

초임계 이산화탄소 처리가 동결 건조된 소간의 이화학적 특성 및 미생물 저감화에 미치는 영향

김혜민¹ · 우성운¹ · 김아나² · 허호진² · 천지연³ · 최성길²

¹아미코젠(주)

²경상대학교 농화학식품공학과(농업생명과학연구원)

³순천대학교 식품공학과

Effect of Supercritical Carbon Dioxide on Physicochemical Properties and Microbial Reduction of Freeze-Dried Bovine Liver

Hye-Min Kim¹, Sung-Woon Woo¹, Ah-Na Kim², Ho-Jin Heo², Ji-Yeon Chun³, and Sung-Gil Choi²

¹AMICOGEN Ltd.

²Department of Agricultural Chemistry and Food Science and Technology
(Institute of Agriculture and Life Sciences), Gyeongsang National University

³Department of Food Technology, Suncheon National University

ABSTRACT Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) treatment has been becoming an important method for substituting the use of organic solvents for samples extraction prior to analysis due to its low toxicity, ease of handling, low cost of disposal etc. Freeze-dried bovine liver was treated with SC-CO₂ under different pressures (200, 300, and 450 bar) in order to investigate effects on physicochemical properties and reduction of microbial load. The yield of lipid extraction from bovine liver by SC-CO₂ treatment increased with increasing pressure, with values of 84, 86, and 90% in response to 200, 300, and 450 bar, respectively. Results of high performance liquid chromatography analysis showed that vitamin A and coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀), which is soluble in lipid, were almost removed from bovine liver by SC-CO₂ treatment. Saturated fatty acids ratio of bovine liver decreased with increasing pressure, whereas polyunsaturated fatty acids increased with increasing pressure. Total content of amino acids in bovine liver treated by SC-CO₂ was less than that of the control sample without treatment. The number of aerobic bacteria in bovine liver, which was stored at 5°C for 5 days and freeze-dried, decreased from 6.2 to 4.2 log CFU/g by SC-CO₂ treatment at 100 bar for 3 h. Interestingly, coliform bacteria were not found in the bovine liver sample by SC-CO₂ at 100 bar for 3 h under all storage conditions. This indicates that SC-CO₂ treatment can effectively reduce coliform bacteria in the food matrix even at low moisture. In conclusion, freeze-dried bovine liver by proper SC-CO₂ treatment may be used as a potential high protein source, with increasing microbial safety and stability of lipid oxidation.

Key words: supercritical carbon dioxide, physicochemical properties, microbial, reduction, bovine liver powder

서 론

소간에는 단백질, 지질, 비타민 A, B₁, B₂ 및 철분이 많이 함유되어 있으며, 비타민 복합체, 철, 구리, 코발트, 망간, 인, 칼슘 등 빈혈이나 스테미나 증진에 필요한 무기질도 다량 함유되어 있다(1). 소의 간장을 가수분해하여 얻어지는 추출물은 간질환의 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있고(2-4), 사염화탄소에 의한 급 만성적 손상에 대해서 간장 추출물의 항독성 효과(5), 초임계 유체를 이용하여 소간에서

천식 치료제로 사용되는 clenbuterol 추출에 관한 연구 등이 이루어졌다(6). 현재까지는 소간을 이용한 생리활성 효과에 관한 연구들이 주로 이루어졌지만, 육가공산업에서 고부가가치 식품소재로 소간을 활용하기 위한 연구는 부족한 실정이다.

초임계 이산화탄소(SC-CO₂) 기술은 유체의 특이적 성질을 이용하여 유용물질을 추출하는 방법으로 비교적 낮은 온도(40~60°C)에서 수행되므로 열에 민감한 천연물질의 분리·정제에 많이 이용되고 있으며(7), 주로 이산화탄소를 이용하기 때문에 인체에 무해한 친환경적인 추출법으로 알려져 있다.

초임계 유체로 사용되는 이산화탄소는 다른 유체에 비해 임계점(31.1°C, 73.8 bar)이 낮고 무색, 불연성, 무독성이며 재활용이 용이한 천연용매라고 할 수 있는데, 용질과의 비

Received 11 August 2015; Accepted 11 November 2015

Corresponding author: Sung-Gil Choi, Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea

E-mail: sgchoi@gnu.ac.kr, Phone: +82-55-772-1906

반응성 및 부식성이 거의 없고 가격이 비교적 저렴하다는 이점으로 인해 초임계 유체의 용매로 가장 많이 이용되고 있다(8,9).

초임계 유체 기술의 응용 범위는 광범위하며, *Bacillus subtilis* spores(10)와 *Escherichia coli* 불활성(11), 식품에 존재하는 미생물 제어(12), 밀에 오염된 *Penicillium oxalicum* 포자멸균(13), 멸치로부터 지방 추출(8), 브로콜리 잎으로부터 유리 아미노산 추출(14) 등 다양한 분야에서 이용되고 있다.

초임계 이산화탄소의 적용을 통해 효과적으로 지방을 제거하고 안전성을 저해하는 미생물을 저감화할 수 있다면 소간이 비타민 및 미네랄을 고함유한 고단백 저지방의 고부가 식품소재로서 활용성이 매우 높을 것으로 판단된다. 이에 본 연구에서는 친환경적이고 인체에 해가 없는 SC-CO₂를 이용하여 소간의 안전한 고부가가치 식품소재로서의 새로운 활용방안을 모색하고, 소간의 기능성 소재화로 육가공산업에 기여하기 위한 기초자료를 마련하고자 다양한 SC-CO₂ 처리 조건에 의한 동결 건조된 소간의 미생물 저감화 효과 및 이화학적 변화에 관하여 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 소간은 경상남도 진주시 소재의 정육점에서 한우 유래의 신선한 것을 구매 후 동결 건조하여 -80°C에서 보관하여 사용하였고, 초임계 이산화탄소 추출에 순도 99.99%의 이산화탄소(CO₂)를 사용하였다. 비타민 A 및 coenzyme Q₁₀(CoQ₁₀) 표준품은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고 그 외 분석 및 보조용매로 사용된 모든 시약은 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

초임계 이산화탄소(SC-CO₂) 추출

본 실험에 사용된 초임계 이산화탄소(SC-CO₂) 추출 장치(SCE-05, Ilshin Autoclave, Daejeon, Korea)의 모식도

는 Fig. 1과 같다. 동결 건조된 소간을 분쇄하여 10 mesh의 체망에 걸러 실험에 이용하였다. 1 L의 내부 용적을 가지고 있는 초임계 이산화탄소 추출 장치 vessel에 동결 건조한 소간 시료 일정량을 투입 후 밀폐하고 이산화탄소 탱크에 연결된 이산화탄소는 냉각기를 이용하여 액화시켰다. 추출 장치 온도가 지정 온도(45°C)에 도달했을 때 냉각된 이산화탄소 탱크의 밸브를 연 다음 V-1, V-2를 열고 감압 밸브(V-3)는 잠갔다. 이어 지정된 압력까지 가압하여 일정하게 압력을 조절하였으며 추출기에 일정한 유량으로 이산화탄소를 유입시켰다. 추출 압력은 지속해서 모니터링하고 추출 용기에 연결된 Back Pressure Regulator(BPR)를 통해 제어했다. 일정 시간 동안 추출 후 추출이 끝나면 추출 용기의 감압 밸브(V-3)를 열어 장치 내 남아있는 이산화탄소를 완전히 제거한 다음 시료를 꺼냈다.

