

고압처리에 의한 *Candida tropicalis*의 불활성화 및 세포구조의 변화

손경현 · 장정국 · 공운영 · 이형주*

제일제당 식품연구소, *서울대학교 식품공학학과

High Pressure Inactivation of *Candida tropicalis* and Its Effects on Ultrastructure of the Cells

Kyung-Hyun Sohn, Cheong-Kook Chang, Un-Young Kong and Hyung-Joo Lee*

Foods R & D Center, Cheiljedang Corporation

*Department of Food Science and Technology, Seoul National University

Abstract

Effects of high pressure on the inactivation and microstructure of *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) were investigated. High pressure inactivation of *C. tropicalis* was a first order reaction. The decimal reduction time (D value) at 400 MPa was 1.4 min at 25°C and z value was 100 MPa. The effect of high pressure treatment was higher when treated at 45°C than at 25°C. Damages in mitochondrial membrane and cell wall of *C. tropicalis* were observed when it was pressurized at 400 MPa for 10 min. It indicates that high pressure affects the membrane system of the cell and causes the inactivation of *C. tropicalis*.

Key words: high pressure inactivation, *Candida tropicalis*, decimal reduction time, ultrastructure

서 론

박테리아등의 생물체가 고압하에서 활성이 감소된다는 보고가 약 100년 전에 있었으며, 1914년 Bridgman은 고압하에서 계란 알부민의 응고화 현상을 발견하였다⁽¹⁾. 이러한 발견이후로 압력이 유기생명체에 미치는 영향에 관한 연구가 진척되어 왔으나, 새로운 식품가공기술로서의 본격적인 연구는 1986년 교토대학의 Hayashi박사에 의하여 시작되었다. 고압기술은 열을 사용하지 않고 살균, 가공, 조리가 가능한 새로운 식품가공기술로서 주목받고 있다. 전통적으로 식품의 살균은 대부분 가열처리에 의해 행해졌으나, 이러한 가열처리는 식품의 갈변, 풍미의 변화 및 영양성분의 분해에 의한 품질저하 등의 문제를 수반하게 된다⁽²⁾.

1918년 Larson 등은 300 MPa의 고압처리에 의하여 세균의 그람 염색성이 양성에서 음성으로 변한 것을 보고하였는데⁽³⁾, 이것은 고압에 의하여 세균의 세포벽 구조가 영향을 받은 것을 알려 주고 있다. 높은 정수압은 미생물에 여러가지의 영향을 미친다. 예를 들면

세포의 모양, 유전기작, 생화학 반응, 세포막, 포자각을 변화시킨다. 미생물의 미세구조 및 대사에 대한 압력의 영향은 Larson 이후로 계속 연구되었지만, 미생물의 사멸에 대한 정확한 기작은 아직 밝혀져 있지 않다. Osumi는 전자현미경을 이용하여 효모세포에 미치는 압력의 영향을 관찰한 결과 *Saccharomyces cerevisiae*의 핵막이 300 MPa에서 붕괴되는 것을 밝혔다⁽⁴⁾. 또한 세포막의 파괴와 관련하여 균체로부터 각종 이온, 아미노산 및 핵산의 누출이 관찰되었다⁽⁵⁾.

본 연구는 식품의 살균에 고압을 이용하기 위한 기초실험으로서, 과일쥬스의 변패 효모로 알려진 *C. tropicalis*를 선정하여 압력에 의한 사멸특성을 검토하였다. 또한 *C. tropicalis* 세포의 미세구조에 미치는 압력의 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

고압처리장치

고압장치로서 Cold Isostatic Press (Quintus Food Processor 6, ABB Autoclave, USA)를 사용하였으며 (Fig. 1), 이 기기는 피스톤에 의한 고압발생 방식으로, 최고 압력은 900 MPa, 처리용량은 700 ml이었다

Corresponding author: Kyung-Hyun Sohn, Foods R & D Center, Cheiljedang Corporation, 636 Guro-dong, Seoul 152-050, Korea

