

고전압 펄스 전기장 처리된 미생물 세포의 생리특성

김경탁·김성수·최희돈·홍희도·하상도*·이영춘**

한국식품개발연구원, *한국보건 의료관리연구원

**중앙대학교 식품공학과

Physiological Properties of Microbial Cells Treated by Pulsed Electric Field (PEF)

Kyung-Tack Kim, Sung-Soo Kim, Hee-Don Choi, Hee-Doo Hong,
Sang-Do Ha* and Young-Chun Lee**

Korea Food Research Institute, *Korea Institute of Health Management Services

**Department of Food Science & Technology, Chung Ang University

Abstract

This study was designed to investigate effects of pulsed electric field (PEF) treatment on physiological changes of microbial cells, using domestically fabricated pilot scale PEF device. The effect of non-thermal PEF treatment on physiological characteristics of microorganisms was determined by salt resistance, the amount of UV absorbents, cell staining, recovery rate of defected cells, and changes in structure of cell membrane. Salt resistance of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Rhodotorula minuta* was examined after PEF treatment at 40 kV/cm, 84 pulse, 10 μ s pulse duration. Approximately 1 log₁₀ cell number of viable microorganisms was decreased by addition of salt. PEF treatment significantly increased the amount of UV absorbents at 260 and 280 nm because of leakage from damaged cell membrane by PEF treatment. Although three kinds of microorganisms treated by PEF were difficult to be observed due to their cell membrane damage, untreated cells were clearly observed by a microscope. PEF-treated *R. minuta* was not stained by methylene blue due to cell membrane defect. When *E. coli*, *B. subtilis* and *R. minuta* were cultured after PEF treatment, they showed 5, 4, and 8 hr longer lag phase, respectively, compared to control, but growth rates were not affected.

Key words: pulsed electric field (PEF), apple juice, non-thermal processing, microorganism, shelf-life

서 론

최근 식품에 대한 소비자들의 구매 욕구는 생활 환경의 변화에 따라 종전의 칼로리 및 영양성 위주에서 건강지향성과 편의성이 강조되고 천연의 품질을 그대로 유지할 수 있는 최소가공 식품을 요구하고 있다^(1,2). 이에 따라 여러 가지 비가열 처리 기술이 개발되고 있는데 현재 식품산업에서 개발되고 있는 비가열 처리 기술에는 고전압 펄스 전기장(pulsed electric field, PEF), 진동 자기장, 이온화 조사, 광펄스, 초고압⁽³⁾, 초음파, 마이크로 웨이브⁽⁴⁾ 등을 이용한 물리적 방법과 이산화탄소, 양이온 다중 고분자 같은 화학물질 및 세

포벽 분해효소 등을 이용하는 방법들이 있다⁽⁵⁾. 이와같은 방법 중에서 고전압 펄스 전기장에 의한 미생물의 불활성화는 주로 전계강도(electric field strength), 펄스의 처리수, 주파수, 파형 및 식품의 전기 저항값에 크게 영향을 받으며 고전압 펄스 전기장 처리에 의한 미생물의 살균기작은 비가역적인 electroporation^(6,8)이며, 이러한 현상은 주로 세포막의 압축(compression)에 의한 것으로 알려져 있다. 이런 측면에서 고전압 펄스를 이용한 전기장 처리 기술은 미생물을 효과적으로 살균하여 기존의 식품에 비해 품질을 개선시키거나 영양적, 관능적 특성이 우수한 고품질의 식품을 제조하는 기술로서 기존의 살균 공정과 비교하여 품질과 저장기간에 있어서 획기적 개선 효과를 거둘수 있는 신 살균 기술^(9,13)으로 평가되고 있다. 현재 우리 나라에서도 일부 연구팀에 의해 고전압 펄스 전기장 처리에 의한

Corresponding author: Kyung-Tack Kim, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Kyunggi-do, 463-420, Korea

