다(31). 즉, 미생물은 어느 정도의 외부 염 농도에 대해서도 상당한 저항 능력을 가지고 있어 세포 자체의 생리 활성과 대사 기능, 균락(colony) 형성 등에 크게 영향을 받지 않는다. 특히 bacteria 계열의 균주들은 상당한 외부의 염농도와 상관없이 생장을 하는 것으로 알려져 있다(32-35). 본 실험에 사용된 *S. cerevisiae*도 어느 정도의 내염성을 갖고 있어(36,37), 일정 수준의 염농도(<1 M NaCl, ca. 5.8% NaCl)에 대해서도 세포 자체의 생리 활성과 대사 기능, 균집 형성 능력이 영향을 받지 않는다.

S. cerevisiae 세포 현탁액을 40°C에서 30-50 kV/cm로 고전압 펄스 전기장 처리를 하였을 때 처리 시간에 따른 세포의 내염성 변화를 potato dextrose agar (PDA, Difco Laboratories)와 PDA에

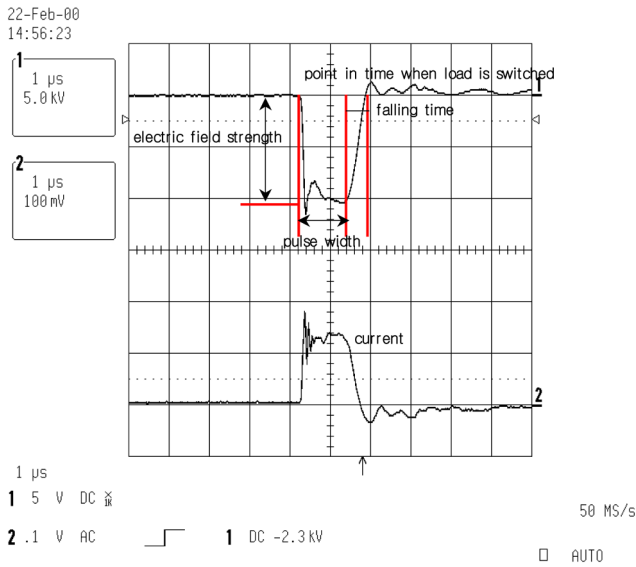


Fig. 2. Generated wave-form from pulse generator for high voltage pulsed electric field treatments. This wave is a square wave with a 1- μ s pulse width.

NaCl이 3% 첨가된 배지(PDAS)에서 균락의 수를 비교하여 관찰하였다(Fig. 3). 그림에서 보듯이 고전압 펄스 전기장 처리한 세포가 PDA에 비해 PDAS에서 생균수가 10^1 - 10^2 CFU 정도 낮게 나타났으며, 전기장의 세기가 커질수록 그 차이가 더 커지는 것을 알 수 있다. 이와 같은 현상은 정상적인 배지에서 균락을 형성하였던 세포 중 사멸하지 않은 세포의 90-99% 이상이 세포벽이나 세포막에 손상을 입어 외부의 stress(염)에 민감성이 높아져서 낮은 농도의 염에도 반응하여 균락 형성이 제대로 되지 않았음을 의미하며, 전기장의 세기가 커질수록, 처리시간이 길어질수록 내염성이 감소하는 세포의 수가 증가하는 것으로 생각할 수 있다.

일반적으로 외부 환경에 의한 세포의 생리적 변화는 일시적인 현상으로 최적의 조건에서 다시 생육하게 되면 원래의 생리 상태로 되돌아와 정상적인 생육과 대사활동이 가능해지기도 한다(38,39). Fig. 3에서 보듯이 고전압 펄스 전기장 처리에 의해 내염성의 변화가 생긴 세포를 신선한 배지에 재현탁하여 26°C에서 배양하면서 시간에 따른 내염성의 회복정도를 PDA와 PDAS에서 측정된 결과 약 4-6시간 후에는 내염성을 회복하는 것을 확인하였다.

