工學碩士學位論文

사과 추출물의 구취억제효과

2002年 2月

釜慶大學校大學院

食品工學科

趙 常 元

工學碩士學位論文

사과 추출물의 구취억제효과

指導敎授 金 善 奉

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함

2002年 2月

釜慶大學校大學院

食品工學科

趙 常 元

趙常元의 工學碩士 學位論文을 認准함

2001年 12月 日

主 審 農學博士 李 養 鳳 (인)

委 員 農學博士 梁 志 榮 (인)

委 員 農學博士 金 善 奉 (인)

목 차

Deodorizing Activity of Apple Extracts

Sang-Won Cho

Department of Food Science and Technology, Graduate School, Pukyong National University

Abstract

Polyphenol oxidase extracted from apple, *Malus pumila*(Hongro), were investigated by measuring the changes of methyl mercaptan as an indicator of halitosis in human mouths in order to know the deodorizing activity on the added the amounts of apple extracts, their molecular fractions, substrate specificity, pH, reducing agents, oxygen and metal ions.

The deodorizing activity of apple extracts was increased with the amount of apple extracts. The deodorizing activity on adding polyphenol oxidase to the low molecular fraction of apple extracts was increased with the amount of the low molecular fraction of apple extracts and the reaction time of the extracts with polyphenol oxidase.

The deodorizing activity on substrate specificity of polyphenol

oxidase showed the high affinity of 81.3% with chlorogenic acid and 36.8% with catechol.

The deodorizing activity of polyphenol oxidase on pH changes against methyl mercaptan was 20% at below at pH 5.5 and 80% at above pH 5.5.

When the reducing agent was added to polyphenol oxidase the deodorizing effect of polyphenol oxidase against methyl mercaptan decreased. It was assumed that the reducing agent prevented the oxidation of chlorogenic acid.

The deodorizing activity of polyphenol oxidase against methyl mercaptan required oxygen. The deodorizing effect of polyphenol oxidase from apple against methyl mercaptan was 20% in an anaerobic state.

When Cu^{2+} or Fe^{3+} was added to polyphenol oxidase the deodorizing effect of polyphenol oxidase against methyl mercaptan increased. It was assumed that metal ions promoted the production of *o*-quinone.

The deodorizing activity of polyphenol oxidase is thought that *o*-quinone as an intermidiate produced by an oxidative reaction of polyphenol oxidase during enzymatic browning reactions may react with methyl mercaptan to form a kind of non-volatile and sulfur-containing compound.

서 론

우리들은 일상생활에서 자신의 담배 냄새, 마늘 냄새, 술 냄새로 고민하거나 혹은 타인에게서 발생되는 이러한 구취(口臭) 때문에 불쾌한 경험을 당한 적이 적지 않다. 이러한 구취는 식생활의 식생활의 다양화, 스트레스의 증대 혹은 구강내의 질환에 의해 점점 증가하는 경향으로서 우리들은 무의식중에 구취를 발생시켜 타인에게 불쾌감을 주고 있다는 사실을 인식할 필요가 있다.

음식 섭취나 기호품에 의한 구취는 오랜 기간 길들여진 식생활 때문에 발생하는 것으로 음식문화가 전혀 다른 이방인이면 쉽게 알 수 있다. 그러나 사람들은 자신의 구취는 느끼지 못하지만 다른 사람의 구취는 쉽게 느낄 수 있는데 이는 계속된 냄새에의 노출로 인한 후각의 적응 때문이다. 따라서 이러한 구취의 억제는 쉽지 않아 일상생활이나 위생적으로 경시할 수 없는 문제이다(Spouge, 1964).

구취는 일반적으로 생리적 구취와 병적 구취로 분류할 수 있다. 생리적 구취는 기상시, 공복시, 긴장시, 월경시의 구취와 마늘이나 담배, 술 냄새 등의 식사 및 기호품에 의한 구취로 나눌 수 있다. 병적 구취는 호흡기관, 소화기관, 대사이상분비 등의 질환이 원인이 되어 일어나는 전신성 구취와 구강내의 질환에 의해 발생하는 국소성 구취로 나눌 수 있다. 이 밖에도 구취가 없음에도 불구하고 자기자신이 심한 구취를 풍기고 있

다고 생각하는 가상적 구취도 있다. 이러한 병적 구취와 가상적 구취는 의료기관 등 전문기관의 치료로 맡기는 수밖에 없으며, 우리들은 일상생활에서 생리적 구취가 문제되는 경우가 많다(Uchida, 1974).

구취는 주로 구강 내의 혐기성 세균이 음식물 잔사나 침출액 등을 분해하여 발생한다. 그 성분은 황화합물, 저급지방산, 알코올, aldehyde 등 다양하지만, 이 중 구취의 강도와 관련이 있는 성분은 hydrogen sulfide, methyl mercaptan, dimethyl sulfide 등의 휘발성 황화합물로서 methyl mercaptan의 농도와 감각적으로 느끼는 구취 사이에는 비례적 상관관계가 있고 구취를 억제하기 위해서는 methyl mercaptan의 발생을 억제하는 것이 대단히 중요하다(Tonzetich et al., 1964; Tsunoda et al., 1975).

구취억제에 관한 연구를 보면, 녹차 추출물의 주성분인 epigallocatechin gallate(EGCg)는 구취억제 효과가 뛰어나 현재 캔디나 껌의 제조시에 사용되고 있다(Sato and Ishikawa, 1984; Suzuki and Uchida, 1984). EGCg의 methyl mercaptan에 대한 구취억제활성은 EGCg가 산화되어 생성되는 *o*-quinone이 methyl mercaptan의 thiol group과 반응하여 methyl mercaptan을 비휘발성으로 전환시키기 때문이다(Yasuda and Arakawa, 1995). 이 이외에 식물 flavonoid, 향신료 및 장미과 식물 등에 구취억제 효과가 있다고 보고되고 있다(Kaji, 1976; Tokita et al., 1984; Urabe et al., 1999; Miura, 1989; Yasuda and Ui, 1992). 또한 Lee et al.(1999, 2000, 2001)은 우리나라 연안산 해조류 28종(녹조류 7, 갈조류

12, 홍조류 9) 추출액의 methyl mercaptan에 대한 구취억제 효과를 검색한 결과 갈조류의 다시마목에 속하는 대황, 감태, 곰피와 모자반목의 톳이 90% 이상의 우수한 methyl mercaptan 억제효과를 나타내었다고 보고하였으며, 이중 구취억제활성이 높은 대황 추출물의 구취억제 활성에 미치는 영향인자, 대황 추출물을 함유한 구취억제용품의 구취억제효과 및 대황 추출물이 *Streptococcus mutans*의 증식과 glucosyltransferase 활성에 미치는 영향을 보고하였다.

한편 과실 및 채소류에 널리 분포되어 있는 polyphenol oxidase(E.C. 1. 10. 3. 1)는 polyphenol을 기질로 하여 갈변 중간체로 *o*-quninone을 생성하는 것으로 알려져 있으나 이들에 대한 구취억제 활성에 관한 연구는 전무한 실정이다.

그러므로 본 연구는 사과 추출물의 구취억제효과를 구명하기 위하여 사과에서 추출한 polyphenol oxidase의 구취억제활성에 대한 기질특이성, pH, 환원제, 산소, 금속염 및 EDTA 등을 검토하였다.