기술 연구가 진행중에 있으나 pilot-scale의 고전압 펄스 전기장 처리에 의한 미생물 사멸 기작에 대한 연구는 거의 수행되지 않고 있는 실정이다. 본 연구에서는 국내 기술로 자체 제작한 장치로 고전압 펄스 전기장 처리된 미생물 세포의 생리특성을 조사하여 미생물의 사멸기작을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

재료

모델 용액 제조를 위한 유기산, 당류, pectin 등은 Sigma 사(미국)의 제품을, 미생물 시험을 위한 배지는 Petrifilm™ (3M, 미국)을 구입하여 사용하였다. 본 연구에 사용한 미생물인 *Escherichia coli* (KFRI No. 00272)는 한국식품개발연구원 생물공학 연구부에서 분양받아 사용하였고, *Bacillus subtilis* (KCTC No. 3135)와 *Rhodotorula minuta* (KCTC No. 6929)는 생명공학연구소에서 분양받아 사용하였다.

고전압 펄스 전기장(pulsed electric field, PEF) 발생 장치

본 연구를 위하여 한국전기연구소와 공동으로 고전압 펄스 전기장(PEF) 발생 장치를 고안·제작하였다. PEF의 공정도는 Fig. 1과 같으며, 전체적인 PEF 장치는 power supply, capacitor, thyatron, transformer, diod, inductance, treatment chamber, pulse generator로 구성되어 있으며, power supply의 용량은 20 kV이고 thyatron은 1000 A×25 kV/cm이다. Pulse generator는 500 V, 100 A, 10 μs, 0~300 Hz이며, treatment chamber는 두 개의 disc electrode와 spacer로 구성되어 있고 spacer의 재질은 acryl, electrode의 재질은 stainless still이다. 전극의 간격은 0.5 cm, 1 cm로 조정 가능하며, chamber의 시료 처리용량은 5.5 L/min, chamber의 용량은 14 mL이었다.

모델용액의 제조

과실주스의 일종인 신선착즙 사과주스와 유사한 이 화학적인 성분조성을 갖는 모델용액을 조제하기 위하여 사과즙의 주요 유기산인 citric acid와 L-malic acid 용액을 이용하여 pH와 산도를 각각 3.7과 0.36이 되게 조정하였다. 총당의 함량은 glucose와 sucrose를 사용하여 12.9%로 조정하였고 pectin을 0.2% 첨가하였으

