

최 종  
연구보고서

전기·물리적 비열 식품가공 신기술 개발

Development of Novel Technology for Electro-physical  
Nonthermal Food Processing

연구기관

연 세 대 학 교

농 립 부

# 최 종 보 고 서

1995 년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 전기·물리적 非熱 식품가공 신기술 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2000 . 12 . .

주관 연구 기관 : 연 세 대 학 교

총괄연구책임자 : 변 유 량 (인)

주관연구기관장 : 연세대학교 총장 직 인

농 립 부 장 관 귀 하

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “전기·물리적 비열 식품가공 신기술 개발”에 관한 연구과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2000. 12.

주관연구기관명 :	연세대학교	협동연구기관명 :	경원대학교
총괄연구책임자 :	변유량	협동연구책임자 :	목철균
연구원 :	박지용	연구원 :	장학길
연구원 :	조형용	연구원 :	박영서
연구원 :	신정규	연구원 :	백형희
연구원 :	김화수	연구원 :	이상기
연구원 :	국무창	연구원 :	송기태
연구원 :	김성보	연구원 :	송최완
연구원 :	김최찬	연구원 :	원장희
연구원 :	이도현	연구원 :	연규춘
연구원 :	이진일	연구원 :	김홍수
연구원 :	박상철	연구원 :	장윤수
연구원 :	정태범	연구원 :	김송기
연구원 :	이동우	연구원 :	강미영
연구원 :	이동언	연구원 :	강정훈
연구원 :	김현정	연구원 :	김동호
연구원 :	윤철구	연구원 :	조중건
연구원 :	문권주	연구원 :	조임래
연구원 :	김남훈	연구원 :	구동주
연구원 :	성용태	연구원 :	유미영
연구원 :	정관재	연구원 :	유영기
연구원 :	변범희	연구원 :	김선귀
연구원 :	김양식	연구원 :	박진근
연구원 :	이양주	연구원 :	정진훈
연구원 :	하구영	연구원 :	이창도
연구원 :	하개원	연구원 :	이상준
연구원 :	이성동	연구원 :	이구선



# 요 약 문

## I. 제 목

전기·물리적 비열 식품가공 신기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 소비자들의 건강에 대한 관심이 고조됨에 따라서 천연 상태의 품질을 가능한 유지한 최소 가공 식품 (minimal processing foods)에 대한 수요가 증가되고 있다. 최소 가공법은 식품 본래의 신선한 품질을 가능한 그대로 유지하면서 안전한 보존 수명을 부여할 수 있는 가공 방법을 말한다.

오늘날 식품 공업에서 사용되고 있는 보존법은 대부분 가열 조작 (thermal operation) 또는 식품 보존제의 첨가등에 의한 화학적 조작 (chemical operation)에 의존하고 있다. 그러나 가열 조작에서는 열에 의한 영양 성분의 파괴, 텍스처의 변화, 향기 성분의 손실등 품질 손실을 피할 수 없으며, 인공 보존료를 점차 사용하지 않는 경향이다.

따라서 식품 가공 및 포장 기술에 기술 혁신이 요청되고 있으며, 여러 가지 非熱 가공 (nonthermal process) 기술이 개발되고 있다. 그 중에서 특히 펄스 전기장 (pulsed electric field) 및 초고압 (ultra-high pressure) 기술은 21세기 식품 공업에 큰 변화를 가져올 emerging technology로 평가되고 있다.

이들 방법은 재래의 熱的, 化學的 방법과는 달리 電氣的 (electrical) 및 物理

的 (physical) 조작으로서 앞으로 이들 기술이 실용화되면 미래의 소비자들에게 오늘날 식품보다 품질면에서 훨씬 우수하고, 천연의 영양 성분을 그대로 함유하고 있으면서, 신선하고 식미가 우수한 高品質의 安全한 식품을 제공할 수 있을 것이다.

초고압 가공 기술은 장치가 고가이고 연속 조업이 곤란한 점 등 단점이 있다. 고전압 전기장 가공 기술은 액체, 고점성 식품, 입자를 함유한 식품 등 펌프로 수송 가능한 식품은 연속 가공이 가능하며, 에너지 효율이 높고, 냉살균 (cold sterilization), 동식물세포로부터의 추출, 압착 탈수, 냉동육의 해동 등응용 범위가 매우 광범위하다.

고전압 펄스 전기장 기술은 독일, 일본 등의 선진국에서는 아직 산업화에 성공하지 못하였으며, 미국에서만 산업화의 전단계 사업을 추진하고 있어, 우리나라에서도 집중적으로 이 분야의 연구 개발을 추진하면 국제 경쟁력 있는 기술 개발이 충분히 가능하다. 따라서 본 연구에서는 高電氣場의 전기 에너지를 이용한 電氣·物理的 農産物 및 식품 가공 기술을 개발하여 국내 농업 발전에 기여할 수 있도록 한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 가. 연구 개발 목표와 내용

- 첨단 非熱 가공 기술의 개발로 농림 수산물의 고품질화 및 다양화를 통한 국내 농업의 육성 발전
- 고전압 펄스 전기장을 이용한 액체 식품의 非熱 살균 기술 개발 및 장치 개발
- 펄스 전기장을 이용한 전통주 非熱 살균 기술 개발

나. 연차별 연구 개발 목표 및 내용

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1995년)	○ 실험실 규모 예비장치 개발 및 기초 실험	○ 실험실 규모 예비장치 제작 ○ 냉살균 및 전기해동 기초실험
2차년도 (1996년)	○ 실험실규모 장치제작완료 ○ PEF기술에 의한 추출/냉살균 기술 개발 ○ 精肉의 전기해동조건 확립	○ PEF기술에 의한 야채, 과일주우스(당근, 사과등) 및 생물 소재 추출 기술개발 ○ PEF에 의한 균질액체식품(당근주스, 동치미, 전통주 등) 냉살균 기술 개발 ○ 냉동精肉의 전기적 해동기술 개발
3차년도 (1997년)	○ 실험실 장치보완 및 pilot scale 실험장치의 제작 및 운전 ○ PEF 가공기술 및 액체 식품 및 냉살균 공정개발	○ 소규모 실험실용 PEF 장치의 성능 개선 및 용기개발 ○ Pilot 규모 PEF 발생장치의 신규 제작 및 운전 조건 확립 ○ 효소의 불활성화 ○ 전분의 PEF가공에 의한 신기능부여 ○ 전통주류 및 발효제품의 냉살균 공정개발, 품질평가 및 보존성연구
4차년도 (1998년)	○ PEF Pilot 규모 장치의 운전 ○ PEF 기술에 의한 액체식품의 냉살균공정 최적화	○ Pilot 규모의 PEF 장치의 연속 작업에 대한 운전 조건 확립 ○ 모델 액체식품의 냉살균 조건의 최적화 ○ 냉살균 식품의 품질 연구 ○ 환경 및 생리조건이 미생물의 불활성화에 미치는 영향
5차년도 (1999년)	○ PEF 연속공정개발 ○ 보존성 및 안전성 확인 ○ 제품화 기술 확립	○ PEF 처리 미생물의 회복 특성 연구 ○ PEF처리 제품의 보존성 연구 ○ 모델 액체식품의 연속 냉살균 공정의 최적화

## IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

### 가. 연구 개발 결과

#### 1. 고전압 펄스 전기장을 이용한 추출 기술 개발

##### 1) 고전압 펄스 전기장을 이용한 생물 소재 추출 기술

고전압 펄스 전기장에 의하여 세포의 투과성이 변하고 세포벽이 파괴되어 물질의 용출이 용이해진다. 이와 같은 현상을 이용하여 미생물 세포, 식품 세포로부터 생물 소재의 추출에 활용할 수 있다. 그 대표적인 연구 대상으로는 세포벽이 단단한 효모인 *Phaffia rhodozyma*로부터 carotenoid의 추출과 자색고구마로부터 색소의 추출에 대하여 연구하였다.

*Phaffia rhodozyma* 세포를 전기장 세기 10~50 kV/cm, 처리 시간 100~300 $\mu$ s의 범위에서 PEF 처리했을 때 전기장의 세기와 처리 시간이 증가함에 따라 세포의 팽창, 손상 정도와 세포내 물질이 유출되는 정도가 증가하였다. 50 kV/cm, 100 Hz의 exponential decay 파로 세포 현탁액을 100 $\mu$ s 또는 300 $\mu$ s 처리하였을 때 생존수가 각각 1.5 및 2.5 log 감소하였으며, 세포막에 형성되는 electroporation 정도는 98%에 달하였고, 이 때 세포의 회복률은 5% 미만으로 확인되었다. 고전압 펄스 전기장은 *P. rhodozyma* 세포막에 손상을 주어 투과성을 80% 이상 증진시키지만, carotenoid 색소가 *P. rhodozyma* 세포막의 지방체와 결합한 상태로 존재하기 때문에 고전압 PEF 처리에 의한 세포막 투과성 증진만으로는 색소 추출 효과가 현저히 향상되지 않았다. 따라서 투과성을 증진시키는 물리적, 화학적 또는 생물학적 방법으로 전처리하고 고전압 PEF 처리를 하는 병합 처리가 색소 추출에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 효모 세포벽 용균 효소 처리나 ultra turrexer를 이용하는 기계적 처리를 한 후에 PEF 처리를 하는 병합 처리의 경우에는 PEF 단독 처리보다 색소 추출이 각각 13.7배 또는 3.3배 증가하였다.



위의 2가지 경우에는 PEF와 전처리에 따른 색소 추출량의 산술적 합계보다도 병합처리하는 경우의 색소 추출량이 각각 52% 및 69.8% 증가하였다. 한편 세포 투과성을 증진시키는 11 종류의 permeabilizing agents의 첨가 효과를 검토한 결과, 계면활성제인 Tween 20과 탄소수 10개의 포화지방산인 capric acid를 각각 0.01% 및 0.1% 첨가하고 PEF 처리했을 때 색소 추출량이 60.7 및 75.2  $\mu\text{g}$ 으로서 가장 효과적이었다. 또한 처리 후 세포 내·외부의 변화를 SEM과 TEM으로 관찰한 결과 PEF 처리에 의해서 세포 표면이 심하게 거칠어지고 쭈글쭈글한 모양을 띠었으며, 세포벽은 형태를 유지하였으나 세포막은 그 구성물질이 많이 빠져나가 손상된 형태를 나타내었다. 이와 같은 결과들은 *P. rhodozyma*로부터 연속적인 색소 추출 가능성을 제시하고 있다.

## 2) 고전압 펄스 전기장에 의한 자색 고구마 색소의 추출

고전압 펄스 전기장을 이용한 식물세포로부터 열에 불안정한 유용 물질의 효율적인 추출 기술을 개발하기 위하여 천연 식용 색소원으로서 최근 주목받고 있는 자색 고구마의 추출량은 전기장의 세기가 증가할수록 점차 증가하였으며 최적 전압은 35 kV/cm이었다. 낮은 주파수에서 500 Hz까지는 주파수가 증가함에 따라 추출량이 큰 폭의 증가하였으나, 500 Hz 이상에서는 spark발생에 의한 색소의 파괴로 추출율이 약간씩 감소하였다. 한편 일정한 전기장과 주파수 하에서 처리 시간은 색소의 추출양에 큰 영향을 미치지 못하였다.

## 2. 고전압 펄스 전기장에 의한 살균 기술 개발

### 1) 고전압 펄스 전기장에 의한 *Bacillus subtilis* 포자의 불활성화

일반적으로 고전압 펄스 전기장 처리에 의하여 영양 세포는 효과적으로

사멸되거나 포자의 불활성화는 어렵기 때문에 해결하여야 하는 문제점으로 남아 있다. 따라서 펄스 전기장에 의한 *B. subtilis* 포자의 불활성화를 연구 검토하였다. 포자 현탁액을 고전압 펄스 전기장 처리하였을 때 포자의 발아율은 전기장의 세기가 클수록, 처리 시간이 길수록, 또한 처리 시료의 온도가 높을수록 증가하는 경향을 보였다. 포자 현탁액을 50℃에서 40 kV/cm의 전기장의 세기로 1000  $\mu$ s 동안 고전압 펄스 전기장 처리를 하였을 때 발아율은 98% 이상이었다. 또한 현미경을 통해 포자가 발아되는 모습을 실시간으로 관찰한 결과 고전압 펄스 전기장에 의한 포자의 발아 현상을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해 고전압 펄스 전기장 처리에 의한 포자의 발아는 포자 불활성화의 예비 단계로 사용할 수 있는 가능성을 제시하였다. 즉, 포자 발아의 최적 조건으로 시료를 펄스 전기장 처리하여 포자를 먼저 발아 시킨후 영양 세포의 최적 사멸 조건으로 펄스 전기장 처리를 한다면 영양 세포뿐만 아니라 포자까지 효율적으로 살균 할 수 있을 것으로 기대된다.

## 2) 고전압 펄스 전기장을 이용한 당근 주스의 살균

당근 주스가 저장성을 향상시키기 위하여 가열 살균 처리함으로써 영양 성분이 파괴되고 신선한 맛을 잃어버린다. 그러므로 고품질의 신선한 당근 주tm 생산을 위해서는 냉살균 기술의 개발이 필수적이므로 고전압 펄스 전기장에 의한 당근 주스의 살균에 대해 연구하였다. 자체 제작한 회분식 chamber를 이용하여 당근 주스를 exponential decay pulse 처리한 결과 총균수와 효모 및 곰팡이의 사멸율은 전기장의 세기와 처리 시간, 처리 온도에 비례하였다. 또한 pilot system에서 square wave pulse를 이용하여서 당근 주스를 PEF 처리한 결과 exponential decay pulse보다 2 log이상 살균효과가 우수함을 알 수 있었고 pH 4.25, 55kV/cm, pulse width 1 $\mu$ s, frequency 1500Hz, 50℃ 처리 조건에서는 연속식으로 처리한 결과 총균수와 효모 및 곰팡이를 거의 모두 사멸 시킬 수 있었다. 특히 PEF 단독 처리시 보다 온도와 pH를 병합한 처리시 사멸효과가 현저히 증가되었다.

PEF 처리에 의한 저장성 향상을 측정하기 위하여 시료를 4℃와 25℃에서 pH, 적정산도, 가용성 고형분, color,  $\alpha$ -carotene, 생균수 등을 실험한 결과 모든 온도에서 무처리 당근 주스는 식품학적 품질이 급속히 감소되었으나, 50℃, pH 4.25에서 PEF 처리한 당근 주스는 품질이 변화가 거의 변하지 않았다. 기존 열처리 방식의 당근 주스와 비교하였을 때 PEF처리한 당근 주스는 풍미등 품질이 우수하였을 뿐만 아니라 품질 변화가 장기간 저장이 가능하였기 때문에 열처리 방식보다 우수한 살균 방법인 것을 확인하였다.

### 3) 고전압 펄스 전기장을 이용한 탁주의 살균

우리나라 전통주인 탁주는 60℃이상에서 가열살균하면 가열취의 생성등으로 품질이 현저히 저하되므로 비열 살균 기술 개발이 시급히 요청되고 있다. 자체 제작한 회분식 chamber를 이용하여 막걸리를 PEF 처리한 결과 막걸리 내에 존재하는 효모의 사멸율은 전기장의 세기와 처리 시간, 알코올의 농도에 비례하였다. 특히 처리 온도에 매우 민감하여 막걸리의 품질에 영향을 주지 않을 정도의 저온인 50℃에서 20 kV/cm의 고전압 펄스를 256회 가하여 열병합 처리한 결과 거의 모든 효모를 사멸 시킬 수 있었다. 시판 막걸리의 알코올 농도는 6%이고 효모의 초기 균수는 약  $2 \times 10^8$  CFU/ml이며, 30 kV/cm, 256회의 펄스를 가하면 99% 사멸되는데 반해 알코올의 농도를 12%로 증가시키면 동일 처리 조건에서 99.99%의 사멸 효과를 나타내었다. PEF에 의한 세포벽과 원형질의 구조적 변화를 SEM과 TEM으로 관찰하였으며, square wave pulse를 이용한 연속식 살균 시스템으로 전기장의 세기 60 kV/cm, 330  $\mu$ s 처리한 막걸리를 4주간 4℃에서 저장 실험한 결과 효모수, pH, 산도의 변화가 거의 없어 저장성이 현저히 향상되었음을 확인하였다.

### 4) 고전압 펄스 전기장에 의한 전통 음료의 살균

#### 가) 동치미음료의 PEF 살균

동치미를 이용한 음료를 개발하기 위하여 동치미음료를 소규모 연속식 PEF 처리장치에서 미생물별 살균 특성을 연구한 결과 동치미음료 미생물의 비가역적 불활성화를 유도하는 최소 전기장 세기인 임계 전기장 세기( $E_c$ )은 27 kV/cm 이었다. 연속 재순환 방식으로 PEF 처리할 경우 처리시간과 전기장세기가 증가함에 따라 생존율이 급격히 감소하였으며, 효모는 세균 및 젖산균에 비해 PEF 감수성이 큰 것으로 나타났다.

회분식으로 exponential decay wave 형태의 펄스로 처리하였을 때 동치미음료의 미생물별 PEF살균에 필요한  $E_c$ 값은 세균 12.48 kV/cm, 젖산균 12.45 kV/cm, 효모 11.87 kV/cm로서 회분식 PEF 처리가 연속 재순환식에 비하여 효과가 큰 것으로 나타났다. 전기장 세기 25 kV/cm에서 512회의 펄스를 처리(누적 처리시간 512  $\mu$ s)했을 때 동치미음료의 미생물은 세균의 경우 약 3 log, 젖산균은 2.5 log, 효모의 경우 3.5 log 정도로 감소하였다. 미생물 사멸 속도는 살균 초기에는 효모, 젖산균, 세균의 순서로 컷으나 살균 후기에서는 효모, 세균, 젖산균의 순서였다. 동치미음료의 식염 첨가량이 높을수록 PEF 살균에 필요한  $E_c$ 값은 낮아졌다.

PEF 처리한 동치미음료를 4°C에서 9주간 저장하는 동안 미생물은 거의 생육하지 않았다. PEF 처리구의 pH는 변화가 없었고, 산도도 경우 저장 기간 중 거의 변화없이 초기 산도를 그대로 유지하여 PEF 처리에 의한 저장성의 향상을 확인하였다.

#### 나) 약주의 PEF 살균

##### ① 소규모 PEF 처리 장치를 이용한 약주의 살균

소규모 회분식 PEF 처리 장치에서 exponential decay wave로 약주를 처리했을 때 세균의 경우  $E_c$ 값은 7.5 kV/cm, 젖산균은 8.5 kV/cm, 효모는 6.5 kV/cm 였으며, 전기장 세기가 증가할수록 미생물의 생존율이 감소하였다.

전기장 세기를 고정하고 펄스 수를 변화시키면서 PEF 처리한 결과 세균, 젖산균, 효모의 경우 모두 동일한 전기장 세기에서 펄스 수가 증가할수록 미생물의 사멸율이 증가하였으나 펄스 수에 따라 사멸율이 직선적으로 감소하지는 않았다. 미생물 종류별로는 효모 (3.5 log), 세균 (3.5 log), 젖산균 (2.5 log)의 순서로 사멸효과가 우수하였다.

회분식 PEF 처리장치를 사용하여 전기장 세기 30 kV/cm에서 250회 펄스 처리한 약주의 저장성을 저장온도 4℃ 와 30℃에서 평가하였다. PEF 처리한 약주의 초기 pH는 무처리 약주에 비해 약간 높았으며 저장기간동안 무처리 약주의 pH는 감소하는 반면 PEF 처리구는 거의 변화가 없었다. 산도의 경우 30℃에서 저장한 무처리 약주는 급격히 증가한 반면 PEF 처리한 시료는 30℃에서도 초기 산도를 그대로 유지하는 경향을 보였다. 또한 30℃에서 저장한 무처리 약주의 경우 2주만에 미생물 수가 급격히 증가하였다가 점차 감소하는 경향을 보였으나 PEF 처리한 약주의 미생물은 전혀 생육하지 않아 펄스 처리에 의해 완벽한 저장성이 부여됨을 확인하였다.

## ② 직렬배열 다중 전극 PEF 처리 장치를 이용한 약주의 살균

Square wave를 이용한 다중전극 PEF 살균 효과는 앞의 exponential decay wave를 이용한 소규모 연속식 PEF살균 보다 살균효과가 우수함이 확인되었다. 약주를 square wave를 이용한 연속 재순환식 PEF 처리 할 경우 미생물 종류에 따른  $D_{PEF}$ 값은 전기장 세기가 증가함에 따라 감소하였으며, 세균의 경우 50 kV/cm에서는 206  $\mu$ s 이었다. 효모는 세균에 비하여 낮은 값을 보여 효모가 PEF 살균에 더욱 민감함을 알 수 있었으며, 약주 산패의 주원인균인 젖산균은 PEF에 대한 저항성이 큰 것으로 나타났다. 약주의 PEF 살균시 미생물별  $z_{PEF}$  값은 젖산균, 효모, 일반세균 순으로 감소하였으며, 따라서 일반세균이 전기장세기에 대한 의존성이 가장 크고 효모, 젖산균 순으로 의존성이 감소하였다.

약주를 PEF장치에 연속적으로 1회 통과하여 처리온도의 영향을 검토한 결과 처리 사멸효과가 증대되어 처리온도의 상승효과가 현저하였다.

미생물, 온도 및 전기장 세기별 사멸속도상수는 미생물별로는 효모의 사멸속도상수가 가장 큰 값을 보여 효모가 가장 쉽게 사멸되었으며 그 다음이 젖산균, 세균 순이었다. 다중전극 PEF 처리한 약주는 색, 향미, 기호도 등 관능적 품질이 우수하였다. 또한 PEF 처리한 약주는 모든 저장온도에서 산도 및 탁도의 변화가 검출되지 않았으며 미생물도 증식되지 않아 PEF 처리는 약주의 저장성 증진에 탁월한 효과를 보였으며 품질도 우수하여 고품질 약주의 생산에의 활용이 크게 기대된다.

#### 5) 기타 액체식품의 PEF 살균

##### ① 저알콜 포도주의 PEF 살균

저알콜 포도주 살균에 필요한 임계 전기장 세기( $E_c$ )는 효모가 14.83 kV/cm로서 가장 낮은 값을 보였으며 그 다음이 세균으로 18.64 kV/cm, 젖산균이 19.46 kV/cm이었다. 40 kV/cm에서의 사멸율은 세균 1.8 log, 효모 2.1 log, 젖산균 1.5 log이었으며, 세균의 전기장 세기에 따른  $D_{PEF}$ 값을 비교하면 젖산균이 가장 높았으며 다음으로 세균, 효모의 순이었으며 전기장 세기가 증가할수록  $D_{PEF}$ 값은 감소하였다.

포도주의 미생물별  $z_{PEF}$ 값은 젖산균이 24.6 kV/cm로 가장 낮았으며, 세균 33.2 kV/cm, 효모 46.8 kV/cm 순으로 높아져 젖산균의 PEF살균이 전기장세기에 대한 의존성이 가장 큰 것으로 나타났다.

##### ② 쌀당화음료의 PEF 살균

쌀당화음료에 존재하는 세균과 효모를 완벽하게 PEF 살균하기 위해서는 1,500 Hz에서 40 kV/cm 이상의 전기장 세기가 요구되었고, 젖산균의 완전 살균을 위해서는 50 kV/cm로 처리해야 하였다. 미생물 종류별로 처리 주파수와 전기장 세기에 따른 생존율의 변화를 반응표면분석법을 사용하여 모델링한 결과 효모에 대한 모델이 결정계수 0.9590으로 가장 큰 값을 나타내 반응표면모형이 가장

잘 적용되는 것으로 나타났다.

$D_{PEF}$  값은 미생물 종류별로 비교할 때 효모가 가장 낮은  $D_{PEF}$  값을 보여 PEF에 대해 가장 민감하게 반응하는 것으로 나타났다.  $D_{PEF}$  값을 토대로 분석할 때 PEF 저항성이 가장 큰 것은 젖산균이고, 세균, 효모의 순으로 저항성이 작아졌다.

쌀당화음료의 PEF 살균시 미생물별  $z_{PEF}$  값은 효모, 젖산균, 세균 순으로 감소하여, 세균의 PEF 살균이 전기장세기에 가장 크게 의존하는 것으로 나타났고, 젖산균, 효모의 순으로 의존도가 감소하였다.

#### 6) 고전압 펄스 전기장에 의한 미생물의 살균 기작

대표적인 모델 균주로 *S. cerevisiae*를 선정하여 고전압 펄스 전기장에 의한 미생물의 사멸 기작에 대하여 상세히 연구하였다. 고전압 펄스 전기장 처리에 의해 *S. cerevisiae* 세포의 세포막이 손상되어 전기장 처리 초기부터 220 nm, 260 nm 및 280 nm의 자외선 흡수물질과, 세포내 이온인  $K^+$ 와  $Na^+$  이온이 유출되었다. 한편 세포내외의 pH 구배 ( $\Delta$  pH)를 간접적으로 측정된 결과, 고전압 펄스 전기장 처리 초기에는 그 차이가 컸으나 처리시간에 따라 차츰 감소하여 약 30  $\mu$ s (실제 처리시간 30 초) 처리 후에는 거의 차이가 없었다. 이와 같은 현상은 고전압 펄스 전기장 처리에 의하여 세포의 pH 항상성을 유지시키는  $H^+$ -translocation 기능을 담당하고 있는  $H^+$ -ATPase 활성이 소실되었거나 세포막 자체가 손상되어 pH 항상성을 잃어버렸기 때문인데, 이는 고전압 펄스 전기장 처리한 세포의  $H^+$ -ATPase의 활성이 처리 초기부터 크게 감소하는 것으로 확인되었다. 또한 세포의 해당 활성이 고전압 펄스 전기장 처리를 약 20  $\mu$ s 받은 후부터 크게 감소하여 고전압 펄스 전기장 처리에 의해 세포의 대사 기능이 손상되었음을 나타내었다.

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 *S. cerevisiae* 세포의 형태학적 변화를 세포 염색, 주사 현미경 및 투과 현미경을 관찰한 결과, Phloxine B 색소로 염색하였을 경우 처리를 받지 않은 생균 세포는 염색되지 않았으나, 고전압 펄스 전기장

처리를 받은 세포는 시간이 증가할수록 염색되는 세포의 수가 증가하여 50 $\mu$ s 처리 후에는 완전히 염색되어 세포막이 손상되었음을 알 수 있었다. 또한 주사 현미경 (SEM)으로 관찰한 결과 처리 받지 않은 세포는 표면이 매끄럽고 균일한 모양을 가지고 있는 반면, 처리를 받은 세포는 표면이 거칠고 주름같은 것이 관찰되었다. 세포내의 미세구조를 투과 현미경 (TEM)으로 관찰한 결과 고전압 펄스 전기장 처리에 의하여 세포내 물질이 상당부분 소실되었으며, 세포막과 세포벽이 손상되어 세포가 일그러지는 형태를 나타내는 것들이 많았다.

*S. cerevisiae* 세포를 일정 시간 고전압 펄스 전기장 처리를 하였을 경우 생존한 세포일지라도 90~99% 이상은 손상을 받은 세포였으며, 이들은 약 4~6시간 후 회복되어 정상적인 세포와 같은 내염성을 나타내었다.

고전압 펄스 전기장 처리가 세포막 손상이외에 세포의 다른 손상 부위에 손상을 주는지 여부를 측정하기 위하여 작용 부위가 서로 다른 최소 농도의 항생 물질을 첨가하여 손상 부위를 측정하였다. 그 결과 세포 단백질도 손상되었음을 확인할 수 있었다. 또한 chromosomal DNA의 손상 여부를 agarose gel과 fluorescence spectrophotometer에 의한 EtBr 발색 정도를 통해 살펴 본 결과 chromosomal DNA 상의 손실이 일부 관찰되었으나 주된 사멸 기작으로 보기에는 그 손상 정도가 미미하였다.

### 3. Ohmic heating 및 microwave를 이용한 해동 기술 개발

#### 1) Ohmic heating을 이용한 동결육의 해동

전통적인 수해동과 ohmic thawing을 병용하여 동결육의 해동을 연구하였다. 동결된 육 (10×10×10 cm)을 수해동 장치 (12×12×12 cm)에 침지 시키고 온도는 10℃ 또는 20℃로 유치시켰고 두 개의 스테인레스 스틸 전극 (10×10 cm) 사이에 위치 시켰다. 다양한 주파수 범위에서 (60 Hz~60 kHz) 전압을 60 V~210



V 까지 변화시켜서 전기 저항에 의한 내부 열 발생을 유도하였다. 일반적인 수해동의 경우 20℃의 물에서 205분이 걸린 반면, ohmic heating의 경우 주파수를 상용 주파수인 60 Hz로 고정시켰을 때 60 V, 110V, 160V, 210V로 전압이 증가함에 따라 154분, 101분, 79분, 55분으로 해동시간이 감소하였으며, 주파수는 해동시간에 중요한 영향을 미치지 않는 듯하였다. 낮은 전압을 이용하여 전기 해동한 경우 drip loss가 적고 높은 보수력을 나타내었다.

### 2) 915 MHz Microwave를 이용한 동결육의 급속 해동

전통적인 해동방법과 비교하기 위하여 냉장고나 오븐을 이용하여 4℃, 28℃, 50℃에서 시료를 녹이면서 대조구로 삼았다. 915 MHz microwave 해동을 위해 전력은 5 kW, 10 kW, 15 kW를 사용하였고, 120℃의 열풍 가열도 검토하였다. 915 MHz microwave를 이용할 경우 해동 시간은 약 1분 30초 정도로 5시간이 걸린 50℃ 해동의 경우보다 시간을 크게 감소시킬 수 있었으며, 또한 침투 깊이, drip loss, 보수력, 총 세균수 감소 등에 있어서 탁월한 효과를 보였다. 915 MHz microwave과 열풍 가열의 병용처리 또한 효과가 있어서 식품 산업에 있어 적절한 해동방법이라 판단되었다.

### 3) 동결 및 해동 방법이 동치미의 품질에 미치는 영향

동치미의 저장 기간 중 과도한 산 생성을 막고 미생물과 효소에 의한 조직의 연화를 방지함으로써, 장기 저장이 가능하도록 동치미를 냉동하였다. 동치미 액과 무를 따로 동결하여, 무는 -20℃, -70℃, 액체 질소에서 동결시켰고 동치미 액은 -20℃, -70℃에서 동결시키면서 품질을 비교하였다. 해동은 915 MHz-microwave를 이용하여 각각 4℃와 27℃에서 해동하였다. 액체 질소에 침지시켜 동결하고 915 MHz-microwave로 해동한 경우 조직감이 가장 우수하였고 색 변화도 가장 적게 나타나 동치미의 장기 보존 방법으로 적당하다고 판단되었다.

-70℃에서 동결하고 915 MHz-microwave로 해동한 동치미 액은 초기의 pH와 총 산도를 유지하여 품질저하가 최소화 되었음을 나타내었다.

#### 나. 연구 개발 결과의 활용

본 연구는 농림 기술 개발 사업의 첨단 가공 기술 개발의 일환으로 지난 5년간 진행되었다. 본 연구 개발의 목적은 전기 에너지를 이용한 냉살균, 非熱 가공 원천 기술과, 산업 현장에 적용할 수 있는 공정을 개발하고자하는 것이었다. 연구 결과 고전압 펄스 전기장 기술에 의하여 기존의 가열 살균에 비하여 천연 상태의 품질을 그대로 유지한 우수한 품질의 가공 식품을 얻을 수 있었으며, 에너지를 현저히 절약할 수 있었다. 또한 본 연구를 통하여 효율적인 저가 보급형 장치 개발을 완료함으로써 장치 운용 비용이나 전기장 발생 장치 비용등이 현저히 낮아 실 산업에 대한 적용성이 매우 클 것으로 예상된다. 또한 고전압 펄스 전기장 처리와 열과의 병합 처리, 또는 산성 pH, 적절한 항균 처리등과 병행을 할 경우 살균 효과가 우수하여 다양한 제품의 비열 살균 기술로서 이용이 가능하였다. 따라서 본 연구 개발 결과는 고품질의 식품이나 의약품등의 생산에 활용이 기대된다. 본 연구 그룹은 지금까지의 연구 결과를 토대로 하여 보다 정확한 살균 기작과 응용 범위등에 대한 연구를 계속 진행할 것이며, 또한 고부가 가치의 제품에 의 적용등 기술의 적용성을 높일 예정이다.

고전압 펄스 전기장 기술은 살균 이외에도 과일 또는 채소로부터 주스의 착즙, 색소나 향기 성분등의 유효 성분의 추출, 폐수 처리 또는 생물 공학 분야에서 동·식물 세포 또는 미생물 세포로부터 대사 산물 (macromolecules, sugar, pigments, flavors, 생리 활성 물질등)의 추출 수율 향상에 응용할 수 있는 등 그 응용 범위가 매우 광범위하다. 식물이나 동물 세포로부터 유용 물질을 추출할 때는 원형질 막이 가장 큰 저항으로 작용하므로 추출 수율이 낮다. 그러나 세포를 고전압 펄스 전기장 처리를 하면 세포벽은 그대로 유지하면서 원형질막만 선택적

으로 파괴시키는 전기 원형질 분리 (electroplasmolysis)가 일어난다. 이러한 전기 원형질 분리에 의한 추출은 추출 수율의 향상 뿐만아니라 거대 분자등이 유출되지 않으므로 추출 후 정제 공정이 간단하고, 큰 전기장을 필요로 하지 않아 장치 구성도 간단한 장점이 있다. 실제 본 연구에서도 미생물 세포와 식물 세포로부터 색소의 추출에 적용한 결과 일반 물리적 처리나 기계적 처리에 의한 것보다 높은 수율을 얻을 수 있었다. 일반적으로 식물 세포는 세포의 크기가 크기 때문에 이 들로부터 유용 물질을 추출할 때는 비교적 낮은 전기장으로도 추출이 가능하였다. 또한 현재 다른 응용 범위로는 의용 기술, 화학 공정, 건조 공정, 의료 제품 생산 등에 적용이 시도되고 있어 앞으로 더욱 더 응용 범위가 확대될 것으로 보인다.

현재 본 과제의 연구 개발을 종료하는 시점에서 산업체와 기술 이전에 대한 협의를 진행중에 있으며, 실제 발효제품의 개발에 적용을 위한 연구를 착수 하였다. 이외에도 몇몇 기업들이 본 기술에 관심을 보이고 있어 기술 이전이 활발해 질 것으로 기대된다.



# SUMMARY

(영문 요약문)

Thermal processing of foods for the extension of the shelf life accompanies physical and chemical changes which deteriorate the quality sometimes seriously. High voltage pulsed electric fields (PEF) treatment is one of the most promising non-thermal technologies. Because of the nutritional and energy-saving benefits, non-thermal processing has the potential to satisfy the growing demand for minimally processed foods and can simultaneously provide safe and stable foods. On the way to these goals the mechanisms, kinetics and parameters associated with PEF need to be clearly understood. In this research we investigated the conditions and factors influencing the pasteurization of several foods, the extraction of pigments from yeast and plant cells in laboratory and pilot scale PEF system. Also, the storage stability and the quality improvement of PEF treated products were determined.

## 1. Effect of high voltage pulsed electric field on the extraction of Carotenoid from *Phaffia rhodozyma*

The yeast cell suspensions were treated with high voltage pulses in a recycled PEF treatment chamber which consists a pair of thin plates of stainless steel adhering to a small chamber with approximately 1~4 mm gap. A 2.5 log reduction in survivability and more than 98% of electropermeabilization of the yeast cells could be achieved by PEF treatment for 300 $\mu$ s with an electric fields of 30 kV/cm and pulse duration of 1  $\mu$ s. When the yeast cell suspended in 0.01% CaCl<sub>2</sub> solution were treated with PEF,

26.3  $\mu\text{g}$  of carotenoid pigments/g of dried yeast was extracted. In order to increase permeability of yeast cell wall, various pretreatment methods such as freezing-thawing, mechanical treatment, solvents, permeabilizing agents, and yeast cell wall lytic enzyme were treated. The combination of PEF (50 kV/cm, 300 Hz, 1000  $\mu\text{s}$ ) and conventional methods such as solvent and freezing-thawing pre-treatment had no enhanced effects on the extraction of carotenoid pigments. Permeabilizing agents, especially Tween 20 and capric acid, enhanced significantly the extraction efficiency of carotenoid pigments from *P. rhodozyma* cells. These results indicate that for the continuous extraction of carotenoid pigments from *P. rhodozyma* PEF treatment combined with permeabilizing agent can be used.

## 2. Effect of high voltage pulsed electric fields on the extraction of anthocyanin pigment from purple sweet potato

Treatments of coarsely ground purple sweet potato (PSP) with PEF(30 kV/cm, 500 Hz) resulted in maximum extraction yield of 65% as compared with 45~50% of conventional ethanol extraction. Extraction yields increased with increases in electric field strength (from 10 kV/cm to 35 kV/cm) and frequency (from 100 Hz to 500 Hz), but treatment time was not effective. PEF treatment of sweet potato tissue required low energy and the temperature increases observed during the treatments were almost negligible. These results suggest that PEF processing can be used effectively for the extraction of desirable bioactive materials from plant cells.

## 3. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by pulsed electric fields

The use of pulsed electric fields (PEF) as a method for spore germination of *Bacillus subtilis* was investigated. Spores suspended in 0.01% NaCl solution (ca.  $10^8$  cells/mL) were treated with electric field intensity of 20 ~ 50 kV/cm and treatment time 250~2000  $\mu$ s at selected temperatures. When PEF treated spores were incubated at 37°C for 40 min after inoculation into various germination media, most of spores germinated during incubation. Extent of germination increased with increasing PEF treatment temperature and electric field intensity. More than 98% of surviving spores in tryptic soy broth (TSB) germinated during incubation after PEF treatment with the electric field intensity of 40 kV/cm for 1000  $\mu$ s at 50 °C. The rate of germination in nutrient rich TSB medium was higher than that in nutrient broth. PEF treatment could activate about the germination of spores without heat activation, which suggested that spores germination by PEF treatment should be useful for pre-step of spores inactivation.

#### 4. Pasteurization of Carrot juice using high voltage pulsed electric fields

Inactivation of *E. coli* in carrot juice increased with increase in intensity of the electric field strength and treatment time. A reduction of 4D was obtained at 40kV/cm and 256 exponential decay pulses at room temperature. Critical electric field strength( $E_c$ ) and treatment time( $E_t$ ) needed for inactivation of *E. coli* were 11.74kV/cm and 3.6 $\mu$ s at room temperature, respectively. The combination of PEF and conventional thermal treatment inactivated *E. coli* more effectively. The reductions of up to 5.5D were observed when the carrot juice was treated with PEF of 22.5kV/cm and 256 pulses at 50 °C. PEF treatment was not changed in color, pH, °Brix, titratable acidity and  $\alpha$ -,  $\beta$ -carotenes of carrot juice. In pilot system, pasteurization of

carrot juice using square wave pulse was more effective than exponential decay pulse. Microorganisms were not detected when the carrot juice was treated with PEF of 55kV/cm, 1500Hz and pulse width 1 $\mu$ s at 50°C and pH 4.25. The inactivation of microorganisms in carrot juice was more effective at lower pH and higher temperature. When the samples treated under optimal conditions were stored at 4°C and 25°C, changes in pH, titratable acid, Brix, color,  $\alpha$ -,  $\beta$ -carotenes and the growth of microorganisms were observed during storage for 28 days.

#### 5. Pasteurization of Takju using High voltage pulsed electric fields

Takju, Korean traditional turbid rice wine, was treated with pulsed electric fields in order to develop a new cold pasteurization process. Inactivation of yeast in Takju increased with increase in electric fields strength, treatment time and alcohol content. The initial yeast count of Takju was  $2 \times 10^8$  cfu/ml. When 256 exponential decay pulses of 30 kV/cm at room temperature were applied, inactivation of yeast was around 2 log cycles, whereas 8 log cycle reductions was obtained when the treatment temperature was increased to 50°C. Micrographs of SEM of yeast cells treated with PEF showed rough surface, where as untreated cells appeared to have smooth surfaces and thick walls. TEM revealed great damage of to the cell organelles and leakage of cytoplasmic contents, which was seen as debris in between the cells. Takju was pasteurized by PEF treatment with square wave pulses using a series of continuous treatment chambers, and then stored at 4°C. No changes in pH, acidity and the growth of yeast were observed during storage for 4 weeks.



## 6. Pasteurization of traditional beverage by high voltage pulsed electric fields

### 1) Dongchimi juice

Dongchimi juice was prepared by the rapid fermentation of the ground turnip and other ingredients using a commercial lactic acid bacteria starter. A small scale PEF treatment system was used for the Dongchimi juice. When exponential-decay pulses were introduced on a batch running mode the critical field strengths ( $E_c$ ), minimum electric field strength required for the inactivation of microorganisms, were estimated to be 12.48 kV/cm for the bacteria, 12.45 kV/cm for the lactic acid bacteria and 11.87 kV/cm for the yeast. The batch running was more effective to the destruction of the microorganism than the continuously recycled running. The microbial counts in Dongchimi juice were reduced by 3 log for the aerobes, 2.5 log for the lactic acid bacteria and 3.5 log for the yeast by the 25 kV/cm, 512  $\mu$ s treatment at room temperature. When the PEF-treated Dongchimi juice was stored at 4°C, no microbial growth, and no changes in pH and acidity were observed during 9 week storage.

### 2) Yakju

The initial microbial counts of Yakju sample were  $2.2 \times 10^5$  CFU/mL for total aerobes,  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL for lactic acid bacteria and  $2.0 \times 10^5$  CFU/mL for yeast. The pH, acidity and electric conductivity of the Yakju were 3.49, 0.37% and 1.24 mS/cm, respectively.

Yakju was treated with square wave pulses of 1  $\mu$ s duration at various electric field strengths and frequencies. The inactivation of microorganisms in Yakju followed a first order kinetics, and increased with increasing in field strength and the frequency. The  $D_{Hz}$ -value and the

$D_{PEF}$ -value decreased with the electric field strength. The single pass of Yakju through the medium sized multiple electrode PEF system at elevated temperatures of 30 ~ 40°C was very effective for the pasteurization of Yakju. Yeast was most sensitive to PEF treatment, followed by lactic acid bacteria and the aerobes. The PEF products resulted in less changes in color and significantly superior in sensory quality to the heat-treated one. The storage test of the PEF-treated Yakju showed a great storage stability and an acceptable sensory quality.

### 3) Other liquid beverages

A fermented red wine containing 8.5% alcohol was treated by the single pass through the medium sized multiple electrode PEF system. The  $E_c$ 's for the yeast, the aerobes and lactic acid bacteria were 14.83 kV/cm, 18.64 kV/cm and 19.46 kV/cm, respectively. The microbial counts in red wine (low alcohol beverage) were reduced by 1.8 log for the aerobes, 1.5 log for the lactic acid bacteria and 2.1 log for the yeast by the 40 kV/cm, 256  $\mu$ S treatment at room temperature. The  $D_{PEF}$ -value was the highest for the lactic acid bacteria and followed by the aerobes and the yeast. The  $Z_{PEF}$ -values were 33.2 kV/cm for the aerobes, 24.6 kV/cm for the lactic acid bacteria and 46.8 kV/cm for the yeast, showing that the sterilization of the lactic acid bacteria was most dependent on the electric field strength while the yeast was least.

A saccharified rice beverage was also treated by the single pass through the medium sized multiple electrode PEF system with different frequencies and electric field strengths. The complete inactivation of the aerobes, the yeast and the lactic acid bacteria was achieved at the electric field strength over 50 kV/cm, and 1,500 Hz. The sterilization degree of the

microorganisms was analyzed by a response surface methodology, and the model for the yeast showed the highest goodness of fit. The  $D_{PEF}$ -value was also the highest for the lactic acid bacteria and followed by the aerobes and the yeast showing that the yeast was most sensitive to the PEF treatment. The sterilization of the aerobes was most dependent on the electric field strength while the yeast was least.

#### 7. Inactivation mechanisms of microorganisms by high voltage pulsed electric fields.

In general, *S. cerevisiae* cells have been found less resistant to PEF treatment than other vegetable cells, which is mostly attributed to their large size. Inactivation mechanisms of microorganisms by PEF have been studied using *S. cerevisiae* as a model organism. The yeast cells treated with high voltage pulsed electric fields showed the cellular membrane damages, which resulted in an increase in the leakage of UV-absorbing materials and intracellular ions. PEF-treated cells showed collapse of pH gradient and loss of salt tolerance. Therefore, it was suggested that cell death resulted from the breakdown of homeostasis, the membrane damage and physical rupture of cell walls. This suggestion was further confirmed by the experimental results such as absorption of Phloxine B dye, reduced glycolysis activity, lowered activities of  $H^+$ -ATPase, morphological changes on SEM photographs, and disruptive cytoplasmic membranes on TEM photographs.

The substantial recovery of injured cells in the presence of metabolic inhibitors indicates that PEF injured cells of *S. cerevisiae* required protein synthesis and cell membrane synthesis for recovery. This results showed PEF-treated cells was damaged cellular proteins and cell membrane. In

addition, the PEF treatment on *S. cerevisiae* led to damaging chromosomal DNA.

#### 8. Ohmic thawing of a frozen meat chunk

Ohmic thawing in combination with conventional water immersion was investigated. Frozen meat chunks (10×10×10 cm) were immersed in a water reservoir (12×12×12 cm) at temperature of 10°C or 20°C, and were positioned between two stainless-steel electrodes (10×10 cm) having no direct contact with the samples. Alternating current (60 V~210 V) at various frequency (60 Hz~60 kHz) was applied to generate internal heat by the electrical resistance. When the frequency was fixed to 60 Hz, thawing time was reduced as the voltage increased. Frequency changes, however, gave no significant effect on thawing time. Thawing with low voltage gave lower drip loss and higher water holding capacity.

#### 9. Rapid Thawing of Frozen Meat by 915 MHz Microwave

A study was conducted to develop a rapid thawing method which can prevent excessive drip loss and local overheating. Effects of thawing methods (conventional oven thawing vs. 2,450 MHz and 915 MHz microwave thawing) on thawing time, temperature profile, drip loss, water holding capacity, total color difference, and total aerobes were investigated. Samples were thawed in a refrigerator at 4°C, and ovens at 28°C and 50°C. Power levels of 5 kW, 10 kW and 15 kW were used for 915 MHz microwave thawing. 915 MHz microwave accelerated the thawing rate. Combine treatment of 915 MHz microwave and convectional heating was appeared to be suitable thawing process for frozen

meat.

#### 10. Effects of Freezing and Thawing Methods on the Quality of Dongchimi

*Dongchimi* (Korean-style fermented radish with juice) was frozen to prevent further acidification and softening of texture by restraining microbial growth and enzyme activity during storage. *Dongchimi* juice and radish were separated prior to freezing process, and then separately frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-70^{\circ}\text{C}$  or immersed in liquid nitrogen. Frozen *dongchimi* samples were thawed at ambient temperatures of  $4^{\circ}\text{C}$  and  $27^{\circ}\text{C}$ , and with 915 MHz-microwave, respectively. The radish samples, which were frozen in liquid nitrogen and then thawed with 915 MHz-microwave, gave the highest pectinesterase activity and hardness, and the lowest polygalacturonase activity and color change. These results indicate that quick freezing-quick thawing method can be used for the long-term storage of *dongchimi* products. *Dongchimi* juice frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  and thawed with 915 MHz-microwave retained its pH and titrable acidity, and showed a largest reduction in total aerobic count and lactic acid bacteria.

#### 11. Development of nonthermal food pasteurization equipment by high voltage pulsed electric fields

The PEF processing system is composed of a high voltage repetitive pulser, a treatment chamber, a cooling system, voltage- and current measuring devices, a control unit, and a data acquisition system. For the first time, we developed power supply (0~50 kV, 50 kW), pulse generator (10~50 kV, 50 kW) and small PFN (generate square wave). The second step, we designed and manufactured the pulse transformer (0.5~8  $\mu\text{s}$ , variable), and then upgraded it

for optimum operation conditions. High voltage SMPS (95% efficiency) and square pulse generator (3~16 kV, 1~1500 pps) was setup is made, and finally compact system. for demonstration was completed.

## 12. Development of treatment chamber for pulsed electric fields system

In order to develop efficient treatment chambers, various types and configurations including static and continuous chambers were tested.

We found the co-field flow treatment chamber was most promising. The co-field flow liquid-electrode treatment chamber is a new design for non-thermal processing of fluid foods. Knowledge of temperature distribution inside this type of chamber is needed to design and to optimize industrial scale treatment systems.

A co-field flow model treatment chamber was design and tested in this study. This chamber consisted of vertical sections of two metal electrodes and one section of acetal. A liquid crystal temperature sensor sheet was used to measure the temperature distribution. Direct current was applied across the two electrodes. Temperature distribution was reconstructed with respect to time and location under static and continuous flow conditions. Voltage or current flow profiles were computed from temperature distribution measurements. Under continuous flow condition, there is a short flow path in this model chamber. Locations in the upper vessel near the orifice and on the insulation are dead spots, they are high temperature.

# CONTENTS

(영문목차)

Summary .....	3
I. Purpose of Project .....	31
1. Background of Project .....	31
2. Purpose of Project .....	32
II. Strategy of Art .....	39
1. High voltage pulsed electric fields technology .....	39
2. Thawing technology by ohmic heating and microwave .....	56
III. Contents and Results of Project .....	59
1. Development of nonthermal food pasteurization equipment by high voltage pulsed electric fields .....	59
2. Development of treatment chamber for pulsed electric fields system	76
3. Development of extraction technology by high voltage pulsed electric fields .....	84
4. Development of nonthermal pasteurization technology by high voltage pulsed electric fields .....	123
5. Development of thawing technology by ohmic heating and microwave .....	390
IV. References .....	441

# 목 차

요약문 .....	3
제 1 장 연구개발의 필요성 .....	31
제 1 절 연구의 배경 .....	31
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	32
제 2 장 국내외 기술 개발 현황 .....	39
제 1 절 고전압 펄스 전기장 기술 .....	39
제 2 절 Ohmic heating 및 microwave를 이용한 해동 기술 .....	56
제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과 .....	59
제 1 절 고전압 펄스 전기장 발생 장치의 개발 .....	59
제 2 절 고전압 펄스 전기장 처리 용기의 개발 .....	76
제 3 절 고전압 펄스 전기장을 이용한 추출 기술 .....	84
제 4 절 고전압 펄스 전기장에 의한 살균 기술 개발 .....	123
제 5 절 Ohmic heating 및 microwave를 이용한 해동기술 개발 .....	390
제 4 장 참고문헌 .....	441



## 제 1 장 연구개발의 필요성

### 제 1 절 연구의 배경

최근 소비자들의 건강에 대한 관심이 고조됨에 따라 천연 상태의 품질을 가능한 유지한 최소 가공 식품 (minimal processing foods)에 대한 수요가 증가되고 있다. 최소 가공법은 식품 본래의 신선한 품질을 가능한 그대로 유지하면서 안전한 보존 수명을 부여할 수 있는 가공 방법을 말한다.

오늘날 식품 공업에서 사용되고 있는 보존법은 대부분 가열 조작(thermal operation) 또는 식품 보존제의 첨가 등에 의한 화학적 조작(chemical operation)에 의존하고 있다. 그러나 가열 조작에서는 열에 의한 영양 성분의 파괴, 텍스처의 변화, 향기 성분의 손실 등 품질 손실을 피할 수 없으며, 인공 보존료를 점차 사용하지 않는 경향이다.

따라서 식품 가공 및 포장 기술에 기술 혁신이 요청되고 있으며 여러 가지 非熱 가공(nonthermal process) 기술이 개발되고 있다. 현재 식품의 보존 기간 연장을 위해 개발되고 있는 非熱 처리 기술은 물리적인 방법으로 고전압 펄스 전기장 (high voltage pulsed electric field), 초고압 (high hydrostatic pressure), 진동 자기장 (oscillation magnetic fields), 이온화 조사 (ionizing radiation), 광 펄스 (pulsed intensive light), 초음파 (untrasonication) 등이 있으며, 화학적 방법으로는 이산화 탄소, 양이온 다중 고분자 (polycationic polymer), 세포벽 분해 효소, 항균제 또는 항균성 효소의 이용등이 있다. 그 중에서 특히 펄스 전기장(pulsed electric field) 및 초고압(ultra-high pressure) 기술은 21세기 식품 공업에 큰 변화를 가져올 emerging technology로 평가되고 있다.

이들 방법은 재래의 熱的, 化學的 방법과는 달리 電氣的(electrical) 및 物理的(physical) 조작으로서 앞으로 이들 기술이 실용화되면 미래의 소비자들에게 오늘날 식품보다 품질면에서 훨씬 우수하고, 천연의 영양 성분을 그대로 함유하고 있으며, 신선하고 식미가 우수한 高品質의 安全한 식품을 제공할 수 있을 것이다.

초고압 가공 기술은 장치가 고가이고 연속 조업이 곤란한 점 등 단점이 있다. 고전압 전기장 가공기술은 액체, 고점성 식품, 입자를 함유한 식품 등 펌프로 수송 가능한 식품은 연속가공이 가능하며, 에너지 효율이 높고, 냉살균(cold sterilization), 동식물세포로부터의 추출, 압착 탈수, 냉동육의 해동 등 응용 범위가 매우 광범위하다.

## 제 2 절 연구 개발의 필요성

### 1. 고전압 펄스 전기장에 의한 식품 가공 기술

#### 가. 기술적 측면

식품의 보존성을 향상시키기 위하여 전통적으로 가열 처리에 의하여 미생물을 살균하여 왔으며, 식품 산업계에서는 가열 살균 공정에서 가열 온도와 시간을 조절하여 가능한 고품질을 유지하고자 노력하여 왔다. 초고온 단시간 살균 등 살균 기술과 cold chain, 포장 재료와 저장 온도 제어 기술의 진보는 가열에 의한 식품의 품질 손상을 어느 정도 감소시킬 수는 있으나 한계가 있다.

특히, 과일 및 채소 주스, 유제품등은 신선도가 중요하며 열에 의하여 쉽게 영양 성분이 파괴되고 손상된다. 따라서 농수산물 및 식품의 품질 저하를 최소화하면서 효율적으로 유해 미생물을 사멸내지 억제시켜 변패를 방지하고 장기

보존하기 위해서는 熱에너지를 이용하지 않는 방법, 예를 들면 전기 에너지를 이용한 電氣的, 物理的인 새로운 가공 기술을 개발하지 않으면 안된다.

고전압 펄스 전기장 (이하 PEF라 약함) 기술은 高電壓의 펄스 전기장을 식품에 걸어 주어 식품 중 미생물의 세포를 파괴시켜 사멸 시키는 것이다. 이 때 식품 전체의 온도는 거의 상승하지 않으므로 가열에 의한 불필요한 에너지의 손실이 없고 품질 손실을 근본적으로 방지할 수 있는 冷殺菌 기술이다.

과일이나 야채중의 즙액의 함유량은 90~95% 범위이며, 착즙 수율을 향상시키기 위하여 기계적인 분쇄, 가열 및 효소 처리법등이 사용되고 있으나 착즙 수율은 50~60%에 지나지 않는다. 특히, 생물 공학 기술의 발전으로 식물 세포의 조직 배양등 첨단 농업 기술이 발전되고 있으며, 이들 원료로부터 생리 활성 물질, 색소등 유용 물질 생산이 주목되고 있으며, 약용 식물등으로부터 기능성 소재의 탐색 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 식물 조직으로부터 유효 성분을 변성시키지 않고 효율적으로 추출할 수 있는 非加熱 추출 기술의 개발이 시급하다.

식물조직으로부터 유용 물질을 추출하는데 가장 큰 저항인자는 원형질막과 세포벽이다. 그러므로 PEF를 식물 조직에 걸어 주어 세포벽을 파괴시키므로서 전체 온도를 1℃ 미만으로 거의 변화시키지 않고 추출하여 수율을 현저히 향상시킬 수 있다.

탁주, 약주 등 전통주는 가열 살균시 이취를 발생하여 품질을 저하시켜 전통주의 대량 생산 및 수출 상품화에 문제점으로 대두되고 있으며, PEF를 적용하면 이취의 발생없이 저장 수명을 연장할 수 있어 전통 식품의 산업화 및 계승 발전에 크게 기여할 수 있다.

이상에서 기술한 바와 같이 전기·물리적 가공 기술은 식품의 보존성 향상을 위한 冷殺菌 기술로서 뿐만아니라, 식물 세포로부터 주스, 향료, 색소 등의 추출, 생물공학 제품의 추출 등에 광범위하게 응용될 수 있는 非熱 가공 기술이므로 앞으로 농산물 및 식품 가공에 혁신을 가져올 것으로 기대된다.

#### 나. 경제·산업적 측면

UR, WTO 체제 출범으로 농산물의 시장이 본격적으로 국제화, 개방화됨에 따라 농산물 및 식품 가공을 위한 첨단 기술을 개발하여 국제 경쟁력을 확보하는 것이 시급한 과제이다.

국내 농산물을 육성 발전 시키기 위해서는 과일이나 채소등을 고부가 가치 제품으로 가공하는 기술을 개발하지 않으면 안된다. 동치미, 나박 김치등 김치의 보존성 향상, 천연 상태의 풍미를 유지하고 있는 야채 에센스 (natural vegetable essences)의 개발, 과일 및 채소 주스의 고품질화, 제품의 다양화로 수요 창출에 노력하여야 할 것이다.

최근 소비자들의 농산물 및 가공 식품에 대한 요구는 건강 지향과 자연 지향이 특징이며 "less heat, less drying, less salt, less sugar, less acid, less use of additives"의 경향이 강하다. 그러나 이와 같은 경향은 식품의 보존성 및 품질 측면에서 본다면 마이너스 요인이므로 이와 같은 소비자의 욕구를 충족시키기 위하여 천연 상태의 품질을 가능한 유지할 수 있는 신기술 개발이 요청된다.

식품 제조업은 소규모에서 현대적인 설비를 갖춘 대규모 경영 체재를 갖추게 되고 지역 사회뿐만 아니라 국제 시장으로 유통이 확대됨에 따라 shelf-life 연장의 필요성이 증대되고 있다.

환경 보존에 대한 사회적 요구가 증대됨에 따라 착즙 수율을 향상시켜 착즙박 등 가공 폐기물의 양을 줄이면서 생산성을 높이는 환경 보존형 농산물 가공 방법의 개발이 요구된다.

#### 다. 사회·문화적 측면

소비자들이 농수산물 및 가공 식품에 대하여 점점 편리성, 안정성, 위생성을 요구하게 되고 건강 지향적, 천연 지향적이고 신선한 것을 찾는 경향이 강해지면서 저장 수명이 긴 제품이 시장에서 더 이상 selling point가 될 수 없다.

그러므로 소비자의 욕구를 충족시키기 위해서 저장 수명이 짧은 천연 원료를 가능한 품질을 손상시키지 않으면서 가공하는 새로운 첨단 가공 기술의 개발이 요청된다. 또한 장기간 저장이 가능하도록 가공하는 제품은 오히려 어느 정도의 저장 수명을 희생하더라도 품질을 향상시킬 수 있는 최소 가공 기술로의 전환이 필요하다.

## 2. Ohmic heating 및 microwave를 이용한 해동 기술

#### 가. 기술적 측면

김치의 산패 현상에 주로 관여하는 미생물은 *Lactobacillus plantarum*이며, 산패 현상과 함께 동치미의 장기 저장시 조직의 연화가 문제가 되는데 조직의 연화에 관여하는 효소로는 pectinesterase (PE)와 polygalacturonase (PG)가 있다. PE는 조직의 연화를 유발하며, PG는 가수 분해에 의한 조직의 연화를 유발한다. 따라서 PE를 활성화시키고 PG를 불활성화시키면서 김치의 장기 저장시 문제가 되는 조직의 연화를 방지할 수 있다.

동치미의 저장 기간을 연장하기 위해서는 과숙 현상을 억제하여야 하는데, 동치미의 과숙 현상의 주원인은 유기산 생성에 따른 pH의 저하, 유기산 조성의 변화 및 불쾌한 휘발성 물질의 생성, 펙틴 분해 효소 작용에 의한 조직의 연화 등이며, 이에 따른 김치의 맛, 냄새, 조직감등 관능적 품질의 저하가 장기 저장시 문제점이라 할 수 있다.

김치를 동결하면 김치내의 수분이 동결되어 미생물의 활동과 효소의 작용이 정지되므로 발효가 더 이상 진행되지 않아 산패 및 김치 조직의 연화를 방지할 수 있다. 따라서 동결 동치미는 장기 저장 방법으로는 바람직하지만, 동결 및 해동시 품질의 변화가 발생하므로 문제가 된다.

이러한 품질 변화의 주원인은 동결시 대형 빙결정 형성과 긴 해동 시간에 따른 미생물의 번식과 효소의 작용등이므로, 식품의 저장성과 품질 유지를 확보하기 위해서는 급속 동결법과 급속 해동법에 대한 연구가 필요하다.

급속 동결 방법으로는 비포장 또는 얇게 포장된 식품의 상(phase)의 변화를 동반하는  $-60^{\circ}\text{C}$  이하의 냉매에 접촉시켜 냉동하는 초급속 냉동 방법이 있다. 동결 매체로 액체 질소 가스와 액화 탄산 가스를 사용하는데 액체 질소의 경우는 액체 질소속에 식품을 넣어 동결하는 방법과 식품에 액체 질소를 분무하는 방법이 있다. 액체 질소를 사용할 경우 동결 시간이 단축되어 연속 공정이 가능하고, 증발 온도가 낮으므로 초급속 동결이 가능하여 미세한 얼음 결정이 생성되므로 품질의 변화를 최소화할 수 있으며, 화학적으로 불활성인 질소 가스에서 동결되므로 산화에 의한 품질 변화를 방지하고, 동결시 건조되는 것을 방지할 수 있다.

현재 주로 사용하고 있는 동결육의 해동 방법에는 공기 해동법과 물 해동법이 있다. 이들 방법은 동결육을 냉기나 냉수 중에 방치하여 외부로부터 내부로의 열 전도에 의해 서서히 해동시키는 것으로, 열 전도율이 낮기 때문에 해동

시간이 길고, 해동 중 변색을 유발하며, 잡균에 의한 오염 가능성이 커지고, 해동에 많은 공간이 필요하다는 단점이 있다.

해동의 방법 중에 전기적 에너지를 이용한 마이크로 웨이브 해동은 가장 신속한 해동 방법으로서 기존의 열 전도에 의한 해동 방법에 비해 수십 배나 빠른 장점을 가지고 있다. 또한 연속 공정으로 노동력의 절감, 세균의 번식을 억제할 수 있으며, 품질의 저하를 최소한으로 하면서 drip 손실의 양을 줄일 수 있고, 발열 효율이 높고, 전파의 누설을 방지할 수 있으며 제어가 용이한 장점을 가지고 있다.

그러나 마이크로웨이브 해동의 경우 주파수가 높을수록 침투 깊이가 낮아져 적용할 수 있는 제품의 두께가 제한되는 단점을 가지고 있다. 따라서 대형 제품일 경우 표면은 이미 타버려도 내부는 얼음으로 존재하는 등의 불균일한 가열이 문제가 되고 있으며 이를 해결하기 위한 연구들로 저주파 마이크로웨이브를 이용한 해동, 상용 2,450 MHz의 마이크로웨이브에서 표면 냉각 시스템을 적용하는 방법등이 연구되고 있다.

#### 나. 경제·산업적 측면

식생활의 변화에 따른 육류 소비의 증가와 수입 자유화 조치에 의한 축산물의 수입 규제 완화로 쇠고기, 돼지 고기등의 수입량이 매년 증가 추세에 있다. 수입육의 대다수는 동결육이며, 국내 생산육도 운반과 보관의 편리성 때문에 동결육의 비율이 높아지고 있다.

식품의 동결에 대해서는 많은 연구가 수행되었고 실제로 상당한 발전이 있었지만, 해동에 대한 연구는 그 중요성이 등한시 된 경향이 있었다. 그러나 적절한 해동 여부는 식품의 품질에 카다란 영향을 미치며, drip loss, 해동 시간등

경제적인 면에도 직접적인 관계가 있으므로 해동도 동결과 마찬가지로 중요한 의미를 지닌다.

동결육을 보다 짧은 시간에 해동하면 시간과 노력이 절감되고, 해동 중 미생물의 성장, 변색, 산화등에 의해 생기는 품질 저하가 방지되며, 시장 수요에 맞추어 적시에 적절한 양을 공급할 수 있는 장점을 가지게 된다.

#### 다. 사회·문화적 측면

최근 현대인의 식생활 패턴의 변화로 김치를 사먹는 인구가 증가하고 있으며 일본, 미국, 동남아등으로 김치를 수출하는 규모도 커지고 있는 추세이다. 특히 우리 나라의 전통 발효 식품인 김치류중 무를 원료로 하는 동치미는 독특한 조직과 매운 맛이 없는 상쾌한 신맛이 나는 국물로 다른 김치류와는 달리 그 독특함이 인정되어 왔다.

그러나 동치미는 현재 사용되는 저장 방법으로는 장기 저장에 한계가 있으므로 김치 산업 발전과 더불어 대규모 생산을 위한 제조, 저장, 유통에 대한 체계적인 연구가 요구되고 있는 실정이다.

식품의 보존성을 향상시키는 방법으로 많이 사용되고 있는 식품 보존제의 사용도 위험성 문제가 증가함에 따라 그 사용이 저마 줄어들고 있는 추세이다. 이런 문제점들을 해결하기 위하여 기존의 방법들을 대체할만한 여러 가지 신기술들이 요구되고 있다.



## 제 2 장 국내외 기술 개발 현황

### 제 1 절. 고전압 펄스 전기장 기술

#### 1. 고전압 펄스 전기장 살균의 발전 동향

식품의 보존성을 향상시키기 위하여 전통적으로 사용되어온 가열 처리법은 앞서 언급했듯이 열에 의한 영양 성분의 파괴, 텍스처 및 색택의 변화, 향기 성분의 손실 등 품질 손실을 피할 수 없으며, 냉동이나 건조법은 오랜 기간 저장할 경우 품질의 손실 및 소비자들의 기호를 저하시키며, 화학 식품 보존제의 사용은 점차 감소되고 있는 추세이다.

따라서 전혀 熱을 가하지 않거나 제한적으로 열처리를 하므로서 고품질의 식품을 생산할 수 있는 非加熱 식품 가공 기술 (nonthermal food processing technology)에 관심이 집중되고 있다.

이러한 비열 식품 가공 기술에는 고전압 펄스 전기장 (high voltage pulsed electric fields, PEF), 진동 자기장 (oscillating magnetic fields), 마이크로웨이브 (microwave induced electromagnetic fields), 이온화 조사 (electron ionizing radiation), 광 펄스 (intensive light pulse) 및 고압 내지는 초고압 (high pressure or ultra high pressure treatment) 등이 유망한 기술로 대두되고 있다.

이러한 여러 비열 가공법 중에서 고전압 펄스 전기장에 의한 미생물의 불활성화는 처리 중 온도가 거의 상승하지 않고 처리 시간이 짧으며 연속 처리가 가능하며, 처리 후에 식품의 물리적, 화학적 및 영양학적인 특성들이 거의 변하지 않기 때문에 최근 관심이 집중되고 있는 신기술이다. 고전압 펄스 전기장은 미생

물의 비열 살균뿐만 아니라 식물이나 미생물로부터 유효 성분의 추출에도 이용할 수 있는 등 그 응용 범위가 크게 확대될 것으로 기대된다.

20세기 중반부터 전기가 미생물의 대사나 생육에 영향을 미친다는 것이 알려지기 시작하였다. Gillissen과 Carlson (1962)은 전류가 곰팡이의 대사 작용을 향상 시킨다는 사실을 보여 주었으나 반대의 경향인 미생물의 치사 효과에 대한 연구 결과가 더욱 많이 보고되었다. 식품에 전기적 에너지를 가함으로써 발생하는 이러한 bacteriostatic 또는 bacteriocidal effect의 원인은 다음의 3 가지 현상 때문인 것으로 알려져 있다.

- ① 주입되는 전기 에너지가 열로 전환되는 현상에 의해
- ② 처리된 식품의 화학적 조성이나 전극 재질에서 생기는 free radicals 또는 전기 분해 물질에 의해서
- ③ 극단적으로 강한 전기 펄스를 가함으로써 야기되는 세포막의 기계적 파괴 등에 의해서 일어난다.

이러한 현상은 따로따로 일어나는 것이 아니라 복합적으로 발생되므로 원인을 정확히 구분하기는 어렵다.

1920년에서 1930년대에는 소위 "Electropure process"라고 불리우는 우유의 저온 살균법이 유럽에서 미국으로 이전되어 유행하였으나, 1950년대 이후에는 거의 이용되지 않았다. 그 이유는 전기 에너지 비용이 너무 높고, 상대적으로 효율적인 가열 기술 (plate-type heat exchanger와 열회수 공정등)이 개발되었기 때문이라 생각된다. 현재는 이것이 ohmic heating이라 불리우며 새로이 주목을 받고 있다.

1925년에 Beattie와 Lewis는 "Electropure process"에서 전기가 미생물의 치사 효과에 미치는 영향은 단지 열에 의한 것이라고 보고하였다. 이와 유사한

실험 결과를 OSU에서 1993년 발표하였고 1995년에는 본 연구진에서 조등의 연구 결과로부터 전기가 포자의 발아에 자극을 준다는 사실을 밝히고, 포자의 효과적인 살균법으로 전기를 이용하는 기술을 특허 출원하였다.

1950년대에서 1960년대에는 소위 'Electrohydraulic Treatment'라고 불리는 가공법에 대하여 많은 사람들이 연구를 하였다. 이는 액체 배양액에서 미생물을 사멸시키기 위하여 매우 강한 전기장을 electric arcs와 quickly expanding plasma를 만들어내는 capacitor discharge를 이용하여 펄스 상태로 처리하는 것이다. 1955년에 Gossling은 고전압 펄스가 미생물에 대하여 치사 효과와 돌연 변이 효과가 있다는 사실에 대하여, 1957년에는 Früngel이 전기적 살균과 유가공 기계의 cleaning장치 등에 대하여 특허를 갖고 있다. 1962년에 Brandt 등은 0.6 $\mu$ F의 capacitor를 이용하여 47 kV의 전압을 반복적으로 방전하여 5 log만큼 미생물 (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*)을 감소시켰으며, *Bacillus subtilis* 포자도 99%까지 사멸시킬 수 있다고 보고 하였다. 그들은 Gossling과는 달리 사용 배지와 치사 효과가 밀접한 관계가 있다고 하였다. 예를 들면, 단백질이 풍부한 배지를 사용하는 경우에는 치사 효과가 분명히 감소한다고 하였으며 배지에 가해지는 스파크 방전에 의해 생기는 free radicals이 치사 효과를 갖는다고 하였다.

1960년 중반에 Edebo 등은 미생물의 치사 효과와 전극 재질과의 관계를 조사하였다. 구리나 은 전극을 사용하는 경우가 동이나 텅스텐 전극을 사용하는 경우보다 효과가 더욱 강하게 나타났다. 그리고 1967년 Allen과 Soike는 14 kV 정도의 낮은 전압으로 고용량 capacitor (95 $\mu$ F이상)를 이용하여 *E. coli*, *S. cerevisiae*, bacteriophages T-2 및 *B. subtilis* 포자 등에 대하여 살균 효과를 증명하였다.

1967년에 Gilliland와 Speek는 capacitor discharge (10 kV, 24 $\mu$ F)를 이용

한 펄스 방전 충격파에 의한 미생물 (*E. coli*, *S. faecalis* 및 *B. subtilis*)의 치사 효과를 보고하였다. 공급되는 에너지 형태에 따라서 치사 효과가 다를 수 있다고 하였는데, 공급되는 에너지 양이 같은 경우 고전압으로 적은 펄스로 처리하는 경우보다 낮은 전압으로 여러 번 처리하는 것이 효과가 좋았다고 하였다. 이는 펄스의 frequency가 미생물의 치사 효과에 영향을 미친다는 사실을 나타내고 있다. 그들은 또한 펄스 방전 충격파가 여러 가지 효소의 활성을 감소시킨다는 사실도 보고하였다.

그러나 'Electrohydraulic Treatment'는 실제로 산업화되지는 않았다. 스파크 방전을 일으킬 수 있는 정도의 에너지 밀도를 얻기 위해서는 바늘 모양의 전극이 필요하고, 여러 크기의 처리 용기 내에서 전극 간격이 수 mm 이여야하므로 치사 효과가 부분적일 수 밖에 없기 때문이다.

1960년대 초에 Doevenspeck는 미생물을 치사시킬 수 있는 펄스 기술의 개발에 결정적인 공헌을 하였다. 균일한 전기장으로 시료를 처리하면, 전계 강도에 따라 여러 가지 다른 영향을 보고 하였다. 강한 펄스, 다시 말해서 'hard' 펄스는 야채의 세포나 동물 origin을 파괴할 수 있고, 'medium strong' 펄스는 미생물을 사멸할 수 있으며 낮은 전기장의 'soft' 펄스는 미생물의 대사 작용을 향상시킬 수 있고, 약한 전기장의 경우에는 하수에 녹아 있는 고형분을 응집시킬 수도 있다고 하였다.

균일한 고전압 펄스 전기장이 미생물을 사멸시킨다는 보고는 Sale과 Hamilton(1967, 1968)이 최초로 보고하였다. 그들은 30 kV/cm에서 소금물 내의 *Bacillus cereus*와 *Bacillus polymyxa*의 포자 및 세균과 효모를 처리하여 영양 세포의 불활성화를 관찰하였으나 포자는 불활성화되지 않았다. 그들은 또한 고전압 펄스의 미생물에 대한 치사 효과는 가하는 전기장의 세기, 처리 시간 및 세포의 크기에 의존한다고 하였으며, 가해진 외부 전기장에 의해서 세포의 막 전위차

(transmembrane potential)가 약 1 volt에 도달하는 순간에 세포의 파괴가 일어나서, 결과적으로 막구조의 변화나 막의 permeability가 변하기 때문에 치사 효과가 나타났다고 주장하였다.

Sakurauchi와 Kondo(1980, Japan)는 오랫동안 고전압 펄스 처리(수초 동안)를 하면 *B. subtilis* 포자도 전기 분해 물질에 의하여 불활성화 시킬 수 있다고 하였고, 최초로 미생물의 고전압 펄스에 의한 사멸에 대하여 속도론적 고찰을 하였다.

Jacob 등(1981)도 효모를 처리하면서 사멸 속도와 전기장의 세기 및 펄스 수와의 관계에 있어서 Sakurauchi와 Kondo의 결과와 유사한 결과를 보고하였다.

Hülshager 등(1980, 1981, 1983)과 미국 OSU의 Zhang 그룹(1995)에서는 전기장의 세기와 pulse duration, 다시 말해서 펄스의 frequency가 미생물의 치사 효과에 영향을 미친다고 하였다. 그들은 전기장의 세기가 클수록, 열이 발생하지 않는 한계에서 frequency가 증가할수록 효과가 크다고 하였다.

Mizuno 와 Hayamizu(1989), Sato 등(1980, 1989), Pothakamury 등(1997) 그리고 조 등(1995, 1996, 1997)은 SEM과 TEM을 이용하여, 고전압 펄스 전기장이 미생물의 영양 세포 및 포자를 물리적으로 파괴하는 효과가 있다는 사실을 보여주었다.

1990년대 초부터 많은 사람들이 액체 및 반고체 식품에서 미생물의 PEF 불활성화에 영향을 미치는 요소에 대한 연구가 활발하게 진행되었다. 전기장의 세기(Zhang 등/1994), 처리 시간(펄스 폭 × 펄스 수, Hülshager 등/1983, Qin 등/1994), 펄스 형태(Zhang 등/1994, Qin 등/1994), 처리 시료의 이온 농도(Vega 등/1994), 처리 시료의 온도(Dunn and Pearlman/1987, Bushnell 등/1991, Jayaram

등/1992, Pothakamury 등/1994), 초기의 미생물 농도(Zhang 등/1994) 및 세포의 성장 시기(Pothakamury 등/1994) 등이 조사되었다.

전기장의 세기와 처리 시간에 비례하여 미생물의 사멸 효과가 증가하고, bipolar 형태의 square wave가 가장 효과적인 펄스 형태라고 보고하였다. Bipolar 형태의 펄스는 monopolar 형태의 펄스에 비해서 전기 분해 현상이 줄어들고, 에너지 이용 효율이 높고, 전극 표면에서 일어나는 고체의 침적 현상이 80% 이상 감소하기 때문이라고 하였다.

또한 처리 시료의 이온 강도가 감소함에 따라 미생물의 불활성화 속도는 증가한다고 하였다. 처리 시료의 온도는 증가할수록 synergistic 효과가 있다고 한다. 미생물 초기 농도가 높게 되면 미생물이 응집되어 비교적 낮은 전압의 펄스가 작용하게 되는 부분이 발생하여 효과가 줄어든다고 하였으며, 휴지기나 정지기 상태의 세포보다 성장기의 세포가 고전압 펄스에 제일 민감하게 반응한다고 하였다.

이와 같이 기초적인 연구 이외에도 1980년대 중반부터 고전압 펄스 장치의 개발이 진전됨에 따라 시료의 대량 처리 및 실제 식품에의 응용 등에 관한 연구들이 시도되고 있다. Grahl(1994)은 우유, 오렌지 주스 및 alginate 용액에서 고전압 펄스 전기장의 미생물 살균 실험 후 다음과 같이 보고하였다.

- ① 미생물에 20 kV/cm 이상의 전기장을 가하면 효과적으로 사멸시킬 수 있다.
- ② 효모에 비해서 세균을 불활성화시키기가 어렵다.
- ③ 매우 강한 전기장하에서도 endospore나 ascospore는 불활성화시키기가 어렵다.
- ④ 우유보다 오렌지 주스에서 좀 더 효과적으로 미생물을 사멸시킬 수 있다.

미국 OSU의 Zhang 등(1994)은 우유를 살균하기 위하여 3단계의 PEF처리를 하였으며, 각 단계에서 16개의 펄스 처리를 하여 2~3 log 정도의 균수를 감소시켰고, 독일 Berlin대학 Knorr그룹의 미발표된 자료에 의하면 UHT우유에 *Pseudomonas fluorescens*를 현탁시키고 7~22.5 kV/cm 범위의 전기장으로 20개의 펄스를 처리했을 때 전기장의 세기를 증가시키기에 따라 최대 4 log까지 균수를 감소시킬 수 있었다고 보고하였다. 미국 WSU의 Barbosa 등(1992)은 사과 주스내에서 초기 *S. cerevisiae*의 농도가  $10^6$  cells/ml인 경우에 0.5 $\mu$ F의 capacitor와 40 kV의 charging voltage 그리고 10 Hz의 펄스 반복 처리로  $10^1$  CFU/ml까지 감소시킬 수 있었다고 보고하였다. 동 연구실의 Castro 등(1994)과 Vega 등(1994)은 고전압 펄스 전기장이 효소의 불활성화에도 영향을 미친다고 하였다.

## 2. 고전압 펄스 전기장에 의한 미생물의 불활성화

짧은 시간안에 직류 전압 또는 교류 전압을 걸어 주었을 때, 이를 펄스 또는 펄스 전압이라고 한다. 미생물은 펄스 폭이 1  $\mu$ s 정도의 매우 짧은 고전압 펄스 전기장에 놓이게 되면 세포막이 물리적으로 파괴된다.

펄스 전기장에 의한 미생물의 살균 효과는 완전히 밝혀지는 않았으나 유전 파괴 이론 (dielectric ripture theory)이 제안되었다. 외부에서 전기장을 걸어 주면 Fig. 1에 나타낸 것과 같이 막 사이에 전위차가 유도되고 그 결과 막 내부의 전하가 분리된다. 만약 외부에서 걸어 주는 전기장의 세기를 증가시키면 세포막 内外의 전위차 (transmembrane potential)도 증가하며, 이 값이 임계값 1 V에 도달하면 전하를 띤 분자 사이의 반발력에 의하여 세포막에 pore가 생기게 되고 투과성이 증가된다. 이 원리에 기초한 electroporation과 electrofusion은 세포 융합이나 외래 유전자 삽입에 널리 이용되고 있다. 외부 전기장의 세기를 더욱 증가시키면 세포막은 비가역적으로 교란이 일어나고 마침내 파괴되어 미생물은 사멸된다.

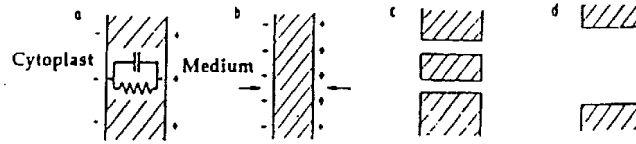


Figure 1. Diagram of reversible and irreversible electric breakdown. (a) Cell membrane with a potential  $V_m$ , (b) membrane compression, (c) pore formation, reversible breakdown, (d) large pores are formed irreversible breakdown.

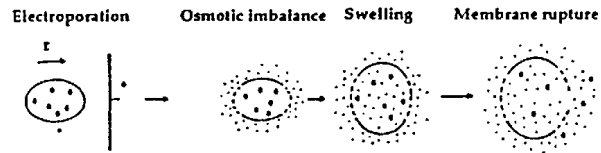


Figure 2. Electroporation of the cell membrane.

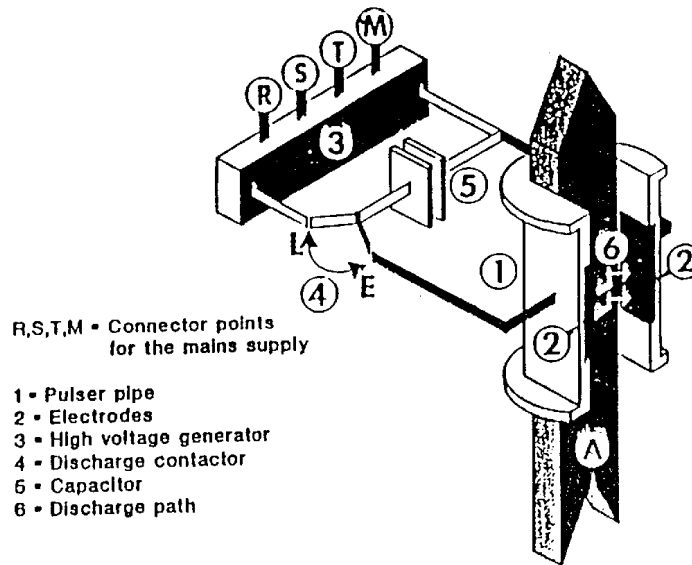


Figure 3. Functional principles of the Elcrack and Elsteril process.



펄스 전기장에 의한 살균 장치의 원리는 Fig. 3에 나타내었다. 액체 식품은 pulser pipe 1로 공급되고, 1의 내부에는 탄소 전극 2가 평행으로 설치되어 있다. Contactor가 L의 위치에 놓이면 고전압 직류 발생기 3에 의하여 capacitor 5는 충전이 된다. 충전이 완료된 후 contactor가 E의 위치에 놓이게 되면 capacitor에 충전되어 있던 전기 에너지는 전극 2 사이의 식품 6을 통하여 순간적으로 방전된다.

PEF를 이용한 非熱 식품 가공 연구의 진보는 식품의 보존성 향상과 식품의 안정성 제어에 혁신적인 기여를 할 것으로 기대된다.

그러나 아직 이 분야에 대해 활발히 연구를 수행하고 있는 연구 기관은 매우 한정되어 있다. 미국 Ohio State University의 Zhang과 공동 연구자, Washington State University의 Barbosa 그룹, FoodCo (San Diego, CA)의 Dunn과 동료 연구자, 캐나다의 Jayaram 그룹, 일본의 Matsumoto와 그의 공동 연구자 및 독일의 Sitzman 그룹 등이다.

미국의 OSU의 Zhang 등은 우유를 살균하기 위해서는 3단계 PEF 처리가 필요하였으며, 각 단계에서 16펄스 처리를 하여, 2~3 log cycle 균수를 감소시켰으며, fiber optic 온도계로 처리조의 온도를 측정하여 PEF 처리는 非熱 공정임을 확인하였다.

독일 Berlin 대학 Knorr 그룹의 미발표된 자료에 의하면 UHT 우유에 *Pseudomonas fluorescens*를 현탁시키고 7~22.5 kV/cm 범위의 전기장으로 20 pulse 처리했을 때 최대 4 log cycle까지 균수를 감소시킬 수 있었다고 보고하였다.

佐藤政之등 맥주 효모(*S. cerevisiae*)를 증류수, 맥아즙, 맥주에 일정한 균수만큼 현탁시키고 펄스 전기장 처리를 한 결과 전기장 강도가 7 kV/cm 이상일 때

부터 생균수는 사멸되기 시작하였으며, 가해주는 에너지가 클수록 사멸 속도도 증가한 것으로 보고되었다.

FMC Europe N. V.와 Krupp Maschinentechnik GmbH의 오렌지 주스의 PEF 처리 연구에 의하면 신선한 착즙 주스의 품질을 거의 손상시키지 않으면서 주스 중의 균수를 3 log cycle 감소시킬 수 있었다고 하였다.

### 3. 고전압 펄스 전기장을 이용한 추출 기술

식물성, 동물성 세포로부터 즙액을 추출하는 방법으로 전기 원형질 분리(electroplasmolysis)를 이용하고 있다. 동식물세포에서 대상 물질을 추출할 때 수율을 높이기 위해서는 저항력이 가장 큰 원형질막을 파괴하여야 하는데 고전압 펄스 전기장을 걸어주면 세포 구조에 손상을 주어 추출 효율을 증대시킬 수 있다. Rogob에 의하면 과일과 야채 중의 즙액의 함유량은 90~95%에 달하지만 일반적인 추출법-기계적, 열적, 효소적 방법등-에 의해서는 추출량이 50~60% 밖에는 되지 않는다. 전기 원형질 분리는 열 원형질 분리와는 달리 세포벽을 파괴하지 않기 때문에 즙액내로 펙틴 물질의 이동이 일어나지 않으며 처리 시간이 짧고 장치 구성이 간단한 장점을 가지고 있다. 전기 원형질 분리의 가공 인자는 전압 구배, 가공 시간, 온도, 그리고 원료의 전기·물리적 성질등이다. 전기 원형질 분리가 일어나는 전기장의 크기는 약 5~15 kV/m로 세포 원형질막 선택적으로 가열, 파괴되지만 즙액의 온도는 거의 증가하지 않는다. 전기 원형질 분리가 크지 않은 전기장 (40 kV/m 이하)에서 일어나면 세포의 생리 기능은 완전히 파괴되지 않으며, 부분적으로나마 복원된다. 실제 예로서 미세하게 분쇄한 사과를  $10^5$  Pa의 압력으로 압착하였을 경우 사과 주스의 수율은 67~68%이었으나, 동일 압력하에서 전기 원형질 분리를 병행하였을 때는 분쇄 정도에 큰 관계없이 사과 주스의 수율을 약 78%까지 향상시킬 수 있었다.

Geulen 등은 당근을 거칠게(3.0 mm 입자) 혹은 미세하게(1.5 mm 입자)

파쇄하여 2.6 kV/cm의 고전압을 처리한 후 상온에서 10 MPa로 5분간 압착한 결과 재래 수율 51.3%에 비하여 최대 수율 76.1%를 얻었다. 고전압 처리하여 얻은 주스의 품질은 45°C에서 80분간 pectinase 처리를 한 시료에 비하여  $\beta$ -carotene 함량은 높았으며 약간 밝은 색을 띠었다.

고전압 전기장 기술은 채소 및 과일 주스의 추출뿐만 아니라 식물 세포로부터 색소를 추출하는 데 유용한 것으로 보고되고 있다. Dornenburg와 Knorr은 적색 색소를 생성하는 *Chenopodium rubrum* 세포를 상온에서 1.6 kV/cm, 10 pulse 처리한 결과 생성된 amaranthin 색소가 거의 100% 추출물내로 배출된 것으로 보고하고 있다. 또한 *Morinda citrifolia* 세포로부터 anthraquinone의 추출에도 효과가 큰 것으로 보고하고 있다.

#### 4. 고전압 펄스 전기장 발생 기술

고전압 펄스 전기장 발생 기술은 주로 마이크로웨이브 응용 기술, 레이더 장치 및 레이저 응용 기술 분야에서 개발되었다. 고전압 발생 장치는 비교적 적당한 가격으로 구입이 가능하다. 하지만, 고전압과 고전류의 전기장을 식품에 가하기 위해서는 고전압 발생 장치로부터 전하를 천천히 충전한 다음 빠르게 식품으로 방전하는 switching 장치가 필요하며, 이 부분은 개발이 필요하다. 지금까지 레이더나 레이저 기술에서 응용되어 왔고 개발되어 있는 switching 장치는 Table 1과 같다.

1980년경부터 1990년 초반까지는 고전압 펄스를 이용한 非熱 가공 기술에서 spark gap switch를 주로 사용하였으나, 1995년에 미국 OSU의 Zhang등은 thyatron switch를 사용하였다. 이를 이용하여 미국의 Purepulse 사에서는 "Coolpure"라는 장치를 개발하였다.

#### 5. 처리 용기의 디자인

Table 1. Switching device for pulsed electric fields system

종 류	전환방식	허용용량	허용펄스폭	허 용 주 파 수
Tetrodes	On/Off	30 kV, 10 A	0.5~500 $\mu$ s	100 kHz
Crossatron	On/Off	20 kV, 500 A	1~50 $\mu$ s	100 kHz
Thyratron	On/	75 kV, 5 kA	2~500 $\mu$ s	5 kHz
Gas Spark Gap	On/	40 kV, 10 kA	2~500 $\mu$ s	10 Hz
Ignitron	On/	20 kV, 10 kA	5~500 $\mu$ s	1 Hz

고전압 펄스 처리를 위한 용기의 설계는 기본적으로 식품과 접촉하는 2개의 전극과 전극 사이의 간격으로 이루어져야 한다. 이때 식품과 접촉하는 전극의 면적에 비하여 전극 사이의 간격은 아주 작아야 한다.

Mizuno와 Hori(1988)는 수용액 상태에서 *S. cerevisiae*를 사멸시키는데 에너지 이용 효율을 최적화시키기 위하여 4가지 형태의 처리 용기를 시험하였으며, 1990년대 초반에 미국의 WSU에서는 3가지 형태의 용기를 시험하였고, 1991년 미국 특허에서는 coaxial 형태의 연속식 chamber를 설계, 제작하였다. 이들은 주로 낮은 전기 전도도를 갖고 있는 식품이나 희석된 수용액을 처리하는데 성공하였다. 이와 같은 내용을 Zhang 등(1994)이 조사를 하여 보고하였다. 그러나 실제 식품의 경우에는 0.2~0.6 S/m의 높은 전기 전도도를 갖고 있으므로 chamber 내에 고전류가 흐르게 되어 안전성 및 arc 등의 문제가 발생된다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 1996년 미국 OSU의 Zhang 등은 slow charging, fast discharging을 하기 위한 고스피드 switch 장치를 사용할 수 있고 용기 내의 peak 전류가 1000 A 이하로 줄이도록 하며, 안전 운전을 위하여 펄스당 에너지 전환을 감소시킬 수 있으며, 전극과 식품의 접촉면에서 일어나는 전기 분해 반응이 최소화되고 용기 내의 전류 밀도를 최소화시킬 수 있는 co-fields 개념을 도입한 새로운 chamber를 디자인하였다.

#### 6. 고전압 펄스 전기장을 이용한 非熱 가공 공정 및 특허

1980년대 초반에 Doevenspeck 등은 Hamburg의 Krupp Maschinentechnik GmbH에서 전기 펄스 공정과 그의 응용성에 대하여 2가지 가능한 분야를 연구하였다. 하나는 소위 'ELCRACK'이라 불리는 공정으로 야채나 동물 세포를 파괴하기 위한 것이다. 이 공정은 최근에 Knorr 등(1994)에 의하여 어유 추출 공정에 이용되었다. 또 하나는 'ELSTERIL' 공정으로서 전기적으로 전도성을 갖고 있는 식품의 전기 살균 공정이다. 두 가지 공정의 차이는 가해지

는 전기장의 세기가 다르다는 점이다. 이들은 capacitor에 천천히 저장된 전기 에너지를 switch 장치를 통해서 식품에 빠르게 방전되도록 고안되었다. 최근에 Krupp Maschinentechnik GmbH 연구팀과 FMC Europe N.V.는 이를 이용하여 수행한 오렌지 주스와 우유 등 유동 식품의 회분식 살균에 관한 연구 자료를 바탕으로 Berlin 대학과 공동 연구를 통해 연속식 살균 장치의 개발에 많은 진전을 보이고 있으며 (Sitzmann/1990, 1995, Grahl 등/1992), 미국의 Maxwell Lab.은 Purepulse사와 더불어 일상 제품, 과일 주스, fluid egg 등의 살균 (Dunn and Pearlman/1987, Bushnell 등/1993, Dunn 등/1995)에 대해서, 미국의 WSU에서는 stimulated milk ultrafiltrate (SMUF)와 같은 모델 식품의 살균 (Pothakamury 등/1994, 1995)에 대한 결과를 보고하였다. 현재 미국의 OSU에서는 pilot 규모의 연속식 고전압 펄스 처리 장치와 무균 포장 기술을 연결하여 실제 식품을 생산하고자 하고 있다. 그 외에도 캐나다의 Guelph 대학, 일본의 Matsumoto 등, 영국의 Campden Food & Drink Research Association 등에서 연구가 활발하게 진행 중이다.

이와 같은 선진국들은 PEF 기술에 관련된 여러 가지 아이디어들에 대하여 특허를 획득하거나 출원중에 있다. 이들 특허는 주로 영국, 소련, 독일, 미국, 일본, 프랑스 및 캐나다 등에서 인정하고 있으며, PEF 기술이 非熱 가공 기술로서의 가능성이 있다는 사실을 확실하게 나타내 주고 있다. 1980년대 말에서부터 조사한 자료에 의하면, Dunn과 Pearlman은 1987년에 static treatment system을 이용하여 우유, 요구르트 및 액체 달걀 가공품의 저장 수명을 연장하기 위한 PEF 공정으로 특허를 신청하였고, 이들은 1989년에 실험을 보충하여 다시 특허를 신청하였다. 1991년과 1993년에는 미국 Food Co.의 Bushnell 등이 coaxial 형태의 용기를 갖춘 continuous flow system으로 Dunn과 Pearlman(1987, 1989)의 자료를 이용하여 특허를 획득하였다. 미국의 Qin 등(1994, 1995)과 Zhang 등(1994, 1995, 1996)은 처리 용기 및 연속식 처리 방법에 대한 연구로 특허를 신청하였다.

## 7. 조사 연구 개발 사례

고전압 펄스 기술을 이용한 非熱 가공 기술은 1960년부터 꾸준히 연구되어 오다가, 1990년 이후부터 활발히 연구되기 시작하여 현재 전세계적으로 약 7개의 그룹에서 연구를 수행하고 있다. 독일의 Krupp Maschinentechnik GmbH 연구팀과 FMC Europe N.V.은 오렌지 주스와 우유등 유동 식품의 회분식 살균에 관한 연구 자료를 바탕으로 Berlin 대학과 연속식 살균 장치의 개발을 위한 공동 연구를 하고 있으며, 미국의 Maxwell Lab.은 과일 주스, liquid egg 등의 살균에 대해서, Washington 주립 대학에서는 stimulate milk ultrafiltrate (SMUF)와 같은 모델 식품의 살균에 대한 결과등을 보고하였다. PurePulse Technologies 회사는 전기장 세기 35~45 kV/cm, feed rate 3000~8000 L/h의 상업적으로 사용 가능한 액상 연속 처리 장치를 개발하여 liquid egg의 냉살균 시스템에 설치하여 운용중에 있다. 한편 우리나라에서는 연세대에서 1993년부터 펄자를 중심으로 활발한 연구가 진행되고 있으며, 현재 소형 pilot system의 개발을 완료하고 실제 산업적 응용이 가능하도록 장치를 소형화하여 시험 가동 중이다.

대부분의 고전압 펄스 전기장 처리 시스템은 50℃를 넘지 않는 범위내에서 5 log 이상의 효모 사멸율을 목표로 하여 오렌지 주스와 다른 과일 주스의 처리 시스템에 대한 적용성이 연구되고 있다. 현재까지의 연구에 의하면 영양 세포의 사멸에는 약 100J/ml (24 calories/ml)의 에너지가 필요하며, 이 전기적 에너지에 의해 주스의 온도는 약 20~25℃ 상승하게 된다. 이러한 온도 상승을 막기 위하여 냉각 시스템을 도입할 경우에는 실제 필요한 에너지는 약 170J/ml가 된다. 그러나 펄스 전기장 처리에 의한 pectin methylesterase, peroxidase, polyphenol oxidase등의 효소 불활성화 정도가 낮아 저온 유통이 유지되어야 하며, 추가적인 열처리가 없을 경우 약 4~6주 정도의 유통 기간을 가질 수 있는 것으로 보고하고 있다. 한편 사과 주스, 우유, whole liquid egg, pea soup과 같은 식품을 고전압 펄스 전기장과 기존의 열처리에 의해 처리하여 관능 평가를 실시한 결과 두

제품간에 차이점이 없었으며, 사과 주스와 같은 경우에는 오히려 나은 것으로 평가되었고, 향 성분은 열처리 제품에 비해 약 20%정도 손실이 적은 것으로 나타났다.

고전압 펄스 전기장 살균 기술이 적용 가능할 것으로 예상되는 식품은 액체 식품, 고체 입자 함유 식품, 고체 식품등 매우 다양하다. 그러나 이들 제품에 고전압 펄스 전기장 기술이 적용되기 위해서는 아직까지는 몇가지 제약점이 있다. 연속 처리 시스템에 적용하기 위해서는 반드시 **pumping**이 가능한 식품이어야 하며, 고형분이 포함되어 있을 경우에는 액체 식품내에 고르게 분산되어야 하고, 그 크기도 아주 작아야 한다. 고체 식품의 경우에는 식품과 전극이 완전히 접촉되지 않고 **bubble**이나 지방등의 유입으로 인하여 **arching**이 일어날 가능성이 크기때문에 두께 30 mm이하로서 균일한 크기를 가져야 하며, 미생물을 불활성화 시킬 수 있는 충분한 수분을 갖는 것만이 가능하고, 현재는 회분식 처리만이 가능하다.

고전압 펄스 전기장 기술을 산업적으로 적용하였을 경우 경제적 비용에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 액체 식품의 살균에 고전압 펄스 전기장 기술을 적용하였을 경우 mL당 100 J의 에너지가 필요하다고 가정하면 전기장을 발생시키는데 약 0.17 cent/L, 장치 유지 비용으로 0.22 cent/L가 필요한 것으로 예상하고 있다. 이는 순수하게 전기장에 의해서만 액체 식품을 처리할 경우를 가정하여 산출한 비용이다. 그러나 펄스 전기장 처리와 열과의 병합 처리, 또한 적절한 향균 처리와 병행하여 처리할 경우에 보다 적은 비용으로도 충분한 살균 효과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

미국의 식품 의약품 안전청 (FDA)은 일차적으로 오렌지 주스 등과 같은 고전압 펄스 전기장 처리된 산성 식품 (pH 4.5 이하)의 경우에는 품질과 안전성에 문제가 거의 없는 것으로 보고 있으나, 미생물 안전성(**microbial stability**), 영양학적 평가, 전기적 처리에 의한 유해 물질의 생성 여부에 대한 보다 상세한 자료를



요구하고 있다. 따라서 전기 화학적 현상에 의해 발생할 수 있는 염소나 과산화수소와 같은 물질의 생성이나 처리 용기, 전극에 의한 식품 내부로의 유해 물질 유입등에 대한 보다 상세한 연구가 필요하며, 전기 화학적으로 안정한 전극에 대한 철저한 검토가 필요하다. 이상과 같은 문제점에 대한 해답이 얻어지고 실제 산업적으로 적용되기 위해서는 앞으로 3~5년 정도의 시간이 걸릴 것으로 예상된다.

## 제 2 절 Ohmic heating 및 Microwave를 이용한 해동기술

Ohmic heating은 식품 자체가 전류가 흐르는 회로의 한 부분이 될 때, 식품이 갖는 고유의 저항값으로 인해 전기 저항 (Joule) 열이 발생하는 것을 이용한 것이다. 이는 가정용 전열기, 제철 공업, 유리 용융등에 이용되어 왔으며, 80년대 말부터 식품 공업에서 상업적 시스템에 고안되어 활용되기 시작하였다. Ohmic heating에서 driving force는 전압으로, 온도차에 관계없이 균일하게 식품 내부에 열을 발생시킨다. Ohmic heating을 이용하면 전류에 의해서 식품 내에 열이 발생하기 때문에 외부 온도와 관계없이 급속한 가열이 가능하며, 전원 장치의 전압, 주파수, 파형 등의 전기적 요소를 변화시켜 미리 예정된 가열 조건을 형성할 수 있고, 마이크로파 가열에서 가장 문제시되는 불균일 가열의 원인인 투과율이 사실상 제한이 없는 등의 장점을 갖는다. 그러나 ohmic heating은 식품과 전극의 전기 전도도 차이에 의해 전극과 식품이 접촉하는 부분이 과열되는 단점이 있다. 이를 방지하기 위해 동결육을 수용액 내에 두고 ohmic heating하여 전극과 식품과의 직접적인 접촉을 피하는 방법이 연구되고 있다.

급속 해동을 위해 전기 에너지를 이용한 해동, 감압·가압하에서의 해동 등이 연구되고 있고, 이중 전기 에너지를 이용한 해동법의 연구가 활발히 진행되고 있다. 전기 에너지를 이용한 해동법은 라디오파를 이용한 해동법, 마이크로파를 이용한 해동법, 그리고 ohmic heating을 이용한 해동법으로 나누어 볼 수 있다. 라디오파 가열과 마이크로파 가열에서 전류는 주파수가 커질수록 도체 내에서도 비도체와 공간에서도 흐르기 쉬워지는 성질이 있는데 이때 전기 에너지가 열 에너지로 변하는 것을 이용한 가열이다. 일반적으로 라디오파라고 부르는 것은 주파수 10 kHz에서 300 MHz에 이르는 교류이고, 라디오파보다 주파수가 커지면 마이크로파 또는 초고주파, 극초단파 등으로 불린다. 이러한 전자파에 의한 가열은 급속 해동이 가능하고, 열효율이 좋으며, 진공중이나 비금속 포장 내에 있는 물체를 가열할 수 있고, 미생물에 의한 변패 가능성이 적으며, 컨베이어 시스템의 적

용이 가능하다는 장점을 가지고 있으나, 전자파가 식품의 표면에 조사되어 표면에서부터 유전체 손실에 의해 에너지가 흡수되면서 내부로 진행되는 것이기 때문에 내부로 갈수록 전계가 약해진다는 단점을 가지고 있다.

Swift 등은 여러 가지 크기와 종류의 대형 동결육에 연속식 915 MHz microwave (12.5~25 kW)를 이용하여 해동한 후 온도 분포를 측정하였으며, 공업용 boxed meat의 경우 해동하는데 수분~십수분 정도 소요됨을 알 수 있었다. Taoukis 등은 isotherm migration method를 이용하여 냉동육의 300 MHz, 915 MHz, 2,450 MHz에서의 해동 시간과 온도, 해동에 소비되는 에너지를 출력에 따라 계산하여 해동에 저주파가 효율적임을 밝혔다. Virtanen 등은 2,450 MHz microwave 해동에 의한 표면의 과열을 방지하고자 model product에 찬 공기를 넣어놓으면서 온도 sensor를 이용하여 hot point와 cold point와의 온도 차이에 대해서 최대와 최소치를 설정하고 최대 온도 차이 이상의 온도 분포 시 자동적으로 magnetron이 꺼지고, 최소 온도 차이 이하의 온도 분포 시 magnetron을 켜지게 하는 system을 이용하여 바람직한 온도 조성의 해동육을 얻고자 하였다.

Microwave의 주파수가 높을수록 발생 열량은 높아지나 상용주파수는 2,450과 915 MHz로 제한되어 있으며 주파수가 높을수록 침투 깊이의 제한으로 표면은 다 녹아도 중심부는 얼음 결정 상태로 남아있는 단점이 있다. 이런 문제들을 해결하기 위해 표면 냉각 시스템을 사용하여 불균일한 가열을 방지하는 방법, 2,450 MHz microwave 해동에 의한 표면의 과열을 방지하고자 on-off system을 이용하는 방법, 저주파수 microwave를 이용한 해동 등이 연구되고 있다.



## 제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 고전압 펄스 전기장 발생 장치의 개발

#### 1.1. 실험실 규모의 고전압 펄스 발생 장치의 개발

장치의 효율적 운영을 위한 기본 설비로서 pulse generator, pulse counter, oscilloscope를 구입 설치하였으며, power의 증폭 장치인 thyatron driver (TRX)를 미국으로부터 직접 구입하여 test한 후 국내에서 회로도의 일부 설계를 변경하여 전체적인 실험실 규모에 맞는 장치를 제작 완료하였다. 실험실 규모의 시스템은 Fig.1-1 과 같으며 이 장치로부터 발생하는 pulse의 형태는 Fig. 1-2 와 같다.

#### 1.2. 소규모 고전압 펄스 발생 장치의 설계 및 제작

50 kV의 고전압을 발생할 수 있는 기초 단계의 실험 장치로서 capacitor부분을 1~11개 까지 임의로 변경할 수 있도록하여 실험에 응용시 유동성이 있도록 제작하였으며, pulse 발생부는 고주파부 (60 Hz~1 kHz)와 저주파부 (10 Hz~200 Hz)로 분리 설계, 제작하였다. 중요 부분인 thyatron switch 부분은 실험의 안전성을 위하여 minus exponential wave를 발생하도록 하였으며 모든 부분은 접지를 통하여 기계 및 운전시의 안전을 고려하였다. 또한 dump switch를 통하여 기계의 불안정 또는 noise 발생시에는 모든 장치의 운전이 정지되도록 하였다. 또한 펄스의 폭을 증가시키기 위한 capacitor와 전압의 안전성을 위해 inductor부를 설치하였다(Fig. 1-3, 1-4).

#### 1.3. 고효율 power supply 및 pulse generator, pulse forming network의 구성 및 제작

기존에 고전압 펄스 전기장 처리 장치에 사용되어 오던 대부분의 power

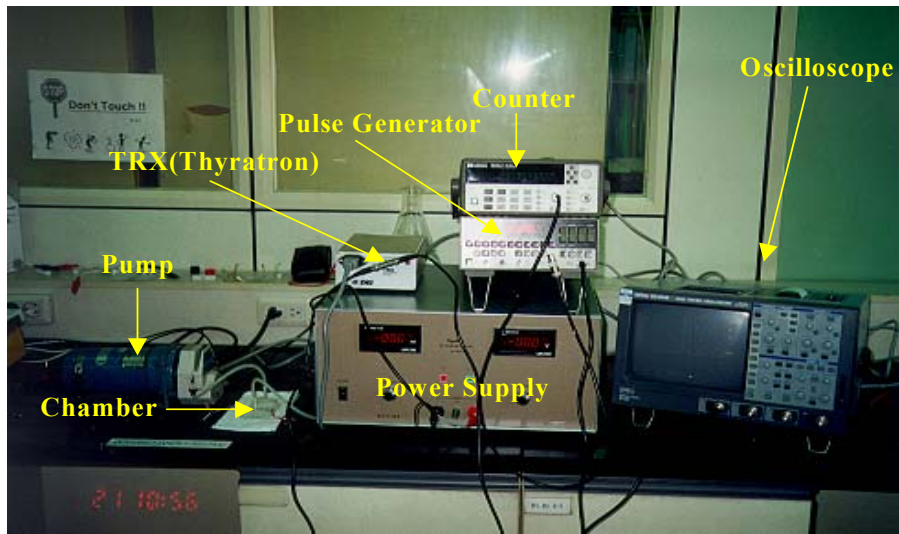


Fig. 1-1. Pulsed electric fields system for Visualized Lab-scale.

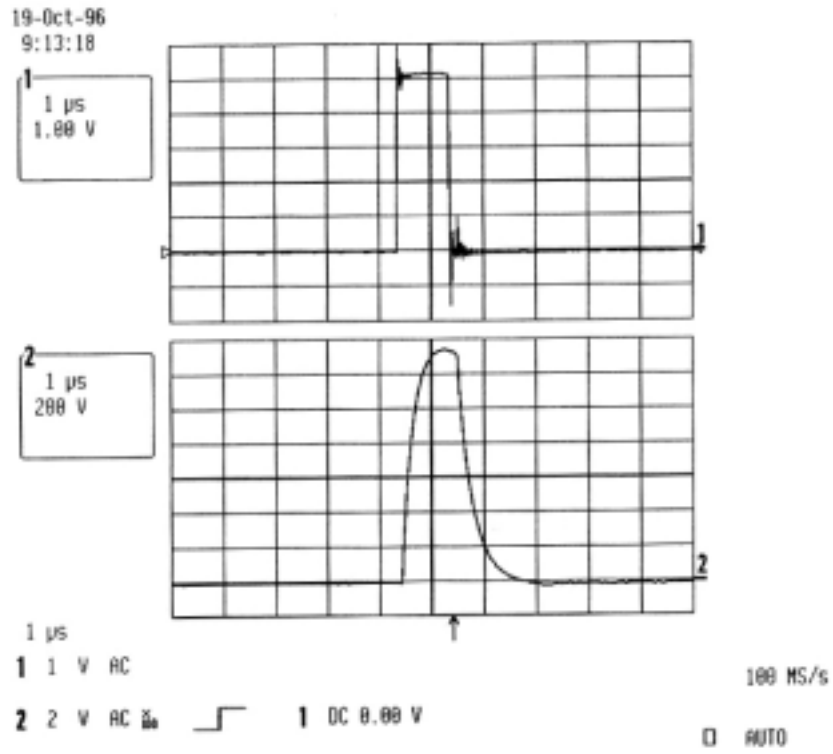


Fig. 1-2. Generated wave form from lab-scale pulsed electric fields system.

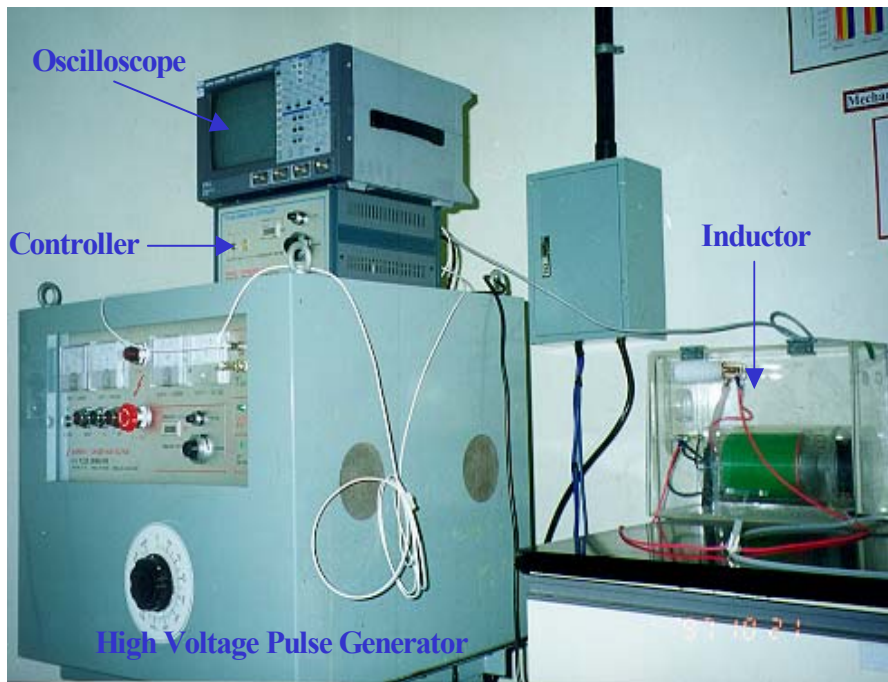
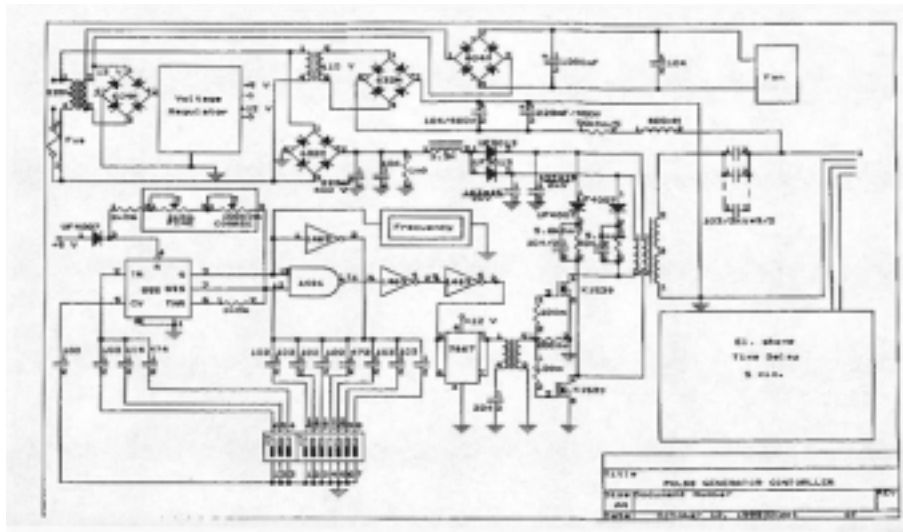
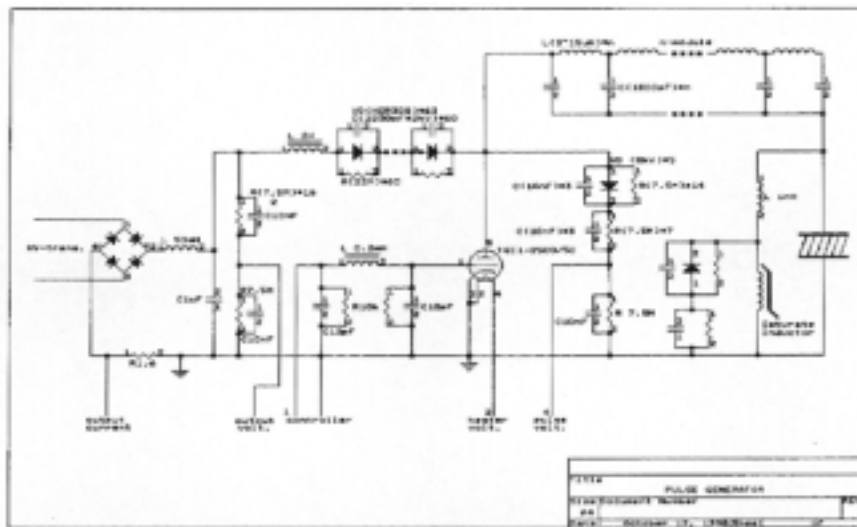


Fig. 1-3. Pulsed electric fields system for Small scale experiments.





(A)



(B)

Fig. 1-4. Circuit diagram of small scale pulsed electric fields system

(A) pulse controller (B) pulse generator

supply는 AC 전원을 정류하여 DC로 출력을 내보내는 것을 사용하여왔다. 그러나 이러한 power supply는 AC에서 DC로 정류를 하게 되더라도 주파수에 의해 갖는 전력 공급의 불안정성 때문에 높은 주파수의 전력을 사용하게 될 경우 골과 골이 겹쳐지는 부분에서 불가피하게 전력이 낮게 되어 출력 전압이 흔들리게 된다. 출력 전압이 흔들리게 되면 시료가 처리 용기를 지나면서 받는 전기장의 세기가 달라져서 시료의 균일한 처리가 어려워지고 효율이 떨어지게 된다. 이러한 AC-DC converting 방식의 비효율성을 극복하기 위하여 IGBT를 이용한 DC-DC convertor 회로를 설계하였으며, 이를 구동하기 위하여 IGBT gate controller를 설계 제작하여 고주파 convertor를 구성하였다. 또한 실험상의 목적으로 일정 전압을 사용하는 것이 아니라 가변의 전압을 사용하게 되기 때문에 DC-DC convertor 전단에 power regulator를 제작 설치하였다 (Fig. 1-5). 이 시스템은 power regulator (thyristor regulator)는 입력부는 AC 220 V, 60 Hz, 3 $\Phi$ 로 제작되었으며, 출력부는 DC 0~220V, 3 $\Phi$ , 0~60 kW의 사양으로 제작되었다. 한편 중심이 되는 DC-DC convertor는 입력부 DC 0~220 V, 3 $\Phi$ , 0~60 kW로, 출력부 DC 0~25 kV, 0~50 kW로 제작되었으며, 운영 주파수는 최대 30 kHz가 되도록 하였다. Pulse generator의 충전 방법은 기존의 방식과는 다르게 resonance charging 방식을 택하여 25 kV power supply로 50 kV까지 charging이 가능하도록 하였다. Pulse generator는 thyatron를 이용하여 입력부 DC 0~25 kV, 50kW, 출력부 50 kV, 50 kW에 사용할 수 있도록 제작하였으며, pulse voltage는 10~50 kV 가변, pulse width는 1~10  $\mu$ s 가변, 사용 가능한 pulse repetition rate은 10~5,000 pps, pulse rising time은 2nS/kV이다. Switching device는 thyatron 50 kV, 25 A를 사용하였으며, charging 방식은 resonance charging 방식을 사용하였다 (Fig. 1-6, 1-7).

