

# 유전체장벽 방전구조의 비접촉식 저온 대기압 면방전 플라즈마를 이용한 빵곰팡이의 살균효과

유영호 · 엄환섭 · 박경순\* · 최은하\*

광운대학교 플라즈마 바이오과학 연구센터, 서울 139-701

(2012년 12월 22일 받음, 2013년 3월 18일 수정, 2013년 3월 20일 확정)

본 연구에서는, 동시에 넓은 면적을 조사할 수 있는 형태의 유전체 장벽 방전을 이용한 대기압 면방전 플라즈마 발생장치를 이용하여 곰팡이의 살균 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 면방전 플라즈마 발생장치의 파워는 사인파 교류전원을 이용하였으며, 1.4~2.3 kV의 방전전압을 가진다. 또한, 유전체 전기용량의 특성으로 인하여 전압과 전류의 위상차는 약 80도를 갖는다. 생물시료에 미치는 온도의 영향은 공랭식 쿨러를 사용하여 유전체의 열을 배출함으로써 최소화 하였으며, 시료의 온도는 온도측정장치를 사용하여 쿨러(Cooler) 작동 시 최대 10분간 플라즈마를 발생시켜도 37도가 넘지 않음을 확인하였다. 플라즈마에서 생성되는 활성종중 오존(O<sub>3</sub>)의 양은 플라즈마 발생부로부터 1 cm 이내에서 약 25~30 ppm이 측정되었으며, 150 cm 떨어진 지점에서도 5 ppm 정도 측정되었다. 그에 비해 일산화질소(NO)나 이산화질소(NO<sub>2</sub>)는 거의 검지되지 않음을 확인하였다. 증류수 속에 담긴 빵 곰팡이 포자를 면방전 플라즈마 발생장치로 처리하였을 때, 포자의 발아율은 처리시간 및 출력파워가 증가함에 따라 급격히 감소하였으며, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) 측정법을 통해 분석한 미토콘드리아 활성도도 처리시간과 출력파워에 비례하여 감소함을 보였다. 반면 포자를 Vogel's minimal 배양액에 넣고 플라즈마 처리를 하면, 앞의 실험과 달리 살균효과가 미비함을 보였는데, 이를 통해 포자를 둘러싸고 있는 환경이 플라즈마의 살균효과에 영향을 미치는 것으로 보여진다. 본 연구를 통하여 유전체 장벽을 이용한 면방전 플라즈마 발생장치는 플라즈마 제트(jet)와는 달리 직접적인 접촉 없이도 미생물 살균이 가능하다는 것을 보여주었으며, 이는 면방전 플라즈마 발생장치로부터 발생하는 활성종들이 곰팡이와 같은 미생물의 비활성화에 주요역할을 하기 때문이라고 본다.

주제어 : 유전체장벽 방전구조, 저온 대기압 면방전, 플라즈마, 빵 곰팡이, 살균, 활성종

## I. 서 론

플라즈마는 제 4의 물질상태를 지칭하는 말로써 기체가 보다 높은 에너지를 가지게 되었을 때 이온과 전자로 분리되면서 이들이 갖는 에너지가 서로 평형을 이루는 상태를 말한다 [1]. 몇 가지 플라즈마의 예를 들면 태양이나 초신성, 천둥, 오로라 등과 같이 자연적으로 발생하는 것들이 있으며, 이는 실제 우리 주변에서 보기 힘들뿐만 아니라 인공적으로 만들어 내는 것 또한 매우 어렵다. 하지만 그럼에도 불구하고 플라즈마에 대한 연구는 그동안 꾸준히 이루어져 왔으며 오늘날 그 원리를 이용한 다양한 기술들, 대표적으로 형광등, 네온사인, PDP, 공기청정기 등이 개발되어 우리 주변에서 널리 사용되고 있다.

반도체 공정이나 식각, 신소재 합성과 같은 공업 분야에 주로 사용되던 플라즈마 기술이 인간의 삶에 직접적으로

들어오게 된 것은 2000년대 초반 PDP (Plasma Display Panel)의 등장에 의해서였다 [2]. 브라운관 형태의 TV에서 벗어나 얇아지고 넓어진 화면은 TV시장의 성장을 가져와 주었으며, 이로 인해 PDP 시장이 커지고 관련된 플라즈마 산업 또한 크게 성장했다. 이후로 플라즈마를 실생활에 접목하고자 하는 다양한 연구가 진행되어 오. 폐수를 플라즈마로 정화시켜 처리하거나 [3], 의료기기의 살균, 불화탄소 가스, 디젤 엔진매연, 화생독가스를 분해하는 [4] 등의 다양한 응용연구가 진행되었다. 최근에 와서는 플라즈마 기술을 미생물의 살균, 상처의 지혈, 치아미백, 암세포 사멸유도와 같은 의학분야에 적용하여 탁월한 효과를 보임에 따라 [5-15] 이를 응용한 실용적 시도가 크게 늘어나고 있다.

경제적, 기술적 측면에 있어 진공에서 플라즈마를 발생시킬 경우 쉽고 저렴하게 사용할 수 있다는 장점이 있지만,

\* [전자우편] ehchoi@kw.ac.kr, gyungp@kw.ac.kr

대체로 이를 적용하기 위해선 처리대상이 진공에서 아무런 영향을 받지 않아야 한다는 전제조건이 필요하다. 이로 인해 플라즈마 기술을 바이오 분야에 적용하는 것은 매우 어려웠으나 오늘날 이를 해결하면서 대기에서 플라즈마를 발생시킴과 동시에 경제적, 기술적 효율성도 살린 저온 대기압 플라즈마 장치의 개발로 바이오 분야 적용에 대한 연구는 더욱더 활발해지고 있다. 특히 살균에 플라즈마를 이용하는 기술은 다른 분야에 비해 일찍 그 가능성이 입증되었고, 심도 있는 연구가 진행되어 오고 있다 [16]. 저온 대기압 플라즈마는 온도가 높지 않아 열에 의한 단백질의 변형을 일으키지 않고 환경에 해로운 물질이 발생하지 않는다는 점에서 종래의 살균기술들이 안고 있는 문제점들을 보완해 줄 수 있는 기술로 주목을 받고 있다. 현재 저온 대기압 플라즈마가 다양한 종류의 미생물들을 죽일 수 있다는 연구결과들이 많이 보고되고 있는데 그중에서 특히 박테리아 살균에 탁월한 효과가 있음을 보이고 있으며, 이스트나 곰팡이 병원균에도 살균효과가 있음을 나타내고 있다 [17]. 하지만 미생물의 종류(크게 원핵 또는 진핵세포의 형태)나 환경에 따라 일부는 살균효과가 증가하지만, 일부는 전혀 영향을 받지 않는 등 효과가 달라지므로, 이는 살균을 위한 플라즈마 기술 개발에 반드시 고려되어야 할 부분이다 [18,19]. 또한 플라즈마에 의한 미생물의 살균에 있어 활성산소(ROS)와 활성질소(RNS)가 대상을 비활성화 시키는 주요 원인으로써 주목받고 있는데, 이들의 적절한 조절이 효율적인 플라즈마 장치 개발에 핵심 요소로 제기되고 있다. 뿐만 아니라 살균을 하는 대상에 따라 다양한 구조 및 형태의 플라즈마 장치가 요구되고 있는데, 병원에서 사용되는 다양한 형태의 의료기구나 미생물에 감염된 식품, 동 식물, 액체 내 살균등 다양한 대상들에 적합한 형태의 장치개발이 필요하다. 따라서 작금의 플라즈마 장치는 이러한 요구에 부합하는 특정한 활성종만을 생성하거나, 특정한 대상만을 조사할 수 있는 형태의, 보다 더 넓은 면적에 전기적인 충격이 없고 에너지 변환 효율도 높아야 하는 등 까다로운 요구조건이 늘어나고 있다.

