

최 종
연구보고서

단감으로부터 유용물질 탐색, 추출 및 가공방법 개발

Screening of Bioactive Substances from Sweet
Persimmon and Development of Its Functional Foods

단감으로부터 유용물질 탐색, 추출 단감의 실태조사 단감의 가공방법 개발

Screening and Extraction of Bioactive Substances from Sweet Persimmon
Survey of Actual Condition of Sweet Persimmon in Farms
Development of Functional Foods For Sweet Persimmon

연구기관

주관: 울산대학교

협동: 단감시험장

위탁: 한국식품개발원

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “단감으로부터 유용물질 탐색, 추출 및 가공방법 개발” 과제 (세부과제 단감가공방법 개발)의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10. 15.

주관연구기관명 : 울산대학교

총괄연구책임자 : 최 혜선

연구원: 정 춘수

연구원: 설 옥주

연구원: 최 지영

연구원: 사 유선

연구원: 강 상욱

연구원: 김 원영

연구원: 연 수인

연구원: 김 석기

협동연구기관명 : 단감시험장

협동연구책임자 : 손 길만

연구원: 노 치웅

연구원: 서 광기

연구원: 김 인하

연구원: 박 두상

위탁연구기관명 : 한국식품개발원

협동연구책임자 : 이 영철

연구원: 정 진웅

연구원: 송 효남

연구원: 김 영언

연구원: 오 세욱

연구원: 박 천희

요 약 문

I. 제 목

단감으로부터 유용물질 탐색, 추출 및 가공방법 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

* 현재 단감은 1975년 총 과실 생산량의 1%에서 1985년 경제성장과 함께 급격히 증가하여 1995년 생산량은 약 26배의 증가를 보이고 있다.

* 단감이 경제과일서 각광을 받으며 재배면적 및 생산량이 증가되었는데 87년을 기준으로 95년 전국재배면적은 220% 증가하였고 생산량도 237% 증가하였으며 경남의 경우 재배면적은 220%, 생산량은 314%의 높은 증가율을 보였다. 재배후 성목이 되는 10-15년후 물량이 한꺼번에 출하되어 생과일의 소비량이 제한되어 있는 것을 고려시 가격의 폭락이 예상되어진다. 따라서 단감재배의 합리성을 높이기 위해서는 단감의 유용물질의 탐색 및 추출, 가공에 의한 부가가치 증대방안이 절실히 요구되고 있다.

* 단감품종별 재배면적 비율은 부유가 82%로 가장 많아 일시에 홍수출하되므로 적당한 가공품의 개발은 필수적이라 할 수있다.

* 감은 과일 중에 오랜 역사를 가지고 있지만 가공이용면에서는 뒤떨어졌고 구미지역에서 많이 섭취하지 않아 기초적 영양학적 지식을 넘어선 생리적 효용성에 대해서는 거의 연구가 이루어지지 않았다. 단감의 생리적 유효성분이 구체적으로 어떠한 약리적 기능을 발휘하는가를 밝혀냄으로써 감의 소비확대의 전기를 마련할 수 있고 감을 일반기호식품에서 건강식품으로, 또 가능하다면 의약품의 원료물질로 이용하여 부가가치를 높일 수 있다.

* 우리나라에서는 감을 민간약으로 옛날부터 사용해 왔다. 종기나 염증질환, 치질에 꽃감을 이겨 붙였고 부스럼이나 화상에는 불에 말린 감을 바르면 통증을 멎게 하고 새살을 돋게 하는 효능이 있다고 알려져 있다. 감이 많이 나는 수덕사근처의 덕산면에는 감을 이용해 뇌졸중을 고치는 민간요법이 내려오고 감잎이나 감의 과육에는 고혈압을 예방하고 동맥경화에 효과가 있는 성분이 있다고 알려져 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 감과 관련된 전래의 민간요법과 이와 관련된 국내외의 연구 결과를 기초로하여 단감의 유용성분을 정량, 정성분석하여 기능성 식품을 개발함으로써 단감의 소비를 촉진시켜 농가소득증대에 기여하고, 국민건강의 증진에 기여하고자 한다.

1. 전래의 민간요법과 외국의 연구결과를 기초로 감의 유용성분의 탐색 및 추출.

가. 감이 숙취에 효과가 있다는 사실에 기인하여 감의 성분중 alcohol대사에 관여하는 alcohol dehydrogenase나 acetaldehyde dehydrogenase의 activator가 존재하는지 아니면 생성된 acetaldehyde의 효율적 배출 및 제거에 관여하는 성분이 있는지를 조사.

나. prostaglandin 합성 경로 억제물질이 응고기작에 관여하므로 항응고물질의 탐색

다. 소염작용과 통증저해 등의 효과에 비추어 prostaglandin 생합성의 경로에 관여하는 물질을 탐색

라. 고혈압저해 및 뇌졸중예방의 효과로 미루어 혈압강화제의 target enzyme인 angiotensin converting enzyme의 inhibitor의 탐색.

마. 유용물질중 alcohol 대사 촉진물질과 항응고물질의 대량 추출과 부분정제, 가공을 위한 기초자료로서 유용물질의 특성 조사.

바. 사람의 alcohol 대사에 대한 감의 영향.

사. 사람의 alcohol 대사에 대한 감가공식품, 감정과 의 영향.

아. 사람의 간세포주, HepG2 cell line에서 감의 alcohol대사 촉진물질의 영향

자. 감을 이용한 감식초, 꽃감등의 기존의 가공식품과 새로 개발된 가공식품에서 유용성분의 농도를 측정.

차. 계절별, 품종별에 따른 유용물질의 농도를 측정하고 새로운 가공식품제조의 기초자료로 활용.

2. 농가에서 단감 품질의 실태조사를 통해 저장이 간편한 가공식품의 개발의 필요성을 확인.

3. 유용물질의 함량을 높인 형태의 가공방법의 개발.

가. 감을 이용한 드링크 제품 개발

나. 감정과 제품 개발

다. 휴대용 gel 형 제품 개발

라. 감분말을 이용한 양갱개발

마. 제조공정도의 설정

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 감의 유용성분의 탐색과 추출, 특성연구: 효소추출물 수준에서 억제나 촉진에 의한 유용물질 탐색

가. alcohol 대사촉진물질: alcohol dehydrogenase (ADH) activator가 감과육에서 탐색되어 물추출물에서 발견되었고 acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activator는 감과육의 유기용매 추출물에서 발견되어 성분과 특성연구.

나. anticoagulant: 감과육과 껍지, 껍질 등에서 anticoagulant가 발견되어 분리, 정제 후 성분과 특성연구

다. prostaglandin inhibitor: 감과육과 잎에서 탐색. 각각 ethylacetate 추출물에서 발견되어 Silica gel과 HPLC에 의하여 분리. anticoagulant와는 다른 물질로 추정.

라. ACE inhibitor : 감잎에서 발견. ethylacetate 추출물에서 발견되어 Silica gel과 HPLC에 의하여 분리

마. 유용물질의 추출, 정제 및 특성

위의 4개의 유용물질중 alcohol대사촉진물질과 항응고물질이 선택되어 후속연구가 진행되었다.

1) Acetaldehyde Dehydrogenase Activator (ALDHA): 감과육에서 추출된 ALDHA는 유기용매분획, silica gel column, TLC, gel filtration, HPLC를 거쳐 정제되었다. 구성물질은 H-NMR, C-NMR, FAB-MS, FT-IR, 원소분석, Bio-LC chromatography를 통해 조사되어지고 주성분은 당으로 보이나 구조는 확실히 밝혀지지 않았다. ALDHA는 열에 안정하고 건조시, evaporation과 동결건조시에도 활성에 큰 변화를 보이지 않아 가공방법에 큰 제한이 없을 것으로 보인다.

2) 항응고물질: 항응고물질은 감꼭지에 높은 농도로 존재하고 유사한 물질이라고 생각되는 물질이 감과육에도 존재하는데 과육의 경우 분해하는 물질을 같이 가지고 있어 감꼭지보다 낮은 농도가 검출된다. 항응고물질의 물리, 화학적 특성에 대한 정보를 얻기 위해 높은 농도로 존재하는 감꼭지를 원료로 하여 항응고물질을 열처리, YM10 ultrafiltration, size-fractionated Sephadex G-100, hydrophobic phenyl Sepharose, and Sephadex G-150 column chromatography를 통해 정제하였다. 주성분은 다당류로 보이고 분자량은 130,000-180,000 dalton으로 측정되었다. 항응고물질은 온도에 대해 상대적으로 안정하고 건조시도 큰 변화를 보이지 않았다.

바. 사람의 alcohol 대사에 대한 감의 영향: alcohol 대사촉진물질은 임상실험에서 효과

가 입증되었음.

8명의 성인 남자를 대상으로 알콜 섭취시 감을 같이 섭취한 경우와 아닌 경우에 대하여 피와 뇨에서 알콜 및 aldehyde 농도 변화를 검사하였다. 대체로 감 섭취시 빠른 감소를 나타내었다. 특히 aldehyde의 감소속도가 현저히 빨라서 숙취해소제 개발의 가능성을 시사하였다.

사. 사람의 alcohol 대사에 대한 감가공식품, 감정과의 영향.

8명의 성인 남자를 대상으로 알콜 섭취시 감정과을 같이 섭취한 경우와 아닌 경우에 대하여 피와 뇨에서 알콜 및 aldehyde 농도 변화를 검사하였다. 감정과 섭취는 피와 오줌의 alcohol의 농도를 감소시켜 주었고 피에서의 aldehyde 농도는 크게 낮추지 못했지만 오줌에서의 aldehyde 농도를 저하시켰다. 생과육섭취시보다 피에서의 aldehyde농도저하는 현저하지 않으나 피에서의 alcohol 농도, 오줌에서의 alcohol, aldehyde농도는 감섭취시 현저한 저하를 보여 감정과는 alcohol 대사를 촉진시켜 주는 것으로 보인다.

아. 사람의 간세포주, HepG2 cell line에서 감의 alcohol대사 촉진물질의 영향

정제된 ALDHA를 간세포주에 배양시 세포생존율이 증가되기는 했으나 alcohol, acetaldehyde자체가 상당히 높은 농도에서도 큰 독성을 보이지 않아서 ALDHA의 활성화로 인해 이러한 변화가 일어났는지는 확실치 않다..

자. 가공식품에서 유용물질의 농도

1) Acetaldehyde Dehydrogenase Activator (ALDHA): 기존 가공품인 귤감과 감식초는 11월 출하된 단감과 비교시 60%, 4%의 활성이 검출되었고 새로 만들어진 감정과는 당을 처리하지 않은 것은 108%, 처리한 것은 71%, 89%로 활성화에 큰 변화를 보이지 않았다. 휴대용젤형 감즙은 67%를 보유한 반면 양갱에서는 20%, 감음료에는 6%의 활성이 남아 있어 alcohol 대사 촉진 효과를 강조한 가공품으로는 감정과가 가장 적합한 것으로 보임.

2) 항응고물질: 10월에 출하된 단감생과육활성을 기준으로 귤감은 6.7%, 감정과는 무처리, 설탕처리, 포도당처리시 0.4%, 0.5%, 0.5%, 양갱은 1.8%의 항응고활성을 보유하고 있었고 휴대용젤형(감즙), 감음료와 감식초는 활성이 검출되지 않았다. 가공식품은 모두 항응고물질의 농도가 생과일에 비해 급격히 저하되었는데 항응고물질이 열, 건조에 안정한 것으로 보아 공정과정에서 감과육의 항응고물질저해분자의 작용때문으로 보인다. 항응고물질을 강조한 가공품을 위해서는 저해분자를 제거, 불활성화시키는 방법이 강구되어야 한다.

차. 계절별, 품종별 유용물질의 농도의 변화

1) Acetaldehyde Dehydrogenase Activator (ALDHA): 단감은 11월 수확된 것의 활성이

가장 높았고 저장창고에 오래 보관할수록 활성이 급격히 저하되었다. 홍시는 가장 활성이 높은 단감과 비교시 50%정도, 서촌조생은 36%의 활성을 보유하고 있으나 단감이 수확시기에 따라 활성에 차이가 나는 것을 고려시 품종에 의한 차이는 크게 나지 않는 것으로 보인다.

2) 항응고물질: 항응고활성은 11월에 수확한 것이 가장 높고 저장이 길어지면서 급격한 감소를 보이고 있다. 갑주백목은 부유와 비교시 활성이 큰 차이를 보이지 않고 청도반시, 서촌조생은 활성이 낮았다. 부유의 경우 갑과육은 갑꼭지의 29%의 활성을 보유하고 있다.

2. 진영주변의 농가를 대상으로 한 농가단감품질실태조사가 수행되어 가공을 위한 기초 자료로 사용

3. 유용물질의 함량을 높인 형태의 가공방법의 개발.

가. 감을 이용한 드링크 제품 개발: 단감을 초파로 파쇄하여 물을 넣은 후 3시간 가열하고 추출하고 적정 첨가 당농도는 12.5%였고, 산으로 사용한 구연산의 적정 첨가량은 0.15%였다. 드링크 맛의 개선하기 위해서는 만다린 농축액 0.5%를 사용하는 것이 우수하게 나타났다. 이때 제품의 pH는 3.7이었다.

나. 감정과 제품 개발: 슬라이서로 일정두께로 절단한 단감 절편을 blanching하여 건조 후 당액을 침투시켜 제조

다. 휴대용 젤형 제품 개발: 단감을 박피하여 4절하고 씨를 제거하고 chopper에서 2번처리하여 마쇄하였다. 마쇄물에 덱스트린과 증점제(solstar-L)를 첨가제로 감, 덱스트린, solstar-L의 비율이 7 : 3 : 0.3 정도로넣고 균질화 하여 투명 필름 포장재에 충전, 밀봉한 후 끓는 물에서 12분간 살균하여 냉수에서 냉각하였다.

라. 감분말을 이용한 양갱개발: 한천과 물을 넣고 가열하면서 물에 불린 단감과 양대 분말(백앙금), 설탕, 펙틴을 일정시간 가열하고 성형틀에 부어 성형한 뒤 상온에서 식힌후 양갱을 제조하였다. 색도, 경도, 관능검사를 토대로 단감 분말 70 : 양대 분말 30의 비율로 제조.

SUMMARY

I. Title

Screening of Bioactive Substances from Sweet Persimmon and Development of Its Functional Foods

II. Purpose and Significance of the Study

* The production of sweet persimmon has been significantly increased. Its production in 1995 was 26-folds in 1975 due to economic growth in Korea.

* Since sweet persimmon was considered to have a large profit, its area of cultivation and production has been increased. The area of cultivation and production in 1995 was increased 220% and 237% on the basis of those in 1987. It is expected that within 5 years the profit will be significantly decreased, because the consumption of fresh fruit is limited. The persimmon trees will grow fully after 10-15 years of cultivation and the production of fruit will be overwhelmed. It is necessary to increase the consumption of persimmon by adequate processing and advertisement of its merit.

* Since the ratio of cultivation area is highest for Fuyu (82%) and its entry period to market is limited, various processings of persimmon are required for high profit.

* Persimmon has been consumed for long times in Korea, but it was not introduced actively in western countries. Since the study of persimmon has been focused on its nutritional effects, not much research was done for its biological effects. The study of biological effects of persimmon will increase the consumption of fruit and its profit. Persimmon can be considered to be one of health food and used to be a starting material for drugs. It will give large profit for cultivation farms.

* Persimmon has been used as a drug for a long time in Korea. It was used for treatment of pus, inflammation, and burns. Persimmon was also used for the treatment of stroke especially in Duksan, the area of large cultivation of persimmon.

III. Scope and Contents of the Study

our research was focused on elucidation of bioactive substances from sweet persimmon and development functional foods on the basis of its biological activities. It is expected to increase the consumption of sweet persimmon, its profit and public health.

1. Screening and extraction of bioactive substances from sweet persimmon on the basis of ancient treatments and new research results

A. Alcohol metabolism activator : alcohol dehydrogenase activator and acetaldehyde dehydrogenase activator

B. Anticoagulant

C. Prostaglandin pathway inhibitor

D. Target enzyme of hypertension: angiotensin converting enzyme inhibitor

E. Purification and properties of bioactive substances

F. Effects of sweet persimmon on alcohol metabolim in human

G. Effects of dried persimmon snack (persimmon jungwa) on alcohol metabolim in human

H. Effects of aldehyde dehydrogenase activator in human HepG2 cell line

I. Determination of concentrations of bioactive substances in processed foods

J. Determination of concentrations of bioactive substances in persimmon according to period of harvest and its species

2. Investigation of quality and marketing price of persimmon in farms

3. Development of processing methods for sweet persimmon with its biological activities

A. persimmon drink

B. dried persimmon snack (persimmon jungwa)

C. sterilized persimmon gel pack

D. sweetened persimmon stick using persimmon powder

IV. Results and Recommendation

1. Screening and extraction of bioactive substances from sweet persimmon

A. Alcohol metabolism activator

We have found alcohol dehydrogenase activator from water soluble fraction and acetaldehyde dehydrogenase activator from ethylactate fraction of persimmon pulp.

B. Anticoagulant

Anticoagulant activities was detected all parts of persimmon with highest activity in persimmon stem using human plasma and purified fibrinogen system.

C. Prostaglandin pathway inhibitor

Prostaglandin synthetase inhibitor was detected from persimmon pulp and persimmon leaf and it was seperated using organic solvent, silica gel and HPLC. It was different from anticoagulant.

D. Target enzyme of hypertension

Angiotensin converting enzyme inhibitor was detected from persimmon leaf and it was seperated using organic solvent, silica gel and HPLC.

E. Purification and properties of bioactive substances

Among above bioactive substances, alcohol metabolism activator and anticoagulant were chosen for further investigation.

1) Acetaldehyde Dehydrogenase Activator (ALDHA): ALDHA was purified from from persimmon pulp through organic solvent fractionation, silica gel chromatography, TLC, gel filtration and HPLC. Its components was investigated with H-NMR, C-NMR, FAB-MS, FT-IR, element analysis and Bio-LC chromatography. Major component seems to be carbohydrate, but its structure was not defined clearly yet. It was thermally stable and no significant change of activity was found after evaporation and lyophilization. It seems to be not many limitation for processing methods.

2) Anticoagulant: High concentration of anticoagulant was detected in persimmon stem and lower concentration was in persimmon pulp. It seems to be due to inactivating compounds found in persimmon pulp. It was purified through heat treatment, YM10 ultrafiltration, size-fractionated Sephadex G-100, hydrophobic phenyl Sepharose, and Sephadex G-150 column chromatographies. Major component seems to be a polysaccharide and the M.W. of anticoagulant was 130,000-180,000 dalton. It was relatively thermal- stable and activity was kept after lyophilization.

F. Effects of sweet persimmon on alcohol metabolism in human

After alcohol with or without persimmon was ingested for 8 men, the concentrations of blood alcohol, aldehyde, urine alcohol, and aldehyde were determined. The levels of alcohol and aldehyde was decreased in 6 of 8 men when treated with persimmon. Especially aldehyde was significantly lowered after persimmon intake, suggesting that persimmon could be used for alcohol intoxicification.

G. Effects of dried persimmon snack (persimmon jungwa) on alcohol metabolim in human

After alcohol with or without dried persimmon snack was ingested for 8 men, the concentrations of blood alcohol, aldehyde, urine alcohol, and aldehyde were determined. Intake of dried persimmon snack decreased the levels of alcohol in blood and urine and that of aldehyde in urine. The concentration of aldehyde in blood was not lowered significantly. Dried persimmon snack could be used for alcohol intoxicification.

H. Effects of aldehyde dehydrogenase activator in human HepG2 cell line

Cell viability was improved slightly when it was treated with ALDHA from persimmon pulp. However, HepG2 cells were not enough sensitive to be toxic to ethanol and acetaldehyde up to the tested concentrations.

I. Determination of concentrations of bioactive substances in processed foods

1) Acetaldehyde Dehydrogenase Activator (ALDHA): Each ALDHA activity was calculated on the basis of the activity of persimmon harvested on Nov.(100%). It was 60% and 4% for dried persimmon and persimmon vinegar, respectively. It was 108%, 71%, 89%, 67%, and 20% for dried persimmon snack (no sugar), that treated with sugar, that treated with glucose, sterilized persimmon gel pack, and sweetened persimmon stick, respectively.

2) Anticoagulant: Each anticoagulant activity was calculated on the basis of the activity of persimmon pulp harvested on Oct.(100%). It was 6.7% and 1.8% for dried persimmon and sweetented persimmon stick, respectively. It was 0.4%, 0.5%, and 0.5% for dried persimmon snack (no sugar), that treated with sugar, that treated with glucose, respectively. No activity was found for persimmon vinegar and sterilized persimmon gel pack.

J. Determination of concentrations of bioactive substances in persimmon according

to period of harvest and its species

1) Acetaldehyde Dehydrogenase Activator (ALDHA): ALDHA activity was highest in persimmon (Fuyu) harvested on Nov. Each ALDHA activity was calculated on the basis of the activity of persimmon harvested on Nov.(100%). It was 54% and 36% for red-ripe persimmon and early harvested persimmon (Syechon), respectively.

2) Anticoagulant: Anticoagulant activity was highest in persimmon stem (Fuyu) harvested on Nov. As the period of storage was increased, the activity was decreased. Each anticoagulant activity was calculated on the basis of the activity of persimmon pulp harvested on Nov.(100%). No difference was found between Fuyu and red-ripe persimmon. Anticoagulant activity of persimmon pulp was 29%.

2. Investigation of quality and marketing price of persimmon in farms

Farms near Jinyoung were selected and investigated.

3. Development of processing methods for sweet persimmon with its biological activities

A. persimmon drink: After persimmon was sonicated and boiled for 3 hr with water, sugar and acid was added to persimmon extracts in the ratio of persimmon: sugar: acid: mandarin concentrate (100:0.125:0.15:0.5).

B. dried persimmon snack (persimmon jungwa): After persimmon was sliced and blanched, sugar or glucose was infiltrated after drying.

C. sterilized persimmon gel pack: After persimmon skin was peeled and seeds were removed, persimmon pulp was chopped twice and homogenized. Dextrin and solstar-L were added to homogenate, mixed, and sterilized for packing in vinyl pack.

D. sweetened persimmon stick using persimmon powder: While agar and water were mixed and boiled, persimmon powder, white bean powder, sugar, and pectin were added. The mixture was molded according to shape of container and cooled to room temperature. The ratio of persimmon powder and white bean powder was 7:3 according to the results of color, hardness, and sense tests.

CONTENTS

Summary in Korean	2
Summary in English	7
Chapter 1 Introduction	16
Chapter 2 Screening and Extraction of Bioactive Substances from Sweet Persimmon	17
I. Introduction	17
II. Materials and Methods	18
1. Extraction of bioactive substances from sweet persimmon	18
2. alcohol dehydrogenase/acetaldehyde dehydrogenase assay	19
3. Determination of aldehyde level	20
4. Anticoagulating activity	20
5. Prostaglandin synthetase inhibitor	21
6. Angiotensin converting enzyme inhibitor	21
7. Cell cytotoxicity	22
III. Results and Discussion	22
1. Alcohol metabolism activator	22
2. Screening, purification and characterization of anticoagulant	47
3. Screening of angiotensin converting enzyme inhibitor	57
4. Screening of prostaglandin synthetase inhibitor	60
5. Determination of concentrations of bioactive substances in processed foods of persimmon	65
6. Determination of concentrations of bioactive substances according to persimmon's harvesting time and species	68
Chapter 3 Survey of Actual Conditions of Sweet Persimmons in Farms	68
I. Materials and Methods	68
1. Survey of actual conditions of sweet persimmons in farms	68
II. Results and Discussion	68
1. Characterization of persimmon according to its harvesting time	68
2. Price change of persimmon according to its sending-out time and grades	68
3. Quantity of sending-out persimmon according to grades	69
Chapter 4 Development of Functional Foods of Sweet Persimmon	71

I. Materials and Methods	71
1. Materials	71
2. Persimmon drink	71
3. Dried persimmon snack (persimmon jungwa)	72
4. Sterilized persimmon gel pack	72
5. Sweetened persimmon stick using persimmon powder	75
II. Results and Discussion	75
1.. Persimmon drink	75
2. Dried persimmon snack (persimmon jungwa)	78
3. Sterilized persimmon gel pack	80
4. Processing procedure of persimmon drink, dried persimmon snack, and sterilized persimmon gel pack	86
5. Sweetened persimmon stick using persimmon powder	88
Chapter 5 References	91

목 차

요약문	2
Summary	7
제 1 장 서 론	16
제 2 장 단감으로부터 유용물질의 탐색과 추출	17
제1절 서 설	17
제2절 연구재료 및 방법	18
1. 단감의 유효성분의 추출	18
2. alcohol dehydrogenase/acetaldehyde dehydrogenase assay	19
3. aldehyde level 측정	20
4. 항응고활성	20
5. prostaglandin 합성저해물질	21
6. angiotensin converting enzyme inhibitor	21
7. cell cytotoxicity	22
제3절 연구결과 및 고찰	22
1. alcohol 대사촉진물질	22
2. 항응고활성분획의 탐색과 정제	47
3. ACE 억제물질 탐색	57
4. prostaglandin 합성저해물질 탐색	60
5. 가공식품에서 유용물질의 농도	62
6. 감의 계절별, 품종별 유용물질의 농도변화	65
제 3 장 단감실태조사	68
제1절 재료 및 방법	68
1. 단감품질실태조사	68
제2절 결과 및 고찰	68
1. 시기별 과실특성조사	68
2. 단감등급별, 시기별 가격변동	68
3. 출하단감의 등급별 수량	69
제 4 장 단감가공방법 개발	71
제1절 재료 및 방법	71
1. 실험재료	71

2. 감을 이용한 드링크 제품 개발	71
3. 감정과 제품 개발	72
4. 휴대용 젤형 제품 개발	72
5. 감분말을 이용한 양갱개발	75
제2절 결과 및 고찰	75
1. 감을 이용한 드링크 제품 개발	75
2. 감정과 제품 개발	78
3. 휴대용 젤형 제품 개발	80
4. 각제품의 제조공정도	86
5. 감분말을 이용한 양갱개발	88
제 5 장 참고문헌	91

제 1 장 서론

* 현재 단감은 1975년 총 과실 생산량의 1%에서 1985년 경제성장과 함께 급격히 증가하여 1995년 생산량은, 15만 5천 톤으로 비율도 크게 늘어나 약 26배의 증가를 보이고 있다. 앞으로 과일의 수입개방이 가속화되면 이런 경향은 더욱 두드러져 경쟁력이 약한 감귤, 포도, 복숭아 등은 크게 위축되고 배, 단감 등이 증가될 전망이다.

* 단감이 경제과일서 각광을 받으며 재배면적 및 생산동향을 보면 87년을 기준으로 95년 전국재배면적은 220% 증가하였고 생산량도 237% 증가하였으며 경남의 경우 재배면적은 220%, 생산량은 314%의 높은 증가율을 보였다. 재배후 성목이 되는 10-15년후 물량이 한꺼번에 출하되어 생과일의 소비량이 제한되어 있는 것을 고려시 가격의 폭락이 예상되어진다.

* 과실생산량과 소비량 측면에서 95년 1인당 단감소비량이 3.8 kg정도인데 2001년 5 kg으로 증가될 것을 고려해도 연간 수요량 22만톤은 현재재배면적 22000ha는 적정재배면적의 한계선으로 볼 수 있다. 따라서 단감재배의 합리성을 높이기 위해서는 단감의 유용물질의 탐색 및 추출, 가공에 의한 부가가치 증대방안이 절실히 요구되고 있다.

* 단감품종별 재배면적 비율은 부유가 82%로 가장 많고 차랑, 대안단감, 서촌조생, 이두, 미가도, 선사환 순인데 만생종인 부유품종이 편중 재배되어 일시에 홍수출하되므로 적당한 가공품의 개발은 필수적이라 할 수있다.

* 저장시설이 영세한 농가에서 한꺼번에 출하시나 상품가치가 떨어지는 과일처리시 생리적 효용물질의 농도가 높은 적당한 가공과정을 거쳤을 때 고부가가치의 상품을 만들 수 있다.

