

## 초고압을 이용한 신선초 녹즙의 살균 및 갈색화 효소의 불활성화

이동언 · 박지용 · 이윤범\* · 여익현\*

연세대학교 식품·생물공학과, \*(주)풀무원 기술연구소

### Inactivation of Microorganisms and Browning Enzymes in *Angelica keiskei* Juice Using High Hydrostatic Pressure

Dong-Un Lee, Jiyong Park, Yunbom Lee\* and Ick-Hyun Yeo\*

Department of Food and Biotechnology, Yonsei University, Seoul, Korea

\*R&D Center, Pulmuone Co., Ltd., Korea

#### Abstract

Effects of high hydrostatic pressure on microorganisms and browning enzymes in *Angelica keiskei* juice were investigated using response surface methodology. The optimum process condition for maximum reduction of total aerobes was 5700 kg/cm<sup>2</sup> (558.6 MPa) pressure and 7.16 min process time, and 3.44 log cycle reduction of total aerobes was predicted at the optimum condition. *E. coli*, initially  $8.8 \times 10^3$  CFU/ml, was completely inactivated by high hydrostatic pressure at all process conditions (3800~6700 kg/cm<sup>2</sup> pressure; 3~17 min process time). Polyphenol oxidase and peroxidase were partly inactivated by the high hydrostatic pressure. It was also indicated that inactivation of microorganisms and browning enzymes by hydrostatic pressure is dependent on pressure rather than process time.

Key words: high hydrostatic pressure, *Angelica keiskei* juice, polyphenol oxidase, peroxidase, response surface methodology

## 서 론

1899년 Hite<sup>(1)</sup>에 의해 압력을 이용한 식품가공이 시도된 이래 1980년대까지 압력과 식품을 접목시키려는 시도는 많지 않았다. 이 기간 동안 발표된 연구중 주목할 연구로는 압력에 의한 난백 단백질의 변성에 대한 연구<sup>(2)</sup>와 압력이 생유(raw milk)중 미생물에 미치는 영향에 대한 연구<sup>(3)</sup> 등을 들 수 있다. 압력을 식품가공에 이용하려는 시도가 미비했던 반면 심해에 생존하는 미생물의 생리학적 연구 등을 통해 압력이 미생물에 미치는 영향에 관한 연구는 꾸준히 이루어져 왔다. 이러한 기초연구들로부터 압력이 효소나 세포내 기관, 혹은 미생물의 사멸에 미치는 영향에 대한 정보들이 축적되었다<sup>(4,5)</sup>.

식품가공에 압력을 이용할 때 기대할 수 있는 효과로는 미생물의 살균, 효소의 불활성화 및 단백질의 응고, 전분의 호화, 미생물 또는 식물세포로부터 이차대사산물(secondary metabolites)의 회수 등이 있으며, 상온 또는 저온에서의 가공이 가능하므로 열처리를 통해 일어날 수 있는 천연의 향과 맛의 변화, 영양성분의 손실을 방지할 수 있다<sup>(6)</sup>. 1980년대 이후 식품가공에 이용할 수 있는

초고압기의 제조가 가능해지면서 압력을 식품에 이용하는 연구가 본격적으로 시작되었고, 야채나 과일 가공에 압력을 이용하려는 연구<sup>(7,8,9,10)</sup>도 이루어지고 있다.

우리나라에서는 생활 수준의 향상으로 인해 건강, 천연향의 식품들이 소비자들로부터 호응을 받고 있다. 이러한 건강식품중 신선초, 케일 등에서 착즙한 녹즙<sup>(11)</sup>이 널리 알려져 있으며 시판 업체도 다수 생겨나게 되었다. 이러한 녹즙의 대량 유통을 위해서는 저장성의 향상이 필요하나 열처리를 이용하는 경우 천연의 향미 및 영양성분의 손실, 소비자의 거부감 등이 문제가 된다.