동결 건조된 소간에서 SC-CO₂ 처리에 의한 이화학적 특성 변화를 확인하고자 45°C의 일정한 온도 조건에서 200, 300 및 450 bar에서 3시간 동안 SC-CO₂를 처리하였고, 미생물 저감화 효과를 확인하기 위해 45°C에서 2시간 동안 다양한 압력(50, 100 및 400 bar) 조건에서 처리하여 실험에 사용하였다.

유기용매 추출

에테르 및 클로로포름과 메탄올을 2:1(v/v)로 혼합한 용액(CM)을 Soxhlet 추출 장치를 이용하여 45°C에서 12시간 동안 동결 건조된 소간으로부터 지방을 추출하였고, 추출 후 지방에 남아있는 유기용매는 진공 감압농축기를 이용하여 완전히 제거 후 실험에 사용하였다.

일반성분 분석

AOAC법(15)에 따라 수분은 105°C의 건조기에서 3시간 동안 상압 건조하여 30분 동안 방랭 후 측정하였고, 회분은 직접 회화법으로 550°C에서 4시간 동안 회화로에서 회화시켰다. 조지방은 Soxhlet 추출법으로 에테르를 이용하여 12시간 동안 60°C에서 추출한 다음 에테르를 완전히 제거하여

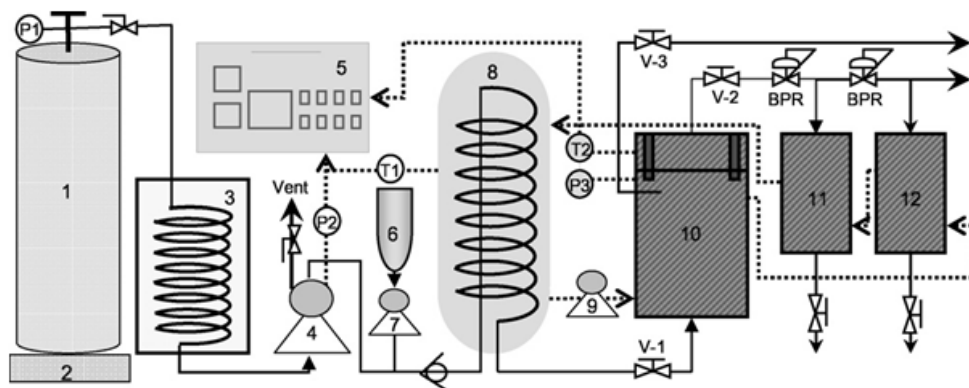


Fig. 1. Schematic diagram of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) system: 1, CO₂ cylinder; 2, electronic balance; 3, chiller; 4, CO₂ pump; 5, controller; 6, cosolvent reservoir; 7, cosolvent pump; 8, heating bath; 9, circulation pump; 10, extractor; 11, separator 1; 12, separator 2; V-1, valve 1, V-2, valve 2; V-3, valve 3; BPR, back pressure regulator; dotted lines, water line; solid lines, CO₂ line.

조지방 함량을 측정하였고, 조단백질은 auto Kjeldahl법으로 측정하였으며 질소 계수 6.25를 사용하여 환산하였다.

무기성분 분석

Jeong 등(16)의 방법에 따라 동결 건조된 소간의 무기성분을 분석하였다. 각 시료 0.5 g에 분해용액(HClO₄:H₂SO₄:H₂O₂=9:2:5) 25 mL를 가하여 hot plate 위에서 무색으로 변할 때까지 분해한 후 100 mL로 정용하여 여과(Whatman No. 2, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)한 후 Inductively coupled plasma mass spectrometer(Optical Emission Spectrometer Optima 5300 DV, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 power 1,400 W, analysis pump flow rate 0.7 L/min, plasma 17 L/min, auxiliary 0.2 L/min, nebulizer 0.7 L/min으로 분석하였다.

비타민 A 및 CoQ₁₀ 분석

Mattila 등(17)의 방법에 따라 high performance liquid chromatography(HPLC, Agilent 1260 Series, Agilent Technology, CA, USA)를 이용하여 비타민 A 및 CoQ₁₀을 분석하였으며 분석 조건은 Table 1에 나타내었다. 비타민 A를 분석하기 위해 시료 0.2 g을 정밀히 달고 50 mL의 KOH-ethanol과 2% pyrogallol-ethanol 1 mL를 가한 후 환류냉각기를 부착하여 30분간 비누화시켰다. 신속히 냉각하여 실온으로 한 후 물 60 mL를 가해 갈색 분액깔때기에 옮긴 다음 분액깔때기 중에서 물을 충분히 분리한 석유-에테르층을 취하여 무수황산나트륨을 가해 탈수하였다. 석유-에테르 추출액을 모두 합하여 50°C에서 감압 농축한 후 잔류물을 isopropanol로 녹여 2 mL로 한 것을 시험용액으로 했다. 그리고 CoQ₁₀을 분석하고자 시료 0.1 g에 0.15 M NaCl 20 mL와 20 mL 에탄올을 첨가하여 혼합시킨 후 50 mL 헥산을 첨가하여 10분간 충분히 추출한 다음 상층의 헥산을 제거한 후 isopropanol로 용해하였다. 또한 모든 시료는 0.45 µm syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였다.

지방 추출 수율

45°C에서 200, 300 및 450 bar로 3시간 동안 SC-CO₂로

추출한 시료와 45°C에서 12시간 동안 유기용매(에테르 및 CM)로 추출한 시료의 지방 추출 수율은 추출 전 시료 내 지방 함량 대비 추출 후 시료에 남아있는 지방 함량을 %로 계산하여 나타내었다.