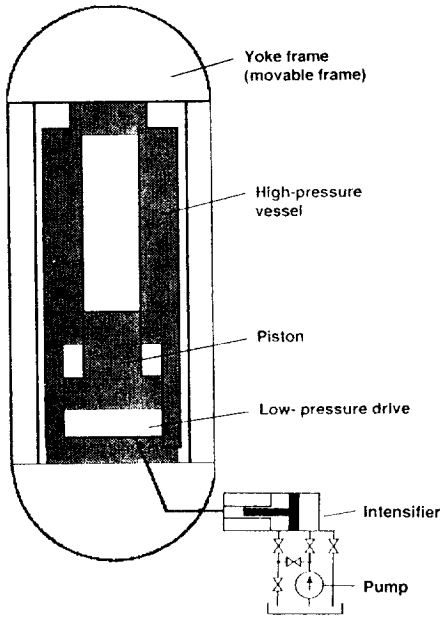


Fig. 1. Schematic diagram of high-pressure food processing system

Table 1. Technical description of high-pressure food processing system

Press	ABB Quintus Food Processor-6
Maximum pressure	900 MPa (130,500 psi)
Vessel I.D.	90 mm
Vessel height	225 mm
Basket volume	700 ml (70 mm I.D. × 180 mm I.L.)
Pressure medium	Tap water
Maximum temp.	80°C
Pressurization	Piston type
Intensifier pressure	207 MPa (30,000 psi)
Press. time	2 min
Heating system	Circulating water with thermostat

(Table 1). 압력용기 내에는 압력매체(물)의 온도를 직접 측정할 수 있도록 온도계가 부착되어 있어, 승압과 함께 나타나는 압력매체의 온도상승을 관측하였다.

시험균주

Candida tropicalis IFO 1400을 Institute of Fermentation (Osaka, Japan)으로 부터 입수하여 시험균주로 사용하였다.

효모 현탁액의 제조

효모는 YM 액체배지(Difco)에서 25°C, 48시간 진탕 배양하였다. 배양액을 3000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하고, 멸균수에 현탁한 다음 가압처

리용 시료로 하였다.

고압처리

2%(w/w) H₂O 용액으로 세척한 polyethylene bag에 효모 현탁액 20 ml를 넣어, 기포가 들어가지 않게 밀봉한 다음 고압처리장치에 투입하였다. 압력 200~800 MPa, 가압시간 1~30분, 온도 25~80°C의 범위에서 고압처리한 후 일정액을 취하여 미생물 수를 측정하였다.

생존균수의 측정

고압처리한 시료를 펩톤수로 단계희석하여 평판주입법으로 생존균수를 측정하였다. 효모는 10% tartaric acid로 pH를 3.5로 조정된 potato-dextrose agar (Difco)를 사용하여 25°C에서 5일간 배양한 후 계수하였다.

D값/z값의 측정

각 미생물의 D값은 생존곡선에서 회귀직선을 구하여 그 기울기로 부터 산출하였다. z값은 logD를 각 처리압력 별로 나타내어, 얻어진 회귀선으로부터 산출하였다.

미생물 세포구조의 관찰

고압처리에 의한 세포의 미세구조의 변화를 SEM (scanning electron microscope) 및 TEM (transmission electron microscope)을 사용하여 관찰하였다. 고압처리한 세포를 2% glutaraldehyde로 전고정한 후, osmium tetroxide로 후고정하였다. 에탄올을 사용하여 탈수한 다음, isoamyl acetate로 치환한 후 critical point drying법으로 건조하였다. 건조 시료를 gold coating한 다음 SEM 8-800 (Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. 한편 glutaraldehyde 및 osmium tetroxide로 고정된 세포를 탈수 및 propylene oxide 치환을 거친 후 EPON 812 수지에 embedding하였다. Ultramicrotome으로 0.5 μm 두께의 thin section을 만든 후 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 TEM CM 10 (Philips, Netherlands)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

고압처리에 의한 *C. tropicalis*의 불활성화

고압처리에 의한 산성식품의 주요 변패효모인 *C. tropicalis* IFO 1400의 사멸율을 조사하기 위하여, 초기 균수를 4×10⁶ CFU/ml로 하여, 25°C에서 1분간 고압처리한 결과 200~300 MPa에서는 균의 감소가 거의

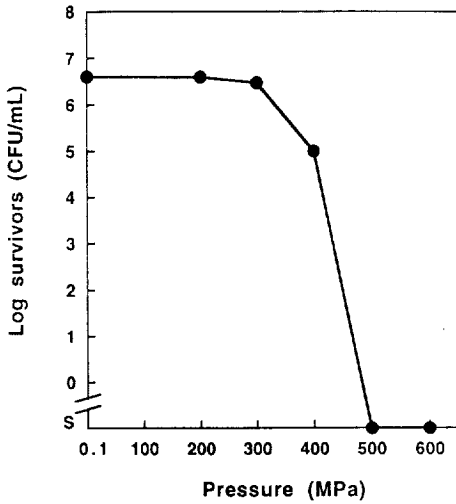


Fig. 2. Effect of high pressure on inactivation of *Candida tropicalis* The pressure was treated for 1 min at 25°C; S: sterilized in the pour plate

