

GOVP1200506001

최 중
연구보고서

202002-02-1-SB010

사과의 구취억제 기능성 해석 및 산업적 이용기술 개발

Deodorizing Mechanism of Apple Extracts for Halitosis
Inhibition and Development of Industrial Application
Technology

연 구 기 관
부 경 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “사과의 구취억제 기능성 해석 및 산업적 이용 기술 개발” 과제 (세부과제 “사과의 구취억제 기능성 해석 및 산업적 이용기술개발”, “구취억제 관여 효소의 특성 해석”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 10월 14 일

주관연구기관명 : 부경대학교
총괄연구책임자 : 김 선 봉
세부연구책임자 : 이 양 봉
연 구 원 : 서 정 은
연 구 원 : 우 진 욱
연 구 원 : 박 현 덕
연 구 원 : 허 민 수
연 구 원 : 신 의 철
연 구 원 : 장 해 진
참 여 기 업 명 : 백경식품(주)
연 구 원 : 김 진 흥
연 구 원 : 조 동 제

요 약 문

I. 제 목

사과의 구취억제 기능성 해석 및 산업적 이용 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

UR 농산물 협상 타결 및 FTA 체제의 도입으로 국내 과수재배 농가의 생계유지 및 미래 생업에 커다란 타격을 주고 있다. FTA 체제 발전으로 저가의 다양한 과실류 및 그 가공품의 수입이 급속하게 증가함에 따라 국내산 과일 수요의 상당량을 대체하여 국내산 과일의 생산 위축현상을 초래함으로써, 국내 사과 생산량은 95년 716,000톤을 기점으로 점차 줄어들어 2003년도에는 365,400톤으로 크게 감소하였다. 이러한 추세에 비추어 볼 때 고가 고품질의 신선 판매용 원과를 제외한 원료 사과의 이용기술 개발이 시급하다고 볼 수 있으며 적과시 대량 발생하는 폐기 미숙과, 낙과 등 B급 제품, 주스 등 제조시 나오는 가공부산물 등의 적극적 이용 기술개발로 부가가치 제고가 필요하다.

국내산 사과의 가공율은 15% 수준에 불과한데 이는 선진국의 30-50% 수준에 크게 못 미치고 있으며 대부분 생과로 소비되어 향후 수입과일의 증가와 더불어 과일 생산시 가격이 폭락할 우려가 크다.

최근 여러 과채류에는 비만방지, 항산화, 항돌연변이, 피부보호 작용 등에 관여하는 기능성 성분 (functional components, nutraceuticals)이 함유되어 있음이 밝혀지고 있는데 이러한 생리활성 작용에는 polyphenol이 관여하고 있다. Polyphenol은 과채류에 보편적으로 존재하는 polyphenol oxidase에 의하여 산화되어 dihydroxyphenol 및 hydroxyquinone을 거쳐 최종반응 생성물인 적갈색의 중합체인 melanin으로 된다. polyphenol 화합물의 산화과정에서 생성되는 quinone 화합물은 입냄새 등 불쾌취의 주성분인 methyl mercaptan 등의 황화합물과 반응하는 성질이 있으므로, 이러한 특이적 반응을 이용하면 입냄새 등의 좋지 못한 불쾌취를 줄일 수 있는 과채류 상품을

개발할 수 있다.

한편, 최근 소비자 청결의식이 크게 증가하여 구취제거 관련 제품의 시장 잠재력이 지대하므로 관련 소재 및 기술 개발시 경제적 파급효과가 클 것으로 예상된다. 이미 치약, 껌, 젤리, 캔디 및 구강세정액 등의 구강청결 및 구취억제와 관련된 다양한 제품이 최근 활발하게 개발되고 있으며, 현재까지 개발 판매되고 있는 구취억제 상품은 합성품의 사용이 대부분을 차지하고 있으므로 과채류의 천연물을 이용한 구취억제 상품의 개발이 크게 요망되고 있다. 특히 우리나라에서는 김치의 소비와, 불고기, 삼겹살 등의 육류의 섭취로 인해서 마늘, 양파, 담배 및 술 등에 기인한 구취제거 제품에 대한 소비자의 요구도가 급증하고 있는 추세이다.

본 연구의 목적은 사과 및 과채류를 원료로 한 구취억제 기능성 소재 제조 신기술 개발 및 산업화에 있으며 이를 위하여 구취억제 유효획분의 검색, 최대 기능 발현 조건 검토, 구취억제 소재의 추출, 제조 기술 개발, 구취억제 기능성 소재의 산업적 생산기술 개발, 구취억제 기능성 소재를 이용한 응용제품 제조 기반 기술 개발을 통하여 사과 원료 및 과채류 등의 적극적 유효이용기술 개발로 고부가가치화에 기여하며, 입냄새에 대한 사회적인 관심이 높으므로 구취억제용 천연 기능성 소재를 사과 및 과채류 등을 원료로 하여 제조하여 사과의 구취억제 기능성에 대한 체계적 구명과 가공기술 개발로 과채류 재배농가의 안정적 소득 증대에 기여하는데 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 개발 목표는 사과 및 과채류를 비롯한 과채류의 가공 이용율을 높이기 위하여 사과를 원료로 한 구취억제 기능성 소재의 추출, 제조 기술을 개발하며, 구취억제 기능성 소재의 산업적 생산기술을 개발 및 구취억제 기능성 소재를 이용한 응용제품 제조 기반 기술을 개발하는데 있다. 이를 위하여 대상 원료 과실류의 기초 분석 및 소취 활성 조사 후 구취억제 소재 제조를 위한 가공 방법을 검색하여 소취 활성을 측정 후 결정된 가공 방법으로 구취억제 기능성 소재의 대량 생산 기법을 연구하며, 소취 활성이 높은 캔디, 젤리, 구강세정액, 음료 등의 응용제품을 제조하여 그 생산체제를 구축하고자 하였다. 본 과제에서 수행하고자 하였던 연구 개발 범위를 각 과제별로 정리하면 다음과 같다.

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2003)	<p>제 1 세부과제</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 원료 과실류의 검색 ○ 구취억제 소재의 제조 ○ 구취억제 소재의 효과 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 대상 원료의 구득 및 기초 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 대상 과실류 : 사과/포도/감귤/감 등 - 종류/부위별 소취활성 조사 등 ▶ 잔류 농약 오염 여부 조사 및 제거 <ul style="list-style-type: none"> • 오염시 제거 방법 검토 ▶ 전처리 <ul style="list-style-type: none"> • 세정/건조/분말화 조건 구명 ▶ 추출/분획 <ul style="list-style-type: none"> • 용매별/조건별 수율 및 활성 등 조사 ▶ 여과/농축/건조 <ul style="list-style-type: none"> • 방법별/조건별 수율 및 활성 등 조사 ▶ 소취력 검증 <ul style="list-style-type: none"> • Methyl mercaptan (CH₃SH)에 대한 소취력 측정 • 반응 특성을 이용한 소취 효과 비교 분석 ▶ 향균력 검증 <ul style="list-style-type: none"> • 충치 원인균에 대한 향균력 측정 ▶ 종합적 효과 해석 <ul style="list-style-type: none"> • 활성 최적 발현 조건의 검토 구명
	<p>제 2 세부과제</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 구취 억제 관여 효소의 추출, 정제 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 구취억제 관여 효소의 추출, 분획 및 효과 구명 <ul style="list-style-type: none"> • 추출/분획 조건 최적화 • 최적 효소 활성 구명
2차 년도 (2004)	<p>제 1 세부과제</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 소취활성 소재의 대량 생산 기법 연구 ○ 산업적 응용제품의 제조 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 대량 제조 공정 설계 ▶ 시제품의 개발 및 생산 ▶ 개발 시제품의 경제성 분석 ▶ 제품형태/유형별 제조 조건 구명 <ul style="list-style-type: none"> • 음료, 젤리 및 구강세정액 등 ▶ 개발 응용 시제품의 평가/개선
	<p>제 2 세부과제</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 구취억제 관여 효소의 반응 특성 구명 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 효소의 반응 특성 구명 <ul style="list-style-type: none"> • 구취억제 관여 효소의 반응 특성 구명

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 과일 및 야채류의 구취억제 활성 검색

구취억제 소재를 선정하기 위하여 과일류는 사과, 포도, 배, 감, 귤을 대상으로 하며 야채류는 우엉, 상추, 버섯, 솔잎, 양송이를 대상으로 하여 methyl mercaptan을 구취 표준물질로 하는 구취억제활성을 검색하였다. 구취억제활성을 50% 억제시키는데 필요한 양으로 표현한 DA₅₀값으로 비교하였을 때, 과일의 경우 포도, 사과, 배, 감, 귤의 순으로 각각 구취억제활성이 높게 나타났으며, 각각의 DA₅₀값은 29.86 mg, 47.56 mg, 86.46 mg, 106.64 mg, 150 mg이었다. 야채의 경우 상추, 깻잎, 우엉, 양송이, 솔잎 순으로 구취억제활성이 높게 나타났으며, 각각의 DA₅₀값은 1.35 mg, 4.63 mg, 5.86 mg, 7.19 mg, 150 mg이었으며, 야채의 경우 과일보다 적은 양에서 높은 구취억제 활성을 나타내었다.

또한, polyphenol의 함량이 높으면 methyl mercaptan에 대한 억제율이 높아져 구취억제효과가 있을 것으로 예상되어 총페놀함량을 측정하였다. 과일 중의 총페놀함량은 포도가 6.2 mg/g으로 가장 높았고 귤, 사과, 배, 감의 순으로 나타났다. 야채류의 총페놀함량은 상추가 12.0 mg/g으로 가장 높았으며 전반적으로 과일보다 야채류가 비교적 높게 나타났다. Polyphenol oxidase는 식물에 많으며 polyphenol의 산화에 관여하므로 과일 및 야채류에서 조효소액을 추출하여 polyphenol oxidase의 활성을 조사하였다. Polyphenol oxidase가 polyphenol을 산화시키면 methyl mercaptan에 대한 구취억제활성에 영향을 미치게 된다. 과일의 경우 polyphenol oxidase 활성은 배에서 가장 높았고 사과, 포도, 감, 귤의 순으로 나타났다. 야채류에서는 상추가 가장 높게 나타났다. 이상의 결과에서 구취억제 활성, 총페놀함량, 효소활성 등을 고려하여, 과일류에서는 사과와 포도를, 채소류에서는 상추를 각각 선정하여 구취억제 실험재료로 사용하였다.

2. 구취억제 소재의 조건별 구취 억제 특성

사과와 포도를 과피와 과육으로 나누어 부위별로 구취억제 활성을 측정하였으며,

상추의 경우는 부위별로 구분하지 않고 구취억제 활성을 측정하였다. 사과와 포도를 각각 과피와 과육으로 분리하여 균질화시킨 후 구취억제 활성을 측정한 결과 두 시료 모두 과육보다는 과피에서 구취억제 활성이 높게 나타났다. 부위별 구취억제 활성과 마찬가지로 총페놀함량도 과육보다는 과피에서 높아 구취억제 활성과 총페놀함량과의 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

과육과 과피를 분리하지 않고 사용한 추출물에서는 구취억제 활성과 수율이 모두 뛰어나 산업화를 위해서는 과피와 과육을 함께 이용하는 것이 바람직하리라 판단된다. 또한 사과 및 포도 가공 공장에서 부산물로 생성되는 과피도 구취억제 소재로 효율적인 이용이 가능하리라 판단된다. 추출조건에 따른 구취억제율 및 수율을 측정하기 위해 water soluble, ethanol soluble, methanol soluble 및 초임계 추출물을 제조하였다. 제조된 각각의 조건별로 구취억제 활성 및 수율을 측정한 결과, 추출 조건별 구취억제활성 결과 상추의 water soluble이 구취억제 활성과 수율이 가장 높았고, 사과와 포도의 경우는 추출용매에 따른 구취억제 활성의 차이는 크지 않았으나 수율은 water soluble이 높게 나타났다. 따라서 구취억제 활성과 경제성을 고려할 때 water soluble이 구취억제 소재의 제조시 가장 적합한 것으로 판단된다.

3. 구취억제 소재 제조시의 영향 인자의 특성 구명

가. 온도

구취억제 소재를 제조할 때 일정한 온도 범위 내에서 최대한의 효과를 얻기 위하여 구취억제 활성이 높은 water soluble 이용하여 각 온도별로 나타나는 구취억제 활성을 측정하였다. 사과, 포도 및 상추의 경우 20℃까지는 구취억제 활성의 차이가 적었으나 온도의 증가와 더불어 구취억제 활성이 모두 감소하는 경향을 나타내었다. 상추와 사과의 경우는 포도와는 달리 60℃ 이상에서 그 구취억제 활성이 급격히 감소하였다. 사과, 포도 및 상추의 polyphenol oxidase 활성의 최적온도는 20~25℃로 나타나고 있는데, 이와 어느 정도 일치하는 결과를 나타내고 있다.

나. pH

사과, 포도 및 상추를 상온에서 pH 별로 구취억제 활성을 측정하였다. pH 실험의 결과 사과 및 포도는 pH 3.5에서 구취억제 활성이 높았으나 폭 넓은 pH의 범위에서

도 활성을 유지하였다. 상추는 pH 5에서 구취억제 활성이 높았고 pH 8까지 활성의 큰 변화없이 유지되었다. 실제로 사과, 포도 및 상추의 water soluble을 만들어 pH를 측정해보면 사과가 pH 4.7, 포도가 pH 3.3 및 상추가 pH 6.2로 나타남으로 이들의 water soluble 자체가 가지고 있는 pH에서 나타내는 구취억제 활성과 큰 차이가 없기 때문에 구취억제 소재 제조시 pH의 조작보다는 시료 자체의 pH에서 소재를 제조하는 것이 유용하다고 판단된다.

다. 가공처리 방법

구취억제 소재의 경우 식품 및 약품에 첨가되기 때문에 저장 및 사용편이성을 위해 분말화 및 열처리가 필요하므로 구취 억제율 저하를 최소화할 수 있는 가공처리 방법을 검토하였다. 건조방법으로는 열풍건조, 동결건조, 분무건조의 방법을 이용하여 시료를 제조하여 구취억제 활성을 측정하였다. 사과 및 포도의 경우는 동결건조 소재의 구취억제 활성이 특별한 가공처리를 하지 않은 water soluble과 비슷하게 나타났으나, 상추의 경우는 동결건조 하여도 그 활성이 크게 감소하였다.

4. 구취억제 소재의 억제 기작 구명

가. 구취억제 활성에 대한 금속 및 환원제의 영향

검색과정을 통하여 선택된 사과, 포도 및 상추의 구취억제 기작에 영향을 미치는 인자들을 세부적으로 알아보기 위하여 water soluble에 질소, 금속 및 환원제를 25℃에서 30분간 처리하여 구취억제 활성을 알아보았다. Water soluble에 질소를 처리한 경우 모든 시료에서 구취억제 활성의 감소가 적었는데, 이는 소재 중의 polyphenol이 polyphenol oxidase 및 산화인자 등에 의하여 어느 정도 산화된 상태로 존재하여 산소의 영향을 적게 받았기 때문으로 판단된다. 금속 첨가의 경우 Cu를 첨가하였을 때 사과, 포도 및 상추 모두 구취억제 활성이 크게 증가하였으나, Fe나 Ca등은 구취억제 활성을 저해하는 것으로 나타났다. Cu는 소재 중의 polyphenol oxidase를 활성화시켜 polyphenol의 산화를 유도하였기 때문으로 판단되며, Fe나 Ca는 polyphenol의 산화나 polyphenol oxidase의 활성화보다는 polyphenol 및 polyphenol 산화물과의 반응으로 구취억제 활성을 감소시키는 것으로 판단된다. 환원제 처리의 경우 구취억제

활성이 감소하였는데 이는 구취억제에 필요한 polyphenol 산화물의 생성을 억제하기 때문으로 판단된다.

나. 구취억제 활성에 대한 효소 및 페놀의 영향

사과, 포도 및 상추로부터 페놀획분 및 polyphenol oxidase를 제조하여 구취억제 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 모든 시료에서 페놀획분과 polyphenol oxidase를 비교하였을 때 페놀획분 단독보다는 페놀획분과 polyphenol oxidase의 혼합물이 구취억제 활성이 높게 나왔으며, 페놀획분, polyphenol oxidase 및 Cu이온을 첨가한 실험구에서 구취억제 활성이 페놀 획분만을 첨가한 실험구보다 높게 나타났다. 그리고 ascorbic acid를 첨가한 경우에는 금속의 산화작용을 억제하여 다소 감소하였으나 polyphenol oxidase의 활성 저해는 적은 것으로 판단된다. 또한 시료 중에 보편적으로 많이 함유되어 있는 polyphenol인 chlorogenic acid 을 polyphenol 모델 물질로 이용하여 사과, 포도 및 상추에서 polyphenol oxidase 및 금속이온을 반응시켜서 구취억제 활성을 측정하였다. 모델 polyphenol 물질을 사용한 경우, chlorogenic acid 단독은 구취억제 활성이 낮았으나, polyphenol oxidase 및 Cu이온을 첨가한 경우 3가지 시료 모두 구취억제 활성이 크게 증가하였다.

다. 구취억제 소재의 구취억제 기작

사과, 포도 및 상추로부터 제조한 구취억제 소재가 나타내는 구취억제 기작은 소재 중의 polyphenol화합물과 polyphenol oxidase와 금속 등에 의하여 산화된 quinone 등의 polyphenol산화물이 methyl mercaptan과 반응 비휘발성의 화합물을 생성하기 때문인 것으로 판단된다. 또한 소재 중의 polyphenol성분이 총치균의 증식을 억제함으로써 미생물에 의해 methyl mercaptan의 생성의 억제도 구취억제에 기여할 것으로 판단된다.

5. 구취억제 소재를 사용한 산업적 응용제품의 제조

가. 음료의 제조

사과, 포도, 상추의 구취억제 소재 (water soluble, ethanol soluble, 초임계추출물)를 이용하여 만든 시제품 음료의 구취억제 활성을 측정한 결과, 사과와 포도는 60

mg/mL, 상추의 경우는 5 mg/mL 첨가 기준으로 하였을 때, water soluble의 경우, 사과에서 31.2%, 포도에서 79.8%, 상추에서 84.1%의 구취억제 효과가 나타났으며, ethanol soluble의 경우는 사과에서 70.2%, 포도에서 75.0%, 상추에서 54.0%였으며, 초임계 추출물의 경우, 30% 첨가하였을 때, 사과에서 75.8%, 포도에서 77.3%, 상추에서 77.1%의 구취억제 활성을 나타내었다.

나. 구강세정액의 제조

사과, 포도, 상추의 구취억제 소재를 이용하여 첨가량별 시제품 구강세정액의 구취억제 활성을 측정한 결과, 첨가량이 증가할수록 구취억제 활성은 증가하였다. 사과와 포도 소재는 60 mg/mL, 상추의 경우는 5 mg/mL 첨가하여 시제품 구강세정액을 제조하였을 때, water soluble의 경우, 구취억제 활성은 사과에서 60.0%, 포도에서 56.2%, 상추에서 38.6%로 나타났다. Ethanol soluble를 사용한 경우, 시제품의 구취억제 활성은 사과에서 70.2%, 포도에서 75.0%, 상추에서 54.9%로 나타났다. 초임계추출물의 경우, 30% 첨가하였을 때, 사과에서 42.4%, 포도에서 52.0%, 상추에서 49.4%로 나타났다.

다. 젤리의 제조

사과, 포도, 상추의 구취억제 소재를 이용 (사과와 포도 소재는 60 mg/g, 상추의 경우는 5 mg/g 첨가) 하여 시제품 젤리를 제조하여 구취억제 활성을 측정한 결과, water soluble의 경우, 시제품의 구취억제 활성은 사과에서 30.4%, 포도에서 19.2%, 상추에서 32.5%로 나타났다. Ethanol soluble를 사용한 경우, 시제품의 구취억제 활성은 사과에서 36.3%, 포도에서 35.7%, 상추에서 20.9%로 나타났다. 초임계추출물의 경우, 30% 첨가하였을 때, 시제품의 구취억제 활성은 사과에서 47.4%, 포도에서 44.4%, 상추에서 33.6%로 나타났다. 젤리의 경우 다른 시제품 보다 구취억제 활성이 낮게 나타났다.

라. 캔디의 제조

사과, 포도, 상추의 구취억제 소재를 이용 (사과와 포도 소재는 60 mg/g, 상추의 경우는 5 mg/g 첨가) 하여 시제품 캔디를 제조하여 구취억제 활성을 측정한 결과, water soluble의 경우, 시제품의 구취억제 활성은 사과에서 76.87%, 포도에서 78.01%, 상추에서 68.8%로 나타났다. Ethanol soluble를 사용한 경우, 시제품의 구취

억제 활성은 사과에서 63.6%, 포도에서 76.4%, 상추에서 45.6%로 나타났다. 초임계 추출물의 경우, 30% 첨가하였을 때, 시제품의 구취억제활성은 사과에서 37.4%, 포도에서 59.9%, 상추에서 16.7%로 나타났다.

마. 시제품의 평가

이상의 결과를 종합하였을 때, 구취억제 소재를 이용한 시제품 제조에서는 소재의 첨가량이 많을수록 구취억제 활성은 높아지는 경향을 보였다. 이 실험을 통하여 산업화 공정을 검토하였으며, 경제성 분석을 수행하였다. 사과, 포도의 경우 물추출의 경우는 소재의 수율이 80% 이상으로 다른 에탄올이나 초임계 추출 공정보다 높게 나타나기 때문에 충분한 산업화가 가능하리라 예상되며, 상추를 이용한 제품의 경우 구취억제 활성은 높게 나타나나, 야채가 가지는 특이한 불쾌취로 인해 기호성이 떨어져 구취억제 원료로서의 이용에 제약이 따를 것으로 보여 진다. 반면에 과일은 향이 좋아 기호성이 높고 실제적인 구취억제 효과가 있으므로 구취억제 효과가 뛰어난 상추와 병용하여 구취억제 소재를 개발하면 기호성과 구취억제 효능이 뛰어난 상품의 개발이 기대된다.

6. 구취억제 관여 효소의 추출, 정제 및 반응 특성 구명

과채류를 이용한 구취억제 활성 검색실험에서 구취억제 활성이 높게 나타난 사과, 포도, 상추를 이용하여 효소의 추출, 정제 및 반응 특성을 구명하였다.

사과, 포도 및 상추로부터 polyphenol oxidase를 정제하여 그 특성을 알아본 결과, 전체 활성은 각각 12,000 20,000 및 60,400 unit를 얻었으며, 수율은 18%, 19% 및 11.6%로 나타났으며, 5.8, 7.0 그리고 7.4의 purification fold를 얻었다. Sephacryl S-200 HR gel filtration column과 DEAE Sephacel ion-exchange column을 통해서 최종 정제된 polyphenol oxidase를 polyacrylamide gel 전기영동을 실시한 결과 사과의 분자량은 40 kDa으로 결정되었고, 포도의 분자량은 36 kDa으로 그리고 상추의 분자량은 55 kDa이었다. Polyphenol oxidase의 활성에 관한 최적 pH는 상추의 경우 pH 6.5에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 사과와 포도의 경우는 pH 7.0에서 가장 활성이 높았다. Polyphenol oxidase의 최적온도에 관해서는 사과와 상추는 25℃에서

가장 높은 활성을 나타내었고, 포도는 30℃에서 최대 활성을 보였다. 각각의 기질에 따른 사과, 포도 및 상추의 polyphenol oxidase의 활성을 보면 공통적으로 monophenol에서는 활성이 낮으며, polyphenol인 gallic acid에서 가장 활성이 높은 것으로 나타났다. 금속염의 농도를 각각 10 mM의 농도로 처리한 결과 Ca^{2+} 의 활성이 가장 높았으며, Fe^{2+} 의 활성은 상대적으로 낮았다. 10 mM의 ascorbic acid는 과일과 채소에서 분리한 polyphenol oxidase의 활성을 첨가 전에 비해서 50% 이하까지 급격히 감소시키는 역할을 하였다.

SUMMARY

I. Title

Deodorizing Mechanism of Apple Extracts for Halitosis Inhibition and Development of Industrial Application Technology

II. Objectives and Significance

Farmers for vegetables and fruits in Korea have had economical crisis because vegetables and fruits are imported with low prices from other countries after UR agricultural agreement and FTA were determined. Therefore, production of fruits and vegetables in Korea has been decreased with the increasing amount of imported fruits and vegetables. For an example, 716,000 ton of apple production for 1995 was sharply decreased to 365,400 ton of that for 2003.

The processing ratio of Korean apples is only 15% which is much lower than 30-50% of advanced countries. Most of fruits are used as a raw state, so it has a chance of a sharp decrease in price due to overproduction. Based on these disadvantages, the advanced processing technology is needed to be developed except high quality of fruits with high prices. Lots of unripened and dropped fruits were produced during harvesting and other periods. These fruits and byproducts of juice processing have ingredients which are required to be used for economical benefits. Several fruits are known to have some functional components which have some effects on obesity protection, antioxidation, antimutagenesis, skin protection. Some polyphenolic compounds in fruits are known to relate to these functions.

Polyphenolic compounds are oxidized to melanins of red or dark red via dihydrophenol or hydroxyquinone by polyphenol oxidase which is widely distributed in fruits and vegetables. Quinones which are formed by the oxidation of phenolic compounds have a function that can bind such sulfur-containing compounds as methyl mercaptan. By using this function, development of fruit or vegetable products is expected to reduce bad smell in mouth.

Consumer has an increasing clean concept on oral condition, so products for halitosis inhibition are largely expected to have increasing market share to have economical benefits with developments of ingredients and technologies for halitosis inhibition. Diverse products such as toothpaste, gum, jelly, candy and mouth rinse have been already developed for clean mouth and halitosis inhibition. Commercial products for halitosis inhibition mainly include synthetic compounds, so development of natural products from fruits or vegetables is needed.

In particular, Korean people often eat kimchi, beef, pork and chicken, and smoke or drink, so they have the increasing bad smell in mouth, which is produced from garlic, onion, cigarette, and alcohol. Therefore, they are increasingly requiring products for halitosis inhibition.

If natural ingredients for halitosis inhibition are extracted from apples and its product is produced in order to follow its increasing social concern on bad smell in mouth, the mechanism of apple extracts on deodorizing activity is successfully studied, the processing technologies for the maximum deodorizing activity are developed and apple farmers can expect to have stable and increasing income by making high prices from apples of low prices and low usage.

The objective of this study was to apply deodorizing materials to industrial application products with deodorizing activity by screening the effective fractions of halitosis inhibition from fruits and vegetables, by knowing the condition for its maximum effect, by developing its industrial manufacturing processing, and by developing the advanced technologies for the application of several food products.

III. Scope and Content of the Study

The objectives of this study were to develop the extraction methods and processing technology of apples for functional ingredient of halitosis inhibition in order to increase the processing ratio of apples, to develop the processing methods for the industrial application of their functional ingredients, and to

develop the basic processing technology for application to several food products with the functional ingredients.

To successfully obtain the objectives, the processing technologies for optimum ingredients of halitosis inhibition were evaluated after measuring the basic analytical data on several fruits and investigating their deodorizing activities. By the chosen processing technologies decided from the screening results, mass production methods on deodorizing materials were studied. Then, the systematic production methods for applied food products such as candy, jelly, mouth rinse, beverage were evaluated.

The detail research ranges for each sections of this study was shown in the below table.

Year	Objectives	Research contents and ranges
2003	<p>Section 1</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Screening of fruits and vegetables for halitosis inhibition ○ Processing for halitosis inhibition ○ Analysis of products on halitosis inhibition 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Screening and fundamental analysis of samples <ul style="list-style-type: none"> • Sample fruits : Apple/grape/tangerine/persimmon etc. - Kinds/parts on deodorization ▶ Investigation/elimination of pesticide residues <ul style="list-style-type: none"> • Elimination methods against contamination ▶ Preparation <ul style="list-style-type: none"> • Washing/drying conditions ▶ Extraction/fraction <ul style="list-style-type: none"> • Yield/activity on solvent/condition ▶ Filtration/concentration/drying <ul style="list-style-type: none"> • Yield/activity on method/condition ▶ Deodorizing activity <ul style="list-style-type: none"> • Measurement of deodorizing activity • Comparison of deodorizing activity by enzyme reaction ▶ Antimicrobial test

		<ul style="list-style-type: none"> • Measurement of antibiotics about bacteria of dental caries (<i>Streptococcus Mutans</i>) <p>▶ Interpretation of whole effects</p> <ul style="list-style-type: none"> • Discussion of optimum condition
	<p style="text-align: center;">Section 2</p> <p>○ Purification/characterization of polyphenol oxidase with deodorizing activity</p>	<p>▶ Optimization of extraction, fraction and enzymatic reaction</p> <ul style="list-style-type: none"> • Optimization of extraction and fraction • Optimization of enzyme activity
2004	<p style="text-align: center;">Section 1</p> <p>○ Research of mass production of ingredients for halitosis inhibition</p> <p>○ Processing of industrial application products</p>	<p>▶ Design of processing for mass production</p> <p>▶ Development and production of products</p> <p>▶ Economic analysis of products</p> <p>▶ Processing optimization on sample shapes/kinds</p> <ul style="list-style-type: none"> • Candy, beverage, jelly and mouth rinse <p>▶ Evaluation/improvement of products</p>
	<p style="text-align: center;">Section 2</p> <p>○ Reaction mechanism of polyphenol oxidase on enzyme activity and deodorizing activity</p>	<p>▶ Investigation of polyphenol oxidase on enzymatic reaction</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reaction mechanism of polyphenol oxidase on deodorizing activity

IV. Major Results and Recommendation

1. Screening of fruits and vegetables with deodorizing activity

Deodorizing activity for halitosis inhibition was investigated by measuring the reduced amount of a standard compound of methyl mercaptan for screening of materials of deodorizing activity from several fruits and vegetables such as apple, grape, pear, persimmon, tangerine, burdock, lettuce, pine leaf and mushroom. DA_{50} s which mean solid amounts required for the reduction of deodorizing activity upto 50% were appeared in the high activity order of grape, apple, persimmon and tangerine. Their DA_{50} values were 29.9mg, 47.6mg, 86.5mg, 106.6mg and >150.0mg. Vegetables were appeared in the high activity order of lettuce, burdock, mushroom and pine leaf showing DA_{50} s of 1.4mg, 4.6mg, 5.9mg, 7.2mg and >150.0mg, respectively. Vegetables generally showed higher deodorizing activities than fruits.

Also, amounts of total phenolic compounds were measured with the prediction of higher deodorizing activities against methyl mercaptan in higher amounts of polyphenolic compounds. The amounts of total phenolic compounds from fruits were showed in the order of grape, tangerine, apple, pear and persimmon. The amount of total phenolic compounds of lettuces was highest showing 12.0 mg/g and vegetables had more phenolic compounds than fruits. Polyphenol oxidase exists in plants and relate to the oxidation of polyphenol. So crude enzyme was extracted from fruits and vegetables and the enzymatic activity was investigated.

Polyphenol oxidase oxidizes polyphenolic compounds and that its oxidized compounds affect deodorizing activity against methyl mercaptan. Pear polyphenol oxidase was highest among fruits. Lettuce was highest in vegetables. By considering the amount of total phenolic compounds and enzyme and deodorizing activities, apple and grape for fruits and lettuce for vegetables were chosen in this study.

2. Characterization of deodorizing activity by conditions of deodorizing materials

After two parts of skin and fresh from apples, grapes were separated except lettuces, the deodorizing activities on the parts were measured. Skins of both samples showed the higher deodorizing activities than freshes of the samples.

Also, total phenol amounts of skins for both fruits were higher than those of freshes of the samples, which means that the phenol amount may be known to relate to halitosis inhibition. The extracts which were not separated by two parts of skins and freshes had high deodorizing activities, so the separating processing was not needed for industrial application. Also, skins which are by-products in manufacturing industries of apples and grapes can be effectively used. Water soluble, ethanol soluble, methanol soluble and supercritical fluid soluble were produced for measuring deodorizing activity and extraction yield. By the results of each extraction condition, water soluble of lettuce was highest for deodorizing activity and yield. There were not big differences between apples and grapes for both activities and yield. The yield was highest in water soluble. Therefore, it was thought that water soluble is the most suitable method for the production of materials for deodorization by considering deodorizing activity and economic view.

3. Effects of factors in processing for deodorizing activity

1) Temperature

In order to obtain the maximum deodorizing activity of ingredients for halitosis inhibition in a temperature range, deodorizing activities on temperature were measured by using water soluble fractions which showed higher deodorizing activity than other extraction fractions. The differences for deodorizing activities of apples, grapes and lettuces were small to 20°C. In the case of apples and

grapes except lettuces, the deodorizing activities were sharply decrease at the above 60°C. The optimum temperature for polyphenol oxidases of apples, grapes and lettuces were 20~25°C.

2) pH

Deodorizing activities of apples, grapes and lettuces on pH were measured at room temperature. The deodorizing activities of apples and grapes were highest at pH 3.5 and stable in a wide range of pH. The deodorizing activity of lettuces was highest at pH 5.0 and stable to pH 8.0. The pHs of water soluble apple, grape and lettuce were pH 4.7, pH 3.3 and pH 6.2, respectively. Because there were no big differences between pH of water soluble samples and pH of the highest deodorizing activities, it is expected that the processing with sample itself is effective without controlling the optimum pHs.

3) Processing method

Because ingredients for halitosis inhibition are mainly used as food or medicine, powder form is required for convenient use and storage safety. Such heat treatment as drying for powder formation may reduce the deodorizing activity, so the optimum processing condition for maximum halitosis inhibition is required to study. Drying methods of hot air-, freeze- and spray drying were evaluated to choose the best method for maximum deodorizing activity. Freeze-dried powders of apple and grape extracts showed almost the same activity as water soluble fraction, but freeze-dried powder of lettuce extract had a lot of decreased activity.

4. Mechanism of deodorizing activity of ingredients

1) Effects of metals and reducing agents on deodorizing activity

In order to know the factors which are related to the mechanism of deodorizing activity of the chosen apple, grape and lettuce, treatment effects of N₂, metals and reducing agents in water soluble fractions on deodorizing activity were

measured after the treatment of those materials for 30 min at 25°C. All samples of N₂ treatment showed less reduction of deodorizing activity. The result is expected that polyphenolic compounds of ingredients were less affected because some of them were existed in oxidized states. The deodorizing activities of all samples on Cu addition were largely increased, but Fe or Ca addition reduced the halitosis inhibition. The reason is thought that Cu activated polyphenol oxidase and produced oxidized phenolic compounds. In the case of Fe and Ca, the reduction was thought that the metals reacted with the oxidized phenolic compounds rather than activation of polyphenol oxidase. Treatment of reducing agents showed the reductions of deodorizing activity. The reason is thought that they inhibited the formation of oxidized phenolic compounds which were required for halitosis inhibition.

2) Effects of polyphenol oxidase and phenolic compounds on deodorizing activity

The deodorizing activities of phenol fractions from apples, grapes and lettuces were evaluated by using their polyphenol oxidases. In all samples, the mixture of phenol fraction and polyphenol oxidase showed higher deodorizing activity than only phenol fraction. The experimental mixture of polyphenol oxidase, Cu and phenol fraction showed higher activity than others. In the case of adding ascorbic acid, the deodorizing activity was a little decreased by inhibiting oxidation of metals, but the enzymatic activity was less affected. Chlorogenic acid which is one of the abundant polyphenolic compound was used for the model system as a substrate. Polyphenol oxidases of apples, grapes and lettuces, Cu and chlorogenic acid was reacted for measuring their deodorizing activities. In the model system of phenolic compounds, only chlorogenic acid showed low deodorizing activity, but the deodorizing activities for all samples were largely increased by adding polyphenol oxidase, Cu and chlorogenic acid.

3) Deodorizing mechanism of ingredients

Deodorizing mechanism of extracts from apples, grapes and lettuces is thought

that such oxidized polyphenolic compounds as oxidized quinone in the ingredients were produced by the reaction of polyphenol oxidase with the polyphenolic compounds of the samples, and they reacted with methyl mercaptan to produce nonvolatile compounds. Also, it is thought that the polyphenolic compounds inhibited the growth of bacteria of dental caries, so the formation of methyl mercaptan from the microorganism was inhibited.

5. Processing for industrial application products from the ingredients with deodorizing activity

1) Beverage processing

Deodorizing activities of beverages from apples, grapes and lettuces on pH changes were measured. The pHs of beverages was not controlled because the original pHs of extracts showed high activities. The deodorizing activities of beverages from water soluble, ethanol soluble or supercritical fluid fractions on the added amounts were measured. The deodorizing activities of beverages from apple and grape extracts (60 mg/mL) and lettuce extracts (5.0 mg/mL) were 31.2%, 79.8% and 84.1% for water soluble fractions, respectively; 70.2%, 75.0%, and 54.0% for ethanol soluble fractions, respectively. The deodorizing activities of beverages on 30% addition of supercritical fluid extracts from apples, grapes and lettuces were 75.8%, 77.3% and 77.1%, respectively.

2) Processing of mouth rinse

Deodorizing activities of mouth rinse from apples, grapes and lettuces on solid contents were measured. As the solid content was increased, the deodorizing activity was increased. The deodorizing activities of mouth rinse from water soluble of apples and grapes (60 mg/mL) and lettuce (5.0 mg/mL) were 60.0%, 56.2%, and 38.5%, respectively. The deodorizing activities of mouth rinses from ethanol soluble of apples and grapes (60 mg/mL) and lettuce (5.0 mg/mL) were 70.2%, 75.0% and 54.9%, respectively. The deodorizing activities of mouth rinses on 30% addition of supercritical fluid extracts from apples, grapes and lettuces

were 42.4%, 52.0% and 49.4%, respectively.

3) Jelly processing

Jelly was made by using deodorizing materials from apples, grapes and lettuces. As the solid content of the ingredients was increased, the deodorizing activity was increased. The deodorizing activities of jellies from water solubles of apples and grapes (60 mg/mL) and lettuce (5.0 mg/mL) were 30.4%, 19.2%, and 32.5%, respectively. The deodorizing activities of jellies from ethanol solubles of apples and grapes (60 mg/mL) and lettuces (5.0 mg/mL) were 36.3%, 35.7% and 20.9%, respectively. The deodorizing activities of jellies on 30% addition of supercritical fluid extracts from apples, grapes and lettuces were 47.4%, 44.4% and 33.6%, respectively.