#### 1.4. Pulse transformer의 제작

고전압 펄스 전기장 처리시 가장 중요한 변수 중 하나가 펄스의 길이이다. 펄스의 길이가 너무 짧으면 높은 frequency를 사용하여야 하기 때문에 전체 시스템에 무리를 일으킬 수 있으며, 너무 긴 펄스를 사용하면 열의 발생이 과도해

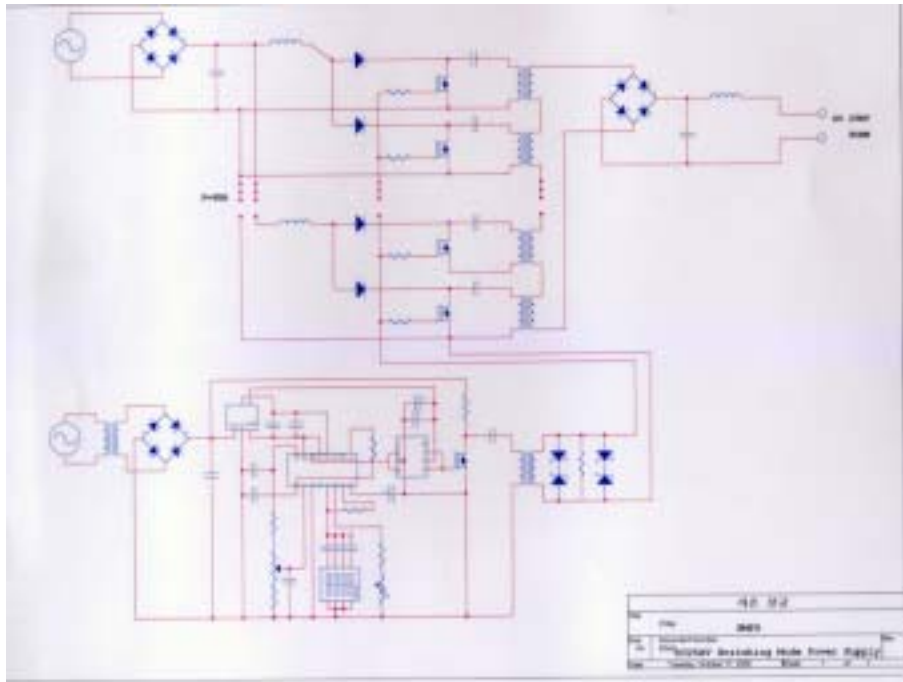


Fig. 1-5. Circuit diagram of DC-DC power supply

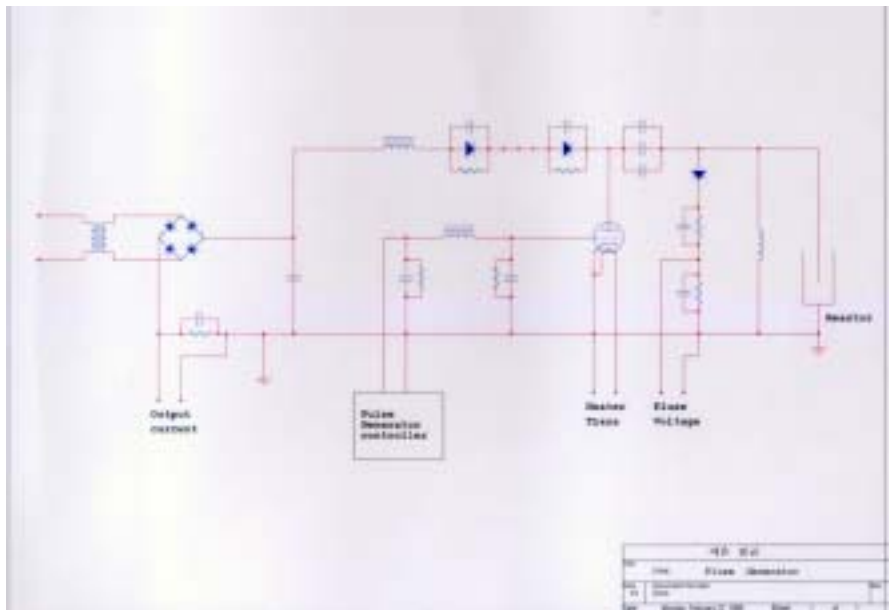


Fig. 1-6. Circuit diagram of pulse generator

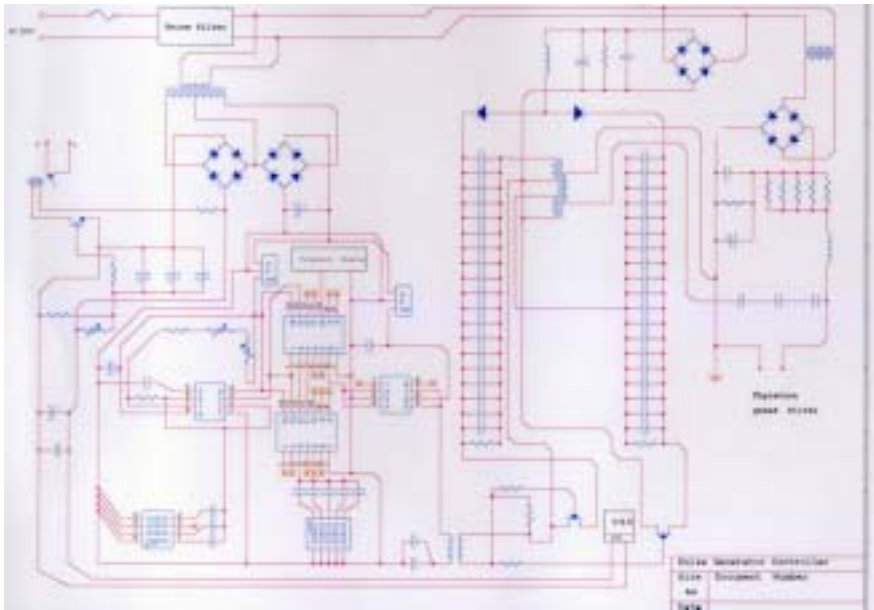


Fig. 1-7. Circuit diagram of pulse generator controller

저서 시료에 나쁜 영향을 줄 수 있다. 따라서 우유의 살균시 가장 적절한 펄스의 길이를 찾는 것이 중요하게 된다. 지금까지 사용되었던 모든 고전압 펄스 장치들은 펄스의 길이를 임의로 조정할 수 없었으며, 시료의 저항성이나 전도도에 따라 그리고 장치내의 inductor와 capacitor에 의해서 하나의 펄스 길이를 사용하여 왔다. Pulse transformer는 펄스의 폭을 임의로 조정할 수 있도록 하는 장치로서 square wave 펄스 폭을  $0.5\sim 8\mu s$ 까지 쉽게 가변할 수 있도록 설계하여 제작되었다. 입력부는  $0\sim 50$  kV, 출력부는  $0\sim 100$  kV, 최대 에너지 60 J, pulse rising time 4 ns/kv가 되도록 하였다 (Fig 1-8,1-9).

#### 1.5. 시스템의 소형화

앞선 연구 결과를 바탕으로 pulse generator, PFN을 개량하고 최적화를 통하여 movable demonstration unit의 generator를 설계 제작하였다. 이에 high voltage switching mode power supply와 square pulse generator를 제작하여 system을 소형화하였다.

High voltage switching mode power supply는 승압 방식은 DC-DC convertor를 이용하였고, full bridge를 이용하여 정류하였으며, buck chopper로 가변하였다. 입력 AC 220 V를 bridge 정류기 및 capacitor로 정류하고 push-pull 방식으로 승압한 다음 full bridge 정류기로 정류하였다. 전압 가변은 push-pull 증폭기 전단에 buck chopper를 설치해 pulse width modulation을 조정함으로써 증폭기의 전단의 DC 전압을 조절하여 출력 전압을 조절하였다.

Square wave pulse generator는 thyatron switching 방식을 이용하였고 generator charging은 resonance를 사용하였으며 charging pulse forming은 L-C network로 실현하였다. Power supply에 SMPS를 적용하고 pulse generator를 최소화한 다음 동일 case내에 설치함으로써 장치를 소형화하였다. 고전압 power supply를 operation frequency 30 kHz 이상의 고주파 SMPS로 구성하므로써 부피 및 무게를 최소화하여 제작하고, pulse generator와 함께 한 case내에 설치함으로써 system의 최소화 및 경량화를 실현하였다. 이 때 pulse generator 및 pulse

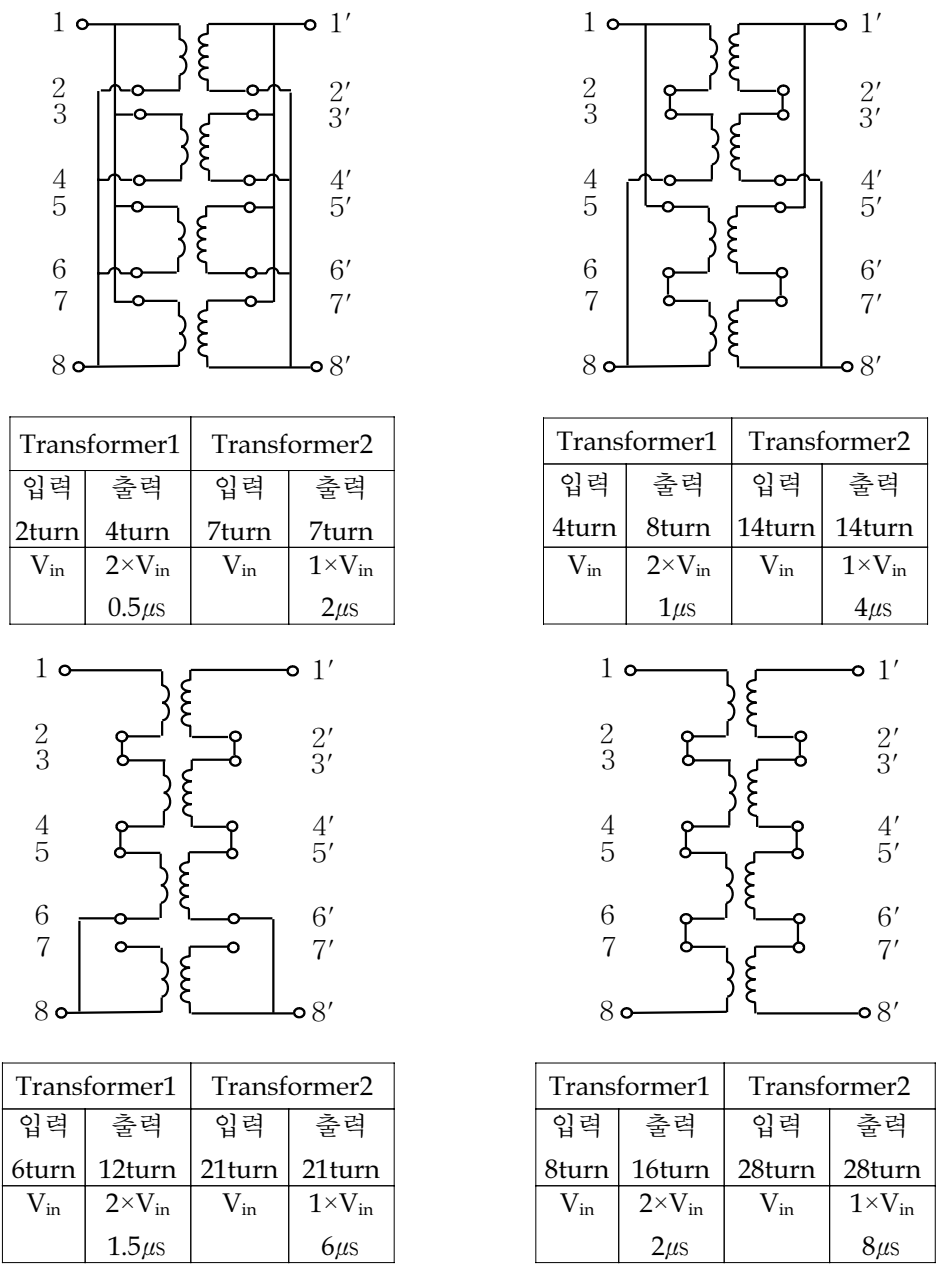


Fig. 1-8. Circuit diagram of Pulse transformer

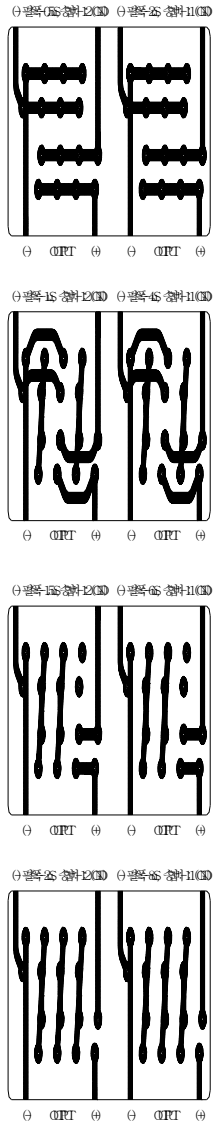


Fig. 1-9. Wiring diagram of pulse transformer



forming network에서 발생하는 noise에 의한 system 오동작 방지 및 소자 보호를 위해 noise 방지 대책이 효과적으로 이루어져야 한다. 제작된 전체 시스템의 크기는 470×605×680 mm이다.

#### 1.6. 보급형 시스템의 구축

고전압 펄스 전기장을 이용한 살균 장치를 개발하기 위해서 수많은 변수에 대한 연구가 필요하였다. 따라서 본 실험에 사용된 초기 살균 장치를 만드는 데는 많은 변수를 사용할 수 있도록 설계·제작되어 크기가 크고 제작 비용이 많이 드는 어려움이 있었다. 그러나 일반적으로 처리 대상 식품에 대한 기초 연구가 완료되면 고정된 변수를 이용하여 장치를 제작하기 때문에 그 크기는 매우 작아질 수 있으며, 제작 비용 또한 감소시킬 수 있다. 지난 연구 결과를 바탕으로 본 연구진은 보급형 소형 시스템을 구성하였다. 보급형으로 사용된 고전압 펄스 살균 장치는 앞서 개발한 소형 시스템을 이용하였으며, 여기에 co-fields 개념의 series식 처리 용기를 사용하였다. 소형 시스템의 power supply는 input voltage AC 220 V, 60 Hz, output voltage DC 0~8 kV, maximum outpower 5 kW, input rectifier는 full bridge를 사용하였으며, input regulatrion은 buck chopper를 이용하였다. Converter type은 push-pull, output rectifier는 full bridge, operation frequency 40 kHz, 최대 효율 95%의 사양을 갖추고 있다. Pulse generator는 최대 출력 16 kV으로 열음극 방전관을 사용하였으며 펄스 폭은 2 $\mu$ s로 고정하였다. Pulse generator의 사양과 회로도는 Table 1-1과 Fig. 1-10과 같다. 사용된 처리 용기는 co-fields 개념의 series식 용기를 사용하여 시료를 one-pass 처리할 수 있도록 구성하였다. 소형화된 장치의 회로도는 Fig 1-11에, 구성된 장치의 사진은 Fig. 1-12에 나타내었다.

Table 1-1. Specification of high voltage pulsed electric field system of prototype in Yonsei university.

Device	Specification
Input voltage	DC 0~8 kV
Charging method	Resonance charging with Inductor and Diode
Charging voltage	Input voltage $\times$ 2
Discharge switch	Hydrogen-tyratron
Pulse output voltage	3~16 kV
Pulse voltage rising time	1.5 ns/kV
Pulse peak current	500 A
Pulse current rising time	2500 A/ $\mu$ s
Pulse repetition rate	1~1500 pps
Pulse forming method	L-C network
Pulse width	2 $\mu$ s
Maximum pulse energy	10 J
Pulse shape	Square

저온살균-1605

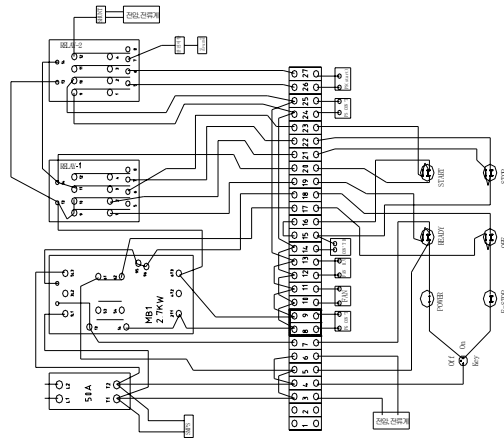


Fig. 1-10. Inside circuit diagram of pulse generator of prototype PEF system

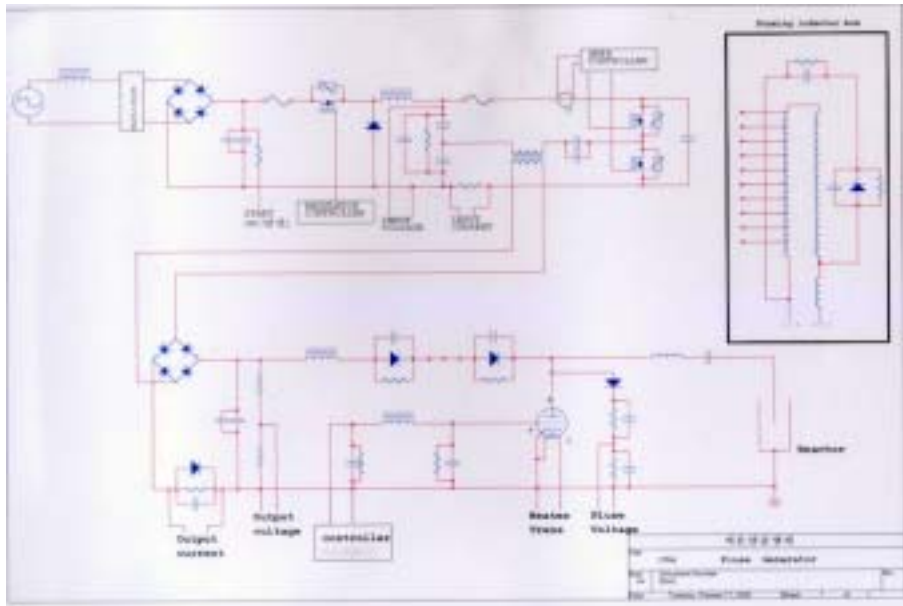


Fig. 1-11. Circuit diagram of prototype PEF system



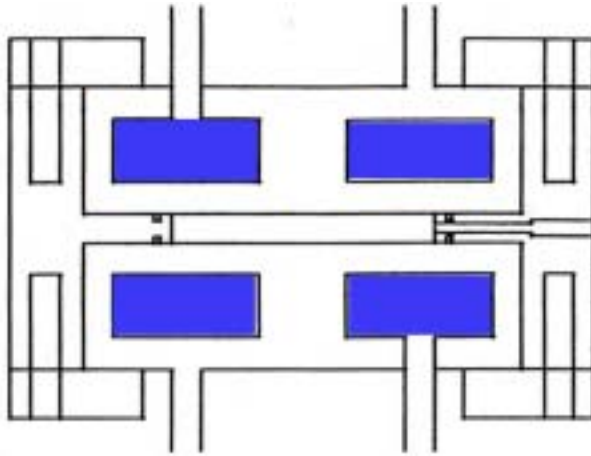
Fig. 1-12. Photograph of the prototype apparatus for high voltage pulsed electric fields system

## 제 2 절 고전압 펄스 전기장 처리 용기의 개발

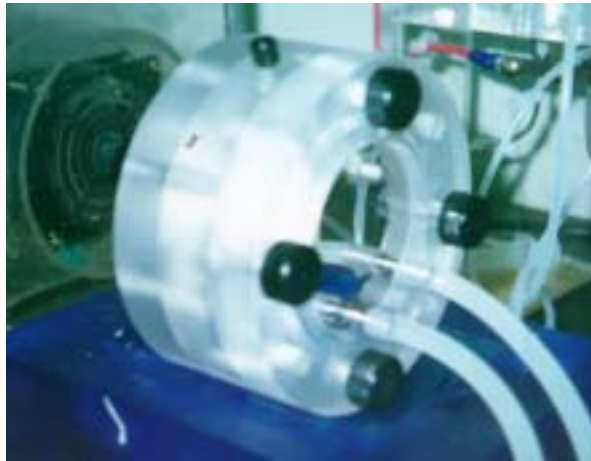
처리 용기는 고전압 펄스 전기장 처리 중 식품이 실제로 전기적 처리를 받는 부분으로서 균일한 전기장 세기로 식품이 처리되고, 정확한 파형을 형성하고, 장치 운전의 안전성을 위해서는 처리 용기의 설계 및 개발이 매우 중요하며, 국외에서는 이에 관련된 특허도 많이 진행되고 있다. 일반적으로 처리 용기는 전극과 전극을 holding할 수 있고 식품을 새지 않게 담을 수 있는 polysulfone과 같은 절연 물질로 구성되어 있다. 대개 전극의 배치는 평행한 판형(plates)이나 선형(wires), 동심의 실린더형, 그리고 막대 판형(rod-plate)등이 가능하다. 이 중 평행한 판형의 전극은 균일한 전기장을 형성할 수 있으며, 넓은 면적을 사용할 수 있어 가장 이상적인 형이라 할 수 있다. 반면에 동심의 실린더형은 식품을 균일하고 평탄하게 흐르게 할 수 있어 실제 산업적 적용에 큰 장점을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다.

지금까지 대부분의 실험에서는 고전압 펄스 전기장에 의한 미생물의 사멸 효과나 식품의 살균에 대한 정확한 자료나 자료의 분석을 위해서 회분식의 처리 용기를 사용하여왔다. 본 연구에서도 연속 처리 공정의 전단계로서 회분식(static treatment chamber) 처리 용기를 자체 설계하고 제작하여 실험을 통해 기본적인 미생물학적 자료를 축적하였다. 처리 용기의 전극의 형태는 가장 기본적인면서 효율이 좋은 것으로 알려진 판형 전극(plate-plate electrodes)을 사용하였으며, 온도를 조절하고 전극 자체에서 발생하는 열에 의한 효과를 배제하기 위하여 전극 내에 일정한 냉각수를 공급할 수 있도록 하였다. 전극의 간격은 O-ring과 holding guides 사이에 넣는 절연 물질의 두께를 이용하여 조절할 수 있도록 하였다. 처리 용기의 재질은 처리 용기 내부의 액체의 흐름을 알 수 있도록 투명한 재질의 아크릴과 실제 처리시 안전성을 위하여 절연성이 큰 아세탈을 사용하여 제작하였으며, 처리 부피는 14 mL에서 50 mL까지 사용할 수 있도록 하였다(Fig. 2-1).

실제 공정에 적용할 경우 회분식 처리 용기는 시료의 흐름을 유도할 수



(a)



(b)

Fig. 2-1. Schematic diagram(A) and photograph(B) of batch chamber

없고 또한 시료가 처리 용기에 오래 머무를 경우 전극의 발열에 의한 식품으로의 열전달로 식품의 품질에 영향을 미칠 수 있기 때문에 부적당하다. 따라서 실제 공정에 고전압 펄스 전기장에 의한 살균 처리 시스템을 적용하기 위해서는 연속식 처리 용기 (continuous treatment chamber)의 도입이 필수적이다. 그러나 연속식 처리 용기는 용기내의 시료의 흐름이 규칙적이고 전기장 형성이 균일하게 형성되도록하여 전기장의 집중에 의한 식품의 파괴나 시료 내의 전기 분해 물질의 생성이 일어나지 않도록 설계되어야 한다. 지금까지 사용되어 오던 연속 처리 용기는 회분식 처리 용기를 변형하여 시료가 통과하면서 하나의 처리 용기내에서 여러번의 고전압 펄스 전기장 처리를 받도록 하였다. 그러나 이 처리 용기는 시료가 충분한 고전압 전기장 처리를 받으려면 용기가 길어져야 하고 용기내의 후반부로 갈수록 발생하는 열이 많아져 식품에 과도한 열이 전달될 수 있다. 내부에 동심형의 실린더와 외부에 같은 재질의 전극을 이용하여 식품에 고전압 펄스 전기장을 가하는 동심형 (coaxial)의 처리 용기는 식품의 흐름이 일정하고 하나의 처리 용기로 시료에 보다 많은 고전압 펄스를 가할 수 있으나 고전압 펄스 전기장 처리시 식품과 전극면이 직접 닿아 식품내에 기포가 유입되어 방전이 일어날 경우 전극으로부터 발생될지 모르는 유해 물질 (electrolytes)이 식품에 혼입될 가능성이 있다.

본 연구에서는 이러한 처리 용기들을 제작하여 실험한 결과를 바탕으로 앞서 언급한 문제점을 해결하고 구조가 간단한 연속 처리 용기를 설계하여 제작하였다. 본 연구에서 제작된 최종 연속식 처리 용기는 co-fields 개념을 도입하여 시료의 흐름선 (flow-lines)이 뒤바뀐이 없이 직선상으로 흐르게 되어 기포의 발생 확률이 매우 적으며, 식품과 전극이 직접 접하지 않아 만약에 스파크 방전이 일어나더라도 전극에서 발생될 수 있는 전기 분해 물질의 식품으로의 혼입을 방지하였다. 또한 처리 용기 내부가 부채꼴형이고 전기장이 집중되는 아주 짧은 부분 (실제 고전압이 인가되는 부분)만이 직선형으로 되어 있어 가능한한 edge를 없애고 흐름의 공백이 없도록 설계되었다(Fig. 2-2, 2-3). 또한 이 처리 용기는 용기 내부에 전류의 흐름이 적고 높은 repetition rate을 적용할 수 있으며, 쉽게 scale-up



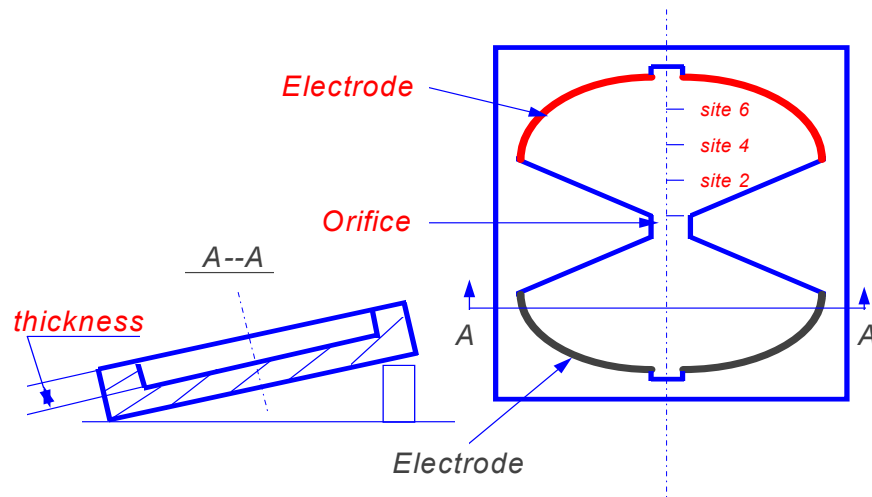


Fig. 2-2. Schematic diagram of continuous treatment chamber

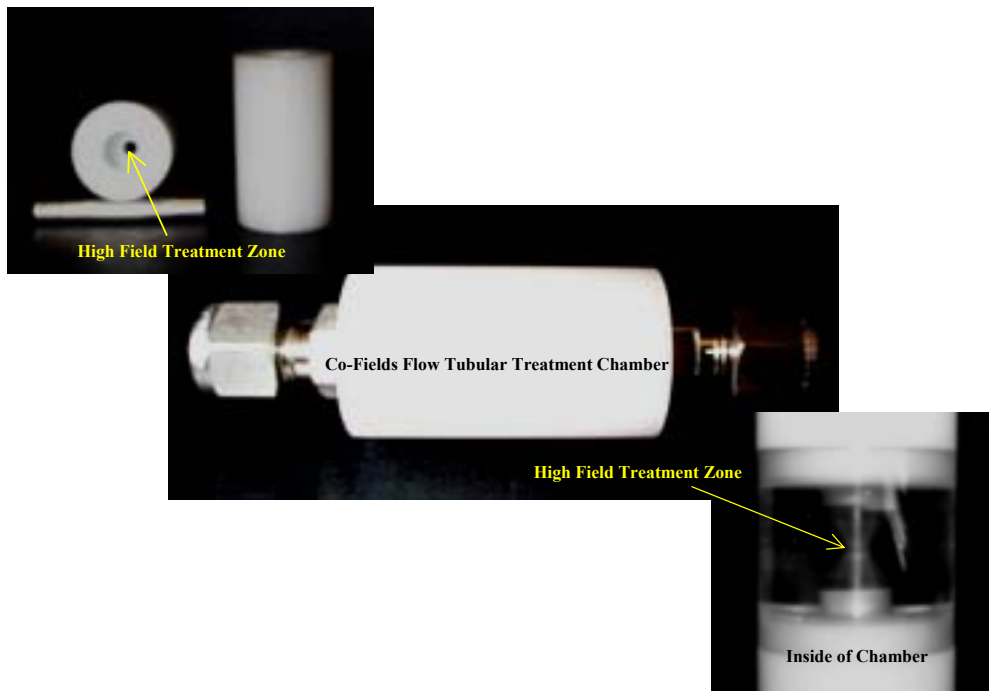


Fig. 2-3. Treatment chamber with co-fields concept for high voltage pulsed electric fields treatment.

이 가능하다. 실제 시료를 처리 용기 내에 통과시키면서 전기장을 가하였을 경우 시간에 따른 전류와 온도의 변화를 Fig. 2-4, 2-5에 나타내었다. Fig. 2-5에서 보듯이 시간에 따른 온도 변화는 그리 크지 않으며 용기 내의 위치에 따른 온도 분포도 크게 차이가 나지 않아 시료가 일정한 처리를 받을 수 있는 것으로 나타났다.

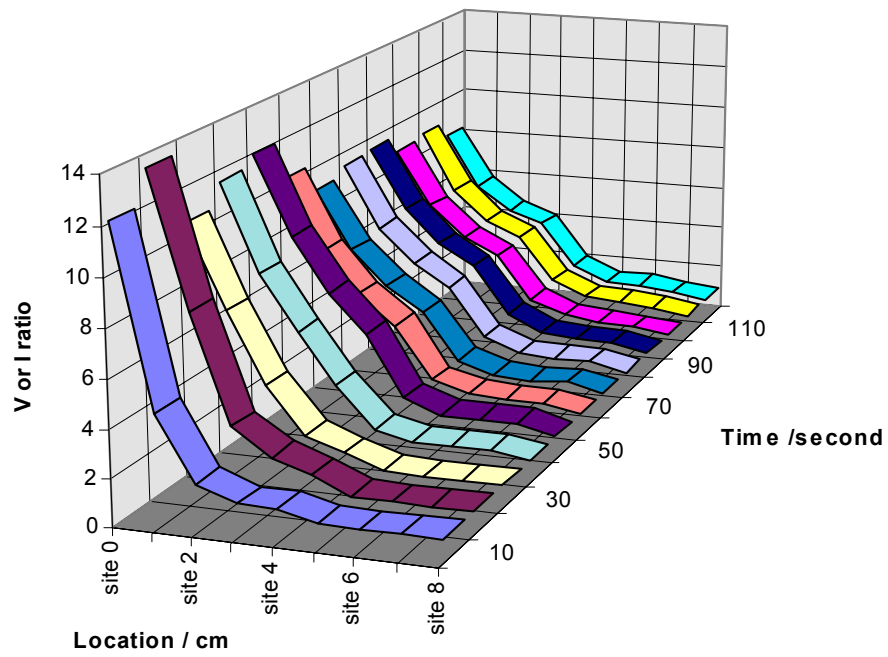


Fig. 2-4. Voltage and current flow profiles in continuous treatment chamber

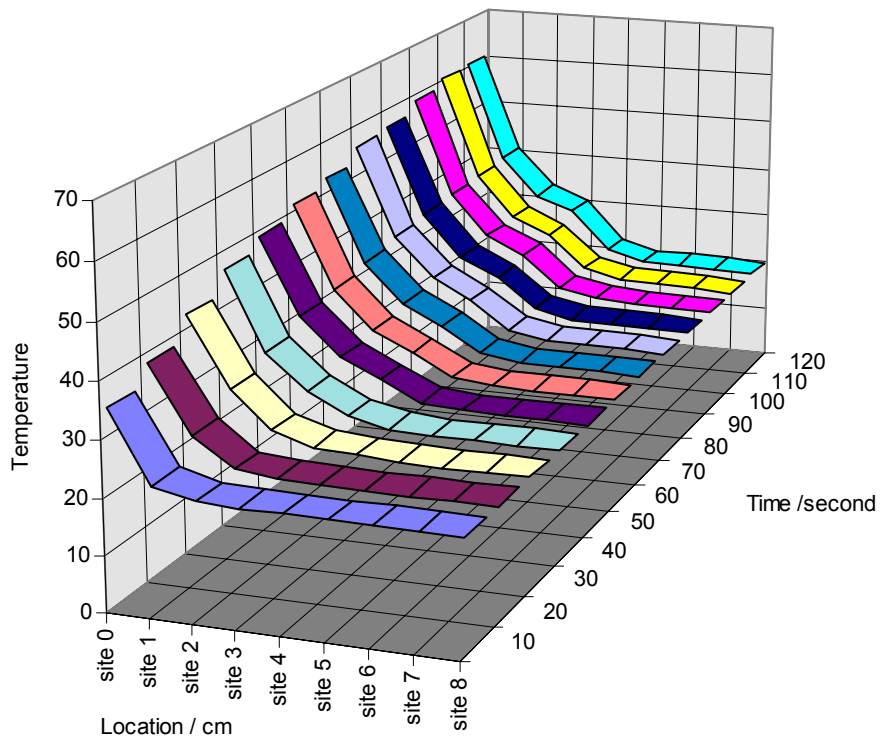


Fig. 2-5. Temperature distribution of continuous treatment chamber under static condition

### 제 3 절 고전압 펄스 전기장을 이용한 추출 기술

고전압 펄스 전기장 기술은 시료의 처리 중에 온도가 거의 상승하지 않고 처리 시간이 짧으며 연속 처리가 가능한 비열 살균 기술로서 최근 관심이 집중되고 있다. 현재 고전압 펄스 전기장 기술은 액체 식품, 즉 과일 및 채소 주스, 유제품, 액체 난제품의 가공시 미생물의 불활성화, 식품의 변패와 관련된 효소의 불활성화, 과일이나 야채로부터의 즙액의 추출등에 한정되어 연구되어 왔다.

동·식물 세포에서 유용물질을 추출할 때 수율을 높이기 위해서는 저항력이 큰 원형질막을 파괴하여야 하는데 고전압 펄스 전기장을 걸어주면 온도는 거의 상승하지 않고 세포막이 손상되어 추출 효율을 증대시킬 수 있다. Rogob는 미세하게 분쇄한 사과를  $10^5$  Pa의 압력으로 압착하였을 경우 사과주스의 수율은 약 67~68%이었으나, 동일압력 하에서 전기 원형질 분리를 병행하였을 경우 분쇄 정도에 관계없이 사과주스의 수율이 약 78%까지 향상되었다고 보고하였다. Geulen등은 당근을 거칠게(3.0 mm 입자) 파쇄하여 2.6 kV/cm의 고전압을 처리한 후 상온에서 10 MPa로 5분간 압착한 결과, 재래 단순 압착법의 수율 51.3%에 비하여 최대 수율 76.1%를 얻었다고 하였다.

고전압 전기장 기술은 채소 및 과일 주스의 추출뿐만 아니라 식물 세포로부터 색소를 추출하는 데 유용한 것으로 보고되고 있다. Knorr등은 적색색소를 생성하는 *Chenopodium rubrum* 세포를 상온에서 1.6 kV/cm, 10 펄스 처리한 결과 세포내의 *amaranthin* 색소가 거의 100% 추출된 것으로 보고하였다. 또한 *Morinda citrifolia* 세포로부터 *anthraquinone*의 추출에도 효과가 큰 것으로 보고하고 있다. Ohshima 등은 *Saccharomyces cerevisiae* 현탁액에 0~18 kV/cm의 PEF 처리를 한 결과, 전기장의 세기를 조절함으로써 세포를 파괴시키지 않고 선택적으로 *intracellular enzyme*을 방출시킬 수 있다는 가능성을 보고하였다.

본 연구에서는 이러한 고전압 펄스 전기장을 이용한 유용 물질의 추출 기술을 개발하기 위하여 미생물 중 *carotenoid* (*astaxanthin*)를 다량 함유하고 있는 미생물로 알려진 *Phaffia rhodozyma*를, 식물 중에는 과육에 *anthocyanin*을 다량

함유한 것으로 알려진 자색고구마를 대상으로 하여 연구를 진행하였다.

Astaxanthin(3, 3'-dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta$ -carotene-4, 4'-dione)은 자연에 많이 분포되어 있으며, 갑각류 및 연어의 주요색소로서 주홍색을 띠고 있으며, 다른 carotenoids나 tocopherol 보다도 뛰어난 항산화 효과를 가지고 있어, 항산화제와 식용색소로 뿐만 아니라 의약적으로 그 중요성이 부각되고 있다. 현재 astaxanthin의 세계 시장 규모는 연간 1,200억원 정도로 추산되고 있다. 최근 생물공학의 발전으로 *Phaffia rhodozyma* 효모로부터 astaxanthin을 생산하는 공정이 개발되고 있다. *P. rhodozyma* 세포벽은 두터운 glucan 층으로 이루어져 있으며, 세포내에 축적되는 astaxanthin은 지방체와 결합하거나 또는 지방체 안에 존재하므로 *P. rhodozyma*로부터 carotenoid를 추출하기 위해서는 세포벽을 파괴시켜야 한다. 기계적 파괴법, 화학적(산 또는 알카리) 가수분해법, 효모세포벽 용균효소를 이용하는 방법, autolysis 시키는 방법등이 알려져 있으나 이들 방법들은 carotenoid 색소를 변성시킬 위험이 있으며, 회분 공정이기 때문에 대규모의 공정에 적용하기가 어렵다는 단점이 있다.

합성 색소의 인체에 대한 안전성의 문제가 제기되면서 이를 대체할 수 있는 새로운 천연 식용 색소원으로 주목을 받고 있는 자색고구마는 일본 Kyushu 지방에서 자생하던 산천자(山川紫)라고 알려진 품종을 국내에 도입하여 재배한 것으로 일반 고구마와는 전혀 다른 특징을 가지고 있으며 표피층 뿐만 아니라 육질 전체에 수용성 색소인 anthocyanin을 다량 함유하고 있다. Anthocyanin은 그 특성상 pH에 대한 의존성이 높아 산성의 수요성 식품에 용도가 제한되기는 하지만 천연 색소중 가장 많이 사용되고 있다. 그러나 anthocyanin은 구조적으로 매우 불안정하여 식품에 용도가 제한되기는 하지만 천연 색소 중 가장 많이 사용되고 있다. 또한 anthocyanin 뿐만 아니라 대부분의 색소의 경우 온도의 변화에 매우 민감하여 색소의 추출 중 물리적인 힘에 의한 열의 발생이나 추출의 용이를 위해 추출 용매의 온도를 상승시킬 경우 쉽게 파괴되는 경향이 있다.

본 연구에서는 이러한 여러 가지 문제점들을 극복하고 유용한 물질을 미생물이나 식물체로부터 추출하기 위한 기술로서 고전압 펄스 전기장 기술의 적용

성에 대한 연구를 실시하였다.

## 제 1 항 고전압 펄스 전기장을 이용한 *Phaffia rhodozyma*로부터 Carotenoid의 추출

### 1. 실험 재료 및 방법

#### 1.1. 사용 균주

본 실험에서는 한국 종균 협회에서 분양받은 wild type의 *Phaffia rhodozyma* ATCC 24202와 yeast cell wall lytic enzyme을 생산하는 *Bacillus circulans* ATCC 21367 균주를 사용하였다. *Phaffia rhodozyma*는 YM 배지(Difco)를 사용하여, 배지 25 ml에 21℃에서 20시간 전배양한 균체를 100 ml 배지에 2%(v/v) 접종한 후 21℃에서 150 rpm으로 4일동안 진탕 배양하였다. *Bacillus circulans*는 yeast extract 0.5%, tryptone 0.5%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02%, soluble starch 1%의 조성을 가진 배지 50 ml를 사용하여 30℃에서 150 rpm으로 24시간 동안 진탕 배양한 후 8000 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 cell free broth만을 얻어 이것을 효모 세포벽 용균 효소로 사용하였다.

#### 1.2. 시료의 전처리

4일간 배양한 *P. rhodozyma* 배양액 30 ml를 원심 분리하여 균체만을 모은 후, 30 ml의 0.01% NaCl 또는 0.01%  $\text{CaCl}_2$  용액에 현탁하여 PEF 및 병합 처리 시료로 사용하였다. 시료의 병합 처리는 세포의 투과성을 증진시킬 수 있는 물리적, 화학적 또는 생물학적인 방법을 다음과 같이 전처리 한 후에 즉시 고전압 PEF 처리를 하였다.

전처리로써 냉동-해동은 0.01% NaCl 또는  $\text{CaCl}_2$  균체 현탁액을 -80℃에서 급속 냉동하고 상온에서 해동하는 과정을 3번 반복하였으며, permeabilizing



agents는 0.01% CaCl<sub>2</sub> 균체 현탁액에 11가지의 permeabilizing agent를 각각 0.01~0.05%(v/v) 농도로 첨가하여 상온에서 2시간 동안 천천히 교반하여 첨가하였다. 효모 세포벽 용균 효소는 *Bacillus circulans*의 cell free broth를 0.01% CaCl<sub>2</sub> 균체 현탁액에 첨가하고 30°C에서 150 rpm으로 24시간 교반하여 반응시켰고, 기계적 방법으로는 0.01% CaCl<sub>2</sub> 균체 현탁액을 ultra turrexer을 이용하여 8000 rpm에서 2분간 처리하여 cell을 파쇄하였으며, 유기용매는 toluene, ethanol 및 ethyl acetate를 적정 비율로 섞은 혼합 용매를 균체 현탁액에 30%의 부피 비율로 첨가한 후 상온에서 2시간 교반 처리하였다.

### 1.3. 고전압 펄스 전기장 처리

처리용기는 disposable electroporation cuvette(Bio-Rad, USA)을 이용하여 제작하였으며, exponential decay pulse의 펄스 폭( $\tau$ )은 1  $\mu$ s로 일정하게 하였다. 처리 용기의 전극 간격은 1~4 mm, 처리 부피는 0.072 ~ 1.00 mL였다. 전처리 전·후의 시료를 시료 저장 용기에 넣고, peristaltic pump를 이용하여 0.3 mL/sec의 속도로 처리 용기에 흘러 보내면서 임의의 전기장 (30~80 kV/cm)과 주파수 (100~1000 Hz)에서 처리 시간이 100 $\mu$ s~1000 $\mu$ s가 되도록 처리하였다. 이때 펄스폭은 1  $\mu$ s이고 펄스 형태는 exponential decay pulse였다. 시료 용기의 온도는 항온조를 이용하여 일정하게 유지하였다.

### 1.4. 형태학적 변화 및 세포 투과성 관찰

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 *P. rhodozyma*의 형태학적 변화는 inverted 현미경에 CCD camera가 연결된 화상 분석기 (Diaphot 300, Nikon, Japan)를 이용하여 측정하였다. 세포의 투과성의 변화에 의한 세포내 물질의 유출 여부는 PEF 처리한 후 세포 현탁액을 상온에서 10분간 원심 분리 (Sorvall RC2C plus, Dupont, USA)하여 상등액의 흡광도 (260 nm)를 측정하여 확인하였다.

주사 전자 현미경(SEM)과 투과 전자 현미경(TEM)을 이용하여 고전압

PEF 처리에 의한 *P. rhodozyma* 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. 50 kV/cm, 1000  $\mu$ s, 300 Hz의 전기적 조건에서 PEF 단독 처리한 균체와 capric acid를 첨가 (0.1%, v/v)하여 PEF 처리한 균체, 그리고 무처리 시료를 정착액(5% paraformaldehyde, 5% glutaraldehyde, 0.2 M phosphate buffered saline solution ; PBS)에서 고정하고, 이를 유기용매로 탈수하고 자연 건조한 다음, 금 코팅하여 주사 전자 현미경(JSM-5410LV, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. 또한 1차 고정된 균체 시료를 2차 고정액(2% OsO<sub>4</sub>, 0.2 M PBS)에서 다시 고정한 후 탈수하여 유기용매와 epon 혼합물에 침윤시키고 이를 건조기에서 중합화한 다음 유리칼로 절단하여 투과 전자 현미경(JEM-1010, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

#### 1.5. 생균수의 측정 및 electroporation 관찰

PEF 처리 전후의 생균수는 한천 평판 배지를 이용하여 pour plate method로 측정하여, CFU/ml로 나타내었다. 생균수를 측정할 때 colony 수가 50~300개가 나오도록 희석하였으며, 각 희석 배수에서 3번 반복하여 측정하였다. PEF 처리에 의한 세포막의 손상 여부와 electroporation 정도를 관찰하기 위하여 Phloxine B(Junsei Chemical Co., Ltd, Japan)염색 시약을 사용하였다. 세포 현탁액에 Phloxine B 염색 시약을 먼저 첨가하고(0.01%, v/v), PEF 처리(10 kV/cm~50 kV/cm, 300  $\mu$ s, 100 Hz, exponential decay pulse)한 다음 화상 분석기를 이용하여 세포막에 손상을 입어 빨간색을 띠고 있는 염색된 세포수를 측정하여 아래와 같이 electroporation 비율을 계산하였다. PEF 처리후 세포의 회복율은 세포 현탁액을 동일한 PEF 조건에서 먼저 처리 후 30분 방치한 다음 Phloxine B 시약을 첨가하여 염색된 세포의 수를 화상 분석기로 측정하여 아래식으로 계산하였다.

$$\text{Percentage of Poration(\%)} = \frac{\text{불계 염색된 세포수}}{\text{총세포수}} \times 100$$

$$\text{Percentage of Recovery(\%)} =$$

$$\frac{\text{불계 염색된 세포수} - \text{PEF 처리 후 Phloxine B를 넣어 염색된 세포수}}{\text{총세포수}} \times 100$$

## 1.6. 총 carotenoids 농도 측정

PEF 처리한 세포 현탁액에 15 mL의 acetone을 첨가한 후 상온에서 10분간 방치한 다음 4°C에서 27,000 g로 45분간 원심 분리하였다. Acetone extract을 분액 깔대기에 넣고 여기에 10 mL의 petroleum ether(ACS grade, Fisher Co.)와 소량의 0.01% NaCl 용액을 첨가한 후 잘 섞어준 다음 약 1 분간 방치하여 층분리가 형성되면 acetone층을 제거한 후 petroleum ether extract만을 분리하였다. 분리한 petroleum ether extract을 lipid globule과 다른 이물질을 제거키 위해 glass wool을 통해 여과한 474 nm에서 흡광도를 측정하여 carotenoid ( $\mu\text{g/g}$  of yeast)양을 결정하였다(1% absorption coefficient = 2100)

$$\text{Total carotenoid } (\mu\text{g/g of dried yeast}) = \frac{(\text{ml of petroleum ether})(A_{474})(100)}{(21)(\text{yeast dry weight})}$$

## 2. 실험 결과 및 고찰

### 2.1. 고전압 PEF 처리 후의 형태학적 변화

전기장 세기 20 kV/cm와 주파수 250 Hz, 처리 시간 100~300  $\mu\text{s}$ 로 PEF 처리하였을 때 *P. rhodozyma*의 형태적 변화와 무처리 시료를 관찰한 광학현미경 사진을 Fig. 3-1에 나타내었다. 무처리 시료인 (a)와 비교해 볼 때 PEF 처리 후의 시료인 (b)~(e)에서는 세포가 팽창되고 응집된 부분을 나타내었으며, (c)와 (e)에서는 세포의 일부가 파괴되어 세포내 물질이 빠져나오는 현상을 관찰할 수 있었다. 동일한 전기장 조건에서 처리시간을 달리하여 처리했을 때 처리 시간이 길어질수록 세포의 구조적 변화가 더 커졌으나, 주파수의 영향은 거의 없었다.

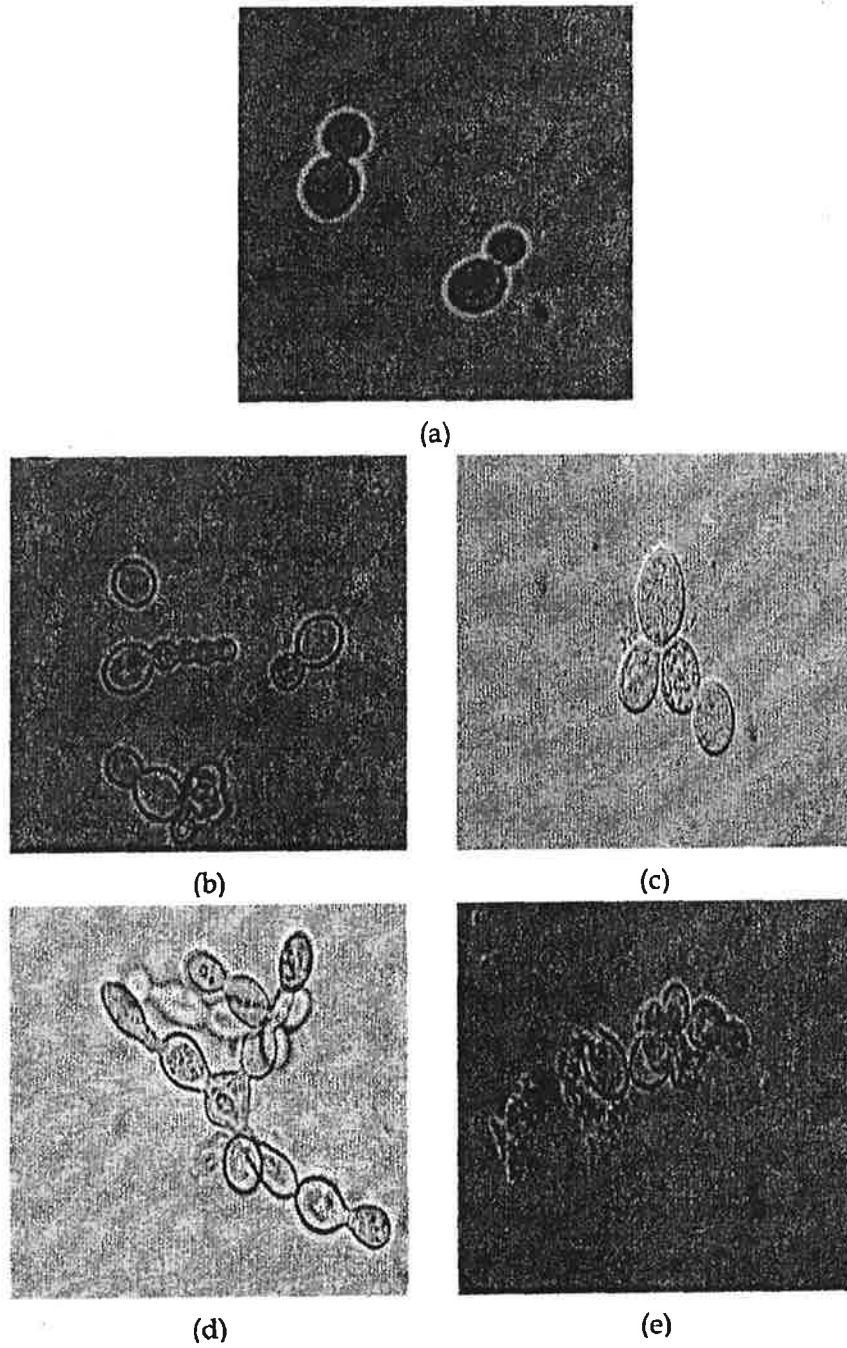


Fig. 3-1. Light micrographs of untreated(a) and treated *P. rhodozyma* cells with 50 kV/cm, 250 Hz for 100  $\mu$ s(b,c) and 300  $\mu$ s(d,e).

## 2.2. 세포내 물질의 유출

고전압 PEF 처리에 의해 세포의 투과성이 변화되고 세포벽의 파괴로 인해 세포내 물질이 유출되는 현상을 확인하기 위하여 *P. rhodozyma* 현탁액을 고전압 PEF 처리 후 원심 분리하여 상등액의 흡광도를 260 nm에서 측정된 값을 Fig. 3-2에 나타내었다. 각각의 처리시간(100  $\mu$ s, 300  $\mu$ s)에서 전기장의 세기(10~50 kV/cm)가 증가할수록 흡광도가 증가하였다. 300  $\mu$ s 처리했을 때 30 kV/cm 이상에서 흡광도는 거의 증가되지 않아, 더 이상 세포내 물질이 유출되지 않았으나, 상대적으로 100  $\mu$ s 처리했을 때 높은 전기장에서도 흡광도가 계속 증가하였다. 이로써 고전압 PEF 처리에 의해 세포내 물질이 유출되는 현상을 확인할 수 있었으며, 고전압 PEF 처리로 세포내 유용 물질을 효율적으로 추출할 수 있는 가능성을 제시하는 것이다. 이러한 사실은 Ohshima 등은 효모로부터 세포내 유용 물질을 선택적으로 추출할 수 있다는 가능성을 제시한 보고한 바 있으며, Knorr와 Angersbach 등도 식물 세포를 고전압 처리했을 때 투과성이 현저히 향상된다고 하였다.

## 2.3. 세포 불활성화

고전압 PEF 처리에 의한 *P. rhodozyma* 세포의 불활성화정도를 Fig. 3-3에 나타내었다. 전기장 세기 10~50 kV/cm, 주파수 100 Hz의 전기적 조건에서 100  $\mu$ s 및 300  $\mu$ s 동안 각각 처리하였을 때 최대 전기장 50 kV/cm에서 각각 생존수가 1.5 및 2.5 log만큼 감소하였다. 그러나 효모의 PEF 살균에 관한 기존의 연구 결과와 비교해 볼 때 사멸 효과가 낮다. Matsumoto 등은 phosphate buffer 용액에 *S. cerevisiae*를 현탁한 후 30 kV/cm의 전기장 세기에서 처리하였을 때 약 5 log cycle의 사멸효과를 얻었다고 보고하였으며, Hofmann 등은 yogurt에 있는 *S. cerevisiae*를 25 kV/cm의 전기장 세기에서 처리하였을 때 약 3 log cycle의 사멸효과를 얻었다고 보고하였다. 이와 같이 살균효과에 상당한 차이를 보이는 것은 Hülshager 등<sup>(18)</sup>이 보고한 것과 같이 *P. rhodozyma*의 세포막 특성과 관계가 있는 것으로 판단되었다. *P. rhodozyma*는 다른 효모에 비하여 두터운 glucan층으로 외

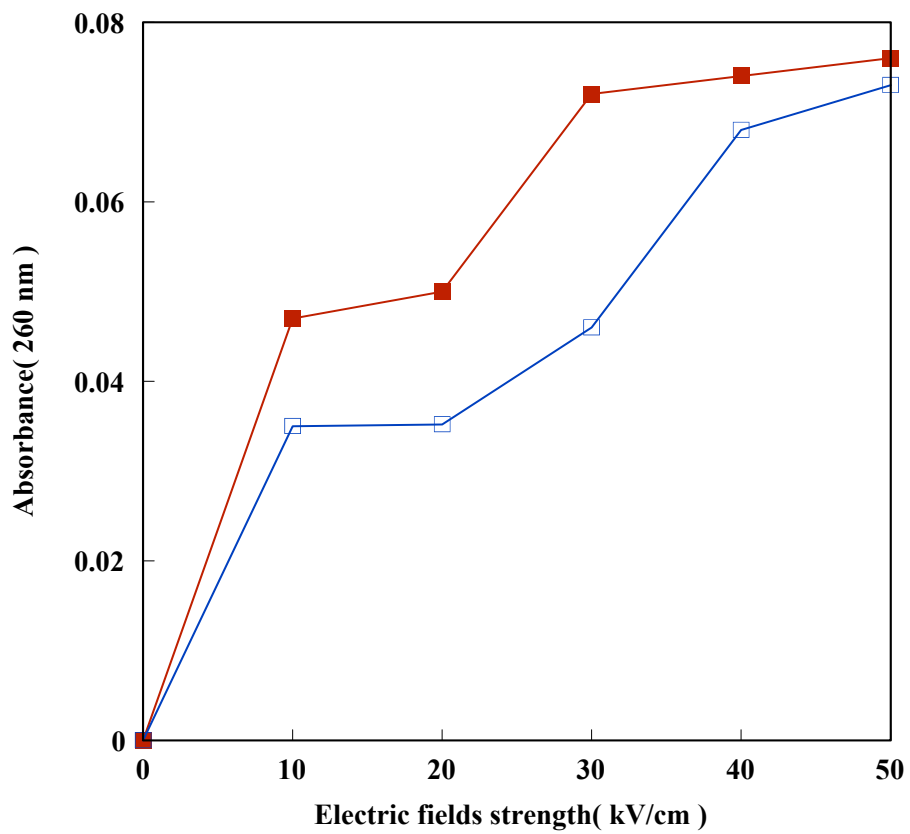


Fig. 3-2. Effect of electric field strength on absorbance at 260 nm of supernatant of *P. rhodozyma* cells suspension after PEF treatment at frequency of 100 Hz.

treatment time : 100  $\mu$ s ( $\square$ ), 300  $\mu$ s ( $\blacksquare$ )

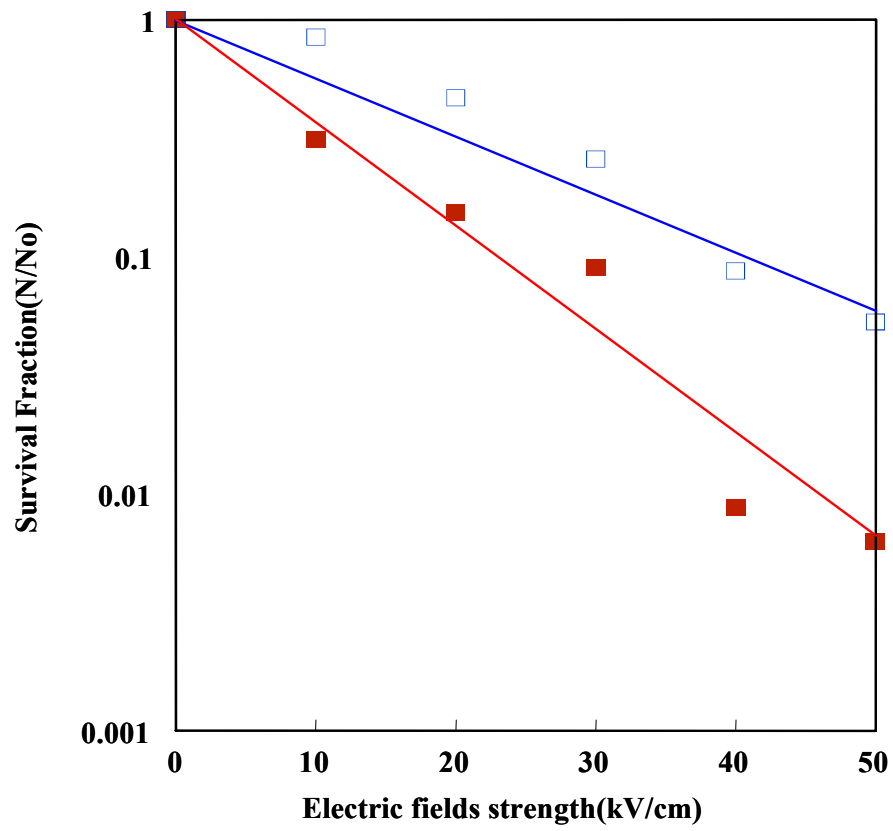


Fig. 3-3. Inactivation of *P. rhodozyma* cells treated with PEF at frequency of 100 Hz.

treatment time : 100  $\mu$ s (□), 300  $\mu$ s (■)

벽을 형성하고 있어 현저한 열적·기계적 저항성을 가지기 때문인 것으로 생각된다. 또한 exponential decay파를 사용하였기 때문에 square파에 비하여 미생물 살균 효과가 적은 데도 기인하는 것으로 추측된다.

#### 2.4. 세포 염색과 Electroporation

Phloxine B 염색 시약으로 염색한 후 광학 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 3-4와 같다. 300  $\mu$ s 처리했을 때, 전기장의 세기가 증가할수록 적색 세포의 수가 크게 증가하였으며, 30 kV/cm의 전기장 세기에서 이미 80%이상의 적색 세포를 관찰할 수 있었다. 그러나 PEF 처리를 받은 세포는 일정 시간이 지난 후에는 회복되는 것으로 보고되고 있으며, 가역적인 electroporation이 일어나는 한계 전기장의 세기를 임계 전기장( $E_c$ )이라한다. PEF 처리에 의한 *P. rhodozyma* 세포의 electroporation되는 정도와 일정 시간(10분)이 지난 후 회복정도를 Fig. 3-5에 나타내었다. 전기장의 세기가 증가할수록 회복율은 급격히 감소하였으며, 40 kV/cm 이상의 전기장에서는 회복율이 약 10%였으며, 50 kV/cm일 때 electroporation 정도는 98%, 회복율은 5% 이하였다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 임계 전기장 이상의 상당한 고전압으로 처리하여도 일부 세포는 회복되는 것을 알 수 있으며, 50 kV/cm이상의 고전압으로 처리하여야만 거의 모든 세포가 비가역적으로 손상되는 것으로 생각된다.

#### 2.5. Carotenoid 추출에 미치는 전기적 조건의 검토

*P. rhodozyma* 배양액 30 ml를 원심분리하여 균체만을 회수한 후 다시 0.01% NaCl 용액에 현탁시킨 후 1 mm의 간격을 가진 순환식 용기(recycle chamber)를 이용하여 전기장 세기 30~50 kV/cm, 주파수 100~900 Hz 및 처리시간 1000~2000  $\mu$ s의 조건에서 PEF 처리하였다. 여러번의 실험 결과 spark와 열 발생으로인해 50 kV/cm 이상의 전기장 세기는 부적절하였으며, 또한 가능한 열 발생을 줄이기 위한 처리 시간과 주파수는 1000  $\mu$ s, 300 Hz임을 확인하였다. 그러나 PEF 처리만으로는 *P. rhodozyma*로부터 carotenoid 색소가 거의 추출되지 않았



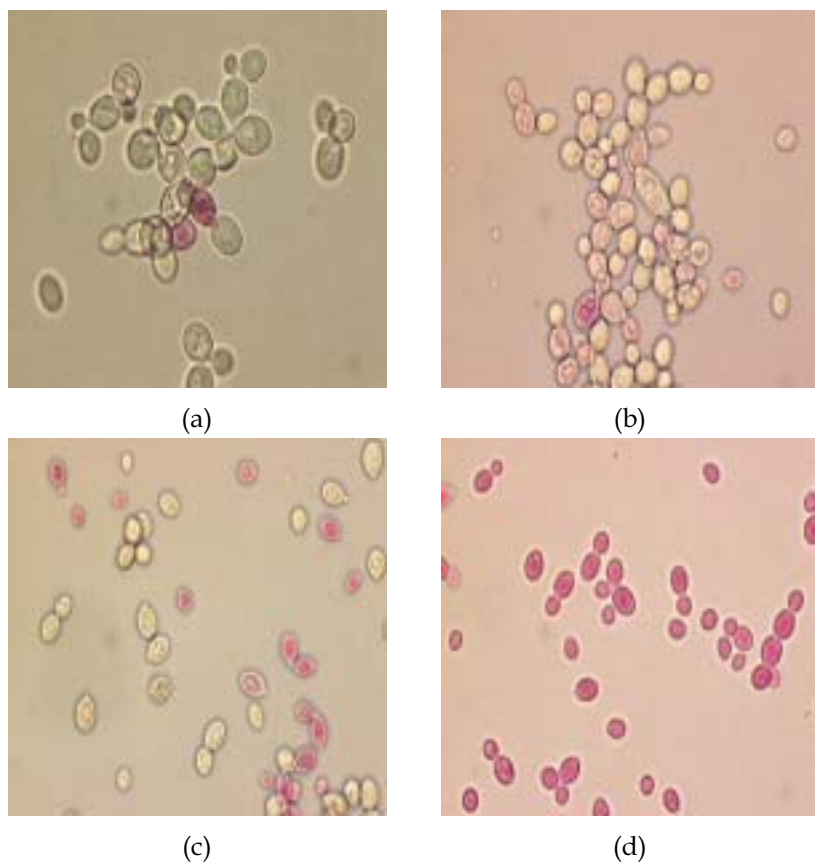


Fig. 3-4. Effect of electric fields strength on the inclusion of phloxine B dye reagent (0.01%, v/v) into *P. rhodozyma* untreated(a) and treated with PEF at 10 (b), 20 (c), and 50 (d) kV/cm for 300  $\mu$ s.

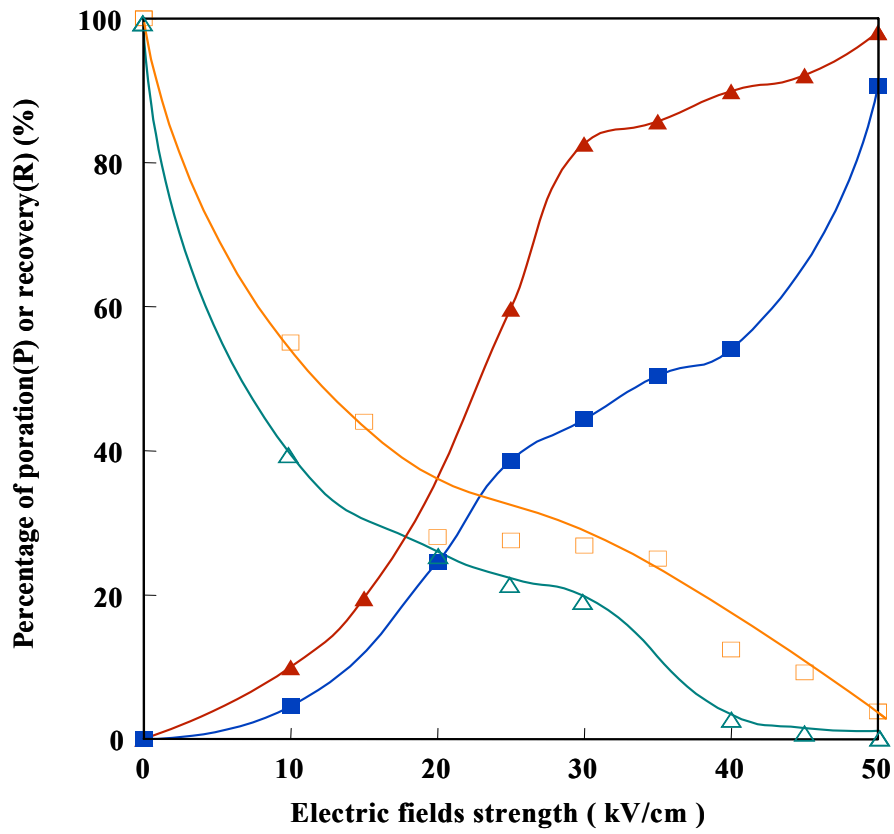


Fig. 3-5. Effect of electric field strength on poration and recovery of *P. rhodozyma* treated with PEF at frequency 100 Hz.

treatment time : ■ 100 μs (P), ▲ 300 μs (P)  
□ 100 μs (R), △ 300 μs (R)

는데, 이는 세포내의 색소가 세포막의 인지질층과 결합된 형태로 존재하기 때문에 세포막의 투과성 증진만으로는 색소를 추출할 수가 없기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 우선 세포를 현탁시키는 전해질 용액을 변화시켜 색소의 추출이 촉진되는지 확인하였다. Table 3-1에서 보듯이 세포를 현탁시키는 용액을 0.01% CaCl<sub>2</sub> 용액으로 바꾼 결과 약간의 색소가 추출되었다. 이는 2가 양이온(Ca<sup>+2</sup>)이 세포막의 투과성을 증진시키는 동시에 세포 현탁액의 전기 전도도에 영향을 미치게 때문인 것으로 생각된다. NaCl 현탁용액의 전기 전도도는 228.5  $\mu\text{s}/\text{cm}$  이었으며, CaCl<sub>2</sub> 현탁용액의 전기전도도는 177.5  $\mu\text{s}/\text{cm}$ 이었다. Jayaram등은 처리 시료의 전기 전도도에 따라 미생물의 치사 효과가 달라지고, 효과적으로 세포막의 비가역적인 파괴를 일으키기 위한 임계 전기장의 세기는 약 25 kV/cm이고 최적의 전기전도도는 약 170  $\mu\text{s}/\text{cm}$ 라고 보고하였다. Table 3-2는 0.01% CaCl<sub>2</sub> 세포 현탁액에 전기장의 세기와 처리 시간, 주파수를 달리 하였을 경우에 추출되는 carotenoid량을 비교하였다. 1000 Hz의 주파수와 1000  $\mu\text{s}$ 의 처리 시간에서 전기장세기를 달리하여 처리한 결과, 색소 추출에는 거의 차이가 없었으나 오히려 처리 조건이 강해질수록 추출량이 약간 감소하였다. 이는 50 kV/cm 이상의 전기장세기에서는 spark에 의한 열발생으로 오히려 추출량이 감소하는 것으로 생각되었다. 또한 50 kV/cm의 전기장 세기에서 주파수와 처리 시간을 달리하여 실험한 결과, 마찬가지로 색소 추출에는 거의 차이가 없었다.

## 2.6. 냉동-해동의 반복처리

Table 3-3에는 Kim 등이 균체를 현탁하는 용액의 전기 전도도에 따라 carotenoid 추출 효과가 다르다고 보고하였던 결과와 전처리로서 -80℃에서 급속 냉동하고 반복하는 과정을 세 번 거친 후에 50 kV/cm, 300 Hz의 조건에서 1000  $\mu\text{s}$  동안 PEF 처리한 후의 carotenoid 추출량을 나타내었다. 미생물은 냉동-해동의 반복에 의해 세포 투과성이 증가한다고 보고되고 있으며, 이는 냉동시 얼음 결정에 의한 세포막 손상이 원인으로 설명되고 있다. 하지만 전처리로 냉동-해동 과정을 실시한 결과에는 별다른 추출효과가 나타나지 않았다. Table 3-3의 실험

Table 3-1. Effect of treatment media on the extraction of carotenoid from *P. rhodozyma* cells

Treatment media	Total carotenoid concentration ( $\mu\text{g/g}$ of dried yeast)
0.01% NaCl	ND <sup>1</sup>
0.01% CaCl <sub>2</sub>	27.3

<sup>1</sup>ND = not detected

Table 3-2. Effect of high-voltage PEF treatment conditions on the extraction of carotenoid from *P. rhodozyma* cells.

Treatment Condition			Total Carotenoid Concentration
Strength (kV/cm)	Treatment time( $\mu$ s)	Frequency (Hz)	( $\mu$ g/g of dried yeast)
50	1000	1000	27.3
60	1000	1000	21.3
70	1000	1000	11.6
80	1000	100	11.3
50	1000	300	27.3
50	1000	500	10.3
50	1000	700	12.9
50	1000	900	10.9
50	2000	300	13.8
50	2000	500	11.9
50	2000	700	8.9
50	2000	900	9.2

*P. rhodozyma* cultured broth was suspended in 0.01% CaCl<sub>2</sub> solution

Table 3-3. Effects of treatment media on the extraction of carotenoid from *P. rhodozyma* cells.

Pretreatment	Treatment media	Total carotenoid concentration ( $\mu\text{g/g}$ of dried yeast)
Control	NaCl	ND <sup>a</sup>
	CaCl <sub>2</sub>	27.3
Freezing-thawing	NaCl <sup>b</sup>	7.6
	CaCl <sub>2</sub> <sup>c</sup>	22.6

<sup>a</sup> ND = Not detection, because of small amount

<sup>b</sup> Cells were suspended in 0.01% NaCl solution, frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , thawed at room temperature and then treated with PEF at 50 kV/cm, 300 Hz for 1000  $\mu\text{s}$ .

<sup>c</sup> Cells were suspended in 0.01% CaCl<sub>2</sub> solution, frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , thawed at room temperature and then treated with PEF at 50 kV/cm, 300 Hz for 1000  $\mu\text{s}$ .

결과에 따라 냉동-해동의 물리적 방법으로는 추출효과를 기대할 수 없으나 색소 추출을 위한 매질로 0.01% CaCl<sub>2</sub> 용액을 선택하여 다른 전처리와 병합 처리에 의한 carotenoid의 추출 효과에 대하여 조사하였다.

## 2.7. Permeabilizing agents와의 병합효과

계면활성제인 Tween 20(polyoxyethylene sorbitan monolaurate)과 Tween 40(polyoxyethylene sorbitan monopalmitan), 지방산 에스테르, Triton X-100, 그리고 탄소수 10개의 지방산 capric acid와 8개의 caproic acid가 carotenoid 색소 추출에 미치는 영향을 검토하기 위해서 세포 현탁액에 이들을 각각 0.01~0.5%(v/v) 농도로 첨가 후 PEF 처리하였다. Permeabilizing agents 들은 농도에 따라 그 작용 능력에 차이를 보이는 것으로 알려져 있으며 실험 결과도 첨가 농도에 따라 추출량에 차이가 있음을 나타냈다(Table 3-4). Tween 20과 Tween 40의 경우에는 0.01%의 첨가농도에서 색소의 추출량이 가장 많았으며 Tween 40보다는 Tween 20이 좋은 추출 효과를 보였다. 이는 Tween 40에 비해 짧은 탄소수를 가진 Tween 20이 미생물 세포막에 더 용이하게 접근하여 세포막의 구조를 교란하여 투과성을 증가시켰을 것으로 판단된다. Caprylic acid, capric acid 등의 지방산은 yeast의 생육을 억제하고 음이온 계면 활성제로서 세포막을 교란하거나 용해할 수 있다. 이러한 지방산의 진균 독성(fungitoxicity)은 탄소수의 길이, 농도, pH에 따라 다르며, 탄소수가 11개까지는 길수록 효과가 크고 직쇄상 탄소 구조의 지방산이 가지 달린 탄소 구조를 가진 지방산보다 항균력이 크다고 보고되고 있다. 실제 탄소수 8개의 caproic acid와 탄소수 10개의 capric acid를 0.01~0.5% 첨가하여 PEF 처리한 결과 0.1%의 첨가 농도에서 최대 색소 추출량을 나타냈으며, 0.5%의 첨가 농도에서는 오히려 감소하였는데, 이는 과도한 양의 지방산 소수성기가 세포막의 lipoprotein과 결합하여 세포막의 성분이 빠져나오지 못하도록 망을 형성하는 것으로 생각된다. Lecithin도 농도에 따라 추출량에 큰 영향을 나타내었으며, 0.1%에서 가장 큰 효과를 나타내었다. Lecithin은 tween계열의 계면 활성제와 마찬가지로 세포막 구조의 교란에 의한 투과성 증진 효과를 갖는 것으로 보고되고

Table 3-4. Effects of PEF treatment combination with permeabilizing agents on the extraction of carotenoid from *P. rhodozyma* cells.

Permeabilizing agents	Total carotenoid concentration ( $\mu\text{g/g}$ of dried yeast)		
	Concentration of permeabilizing agents added (%, v/v)		
	0.01	0.1	0.5
Tween 20	60.7	42.5	59.83
Tween 40	53.5	23.7	8.7
DMSO	7.4	8.4	10.72
Glycerin fatty acid ester	37.6	18.7	8.4
Triton X-100	18.5	24.3	18.9
Phthalic acid bis ester	25.4	22.5	13
Sodium lauryl sulfate	21.2	21.3	12.6
Lecithin	38.6	45.8	13
Capric acid ( $\text{C}_{10}$ )	61.7	75.2	35.5
Caproic acid ( $\text{C}_8$ )	55.4	67.5	20.3
Chitosan	24	12.7	13.6

All determination were made in duplicate in two independent runs.

All permeabilizing agents were added in 30 ml cell suspension, stirred at room temperature for 2 hr mildly and then treated with PEF at 50 kV/cm, 300 Hz for 1000  $\mu\text{s}$ .



있다. Pemeabilizing agents는 양친매성을 가지고 있어서 소수성기가 세포막의 지질 이중층(lipid bilayer)의 지질 단백질과 결합하고 친수성기는 세포밖의 물질과 결합한 상태에서 micelle을 형성하고 마침내 지질단백질 성분을 세포 밖으로 빼냄으로써 세포막의 투과성 변화를 가져오게 되어 PEF와의 병합처리 시 색소의 추출량을 향상시킨다. Fig. 3-6은 4가지의 permeabilizing agents에 대하여 최적 농도 첨가 후 50 kV/cm의 전기장 세기와 300 Hz의 주파수에서 처리 시간에 따른 carotenoid 추출량을 비교하였다. 처리 시간이 증가함에 따라 대부분 carotenoid 추출량이 증가하였으나, 추출량의 증가 정도는 매우 적었다. 즉 처리 시간이 carotenoid 추출에 미치는 영향은 크지 않은 것을 알 수 있었다.

Fig. 3-7은 Tween 20을 0.01% 첨가 후 100 Hz의 주파수와 1000  $\mu$ s의 처리시간에서 전기장의 세기에 따른 carotenoid 추출량을 비교하였다. 50~70 kV/cm의 전기장 세기에서는 추출량에 큰 차이가 없었으나 80 kV/cm에서 약 30  $\mu$ g 정도가 더 추출되었다. Capric acid를 0.1% 첨가 후 같은 조건에서 추출량을 비교하였으나 추출량에는 큰 차이가 없었다(data not shown).

## 2.8. 용균 효소와의 병합 효과

*B. circluan*은 glucanase, xylanase, protease 등의 효모 세포벽 용균 효소를 생산하며 이들 효소체계가 효모 세포벽 용균에 관여하고 있다고 보고되고 있다. *P. rhodozyma*의 세포벽은 두터운 glucan 층으로 이루어져 있어 PEF 처리만으로는 세포내 물질인 carotenoid를 추출하기 어렵기 때문에 *B. circularan*의 배양여액을 첨가하여 PEF 처리한 결과, *B. circularan*만 처리한 결과에 비하여 carotenoids의 추출량이 약 65% 증가하였을 뿐만 아니라 PEF 단독처리보다는 추출량이 약 13.7배 증가하였고, 전통적 추출 방법인 bead cell honogenizer를 이용하는 경우보다 추출량이 약 1.9배 증가하였다(Table 3-5). 뿐만 아니라 효소 처리와 PEF 단독 처리의 색소 추출량에 대한 산술적 합계보다도 병합 처리를 하는 경우가 약 52% 정도 증진 효과가 있었다. 이러한 결과는 용균 효소와의 병합 처리는 synergy 효과가 있음을 알 수 있었다.

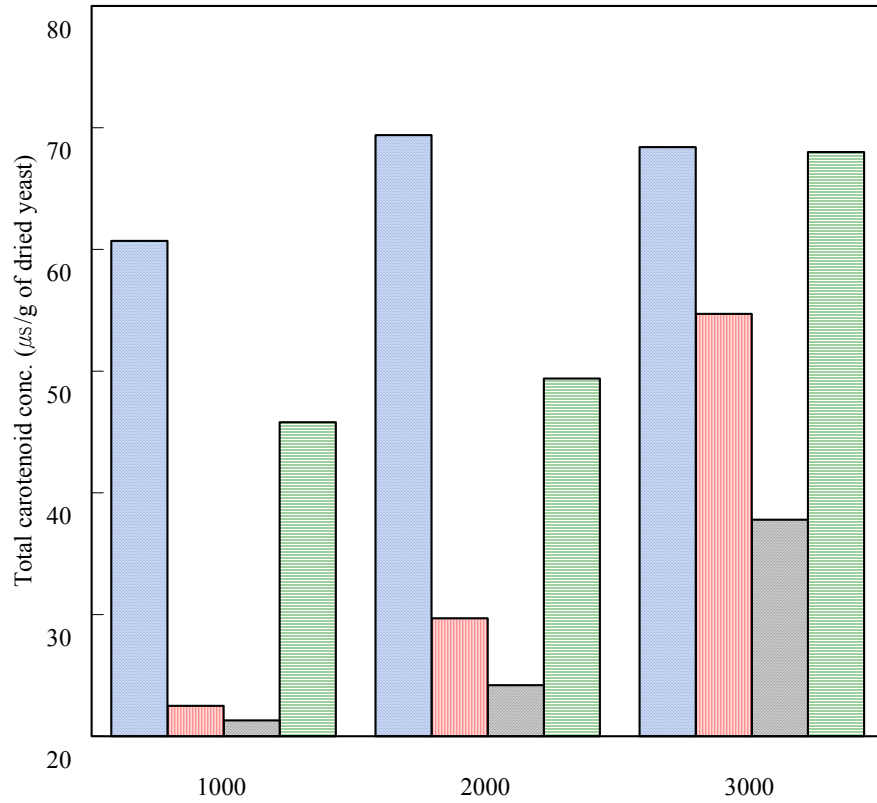


Fig. 3-6 Effects of treatment time on the extraction of carotenoid by PEF combined with permeabilizing agents. ▨ Tween 20 (0.01%), ▩ Phthalic acid bis ester (0.01%), ▤ Sodium lauryl sulfate (0.01%), ▥ Lecithin (0.01%)

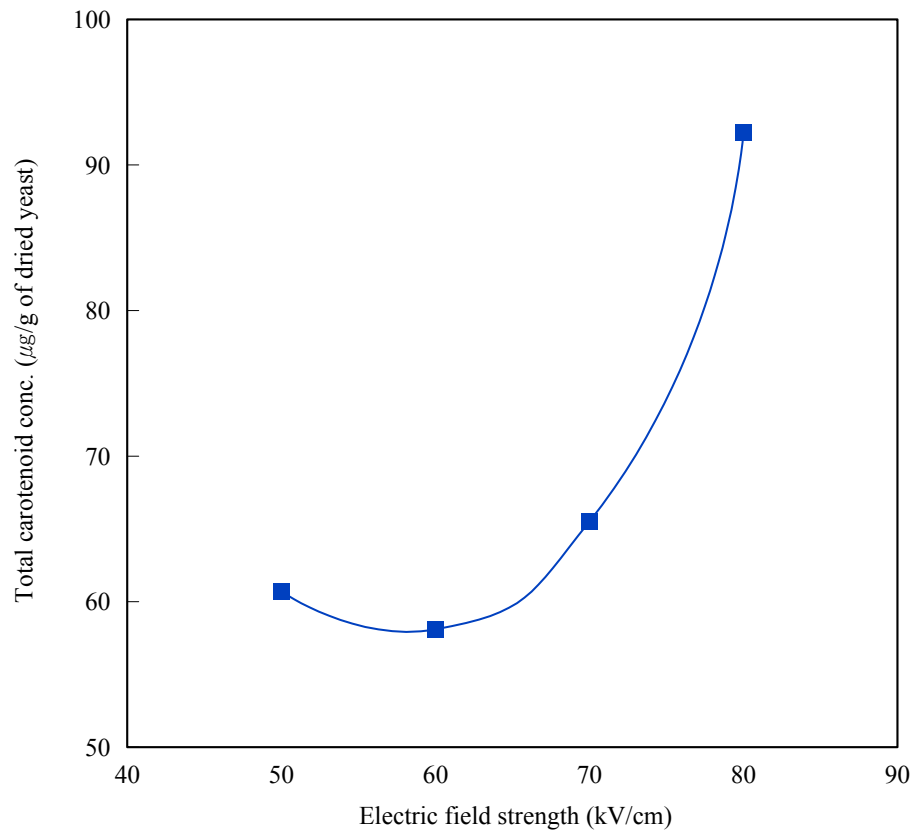


Fig. 3-7. Effects of electric field strength combined with Tween 20 (v/v, 0.01%) on the extraction of carotenoid by PEF

Table 3-5. Effects of PEF combined with *B. circulan* producing yeast cell wall lytic enzyme on the extraction of carotenoid for *P. rhodozyma* cells.

Treatment condition	Total carotenoid conc. ( $\mu\text{g/g}$ dried yeast)
Bead cell homogenizer	200
PEF only	27.3
<i>B. circulan</i> only	242.5
<i>B. circulan</i> + PEF	372

## 2.9. 기계적 방법과의 병합 효과

*P. rhodozyma* 배양액을 ultra turrexer을 이용하여 8000 rpm, 2분동안 전처리한 다음 1000  $\mu$ s의 처리시간과 300 Hz의 주파수에서 전기장 세기를 달리하여 PEF 처리한 후 carotenoid를 추출한 결과를 Table 3-6에 나타내었다. 전처리 단독으로는 색소 추출 효과가 없었으나, ultra turrexer와 PEF 처리의 병합 처리에 의해서 색소 추출 효과는 증진되었다. 뿐만 아니라 PEF 단독처리(50 kV/cm, 1000 $\mu$ s, CaCl<sub>2</sub> solution)보다 약 200%의 색소 추출 증진 효과가 있어 이 방법 역시 synergy 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 그러나 전기장 세기의 증가에 따라 추출 효과는 별로 증가하지 않았다.

## 2.10. 유기 용매와의 병합 효과

Toluene과 ethyl acetate는 효모의 세포막 투과성을 증진시키는 대표적인 유기 용매로서 사용되고 있으며, 주로 세포내 효소를 추출하기 위하여 사용되고 있다. Toluene, ethanol 및 ethyl acetate를 임의의 비율로 섞은 혼합용매를 *P. rhodozyma* 배양액에 30%의 부피 비율로 첨가한 후 상온에서 2시간 동안 교반 처리한 후 50~70 kV/cm, 1000  $\mu$ s, 300 Hz의 전기적 조건에서 PEF 처리하여 carotenoid 추출량을 비교하였다. Table 3-7에서 보듯이 전반적으로 추출에 미치는 효과가 toluene이 ethyl acetate에 비해서 우수함을 확인할 수 있었다. Toluene은 비극성용매로서 toluene만을 이용하여 세포를 현탁하였을 경우 세포가 균일하게 현탁되지 않고 뭉치는 현상을 보여 실험에 적당하지 않았다. 따라서 극성 용매인 ethanol을 혼합하여 실험에 사용하였다. Ethanol의 혼합 비율에 따라 추출량에 다소 차이를 보였는데 toluene, ethyl acetate의 경우 모두 ethanol의 함량이 높아짐에 따라 효과가 감소하는 경향을 나타내었다. Toluene이 ethyl acetate에 비해 높은 추출율을 보이는 것은 toluene이 비극성용매로서 극성용매인 ethyl acetate보다 세포막의 지질층과 효과적으로 상호 작용하여 나타나는 현상으로 보이며, toluene에 극성용매인 ethanol의 첨가량이 많아짐에 따라 추출량이 줄어드는 것도 같은 원인으로 보인다.

Table 3-6. Effects of electric fields strength combined with mechanical method on the extraction of carotenoid from *P. rhodozyma* cells by PEF.

Mechanical method	Electric field strength (kV/cm)	Total carotenoid conc. ( $\mu\text{g/g}$ dried yeast)
	-	ND
Ultra turrexer	50	90.6
	60	87.1
	70	94.5
	80	97

These samples were, after mechanical treatment, treated with PEF.

Table 3-7. Effects of electric field strength combined with solvent pretreatment on the extraction of carotenoid from *P. rhodozyma* cells by PEF.

Solvent(v:v)			Electric field strength (kV/cm)	Total carotenoid concentration ( $\mu\text{g/g}$ of dried yeast)
Toluene	Ethanol	Ethyl acetate		
			-	75.3
7	3	-	50	77.6
			70	96
			-	18.1
-	-	10	50	41.3
			70	70.5
			-	73
9	1	-	50	76
			70	121
			-	29.2
-	1	9	50	30
			70	32

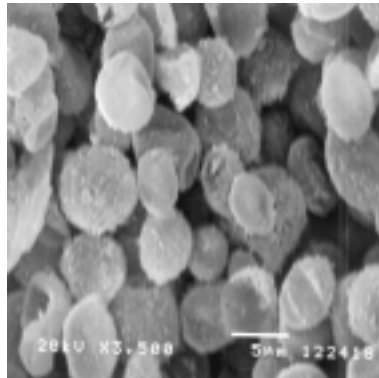
### 2.11. 병합 처리 후의 형태학적 변화

50 kV/cm, 1000  $\mu$ s, 300 Hz의 전기적 조건에서 PEF 처리만 한 세포, 무처리 세포 및 permeabilizing agent로서 사용된 capric acid(0.1%, v/v)와 병합 처리된 세포의 외관을 관찰한 주사 전자 현미경(SEM) 사진은 Fig. 3-8과 같다. 고전압 펄스 전기장 처리만 한 세포의 경우 세포 외관이 많이 거칠어지긴 하였으나 원래의 형태를 유지하고 있음을 확인할 수 있었으며, capric acid와 병합 처리된 세포는 세포내 물질이 과도하게 빠져나가면서 세포가 더 이상 원형의 모습을 유지하지 못하고 쭈글쭈글해진 형태를 띄고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 색소 추출 정도와 비교해서 생각해볼 때 PEF 처리만으로는 색소추출이 거의 되지 않았던 점과 capric acid와의 병합 처리가 색소 추출에 어느 정도 효과가 있었다는 점을 고려하면 이해가 되는 부분이라고 생각된다. *P. rhodozyma* 세포의 미세 구조를 관찰한 투과 전자 현미경(TEM) 사진을 Fig. 3-9에 나타내었다. Capric acid와 병합 처리된 세포의 경우 세포벽이 부분적으로 파손되었음을 확인할 수 있었으며, 세포막과 세포내의 구성물질이 대부분 파손되고 세포 밖으로 빠져나가 세포 중심부 곳곳이 비어 있는 것을 발견할 수 있었다.

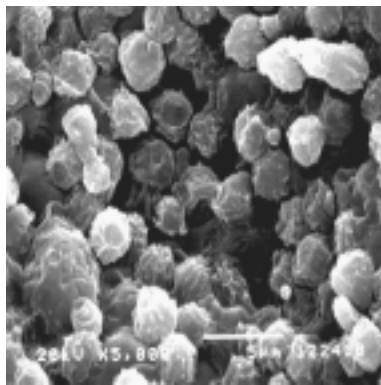
### 3. 결 론

전기장 세기 10~50 kV/cm와 처리시간 100~300  $\mu$ s의 범위에서 세포를 PEF 처리했을 때 전기장의 세기와 처리 시간이 증가함에 따라 세포의 팽창, 손상 정도와 세포내 물질이 유출되는 정도가 증가하였다. 10~50 kV/cm, 100 Hz의 exponential decay파로 세포현탁액을 100  $\mu$ s 또는 300  $\mu$ s 처리하였을 때 최대 전기장(50 kV/cm)에서 생존수가 각각 1.5 및 2.5 log 감소하였다. 50 kV/cm의 전기장에서 세포막에 형성되는 electroporation 정도는 98%에 달하였고, 이 때 세포의 회복률은 5% 미만으로 확인되었다. Phloxine B 색소로 세포를 염색했을 때 생존 세포는 염색되지 않았으나, PEF 처리한 세포는 색소가 내부로 침투되어 적색으로 염색되었으므로 세포막이 손상된 것을 알 수 있었다. Carotenoid 색소가 *P. rhodozyma* 세포막의 지방체와 결합한 상태로 존재하기 때문에 고전압 PEF 처

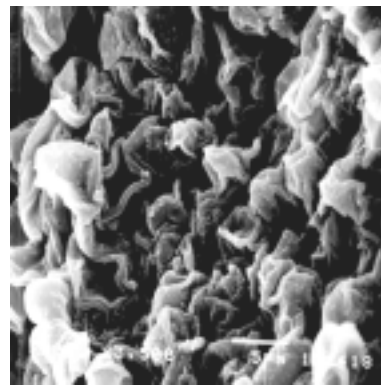




(a)



(b)



(c)

Fig. 3-8. Scanning electron micrographs of *P. rhodozyma* treated with PEF. (a) control cells, (b) cells treated with only PEF at 50 kV/cm, 1000  $\mu$ s, 300 Hz, (c) cells treated with PEF combined with capric acid(v/v 0.1%) at 50 kV/cm, 1000  $\mu$ s, 300 Hz.

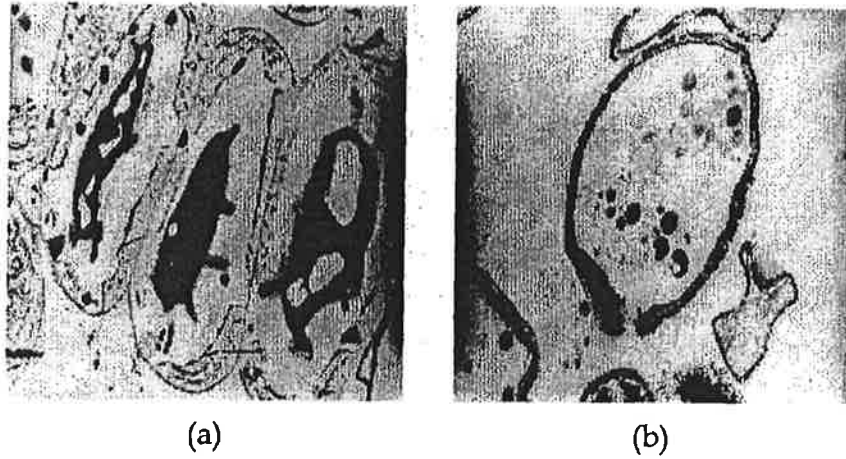


Fig. 3-9. Transmission electron micrographs of *P. rhodozyma* treated with PEF. (a) control cells, (b) PEF treated combined with capric acid(v/v, 0.1%) at 50 kV/cm, 1000  $\mu$ s, 300 Hz.

리에 의한 세포막 투과성 증진의 효과만으로는 색소 추출이 어려웠으나, 세포현탁액 조제시에 0.01% NaCl 용액 대신에 0.01% CaCl<sub>2</sub> 용액을 사용하는 경우에는 10~20  $\mu\text{g}$ 의 색소 추출 증진 효과가 있었다. 고전압 PEF는 *P. rhodozyma* 세포막에 손상을 주어 투과성을 80% 이상 증진시키지만, carotenoid 색소가 *P. rhodozyma* 세포막의 지방체와 결합한 상태로 존재하기 때문에 고전압 PEF 처리에 의한 세포막 투과성 증진의 효과만으로는 색소 추출 효과가 거의 없다는 김 등의 보고에 이어서, 본 실험에서는 투과성을 증진시키는 물리적, 화학적 또는 생물학적 방법을 전처리하고 고전압 PEF 처리를 하는 병합 처리가 색소 추출에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 유기 용매 처리 또는 냉동-해동의 반복 처리 후에 50 kV/cm, 300 Hz에서 1000  $\mu\text{s}$  동안 PEF 처리하는 병합 처리의 경우에는 색소 추출에 synergy 효과가 없었다. 효모 세포벽 용균 효소 처리나 ultra turrexer를 이용하는 기계적 처리를 한 후에 PEF 처리를 하는 병합 처리의 경우에는 색소 추출이 PEF 단독 처리보다 각각 13.7배 또는 3.3배 증가하였다. 위의 2가지 경우에는 PEF와 전처리에 따른 색소 추출량의 산술적 합계보다도 병합 처리하는 경우의 색소 추출량이 각각 52% 및 69.8% 증가하였다. 따라서 병합 처리가 synergy 효과가 있다는 것을 알 수 있었지만 연속 공정으로 적합하지 못하였다. 한편 세포 투과성을 증진시키는 11가지의 permeabilizing agents를 0.01~0.5%(v/v)의 농도로 0.01% CaCl<sub>2</sub> 세포 현탁액에 첨가하여 상온에서 2시간 교반 후에 고전압 PEF 처리하는 병합 처리를 한 결과, 계면 활성제인 Tween 20과 탄소수 10개의 포화지방산인 capric acid는 각각 0.01% 및 0.1% 첨가했을 때 색소 추출량이 60.7 및 75.2  $\mu\text{g}$ 으로서 가장 효과적이었다. 이러한 병합 처리는 연속 공정으로서의 가능성도 충분하다. 뿐만 아니라 capric acid를 첨가하고 난 후에 PEF 처리하는 병합 처리 효과를 직접 확인 하고자 무처리, PEF 단독처리 및 병합처리 후의 세포 내·외부의 변화를 SEM과 TEM으로 관찰하였다. SEM으로 관찰한 결과 PEF 처리에 의해서 세포 표면이 거칠어지고 주글주글한 모양을 띠어 무처리 세포와는 다른 형태로 나타내었으며, 병합처리의 경우에는 정도가 심하였다. TEM으로 관찰한 결과 병합 처리에 의하여 세포벽은 유지되었으나 세포막은 그 구성 물질이 많이 빠져

나가 손상된 모습을 나타내었다. 이와 같은 결과들은 *P. rhodozyma*로부터 연속적으로 색소 추출 가능성을 제시하고 있다.

## 제 2 항 고전압 펄스 전기장에 의한 자색 고구마 색소의 추출

### 1. 실험 재료 및 방법

#### 1.1. 재료

본 실험에서 사용한 자색 고구마는 호남농업시험장 목포시험장에서 재배하여 목포 대학교 식품공학과에서 보관하던 것을 분양받았다. 분양받은 고구마를 수세하여 세절한 후 동결 건조기(FD8-3 system)를 사용하여 24시간동안 동결 건조한 후 분말화하여 보관하면서 시료로 사용하였다.

#### 1.2. 색소의 추출과 검량선의 작성

검량선의 작성은 세절한 자색고구마 500g을 0.1% citric acid를 함유하는 20% ethanol 용액으로 24시간 추출한 후 homogenizer로 마쇄하고 membrane filter(5.0 $\mu$ m)로 여과하여 얻어진 여액을 vacuum evaporator를 사용하여 40 $^{\circ}$ C의 온도에서 수분이 거의 제거될 때까지 감압 농축하였다. 여기에 소량의 증류수를 가하여 색소를 용해시킨 다음 12시간 정도 동결시킨 후 동결 건조기를 사용하여 24시간동안 동결 건조하여 자색 고구마 색소 분말을 제거하였다. 이렇게 얻은 색소 분말을 정량적으로 취하여 0.1% citric acid를 함유하는 20% ethanol 용액에 녹인 후 532nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였다. 색소의 추출에 사용된 용매와 색소의 추출방법은 김 등이 보고한 방법에 의해 실시하였다.

#### 1.3. 고전압 펄스 발생을 위한 장치

Pulse 발생장치와 처리용기를 설계, 제작하였다. 고전압 펄스 처리 장치

는 30 kV DC를 발생할 수 있는 고전압 펄스 발생부와 회분식, 연속식 처리용기로 이루어져 있다. 220V AC, 25A의 입력을 고전압 변압기를 통하여 승압시키고 정류하였다 (공급된 고전압은 series로 연결된 6M $\Omega$  저항을 통해 0.12 $\mu$ F의 capacitor에 충전시켰다). 전력원은 30 kV까지 공급할 수 있다. Capacitor는 corona와 arching을 막기 위해 oil에 담았다. 고전압 펄스의 발생은 thyatron (switch의 일종)을 통한 capacitor의 방전에 의한다. 이렇게 발생된 전기장(exponential decay pulse)은 처리 용기의 두 전극사이에 방전된다.

#### 1.4. 시료의 고전압 펄스 전기장 처리와 처리 시간의 계산

고전압 펄스 처리에 의한 시료로 부터의 색소 추출은 동결 건조하여 분말화한 시료를 2g을 취하여 여기에 추출 용매 50 ml를 첨가한 후 고르게 현탁한 후 peristaltic pump를 통하여 전체 시스템을 순환시키면서 시료와 장치를 안정화시킨다. 시료와 장치가 안정되고 시료가 추출 용매에 의해 고르게 현탁되어 처리 라인에 순환하면서 처리 용기를 통과할 때 미리 설정한 전기장과 주파수를 가진 고전압 펄스를 인가하여 처리 용기에 고전압 펄스 전기장을 형성하게 하여 이를 통과하는 시료가 고르게 전기장의 영향을 받도록 한다. 고전압 펄스 전기장 처리된 시료는 다시 저장 용기에서 재현탁된 후 다시 pump를 통해 전기장이 형성되어 있는 처리 용기를 통과한다. 이렇게 시료를 처리 라인에 순환시키면서 처리를 하고자 하는 시간만큼 전기장을 가한다. 시료의 처리 시간의 계산은 다음에 의한다. 전체 시료가 처리 라인을 1 cycle하는 동안에 받는 전기장의 처리시간은

$$t = n \cdot \tau, \quad n = f \cdot V/m$$

이다. 여기서  $t$ 는 시료가 완전하게 1 cycle 되는 동안의 처리시간;  $n$ 은 고전압 전기장 펄스의 수;  $f$ 는 고전압 전기장 펄스의 주파수;  $V$ 는 처리 용기의 부피;  $m$ 은 처리 용액의 유속이다. 따라서 시료가  $M$  cycle 순환되는 동안 받는 고전압 펄스 전기장의 총 처리시간은

$$T = M \cdot t$$

이다.

## 2. 실험 결과 및 고찰

### 2.1. 자색고구마 과육에 미치는 고전압 펄스 전기장의 영향

자색 고구마를 일정한 크기로 세절하여 처리 용기에 넣고 30 kV/cm의 고전압을 1000 $\mu$ s 동안 가한 후 고구마 세포의 변화를 광학 현미경과 전자 현미경을 통하여 관찰하였다. 고전압을 가하지 않은 생시료의 경우 세포내에 전분 입자들이 촘촘히 들어 있는 구조를 나타냈다. 이는 일반적으로 보고된 서류(감자 등)와 같은 구조와 일치한다. 그러나 고전압 펄스 전기장 처리를 받은 고구마 시료의 경우 처리전에 관찰되던 세포내의 전분 입자들이 완전히 보이지 않고, 처리전에 전분 입자들을 감싸고 있던 얇은 세포벽이 두꺼워지고 확실하게 나타나면서 그물망 같은 망사구조를 이루고 있어 세포벽들만이 나타났다 (Fig. 3-10). 이는 고전압 펄스 전기장 처리 후 세포내의 전분 입자들은 대부분 용출되고 일부 전분들은 세포벽에 붙어 세포벽이 두꺼워지는 것으로 보이는 것으로 생각된다.

### 2.2. 전기장의 세기에 의한 영향

주파수와 처리 시간을 동일(300 Hz, 3000 $\mu$ s)하게 한 후 전기장의 세기를 달리하면서 전기장 처리를 하여 색소의 추출에 미치는 영향을 조사하였다. 색소 추출량의 전체적인 경향은 약 35 kV/cm까지는 전기장의 크기가 커질수록 추출량이 증가하는 경향을 보였다. 그렇지만 35kV/cm이상의 전기장 세기에서는 추출량에 있어서 큰 차이를 보이지는 않았다 (Fig. 3-11). 이는 Dornenburg 등이 적색 색소를 생성하는 *Chenopodium rubrum* 세포를 상온에서 고전압 처리를 하였을 경우 전기장의 세기가 증가함에 따라 amaranthin 색소의 추출량이 증가한다는 보고와 일치하고 있다. 각 전기장의 세기에서의 추출량은 30 kV/cm에서는 552mg/g

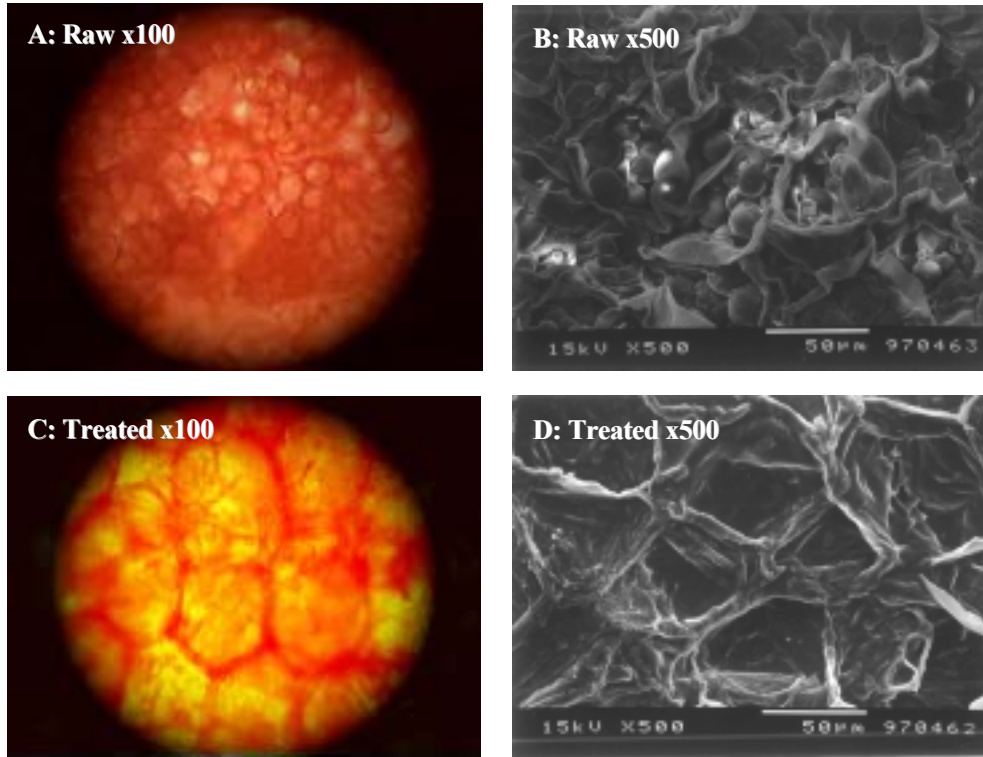


Fig. 3-10. Light (A, C) and scanning electron micrograph (B, D) of purple sweet potato

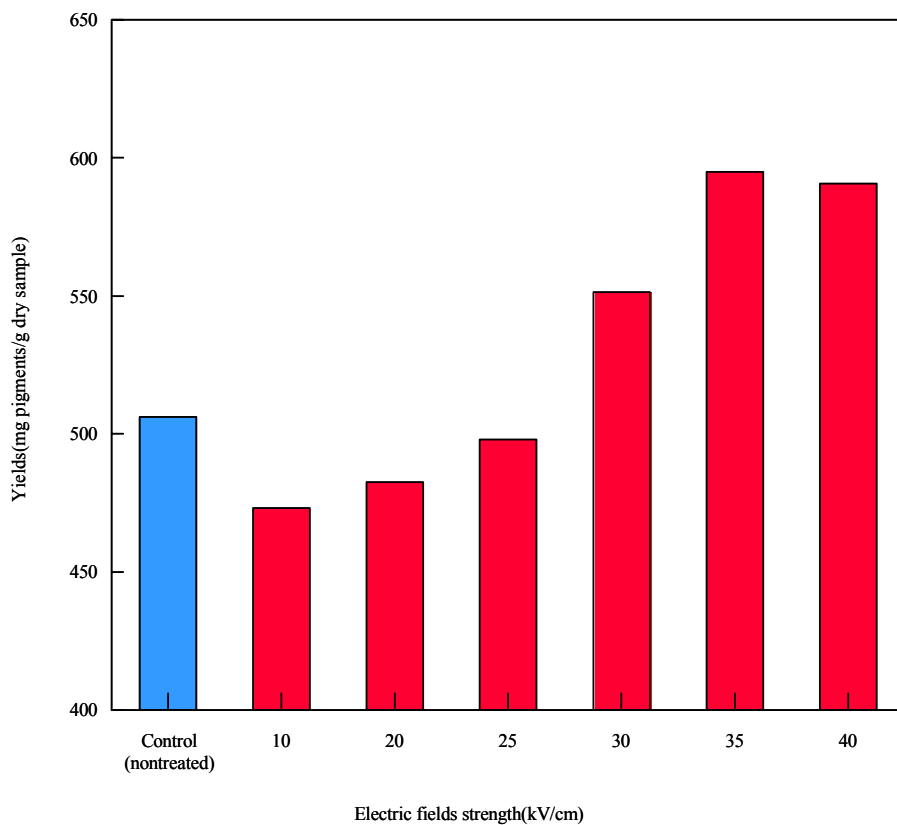


Fig. 3-11. Effect of electric fields strength on extraction of pigments by high voltage pulsed electric fields (300 Hz, 3000 $\mu$ s)



sample, 35, 40 kV/cm에서는 각각 595, 591 mg/g sample로 control의 513 mg/g sample에 비해 8~16%의 추출 향상효과를 보였다. 25kV/cm에서는 control과 큰 차이를 보이지 않았으며, 그 이하의 전기장에서는 6~7%의 추출량 감소를 나타내었다.

### 2.3. 주파수에 의한 영향

동일한 전압과 처리시간(30 kV/cm, 3000  $\mu$ s)에서 주파수를 다르게 하여 추출에 미치는 영향을 조사하였다. 낮은 주파수에서 500 Hz까지는 주파수가 증가함에 따라 추출량이 크게 증가하는 경향을 보이고 그 이상의 주파수 범위에서는 추출량의 변화가 크게 없었다 (Fig. 3-12). 최대의 추출량을 나타낸 주파수는 500 Hz로 634.10 mg/g sample의 추출량을 보였으며, control에 비해 37 % 이상의 추출량 향상 효과를 나타냈다. 그리고 300, 700, 1000 Hz에서는 각각 535.63, 614.44, 611.39 mg/g sample의 추출량을 나타냈다. 그러나 500 Hz 이상에서는 충전 용량이 방전 용량에 미치지 못하는 이유로 인해 전기장의 진동이 심하게 나타났으며, 700 Hz 이상에서는 열의 발생이 일어나 시료를 현탁한 용액내의 기체들이 용출되면서 전기장 형성의 불균형을 일으켜 처리 용기내에 spark를 발생하였다. 500 Hz 이상의 주파수에서 색소의 추출량이 약간씩 감소하는 것도 spark 발생에 따른 색소의 파괴와 전기장 형성의 불균형에 기인한 것으로 보인다. 이 결과로 보아 고전압에 의한 추출의 경우에 있어 고주파수를 사용하여 추출을 할 경우에는 충전 용량과 방전 용량을 충분히 고려한 후 적당한 주파수를 찾아 추출을 해야 될 것이다.

### 2.4. 처리 시간에 따른 영향

일정한 전압과 주파수(30kV/cm, 300Hz)에서 처리 시간만을 달리하여 추출에 미치는 영향을 조사하였다. 처리시간은 100~3000 $\mu$ s까지 넓은 범위에 걸쳐 조사를 하였다. 처리 시간에 따른 추출량은 control에 비해 약 17~30% 정도의 향상 효과를 보였지만 대부분 처리 시간의 길고 짧음에 관계없이 거의 일정한 수

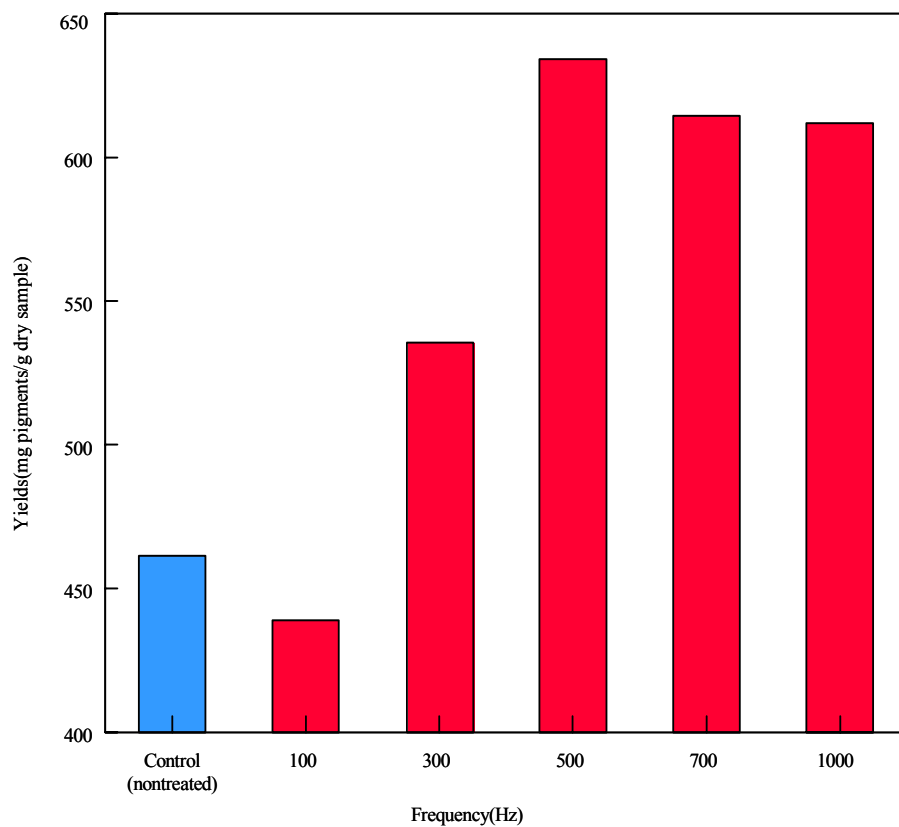


Fig. 3-12. Effect of frequency on extraction of pigments by high voltage pulsed electric fields (30 kV/cm, 3000  $\mu$ s)

준을 나타내었다 (Fig. 3-13). 즉 대부분의 색소는 고전압 전기장 처리를 받는 초기에 대부분 밖으로 추출되어 나오고 시간이 지남에 따라서 약간의 잔존 색소가 추출되어 나오는 것으로 볼 수 있다. 또한 고전압 전기장 처리에 의한 색소의 추출이 처리 시간보다는 전압의 크기나 주파수에 의해 크게 영향을 받는 것으로 보인다.

### 3. 결 론

천연 식용 색소원으로서 최근 주목받고 있는 자색 고구마로부터의 색소 추출에 대한 고전압 펄스 전기장의 영향을 조사하였다. 자색 고구마 색소는 일정한 주파수와 처리시간 하에서 전기장의 세기를 변화시켜 추출하였을 경우 전기장의 크기가 증가함에 따라 색소의 추출량도 점차 많아지고 있음을 나타내었으며 최적 전압은 35 kV/cm임을 알 수 있었다. 동일한 전기장의 세기와 처리시간을 주고 주파수만을 변화시키면서 추출을 했을 경우 낮은 주파수에서 500 Hz까지는 추출량이 큰 폭의 증가를 보였으나, 500 Hz 이상에서는 spark발생에 의한 색소의 파괴로 약간씩의 감소를 나타내었다. 전기장의 세기나 주파수가 추출에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났지만 일정한 전기장과 주파수 하에서 처리 시간은 색소의 추출양에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

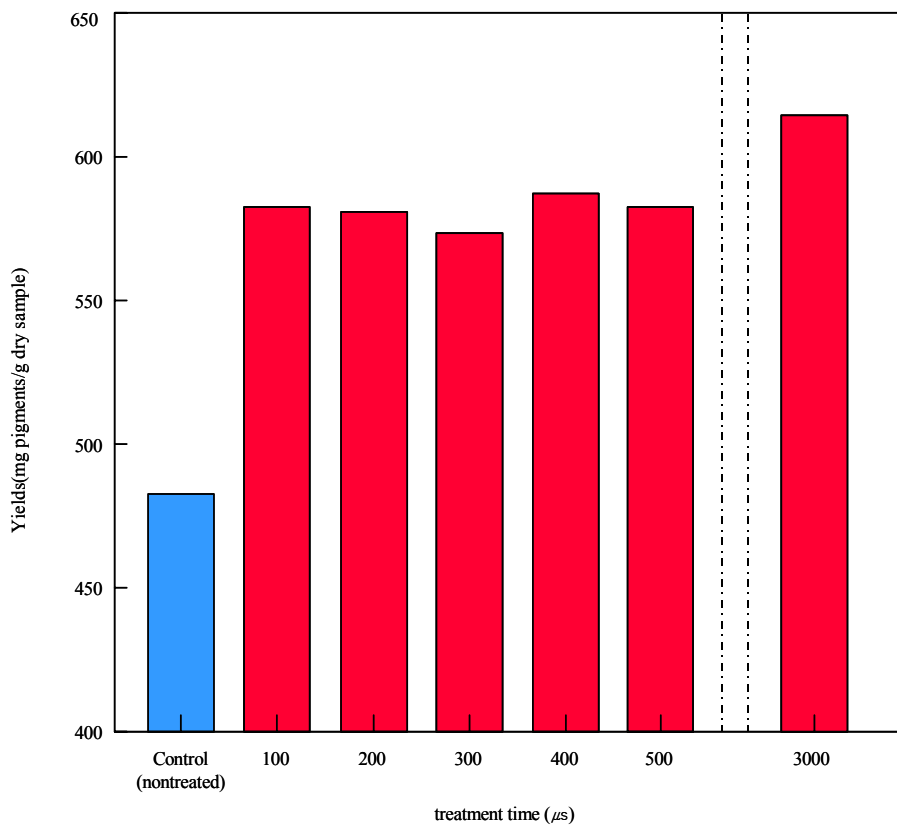


Fig. 3-13. Effect of treatment on extraction of pigments by high voltage pulsed electric fields.