본 연구에서는 전기적 충격이 없고 넓은 면적을 동시에 처리할 수 있는 유전체 장벽(DBD, Dielectric Barrier Discharge)형태의 대기압 면방전 플라즈마 발생장치를 사용하여 곰팡이 살균에 대한 기본 실험 및 분석을 하였다. 이미 이와 같은 저온 대기압 플라즈마 장치의 살균 효과는 박테리아 같은 미생물들을 대상으로는 많은 연구가 이루

어져 있다 [20-29]. 하지만 곰팡이와 같은 진핵 미생물들에 대한 연구는 상대적으로 적다. 곰팡이는 박테리아나 바이러스보다 구성이 복잡하고 동물세포와 다르게 세포벽이 있어 외부로부터 세포의 손상을 덜 받는 특징이 있다. 곰팡이의 살균에 있어 박테리아와 같은 원핵 미생물과는 다른 방법의 적용이 요구되어 진다. 현재 곰팡이의 살균은 화학약품을 사용하거나 물리적으로 감염된 부분을 제거하는 것 이외에 마땅한 살균법이 없다. 이러한 방법은 환경오염을 유발시키고 감염대상의 피해가 크다는 단점들이 있다 [30]. 특히, 실내 환경이나 식품들의 곰팡이 포자에 의한 오염은 좀 더 효율적이고 안전한 제어 방법을 요구하고 있다. 실내 환경의 경우 이미 플라즈마 방전을 이용한 공기청정기가 있으나, 식품의 경우에는 폐기하거나 감염된 부분을 떼어내는 것 이외에는 마땅한 해결책이 없는 실정이다. 여기서 우리는 저온 대기압 플라즈마를 이용하여 병원성을 지닌 곰팡이의 제어에 대한 가능성을 타진해볼 필요가 있다.

본 논문에선 첫째로, 실험에 사용한 유전체 장벽구조의 저온 대기압 면방전 플라즈마 발생장치의 기초적 방전특성인 전압, 전류 및 출력파워, 온도, 활성종 등을 측정 및 분석하였다. 둘째로, 본 실험 장치에서 발생하는 면방전 플라즈마에 의한 곰팡이에 대한 살균효과를 관찰하기 위해, 빵곰팡이를 플라즈마 처리하여 발아율(germination rate)과 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) 측정법(assay), 모양(morphology)을 보았다. 빵곰팡이를 이용한 이유는 생물학적으로 빵곰팡이에 대한 다양한 기초 자료들이 확립되어 있어 플라즈마에 의한 변화를 가장 효과적으로 분석할 수 있기 때문이며, 또한 밀을 주식으로 하는 나라에서 흔히 볼 수 있는 곰팡이로써 경제적 가치도 있기에 선택하였다. 셋째로, 본 실험에서 사용한 대기압 면방전 플라즈마 발생에 의한 활성종인 오존(O<sub>3</sub>), 일산화질소(NO), 및 이산화질소(NO<sub>2</sub>) 기체를 가스 포집기를 이용해 측정하였다. 이를 위하여 저온 플라즈마가 대기에서 생성될 때 발생하는 활성종의 특성을 광학방출 스펙트럼(OES, Optical Emission Spectroscopy)로 분석한 자료들 [20,30,31]을 활용하였다. 마지막으로, 대기압 면방전 플라즈마에 의해 생성되어 용액 속에 녹아 들어간 부산물들의 종류 및 효과를 이온분석(Ion chromatography)과 pH측정을 통해 분석하였다.

## II. 실험장치 및 방법

### 1. 저온 대기압 면방전 플라즈마 장치 제작

본 실험을 위해 제작한 저온 대기압 면 방전 플라즈마 장치의 모식도를 Fig. 1(a)에 나타내었다. 지름 80 mm, 두께 18 mm인 원형의 소다 유리를 유전체로 하여 그 윗면은 0.2 mm의 은(silver) 전극으로 덮어 하나의 전극으로 삼고 아랫면은 두께 1.5 mm, 간격 1.5 mm의 사각형 그물구조를 가지는 스테인레스 재질의 그물망(mesh)을 반대 전극으로 사용하였다. 이 형태는 두 전극 사이의 유전체로 인해 고전압 인가시 상대적으로 유전율이 낮은 그물망(mesh)의 빈

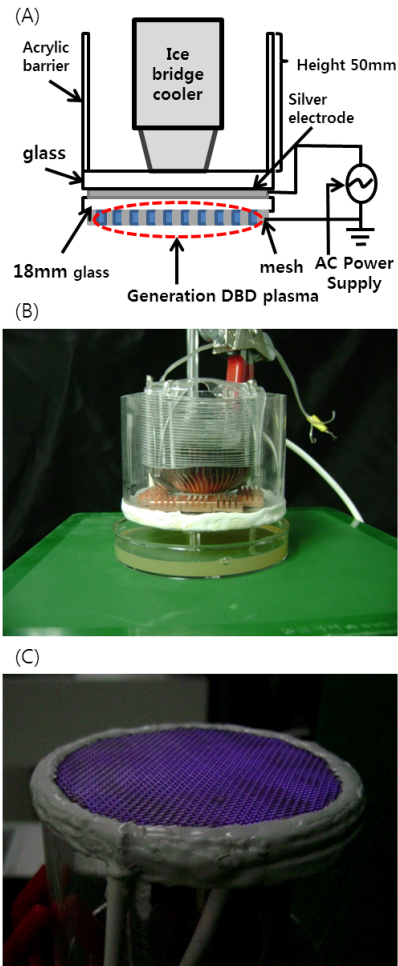


Figure 1. Structure of the DBD (Dielectric Barrier Discharge) plasma device. (a) Schematic view of the device, (b) plasma discharge on mesh, (c) whole view of the device with cooler system.

