

## 석류추출액의 청징화를 위한 효소처리조건 최적화

김성호<sup>1</sup> · 김인호<sup>2</sup> · 차태양<sup>2</sup> · 강복희<sup>2</sup> · 이진형 · 김종명 · 송경식<sup>3</sup> · 송방호<sup>4</sup> · 김종국 · 이진만<sup>1,\*</sup>

경북대학교 미생물학과, <sup>1</sup>경북과학대학 약용식품과/바이오건강산업연구소, <sup>2</sup>경북과학대학/바이오건강산업연구소  
<sup>3</sup>경북대학교 농업생명과학대학, <sup>4</sup>경북대학교 생물교육과

## Optimization of Enzyme Treatment Condition for Clarification of Pomegranate Extract

Seong-Ho Kim<sup>1</sup>, In-Ho Kim<sup>2</sup>, Tae-Yang Cha<sup>2</sup>, Bok-Hee Kang<sup>2</sup>, Jin-Hyung Lee, Jong Myung Kim, Kyung-Sik Song<sup>3</sup>, Bang-Ho Song<sup>4</sup>, Jong-Guk Kim and Jin-Man Lee<sup>1,\*</sup>

Department of Microbiology, Kyungpook National University, 702-701, Daegu Korea

<sup>1</sup>Department of Herb & Food Science, Kyungpook College of Science, Chilgok 718-851, Korea

<sup>2</sup>Bio-Health Industrial Institute, Kyungpook College of Science, Chilgok 718-851, Korea

<sup>3</sup>College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, 702-701, Daegu Korea

<sup>4</sup>Department of Biology Education, Kyungpook National University, 702-701, Daegu Korea

Received July 6, 2005; Accepted September 2, 2005

Response surface methodology was used to investigate clarification characteristics (turbidity, brown color, soluble solid, total sugar and reducing sugar) of enzyme in pomegranate extract. Enzyme was treated at 16 conditions including independent variables of temperature (35~55°C), time (30~70 min) and concentration (0.02~0.10%) based on central composition design. Turbidity was decreased with increase of enzyme concentration, and the minimum value of turbidity was 0.04 (OD) when 0.08% enzyme was treated at 37.99°C for 60.90 min. Total sugar was affected by all treatment conditions and the maximum value was 8.37% when 0.03% enzyme was treated at 39.28°C for 42.04 min. Reducing sugar and soluble solid were largely affected by enzyme concentration, and the maximum value of reducing sugar was 7.22% when 0.02% enzyme was treated at 42.96°C for 46.21 min. The maximum value of soluble solid was 8.13% when 0.02% enzyme was treated at 46.91°C for 42.13 min.

**Key words:** pomegranate, enzyme, clarification, turbidity, RSM

### 서 론

석류는 Punicaceae과에 속하며 생과실로 소비되거나 주스, 잼, 시럽 및 주류로 가공되어 이용되기도 한다.<sup>1)</sup> 또한 석류추출액은 항균성, 항바이러스 작용, 항암작용 등이 보고된 바 있으며 anthocyanin과 phenol 화합물 등을 포함한 플라보노이드 성분이 풍부한 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 국내에서의 석류관련연구로는 심<sup>3)</sup> 등이 석류추출성분의 암세포 증식억제에 관한 효과를 보고하였으며, 이<sup>4)</sup> 등이 석류과실의 성숙에 따른 당, 산 및 polyphenol 성분 등의 변화를 보고한 것 외엔 거의 전무한 실정이다. 또한 석류피의 항균작용에 관한 연구로는 *in vitro*에서의 미생물 생육억제효과 및 병원성 virus fungi의 항균작용에 대한 보고가 있다.<sup>5-6)</sup>

최근 건강에 대한 관심의 증가 및 석류의 기능성에 대한 인식이 확대됨에 따라 석류과실에 대한 소비의 급증과 더불어 석류를 이용한 기능성식품개발이 확대되고 있으며, 이러한 흐름에 따라 석류과실즙의 이용을 위한 보다 많은 연구개발이 요구되고 있는 실정이다. 과실 주스 제조시 과실 중의 pectin질에 의해 가공과정 중 압착이 곤란하며 수량이 낮아지거나 제품이 혼탁되는 여러 문제가 발생한다. 이러한 어려움을 해결하기 위해 특히 과실주스의 효소 청징화에 널리 사용되고 있는 펙틴분해효소 등은 사과주스 등의 청징과정에서 여과수율을 높이며 청징화에 효과적인 것으로 알려져 있다.<sup>7-9)</sup> 효소처리에 의한 청징관련 연구로는 손<sup>10)</sup> 등이 효소처리조건에 따른 혼합과채주스의 청징에 관한 보고와, 허<sup>11)</sup> 등이 보고한 polygalacturonase와 젤라틴을 병용하여 과실주스의 청징화에 관한 연구 및 정<sup>12)</sup> 등에 의한 pectinase를 이용한 감식초 청징화가 시도된 바 있다.

