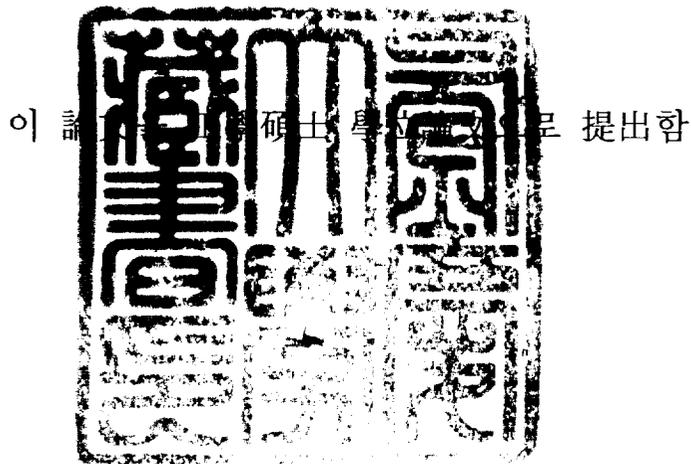


工學碩士 學位論文

포도 추출물의 구취억제 특성 해석

指導教授 李 養 鳳



2005年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

許 敏 修

허민수의 공학석사 학위논문을 인준함

2004년 12월 23일

주 심 농학박사 김 선 봉



위 원 농학박사 양 지 영



위 원 농학박사 이 양 봉



목 차

Abstract.....	1
서 론	5
재료 및 방법	8
1. 실험재료	8
1. 1. 시료	8
1. 2. 완충액 제조	8
1. 3. 사용시약	8
1. 4. Methyl mercaptan 표준액 제조.....	8
2. 실험방법	9
2. 1. 구취억제 활성 측정.....	9
2. 2. Gas chromatography.....	9
2. 3. 구취억제 소재의 건조방법.....	11
2. 4. 총페놀 함량의 측정	11
2. 5. Polyphenol oxidase의 활성 측정	11
2. 6. 조효소액 추출.....	12
2. 7. Water soluble, ethanol soluble 및 methanol soluble의 제조..	12
2. 8. 온도별 구취억제 활성 측정.....	12
2. 9. pH별 구취억제 활성 측정.....	12
2. 10. 금속이온 및 환원제 혼합비	13

결과 및 고찰	14
1. 포도의 조건별 구취억제 특성.....	14
1. 1. 부위별 구취억제 활성 및 추출물의 수율.....	14
1. 2. Total polyphenol 함량.....	14
1. 3. 추출조건별 구취억제 소재의 구취억제 특성.....	17
2. 구취억제 소재 제조시의 영향 인자의 특성 구명.....	17
2. 1. 온도.....	17
2. 2. pH.....	20
2. 3. 가공처리 방법.....	20
3. 포도 구취억제 소재의 기작 구명.....	23
3. 1. 금속 및 환원제의 영향.....	23
3. 2. 효소 및 페놀의 영향.....	25
3. 3. 구취억제 소재의 억제기작.....	26
요 약	29
참 고 문 헌	32
감 사 의 글	37

Analysis of Deodorizing Mechanisms for Halitosis Inhibition of Grape Extracts

Min-Su Hur

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

Abstract

The objectives of this study were to investigate the deodorizing mechanism of grape extracts, and to develop an extraction method and processing technology of grapes for functional ingredient of halitosis inhibition. Deodorizing activity was investigated by measuring the reduced amount of a standard compound of methyl mercaptan. Also, the amounts of total phenolic compounds were measured with the prediction of higher deodorizing activities against methyl mercaptan in higher amounts of polyphenolic compounds. The amount

of total phenolic compounds of grapes was 6.2 mg/g grapes.

Skins of grapes showed higher deodorizing activities than freshes of the grapes. Also, total phenol amounts of skins for grapes were higher than those of freshes of grapes. The extracts which were not separated by two parts of skins and freshes had high deodorizing activities, so the separating processing was not needed for industrial application. Also, skins which are by-products in manufacturing industries of grapes can be effectively used.

Water soluble, ethanol soluble and methanol soluble were produced for measuring deodorizing activity and extraction yield. By the results of each extraction condition, water soluble of grapes was highest for deodorizing activity and yield. Therefore, it was thought that water soluble is the most suitable method for the production of materials for deodorization.

Effects of factors in processing for deodorizing activities on temperature were measured by using water soluble fractions which showed higher deodorizing activity than other extraction fractions. The differences for deodorizing activities of grapes were small to 2 0°C. There were no big differences between pH of water soluble extracts and pH of the highest deodorizing activities, it is expected that the processing with grape itself is effective without controlling the optimum pHs.

Because ingredients for halitosis inhibition are mainly used as food

or medicine, powder form is required for convenient use and storage safety. Such heat treatment as drying for powder formation may reduce the deodorizing activity, so the optimum processing condition for maximum halitosis inhibition is required to study. Freeze-dried powders of grape extracts showed almost the same activity as water soluble fraction.

In order to know the factors which are related to the mechanism of deodorizing activity of the chosen grapes, treatment effects of N₂, metals and reducing agents in water soluble fractions on deodorizing activity were measured after the treatment of those materials for 30 min at 25°C. Grape extracts of N₂ treatment showed less reduction of deodorizing activity. The deodorizing activities of all samples on Cu addition were largely increased, but Fe or Ca addition reduced the halitosis inhibition. In the case of Fe and Ca, the reduction was thought that the metals reacted with the oxidized phenolic compounds rather than activation of polyphenol oxidase. Treatment of reducing agents showed the reductions of deodorizing activity. The reason is thought that they inhibited the formation of oxidized phenolic compounds which were required for halitosis inhibition.

The deodorizing activities of phenol fractions from grapes were evaluated by using their polyphenol oxidases. The mixture of phenol fraction and polyphenol oxidase showed higher deodorizing activity than only phenol fraction. The experimental mixture of polyphenol

oxidase, Cu and phenol fraction showed higher activity than others. In the case of adding ascorbic acid, the deodorizing activity was a little decreased by inhibiting oxidation of metals, but the enzymatic activity was less affected. Chlorogenic acid which is one of the abundant polyphenolic compound was used for the model system as a substrate. In the model system of phenolic compounds, only chlorogenic acid showed low deodorizing activity, but the deodorizing activities for grapes were largely increased by adding polyphenol oxidase, Cu and chlorogenic acid.

