

식품 공학에 중요한 몇가지 효소들의 열불활성화

박 관 화
(서울대 농대 식품공학과)

Thermal Inactivation of Technological Important Enzymes

by

K.H. Park

Dept. of Food Technology, Seoul National University, Suwon

1. 효소 불활성화의 문제점

효소가 식품 저장중에 식품의 품질에 큰 영향을 미친다는 사실은 오래 전부터 잘 알려진 사실이다. 이들 효소작용이 우리들의 목적에 불리하게 작용하는 예로는 맛의 변질, off flavor, 색소의 변화 및 불량한 consistency라 하였다. 이와같은 효소작용의 억제를 위해 식품은 저온에서 즉 냉동 등을 통한 저장과 또는 건조의 수단으로 저장되고 있다. 이러한 저장 기간 중에도 효소는 식품중에 존재하는 기질과 작용한다. 그 예로 lipase, lipoxigenase, α -, β -amylase는 -20°C 부근에서도 활동하며 수분이 단분자층을 이루고 있는 BET-point이하(water activity <0.3)의 상태에 있는 건조식품에서도 효소 활동이 가능함이 알려져 있다⁽¹⁾. 따라서 식품 중에 존재하는 효소는 식품을 저장하기 전에 열, 방사선, 화학적 방법을 통하여 불활성화시켜 저장성을 높여야 하는 데 그 방법이 간편하고 현재 식품 공업계에서 널리 이용되고 있는 것은 열에 의한 효소의 불활성화 방법이다. 통조림 식품의 살균, 우유의 살균, 야채, 과일류의 냉동저장 및 건조과정의 전처리로 행하는 데치기(blanching)는 대표적인 미생물의 사멸 및 효소의 열에 의한 불활성화라 하겠다. 식품을 가열 처리할 때에는 식품중에 존재하는 미생물의 사멸, 효소의 불활성화 외에 영양소의 파괴 및 식품조직의 연화등의 부작용이 수반되는 것으로 가장 이상적인 가열 처리는 최대의 미생물 사멸과 효소의 불활성화를 달성하고 최소의 영양소 파괴 및 조직의 연화를 일으키는 것이라

하겠다. 이와같은 식품 살균과정을 합리화시키기 위하여 미생물, 효소, 영양소, 조직등의 열에 대한 저항성을 체계적으로 연구해야 하며 이를 위해 기타분야와는 달리 지금까지 충분한 자료가 수집되지 못한 효소의 열에 대한 저항성 연구는 식품 살균 공정의 합리화에 시급히 요구되는 분야라 하겠다. 본 실험에서는 우선 첫 단계로 식품품질과 제조공정에 영향력을 많이 미친다고 생각되는 효소, 특히 지방 분해 내지 산화효소를 중심으로 연구하였다.

2. 효소 불활성화 기작

효소는 단백질 분자로 이루어져 있어 효소를 불활성화시키는 어느 요인이 작용하면 본래의 특징적으로 접혀져 있는 polypeptide 구조가 개열되어 polypeptide chain이 비특정적이고 고유의 것이 아닌 방법으로 꼬여 있거나 감겨 있다. 이리하여 효소는 기질과 더 이상 결합할 능력을 상실하고 적당한 방법으로 활성화 시키지 못한다. 한편 가역적인 불활성화에서는 active center에 속한 group들이 불가역적인 불활성화의 경우처럼 멀리 떨어져 있지 않아 시간이 경과하면 일부는 원형대로 돌아와 활성을 찾게 된다.

효소 단백질이 불활성화 될때 끊어지는 결합들은 electrostatic interaction, hydrogen bond, hydrophobic interaction, disulfide 결합등인데 이들의 bond energy는 disulfide의 경우 $30\sim 100$ kcal/mole로 제일 크고 그 외의 경우는 일반적으로 $5\sim 20$ kcal/mole로 환원하면 위의 에너지를 공급해야만 효소 단백질의 불활성화가 일어

본 원고는 1976년 11월 6일에 열렸던 본학회 제17차 학술발표회에서 가진 특별 강연 초록이다.

나게 된다.

