

工學碩士 學位論文

상추 (*Lactuca sativa* L.) 추출물의
Methyl Mercaptan 억제 활성

指導教授 全善奉

이 論文은 工學碩士 學位論文에 提出함



2005年 8월

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

徐 淨 恩

徐淨恩의 工學碩士學位論文을 認准함

2005年 8月

主審 農學博士 李 養 鳳



委員 農學博士 金 善 奉



委員 農學博士 安 東 賢



목 차

Abstract	1
서 론	3
재료 및 방법	6
1. 실험재료	6
1. 1. 시료	6
1. 2. 완충액 제조	6
1. 3. 사용시약	6
1. 4. Methyl mercaptan 표준용액 제조	6
2. 실험방법	7
2. 1. 구취억제 활성 측정	7
2. 2. Gas chromatography 분석 조건	7
2. 3. Total polyphenol함량 측정	8
2. 4. 용매에 따른 구취억제 소재의 추출	8
2. 5. 초임계 유체 추출물의 제조	8
2. 6. 온도, pH 및 시간에 따른 구취억제 활성의 영향	9
2. 7. 구취억제 소재의 가공처리 방법	9
2. 8. 조효소 추출	10
2. 9. 금속이온 및 환원제 혼합비에 따른 구취억제 활성의 영향	10
2. 10. 효소 및 페놀 획득에 따른 구취억제 활성의 영향	10
결과 및 고찰	11
1. 구취억제 소재의 적합성 판단	11
2. 구취억제 소재 제조의 조건별 구취억제 활성	14

2. 1. 부위별 구취억제 활성	14
2. 2. 추출 용매별 구취억제 활성	14
3. 구취억제 소재 제조시 미치는 영향인자 특성	17
3. 1. 온도	17
3. 2. pH	17
3. 3. 시간 및 가공처리 방법	20
4. 구취억제 소재의 구취억제 기작 구명	23
4. 1. 금속이온 및 환원제의 구취억제 활성 영향	23
4. 2. Phenol 및 효소의 영향	26
5. 시판 구강세정액과의 비교	29
요 약	32
참 고 문 헌	34
감사의 글	40

Deodorizing Activity against Methyl Mercaptan of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Extracts

Jung-Eun Seo

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

Abstract

This study was to investigate deodorizing activity of lettuce extracts with methyl mercaptan as a main component of halitosis among volatile sulfur compounds.

Water soluble of lettuce showed higher deodorizing activities than fiber of the lettuce. The deodorizing activities of lettuce extracts according to an extraction way showed 74.2% for water soluble, 34.0% for ethanol soluble, 47.5% for methanol soluble and 53.6% for supercritical fluid extracts. So deodorizing activity of water soluble was the highest.

Effects of iron and reducer about the deodorizing activity of lettuce extracts was studied. In result, FeCl_3 , CaCl_2 decreased deodorizing activity, CuCl_2 and FeCl_2 increased deodorizing activity. A case of a the reducer of

ascorbic acid decreased deodorizing activity with forming a complex and quinone. Effect of polyphenol oxidase (PPO) about the deodorizing activity was studied. There fore, PPO and phenollic compounds were relatel to deodorizing activity. Only PPO appeared than adding of phenol compound by participation in deodorizing activity.

서 론

Methyl mercaptan은 황을 포함하는 휘발성 황 화합물로 마늘, 표고버섯 같은 채소류에 존재하며 특히 무순에서는 무순의 특유 향을 낸다 (Chung et al., 1994; Chen et al., 1986; Song, 2001). 또한 가열한 쇠고기에서 분리된 methyl mercaptan은 육류 속 아미노산의 가열분해로 발생하여 다른 화합물과 함께 가열된 쇠고기의 향기에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Machiels et al., 2003). 해조류에서 효소작용에 의해 발생하는 methyl mercaptan (Lewin, 1962; Teruhisa, 1961; 天野秀臣, 1991)은 어패류에서는 *Pseudomonas* 속의 일부 세균에 의해 분해되어 이취를 발생하며 (Park et al., 1997), 맥주, 브랜디나 위스키 같은 알코올 음료에서는 극미량으로 나쁜 냄새를 유발하여 제품의 품질에 치명적인 영향을 미치는 (박, 1994; Nykanen et al., 1983) 등 식품에서 그 특유의 향기나 악취를 낸다.

인체에 존재하는 methyl mercaptan은 주로 구강에서 많이 발생하며, 이는 구강내 남은 음식물이나 타액, 혈액 등이 세균에 의해 부패가 되어 발생한다 (Kleinberg et al., 1992). 이 때 관여하는 세균은 대표적으로 혐기성 그람 음성 세균인 *Porphyromonas gingivalis*와 *Fusobacterium nucleatum*을 들 수 있다 (Yoshimura et al., 2000). 이 세균들은 L-methionine을 함유하는 아미노산을 분해하여 methyl mercaptan을 만들게 되는데 (Yoshimura et al., 2000; Chang, 2000) 그 농도는 하루 중에 아침이 가장 높다. 이는

밤 사이 타액이 정제하여 배양효과를 가져오기 때문인데 타액의 부패로 인한 methyl mercaptan의 농도는 24시간 이내에 100-1000 배 가량 증가하는 것으로 알려져 있다 (Tonzetich, 1971; Tonzetich, 1997). 또 hydrogen sulfide와 같은 다른 구취성분 보다 더 역하고 역치가 낮아 (Tonzetich, 1976) 구취억제에 관한 연구에서 지표물로 많이 이용되고 있다.

구취억제 효과가 잘 알려진 녹차는 내부의 (-)-epigallocatechin gallate의 영향으로 휘발성 methyl mercaptan을 비휘발성으로 변화시켜 구취를 억제하는 것으로 알려져 있으며 (Yasuda et al., 1995), 장미과 raspberry 앞에서는 ellagitannins를 위주하는 polyphenol이 methyl mercaptan을 억제하는 것으로 보고된 바 있다 (Yasuda et al., 1992). 그 외에도 또한 향신료 추출물에 대한 methyl mercaptan 감소효과가 보고된 바 있는데 (Tokita et al., 1984) 이러한 polyphenol 화합물은 산화작용시 갈변을 일으키게 되는데, 이 때 중간산물인 quinone이 methyl mercaptan의 thiol group과 반응하여 비휘발성 물질로 전환되면서 구취를 억제한다 (Cho et al., 2001).

구취억제에 관여하는 polyphenol 화합물은 식물에 널리 분포되어 있다. 식물 생리 현상에 중요한 효소로 엽록체 내의 틸라코이드 막에 두드러지게 존재하고 있으며 식물체가 손상을 받으면 PPO의 관여로 효소적 갈변을 일으킨다 (Chazarra et al., 1996). Cu를 함유하고 있는 PPO는 산소 존재시 기질의 특이성으로 인해 해당 phenol을 산화시켜 상응하는 quinone으로 변화시키는데, 계속적인 산화와 중합 또는 축합으로 갈변을 일으킨다 (Mayer, 1987; Zhou et al., 1991).