* 감은 과일 중에 오랜 역사를 가지고 있지만 가공이용면에서는 뒤떨어졌고 구미지역에서 많이 섭취하지 않아 기초적 영양학적 지식을 넘어서 생리적 효용성에 대해서는 거의 연구가 이루어지지 않았다. 단감의 생리적 유효성분이 구체적으로 어떠한 약리적 기능을 발휘하는가를 밝혀냄으로써 감의 소비확대의 전기를 마련할 수 있고 감을 일반기호식품에서 건강식품으로, 또 가능하다면 의약품의 원료물질로 이용하여 부가가치를 높일 수 있다.

제 2 장 단감으로부터 유용물질의 탐색과 추출

제 1 절 서설

* 우리나라에서는 감을 적으나마 민간약으로 옛날부터 사용해 왔다. 종기나 염증질환, 치질에 꽃감을 이겨 붙였고 부스럼이나 화상에는 불에 말린 감을 바르면 통증을 멎게 하고 새살을 돋게 하는 효능이 있다고 알려져 있다. 감이 많이 나는 수덕사근처의 덕산면에는 감을 이용해 뇌졸중을 고치는 민간요법이 내려오고 감잎이나 감의 과육에는 고혈압을 예방하고 동맥경화에 효과가 있는 성분이 있다고 알려져 있다. 또 감의 탄닌, 능금산 성분은 지사작용의 효과가 알려져 있고 딸꾹질이나 야뇨증에도 사용이 되고 있다.

* 감과 관련된 전래의 민간요법과 이와 관련된 국내외의 연구 결과를 기초로하여 단감의 유용성분을 탐색, 추출하여 특성을 규명하고 단감을 이용한 가공식품을 기능성식품화하는 기초자료로 이용하고자 한다. 이는 단감의 소비를 촉진시켜 농가소득증대에 기여하고, 국민건강의 증진에 기여할 수 있다.

* 국내연구는 감에 대한 영양학적 관점에서 구성분에 대한 연구가 주류를 이루고 있다. 감에는 무기질로 칼슘이 124 mg, 철분 5.2 mg, 인 413 mg가량 들어있다. 감꼭지에는 무질소결정성물질이 함유되어있고 과육에는 전화당이 14%, 능금산이 0.3% 그리고 탄닌, 산화효소들이 미량들어 있다. 특히 vitamin A (450 IU)와 vitamin C (30 mg)가 다량 함유되어 감 1개를 섭취시 1일 권장량으로 충분하다는 것이 알려져 있다.

* 구미에서 감을 많이 섭취하지 않으므로 감에 대한 연구가 거의 없고 일본에서 감의 생리적 효용성에 대한 연구가 되어 있다. 감잎은 일본에서 전통적으로 고혈압의 치료에 사용되어 왔다. 잎에서 추출한 tannin이 혈압강하의 유효성분으로 추측되고 있으나 Ucida, S. *et al.* (1995)에 의하면 tannin은 혈압강하에는 직접효과가 없으나 고혈압쥐의 수명을 연장시키고 뇌졸중이 일어나는 빈도를 낮추었다. Kameda *et al.* (1987) 은 잎의 flavonoid 성분들도 혈압강하에 작용하는 Angiotensin converting enzyme (ACE) activity에 약간의 저해작용이 있는 것을 시사하고 있다. Okonogi, T. *et al.* (1979)에 의하면 감의 tannin성분은 snake venom과 bacterial toxin의 해독제로도 효과가 있음이 보고되고 Hibasami *et al.* (1996)에

의하면 감추출물은 human lymphoid leukemia Molt 4B cell에 투여시 세포의 성장저해와 programmed cell death를 유도하는 것을 보여주고 있어 감추출물에 항암효과를 가진 성분이 있을 것을 예시하고 있다..

제 2 절 연구재료 및 방법

1. 단감의 유효성분의 추출

가. 유효성분의 추출

단감의 유효성분중 물에 녹는 분획을 추출하기 위해 단감의 각 해당 부위(꼭지부분, 과육, 껍질, 씨, 감잎)를 잘게 잘라 10 mM Tris-Cl, pH 7.5에 넣은 후 ice-chilled bead beater(Bio-Spec)를 이용하여 5분간 pulse를 주고 homogenization시킨다. homogenate는 A-8.24 rotor를 이용한 T-324 refrigerated centrifuge를 이용하여 10,000 xg 에서 40분간 원심분리시켜 상등액을 얻어낸다. 상등액을 분자량 10,000 dalton을 기준으로 가르기 위해서는 PM-10 membrane을 이용한 ultrafiltration을 시켜 10,000 dalton이하의 filtrate와 10,000 dalton 이상의 물질을 갈라 각 분획을 조사한다.

유기용매에 녹는 분획을 추출하기 위해서는 위에서 얻어진 상등액을 methanol, butanol, ethylacetate, methylene chloride, hexane, chloroform과 각각 섞은 후 partition flask에 방치하여 각 용매에 용해도가 있는 분획을 가른 후 각각을 evaporator를 이용하여 농축시킨다. 각 분획의 무게를 측정하고 각 분획을 assay 조건을 저해하지 않는 가능한 용매에 녹인 후 각 assay에 대한 영향을 측정한다. 긍정적인 결과가 나온 분획을 유기용매를 연속적으로 사용하여 불순물을 없애고 어느 정도 정제를 한 후 thin-layer chromatography를 하고 이 결과를 바탕으로 silica gel chromatography를 통해 정제를 거치고 마지막으로 HPLC에서 C₁₈ column을 이용한 reversed phase 에서의 여러 가지 용매를 가지고 용출을 시도하여 정제를 하여 사용한다.

나. alcohol 대사 촉진물질 (aldehyde dehydrogenase activator)

단감의 각 해당 부위(꼭지부분, 과육, 껍질, 씨, 감잎)를 잘게 잘라 최소한의 증류수를 넣고 ice-chilled bead beater(Bio-Spec)를 이용하여 5분간 pulse를 주고 homogenization시킨다. 유기용매에 녹는 분획을 추출하기 위해서는 위에서 얻어진 상등액을 ethylacetate와 섞은 후 partition flask에 방치하여 ethylacetate에 용해도가 있는 분획을

가른 후 이 분획을 evaporator를 이용하여 농축시킨다. 농축액은 methanol에 녹이고 silica gel chromatography에 loading하여 chloroform과 methanol의 비율을 낮추어 가며 점진적으로 용출시킨다. alcohol 대사 촉진물질은 chloroform과 methanol의 비율이 98:2일 때 용출된다. 용출액을 농축시킨후 preparative silica gel TLC에 실어 chloroform과 methanol의 비율이 9:1 로 develop하여 정제를 거치고 다시 농축하여 작은 분자를 정제하기 위한 Sephadex LH-20을 거쳐 마지막으로 HPLC에서 C₁₈ column을 이용한 reversed phase에서 물로 씻어주고 100% methanol로 용출하여 정제한다.

다. 항응고물질

단감의 유효성분중 물에 녹는 분획을 추출하기 위해 단감의 각 해당 부위(꼭지부분, 과육, 껍질, 씨, 감잎)를 잘게 잘라 10 mM Tris-Cl, pH 7.5에 넣은 후 ice-chilled bead beater(Bio-Spec)를 이용하여 5분간 pulse를 주고 homogenization시킨다. homogenate는 A-8.24 rotor를 이용한 T-324 refrigerated centrifuge를 이용하여 10,000 xg 에서 40분간 원심분리시켜 상등액을 얻어낸다. 항응고물질을 저해하는 물질을 불활성화시키기 위해 상등액을 60°C에서 15분 열처리 한다. 상등액을 분자량 10,000 dalton을 기준으로 가르기 위해 PM-10 membrane을 이용한 ultrafiltration을 시켜 10,000 dalton 이상의 물질을 농축하여 얻어낸다. 먼저 Sephadex G-100을 거쳐 활성이 있는 분획을 분리하고 PM-10 membrane을 이용한 ultrafiltration으로 부피를 줄인후 hydrophobic phenyl Sepharose column에 실어 column에 단단히 붙은 활성이 있는 분획을 10 mM Tris-Hcl, pH 7.5로 용출시킨다. 그후 다시 size-fractionation시키는 Sephadex G-150 이나 Sephacryl S-300을 통해 활성이 있는 분획을 얻는다. 분석을 위해서는 3차증류수로 투석시키거나 gel filtration column에서 물로 용출시킨후 lyophilization시켰다.

2.alcohol dehydrogenase/ acetaldehyde dehydrogenase assay

감을 숙취에 효과가 있다는 사실에 기인하여 감의 성분중 alcohol대사에 관여하는 alcohol dehydrogenase나 acetaldehyde dehydrogenase의 activator가 존재하는지 아니면 생성된 acetaldehyde 의 효율적 배출 및 제거 (Wickramasinghe, S. N. *et al.*, 1995) 에 관여하는 성분이 있는지를 조사한다. enzyme은 활성이 풍부한 쥐의 간에서 얻으려고 하고 Ku, H. S. *et al* (1992)의 방법을 변형하여 사용했다. 쥐의 간을 칼로 잘게 썬후 Teflon-pestle Wheaton Elvehjem조직파쇄기를 이용하여 70 mM sucrose, 220 mM mannitol을 포함한 20 mM HEPES, pH 7.4 으로 20% 를 만든 후 20 strokes로 파쇄한다. homogenate는 100,000 xg에서

60분 원심분리시켜 상등액을 얻는다. 상등액은 35-60% ammonium sulfate fractionation을 시킨 후 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol을 함유한 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4에서 하룻밤 투석시킨다. 염이 제거된 효소액을 DEAE-Sephadex column에 도입하여 결합되지 않은 단백질을 씻어버리고 10-100 mM sodium phosphate, pH 7.4로 gradient elution시킨다. 활성이 있는 분획을 모아 충분히 투석후 hydroxyapatite column에 충전 후 10-500 mM potassium phosphate, pH 7.4로 linear gradient를 형성하여 효소를 용출시킨다. 마지막으로 5'-AMP Sepharose 4B column에 실어 0.25 mM NAD를 함유한 10 mM phosphate, pH 7.4로 용출시킨다. 오줌에서 alcohol의 농도측정시에도 96 well을 이용한 alcohol dehydrogenase assay를 하여 alcohol의 standard curve를 그린후 측정한다. acetaldehyde dehydrogenase의 활성 측정은 Blackwell, L. F. (1983)의 방법을 변형하여 사용한다.

3. aldehyde level 측정

0.5 ml의 피나 오줌을 5 ml 의 3.6 M HCl 에 준비된 0.01 M DNP hydrazine에 처리하고 상온에서 30분간 섞어준다. 20 ml의 hexane을 첨가후 organic phase를 분리하고 10 ml의 물로 3번 씻어준다. hexane에 남아있는 약간의 물은 Na₂SO₄를 넣어 제거한다. 유기용매층을 분리하여 evaporation 시키고 CH₃CN:water (1:1) 로 녹여 20 ul씩 HPLC에서 분석하였다. C₁₈ column에 loading 하고 mobile phase는 CH₃CN:water (1:1)을 사용하여 0.5 ml/min로 elution 하였다. aldehyde DNP hydrazine은 356 nm에서 검출되었고 retention time은 9.7 min이고 blood control 에는 해당 peak 가 관찰되지 않았다.

4. 항응고활성

Fresh normal human blood (54 ml) 를 6 ml of 3.8% sodium citrate에 넣어 잘 섞어준다. Plasma는 initial whole blood를 400 g for 10 min에서 centrifugation하고 800 g for 20 min에서 second centrifugation하여 residual platelet을 제거한다. Activated partial thromboplastin time (APTT)과 thrombin time (TT)은 420 nm에서 흡광도의 증가에 의해 측정되었다. APTT assay는 1 ml에 0.3 ml platelet poor plasma, 0.3 ml APTT reagent와 다양한 농도의 fraction을 포함한다. 반응용액은 37°C에서 2 min간 배양하고 반응은 8 ul 의 1 M CaCl₂을 첨가하여 시작한다. TT는 APTT reagent와 CaCl₂ 를 빼고 반응이 thrombin (0.8 ug/ml)을 첨가하면서 시작한다. clotting time은 흡광도의 증가가 급격히 일어나는 시간을 잡았다 ($\Delta A_{420} > 0.010$). 같은 방법이 snake venom, reptilase activity를 측정하기 위해 사용

되고 4 ug/ml의 reptilase가 thrombin 대신에 사용되었다. fibrinogen clotting time을 위한 반응용액은 정해진 농도의 fibrinogen을 50 mM NaCl를 포함하는 0.2 M borate buffer, pH 7.8 에 넣어주고 반응은 1 ug/ml of thrombin을 넣어 준다.

5. prostaglandin 합성저해 물질

prostaglandin synthesis의 속도결정단계에 해당하는 prostaglandin H synthase 1은 cyclooxygenase와 peroxidase activity를 모두 가지고 있다 (Tam, S., S. et al., 1995) lipooxygenase pathway는 HPETE, HETE를 합성하고 cyclooxygenase는 cyclic endoperoxide (PGG and PGH)와 PGE, PGD 등의 일련의 대사물질을 합성한다. aspirin이나 indomethacin 같은 알려진 nonsteroidal anti-inflammatory drug (Amin et al., 1995) 는 단지 cyclooxygenase만을 저해한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 나누어진 분획중 cyclooxygenase에 대해 억제 정도를 측정한다. bovine seminal vesicle을 homogenize한 후 12,000 g에서 10분동안 원심분리한 후 상등액을 100,000 g에서 1시간 원심분리하고, 침전물을 Tris 완충용액 (pH 8.3, 50 mM) 으로 현탁시켜 효소 7.5용액으로 사용하였다. 효소용액 130 ul, 4.9 mM glutathione 0.5 ml, 5.0 mM epinephrine 0.5 ml, Tris 완충용액 (50 mM pH 8.3) 1.5 ml을 섞고 37°C에서 6분 동안 반응시킨후 2.5 ml ethylether로 2회 세척한다. 1N HCl 로 pH 2.0이 되도록한 후 ethyl ether로 3회 추출한다. 건조시킨후 0.1 ml ethyl alcohol에 녹이고, 0.1 ml 2.5N alcoholic KOH, 0.1 ml 1 % dinitrobenzene와 ice bath에서 20분 동안 빛을 차단한 채 반응시킨다. 0.8 ml 80 % 알콜을 넣고 580nm에서 측정한다.

6. angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor

고혈압저해 및 뇌졸중예방에 사용되어 온 것으로 미루어 현재 혈압강화제의 target enzyme인 angiotensin converting enzyme의 inhibitor의 함유를 조사한다. ACE inhibitor의 activity는 Cushman and Cheung (1971)의 방법을 변형한다. rabbit lung powder를 구입하여 1 uM ZnCl₂를 보유한 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.3에 녹인후 cell sonicator를 이용하여 5분간 output 3으로 pulse를 주어 깨준다. homogenate는 4°C 에서 37,000 xg에서 30분간 원심분리시켜 상등액을 얻는다. 상등액은 동일 buffer로 투석시키고 농축시킨다. ACE activity는 hippuryl-His-Leu에서 방출된 hippuric acid의 양을 측정한다. 반응용액은 0.1M potassium phosphate, pH 8.3, 0.3M NaCl, 2.5 mM hippuryl-His-Leu와 ACE, 그리고 조사하고자 하는 분획이나 증류수를 넣어준다. 37°C에서

1시간 배양후 1 N HCl을 0.25 ml 넣어 반응을 종결시키고 1.5 ml ethylacetate를 넣어 hippuric acid를 추출해 낸다. 반응액을 원심분리후 1 ml을 꺼내어 evaporation시키고 1ml의 물로 녹여 228 nm 에서 흡광도를 측정하여 방출된 hippuric acid를 계산하고 ACE 억제율을 측정한다.

7. cell cytotoxicity

세포주는 human hepatocyte cell line HepG2를 사용하여 ethanol induced hepatotoxicity를 측정하고 감의 추출물 투여시 toxicity를 완화시킬 수 있는지를 관찰 할 것이다. cell line은 한국세포연구원에서 분양받아 사용할 것이다. 세포는 RPMI 1640 medium에 10% fetal bovine serum을 넣고 exponential growth에 이른 후 사용한다. cell cytotoxicity는 여러 가지 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 가해진 MTT가 spectrophotometer로 측정될 수 있는 blue formazan product를 형성하는 cellular reduction에 의존한다. 세포는 96 well plate에 1×10^4 cell 이 inoculation되고 100 ul의 배양액이 첨가된다. 세포는 ethanol, 감의 여러 분획등과 함께 또 따로 따로 여러 농도에서 투여되어 37°C 에서 24 시간간 배양된다. 50 ul MTT (1 mg/ml) 이 각 well에 더해주고 4시간 더 배양된다. MTT가 제거되고 DMSO를 넣어 formazan을 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. alcohol 대사촉진물질 (alcohol/acetaldehyde dehydrogenase activator)

가. alcohol/acetaldehyde dehydrogenase (ADH/ALDH) 의 정제

시판되는 효소는 yeast에서 얻어진 효사이므로 포유동물에서 ADH, ALDH를 얻기 위해 소의 간을 사용하여 정제하였다. 소의 간은 울산근교의 도살장에서 준비하고 피, 응고혈액등을 제거하기 위해 흐르는 물에서 장시간 씻어준후 1 kg단위로 -20°C에 보관한다. 300 g의 조직에 10 mM Tris-HCl, pH 7.5를 500 ml 넣고 homogenizer로 2분간 갈아준후 cytosol을 얻기 위해 10,000 xg, 40분간 원심분리시킨다. 상등액에 40-70% ammonium sulfate fractionation을 시킨후 얻어진 침전물을 여러차례 10 mM Tris-HCl, pH 7.5를 갈아주면서 10 mM Tris-HCl, pH

7.5에 대해 투석한다. 투석후 얻어진 물질을 10,000 xg, 10분간 원심분리시켜 맑은 용액을 얻어 DEAE-Sephadex A-50에 실어준다. ADH, ALDH는 0.2-0.5M KCl, 0.5M KCl 농도에서 각각 용출되어 YM10을 이용하여 농축시킨후 분획을 -20°C에 보관하였다.

나. 감에 의한 alcohol dehydrogenase (ADH) 의 활성화

단감을 감꼭지, 감과육, 감속, 감껍질, 감씨의 부위별로 나누어 alcohol dehydrogenase (ADH), acetaldehyde dehydrogenase (ALDH)를 활성화시키는지를 측정했다. ADH는 효모의 ADH와 소의 간에서 ADH를 정제하여 사용했다. 감과육을 물로 추출하고 이를 건조시킨 후 물에 다시 녹인 결과 효모의 ADH는 과육은 2배, 속은 1.7배, 껍질은 1.4배의 효소활성 촉진 효과가 있음을 확인 하였다 (Fig. 1-1). 단감에는 소의 간에서 얻어진 ADH에 대한 activator가 존재함을 확인하고 단감을 분획을 나누기 위해 단감의 과육을 hexane 으로, 속을 methylene chloride로 추출하고 여기에 물을 첨가하여 분배시킨 후 물 층을 효소에 첨가한 결과 촉진효과는 그림 2에서와 같이 농도에 의존적이고, 조사된 최대의 속도에서 과육은 7.4배, 속은 15.4배의 높은 효소활성 촉진효과가 있음을 확인하였다.

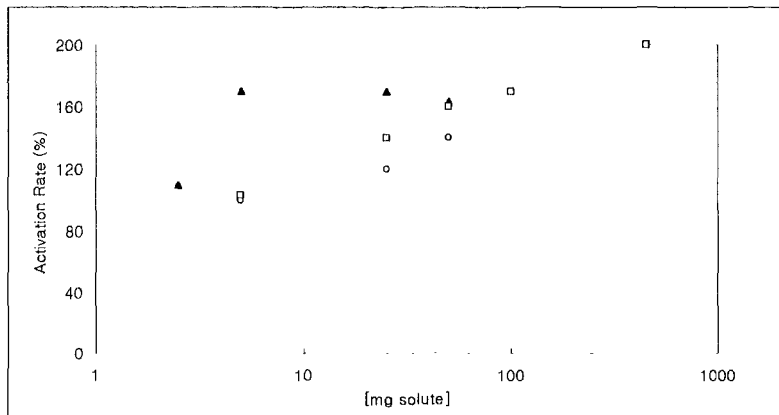


Fig. 1-1. Effect of sweet persimmon extracts on yeast ADH (Alcohol Dehydrogenase).

Each parts of the persimmon was extracted with water. The 100 % of activity was determined with used amount of water and enzyme. Symbols; ▲; core(속), □; pulp(과육), ○; peel(껍질)

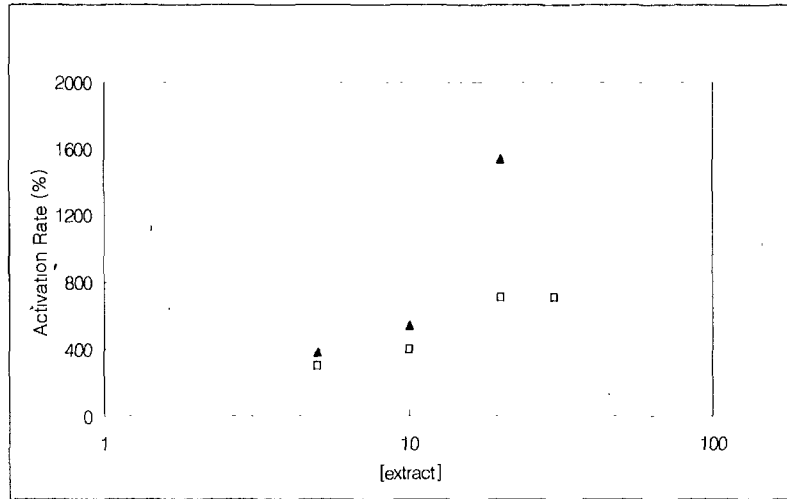


Fig. 1-2. Effect of sweet persimmon extracts on bovine liver ADH.

The pulp of the sweet persimmon was extracted with hexane, and the core was extracted with methylene chloride. The aqueous part was separated from each solvent part and the aqueous one was used for the assay. The 100 % of activity was determined with used amount of water and enzyme.

Symbols: ▲; core(속), □; pulp(과육)

다. 감에 의한 acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) 의 활성화

소의 간에서 얻어진 aldehyde dehydrogenase (ALDH)에 대한 activator가 존재함을 확인하였다. 단감의 과육과 감속을 ethylacetate로 추출하고 건조시킨 후 methanol에 녹여 효소에 첨가한 결과 Fig. 1-3에서 보이는 바와 같이 농도의존적인 효소활성 촉진효과를 보였으며, 조사된 최대의 속도에서 과육은 1.4배, 속은 2배의 촉진효과가 있음을 확인하였다. Fig. 1-2, 1-3에서 제시한 결과는 단감을 숙취제거용으로 이용할 수 있음을 시사하고 있다.

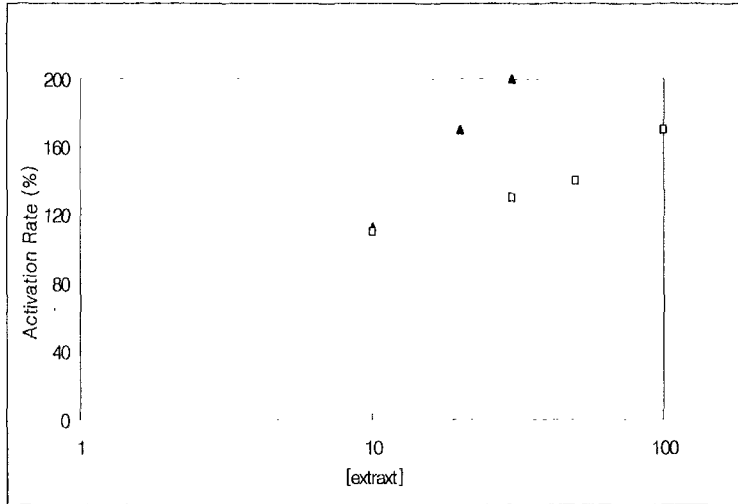


Fig. 1-3. Effect of sweet persimmon extracts on bovine liver ALDH.

The pulp and core of sweet persimmon were extracted with ethylacetate. The extracts were dried and dissolved with methanol. They were reacted with enzyme. The 100 % of activity was determined with used amount of methanol and enzyme.

Symbols: ▲; core(속), □; pulp(과육)

라. 감과육과 감속에서 acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성화 분획의 정제

감과육과 감속에서 ALDH 활성화분획이 발견되었으므로 분석을 위한 정제를 시작했다. ALDH activator를 분리하기 위해 TLC plate에서 여러 유기용매를 사용하여 develop시킨 결과 water: methanol의 비를 증가시켰을 때 ALDH activator의 이동이 커졌다. ALDH activator분획은 NAD 유사물질일 가능성이 높으므로 340 nm에서 검출하였다. 감과육 1 kg에 가능한 소량의 증류수를 더한후 blender로 10 분간 완전히 부수고 1L의 ethylacetate를 첨가하여 잘 섞어준후 3시간후에 가제에 거른후 상등액을 분획한다. 유기용매층을 모아 evaporation시킨후 methanol에 녹이고 silica gel chromatography에 loading한다. silica gel은 10 bed volume의 hexane, methylene chloride로 씻어주고 methanol로 용출하여 evaporation시킨다. 0.2 u filter로 filtration시킨후 C₁₈ HPLC column에서 분리한다. column은 15분간 0-100% methanol의 gradient를 사용하고 그후 20분간 100% methanol로 isocratic elution을 하였다. 감과육, 감속모두 100% methanol로 용출되는 retention time '27분에서 ALDH activator가 발

여 백

지 않은 것으로 보였다. ALDHA에 buffer만 처리한 것을 100%로 잡았을 때 β -N-acetyl hexoseaminidase, lysozyme처리시에는 각각 63, 58%의 활성이 보유되었지만 hyaluronidase, heparinase, crude α -amylase처리시에는 전혀 ALDHA에 의한 활성이 일어나지 않아 ALDHA가 이런 효소와 작용하는 특이적인 구조를 보유하지 않았나 추정되어진다. 또 pectinase처리시에는 활성증가가 일어나서 ALDHA에 pectinase를 처리후 37°C에서 배양시 2, 5, 26 시간후의 활성 측정시 Fig. 1-5에서 와 같이 처리하지 않은 것보다 2-3배의 활성 증가를 보였다. pectinase에 의해 활성의 증가가 일어나기는 하나 ALDHA에대한 효과일수도 있고 pectinase자체가 ALDH를 활성화시킬 수도 있다. 결론적으로 ALDHA는 hyaluronidase, heparinase에 분해되는 구조를 활성부위에 보유하고 있는 물질로 추정된다. ALDHA의 온도에 대한 영향을 보기 위해 HPLC정제된 ALDHA를 10, 50, 60, 70, 100°C에서 15분간 처리하고 ALDH에 대한 활성정도를 측정했을 때 Fig. 1-6에서와 같이 100°C에서도 활성이 크게 저하되지 않아 위에서 관찰된 열처리시의 활성저하는 37°C, 16시간의 배양에 의해 안정도가 떨어진 상태에서 열처리가 주는 영향으로 보인다. 열에 대한 안정도가 상당히 높아 가공방법에 큰 제한이 없을 것으로 보인다. 건조시의 ALDHA의 활성의 변화를 측정시 HPLC 정제후에는 methanol 용액에 존재하므로 evaporation시켰고 생과육의 상태에서는 동결건조후 활성의 변화를 측정하였다. Fig. 1-7에서와 같이 evaporation시 90%, 동결건조시는 85%의 활성보유로 ALDH를 활성화시키는 능력은 큰 변화를 보이지 않았다. 구조를 규명하기 위해서는 mg 수준의 안정된 순수한 물질이 필요한데 ALDHA의 경우 정제단계에서 많은 활성이 소실되고 정제후에는 빠른 속도로 활성을 잃어버려 구조분석에 많은 어려움을 가지고 있고 다양한 시도에도 불구하고 현재 확실한 구조는 규명이 되지 않았다.