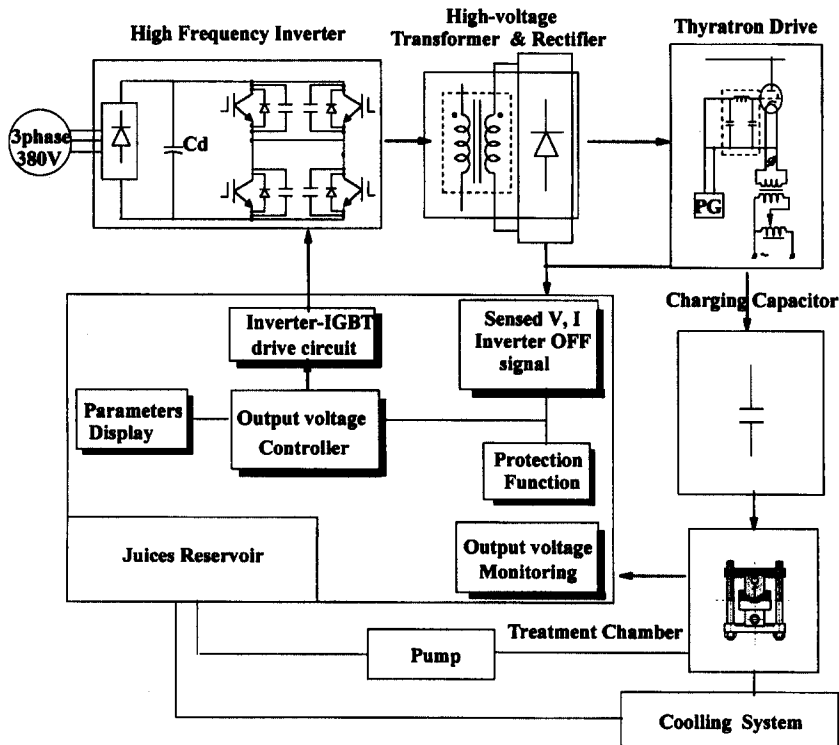


Fig. 1. Block diagram of pulsed electric field (PEF) treatment system.

며, NaCl 용액을 첨가하여 전기 저항값을 50 ohm으로 조정하였다.

내염성 측정

내염성(salt tolerance) 변화 측정은 40 kV/cm에서 10 μs 펄스 지속기, 21, 42, 63, 84 펄스의 수로 PEF 처리한 *E. coli*, *B. subtilis* 그리고 *R. minuta* 균액을 여러 농도의 NaCl을 함유한 nutrient agar와 YM agar에 도말하여 평판배양한 후 colony를 계수하여 균의 내염성을 조사하였다⁽¹⁴⁾.

자외선 흡수물질 측정

자외선 흡수 물질 측정^(15,16)은 균 배양액을 모델용액에 접종한 후 40 kV/cm에서 10 μs 펄스 지속기, 21, 42, 63, 84 펄스의 수로 PEF 처리하여 시료액을 4°C에서 15,000×g로 15분간 원심분리하여 상정액을 취한 다음 Spectrophotometer (V-550, Jasco, Japan)를 이용하여 260과 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포염색 관찰

세포염색 관찰은 PEF 처리 균체 시료액 1 mL에 1% (w/v) methylene blue 용액 0.1 mL를 첨가한 다음 약 10분 경과 후 광학현미경(Diaphot 300, Nikon, Japan)을 이용하여 세포를 관찰하였다.

세포의 회복도 측정

세포의 회복도 측정은 세균과 효모의 배양액을 원심분리하여 수거한 균체를 모델용액에 넣고 40 kV/cm에서 84 펄스의 수로 PEF 처리한 후 균주액 1 mL를 취하여 새로운 액체배지에 접종시킨 다음 손상된 세포가 회복되도록 효모는 25°C, 세균은 37°C에서 진탕배양하며 시간별로 600 nm에서 배양액의 흡광도를

측정하였다.

주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM) 관찰

주사전자현미경 관찰은 40 kV/cm에서 84 펄스의 수로 PEF 처리한 균체시료와 무처리 시료를 정착액(5% paraformaldehyde, 5% glutaraldehyde, 0.2 M phosphate buffered saline, pH 6.2)으로 고정하고 이를 무기질 여과막(Anodisc 25, Whatman Lab.)에 통과시켜 탈수, 건조한 다음 금(Au) 코팅하여 SEM (JSM-5410LV, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

내염성 측정

Escherichia coli, *B. subtilis* 및 *R. minuta*를 NaCl을 첨가하지 않은 nutrient agar와 각 균이 내염성을 갖는 농도의 NaCl을 첨가한 배지에서 배양시킨 결과는 Fig. 2와 같다. 세균은 모두 PEF 처리 펄스수가 증가됨에 따라 내염성이 감소하였고, 84 pulse에서는 약 90%의 균이 내염성을 소실하였다. *B. subtilis*는 *E. coli*와 *R. minuta*에 비하여 내염성 감소율이 낮은 것으로 보아 PEF에 상대적으로 강한 것으로 판단되었다. 84 pulse에서 약 1 log cycle 정도의 내염성 미생물 수가 감소한 결과는 PEF 처리에 의해 세포막의 손상이 일어나 내염성을 소실하였기 때문으로 생각되었다. Shin 등⁽¹⁷⁾도 젖산균인 *Lactobacillus plantarum*을 80 kV/cm, 300 μs, 50°C에서 PEF 처리한 후 MRS 배지와 NaCl 4%가 포함된 MRSS 배지에 배양하여 생존율을 측정 한 결과, MRS 배지에 비하여 MRSS 배지에서 낮은 생존율을 나타내었고 PEF 처리시간이 계속 증가함에 따라서 내염성이 완전히 소실되어 생존율에 큰 차이

