

## 110°C 이상에서의 Peroxidase의 열에 의한 불활성화

朴官和 · R. Stahl\* · B.N. Srimani\*\* · M. Loncin\*

서울대 농대 식품공학과  
(1976년 4월 15일 수리)

## Thermal Inactivation of Horseradish Peroxidase for the Range of Temperatures 110°~140°C

by

K.H. Park, R. Stahl,\* B.N. Srimani,\*\* and M. Loncin\*

Department of Food Technology, Seoul National University, Suwon

\*Institute for Food Engineering, University Karlsruhe, Germany.

(Received April 15, 1977)

### Summary

An apparatus for continuous sterilization of fluids in which heating-up and cooling time are negligible enabled determination of the kinetics of thermal inactivation of peroxidase for the range of temperatures 110~140°C.

The enthalpy of activation was 146.4 kJ/mol; free energy of activation, 113kJ/mol; and the entropy of activation, 82.9J/mol·K.

Comparisons of the experimental results with the thermal destruction time curves of microorganisms showed the possibility that the time required to inactivate peroxidase might be taken into account in evaluating thermal processes for commercial HTST methods.

### 서 론

효소가 식품 저장중에 그 품질에 영향을 주고 있다는 것은 잘 알려진 사실이며 이들을 불활성화하기 위해 가열처리를 행하고 있다. 품질에 영향을 주지 않는 효소까지 모두 불활성화 시켜서 불필요한 과잉 열처리를 하게된다는 우려 때문에 최근 효소의 열 불활성 속도와 잔류 효소의 식품 품질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>(1,2)</sup>

일반적으로 식품의 살균 공정에 필요한 수학적 내지는 물리적 특성과 계산은 비교적 잘 알려져 있는 편이다. 이와같은 계산은 실험적으로 구해진 미생물의 열에 의한 사멸 속도와 효소의 열에 의한 불활성화 속도

에 기초를 둔 것으로 이 때 특히 유의해야 할 점은 가열온도 외에 가열시에 존재하는 환경인자들이 살균시간 계산에 큰 영향을 미치게 된다는 것이다.

최근 많이 이용되고있는 고온 단시간 살균(HTST)과 초고온 단시간 살균(UTST) 공정은 일반적으로 식품의 방향, 색, 열에 파괴되기 쉬운 영양소 등의 보존 상태가 양호하여 재래식 살균 방법보다 유리한 점이 있다. 우유 살균의 한 예로 초고온 단시간 살균의 경우 130°C에서 150°C 사이의 온도에서 2~3초 처리한다. 이와같은 고온에서 단시간 열처리하는 공정에 필요한 미생물 및 효소의 불활성화 속도는 실험장치의 어려운 점 때문에 실험적으로 직접 측정하기가 곤란하였으며 따라서 저온(주로 100°C이하)에서 실험적으로 구한 불활성화 자료를 고온까지 외삽법에 의하여 연장 사용하여왔다.

\*\*Department of Food Technology and Biochemical Engineering, Jadavpur University, India.

이는 고온에서 식품의 물리적 성질등 환경인자의 상태 변화에 따른 미생물 및 효소의 열 저항성의 변화가 수반될 경우를 고려할 때 불완전한 방법이라 하겠다.

Resende등<sup>(3)</sup>은 유리로 된 모세관에 측정할 효소 용액을 넣고 glycerol湯에서 177°C까지 가열하였고 기타 Stumbo<sup>(4)</sup>에 의한 고온 살균 측정기가 고안되었으나 측정하고자하는 효소용액을 열처리 온도까지 올리는 시간과 일정한 시간동안 열처리한 후 냉각되는 시간이 열처리 시간에 비해 무시할 정도로 짧아야 하는 실험 조건을 만족시키지 못하고 있어 정확한 실험결과를 얻기가 어렵고 복잡한 계산이 따라야하는 난점이 있었다. 이와같은 부정확한 실험조건을 개선하여 미생물의 사멸 속도에 응용한 바 있는 연속 살균기<sup>(5)</sup>를 이용하여 열 저항성이 특별히 강하여 고온 식품 살균에 문제점으로 대두되고 있는 peroxidase의 불활성화 속도를 측정하고 기존의 여러 측정치들과 비교 검토하였다.