원소	C	H	N	S	O
감과육 ALDH activator	66.033	11.242	0.251	0	23.974
heparin	17.9	3.1	1.5	10.0	45.5

Table 1-2. 감과육 ALDHA의 원소분석

	Fuc	GalN	GluN	Gal	Glu	Man	NAc Neu	GluC	NGly	Neu	IduC
6N HCl heparin			5.42								
6N HCl 감과옥				0.58	0.17						
TFA heparin			0.59	0.06	0.04	0.04					
TFA 감과옥				1.00	0.25						
0.1N HCl heparin											0.16
0.1N HCl 감과옥											

Table 1-2. BioLC에 의한 감과옥ALDHA의 구성당분석

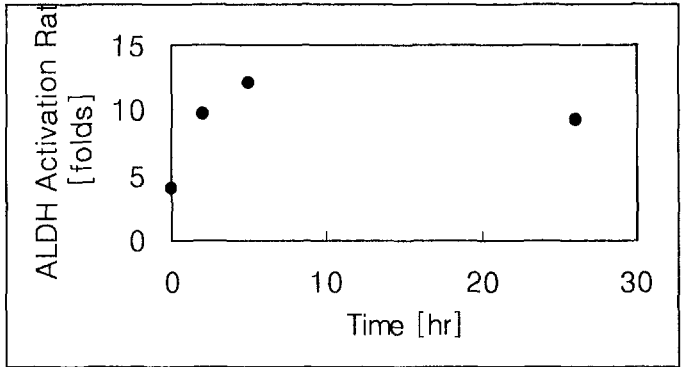


Fig. 1-5. 단감의 ALDHA에 pectinase 처리후의 활성의 변화

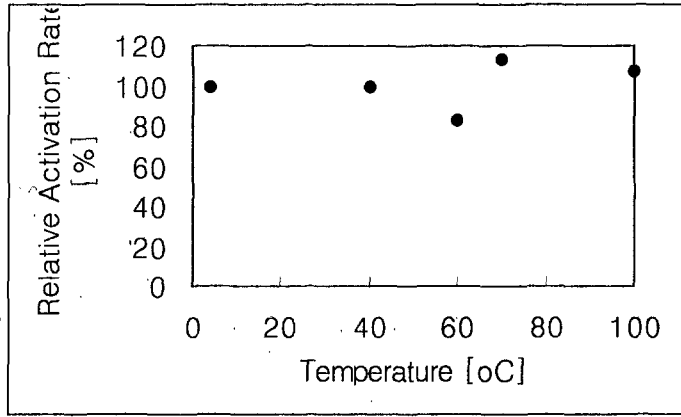


Fig. 1-6. Thermal stability of ALDHA

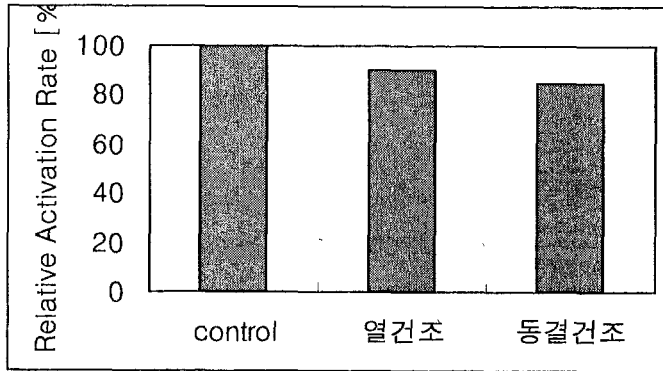


Fig. 1-7. 건조에 의한 ALDHA의 활성의 변화

Treatment	Activation Fold	Activation Fold After Heat Treatment
control	14.3	14.0
buffer only	6.4	3.1
pectinase	14.3	14.5
β -N-acetyl hexoseaminidase	4.0	2.7
lysozyme	3.7	2.6
hyaluronidase	0.91	0.9
heparinase	1.0	1.0
α -amylase	0.91	1.0

Table 1-3 Effects of various enzymes related to carbohydrate metabolism on ALDHA

바) 사람에게서 ALDH activator의 효과

인체에서 alcohol 섭취시 감과육의 ALDH activator가 alcohol의 대사를 촉진시켜주는지를 알기 위해 8명의 subject (20대 중반의 남성)를 대상으로 실험하였다 (Table 1-4). 25% alcohol을 3 ml/kg 투여시 감과육 8.5 g/kg을 함께 또는 없이 시간에 따른 피 속의 alcohol 농도 (Fig. 1-9), aldehyde농도 (Fig. 1-10), urine의 aldehyde 농도 (Fig. 1-11)를 측정했다. 피 속의 alcohol농도는 8명중 5명은 감섭취시 더 빠른 감소를 보였다. 그중 4인은 감섭취시 현저한 감소를 보였고 1인은 약간의 감소를 보였다. 8인중 1인은 혈중 alcohol 농도에

거의 차이가 없었고 2인은 감섭취시 오히려 약간의 증가를 보였다. 감섭취시 혈중 alcohol농도의 증가를 보인 1인은 당일 감기, 몸살로 상태가 좋지 못했다. 피와 오줌에서 aldehyde농도 측정시 감섭취후 오줌에서의 aldehyde는 7인의 subject에서 현저한 차이를 보이며 감소되었고 1인의 경우는 거의 차이가 없었다. 피에서의 aldehyde의 농도는 피를 뽑은 후 얼려 보관후 나중에 aldehyde 를 추출하였는데 피 자체의 높은 단백질의 농도에 의해 부착되어서 인지 농도의 변이가 오줌보다 심했지만 5인은 감섭취시 aldehyde 농도가 현저하게 낮아졌고 2인은 약간 낮았고 1인은 거의 차이가 나지 않았다. 위의 결과에 종합하면 감섭취는 혈중 alcohol의 농도를 저하시켜 주기도 하지만 aldehyde 농도를 현저히 저하시키는 것으로 보인다. 감과육의 ALDH activator가 aldehyde dehydrogenase를 활성화시켜 체내에 생성된 aldehyde를 빨리 없애주어 농도를 저하시키는 것으로 보여 감을 숙취해소제로 사용할 수 있는 가능성을 보여 주고 있다.

Table 1-4. Description of Each Subject

Subject	Age	Weight [kg]	Height [cm]	Color of face	Usual amount of alcohol	Frequency	Period of Intoxication after alcohol	Symptom of hangover after alcohol consumption	Period of intoxication after alcohol + Persimmon
1	25	66	165	slightly flusher	24% x 700 ml	1/7 days	16 hrs after	headache after 4-9 hrs	9 hrs after
2	26	74	172	none	24% x 525 ml	2/7 days	7 hrs after	none	6 hrs after
3	25	82	180	flusher	24% x 350 ml	0.5/7 days	3 hrs after	slight headache	2 hrs after
4	24	54	172	flusher	24% x 350 ml	0.5/7 days	16 hrs after	severe headache after 2-5 hrs	6.5 hrs after
5	24	55	168	none	24% x 350 ml	2/7 days	5 hrs after	headache after 0.3-3hrs	5 hrs after
6	22	61	174	flusher	24% x 350 ml	2/7 days	day after noon	headache after 1-2 hr	day after morning
7	25	71.5	179	flusher	24% x 875 ml	2/7 days	3.3 hrs after	slight headache	3 hrs after
8	25	73	178	flusher	24% x 350 ml	1.5/7 days	4 hrs after	slight headache	3 hrs after

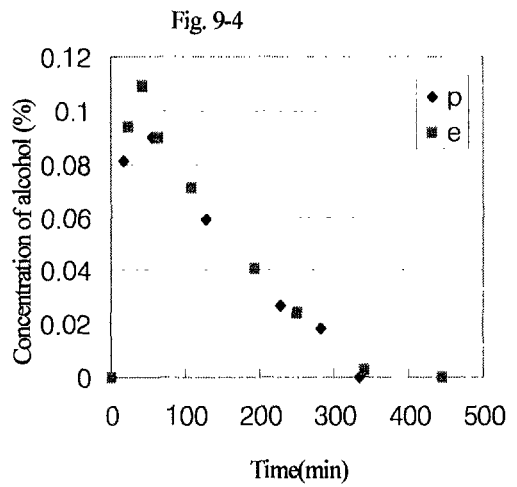
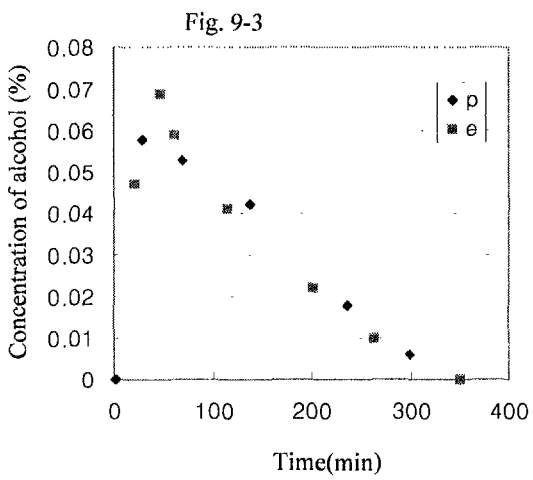
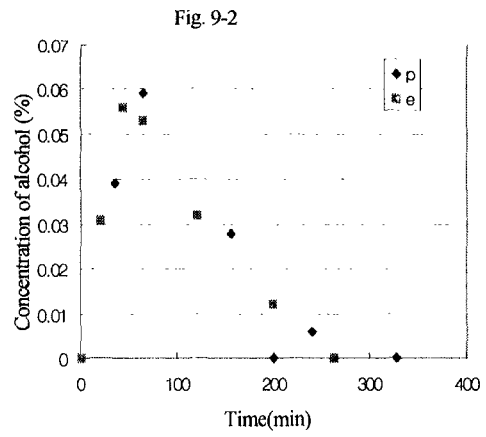
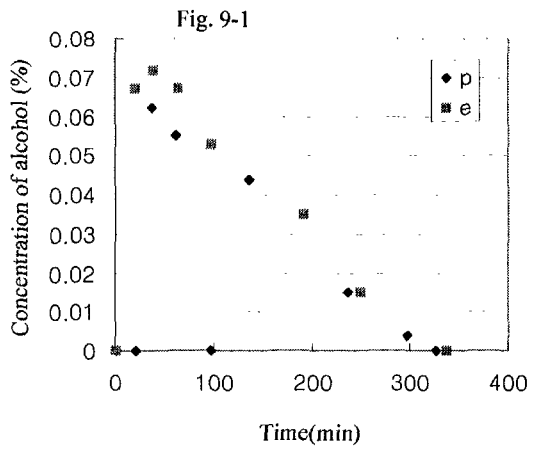


Fig. 9-5

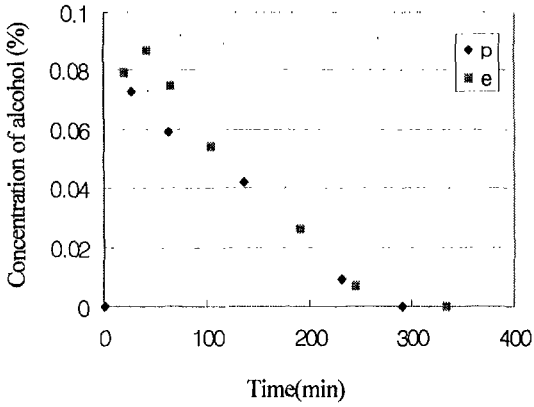


Fig. 9-6

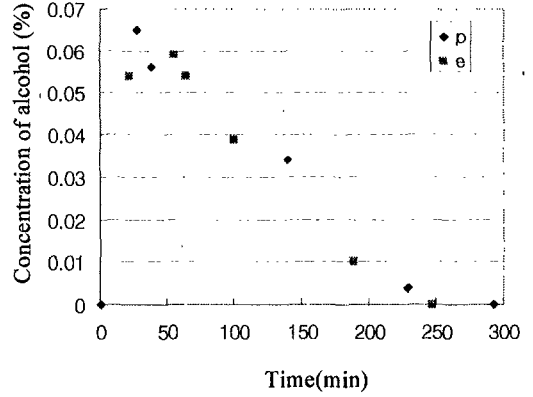


Fig. 9-7

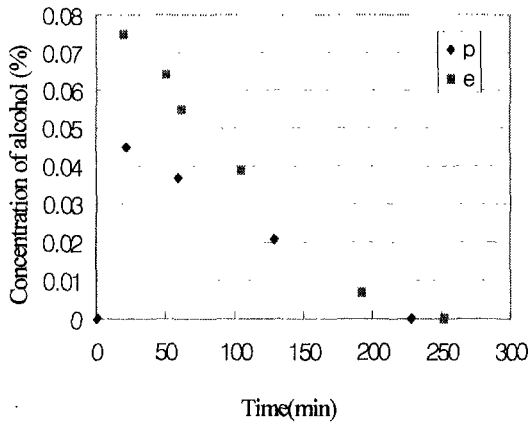


Fig. 9-8

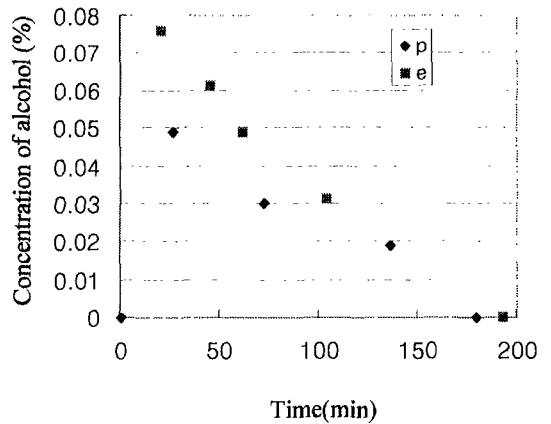


Fig. 1-9. The blood level of ethanol after alcohol consumption with or without intake of Persimmon. Eight Korean male adults consumed 3 ml/kg of 25% alcohol with or without 8.5 g/kg of Persimmon pulp. Each set was performed at two different days. Blood alcohol was determined by lion alcohol meter SD-400 (Lion Laboratory, UK). Symbols: \blacklozenge : with intake of persimmon, \blacksquare : without intake of persimmon

Fig.10-1

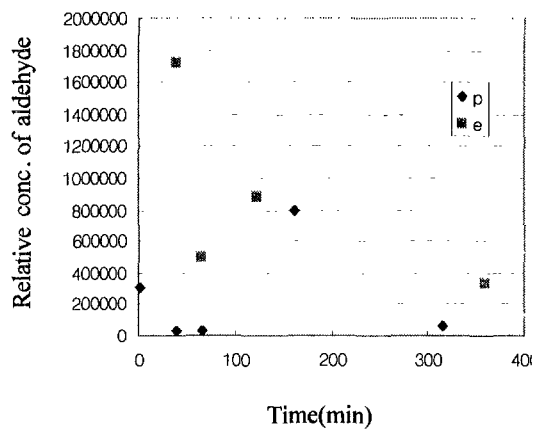


Fig.10-2

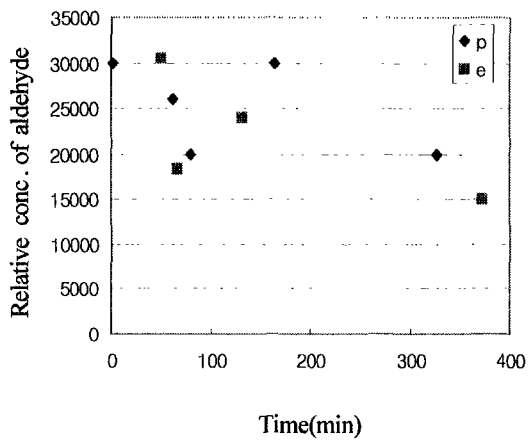


Fig.10-3

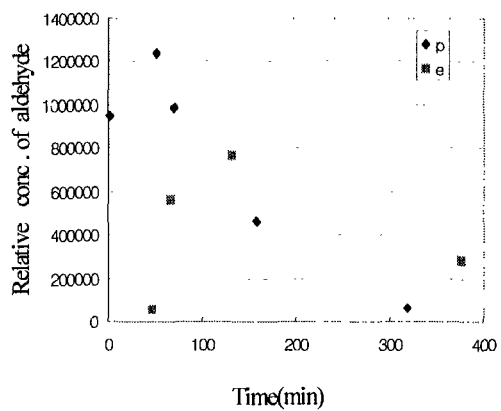


Fig.10-4

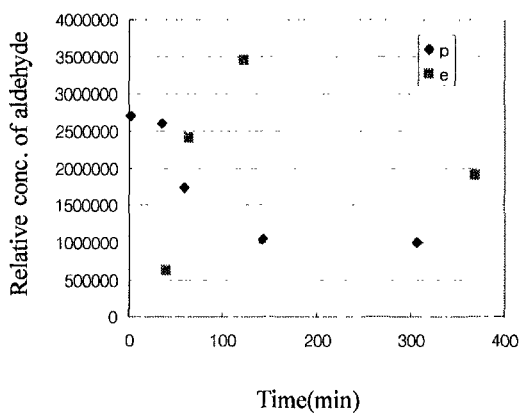


Fig.10-5

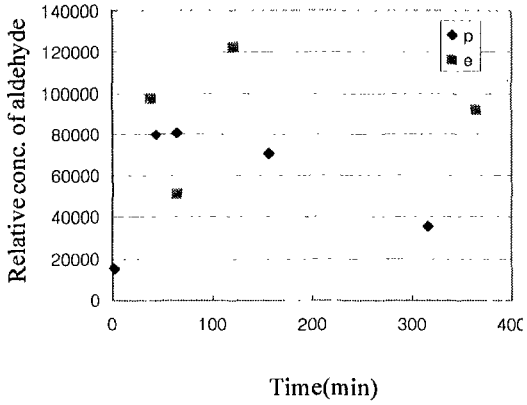


Fig.10-6

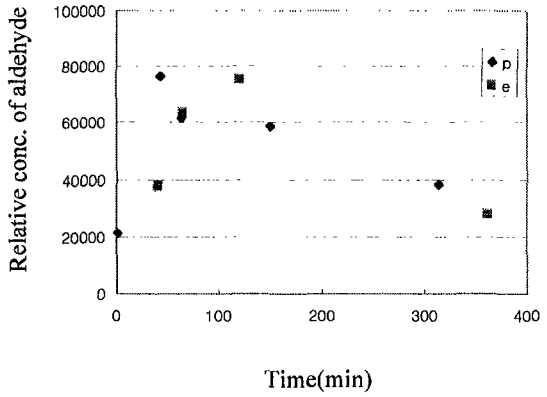


Fig.10-7

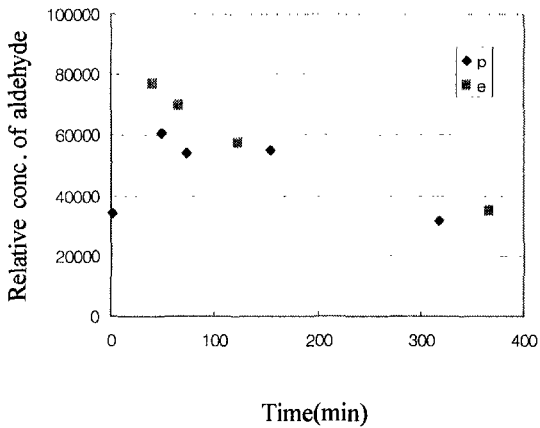


Fig.10-8

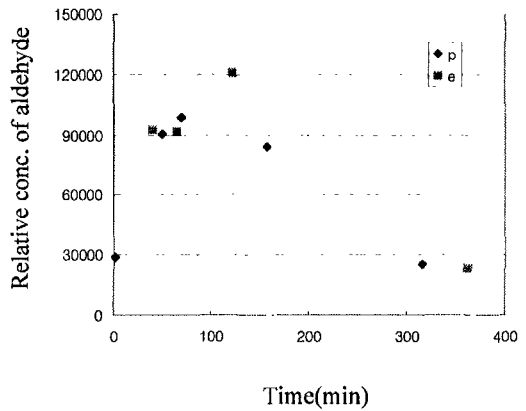


Fig. 1-10. The blood level of aldehyde after alcohol consumption with or without intake of Persimmon. Eight Korean male adults consumed 3 ml/kg of 25% alcohol with or without 8.5 g/kg of Persimmon pulp. Each set was performed at two different days. Blood aldehyde was determined by the method of Park et al. (1998). Symbols: ◆; with intake of persimmon, ■; without intake of persimmon

Fig.11-1

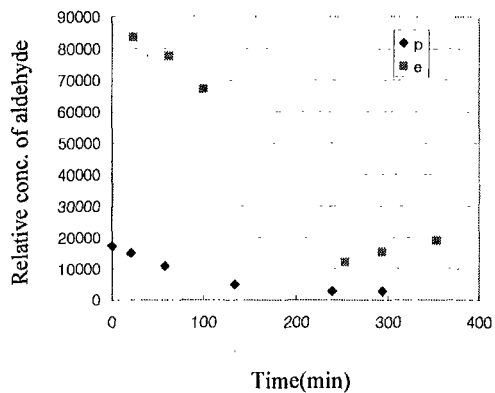


Fig.11-2

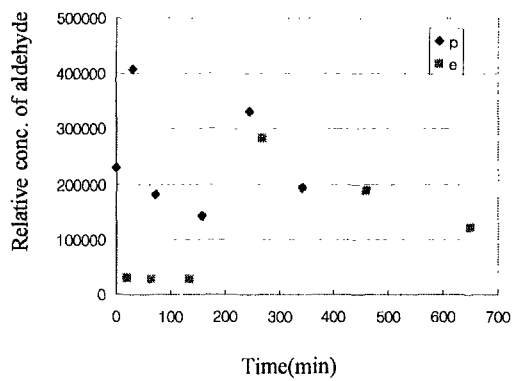


Fig. 11-3

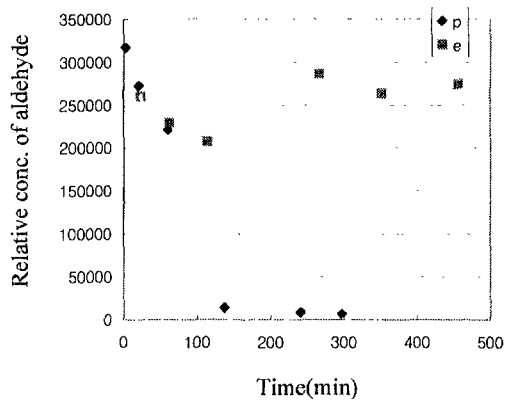
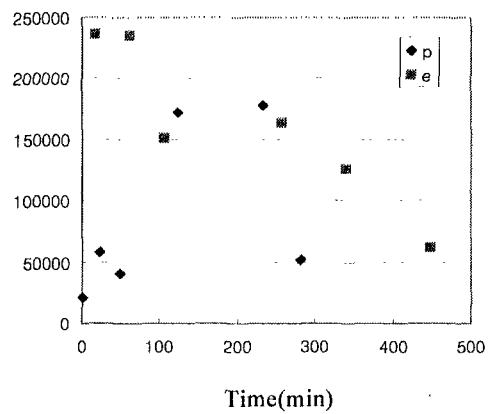


Fig. 11-4



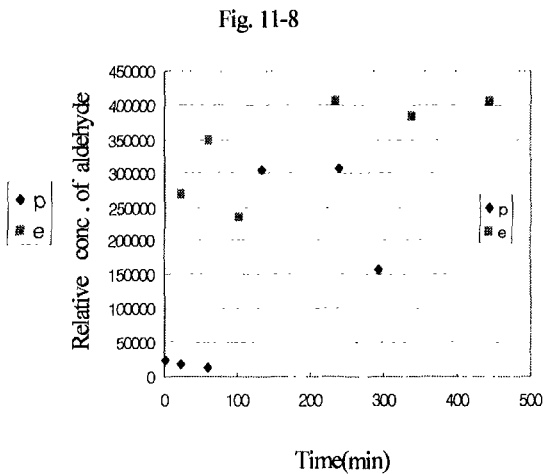
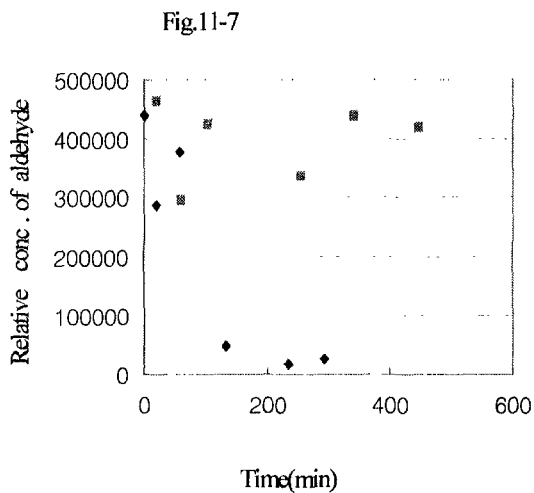
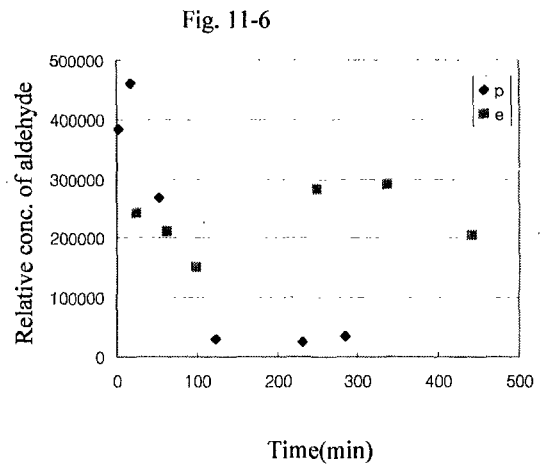
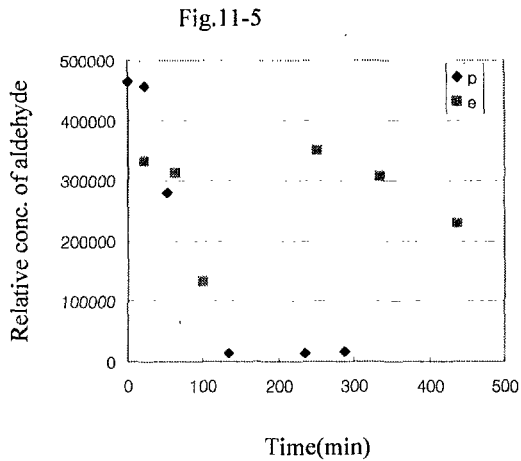


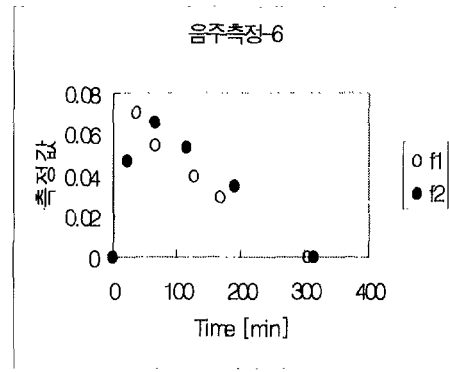
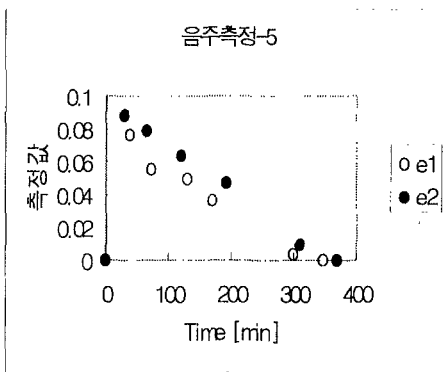
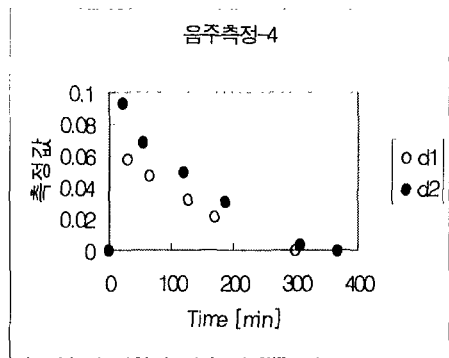
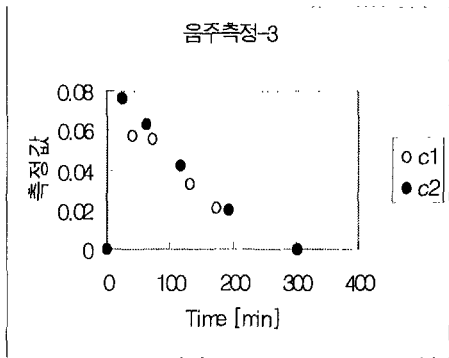
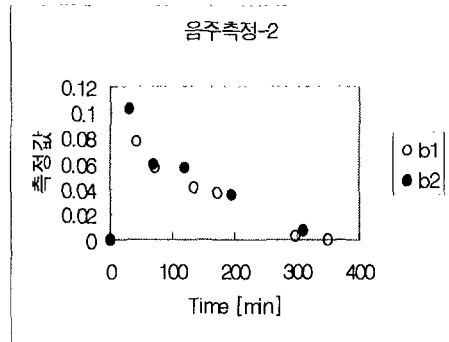
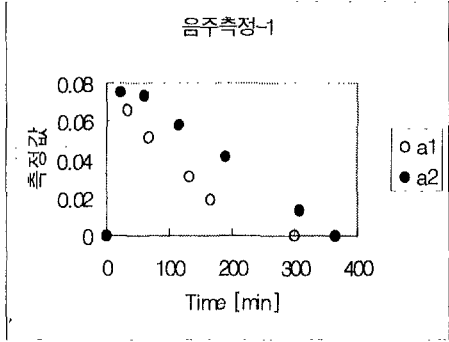
Fig. 1-11. The urine level of aldehyde after alcohol consumption with or without intake of Persimmon. Eight Korean male adults consumed 3 ml/kg of 25% alcohol with or without 8.5 g/kg of Persimmon pulp. Each set was performed at two different days. Urine aldehyde was determined by modification of the method of Park et al. (1998). Symbols: ◆: with intake of persimmon, ■: without intake of persimmon

사) 감정과의 사람의 alcohol 대사에 대한 영향

인체에서 alcohol 섭취시 가공식품인 감정과의 ALDH activator가 alcohol의 대사를 촉진시켜주는지를 알기 위해 8명의 subject (20대 중반의 남성)를 대상으로 실험하였다 (Table 1-5). 22.5% alcohol을 3.5 ml/kg으로 투여시 감정과를 2g/kg으로 함께 또는 없이 시간에 따른 피 속의 alcohol 농도 (Fig. 1-12/1-13), aldehyde농도 (Fig. 1-14), urine의 alcohol (Fig.1-15), aldehyde 농도 (Fig. 1-16)를 측정했다. 피 속의 alcohol농도는 음주측정기로 측정시 8명중 6명은 감정과 섭취시 더 빠른 감소를 보이고 2인은 큰 차이가 없었고 alcohol dehydrogenase assay로 측정시 8인 모두에서 감정과섭취시 alcohol 농도가 감소되었다. 오줌에서 alcohol농도는 7인은 감소를 보였고 1인은 감정과 섭취시 오히려 높았다. 피와 오줌에서 aldehyde농도 측정시 감정과 섭취후 피에서의 aldehyde는 3인의 subject에서 현저한 차이를 보이며 감소되었고 4인은 차이가없었고 1인의 경우는 오히려 높았다. 오줌에서의 aldehyde의 농도는 5인은 감섭취시 aldehyde 농도가 현저하게 낮아졌고 3인은 거의 차이가 나지 않았다. 위의 결과에 종합하면 감정과 섭취는 피와 오줌의 alcohol의 농도를 감소시켜 주었고 피에서의 aldehyde 농도는 크게 낮추지 못했지만 오줌에서의 aldehyde 농도를 저하시켰다. 생과육섭취시보다 피에서의 aldehyde농도저하는 현저하지 않으나 피에서의 alcohol 농도, 오줌에서의 alcohol, aldehyde농도는 감섭취시 현저한 저하를 보여 감정과는 alcohol 대사를 촉진시켜 주는 것으로 보인다.