상대적 pH 구배

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 *S. cerevisiae*의 상대적인 pH 구배 변화를 측정하였다. Fig. 4에서 고전압 펄스 전기장 처리에 의한 균체 현탁액의 pH_i, pH_e 변화를 살펴보면 처리시간이 증가함에 따라 각 값이 증가하다가 감소하는 경향을 나타내었다. 초기 pH_i 값이 6.3에서 고전압 펄스 전기장 처리가 시작되면서 6.6으로 pH가 증가하는 것은 중성에 가까운 *S. cerevisiae* 세포 내액이 외부로 유출되면서 pH의 상승을 일으킨 것으로 추측되며, 처리 후반기에 세포의 pH가 떨어지는 것은 이미 세포내액이 외부로 거의 유출된 세포가 *n*-butanol의 pH (pH 5.6)에 영향을 받을 것으로 생각된다. 이러한 Δ pH 값의 감소는 고전압 펄스 전기장 처리에 의해 세포의 proton motive force나 pH를 유지하는 항상성이 파괴된 것으로 생각할 수 있으며, 이는 세포막의 고유의 기능

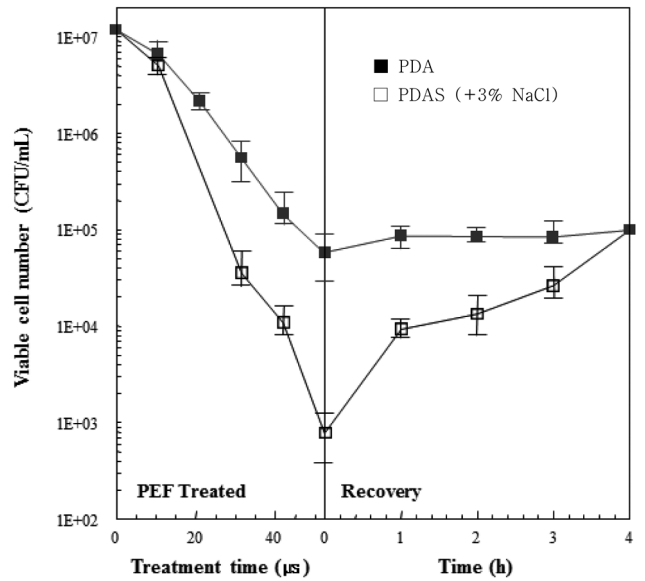


Fig. 3. Injury and recovery of *S. cerevisiae* cells on PDA and PDAS agar after exposure to high voltage pulsed electric field at 40°C and 50 kV/cm. Recovery of the cells was carried out in fresh YM broth at 26°C.

인 H⁺-translocation 기능이 상실되었거나 세포막 자체가 완전히 파손되어 생리적 기능이 소실된 것을 의미한다(40).

해당활성의 변화

모든 미생물은 생육과 증식 활동에 필요한 에너지를 당을 분해하는 해당과정을 통해 얻어지는 ATP에 의존하게 된다(18,41). 따라서 이러한 ATP를 만들어내는 세포의 해당 활성의 변화를 측정하면 세포의 생리적 변화를 추측하는데 있어서 매우 중요한 의미를 갖는다(42). Fig. 5는 고전압 펄스 전기장 처리에 의한 *S. cerevisiae*의 해당 활성 변화와 생균수 감소 경향을 나타내었다. 고전압 펄스 전기장 처리 초반에는 해당 활성이 큰 변화가 없었으나, 약 30 μ s 처리 후에는 급격히 해당 활성이 손실되어 약 10-20%의 활성만을 나타내었다. 그러나 해당 활성이 변화되지 않았던 처리 시간 초기에도 생균수는 약 2-2.5 log 감소하였다. 이러한 사실로 미루어 볼 때 고전압 펄스 전기장 처리가 세포의 사멸에는 직접적인 영향을 미쳤으나 세포의 생리적 기능에는 직접적인 영향을 미치지 않은 것으로 판단되며, 세포의 해당 활성의 감소는 세포의 사멸이 아닌 세포의 생리 조절 시스템의 손상이나 대사과정에 참여하는 효소의 불활성화에 의한 것으로 판단된다(43).