.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1. 1. 시료

실험에 사용한 사과, *Malus pumila*(홍로), 는 부산시 남구 대연동 소재의 시장에서 구입하여 4°C에 저장하면서 사용하였다.

1. 2. 완충액 제조

완충액 중 pH 3.0 5.0 완충액은 0.01M citrate-0.02M phosphate, pH 6.0 8.0 완충액은 0.01M Na_2HPO_4-NaH_2PO_4로써 각각 조제하여 사용하였다.

1. 3. 사용시약

구취억제효과측정에 사용한 methyl mercaptan은 Wako, 기질인 L-tyrosine, catechol, chlorogenic acid, L-3,4-dihydorxyphenylalanine (L-DOPA) 및 gallic acid는 sigma 시약을 사용하였다. 기타 실험에 사용된 시약은 실험용 특급시약을 사용하였다.

1. 4. 사과 추출물의 제조

사과육 300 g을 착즙한 후 여액의 ethanol 최종농도가 80% 되게하여 4℃에서 2시간 방치하였다. 이것을 4℃ 3000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액인 저분자 획분과 침전물인 고분자 획분을 분리한 후 각 획분을 동결건조하여 -80 ℃에 보관하

여 사용하였다.

1. 5. Methyl mercaptan 표준액 제조

Methyl mercaptan 표준액(1 μg/μℓ in benzene ; Wako Pure Chem., Osaka, Japan) 2 mℓ를 198 mℓ ethanol 용액에 용해시켜 4℃에 냉장 보관하였다. 그리고 구취억제활성 측정시 이 표준액을 증류수로 10배 희석(1 μg/mℓ)하여 사용하였다.

2. 실험방법

2. 1. Polyphenol oxidase의 추출

Polyphenol oxidase의 추출은 Flurkey et al.(1978)의 방법으로 하였다. 즉 사과육 200 g에 -23℃ acetone 300 mℓ을 첨가하여 2분간 균질화 시킨 후 Whatman #1여지를 사용하여 감압여과하였다. 그리고 잔사에 -23℃ acetone 150 mℓ를 첨가하여 재추출 후 Whatman #1여지를 사용하여 감압여과 하였다. 이 과정을 3번 반복 후 잔사를 동결건조하여 acetone powder를 제조하였다. 동결건조된 acetone powder 2 g에 1 M KCl이 함유된 0.05 M phosphate buffer(pH 6.5) 200 mℓ를 첨가하여 4℃에서 30분간 교반하였다. 이것을 4℃ 10,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액을 glass wool를 사용하여 여과하였다. 이 여액을 polyphenol oxidase로 하여 본 실험에 사용하였다.

2. 2. Polyphenol oxdiase의 활성측정

Polyphenol oxidase의 활성측정은 Zenin et al.(1978)의 방법에 의했다. 즉 효소반응액은 10mM의 catechol을 함유하는 0.01M sodium phosphate buffer(pH6.5) 2.9ml를 cell에 넣고 water bath에서 30℃로 안정화시킨 후, 효소액 0.1ml를 가하여 반응시키고, 420nm에서 흡광도를 측정(Shimazu, UV-160A)하였으며, 1분간에 효소 1ml당 흡광도 0.01의 증가를 1unit로 하였다.

2. 3. 갈변도의 측정

사과 추출물의 분획에 사과에서 추출한 polyphenol oxidase을 첨가하여 37℃에소 6분간 incubate한 후 420nm에서 흡광도를 측정하여 갈변도를 측정하였다.

2. 4. 구취억제활성 측정

구취억제활성 측정은 Tokita et al.(1984)의 방법인 Fig. 1과 같이 분석하였다. 즉, 시료 일정량과 0.2M potassium phosphate buffer(PPB) 1㎖를 내용량 30㎖의 vial에 넣고 pH를 7.5로 조절하였다. 여기에 methyl mercaptan 표준액(1㎍/㎖) 1㎖를 가하여 즉시 실리콘 캡으로 밀봉하여 vortex mixer로 5초간 교반하고 37℃에서 6분간 incubate한 후 vial의 headspace에 유리된 methyl mercaptan을 FPD(flame photometric detector)가 장착된 gas chromatography(GC)로서 분석하였으며, 구취억제활성은 아래의 식에 의하여 계산하였다.

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

C : control의 methyl mercaptan 피크 면적
S : 시료 첨가시의 methyl mercaptan 피크면적

2. 5. Gas chromatography(GC)

Methyl mercaptan의 분석을 위해 FPD(flame photometric detector)가 장착된 GC(Hewlett Packard 5890, series Ⅱ ; Column, HP-1 phase(5m×0.53mm×2.65㎛) ; Column temperature, 35℃ ; Injector temperature, 150℃ ; Detector temperature, 200℃ ; Carrier Gas(He) flow rate, 40㎖/min)을 사용하였다(Table 1).

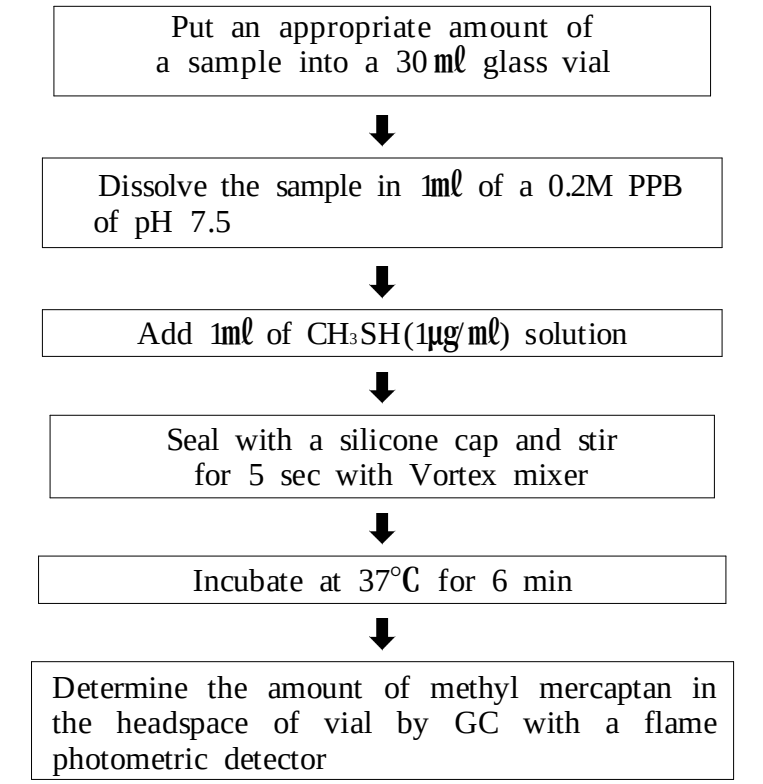

Fig. 1. Flow chart for the deodorizing assay.

Table 1. Operating condition of gas chromatography for measuring deodorizing activities

Gas chromatograph	He wlett Packard 5890, series II
Column	HP-1(methyl silicone gum)phase, 5m×0.53mm×2.65㎛
Column temperature	35℃
Injector temperature	150℃
Detector temperature	200℃
Detector	Flame photometric detector(FPD)
Carrier gas	He : 40 ㎖/min

결과 및 고찰

1. 사과 추출물의 구취억제 활성

사과를 착즙하여 구취억제용 표준시액인 methyl mercaptan에 대한 억제활성을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 사과 추출물의 농도가 증가함에 따라 구취억제활성은 증가하는 경향을 나타내었으며, 10 mg/㎖ 첨가의 경우 73.5%의 구취억제활성을 나타내었다. Lee et al.(1999)은 시판 상업용 구강세정액에서 구취억제 및 항균 유효성분인 sodium fluoride, cetylpyridinium chloride, benxethonium 등이 methyl mercaptan에 대한 구취억제 활성이 5 mg/㎖의 농도에서 50%이하로 보고하였다.