지방 추출 수율(%)=

$$\frac{\text{동결 건조된 소간의 지방 함량} - \text{추출 후 지방 함량}}{\text{동결 건조된 소간의 지방 함량}} \times 100$$

지방산 분석

Metcalf와 Schmitz(18)의 방법에 따라 동결 건조된 소간으로부터 총 12가지의 지방산을 분석하였다. 시료 50 mg에 0.5 N NaOH-methanol을 3 mL 가하여 100°C에서 5분간 중탕 후 5분간 냉각하였다. 그다음 14% BF₃-methanol 3 mL를 가하여 잘 흔들어준 후 5분간 100°C에서 중탕하였고 5분간 냉각한 다음 5 mL의 헥산을 가했다. 분액깔때기에 상기의 여액과 포화 NaCl 용액을 가하여 30초간 혼합하고 방치한 후 상층을 분리하였고 여분의 수분을 제거하기 위하여 무수황산나트륨을 이용하여 완전히 제거한 뒤 gas chromatography(GC, 6890N, Agilent Technologies)로 분석하였다. 분석칼럼은 SPTM-2560(100 mm×0.25 mm, 0.20 µm)이며, 검출기는 FID를 사용하였다.

아미노산 분석

Jeong과 Shim(19)의 방법에 따라 지방을 추출한 소간에서 총 17가지의 아미노산을 분석하였다. 각 시료 50 mg을 취하여 6 N HCl 용액을 가하고 진공 밀봉하여 건조기(110±1°C)에서 24시간 동안 가수 분해한 후 glass filter로 여과한 여액을 회전 진공 농축기를 이용하여 염산을 제거하고 증류수로 3회 세척한 다음 감압 농축하여 sodium citrate buffer(pH 2.2) 3 mL로 용해한 후 0.45 µm membrane filter로 여과한 여액을 아미노산 자동분석기(Biochrom 30, Biochrom, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다. 이때 아미노산 표준품은 Pharmacia Biotech(Cambridge, UK)의 제품을 이용하였다.

총세균 및 대장균군 분석

SC-CO₂ 처리에 따른 소간의 미생물 저감화 효과를 알아 보고자 소간을 냉장고에서 0, 1, 3, 5, 7일간 냉장(4°C) 보관하면서 미생물을 증식시킨 시료를 동결 건조한 후, 다양한 압력 조건에 따라 SC-CO₂ 처리하여 실험에 사용하였다. 그리고 각 시료를 RF0(0일 저장), RF1(1일 저장), RF3(3일 저장), RF5(5일 저장), 그리고 RF7(7일 저장)로 명명하였다.

총세균 및 대장균군 분석은 Diliello(20)의 방법에 따라 실험하였고, 총세균수를 계수하고자 stomacher bag에 시료 1 g과 0.85% 멸균생리식염수 9 mL를 가한 후 stomacher를 이용하여 120초간 균질화한 다음 0.85% 멸균 생리식염수를 이용하여 단계별로 희석해 시료를 준비한 후, plate

Table 1. Analytical conditions of vitamin A and CoQ₁₀ by HPLC

	Vitamin A	CoQ ₁₀
Mobile phase	A: ACN B: Methanol	A: Ethanol B: Methanol
Isocratic condition	A: 75 B: 25	A: 35 B: 65
Flow rate	1 mL/min	1 mL/min
Column temperature	35°C	25°C
Detector	UV	UV
Wavelength	325 nm	275 nm
Injection volume	20 µL	20 µL
Column	Luna C ₁₈ (150 mm×4.6 mm×5 µm)	

count agar(Difco Lab., Detroit, MI, USA)에 희석액을 접종한 다음, 35±1°C에서 48시간 배양시킨 후 수를 측정하여 colony forming unit(CFU/g)으로 표시하였다. 그리고 대장균군은 상기의 방법과 동일하게 실시한 후 desoxycholate lactose agar(Difco Lab.)에 희석액을 접종시켜 35±1°C에서 48시간 배양 후 30~300개 사이의 집락을 계수하였다.

통계처리

모든 실험은 3번 반복하였으며, 통계처리는 Window용 SAS 9.1 version(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 분산분석(analysis of variance)을 하였으며, Duncan의 다중 범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

일반성분 및 무기성분

동결 건조된 소간의 일반성분 분석 결과는 Table 2와 같다. 대조군의 일반성분 분석 결과 수분 4.78%, 회분 11.61%, 지방 32.09%, 단백질 49.26%로 나타났다. 먼저 조지방의 경우 대조군에서는 32.09%였지만, 처리군에서는 200, 300, 450 bar에서 각각 5.04, 4.49, 3.08%로 초임계 이산화탄소 처리에 의한 지방 추출로 인해 대체적으로 크게 감소한 결과를 보였다. 초임계 이산화탄소와의 비교를 위해 실험한 유기용매 추출의 경우 에테르와 CM에서 각각 9.50, 9.52%

로 나타나 지방 추출에 효과적인 유기용매 추출법에 비하여 초임계 이산화탄소 추출에 의해 지방 함량이 더 크게 감소하는 것을 알 수 있었다. 수분, 조회분, 조단백질의 경우 처리군에서는 지방성분의 추출로 인해 대조군에 비해 다소 높은 결과를 보였다.

총 9종(K, Ca, Mg, Na, Cu, Mn, Zn, Fe, P)의 무기성분을 정량 분석한 결과는 Table 3과 같다. 대체적으로 초임계 이산화탄소 처리군에서 대조군에 비해 높은 결과를 보였다. P의 경우 대조군에서 1,077.39 mg/100 g으로 가장 높은 수치를 보였고, 처리군에서는 200, 300, 450 bar에서 각각 1,349.98, 1,306.17, 1,247.01 mg/100 g으로 다소 높게 나타난 결과를 보였다. 그리고 K, Ca, Mg, Na, Mn, Zn, Fe에서도 모두 처리군에서 높은 결과를 보였다. 흥미로운 점은 다른 무기성분과는 달리 중금속으로 분류되는 Cu의 경우 대조군(25.64 mg/100 g)에 비해 처리군에서는 200, 300, 450 bar에서 각각 14.82, 23.16, 9.24 mg/100 g으로 다소 낮은 결과를 보인 것이다. 이는 무기성분의 각 성분에 대한 초임계 이산화탄소의 용매력의 차이 때문으로 사료된다. 초임계 이산화탄소 처리에 의해 오징어 가공 부산물의 중금속(비소, 납, 수은)이 감소한 것으로 보고(21)된 바 있다. 한편 유기용매를 처리하였을 때는 K과 Na를 제외한 대부분의 미네랄 수치가 대조군에 비해 낮은 결과를 보였다.