Table 1-5. Description of Each Subject

Subj ect	Age	Weight [kg]	Height [cm]	Color of face	Usual amount of alcohol	Frequ ency	Period of Intoxica tion after alcohol	Syptom of hangover after alcohol consumpti on	Period of intoxicati on after alcohol + Persimmon
1	26	64	165	none	24% x 350 ml	2 / 7 days	2 hrs after	dizziness	2 hrs after
2	27	65	165	slightly flusher	24% x 350 ml	1 / 7 days	5 hrs after	slight headache	5 hrs after
3	25	63	173	none	24% x 350 ml	2 / 7 days	7 hrs after	none	6 hrs after
4	26	65	172	none	24% x 350 ml	3 / 7 days	16 hrs after	none	16 hrs after
5	25	50	172	flusher	24% x 180 ml	1 / 7 days	7 hrs after	severe headache	6 hrs after
6	25	75	173	none	24% x 530 ml	1 / 7 days	4 hrs after	severe headache	4 hrs after
7	25	62	168	flusher	24% x 180 ml	1 / 7 days	4 hrs after	none	3 hrs after
8	25	77	173	slightly flusher	24% x 530 ml	2 / 7 days	4 hrs after	headache	3 hrs after



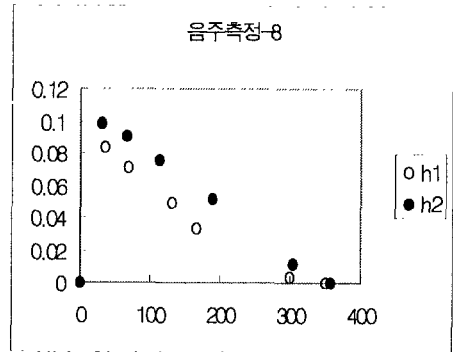
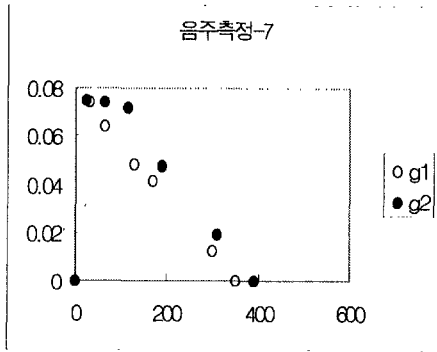
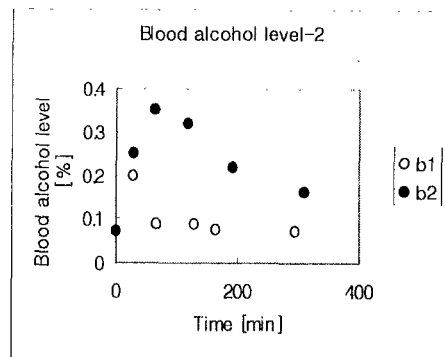
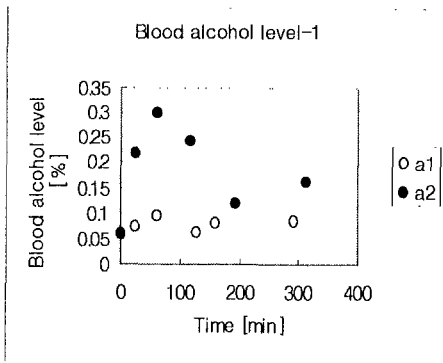


Fig. 1-12. The blood level of alcohol after alcohol consumption with or without intake of dried persimmon snack. Eight Korean male adults consumed 3.5 ml/kg of 22.5% alcohol with or without 2 g/kg of dried persimmon snack. Each set was performed at two different days. Blood alcohol was determined by lion alcohol meter SD-400 (Lion Laboratory, UK). Symbols; ○: with intake of dried persimmon snack, ●: without intake of dried persimmon snack.



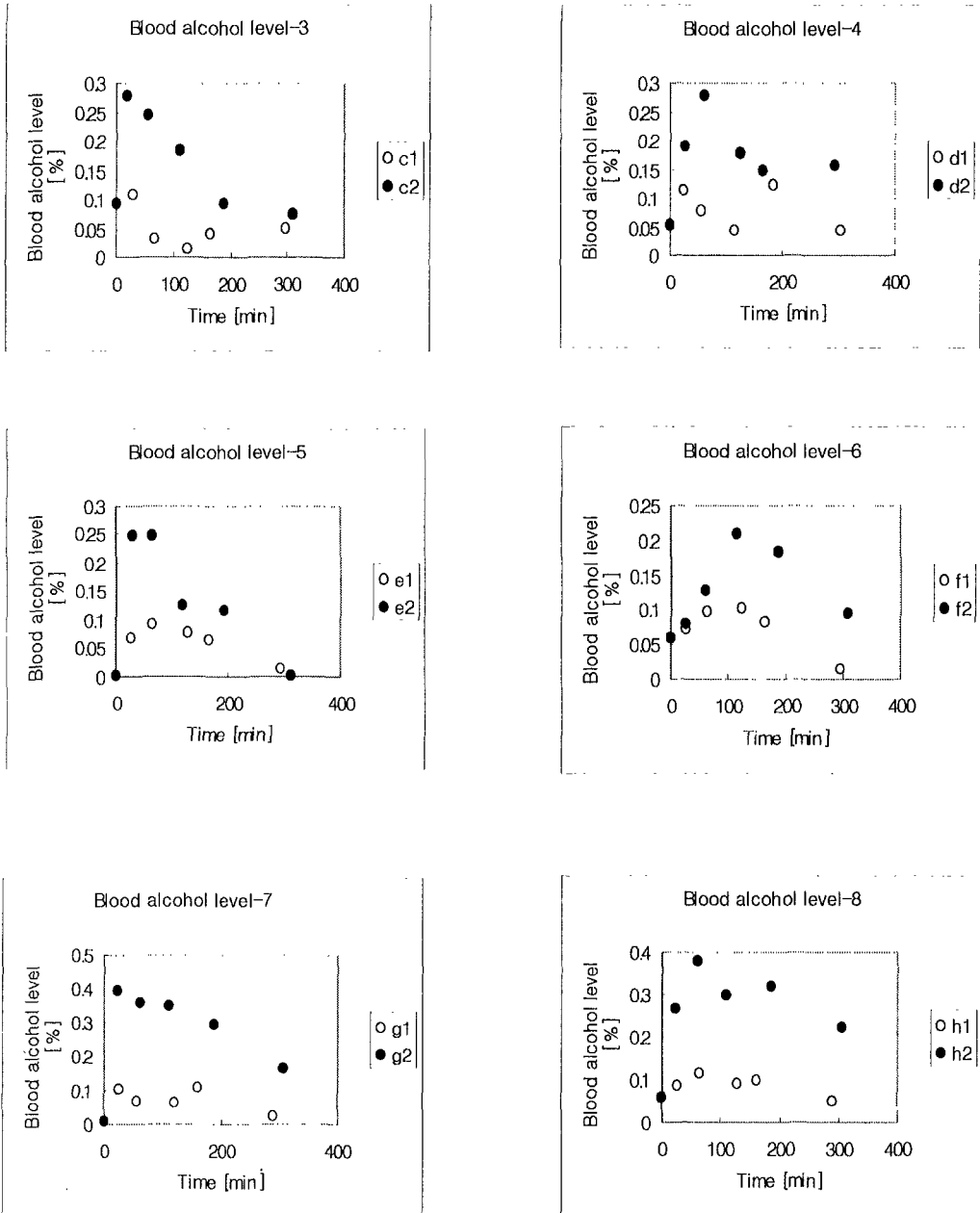
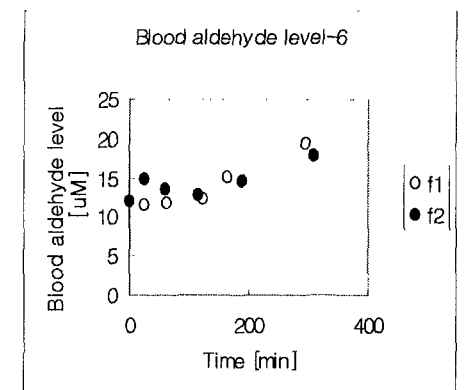
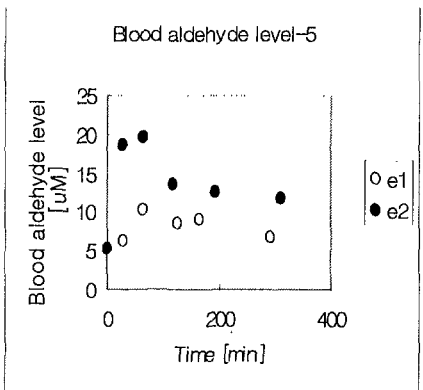
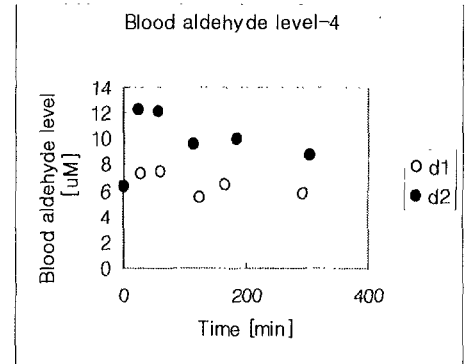
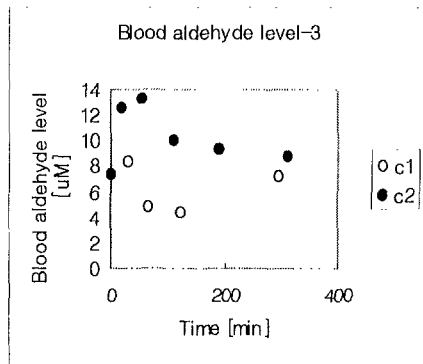
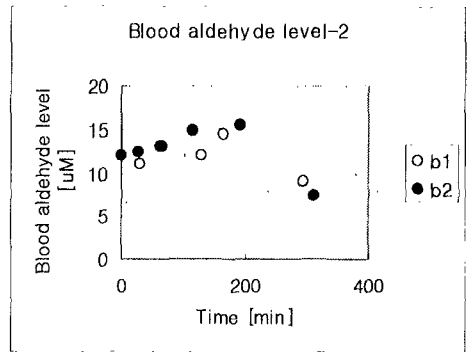
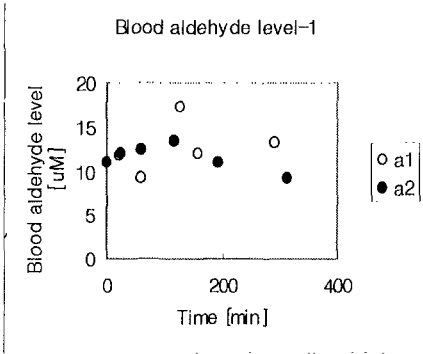


Fig. 1-13. The blood level of alcohol after alcohol consumption with or without intake of dried persimmon snack. Eight Korean male adults consumed 3.5 ml/kg of 22.5% alcohol with or without 2 g/kg of dried persimmon snack. Each set was performed at two different days. Blood alcohol was determined by alcohol dehydrogenase assay. Symbols: ○: with intake of persimmon, ●: without intake of persimmon



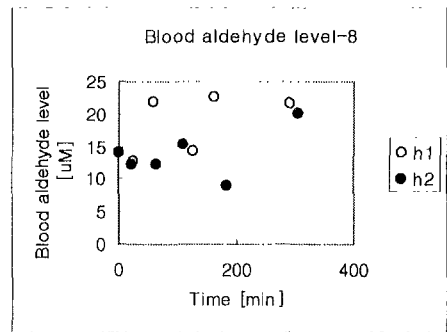
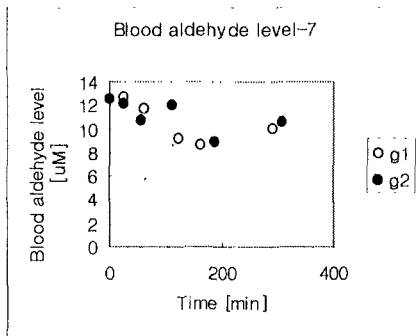
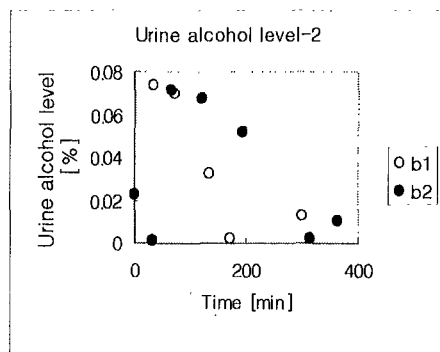
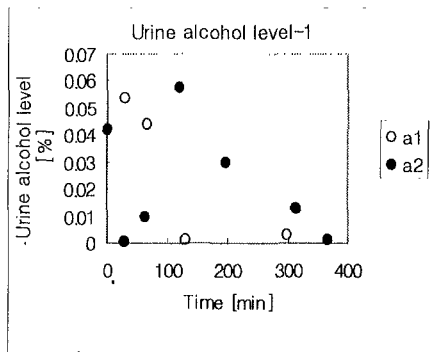


Fig. 1-14. The blood level of aldehyde after alcohol consumption with or without intake of dried persimmon snack. Eight Korean male adults consumed 3.5 ml/kg of 22.5% alcohol with or without 2 g/kg of dried persimmon snack. Each set was performed at two different days. Blood aldehyde was determined by the method of Park et al. (1998). Symbols: ○; with intake of persimmon, ●; without intake of persimmon



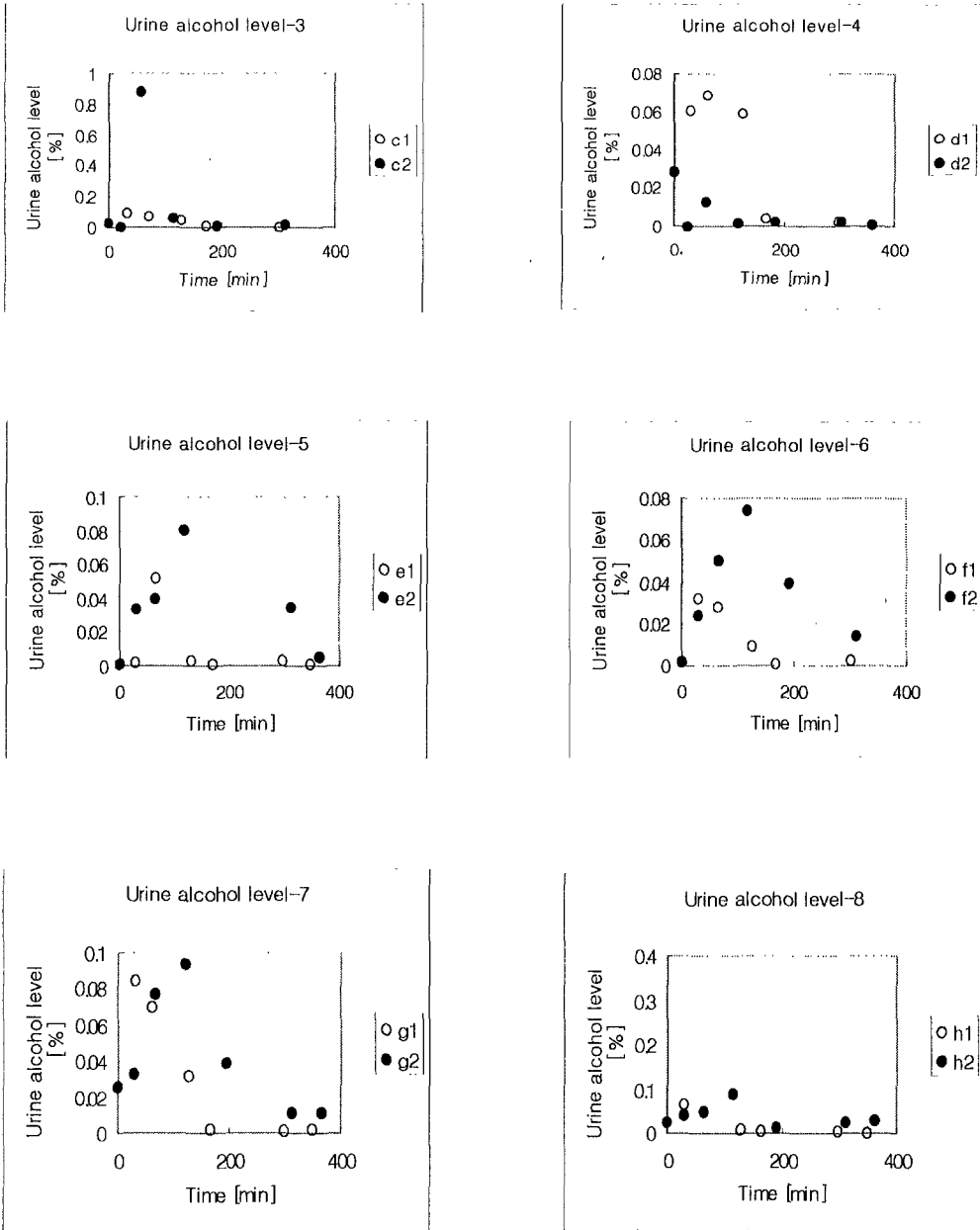
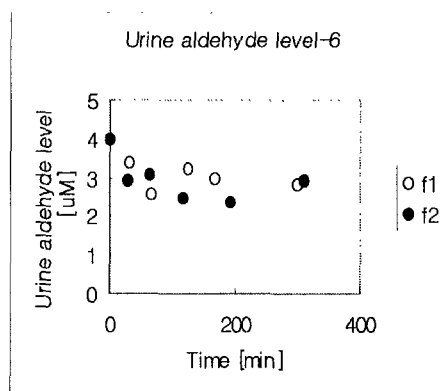
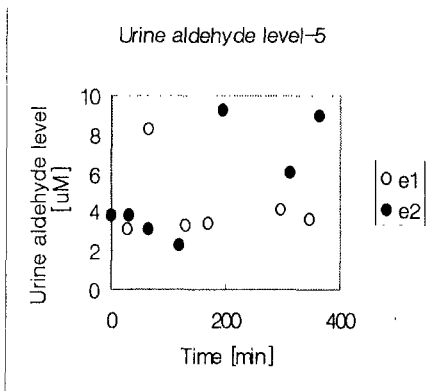
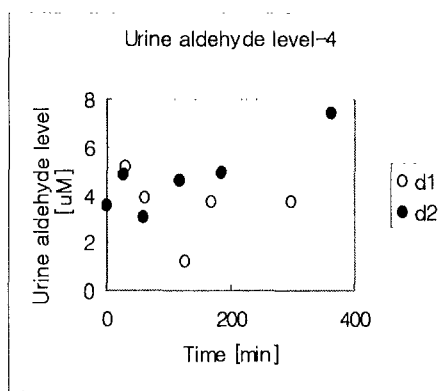
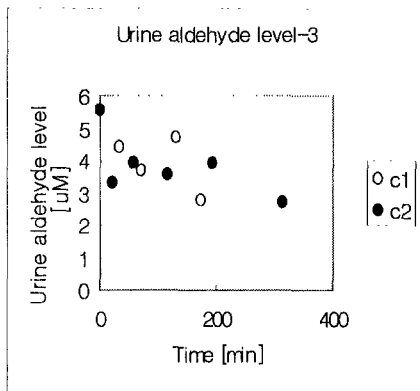
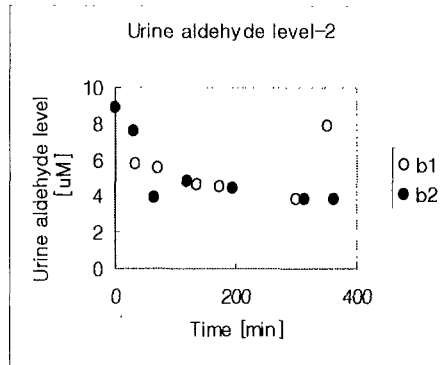
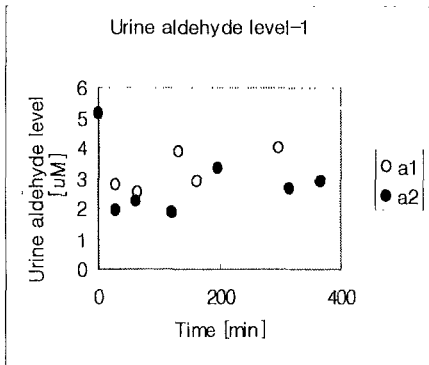


Fig. 1-15. The urine level of alcohol after alcohol consumption with or without intake of dried persimmon snack. Eight Korean male adults consumed 3.5 ml/kg of 22.5% alcohol with or without 2 g/kg of dried persimmon snack. Each set was performed at two different days. Urine alcohol was determined by alcohol dehydrogenase assay. Symbols: ○: with intake of persimmon, ●: without intake of persimmon



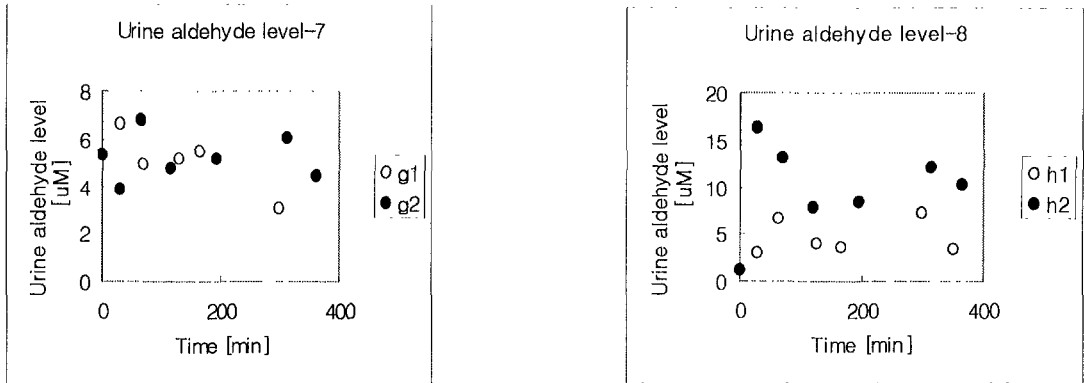


Fig. 1-16. The urine level of aldehyde after alcohol consumption with or without intake of dried persimmon snack. Eight Korean male adults consumed 3.5 ml/kg of 22.5% alcohol with or without 2 g/kg of dried persimmon snack. Each set was performed at two different days. Urine aldehyde was determined by the method of Park et al. (1998). Symbols: ○: with intake of persimmon, ●: without intake of persimmon

아. 사람의 간세포주, HepG2 cell line에서 감의 alcohol대사 촉진물질의 영향

정제된 ALDHA를 간세포주에 배양시 세포생존율이 증가되기는 했으나 alcohol, acetaldehyde자체가 상당히 높은 농도에서도 큰 독성을 보이지 않아서 ALDHA의 활성화로 인해 이러한 변화가 일어났는지는 확실치 않다.

Table 1-6 Effects of ethanol and acetaldehyde with or without persimmon ALDHA in Hep G2 cell lines

	Cell Viability [%]
Cell Only	100
Cell with 1.5 M ethanol	72
Cell with 2.0 M ethanol	70
Cell with 3 mM acetaldehyde	93
Cell with 4 mM acetaldehyde	92
Cell with persimmon ALDHA	135
Cell with 1.5 M ethanol and ALDHA	115
Cell with 3 mM ethanol and ALDHA	112

2. 항응고활성분획의 탐색과 정제

감각부위에 10 mM Tris-HCl, pH 7.5를 넣은 후 2분간 bead-beater를 이용하여 파쇄하여 10,000 xg에서 40분간 원심분리한다. 얻어진 상등액으로 human plasma를 이용하여 activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT)을 측정하였다. 감분획 투여시 APTT보다 TT가 더 민감하여 이후 TT를 사용하여 anticoagulant activity를 측정했다. 용질 무게당 활성을 비교시 감씨를 제외한 모든 분획에서 anticoagulant activity가 측정되었다. 분획을 나누기 위해 PM10을 이용한 ultrafiltration으로 분자량 10,000 dalton을 기준으로 나누었을 때 고분자분획에서만 활성이 발견되었다. Fig.2-1에서와 같이 감속, 각잎, 감꼭지에서 용질 무게당 높은 anticoagulant activity가 관찰되었다. 감과육과 감껍질에도 농도는 약간 낮지만 anticoagulant activity가 발견되어 높은 농도로 있는 부위를 이용하여 정제후 특성을 알아내고 그것을 기초자료로 감과육의 anticoagulant에 대한 연구를 착수했다.