2. Polyphenol oxidase의 활성에 미치는 pH와 온도의 영향

반응액의 pH와 온도 변화에 따른 polyphenol oxidase 활성을 조사한 결과를 Fig. 3과 4에 나타내었다.

pH 3.0에서는 상대활성이 약 0.74% 정도였으며 pH 가 증가함에 따라 활성이 증가하여 pH 6.5에서 가장 높은 활성을 나타내었고 그 이상의 pH에서는 활성이 감소화였다.

Chung et al.(1983, 1984)은 홍옥과 국광의 polyphenol oxidase의 최적 pH가 각각 6.5, 6.0이라 하였고, Choi et al.(1987)은 후지사과의 최적 pH가 5.5로 보고하였다. 또 Rivas and Whitaker(1973), Luh and

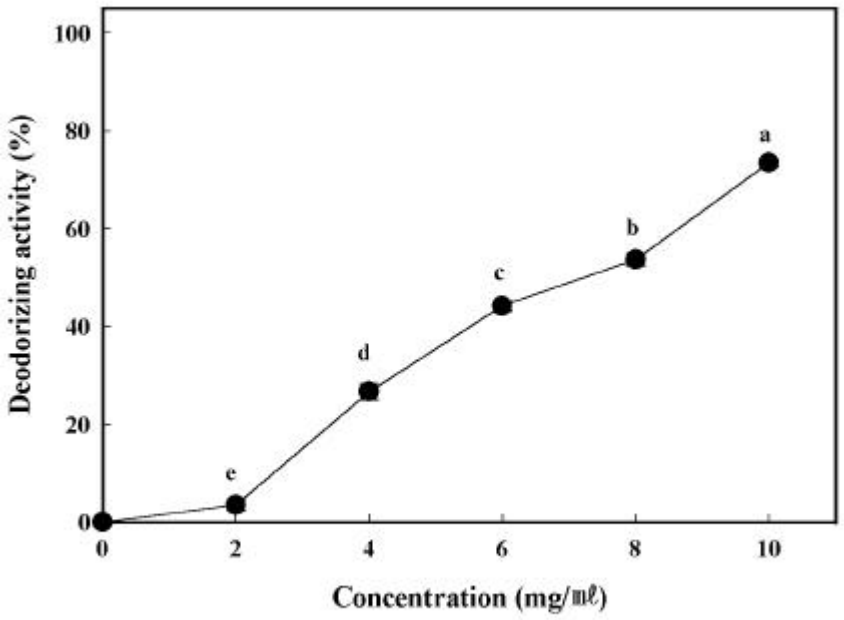

Fig. 2. Effect of the concentration of apple extracts on the deodorizing activity.

Values are means of three replicates and those with different letters are significantly different at $p<0.05$.

Phithapol(1972) 그리고 Park et al.(1980)은 배, 복숭아, Mango 등의 최적 pH가 각각 6.2, 6.2, 5.6 6.0이라고 보고하였다. 이상의 보고들과 본 실험의 결과가 상이한 것은 과실의 종류와 품종의 차이에서 오는 경향이라 생각된다.

그리고 반응온도가 10℃에서는 25% 정도의 활성을 나타내었으며 온도가 상승함에 따라 급격히 활성이 증가되어 30℃에서 가장 높은 활성을 나타내었고 30℃ 이상에서는 크게 활성이 감소되어 60℃에서는 20% 정도의 활성을 나타내었다.

Wissemann and Lee(1981)는 포도 polyphenol oxidase의 최적온도를 25℃라고 하였으며, Ha and Lee(1988)는 감자 polyphenol oxidase의 최적온도를 37℃로 보고하였다. 이상의 보고들과 본 실험의 결과를 비교해 볼 때, 사과 polyphenol oxidase의 최적온도는 포도보다 조금 높고 감자보다는 조금 낮았다.

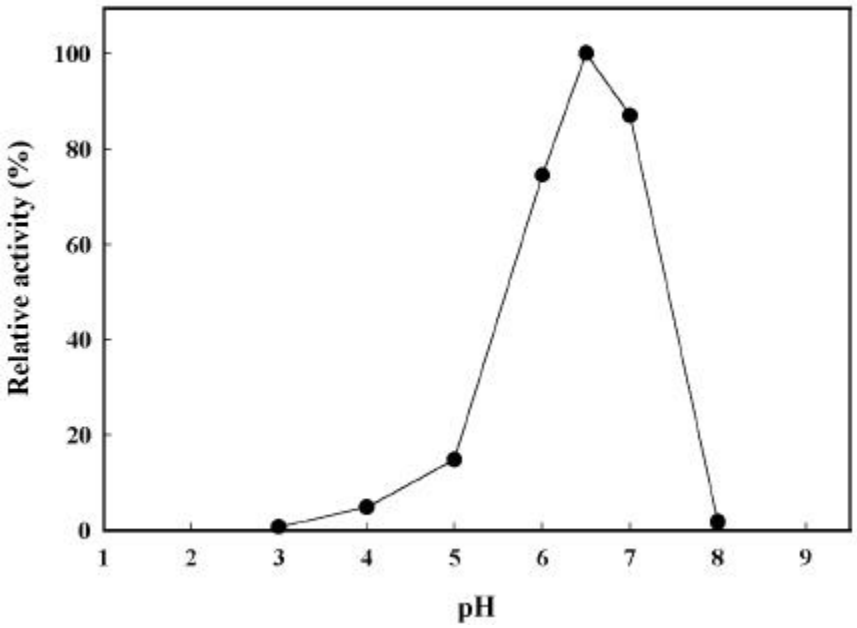

Fig. 3. Effect of pH on the activity of polyphenol oxidase from apples.

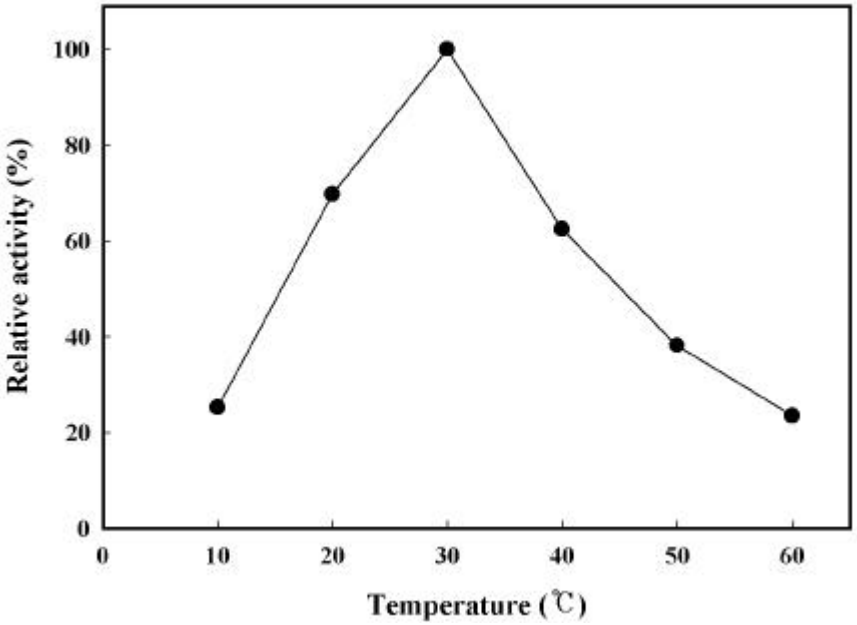

Fig. 4. Effect of temperature on the activity of polyphenol oxidase from apples.