비타민 A 및 CoQ₁₀

대부분의 포유류에 함유되어 있는 주요 지용성 유기화합

Table 2. Proximate composition of freeze-dried bovine liver treated by SC-CO₂ or organic solvents (Unit: %)

	Control	SC-CO ₂ treatment			Organic solvents	
		200 bar	300 bar	450 bar	Ether	CM ¹⁾
Moisture	4.78±0.14 ^{b2)}	5.96±1.23 ^{ab}	6.78±1.46 ^{ab}	6.49±0.96 ^{ab}	7.81±0.23 ^a	7.43±2.46 ^a
Ash	11.61±0.64 ^{bc}	10.38±2.87 ^c	11.01±0.34 ^{bc}	11.57±2.25 ^{bc}	14.86±0.21 ^a	12.97±0.27 ^{ab}
Crude protein	49.26±1.93 ^c	59.99±1.38 ^a	60.04±3.56 ^a	60.99±2.40 ^a	55.19±1.22 ^b	57.06±1.66 ^{ab}
Crude fat	32.09±0.60 ^a	5.04±1.38 ^c	4.49±0.38 ^c	3.08±0.36 ^c	9.50±0.30 ^b	9.52±2.47 ^b

All measurements were performed in triplicate.

¹⁾Chloroform : methanol (2:1, v/v).

²⁾Means with different letters in a row were different significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. Mineral contents of freeze-dried bovine liver treated by SC-CO₂ or organic solvents

(Unit: mg/100 g of freeze-dried bovine liver)

Mineral	Control	SC-CO ₂ treatment			Organic solvents	
		200 bar	300 bar	450 bar	Ether	CM ¹⁾
K	168.05±0.51 ^{f2)}	295.54±1.07 ^a	289.42±1.36 ^b	210.08±0.34 ^d	264.65±1.22 ^c	188.85±2.15 ^e
Ca	8.35±0.04 ^c	12.30±0.03 ^a	9.76±0.03 ^b	9.77±0.12 ^b	6.07±0.82 ^d	6.29±1.08 ^d
Mg	68.84±0.20 ^c	73.56±0.14 ^b	73.05±0.09 ^b	74.83±0.17 ^a	46.85±1.21 ^d	31.40±0.25 ^e
Na	252.32±0.59 ^f	360.87±0.63 ^a	332.54±0.18 ^c	319.61±0.25 ^d	297.84±0.34 ^e	339.74±0.27 ^b
Cu	25.64±0.07 ^a	14.82±0.03 ^c	23.16±0.05 ^b	9.24±0.01 ^e	7.05±1.92 ^f	12.49±0.43 ^d
Mn	0.68±0.00 ^b	0.92±0.00 ^a	0.93±0.00 ^a	0.66±0.00 ^b	0.44±0.02 ^c	0.40±0.14 ^c
Zn	6.20±0.05 ^d	13.79±0.05 ^a	13.29±0.05 ^b	7.46±0.07 ^c	4.29±0.02 ^e	3.85±0.03 ^f
Fe	32.36±0.24 ^b	38.10±0.11 ^a	38.05±0.12 ^a	28.58±0.27 ^c	7.46±0.31 ^e	19.83±0.26 ^d
P	1,077.39±2.32 ^d	1,349.98±2.15 ^a	1,306.17±3.06 ^b	1,247.01±7.90 ^c	661.70±1.74 ^e	300.58±1.92 ^f

All measurements were performed in triplicate.

¹⁾Chloroform : methanol (2:1, v/v).

²⁾Means with different letters in a row were different significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 4. The values of vitamin A and CoQ₁₀ in freeze-dried bovine liver treated by SC-CO₂ or organic solvents (Unit: mg/100 g of freeze-dried bovine liver)

Vitamins	Control	SC-CO ₂ treatment			Organic solvents	
		200 bar	300 bar	450 bar	Ether	CM ¹⁾
Vitamin A	75.48±0.43 ^{a2)}	14.28±1.27 ^b	5.28±2.00 ^c	2.60±0.21 ^d	3.75±0.93 ^d	1.28±0.41 ^c
CoQ ₁₀	5.74±0.11 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b

All measurements were performed in triplicate.

¹⁾Chloroform : methanol (2:1, v/v).

²⁾Means with different letters in a row were different significantly at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

물인 비타민 A와 CoQ₁₀은 소간에 함유된 우수한 생리활성 물질로 고부가가치의 우수한 식품소재로서의 활용 가치를 설명할 수 있는 성분들이다. 비타민은 인간에게 필요한 유기 화합물로 비타민 A가 부족하면 야맹증(22)이 유발된다. 그리고 CoQ₁₀은 세포막을 보호하고 자유라디칼의 손상으로부터 지단백을 보호하는 항산화 기능을 가지는 것으로 알려져 있다(23). 초임계 이산화탄소 처리에 의해 소간의 비타민 A와 CoQ₁₀의 함량에 미치는 영향을 확인하기 위하여 초임계 이산화탄소 처리에 따른 소간의 비타민 A와 CoQ₁₀의 함량을 분석하였고, 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 비타민 A의 경우 대조군에서 75.48 mg/100 g이었고, 처리군에서는 200, 300, 450 bar에서 각각 14.28, 5.28, 2.60 mg/100 g으로 나타났으며, 압력이 높아짐에 따라 소간으로부터 함량이 감소하는 결과를 보였다. CoQ₁₀의 경우 대조군에서는 5.74 mg/100 g으로 나타났으나 모든 처리군에서는 전혀 검출되지 않았다. 이는 초임계 이산화탄소 처리에 의해 지용성 유기화합물인 비타민 A가 소간으로부터 다른 지방성분과 같이 추출되어 나온 결과로 사료된다. 초임계 이산화탄소 처리를 통해 소간의 기름이 부산물로 발생되지만, 소간의 지방 성분에는 이들 비타민 A와 CoQ₁₀ 같은 지용성 물질들이 함유되어 있기 때문에 추가적인 정제 및 가공 과정 등을 통해 고부가 식품소재로 활용할 수 있으리라 판단된다.

지방 추출 수율

소간은 많은 지방을 함유하기 때문에 생산 및 저장, 유통 등의 과정에서 지방 산패가 우려된다. 또한 30% 이상의 높은 지방 함량은 고부가 식품소재로 활용하기 위한 요건인 고단백, 저지방이라는 특성에도 부합하지 않고, 이로 인해 단백질 소재로 활용하기에 한계가 있기 때문에 효과적인 지방 성분의 저감화는 매우 중요하다고 사료된다. 따라서 본 연구에서는 초임계 이산화탄소 처리가 소간의 지방 추출에 미치는 영향을 확인하기 위하여 다양한 압력 조건에 따른 지방 추출 수율을 분석하였고, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 초임계 이산화탄소 처리 시 200, 300, 450 bar에서 각각 약 84, 86, 90%의 지방 추출 수율을 보여 처리 압력이 높아질수록 수율이 증가($P<0.05$)하는 경향을 보였다. 지방 추출이 용이한 방법인 유기용매 추출의 경우 에테르와 CM 모두 약 70%의 결과를 보였다. 결과적으로 초임계 이산화탄소 처리를 통해 소간의 지방을 효과적으로 추출할 수 있을 것으