따라서, 본 연구는 압력이 신선초 녹즙의 부패 미생물 및 갈색화효소 활성에 미치는 영향을 연구하고, 초고압을 이용한 비열(非熱)살균 공정의 최적화를 목적으로 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 재료

녹즙의 재료로는 미나리과에 속하는 다년생 식물인 신선초(*Angelica keiskei* Koidz 또는 *Angelica keiskei* Makino)를 사용하였으며, 경기도 하남시에서 1994년 2월 파종되어 1년간 재배된 것을 1995년 2월 23일에 구입하여 사용하였다. 구입한 신선초를 흐르는 물로 수분간 세척하고 tissue towel로 표면의 물기를 제거한 후 녹

Corresponding author: Jiyong Park, Ph. D., Department of Food and Biotechnology, Yonsei University, Seodamun-Ku, Seoul 120-749, Korea

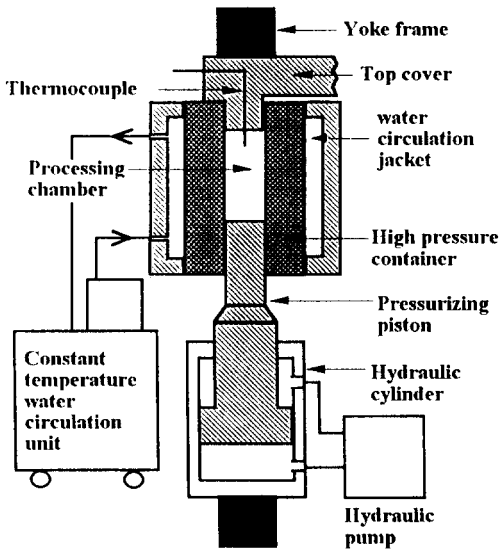


Fig. 1. Schematic diagram of high pressure test machine

즙기(엔젤라이프, Korea)를 이용하여 착즙하였다. 착즙한 시료는 네겹의 cheese cloth로 한번 여과한 후, 5.5×13.0 cm 크기의 polyethylene bag속에 10 ml씩 분주하여 가열밀봉하였다.

**초고압처리**

본 실험에서 사용된 초고압기(MFP-7000, Mitsubishi Heavy Industries Co., Japan)의 개략도는 Fig. 1과 같다. 초고압용기(내부용적 600 ml)에 polyethylene으로 포장한 시료를 넣고 pressure medium으로 증류수를 채운 후 hydraulic pump로 pressurizing piston을 상승시켜 가압하였다. 초고압처리는 상온(16°C)에서 행하여졌으며, 초고압기의 top cover에 부착되어있는 thermocouple을 이용하여 처리중의 온도변화를 확인하였다.

**생균수 측정**

생균수는 A.O.A.C. 방법<sup>(12)</sup>에 따라 측정하였는데 총세균(total aerobes)수는 plate count agar에서 48시간 배양하여 측정하였으며, *E. coli*는 EC broth에서 24시간 배양한 후 MPN 법으로 측정하였다. 균체수의 측정은 2회 반복 측정하였다.

**효소활성 측정**

시료 10 ml에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5, 4°C) 10 ml를 혼합하고, 이 혼합액을 7500×g에서 40 분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 여과지(Whatman No.41)로 여과한 용액을 조효소로 하였다.

Polyphenol oxidase(PPO)의 활성은 0.01 M catechol을 기질로 하여 spectrophotometer(Uvikon 860, Kontron

Table 1. Combination of variables used in the central composite rotatable design for response surface analysis

Treatment	Coded Variables		Natural Variables	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	Time(min)
1	-1	-1	3800	5
2	-1	+1	3800	15
3	+1	-1	6200	5
4	+1	+1	6200	15
5	0	0	5000	10
6	0	0	5000	10
7	0	0	5000	10
8	0	0	5000	10
9	0	0	5000	10
10	+1.414	0	6700	10
11	-1.414	0	3300	10
12	0	+1.414	5000	17
13	0	-1.414	5000	3

Instruments, Italy)로 420 nm에서 흡광도 변화를 측정<sup>(13)</sup> 하였으며, peroxidase의 활성은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 존재하에서 20 mM guaiacol을 기질로 475 nm에서 흡광도 변화를 측정<sup>(14)</sup>하였다.

**색도의 측정**

색도는 헌터체계(Hunter system)에 따르는 색차계(Chromameter CR200, Minolta Co., Japan)를 이용하여 L-, a-, b-value를 3회 반복 측정하였다.