3. 사과 추출물의 분획별 구취억제효과에 대한 polyphenol oxidase의 영향

사과 추출물의 구취억제인자를 구명하기 위하여 사과 추출물을 저분자획분(상층액)과 고분자획분(잔사)으로 나누어서, 여기에 사과로부터 추출한 polyphenol oxidase를 첨가하여 구취억제 효과와 갈변도를 Fig. 5와 Fig. 6에 각각 나타내었다.

Polyphenol oxidase를 첨가한 저분자획분은 대조군과 비교하여 농도를 증가함에 따라 구취억제활성이 증가하는 경향을 나타내었지만, 고분자획분의 경우는 농도를 증가 시켜도 구취억제활성은 변화가 거의 없었다($P<0.05$). 이상의 결과는 저분자획분에 polyphenol oxidase의 기질로 이용되는 phenol화합물이 존재하지만 고분자획분에는 이러한 phenol화합물이 존재하지 않기 때문이라 생각된다. 사과에 존재하는 phenol화합물에는 chlorogenic aicd, catechin, procyanidin B_2, procyanidin C_1, phloridzin, *l*-epicatechin, phloretin xylogucoside 등이 있다고 보고되었다(Wieslaw et al., 1988). 갈변도의 경우 대조군과 polyphenol oxidase 첨가군의 유의적인 차이는 없었다($P<0.05$). Phenol화합물이 존재하는 저분자 획분에 polyphenol oxidase을 첨가시 갈변이 진행되지 않은 것은 methyl mercaptan의 thiol기가 갈변을 억제시킨 것으로 생각된다. 김(2001)은 cysteine, glutathione같은 SH화합물들은 기질과 복합체을 형성하여 효소적 갈변반응을 저해한다고 하였다. 사과 추출물의 구취억제효과는 사과의 polyphenol oxidase와 상층액으로부터 얻어지는 저분자획분인

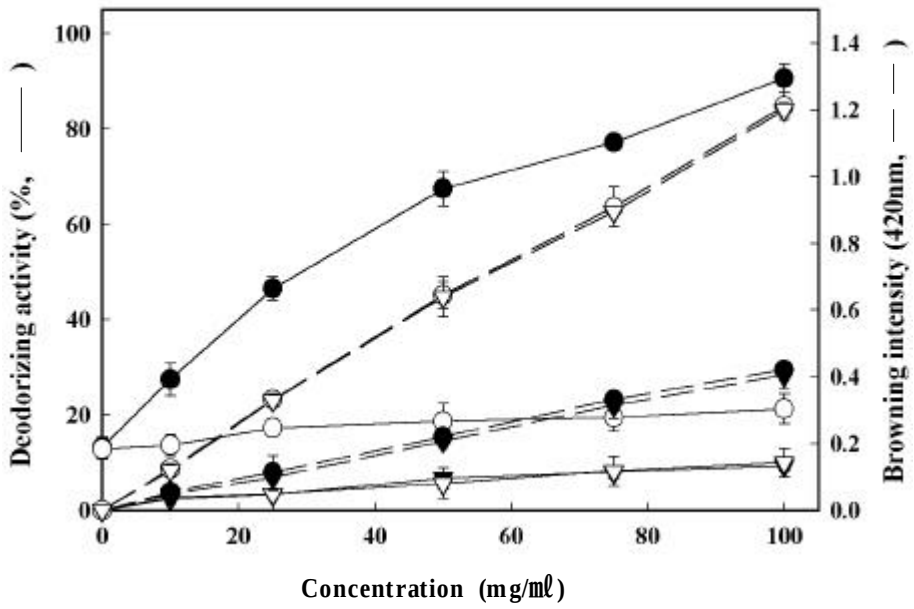

Fig. 5. Deodorizing activity and browning intensity of the added polyphenol oxidase on the concentration of supernatants and residues by 80% ethanol treatment of apple extracts.

● ; polyphenol oxidase-added supernatants
○ ; polyphenol oxidase-added residues
▼ ; supernatants without adding polyphenol oxidase
▽ ; residues without adding polyphenol oxidase

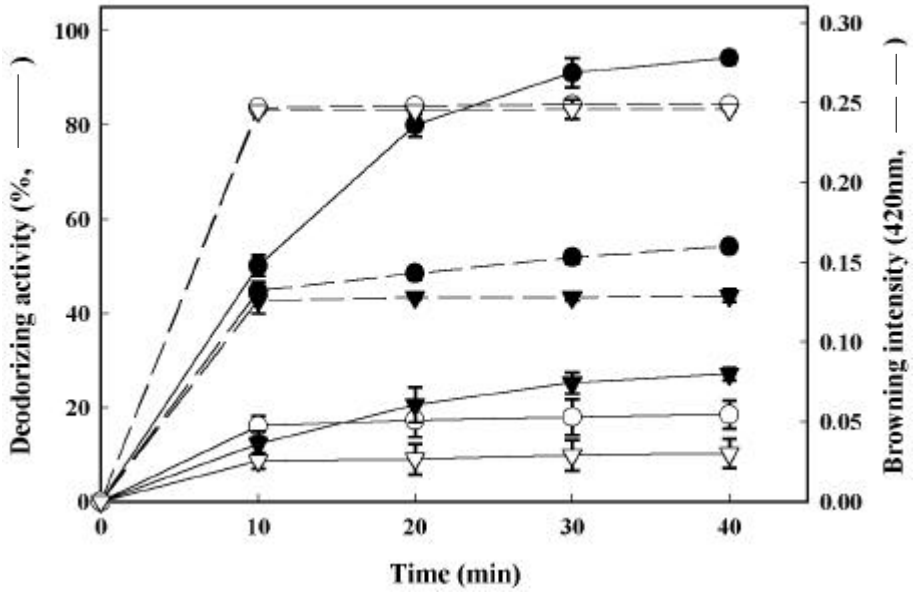

Fig. 6. Effect of reaction time of polyphenol oxidase on deodorizing activity and browning intensity in supernatants and residues by 80% ethanol treatment of apple extracts.

● ; polyphenol oxidase-added supernatants
○ ; polyphenol oxidase-added residues
▼ ; supernatants without adding polyphenol oxidase
▽ ; residues without adding polyphenol oxidase

phenol화합물과 반응하여 구취억제효과를 나타내는 것으로 추측된다.

그리고, 저분자획분에 polyphenol oxidase을 첨가한 경우 반응시간에 따른 구취억제활성이 증가하는 경향을 나타내었지만 고분자획분은 구취억제활성은 변화가 없었다($P<0.05$). 갈변도의 경우 대조군과 polyphenol oxidase 첨가군의 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다($p<0.05$).

이상의 결과를 통해 사과의 구취억제효과는 사과에서 추출한 polyphenol oxidase의 갈변반응시 중간체로 생성되는 *o*-quinone이 methyl mercaptan과 결합하여 methyl mercaptan을 비휘발성으로 전환시키는 것으로 추측된다. Yasuda et al.(1995)은 EGCg의 methyl mercaptan에 대한 구취억제기작이 EGCg가 산화되어 생성되는 *o*-quinone이 methyl mercaptan의 thiol group과 반응하여 methyl mercaptan을 비휘발성으로 전환시키는 것이라고 보고하였다.