## 제 4 절 고전압 펄스 전기장에 의한 살균 기술 개발

### 제 1 항 고전압 펄스 전기장에 의한 *Bacillus subtilis* 포자의 불활성화

많은 미생물들은 포자를 형성하는데, 특히 진핵 생물에서 잘 형성한다. Gram 양성균의 포자를 형성하는 균에는 *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Oscillospira* 등이 있고, *Bacillus*는 운동성이 있는 호기성 단간균이고, *Sporolactobacillus*는 통성 혐기성이며 *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Oscillospira* 등은 절대 혐기성으로 알려져 있다.

포자는 생육 세포와는 여러 가지 면에서 다른 점을 갖고 있다. 특히 구조적인 차이로 인해 포자는 화학 약품, 물리적 충격, UV 조사, lysozyme과 같은 효소에 대해 더 큰 저항성을 갖고 있다. 또한 포자는 열은 물론 고전압 펄스 전기장에도 강한 저항성을 지니고 있다.

포자의 기본적 구조는 spore core, cortex, membranes, spore coats, exporium으로 구성되어 있다. Core는 상대적일 일반 세포에 더 가까운데, 지방의 구성과 포자의 효소가 생육 세포와 유사하다. Cortex는 spore core와 spore coats 사이에 존재하는데, 주요 구성 성분은 peptidoglycan으로 생육 세포에서 발견되는 것과 비슷하다. 포자 형성 과정 중에서 spore cytoplasm을 둘러싸고 있는 double membrane의 존재는 포자의 구별되는 성질 중의 하나이다. Ellar는 *Bacillus megaterium* spores의 inner membrane에 phospholipid의 80%, spore lipid의 66%가 존재한다고 보고하였다. 포자 전체 용적의 반을 차지하고 있는 spore coats는 주로 단백질로 구성되어 있고, 소량의 탄수화물과 지방의 혼합물로 되어 있다. *Baillus cereus* spore coats의 구조적 단백질은 대수 증식기가 끝나고 1~2시간이 지난 후에 약 65,000 daltons의 질량을 갖는 전구체로서 합성되기 시작한다. 이 전구체의 약 40%가 spore coat monomers로 전환된다. 전환되는 속도는 처음에는 느리고, coat layer가 형성될 때 가장 빠르며, 포자가 형성되면 다시 늦어진다. Spore coat를 제거한 포자는 열이나 방사선에는 저항성을 갖지만 lysozyme이나

octanol에는 민감한 반응을 보인다.

Exoporium은 많은 양의 glucose와 lipid를 함유하고 있으며, 주요 화학적 구성물은 단백질이다. 포자의 5~14%를 구성하고 있는 dipicolinic acid (pyridine-2,6-dicarboxylic acid, DPA)도 생육 세포와 구별짓는 포자의 중요한 특성중의 하나이다. DPA의 분석은 포자 형성, 발아, 포자의 구조등을 연구하는데 있어서 매우 중요하다. Liquid chromatography를 이용해서 DPA를 분석하는 방법도 연구되었다. 이런 구조적 차이에서 포자는 생육 세포보다 훨씬 큰 저항성을 갖게되고, 이런 포자의 열 저항성에 관한 연구는 많이 보고되고 있다.

위와 같은 성질을 지닌 포자를 낮은 온도에서 효과적으로 불활성화 시키기 위해서는, 포자를 발아시킨 후에 발아된 미생물을 불활성화 시키는 두가지 과정을 거쳐야 한다. 주변의 환경이 좋아지면 포자는 생육 세포로 회귀하려는 성질을 갖고 있는데, 이 과정은 두 단계로 나뉜다. 즉, activation energy에 의한 휴면 타파와 영양분에 의한 outgrowth이다. 첫 번째 단계에서는 activation energy로서 열과 같은 energy를 필요로하는데, 60~70℃로 수분간 처리하면 휴면기가 정지되고 활성화된다. 이 때 포자의 refractility가 없어지면서 염색율이 높아지고, 열 저항성이 현저하게 감소한다. 포자의 전체적인 크기가 부풀면서 새로운 생육 세포가 spore coat를 뚫고 나오는데, 이런 과정을 outgrowth라고 한다. Spore wall과 spore coat는 세포를 용해하는 효소의 작용에 의해 붕괴된다.

포자의 발아 정도는 배지에 첨가되는 물질과 온도에 크게 좌우된다. 특히 배지내에 L-alanine이 존재할 경우 발아를 촉진시키는 역할을 하며, 배양 온도가 38℃일 때 발아되는 속도가 가장 빠르고, 발아 온도가 낮을수록 발아되는 정도가 작아진다.

본 연구에서는 고전압 펄스 전기장의 처리 조건을 변화시켜서 포자를 발아시키는 최적 조건을 찾고, 또한 고전압 펄스 전기장 처리에 의하여 포자를 발아시킨 후에 발아된 미생물을 다시 고전압 펄스 전기장을 이용하여 효과적으로 불활성화시킬 수 있는 효율적인 2단 처리법의 가능성을 제시하고자 하였다.

## 1. 실험 재료 및 방법

### 1.1. 사용 균주

한국 중균 협회에서 분주 받은 *Bacillus subtilis* ATCC 6633을 nutrient broth (NB)에 접종하여 37℃에서 24시간 동안 배양을 한 후, nutrient agar slant에 streaking하여 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다.

### 1.2. 포자 시료 조제

*Bacillus subtilis*를 nutrient broth에 접종한 후 37℃에서 25시간동안 배양하였다. 이 균주를 50개의 sporulation medium plates에 도말한 후, 37℃에서 15일간 배양하였다. Sporulation medium은 500 ppm의 Bacto dextrose (Difco)와 3 ppm의 manganese sulfate를 nutrient agar에 첨가하여 만들었다. 포자 형성 정도를 위상차 현미경으로 관찰하여 95~99%의 포자가 형성되면 plates를 4℃에서 24시간동안 보관하였다. 각 plate에 10 mL의 살균 증류수를 넣고 그 표면의 포자를 유리 막대를 이용해서 긁어 모은 후, 현탁액을 ice bath안에서 2분동안 sonication을 하고 20분 간격으로 3회 반복하였다. Sonication한 현탁액을 4℃에서 20분간 원심 분리 (8000×g)하고 살균 증류수로 다시 현탁액을 만드는 과정을 6회 반복한 후 원심 분리한 포자를 살균한 peptone water에 현탁하여 다시 원심 분리하였다. 포자 현탁액은 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다.

### 1.3. 불활성화도와 발아율의 측정

불활성화도(L)와 발아율(G)은 PEF 처리전 ( $N_0$ ), 처리 직후 ( $N'$ ), 40분 배양 후(N)의 생균수를 tryptone glucose extract (TGE) agar를 이용하여 pour plate method로 측정하여, CFU/ml로 나타낸 후에 다음의 식으로 구하였다.

$$L = (1 - \frac{N'}{N_0}) \times 100$$

$$G = (1 - \frac{N}{N'}) \times 100$$

이 때 plate내의 균체수는 20~300 이내로 나오도록 희석하였으며, 각 희석 배수에서 5번 반복하여 가장 높은 값과 가장 낮은 값을 제외한 3개의 중간값의 평균으로 나타내었다.

#### 1.4. 흡광도 측정

고전압 펄스 전기장 처리를 한 시료를 배지에 접종을 한 후, 접종한 배지를 4 ml의 cuvette에 넣고 580 nm에서 일정한 간격으로 흡광도를 측정하였다. 항온조 (Hakke DC 3, German)를 통해 spectrophotometer (Beckman DU 650, USA) 내부의 cuvette의 온도를 일정하게 유지하면서 연속적으로 측정하였다. 각 시료의 동일한 비교를 위해 최초의 값을 기준으로 하여 그 후의 값들을 백분율로 나타내었다.

#### 1.5. 광학 현미경에 의한 분석

고전압 펄스 전기장이 포자의 발아에 미치는 영향을 조사하기 위해 DIC condensor가 있는 광학 현미경으로부터 CCD camera를 이용하여 포자가 발아되는 모습을 실시간으로 촬영하였다.

### 2. 실험 결과 및 고찰

#### 2.1. *Bacillus subtilis* 포자의 발아

*B. subtilis* 포자가 상온(25℃)에서 자체 발아되는 정도를 측정하기 위하여 0.01% NaCl 용액에 접종을 한 후 발아되는 정도를 20분 간격으로 측정하였다. 순수한 포자의 총균수만은 측정하기 위하여 80℃에서 30분간 가열을 하였다. 이 과



정은 발아하여 생육세포가 된 미생물들을 사멸하기 위한 것이다. 열처리한 후 시료를 단계적으로 희석하여 pour plate method를 통해 생균수를 측정하였다. 이때 초기의 생균수와 비교하여 차이가 나는 만큼이 포자가 발아된 것으로 생각하였다.

초기의 생균수는  $1.62 \times 10^6$  CFU/ml이었으며, Table 4-1에서 보는 바와 같이 시간이 지나감에 따라 발아율이 조금씩 증가하였으며 60분이 지난 후 약 40% 정도만의 발아율을 나타내었다. 또한 포자를 NB와 TSB 배지에서 30분간 발아를 시켰을 경우 각각 52%, 75%의 포자가 발아하였다. 이것은 포자가 발아하기 위해서 휴면타과를 위한 에너지가 필요한데, 상온 정도의 온도에서는 충분한 에너지를 공급할 수 없기 때문에 포자가 발아하기 위해서는 많은 시간이 필요하다는 것을 보여주고 있다. 배지간의 발아되는 정도는 TSB, NB, 0.85% NaCl의 순서로 포자의 발아율이 높았다.

## 2.2. *Bacillus subtilis* 포자의 발아에 필요한 최적 배양온도

*Bacillus subtilis* 포자를 고전압 펄스 전기장 처리를 하여 다양한 온도에서 배양을 하면서 580 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양 온도가 20°C 미만에서는 Fig. 4-1에서 보는 것과 같이 흡광도가 감소되는 정도와 그 속도가 느렸으나, 30°C 이상에서는 급격히 감소하였으며, 특히 37°C에서 흡광도가 가장 급속히 감소하였다. 그러나 37°C 이상의 온도에서 배양하였을 경우에는 오히려 발아되는 정도와 발아 속도가 느려졌다.

포자가 발아되기 시작하면 포자의 외벽을 구성하고 있는 spore coat 부분이 얽어지면서 없어지는데, 이 때문에 흡광도를 측정하면 흡광도의 값이 점차 감소한다. 그 후 생육 세포가 spore coat를 뚫고 outgrowth하게 되면 흡광도는 다시 증가하기 시작한다. 흡광도가 처음에 급격히 감소하다가 일정해지는 것은 spore coat 부분의 얽어지는 속도와 생육 세포의 outgrowth의 속도가 같아지기 때문이다. 약 2시간 정도 배양을 하면 초기의 흡광도값까지 다시 증가하게 되고, 그 후 부터는 생육 세포의 생육 곡선을 그리게 된다.

배양 초기에 흡광도가 감소하는 속도는 발아율과 밀접한 관계가 있다. 특

Table 4-1. Viable spore counts in NaCl solution without PEF treatment at 25°C

Time (min)	Spores (CFU/ml)	Germination
0	$1.62 \times 10^6$	0.0
20	$1.15 \times 10^6$	29.0
40	$1.08 \times 10^6$	33.3
60	$9.63 \times 10^5$	40.6

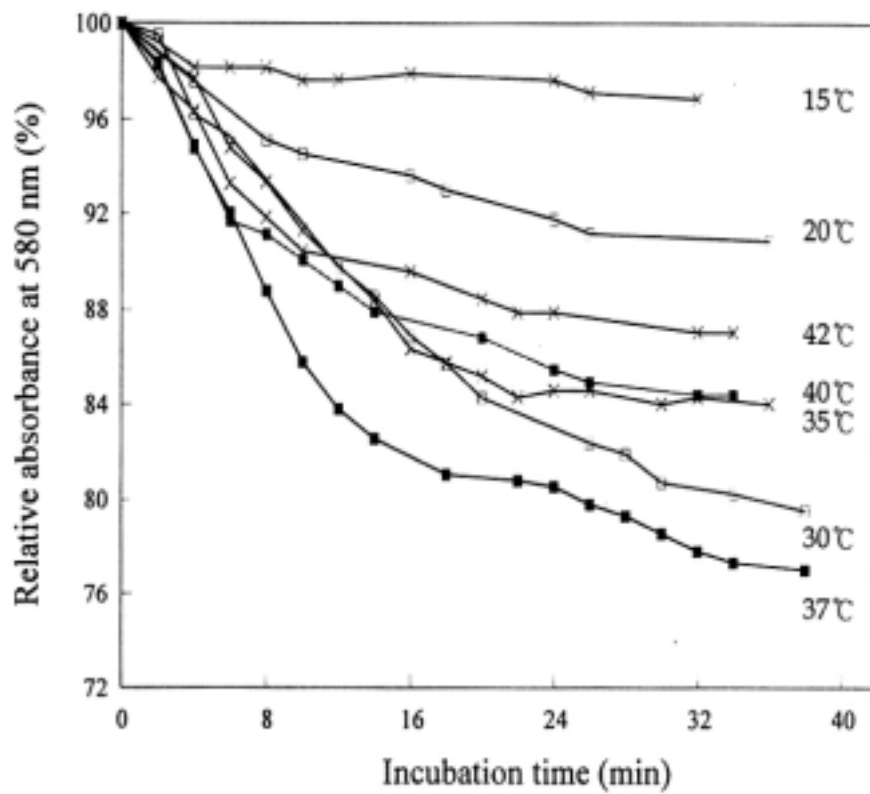


Fig. 4-1. Changes in absorbance of the spore suspensions treated with PEF at 30 kV/cm for 1000  $\mu$ s in TSB medium until 40 minutes at various incubation temperatures.

히 배양 초기 10분 동안은 Fig. 4-2에서 보는 바와 같이 1차 함수로 표현할 수 있는데, 배양 온도가 증가할수록 기울기가 커지는 것을 볼 수 있다. Fig. 4-2에서 나타나지는 않았지만 37°C 이상의 온도에서 배양했을 경우에는 오히려 기울기가 오히려 작아졌다. 이 결과를 통해 모든 고정압 펄스 전기장 처리를 통한 포자의 발아는 37°C에서 배양을 실시하였다.

### 2.3. PEF 처리에 의한 *Bacillus subtilis* 포자의 발아

*Bacillus subtilis* 포자를 0.01% NaCl 용액에 현탁시켜서 고전압 펄스 전기장을 이용해 발아에 필요한 에너지를 주었다. NaCl 용액의 농도가 높은 경우에는 전기 전도도가 증가하여 고전압 펄스 전기장의 세기를 증가시키기 곤란하고 spark가 발생하는 문제가 생기기 때문에 NaCl의 농도가 낮을수록 좋은데, 0.01%의 농도에서 가장 안정된 펄스 전기장을 형성하는 것으로 나타났다. PEF 처리할 때 전기장의 세기에 따른 포자현탁액 시료의 온도 상승 정도는 Table 4-2에서 보는 바와 같이 20 kV/cm를 걸어주었을 때 시료의 온도는 0~1°C 정도로 거의 상승되지 않았으나, 60 kV/cm일 경우에는 3분동안 11°C나 상승하였다. 그러므로 고전압 펄스 전기장이 포자의 발아에 미치는 영향을 정확히 확인하기 위하여 40 kV/cm 이내의 전기장에서 실험을 하였고, 모든 처리도 6분 이내에서 실시하였다.

포자 현탁액을 PEF 처리한 후에 포자를 nutrient broth(NB), tryptic soy broth(TSB), 0.85% NaCl 용액에 각각 접종을 한 후, 37°C에서 배양을 하면서 580 nm에서 10분 간격으로 흡광도를 측정된 결과는 Fig. 4-3과 같다. TSB 배지에 접종을 했을 때 가장 빠른 속도로 발아가 시작되었고, 발아되는 정도도 컸다. 앞에서 이미 언급한 바와 같이, 많은 수의 포자가 발아를 하면 그만큼 spore coat 부분이 얇아지기 때문에 포자가 발아하는 속도와 정도는 흡광도가 감소되는 기울기로 판단할 수 있다. TSB 배지에 경우 40분이 경과한 후 흡광도가 완만하게 증가하는 경향을 보이는데, 이것은 생육세포가 spore coat를 뚫고 outgrowth되기 때문이다. NaCl 용액의 경우에는 흡광도는 증가하지 않고 계속적으로 감소를 하는데, 고전압 펄스 전기장에 의해 휴면 타파에 필요한 에너지를 얻어 spore coat 부분이 얇

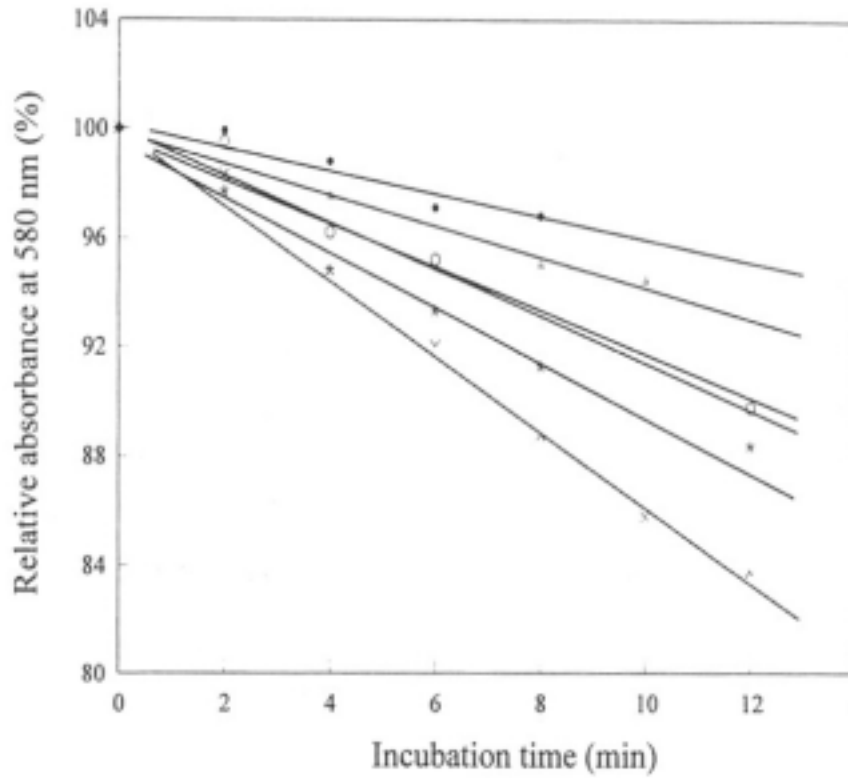


Fig. 4-2. Changes in absorbance of the spore suspensions treated with PEF at 30 kV/cm for 1000  $\mu$ s in TSB medium until 12 minutes at various incubation temperatures.

- : 10 °C
- ▲ : 20 °C
- : 25 °C
- : 30 °C
- \* : 35 °C
- \* : 37 °C

Table 4-2. Temperature increase of spore suspensions in 0.01% NaCl solution during PEF treatment

Electric fields strength (kV/cm)	Temperaute increase (°C)		
	Treatment time (min)		
	3	6	12
20	0	1	1
40	4	6	7
60	11	15	18

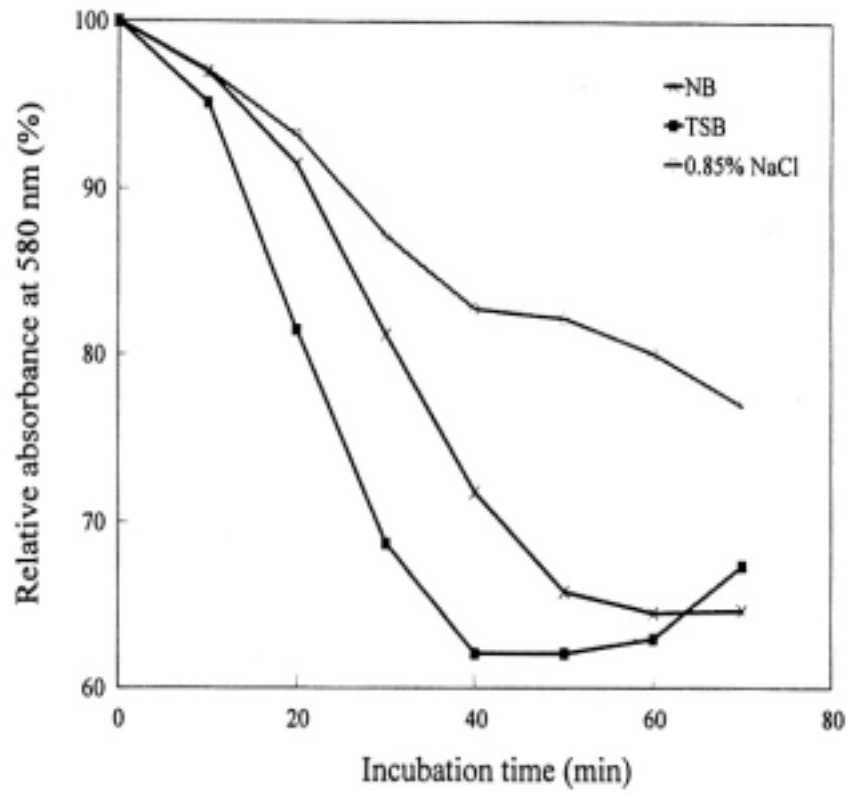


Fig. 4-3. Changes in absorbance of the PEF treated spore suspensions in different solutions during incubation at 37°C

어지기는 하지만 영양분이 없기 때문에 생육 세포가 outgrowth되지 못하기 때문이다. NB 배지의 경우에는 50분까지 급격히 흡광도가 감소했으나 60분 이후부터는 완만하게 증가하였다.

*B. subtilis* 포자 현탁액을 50℃로 유지하면서 40 kV/cm의 전기장 세기로 1000  $\mu$ s 동안 처리한 직후와 37℃에서 40분 배양후의 총균수 변화를 관찰하였다. Fig. 4-4을 살펴보면 PEF 처리 전과 처리 직후의 총균수 변화는 PEF 처리에 의한 직접적인 포자의 불활성화를 나타낸다. 불활성화도(L)는 50% 미만으로 포자가 고전압 펄스 전기장에 강한 저항성을 갖고 있음을 알 수 있다. 그러나 40분간 배양을 한 후의 발아율(G)을 측정해보면 배지에 따라 큰 차이가 나타나는 것을 볼 수 있는데 0.85% NaCl 용액, NB 배지, TSB 배지에서 발아율은 각각 43.3%, 87.7%, 98.2%로 TSB 배지에서 발아가 가장 잘 되었다. 이것은 Fig. 4-3에서의 결과와 일치하는 것으로 흡광도 감소 기울기를 통해 발아되는 정도를 예측할 수 있다는 결론을 내릴 수 있었다.

지금까지 보고된 고전압 펄스 전기장에 의한 생육 세포의 불활성화에 관한 실험에서는, PEF 처리를 할 때 시료의 온도가 미치는 영향에 대해서 상반되는 결과가 보고되었다. Sale과 Hamilton은 시료의 온도는 PEF 처리시 세포 불활성화에 영향을 주지 않는다고 하였으나, Jayaram 등은 시료의 온도가 증가하면 살균율이 증가하는 synergistic effect가 있다고 보고하였다.

시료의 온도가 PEF 처리를 한 포자의 발아에는 어떠한 영향이 있는지를 알아보기 위해 *Bacillus subtilis* 포자 현탁액의 온도를 각각 20℃, 30℃, 40℃, 50℃로 일정하게 유지하면서 PEF 처리를 하였을 때 흡광도의 변화와 발아율을 관찰하였다. Fig. 4-5는 시료의 온도를 각각 20℃와 50℃로 유지하면서 20 kV/cm의 전기장의 세기로 1000  $\mu$ s 동안 PEF 처리를 한 후, TSB 배지에 접종을 하여 37℃에서 배양을 하면서 흡광도를 측정하는 것이다. 포자 현탁액의 온도를 50℃로 유지하면서 PEF 처리를 한 시료보다 더 급격했으며 최저점에 도달하는 시간도 약 20분 정도가 빨랐다. Table 4-3은 시료의 온도를 동일조건으로 유지하면서 30 kV/cm의 전기장의 세기로 1000  $\mu$ s 동안 PEF 처리를 하였을 때 각각의 발아율을 배지별로 나



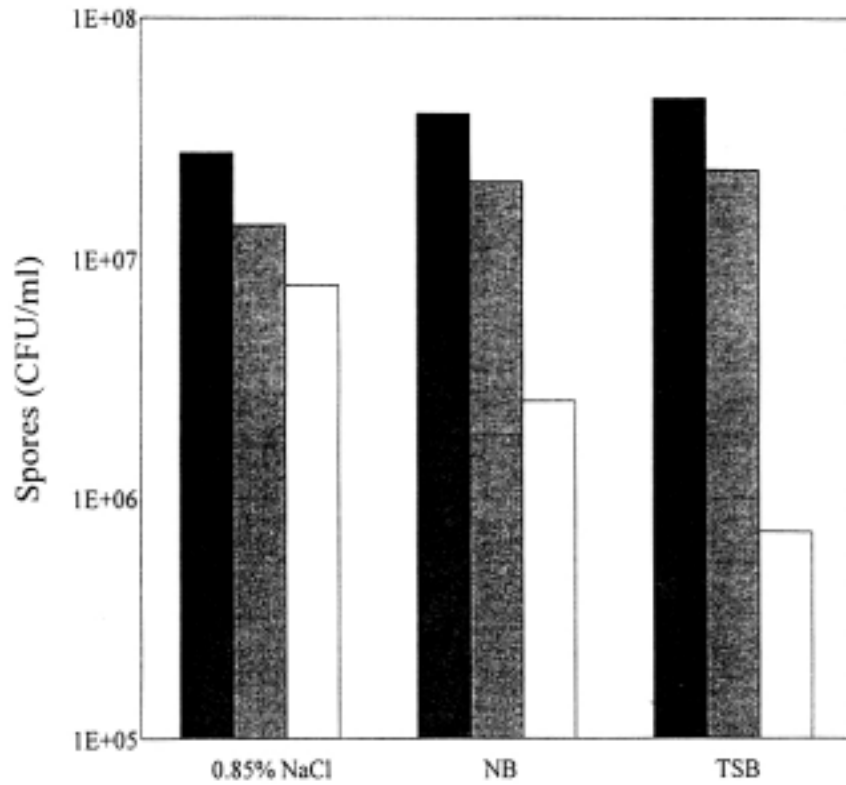


Fig. 4-4. Viable spore counts of spore suspensions

■ : before PEF treatment

▨ : after PEF treatment with electric fields strength 40 kV/cm for 1000  $\mu$ s at 50°C

□ : after incubation of the PEF treated suspension at 37°C for 40 min

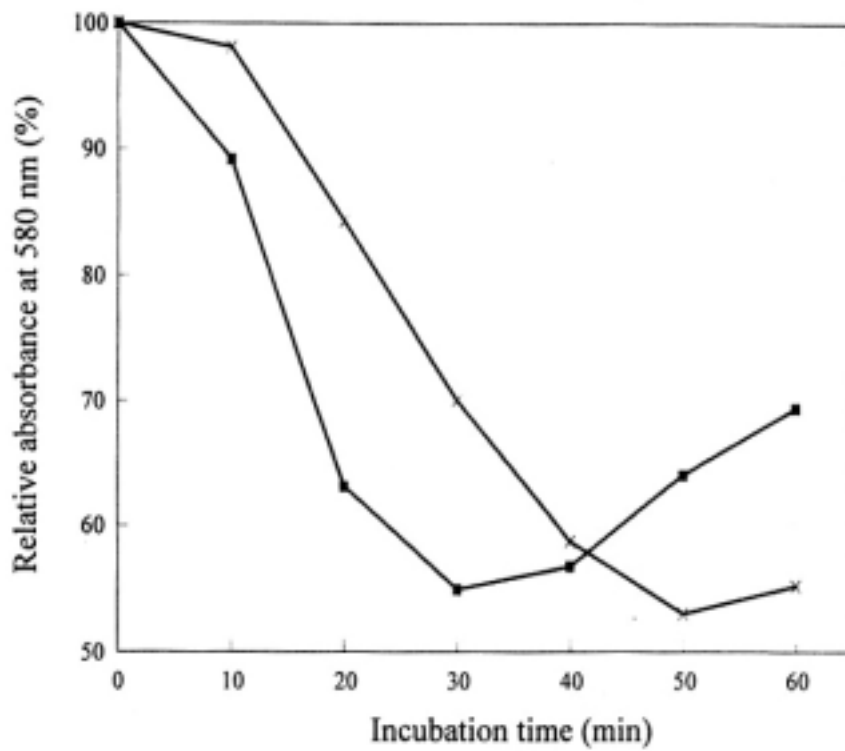


Fig. 4-5. Changes in absorbance (at 580 nm) of the PEF treated spore suspension at various treatment temperature.

× : 20 °C

■ : 50 °C

Table 4-3. Percentage of spore germination at various treatment temperature (30 kV/cm and 1000  $\mu$ s)

Treatment temperature (°C)	% Germination (G)		
	0.85% NaCl	NB <sup>a</sup>	TSB <sup>b</sup>
20	14.2	38.9	70.2
30	21.3	52.3	77.1
40	38.2	56.3	83.9
50	58.5	93.1	97.8

<sup>a</sup> : Nutrient broth

<sup>b</sup> : Tryptic soy broth

타낸 것이다. 50℃로 유지하였을 때 NB 배지와 TSB 배지에서 발아율은 거의 차이가 없었으나, 40℃ 이하로 유지했을 경우에는 TSB 배지에서 발아율이 매우 우수하였다. 고전압 펄스 전기장을 이용한 포자의 발아에 있어서 PEF 처리를 할 때 시료의 온도는, 포자 발아에 필요한 에너지를 부분적으로 공급하며 고전압 펄스 전기장이 포자에 좀 더 원활한 에너지를 공급할 수 있도록 도와주는 역할을 한다고 판단하였다.

그러나 주파수와 전극 간격이 포자 발아에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 판단되었다. 주파수와 전극 간격을 달리하여 총균수와 흡광도 변화를 관찰한 결과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 다만 전극 간격이 적은 처리 용기를 사용할 경우 높은 전기장을 형성하기에는 용이하였으나, 상대적으로 PEF 처리를 할 수 있는 시료의 양이 줄어들어 처리 시간이 길어지는 문제점이 발생하였다.

전기장의 세기와 처리시간에 따른 포자의 발아율은 Table 4-4~4-5에서 나타낸 것처럼 처리시간이 길수록, 전기장의 세기가 클수록 발아율이 증가하였다. NB 배지와 TSB 배지에서 발아율은 20 kV/cm, 1000  $\mu$ s로 처리했을 경우 각각 68.7%, 88.5%였다. 30 kV/cm의 전기장의 세기로 동일 시간 처리했을 경우의 발아율은 각각 90.4%, 95.5%, 40 kV/cm의 경우에는 각각 96.2%, 98.2%로 전기장의 세기가 증가할수록 포자의 발아율은 증가하였다. 그러나 30 kV/cm 이상의 전기장 세기로 처리했을 경우에는 큰 차이가 없었으며, 배지간의 발아율 차이도 줄어들었다. 즉, 전기장의 세기가 증가할수록 포자의 발아에 미치는 영향은 배지보다는 전기장의 세기가 더 크다는 것을 알 수 있다. 이런 현상은 처리 시간에 따른 발아율에서도 나타났다. 일반적으로 생육 세포의 불활성화 실험에서 전기장의 세기와 처리 시간이 증가함에 따라 살균율이 증가한다고 보고되고 있는데, 포자의 발아율(G) 역시 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 불활성화 실험에서 전기장의 세기와 처리 시간에 비례하여 살균율이 증가하는 것과는 달리, 포자 발아율의 경우에는 고전압 펄스 전기장의 처리 조건이 강화되더라도 2 log cycle 이상의 발아는 불가능하였다.

총균수의 측정이나 흡광도 감소 기울기를 통한 간접적인 포자 발아 현상

Table 4-4. Percentage of spore germination at various electric fields strength with PEF treatment of 1000  $\mu$ s

Electric fields strength (kV/cm)	% Germination (G)	
	NB	TSB
20	68.7	88.5
30	90.4	95.5
40	96.2	98.2

Table 4-5. Percentage of spore germination at various treatment time with PEF treatment of 20 kV/cm

treatment time ( $\mu$ s)	% Germination (G)	
	NB	TSB
250	37.1	60.8
500	53.8	77.8
1000	68.7	88.5
2000	78.2	91.5

을 직접 관찰하기 위하여, 20 kV/cm의 전기장의 세기로 1000  $\mu$ s 동안 PEF 처리를 한 포자를 각 배지에서 배양을 하면서 포자의 발아정도를 DIC condenser가 있는 광학 현미경으로부터 CCD camera를 이용하여 실시간으로 촬영하였다. Fig. 4-6의 A는 PEF 처리를 한 후 배양 직전에 촬영한 사진으로 포자가 발아하여 생육 세포로 되는 모습이 전혀 관찰되지 않았다. B~D는 각 배지에서 40분간 배양을 한 후 촬영한 사진으로, 0.85% NaCl 용액에서 배양한 사진 B의 경우는 영양분이 없기 때문에 생육 세포로 자라지 못하는 것이 A의 사진 내용과 거의 같음을 볼 수 있다. 그러나 NB 배지와 TSB 배지에서 배양한 포자는 C~D의 사진에서 나타나는 바와 같이 포자가 발아하여 생육세포로 outgrowth되었다. 특히 TSB 배지에서는 대부분의 포자가 발아한 것을 관찰할 수 있었다.

위의 모든 실험들을 종합적으로 고찰해볼 때 고전압 펄스 전기장에 의한 포자의 발아 현상을 확인할 수 있었으며, 매우 짧은 시간동안 2 log cycle 정도의 포자를 발아시킬 수 있었다.

### 3. 결 론

고전압 펄스 전기장에 의하여 포자를 효율적으로 불활성화 시키기 위하여 1차로 고전압 펄스 처리에 의하여 포자를 발아시키고, 발아된 생육 세포를 재차 고전압 펄스 처리하는 2단 처리법을 개발하기 위하여 고전압 펄스 처리가 포자의 발아에 미치는 영향을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 포자는 배양온도가 37°C일 때 발아율이 가장 높으며 37°C 이상에서는 온도가 증가함에 따라 발아율이 감소하였다. 또한 영양분이 없는 NaCl 용액에서는 포자는 발아하여 outgrowth되지 않았으며, nutrient broth보다 tryptic soy broth에서 발아율이 높았다. 또한 *B. subtilis* 포자 현탁액( $3 \times 10^7$  CFU/ml)을 고전압 펄스 처리하였을 때 전기장의 세기, 처리시간, 처리온도가 증가함에 따라 포자의 발아율도 증가하였다. 이 중에서도 전기장의 세기, 처리시간 영향을 주지 못했다. 40 kV/cm의 전기장의 세기로 포자 현탁액의 온도를 50°C로 유지하면서 1000  $\mu$ s 동안 고전압 펄스 전기장 처리를 하였을 때 98% 이상

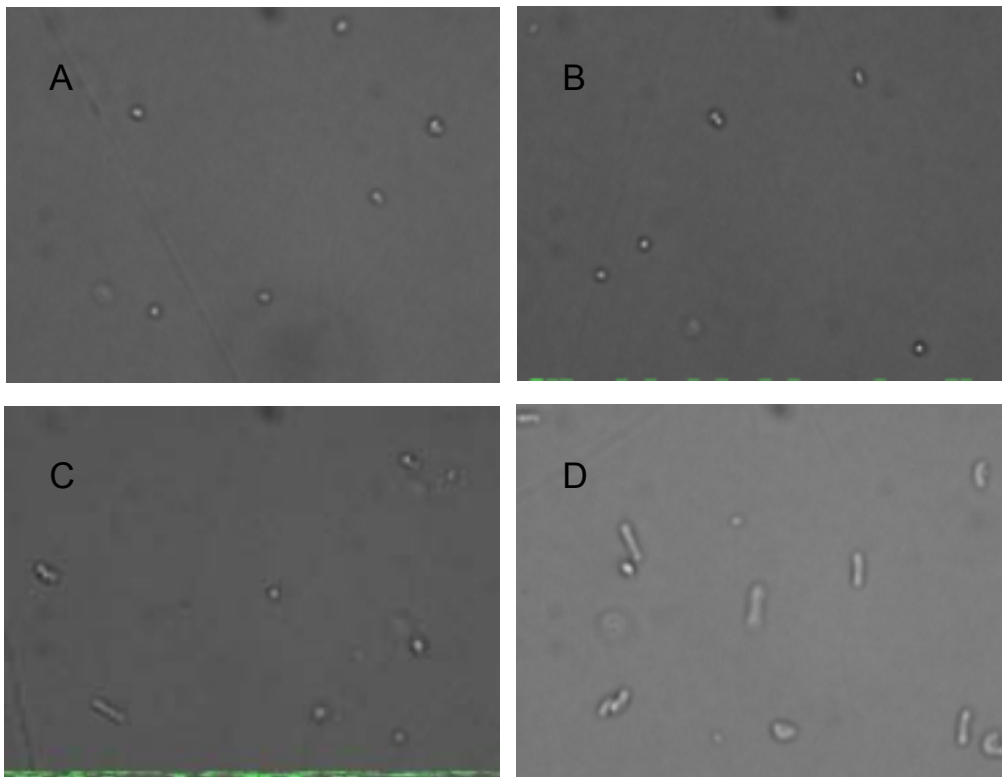


Fig. 4-6. Micrographs showing germination of PEF treated spores after incubation at 37°C for 40 min in various medium

A : 0.85% NaCl solution,

B : 0.85% NaCl solution after incubation

C : NB after incubation,

D : TSB after incubation



의 포자가 발아하였으며, image analyzer로 실시간으로 촬영한 현미경 사진을 통해서 고전압 펄스 전기장에 의한 포자의 발아 현상을 확인할 수 있었다.

## 제 2 항 고전압 펄스 전기장을 이용한 당근 주스의 살균

최근 소비자들의 건강과 천연 지향적인 가공 식품에 대한 선호가 증가함에 따라 야채 주스에 대한 관심이 높아지고 있다. 우리나라에서는 당근을 주로 생식용 또는 라면 스프용으로 이용하고 있었으나 최근에 주스로의 개발이 활발히 이루어지고 있다.

당근 주스의 제조 공정시 당근 주스의 고유의 pH가 6.1~6.5 정도의 중성 범위에 위치하기 때문에 매우 높은 온도에서 처리해야만 적절한 살균효과를 기대할 수 있다. 이러한 과도한 열처리 공정단계를 거치게 되면서 당근주스의 영양성분, 풍미 및 품질저하를 초래하게 된다. 또한 유통과정과 저장중의 유해미생물의 증식을 방지하기 위하여 pH를 4.0 이하로 낮추어서 시판하고 있다.

당근 속에 함유되어 있는 carotenoid는 물에는 녹지 않으나 지방이나 지용성 용매에는 잘 녹는다. 당근색은 노란색을 가진 carotenoid로서 모두 trans- $\beta$ -carotene의 형태를 가지며 공액 이중결합(conjugated double bond)이 당근 색소의 주된 원인이 된다. 가열, 산, 광선의 조사(irradiation)의 영향으로 일부 공액 이중결합이 cis-형으로 isomerize되는 경우가 많다. 이로 인해 vitamin A activity가 감소하고 color intensity도 감소한다.

Carotenoid는 isoprene unit가 8개가 결합하여 만들어진 isoprenoid polyenes이다. 기본구조에서 수소화, 환산화, 산화 또는 이들 과정의 조합으로 여러 carotenoid가 만들어진다. carotenoid의 구조에 따라 약간씩의 차이는 있지만 대체로 400~500 nm에서 최대 흡광도를 나타내며 최대 흡광도는 carotenoid의 함량을 측정하는 기준으로 사용된다. 특징적인 흡광 spectrum은 carotenoid의 conjugated polyene chain으로부터 나타나는데 이러한 흡광 성질 때문에 노란색, 오렌지색, 붉은색 등의 색깔을 나타내기도 한다, 현재 채소 주스의 가공에서 가장

문제가 되는 것은 열처리로 인한 유효 성분들의 파괴, 기호성분의 변화, 부유물의 생성 등이다. 하지만 열처리를 하지 않을 경우 미생물을 제거하기 어려워 저장에 곤란하다. 지금까지 채소 또는 과일 주스의 보편적인 살균과정은 ascorbic acid를 적게 파괴하게 하면서 미생물을 많이 사멸시킬 수 있는 96℃에서 15초간 (D-value)의 열처리이나 이러한 열처리는 주스의 신선도를 저하시킨다. 최근 한외여과를 이용하여 고온살균 과정에서 야기되는 향미의 손실과 ascorbic acid와 같은 영양성분의 파괴를 감소시킴과 동시에 미생물을 제거함으로써 주스의 저장성을 향상시키는 방법이 보고되고 있다. 현재 시중에 유통되고 있는 채소와 과일을 혼합한 혼합 주스의 문제점은 성분상호간의 반응으로 인한 색의 변화와 저장 중 기호 성분간의 불안정성이다. 특히 사과, 토마토, 당근, 수박의 산화를 막기 위해서 첨가되는 항산화제에 의해서 pH가 떨어져서 오히려 녹색채소의 chlorophyll이 pheophytin으로 되어 저장성을 더 떨어뜨리는지도 모른다.

본 연구에서는 당근 주스의 신선도와 고유의 맛을 유지하면서 장기간 보관하기 위한 방법을 개발하기 위하여 기존의 당근 주스와 제조한 당근 주스를 특수 제작한 용기에 통과시키면서 고전압 펄스 전기장 처리를 하여 미생물을 사멸시킬 수 있는 최적 처리조건을 연구 검토하였으며, 특히 품질에 영향을 주지 않을 정도인 60 ℃ 이하의 온도에서 고전압 펄스 전기장과 열병합 처리효과, pH병합 처리효과, 식품학적 품질평가를 연구하였다. 또한 PEF 처리한 당근 주스의 저장성을 검토하였다. 결국 본 연구의 목적은 고전압 펄스 전기장 처리에 의하여 당근 주스의 비열 살균 방법을 제시하는 것이다.

## 1. 실험 재료 및 방법

### 1.1. 실험 재료

당근 주스는 시중에서 유통되고 있는 G사의 제품을 구입하여 사용하였다. 시험 균주로는 *Escherichia coli* ATCC 10536를 사용하였으며, nutrient broth(Difco, USA)를 사용하여 37℃에서 12시간 전배양한 배양액을 500ml 배지에

2%(v/v) 접종한 후 37℃에서 150rpm으로 12시간 동안 진탕 배양하였다. 균체 배양액을 4000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 생리 식염수로 2회 세척하고 구입한 당근 주스에 초기 균수가  $10^8$ cfu/ml가 되게 재현탁하여 실험에 사용하였다. 균체 배양액 시료는 매번 동일 조건에서 새로이 배양하여 사용하였다.

## 1.2. 당근 주스의 제조

제주도에서 과종되어 재배된 흙당근을 구입하여 표면에 상처가 없는 신선한 당근을 선별하여 당근주스 제조에 사용하였다. 구입한 당근을 흐르는 물로 수분간 세척한 후 박피기로 껍질을 벗겨내고 작은 조각으로 조각 낸 후 쥬서기 (MC-901, Samsung Co., Korea)를 사용하여 착즙하였다.

## 1.3. 생균수의 측정

PEF 처리전후의 생균수를 pour plate method로 측정하여, cfu/ml로 나타내었다. 생균수를 측정할 때 한천 평판상의 colony수가 30~200개가 나오도록 희석하였으며, 각 희석배수에서 3번 반복하여 측정하였다. 효모와 곰팡이는 potato dextrose agar(Difco, USA)에서 triple test로 30℃에서 3일간 배양하였다. 총 세균수는 plate count agar(Difco, USA)에서 역시 triple test로 37℃에서 3일간 배양한 후 균수를 측정하였다.

## 1.4. 품질 평가

### 1.4.1. pH

pH는 pH meter(model 520A, Orion, USA)로 상온에서 세 번 반복하여 측정하여 평균치를 구하였다.

### 1.4.2. 가용성 고형분(。 Brix)

가용성 고형분(soluble solid)은 당도계(Hand refractometer, model N-1E, range : 0~32%, Atago, Japen)를 이용하여 상온에서 측정하였다.

#### 1.4.3. 적정 산도

당근 주스의 적정 산도는 약 2g의 시료에 10ml의 증류수를 가한 후 0.1N NaOH로 적정하여 사과산(%)으로 나타내었다.

$$\% \text{Titrateable acidity} = \frac{(\text{ml NaOH})(\text{Normality of NaOH})(0.067)(100)}{\text{Weight of sample(g)}}$$

#### 1.4.4. 색도 측정

당근 주스의 색도는 헌터 체계(Hunter system)에 따르는 색차계(color and color difference meter, Chromometer CR 200, Minolta Co., Japan)를 이용하여 L(명도), a(적녹도), b(황청도) 값을 3회 반복 측정하여 평균치를 구하였다.

#### 1.5. $\alpha$ - $\beta$ -Carotenes의 분석

$\alpha$ -와  $\beta$ -carotenes 함량은 HPLC법에 의하여 분석하였다. 250ml separation funnel에 당근 주스 4ml, 추출 용액(hexane:acetone:absolute alcohol:toluene = 10:7:6:7 v/v/v/v) 30ml와 40% methanolic KOH 6ml를 넣은 후 1분간 흔들어 준 다음 16시간동안 암실에서 saponification을 하였다. 30ml 핵산과 동량의 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣고 1분간 흔들어 준 다음 두층이 분리될 때까지 암실에 넣어 두었다. 윗층에 carotenoids가 함유되어 있기 때문에 진공 증발 농축기를 이용하여 건조시킨 후에 10ml의 methanol과 methylene chloride 혼합 용액(45:55 v/v)으로 다시 용해시켜서 0.2 $\mu$ m membrane filter로 여과 한 후 HPLC 분석용 시료로 사용하였다.

HPLC 시스템은 Waters사의 Model M-45 solvent delivery system과 Hewlett Packard사의 Model 3396 SERIES intergrator, Young In사의 Model M720 Absorbance Detector, Capcell pak C<sub>18</sub> column(Shiseido, 4.6 $\times$ 250mm)로 구성되어 있다. 검출 파장은 450nm였으며 이동상은 acetonitrile : methanol : acetone (40:40:20)이며, 유속은 1.5ml/min이었다. 검량선은 Sigma사의  $\alpha$ -(type V),  $\beta$

-(typeIV) carotene을 구입하여 methanol과 methylene chloride 혼합 용액(45:55 v/v)에 일정량을 용해시켜 HPLC로 분석하여 피크면적으로 작성하였다.

## 1.6. 저장성 평가

PEF 처리구와 열처리구, 열병합 PEF처리구, 무처리구, 기존 열처리구를 4°C와 25°C에 저장하면서 저장 기간 동안의 pH와 Brix(%), 적정 산도, 색도,  $\alpha$ - $\beta$ -carotenes, 생균수를 관찰하였다.

## 2. 실험 결과 및 고찰

### 2.1. 실험실 규모의 PEF 살균 효과

#### 2.1.1. 전기장의 세기 및 처리 시간에 따른 당근 주스의 PEF 살균

일반적으로 PEF 처리에 의하여 미생물을 불활성화시킬 때 영향을 주는 인자는 전기장 세기(E)와 처리 시간으로서 특히 전기장 세기가 큰 영향을 미친다고 보고되었으며, 미생물의 크기가 클수록 그 효과는 큰 것으로 알려져 있다. 이는 세포막의 전위차(transmembrane potential)가 미생물의 크기가 증가함에 따라 커져서 미생물의 불활성화가 증대되는 것으로 설명하고 있다. 전기장 세기가 당근 주스의 살균에 미치는 효과를 검토하기 위하여, 시판 당근 주스에 *Escherichia coli* (ATCC 10536)가  $1 \times 10^8$  cfu/ml되게 접종하여서 특수 제작한 회분식 PEF 용기에 넣고 상온에서 펄스수는 8~256회로 하고 각각 전기장 세기를 변화시키면서 실험하였다(Fig. 4-7). 이때 사용된 펄스는 exponential decay pulse이었고, 펄스폭은  $0.8 \mu s$ 이었다.  $\log S = B_E(E - E_C)$ 을 이용하여 당근 주스가 살균되기 시작하는 최소 전기장 세기인 임계 전기장 세기( $E_C$ )를 외삽한 결과 11.74 kV/cm였다. 이 이상의 전기장 세기에서는 전기장의 세기가 증가할수록 지수적으로 살균 효과는 증가하였으며 40 kV/cm의 전기장 세기에서는 약 4 log 정도의 살균 효과를 나타내었다.

처리 시간에 따른 *E. coli*의 불활성화를 살펴보면 다음과 같다(Fig. 4-8).

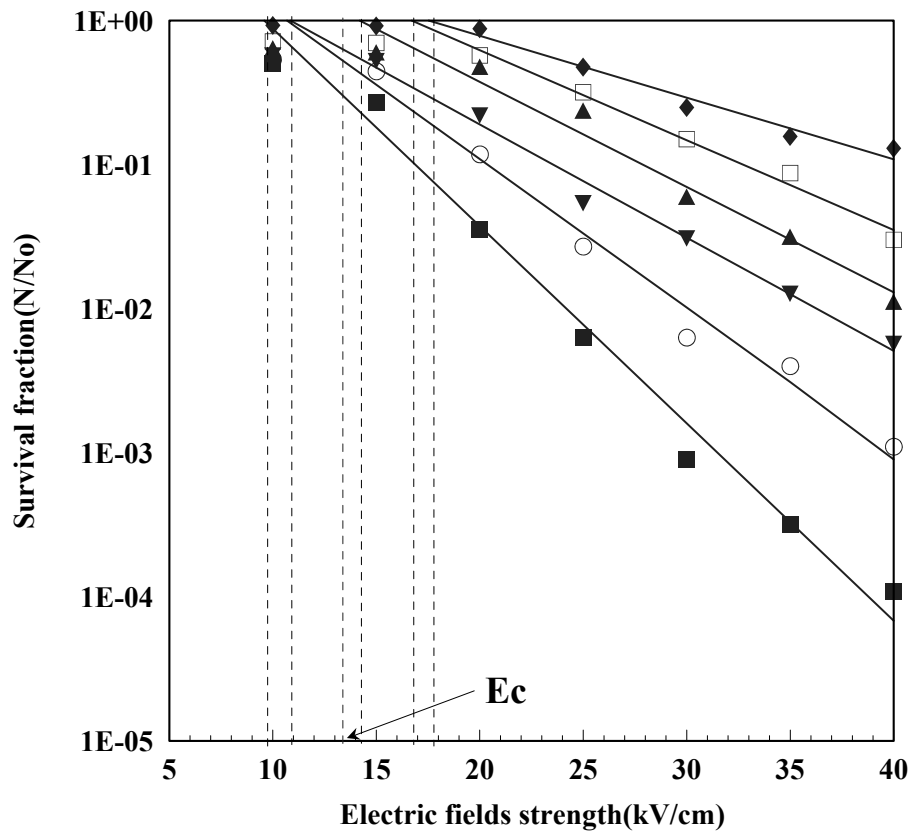


Fig. 4-7. Effect of electric field strength( $E$ ) on inactivation of *E. coli* suspended in carrot juice by pulsed electric field ( $0.8\mu s$  pulse width) treatment at room temperature.

Pulse number	8	◆	16	□	32	▲
	64	▼	128	○	256	■

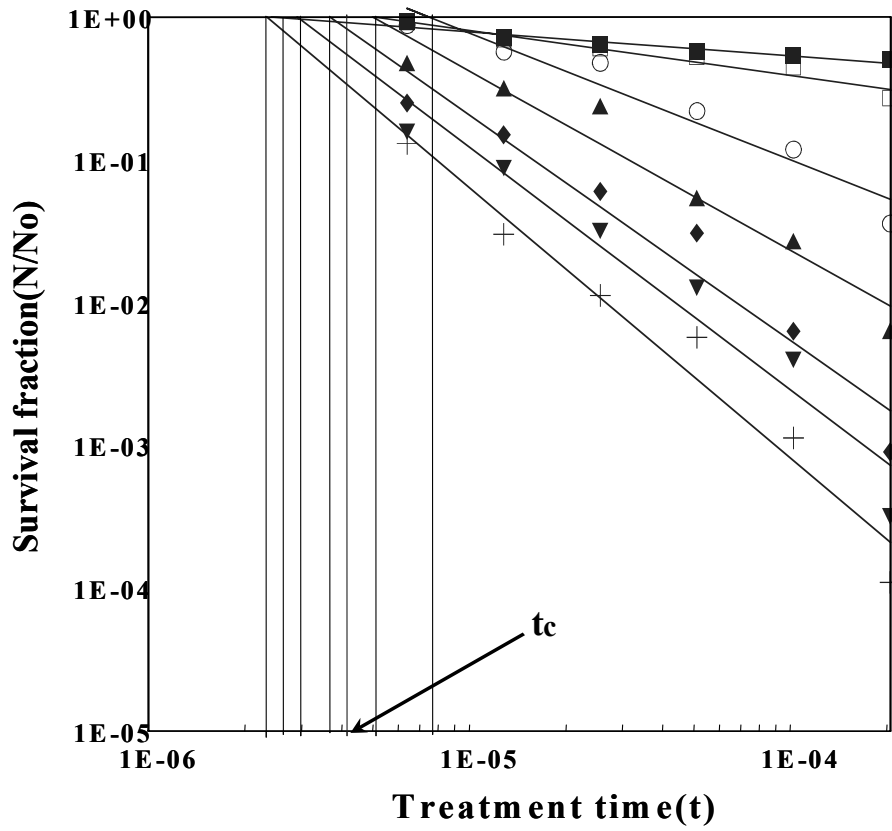


Fig. 4-8. Effect of treatment time( $\mu\text{s}$ ) on inactivation of *E. coli* suspended in carrot juice by pulsed electric field ( $0.8\mu\text{s}$  pulse width) treatment at room temperature.

- |           |           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ■ 10kV/cm | □ 15kV/cm | ○ 20kV/cm | ▲ 25kV/cm |
| ◆ 30kV/cm | ▼ 35kV/cm | + 40kV/cm |           |

그 결과 전기장의 세기 40 kV/cm, 처리시간 204.8  $\mu$ s에서 약 4 log 정도의 살균 효과를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 처리 시간과 전기장의 세기를 높일수록 살균 효과는 증대된다. 또한 처리 중에는 당근 주스의 온도가 거의 변화가 없어서 열에 의한 살균은 전혀 일어나지 않았다. Jayaram등은 처리시간의 영향을 검토한 결과 survivor fraction ( $\log(N/N_0)$ )은 처리 시간에 비례한다고 보고하였다. 본 연구에서도  $\log(N/N_0)$ 와  $\log T$ 는 직선적으로 감소하여  $\log S = B_t \log(T/T_c)$ 에 적용하여 임계 처리 시간  $T_c$ 를 구한 결과 3.6 $\mu$ s였다.

### 2.1.2. 처리 온도에 따른 당근 주스의 PEF 살균

PEF 처리에 의한 미생물의 불활성화 연구에서 전기장 세기 및 처리 시간이 중요한 인자이지만, 이외에 pH와 처리온도 등을 병합하여 처리하여 그 효율을 높이는 연구가 보고되고 있다. pH의 경우 알칼리보다는 산성에서, 그리고 온도는 증가될수록 그 효과가 증가된다. 본 실험에서도 처리 온도의 효과를 보기 위하여 전기장 세기는 22.5 kV/cm로 처리 시간은 204.8  $\mu$ s로 각각 고정시키고, 열에 의한 치사 효과를 배제하기 위하여 처리 온도를 치사 온도 이하인 10, 20, 30, 40, 50 $^{\circ}$ C로 변화시키면서 PEF 처리를 하여 *E. coli*의 살균효과를 측정하였다(Fig. 4-9). 일반적으로 온도가 증가하면 전기 전도도가 증가하여 저항이 낮아지므로 전기장의 세기가 낮아지게 된다. 전기장의 세기를 비교적 낮은 22.5 kV/cm로 정한 이유도 50 $^{\circ}$ C에서 PEF장치가 안전하게 작동할 수 있는 최고 전압이었기 때문이다. 이때 사용된 펄스는 exponential decay pulse이었고, 펄스폭은 0.8 $\mu$ s이었다. 그 결과 온도가 상승함에 따라 생존율이 감소하여 50 $^{\circ}$ C, 204.8 $\mu$ s 처리 시에 6 log까지 생존수가 감소되었다. 이는 온도 증가에 따라 균체 사멸속도가 증가된 다른 보고와 동일한 결과로 PEF 처리 시에 온도 처리를 병합함으로써 미생물의 불활성화 정도를 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다. 또한 이러한 사멸 효과가 열에 의한 것이 아닌지 검증하기 위하여 PEF 처리를 하지 않고 같은 시간 동안 순수하게 열처리만 한 결과, 50 $^{\circ}$ C에서도 거의 균수가 줄어들지 않았다. 처리 시료 온도는 균체막의 유동성에 큰 영향을 미치므로 저온에서는 세포막의 인지질은 밀접하게 충전된 rigid



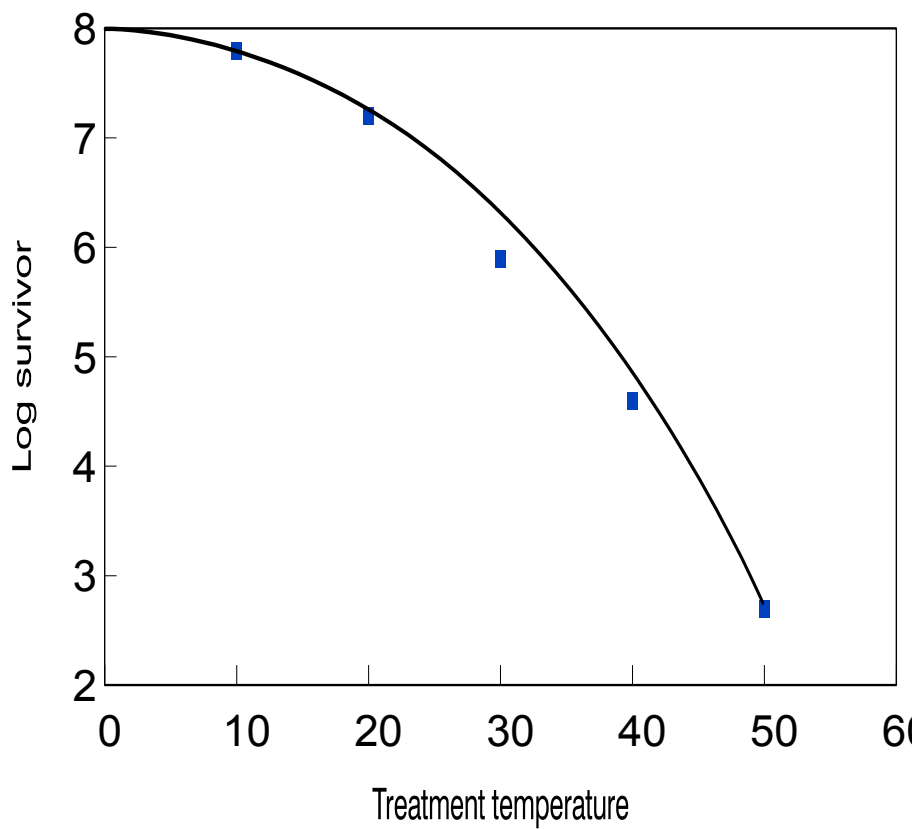


Fig. 4-9. High kill levels of *E. coli* suspended in carrot juice by the combined treatment with heating and PEF

Electric field strength : 22.5 kV/cm, pulse period : 2 sec

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. 고온에서 세포막의 이와 같은 변화는 고전압 전기장에서는 세포막 지질층의 구조적 변화를 촉진하여 결과적으로 비가역적 전기적 파괴를 가져오고 따라서 osmotic shock을 받아서 세포의 사멸이 촉진된다.

### 2.1.3. 식품학적 품질 평가

#### 2.1.3.1. pH, 가용성고형분(° Brix), 적정산도의 변화

처리하지 않은 시판 주스를 control로 하고 실온에서 PEF처리 주스, 50℃ 열병합 PEF처리 주스, 50℃ 열처리 주스의 pH, 가용성고형분(° Brix), 적정 산도를 측정된 결과는 Table 4-6과 같다. 무처리 주스의 pH는 4.30이었고 처리 시료들도 pH의 변화가 없었다. 50℃ 열처리 당근 주스만이 pH가 0.05 정도 증가되는 경향을 보였다. 가용성 고형분(° Brix)은 control이 10이고 다른 처리구들은 9.8로 거의 변화가 없었는데 이는 PEF 처리와 저온 열처리에 의한 당과 아미노산의 용출 유실이 없는 것으로 추정된다.

적정 산도는 control이 0.469이었으며 다른 처리구들도 거의 변화가 없었다. 열병합 PEF처리는 당근 주스의 pH, 가용성 고형분(° Brix), 적정 산도를 변화시키지 않는다는 것을 알 수 있었다.

#### 2.1.3.2. 색도 변화

시판 주스를 control로 하고 실온에서 PEF처리 주스, 50℃ 열병합 PEF처리 주스, 50℃ 열처리 주스의 명도(L값), 적녹도(a값), 황청도(b값)를 측정된 결과는 Table 4-7과 같다. 명도는 모든 처리구들이 거의 비슷하였으나 50℃ 열병합 PEF처리 주스만이 약간 낮았다. 적녹도와 황청도는 모두 비슷하였다. Chen등은 가열 살균에서의 당근 주스의 색도 변화를 관찰한 결과 열처리한 당근 주스가 많은 색도

Table 4-6. Effects of PEF treatment on pH, ° Brix, titratable acidity of carrot juice.

Sample	pH	° Brix	Titratable acidity(%)
Control <sup>a</sup>	4.3	10	0.469
PEF	4.31	9.8	0.458
PEF + 50°C	4.32	9.8	0.464
Heating 50°C	4.35	9.8	0.462

<sup>a</sup> Untreated carrot juice

Electric field strength = 22.5 kV/cm, Treatment time = 204.8 $\mu$ s

Table 4-7. Effects of PEF treatment on color of carrot juice.

Sample	Color		
	L	a	b
Control <sup>a</sup>	12.63	+20.06	+21.68
PEF	12.81	+20.04	+22.01
PEF + 50°C	12.53	+19.92	+21.56
Heating 50°C	12.62	+19.93	+21.71

<sup>a</sup> Untreated carrot juice

Electric field strength : 22.5 kV/cm, Treatment time : 204.8 $\mu$ s

변화를 보였음을 보고하였다. 따라서 PEF처리는 가열 살균 당근 주스보다 색도를 변화시키지 않는다는 것을 알 수 있다.

### 2.1.3.3. $\alpha$ - $\beta$ -carotenes의 함량 변화

시판 주스를 control로 하고 실온에서 PEF 처리 주스, 50℃ 열병합 PEF 처리 주스, 50℃ 열처리 주스의  $\alpha$ - $\beta$ -carotenes 함량을 측정된 결과는 Table 4-8과 같다. 모든 처리구들이 control과 비교하여 볼 때 약간의 감소를 보이고 있지만 함량의 변화는 거의 관찰되지 않았다.  $\alpha$ -Carotene에 경우 제일 손실이 많았던 것은 50℃ 열처리 당근 주스로 약 0.1 RE/ml의 감소를 보였다.  $\beta$ -Carotene도 제일 손실이 많았던 것은 50℃ 열처리 당근 주스로 약 1.04 RE/ml의 감소를 나타냈다. Chen등이 가열처리한 당근 주스의  $\alpha$ - $\beta$ -carotenes 함량을 분석한 결과, 무처리구에 비해 많은 감소가 일어나는 것을 볼 수 있었다. 이와 같은 결과로 볼 때 PEF처리는 당근 주스의 영양 성분인  $\alpha$ - $\beta$ -carotenes의 함량 변화를 일으키지 않는다는 것을 알 수 있었다.

## 2.2. Pilot 규모의 PEF 살균 효과

### 2.2.1. 전기장의 세기 및 처리 시간에 따른 당근 주스의 PEF 살균

고전압 펄스 전기장에 의한 미생물의 치사 효과에 미치는 가장 직접적인 영향인자는 전기장의 세기와 처리 시간(펄스수×펄스폭)이다. 시판 당근을 구입하여 직접 착즙한 당근 주스를 특수 제작한 연속식 PEF 처리용기에서 1 $\mu$ s의 펄스폭을 갖는 50~70kV/cm의 square wave pulse를 frequency 1500Hz에서 flow rate 1ml/s에 속도로 1~3회 recycle를 시키면서 전기장을 가한 결과는 다음과 같다(Fig. 4-10, 4-11). 연속식 chamber는 각각의 volume이 0.00663ml이고 전극의 간격은 2mm인 것을 7개를 연속식으로 처리되도록 제작하였다. 제조한 당근 주스의 초기 총균수는  $5.0 \times 10^5$  cfu/ml이고 효모 및 곰팡이 수는  $7.0 \times 10^4$  cfu/ml이었다. 70kV/cm, 198.45 $\mu$ s의 고전압 펄스 처리 후 총균수는 4 log 이상 감소하였고 효모 및 곰팡이

Table 4-8.  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene contents and vitamin A activities of the carrot juices by HPLC.

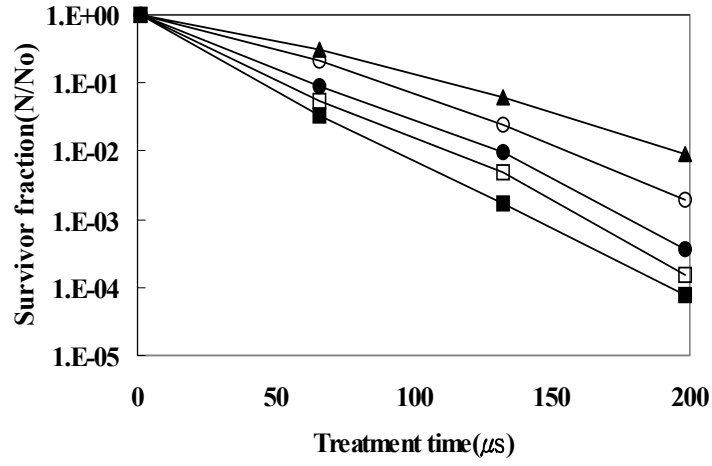
Carotene content	Treatment			
	control <sup>c</sup>	PEF	PEF+50°C	Heating 50°C
$\alpha$ -carotene( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	30.27	30.11	29.62	29.08
(RE/ml) <sup>a</sup>	2.51	2.50	2.46	2.41
$\beta$ -carotene( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	65.65	65.21	61.11	59.40
(RE/ml)	10.96	10.89	10.20	9.92
Vitamin A content <sup>b</sup> (RE/ml)	13.47	13.39	12.66	12.33

<sup>a</sup> RE represents retinol equivalent

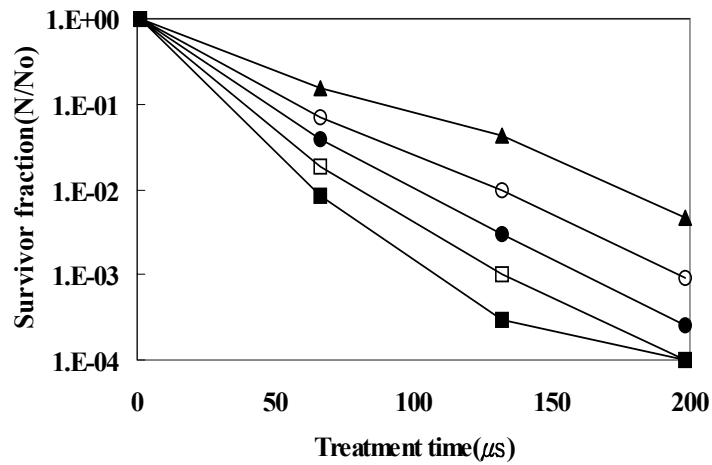
<sup>b</sup> Vitamin A contents from  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene

<sup>c</sup> Untreated carrot juice

Electric field strength : 22.5 kV/cm, Treatment time : 204.8 $\mu\text{s}$



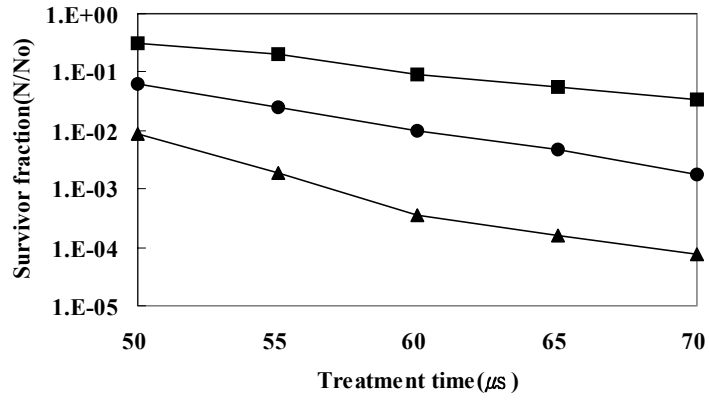
(a) Total aerobics



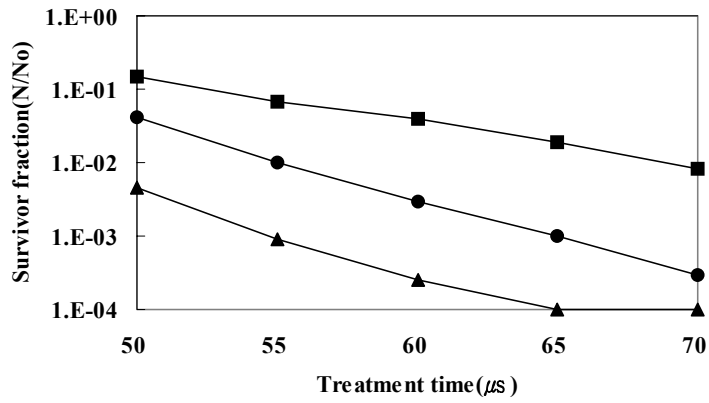
(b) Yeasts & molds

Fig. 4-10. Effect of electric field strength on inactivation of microorganisms in carrot juice by using square wave pulses at room temperature.

▲ 50kV/cm ○ 55kV/cm ● 60kV/cm □ 65kV/cm ■ 70kV/cm



(a) Total aerobics



(b) Yeasts & molds

Fig. 4-11. Effect of treatment time on inactivation of microorganisms in carrot juice by using square wave pulses at room temperature.

■ 66  $\mu s$  ● 132  $\mu s$  ▲ 198  $\mu s$



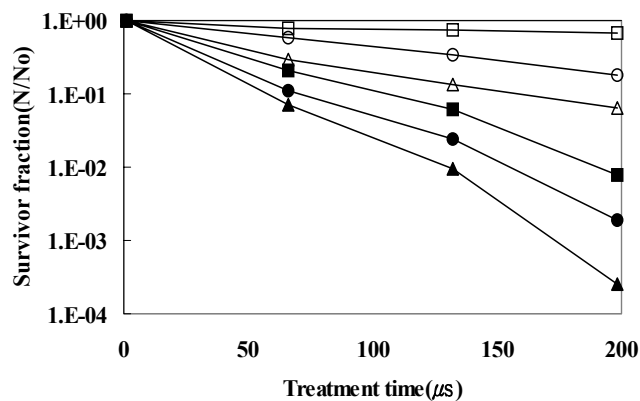
는 완전히 멸균되었다. 전기장의 세기와 처리 시간이 증가할수록 살균 효과가 증가함을 알 수 있었고 처리 중 당근 주스의 온도는 거의 변화가 없어서 열에 의한 살균은 전혀 일어나지 않았다.

### 2.2.2. Square wave pulse와 exponential decay pulse의 살균 효과 비교

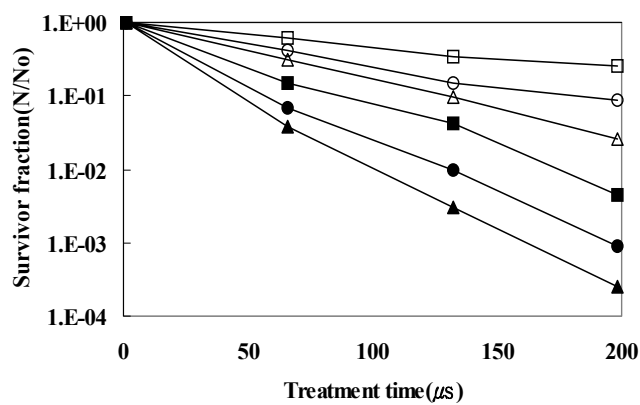
앞서 서론에서 언급한 바에 의하면 square wave pulse는 system의 에너지가 열로 전환되는 것을 최소화할 수 있기 때문에 미생물의 불활성화에 있어서 exponential decay pulse보다 더 효과적이다. 전기장의 세기는 50~60kV/cm로 하고 연속 처리 용기에서 1ml/sec의 flow rate으로 제조한 당근 주스를 흘려 보내면서 frequency 1500Hz로 처리 시간을 66~198 $\mu$ s까지 달리하여 동일한 처리 조건으로 pulse의 모양에 따른 살균 효과의 차이를 조사하였고 착즙 후 당근 주스의 pH는 6.25이고 시판 당근 주스의 pH는 4.25이므로 각각의 조건에서 실험하였다. pH 6.25에서 60kV/cm, 198 $\mu$ s 처리시 총균수와 효모 및 곰팡이 수는 각각 2.0 log cycle 이상의 차이를 보여 처리 시간이 길어질수록 square wave pulse를 이용한 PEF 살균 효과가 exponential decay pulse 보다 더 우수함을 알 수 있었다(Fig. 4-12). pH 4.25에서 55kV/cm, 132 $\mu$ s 처리시 효모 및 곰팡이는 square wave pulse에서 멸균이 되었지만 exponential decay pulse에서는 1.5 log cycle만 감소하였다. 총균수는 60kV/cm, 198 $\mu$ s 처리시 2 log cycle 이상의 살균 효과가 square wave pulse가 더 우수하였다(Fig. 4-13). Zhang등은 *S. cerevisiae*를 이용하여서 동일한 전기장의 세기와 처리 시간을 가지고 square wave pulse와 exponential decay pulse의 살균 효과를 비교한 결과 1 log cycle 이상의 살균 효과가 square wave에서 더 높게 나왔다. 이러한 결과를 보았을 때 exponential decay pulse보다 square wave pulse를 사용하는 것이 pilot system에서 더 효율적이고 pH는 낮추어서 병합 처리하는 것이 더 효율이 높은 살균 방법인 것을 알 수 있었다.

### 2.2.3. 온도 및 pH 변화에 따른 PEF 살균

고전압 펄스 전기장에 의한 미생물의 불활성화에 미치는 또 다른 인자는



(a) Total aerobics



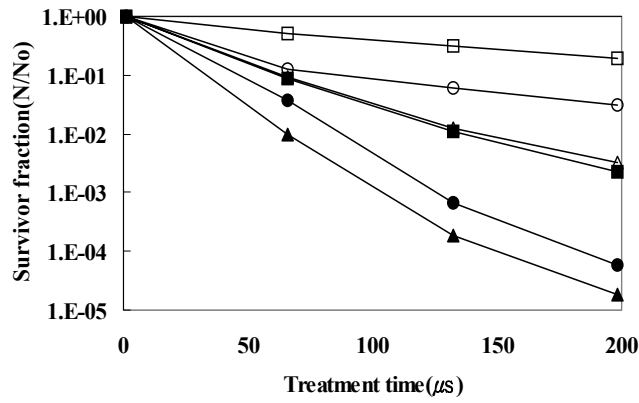
(b) Yeasts & molds

Fig. 4-12. Survival fraction of microorganisms in carrot juice at pH 6.25 after pulsed electric field treatment using exponential and square wave pulses.

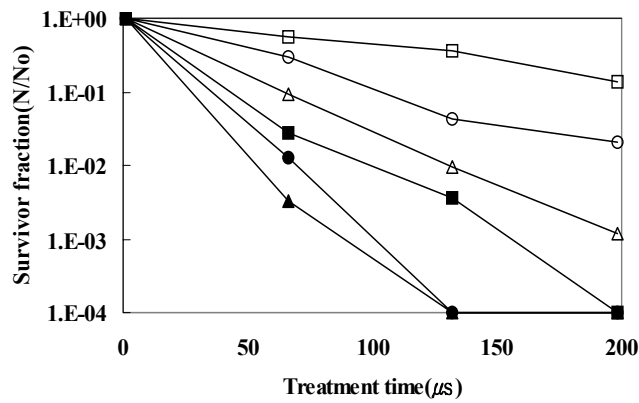
opened, Exponential decay pulse; closed, Square wave pulse

■ 50kV/cm ● 55kV/cm ▲ 60kV/cm

□ 50kV/cm ○ 55kV/cm △ 60kV/cm



(a) Total aerobics



(b) Yeasts & molds

Fig. 4-13. Survival fraction of microorganisms in carrot juice at pH 4.25 after pulsed electric field treatment using exponential and square wave pulses.

opened, Exponential decay pulse; closed, Square wave pulse

■ 50kV/cm ● 55kV/cm ▲ 60kV/cm

□ 50kV/cm ○ 55kV/cm △ 60kV/cm

미생물이 포함되어 있는 매질의 온도이다. 일반적인 시판 당근 주스는 blanching 후에 105℃에서 1min간 가열 살균을 실시한다. 따라서 품질에 영향을 주지 않을 정도의 저온인 50℃ 이하의 온도에서 저온 가열 살균과 PEF 처리의 병합 효과를 조사하였고 pH 변화에 따른 살균 효과도 병합하여 실험하였다. 지금까지는 PEF에 관련된 연구 중 온도에 관한 연구는 있었지만 pH에 따른 영향을 연구한 문헌은 거의 없었다. 따라서 본 연구에서는 pH와 온도에 따른 PEF 처리가 비열 살균에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보았다. Square wave pulse를 이용하여, 전기장의 세기는 55kV/cm, pulse width 1 $\mu$ s, frequency 1500Hz, flow rate 2 ml/sec로 하고 처리 온도는 20, 30, 40, 50℃로 하고 각각 pH를 3.25, 4.25, 5.25, 6.25에서 1 cycle로 연속적으로 실험하였다. 일반적으로 온도가 증가하면 전기 전도도가 증가하여 저항이 낮아지므로 전기장의 세기가 낮아지게 된다. 전기장의 세기를 55kV/cm로 정한 이유도 50℃에서 안전한 최고 전압이었기 때문이다. 한편, 온도가 높아지면 세포막의 유동성이 증가해서 세포막이 더 잘 수축되므로 고전압 펄스에 의한 세포막의 파손이 더 쉽게 일어난다. Table 4-9는 제조한 당근 주스를 앞서 말한 조건으로 처리한 결과를 나타낸 것이다. pH 5.25, 6.25에서 20℃로 처리한 결과만 2 log 정도의 효모 및 곰팡이가 관찰되었을 뿐 나머지 조건에서는 모두 사멸되었다. 따라서 pH 병합 효과만으로도 효모 및 곰팡이는 저온인 20℃에서도 멸균을 시킬 수 있었다. 또한 이러한 사멸 효과가 열에 의한 것이 아닌지 검증하기 위하여 PEF 처리를 하지 않고 같은 시간 동안에 순수하게 열처리만 한 결과, 60℃에서도 거의 균수가 줄어들지 않았다. 총균수는 pH 4.25에서 50℃에서도 멸균되었다(Fig. 4-14). 이로서 pH 4.25와 50℃ 조건에서 당근 주스의 살균이 가능한 것을 알 수 있었고 처리 온도 및 pH가 당근 주스의 PEF 살균에 매우 큰 영향을 미치는 인자라는 사실을 알 수 있었다.

#### 2.2.4. PEF 처리한 당근 주스의 저장성 평가

신선한 당근을 구입하여 당근 주스를 제조한 다음, 무처리 sample, pH 4.25 sample, pH 4.25와 열처리, pH 4.25에서 PEF처리, pH 4.25에서 PEF와 열 병

Table 4-9. Effect of treatment temperature & pH on survival fraction of yeasts & molds in carrot juice (electric field strength : 55kV/cm, pulse width : 1 $\mu$ s, frequency : 1500Hz, treatment time : 131 $\mu$ s).

Temperature( $^{\circ}$ C)	Viable cell(cfu/ml)			
	pH 3.25	pH 4.25	pH 5.25	pH 6.25
20	n.d. <sup>a</sup>	n.d.	6.90 $\times$ 10 <sup>1</sup>	2.45 $\times$ 10 <sup>2</sup>
30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup>: not detected

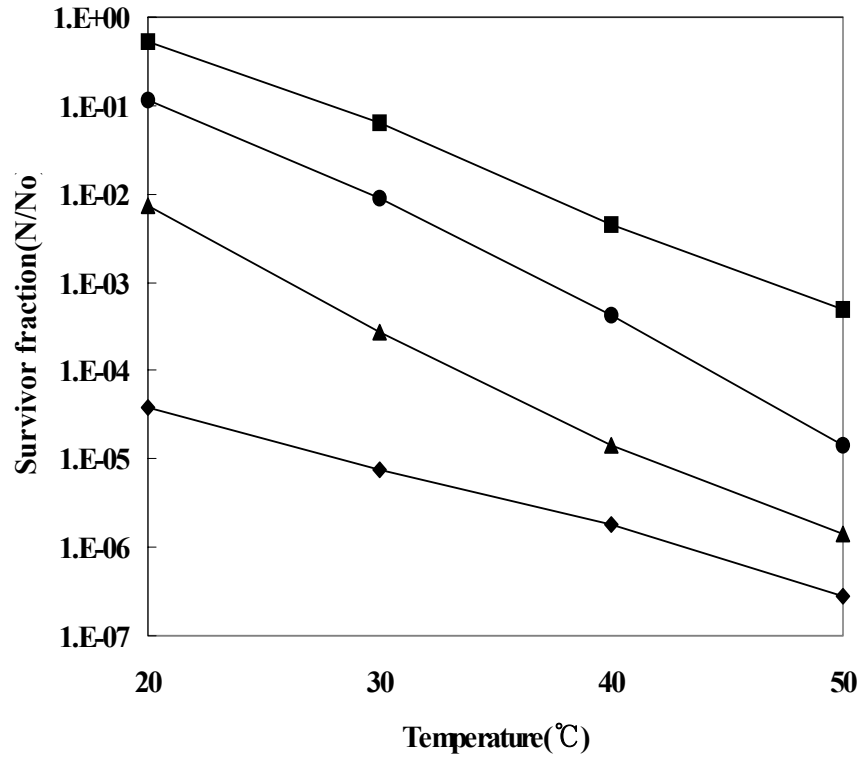


Fig. 4-14. Effect of treatment temperature & pH on survival fraction of total aerobics in carrot juice (electric field strength : 55kV/cm, pulse width : 1 $\mu$ s, frequency : 1500Hz, treatment time : 131 $\mu$ s).

■ pH 6.25 ● pH 5.25 ▲ pH 4.25 ◆ pH 3.25

합처리, 기존의 열처리 당근 주스로 구분해서 각각 4, 25℃에서 4일 간격으로 실험하였다. PEF처리 조건은 전기장의 세기 55kV/cm, pulse width 1 $\mu$ s, frequency 1500Hz, flow rate 2 ml/sec, treatment time 132 $\mu$ s로 하였고 pH 조절은 1N citric acid 용액으로 하였다. 기존의 열처리 조건은 peeling→trimming→blanching→착즙→살균(105℃, 1min)이었다.

#### 2.2.4.1. pH

저장 기간 동안에 4℃에서는 모든 sample이 거의 pH를 유지하였지만 무처리 sample은 8일째부터 pH가 낮아져서 28일에는 4까지 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4-15). 이것은 무처리 sample에 있는 효소나 미생물 등에 작용으로 acid가 형성이 되어서 품질에 나쁜 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었다. 25℃에서는 모든 sample의 pH가 낮아지는 것을 관찰 할 수 있었는데 다만 pH 4.25에서 PEF와 열 병합처리한 것이 가장 낮은 변화를 보여서 PEF 처리가 저장 기간 동안에 pH 변화를 일으키지 않는 것을 알 수 있었다(Fig. 4-16).

#### 2.2.4.2. 가용성 고형분(。Brix)

4℃에서는 모든 sample들이 변화가 없었다(Fig. 4-17). 따라서 당근 주스는 저온 유통시 가용성 고형분들의 변화가 없다는 것을 알 수 있었다. 25℃에서는 변화폭이 무처리 sample이 가장 커서 28일 후에는 50%가 감소되는 것을 알 수 있었고 가시적으로도 층분리 현상을 볼 수 있었다(Fig. 4-18). 또한 기존의 열처리 방식의 당근 주스도 적은 양의 손실을 볼 수 있었는데 가장 손실이 적고 품질이 유지된 sample은 pH 4.25에서 PEF와 열 병합처리한 것이었다.

#### 2.2.4.3. 적정 산도(Titratable acid)

저온 저장 온도인 4℃에서는 적정 산도의 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 4-19). 가용성 고형분과 마찬가지로 적정산도도 저온 유통하에서는 변화가 생기지 않는다는 것을 알 수 있었다. 상온인 25℃에서는 약간의 적정 산도의 상승이 있었

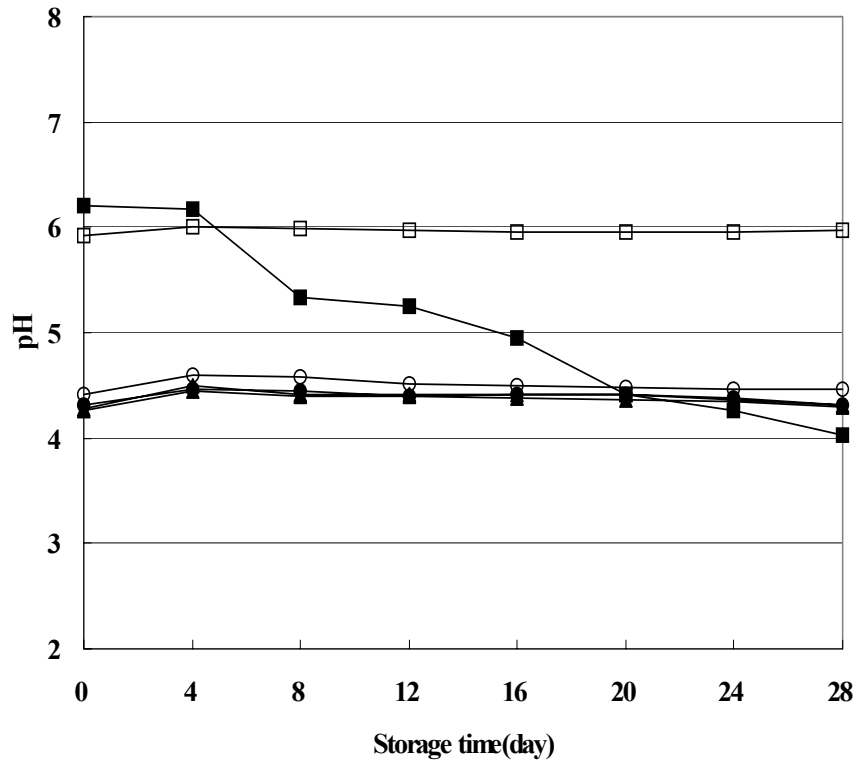


Fig. 4-15. Changes in pH of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 4°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1 $\mu$ s

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice



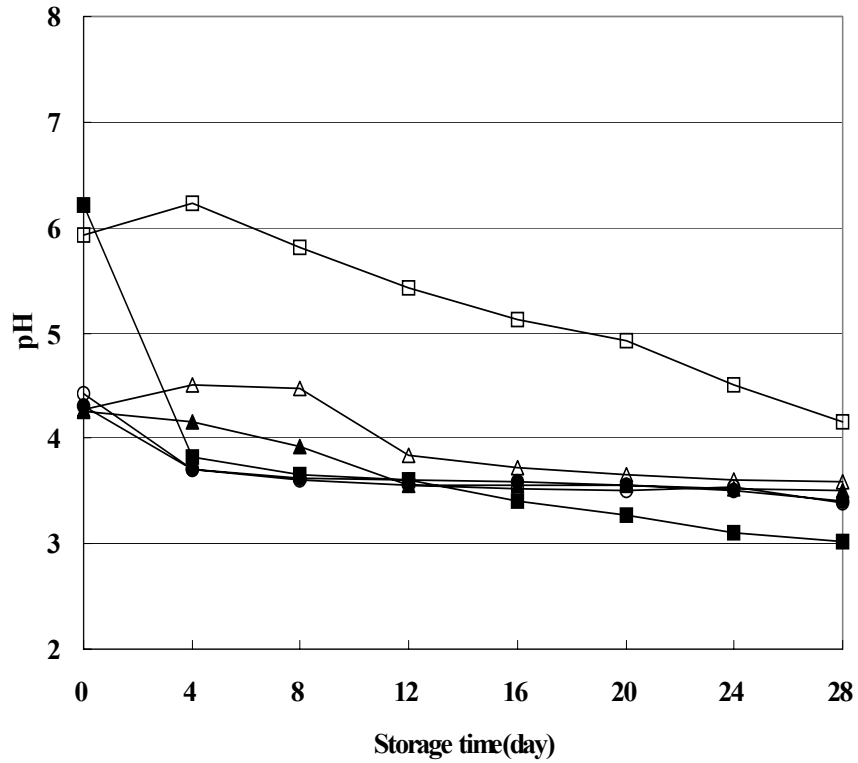


Fig. 4-16. Changes in pH of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 25°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment              ○ pH 4.25                                  △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1μs

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

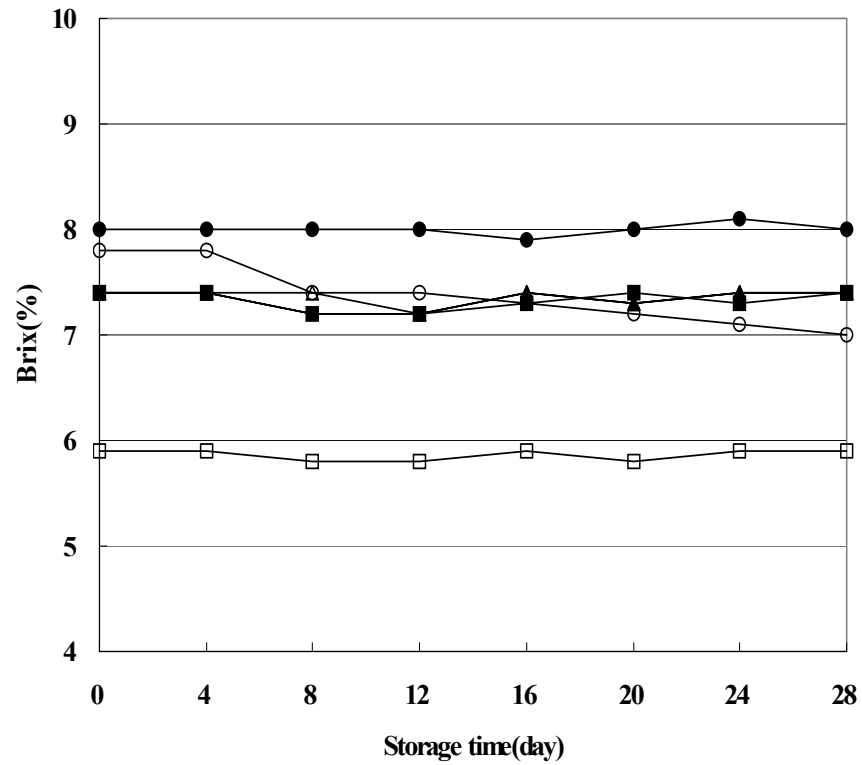


Fig. 4-17. Changes in Brix of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 4°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF

□ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1μs

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

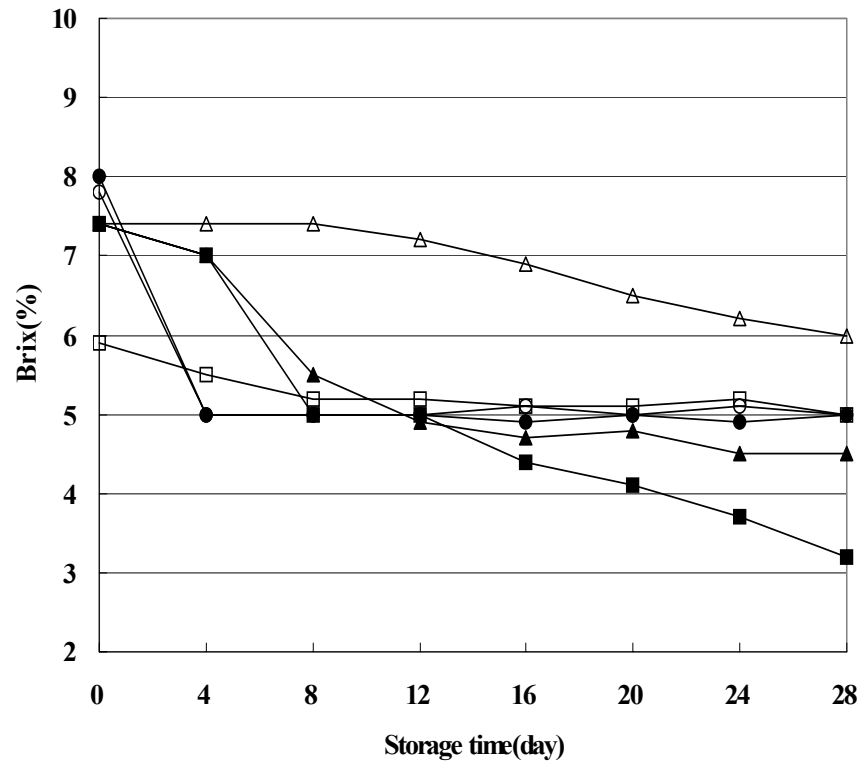


Fig. 4-18. Changes in Brix of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 25°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment              ○ pH 4.25                              △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1μs

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

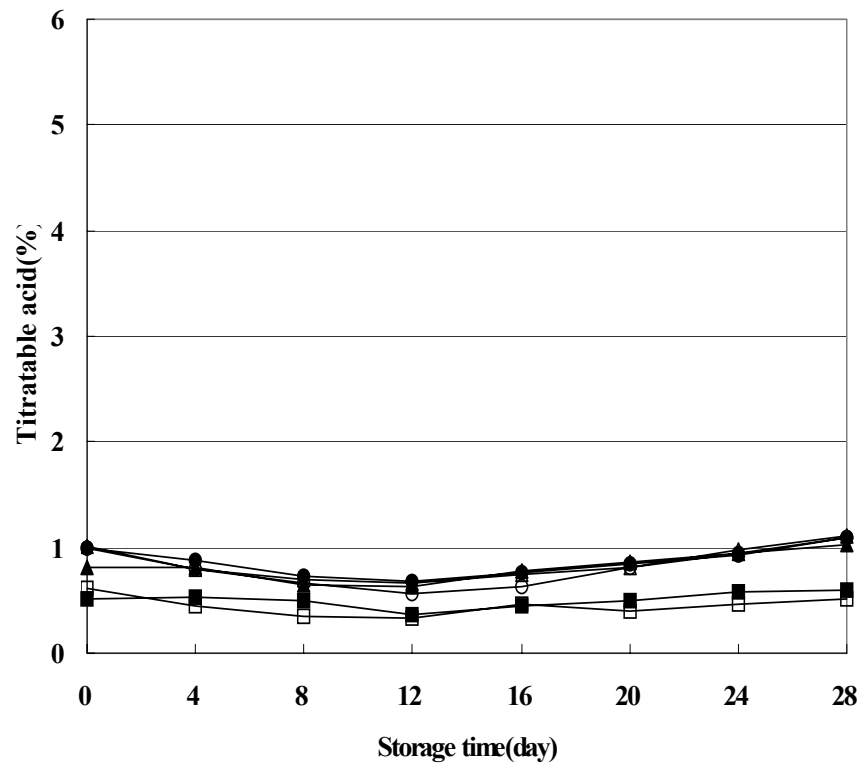


Fig. 4-19. Changes in titratable acid of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 4°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1μs

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

지만 품질에 이상을 줄만큼의 변화는 아니었고, 무처리 sample만 5배의 증가를 보이고 산취를 나타내었다(Fig. 4-20). 정은 탁주를 같은 조건에서 실험한 결과 30℃에서는 8일째부터 무처리 sample에서 산도의 증가를 보였주었고 4℃에서는 변화가 없는 것을 보고하였다. 이러한 결과를 보았을 때 pH와 열을 병합한 PEF처리가 식품에 관능적인 변화를 주지 않는 것을 알 수 있었다.

#### 2.2.4.4. 색도(Color)

명도를 나타내는 L value에서는 앞서 실험한 결과와 같이 4℃에서는 변화를 관찰할 수 없었고 당근 주스에 고유의 색을 나타내었다(Fig. 4-21). 25℃에서는 변화폭이 적게 나타났지만 시각적인 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 4-22). Chen 등은 기존의 열처리구에서 색도가 감소되는 이유 중의 하나는 열처리동안 carotenoid가 열에 의해서 cis-isomer의 형성으로 인해서 color intensity가 감소하기 때문이라고 보고하였다. 적녹도를 나타내는 a value는 모든 값이 +(적색)가 나왔고 4℃에서는 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 4-23). 25℃에서는 무처리 sample만이 50% 이상의 감소를 보였는데 이것은 carotenoid의 감소와 같은 경향을 볼 수 있었다(Fig. 4-24). 황청도를 나타내는 b value도 모든 값이 +(황색)가 나왔고 4, 25℃의 값들은 모든 sample이 일정하게 유지되었다(Fig. 4-25, 4-26). 다만 무처리 sample만이 낮게 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다.

#### 2.2.4.5. $\alpha$ , $\beta$ -carotene

Vitamin A의 전구체로 쓰이는  $\alpha$ , $\beta$ -carotene은 열과 빛에 민감하게 반응해서 활성이 떨어지는 성질을 가지고 있다.  $\alpha$ -Carotene은 모든 sample이 감소하는 경향을 나타내었고 온도가 증가할수록 더 많이 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4-27, 4-28). 무처리 sample은 초기에 3 RE/ml의 제일 높은 carotene 수치를 나타내지만 28일에는 열처리 당근 주스만큼 활성이 떨어졌다. Vitamin A에서 80%의 활성을 가지는  $\beta$ -carotene은 변화폭이  $\alpha$ -carotene보다 많은 것을 알 수 있었는데 4, 25℃에서 무처리 sample은 활성이 거의 없어졌다(Fig. 4-29, 4-30). 이러한

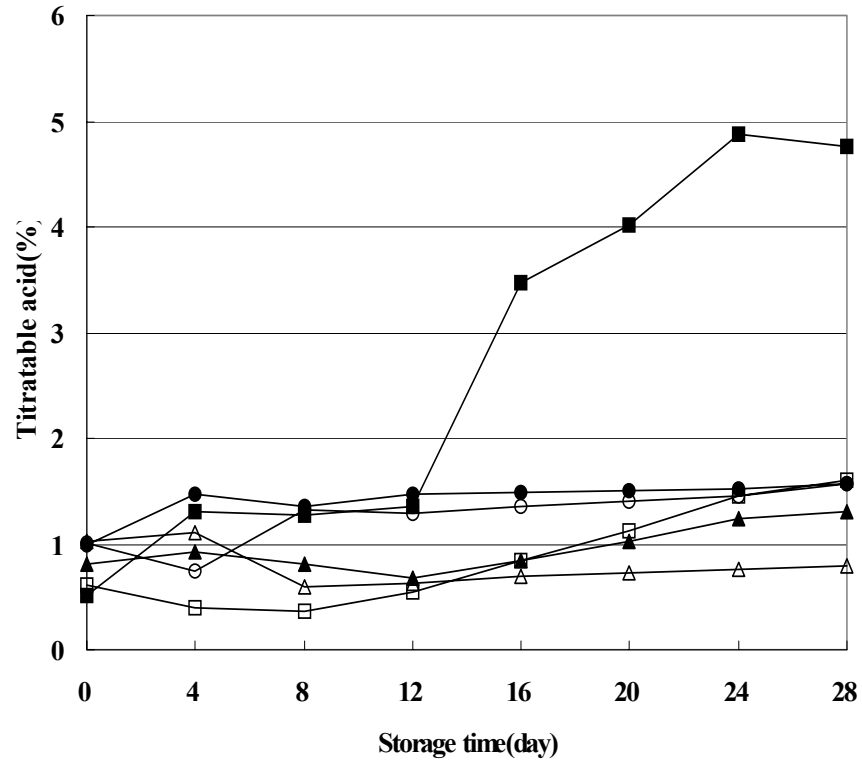


Fig. 4-20. Changes in titratable acid of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 25°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1 $\mu$ s

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

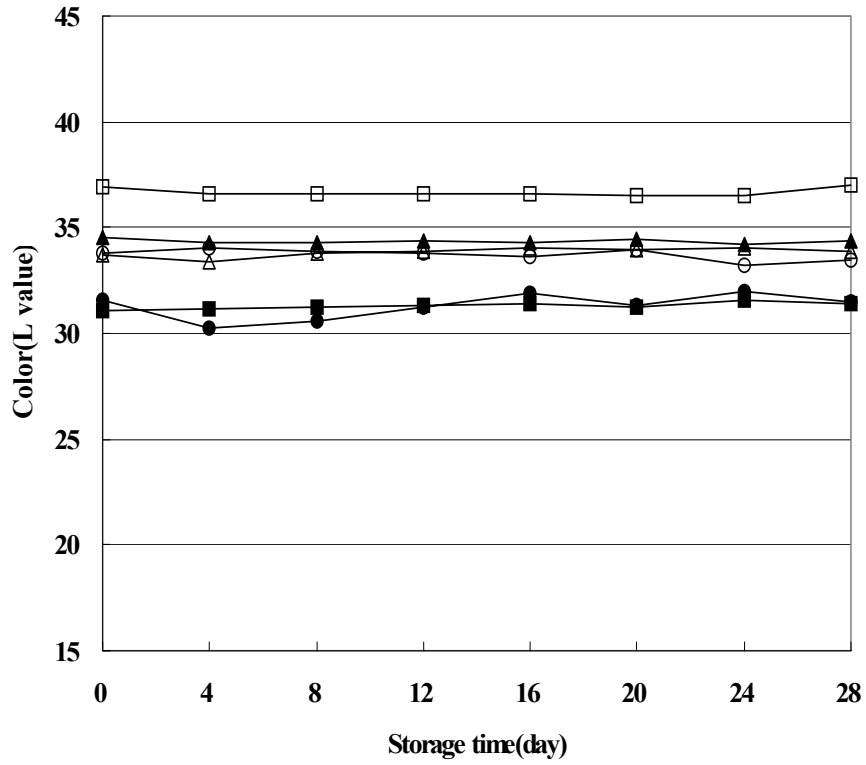


Fig. 4-21. Changes in color(L value) of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 4°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1μs

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

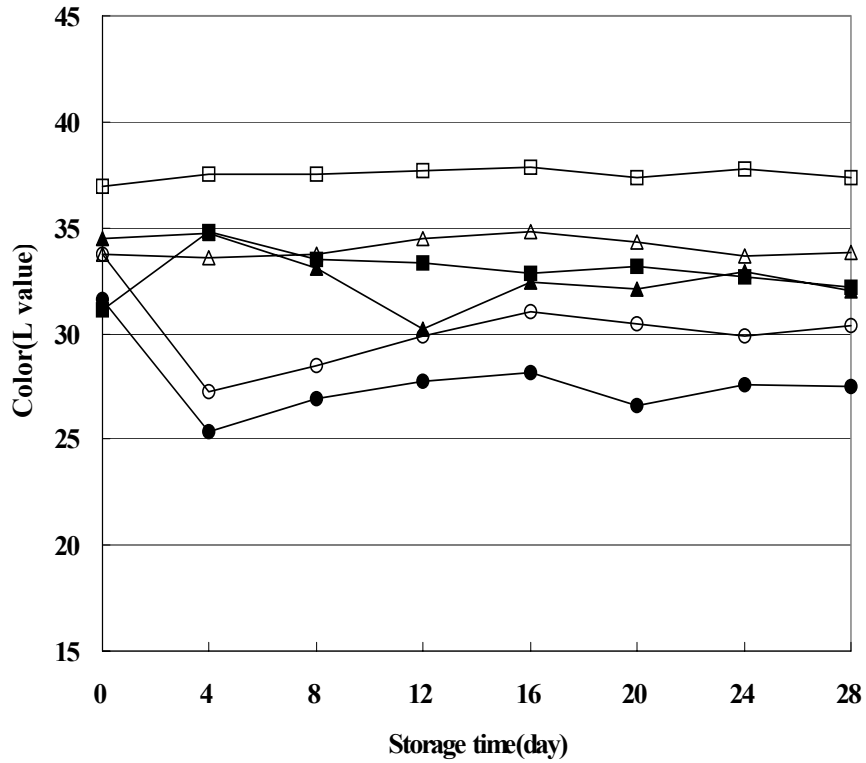


Fig. 4-22. Changes in color(L value) of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 25°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1μs

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice



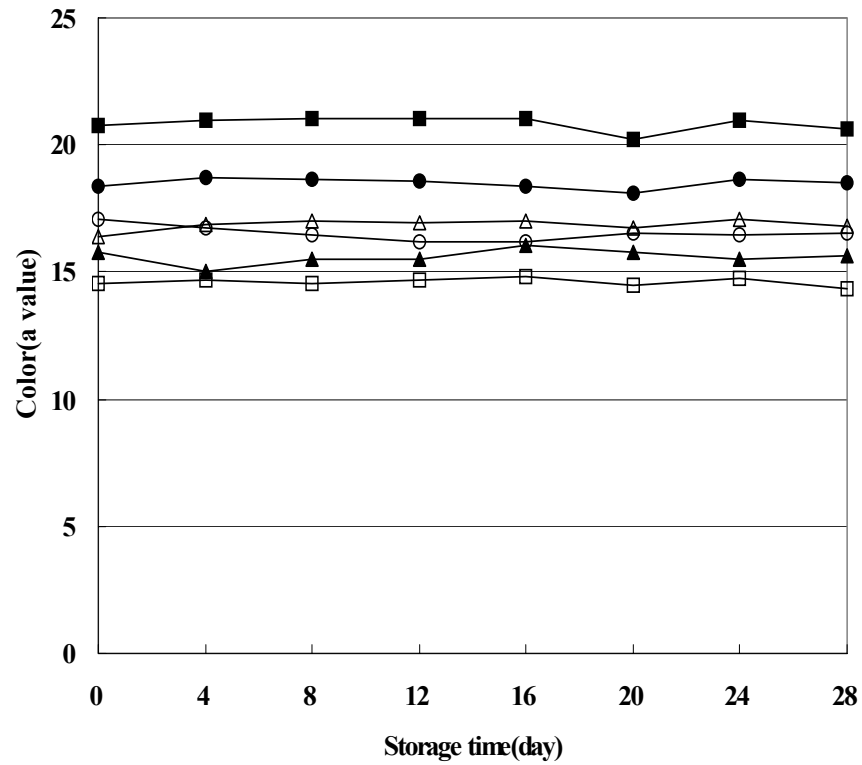


Fig. 4-23. Changes in color(a value) of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 4°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1μs

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

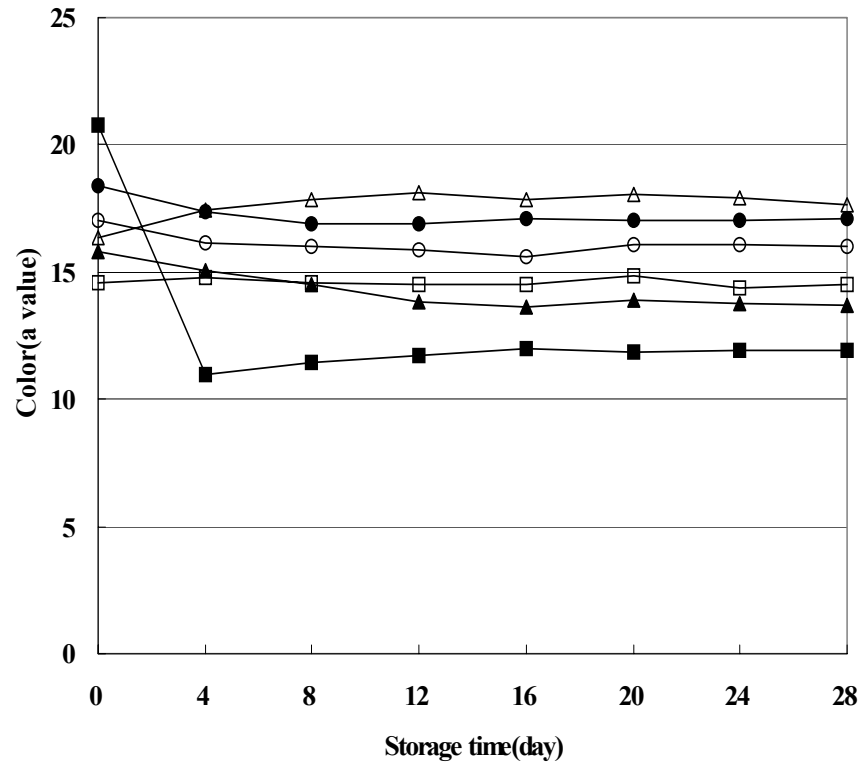


Fig. 4-24. Changes in color(a value) of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 25°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF  
 PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1μs  
 heat treatment : 105°C, 1 min  
 heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

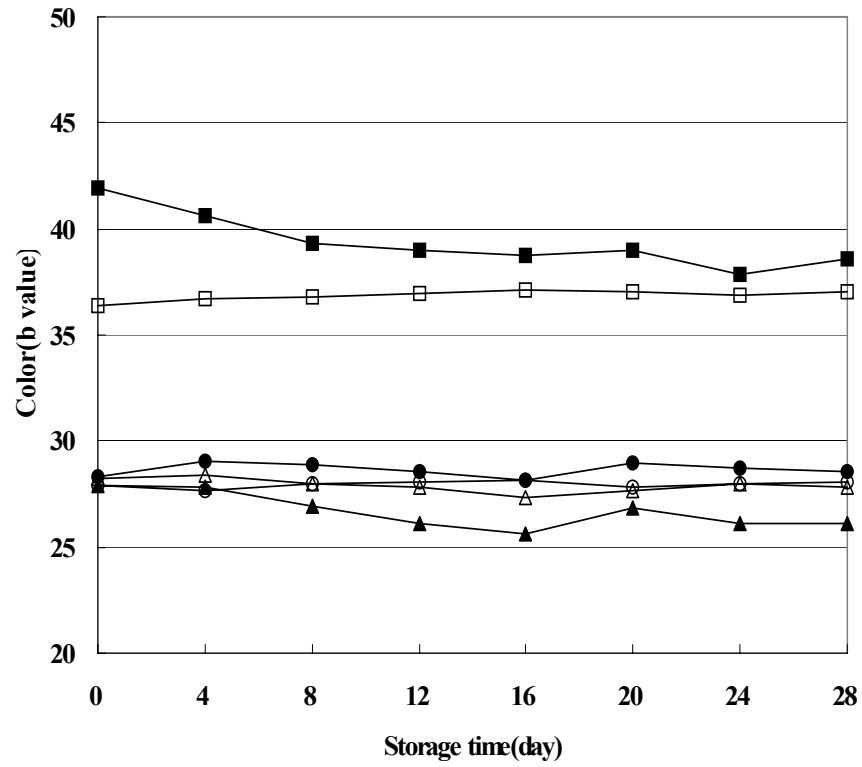


Fig. 4-25. Changes in color(b value) of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 4°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment              ○ pH 4.25                                  △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1 $\mu$ s

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

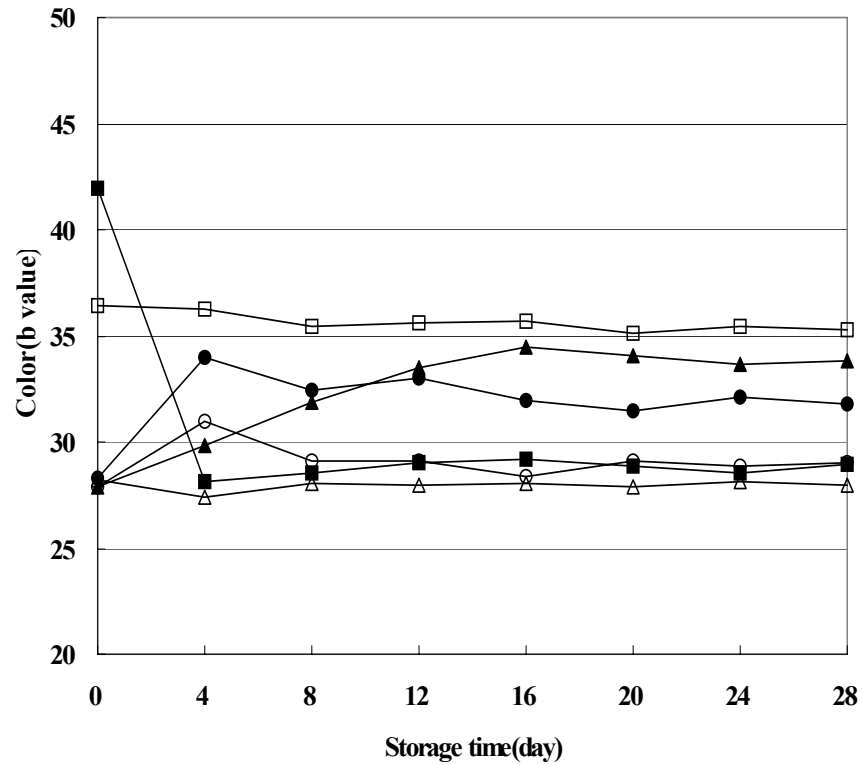


Fig. 4-26. Changes in color(b value) of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 25°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1 $\mu$ s

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

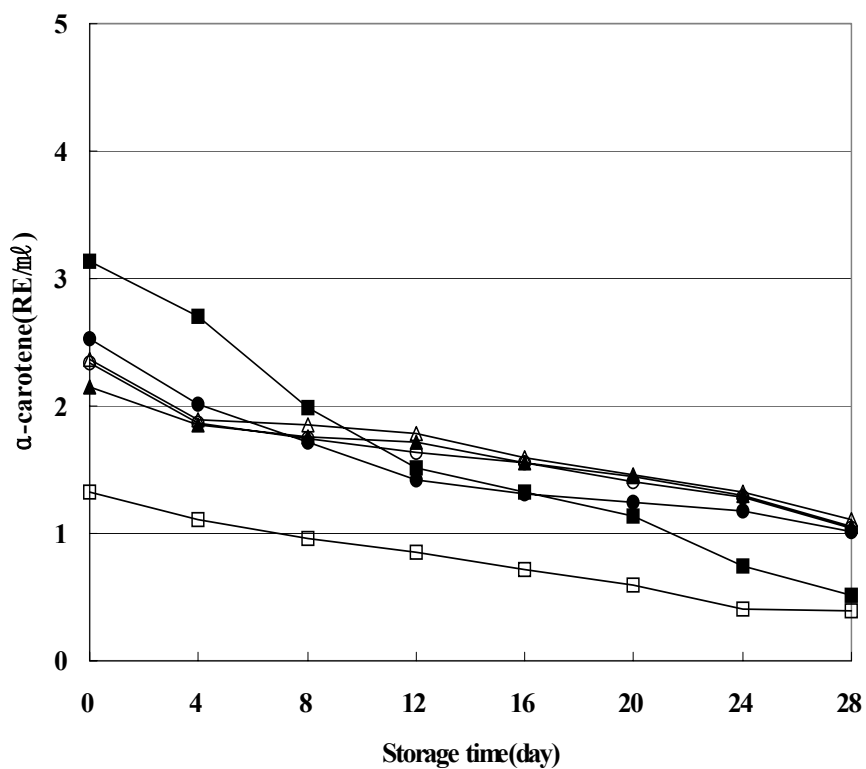


Fig. 4-27. Changes in  $\alpha$ -carotene of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 4°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF

□ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1 $\mu$ s

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

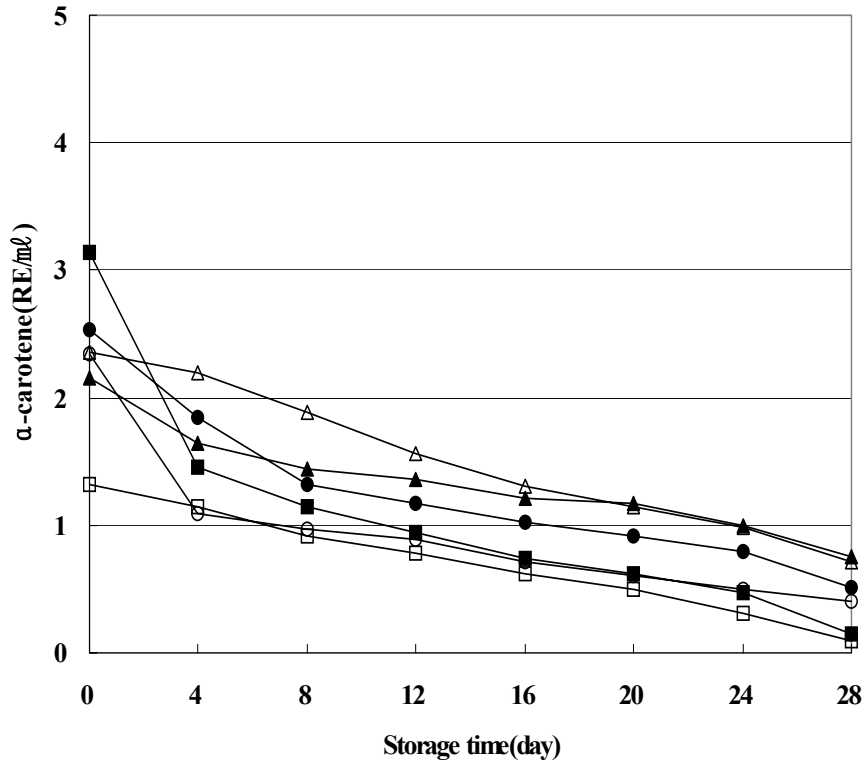


Fig. 4-28. Changes in  $\alpha$ -carotene of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 25°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1 $\mu$ s

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

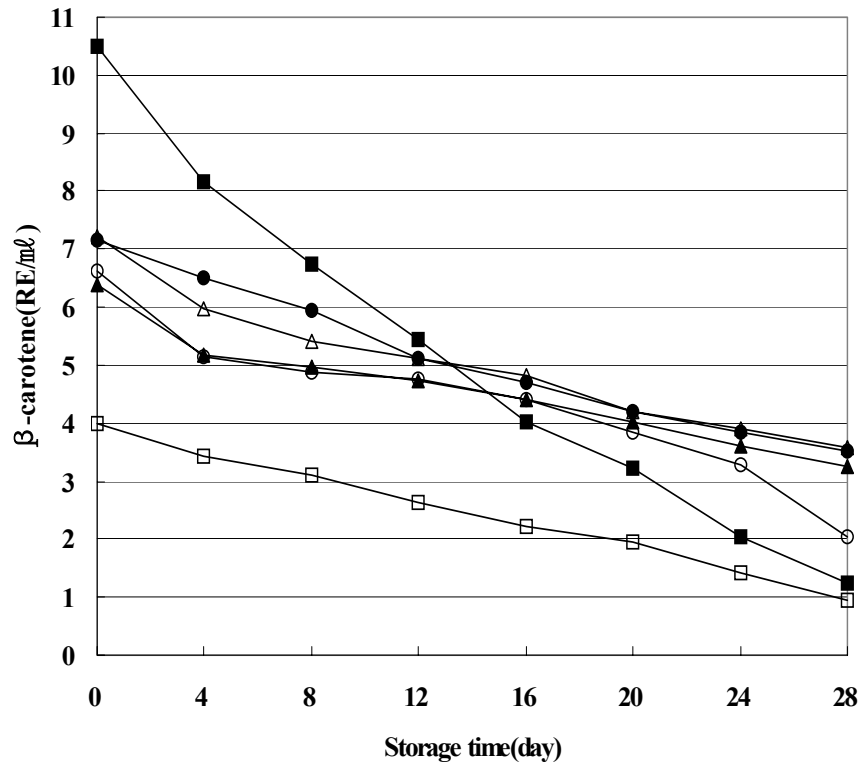


Fig. 4-29. Changes in  $\beta$ -carotene of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 4°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF

□ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1 $\mu$ s

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

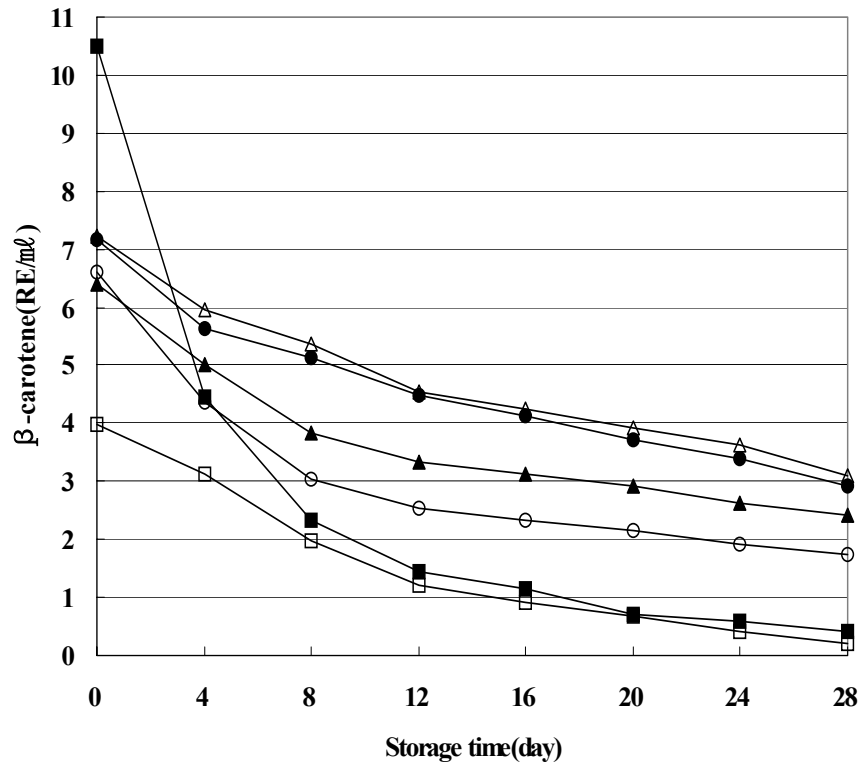


Fig. 4-30. Changes in  $\beta$ -carotene of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 25°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment              ○ pH 4.25                              △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1 $\mu$ s

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice



결과로 볼 때 PEF처리시 carotenes의 안정도가 유지되는 것을 볼 수 있었는데 이것은 lipoxygenase의 활성과 관련이 있는데 이 효소는 과일 또는 야채에 존재하면서 비타민 특히 carotene류의 산화 파괴에 관여하는데 PEF처리 결과 이 효소의 활성이 낮아진 것으로 생각된다.