### 실험 방법

#### 1. 고온 살균 실험을 위한 연속 살균 장치

본 실험에 사용한 연속 살균장치는 Fig. 1과 같으며 열처리 시간에 비해 처리 용액의 온도 상승시간과 냉각 시간이 무시할 정도로 작은 것이 특징이다. 예비수조로부터 압축 공기에 의해 약 5~6 bar의 기압하에 보내진 증류수가 열교환기를 통과하면서 열처리 온도보다 약간 높은 온도로 가열되어 교반장치가 달린 반응조로 운반된다.

동시에 기저 농도의 효소용액(25°C)이 역시 압축공기에 의해 5~6 bar의 압력 하에 효소용액 용기로부터 보내져 반응조에서 열교환기를 통해 가열된 고온의 증류수와 혼합된다. 이 때 효소용액의 體積速度(volume/time)는 증류수의 체적속도보다 훨씬 적은 양(일반적으로 1:20)으로 하여 반응조의 온도를 열교환기를 통과한 증류수의 온도와 비슷한 정도로 유지한다. 반응조에서의 교반이 이상적으로 이루어진다고 가정할 때 효소용액의 온도는 급상승하게 되며 온도 상승시간은 실제로 영(零)으로 간주된다. 반응조에서 배출되는 혼합용액은 발브를 통하여 냉각된 감압용기로 보내져 감압팽창되어 효소용액이 급냉각된 후(예: 0.5기압에서 81°C로 될) 얼음 속에 미리 냉각된 시험관으로 옮겨진다. 이리하여 냉각시간도 역시 무시할 수 있을 정도로 단축된다. 연속되는 모든 열처리 과정은 5~6 bar 하에서 실시되어 수용액의 비등을 방지하고 sample의 채취는 定常狀態(stationary state)에서 조작한다. 증류수와 효소용액의 체적속도는 Rotameter에 의해 측정되고 각

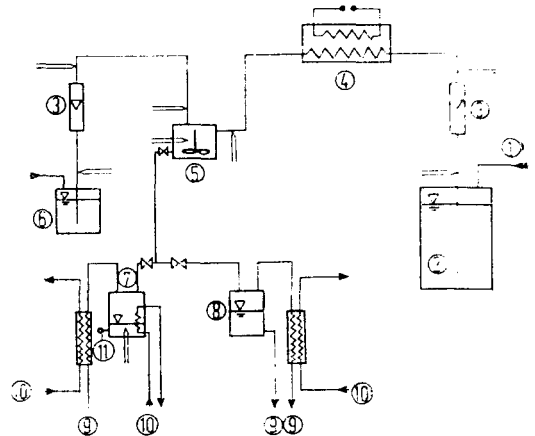


Fig. 1. Continuous sterilization apparatus

- 1. Compressed air
- 2. Reservoir; demineralized water
- 3. Rotameter
- 4. Heat exchanger
- 5. Mixer
- 6. Reservoir; Enzyme solution
- 7. Expansion room
- 8. Expansion chamber
- 9. Vacuum
- 10. Cooling water
- 11. Sample collector

효소의 온도는 Cu-constantan-thermocouple을 써서 측정, multi channel recorder에 의해 측정된다.

#### 2. Decimal Reduction Time(D-value)의 산출 원리

반응조 내에서의 효소용액과 증류수의 완전혼합(complete mixing)이 이루어진다는 확인 실험은 KCl용액을 사용하여 residence time distribution curve를 얻고 완전혼합이 이루어짐을 확인하고 효소용액을 사용하여 서로 동일한 결과를 얻었다. 이 때 반응조내의 平均滯在時間은 15s ≤ t̄ ≤ 60s 범위내에서 행하였고 이 범위내에서 定常상태에 이르는 시간은 약 300s로 확인되었다

Decimal reduction time, D의 산출은 다음과 같이 하였다. 일정한 滯在時間(Residence time)t 동안 열처리 받은 효소의 잔류농도는 공식(1)과 같이 표현된다.

$$M = M_0 \cdot e^{-k_M \cdot t} \tag{1}$$

M = 잔류 효소의 농도

(enzyme concentration at time t)

M<sub>0</sub> = 초기의 효소농도

(initial enzyme concentration)

k<sub>M</sub> = 반응 상수(reaction rate constant)

t = 반응시간(residence time)