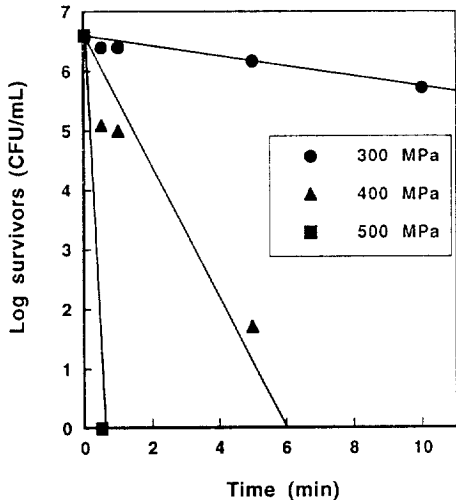


Fig. 3. Survival curve of *C. tropicalis* at different pressures The pressure was treated at 25°C for 30-600 sec

나타나지 않았으나, 400 MPa에서는 10^5 CFU/ml 수준으로 감소하였고, 500 MPa 및 600 MPa에서는 완전 사멸되었다(Fig. 2).

다음으로 300-500 MPa의 압력에서 처리시간에 대하여 *C. tropicalis*의 생존곡선을 조사하였다(Fig. 3). 300 MPa에서 10분간의 고압처리로는 균수의 감소가 거의 나타나지 않았으나, 400 MPa의 처리에는 완전히 사멸되었다. 또한 500 MPa의 처리시 1분 내에 완전히 사멸되었다. 한편 작성된 그래프(Fig. 3)는 직선을 나타내어, *C. tropicalis*의 고압사멸은 1차 반응을 따랐

Table 2. D values of *Candida tropicalis* at three different pressures

Pressure (MPa)	Number of samples	D value (sec)	r^2
300	5	768	0.96
400	4	68	0.95
500	2	4.8	1.00

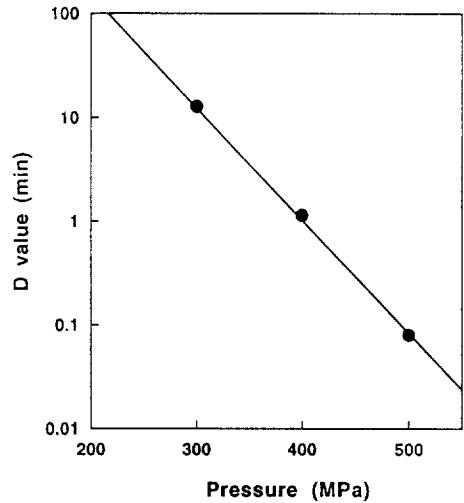


Fig. 4. Dependence of D value on pressure in *Candida tropicalis*

다. 또한 가열살균에서와 같이 처리시간에 영향을 받는 것을 알 수 있으며, 다음과 같이 실험식을 만들 수 있었다.

$$\text{Log } N = a + bt$$

여기서 N은 균수이며, t는 처리시간(분), b는 사멸 곡선의 기울기이며, a는 초기 균수의 log값이다. Fig. 4로부터 생존수가 1/10로 감소되는데 필요한 처리시간(decimal reduction time, D값)은 $1/|b|$ 이므로 300 MPa에서 D값은 12.8분, 400 MPa에서 1.4분, 500 MPa에서 0.13분이었다(Table 2). 한편 여러 압력에서 얻어진 D값의 대수를 종축에, 압력을 횡축에 나타낸 결과 압력이 높아질수록 D값은 대수적으로 감소하여 다음의 직선식을 나타내었다(Fig. 4).

$$\text{Log } D = 4.431 - 0.011P$$

따라서 D값이 10배로 변화되는데 필요한 압력범위(z 값)는 91 MPa이었다. 가열살균에서 z값을 온도에 대한 민감도를 나타내는 지표로서 사용하는데, 마찬가지로 고압살균에서도 z값을 압력에 대한 민감도를 나타내는 지표로서 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