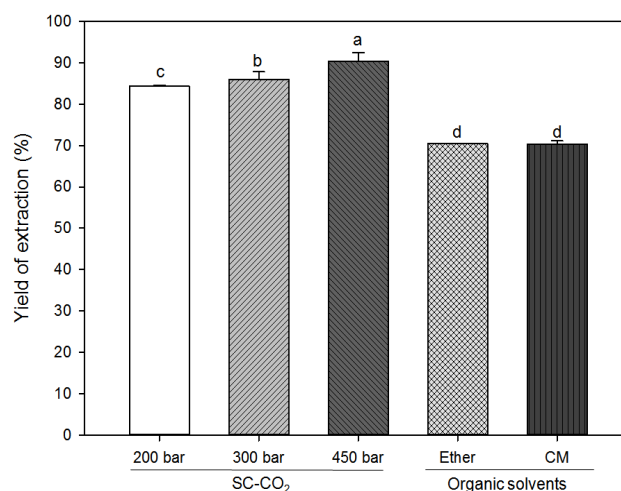


Fig. 2. The amount of lipid extracted from freeze-dried bovine liver by SC-CO₂ under different temperatures and pressures and organic solvents. Yield of extraction was calculated as follows: % yield=(fat contents of freeze-dried bovine liver-extracted fat contents of freeze-dried bovine liver)/(fat contents of freeze-dried bovine liver). Data were expressed as mean±SD in triplicate. Different letters (a-d) above the bars indicate significant differences between the groups by Duncan's multiple range tests at $P<0.05$.

로 사료된다. 상어 간(24) 및 난황분(25)의 초임계 이산화탄소 추출 시 처리 압력이 높아짐에 따라 지방 및 콜레스테롤의 추출 수율이 증가했다는 보고가 있다.

지방산 조성

초임계 이산화탄소 처리에 의해 동결 건조된 소간으로부터 추출한 지질의 지방산을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 포화지방산의 경우 초임계 이산화탄소 처리에 따라 200, 300, 450 bar에서 각각 64.52, 54.37, 50.61%로 나타나 압력이 높아질수록 감소하는 경향을 보였다. 단일불포화지방산의 경우 일정한 경향을 보이진 않았지만, 다가불포화지방산은 초임계 이산화탄소 처리에 따라 200, 300, 450 bar에서 각각 18.91, 30.89, 31.92%로 나타나 압력이 높아질수록 그 비율이 증가하는 경향을 보였다. 포화지방산의 경우 palmitic acid가 가장 높은 비율을 차지하였고, 200, 300, 450 bar에서 각각 53.13, 43.20, 44.22%로 처리 압력이 높아질수록 감소하는 경향을 보였다. 흥미로운 점은 단일불포화지방산의 gadoleic acid의 경우 200 bar에서는 검출되

Table 5. The contents of fatty acids extracted from freeze-dried bovine liver by SC-CO₂ or organic solvents (Unit: %)

Fatty acids	SC-CO ₂ treatment			Organic solvents	
	200 bar	300 bar	450 bar	Ether	CM ¹⁾
SFA ²⁾	64.52	54.37	50.61	55.80	53.38
Caprylic acid	0.12±0.11 ^{b8)}	0.00±0.00 ^b	1.01±0.20 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
Lauric acid	0.73±0.02 ^a	0.66±0.23 ^a	0.22±0.12 ^b	0.35±0.01 ^b	0.55±0.00 ^a
Myristic acid	10.54±0.04 ^a	10.51±0.07 ^a	5.16±2.53 ^c	9.33±0.04 ^{ab}	8.24±0.01 ^b
Palmitic acid	53.13±0.39 ^a	43.20±1.19 ^c	44.22±3.05 ^{bc}	46.12±0.08 ^b	44.59±0.29 ^{bc}
MUFA ³⁾	16.19	14.11	18.49	11.94	6.34
Myristoleic acid	2.44±0.01 ^b	3.04±0.62 ^a	0.88±0.46 ^c	1.24±0.02 ^c	0.00±0.00 ^d
Palmitoleic acid	10.33±0.06 ^a	7.27±2.78 ^b	6.04±3.36 ^b	6.32±0.04 ^b	4.20±0.81 ^b
Oleic acid	3.42±0.14 ^{bc}	2.70±1.09 ^{cd}	5.35±1.40 ^a	4.38±0.08 ^{ab}	2.14±0.45 ^d
Gadoleic acid	0.00±0.00 ^b	1.10±0.13 ^b	6.22±8.79 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
PUFA ⁴⁾	18.91	30.89	31.92	22.26	24.09
Linoleic acid	12.07±0.22 ^{ab}	9.25±4.05 ^b	12.08±0.86 ^{ab}	12.13±0.56 ^{ab}	14.77±0.03 ^a
GLA ⁵⁾	0.95±0.40 ^b	0.81±0.03 ^b	3.30±1.90 ^a	0.00±0.00 ^b	0.56±0.01 ^b
ALA ⁶⁾	2.02±0.04 ^b	0.50±0.08 ^c	6.47±0.65 ^a	1.37±0.31 ^b	0.00±0.00 ^c
Arachidonic acid	3.61±1.45 ^b	5.64±0.15 ^b	10.07±3.64 ^a	8.76±0.90 ^a	8.75±0.12 ^a
EPA ⁷⁾	0.26±0.02 ^b	4.69±0.77 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b

All measurements were performed in triplicate.

¹⁾Chloroform : methanol (2:1, v/v).

²⁾SFA: sum of saturated fatty acid. ³⁾MUFA: sum of monounsaturated fatty acid. ⁴⁾PUFA: sum of polyunsaturated fatty acid.

⁵⁾GLA: γ -linolenic acid. ⁶⁾ALA: α -linolenic acid. ⁷⁾EPA: eicosapentaenoic acid.

⁸⁾Means with different letters in a row were different significantly at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

지 않았지만, 300 및 450 bar에서는 각각 1.10, 6.22% 증가하는 결과를 보였으며, oleic acid는 450 bar에서는 다소 증가한 반면에 myristoleic acid와 palmitoleic acid는 감소하는 경향을 보였다. 다가불포화지방산의 경우 arachidonic acid와 EPA가 선택적으로 추출되는 경향을 보였다. 유기용매법의 경우 포화지방산에서는 300 bar의 결과와 다소 유사한 수치를 보였고, 단일불포화지방산은 초임계 이산화탄소 처리군에 비해 전체적으로 낮은 수치를 보였다. 그리고 다가불포화지방산의 경우 200 bar 처리군의 결과에 비해 다소 높고, 300 및 450 bar의 결과보다는 낮은 수치를 보였다.