H⁺-ATPase의 활성 변화

미생물의 세포내 산-염기 농도 조절에 의한 pH 항상성 유지를 위해서 이온 성분의 수송, 유기산 이동, 대산산물 및 기질의 이동, 수소 이온 농도 구배 등 많은 인자가 관여한다(41). 또한 이는 기본적으로 세포막 자체가 보유하고 있는 외부 수소 이온의 체외 배출 능력(proton motive force, PMF)에 의해서 복합적으로 조절된다. 또한 세포막 integrity는 수소 이온의 유입 통로로 이용되는 세포막 표면의 lipid pitch양, 단백질과 지질의 비율, 막 인지질의 지방산 조성 등에 의해 영향을 받으며(44,45), proton motive force는 세포막에 결합되어 있는 H⁺-ATPase의 양과 고유 활성에 의해 크게 좌우되는 것으로 알려져 있다(46-49). 특히 H⁺-

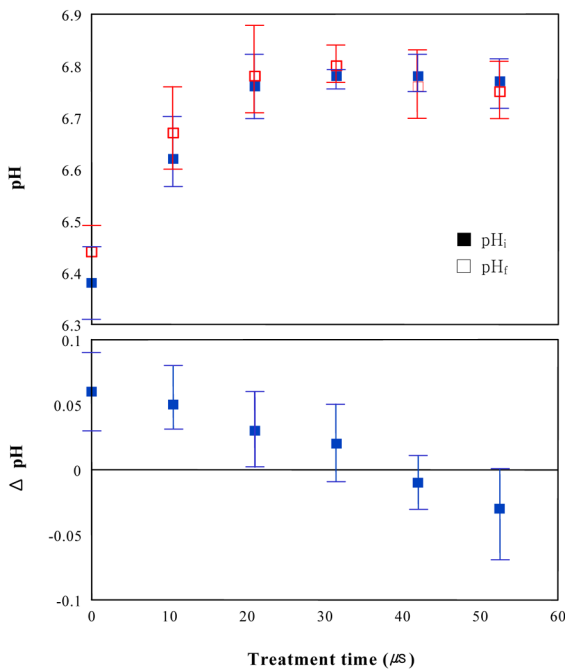


Fig. 4. Changes in pH of the suspensions before (pH_i) and after (pH_f) lysis of the cells treated with high voltage pulsed electric fields, and its difference (ΔpH). Experiments were carried out at 50 kV/cm and 40°C.

ATPase의 F_0 는 세포막에 결합되어 수소이온의 배출과 coupling되는 부위이고, F_1 은 세포 내부로 향해 있는 열쇠 고리 모양의 ATP hydrolase의 활성 부위로서 ATP를 소비하여 세포질의 수소 이온을 외부로 배출하는 기능으로 세포 내외의 수소 이온 농도 구배를 결정한다(50,51).

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 *S. cerevisiae*의 H^+ -ATPase 활성 변화를 확인하기 위하여 세포막 단편을 조효소액으로 하여 처리 시간별로 활성을 측정하여 실험 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 H^+ -ATPase의 활성값은 처리 직후부터 급격히 감소하여 활성을 거의 나타내지 않았다. 즉 고전압 펄스 전기장 처리를 받는 세포는 세포막의 ATPase의 활성 소실로 인하여 세포내의 항상성을 유지 못하여 사멸하게 되는 것으로 생각된다.