3. 효소 불활성화 법칙 및 실험조작

효소의 열에 의한 불활성화는 미생물의 사멸 및 화학반응에서의 단분자 분열반응과 마찬가지로 1차 반응 속도 법칙을 따른다. 즉

$$\dot{M} = -k_M \cdot M \quad (1)$$

\dot{M} = 불활성화 속도

M = 효소의 농도

k_M = 반응속도 경수

(1)식을 적분하면

$$\ln \frac{M}{M_0} = -k_M \cdot t \quad \text{또는} \quad \frac{M}{M_0} = e^{-k_M \cdot t} \quad (2)$$

M_0 = 효소의 초기 농도

한편 $k_M = \frac{2.303}{D}$ 이라 하면 (2)식은 다음과 같이 표현된다.

$$\log \frac{M_0}{M} = \frac{t}{D} \quad (3)$$

또한 D 와 온도, θ 와의 관계식을 보면

$$\log \frac{D_1}{D_2} = \frac{\theta_2 - \theta_1}{z} \quad (4)$$

단 D_1, D_2 는 각 온도 θ_1, θ_2 에서의 D -value

여기에서 D 는 Decimal reduction time으로 효소의 초기 역가가 100%에서 열처리 후 10%로 감소되는데 요하는 시간을 나타내며 z 는 D 값이 90% 감소하는데 올려 주어야 할 온도이다.

D -value 및 z -value는 식품의 살균 공정 계산에 필요한 효소의 열저항성 데이터로써 본 실험에서 구하고자 한다. 직접 실험을 통해 얻어지는 D 값은 그 정확한 값을 얻기 위해서는 될수록 짧은 시간에 효소 용액의 온도를 원하는 온도로 올리고 열처리 후 가능한 한 단 시간 내에 냉각시키는 것이 요구된다. 이것은 짧은 시간 열처리하는 고온에서의 실험에서 문제가 되겠다. 이를 위한 여러가지 실험 조작이 고안되고 있는데 이들 중 본 실험에서 사용한 방법을 소개하겠다.

첫째로 Levine에 의한 "flask method"이다. 이는 100°C 이하의 실험에 적합한 것으로 1~2ml의 효소 용액을 미리 열처리 온도까지 water bath에서 올려 놓은 30ml가량의 완충용액(三口 flask에 넣으면 온도 측정등 작업에 편리함)에 가한다. 용액은 자석식 교반기로 격렬히 교반되고 또 회석 비울에서도 보는 바와 같이 가해진 효소 용액의 온도는 순간적으로 상승이 된다. 일정한 열처리를 한 후 1ml가량의 용액을 피펫으로 뽑아 미리 얼음으로 냉각시켜 놓은 시험관에 넣는다. 이 방

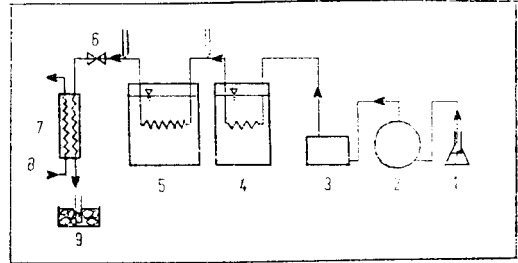


Fig.1. Apparatus for heat treatment of enzyme solution

- 1 : enzyme solution
- 2 : pump
- 3 : pulsation damper
- 4 : preheater
- 5 : holding section
- 6 : valve
- 7 : condenser
- 8 : cooling water
- 9 : ice bath

법은 특히 산소 부재하 즉 N_2 존재 하의 효소 열변성을 측정할 때 적당하다. (2) 다음으로는 Fig.1과 같은 연속적인 살균 조작을 본 실험실에서 개발 사용하였다. 펌프를 이용하여 효소용액이 3~6 bar의 압력 하에 연속적으로 내부직경 2.6mm, 관벽두께 0.35mm인 stainless. 관을 통하여 예비가열 oil bath와 다음으로 본 가열 oil bath로 보내진다. 예비가열 oil bath를 본가열 oil bath보다 20~50°C정도 높게하여 가능한 한 신속한 용액의 온도 상승을 꾀했으며 효소용액은 본 가열 oil bath에서 열처리된 후 밸브를 통해 대기압으로 팽창시키고 이어서 냉각기를 통하게 되므로 급속히 냉각이 된다. 이와같은 연속 살균기에서는 관 내부를 흐르는 효소 용액의 유속이 분체가 된다. 용액이 난류(turbulent flow) 흐름인 경우($Re > 2,300$)는 대부분의 효소 분자들이 관을 통과하는 시간이 평균시간, \bar{t} 에 해당하므로 공식(3)은 $\log \frac{M_0}{M} = \frac{\bar{t}}{D}$ 로 표현되고 따라서 D -value가 간단히 계산된다. 그러나 효소 용액이 층류(laminar flow)인 경우는 각 효소 분자들의 관내 체류 시간이 다르게 되어 공식(3)에서 열처리 시간, t 의 대입에 신중을 기해야 한다. 이때는 각 효소 분자들의 체류 시간을 residence time distribution function에 입각하여 계산하게 되는데 간편한 방법이 없어 실제로 사용하기에는 불편한 점이 있다. 따라서 위와 같은 살균 장치에서는 용액의 흐름이 난류가 되게 하면 간편한 계산 외에도 열전도가 층류보다 좋아 난류의 흐름이 되도록 조작하는 것을 추천한다. 그의 연속화학반응로의 원리를 이용한 장치를 고안 사용하였는데 지면 관계상 참고 문헌(5)만을 소개하기로 하겠다.