아미노산 조성

동결 건조된 소간으로부터 총 17가지의 아미노산을 분석한 결과는 Table 6과 같다. 대조군의 경우 총 아미노산이 약 15,982 mg/100 g으로 나타났고, threonine, valine, methionine 등 필수아미노산이 약 9,719 mg/100 g, aspartic acid, serine, glutamic acid 등 비필수 아미노산이 6,263 mg/100 g으로 나타났다. 필수아미노산 중에서는 leucine이 약 2,060 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 보였고, 다음으로 lysine(1,650 mg/100 g), arginine(1,408 mg/100 g), valine(1,199 mg/100 g), phenylalanine(1,166 mg/100 g), isoleucine(742 mg/100 g), threonine(507 mg/100 g), histidine(495 mg/100 g), methionine(492 mg/100 g) 등의 순으로 나타났다. 그리고 비필수아미노산의 경우 alanine(2,707 mg/100 g)이 가장 높은 함량을 보였고, 다음으로 proline(1,371 mg/100 g), tyrosine(834 mg/100 g), glycine(834 mg/100 g), cysteine(299 mg/100 g),

aspartic acid(132 mg/100 g), serine(72 mg/100 g), glutamic acid(14 mg/100 g) 등의 순으로 나타났다. 초임계 이산화탄소 처리에 의해 대체적으로 모든 종류의 아미노산이 감소하는 경향을 보였다. 유기용매법의 경우 초임계 이산화탄소 처리군에 비해 더 큰 감소를 보였다. 초임계 이산화탄소 처리에 의해 아미노산이 추출되어 소실된 것으로 사료된다.

SC-CO₂ 처리에 의한 미생물(총세균 및 대장균군) 저감화 효과

동결 건조된 소간으로부터 총세균(Fig. 3A)과 위생지표세균인 대장균군(Fig. 3B)의 미생물 저감화 효과를 확인하고자 SC-CO₂ 장치를 이용하여 처리 시간(0.5~3시간)에 따라 45°C와 100 bar의 일정한 온도 및 압력 조건에서 처리한 결과는 Fig. 3과 같다.

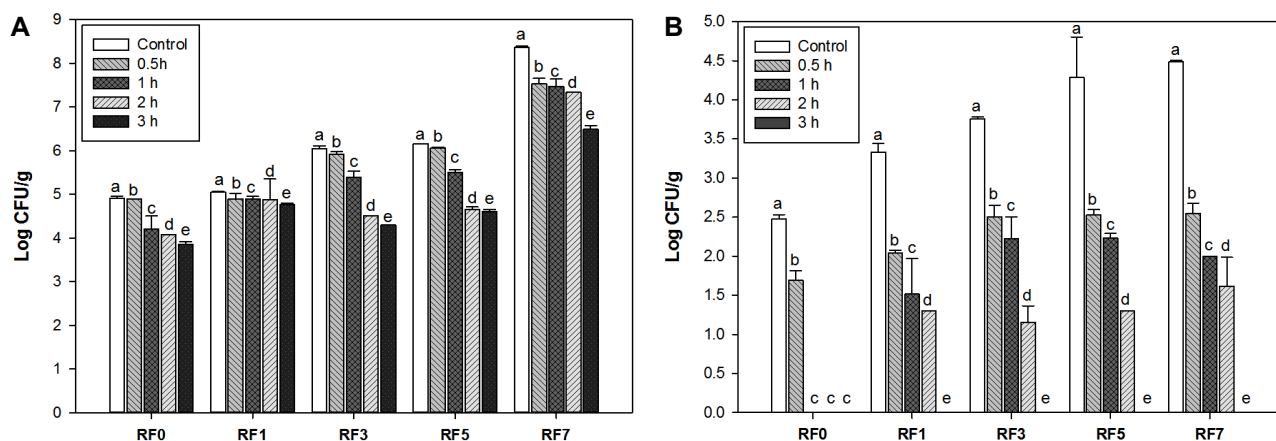
먼저 저장 전 시료의 총세균수의 경우 대조군에서는 약 4.8 log CFU/g으로 나타났고, 초임계 이산화탄소 처리군에서 30분 처리 시에는 대조군과 거의 차이가 없었지만 1시간 이후부터 3시간까지는 각각 약 4.25, 4.1, 3.8 log CFU/g으로 감소하였다. 이후 저장에 따라 전체적으로 총세균수가 증가하는 경향을 보였다. 저장 1일차에서는 대조군과 처리군의 차이가 크게 나타나지 않았고 3일째에는 대조군의 경우 6 log CFU/g 이상으로 증가하였으며, 30분 처리군에서는 대조군과 거의 차이가 없었지만 1시간 처리군에서는 다소 감소하였고, 2, 3시간 처리군에서는 각각 약 4.5, 4.2 log CFU/g으로 크게 감소하는 결과를 보였다. 저장 5일째 시료에서도 3일째와 유사한 경향을 보였다. 저장 7일째에는 대

Table 6. Amino acids content of freeze-dried bovine liver treated by SC-CO₂ or organic solvents

(Unit: mg/100 g freeze-dried bovine liver)