효소 활성 변화

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 효소의 불활성화나 활성화에 대한 다양한 실험 결과가 보고되었다(52-55). Ho 등(53)은 시판되는 peroxidase, alkaline phosphatase, α -amylase, lipase, lysozyme, glucose oxidase, polyphenol oxidase, pepsin 등을 5-26 kV/cm의 고전압 전기장으로 30-100 μ s 처리한 후와 처리하기 전의 효소의 활성을 비교하였다. 실험 결과 peroxidase, alkaline phosphatase, α -amylase, lipase, glucose oxidase, lysozyme, polyphenol oxidase 등 대부분 효소의 활성이 크게는 90%에서 작게는 5% 정도까지 감소되었으며, pepsin의 경우에만 활성이 증가하였다. Shin(54)의 보고에 의하면 Castro 등은 alkaline phosphatase를 약 70 kV/cm, 20 pulse로 고전압 펄스 전기장 처리한 결과 약 44% 활성이 감소하였으며, Vega-Mercado 등은 plasmin과 protease를 각각 70% 감소하였고, Yeom 등은 연속 처리 장치를 이용하여 papain을 고전압 펄스 전기장 처리한 결과 최대 약 90%의 효소 활성이 감소하였을 뿐만 아니라, CD spectra를 통해 효소의 α -helix 구조가 변화한다고 하였다. 한편 Shin (55)도 lipase를 50 kV/cm로 고전압 펄

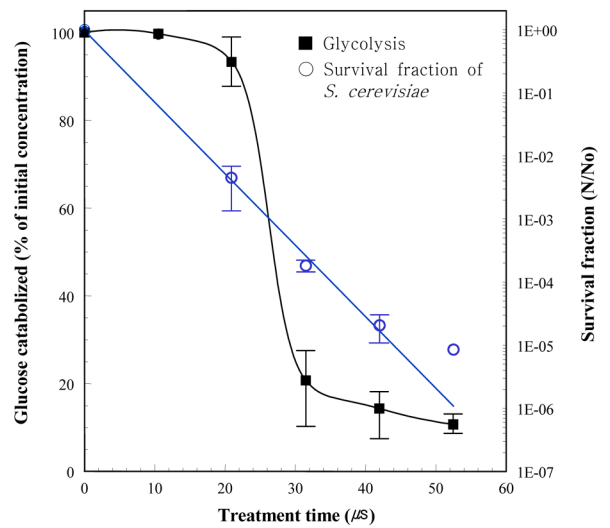


Fig. 5. Glycolysis activity of *S. cerevisiae* cells during high voltage pulsed electric fields treatment at 40°C and 50 kV/cm. The data indicate the percentage of glucose added initially that was catabolized after 2 h at 26°C.

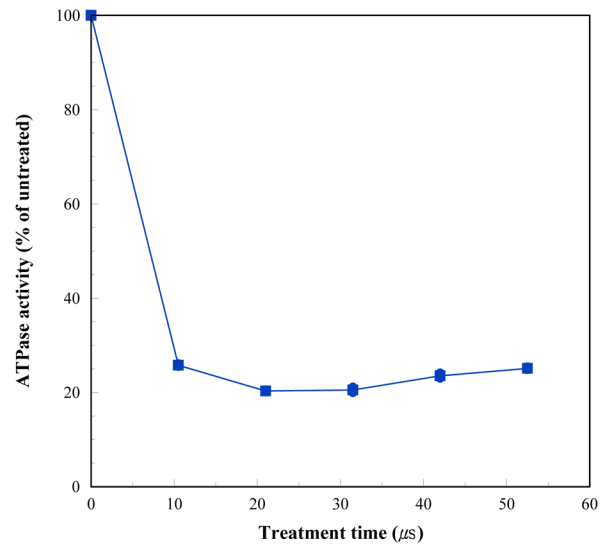


Fig. 6. Activity of H^+ -ATPase in *S. cerevisiae* cells during high voltage pulsed electric fields treatment at 40°C and 50 kV/cm. Enzyme activity was assessed with the membrane vesicles isolated from the cells.

스 전기장 처리하였을 경우 효소 활성이 약 60-70% 효소 활성이 감소하였으며, K_m 과 V_{max} 값도 변화되었다고 보고하였다.