식품을 가열살균할 때 주어진 온도에서 살균에 필요한 조건을 nD 로 나타낸다. n 은 안전성 지수로서 일반적으로 5~6이다. 이 방법은 고압살균에도 적용할 수 있다. 예를 들면, 고압살균하는 식품이 *C. tropicalis*로 오염되어 있다고 하자. 이 효모에 대한 400 MPa에서의 D 값이 1.4분이므로, 만약 1개의 포장중에 효모가 10^7 CFU/ml 있다면, 효모가 거의 0 (즉 $10^1=0.1$) CFU/ml로 감소하기까지의 고압살균시간은 7분이다. 만약 식품중의 효모균수가 만약 10^{10} CFU/ml이었다고 하면, 15.4분의 처리가 필요하게 된다. 따라서 고압살균은 원료의 오염의 정도(초기 미생물부하)에 따라 처리 효과가 다르게 나타날 것이다.

고압 불활성화에 미치는 온도의 영향

300 MPa의 고압처리를 상온(25°C) 및 45°C의 설정 온도에서 행하여 가압시의 온도가 고압살균 효과에 미치는 영향에 대하여 검토하였다(Fig. 5). 상온처리의 경우 초기 생균수(N_0)는 4×10^6 CFU/ml에서 10분후 5×10^5 CFU/ml로 감소하였다. 한편 45°C 처리의 경우 30초후 1×10^1 CFU/ml 수준으로, 1분후 100 CFU/ml 수준으로 감소하였다. 즉, 고압처리시의 온도를 상온(25°C)에서 45°C로 높일 경우 D 값은 12.8분에서 0.09분으로 크게 감소하였다. 따라서 상온보다 온도를 높여서 처리하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 과일주스의 주요변패균인 *C. tropicalis*에 대하여 가열살균을 대체할 수 있는 고압살균의 가능성을 확인할 수 있었다. *C. tropicalis*는 일정한 압력하에서 생균수가 처리시간에 대하여 대수적으로

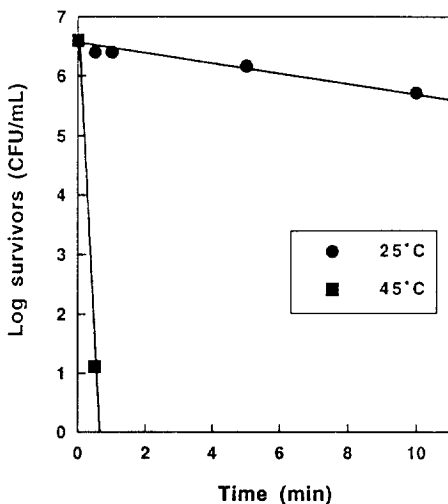


Fig. 5. Effect of temperature on pressure inactivation of *C. tropicalis* at 300 MPa

감소하였으며, 따라서 가열살균에서의와 같이 D 값을 산출할 수 있었다.

압력에 의한 세포구조의 변화

고압살균을 식품에 광범위하게 사용하기 위하여 고압하에서 발생하는 미생물의 미세구조의 변화 및 사멸기작에 대한 검토가 필요하며, 본 연구에서는 *C. tropicalis* IFO 1400에 미치는 압력의 영향을 전자현미경으로 관찰하였다. *C. tropicalis* IFO 1400은 구형, 또는 타원형의 세포로서, 균일한 표면이 관찰되었다(Fig. 6 A). 한편 *C. tropicalis*가 완전히 사멸되는 조건인 400 MPa, 25°C, 10분간의 처리 후 대부분의 세포는 압축효과에 의하여 부피가 감소하면서 납작한(flat) 형태로 변화하였으며(Fig. 6 C), 대부분 세포에서 표면의 함몰이 관찰되었다(Fig. 6 B). 또한 가압처리 후 대부분의 세포는 20~30개씩 뭉쳐진 cluster 형태로 존재하였다(Fig. 6 C).