Amino acids	SC-CO ₂ treatment				Organic solvents	
	Control	200 bar	300 bar	450 bar	Ether	CM ¹⁾
Total essential amino acids	9,718.68	8,033.95	8,132.15	7,959.40	5,624.79	4,035.68
Threonine	507.03±2.63 ^{a2)}	367.78±0.21 ^b	349.34±0.62 ^c	330.42±2.27 ^d	260.29±1.22 ^e	187.02±0.26 ^f
Valine	1,199.25±3.16 ^a	910.80±2.84 ^d	941.63±3.16 ^c	993.85±0.21 ^b	663.49±2.45 ^e	452.52±2.15 ^f
Methionine	491.64±1.00 ^a	448.43±2.94 ^b	435.29±3.26 ^c	399.58±0.02 ^d	301.97±2.51 ^e	215.31±2.21 ^f
Isoleucine	742.43±0.36 ^a	562.88±0.39 ^d	585.93±1.95 ^c	625.82±1.49 ^b	461.82±1.29 ^e	290.70±1.69 ^f
Leucine	2,059.96±2.51 ^a	1,571.41±0.28 ^d	1,675.56±0.39 ^c	1,729.67±0.19 ^b	1,003.82±0.21 ^e	862.16±0.35 ^f
Phenylalanine	1,165.55±3.37 ^a	912.10±2.04 ^d	984.65±2.10 ^c	1,001.13±4.00 ^b	629.12±1.95 ^e	503.07±0.54 ^f
Histidine	495.06±2.62 ^a	432.45±0.05 ^b	412.63±1.39 ^c	375.38±2.81 ^e	406.56±1.22 ^d	195.96±2.09 ^f
Lysine	1,649.63±2.15 ^a	1,505.79±1.69 ^b	1,443.20±0.33 ^c	1,360.90±3.20 ^e	1,122.59±2.43 ^d	717.92±2.29 ^f
Arginine	1,408.13±3.16 ^a	1,322.31±3.30 ^b	1,303.92±0.32 ^c	1,142.65±2.45 ^d	775.13±2.64 ^e	611.01±1.43 ^f
Total non essential amino acids	6,263.24	5,269.69	5,192.50	5,073.43	4,034.89	3,184.98
Aspartic acid	132.24±2.61 ^a	63.70±0.11 ^b	62.38±0.46 ^b	52.76±1.32 ^d	60.03±1.03 ^c	59.81±2.11 ^c
Serine	71.66±1.37 ^a	40.15±3.10 ^b	33.40±2.63 ^c	29.18±1.44 ^c	24.68±2.11 ^d	19.80±0.24 ^e
Glutamic acid	13.73±2.12 ^a	8.55±1.09 ^b	7.69±2.10 ^b	6.93±2.87 ^b	7.02±1.28 ^b	7.49±3.41 ^b
Proline	1,371.24±1.11 ^a	1,136.67±1.00 ^c	1,138.77±4.10 ^c	1,210.28±2.92 ^b	921.45±2.18 ^d	609.66±2.11 ^e
Glycine	833.94±2.01 ^a	675.61±2.21 ^c	620.10±2.08 ^e	605.42±1.05 ^f	730.40±1.47 ^b	673.05±3.33 ^d
Alanine	2,707.15±2.17 ^a	2,335.73±2.01 ^b	2,328.59±4.12 ^c	2,225.55±2.74 ^d	1,420.21±2.19 ^e	1,106.66±3.25 ^f
Cysteine	299.02±2.96 ^a	276.97±2.06 ^d	278.58±0.49 ^c	291.87±1.93 ^b	230.52±1.97 ^e	141.80±2.40 ^f
Tyrosine	834.26±1.41 ^a	732.22±3.83 ^b	722.99±2.01 ^c	651.44±3.26 ^d	640.58±2.74 ^e	566.71±2.57 ^f
Total amino acids	15,981.92	13,532.60	13,573.00	12,555.52	9,659.68	7,220.66

All measurements were performed in triplicate.

¹⁾Chloroform : methanol (2:1, v/v).²⁾Means with different letters in a row were different significantly at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.**Fig. 3.** Effects of different treatment times on aerobic bacteria (A) and coliform group (B) by supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) treatment at 100 bar and 45°C. Data were expressed as mean±SD in triplicate. Different letters (a-e) on the bars indicate significant differences among groups by Duncan's multiple range tests at $P<0.05$. RF0, RF1, RF3, RF5 and RF7 indicate that samples were refrigerated for 0, 1, 3, 5 and 7 days at 4°C, respectively and then were freeze-dried.

조균의 경우 8 log CFU/g 이상으로 총세균수가 크게 증가하였고, 초임계 이산화탄소 처리군의 경우에도 대체로 6 log CFU/g 이상으로 높은 결과를 보였다. 결과적으로 초임계 이산화탄소 처리에 의해 소간의 총세균수를 저감화시킬 수 있었다.

다음으로 대장균군의 경우 저장 전 시료에서 대조군은 약 2.5 log CFU/g으로 나타났고, 초임계 이산화탄소 처리에

의해 30분 처리군에서는 약 1.7 log CFU/g으로 감소하였으며, 특히 1, 2, 3시간 처리군에서는 모두 전혀 검출되지 않았다. 이후 저장에 따라 대조군의 경우 저장 1일차에서 7일차까지 각각 3.3, 3.8, 4.2, 4.4 log CFU/g으로 증가하였고, 저장 1일차에서 처리군의 경우 30분~2시간 처리한 경우 각각 2.1, 1.5, 1.3 log CFU/g으로 크게 감소하였으며, 특히 3시간 처리군에서는 전혀 검출되지 않았다. 초임계 이산화

탄소 처리 시간이 경과할수록 대장균군의 감소가 두드러지는 것을 확인할 수 있었으며, 저장 7일차까지 유사한 경향을 보였다. 모든 저장기간에서 3시간 처리군의 경우 대장균군이 검출되지 않았다. 결과적으로 초임계 이산화탄소 처리에 의해 소간의 대장균군을 효과적으로 저감화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Park 등(26)은 SC-CO₂를 처리하여 suspension과 dry form 상태에 존재하는 *P. oxalicum* spores를 살균시키고자 하였는데, suspension 상태에 있는 포자는 완전한 불활성화(i.e., 7.0 log CFU/g 감소)가 가능한 반면에 dry spores에서는 오직 1.0 log CFU/g 수준만 감소되었다. 이는 이산화탄소는 식품이나 세포 내 수분이 있는 곳에 용해되어 탄산으로 존재하게 되고 이는 세포 내 pH를 강하시키고 세포막 구조를 변형시켜 미생물을 감소시킨다(27-32)고 알려져 있는데, 이때 식품이나 세포 내 수분이 존재하지 않으면 이산화탄소 가스가 침투할 수 없어서 미생물의 저감화가 어렵다. 그리고 고체 matrices는 이산화탄소의 확산이 제한적이므로 SC-CO₂를 처리할 때 solid phase 상태에 있는 식품 내 미생물은 liquid phase 상태보다 미생물을 제어하기 훨씬 어려우므로(12) 본 연구에서는 동결 건조된 시료를 사용하여 시료 내 수분 함량이 4.78%로 낮았음에도 불구하고 총세균에서는 최대 22.33%, 대장균군에서는 100% 사멸이 가능하였다.

요 약

본 연구에서는 초임계 이산화탄소 처리에 따라 동결 건조된 소간의 이화학적 특성과 미생물 저감화 효과를 연구하였다. 다양한 압력(200, 300 및 450 bar)으로 초임계 이산화탄소를 처리한 결과, 먼저 지방 추출 수율의 경우 200, 300, 450 bar에서 각각 84, 86, 90%로 나타나 처리 압력이 높아짐에 따라 증가하는 경향을 보였다. 비타민 A 및 CoQ₁₀ 성분은 지용성 물질로서 거의 대부분 초임계 이산화탄소 처리에 의해 다른 지방성분과 같이 추출된 것으로 나타났다. 추출된 지방의 지방산을 분석한 결과, 포화지방산 비율은 처리 압력이 높아질수록 감소한 반면에 다가불포화지방산은 증가하는 경향을 보였다. 총 아미노산의 경우 초임계 이산화탄소를 처리한 시료군에서 대조군에 비해 낮은 함량을 보였다. 총세균수의 경우 동결 건조로 인해 수분 함량이 극히 낮아졌음에도 불구하고 처리 시간이 길어질수록 저감화되었으며, 또한 5일간 냉장 저장한 시료에서 총세균수가 약 6.2 log CFU/g이었으나 100 bar에서 3시간 처리에 의해 약 4.4 log CFU/g으로 저감화되었다. 특히 홍미롭게도 대장균군의 경우 100 bar에서 3시간 처리 후 저장 시 7일차까지 전혀 검출되지 않았다. 본 결과는 초임계 이산화탄소 처리가 수분 함량이 낮은 식품소재의 대장균군 저감화에도 효과적일 수 있다는 것을 나타내는 것이라 사료된다. 결론적으로 초임계 이산화탄소의 적절한 처리를 통해 미생물 안전성 및 지방 산화에

대한 안정성이 개선된 소간을 고단백 식품소재로 활용할 수 있으리라 판단된다.