본 실험에서도 *S. cerevisiae*가 생산하는 효소에 대한 고전압 펄스 전기장의 영향을 알아보기 위하여 APIZYM kit를 사용하여 효소활성 변화를 측정하였다(26,40). 40°C, 50 kV/cm로 고전압 펄스 전기장 처리한 균체와 무처리 균체를 APIZYM kit에 접종하여 배양한 후 양성 반응을 나타낸 11가지 효소의 상대적 활성 변화를 관찰할 결과를 L, a, b 값으로 Table 1에, 그리고 발색정도를 Fig. 7에 나타내었다. 표와 그림에서 알 수 있듯이 esterase (slight activation, SA), esterase lipase (slight inactivation, SI), lipase (SI), valine arylamidase (SI), phosphate acid (SI) 등은 고전압 펄스 전기장 처리 전후의 효소 활성에 큰 변화가 없었으며, phosphatase alkaline, leucine arylamidase, naphthol-AS-BI-phospho-

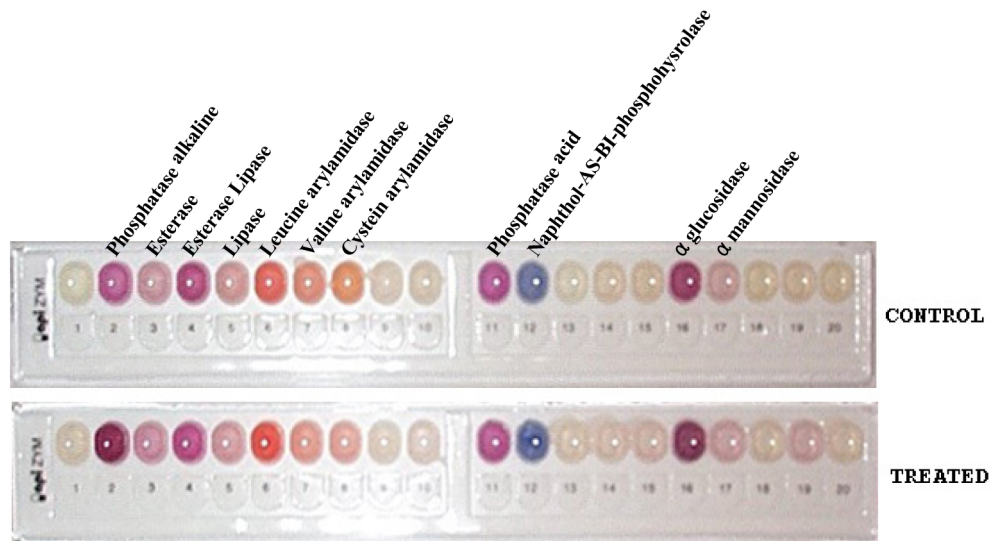


Fig. 7. Changes in enzymatic activities of *S. cerevisiae* by the high voltage pulsed electric field treatment. Experiments were carried out at 40°C and 50 kV/cm.

Table 1. Changes in enzymatic activities¹⁾ of *S. cerevisiae* by the high voltage pulsed electric field treatment