TEM에 의한 내부구조의 변화를 Fig. 7에 나타내었다. 무처리 세포에서는 핵, 미토콘드리아 등의 소기관

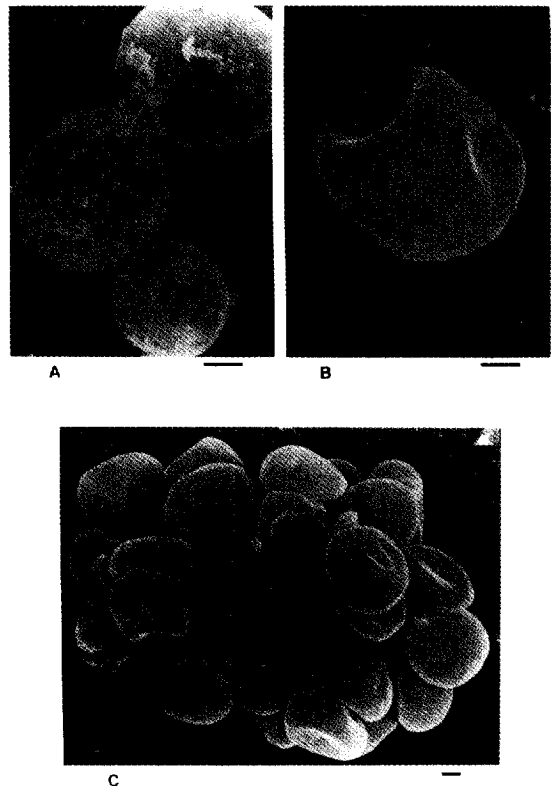


Fig. 6. Scanning electron microscopes of high pressure-treated *Candida tropicalis* A: No treatment, B,C: Pressure treatment at 400 MPa for 10 min at 25°C; Bar=1 μ m

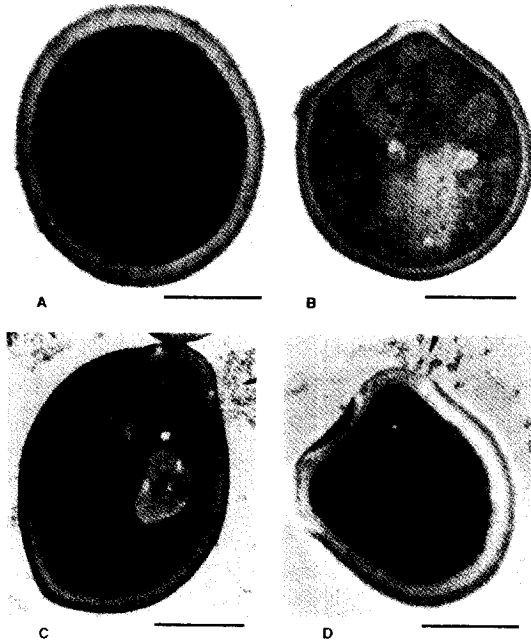


Fig. 7. Transmission electron microscopes of high pressure-treated *Candida tropicalis* A,B: No treatment, C,D: Pressure treatment at 400 MPa for 10 min 25°C; Bar=1 μ m

(organelle)이 관찰되었으나(Fig. 7 A 및 Fig. 7 B), 400 MPa, 10분간의 고압처리로 미토콘드리아의 손상(Fig. 7 D) 및 핵막의 변형(Fig. 7 C)이 관찰되었다. 고압처리에 의한 원형질막의 변형은 관찰되지 않았다. 한편, 세포벽은 군데군데 손상된 것이 관찰되었으며, 이들 손상된 부위를 통하여 세포내 성분들이 세포외로 유출되는 것이 보였다 (Fig. 7 C 및 D의 화살표시). 또한 원형질막과 세포벽 사이의 공간에서 전자밀도가 현저히 저하된 부위(Fig. 7 D)가 나타났다. Osumi 등은 300~400 MPa에서 *Saccharomyces cerevisiae*의 핵막과 미토콘드리아막의 파괴가 발생한다고 보고하였다⁽⁴⁾. 본 연구에서는 핵막과 미토콘드리아막의 변형외에도 세포벽의 손상 및 내부물질의 세포외부로의 유출이 확인되었다.

현재까지 보고된 미생물에 대한 압력의 영향은 핵막의 붕괴⁽⁴⁾, 그람염색성의 변화⁽⁶⁾, 세포막의 손상⁽⁷⁾, 균체로부터 각종 이온·아미노산·핵산의 누출⁽⁸⁾, DNA 복제·전사·번역의 저해⁽⁹⁾, ATPase의 저해⁽¹⁰⁾ 등이 있다. 이와 같이 세포조직 및 세포내 성분이 가압처리에 의하여 다양하게 영향을 받기 때문에, 압력에 의한 미생물의 사멸기작을 특정적으로 한정하기는 어려움이 있었다. 하지만 현재까지 진행된 여러 연구들을 종합해 볼 때 압력에 의한 미생물의 사멸기작은 물리적인