4. Polyphenol oxidase의 기질특이성이 구취억제활성에 미치는 영향

사과 polyphenol oxidase의 기질 특이성이 methyl mercaptan에 대한 구취억제효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 monophenol인 L-tyrosine, *o*-diphenol인 catechol, chlorogenic acid, L-DOPA 및 trihydroxyphenol인 gallic acid을 사용하여 기질의 특이성 및 구취억제효과 측정하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다.

Polyphenol oxidase의 활성 경우는 chlorogenic acid와 catechol에서 높게 나타났었으므로 *o*-diphenol이 주 기질인 것으로 생각되며, 이는 국광 polyphenol oxidase의 결과와 일치하였다 (Jung et al., 1983). 또한 *o*-diphenol 중에서는 chlorogenic acid에서 가장 높은 활성을 나타내 사과 polyphenol oxidase의 갈변반응의 주요 기질을 chlorogenic acid라고 한 Walker et al.(1965)의 견해와 일치하였고, Jung et al.의 홍옥(1984)과 국광(1983)에서 조사한 결과와도 일치하였다. 이외에도 사과 polyphenol oxidase의 기질로서 esculetin과 dihydorquercetin 그리고 *l*-epicatechin 등이 보고되었다(Shsmsnnon and Pratt, 1967).

구취억제효과의 경우는 polyphenol oxdiase의 활성과 비례하는 경향을 나타내었으며, 그 중에서도 chlorogenic acid와 catechol이 각각 81.3%와 36.8%의 구취억제효과를 나타내었다.

Table 2. Effect of polyphenol compounds on the deodorizing activity of polyphenol oxidase(PPO) from apples

	Substrate (10mM)	Activity (unit)	Relative activity (%)	Deodorizng activity (%)
Without PPO	L-tyrosine	0	-	0
	Chlorogenic acid	0	-	2.5
	Catechol	0	-	6.8
	L-DOPA[a]	0	-	0
	Gallic acid	0	-	0
With PPO	L-tyrosine	0	0	0
	Chlorogenic acid	78.0	205.3	81.3
	Catechol	38.0	100.0	36.8
	L-DOPA	6.7	17.6	13.9
	Gallic acid	1.3	3.4	13.6

[a]L-DOPA means L-3,4-dihydroxyphenylalanine.

5. 구취억제활성에 미치는 영향인자

5. 1. pH

구취억제활성 시험의 반응계 내의 pH가 구취억제활성에 영향을 미치리라 생각되어 사과에서 추출한 polyphenol oxidase와 10mM chlorogenic acid을 이용하여 pH가 구취억제효과에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 7에 나타내었다.

사과 polyphenol oxidase의 methyl mercaptan에 대한 구취억제효과는 pH가 산성으로 갈수록 감소하고 중성과 알칼리 영역에서는 비슷한 경향을 보여 pH 7.5의 경우 86.5%, pH 5.5의 경우 14.7%의 구취억제효과를 나타내어 구취가 중성과 알칼리성에서 생기며 산성에서 방해를 받는다는 일반적인 사실과도 일치하였다. Yasuda and Arakawa(1995)는 녹차 catechin류의 구취억제효과 연구에서 반응계가 pH 5.0 이하에서는 완전히 억제된다고 하였다. 또한 Lee et al.(2000)은 대황 추출물의 구취억제효과는 pH가 알칼리성 측으로 갈수록 높아지고 산성 측으로 갈수록 감소하는 경향은 보여 본 결과와 비슷한 경향을 나타내었으며, Mcnamara et al.(1972)은 타액에 포도당을 첨가한 시험구와 첨가하지 시험구를 37℃에서 24시간 배양한 결과, 포도당을 첨가했을 때에는 급격하게 산성화 되면서 구취는 발생하지 않았으나, 포도당을 첨가하지 않았을 경우에는 pH가 서서히 증가하고 심한 구취가 발생하였다는 결과와도 잘 부합되었다.

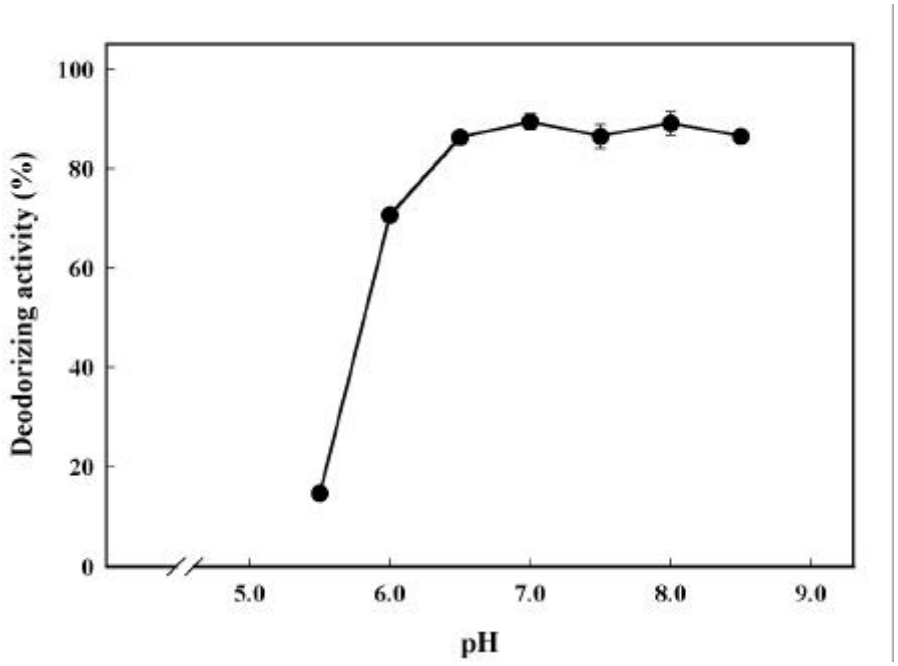

Fig. 7. Effect of pH on the deodorizng activity of polyphenol oxidase from apples against methyl mercaptan.

5. 2. 환원제

사과에서 추출한 polyphenol oxidase의 구취억제활성에 효소적 갈변억제제로 알려진 ascobic acid와 sodium hydrosulfite같은 환원제가 미치는 영향을 조사하여 Fig. 8에 나타내었다.

Ascorbic acid와 sodium hydrosulfile는 첨가량의 증가에 따라 구취억제활성이 급격히 감소하였다. Yasuda and Onogi(1996)은 EGCg에 ascorbic acid 첨가하여 구취억제효과를 조사한 결과 구취억제효과가 거의 나타나지 않았다고 보고와도 일치하였으며, Lee et al.(2000)이 대황추출물에서 조사한 결과와도 부합하였다. Mcevily et al.(1992)은 *o*-diphenols는 polyphenol oxidase, O_2에 의해 산화되어 *o*-quinones으로 되며 이러한 작용은 ascorbic acid와 sulfites 같은 환원제에 의하여 저해된다고 하였다.