따라서 polyphenol 함량과 PPO의 활성이 높을수록 methyl mercaptan의 억제 효과가 효과적일 것으로 판단하여 본 연구에서는 polyphenol 함량이 높은 상추를 소재로하여 gas chromatography (GC)로써 methyl mercaptan의 억제 활성을 알아보았다. 그리고 소재 제조시 조건별 methyl mercaptan의 억제 활성, 영향인자 특성 및 기작 구명 세 단계로 분류하여 실험하였다. 소재 제조의 조건은 부위별, 추출 용매에 따라서 비교하였으며 또한 영향인자로 온도, pH, 시간 및 가공처리 방법을 선정하였다. 그리고 소재의 methyl mercaptan의 억제 기작을 구명하기 위해서 효소 및 phenol획분이 methyl mercaptan의 억제 활성에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1. 1. 소재

부산광역시에 위치한 메가마트 남천점에서 상추 (*Lactuca sativa* L.)를 구입하여 4℃에서 저장하면서 사용하였다.

1. 2. 완충액 제조

사용된 완충액은 0.2 M potassium phosphate buffer 이며, pH 7.5로 조절하여 사용하였다.

1. 3. 사용시약

구취억제 활성 측정의 표준물질은 Wako사 (Wako Pure Chem., Osaka, Japan)의 methyl mercaptan을 사용 하였으며, 기타 실험에 사용된 시약은 실험용 특급시약을 사용하였다.

1. 4. Methyl mercaptan 표준액 제조

증류수 18 mL에 methyl mercaptan 2 mL를 녹인 후, 40% ethanol 180 mL을 가하여 methyl mercaptan이 100배 희석 되도록 하여 -70℃에서 보관하면서 사용하였다.

2. 실험 방법

2. 1. 구취억제 활성 측정

일정량의 시료와 0.2 M potassium phosphate buffer (PPB) 4 mL를 50 mL vial에 넣고 pH 7.5가 되도록 조절하였다. 이 vial에 1. 4에서 제조한 methyl mercaptan 표준액을 1 mL를 가한 즉시 실리콘 캡으로 밀봉하여 5초간 혼합한 후 37°C에서 6분간 방치한다. 그리고 vial의 headspace에 유리된 methyl mercaptan을 GC로 분석하여 측정하였으며, 다음 식에 의해 구취억제 활성값을 구하였다 (Cho et al., 2001).

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

C : control의 methyl mercaptan 피크 면적

S : 소재 첨가시의 methyl mercaptan 피크 면적

2. 2. Gas chromatography 분석 조건

FPD (flame photometric detector)가 장착된 GC (Hewlett Packard 5890, series II)를 사용하여 methyl mercaptan을 분석하였다. Column은 HP-1 phase (25 m × 0.33 mm × 2.65 μm, USA)을 사용하였으며, Carrier gas, N₂의 유속을 1.45 mL/min로 하여 column temperature 35°C, injector temperature 150°C 그리고 detector temperature 200°C의 조건에서 분석하였다.

2. 3. Total polyphenol함량 측정

시료 용액 0.5 mL, Folin-Denis 시약 2.5 mL 및 포화 Na_2CO_3 5 mL을 가하여 50 mL 정용한 것을 18℃에서 30분간 방치하여 760 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 표준검량곡선은 chlorogenic acid를 사용하여 만들었다.

2. 4. 용매에 따른 구취억제 소재의 추출

상추를 착즙하여 수분함량이 90% 이하가 되게끔 농축하여 water solubles로 사용하였다. Ethanol solubles과 methanol solubles은 water solubles에 4배량의 ethanol과 methanol을 가하여 이들의 최종농도가 80%가 되게 한다. 4℃에서 2시간 동안 방치한 후 동일 온도의 1630 g · force에서 30분간 원심분리 한 후 다시 상층액을 여과하여 60℃에서 감압 농축 (SB-651, EYELA, Japan)하여 제조하였다 (Cho et al., 2001).

2. 5. 초임계 유체 추출물의 제조

동결건조된 상추 50 g을 추출조에 넣어 초임계 추출하였다. 추출조는 1000 mL의 용량으로 100 bar의 압력, 100℃의 온도 범위를 유지할 수 있도록 고압용 stainless steel (316ss)을 사용하였고 이산화탄소가 흐르는 전 구간은 1/4" 와 1/8"의 stainless steel (316ss)을 사용하였다. 초임계 이산화탄소가 추출조를 통하여 나오는 추출조 상단의 압력은 analogue pressure gauge (Heise co. model No. CM-123958, WIKA co. model No. DM-16007)을 이용하여 측정하였다. 추출탑내의 미세한 압력은 2개의 metering value에 의해 조절되었다. 초임계 이산화탄소를 이용한 추출공정

에서 추출물과 기화된 이산화탄소를 분리하기 위해 분리조를 이용하여 추출물을 전량 회수 하였으며 온도는 45℃, 50 bar의 압력을 유지시켰다.

2. 6. 온도, pH 및 시간에 따른 구취억제 활성의 영향

조제한 water solubles 시료에 대한 고형분 함량이 2 mg이 되도록 계산하여 사용하였으며, 시료의 여러 온도대에서 각각 6분간 방치한 후 시료에 대한 구취억제 활성을 측정하여 온도에 따른 영향을 살펴보았다.

Water solubles의 pH는 6 N HCl, 0.5 N NaOH를 이용하여 일정 간격으로 pH를 조절하여 pH에 대한 구취억제 활성을 측정하였으며, 시간에 따른 구취억제 활성은 20℃에서 각 시간에 따라 방치한 후 측정하였다.

2. 7. 구취억제 소재의 가공처리 방법

동결건조 (SFDSM24L, Samwon, Korea), 열탕처리 (Unthermo Shaker NTS-1200, Eyela, Japan), 열풍건조 (WFO-600SD, Eyela, Japan) 및 분무건조 (YP-1000, Taeha, Korea)의 방법으로 건조하였다. 동결건조는 -80℃, 5 microns Hg의 조건에서 3일간 실시하였으며 열탕처리는 시료의 소재를 100℃의 끓는 물에 30분간 열탕처리하였다. 그리고 열풍건조는 60℃, 1.4 m/sec의 조건에서 24시간동안 실시하였고 분무건조는 150℃, 0.7 m³/min 및 184 kPa의 조건에서 실시되었다.

2. 8. 조효소 추출방법

상추 100 g에 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)를 100 mL 첨가하여 waring blender (HMF-340, Hanil, Korea)에 5분간 균질시킨 후 30분간 방치하고, 4℃에서 원심분리 (SUPRA 30K, Hanil, Korea)를 하였다. 그리고 400 g · force에서 30분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 실험에 사용하였다.