#### 2.2.4.6. 총균수

4℃에서 보관된 당근 주스의 sample은 최고 2 log cycle에 균수의 증가를 보였다(Fig. 4-31). 열처리 당근 주스와 pH 4.25에서 열과 PEF를 병합 처리한 sample은 저장 기간동안 멸균 상태가 유지되었지만 열처리 당근 주스는 저장 기간이 20일 후에는 균들이 자라는 것을 볼 수 있었다. 25℃에서는 모든 sample들이 균수의 증가를 보였다(Fig. 4-32). 다만 4℃에서와 같이 pH 4.25에서 열과 PEF를 병합처리한 sample만이 저장 기간에서 가장 낮은 균수를 보였다. PEF처리한 sample과 열처리 당근을 제외한 sample은 변패가 심하게 일어나서 관능적으로 주스의 품질을 갖지 못했다.

#### 2.2.4.7. 효모 및 곰팡이

미생물들의 성장 경향은 총균수와 같은 경향을 보였다(Fig 4-33, 4-34). 총균수보다 PEF살균 효과가 더 좋은 경향을 볼 수 있는데 이것은 bacteria보다 효모 및 곰팡이가 전기저항도가 크기 때문에 PEF효과가 더 좋은 것이다. pH 4.25에서 열과 PEF를 병합 처리한 sample만이 저장 기간 동안에 균수를 관찰 할 수 없었기 때문에 PEF 단독 처리보다는 열과 pH를 병합한 처리가 살균 효과를 높일 수 있는 방법인 것을 알 수 있었다.

### 3. 결 론

비열 처리 기술인 고전압 펄스 전기장(PEF)을 이용하여 당근 주스를 비열 살균하여 신선도와 고유의 맛을 유지하면서 장기간 보존하기 위한 연속식 공정을 개발하기 위하여 PEF 처리 조건에 따른 살균 효과를 연구, 검토한 결과 다음과

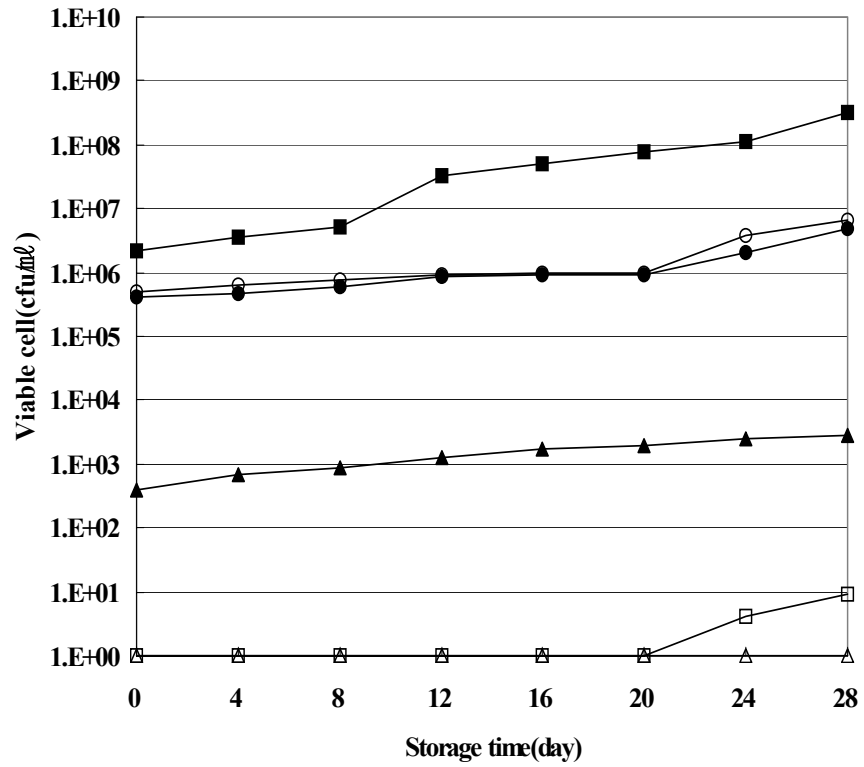


Fig. 4-31. Changes in viable total aerobics cell count of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 4°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment              ○ pH 4.25                              △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1μs

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

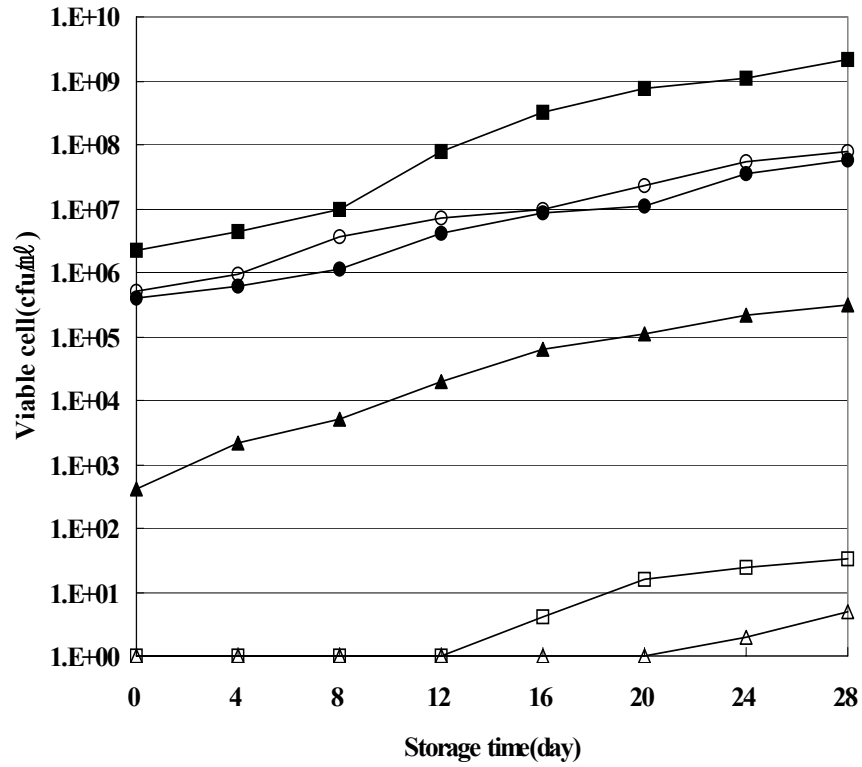


Fig. 4-32. Changes in viable total aerobics cell count of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 25°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1μs

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

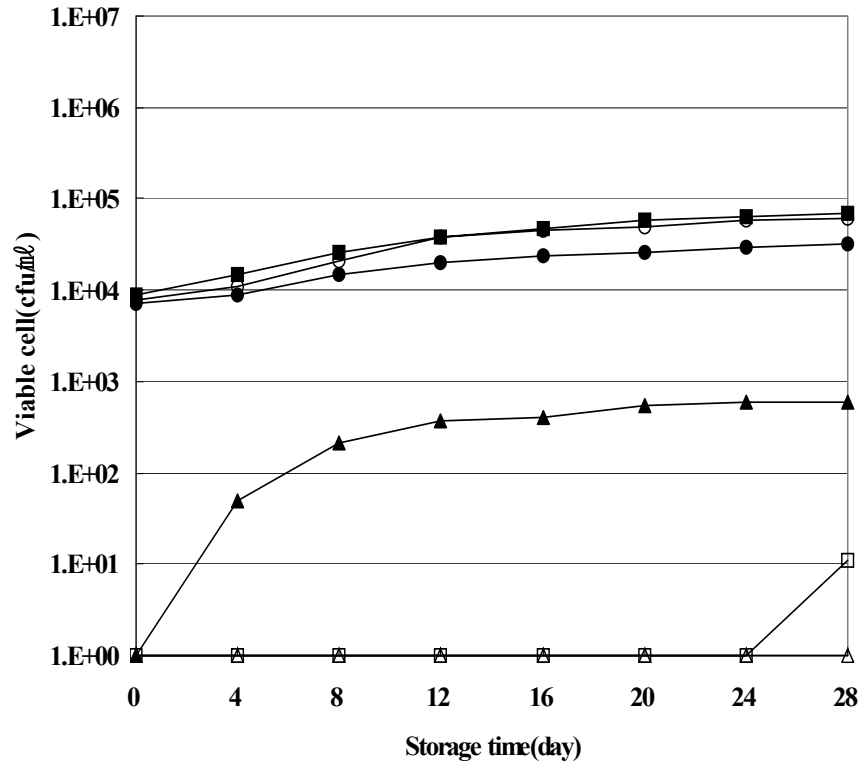


Fig. 4-33. Changes in viable yeasts & molds cell count of carrot juice with and without PEF treatment during storage at 4°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment              ○ pH 4.25                              △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1 $\mu$ s

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

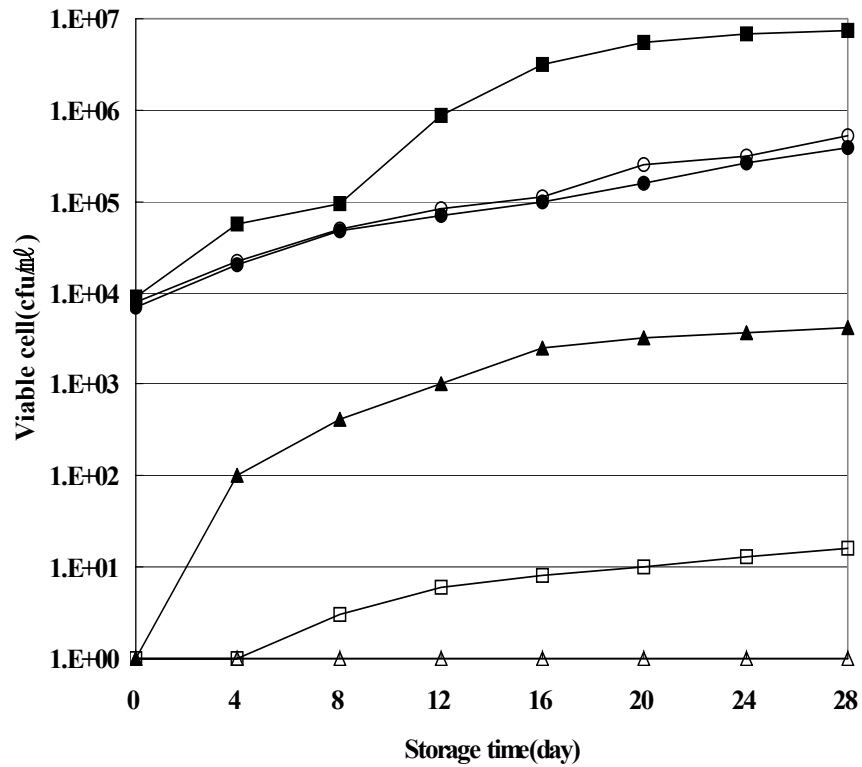


Fig. 4-34. Changes in viable yeasts & molds cell count of carrot juice with and with out PEF treatment during storage at 25°C.

■ Control                      ● pH 4.25 + heat                      ▲ pH 4.25 + PEF  
 □ heat treatment                      ○ pH 4.25                      △ pH 4.25 + PEF

PEF treatment : 55kV/cm, 1500Hz, pulse width 1 $\mu$ s

heat treatment : 105°C, 1 min

heat : 50°C, 100sec, control : untreated carrot juice

같은 결론을 얻었다. 실험실 규모의 PEF 장치를 이용하여 회분식 처리 용기에서 10~40 kV/cm의 exponential decay pulse를 8~256회 가한 결과, 전기장의 세기와 처리 시간이 증가함에 따라 당근 주스의 *E. coli*의 사멸율이 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 당근 주스의 살균에 미치는 PEF 처리 온도의 효과를 알아보기 위하여 당근 주스의 품질에 영향을 주지 않을 정도의 저온인 50℃에서 22.5 kV/cm, 256회의 exponential decay pulse를 가한 결과 6 log cycle 사멸되어 PEF와 가열 병합 처리가 당근 주스의 살균에 매우 효과적임을 알 수 있었다. PEF 처리에 의해 당근 주스의 식품학적 품질을 실험한 결과, pH, 가용성 고형분(。Brix), 적정 산도(Titratable acid), color,  $\alpha$ - $\beta$ -carotene의 변화를 관찰 할 수 없었다. 따라서 고전압 펄스 전기장의 처리가 당근 주스의 식품학적 품질의 변화를 주지 않음을 알 수 있었다. Pilot 규모의 PEF 장치 및 자체 설계·제작한 연속 순환식 처리 시스템을 이용하여 당근 주스를 상온에서 펄스폭 1 $\mu$ s의 square wave pulse를 50~70kV/cm, 66~198 $\mu$ s 처리한 결과, 전기장의 세기가 강해질수록, 처리시간이 늘어날수록 PEF에 의한 총균수와 효모 및 곰팡이의 살균 효과는 증대되었다. 펄스의 형태에 따른 살균 효과의 차이를 알아보기 위하여 당근 주스를 exponential decay pulse와 square wave pulse로 각각 50~60kV/cm, 66~198 $\mu$ s 처리한 결과, 총균수와 효모 및 곰팡이의 살균 효과가 2 log 이상의 차이를 보였고 처리 시간이 길어질수록 square wave pulse의 살균 효과가 exponential decay pulse보다 더 우수함을 알 수 있었다. Pilot 규모의 PEF 장치에서 당근 주스의 살균에 미치는 PEF 처리 온도와 pH의 효과를 알아보기 위하여 20~50℃에서 55kV/cm, 131 $\mu$ s, 1500Hz, pulse width 1 $\mu$ s 조건으로 pH 3.25, 4.25, 5.25, 6.25로 변화시킨 당근 주스에 square wave pulse를 가한 결과 효모와 곰팡이는 모든 조건에서 거의 사멸되었고 총균수는 pH 3.25와 4.25에서 사멸되었다. 따라서 PEF처리시 온도뿐만 아니라 pH도 중요한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. PEF 처리한 당근 주스, 무처리 당근 주스, 열처리 당근 주스를 4℃와 25℃에 각각 저장하면서 pH, 가용성 고형분(。Brix), 적정산도(titratable acid), color,  $\alpha$ - $\beta$ -carotene, 균수의 변화를 측정하여 PEF 처리에 의한 당근 주스의 저장성을 평가한 결과. 무처리 당근 주스는 8일만

에 부패가 일어난 반면에 pH 조절후 열병합 처리하여 냉장 보관한 당근 주스는 품질변화가 거의 없어 저장성이 현저히 향상되었음을 확인하였다. 또한 기존 열처리 당근 주스보다도 영양학적으로나 관능적인 면에서도 훨씬 우수함을 알 수 있었다.

### 제 3 항 고전압 펄스 전기장을 이용한 탁주의 살균

막걸리는 여과하지 않은 저농도 알코올 발효 음료로서 그 물리적 성상이 불균일하고 유통·저장 과정 중에서 계속적으로 발효가 진행되므로 품질의 균일화를 기하기 어려운 근본적인 문제점을 안고 있다. 최근 경제 수준의 향상과 식생활 습관의 변화에 의하여 전통 막걸리의 소비가 급속히 감소되고 있다. 이것은 주로 막걸리의 저장성, 편이성, 소화성이 불량함에 기인하는 것이며 소비자의 기호에 맞는 품질 향상과 제품 개발이 미진하였던 결과이다. 막걸리의 저장성과 편이성을 향상시키기 위해서는 적절한 저장 방법 및 포장 방법의 개발이 가장 시급한 과제로 인식되고 있으나 이를 위한 기초 연구들이 거의 수행되지 않고 있다. 막걸리의 관능적 품질 요소를 규명하고 공정 개선이나 포장 방법등의 새로운 제품 개발이 소비자의 기호에 미치는 영향에 대한 체계적인 조사가 필요하다.

막걸리의 재래식 발효 공정은 곡자와 주모를 사용하는 자연 발효의 형태이므로 여러 가지 미생물이 생육할 수 있다. 이 등과 신등에 의하면 막걸리 속에는 *Mucor*속을 비롯하여 *Rhizopus*, *Aspergillus*속 등의 곰팡이와 *Sacchromyces*, *Phichia*, *Candida*, *Torulopsis*, *Hansenular*속등의 효모, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Pseudomonas* 속등의 세균들이 생육하고 있는 것으로 보고하였다. 그러므로 이들 모든 미생물들이 막걸리의 저장 유통 기간 중에 일어나는 변질에 참여할 수 있다. 이와 같이 막걸리의 부패와 산패의 원인은 발효액 중에 존재하는 잡균과 효모에 의한 것이다. 막걸리가 발효 도중에 산패되는 이유는 곡자 또는 공기중의 젖산균에 의하여 젖산이 생성되거나 또한 생성된 알코올이 초산균이나 낙

산균에 의하여 초산이나 낙산이 생성되기 때문이다. 막거리의 후발효에 주로 관여하는 것은 주로 효모이다. 현재 막걸리 생산 공정에서 발효를 일으키는 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*로 알려져 있으며, 현재 시판되고 있는 종균이 *S. cerevisiae*의 분말상이다. 그러나 시판 막걸리 중에는 *S. cerevisiae* 이외 오염된 *S. pretoriensis*, *S. rouxii*, *Hansenular anomala*, *Pichia polymorpha* 등 몇가지 효모가 혼합되어 있는 상태이며 제조 원료와 방법에 따라 차이가 있다. 막걸리는 발효 과정이 끝난 후에 살균 과정을 거치지 않고 또한 여과 과정이 철저하지 않기 때문에 콜로이드성 고분자화물이 많이 현탁되어 있다. 따라서 막걸리는 후숙에 의한 품질 향상을 기대하기 어려울 뿐만 아니라 출고 후에 오히려 후발효가 계속 진행되어 3~5일이면 변패되어 폐기 처분된다. 이들을 저온 살균 처리에 의해서 사멸시킴으로서 저장 기간을 연장하려는 시도가 있었다. 또한  $\gamma$ -ray와 가열처리를 병행하여 저장성을 조사해 본 결과 저장 기간을 20일까지 연장시킨 연구도 보고되고 있다. 이들 연구 결과에 의하면 막걸리의 저장성은 어느 정도 연장시킬 수는 있으나 열처리 혹은 방사선 조사에 의한 강한 악취(화독 냄새)의 생성과 변색, 층분리 등의 물리적 성상의 변화로 인하여 상품성을 상실하게 되는 문제점을 아직 해결하지 못하고 있다. 따라서 전래의 전통 발효주의 상업화를 가속화시키기 위해서는 이들 주류의 고유한 맛을 유지시키면서 저장성을 연장시키는 새로운 방법을 개발하여야 할 필요성이 급격히 대두되고 있다.

본 연구에서는 전통 주류의 신선도와 고유의 맛을 유지하면서 장기간 보관하기 위한 방법을 개발하기 위하여 적숙기의 막걸리를 특수 제작한 용기를 통과시키면서 고전압 펄스 전기장 처리를 하여 변질의 주 원인균인 효모를 사멸시킬 수 있는 최적 처리 조건을 연구 검토하였으며, 특히 품질에 영향을 주지 않을 정도의 60℃ 이하의 온도에서 고전압 펄스 전기장과 열병합 처리 효과, PEF 처리한 막걸리의 저장성을 검토하였다.

## 1. 실험 재료 및 방법



### 1.1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 막걸리는 시중에서 판매되고 있는 S사의 막걸리를 사용하였다. 보존 기간은 10℃이하의 제조일로부터 5일 이내이며 본 실험에서는 병입일로부터 하루 경과한 신선한 막걸리를 사용하였다. 막걸리의 여과는 cheese cloth와 Whatman No.1 filter paper로 각각 1회씩 여과하였다. 초기 효모수는 약  $1.5 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$  cfu/ml이고, 전기전도도는 0.70~0.76mS/cm이었으며 pH는 3.76~3.82 범위이었다. 여과 후에도 효모의 수, 전기전도도, pH 등의 변화는 없었다. 본 연구에 사용한 막걸리의 알코올 농도는 6%이며 알코올 농도를 2~12%로 변화시키면서 알코올 농도에 따른 PEF 비열살균 효과를 연구하였다.

### 1.2. 효모 생존율의 측정

생균수는 일정량의 막걸리 시료를 무균적으로 취하고 멸균 식염수(0.85% NaCl soln.)에 의한 10배 희석법으로 희석하여 10% tartaric acid(주석산)로 pH를 3.5로 조절한 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco)에서 pouring method로 28℃, 24시간 배양한 후 생긴 colony를 계수하여 초기 미생물 수( $N_0$ )에 대한 PEF 처리 후의 미생물 수( $N$ )의 비로 생존율(survival fraction)을 구하였다.

### 1.3. 형태학적 변화 관찰

주사 현미경(Scanning Electron Microscope, SEM)과 투과 전자 현미경(Transmission Electron Microscope, TEM)을 이용하여 PEF 처리에 의한 효모의 형태학적 변화를 관찰하였다. 30 kV/cm, 256회의 펄스로 PEF 처리한 막걸리 시료와 무처리 시료 내의 효모를 분리하여 4℃에서 2~4시간 동안 정착액(5% paraformaldehyde, 5% glutaraldehyde, 0.2M phosphate buffered saline soln.; PBS)에서 고정하고 다시 0.1M PBS로 4℃에서 15~20분간 washing하는 과정을 3회 반복한 후 이를 50, 70, 80, 90, 100% 에탄올로 각각 15분간 탈수하고 다시 액체 CO<sub>2</sub>로 임계점까지 탈수 건조한 다음, ion-coater를 이용하여 금 코팅한 수 주사전자현미경(JSM-5410LV, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. 또한 1차 고정된 균체

시료를 4℃에서 2~4시간 동안 2차 고정액(2% OsO<sub>4</sub>, 0.2M PBS)으로 다시 고정한 후 4℃에서 15~20분간 0.1M PBS로 3회 washing한 다음 50, 70, 80, 90, 100% 에탄올로 각각 15분간 탈수하여 유기용매와 epon 혼합물에 침윤시키고 60℃ oven에서 48시간 동안 embedding하여 중합한 다음 유리칼로 두께 60~90 nm가 되도록 절단하고 lead citrate와 uranyl acetate로 staining하여 투과전자현미경(JEM-1010, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

#### 1.4. 저장성 평가

PEF 처리구와 무처리구를 4℃와 30℃에 저장하면서 저장 기간 동안의 pH와 적정산도, 효모의 수를 관찰하였다. pH는 pH meter(Orion, 520-A, USA)를 사용하였으며 적정 산도는 시료 10 ml를 취하여 지시약(0.1% phenolphthalein)을 사용하여 0.1N NaOH로 적정하여 다음 식에 의거하여 산출하였다.

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

여기서  $f$ 는 NaOH의 factor이다.

## 2. 실험 결과 및 고찰

### 2.1. 실험실 규모의 회분식 처리 시스템에서 PEF 살균 효과

#### 2.1.1. 전기장의 세기 및 처리 시간에 따른 막걸리의 PEF 살균

고전압 펄스 전기장에 의한 미생물의 치사 효과에 미치는 가장 직접적인 영향 인자는 전기장의 세기와 처리 시간(펄스수×펄스폭)이다. 시판 막걸리를 특수 제작한 회분식 PEF 용기에 넣고 밀봉한 후 상온에서 1 μs의 펄스폭을 갖는 10~30 kV/cm의 exponential decay pulse를 8~256회 가한 결과를 Fig. 4-35에 나타내었다. 시판 막걸리의 초기 효모수는 약 2×10<sup>8</sup>cfu/ml이고, 30 kV/cm, 256회의 고전압 펄스 처리 후 효모의 생존율이 약 1.8 log cycle 감소하였으며, 전기장의 세기

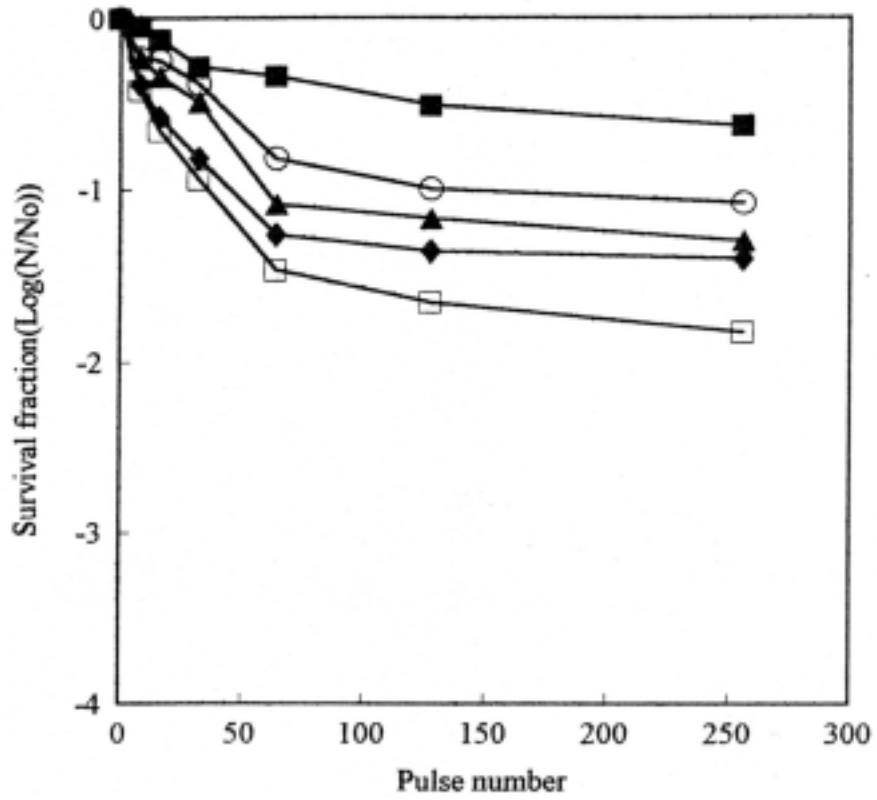


Fig. 4-35. Effect of electric field strength and treatment time on survival fraction of yeasts in Takju

■ 10 kV/cm, ○ 15 kV/cm, ▲ 20 kV/cm, ◆ 25 kV/cm, □ 30 kV/cm

와 펄스의 수가 증가할수록 살균 효과가 증가함을 알 수 있었고 처리 중 막걸리의 온도는 거의 변화가 없어서 열에 의한 살균은 전혀 일어나지 않았다. 한편, 막걸리 내에 다량 존재하는 전분 입자 등의 고형분이 전기장의 효과를 방해할 수 있다는 점에 착안하여 cheese cloth와 Whatman No. 1 filter paper로 막걸리를 여과하여 고형분을 일부 제거한 다음 동일한 조건하에서 고전압 펄스 처리를 하였다. 여과한 후에도 막걸리의 초기 균수에는 거의 변화가 없었다. Fig. 4-36에 나타낸 바와 같이 여과한 막걸리의 경우, 30 kV/cm, 256회의 고전압 펄스 처리 후 효모의 생존율이 약 4.1 log cycle의 감소를 보여서 살균 효과가 현저히 증가하여 막걸리의 고형분이 PEF 살균에 영향을 미친다는 것은 알 수 있었다. 미생물의 불활성화에 영향을 미칠 수 있는 최소 임계 전기장의 세기( $E_c$ )는 Fig. 4-37과 같이 전기장의 세기에 따른 생존율을 외삽하여 측정하였으며 여과하지 않은 막걸리에서 효모의 경우 6 kV/cm이었다. 또한 최소 임계처리 시간은 5  $\mu$ s인 것으로 나타났다 (Fig. 4-38).

#### 2.1.2. 처리 온도에 따른 막걸리의 PEF 살균

고전압 펄스 자기장에 의한 미생물의 불활성화에 미치는 또 다른 인자는 미생물이 포함되어 있는 매질의 온도이다. 막걸리를 60°C 이상으로 가열 살균하면 열처리에 따라 화독 냄새와 같은 강한 이취가 발생하고 쓴맛이 생기며 변색, 청량감의 상실 및 층이 분리되는 등의 물리적 성상 변화가 일어나 상품성이 현저히 떨어지는 문제가 있다. 따라서 막걸리의 품질에 영향을 주지 않을 정도의 저온인 55°C 이하의 온도에서 저온 가열 살균과 PEF 처리의 병합 효과를 조사하였다. Exponential decay pulse를 이용하여, 처리 온도는 25, 35, 45, 50, 55°C로 각각 달리하였다. 일반적으로 온도가 증가하면 전기 전도도가 증가하여 저항이 낮아지므로 전기장의 세기가 낮아지게 된다. 전기장의 세기를 비교적 낮은 20 kV/cm로 정한 이유도 55°C에서 높일 수 있는 최고 전압이었기 때문이다. 한편, 온도가 높아지면 세포막의 유동성이 증가해서 세포막이 더 잘 수축되므로 고전압 펄스에 의한 세포막의 파손이 더 쉽게 일어난다. Fig. 4-39는 여과하지 않은 막걸리의 경우,

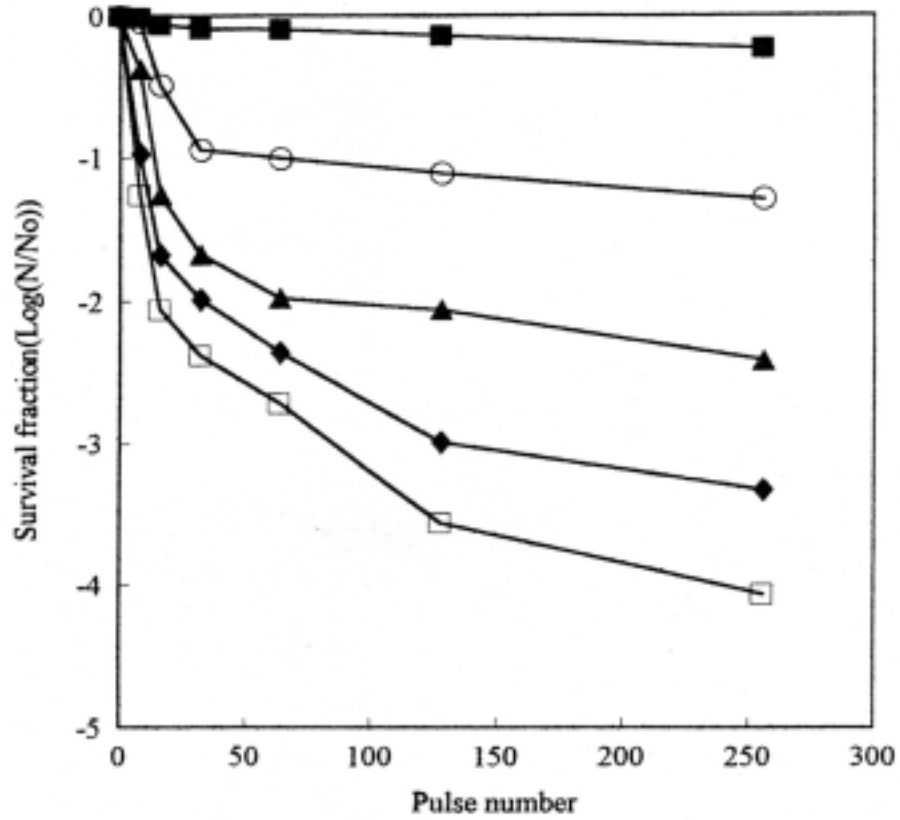


Fig. 4-36. Effect of electric field strength and treatment time on survival fraction of yeasts in filtrated Takju.

■ 10 kV/cm, ○ 15 kV/cm, ▲ 20 kV/cm, ◆ 25 kV/cm, □ 30 kV/cm

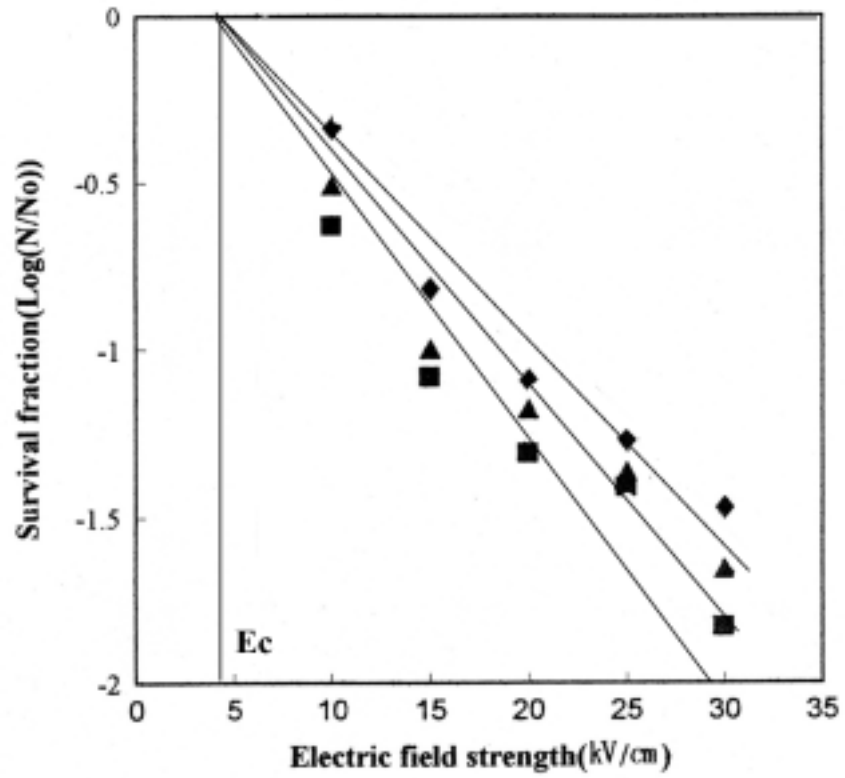


Fig. 4-37. Critical electric field strength against yeasts in Takju.

■ 256 pulse, ▲ 128 pulse, ◆ 64 pulse, □ 30 kV/cm

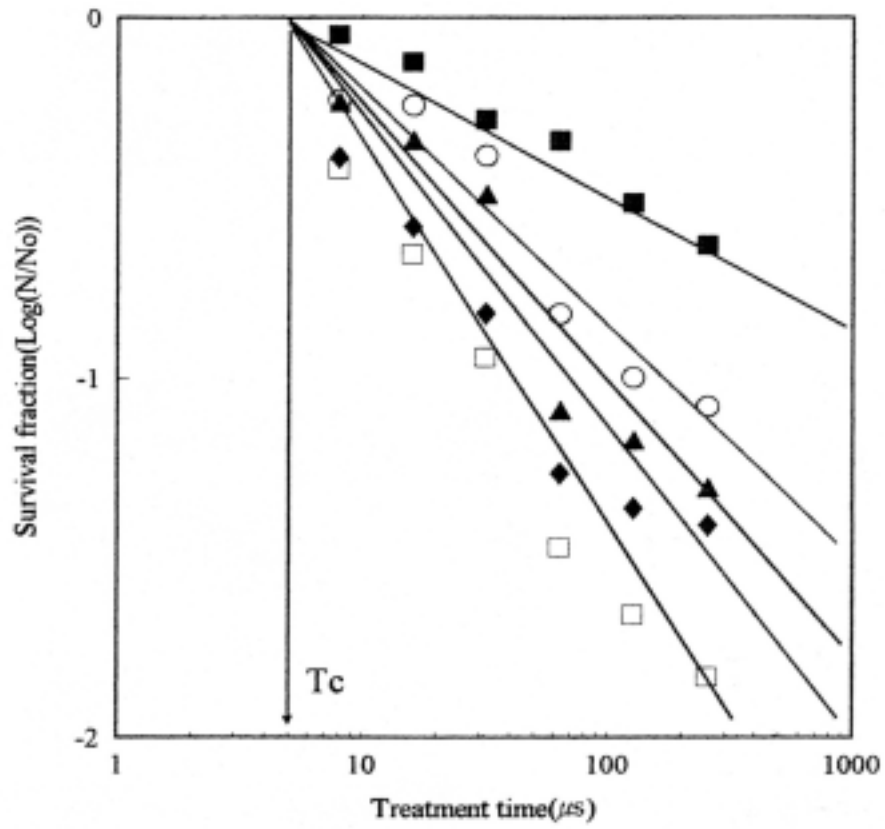


Fig. 4-38. Critical treatment time against yeasts in Takju.

■ 10 kV/cm, ○ 15 kV/cm, ▲ 20 kV/cm, ◆ 25 kV/cm, □ 30 kV/cm

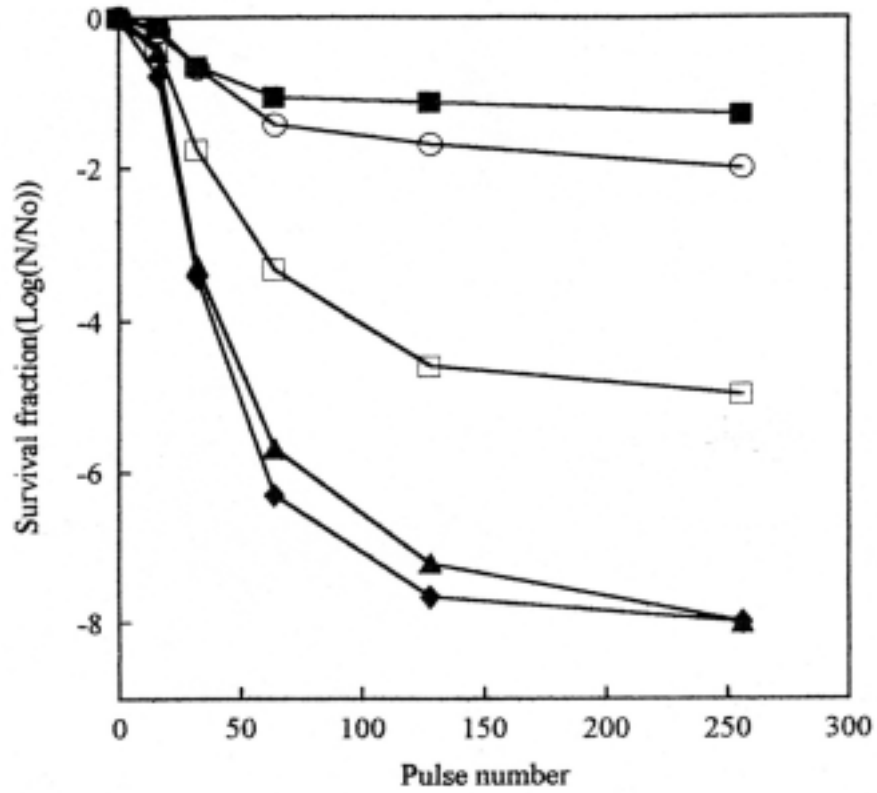


Fig. 4-39. Effect of treatment temperature on survival fraction of yeasts in Takju (electric field strength 20 kV/cm, exponential decay pulse).

■ 25°C, ○ 35 °C, □ 45°C, ▲ 50°C, ◆ 55°C



상온에 가까운 25℃와 35℃에서는 2 log cycle 미만의 생존율 감소를 보여 큰 살균 효과를 얻지 못했으나 45℃ 이상의 처리 온도에서는 5 log cycle 이상의 생존율 감소를 보여 상당히 좋은 살균 효과를 얻을 수 있었다. 특히 50℃에서 256회의 펄스를 가한 결과 거의 모든 효모가 사멸되는 것으로 나타났다. 또한 이러한 사멸 효과가 열에 의한 것이 아닌지 검증하기 위하여 PEF 처리를 하지 않고 같은 시간 동안 순수하게 열처리만 한 결과, 55℃에서도 거의 균수가 줄어들지 않았다(Table 4-10). 이로써 처리 온도가 막걸리의 PEF 살균에 매우 큰 영향을 미치는 인자라는 사실을 알 수 있었다.

#### 2.1.3. 알코올 농도에 따른 막걸리의 PEF살균

막걸리의 간략한 제조 방법은 다음과 같다. 찌살과 조곡(組麴)으로 술밑을 만든 후 찌살 및 조곡(組麴)을 첨가하여 본담금을 거친 다음 3일이 경과하면 알코올 농도는 10~12%가 되며 이때 탁주용 술덧으로 쓰인다. 막걸리는 숙성되기 전에 술덧을 제정실로 옮겨 알코올 농도가 6% 되게 물을 섞어 성긴 체를 사용하여 마구 걸러낸 술을 말한다. 지금까지 PEF에 관련된 연구 중 알코올의 영향을 연구한 문헌은 거의 없었다. 따라서 본 연구에서는 알코올의 농도에 따라 PEF를 이용한 비열 살균에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보았다. 우선 여과하지 않은 시판 막걸리(알코올 농도 : 60%)에 알코올을 첨가 하여 농도가 8, 10, 12%가 되도록 하였으며 vacuum evaporator를 이용하여 알코올을 제거하여 2, 4%로 알코올 농도를 조절하였다. 한편, 초기 효모수는  $1.2\sim 1.9\times 10^8$  cfu/ml로 알코올의 농도에 따라 큰 영향을 받지 않았다. 전기장의 세기는 30kV/cm로 일정하게 하고 상온에서 exponential decay pulse를 8~256회 가하였을 때 효모의 수가 3.7 log cycle 감소하였고 알코올 농도 2%인 막걸리는 1.3 log cycle 감소하여 알코올의 농도가 높을수록 더 효과적인 살균이 이루어짐을 알 수 있었다(Fig. 4-40).

#### 2.1.4. 전자 현미경 관찰

주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM)과 투과전자현미경

Table 4-10. Comparison of heat treatment and PEF treatment

Treatment Condition	Viable yeast cells (CFU/ml)
Before PEF treatment	2.01×10 <sup>8</sup>
After 55°C heat treatment	1.53×10 <sup>8</sup>
After 55°C heat and PEF treatment	not detected

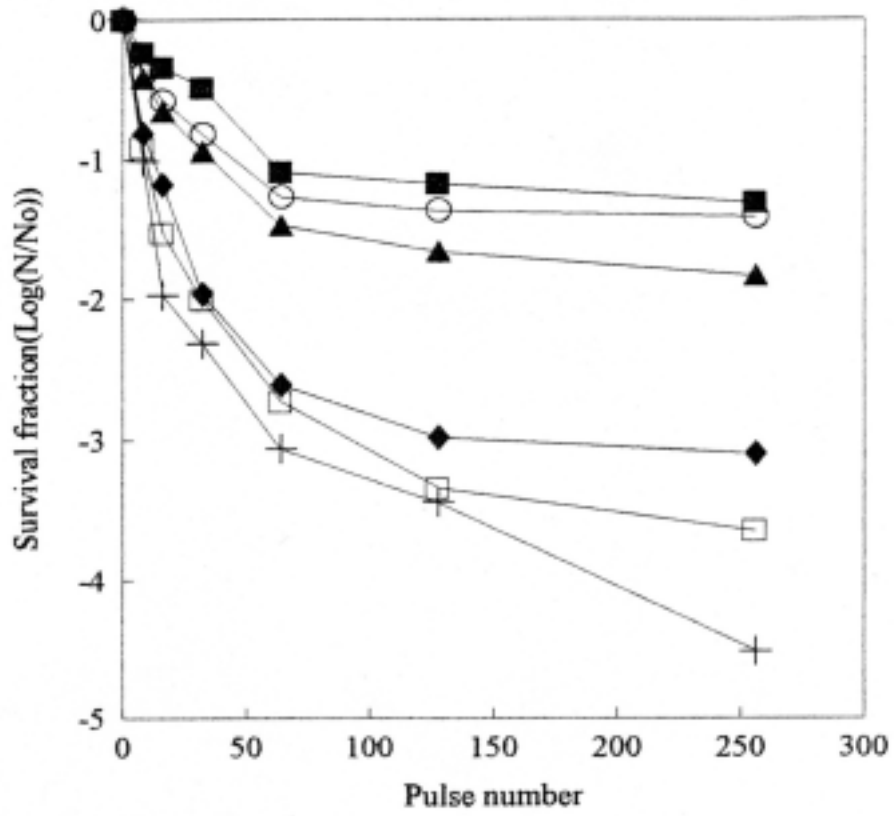


Fig. 4-40. Effect of alcohol content on inactivation of yeasts in Takju (electric field strength 30 kV/cm, exponential decay pulse, room temperature)

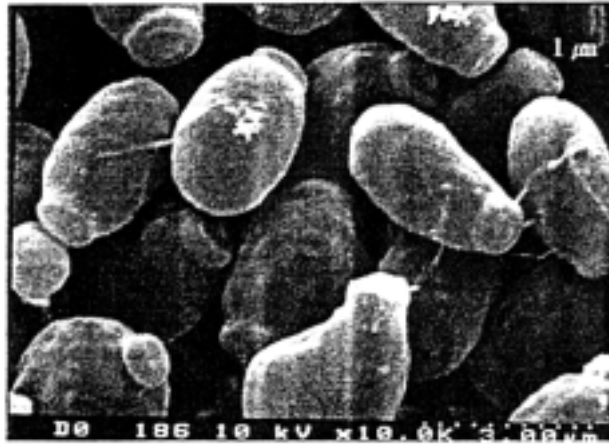
■ 2%, ○ 4%, ▲ 6%, ◆ 8%, □ 10%, + 12%

(Transmission Electron Microscope, TEM)을 이용하여 PEF 처리에 의한 효모의 형태학적 변화를 관찰하여 Fig. 4-41, 4-42에 나타내었다. PEF 처리는 온도를 50℃로 하고 20kV/cm의 exponential decay pulse를 256회 가하였다. 세포의 형태는 등근 원형으로서 전형적인 효모의 형태를 나타내고 있으며 출아에 의한 세포 증식을 한 흔적을 볼 수 있었다. 관찰 결과, PEF 처리를 하지 않은 효모의 경우 세포의 표면이 매끈하고 세포질도 세포막 내에 조밀하게 밀집되어 있는 것을 볼 수 있었다. 한편, PEF 처리한 효모는 표면이 원래의 형태를 유지하지 못하고 심하게 찌그러졌으며 세포 내부에서도 원형질이 크게 손상을 받아 밀도가 많이 떨어짐을 확인하였다.

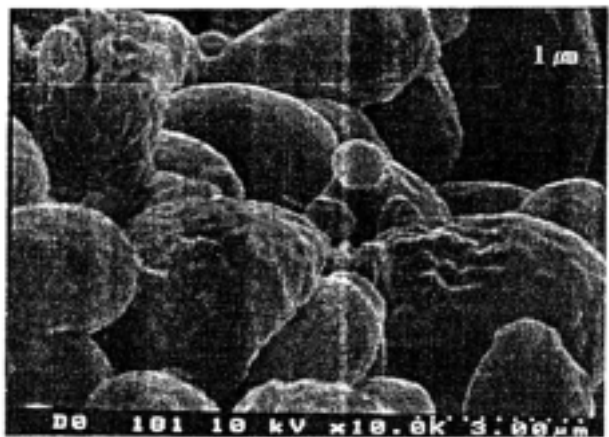
## 2.2. Pilot 규모의 연속 순환식 처리 시스템에서 PEF 살균 효과

### 2.2.1. 전기장의 세기 및 처리 시간에 따른 막걸리의 PEF 살균

실제 대용량 시스템 처리시 최대 효율을 나타낼 수 있는 pulse forming 과정을 거쳐 1 $\mu$ s의 펄스폭을 갖는 square wave pulse를 이용하여 자체 제작한 연속 및 단계적 처리 용기에서 PEF 살균 효과를 알아보았다. 전기장의 세기는 40, 50, 60, 70kV/cm로, 주파수 1,500 Hz, 처리 시간을 66~330  $\mu$ s까지 달리하여 상온에서 1 ml/sec의 flow rate로 여과하지 않은 막걸리를 처리 용기 내로 흘려보내면서 PEF를 가하였다. 실험 결과, 전기장의 세기가 강해질수록, 처리 시간이 늘어날수록 PEF에 의한 효모의 살균 효과는 증대되었다(Fig. 4-43). 40kV/cm의 전기장에서는 330 $\mu$ s 처리시 1.8 log cycle 정도의 균수 감소를 보인 반면 70kV/cm의 높은 전기장으로 330 $\mu$ s 처리했을 때는 5.9 log cycle 감소하여 전기장의 세기와 살균 효과는 비례하였다. 또한 동일한 전기장의 세기에서는 처리 시간이 길수록 좋은 살균 효과를 얻었다. 한편 PEF 처리 전의 막걸리의 온도는 상온에서 20℃이었고 70kV/cm, 330 $\mu$ s 처리를 하면 막걸리의 온도가 26℃에 불과해 열에 의한 살균 효과는 거의 없는 것으로 보인다. 소규모 exponential pulse 실험 때와 마찬가지로 막걸리 내의 많은 고형분으로 인한 영향을 알아보기 위하여 여과한 막걸리에 대

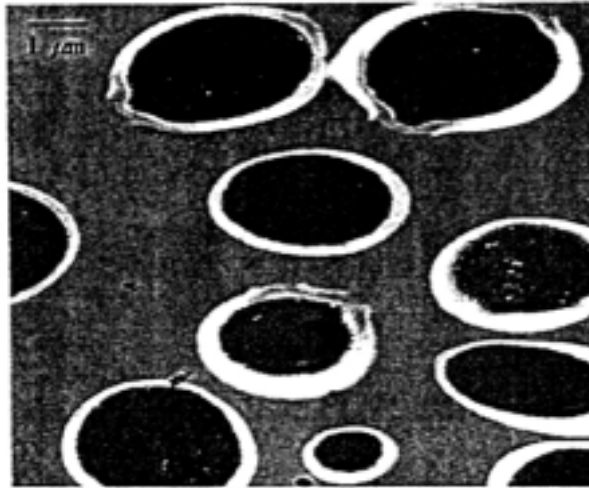


(a) untreated cells



(b) PEF treated cells

Fig. 4-41. Scanning electron micrographs of yeast cells ( $\times 10,000$ )



(a) untreated cells



(b) PEF treated cells

Fig. 4-42. Transmission electron micrographs of yeast cells ( $\times 10,000$ )

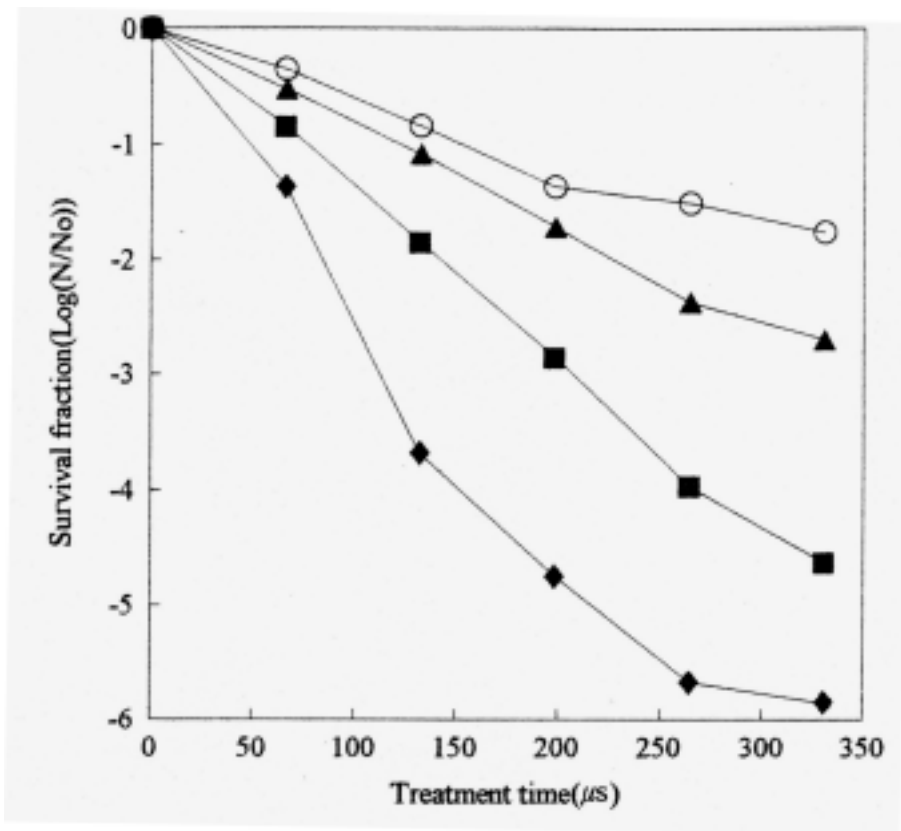


Fig. 4-43. Effect of electric field strength and treatment time on inactivation of yeast in Takju by using square wave pulses at room temperature

◆ 70 kV/cm, ■ 60 kV/cm, ▲ 50 kV/cm, ○ 40 kV/cm

하여 실험을 하였다. 전기장의 세기는 60kV/cm로 하고 66 $\mu$ s 처리하였을 때, 여과한 막걸리의 경우에는 3.5 log cycle의 효모가 감소한 반면 여과하지 않은 막걸리에서는 0.8 log cycle 감소에 그쳐서 역시 고형분의 영향이 크게 있음을 알 수 있었다.

### 2.2.2. 알코올 농도에 따른 막걸리의 PEF 살균

전기장의 세기는 장치에 무리가 가지 않은 정도인 60kV/cm로 하고 flow rate은 1ml/sec, 주파수 1500Hz, 처리 시간은 66~330 $\mu$ s로 변화시키면서 이전에 exponential delay pulse 실험 때와 같은 방법으로 여과하지 않은 막걸리의 알코올 농도를 조절하여 상온에서 square wave pulse를 이용한 PEF 살균 효과를 조사하였다. 초기 효모 수는 1.2~1.9 $\times 10^8$  cfu/ml로 알코올의 농도에 따라 큰 영향을 받지 않았으며 알코올 농도가 6%인 시판 막걸리는 330 $\mu$ s 처리시 4.6 log cycle의 균수 감소를 보였고, 12%로 알코올 농도를 높이면 6 log cycle, 2%로 알코올의 농도를 낮추면 4.1 log cycle의 효모가 감소하여 알코올의 농도가 높을수록 PEF 살균 효과가 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4-44). 실제로 알코올이 PEF를 이용한 미생물의 불활성화에 작용하는 기작에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

### 2.2.3. Square wave pulse와 exponential decay pulse의 살균 효과 비교

Square wave pulse는 system의 에너지가 열로 전환되는 것을 최소화할 수 있기 때문에 미생물의 불활성화에 있어서 exponential decay pulse보다 더 효과적이다. 전기장의 세기는 50 kV/cm로 하고 연속 처리 용기에 1 ml/sec의 flow rate으로 여과하지 않은 막걸리를 흘려 보내면서, 주파수 500~1500Hz로 처리 시간을 22~198 $\mu$ s까지 달리하여 동일한 처리 조건으로 pulse의 모양에 따른 살균 효과의 차이를 조사하였다. 그 결과, 198 $\mu$ s 처리시 효모의 생존율에 있어서 1 log cycle 이상의 차이를 보여 처리 시간이 길어질수록 square wave pulse를 이용한 PEF 살균효과가 exponential decay pulse보다 더 우수함을 알 수 있었다(Fig. 4-45).



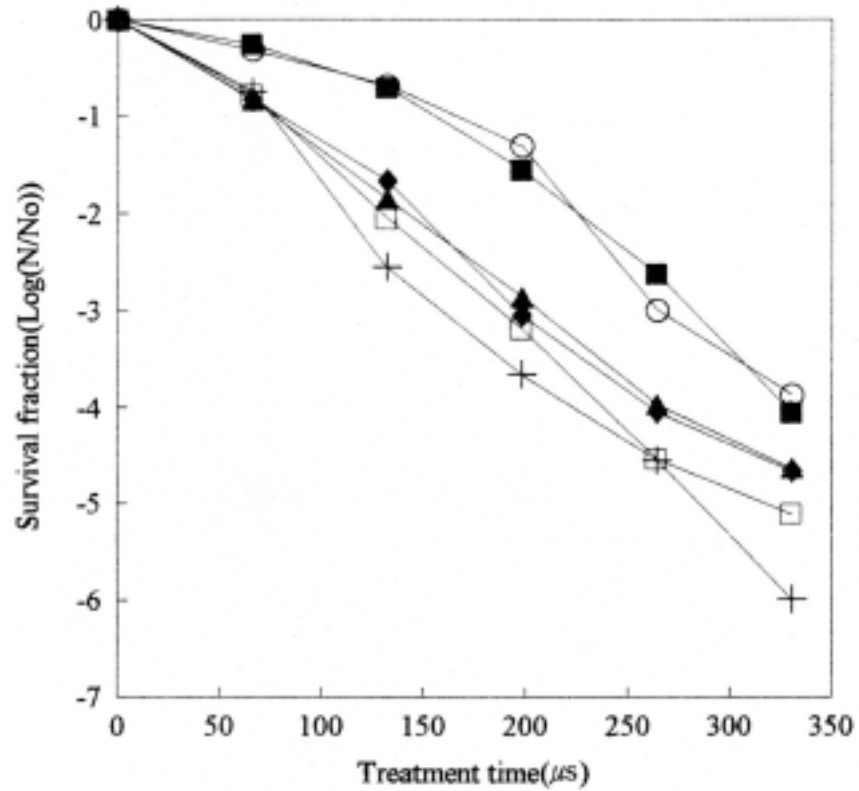


Fig. 4-44. Effect of alcohol content on inactivation of yeasts in Takju (electric field strength 60 kV/cm, square wave pulse, room temperature)

■ 2%, ○ 4%, ▲ 6%, ◆ 8%, □ 10%, + 12%

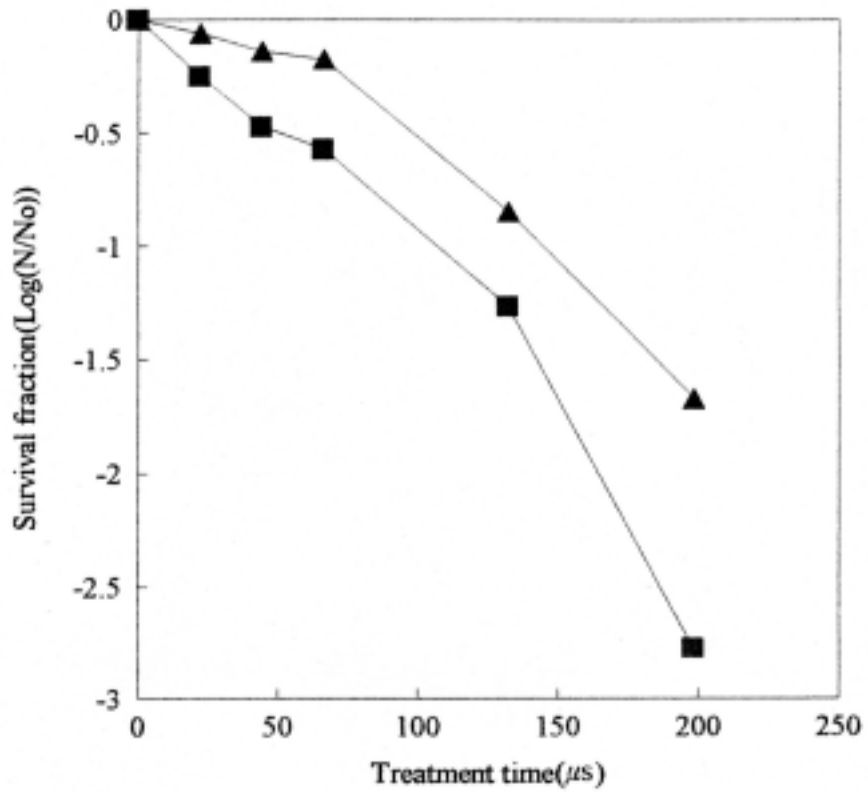


Fig. 4-45. Survival fraction of yeast in Takju after pulsed electric field treatment using exponential and square wave pulses (electric field strength 50 kV/cm)

■ square wave pulse, ▲ exponential pulse

#### 2.2.4. PEF 처리한 막걸리의 저장성 평가

신선한 막걸리를 구입하여 연속 처리 용기를 사용하여 전기장의 세기 60 kV/cm, 1500Hz로 square wave 형태의 펄스를 330 $\mu$ s 걸어주어 실온에서 살균하였다. 고전압 펄스 전기장 처리로 비열 살균한 막걸리를 30℃와 4℃에 저장하면서 일정 간격으로 시료를 채취하여 효모 균수와 산도 및 pH 변화를 4주간 측정하였다. 그림에 나타낸 것과 같이 PEF처리하지 않은 막걸리의 경우 30℃에서 산도는 저장 3일까지 비교적 완만히 증가하였다가 그 후 저장 7일 까지 급격히 증가하였으며 그 이후는 완전히 산패되었다. 이에 비해 고전압 펄스 전기장 처리를 한 막걸리의 경우 30℃에서도 저장 기간동안 거의 변화가 없었다. 저장 온도가 4℃에서는 PEF 처리한 막걸리의 pH와 산도 및 효모 균수에 있어서 큰 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 4-46~4-48).

### 3. 결 론

비열 처리 기술인 고전압 펄스 전기장(PEF)을 이용하여 전통 주류인 막걸리를 비열 살균하여 막걸리의 신선도와 고유의 맛을 유지하면서 장기간 보존하기 위한 공정을 개발하기 위하여 PEF 처리 조건에 따른 살균 효과를 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

실험실 규모의 PEF 장치를 이용하여 회분식 처리 용기에서 10~30 kV/cm의 exponential decay 펄스를 8~256회 가한 결과, 전기장의 세기와 처리 시간이 증가함에 따라 막걸리 내의 효모의 사멸율이 증가함을 확인 할 수 있었고 막걸리에 다량 존재하는 고형분은 PEF의 살균 효과를 감소시키는 것으로 나타났다.

막걸리 중의 효모의 살균에 미치는 PEF 처리 온도의 효과를 알아보기 위하여 막걸리의 품질에 영향을 주지 않은 정도의 저온인 50℃에서 20 kV/cm, 256회의 exponential decay 펄스를 가한 결과 거의 모든 효모가 사멸되어 PEF와 가열 병합 처리가 막걸리의 살균에 매우 효과적임을 알 수 있었다. 또한 알코올의 농도를 2~12%로 변화시키면서 PEF 처리한 결과, 알코올의 농도가 증가할수록 살

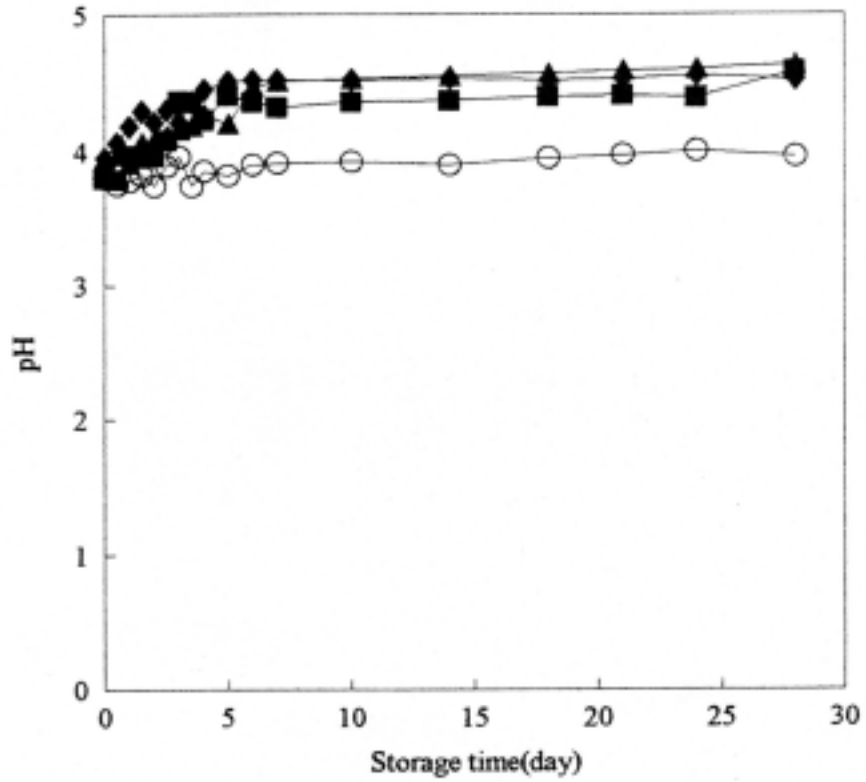


Fig. 4-46. Changes in pH of Takju with and without PEF treatment during storage at 4°C and 30°C

PEF treatment : ◆ 4°C, ▲ 30°C

Without treatment : ○ 4°C, ■ 30 °C

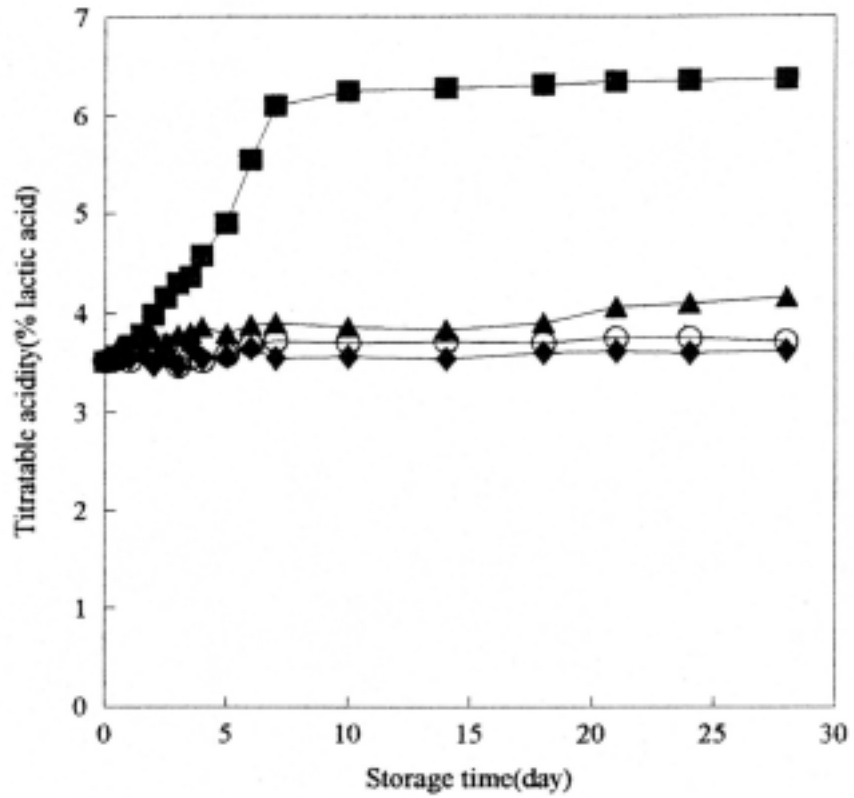


Fig. 4-47. Changes in titratable acidity of Takku with and without PEF treatment during storage at 4°C and 30°C.

PEF treatment : ◆ 4°C, ▲ 30°C

Without treatment : ○ 4°C, ■ 30 °C

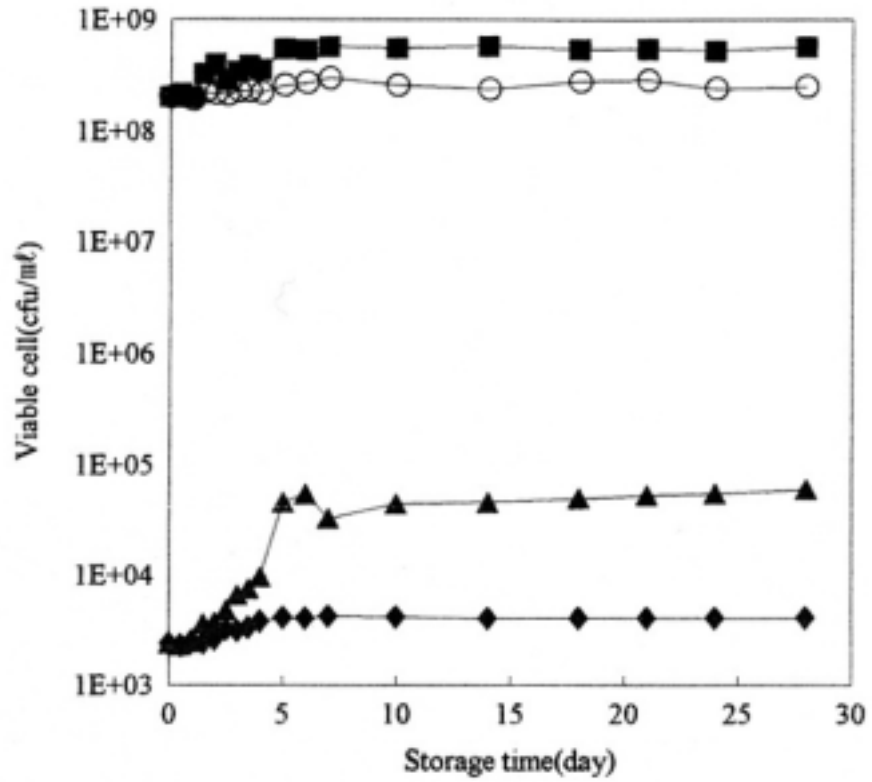


Fig. 4-48. Changes in viable yeast cell count of Takju with and without PEF treatment during storage at 4°C and 30°C.

PEF treatment : ◆ 4°C, ▲ 30°C

Without treatment : ○ 4°C, ■ 30 °C

균 효과도 증가함을 확인하였다.

PEF 처리에 의해 막걸리 내에 존재하는 효모의 형태적 변화를 주사 전자 현미경(SEM)과 투사 전자 현미경(TEM)으로 관찰한 결과, 세포 표면이 찌그러지며 원형질의 심한 손상이 관찰되어 무처리 효모와는 확연히 다른 형태를 나타내었다.

Pilot 규모의 PEF 장치 및 자체 설계·제작한 연속 순환식 처리 시스템을 이용하여 막걸리를 상온에서 펄스폭  $1\mu\text{s}$ 의 square wave 펄스를  $40\sim 70\text{kV}/\text{cm}$ 로,  $22\sim 330\mu\text{s}$  처리한 결과, 전기장의 세기가 강해질수록, 처리 시간이 늘어날수록, 알코올의 농도가 높을수록 PEF에 의한 효모의 살균효과는 증대되었다.

펄스의 형태에 따른 살균 효과의 차이를 알아보기 위하여 막걸리를 exponential decay 펄스와 square wave 펄스로 각각  $50\text{kV}/\text{cm}$ ,  $198\mu\text{s}$  처리한 결과 효모의 생존율이 1 log 이상의 차이를 보여 처리 시간이 길어질수록 square wave pulse의 살균 효과가 exponential decay pulse보다 더 우수함을 알 수 있었다.

PEF 처리한 막걸리와 무처리 막걸리를  $4^\circ\text{C}$ 와  $30^\circ\text{C}$ 에 각각 저장하면서 적정 산도, pH, 균수의 변화를 측정하여 PEF 처리에 의한 막걸리의 저장성을 평가한 결과, 무처리 막걸리는 일주일만에 산패된 반면, PEF 처리하여 냉장 보관한 막걸리는 품질 변화가 거의 없어 저장성이 현저히 향상되었음을 확인하였다.

#### 제 4 항 고전압 펄스 전기장에 의한 전통 음료의 살균

우리나라에는 다양한 발효식품, 특히 발효음료가 오랫동안 응용되어 왔는데 대부분의 발효음료는 미생물 생육에 양호한 환경을 제공하는 성분조성을 보이기 때문에 제한된 저장기간(품질유지기간)을 갖고 있다. 이러한 발효음료의 대량생산 및 소비를 위해서는 저장성을 확립이 필요하며 이를 위해서 가장 간편하고 보편적으로 사용되는 방법이 가열살균이다. 그러나 가열에 의한 영양성분의 파괴, 향미의 손실 및 이취발생, 변색 등에 기인한 품질열화가 수반되므로 고품질 제품의 생산을 위해서는 가열살균을 대체할 수 있는 새로운 기

술 개발이 필요한 실정이다.

우리나라의 대표적 발효식품인 김치 중에서 액을 다량 함유하는 동치미는 주로 겨울철에 즐겨 먹던 식품이지만 냉장기술의 발달과 원료 재배기술의 발달로 계절에 따른 제한이 없어지면서 사철 소비가 증가되고 있는 식품이며, 액상제품으로 개발, 보급된다면 상품성이 대단히 높을 것으로 예상된다. 동치미 발효는 토양등 자연에 존재하는 미생물에 의한 젖산발효를 이용한 식품인데 제조과정에서 젖산균 이외의 미생물도 혼재하게 되며 적정 발효기간 경과 후에는 젖산균과 기타 미생물의 생육을 억제하여야만 장기간 품질을 유지할 수 있다. 그러나 동치미를 가열할 경우 동치미 고유의 향, 맛 등이 심각하게 변화하여 상품성을 잃게 되므로 가열살균이 불가능한 식품으로 열을 사용하지 않는 보존성 향상시키는 비열살균기술의 적용에 매우 적합한 식품이다.

약주는 우리나라의 대표적인 전통주로 오랫동안 애용되어 왔으나 식량 자원 부족, 수입주류 증가, 주류 소비패턴 변화 등의 이유로 1970년대 이후 소비가 지속적으로 감소해 왔다. 다행히 최근 건강에 대한 관심이 고조되면서 약재를 첨가한 다양한 약주의 재현 및 신제품 개발, 약주 효능에 대한 과학적 검증 등에 힘입어 기능성과 품질을 높인 약주제품이 인기를 얻어 가고 있으며 차츰 고급 주류로서 자리를 잡아감에 따라 약주의 소비가 늘어나기 시작하고 있다. 그러나 약주도 가열살균할 경우 향 소실, 이취 발생, 단백질 변성에 의한 백탁, 변색 등의 품질변화를 가져오므로 가열살균공정을 대체할 수 있는 비열처리기술에 의한 저장성 증진 및 품질 향상 기법의 개발이 필요하다.

포도주는 오랜 옛날부터 인류가 즐기던 대표적인 주류로서 향과 맛이 우수하고 최근 심장질환 예방효과 등 건강증진 효과가 밝혀짐에 따라 관심이 고조되고 있는 주류이다. 그러나 포도주 발효 및 저장 중 잡균의 번식을 억제를 위해 아황산을 처리하는데 이에 따른 유해성 논란이 제기되고 있고 보존성을 위해 알콜함량을 비교적 높게 제조하기 때문에 음용 후 정상적인 활동에 제한을 받게 된다. 따라서 포도주의 알콜함량을 낮춘 저알콜 포도주를 생산할 필요가 제기되고 있으나 이상발효, 미생물의 오염, 저장 중 맛과 향의 변화에 의



한 상품가치의 상실 등의 문제의 해결이 선행되어야 하는데, 저알콜 포도주를 가열하여 살균할 경우 특유의 과실 향과 신선한 맛을 잃게 되므로 저알콜 포도주 생산을 위해서는 비열살균기술의 개발이 필요하다.

한편 우리나라의 음료소비 경향은 탄산음료 위주에서 건강지향적인 제품으로 소비패턴이 변화고 있다. 특히 전통음료에 대한 선호도가 급격히 증가하여 식혜, 매실음료, 곡류음료 등이 시장에서 강세를 나타내고 있다. 그 중에서도 식혜는 전통음료를 재현한 제품으로 캔제품이 주종을 이루며 꾸준히 소비되고 있는 대표적인 제품이다. 그러나 이들 캔제품은 가열살균시 발생하는 Maillard 반응과 카라멜화 반응에 의한 갈변이 심하여 관능적 품질을 낮추므로 이의 개선이 필요하며, 아울러 식혜의 밥알에 대한 별도 처리방안이 요구된다. 따라서 식혜를 현대인의 감각에 맞도록 순수 액상음료로 가공하는 방법의 개발이 필요하며 제품의 보존성 증진을 위한 방안의 확립이 필요하다.

본 연구에서는 비열살균기술로서 PEF를 이용한 제품 살균기술을 개발하고, 식품 특성상 가열 조작을 할 경우 제품의 물리적, 화학적 변화가 뚜렷하게 발생하여 가열살균을 실시할 수 없는 여러 전통식품에 적용함으로써 품질이 양호하고 보존성 있는 음료제품을 생산하기 위한 방안을 마련하고자 하였다.

이를 위하여 선택된 각종 식품, 즉 동치미음료, 약주, 저알콜 포도주, 쌀당화음료의 식품학적 기초특성을 조사하고 PEF 처리에 의한 각각의 식품에 존재하는 미생물의 사멸기구를 해석하여 적정 살균조건을 설정한 후 살균처리 제품의 저장성을 조사하여 이들 식품의 제품화에 필요한 PEF 살균기술을 완성하고자 하였다.

## 1. 실험 재료 및 방법

### 1.1. 실험 재료

#### 1.1.1. 동치미 음료

본 연구에서 사용한 동치미음료는 액의 수율을 높이기 위하여 원료를 마쇄하여 사용하고 젖산균 스타터를 첨가하여 속성으로 발효한 후 희석, 조미한 액상 음료 제품을 제조하여 사용하였으며 원료 조성 및 제조 방법은 다음과 같다. 마쇄한 원료의 배합비는 무 28.2%, 파 2.8%, 마늘 0.5%, 생강 0.4%, 설탕 1.4%, 식염 0.25 ~ 1.0%, 물 65.7%로 하였으며, 원료를 혼합한 후 예비 실험을 통하여 적정 동치미 제품 발효용 균주로 선발된 *Pediococcus acidilactici*와 *Lactobacillus plantarum*을 1:1로 혼합한 냉동 건조 스타터를 혼합 원료 중량의 0.05% 수준으로 첨가한 후 역시 예비 실험을 통해 결정한 적정 발효 조건인 37℃에서 12시간 발효하여 발효 원액을 완성하였다. 완성된 발효 원액을 70 mesh 나일론 필터로 여과하고 회수된 여액에 그 중량의 2배의 물을 가함으로써 3배로 희석한 후 조미를 위해 1.5% 수준으로 설탕을 첨가한 액을 동치미 음료로 정의하고 실험 재료로 사용하였다.

#### 1.1.2. 약주

본 연구에서 사용한 약주는 김포양조공사(서울 강서구 화곡동 소재)에서 소맥분, 옥수수 전분, 종국을 사용하여 제조한 것으로 60시간 발효 후 상온에서 일주일 숙성하여 압착 여과하고 구조토로 2차 여과한 약주를 재료로 사용하였다. 약주의 수집, 처리 및 운송은 멸균한 배지병을 사용하였으며 냉장 조건을 유지하여 운반함으로써 운송 중 미생물학적 변화를 억제하였다.

#### 1.1.3. 포도주

포도주는 2000년산 영동학산 포도를 구입하여 제조하였다. 포도를 수세한 후 마쇄하고  $K_2S_2O_5$ 를 200ppm 수준으로 처리하여 3시간 경과 후 거즈를 사용하여 여과하여 과즙을 분리하였다. 여과 과즙의 당도를 측정하고 최종 당도가 24. Brix가 되도록 설탕량을 계산하여 가당한 후 30℃에서 12시간 배양한 효모 스타터(*Saccharomyces cerevisiae*)를 0.5% 수준으로 첨가하고 25℃에서 2주간 발효하였다. 발효 후 70 mesh 나일론 필터로 여과하여 유리병에 옮겨 15℃에서 6주간 숙성하

였다. 숙성이 끝난 후 다시 70 mesh 나일론 필터로 여과하여 실험에 공시하였다.

#### 1.1.4. 쌀당화 음료

본 연구에 사용한 쌀당화 음료는 증자한 쌀과 맥아 추출액을 원료로 기존의 식혜 제조 방법과 유사한 방법으로 제조하여 사용하였으며 원료 조성 및 제조 방법은 다음과 같다. 먼저 쌀을 물에 30분간 침지하여 수화시킨 후 물을 빼고 거즈에 싸서 121℃에서 15분간 증자하여 증자미를 제조하였다.

맥아 추출액의 제조는 맥아와 물을 1:15(w:w)로 혼합한 후 교반기(Yamato LR500B, Japan)를 사용하여 30 rpm의 속도로 교반하며 2시간 동안 추출하여 30 mesh 체로 1차 여과, 70 mesh 체를 사용하여 2차 여과, 200 mesh 체를 사용하여 최종(3차) 여과한 여액을 회수하여 완성하였다.

쌀당화 음료 제조는 스텐레스 스틸 용기에 증자미와 맥아 추출액을 1:8 (w:w)의 비율로 혼합한 후 히터를 사용하여 교반기(Yamato LR500B, Japan)로 30 rpm으로 교반하면서 60℃가 될 때까지 가열하였다. 온도가 60℃에 도달하면 용기를 60℃ 배양기로 옮겨 간헐적으로 교반하면서 5시간 동안 당화한 후 70 mesh 나일론 필터를 사용하여 여과한 액을 회수함으로써 쌀당화 음료 제조를 완성하였다.

## 1.2. 총 처리 시간의 계산

연속 재 순환식 처리 장치를 사용한 PEF 연구에서는 총 처리 시간의 정량화가 필요하다. PEF 처리 시 용기 부피, 유량, 주파수, 순환횟수에 따른 누적처리시간을 총 처리 시간으로 정의하고 다음과 같이 계산하였다.

약주가 순환식 용기를 한 번 순환하는데 걸리는 시간을  $t$  ( $\mu\text{s}$ )라고 할 때,

$$t = n \cdot \tau$$

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

라고 나타낼 수 있다. 여기서,  $n$  = 펄스 수,  $f$  = 주파수(1/s),  $V$  = 용기의 부피 (mL),  $\dot{m}$  = 유량(mL/s),  $\tau$  = 펄스폭( $\mu\text{s}$ )이다. 결국,  $i$ 회 순환시 총 처리 시간 ( $t_{\text{total}}$ )은 아래 식과 같다.

$$t_{\text{total}} = i \cdot t$$

### 1.3. 미생물 수 측정 및 생존율의 계산

PEF 처리 시료의 미생물 수는 한천 평판을 이용한 평판 도말법으로 측정하여 colony forming unit(CFU)/mL로 나타내었다. 세균(total aerobes)의 경우 시료를 적정 배수가 되도록 멸균수로 희석하여 plate count agar (Difco, USA)에, 젖산균은 Rogosa SL agar (Difco, USA)에, 효모는 malt extract agar (Difco, USA)에 도말하여 세균과 젖산균은 37°C에서 48시간, 효모는 30°C에서 48 ~ 72시간 배양한 후 집락 수를 측정하였다. PEF 처리에 따른 미생물별 생존율(s)은 초기 미생물 수( $N_0$ )에 대한 PEF 처리 후의 미생물 수( $N$ )의 비로 표시하였다. PEF 처리에 따른 미생물별 생존율(s)은 초기 미생물 수( $N_0$ )에 대한 PEF 처리 후의 미생물 수( $N$ )의 비로 표시하였다.

$$s = N/N_0$$

### 1.4. 살균 기구

회분식 PEF 처리 시 펄스 수 및 연속식 PEF 처리 시 총 처리 시간에 따른 균수의 변화는 우선 다음과 같은 1차 반응으로 해석하였다.

$$\ln(s) = -k_b n \quad (\text{회분식})$$

$$\ln(s) = -k_c t_{\text{total}} \quad (\text{연속식})$$

여기서  $k_b$  = 회분식 처리시 사멸 속도 상수 ( $\text{pulse}^{-1}$ ),

$k_c$  = 연속식 처리시 사멸 속도 상수 ( $\mu\text{s}^{-1}$ )

한편 PEF사멸 패턴을 1차 반응으로 나타낼 수 없는 경우에는 Hülshager 등이 제시한 아래의 모델을 사용하여 해석하였다.

$$\ln(s) = A - k_H \ln(n)$$

여기서  $k_H = \text{Hülsheger}$  모델의 사멸정수

한편 PEF 살균시 미생물 수를 1/10로 낮추는데 필요한 처리 시간( $\mu\text{s}$ )을 나타내는  $D_{\text{PEF}}$ 값은 처리시간에 따른  $\log(s)$ 를 그려 얻어지는 직선의 기울기의 역수를 취하여 산출하였다. 또한 가열 살균 이론의  $z$ 값에 해당하는 PEF 살균시의  $z_{\text{PEF}}$ 값은 전기장 세기와  $\log(D_{\text{PEF-value}})$ 를 그려 얻어진 직선의 기울기의 역수로부터 계산하였다. 즉  $D_{\text{PEF}}$ 값을 1/10로 단축하는데 필요한 전기장 세기 증가량을  $z_{\text{PEF}}$ 값으로 정의하고 미생물 종류별로 비교하였다.

#### 1.5. 미생물 사멸 패턴 모델링

온도와 전기장 세기의 미생물 사멸에 미치는 영향을 아래 모델에 의거하여 조사하였으며 회귀 직선의 기울기로부터  $K_T$  및  $K_E$ 를 계산하였다.

$$\log(N_0/N) = K_T \cdot T$$

$$\log(N_0/N) = K_E \cdot E$$

여기서 T: 온도 ( $^{\circ}\text{C}$ )

E: 전기장 세기(kV/cm)이다.

아울러 전기장 세기와 온도의 영향을 비교하기 위하여 중선형 회귀 분석 또는 반응표면 분석법으로 모델링하였다. 이들 모델링은 모두 SAS를 사용하여 실시하였다.

#### 1.6. 이화학적 특성 및 관능 특성

##### 1.6.1. pH 및 전기전도도

동치미와 약주의 pH는 pH meter (Orion, 520-A, USA)로, 전기전도도는 pH meter/controller (Model 1260, Germany)를 사용하여 측정하였다.

#### 1.6.2. 색도

시료의 색도 측정은 시료를 폴리프로필렌 petri dish에 가득 채우고 cover 를 덮은 후 standard white plate 위에 올려 놓고 cover 위에서 색차계(Minolta CR-200, Minolta Camera Co., Japan)를 사용하여 L값, a값, b값을 측정하고 아래 식을 사용하여 색차( $\Delta E$ )를 계산하였다. 색차계의 보정은 시료를 채우지 않은 petri-dish를 standard white plate 위에 놓고 실시하였다.

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

#### 1.6.3. 적정산도

적정 산도는 시료 10 mL를 취하여 지시약(0.1% phenolphthalein)을 가하고 0.1 N NaOH로 적정하여 다음 식에 따라 산출하였다.

$$\text{산도}(\% \text{젖산}) = \frac{\text{NaOH 적정량}(\text{mL}) \times \text{역가}(f) \times 0.009}{\text{시료량}(\text{mL})}$$

#### 1.6.4. 탁도

약주의 탁도는 660nm에서 흡광도를 분광광도계(Shimadzu UV-1201, Japan)로 측정하였다.

#### 1.6.5. 향 분석

약주의 향기 성분 추출은 용매 추출법과 solid phase microextraction(SPME)법을 사용하였다. 용매 추출법은 cap test tube에 약주 30 mL, dichloromethane 5 mL와 9.72  $\mu\text{g}$ 의 3-heptanol (internal standard)을 넣은 후 2 시간동안 상온에서 교반하였다. 이 후 원심 분리하여 용매와 수분층을 분리시킨 후 용매층을 Pasteur pipette으로 취하여 test tube에 넣고  $-20^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 방치하여 냉동에 의해 수분을 제거하였다. 여분의 수분은 2g의 무수 sodium

sulfate로 제거하고 질소기체 하에서 100  $\mu$ L까지 농축한 후 gas chromatography/olfactometry (GC/O, aroma extract dilution analysis)를 행하였다.

SPME법에서는 약주 15 mL를 vial에 넣고 capping하여 40 $^{\circ}$ C에서 20분간 정치한 후 비극성 fiber인 100 $\mu$ m polydimethylsiloxane fiber로 20분 동안 향을 포집하였다. 포집된 향은 GC injector에서 1분간 desorption시킨 후 GC/O를 행하였다. 또한 극성 fiber인 65 $\mu$ m polydimethylsiloxane/divinyl benzene fiber로 25 $^{\circ}$ C에서 40분간 향을 포집한 후, GC injector에서 1분간 desorption시켜 GC/O를 행하였다.

향추출물은 aroma extract dilution analysis법으로 GC/O를 행하였다. 즉 향추출물을 단계적으로 (1:3, 1:9 등) 희석하여 각각을 sniffing port가 부착된 Varian 3350 gas chromatograph에서 GC/O를 행하였다. 냄새가 더 이상 느껴지지 않을 때의 희석 배수를 flavor dilution(FD) factor라 정의하였으며, 따라서 FD factor가 클수록 강한 향기 성분을 의미한다.

Column으로는 DB-wax (30m x 0.25 mm i.d. x 0.25  $\mu$ m film thickness)를 사용하였고, oven온도는 처음에 40 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지한 후 8 $^{\circ}$ C/min속도로 온도를 올렸으며 200 $^{\circ}$ C까지 올린후 20분간 유지하였다. Injector 온도는 200 $^{\circ}$ C였으며, FID detector 온도는 250 $^{\circ}$ C였다. 시료 주입은 splitless mode (valve time 0.75min)로 1  $\mu$ L를 injection하였다. Sniffing test에 의한 향의 강도는 가장 강하게 느껴지는 것을 10점으로 가장 약하게 느껴지는 것을 1 점으로 나타내었다.

#### 1.6.6. 관능특성

관능 검사는 9점 채점법으로 평가하였으며 결과는 SAS를 사용하여 유의차를 분석하였다.

#### 1.7. 미생물의 현미경 관찰

PEF 처리에 의한 미생물의 형태 변화는 현미경(Nikon Diaphoto 300,

Japan)을 사용하여 조사하였으며 화상 분석기(BMI plus, US)를 현미경에 부착하여 화상을 얻었다.

## 1.8. 저장성 평가

PEF 처리한 시료를 4℃ 와 30℃에서 저장하면서 저장 기간동안의 pH와 적정 산도, 미생물 수를 조사하였으며 무처리구와 비교하였다.

## 2. 실험 결과 및 고찰

### 2.1 고전압 펄스 전기장을 이용한 동치미 음료의 살균

#### 2.1.1. 동치미음료의 일반 특성

마쇄 원료를 사용하여 스타터를 첨가하고 염농도 1%에서 37℃에서 12시간 발효하여 3배 희석 후 조미한 동치미 음료의 일반 이화학적 및 미생물학적 특성은 Table 4-11과 같다. 동치미 음료의 pH는 3.50였으며 산도는 0.09%를 나타냈다. 동치미 음료의 미생물 수는 일반 호기성 세균(이하 세균이라 칭함)  $1.2 \times 10^8$  CFU/mL, 젖산균  $1.2 \times 10^8$  CFU/mL, 효모  $4.0 \times 10^8$  CFU/mL로서 동치미에 존재하는 세균은 대부분 스타터에 함유된 젖산균임을 알 수 있었으며, 발효 중 효모수도 함께 높아지는 현상을 보였다. 효모의 발육은 무와 과, 마늘 등의 향신료 등 동치미음료의 원료에서 유래된 것으로 생각되며 동치미 발효는 효모 생육에 적합한 환경을 제공하는 것으로 나타났다. 즉 효모와 젖산균이 동치미 음료의 풍미에 기여하는 것으로 생각되며 신선한 산미를 주는 젖산 발효와 함께 청량감을 주는 탄산가스를 생성하는 알콜 발효가 동시에 일어남을 알 수 있었다.

#### 2.1.2. 염농도에 따른 동치미음료의 특성

염농도를 변화하며 발효함으로써 제조한 동치미음료의 pH 및 전기 전도



Table 4-11. Physicochemical and microbial properties of Dongchimi beverage

Properties	Values
pH	3.50
Acidity (%)	0.09
Total aerobes	$1.2 \times 10^8$ CFU/mL
Lactic acid bacteria	$1.2 \times 10^8$ CFU/mL
Yeast	$4.0 \times 10^8$ CFU/mL

도를 Table 4-12에 정리하였다. 즉 마쇄 원료를 37℃에서 발효한 동치미 원액을 3배 희석하여 제조한 동치미 음료의 pH는 식염을 첨가하지 않고 발효한 경우 3.47이었고, 식염 첨가량이 0.25%인 경우는 3.29 였으며, 0.5%의 식염을 첨가하였을 경우는 3.24를 나타내 식염을 첨가한 경우 산 생성량이 증가하였으나 식염을 1% 첨가한 경우에는 pH가 3.50으로 높아졌다(Table 4-11). 동치미 음료의 전기 전도도는 식염을 첨가하지 않고 발효하여 제조한 경우 0.607 mS/cm이었으며 식염 첨가량 0.25%와 0.5%에서 발효하여 제조한 경우 각각 전기전도도 1.405와 2.130 mS/cm의 값을 보여 식염 첨가량이 증가할수록 높은 값을 나타내었다. 따라서 이후의 동치미 음료는 pH가 가장 낮았던 식염첨가량인 0.5% 수준으로 첨가하여 발효한 원액을 사용하여 제조하였다.

### 2.1.3. 동치미 음료의 PEF 살균

동치미 음료를 대상으로 소규모 PEF 처리장치에서 exponential decay wave 형태의 펄스를 사용하여 연속 재순환식 또는 회분식으로 처리하였으며 이에 따른 미생물별 살균 특성을 조사하였다.

#### 2.1.3.1. 연속 재순환식 PEF 살균

PEF의 미생물 불활성화 효과는 통상 유전 파괴(dielectric breakdown) 이론으로 설명되어 지는데, 이는 전기장이 세포막 내외부에 전위차를 유도하고 이에 따라 세포막에서 전하의 분리가 일어나며, 세포막 내외부에 반대 전하를 띤 분자들 간의 전기적 압축작용으로 인하여 세포막에 틈이 생기며, 전기장 세기가 임계 전기장 세기( $E_C$ , critical electric field strength)를 초과할 경우 세포막에 비가역적인 구멍이 생겨 세포막이 파괴되고 세포가 죽는다는 이론이다.

소규모 연속 재순환식 처리장치를 이용하여 주파수를 200 Hz로 고정시키고 30~50 kV/cm의 전기장에서 총처리시간(누적 처리시간)을 500~2,000  $\mu$ s로 변화시키면서 처리한 결과로부터 최소 임계전기장 세기( $E_C$ )를 측정하였으며 생존율을 조사하여 미생물 종류별 사멸 현상을 해석하였다.

Table 4-12. Effects of salt concentration on pH and conductivity of Dongchimi beverage

Salt concentration (%)	pH	Conductivity (mS/cm)
0.00	3.47	0.607
0.25	3.29	1.405
0.50	3.27	2.130

전기장 세기를 30~50 kV/cm로 달리하여 400  $\mu$ s와 600  $\mu$ s 동안 처리한 동치미음료 세균의 생존율을 측정된 결과 전기장 세기가 증가함에 따라 생존율이 감소하였다. 전기장 세기별 동치미음료 세균의 감소 패턴을 알아보기 위하여 전기장 세기에 따른 생존율 변화를 반대수지에 작도한 결과 Fig. 4-49와 같이 전기장 세기에 따라 log(s)가 직선적으로 감소하였다.

또한 연속 재순환식 PEF 처리 장치에서 동치미 음료 미생물의 비가역적 불활성화를 유도하는 임계 전기장 세기( $E_c$ )를 측정하였다. 임계 전기장 세기는 미생물의 불활성화에 영향을 미칠 수 있는 최소 전기장 세기로 정의될 수 있으므로 Fig. 4-49에서 얻어진 직선을 외삽하여 생존율 1.0인 선(초기 생존율)과의 교점에 해당하는 전기장 세기를 읽어 임계 전기장 세기로 환산하였으며, 이 경우  $E_c$ 값은 27 kV/cm로 확인되었다. 이 값은 Grahl과 Markl이 보고한 *E. coli*의 11.9 ~ 14.2 kV/cm, *L. brevis*의 11.5 ~ 12.6 kV/cm에 비하여 상당히 큰 값을 보였다. 이는 본 실험에 사용한 PEF장치는 소규모 실험실용 장비의 초기 모델이었으며 운영방식도 재순환식으로 운영하여 불활성화된 미생물이 생존 미생물을 함유하는 원액에 되돌려졌기 때문으로 생각된다.

한편  $E_c$ 값은 PEF의 펄스 폭에 따라 변화하는 것으로 알려져 있으며 Schoenbach 등은 펄스 폭이 2 $\mu$ s인 경우  $E_c$ 값이 40 kV/cm인데 반해 펄스 폭이 50  $\mu$ s으로 커진 경우에는 4.9 kV/cm로 작아짐을 보고한 바 있다.

전기장 세기를 달리하여 처리시간에 따른 동치미음료에 존재하는 세균의 생존율 변화는 Fig. 4-50에서 보는 바와 같이 전기장 세기와 총 처리 시간이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 전기장 세기 30 kV/cm에서 2000  $\mu$ s 동안 처리한 동치미 음료의 세균은 1 log정도 감소하였고 이후 처리 시간이 늘어나도 생존율 감소는 뚜렷이 증가하지 않았다. 반면 전기장 세기 40 kV/cm로 처리한 동치미 음료의 경우 처리시간에 따라 대수적으로 감소하였으며 1000  $\mu$ s 동안 처리한 후에는 3 log 정도 감소하였다. 50 kV/cm 의 전기장에서는 처리시간 500 $\mu$ s까지는 급속히 사멸되었으나 이후에는 처리시간에 따라 생존율의 감소 속도가 낮아지는

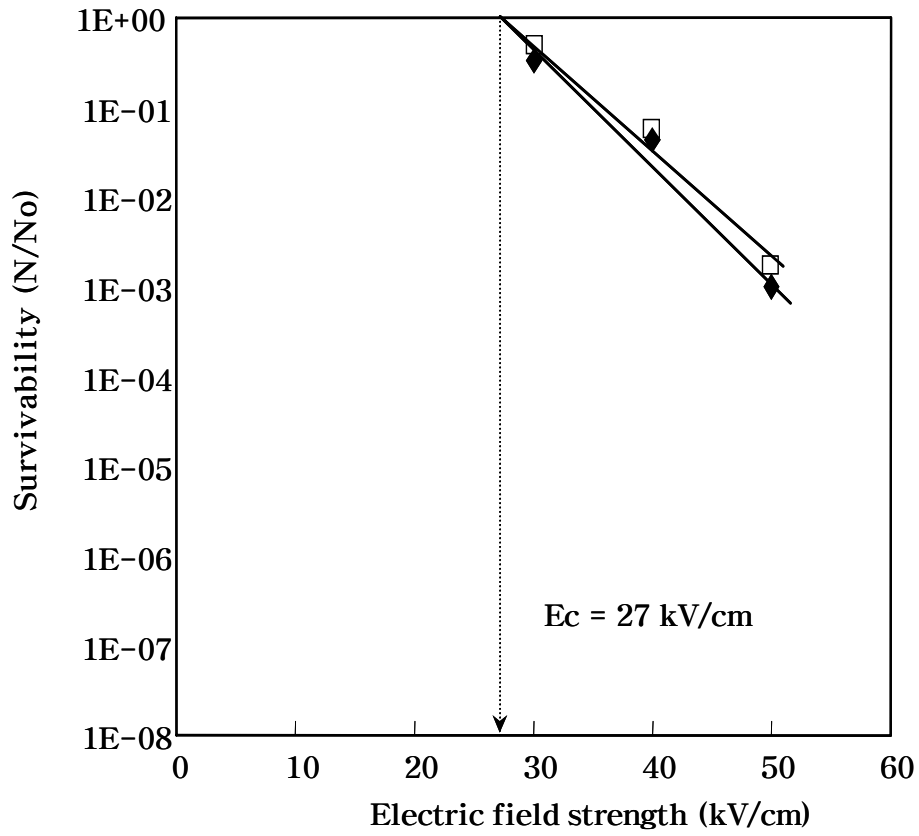


Fig. 4-49. Critical electric field strength for total aerobes of Dongchimi beverage

□ 30kV/cm      ◆ 40kV/cm      ▲ 50kV/cm

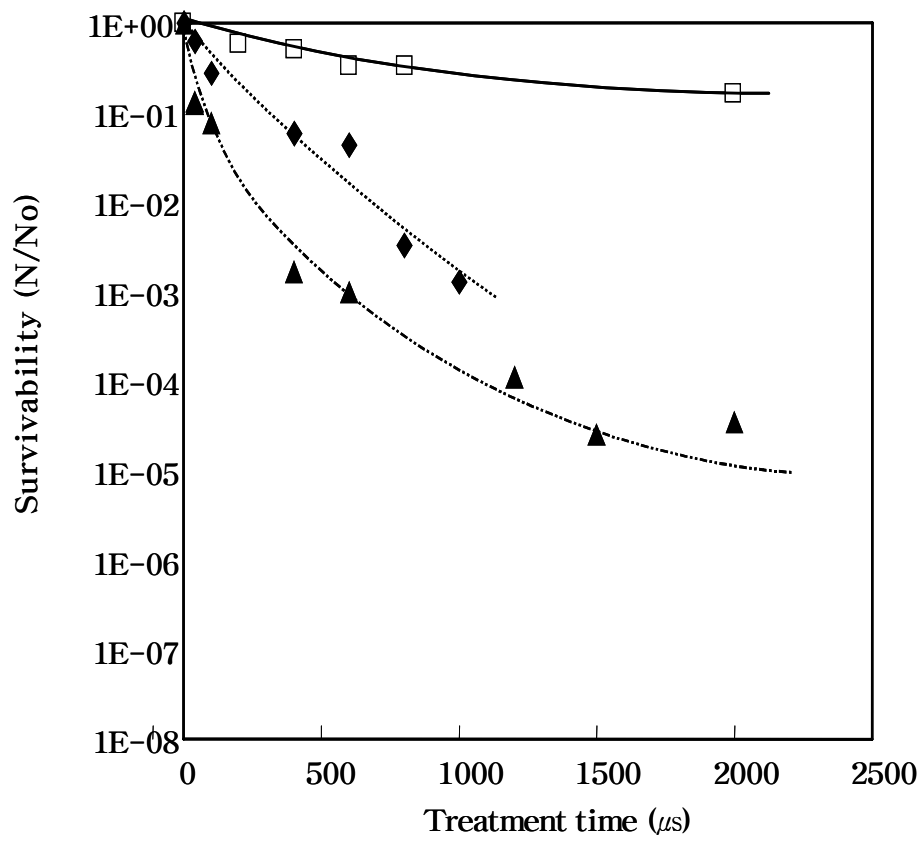


Fig. 4-50. Effect of electric field strength on survivability of total aerobes in Dongchimi beverage

□ 30kV/cm      ◆ 40kV/cm      ▲ 50kV/cm

경향을 보였으며 1500  $\mu$ s 동안 처리한 경우 세균의 생존율이 4.5 log정도 감소하였다.

이 결과는 세균에 따라 PEF 저항성이 다름을 나타내며, 연속 재순환 방식으로 PEF 처리할 경우 높은 전기장과 긴 처리시간에도 생존할 수 있는 세균이 존재하는 것을 의미한다. 아울러 연속 재순환 방식의 경우 소량의 시료가 PEF 처리된 후 다시 reservoir로 돌아가 처리 전 시료와 혼합되기 때문에 장시간 처리 후에도 생존 세균이 나타나는 것으로 생각된다.

동치미음료에 존재하는 젖산균의 PEF 사멸패턴은 Fig. 4-51에 나타난 바와 같이 처리시간과 전기장세기가 증가함에 따라 감소정도가 급격해졌으며, 전반적인 사멸패턴은 Fig. 4-50의 세균과 유사하였다.

한편 효모의 경우는 Fig. 4-52과 같이 처리시간과 전기장 세기에 따라 생존율이 감소하였으며, 세균 및 젖산균에 비해 동일 조건에서 더 낮은 생존율을 보여 세균에 비해 PEF 감수성이 큰 것으로 나타났다. 즉 전기장 세기 50 kV/cm에서 1000  $\mu$ s 처리한 경우의 효모의 생존율은 5 log 정도 감소하여 4 log 정도가 감소한 세균과 젖산균에 비하여 감소정도가 크게 나타났다.

일반적으로 PEF 감수성은 세포크기에 비례하는 것으로 알려져 있으며, 따라서 세포의 크기가 큰 효모의 세포막 내외에 걸리는 전위차가 크기가 작은 세균에 비하여 높아지므로 PEF 감수성이 높아지는 것으로 여겨진다.

### 2.1.3.2. 소규모 회분식 시스템에서 PEF 살균

동치미음료에 존재하는 미생물의 PEF 처리에 의한 정확한 사멸패턴을 조사하기 위하여 전극 간격 4 mm, 처리부피는 1 mL인 disposable electroporation cuvette(Bio-Rad, USA)에 시료를 가하고 전기장세기 12.5 ~ 25 kV/cm에서 회분식으로 exponential decay wave 형태의 펄스(펄스 폭 1 $\mu$ s)를 128회 처리한 결과 생존율은 Table 4-13과 같았다.

즉 전기장 세기 22.5 kV/cm에서 128회의 펄스를 처리하였을 때 미생물 수는 처리 전 상태의 약 1/10 수준으로 감소되는 것이 관찰되었으며 25 kV/cm에

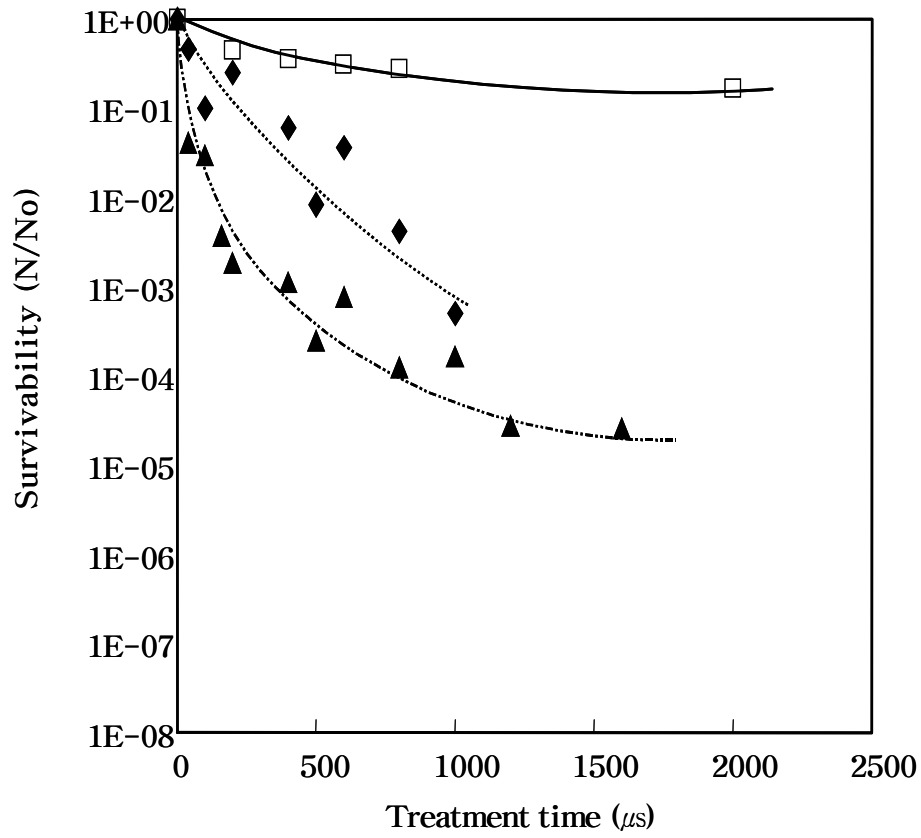


Fig. 4-51. Effect of electric field strength on survivability of lactic acid bacteria in Dongchimi beverage

□ 30kV/cm      ◆ 40kV/cm      ▲ 50kV/cm



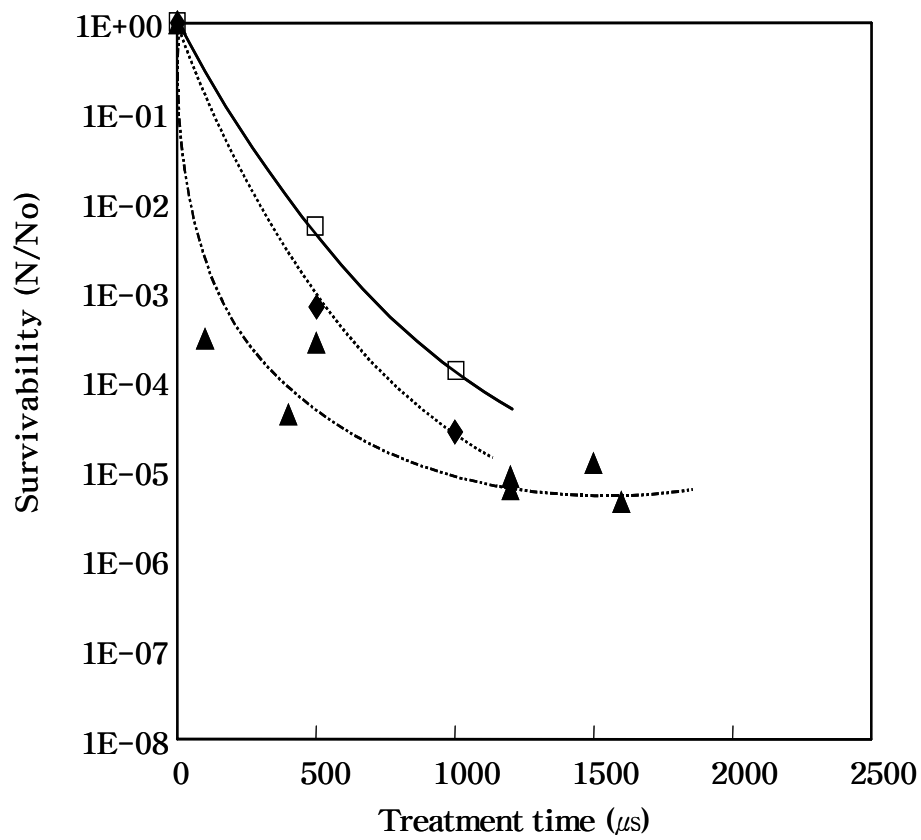


Fig. 4-52. Effect of electric field strength on survivability of yeast in Dongchimi beverage

□ 35kV/cm      ◆ 45kV/cm      ▲ 50kV/cm

Table 4-13. Survivability of microorganisms of Dongchimi beverage at 128 pulse treatment at different electric field strength

Electric field strength (kV/cm)	Survivability		
	Total aerobes	Lactic acid bacteria	Yeast
12.5	0.833	0.8875	0.765
22.4	0.158	0.0875	0.0922
25.0	0.0238	0.04	0.0195

서 처리한 경우의 미생물 수는 1/25 ~ 1/50 수준으로 감소되었다. 동일 전기장 세기에서 미생물 종류에 따라 생존율을 비교하면 효모의 생존율이 세균에 비하여 낮은 값을 보여 효모의 PEF 민감성이 세균보다 큰 것으로 나타나 연속 재순환식으로 운영하였을 때와 동일한 차이를 보였는데, 이 또한 효모의 크기가 세균보다 크므로 동일한 세기의 전기장에서 더 큰 세포막간 전위차가 발생하였기 때문이다.

한편 전기장 세기에 따른  $\log(s)$ 의 변화를 작도하면 Fig. 4-53와 같이 전기장 세기에 따라 직선적인 감소양상을 보였다. 이 직선을 생존율 1.0인 지점까지 연장하여  $E_c$ 값을 구하였으며, 회귀식을 이용하여 구한  $E_c$ 값을 Table 4-14에 나타내었다.