4) Candy processing

Candy was made by using deodorizing materials from apples, grapes and lettuces. The deodorizing activities of candies from water solubles of apples and grapes (60 mg/mL) and lettuce (5.0 mg/mL) were 76.9%, 78.0%, and 68.8%, respectively. The deodorizing activities of candies from ethanol solubles of apples and grapes (60 mg/mL) and lettuces (5.0 mg/mL) were 63.6%, 76.4% and 45.6%, respectively. The deodorizing activities of candies on 30% addition of supercritical fluid extracts from apples, grapes and lettuces were 37.4%, 59.9% and 16.7%, respectively.

5) Evaluation of industrial products

In the results of processing conditions of several products, the deodorizing activity tend to increase with the added amount of deodorizing materials. Extraction yields of apples and grapes were high, showing more than 80%. It is expected to be able to commercialize these products. In the case of lettuces, the deodorizing activity was high, but bad smell of the vegetable itself reduced its flavor quality. Fruits had good flavor, high acceptance, and had high deodorizing activity, so the use of fruits is thought to be economically effective for

commercialization of ingredients for halitosis inhibition.

6. Extraction, purification and reaction mechanism of polyphenol oxidase for deodorizing activities

Polyphenol oxidases were purified from extracts of apples (*Malus pumila*), grapes (*Vitis vinifera*) and lettuces (*Lactuca sativa* L.) by ammonium sulfate fractionation followed by Sephacryl S-200 HR gel filtration chromatography and DEAE-Sephacel chromatography. Total activities of apple, grape and lettuce polyphenol oxidases were 12,000, 20,000 and 60,400 units and yields were 18.0%, 19.0% and 11.6%, and purification folds were 5.8, 7.0 and 7.4, respectively. Polyphenol oxidases of apples, grapes and lettuces were most activated at pH 7.0, 7.0 and 6.5, respectively, and their optimum temperatures of polyphenol oxidases were appeared at 25°C, 30°C and 25°C, respectively. Substrate specificities of polyphenol oxidases were high to polyphenolics, but activities of polyphenol oxidases were low to monophenolics. The activities of polyphenol oxidases were catalyzed by Ca^{2+} and inhibited by ascorbic acid. Molecular weights of apple, grape and lettuce polyphenol oxidases were measured 40 kDa, 36 kDa and 55 kDa, respectively.

CONTENTS

Summary.....	13
Chapter 1. Introduction of the study.....	37
I. Significance of the study.....	37
II. Scope and content of the study.....	40
Chapter 2. Current trends of related technologies.....	41
I. Current trends of development of apple ingredients for deodorization.....	41
II. Research areas of apple ingredients for deodorization.....	41
Chapter 3. Experimental methods and results.....	43
Section 1. Deodorizing mechanism of apple extracts for halitosis inhibition and development of industrial application technology.....	45
I. Screening of deodorizing activity of fruits and vegetables.....	47
1. Materials and methods.....	47
A. Measurement of deodorizing activity.....	47
B. Gas chromatography	47
C. Drying method of deodorizing materials.....	47
D. Measurement of contents of total phenolic compounds.....	47
E. Measurement of deodorizing activity of polyphenol oxidase.....	48
F. Analysis of phenolic compounds	48
G. Analysis of pesticide residues.....	48
2. Results and discussion.....	48
A. Screening of fruits on deodorizing activity	48
1) Ratio of halitosis inhibition.....	49
2) Content of total phenolic compounds	49
3) Deodorizing activity of polyphenol oxidase.....	50

4) Determination of fruits for deodorization.....	51
B. Screening of vegetables on deodorizing activity.....	52
1. Deodorizing ratio.....	52
2. Content of total phenolic compounds.....	52
3. Deodorizing activity of polyphenol oxidase.....	53
4. Determination of vegetables for deodorization.....	54
C. Analysis of pesticide residue in deodorizing materials.....	55
II. Evaluation of extraction methods for deodorizing materials.....	56
1. Materials and methods.....	56
A. Measurement of content of total phenolic compounds	56
B. Processing of methanol, ethanol and water solubles.....	56
C. Extraction condition with supercritical fluid	56
2. Results and discussion.....	57
A. Deodorizing activities of apple extracts on processing condition	57
1) Content of total phenolic compounds.....	57
2) Deodorizing activities and yields of parts.....	57
3) Deodorizing mechanism of deodorizing material on extraction condition.....	58
B. Deodorizing activities of grape extracts on processing condition	59
1) Content of total phenolic compounds.....	59
2) Deodorizing activities and yields of parts.....	59
3) Deodorizing mechanism of deodorizing material on extraction condition.....	60
C. Deodorizing activities of lettuce extracts on processing condition	61
1) Content of total phenolic compounds.....	61
2) Deodorizing activities and yields of parts.....	61
3) Deodorizing mechanism of deodorizing material on extraction	

condition.....	62
III. Studies on factors in processing of deodorizing materials.....	63
1. Materials and methods.....	63
A. Temperature.....	63
B. pH.....	63
C. Processing method.....	63
2. Results and discussion.....	63
A. Effect of related factors on deodorizing activity of apple extracts.....	63
1) Temperature.....	63
2) pH.....	65
3) Processing method.....	66
B. Deodorizing activity of grape extracts.....	67
1) Temperature.....	67
2) pH.....	69
3) Processing method.....	69
C. Deodorizing activity of lettuce extracts.....	70
1) Temperature.....	70
2) pH.....	71
3) Processing method.....	72
3. Optimum processing condition of deodorizing materials	73
IV. Deodorizing mechanism of deodorizing materials	74
1. Materials and methods	74
A. Mixing ratios of metals and reducing agents.....	74
B. Preparation of polyphenol oxidase and phenolic fractions.....	74
C. HPLC analysis.....	74
D. Antimicrobial test against bacteria of dental caries	75
2. Results and Discussion.....	75
A. Deodorizing mechanism of apple extracts.....	75
1) Effect of metals and reducing agents.....	75

2) Effect of polyphenol oxidase and phenolic compounds.....	76
3) Antimicrobial test against bacteria of dental caries.....	78
B. Deodorizing mechanism of grape extracts.....	79
1) Effect of metals and reducing agents.....	79
2) Effect of polyphenol oxidase and phenolic compounds.....	80
3) Antimicrobial test against bacteria on dental caries.....	83
C. Deodorizing mechanism of lettuce extracts.....	83
1) Effect of metals and reducing agents.....	83
2) Effect of polyphenol oxidase and phenolic compounds.....	85
3) Antimicrobial test against bacteria of dental caries.....	86
D. Polyphenol analysis of deodorizing materials.....	87
E. Deodorizing mechanism of deodorizing materials.....	88
V. Comparisons of deodorizing activities with commercial mouth rinse.....	89
VI. Mass production of deodorizing materials.....	90
1. Flow chart for mass production of deodorizing materials.....	90
2. Economical analysis of prototype deodorizing materials.....	91
A. Cultivating areas production amounts of ingredients.....	91
1) Apple.....	91
2) Grape.....	92
3) Lettuce.....	93
B. Economical analysis of deodorizing materials.....	94
VII. Processing of industrial application products from deodorizing materials.....	96
1. Materials and methods for processing of prototype deodorizing products.....	96
A. Beverage.....	96
B. Mouth rinse.....	98
C. Jelly.....	100

D. Candy.....	101
E. Measurement of deodorizing activity.....	103
2. Results and discussion.....	103
A. Deodorizing activity of prototype beverages.....	103
1) Effect of pH	103
2) Effect of added amount of water solubles.....	104
3) Effect of added amount of ethanol solubles.....	106
4) Effect of added amount of supercritical fluid extracts.....	107
B. Deodorizing activity of prototype mouth rinse.....	110
1) Effect of added amount of water solubles	110
2) Effect of added amount of ethanol solubles	112
3) Effect of added amount of supercritical fluid extracts.....	112
C. Deodorizing activity of prototype jelly.....	115
1) Effect of added amount of water solubles.....	115
2) Effect of added amount of ethanol solubles	116
3) Effect of added amount of supercritical fluid extracts.....	118
D. Deodorizing activity of prototype candy.....	120
1) Effect of added amount of water solubles.....	120
2) Effect of added amount of ethanol solubles.....	121
3) Effect of added amount of supercritical fluid extracts.....	123
3. Economical analysis of industrial application products.....	125
A. Beverage	125
B. Mouth rinse	126
C. Jelly	128
D. Candy	129
Section 2. Reaction mechanism of polyphenol oxidase	131
VIII. Purification of polyphenol oxidase	133
1. Materials and methods.....	133

A. Extraction of crude enzyme.....	133
B. Protein analysis.....	133
C. Fractionation with ammonium sulfate.....	133
D. Gel chromatography.....	133
E. Ion-exchange chromatography.....	134
F. SDS-PAGE	134
2. Results and discussion.....	134
A. Purification of polyphenol oxidase from apples.....	134
B. Purification of polyphenol oxidase from grapes.....	138
C. Purification of polyphenol oxidase from lettuces.....	142
IX. Reaction mechanism of polyphenol oxidase	147
1. Materials and methods	147
A. Enzymatic activity on temperature.....	147
B. Enzymatic activity on pH.....	147
C. Enzymatic activity on substrates.....	147
D. Enzymatic activity on reducing agents.....	147
E. Enzymatic activity on metals.....	147
2. Results and discussion.....	148
A. Effect of pH on enzymatic activity of polyphenol oxidase.....	148
1) Apple.....	148
2) Grape.....	149
3) Lettuce	150
B. Effect of temperature on enzymatic activity of polyphenol oxidase...151	
1) Apple.....	151
2) Grape.....	152
3) Lettuce	153
C. Substrate specificities of polyphenol oxidases of fruits and vegetables	154
D. Effect of metals and reducing agents on enzyme activity of polyphenol oxidase.....	154

1) Apple.....	154
2) Grape.....	156
3) Lettuce	157
Chapter 4. Degree of goal achievement and contribution to relative branches.....	159
Chapter 5. Application of research results.....	160
Chapter 6. References.....	161

목 차

요 약 문	3
제 1 장 연구개발 과제의 개요.....	37
제 1 절 연구의 필요성	37
제 2 절 연구의 내용 및 범위	40
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	41
제 1 절 국내·외 사과외 구취억제 소재 개발 현황.....	40
제 2 절 국내·외 사과외 구취억제 소재 개발 분야.....	40
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과.....	43
제 1 세부과제 : 사과외 구취억제 기능성 해석 및 산업적 이용기술 개발.....	45
제 1 절 원료 과채류의 구취억제 활성 검색.....	47
1. 실험방법 및 내용.....	47
가. 구취억제활성 측정.....	47
나. Gas chromatography (GC).....	47
다. 구취억제 소재의 건조방법.....	47
라. 총페놀함량의 측정.....	47
마. Polyphenol oxidase의 활성측정.....	48
바. Polyphenol 화합물의 분석.....	48
사. 잔류 농약의 분석.....	48
2. 결과 및 고찰.....	48
가. 원료 과채류의 구취억제 활성 검색.....	48
1) 구취억제율	49
2) 총페놀함량	49
3) Polyphenol oxidase의 활성.....	50

4) 구취억제 과일의 선정.....	51
나. 원료 야채류의 구취억제 활성 검색.....	52
1) 구취억제율	52
2) 총페놀함량	52
3) Polyphenol oxidase의 활성.....	53
4) 구취억제 원료 야채의 선정.....	54
다. 구취억제 소재의 잔류 농약 분석.....	55
제 2 절 구취억제 소재의 조건별 구취억제 특성.....	56
1. 실험방법 및 내용.....	56
가. 총페놀 함량의 측정.....	56
나. Water soluble, ethanol 및 methanol soluble의 제조.....	56
다. 초임계 유체 추출물의 제조.....	56
2. 결과 및 고찰.....	57
가. 사과와의 조건별 구취 억제 특성.....	57
1) Total polyphenol 함량.....	57
2) 부위별 구취억제 활성 및 추출물의 수율.....	57
3) 추출 조건별 구취억제 소재의 구취억제 특성.....	58
나. 포도의 조건별 구취 억제 특성.....	59
1) Total polyphenol 함량.....	59
2) 부위별 구취억제 활성 및 추출물의 수율.....	59
3) 추출 조건별 구취억제 소재의 구취억제 특성.....	60
다. 상추의 조건별 구취 억제 특성.....	61
1) Total polyphenol 함량.....	61
2) 부위별 구취억제 활성 및 수율.....	61
3) 추출 조건별 구취억제 소재의 구취억제 특성.....	62
제 3 절 구취억제 소재 제조시의 영향 인자의 특성 구명.....	63
1. 실험방법 및 내용.....	63
가. 온도.....	63
나. pH.....	63
다. 가공처리방법.....	63
2. 결과 및 고찰.....	63

가. 사과	의 영향인자의 특성 구명	63
1)	온도	63
2)	pH	65
3)	가공처리방법	66
나. 포도	의 영향인자의 특성 구명	67
1)	온도	67
2)	pH	69
3)	가공처리방법	69
다. 상추	의 영향인자의 특성 구명	70
1)	온도	70
2)	pH	71
3)	가공처리방법	72
3.	구취억제 소재의 최적 제조 조건	73
제 4 절	구취 억제 소재의 억제 기작 구명	74
1.	실험 방법 및 내용	74
가.	금속이온 및 환원제 혼합비	74
나.	효소 및 페놀획분 제조	74
다.	HPLC 분석조건	74
라.	충치균에 대한 항균성 test	75
2.	결과 및 고찰	75
가.	사과 구취억제 소재의 기작 구명	75
1)	금속 및 환원제의 영향	75
2)	효소 및 페놀의 영향	76
3)	충치균에 대한 항균성	78
나.	포도 구취억제 소재의 기작 구명	79
1)	금속 및 환원제의 영향	79
2)	효소 및 페놀의 영향	80
3)	충치균에 대한 항균성	83
다.	상추 구취억제 소재의 기작 구명	83
1)	금속 및 환원제의 영향	83
2)	효소 및 페놀의 영향	85

3) 총치균에 대한 항균성.....	86
라. 구취억제 소재별 polyphenol 분석.....	87
마. 구취억제 소재의 억제 기작.....	88
제 5 절 시판 구강청정제와의 억제활성 비교.....	89
제 6 절 구취억제 활성 소재의 대량 생산 기법 연구.....	90
1. 구취억제 활성 소재 대량 생산 공정도.....	90
2. 구취억제 활성 소재 시제품의 경제성 분석.....	91
가. 원료 소재의 수급 구조.....	91
1) 사과 재배 면적 및 수급 동향.....	91
2) 포도 재배 면적 및 수급 동향.....	92
3) 상추 재배 면적 및 수급 동향.....	93
나. 구취억제 소재의 경제성 분석.....	94
제 7 절 구취억제 소재를 이용한 산업적 응용제품의 제조.....	96
1. 실험 방법 및 내용.....	96
가. 시제품 음료의 제조.....	96
나. 시제품 구강세정액의 제조.....	98
다. 시제품 젤리의 제조.....	100
라. 시제품 캔디의 제조.....	101
마. 구취억제 활성의 측정.....	103
2. 결과 및 고찰.....	103
가. 시제품 음료의 구취억제 활성.....	103
1) pH 에 따른 구취억제 활성의 측정.....	103
2) Water soluble의 첨가량별 시제품 음료의 구취억제 활성.....	104
3) Ethanol soluble의 첨가량별 시제품 음료의 구취억제 활성.....	106
4) 초임계 추출물의 첨가량별 시제품 음료의 구취억제 활성.....	107
나. 시제품 구강세정액의 구취억제 활성.....	110
1) Water soluble의 첨가량별 시제품 구강세정액의 구취억제 활성.....	110
2) Ethanol soluble의 첨가량별 시제품 구강세정액의 구취억제 활성.....	112
3) 초임계 추출물 첨가량별 구강세정액의 구취억제 활성.....	112
다. 시제품 젤리의 구취억제 활성.....	115

1) Water soluble의 첨가량별 시제품 젤리의 구취억제 활성.....	115
2) Ethanol soluble의 첨가량별 시제품 젤리의 구취억제 활성.....	116
3) 초임계 추출물 첨가량별 시제품 젤리의 구취억제 활성.....	118
라. 시제품 캔디의 구취억제 활성.....	120
1) Water soluble의 첨가량별 시제품 캔디의 구취억제 활성.....	120
2) Ethanol soluble의 첨가량별 시제품 캔디의 구취억제 활성.....	121
3) 초임계 추출물 첨가량별 시제품 캔디의 구취억제 활성.....	123
3. 시제품의 경제성 분석.....	125
가. 구취억제 음료의 경제성 분석.....	125
나. 구취억제 구강세정액의 경제성 분석.....	126
다. 구취억제 젤리의 경제성 분석.....	128
라. 구취억제 캔디의 경제성 분석.....	129
제 2 세부과제 : 구취억제 관여 효소의 특성 해석.....	131
제 8 절 구취 억제 관여 효소의 정제.....	133
1. 실험방법 및 내용.....	133
가. 조효소액 추출.....	133
나. 단백질 정량.....	133
다. Ammonium sulfate에 의한 분획.....	133
라. Gel chromatography.....	133
마. Ion-exchange chromatography.....	134
바. 전기영동 (SDS-PAGE).....	134
2. 결과 및 고찰.....	134
가. 사과로부터 polyphenol oxidase의 정제.....	134
나. 포도로부터 polyphenol oxidase의 정제.....	138
다. 상추로부터 polyphenol oxidase의 정제.....	142
제 9 절 구취억제 관여 효소의 반응 특성 구명.....	147
1. 실험방법 및 내용.....	147
가. 온도에 대한 활성 측정.....	147
나. pH에 대한 활성 측정.....	147

다. 기질에 대한 활성 측정.....	147
라. 환원제에 대한 활성 측정.....	147
마. 금속에 대한 활성 측정.....	147
2. 결과 및 고찰.....	148
가. pH의 영향.....	148
1) pH에 의한 사과 polyphenol oxidase의 영향.....	148
2) pH에 의한 포도 polyphenol oxidase의 영향.....	149
3) pH에 의한 상추 polyphenol oxidase의 영향.....	150
나. 온도의 영향.....	151
1) 온도 변화에 의한 사과 polyphenol oxidase의 영향.....	151
2) 온도 변화에 의한 포도 polyphenol oxidase의 영향.....	152
3) 온도 변화에 의한 상추 polyphenol oxidase의 영향.....	153
다. 구취억제 관여 과채류 효소의 기질 특이성.....	154
라. 금속 및 저해제의 영향.....	154
1) 사과 polyphenol oxidase의 금속 및 저해제의 영향.....	154
2) 포도 polyphenol oxidase의 금속 및 저해제의 영향.....	156
3) 상추 polyphenol oxidase의 금속 및 저해제의 영향.....	157
제 4 장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도.....	159
제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획.....	160
제 6 장 참고문헌.....	161

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 필요성

1. 기술적 측면

국내의 과실가공품 및 과실을 이용한 소재 분야의 시장규모는 상당히 큰 규모를 차지하고 있지만 가격 경쟁력 때문에 국내산 과일을 이용하는 예는 극히 드물고 대부분 외국산 과일 등을 단순 가공하여 판매하고 있는 실정이다.

선진국의 경우 사과 가공율은 30-50% 수준이나 국내산 사과의 가공율은 약 15%에 불과한 실정으로 취약한 유효이용가공기술 극복 노력이 필요한 실정이다.

또한 사과의 재배과정에서 발생하는 미숙과에 대한 처리가 시급한데, 매년 재배과정에서 5월 말경부터 6월에 걸쳐 20-30%가 발생하고 있으며, 대부분 현장에서 폐기처분되거나 일부 식/약용으로 이용되고 있다. 그러나 이러한 미숙과는 성숙과에 비해 유기산류, 아미노산, 칼슘이온 등이 많이 존재하며 특히, 폴리페놀류는 10배 이상의 농도가 존재하고 있는 것으로 보고되고 있다.

현재 국내산 사과의 경우 생과용 위주로 판매되고 있으나 사과주스, 잼, 통조림, 식초 등으로 가공하여 판매되고 있으며, 이 중 사과주스로의 가공이 가장 많다. 이러한 가공식품을 통해 소비자의 기호를 충족시킬 수 있으며, 또한 국내산 과실의 가격 유지 및 농민의 소득증대에 기여할 수 있다.

또한 인체 안전성에 대한 최근의 소비자 요구도에 부응한 천연의 구취억제 기능성 소재 개발 기술 확보가 시급히 필요한데, 구취문제로 내원하는 환자의 약 90%는 구강내 원인에 의한 것으로 그 발생 원인은 주로 입안, 혀 및 몸 안에 존재하는 혐기성 그람음성 세균 등에 의해 단백질 등이 분해되어 발생하는 휘발성 황화합물(volatile sulfur-containing compounds)이며, 관련 세균의 제어 및 황화합물의 효율적 제거가 구취의 개선에 효과적이라 하겠다.

구취의 원인 물질은 methyl mercaptan이 대표적인데, 구취를 제거하기 위하여 시중에는 많은 구강위생 상품 등이 판매되고 있다. 일반적으로 사용되는 구취 제거용 제품의 주요 성분은 구강 내 항균 및 정균제, 향류, 당미제, 에틸알코올 및 증류수로 되어 있으며, 최근에는 인체의 안전성에 대한 사회의 관심이 점차 고조되어 인공합

성 제제 보다는 천연물 유래의 물질을 선호하며 이러한 물질의 이용이 점차 증가되고 있는 추세이다.

2. 경제·산업적 측면

수년전만 해도 과수부분은 고소득 작목으로 비교적 안정적인 생산기반을 유지해 왔으나 UR 농산물 협상 타결 및 한·칠레 FTA 협정의 타결 등으로 인해 국내 과수농가는 큰 타격을 받고 있다. 특히 신선사과는 1995년, 모든 과일 가공품은 1997년 7월 이후 시장이 완전 개방되어 값싼 외국산 과일과의 경쟁이 불가피 하게 되어 국내 과수가공 산업은 한단계 도약의 시기가 불가피 하게 되었다. 특히 생산비 상승 대비 수익성이 현저하게 감소되고 이로 인한 사과 재배 산업의 수익 구조 개선 노력이 필요한 실정이다. 1991년도에 전체 과수생산량 중 31%를 차지하던 것이 2001년도에는 16%로 감소하였으며, 또한 사과는 타 과수에 비해 연간 생산량 및 가격 변동폭이 약 2배에 달하므로 안정적인 수익의 기반 확보가 필요하다.

최근 국민소득의 증가와 함께 삶의 질에 대한 관심이 크게 증가하여 식품에서도 well-being 열풍과 함께 다양한 기능성 식품 및 기능성 소재에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있는데, 소비자의 청결의식 또한 크게 증가하여 구취제거 관련 제품의 시장 잠재력이 지대하므로 관련 소재 및 기술 개발 시 경제적 파급 효과가 클 것으로 생각된다.

이미 시중에 치약, 껌, 젤리, 캔디 및 구강세정액 등의 구강청결 및 구취억제와 관련한 다양한 제품이 최근 활발하게 개발되고 있으며, 특히 우리나라에서는 마늘, 양파, 담배 및 술 등에 기인한 구취제거 제품에 대한 소비자의 요구도가 급증하고 있다. 이러한 관련 핵심 소재 및 가공기술 개발시 산업·경제적 파급 효과가 지대하여 사과의 새로운 소비창출 및 가격 안정에 크게 기여할 것으로 기대되며 동시에 사과 재배 농가의 새로운 소득원 창출에도 기여할 것으로 예상된다.

3. 사회 문화적 측면

구취는 사회적 및 치과의학적으로 경시할 수 없는 문제로 대두되고 있는데, 주로 구강 및 인접기관 즉 비강, 상기도 및 소화기 상부로부터 유래되는 불유쾌하고 역겨운 악취로 정의되며, 성인 인구의 약 50% 이상에서 경험하는 것으로 알려져 있다.

청결의식의 고조와 더불어 구강질환 및 사회활동 증가로 인한 구취에 대한 개인의 스트레스가 급증하고 있으며, 한국인은 특히 일상생활에서 마늘, 김치, 양파, 겨자류 등의 자극취를 갖는 음식을 많이 섭취하고 있어 이로 인한 구취 억제 노력이 필요하며, 건강지향의 현대인의 성향에 부합하는 생리기능성 성분의 적극 개발 및 이용으로 사과 등 과일류 제품의 소비 촉진과 부가가치 제고 노력이 필요하다. 따라서 사과의 단순 기능성 해명 차원에서 벗어나, 유효성분의 적극적인 상품화 기술을 개발함으로써 재배업자 및 가공·생산업자 등의 측면에서도 부가가치의 향상이 기대된다.

제 2 절 연구의 내용 및 범위

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2003)	<p>제 1 세부과제</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 원료 과실류의 검색 ○ 구취억제 소재의 제조 ○ 구취억제 소재의 효과 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 대상 원료의 구득 및 기초 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 대상 과실류 : 사과/포도/감귤/감 등 - 종류/부위별 소취활성 조사 등 ▶ 잔류 농약 오염 여부 조사 및 제거 <ul style="list-style-type: none"> • 오염시 제거 방법 검토 ▶ 전처리 <ul style="list-style-type: none"> • 세정/건조/분말화 조건 구명 ▶ 추출/분획 <ul style="list-style-type: none"> • 용매별/조건별 수율 및 활성 등 조사 ▶ 여과/농축/건조 <ul style="list-style-type: none"> • 방법별/조건별 수율 및 활성 등 조사 ▶ 소취력 검증 <ul style="list-style-type: none"> • Methyl mercaptan (CH₃SH)에 대한 소취력 측정 • 반응 특성을 이용한 소취 효과 비교 분석 ▶ 향균력 검증 <ul style="list-style-type: none"> • 충치 원인균에 대한 향균력 측정 ▶ 종합적 효과 해석 <ul style="list-style-type: none"> • 활성 최적 발현 조건의 검토 구명
2차 년도 (2004)	<p>제 1 세부과제</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 소취활성 소재의 대량 생산 기법 연구 ○ 산업적 응용제품의 제조 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 대량 제조 공정 설계 ▶ 시제품의 개발 및 생산 ▶ 개발 시제품의 경제성 분석 ▶ 제품형태/유형별 제조 조건 구명 <ul style="list-style-type: none"> • 음료, 젤리 및 구강세정액 등 ▶ 개발 응용 시제품의 평가/개선

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 사과 구취억제 소재 개발 현황

사과의 구취억제 성분의 추출/정제 및 산업적 이용기술 개발이 국내외적으로 미진한 실정으로 고효성의 사과 유래 구취억제 소재는 상품화된 바가 없다.

이에 본 연구진은 이와 관련한 연구 경험을 바탕으로 사과 중의 구취억제 관여 효소 및 그 산화반응 생성물의 특성을 이용하여 활성이 강한 천연 구취억제 소재를 추출, 제조하는 기술을 개발하여 구강청결제의 핵심소재로써 개발함과 동시에 그 응용제품의 제조 기반을 확보하고자 한다.

제 2 절 국내·외 사과 구취억제 소재 개발 분야

1. 국내

사과에 대한 주 연구 분야는 클로로필/카로티노이드, 무기질, 유기산, 유기당, 및 펙틴질 등의 식이섬유 조성 및 이용 등의 식품영양학적 성분의 조성 분석 등이 대부분을 차지하고 있다. 사과에 대한 생리적 기능 연구는 최근에 들어 일부 수행되고 있으나 대부분이 활성 성분 함량이나 조성의 구명 등에 국한되어 있고 단순한 기능성 해명 수준으로 주로 사과의 저장 중 갈변 억제에 관한 연구, 페놀화합물 등의 조성에 관한 연구와 더불어 갈변물질의 항산화 및 항 돌연변이 작용 등에 관한 연구가 있다.

그러나 사과에 대한 체계적인 구취억제 기능성 해석과 유효 성분의 추출과 정제 그리고 상품화 기술 개발에 대한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구진은 최근 국내산 사과인 “홍로”에 대해 대표적 구취 원인 화합물인 methyl mercaptan에 대한 소취 활성을 확인하고 그 활성이 사과 중의 폴리페놀화합물의 산화 반응 특성과 깊이 관여한다는 것을 구명한 것이 유일하다.

2. 국외

사과의 품종별로 식품영양학적 및 생리기능성 측면에서 많은 연구가 수행되어 오고 있다. 특히 생리기능성에 대해서는 일본을 중심으로 활발한 연구가 진행되고 있는데, 이제까지 구명된 기능성은 항산화작용, 항고혈압작용, 발암초기 변이원성 억제작용, 치석형성 효소 저해 작용, 항 충치작용, 멜라닌 생성억제작용 및 소취작용 등이 있다.

사과에 대해서는 주로 페놀화합물과 관련한 생리기능성 연구 사례가 많으며, 산업적 이용기술 개발 단계에 이르고 있는 것으로 판단된다. 사과를 비롯한 각종 과실류 및 야채 중에 함유된 페놀화합물의 다양한 생리기능성 구명 및 적극적 이용 연구가 일본을 중심으로 활발히 진행되고 있으며, 사과에서 추출한 페놀화합물은 다양한 식품첨가물로서도 이용되고 있는 수준이다.

그러나 사과의 구취 억제 성분의 추출, 정제 및 산업적 이용기술 개발에 의한 사과 유래 구취억제 소재의 상품화 사례는 없는 실정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 세부과제

사과의 구취억제 기능성 해석 및 산업적 이용 기술 개발

제 2 세부과제

구취억제 관여 효소의 특성 해석

제 1 세부과제

사과의 구취억제 기능성 해석 및 산업적 이용 기술 개발

주관연구기관명 : 부경대학교

총괄연구책임자 : 김 선 봉

세부연구책임자 : 김 선 봉

연 구 원 : 서 정 은

연 구 원 : 우 진 욱

연 구 원 : 박 현 덕

참 여 기 업 명 : 백경식품(주)

연 구 원 : 김 진 홍

연 구 원 : 조 동 제

제 1 절 원료 과채류의 구취억제 활성 검색

1. 실험방법 및 내용

가. 구취억제활성 측정

구취억제활성 측정은 시료 일정량과 0.2M potassium phosphate buffer (PPB) 4 mL를 내용량 50 mL의 vial에 넣고 pH를 7.5로 조절한다. 여기에 methyl mercaptan 표준액 (1 µg/mL) 1 mL를 가하여 즉시 실리콘 캡으로 밀봉하여 vortex mixer로 5 초간 교반하고 37°C에서 6분간 incubate한 후 vial의 headspace에 유리된 methyl mercaptan을 FPD (flame photometric detector)가 장착된 GC에 gas tight syringe 200 µL를 주입하여 분석하며, 이 때 구취억제활성은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{구취억제활성 (\%)} = \frac{C-S}{C} \times 100$$

C : control의 methyl mercaptan 피크 면적

S : 시료 첨가시의 methyl mercaptan 피크면적

나. Gas chromatography (GC)

Methyl mercaptan의 분석을 위해 FPD (flame photometric detector)가 장착된 GC (Hewlett Packard 5890, series II)를 사용하였고, column은 HP-1 phase (5 m×0.53 mm×2.65 µm)였으며 column temperature는 35°C였고, injector temperature는 150°C였으며 detector temperature는 200°C였다. Carrier gas는 N₂를 1.45 mL/min의 유속으로 사용하였다.

다. 구취억제 소재의 건조방법

구취억제 소재의 건조방법으로 동결건조, 열풍건조 및 분무건조가 사용되었다. 동결건조는 -70°C에서 동결한 후, 35°C에서 5 microns Hg의 조건에서 3일간 실시되었다. 열풍건조는 60°C, 1.4 m/sec의 조건에서 24시간동안, 분무건조는 150°C, 0.7 m³/min 및 184 kPa의 조건에서 각각 실시되었다.

라. 총페놀함량의 측정

시료 0.5 mL, Folin-Denis 시약 2.5 mL 및 포화 Na₂CO₃ 5 mL을 가하여 50 mL

정용한 것을 18℃에서 30분간 방치하여 760 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

마. Polyphenol oxidase의 활성측정

제 2 세부과제에서 과일별로 분리한 polyphenol oxidase의 활성은 catechol을 기질로 하여 420 nm의 파장에서 흡광도의 증가를 이용하여 25℃에서 측정하였다. 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.5)의 완충액에 0.1 M catechol 기질액을 제조하여 기질용액으로 사용하였다. 기질용액 2.7 mL에 0.3 mL의 효소액을 첨가하여 총 부피 3 mL의 반응액을 만들어 420 nm파장에서 3분간 증가하는 흡광도의 양을 측정하여 polyphenol oxidase의 활성을 측정하였다. 효소활성의 1 unit은 25℃에서 1분간 증가한 흡광도 0.001의 증가량을 효소의 활성단위로 계산하였다.

바. Polyphenol 화합물의 분석

Polyphenol 화합물의 분석은 HPLC를 사용하였다. HPLC 분석기기에서 펌프 (water 510), 검출기 (waters 486, Tunable Absorbance Detector)와 controller (Waters Automated Gradient Controller)를 사용하였으며 software로는 Autochro-Win 2.0 Plus 영린 software를 사용하였다. Column은 XTerra™ RP18 5 μm (3.9×150 mm), 이동상은 A (5% formic acid)와 B (methanol)를 1.0 mL/min 유속으로 분석하였다. 280 nm에서 시료 주입량은 5 μL이었으며 B 용매를 1분에서 5분까지 5%에서 15%로, 12분에 45%, 18분에 80%까지 단계적 상승기울기법으로 용출시켜 분석하였다.

사. 잔류 농약의 분석

시료 30 g에 70% 아세톤 100 mL를 넣고 10분간 교반한 후, 여과하고 여액에 100 mL 석유에테르와 100 mL dichloromethane을 넣고 10분간 교반하였다. 상층액에 포화 식염수 100 mL를 넣고 5분간 교반하였다. 상층액에 무수 sodium sulfate로 탈수하고 아세톤으로 5 mL 정용하여 ECD 및 NPD를 이용하여 GC (HP 6890)로 분석하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 원료 과실류의 구취억제 활성 검색

구취억제 소재를 선정하기 위하여 과일류를 대상으로 하여 methyl mercaptan을 구취 표준물질로 하여 구취억제율을 검색하였고, 아울러 구취억제 관여 인자로 예상되는 총페놀함량 및 polyphenol oxidase의 활성을 측정하였다.

Table 1. Deodorizing activity of fruits against methyl mercaptan

Fruits	DA ₅₀ (mg)
Apple Fuji, <i>Malus pumila</i> <i>Vitis vinifera</i>	47.6
Grape Campbell, <i>Vitis vinifera</i>	29.9
Pear, <i>Pyrus pyrifolia</i> var. <i>culta</i> NAKAI.	86.5
Persimmon, <i>Diospyros kaki</i>	106.6
Tangerine, <i>Citrus unshiu</i>	》 150

DA₅₀ is the amount that inhibit half (50%) of methyl mercaptan.

1) 구취억제율

과일류를 균질화시킨 후, methyl mercaptan에 대한 구취억제활성을 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 구취는 주로 음식물 잔사나 침출액 등이 분해되어 발생된 methyl mercaptan, hydrogen sulfide, dimethyl sulfide 등의 휘발성 황화합물이 구취 성분으로 작용한다. 이 중에서 특히 methyl mercapthan이 구취의 주요성분으로 알려지고 있다. 따라서 본 연구에서는 구취와 비례적인 상관관계를 가지는 methyl mercaptan을 이용하여 구취억제율을 알아보았다. 구취억제율은 methyl mercaptan을 50% 억제시키는데 필요한 양(DA₅₀)으로 표현하였다.

실험의 결과, 과일 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 구취억제활성이 증가하는 경향을 나타내었다. 과일의 경우는 포도, 사과, 배, 감, 귤의 순으로 구취억제 활성이 높게 나타났다.

2) 총페놀함량

Polyphenol의 함량이 methyl mercaptan에 대한 구취억제효과에 영향을 미칠 것으

로 예상되어 총페놀함량을 측정하였다. 과일 중의 총페놀함량은 포도가 16.29 mg/g으로 가장 높았고 귤, 사과, 배, 감의 순으로 나타났다 (Fig. 1).

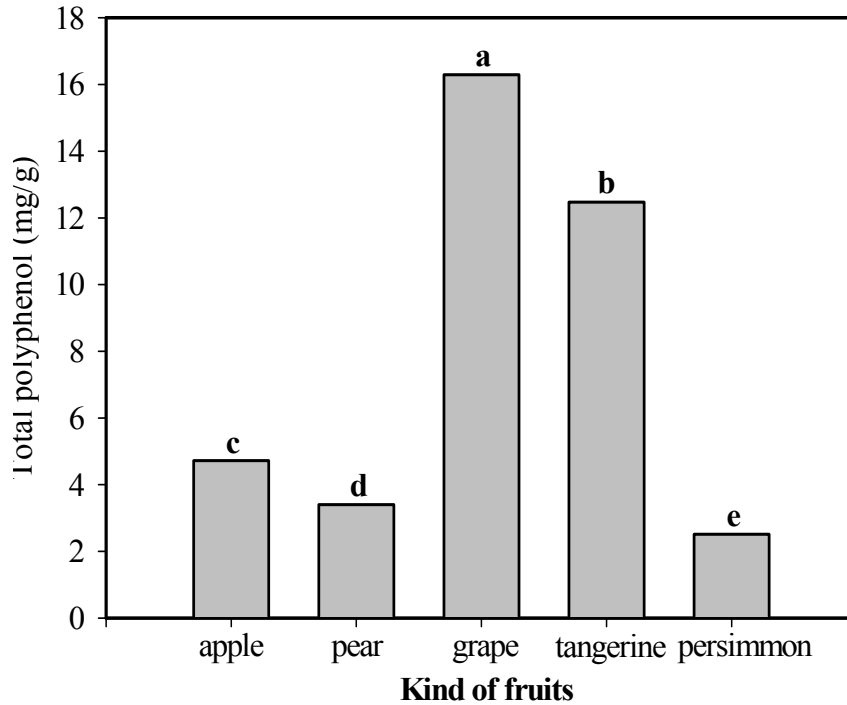


Fig. 1. Contents of total polyphenolic compounds in fruits. Different letters indicate significant differences at $p=0.05$.

3) Polyphenol oxidase의 활성

Polyphenol oxidase는 식물에 보편적으로 폭넓게 분포되어 있으며 polyphenol의 산화에 관여하므로 과일류에서 조효소액을 추출하여 polyphenol oxidase의 활성을 조사한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Polyphenol oxidase가 polyphenol를 산화시키면 methyl mercaptan에 대한 구취억제활성에 영향을 미칠 것으로 예상된다. 과일의 경우 polyphenol oxidase 활성은 배에서 가장 높았고 사과, 포도, 감, 귤의 순으로 나타났다.