공간에 전하가 집중되어, 이를 통해 플라즈마의 방전이 이루어지는 유전체 장벽방전방식이다. 아랫면의 그물망(mesh) 사이 빈 공간에서 생성되는 플라즈마는 Fig. 1(b)와 같이 대기 중에서 생성되며 푸른빛을 낸다. 또한, 장치간 방전할 경우 플라즈마 발생을 위한 많은 에너지의 집중으로 인해 장치의 구성요소들이 열을 받기에 이를 식혀주기 위해 방전과 동시에 유전체 위에 공냉쿨러(COOLERTEC Ice Bridge-1)를 Fig. 1(c)와 같이 부착해 지속적으로 동작시켜 장치의 열을 식혀주었다. 이는 장치의 내구성을 높임과 동시에 실험대상에게 열에 의한 손상을 입히지 않도록 하기위한 조치이다.

Fig. 2(a)에 DBD (Dielectric Barrier Discharge) 플라즈마 발생을 위한 회로도를 나타내었다. 플라즈마 발생을 위한 전원(power supply)은 네온사인에 사용되는 변압기를 사용하였으며, 0 V에서 240 V까지 인가전압을 조절할 수 있는 슬라이더스(대광 DS-3023/3 KVA, 입력 220 V, 출력 0~300 V)의 전압을 조절하여 변압기의 출력을 조절하였다. 오실로스코프(LeCroy WaveSurfer 434 350 MHz Oscilloscope 2 GS/s)로 측정된 저온 대기압 면방전 플라즈

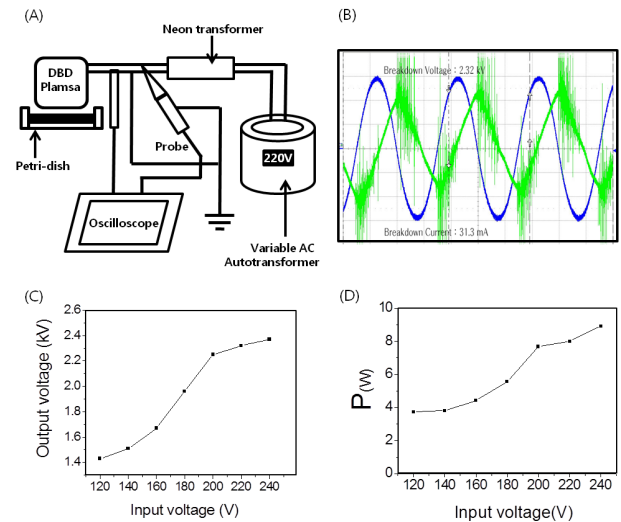


Figure 2. Electrical characteristics of the DBD plasma device. (a) Experimental set-up for measuring electrical properties, (b) discharge voltage (sinusoidal) and current (spiked) signals appeared on the oscilloscope (input voltage: 220 V), (c) measured output voltage versus applied input voltage, (d) measured output power by  $P=VI\cos\theta$  (V; input voltage, I; current,  $\theta$ ; phase angle between the voltage and current) versus the input voltage.

마 장치에 인가되는 전압 및 전류 파형은 Fig. 2(b)에 나타내었다. 방전 시 두 전극간에 존재하는 유전체의 높은 전기용량성 저항특성에 따라 전압과 전류의 위상차가 거의 80도가 됨을 알 수 있다. 본 실험에 사용된 저온 대기압 면방전 플라즈마 장치의 플라즈마가 생성되기 위한 최소한의 방전 전압은 1.4 kV이며, 슬라이드스를 통해 인가되는 전압이 높아질수록 육안으로 보이는 플라즈마의 밝기 및 출력전압이 비례하여 증가함을 보인다. 다음으로 Fig. 2(c)에 인가전압 대비 출력전압을 나타내었다. 인가전압이 120 V 일 때 출력전압이 1.4 kV이고, 최대 240 V에서 출력전압이 2.4 kV까지 올라감을 보인다. Fig. 2(d)에는 인가전압대비 출력파워를 나타내었다. 출력파워는  $P=VI\cos\theta$ 를 사용하여 구했으며,  $\cos\theta$  값은 각 인가전압별로 출력전압과 전류의 위상차를 측정하여 구하였다. 출력파워는 인가된 전압이

증가함에 따라 직선으로 비례하며 증가됨을 볼 수 있다.

면방전 플라즈마에 의해 실험대상에게 미치는 온도의 변화를 정확히 측정하기 위하여, 공랭식 쿨러를 사용할 때와 사용하지 않을 때로 나눠 플라즈마 생성부로부터 3 mm 떨어진 아래부분에서 Digital thermometer (COOLERTEC, Korea)를 사용하여 측정한 뒤 비교해 보았다. 이의 온도측정에 관한 개략도를 Fig. 3(a)에 나타내었다. Fig. 3(b)에는 플라즈마 방전시간에 대한 시료대의 온도측정 결과를 나타내었다. 플라즈마가 발생하는 그물망(mesh) 부근의 시료대의 온도 측정 결과, 플라즈마 방전 시간이 길어질수록 온도가 증가되고 있음을 볼 수 있다. 부착한 쿨러(Cooler)의 작동 유무에 따라 온도의 차이가 있었는데, 쿨러(Cooler)를 작동하지 않았을 때는 온도가 급격히 증가하였으며, 10분까지 방전테스트를 한 결과 52°C까지 상승하였다. 반면 쿨러(Cooler) 작동 시에는 10분 까지 처리했을 때 35°C 까지 온도가 올라감을 보였다. 세포내의 많은 생물분자(biomolecule)들의 활동은 온도의 변화에 영향을 받고 그 활성도에 있어 요구되는 최저 및 최고 온도를 벗어나게 되면 세포를 구성하고 있는 단백질의 변성으로 인해 치명적인 영향을 미칠수 있다 [33,34]. 즉, 살균에 있어 플라즈마의 적용은 여러 다양한 상황(예를 들면 미생물이 감염되어 있는 숙주) 고려되어야 하므로 장시간 사용되는 플라즈마 장치에서 발생하는 열은 배제되어야 할 필요가 있다. 따라서 본 실험을 위해 제작한 플라즈마 장치의 빵 곰팡이에 대한 살균실험에는 열에 의한 영향을 주지 않도록 공랭식 쿨러(Cooler)를 동작시킨 상태에서 처리시간을 최대 10분까지 하여 진행하였다.