**실험계획 및 통계처리**

초고압에 의해 미생물 살균 및 갈색화효소 불활성화 처리조건을 최적화하기 위해 반응표면분석법(response surface methodology)을 사용하였으며 압력과 처리시간을 독립변수로, 총균수와 갈색화효소(PPO, peroxidase)의 활성을 반응변수로 하여 중심합성회전계획(central composite rotatable design)<sup>(15)</sup>에 따라 계획되었다. 이 방법은 α=1.414에서 중심합성계획을 형성하는 4개의 factorial point, 4개의 star point, 5개의 중심점으로 총 13개의 실험으로 구성되었다(Table 1). 독립변수들의 범위 및 중심점은 예비 실험을 통해 설정되었다. 반응표면은 statistical analysis system program의 RSREG procedure<sup>(16)</sup>를 사용하여 구하였으며, SAS/GRAPH GCONTOUR program을 사용하여 contour plot을 작성하였다.

**결과 및 고찰**

**초고압에 의한 살균효과**

초고압용기 내부 압력이 5000 kg/cm<sup>2</sup>까지 상승되는 데는 90초 가량이 소요되었으며, 압력이 5000 kg/cm<sup>2</sup>까지 상승함에 따라 16°C를 유지하던 초고압용기 내부 온

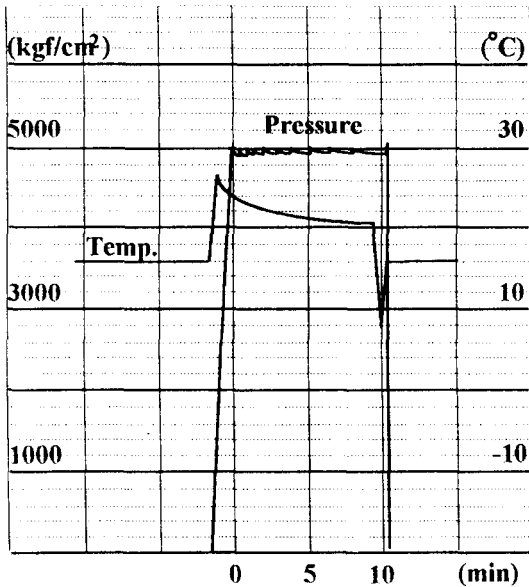


Fig. 2. Pressure-temperature diagram during pressurization at 5000 kg/cm<sup>2</sup> for 10 min

도는 27°C까지 상승하였다. 지정된 압력에 도달하면 hydraulic pump는 정지하고 압력이 조금씩 감소하는데 지정된 압력의 99%까지 압력이 감소하면 다시 hydraulic pump가 작동해 압력을 상승시키도록 setting되었다. 5000 kg/cm<sup>2</sup>에서 대기압까지 감압하는 데는 10초 정도가 소요되므로 초당 500 kg/cm<sup>2</sup> 정도의 속도로 감압되며 초고압용기 내부 온도도 감압과 더불어 급격히 떨어지나 곧 초기온도로 회복되었다(Fig. 2).

초고압처리에 의한 *E. coli* 및 총세균(total aerobes) 수의 변화를 Table 2에 나타내었다. *E. coli*의 경우, 2000 기압 정도까지는 압력에 내성이 있으나 4000기압 이상에서 처리하면 8 log cycle 이상의 살균 효과를 보이는 것으로 보고<sup>(17)</sup>되고 있는데 본 실험에서는 초기 8.80×10<sup>3</sup> CFU/ml 존재하던 것이 초고압처리에 의해 완전히 살균되었다. 총세균의 경우, 초고압에 의하여 부분적인 살균이 이루어졌는데 그램 음성 세균에 비해 압력에 내성을 갖고 있는 그램 양성 세균 및 포자형성균이 신선초 녹즙 중 다수 포함되어 있는 것으로 생각된다.