서 론

구취는 식품에서 유래하는 타액 중의 단백질, 탈락된 점막세포, 삼출액(滲出液) 중의 혈구성분, 치주조직 등의 각종 단백질 성분이 세균 및 효소의 작용에 의해 생성되는 amine, ammonia, hydrogen sulfide, methyl mercaptan 및 dimethyl sulfide 등에 기인하여 발생한다(Tonzetich et al., Richter, 1964; Tsunoda, 1975). 이러한 구취의 발생 원인은 주로 cysteine 과 methionine, 또는 이들 아미노산을 포함하는 단백질이나 펩타이드로부터 형성되는 휘발성 황화합물인 volatile sulfur compound로부터 기인한다. 즉 hydrogen sulfide, methyl mercaptane, dimethyl sulfide 등이 이에 속한다. 구강 내에 존재하는 대부분의 비당분해성 세균들은 타액이나 음식물 찌꺼기에 포함된 cysteine을 분해하여 hydrogen sulfide를 만들고, methionine을 분해하여 methyl mercaptane을 만든다. 일반적으로 이 두 가지 물질이 구취를 일으키는 주범이다 (Jang et al., 2000). 이러한 구취를 진단하기 위한 객관적인 분석방법들이 개발되어 왔는데, 1966년 Brody와 Chaney가 휘발성 황화합물에 선택적이면서 고감도로 반응하는 불꽃광전감지기(flame photometric detector, FPD)를 개발함으로써 구강내 휘발성 황화합물의 농도를 측정하는 것이 가능하게 되었다. Tonzetich(1971)은 GC를 이용하여 구강내 기체에서 hydrogen sulfide, methyl mercaptan, dimethyl sulfide 등 휘발성 황화합물의 존재를 확인하였으며, Kaizu (1976), Schmidt와 Tarbet(1978)는 이러한 휘발성 황화합물 중에서 methyl mercaptan 농도와 감각적으로 느끼

는 구취 사이에는 높은 상관관계가 있다는 것을 확인하였으며, 구취를 감소시키기 위해서는 methyl mercaptan을 억제하는 것이 대단히 중요하다고 주장하였다. 그리고 이러한 휘발성 황화합물은 개인에 따라 농도의 차이는 있지만 그 역치(閾値)를 보면 hydrogen sulfide 5 ppb, methyl mercaptan 0.1 ppb, dimethyl sulfide 10 ppb로서 구취 원인물질로서 methyl mercaptan의 중요성을 알 수 있다 (Lee, 2000).

Polyphenol oxidase (PPO, EC 1.10.3.1)는 채소와 과일에서 일반적으로 발견되는 Cu를 함유한 효소이며, mono-hydroxyphenol을 dihydroxyphenol로 수화시키는 반응에 관여하고 그 반응으로부터 생성된 hydroxyquinone이 중합반응을 일으켜 최종반응 생성물로 적색과 적갈색의 중합체인 melanin이 생성된다(Oh et al., 1988). 이러한 PPO의 강력한 산화작용은 또한 구취억제 작용에도 관여하는 것으로 알려져 있는데, 현재 밝혀진 polyphenol의 구취억제 작용기작은 수소결합인 phenolic hydroxyl group과 thiol group사이의 물리적 흡착 작용에 의하여 구취억제 작용이 일어난다고 알려져 있으며 (Yasuda et al., 1995), PPO에 의해 산화된 *o*-Diphenol이 *o*-quinone 형태로 전환되어지면서 methyl mercaptan과 다른 thiol 화합물과 반응하여 휘발성이 강한 methyl mercaptan을 비휘발성으로 전환시켜 구취억제 작용을 한다고 알려져 있다 (Negishi et al., 1997).

이를 바탕으로 polyphenol oxidase를 포함하고 있는 과채류에 대한 다양한 연구들이 진행되어 왔는데, 녹차에 함유되어 있는 catechin

의 구취억제 작용에 관한 연구(Kida et al., 2002; Suzuki et al., 1983; Yasuda et al., 1995), 야채 추출물의 구취억제 작용에 관한 연구(Miyamoto et al., 1984), 버섯에서의 metcaptan capturing 작용에 관한 연구 (Negishi et al., 2001) 등이 있다.

포도(Grape/Vitis vinifera)는 약 8000년 전부터 경작되기 시작하여 현재는 총 15만여 품종에 이르며 인간이 재배한 오래된 과일 중의 하나이며, 갈매나무목(Rhamnales) 포도과(Vitaceae)에 속하는 낙엽성 덩굴식물로 11속 약 700여종이 있다 (Park et al., 2003). 현재 한국에서 재배되고 있는 포도의 약 85~90% 정도는 생식용으로 소비되고 나머지 10~15% 정도가 포도 주스, 포도주, 포도즙과 같은 포도 가공식품의 제조에 사용되고 있다 (Jung et al., 2002). 최근 한·칠레 FTA 협정 등의 영향으로 국내 과수재배 농가의 생계유지 및 미래 생업에 커다란 타격을 주고 있다. FTA 체제 발전으로 저가의 다양한 과실류 및 그 가공품의 수입이 급속하게 증가함에 따라 국내산 과일 수요의 상당량을 대체하여 국내산 과일의 생산 위축현상을 초래하고 있다.

따라서 본 연구에서는 구취억제 효과가 뛰어난 구취억제 소재의 개발 및 구취억제 기작의 구명을 목적으로 polyphenol 함량이 많은 것으로 알려진 포도를 대상으로 하여 과피 및 과육 등의 부위별 구취억제 활성 측정, 추출조건별 구취억제 특성, 구취억제 소재 제조시의 영향 인자의 특성 구명, 구취억제 소재의 억제 기작 구명에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1. 1. 시료

본 연구에 사용된 포도 (Campbell Early, *Vitis vinifera*)는 부산시 반여동 소재의 도매시장에서 구입(2003년)하여 -20°C 의 냉장고에 보관하며 실험에 사용하였다.

1. 2. 완충액 제조

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

1. 3. 사용시약

구취억제 효과 측정에 사용한 methyl mercaptan은 Wako (98.0%), 기타 실험에 사용된 시약은 실험용 특급시약을 사용하였다.

1. 4. Methyl mercaptan 표준액 제조

Methyl mercaptan 표준액($1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ in benzene ; Wako Pure Chem., Osaka, Japan) 2 mL 를 18 mL ethanol 용액에 용해시켜 다시 40% ethanol 용액에 10배 희석하여 5 mL의 vial에 담아, -70°C 에 냉동 보관하였다. 그리고 구취억제 활성 측정시 이 표준액을 녹여 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

2. 1. 구취억제활성 측정

구취억제활성 측정은 Tokita et al.(1984)의 방법을 변형하여 실험하였으며 그 방법을 Fig. 1에 나타내었다. 시료 일정량과 0.2M potassium phosphate buffer (PPB) 4 mL를 내용량 50 mL의 vial에 넣고 pH를 7.5로 조절한다. 여기에 methyl mercaptan 표준액 (1 μ g/mL) 1 mL를 가하여 즉시 실리콘 캡으로 밀봉하여 vortex mixer로 5초간 교반하고 37 $^{\circ}$ C에서 6분간 incubate한 후 vial의 headspace에 유리된 methyl mercaptan을 (flame photometric detector : FPD) 가 장착된 GC에 gas tight syringe 50 μ L를 주입하여 분석하며, 이 때 구취억제활성은 다음 식에 의해 계산하였다.