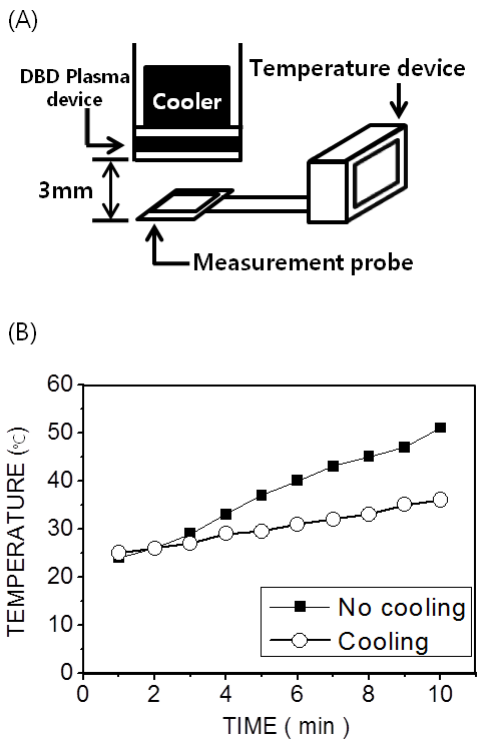


Figure 3. Measurement of temperature. (a) Schematic view of setting for temperature measurement. Temperature was measured at 3 mm downstream from the mesh by using digital thermometer (COOLERTEC, Korea). (b) Temperature profile versus plasma exposure time when the cooling system is on or off. Each point is the average of three replicate measurements.

## 2. 저온 대기압 면방전 플라즈마 장치로부터 발생하는 활성종 측정

Gastec 사의 GV-100 가스 포집기 장치를 사용하여 플라즈마 발생 부근의 활성종의 양을 조사하였다. Fig. 4(a)는 면방전 플라즈마 발생장치의 그물망(mesh) 부근에서 발생하는 활성종인 오존(O<sub>3</sub>), 일산화질소(NO), 이산화질소(NO<sub>2</sub>) 기체를 측정하는 실험방법에 대한 개략도이다. 우선 해당 기체에 맞는 검지관을 이용하여 오존(O<sub>3</sub>), 일산화질소(NO), 이산화질소(NO<sub>2</sub>) 기체를 장치의 최대 파워에서 거리별로 검사하였다. 그리고 오존(O<sub>3</sub>)은 추가적으로 발생부와 가장 가까운 부분(3 mm)에서 출력파워에 따른 발생

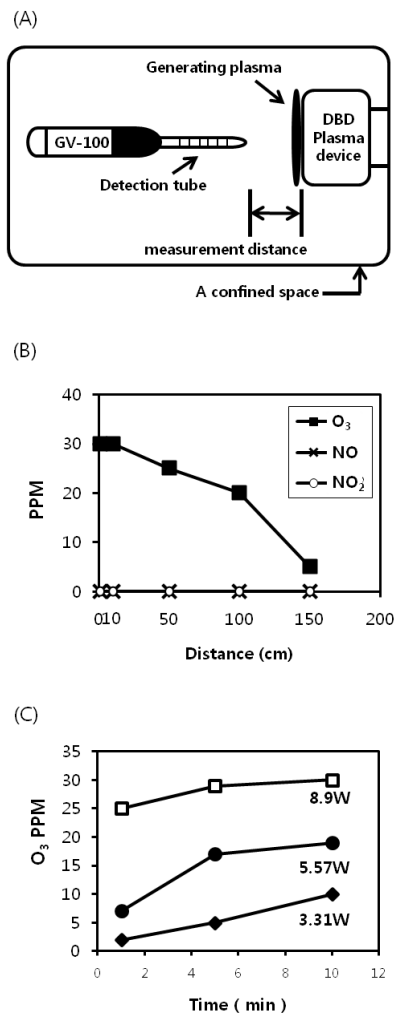


Figure 4. Measurement of reactive species generated from DBD plasma device. (a) Experimental set-up for measuring O<sub>3</sub>, NO, and NO<sub>2</sub> by using gas detector tube system. Reactive species were detected at various distances from the mesh of plasma device using the detector tubes. (b) Concentrations of O<sub>3</sub>, NO, and NO<sub>2</sub> at various distances from the mesh. (c) Concentration of O<sub>3</sub> at 3 mm away from the mesh during plasma discharge for the respective powers of 3.31 W, 5.57 W, and 8.9 W.

비율을 측정해 도식화 하였다. Fig. 4(b)에 발생한 오존(O<sub>3</sub>), 일산화질소(NO), 이산화질소(NO<sub>2</sub>) 기체의 농도를 거리에 따라서 나타내었다. 플라즈마를 발생시키면서 장치로부터 거리를 달리한 지점에서 가스를 포집한 결과 오존(O<sub>3</sub>)의 경우 1 cm 내에서 25~30 ppm이 측정되었으며 거리가 멀어질수록 떨어짐을 보였다. 오존(O<sub>3</sub>)은 150 cm 떨어진 지점에서도 5 ppm 정도 측정됨을 보였다. 오존(O<sub>3</sub>) 기체가

Table 1. Ion analysis in DI water treated by DBD plasma.

	Name	P (W)		
		0 W (No plasma)	3.31 W	8.9 W
Positive Ion	Na <sup>+</sup>	0.0055	0.1285	0.1398
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.0394	0.4552	0.5800
	K <sup>+</sup>	0.0032	0.0852	0.1663
	Mg <sup>+</sup>		0.0433	
	Ca <sup>+</sup>		0.6689	0.1517
Negative Ion	Cl <sup>-</sup>	0.0964	0.3427	0.3744
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.1028	0.7359	12.5003
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.0212	307.9545	829.5652
	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0.0128		

(amount mg/L)

상대적으로 많이 검출되어지며, 일산화질소(NO)와 이산화질소(NO<sub>2</sub>)의 농도는 이와 반대로 거의 검지가 되지 않는 것으로 나타나고 있다. 이는 일산화질소(NO)와 이산화질소(NO<sub>2</sub>)가 생성되지 않는 경우이거나 검지관의 검지 한계로 인하여 소량의 일산화질소(NO)와 이산화질소(NO<sub>2</sub>)는 검지되지 않는 경우일 수 있다. Table 1에서 보듯이 플라즈마를 처리한 증류수(Deionized water, DI water)의 이온 분석 결과 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 이온의 농도가 급격히 증가하는 것을 보면 플라즈마에서 일산화질소(NO) 생성이 어느 정도 되고 있다고 본다. 오존(O<sub>3</sub>)은 반감기가 짧아 금방 분해되어 잔존하지 않지만, 본 실험의 경우 무균실험대(Clean bench) 안에서 실험이 이루어 졌으며 효율적인 배기 시스템을 통해 오존(O<sub>3</sub>)을 배출하였다. 오존(O<sub>3</sub>) 농도에 따른 인체 영향에 대해 측정된 자료를 보면, 50 ppm 이상에서 1시간 노출될 경우 생명이 위험하며 20~15 ppm에서는 2시간 이내에 작은 동물들은 사망하고, 10~5 ppm에서는 맥박이 증가하고 몸이 아프며 마비증세가 올 수 있으며, 0.5 ppm에서는 확실히 상부기도에 자극을 느끼며 0.5~0.2 ppm에서는 3~6시간 노출 시 시각이 감퇴한다. 0.1 ppm에서는 확실히 냄새가 나고 코나 목에 자극을 느낀다고 알려져 있다 [35]. 이러한 형태의 장치를 사용하여 대기압 플라즈마 실험을 할 경우 충분히 환기가 되는 공간 또는 오존(O<sub>3</sub>) 배기가 원활히 이루어 질 수 있는 상자 안에 장치를 넣고 실험하여 실험자의 안전을 충분히 고려해야 하며 이를 상용화된 제품으로 개발하고자 한다면 오존(O<sub>3</sub>)에 대한 안전문제를 해결해야 할 것이다. 이는 이 장치 뿐만이 아니라 다른 연구에