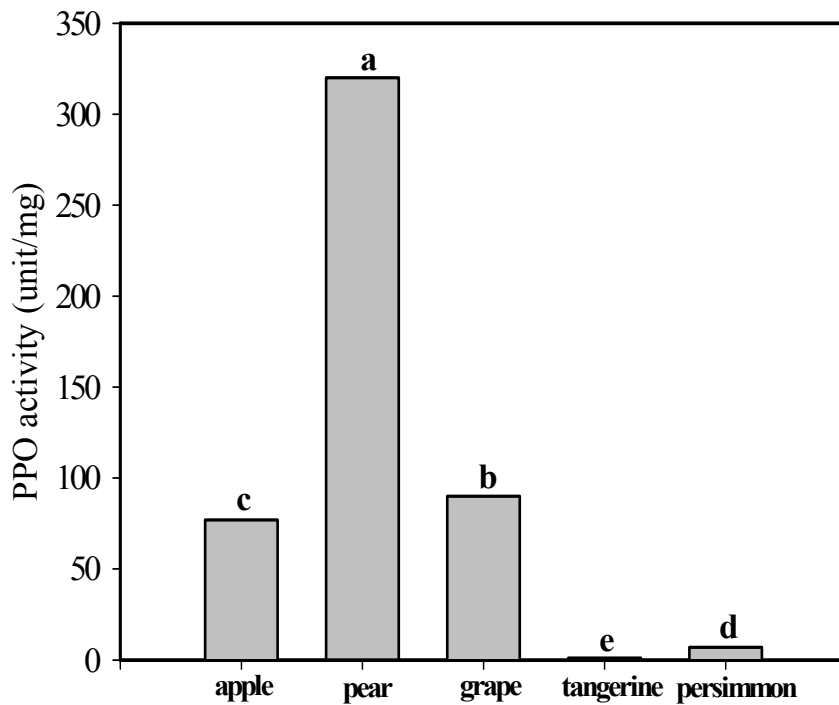


Fig. 2. Enzyme activity of polyphenol oxidase (PPO) partially purified from several fruits. Different letters (a, b, a', b'...) indicate significant differences at $p=0.05$.

4) 구취억제 원료 과일의 선정

과일류에서 구취억제 원료를 선정하고자 구취억제율, 총페놀함량 및 polyphenol oxidase의 활성을 검토하였다. 총페놀함량의 경우 포도와 귤이 가장 높게 나타났는데 귤은 polyphenol oxidase의 활성이 거의 없는 것으로 나타났으며 구취억제활성 또한 가장 낮았다. 이는 페놀의 함량이 많아도 이를 산화시킬 수 있는 효소 등의 산화인자가 없을 경우 구취억제율이 떨어지는 것을 의미한다. 따라서 구취억제활성은 총페놀함량과 polyphenol oxidase의 활성 및 시료내의 산화·환원 인자 사이의 상관관계에 의해 차이가 나타난다고 판단된다.

과일은 향이 좋아 기호성이 높고 실제적인 구취억제효과가 있으므로 구취억제 소

제를 개발하면 기호성과 구취억제 효능이 뛰어난 상품의 개발이 기대된다. 따라서 본 연구과제에서는 과일 중에서는 구취억제율이 높은 사과와 포도를 구취억제 원료 과일로 선정하여 연구를 수행하였다.

나. 원료 야채류의 구취억제 활성 검색

야채류 중 구취억제 소재를 선정하기 위하여 일반적으로 많이 소비되고 있는 원료 야채를 선정하여 methyl mercaptan에 대한 구취억제율을 검색하였고, 총페놀함량 및 polyphenol oxidase의 활성을 측정하였다.

1) 구취억제율

야채류를 균질기를 이용하여 잘게 균질화시킨 후 methyl mercaptan에 대한 구취억제율을 측정한 결과를 Table 2에 나타내었다. 구취억제율은 methyl mercaptan을 50% 억제시키는데 필요한 양을 DA₅₀으로 표현하였다. 실험결과로는 상추, 깻잎, 우엉, 양송이의 순으로 구취억제율이 높게 나타났으며, 솔잎은 구취억제율을 거의 나타내지 않았다. 야채는 과일보다 구취억제 활성이 높은 경향을 보였다.

Table 2. Deodorizing activities of vegetables against methyl mercaptan

Vegetables	DA ₅₀ (mg)
Burdock, <i>Arctium lappa</i> LINNAEUS.	5.9
Lettuce, <i>Lactuca sativa</i> LINNAEUS.	1.4
Mushroom, <i>Agaricus bisporus</i>	7.2
Perilla leaf, <i>Perilla frutescens</i> var. <i>japonica</i> HARA.	4.6
Pine needles, <i>Agaricus bisporus</i> Pine needle	》 150

DA₅₀ is the amount that inhibit half (50%) of methyl mercaptan.

2) 총페놀함량

야채류의 총페놀함량은 상추가 12.0 mg/g으로 가장 높았으며, 참깨, 솔잎, 우엉, 버섯의 순으로 페놀함량이 높게 나타났다. 전반적으로 야채는 과일류와 비교하여 폴리페놀 함량이 높은 경향을 보였다.

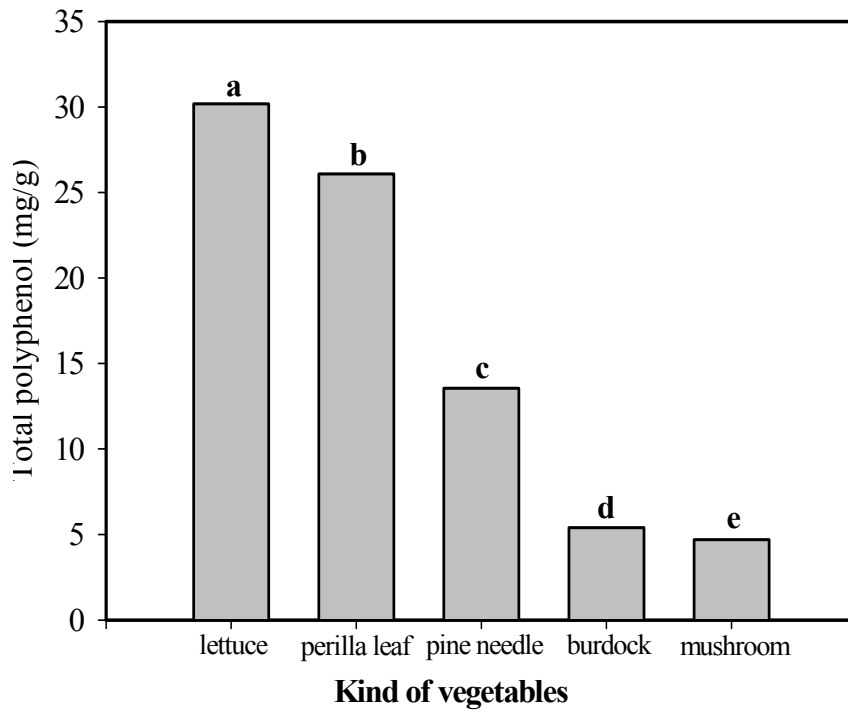


Fig. 3. Contents of total polyphenolic compounds in several vegetables.

Different letters indicate significant differences at $p=0.05$.

3) Polyphenol oxidase의 활성

과일류의 경우처럼 야채류 역시 polyphenol oxidase가 많이 함유되어 있으며 polyphenol의 산화에 관여하므로 야채류에서 조효소액을 추출하여 polyphenol oxidase의 활성을 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 실험결과, 상추, 참깨, 우엉, 버섯, 솔잎의 순으로 polyphenol oxidase의 활성이 높게 나타났다.

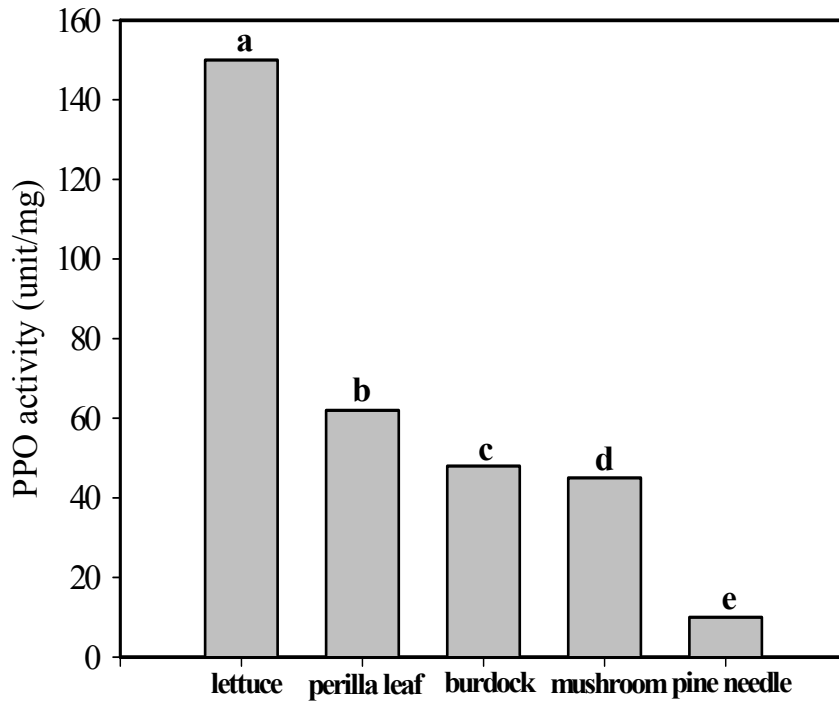


Fig. 4. Enzyme activities of polyphenol oxidase (PPO) partially purified from several vegetables. Different letters (a, b, ...) indicate significant differences at $p=0.05$.

4) 구취억제 원료 야채의 선정

야채류에서의 구취억제 원료를 선정하고자 구취억제율, 총페놀함량 및 polyphenol oxidase의 활성을 검토하였다. 실험결과 상추가 총페놀함량이 가장 많고 효소 활성이 높으며 또한 구취억제 활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 구취억제 활성은 야채의 경우도 총페놀함량과 polyphenol oxidase의 활성 및 시료 내의 산화·환원 인자 사이의 상관관계에 의해 차이가 나타난다고 판단된다. 야채류는 과일에 비해 구취억제 활성이 높은 경향을 보이고 있었으나 야채가 가지는 특이한 불쾌취로 인해 기호성이 떨어져 구취억제 원료로서의 이용에 제약이 따를 것으로 보여 졌다. 반면에 과일은 향이 좋아 기호성이 높고 실제적인 구취억제 효과가 있으므로 구취억제 효과가 뛰어

난 상추와 병용하여 구취억제 소재를 개발하면 기호성과 구취억제 효능이 뛰어난 상품의 개발이 기대된다. 따라서 본 연구과제에서는 야채의 경우 상추를 구취억제 원료로 선정하여 연구를 수행하였다.

다. 구취억제 소재의 잔류 농약 분석

잔류농약에 관한 연구보고서들을 참고로 시험항목 8가지를 선정하여 Table 3에 결과를 나타내었다. 사과, 포도, 상추 추출물의의 착즙물의 시험결과 잔류농약은 어느 것에도 나타나지 않았으며 이는 시료가 구매 전에 세척되었거나 살포된 농약이 자연광이나 체내 효소 및 토양미생물에 의한 분해, 강우 및 증발 등을 통해 대부분 소실된 결과로 생각된다.

Table 3. Organophosphorin pesticide residues in apples, grapes and lettuces

Pesticides	Sample		
	Apple	Grape	Lettuce
Fenitrothion	ND	ND	ND
Chlorpyrifos	ND	ND	ND
DDVP	ND	ND	ND
Captan	ND	ND	ND
Isofenphos	ND	ND	ND
Chlorbenzilate	ND	ND	ND
α -Endosulfan	ND	ND	ND
Chinomethionate	ND	ND	ND

ND means not detected.

제 2 절 구취억제 소재의 조건별 구취억제 특성

1. 실험방법 및 내용

가. 총페놀함량의 측정

시료 용액 0.5 mL, Folin-Denis 시약 2.5 mL 및 포화 Na_2CO_3 5 mL을 가하여 50 mL 정용한 것을 18°C에서 30분간 방치하여 760 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

나. Water soluble, ethanol soluble 및 methanol soluble의 제조

Water soluble은 사과, 포도 및 상추를 각각 균질기로 잘게 마쇄하여 거즈를 이용해 착즙하고, 잔사에 3배량의 물을 가해 추출하여 제조하였다. Ethanol soluble과 methanol soluble은 water soluble에 4배량의 에탄올 및 메탄올을 최종농도가 80%가 되게 하여 4°C에서 2시간 동안 방치한 후 동일온도의 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 다시 상층액을 여과하여 60°C에서 감압 농축하여 제조하였다.

다. 초임계 유체 추출물의 제조

동결건조된 사과 200 g, 포도 100 g 그리고 상추 50 g을 추출조에 넣어 초임계추출하였다. 추출조는 1000 mL의 용량으로 100 bar의 압력, 100°C의 온도 범위를 유지할 수 있도록 고압용 stainless steel (316ss)을 사용하였고 이산화탄소가 흐르는 전 구간은 1/4" 와 1/8"의 stainless steel (316ss)을 사용하였다. 추출조의 압력은 초임계 이산화탄소가 추출조를 통하여 나오는 추출조 상단은 analogue pressure gauge (Heise co. model No. CM-123958, WIKA co. model No. DM-16007)을 이용하여 측정하였다. 추출탑내의 미세한 압력은 2개의 metering value에 의해 조절되었다. 초임계 이산화탄소를 이용한 추출공정에서 추출물과 기화된 이산화탄소를 분리하기 위한 분리조를 이용하여 추출물을 전량 회수 하였으며 온도는 45°C, 50 bar의 압력을 유지시켰다.

2. 결과 및 고찰

가. 사과의 조건별 구취 억제 특성

사과의 구취억제 특성을 해석하기 위해서 사과의 부위별 및 추출조건별로 구취억제 활성을 측정하였다.

1) Total polyphenol 함량

사과를 과피와 과육으로 나누어 균질화 시켜 각각의 total polyphenol 함량을 측정한 결과를 Table 4에 나타내었다. 사과의 과피에서 과육보다 페놀 함량이 높게 나타나는 것을 알 수 있었다.

Table 4. Contents of total polyphenolic compounds according to the parts of apples

Sample	Pericarp	Flesh	Total
Amount of total polyphenolic compounds (mg/100g, dry basis)	118	98	219

2) 부위별 구취억제 활성 및 추출물의 수율

사과의 부위별 구취억제 활성을 측정하여 Table 5에 나타내었다. 사과를 과피와 과육으로 나누어 각각의 구취억제 활성을 측정하였으며, 사과를 추출물을 제조하고 남은 잔사인 섬유질에 대한 구취억제 활성도 측정해 보았다. 실험결과로 사과의 전체 추출물의 구취억제 활성이 가장 높게 나타났으며, 수율 역시 가장 높았다. 따라서 산업적으로 이용되기 위해서는 추출물이 가장 유용함을 본 실험을 통하여 알 수 있었다.

Table 5. Deodorizing activities against methyl mercaptan and yields of extracts according to parts of apples

Samples	Deodorizing activity (%) [*]	Yield (%)
Pericarp	54.6±2.0	15.5±1.8
Flesh	48.5±1.2	83.6±2.4
Fiber	32.3±2.6	16.8±2.8
Water soluble	65.4±1.5	83.5±1.2

*Sixty milligrams of solid contents of samples were used.

3) 추출 조건별 구취억제 소재의 구취억제 특성

추출 조건별 구취억제 활성 및 수율을 측정하기 위해 water soluble, ethanol soluble, methanol soluble 및 초임계유체 추출물을 제조하여 Table 6에 나타내었다.

Table 6. Deodorizing activities against methyl mercaptan and yields of apple extracts as affected by extraction conditions

Treatment condition	Deodorizing activity (%)	Yield (%)
Water solubles	65.4±1.5	83.5±1.2
Ethanol solubles	61.2±1.7	57.7±4.1
Methanol solubles	70.1±2.7	60.4±3.9
Supercritical fluid extracts	60.4±2.4	0.2±0.0

*Sixty milligrams of solid content of apple extracts were used.

제조된 각각의 조건별 구취억제 활성 및 수율을 측정된 결과, 구취억제 활성은 4가지 조건 모두 구취억제 활성의 차이가 크지 않았으나, 수율은 water soluble이 가장 높게 나타났다. 따라서 구취억제 소재 제조를 위한 산업적인 측면에서 구취억제 활성이 높고 수율 역시 높게 나타난, water soluble이 가장 적당한 것으로 판단된다.

나. 포도의 조건별 구취억제 특성

1) Total polyphenol 함량

포도 (Campbell)를 과피와 과육으로 나누어 균질화시켜 각각의 total polyphenol 함량을 측정된 결과를 Table 7에 나타내었다. 실험결과, 과피가 과육보다 높은 페놀 함량을 보였으며, 전체적인 함량은 사과보다 total polyphenol 함량이 높게 나타났다.

Table 7. Total polyphenol contents according to the part of grape

Sample	Pericarp	Flesh	Total
Total polyphenol (mg/100g, dry basis)	332	214	548

2) 부위별 구취억제 활성 및 추출물의 수율

Table 8은 포도의 부위별 구취억제 활성을 측정된 것이다. 포도를 과피와 과육으로 나누어 각각의 구취억제 활성을 측정하였으며, 포도의 과피와 과육 전체를 거즈로 착즙한 후 남은 섬유질에 대한 구취억제 활성도 측정해 보았다. 실험결과, 사과 추출물의 구취억제 활성이 가장 높게 나타났으며, 수율 역시 가장 높았다. 따라서 산업적으로 이용되기 위해서는 추출물이 가장 유용함을 본 실험을 통하여 알 수 있었다. 또한 포도의 가공 공장에서 부산물로 생산되는 과피도 구취억제 소재로 효율적인 이용이 가능하리라 판단된다.

Table 8. Deodorizing activities against methyl mercaptan and yields of extracts according to a part of grape

Samples	Deodorizing activity (%)	Yield (%)
Pericarp	80.2±2.4	24.6±4.5
Flesh	47.1±2.4	63.2±5.1
Fiber	35.3±2.4	17.9±2.6
Water solubles	73.7±1.9	81.7±4.5

*Sixty milligrams of samples were used

3) 추출 조건별 구취억제 소재의 구취억제 특성

포도의 추출 조건별 구취억제 활성 및 수율을 측정하기 위해 water soluble, ethanol soluble, methanol soluble 및 초임계추출물을 제조하여 Table 9에 나타내었다.

Table 9. Deodorizing activities against methyl mercaptan and yields of grape extracts as affected by extraction conditions

Treatment condition	Deodorizing activity (%)	Yield (%)
Water solubles	73.7±1.9	81.7±4.5
Ethanol solubles	68.6±1.0	39.1±2.4
Methanol solubles	77.8±1.9	48.1±3.1
Supercritical fluid extracts	55.9±1.0	0.8±0.0

*Sixty milligrams of solid content apple extracts were used

제조된 각각의 조건별 구취억제 활성 및 수율을 측정한 결과, 구취억제 활성은 4 가지 조건 모두 구취억제 활성의 차이가 크지 않았으나, 수율은 사과와 마찬가지로 water soluble이 가장 높게 나타났다.

따라서, 구취억제 활성과 수율의 결과에서, water soluble이 산업적으로 이용 가능한 구취억제 소재로 가장 적당한 것으로 판단된다.

다. 상추의 조건별 구취억제 특성

1) Total polyphenol 함량

상추는 시료의 특성상 과피와 과육으로 나누어져 있지 않기 때문에 부위별로 나누지 않고 total polyphenol 함량을 측정한 결과, 1,200 mg/100 g으로 사과나 포도보다 높았다.

2) 부위별 구취억제 활성 및 수율

Table 10은 상추의 부위별 구취억제 활성을 측정한 것이다. 상추는 시료의 특성상, 과피와 과육으로 나누어져 있지 않기 때문에, 상추 전체를 거즈로 착즙하여 나온 extract와 착즙 후 남은 fiber의 구취억제 활성 및 수율을 측정하였다.

실험결과에서 사과와 포도 추출물과 마찬가지로 water soluble에서 높은 구취억제 활성을 보였으며, 수율은 fiber가 높게 나타났다.

Table 10. Deodorizing activities against methyl mercaptan and yields of according to a part of lettuce

Condition	Deodorizing activity (%)	Yield (%)
Fiber	39.0±2.8	73.7±3.1
Water solubles	74.2±1.7	26.0±3.8

Two milligrams of samples were used.

3) 추출 조건별 구취억제 소재의 구취억제 특성

상추의 추출 조건별 구취억제 활성 및 수율을 측정하기 위해 water soluble, ethanol soluble, methanol soluble 및 초임계추출물을 제조하여 Table 11에 나타내었다. 제조된 각각의 조건별 구취억제 활성 및 수율을 측정한 결과에서 구취억제 활성은 water soluble이 가장 높게 나타났으며, ethanol 및 methanol solubles는 낮은 구취억제 활성을 보였으며, 수율의 경우도 과일과 비교하였을 때 낮은 경향을 보였다. 구취억제 활성이 낮게 나타나는 것은 유기용매를 이용하여 감압 농축하는 과정에서의 phenol 및 polyphenol oxidase의 특이적인 산화에 의한 현상이라고 생각되어진다. 상추의 경우도 과일류와 마찬가지로 water soluble이 구취억제 소재로 가장 적당한 것으로 판단된다.

Table 11. Deodorizing activities against methyl mercaptan and yields of lettuce extracts as affected by extraction conditions

Treatment condition	Deodorizing activity (%)	Yield (%)
Water solubles	74.2±1.7	26.0±3.8
Ethanol solubles	34.0±0.8	15.2±1.8
Methanol solubles	47.5±3.1	16.2±2.1
Supercritical fluid extracts	53.6±1.4	0.4±0.0

Two milligrams of samples were used.

제 3 절 구취억제 소재 제조시의 영향 인자의 특성 구명

1. 실험방법 및 내용

가. 온도

사과, 포도, 상추 시료를 거즈로 착즙하여 water soluble을 조제 한 후 각각의 시료에 대한 고형분 함량을 계산하였으며, 시료의 온도 대에서 6분간 방치한 후 각각의 시료에 대한 구취억제 활성을 측정하였다.

나. pH

pH별 시료의 구취억제 활성을 측정하기 위하여 6 N HCl, 0.5 N NaOH를 제조하여 각각의 시료에 제조한 시약을 마이크로 피펫을 이용하여 미량 첨가하여 각각의 pH를 조절하여 구취억제 활성을 측정하였다.

다. 가공처리방법

동결건조는 -70°C 에서 동결한 후 35°C 에서 5 microns Hg의 조건에서 3일간 실시되었다. 열풍건조는 60°C , 1.4 m/sec의 조건에서 24시간동안, 분무건조는 150°C , $0.7\text{ m}^3/\text{min}$ 및 184 kPa의 조건에서 각각 실시되었다.

2. 결과 및 고찰

식품을 제조 및 가공하는데 있어서 온도와 pH는 매우 중요한 영향을 끼친다. 구취억제 소재를 제조할 때 일정한 온도 범위 내에서 최대한의 효과를 얻기 위하여 구취억제 활성이 높은 water soluble을 이용하여 각 온도, pH 별로 나타나는 구취억제 활성을 측정하였다.

가. 사과의 영향인자의 특성 구명

1) 온도

사과의 water soluble을 이용하여 온도별 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과, 온도가 높아질수록 구취억제 활성은 점차 감소하는 경향을 보였으며, 20℃까지는 구취억제 활성의 차이가 적었으나 60℃ 이상에서는 구취억제 활성이 급격하게 감소하였다. 사과의 polyphenol oxidase 활성의 최적 온도는 20-25℃로 나타나고 있는데 이와 어느 정도 일치하는 결과를 나타내고 있으며, polyphenol oxidase의 최적 온도와 같은 20℃ 이하의 온도에서 구취억제 활성도 높게 나타났다.

따라서, 사과의 경우 구취억제 소재를 제조할 때 구취억제 효과를 높이기 위해서는 20℃ 이하에서 처리하여 polyphenol oxidase의 활성 변화를 줄여야 할 것으로 판단된다.

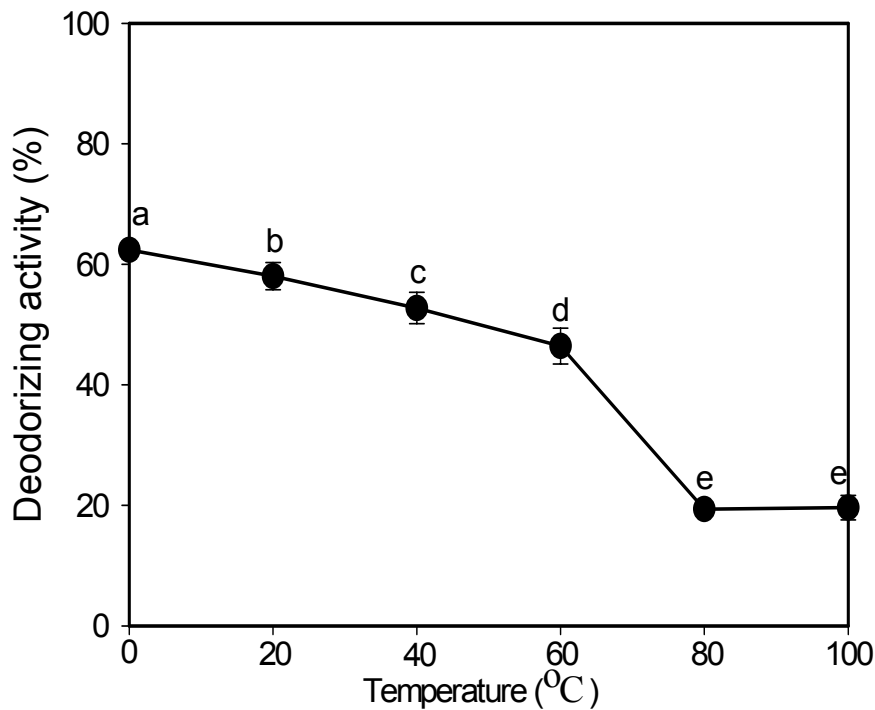


Fig. 5. Effect of temperature on deodorizing activity against methyl mercaptan of apple water solubles. Different letters indicate significant differences at $p=0.05$. Sixty milligrams of apple water solubles were used.

2) pH

사과를 상온에서 pH별로 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 6 나타내었다. pH 실험의 결과 사과는 pH 3.5에서 구취억제 활성이 가장 높았으나, 폭넓은 pH의 범위에서도 활성을 유지하였다.

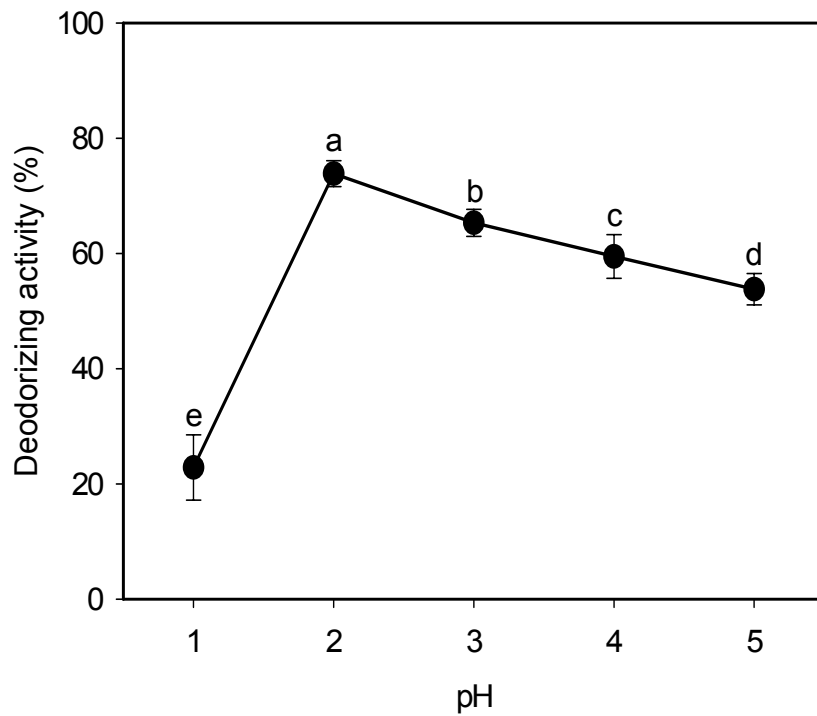


Fig. 6. Effect of pH on deodorizing activity against methyl mercaptan of apple water solubles. Different letters indicate significant differences at $p=0.05$. Sixty milligrams of apple water solubles were used.

실제로 사과의 water soluble을 만들어 pH를 측정해 보면 사과는 pH 4.7로 나타남으로, 사과의 water soluble 자체가 가지고 있는 pH에서 나타나는 구취억제 활성과 큰 차이가 없기 때문에 사과의 구취억제 소재 제조 시 pH의 조작보다는 시료 자체에서의 pH에서 소재를 제조하는 것이 유용하다고 판단된다.

3) 가공처리 방법

구취억제 소재의 경우 식품 등에 첨가되기 때문에 저장 및 사용편이성을 위해 분말화 및 열처리가 필요하므로 건조방법 및 가열처리에 따른 구취억제활성을 Fig. 7에 나타내었다.

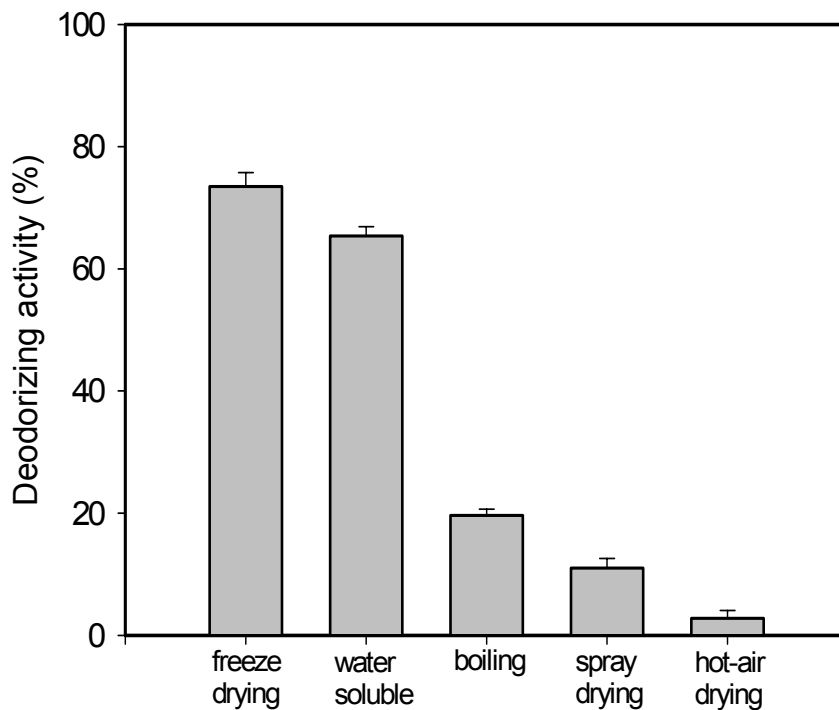


Fig. 7. Deodorizing activity against methyl mercaptan of apple water solubles by different processing methods. Sixty milligrams of apple water solubles were used.

건조방법으로는 열풍건조, 동결건조, 분무건조의 방법을 이용하여 시료를 제조하여 구취억제 활성을 측정하였다. 실험결과에서 사과와 배의 경우는 동결건조 소재의 구취억제 활성이 가장 높게 나타났으며, water soluble과 비교하였을 때 가장 비슷하게 나타났다. 나머지 가공조건인 boiling, spray drying 및 hot-air drying의 경우 모두 구취억제 활성이 낮게 나타났다. 실험결과와 같이 가공처리시 열처리하면 구취억제 활성이 감소하므로 구취억제 활성을 최소화 할 수 있는 제조방법은 동결건조로 나타났다.

나. 포도의 영향 인자의 특성 구명

1) 온도

포도의 water soluble을 이용하여 온도별 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 8에 나타내었다.

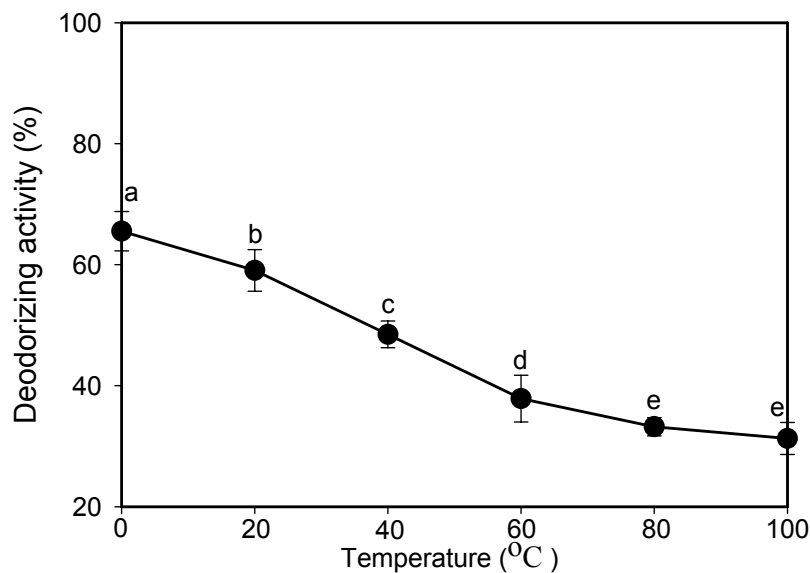


Fig. 8. Effect of temperature on deodorizing activity against methyl mercaptan of grape water solubles. Different letters indicate significant differences at $p=0.05$. Sixty milligrams of grape water solubles were used.

그 결과, 온도가 높을수록 구취억제 활성은 점차 감소하는 경향을 보였다. 포도의 polyphenol oxidase 활성의 최적 온도는 30℃로 나타나고 있는데 이와 어느 정도 일치하는 결과를 나타내고 있으며, polyphenol oxidase의 최적 온도와 같은 20℃ 이하의 온도에서 구취억제 활성도 높게 나타났다.

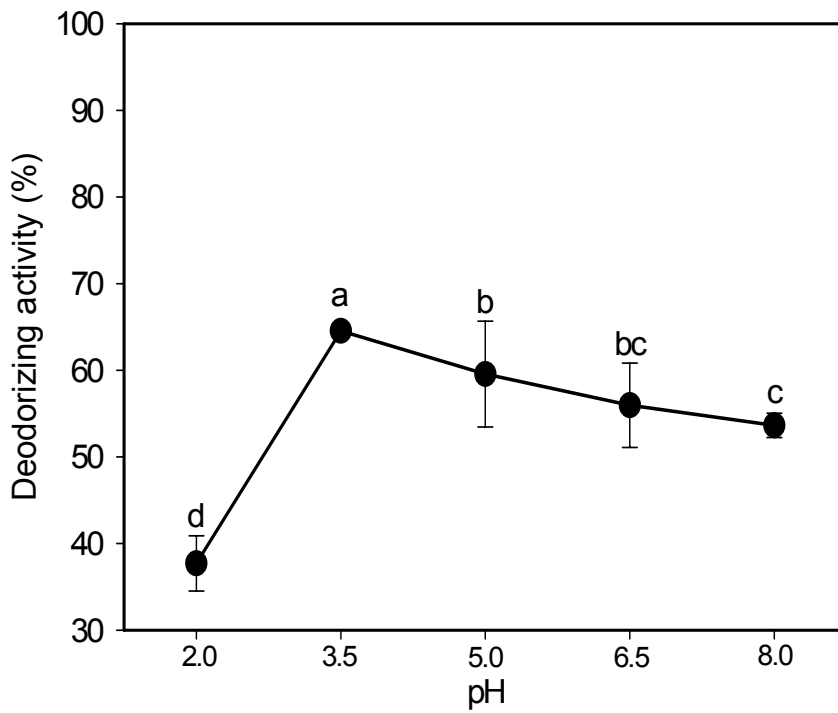


Fig. 9. Effect of pH on deodorizing activity against methyl mercaptan of grape water solubles. Different letters indicate significant differences at p=0.05. Sixty milligrams of grape water solubles were used.

따라서, 포도의 경우도 역시 사과와 마찬가지로, 구취억제 소재를 제조할 때 구취억제 효과를 높이기 위해서는 20℃ 이하에서 처리하여 polyphenol oxidase의 활성 변화를 줄여야 할 것으로 판단된다.

2) pH

포도를 상온에서 pH 별로 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 9에 나타내었다. pH 실험의 결과 포도는 pH 3.5에서 구취억제 활성이 가장 높았으나, 폭넓은 pH의 범위에서도 활성을 유지하였다. 실제로 포도의 water soluble을 만들어 pH를 측정해 보면 포도는 pH 3.3으로 나타남으로, 포도의 water soluble 자체가 가지고 있는 pH에서 나타나는 구취억제 활성과 큰 차이가 없기 때문에 포도의 구취억제 소재 제조시, 사과와 마찬가지로 pH의 조작보다는 시료 자체에서의 pH에서 소재를 제조하는 것이 유용하다고 판단된다.

3) 가공처리 방법

포도 역시 사과와 동일한 방법으로, 열풍건조, 동결건조, 분무건조의 방법을 이용하여 시료를 제조하여 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 10에 나타내었다. 실험결과, 사과와 동일하게 동결건조 소재의 구취억제 활성이 가장 높게 나타났으며, water soluble과 비교하였을 때 가장 비슷하게 나타났다. 나머지 가공조건인 boiling, spray drying 및 hot-air drying의 경우 모두 구취억제 활성이 낮게 나타났으며, 이는 사과와 동일한 경향이였다. 따라서, 과일류의 경우 동결건조가 구취억제 소재 제조를 위한 최적의 가공 조건인 것을 본 실험을 통해 알 수 있었다.