4. 효소의 열불활성화

4.1. 완충 용액에서의 효소의 열불활성화

효소의 열에 의한 불활성화에 대한 기초적인 자료를 수집하기 위해 Model용액 즉 완충용액을 택하여 실험하였다.

Fig. 2에 인산완충액 pH 7.0에서의 lipoxygenase의 불활성화 곡선을 대표적인 예로 실었다. 기타 효소 peroxidase, lipase, lipid-acyl-hydrolase에서도 이와 비슷한 경향을 보였다. Fig.2에서 열처리 온도 60~64°C

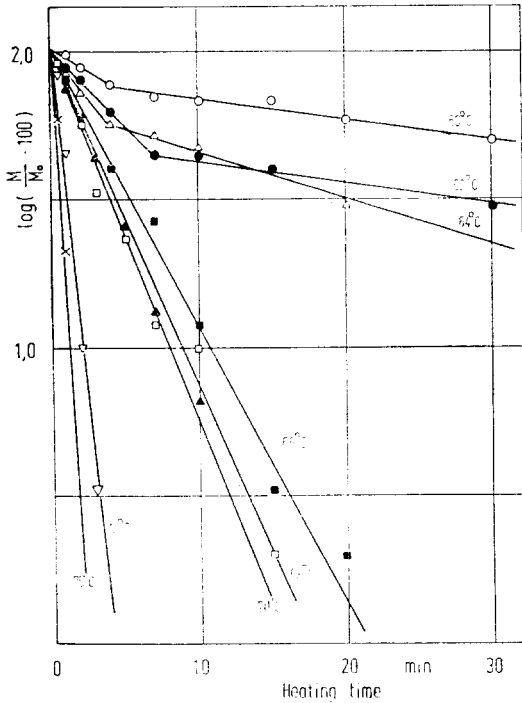


Fig. 2 Thermal inactivation of soybean lipoxygenase at various temperatures in phosphate buffer pH 7.0. Enzyme concentration 40μg/ml

M: Enzyme concentration at time, t
M₀: Initial enzyme concentration

범위에서는 효소의 역가가 열처리 시간에 따라 지수함수적으로 감소되지 않고 꺾어지는 점을 볼 수가 있다. 즉 열불활성화 속도가 일정한 열처리 시간 후 초기의 빠른 속도로부터 갑자기 완만해지고 따라서 장시간의 열처리 후에도 활동적인 효소가 남아 있다는 것이다. 이는 효소 불활성화가 1차 반응 속도론에 의거한다는 설에 위배되는 것으로 볼 수도 있는데 여러 학설이 제안되어 그 기작을 설명하고 있다. 첫째로는 분자 내의 aggregation설⁽³⁾로 열을 받은 효소 분자들은 서로 엉겨서 열저항성이 더 큰 aggregate를 형성한다는 것이다. Isoenzyme학설⁽⁴⁾은 효소는 열저항성이 전혀 다른 isoenzyme으로 구성되어 있어 열저항성이 큰 isoenzyme이 열처리 후반기에 남아 있어 완만한 불활성화 속도를 보인다는 것이다. Table 1에는 Fig.1과 같은 열불활성화 곡선에서 얻은 D-value와 또한 D-value의 온도에 대한 관계를 나타내는 z-value를 종합하여 표시하였다. 비교적 높은 D-value와 z-value를 가진 horse radish peroxidase가 시금치 peroxidase, lipase, lipoxygenase보다 더 큰 열저항성을 가졌다고 할 수 있겠다. 뱀독소에서 채취한 phospholipase A₂는 90°C에서 30분간 열처리 하였으나 열불활성화가 전혀 일어나지 않았다. 이는 후에 비교하게 될 시금치의 phospholipase group과는 대조적이다(Table 2와 비교)