사용된 모든 대기압 플라즈마 장치에 대한 것이며 궁극적으로 오존(O<sub>3</sub>)의 발생을 줄이면서 활성종의 생성을 늘리는 방향으로의 개발이 진행되어야 한다고 본다.

Fig. 4(c)에 오존(O<sub>3</sub>)의 발생농도 특성을 플라즈마 노출 시간에 따라 나타내었다. 이때 플라즈마 발생 파워는 각각 3.3 W, 5.8 W, 8.9 W로 하였다. 특히 오존(O<sub>3</sub>)의 경우 1 mm 떨어진 거리에서 출력파워와 플라즈마 처리 시간에 따른 농도 변화를 좀 더 분석하였는데, 오존(O<sub>3</sub>) 농도는 플라즈마 처리시간이 증가함에 따라 커져 최대 10분 처리시 최고 농도에 도달하였다. 또한, 같은 시간 동안 플라즈마를 처리하였을 때 출력 파워가 커짐에 따라 농도 수치가 비례하여 증가함을 보이고 있다.

### 3. 저온 대기압 면방전 플라즈마를 이용한 살균 처리

플라즈마의 살균효과를 보기위해 사용한 곰팡이는 빵 곰팡이(*Neurospora crassa*-wild type strain; ORS-SL6a)이다. 이 곰팡이는 삼각플라스크 바닥의 빵 곰팡이를 배양할 때 쓰이는 영양액인 VM (Vogel's Minimal) 배지위에 접종하여 빛이 없는 30°C 상태에서 2일간 키우고 이후 빛이 있는 25°C 상태에서 5일간 키운 뒤 사용하였다. 플라즈마 처리에 앞서 일주일동안 배양된 곰팡이가 들어있는 삼각플라스크에 약 50 ml의 멸균된 증류수(Deionized water, DI water)을 넣고 흔든 후 멸균된 여과필터(Mira cloth (Calbiochem., USA))를 이용하여 균사를 걸러 냈다. 이를 통해 포자만 걸러낸 뒤 걸러낸 포자액을 원심분리기를 이용하여 가라앉힌 후(4,000 rpm, 5분) 액만 제거하고 남은 포자를 멸균된 증류수(Deionized water, DI water) 5 ml을 넣은 뒤 여러 번 흔들어 섞어(suspension) 주었다. 충분히 흔들어 섞은(suspension) 포자액내의 포자 갯수를 헤마 사이토메타(Hemocytometer (Marienfeld, Germany))를 이용하여 측정한다. 다음 포자액을 둘로 나눈 후 다시 원심분리로 포자를 가라앉힌 뒤 액을 제거하였고, 하나는 멸균된 증류수(Deionized water, DI water)를 넣고 나머지 하나는 멸균된 VM (Vogel's Minimal) 배양액을 넣어 1 ml 당 10<sup>7</sup> 개의 농도가 되도록 하였다. 그 다음 포자액 1 ml을 피펫팅(pipetting)하여 지름 9 mm인 세균배양용 플라스틱용기(petri-dish)위에 올린 뒤 플라즈마로 처리하였다. 플라즈마 방전부와 샘플과의 간격은 3 mm였으며 플라즈마 방전 동안 공랭식 쿨러(cooler)를 작동시켜 발생하는 열을 최

소화 하였다. 플라즈마 장치의 출력파워를 높여가며 각 1 ml 포자액에 1, 3, 5분씩 처리한 후 모두를 피펫팅(pipette)을 이용하여 마이크로 튜브에 회수하였고 포자 농도를 10<sup>5</sup> 배 희석시켜 FGS (Fructose Glucose Sucrose) 한천판(agar plate)에 깔아 발아하는 정도를 관찰하였다. 빛이 없는 상태에서 48시간 30°C 인큐베이터에서 배양시킨 후 발아된 포자의(colony의 형태로 나타남) 개수를 조사함으로써 포자의 생존정도를 관찰하였고 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 측정법(assay)을 통해서도 포자의 생존 정도를 측정하였다. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) 측정법은 세포내 미토콘드리아의 활성정도를 형광염색을 통해 측정하는 것으로 세포생존을 판단하는 생명과학분야의 기본적인 기법이다. 살아있는 세포의 미토콘드리아는 탈수소 효소(dehydrogenase)작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)를 자주색을 띠는 비수용성의 formazan 결정으로 환원시키는데 생성된 formazan 양에 따라 미토콘드리아의 활성이 결정되며 미토콘드리아의 활성도는 살아있는 세포(cell) 수에 비례하므로 이를 이용하여 세포(cell)의 생존율(viability)을 간접적으로 측정할 수 있다 [36]. 또한 앞의 실험과 동일한 조건으로 플라즈마 처리한 빵 곰팡이를 10<sup>5</sup>배 희석시켜 시료대 위에 10 μl 피펫팅한 뒤 광학현미경(Samwon CSB-HP3 optical microscope (Samwon Scientific., Seoul, Korea))을 이용하여 400배의 배율에서 포자의 모양(morphology) 변화를 관찰하였다.

살균효과를 관찰한 뒤, 플라즈마의 곰팡이 포자에 미치는 영향에 대한 심도 있는 분석을 위해 멸균된 증류수(Deionized water, DI water) 만을 플라즈마 처리하여 해당 용액의 이온 조성과 pH를 측정해 보았다. 또한 VM (Vogel's minimal) 배양액의 pH도 측정하였다. 이온분석은 증류수(Deionized water, DI water) 2 ml을 살균실험 조건과 동일한 상태에서 플라즈마 조사하여 0.22 μm 필터에 걸러 마이크로 튜브(용량: 2 ml)에 피펫팅(pipetting)하여 모은 뒤에 이온분석기(ion chromatograph ICS-3000 (Dionex, USA))로 분석하였고(서울대학교 공동기기원 NICEM), pH측정에는 소형 portable pH meter (Eutech Instruments, Singapore)를 이용하였다.