Table 2의 결과를 이용하여 최적의 살균조건을 찾기 위해서 압력(X<sub>1</sub>)과 처리시간(X<sub>2</sub>)을 독립변수로 하여 반응표면분석을 행하였다. 살균정도는 decimal reduction으로 나타냈으며, 독립변수의 scale을 같게 하기 위해 -1과 +1 사이의 범위로 coding 하였다. 얻어진 2차 회귀식은 다음과 같다.

$$-\log(N/N_0) = 3.406 + 0.156X_1 - 0.029X_2 - 0.256X_1^2 - 0.135X_1X_2 - 0.104X_2^2 \quad (1)$$

F-검정결과 추정된 회귀식이 p<0.05 수준에서 유의

Table 2. Effects of high hydrostatic pressure treatment on total aerobes and *E. coli* in *Angelica keiskei* juice

Treatment	Pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	Time (min)	Total aerobes (CFU/ml)	<i>E. coli</i> (CFU/ml)
Control	—	—	1.76×10 <sup>6</sup>	8.80×10 <sup>3</sup>
1	3800	5	1.66×10 <sup>3</sup>	<10
2	3800	15	1.24×10 <sup>3</sup>	<10
3	6200	5	7.15×10 <sup>2</sup>	<10
4	6200	15	1.00×10 <sup>3</sup>	<10
5	5000	10	7.20×10 <sup>2</sup>	<10
6	5000	10	7.80×10 <sup>2</sup>	<10
7	5000	10	4.55×10 <sup>2</sup>	<10
8	5000	10	7.55×10 <sup>2</sup>	<10
9	5000	10	8.20×10 <sup>2</sup>	<10
10	6700	10	8.40×10 <sup>2</sup>	<10
11	3300	10	1.67×10 <sup>3</sup>	<10
12	5000	17	9.40×10 <sup>2</sup>	<10
13	5000	3	7.40×10 <sup>2</sup>	<10

Table 3. Fit of experimental data to response surface model; analysis of variance table

Source	df	Sum of squares	Prob>F	R-square
Total regression	5	0.2419	0.0126	0.8306
Linear	2	0.1005	0.0205	0.3450
Quadratic	2	0.1230	0.0126	0.4221
Crossproduct	1	0.0185	0.1493	0.0635
Total error	7	0.0493		
Lack of fit	3	0.0062	0.8981	
Pure error	4	0.0432		

성이 있음을 알 수 있으며, lack of fit의 F-검정결과 유의성이 없는 것(p>0.05)으로 나타났다(Table 3). 따라서 반응표면 모형이 통계적으로 유의하며 자료에 적합하다고 볼 수 있다. 회귀식의 계수는 살균정도에 미치는 영향을 나타내는데 처리시간보다는 압력에 의한 영향을 알 수 있다.

Fig. 3은 이 결과를 contour plot한 것이다. 살균의 최적 조건은 최대의 정상점에 해당하는 곳으로 5700 kg/cm<sup>2</sup>에서 7.16 min 처리하면 3.44 log cycle의 총균수 감소 효과를 기대할 수 있다(Table 4).

#### 초고압에 의한 효소의 불활성화

야채나 과일가공시 문제가 되는 갈변현상은 maillard reaction, ascorbic acid oxidation 등의 비효소적 갈변과 polyphenol oxidase(PPO), peroxidase, lipoxygenase 등에 의한 효소적 갈변으로 구분되는데 열처리 공정이 이용될 경우, 효소적 갈색화는 효과적으로 억제할 수 있으나 비효소적 갈색화는 열처리 과정중 촉진되는 문제점이 있다. 초고압처리의 경우, maillard reaction에 의한 비효소적 갈색화는 효과적으로 억제할 수 있다고 보고<sup>(18)</sup>되고 있으나 갈변효소에 의한 효소적 갈색화에