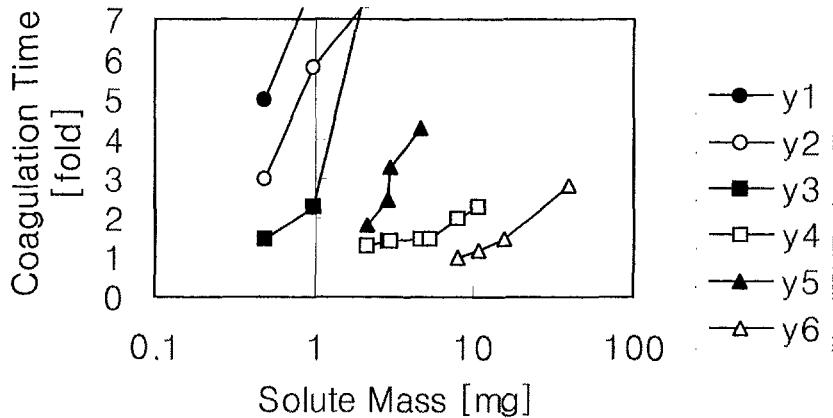


Fig. 2-1. Anticoagulant activity of each part of Persimmon. The effect of each Persimmon part on thrombin time was measured by adding the extract to 0.3 ml of citrated plasma 2 minutes before initiating activation and coagulation at 37°C using the increase the absorbance at 420 nm. Control time was TT, 25±2.0 seconds. Each set of assay was performed in single subject. y1, Persimmon core; y2, Persimmon leaf; y3, Persimmon stem; y4, Persimmon skin; y5, Persimmon pulp; y6, Persimmon seed

가. 감꼭지에서 anticoagulant의 정제

감꼭지 300g을 위의 방법으로 파쇄후 60°C, 15분 열처리하여 감꼭지의 anticoagulant를 inactivation시키는 물질을 불활성화시킨후 YM10 membrane filter를 사용하여 ultrafiltration으로 저분자분획을 확실히 제거한다. 감꼭지는 분자량에 의한 분획을 나눈 후 anticoagulant activity가 현저하게 증가되었는데 이는 저분자분획에 coagulation을 촉진시키는 물질이 존재하기 때문이다. 저분자분획에 의한 방해효과를 없애기 위해 10 mM Tris-HCl, pH 7.5를 넣어 다시 씻어준후 농축액을 gel filtration column인 Sephadex G-100에서 분리한다. anticoagulant activity가 있는 분획을 농축후 hydrophobic column인 phenyl Sepharose (PS) column에 실어준다. anticoagulant activity는 PS에 단단히 부착되어 10 mM Tris-HCl, pH 7.5로 용출시에 PS에서 떨어진다. ultrafiltration으로 다시 농축시키고 염을 제거하고 anion exchanger인 DEAE-Sephadex A-50에 실어준후 NaCl로 용출시킨다. 농축후 gel-filtration column인 Sephadex G-150에서 마지막으로 분리한다. 정제된 분획의 dextran을 standard로 사용할 때 분자량이 130,000-180,000 dalton 상태로 존재하는 것으로 보인다.

나. 감꼭지의 anticoagulant의 특성

정제된 분획의 분자적 특성을 규명하기 위해 urea와 iodoacetamide 를 처리하고 trypsin, pepsin를 처리하여 anticoagulant의 활성의 변화를 보았을 때 각각 6%, 9%의 활성의 손실을 보였다. 이 결과는 anticoagulant는 단백질이 아니라는 것을 시사하고 있다. anticoagulant가 당성분인지를 확인하기 위해 periodate oxidation후의 활성의 변화를 측정시 99% 활성의 소실을 가져와 carbohydrate가 anticoagulant로 작용하는 것으로 추정된다. 구성분에 대한 정보를 얻기 위해 올산대의 공동기기센터에 원소분석을 한 결과 Table 2-1와 같다. 향응고물질의 당의 구성분에 대한 정보를 얻기 위해 중성당, amino 당, 산성당을 위한 조건에서 acid hydrolysis후 cellulase TLC에서 당의 존재를 확인하고 Bio-LC로 당분석시 Table 2-2와 같은 결과를 얻었다. 감꼭지나 감과육의 향응고물질은 다당류로 보여지는데 결합과 구성분에 대한 정보를 얻기 위해 감꼭지에서 정제된 향응고물질을 여러 가지 종류의 당과 반응하는 효소들과 반응시킨후 활성을 측정시 Fig. 2-2에서 보는 것과 같이 처리한 효소들은 활성에 큰 영향을 주지 않았지만 glycosidase F 처리시에는 활성이 증가되어 활성이 있는 다당류에 부착된 단백질이 떨어져 나가면서 활성이 증가되는 것으로 보인다

건조시의 감과육의 향응고물질 활성의 변화를 측정하기 위해 정제된 향응고물질을 40°C에서 evaporation시키거나 동결건조후 활성의 변화를 측정하였다. Fig. 2-3에서와 같이 evaporation시 103%, 동결건조시는 95%의 활성보유로 향응고활성은 건조시 큰 변화를 보이지

않았다.

정제된 감꼭지의 anticoagulant 분획의 열에 대한 성질을 조사하기 위해 각 온도에서 15 분간 처리후 anticoagulant assay로 측정시 Fig. 2-4에서와 같이 70°C까지 거의 변화가 없었고 100°C에서도 15% 정도만 활성이 소실되었다. 감꼭지의 anticoagulant는 예외적으로 열에 안정한 물질로 보이고 열에 대한 안정성은 감을 이용한 가공식품을 만들 때 보다 다양한 방법을 시도할 수 있는 유리한 점을 제공한다.

정제된 분획으로 human plasma를 사용하여 APTT, TT를 다시 측정시 (Fig. 2-5), TT에 대해 훨씬 민감했고 13, 17 pM에서 TT를 기준값보다 각각 2배와 3배 지연시켰다. APTT는 37, 53 nM에서 각각 기준값의 2배와 3배 지연시켰다. APTT는 응고과정중 내인성경로의 coagulation factor에 이상이 있을 때 지연되고 TT는 내인성과 외인성이 통합되는 fibrinogen이 fibrin이 되는 과정에 이상이 있을 때 지연되는 것으로 미루어 감꼭지가 TT에 더 민감한 것은 감꼭지의 anticoagulation activity가 fibronogen이 fibrin이 되는 과정중의 하나를 저해하여 일어난다는 것을 시사한다. control로 heparin사용시 4.5, 10.0 ug에서 각각 APTT, TT를 2배 연장시켜 사용한 assay system이 제대로 작동됨을 검증하였다.

Table 2-1. 감꼭지 항응고물질의 원소분석

원소	C	H	N	S	O
감꼭지 anticoagulant	61.8	10.0	0.2	0	28.8
heparin	17.9	3.1	1.5	10.0	45.5

	Fuc	GalN	GluN	Gal	Glu	Man	NAc Neu	GluC	NGly	Neu	IduC
6N HCl heparin			5.42								
6N HCl 감꼭지			0.11	0.07	0.68						
TFA heparin			0.59	0.06	0.04	0.04					
TFA 감꼭지			0.04	0.3	1.12	0.15					
0.1N HCl heparin											0.16
0.1N HCl 감꼭지											

Table 2-2. 감꼭지 항응고물질의 Bio-LC에 의한 당분석

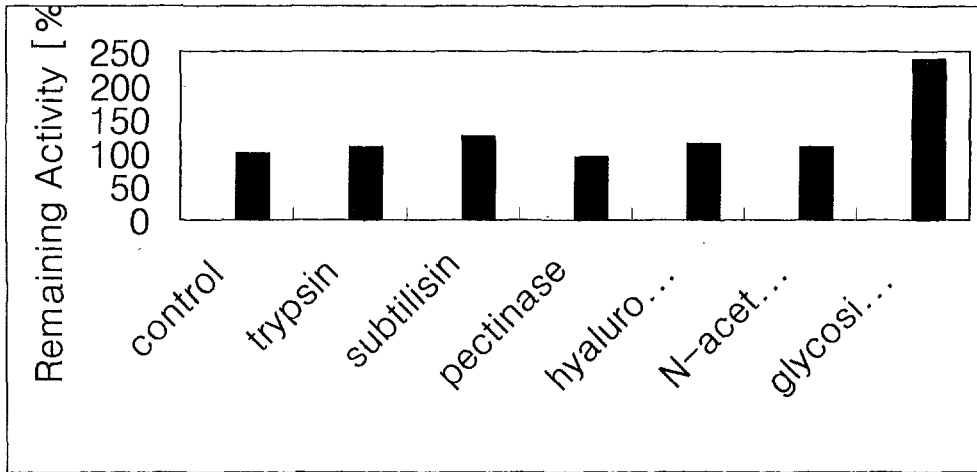


Fig. 2-2. 감꼭지의 항응고물질 활성화에 대한 효소의 영향

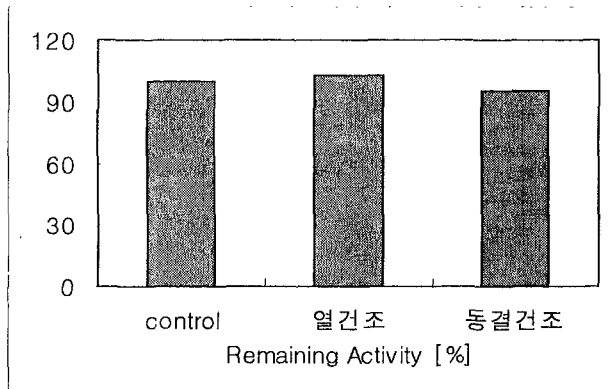


Fig. 2-3. 건조에 의한 항응고활성의 변화

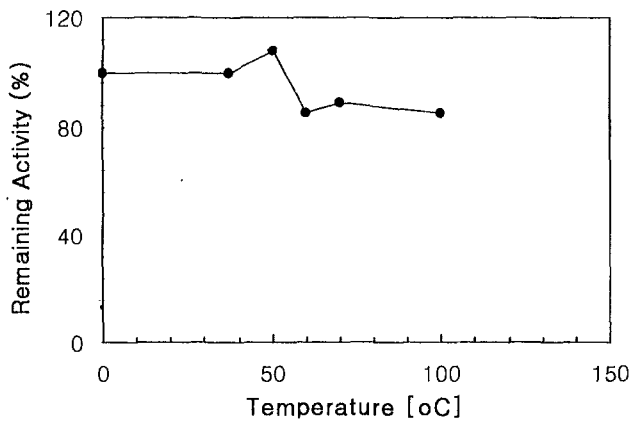


Fig. 2-4. Effect of temperature on anticoagulant activity from Persimmon stem. The purified preparation was incubated at each indicated temperature for 15 min.

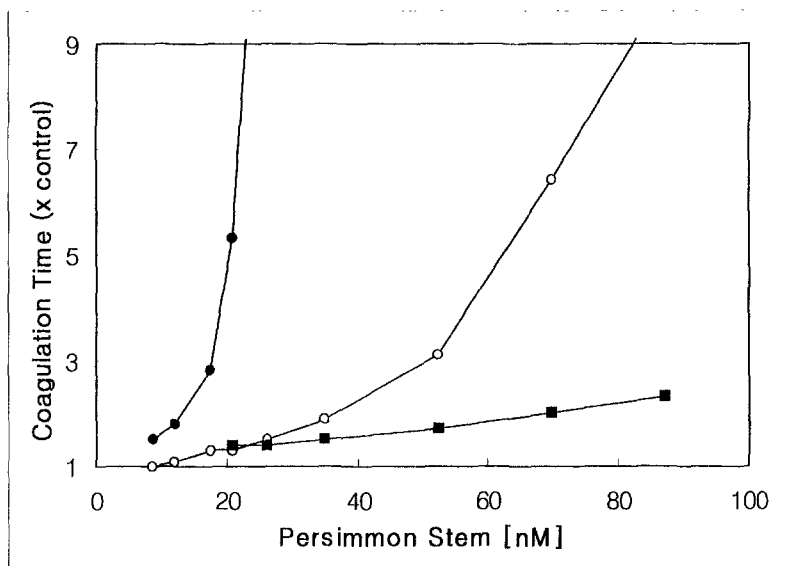


Fig. 2-5. Anticoagulant activity of Persimmon stem. The effect of Persimmon stem on thrombin time (TT, ●-●), APTT (○-○), and PT (■-■) was measured by adding the extract to 0.3 ml of citrated plasma 2 minutes before initiating activation and coagulation at 37°C using the increase the absorbance at 420 nm. Control time was TT, 25.0±2.0 seconds; and APTT, 35.0±0 seconds. Each set of assay was performed in single subject.

감쪽지의 anticoagulation activity가 어디에서 기인하는지 알기 위하여 응고의 통합과정 중 중요한 과정인 thrombin에 대한 영향을 조사했다. human plasma에서 Bothrops atrox의 snake venom인 reptilase도 thrombin과 같이 응고를 유도한다. reptilase를 사용하여 응고를 유도시 감쪽지를 TT를 2배 연장시킨 농도의 5배이상 투여시에도 전혀 응고시간이 지연되지 않아 감쪽지의 anticoagulant activity는 thrombin에 대해 특이적인 것으로 보인다. thrombin과 같이 serine protease 계열인 trypsin, factor Xa에 대해서도 synthetic substrate를 가지고 조사시 전혀 활성을 억제하지 않았다 (Fig. 2-6). 감쪽지의 fibrinogen에 대한 영향은 fibrinogen이 subtilisin Carlsburg와 같이 배양시켜 완전 분해가 일어나는 조건에서 측정시 정제된 감쪽지 분획은 fibrinogen의 가수분해를 전혀 일으키지 않아 감쪽지의 fibrinolysis는 thrombin에 대한 영향에 의거한 것으로 보인다.

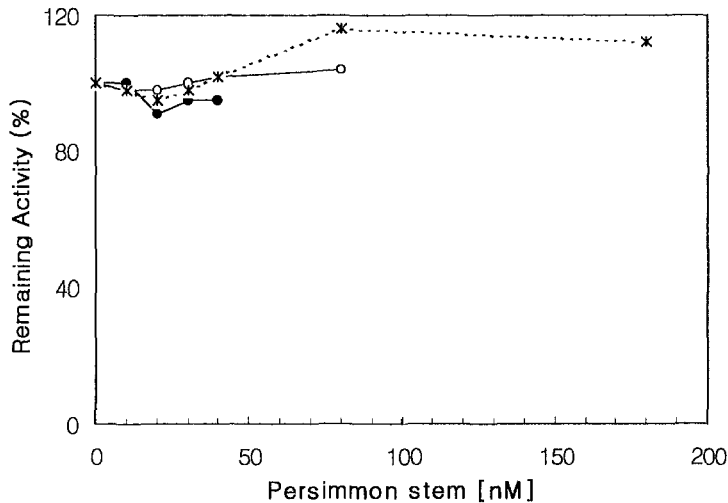


Fig. 2-6. Inhibition of thrombin (●-●), trypsin (○-○), and factor Xa (×-×) by Persimmon stem using synthetic substrates.

감쪽지의 anticoagulant activity가 heparin과 유사하게 + charge를 가진 분자에 의해 활성이 상쇄되는지 조사하기 위해 + charge를 가진 단백질인 protamine sulfate를 함께 투여하였다. Fig. 2-7에서와 같이 protamine sulfate첨가는 감쪽지의 anticoagulant activity를 감쇄시켰다. 응고시키는 시간이 기준값의 3배에 도달하는 농도는 protamine부재시 17 pM이 protamine sulfate가 2, 5 ug/ml 투여시 각각 22, 29 pM로 증가되었다. protamine sulfate

의 농도가 높아질수록 curve는 오른쪽으로 이동되어 감꼭지의 anticoagulant 활성의 민감도를 낮추어 주는 것을 보이고 있다. 감꼭지와 heparin의 활성과의 관계를 보기 위해 감꼭지와 heparin을 함께 투여시 투여된 감꼭지는 heparin의 anticoagulant activity를 감소시켰다 (Fig. 2-8). 이러한 결과들은 감꼭지의 anticoagulant activity가 thrombin에 부착시 -charge를 사용하여 anion binding exosite에 부착할 가능성이 있다는 것을 시사한다.

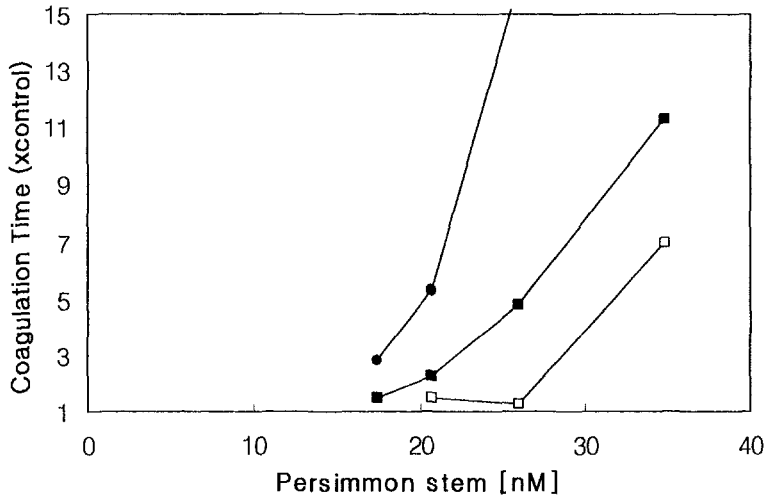


Fig. 2-7 Effect of protamine sulfate on anticoagulant activity by Persimmon stem. The effect of Persimmon stem on thrombin time (TT of Persimmon stem alone, ●-●; TT of Persimmon stem with 2 ug/ml protamine sulfate, ■-■; TT of Persimmon stem with 5 ug/ml protamine sulfate, □-□) was measured by adding the extract to 0.3 ml of citrated plasma 2 minutes before initiating activation and coagulation at 37°C using the increase the absorbance at 420 nm. Control time was TT, 25.0±2.0 seconds. Each set of assay was performed in single subject.

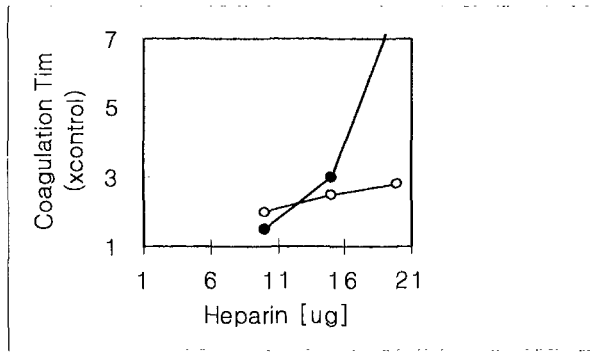


Fig. 2-8 Effect of Persimmon stem on anticoagulant activity by heparin. The effect of heparin on thrombin time (TT of heparin alone, ●-●; TT of heparin with 17.4 μ M of Persimmon stem, ○-○) was measured by adding the extract to 0.3 ml of citrated plasma 2 minutes before initiating activation and coagulation at 37°C using the increase the absorbance at 420 nm. Control time was TT, 25.0 \pm 2.0 seconds. Each set of assay was performed in single subject.

위에서 보여준 thrombin에 대한 억제효과와는 상반된 결과가 synthetic substrate를 사용할 때 얻어졌다. 기질로 N-Tos-Gly-Pro-Arg pNA, Z-Lys-sBz를 사용할 때 thrombin농도의 5배 정도의 감쪽지를 투여시에도 단지 5% 정도의 억제를 보였다 (Fig. 2-6). 이는 감쪽지의 anticoagulant가 thrombin의 active site에서 작용하지 않고 fibrinogen이 부착하는 anion binding exosite에 부착한다는 것을 지지해 주고 있다. 정제된 fibrinogen을 이용하여 응고 지연을 측정시에도 감쪽지는 지연효과를 보였고 fibrinogen의 낮은 농도에서 지연효과가 더 뚜렷한 것을 보여준다 (Fig. 2-9). 감쪽지를 thrombin에 의한 fibrin formation의 저해제로 분석을 위해 도표로 그렸을 때 감쪽지는 fibrinogen과 같은 부착자리를 경쟁하고 K_i 값은 1 nM로 thrombin에 대한 친화력이 상당히 높음을 보여주고 있다. thrombin의 fibrinogen binding site는 fibrin역시 부착하는 것으로 알려져 있으므로 감쪽지가 thrombin이 fibrin에 부착하는 것을 억제하는지가 조사되었다. fibrin II monomer가 thrombin에 첨가시 fibrin clot이 형성되어 상등액에서 thrombin의 농도가 감소되어 38%가 제거된다. 그러나 감쪽지 투여시 87 μ M에서 가장 높은 활성을 가지고 fibrin II가 thrombin에 부착하는 것을 저해하였다 (Fig. 2-10).

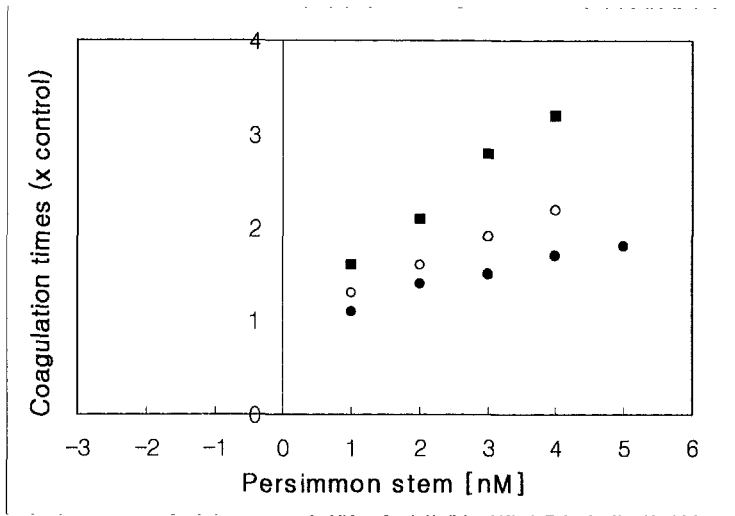


Fig. 2-9. Inhibition of coagulation by persimmon stem at different fibrinogen concentrations. The effect of Persimmon stem on thrombin time (TT of Persimmon stem at 2.3 uM of fibrinogen, ●-●; TT of Persimmon stem at 4.7 uM of fibrinogen, ○-○; TT of Persimmon stem at 9.4 uM of fibrinogen, ■-■) was measured by adding different concentrations of fibrinogen in 0.2 M borate, pH 7.8 containing 50 mM NaCl 2 minutes before initiating activation and coagulation at 37°C using the increase the absorbance at 420 nm. The value of K_i of Persimmon stem was calculated to be 1 nM. Control time was TT, 20.0 ± 2.0 seconds.

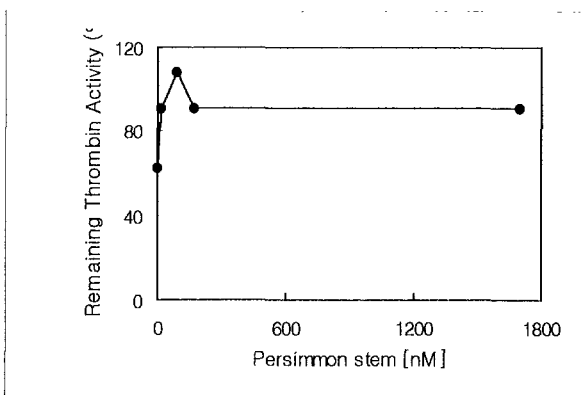


Fig. 2-10. Inhibition of thrombin removal through fibrin clotting by Persimmon stem.

다. 감과옥의 anticoagulant activity의 정제와 특성연구

감과육의 anticoagulant는 감꼭지에 있는 것과 열에 대한 영향이나 정제를 위한 column에서 양상이 유사하므로 같은 성분이라고 생각된다. 그러나 감과육의 anticoagulant는 세포파쇄추출물에서 활성이 급격하게 소실되어 37°C, 24시간 처리시 거의 활성이 없어졌고 -20°C, 10일 보관시도 활성이 50% 이상 소실되었다. 이는 감과육안에 감과육의 anticoagulant를 불활성화시키는 물질이 포함되어 있다는 것을 의미하고 감과육에서 anticoagulant의 정제를 불가능하게 하고 있다. 감과육에서 anticoagulant를 불활성화시키는 물질을 효율적으로 제거하기 위해 열처리를 하였다. 감과육에서도 감꼭지의 정제된 분획에서 관찰한 것과 전체적으로 유사한 양상을 보였다 (Fig. 2-11). 70°C, 15분 처리시까지는 약간의 활성이 소실되었으나 100°C, 15분 처리시에는 50% 정도의 활성이 소실되었다. 감과육의 anticoagulant의 활성에 영향을 주지않고 불활성화시키는 물질을 제거하기 위해 감과육의 세포파쇄액을 60°C, 15분 처리한 후 감꼭지와 유사하게 DEAE-Sephadex A-50, phenyl Sepharose, Sephadex G-150을 통과하여 anticoagulant를 정제하는 작업이 단감시험장과 함께 수행되어 특성에 대한 연구가 진행되고 있다.

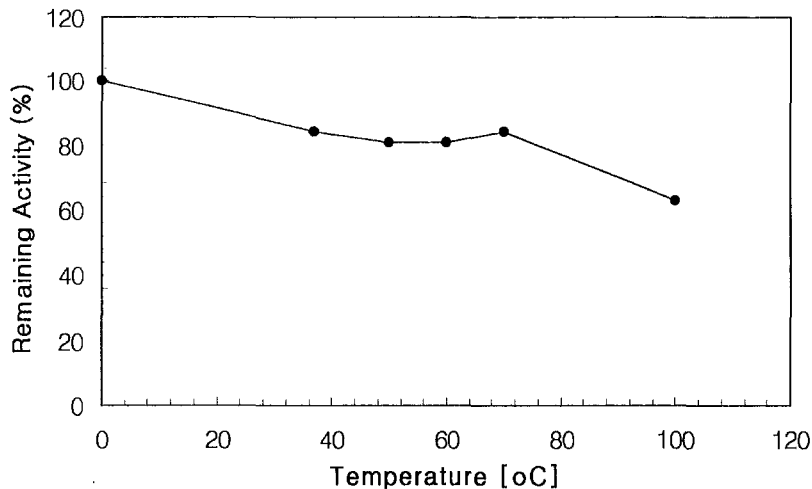


Fig. 2-11. Effect of temperature on anticoagulant activity from Persimmon pulp. The crude homogenized preparation was incubated at each indicated temperature for 15 min and fibrinogen clotting time was measured by measured by adding 23.5 μ M of fibrinogen in 0.2 M borate, pH 7.8 containing 50 mM NaCl 2 minutes before initiating activation and coagulation at 37°C using the increase the absorbance at 420 nm. Control time was TT, 20.0 ± 2.5 seconds.

3. ACE (angiotensin converting enzyme)억제물질 탐색

가. ACE 효소 준비 및 반응

소의 폐 acetone 침전물을 Sigma로부터 구입하여 사용하였다. 침전물 1 g을 10 ml Tris 완충용액 (100 mM, pH 8.3, Triton X-100 0.01 %)에 24시간 교반시켜 녹인 후 상등액을 사용하였다. 효소반응은 Ethanol에 녹인 시료와 효소용액을 5분동안 37 °C에서 preincubation 시킨 후 기질인 HHL을 첨가하고(0.8 mM) 30분 동안 반응시켰다. 83 μ l HCl (1N)을 첨가하여 반응을 멈춘 후 ethyl acetate로 추출하고, 건조 후 증류수 1 ml을 첨가하여 228 nm에서 측정하였다.