반응조에서 효소가 받는 작용은 각 효소 분자가 각각의 체제시간에 작용받아 불활성화된 것의 총화이다. 따라서

$$\frac{M}{M_0} = \int_0^{\infty} e^{-k_M \cdot t} \cdot E(t) dt \tag{2}$$

$E(t)$ =residence time distribution function

완전혼합이 이루어지는 반응조에서  $E(t)$ 는 공식(3)과 같이 표현된다.

$$E(t) = \frac{1}{\bar{t}} e^{-\frac{t}{\bar{t}}} \quad (3)$$

$\bar{t}$ =평균체재시간(mean residence time)

공식(3)을 공식(2)에 대입한 후 적분하면

$$\frac{M}{M_0} = \frac{1}{1 + k_M \cdot \bar{t}} \quad (4)$$

Decimal reduction time,  $D = \frac{2.303}{k_M}$ 의 관계를 공식

(4)에 대입하면

$$D = \frac{2.3M}{M_0 - M} \cdot \bar{t} \quad (5)$$

가 얻어지며 이에 의하여 D가 산출된다.

### 3. 재료 및 효소의 열처리 조건

a) horseradish peroxidase; 250 U/mg(25°C, 기질 Guajacol과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>사용)인 효소를 Boehringer, Mannheim으로부터 구입사용 o-phenylenediamine; 1.2 phenylenediamin zur Synthese, Merck, Darmstadt에서 구입사용 albumin; 소 혈청, Merck, Darmstadt에서 구입

b) 효소용액은 60µg peroxidase/ml의 농도로 albumin이 0.4%(w/v)되게 조제한 0.1M 인산완충액에 희석한 후 열처리하였으며 전 공정은 약 6 bar의 압력하에 행하였고 효소용액과 증류수용액의 體積速度는 약 1:20의 범위 안에서 열처리 하였다. 열처리가 끝난 시료의 채취는 정상상태에 이른 후 즉 효소용액을 반응조로 보내기 시작한 후 6분 후에 채집하였다.

### 4. Peroxidase역가의 측정<sup>(1)</sup>

0.1M 인산완충액(pH 7.0) 2.5ml가 든 cuvette에 0.04M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액 0.2ml를 가하고 peroxidase용액 0.2ml를 첨가한 후 o-phenylenediamine (550mg/10ml H<sub>2</sub>O+3ml Ethanol)을 넣고 단시간 내에 흔들어 혼합용액을 잘 섞은 후 spectrophotometer(ZEISS PM QII)를 써서 420nm에서의 흡광도 변화를 연속적으로 측정하였다. 반응 생성물의 농도 증가에 의한 초기 단위시간당 흡광도의 변화( $\Delta E/\Delta t$ )를 효소의 역가로 하였다.

### 결과 및 고찰

열처리 실험에 사용한 효소용액에 0.4% albumin을 첨가한 것은 효소농도가 반응조 내에서 증류수에 의해 약 20배 정도 희석되어 열작용을 받게 되는데 peroxidase가 일반 열저항성 실험에 사용되는 농도에서 보다 희박한 농도에서 현저하게 열저항성이 떨어지게 되어 타 실험치와 비교하는데 난점이 있다<sup>(1)</sup>. 따라서 이와 같

은 희박한 농도에서 오는 열저항성의 차이점을 보정하기 위하여 단백질 원으로 0.4% albumin을 첨가하여 실험하였다.

열처리 온도 110°C와 140°C 범위 내에서의 horse radish peroxidase의 불활성화 속도의 온도에 대한 영향은 Fig. 2와 같다. D-값과 z-값은 Tab. 1과 같으며 reaction rate constant  $k_M$ 은  $k_M = \frac{2.303}{D}$ 에 의하여 구하였다. 실험 조건이 비슷하여 비교가 될 수 있다고 생각되는 JOFFE and BALL<sup>(6)</sup>에 의한 측정치에서 보느냐와 같이 본 실험에서 얻은 측정치와 유사한 값들을 보