회분식 운영 시 동치미음료의 미생물별 PEF살균에 필요한  $E_c$ 값은 세균은 12.481 kV/cm, 젖산균은 12.449 kV/cm로서 동일한 값을 보였으며, 반면에 효모는 11.871 kV/cm로서 세균보다 다소 낮은  $E_c$ 값을 보였다. 효모의 낮은  $E_c$ 값 또한 세포의 크기로 설명되어 질 수 있으며, Grahl과 Markl도 우유에서 효모의  $E_c$ 값은 4.7 kV/cm로서 세균의 11.9~14.2 kV/cm 보다 작음을 보고한 바 있다. 한편 Zhang 등은 *S. cerevisiae*의  $E_c$ 값을 19.3 kV/cm로 보고하였다.

회분식 처리에서의 세균의  $E_c$ 값(12.481 kV/cm)을 연속 재순환식 처리 시의  $E_c$ 값, 27 kV/cm (Fig. 4-49)와 비교할 때 회분식 처리 시 미생물사멸에 필요한 전기장의 임계값이 훨씬 낮아 회분식 PEF 처리가 연속 재순환식에 비하여 더욱 확실한 효과를 가져오는 것으로 나타났다.

한편 전기장 세기 25 kV/cm에서 512회의 펄스를 처리(누적 처리시간 512  $\mu$ s)한 동치미음료의 미생물은 세균의 경우 약 3 log (Fig. 4-54), 젖산균은 2.5 log (Fig. 4-55), 효모의 경우 3.5 log (Fig. 4-56)정도로 감소하였다. 이 결과를 위에서 기술한 연속 재순환식 처리 시의 미생물의 사멸율과 비교하면, 연속 재순환식으로 전기장 세기 50 kV/cm에서 1,500  $\mu$ s 동안 처리한 경우의 세균의 생존율이 4.5 log정도 감소한 것으로 나타나 회분식 PEF 처리에서는 연속 재순환식에 비하여 보다 낮은 전기장과 짧은 처리시간에 동일한 효과를 볼 수 있는 것으로 나타났다.

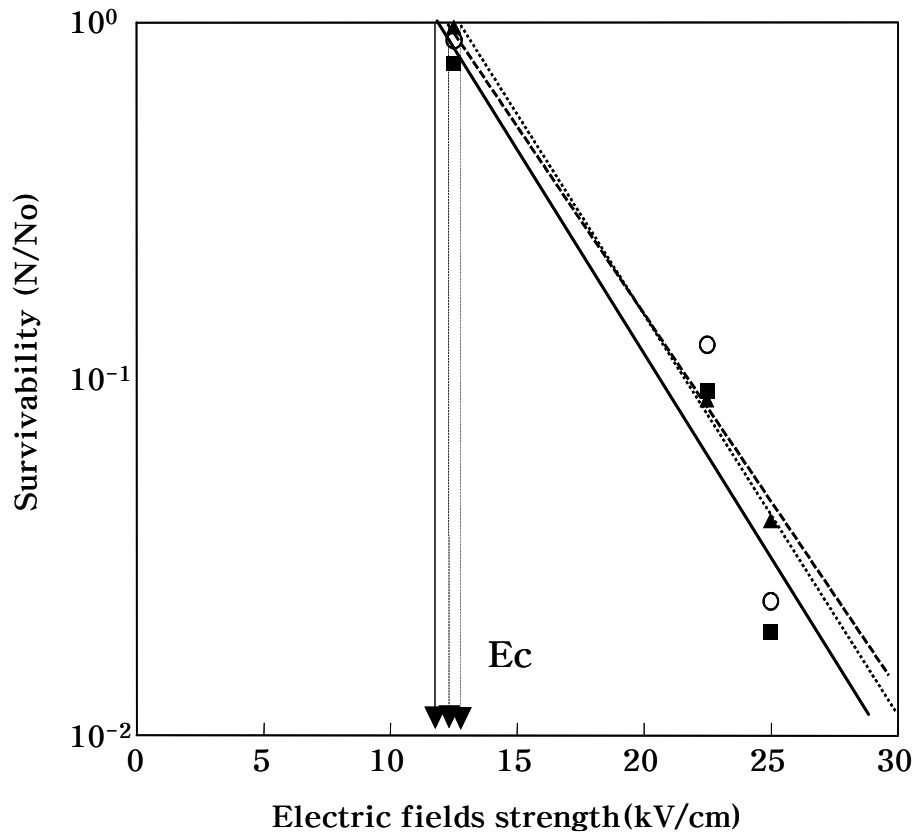


Fig. 4-53. Estimation of critical electric field strength for destruction of microorganisms of Dongchimi beverage in batch operation.

- Total aerobes
- ▲ Lactic acid bacteria
- Yeast

Table 4-14. Critical electric field strength( $E_c$ ) of microorganisms of Dongchimi beverage

Microorganisms	Critical electric field strength (kV/cm)
Total aerobes	12.481
Lactic acid bacteria	12.449
Yeast	11.871

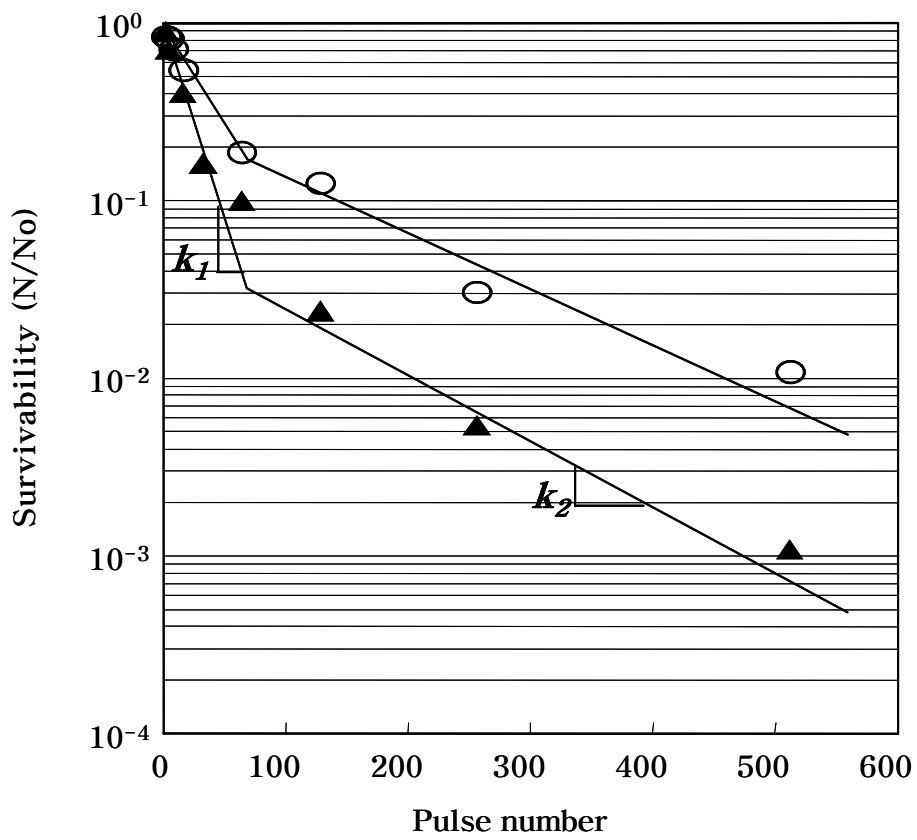


Fig. 4-54. Effect of electric field strength on total aerobes of Dongchimi beverage in batch PEF operation.

Electric fields strength: ○ 22.5kV/cm, △ 25.0kV/cm

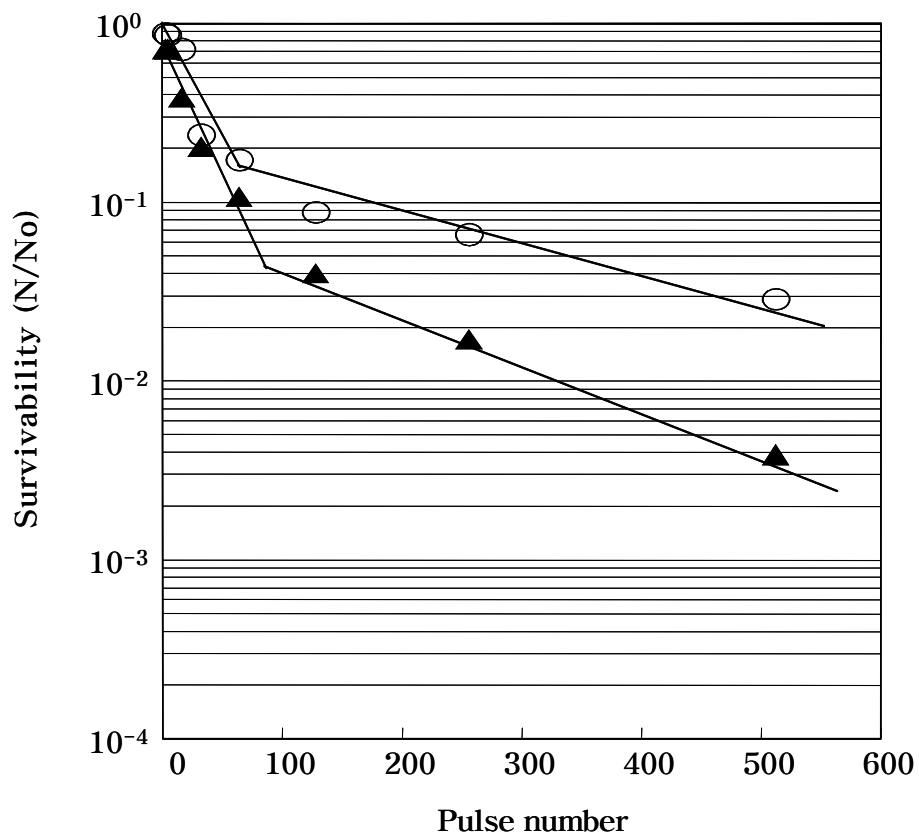


Fig. 4-55. Effect of electric field strength on lactic acid bacteria of Dongchimi beverage in batch PEF operation

Electric fields strength: ○ 22.5kV/cm, △ 25.0kV/cm

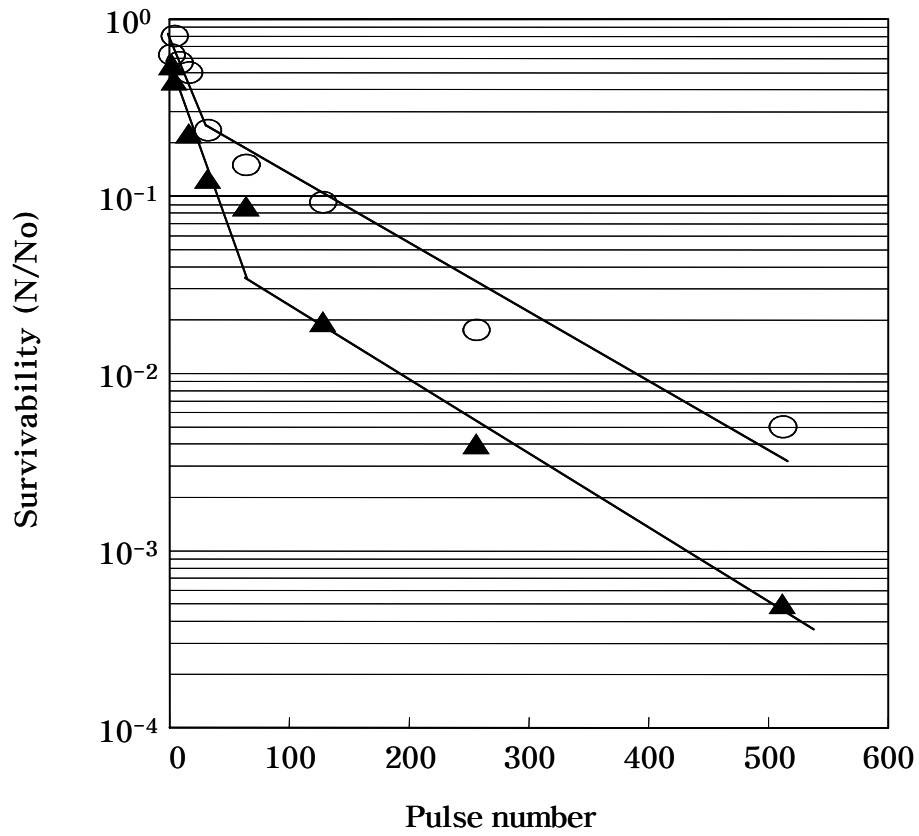


Fig. 4-56. Effect of electric field strength on yeast of Dongchimi beverage in batch PEF operation.

Electric fields strength: ○ 22.5kV/cm, △ 25kV/cm



### 2.1.3.3. 동치미음료의 살균 모델

회분식 PEF 처리 시 특정 전기장 세기에서 펄스 수에 따른 미생물별 사멸율의 변화는 Fig. 4-54, 4-55 및 4-56에서 보는 바와 같이 전기장 세기가 증가함에 따라 생존을 감소가 뚜렷해 졌으며, 일정 펄스 수를 경계로 감소 양상이 달라졌다. 즉 펄스 수 약 100회를 경계로 100 펄스 이하에서와 100 펄스 이상에서의 사멸 효과가 다르게 나타나 사멸곡선을 2단계로 해석하였다. 즉 동치미음료의 PEF 살균곡선을 초기(1단계)에는  $\ln(s) = -k_1 \cdot n$ 을 적용하여 해석하였고 후기(2단계)에는  $\ln(s) = A - k_2 \cdot n$ 을 사용하여 1단계 사멸속도 상수( $k_1$ )과 2단계 사멸속도 상수( $k_2$ )를 계산하여 Table 4-15에 나타내었다.

사멸속도 상수는 전기장 세기에 따라 높아졌으며, 단계별로는 1단계 사멸속도상수( $k_1$ )가 2단계 사멸속도상수( $k_2$ )보다 큰 값을 보여 초기 살균속도가 후기에 비하여 3~8배정도 큰 것으로 나타났다. 미생물 종류별로  $k_1$ 을 비교하면 경우 효모가 0.0411~0.0487 pulse<sup>-1</sup>이었고 세균은 0.0241~0.0275 pulse<sup>-1</sup>, 젖산균은 0.0287~0.0316 pulse<sup>-1</sup>을 나타내어 효모의 경우가 세균에 비해 높은 값을 보였다. 또한  $k_2$ 의 경우도 효모는 0.00808~0.00938 pulse<sup>-1</sup>이었고 세균은 0.00644~0.00780 pulse<sup>-1</sup>, 젖산균은 0.00363~0.00605 pulse<sup>-1</sup>의 값을 나타내어 효모의 값이 가장 높았고 젖산균이 가장 낮은 값을 나타내었다.

따라서 낮은 펄스 수, 즉 살균 초기에서의 미생물 사멸효과는 효모, 젖산균, 세균의 순서로 좋지만 높은 펄스 수, 즉 살균 후기에서는 효모, 세균, 젖산균의 순서로 사멸효과가 증가하는 것을 볼 수 있었다.

각 살균단계에서 미생물별 전기장 세기에 따른 사멸속도상수의 변화는 펄스 수에 따른 변화와 비슷한 현상을 보여, 전기장 세기 22.5 kV/cm와 25 kV/cm에서  $k_1$ 값은 효모의 경우 그 값이 가장 크게 나타났으며 세균이 가장 낮은 값을 나타내었고,  $k_2$ 값은 효모의 값이 가장 크고 젖산균이 가장 낮은 값을 보여 효모 살균이 세균에 비해 용이함을 알 수 있었다.

PEF 처리 시 처리 단계에 따라 다른 사멸속도상수를 나타낸 결과는 동치미음료에 존재하는 미생물 중 낮은 전기장과 짧은 시간 처리로 쉽게 사멸되는 미

Table 4-15. Sterilization constants at different stages of PEF sterilization of microorganisms in Dongchimi beverage

Microorganisms	Electric field strength (kV/cm)	$k_1$ (pulse <sup>-1</sup> )	$k_2$ (pulse <sup>-1</sup> )
Total aerobes	22.5	0.0241	0.00644
	25.0	0.0275	0.00780
Lactic acid bacteria	22.5	0.0287	0.00363
	25.0	0.0316	0.00605
Yeast	22.5	0.0411	0.00808
	25.0	0.0487	0.00938

생물과 높은 전기장과 긴 처리시간에도 살아남을 수 미생물이 함께 존재하는 것을 시사하며, 이러한 경향은 식품의 방사선 조사, 초고압 살균등 다른 비열처리 과정에서도 확인된 바 있다.

#### 2.1.3.4. 염농도가 $E_c$ 에 미치는 영향

염농도를 달리하여 액상 동치미를 발효하여 회석, 조미한 동치미음료를 제조하여 스타터로 첨가한 젖산균의 PEF 사멸효과를 관찰한 결과 Table 4-16과 같이 식염을 첨가하지 않았을 경우 임계 전기장 세기( $E_c$ 값)가 12.175 kV/cm이었고, 식염을 0.25% 첨가하여 발효하여 제조한 동치미음료의  $E_c$ 값은 12.169 kV/cm, 식염을 0.5% 첨가하여 발효하여 제조한 동치미음료는 10.373 kV/cm로 발효 시 식염 첨가량이 높을수록  $E_c$ 값이 낮아졌다. 이는 식염 첨가량에 따라 전기전도도가 높아지고(Table 4-13), 시료의 전하 증가로 세포의 전하량이 증가하여 유전파괴가 용이해지며 아울러 유전상수 및 유전손실계수의 증가로 일부 전기에너지가 열에너지로 바뀌기 때문인 것으로 생각된다. 실제로 염농도가 높은 경우 높은 처리 펄스 수에서는 약 10 ~ 20℃ 정도의 온도상승이 수반되는 것으로 관찰되었다.

#### 2.1.4. PEF 처리 동치미음료의 저장성 평가

소규모 연속 재순환 살균시스템에서 전기장세기 40 kV/cm에서 3000  $\mu$ s 동안 처리한 동치미음료와 50 kV/cm로 2000  $\mu$ s 처리한 동치미음료를 4℃에서 저장하면서 미생물 수의 변화를 조사한 결과 Fig. 4-57과 같이 무처리구는 저장기간에 따라 세균과 젖산균, 효모수가 초기수준을 유지하거나 약간 감소하여  $10^4 \sim 10^5$  CFU/mL 정도의 값을 보인 반면, PEF 처리한 시료는 9주간 저장 중 미생물의 생육을 전혀 보이지 않았다.

PEF 처리 동치미음료의 초기 pH가 무처리구에 비해 다소 높게 나타났으며 저장기간동안 무처리구의 pH는 감소하는 반면 PEF 처리구의 pH는 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4-58). 산도의 경우 PEF 처리구가 무처리구보다 낮게 나타났으며 저장기간 중에도 큰 변화가 없이 초기 산도를 그대로 유지하여 PEF 처리에

Table 4-16. Initial viable cell counts of Dongchimi beverage for storage study

(unit: CFU/mL)

Storage temperature	Microorganism	Treatment	
		Control	PEF treated*
4°C	Total aerobes	$1.58 \times 10^7$	$2.50 \times 10^4$
	Lactic acid bacteria	$5.24 \times 10^7$	$4.36 \times 10^4$
	Yeast	$1.20 \times 10^4$	-
30°C	Total aerobes	$3.00 \times 10^7$	$3.60 \times 10^4$
	Lactic acid bacteria	$4.62 \times 10^7$	$4.08 \times 10^4$
	Yeast	$4.00 \times 10^4$	-

\* 250 pulses were treated at 35 kV/cm on a small scale batch PEF system.

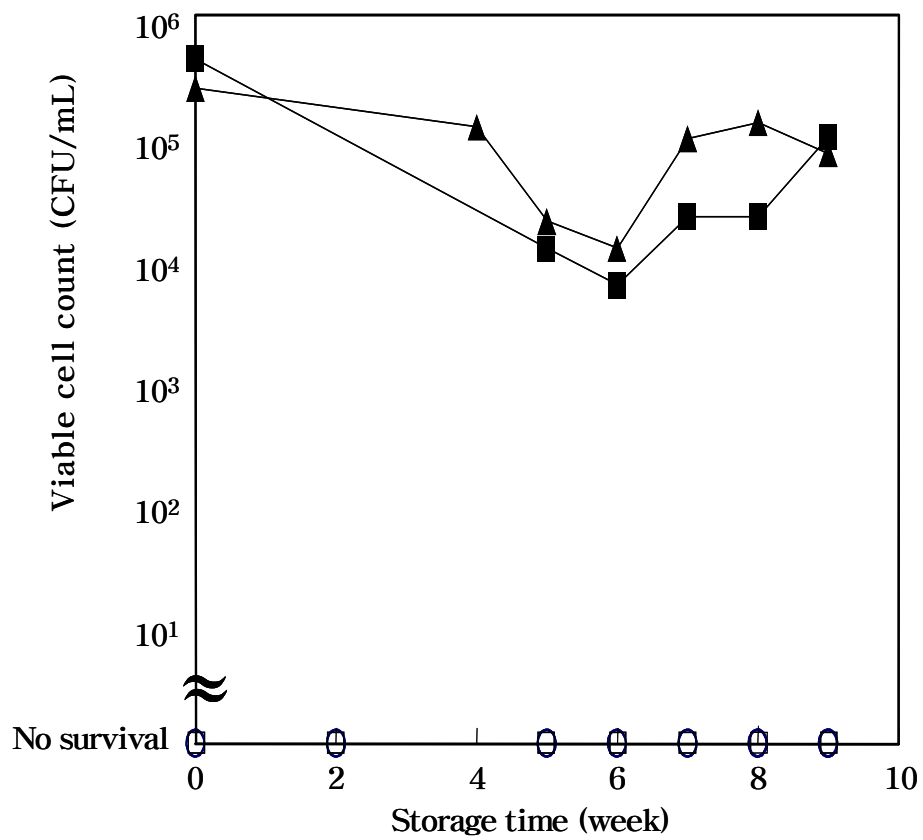


Fig. 4-57. Effect of PEF treatment on changes in microorganisms of Dongchimi beverage during storage at 4°C.

- Control, total aerobes
- ▲ Control, yeast
- 40kV/cm, 3000 $\mu$ s PEF treated
- 50kV/cm, 2000 $\mu$ s PEF treated

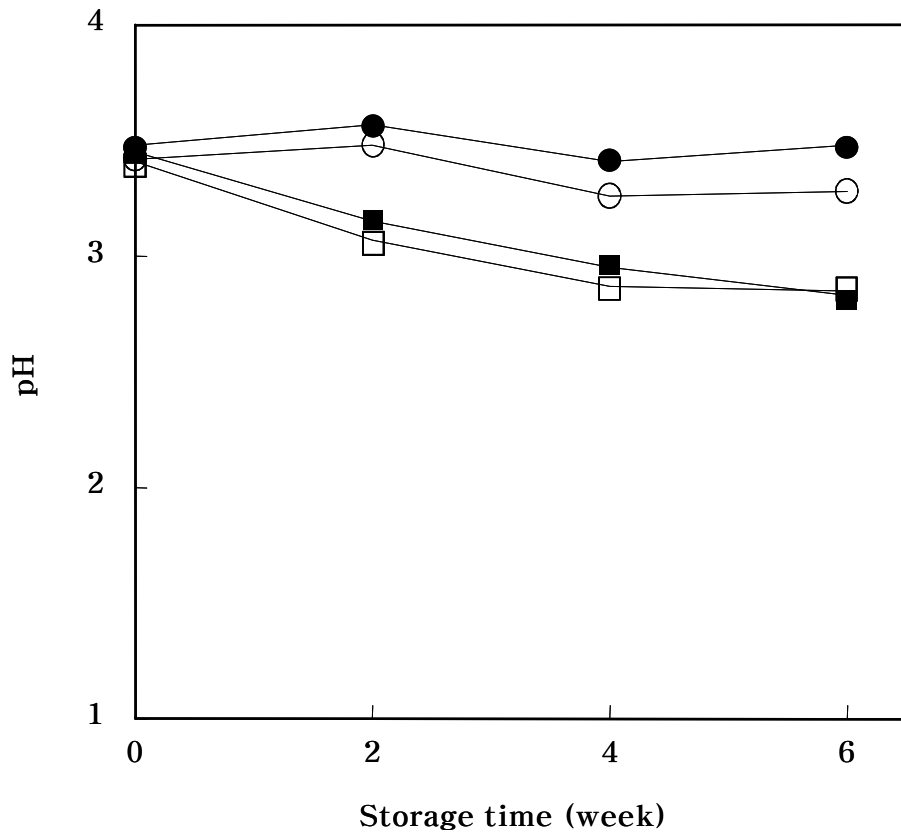


Fig. 4-58. Effect of PEF treatment on changes in pH of Dongchimi beverage during storage at 4°C and 30°C.

- Control (4°C)
- 35 kV/cm, 250 pulses (4°C)
- Control (30°C)
- 35 kV/cm, 250 pulses (30°C)

의한 저장성의 향상을 확인하였다(Fig. 4-59).

한편 소규모 회분식 PEF 시스템에서 전기장세기 35 kV/cm로 250회의 펄스를 처리한 동치미음료의 처리 후 미생물 수는 Table 4-16에서 보는 바와 같이 PEF 처리 후에도 효모를 제외한 미생물의 생육이 나타났는데, 펄스 수를 250회 이상 처리 시 동치미음료에 존재하는 염에 의한 발열현상 때문에 PEF 단독 살균 효과로 검정할 수 없어서 처리 펄스 수를 완전살균까지 증가시킬 수 없었다.

세균의 경우 Fig. 4-60에서 보는 바와 같이 무처리 동치미음료는 초기  $10^7$  CFU/mL 수준에서 저장기간에 따라 감소하는 경향을 보였는데 이는 동치미가 시어짐에 따라 pH가 저하하여 균의 생육이 정지됨을 나타내며, 이 현상은 저장온도 30°C의 경우가 4°C보다 급격히 나타났다. 반면에 PEF 처리 동치미음료는 4°C 저장 시에는 저장기간을 통하여 초기 균수  $2.5 \times 10^4$  CFU/mL를 그대로 유지하였고, 30°C 저장 시에는 저장 2주 후 균수가 1 log 정도 증가하다가 감소하는 양상을 보였다. 젖산균의 경우도 Fig. 4-61에서와 같이 4°C와 30°C에서 저장한 무처리 동치미음료는 과도한 산 생성으로 인해 저장기간에 따라 모두 균수가 감소하였지만 PEF 처리 동치미음료는 초기 균수를 그대로 유지하여 세균의 경우(Fig. 4-60)와 동일한 경향을 나타내었다.

## 2.2. 고전압 펄스 전기장을 이용한 약주의 살균

### 2.2.1. 소규모 연속 재순환식 고전압 펄스 살균 장치를 이용한 약주의 살균

#### 2.2.1.1. 약주의 일반 특성

약주는 쌀을 원료로 하고 우리나라 특유의 누룩을 발효제로 하여 제조되며 알코올 함량은 통상 13% 이하이다. 현재 약주 제조에 사용되는 주원료는 밀가루, 쌀, 옥수수, 보리쌀, 전분, 전분당, 포도당 그리고 양조용수 등이다. 약주는 통상 2단 담금하여 발효하는데 효모증식을 주목적으로 하는 1단 담금과 알코올발효(양조)를 주목적으로 하는 2단 담금으로 구분된다.

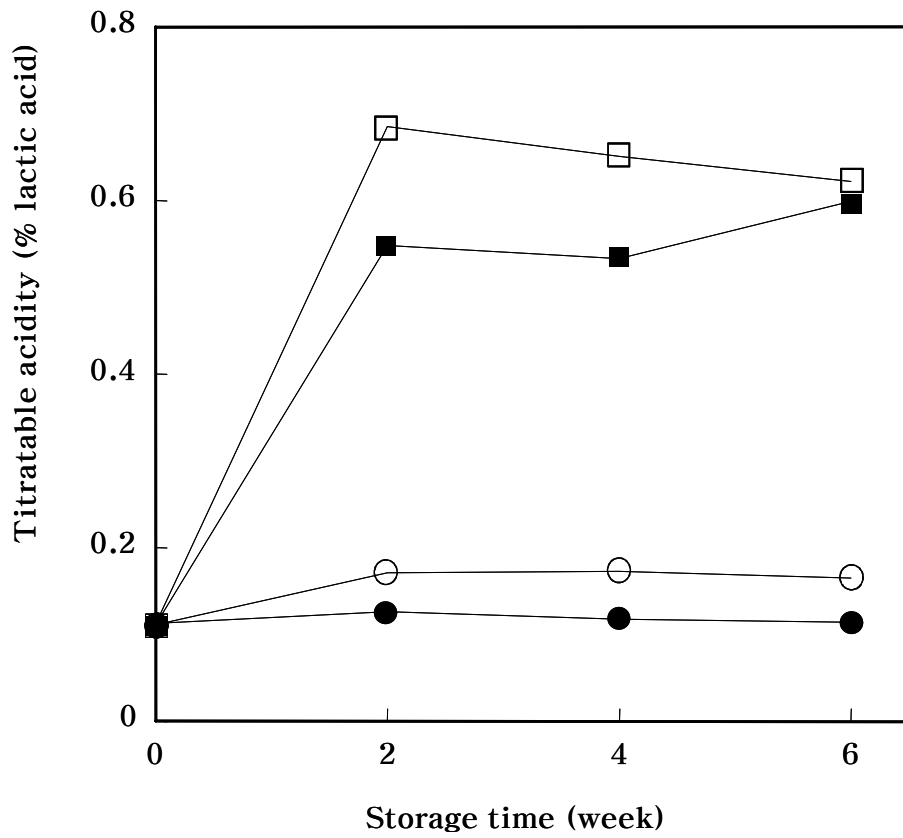


Fig. 4-59. Effect of PEF treatment on changes in titratable acidity of Dongchimi beverage during storage at 4°C and 30°C .

- Control (4°C)
- 35 kV/cm, 250 pulses (4°C)
- Control (30°C)
- 35 kV/cm, 250 pulses (30°C)



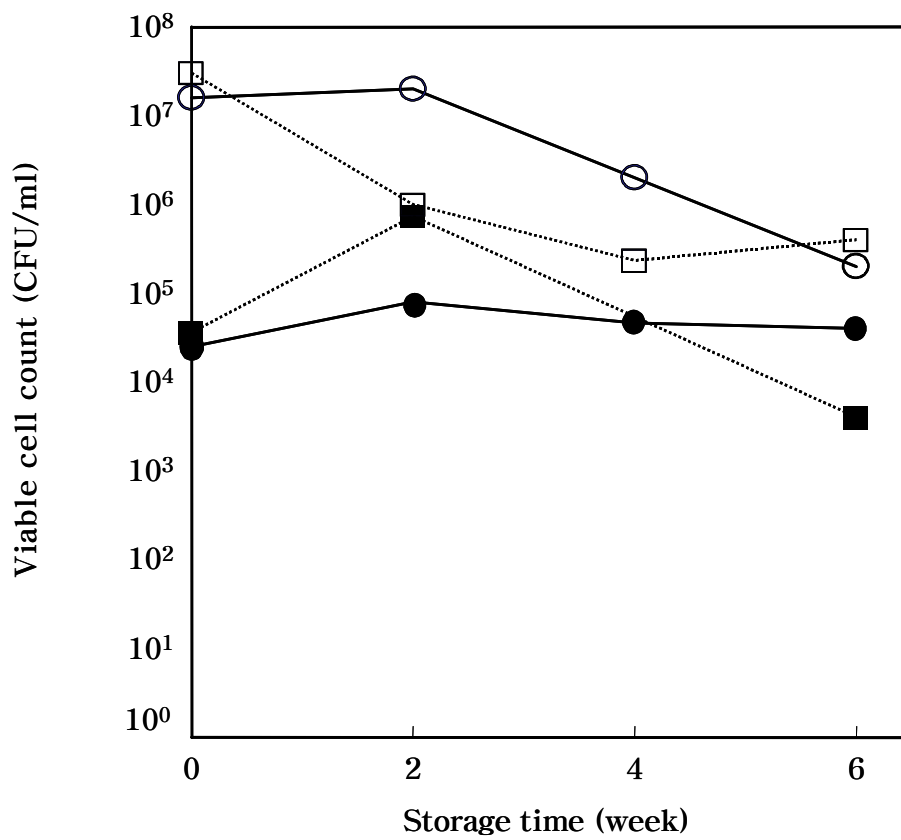


Fig. 4-60. Effect of PEF treatment on changes in total aerobes in Dongchimi beverage during storage at 4°C and 30°C.

- Control (4°C)
- Control (30°C)
- PEF treated (4°C)
- PEF treated (30°C)

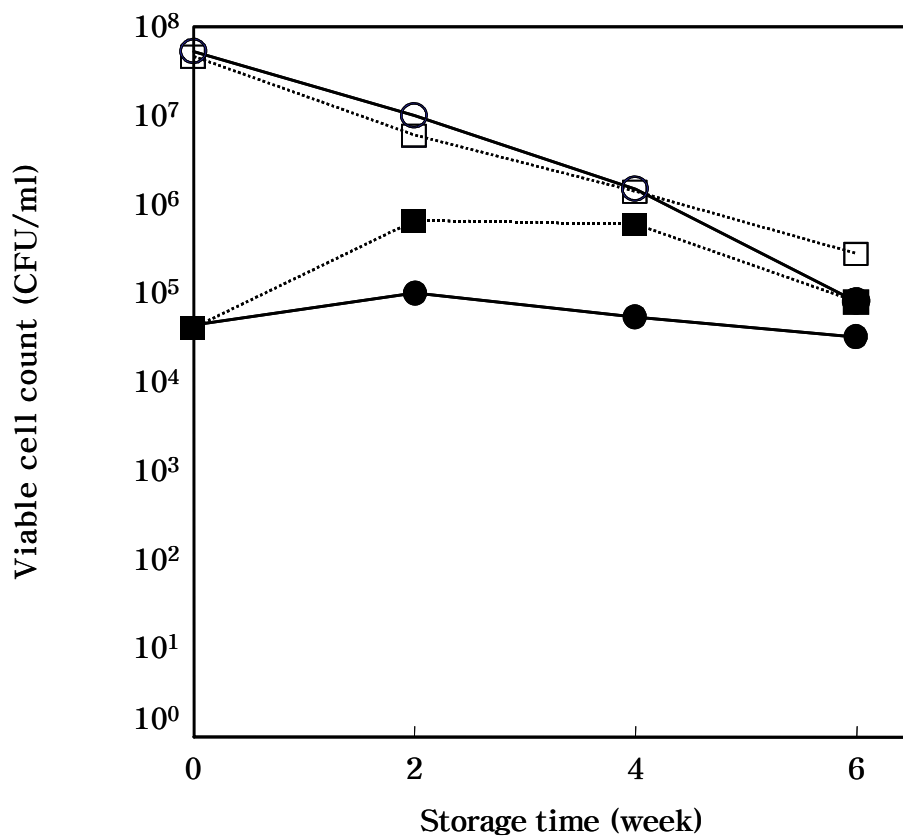


Fig. 4-61. Effect of PEF treatment on changes in lactic acid bacteria in Dongchimi beverage during storage at 4°C and 30°C.



본 연구에서는 김포양조공사(서울 강서구 화곡동 소재)에서 상온에서 60 시간 발효한 후 1주일간 숙성시킨 것을 부유물을 제거하기 위하여 1차로 압착 여과하고 규조토로 2차 여과한 약주를 재료로 사용하였다.

소규모 연속 재순환식 PEF 처리에 사용한 약주의 PEF 처리 전 일반 특성은 Table 4-17와 같다. 약주의 초기 미생물 수는 세균  $2.2 \times 10^5$  CFU/mL, 젖산균  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL, 효모  $2.0 \times 10^5$  CFU/mL이었다. 약주의 전기전도도는 1.24 mS/cm이었으며 pH와 산도는 각각 3.49, 0.37%이었다.

#### 2.2.1.2. PEF 처리에 의한 약주 미생물의 사멸

PEF 처리가 약주 미생물의 형태변화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 전기장 세기 17 kV/cm에서 25 $\mu$ s동안 처리하여 관찰한 약주 효모의 모양은 Fig. 4-62와 같다. PEF 처리 전의 효모는 완전한 형태의 모양과 세포막을 가졌으나, PEF 처리 후에는 화살표로 표시된 것과 같이 세포막의 손상이 관찰되었다. 이는 Harrison등이 관찰한 PEF 처리에 의한 *Saccharomyces cerevisiae* 구조 변화와 유사한 것으로서 전기장의 크기가 임계 전기장 세기( $E_c$ )를 넘게 되면 세포막에 비가역적인 세공(pore)이 형성되어, 즉 유전과피에 의해 세포막의 투과성이 증가되고 세포는 사멸하게 된다는 학설을 뒷받침하고 있다.

#### 2.2.1.3. PEF 처리에 따른 살균율 변화

PEF 처리가 약주 미생물의 사멸에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 주파수를 100 Hz로 고정시키고 전기장 세기를 20 ~ 35 kV/cm의 범위에서 변화시키면서 총처리시간에 따른 생존율을 측정하였다.

세균의 경우 각 전기장 세기에서 총처리시간 500 ~ 4,000  $\mu$ s의 범위로 PEF 처리한 결과 Fig. 4-63과 같이 총처리시간이 증가함에 따라 직선에 가까운 완만한 곡선으로 생존율의 log값(log(s))이 감소하였다. 동일한 총처리시간에서 전기장 세기를 20 ~ 35 kV/cm의 범위에서 변화하면서 처리하였을 경우 전기장 세기

Table 4-17. Physicochemical and microbial properties of Yakju

Properties	Values
pH	3.49
Acidity (% lactic acid)	0.37
Conductivity	1.24 mS/cm
Total aerobes	$2.2 \times 10^5$ CFU/mL
Lactic acid bacteria	$1.5 \times 10^5$ CFU/mL
Yeast	$2.0 \times 10^5$ CFU/mL

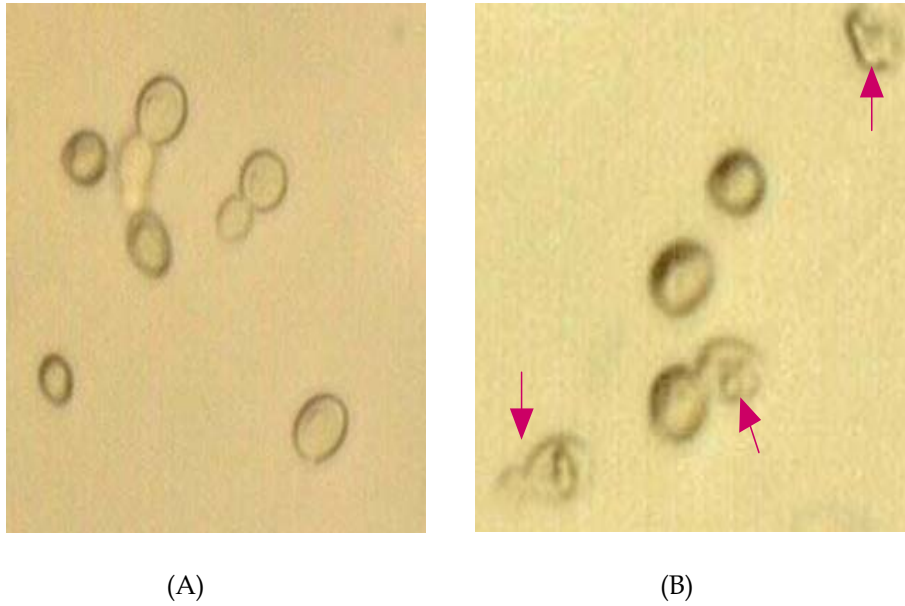


Fig. 4-62. Micrographs ( $\times 600$ ) of cells in Yakju after PEF treatment. (A) control (B) PEF treated

Arrows indicate the damage of cells by PEF treatment

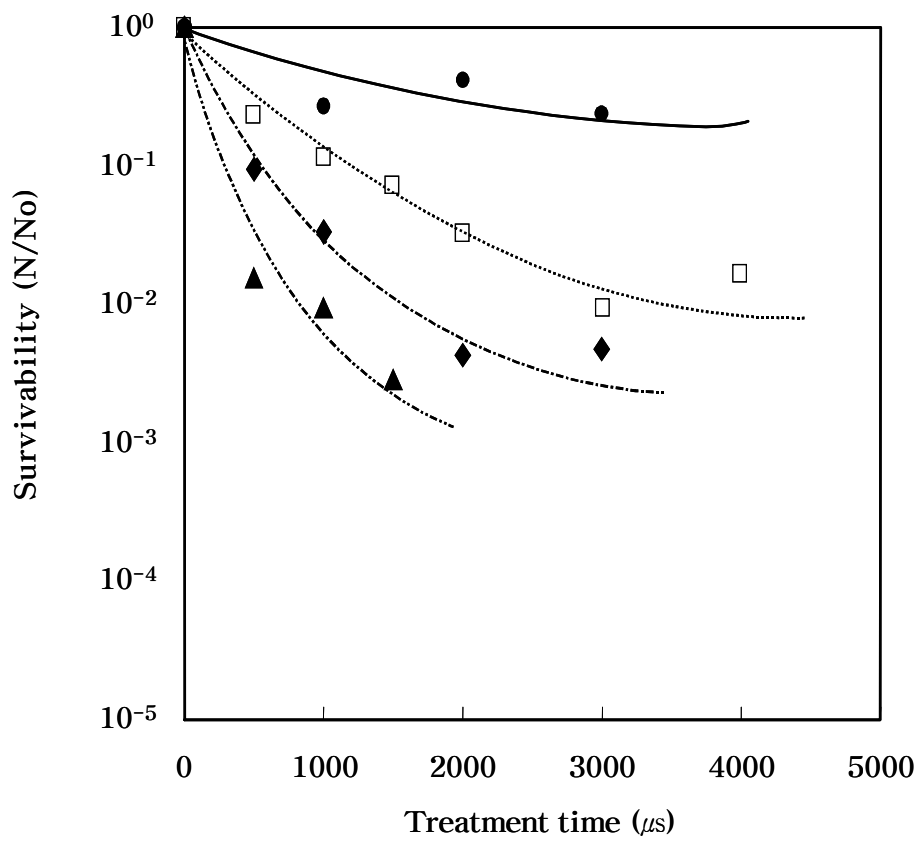


Fig. 4-63. Effect of electric field strength on survivability of total aerobes in Yakju.

- 20kV/cm      □ 25kV/cm
- ◆ 30kV/cm      ▲ 35kV/cm

가 증가함에 따라 생존율이 감소하여 1,500 $\mu$ s 처리 시 20 kV/cm에서는 생존율 0.5를 나타낸 반면, 35 kV/cm에서는 생존율 0.005로 100배나 낮은 값을 보였다.

또한 총처리시간을 각각 500, 1000, 2000  $\mu$ s로 고정하고 PEF 처리하였을 경우 Fig. 4-64과 같이 전기장 세기가 증가함에 따라 log(s)가 직선적으로 감소하였다. 세균을 비가역적으로 사멸할 수 있는 최소 임계전기장 세기(Ec)는 Fig. 4-64에서 얻어진 직선을 외삽하여 산출하였으며, 세균의 Ec는 16.0 kV/cm로 나타났다. 이는 Hülshleger등이 연구한 *E. coli*의 Ec 8.3 kV/cm 보다는 다소 높은 값이었으나, Zhang 등이 보고한 *E. coli*의 17.5 kV/cm와는 유사한 수치였다.

젖산균의 경우도 세균과 마찬가지로 전기장 세기 별로 총처리시간을 증가시키면서 PEF 처리한 결과 총처리시간이 증가함에 따라 직선에 가까운 완만한 곡선으로 log(s)값이 감소하였다(Fig. 4-65). 또한 총처리시간을 고정하고 PEF 처리하였을 경우 젖산균의 경우도 Fig. 4-66과 같이 전기장 세기에 따라 log(s)가 직선적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, Ec값은 16.9 kV/cm로서 세균의 16.0 kV/cm보다 약간 높은 값을 나타내었다. 본 실험에서 구한 젖산균의 Ec값 16.9 kV/cm는 Grahl과 Markl이 보고한 우유에 존재하는 *Lactobacillus brevis*의 Ec값 12.6 kV/cm보다 다소 높은 수치였다.

효모의 경우도 세균이나 젖산균과 마찬가지로 PEF 처리 시 Fig. 4-67에 나타난 바와 같이 총 처리시간이 증가함에 따라 직선에 가까운 완만한 곡선으로 log(s)가 감소하였으며 전기장 세기가 증가할수록 log(s)값은 급격하게 감소하였다. 효모의 Ec값은 Fig. 4-68과 같이 19.3 kV/cm로 산출되어 세균 및 젖산균의 Ec보다 큰 값을 보여 앞의 동치미음료의 경우와는 다른 양상을 보였다. 일반적으로 효모는 세균에 비하여 세포 크기가 크므로 낮은 Ec값을 갖는 것으로 알려져 있으나 연속 재순환식으로 PEF 처리한 약주에서는 상이한 결과를 보였다. 그러나 이 결과는 Zhang 등이 보고한 *S. cerevisiae*의 Ec 19.5 kV/cm와 유사한 값이었으며, 이들도 *E. coli*의 Ec 17.5 kV/cm보다 높은 값을 보고한 바있다.

한편 처리시간을 2000  $\mu$ s로 고정하고 전기장 세기를 달리하여 처리하였을 때 약주 미생물별 생존율의 변화는 Table 4-18에 정리된 바와 같이 전기장 세

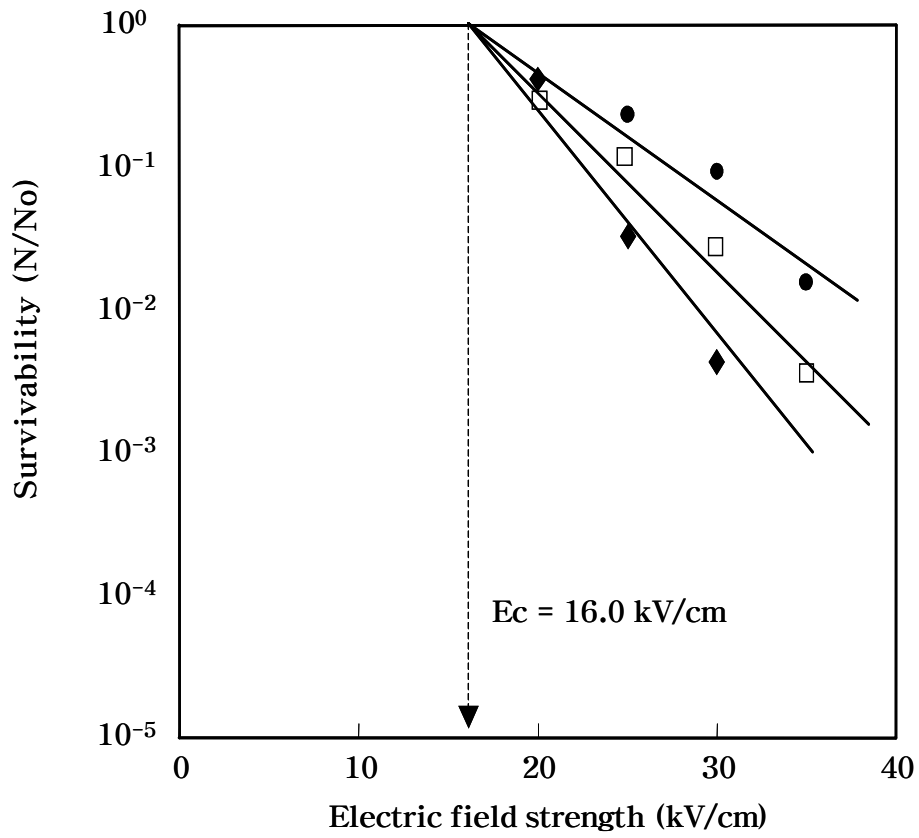


Fig. 4-64. Critical electric field strength against total aerobes in Yakju.

● 500μs    □ 1000μs    ◆ 2000μs



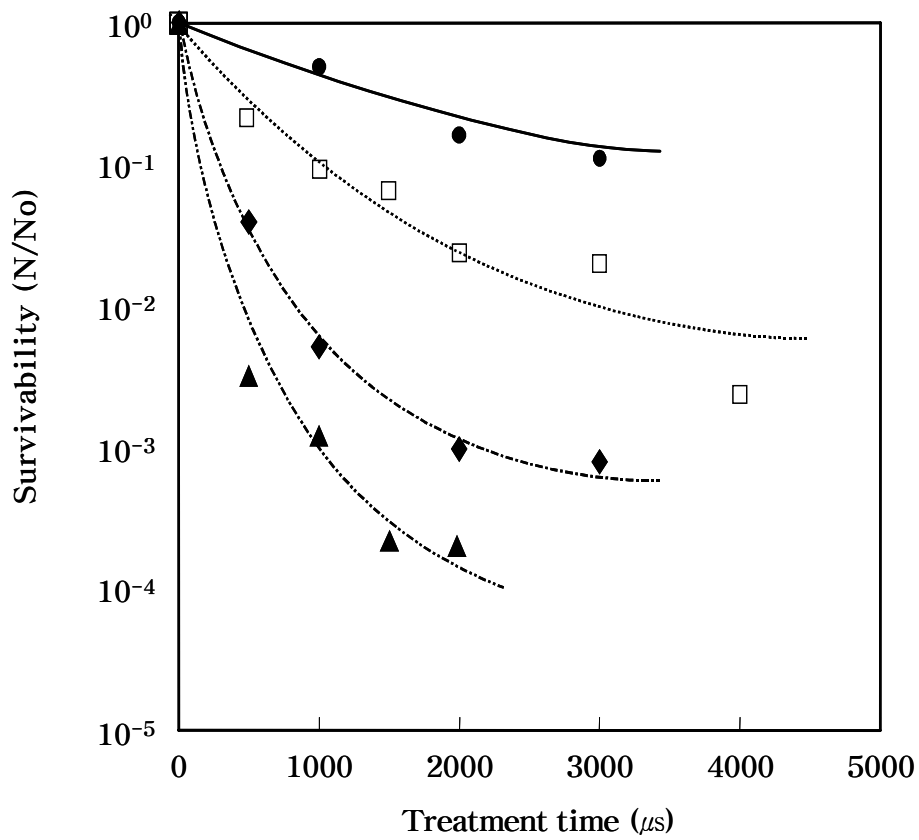


Fig. 4-65. Effect of electric field strength on survivability of lactic acid bacteria of Yakju.

- |   |         |   |         |
|---|---------|---|---------|
| ● | 20kV/cm | □ | 25kV/cm |
| ◆ | 30kV/cm | ▲ | 35kV/cm |

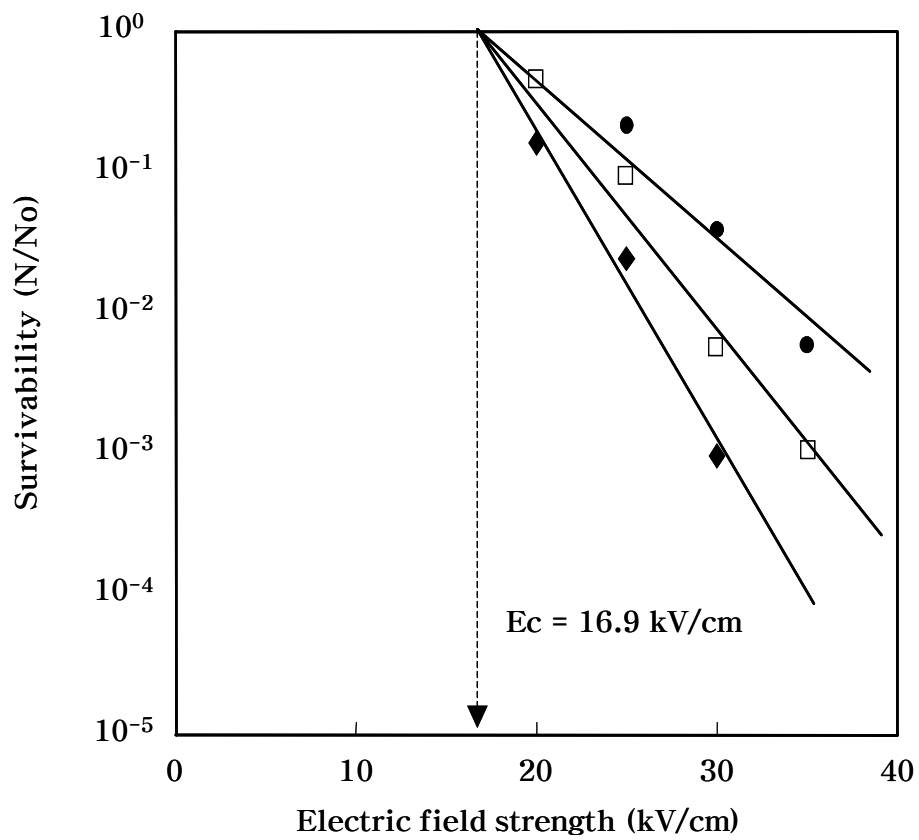


Fig. 4-66. Critical electric field strength against lactic acid bacteria of Yakju.

● 500μs    □ 1000μs    ◆ 2000μs

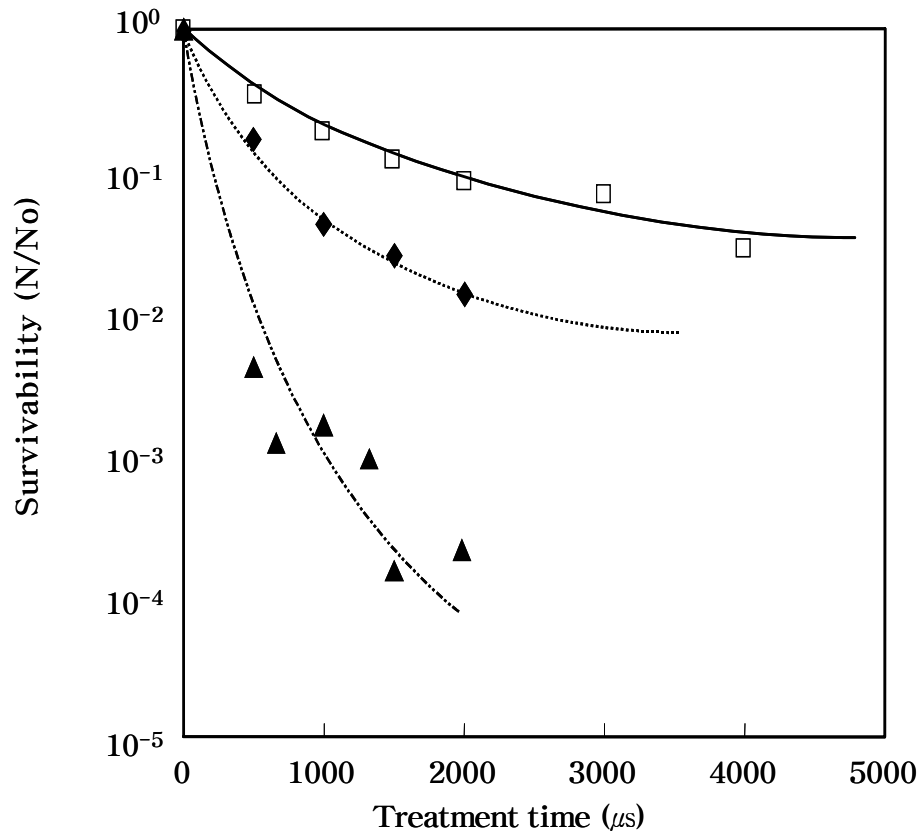


Fig. 4-67. Effect of electric field strength on survivability of yeast of Yakju.

□ 25kV/cm    ◆ 30kV/cm    ▲ 35kV/cm

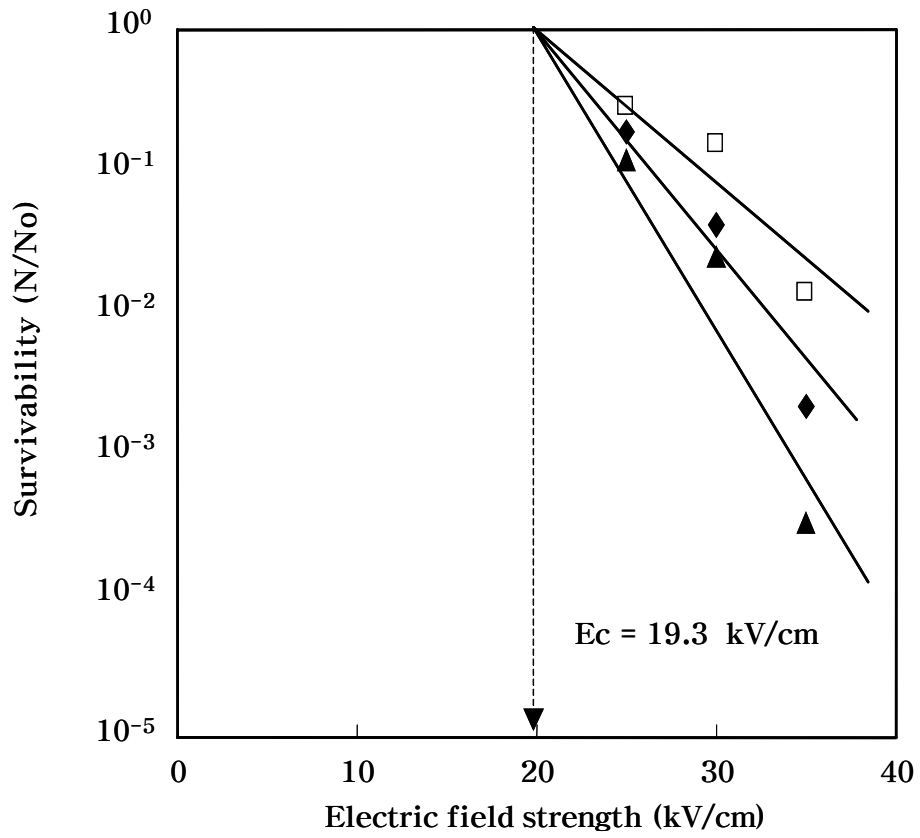


Fig. 4-68. Critical electric field strength against yeast of Yakju.

● 500 $\mu$ s    □ 1000 $\mu$ s    ◆ 2000 $\mu$ s

Table 4-18. Survivability of microorganisms in PEF treated Yakju for 2,000  $\mu$ s

Electric field strength (kV/cm)	Survivability		
	Total aerobes	Lactic acid bacteria	Yeast
20	0.4200	0.1600	0.0000
25	0.0330	0.0242	0.0860
30	0.0043	0.0010	0.0133
35	0.0010	0.0002	0.0002

기 20 kV/cm에서 세균의 생존율은 0.42로 감소하여 58%의 살균율을 보였고, 젖산균은 생존율 0.16으로 84%의 살균율을 보인 반면, 효모의 생존율 변화는 관찰되지 않아 전기장 세기 20 kV/cm에서는 효모에 대한 사멸효과는 없었다. 이는 앞에서 Fig. 4-68에서와 같이 효모의  $E_c$ 값은 19.3 kV/cm로서 전기장 세기 20 kV/cm는 효모의 사멸에 거의 영향을 미치지 않는 전기장 세기이었기 때문에 나타난 결과이다.

전기장 세기 25 kV/cm 이상에서는 젖산균이 가장 낮은 생존율을 보였으며, 25 kV/cm와 30 kV/cm에서 효모의 생존율은 세균보다 높은 값을 보였으나 35 kV/cm에서는 효모의 생존율이 세균보다 낮은 수치를 보였다. 이는 효모의 생존율에 미치는 전기장 세기의 영향이 세균에 비하여 크게 작용함을 시사하는 것으로서 효모의 살균을 위해서는 높은 전기장 세기에서 단시간 처리하는 것이 바람직함을 의미한다.

이상의 소규모 연속 재순환식 PEF 처리에 의한 약주 살균 결과를 종합할 때 약주의 세균과 젖산균, 효모의  $\log(s)$ 값이 모두 처리시간이 증가함에 따라 직선에 가까운 완만한 곡선을 나타내었고, 처리시간 2000  $\mu s$ 까지는 살균효과가 높았으나 2000  $\mu s$  이상의 시간을 처리하였을 경우에는 살균효과가 둔화되었다. 이는 처리시간을 길게 한다고 해서 미생물의 사멸이 계속 동일한 속도로 일어나는 것이 아님을 보여주고 있으며 PEF 처리에 의한 미생물 살균효과는 전기장세기가 처리시간보다 더 큰 영향을 미치는 인자임을 보여주며, 이러한 결과는 Shin 등 과 Jayaram 등 에 의해 보고된 결과와 동일하였다.

한편 전기장세기 20 kV/cm에서는 미미한 살균효과를 보였으나 35 kV/cm이상에서는 처리시간이 증가함에 따라 뚜렷한 살균효과를 보였으며, 특히 효모의 살균효과가 세균보다 큰 것으로 나타났다. 일반적으로 효모의 크기는 3~8  $\mu m \times 4 \sim 8 \mu m$  정도이고 세균은 지름 1 $\mu m$ 이하로 효모의 크기가 세균에 비하여 훨씬 크기 때문에 PEF 노출 시 효모의 세포막의 전위차가 세균보다 높으며 특히 높은 전기장 세기에서 효과가 큰 것으로 알려져 있다.

고전압 펄스 전기장에 의한 미생물의 치사효과에 영향을 미치는 직접적

Table 4-19. Regression\* data for PEF sterilization of microorganisms in Yakju

Coefficient	Microorganisms		
	Total aerobes	Lactic acid bacteria	Yeast
$\beta_0$	0.792436 (p<0.0001)	0.808789 (p<0.0001)	0.799615 (p<0.0001)
$\beta_1$	-0.022278 (p<0.0002)	-0.021956 (p<0.0004)	-0.020703 (p<0.0001)
$\beta_2$	-0.000053718 (p<0.0821)	-0.000086686 (p<0.0117)	-0.000082502 (p<0.0015)

인 인자인 전기장 세기와 처리시간 중에서 미생물의 살균효과에 더 큰 영향을 주는 인자를 확인하기 위해 전기장 세기와 처리시간에 대한 회귀 데이터를 Table 4-19에 나타내었다. 모든 미생물에 대해 전기장 세기가 처리시간 보다 낮은 p값을 보여 전기장 세기가 살균에 더욱 중요한 인자로 작용하는 것으로 나타났다.

#### 2.2.1.4. 연속 재순환식 PEF 처리 약주의 저장성 평가

소규모 연속 재순환식 PEF장치를 사용한 실험에서 약주 미생물의 살균효과가 가장 두드러졌던 PEF 처리 조건은 전기장 세기 30 kV/cm, 총처리시간 6000  $\mu$ s로 처리하는 것이었다. 이러한 조건에서 PEF 처리한 약주의 저장성을 평가하기 위해 4°C와 30°C에서 9주간 저장하면서 pH, 적정산도, 미생물 수의 변화를 조사하였다.

PEF 처리한 약주의 초기 pH는 3.57로 무처리구의 pH 3.49와 큰 차이를 보이지 않았다. 저장온도 4°C에서 저장 중 pH 변화는 Fig. 4-69에 나타난 바와 같이 PEF 처리한 약주와 무처리 약주의 pH는 커다란 변화가 없었다. 반면 저장온도 30°C에서 저장한 경우에는 무처리 약주의 pH는 뚜렷이 감소하였으나 PEF 처리 약주의 pH는 변화없이 일정하게 유지되었다.

저장기간동안 적정산도의 변화는 Fig. 4-70에서와 같이 4°C에서 저장한 경우 PEF 처리한 약주와 무처리 약주 모두 저장 초기의 적정산도를 유지하면서 커다란 변화를 보이지 않았으나, 30°C에서 저장한 경우는 무처리 약주의 산도가 저장기간에 따라 급격하게 증가하는 반면 PEF 처리한 약주의 경우 큰 변화가 없이 초기산도를 그대로 유지하여 PEF 처리는 약주의 저장성을 크게 향상시키는 것으로 확인되었으며 최소한 9주 이상 저장이 가능하였다.

또한 4°C 저장 중 미생물 수의 변화는 Fig. 4-71과 같이 무처리 약주의 경우 저장기간에 따라 미생물 수가 증가하는 경향을 보였으나 PEF 처리한 약주는 9주간 저장 중 미생물의 생육을 전혀 보이지 않아 PEF 처리에 의해 완벽한 저장성이 부여됨을 확인할 수 있었다.

현재 시중에 유통되는 약주는 열처리하여 병입한 후 다시 저온 살균하여



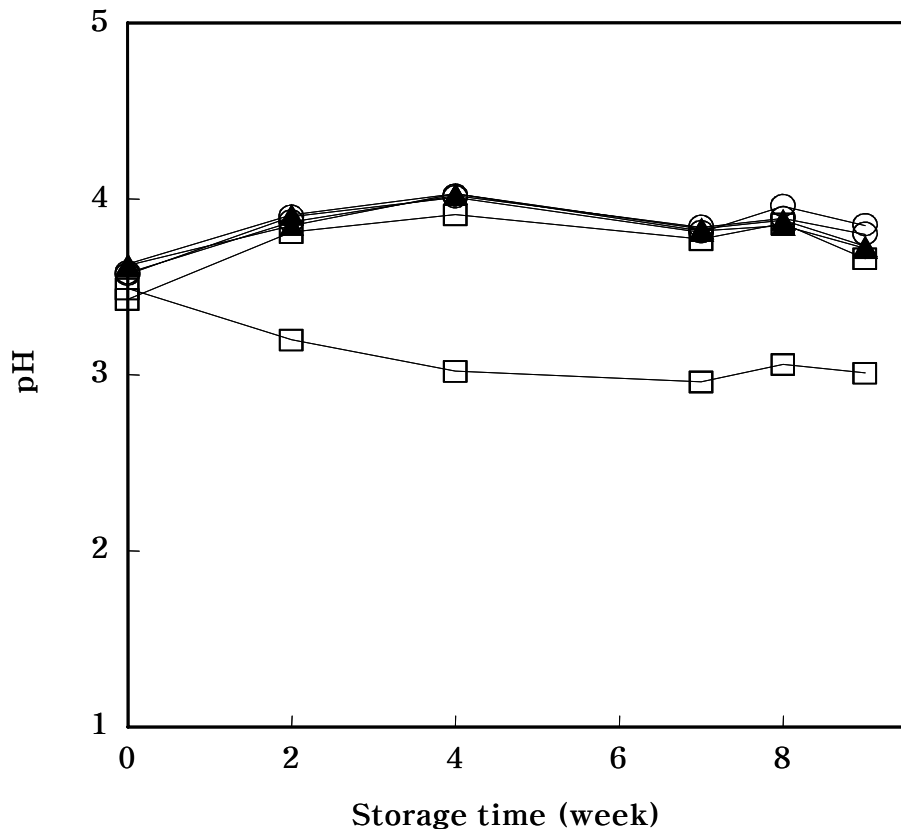


Fig. 4-69. Changes in pH of Yakju during storage at 4°C(dotted line) and 30°C (solid line)

□ Control    ○ 30kV/cm,6000μs    ▲ 35kV/cm,5000μs

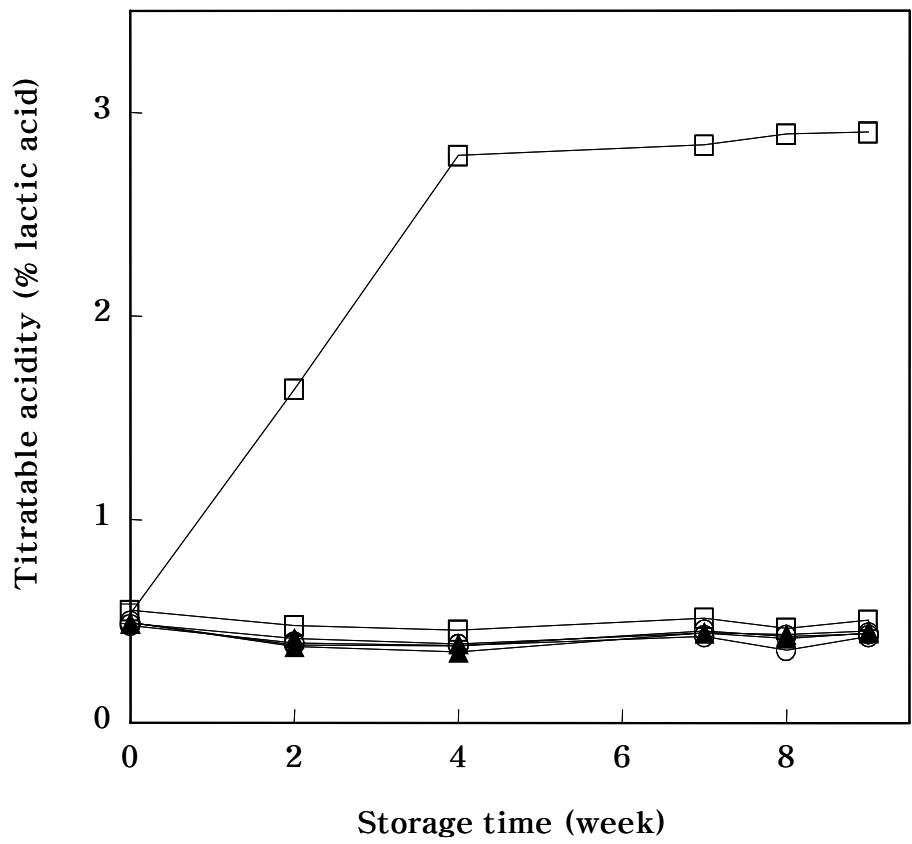


Fig. 4-70. Changes in titratable acidity of Yakju during storage at 4°C (dotted line) and 30°C (solid line).

□ Control    ○ 30 kV/cm, 6000  $\mu$ s    ▲ 35 kV/cm, 5000  $\mu$ s

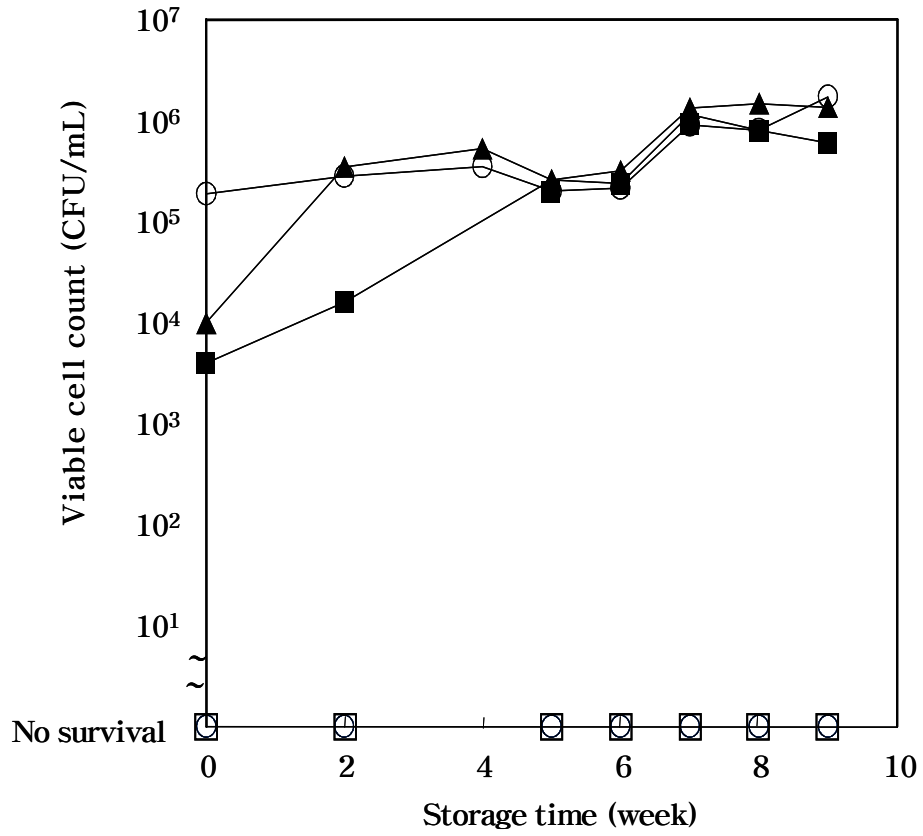


Fig. 4-71. Changes in microorganisms of Yakju during storage at 4°C.

■ Total aerobes    ○ Lactic acid bacteria    ▲ Yeast

○ 30kV/cm, 6000 $\mu$ s    □ 35kV/cm, 5000 $\mu$ s

출하함에도 불구하고 하절기에는 약 3 ~ 4주 이하의 유통만이 가능하여 이의 개선이 필요한데 PEF살균은 이에 대한 대안을 제공하며 열처리에 의한 향미 변화, 변색, 이취발생 등 약주의 품질열화를 방지할 수 있는 획기적인 비열가공기술로 평가되었다.

## 2.2.2. 소규모 회분식 PEF 처리장치를 이용한 약주의 살균

### 2.2.2.1. 약주의 일반 특성

소규모 회분식 PEF 처리에 사용한 약주의 PEF 처리 전 일반 특성은 Table 4-20과 같다. 약주의 초기 미생물 수는 세균  $7.52 \times 10^4$  CFU/mL, 젖산균  $2.20 \times 10^4$  CFU/mL, 효모  $7.08 \times 10^4$  CFU/mL이었다. 약주의 전기전도도는 1.24 mS/cm이었으며 pH와 산도는 각각 3.36과 0.462%였다.

### 2.2.2.2. 회분식 PEF 처리에 의한 약주 미생물 살균

소규모 회분식 PEF 처리 장치에서 약주 미생물의 살균효과를 조사하기 위하여 펄스 수와 전기장 세기를 변화시키면서 생존율을 측정하였다. 전기장 세기를 12.5, 22.5, 25.0 kV/cm로 달리하여 32회의 exponential decay wave 펄스를 처리한 결과 Fig. 4-72와 같이 전기장 세기가 증가함에 따라 미생물의 생존율이 감소하였다. 세균의 경우 12.5 kV/cm에서 32회의 펄스를 처리한 후의 생존율은 0.50을 나타낸 반면, 25 kV/cm에서는 생존율 0.005로 12.5 kV/cm에 비하여 100배 정도 감소하였으며 log(s)는 전기장세기에 따라 직선적으로 감소하였다. 젖산균과 효모의 경우도 유사한 패턴으로 변화하였다.

한편 미생물의 비가역적 불활성화를 유도하는 최소 전기장 세기인 임계 전기장 세기( $E_c$ )는 Fig. 4-72의 직선을 외삽하여 산출하였는데, 세균의 경우  $E_c$ 값은 7.5 kV/cm이었으며, 젖산균은 8.5 kV/cm, 효모는 6.5 kV/cm의 값을 보여 효모의 값이 가장 낮게 나타났다. 이는 Hülshager등이 연구한 *E. coli*의  $E_c$ 는 8.3 kV/cm과 비슷한 값을 보였으며 앞에서 고찰한 연속 재순환식 PEF장치를 사용하

Table 4-20. Physicochemical and microbial properties of Yakju

Properties	Values
pH	3.36
Titrateable acidity(% lactic acid)	0.462
Conductivity	1.24 mS/cm
Total aerobes	$7.52 \times 10^4$ CFU/mL
Lactic acid bacteria	$2.20 \times 10^4$ CFU/mL
Yeast	$7.08 \times 10^4$ CFU/mL

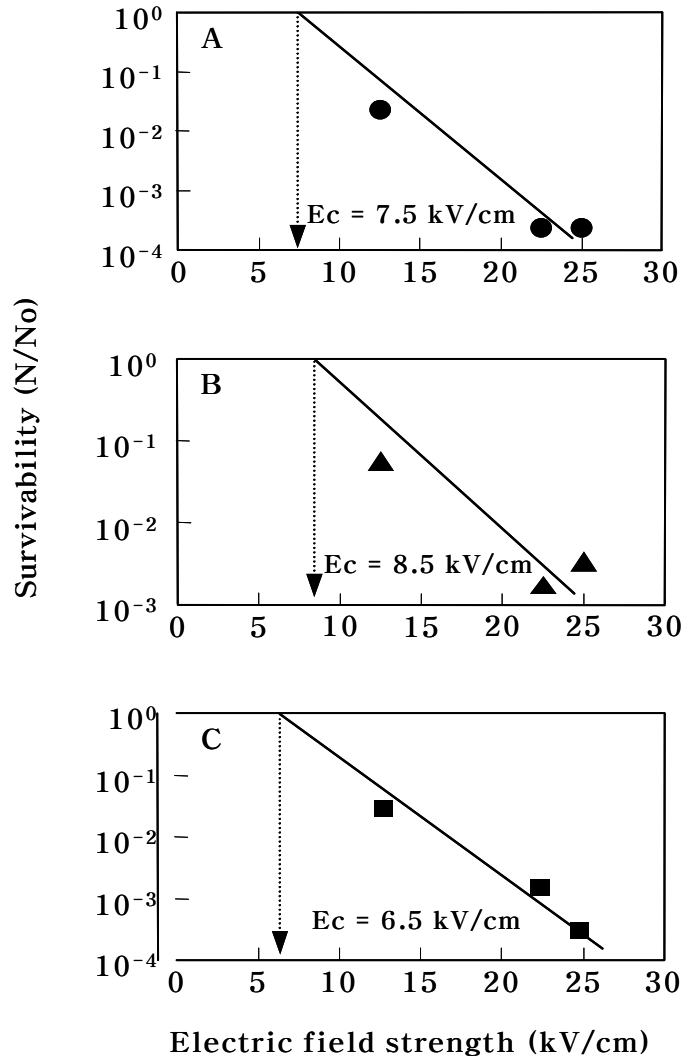


Fig. 4-72. Estimation of critical electric field strength( $E_c$ ) against microorganisms in Yakju at 32 pulses PEF treatment.

A : Total aerobes  
C : Yeasts

B : Lactic acid bacteria

여 산출한 약주의 미생물별  $E_c$ 값인 16.0~19.3 kV/cm에 비하여 훨씬 낮은 값을 보임으로써 회분식 살균이 훨씬 효과적임을 알 수 있었다. 이는 연속 재순환식 PEF장치를 사용한 경우 평균유속과 평균 체류 시간으로부터 PEF 처리시간을 산출하였는데 처리용기 내의 dead volume등에 의해 균일한 PEF 처리에는 한계가 있었으며 살균된 약주가 다시 reservoir로 돌아가 비살균 약주와 혼합되어 살균효과가 희석되었기 때문에 나타난 결과로 사료된다.

전기장 세기를 12.5 kV/cm와 25.0 kV/cm로 고정하고 2~64회로 펄스 수를 변화시키면서 PEF 처리한 결과 Fig. 4-73에서와 같이 세균, 젖산균, 효모의 경우 모두 동일한 전기장 세기에서 펄스 수가 증가함에 따라 미생물의 생존율이 감소하였으나 펄스 수에 따라  $\log(s)$ 가 직선적으로 감소하지는 않는 것으로 나타났다. 그러나 일정한 펄스 수에서의 생존율의 감소 정도는 전기장 세기에 비례하였다. 미생물 종류별로는 효모, 세균, 젖산균의 순서로 사멸효과가 증가하였다. 이 결과는 약주를 연속 재순환 방식으로 PEF 처리 시 효모의 살균효과가 세균이나 젖산균보다 컸던 결과와 동일한 경향으로서, 전기장 세기 25 kV/cm에서 64회의 펄스를 처리할 경우 약주의 세균은 3.5 log, 젖산균은 2.5 log, 효모는 3.5 log정도 감소하였다.

이상의 결과를 종합할 때, 세균과 젖산균, 효모 모두 처리시간(펄스 수×펄스 폭)이 증가함에 따라 살균효과가 증가하는 것으로 나타났으며 임계 전기장 세기 이상의 높은 전기장 세기 하에서는 펄스 수 증가에 따라 살균효과가 뚜렷이 증가되었다. 또한 PEF 처리시간을 길게 한다고 해서 미생물의 사멸이 계속 동일한 속도로 진행되는 것은 아니었으며, 이 결과는 PEF 처리에 의한 미생물 살균에는 전기장 세기가 처리시간보다 더 큰 영향을 미치는 인자임을 의미한다.

### 2.2.2.3. 약주의 회분식 PEF 살균 모델

회분식 PEF 처리 시 펄스 수에 따른 약주 미생물의 살균 패턴을 Hülshager등이 제시한 모델  $\ln(s) = A - k_H \ln(n)$ 에 의거하여 해석한 결과 Fig. 4-74와 같이 Hülshager 모델이 1차 반응 모델보다 더 잘 적용됨을 알 수 있었으

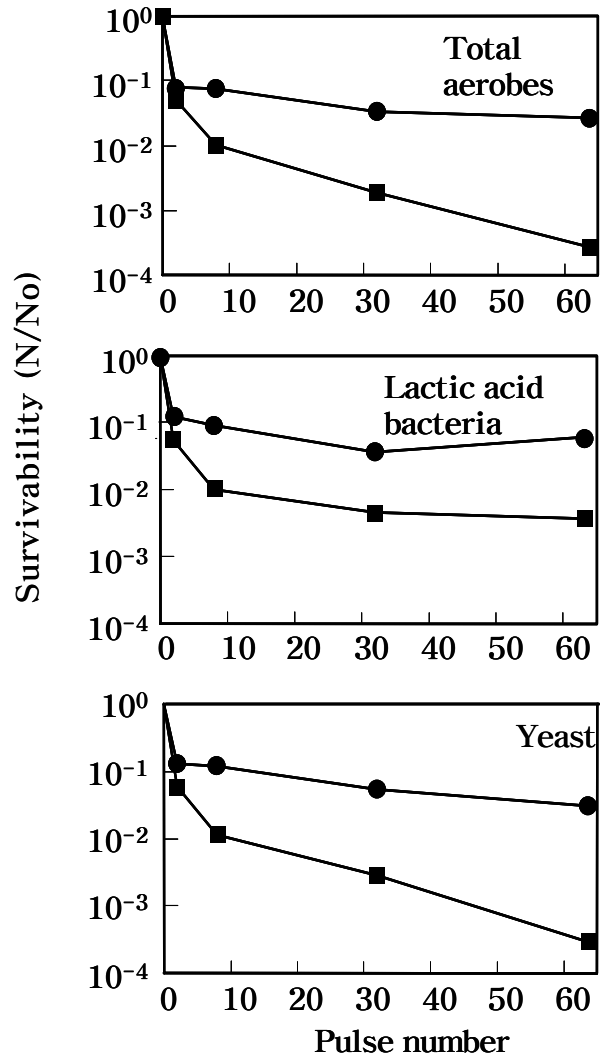


Fig. 4-73. Effect of electric field strength on survivability of microorganisms in Yakju.

● 12.5kV/cm      ■ 25.0kV/cm



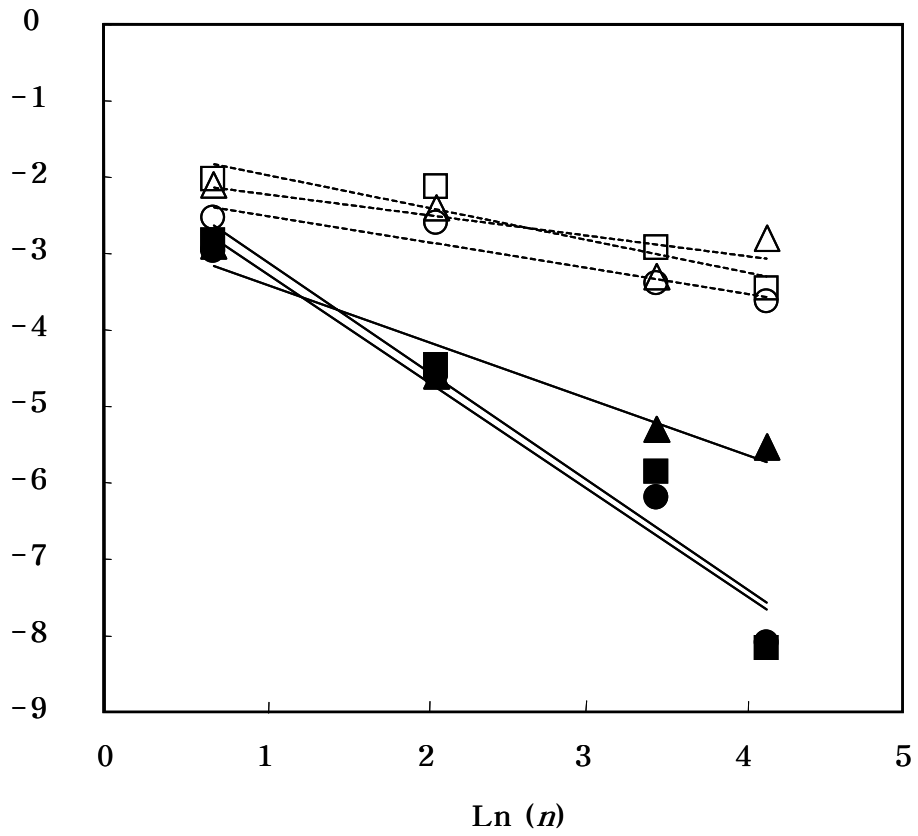


Fig. 4-74. PEF sterilization mode of microorganisms in Yakju with respect to pulse numbers.

12.5 kV/cm : ○ Total aerobes      25.0 kV/cm : ● Total aerobes  
 △ Lactic acid bacteria      ▲ Lactic acid bacteria  
 □ Yeasts      ■ Yeasts

며, 직선의 기울기로부터 계산한 사멸정수( $k_H$ )를 계산하여 Table 4-21에 나타내었다.

전기장세기가 증가함에 따라 사멸정수는 증가하였으며 미생물 종류별로는 효모의 사멸정수가 세균의 경우보다 큰 값을 보여 효모가 PEF 처리에 더욱 예민한 것으로 나타났으며, 이 결과는 미생물 크기가 증가함에 따라 PEF에 의한 사멸효과가 증대되었던 Mazurek 등과 Gáskova등의 결과와 일치하였다. 한편 젖산균의 경우 세균에 비하여 낮은 사멸속도상수를 보였는데 이 또한 통상 젖산균의 크기가 일반세균에 비하여 작기 때문에 나타나는 현상으로 사료된다.

#### 2.2.2.4. 회분식 PEF 처리 약주의 저장성 평가

회분식 PEF 처리장치를 사용하여 전기장 세기 30 kV/cm에서 250 펄스 처리한 약주의 저장성을 저장온도 4°C 와 30°C에서 평가하였다. PEF 처리한 약주의 초기 pH는 Fig. 4-75와 같이 무처리 약주에 비해 다소 높게 나타났으며 저장기간동안 무처리 약주의 pH는 감소하는 반면 PEF 처리구의 pH는 변화가 없으므로 나타났다. 온도별로는 4°C 보다 30°C에서 저장하였을 경우 더욱 빠른 변화를 나타내었다.

산도의 경우 Fig. 4-76에 나타난 바와 같이 30°C에서 저장한 무처리 약주의 산도는 급격하게 증가한 반면 PEF 처리한 시료의 경우 30°C에서도 큰 변화가 없이 초기 산도를 그대로 유지하는 경향을 보여 PEF 처리에 의한 확연한 저장성의 향상을 보여주고 있다.

초기 미생물 수가 세균  $2.0 \times 10^2$  CFU/mL, 젖산균  $8.0 \times 10^2$  CFU/mL, 효모  $2.0 \times 10^1$  CFU/mL로 미생물학적으로 비교적 청결한 상태의 약주를 전기장 세기 30 kV/cm에서 250 펄스 PEF 처리하여 4°C에서 저장하면서 조사한 미생물 변화를 보면 Fig. 4-77과 같다. 무처리 약주의 경우 세균과 젖산균은 저장기간에 따라 약간 감소하는 경향을 보였으나 효모수는 증가하여 6주간 저장 후  $10^2$  CFU/mL 수준을 보였다. 반면에 PEF 처리한 약주는 6주간 저장 중 미생물의 생육을 전혀 보이지 않아 PEF 처리에 의해 완벽한 저장성을 부여할 수 있었다.

Table 4-21. Hülsheger sterilization rate constant of microorganisms in Yakju

Microorganisms	Electric field strength (kV/cm)	$k_H$
Total aerobes	12.5	0.3428
	25.0	1.4067
Lactic acid bacteria	12.5	0.2767
	25.0	0.7449
Yeast	12.5	0.4185
	25.0	1.4271

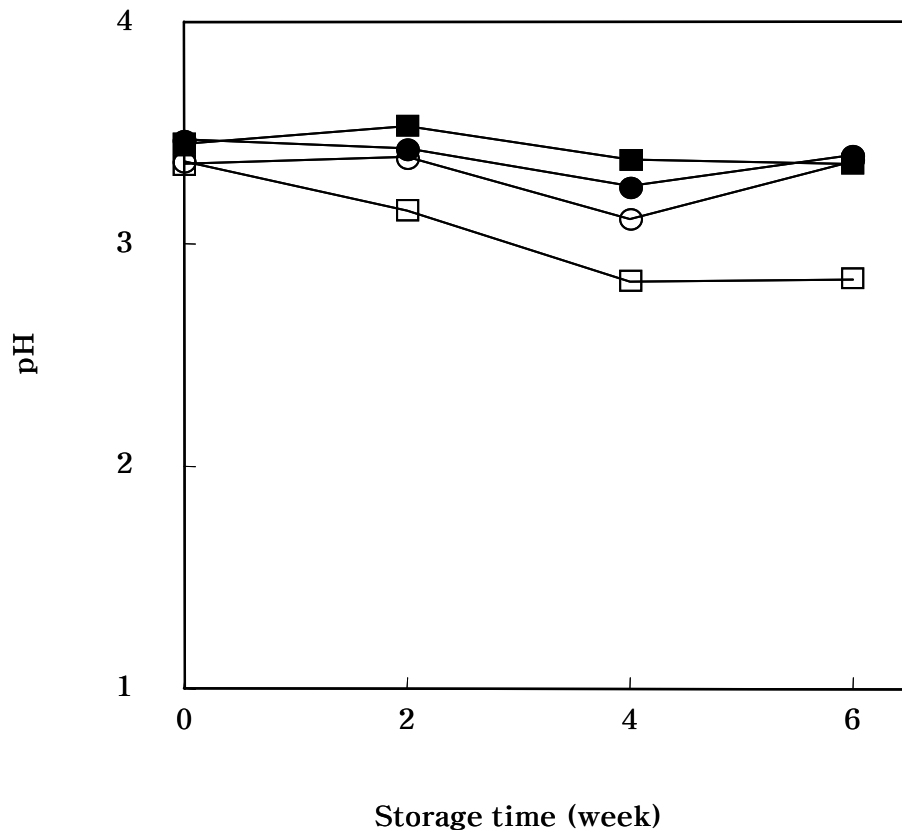


Fig. 4-75. Changes in pH of Yakju during storage at 4°C and 30°C.

- Control (4°C)
- PEF treated (4°C)
- Control (30°C)
- PEF treated (30°C)

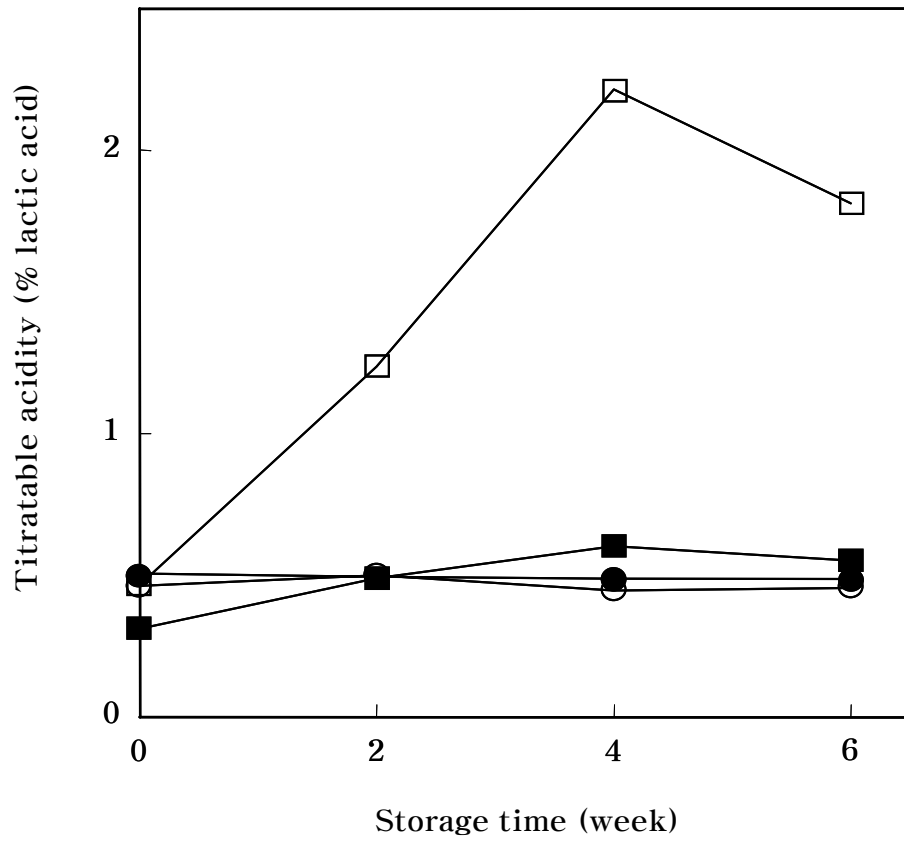


Fig. 4-76. Changes in titratable acidity of Yakju during storage at 4°C and 30°C.

- Control (4°C)
- PEF treated (4°C)
- Control (30°C)
- PEF treated (30°C)

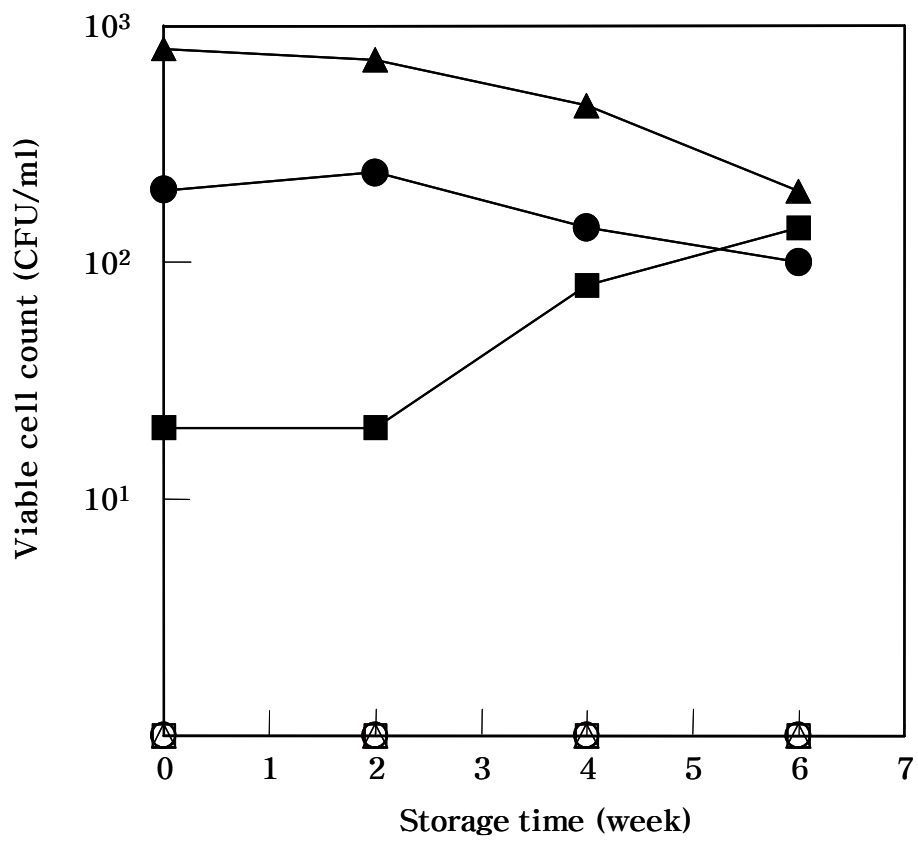


Fig. 4-77. Changes in microorganisms of Yakju during storage at 4°C.

Control:	● Total aerobes	PEF treated:	○ Total aerobes
	▲ Lactic acid bacteria		△ Lactic acid bacteria
	■ Yeast		□ Yeast

또한 30℃에서 저장한 약주의 미생물은 Fig. 4-78과 같이 무처리 약주의 경우 2주만에 미생물의 생육이 급격히 증가하였다가 점차 감소하는 경향을 보였으나 PEF 처리한 약주의 미생물은 30℃에서도 생육이 전혀 나타나지 않아 관리가 양호한 공정에 의해 생산된 청결한 약주는 30 kV/cm에서 250회의 펄스 처리에 의해 완벽한 저장성이 부여됨을 알 수 있었다.

## 2.2.3. 직렬배열 다중전극 PEF 처리장치를 이용한 약주의 살균

### 2.2.3.1. 연속 재순환식 운영

#### 2.2.3.1.1. 약주의 PEF살균 특성

Square wave 펄스를 발생시키는 직렬배열 다중전극 PEF 처리장치를 연속 재순환식으로 운영하여 약주를 PEF 처리하였다. 사용한 약주의 초기 세균수는  $1.88 \times 10^3 \sim 2.13 \times 10^4$  CFU/mL이었고, 효모는  $1.72 \times 10^3 \sim 2.39 \times 10^4$  CFU/mL이었으며, 젖산균은  $1.55 \times 10^3 \sim 2.85 \times 10^4$  CFU/mL 범위의 것이었다.

약주 500 mL를 reservoir에 넣고 유량 1mL/s의 속도로 다중전극 PEF장치에 투입하여 주파수를 300 ~ 1,500 Hz사이에서 변화시켜 PEF 처리한 후 reservoir로 되돌아오도록 하는 재순환 방식으로 500초간 운영한 결과 Fig. 4-79와 같이 log(s)는 주파수에 따라 직선적으로 낮아져 1차 반응으로 해석될 수 있었고, 전기장 세기가 증가함에 살균율이 증가하여 기존의 연구 결과와 같은 경향을 보였다.

약주의 PEF 살균은 1차반응에 속하였으므로 가열살균에 적용되는 미생물 사멸이론을 적용하여 해석하고자 하였다. 즉 약주 500 mL를 유량 1mL/s의 속도로 500초간 재순환시킨 경우 미생물 수를 1/10로 낮추는데 필요한 주파수(Hz)를 나타내는  $D_{Hz}$ 값을 전기장 세기 별로 계산하여 Table 4-22에 나타내었다.

일반세균의 경우 균수가 1/10로 감소되는데 소요되는 주파수는 20

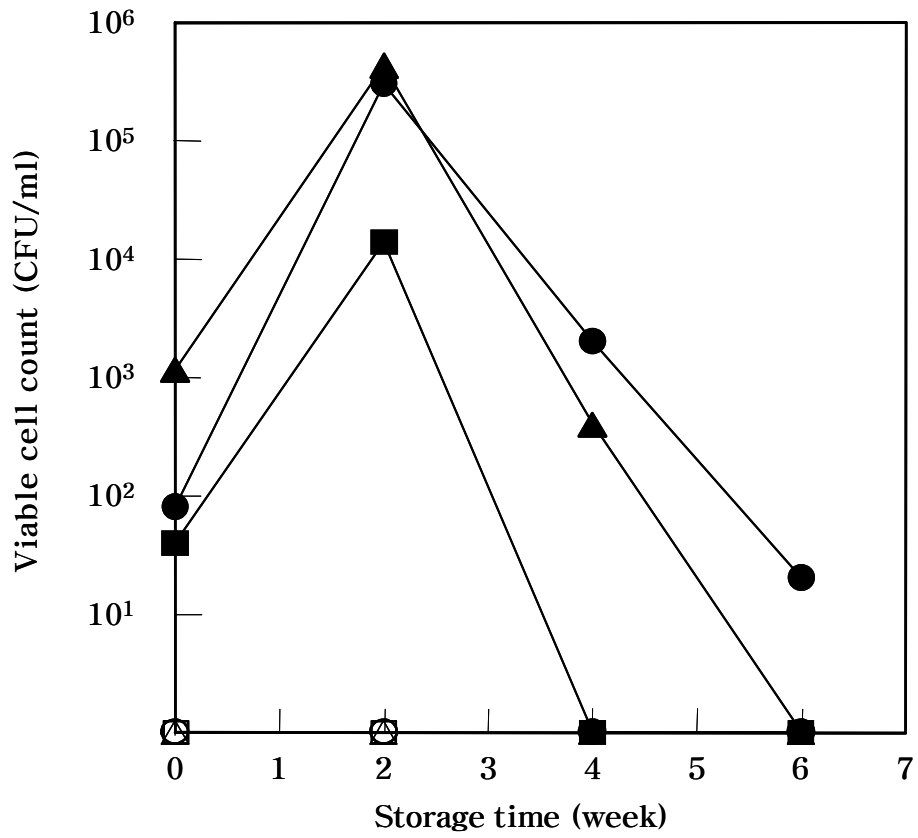


Fig. 4-78. Changes in microorganisms of Yakju during storage at 30°C.

Control: ● Total aerobes	PEF treated: ○ Total aerobes
▲ Lactic acid bacteria	△ Lactic acid bacteria
■ Yeast	□ Yeast



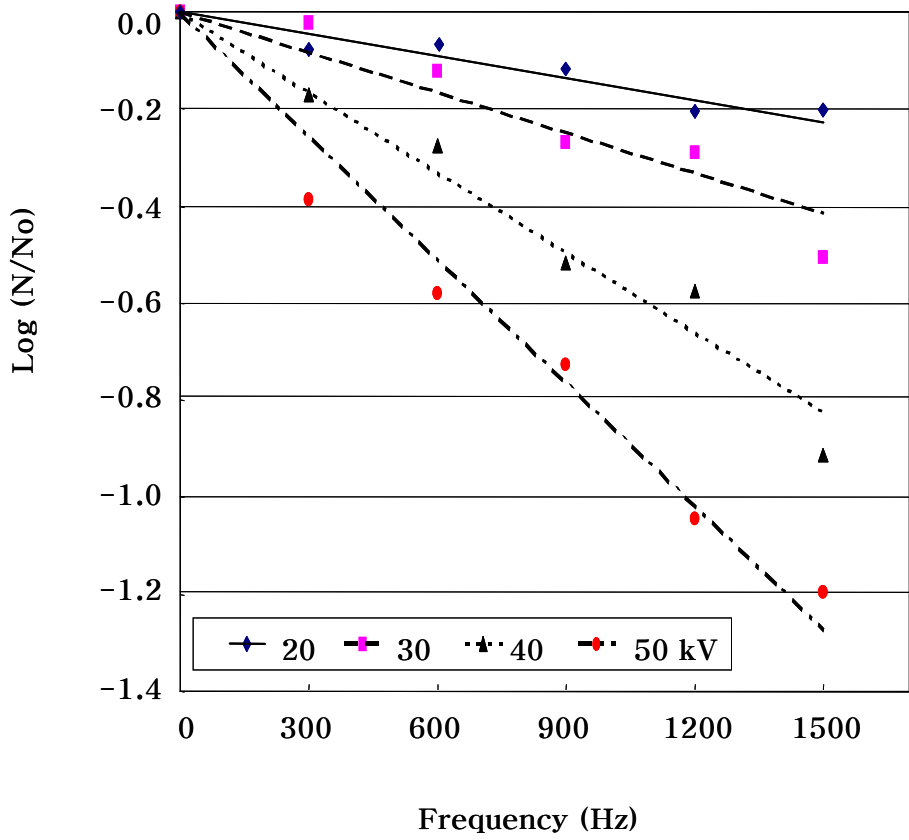


Fig. 4-79. Sterilization of total aerobes in Yakju by PEF treatment at different electric field strength and frequency.

Table 4-22. Effect of electric field strength on  $D_{Hz}$  value of microorganisms in Yakju

(unit: Hz)

Microorganisms	Electric field strength (kV/cm)			
	20	30	40	50
Total aerobes	6,600	3,600	1,820	1,180
Yeast	4,480	1,480	1,380	1,130
Lactic acid bacteria	6,530	3,250	2,770	1,460

kV/cm에서는 6,600 Hz가 필요하였으며, 30 kV/cm에서는 3,600 Hz, 40 kV/cm에서는 1,820 Hz, 50kV/cm에서는 1,180 Hz의 처리가 필요한 것으로 나타나, 전기장 세기가 증가함에 따라  $D_{Hz}$ 값이 감소하였다.

미생물 종류별로는 세균의  $D_{Hz}$ 값이 효모에 비하여 높았으나 그 차이는 전기장 세기가 증가함에 따라 줄어드는 양상을 보였다. 이는 효모의 크기가 세균보다 크고, 미생물의 크기가 증가함에 따라 동일한 전기장 세기에서 세포막 내외의 전위차가 커져 효모의 사멸율이 증대되는 것으로 설명되어 질 수 있다. 한편 젖산균은 전기장 세기에 따른  $D_{Hz}$  값의 변화 폭이 일반세균에 비하여 작았으며 20 kV/cm에서는 6,530 Hz이었던 것이 50 kV/cm에서는 1,460 Hz로 감소하였는데, 이는 젖산균의 크기가 세균보다 작기 때문에 세포막 내외부에 발생하는 전위차가 작아 젖산균의 사멸효과가 낮은 것으로 추정된다.

누적처리시간에 따른 약주의 세균, 효모, 젖산균 생존율의 변화를 각각 Fig. 4-80, 4-81, 4-82에 나타내었다. 세균(Fig. 4-80)은 누적처리시간 및 전기장 세기에 비례하여 생존율이 직선적으로 감소하였다. 반면에 효모의 경우(Fig. 4-81)는 전기장 세기 30 kV/cm에서의 생존율과 20 kV/cm에서의 생존율의 차이가 미미하였으나 40 kV/cm에서의 살균효과는 30 kV/cm에 비하여 크게 증가하였으며 50 kV/cm에서의 살균효과는 40 kV/cm에 비하여 약간 높아지는 것으로 나타났다. 젖산균(Fig. 4-82)의 경우는 전기장 세기 30 kV/cm와 40 kV/cm간의 차이가 미미한 것으로 나타났으며 50 kV/cm에서는 40 kV/cm에 비하여 살균효과가 크게 증가되었다.

미생물 종류에 따른 전기장 세기별 균수 1 log 감소에 필요한 처리시간으로 정의되는  $D_{PEF}$ 값을 Fig. 4-83과 같이 산출하여 그 결과를 Table 4-23에 나타내었다. 전기장 세기 20 kV/cm에서 일반세균은 1,154  $\mu$ s 처리하면 1 log 감소시킬 수 있었으며 전기장 세기가 증가함에 따라  $D_{PEF}$ 값은 감소하여 50 kV/cm에서는 206  $\mu$ s이 소요되는 것으로 나타났다. 효모의  $D_{PEF}$ 값은 세균에 비하여 낮은 값을 보여 효모가 PEF 살균에 더욱 민감함을 알 수 있었다. 약주 산패의 원인균으로 알려진 젖산균의  $D_{PEF}$  값은 전기장 세기 20~30 kV/cm에서는 일반세균보다 낮은

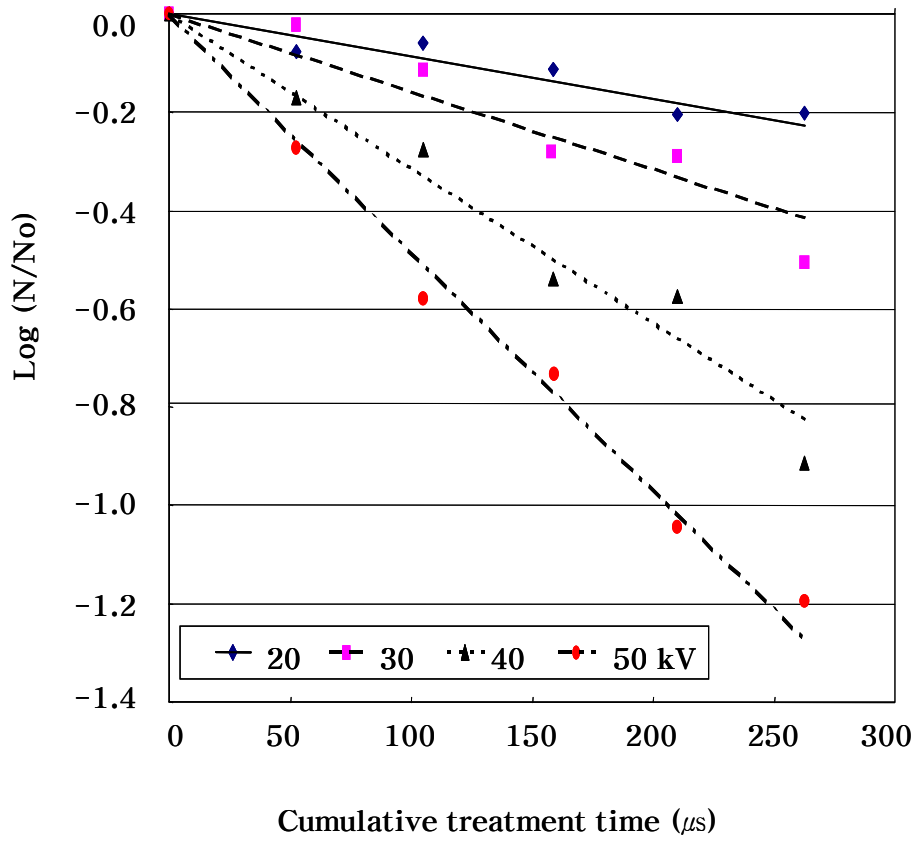


Fig. 4-80. Changes in total aerobes count in Yakju with electric field strength and treatment time during PEF treatment

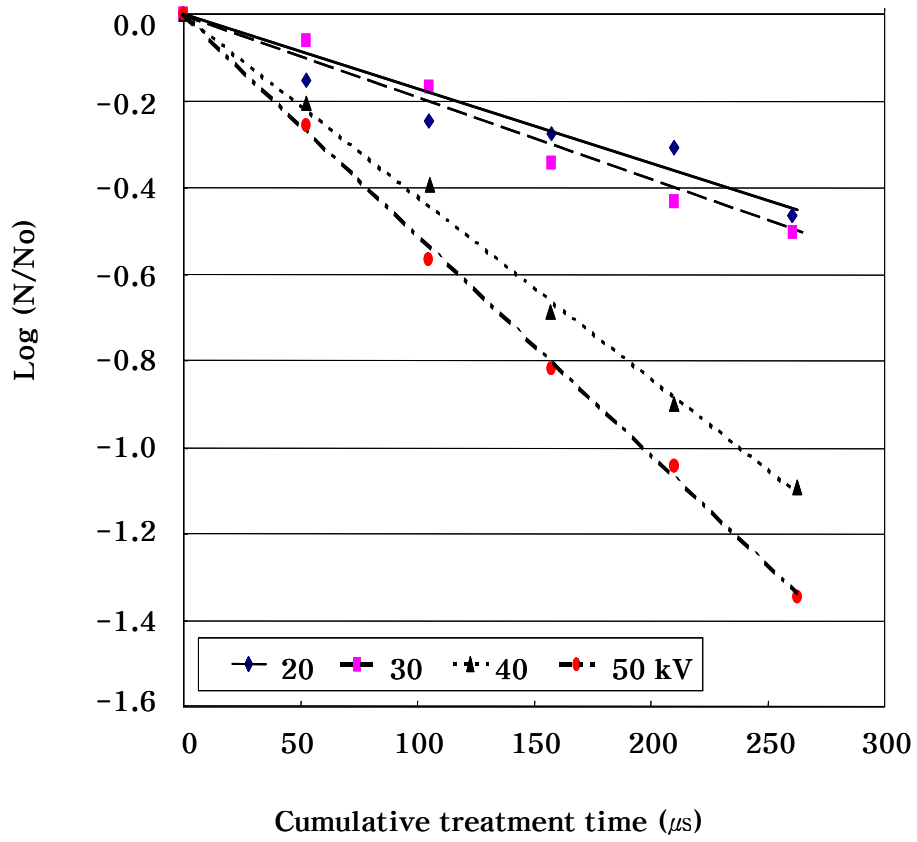


Fig. 4-81. Changes in yeast count in Yakju with electric field strength and treatment time during PEF treatment.

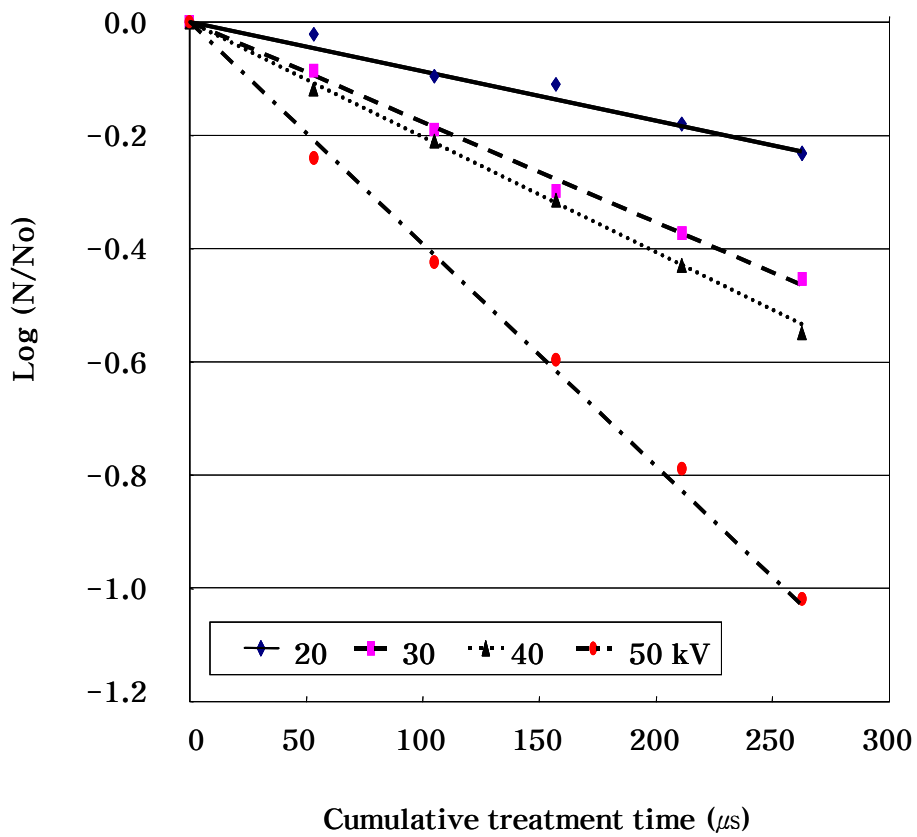


Fig. 4-82. Changes in lactic acid bacterial count in Yakju with electric field strength and treatment time during PEF treatment

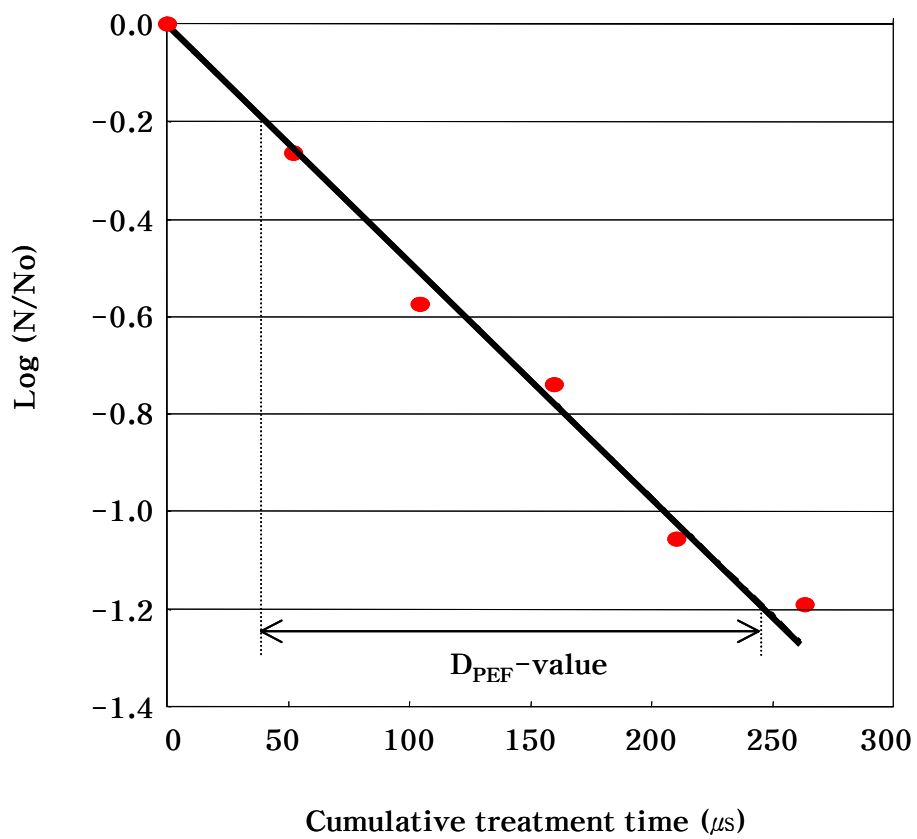


Fig. 4-83. High voltage electric field sterilization kinetics of bacteria in Yakju treated at 50 kV/cm.