따라서 본 연구에서는 석류의 기능성 음료제조시 기초자료 확보를 위해 과실주스의 청징화에 널리 사용되고 있는 효소를

\*Corresponding author

Phone: +82-54-972-9543; Fax: +82-54-979-9220

E-mail: jmlee@kbc.ac.kr

이용하여 석류추출액의 청징특성을 중심합성계획법에 의한 반응표면분석법으로 살펴보고자 한다.

### 재료 및 방법

**재료.** 국내산 석류는 2002년 9월부터 11월 초순까지 대구 및 경북 일대 농가에서 수확된 것을 직접 구매하여 냉동보관하면서 시료로 사용하였고, 파쇄 후 100°C에서 4시간 열수 추출하여 부직포로 여과(10 brix<sup>o</sup>)한 것을 생석류추출액으로 하였다. 효소는 pectinase를 함유한 복합효소로서 비전바이오캠(주)에서 생산되는 RAPIDASE PRESS(pectinase and hemicellulase)를 이용하였다.

**석류추출액에 대한 효소처리 실험계획.** 효소처리조건에 따른 석류추출액의 청징화 특성을 알아보기 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)<sup>13)</sup>을 사용하였으며, 효소처리조건에 대한 실험계획은 중심합성계획에 따라 Table 1과 같이 효소처리온도(35, 40, 45, 50, 55°C), 처리시간(30, 40, 50, 60, 70 min) 및 효소농도(0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10%)를 독립변수로 하여 총 16구로 설정한 후 실험을 수행하였다. 독립변수인 온도(X<sub>1</sub>), 시간(X<sub>2</sub>) 및 농도(X<sub>3</sub>)에 영향을 받는 종속변수로는 탁도(Y<sub>1</sub>), 갈색도(Y<sub>2</sub>), 가용성 고형분 함량(Y<sub>3</sub>), 총당(Y<sub>4</sub>) 및 환원당 함량(Y<sub>5</sub>)을 측정하여 이들 값을 SAS 프로그램을 이용하여 회귀분석하였다. 또한 효소처리조건이 석류추출액의 청

징특성에 미치는 영향을 알아보기 위해 예측된 모델식을 바탕으로 Mathematica program<sup>14)</sup>을 이용하여 4차원 반응표면분석으로 해석하였다.

#### 효소처리액의 청징특성 시험

**탁도 및 갈색도.** 탁도는 일정량의 시료를 spectrophotometer (Shimadzu UV-1601 PC, Japan)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 갈색도는 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>12)</sup>

**가용성 고형분.** 가용성 고형분의 함량은 시료용액 20 mL를 지방항량플라스크에 취하여 105°C에서 증발 건조 후 그 무게를 측정하였으며 추출물에 사용된 원료량에 대한 백분율로써 나타내었다.<sup>15)</sup>

**총당 함량.** 총당 함량은 phenol-sulfuric acid법<sup>16)</sup>을 이용하여 정량하였다. 석류추출액 2 mL에 70% ethanol 용액 98 mL를 가하여 100°C에서 1시간 추출한 후 Whatman No. 2로 여과한 것을 시료용액으로 사용하였다. 적절히 희석한 검액 1 mL에 5% 페놀 1 mL를 가한 다음 진한 황산 5 mL를 가하여 혼합하고 30°C에서 30분간 방치 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**환원당 함량.** 효소를 처리한 석류추출액의 환원당 함량은 dinitrosalicylic acid에 의한 비색법<sup>17)</sup>으로 spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 검액 대신 증류수를 넣어 동일하게 처리하였고, 표준물질로는 glucose를 100~500 µg/mL의 농도로 조제하여 검량선 작성에 이용하였다.