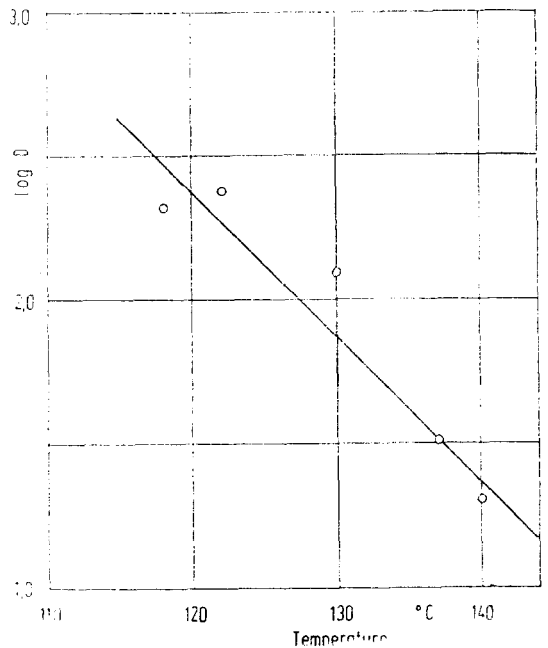


Fig. 2. Thermal destruction curve for inactivation of horseradish peroxidase

Table 1. First order reaction rate constants and D values for inactivation of horseradish peroxidase

Heating temperature (°C)	Reaction rate constant, $k_M$ ( $s^{-1} \cdot 10^3$ )	D-value (s)	D-value from JOFFE and BALL
118	11.03	208.8	
120			448
122	9.47	243.1	
130	18.4	124.8	186.6
135			108.6
137	71.3	32.3	
140	114.0	20.2	
145			40.7
$z$ (°C)		20.0	27.7

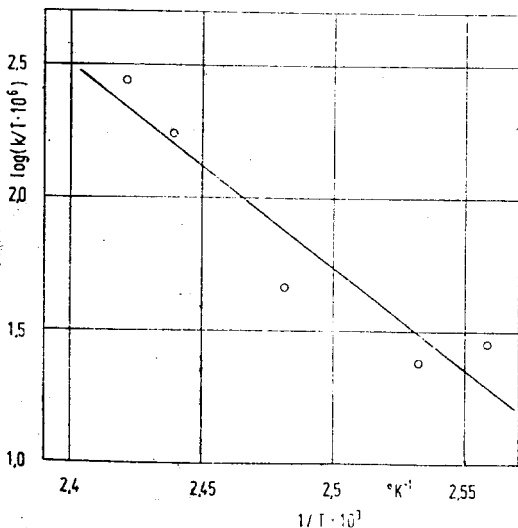
이고 있다.

JOFFE, BALL이 측정한 방법에서는 효소 용액이 처리 온도까지의 상승기간 동안 받은 열작용을 열처리 온도에서의 해당시간으로 환산함으로써 고온 열처리의 부정확한 점을 보정하였다. 본 실험장치는 이런 번거로움이 없는 장점이 있다 하겠다. 문헌에 보고된 측정치와 약간의 차이점을 보이는 것은 peroxidase의 정제상태, pH 및 열처리 방법을 달리한 것등 상이한 실험조건에 기인한 것이라고 보겠다. 열역학적인 상수(Table 2)들은 반응속도정수  $k_M$ 을 Eyring의 방법에 의하여 도시한 Fig. 3에 의하여 산출하였다. 본 실험에서 수집한 horseradish peroxidase의 열 불활성화 자료를 일반 미생물 살균 그래프 및 영양소 파괴 곡선과 비교하면 Fig. 4와 같다. 예로써 120°C에서 *Clostridium* 포자의 살균에 충분하다고 생각되는 시간만큼 식품을 열처리한다면 약 10%의 활성 peroxidase가 잔류하게 된다. *Bacillus stearothermophilus* 포자의 경우도 135°C 이상의 온도에서 후자의 포자 멸균을 목적으로하는 시간만큼 식품에 열처리하는 경우 10% 이상의 활성 peroxidase가 잔류하게

**Table 2. Thermodynamic constants for inactivation of horseradish peroxidase at pH 6.0**

Temp. (°C)	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta G^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol.K)
130	146.4	113.1	82.9

$\Delta H^*$  ; enthalpy of activation  
 $\Delta G^*$  ; free energy of activation  
 $\Delta S^*$  ; entropy of activation



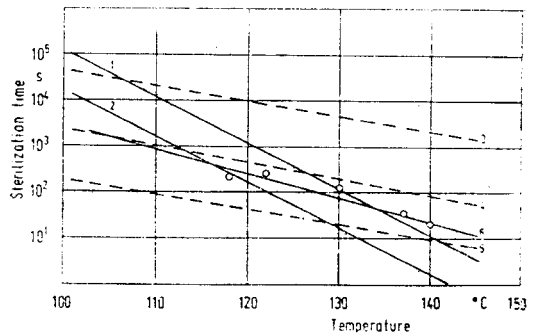
**Fig. 3. Inactivation rate constant of horseradish peroxidase as a function of temperature**