2. 9. 금속이온 및 환원제 혼합비에 따른 구취억제 활성의 영향

금속이온은 (Junsei Chemical Co., Japan) 20 mM 농도의 FeCl_2 , FeCl_3 , CuCl_2 및 CaCl_2 를 이용하였으며 환원제는 역시 같은 농도로 ascorbic acid, sodium hydrosulfite, 그리고 citric acid (St. Louis, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 10. 효소 및 phenol 희분에 따른 구취억제 활성의 영향

상추 water solubles을 동결건조한 소재와 직접 정제한 조효소를 실험에 사용하였으며 모델 표준 물질은 10 mM chlorogenic acid를 사용하였다

결과 및 고찰

1. 구취억제 소재의 적합성 판단

선정한 상추 소재가 구취억제 소재로 적합한지를 판단하기 위하여 상추 이외 우엉, 솔잎, 깻잎, 양송이의 구취억제 활성을 측정하여 비교하였다. 그 결과는 구취를 반으로 줄이는데 필요한 양으로 계산하여 Table 1에 나타내었으며, total polyphenol함량 (Fig. 1)을 측정하여 구취억제와의 관계를 살펴보았다. Table 1에서 나타나듯이 구취를 절반으로 줄이는데 필요한 상추의 양이 1.35 mg인 반면 솔잎은 150 mg 이상의 상대적으로 많은 양을 필요로 하여 이들 채소류 중에서는 상추가 가장 적은 양을 필요로 하는 것으로 나타났다. 또한 Fig. 1에서도 상추의 total polyphenol 함량이 10.97 mg으로 가장 높게 측정되었으며, 이들의 상관관계를 볼 때 Table 1에서 상추, 깻잎, 우엉, 양송이, 솔잎 순으로 구취억제 활성 효과가 나타났다. 이와 비슷하게 Fig. 1에서는 상추, 깻잎, 솔잎, 우엉, 양송이 순으로 total polyphenol함량이 높게 나타나 솔잎을 제외하고는 같은 경향을 나타냈다. 따라서 구취를 억제하는데 total polyphenol함량이 어느 정도 관여하는 것으로 생각되며 결과적으로 상추가 구취를 억제시키는데 적합한 소재라고 판단된다.

Table 1. Deodorizing activity of vegetables

vegetables	DA ₅₀ (mg)
Burdock, <i>Arctium lappa</i> LINNAEUS.	5.86
Lettuce, <i>Lactuca sativa</i> LINNAEUS.	1.35
Mushroom, <i>Agaricus bisporus</i>	7.19
Perilla leaf,	4.63
<i>Perilla frutescens</i> var. <i>japonica</i> HARA.	
Pine needles, <i>Agaricus bisporus</i> Pine needle	» 150

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

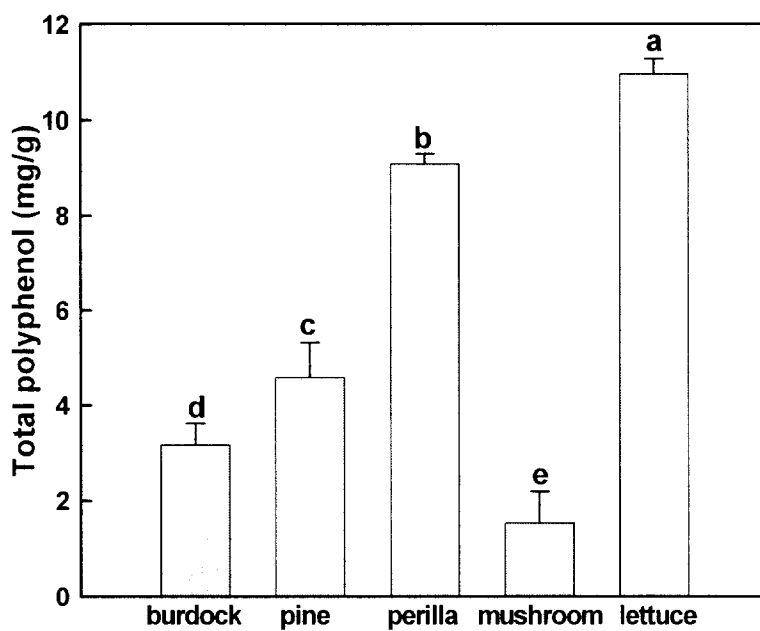


Fig. 1. Contents of total polyphenol as the kind of vegetables. Different letters (a, b...) indicate significant differences at $p=0.05$.

2. 구취억제 소재 제조의 조건별 구취억제 활성

2. 1. 부위별 구취억제 활성

상추의 형태적 특성상 과피, 과육, 씨와 같이 나눌 수 없으며 따라서 fiber와 water solubles로 나누어 구취억제 활성을 보았다. 그 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 구취억제 활성이 fiber 39.0% 보다 water solubles가 74.2%로 약 2배 가량 높게 나타났다. 이는 phenol물질이 당과 결합한 배당체로 되어 있어 수용성을 가지기 때문에 water solubles에 포함되어 fiber보다 더 좋은 효과를 가지는 것으로 판단된다.

2. 2. 추출 용매별 구취억제 활성

상추의 추출 용매에 따른 구취억제 활성을 보기위해 water solubles 이외에 ethanol solubles, methanol solubles 및 supercritical fluid extracts을 제조하였다. 구취억제 활성은 Table 3과 같이 water solubles가 74.2%로 가장 높았으며 다른 추출물들과 큰 차이를 나타내었다. Ethanol solubles와 methanol solubles는 구취억제 활성 뿐 아니라 수율 또한 낮게 나타났으며 supercritical fluid extracts는 5 μ g 사용으로 상추 2 mg에 비해 월등히 적은 양을 사용하여 53.6% 활성의 결과를 얻었으나 수율이 매우 낮아 결과적으로 water solubles가 가장 적당한 소재라고 판단되어진다.

Table 2. Deodorizing activities against methyl mercaptan and yields of extracts according to a part of lettuce

samples	Deodorizing activity (%)	Yield (%)
Fiber	39.0±2.8	37.1±2.2
Water solubles	74.2±1.7	44.6±1.5

Table 3. Deodorizing activities against methyl mercaptan and yields of lettuce extracts as affected by extraction conditions

Treatment condition	Deodorizing activity (%)	Yield (%)
Water solubles	74.2±1.7	44.6±1.5
Ethanol solubles	34.0±0.8	15.2±1.8
Methanol solubles	47.5±3.1	16.2±2.1
Supercritical fluid extracts	53.6±1.4	0.4±0.0

3. 구취억제 소재 제조시 미치는 영향인자 특성

3. 1. 온도

온도에 따른 water solubles의 구취억제 활성변화를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 것과 같이 반응온도가 상승함에 따라 구취억제 활성이 점차 감소하는 것을 볼 수 있으며 특히 20℃ 이상의 온도에서는 활성이 급격히 감소하는 것을 볼 수 있다. 이는 상추 PPO의 활성이 온도에 따라 증가하다 25℃에서 최대를 보인 후 그 이상의 온도에서는 점차 감소하는 결과와 서로 상응하는 것으로 보여지며 (Shin, 2004), 20℃와 25℃에서의 구취억제 활성이 크게 차이 나지않는 것으로 보아 상추의 구취억제 소재 제조는 25℃ 이하에서 이루어지는 것이 구취억제 효과를 높일 수 있을 것으로 판단된다.