Enzymatic activities	<i>S. cerevisiae</i> untreated			<i>S. cerevisiae</i> treated ²⁾		
	L	a	b	L	a	b
Phosphatase alkaline	42.9±0.7	28.6±0.8	8.27±0.0	39.0±3.5	18.2±2.1	16.7±0.4
Esterase	55.0±0.6	14.8±1.2	-1.31±0.2	53.4±0.4	15.6±0.5	-3.3±0.0
Esterase lipase	47.2±2.2	19.9±2.7	-4.0±0.6	42.6±0.8	26.5±1.5	-6.0±0.5
Lipase	56.2±0.2	11.39±0.5	4.8±0.2	55.2±0.1	13.8±1.7	3.1±0.6
Leucine arylamidase	52.9±1.8	24.2±2.0	31.7±4.6	49.2±0.7	28.5±0.7	34.9±1.1
Valine arylamidase	56.3±0.7	15.4±1.2	23.7±2.9	57.3±0.5	15.2±0.7	22.2±1.2
Cystein arylamidase	56.7±0.7	15.9±1.8	32.2±4.3	57.9±1.1	12.3±1.1	16.5±2.5
Phosphatase acid	43.2±0.7	28.0±1.4	-13.6±6.2	38.9±1.8	26.9±3.6	-7.5±0.7
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	44.3±1.6	7.5±0.9	-19.8±1.3	38.4±1.9	8.9±0.2	-21.9±0.6
α-glucosidase	39.5±1.4	22.6±1.6	-3.0±0.7	32.0±1.2	17.9±0.6	-0.4±0.3
α-mannosidase	64.5±0.6	1.1±0.0	6.6±0.1	60.2±0.6	7.1±0.1	-0.0±0.0

¹⁾assessed by APIZYM system

²⁾treated with PEF for 53 μs at 40°C and 50 kV/cm

hydrolase, α-glucosidase, α-mannosidase 등의 효소는 활성화된 반면에, cystein arylamidase는 불활성화되는 양상을 나타내었다. 이로 미루어 볼 때, 고전압 펄스 전기장이 미생물 세포를 사멸시키는 것과는 달리 효소에 대해서는 선택적으로 작용하여 효소에 따라서 활성화와 불활성화 양상이 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다. 효소가 활성화되거나 불활성화되는 기작에 대해서는 아직 정확하게 밝혀진 바가 없으나 다른 연구에 의하면 고전압 펄스 전기장 처리가 효소의 구조적 변화를 가져와 불활성화를 일으키는 것으로 추측된다. 그리고 고전압 펄스 전기장 처리가 미생물이 가지고 있는 효소의 활성화에 영향을 미칠 수 있는 것으로 판단된다.

요 약

고전압 펄스 전기장 기술은 가열 공정을 대체할 수 있는 비가열 살균기술로서 꾸준한 연구가 이루어지고 있는 기술이다. 본 실험에서는 미생물의 생리적 측면에서 고전압 펄스 전기장 처리