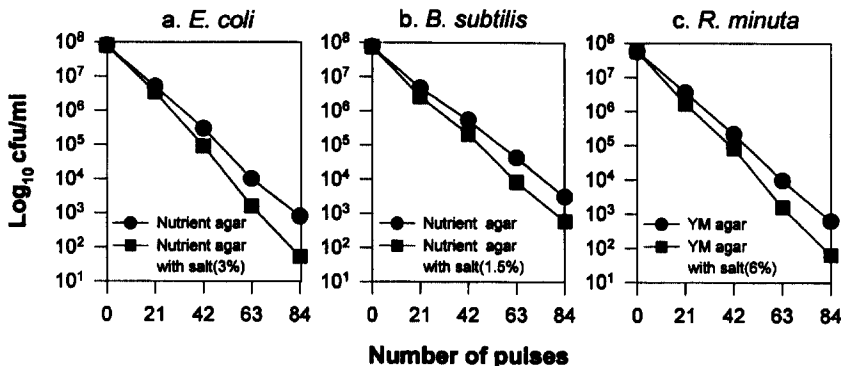


Fig. 2. Inactivation of microbes on Nutrient agar with and without salt after pulsed electric field (PEF) treatment.

를 나타내지 않았음을 보고하였다.

자외선 흡수물질 측정

PEF 처리에 따른 세포의 세포막 손상 여부를 확인하기 위하여 260 nm와 280 nm에서 자외선 흡수물질의 양을 측정된 결과는 Fig. 3, 4와 같다. 펄스의 수가 증가할수록 세포 내부에서 유출된 자외선 흡수물질의 양이 증가하는 것으로 나타났으며 세균인 *E. coli*와 *B.*

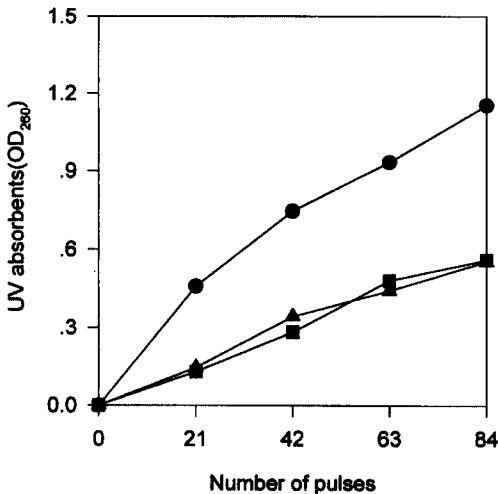


Fig. 3. Amount of UV absorbents at 260 nm leaked from cells by pulsed electric field (40 kV/cm, 10 μ s pulse duration) treatment. \blacktriangle — \blacktriangle : *Escherichia coli*, \blacksquare — \blacksquare : *Bacillus subtilis*, \bullet — \bullet : *Rhodotorula minuta*.

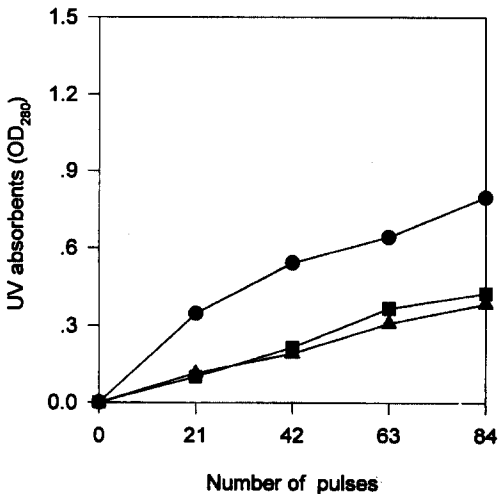


Fig. 4. Amount of UV absorbents at 280 nm leaked from cells by pulsed electric field (40 kV/cm, 10 μ s pulse duration) treatment. \blacktriangle — \blacktriangle : *Escherichia coli*, \blacksquare — \blacksquare : *Bacillus subtilis*, \bullet — \bullet : *Rhodotorula minuta*.