3. 2. pH

구취억제 소재 제조시의 온도에 따른 구취억제 활성 결과를 감안하여 상온에서 제조한 water solubles의 pH를 달리하여 구취억제 활성을 관찰하였다. Fig. 3에 따르면 pH 3.0에서는 상대활성이 약 20-40% 정도였으며 pH가 증가함에 따라 활성이 증가하여 pH 5.0에서 가장 높은 활성을 나타내었다. pH 5.0 이후 급격히 감소하다 pH 6.5 이상에서는 차이를 나타내지 않았으나 대체로 높은 활성을 유지하였다. 상추 PPO의 최적활성 pH가 5.0이라고 밝힌 Chazarra (Chazarra et al., 1999)와 달리 Shin은 pH 6.5라 하였으며 이러한 차이는 PPO의 다양한 분리 방법의 차이에서 오는 결과라고 보고 하였다 (Shin, 2004). Water solubles의 pH는 6.2로

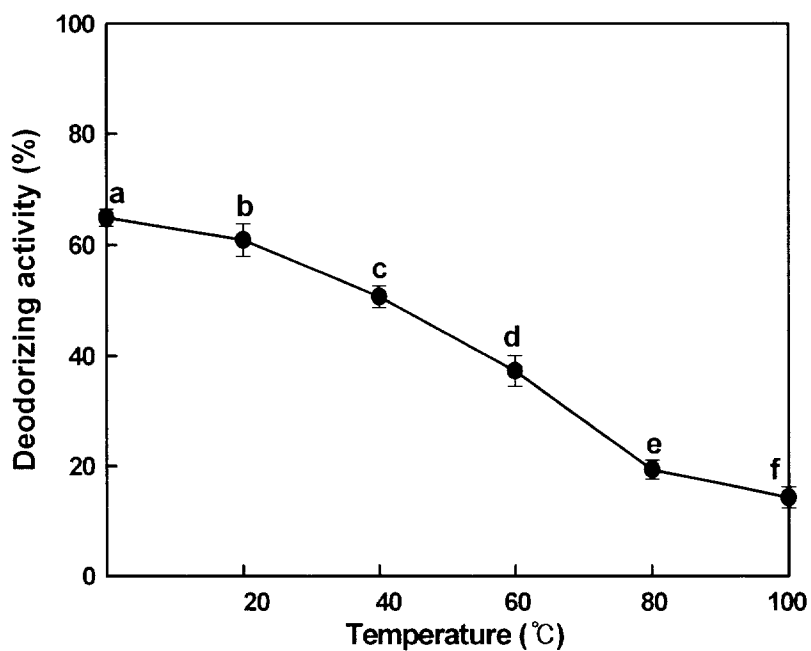


Fig. 2. Effect of temperature on deodorizing activity against methyl mercaptan of lettuce water solubles.

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

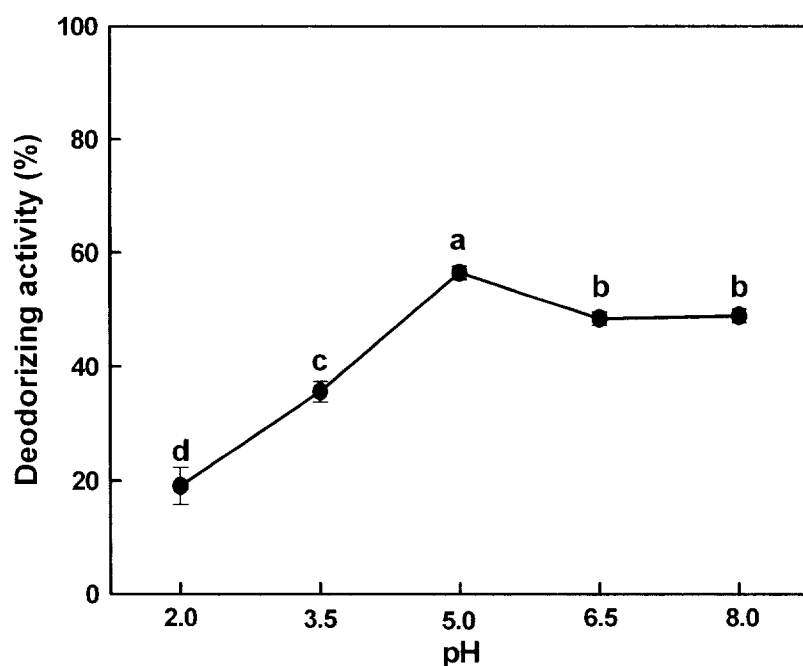


Fig. 3. Effect of pH on deodorizing activity against methyl mercaptan of lettuce water solubles.

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

이미 보고된 최적 pH 5.0과 6.5 사이에 존재하고 있으며, water solubles 자체 구취억제 활성과 Fig. 3에 나타난 최적 pH에서의 구취억제 활성의 차가 그다지 크지 않기 때문에 구취억제 소재 제조시 pH는 조절이 따로 필요없이 소재 자체의 pH를 이용하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

3. 3. 시간 및 가공처리 방법

구취억제 소재 제조시 미치는 영향인자 특성을 살핍으로써 구취억제 활성의 감소를 최소화 할 수 있으며, 이 소재가 산업적으로 이용될 경우 생산 조건이 될 수도 있다. 따라서 온도와 pH 뿐만 아니라 제조 시간과 가공처리 방법도 영향인자 선정하여 이들에 대한 구취억제 활성을 보았다.

사용한 소재는 Fig. 2와 3의 결과를 바탕으로 제조하였으며 그 결과는 Fig. 4와 5에 나타난 바와 같이 시간이 지날수록 구취억제 활성은 급격하게 감소하였다. 기존에 발표된 peel of banana의 total polyphenol 함량이 (Nguyen et al., 2004) 시간에 따라 Fig 4와 같은 경향을 나타내는 것으로 보아 구취억제 활성의 감소는 total polyphenol 함량이 감소함에 따라 나타나는 결과라 생각된다. 따라서 구취억제 소재 제조시간은 24시간 이내로 경과시간을 줄이는 것이 바람직하다고 판단된다.

구취억제 소재의 가공처리 방법은 freeze drying, boiling, hot-air drying 및 spray drying으로 하여 water solubles과 함께 비교하였다 (Fig. 5). 각 가공처리 방법에 따른 구취억제 활성은 water solubles 73.3%에 비하여 모두 낮게 나왔으나 freeze drying이 48.9%로 다른 건조 방법에 비해 3-4배 이상의 높은 활

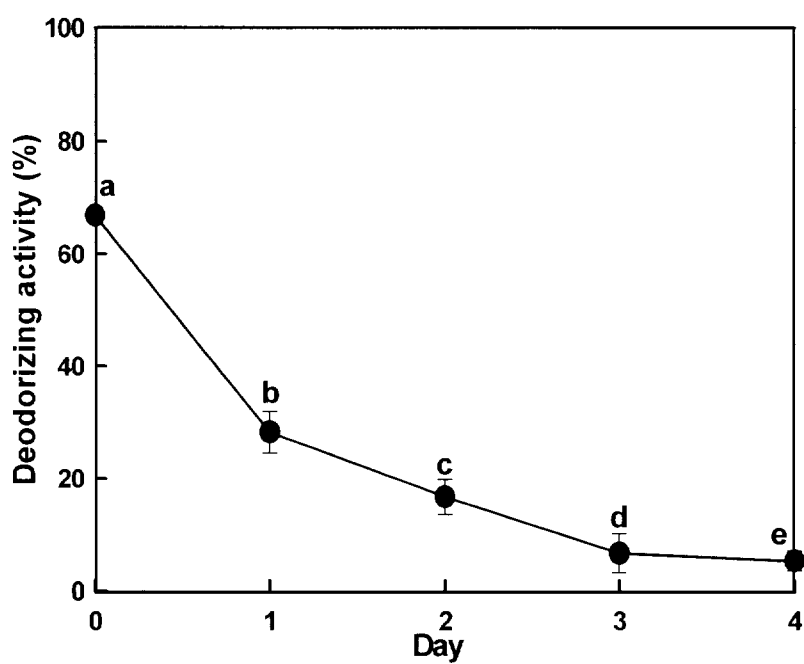


Fig. 4. Effect of day on deodorizing activity of lettuce.