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

C : control의 methyl mercaptan 피크 면적

S : 시료 첨가시의 methyl mercaptan 피크면적

2. 2. Gas chromatography

Methyl mercaptan의 분석을 위해 (flame photometric detector : FPD) 가 장착된 gas chromatography (Hewlett Packard 5890, series II)를 사용하였고, column은 HP-1 phase (25 m \times 0.2 mm \times 0.33 μ m)였으며 column temperature는 35 $^{\circ}$ C였고, injector temperature는 150 $^{\circ}$ C였으며 detector temperature는 200 $^{\circ}$ C였다. Carrier gas는 N₂를 1.45 mL/min의 유속으로 사용하였다.

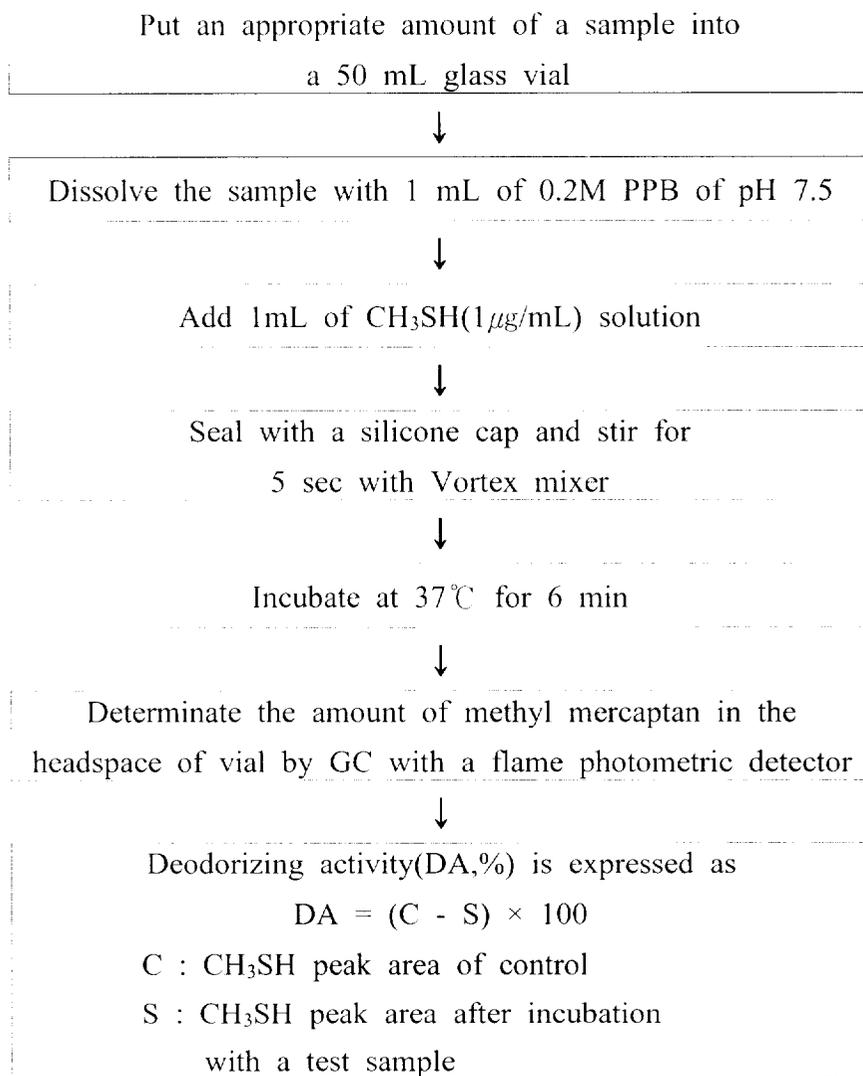


Fig. 1. Flow chart for the deodorizing assay.

2. 3. 포도 추출물의 건조방법

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

2. 4. 총페놀함량의 측정

총 페놀함량의 측정은, Folin-Denis방법(1985)을 이용하여 측정하였다. 시료 0.5 mL, Folin-Denis 시약 2.5 mL 및 포화 Na_2CO_3 5 mL을 가하여 50 mL 정용한 것을 18°C 에서 30분간 방치하여 760 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

2. 5. Polyphenol oxidase의 활성측정

Polyphenol oxidase의 활성은 Zenin et al.(1978)의 방법으로 하였다. catechol을 기질로 하여 420nm의 파장에서 흡광도의 증가를 이용하여 25°C 에서 측정하였다. 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.5)의 완충액에 0.1 M catechol 기질액을 제조하여 기질용액으로 사용하였다. 기질용액 2.7 mL에 0.3 mL의 효소액을 첨가하여 총 부피 3 mL의 반응액을 만들어 420nm파장에서 3분간 증가하는 흡광도의 양을 측정하여 polyphenol oxidase의 활성을 측정하였다. 효소활성의 1 unit은 25°C 에서 1분간 증가한 흡광도 0.001의 증가량을 효소의 활성단위로 계산하였다.

2. 6. 조효소액 추출

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

2. 7. Water soluble, ethanol soluble 및 methanol soluble의 제조

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

2. 8. 온도별 구취억제 활성 측정

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

2. 9. pH별 구취억제 활성 측정

pH별 시료의 구취억제 활성을 측정하기 위하여 6 N HCl, 0.5 N NaOH를 제조하여 각각의 시료에 제조한 시약을 마이크로 피펫을

이용하여 미량 첨가하여 각각의 pH를 조절하여 구취억제 활성을 측정하였다.