### III. 실험결과 및 고찰

#### 1. 곰팡이(*Neurospora crassa*)의 살균 효과 분석

플라즈마를 빵곰팡이의 포자에 처리한 후 포자의 생존은

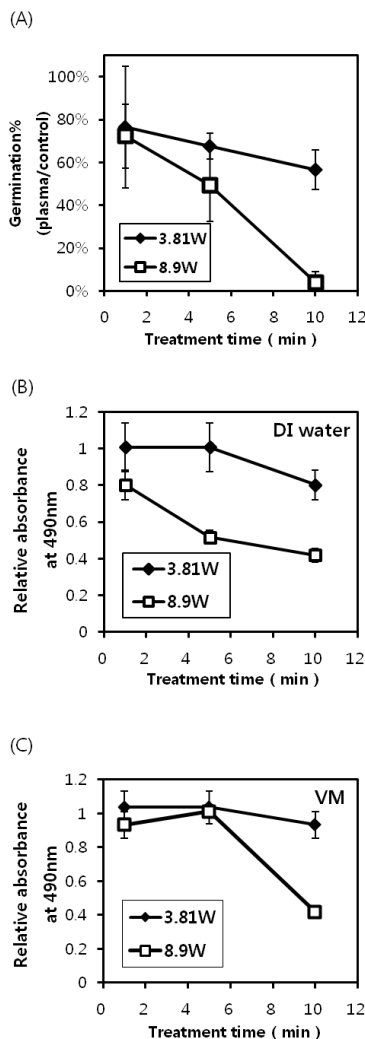


Figure 5. Spore viability versus plasma treatment times for two electrical powers of 3.81 W and 8.91 W. (a) Percentage of spore germination versus plasma treatment times. Spores were submerged in deionized water. (b) Mitochondrial activity of spores in deionized water versus the plasma treatment times. (c) Mitochondrial activity of spores in VM media versus the plasma treatment times. Formazan (product of mitochondrial enzyme reaction by using MTT as substrate) production method has been used in (b) and (c) for analysis after plasma treatment.

포자의 발아율과 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 측정법(assay)으로 분석된 미토콘드리아의 활성정도를 통해 알아보았다. 이때 다른 환경조건이 어떻게 플라즈마 효과에 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 곰팡이 포자를 증류수(Deionized water, DI water)와 VM (Vogel's minimal) 배양액에 넣고 처리하여 생존 정도를 비교하였다. Fig. 5(a)에서 보듯이, 약  $10^7$ 개수의 포자를 물에서 처리한 곰팡이 포자의 발아율은 처리시간에 따라 감소하는 것으로 보였으며, 출력 파워가 클수록 그 감소되는 정도가 급격하였다. 여기서 출력 파워가 8.9 W에서 10분 처리했을 때 거의 모든 포자가 발아하지 못함을 보이고 있다. 또한 Fig. 5(b)와 5(c)에서 보듯이, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 측정법(assay)에서 보면 490 nm에서의 흡수도가 (미토콘드리아 활성정도를 나타내는 생성물의 양에 비례함) 포자를 물에 넣고 처리했을 때, 처리시간에 따라 감소하고 같은 처리시간일 때 출력 파워가 클수록 더 감소하는 것으로 보이고 있다. 하지만 Fig. 5(c)에서 보듯이, 곰팡이를 VM (Vogel's minimal) 배양액에 넣고 처리했을 때 시간에 따라 포자 발아율이 물에서 처리했을 때와 마찬가지로 낮아지고 있으나 그 감소 정도가 Fig. 5(b)인 물의 경우에 비해 낮음을 볼 수 있다. VM (Vogel's minimal) 배양액에서는 3.81 W의 출력 파워를 가했을 때 시간에 따른 포자 발아율의 감소는 아주 미미하나, 파워를 8.9 W로 높이면 이의 감소가 급격해져 10분 처리 시 물에서 처리했을 때와 큰 차이가 없는 40%의 발아율을 보이고 있다. 이와 같이 플라즈마의 빵 곰팡이에 대한 살균효과가 기저용액(background solution)에 따라 차이를 보이는 것은 앞선 연구들에서도 관찰된 것이며, 이는 플라즈마와 용액안에 있는 성분들과의 상호작용에 의한 결과로 보여진다 [37]. Fig. 6은 증류수(Deionized water, DI water)와 VM (Vogel's minimal) 배양액에서 플라즈마 처리된 포자의 현미경 관찰 결과를 보여준다. 이때 플라즈마의 출력파워는 8.9 W이며, 처리시간은 3분으로 하였다. 증류수에서 처리된 곰팡이 포자의 모양이 찌그러지는 모습을 볼 수 있다. 반면에 VM (Vogel's minimal) 배양액에서는 곰팡이 포자의 모양이 큰 차이가 없었다. 이의 결과와 Fig. 5의 결과를 종합하였을 때, 포자의 모양 변화와 포자의 발아율은 밀접한 관



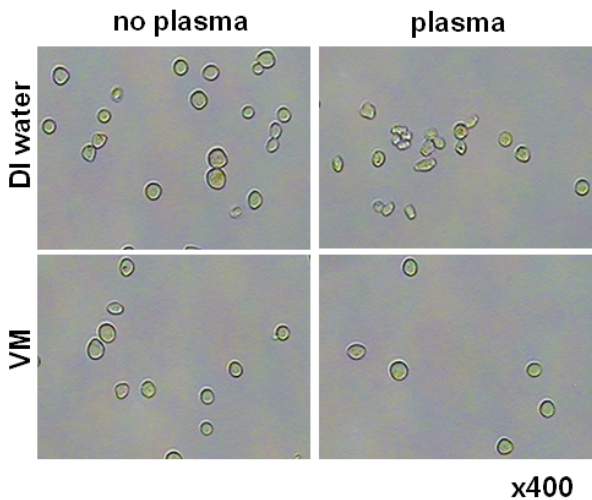


Figure 6. Microscope images of spores in DI and VM media with and without plasma treatment, respectively. The electrical power applied to the plasma discharge is 8.9 W.

계가 있는 것으로 보인다. 일반적으로 곰팡이는 박테리아에 비해서 플라즈마 처리에 의한 살균효과가 적다 [38]. 곰팡이는  $\beta$ -글루칸( $\beta$ -glucan)이라는 탄수화물로 구성된 세포벽을 가지고 있어 플라즈마에 의한 영향이 박테리아에 비해 다르게 나타날 수 있다. 또한 빵 곰팡이의 경우 항산화제(antioxidant) 역할을 하는  $\beta$ -카로틴( $\beta$ -carotene)이라는 색소가 포자에 많은 양으로 존재하고 있어, 플라즈마에 의한 산화로부터 보호되는 효과를 가질 수 있다 [39]. 많은 곰팡이들이 다양한 색소를 가지고 있으며 이들 색소들은 대체로 많은 경우에 항산화제로 작용할 수 있기에 플라즈마 처리 시 곰팡이가 박테리아에 비해 더 보호받는데 역할을 하는 것으로 보인다 [37].