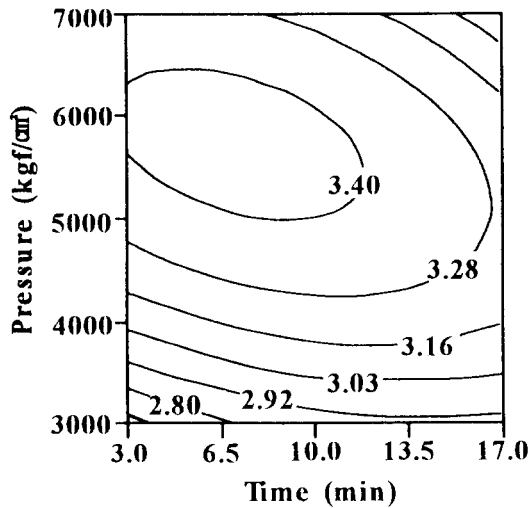


Fig. 3. Response surface contour for reduction ( $-\log N/N_0$ ) of total aerobes in *Angelica keiskei* juice as a function of pressure and time

Table 4. Canonical analysis of response surface (based on coded data)

Variables	Critical value	
	Pressure	Time
Coded	0.4117	-0.4051
Natural	5699.9 kg/cm <sup>2</sup>	7.1645 min
Predicted value at stationary point	3.4439	

초고압처리가 미치는 영향은 연구자마다 다른 결과를 보고하고 있다.

초고압 처리에 따른 peroxidase와 PPO의 활성 변화를 Table 5에 나타내었다. 효소활성은 초고압처리를 하지 않은 시료의 활성을 100으로 하여 상대적인 활성으로 나타내었다. Peroxidase의 경우 3300 kg/cm<sup>2</sup>이나 3800 kg/cm<sup>2</sup>에서 처리했을 때는 효소활성이 감소하지 않았으며 PPO의 경우 3300 kg/cm<sup>2</sup>에서 10분간 처리했을 때는 효소활성이 오히려 증가하였다.

PPO의 경우에도 압력에 의해서는 크게 불활성화 되지 않음을 알 수 있다. 그러나 실험범위 내에서 peroxidase가 압력이 상승할수록 불활성화 정도가 증가하는데 반해 PPO는 5470 kg/cm<sup>2</sup> 정도의 압력에서 4분간 처리시 최대 불활성화(32%) 될 것으로 예상되었다. PPO의 경우, 압력처리에 의한 불활성화는 연구자에 따라 다른 결과를 보고하고 있는데, Hayashi 등<sup>(20)</sup>은 배(Bartlett pear)에서 분리한 PPO를 400 MPa의 압력으로 10 min 처리하면 PPO activity가 5배 이상 증가한다고 보고하였으며, Knorr 등<sup>(21)</sup>은 0.5~1.0% citric acid를 immersion

Table 5. Effect of high hydrostatic pressure treatment on activity of PPO and peroxidase in *Angelica keiskei* juice

Treatment	Pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	Time (min)	Relative activity of PPO(%)	Relative activity of peroxidase(%)
1	3800	5	94	96
2	3800	15	104	100
3	6200	5	81	80
4	6200	15	85	73
5	5000	10	95	89
6	5000	10	74	82
7	5000	10	64	87
8	5000	10	64	78
9	5000	10	64	78
10	6700	10	72	67
11	3300	10	120	96
12	5000	17	74	84
13	5000	3	67	84

medium으로 사용하여 4000기압에서 15 min 처리하면 감자에 존재하는 PPO를 완전히 불활성화시킬 수 있다고 보고하였다.

Table 5의 결과를 이용하여 압력(X<sub>1</sub>)과 처리시간(X<sub>2</sub>)을 변수로 하여 peroxidase와 PPO의 불활성화 정도를 반응표면분석하였으며 그 결과를 contour plot하였다(Fig. 4). Peroxidase의 불활성화는 시간보다 압력에 의존하고 있으며, peroxidase를 상온에서 불활성화 하려면 매우 높은 압력이 필요하다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 감과류에 존재하는 peroxidase가 압력에 의해 쉽게 불활성화 되지 않았다는 Hiroshi 등<sup>(19)</sup>의 보고와 일치한다.

색도의 변화

초고압처리 전후의 녹즙을 Hunterlab L-, a-, b-value로 나타낸 결과를 Table 6에 나타내었다. 전체적인 경향을 살펴보면 압력처리후 L값(lightness), -a값(greenness), +b값(yellowness)이 증가하였다.