Fig. 9는 ascorbic acid 첨가가 polyphenol oxidase의 methyl mercaptan 억제작용에 미치는 영향을 시간별로 살펴 본 결과이다. 사과에서 추출한 polyphenol oxidase 20㎕, 10mM chlorogenic acid 20㎕, 0.2M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 1㎖ 및 methyl mercatan 표준액(0.01㎍/㎖) 1㎖를 내용량 30㎖ vial에 넣고 ascorbic acid 첨가구엔 ascorbic acid(50㎍/㎖) 1㎖를 첨가하고 비첨가구에는 증류수 1㎖를 첨가하여 실리콘 캡으로 밀봉하고 37℃에서 배양하면서 6, 10, 15, 20분 간격으로 headspace gas 100㎕를 sampling하여 GC로써 분석하였다.

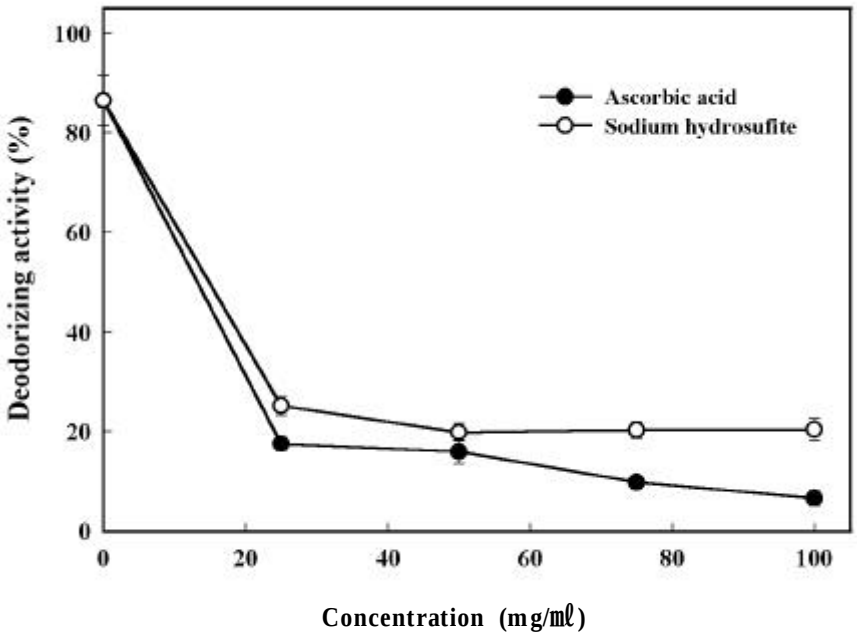

Fig. 8. Effect of reducing agents on the deodorizing activity of polyphenol oxidase from apples against methyl mercaptan.

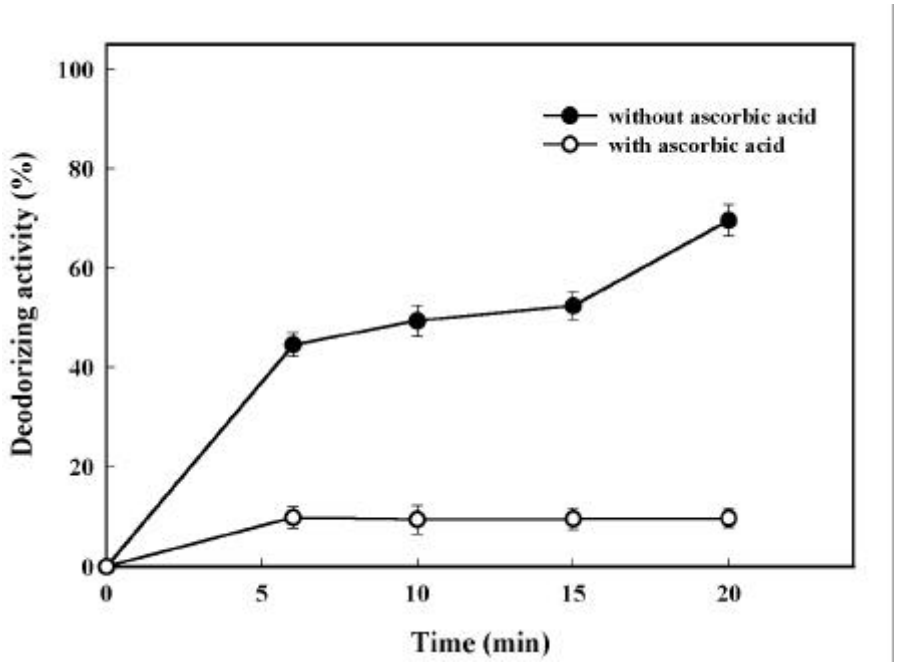

Fig. 9. Effect of ascorbic acid on the deodorizing activity of polyphenol oxidase from apples against methyl mercaptan.

Ascorbic acid를 첨가하지 않은 시험구에는 반응시간 내내 계속적인 methyl mercaptan의 감소가 관찰되었으나 ascorbic acid를 첨가한 시험구의 methyl mercaptan 농도는 항상 일정한 수준으로 유지되었다.

이상의 결과를 종합하면 ascorbic acid의 첨가는 polyphenol oxidase의 methyl mercaptan 억제효과를 감소시켰으며, 이러한 작용은 강력한 환원제인 ascorbic acid가 methyl mercaptan에 대한 구취억제 작용의 필수단계인 *o*-quinone 형성을 방해하기 때문인 것으로 판단된다.

5. 3. 산소

사과에서 추출한 polyphenol oxdiase의 methyl mercaptan에 대한 구취억제 작용에 미치는 대기 산소의 영향을 검토하여 그 결과를 Fig. 10에 나타내었다.

산소(O_2)가 존재하는 정상 조건에서는 시간의 경과에 따라 구취억제효과는 증가하였으나 공기를 helium gas로 치환한 혐기적 조건하에서는 시간의 경과에 따른 구취억제효과는 변화가 거의 없었다. Mcevily et al.(1992)은 *o*-diphenols는 polyphenol oxidase, O_2에 의해 산화되어 *o*-quinones으로 되며 이러한 작용은 ascorbic acid와 sulfites 같은 환원제에 의하여 저해된다고 하였다. 따라서 본 실험의 결과는 helium gas로 치환한 혐기적 조건에서는 구취억제 작용의 필수 단계인 *o*-diphenols의 산화가 일어나지 않았기 때문이라고 생각된다.

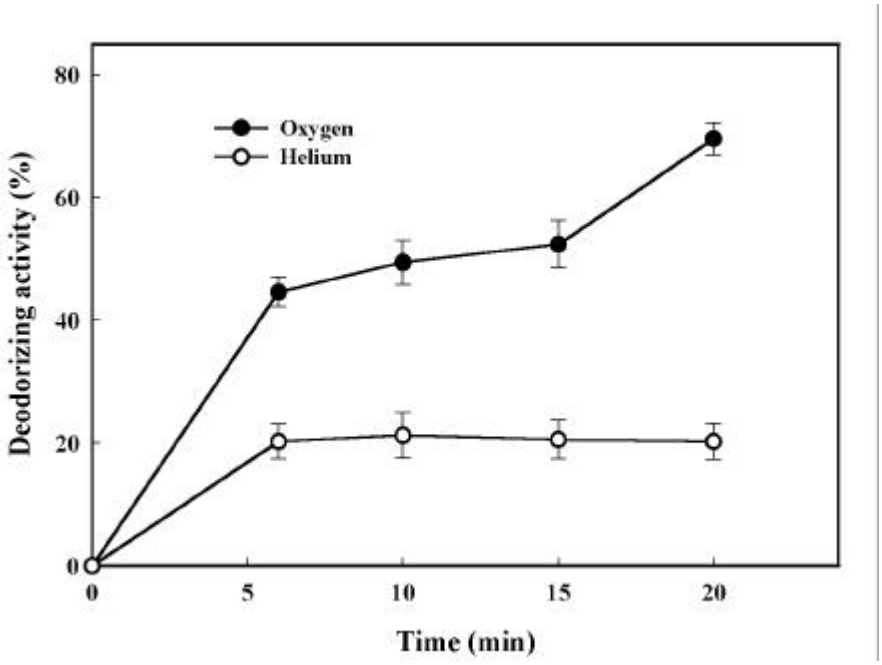

Fig. 10. Effect of oxygen on the deodorizing activity of polyphnol oxidase from apples against methyl mercaptan.