플라즈마 처리시간에 대한 증류수(Deionized water, DI water)와 VM (Vogel's minimal) 배양액의 pH 변화를 Fig. 7에 나타내었다. 플라즈마를 10분까지 처리하였을 때 물의 경우 pH가 2.7까지 떨어졌지만, VM (Vogel's minimal) 배양액에서는 거의 변화가 없었다. 산성으로 변한 물이 곰팡이 포자의 비활성화에 어느 정도 원인이 된 것으로 보인다. Table 1에 플라즈마 처리 전과 후의 물의 이온농도의 변화를 출력파위에 따라 비교해 보았다. 여기에서  $\text{NO}_3^-$  이온의 농도는 플라즈마 출력이 8.9 W일때, 829 mg/L으로 급격한 상승을 보였고, 반면  $\text{NH}_4^+$  이온의 농도는 약간 증가함을 보였다. 따라서 플라즈마 처리 후 물에서 보이는 pH의 감소는  $\text{NO}_3^-$  이온농도의 증가로 인한  $\text{HNO}_3$ 의 생성

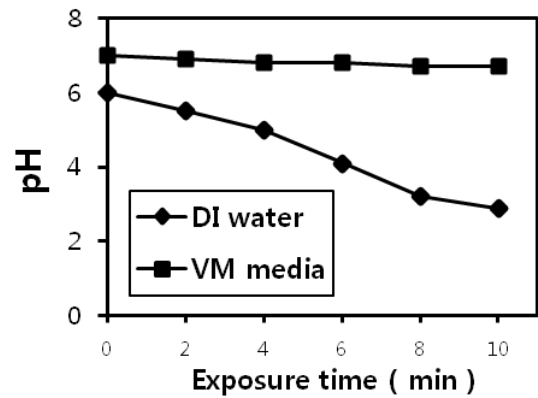


Figure 7. pH profiles versus the plasma exposure time in DI and VM media. Each measurement is an average of three replicates.

때문으로 보인다. 이온분석결과를 토대로 플라즈마 처리에 의해 특정 화합물 없이도 질산염을 만들어 낸다면 이를 이용하여 식물계통의 연구에 쓰일 가능성도 충분히 있다고 보인다. Fig. 7에서 보듯이, VM (Vogel's minimal) 배양액과 같은 증화제 혹은 완충제를 첨가하여 용액의 pH 값이 변화가 없도록 조절할 수 있다고 보여 진다. 다만 본 실험에 사용한 장치는 공장단위의 커다란 장치를 구상할 경우는 고려되지 않았으며, 소규모 작물재배 등의 촉진제로 쓰일 수 있는 가능성이 보인다 [40].

#### IV. 결 론

본 연구에서는 넓은 면적을 동시에 처리할 수 있고 전기적 충격이 없는 면방전 플라즈마 살균장치를 개발하였다. 시중에서 큰 제약 없이 쉽게 구매 할 수 있는 변압기와 비용이 크게 들지 않는 재료들을 사용하여 면 방전 구조의 소형 플라즈마 장치를 제작하였고, 곰팡이 포자를 비활성화시키는지 조사해 보았다. 본 연구의 실험결과는 플라즈마 제트(jet)와는 달리 직접적인 접촉 없이도 곰팡이와 같은 미생물의 살균이 가능할 수 있다는 가능성을 보여주며, 이는 면에서 방전되는 유전체 장벽(DBD, Dielectric Barrier Discharge) 플라즈마로부터 발생하는 활성종 성분들이 미생물의 비활성화에 역할을 할 수 있기 때문으로 보여 진다. 그리고 활성종들의 농도는 면방전 플라즈마 발생장치로부터 멀리 떨어지면 낮아진다는 결과를 얻었다. 본 연구를 통하여 대체로 살균이 어렵다고 알려진 곰팡이를 플라즈마를



이용하여 효율적으로 단기간에 제거할 수 있는 가능성을 보였다. 특히 본 실험에서는 빵 곰팡이(*Neurospora crassa*) 살균을 통해 그 가능성을 실험적으로 제시하였다. 향후 일련의 과정을 통해 플라즈마의 곰팡이에 대한 살균 메커니즘을 밝혀낸다면 관련 산업에 무궁무진한 응용이 가능하리라 본다.

### 감사의 글

연구에 사용된 빵 곰팡이(*Neurospora crassa*) 균주는 Fungal Genetics Stock Center (Kansas City, Missouri USA)로부터 분양 받았습니다. 본 논문은 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(과제번호: 20100029418, 20110014825).

