

사과 추출물의 구취억제효과에 대한 Polyphenol Oxidase의 영향

- 연구노트 -

조상원 · 광기석 · 이주항 · 윤영수 · 구연숙 · 지청일 · 이두석* · 이양봉 · 김선봉[†]

부경대학교 식품생명공학부

*국립수산진흥원

The Effect of Polyphenol Oxidase on Deodorizing Activity of Apple Extract against Methyl Mercaptan

Sang-Won Cho, Ki-Suk Kwak, Joo-Hang Lee, Young-Soo Yun, Yeun-Suk Gu,
Cheong-Il Ji, Doo-Seog Lee*, Yang-Bong Lee and Seon-Bong Kim[†]

Faculty of Food and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

*National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

Abstract

Deodorizing activity of polyphenol oxidase (PPO) extracted from apples was investigated by measuring the changes of methyl mercaptan as an indicator of halitosis in human mouths. In the studies of apple extracts on deodorizing activity, the deodorizing activity was increased with the amount of apple extracts. In the cases of adding PPO to the low molecular fraction of apple extracts, the deodorizing activities were increased with the amount of the low molecular fraction of apple extracts and the reaction time of the extracts with PPO. Deodorizing activities of PPO is thought that *o*-quinone as an intermediate produced by an oxidative reaction of PPO during enzymatic browning reactions may react with methyl mercaptan to form a non-volatile and sulfur-containing compound.

Key words: deodorizing activity, halitosis, methyl mercaptan, apple, polyphenol oxidase

서 론

일상생활에서 구강내 담배 냄새, 마늘 냄새, 술 냄새로 고민한다거나 혹은 타인에게서 발생하는 구취 때문에 불편한 경험을 당한 적이 적지 않다. 이러한 구취는 식생활의 다양화, 스트레스의 증대 혹은 구강 내의 질환에 의해 점점 증가하고 있으며 사회적으로나 구강학적으로도 경시할 수 없는 문제로 대두되고 있다.

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(1,2).

구취억제에 관한 연구를 보면, 녹차 추출물의 주성분인 epigallocatechin gallate(EGCg)이 구취억제 효과가 뛰어나 현재 캔디나 껌의 제조시에 사용되고 있다(3,4). EGCg의 methyl mercaptan에 대한 구취억제활성은 EGCg가 산화되어

생성되는 *o*-quinone이 methyl mercaptan의 thiol group과 반응하여 methyl mercaptan을 비휘발성으로 전환시키기 때문이다(5). 이 이외에 식물 flavonoid, 향신료 및 장미과 식물 등에 구취억제 효과가 있다고 보고되고 있다(6-10). 또한 Lee 등은(11-14) 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 구취억제 효과 및 대황 추출물이 *Streptococcus mutans*의 증식과 glucosyltransferase 활성에 미치는 영향을 보고하였다.

한편 과실 및 채소류에 널리 분포되어있는 polyphenol oxidase(PPO)는 polyphenol을 기질로 하여 갈변 중간체로 *o*-quinone을 생성하는 것으로 알려져 있으나 이들에 대한 구취억제활성에 관한 연구는 전무한 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 우리나라에서 많이 섭취되고 있는 과실류의 하나인 사과 추출물의 구취억제효과에 대한 polyphenol oxidase(PPO)의 영향을 알아보았다.

[†]Corresponding author. E-mail: owlkim@pknu.ac.kr
Phone: 82-51-620-6418, Fax: 82-51-626-8494

재료 및 방법

재료

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

효소의 추출

효소액의 추출은 Flurkey와 Jen(15)의 방법으로 하였다. 즉 사과육 200 g에 -23°C acetone 300 mL를 첨가하여 2분간 균질화시킨 후 Whatman #1여지를 사용하여 감압여과하였다. 그리고 잔사에 -23°C acetone 150 mL를 첨가하여 재추출 후 Whatman #1여지를 사용하여 감압여과하였다. 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°C에서 30분간 교반하였다. 이것을 4°C, 10,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액을 glass wool를 사용하여 여과하였다. 이 여액을 효소액으로 하여 본 실험에 사용하였다.