5. 4. 금속염

사과에서 추출한 polyphenol oxidase의 methyl mercaptan에 대한 구취억제 작용에 미치는 금속염의 영향을 검토하기 위하여 금속염의 농도를 각각 10^{-1} M의 농도로 처리한 결과를 Table 3에 나타내었다.

Polyphnol oxidase의 활성의 경우 활성을 가지지 않는 기질인 L-tyrosine은 금속염을 첨가하여도 활성을 나타내지 않았으며, L-DOPA와 gallic acid는 약간의 증가 또는 비슷한 활성을 나타내었다. 이에 반에 활성이 높은 기질인 chlorogenic acid와 catechol의 경우는 Cu^{2+}, Fe^{3+}에 의하여 활성이 증가했지만, Ca^{2+}, Mg^{2+}에 의해서는 영향이 없었다. Kim et al.(1983)은 국광 polyphenol oxidase의 경우 10^{-1} mM의 금속염을 첨가한 결과, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}에 의하여 활성이 증가하였으며 Na^{+}, Hg^{2+}, Co^{2+}에 의하여서는 저해작용을 나타내었다고 보고하였다. 또 Kim et al.(1981)의 polyphenol oxidase에서 Cu^{2+}의 농도에 따른 polyphenol oxidase의 활성변화를 측정해 본 결과 저농도(10^{-2} 1.0 mM)의 Cu^{2+}는 활성이 증가하였으나, 고농도(10mM)에서는 활성이 감소한다고 하였다. 본 실험에서의 Cu^{2+}에 의한 활성증가현상은 Cu^{2+}가 polyphenol oxidase의 cofactor로서 작용하기 때문이라고 생각된다.

구취억제활성의 경우는 polyphenol oxidase의 활성과 비례하는 경향을 나타내었다. 활성이 가장 높은 기질인 chlorogenic acid에 Cu^{2+}와 Fe^{2+}을 첨가한 경우 각각 93.5, 88.7%의

Table 3. Effect of metals and polyphenols on the deodorizing activity of polyphenol oxidase from apples against methyl mercaptan

Substrate	Metal Salt (10^{-1}M)	Activity (unit)	RA[a] (%)	DA[b] (%)
L-tyrosine	None	0	0	0
	$CuCl_2$	0	0	0
	$FeCl_3$	0	0	0
	$CaCl_2$	0	0	0
	$MgCl_2$	0	0	0
Chlorogenic acid	None	76.0	190.0	82.5
	$CuCl_2$	107.9	269.8	93.5
	$FeCl_3$	91.2	225.5	88.7
	$CaCl_2$	76.0	100.0	81.5
	$MgCl_2$	85.1	212.8	83.7
Catechol	None	40.0	100.0	34.7
	$CuCl_2$	55.2	138.0	48.5
	$FeCl_3$	48.4	121.0	40.4
	$CaCl_2$	39.2	98.0	34.5
	$MgCl_2$	42.0	105.0	36.5
L-DOPA[c]	None	6.4	16.0	12.6
	$CuCl_2$	7.0	17.5	14.7
	$FeCl_3$	6.9	17.3	13.5
	$CaCl_2$	6.3	15.8	11.9
	$MgCl_2$	6.6	16.5	12.8
Gallic acid	None	1.5	3.8	11.9
	$CuCl_2$	1.7	4.3	12.8
	$FeCl_3$	1.6	4.0	12.6
	$CaCl_2$	1.5	3.8	11.7
	$MgCl_2$	1.5	3.8	11.3

[a]RA means relative activity,
[b]DA means deodorizing activity,
[c]L-DOPA means L-3,4-dihydroxyphenylalanine.

구취억제효과를 나타내어 대조구인 비첨가구보다 높은 구취억제효과를 나타내었다. 이러한 결과는 Cu^{2+}와 Fe^{3+}이 polyphenol oxidase의 cofactor로서 작용하여 *o*-quinone형성을 촉진하기 때문으로 생각된다.

5. 5. Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)

사과에서 추출한 polyphenol oxidase의 methyl mercaptan에 대한 구취억제 작용에 미치는 EDTA의 영향을 검토하기 위하여 25mM EDTA을 첨가하여 그 결과를 Table 4에 나타내었다.

EDTA을 첨가한 경우, polyphenol oxidase의 활성 및 구취억제효과는 EDTA을 첨가하지 않은 대조구에 비해 기질의 종류에 관계없이 감소하였다. 김 등(1984)은 매실 polyphenol oxidase에 100 mM EDTA 첨가시 저해효과가 62%로 보고하였다. 이러한 결과는 금속chelator인 EDTA가 polyphenol oxidase의 prosthetic group인 Cu와 결합하여 *o*-quinone 형성을 저해하기 때문으로 생각된다.

Table 4. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) on the deodorizing activity of polyphenol oxidase from apples against methyl mercaptan

	Substrate (10mM)	Activity (unit)	RA[a] (%)	DA[b] (%)
Without EDTA	L-tyrosine	0	0	0
	Chlorogenic acid	75.0	208.3	82.5
	Catechol	36.0	100.0	36.1
	L-DOPA[c]	6.5	18.1	13.5
	Gallic acid	1.4	3.9	13.1
With EDTA	L-tyrosine	0	0	0
	Chlorogenic acid	65.5	181.9	74.2
	Catechol	30.0	83.3	28.5
	L-DOPA	4.7	13.1	10.5
	Gallic acid	0	0	0

[a]RA means relative activity,
[b]DA means deodorizing activity,
[c]L-DOPA means L-3,4-dihydroxyphenylalanine.

요 약

본 연구는 사과 추출물의 구취억제효과를 구명하기 위하여 사과에서 추출한 polyphenol oxidase의 구취억제활성에 대한 기질 특이성, pH, 환원제, 산소, 금속염 및 EDTA 등을 검토하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 사과를 착즙하여 구취억제용 표준시액인 methyl mercaptan에 대한 구취억제활성을 측정한 결과, 농도가 증가함에 따라 구취억제활성은 증가하는 경향을 나타내었으며 10mg/ml 경우 72.5%의 구취억제활성을 나타내었다.

2. Catechol을 기질로 사용하여 polyphnol oxidase의 최적 pH와 온도를 측정한 결과, polyphenol oxidase의 최적 pH는 6.5, 최적 온도는 30℃로 나타났다.

3. 사과 추출물의 분획에 사과에서 추출한 polyphenol oxidase를 첨가하여 구취억제효과를 측정한 결과, 저분자 획분의 농도증가 및 반응시간에 따른 methyl mercaptan에 대한 구취억제활성은 증가하는 경향을 나타내었다.