### 참고문헌

- [1] M. A. Lieberman and A. J. Lichtenberg, *Principles of Plasma Discharges and Materials Processing* (John Wiley & Sons Inc, San Francisco, CA, 1994), p. 757.
- [2] C. B. Park, IEEK. **4**, 28 (2001).
- [3] D. S. Kim and Y. S. Park, KSEH. **3**, 37 (2011).
- [4] H. S. Uhm, J. Korean Vac. Soc. **15**, 117 (2006).
- [5] M. Laroussi, Plasma Process. Polym, **2**, 391 (2005).
- [6] R. Brandenburg, J. Ehlbeck, M. Stieber, Th. von Woedtke, J. Zeymer, O. Schluter, and K. D. Weltmann, Plasma Phys, **47**, 72 (2007).
- [7] K. D. Weltmann, R. Brandenburg, Th. Von Woedtke, J. Ehlbeck, R. Foest, M. Stieber, and E. Kindel, J. Phys. D. Appl. Phys. **41**, 194008 (2008).
- [8] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets, and A. Fridman, Plasma Process. Polymers, **5**, 503 (2008).
- [9] K. D. Weltmann, E. Kindel, T. von Woedtke, M. Hahnel, M. Stieber, and R. Brandenburg, PureAppl. Chem. **82**, 1223 (2010).
- [10] K. D. Weltmann, T. von Woedtke, R. Brandenburg, and J. Ehlbeck, Chem. Listy **102**, 1450 (2008).
- [11] G. E. Morfill, M. G. Kong, and J. L. Zimmermann, New J. Phys. **11** (2009).
- [12] R. Ben Gadri, J. R. Roth, T. C. Montie, K. Kelly-Wintenber, P. P. Tsai, D. J. Helfritsch, P. Feldman, D. M. Sherman, F. Karakaya, and Z. Chen, Surf. Coat. Technol. **131**, 528 (2000).
- [13] R. Brandenburg, U. Krohmann, M. Stieber, K. D. Weltmann, T. V. Woedtke, and J. Ehlbeck, *Plasma Assisted Decontamination of Biological and Chemical Agents* (Springer, New York/Heidelberg, 2008), pp. 51-63.
- [14] C. Cheng, P. Liu, L. Xu, L. Y. Zhang, R. J. Zhan, and W. R. Zhang, Chin. Phys. **15**, 1544 (2006).
- [15] F. Iza, G. J. Kim, S. M. Lee, J. K. Lee, J. L. Walsh, Y. T. Zhang, and M. G. Kong, Plasma Process. Polym. **5**, 322 (2008).
- [16] M. Moisan, J. Barbeau, M. C. Crevier, J. Pelletier, N. Philip, and B. Saoudi, Pure Appl, Chem. **74**, 3, 349, (2002).
- [17] K. Lee, K. Paek, W. Ju, and Y. Lee, Journal of Microbiology, **44**, 3, 269 (2006).
- [18] P. Muranyi, J. Wunderlich, and M. Heise, Journal of Applied Microbiology **103**, 1535 (2007).
- [19] G. Kamgang-Youbi, J. M. Herry, T. Meylheuc, J. L. Brisset, M. N. Bellon-Fontaine, A. Doubla, and M. Naitali, Lett. Appl. Microbiol. **48**, 13 (2009).
- [20] H. Son and W. K. Lee, Appl. Chem. Eng. **22**, 261 (2011).
- [21] N. S. J. Braithwaite, Plasma Sources Sci. Technol. **9**, 517 (2000).
- [22] T. C. Montie, K. Kelly-Wintenber, and J. R. Roth, IEEE. Trans. Plasma Sci. **28**, 41 (2000).
- [23] K. Kelly-Wintenber, D. M. Sherman, P. P. Y. Tsai, R. B. Gardi, F. Karakaya, Z. Chen, J. R. Roth, and T. C. Montie, IEEE. Trans. PlasmaSci. **28**, 64 (2000).
- [24] E. Stoffels, A. J. Flikweert, W. W. Stoffels, and G. M. W. Kroesen, PlasmaSources Sci. Technol. **11**, 383 (2002).

- [25] R. E. J. Sladek, E. Stoffels, R. Walraven, P. J. A. Tielbeek, and R. A. Koolhoven, IEEE. Trans. PlasmaSci. **32**, 1540 (2004).
- [26] M. Moisan, J. Barbeau, S. Moreau, J. Pelletier, M. Tabrizian, and L'H. Yahia, Int. J. Pharmaceutics, **226**, 1 (2002).
- [27] B. J. Park, D. H. Lee, J. C. Parka, I. S. Lee, K. Y. Lee, S. O. Hyun, M. S. Chun, and K. H. Chung, Phys. Plasmas, **10**, 4539 (2003).
- [28] T. Akitsu, H. Ohkawa, M. Tsuji, H. Kimura, and M. Kogoma, Surf. Coating Technol. **193**, 29 (2005).
- [29] M. Laroussi and X. Lu, Appl. Phys. Lett. **87**, 113902 (2005).
- [30] D. C. Wolf, T. H. Dao, H. D. Scott, and T. L. Lavy. Journal of Environmental Quality **18**, 39-44 (1989).
- [31] A. Poiata, I. Motrescu, A. Nastuta, D. E. Creanga, and G. Popa, Journal of Electrostatics, **68**, 128, (2010).
- [32] Y. J. Hong, C. J. Nam, K. B. Song, G. S. Cho, H. S. Uhm, D. I. Choi, and E. H. Choi, Jinst. **15**, 13 (2011).
- [33] M. Guoa, Y. Xub, and M. Gruebele. PNAS. **10**, 1073. 1201797109 (2012).
- [34] L. Lighezan, R. Georgieva, and A. Neagu, Physica. Scripta. **86**, 035801 (2012).
- [35] 宗宮 功, 新版 *Ozone 利用의 新技術*, (三瑠書房, 東京大, 1993).
- [36] D. Gerlier and N. Thomasset, Journal of Immunological Methods, **94**, 57 (1986).
- [37] G. Park, Y. H. Ryu, Y. J. Hong, E. H. Choi, and H. S. Uhm, Appl. Phys. Lett. **100**, 063703 (2012).
- [38] E. S. Jacobson, E. Hove, and H. S. Emery, Infection and Immunity **63**, 4944 (1995).
- [39] C. Echavarri-Erasuna and E. A. Johnson, Applied Mycology and Biotechnology **2**, 45 (2002).
- [40] K. S. Roh, JLS. **20**, 1667 (2010).

# Sterilization of *Neurospora Crassa* by Noncontacted Low Temperature Atmospheric Pressure Surface Discharged Plasma with Dielectric Barrier Structure

Young Hyo Ryu, Han Sup Uhm, Gyung Soon Park\*, and Eun Ha Choi\*

*Plasma Bioscience Research Center, Kwangwoon University, Seoul 139-701*

(Received December 22, 2012, Revised March 18, 2013, Accepted March 20, 2013)

Sterilization of *Neurospora crassa* has been investigated in this research by using a surface air plasma with dielectric barrier discharged (DBD) structure under atmospheric pressure. The sinusoidal alternating current has been used in this experiment with discharge voltage of 1.4~2.3 kV. The phase difference between the voltage and current signals are found to be almost 80 degree due to the capacitive property of dielectric barrier. Temperature on the biomaterials has been minimized by radiating the heat with the air cooling system. It is noted that the substrate temperature remains under 37 degree for plasma exposure time of 10 minutes with operation of cooler system. It is found that the ozone, O<sub>3</sub>, has been measured to be about 25~30 ppm within 1 cm region and to be about 5 ppm at the 150 cm downstream region away from the surface plasma. It is also noted that the nitric oxide, NO, and nitric dioxide, NO<sub>2</sub>, are not nearly detected. Germination rate and mitochondrial activity of *Neurospora crassa* immersed in the deionized water have been found to be drastically decreased as the plasma treatment time and its electrical power are increased in this experiment. Here, the mitochondrial activity has been analyzed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay. However, sterilization of *Neurospora crassa* immersed in the Vogel's minimal media has been found to be low by plasma treatment, which is caused by surrounding background solution. This research shows the sterilization possibility of *Neurospora crassa* by using the noncontacted surface DBD plasma, which is different from the plasma jet. This is mainly attributed to the reactive species generated by the surface plasma, since they play a major role for inhibition of microbes such as *Neurospora crassa*.

Keywords : Dielectric barrier discharge, Low temperature atmospheric pressure surface discharged, Plasma, *Neurospora crassa*, Sterilization, Reactive species

\* [E-mail] ehchoi@kw.ac.kr, gyungp@kw.ac.kr