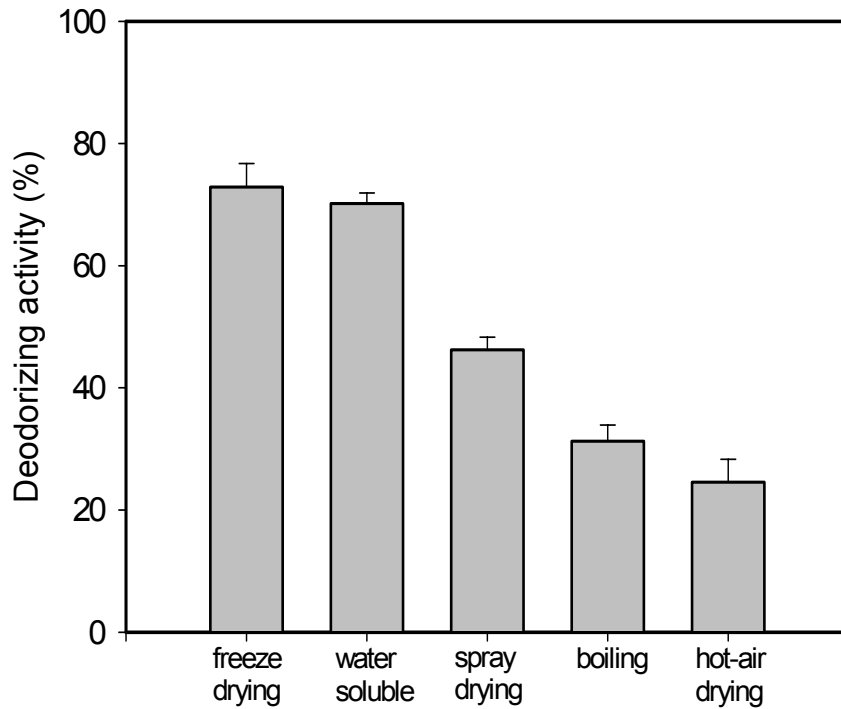


Fig. 10. Deodorizing activities of grape water solubles against methyl mercaptan on processing methods. Sixty milligrams of grape water solubles were used.

다. 상추의 영향 인자의 특성 구명

1) 온도

상추의 water soluble을 이용하여 온도별 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 11에 나타내었다. 그 결과, 사과, 포도와 마찬가지로 온도가 높을수록 구취억제 활성은 점차 감소하는 경향을 보였다. 상추의 최대 polyphenol oxidase 활성의 온도는 25℃로 나타나고 있는데 이와 어느 정도 일치하는 결과를 나타내고 있으며, polyphenol oxidase의 최적 온도와 비슷한 20℃ 이하의 온도에서 구취억제 활성도 높게 나타났

다. 따라서, 상추의 경우도 역시 과일류와 마찬가지로, 구취억제 소재를 제조할 때 구취억제 효과를 높이기 위해서는 20℃ 이하에서 처리하여 polyphenol oxidase의 활성 변화를 줄여야 할 것으로 판단된다.

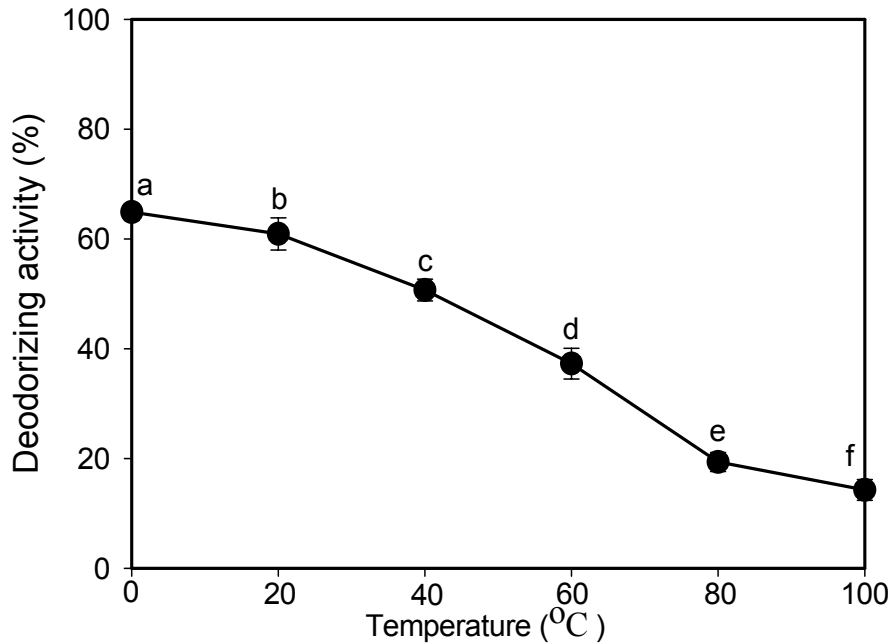


Fig. 11. Effect of temperature on deodorizing activity against methyl mercaptan of lettuce water solubles. Different letters indicate significant differences at $p=0.05$. Two milligrams of lettuce water solubles were used.

2) pH

상추를 상온에서 pH별로 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 12에 나타내었다. pH 실험의 결과에서 상추는 pH 5.0에서 구취억제 활성이 가장 높았으며, 주로 염기성 pH의 범위에서 높은 활성을 유지하였다. 실제로 상추의 water soluble을 만들어 pH를 측정해 보면 pH 6.2로 나타남으로, 상추의 water soluble 자체가 가지고 있는 pH에서 나타나는 구취억제 활성과 큰 차이가 없기 때문에 포도의 구취억제 소재 제조시,

사과 및 포도와 마찬가지로 pH의 조작보다는 시료 자체에서의 pH에서 소재를 제조하는 것이 유용하다고 판단된다.

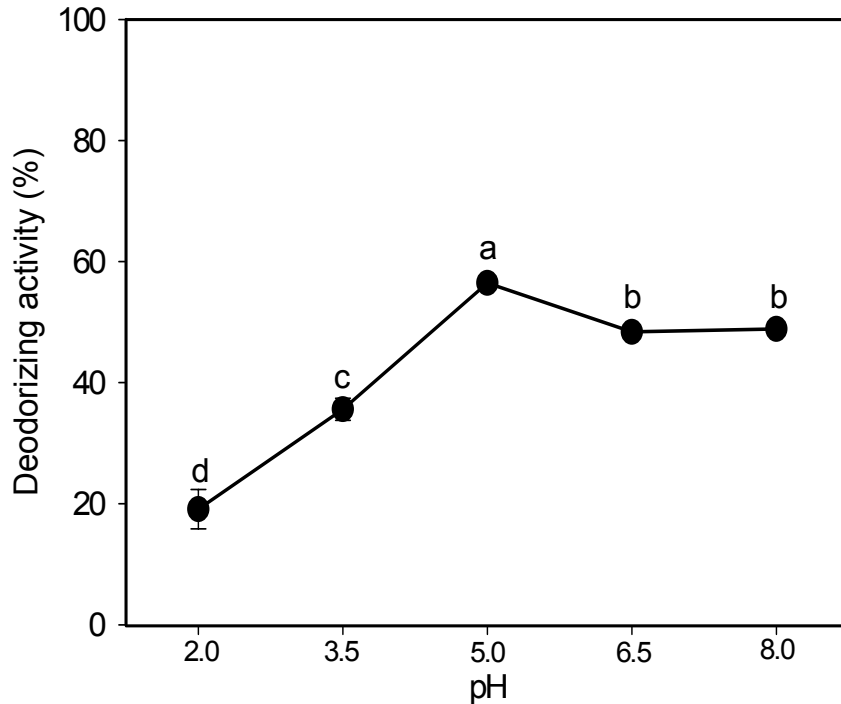


Fig. 12. Effect of pH on deodorizing activity against methyl mercaptan of lettuce water solubles. Different letters indicate significant differences at $p=0.05$. Two milligrams of lettuce water solubles were used.

3) 가공처리 방법

상추 물 추출물을 열풍건조, 동결건조, 분무건조의 방법을 이용하여 시료를 제조하여 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 13에 나타내었다. 실험결과, 사과, 포도와 동일하게 동결건조 소재의 구취억제 활성이 가장 높게 나타났으며, water soluble과 비교하였을 때 구취억제 활성의 차이가 사과 포도와 비교하였을 때 비교적 낮게 측정되었으나 다른 가공조건에 비해 구취억제 활성이 높게 나타났다. 나머지 가공조건인 boiling, spray drying 및 hot-air drying의 경우 모두 구취억제 활성이 낮게 나타났으며, 이는 사과, 포도와 동일한 경향이었다. 따라서 상추의 경우역시 사과, 포도와

마찬가지로 동결건조가 구취억제 소재 제조를 위한 최적의 가공 조건인 것을 본 실험을 통해 알 수 있었다.

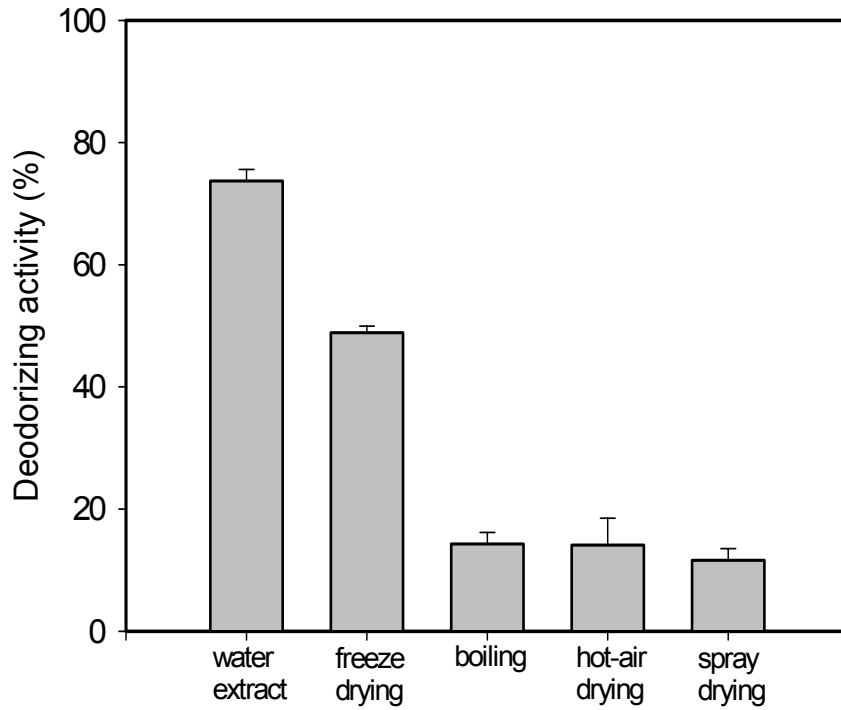


Fig. 13. Deodorizing activity of lettuce extracts against methyl mercaptan of lettuce water solubles by different processing methods. Two milligrams of lettuce water solubles were used.

3. 구취억제 소재의 최적 제조 조건

이상의 결과를 종합해 볼 때, 구취억제 소재를 효율적으로 제조하기 위해서 ① 추출용매로 유기용매보다는 물을 사용하는 것이 구취억제 활성 및 수율이 월등히 높아

바람직하며, ② 시료부위로 과피와 과육을 혼합사용하고, ③ 시료의 처리온도는 25℃ 이하가 좋으며, ④ pH는 원래 가지고 있는 pH와 유사하게 사과 4.7, 포도 3.3 및 상추 6.2가 바람직하며, ⑤ 가공처리 방법으로는 사과 및 포도는 건조할 경우 동결건조가 좋으며 특별한 가공처리가 필요 없을 때는 가공처리 없이 water soluble을 저온 보관하여 사용하는 것이 최적 조건인 것으로 나타났다.

제 4 절 구취 억제 소재의 구취 억제 기작 구명

1. 실험 방법 및 내용

가. 금속이온 및 환원제 혼합비

실험에 쓰인 금속 이온, 환원제는 각각 20 mM의 농도로 제조하여 실험에 사용하였으며, Cu는 1 N HCl에 녹인 시약을 사용하였다. 각각의 혼합비는 과채류 phenol 획분을 100 ppm, 100 μ L polyphenol oxidase, 20 μ L Cu와 10 μ L ascorbic acid를 실험구에 따라 혼합하여 실험에 사용하였으며, vial의 headspace를 표준과 동일하게 하기 위해 나머지 양은 buffer를 주입하였다.

나. 효소 및 페놀획분 제조

실험에 쓰인 조효소는 제 2 세부과제에서의 실험을 통해 추출한 조효소를 사용하였으며, 페놀획분은 사과, 상추, 포도를 에탄올 추출하여 여과한 후 동결건조하여 실험에 사용하였다.

다. HPLC 분석조건

HPLC에 의한 분석은 펌프 (water 510), 검출기 (waters 486, Tunable Absorbance Detector)와 controller (Waters Automated Gradient Controller)를 사용하였으며 software로는 Autochro-Win 2.0 Plus 영린 software를 사용하였다. Column은 XTerra™ RP18 5 μ m (3.9×150 mm), 이동상은 A (5% formic acid)와 B (methanol)를 1.0 mL/min유속으로 분석하였다. 280 nm에서 시료 주입량은 5 μ L이었

으며 B 용매를 1분에서 5분까지 5%에서 15%로, 12분에 45%, 18분에 80%까지 단계적 상승기울기법으로 용출시켜 분석하였다.

라. 총치균에 대한 항균성 test

총치균으로 *Streptococcus mutans* 및 *Streptococcus sorbinus*를 사용하였으며 평균에 균수가 10^{-7} 정도 들어가도록 희석하여 주입하였다. 사과, 포도 및 상추의 water soluble과 ethanol soluble을 농도별로 BHI 배지와 혼합하여 37°C에서 24시간 배양하여 생성되는 colony의 수를 순수 BHI 배지의 colony 수와 비교하여 항균력을 검증하였다.

2. 결과 및 고찰

검색과정을 통하여 선택된 사과, 포도 및 상추의 구취억제 기작에 영향을 미치는 인자들을 세부적으로 알아보기 위하여 water soluble에 질소, 금속 및 환원제를 25°C에서 30분간 처리하여 구취억제 활성을 알아보았다. 또한 시료 중에 보편적으로 많이 함유되어 있는 페놀 화합물인 chlorogenic acid를 페놀 모델 물질로 이용하여 사과, 포도 및 상추에서 polyphenol oxidase 및 금속이온을 반응시켜서 구취억제 활성을 측정하여 나타내었다.

가. 사과 구취억제 소재의 기작 구명

1) 금속 및 환원제의 영향

사과로부터 제조한 구취억제 소재의 작용기작을 밝히기 위하여 먼저 금속 및 환원제의 영향을 검토하여 Fig. 14에 나타내었다. 사과의 water soluble에 질소를 처리한 경우에는 구취억제 활성의 감소가 적었는데, 이는 소재 중의 phenol이 polyphenol oxidase 및 산화인자 등에 의하여 어느 정도 산화된 상태로 존재하여 산소의 영향을 적게 받았기 때문으로 판단된다. 금속을 첨가한 경우에는 Cu를 첨가하였을 때 구취억제 활성이 크게 증가하였으나, Fe나 Ca등은 구취억제 활성을 저해하는 것으로 나타났다. Cu는 소재 중의 polyphenol oxidase를 활성화시켜 phenol의 산화를 유도하였기 때문으로 판단되며, Fe나 Ca는 phenol의 산화나 polyphenol oxidase의 활성화보다는 phenol 및 phenol 산화물과의 반응으로 구취억제 활성을 감소시키는 것으로 판

단된다. 환원제 처리의 경우는 구취억제 활성이 감소하였는데 이는 구취억제에 필요한 phenol 산화물의 생성을 억제하기 때문으로 판단된다.

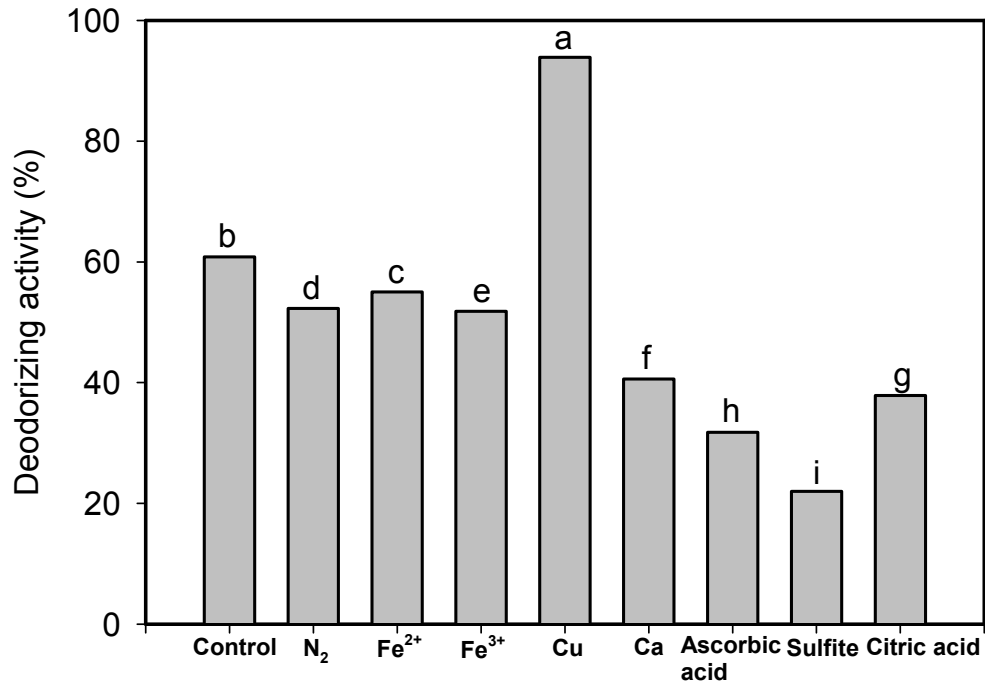


Fig. 14. Effect of metal ions and reducing against on deodorizing activity against methyl mercaptan of apple water solubles. Different letters (a, b...) indicate significant differences at p=0.05.

2) 효소 및 페놀의 영향

사과로부터 페놀 획득 및 polyphenol oxidase를 제조하여 구취억제 활성에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 15-16에 나타내었다. 사과로부터 추출된 페놀획분과 polyphenol oxidase를 비교하였을 때 페놀 획득 단독보다는 페놀획분과 polyphenol

oxidase의 혼합물이 구취억제 활성이 높게 나왔으며, 페놀 획분, polyphenol oxidase 및 Cu 이온을 첨가한 실험구에서 구취억제 활성이 페놀 획분 만을 첨가한 실험구보다 높게 나타났다. 그리고 ascorbic acid를 첨가한 경우에는 금속의 산화작용을 억제하여 다소 감소하였으나 polyphenol oxidase의 활성 저해는 적은 것으로 판단된다.

모델 페놀 물질을 사용한 경우에 chlorogenic acid 단독은 구취억제 활성이 낮으나 polyphenol oxidase 및 Cu 이온을 첨가한 경우 구취억제 활성이 크게 증가하였다. 이는 소재 제조시 시료 중에 함유된 polyphenol oxidase나 금속이온, 산소 등에 의해서 소재 중의 페놀이 어느 정도 산화된 형태로 존재하기 때문으로 판단된다.

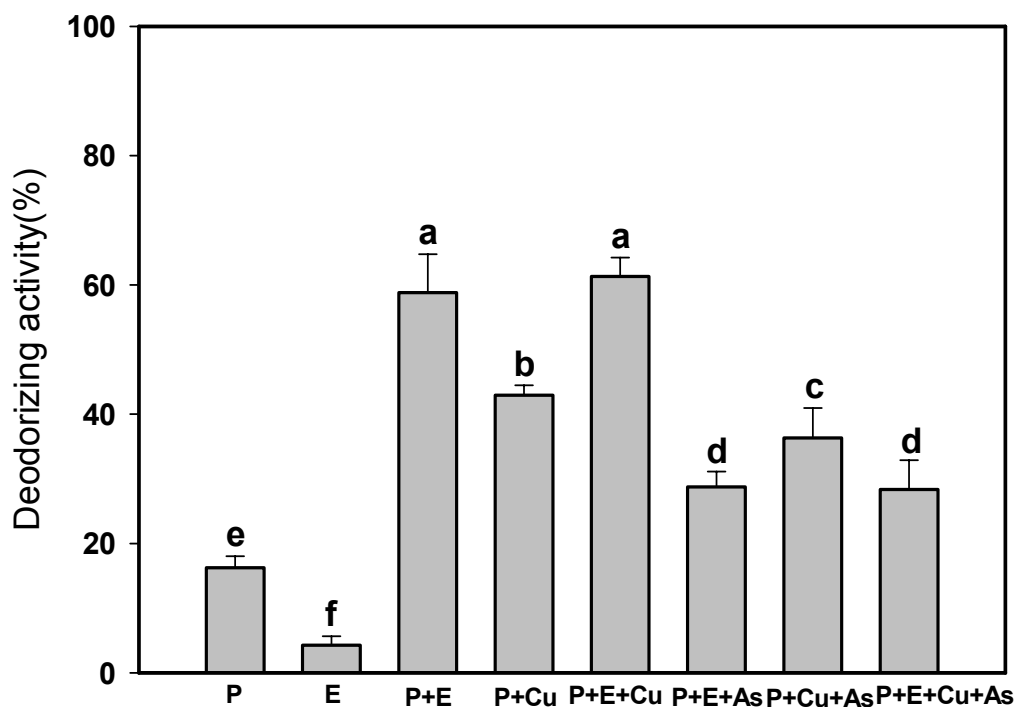


Fig. 15. Effect of metal and ascorbic acid on the deodorizing activity against methyl mercaptan of phenol fraction and polyphenol oxidase from apples. (P: phenol fraction, E: polyphenol oxidase, Cu: copper, As: ascorbic acid).

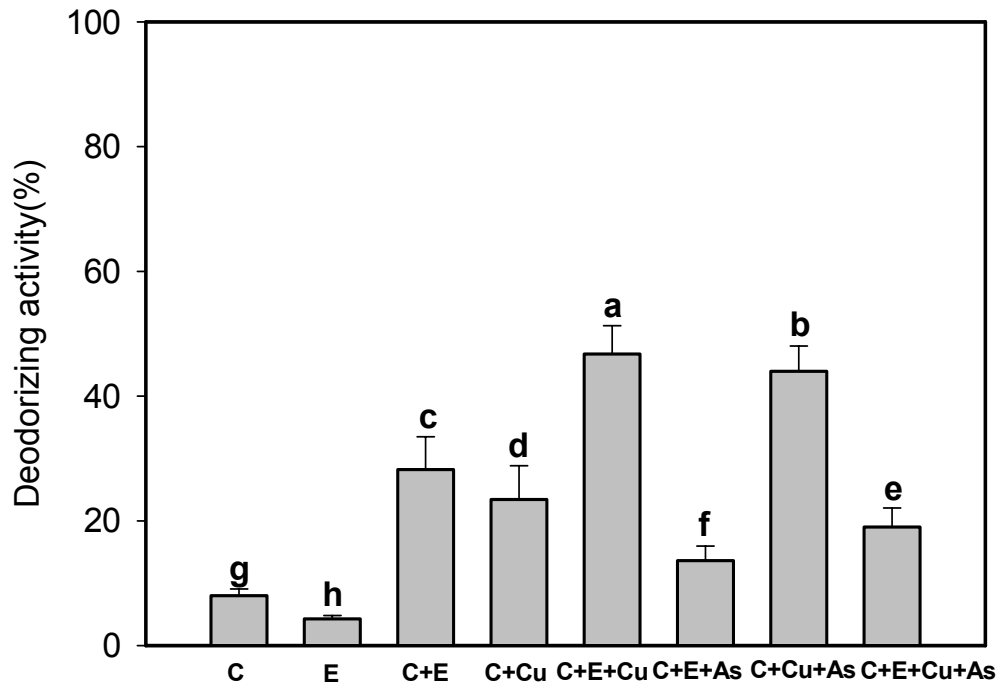


Fig. 16. Effect of metal, ascorbic acid and polyphenol oxidase from apple on deodorizing activity against methyl mercaptan for authentic chlorogenic acid. Different letters indicate significant difference at $p=0.05$.

(C: chlorogenic acid, E: polyphenol oxidase, Cu: copper, As: ascorbic acid)

3) 충치균에 대한 항균성

구취는 주로 입속에 존재하는 혐기성 세균인 충치균에 의해서도 일어나게 된다. 따라서 대표적으로 알려져 있는 충치균에 대한 구취억제 소재의 항균작용을 측정하여 Table 12에 나타내었다. 실험결과, 충치균 *Streptococcus mutans*는 사과 water solubles 고농도의 경우 고형분함량이 100 mg이 되게 하였을 때 3.25×10^9 에서 1.48×10^9 으로, 50 mg의 저농도의 경우 셀 수 없을 만큼 많이 증가 하였으며 또 다른 균 *Streptococcus sorbinus*는 *Streptococcus mutans*와 같은 방법으로 하여 고농도는

1.85×10⁹에서 2.91×10⁹으로 저농도에서는 셀 수 없을 만큼 증가하였다. 따라서 사과추출물에 대해서는 대체적으로 항균력을 볼 수 없었다.

Table 12. Antimicrobial effects of apple water soluble on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sorbinus*

Bacteria	Control	Apple water soluble	
		100 mg	50 mg
<i>Streptococcus mutans</i>	3.25 × 10 ⁹	1.48 × 10 ⁹	TNTC
<i>Streptococcus sorbinus</i>	1.85 × 10 ⁹	2.91 × 10 ⁹	TNTC

TNTC means Too Numerous To Count

나. 포도 구취억제 소재의 기작 구명

1) 금속 및 환원제의 영향

포도에서 얻은 구취억제 소재의 작용기작을 구명하기 위하여 먼저 금속 및 환원제의 영향을 검토하여 Fig. 17에 나타내었다. 포도 water soluble에 질소를 처리한 경우 control과 비교하였을 때, 구취억제 활성의 감소가 적었는데, 이는 소재 중의 phenol이 polyphenol oxidase 및 산화인자 등에 의하여 어느 정도 산화된 상태로 존재하여 산소의 영향을 적게 받았기 때문으로 판단된다. 금속 첨가의 경우 Cu를 첨가하였을 때 사과와 마찬가지로 구취억제 활성이 크게 증가하였으나, Fe나 Ca등은 구취억제 활성을 저해하는 것으로 나타났다. Cu는 소재 중의 polyphenol oxidase를 활성화시켜 phenol의 산화를 유도하였기 때문으로 판단되며, Fe나 Ca는 phenol의 산화나 polyphenol oxidase의 활성화보다는 phenol 및 phenol 산화물과의 반응으로 구취억제 활성을 감소시키는 것으로 판단된다. 환원제 처리의 경우는 control과 비교하였을 때, sulfite의 경우는 구취억제 활성이 감소하였으나 ascorbic acid와 citric acid는 구취억제 감소에 별다른 영향을 미치지 않았다. 이는 사과와 비교하였을 때 차이가

나는 점인데 이는 페놀의 산화에 따른 포도 획분의 특성 때문이라 생각되어진다.

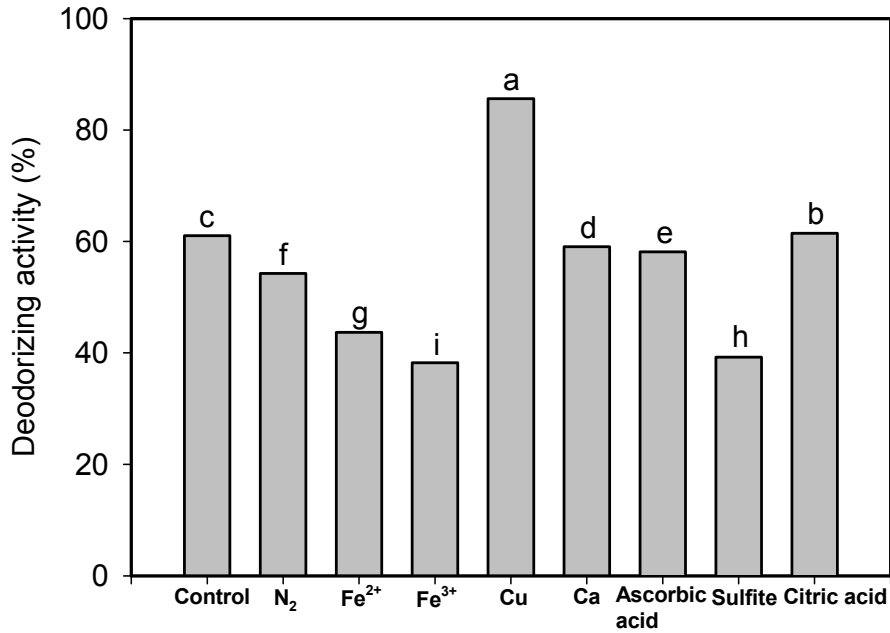


Fig. 17. Effect of metal ions and reducing agents on deodorizing activity against methyl mercaptan of grape water solubles. Different letters (a, b...) indicate significant differences at $p=0.05$.

2) 효소 및 페놀의 영향

포도로부터 페놀 획분 및 polyphenol oxidase를 제조하여 구취억제 활성에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 18-19에 나타내었다.

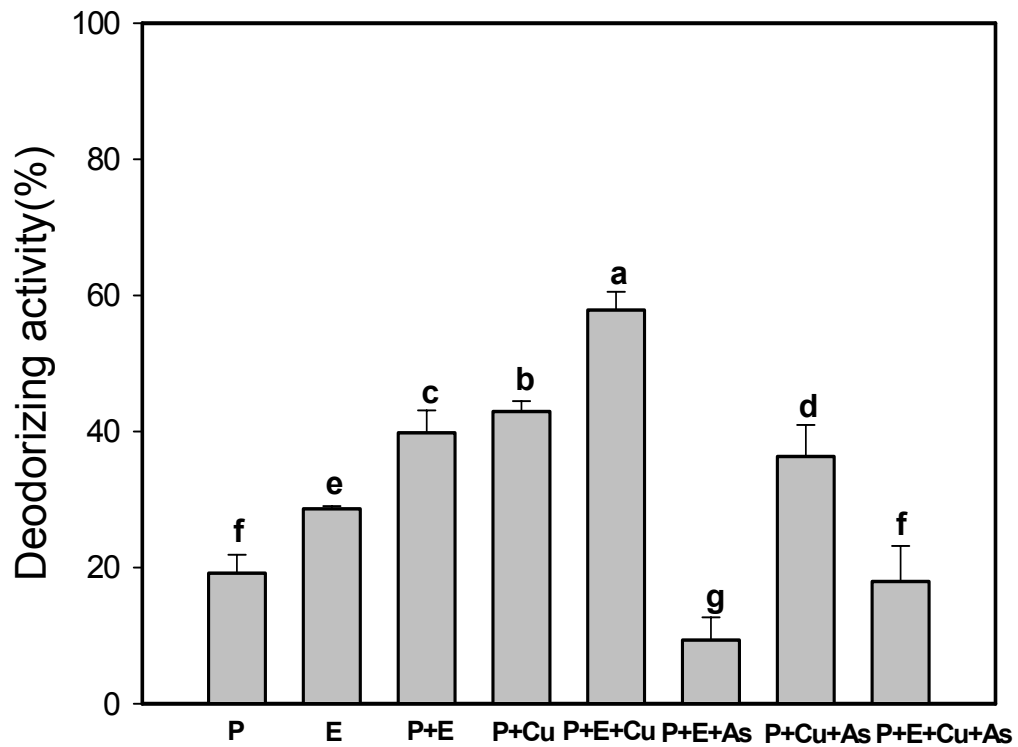


Fig. 18. Effect of metal and ascorbic acid on deodorizing activity against methyl mercaptan of phenol fraction and polyphenol oxidase from grape. (P: phenol fraction, E: polyphenol oxidase, Cu: copper, As: ascorbic acid).

포도로부터 추출된 페놀획분과 polyphenol oxidase를 비교하였을 때 페놀획분 단독보다는 페놀획분과 polyphenol oxidase의 혼합물이 구취억제 활성이 높게 나왔으

며, 페놀획분, polyphenol oxidase 및 Cu 이온을 첨가한 실험구에서 구취억제 활성이 페놀획분만을 첨가한 실험구보다 높게 나타났다.

그리고 ascorbic acid를 첨가한 경우에는 금속의 산화작용을 억제하여 감소하는 경향을 나타내었다.

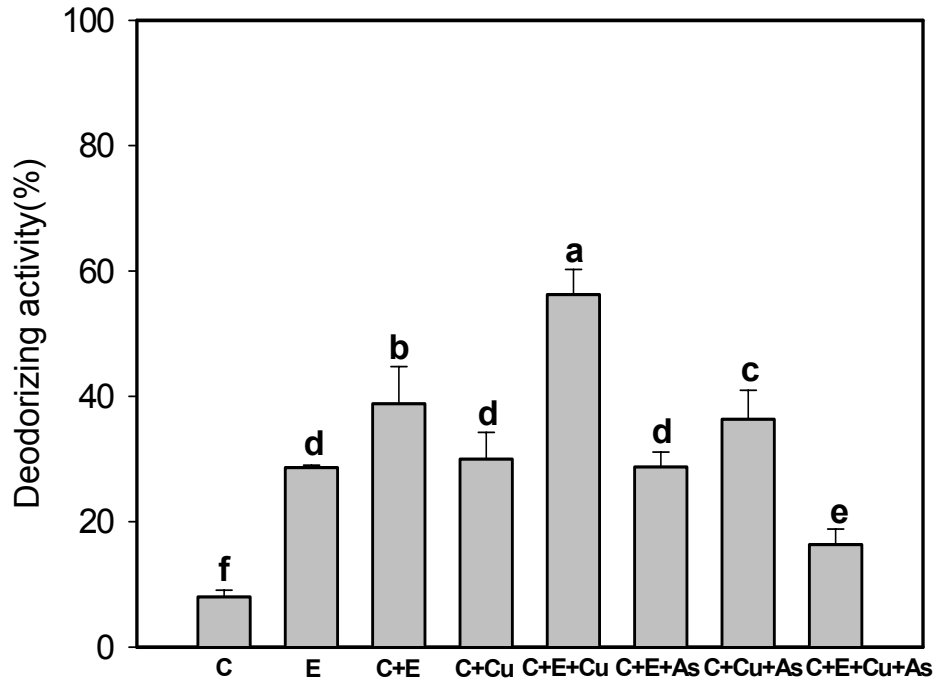


Fig. 19. Effect of metal, ascorbic acid and polyphenol oxidase from grape on deodorizing activity against methyl mercaptan of authentic chlorogenic acid. Different letters indicate significant differences at $p=0.05$. Sixty milligrams of grape water solubles were used.

(C: chlorogenic acid, E: polyphenol oxidase, Cu: copper, As: ascorbic acid)

모델 페놀 물질을 사용한 경우는 chlorogenic acid 단독은 구취억제 활성이 낮으

나 polyphenol oxidase 및 Cu이온을 첨가한 경우는 사과와 마찬가지로 구취억제 활성이 크게 증가하였다. 이는 소재 제조시 시료 중에 함유된 polyphenol oxidase나 금속이온, 산소 등에 의해서 소재 중의 페놀의 어느 정도 산화된 형태로 존재하기 때문으로 판단된다.

3) 충치균에 대한 항균성

포도 water soluble의 충치균에 대한 항균력은 Table 13에 나타내었다. 그 결과, 사과 water soluble과 같은 방법으로 고농도와 저농도의 두 농도에서 항균력을 보았으며 *Streptococcus mutans*의 항균력은 고농도의 경우는 3.25×10^9 에서 5.70×10^8 으로, 저농도의 경우에도 3.70×10^7 으로 약간의 항균력을 나타내었다. 또한 다른 균인 *Streptococcus sorbinus*는 고농도에서는 1.85×10^9 에서 9.00×10^7 으로, 저농도에서도 5.00×10^7 으로 약간의 항균력을 나타내었다. 따라서 포도 water soluble은 사과에 비하여 다소 높은 항균력을 나타내었다.

Table 13. Antimicrobial effects of grape water soluble on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sorbinus*

Bacteria	Control	Grape water soluble	
		100 mg	50 mg
<i>Streptococcus mutans</i>	3.25×10^9	5.70×10^8	3.70×10^7
<i>Streptococcus sorbinus</i>	1.85×10^9	9.00×10^7	5.00×10^7

다. 상추 구취억제 소재의 기작 구명

1) 금속 및 환원제의 영향

상추의 구취억제 기작을 밝히기 위하여 water soluble에 금속 및 환원제를 처리하여 Fig. 20에 나타내었다. 상추 water soluble에 질소를 처리한 경우 control과 비

교하였을 때, 사과 및 포도와 마찬가지로 구취억제 활성의 감소가 적었다. 금속 첨가의 경우 Cu를 첨가하였을 때 사과 및 포도와 마찬가지로 구취억제 활성이 크게 증가하였으나, Fe나 Ca등은 구취억제 활성을 저해하는 것으로 나타났다.

Cu는 소재 중의 polyphenol oxidase를 활성화시켜 phenol의 산화를 유도하였기 때문에 판단되며, Fe나 Ca는 phenol의 산화나 polyphenol oxidase의 활성화보다는 phenol 및 phenol 산화물과의 반응으로 구취억제 활성을 감소시키는 것으로 판단된다. 환원제 처리의 경우 control과 비교하였을 때, ascorbic acid, sulfite의 경우 구취억제 활성이 감소하였으나 citric acid는 구취억제 감소에 별다른 영향을 미치지 않았다.

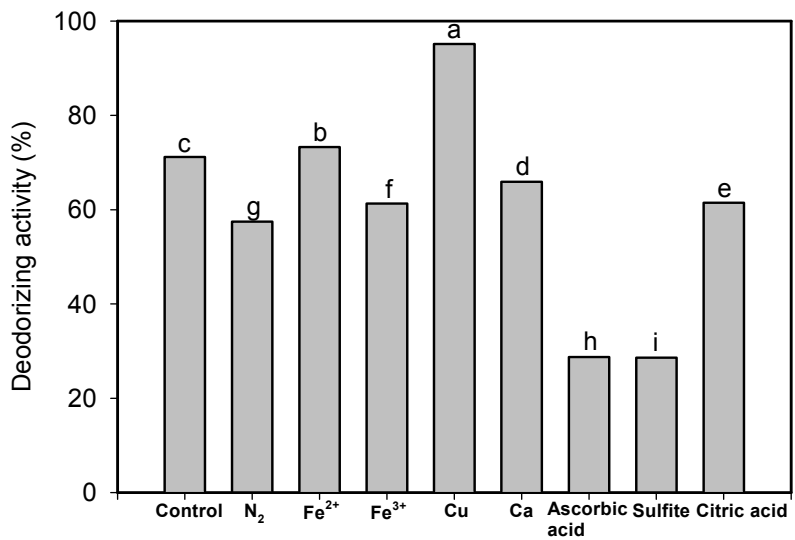


Fig. 20. Effect of metal ions and reducing agents on deodorizing activity against methyl mercaptan of lettuce water solubles. Different letters (a, b...) indicate significant differences at $p=0.05$.