Table 1. Level in enzyme treatment condition of pomegranate extract

Treatment conditions	-2	-1	0	1	2
X <sub>1</sub> Treatment temp. (°C)	35	40	45	50	55
X <sub>2</sub> Treatment time (min)	30	40	50	60	70
X <sub>3</sub> Enzyme concentration (%)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10

Table 2. Experimental data on turbidity, brown color, soluble solid, total sugar and reducing sugar of pomegranate extract on enzyme treatment

Exp. No.	Enzyme treatment conditions <sup>a)</sup>			Turbidity (OD)	Brown color (OD)	Soluble solid (%)	Total sugar (%)	Reducing sugar (%)
	Temp. (°C)	Time (min)	Enzyme conc. (%)					
1	50	60	0.08	0.090	0.400	7.65	6.31	5.23
2	50	60	0.04	0.152	0.469	7.76	6.98	6.48
3	50	40	0.08	0.088	0.404	6.96	5.74	5.22
4	50	40	0.04	0.086	0.453	7.85	5.79	5.29
5	40	60	0.08	0.064	0.396	7.47	5.82	5.22
6	40	60	0.04	0.099	0.435	7.81	6.28	5.51
7	40	40	0.04	0.098	0.473	7.75	8.04	7.00
8	40	40	0.04	0.107	0.476	7.79	8.07	7.05
9	45	50	0.06	0.086	0.405	7.62	6.41	5.79
10	45	50	0.06	0.076	0.409	7.65	6.88	5.85
11	55	50	0.06	0.094	0.430	7.85	6.35	5.42
12	35	50	0.06	0.063	0.428	7.38	6.76	5.28
13	45	70	0.06	0.096	0.443	7.26	6.23	5.24
14	45	30	0.06	0.067	0.437	7.44	6.06	5.71
15	45	50	0.10	0.069	0.399	6.93	6.13	5.43
16	45	50	0.02	0.151	0.548	8.02	8.22	7.30

<sup>a)</sup>The number of experimental conditions by central composite design

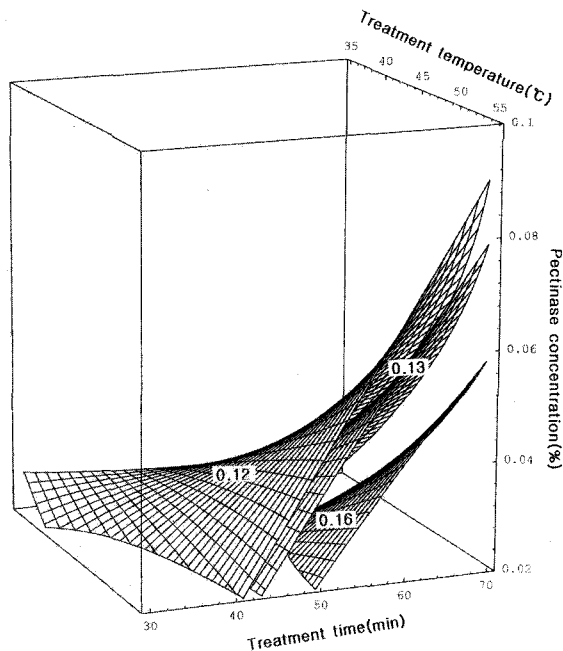


Fig. 1. Response surface for turbidity of pomegranate extract at constant values (turbidity: 0.12, 0.13, 0.16 OD) as conditions of treatment temperature, time and enzyme concentration.

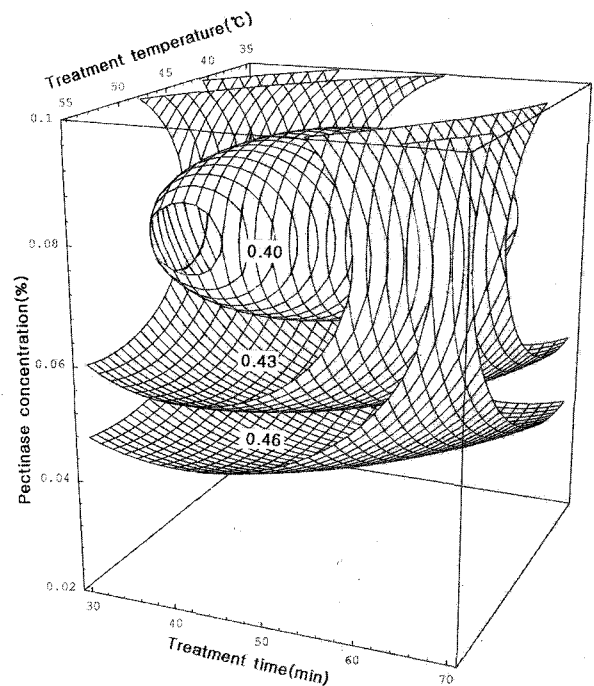


Fig. 2. Response surface for brown color of pomegranate extract at constant values (brown color: 0.40, 0.43, 0.46 OD) as conditions of treatment temperature, time and enzyme concentration.