*subtilis*에 비하여 효모인 *R. minuta*의 자외선 흡수물질이 더욱 증가하였다. 효모의 세포가 PEF 처리에 의해 세균보다 쉽게 파괴된다고 판단할 수 있으나, PEF 처리에 의한 이들 세균의 사멸율이 거의 차이가 없는 것으로 보아 *R. minuta*가 *E. coli*와 *B. subtilis*에 비하여 세포막의 손상정도가 컸다기 보다는 세균과 효모의 세포 내부 구성성분의 차이에 의한 것으로 생각되었다. Kim⁽¹⁸⁾는 *Phaffia rhodozyma* 현탁액을 10~30 kV/cm로 PEF 처리하였을 때 무처리한 대조구에 비하여 전기장의 세기가 커질수록 흡광도가 증가하는 것을 근거로 PEF 처리에 의한 세포막의 투과성 변화와 함께 세포내 물질이 유출되는 것을 확인하였다고 하였다.

세포염색 관찰

세포막이 완전한 생균은 색소를 첨가했을 때 이를 계속 배출하여 염색되지 않으나 세포막이 손상된 경우에는 내부로 흡수되어 염색된다. 이를 근거로 phloxine B나 methylene blue와 같은 색소는 미생물 세포의 생사뿐만 아니라 세포막의 파손여부를 결정하는 도구로도 흔히 사용하여 왔다⁽¹⁹⁾. PEF 처리된 *R. minuta* 균의 세포막 손상정도를 확인하기 위하여 PEF 처리된 균과 무처리 균에 일정량의 methylene blue를 첨가한 후 광학현미경을 이용하여 염색된 세포와 투명한 세포를 관찰하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같다. 무처리 균체시료에서는 색소가 세포 내부로 거의 침투되지 못하고 세포 원형 그대로 염색되어 있으나 PEF 처리된 균체에서는 세포막이 터져 세포 내, 외부가 골고루 염색되었으며, 세포 원형을 관찰하기 어려웠다. 이것은 PEF 처리에 의해 미생물의 세포막이 손상되었음을 증명하는 결과로서 이로 인한 균체 사멸 가능성을 보여 주었다. Kim⁽¹⁸⁾도 *Phaffia rhodozyma* 세포의 PEF 처리에 의한 phloxine B 염색시약의 침투정도를 화상분석기를 이용하여 관찰한 결과 무처리 세포의 경우 phloxine B 염색시약이 세포막에 침투하지 못하여 원형 그대로 염색되었으나 PEF 처리한 세포의 경우는 phloxine B 염색시약의 세포 내부 침투로 붉은색으로 염색되었음을 보고하였다.

세포의 회복도 측정

40 kV/cm에서 84 펄스 수로 PEF 처리한 *E. coli*, *B. subtilis*, *R. minuta* 균주를 각각 1 mL씩 취하여 YM broth와 nutrient broth에 접종 시킨 후 25°C와 37°C에서 배양하면서 시간에 따른 세포의 회복정도를 lag time으로 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. 40 kV/cm에서 21, 42, 63, 84 펄스수로 PEF 처리된 *E. coli*, *B. subtilis*,