2) 효소 및 페놀의 영향

상추로부터 페놀획분 및 polyphenol oxidase를 제조하여 구취억제 활성에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 21과 22에 나타내었다. 포도로부터 추출된, 페놀획분과 polyphenol oxidase를 비교하였을 때 페놀획분 단독보다는 페놀획분과 polyphenol oxidase의 혼합물이 구취억제 활성이 높게 나왔으며, 페놀획분, polyphenol oxidase 및 Cu 이온을 첨가한 실험구에서 구취억제 활성이 페놀획분만을 첨가한 실험구보다 높게 나타났다. 그리고 ascorbic acid를 첨가한 경우에는 사과와 포도와는 달리 구취억제활성이 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 제 2 세부과제에서 측정한 상추의 polyphenol oxidase의 활성이 매우 큰 상추의 특성 때문이라 판단된다.

모델 페놀 물질을 사용한 경우, chlorogenic acid 단독은 구취억제 활성이 낮으나 polyphenol oxidase 및 Cu 이온을 첨가한 경우 사과와 마찬가지로 구취억제 활성이 크게 증가하였으며, ascorbic acid는 구취억제 감소에 별다른 영향을 미치지 않았다.

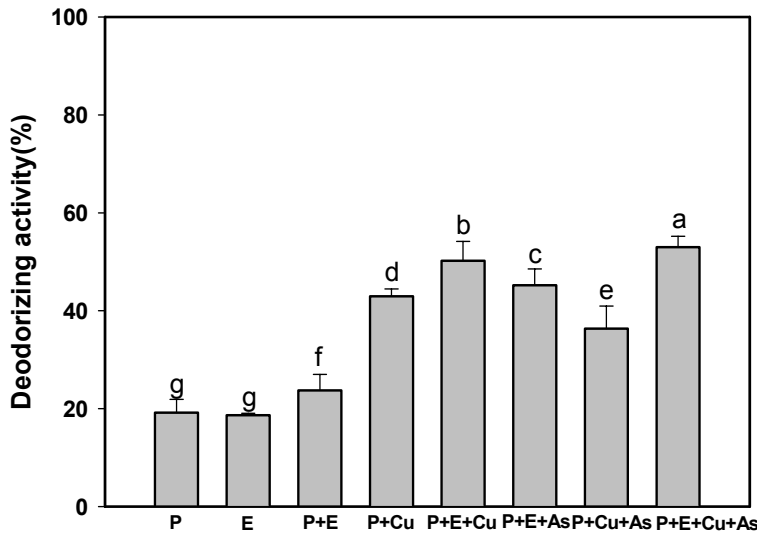


Fig. 21. Effect of metal and ascorbic acid on deodorizing activity against methyl mercaptan of phenol fraction and polyphenol oxidase from lettuce. (P: phenol fraction, E: polyphenol oxidase, Cu: copper, As: ascorbic acid).

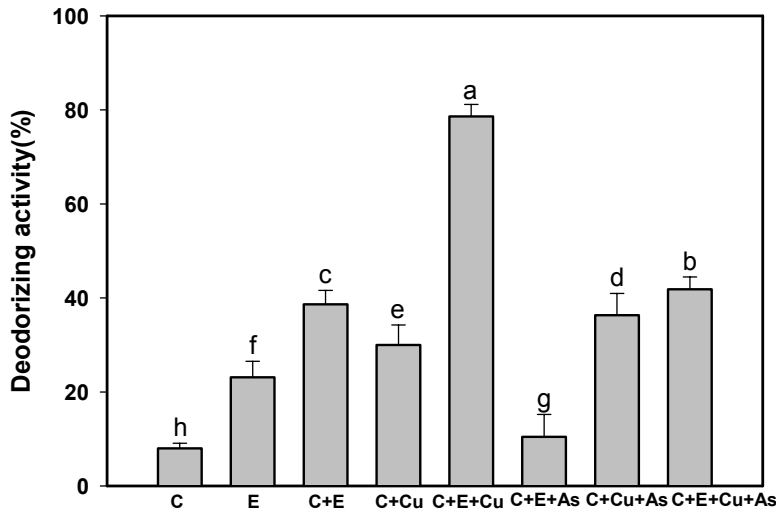


Fig. 22. Effect of metal, ascorbic acid and polyphenol oxidase from lettuce on deodorizing activity against methyl mercaptan of authentic chlorogenic acid. Different letters indicate significant differences at $p=0.05$.

(C: chlorogenic acid, E: polyphenol oxidase, Cu: copper, As: ascorbic acid)

3) 총치균에 대한 항균성

상추 water soluble의 총치균에 대한 항균력을 Table 14에 나타내었다. 그 결과, 상추 water soluble은 고농도와 저농도 두 농도에서 항균력이 나타났으며 *Streptococcus mutans*에 대한 항균력은 고농도의 경우 3.25×10^9 에서 6.15×10^7 로 약하게 나타내었으나, 저농도의 경우에는 1.47×10^9 으로 항균력을 나타내지 못하였다. 또 다른균 *Streptococcus sorbinus*는 고농도에서는 1.85×10^9 에서 4.30×10^7 으로 저농도에서는 3.50×10^7 으로 항균력이 약하게 나타났다. 따라서 상추 water soluble은 대체적으

로 항균력이 약한 것으로 나타났다.

Table 14. Antimicrobial effects of lettuce water soluble on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sorbinus*

Bacteria	Control	Lettuce water soluble	
		100 mg	50 mg
<i>Streptococcus mutans</i>	3.25×10^9	6.15×10^7	1.47×10^9
<i>Streptococcus sorbinus</i>	1.85×10^9	4.30×10^7	3.50×10^7

라. 구취억제 소재별 polyphenol 분석

구취억제 소재의 polyphenol 화합물의 종류와 함량을 측정된 결과를 Table. 15에 나타내었다. 포도의 경우는 polyphenol 화합물의 종류가 많이 검출되었으며 함량 또한 높게 나타났다. 사과는 포도에 비해 종류 및 함량이 작게 나타났는데 이는 Fig. 1의 총페놀함량의 결과와 같은 경향을 보이고 있다.

Table 15. Contents of polyphenolics of water solubles from apples, grapes and lettuces

Samples	Polyphenolics ($\mu\text{g/g}$)					
	Gallic acid	(\pm) catechin	Chlorogenic acid	Caffeic acid	p - coumaric acid	Ferulic acid
Apple	2.1	ND ¹⁾	0.74	ND	0.42	0.19
Grape	0.16	0.67	0.53	0.60	0.76	0.24
Lettuce	ND	0.27	0.41	ND	ND	ND

ND means not detected.

반면에 상추의 경우는 총페놀함량이 높음에도 불구하고 2가지만 검출되었는데 이는 검색에 이용된 6가지 표품 이외의 polyphenol 화합물이 다량 존재하고 있는 것으로 판단되어진다.

마. 구취억제 소재의 억제 기작

사과, 포도 및 상추로부터 제조한 구취억제 소재가 나타나는 구취억제 기작은 Fig. 23과 같이 소재중의 페놀화합물과 polyphenol oxidase와 금속 등에 의하여 quinone 등의 페놀산화물이 methyl mercaptan과 반응하기 때문인 것으로 판단된다. 또한 소재 중의 페놀성분이 충치균의 증식을 억제함으로써 미생물에 의해 methyl mercaptan의 생성의 억제도 구취억제에 기여할 것으로 판단된다.

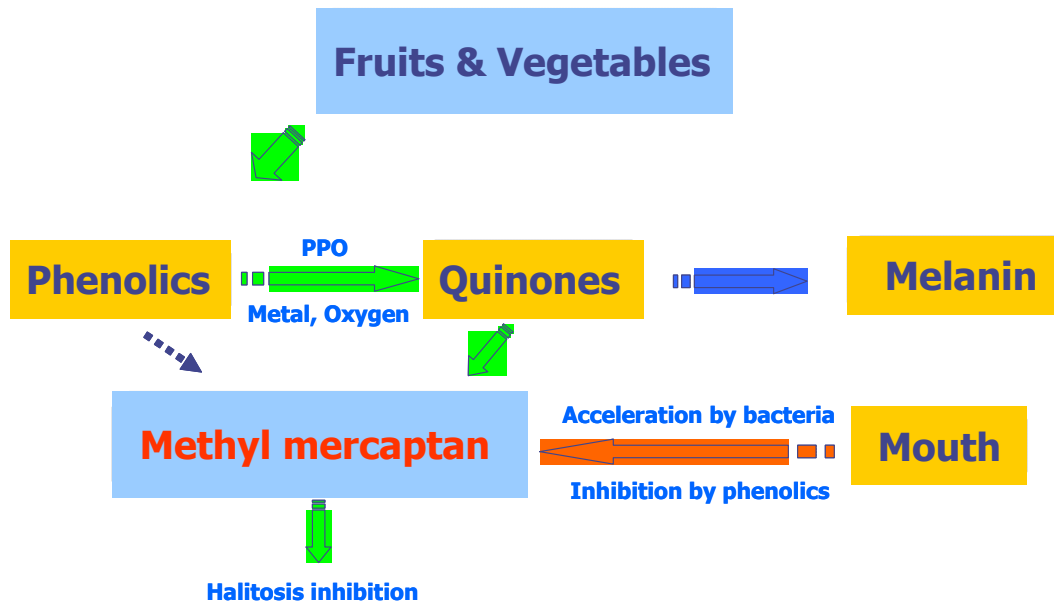


Fig. 23. Proposed scheme for halitosis inhibition by fruits and vegetables.

제 5 절 시판 구강청정제와의 억제 활성 비교

사과, 포도 및 상추로부터 제조한 구취억제소재와 시중에서 판매되고 있는 구강세정액을 A사, B사와 C사의 3종류 제품을 구입하여 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 24에 나타내었다. 전체적으로 사과, 포도 및 상추의 구취억제 소재는 시판 구강세정액보다 methyl mercaptan에 대한 구취억제 효과가 월등히 높은 것으로 나타났다. 시중에서 판매되고 있는 구강세정액은 구취성분과의 반응으로 인하여 나타나는 구취감소효과보다는 입안의 구취성분을 둘러싸서 구취냄새를 줄이는 것은 masking 효과에 의한 것으로 판단된다.

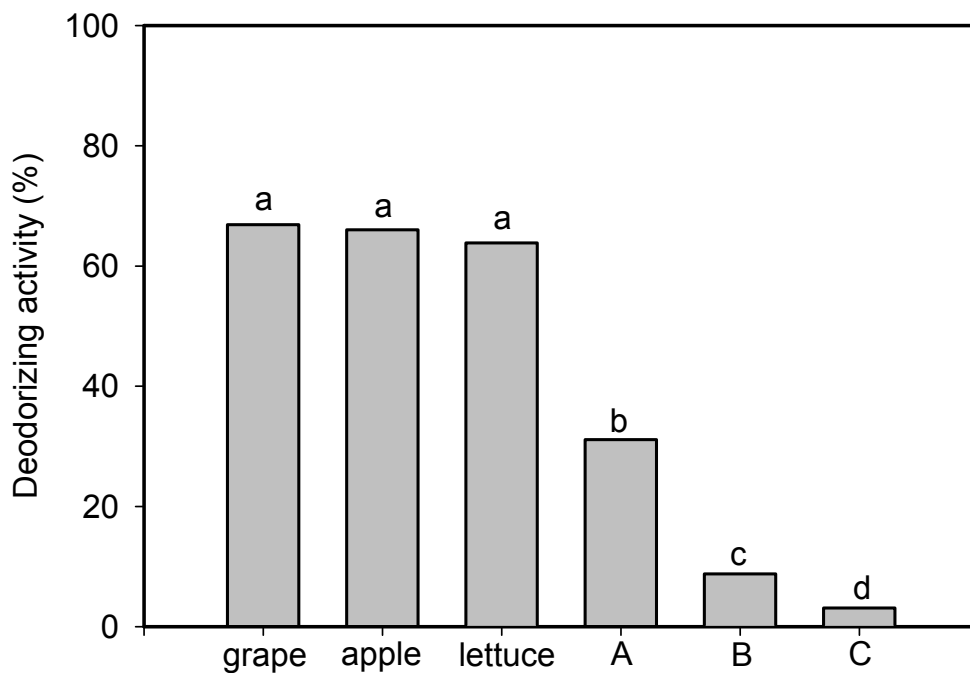


Fig. 24. Comparison of deodorizing activity between water solubles and commercial mouth rinses (A, B and C for commercial products). Sixty milligrams of apple and grape water solubles, and 2 mg of lettuce water solubles were used.

제 6 절 구취억제 활성 소재의 대량 생산 기법 연구

1. 구취억제 활성 소재 대량생산 제조공정도

구취억제 활성 소재를 실제 공장에서 제조하기 위한 제조공정도는 Fig. 25와 같다.

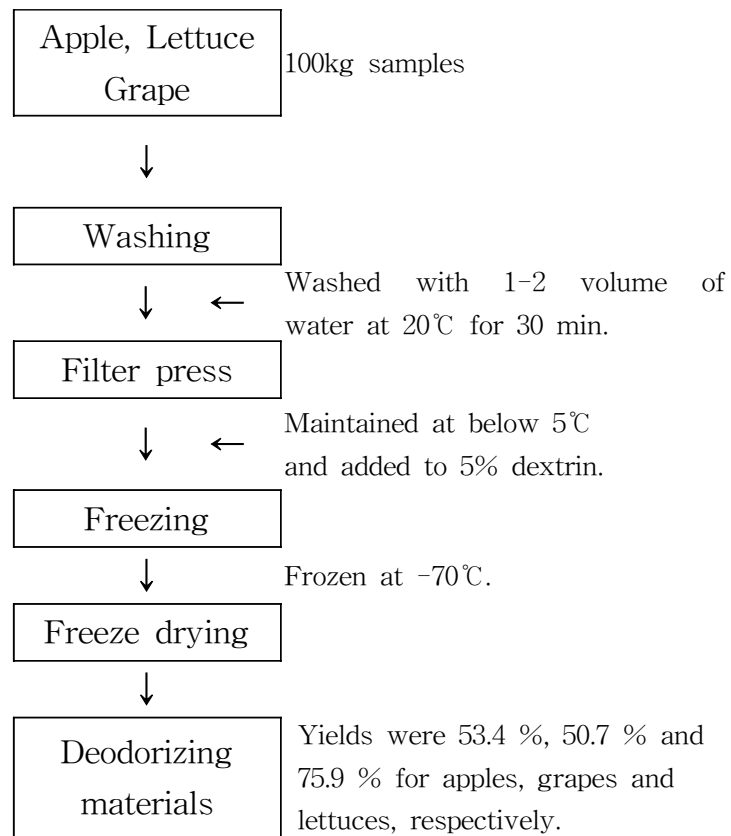


Fig. 25. Flow chart for manufacturing of deodorizing materials from apples, grapes and lettuces.

사과, 상추 및 포도 각각 100 Kg을 세정기를 이용하여 20℃에서 30분간 세척하여 과일과 야채의 표면에 묻어 있는 각종 잔류농약, 모래 등의 오염물질이 잔류하지 않도록 세척하였다.

세척된 원료를 거름천을 두른 filter press에 6 kg/cm²의 조건으로 압력을 가하며 5℃를 유지한 채 압착 및 여과과정을 거친 후 5%의 dextrin을 첨가한 후 -70℃에서 급속동결시켰다. 동결된 시료를 동결건조기에 넣어 동결건조하여 구취억제 소재를 제조한다. 제조공정을 거쳐 나온 구취억제 소재는 사과 : 53.41 %, 포도 : 50.73 %, 상추 : 75.85 %의 수율을 보였다.

2. 구취억제 활성 소재 시제품의 경제성 분석

가. 원료 소재의 수급 구조

1) 사과 재배 면적 및 수급동향

사과의 전국재배면적은 1995년 50,103ha에서 감소하여 2003년에는 26,398ha가 되었다. 사과의 생산면적은 전국적으로 계속 감소하고 있는 추세를 보이고 있으며 이는 타 과일에 비해 상대가격과 소득이 낮아 재배면적이 감소한 것으로 추측된다. 사과의 주 생산지인 경북지방에서 2003년 기준으로 16,778ha로 가장 많이 재배되어지고 있는데, 이런 경북지방의 경우도 1995년보다 약 50%가 감소되었다.

사과의 수급동향은 Table 16에 나타나 있다. 사과는 생과용 소비가 거의 대부분을 차지하고 있으며, 2001년도를 살펴보면, 생과용 소비는 90.6%인데 비해 가공용으로서의 소비는 8.4%에 불과한 실정이다. 가공용으로서의 소비도 거의 대부분이 사과주스 형태로 판매되어지고 있으며, 이마저도 소비의 감소로 인한 생산량의 저하로 이어져, 가공용으로서의 수요도 계속적으로 정체되고 있는 실정이다. 또한 사과의 수출실적도 거의 미미한 실정인데, 주요 수출시장인 동남아시아에서도 중국, 미국, 칠레산과의 가격경쟁력의 약화로 수출이 계속해서 감소하는 추세에 있다.

Table 16. Production amounts and usage amounts of apples

(Unit : M/T, %)

Year	Total Amount	Processing		Export		Direct Eating	
		Amount	%	Amount	%	Amount	%
1997	651,778	60,382	9.3	4,441	0.7	586,955	90.0
1998	459,010	32,314	7.0	3,519	0.4	424,901	92.6
1999	490,152	22,815	4.7	1,795	0.4	465,542	94.9
2000	488,960	37,971	7.8	2,340	0.4	448,649	91.8
2001	403,583	33,938	8.4	3,733	1.0	365,912	90.6

Reference is Agricultural Statistics of Department of Agriculture.

2) 포도 재배면적 및 수급동향

포도의 재배면적은 1999년 30,537ha 로 최고조를 보이고 있었으나, 가격하락에 따른 채산성의 악화로 인해 2000년 이후 계속적으로 재배면적이 감소하는 추세에 있다. 포도는 사과에 비해, 전국적으로 고른 재배면적을 보이고 있으며, 주요 생산지는 경북, 충청지방에서 많이 재배되어지고 있다. 최근 한·칠레간의 FTA협정의 발효로 인한 값싼 칠레산 포도의 대량 수입으로 인해 국내 포도생산 농가의 채산성은 더욱 악화되어가고 있는 실정이다.

포도의 수급동향을 살펴보면, 사과에 비해 생과용 소비는 늘어나고 있으나, 가공용으로의 소비는 오히려 계속적으로 감소하고 있는 추세이다 (Table 17). 이는 국내에서 재배되어지고 있는 품종은 주로 생과용이며, 가공용으로 특별히 재배되어지고 있는 품종이 없는 까닭도 있으며, 와인 등을 주로 수입에 의존하고 있기 때문으로 풀이된다. 또한 자유무역협정 등의 영향으로 값싼 외국산 가공용 포도의 수입이 늘어나고 있는 것도 가공용 포도의 소비가 줄어든 것으로 판단된다.

반면에 일반가공용 포도 소비는 포도즙 및 포도주스 소비증가의 영향으로 증가하고 있는 것으로 나타났으며, 2001년에는 117톤이 수출되었다.

Table 17. Production amounts and usage amounts of grapes

(Unit : M/T, %)

Year	Total amount	Processing		Export		Direct eating	
		Amount	%	Amount	%	Amount	%
1990	131,324	27,009	20.6	2	0.0	104,313	79.4
1995	316,443	29,471	9.3	62	0.0	286,910	90.7
1999	470,124	9,137	1.9	156	0.0	460,987	98.1
2000	475,594	7,726	1.6	32	0.0	467,836	98.4
2001	453,578	14,797	3.3	117	0.0	438,664	96.7

Reference is Agricultural Statistics of Department of Agriculture.

3) 상추 재배면적 및 수급동향

상추는 경제발전에 따른 식생활의 변화로 그 수요가 연중 지속되고 있는 신선채소로, 재배면적, 생산량 및 소비가 매년 꾸준히 증가하고 있는 품목이다. 상추는 쌈이나 샐러드용 등 생식으로 주로 이용되고 있으며, 불고기와 생선회 등 육류소비가 늘어남에 따라 소비량이 점차 증가되고 있다 (Table 18). 2002년 기준 상추 소비량은 1인당 연간 3kg이었으며, 국내에서 100% 자급 가능한 채소류이다.

Table 18. Production amounts of lettuces

Year	Production amount (ton)
1999	173,668
2000	203,509
2001	182,509
2002	178,998
2003	190,304

Reference is Agricultural Statistics of Department of Agriculture.

나. 구취억제 소재의 경제성 분석

사과, 포도 및 상추의 구취억제 동결건조 소재의 각 소재별 재료비 내역은 Table 19와 같다. 원료 소재를 도매가격으로 구입하여 filter press를 이용하여 압착 및 여과과정을 거친 후 나오는 즙을 즉시 동결하여, 5% dextrin을 첨가하여 샘플이 원활하게 동결될 수 있도록 한다. 동결된 소재를 동결건조기를 이용하여 구취억제 소재를 제조하게 된다. 소재 제조시 가장 비용이 많이 들어가는 부분은 원료사과 구입비와, 동결건조 비용이다. 실제 판매시 원가부담을 줄이기 위해서는 특히 원료 과실류의 구입비용을 최소화 시키는 방안이 필요한데, 그러기 위해서는 제철에 일괄 구매 후 동결건조를 하여 원가 부담을 줄이는 방안이 필요하다.

구취억제 소재 가공사업의 재료비를 산정하여, 1 kg의 구취억제 소재를 제조하였을 때의 제조비를 산정하여 Table. 19에 나타내었다. 제조원가는 사과소재의 경우 kg 당 8,675원, 포도소재의 경우는 kg당 6,675원, 상추소재의 경우는 kg당 5,775원이 소요되었다. 이들 소재의 사진은 Fig. 26에 나타내었다.

Table 19. Price estimation of deodorizing materials from apples, grapes and lettuces

Section	Unit price (Won/kg)
Apple	4,400
Grape	2,400
Lettuce	1,500
Dextrin	1,500
Freeze drying	4,000
Filter press	100
Freezing	100



<Freeze dried powders of water solubles>



<Freeze dried powders of homogenates>



<Supercritical fluid extracts>

Fig. 26. Prototype deodorizing materials from apples (1), grapes (2) and lettuces (3).

제 7 절 구취억제 소재를 이용한 산업적 응용제품의 제조

1. 실험 방법 및 내용

가. 시제품 음료의 제조

제조된 구취억제 소재를 이용한 구취억제 음료를 제조하기 위한 배합비는 다음과 같다 (Table 20-22). 음료 형태는 액상차 형태의 음료로 제조하였다. 음료의 저장성을 부여하기 위해 ascorbic acid를 첨가하였으며, 음용시 점도가 중요한 영향을 미치기 때문에 maltodextrin을 첨가하였다. 또한, 감미의 부여를 위해 sorbitol을 첨가하여 시제품 음료를 제조하였다.

Table 20. Formulation of beverage products containing deodorizing material from apples and grapes

Ingredients		Formulation (g)			
Ascorbic acid	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Maltodextrin	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Sorbitol	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Deodorizing material	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
Water	86.8	85.8	84.8	83.8	82.8

Table 21. Formulation of beverage products containing deodorizing material from lettuces

Ingredients	Formulation (g)				
Ascorbic acid	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Maltodextrin	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Sorbitol	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Deodorizing material	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Water	88.7	88.6	88.5	88.4	88.3

Table 22. Formulation of beverage product containing deodorizing material from supercritical fluid extract

Ingredients	Formulation (g)				
Ascorbic acid	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Maltodextrin	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Sorbitol	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Deodorizing material	10.0	15.0	20.0	25.0	30.0
Water	78.8	73.8	68.8	63.8	58.8

나. 시제품 구강세정액의 제조

구취억제 소재를 이용하여 제조한 구강세정액의 배합비는 Table 23-25와 같다. 일반적으로 구강세정액은 액체 조성물은 알코올과 정제수부로 나눌 수 있으며, 습윤제로서 글리세린, 방부제로서 안식향산, 감미제로서 삭카린, 향료로서 멘톨, 구취관련 성분으로서 제조된 구취억제 소재를 고형분 함량을 계산하여 제조하였다.

Table 23. Formulation of mouth rinse product containing deodorizing material from apples and grapes

Ingredients	Formulation (g)				
Ethanol	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000
Glycerine	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
Benzoic acid	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Saccharine	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013
Menthol	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Deodorizing material	0.500	0.750	1.000	1.250	1.500
Water	19.937	19.687	19.437	19.187	18.937

Table 24. Formulation of mouth rinse product containing deodorizing material from lettuces

Ingredients	Formulation (g)				
Ethanol	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000
Glycerine	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
Benzoic acid	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Saccharine	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013
Menthol	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Deodorizing material	0.025	0.050	0.075	0.100	0.125
Water	20.412	20.387	20.362	20.337	20.312

Table 25. Formulation of mouth rinse product containing deodorizing materials from supercritical fluid extract

Ingredients	Formulation (g)				
Ethanol	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000
Glycerine	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
Benzoic acid	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Saccharine	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013
Menthol	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Deodorizing material	2.500	3.750	5.000	6.250	7.500
Water	17.937	16.687	15.437	14.187	12.937

다. 시제품 젤리의 제조

구취억제 소재를 이용한 젤리의 배합비는 Table 26-28과 같다. 젤리의 제조에는 장기간 보관해도 미생물이 잘 번식하지 않는 한천을 사용하였으며, 구취억제 소재는 물추출물을 동결건조하여 분말상태에서 사용하였다. 제조방법은 원료 소재인 한천을 끓는 물에 녹인 후, 물엿을 첨가하여 수분이 증발할 때 까지 1시간 중탕하여 가열하였다. 가열된 젤리가 굳기 전 구취억제 소재를 첨가한 후, 교반하면서 균질화시켜 틀에 넣고 25℃에서 3일간 성형하였다. 성형 후 오브라이트에 묻힌 상태로 70℃에서 24시간 동안 열풍건조하였다.

Table 26. Formulation of jelly product containing deodorizing material from apples and grapes

Ingredients	Formulation (g)				
Millet jelly	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Agar	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Deodorizing material	2.50	3.75	5.00	6.25	7.50
Water	21.00	19.75	18.50	17.25	16.00

Table 27. Formulation of jelly product containing deodorizing material from lettuces

Ingredients	Formulation (g)				
Millet jelly	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Agar	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Deodorizing material	0.13	0.25	0.38	0.50	0.63
Water	23.37	23.25	23.12	23.00	22.87

Table 28. Formulation of jelly product containing deodorizing material from supercritical fluid extract

Ingredients		Formulation (g)			
Millet jelly	100.0	100.0	100.00	100.0	100.0
Agar	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Deodorizing material	15.0	22.5	30.0	37.5	45.0
Water	33.5	26.0	18.5	11.0	3.5

라. 시제품 캔디의 제조

구취억제 소재를 이용한 사탕의 제조방법은 Table 29-31과 같다. 설탕을 증류수에 녹여 동량의 물엿과 혼합하여 졸여질 때 까지 가열하였다. 가열 후 졸여진 사탕 소재가 굳어지기 전 구취억제 소재를 첨가한 후, 균질화시켜 틀에 성형한 후 굳혀 캔디를 제조하였다.

Table 29. Formulation of candy product containing deodorizing material from apples and grapes

Ingredients		Formulation (g)			
Millet jelly	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Sugar	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Deodorizing material	1.4	2.1	2.8	3.5	4.2
Water	18.6	17.9	17.2	16.5	15.8

Table 30. Formulation of candy product containing deodorizing material from lettuces

Ingredients	Formulation (g)				
Millet jelly	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Sugar	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Deodorizing material	0.07	0.14	0.21	0.28	0.35
Water	19.93	19.86	19.79	19.72	19.65

Table 31. Formulation of candy product containing deodorizing material from supercritical fluid extract

Ingredients	Formulation (g)				
Millet jelly	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Sugar	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Deodorizing material	9.0	13.5	18.0	22.5	27.0
Water	31.0	26.5	22.0	17.5	13.0

마. 구취억제 활성의 측정

구취억제 활성의 측정은 제 1 절 가항의 조건으로 측정하였으며, 캔디는 잘게 분쇄한 후 60℃에서 증탕하여 완충용액과 함께 녹인 후, methyl mercaptan을 첨가하여 구취억제 활성을 측정하였으며, 젤리는 ultrasonic homogenizer (Bandelin, Germany)를 이용하여 젤리를 완전히 균질화시킨 후, 구취표준물질을 첨가하여 구취억제 활성을 측정하였다. 음료 및 구강세정액은 액체이므로 위의 과정을 거치지 않고 1 mL씩을 vial에 넣어 구취억제 활성을 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 시제품 음료의 구취억제 활성

1) pH 에 따른 구취억제 활성의 측정

구취억제 효과가 높은 음료의 제조를 위하여 pH의 조절이 필요한지 알아보기 위하여 제조된 음료의 pH별 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 27에 나타내었다. pH를 조절하지 않은 원 소재의 pH는 5.0이었는데 실험결과 pH를 조절하지 않은 실험구에서 구취억제 활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 구취억제 효과가 높은 음료를 제조하기 위해서는 pH의 조절 과정이 없이 추출물 자체의 pH를 사용할 수 있다.

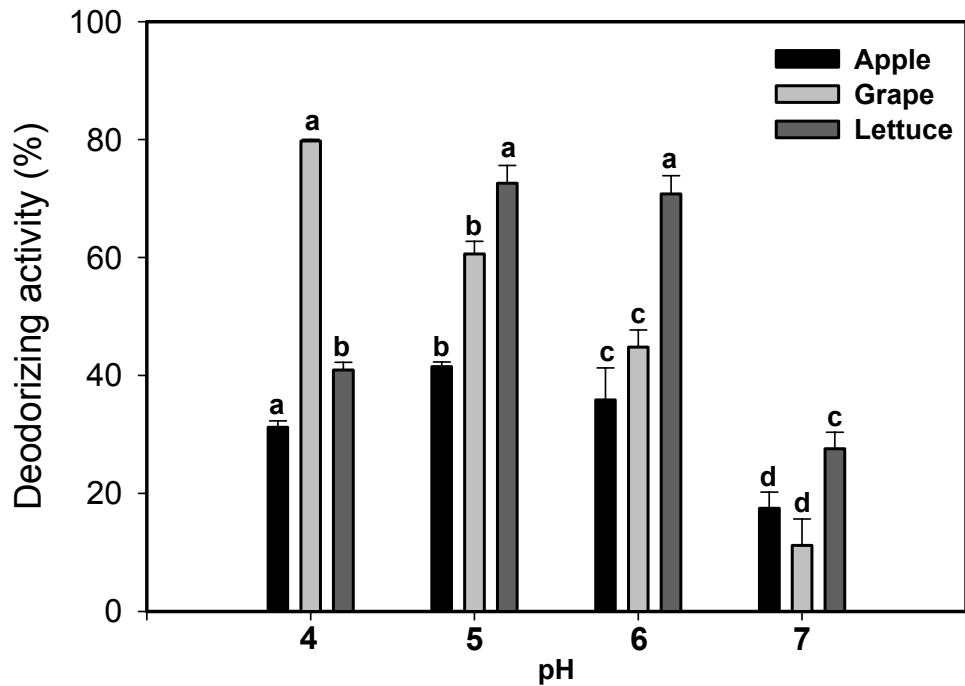


Fig. 27. Effect of pH on deodorizing activities against methyl mercaptan of prototype beverages using deodorizing materials from apples, grapes and lettuces.

2) Water soluble의 첨가량별 시제품 음료의 구취억제 활성

첨가량이 높을수록 구취억제 활성은 높아지는 일반적인 경향을 토대로 하여, 첨가량에 대한 사과, 포도 및 상추 음료의 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 28-29에 나타내었다. 실험결과에서도 첨가량이 커질수록 구취억제 활성은 증가하는 경향을 나타내었다. 사과와 포도는 60 mg/mL, 상추의 경우는 5 mg/mL 첨가 기준으로 하였을 때, water soluble의 경우는 사과에서 31.2%, 포도에서 79.8%, 상추에서 84.0%의 구취억제 효과가 나타났다.

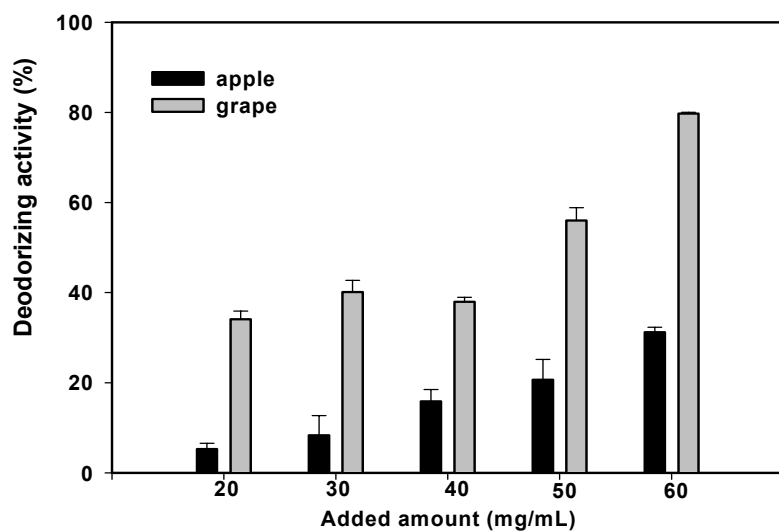


Fig. 28. Deodorizing activities against methyl mercaptan of prototype beverages using deodorizing materials from water solubles of apples and grapes.

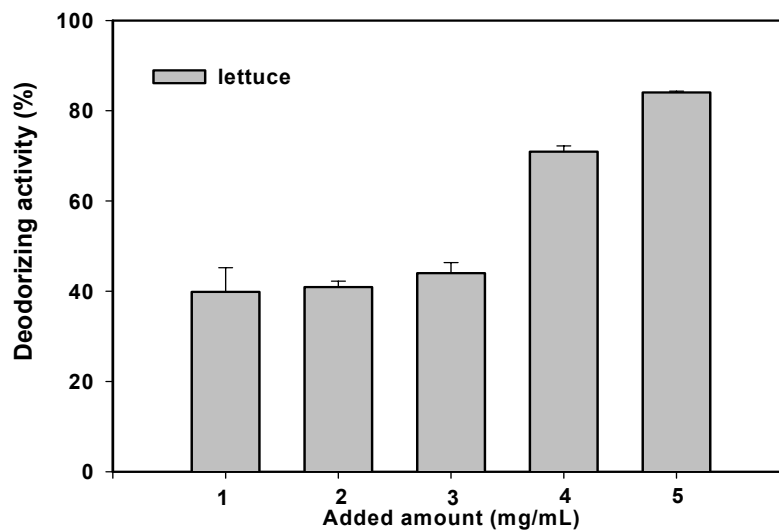


Fig. 29. Deodorizing activities against methyl mercaptan of prototype beverage using deodorizing material from water solubles of lettuces.

3) Ethanol soluble의 첨가량별 시제품 음료의 구취억제 활성

Water soluble과 동일하게 구취억제 활성이 높게 나타난 ethanol soluble을 동결 건조하여 구취억제 활성을 측정하였다 (Fig. 30). 사과와 포도는 60 mg/mL, 상추의 경우는 5 mg/mL 첨가 기준으로 하였을 때, ethanol soluble의 경우는 사과에서 70.2%, 포도에서 75.0%, 상추에서 54.0%였다. Ethanol soluble은 water soluble보다 수율이 떨어지고, 용매의 구입에 비용이 많이 드는 단점이 있다.

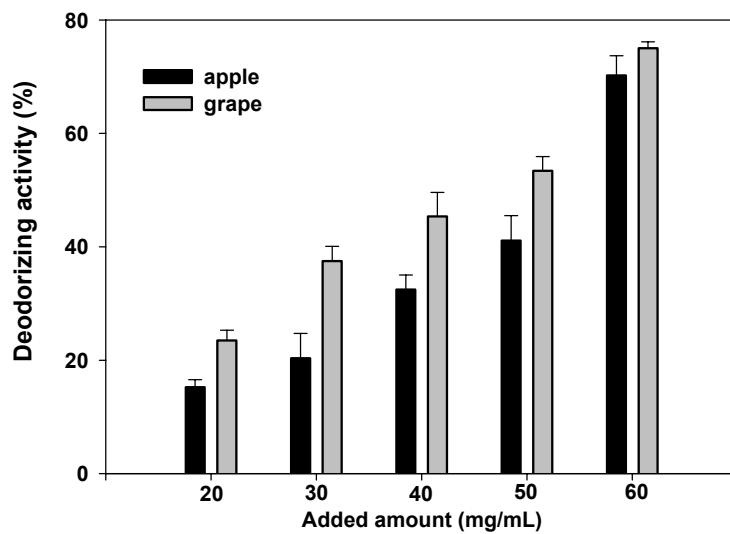


Fig. 30. Deodorizing activities against methyl mercaptan of prototype beverages using deodorizing material from ethanol solubles of apples and grapes.

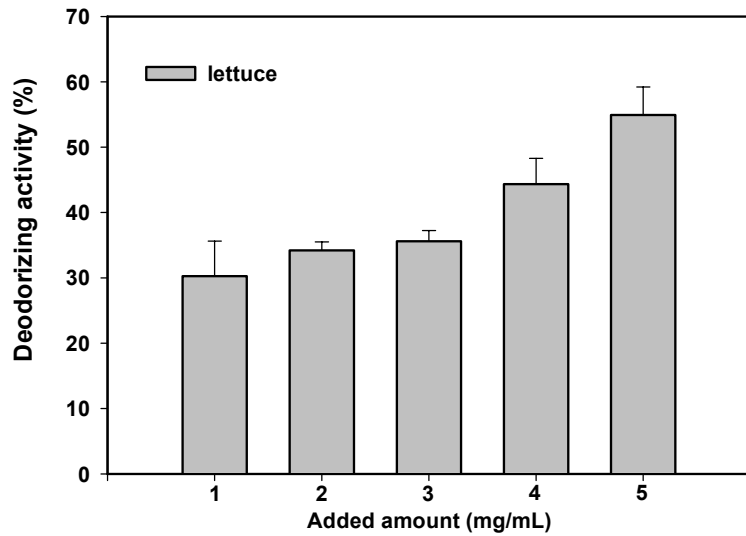


Fig. 31. Deodorizing activities against methyl mercaptan of prototype beverage using deodorizing material from ethanol solubles of lettuces.

4) 초임계 추출물의 첨가량별 시제품 음료의 구취억제 활성

산업적으로 이용되는 여러 추출조건 중 최근 기능성 신물질의 추출에 많이 이용되고 있는 초임계 추출법을 이용하여 제조한 시제품의 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 32 에 나타내었다. 실험결과 %함량이 높을수록 구취억제 활성은 높아지는 경향을 보였으며, 초임계 추출물의 경우, 30% 첨가하였을 때, 사과에서 75.8%, 포도에서 77.3%, 상추에서 77.1%의 구취억제 활성을 나타내었다. 초임계 추출물은 활성은 높으나 수율이 다른 추출물에 비하여 극히 낮은 단점이 있다.