2. 10. 금속 이온 및 환원제 혼합비

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

결과 및 고찰

1. 포도의 조건별 구취억제 특성

1. 1. 부위별 구취억제 활성 및 추출물의 수율

Table 1은 포도의 부위별 구취억제 활성을 측정한 것이다. 포도를 과피와 과육으로 나누어 각각의 구취억제 활성을 측정하였으며, 포도의 과피와 과육 전체를 거르로 착즙한 후 남은 섬유질에 대한 구취억제 활성도 측정해 보았다. 구취억제 활성의 경우, 과피가 80.2%의 구취억제 활성을 보였으나 수율의 경우는 24.6%로 가장 낮게 나타났으며 water soluble의 경우 구취억제 활성은 73.7%였으나 수율이 81.7%로 가장 높게 나타났다. 따라서 산업적으로 이용되기 위해서는 추출물이 가장 유용함을 본 실험을 통하여 알 수 있었다. 또한 포도의 가공 공장에서 부산물로 생산되는 과피도 구취억제 소재로 효율적인 이용이 가능하리라 판단된다. Shimizu(2001)는 cacao의 껍질과 과육 추출물에 대한 구취억제 활성을 측정한 결과, 50%의 ethanol 추출물을 이용하여 추출한 cacao의 껍질에서 높은 구취억제 활성을 나타낸다고 보고하였다.

1. 2. Total polyphenol 함량

포도 (Campbell)를 과피와 과육으로 나누어 균질화 시켜 각각의 total polyphenol 함량을 측정한 결과를 Table 2에 나타내었다. 실험 결과, 과피가 332 mg, 과육이 214 mg으로 과피가 과육보다 높은 페놀함량을 보였다.

Table 1. Deodorizing activities against methyl mercaptan and yields of extracts according to a part of grape

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

**Sixty milligrams of samples were used.*

Table 2. Total polyphenol contents according to the part of grape

Samples	Total polyphenol (mg/100g, dry basis)
Pericarp	332
Flesh	214
Total	518

1. 3. 추출조건별 구취억제 소재의 구취억제 특성

포도의 추출 조건별 구취억제 활성 및 수율을 측정하기 위해 water soluble, ethanol soluble, methanol soluble을 제조하여 Table 3에 나타내었다. 제조된 각각의 조건별 구취억제 활성 및 수율을 측정한 결과, 구취억제 활성은 3가지 조건 모두 구취억제 활성의 차이가 크지 않았으나, 수율은 water soluble이 가장 높게 나타났다. 이 (2000)는 해조류 추출물의 구취억제 활성 검색에서 수율의 경우 극성도가 높아질수록 수율도 높아지는 경향을 나타내며, 물 추출물이 가장 높은 수율을 나타내었으며, 구취억제 활성은 water, acetone, ethanol, methanol, ethyl acetate를 이용한 추출물에서 높은 구취억제 활성을 나타낸다고 보고하였다.

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

2. 구취억제 소재 제조시의 영향 인자의 특성 구명

2. 1. 온도

포도의 water soluble을 이용하여 온도별 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과, 온도가 높을수록 구취억제 활성은 점차 감소하는 경향을 보였다. Wissemann and Lee(1981)는 포도의 polyphenol oxidase 활성의 최적 온도를 25℃ 라고 하였는데, 이와 어느 정도 일치하는 결과를 나타내고 있으며, polyphenol oxidase

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

Treatment condition	Deodorizing activity (%) [*]	Yield (%)
Water solubles	73.7±1.9	81.7±4.5
Ethanol solubles	68.6±1.0	39.1±2.4
Methanol solubles	77.8±1.9	48.1±3.1

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

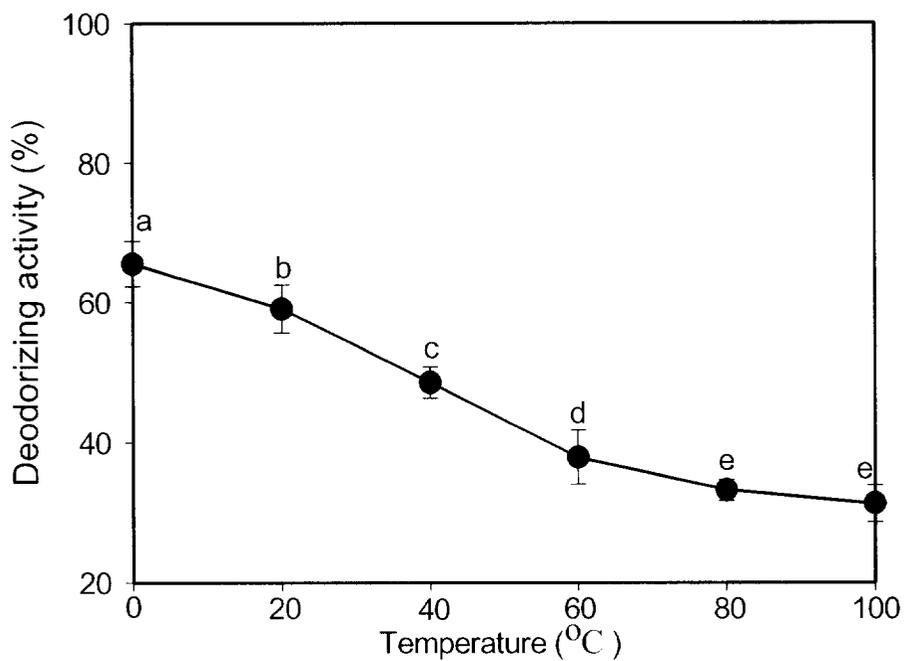


Fig. 2. Effect of temperature on deodorizing activity against methyl mercaptan of grape water solubles.

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

Sixty milligrams of grape water solubles were used.

의 최적 온도와 같은 20℃ 이하의 온도에서 구취억제 활성도 높게 나타났다.

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

2. 2. pH

포도를 상온에서 pH 별로 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. pH 실험의 결과 포도는 pH 3.5에서 구취억제 활성이 가장 높았으며, 폭넓은 pH의 범위에서도 활성을 유지하였다. 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 보고하였는데 이는 본 실험과 약간의 상이한 결과를 보였으며, 이는 과실의 종류와 품종의 차이에서 오는 결과라고 생각된다. 실제로 포도의 water soluble을 만들어 pH를 측정해 보면 포도는 pH 3.3으로 나타났으며 이는 Jane et al.(2002)의 결과와 일치한다. 본 실험에서는, 포도의 water soluble 자체가 가지고 있는 pH의 구취억제 활성과 큰 차이가 없기 때문에 포도의 구취억제 소재 제조시, pH의 조작보다는 시료 자체의 pH에서 소재를 제조하는 것이 유용하다고 판단된다.