Dornenburg 등<sup>(16)</sup>은 식물세포 배양액에 압력을 가하여 색소 성분을 용출하는 연구를 하였는데 500기압까지는 색소의 추출이 거의 일어나지 않지만 1500기압에 이르면 50%의 색소가 용출되며 2500~3500기압에서 15 min 처리하면 거의 대부분의 색소를 세포 바깥으로 용출할 수 있음을 밝혔다. 따라서 실험에 사용된 압력 범위에서는 신선초 조직내부의 색소 성분이 거의 모두 녹즙액으로 빠져나왔다고 볼 수 있으며 색도의 증가는 이러한 결과에 따른 것으로 생각된다.

요 약

비열처리공법 중 하나로 새롭게 주목받고 있는 초고압처리를 신선초 녹즙에 적용하여 미생물의 살균정도 및

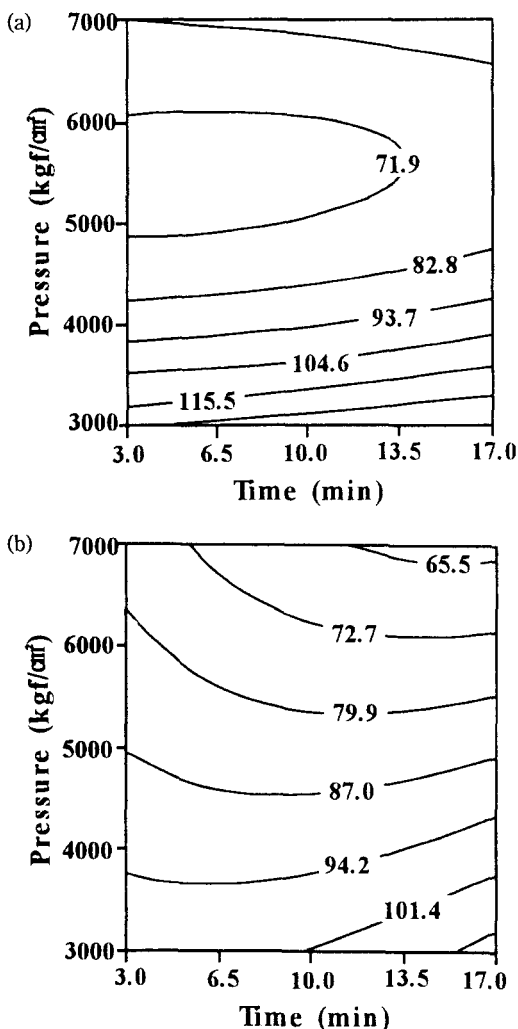


Fig. 4. Response surface contour for inactivation (%activity) of polyphenoloxidase(a) and peroxidase(b) in *Angelica keiskei* juice as a function of pressure and time

갈변효소의 불활성화정도를 살펴보았다. 실험에는 3800 kg/cm<sup>2</sup>~6700 kg/cm<sup>2</sup> 범위의 압력에서 3~17 min 동안 처리하였으며 반응표면분석법(RSM)을 이용하여 미생물 및 효소 불활성화의 최적조건을 구하고자 하였다. 반응표면분석결과 5700 kg/cm<sup>2</sup>(558.6 MPa)에서 7.16 min 처리할 때 3.44 log cycles의 총균수 감소효과를 얻을 수 있을 것으로 예상되었다. 대장균의 경우, 모든 처리 조건에서 완전살균이 가능하였다. Peroxidase나 PPO와 같은 갈색화효소는 초고압처리에 의해서 쉽게 불활성화 되지 않았으며, 미생물이나 효소의 불활성화는 처리시간보다는 압력에 더욱 의존함을 알 수 있었다.

감사의 글

Table 6. Color changes of *Angelica keiskei* juice after high hydrostatic pressure treatment

Treatment	Pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	Time (min)	L value	a value	b value
Cotrol	—	—	27.64	-8.70	10.78
1	3800	5	31.92	-13.17	16.33
2	3800	15	32.06	-13.22	16.59
3	6200	5	32.28	-13.19	16.51
4	6200	15	32.48	-13.44	17.06
5	5000	10	32.11	-13.06	16.63
6	5000	10	31.25	-11.41	14.84
7	5000	10	32.51	-13.39	16.92
8	5000	10	32.75	-12.84	15.83
9	5000	10	31.61	-12.14	15.62
10	6700	10	31.96	-12.58	16.12
11	3300	10	31.58	-12.54	15.75
12	5000	17	32.28	-12.68	16.41
13	5000	3	31.32	-11.81	15.10