이상에서와 같이 각 추출 조건에서 제조한 시제품 음료의 사진을 Fig. 33에 나타내었다.

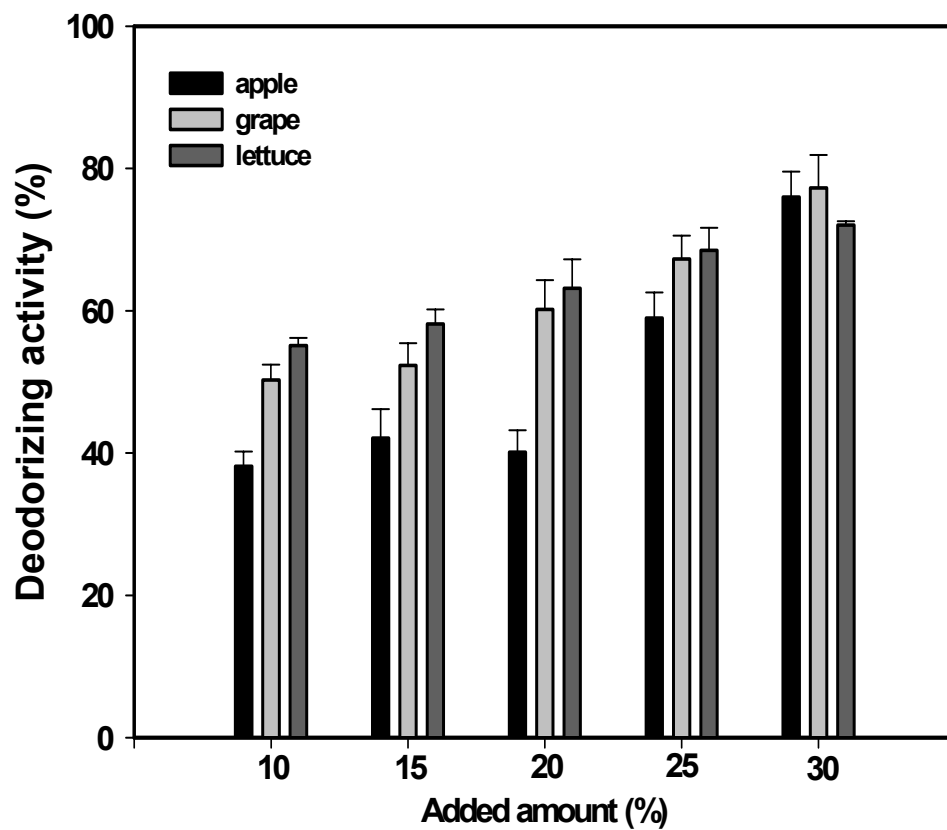


Fig. 32. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype beverages using deodorizing material from supercritical fluid extracts of apples, grapes and lettuces.



<Apple>



<Grape>



<Lettuce>

Fig. 33. Prototype beverages from water solubles (A), ethanol solubles (B) and supercritical fluid extracts (C).

나. 시제품 구강세정액의 구취억제활성

1) Water soluble의 첨가량별 시제품 구강세정액의 구취억제 활성

구강세정액은 구취억제 소재 함유량을 %농도로 계산하여 제조하였으며, 각각의 농도에 대한 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 34-35에 나타내었다. 사과와 포도 소재는 60 mg/mL, 상추의 경우는 5 mg/mL 첨가하여 시제품 구강세정액을 제조하였을 때, water soluble의 경우, 구취억제 활성은 사과에서 60.0%, 포도에서 56.2%, 상추에서 38.6%로 나타났다. 실험결과에서 사과의 경우는 농도에 따른 구취억제 활성의 유의차는 없는 것으로 나타났으며, 포도 및 상추의 경우는 농도가 높아질수록 구취억제 활성은 증가하는 경향을 나타내었다.

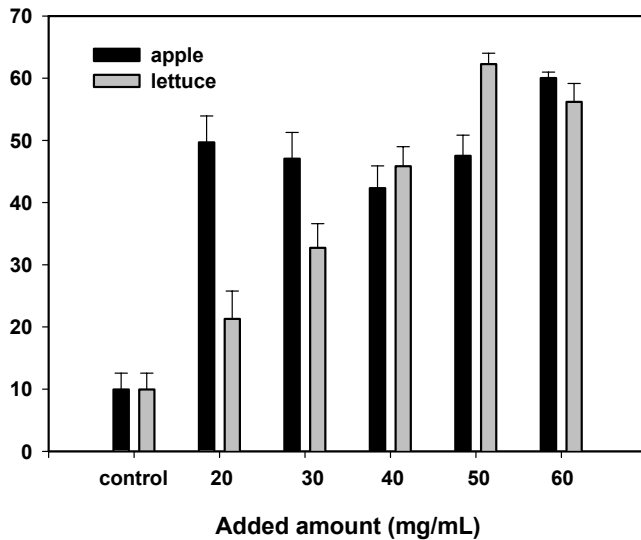


Fig. 34. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype mouth rinses using deodorizing material from water solubles of apples and grapes.

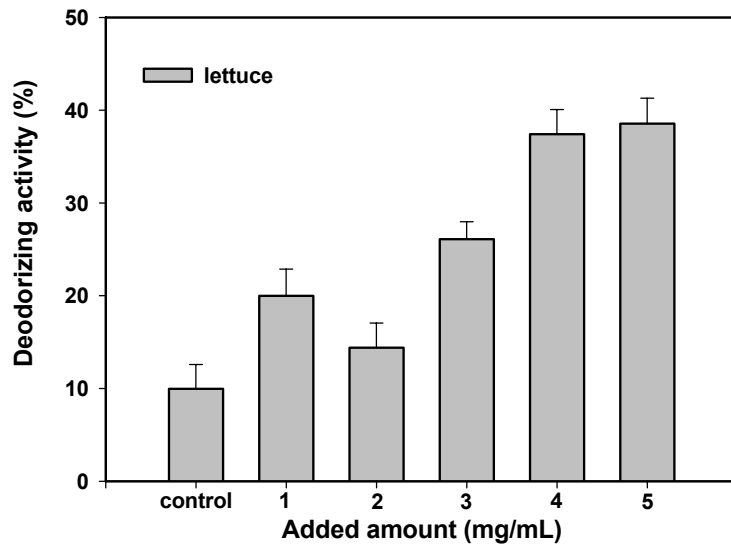


Fig. 35. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype mouth rinse using deodorizing material from water solubles of lettuces.

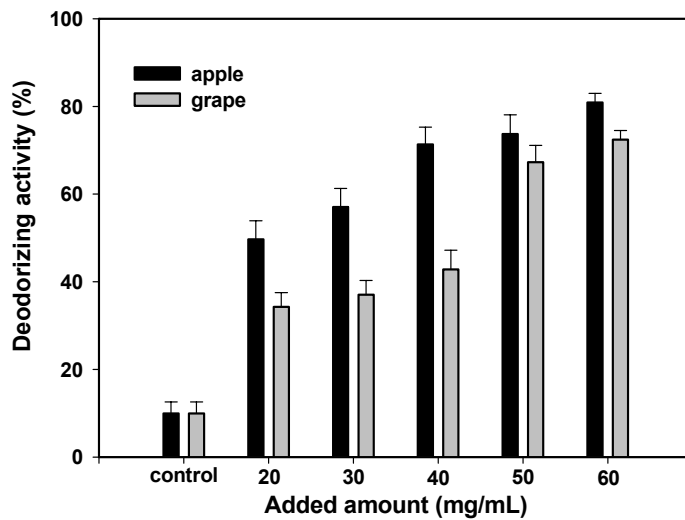


Fig. 36. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype mouth rinses using deodorizing material from ethanol solubles of apples and grapes.

2) Ethanol soluble의 첨가량별 시제품 구강세정액의 구취억제 활성

Ethanol soluble을 이용하여 조제한 구강세정액의 구취억제활성을 Fig. 36-37 에 나타내었다. 사과와 포도 소재는 60 mg/mL, 상추의 경우는 5 mg/mL 첨가하여 시제품 구강세정액을 제조하였을 때, ethanol soluble을 사용한 경우, 시제품의 구취억제 활성은 사과에서 70.24%, 포도에서 75.01%, 상추에서 54.92%로 나타났다.

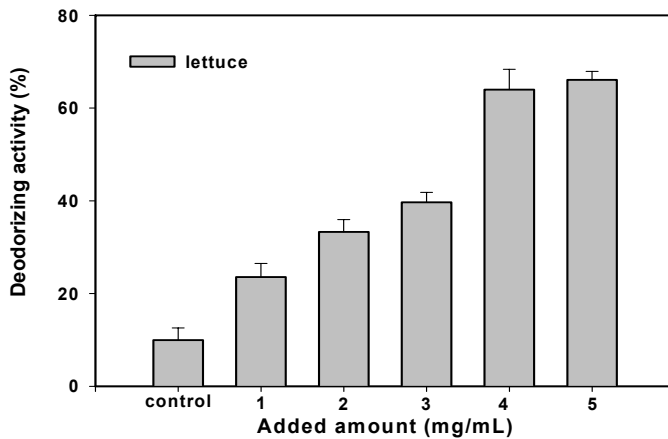


Fig. 37. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype mouth rinse using deodorizing material from ethanol solubles of lettuces.

3) 초임계 추출물 첨가량별 구강세정액의 구취억제 활성

초임계 추출물을 첨가한 구강세정액의 구취억제활성은 초임계추출물의 경우에 30% 첨가하였을 때, 사과에서 42.4%, 포도에서 52.0%, 상추에서 49.4%로 나타났다. 초임계 추출물은 water soluble 및 ethanol soluble보다 대체적으로 낮은 구취억제 활성을 유지하였다 (Fig. 38).

이상에서와 같이 각 추출 조건에서 제조한 시제품 구강세정액의 사진을 Fig. 39 에 나타내었다.

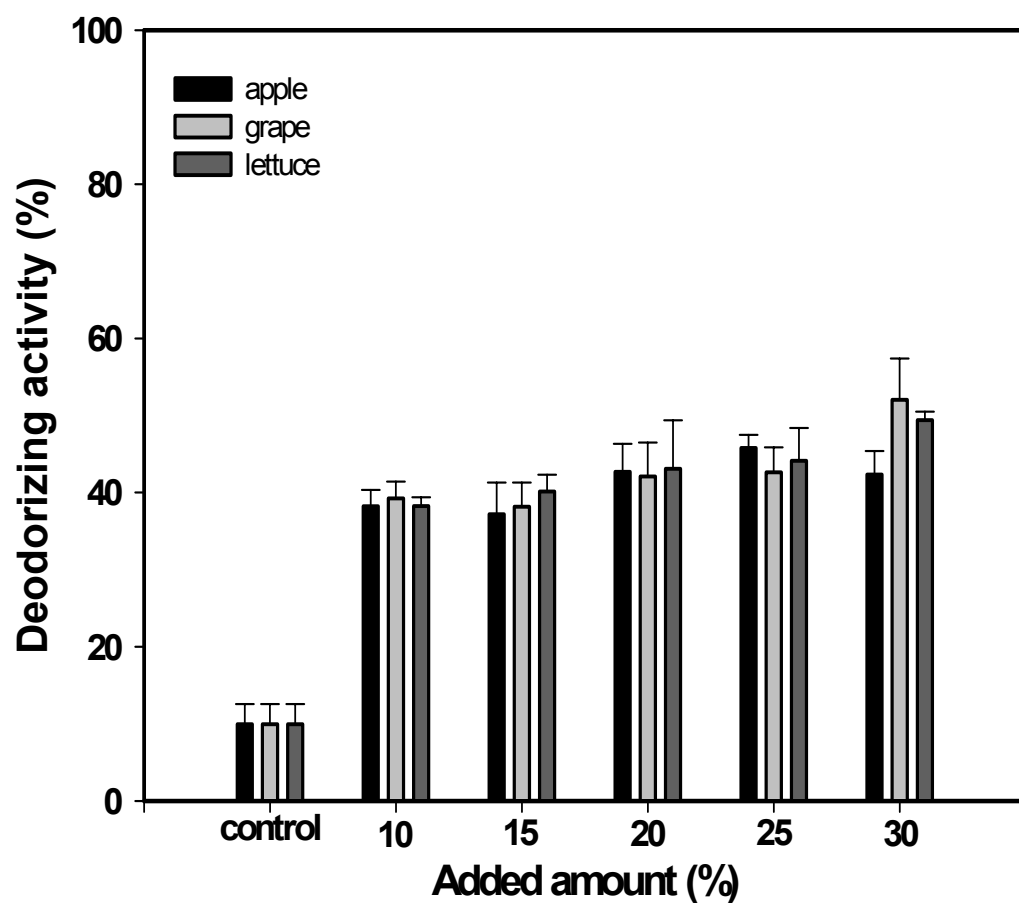


Fig. 38. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype mouth rinses using deodorizing material from supercritical fluid extracts of lettuces.



<Apple>



<Grape>



<Lettuce>

Fig. 39. Prototype mouth rinses from water solubles (A), ethanol solubles (B) and supercritical fluid extracts (C) of apples, grapes and lettuces.

다. 시제품 젤리의 구취억제 활성

1) Water soluble의 첨가량별 시제품 젤리의 구취억제 활성

Water soluble을 이용하여 젤리를 제조한 후, ultrasonic homogenizer를 이용하여 젤리를 균질화시켜 구취억제활성을 측정하여 Fig. 40-41 에 나타내었다. 사과와 포도 소재는 60 mg/g, 상추의 경우는 5 mg/g 첨가하여 시제품 젤리를 제조하여 구취억제 활성을 측정한 결과, water soluble의 경우, 시제품의 구취억제 활성은 사과에서 30.36%, 포도에서 19.18%, 상추에서 32.51%로 나타났다. 실험결과에서 첨가량이 높을수록 구취억제활성은 증가하는 경향을 보였지만, 대체적으로 낮은 구취억제 활성을 나타내었다. 젤리의 구취억제활성이 낮게 측정된 것은 제조과정에서 건조시키기 위하여 열풍건조를 하게 되는데, 이 과정에서 polyphenol oxidase의 실활 및 phenol의 산화에 의해 변화되었기 때문으로 판단된다.

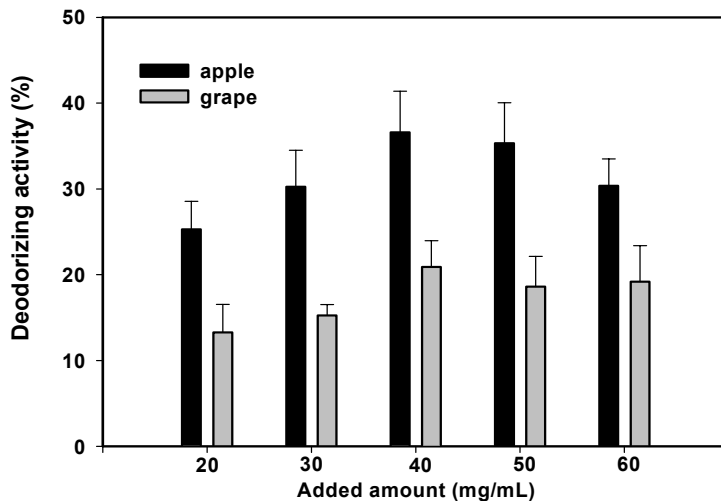


Fig. 40. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype jelly using deodorizing material from water solubles of apples and grapes.

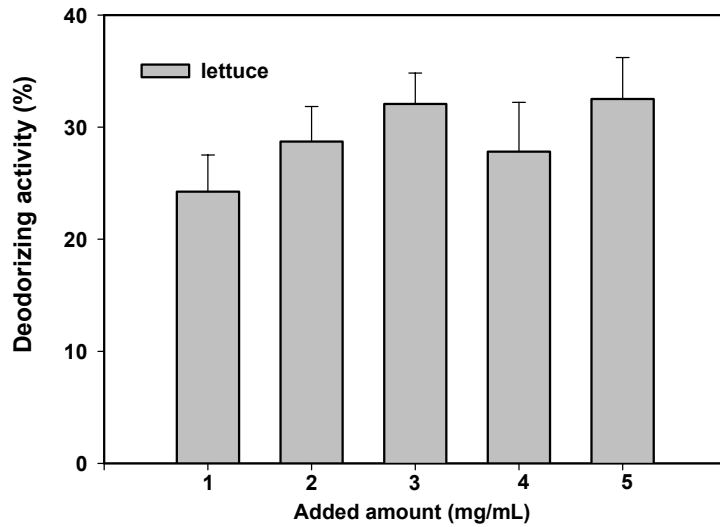


Fig. 41. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype jelly using deodorizing material from water solubles of lettuces.

2) Ethanol soluble의 첨가량별 시제품 젤리의 구취억제활성

Ethanol soluble을 이용하여 젤리를 제조한 후, 구취억제소재 첨가량별 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 42-43에 나타내었다. 사과와 포도 소재는 60 mg/g, 상추의 경우는 5 mg/g 첨가하여 시제품 젤리를 제조하여 구취억제 활성을 측정한 결과, ethanol soluble를 사용한 경우에 시제품의 구취억제 활성은 사과에서 36.26%, 포도에서 35.70%, 상추에서 20.87%로 나타났다. 실험결과에서 앞서 실험한 water soluble 과 마찬가지로 대체적으로 낮은 구취억제 활성을 나타내었다.

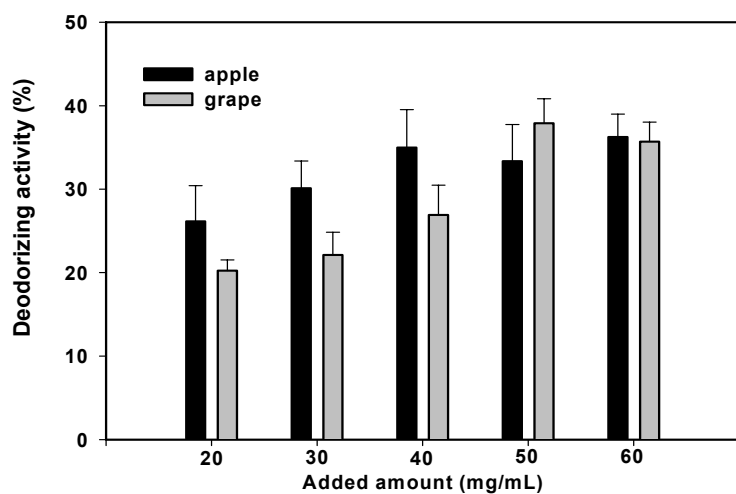


Fig. 42. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype jelly using deodorizing material from ethanol solubles of apples and grapes.

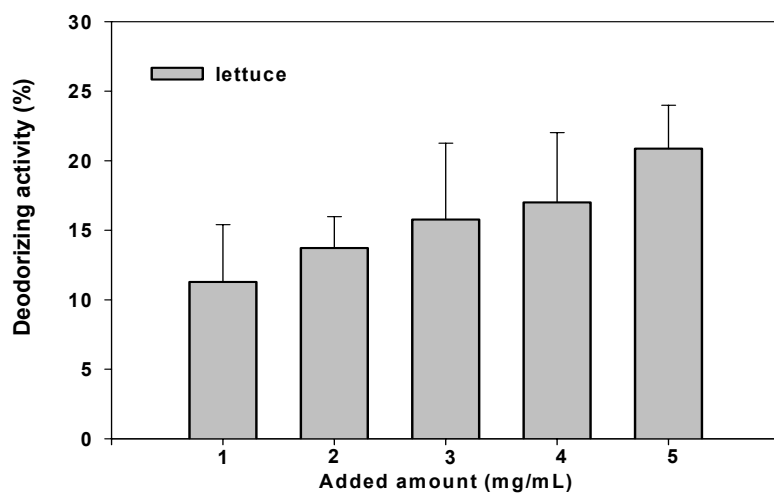


Fig. 43. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype jelly using deodorizing material from ethanol solubles of lettuces.

3) 초임계 추출물의 첨가량별 시제품 젤리의 구취억제활성

초임계 추출물을 이용하여 젤리를 제조하여 첨가량별 구취억제활성을 측정하여 Fig. 44에 나타내었다. 초임계추출물의 경우에 30% 첨가하였을 때, 시제품의 구취억제활성은 사과에서 47.4%, 포도에서 44.4%, 상추에서 33.6%로 나타났다.

이상에서와 같이 각 추출 조건에서 제조한 시제품 젤리의 사진을 Fig. 45에 나타내었다.

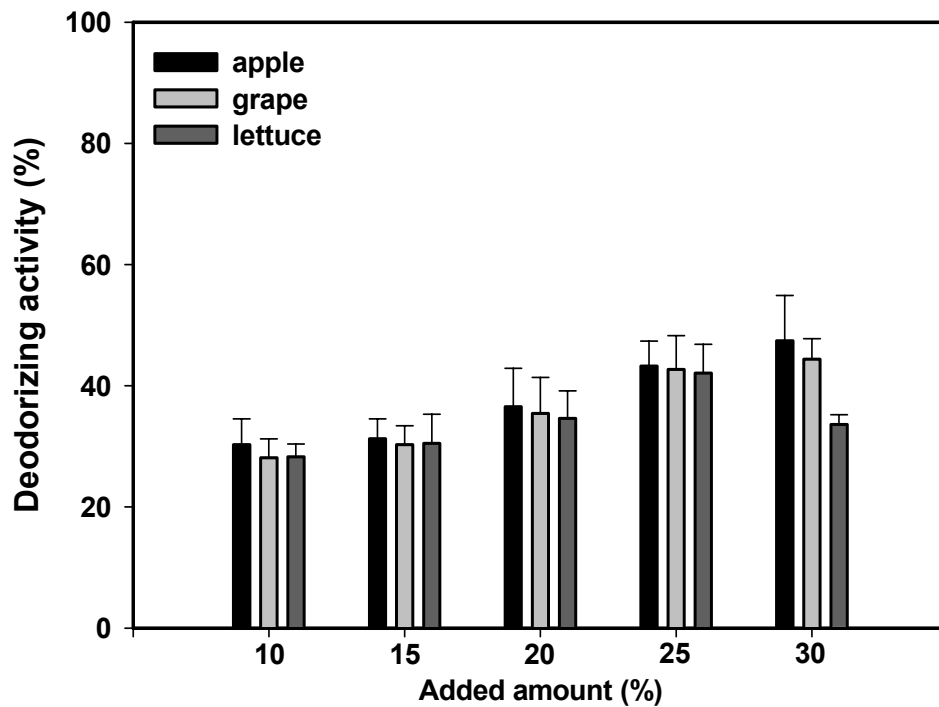
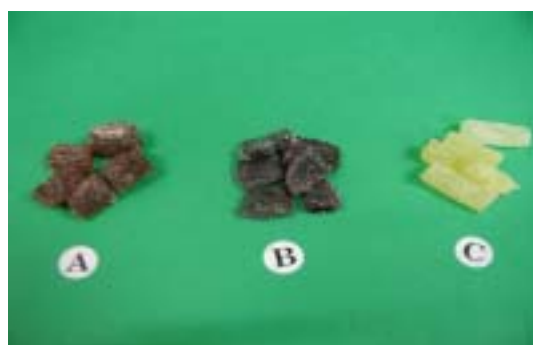


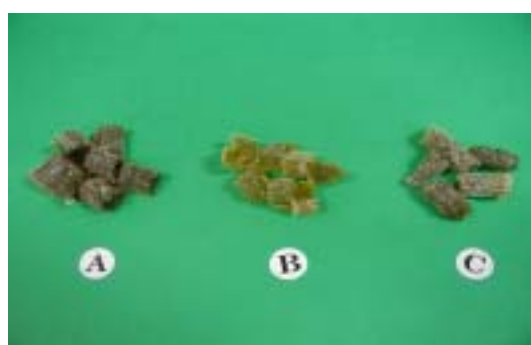
Fig. 44. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype jelly using deodorizing material from supercritical fluid extracts of apples, grapes and lettuces.



<Apple>



<Grape>



<Lettuce>

Fig. 45. Prototype jellies from water solubles (A), ethanol solubles (B), supercritical fluid extracts (C) of apples, grapes and lettuces.

라. 시제품 캔디의 구취억제 활성

1) Water soluble의 첨가량별 시제품 캔디의 구취억제 활성

동결건조소재를 이용하여 캔디를 제조한 후, 각각의 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 46 -47에 나타내었다. 사과와 포도 소재는 60 mg/g, 상추의 경우는 5 mg/g 첨가하여 시제품 캔디를 제조하여 구취억제 활성을 측정한 결과, water soluble의 경우, 시제품의 구취억제 활성은 사과에서 76.87%, 포도에서 78.01%, 상추에서 68.79%로 나타났다. 실험결과에서 첨가량이 높아질수록 구취억제 활성은 점차적으로 높아지는 경향을 나타내었으며, 구취억제활성은 이전의 젤리보다 높은 결과를 보였다.

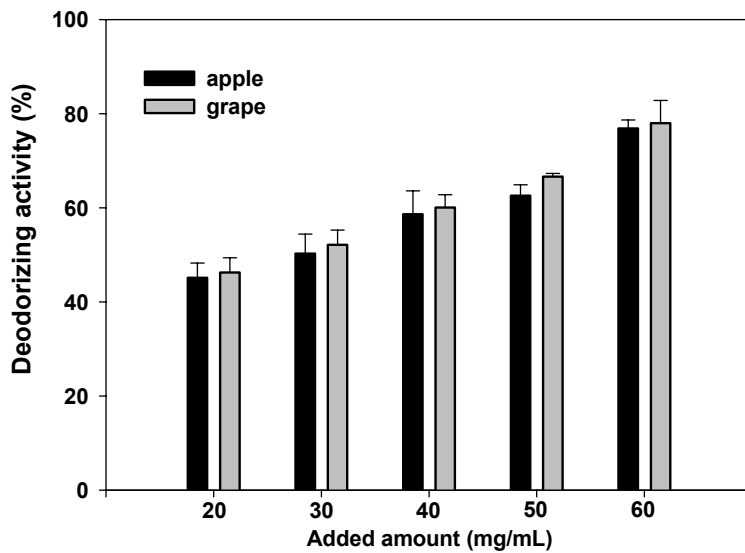


Fig. 46. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype candy using deodorizing material from water solubles of apples and grapes.

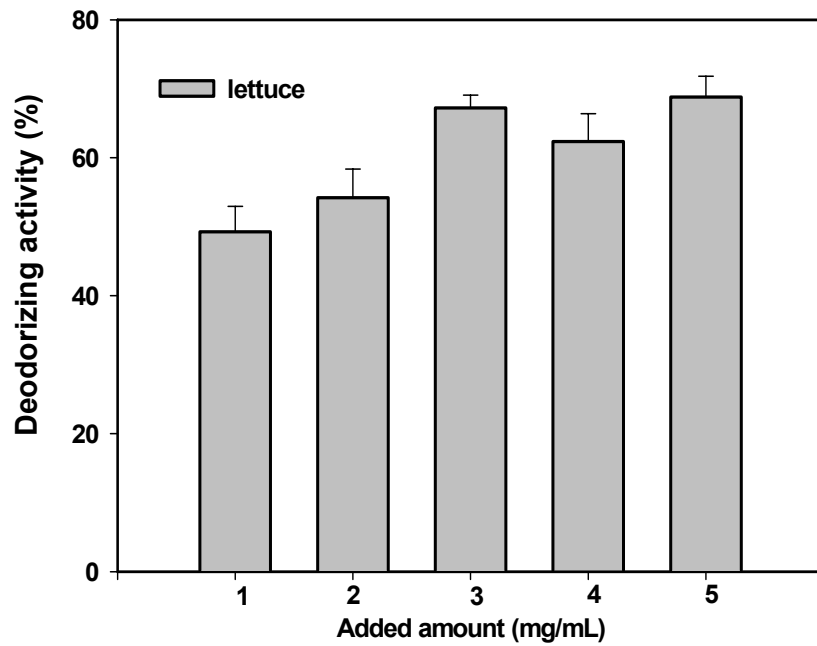


Fig. 47. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype candy using deodorizing material from water solubles of lettuces.

2) Ethanol soluble의 첨가량별 시제품 캔디의 구취억제활성

Ethanol soluble을 이용하여 제조한 캔디의 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 48-49 에 나타내었다. 사과와 포도 소재는 60 mg/g, 상추의 경우는 5 mg/g 첨가하여 시제품 캔디를 제조하여 구취억제 활성을 측정한 결과, ethanol soluble를 사용한 경우에 시제품의 구취억제 활성은 사과에서 63.6%, 포도에서 76.4%, 상추에서 45.6%로 나타났다. 실험결과에서 water soluble보다는 대체적으로 낮은 구취억제 활성을 나타내었다.

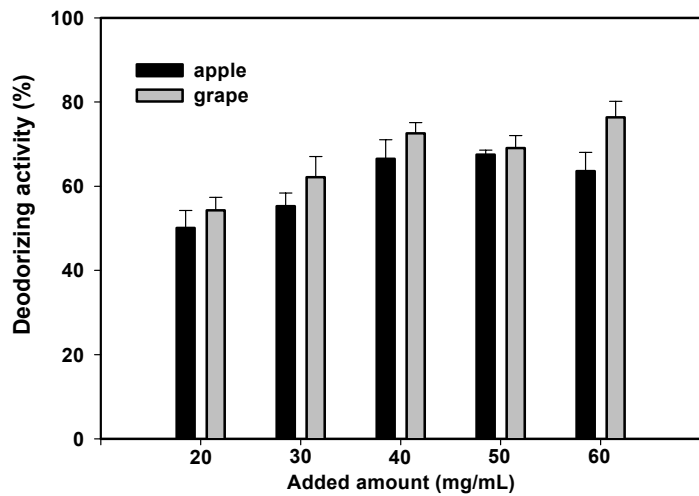


Fig. 48. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype candy using deodorizing material from ethanol solubles of apples and grapes.

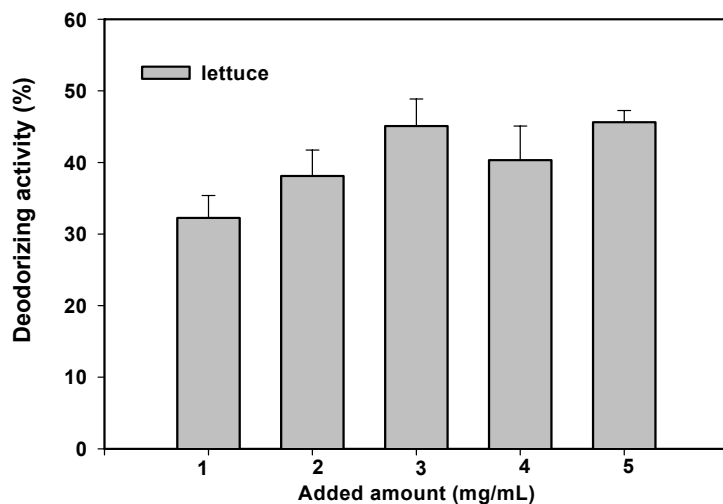


Fig. 49. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype candy using deodorizing material from ethanol solubles of lettuces.

3) 초임계 추출물의 첨가량별 시제품 캔디의 구취억제활성

초임계 추출물을 이용하여 캔디를 제조하여 구취억제소재의 첨가량별 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 50에 나타내었다. 초임계추출물의 경우, 30% 첨가하였을 때, 시제품의 구취억제활성은 사과에서 37.39%, 포도에서 59.89%, 상추에서 16.71%로 나타났다.

이상에서와 같이 각 추출 조건에서 제조한 시제품 젤리의 사진을 Fig. 51에 나타내었다.

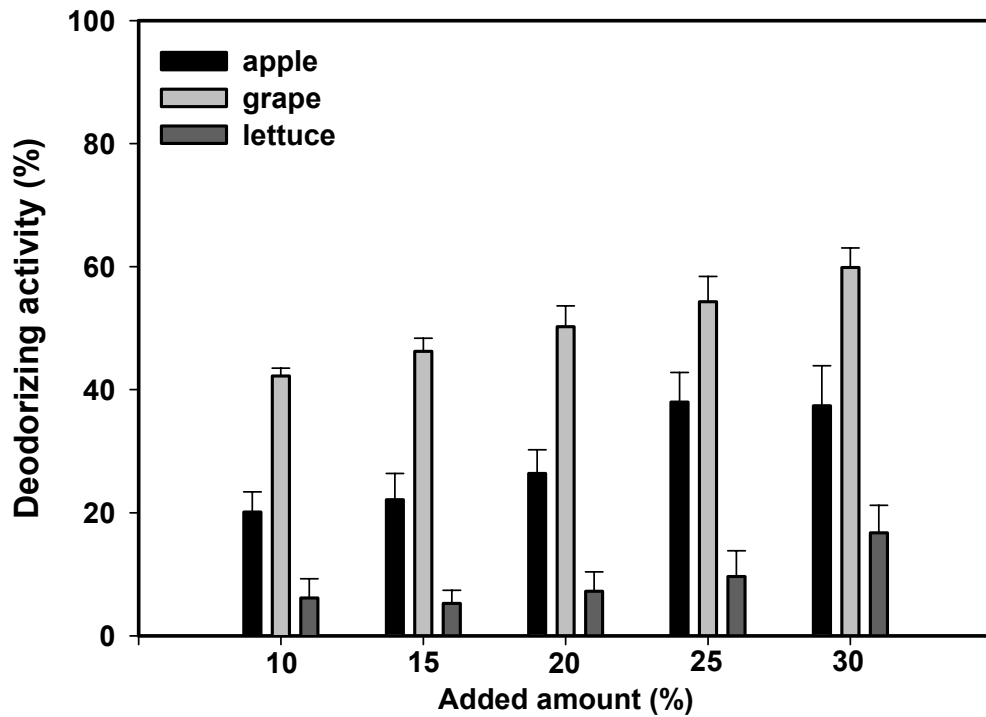


Fig. 50. Deodorizing activity against methyl mercaptan of prototype candy using deodorizing material from supercritical fluid extract of apples, grapes and lettuces.



<Apple>



<Grape>



<Lettuce>

Fig. 51. Prototype candies from water solubles (A), ethanol solubles (B) and supercritical fluid extract (C) of apples, grapes and lettuces.

3. 시제품의 경제성 분석

가. 구취억제 음료의 경제성 분석

구취억제 소재를 이용한 음료의 생산에 소요되는 주재료의 단가는 Table 32와 같다. 구취억제 소재 제조 단가와 음료 제조에 소요되는 첨가물의 단가로부터 음료 제조에 소요되는 경비를 계산해 보면, 사과와 포도의 경우 1,033원, 상추의 경우 542원으로 나타났다 (Table 33). 시중에 판매되는 기능성 음료의 가격은 대개 100 mL 당 500-1,500원 정도이므로 본 시제품은 100 mL로 환산해 보면 50-100원 수준이므로 노무비와 인건비를 감안하더라도 경제성이 있다고 판단된다.

Table 32. Cost estimation for beverage processing with deodorizing activity

Material	Unit price (Won/kg)	Amount (kg)	Cost (Won/kg)
Deodorizing material from apple	8,675	0.06	520.5
Deodorizing material from grape	6,675	0.06	400.5
Deodorizing material from lettuce	5,775	0.005	28.875
Ascorbic acid	18,600	0.02	372
Maltodextrin	1,500	0.06	90
Sorbitol	850	0.05	42.5
Water	10	0.82	8.2

Table 33. Cost estimation of prototype beverages with deodorizing activity

Products	Unit price (Won/kg)
Apple beverage	1033.2
Grape beverage	913.2
Lettuce beverage	541.58

나. 구취억제 구강세정액의 경제성 분석

구취억제 소재를 이용한 구강세정액의 생산에 소요되는 주재료의 단가는 Table 34와 같다. 구취억제 소재 제조 단가와 구강세정액 제조에 소요되는 첨가물의 단가로부터 구강세정액의 제조에 소요되는 경비를 계산해 보면, 실제 구강세정액 제품에서 판매되는 양인 250 mL를 기준으로 할 때 사과 유래의 구강세정액은 363.75원이었으며, 포도는 333.98원 그리고 상추는 241.07원으로 계산되었다 (Table 35). 이는 실제 판매되고 있는 구강세정액의 가격인 2,000원의 약 15% 수준에 불과하므로 경제성이 있다고 판단되어진다.

Table 34. Cost estimation for processing of prototype mouth rinse with deodorizing activity

Material	Unit price (Won/kg)	Amount (kg)	Cost (Won/kg)
Deodorizing material from apple	8,675	0.06	520.5
Deodorizing material from grape	6,675	0.06	400.5
Deodorizing material from lettuce	5,775	0.005	28.875
Ethanol	5,000	0.16	800
Glycerine	3,700	0.02	74
Benzoic acid	1,500	0.001	1.5
Saccharine	8,600	0.0052	44.72
Menthol	7,600	0.001	7.6
Water	10	0.758	7.58

Table 35. Cost estimation for processing of prototype mouth rinse with deodorizing activity

Products	Unit price(kg)	Cost(Won/250 ml)
Apple mouth rinse	1455.9	363.75
Grape mouth rinse	1335.9	333.98
Lettuce mouth rinse	964.28	241.07

다. 구취억제 젤리의 경제성 분석

구취억제 소재를 이용한 젤리의 생산에 소요되는 주재료의 단가는 Table 36와 같다. 구취억제 소재 제조 단가와 젤리 제조에 소요되는 첨가물의 단가로부터 젤리의 제조에 소요되는 경비를 계산해 보면, 사과젤리의 원가는 1,501.8원이었으며, 포도젤리는 1,381.78원 그리고 상추음료는 1,010.16원으로 계산되었다 (Table 37). 이는 실제 판매되고 있는 젤리의 가격인 7,000원의 약 20% 의 가격으로써 충분히 경제성이 있다고 판단되어진다. 그러나 젤리 제품은 다른 제품과는 달리 구취억제 활성이 낮아 구취억제 활성을 높이기 위한 보완 연구가 필요하다.