2. 3. 가공처리 방법

포도를 열풍건조, 동결건조, 분무건조 및 열탕 등의 가공방법을

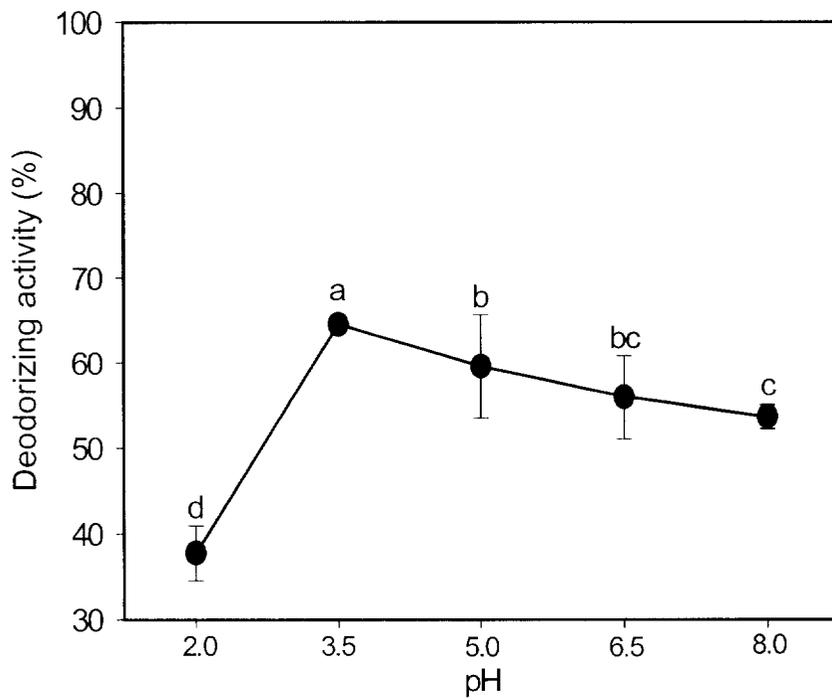


Fig. 3. Effect of pH on deodorizing activity against methyl mercaptan of grape water solubles.

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

Sixty milligrams of grape water solubles were used.

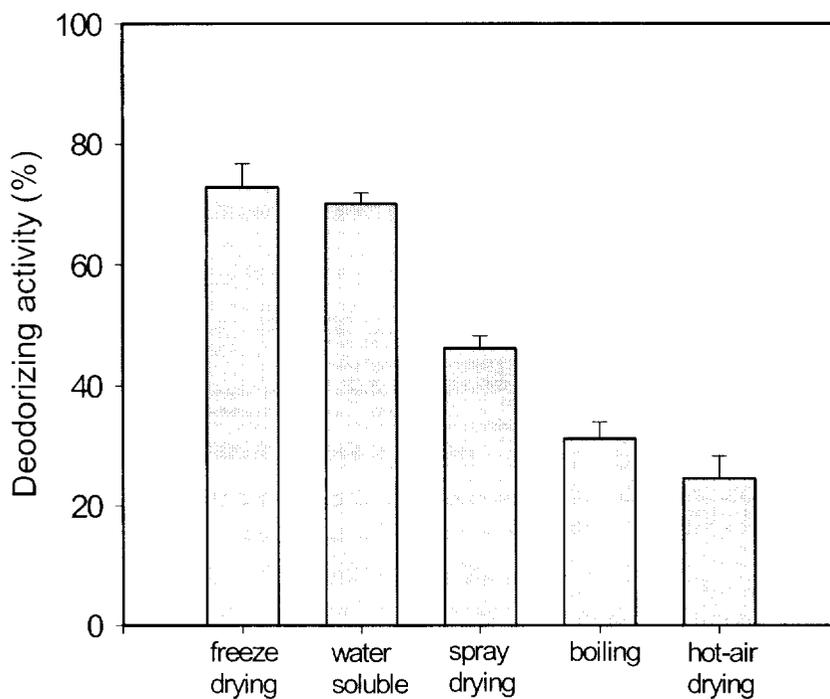


Fig. 4. Deodorizing activities of grape water solubles against methyl mercaptan on processing methods.

Sixty milligrams of grape water solubles were used.

이용하여 시료를 제조하여 구취억제 활성을 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 동결건조 소재의 구취억제 활성이 72.85%로 가장 높게 나타났으며, water soluble과 비교하였을 때 가장 비슷하게 나타났다. 나머지 가공조건인 spray drying, boiling 및 hot-air drying의 경우 모두 구취억제 활성이 46.23%, 31.27 및 24.58%로 동결건조보다 낮게 나타났다.

그러므로, 동결건조가 구취억제 소재 제조를 위한 최적의 가공 조건임을 본 실험을 통해 알 수 있었다.

3. 포도 구취억제 소재의 기작 구명

3. 1. 금속 및 환원제의 영향

포도에서 얻은 구취억제 소재의 작용기작을 구명하기 위하여 먼저 금속 및 환원제의 영향을 검토하여 Fig. 5에 나타내었다. 포도 물 추출물에 질소를 처리한 경우 control과 비교하였을 때, 구취억제 활성의 감소가 적었는데, 이는 소재 중의 phenol이 polyphenol oxidase 및 산화인자 등에 의하여 어느 정도 산화된 상태로 존재하여 산소의 영향을 적게 받았기 때문으로 판단된다. 금속 첨가의 경우 Cu^{2+} 를 첨가하였을 때 사과와 마찬가지로 구취억제 활성이 크게 증가하였으나, Fe^{2+} 나 Ca^{2+} 등은 구취억제 활성을 저해하는 것으로 나타났다. Chung 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 의해서 저해작용을 나타낸다고 보고하였다. Cu는 소재 중의 polyphenol oxidase를 활성화시켜

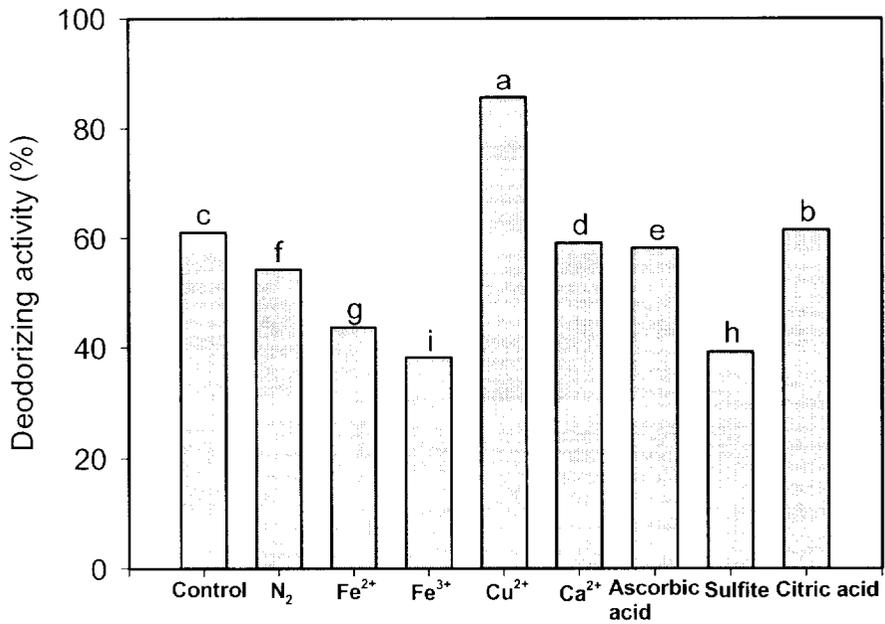


Fig. 5. Effect of metal ions and reducing agents on deodorizing activity against methyl mercaptan of grape water solubles.