4.2. 환경 인자들이 미치는 영향

여러가지 계면활성제의 존재하에 peroxidase의 열불활성화는 Fig.3과 같이 나타내어진다. 실험에 사용한 모든 계면활성제는 불활성화에 영향을 미치는 데 이 중 수용액 중에서 팽창되는 계면활성제 lecithin과 monoglyceride가 가장 큰 영향을 미쳤다. 이는 식품 열처리 공정을 첨가물을 통하여 조절할 수 있는 가능성을 시사한 것이라 하겠다. 여러가지 지방산의 존재 하에 열처리한 lipoxygenase는 열불활성화가 무처리 구에 비하여 현저히 증가되었는데 이는 지방산이 lipoxygenase의 active center에 hydrophobic 결합을 이루워 효소의 구조를 불안정화 시킨 것으로 생각된다. 기타 pH의 영향도 불활성화에 큰 영향을 미쳤는데 시금치 및 horse

Table 1. Decimal reduction time D- and z-value for inactivation of various enzymes

Enzyme	pH	D (s)										z(°C)
		50	60	64	70	75	80	90	100	110	120°C	
Horseradish peroxidase	6	—	1800	—	702	—	396	102	19	10.4	7.2	25.5
Spinach peroxidase (isolated)	6	—	2560	—	744	—	79.8	14	—	—	—	13
Geotrichum candidum-lipase	7	1200	636	—	90	—	36	—	—	—	—	19
Soybeanlipoxygenas	7	—	1980	985	495	90	—	—	—	—	—	9.8
Phospholipase A ₂ (snake venom)	7	—	∞	—	∞	—	∞	∞	—	—	—	—

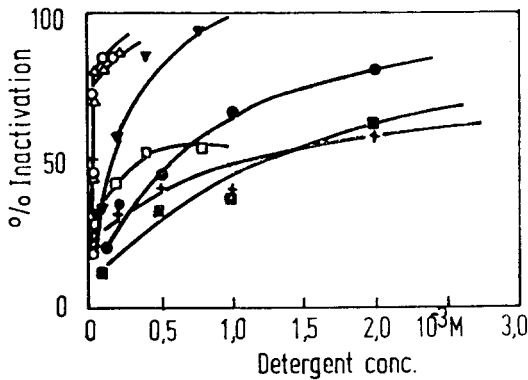


Fig. 3. Thermal inactivation of horseradish peroxidase as function of detergent concentration. Heat treatment: 120 s at 70°C and pH 6.0
 ○ lecithin △ monoolein ▼ oleic acid
 □ lauric acid ● tween 20
 + dodecyltrimethylbenzyl ammonium salt
 ■ sodium dodecylsulfate

radish peroxidase의 경우 pH 5~6에서 가장 열저항성이 컸고 pH 4.0에서 가장 낮았다.

4.3. Apo-, coenzyme의 불활성화

Peroxidase의 경우 불활성화 기작을 설명해 보기위한 시도로 효소의 prosthetic group을 apoprotein으로부터 분리시킨 후 각각 열처리한 후 다시 재결합시켜 그 역가 등을 관찰하였다. 이때 apoprotein만을 열처리하여 열처리 하지 않은 prosthetic group인 heme과 재결합시켜 측정한 결과 holoenzyme보다 더 열에 강한 결과를 얻었다. 한편 prosthetic group도 열처리 과정 중 급속한 열불활성화 곡선을 보였는데 이는 polymerisation에 의한 것으로 보인다. Apoprotein의 열변성 정도와 자연상태의 holoenzyme의 열변성 정도가 상이한 점으로 보아 peroxidase의 수용액 중에서의 열불활성화는 apoprotein적의 결과는 아니라고 추측할 수 있겠다. prosthetic group의 영향 하에 효소의 전체적인 삼차적인 구조가 열불활성화에 관여한다고 보겠다. 열처리한 peroxidase의 흡수 spectrum을 측정했을 때 400nm 부근의 Soret-band의 extinction이 열처리 하지 않은 peroxidase

에 비해 현저히 감소된 것을 관찰할 수 있었는데 이것도 prosthetic group주위의 부분에 삼차원적인 modification이 일어난 것으로 추정된다.