Table 36. Cost estimation of prototype jelly processing with deodorizing activity

Material	Unit price (Won/kg)	Amount (kg)	Cost (Won/kg)
Deodorizing material from apple	8,675	0.06	520.5
Deodorizing material from grape	6,675	0.06	400.5
Deodorizing material from lettuce	5,775	0.005	28.9
Millet jelly	850	0.8	680
Agar	25,000	0.012	300
Water	10	0.128	1.28

Table 37. Cost estimation for prototype jelly with deodorizing activity

Products	Cost (Won/kg)
Apple jelly	1,501.80
Grape jelly	1,381.78
Lettuce jelly	1,010.16

라. 구취억제 캔디의 경제성 분석

구취억제 소재를 이용한 캔디의 생산에 소요되는 주재료의 단가는 Table 38와 같다. 구취억제 소재 제조 단가와 캔디 제조에 소요되는 첨가물의 단가로부터 캔디의 제조에 소요되는 경비를 계산해 보면, 실제 캔디 제품에서 판매되는 양인 300g을 기준으로 할 때 사과젤리의 원가는 332.55원이었으며, 포도젤리는 296.55원 그리고 상추음료는 185.07원으로 계산되었다 (Table 39). 이는 실제 판매되고 있는 젤리의 가격인 4,000원의 약 10%의 가격으로써 충분히 경제성이 있다고 판단되어진다.

Table 38. Cost estimation of prototype candy processing with deodorizing activity

Material	Unit price (Won/kg)	Amount (kg)	Cost (Won/kg)
Deodorizing material from apple	8,675	0.06	520.5
Deodorizing material from grape	6,675	0.06	400.5
Deodorizing material from lettuce	5,775	0.005	28.875
Millet jelly	850	0.355	301.75
Sugar	800	0.355	284
Water	10	0.226	2.26

Table 39. Cost estimation for prototype candy with deodorizing activity

Products	Cost (Won/kg)
Apple candy	1108.51
Grape candy	988.51
Lettuce candy	616.89

제 2 세부과제

구취억제 관여 효소의 특성 해석

주관연구기관명 : 부경대학교

세부연구책임자 : 이 양 봉

연 구 원 : 장 해 진

연 구 원 : 허 민 수

제 8 절 구취 억제 관여 효소의 정제

1. 실험방법 및 내용

가. 조효소액 추출

각 시료과일을 100 g의 무게를 달아 waring blender (HMF-340, Hanil, Korea)에 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)를 100 mL 첨가하여 5분간 균질시킨 후, 30분간 방치하고 4°C에서 냉동원심분리기 (SUPRA 30-K, Hanil, Korea)를 이용하여 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소 추출액으로 하여 실험에 사용하였다.

나. 단백질 정량

단백질의 정량은 bovine serum albumin 표준 단백질을 사용하여 Lowry법으로 측정하였다. 단백질 용액에 증류수를 첨가하여 1 mL가 되게 한 후 Lowry 반응용액을 1 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 반응을 시킨다. Folin & ciocalteu's phenol 반응용액 0.5 mL를 첨가한 후, 30분간 발색시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 표준용액으로 만든 검량선과 비교하여 단백질을 정량하였다.

다. Ammonium sulfate에 의한 분획

Polyphenol oxidase 조효소액에 ammonium sulfate를 25%~75%의 포화도로 천천히 교반하면서 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 방치시켜 단백질을 석출시켰다. 석출된 단백질을 10,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)에 현탁시켜 40배의 동일 buffer에서 투석막 (MW cut-off: 12,000 supelco, USA)을 이용하여 하룻밤동안 buffer를 교환하면서 투석을 행하였다.

라. Gel chromatography

투석을 거친 조효소액을 분자량별로 분리시키기 위해 겔 크로마토그래피를 행하였고 조건은 다음과 같다. 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.4)로 미리 평형화시킨 Sephacryl S-200 HR gel filtration column (2.6×100 cm; Pharmacia Biotech, USA)에 단백질용액을 loading하여 동일 완충용액으로 시간당 25 mL/hr의 유속으로 용출시켰고, 1획분당 분획량은 10 mL로 하였다.

마. Ion-exchange chromatography

겔 크로마토그래피로 정제한 분획 중 활성이 높은 분획들을 모아 농축한 효소액을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 미리 평형화시킨 DEAE Sepharose fast flow ion-exchange column (1.6×40 cm; Pharmacia Biotech, USA)에 loading하여 NaCl을 0 M에서 0.5 M까지 농도구배를 만들어 1.0 mL/min의 유속으로 조효소액을 용출시켰고, NaCl의 농도당 25개의 획분을 받았으며 분획량은 10 mL로 하였다. 정제 후 나온 획분들 중 활성이 높은 획분들을 합쳐 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)내에서 투석하여 효소액을 얻을 수 있었다.

바. 전기영동 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법으로 100 V의 정전압에서 실시하였다. 분리 gel은 7.5% gel을 사용하였고, 고정 gel은 5%의 gel을 사용하였으며, 1회 주입량은 20 μ L로 하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 사과로부터 polyphenol oxidase의 정제

사과에서 polyphenol oxidase를 정제하여 다음과 같이 나타내었다 (Table 40). 먼저 ammonium sulfate는 25~75%의 용해도에서 효소의 활성을 확인할 수 있었다. 0~25% 와 75~100%의 포화도에서는 효소의 활성이 나타나지 않았다. Sephacryl S-200 HR column과 DEAE Sephacel 이온수지를 통과한 결과 total activity는

66,700 unit/mL의 결과를 얻었으며, specific activity는 최종 정제를 거친 후 176.5 unit/mg로 나타났다. 전체 단백질 함량은 2,200 mg에서 최종정제를 거친 후 68 mg으로 나타났다. 수율은 18%로 나타났으며, 5.83의 purification fold를 얻었다.

Table 40. Stepwise purification results of polyphenol oxidase of apples

Step	Total activity (unit/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	66,700	2,200	30.3	1.0	100.0
Ammonium sulfate (25-75%) saturation	40,000	1,080	37.0	1.2	60.0
Sephacryl S-200 HR	14,500	191	69.8	2.3	21.7
DEAE Sephacel	12,000	68	176.5	5.8	18.0

사과에서 추출한 polyphenol oxidase의 겔 크로마토그래피를 실시한 결과 3개의 주요한 단백질 peak를 280 nm의 영역에서 확인하였고 (Fig. 52), 그 중 2번째에 나타난 peak에서 polyphenol oxidase의 활성을 확인하였다.

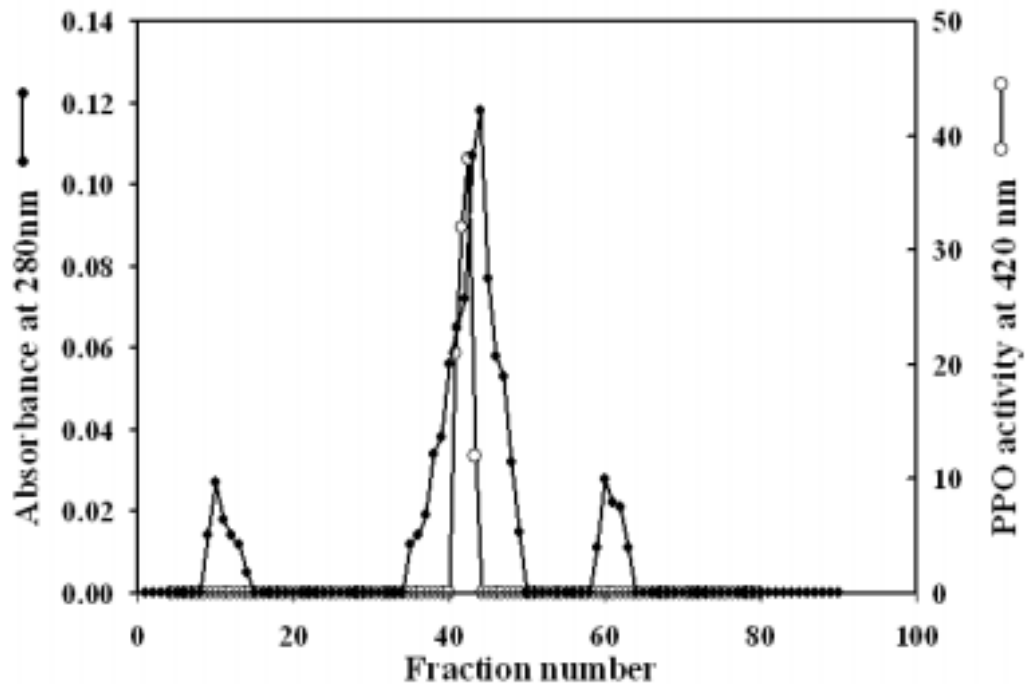


Fig. 52. Gel filtration of polyphenol oxidase of apples on Sephacryl S-200 HR. flow rate : 25 mL/hr, 10 mL/fraction.

겔 여과 크로마토그래피를 통해서 활성이 없는 단백질을 제거한 후 농축하여 DEAE Sephacel 이온 수지에 주입한 결과 다음과 같은 결과가 나타났다 (Fig. 53). DEAE Sephacel 이온수지를 이용하여 NaCl의 농도구배를 이용하여 단백질의 이온세기를 이용하여 효소의 정제를 유도한 결과 3개의 주요 단백질 peak를 분리해 내었다. 첫 번째로 분리되어진 단백질 peak는 NaCl의 농도가 0.0 M에서 분리가 이루어졌으며, 두 번째의 peak는 약 0.1 M NaCl의 농도에서 분리가 이루어졌으며 세 번째 peak는 약 0.3 M에서 분리가 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 세 개의 peak중에서 polyphenol oxidase의 활성을 보이는 peak는 첫 번째인 0 M에서 나타났다.

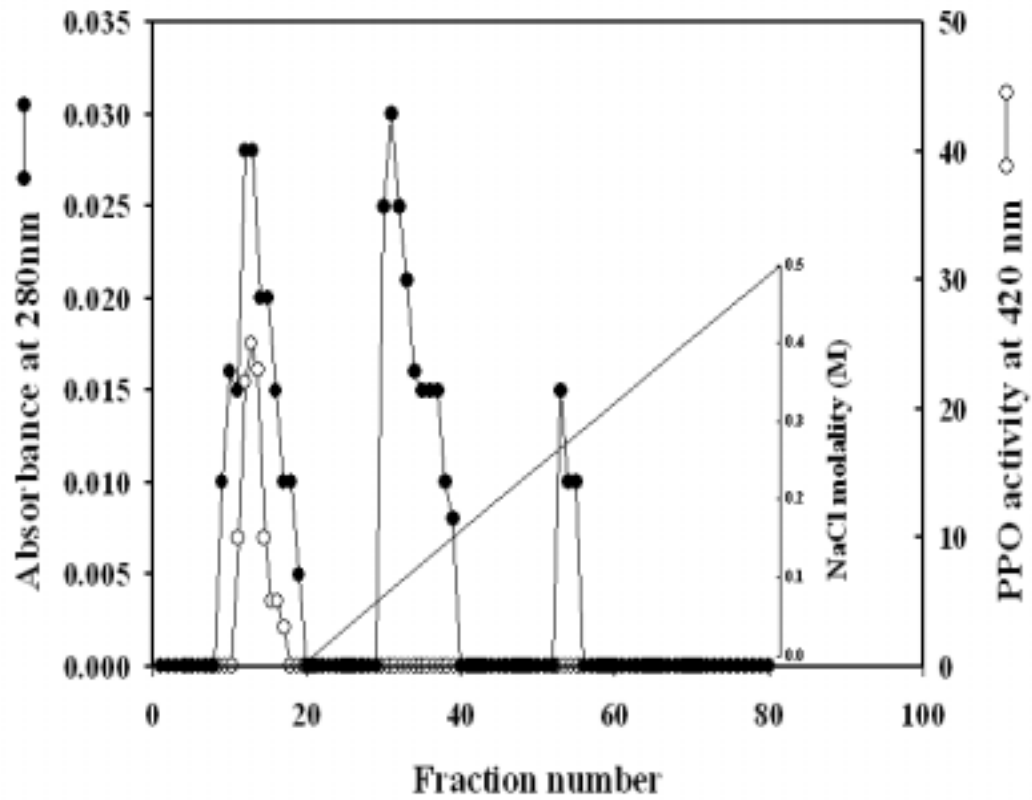


Fig. 53. Ion-exchange chromatography of polyphenol oxidase of apples on DEAE-Sephacel.

최종정제를 거친 사과의 polyphenol oxidase는 7.5% polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 polyphenol oxidase의 분자량을 결정하였고, 그 결과는 다음과 같이 나타났다 (Fig. 54). 표준 단백질과의 비교를 통해서 사과의 polyphenol oxidase는 약 40 kDa의 분자량을 가진 단일 단백질로 이루어진 것으로 판단되었다.

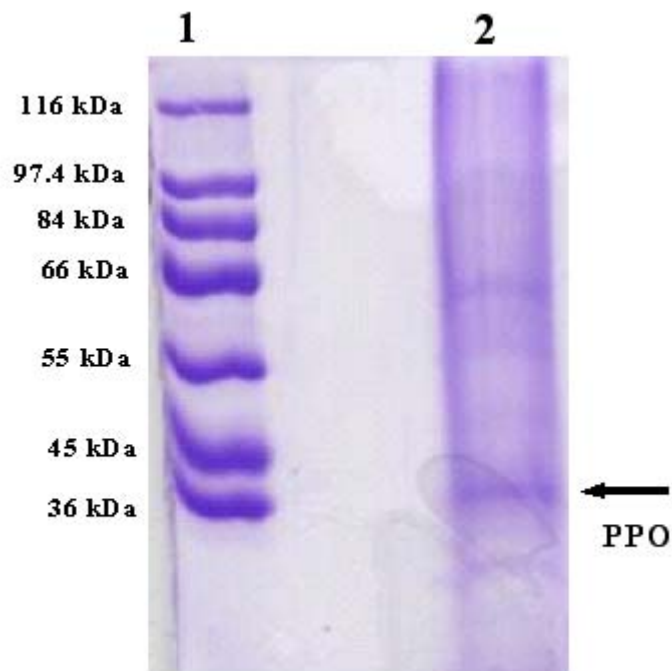


Fig. 54. SDS-PAGE of PPO purified from apples.

Lane 1 contained molecular mass markers of galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), fructose-6-phosphate kinase (84 kDa) albumin, bovine (66 kDa), glutamic dehydrogenase (55 kDa) albumin, egg (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa). Lane 2 arrows indicate the PPO position (around 40 kDa).

나. 포도로부터 polyphenol oxidase의 정제

포도에서 분리한 polyphenol oxidase를 정제한 결과 Table 41과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 정제과정을 통해서 조효소액에서 확인한 specific activity보다 약 7배 이상의 높은 활성을 확인하였고, 19%의 수율을 확인하였다. 정제수율은 7.0으로 나타났다, 최종정제결과 총 20,000 unit를 얻었다.

Table 41. Stepwise purification results of polyphenol oxidase of grapes

Step	Total activity (unit/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	105,000	2,000	52.5	1.0	100.0
Ammonium sulfate (25-75%) saturation	90,200	1,540	58.5	1.1	86.0
Sephacryl S-200 HR	36,000	144	250.0	4.8	34.2
DEAE Sephacel	20,000	54	370.0	7.0	19.0

Sephacryl S-200 HR column을 이용하여 포도에서 추출한 polyphenol oxidase를 분자량 별로 분리한 결과 2개의 peak를 분리할 수 있었으며, Fig. 55에 나타내었다. 두 개의 peak중에서 첫 번째의 peak에서 효소의 활성을 확인할 수 있었다.

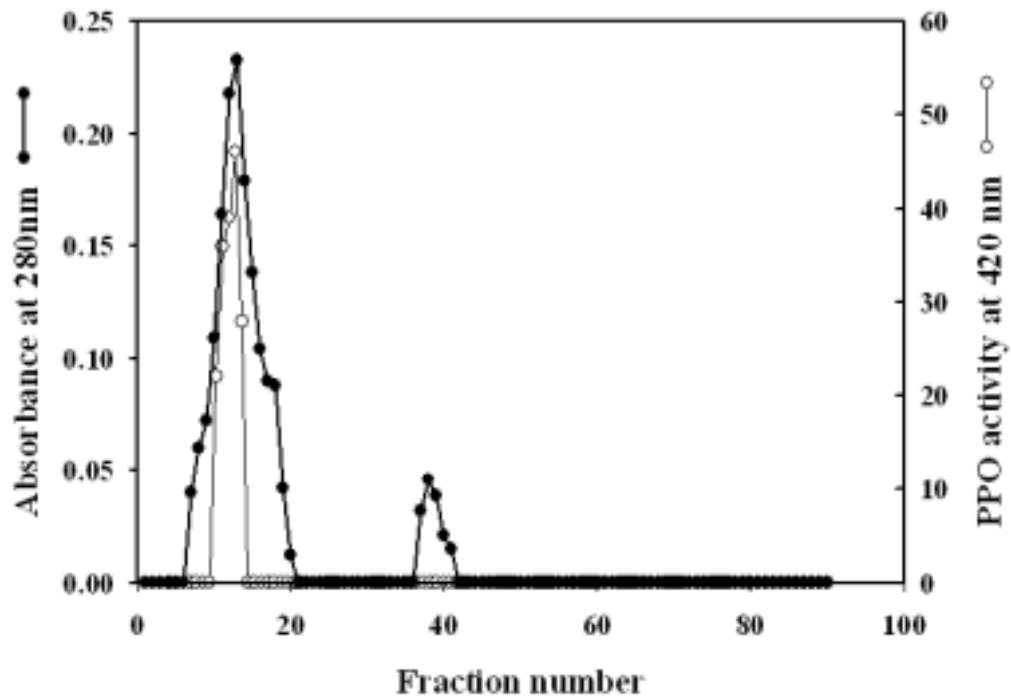


Fig. 55. Gel filtration of polyphenol oxidase purified from grapes on Sepharose S-200 HR. flow rate: 25mL/hr, 10mL/fraction.

Column에서 분리한 단백질을 모아서 농축한 후 NaCl 농도구배를 행한 이온교환수지를 통해서 단백질의 분리를 실시하여 그 결과를 Fig. 56에 나타내었다. DEAE-Sephacel 이온교환수지를 통해서 0.1 M의 NaCl의 용액을 통해 한 개의 단백질 peak를 분리해 내었고, 0.2~0.3 M 사이에서 2개의 peak를 분리하였으며, 0.4 M의 농도에서 용출되어진 4번째 peak에서 polyphenol oxidase의 활성을 확인할 수 있었다. 이를 통해 포도에 존재하는 polyphenol oxidase의 이온강도는 0.4 M이라고 판단할 수 있었다.

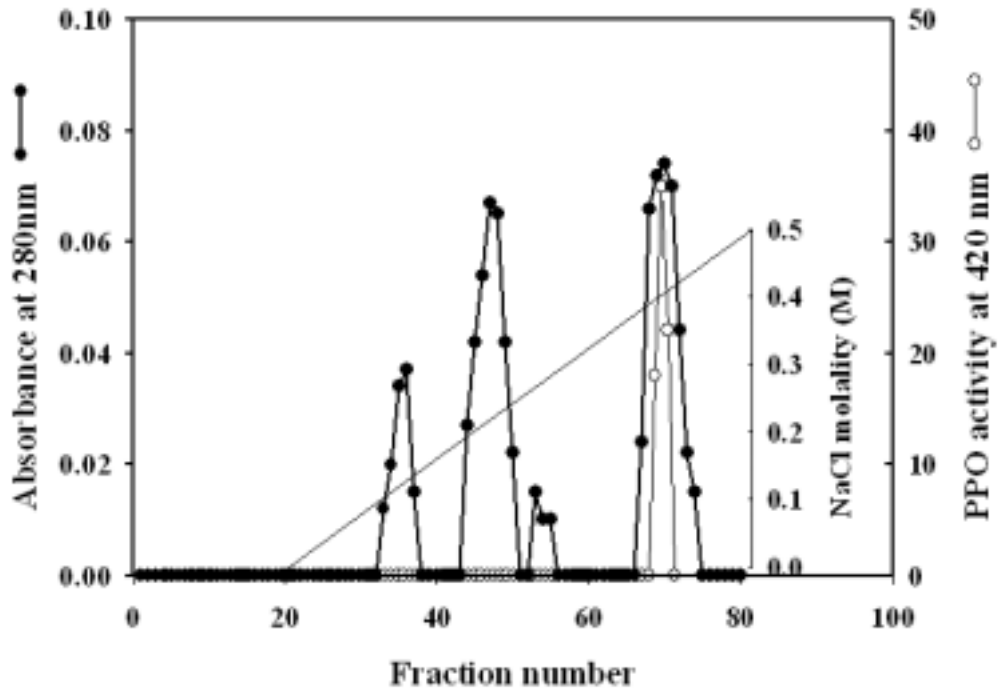


Fig. 56. Ion-exchange chromatography of polyphenol oxidase purified from grapes on DEAE-Sephacel.

7.5% polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 polyphenol oxidase 분자량을 측정하였고, 그 결과를 Fig. 57에 나타내었다. 표준 단백질과의 비교를 통해서 포도의 polyphenol oxidase는 약 36 kDa의 분자량을 가진 단일 단백질로 이루어진 것으로 판단되었다.

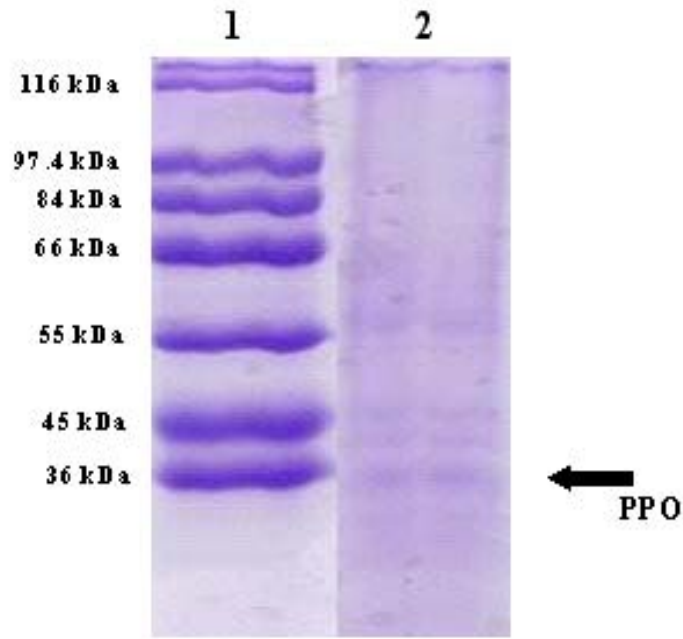


Fig. 57. SDS-PAGE of PPO purified from grapes.

Lane 1 contained molecular mass markers of galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), fructose-6-phosphate kinase (84 kDa) albumin, bovine (66 kDa), glutamic dehydrogenase (55 kDa) albumin, egg (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa). Lane 2 arrows indicate the PPO position (around 36 kDa).

다. 상추로부터 polyphenol oxidase의 정제

상추의 polyphenol oxidase의 정제를 실시한 결과는 Table 42에 나타나 있다. 정제과정을 통해서 11.6%의 수율을 얻었으며 1006.7 unit/mg의 specific activity를 확인할 수 있었다.

Table 42. Stepwise purification results of polyphenol oxidase of lettuces

Step	Total activity (unit/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	520,000	3,830	135.8	1.0	100.0
Ammonium sulfate (25-75%) saturation	380,000	1,220	311.5	2.3	73.1
Sephacryl S-100 HR	183,000	400	457.5	3.4	35.2
DEAE Sephacel	60,400	60	1006.7	7.4	11.6

상추에서 추출한 조효소 추출액을 분자량 별로 분리시키기 위해 Sephacryl S-200 HR column을 통해 분리시킨 결과 2개의 단백질 peak를 확인하였으며, 그 중에서 첫 번째에 나타난 peak에서 polyphenol oxidase의 활성을 확인하였다 (Fig. 58).

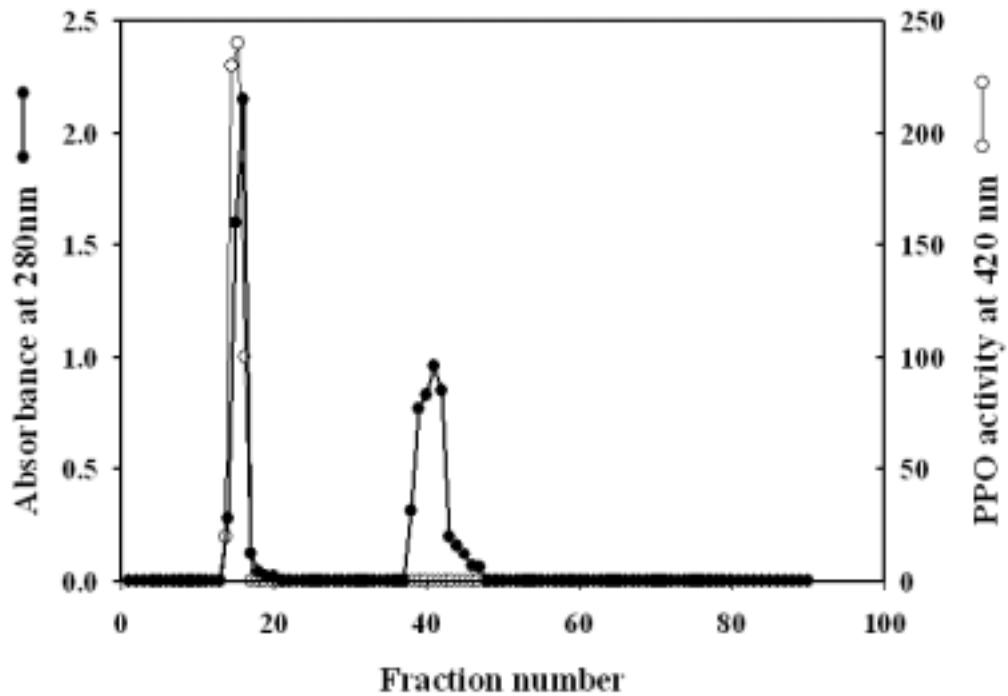


Fig. 58. Gel filtration of polyphenol oxidase purified from lettuces on Sepharose S-200 HR. flow rate: 25mL/min, 10mL/fraction.

Sephacryl S-200 column을 통해 얻어진 효소 획분을 농축하여 DEAE Sephacel 수지에 통과시켜 이온세기에 따른 분리를 실시한 결과 다음과 같은 결과를 확인하였다 (Fig. 59). DEAE Sephacel 이온교환수지를 통해서 3개의 peak를 분리하였고, 먼저 NaCl 0.0 M의 농도에서 peak를 분리하였으며, 0.1 M의 농도에서 그리고 0.3 M의 농도에서 peak를 분리시킬 수 있었다. 그 중 polyphenol oxidase의 활성이 나타난 peak는 두 번째에서 분리한 peak에서 활성을 찾아볼 수 있었다. 이 결과를 토대로 상추에서 분리한 polyphenol oxidase의 이온강도는 약 0.1 M이라고 판단하였다.

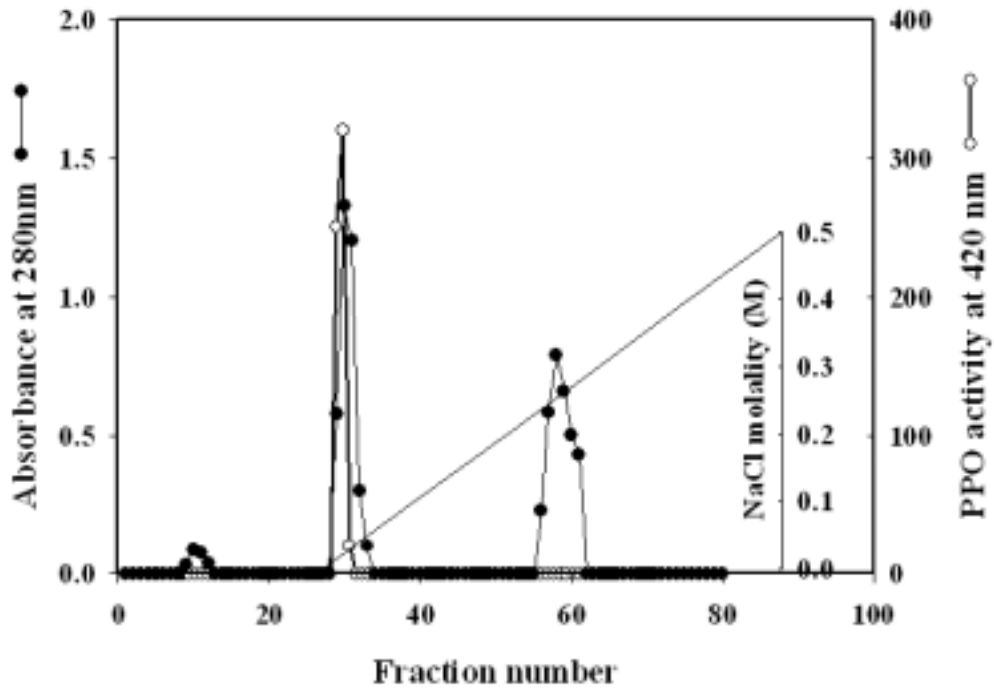


Fig. 59. Ion-exchange chromatography of polyphenol oxidase purified from lettuces on DEAE-Sephacel.

Gel chromatography와 DEAE Sephacel column을 통해 최종정제를 거친 포도의 polyphenol oxidase는 7.5% polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 polyphenol oxidase 분자량을 알아보았고, 그 결과를 나타내었다 (Fig. 60). 표준 단백질과의 비교를 통해서 상추의 polyphenol oxidase의 분자량은 약 55 kDa으로 결정되었다. 동일한 채소나 과일에서 분리한 polyphenol oxidase의 분자량의 차이가 나는 이유는 각각의 품종의 차이에서 오는 결과라고 판단되며, 이상의 결과를 토대로 판단해 볼 때 과일이나 채소의 polyphenol oxidase는 30~60 kDa 정도의 범위에서 판단하였다.

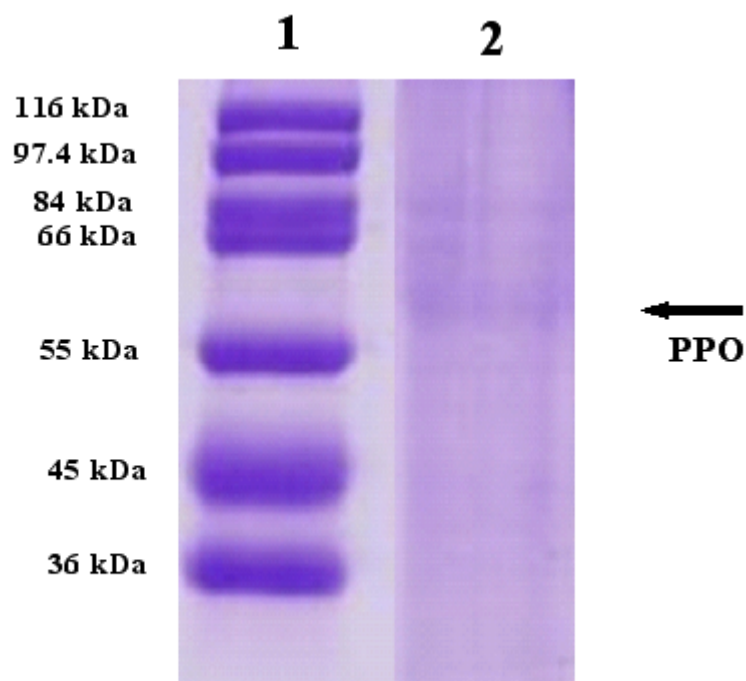


Fig. 60. SDS-PAGE of PPO purified from lettuces.

Lane 1 contained molecular mass markers of galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), fructose-6-phosphate kinase (84 kDa) albumin bovine (66 kDa), glutamic dehydrogenase (55 kDa) albumin, egg (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa). Lane 2 arrows indicate the PPO position (around 60 kDa).

제 9 절 구취억제 관여 효소의 반응 특성 구명

1. 실험방법 및 내용

가. 온도에 대한 활성 측정

온도에 따른 polyphenol oxidase의 활성을 측정하기 위해 20℃에서부터 60℃까지 10℃씩 증가함에 따라 polyphenol oxidase의 활성변화를 측정하였다.

나. pH에 대한 활성 측정

pH에 따른 polyphenol oxidase의 활성을 알아보기 위하여 pH 4에서부터 9까지의 범위에서 효소의 활성변화를 측정하였다.

다. 기질에 대한 활성 측정

기질에 따른 polyphenol oxidase의 영향을 알아보기 위해 gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, *para*-coumaric acid, catechin, ferulic acid 그리고 L-DOPA를 사용하여 각각의 polyphenol oxidase의 활성을 측정하였다.

라. 환원제에 대한 활성 측정

환원제의 농도에 대한 polyphenol oxidase의 활성저해를 확인하기 위해 사과, 포도 그리고 상추에서 추출한 polyphenol oxidase의 활성을 저해하는 저해제로 알려져 있는 ascorbic acid, sodium hydrosulfite, 그리고 citric acid와 같은 환원제가 미치는 영향을 측정하였다.

마. 금속에 대한 활성 측정

Polyphenol oxidases의 활성에 대한 금속염의 영향을 알아보기 위하여 10 mM

농도의 FeCl_2 , FeCl_3 , CuCl_2 및 CaCl_2 를 이용하여 polyphenol oxidase의 활성을 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. pH의 영향

1) pH에 의한 사과 polyphenol oxidase의 영향

반응액의 pH 변화에 따른 사과의 polyphenol oxidase 활성을 조사한 결과를 Fig. 61과 같이 나타내었다.

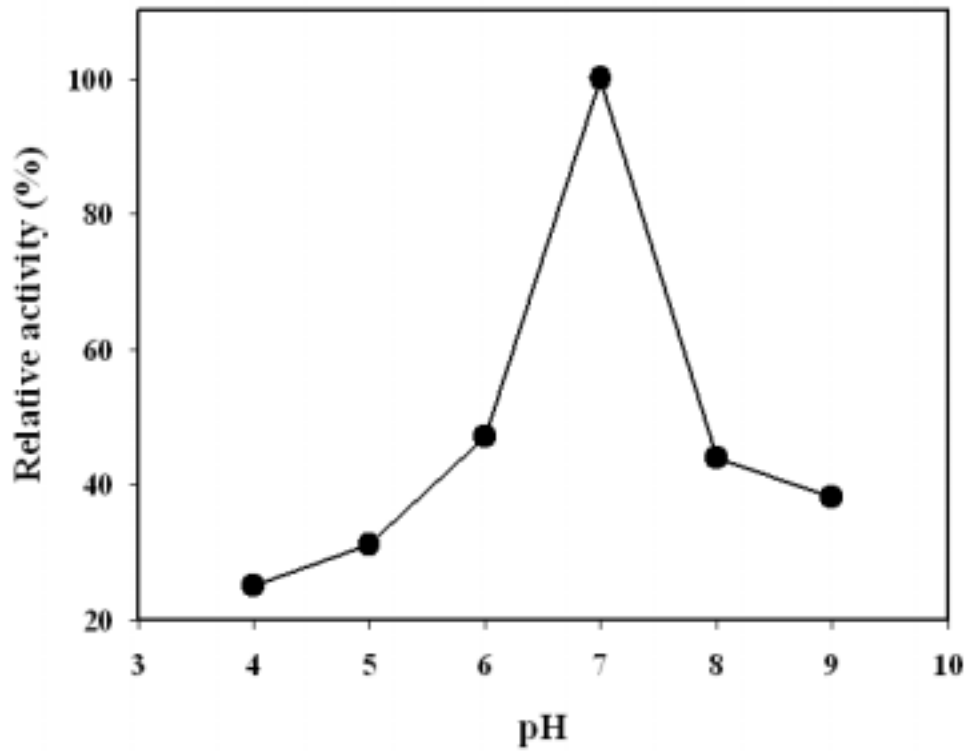


Fig. 61. Effects of pH on polyphenol oxidase activities from apples.

pH 3.0에서는 상대활성이 약 20-40% 정도였으며 pH가 증가함에 따라 활성이 증가하여 pH 7에서 가장 활성이 높았으며 pH 7 이상에서 활성이 급격히 감소하는 경향을 보였다. 이는 홍옥과 국광의 polyphenol oxidase의 최적 pH가 각각 6.5, 6.0이라는 보고와도 약간의 차이를 보였다. 이러한 차이는 polyphenol oxidase의 다양한 분리 방법의 차이에서 오는 결과라고 판단되어진다.

2) pH에 의한 포도의 polyphenol oxidase의 영향

반응액의 pH 변화에 따른 포도의 polyphenol oxidase 활성을 조사한 결과를 Fig. 62과 같이 나타내었다.

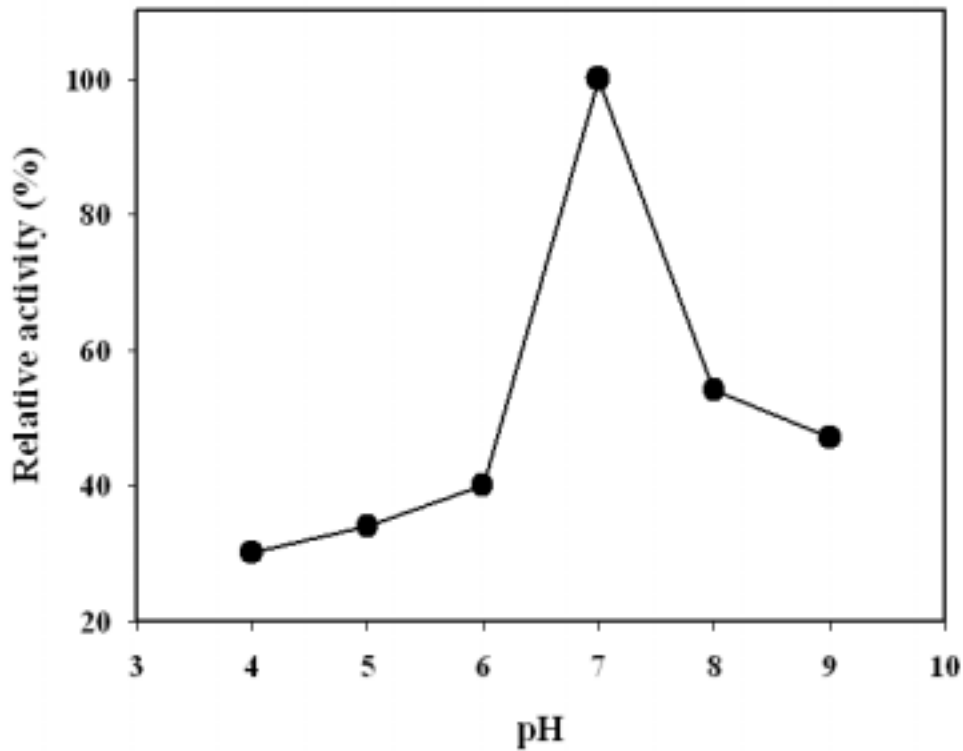


Fig. 62. Effects of pH on polyphenol oxidases activities from grapes.

pH 3.0에서는 상대활성이 약 20-40% 정도였으며 pH가 증가함에 따라 활성이 증가하여 사과와 마찬가지로 pH 7에서 가장 활성이 높았으며 pH 7.0 이상에서 활성이 급격히 감소하는 경향을 보였다. 이는, 홍옥과 국광의 polyphenol oxidase의 최적 pH가 각각 6.5, 6.0이라는 보고와 약간의 차이를 보였다. 또한, 배, 복숭아 및 망고의 최적 pH가 각각 6.2, 6.2 그리고 5.6~6.0이라고 보고되고 있는데, 이러한 차이는 polyphenol oxidase의 다양한 분리 방법의 차이에서 오는 결과라고 판단되어진다.