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

phenol의 산화를 유도하였기 때문으로 판단되며, Fe^{2+} 나 Ca^{2+} 는 phenol의 산화나 polyphenol oxidase의 활성화보다는 phenol 및 phenol 산화물과의 반응으로 구취억제 활성을 감소시키는 것으로 판단된다. 환원제 처리의 경우는 control과 비교하였을 때, sulfite의 경우는 구취억제 활성이 감소하였으나 ascorbic acid와 citric acid는 구취억제 감소에 별다른 영향을 미치지 않았다. 이는 페놀의 산화에 따른 포도 흑분의 특성 때문이라 생각되어진다. Mcevity et al.(1992)는 polyphenol oxidase의 산화작용에서 O_2 에 의해 산화되어 *o*-quinone으로 되며 이러한 작용은 ascorbic acid와 sulfites와 같은 환원제에 의하여 저해된다고 하였다.

3. 2. 효소 및 페놀의 영향

포도로부터 페놀 흑분 및 polyphenol oxidase를 제조하여 구취억제 활성에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 6-7에 나타내었다.

포도로부터 추출된 페놀 흑분과 polyphenol oxidase를 비교하였을 때 페놀 흑분 단독보다는 페놀 흑분과 polyphenol oxidase의 혼합물이 구취억제 활성이 높게 나왔으며, 페놀 흑분, polyphenol oxidase 및 Cu 이온을 첨가한 실험구에서 구취억제 활성이 페놀 흑분만을 첨가한 실험구보다 높게 나타났다. 그리고 ascorbic acid를 첨가한 경우에는 금속의 산화작용을 억제하여 감소하는 경향을 나타내었다.

모델 페놀 물질을 사용한 경우는 chlorogenic acid 단독은 구취억제 활성이 낮으나 polyphenol oxidase 및 Cu이온을 첨가한 경우는

구취억제 활성이 크게 증가하였다. 이는 소재 제조시 시료 중에 함유된 polyphenol oxidase나 금속이온, 산소 등에 의해서 소재 중의 페놀이 어느 정도 산화된 형태로 존재하기 때문으로 판단된다.

조(2002)는 사과추출물을 이용한 구취억제 활성 실험에서 chlorogenic acid에 Cu^{2+} 를 첨가한 경우 93.5%의 구취억제 작용을 나타내었다고 하였으며, 이는 본 실험과 부합하는 결과이다.

3. 3. 구취억제 소재의 억제 기작

포도로부터 제조한 구취억제 소재가 나타나는 구취억제 기작은, 소재중의 페놀화합물 및 polyphenol oxidase와 금속 등에 의하여 quinone 등의 페놀산화물이 methyl mercaptan과 반응하기 때문인 것으로 판단되는데(Yasuda et al., 1995), 이는 polyphenol oxidase의 산화작용과 밀접한 연관이 있는 것으로 판단된다. 즉, mono-hydroxyphenol을 dihydroxyphenol로 수화시키는 반응으로부터 생성된 hydroxyquinone이 중합반응을 일으켜 최종반응 생성물로 적색과 적갈색의 중합체인 melanin이 생성되며(Oh et al., 1988), 이 과정에서 휘발성이 강한 methyl mercaptan이 비휘발성으로 전환되어 구취억제 작용을 일으키는 것으로 보인다. 또한, 소재 중의 페놀성분이 충치균의 증식을 억제함으로써 미생물에 의해 methyl mercaptan의 생성의 억제도 구취억제에 기여할 것으로 판단된다.

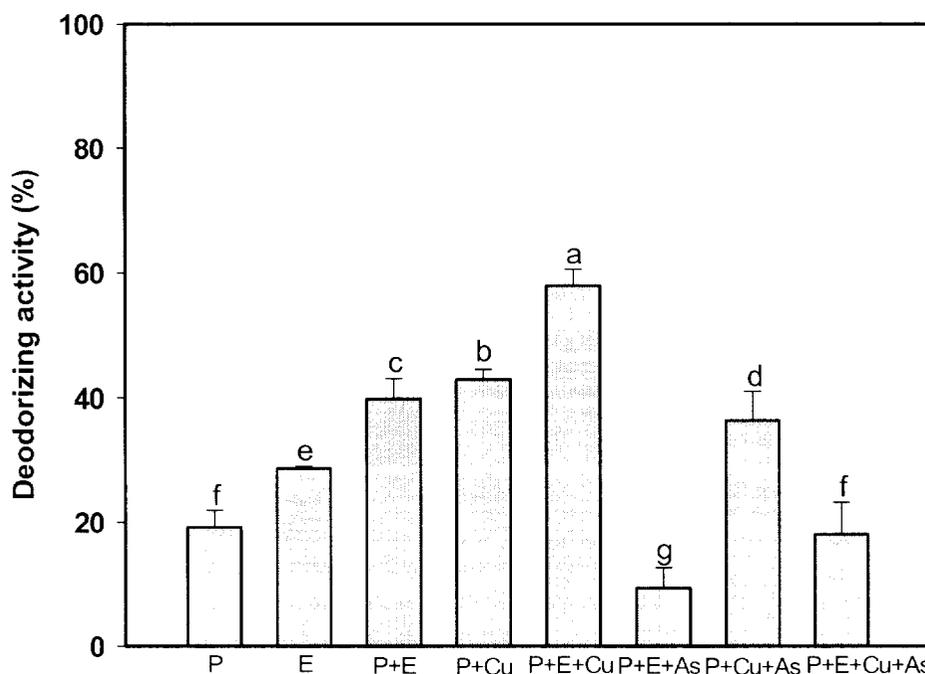


Fig. 6. Effect of metal and ascorbic acid on deodorizing activity against methyl mercaptan of grape water extract and polyphenol oxidase from grape.

(P: grape water extract, E: polyphenol oxidase, Cu: copper, As: ascorbic acid).