Different letters (a, b...) indicate significant differences at $p=0.05$.

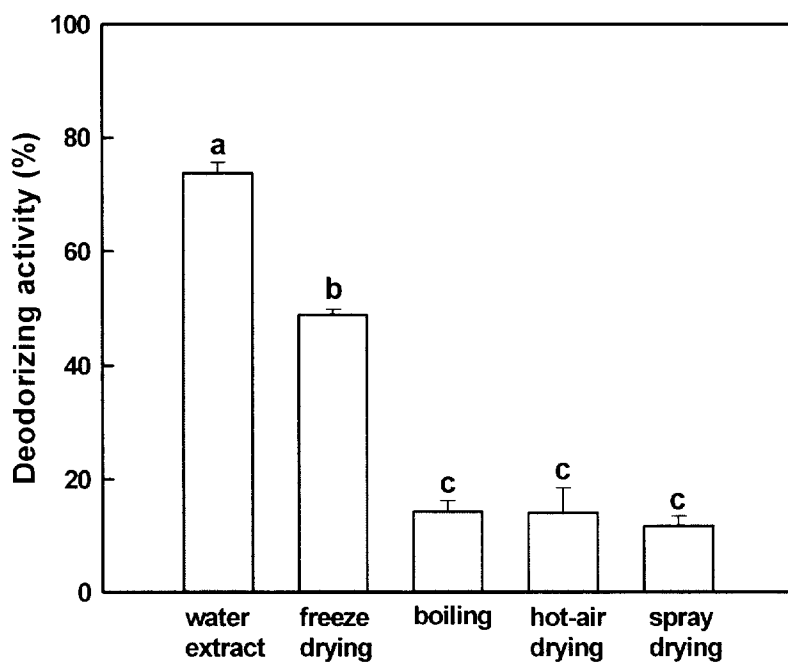


Fig. 5. Deodorizing activity of lettuce extracts against methyl mercaptan of lettuce water solubles by different processing methods.

성을 나타내었다. 그 외 boiling, hot-air drying 및 spray drying
는 14.3%, 14.1%, 11.6%로 구취억제 활성의 차이가 없으며 이들
처리 방법은 열에 의한 polyphenol의 손실로 인한 것으로 판단된
다. 따라서 구취억제 소재를 가공처리 할 경우 freeze drying의
처리가 가장 적합한 가공 조건으로 보여진다.

4. 구취억제 소재의 구취억제 기작 구명

4. 1. 금속이온 및 환원제의 구취억제 활성 영향

상추 소재의 구취억제 영향을 살피기 위하여 water solubles에
금속 및 환원제를 처리하고 그 결과를 Fig. 6과 Fig. 7에 나타내
었다. Water solubles에 질소를 처리한 경우 control에 비하여 구
취억제 활성이 감소하였으며, 금속을 첨가한 경우 FeCl_3 , CaCl_2 는
구취억제 활성이 감소되었으나 CuCl_2 는 크게 증가되었다. 이는
 CuCl_2 가 소재 중의 PPO를 활성화시켜 phenol의 산화를 유도하였
기 때문으로 생각되며, *puerariae radix*나 *Flammulina velutipes*의
PPO (Park et al., 1991; Pyo et al., 2002), 그리고 spinach beet에
서 얻은 정제효소 (Sato et al., 1976) 등이 Cu^{2+} 나 Fe^{2+} 에 의해 크
게 혹은 적게 활성을 증가시킨다는 기존의 연구결과와 같은 결과
를 보인다. 그러나 본 실험에서는 FeCl_2 에 대한 구취억제 활성에
변화가 없는 것으로 보아 PPO의 활성 효과에 대해 FeCl_2 가 영향
을 미치지 않은 것으로 판단되며 이 부분에 대해서는 기존에 보
고된 결과와 상이하게 나타났다. 구취억제 활성이 감소된 FeCl_3 나
 CaCl_2 는 phenol의 산화나 PPO의 활성화보다는 phenol 및 phenol

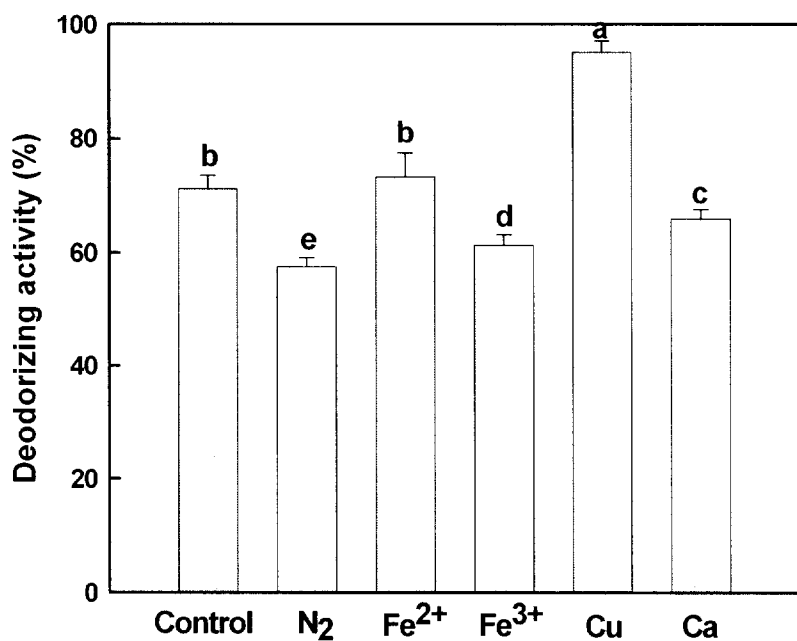


Fig. 6. Effect of metal ions on deodorizing activity against methyl mercaptan of lettuce water solubles. Different letters (a, b...) indicate significant differences at $p=0.05$.