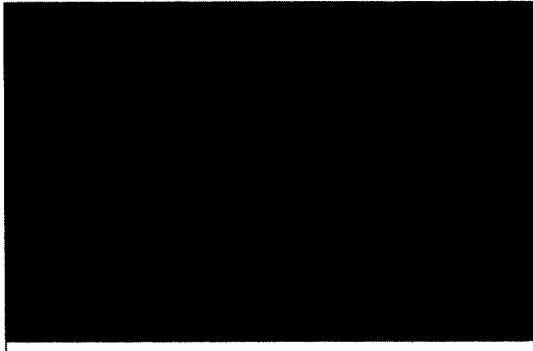


Fig. 5. Inclusion of methylene blue in *Rhodotorula minuta* cells untreated (a) and treated (b) by pulsed electric field at 40 kV/cm, 10 μ s pulse duration.

R. minuta 균주를 Nutrient broth에서 재배양한 경우, 무처리 균주에 비하여 성장을 시작하기 위하여 필요한 lag time이 각각 5시간, 5시간, 8시간 정도 지연되었다. Shin 등¹⁷⁾도 PEF처리된 *L. plantarum*을 재배양한 경우 무처리균에 비해 MRS 배지와 MRSS 배지에서 lag

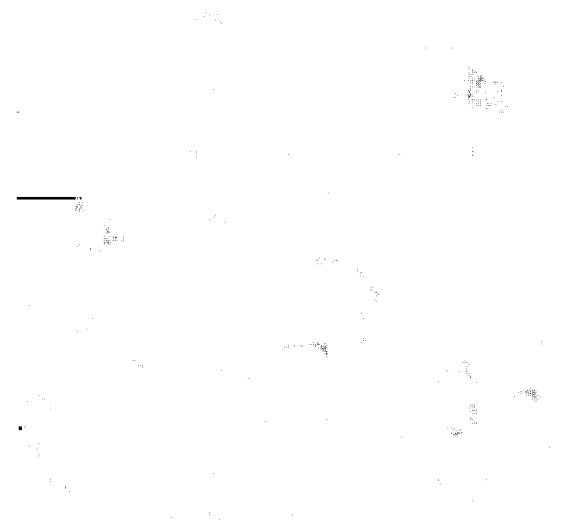


Fig. 7. Scanning electron micrographs of *Escherichia coli* cells untreated (a) and treated (b) by pulsed electric field at 40 kV/cm, 10 μ s pulse duration.

time이 각각 2시간, 4시간 지연되었다고 보고하였다.

주사전자현미경 관찰

E. coli, *B. subtilis*, *R. minuta*를 40 kV/cm에서 84 펄스수, 10 μ s 펄스 지속기로 PEF 처리한 후 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과는 Fig. 7, 8, 9에서 나타

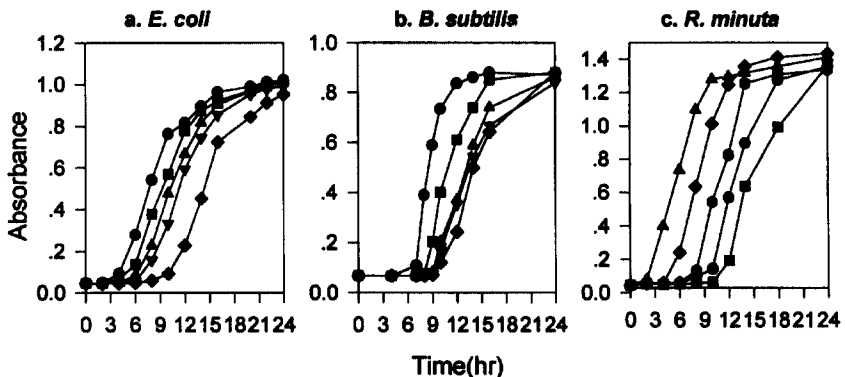


Fig. 6. Growth curve of pulsed electric field (PEF) treated microbes on nutrient broth at various numbers of pulses (40 kV/cm, 10 μ s pulse duration). ●—●: Control, ■—■: 21 pulses, ▲—▲: 42 pulses, ▼—▼: 63 pulses, ◆—◆: 84 pulses.