에 의한 효모의 생리적 변화를 살펴보았다. 내염성의 변화를 측정할 결과 사멸하지 않은 세포의 90-99% 이상이 세포 손상에 의해 내염성을 상실하였으며, 내염성을 회복하는데 약 4-6시간의 시간이 걸렸다. 고전압 펄스 전기장 처리 초기에는 세포 내외의 pH 구배(ΔpH)가 차이가 컸으나 처리시간이 증가함에 따라 그 차이가 감소하였다. 이는 세포의 pH 항상성을 유지시키는 H⁺-transportation 기능을 담당하고 있는 H⁺-ATPase 활성이 상실되었거나 세포막 자체가 손상되어 pH 항상성을 잃어버렸기 때문으로, 이는 고전압 펄스 전기장 처리한 세포의 H⁺-ATPase의 활성이 초기부터 크게 감소하는 것으로 확인할 수 있었다. 또한 세포의 해당 활성이 고전압 펄스 전기장 처리에 의해 크게 감소하여 세포의 대사 기능이 손상되는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농림수산기술개발사업(고부가가치 식품개발사업)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Castro AJ, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields. *J. Food Process. Pres.* 17: 47-73 (1993)
2. Qin BL, Pothakamury UR, Vega H, Martin O, Barbosa-Canovas GC, Swanson BG. Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technol.-Chicago* 49: 55-60 (1995)
3. Leistner G, Gorris LGM. Food preservation by combined processes. FLAIR Final Report, EUR 15576 EN, 100 pp. Brussels: European Commission, DG (1994)
4. Monfort S, Saldana G, Condon S, Raso J, Alvarez I. Inactivation of *Salmonella* spp. in liquid whole egg using pulsed electric fields, heat, and additives. *Food Microbiol.* 30: 393-399 (2012)
5. Zhu Z, Bals O, Grimi N, Ding L, Vorobiev E. Qualitative characteristics and dead-end ultrafiltration of chicory juice obtained from pulsed electric field treated chicories. *Ind. Crop. Prod.* 46: 8-14 (2013)
6. Puertolas E, Cregenzan O, Luengo E, Alvarez I, Raso J. Pulsed electric field assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshe potato. *Food Chem.* 136: 1330-1336 (2013)
7. Mhemdi H, Grimi N, Bals O, Lebovka NI, Vorobiev E. Effect of apparent density of sliced food particles on the efficiency of pulsed electric field treatment. *Innov. Food Sci. Emerg.* 18: 115-119 (2013)
8. Turk MF, Vorobiev E, Baron A. Improving apple juice expression and quality by pulsed electric field on an industrial scale. *LWT-Food Sci. Technol.* 49: 245-250 (2012)
9. Knorr D, Geulen M, Grahl T, Sitzmann W. Food application of high electric field pulses. *Trend. Food Sci. Tech.* 5: 71-75 (1994)
10. Pothakamury UR. Preservation of food by nonthermal processes. PhD thesis, Washington State University, Pullman, WA, USA (1995)
11. Harrison SL. High intensity pulsed electric field and high hydrostatic pressure processing of apple juice. PhD thesis, Washington State University, Pullman, WA, USA (1996)
12. Zimmermann U, Pilwat G, Riemann F. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys. J.* 14: 881-899 (1974)
13. Marx G, Moody A, Bermudez-Aguirre D. A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. *Int. J. Food Microbiol.* 151: 327-337 (2011)
14. Gallo LI, Pilosof AMR, Jagus RJ. Effect of the sequence of nisin and pulsed electric fields treatments and mechanisms involved in the inactivation of *Listeria innocua* in whey. *J. Food Eng.* 79: 188-193 (2007)
15. Delorme E. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Appl. Environ. Microb.* 55: 2242-2246 (1989)
16. Calderon-Miranda ML, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. Transmission electron microscopy of *Listeria innocua* treated by pulsed electric fields and nisin in skimmed mil. *Int. J. Food Microbiol.* 51: 31-38 (1999)
17. Slavik J. Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probe. *FEBS Lett.* 140: 22-26 (1982)
18. Bender GR, Marquis RE. Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microb.* 53: 2124-2128 (1987)
19. Hong SI, Pyun YR. Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO₂ treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 63: 19-28 (2001)
20. Bender GR, Sutton SVW, Marquis RE. Acid tolerance, proton permeabilities and membrane ATPases of oral *streptococci*. *Infect. Immun.* 53: 331-338 (1986)
21. Poole RK. The isolation of membranes from bacteria. vol. 19, pp. 109-122. In: Biomembrane Protocols. Graham J, Higgins J (eds). Humana Press Inc., New York, NY, USA (1993)
22. Simpson RK, Whittington R, Earnshaw RG, Russell NJ. Pulsed high electric field causes 'all or nothing' membrane damage in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*, but membrane H⁺-ATPase is not a primary target. *Int. J. Food Microbiol.* 48: 1-10 (1999)
23. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400 (1925)
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
25. Markwell MAK, Hass SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87: 206-210 (1978)
26. Humble MW, King A, Phillips I. APIZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *J. Clin. Pathol.* 30: 275-277 (1977)
27. Przybylski KS, Witter LD. Injury and recovery of *Escherichia coli* after sublethal acidification. *Appl. Environ. Microb.* 37: 261-265 (1979)
28. Iandolo JJ, Ordal ZJ. Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 91: 134-142 (1966)
29. Hurst A. Bacterial injury: A review. *Can. J. Microbiol.* 23: 935-944 (1977)
30. Shin JK, Pyun YR. Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed microwave irradiation. *J. Food Sci.* 62: 163-166 (1997)
31. Mitchell P, Moyle J. Osmotic structure and function in bacteria. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 6: 150-180 (1956)
32. Pina-Perez MC, Rodrigo D, Lopez AM. Sub-lethal damage in *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii* cells after different pulsed electric field treatments in infant formula milk. *Food Control* 20: 1145-1150 (2009)
33. Zhao W, Yang R, Shen X, Zhang S, Chen X. Lethal and sublethal injury and kinetics of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk by pulsed electric fields. *Food Control* 32: 6-12 (2013)
34. Rozes N, Peres C. Effect of oleuropein and sodium chloride on viability and metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 839-843 (1996)
35. Dreyfuss HS, Chipley JR. Comparison of effects of sublethal microwave radiation and conventional heating on the metabolic activity of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microb.* 39: 13-16 (1980)
36. Garcia MJ, Rios G, Ali R, Belles JM, Serrano R. Comparative physiology of sal tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143: 1125-1131 (1997)
37. Mendoza I, Rubio F, Rodriguez-Navarro A, Pardo JM. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269: 8792-8796 (1994)
38. Somolinos M, Manas P, Condon S, Pagan R, Garcia D. Recovery of *Saccharomyces cerevisiae* sublethally injured cells after pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 125: 352-356 (2008)
39. Khalil H, Villota R. Comparative study on injury and recovery of *Staphylococcus aureus* using microwaves and conventional heating. *J. Food Protect.* 51: 181-186 (1988)
40. Hong SI. Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide. PhD thesis, Yonsei University, Seoul, Korea (1997)
41. Albert SG. Biochemical aspects of yeasts. pp. 33-46. In: Yeast Technology. Reed G, Pepler HJ (eds). Westport, CN, USA (1973)
42. Poolman B. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 125-147 (1993)
43. Tanino T, Sato S, Oshige M, Ohshima T. Analysis of the stress response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* toward pulsed electric field. *J. Electrostat.* 70: 212-216 (2012)
44. Foster JW, Cowan RM, Magg TA. Rupture of bacteria by explosive decompression. *J. Bacteriol.* 83: 330-334 (1962)
45. Jung S, Lowe SE, Hollingsworth RI, Zeikus JG. *Sarcina ventriculi* synthesizes very long chain dicarboxylic acids in response to different forms of environmental stress. *J. Biol. Chem.* 268: 2828-2835 (1993)
46. Booth IR. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* 49: 359-378 (1985)
47. Kobayashi H, Suzuki T, Unemoto T. Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-