사과 추출물의 분획

사과육 300 g을 착즙한 후 여액의 ethanol 최종농도가 80% 되게 하여 4°C에서 2시간 방치하였다. 이것을 4°C, 3000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액인 저분자 획분과 침전물인 고분자 획분을 분리한 후 각 획분을 동결건조하여 -80°C에 보관하여 사용하였다.

Methyl mercaptan 표준액의 조제

Methyl mercaptan 표준액(1 µg/µL in benzene; Wako Pure Chem., Osaka, Japan) 2 mL를 198 mL ethanol 용액에 용해시켜 4°C에 냉장 보관하였다. 그리고 구취억제활성 측정시 이 표준액을 증류수로 10배 희석(1 µg/mL)하여 사용하였다.

구취억제활성 측정

구취억제활성 측정은 Tokita 등(16)의 방법으로 하였다. 즉, 시료 일정량과 0.2 M potassium phosphate buffer 1 mL를 내용량 30 mL의 vial에 넣고 pH를 7.5로 조절하였다. 여기에 methyl mercaptan 표준액(1 µg/mL) 1 mL를 첨가 후 실리콘 캡으로 밀봉하여 5초간 교반하고 37°C에서 6분간 반응시켰다. 이 반응액의 headspace에 유리된 methyl mercaptan을 FPD(flame photometric detector)가 장착된 GC로서 분석하였으며, 구취억제활성은 시료 첨가 전후 methyl mercaptan의 감소량으로 나타내었다.

결과 및 고찰

사과추출물의 구취억제효과

사과를 착즙하여 구취억제용 표준시액인 methyl mercaptan에 대한 억제활성을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 사과 추출물의 농도가 증가함에 따라 구취억제활성은 증

가하는 경향을 나타내었으며, 10 mg/mL 첨가의 경우 73.5%의 구취억제활성을 나타내었다. Lee 등(11)은 시판 상업용 구강세정액에서 구취억제 및 향균 유효성분인 sodium fluoride, cetylpyridinium chloride, benzethonium 등의 methyl mercaptan에 대한 구취억제활성이 5 mg/mL의 농도에서 50% 이하라고 보고하였다.

사과 추출물의 획분별 구취억제효과에 대한 효소의 영향

사과의 구취억제인자를 추정하기 위하여 사과 추출물의 저분자획분(상층액)과 고분자획분(잔사)으로 나누어서, 여기에 사과로부터 추출한 PPO를 첨가하여 구취억제 효과와 갈변도를 Fig. 2와 Fig. 3에 각각 나타내었다.

PPO를 첨가한 저분자획분은 대조군과 비교하여 농도를 증가함에 따라 구취억제활성이 증가하는 경향을 나타내었지

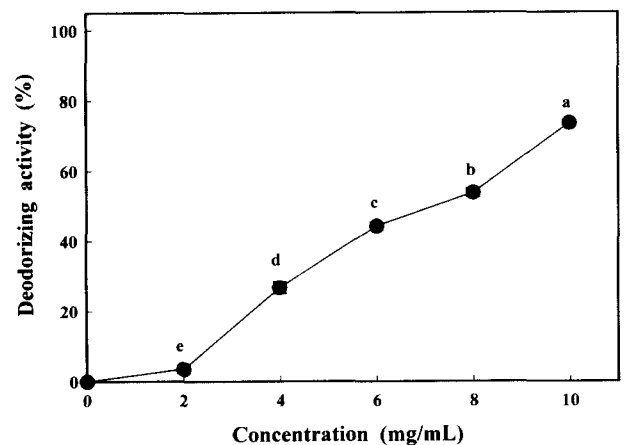


Fig. 1. Effect of the concentration of an apple extract on deodorizing activity.