REFERENCES

- Joo ST. 2012. *Meat notebook*. Woodeumji Publisher, Seoul, Korea. p 110.
- Stille G. 1953. Antitoxic effect of liver extracts. *Arzneimittelforschung* 3: 127-129.
- Balazs M, Ban I, Magyar I, Richter R, Vecsei A. 1963. A study on the effect of aqueous liver extract and liver hydrolysate on chronic liver damage in rats induced by carbon. *Orv Hetil* 24: 342-344.
- Mascitelli-Coriandoli E, Lanzani P. 1962. Antitoxic and liver-protective activities of liver extracts in carbon tetrachloride poisoning. *Boll Chim Farm* 101: 698-714.
- Kim HJ, Kwon DH, Shon DH. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis for the production of antitoxic bovine hepatic extract. *Korean J Food Sci Technol* 40: 190-193.
- O'Keeffe MJ, O'Keeffe M, Glennon JD, Lightfield AR, Maxwell RJ. 1998. Supercritical fluid extraction of clenbuterol from bovine liver tissue. *Analyst* 123: 2711-2714.
- Joung SN, Kim SY, Yoo KP. 2001. Ultra dry-cleaning technology using supercritical carbon dioxide. *Clean Technology* 7: 13-25.
- Lee SM, Yun JH, Chun BS. 2011. Fatty acid composition and oxidative properties of anchovy oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Clean Technology* 17: 266-272.
- Hwang AR, Jung II, Lim GB, Ryu JH. 2009. Extraction of oil from canola seeds with supercritical carbon dioxide. *KSBB J* 24: 367-376.
- Spilimbergo S, Bertucco A, Lauro FM, Bertoloni G. 2003. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO₂ treatment. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 4: 161-165.
- Ballestra P, Abreu Da Silva A, Cuq JL. 1996. Inactivation of *Escherichia coli* by carbon dioxide under pressure. *J Food Sci* 61: 829-831.
- Garcia-Gonzalez L, Geeraerd AH, Spilimbergo S, Elst K, Van Ginneken L, Debevere J, Van Impe JF, Devlieghere F. 2008. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *Int J Food Microbiol* 117: 1-28.
- Park HS, Lee YH, Kim W, Choi HJ, Kim KH. 2012. Disinfection of wheat grains contaminated with *Penicillium oxalicum* spores by a supercritical carbon dioxide-water cosolvent system. *Int J Food Microbiol* 156: 239-244.
- Amáiz E, Bernal J, Martín MT, Nozal MJ, Bernal JL, Toribio L. 2012. Supercritical fluid extraction of free amino acids from broccoli leaves. *J Chromatogr A* 1250: 49-53.
- AOAC. 1990. *Official method of analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 8-35.
- Jeong CH, Bae YI, Lee HJ, Shim KH. 2003. Chemical components of propolis and its ethanolic extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 501-505.
- Mattila P, Lehtonen M, Kumpulainen J. 2000. Comparison of in-line connected diode array and electrochemical detectors in the high-performance liquid chromatographic analysis of coenzymes Q₉ and Q₁₀ in food materials. *J Agric Food Chem* 48: 1229-1233.
- Metcalfe LD, Schmitz AA. 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal Chem*

- 33: 363-364.
19. Jeong CH, Shim KH. 2004. Quality characteristics of sponge cakes with addition of *Pleurotus eryngii* mushroom powders. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 716-722.
 20. Diliello LR. 1982. *Methods in food and dairy microbiology*. AVI Publishing Co., Westport, CT, USA. p 20-44.
 21. Kang SS, Kim BJ, Chun BS. 1999. Recovery of high unsaturated fatty acid from squid processing wastes using supercritical carbon dioxide extraction method. *J Korean Fish Soc* 32: 217-222.
 22. Turne C, King JW, Mathiasson L. 2001. Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *J Chromatogr A* 936: 215-237.
 23. Kim JY, Jeong SW, Paek JE, Kim JH, Kwak JS, Lee YJ, Kang TS, Kwon OR. 2013. Systematic review of the effect of coenzyme Q10 on antioxidant capacity while focused on evaluation of claims for health functional food. *J Nutr Health* 46: 218-225.
 24. Catchpole OJ, von Kamp JC, Grey JB. 1997. Extraction of squalene from shark liver oil in a packed column using supercritical carbon dioxide. *Ind Eng Chem Res* 36: 4318-4324.
 25. Lim SB, Jwa MK, Ko YH, Yoo IJ. 1997. Supercritical carbon dioxide extraction of dried egg yolk. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 860-865.
 26. Park HS, Choi HJ, Kim KH. 2013. Effect of supercritical CO₂ modified with water cosolvent on the sterilization of fungal spore-contaminated barley seeds and the germination of barley seeds. *J Food Saf* 33: 94-101.
 27. Arashisar S, Hisar O, Kaya M, Yanik T. 2004. Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *Int J Food Microbiol* 97: 209-214.
 28. Daniels JA, Krishnamurthi R, Risvi SSH. 1985. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and quality. *J Food Prot* 48: 532-537.
 29. Finne G. 1982. Modified- and controlled-atmosphere storage of muscle foods. *Food Technol* 36: 128-133.
 30. Gill CO, Mollin G. 1991. Modified atmosphere and vacuum packaging. In *Food Preservatives*. Russell NJ, Gould GW, eds. Kluwer Academic Publishers, New York, NY, USA. p 172-199.
 31. Hotchkiss JH. 1989. Advances in and aspects of modified atmosphere packaging in fresh red meats. Proceeding of 42nd Annual Reciprocal Meat Conference of the American Meat Science Association, National Life Stock and Meat Board. Chicago, IL, USA. p 31-33.
 32. Stammen K, Gerdes D, Caporaso F. 1990. Modified atmosphere packaging of seafood. *Crit Rev Food Sci Nutr* 29: 301-331.