- translocating ATPase. J. Biol. Chem. 261: 627-630 (1986)
48. Kashket ER. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. FEMS Microbiol. Lett. 46: 233-244 (1987)
49. Hutkins RW, Nannen NL. pH homeostasis in lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 76: 2354-2365 (1993)
50. Futai M, Kanazawa H. Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase (F_0F_1) biochemical and molecular biological approaches. Microbiol. Rev. 47: 285-312 (1983)
51. Schneider E, Altendorf K. Bacterial adenosine 5'-triphosphate synthase (F_0F_1): purification and reconstitution of F_0 complexes and biochemical and functional characterization of their subunits. Microbiol. Rev. 51: 477-497 (1987)
52. Zhao W, Yang R, Zhang HQ. Recent advances in the action of pulsed electric fields on enzymes and food component proteins. Trends Food Sci. Tech. 27: 83-96 (2012)
53. Ho SY, Mittal GS, Cross JD. Effects of high field electric pulses on the activity of selected enzymes. J. Food Eng. 31: 69-84 (1997)
54. Shin JK. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by high voltage pulsed electric fields treatment. PhD thesis, Yonsei University, Seoul, Korea (2000)
55. Shin JK. Nonthermal sterilization of foods using high power electrical energy (D10-3). In: 2013 Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology. August 28-30, Cheonan Art Center, Cheonan, Korea. The Korean Society of Food Science and Technology, Seoul, Korea (2013)