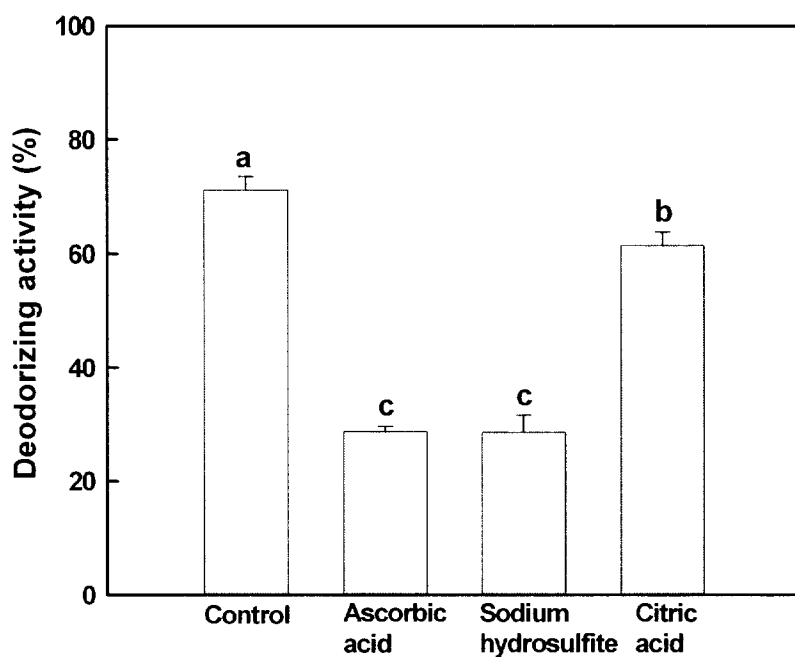


Fig. 7. Effect of reducing agents on deodorizing activity against methyl mercaptan of lettuce water solubles. Different letters (a, b...) indicate significant differences at $p=0.05$.

산화물과의 반응으로 구취억제 활성을 감소시키는 것으로 생각된다.

환원제를 처리한 실험구의 구취억제 활성은 control과 비교하였을 때 정도의 차이는 있으나 모두 감소하였다. 특히 ascorbic acid는 polyphenol의 산화시 생성되는 중간산물인 quinone과 복합체를 형성하는 것으로 알려져 있으며 이에 따라 구취억제 활성이 감소되는 것으로 판단된다 (Choi et al., 1987). Puerariae radix (Park et al., 1991), *Flammulina velutipes* (Pyo et al., 2002), Fuji apple (Choi et al., 1987), Monroe apple peel (Zhou et al., 1993), Victoria grape (Rapeanu et al., 2004), banana peel (Yang et al., 2001), white yam tuber (Christopher et al., 1982) 등의 소재에서 ascorbic acid가 PPO에 미치는 영향은 0.05-15 mM 농도로 다양하게 연구된바 있으며, 대체로 1 mM의 저농도에서 100% 저해되었다는 보고가 많았다. 이러한 결과를 미루어 볼 때 Fig. 7의 결과는 ascorbic acid가 PPO를 억제하기 때문에 methyl mercaptan은 polyphenol에 의해 억제된 것으로 판단된다. 상대적으로 구취억제 활성이 높은 citric acid는 PPO의 활성을 적게 감소시킨 결과라 판단되며, banana peel에서 얻은 PPO의 활성이 citric acid에 의해 아주 조금 감소시킨다는 기존의 연구 (Yang et al., 2001) 결과에 상응하는 것으로 보인다.

4. 2. Phenol 및 효소의 영향

Phenol과 PPO가 구취억제 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 상추로부터 얻은 phenol획분, 제조한 PPO 그리고 모델 phenol물질 chlorogenic acid을 이용하여 Fig. 8과 9에 그 결과를

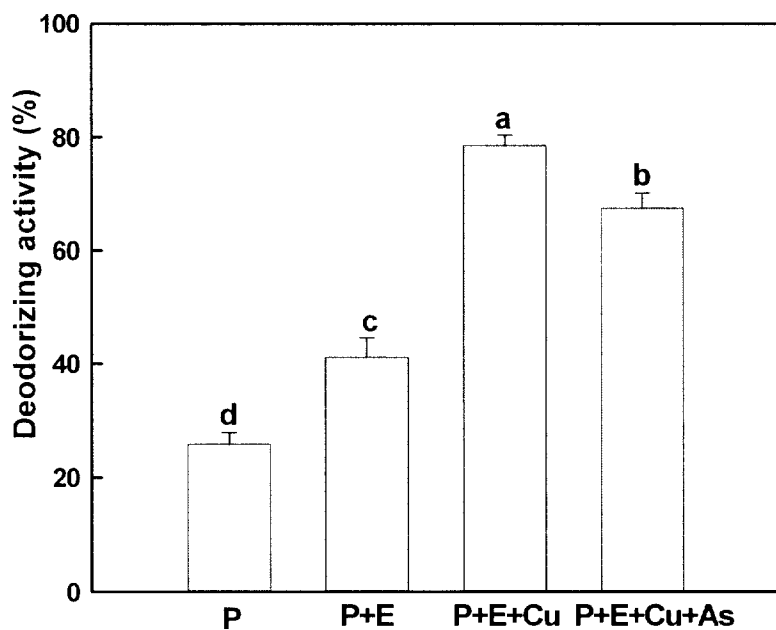


Fig. 8. Effect of metal and ascorbic acid on deodorizing activity against methyl mercaptan of phenol fraction and polyphenol oxidase from lettuce. (P: phenol fraction, E: polyphenol oxidase, Cu: copper, As: ascorbic acid).

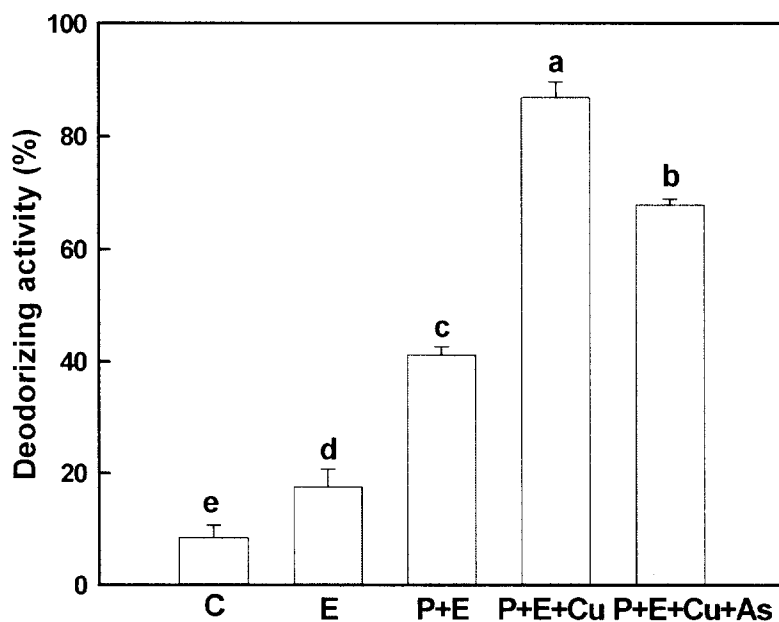


Fig. 9. Effect of metal, ascorbic acid and polyphenol oxidase from lettuce on deodorizing activity against methyl mercaptan of authentic chlorogenic acid. Different letters indicate significant differences at $p=0.05$. (C: chlorogenic acid, E: polyphenol oxidase, Cu: copper, As: ascorbic acid)

나타내었다. 제조된 phenol획분과 phenol획분에 PPO를 첨가한 실험구의 구취억제 활성을 비교하였을 때 phenol획분 단독보다는 PPO를 첨가한 실험구의 구취억제 활성이 높게 나왔으며 CuCl_2 와 ascorbic acid를 첨가할 경우 Fig. 6과 7에서 나타난 결과와 마찬가지로 구취억제 활성을 증가시키거나 감소시켰다. 또한 모델 phenol 물질 chlorogenic acid를 단독으로 사용할 경우 구취억제 활성은 낮게 측정되었으나 PPO를 첨가할 경우 구취억제 활성은 크게 증가되었다. 따라서 구취억제 활성에 효소와 phenol은 서로 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.