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

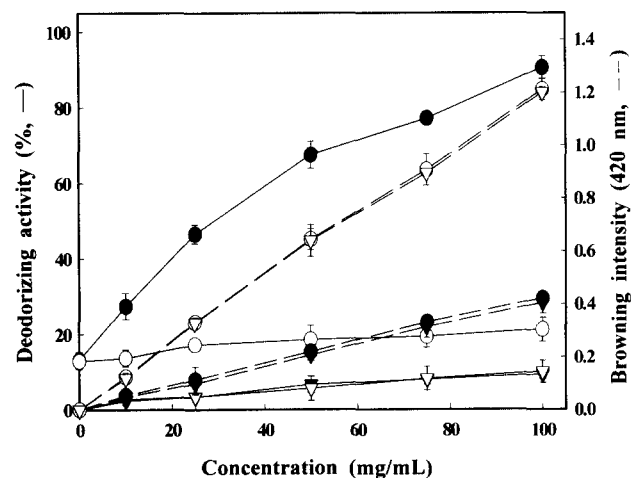


Fig. 2. Deodorizing activity and browning intensity of the added PPO on the concentration of supernatant and residue by 80% ethanol treatment of apple extract.

●: PPO-added supernatant, ○: PPO-added residue, ▼: supernatant without adding PPO, ▽: residue without adding PPO.

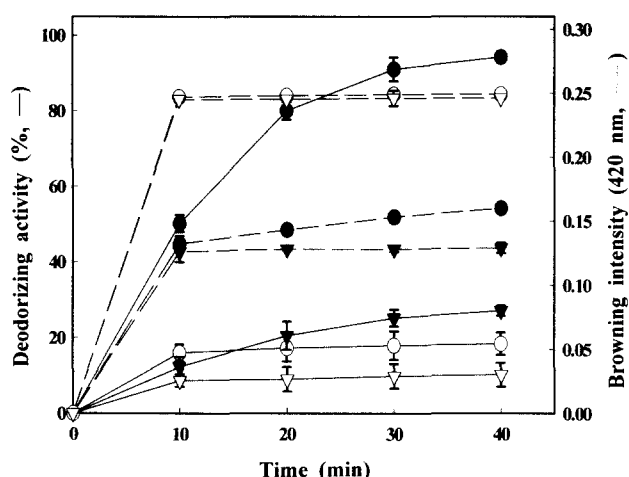


Fig. 3. Effect of reaction time of PPO on deodorizing activity and browning intensity in supernatant and residue by 80% ethanol treatment of apple extract.

●: PPO-added supernatant, ○: PPO-added residue, ▼: supernatant without adding PPO, ▽: residue without adding PPO.

만, 고분자획분의 경우는 농도를 증가시켜도 구취억제활성은 변화가 거의 없었다($p < 0.05$). 이상의 결과는 저분자획분에 PPO의 기질로 이용되는 페놀화합물이 존재하지만 고분자획분에는 이러한 phenol화합물이 존재하지 않기 때문이라고 생각된다. 사과에 존재하는 phenol화합물에는 chlorogenic acid, catechin, procyanidin B2, procyanidin C1, phloridzin, l-epicatechin, phloretin xyloglucoside 등이 있다고 보고되었다(17). 갈변도의 경우 대조군과 PPO 첨가군의 유의적인 차이는 없었다($p < 0.05$). 페놀화합물이 존재하는 저분자획분에 PPO를 첨가시 갈변이 진행되지 않은 것은 methyl mercaptan의 thiol기가 갈변을 억제시킨 것으로 생각된다. 사과의 구취억제효과는 사과에서 추출한 PPO와 상층액으로부터 얻어지는 저분자획분인 phenol화합물과 반응하여 구취억제효과를 나타내는 것으로 추측된다.

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

이상의 결과를 통해 사과의 구취억제효과는 사과에서 추출한 PPO의 갈변반응시 중간체로 생성되는 *o*-quinone이 methyl mercaptan과 결합하여 methyl mercaptan을 비휘발성으로 전환시키는 것으로 추측된다. Yasuda와 Arakawa(5)는 EGCG의 methyl mercaptan에 대한 구취억제작용이 EGCG가 산화되어 생성되는 *o*-quinone이 methyl mercaptan의 thiol group과 반응하여 methyl mercaptan을 비휘발성으로 전환시키는 것이라고 보고하였다.