4.4. 식품중에서 효소의 열불활성화

지금까지 살펴 본 model용액에서는 그 용액의 성분이 정확히 알려진 것이었으나 식품과 같은 복잡한 계에도 적용될 수 있는 것인지는 검토되어야 할 것이다. 식품의 한 예로 시금치 중의 peroxidase와 lipid-acyl-hydrolase의 열에 대한 저항성을 측정하여 Table 2에 종합하였다. 표에서 보는 바와 같이 분리하여 완충액 중에서 열처리된 시금치의 peroxidase는 suspension 상태에서 열처리 된 동일한 효소와 전혀 다른 열저항성을 보이고 있다. 이는 식품 내용물과의 상호 작용이 효소의 열저항성에 영향을 미치고 있다는 것을 말해 주고 있는 것으로 모델 용액에서 얻은 효소의 열역학적 자료를 식품의 열처리 공정에 직접 이용할 때에는 식품 중에 존재하는 기타물질의 영향과 물리적인 상태를 고려해야 한다는 점을 시사하고 있다. 그의 한가지 특기할 것은 시금치에 존재하는 phospholipase group의 복합체⁽²⁾인 lipid-acyl hydrolase가 60°C에서 1분간 처리될 경우 약 90%가 불활성화 되는데 백독소 phospholipase의 경우 90°C에서 30분간 처리했을 때 전혀 열불활성화가 일어나지 않는다는 점이다. lipid-acyl-hydrolase의 분자량은 70000정도이고 oligomer인 반면에 백독소인 phospholipase A₂는 15000정도의 분자량을 가지고 있으며 6~8개의 disulfide결합을 지닌 구형이어서 전형적인 큰 열저항성을 가진 것으로 추측된다.

결 론

지금까지 얻은 효소 열불활성화의 자료를 어떻게 식품 살균 처리에 이용이 되느냐가 남은 문제이다. 그 한 예로 *Bacillus stearothermophilus* 포자 10⁴배 감소, *Clostridium botulinum* 포자의 10¹²배를 감소시키는데 필요한 살균시간과 효소의 99%가 감소되는 데 필요한 열처리 시간을 도표에 그려 넣고 영양소의 열에 의한 파

Table 2. D-values for inactivation of peroxidase and lipid-acylhydrolase from spinach

Enzyme	pH	D (s)							z(°C)
		45	50	55	60	70	80	90°C	
Spinach peroxidase (isolated*)	6.0				2560	744	79.8	14	13
Spinach peroxidase (suspension**)	6.0				840	282	60		17.5
Spinach lipid-acyl hydrolase	7.0	2400	1140	372	72				9.75

*) (NH₄)₂SO₄- fraction between 0.4 and 0.85 saturation

***) Powder of freeze dried spinach was homogenized in buffer solution

괴곡선을 함께 그려 비교를 한다. 효소의 잔존 활성이 식품 품질에 악영향을 미친다고 가정할 때를 생각해 보자. 일반적으로 세균 포자의 x -value는 10°C 로 살균온도의 변화에 비교적 예민한 편이나 horseradish peroxidase는 $x=25.5^{\circ}\text{C}$ (Table 1 참조)로 살균온도의 변화에 예민하지 않다. 따라서 고온에서 단시간 살균하는 경우 미생물 포자의 멸균을 기준으로 살균시간을 정할 경우 효소의 열불활성화 시간이 미급하게 될 수가 있다. 위의 실험결과 약 130°C 부근을 한계점으로 그 이상의 온도에서는 horseradish peroxidase를 불활성화 시키는 시간이 미생물 포자 살균시간 보다 길어지게 되어 살균시간을 미생물 포자를 기준으로 할 경우 peroxidase의 활성이 남게 된다.^{(2)참조}.

위의 이론적인 살균 곡선을 떠나 시금치의 blanching의 경우를 보자.

Table 2에서 보는 바와 같이 시금치에 존재하는 peroxidase는 horseradish peroxidase보다 훨씬 열저항성이

떨어져 80°C 에서 2~3분 정도면 거의 완전히 활성을 잃는다. 현재 공장에서 실행되고 있는 열처리(100° 에서 2~3분)는 과잉 열처리를 볼 수가 있겠다. lipid-acylhydrolase의 열불활성화도 70°C 에서 1분이하로 완전히 이루어지므로 현행되는 열처리는 70° 내지 80°C 에서 1~2분 정도로 blanching하여 과잉 열처리에서 오는 식품 품질의 손상등을 방지해야 할 것으로 안다.

참 고 문 헌

1. Duden, R.: Dissertation, Univ. Karlsruhe (1972)
2. Park, K.H.: Dissertation, Univ. Karlsruhe (1976)
3. Winter, E.: Z, Lebensm. -Unters. -Forsch. 145 3—6 (1971)
4. Delincee, H.: Dissertation, TU München (1973)
5. Oquendo, R., Valdivieso, L., Stahl, R. and Loncin, M.: Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 8, 181 (1975)