Table 4-23. Effect of electric field strength on  $D_{PEF}$ -value of microorganisms in Yakju

(unit:  $\mu s$ )

Microorganisms	Electric field strength (kV/cm)			
	20	30	40	50
Total aerobes	1,154	630	318	206
Yeast	768	511	240	197
Lactic acid bacteria	1,143	570	485	255



값을 보였으나 전기장 세기가 40~50 kV/cm로 증가하면 일반세균에 비하여 높은 값을 보여 높은 전기장에서의 PEF에 대한 저항성이 큰 것으로 나타났다.

이상의 다중전극 PEF 살균 결과를 앞의 소규모 연속식 PEF살균 결과와 비교할 때 살균효과의 상승이 있었으며, 특히 20 kV/cm에서는 뚜렷한 향상이 확인되었다. 이는 처리시간은 동일하지만 본 장치에서는 7개의 PEF발생 전극을 직렬로 배열하여 처리함으로써 약주에 존재하는 미생물이 펄스전기장에 연속적으로 노출되는 횟수가 더 많았고 펄스형태를 square wave로 하였기 때문에 소규모 연속식 PEF살균장치에 비하여 PEF 처리효과가 높은 것으로 생각된다.

한편  $\log(D_{PEF})$ 를 전기장 세기에 대하여 작도하면 Fig. 4-84와 같이 직선적으로 감소하였으며, 따라서 처리시간을 1/10으로 단축하는데 필요한 전기장 세기를  $z_{PEF}$ 값으로 정의하고 직선의 기울기로부터 계산한  $z_{PEF}$ 값을 Table 4-24에 나타내었다.

약주의 PEF 살균시 미생물별  $z_{PEF}$  값은 젖산균, 효모, 일반세균 순으로 감소하였으며, 따라서 일반세균의 살균시간의 전기장 세기에 대한 의존성이 가장 큰 것으로 나타났고, 효모, 젖산균 순으로 전기장 세기에 대한 의존성이 감소하였다.

#### 2.2.3.1.2. 다중전극 PEF 처리 시스템을 이용한 약주의 상업적 살균

이상의 결과로부터 높은 전기장세기에서  $D_{PEF}$ -value가 가장 큰 젖산균을 기준으로 PNSU(probability of nonsterile unit)개념을 도입하여 비병원성 중온균에 대한  $PNSU=10^{-6}$ 을 기준으로 약주의 살균에 필요한 PEF 처리시간을 산출하였다. 약주 500 mL를 재순환 방식으로 PEF 처리 시 상업적 살균에 필요한 펄스 수는 전기장 세기 40 kV/cm에서는 24,930회, 50 kV/cm에서는 13,140회로서, 주파수를 1,500 Hz로 고정하여 처리할 경우 이론상 필요한 recycle수는 40 kV/cm에서는 약 16회, 50 kV/cm에서는 약 9회가 필요한 것으로 나타났다. 이를 누적처리시간으로 환산하면 40 kV/cm에서는 4,365  $\mu s$ , 50 kV/cm에서는 2,296  $\mu s$ 에 해당하였다.

한편 주파수를 1,500 Hz로 고정하고 전기장 세기 40 kV/cm에서 recycle 횟수에 따른 미생물의 변화를 조사한 결과 Fig. 4-85와 같이 2 cycle 이상에서는

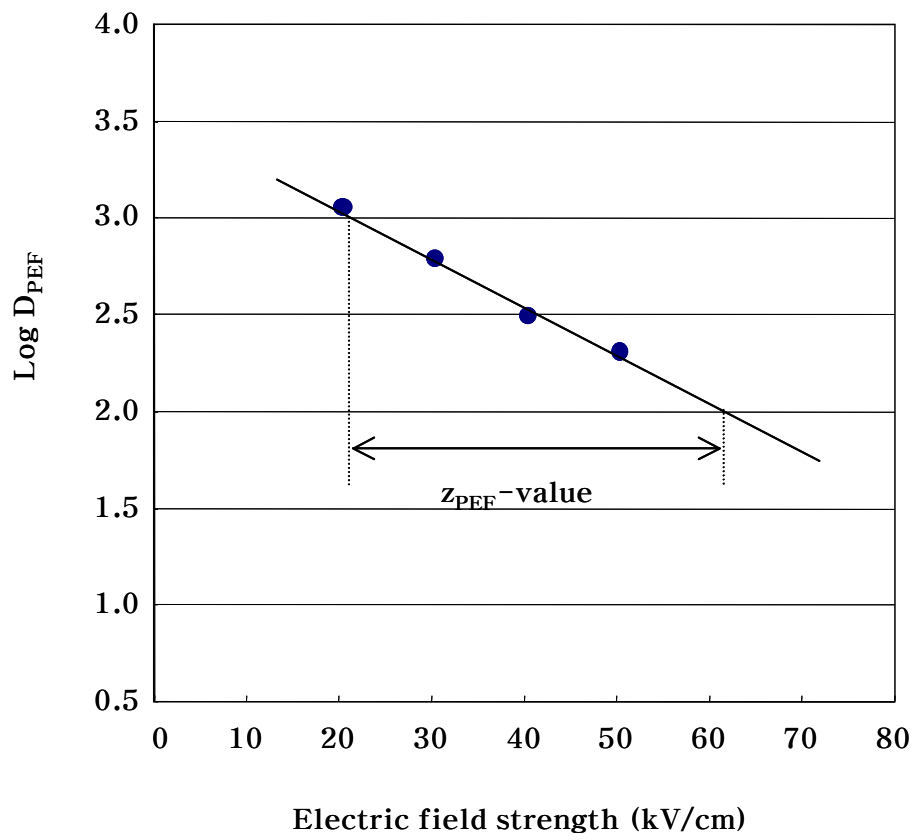


Fig. 4-84. Semilogarithmic plot of decimal reduction time ( $D_{PEF}$ ) of bacteria in Yakju versus electric field strength

Table 4-24.  $z_{PEF}$ -value of microorganisms in Yakju

Microorganisms	$z_{PEF}$ -value (kV/cm)
Total aerobes	39.4
Yeast	47.6
Lactic acid bacteria	49.3

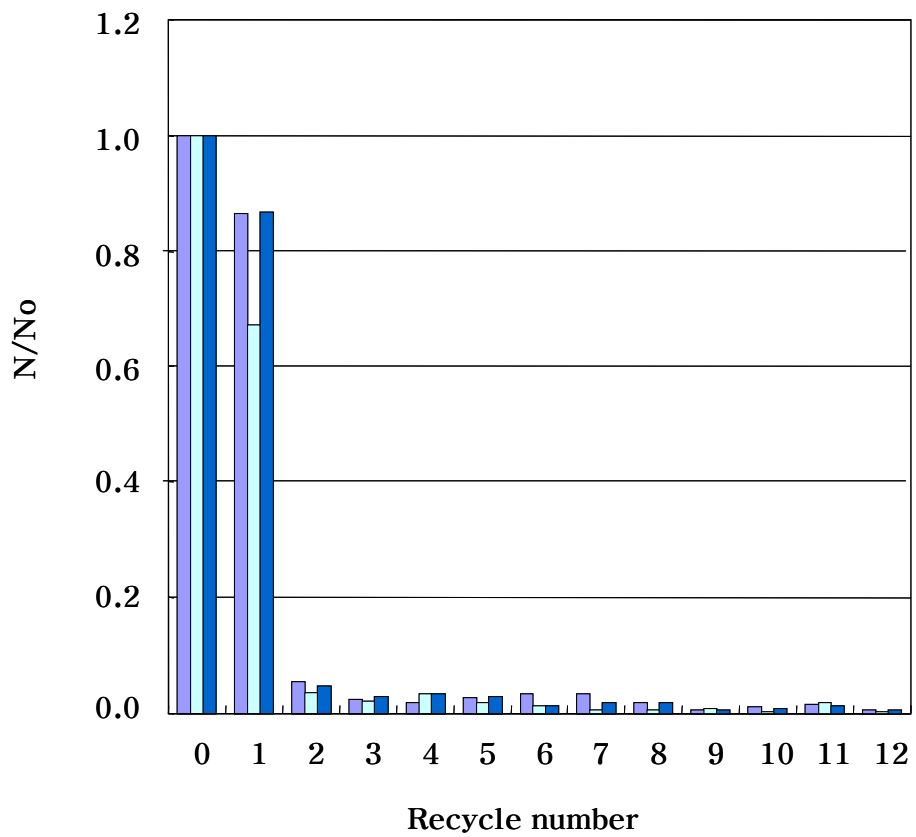


Fig. 4-85. Changes in microbial counts of Yakju on recycled PEF treatment

- Bacteria
- Yeast
- Lactic acid bacteria

거의 모든 미생물이 사멸됨을 알 수 있었으며 3 cycle 이상에서의 사멸효과는 크게 증가되지 않았다. 그러나 이는 PEF 처리 후 시료를 회수할 때 불가피하게 발생한 오염으로 생각되며, 따라서 PEF 살균과 무균포장 공정이 결합되어야만 상업적 살균 제품을 생산할 수 있음을 시사하고 있으며 PEF 처리한 식품의 무균포장 공정에 대한 연구가 요구된다.

### 2.2.3.2. 1회 통과(single pass) 방식 운영

#### 2.2.3.2.1. 약주의 초기 미생물

직렬배열 다중전극 PEF장치에 1회 통과(single pass)시키는 방식으로 살균하는 실험에 사용한 약주의 초기 세균수는  $1.92 \times 10^4 \sim 2.76 \times 10^4$  CFU/mL이었고, 효모는  $2.63 \times 10^4 \sim 2.92 \times 10^4$  CFU/mL이었으며, 젖산균은  $5.40 \times 10^4 \sim 9.00 \times 10^4$  CFU/mL 수준이었다.

#### 2.2.3.2.2. PEF 처리에 의한 미생물 사멸

약주를 유량 1mL/s의 속도로 다중전극 PEF장치를 통과시키면서 펄스에 노출시키는 방법으로 주파수와 전기장 세기를 달리하여 처리하고 미생물의 생존율 변화를 조사하였으며, 처리 온도(시료 온도)의 영향도 분석하였다.

유속을 1 mL/s로 고정하고 주파수를 500, 1,000, 1,500 Hz으로 변화시킴으로써 처리시간을 각각 87.5, 175.0, 262.5  $\mu$ s으로 조절하면서 전기장 세기를 20, 30, 40 kV/cm로 달리하여 20°C에서 PEF 처리한 약주 세균의 생존율 변화는 Fig. 4-86과 같이 처리시간에 따른 log(s)가 직선적으로 감소하였으나 기울기는 낮아 비교적 낮은 사멸속도를 나타내었다.

약주의 온도를 30°C로 하여 PEF 처리한 세균의 사멸속도는 Fig. 4-87과 같이 20°C에 비하여 사멸속도가 상승하였으며 전기장 세기에 따라 사멸속도는 증가하였다. 처리온도를 40°C로 높인 경우는 Fig. 4-88에서 보는 바와 같이 20°C와 30°C에서 처리한 경우에 비하여 급격한 생존율의 감소를 보였다. 이상의 결과는

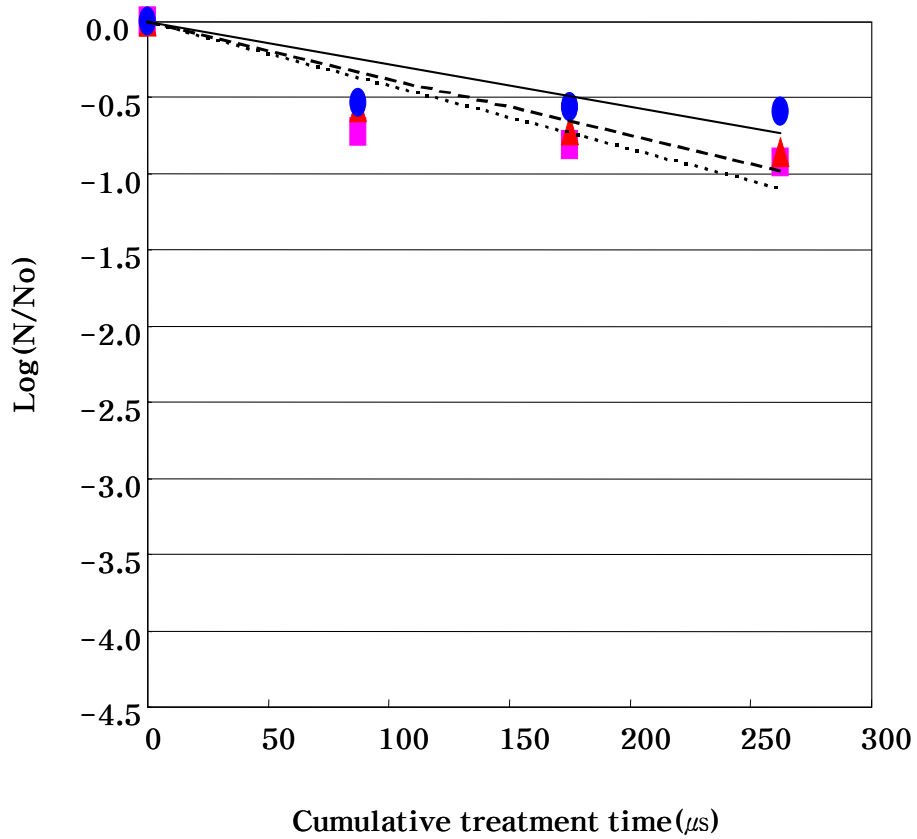


Fig. 4-86. Changes in total aerobes of Yakju with electric field strength and treatment time during PEF treatment at 20°C

■ 40 kV/cm      ▲ 30 kV/cm      ● 20 kV/cm

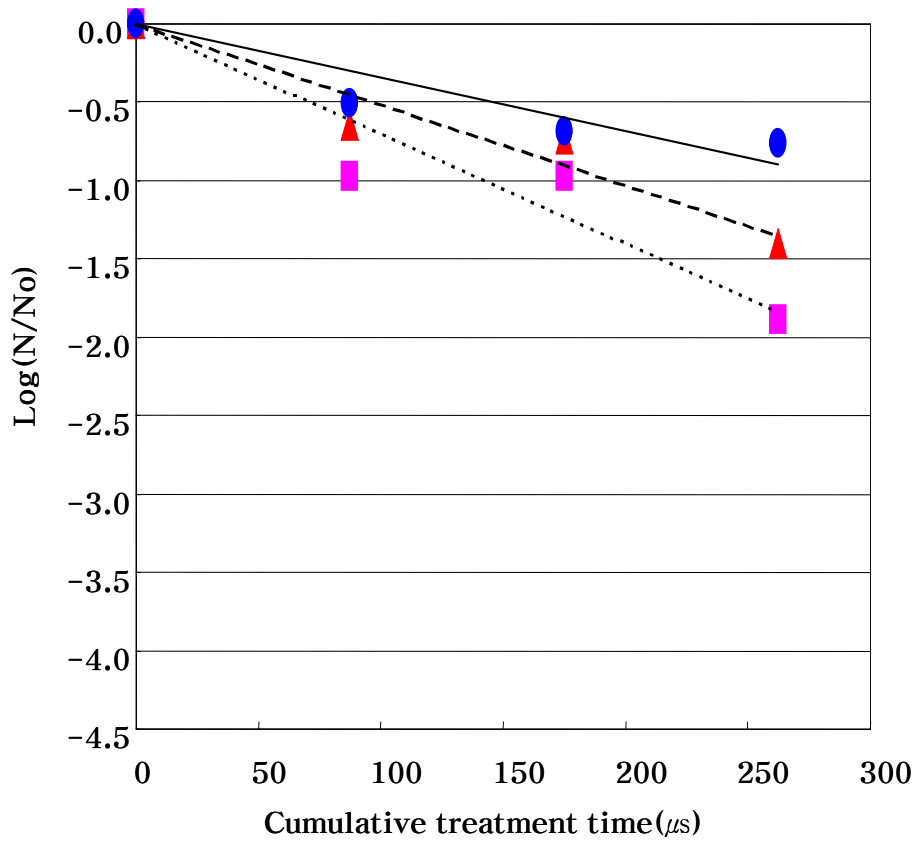


Fig. 4-87. Changes in total aerobes of Yakju with electric field strength and treatment time during PEF treatment at 30°C

■ 40 kV/cm      ▲ 30 kV/cm      ● 20 kV/cm

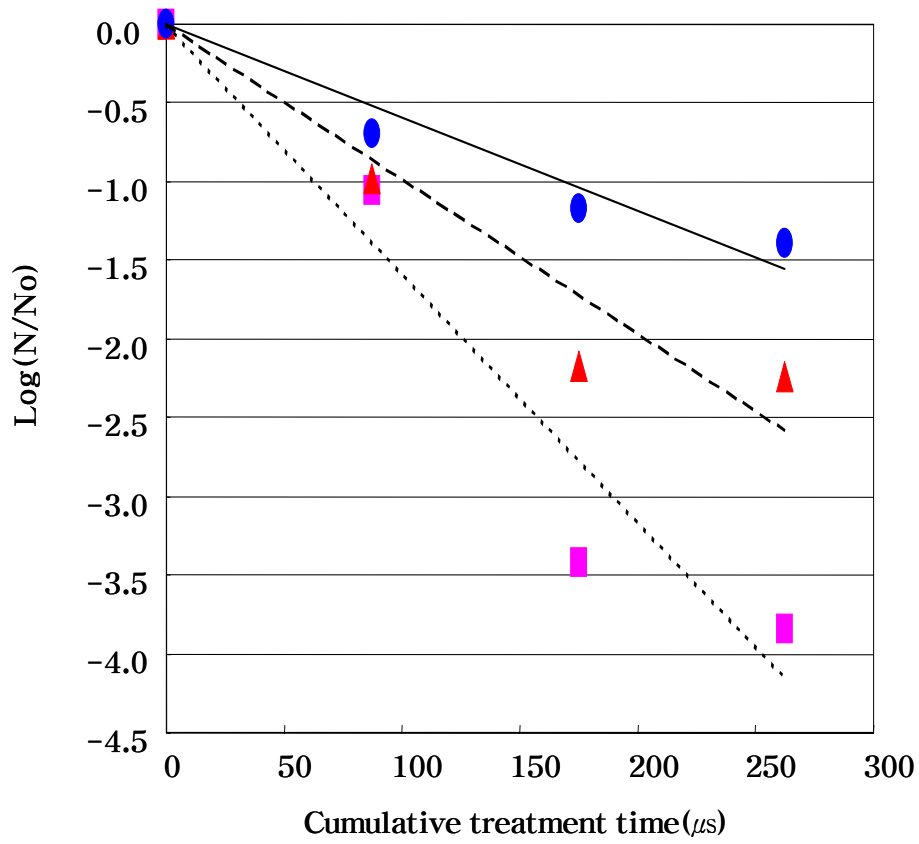


Fig. 4-88. Changes in total aerobes of Yakju with electric field strength and treatment time during PEF treatment at 40°C

■ 40 kV/cm      ▲ 30 kV/cm      ● 20 kV/cm



PEF 처리 시 온도를 높이면 사멸효과가 증대됨을 의미하는 것으로 PEF 처리 시 전기장 세기와 처리온도는 상승효과가 있음을 나타낸다.

시료의 온도를 달리하여 PEF 처리한 약주 효모의 생존율 변화를 보면 20℃에서는 Fig. 4-89와 같이  $\log(s)$ 가 직선적인 감소를 보였으나 전기장 세기에 따른 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다.

약주 온도를 30℃로 고정하여 처리한 경우는 Fig. 4-90과 같이 20℃에서 처리한 경우에 비하여 뚜렷한 살균효과의 증가를 볼 수 있었으며, 처리시간에 따라  $\log(s)$ 는 직선적인 감소를 보였다. 전기장 세기에 따른 효모 감소속도는 20 kV/cm와 30 kV/cm 간에는 확연한 차이를 보이지 않았으나 40 kV/cm에서는 뚜렷한 사멸속도 증가가 있었다. 온도를 40℃로 높여 PEF 처리한 경우는 Fig. 4-91과 같이 사멸속도가 크게 증가되었으며 전기장 세기에 따른 차이도 뚜렷해짐을 알 수 있었다.

젖산균의 경우도 세균 및 효모와 유사하게 PEF 처리효과는 온도에 따라 커졌으며 40℃에서 처리한 경우의 젖산균 사멸패턴은 Fig. 4-92와 같았다.

한편 PEF 처리 시 시료의 온도를 높여 처리하면 시료에 존재하는 미생물의 세포막 성분인 지질의 확산속도를 증가시켜 액정형태의 구조를 만들고 세포막의 유연성을 증대시킴으로써 PEF 민감성을 증가시키는 것으로 여겨지고 있다.

이들 사멸곡선의 기울기로부터 산출한 미생물, 온도 및 전기장 세기별 사멸속도상수는 Table 4-25와 같이 미생물별로는 효모의 사멸속도상수가 가장 큰 값을 보여 효모가 가장 쉽게 사멸되는 것으로 나타났으며 그 다음이 젖산균, 세균 순으로 사멸속도상수가 감소하였다. 사멸속도상수는 전기장 세기 및 온도에 따라 증가하였다. 전기장 세기와 온도의 약주 미생물별 사멸속도상수에 미치는 영향을 분석하기 위하여 중선형 모델을 사용하여 회귀분석을 실시하였으며, 회귀모델의 각 변수의 값은 Table 4-26과 같다.

사멸속도상수에 미치는 온도와 전기장 세기의 영향을 비교하면 세균과 효모의 경우는  $\beta_2$ 가  $\beta_1$ 보다 더 약간 큰 값을 보였고  $p$ -값은 더 작아 온도의 영향이 전기장 세기의 영향보다 다소 큰 것으로 나타났으며, 젖산균의 경우는 그 반대로 나타

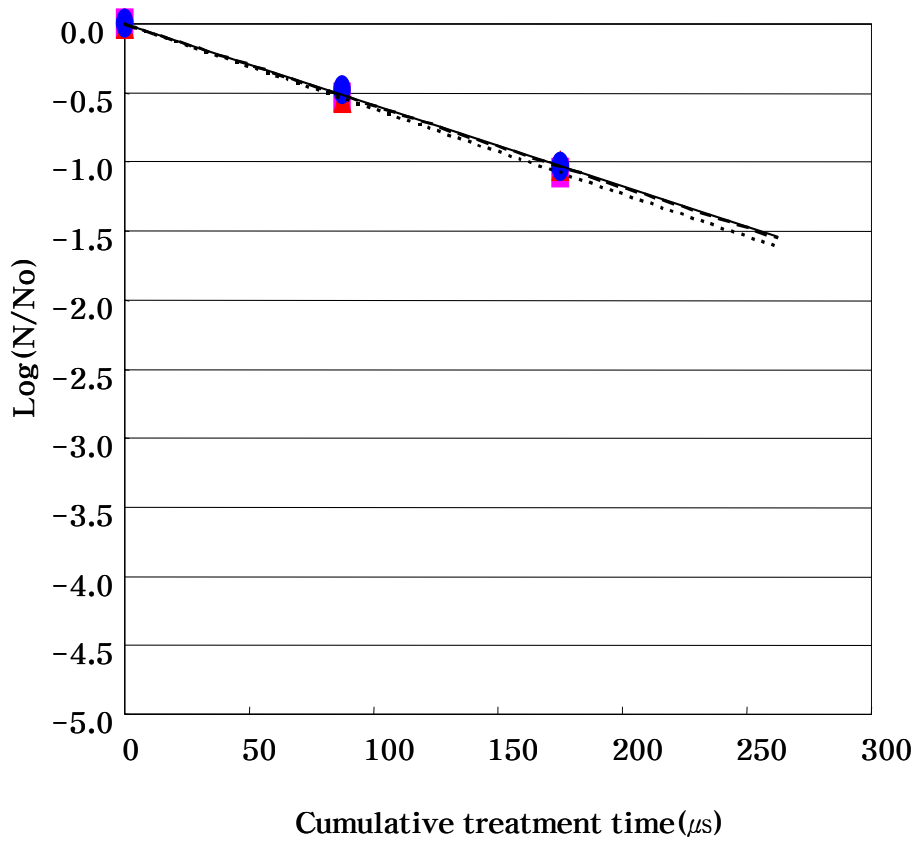


Fig. 4-89. Changes in yeast of Yakju with electric field strength and treatment time during PEF treatment at 20°C

■ 40 kV/cm      ▲ 30 kV/cm      ● 20 kV/cm

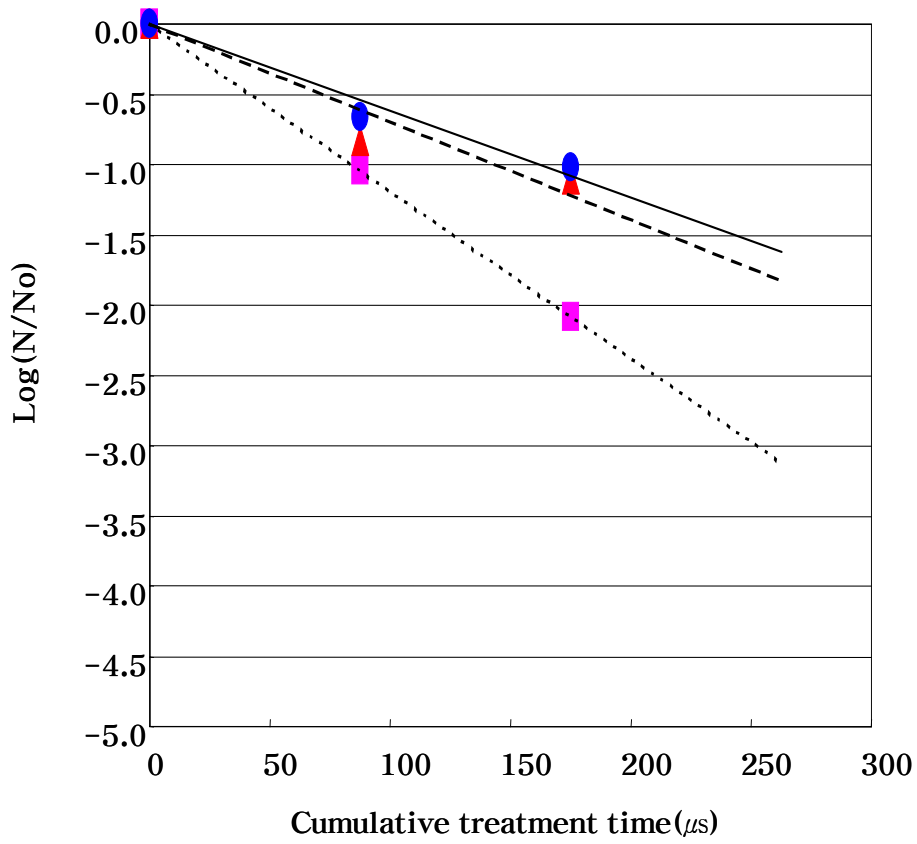


Fig. 4-90. Change in yeast of Yakju with electric field strength and treatment time during PEF treatment at 30°C

■ 40 kV/cm      ▲ 30 kV/cm      ● 20 kV/cm

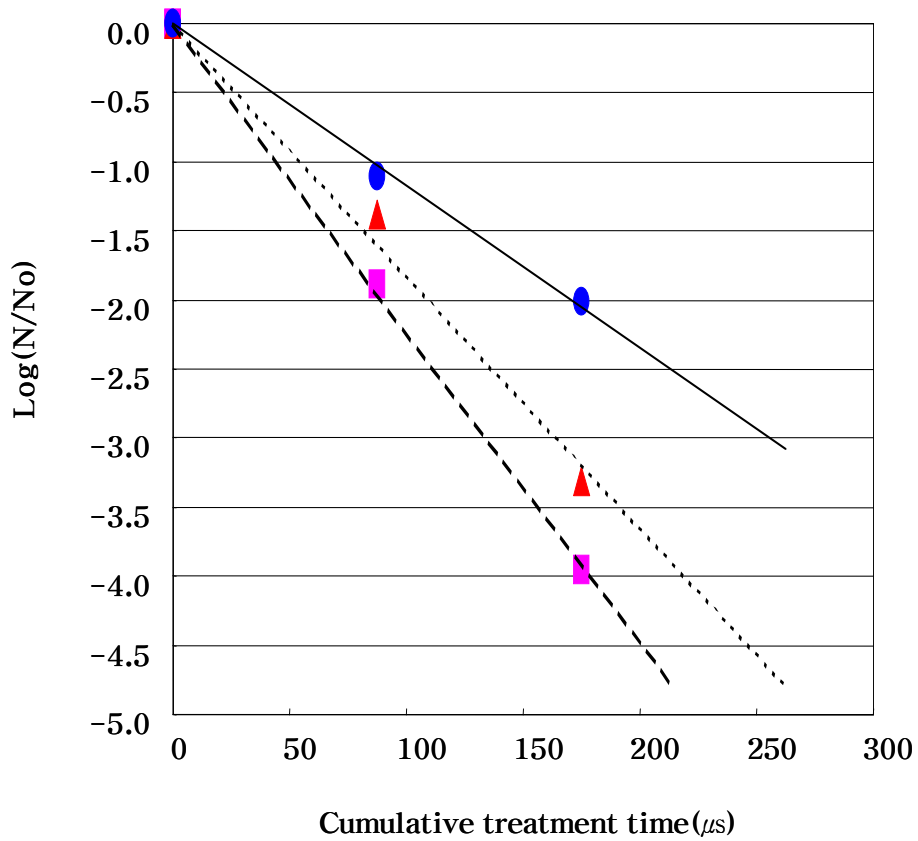


Fig. 4-91. Change in yeast count of Yakju with electric field strength and treatment time during PEF treatment at 40°C

■ 40 kV/cm      ▲ 30 kV/cm      ● 20 kV/cm

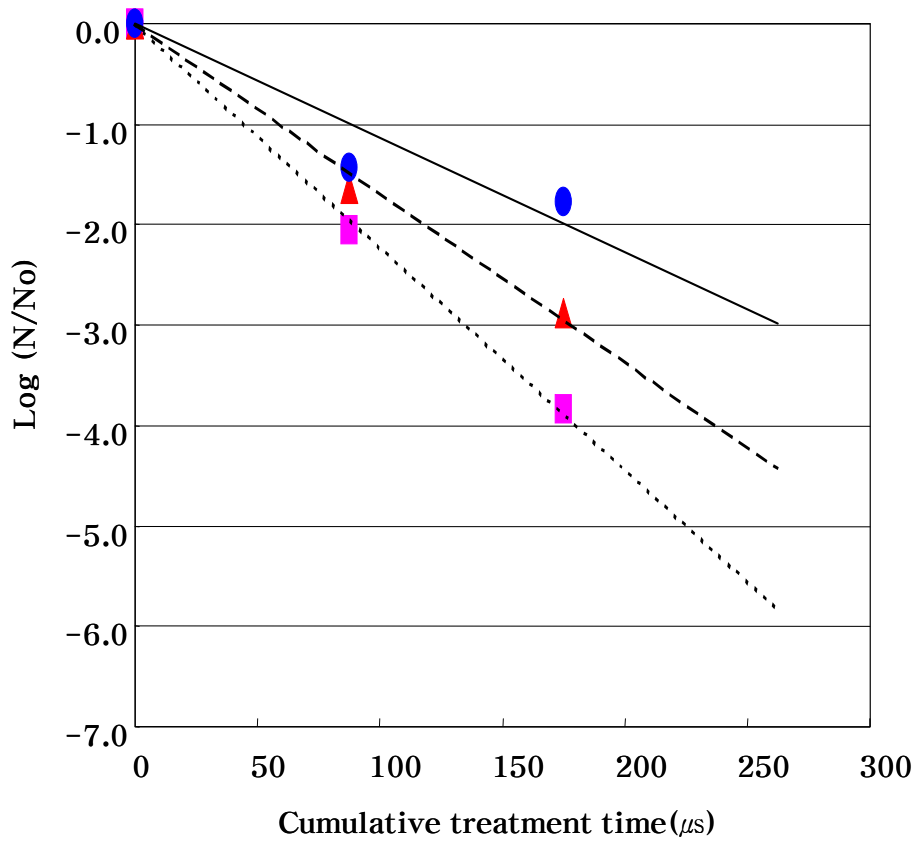


Fig. 4-92. Change in lactic acid bacteria count of Yakju with electric field strength and treatment time during PEF treatment at 40°C

■ 40 kV/cm      ▲ 30 kV/cm      ● 20 kV/cm

Table 4-25. PEF sterilization rate constants (k) of Yakju microorganisms

(unit:  $\mu\text{s}^{-1}$ )

Microorganisms	Temperature (°C)	Electric field strength (kV/cm)		
		20	30	40
Total aerobes	20	$6.43 \times 10^{-3}$	$8.59 \times 10^{-3}$	$9.60 \times 10^{-3}$
	30	$7.83 \times 10^{-3}$	0.012	0.016
	40	0.014	0.023	0.037
Yeast	20	0.013	0.014	0.014
	30	0.014	0.016	0.027
	40	0.027	0.042	0.052
Lactic acid bacteria	20	0.022	0.031	0.038
	30	0.025	0.036	0.035
	40	0.026	0.039	0.051

Table 4-26. Regression\* data for PEF sterilization rate constant of microorganisms of Yakju

Coefficient	Microorganisms		
	Total aerobes	Yeast	Lactic acid bacteria
$\beta_0$	$-2.69 \times 10^{-2}$ ( $p < 0.0228$ )	$-3.52 \times 10^{-2}$ ( $p < 0.0285$ )	$4.33 \times 10^{-3}$ ( $p < 0.5583$ )
$\beta_1$	$5.72 \times 10^{-4}$ ( $p < 0.0314$ )	$6.50 \times 10^{-4}$ ( $p < 0.0619$ )	$8.50 \times 10^{-4}$ ( $p < 0.0019$ )
$\beta_2$	$8.23 \times 10^{-4}$ ( $p < 0.0070$ )	$1.33 \times 10^{-3}$ ( $p < 0.0070$ )	$4.17 \times 10^{-4}$ ( $p < 0.0421$ )
$R^2$	0.7996	0.8200	0.8507

나 전기장 세기가 온도보다 사멸속도상수에 미치는 영향이 큰 것으로 나타났다. 그러나  $\mu_1$ 과  $\mu_2$ 의 값이 확연한 차이를 보이지는 않았으며  $\mu_1$ 과  $\mu_2$  모두 낮은 p-값을 보여 전기장 세기와 처리온도 모두 사멸속도에 미치는 영향은 모두 유의한 것으로 분석되었다. 사멸속도상수에 대한 중선형 회귀모델의 결정계수는 미생물 종류에 따라 0.7996~0.8507의 값을 보여 모델의 유의성이 상당히 높았다.

한편 PEF 처리 시 미생물의 수를 산출한 결과 Table 4-27에서 보는 바와 같이 온도와 전기장세기가 높아짐에 따라  $D_{PEF}$ 값이 낮아졌으며 가장 사멸효과가 높았던 40 kV/cm, 40°C에서 세균은 63  $\mu$ s 처리 시, 효모와 젖산균은 45  $\mu$ s 처리하면 1/10로 수를 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 토대로 처리온도 40°C, 전기장 세기 40 kV/cm에서  $D_{PEF}$ 값이 63  $\mu$ s으로 가장 높은 값을 보인 세균을 기준으로 PNSU(probability of nonsterile unit)= $10^{-6}$ 에 필요한 약주의 상업적 살균에 필요한 PEF 처리시간을 산출한 결과 648 ~ 931  $\mu$ s이었다. 이 결과를 앞에서 확인된 연속 재순환 방식에서 필요하였던 처리시간 4,365  $\mu$ s와 비교할 때 1/5 ~ 1/7 수준으로 감소된 것으로 온도를 40°C로 높여 1회 통과(single pass) 방식으로 운영하면 효율적인 연속 비열 살균이 가능함을 보여준다.

한편  $\log(D_{PEF})$ 를 전기장 세기에 대하여 작도하면 Fig. 4-93과 같이 직선적으로 감소하였으며, 직선의 기울기로부터 계산한  $z_{PEF}$ 값을 Table 4-28에 나타내었다.

즉 1회 통과 방식으로 PEF 처리할 때 사멸속도상수를 10배로 늘려 처리시간을 1/10로 줄이는데 필요한 전기장세기 변화량인  $z_{PEF}$ 값을 보면 미생물별로는 세균이 86.0 kV/cm으로 가장 작은 값을 보였으며, 그 다음은 젖산균으로 98.0 kV/cm이었고 효모는 105.8 kV/cm로 가장 큰  $z_{PEF}$ 값을 보였다. 이 결과는 1회 통과 방식에서의  $z_{PEF}$ 값이 Table 4-24의 연속 재순환 방식보다 큰 값을 보이는 것으로서 1회 통과 방식에서의 PEF 처리시간이 짧아 전기장 세기가 사멸속도상수에 미치는 영향이 작아지기 때문이며 아울러 높은 처리온도에서는 온도의 영향이 전기장 세기의 영향과 병합되기 때문으로 생각된다.



Table 4-27. D<sub>PEF</sub>-value of microorganisms of Yakju

(unit:  $\mu$ s)

Microorganisms	Temperature (°C)	Electric field strength (kV/cm)		
		20	30	40
Total aerobes	20	358	268	240
	30	294	194	143
	40	169	101	63
Yeast	20	171	169	162
	30	162	144	84
	40	85	55	45
Lactic acid bacteria	20	105	74	60
	30	91	64	66
	40	88	59	45

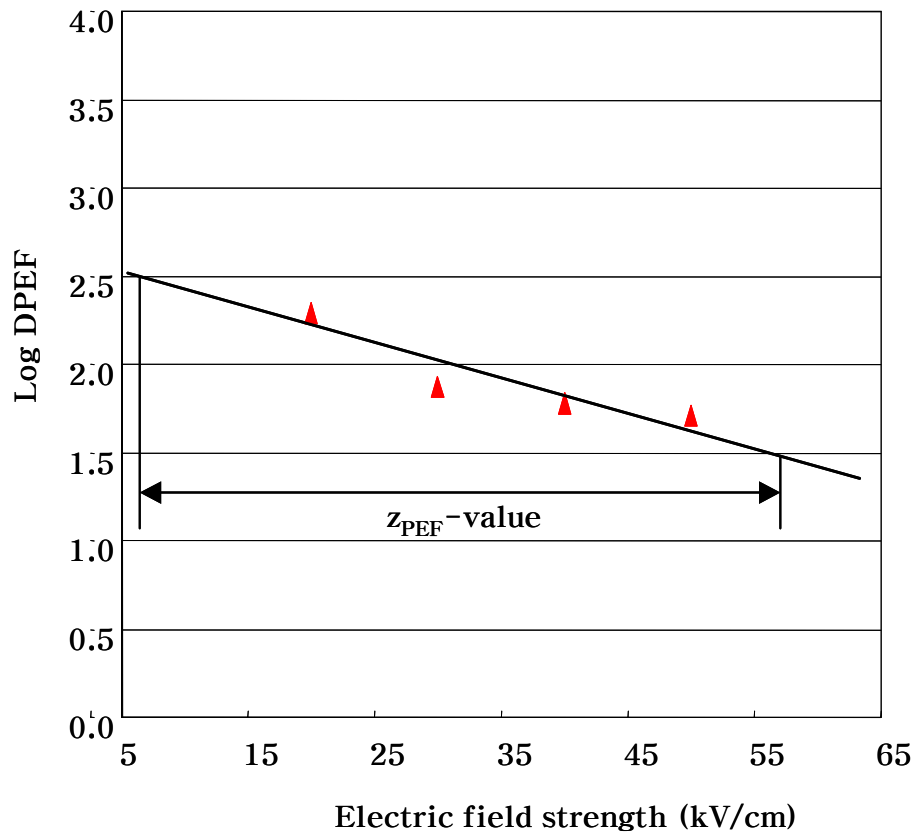


Fig. 4-93. Semilogarithmic plot of decimal reduction time of bacteria in Yakju versus electric field strength (20°C).

Table 4-28.  $Z_{PEF}$ -value of microorganisms in PEF treated Yakju at 40°C

Microorganisms	$Z_{PEF}$ -value (kV/cm)
Total aerobes	86.0
Yeast	105.8
Lactic acid bacteria	98.0

### 2.2.3.3. PEF 살균 약주의 품질 평가

#### 2.2.3.3.1. 색도

다중전극 PEF 처리장치를 통과시켜 PEF 처리한 약주의 색도를 무처리 약주 및 65°C에서 30분간 저온살균한 약주와 비교한 결과 Table 4-29와 같이 PEF 처리한 약주는 무처리 약주와 유사한 L값과 a값을 보였으며 b값은 약간 증가하여 무처리구와의 색차가 0.383을 보였다. 반면에 열처리한 약주는 무처리구 및 PEF 처리구에 비하여 L값, a값 및 b값이 모두 낮아졌으며, 무처리구와의 색차는 0.643으로서 열처리에 의한 색택 변화는 PEF 처리에 비하여 대단히 큼을 알 수 있었다. 열처리 중 약주는 캐러멜화 반응과 Maillard 반응이 일어나 밝기(L값)가 떨어질 뿐만 아니라 갈변물질의 생성에 의한 황색도(b값)의 증가 및 적색도(a값)의 감소가 나타나는 것으로 생각된다. 이로써 PEF 처리는 살균 중 약주의 색택 변화를 적게하며 가열살균공정을 대체할 경우 가열로 인한 품질의 변화를 방지하면서 살균할 수 있을 것으로 기대된다.

#### 2.2.3.3.2. 향 분석

식품에 있어서 향은 매우 관능적으로 중요한 위치를 차지하고 있다. 식품을 가열하게 되면 물리적 특성도 변하지만 화학적 특성의 변화와 새로운 화합물의 생성으로 인해서 향이 변한다. 또한 가열에 의해 휘발성 성분이 소실되어 향기가 소실될 수 있으며 생성된 새로운 휘발성 성분 때문에 가공공정 중 이취가 발생할 수 있다. 특히 술은 기호식품으로 향이 품질에 커다란 영향을 미치게 되므로 PEF 살균처리한 약주의 향을 분석하여 열처리 약주와 비교하였다.

PEF 살균 약주의 향을 용매추출법 및 solid phase microextraction법으로 추출하여 gas chromatography/oflactometry(GC/O)로 분석하여 무처리 약주 및 가열살균(65°C, 30분) 약주와 비교하였다. 먼저 위의 3종류 약주를 관능적으로 비교한 결과 무처리 약주는 특유의 약주향을 나타내었으나 가열 살균한 약주는 바람직하지 않은 plastic 냄새가 감지되었다. PEF 살균한 약주는 살균하지 않은 약

Table 4-29. Color of PEF treated and heat treated Yakju

Sample	Color value			Difference ( $\Delta E$ ) from control
	Lightness(L)	Redness(a)	Yellowness(b)	
Control	97.54	-0.46	4.75	0
PEF treated Yakju	97.89	-0.50	4.90	0.383
Heat treated Yakju	96.92	-0.61	4.64	0.643

주와 비슷한 향을 나타내었다. 즉 관능적으로 살균하지 않은 약주와 PEF살균한 약주는 향 특성이 비슷하였으나, 가열살균한 약주는 관능적으로 좋지 않은 냄새를 함유하고 있었다.

무처리 약주, PEF살균 약주 및 가열살균 약주의 향을 용매추출법으로 추출하여 aroma extract dilution analysis (AEDA)에 의해 분석한 결과 각각 Fig. 4-94, 4-95 및 4-96과 같았으며 분리된 각 향의 특성은 Table 4-30과 같았다. 세 종류 약주에서 공통적으로 강하게 감지된 향기성분은 막걸리 쉰내 또는 꼬릿한 냄새 (no. 3), earthy향 (no. 4), 그리고 밀가루 냄새 또는 fatty 향 (no. 7)이었다. 또한 시큼한 냄새 (no. 5) 및 막걸리 쉰내 또는 꼬릿한 냄새 (no. 9)등도 감지되었다. 가열살균한 약주에서는 이들 외에도 baked potato 향 (no. 6 와 no. 10)이 log<sub>3</sub>FD 값 3을 나타낼 정도로 강하게 감지되었다.

PEF살균 약주는 무처리 약주에 비해 향이 약했으며 무처리 약주에서는 존재하지 않았던 caramel향 (no. 1 과 no. 2)이 검출되었다. 가열살균 약주에서 관능적으로 느껴졌던 바람직하지 않은 plastic냄새는 검출되지 않았는데 이는 plastic 냄새 성분의 휘발성이 아주 강하여 용매추출후 농축하는 과정에서 전량 휘발되었기 때문일 수도 있을 것으로 생각되어 용매를 사용하지 않는 headspace법으로 향을 다시 분석하였다.

비극성 fiber로 SPME를 행한 결과는 Table 4-31과 같다. 살균하지 않은 약주의 경우 높은 RI값에서 좋은 약주 향이 강하게 감지되었다. 가열살균 약주에서는 막걸리 쉰내 또는 꼬릿한 냄새 (no. 3, RI=1214)가 더 강하게 느껴진 것 이외에는 세 종류 약주의 향 특성에서 큰 차이가 없었다. 비극성 fiber를 사용한 SPME법으로도 가열살균 약주에 존재하였던 plastic 냄새성분이 감지되지 않았는데, 이는 이러한 plastic 냄새성분의 polarity가 강함을 의미하였다.

극성 fiber를 사용하여 SPME를 행한 결과 Table 4-32와 같이 가열살균 약주에서 RI값 1008을 갖는 plastic 냄새가 감지되었다. 가열살균 약주에서 감지된 이 냄새성분은 가열살균하지 않은 약주나 PEF살균한 약주에서는 감지되지 않았다.

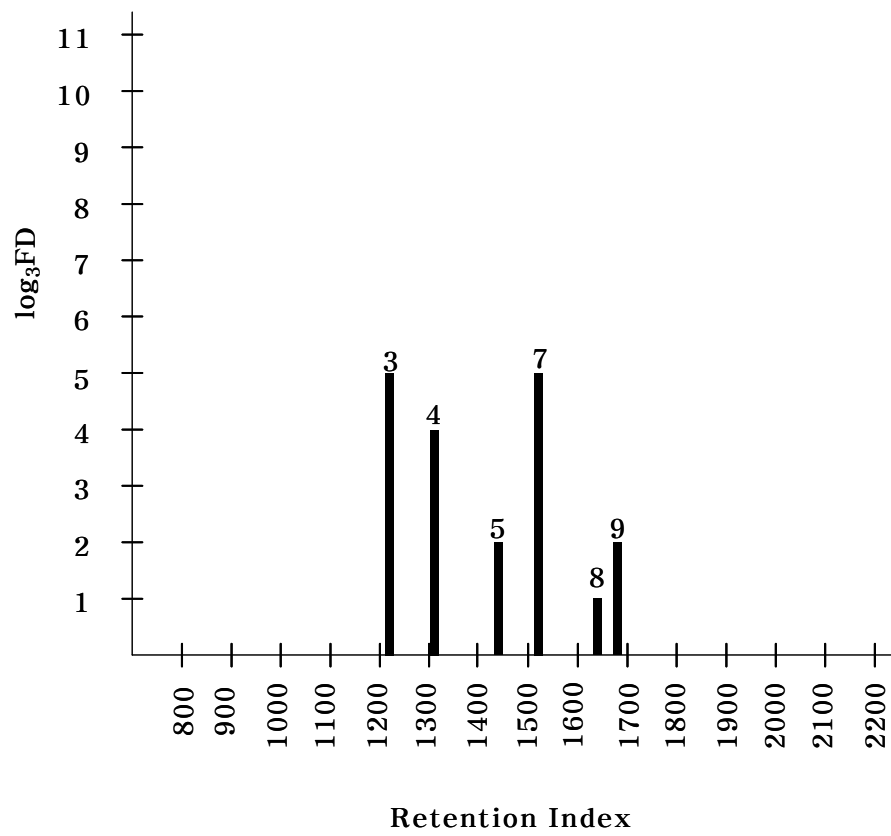


Fig. 4-94. Flavor profile of fresh Yakju

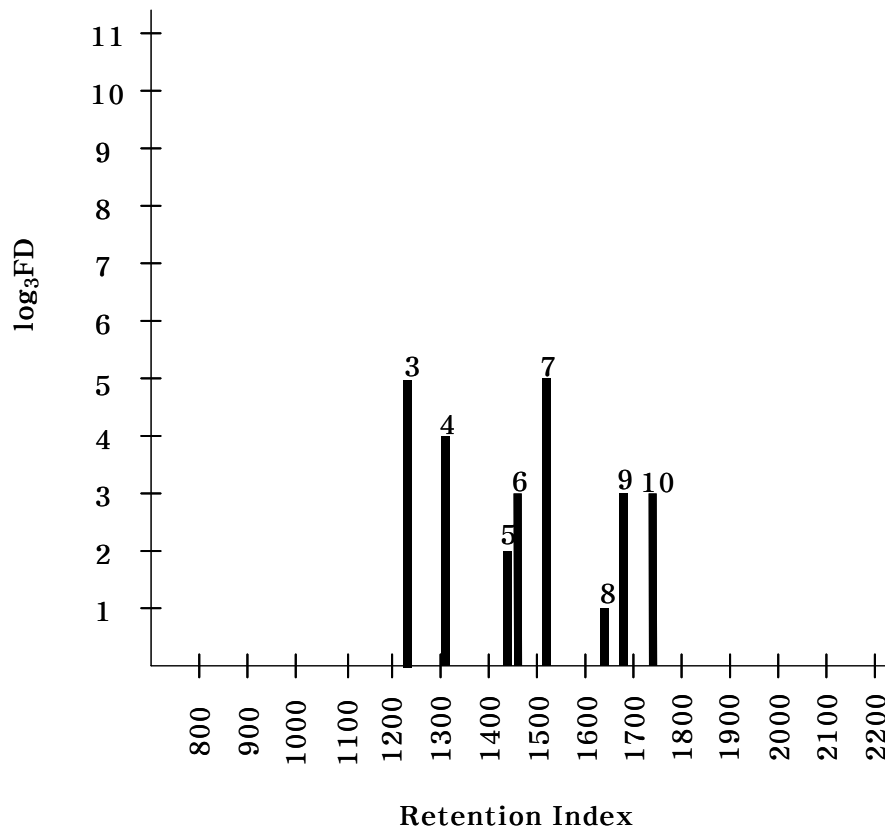


Fig. 4-95. Flavor profile of heat treated Yakju



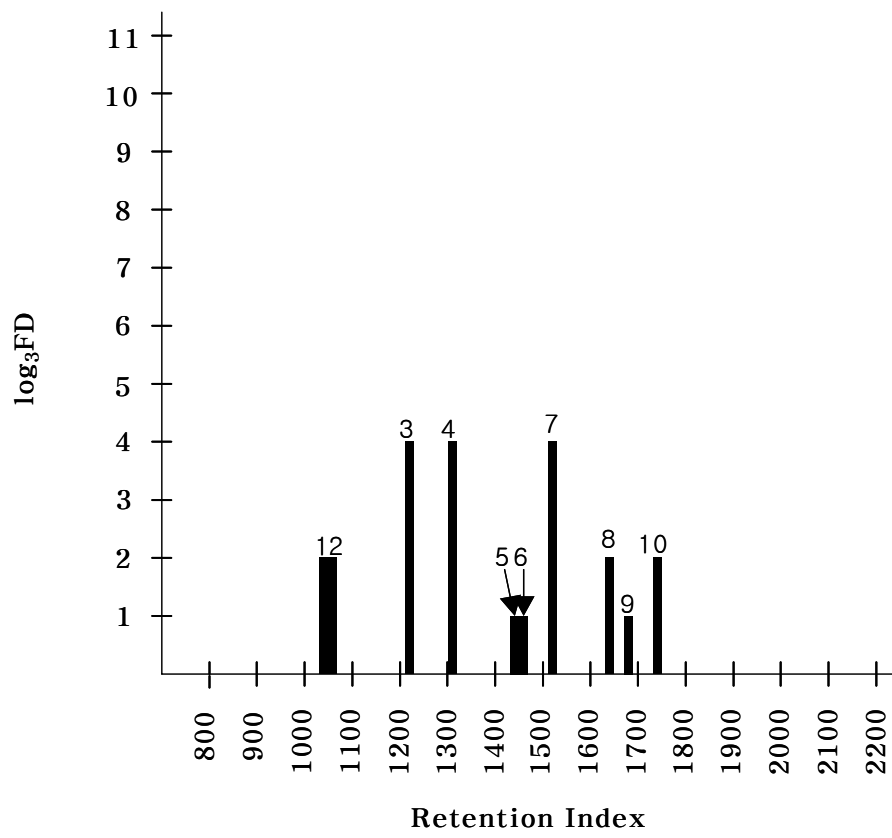


Fig. 4-96. Flavor profile of PEF treated Yakju

Table 4-30. Aroma-active components of Yakju identified by solvent extractive

No.	RI	Aroma Description
1	1038	Caramel-like
2	1053	Caramel-like
3	1214	Korea traditional alcoholic beverage (Makgeoli) + dirty socks
4	1303	Earthy
5	1438	Sour
6	1465	Soy-sauce, baked potato
7	1514	Wheat flour, fatty, card board
8	1636	Peanut-like
9	1678	Korea traditional alcoholic beverage (Makgeoli) + dirty socks
10	1735	Baked potato

Table 4-31. Aroma-active components of Yakju identified by solid phase microextraction using nonpolar fiber

RI	Aroma Description	Yakju		
		Fresh	Heat treated	PEF treated
<1000	Floral		1*	
<1000	Floral		1	
1037	Dirty socks		1	
1214	Dirty socks	1	5	
1303	Earthy	6	3	5
1329	Wheat flour, fatty			2
1410	Floral	1		
1483	Peanut like	2		
1514	Wheat flour, fatty	3	2	1
1656	Floral		1	
1728	Floral	1		
1846	Floral(Yakju)	4	2	2
1933	Korea traditional alcoholic beverage (Makgeoli)	3	2	1
2090	Floral(Yakju)	4		

\* intensity (The greater number is the more intense flavor.)

Table 4-32. Aroma-active components of Yakju identified by solid phase microextraction using polar fiber

RI	Aroma Description	Yakju		
		Fresh	Heat treated	PEF treated
<1000	Floral	1*	1	1
<1000	Floral	1		
1003	Alcohol (Makgeoli)	3		
1008	Plastic		1	
1009	Floral			2
1115	Floral		1	
1214	Korea traditional alcoholic beverage (Makgeoli) + dirty socks	1	3	1
1303	Earthy	5	6	6
1444	Peanut like		1	
1475	Popcorn	1		
1522	Peanut like			1
1542	Floral	1		
1672	Floral	1	2	
1704	Dirty socks	1		
1726	Fresh			1
1752	Floral	1		
1804	Korea traditional alcoholic beverage (Makgeoli)	1	4	
1832	Korea traditional alcoholic beverage (Makgeoli)	3		
1880	Floral		3	1
1916	Dirty socks	3		
1946	Dirty socks			2
1991	Floral		3	
2069	Floral			3

\* intensity (The greater number is the more intense flavor.)

이상의 결과로부터 가열살균 약주에서는 plastic 냄새가 생성되어 관능적 품질이 열악해진 반면, PEF 살균 약주는 전반적으로 무처리 약주와 유사한 향을 나타낼 뿐만 아니라, 무처리 약주에서는 감지되지 않은 카라멜 향이 감지되어 양호한 향기 프로파일을 보임으로써 PEF살균은 약주의 향을 저하시키지 않는 것으로 확인되었다.

#### 2.2.3.3.3. 관능특성

PEF 처리한 약주를 열처리(65°C, 30분)한 약주와 비교하여 실시한 관능검사 결과 Table 4-33과 같이 색, 풍미, 종합적기호도에서 모두 PEF 처리한 약주가 월등히 우수하여 PEF 살균은 약주의 품질을 유지하며 저장성을 향상시킬 수 있는 기술임을 확인하였다.

이상의 결과를 종합할 때 PEF 처리에 의한 품질 변화는 거의 일어나지 않았고 PEF살균 약주의 품질은 무처리 약주와 비슷하게 우수한 것으로 나타났으며, 가열살균 약주와 비교하여 월등히 우수한 품질을 지니고 있어 PEF살균은 고품질 약주 생산에 유용한 공정으로 평가되었다.

#### 2.2.3.4. PEF 처리 약주의 저장성

다중전극 PEF 처리장치를 1회 통과 방식으로 운영하며 처리온도 40°C, 전기장 세기 40 kV/cm에서 주파수 1,500 Hz로 펄스를 발생시키며 1회 통과 처리한 약주의 저장성을 평가하였다. 저장 온도는 4, 25, 30°C로 하였으며 4주간 저장하면서 산도, 탁도, 미생물 수의 변화를 조사하였다.

저장 중 약주의 산도변화는 Fig. 4-97과 같이 무처리 약주의 경우 25°C 및 30°C 저장중의 산도는 저장 1주 후부터 급격히 증가하였으나 4°C 저장 중에는 뚜렷한 산도 상승이 없었다. 반면에 PEF 처리한 약주는 모든 저장온도에서 산도 증가 없이 품질을 유지하는 것으로 나타났다.

Table 4-33. Comparison of sensory properties of PEF-treated with heat-treated Yakju

Sample	Sensory properties*		
	Color	Flavor and taste	Overall
PEF-treated Yakju	7.90	7.50	8.00
Heat-treated Yakju	5.30	4.80	5.60
p-value	0.0004	0.0055	0.0001

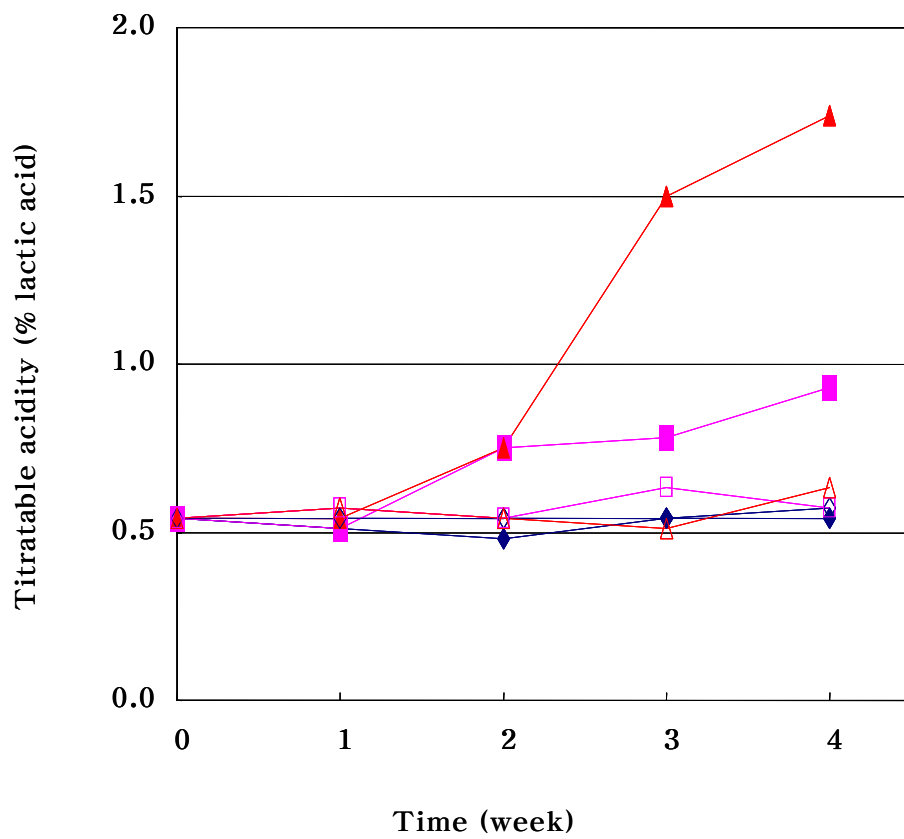


Fig. 4-97. Changes in titratable acidity of untreated and PEF-treated Yakju during storage at 4, 25, 30°C

- ◆ 4°C-control      ■ 25°C-control      ▲ 30°C-control
- ◇ 4°C-PEF      □ 25°C-PEF      △ 30°C-PEF

탁도는 Fig. 4-98에 나타난 바와 같이 PEF 처리 약주는 저장 중 탁도 변화 없이 투명한 상태를 유지하였으나 무처리 약주는 25℃ 및 30℃ 저장 중 탁도가 저장 시작부터 급격히 증가하였다. 4℃ 저장 중에는 무처리 약주도 뚜렷한 탁도 변화는 없었다.

PEF 처리 약주의 저장 중 세균수의 변화는 Fig. 4-99와 같이 모든 저장 온도에서 세균의 증가가 관찰되지 않았다. 이에 반하여 무처리 약주는 저장 전  $2.85 \times 10^3$  CFU/mL 수준에서 25℃ 및 30℃ 저장 중에는 증가하였는데, 특히 25℃ 저장의 경우 세균이 급격히 증가하여 저장 3주 후에  $1.80 \times 10^6$  CFU/mL으로 최대치를 보였다. 저장온도 30℃의 경우 저장 3주 후부터 세균이 급격히 증가하여 저장 4주 후에  $6.70 \times 10^4$  CFU/mL으로 높아졌다. 그러나 4℃ 저장 중에는 초기 수준을 유지하였다.

저장 중 효모 수의 변화(Fig. 4-100)를 보면 PEF 처리 약주는 효모가 발생하지 않은 반면, 무처리 약주는 효모 수가 증가하는 것으로 나타났으며 특히 25℃와 30℃ 저장 중 증가가 두드러졌으며 4℃ 저장에서도 약간의 증가가 관찰되었다.

젖산균 역시 Fig. 4-101과 같이 PEF 처리 약주에서는 저장 중 검출되지 않았으나 무처리 약주는 수가 증가하는 것으로 확인되었으며 증가양상은 세균의 경우와 유사하였다.

따라서 PEF 처리는 약주의 저장성 증진에 탁월한 효과를 보였으며 앞에서 살펴본 바와 같이 품질도 우수하여 PEF 처리공정의 저장성이 있는 고품질 약주의 생산에의 활용이 기대된다.

## 2.3. 고전압 펄스 전기장을 이용한 기타 액체 식품의 살균

### 2.3.1. 저알콜 포도주의 PEF 살균

포도주는 통상 12% 이상의 알콜을 함유하는데 이는 음주 후 일상생활의 수행에 지장을 줄 수 있는 양으로서 저알콜 포도주에 대한 수요가 증가하고 있다.



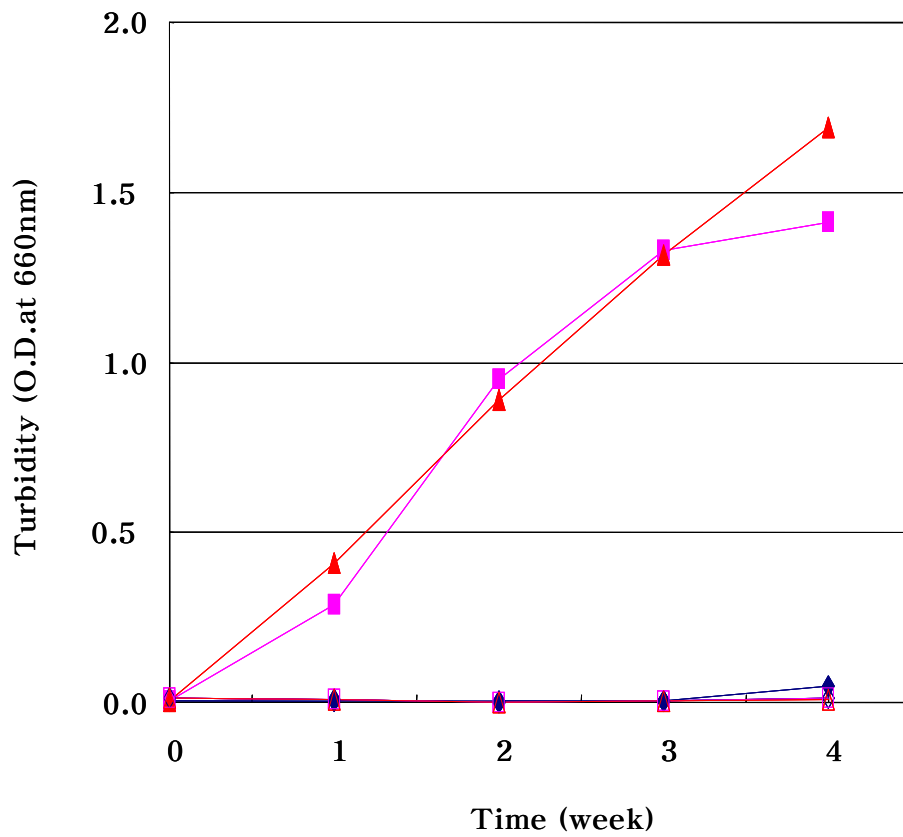


Fig. 4-98. Changes in turbidity of untreated and PEF-treated Yakju during storage at 4, 25, 30°C

◆ 4°C-control      ■ 25°C-control      ▲ 30°C-control  
 ◇ 4°C-PEF      □ 25°C-PEF      △ 30°C-PEF

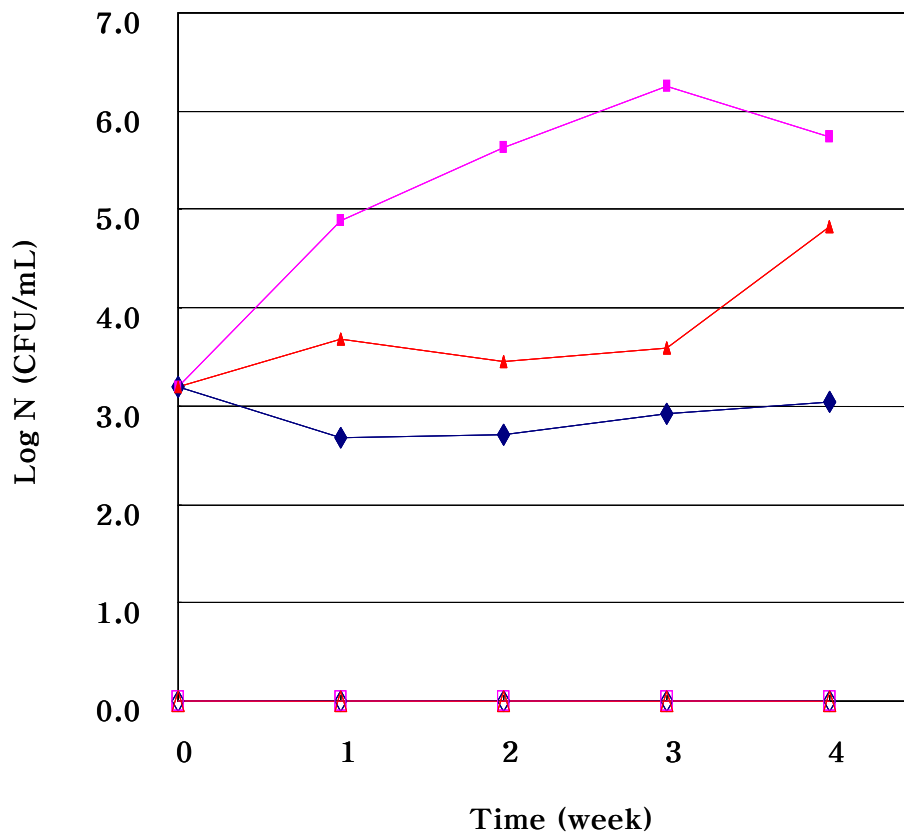
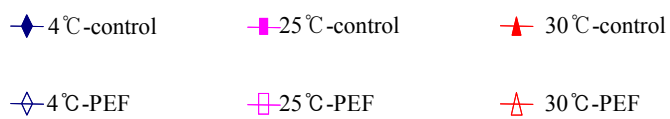


Fig. 4-99. Changes in total aerobes of untreated and PEF-treated Yakju during storage at different temperature



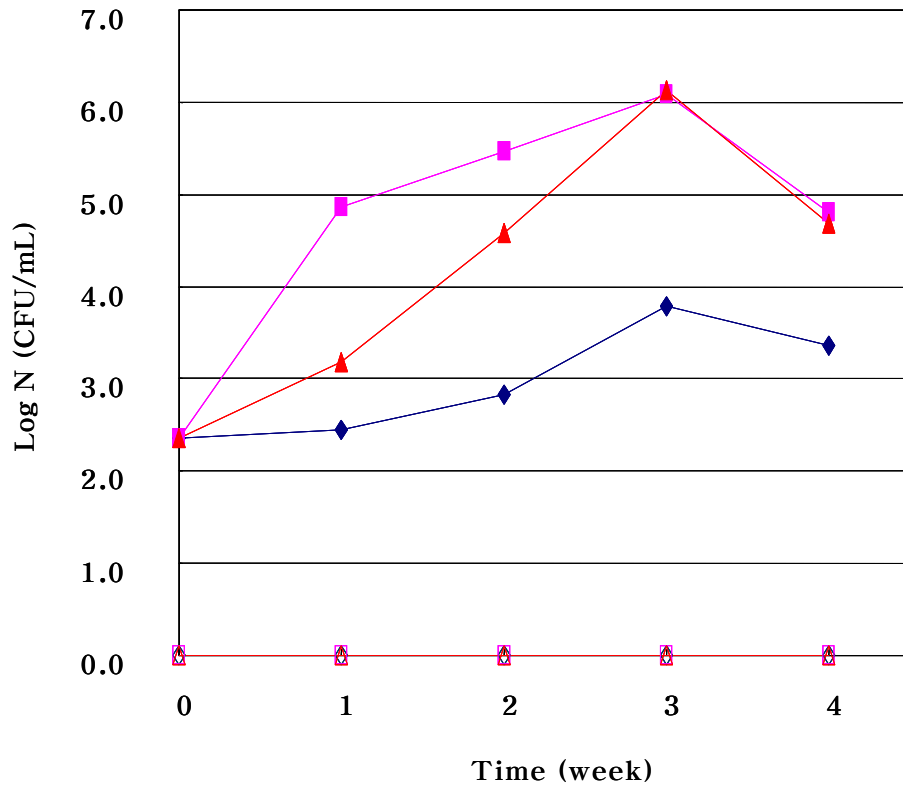
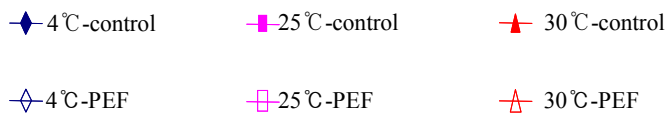


Fig. 4-100. Changes in yeast count of untreated and PEF-treated Yakju during storage at different temperature



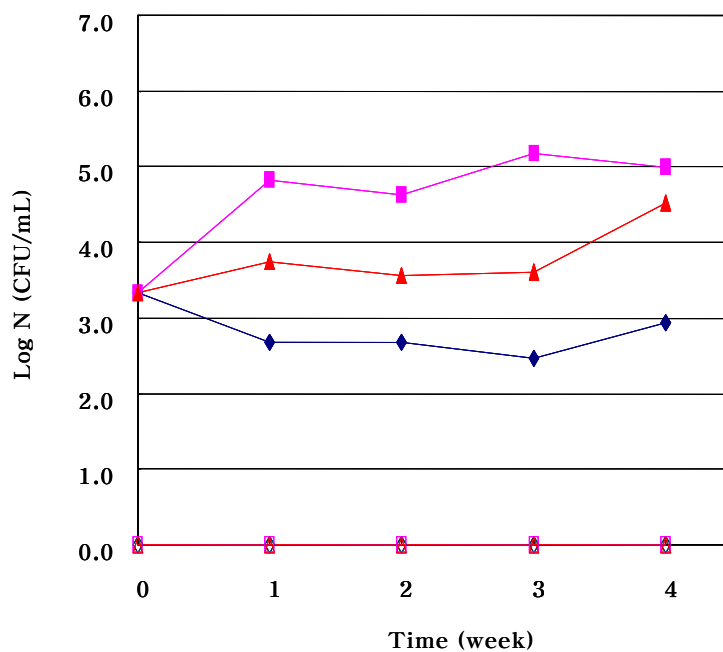
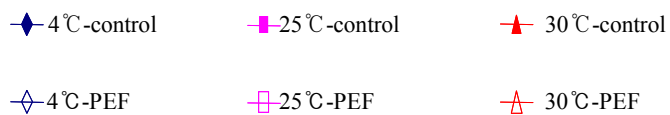


Fig. 4-101. Changes in lactic acid bacteria count of untreated and PEF-treated Yakju during storage at different temperature



그러나 알콜 함량이 낮으면 산패 등 변패가 일어나 품질을 유지할 수 없으므로 이에 적합한 살균방법의 적용이 필요하다. 또한 저알콜 포도주는 효모에 의한 발효가 끝나고 제품 생산까지 긴 숙성이 필요한데 숙성단계를 거쳐 출하될 때까지 오염 위험성이 크다. 만일 숙성 중 공정조작의 오류 등에 의해 미생물 오염이 일어나면 제품생산 일정에 막대한 차질과 경제적인 손해를 수반하게 되므로 보다 안전하게 생산하는 방법의 개발이 요구되고 있다. 통상 지속적인 아황산 처리에 의해 숙성 중 오염을 막고 있는데 이에 의한 위해성에 대한 우려가 제기되고 있는 실정이다.

저알콜 포도주의 저장성 향상을 위한 방법이 요구되지만 포도주 제품의 등급은 향, 맛, 색에 의해 좌우되므로 포도주의 품질을 유지하기 위해서는 가열살균은 부적합하므로 이들 특성을 유지하면서 미생물을 제거하는 기술의 도입이 필요하다. 포도주는 비열살균이 필요한 대표적인 주류로서 PEF 처리에 의해 제품의 향과 색의 변화를 최소화하며 살균한다면 안전한 제품생산과 품질관리가 가능해지므로 PEF 살균에 적합 식품으로 평가된다.

따라서 본 연구에서는 알콜 함량을 낮추어 발효한 포도주의 품질과 저장성을 향상시키기 위한 목적으로 PEF 살균공정을 개발하고자 존재 미생물의 PEF 살균 패턴을 조사하였다.

착즙한 포도즙에 최종 당도가 24. Brix가 되도록 가당하여 25℃에서 2주간 발효 후 15℃에서 6주간 숙성한 포도주의 알콜 함량은 8.5%였으며, 초기 미생물 수는 세균  $3.64 \times 10^5$  CFU/mL, 효모  $4.12 \times 10^5$  CFU/mL, 젖산균  $1.68 \times 10^5$  CFU/mL의 값을 보였다.

저알콜 포도주 살균에 사용한 시스템은 다중전극 PEF 살균시스템으로서 1회 통과시키는 (single pass) 방식으로 처리하였다. 즉 포도주를 유량 1 mL/s의 속도로 다중전극 PEF장치에 투입하여 1회 통과시킨 결과 Fig. 4-102와 같이 사멸기구는 1차 반응으로 나타났으며 전기장 세기가 높아질수록 높은 사멸율을 나타냈다. 일정 전기장 세기에서는 주파수가 증가함에 따라 생존율이 감소하였고, 일정 주파수에서는 전기장 세기가 증가함에 따라 살균율이 증가하였다.

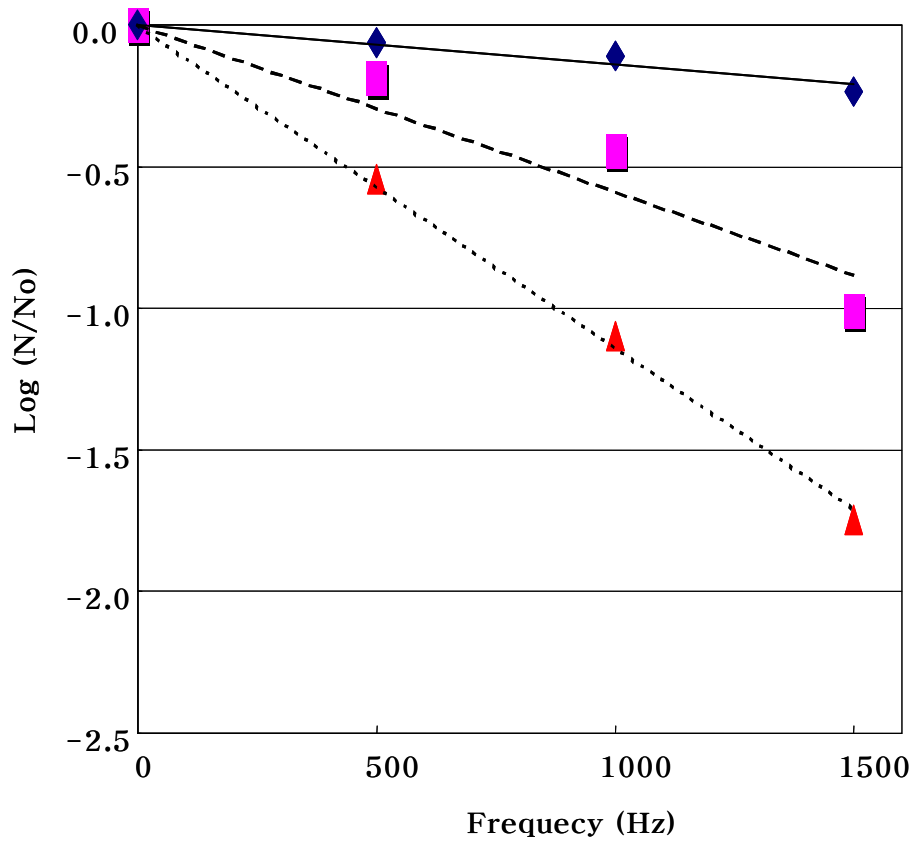


Fig. 4-102. Sterilization of total aerobes in red wine by PEF treatment at different electric field strength and frequency.

▲ 40 kV/cm      ■ 30 kV/cm      ◆ 20 kV/cm

저알콜 포도주 살균에 필요한 최소 전기장 세기로 정의되는 임계 전기장 세기( $E_c$ )는 Table 4-34에 나타난 바와 같이 효모가 14.83 kV/cm로서 가장 낮은 값을 보였으며 그 다음이 세균으로 18.64 kV/cm의 값을, 그리고 젖산균이 19.46 kV/cm로서 가장 높은 값을 보였다. 이러한 경향은 앞서 설명한 미생물의 크기에 따른 PEF 민감성의 차이, 즉 세포 크기가 큰 효모가 일정 전기장 세기에서 보다 큰 세포막 전위차가 형성됨에 따라 나타나는 현상으로 설명될 수 있다.

포도주의 PEF 살균은 1차 반응에 속하였으므로 포도주의 PEF 살균시 1/10로 감소되는데 필요한 주파수(Hz)를 나타내는  $D_{Hz}$ 값을 계산하여 Table 4-35에 나타내었다.

즉 세균의 전기장 세기에 따른  $D_{Hz}$ 값을 비교하면 세균의 경우 20 kV/cm에서는 7,092 Hz, 30 kV/cm에서는 1,702 Hz, 40 kV/cm에서는 877 Hz가 필요한 것으로 나타나 전기장 세기가 증가함에 따라 급격히 감소하였다. 미생물에 따라서는 젖산균의  $D_{Hz}$ 값이 가장 높았으며 다음으로 세균이었고, 효모가 가장 낮은 값을 보였으며 전기장 세기가 증가함에 따라 줄어드는 양상을 보였다. 즉 효모는 20 kV/cm에서 3,617 Hz의 값을 보였으나 30 kV/cm에서는 1,240 Hz, 40 kV/cm에서는 894 Hz으로 급격히 감소하였는데, 이러한 경향은 앞서 살펴 본 약주의 경우와 동일한 것으로서 이 결과 역시 효모가 가장 PEF에 민감함을 보여주는 것으로 포도주 발효 후 잔류 효모의 비열 불활성화 조작으로도 PEF의 응용 가능성이 있음을 의미한다.

주파수를 처리시간으로 환산하여 처리시간에 따른 생존율 변화( $\log(s)$ ) 양상을 미생물 종류별로 정리한 결과 각각 Fig. 4-103, 4-104, 4-105로 나타났다. 일반적으로 세균(Fig. 4-103)은 처리시간에 따라  $\log(s)$ 가 직선적으로 감소하였으며 전기장 세기에 비례하여 생존율이 감소하였다. 전기장 세기 별로는 20 kV/cm에서는 사멸율이 극히 낮았고 처리시간에 따라서도 미미한 차이를 보였으나 30 kV/cm 이상에서는 사멸율이 처리시간에 따라 크게 증가하였고, 40 kV/cm에서는 더욱 빠른 속도로 사멸율이 증가하였다.

Table 4-34 Critical electric field strength( $E_c$ ) of microorganisms in red wine

Microorganisms	$E_c$ (kV/cm)
Total aerobes	18.64
Yeast	14.83
Lactic acid bacteria	19.46



Table 4-35. Effect of electric field strength on  $D_{Hz}$ -value of microorganisms in red wine

(unit: Hz)			
Microorganisms	Electric field strength (kV/cm)		
	20	30	40
Total aerobes	7,092	1,702	877
Yeast	3,617	1,240	894
Lactic acid bacteria	18,975	2,873	1,313

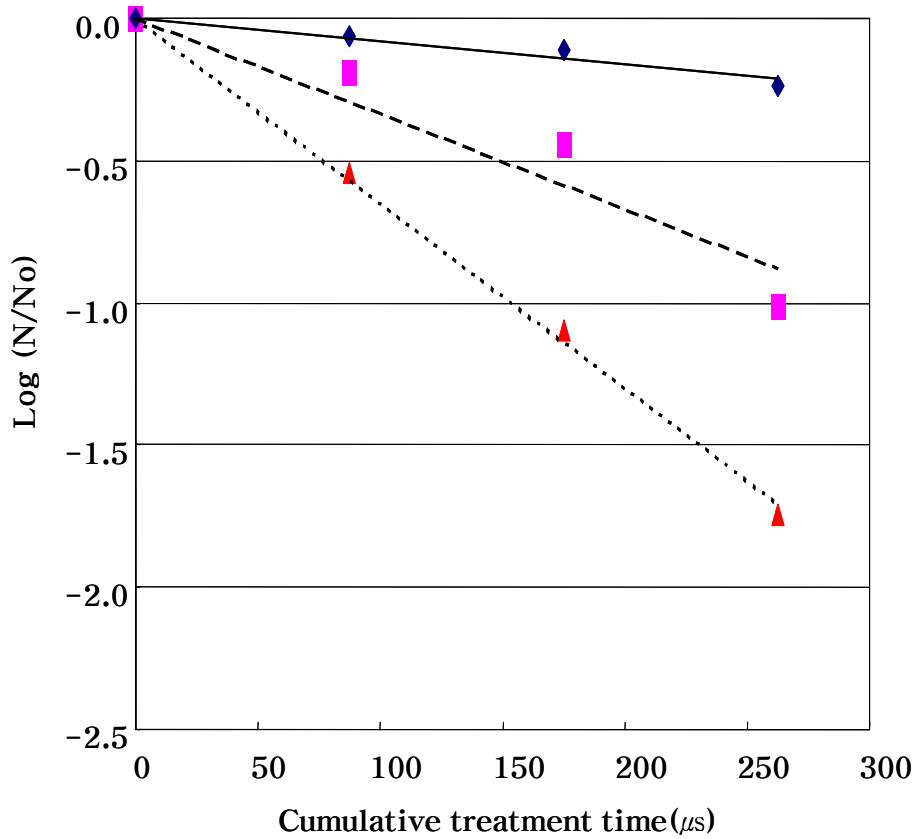


Fig. 4-103. Change in total aerobes in red wine with electric field strength and treatment time during PEF treatment

▲ 40 kV/cm      ■ 30 kV/cm      ◆ 20 kV/cm

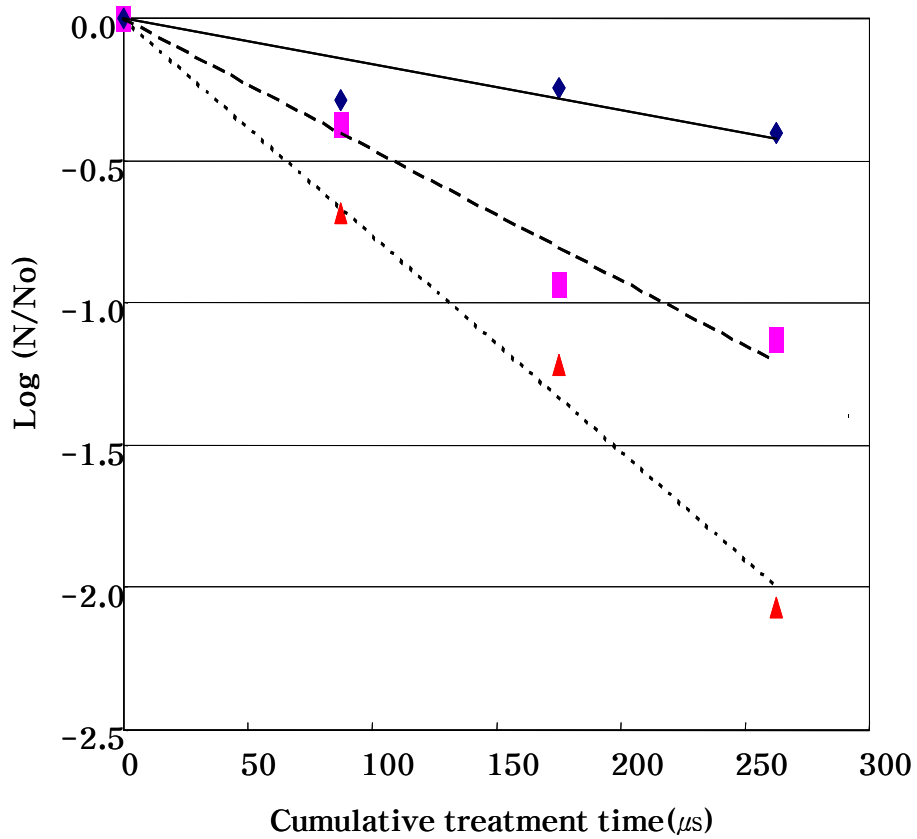


Fig. 4-104. Changes in yeast of red wine with electric field strength and treatment time during PEF treatment

▲ 40 kV/cm      ■ 30 kV/cm      ◆ 20 kV/cm

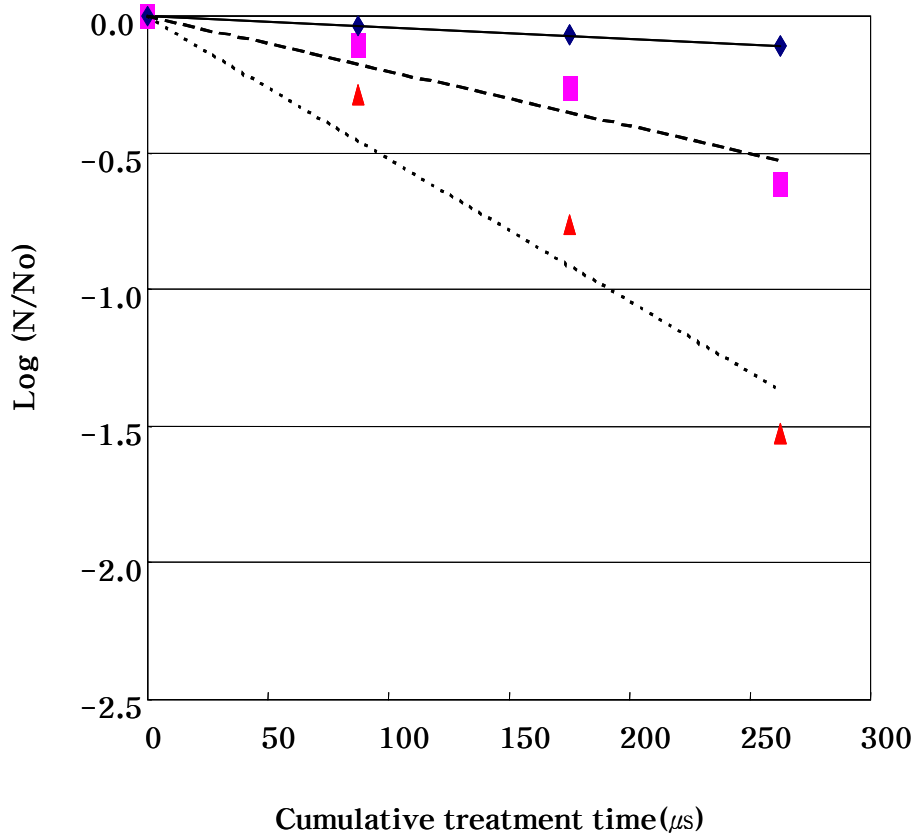


Fig. 4-105. Changes in lactic acid bacteria in red wine with electric field strength and treatment time during PEF treatment

▲ 40 kV/cm      ■ 30 kV/cm      ◆ 20 kV/cm

효모(Fig. 4-104)의 경우 일반세균과 젖산균에 비해 짧은 처리시간에도 높은 사멸율을 보였으며 전기장 세기가 증가에 따른 사멸율의 감소가 뚜렷하였다. 즉 전기장 세기가 낮은 20 kV/cm의 경우에서도 사멸율이 세균에 비해 약 2배 정도, 젖산균에 비해 약 4배 이상의 사멸효과를 보였다.

젖산균(Fig. 4-105) 역시 처리시간에 따라 직선적인  $\log(s)$ 의 감소를 보였으나, 포도주에 존재하는 미생물 중에서는 가장 완만한 기울기를 보여 젖산균의 PEF 살균효과가 가장 낮음을 알 수 있었다.

한편 Fig. 4-103, 4-104, 4-105에서 작도된 직선의 회귀식을 이용하여 계산한 미생물별 PEF 사멸속도상수를 Table 4-36에 나타내었다. 즉 전기장 세기 20 kV/cm와 30 kV/cm에서는 효모, 세균, 젖산균 순으로 사멸속도상수가 낮아져 역시 효모의 살균이 가장 용이함을 알 수 있었다. 전기장 세기 40 kV/cm에서는 효모와 세균의 사멸속도상수가  $0.015 \mu s^{-1}$ 로 같은 값을 보였으며 젖산균의 경우는  $0.010 \mu s^{-1}$ 으로 계산되었다.

한편 PEF 살균공정의 현장적용에 유용한  $D_{PEF}$ 값을 Fig. 4-106과 같이 산출하여 그 결과를 Table 4-37에 나타내었다. 즉 전기장 세기 20 kV/cm에서는  $1,241 \mu s$  처리하면 세균을 1/10로 감소시킬 수 있었으며 전기장 세기가 증가함에 따라  $D_{PEF}$ 값은 작아져 40 kV/cm에서는 1 log 감소에  $156 \mu s$ 의 처리시간이 소요되는 것으로 계산되었다. 효모의  $D_{PEF}$ 값은 세균에 비해 낮은 값을 보여 효모가 PEF 살균에 더욱 민감함을 알 수 있었으며 젖산균은 미생물 중 가장 큰  $D_{PEF}$ 값을 보였다.

한편  $\log(D_{PEF})$ 를 전기장 세기에 대하여 작도하면 Fig. 4-107과 같이 직선으로 작도되었으며, 따라서 PEF 처리시간을 1/10으로 단축시키는데 필요한 전기장 세기 증가량인  $z_{PEF}$ 값을 작도된 직선의 기울기의 역수를 취하여 산출하였으며 그 값을 Table 4-38에 나타내었다.

포도주의 미생물별  $z_{PEF}$ 값은 젖산균이 24.6 kV/cm로 가장 낮았으며, 세균 33.2 kV/cm, 효모 46.8 kV/cm 순으로 높아졌다. 이로부터 젖산균의 PEF 살균이

Table 4-36. PEF sterilization rate constant(k) of microorganisms in red wine

(unit:  $\mu\text{s}^{-1}$ )

Microorganisms	Electric field strength (kV/cm)		
	20	30	40
Total aerobes	$1.86 \times 10^{-3}$	$7.73 \times 10^{-3}$	0.015
Yeast	$3.73 \times 10^{-3}$	0.011	0.015
Lactic acid bacteria	$9.51 \times 10^{-4}$	$4.64 \times 10^{-3}$	0.010

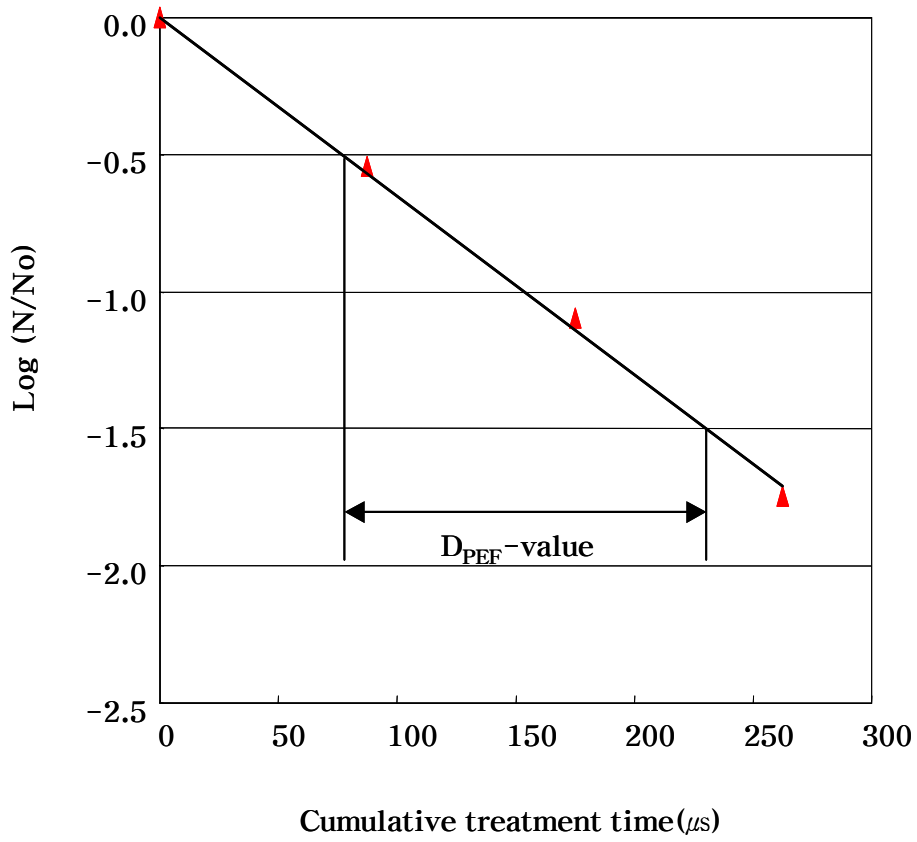


Fig. 4-106. High voltage electric field sterilization kinetics of bacteria in Yakju treated at 40 kV/cm

Table 4-37.  $D_{PEF}$ -value of microorganisms in red wine

(unit:  $\mu s$ )

Microorganisms	Electric field strength (kV/cm)		
	20	30	40
Total aerobes	1,241	298	156
Yeast	617	217	156
Lactic acid bacteria	2,422	496	225



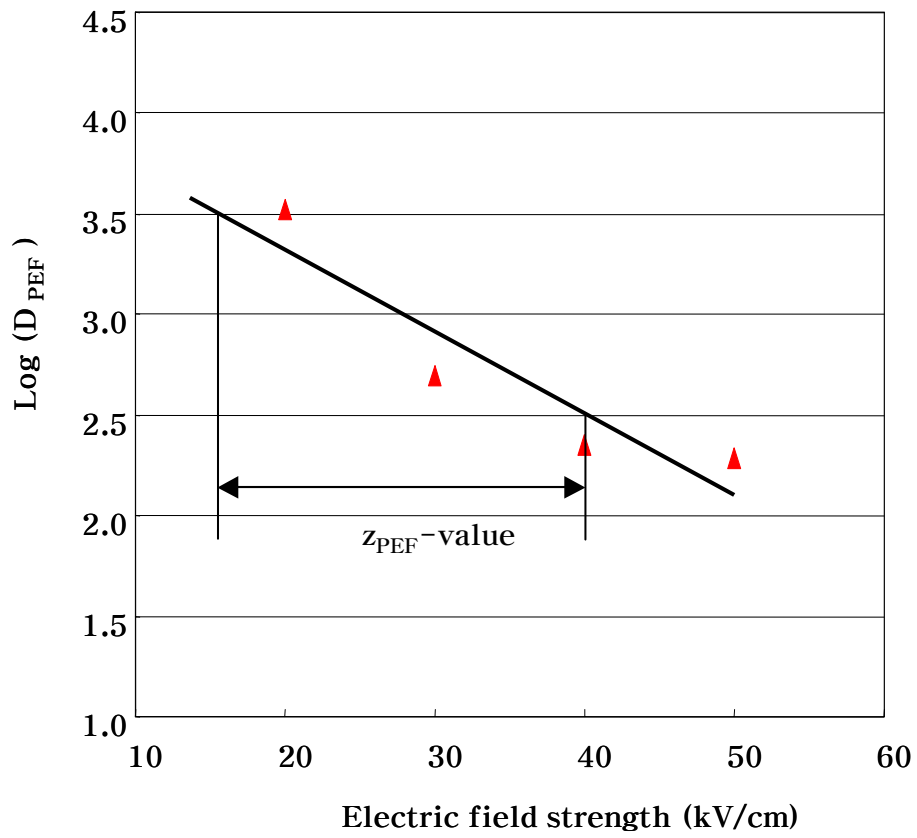


Fig. 4-107. Semilogarithmic plot of decimal reduction time (DPEF) of lactic acid bacteria in red wine versus electric field strength.

Table 4-38.  $Z_{PEF}$ -value of microorganisms in red wine

Microorganisms	$Z_{PEF}$ -value (kV/cm)
Total aerobes	33.2
Yeast	46.8
Lactic acid bacteria	24.6

전기장세기에 대한 의존성이 가장 큰 것으로 나타났고, 세균, 효모 순으로 의존성이 낮아졌다. 이러한 결과를 위의 사멸속도상수와 결부시킬 때 젓산균의 PEF 살균을 위해서는 전기장 세기를 높여서 처리하는 것이 바람직함을 시사하였다.

포도주가 PEF 처리 시 효과적인 사멸효과를 나타낸 것은 포도주의 미생물이 지속적인 성장을 보이며 저온에서 숙성되기 때문이라 추정되어진다. 기존의 연구에 의하면 세포 배양 온도에 의한 영향이 사멸효과에 큰 영향을 주는 것으로 보고되고 있는데 이것은 배양 온도에 따라 미생물 세포가 외부 stress에 반응하는 정도의 차이를 보이는 것으로 세포막이나 세포벽을 구성하는 지방산의 조성의 차이를 가져오기 때문으로 생각되어진다.

일반적으로 세포는 배양 온도가 높아질수록 세포막을 구성하는 지방산중 불포화지방산의 함량이 감소된다고 알려져 있다. 즉, 저온에서 배양하면 미생물의 세포막은 유연성이 증가되고 지방사슬의 길이는 짧아지며 불포화 지방산의 비율이 높아지는 것으로 보고되고 있다. 아울러 세포막의 견고성은 구성 지방산의 종류에 따라 달라지는데 일반적으로 포화지방산은 직선의 탄소 사슬이 서로 강하게 상호간에 작용하기 때문에 포화지방산의 함량이 많을수록 세포막은 견고한 상태가 된다.

이러한 이유로 저온에서 숙성한 포도주에 존재하는 미생물의 세포막은 유연성이 증대되어 PEF효과가 높아지는 것으로 생각된다. 또한 포도주의 발효 미생물인 효모의 크기가 세균보다 크기 때문에 PEF 처리 시 처리온도를 높이지 않아도 포도주에 존재하는 효모를 충분히 사멸시킬 수 있었다. 이러한 결과는 고전압 펄스 전기장은 저알콜 포도주의 비열살균에 매우 효과적인 비열살균 공정으로 완제품의 살균뿐만 아니라 발효 후의 살균에도 유용할 것으로 사료된다.

결론적으로 포도주의 PEF 처리는 고품질 저알콜 포도주 생산에 매우 적합한 살균기술로 평가되며 다양한 저알콜 제품 개발에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

### 2.3.2 쌀당화음료의 PEF 살균

### 2.3.2.1. 쌀당화음료 제조

식혜는 오랜 옛날부터 우리 민족이 음용하던 전통식품으로 단술이라고도 하며 맥아 효소에 의해 쌀을 당화하여 음용하던 전통음료이다. 식혜에는 가수분해되고 남은 비전분성 밥알과 맥아당, 한계 덱스트린이 함께 들어 있으며 포도당도 함유되어 있다. 효소에 의해서 쌀 전분이 분해되어 밥알이 뜨게 되면 밥알을 건져내어 따로 보관하고 당화가 끝난 식혜를 가열살균한 후 냉각시키고 냉각된 밥을 띄워서 음용한다. 당화 후 액을 가열하여 살균하는데 이 때 Maillard 반응 및 카라멜화 반응이 급속히 진행되어 색을 어둡게 만들고 옛 냄새와 같은 무거운 향을 생성한다. 이러한 향미는 식혜 고유의 특색이긴 하지만 현대인 특히 청소년의 취향에 맞는 향미라고는 할 수 없다. 본 연구에서는 식혜의 색과 향미를 개선하고자 쌀을 당화하고 액만을 분리하여 액상음료로 제조한 쌀당화음료를 대상으로 PEF 살균을 시도하였다.

쌀당화음료는 맥아의 전분분해효소를 이용하여 쌀 전분을 분해하여 제조하므로 최적 당화온도를 결정하기 위해 각 온도에서의 당도변화를 측정하였으며, 결과는 Fig 4-108과 같았다. 당화초기에 당화력은  $60^{\circ}\text{C} > 70^{\circ}\text{C} > 50^{\circ}\text{C} > 40^{\circ}\text{C}$ 의 순으로 감소하는 경향을 보였으나 당화시간 4시간 이상에서는  $60^{\circ}\text{C} > 50^{\circ}\text{C} > 40^{\circ}\text{C} > 70^{\circ}\text{C}$ 의 순으로 낮아졌다.  $60^{\circ}\text{C}$ 의 경우 당화 초반부터 꾸준히 당도가 상승하였으며 당화 후반에서도 가장 높은 당화력을 보여 당화에 최적 온도임을 알 수 있었으며 이등의 연구결과와 일치하였다.  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 당화시간 5시간 이후에는 당도의 증가가 둔화되어 적정 당화시간을 5시간으로 결정하였고, 이 때 당도는 10.2° Brix를 약간 상회하였다.

완성된 쌀당화음료의 일반 특성은 Table 4-39와 같이 초기 세균수는  $3.0 \times 10^7$  CFU/mL이었고, 효모수는  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL, 젖산균은  $1.2 \times 10^7$  CFU/mL로서 상당히 높은 수준이었으며 pH는 6.24, 산도는 0.037%, 당도는 10.2° Brix 이었다.

쌀당화음료는 pH는 6.24로서 중성에 가깝고 초기 미생물 수가 높으므로

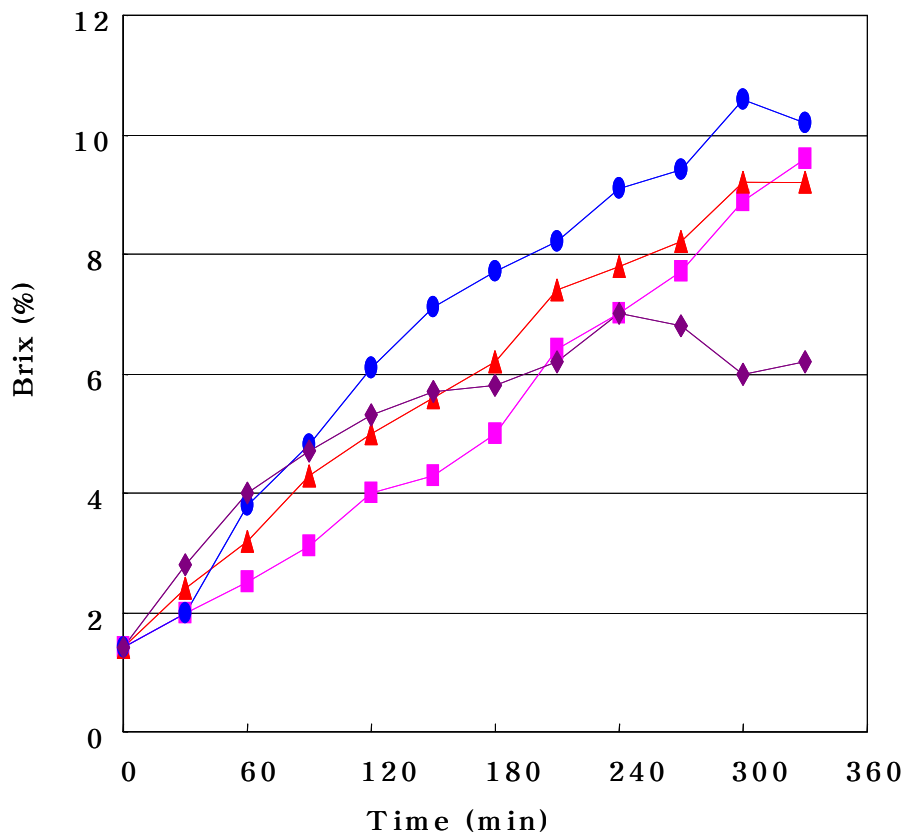


Fig. 4-108. Change in sugar content of saccharified rice beverage during saccharification at different temperature

■ 40°C    ▲ 50°C    ● 60°C    ◆ 70°C

Table 4-39. Physicochemical and microbial properties of saccharified rice beverage

Properties	Values
pH	6.24
Titrateable acidity (% lactic acid)	0.037%
Saccharification index	10.2。 Brix
Total aerobes	$3.0 \times 10^7$ CFU/mL
Yeast	$1.2 \times 10^5$ CFU/mL
Lactic acid bacteria	$1.2 \times 10^5$ CFU/mL

살균이 필요한 제품으로 판명되었으며 가열에 의한 살균은 반드시 100℃이상의 고온에서 행해져야 하는 것으로 나타났다. 그러나 고온에서 가열 살균할 경우 색, 맛, 향 등의 품질변화를 가져오게 되며 특히 갈변반응에 의한 변색이 심한 제품이므로 PEF를 이용한 비열살균 가능성을 조사하고자 하였다.

### 2.3.2.2. 쌀당화음료의 PEF 살균

쌀당화음료의 PEF 살균은 다중전극 살균 시스템을 이용하여 1회 통과 (single pass) 방식으로 처리하였다. 전기장 세기 20~50kV/cm에서 펄스폭 1 $\mu$ s인 square wave 형태의 펄스를 주파수는 500~1,500 Hz로 발생시켰으며, 시료를 유속 1.0mL/s로 주입하여 처리하였으며 처리온도 50℃에서 PEF 처리하고 각 처리조건에 따라 쌀당화 음료에 존재하는 미생물의 사멸 현상을 조사하였다.

전기장 세기 20~50 kV/cm 범위에서 주파수를 0~1500 Hz 까지 증가시키면서 PEF 처리한 결과 세균의 경우 Fig. 4-109와 같은 살균율을 보였다. 즉 전기장 세기 50 kV/cm에서 주파수를 500 Hz로 하여 처리한 쌀당화음료의 세균수는  $7.30 \times 10^6$  CFU/mL를 보여 75.67%의 살균율을 나타냈으며, 40 kV/cm에서 70.33%, 30 kV/cm에서 51.7% 그리고 20 kV/cm에서는 13.33%로 살균율이 낮아졌다.

주파수를 1,000 Hz로 높인 경우 전기장 세기에 따른 살균율을 보면 50 kV/cm에서 89.67%의 살균율을, 40 kV/cm에서는 60.00%, 30 kV/cm에서는 53.33% 그리고 20 kV/cm에서는 36.67%의 살균율을 나타내었다. 주파수 1,500 Hz에서는 전기장 세기 50 kV/cm에서 99.97%, 40 kV/cm에서 99.92%의 살균율을 나타내어 대단히 살균율을 나타내었다. 그러나 30 kV/cm에서는 74.33%, 20 kV/cm에서는 50.00%의 살균율을 나타내어 쌀당화음료에 존재하는 세균을 살균하기 위해서 1,500 Hz에서 40 kV/cm 이상의 전기장 세기가 요구됨을 알 수 있었으며 이때 세균은 3 log cycle 이상 감소되었다.

전기장 세기와 주파수의 증가에 따른 살균효과를 반응표면분석법으로 분석한 결과 Fig. 4-110과 같았으며 전기장 세기 및 주파수가 증가할수록 세균의 생

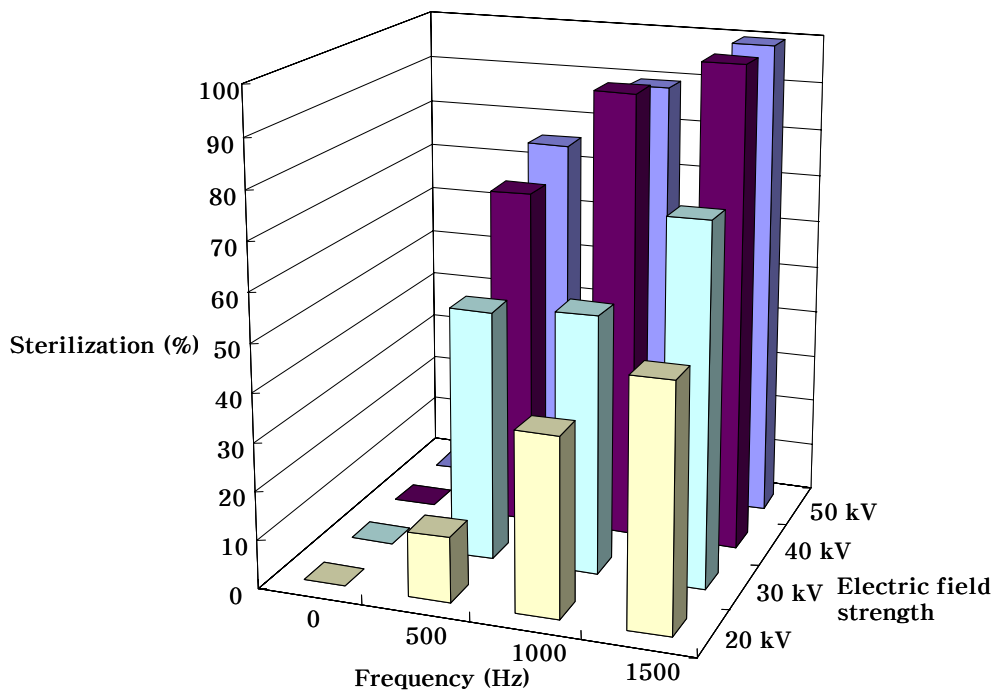


Fig. 4-109. Sterilization of total aerobes in saccharified rice beverage by PEF treatment at different electric field strength and frequency.



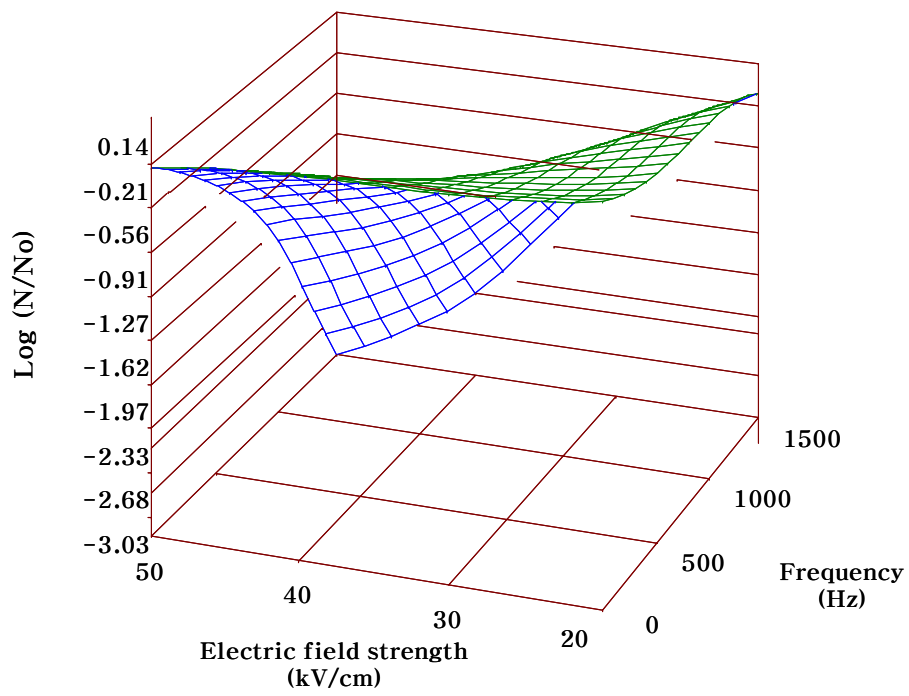


Fig. 4-110. Response surface of survivality of total aerobes in saccharified rice beverage function of electric field strength and frequency

존율이 급격히 감소하는 양상을 보였다.

효모에 대한 전기장 세기와 주파수 변화에 의한 살균율 변화를 Fig. 4-111에 나타내었다. 쌀당화음료에 존재하는 효모의 초기 균수는  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL로 검출되었고, 전기장 세기와 주파수의 변화에 따른 살균율을 보면 주파수 500 Hz에서 전기장 세기 20 kV/cm로 처리하였을 때  $1.50 \times 10^4$  CFU/mL로 80.00%, 30 kV/cm에서는  $5.20 \times 10^3$  CFU/mL로 94.80%의 살균율을 나타냈다. 전기장 세기 40 kV/cm에서는  $4.2 \times 10^3$  CFU/mL로 95.80%, 그리고 50 kV/cm에서는  $1.60 \times 10^3$  CFU/mL로 98.40%의 살균율을 나타내 주파수가 500 Hz에서는 전기장 세기에 따른 효과는 그다지 크지 않았다.

주파수를 1000 Hz로 늘린 경우 효모의 전기장 세기에 따른 살균율을 보면 20 kV/cm에서  $2.00 \times 10^4$  CFU/mL로 살균율 85.00%, 30 kV/cm에서  $1.00 \times 10^3$  CFU/mL의 값을 보여 99.00%의 높은 살균율을 나타내었으며, 40 kV/cm에서는  $5.90 \times 10^2$  CFU/mL로 99.41%의 살균율을, 50 kV/cm에서는  $1.60 \times 10^2$  CFU/mL의 효모 수를 보여 99.84%의 살균율을 보여 1000Hz에서 40 kV/cm의 전기장 세기로 처리할 경우 효모수가 3 log 이상 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 50 kV/cm에서의 살균율은 40 kV/cm와 그리 큰 차이를 보이지 않았다.

주파수를 1500 Hz로 증가시킨 경우를 보면 전기장 세기 20 kV/cm에서 처리 후  $3.20 \times 10^3$  CFU/mL의 값을 나타내어 2 log 이상의 살균효과를 나타내었으며, 전기장 세기가 30 kV/cm에서는  $1.10 \times 10^2$  CFU/mL의 생존을 보여 3 log 정도의 살균효과를 보였다.

전기장 세기 40 kV/cm 이상에서 처리한 경우에는 효모가 검출되지 않아 쌀당화음료에 존재하는 효모를 살균하는데 있어서 살균율 100%를 얻기 위해서 필요한 조건은 주파수는 1500 Hz, 전기장 세기는 40 kV/cm 이상임을 알 수 있었다.

효모에 대한 전기장 세기와 주파수의 관계를 반응표면 분석법으로 분석한 결과 Fig. 4-112와 같이 나타나 전기장 세기와 주파수가 증가할수록 효모에 대한 살균율은 증가하였으며 효모에 대한 PEF 살균은 매우 효과적임을 알 수 있었다. 이 또한 미생물의 크기와 사멸효과와의 관련이론으로 설명될 수 있었다.

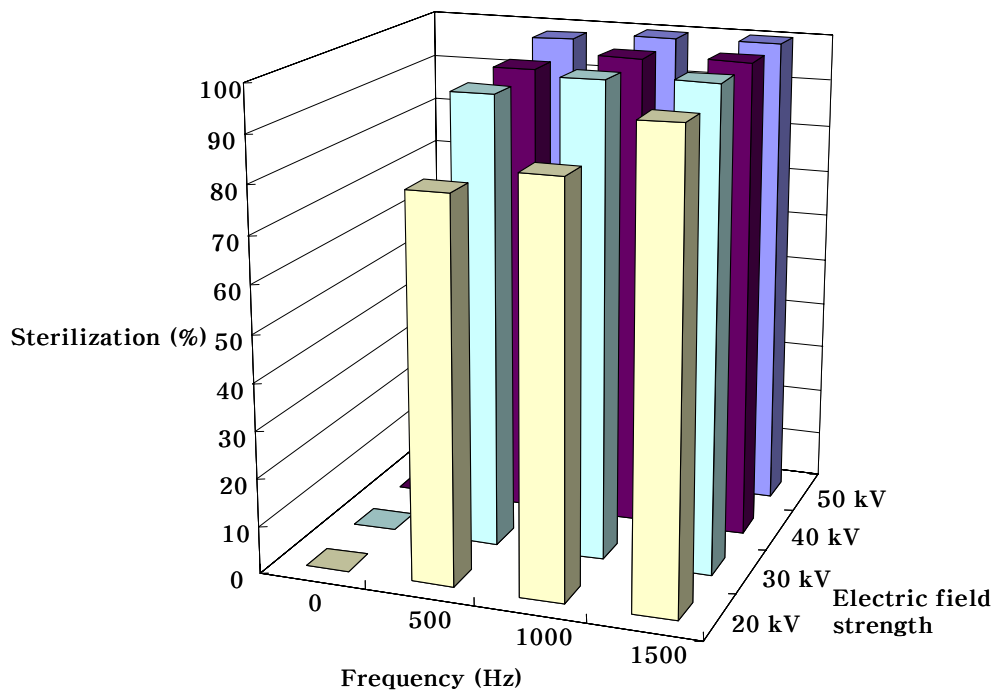


Fig. 4-111. Sterilization of yeast in saccharified rice beverage by PEF treatment at different electric field strength and frequency.