요 약

본 연구는 사과의 구취억제인자를 구명하기 위한 기초자

료로서 사과 추출물의 획분에 따른 사과에서 추출한 PPO의 methyl mercaptan에 대한 구취억제활성을 조사하였다. 사과를 착즙하여 구취억제활성을 측정해 본 결과, 사과 고형분의 농도가 증가함에 따라 구취억제활성이 증가하는 경향을 나타내었다. 사과의 저분자획분에 PPO를 첨가한 경우, 저분자획분의 농도증가 및 반응시간에 따른 methyl mercaptan에 대한 구취억제활성이 증가하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과는 사과에서 추출한 PPO에 의한 갈변반응의 중간체로 생성되는 *o*-quinone이 methyl mercaptan과 결합하여 methyl mercaptan을 비휘발성으로 전환시켜 구취억제활성을 나타내는 것으로 생각된다.

문 헌

1. Tonzetich, J. and Richter, V.J. : Evaluation of volatile odoriferous components of saliva. *Archs oral Biol.*, **9**, 39-45 (1964)
2. Tsunoda, M. : Analysis of fetor ex ore by gas chromatography. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*, **17**, 1-13 (1975)
3. Sato, Y., Terazawa, M. and Ishikawa, M. : Deodorant gums containing green tea flavonoids. *Shokuhinkogyo*, **27**, 42-48 (1984)
4. Suzuki, S., Moroe, M. and Uchida, Y. : Green tea flavonoids. *Shokuhinkogyo*, **26**, 57-65 (1983)
5. Yasuda, H. and Arakawa, T. : Deodorizing mechanism of (-)-epigallocatechin gallate against methyl mercaptan. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1232-1236 (1995)
6. Kaji, T. : Analysis of volatile sulphur compounds in mouth air by gas chromatography. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*, **18**, 1-12 (1976)
7. Tokita, F., Ishikawa, M., Shibuya, K., Koshimizu, M. and Abe, R. : Deodorizing activity of some plant extracts against methyl mercaptan. *Nippon Nögeikagaku Kaishi*, **58**, 585-589 (1984)
8. Urabe, K., Nadamoto, T., Kawamura, M. and Yasumoto, K. : Deodorization activity of wild grasses against methyl mercaptan. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **46**, 484-486 (1999)
9. Miura, K., Inagaki, T. and Nakatani, N. : Structure and activity of new deodorant biphenyl compounds from Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1816-1819 (1989)
10. Yasuda, H. and Ui, M. : Deodorant effect of plant extracts of the family Rosaceae against methyl mercaptan. *Nippon Nögeikagaku Kaishi*, **66**, 1475-1479 (1992)
11. Lee, D.S., Kim, S.B., Kim, T.J., Kim, J.H., Ji, C.I. and Park, J.H. : Deodorant effect of marine algae extracts on halitosis. *Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korea*, **57**, 195-201 (1999)
12. Lee, D.S., Kim, S.B., Kim, T.J., Min, J.G., Kim, J.H. and Park, J.H. : Factors of why *Eisenia bicyclis* extracts counteract halitosis. *Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korea*, **58**, 163-167 (2000)
13. Lee, D.S., Kim, S.B., Kim, T.J., Min, J.G., Kim, J.H. and Park, J.H. : Efficacy of deodorant products containing *Eisenia bicyclis* extracts on halitosis. *Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korea*, **58**, 168-174 (2000)
14. Lee, D.S., Kim, T.J., Kim, J.H., Kim, S.B., Cho, S.W., Lim, C.W. and Min, J.G. : Effect of *Eisenia bicyclis* extracts on the growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus mutans*. *Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korea*, **59**, 171-

- 176 (2001)
15. Flurkey, W.H. and Jen, J.J. : Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *J. Food Sci.*, **43**, 1826-1828 (1978)
16. Tokita, F., Ishikawa, M., Shibuya, K., Koshimizu, M. and Abe, R. : Deodorizing activity of some plant extracts against methyl mercaptan. *Nippon Nôgeikagaku Kaishi*, **58** 585-589 (1984)
17. Wieslaw, O., Lee, C.Y., Jaworski, A.W. and Price, K.R. : Identification of some phenolic compounds in apple. *J. Agric. Food Chem.*, **236**, 430-432 (1988)

(2001년 9월 29일 접수)