된다. 이와같은 사실은 만약 잔류된 활성 peroxidase가 식품의 품질에 영향을 미친다고 가정했을 때 고온 단시간 열처리공정 (HTST 또는 UTST)에서 문제가 되는 것으로 식품의 열처리 시간을 미생물의 포자 멸균에 충분한 시간보다는 peroxidase의 불활성화에 충분한 시간에 기초를 두어야 한다는 결론이 나온다.

한편 열저항성이 타 효소보다 높은 peroxidase가 식품 품질에 미치는 영향에 대해 많은 논의가 있으나 아직 정설이 없다. 일반적으로 peroxidase는 식품중에 off-flavor를 유발하고 anthocyanin색소를 탈색시키는 등의 악영향을 미치는 것으로 알려져 있다. (7,8)

BÖTTCHER<sup>(2)</sup>는 식품 중에 10%이하의 잔류 peroxidase는 실제로 식품의 품질에 영향을 미치지 않는다고 보고하였고 BRUEMMER<sup>(9)</sup>은 오렌지 주스에 존재하는 peroxidase의 작용으로 생성되는 산화물질이 검출되지 않는 것으로 보아 오렌지 주스에 존재하는 효소의 기질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 저 농도이므로 효소작용이 제한된 것이라 추정하였다.

결론적으로 고온 단시간 열처리 과정에서의 peroxidase의 잔류문제는 이 효소가 식품품질에 얼마 만큼의 영향을 미치는가하는 의문이 해결되지 않은 한 단정을 내리기는 어렵다. 그 밖에도 효소의 불활성화 속도가 그 구성 성분이 복잡한 식품에서 Model용액에서와는 다를 것으로 기대되는 만큼 모형실험에서의 자료를 실제식품 살균 공정에 직접 이용하는 데는 고려할 점이 많다.



**Fig. 4. Thermal destruction time curves for spores of bacteria and for horseradish peroxidase**

1. 10<sup>4</sup> times reduction of *Bacillus stearothermophilus* spores
2. 10<sup>12</sup> times reduction of *Clostridium botulinum* spores
- 3, 4, 5. 99, 10 and 1% destruction of thiamine
6. 90% inactivation of horseradish peroxidase (○—○; experimental data)

## 요 약

용액의 열처리 온도까지의 온도 상승시간과 열처리 후 냉각시간이 무시될 수 있을 정도로 단시간이어서 고온에서의 측정이 가능한 연속 살균장치를 이용하여 열처리온도 110°C와 140°C범위 내에서 horseradish peroxidase의 열에 의한 불활성화 속도와 열역학적 자료를 측정 수집하였다. 그 결과 peroxidase의 열에 의한 불활성화 enthalpy, 146.4kJ/mol, free energy of activation 113 kJ/mol, entropy of activation 82.9 J/mol.k를 얻었다.

본 실험에서 얻은 자료를 기초로하여 일반 미생물 살균 그래프와 비교하고 고온 단시간 살균공정(HTST)에서 효소의 불활성화에 충분한 열처리 시간을 고려해야 함을 토론하였다.

## 참 고 문 헌

1. Park, K.H.: Dissertation. University of Karlsruhe, Germany (1976).
2. Böttcher, H.: *Die Nahrung* 19, 173(1975).
3. Resende, R., Francis, J. and Stumbo, C.R.: *Food Technol.*, 23, 63(1969).
4. Stumbo, C.R.: *Food Technol.*, 2, 228(1948).
5. Oquendo, R., Valdivieso, L., Stahl, R. and Loncin, M.: *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 8, 181(1975).
6. Joffe, F.M. and Ball, C.O.: *J. Food Sci.*, 27, 587 (1962).
7. Zoueil, M.E. and Esselen, W.B.: *Food Research*, 24, 119(1959).
8. Grommick, R. and Markakis, P.: *J. Food Sci.*, 29, 53(1964).
9. Bruemmer, J.H., Roe, B. and Bowen, E.R.: *J. Food Sci.*, 41, 186(1976).