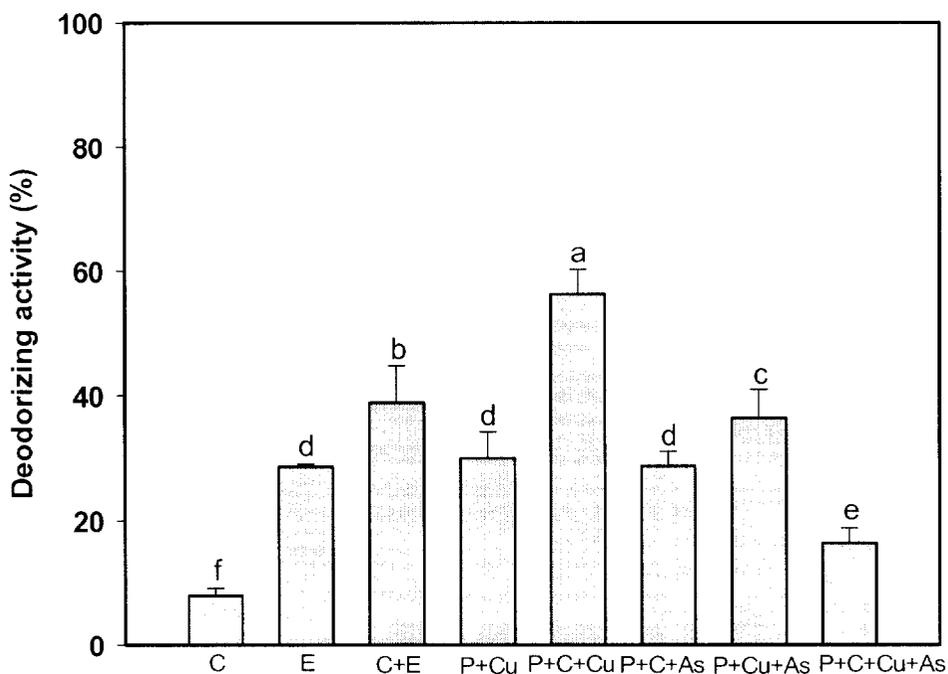


Fig. 7. Effect of metal, ascorbic acid and polyphenol oxidase from grape on deodorizing activity against methyl mercaptan of authentic chlorogenic acid.

Different letters indicate significant differences at $p=0.05$. Sixty milligrams of grape water solubles were used.

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

요 약

본 연구는 포도를 원료로 한 구취억제 기능성 소재 제조 신기술 개발 및 산업화에 있으며 이를 위하여 구취억제 유효획분의 검색, 최대 기능 발현 조건 검토, 구취억제 소재의 추출, 제조 기술 개발, 구취억제 기능성 소재의 산업적 생산기술 개발, 포도의 적극적인 유효이용기술 개발로 고부가가치화에 기여하며, 입냄새에 대한 사회적인 관심이 높으므로 구취억제용 천연 기능성 소재를 포도를 원료로 하여 제조하여 포도의 구취억제 기능성에 대한 체계적 구명과 가공기술 개발로 과채류 재배농가의 안정적 소득 증대에 기여하는데 있다.

포도를 과피와 과육으로 나누어 부위별로 구취억제 활성을 측정하였다. 포도를 각각 과피와 과육으로 분리하여 균질화시킨 후 구취억제 활성을 측정한 결과 과육보다는 과피에서 구취억제 활성이 높게 나타났다. 부위별 구취억제 활성과 마찬가지로 총페놀함량도 과육보다는 과피에서 높아 구취억제 활성과 총페놀함량과의 상관관계가 있음을 알 수 있었다. 또한 포도 가공 공장에서 부산물로 생성되는 과피도 구취억제 소재로 효율적인 이용이 가능하리라 판단된다.

추출조건에 따른 구취억제율 및 수율을 측정하기 위해 water soluble, ethanol soluble, methanol soluble을 제조하였다. 제조된 각각

의 조건별로 구취억제 활성 및 수율을 측정한 결과, 추출 조건별 구취억제활성 결과 추출용매에 따른 구취억제 활성의 차이는 크지 않았으나 수율은 water soluble이 높게 나타났다. 따라서 구취억제 활성과 경제성을 고려할 때 water soluble이 구취억제 소재의 제조시 가장 적합한 것으로 판단된다.

구취억제 소재 제조시 영향인자의 특성 구명을 위해 온도, pH, 가공처리 조건별 구취억제 활성을 측정한 결과 20℃까지는 구취억제 활성의 차이가 적었으나 온도의 증가와 더불어 구취억제 활성이 감소하는 경향을 나타내었으며 pH는 포도의 원래 pH인 3.3이 적당하며, 구취억제 소재의 경우 식품 및 약품에 첨가되기 때문에 저장 및 사용편이성을 위해 분말화 및 열처리가 필요하므로 구취억제율 저하를 최소화 할 수 있는 가공처리 방법을 검토한 결과 동결건조가 가장 적당한 것으로 나타났다.

포도의 구취억제 기작에 영향을 미치는 인자들을 세부적으로 알아보기 위하여 water soluble에 질소, 금속 및 환원제를 25℃에서 30분간 처리하여 구취억제 활성을 알아보았다. Water soluble에 질소를 처리한 경우 모든 시료에서 구취억제 활성의 감소가 적었으며, 금속 첨가의 경우 Cu를 첨가하였을 때 구취억제 활성이 크게 증가하였으나, Fe나 Ca등은 구취억제 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 환원제 처리의 경우 구취억제 활성이 감소하였는데 이는 구취억제에 필요한 polyphenol 산화물의 생성을 억제하기 때문으로 판단된다.

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

참고문헌

AOAC. 1985. Official methods of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C.

Chung, H.Y., and S.J. Yoon. 2002. Antioxidant activity of grape seed ethanol extract. *Korean J. Food Sci Nutr.* 31(5), 893-898.

Choi, E.H., D.S. Jung, N.S. Cho and Y.H. Shim. 1987. Characteristics and inhibition of polyphenol oxidase from fuji apples. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 3, 278~284.

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.

Jang, J.K. and J.Y. Han. 2002. The antioxidant ability of grape seed extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34(3), 121-124.

Kida, K., Suzuki, M., Takagaki, A. and Nanjo, F. 2002. Deodorizing effects of tea catechins on amines and ammonia. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 66(2), 373~377.

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

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

Lowry, O.H., N. Rosenbrough, A.L. Far and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Negishi, O., Y. Negishi, Y. Aoyagi, T. Sugahara and T. Ozawa. 2001. Mercaptan capturing properties of mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5509~5514.

Negishi, O. and T. Ozawa. 1997. Effect of polyphenol oxidase on deodorization. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61(12), 2080~2084.