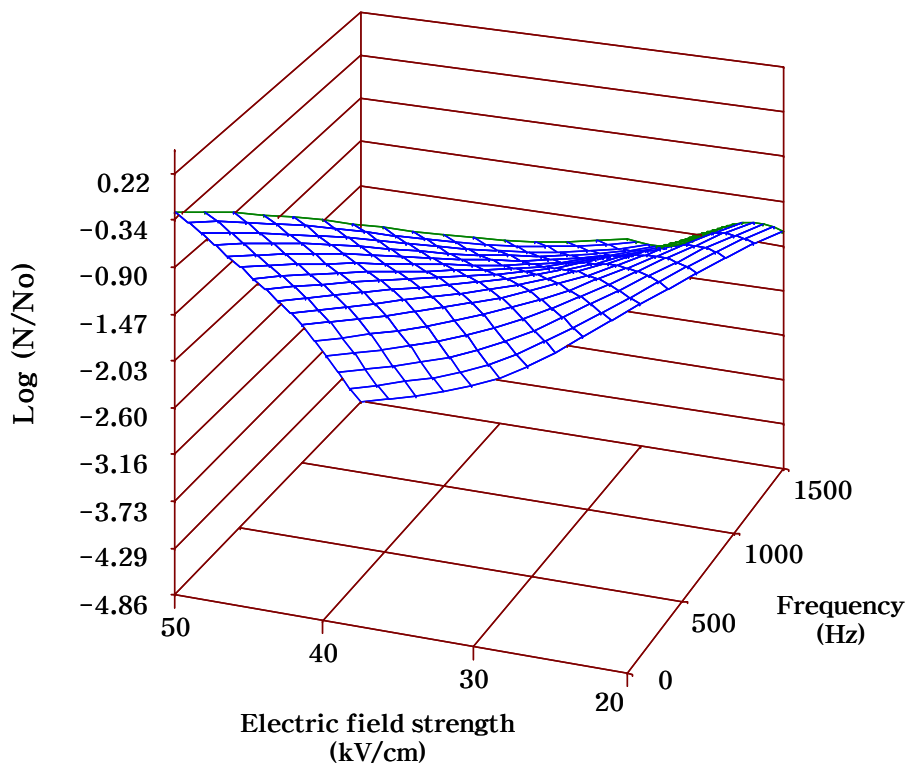


Fig. 4-112. Response surface of survivality of yeast in saccharified rice beverage as function of electric field strength and frequency

쌀당화음료의 초기 젖산균 수는  $1.2 \times 10^5$  CFU/mL이었으며 이를 PEF 살균하였을 경우 주파수와 전기장 세기에 따른 젖산균의 생존율(Fig. 4-113)을 보면 주파수 500 Hz에서 전기장 세기 20 kV/cm로 처리하였을 때 8.33%의 살균율을 보였고, 30 kV/cm에서  $9.3 \times 10^4$  CFU/mL의 생존을 나타내 생존균 수에서 약 1 log의 감소를 보였다. 전기장 세기 40 kV/cm에서는 살균율 60.83%를, 50 kV/cm에서는 68.33%의 살균율을 보여 그 차이가 크지 않았다.

주파수 1000 Hz에서 전기장 세기가 20 kV/cm인 경우는  $9.90 \times 10^4$  CFU/mL 수준의 생존을 보여 주파수 500 Hz, 20 kV/cm인 경우에 비해 생존 균 수는 약 1 log 차이를 보였다. 30 kV/cm의 전기장 세기에서는 43.33%, 40 kV/cm에서는 67.50%의 살균율을 보였고, 50 kV/cm에서는 96.67%의 살균율을 보였다.

주파수를 1500 Hz로 늘릴 경우 전기장 세기 20 kV/cm 와 30 kV/cm에서의 살균율 차이는 거의 없었으나, 전기장 세기를 40 kV/cm로 높인 경우는 살균율이 99.56%로 급격히 증가함을 보였고, 50 kV/cm의 전기장 세기에서는 젖산균이 모두 사멸되었다. 즉 쌀당화음료에 존재하는 젖산균의 완전 살균을 위해서는 주파수 1500 Hz에서 전기장 세기 50 kV/cm로 처리해야 함을 알 수 있었다.

반응표면분석법을 이용한 전기장 세기와 주파수에 따른 젖산균의 살균율은 Fig. 4-114에 나타나 있으며 쌀당화음료 미생물의 생존율에 대한 반응표면모형은 Table 4-40에 제시되어 있다. 미생물 종류 중에서는 효모의 생존율에 대한 모형이 결정계수 0.9590으로 가장 큰 값을 나타내 반응표면모형이 가장 잘 적용되는 것으로 나타났다.

쌀당화음료에 대한 PEF 살균처리 결과를 처리시간에 따른 log(s)로 나타내면 Fig. 4-115와 같이 직선으로 나타낼 수 있었으며 직선의 기울기의 역수를  $D_{PEF}$ 값으로 주파수별로 Table 4-41에 나타내었다.

미생물 종류 및 전기장 세기별  $D_{PEF}$ 값은 세균의 경우 20 kV/cm에서 899  $\mu$ s, 30 kV/cm에서 446  $\mu$ s, 40 kV/cm에서 102  $\mu$ s 그리고 50 kV/cm에서 94  $\mu$ s의 값을 보여 전기장 세기가 증가함에 따라 세균의 PEF 저항성이 낮아짐을 알 수 있

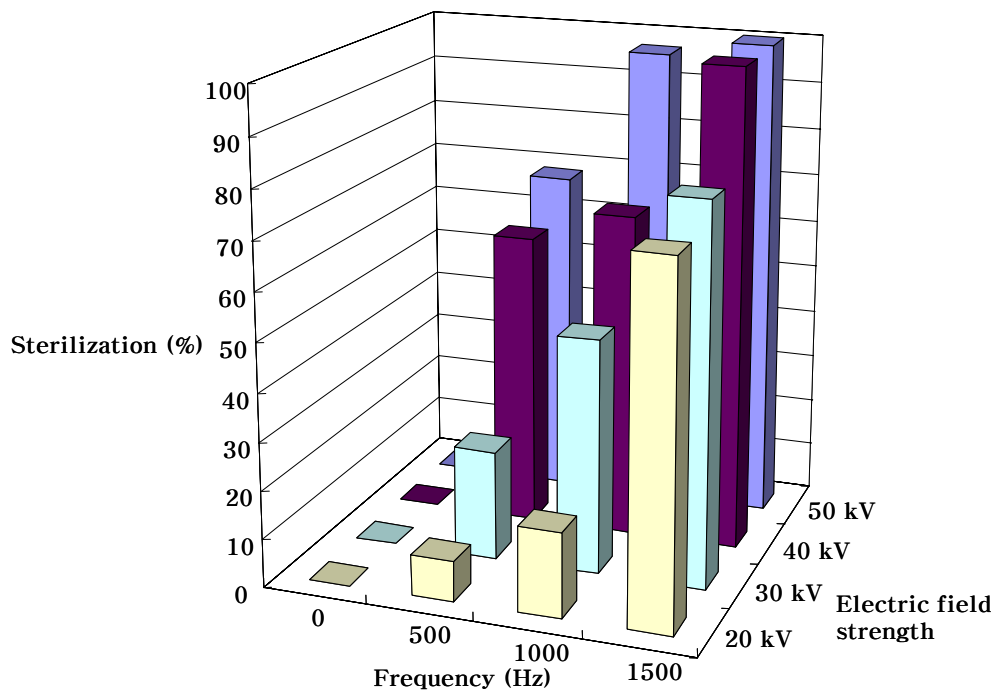


Fig. 4-113. Sterilization of lactic acid bacteria in saccharified rice beverage by PEF treatment at different electric field strength and frequency.

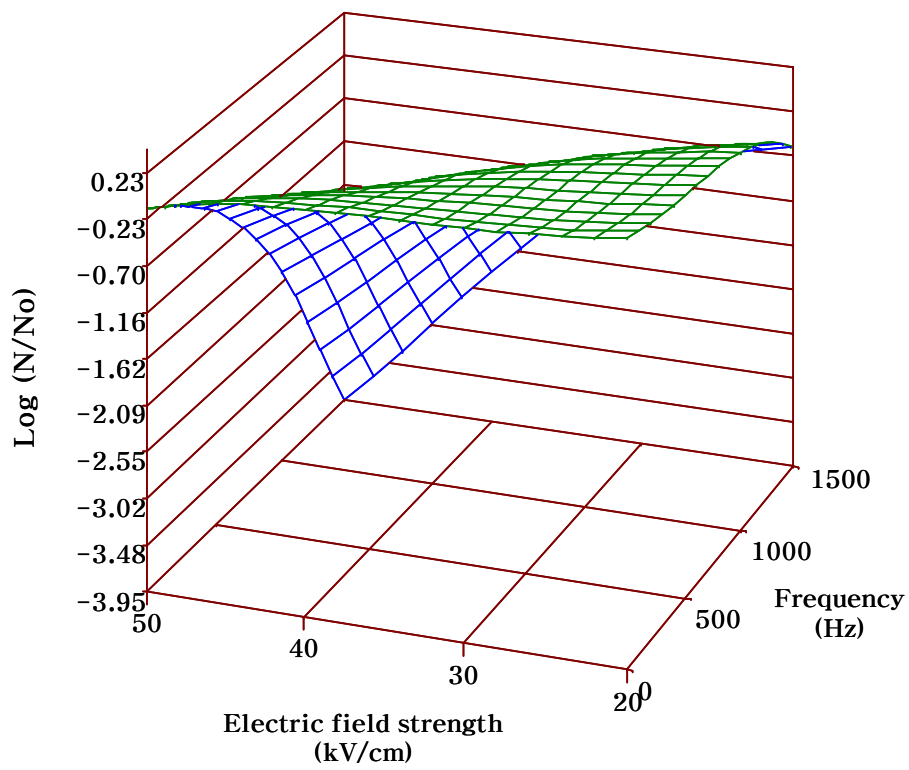


Fig. 4-114. Response surface of survivality of lactic acid bacteria in saccharified rice beverage as function of electric field strength and frequency

Table 4-40. Response surface regression equation for survivability of microorganisms in saccharified rice beverage as functions of electric field strength and frequency

Microorganisms	Response surface model*	R <sup>2</sup>	p-value	
			Electric field strength	Frequency
Bacteria	$\log(N/N_0) = 2.14 \times 10^{-4} E^2 + 2.732 \times 10^{-3} E - 8.0432 \times 10^{-5} E \cdot f + 2.739 \times 10^{-3} f - 7.0 \times 10^{-7} f^2 - 0.44087$	0.8669	0.0014	0.0004
Yeast	$\log(N/N_0) = 1.399 \times 10^{-3} E^2 + 9.14 \times 10^{-2} E - 8.2358 \times 10^{-5} E \cdot f + 1.136 \times 10^{-3} f - 3.62 \times 10^{-7} f^2 + 1.22079$	0.9590	0.0001	0.0000
Lactic acid bacteria	$\log(N/N_0) = -2.149 \times 10^{-3} E^2 + 1.69529 \times 10^{-1} E - 9.6314 \times 10^{-5} E \cdot f + 3.995 \times 10^{-3} f - 1.32 \times 10^{-6} f^2 - 3.09831$	0.8914	0.0006	0.0002

\* No = initial viable cell count (CFU/mL)

N = viable cell count after PEF treatment (CFU/mL)

E = electric field strength (kV)

f = frequency (Hz)



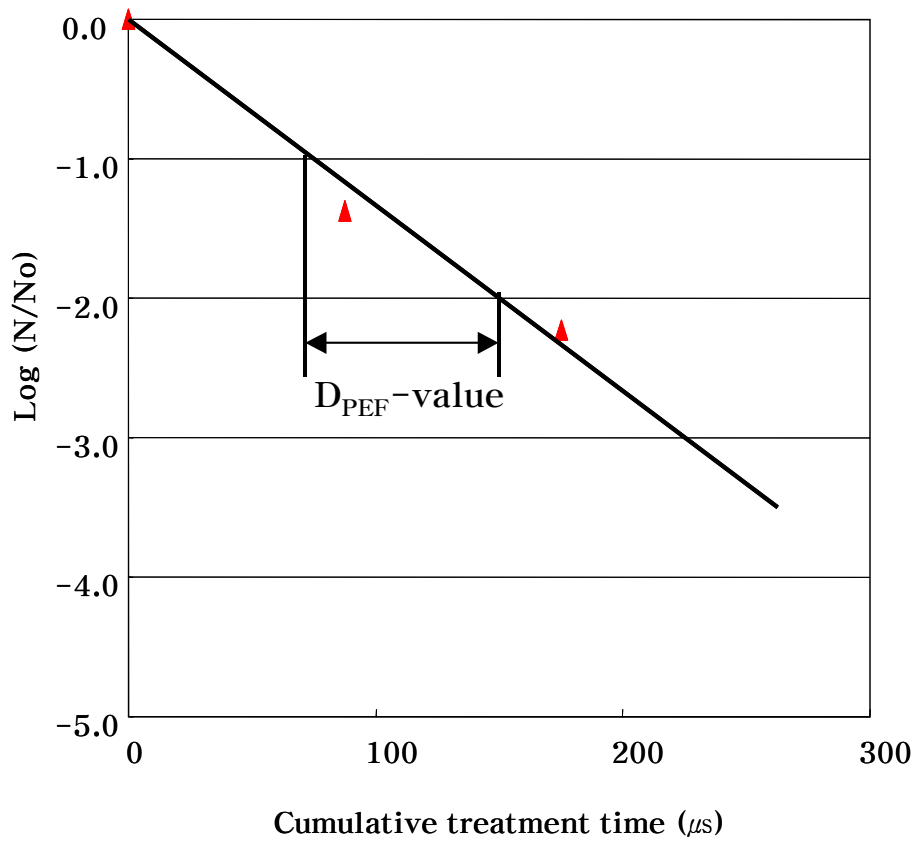


Fig. 4-115. High voltage electric field sterilization kinetics of bacteria in saccharified rice beverage treated at 40 kV/cm

Table 4-41. Effect of electric field strength on  $D_{PEF}$  value of microorganisms in saccharified rice beverage

(unit:  $\mu s$ )

Microorganisms	Electric field strength (kV/cm)			
	20	30	40	50
Bacteria	899	446	102	94
Yeast	179	87	75	59
Lactic acid bacteria	636	458	145	127

었다.

효모의  $D_{PEF}$  값은 20 kV/cm의 전기장 세기에서 179  $\mu$ s, 30 kV/cm에서 87  $\mu$ s로 급격히 감소하였으며, 40 kV/cm 이상의 전기장에서는 서서히 감소하는 것으로 나타났고, 미생물 종류에 따라 비교할 때 효모가 가장 낮은  $D_{PEF}$  값을 보여 PEF에 대해 가장 민감하게 반응하는 것으로 나타났다.

젖산균의 경우는 20 kV/cm에서 636  $\mu$ s, 30 kV/cm에서 458  $\mu$ s, 40 kV/cm에서 145  $\mu$ s, 그리고 50 kV/cm에서 127  $\mu$ s의 값을 보여 20 kV/cm의 전기장 세기에서는 세균보다 PEF 저항성이 낮은 것으로 나타났으나 30 kV/cm에서는 세균과 거의 차이를 보이지 않았으며 40 kV/cm의 전기장 세기에서는 세균보다도 저항성이 더 커지는 것으로 나타났다.

이상의  $D_{PEF}$  값을 토대로 PEF 저항성을 분석할 때 저항성이 가장 큰 것은 젖산균이고, 세균, 효모의 순으로 저항성이 작아졌다.

$\log(D_{PEF})$ 를 전기장 세기에 대하여 작도하면 Fig. 4-116와 같이 직선적으로 감소하였으며,  $z_{PEF}$  값을 계산한 결과 Table 4-42와 같았다. 쌀당화음료의 PEF 살균 시 미생물별  $z_{PEF}$  값은 효모, 젖산균, 세균 순으로 감소하여, 세균의 PEF 살균이 전기장세기에 가장 크게 의존하는 것으로 나타났고, 젖산균, 효모의 순으로 의존도가 감소하였다.

이상의 쌀당화음료에 대한 PEF 살균 결과를 앞서 기술한 다른 식품과 비교할 때 쌀당화음료의 PEF 살균효과 비교적 낮은 것으로 나타났는데 그 이유는 쌀당화음료는 중성식품(pH 6.24)에 속하고 여과하여 제조하였지만 다른 액체 식품에 비해 고형물이 다량 존재하는 식품이기 때문으로 생각된다.

통상 PEF 사멸효과는 중성에서 보다 산성이나 알칼리성이나 산성쪽으로 갈수록 사멸효과가 현저하게 증대된다고 알려져 있다. 또한 부유 고형물은 PEF 처리 시 capacitor로 작용하여 전기를 저장하여 PEF 효과를 감소시키는 것으로 생각되며, 아울러 쌀당화음료 제조시 당화온도는 60°C로서 당화조건에서 생존한 미생물은 대부분 내열성을 띠고 있어 열악한 환경에 대한 방어능력이 높은 미생물이므로 PEF 처리에 대한 저항성도 높기 때문인 것으로 사료된다. 일반적으로 미

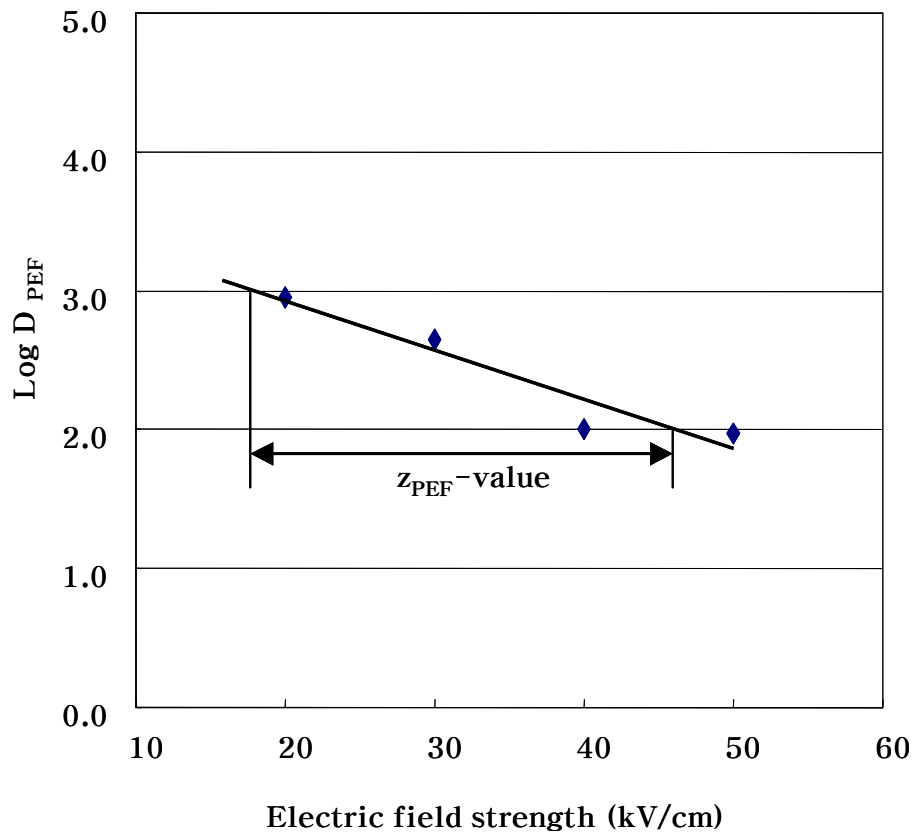


Fig. 4-116. Semilogarithmic plot of decimal reduction time ( $D_{PEF}$ ) of bacteria in saccharified rice beverage versus electric field strength

Table 4-42.  $z_{PEF}$ -value of microorganisms in PEF treated saccharified rice beverage

Microorganisms	$z_{PEF}$ -value (kV/cm)
Total aerobes	27.9
Yeast	66.4
Lactic acid bacteria	38.4

생물이 높은 온도에 장시간 노출되면 온도에 의한 스트레스를 받게 되고 스스로 방어하기 위해 새로운 단백질을 합성하여 세포 표면을 보호하는 것으로 알려져 있다.

## 제 5 형 고전압 펄스 전기장에 의한 미생물의 살균 기작

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 미생물의 살균 실험은 지금까지 주로 액상 식품이나 model 식품 내에서 미생물의 감소에 대한 것을 관점으로 하여 식품의 보존 기간 연장을 목적으로 수행되어 왔으며, 아직까지도 여러 가지 식품을 대상으로하여 실험이 진행되고 있다. 따라서 미생물의 불활성화에 대한 단편적인 자료들은 많이 보고가 되고 있으나, 체계적이고 종합적인 보고가 이루어지지 않고 있다. 현재까지의 보고에 의하면 미생물의 불활성화의 기작이 단순히 세포벽이나 세포막의 파괴나 기능적 손상에 의한 것으로 설명이 되어지고 있으나 (Pothakamury, 1995; Ho, 1997; Zimmerman 등, 1974; Jayaram 등, 1992; Barbosa-Canovas, 1997a, 1997b, 1997c) 아직까지 그 기작이 분명하게 입증되지 않고 있다.

본 연구에서는 일상 식품이나 alcohol 음료등 널리 산재하여 있는 효모를 대상 미생물로하여 이 균주에 미치는 고전압 펄스 전기장의 효과를 종합적이고 체계적으로 연구하여 가열 살균을 대체하는 기술로서의 고전압 펄스 전기장 처리에 대한 기본 자료를 제공하고자 하였다. 구체적으로 고전압 펄스 전기장 처리에 의해 일어날 수 있는 세포막의 파괴 뿐만아니라 최소 농도 항생 물질 시험,  $H^+$ -ATPase, alcohol dehydrogenase (ADH) 등의 효소활성, 세포막 손상에 따른 세포내 물질의 유출, 세포내외 상대적 pH 구배, proton permeability 변화, 해당 대사 활성 변화, DNA 손상 측정등을 통하여 세포의 생리학적 변화를 고찰하였으며, 전자주사현미경과 투과현미경, 광학현미경을 통하여 형태학적 변화를 살펴 보았다.

## 1. 실험 재료 및 방법

### 1.1. 사용균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* 균주는 ATCC 4105로 한국 종균 협회(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)로부터 분양 받아 사용을 하였다. 균주 보관용 평판배양은 YM agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 사용하였으며, 사용전까지 0℃에 보관하였다. 실험 균주의 생리적 상태를 동일하게 유지하기 위하여 접종균은 균주보관용 평판배지로부터 2~3백급이를 YM broth (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% dextrose) 100 mL가 들어있는 250 mL 삼각 플라스크에 접종한 후 26℃에서 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. 다만 균주의 배양 온도나 생육단계의 영향을 살펴볼 때는 16℃에서는 32시간 배양 (대수증식기 후반)하거나 26℃에서 32시간 배양 (정상기)한 다음 실험에 사용하였다. 배양한 배양액은 4℃에서 4000 rpm으로 원심분리 (Sorvall RC2C plus, Dupont, USA)하여 살균 증류수 및 완충 용액 (50 mM acetate buffer pH 4.0, pH 5.0; 50 mM phosphate buffer, pH 6.0, pH 7.0; 50 mM bicarbonate buffer, pH 8.0, pH 9.0)에 1회 세척한 후 현탁하여 사용하였다. 이 때 최종 균체 농도는  $2.0 \times 10^7 \sim 3.0 \times 10^7$  수준이었으며, 본 실험에 사용된 모든 균 시료액은 같은 방법으로 매번 새로이 배양한 것을 사용하였다.

### 1.2. 고전압 펄스 전기장 처리

배양액 200 mL를 시료 용기에 넣고 밀봉한 다음 연동 펌프 (peristaltic pump)를 사용하여 시료를 처리 라인에 채웠다. 처리 라인은 일정한 온도 (20 ~ 40℃)로 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 시

료의 유속을 조정하고 처리하고자 하는 전압까지 전원을 공급하여 처리 용기내에 전기장을 형성시켜 시료를 처리한다. 일정 시간 시료를 처리한 후 처리 line에서 나오는 시료를 일정량 수거하여 다음 분석을 위해 사용하였다.

### 1.3. 생균수 측정 및 내염성의 측정

고전압 펄스 전기장 처리를 마친 효모 현탁액을 멸균된 생리 식염수 (0.85% NaCl) 수용액에 단계별로 희석한 후 potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA; potatoes 20%, dextrose 2%, agar 1.5%)에 0.1 mL 씩 도말하였다. 이를 26°C에서 48시간동안 평판 배양한 다음 생성된 colony를 계수하여 생균수를 측정하였다 (Lin 등, 1993). 고전압 펄스 전기장 처리에 따른 균체의 생존율은 초기 생균수 ( $N_0$ )에 대한 처리 후 생균수 ( $N$ )의 비율로 표시하였으며, 최소 3회 이상의 반복 실험 결과를 평균하여 나타내었다.

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 미생물 세포의 손상 (injury) 정도를 확인하기 위하여 내염성 (salt tolerance) 변화를 측정하였다. 생균수 측정에 사용한 균체 시료액을 PDA에 3% NaCl을 첨가한 배지 (PDAS)에서 동일한 방법으로 도말하여 평판 배양한 다음 생성된 colony를 계수하여 비교하였다. 세포의 손상도는 내염성의 소실 여부를 그 기준으로 정하였으며, PDA에서의 생균수 ( $N$ )에 대한 PDAS에서의 생균수 ( $S$ ) 비율로 표시하였다.

### 1.4. 자외선 흡수 물질 측정

미생물 세포막의 손상 또는 투과성의 변화에 의한 세포내 물질의 외부로의 유출을 측정하기 위하여 세포 외액에서 자외선 흡수 물질을 측정하였다. 세포 배양액을 멸균 증류수로 1회 세척한 후 완충액 (50 mM phosphate buffer, pH 7.0)에 현탁하여 시료액을 준비하고 이를 40°C에서 임의의 전기장 세기와 처리시간으로 처리하였다. 처리된 시료액을 4°C에서 4000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 취한 다음 spectrophotometer (Hewlett Packard, model 8452A Diode Array Spectrophotometer)를 이용하여 220, 260 및 280 nm에서 흡광도를 측정하



여 나타내었다.

### 1.5. pH 구배 측정

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 *S. cerevisiae* 세포의 proton motive force (PMF) 변화를 확인하고자 세포 내외의 상대적인 pH 구배를 측정하였다. 세포 배양액을 원심 분리하여 멸균 증류수에 1회 세척한 다음 완충액에 현탁하여 시료액을 준비하고 앞의 실험 방법과 동일한 방법으로 고전압 펄스 전기장 처리를 하였다. 임의의 시간으로 처리된 시료액과 처리하지 않은 시료액을 동일하게 다시 원심 분리한 다음 1 mM MgCl<sub>2</sub>를 포함한 150 mM KCl 용액에 20 mg/cells (건조중량)/ml의 농도로 현탁하였다. 이들 현탁액의 초기 pH를 측정하여 초기 pH (pH<sub>i</sub>)로 정하고, *n*-butanol을 5% (v/v) 첨가하여 세포막을 파손시켜 세포내 내용물이 완전히 유출되어 더 이상의 pH 변동이 없을 때를 최종 pH (pH<sub>f</sub>)로 정의하였다. 균체의 상대적 pH 구배는 이와 같이 결정된 pH 값의 차이 (최종 pH - 초기 pH, pH<sub>f</sub> - pH<sub>i</sub>)로 나타내었다.

### 1.6. 해당활성 측정

미생물 세포의 기본적인 대사과정인 해당 활성을 측정하여 세포의 손상 여부를 측정하였다. 세포 배양액을 원심 분리하여 탈이온수에 1회 세척한 후 1 mM MgCl<sub>2</sub>를 함유한 20 mM phosphate 완충액 (pH 7.0)에 현탁하여 26°C에서 1 시간 배양하여 세포질 내의 대사산물을 제거하였다. 이를 다시 원심분하여 1 mM MgCl<sub>2</sub>와 0.1%의 glucose를 함유한 50 mM phosphate 완충액 (pH 7.0)에 현탁한 다음 앞의 실험과 동일한 방법으로 고전압 펄스 전기장 처리를 하였다. 시간별로 처리를 마친 균체 현탁액을 26°C에서 2시간 동안 재배양한 후 즉시 원심 분리하여 상등액을 얻고, glucose 진단 시약 (Sigma Co.)을 사용하여 소모되지 않은 잔존 glucose 농도를 측정하였다. 균체의 해당 활성을 소모된 glucose 양을 초기 함량에 대한 백분율로 나타내었다.

### 1.7. 이온의 영향 측정

고전압 펄스 전기장 처리시 현탁액내의 이온의 종류가 미생물의 사멸에 영향을 조사하였다. 세포 배양액을 원심 분리하여 탈이온수에 1회 세척한 후 동량의 탈이온수에 재현탁하였다. 고전압 펄스 전기장 처리시 전류의 흐름이나 저항에 영향을 없애기 위하여 동일한 전기 전도도 (ca. 6 mS/cm)를 갖도록 이온의 농도를 조절하여 세포 현탁액에 첨가하였다. 세포 현탁액에 사용한 이온은 일가 이온으로  $\text{Na}^+$  (NaCl),  $\text{K}^+$  (KCl), 이가 이온으로  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ),  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{MgCl}_2$ )를 사용하였으며, 각각의 농도는 0.056 mol/l, 0.047 mol/l, 0.071 mol/l, 0.064 mol/l였다.

### 1.8. K, Na 이온 분석

효모 배양액을 원심분리하여 탈이온수에 1회 세척한 후 현탁하여 이온 분석을 위한 시료액을 준비하였다. 우선 일정량의 시료액을 취하여 균체의 건조 중량을 측정하고, 나머지 시료는 6 N 질산 용액이 담긴 Kjeldahl 플라스크에 넣어 150°C에서 10시간동안 분해하였다. 완전히 분해된 시료액은 정용 플라스크에서 필요에 따라 탈이온수를 가하여 원래의 부피로 맞춘 다음 atomic absorption spectrophotometer (model 2380, Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 균체의 Na 및 K 이온 함량을 측정하였다. 또한 동일하게 준비된 시료액을 위의 실험 방법에서와 마찬가지로 고전압 펄스 전기장 처리한 후 원심 분리하여 상등액을 얻고 그에 대한 Na와 K 이온 함량을 측정하였다. 이들 이온 성분의 농도는  $\mu\text{g}/\text{mg cells}$  (건조 중량)으로 계산하여 세포의 이온 총 함량에 대한 백분율로 나타내었다.

### 1.9. $\text{H}^+$ -ATPase 분리 및 활성 측정

일반적으로 모든 세포는 pH 항상성을 유지하여 세포의 생리적 상태를 일정하게 유지하려한다. 이러한 pH 항상성 유지에 중요한 역할을 하는  $\text{H}^+$ -ATPase를 분리하여 활성을 측정하였다.

### 1.9.1. 세포막 분리

배양액 (2.8 mL)을 10,000 g에서 10분동안 원심분리하고 살균 증류수로 2회 세척한 후 상등액은 버리고, pellet을 50 mM Tris-maleate buffer (pH 7.4)에 재현탁하였다. 현탁액에 lysozyme (0.1%, Sigma L6876)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., USA)하였다. 처리된 시료액을 10,000 g에서 10분동안 원심분리하여 침전물(파괴되지 않은 세포와 파쇄된 세포의 큰 부분)을 제거한 후, 상등액을 4°C에서 100,000 g로 1시간동안 초원심분리 (Ultracentrifuge, Centrikon T-1080, Kontron Instrument, UK)하여 세포막 단편을 회수하였다. 회수된 세포막 단편을 100 mM Tris-maleate buffer (pH 7.4)에 재현탁하였다. 시료는 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다. 일반적으로 ATPase 활성은 -70°C에서 수개월동안 유지되는 것으로 보고되었다.

### 1.9.2. 무기질 phosphate의 유리

ATPase 활성은 ATP로부터 inorganic phosphate가 유출되는 것으로 측정한다. 앞에서 분리한 세포막 현탁액 100  $\mu$ l를 50 mM MgCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ l와 100 mM Tris-maleate buffer (pH 7.4) 300  $\mu$ l를 포함한 반응액에 첨가한 후 ATPase 활성 최적 온도인 55°C에서 5분동안 배양한 다음 30 mM ATP (Sigma, A7699) 50  $\mu$ l를 첨가하여 20분동안 반응시키고 10% (w/v) trichloroactic acid 250  $\mu$ l를 넣어 반응을 종결하였다.

### 1.9.3. Phosphate 측정 (ATPase 활성 측정)

반응이 종결된 시료액에 증류수 3.85 ml를 첨가한 후 2500 g에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 깨끗한 tube에 옮긴 후 5% (w/v) ammonium molybdate 200  $\mu$ l, amidol reagent (2,4-diaminophenol 0.5 g을 함유한 20% (w/v) sodium sulphite) 200  $\mu$ l를 첨가하고, 잘 섞는다. 이 시료를 80°C에서 2분동안 배양한 후 급냉시킨 후, 830 nm에서 흡광도를 측정한다. 세포막 단백질 함

량은 변형된 Lowry 법 (1951)을 이용하여 측정하였다 (Markewell at al., 1978). Bovine serum albumin (Sigma, A3059)를 standard protein으로 사용하였으며, ATPase 비활성 (specific activity)은 1 mg의 세포막 단백질에 대해 1분동안 ATP로부터 유리된 무기질 phosphate의 nmol로서 계산하였으며, 결과는 처리하지 않은 시료의 ATPase 활성에 대한 백분율로서 나타내었다.

#### 1.10. 세포 염색 관찰 및 전자 현미경 관찰

세포막의 기능이 정상적인 생균은 색소를 첨가하였을 때 이를 계속 외부로 배출하여 세포 자체가 염색이 되지 않으나, 세포막이 손상된 경우에는 세포 내부로 흡수되어 세포가 염색이 된다. 이 사실을 근거로 고전압 펄스 전기장에 의한 효모 세포의 세포막 손상 여부를 확인하기 위하여 적색 색소인 phloxine B (Sigma Co.)를 사용하였다. 일정 시간 고전압 펄스 전기장 처리를 가한 다음 균체 시료액 1 mL에 1% (wt/vol)의 Phloxine B 용액 1%를 첨가한 다음 10여분이 경과한 후 화상 분석기 (Image analyser, Diapot 300, Nikon, Japan)를 이용하여 염색된 세포와 투명한 세포를 관찰하였다.

주사 전자 현미경 (Scanning Electron Microscope, JSM-5410LV, JEOL, Japan)과 투과 현미경 (Transmission Electron, Microscope, JEM-1010, JEOL, Japan)을 이용하여 고전압 펄스 전기장 처리에 의한 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. 40 °C, 50 kV/cm의 전기장 세기로 53  $\mu$ s 처리한 세포 현탁액과 무처리 시료를 고정액 (5% paraformaldehyde, 5% glutaraldehyde, 0.2 M phosphate buffered saline ; PBS)에서 고정한다. 주사현미경 관찰을 위해서 고정액으로 고정한 시료를 0.1 M PBS (pH 7.2)로 세척한 후 osmium tetroxide (2% OsO<sub>4</sub>)로 1.5 ~ 2 시간 후 고정하였다. 이 시료를 0.1 M PBS로 두 번 세척한 후 30, 50, 70, 95% ethanol로 각각 10분동안, 그리고 100% ethanol로 15분동안 두 번 탈수한다. acetone, hexamethyl disilazane(HMDS)로 각각 30분동안 처리하여 건조한다. 세포 현탁액을 carbon tape을 이용하여 metal stub에 정착하고 3분동안 금 coating한 후 주사현미경 관찰을 하였다. 투과현미경 관찰을 위하여 고정액으로

고정한 시료를 0.1 M PBS로 세척한 후 8% bovine serum albumin (BSA)로 encapsulation 하였다. 원심분리에 의하여 PBS를 제거하고 8% BSA 0.5 mL를 첨가한 후 다시 원심분리하였다. 50% glutaraldehyde를 2~3방울 떨어뜨려 BSA를 gel화한 후 1 mm<sup>2</sup>의 크기로 잘라낸 다음 1% osmium tetroxide로 1~1.5 시간동안 후고정 시킨다. 고정후 ethanol과 acetone으로 탈수한 후 Spurr's resin으로 혼합한 다음 유리칼 (ultramicroton)으로 절단하고 uranyl acetate로 20분간, lead stain으로 10분간 처리하여 투과현미경 관찰에 사용하였다.

#### 1.11. 세포의 회복도 측정

세포 배양액을 40℃, 50 kV/cm로 53 $\mu$ s 처리한 다음 원심분리하여 상등액을 제거하고 균체만을 수거하였다. 얻어진 균체를 상등액과 같은 용량의 YM broth에 현탁한 다음 손상된 세포가 회복되도록 26℃에서 다시 배양하면서 일정한 시간 간격을 두고 시료를 채취하여 PDA와 PDAS 배지에 도말하였다. 세포의 회복 여부는 내염성을 복원을 기준으로 하였다. 즉, 두 배지에서의 생균수가 동일한 수준에 도달하는 것으로 세포의 회복 정도를 확인하며, PDA에서의 생균수에 대한 PDAS에서의 생균수 비율로 표시하였다.

#### 1.12. 대사 저해 물질 첨가에 의한 손상부위 측정

세포 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거하고 균체만을 수거한 후 phosphate buffer에 재현탁하여 40℃, 50 kV/cm에서 53 $\mu$ s 처리하였다. 처리한 세포액을 서로 다른 성장 저해 물질 또는 대사 저해물질 (nikkomycin Z, cycloheximide, tunicamycin, amphotericin B, cerulenin)을 정상적인 세포의 대사 활동에 영향을 주지 않는 농도 (cyclohexamide 2.5  $\mu$ g/L, others 10  $\mu$ g/L, El-Sherbeini and Clemas, 1995)로 첨가한 YM broth에 2% 접종한 후 26℃에서 4 시간동안 진탕 배양하면서 매시간 일정량을 수거하여 단계별 희석을 한 후, PDA와 PDAS에 도말한 후 26℃에서 36시간 평판 배양하여 colony 수를 계수하여서 세포의 회복정도를 관찰하였다.

### 1.13. 효소 활성 측정

APIZYM kit (Biomeriux, France)를 사용하여 고전압 펄스 전기장 처리에 따른 효모의 효소 활성 변화를 측정하였다. 40°C, 50 kV/cm의 고전압 펄스 전기장으로 처리한 균체 시료액과 무처리 시료액을 PAIZYM 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, Japan)를 이용하여 처리된 시료와 무처리 시료에 대한 kit 상의 색깔 변화를 L, a, b 값으로 측정하고 이들의 상대적인 색깔 차이를 각 효소의 활성 변화로 정의하여 초기값에 대한 백분율로 표시하였다.

### 1.14. Chromosomal DNA의 분리와 DNA 손상 측정

#### 1.14.1. Chromosomal DNA 분리

세포 배양액을 40°C, 50 kV/cm에서 53 $\mu$ s 고전압 펄스 전기장 처리한 다음 4°C, 5000 g에서 15분동안 원심 분리하여 균체를 수거하였다. 수거한 균체를 0.01 M EDTA, 0.15 M NaCl을 포함한 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)에 재현탁한 후 4°C, 8000 g에서 15분동안 다시 원심분리 한 후, 균체만을 수거하여 같은 0.5 M NaCl과 0.1 M EDTA를 포함한 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)에 현탁하였다. 이 세포 현탁액에 lysozyme (20 $\mu$ g/ml of 1 mM Tris, pH 8.0/0.1 M EDTA)을 첨가한 후 37°C에서 20분간 배양한 후, 1%의 SDS를 첨가하고 60°C에서 10분간 다시 배양하였다. 이 배양액에 pronase solution (200 mg pronase in 10 ml tris buffer (50 mM, pH 7.4))을 첨가하여 37°C에서 1시간동안 반응 시킨 후, phenol, phenol/sevag (1:1, v/v), sevag으로 단계적으로 추출하고, RNase T1 (units/ml)과 RNase A (100  $\mu$ g/ml)를 80°C에서 한 시간 반응시킨 다음 sevag으로 추출하였다. 최종적으로 0.1 volume 3M NaAc와 1 volume cold ethanol로 DNA를 회수하였다.

#### 1.14.2. Ethidium bromide-fluorescence (EBF) 측정

DNA의 손상정도를 파악하기 위하여 Lown의 방법(1984)에 의하여 ethidium binding assay를 수행하였다. 앞서 추출한 DNA 40  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ )를 2 ml ethidium bromide solution (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of ethidium bromide / 20 mM triphosphorus phosphate, pH 11.8 / 0.5 mM EDTA)에 넣고, excitation 525 nm, emission 600 nm에서 "before heat" fluorescence 값을 측정 (SFM25, Kontron Instrument, UK)하였다. "Before heat" fluorescence 값을 측정한 다음 96°C에서 90초간 열을 가한 후 바로 ice water로 냉각하여 보관하면서 "after heat" fluorescence 값을 측정하였다. 이로부터 얻은 값들을 다음 식에 적용하여 DNA 손상정도를 측정하였다.

$$\text{DNA damage}(\%) = 100 - 100 \times \left[ \frac{\left[ \frac{\text{after heat value}}{\text{before heat value}} \right]_{\text{treated}}}{\left[ \frac{\text{after heat value}}{\text{before heat value}} \right]_{\text{untreated}}} \right]$$

## 2. 실험 결과 및 고찰

### 2.1. 내염성 변화 및 손상된 세포의 회복

일반적으로 미생물 (세균 및 세포)은 적당한 외부 환경의 변화나 스트레스에 적응하여 자신의 대사 활동을 유지할 수 있도록 되어 있다. 그러나 치명적인 외부 환경에 놓이게 되면 미생물은 사멸하거나 손상 (injury)을 입게 되는데, 손상이란 정상적인 세포가 생육이 가능한 조건에서 생육 능력에 이상이 발생한 상태를 의미한다. 대부분 미생물의 손상 정도를 파악하기 위해서는 정상적인 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. 대부분의 미생물은 약 20 atm 정도의 매우 높

은 내부 삼투압을 가지고 있다. 즉 미생물은 어느 정도의 외부 염 농도에 대해서도 상당한 저항 능력을 가지고 있어 세포 자체의 생리 활성과 대사 기능, 군락(colony) 형성등에 크게 영향을 받지 않는다. 특히 bacteria 계열의 균주들은 상당한 외부의 염농도와 관계없이 생장을 하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에 사용된 *S. cerevisiae*도 어느 정도의 내염성을 갖고 있어, 일정 수준의 염농도 (< 1 M NaCl, ca. 5.8% NaCl)에 대해서도 세포 자체의 생리 활성과 대사 기능, 군집 형성 능력등이 영향을 받지 않는다.

앞서 언급했던 바와 같이 고전압 펄스 전기장은 세포 벽이나 세포막에 손상을 주어 세포를 사멸시키거나 또는 사멸되지 않은 세포에 손상을 주게 된다. *S. cerevisiae* 세포 현탁액을 40℃에서 30 ~ 50 kV/cm로 고전압 펄스 전기장 처리하였을 때 처리 시간에 따른 세포의 손상 정도를 potato dextrose agar (PDA)와 PDA에 NaCl이 3% 첨가된 배지(PDAS)에서 군락의 수를 비교하여 관찰하였다 (Fig. 4-117). 그림에서 보듯이 고전압 펄스 전기장 처리한 세포가 PDA에 비해 PDAS에서 생균수가  $10^1 \sim 10^2$  정도 더 감소하였으며, 전기장의 세기가 커질수록 그 차이가 더 커지는 것을 알 수 있다. 이와 같은 현상은 정상적인 배지에서 군락을 형성하였던 세포 중 약 90~99% 이상은 사멸되지는 않았으나 세포벽이나 세포막에 손상을 입어 외부의 stress (염)에 민감해져 군락 형성이 제대로 되지 않았음을 의미하며, 전기장의 세기가 커질수록, 처리시간이 길어질수록 그 정도는 더욱 심해지는 것으로 생각할 수 있다.

일반적으로 외부 환경에 의한 미생물 세포의 손상은 일시적인 현상으로 최적의 조건에서 다시 배양하면 원래의 생리 상태에 도달하여 정상적인 생육과 대사활동이 가능해지기도 한다. Fig. 4-117에서 보듯이 처리한 세포를 신선한 배지에 재현탁하여 26℃에서 배양하면서 시간에 따른 회복 정도를 PDA와 PDAS에서 측정한 결과 고전압 펄스 처리 후 사멸하지 않은 세포의 손상 정도는 약 90~99%였으나, 회복 과정을 시작한 후 4~6시간후에는 생균수가 서로 같아져 손상된 세포가 회복되고 있음을 확인하였다.



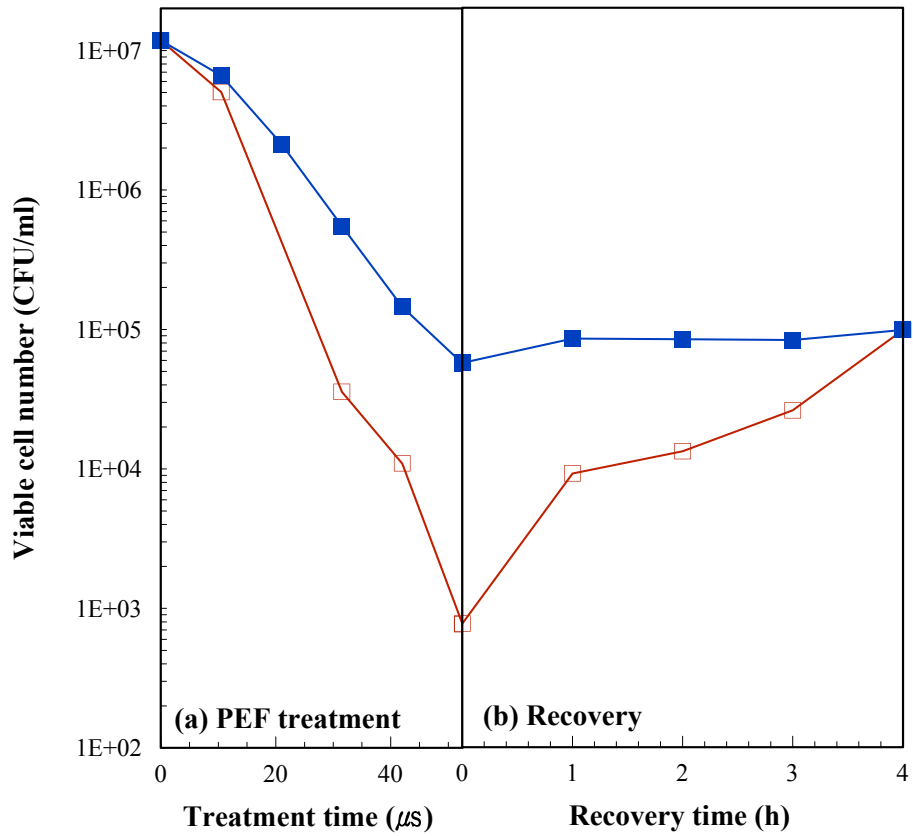


Fig. 4-117. Injury and recovery of *S. cerevisiae* cells on PDA and PDAS agar after exposure to high voltage pulsed electric fields at 30°C and 50 kV/cm. Recovery of the cells was carried out in fresh YM broth at 26°C.

■ PDA                      □ PDAS (+3% NaCl)

## 2.2. 자외선 흡수 물질 유출

미생물이 세포벽 또는 세포막이 파괴되거나 투과성에 영향을 받아 세포 내액이 세포 외로 유출되면 세포 외액에는 세포내 물질, 예를 들면 purine이나 pyrimidine과 같이 특별한 파장에서 흡광을 나타내는 물질들이 증가하게 된다. 220 nm에서는 peptide 결합이, 260 nm에서는 purine, pyrimidine, ribonucleotide, 280 nm에서는 tyrosine, tryptophan과 같은 물질에 의해 단백질이 최대 흡광을 나타내게 된다.

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 효모의 세포막 손상 정도를 확인하기 위하여 50 kV/cm, 40°C에서 전기장을 인가하면서 처리 시간에 따른 흡광도를 Fig. 4-118에, 40°C에서 일정시간 (53 $\mu$ s)동안 인가되는 전기장 세기를 달리하면서 그에 따른 흡광도를 Fig. 4-119에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 흡광도는 처리 시간이 증가함에 따라 그리고 전기장 세기가 커짐에 따라서 급격히 증가하는 양상을 나타내어 세포막의 손상 정도가 매우 큼을 알 수 있었다.

## 2.3. 이온 성분 유출

미생물 세포가 손상되어 투과성에 변화가 생기면 세포 내 물질중 흡광도를 나타내는 물질 이외에도  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  등의 이온 성분의 손실과 지방질의 손실등을 가져오게 된다.  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ 와 같은 1가 (monovalent) 또는 2가 (divalent) 금속 이온들은 yeast 세포내에 매우 많이 존재하며, 이들은 대부분 세포벽이나 세포막이 손상을 입게되면 외부로 유출되게 된다. 그러나 이러한 세포내 이온의 외부 유출은 일정하지 않고 변화가 심하다. 본 실험에서도 세포가 고전압 펄스 전기장 처리를 받으면 세포벽이나 세포막이 손상을 입는 것으로 추측되어 처리 전후의 세포내 이온 유출을 측정하였다 (Fig. 4-120). 그러나 앞선 실험에서 UV 흡수물질이 처리 시간이 증가함에 따라 증가한 것과는 달리 외부로 유출된 이온 농도는 10~30  $\mu$ s 이후에는 큰 변화가 없었다. 이는 고전압 펄스 전기장 처리시 내부에 형성된 전기장에 의해 세포외로 유출된 이온들이 처리 용기내의 전극면에 흡착하여 실제 세포내의 이온이나 UV 흡수 물

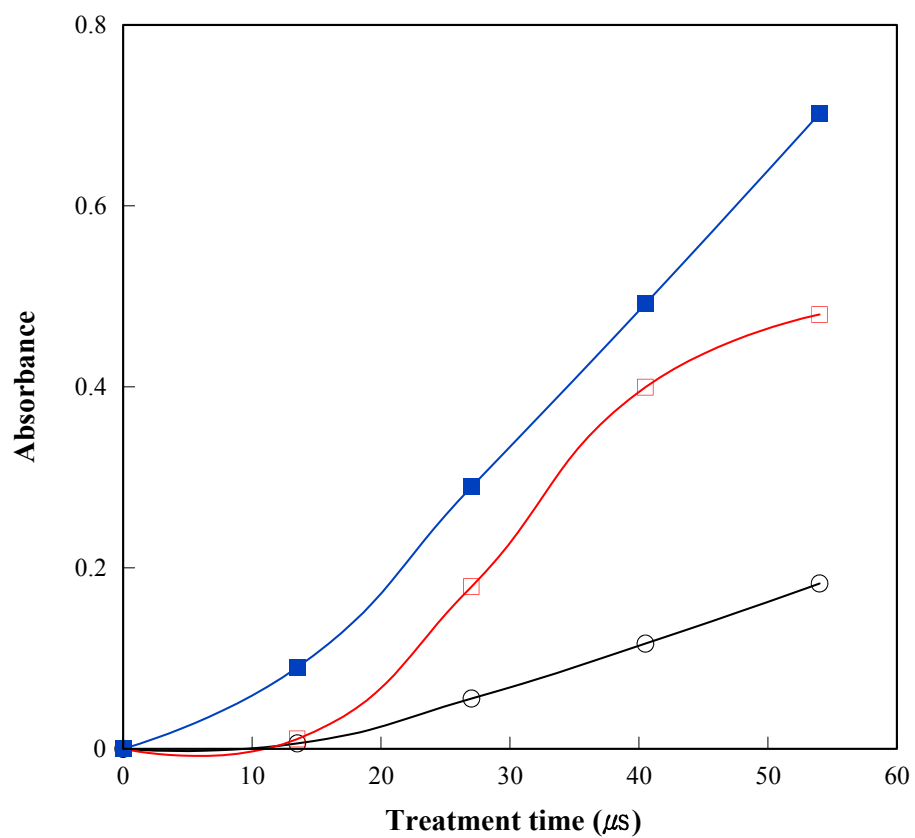


Fig. 4-118. Amount of UV absorbing materials at 220 nm, 260 nm and 280 nm leaked into the cell suspensions as a function of treatment time. High voltage pulsed electric fields treatments were carried out at 40°C and 50 kV/cm.

■ 220 nm,                      □ 260 nm,                      ○ 280 nm

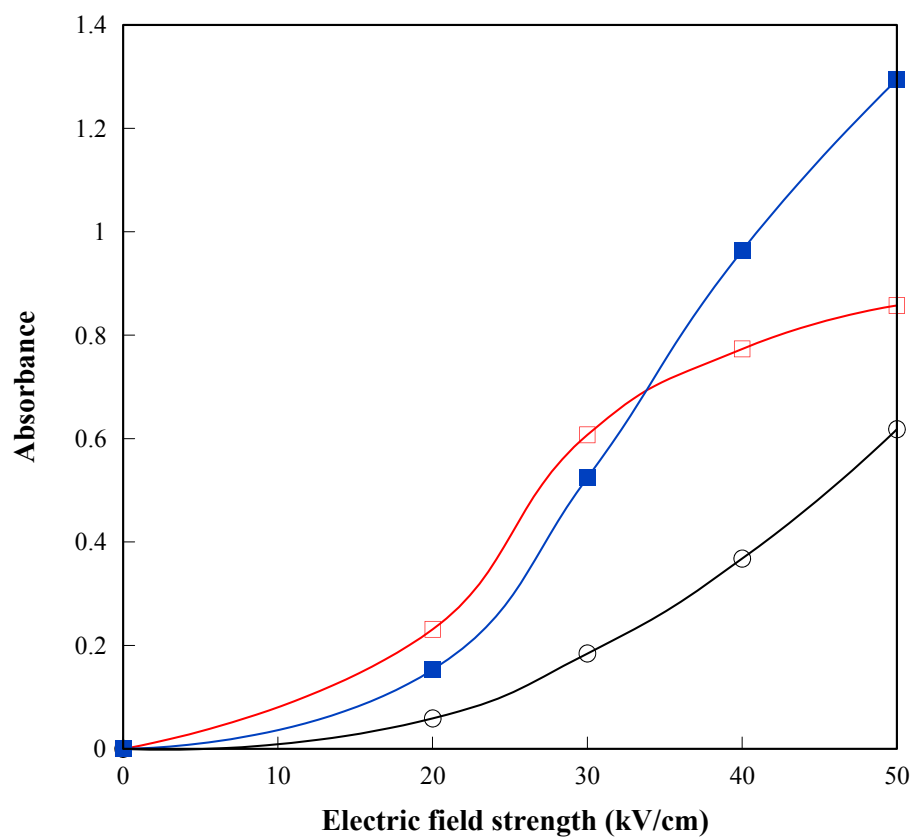


Fig. 4-119. Amount of UV absorbing materials at 220 nm, 260 nm and 280 nm leaked into the cell suspensions as a function of electric fields strength. High voltage pulsed electric fields treatments were carried out at 40°C and 53  $\mu$ s.

■ 220 nm,                      □ 260 nm,                      ○ 280 nm

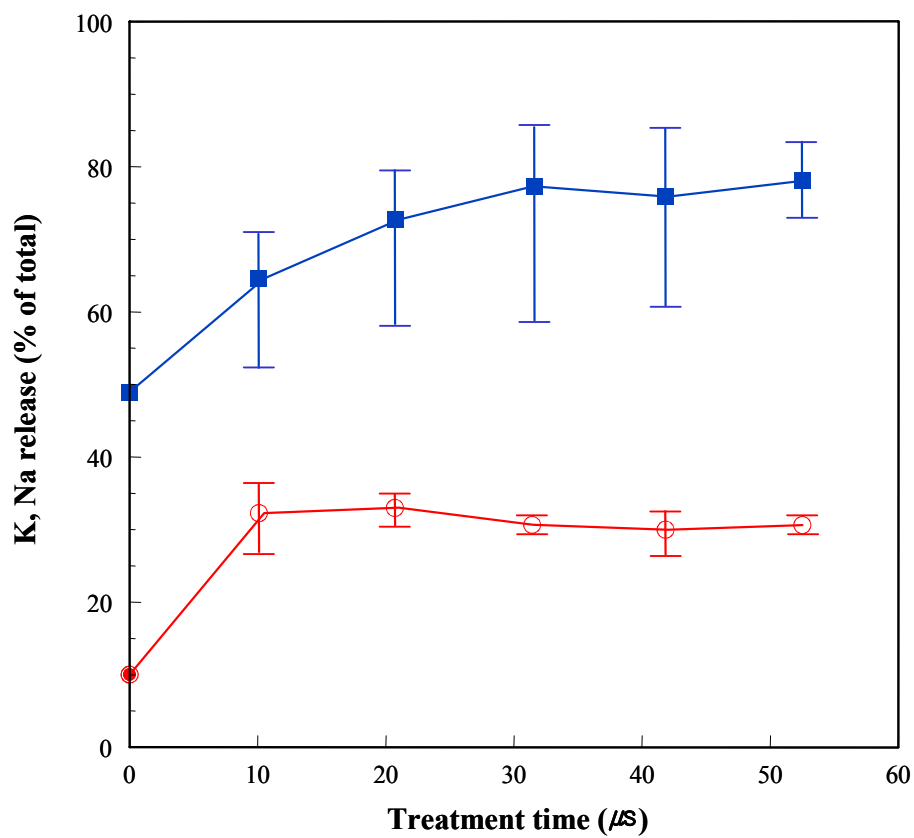


Fig. 4-120. Amount of intracellular ions leaked into the cell suspensions by treatment with high voltage pulsed electric fields. Experiments were carried out at 50 kV/cm and 40°C. Total potassium and sodium contents were 7.64  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  DCW and 12.42  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  DCW, respectively.

■ K<sup>+</sup> ;                      ○ Na<sup>+</sup>

질들이 유출되었음에도 불구하고 UV 흡수물질만이 세포 외액에 용출되고 이온 성분들은 유출되지 않는 것처럼 나타나는 것으로 생각된다. 실제 전극을 사용하는 많은 실험들에서 식품이나 기타 여러 성분들중  $\text{Na}^+$ 나  $\text{K}^+$ 이온등이 전극 표면에 흡착하여 침전물 (scale)을 형성하는 것으로 보고되고 있다.

#### 2.4. 상대적 pH 구배

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 미생물의 세포벽 또는 세포막의 손상을 추정할 수 있는 방법으로 세포 내외의 상대적인 pH 구배 변화를 측정하였다. 20 g cells/ml (dry weight basis)의 농도로 농축한 세포 현탁액의 초기 pH를 측정하여 초기 pH ( $\text{pH}_i$ )로 정하고, 5% (v/v)의 *n*-butanol을 첨가하여 세포막을 완전히 파괴시켜 내용물이 더 이상 유출되지 않아 pH의 변화가 없을 때를 최종 pH ( $\text{pH}_f$ )로 정한 다음, 이 값의 차이 ( $\text{pH}_i - \text{pH}_f$ )를 상대적 pH 구배인  $\Delta\text{pH}$ 로 나타내었다. Fig. 4-121에서 고전압 펄스 전기장 처리에 의한 균체 현탁액의  $\text{pH}_i$ ,  $\text{pH}_f$ ,  $\Delta\text{pH}$  변화를 살펴보면 처리 시간이 증가함에 따라 각 값이 증가하다가 감소하는 경향을 나타내었다. 초기  $\text{pH}_i$  값이 6.3에서 고전압 펄스 처리가 시작되면서 6.6으로 pH가 증가한 것은 중성에 가까운 *S. cerevisiae* 세포 내액이 외부로 유출되면서 pH의 상승을 일으킨 것으로 추측되며, 처리 후반에 세포의 pH가 떨어지는 것은 이미 세포내액이 외부로 거의 유출된 세포가 *n*-butanol의 pH (pH 5.6)에 영향을 받은 것이다. 이러한  $\Delta\text{pH}$  값의 감소는 고전압 펄스 전기장 처리에 의해 세포의 proton motive force나 pH를 유지하는 항상성이 파괴된 것으로 생각할 수 있으며, 이는 세포막의 고유 기능인  $\text{H}^+$ -translocation 기능이 상실되었거나 세포막 자체가 완전히 파손되었음을 의미한다.

#### 2.5. 해당 활성의 변화

모든 미생물은 생육과 증식에 필요한 대부분의 에너지를 해당 과정을 통하여 얻어지는 ATP에 의존한다. 따라서 에너지를 얻는 대사 과정인 해당 활성은 세포의 생리적 상태를 알아보는 데 있어서 매우 중요한 의미를 갖는다. Fig. 4-122

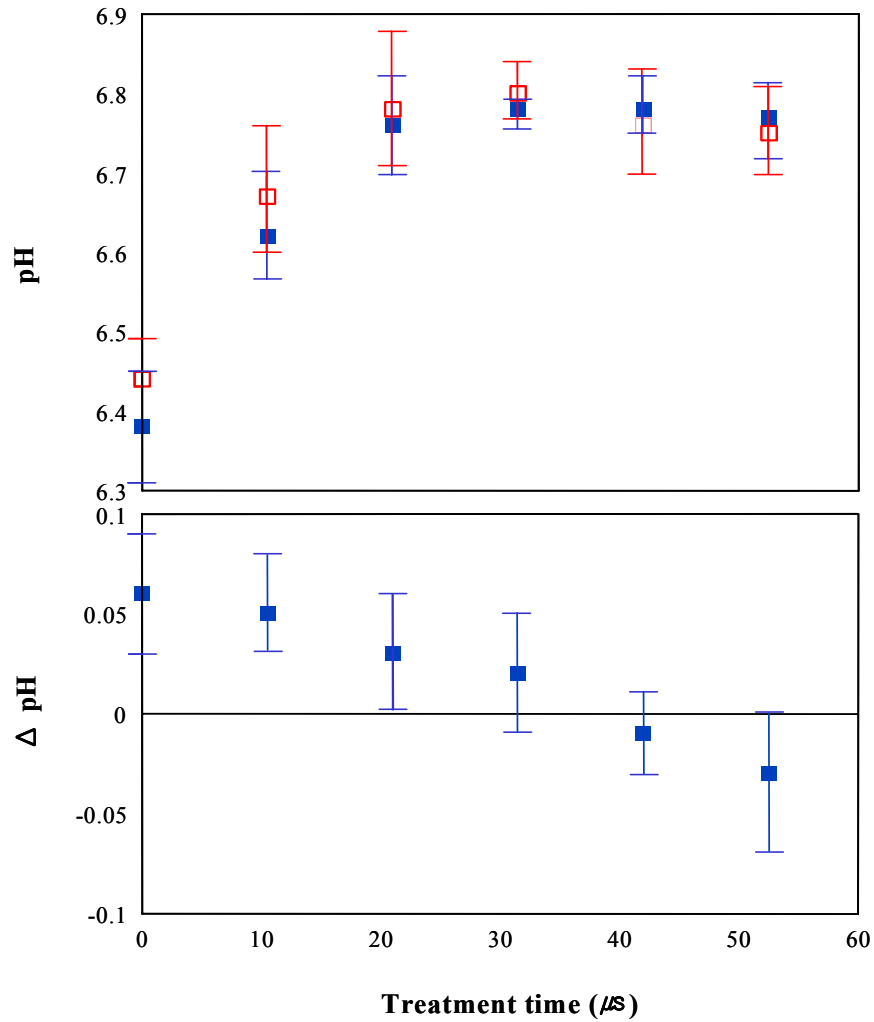


Fig. 4-121. Changes in pH of the suspensions before ( $pH_i$ ) and after ( $pH_f$ ) lysis of the cells treated with high voltage pulsed electric fields, and its difference ( $\Delta pH$ ). Experiments were carried out at 50 kV/cm and 40°C.

■  $pH_i$  ;                      □  $pH_f$

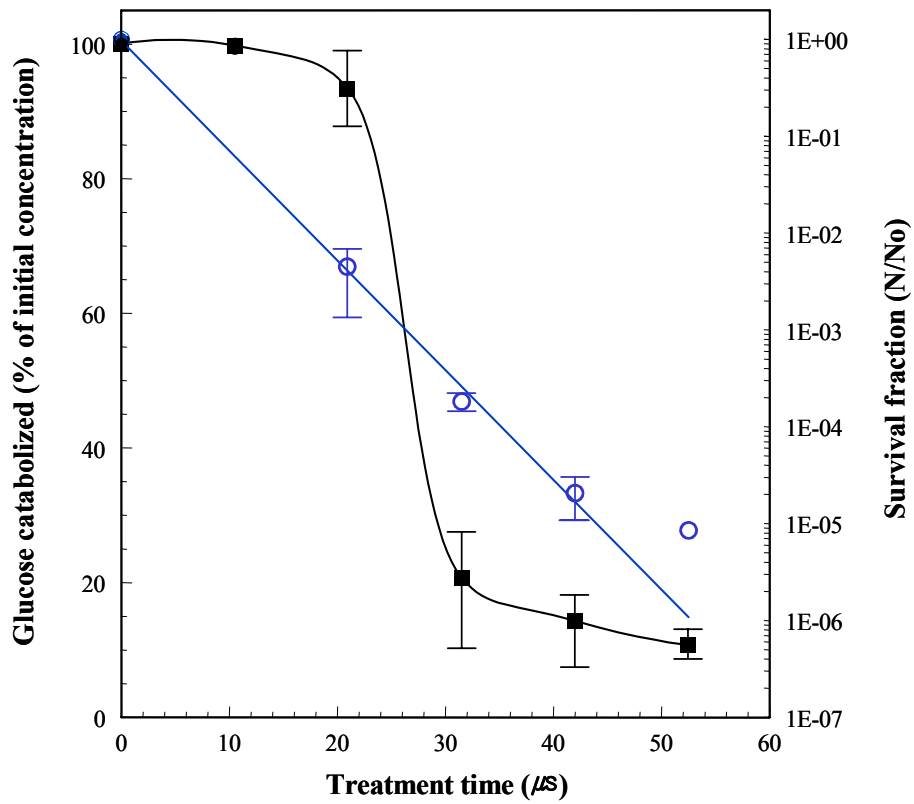


Fig. 4-122. Glycolysis activity of *S. cerevisiae* cells during high voltage pulsed electric fields treatment at 40°C and 50 kV/cm. The data indicate the percentage of glucose added initially that was catabolized after 2 h at 26°C.

■ Glycolysis      ○ Survival fraction of *S. cerevisiae*



에는 고전압 펄스 전기장 처리에 의해 *S. cerevisiae*의 해당 활성 변화와 생존수 감소 경향을 나타내었다. 고전압 펄스 전기장 처리 초반에는 해당 활성이 큰 변화가 없었으나, 약 30 $\mu$ s 처리 후에는 급격히 해당 활성이 손실되어 약 10~20%의 활성만을 나타내었다. 그러나 해당 활성이 변화되지 않았던 처리 시간 초기에 생존수는 약 2~2.5 log (99~99%) 감소하였다. 이러한 사실로 미루어 볼 때 해당 활성의 소실이 세포 사멸의 직접적인 원인으로 볼 수 없으며, 이러한 해당 활성의 감소는 세포의 고유 기능의 소실이나 항상성의 파괴로 나타나는 2차적인 현상일 것으로 생각된다.

## 2.6. H<sup>+</sup>-ATPase 활성 변화

미생물의 세포내 산-염기 농도 조절에 의한 pH 항상성 유지를 위해서 이온 성분의 수송, 유기산 이동, 대사산물 및 기질의 이동, 수소 이온 농도 구배 등 많은 인자가 관여한다. 또한 이는 기본적으로 세포막 자체가 보유하고 있는 외부 수소 이온의 세포내 유입 차단 능력 (membrane integrity)과 세포 내부로 들어온 수소 이온의 체외 배출 능력 (proton motive force, PMF)에 의해서 복합적으로 조절된다. 또한 세포막 integrity는 수소 이온의 유입 통로로 이용되는 세포막 표면의 lipid pitch 양, 단백질과 지질의 비율, 막 인지질의 지방산 조성등에 의해 영향을 받으며, proton motive force는 세포막에 결합되어 있는 H<sup>+</sup>-ATPase의 양과 고유 활성에 의해 크게 좌우되는 것으로 알려져 있다. 특히 H<sup>+</sup>-ATPase의 F<sub>0</sub>는 세포막에 결합되어 수소이온의 배출과 coupling되는 부위이고, F<sub>1</sub>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.

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 *S. cerevisiae*의 H<sup>+</sup>-ATPase 활성 변화를 확인하기 위하여 세포막 vesicles을 조효소액으로하여 처리 시간별로 활성을 측정하여 실험 결과를 Fig. 4-123에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성값은 처리 직후부터 급격히 감소하여 활성을 거의 나타내지 않았다. 즉 고전

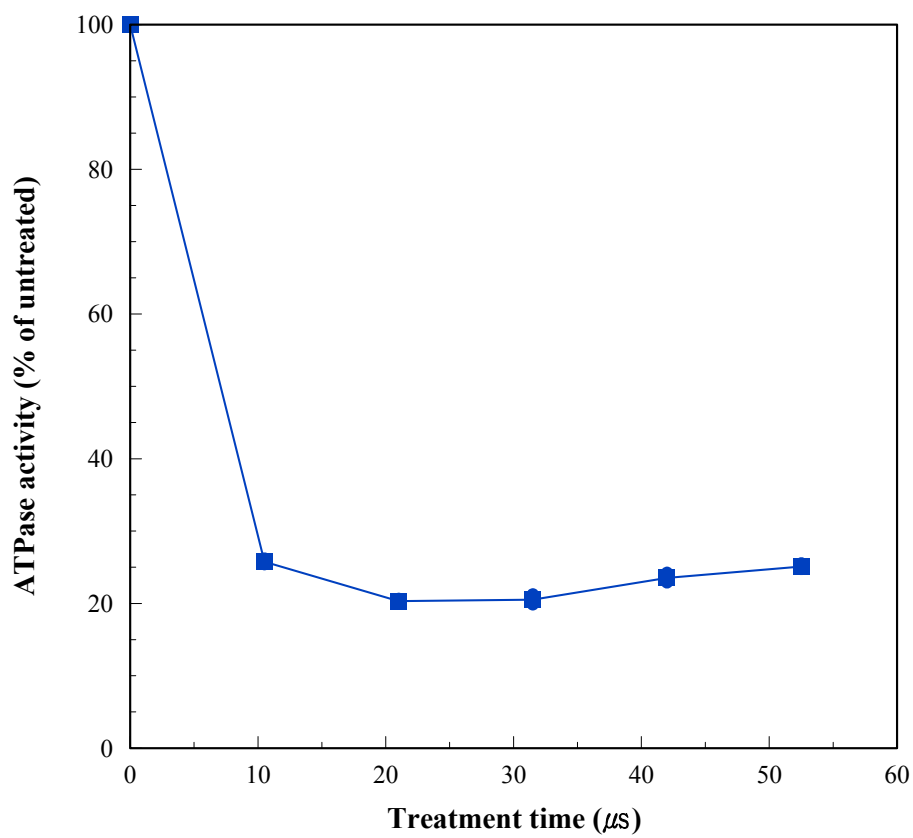


Fig. 4-123. Activity of  $\text{H}^+$ -ATPase in *S. cerevisiae* cells during high voltage pulsed electric fields treatment at  $40^\circ\text{C}$  and  $50\text{ kV/cm}$ . Enzyme activity was assessed with the membrane vehicles isolated from the cells.

압 펄스 전기장 처리를 받은 세포는 세포막의 ATPase의 활성 소실로 인하여 세포 내의 항상성을 유지 못하여 사멸하게 되는 것으로 생각된다.

## 2.7. 세포 염색

정상적인 세포는 외부에서 색소나 기타 다른 이물질이 유입되면 세포막이 이를 세포외로 배출시켜 원형질내에 축적되는 것을 방지할 수 있다. 몇몇 연구자들은 이에 근거하여 염색 시약을 사용하여 미생물 세포의 손상여부를 직접 확인할 수 있는 방법으로 사용하였다. 본 연구에서도 고전압 펄스 전기장 처리된 세포 현탁액과 무처리 세포 현탁액에 1% phloxine B 염색 시약을 1%(v/v) 첨가한 후 10분 후에 세포내로의 염색 시약의 침투 정도를 화상 분석기 (Diaphot 300, Nikon, Japan)를 통하여 관찰하였다. Fig. 4-124에서 보는 바와 같이 정상적인 세포는 침투된 염색 시약을 계속 배출하여 색소가 세포내로 유입되지 않았으며, 이를 통해 세포막의 기능이 정상적으로 작용하는 것을 알 수 있었다. 그러나 고전압 펄스 전기장 처리를 받은 세포는 처리 시간이 길어짐에 따라 점차 염색된 세포의 수가 많아지는 것을 알 수 있었다. 즉, 처리 시간이 길어짐에 따라서 세포막의 기능이 소실되거나 세포막 자체가 파괴되는 세포가 많아지는 것을 알 수 있다. 세포는 약 32  $\mu$ s 정도 처리를 받으면 거의 모든 세포가 염색되어 세포막이 파괴되어진 것으로 추정할 수 있다. 그러나 사멸 곡선을 보면 약 21 $\mu$ s 정도 처리를 받은 경우 세포가 약 1~2 log 정도 사멸한 것으로 나타난 반면 염색된 세포의 수는 이에 못 미치는 것으로 관찰되었다. 이는 세포의 사멸이 기존에 보고된 세포막의 파괴이외에도 다른 요인에 의해서 일어날 수 있음을 간접적으로 증명할 수 있는 것이라 할 수 있다.

## 2.8. 형태학적 변화

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 미생물의 형태학적 변화에 대한 연구 결과는 많은 연구자들에 의해 보고가 되고 있다. Pothakmury 등은 *Staphylococcus*

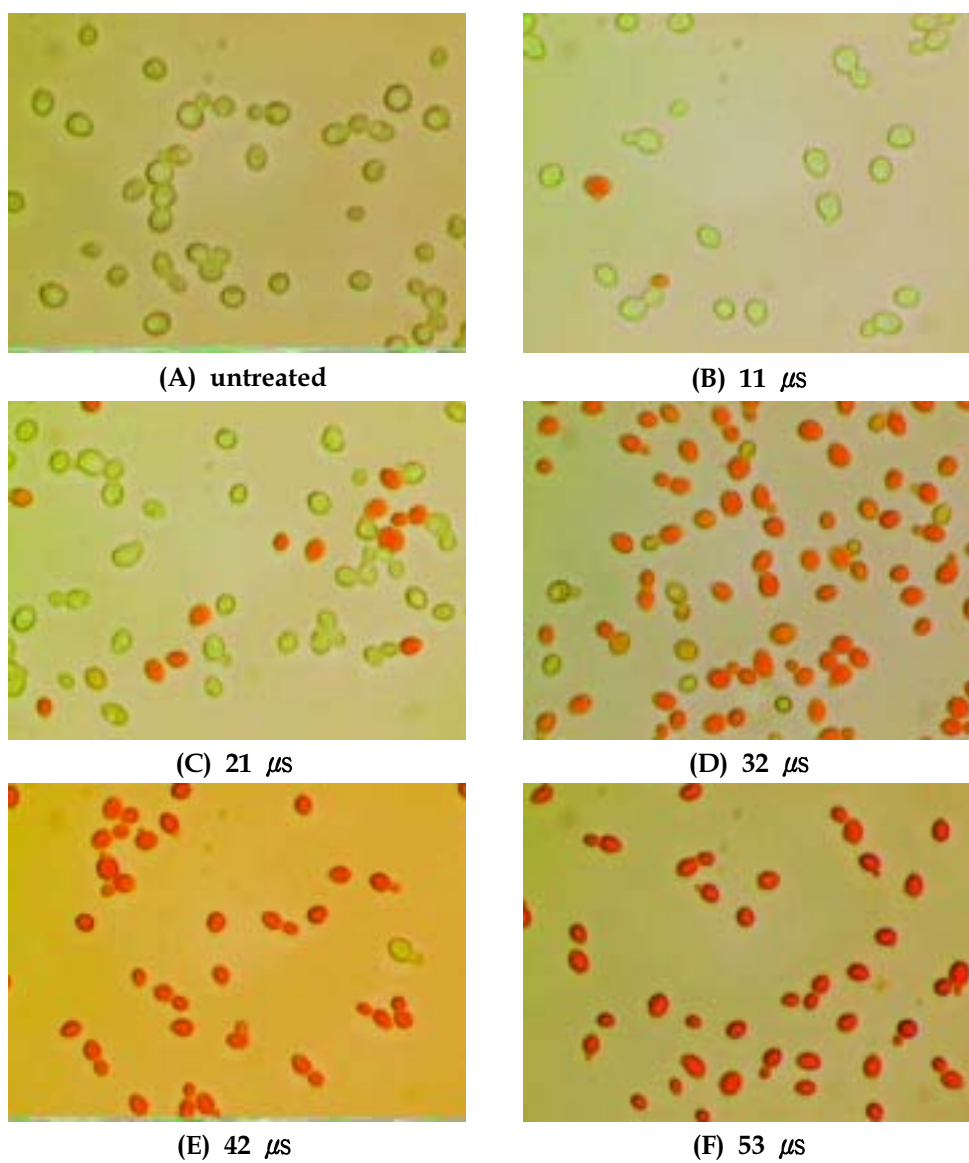


Fig. 4-124. Inclusion of Phloxine B in *S. cerevisiae* cells untreated (A) and treated with high voltage pulsed electric fields for 11~53  $\mu\text{s}$  at 40°C and 50 kV/cm.

*aureus*를 25℃, 60 kV/cm에서 64 pulse 고전압 펄스 전기장 처리한 후 전자 현미경으로 관찰한 결과 투과 전자 현미경에서는 세포가 터져 세포내의 물질이 외부로 유출되는 현상이 관찰되었으며, 주사 전자 현미경에서는 세포 표면이 불규칙적으로 바뀌는 것을 확인하였다. 또한 Caldreon-Miranda등도 *Listeria innocua*를 고전압 펄스 전기장 처리와 bacteriocin의 일종인 nisin과 병합 처리한 후 투과 현미경을 이용하여 세포의 형태를 관찰한 결과 표면과 세포 내 물질이 상당히 변화된 것으로 보고하였다. 본 실험에서는 50kV/cm, 40℃에서 53 $\mu$ s로 고전압 펄스 전기장 처리한 후 주사 현미경과 투과 현미경 관찰을 시도하였다. 주사 현미경 관찰 결과 처리하지 않은 세포는 표면이 매끄럽고 일반적인 효모의 형태인 구형의 모습을 보였다 (Fig. 4-125). 그러나 고전압 펄스 전기장 처리를 받은 세포는 처리 받지 않은 것에 비해 표면이 거칠고 굴곡이 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 강한 전기장에 의해 세포가 충격을 받았거나, 세포벽이나 세포막 내외에 전압차에 의해 물리적인 힘을 받아 형태의 변화를 일으킨 것으로 추측되며, 또는 세포 내 물질이 외부로 유출되면서 세포가 수축하면서 생긴 주름과 같은 형태의 것으로 추측된다. 한편, 투과 현미경 관찰에서는 처리를 받지 않은 세포는 세포 내 구성 물질, 즉 vacuole, cytoplasmic membrane, spindle reservoir, mitochondria와 같은 것들이 모두 관찰되었으며 세포의 형태도 일정한 구형의 형태를 보였다 (Fig. 4-126). 고전압 펄스 전기장 처리를 받은 세포는 세포벽과 세포질막사이의 구분이 불분명해진 것들이 다수 관찰되었으며, 전형적인 세포내 물질도 상당부분 유실된 것을 볼 수 있었다. 또한 세포의 형태도 일반적인 형태에서 벗어나 안으로 함몰된 구조를 가진것이나, bud scar부분이 터져 세포내 물질이 외부로 유출되고 있는 모습의 것도 관찰되었다. 그러나 세포막이나 세포벽의 형태가 변화가 없는 것도 다수 관찰되었다. 이는 고전압 펄스 전기장 처리에 의해 손상을 입은 세포 모두가 세포막이나 세포벽의 파괴에 의한 것이 아닌 세포막의 투과성 변화나 다른 부분의 손상에 의한 것도 존재할 수 있음을 의미한다.

## 2.9. 향생 물질을 이용한 손상 부위 측정

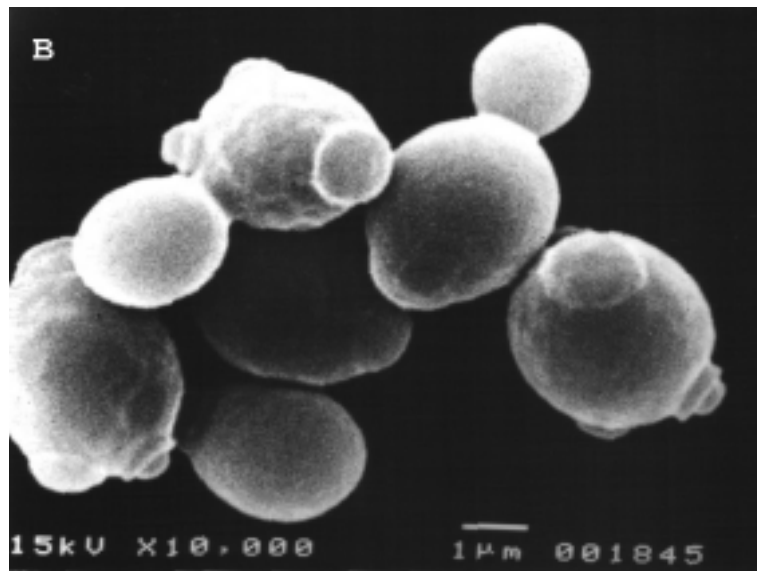
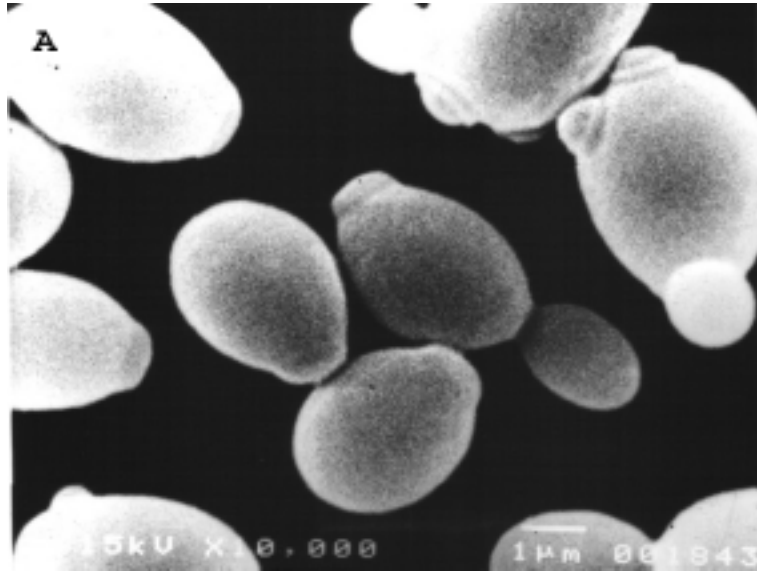


Fig. 4-125. Scanning electron micrographs of untreated *Saccharomyces cerevisiae* cells (A) and treated (B) with high voltage pulsed electric fields for 53  $\mu$ s at 40°C and 50 kV/cm. ( $\times 10,000$ )

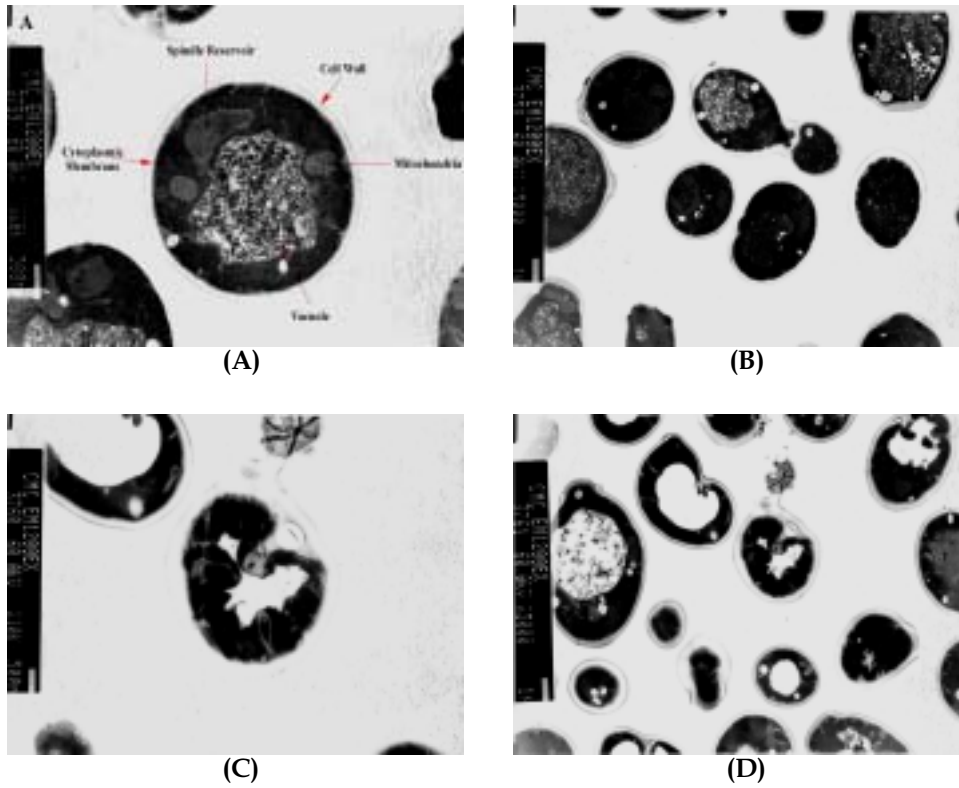


Fig. 4-126. Transmission electron micrographs of untreated *S. cerevisiae* cells (A, B) and treated (C, D) with high voltage pulsed electric fields for 53  $\mu$ s at 40°C and 50 kV/cm.

전자 현미경이나 광학 현미경을 통한 관찰 결과 사멸이나 손상을 입은 세포가 단지 세포막이나 세포벽의 파괴에 의한 것만으로 보기에는 형태학적으로 변화가 없는 세포가 다수 존재하여, 고전압 펄스 전기장에 의한 세포의 사멸내지는 손상이 세포막의 파괴 뿐만아니라 다른 대사 활동이나 세포 고유 기능에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 항생 물질이나 대사 저해 물질을 사용하여 세포의 특정 부위에 대한 고전압 펄스 전기장 처리의 영향을 연구하였다. 50 kV/cm, 40℃에서 53 $\mu$ s 처리한 세포를 10  $\mu$ g/ml (cylcoheximide는 2.5 $\mu$ g/ml)의 농도로 항생 물질이나 대사 저해 물질이 첨가된 YM 배지에 재접종하여 26℃에서 4시간동안 배양한 후 일정량을 PDA와 PDAS 배지를 사용하여 평판 배양을 통해 세포의 회복 정도를 확인하였다. 사용된 대사 저해 물질과 항생 물질은 cycloheximide, tunicamycin, amphotericin B, nikkomycin Z, cerulenin이다. Cycloheximide는 곰팡이나 기타 eucaryotes등의 단백질 합성을 저해하는 물질로서 ribosome의 translocation을 저해하여 단백질 합성의 진행을 저해한다. Tunicamycin은 *Streptomyces lysosuperrificus*에 의해 만들어지는 uracil, N-acetylglucosamin(GlcNAc)과 tunicamine이라는 amino sugar로 구성된 물질로서 bacteria에서는 teichoic acid의 합성을 방해하고, eucaryotes에서는 glycosylation 단계를 저해한다. Amphotericin은 *Streptomyces nodosus*가 생산하는 polyene 계통의 항생 물질로서 세포막의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다. Nikkomycin Z는 그 작용과 구조가 polyoxins과 유사한 항생 물질로서 chitin의 합성을 저해하여 세포벽 구성에 영향을 준다 (El-Sherbeini and Clemas, 1995). 또한 cerulenin은 지방산과 sterol의 합성을 저해하여 nikkomycin과 마찬가지로 세포벽이나 세포막의 구성에 영향을 미친다. 이러한 대사 저해 물질들을 신선한 배지에 첨가한 후 손상을 입은 세포를 접종하여 배양할 경우 각 대사 물질에 의해 저해 받는 부분이 손상을 입은 세포는 제대로 회복이 이루어지지 못하게 되고, 그 이외의 세포들은 정상적인 생육을 하게된다. Table 4-43에서 보는 바와 같이 고전압 펄스 전기장 처리를 받은 세포는 cycloheximide, cerulenin, nikkomycin



Table 4-43. Recovery of PEF-injured *Saccharomyces cerevisiae* at 26°C in YM broth containing different inhibitors

Inhibitor <sup>1</sup>	Recovery after 4 h(%)	SD
Control	93.2	7.6
Cycloheximide	33.0	4.7
Tunicamycin	79.7	9.6
Amphotericin	86.2	4.2
Nikkomycin	68.2	5.4
Cerulenin	60.0	2.5

<sup>1</sup> Inhibitor concentration : 10 µg/ml (except cycloheximide 2.5 µg/ml)

SD : standard deviation of % recovery in triplicate trials.

Z이 첨가된 배지에서 각각 33%, 60% 정도의 회복을 보였으나, tunicamycin이나 amphotericin이 첨가된 배지에서는 79.7%, 86.2% 회복되었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 고전압 펄스 전기장 처리에 의해 세포는 기존에 밝혀진 세포벽이나 세포막의 손상 (chitin 합성이나 sterol 합성 체계 손상)에 의해 사멸될 뿐만아니라 단백질 합성 체계에도 손상을 입은 것으로 예상된다. 따라서 단백질 합성 체계 중 어느 부분이 손상을 입었는지에 대한 연구가 더욱 필요할 것이다.

## 2.10. 효소 활성 변화

고전압 펄스 전기장 처리에 의한 효소의 불활성화나 활성화에 대한 실험 결과가 최근들어 보고되고 있다. Ho 등은 시판되는 peroxidase, alkaline phosphatase,  $\alpha$ -amylase, lipase, lysozyme, glucose oxidase, polyphenol oxidase, pepsin등을 5 ~ 26 kV/cm의 고전압 전기장으로 30 ~ 100  $\mu$ s 처리한 후와 처리하기 전의 효소의 활성을 비교하였다. 실험 결과 peroxidase, alkaline phosphatase,  $\alpha$ -amylase, lipase, glucose oxidase, lysozyme, polyphenol oxidase등 대부분 효소의 활성이 크게는 90%에서 작게는 5% 정도까지 감소되었으며, pepsin의 경우에만 활성이 증가하였다. Castro 등은 alkaline phosphatase를 약 70 kV/cm, 20 pulse로 고전압 펄스 전기장 처리한 결과 약 44% 활성이 감소한 것으로 보고하였다. Vega-Mercado 등은 plamin과 protease를 각각 40 kV/cm, 50 pulse 및 30 kV/cm, 20 pulse를 처리하여 각각 활성이 90% 및 70% 감소하였다. 최근에는 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  $\alpha$ -helix 구조가 변화한다는 사실을 보고하였다. 한편 Shin 등도 lipase를 50 kV/cm로 고전압 펄스 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 kit (Biomérieux, France)를 사용하여 효소활성 변화를 측정하였다. 40°C, 50 kV/cm로 고전압 펄스 전기장 처리한 균체와 무

처리 균체를 APIZYM kit에 접종하여 배양한 후 양성 반응을 나타낸 11가지 효소의 상대적 활성 변화를 관찰한 결과를 L, a, b값으로 Table 4-44에, 그리고 발색정도를 Fig. 4-127에 나타내었다. 표와 그림에서 알 수 있듯이 esterase (slight activation, SA), esterase lipase (slight inactivation, SI), lipase (SI), valine arylamidase (SI), phosphatase acid (SI) 등은 고전압 펄스 전기장 처리 전후의 효소 활성에 큰 변화가 없었으며, phosphatase alkaline, leucine arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -mannosidase 등의 효소는 활성화된 반면에, cysteine 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 나타났다. 효소가 활성화되거나 불활성화되는 기작에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없으나 앞선 연구자들에 의하면 고전압 펄스 전기장 처리가 효소의 구조적 변화를 가져와 불활성화를 일으키는 것으로 추측되며, 이에 대한 연구는 앞으로 계속 연구되어야 할 것이다.

#### 2.11. Chromosomal DNA의 손상

고전압 펄스 전기장에 의한 *S. cerevisiae*의 chromosomal DNA의 손상 정도를 알아 보았다. Chromosomal DNA가 손상되면 agarose gel 상의 DNA band가 smear되어 나타나게 된다. Fig. 4-128에서 보는 바와 같이, 고전압 펄스 전기장 처리를 받은 *S. cerevisiae*의 chromosomal DNA band가 smear되어 나타나는 것으로 보아 chromosomal DNA에 손상이 있음을 나타내고 있다. 고전압 펄스 전기장 처리에 의한 *S. cerevisiae*의 chromosomal DNA의 손상은 chromosomal DNA에 nick에 의한 것으로 추정된다.

#### 2.12. Ethidium bromide-fluorescence (EBF) 측정

Fig. 4-128에서 확인된 고전압 펄스 전기장 처리에 의한 chromosomal DNA의 손상 정도를 좀 더 정확히 알아보기 위해 fluorescence spectrophotometer

Table 4-44. Changes in enzymatic activities<sup>1</sup> of *S. cerevisiae* by high voltage pulsed electric fields treatment

Enzymatic activities	<i>S. cerevisiae</i> untreated			<i>S. cerevisiae</i> treated <sup>2</sup>		
	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

<sup>1</sup> assessed by APIZYM system

<sup>2</sup> treated with PEF for 53  $\mu$ s at 40°C and 50 kV/cm

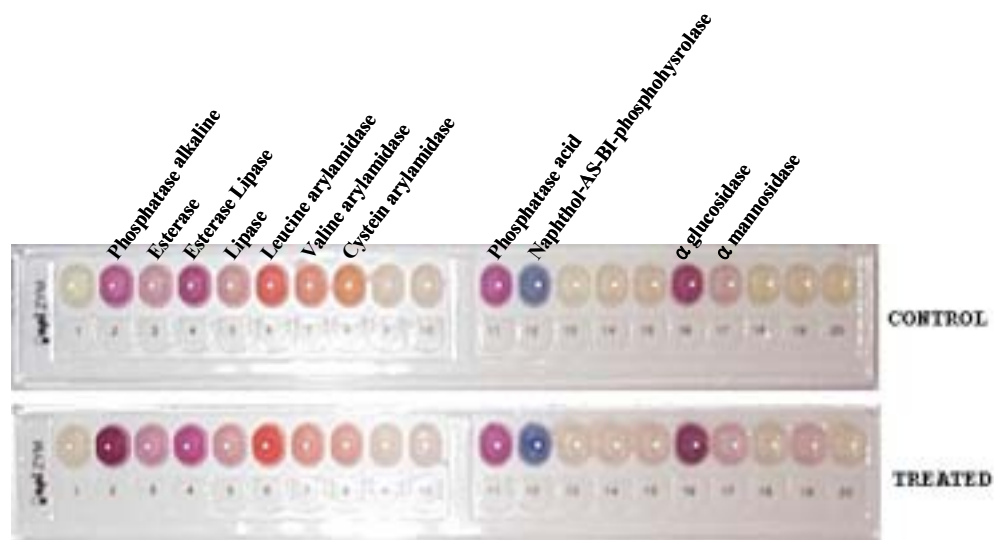
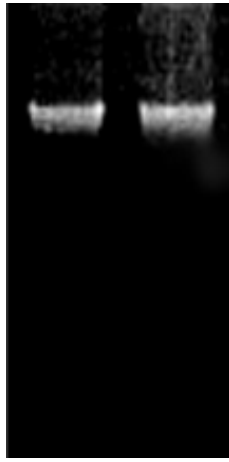


Fig. 4-127. Changes in enzymatic activities of *S. cerevisiae* by high voltage pulsed electric fields treatments. Experiments were carried out at 40°C and 50 kV/cm.



**A**      **B**

Fig. 4-128. Change in intracellular chromosomal DNA of *S. cerevisiae* by high voltage pulsed electric field treatment. Experiments were carried out for 53  $\mu$ s at 50 kV/cm, 40°C and pH 7.0 phosphate buffer.

A : untreated

B : PEF treated

를 이용한 ethidium binding assay를 수행하였다. Ethidium bromide (EtBr)는 duplex DNA에 삽입되어 형광 발색정도를 증가시킨다. 형광 발색의 정도는 DNA의 위상학적 특성과 양에 의해 달라진다. 만약 DNA가 손상되어 위상학적 특성에 변화가 일어나고, 재결합하는 능력이 손실되면 EtBr 형광 발색 정도가 감소된다. 따라서 사슬 절단에 의한 double strand DNA 손상 정도는 열을 가하지 않았을 때와 일정 온도의 열을 가하였을 때의 double strand DNA 사이에 끼어 들어간 ethidium bromide (EtBr)에 의해 발생하는 형광 발색 강도 (fluorescence intensity)의 비율을 서로 비교함으로써 DNA 손상 정도를 추정할 수 있다 (Lown, 1984). 고전압 펄스 전기장 처리를 하지 않은 세포 처리액의 열처리 전과 후의 intensity 비는  $1.08 \pm 0.04$ 로써 거의 변화가 없었으나, 처리 받은 세포 처리액은 열처리 전과 후의 intensity 비는  $0.78 \pm 0.03$ 으로 약 27.3%의 DNA가 손상된 것으로 추정되었다. 이 결과는 단순히 외부에서 세포에 가해진 전기장에 의해 유도된 세포막 전위차에 의하여 세포막이나 세포벽이 파괴되어 세포 기능이 손실됨으로 인하여 불활성화가 일어난다는 것 이외의 다른 기작이 밝혀지지 않은 상태에서 고전압 펄스 전기장이 DNA 수준까지 영향을 미친다는 새로운 사실을 알 수 있다.

## 제 5 절 Ohmic heating 및 Microwave를 이용한 해동 기술 개발

식생활의 변화에 따른 육류 소비의 증가와 수입 자유화 조치에 의한 축산물의 수입 규제 완화로 쇠고기, 돼지고기 등의 수입량이 매년 증가 추세에 있다. 수입육의 대다수는 동결육이며, 국내 생산육도 운반과 보관의 편리성 때문에 동결육의 비율이 높아지고 있다.

김치는 현재 사용되는 저장 방법으로는 장기 저장에 한계가 있으므로 김치 산업 발전과 더불어 대규모 생산을 위한 제조, 저장, 유통에 대한 체계적인 연구가 요구되고 있는 실정이다.

품질 변화의 주원인은 동결시 대형 빙결정 형성과 긴 해동 시간에 따른 미생물의 번식과 효소의 작용 등이므로, 식품의 저장성과 품질 유지를 확보하기 위해서는 급속 동결법과 급속 해동법에 대한 연구가 필요하다.

식품의 보존성을 향상시키는 방법으로 많이 사용되고 있는 식품 보존제의 사용도 위험성 문제가 증가함에 따라 그 사용이 점차 줄어들고 있는 추세이다. 이런 문제점들을 해결하기 위하여 기존의 방법들을 대체할만한 여러 가지 신기술들이 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 식품의 장기 보존을 위한 새로운 냉·해동 기술을 개발하고, 효과적으로 유해 미생물을 살균하면서도 식품 고유의 품질을 유지하는 새로운 비열가공기술을 개발하기 위하여 ohmic heating과 microwave, PEF를 이용한 접근방법을 통해 연구를 수행하였다.

### ▶ Ohmic Heating을 이용한 동결육의 해동

기존의 수해동이 해동에 오랜 시간이 필요하다는 점과 이로 인해 야기되는 drip loss, 해동품의 품질저하 등의 단점을 개선하기 위해 실험실 규모의 ohmic heating과 수해동을 병용한 장치를 고안하여 전압, 주파수, 용기 내 물의



온도가 동결육의 해동시간과 해동후의 품질에 미치는 영향을 고찰하였다.

▶ 915 MHz Microwave를 이용한 동결육의 급속 해동

동일 제품에 2,450 MHz와 915 MHz microwave를 적용하여 해동 후의 품질 특성을 비교함으로써 915 MHz microwave가 열전도를 이용한 기존의 해동 방법에 비해 얼마나 해동시간을 단축시키고, 2,450 MHz microwave의 침투 깊이 제한에서 오는 품질 저하를 얼마나 방지할 수 있는지를 연구하였다. 또한, 915 MHz microwave의 출력이 해동에 미치는 영향을 조사하였으며, 915 MHz microwave와 열풍을 함께 사용하여 해동을 실시하고 품질 특성을 살펴보았다.

▶ 동결 및 해동 방법이 동치미의 품질에 미치는 영향

동치미의 저장 중 산패 및 조직의 연화를 방지하기 위하여 동결 저장 공정을 적용하였고 동결 및 해동 시 품질의 변화를 최소화하기 위해서 액체 질소를 이용한 급속 동결 및 915 MHz microwave oven을 이용한 급속 해동을 실시하여 동치미의 품질 지표인 pH, 미생물, 효소, 조직감, 색도 등에 미치는 영향을 조사하였다.

## 제 1 장 Ohmic heating을 이용한 동결육의 해동

### 1. 실험 재료 및 방법

#### 1.1. 실험 재료

실험에 사용된 재료는 돼지고기 뒷다리 정육 (pork, fresh ham)으로 (주)미원농장에서 구입하였다. 도살 24시간 후에 뒷다리 정육을 분리하여 PVC 필름으로 포장하였고, 4℃에서 48시간 예냉한 후 -25℃에서 동결시키면서 심부온도가 -20℃에 도달하였을 때 동결을 완료하였다. Rolling saw (Universal Prometal, Krups, Germany)를 사용하여 정육면체 (10×10×10 cm)로 성형한 후 -20℃ 냉동

고에서 보관하였다.

## 1.2. 실험 장치

실험에 사용한 ohmic 수해동 장치는 자체 제작하였으며 그 개략도는 Fig 5-1에 나타내었다. 윗면이 개방된 acryl box (12×12×12 cm)에 stainless-steel 전극 (10×10 cm)을 양쪽 벽면에 설치하여 수해동 또는 ohmic 수해동(ohmic heating과 수해동을 병용한 해동)을 위한 용기로 사용하였다. Ohmic heating을 위한 전원 공급 장치로 주파수 발생기 (PM 5191, Philips, France)와 증폭기 (4510, NF Electronics, Japan)를 사용하였다. 온도 측정에는 전류의 영향을 받지 않도록 Teflon으로 코팅된 T-type의 온도계(Type IT-18, Physitemp Instruments Inc., U.S.A.)를 사용하였고, 전류는 ammeter (80i-110S, Fluke, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다. 전압 측정과 측정된 자료의 저장은 PC가 연결된 data logger (2620A, Fluke, U.S.A.)를 이용하였다. Ohmic 수해동 용기 내 물의 온도를 일정하게 하기 위해 cooling water circulator (MC-11, Jeio Tech, Korea)로 일정 온도의 물을 순환시켰으며, roller pump (Eyela RP-1000, Rikakikai, Japan)로 용기에 공급되는 물의 유속을 조정하였다.

## 1.3. 해동 방법

수해동은 전압을 걸지 않은 채 용기 내 물의 온도를 20℃ 또는 10℃로 고정된 후 육괴의 심부 온도가 -1℃에 도달하였을 때 해동을 완료하였다. Ohmic 수해동은 60 Hz~60 kHz까지의 주파수에서 극간 전압을 60 V~210 V까지 변화시켜서 적용하여 육괴의 심부 온도가 -1℃에 도달했을 때 해동을 완료하였다. 이 경우도 용기 내 물의 온도를 20℃ 또는 10℃로 달리하여 실험하였다.

## 1.4. Drip loss 측정

해동중 발생하는 육즙의 손실정도를 알아보기 위해 동결육의 해동 전·후의 무게를 비교하여 나타내었다.

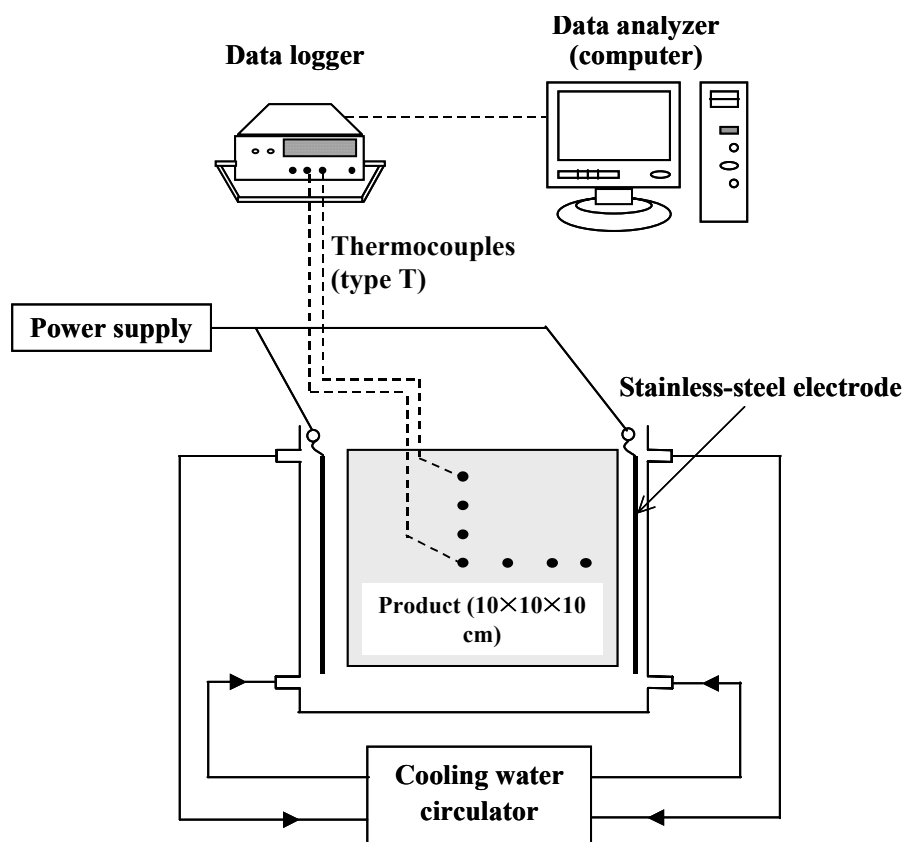


Fig. 5-1. Schematic diagram of experimental set-up.

## 1.5. 보수력 측정

해동이 끝난 육을 마쇄하여 잘 혼합한 다음 25 g의 시료를 취하여 원심 분리관 상부의 fritted glass disk 위에 채우고, 고무마개를 한 다음 70℃의 열탕조에서 30분간 가열하고, 25℃에서 10분간 식힌 후, 상온에서 170×g로 10분간 원심 분리하여 원심분리관의 하부에 분리된 육즙의 양을 읽었다. 이때 상부에 뜨는 지방층은 무시하였으며, 총 수분량을 측정하기 위하여 동일한 재료를 5~6 g 취하여 105℃ 오븐에서 16시간 건조하였다.

## 2. 실험 결과 및 고찰

### 2.1. 전압이 해동시간에 미치는 효과

-20℃로 동결된 정육면체 (10×10×10 cm) 형태의 돈육을 20℃의 물이 흐르는 용기에 위치하고 상용 주파수인 60 Hz에서 전압을 달리하여 ohmic heating 하였다. 중심부의 온도가 -1℃에 이르렀을 때 해동을 완료하였다. 전류를 흘려주지 않고 20℃로 물의 온도를 유지한 일반적인 수해동은 205.1 min이 걸린 반면, 전압이 60 V, 110 V, 160 V, 210 V 증가함에 따라, 해동에 걸리는 시간이 각각 154.2 min, 101.4 min, 79.3 min, 54.7 min으로 단축되었다 Fig. 5-2와 같이 전압의 증가와 해동시간 사이에 반비례 관계가 성립하는데 이는 ohmic heating에서는 전압이 driving force로 작용하므로 전기장의 세기가 증가할수록 가열속도가 빨라진다는 Kwak의 연구와 일치하였다. 160 V 이상의 전압을 걸어주었을 때 해동 완료시 표면 온도가 40℃ 이상으로 과열되어 가열감량, 단백질 조성의 변화 등 품질 저하가 예상되었다.

Ohmic heating시 시간에 따른 전류량의 변화를 Fig. 5-3에 나타내었다. 시간이 지남에 따라 전류의 양이 급격히 증가하다가 점차 일정한 양을 유지하는 것을 볼 수 있는데, 이는 얼음이 큰 저항체로서 작용하기 때문에 동결육중 이미 녹아서 저항이 낮아진 부분으로 전류가 선택적으로 흘러서 열을 발생시키기 때문이다. 이때 발생된 열은 얼음 경계면에 열을 공급하게 되어 연속적으로 새로운 열

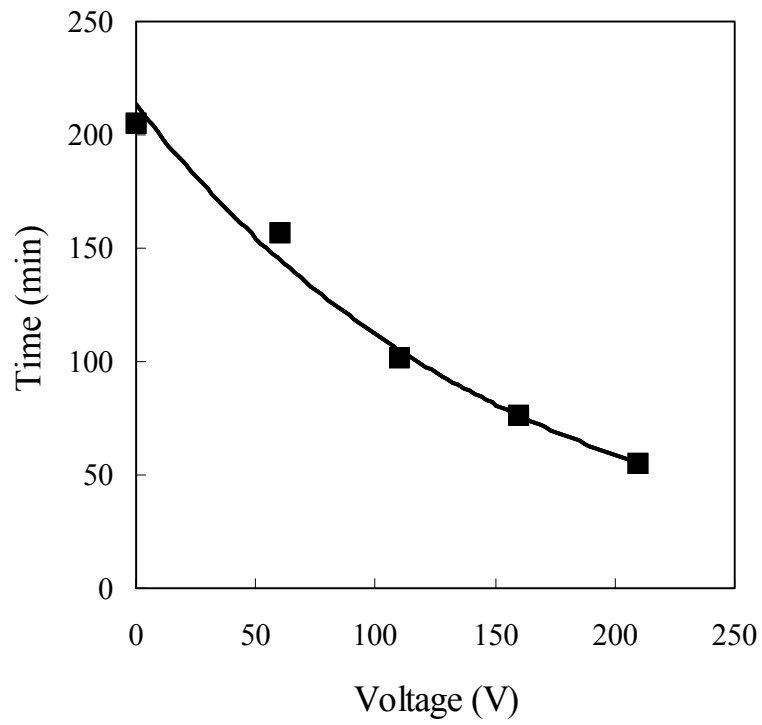


Fig. 5-2. Changes in thawing time with voltage of alternating current. Frequency of alternating current was fixed to 60 Hz and immersion water temperature at 20°C.

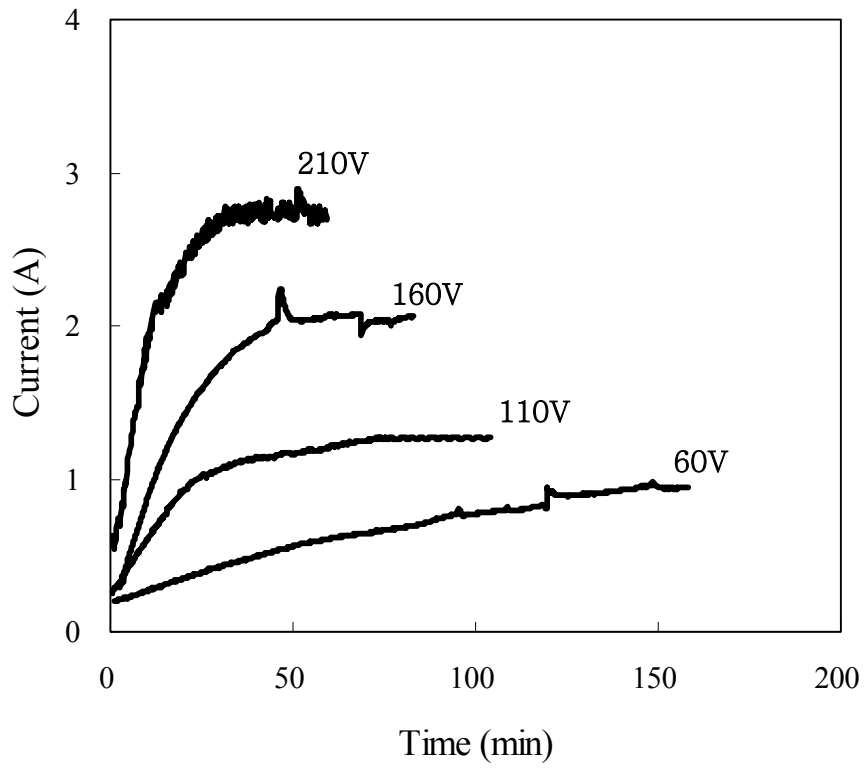


Fig. 5-3. Comparison of time-current curves with different voltage when frequency of alternating current was fixed to 60 Hz.

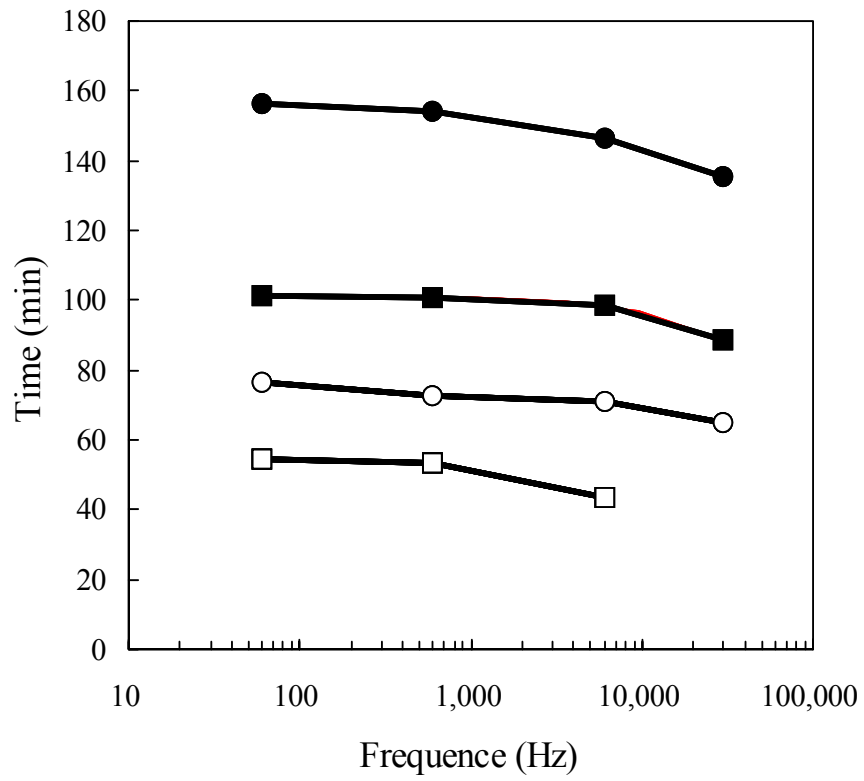


Fig. 5-4. Changes in ohmic thawing time with different frequency of alternating current.

공급원이 생기게 되고 얼음 경계면은 점차 중심부로 후퇴하게 된다. 이에 따라 전체적으로 저항값은 작아져서 전류량이 많아지게 된다. 이는 ohmic heating에 의한 해동시간의 단축효과를 설명할 수 있으며, 높은 전압에서 보다 높은 전류량을 나타내어 전압이 높을수록 해동시간이 단축되었다.

## 2.2. 주파수가 해동시간에 미치는 효과

주파수를 변화시키면서 동결육을 ohmic heating했을 때 해동시간의 변화를 Fig. 5-4에 나타내었다. 식품의 가열속도의 주파수 의존성은 식품 고유의 특성이라는 Cho 등의 보고와는 달리 주파수가 증가할수록 해동시간이 단축되는 경향이 있었는데, 이는 동결육이 얼음과 유사한 절연체로서의 특성을 나타내고 있기 때문으로 생각되었다. 한편 실험장치상의 제약으로 30 kHz (210 V의 경우는 6 kHz) 이상의 주파수는 검토하지 못하였으며 이 범위에서의 해동시간 단축 효과는 주목할 만 하지 않았다.