4. 사과에서 추출한 polyphenol oxidase의 기질특이성에 따른 구취억제효과는 polyphenol oxidase의 활성과 비례하는 경향을 나타내었으며, 그 중에서도 chlorogenic acid와 catechol이 각각 81.3%와 36.8%의 구취억제효과를 나타내었다.

5. 사과에서 추출한 polyphenol oxidase의 구취억제효과에 대한 pH 의존성은 pH 5.5에서는 20%이하였으나, 중성 및 알카리 영역에서는 80%이상의 구취억제효과를 나타내었다.

6. 사과에서 추출한 polyphenol oxidase에 환원제인 ascorbic acid와 sodium hydrosufile를 첨가한 경우 구취억제효과는 급격히 감소하여 30%이하를 나타내었다.

7. 사과의 효소적 갈변 중의 구취억제 작용에는 공기 중의 산소가 필수적으로 요구되었으며, 혐기적 조건하에서는 20% 정도의 구취억제효과를 나타내었다.

8. 사과에서 추출한 polyphenol oxidase에 Cu^{2+}와 Fe^{3+}을 첨가한 경우 구취억제효과는 증가하는 경향을 나타내었으나, Ca^{2+}와 Mg^{2+}을 첨가시에는 구취억제효과는 변화가 거의 없었다.

9. **사과에서 추출한** polyphenol oxidase**에 금속 킬레이트제인** EDTA**를 첨가한 경우 구취억제효과는 감소하는 경향을 나타내었다**.

참고 문헌

Chung, K.T., S.K. Seo and H.I. Song. 1983. Enzymatic characteristics of polyphenol oxidase from apple(Ralls Janet). *Korean J. Food & Nutrition*, 12(4), 316 322.

Chung, K.T., S.K. Seo and H.I. Song. 1984. Some properties of polyphenol oxidase from apple(jonathan) and thermal stability of the active bands. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 13(4), 397 402.

Flurkey, W.H. and J.J. Jen. 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *J. Food Sci.*, 43, 1826 1828.

Ha, Y.D. and M.O. Lee. 1988. Some properties of the polyphenol oxidase from potatoes (*Solanum tubersum* L.) and inhibiting effect of the polyphenol oxidase by sulfites. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 17(3), 198 204.

Kaji, T. 1976. Analysis of volatile sulphur compounds in mouth air by gas chromatography. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*, 18, 1 12.

Kim, D.Y., C.O. Rhee and Y.B. Kim. 1981. Characteristics of polyphenol oxidase from Garlic(*Allium sativum* L.). *J. Korean Agricultural Chemical*, 24(3), 167 173.

Lee, D.S., S.B Kim, T.J. Kim, J.H. Kim, C.I. Ji and J.H. Park. 1999. Deodorant effect of marine algae extracts on halitosis.

Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korea, 57, 195 201.

Lee, D.S., S.B. Kim, T.J. Kim, J.G. Min, J.H. Kim and J.H. Park. 2000. Efficacy of deodorant products containing *Eisenia bicyclis* extracts on halitosis. *Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korea*, 58, 168 174.

Lee, D.S., S.B. Kim, T.J. Kim, J.G. Min, J.H. Kim and J.H. Park. 2000. Factors of why *Eisenia bicyclis* extracts counteract halitosis. *Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korea*, 58, 163 167.

Lee, D.S., T.J. Kim, J.H. Kim, S.B. Kim, S.W. Cho, C.W. Lim and J.G. Min. 2001. Effect of *Eisenia bicyclis* extracts on the growth and glucosyltansferase activity of *Streptococcus mutans*. *Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korea*, 59, 171 176.

Luh, B.S. and B. Phithapol. 1972. Characteristics of polyphnol oxidase related to browning in cling peaches. *J. Food Sci.*, 37, 264 268.

Mcevily, A.Z., R. Iyengar, and W.S. Otwell. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 253 273.

Mcnamara, T.F., J.F. Alexander and M. Lee. 1972. The role of microorganisms in the production of oral malodor. *Oral Surg.*, 34, 41 48.

Miura, K., T. Inagaki and N. Nakatani. 1989. Structure and activity of new deodorant biphenyl compounds from Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 1816 1819.

Park, Y.K., H.H. Sato, D. Almeida and R.H. Moretti. 1980. Polyphenol oxidase of mango. *J. Food Sci.*, 45, 1619 1621.

Rivas, N.D.J. and J.R. Whitaker. 1973. Purification and some properties of polyphenol oxidase. *Plant Physiol.*, 52, 501 503.

Sato, Y., M. Terazawa and M. Ishikawa. 1984. Deodorant gums containing green tea flavonoids. *Shokuhinkogyo*, 27, 42 48.

Spouge, J.D. 1964. Halitosis; a review of its causes and treatment. *Dent. Prac. Dent. Rec.*, 14:307 317.

Suzuki, S., M. Moroe and Y. Uchida. 1983. Green tea flavonoids. *Shokuhinkogyo*, 26, 57 65.

Tokita, F., M. Ishikawa, K. Shibuya, M. Koshimizu and R. Abe. 1984. Deodorizing activity of some plant extracts against methyl mercaptan. *Nippon Nŏgeikagaku Kaishi*, 58, 585 589.

Tokita, F., M. Ishikawa, K. Shibuya, M. Koshimizu and R. Abe. 1984. Deodorizing activity of some plant extracts against methyl mercaptan. *Nippon Nôgeikagaku Kaishi*, 58(6), 585 589.

Tonzetich, J. and V.J. Richter. 1964. Evaluation of volatile odoriferous components of saliva. *Archs. Oral Biol.*, 9, 39 45.

Tsunoda, M. 1975. Analysis of fetor ex ore by gas chromatography. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*, 17, 1 13.

Uchida, Y. 1974. Case of self halitosis. *Quintessence Int*., 7: 101 109.

Urabe, K., T. Nadamoto, M. Kawamura and K. Yasumoto. 1999. Deodorization activity of wild grasses against methyl mercaptan. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 46, 484 486.

Walker, J.R.L. and A.C. Hulme. 1965. The inhibition of the phenolase from apple peel by polyvinylpyrrolidone. *Phytochemistry*, 4, 677 685.

Wieslaw, O., C.Y. Lee, A.W. Jaworski and K.R. Price. 1988. Identification of some phenolic compounds in apple. *J. Agric. Food Chem.*, 236, 430 432.

Wissemann, K.W. and C.T. Lee. 1981. Characterization of polyphenol oxidase from ravat 51 and niagara grapes. *J. Food Sci.*, 43, 506 514.

Yasuda, H. and A. Onogi. 1996. Effects of ascorbic acid on the deodorizing activity of polyphenols against methanethiol. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(10), 1703 1704.

Yasuda, H. and M. Ui. 1992. Deodorant effect of plant extracts of the Family Rosaceae against methyl mercaptan. *Nippon Nŏgeikagaku Kaishi*, 66, 1475 1479.

Yasuda, H. and T. Arakawa. 1995. Deodorizing mechanism of (-)-epigallocatechin gallate against methyl mercaptan. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(7), 1232 1236.

Yasuda, H. and T. Arakawa. 1995. Deodorizing mechanism of (-)-epigallocatechin gallate against methyl mercaptan. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1232 1236.

김동훈. 2001. **식품화학**. **탐구당**, p. 436

김영희, **장채철**, **오석흥**. 1984. **매실중의** polyphenol oxidase**에 관한 연구**. polyphenol oxidase**의 분리와 정제 및 특성에 대하여**. **경북대학교 대학논문집**, 15, 73 83.