3) pH에 의한 상추의 polyphenol oxidase의 영향

반응액의 pH 변화에 따른 상추 polyphenol oxidase 활성을 조사한 결과를 Fig. 63에 나타내었다.

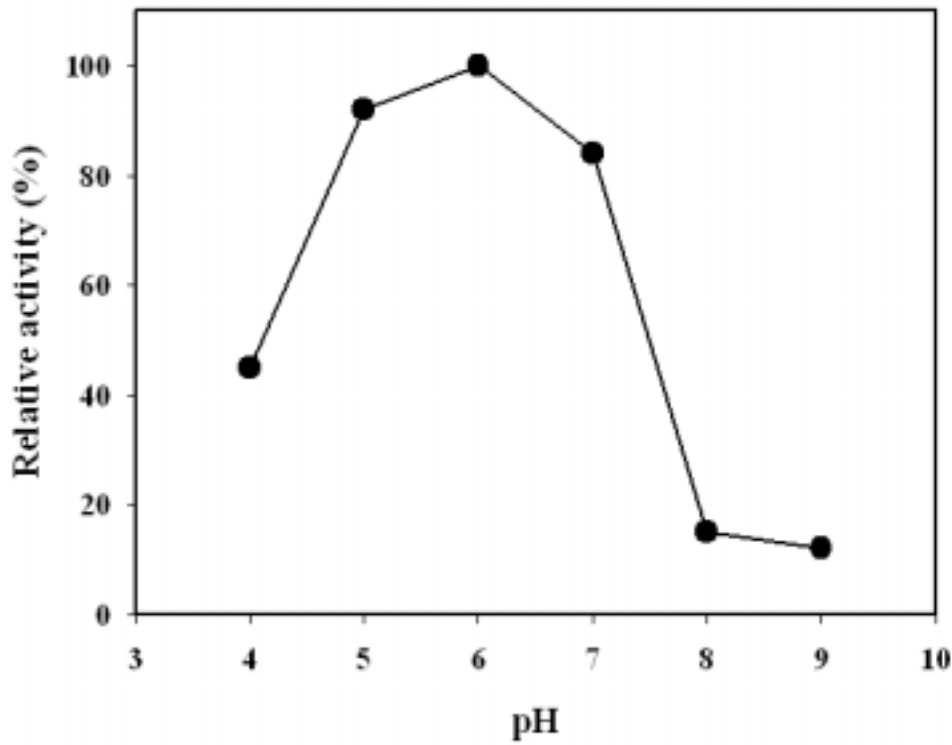


Fig. 63. Effects of pH on polyphenol oxidases activities from lettuces.

pH 4.0에서는 상대활성이 약 40% 정도였으며, pH 6.5에서 가장 높은 활성을 나타내었고 pH 7.0 이상에서 활성이 급격하게 감소하였다.

나. 온도의 영향

1) 온도 변화에 의한 사과 polyphenol oxidase의 영향

사과 polyphenol oxidase 활성의 온도에 대한 영향을 확인하였고 그 결과를 Fig. 64에 나타내었다. 반응온도가 10°C에서는 약 40%의 활성을 나타내었으며, 온도가 상승함에 따라 급격히 활성이 증가되어 약 25°C에서 가장 높은 활성을 나타내었고 30°C 이상에서 활성이 감소되어 60°C에서는 거의 활성을 보이지 않았다.

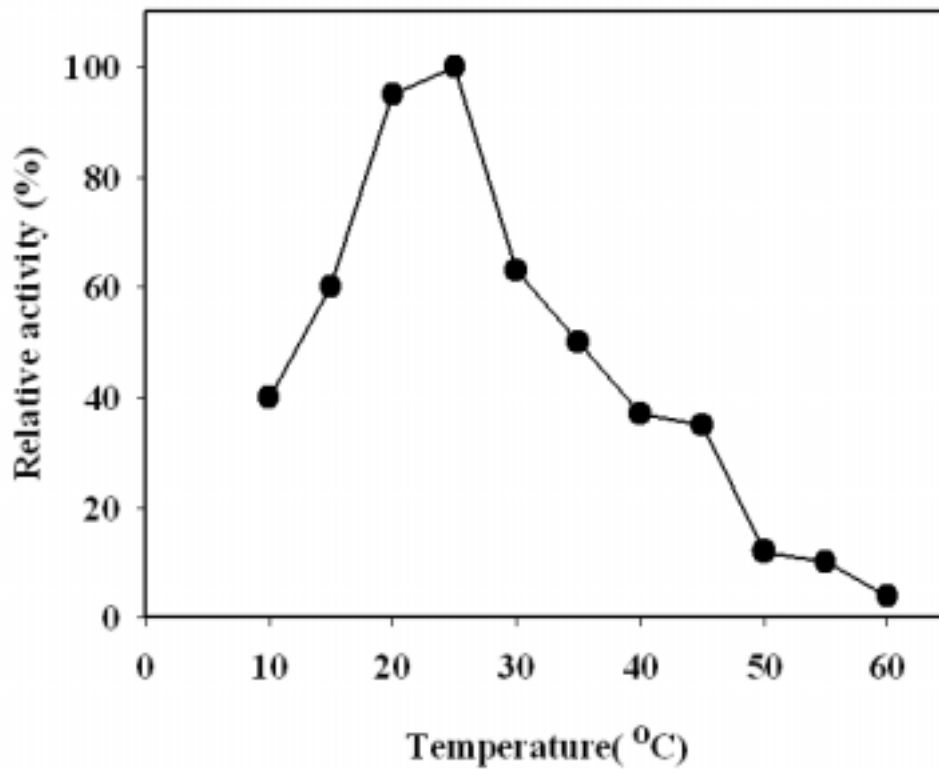


Fig. 64. Effects of temperature on polyphenol oxidases activities from apples.

2) 온도 변화에 의한 포도의 polyphenol oxidase의 영향

포도 polyphenol oxidase 활성의 온도에 대한 영향을 확인하였고 그 결과를 Fig. 65에 나타내었다. 사과와 마찬가지로, 반응온도가 10℃에서는 약 40%의 활성을 나타내었으며, 온도가 상승함에 따라 급격히 활성이 증가되어 약 30℃에서 가장 높은 활성을 나타내었고 30℃ 이상에서 활성이 감소되어 60℃에서는 거의 활성을 보이지 않았다.

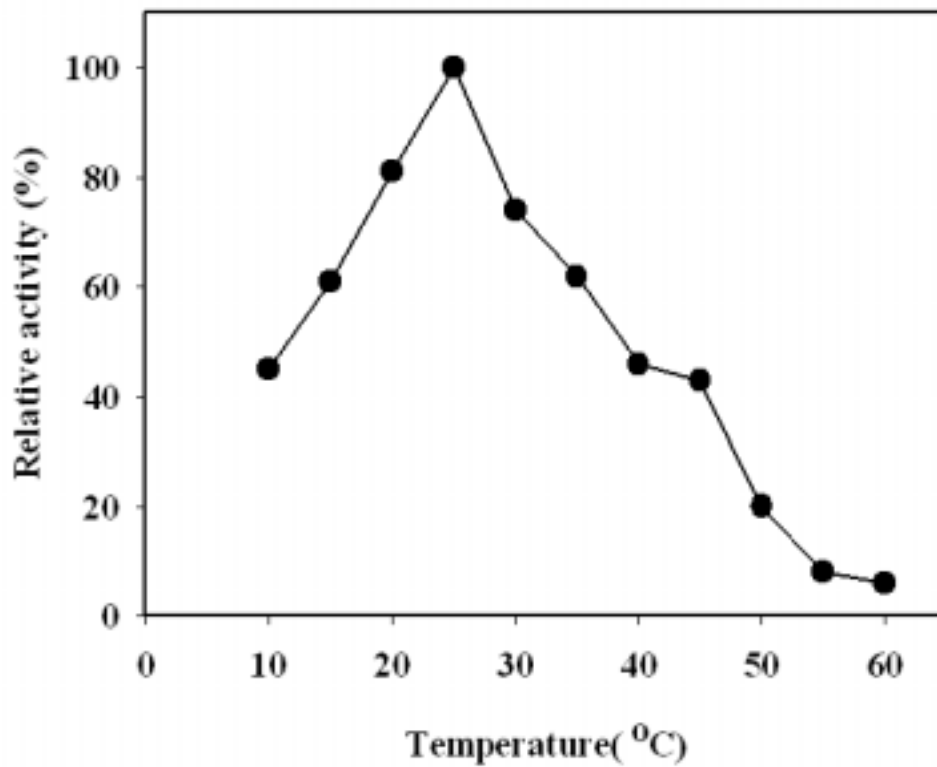


Fig. 65. Effects of temperature on polyphenol oxidases activities from grapes.

3) 온도변화에 의한 상추의 polyphenol oxidase의 영향

상추 polyphenol oxidase 활성의 온도에 대한 영향을 확인하였고 그 결과를 Fig. 66에 나타내었다. 반응온도가 10°C에서는 약 20%의 활성을 나타내었으며, 온도가 상승함에 따라 급격히 활성이 증가되어 약 25°C에서 가장 높은 활성을 나타내었고 30°C 이상에서 활성이 급격히 감소되어 60°C에서는 거의 활성을 보이지 않았다.

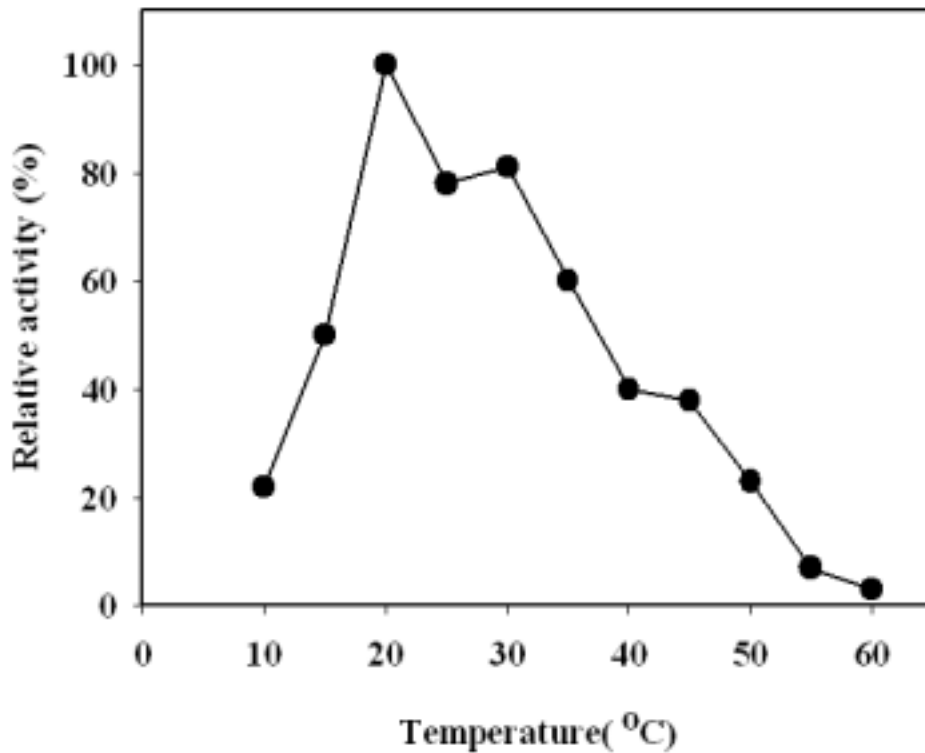


Fig. 66. Effects of temperature on polyphenol oxidases activities from lettuces.

다. 구취억제 관여 과채류 효소의 기질 특이성

Polyphenol oxidase는 기질의 형태에 따라 monophenol을 산화시키는 cresolase와 diphenol을 산화시키는 catecholase, 그리고 monophenol과 *ortho*-diphenol, *para*-diphenol 및 triphenol등을 산화시키는 laccase로 구분하기도 한다. 사과, 포도 그리고 상추 각각의 polyphenol oxidase에 대한 기질 특이성을 검토하기 위해 각 phenol 함량에 따른 몇 가지 기질을 선정하여 polyphenol oxidases의 활성을 확인 해 본 결과는 Table 43에 나타내었다. 각각의 기질에 따른 사과, 포도 및 상추의 polyphenol oxidase의 활성을 보면 공통적으로 monophenol에서는 활성이 낮으며, polyphenol인 gallic acid에서 가장 활성이 높은 것으로 나타났다. 종류에 따라서는 상추의 활성이 사과와 포도보다 월등히 높은 활성을 보였으며, 특히 (+)-catechin을 기질로 사용했을 때 가장 활성이 높은 것으로 나타났다.

라. 금속 및 저해제의 영향

Polyphenol oxidase에 대한 금속 및 저해제의 작용 기작을 살펴보면 기질인 phenol을 우선적으로 산화시킴으로써 저해하는 것과 효소의 보결분자단과 복합체를 형성함으로써 저해하는 것, 치환함으로써 저해하는 것, 기질과 복합체를 형성함으로써 저해하는 것 등이 있다. 본 연구에서는 사과, 포도 그리고 상추에서 추출한 polyphenol oxidase의 활성을 촉매하는 금속 이온과 효소의 차기 반응산물인 quinone과 복합체를 형성하여 갈변을 지연시키는 것으로 알려진 ascorbic acid와, sodium hydrosulfite 그리고 citric acid같은 환원제가 polyphenol oxidase에 미치는 영향을 조사하였다.

1) 사과 polyphenol oxidase의 금속 및 저해제의 영향

사과에서의 polyphenol oxidase의 금속 및 저해제의 영향에 대한 실험결과는 Fig. 67에 나타내었다. 금속염의 농도를 각각 10 mM의 농도로 처리한 결과에서 Cu^{2+} 첨가구에서는 활성이 가장 높았으며, Fe^{2+} 첨가구에서는 활성이 상대적으로 낮았다.

Table 43. Substrates specificity of polyphenol oxidases from apples, grape and lettuces

Substrates	Relative activity (%)		
	Apples	Grapes	Lettuces
Monophenols			
<i>para</i> - Coumaric acid	20	20	197
Ferulic acid	13	24	255
<i>ortho</i> -Diphenols			
(+)-Catechin	28	64	1200
L-DOPA	130	40	260
Chlorogenic acid	50	38	193
Caffeic acid	97	287	807
Polyphenol			
Gallic acid	262	880	860

촉매 역할을 하는 금속이온과 함께 polyphenol oxidase의 활성을 저해하는 저해제에 대한 영향을 알아보기 위한 1 mM의 ascorbic acid, sodium hydrosulfite 그리고 citric acid를 이용하여 사과 polyphenol oxidase의 활성을 측정해 보았다. Ascorbic acid의 첨가는 사과의 효소활성 저해제를 첨가하지 않았을 때의 활성과 비교해볼 때 50%이하까지 활성을 급격히 감소시키는 역할을 하였다. 또한, sodium hydrosulfite를 첨가하였을 때의 효소활성은 전혀 나타나지 않았다.

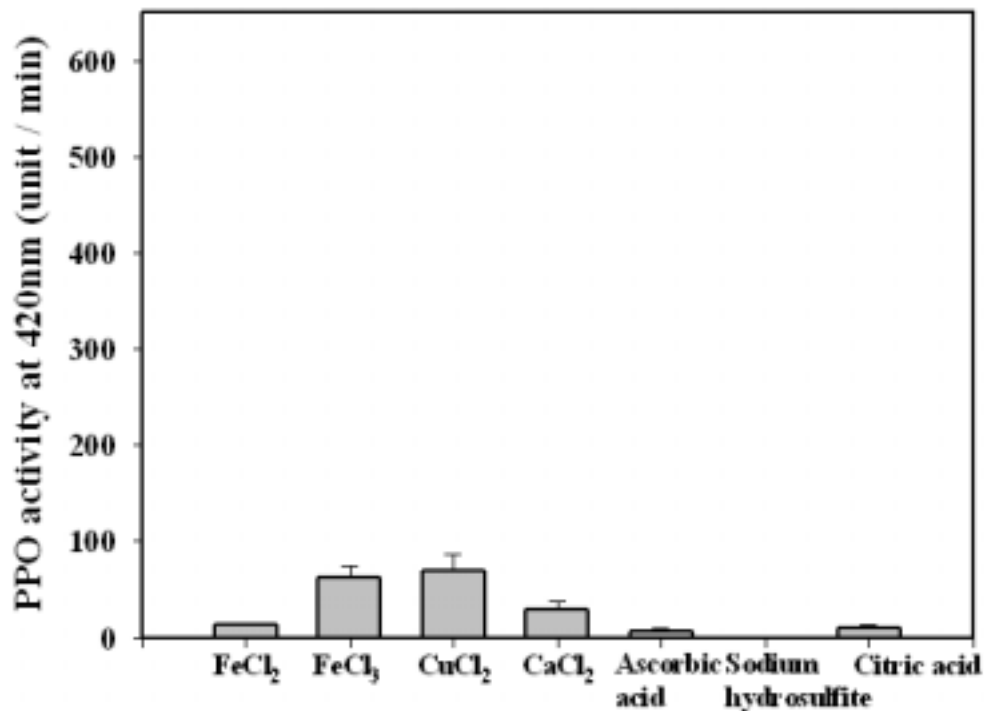


Fig. 67. Effects of metal ions and inhibitors on the activities of polyphenol oxidases from apples.

2) 포도 polyphenol oxidase의 금속 및 저해제의 영향

포도에서의 polyphenol oxidase의 금속 및 저해제의 영향에 대한 실험결과는 Fig. 68에 나타나 있다. 금속염의 농도를 각각 10 mM의 농도로 처리한 결과 Cu²⁺ 첨가구에서는 활성이 가장 높았으며, Fe²⁺ 첨가구에서는 활성이 상대적으로 낮았다. 촉매 역할을 하는 금속이온과 함께 polyphenol oxidase의 활성을 저해하는 저해제에 대한 영향을 알아보기 위한 1 mM의 ascorbic acid, sodium hydrosulfite 그리고 citric acid를 이용하여 포도 polyphenol oxidase의 활성을 측정해 보았다. Ascorbic acid의 첨가는 사과와 효소활성 저해제를 첨가하지 않았을 때의 활성과 비교해볼 때 50%이하까지 활성을 급격히 감소시키는 역할을 하였으며, 전체적으로 볼 때 저해제를 첨가하였을 때의 효소활성은 금속이온의 첨가시보다 낮게 측정되었다.

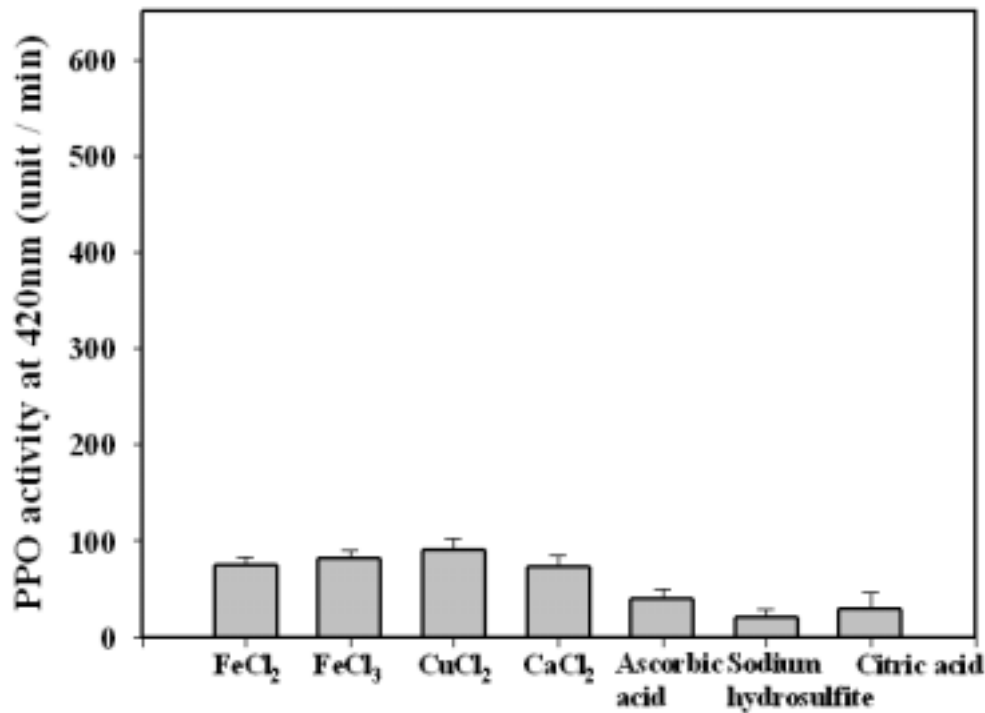


Fig. 68. Effects of metal ions and inhibitors on the activities of polyphenol oxidases from grapes.

3) 상추 polyphenol oxidase의 금속 및 저해제의 영향

상추에서의 polyphenol oxidase의 금속 및 저해제의 영향에 대한 실험결과는 Fig. 69에 나타나 있다. 상추의 polyphenol oxidase도 역시 사과와 포도에서와 마찬가지로 금속염의 농도를 각각 10 mM의 농도로 처리한 결과로 Ca²⁺첨가구에서는 활성이 가장 높았으며, Fe²⁺첨가구에서는 활성이 상대적으로 낮았다. 전체적으로 볼 때 효소활성은 사과, 포도보다 높았으며, 촉매 역할을 하는 금속이온과 함께 polyphenol oxidase의 활성을 저해하는 저해제에 대한 영향을 알아보기 위한 1 mM의 ascorbic acid, sodium hydrosulfite 그리고 citric acid를 이용하여 상추 polyphenol oxidase의 활성을 측정해 보았다. Ascorbic acid의 첨가는 사과의 효소활성 저해제를 첨가하지 않았을 때의 활성과 비교해볼 때 50%이하까지 활성을 급격히 감소시키는 역할을 하

였으며, 전체적으로 볼 때 저해제를 첨가하였을 때의 효소활성은 금속이온의 첨가시 보다 낮게 측정되었다.

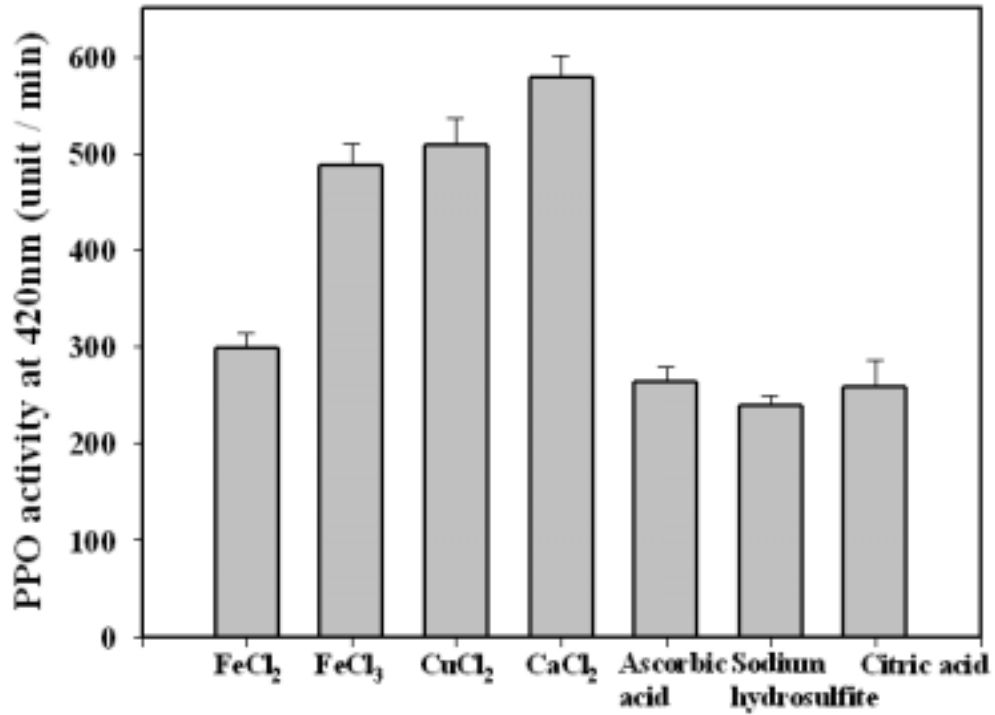


Fig. 69. Effects of metal ions and inhibitors on the activities of polyphenol oxidases from lettuces.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구목표	평가의 착안점	목표달성도 및 관련 분야의 기여도
원료 과실류의 기초 분석을 통한 대상원료의 선정 및 구취억제 소재의 제조	대상 원료 과실류의 검색은 타당하였으며, 이를 통한 구취억제 소재의 제조 조건을 확립하였는가?	높은 구취억제 활성을 보인 사과, 포도 및 상추를 대상 원료로 선정하였으며, 다양한 가공조건에서의 구취억제 활성을 측정하여 소재의 제조조건을 확립하여 물 추출물 동결건조 소재를 구취억제 소재로 최종 선정하였다.
선정된 구취억제 소재의 효과 분석	Methyl mercaptan에 대한 소취력을 측정하였으며, 반응 특성을 이용한 소취 효과의 비교 분석 및 활성 최적 발현 조건을 검토 구명 하였는가?	금속 및 환원제를 첨가하여 각각의 반응특성에 대한 최적활성 조건을 구명함과 아울러 구취억제 활성을 비교 분석하여 구취억제 활성에는 금속이온 및 환원제가 영향을 미친다는 것을 확인하였으며, polyphenol oxidase 및 phenol의 상호작용에 의해 구취억제 활성이 발현된다는 것을 밝혔다.
소취활성 소재의 대량 생산 기법 연구 및 산업적 응용 제품의 제조	구취억제 소재의 대량 생산 공정 확립 및 산업적 응용제품을 개발하여 개발 시제품에 대한 경제성 분석을 실시하였는가?	구취억제 소재를 대량 생산하기 위한 제조조건을 확립하였으며, 시제품으로 구강세정액, 젤리, 사탕, 음료를 제조하여 각 제품에 대한 경제성 분석을 하였다.
구취억제 관여 효소의 추출, 정제 및 반응 특성 구명	구취억제 관여 효소의 추출/분획조건 최적화 및 반응 특성을 구명하였는가?	선정된 과채류에 대한 효소를 정제하여 겔 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, SDS-PAGE를 통해 단백질을 정제하고 금속이온 및 환원제 첨가를 통한 반응 특성을 구명하여 구취억제 작용과 상호관계를 밝혔다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

*본 연구를 통해 얻어진 구취억제 효과가 높은 과채류의 검색, 제조조건의 확립, 금속이온 및 환원제 첨가를 통한 활성 최적 발현 조건의 검토, 소취 활성 소재의 대량 생산 기법 및 구취억제 관여 효소의 정제 및 반응 특성 구명에 대한 연구결과를 발표하였으며, 본 연구를 통하여 학술지에 발표 혹은 게재된 논문은 다음과 같다.

● 학위 논문 1편

- 사과, 포도 및 상추 polyphenol oxidase의 정제 및 특성, 부경대학교 대학원 공학 석사 학위 논문, 2004.

●국내 학회 발표 4건

- 구취억제에 대한 여러 가지 과일 추출물의 polyphenol oxidase의 영향, 한국생물공학회, 2003.

- 후지사과 (*Malus pumila*)의 구취억제 작용 및 특성 연구, 한국식품과학회 (2004)

- 상추 (*Lactuca savita* LINNAEUS) 추출물의 구취억제 활성, 한국식품과학회, 2004.

- 포도의 구취억제 작용에 대한 polyphenol oxidase의 역할 및 특성 연구, 한국식품과학회, 2004.

●국제 학회발표 2건

- Halitosis inhibition against methyl mercaptan by polyphenol oxidase of apple extracts. IFT (국제 식품과학회), 2003, Cicago, USA.

- Effect of polyphenol oxidase from several fruit extracts on halitosis inhibition. IFT (국제식품과학회), 2003, Cicago, USA.

*사과, 포도 및 상추의 기능성 해석 및 산업적 이용 기술 개발 연구 결과는 국내외 전문학술지에 논문을 투고함과 아울러 개발된 구취억제 소재 및 음료, 구강세정액, 사탕 및 젤리의 제조 방법에 대한 가공기술은 기존 제조업체 현장에서 약간의 설비 증설 및 변경을 통하여 산업적으로 활용될 수 있도록 산업체와의 협약을 통하여 기술이전 및 지원을 추진할 계획이다.

제 6 장 참고문헌

1. Shimizu, K., Maeda, Y., Osawa, K. and Shimura, S.. 2000. Deodorizing effect of cacao polyphenols against methyl mercaptan. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 48(4), 238~245.
2. Yasuda, H. and Onogi, A.. 1996. Effects of ascorbic acid on the deodorizing activity of polyphenols against methanethiol. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(10), 1703~1704.
3. Negishi, O., Negishi, Y., Aoyagi, Y., Sugahara, T. and Ozawa, T.. 2001. Mercaptan capturing properties of mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5509~5514.
4. Negishi, O. and Ozawa, T.. 1997. Effect of polyphenol oxidase on deodorization. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61(12), 2080~2084.
5. Kida, K., Suzuki, M., Takagaki, A. and Nanjo, F.. 2002. Deodorizing effects of tea catechins on amines and ammonia. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 66(2), 373~377.
6. Yang, Y.J. and Kim, S.J. 1995. Changes in chlorophyll and carotenoid contents during cold and CA storage, and characterization of the carotenoids in the peel of "Fuji" apple fruit. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, 36(4), 500~505.
7. Kim, T.R., Whang, H.J. and Kwang, R.Y. 1996. Mineral contents of Korean apples and apple juices. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28(1), 90~98.
8. Youn, K.S., Lee, J.H. and Choi, Y.H. 1996. Changes of free sugar and organic acid in the osmotic dehydration process of apples. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28(6), 1095~1103.
9. Rim, H.J. and Rhee, W.S. 1986. A study on pectic substances of Korean apple varieties. *Korean J. Soc. Food Sci.*, 2(1), 65~70.
10. Hong, J.S., Kim, M.K., Yoon, S., Ryu, N.S. and Kim Y.K. 1993. Preparation of noodle supplemented with treated apple pomace and soymilk residue as a source of dietary fiber. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 36(2), 80~85.
11. Lee, H.A., Lee, S.S. and Shin, H.K. 1997. Effect of apple dietary fiber on the

- in vitro* growth of intestinal bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(1), 107~114.
12. Lee, J.H., Kim, Y.C., Kim, M.Y., Chung, H.S. and Chung, S.K. 2000. Antioxidative activity and related compounds of apple pomace. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 32(4), 908~913.
 13. Baik, C.W. and Ham, S.S. 1990. Antimutagenic effects of browning products reacted with polyphenol oxidase extracted from apple. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 22(6), 625~631.
 14. Lee, J.J., Kim, C.S., Kim, S.H., Huh, C.S. and Baek, Y.J. 1999. Changes of polyphenol contents in unripe apples according to heat treatments. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 31, 147~152.
 15. Mcevely, A.Z., R. Iyengar, and W.S. Otwell. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 253~273.
 16. Mcnamara, T.F., J.F. Alexander and M. Lee. 1972. The role of microorganisms in the production of oral malodor. *Oral Surg.*, 34, 41~48.
 17. Oh, M.J., W.Y. Lee and K.S. Lee. 1988. Purification and some properties of polyphenol oxidase from arrowroot. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 31(4), 331~338.
 18. Seo, J.H. and Y.S. Whang, J.P. Chun and J.C. Lee. 2001. Changes of phenolic compounds and occurrence of skin browning, and characterization of partially purified polyphenol oxidases in oriental pear fruits. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 42(2): 184~199.
 19. Wissemann, K.W. and C.T. Lee. 1981. Characterization of polyphenol oxidase from ravat 51 and niagara grapes. *J. Food Sci.*, 43, 506~514.
 20. Yang, C.P., S. Fujita, M.D. Ashrafuzzaman, N. Nakamura and N. Hayashi. 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Banana (*Musa sapientum L.*) pulp. *J. Agric. Food. Chem.* 48, 2732~2735.
 21. Bolwell, G.P. and J.C. Partington. 1996. Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein patatin from Potato Tuber. *Phytochem.*, 42, 1499~1502.
 22. Brill, S. and E. Dean. 1994. Identifying and harvesting edible and medicinal plants in wild places. *Hearst Books, New York.*

23. Choi, E.H., D.S. Jung, N.S. Cho and Y.H. Shim. 1987. Characteristics and inhibition of polyphenol oxidase from fuji apples. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 3, 278~284.
24. Chung, K.T., S.K. Seo and H.I. Song. 1983. Enzymatic characteristics of polyphenol oxidase from apple (*Ralls Janet*). *Korean J. Food & Nutrition*, 12(4), 316~322.
25. Chung, K.T., S.K. Seo and H.I. Song. 1984. Some properties of polyphenol oxidase from apple(jonathan) and thermal stability of the active bands. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 13(4), 397~402.
26. Coombs, J., C. Boldry, C. Buck and S.P. Long. 1974. *o*-Diphenol oxygen oxidoreductase from leaves of sugar cane. *Phytochem.*, 13, 2703~2708.
27. Estrella, N.D., M.M. Sojo, G.C. Francisco and S. Alvado. 2003. Partial purification and latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2058~2063.
28. FAO. 2000. Provisional 2000. Production and production induces data for information on the source of FAO statistical data.
29. Ferrar, P.H. and J.R. Whitaker. 1996. Inhibition of diphenoloxidases: A comparative study. *J. Food Biochem.*, 20, 15~30.
30. Ha, Y.D. and M.O. Lee. 1988. Some properties of the polyphenol oxidase from potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and inhibiting effect of the polyphenol oxidase by sulfites. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 17(3), 198~204.
31. Harel, E. and A.M. Mayer. 1971. Partial purification of catechol oxidase in grapes. *Phytochem.*, 10, 17~22.
32. Izawa, S.K. 1980. Tropical vegetables. The ministry of agriculture, forestry and fisheries, tropical research center, Japan. 542~550.
33. Kanner, J., E. Frankel, R. Granit, B. German and J.E. Kinsella. 1994. Natural antioxidants in grape and wines. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 64~69.
34. Kinsella, J.E., E. Frankel, R. Granit, B. German and J. Kanner. 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.*, 47, 85~91.
35. Kim, D.Y., C.O. Rhee and Y.B. Kim. 1981. Characteristics of polyphenol

- oxidase from garlic (*Allium sativum* L.). *J. Korean Agricultural Chemical*, 24(3), 167~173.
36. Kim, J.H. 1990. Studies on the characteristics of dehydration of fuji apples. Seoul women univ. dissertation.
 37. Kim, S.Y., W.Y. Choi and J.H. Kang. 1970. Studies on the chemical composition of grape juices in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 2, 72~80.
 38. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680~685.
 39. Lee, D.S. S.K. Woo and C.B. Yang. 1972. Studies on the chemical composition of major fruits in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 4, 134~139.
 40. Lowry, O.H., N. Rosenbrough, A.L. Far and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
 41. Luhand, B.S. and B. Phithapol. 1972. Characteristics of polyphenol oxidase related to browning in cling peaches. *J. Food Sci.*, 37, 264~268.
 42. Matheis, G. and J.R. Whitaker. 1984. Modification of protein by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *J. Food. Biochem.*, 8, 137~162.
 43. Mcevely, A.Z., R. Iyengar, and W.S. Otwell. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 253~273.
 44. Ministry of Agriculture and Forestry. 2000. Statistical year of agriculture & forestry.
 45. Oh, M.J., W.Y. Lee and K.S. Lee. 1988. Purification and some properties of polyphenol oxidase from arrowroot. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 31(4), 331~338.
 46. Park, Y.K., H.H. Sato, D. Almeida and R.H. Moretti. 1980. Polyphenol oxidase of mango. *J. Food Sci.*, 45, 1619~1621.
 47. Patricia, F.P., D.A. Jose, M.M. Marcelo, C.O.L. Luiz and E.M. Laudiene. 2003. Purification of polyphenol oxidase from coffee fruits. *Food Chem.*, 83, 7~11.
 48. Paul, B. and L.R., Gowda. 2000. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean. *J. Agric. Food Chem.*, 48,

49. Pyo, H.J., D.Y. Son and C. Lee. 2002. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from *Flammulina velutipes*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 34(4), 552~558.
50. Rivas, N.D.J. and J.R. Whitaker. 1973. Purification and some properties of polyphenol oxidase. *Plant Physiol.*, 52, 501~503.
51. Seo, J.H. and Y.S. Whang, J.P. Chun and J.C. Lee. 2001. Changes of phenolic compounds and occurrence of skin browning, and characterization of partially purified polyphenol oxidases in oriental pear fruits. *J. Korean Soc. Hort. Sci.*, 42(2), 184~199.
52. Seol, J.Y., S.S. Park and A.K. Kim. 1999. Purification and some properties of polyphenol oxidase from *Ginkgo biloba* leaves. *Kor. J. Pharmacogn.*, 30, 306~313.
53. Soledad, C., Francisco, G. and Juana, C. 1999. Characterization of monophenolase activity of polyphenol oxidase from iceberg lettuce. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1422~1426.
54. Soledad, C., Francisco, G. and Juana, C. 2001. Evidence for a tetrameric form of iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.) polyphenol oxidase: Purification and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4870~4875.
55. Stephane, M., Laurence, M., Frederic, B., Yannis, K., and Jean, M. 2001. Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 49, 1213~1217.
56. Vaughan, P.F.T., R. Eason and J. Paton. 1975. Molecular weight and amino acid composition of purified spinach beet phenolase. *Phytochem.*, 14, 2383~2386.
57. Wesche-Ebeling, P. and M.W. Montgomery. 1990. Strawberry polyphenol oxidase: purification and characterization. *J. Food Sci.*, 55, 1315~1319.
58. Wissemann, K.W. and C.T. Lee. 1981. Characterization of polyphenol oxidase from ravat 51 and niagara grapes. *J. Food Sci.*, 43, 506~514.