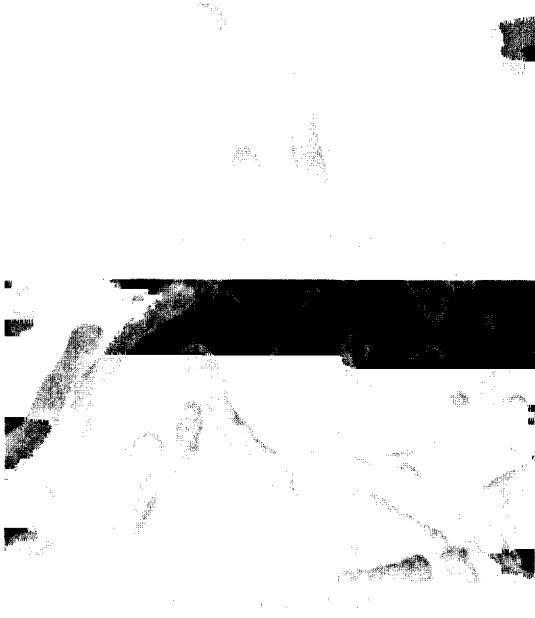


Fig. 8. Scanning electron micrographs of *Bacillus subtilis* cells untreated (a) and treated (b) by pulsed electric field at 40 kV/cm, 10 μ s pulse duration.

나는 바와 같이 처리된 세포는 외형상 무처리 세포에 비하여 세포막의 손상이 매우 심하게 일어나 일부 세포는 완전히 터진 상태인 것을 관찰할 수 있었다. 또한 일부 세포는 세포막에 상당한 손상을 입어 세포막 주변이 허물허물한 상태로 개열되어 있는 것들도 있었다. Jayaram과 Castle²⁰⁾은 *L. brevis* 세포를 PEF 처리한 후 전자현미경으로 관찰한 결과 PEF 처리 시간이 길어질수록 무처리균에 비하여 세포손상의 정도가 심하였으며, 세포의 사멸은 손상된 막을 통하여 내부 성분이 유출되는 것에 기인하는 것으로 보고하였다. 이와 같이 PEF 처리에 의한 세포의 형태학적 변화는 앞서 언급한 자외선 흡수물질의 유출과 염색색소 흡수 등의 세포막 손상을 확인해 주는 실험결과와 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

요 약

식품공정에 있어서 비가열 살균 기술로 개발되고 있는 고전압 펄스 전기장(pulsed electric fields, PEF)을 과실주스의 품질 향상에 응용하고자 pilot-scale의 고전압 펄스 전기장 살균장치를 개발하였으며, 이것을



Fig. 9. Scanning electron micrographs of *Rhodotorula minuta* cells untreated (a) and treated (b) by pulsed electric field at 40 kV/cm, 10 μ s pulse duration.

과실주스의 모델로 선정된 사과주스의 대표적 오염지표균 또는 품질을 저하시키는 미생물 중 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Rhodotorula minuta*에 적용시켜 세포의 생리특성을 조사하였다. 내염성, 자외선 흡수물질, 세포염색, 세포의 회복도, 세포의 표면구조 등을 조사함으로써 PEF의 미생물 생리특성에 대한 영향을 규명하고자 하였다. *E. coli*, *B. subtilis*, *R. minuta*를 40 kV/cm, 84 pulse, 10 μ s pulse duration의 PEF 조건에서 처리하여 내염성을 조사한 결과 1 log cycle 정도의 생존율 감소를 나타내었다. PEF 처리에 의한 세포 내부 성분의 유출 여부를 살펴본 자외선 흡수물질 측정결과 260 nm, 280 nm에서 모두 PEF 처리 세포가 무처리균에 비하여 현저하게 증가된 흡수물질 농도를 나타내었다. PEF 처리된 *R. minuta*를 세포 염색하여 관찰한 결과 세포막이 터져서 개열됨에 따라 염색시약이 세포 내, 외부로 고루 염색되어 세포 본래의 형태를 관찰할 수가 없었다. PEF 처리후 세포의 회복도는 무처리균에 비하여 *E. coli*와 *B. subtilis*가 약 5시간, *R. minuta*가 약 8시간 정도 지연된 lag time을 보였다. 그리고 PEF 처리후의 *E. coli*, *B. subtilis*, *R. minuta*는 정상적인 세포와는 달리 세포막이 상당한 손상을 입