결과적으로 4. 1.와 4. 2.의 내용을 종합해 볼 때 소재 중의 phenol compounds가 PPO나 금속이온 등의 요인에 의해 어느 정도 산화가 되면 이 때 중간 산물인 quinone이 생성해서 휘발성 methyl mercaptan과 반응해서 methyl mercaptan을 비휘발성으로 전환하여 구취를 억제하는 것으로 보여진다.

5. 시판 구강세정액과의 비교

상추에서 얻은 phenol획분과 구취방지를 목적으로 하는 구강세정액의 효과를 비교하기 위해서 시판매되고 있는 구강세정액 3종류를 구입하여 구취억제 활성을 측정하였다 (Fig. 10). 이 때 구강세정액 사용량은 1 mL이며 1 mL에 대한 methyl mercaptan의 억제는 phenol획분에 비해 월등히 낮은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 phenol획분과 구강세정액 간에 구취억제 기작이 다르기 때문인 것으로 생각된다.

구강세정액의 주성분으로 알려진 염화아연은 구강내에서 methyl

mercaptan 뿐만 아니라 황함유 가능성이 있는 물질이나 효소들과 이온화 아연반응을 일으켜 휘발성 황화합물의 생성을 감소시켜 구취발생을 억제한다 (Schmidt et al., 1978). 따라서 구강세정액은 methyl mercaptan 발생전에 먼저 음식물과의 반응으로 구취를 억제하고 phenol획분은 이미 발생한 methyl mercaptan과의 반응으로 구취를 억제하기 때문에 구강세정액의 구취억제 활성이 낮게 나타난 것으로 판단된다

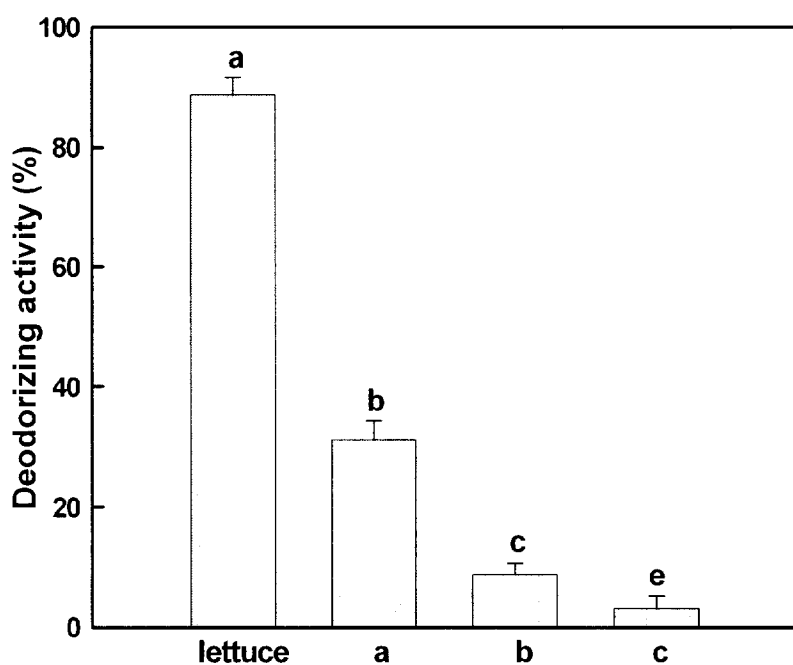


Fig. 10. Comparison of the deodorizing activity of lettuce water solubles and mouthrinse.

요 약

본 연구에서는 상추 추출물을 이용하여 구취의 주성분인 methyl mercaptan의 구취억제 활성을 알아보고, 구취억제 소재 제조시에 미치는 영향인자들에 대한 특성과 구취억제 소재 제조시에 알맞은 조건을 알아보았다.

상추를 fiber와 water solubles로 나누어 각각의 구취억제 활성을 측정한 결과 fiber 보다 water solubles이 약 2배 가량 높게 나타났다으며 추출 용매에 따른 구취억제 활성은 water solubles이 ethanol solubles, methanol solubles, supercritical fluid extracts 보다 높게 나타났다.

구취억제 소재 제조시 온도에 대한 구취억제 활성은 20℃ 이후 급격히 감소하였으며, 상추의 원래 pH가 최적 pH 범위에 있어 따로 pH 조절이 필요 없는 것으로 나타났다. 이러한 조건들에서 소재를 제조하는 것은 24시간 이내에 이루어져야 구취억제 활성의 감소를 최소화시킬 것으로 보인다. 뿐만 아니라 구취억제 소재는 사용 편의성을 위해 가공처리를 필요로 하는데 이 때도 구취억제 활성은 감소하게 된다. 따라서 그 손실을 최소화하기 위해서는 열을 가하는 다른 건조 방법들보다 freeze drying을 사용하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

구취억제 기작을 구명하기 위해 금속과 환원제가 미치는 구취억제 활성을 조사하였다. 그 결과 CuCl_2 는 소재 중의 PPO를 활성화시켜 phenol의 산화를 유도하여 구취억제 활성을 증가시켰으며, 반면에 환원제 ascorbic acid는 quinone과 복합체를 형성함으로써 구취억제 활성이 감소되었다. 상추로부터 얻은 phenol획분

과 chlorogenic acid은 단독으로 사용할 때 보다 PPO를 첨가할 때가 활성이 더 높은 것으로 나타났으며, 이 실험구에 CuCl_2 를 첨가할 경우 구취억제 활성은 더욱 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 phenol과 PPO는 구취를 억제하는데 밀접한 관계가 있다는 것을 알 수 있다.

참 고 문 헌

- Chang, Y.W. 2000. Oral malodor, bad breath, halitosis. *K. H. M.*, 16, 1-3.
- Chazarra, S., J. Cabanes, J. Escribano and F. Garcia-Carmona. 1996. Partial Purification and Characterization of Latent Polyphenol Oxidase in Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 44, 984-988.
- Chazarra, S., F. Garcia-Carrnona and J. Cabanes. 1999. Characterization of monophenolase activity of polyphenol oxidase from Iceberg lettuce. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1422-1426.
- Chen, C.C. and C.T. Ho. 1986. Identification of sulfurous compounds of shiitake mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). *J. Agric. Food Chem.*, 34, 830-833.
- Cho, S.W., K.S. Kwak, J.H. Lee, Y.S. Yun, Y.S. Gu, C.I. Ji, D.S. Lee, Y.B. Lee and S.B. Kim. 2001. The effect of polyphenol oxidase on deodorizing activity of apple extract against methyl mercaptan. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 30, 1301-1304.