나. 감에 의한 ACE 저해작용

단감을 잎, 과육, 껍질, 내심, 꼭지로 각각 분획한 후 물, ethyl alcohol, butanol, ethyl acetate, methylene chloride로 추출하여 건조시킨 후 methyl alcohol을 첨가하여 녹여 각 분획 성분의 ACE 저해 작용을 측정하였다. Fig. 3-1에서 보이는 바와 같이 단감의 잎에는 ACE inhibitor가 존재함을 확인할 수 있었다. 이 부위를 추출하기 위하여 여러 가지 유기용매를 사용하였다. 그 결과 잎의 solvent 추출물이 ACE를 억제함을 확인하였다. 단감의 다른 부위에서는 ACE inhibitor가 아직 발견되지 않았다. 다른 부위에서 ACE inhibitor를 찾으려는 노력의 일환과, 잎 분획의 inhibitor 성격 규명을 위하여 단감 과육 추출물과 잎-물 추출물을 분자량 10,000에서 분리하여 (centricon 사용) 분자량에 의한 분획을 나누고 각각에 대한 ACE inhibition rate를 측정하였다.

잎 추출물에는 분자량 10,000 이상과 이하에서 모두 ACE inhibitor가 발견되었고, 과육에서는 물 추출물 분자량 10,000이하에서 ACE inhibitor가 존재할 가능성이 있었다. 이에 따라 잎을 ethyl acetate로 추출한 후 methyl alcohol에 녹이고 이를 Silica gel에서 분리하였다.

Fig. 3-3에 제시한 바와 같이 Silica gel에서 chloroform과 methanol로 용출된 분획에서 농도에 비례하여 ACE를 억제하는 성분이 있음을 확인하였다. 이중에서 methanol 분획에는 착색물질이 적게 함유되어 있기 때문에 먼저 분리를 시도하였다. 이 분획을 농축하여 HPLC로 분리한 결과 그림 3-4에 제시한 것과 같이 분리되었고, ▼표기된 분획에 ACE inhibitor가 있음을 확인하였다.

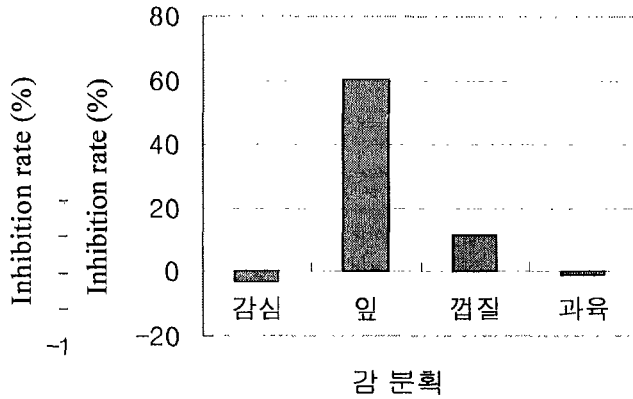


Fig. 3-1. Effect of sweet persimmon extracts on ACE (bovine lung) activity. Each part of the persimmon was extracted with water and dried and resolved with ethanol. The activity was compared with that of ethanol as control solvent.

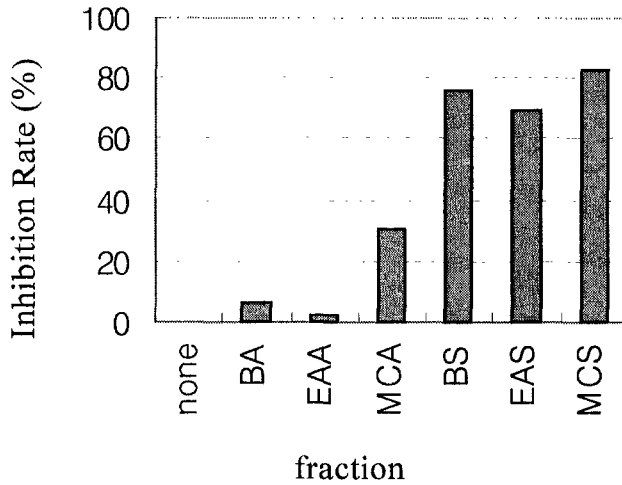


Fig. 3-2. Effect of the leaf extract of sweet persimmon on ACE (bovine lung) activity. The homogenates of the leaf was partitioned with butanol (B), ethyl acetate (EA) and methylene chloride (MC). After dried, each fraction was resolved with ethyl alcohol and the activity was compared with that of ethanol as control solvent.

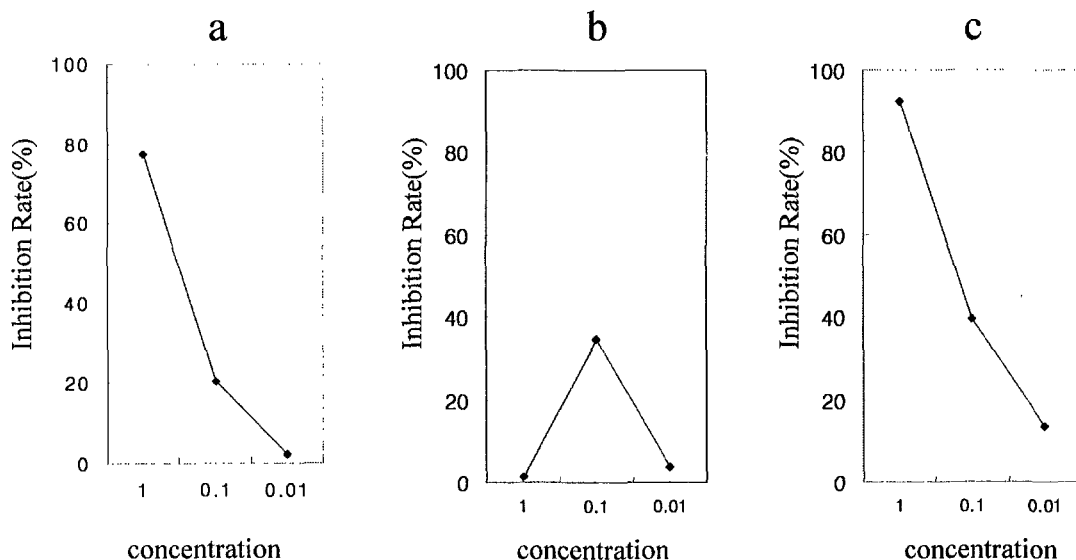


Fig. 3-3 ACE inhibition rate of fractions from Silica gel. a: eluted with chloroform, b: eluted with ethyl acetate, c: eluted with methyl alcohol. The values are represented with relative inhibition rate.

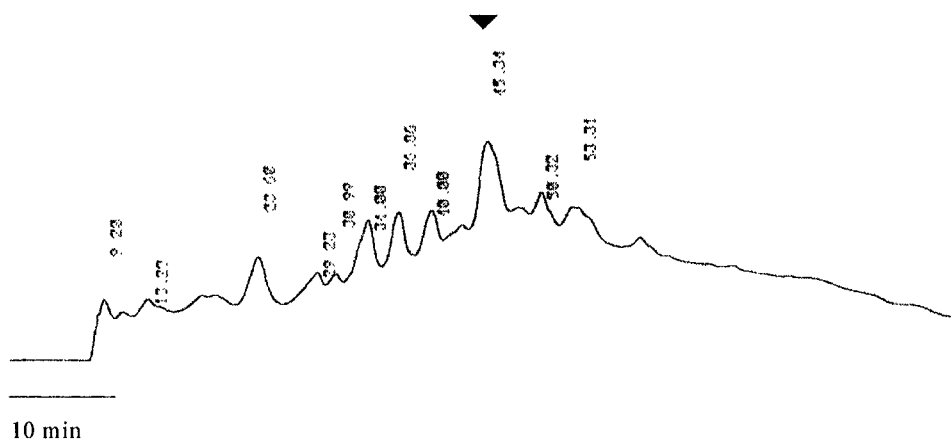


Fig. 3-6. Purification of ACE inhibitor from methanol eluents from Silica gel using HPLC. C_{18} column was used with linear gradient of solvent A (2% acetonitrile) and solvent B (60% acetonitrile).

4. Prostaglandin 합성저해물질 탐색

가. Prostaglandin 합성효소의 준비 및 효소 반응

소의 seminal vesicle 80 g을 도축장으로부터 준비하여 인산완충용액 (50 mM pH 8.0) 150ml을 첨가하여 homogenizer로 2분간 분쇄한 후 10,000g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 100,000g에서 1시간 동안 초원심분리하여 microsome을 회수한 후 20 mg/ml 농도가 되도록 완충용액에 녹여 효소 (cyclooxygenase)로 사용하였다. 준비된 효소 용액에 단감 추출물과 cofactor인 epinephrine (5.8 mM)을 첨가하여 37 °C, 5분 preincubation 시킨 후 기질인 arachidonic acid (2 mM)을 첨가하고 480 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

나. 단감에 의한 prostaglandin 합성 억제

단감을 잎, 과육, 껍질, 내심, 꼭지로 각각 분획한 후 물, ethyl alcohol, butanol, ethyl acetate, methylene chloride로 추출하여 건조시킨 후 ethyl alcohol을 첨가하여 각 분획의 cyclooxygenase 저해 작용을 측정하였다.

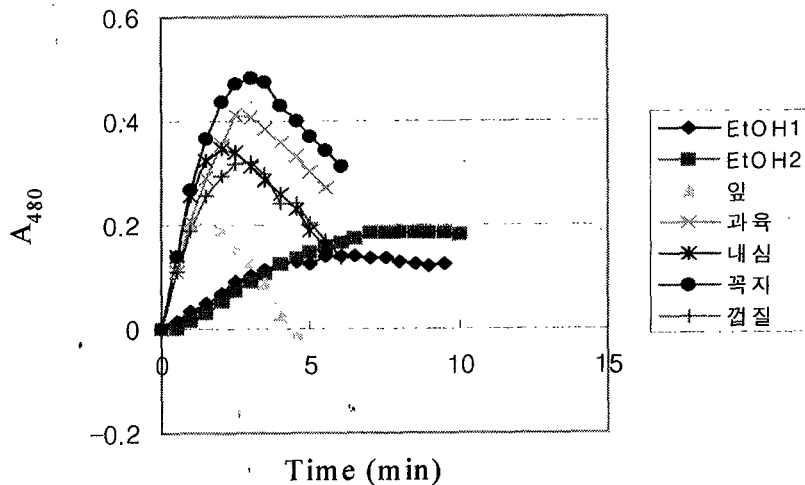


Fig. 4-1. Effect of sweet persimmon extracts on cyclooxygenase activity

Each fraction of sweet persimmon was extracted with water and resolved with ethanol

Fig. 4-1에 나타낸 바와 같이 물 추출물들은 cyclooxygenase를 억제하지 않았고 오히려 활성화시키는 것으로 나타났다.

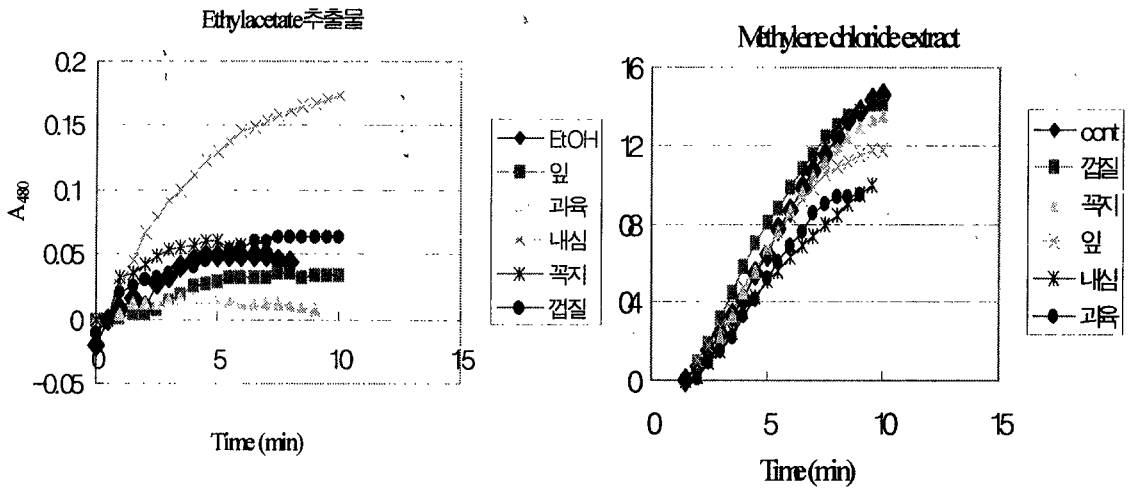


Fig. 4-2. Effect of sweet persimmon extracts on cyclooxygenase activity

Each fraction of sweet persimmon was extracted with ethylacetate and methylenechloride, respectively and resolved with ethanol

그러나 Fig 4-2에 나타난 바와 같이 ethyl acetate 추출물과 methylene chloride 추출물의 경우 잎과 과육에서 cyclooxygenase활성을 억제하는 물질이 있음을 확인할 수 있었다. aspirin과 같은 기존에 알려진 cyclooxygenase inhibitor들이 유기용매에 물 보다 더 soluble한 것이 알려져 있기 때문에 위의 결과로부터 단감의 잎과 과육에서는 유사한 물질이 발견될 가능성이 높은 것으로 나타났다. 이에 따라 잎을 ethyl acetate로 추출하고 methanol에 녹인 후 Silica gel에서 분리하였다.

Fig 4-3에 제시한 바와 같이 cyclooxygenase inhibitor가 Silica gel의 methanol fraction에서 발견되었으며 inhibition rate가 농도의존적임을 보였다. 이 분획을 농축하여 HPLC 상에서 분리한 결과 Fig 3-6에서 retention time 22-25분 사이에서 용출되었다. Silica gel에서는 ACE inhibitor와 cyclooxygenase inhibitor가 모두 methanol fraction에서 검출되었는데, 이는 HPLC 상에서 분리되어 서로 다른 물질임을 알 수 있었다.

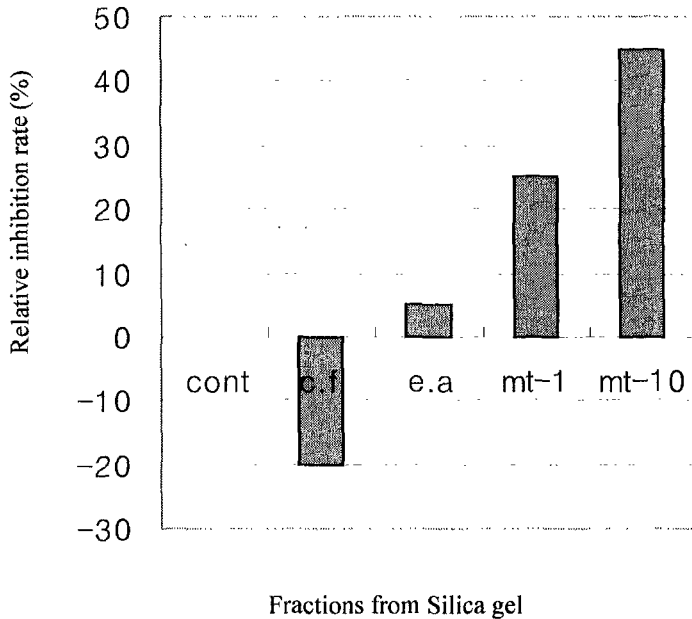


Fig. 4-3. Cyclooxygenase inhibition rate of fractions from Silica gel. c.f.; eluted with chloroform, e.a; eluted with ethyl acetate, mt; eluted with methyl alcohol. The concentration of effector of mt-10 was 10 times higher than that of mt-1. The values are represented with relative inhibition rate.

5. 가공식품에서 유용물질의 농도

가. ALDHA

현재 시판되고 있는 감의 가공식품인 꽃감과 감식초에서 단감에서 발견된 ALDHA가 존재하는지, 한다면 양의 차이가 있는지를 알아보기 위해 꽃감과 감식초를 단감을 정제하는 것과 같이 ethyl acetate extraction 후에 HPLC를 거쳐 ALDH 활성화 분획을 가른 후 전체의 양을 비교하였다. silica gel을 거친 후 더 깨끗한 분획이 얻어지기는 하나 양의 소실이 많아 정량하는데는 적합하지 않아 이 단계를 생략했다. Fig. 5-1에서 보여주듯이 꽃감은 ALDHA의 활성이 크게 저하되지 않았다. 단감자체가 수확시기에 따라 활성에 차이가 있고 꽃감의 경우 시장에서 구입을 했기 때문에 수확시기를 알수 없지만 11월 단감을 기준으로 활성을 계산했다. 또 HPLC분리시 단감의 ALDHA는 retention time 26 min에 나타나는데 꽃감의 ALDHA도 같은 분

획에서 나타나 같은 물질로 추정되고 있다. 그러나 감식초의 경우 11월 수확한 단감과 비교 시 4% 정도만의 활성이 보유되었고 HPLC분리후에 retention time 16 min에 활성이 있는 분획이 나타나 단감의 ALDHA와는 구조나 성분이 다른 물질이 같은 활성을 보이는 것으로 보인다. 감식초의 경우 발효과정중에 구성분의 변화로 인한 ALDHA의 화학적 전환이 일어난 것으로 추정된다.

새로 제작된 단감 가공식품인 감정과, 휴대용젤형(감즙), 양갱, 감음료에 단감에서 발견되는 ALDHA가 존재하는지, 한다면 양의 차이가 있는지를 알아보기 위해 각 가공품을 단감을 정제하는 것과 같이 ethyl acetate extraction후에 HPLC를 거쳐 ALDH 활성화 분획을 가른후 전체의 양을 비교하였다. 감정과는 3가지 종류로 당처리하지 않은 것, 설탕처리, 포도당처리로 준비하였는데 10 g의 생과를 동결건조시 2 g으로 무게가 감소하고 설탕이나 포도당처리시 무게가 3.3 배 증가하였다. 이것을 고려하여 ALDHA 활성을 측정하여 앞의 계절별 단감의 활성과 비교시 가장 활성이 높은 11월 단감과 감정과의 경우 설탕이나 포도당처리시 활성이 약간 떨어지기는 하나 ALDHA의 활성에 큰 차이가 없었다. 감의 휴대용젤형은 100 g당 감의 함량이 60 g이 들어있는데 ALDHA의 활성은 생과의 67% 활성을 보유하고 있다. 양갱은 감분말가루가 70% 가 들어가서 100 g당 생과가 350 g이 들어갔다. ALDHA의 활성은 가공중 많이 손실되어 생과의 20%만 보유하고 있었다. 반면 감음료는 100 ml에 감 3.6 g을 포함하는 낮은 농도로 들어가서 ALDHA의 활성이 아주 미미하게 검출되었다.

나. 향응고물질

현재 시판되고 있는 감의 가공식품인 꽃감과 감식초에서 단감에서 발견된 향응고물질이 존재하는지, 한다면 양의 차이가 있는지를 알아보기 위해 단감을 정제하는 초기단계에서 응고촉진물질을 제거한후 향응고물질의 활성을 측정했다. 여러 단계의 정제를 거칠 때 활성비교가 어려워서 60°C 열처리후 YM10 membrane을 이용한 ultrafiltration을 거친후 농축하여 활성을 측정해서 무게 [g] 당 활성을 비교했다. Fig.5-2에서 보여주듯이 꽃감의 경우 향응고 활성이 단감과 비교시 큰 차이가 있었다. 단감은 수확시기에 따라 활성에 큰 차이가 없었는데 꽃감의 경우 시장에서 구입을 했기 때문에 수확시기를 알수없지만 평균잡아 150배 가량 활성의 저하를 보였고 생과실보다 수분감소로 인한 무게감소를 감안하면 생과실보다 활성의 저하는 더욱 크다. 감식초는 산성분으로 인해 활성측정이 어려웠는데 활성을 측정할수 있는 8 mg의 감까지는 전혀 향응고활성을 보이지 않았다.

새로 제작된 단감 가공식품인 감정과, 휴대용젤형, 양갱, 감음료에 단감의 과육과 꼭지에서 발견되는 향응고물질이 존재하는지, 한다면 양의 차이가 있는지를 알아보기 위해 각 가공품을 응고촉진물질을 제거한후 향응고물질의 활성을 측정했다. 여러 단계의 정제를 거칠 때

활성비교가 어려워서 60°C 열처리후 YM10 membrane을 이용한 ultrafiltration을 거친후 농축하여 활성을 측정해서 무게 [g] 당 활성을 비교했다. Fig. 7-2 에서 보여주듯이 가공식품의 경우 생과실에 비해 항응고활성이 56-260배 정도로 크게 저하되어 있었다. 생과일의 경우 1 mg 수준에서도 활성이 검출되는 반면 휴대용젤형과 감음료은 각각 400 mg, 2 mg 까지도 활성을 보이지 않았다. 기존의 가공식품과 비교시 비슷한 수준의 활성을 보여 항응고활성을 이용한 가공식품은 공정에 대한 영향이 조사되어야 하고 항응고활성을 저해하는 인자를 초기에 제거하거나 불활성화시키는 작업이 필요한 것으로 보인다.

Fig. 5-1 단감 가공식품에서의 ALDHA의 활성

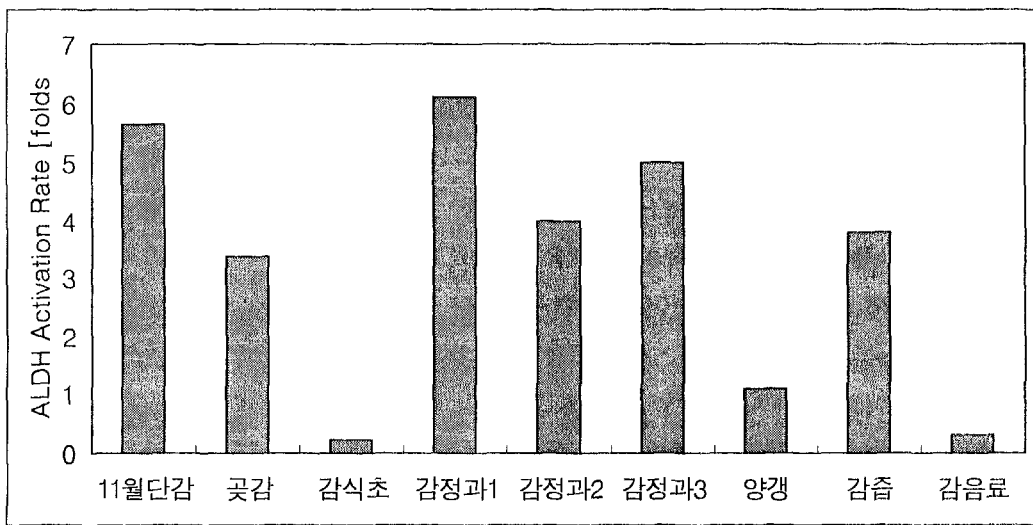
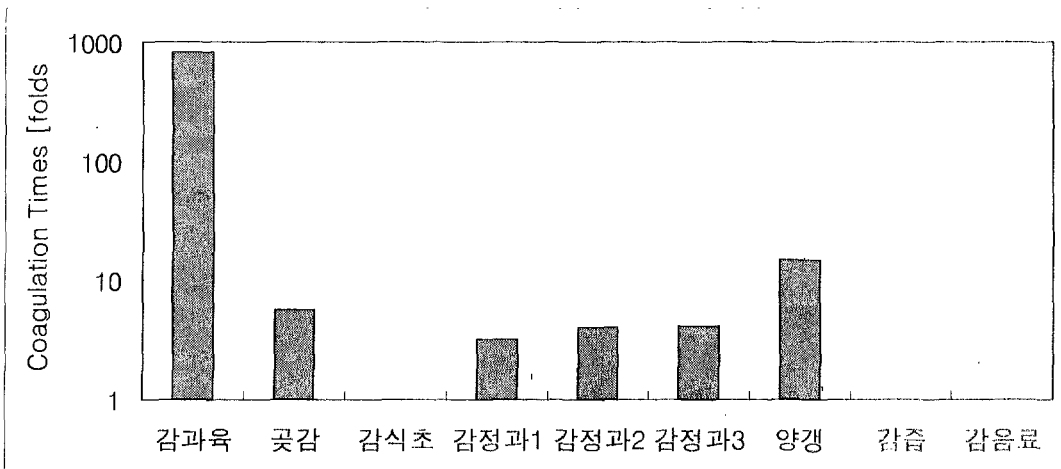


Fig.5-2. 시판 가공식품에서의 항응고활성



6. 감의 계절별, 품종별 유용물질의 농도 변화

가. ALDHA

수확시기에 따른 단감의 ALDHA에 차이가 있는지, 있다면 양의 차이, 혹은 구성분의 변화가 있는지를 알아보기 위해 수확시기별로 단감을 구입하여 앞서서의 방법과 같이 ethyl acetate extraction 후에 HPLC를 거쳐 ALDH 활성화 분획을 가른 후 전체의 양을 비교 하였다 (Fig. 6-1). 12월과 2월은 수확시기가 아니고 11월 말 수확 후 저장창고에 또 품종에 따른 변화를 보기 위해 9월에 수확된 서촌조생과 11월 수확된 홍시를 구입하여 11월 수확된 단감과 비교하였다. 홍시는 감주백목과 청도반시를 측정시 11월 수확 단감에 비해 53% 활성이 보유했다. HPLC 분리시 단감의 ALDHA는 retention time 26 min에 나타나는데 홍시의 경우도 같은 분획에서 나타나 같은 물질로 추정되고 있다.

나. 항응고물질

수확시기에 따라 단감의 항응고물질 활성에 차이가 있는지를 알아보기 위해 수확시기별로 단감을 구입하여 응고촉진물질을 제거한 후 항응고물질의 활성을 측정했다. 여러 단계의 정제를 거칠 때 활성비교가 어려워서 YM10 membrane을 이용한 ultrafiltration을 거친 후 농축하여 활성을 측정해서 무게 [g] 당 활성을 비교했다 (Fig. 6-2). 또 감과육의 항응고물질은 같이 존재하는 단백질로 추정되는 항응고활성을 파괴하는 물질의 함량이 높아 계절별 정확한 비교가 어려워 감꼭지의 항응고물질을 계절별로 비교하였다. 전 연구에 의하면 감꼭지와 감과육의 항응고물질은 양의 차이는 있으나 같은 물질로 추정된다. 12월 이후는 11월 말에 저장창고에서 보관되다가 시중에 나온 것들로 개월의 표시는 저장창고에서 꺼낸 시기에 해당한다. 항응고활성은 11월에 수확한 것이 가장 높고 저장이 길어지면서 급격한 감소를 보이고 있다. 홍시중 감주백목과 청도반시를 구입하여 11월 단감과 활성을 비교시 감주백목은 활성이 큰 차이를 보이지 않았으나 청도반시와 9월에 수확하는 서촌조생은 다소 활성이 낮았다. (Fig. 6-3). 각 감과육의 경우에도 부유가 가장 높고 서촌조생이 가장 낮았다 (Fig. 6-4).