어 허물어진 상태를 관찰할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 산업 자원부 에너지기술개발사업의 지원에 의한 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

문헌

- Huxsoll, C.C. and Bolin, H.R.: Processing and distribution alternatives for minimally processed fruits and vegetables. *Food Technol.*, **43**(2), 124-128 (1989)
- Ohlsson, T.: Minimal processing-preservation methods of the future. *Trends Food Sci. Technol.*, **5**, 341-344 (1994)
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C.P. and Ray, B.: Hydrostatic pressure and electroporation have increased bacteriocidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4174-4177 (1994)
- Shin, J.K. and Pyan, Y.R.: Inactivation of *Lactobacillus Plantarum* by pulsed-microwave irradiation. *J. Food Sci.*, **62**, 163-166 (1997)
- Qin, B.L., Pothakamury, U.R., Vega, H., Martin, O., Barbosa-Canovas, G.V. and Swanson, B.G.: Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technol.*, **49**, 55-60 (1995)
- Grahl, T. and Markl, H.: Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 148-157 (1996)
- Gaskov, D., Sigler, K., Janderova, B. and Plasek, J.: Effect of high-voltage electric pulses on yeast cells: Factors influencing the killing efficiency. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **39**, 195-201 (1996)
- 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)
- Hulsheger, H., Potel, J. and Niemann, E.G.: Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiat. Environ. Biophys.*, **20**, 53-65 (1981)
- Pothakamury, U.R., Vega, H., Zang, Q., Barbosa-Canovas, 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)
- Hulsheger, 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-Canovas, G.V. and Swanson, B.G.: Inactivation of *E. coli* for food pasteurization by high-intensity-short-duration pulsed electric fields. *J. Food Process and Preser.*, **19**, 103-118 (1995)
- Ho, S.Y., Mittal, G.S., Cross, J.D. and Griffiths, M.W.: Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* by high voltage electric pulses. *J. Food Sci.*, **60**, 1337-1340 (1995)
- Hurst, A., Hughes, A., Beare-Roger, J.L. and Collins-Thompson, D.L.: Physiological studies on the recovery of salt tolerance by *Staphylococcus aureus* after sublethal heating. *J. Bacteriol.*, **116**, 901-907 (1973)
- Kato, S., Kobayashi, H. and Watanabe, T.: Effect of pH on the microbial action of sucrose laurate. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **27**, 218-223 (1986)
- Tatsuguchi, K., Sakamoto, J., Lee, J.K. and Tsutsumi, M.: Leakage of cellular materials and damage to the cellular surface of *Escherichia coli* by glycine and/or sodium chloride. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **30**, 506-511 (1989)
- Shin, H.H., Shin, J.K. and Pyun, Y.R.: Physiological properties of *Lactobacillus plantarum* treated by pulsed electric field. *Korean J. Food Sci. Technol., Academic Conference, Abstracts*, p.126 (1997)
- Kim, N.H.: Effect of high voltage pulsed electric field on the extraction of carotenoid from *Phaffia rhodozyma*. *M.S. Thesis*, Yonsei Univ., Seoul, Korea (1997)
- Iandolo, J.J. and Ordal, Z.J.: Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **91**, 134-142 (1966)
- Jayaram, S. and Castle, G.S.P.: Kinetics of sterilization of *Latobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1412-1420 (1992)

(1998년 9월 25일 접수)