- Choi, E.H., D.S. Jung, N.S. Cho and Y.H. Shim. 1987. Characteristics and inhibition of polyphenol oxidase from Fuji apples. *J. Korean Agricultural Chemical Society*, 30, 278-284.
- Christopher, O.I. and N.O. Helen. 1982. Purification and some properties of *o*-diphenolase from white yam tubers. *Phytochemistry*, 21, 2815-2820.
- Chung, S.K., H.M. Seog and J.U. Choi. 1994. Change in volatile sulfur compounds of garlic (*Allium sativum* L.) under various drying temperatures. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26, 679-682.
- Kleinberg, I. and G. Westbay. 1992. Salivary and metabolic factors involved in oral malodor formation. *J. Periodontol.*, 63, 768-775.
- Machiels, D., S.M. van Ruth, M.A. Posthumus and L. Istasse. 2003. Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats. *Talanta*, 60, 755-764.
- Mayer, A.M. 1987. Polyphenoloxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*, 26, 11-20.
- Nguyen, T.B.T, S., Ketsa and W.G. van Doorn. 2004. Effect of modified atmosphere packaging on chilling-induced peel

- browning in banana. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 313-317
- Park, S.S., A.K. Kim and J.S. Lee. 1991. Studies on polyphenol oxidase from puerariae radix. *Kor. J. Pharmacogn.*, 22, 101-108.
- Pyo, H.J., D.Y. Son and C. Lee. 2002. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Flammulina velutipes*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 34, 552-558.
- Rapeanu, G., A. Van Loey, C. Smout and M. Hendrickx. 2004. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). *Food Chemistry*, In Press, Corrected Proof.
- Sato, M. and M. Hasegawa. 1976. The latency of spinach chloroplast phenolase. *Phytochem.*, 15, 61-65.
- Schmidt, N.F. and Trabet, W.J. 1978. The effect of oral rinses on organoleptic mouth odor ratings and levels of volatile sulfur compounds. *Oral Surg. Oral Med. Oral Path.*, 45, 876.
- Shin, E.C. 2004. Purification and methyl mercaptan-capturing properties of polyphenol oxidase from apple, grape, lettuce. *A master's thesis of Pukyong National University*.

Song, M.R. 2001. Volatile flavor components of cultivated radish (*Raphanus sativus* L.) sprout. *Korean J. Food & Nutr.*, 14, 20-27.

Teruhisa, K. 1961. Chemical studies on volatile constituents of seaweed-XVI. Their phylogenetic and biochemical significance. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 27, 75-84.

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, 585-589.

Tonzetich, J. 1971. Direct gas chromatographic analysis of sulphur compounds in mouth air in man. *Arch. Oral. Biol.*, 16, 587-597.

Tonzetich, J. 1977. Production and origin of oral malodor: A review of mechanisms and methods of analysis. *J. Periodontol.*, 48, 13-20.

Tonzetich, J. and S.K. Ng. 1976. Reduction of malodor by oral cleansing procedures. *Oral Surg.*, 42, 172-181.

Yang, C.P., S. Fujita, K. Kohno, A. Kusubayashi, M.D.

- Ashrafuzzaman and N. Hayashi. 2001. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1446-1449.
- Yasuda, H. and T. Arakawa. 1995. Deodorizing mechanism of (-)-epigallocatechin gallate against methyl mercaptan. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1232-1236.
- Yasuda, H. and M. Ui. 1992. Deodorant effect of plant extracts of the family rosaceae against methyl mercaptan. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, 66, 1475-1479.
- Yoshimura, M., Y. Nakano, Y. Yamashita, T. Oho, T. Saito and T. Koga. 2000. Formation of methyl mercaptan from L-methionine by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, 68, 6912-6916.
- Zhou, P., N.L. Smith and C.Y. Lee. 1993. Potential purification and some properties of monroe apple peel polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 532-536.
- Zhow, H. and X. Feng. 1991. Polyphenoloxidase from Yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *J. Sci. Food Agric.*, 57, 307-313.
- Nykanen L. and H. Soumalainen. 1983. Aroma of beer, wine

and distilled alcoholic beverages. D. Reidel Pub. Co. Berlin.
W. Germany. 233.

Lewin R.A. 1962. Physiology and biochemistry of algae.
Academic Press, New York and London, 467.

박승국. 1994. 주류에서의 휘발성 황화합물에 대해서. *Bioindustry News*, 7, 18-24.

박영호, 장동석, 김선봉. 1997. 水産加工利用學. 螢雪出版社, 375.

山口勝己. 1991. 水産生物化學. 恒星社厚牲閣, 170.

감사의 글

이제 논문을 마무리하면서 그 동안 많은 도움을 주신분들께 감사의 인사를 드리기 위해 이렇게 몇 자 적어봅니다. 먼저 많이 부족한 저를 기꺼이 받아주신 김선봉 교수님, 제게 이런 기회를 주셔서 감사합니다. 학부 3학년 수업시간에 인생 그래프에 대해 설명해 주셨던 교수님 말씀이 아니었다면 지금 저의 진로에 대한 확신을 가질 수 없을거라 생각하며, 언제나 말씀하셨듯이 어느 곳을 가든지 일에 대한 열정을 가지고 열심히 살아가겠습니다. 아울러 논문심사를 맡아 지도 해주신 이양봉 교수님과 안동현 교수님, 영어에 대한 끈을 놓지 않도록 해주시고 아낌없는 칭찬과 격려로 제게 너무나 많은 힘을 주셔서 감사합니다. 그리고 수업시간에 다양한 주제를 가지고 여러 분야에 관심을 가지도록 해주신 장동석 교수님, 이근태 교수님, 조영제 교수님, 양지영 교수님, 전병수 교수님 감사합니다.

2년간의 대학원 생활을 겁이 많아 좀 망설였습니다. 그 때부터 지금까지 많은 격려와 힘을 실어주신 승목이 선배님 많이 가르쳐 주셔서 감사하고, 세상의 많은 즐거움을 가르쳐 주신 주현이 선배님과 인우 언니도 감사합니다.

감사해야 할 실험실 식구들이 너무도 많네요 아마도 그 만큼 제가 많이 부족하고 도움을 받아서 그렇겠지요. 그래서 후배님들이 고생하셨습니다. 하루에도 몇 번이고 샘플링이며 세척이며 도와주신 수현이, 희진이, 광현이, 혜영이, 자선이, 현진이 밤이며 주말이며 할 것없이 너무 많이 수고줘서 나름대로 좋은 결과를 얻었습니다. 우리 후배님들이 이렇게 도움을 주시기

까지 선경이, 영경이, 연주 후배님이 잘 이끌어 주었기 때문이라 생각합니다. 실험실 잘 이끌어 가도록 선배다운 면모를 보여줘서 고마워요.

계속해서 실험실을 끌고 갈 재환이, 혜진이, 주린 후배님, 앞으로 좋은 모습 보여서 상훈이, 봄비, 대용이, 수연이, 태완이, 준영이, 경환이까지 여러 후배님들과 함께 멋진 실험실 만들어가시길 바랍니다. 그리고 진욱이 선배님 남은 학기 마무리 잘 하십시오.

참 꼭 인사드리고 싶은 분이 계십니다.

새벽에도 마다하지 않고 힘을 준 요집이 오빠 너무나 감사하고,, 박미연 교수님~ 대학원 생활에서 큰 시련이 닥쳤을 때 정말로 함은 힘을 주셨습니다.너무너무 감사합니다.

마지막으로 우리 아버지, 제게 많은 것을 양보해 주셨습니다. 꼭 성공해서 배로 돌려드리겠습니다. 그러니까 항상 건강하세요.