파괴효과에 의한 세포막의 손상과 단백질의 가압변성에 의한 주요 효소의 불활성화의 2가지로 요약될 수 있다. 어느 경우든지 자유수가 중요한 역할을 하여, 고압사멸 효과에 크게 영향을 미칠 것으로 생각된다. 이러한 점은 가열살균에서도 동일한 현상이다. 미생물의 세포막은 물질의 수송 및 호흡에 중요한 역할을 하고 있어, ATPase의 불활성화로 세포막의 투과성이 현저히 변화되면 세포가 사멸할 수도 있다. 그러나 일반적으로 효소를 비가역적으로 불활성화시키기 위해서는 살균에 필요한 것보다 강한 가압처리조건이 필요하므로, 미생물의 압력에 의한 사멸은 세포의 막 system의 가압손상이 직접적인 원인일 것으로 생각된다. 한편 압력작용에 의한 미생물의 사멸기작은 미생물의 대사 및 효소 활성과 함께 보다 체계적으로 연구되어야 할 것이며, 향후에는 기탁 균주보다 식품에서 바로 분리된 균주를 사용한 연구가 요망된다.

식품의 살균공정의 목적은 모든 생육할 수 있는 미생물을 파괴하는데 있는 것이 아니라, 식품 자체의 특성, 환경, 포장의 기밀성, 저장 온도와 함께 부여하는 살균처리로 변태균과 공중위생균의 증식을 방지하는데 있다. 즉 살균은 식품에 일정한 시간동안 상업적 멸균상태를 유지하도록 하는 처리를 말한다. 현재 식품을 유통시키는 경우에는 법적으로 가열살균 혹은 그것과 동등 이상으로 효과를 가진 방법으로서 처리하는 것이 규정되어 있다. 향후에는 보다 다양한 균종별로 고압처리에 의한 살균효과를 상세하게 조사하여 가열살균과 동등한 효과를 입증할 수 있도록 충분한 데이터를 축적할 필요가 있다.

요 약

과일쥬스의 변패에 관여하는 *Candida tropicalis*에 대하여 고압처리에 의한 사멸과 미생물의 미세구조에 미치는 압력의 영향을 조사하였다. *C. tropicalis*의 가압사멸은 1차 반응을 따르며, 25°C-400 MPa에서 D값은 1.4분이었고, z값은 100 MPa이었다. 고압처리에 의한 살균효과는 25°C에서보다 45°C에서 높게 나타났다. 25°C에서 400 MPa, 10분 고압처리로 *C. tropicalis*는 미토콘드리아막과 세포벽이 변형되었다. 따라서 고압처리에 의한 세포막, 원형질막 등의 변형이 미생물 가압사멸의 원인이 되는 것으로 판단된다.

문 헌

1. Bridgman, P. W.: The coagulation of egg albumin by

- pressure. *J. Biol. Chem.*, **19**, 511(1914)
2. Ramaswamy, H. and K. Abdelrahim.: Thermal processing and food quality. In *Encyclopedia of Food Sci. Technol.*, Vol. 4, Hui, Y. H. (Ed.), John Wiley & Sons, New York, p.2552 (1992)
 3. Larson, W. P., Hartzell, T. B. and Diel, H. S.: The effect of high pressure on bacteria. *J. Infect. Diseases*, **22**, 272 (1918)
 4. Osumi, M.: Effect of hydrostatic pressure to ultrastructure of yeast cells. In *Pressure-Processed Food Research and Development*, Hayashi, R. (Ed.), San-Ei Pub. Co., Kyoto, p.157 (1990)
 5. Shimada, S.: Effect of high pressure on the microbial behavior. *Shokuhin Kakou Gijutsu*, **10**, 27 (1990)
 6. Larson, W. P., Hartzell, T. B. and Diel, H. S.: The effect of high pressure on bacteria. *J. Infect. Diseases*, **22**, 272 (1918)
 7. Morita, R. Y.: Psychotrophic bacteria. *Bact. Rev.*, **39**, 144 (1975)
 8. Shimada, S.: Effect of high pressure on the microbial behavior. *Shokuhin Kakou Gijutsu*, **10**, 27 (1990)
 9. Landau, J. V.: Protein and nucleic acid synthesis in *Escherichia coli*: pressure and temperature effects. *Biochim. Biophys. Acta*, **149**, 506 (1967)
 10. Roer, R. D. and Pequeux, A. J. R.: In *High Pressure Effects on Selected Biol. Systems*, Pequeux, A. J. R., Gills, R. (Ed.), Spring-Verlag, Berlin, p.31 (1985)

(1996년 3월 18일 접수)