Fig. 6-1 감의 계절별, 품종별 ALDHA의 활성

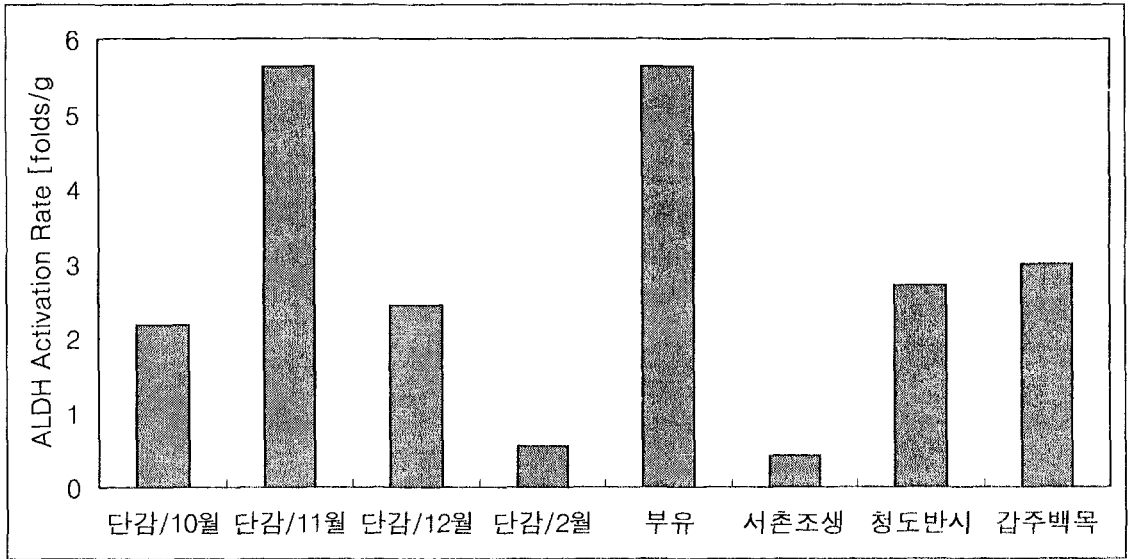


Fig. 6-2 감의 계절별 항응고활성

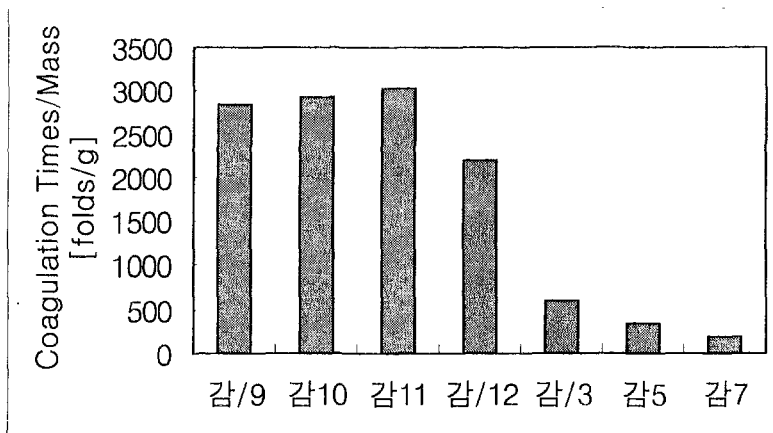


Fig. 6-3 감꼭지의 품종별 항응고활성 비교

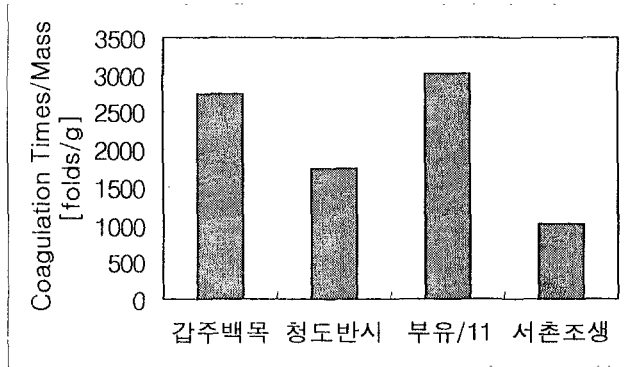
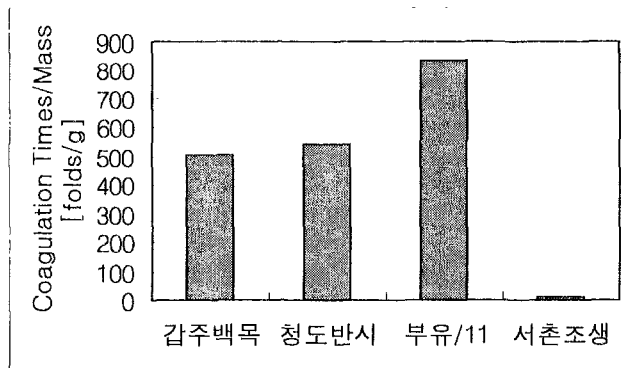


Fig. 6-4 감과육의 품종별 항응고활성



제 3 장 단감실태조사

제 1 절 재료 및 방법

1. 단감품질 실태조사

- 조사지역: 김해, 창원, 진주, 사천, 의령 등 5개 지역에서 지역별 5개 농가 이상
- 조사항목: 등급별 수량 및 시기별 가격
- 조사품종: 부유

제 2 절 결과 및 고찰

1. 시기별 과실통성 조사

성숙기 당감 특성을 보면 과중의 증가는 11월 중순까지 계속되었고, 경도는 과실이 성숙함에 따라 점차 낮아지는 경향을 보였으며 색도는 10월 중순에서 10월 말까지 가장 많은 변화가 일어났는데, 특히 a, b 값이 크게 증가되어 10월 말 경에 14.5 Brix로 11월 중순의 14.7 Brix에 비하여 큰 차이를 나타내지 않았다. 단조성의 변화는 Fructose와 Glucose는 성숙함에 따라 점차 감소하였고, Sucrose는 증가하는 경향을 나타내었다. 우리나라 단감 수확 시기를 첫서리 이전으로 잡으면 수확기를 10월 중순부터 11월 초순경으로 볼 수 있는데, 전년도에는 예년과 달리 11월의 평균기온이 높고 첫서리가 늦은 관계로 11월 중순까지 수확이 이루어졌고, 단감의 과중도 예년에 비하여 증가한 것으로 판단된다.

2. 단감 등급별, 시기별 가격 변동

단감 가격형성은 수확 최성기인 10월 중순에서 11월 상반기까지 대체로 낮은 가격으로 출하되었고, 15 Kg 박스당 80개 이상은 만원 이하로 나타났다. 수확 말기인 11월 후반기에서 초기 저장 물량 출하기인 12월 상반기부터 가격이 높아지는 것을 볼 수 있다. 단감의 재배면적이 90년 9.9천 ha에서 98년 23.5천 ha로 2.4배 증가하였고, 생산량도 90년 66천톤에서 98년 209천톤으로 3.2배 증가하였으며, 98년도 수확이 가능한 과수가 65 %이고 아직 결실이 없는 과수가 35 %로 이들이 성목이 되어감에 따라 과실의 수량이 증가될 것으로 예상되어지며 출하가격 15 Kg 박스당 만원이하인 것을 단감 가공에 이용한다고 보면 상당한 물량확보가 가능하리라고 본다.

Table 1 Changes of fruit characteristics during maturation of sweet persimmon (Fuyu)

Date	Fruit Weight (g/fruit)	Hardness (Kg/φ5mm)	Peel Color ^p			Soluble solid (° Brix)	Soluble Sugars		
			L	a	b		F	G	S
Sep. 1	101	6.3	43.3	-5.8	19.9	7.9	3.00	3.72	1.02
Sep. 14	115	6.1	43.7	-5.7	20.0	8.8	1.77	2.11	4.69
Sep. 30	150	5.6	45.3	-3.8	21.1	10.6	1.63	2.17	7.81
Oct. 14	181	5.3	48.9	5.1	26.5	11.8	1.49	1.79	7.12
Oct. 30	201	4.4	51.5	29.3	28.7	14.5	1.17	1.41	10.79
Nov. 14	235	3.9	31.1	31.1	30.6	14.9	0.84	0.98	11.78

^p: Huntr value, L: Light a: + red - green, b: + yellow - blue
 F: fructose, G: glucose, S: sucrose

Table 2. Change of fruit price in grades and interval of sweet persimmon (Fuyu)
 (unit: thousand won)

Date Grades	Oct. 15 - 30	Nov. 1 - 15	Nov. 16 - 30	Dec. 1 - 15	Dec. 16 - 31	Jan. 1 - 15	Jan. 16 - 31	Feb. 1 - 15
50 below	19.7	18.8	26.8	26.8	29.8	33.7	39.3	41.6
51 - 60	19.2	16.7	22.1	24.8	24.7	30.4	36.4	39.5
61 - 70	15.8	14.1	18.5	21.6	21.5	26.9	32.4	35.1
71 - 80	12.5	11.8	15.7	18.7	18.8	24.4	29.9	30.9
81 - 90	8.7	9.9	12.1	16.5	16.2	21.0	27.1	27.1
91 - 100	8.7	8.2	9.9	13.0	13.8	19.7	24.7	24.4
101 - 110	6.7	6.9	8.3	10.0	9.0	17.6	20.0	21.2
111 - 120	6.4	6.3	7.0	10.5	9.8	19.0	19.0	21.4
120 above	5.5	5.8	5.3	3.0	6.5	-	15.8	17.3

3. 출하 단감의 등급별 수량

농가에서 출하되는 단감의 등급별 수량을 보면 박스당 80개 이상이 28.4%를 차지하고 100개 이상이 5.9%를 차지하고 있는 것으로 나타났다. 98년 생산량 209톤을 감안하면 80개 이상인 불량량이 약 59.4천톤, 100개이상인 불량량이 12.3천톤 가량으로 가격이 낮은 100개 이상의 불량량을 가공용으로 사용한다면 12천톤 이상의 불량량 확보가 가능하리라 본다.

Table 3. Volumes per grade of sending out sweet persimmon (Fuyu)

^a: 15 Kg/box

Grade	50 below	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	101-110	111-120	120 above
Volumes ^a (%)	638 (2.5)	4524 (17.7)	6804 (26.5)	6388 (24.9)	3697 (14.4)	2082 (8.1)	857 (3.4)	507 (2.0)	135 (0.5)

제 4 장 단감 가공방법 개발

제 1 절 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 단감은 시중에서 구입하여 사용하였다. 반유동성 젤형 제품 개발을 위해 사용한 감은 박피한 후 마쇄하여 냉동상태로 보관하면서 사용하였다.

2. 감을 이용한 드링크 제품 개발

가. 단감 추출물의 제조

단감 음료로 사용할 base를 만들기 위해 단감을 초파로 파쇄(die 직경 0.4 cm)하여 단감 중량에 1, 3, 5, 7배의 물을 넣은 후 3시간 가열하여 추출하였다. 추출물의 관능특성을 조사하여 추출을 위한 적정 물 첨가량을 설정하였다.

나. 추출물의 추출시간에 따른 °Brix의 변화

단감 음료로 사용할 base를 만들기 위해 단감 중량에 3배의 물을 첨가하여 3시간 추출하였을 때 관능특성이 우수하였으므로, 단감에 3배의 물을 첨가하여 10시간동안 추출하면서 Refractometer를 이용하여 °Brix를 측정하였다.

다. 단감 드링크의 조성 설정

1) 당 농도의 설정: 단감 중량에 3배의 물을 넣어 3시간 추출하여 제조한 음료 base에 설탕을 10, 12.5, 15%를 가하여 관능검사를 통해 적정 당 첨가량을 설정하였다. 이때 구연산은 0.1% 첨가하였다.

2) 산 농도의 설정: 단감 중량에 3배의 물을 넣어 추출하여 제조한 음료 base에 설탕을 10%와 솔비톨 2.5%를 첨가한 후 구연산을 0.1, 0.15, 0.2%첨가하여 관능검사를 통해 적정 산 첨가량을 설정하였다.

3) 드링크 맛의 개선 시험: 단감 중량에 3배의 물을 넣어 추출하여 제조한 음료 base에 설탕을 10%와 솔비톨 2.5%를 첨가한 후 구연산 0.15%를 첨가하여 제조한 단감 드링크는 마신후 느끼는 후미에서 쓴맛과 떫은 맛을 느껴, 과실 농축액을 사용하여 후미를 억제하고자 하였다. 이때 사용한 과실 농축액은 오렌지농축액, 포도농축액, 토마토 농축액과 제주산 만다린 농축액 4가지를 사용하였다. 과실 농축액을 설정후 최종 가향처리를 하였다.

라. 관능검사

관능검사는 아래의 Table 1에 나타난 방법으로 향, 맛, 종합적 기호도를 대상으로 무작위

료 시료를 제공하면서 5점 척도법(1)으로 평가하였으며, 통계처리는 Duncan 다중비교법(2)을 사용하였다.

Table 1. Sheet of sensory evaluation for preparation of persimmon drink

Sample No.				
Taste				
Flavor				
Overall acceptance				
Score	1: very poor, 2: moderate, 3: very good			

3. 감 정 과 제 품 개 발

가. Blanching에 따른 특성

슬라이서로 0.2 - 0.4cm의 두께로 절단한 단감 절편을 blanching 시료로 사용하였다. Blanching 시간은 30, 60, 90, 120, 180초로 30초 간격으로 끊으는 물에서 blanching하였으며, blanching에 따른 시료의 무게 변화를 측정하여 blanching의 적정 여부를 조사하였다.

나. 제조방법별 정과제조

슬라이서로 0.2 - 0.4cm의 두께로 절단한 단감 절편을 1) 아무처리 없이 사용 2)50% 당액에 24시간 침지, 3)끓으는 50% 당액에 10분동안 삶은후 24시간 침지 처리하였다. 이 3가지 처리구를 각각 열풍건조 및 동결건조를 하였다.

4. 휴대용 (반유동성) 젤형 제품 개발

가. 유동성을 주기 위한 젤화제 농도의 설정 시험

유동성을 주기 위한 젤화제로는 덱스트린과 solstar-L을 사용하였다. 먼저 감과 덱스트린, solstar-L의 함량을 Table 2와 같이 각각 달리하여 8가지 제품을 만든 다음 젤 특성을 조사한 후 2차로 Table 3처럼 solstar-L의 함량은 일정하게 유지하고 감과 덱스트린의 함량만을 아래와 같이 변화시켜 3가지 제품을 만들었다.

Table 2. The 1st formular of concentrations of gelling agents on flow property

(unit : g)

Samples	persimmon	dextrin	solstar-L
A	75	10	3
B	90	10	1
C	90	10	2
D	95	5	0.5
E	95	5	1
F	95		1
G	95		2
H	95		3

Table 3. The 2nd formular of concentrations of gelling agents on flow property (unit: g)

Samples	persimmon	dextrin	solstar-L
A	70	30	3
B	80	20	3
C	90	10	3

나. 조성물의 혼합

Table 2와 3에 나타난 조성물을 혼합하는 방법으로는 감과 덱스트린을 일정량 넣고 먼저 homogenizer로 3분간 1,000rpm에서 마쇄한 후 solstar-L을 첨가하여 다시 homogenizer로 3분간 1,000rpm에서 마쇄하여 혼합하고 포장하였다. 살균은 끓는 물에서 10분동안 하였다.

다. 맛의 강화를 위한 기타 부재료의 선정

1) 맛 보강 : 제품의 맛을 보강하기 위해 계피 추출물을 첨가하고 산미를 약간 증가시키기 위해 비타민 C와 citric acid의 함량을 0.15 ~ 0.25%까지 달리하여 첨가하였다. 즉 조성은 60g, dextrin 30g, 계피추출액 10g, solstar-L 3g, 비타민 C 0.1%였으며, 구연산 농도는 0.15, 0.2, 0.25%로 달리하면서 제조하였다. 제조방법은 앞에 언급한 방법과 동일하게 하였으며, 만들어진 3가지 제품에 대해 관능검사를 실시하여 가장 기호도가 높은 것을 조사하였다. 사용한 계피추출물은 계피와 물의 비율을 1:30으로 하여 끓기 시작한 점에서 3시간을 열수 추출하여 여과한 후 사용하였다. 계피추출물의 °Brix는 0.2였다.

2) 물성 향상 : 제품의 물성을 향상시키기 위해서 gellan gum과 xathane gum을 각각 첨가하여 물성을 비교해 보았다. 이때 사용한 조성은 감 60g, 덱스트린 30g, 계피추출물 10g, solstar-L 2%, 비타민 C 0.1%, citric acid 0.15% 였으며, 물성개량제로 gellan gum

0.2%와 xanthane gum 0.2%를 각각 사용하였다. 제조방법은 감과 덱스트린을 먼저 3min동안 1,000rp에서 균질화하였다. sol-L과 gum을 첨가한 후에 다시 같은 조건에서 균질화한 후 밀봉하여 끓는 물에서 10분간 살균하였다.

3) 겔 첨가량에 따른 물성 개량 : 겔 첨가량에 따른 물성 개량을 하기 위해 gellan gum과 sol-L의 첨가량을 각각 달리하였다. 사용한 조성은 감 60g, dextrin 30g, 계피추출물 10g, Vit C 0.1%, citric acid 0.15%이었으며, 겔 첨가량은 Table 4에 나타내었다.

Table 4. Formular for improvement of flow perperty using gum

	gellan gum(%)	sol-L(%)
A.	0.2	×
B.	0.1	×
C.	0.2	1.0
D.	0.2	0.5
E.	0.1	1.0
F.	0.1	0.5

라. 반유동성 젤형 제품의 저장성 실험

1) 시료의 제조 및 저장: 반유동성 젤형 제품의 저장성을 증대하기 위해 항갈색화제로 알려진 vit C, 구연산, cysteine의 첨가량을 각각 달리하여 제품을 만든후 저장일수에 따른 갈변정도를 측정하였다. 이때 반유동성 제품의 조성은 감 60g, dextrin 30g, 계피추출물 (0.2 °Bx) 10g, gellan gum 0.1%이었으며, Vit C, 구연산, cysteine의 첨가량은 Table 5에 나타내었다. Table 5처럼 제조한 젤형제품은 상온에서 저장하면서 매 5일마다 색차와 browning index(3)를 측정하였다.

Table 5. The concentration of vitamin C, citric acid and cysteine containing gel products.

	Vit C(%)	citric acid(%)	cysteine(%)
control	×	×	×
A.	0.25	×	×
B.	×	0.25	×
C.	0.1	0.15	×
D.	0.1	0.15	0.05

2) browning index 측정: 저장 시료 20g에 물 25ml을 가한 후 균질화(3min, 10,000rpm)한 후 2시간 동안 shaker에서 shaking하면서 갈색 물질을 추출하였다. 추출후 여과지(whatman No. 42)로 여과하여 420nm에서 O.D 측정하였다(3). 이때 blank는 증류수를 사용하였다.

5. 감분말을 이용한 양갱개발

가. 재료 및 제조방법

1) 재 료: 1999년도에 생산된 단감을 껍질, 씨 등을 제거하고 얇게 썰어서 온도 70~75℃에서 건조한후 곱게 갈아서 100 mesh 체로 쳐서 분말을 만들었고, 양대 분말은 양대의 껍질을 제거한 후 믹서기로 갈고 100 mesh 체로 쳐서 분말을 만들었다.

2) 제조방법: 한천과 물을 넣고 가열하면서 물에 불린 단감과 양대 분말(백앙금), 설탕, 펙틴 첨가비율을 달리하여 일정시간 가열하고 성형틀에 부어 성형한 뒤 상온에서 식힌 후 양갱을 제조하였다.

나. 제조공정

한천+물 → 가열 → (물에 불린)단감 및 양대 분말 → 펙틴, 설탕 첨가 → 성형 → 식히기 → 제품

다. 조사방법

색도는 Color Difference Meter(Color Quest II, Hunter Lab, USA)를 사용하여 측정하였고, 경도는 Texture Analyser(TA-XT2, Stable Micro Systems, U.K.)를 사용하여 probe size는 ϕ 5mm, head speed는 2mm/s, 표면으로부터 이동거리는 5mm로 측정하였고, 관능검사는 관능검사원 10명을 선정하여 외관, 색, 맛을 채점하였다.

제 2 절 결과 및 고찰

1. 감을 이용한 드링크 제품 개발

가. 단감 추출물의 제조

단감 음료로 사용할 base를 만들기 위해 단감을 초파로 파쇄(die 직경 0.4 cm)하여 단감 중량에 1, 3, 5, 7배의 물을 넣은 후 3시간 가열하여 추출하였을 때 추출물의 맛, 향, 기호도에 대한 관능특성을 조사한 결과는 Table 6에 나타내었다. Table 6에서 물 첨가량에 따른 기호도에서 단감중량에 3배의 물을 넣어 추출한 추출물이 관능적 특성이 우수하게 나타났다. 전반적으로 첨가하는 물의 양이 많아질수록 향의 강도가 떨어졌으며, 맛에서는 EX-1에서는

떫은맛과 쓴맛이 강하게 느끼는 편이었으나, 감의 향이 강하게 느껴졌으며, EX-3과 EX-4에서는 입에서 느끼는 감촉이 없는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과를 고려하여 단감 추출물 제조시 첨가하는 물량은 3배로 설정하였다.

Table 6. Sensory evaluation of water extracts obtained from Persimmon

Extracts	Flavor	Taste	Overall acceptance
Ex-1	3.9 ^a	2.0 ^a	2.1 ^a
Ex-2	3. ^{ab}	3.8 ^b	3.8 ^b
Ex-3	2.5 ^b	2.8 ^c	2.8 ^c
Ex-4	2.1 ^b	2.4 ^a	2.5 ^c
Score	1: very poor, 2: moderate, 3: very good		
EX-1: Extract from water : persimmon(1:1, V:V)			
EX-2: Extract from water : persimmon(1:3, V:V)			
EX-3: Extract from water : persimmon(1:5, V:V)			
EX-4: Extract from water : persimmon(1:7, V:V)			

나. 추출물의 추출시간에 따른 °Brix의 변화

단감 음료로 사용할 base를 만들기 위해 단감 중량에 1, 3, 5, 7배의 물을 넣은 후 3시간 가열하여 추출하였을 때 3배의 물을 첨가하여 추출시 관능특성이 우수하였으므로, 단감에 3배의 물을 첨가하여 10시간동안 추출하면서 °Brix를 측정한 결과는 Table 7에 나타내었다. 추출초기에 °Brix가 급격히 증가하여 단감에 있는 수용성 물질은 추출 초기에 용출되었으며, 3시간이후에는 °Brix의 증가가 거의 없어 적정 추출시간은 3시간으로 판단되었다.

Table 7. Changes of °Brix for water extraction from Perimmon

Extraction time(hr)	0	1.5	3	5	10
°Brix	0	3.4	3.6	3.6	3.8

다. 단감 드링크의 조성 설정

1) 당 농도의 설정: 단감 중량에 3배의 물을 넣어 추출하여 제조한 음료 base에 설탕을 10, 12.5, 15%를 가하여 관능검사를 통해 적정 당 첨가량을 설정한 결과는 Table 8에 나타내었다. 첨가 당농도에 따라 향에서는 큰 차이가 없었으나, 맛에서는 10%사용시 단맛이 약한편이었고, 15%사용시는 단맛이 강한 편이었다. 맛, 향, 종합적 기호도에서 각 처리구마다 유의차가 없었지만 적정 첨가 당농도는 12.5%로 판단되었다.

Table 8. Sensory evaluation with sugar contents of water extracts obtained from Persimmon

Sugar contents(%)	Flavor	Taste	Overall acceptance
10	3.4 ^a	2.7 ^a	3.1 ^a
12.5	3.5 ^a	3.3 ^b	3.5 ^b
15	3.5 ^a	2.8 ^a	3.2 ^a

2) 산 농도의 설정: 단감 중량에 3배의 물을 넣어 추출하여 제조한 음료 base에 설탕을 10, 12.5, 15%를 가하여 관능검사를 통해 적정 당 첨가량을 설정한 결과 적정 첨가 당 농도는 12.5%로 나타나 당조성을 설탕 10%와 솔비톨 2.5%로 한후 구연산을 0.1, 0.15, 0.2% 첨가하여 관능검사를 통해 적정 산 첨가량을 설정한 결과는 Table 9에 나타내었다. 구연산 0.1%첨가시 신맛이 약간 약한 편으로 나타났고, 0.2%첨가시 신맛이 약간 강한 편으로 나타나 구연산의 적정 첨가량은 0.15%였다.

Table 9. Sensory evaluation with citric acid contents of water extracts obtained from Persimmon

Citric acid contents(%)	Flavor	Taste	Overall acceptance
0.1	3.4 ^a	2.7 ^a	3.0 ^a
0.15	3.5 ^a	3.3 ^b	3.5 ^b
0.2	3.5 ^a	3.5 ^b	3.2 ^a

3) 드링크 맛의 개선 시험: 단감 중량에 3배의 물을 넣어 추출하여 제조한 음료 base에 설탕을 10%와 솔비톨 2.5%를 첨가한 후 구연산 0.15%를 첨가하여 제조한 단감 드링크의 맛을 개선하기 위해 오렌지농축액, 포도농축액, 토마토 농축액과 제주산 만다린 농축액 4가지를 0.5%첨가하여 제조한 단감 드링크의 관능검사 결과는 Table 10에 나타내었다. 사용한 과일 농축액중 토마토 농축액을 사용시 기호도가 가장 떨어졌으며, 감귤계통의 농축액을 사용시 기호도가 우수하게 나타났으며, 오렌지농축액보다는 만다린 농축액을 사용한 것이 기호도가 좋게 나타났다.

Table 10. Sensory evaluation of Persimmon drink containing some fruit concentrates

Kind of fruit concentrates	Flavor	Taste	Overall acceptance
Orange	3.8 ^a	3.7 ^a	3.6 ^a
Grape	3.1 ^b	3.3 ^b	3.4 ^a
Tomato	2.5 ^c	2.5 ^c	2.2 ^b
Mandarin	4.1 ^a	3.9 ^a	4.0 ^c

라. 단감 드링크의 최종 조성 배합비

단감 음료로 사용할 base는 3배의 물로 첨가하여 3시간 추출한 추출물이었으며, 적정 첨가 당농도는 12.5%였고, 산으로 사용한 구연산의 적정 첨가량은 0.15%였다. 드링크 맛의 개선하기 위해서는 만다린 농축액 0.5%를 사용하는 것이 우수하게 나타났다. 이때 제품의 pH는 3.7이었다.

Table 11. Formular of persimmon drink

Kind of ingredients	Weight(g)
Persimmon extract	86.75(3.6°Brix)
Sugar	10
Sorbitol	2.5
Citric acid	0.15
Mandarin	0.5
Lemon flavor	0.1

2. 감 정과 제품 개발

가. Blanching에 따른 특성

단감을 슬라이서로 0.2 - 0.4cm의 두께로 절단한 다음 30초 간격으로 180초까지 끓이는 물에서 blanching하였을 때 blanching에 따른 시료의 무게 변화는 Table 12에 나타내었다. 전반적으로 blanching 시간이 증가함에 따라 단감의 무게가 감소하였으며, 90초까지는 1.5% 이내의 감소가, 120 - 180초에서는 3%의 감소가 있었다. 이러한 경향은 단감에 있는 가용성 고형물이 blanching하면서 용출되었기 때문으로 사료되었다.

Table 12. Weight lose of blanching time of persimmon slice

Time(sec)	30	60	90	120	150	180
Weight loss(%)	0.5	0.8	1.5	2.3	2.8	3.1

나. 당 침투 특성

일정두께로 절단한 단감을 10분동안 blanching한 후 50% 당액에 24시간 침지하면서 침투되는 당농도는 Table 13과 같았다. 단감정과를 만들기 위해 당액에 침지하였을 때 침지 12시간까지 단감의 당농도가 급격히 증가하여 당의 침투가 12시간이내에 많이 이루어짐을 알 수 있었으며, 침지 20시간 경과시 거의 평형을 이루었다. 따라서 정과를 제조하기 위해 50% 당액에 침지시 12시간 이상 침지하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

Table 13. Changes of °Brix of persimmon snack

Time(hr)	4	8	12	16	20	24
°Brix of persimmon snack	10	14	17	20	23	24

다. 건조 및 제조방법별 정과제조

슬라이서로 0.2 - 0.4cm의 두께로 절단한 단감 절편을 1) 아무처리 없이 사용 2)50% 당액에 24시간 침지, 3)끓이는 50% 당액에 10분동안 삶은후 24시간 침지 처리하였다. 이 3가지 처리구를 각각 열풍건조 및 동결건조를 하였을 때 부피 변화율을 측정한 결과는 Table 14에 나타내었다. 당액을 처리한 단감 절편시료를 열풍건조와 동결건조를 하였을 때 열풍건조시 부피감소율은 절단하여 건조전에 비해 2배정도 감소하여 형태를 유지할 수 없었으며, 동결건조시 부피감소율은 거의 없었다. 따라서 부피감소율 측면에서는 동결건조 방법이 우수하였으나 건조비용이 비싸다는 단점이 있었다. 그러나 50% 당액을 사용시 조직감 등은 우수하였으나, 단맛이 강하고 sugar blooming 현상이 일어나 당액의 농도를 조절할 필요가 있었다.