Oh, M.J., W.Y. Lee and K.S. Lee. 1988. Purification and some properties of polyphenol oxidase from arrowroot. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 31(4), 331~338.

Park, S.J. and D.H. Oh. 2003. Free radical scavenging effect of seed skin extracts of black Olympia grape. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35, 121-124.

Shimizu, K., Y. Maeda, K. Osawa and S. Shimura. 2000. Deodorizing effect of cacao polyphenols against methyl mercaptan. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 48(4), 238~245.

Schmidt, N. F and W. J. Tarbet. 1978. The effect of oral rinses on organoleptic mouth odor ratings and levels of volatile sulfur compounds. *Oral Surg.*, 45, 876~884.

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 V. J. Richer. 1964. Evaluation of volatile odoriferous components of saliva. *Arch. Oral Biol.*, 9, 39~45.

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

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

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.

Zenin, C. T., and Y.K. Park. 1978. Isoenzyme of polyphenol oxidase from high L-DOPA containing velvet bean. *Journal of Food Science*, 43, 646-651.

장영운. 2000. 구취. *경희의학*, 16(1), 1~3.

이재명, 임성빈, 정진형, 홍기석. 2004. 치주질환 치료 후 구취감소에 대한 연구. *대한치주과학회지*, 34(2), 449~459.

이두석. 2000. 해조류 추출물의 구취억제 효과 및 산업적 이용. 부경대학교 대학원 박사학위논문.

조상원. 2002. 사과 추출물의 구취억제효과. 부경대학교 대학원 석사학위논문.

신의철. 2004. 사과, 포도 및 상추 polyphenol oxidase의 정제 및 특성. 부경대학교 대학원 석사학위논문

감사의 글

본 논문이 마무리 되는 이 시점에서 부족한 논문이 완성되기 까지 도움을 주신 분들께 지면으로나마 감사의 인사를 올리고자 합니다.

먼저 지난 2년간 많이 부족한 저를 이끌어주시고 지도해 주신 이양봉 교수님께 감사의 인사를 올립니다. 본 논문이 완성되기까지 변함없는 모습으로 지도와 조언을 아끼지 않으셨던 김선봉 교수님, 양지영 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 대학원 생활을 하면서 많은 관심과 지도로 이끌어 주신 박희열 교수님, 장동석 교수님, 이근태 교수님, 조영제 교수님, 전병수 교수님, 안동현 교수님, 박미연 교수님께도 깊이 감사드립니다. 학부과정 동안, 늘 사랑으로 이끌어 주시고 격려해주신 서재수 교수님, 강진훈 교수님, 이정숙 교수님, 류은순 교수님, 정동관 교수님께도 깊은 감사의 인사를 드립니다.

오륙도가 창밖으로 보이는 고신대 식품화학 실험실에서 같이 동거동락 하며, 즐겁게 지냈던 실험실 후배인 정보, 황보 정, 길순, 유미, 세영 그리고 일일이 다 기록하지는 못하였지만, 졸업한 선배들과 지금 현재 실험실을 지키고 있는 후배들에게도 감사의 인사를 드립니다.

대학원 2년간 같이 실험실에서 밤낮으로 같이하며 함께했던 식품생화학 실험실원들에게도 감사드립니다. 졸업하여 이제 사회에서 각자의 분야에서 열심히 살고 계신 해룡 선배님, 종필 선배님, 미정 선배님, 현창 선배님, 봉수 선배님, 그리고 같이 대학원에 입학하여 함께한 실장 해진이와 이제 막 졸업하여 자신들의 길을 개척하며 열심히 살고 있는 신조, 은주, 의철, 나연, 영순, 영랑, 혜진이를 비롯하여 이번에 졸업하는 상훈, 창봉, 이제 실험실에 들어온지 얼마 되지 않았지만 잘 적응하고 있는 수은, 은혜, 상철, 미주, 미라, 세원이 에게 늘 신의 은총이 함께 하시길 기도합니다.

그리고 산업대학원을 졸업하신 김민지 선생님, 교육대학원 김주일 선생님, 김채경 선생님, 박사과정에 있는 이광수 선생님, 김경보 선생님, 언련누나, 선성누나, 호수형, 비영누나에게도 감사합니다. 같이 있어 즐거웠습니다. 식사과정을 1년간이었지만, 많은 도움을 받았으며 즐거움을 함께했던 성구형, 찬웅이, 형섭이, 승목형, 주현형 에게도 감사드립니다. 늘 긍정적으로 사시는 모습들 보기 좋습니다. 그리고 대학원에 같이 입학하여 함께했던 동기들 현덕형, 진한, 상준, 성진, 해경, 미경, 보미에게도 감사드리며, 1년이었지만 같이 수업을 들으면서 정이 많이 들었던 후배 재희, 선미, 유진, 진욱, 정은, 권혁, 호진, 지연, 진규, 선희 에게도 감사의 인사를 드립니다. 남은 기간동안 잘 할 수 있을 겁니다.

논문을 마무리 지으면서 인사하였지만, 많이 격려해 주시고 배려해 주신, 한국식품연구원 쌀 연구단의 이현유 박사님, 금준석 박사님, 박종대 박사님, 봉규형, 상하씨, 현주씨에게도 감사드립니다.

그리고 어려울 때 마다 많은 조언을 해주시고 격려를 아끼지 않았던 한국기독교학생회(IVF) 지성근, 윤재두, 박철진 간사님께도 감사드립니다. 언제나 감사했습니다. 그리고 함께 있어 언제나 든든하고 즐거웠던 벗인 상철형, 영훈형, 준섭형, 성흠형, 한신형, 광욱형, 언정누나, 경희누나, 미순누나, 현식, 근우, 병근, 상연, 희성, 재숙, 정주, 혜영에게도 감사합니다. 그리고 복상모임 식구들 김기현 목사님, 혜윤 누님, 무영, 지혜, 세인, 도훈 등에게도 감사합니다. 같이 고민하고 토론하며 즐거운 시간이었습니다.

그리고 무엇보다도 저를 낳아주시고 지금까지 저를 기르다고 고생하신 부모님께 감사하다는 말을 하고 싶습니다. 당신들이 있었기에 오늘날 제가 있는 것 같습니다. 앞으로도 최선을 다할게요, 그리고 누나에게도 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 늘 고마웠어^^

마지막으로 나의 등 뒤에서 언제나 나와 함께 하시며, 보이지 않지만

늘 지켜주시고 어려울 때 떠나 늘 새로운 길을 내어 주시고 격려해 주시
는 하나님 감사합니다. 앞으로 남은 인생동안 늘 지켜주시고 바른 길로
살 수 있도록 인도해 주세요.

2005년 1월

허민수