본 연구는 1995년도 보건복지부 지원에 의해서 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- Hoover, D.G.: Pressure effects on biological systems. *Food Technol.*, 47, 150 (1993) [Hite, B.H.: The effect of pressure in the preservation of milk. *West Va. Univ. Agr. Expt. Sta. Bull.* (1899)]
- Hoover, D.G.: Pressure effects on biological systems. *Food Technol.*, 47, 150 (1993) [Bridgman, P.W.: The coagulation of albumin by pressure. *J. Bio. Chem.*, 19, 511 (1914)]
- Timson, W.J. and Short, A.J.: Resistance of microorganisms to hydrostatic pressure. *Biotechnol. Bioeng.* 7, 139 (1965)
- Marquis, R.E.: High-pressure microbial physiology. *Adv. Microbial Physiol.*, 11, 159 (1976)
- Heremans, K.: High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 11, 1 (1982)
- Knorr, D.: Effects of high-hydrostatic pressure processes on food safety and quality. *Food Technol.* 47, 156 (1993)
- Horie, Y., Kimura, K., Ida, M., Yoshida, Y. and Ohki, K.: Jam preparation by pressurization. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, 65, 975 (1991)
- Kinugasa, H., Takeo, T., Fukumoto, K. and Ishihara, M.: Changes in tea components during processing and preservation of tea extract by hydrostatic pressure sterilization. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, 66, 707 (1992)
- Sumitani, H., Suekane, S., Nakatani, A. and Tatsuka, K.: Changes in composition of volatile compounds in high pressure treated peach. *J. Agric. Food. Chem.*, 42, 785 (1994)
- Eshtiaghi, M.N., Stute, R. and Knorr, D.: High pressure and freezing pretreatment effects on drying, re-

- hydration, texture and color of green beans, carrots and potatoes. *J. Food Sci.*, **59**, 1168 (1994)
11. 김옥경, 궁성실, 박원봉, 이명환, 함승시: 명일엽 전초 및 생즙의 영양성분 분석. 한국식품과학회지, **24**, 592 (1992)
  12. A.O.A.C.: Official Method of Analysis. 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., p.822 (1984)
  13. Wong, T.C., Luh, B.S., and Whitaker, J.R.: Isolation and characterization of PPO isozymes of clingstone peach. *Plant Physiol.*, **48**, 19 (1971)
  14. 지완정, 조남숙, 김인철, 박관화, 최연호: 사과 peroxidase의 분리 및 특성. 한국식품과학회지, **23**, 442 (1991)
  15. Montgomery, D.C.: Design and analysis of experiments, 2nd ed., John Wiley & Sons, p.445 (1983)
  16. 성내경: SAS/STAT-회귀분석, 자유아카데미, p.201 (1991)
  17. Ludwig, H., Bieler, C., Hallbauer, K. and Scigalla, W.: Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure. In *High pressure and Biotechnology*, C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson (eds.), *John Libbey*, London, p.25 (1992)
  18. Tamaoka, T., Itoh, N. and Hayashi, R.: High pressure effect on maillard reaction, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2071 (1991)
  19. Ogawa, H., Fukuhisa, K. and Fukumoto, H.: Effect of hydrostatic pressure on sterilization and preservation of citrus juice. In *High pressure and Biotechnology*, C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson (eds.), *John Libbey*, London, p.269 (1992)
  20. Asaka, M. and Hayashi, R.: Activation of polyphenol oxidase in pear fruits by high pressure treatment. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2439 (1991)
  21. Eshitiaghi, M.N. and Knorr, D.: Potato cubes response to water blanching and high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.*, **58**, 1371 (1993)
  22. Dornenburg, T. and Knorr, K.: Cellular permeabilization of cultured plant tissue by high electric field pulses or ultra high pressure on the recovery of second metabolites. *Food Biotechnol.*, **7**, 35 (1993)

---

(1995년 9월 5일 접수)