Table 14. Changes of volume of persimmon snack (unit: %)

Treatments	I	II	III
hot-air drying	48.2	50.4	48.2
freeze drying	2.5	3.9	3.2

라. 당액 농도별 정과제조

0.2 - 0.4cm의 두께로 절단한 단감 절편을 끓이는 당액에 첨가하였을 때 침지액의 Brix가 10, 20, 30, 40, 50되도록 한 후 10분동안 삶은후 24시간 침지 처리한 후 동결건조하여 제조한 정과의 관능적 특성은 Table 15에 나타내었다. 사용한 당액 농도중 10 - 20%로 처리한 것이 관능특성이 가장 좋았으며, 30%이상에서는 sugar blooming 현상 및 입에 들러붙는 느낌이 있었다. 따라서 단감정과를 제조시 동결건조기법으로 제조할 경우 적정 당농도는 10 - 20%였다.

Table 15. Sensory evaluation of persimmon snack by sugar concentration

Sugar concentration(%)	Flavor	Taste	Overall acceptance
10	3.8 ^a	3.7 ^a	3.6 ^a
20	3.1 ^b	3.3 ^b	3.4 ^a
30	2.5 ^c	2.5 ^c	2.2 ^b
40	2.1 ^a	2.2 ^c	2.2 ^b
50	2.1 ^a	2.3 ^c	2.4 ^b

3. 휴대용(반유동성) 젤형 제품의 개발

가. 유동성을 주기 위한 젤화제 농도의 설정 시험

단감을 이용한 반유동 특성을 갖는 gel형 제품은 기호성과 편의성을 주된 요소로 하였다. 우선 가장 중요한 것은 제품의 흐름성으로 고체와 액체의 중간적 특성을 갖도록 하는 것이다. 마쇄된 감은 흐름성이 좋아 섭취시 불편한 점이 있어 이를 해결하기 위해 증점제를 첨가하였다. 유동성을 주기 위한 젤화제로는 덱스트린과 solstar-L을 사용하였다. 먼저 감과 덱스트린, solstar-L의 함량을 앞의 실험방법에 언급한 Table 2에 나타낸 것 처럼 8가지 제품을 만든 다음 젤 특성을 조사한 결과는 Table 16에 나타내었다. Table 16에서 보면 solstar-L과 덱스트린의 배합비가 제품의 흐름성에 영향을 주는 것을 알 수 있다. 덱스트린은 단 맛을 주는 동시에 수분을 흡수하여 반 유동체가 되는데 영향을 미친다. 먼저 감 첨가량은 완제품 100g을 기준으로 할 때 70g 정도인 것이 무난할 것으로 판단되었다. 감 첨가량을 높이면 수분함량의 상승으로 반 유동체 형성이 어려움을 알 수 있다. 또한 이때에는 solstar-L의 첨가량이 증가하더라도 제품의 점성에 큰 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 1차 실험에서는 감 첨가량을 줄이고 덱스트린 함량은 증가시키면서 solstar-L의 함량을 조절할 필요가 있었다. 따라서 solstar-L의 첨가량을 고정시키고 감 첨가량과 덱스트린 함량을 변화시키면서 흐름성을 살펴본 결과는 Table 17에 나타내었다. 표 17에서 나타난 것

처럼 반 유동성 감 제품 제조를 위해서는 감, 덱스트린, solstar-L의 비율이 7 : 3 : 0.3 정도일 때 가장 적당하였다. 따라서 제품 제조시(완제품 100g 기준) 감의 함량은 70g 이하를 유지하는 것이 바람직하였다.

Table 16. Flow property by dextrin and solstar-L used as gelling agents

Samples	persimmon(g)	dextrin(g)	solstar-L(g)	flow(score) *
A	75	10	3	4
B	90	10	1	2
C	90	10	2	2
D	95	5	0.5	1
E	95	5	1	1
F	95		1	1
G	95		2	1
H	95		3	1

* flow : 9 : solid, 5 : semi-solid, 1 : liquid

Table 17. Flow property by dextrin contents used as gelling agents

Samples	persimmon(g)	dextrin(g)	solstar-L(g)	flow(score)
A	70	30	3	5
B	80	20	3	4
C	90	10	3	2

* flow : 9 : solid, 5 : semi-solid, 1 : liquid

나. 반유동성 젤형 제품의 개발

감을 이용한 반유동성 제품을 제조하기 위한 부재료로는 신맛을 내기 위해 구연산을 첨가하였고 기능성을 높이기 위해 비타민 C를 첨가하였으며, 맛을 보강하기 위해 계피추출물을 사용하였다. 또한 제품의 물성을 좋게 하기 위해서 gellan gum을 사용하였다. 구연산의 첨가량을 결정하기 위해 관능검사를 실시한 결과는 Table 18과 같았다. 결과에서 알 수 있듯이 구연산을 0.15% 첨가하였을 때 종합적 기호도가 5.75점이고, 0.2% 첨가한 제품이 5.38점, 0.25% 첨가한 제품이 4.50점으로 구연산을 0.15% 첨가한 것이 가장 높은 기호도를 보였기 때문에 구연산의 첨가량은 0.15%로 결정하였다. Gellan gum과 xanthane gum을 각각 0.2%씩 넣어서 물성을 비교한 결과, xanthane gum을 넣은 것은 유동성이 매우 커고 너무 흐물거려서 반유동성 음료로 적합하지 않았다. gellan gum을 넣은 것은 xanthane gum을 넣은 것과 비교

하였을 때, 유동성이 훨씬 작았으며 그 정도가 심한 것 같아 첨가량을 더욱 소량으로 조절하였다. Gellan gum을 0.2% 첨가하였을 때 유동성이 너무 작아 걸쭉한 정도가 심했기 때문에 gellan gum과 solstar-L의 첨가량을 달리하여 물성을 비교하였다. 그 결과 gellan gum을 0.1% 첨가하고 solstar-L을 첨가하지 않은 것의 물성이 가장 뛰어났기 때문에 앞으로는 solstar-L을 첨가하지 않고 gellan gum만을 0.1% 첨가하기로 하였다.

Table 18. Sensory evaluation of gel-type products using presimmon containing different concentration of citric acid

Taste	citric acid content(%)		
	0.15	0.2%	0.25%
Acid	3.25	6.38	7.00
Sweet	5.88	5.38	5.50
Overall acceptance	5.75	5.38	4.50

Score : 1:very poor, 5:moderate, 9:very good

다. 반유동성 젤형 제품의 저장성 실험

감을 이용해서 제조한 반유동성 제품의 저장기간동안의 갈변정도를 알아보기 위하여 항갈색화제로서 비타민 C, 구연산, 시스테인을 함량을 달리하여 첨가한 후 30일동안 저장하면서 매 5일마다, browning index와 색차를 측정하였으며 그 결과는 Fig. 1과 Table 19와 같았다. Fig. 1는 감을 이용한 반유동성 제품에 항갈색화제를 첨가한 후 매 5일마다의 browning index를 측정한 결과로 대조군의 경우 저장을 시작한 날로부터 30일이 경과한 후에 browning index의 차이는 0.1601로 항갈색화제를 첨가한 다른 군들에 비해서 훨씬 높았다. 항갈색화제의 종류와 첨가량에 따른 변화를 비교해 보면, Vit C만 0.25%첨가한 군은 0.1282였고, 구연산만 0.25%첨가한 군은 0.0500이며, Vit C를 0.1%첨가하고 구연산을 0.15% 첨가한 군은 0.1112이며, Vit C를 0.1%첨가하고 구연산을 0.15% 첨가하고 시스테인을 0.05% 첨가한 군은 0.0432였다. 이 결과들로 미루어 볼 때 항갈색화제로 구연산만을 0.25% 첨가한 군과 Vit C 0.1% + 구연산 0.15% + 시스테인 0.05%를 함께 첨가한 경우에 갈색화 정도를 억제하는 효과가 뛰어났다. Table 19는 감을 이용한 반유동성 제품에 항갈색화제(4)를 첨가한 후 매 5일마다의 색차를 측정한 결과로 browning index 처럼 항갈색화제로 구연산만을 0.25% 첨가한 군과 Vit C 0.1% + 구연산 0.15% + 시스테인 0.05%를 함께 첨가한 경우에 갈색화 정도를 억제

하는 효과가 뛰어났다. 따라서 반유동성을 갖는 젤형 제품에 구연산을 0.25% 첨가하거나 Vit C 0.1% + 구연산 0.15% + 시스테인 0.05%를 함께 첨가하여 제조하는 것이 제품의 갈색화를 어느정도 억제할 수 있을 것으로 판단되었다.

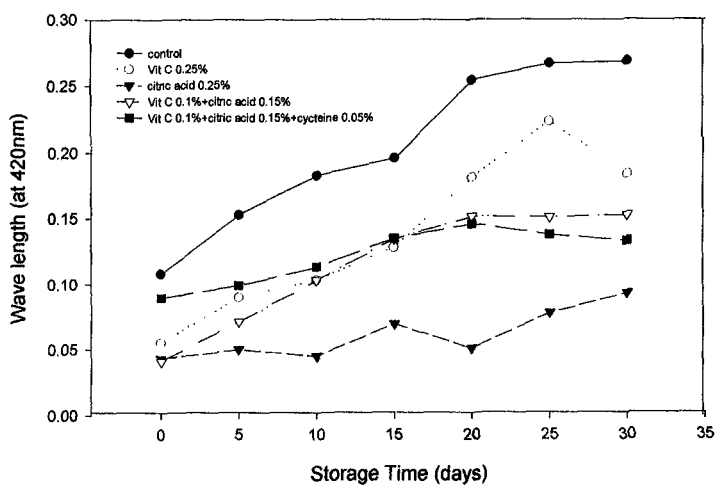


Fig. 1. Changes of browning index of persimmon gel-type products containing some antibrowning agents for storage

Table 19. Changes of browning index of gel-type products from persimmon for storage

sample \ 저장일수	0일	5일	10일	15일	20일	25일	30일	30일-0일
control	0.1084	0.1529	0.1828	0.1962	0.2543	0.2671	0.2685	0.1601
1	0.0554	0.0902	0.1034	0.1284	0.1811	0.2235	0.1836	0.1282
2	0.0431	0.0501	0.0450	0.0696	0.0508	0.0781	0.0931	0.0500
3	0.0411	0.0714	0.1034	0.1347	0.1513	0.1509	0.1523	0.1112
4	0.0899	0.0993	0.1135	0.1352	0.1459	0.1378	0.1331	0.0432

1 : Vit C 0.25%, 2 : citric acid 0.25%, 3 : Vit C 0.1%, citric acid 0.15%,
 4 : Vit C 0.1%, citric acid 0.15%, cysteine 0.05%

		L	a	b	DE
1일	std	92.67	-0.83	0.85	
	control	30.41	2.98	7.08	62.69
	1	31.97	3.13	8.97	61.37
	2	30.33	3.13	7.39	62.81
	3	34.57	3.81	10.83	59.14
	4	33.61	3.46	10.42	60.03
5일	std	92.71	-0.86	0.83	
	control	29.01	2.19	5.99	60.32
	1	31.51	2.89	8.53	58.46
	2	29.78	2.94	6.82	59.77
	3	33.64	3.82	10.04	56.97
	4	33.73	3.43	10.40	57.03
10일	std	92.67	-0.84	0.84	
	control	30.80	3.19	6.99	58.63
	1	31.78	2.83	8.20	57.95
	2	30.34	3.08	6.55	59.00
	3	32.28	3.76	8.62	57.70
	4	34.33	3.53	10.30	56.26
15일	std	92.68	-0.83	0.86	
	control	29.71	2.86	6.39	59.66
	1	32.03	3.41	9.04	58.16
	2	28.76	2.85	5.87	60.62
	3	29.63	3.62	7.44	60.24
	4	32.88	3.43	9.59	57.48
20일	std	92.70	-0.83	0.86	
	control	29.07	2.68	5.93	60.27
	1	31.70	3.43	9.11	58.59
	2	28.94	3.07	6.05	60.50
	3	30.95	4.06	8.36	59.17
	4	32.66	3.60	9.63	57.80
25일	std	92.67	-0.83	0.85	
	control	25.54	2.54	4.86	64.20
	1	28.69	3.34	8.41	61.76
	2	26.95	2.99	5.28	62.63
	3	27.87	3.94	7.99	62.64
	4	29.78	3.40	8.86	60.70

Table 19. Changes of color of gel-type products from persimmon for storage

1 : Vit C 0.25%, 2 : citric acid 0.25%, 3 : Vit C 0.1%, citric acid 0.15%, 4 : Vit C 0.1%, citric acid 0.15%, cysteine 0.05%

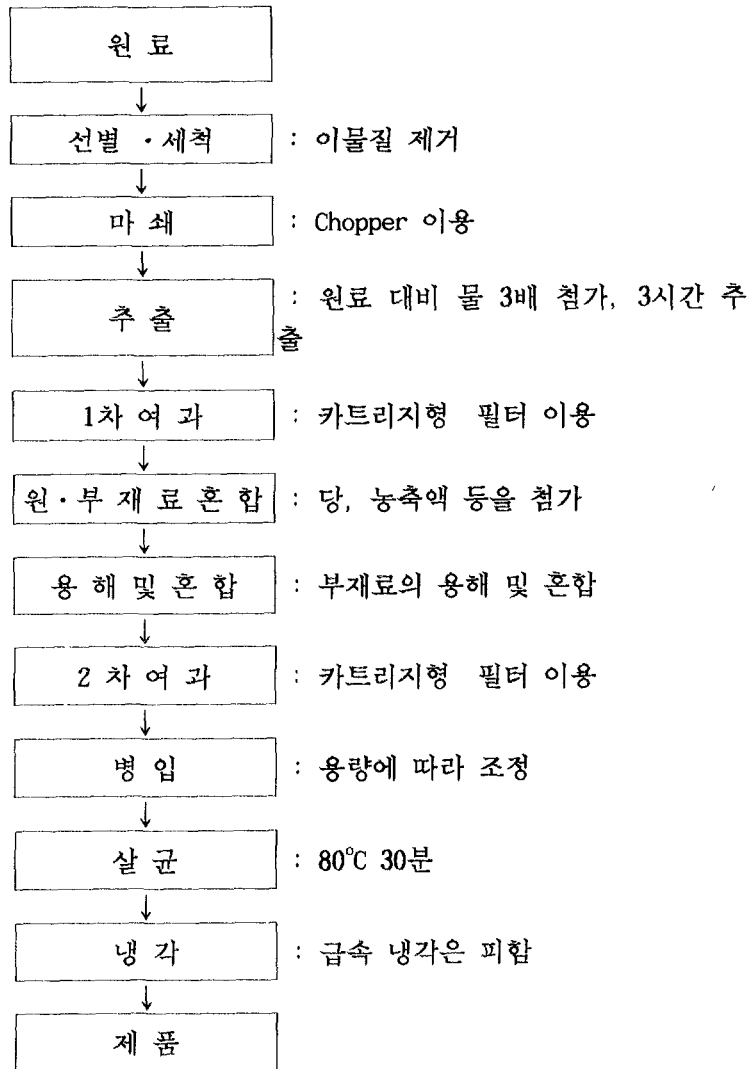
라. 반유동성 젤형 제품의 최종 배합비: 반유동성 젤형 제품의 최종 배합비는 Table 20과 같다.

Table 20. Formula of gel-type products from persimmon

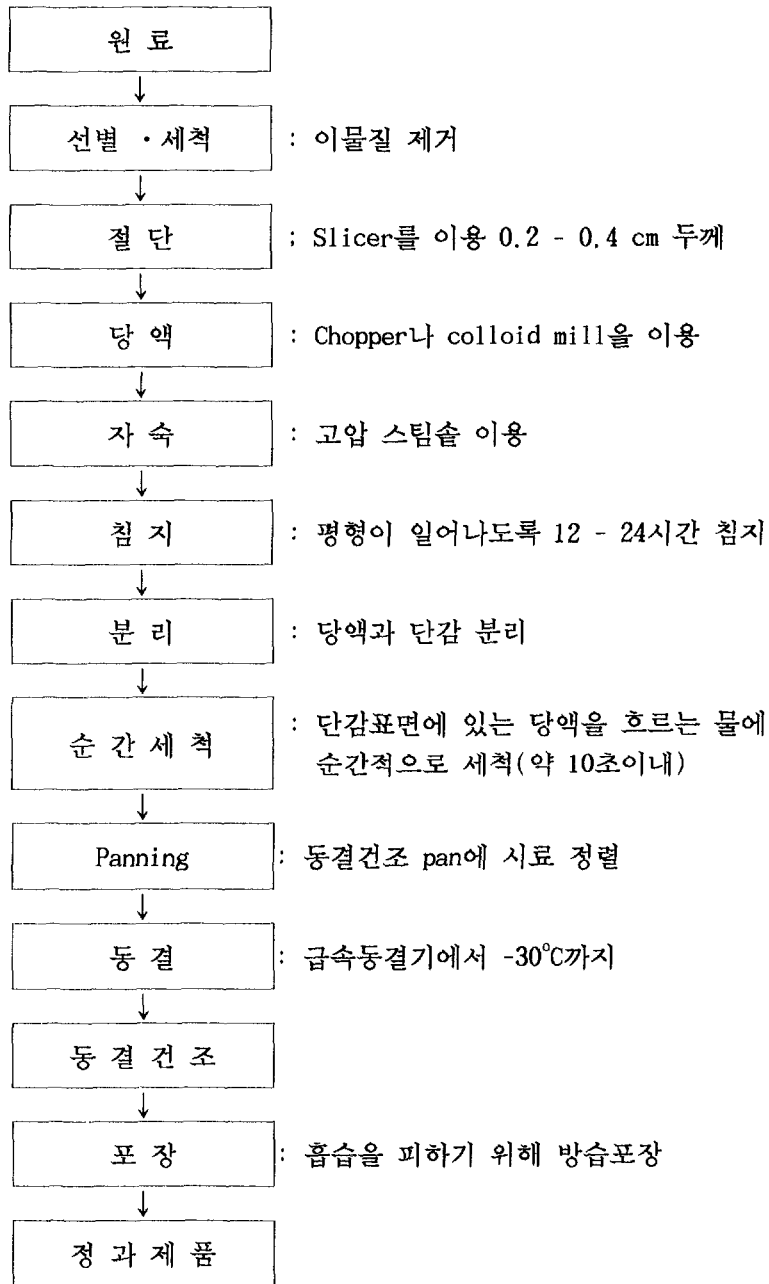
Additives	Amount(g or %)
persimmon(peeling and crushed)	60g
dextrin	30g
cinnamomi cortex extract(0.2 °Bx)	10g
gellan gum	0.1%
vitamin C	0.1%
citric acid	0.15%

4. . 각제품의 제조 공정도

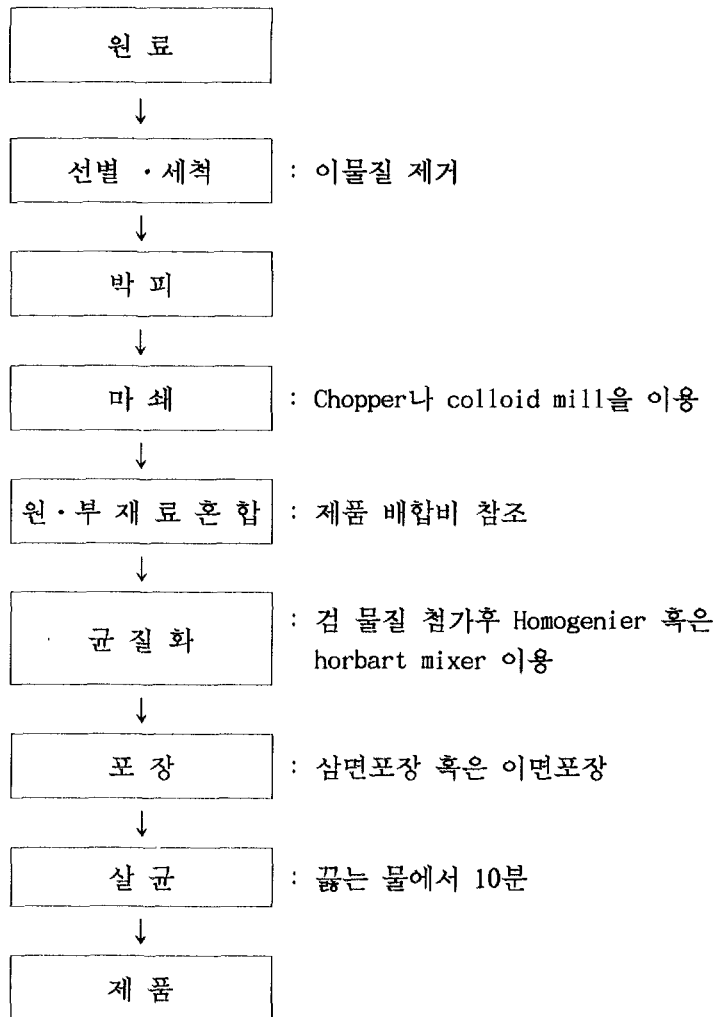
가. 단감 드링크 제조 공정도



나. 단감 정과 제품 제조 공정도



다.. 반유동성 젤형 제품의 제조공정도



5. 감분말을 이용한 양갱개발

단감 분말과 양대 분말의 적정 혼합비를 알기위하여 분말 30%, 설탕, 69%, 한천 1%로 양갱을 제조한 결과 색도에 있어서 양대의 비율이 증가할수록 L과 b는 높았고, a는 감소하였으며, 경도는 양대의 비율이 증가할수록 높았다. 관능검사에서는 색은 단감 분말의 비율이 높을수록 좋았으나 전체적으로 보면 단감 분말 70 : 양대 분말 30에서 좋은 것으로 나타났다. 분말과 설탕의 비율을 알기 위하여 양갱을 제조한 결과 설탕 함량이 증가할수록 L, a, b값 모두 낮아지는 경향이었으나 경도는 증가하였고, 관능검사에서는 분말과 설탕의 비가 30 : 70에서 좋았으며, 한천을 첨가하였을 표 3에서 와 같이 첨가량이 증가할수록 색도 값이 모

두 증가하였으나 관능검사에서 2% 첨가하였을 때 가 좋았다. 품질 좋은 양갱 제조를 위하여 첨가물 한천과 펙틴을 각각 2%로 두고 분말과 설탕의 배합비를 조정하여 양갱을 제조한 결과 설탕의 첨가량이 증가할수록 색도 L, a, b값은 낮아졌고, 경도는 증가하였으며, 관능검사 결과는 분말 28%, 설탕 68%, 한천 2%, 펙틴 2%에서 가장 선호하는 것으로 나타났다.

표 1. 단감 분말과 양대 분말 비율에 따른 품질조사

처 리 내 용 (단감 : 양대)	색 도 ¹			관 능 검 사			Hardness (g)
	L	a	b	외관	색	맛	
100 : 0	24.0	6.3	6.9	5	9	6	119
90 : 10	25.7	6.1	7.6	6	9	7	130
80 : 20	26.6	5.8	7.8	7	8	7	152
70 : 30	27.7	5.2	8.2	8	8	8	168
50 : 50	28.6	4.4	8.5	8	6	6	183

1 L : Lightness, a : + red, - green, b : + yellow, - blue

* 분말(30) : 설탕(69) : 한천(1)

표 2. 분말과 설탕 비율에 따른 품질조사

처 리 내 용 (분말:설탕)	색 도 ¹			관 능 검 사			Hardness (g)
	L	a	b	외관	색	맛	
60 : 40	25.8	5.7	7.5	5	5	4	158
50 : 50	25.6	5.5	7.3	6	6	6	160
40 : 60	24.2	5.2	6.4	8	7	7	186
30 : 70	23.8	4.3	5.6	8	8	8	199
20 : 80	23.2	4.1	5.3	8	8	7	249

1 L : Lightness, a : + red, - green, b : + yellow, - blue

* 단감 + 설탕 (98) : 한천 (2%)

표 3. 한천 첨가량에 따른 품질조사

처 리 내 용	색 도 ¹			관 능 검 사			Hardness (g)
	L	a	b	외관	색	맛	
0.5%	25.6	5.4	7.1	7	7	5	176
2%	26.2	5.9	8.0	8	8	7	184
3%	26.6	6.2	8.2	8	7	7	182
4%	26.9	6.1	8.2	7	7	6	186
6%	27.4	6.2	8.4	7	7	5	182

♪ L : Lightness, a : + red, - green, b : + yellow, - blue

표 4. 배합비율을 달리한 단감 양갱의 품질조사

처 리 내 용	색 도 ¹			관 능 검 사			Hardness (g)
	L	a	b	외관	색	맛	
48 : 48 : 2 : 2	27.5	6.4	8.2	7	7	5	154
38 : 58 : 2 : 2	26.8	6.4	8.0	8	7	7	176
28 : 68 : 2 : 2	25.8	5.8	7.6	8	8	8	189
18 : 78 : 2 : 2	24.1	5.2	7.1	9	8	6	201

♪ L : Lightness, a : + red, - green, b : + yellow, - blue

* 처리내용 : 분말(단감 70: 양대 30) : 설탕 : 한천 : 펙틴

제 5 장 참고문헌

- Abad, M.J., Bermejo, P. and Villar, A. (1995) *Gen. Pharmacol.* 26, 815-819.
- Amin, A.R., vyas, P., Attur, M., Ileszczynska-Piziak, J., Patel, I.R., Weissman, G. and Abramson, S.B. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92, 7926-7930.
- Auchlar and Visin (1984) in *CRC Handbook of Methods for Oxygen radical research*, pp. 123-132, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Beveridge, T. (1984) *J. Food Sci.* 49, 1335
- Blackwell, L.F., Benett, A.F., and Buckley, P.D. (1983) *Biochemistry* 22, 3784-3791
- Borgeat, P. Samuelsson, B. (1979) *J Biol. Chem.*, 254, 7865-7869.
- Cushman, D.W. and Cheung, H.S. (1971) *Biochem. Pharmacol.* 20, 1637-1648.
- Dahn, H.C., Benedetti, M.S. and Dostert, P. (1983) *J. Neurochem.* 41, 618-622
- Eckfeldt, J.H. and Yonetani, T. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 717-722.
- Greenfield, N.J. and Pietruszko, R. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, 483, 35-45.
- Jager, A.K., Hutchings, A. and van Staden, J. (1996) *J. Ethnopharmacol.* 52, 95-100.
- Hibashami, H., Achiwa, Y., Fujikawa, T. and Komiya, T. (1996) *Anticancer Res.* 16, 1943-1946.
- Kameda, K., Takaku, T. Okuda, H., kimura, Y., okuda, T., Haitian, T., Agata, I. and Arichi, S. (1987) *J. Natl. Prod.*, 50, 680-683.
- Kim, D. H. Browning reaction, pp426-430, In: *Food Chemistry*. Tamgoodang Press, Seoul, Korea(1990) 1.
- Kim, T., Yang, S. and Kim, S. (1996) *J. Biochem. Mol. Biol.* 29, 489-492.
- Nugteren, D.H. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 380, 299-307
- Ku, H.S. and Joo, C.N. (1992) *Korean. Biochem. J.* 25, 475-482.
- Okonogi, T., Hattori, Z., Ogiso, A. and Mitsui, S. (1979) *Toxicon*, 17, 524-527.
- Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R.L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., kata, H., Kondo, M. and Hla, T. (1995) *Cancer Res.* 55, 3785-3789.
- SAS institute, Inc. *SAS User's Guide*. Statistical Analysis Systems Inst., Cary, NC, USA(1990)
- Susumi, M. Shinsuke, M. and Hideoki, T. (1989) *Agri. Biol. Chem.* 53, 2763-2767.
- Tam, S.S., Lee, D.H., Wang, E.Y., Munroe, D.G. and Lau, C.Y., 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 13948-13955.

Uchida, S., Ozaki, M., Akashi, T., Yamashita, K., Niwa, M. and Taniyama, K. (1995)
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 22, 302-323.

Wickramasinghe, S.N., Corridan, B., Izaguirre, J. Hasan, R. and Marjot, D.H. (1995)
Alcohol 30, 675-680.

Yasuhiro, K., Shigeru, M., Hiroaki, O., Tetsuyuki, T., Mansard, O. and Tsutomu, M.
(1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 155, 332-337.

이영춘, 김광옥 : 소비자 기호도 조사, pp238 - 250, In : 식품의 관능검사. 학연사,
서울(1996)