## 2.3. 용기 내 물의 온도가 해동에 미치는 효과

용기 내 물의 온도를 각각 20℃와 10℃로 고정된 후 동결육을 ohmic heating 하였을 때의 해동시간과 표면온도의 변화를 Fig. 5-5에 나타내었다. 외부 온도가 해동속도에 미치는 영향이 거의 없다는 Naveh 등의 보고와는 달리 물의 온도가 낮을 때 해동시간은 길어졌으며 표면온도는 낮아졌는데, 물의 온도가 낮은 경우 물로부터의 열전도 효과가 작아서 해동속도가 늦어지지만 해동이 진행되면서 ohmic heating에 의해 과열되는 부분을 냉각시켜 주는 작용을 하기 때문에 표면 온도는 낮아지는 것이라 생각되었다.

## 2.4. 해동시 drip loss와 보수력의 비교

해동시 발생하는 drip loss와 보수력을 Fig. 5-6에 나타내었다. Ohmic heating을 적용한 경우 낮은 전압에서는 drip loss가 적었고 보수력도 높았으며, 전압이 높아질수록 drip loss가 커졌고 보수력은 낮아졌다. 또한, 전반적으로 용기



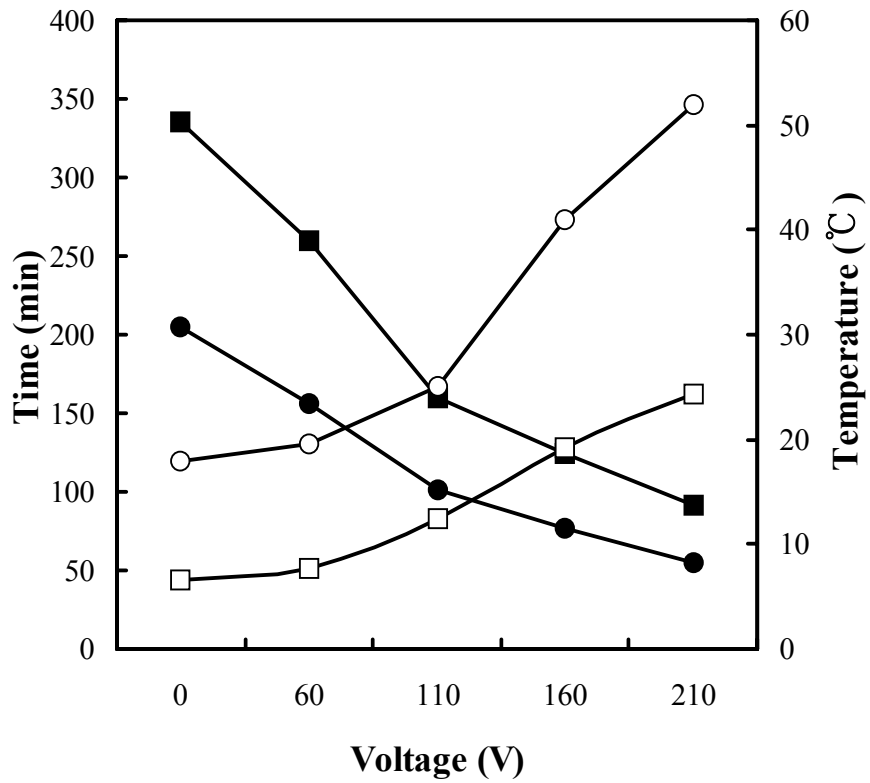


Fig. 5-5. Changes in ohmic thawing time and surface temperature of the samples when immersion water temperature was controlled at 10°C and 20°C. The frequency of alternating current was fixed to 60 Hz. ●-●: ohmic thawing time at 20°C, ■-■: ohmic thawing time at 10°C, ○-○: surface temperature of the sample at 20°C, □-□: surface temperature of the sample at 10°C.

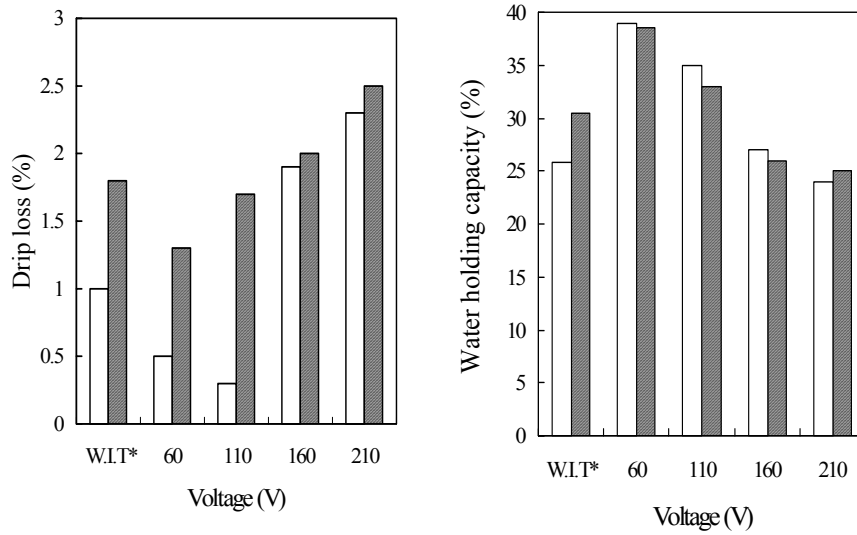


Fig. 5-6. Comparison of drip loss and water holding capacity with different voltage when frequency of alternating current was fixed to 60 Hz. □: when immersion water temperature was fixed at 10°C, ▨: when immersion water temperature was fixed at 20°C. \*W.I.T: water immersion thawing.

내 물의 온도가 낮을 때 drip loss가 적었고 보수력도 높았다. 낮은 전압에서는 ohmic heating에 의해 해동시간이 단축되어 육즙이 외부로 유출되는 시간이 줄어들었으나, 전압이 높아질수록 표면 온도상승에 의한 가열감량이 심해지면서 drip loss가 커졌다고 생각되었다.

## 2.5. 얼음 경계면의 변화

해동중 재료 각 부분의 온도를 측정하여  $-1^{\circ}\text{C}$  부분(얼음 경계면)이 변하는 과정을 Fig. 5-7에 나타내었다. Naveh 등이 보고한 것과 같이 전극과 수직인 부분이 평행한 부분보다 빨리 해동되는 것을 볼 수 있는데 이는 전류가 보다 흐르기 쉬운 곳을 찾아서 흐르는 성질에 기인한다. 전류가 전기전도도가 낮은 동결육 자체에 직접 흐르지 못하고 일부 녹아서 전기전도도가 높아진 부분으로 집중되기 때문이다. 전극의 개수와 위치를 조절하여 전류를 흘려주는 방향에 변화를 준다면 더 좋은 해동효과를 기대할 수 있으리라 생각되었다.

## 2.6. 대기중 ohmic thawing 효과

대기중( $20^{\circ}\text{C}$ )에서 ohmic heating 효과를 알아보기 위해 양쪽 전극판에 동결육이 직접 접촉되도록 하고, 60 Hz, 60 V의 전압을 걸어주었을 때의 해동 곡선을 Fig. 5-8에 나타내었다. 전류를 흘려주지 않고 대기 중에 방치한 경우 (공기 해동) 보다 빨리 해동되었으며, 해동 초기에는 수해동을 한 것보다도 중심과 표면과의 온도차이가 작았으나, 중심 온도가 약  $-3^{\circ}\text{C}$ 에 이르렀을 때부터 표면 온도가 급격히 상승하였다. 수해동에 ohmic heating을 적용한 경우 물을 통해 전류가 흐르기 쉬우므로 물과 접한 부분부터 가열되기 때문에 표면 온도가 쉽게 상승하지만, 대기 중에서 ohmic heating을 하는 경우에는 동결육 전체에 골고루 전류가 흐르다가 일단 표면의 일부가 녹아서 저항값이 작아지면 전류가 편중되어 표면 과열 현상을 보이기 때문이라고 생각되었다. 수해동과는 달리 물과 접촉하지 않기 때문에 물과의 접촉에 의한 품질 저하가 우려되는 재료의 반해동 ( $-5^{\circ}\text{C} \sim -3^{\circ}\text{C}$ 에서 해동을 완료)을 목적으로 하는 경우에는 적절한 방법이라 생각되나 완전해동을 위해

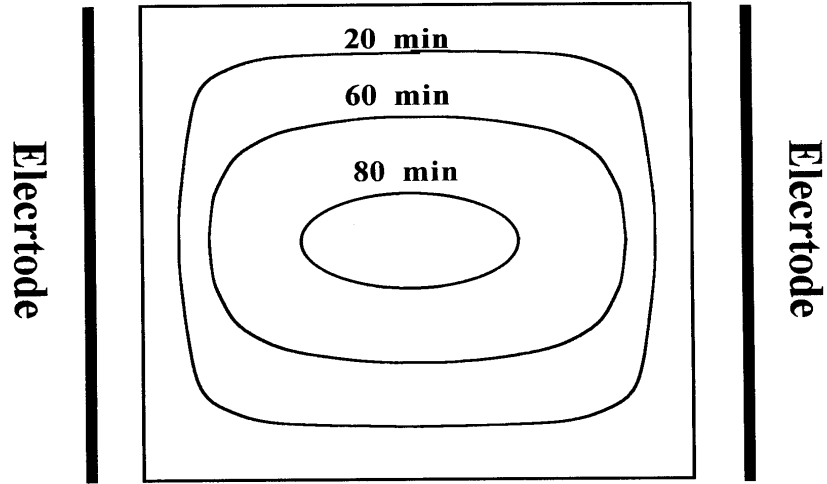


Fig. 5-7. Schematic drawing of ice front retreating pattern during ohmic thawing of frozen pork ham muscle (10×10×10 cm).

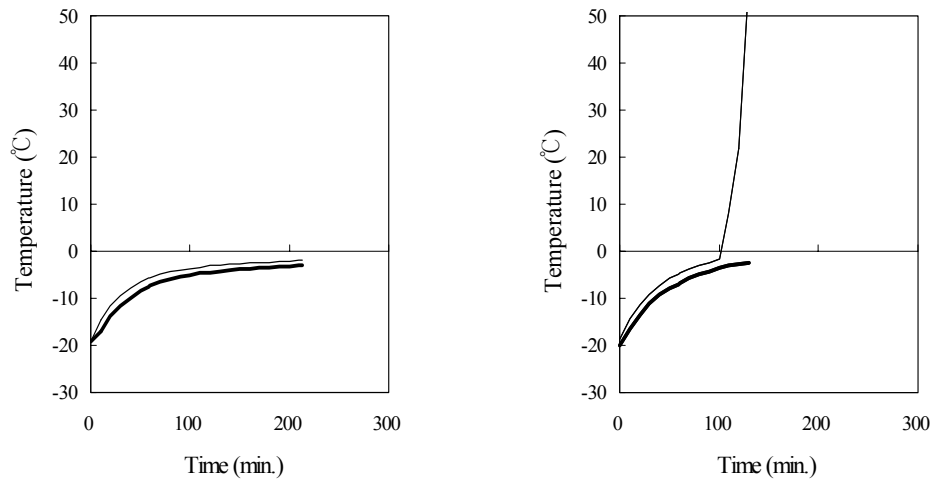


Fig. 5-8. Time-temperature curves during ohmic thawing (60 V, 60 Hz) without immersion water and conventional air thawing at 20°C. — : ohmic thawing, - - : conventional air thawing.

서는 표면을 강제로 냉각시키는 등의 개선책이 있어야 한다고 판단되었다.

### 3. 결 론

Ohmic heating은 식품에 교류 전류를 흘려줄 때 식품 내부에 전기 저항 열이 발생하는 것을 이용한 것으로, 이를 기존의 수해동법에 적용하여 해동시간의 단축과 그에 따른 품질 향상 효과를 연구하였다. 자체 제작한 ohmic 수해동 장치에 동결육(10×10×10 cm)을 넣고 해동 실험하였다. 윗면이 개방된 acryl box (12×12×12 cm)를 용기로 사용하였으며, stainless-steel 전극 (10×10 cm)을 양쪽 벽면에 설치하였다. 용기 내 물의 온도를 20℃ 또는 10℃로 고정하였다. 해동시간은 동일한 주파수 (60 Hz)에서 전압을 높여줄수록 (60 V~210 V) 단축되었으며, 수해동만을 한 경우에 비해 최고 1/4 이상 단축되었다. 동일한 전압에서 주파수가 높아질수록 (60 Hz~60 kHz) 해동시간이 단축되었으나 그 효과는 크지 않았다. 수해동만을 한 경우나 높은 전압을 적용한 경우보다 낮은 전압을 적용한 경우 drip loss가 적었고 보수력이 우수하였다.

## 제 2 항 915 MHz Microwave를 이용한 동결육의 급속 해동

### 1. 실험 재료 및 방법

#### 1.1. 실험 재료

원료 육은 미원 농장에서 사육한 삼원 교잡돈 ((LY×YL)×D, L: Landrace, Y: Yorkshire, D: Duroc-Jersey)으로서, 체중 100±5 kg의 규격 돈을 도살한 후 5℃에서 24 hr 예냉 후 진공 포장하여 냉장 저장한 대퇴부 (fresh ham muscle)를 사용하였다.

#### 1.2. 동결 방법

원료 육을  $-30^{\circ}\text{C}$ 에서 3일간 냉동 저장 후, 골절기 (HBS-200A, 한국후지공업, Korea)를 이용하여 정육면체 ( $10\text{ cm}\times 10\text{ cm}\times 10\text{ cm}$ )로 성형하고, 겉표면에서 5 cm 깊이가 되게 각각 표면부 (겉표면과 1 cm 간격)와 중심부 (겉표면과 5 cm 간격) 까지 drill로 구멍을 뚫고, thermocouple의 외경과 같은 크기의 내경을 갖는 Teflon tube를 삽입한 후,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 4일간 냉동 보관하였다.

### 1.3. 해동 방법

해동은 중심부 온도가  $-1^{\circ}\text{C}$ 에 도달하였을 때 해동을 완료하였다. 냉장 해동은  $4^{\circ}\text{C}$  냉장고에서, 상온 해동은 여름철 실내 온도인  $28^{\circ}\text{C}$ 에서 방치하였다. 오븐 해동은 drying oven (NO-600M, Jeio Tech, Korea)을  $50^{\circ}\text{C}$  온도로 고정하고 해동이 완료될 때까지 방치하였다.

Microwave oven을 이용한 해동방법을 위해 2,450 MHz (MPG-2050, 대원특수포장, Korea)와 915 MHz (MPG-9200, 대원특수포장, Korea)의 두 가지 주파수를 사용한 microwave oven을 이용하였다. 2,450 MHz의 microwave oven은 cavity 크기  $82\text{ cm}\times 70\text{ cm}\times 54.5\text{ cm}$ 이고, 1~5 kW의 출력을 낼 수 있는 시스템을 사용하였고, 915 MHz microwave oven은 출력 5~20 kW, cavity의 크기  $187\text{ cm}\times 154\text{ cm}\times 138\text{ cm}$ 이며, microwave를 고루 분산시키기 위해서 cavity의 위쪽에 stirrer가 부착되어 있고,  $120^{\circ}\text{C}$ 의 열풍을 불어 넣어 대류가열을 병용할 수 있는 시스템을 사용하였다 (Fig. 5-9). 온도 측정은 2,450 MHz와 915 MHz의 주파수에서 5 kW의 출력으로 일정 시간 간격으로 microwave를 조사한 후에 전원을 차단하고, 중심과 표면의 일정 부위에 미리 삽입한 Teflon tube를 통해 Teflon 코팅된 T-type의 thermocouple (Type IT-18, Physitemp Instruments Inc., U.S.A.)을 삽입하여 thermometer (HI 93530, Hanna instrument, Singapore)로 온도를 측정하였다. 중심 온도가  $-1^{\circ}\text{C}$ 가 되는데 걸리는 시간을 해동 완료 시간으로 하였다. 측정된 자료의 저장은 PC가 연결된 data logger (2620A, Fluke Co., U.S.A.)를 이용하였다.

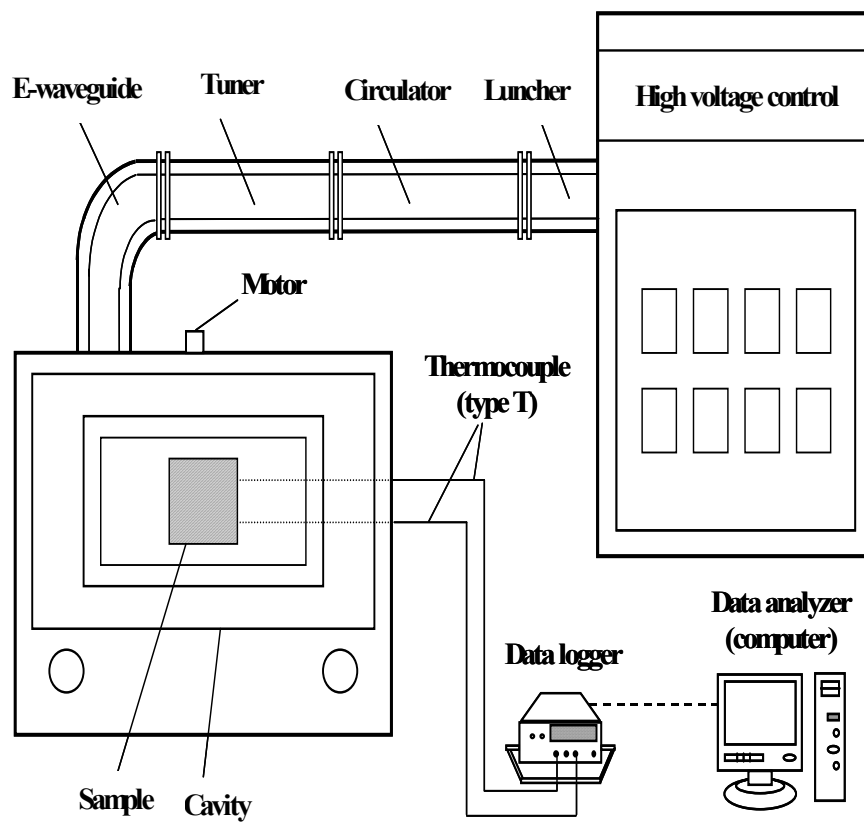


Fig. 5-9. Schematic diagram of 915 MHz microwave oven.



#### 1.4. 분석 방법

Drip 손실 측정은 Lambert 등의 방법으로 측정하였고, 보수력 측정은 Wierbicki 등의 방법으로 측정하였으며, 색도 측정은 Hunter system에 따르는 색차계(Chromameter CR200, Minolta Co., Japan)를 이용하여 sample의 표면을 10회 반복하여 L-, a-, b-value를 측정하였으며 total color difference 값은  $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{0.5}$ 로 계산하였다. 총 세균수의 측정은 이와 정의 방법으로 표면에 존재하는 미생물의 수를 검사하였다. 이 때 37°C 배양기에서 2일간 배양한 후의 집락수를 측정하였으며, 집락수는 1 cm<sup>2</sup>당 세균수로 나타내었다.

## 2. 실험 결과 및 고찰

### 2.1. 해동 방법에 따른 해동 시간 및 온도 분포

열전도에 의한 해동 방법과 microwave oven을 이용한 해동 방법의 해동 소요 시간을 관찰하였다. 열전도에 의한 해동 방법은 4°C (냉장 해동), 28°C (상온 해동), 50°C (오븐 해동)을 실시하였고, microwave를 이용한 해동 방법은 2,450 MHz와 915 MHz의 microwave oven을 이용하여 각각 5 kW의 출력으로 비교하였다. Fig. 5-10에는 냉장 해동, 상온 해동, 50°C 해동에서의 시간-온도 곡선을 나타내었다. 중심부의 온도가 -1°C에 도달하는 시간을 해동 시간으로 한 결과, 4°C 해동을 이용한 경우는 18시간, 28°C 해동은 6.5시간, 50°C 해동은 5시간이 소요되었다. 또한 해동이 완료되었을 때의 표면부의 온도는 4°C 해동이 -0.6°C, 28°C 해동이 14°C, 50°C 해동이 22°C이었다. 따라서 열전도에 의하여 해동이 이루어지는 차례적인 해동 방법에 의하면 해동이 이루어지는 해동실의 온도가 낮은 경우에 해동에 오랜 시간이 소요되지만, 중심부와 표면의 온도 차이가 적어져 균일한 온도 조성의 해동 육을 얻을 수 있었다. 반면, microwave oven을 이용한 경우의 해동은 차례적인 방법에 비하여 해동속도에 대해서 현격한 효과가 있었다. Fig. 5-11

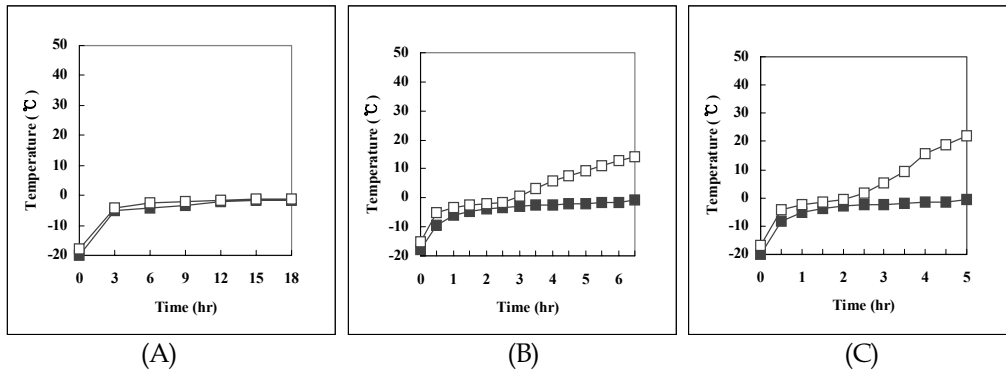
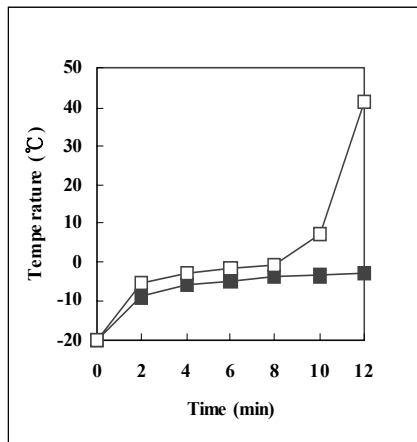
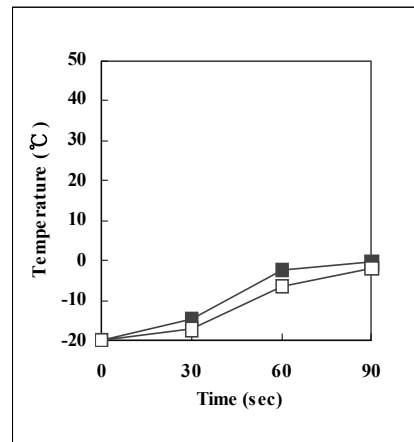


Fig. 5-10. Time-temperature curves of frozen pork ham muscle (10 cm×10 cm×10 cm). (A) 4°C thawing, (B) 28°C thawing, (C) 50°C thawing.

■: center temperature, □: surface temperature.



(A)



(B)

Fig. 5-11. Time-temperature curves of frozen pork ham muscle (10 cm×10 cm ×10 cm). (A) 2,450 MHz microwave thawing, (B) 915 MHz microwave thawing, ■: center temperature, □: surface temperature.

에 2,450 MHz microwave와 915 MHz microwave를 이용하여 5 kW의 power에서 실시한 해동의 시간-온도 곡선을 나타내었다. 주파수 2,450 MHz의 microwave oven을 이용한 경우는 8분이 지나자 중심부는 -3.9℃, 표면부는 -0.7℃에 도달하였으나, 12분이 경과한 후 중심부는 -2.6℃, 표면부는 41℃까지 상승하였다. 이미 얼음이 녹아 물이 된 표면부에 microwave 에너지가 집중되어 계속 표면 온도가 상승 하지만 녹은 부분에 의하여 microwave의 침투 깊이가 제한되면서 표면은 수분의 건조에 의한 경화와 부분적인 burning 현상을 보인다. 따라서, 표면이 경화된 후 중심부의 온도 상승은 열전도에 의존하게 된다. 915 MHz의 microwave oven을 이용한 해동은 1분 30초만에 중심부가 -1℃에 도달하였고, 이 때 표면부의 온도는 -2.0℃였다. 이와 같이 표면부의 온도가 중심부 온도 보다 낮은 것은 실험한 동결육의 형태적 특징 (10 cm×10 cm×10 cm 정육면체)에 의하여 915 MHz의 microwave가 중심부에 집중된 것으로 생각되었다. 동일 물질에서의 침투깊이는 주파수에 반비례하고, 주파수는 손실계수에 영향을 주므로 상용되는 2450 MHz와 비교할 때 주파수가 낮은 915 MHz가 해동에 적합함이 확인되었다. 또한 동일 power 적용시 2,450 MHz에서 해동에 장시간이 소요된 이유는 2,450 MHz microwave oven의 cavity size가 작았고 stirrer가 없기 때문에 공진 형태가 많지 않아 효과적으로 파를 분산하지 못했기 때문인 것으로 추정되었다.

## 2.2. 해동 방법이 drip 손실에 미치는 영향

Drip이란 해동시 액체가 육조직에서 분리되어 흘러나오는 것으로 동결, 저장, 해동시에 발생한 근세포의 손상 정도를 나타내며, 절단한 고기 크기와 모양, 표면적 대 중량의 비율, 혈관의 양 등에 의해 영향을 받는다. 해동시 drip 손실은 수분활성도를 낮추며 저분자량 화합물을 방출, 영양분을 제공하여 미생물이 다시 성장하도록 돕는 역할을 한다. 동결 저장 기간이 길어질수록, 저장 온도가 높을수록 단백질의 변성이 많이 일어나 drip 손실의 양은 증가한다. Fig. 5-12에 각 해동 방법에 따른 drip 손실을 나타내었다. 4℃ 해동은 0.41%, 28℃ 해동은 2.24%, 50℃ 해동은 4.42%로 열전도에 의한 해동 방법은 해동 온도에 비례하여 drip 손실이 증

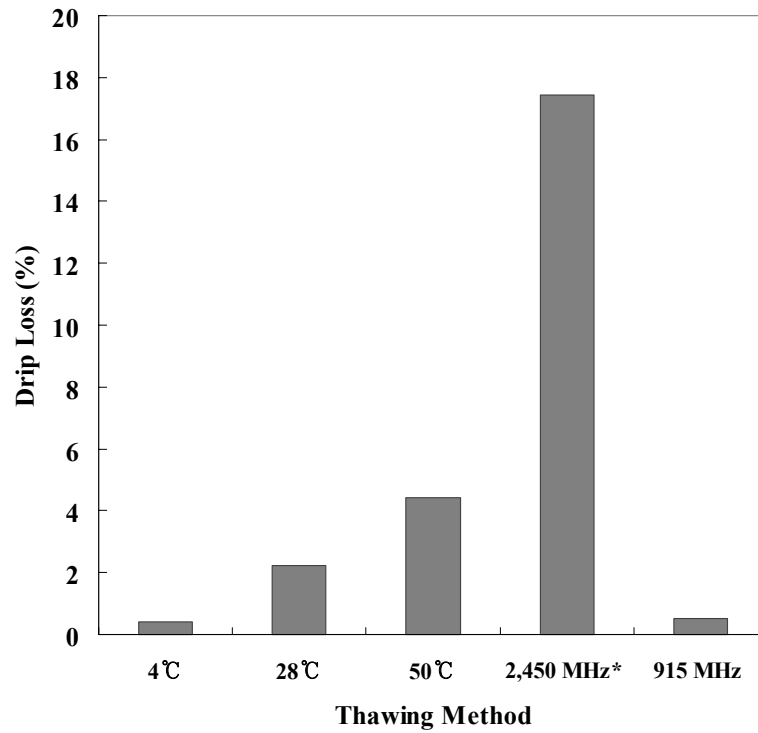


Fig. 5-12. Effect of various thawing methods on drip losses (%) in pork ham muscle (10 cm×10 cm×10 cm). For 2,450 MHz microwave oven, thawing was completed when the center temperature of sample reached to -2.6°C.

가하였다. 2,450 MHz microwave를 이용한 경우는 microwave의 침투 깊이 제한으로 중심부의 온도가 -1℃에 도달하기도 전에 표면에 에너지가 집중되면서 과열되어 drip 손실이 17.45%이었다. 따라서 2,450 MHz microwave는 대형 sample의 해동에는 이용에 많은 어려움이 있으며, 과열을 막기 위한 표면 냉각 시스템이 필요함을 알 수 있다. 반면, 915 MHz microwave를 이용한 해동은 동일 출력에서 0.52%로 4℃ 해동과 거의 비슷한 정도의 drip 손실을 보였다.

### 2.3. 해동 방법이 보수력에 미치는 영향

해동 방법에 따른 보수력을 Fig. 5-13에 나타내었다. 4℃ 해동의 경우 72.5%를 보였고, 28℃, 50℃로 해동 온도가 높을수록 보수력이 낮아져서 50℃ 해동의 경우 65.0%의 보수력을 보였다. 일반적으로 해동 온도가 높고, 해동육 자체의 표면 온도가 높을수록 보수력은 낮아지는데 해동 속도가 빠르면 근육 단백질의 세포간에 유리되었던 수분을 재흡수할 시간이 부족하기 때문이다. 2,450 MHz microwave를 이용한 해동의 경우 표면의 과열에 의한 단백질 변성으로 보수력이 61.3%로 가장 낮았다. 반면, 915 MHz의 microwave를 이용한 해동은 보수력이 75.6%으로 가장 높은 보수력을 보였다.

### 2.4. 해동 방법이 해동육의 표면 색에 미치는 영향

Table 5-1에 비동결육, 동결육, 그리고 해동방법에 따른 해동육의 표면 색도 측정 값을 나타내었다. 비동결육은 a-value가 10.84로 가장 높고, b-value는 2.76으로 가장 낮았다. 반면 동결육에서는 L-value가 53.26으로 가장 높았고, a-value는 9.25로 낮았으며, b-value는 비교적 높은 4.76의 값을 나타냈다. 50℃ 해동의 경우 L-value가 높았고 a-value는 5.88로 가장 낮았다. 2,450 MHz microwave 해동은 중심부가 완전 해동이 이루어지지 않았지만 표면의 과열로 burning이 되어 yellowness가 가장 높았다. 915 MHz microwave를 이용한 해동의 a-value는 가장 비동결육과 유사하였다. 전체적인 색의 변화 ( $\Delta E$ )를 비동결육을 대조구로 하여 비교하였다. 대조구와 비교하여 색의 변화가 클수록  $\Delta E$  값도 증가

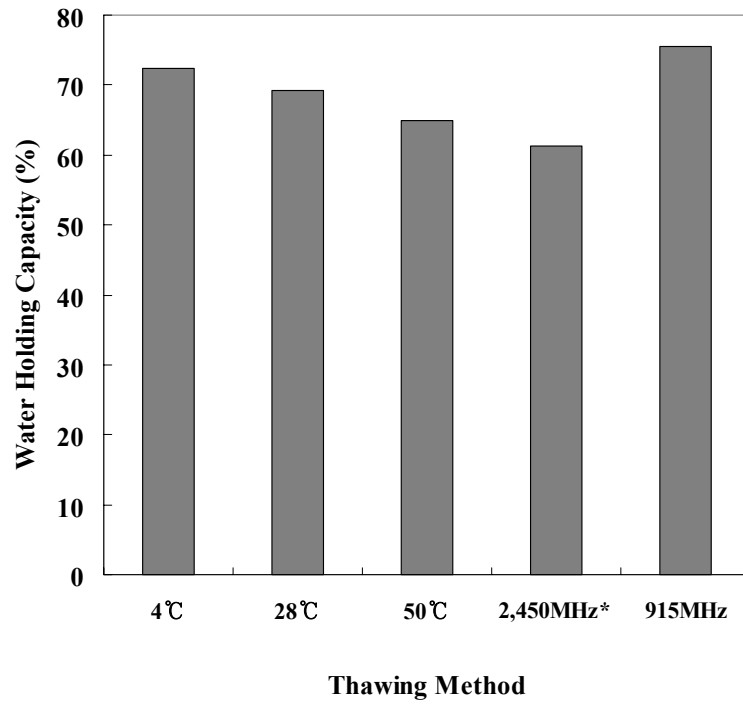


Fig. 5-13. Effect of various thawing methods on water holding capacity (%) in pork ham muscle (10 cm×10 cm×10 cm). For 2,450 MHz microwave oven, thawing was completed when the center temperature of sample reached to -2.6°C.

Table 5-1. Effect of thawing methods on total color difference when the value was calculated as  $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{0.5}$

Treatment	L-value	a-value	b-value	$\Delta E$
Unfrozen	48.07	10.84	2.76	0
4 °C thawing	46.89	10.40	5.31	2.84
28 °C thawing	43.76	8.96	3.48	4.76
50 °C thawing	51.34	5.88	3.69	6.01
2,450 MHz MW <sup>1)</sup> thawing	50.78	9.05	11.28	9.12
915 MHz MW thawing	43.56	10.80	4.00	4.68

<sup>1)</sup>Microwave.



한다. 전체적으로 해동 방법에 따라 4℃ 해동에서 전체적인 색변화가 가장 작았으며, 915 MHz microwave를 이용한 해동 방법은 4℃ 해동 다음으로 낮은 값을 나타냈고, 28℃ 해동과 거의 차이가 없었다. 그러나 50℃에서의 해동은 6 이상의 값을 나타내어 전체적인 색의 변화가 컸고, 2,450 MHz microwave를 이용한 해동은 9 이상의 값을 나타내어 색변화가 가장 심하게 나타났다.

## 2.5. 해동 방법이 총 세균수에 미치는 영향

Table 5-2에 해동 방법에 따른 총 세균수를 나타내었다. 동결 직후 총 세균수는 0이었으며, 해동 후 총 세균수는 증가하였다. 28℃ 해동보다는 50℃ 해동에서 미생물의 수가 더 적은데, 이것은 급속 해동이 저속 해동보다 재결정의 성장을 방지하고, 미생물이 고염농도에 노출되는 시간을 줄일 수 있기 때문이며, 냉장 해동의 경우는 해동실 온도가 낮아 반응 속도를 낮추어 미생물의 성장을 지연시킨 것이라 추정되었다. 미생물의 성장을 결정하는 가장 중요한 인자로는 해동된 고기의 저장 온도로서 0~3℃가 바람직하다. 일반적으로 microwave는 세균 세포 및 포자를 파괴한다는 보고가 있다. 2,450 MHz와 915 MHz microwave를 이용한 해동 방법은 총세균수가 단위 면적당 20 이하로 가장 낮아 해동 과정에서 미생물에 의한 오염을 최소로 할 수 있어 위생적인 공정임을 알 수 있었다.

## 2.6. 915 MHz Microwave 해동에서 출력의 변화와 열풍이 해동 시간 및 온도 분포에 미치는 영향

여러 해동 방법 중 915 MHz microwave를 이용한 해동 방법이 가장 우수하여 출력을 달리하여 915 MHz microwave로 해동을 실시하였다. 또한 온도 조성을 균일하게 하고자 120℃ 열풍을 함께 이용하여 microwave만 조사한 경우와 비교하여 Table 5-3에 이를 나타내었다. 해동 시간 (중심 온도가 -1℃에 이르는 데 소요된 시간)을 측정한 결과, 출력이 높아지면 해동 시간이 감소하였다. 그러나, 출력을 높일수록 표면과 중심부의 온도차가 더 증가하여 균일한 해동육을 얻는데는 바람직하지 않은 것으로 판단되었다.

Table 5-2. Effect of thawing methods on total aerobes

Treatment	Total aerobes (unit: CFU/cm <sup>2</sup> )
Unfrozen	2.5×10 <sup>3</sup>
Frozen	N.D.
4 °C thawing	7.5×10 <sup>1</sup>
28 °C thawing	7.1×10 <sup>2</sup>
50 °C thawing	4.4×10 <sup>1</sup>
2,450 MHz MW <sup>1)</sup> thawing	<20
915 MHz MW thawing	<20

N.D.: not detected.

<sup>1)</sup>Microwave.

Table 5-3. Effect of microwave power on thawing time and surface temperature without and with hot air (120°C) in 915 MHz microwave heating.

Thawing method	Thawing time <sup>1)</sup> (sec)	Surface temperature (°C)
5 kW	90	-2.0
5 kW+120°C	60	-1.9
10 kW	60	-3.3
10 kW+120°C	40	-3.2
15 kW	30	-3.6
15 kW+120°C	25	-2.6

<sup>1)</sup>The thawing time was determined when the center temperature of sample reached to -1°C.

Microwave와 열풍을 병행하여 가열을 하는 방법이 microwave만 조사하는 방법보다 해동 시간이 적게 소요되었다. 단일 조사하였을 때보다 915 MHz microwave와 열풍을 함께 가열하여 표면의 온도를 약 0.1~1.0℃ 가량 상승시켜 균일한 조성의 해동육을 얻을 수 있었다.

Modified isotherm migration method에 의해 각 300 MHz, 915 MHz, 2,450 MHz에서 해동을 실시할 경우 출력이 미치는 영향을 예상한 결과에서 주파수가 낮은 300 MHz에서 가장 해동 시간이 가장 짧았고, 0~500 W 까지의 출력에서 해동 시간과 출력은 반비례하는 결과를 보였으나 200 W 이상에서는 해동 시간의 감소율이 크지 않다고 보고되어 있다. Microwave로 물체를 가열할 경우는 침투 깊이와 가열 효과 두 가지 측면에서 생각해서 최적의 주파수, 출력, 가열 시간을 결정해야 한다.

## 2.7. 915 MHz Microwave 해동에서 출력의 변화와 대류 가열 병용이 품질에 미치는 영향

915 MHz microwave를 이용하여 출력을 달리하고, 120℃ 대류 가열 병용 유무에 따라 drip 손실을 측정하여 Fig. 5-14에 나타내었다. 출력이 높아지면 대체적으로 drip 손실이 크게 나타났다. 그러나, 15 kW의 고출력에서는 drip 손실이 0.62%에 이르러 10 kW에서 보다 작았는데, 이는 중심부는 가열되었지만 표면부는 -3.6℃ 이어서 녹지 않았기 때문인 것으로 추측되었다.

120℃ 대류 가열을 병용하여 해동을 하고 drip 손실을 측정한 결과를 보면, 표면이 열풍에 의해 가열되어 균일한 온도 조성의 해동육이 얻을 수 있으므로 보수력이 좋아져서 drip 손실이 낮게 나온 것으로 판단되었다. 대류 가열이 drip 손실에 미치는 영향은 일관적이지 않았지만, 대체적으로 915 MHz microwave 단독 사용에 비해 drip 손실을 줄일 수 있었다. 전체적으로 915 MHz microwave 해동은 1.2% 이하의 낮은 drip 손실 값을 얻을 수 있었다.

Fig. 5-15에 출력의 변화와 120℃ 대류 가열 병용에 따른 해동 후 보수력

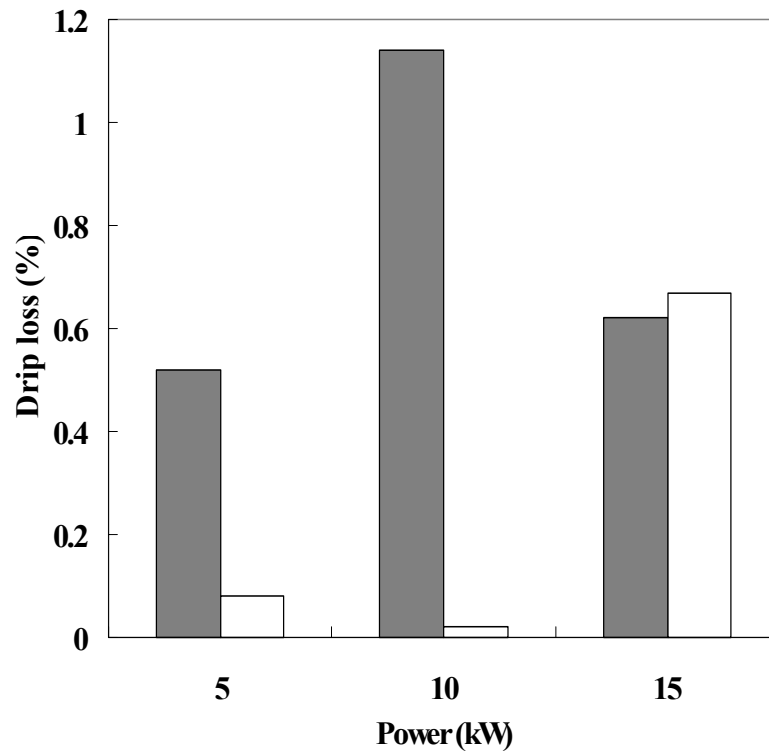


Fig. 5-14. Effect of microwave power on drip losses(%) without and with 120°C hot air in 915 MHz microwave heating. ■: without convection heating (120°C), □: cotreatment of 915 MHz microwave and convection heating (120°C).

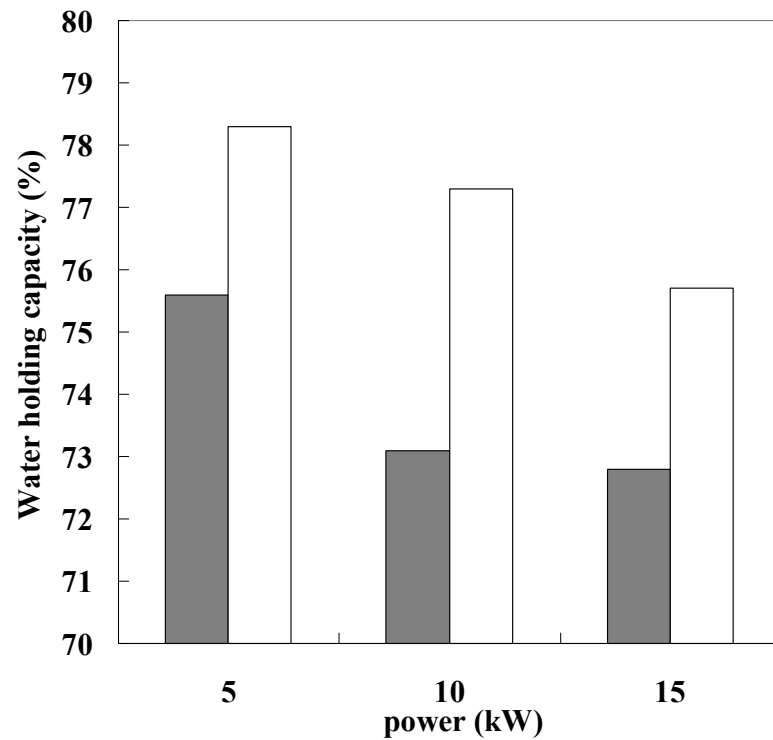


Fig. 5-15. Effect of microwave power on water holding capacity (%) without and with 120°C hot air in 915 MHz microwave heating. ■: without convection heating (120°C), □: cotreatment of 915 MHz microwave and convection heating (120°C).

을 측정하였다. 915 MHz microwave 단독 사용시, 출력이 높을수록 보수력이 낮았다. 이는 출력이 높을수록 표면의 온도가 낮고, 생체내의 막투과성을 변화시켜 보수력이 낮아지기 때문인 것으로 판단되었다. 그러나 대부분 70% 이상의 높은 보수력을 나타내어 915 MHz microwave가 동결육의 해동에 바람직한 것으로 나타났다.

120℃ 대류 가열을 병용한 경우가 더 보수력이 높았는데, 이는 육 표면을 가열시켜 온도 조성을 0℃ 부근으로 상승시켜 세포의 복원력을 좋게 하여 보수력이 높아진 것으로 추측되었다. 보수력은 drip 손실과 밀접한 상관관계를 보여 보수력이 좋은 육이 일반적으로 drip 손실도 낮게 나온다고 보고되어 있다.

### 3. 결 론

본 연구는 해동중 발생하는 drip 손실, 미생물의 오염, 표면의 과열 등을 방지하면서 급속 해동 방법을 찾기 위해 동결 돈육에 여러 가지 해동 방법을 적용하였다. 4℃, 28℃, 50℃에서의 해동과 2,450 MHz, 915 MHz의 microwave를 이용하여 해동을 실시하였고, 915 MHz microwave 해동은 출력을 5, 10, 15 kW로 변화시키면서 단일 조사와 120℃의 열풍을 함께 조사한 경우를 해동시간, 온도분포, drip 손실, 보수력, 표면색도, 총세균수를 측정하였다. 915 MHz microwave를 이용한 해동은 열전도에 의한 해동보다 최대 수백배 이상 시간이 단축되었고, 2,450 MHz microwave를 이용한 해동 방법의 침투깊이를 개선시킬 수 있었으며 drip loss, 보수력, 총세균수에 있어서도 효과가 컸다. 저주파수 (915 MHz), 저출력 (5 kW)의 microwave와 대류 가열을 병용하여 품질 저하를 최소한으로 방지하면서 산업적 이용이 가능한 것으로 기대할 수 있었다.

## 제 3 항 동결 및 해동 방법이 동치미의 품질에 미치는 영향

### 1. 실험 재료 및 방법

## 1.2. 재료

실험에 사용한 무는 1998년 강원도 정선산이며 부재료인 파, 마늘, 생강과 같이 백화점에서 구입하였다. 소금은 천일염이고 염도가 88% 이상인 것을 사용하였다.

## 1.3. 동치미 제조

무를 깨끗이 세척한 후 2 cm×2 cm×6 cm, 4 cm×4 cm×6 cm, 6 cm×6 cm×6 cm로 각각 절단하여 1% 소금용액에 담근 후 30℃에서 발효시켰다. 무와 소금물의 비율은 1:1.5(w/v)로 하였으며 파, 마늘, 생강은 전체 무 중량의 3.0%, 1.0%, 0.5% 씩 첨가하였다.

## 1.4. 동결 방법

동치미 액의 pH가 3.8이 되었을 때 동결하였다. 동치미 무와 액을 분리하여 각각 동결시켰는데, 무는 수분 및 기체 차단성인 PET/PE 필름에 포장하여 동결시켰고, 동치미 액은 5 cm×10 cm×15 cm형태가 되게 플라스틱 통에 넣어 동결시켰다. 동치미 무와 액을 함께 동결한 경우는 전체 크기가 5 cm×10 cm×15 cm형태가 되게 플라스틱 통에 넣어 동결시켰다. 동치미 무는 -20℃, -70℃, 액체질소를 이용해서 동결한 후, -20℃에서 동결된 무는 -20℃ freezer에, -70℃와 액체질소로 동결된 무는 -70℃ deep freezer에서 각각 2주간 저장하였다. 동치미 액은 -20℃, -70℃에서 동결한 후 -20℃에서 동결된 액은 -20℃ freezer에, -70℃에서 동결된 액은 -70℃ deep freezer에서 각각 2주간 저장하였다.

## 1.5. 해동 방법

동치미 무는 중심부의 온도가 4℃에 도달하였을 때 해동을 완료시켰고, 동치미 액은 해동된 양이 전체 부피의 50%에 도달하였을 때 해동을 완료시켰다. 냉장 해동은 4℃ 냉장고에서, 상온 해동은 27℃로 고정된 incubator에서, 전기 해



동은 915 MHz microwave oven을 이용하였다. 온도 측정은 sample의 기하학적 중심부에 thermocouple을 삽입한 후 측정하였다.

#### 1.6. pH 및 산도 측정

동치미 액을 3겹의 거즈로 여과한 후 pH는 pH meter (Orion 410A, Orion Research Inc., U.S.A.)로 측정하였으며, 산도 (titrable acidity)는 A.O.A.C. 방법에 의하여 동치미 액 10 mL을 pH 8.3이 될 때까지 소비된 0.1 N NaOH의 양을 lactic acid로 환산하고 함량을 % 농도를 표시하였다.

#### 1.7. 총세균수 및 젖산균수 측정

총세균수 (total aerobes)는 plate count agar 배지에 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였고, 젖산균은 MRS 배지에 접종하여 37°C에서 60시간 배양하였다. 균체수의 측정은 3회 반복 측정하였다.

#### 1.8. 색도 측정

색도는 헌터체계 (Hunter system)에 따르는 색차계 (Chromameter CR200, Minolta Co., Japan)를 사용하였다. 동치미액은 3회 반복, 무 표면은 10회 반복 하여 L, a, b-value를 측정하였다. Total color difference 값은  $\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$  로 계산하였다.

#### 1.9. 효소액의 제조

동치미 무의 효소 활성 변화를 측정하기 위하여 동치미 무와 1 M NaCl 용액을 1:1 (w/v)의 비율로 넣고 waring blender (37BLB4, Waring Products Division Dynamics Co., U.S.A.)에서 1분간 마쇄한 후 4°C에서 24시간 방치하였다. 이 용액을 3겹의 거즈로 걸러 9,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 효소액으로 사용하였다.

#### 1.10. Pectinesterase (PE)의 활성 측정

Park 등의 방법을 변형시켜 측정하였다. 0.1 M NaCl를 함유한 0.45% 펙틴 용액 50 mL를 pH 7.0으로 조절한 후 효소액 2 mL을 첨가하였다. 정확하게 pH 7.0으로 다시 조절한 다음 이 순간부터 pH 7.0에서 10분 동안 생성되는 산을 0.002 N NaOH로 적정하였다. PE 1 unit는 pH 7.0에서 1분 동안  $1 \times 10^{-6}$  M의 카르복실기를 생성하는 효소의 양으로 하였다.

#### 1.11. Polygalacturonase (PG)의 활성 측정

Yook 등의 방법을 변형시켜 측정하였다. 0.45% polygalacturonic acid 용액 (0.1 M NaCl을 함유한 0.03 M acetate buffer, pH 5.0) 2.5 mL에 효소액 0.5 mL을 첨가하고 30°C 항온 수조에서 교반하면서 2시간 동안 반응시켰다. 100°C 항온 수조에서 3분간 끓여 효소를 불활성화시킨 다음 0.1 N NaOH 1 mL를 넣어 알칼리용액으로 만든 후 dinitrosalicylic acid 용액 1 mL를 첨가하여 다시 100°C 항온 수조에서 5분간 끓였다. 곧 흐르는 물에 냉각시키고 증류수 10 mL를 넣어 충분히 혼합시킨 후 2,500×g에서 5분간 원심분리 하였다. 520 nm에서 흡광도를 측정하여 α-D-galacturonic acid로 만든 표준곡선에서 환원당의 양을 구했다. PG 1 unit는 2시간 동안 1 mg의 환원당을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

#### 1.12. 동치미 무 조직감 측정

동치미 무를 2 cm×2 cm×2 cm로 자른 후 texture analyzer (TA-WT2, Stable Micro System, U.K.)로 조직감을 측정하였다. Puncture test에 의하였으며 중심부를 지름 2 mm인 probe가 시료 두께의 75%까지 관통하면서 받는 최대 힘으로 표시하였다. 각 처리구당 30개의 시료를 측정하여 평균치를 경도로 나타내었다.

## 2. 실험 결과 및 고찰

## 2.1. 동치미 액과 무를 각각 동결 후 품질 변화

동결 시 동치미의 품질 변화를 최소화하기 위한 sample 상태를 결정하기 위해서  $-70^{\circ}\text{C}$  deep freezer에서 동치미 액과 무를 함께 동결한 것과 동치미 액 (5 cm×10 cm×15 cm)과 무 (2 cm×2 cm×6 cm)를 각각 동결한 것의 특성을 비교하였다 (Table 5-4). 동치미 액과 동치미 무를 함께 동결한 것은 무(2 cm×2 cm×6 cm)를 동치미 액에 넣고 전체 size를 5 cm×10 cm×15 cm가 되게 동결하였다. 해동은 급속 해동이 가능한 915 MHz microwave oven을 이용하였다. 해동 후 무의 품질에 가장 중요한 인자인 relative hardness는 무를 각각 동결한 경우 91.8%이었고, 액과 함께 동결한 무의 경우 79.6%을 나타내어 무를 각각 동결한 후 해동하였을 때 조직의 손상이 적은 것을 알 수 있었다. 액과 함께 동결한 무는 동결 시 수분 손실에 의한 수축에 따른 조직 손상으로 hardness가 감소한 것으로 판단되었다. 색도는 각각 동결한 것이 함께 동결한 것보다 높은 L값을 나타냈으며 a, b값은 조금 낮게 나타났지만 별다른 차이는 보이지 않았다. 무를 각각 동결한 것은 함께 동결한 것보다 전체적인 색의 변화를 나타내는 total color difference ( $\Delta E$ ) 값이 낮게 나타나므로 동결전의 무의 색도와 비교해 품질의 변화가 적었음을 알 수 있었다. 동치미 액의 경우, 함께 동결한 것은 pH 3.80에서 3.87로 증가하였고 산도는 0.20%에서 0.18%로 감소했으며, 각각 동결한 것은 pH 3.78로 감소하였고, 산도는 0.21%로 약간 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다 ( $P>0.05$ ). 색도는 두 처리구 모두 L 값이 감소하였고 a, b 값은 증가하였으나, 함께 동결한 것이 변화가 더 크게 나타났으며 결과적으로  $\Delta E$  값도 높게 나타났다.

## 2.2. 동결 및 해동시 무의 size가 동치미 품질에 미치는 영향

$-70^{\circ}\text{C}$  deep freezer에서 동결되고 915 MHz microwave로 해동된 동치미 무의 size가 품질에 미치는 영향을 Table 5-5에 나타내었다. 무의 size가 커질수록 relative hardness는 각각 91.8%, 84.8%, 83.8%로 감소하였고, L, b,  $\Delta E$  값도 점차적으로 증가하였다. 무의 size가 커질수록 동결 속도가 느려지므로 얼음 결정이 크게 형성되어 조직에 손상을 많이 주고 해동속도도 느려지므로 조직의 연화가 증

Table 5-4. Effects of respective freezing methods on the quality of *dongchimi* radish and *dongchimi* juice

Sample	Measurement	Non-frozen	Method 1 <sup>1)</sup>	Method 2 <sup>2)</sup>
<i>Dongchimi</i> radish	Relative hardness (%)	100	91.84±6.97 <sup>3)</sup>	79.58±7.67
	L-value	62.07 ±2.15	48.99±3.13	43.82 ±2.85
	a-value	-1.88 ±0.79	-0.76 ±0.63	0.30 ±0.21
	b-value	4.62 ±0.98	2.81±0.76	3.44 ±1.13
	$\Delta E$ <sup>4)</sup>	0	13.25	18.41
<i>Dongchimi</i> juice	pH	3.80±0.00	3.78±0.01	3.87 ±0.05
	Titration acidity (%)	0.20±0.00	0.21±0.01	0.18 ±0.01
	L-value	88.02±0.34	84.70±0.76	84.14 ±0.90
	a-value	0.34 ±0.07	0.45±0.11	0.55 ±0.10
	b-value	5.40 ±0.12	6.79±0.87	7.96 ±0.47
	$\Delta E$	0	3.60	4.65

<sup>1)</sup>*Dongchimi* radish and juice were separated and frozen at -70°C respectively; thawed with 915 MHz microwave.

<sup>2)</sup>*Dongchimi* radish and juice were frozen at -70°C together; thawed with 915 MHz microwave.

<sup>3)</sup>Values are mean±standard deviation.

$$^4) \Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}.$$

Table 5-5. Effects of sample size on the quality *dongchimi* radish frozen at -70°C and thawed in 915 MHz microwave oven

Measurement	Condition	Sample size (cm)		
	Non-frozen	2×2×6	4×4×6	6×6×6
Thawing time (sec) <sup>1)</sup>	0	105	130	175
L-value	62.07 ±2.15 <sup>2)</sup>	48.99 ±3.13	48.57±2.68	45.74±1.91
a-value	-1.88 ±0.79	-0.76 ±0.63	-0.71±0.43	-0.79 ±0.31
b-value	4.62 ±0.98	2.81 ±0.76	2.32±0.92	2.02±0.51
$\Delta E$ <sup>3)</sup>	0	13.25	13.74	16.57
Relative hardness (%)	100	91.8 ±6.97	84.8±8.86	83.8±8.36

<sup>1)</sup>The thawing time was determined when the center temperature of sample reached to 4°C.

<sup>2)</sup>Values are mean±standard deviation.

<sup>3)</sup>  $\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$ .

가된 것으로 판단되었다.

### 2.3. 동결 및 해동 방법이 동치미 무의 품질에 미치는 영향

Table 5-6에 동치미 무의 동결 및 해동 방법에 따른 해동 시간 및 표면 온도를 나타내었다. 동치미 무의 해동은 중심부의 온도가 4℃에 도달하였을 때 완료하였다. -20℃에서 동결한 무는 -70℃에서 동결한 것보다 해동 시간이 조금 단축되었고, -70℃에서 동결한 것과 액체 질소를 이용해서 동결한 무는 모두 -70℃에서 저장하였기 때문에 해동 시간의 차이는 거의 없었다. 4℃ 해동의 경우 주위의 온도가 낮기 때문에 오랜 시간이 소요됐지만 중심과 표면의 온도차는 적게 나타났다. 915 MHz microwave를 이용한 해동은 다른 해동 방법보다 해동 속도가 현저히 증가하였으며, 중심과 표면의 온도차는 2.5~2.9℃ 정도이므로 표면이 과열되는 2450 MHz microwave의 문제점을 해소할 수 있었고 균일 해동이 가능하였다. 이상의 내용은 동결육의 급속 해동에 915 MHz microwave을 적용 시 표면과열 현상을 방지한 Lee와 Park의 결과와 일치하였다.

동결 및 해동 방법에 따른 PE 활성 변화를 Fig. 5-16에 나타내었다. 조직의 hardness에 기여하는 PE는 동결 및 해동 후에 전반적으로 감소하였지만 액체 질소로 동결하고 915 MHz microwave로 해동한 동치미 무 (이하 LN-915MW로 칭함)는 동결전의 효소활성을 100%으로 하였을 때 94.4%로 잔존 활성이 가장 큰 것으로 나타났다. PE 활성은 동결 및 해동 방법에 따라 유의적인 차이를 나타내었다 ( $P<0.001$ ). Main 등은 딸기를 동결하였을 때 PE의 활성이 증가한다고 보고하였지만 동치미의 경우는 PE 활성이 저해되는 pH 3.8 부근에서 동결되므로 해동 속도가 느릴수록 PE가 낮은 pH에 노출되는 시간이 길어지므로 PE 활성이 낮아졌다고 판단되었다.

동결 및 해동 방법에 따른 PG 활성 변화를 Fig. 5-17에 나타내었다. 조직의 연화와 관계 있는 PG는 PE와 마찬가지로 동결 및 해동 후에 감소하는 경향을 나타내었다. 동결이 PG의 활성을 저해한다는 보고가 있었고, 27℃ 해동이 가장 높은 PG 활성을 나타내었고 4℃ 해동, 915 MHz microwave을 이용한 해동 순으로 활

Table 5-6. Effects of freezing and thawing methods on thawing time and surface temperature of *dongchimi*

Freezing method	Thawing method	<i>Dongchimi</i> radish		<i>Dongchimi</i> juice
		Thawing time <sup>1)</sup> (min)	Surface temp (°C)	Thawing time <sup>2)</sup> (min)
	4°C	285.0	5.3	1530.0
-20°C	27°C	68	7.9	4.25
	915 MHz MW <sup>3)</sup>	1.5	6.5	1.7
	4°C	295.2	5.5	1555.2
-70°C	27°C	74	8.1	4.50
	915 MHz MW	1.75	6.9	1.92
	4°C	295.2	5.5	
LN <sub>2</sub> <sup>4)</sup>	27°C	74	8.0	
	915 MHz MW	1.75	6.8	

<sup>1)</sup>The thawing time was determined when the center temperature of *dongchimi* radish reached to 4°C.

<sup>2)</sup>The thawing time was determined when the volume of thawed *dongchimi* juice was 50% of total volume.

<sup>3)</sup>Microwave. <sup>4)</sup>Liquid nitrogen.

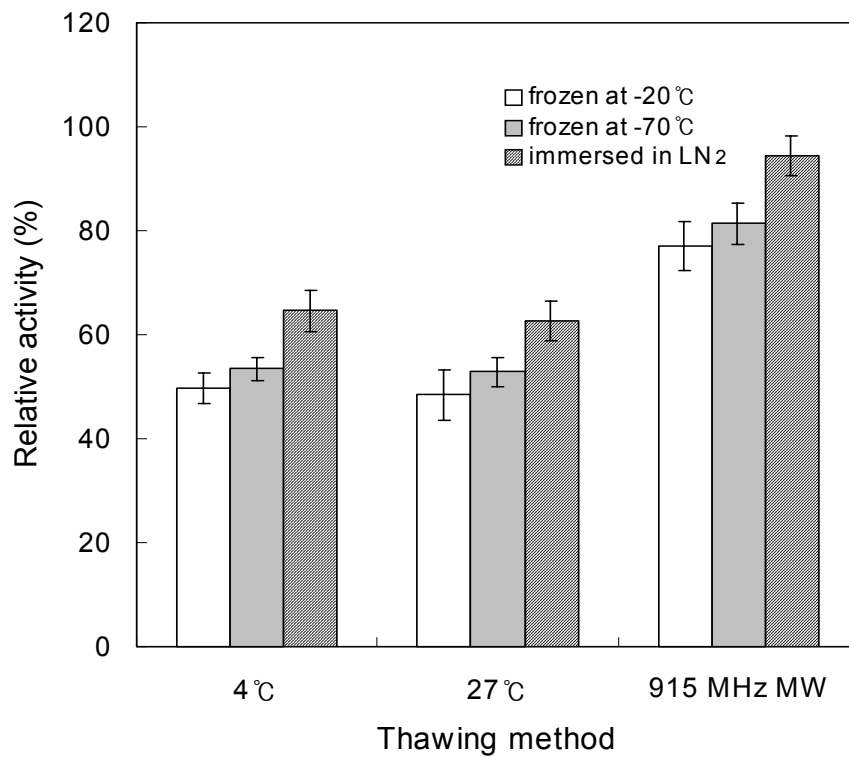


Fig. 5-16. Effects of freezing and thawing methods on pectinesterase relative activity (%) of *dongchimi* radish. Error bars represent the standard deviation.



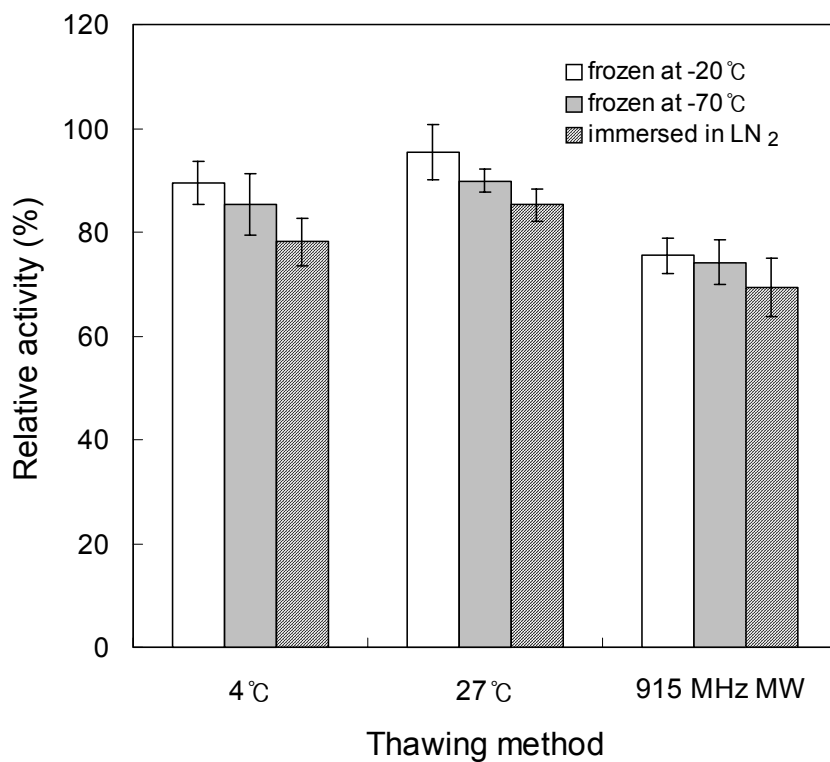


Fig. 5-17. Effects of freezing and thawing methods on polygalacturonase relative activity (%) of *dongchimi* radish. Error bars represent the standard deviation.

성이 높게 나타났다. 동결 속도가 빠를수록 PG 활성이 낮게 나타나는 경향을 보였으며, LN-915MW의 PG가 69.7%을 나타내어 가장 많이 감소된 것으로 나타났다. PG 활성은 동결 및 해동 방법에 따라 유의적인 차이를 나타내었다 ( $P<0.001$ ).

동결 및 해동 방법을 변화하였을 때 동치미의 무 조직의 *hardness*에 미치는 영향을 Fig. 5-18에 나타내었다. 동일한 해동 조건에서  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결한 것보다  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 동결한 동치미가 높은 *hardness*를 나타내었고 액체질소를 이용해서 동결된 동치미가 가장 높은 *hardness*를 나타내었다. 급속 동결을 하면 얼음 결정 형성 온도대인  $-4^{\circ}\text{C}\sim 0^{\circ}\text{C}$ 를 빠르게 지나가기 때문에 얼음 결정이 미세하게 형성되어 무 조직에 손상을 적게 주었기 때문에 동결전의 *texture*를 유지 할 수 있었다고 판단된다. 동일한 동결조건에서 915 MHz *microwave*를 이용한 해동 방법이 가장 높은 *hardness*를 나타내었고, 그 다음은  $4^{\circ}\text{C}$  해동이 높았고,  $27^{\circ}\text{C}$  해동이 가장 낮았다. 결과적으로 LN-915MW의 *relative hardness*가 97.2%으로 처리전의 상태와 비교하여 거의 차이가 없기에 장기 저장의 가능성을 제시하였다. 동치미 무의 *hardness*는 동결 및 해동 방법에 따라 유의적인 차이를 나타내었다 ( $P<0.001$ ). 이와 같은 결과는 당근을 급속 동결하였을 때 *cell damage*를 방지할 수 있다고 보고한 Fuchigami 등의 결과와 일치하여 급속 동결이 무의 *hardness* 유지에 효과적이라고 판단되었다.

Table 5-7에 동결 및 해동 방법에 따른 동치미 무 표면의 색도 측정값을 나타내었다. L 값은 모든 처리구가 동결전보다 감소하는 경향을 보였지만 LN-915MW는 54.2로 가장 높게 나타났으며,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결하고  $27^{\circ}\text{C}$ 에서 해동한 것이 44.7로 가장 작은 값은 나타내었다. 동결전의 무의 a, b 값은 L 값보다 상대적으로 매우 낮았고, 처리 후에도 a, b 값은 별다른 차이가 없었다. LN-915MW가 가장 적은 L값의 변화를 나타냈으며  $\Delta E$  값도 가장 낮게 나타났다. 동결 속도와 해동 속도가 빨라질수록  $\Delta E$  값이 감소하므로 급속 동결과 급속 해동은 전체적인 색도를 유지하는데 효과적이라고 판단되었다. 이것은 동결한 복숭아를 *microwave*로 급속 해동 시 다른 해동 방법보다 L 값의 변화가 적었다고 보고한 Phan의 결과와 일치하였다. L, b 값은 동결 및 해동 방법에 따라 유의적인 차이를 나타냈으

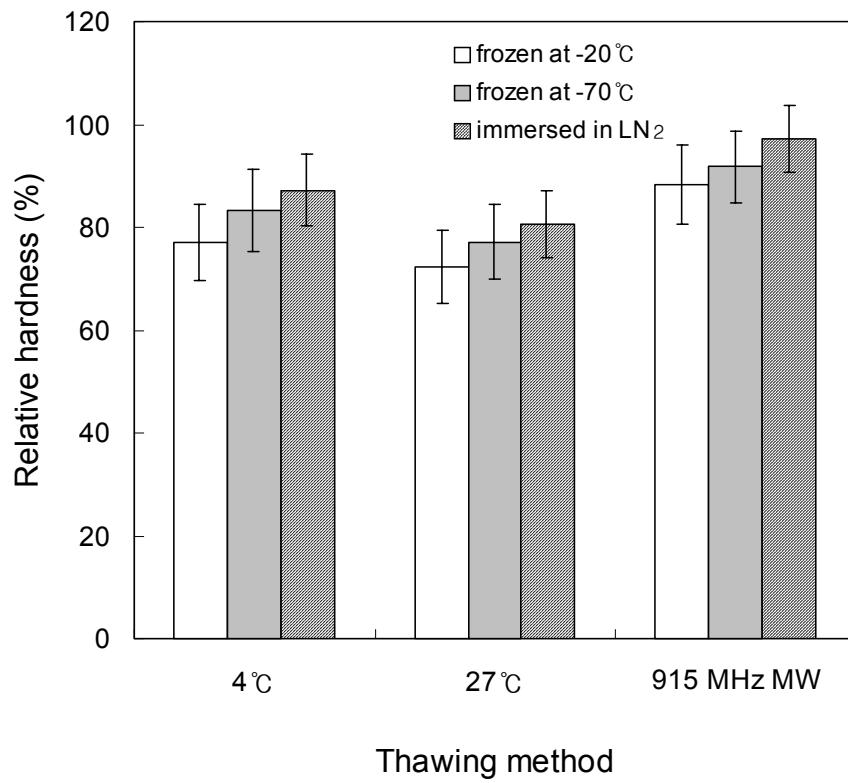


Fig. 5-18. Effects of freezing and thawing methods on relative hardness (%) of *dongchimi* radish. Error bars represent the standard deviation.

Table 5-7. Effects of freezing and thawing methods on L, a, b values and total color difference ( $\Delta E$ ) of *dongchimi* radish

Freezing method	Thawing method	L-value	a-value	b-value	$\Delta E$ <sup>1)</sup>
Non-frozen		62.07±2.15 <sup>2)</sup>	-1.83±0.79	4.62±0.98	0
	4°C	47.70±2.22	-0.11±0.40	3.51±0.70	14.52
-20°C	27°C	44.68±3.26	-0.04±0.79	3.01±1.12	17.56
	915 MHz MW <sup>3)</sup>	48.12±3.97	-0.61±0.46	2.93±0.32	14.11
	4°C	48.15±2.19	-0.44±0.42	2.46±1.14	14.16
-70°C	27°C	45.55±2.27	-0.16±0.55	1.97±0.98	16.81
	915 MHz MW	48.99±3.13	-0.76±0.63	2.81±0.76	13.25
	4°C	52.21±2.44	-0.69±1.15	3.85±1.58	9.96
LN <sub>2</sub> <sup>4)</sup>	27°C	45.80±2.27	-0.51±0.43	2.21±1.89	16.50
	915 MHz MW	54.22±3.01	-0.91±0.37	3.04±0.37	8.06

<sup>1)</sup>  $\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$ .

<sup>2)</sup> Values are mean±standard deviation.

<sup>3)</sup> Microwave. <sup>4)</sup> Liquid nitrogen.

나 ( $P < 0.01$ ), a 값은 유의적인 차이가 없었다 ( $P > 0.05$ ).

#### 2.4. 동결 및 해동 방법이 동치미 액의 품질에 미치는 영향

Table 5-6에 동치미 액의 동결 및 해동 방법에 따른 해동 시간 및 온도 분포를 나타내었다. 동치미 액의 해동은 녹은 액의 양이 전체 부피의 50%에 도달하였을 때 완료하였다. 동치미 액도 동치미 무와 마찬가지로  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결된 것이  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 동결된 것보다 해동 시간이 단축되었고, 915 MHz microwave에 의한 급속 해동의 효과를 볼 수 있었다. 이러한 해동 시간의 단축은 산업 현장이나 가정에서 경제성, 편의성, 간편성 등을 향상시킬 것으로 기대된다.

Table 5-8에 동결 및 해동 방법이 동치미 액의 pH와 산도에 미치는 영향을 나타내었다. 발효 적숙기인 pH 3.80에서 동결한 동치미 액을 해동하면 pH는 약간 감소하는 경향을 나타내었다.  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 동결하고 915 MHz microwave로 해동한 동치미 액의 pH는 가장 높은 3.78을 나타내었고,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결되고  $4^{\circ}\text{C}$  해동된 동치미 액의 pH는 가장 낮은 3.75를 나타내었다. 해동 시간이 길어짐에 따라 미생물의 의한 유기산의 생성이 많아지므로  $4^{\circ}\text{C}$  해동이 가장 낮은 pH값을 나타낸 것이라 생각되었다. 산도의 경우 동결 및 해동 후 조금 증가하였으나, pH와 산도 모두 처리 방법에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다 ( $P > 0.05$ ).

동결 및 해동 방법이 동치미 액의 총세균수와 젖산균수에 미치는 영향을 Table 5-9에 나타내었다. 동결전의 총세균수는  $3.28 \times 10^8$  CFU/mL이고 젖산균수는  $2.50 \times 10^8$  CFU/mL이었다.  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결된 것보다  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 동결된 동치미 액의 총세균수와 젖산균수가 더 감소하였는데, 동결 시 얼음 결정 생성과 급격한 온도 변화에 의한 영향으로 미생물이 사멸된 것으로 판단되었다. 915 MHz microwave를 이용한 해동이  $27^{\circ}\text{C}$  해동과  $4^{\circ}\text{C}$  해동보다 미생물의 사멸효과가 더 좋았고 microwave로 해동 시 효과적으로 세균 세포 및 포자를 파괴한다고 보고되고 있어서, 본 연구의 결과와 일치하였다.

Table 5-10에 동결 및 해동 방법이 동치미 액의 색도에 미치는 영향을 나타내었다. 동결전의 L 값은 88.02, a 값은 0.34, b 값은 5.40이었다. 전반적으로 동

Table 5-8. Effects of freezing and thawing methods on pH and titrable acidity of *dongchimi* juice

Freezing method	Thawing method	pH	Titrable acidity (%)
Non-frozen		3.80±0.00 <sup>1)</sup>	0.20±0.00
	4°C	3.75±0.01	0.21±0.00
-20°C	27°C	3.77±0.00	0.21±0.00
	915 MHz MW <sup>2)</sup>	3.78±0.01	0.21±0.01
	4°C	3.75±0.01	0.21±0.00
-70°C	27°C	3.77±0.01	0.21±0.00
	915 MHz MW	3.78±0.01	0.21±0.01

<sup>1)</sup>Values are mean±standard deviation.

<sup>2)</sup>Microwave.

Table 5-9. Effects of freezing and thawing methods on total aerobes and lactic acid bacteria of *dongchimi* juice (unit: CFU/mL)

Freezing method	Thawing method	Total aerobes	Lactic acid bacteria
Non-frozen		$3.28 \times 10^8$	$2.50 \times 10^8$
	4°C	$6.62 \times 10^3$	$4.46 \times 10^3$
-20°C	27°C	$7.04 \times 10^3$	$3.94 \times 10^3$
	915 MHz MW <sup>1)</sup>	$5.14 \times 10^3$	$2.88 \times 10^3$
	4°C	$6.24 \times 10^3$	$4.18 \times 10^3$
-70°C	27°C	$5.70 \times 10^3$	$3.48 \times 10^3$
	915 MHz MW	$2.94 \times 10^3$	$1.36 \times 10^3$

<sup>1)</sup>Microwave.

Table 5-10. Effects of freezing and thawing methods on L, a, b values and total color difference ( $\Delta E$ ) of *dongchimi* juice

Freezing method	Thawing method	L-value	a-value	b-value	$\Delta E$ <sup>1)</sup>
Non-frozen		88.02±0.34 <sup>2)</sup>	0.34±0.07	5.40±0.12	0
	4°C	87.49±1.86	0.43±0.11	5.73±1.93	0.63
-20°C	27°C	85.25±1.58	0.49±0.05	6.81±0.67	3.11
	915 MHz MW <sup>3)</sup>	84.54±0.54	0.46±0.05	6.80±0.24	3.75
	4°C	87.69±1.22	0.34±0.10	5.98±0.58	0.67
-70°C	27°C	86.82±0.84	0.35±0.05	5.47±0.29	1.20
	915 MHz MW	84.70±0.76	0.45±0.11	6.79±0.87	3.60

<sup>1)</sup>  $\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$ .

<sup>2)</sup> Values are mean±standard deviation.

<sup>3)</sup> Microwave.



결 및 해동 후 동치미 액의 L 값은 조금 감소하였고, a, b 값은 증가하는 것으로 나타났다. 4℃ 해동은 해동 중에 주위의 온도가 낮기 때문에 색도의 변화가 가장 작게 나타난 것으로 판단되었다. 동치미 무보다는 동치미 액이 전체적인 색도의 변화가 적었고  $\Delta E$  값도 낮게 나타났다. L, a, b 값 모두 동결 및 해동 방법에 따라 유의적인 차이를 나타냈었다 ( $P < 0.01$ ).

### 3. 결론

동치미를 동결하면 미생물의 사멸 및 성장과 효소의 작용이 정지되어 더 이상 발효가 진행되지 않아 산패 및 조직의 연화를 방지할 수 있으므로 동결 저장은 동치미의 효과적인 저장 방법이다. 그러나 일반적인 동결 방법과 해동 방법으로는 동결 및 해동 공정 시 품질의 변화가 발생하는 문제점이 있기 때문에 액체질소를 이용한 급속 동결 및 915 MHz microwave을 이용한 급속 해동 공정을 실시하였다. 동치미를 제조한 후 발효 적숙기인 pH 3.8에서 동결하였는데 동치미 무와 액을 함께 동결할 경우 동치미 무의 hardness가 크게 감소하기 때문에 무와 액을 각각 분리하여 동결시켰다. 동치미 무의 size는 2×2×6 cm이 품질의 변화를 최소화할 수 있는 크기이었고, 동치미 액은 5×10×15 cm로 설정하였다. 동치미 무의 경우 액체질소로 동결하고 915 MHz microwave로 해동하였을 때 조직의 hardness에 기여하는 pectinesterase activity가 가장 높았고, 조직의 연화에 작용하는 polygalacturonase activity가 가장 낮아서 hardness가 가장 좋았으며 색도의 변화도 가장 적었다. 동치미 액의 경우 -70℃에서 동결하고 915 MHz microwave로 해동하였을 때 pH와 산도의 변화가 적었으며 미생물이 가장 많이 사멸되었다. 따라서 급속 동결 및 급속 해동을 이용한 저장 방법은 동치미의 장기 저장 시 효과적인 방법으로 판단되었다.



## 제 4 장 참 고 문 헌

- Aibara, S., Hisaki, K. and Watanabe, K. (1992) Effects of high-voltage field treatment on wheat dough and bread-making properties. *Cereal Chem.*, **69**(4), 465-467
- Albert, S. G. (1938) Biochemical Aspects of Yeasts, *In Yeast Technology* (1973 ed.), Reed G. and Pepler, H. J., AVI publishing company, Westport, Connecticut, p 33-52
- Alonso, J., Canet, W. and Rodriguez, M.T. Effect of various thermal pre-treatment on the texture of frozen cherries (*Prunus avium* L.). Related enzyme activities. *Z. Lebensm. Unters Forsch.* 196: 214-218 (1993)
- Alwis, A.A. and Fryer, P.J.: The use of direct resistance heating in the food industry. *J. Food Eng.*, **11**, 3-27 (1990)
- Anon.: Sun Valley finds radio frequency improves quality and saves money and time. *Food Trade Rev.*, 90-92 (1992)
- A.O.A.C. Official Method of Analysis. p. 366. 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1980)
- A.O.A.C. Official Method of Analysis. p. 824. 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1980)
- Balaban, M.O., Henderson, T., Teixeira, A. and Otwell. W.S.: Ohmic thawing of shrimp blocks. *Developments in Food Engineering*, 307-310 (1994)
- Barbini, S. and Jolion, M.: Device for rapid defreezing of frozen or deep-frozen products. U.S. Patent 4,343,979 (1982)
- Barbosa-Canovas, G. V., Qin, B-L., and Swanson. B. G. (1997a) The study of critical variables in the treatment of foods by pulsed electric fields. *In*

- Food Engineering 2000*, Pedro, Champan & Hall, New York, pp 141-159
- Barbosa-Canovas, G. V., Pothakamury, U. R., Palou, E. and Swanson, B. G. (1997b) High intensity pulsed electric fields : Processing equipment and design. In *Nonthermal preservation of foods*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp 53-72
- Barbosa-Canovas, G. V., Pothakamury, U. R., Palou, E. and Swanson, B. G. (1997c) Biological effects and application of pulsed electric fields for the preservation of foods. In *Nonthermal preservation of foods*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp 73-112
- Barsotti, L., Merle, P. and Cheftel, J. C. (1999) Food processing by pulsed electric fields. I. Physical aspects. *Food Rev. Int.*, **15**(2), 163 - 180
- Barsotti, L. and Cheftel, J. C. (1999) Food processing by pulsed electric fields. II Biological aspects. *Food Rev. Int.*, **15**(2), 181 - 213
- Bender, G. R., Sutton, S. V. W. and Marquis, R. E. (1986) Acid tolerance, proton permeabilities and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect. Immun.*, **53**(2), 331
- Bender, G. R. and Marquis, R. E. (1987) Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**(9), 331
- Bengtsson, N.E.: Dielectric heating in food processing measurements of dielectric properties of foods and experiments with thawing and pasteurization. *Dissertation Abstracts International*, **35**(3), 1287-1294 (1971)
- Bhattacharya. M. and Hanna. M.A.: Kinetics of drip loss, cooking loss and color degradation in frozen ground beef during storage. *J. Food Eng.*, **9**, 83-96 (1989)
- Bialod, D., Jolion, M. and LeGoff, R. Microwave thawing of food products using associated surface cooling. *J. Microwave Power* **13**(3): 269-274

(1976)

- Booth, I. R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbio. Rev.*, **49**(4), 359
- Buazzi, M. M. and Marth, E. H. (1992) Sites of action by propionate on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food. Microbiol.* **15**, 109 - 119
- Bushnell, A. H., Dunn, J. E. and Clark, W. (1991) High pulsed voltage systems for extending the shelf life of pumpable food products. U. S. Patent. 5,048,404
- Bushnell, A. H., Dunn, J. E., Clark, W. and Pearlman, J. S. (1993) High pulsed voltage systems for extending the shelf life of pumpable food products. U. S. Patent. 5,235,905.
- Braithwaite, N. and Weaver, G. (1990) *Electronic Materials*. Butterworth Scientific Ltd, London.
- Calderón-Miranda, M. L., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. (1999a) Inactivation of *Listeria innocua* in liquid whole egg by pulsed electric fields and nisin. *Intl. J. Food Microbiol.*, **51**, 7 - 17
- Calderon-Miranda, M. L., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G (1999b) Transmission electron microscopy of *Listreia innocua* treated by pulsed electric fields and nisin in skimmed milk. *Intl. J. Food Microbiol.*, **51**, 31-38
- Cano, M.P., Hernandez, A. and Ancos, B.DE. : High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *J. Food Sci.*, **62**(1), 85-88 (1997)
- Castro, A. J., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. (1993a) Microbial inactivation of Foods by Pulsed Electric Field. *J. Food Proc. and Preservation*, **17**, 47
- Castro, A. J., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1993b) Pulsed

- electric field inactivation of alkaline phosphatase. *IFT 1993 Annual Meeting: Book of Abstracts*. pp 105
- Castro, A. J., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1993c) Inactivation of microorganisms in liquid foods by pulsed electric fields. *IFT 1993 Annual Meeting: Book of Abstracts*. pp 8
- Castro, A. J., Swanson, B. G. and Barbosa-Canovas, G. V. (1994) Protein denaturation by strong electric fields. *IFT Annual Meeting: Book of Abstracts*. pp. 131
- Cha, B.S., Kim, W.J., Byun, M.W., Kwon, J.H. and Cho, H.O. Evaluation of gamma irradiation for extending the shelf life of kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21(1): 109-119 (1989)
- Chandler, B.U. and Robertson, G.L. : Effect of pectic enzymes on cloud stability and soluble limonin concentration in stored orange juice. *J. Sci. Food Agric.*, 34, 599-611 (1983)
- Cho, H. Y., Zhang, Q. H., Yousef, A. E. and Sastry, S. K. (1995) Visualizing lethal effect of pulsed electric fields to *E. coli* and *S. cerevisiae*, *AIChE Conf. on Food Eng.*, Chicago, Nov. 1.
- Cho, W.I.: A Study on pasteurization of paste foods by ohmic heating. *M.S. Thesis*, Yonsei University, Seoul, Korea (1993)
- Curt, C. (1997) Characterisation de produits et de procedes alimentaires par conductimetrie electrique, *Sci. Aliments*, 17, 435-456
- Datta, A.K. Heat and mass transfer in the microwave processing of food. *Chem. Eng. Prog.* 86: 47-53 (1990)
- Delorme, E. (1989) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(9), 2242
- Dornenburg, H and Knorr, D. (1993) Cellular permeabilization of cultures plant tissues by high electric field pulses or ultra high pressure for the

- recovery of secondary metabolites. *Food Microbiol.* **7**(1), 35-48
- Dreyfuss, H. S. and Chipley, J. R. (1980) Comparison of effects of sublethal microwave radiation and conventional heating on the metabolic activity of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**(1), 13 - 16
- Dunn, J. E. and Pearlman, J. S. (1987) Methods and apparatus for extending the shelf-life of fluid food products.. U. S. Patent 4,695,472
- Dunn, J. E. and Pearlman, J. S. (1989) Apparatus for extending the shelf-life of fluid food products. U. S. Patent 4,838,154
- El-Sherbeini, M. and Clemas, J. A. (1995) Nikkomycin Z supersensitivity of an echinocandin-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agent and Chemotherapy*, **39**(1), 200-207
- Eshtiaghi, M.N. and Knorr, D. : Potato cubes response to water blanching and high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.*, **58**(6), 1371-1374 (1993)
- Fiske, J. C. and SubbaRow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 - 400
- Foster, J. W., Cowan, R. M. and Magg, T. A. (1962) Rupture of bacteria by explosive decompression. *J. Bacteriol.*, **83**, 330
- Fuchigami, M., Hyakumoto, N. and Miyazaki, K. Programmed freezing affects texture, pectic composition and electron microscopic structures of carrots. *J. Food Sci.* **60**(1): 137-141 (1995)
- Fuchigami, M., Hyakumoto, N., Miyazaki, K., Nomura, T. and Sasaki, J. Chinese cabbage midribs and leaves physical changes as related to freeze-processing. *J. Food Sci.* **60**(6): 1260-1264 (1995)
- Fuchigami, M., Miyazaki, K. and Hyakumoto, N. Frozen carrots texture and pectic components as affected by low-temperature-blanching and quick freezing. *J. Food Sci.*, **60**(1): 132-136 (1995)
- Futai, M. and Kanazawa, H. (1983) Structure and function of

- proton-translocating adenosine triphosphatase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) biochemical and molecular biological approaches. *Microbiol. Rev.*, **47**(3), 285
- Gallagher, T. J. (1975) Simple Dielectric Liquids, Mobility, Conduction and Breakdown. Oxford University Press, London
- Garcia, M. J., Rios, G., Ali, R., Belles, J. M. and Serrano, R. (1997) Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **143**, 1125-1131
- Gaskova, D., Sigler, K., Janderova, B. and Plasek, J. (1996) Effect of high-voltage electric pulses on yeast cells: factors influencing the killing efficiency. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **39**, 195-202
- Geduspan, H.S. and Peng, A.C. : Changes in cucumber volatile compounds on chilling temperature and calcium chloride treatment. *J. Food Sci.*, **51**, 852-854 (1986)
- Geulen, M., Teichgraber, P., and Knorr, D. (1993) Effects of high electric field pulse treatment on carrot juice yield. *IFT 1993 Annual Meeting: Book of Abstracts*. pp 53
- Gilliland, S.E. and Speck, M.L. : Mechanism of the bactericidal action produced by electrohydraulic shock. *Appl. Microbiol.*, **15**, 1038-1044 (1967)
- Gould, G. W. (1995) High voltage pulse techniques for food preservation. *In New methods of Food Preservation*, Black Academic & Professional, New York
- Grahl, T., Sitzmann, W. and Markl, H. (1992) Killing of microorganisms in fluid media by high-voltage pulses. *DECHEMA Biotechnol. Conference Series*, **5B**: 675-678
- Grahl, T. and Markl, H. (1996) Killing of microorganisms by pulsed electric fields, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 148-157
- Grosch, W., Laskawy, G. and Weber, F. : Differences in the amount and range



- of volatile carbonyl compounds formed by lipoxigenase isozymes from soybeans. *J. Agri. Food Chem.*, 23, 791-794 (1975)
- Grosch, W., Laskawy, G. and Weber, F. : Formation of volatile carbonyl compounds and cooxidation of  $\beta$ -carotene by lipoxigenase from wheat, potato, flax, and beans. *J. Agri. Food Chem.*, 24, 456-459 (1976)
- Gupta, R. P. and Murray, W. (1989) Pulsed high electric field sterilization. *7th IEEE Pulsed Power Conference*, Monterey, CA, June 11-14
- Hagerman, A.E. and Austin, P.J. : Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *J. Agri. Food Chem.*, 34, 440-444 (1986)
- Halden, K., Alwis, A. A. P. and Fryer, P. J. (1990) Changes in the electrical conductivity of foods ohmic heating, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 25, 9-25
- Harrison, S. L. (1996) High intensity pulsed electric field and high hydrostatic pressure processing of apple juice. Ph. D. Thesis, Washington State University, U. S. A.
- Hawer, W.D., Ha, J.H., Seog, H.M., Nam, Y.J. and Shin, D.W. Changes in the taste and flavor compounds of kimchi during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.* 20(4): 511-517 (1988)
- Heinz, G.: Auftauen von gefrorenem Fleisch. *Kälte und Klima-Rundschau*, 10(1), 9-16 (1972)
- Ho, S. Y., Mittal, G. S., Cross, J. D. and Griffiths, M. W. (1995) Inactivation of *P. fluorescens* by high voltage electric pulses. *J. Food Sci.*, 60(6), 1337-1340
- Ho, S. Y. and Mittal, G. S. (1996) Electroporation of cell membrane: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 16, 349-362
- Ho, S. Y. (1997) Analysis of two high voltage electric pulse systems for batch and continuous pasteurization of selected fluid products. Ph. D. Thesis. The University of Guelph, Canada
- Ho, S. Y., Mittal, G. S. and Cross, J. D. (1997) Effects of high field electric

- pulses on the activity of selected enzymes. *J. Food Eng.*, **31**, 69-84
- Hoffmann, G. A. (1989) Cells in electric fields, physical and practical electron aspects of electro- cell fusion and electroporation. *In Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, Neumann, E., Sower, A. E. and Jordan, C. A. Plenum Press, New York.
- Hong, K. and Park, J. Effects of high hydrostatic pressure on the shelf-life and quality of dongchimi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30(3): 602-607 (1998)
- Hong, S. I. (1997) Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide. Ph. D. Thesis, Yonsei University, KOREA
- Huh, Y.J. and Rhee, H.S. Effect of preheating and concentration on texture of cucumber kimchi during fermentation. *Korean J. Soc. Food Sci.* 6(2): 1-6 (1990)
- Hulsheger, H. and Niemann, E. G. (1980) Lethal effects of high voltages pulses on *E. coli* K12. *Radiat. Environ. Biophys.* **18**, 281-288
- Hulsheger, H., Potel, J. and Niemann, E. G. (1981) Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiat. Environ. Biophys.* **22**, 149-162
- Hulsheger, H., Potel, J. and Niemann, E. G. (1983) Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **22**, 149-162
- Humble, M. W., King, A. and Phillips, I. (1977) APIZYM ; a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *J. Clin. Pathol.*, **30**, 275
- Hurst, A., Hughes, A., Collins-Thompson, D. L. and Shah, B. G. (1974) Relationship between loss of magnesium and loss of salt tolerance after sublethal heating of *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.*, **20**, 1153
- Hutkins, R. W. and Nannen, N. L. (1993) pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **76**(8), 2354
- Iandolo, J. J. and Ordal, Z. J. (1966) Repair of thermal injury of *Staphylococcus*

- aureus*. *J. Bacteriol.*, **91**(1), 134-142
- Inoue, K. and Shima, Y.: Preparation of frozen and defrosted foods. *U.S. Patent* 4,054,672 (1977)
- Jason, A.C.: Rapid thawing of foodstuffs. *IFST-Proceedings*, 7(3), 146-157 (1974)
- Jay, J.M. *Modern Food Microbiology*, 4th edition, Van Nostrand Reinhold, New York (1992)
- Jayaram, S., Castle, G. S. P. and Margaritis, A. (1992) Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltages pulses. *Biotech. Bioeng.*, **40**, 1412-1420
- Jayaram, S., Castle, G. S. P. and Margaritis, A. (1993) The effects of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *Lactobacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 117-122
- Jia, M., Zhang, Q. H., and Min, D. B. (1996) Effect of pulsed electric field processing on orange juice flavour analyzed by dynamic headspace gas chromatography. *1996 IFT Annual Meeting: Book of Abstracts*. pp. 151
- Jung, S., Lowe, S. E., Hollingsworth, R. I. and Zeikus, J. G. (1993) *Sarcina ventriculi* synthesizes very long chain dicarboxylic acids in response to different forms of environmental stress. *J. Biol. Chem.*, **268**(4), 2828
- Kaneda, T. (1991) Iso- and Anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.*, **55**(2), 288
- Kang, K.O., Ku, K.H. and Kim, W.J. Combined effect of brining in hot solution and salts mixture addition for improvement of storage stability of dongchimi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 20(6): 559-564 (1991)
- Kashket, E. R. (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.*, 55(2), 288
- Kent, M. (1987) *Electrical and Dielectric Properties of Food Materials*. Science and Technology Publishers, England.

- Khalil, H. and Villota, R. (1988) Comparative study on injury and recovery of *Staphylococcus aureus* using microwaves and conventional heating. *J. Food Protection*, **51**(3) 181 - 186
- Kim, D. U. and Pyun, Y. R. (1994) Food processing by ohmic heating, *Korea Food Sci. Ind.*, **27**(4), 21-33
- Kim, W.J., Kang, K.O., Kyung, K.H. and Shin, J.I. Addition of salts and their mixtures for improvement of storage stability of kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**(2): 188-191 (1991)
- Kim, Y.H., Yand, S.Y. and Lee, M.H. Quality changes of thawed porcine meat on the thawing methods. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**(2): 123-128 (1990)
- Kim, Y.M., Lee, C.W. and Park, K.H. : Purification and thermal inactivation of two lipoxigenase isoenzymes from potato tubers. *Korean J. Food Sci. Tech.*, **19**(5), 397-402 (1987)
- Klavons, J.A., Bennette, R.D. and Vannier, S.H. : Nature of the protein constituent of commercial orange juice cloud. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1545-1548 (1991)
- Knorr, D., Geulen, M., Grahl, T. and Sitzmann, W. (1994) Food application of high electric field pulses. *Trend in Food Sci. Technol.*, **5**, 71-75
- Kobayashi, H., Suzuki, T. and Unemoto, T. (1986) Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.*, **261**, 627
- Kolter, R. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 855
- Krasuchi, Z. (1968) Breakdown of commercial liquid and liquid-solid dielectrics. In "*High Voltage Technology*" Ed. Alston, L. L., Oxford University Press, London.

- Kwak, N.S.: A Study on the ohmic heating effect on the coagulation of soy protein. M.S. Thesis, Yonsei University, Seoul, Korea (1995)
- Lambert, A.D., Smith, J.P. and Dodds, K.L.: Physical chemical and sensory changes in irradiated fresh pork packaged in modified atmosphere. *J. Food Sci.*, 57(6), 1294-1299 (1992)
- Lee, J.K. and Park, J. Rapid Thawing of Frozen Pork by 915 MHz Microwave. *Korean J. Soc. Food Sci.* 31(1): 54-61 (1999)
- Lee, Y.H. and Yang, I.W. Studies on the packaging and preservation of kimchi. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 13(3): 207-218 (1970)
- Leistner, G. and Goriss, L. G. M. (1995) Food preservation by combined processes. Final Report FLAIR Concerted Action No. 7, Subgroup B, EUR 15776 EN.
- Lewis, T. J. (1968) The electric conduction and strength of pure liquids. In *High Voltage Technology*, Ed. Alston, L. L., Oxford University Press, London.
- Lin, H. M., Yang, Z. and Chen, L. F. (1993) Inactivation of *Leuconostoc dextranicum* with carbon dioxide under pressure. *Chem. Engin. J.*, **52**, B29
- Lown, J. W. (1984) Ethidium binding assay for reactive oxygen species generated from reductively activated adriamycin. In *Method in Enzymology*, Packer, L. (ed.), Academic Press, New York, 532-539
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 - 275
- Lubicki, P. and Jayaram, S. (1997) High voltage pulse application for the destruction of the Gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *Bioelectrochem. Bioenergetics.*, **43**, 135-141

- Main, G.L., Morris, J.R. and Wehunt, E.J. Effect of preprocessing treatment on the firmness and quality characteristics of whole and sliced strawberries after freezing and thermal processing. *J. Food Sci.* 51(2): 391-394 (1986)
- Markwell, M. A. K., Hass, S. M., Bieber, L. L. and Tolbert, N. E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, 87, 206 - 210
- Marquez, V. O., Mittal, G. S. and Griffiths, M. W. (1997) Destruction and inhibition of bacterial spores by high voltage pulsed electric field. *J. of Food Sci.*, 62(2), 1-4
- Martin-Belloso, O., Vega-Mercado, H., Qin, B. L., Chang, F. J., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1996a) Effect of high intensity pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli* in liquid egg. 1996 *IFT Annual Meeting: Book of Abstracts.* 26A-17
- Matsumoto, Y., Shioji, N., Satake, T. and Sakuma, A. (1991) Inactivation of microorganisms by pulse high voltage application. *IEEE Conf. Rec. Ind. Appl. Soc. Anu.*, 652 - 659
- Mazurek, B., Lubicki, P. and Staroniewicz, Z. (1995) Effect of short duration HV pulses on bacteria and fungi. *IEEE Trans. Dielectrics and Electrical Insulation.* 2(3), 418-425
- McDonald, L. C., Fleming, H. P. and Hassan, H. M. (1990) Acid tolerance of *Leconostock mesentroids* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(7), 2120
- McEvily, A.J., Iyengar, R. and Otewell, W.S. : Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 253-273 (1992)
- Meisel, N.: Tempering of meat by microwaves. *Microwave Energy Appl. News.*,

5(3), 3-7 (1972)

- Mendoza, I., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A. and Pardo, J. M. (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Sacchromyces cerevisiae*. *The J. Biol. Chem.*, **296**(12) 8792-8796
- Mertens, B. and Knorr, D. (1992) Development of nonthermal processes for food preservation. *Food Technol.*, **46**(5), 124
- Michael, J.L.: Heat transfer mechanisms. In *Physical Properties of Foods and Food Processing Systems*, Ellis Horwood Limited, West Sussex p.246-291 (1990)
- Miller, W.O., Saffle, R.L. and Zirkle. S.B.: Factors which influence the water-holding capacity of various type of meat. *Food Technol.*, **22**, 1139-1142 (1968)
- Minett, P.J.: Radio frequency and microwaves. *Food Processing Ind.*, **45**, 36-41 (1976)
- Mitchell, P. and Moyle, J. (1956) Osmotic structure and function in bacteria. Society of General Microbiology.
- Mizuno, A. and Hori, Y. (1988) Destruction of living cells by pulsed high-voltage application. *IEEE Trans. on Ind. Applications*. **24**(3), 387-394
- Monotoya, M. M., Lopez-Rodriquez, V. and Plaza, J. L. (1994) An improved technique for measuring the electrical conductivity of intact fruits, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **27**, 29-33
- Mukjerjee, T. M. and Dixon, B. (1993) Diagnostic EM procedures, *Microscopy Society American Bulletin*, **23**(4), 200 -205
- Naveh, D., Kopelman, I.J. and Mizrahi, S.: Electroconductive thawing by liquid contact. *J Food Technol.*, **18**, 171-176 (1983)
- Oshima, T., Sato, M. and Saito M. (1995) Selective release of intracellular protein using pulsed electric field. *J. of Electrostatics*. **35**, 103-112
- Olson, V.M., Swaminathan, B., Prett, D.E. and Stadelman. W.J.: Effect of five

- cycle rapid freeze-thaw treatment in conjugation with various chemicals for the reduction of *Salmonella typhimurium*. *Poultry Sci.*, 60, 1822-1826 (1981)
- Padan, E., Zilberstein, D. and Schuldiner, S. (1981) pH homeostasis in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 650, 151
- Park, H.O., Kim, Y.K. and Yoon, S. A study of enzyme system during kimchi fermentation . *Korean J. Soc. Food Sci.* 7(4): 1-7 (1991)
- Peng, A.C. and Geisman, J.R. : Lipid and fatty acid composition of cucumbers and their changes during storage of fresh pack pickles. *J. Food Sci.*, 41, 859-860 (1976)
- Pethig, R. (1979) *Dielectric and Electronic Properties of Biological Materials*. John and Wiley and Sons, New York
- Phan, P.A. Microwave thawing of peaches a comparative study of various thawing processes. *J. Microwave Power* 12(4): 261-271 (1977)
- Poole, R. K. (1993) The isolation of membranes from bacteria. *In Biomembrane protocol*. Graham, J and Higgins, J., Humana Press Inc., New Jersey, p. 109
- Pothakamury, U. R., Barbosa-Canovas, G. V., Vega, H., Zhang, Q. and Swanson, B. G. (1994a) Temperature dependence on the inactivation of *E. coli* by High voltage pulsed electric field. *IFT 1994 Annual Meeting: Book of Abstracts*. pp 169
- Pothakamury, U. R., Monsalve-Gonzalez, A., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1994b) Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *Food Preservation 2000 Proceedings*, Natrick, Ma
- Pothakamury, U. R., Monsalve-Gonzalez, A., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1994c) High voltage pulsed electric field inactivation



- of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii*. Not reported print matter.
- Pothakamury, U. R. (1995) Preservation of Foods by Nonthermal Processes. Ph. D. Thesis, Washington State University, U. S. A
- Potakamury, U. R., Monsalve-Gonzalez, A., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1995) High voltage pulsed electric field inactivation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii*, *Rev. Esp. Cienc. Technol. Aliment.*, **35**, 557-565
- Pothakamury, U. R., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G. and Spence, K. D. (1997) Ultrastructural changes in *Staphylococcus aureus* treated with pulsed electric fields. *Food Sci. Technol. Intl.*, **3**, 113 -121
- Price, N.C. and Stevens, L. : Enzymes: structure and function. In *Food enzymology, Volume I and II*, ed. P. F. Fox. pp. 1-25, Elsevier Applied Science, New York, (1991)
- Przybylski, K. S. and Witter, L. D. (1979) Injury and recovery of *Escherichia coli* after sublethal acidification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**(2), 261-265
- Qin, B. L., Zhang, Q., Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B. G. and Pedrow, P. D. (1994a) Pulsed electric field treatment chamber design using a finite element method. *1994 ASAE International Winter Meeting*, Atlanta, Georgia, Paper No. 946549
- Qin, B. L., Zhang, Q., Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B. G. and Pedrow, P. D. (1994b) Inactivation of microorganisms by pulsed electric fields of different voltage waveforms. *IEEE Trans. on Dielectric and Electrical Insulation*. **1**(6), 1047-1057
- Qin, B. L., Chang, F. J., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1995) Nonthermal inactivation of *S. cerevisiae* in Apple juice using pulsed electric fields. *Food Sci. Techno.*, **28**, 564-568
- Qin, B. L., Pothakamury, U. R. Vefa, H., Martin, O., Barbosa-Cánovas, G. V.

- and Swanson, B. G. (1995b) Food Pasterization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technol.*, **49**(12), 55
- Raso, J., Calderon, M., Gongora, M. Barbosa-Canovas, G. and Swanson, B. G. (1998) Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juices by pulsed electric fields. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **31**, 668-672
- Ray, B. (1996) Control by new nonthermal methods. *In Fundamental food microbiology*. Ray, B., CRC press, New York, p 441
- Riley, T. and Watson, A. (1987) Polarography and other Voltammetric Methods. John Wiley and Sons, New York.
- Robertson, B. and Astumian, R.D. : Frequency dependence of catalyzed reactions in a weak oscillatory field. *J. Chem. Phys.*, **94**, 7414-7419
- Rogob , E. A. (1988) Electropasmolysis, *In Electrical and physical process of Food. Agriculture Production*. Moscow. p 86
- Rosset, R.: Chilling, freezing, and thawing. *In Meat Microbiology*, Brown, M.H. (Ed.), Applied Science Publishers Ltd., London and New York, p.265-318 (1982)
- Sale, A. J. H. and Hamilton, W. A. (1967) Electric fields on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **148**, 781-788
- Sale, A. J. H. and Hamilton, W. A. (1968) Effects of high electric fields on microorganisms. III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **163**, 37-43
- Sanguinetti, S.G., Anon, M.C. and Calvelo, A.: Effect of thawing rate on the exudate production of frozen beef. *J. Food. Sci.*, **50**, 697-700 (1985)
- Sapers, G.M. : Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technol.*, **47**(10), 75-84 (1993)
- Saravia, J., Oliviera, J. C., Lemos, A. and Hendrickx, M. (1996) Analysis of the

- kinetic patterns of horseradish peroxidase thermal inactivation in sodium phosphate buffer solutions of different ionic strength. *Intl. J. Food Sci. Technol.*, **31**, 223-231
- Sastry, S. K. and Kim, H.-, J. (1996) Ohmic heating for thermal processing of Foods: Government, industry and academic perspectives. *Food Technol.*, May, 241-273
- Sato, M., Kimura, K., Ikeda, K., Ogiyama, T. and Hata, K. (1994) Sterilization of Beverages under Normal Temperature by a High-Voltage, Pulse Discharge. In *Developments of Food Engineering, Proceeding of the 6th International Congress in Engineering and Food*, edited by Yano, T., Matsuno, R., Nakamura, K., Blackie Academic and Professional. Glasgow, UK. pp 736-738
- Schneider, E. and Altendorf, K. (1987) Bacterial adenosine 5'-triphosphate synthase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>): purification and reconstitution of F<sub>0</sub> complexes and biochemical and functional characterization of their subunits. *Microbiol. Rev.*, **51**(4), 477
- Schubert, D. (1987) Biophysical approaches to the study of biological membranes. In *Biological membranes - a practical approach*, edited by Findlay, J. B. C. and Evans, W. H., IRL Press, Oxford University
- Sharp, K.A. and Honig, B. : Electrostatic interactions in macromolecules: Theory and applications. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **19**, 301-332 (1990)
- Shimada, S., Andou, M., Naito, N., Yamada, N., Osumi, M. and Hayashi, R. (1993) Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 123-131
- Shin, J. K., Shin, H. H. and Pyun, Y. R. (1997) Extraction of pigments from red sweet potato by high voltage pulsed electric fields. 1997 *The Korean*

- Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology Abstract Book*, pp. 154
- Shin, J. K. and Pyun, Y. R. (1997) Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed-microwave irradiation. *J. Food Sci.*, 62(1), 163 - 166
- Shin, J. K., Cho, H. Y. and Pyun, Y. R. (1998) Inactivation of Lipase by high voltage pulsed electric fields. 1998 *The Korean Society of Food Science and Technology Abstracts Book*, p 5-9
- Sims, C.A., Peng, H.Y. and Chen, H.E. : Changes of carotenoids, colors and vitamin A contents during processing of carrot juice. *J. Agri. Food Chem.*, 43, 1912-1916 (1995)
- Simpson, M. V., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1995) The combined inhibitory effect of lysozyme and high voltage pulsed electric fields on the growth of *Bacillus subtilis* spores. 1995 *IFT Annual Meeting: Book of Abstracts*. pp. 267
- Simpson, R. K., Whittington, R., Earnshaw, R. G. and Russell, N. J. (1999) Pulsed high electric field causes 'all or nothing' membrane damage in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*, but membrane H<sup>+</sup>-ATPase is not a primary target. *Intl. J. Food Microbiol.*, 48, 1 - 10
- Sinensky, M. (1974) Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71(2), 522
- Singleton, P. and Sainsbury, D. (1987) *Dictionary of microbiology and molecular biology* (2nd ed.)
- Skoog, D. A. and Leary, J. J. (1992) *Principles of instrumental analysis*. Saunder College Publishing.
- Slavik, J. (1982) Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probe. *FEBS Lett.*, 140, 22
- Stephens, T.S., Sadana, G. and Brown, H.E. : Stabilization of carrot juice by

- dilute acid treatment. *J. Food Sci.*, 36, 36-38 (1971)
- Stryer, L. (1988) *Biochemistry* (3rd ed.) W. H. Freeman & Company, New York.
- Su, Y., Zhang, Q. H. and Yin, Y. (1996) Inactivation of *Bacillus subtilis* spores using high voltage pulsed electric fields. *1996 IFT Annual Meeting: Book of Abstracts*. p 48
- Swift, J. and Tuomy, J.M.: Evaluation of microwave tempering of meat for use in central food preparation facilities. *Microwave Energy Appl. News.*, 11(1), 3-10 (1978)
- Swpes, R. K. (1994) *Protein purification principles and practice*. Springer-Verlag.
- Takahashi, Y., Ohta, H., Yonei, H. and Ifuku, Y. : Microbiocidal effect of hydrostatic pressure on satsuma mandarin juice. *International J. Food Sci. Technol.*, 28, 95-102 (1993)
- Taoukis, P., Davis, E.A., Davis, H.T., Gordon, J. and Talmon, Y.: Mathematical modeling of microwave thawing by the modified isotherm migration method. *J. Food Sci.*, 52(2), 455-463 (1987)
- Tatabe, W., Muraji, M. and Fujii, T. (1996) The relationship between electroporation and growth phase in a suspension of yeast cells, *Saccharomyces cerevisiae*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 70(5), 563
- Tedeschi, H. (1993) The cell membranes. In *Cell physiology - molecular dynamics* (2nd), Wm. C. Brown Publishers, Oxford, England
- Thury, J.: Thawing and tempering. In *Microwaves: Industrial, Scientific, and Medical Applications*, Grant. E.H. (Ed.), Artech House, Boston·London, p.275-297 (1991)
- Tressler, D.K. and Joslyn, M.A. : *Fruits and vegetable juice processing technology*. The AVI publishing company, Inc. (1961)
- Tsai, T.C. and Ockerman, H.W.: Water binding measurement of meat. *J. Food Sci.*, 46, 697-701, 707 (1981)

- Uchida K. (1975) Effects of cultural conditions on the cellular fatty acid composition of *Lactobacillus heterohiochii*, an alcoholophilic bacterium. *Agr. Biol. Chem.*, **39**(4), 837-842
- Um, D.H., Chang, H.G. and Kim, W.J. Effect of pasteurization on quality characteristics of low salt dongchimi juice. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**(4): 730-736 (1997)
- Vamos-Vigyazo, L. : Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **15**(5), 49-127 (1981)
- Vega, H., Powers, J., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1994) Effect of high voltage pulsed electric fields on plasmin. *IFT Annual Meeting: Book of Abstracts.* pp 21
- Vega-Mercado, H., Powers, J. R., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1994a) Plasmin inactivation with pulsed electric fields. *J. Food Sci.*, **60**(5), 1143-1146
- Vega-Mercado, H., Powers, J. R., Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B. G. and Luedecke, L. (1995b) Inactivation of a protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 using high voltage pulsed electric fields. *1995 IFT Annual Meeting: Book of Abstracts.* pp 267
- Vega-Mercado, H., Pothakamury, U. R., Zhang, Q., Chang, F., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1995c) Inactivation of *E. coli* using combined non-thermal methods: pH, ionic strength and high voltage pulsed electric fields. *1995 IFT Annual Meeting: Book of Abstracts.* pp 218
- Vega-Mercado, H., Martin-Belloso, O., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1995d) Inactivation of *E. coli* in green pea soup using pulsed electric fields. *1995 AIChE Annual Meeting: Book of Abstracts.* B 6.5

- Vega-Mercado, H., Martin-Belloso, O., Chang, F. J., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1996a) Inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* suspended in pea soup using pulsed electric fields. *J. of Food Proc. Preser.*, **20**, 501-510
- Vega-Mercado, H., Pothakamury, U. R., Chang, F. J., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1996b) Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles. *Food Res. Intl.*, **29**(2), 117-121
- Versteeg, C., Rombouts, F.M., Spaansen, C.H. and Pilnik, W. : Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. *J. Food Sci.*, 45, 969-971, 998 (1980)
- Vespa, M. N. and Lebecq, J. C. (1996) The morphology of *Candida albicans* in two different Earle base media in the presence of tunicamycin. *Mycoses*, 39, 271-277
- Virtanen, A.J., Goedeken, D.L. and Tong, C.H.: Microwave assisted thawing of model frozen food using feed-back temperature control and surface cooling. *J. Food Sci.*, 62(1), 150-154 (1997)
- Wang, D. I. C., Cooney, C. L., Demain, A. L., Dunnill, P., Humphrey, A. E. and Lilly, M. D. (1979) *Fermentation and Enzyme Technology*, John Wiley & Sons, New York.
- Wang, W. C. and Sastry, S. K. (1997) Changes in electrical conductivity of selected vegetables during multiple thermal treatments, *J. Food Process Eng.*, **20**, 499-516
- Whiting, R. C. and Beacorn. T. E. (1994) Factors affecting the inactivation of *E. coli* O157:H7 by pulsed high voltage electric fields. *IFT 1994 Annual Meeting: Book of Abstracts*. pp 169
- Wierbicki, E., Kunkle, L.E. and Deatherage, F.E.: Changes in water holding

- capacity of cationic shifts during the heating and freezing and thawing of meat as revealed by a simple centrifugal method for measuring shrinkage. *Food Technol.*, 11, 69-73 (1957)
- Yang, C.Y. Fundamentals and Application of Food Freezing. pp. 230-239. Sejinsa, Korea (1997)
- Yen, G.C. and Lin, H.T. : Comparison of high pressure treatment and thermal pasteurization effects on the quality and shelf life of guava puree. *International J. Food Sci. Technol.*, 31, 205-213 (1996)
- Yen, G.C., Lin, H.T. and Yang, P. : Effects of heating process and frozen storage on changes in quality of guava puree. *J. Chinese Agric. Chem. Soc.*, 32, 156-160 (1994)
- Yeom, H. W., Zhang, Q. H. and Dunne, C. P. (1999) Inactivation of papain by pulsed electric fields in a continuous system. *Food Chem.* 67, 53-59
- Yiping, S. (1996) Inactivation of *Bacillus* spore. In *Progress report*, Ohio State University.
- Yongsawatdigul, J., Park, J. W. and Kolbe, E. (1995) Electrical conductivity of Pacific whiting surimi paste during ohmic heating, *J. Food Sci.*, 60, 922-925
- Yook, C., Chang, K., Park, K.H. and Ahn, S.Y. Pre-heating treatment for prevention of tissue softening of radish root kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17(6): 447-453 (1985)
- Younathan, M.T., Farr, A.T. and Laird, D.L.: Microwave energy as a rapid-thaw method for frozen poultry. *Poultry Sci.*, 63, 265-268 (1984)
- Zhang, Q., Monsalve-Gonzalez, A., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1994a) Inactivation of *E. coli* and *S. cerevisiae* by pulsed electric field under controlled temperature conditions. *Trans. ASAE.* 37(2), 581-587
- Zhang, Q., Monsalve-Gonzalez, A., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G.



- (1994b) Inactivation of *S. cerevisiae* in apple juice by square-wave and exponential decay pulsed electric fields. *J. Food Proc. Eng.* **17**, 469-478
- Zhang, Q., Qin, B-L., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1994c) Inactivation of *E. coli* for food pasteurization by high-intensity short duration pulsed electric fields. *J. of Food Process and Preser.*, **19**, 103
- Zhang, Q., Monsalve-Gonzalez, A., Qin, B. L. Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1994d) Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by square wave and exponential-decay pulsed electric fields. *J. Food. Proc. Eng.*, **17**, 469-478
- Zhang, Q., Chang, F. J., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1994e) Inactivation of microorganism in a semisolid model food using high voltage pulsed electric field. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **27**, 538-543
- Zhang, Q. (1995) Demonstration of Technology for Cold Preservation and Stabilization of Military Rations, Project Reports, Ohio State University
- Zhang, Q., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1995a) Engineering aspects of pulsed field pasteurization. *J. Food Eng.*, **25**, 261-281
- Zhang, Q., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1995b) Inactivation of *E. coli* for food pasteurization by high-strength pulsed electric fields. *J. of Food Proc. Preser.*, **19**, 103-118
- Zhang, Q., Qin, B. L., Barbosa-Canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1995c) Inactivation of *E. coli* for food pasteurization by high-strength pulse electric fields. *J. Food Proc. Eng.*, **17**, 581-597
- Ziauddin, K.S., Rao, D.N., Ramesh, B.S. and Amla, B.L. Effect of freezing, thawing and frozen storage on microbial profiles of buffalo meat. *J. Food Sci. Technol.* 30(6): 465-467 (1993)
- Zimmermann, U. Pilwat, G. and Riemann, F. (1974) Dielectric breakdown of cell membranes, *Biophys. J.*, **14**, 881

Zimmermann, U. (1986) Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **105**, 176-250

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.