## 결 과

**탁도.** 과실 추출액으로 음료의 제조시 혼탁 및 침전으로 인해 발생하는 품질변화는 소비자의 기호도를 저하시키며 유통 및 저장시 문제가 되고 있다. 따라서, 이러한 혼탁생성의 원인을 예방할 수 있는 방법을 연구개발하여 식품산업 현장에 적용하는 것은 매우 중요하다 할 수 있다. 석류추출액의 청징화를 위하여 효소를 조건에 따라 다르게 처리한 결과는 Table 2와 같다. 처리조건에 따라 탁도값이 0.063에서 0.152의 범위로 나타났으며, 반응표면에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.9220이었고 5% 이내에서 유의성이 인정되었다. 탁도의 최소값은 0.04로 예측되었으며 이 때의 효소처리조건은 온도 37.99°C, 시간 60.90분 및 농도 0.08%로 나타났다. 탁도에 대한 효소처리조건의 영향은 Fig. 1과 같이 첨가한 효소의 농도가 높을수록 탁도가 낮아지

는 경향을 나타내었다. 또한 Table 3에서와 같이 효소의 농도에 많은 영향을 받고 있었으며 1% 이내의 범위에서 유의성이 인정되었다. 이는 정<sup>12)</sup> 등의 pectinase 처리에 의한 감식초청징 연구에서 탁도는 온도나 pectinase 농도 보다는 시간에 영향을 많이 받는 것과는 다른 경향을 나타내었다.

**갈색도.** 생석류추출액의 청징화를 위해 효소를 처리한 후 나타난 갈색도의 변화는 Fig. 2와 같다. 효소처리조건에 대한 석류추출액의 갈색도에 대한  $R^2$ 는 0.9575로 1% 이내의 범위에서 유의성이 인정되었다. 처리조건에 따라 예측된 정상점은 최소점으로 최소값은 0.39이었으며 이 때의 조건은 온도 45.47°C, 시간 50.68분 및 농도 0.08%이었다. 처리조건에 대한 갈색도의 변화는 Fig. 2와 같이 효소의 농도가 높을수록 낮아졌으며, Table 4에서와 같이 효소의 농도에 의해 가장 많은 영향을 받

Table 3. Polynomial equations calculated by RSM program of turbidity, brown color, soluble solid, total sugar and reducing sugar of pomegranate extract on enzyme treatment condition

Response	Second order polynomials <sup>a)</sup>	R <sup>2</sup>	Significance
Turbidity (OD)	$Y_{TB} = 0.441000 - 0.007758X_1 - 0.007083X_2 - 0.991667X_3 - 0.000025000X_1^2 + 0.000228X_2X_1 + 0.000001250X_2^2 + 0.003333X_3X_1 - 0.044583X_3X_2 + 18.125000X_3^2$	0.9220	0.0103
Brown color (OD)	$Y_{BC} = 1.639596 - 0.027012X_1 - 0.016372X_2 - 5.603526X_3 + 0.000220X_1^2 + 0.000175X_2X_1 + 0.000082500X_2^2 - 0.023141X_3X_1 + 0.000929X_3X_2 + 41.562500X_3^2$	0.9575	0.0018
Soluble solid (%)	$Y_{SS} = 7.529423 + 0.025388X_1 + 0.031123X_2 - 43.570513X_3 - 0.000200X_1^2 + 0.000016026X_2X_1 - 0.000713X_2^2 + 0.112179X_3X_1 + 0.743590X_3X_2 - 100.000000X_3^2$	0.8698	0.0414
Total sugar (%)	$Y_{TS} = 36.085000 - 0.612000X_1 - 0.404375X_2 - 135.000000X_3 - 0.000900X_1^2 + 0.011400X_2X_1 - 0.001250X_2^2 + 1.425000X_3X_1 + 0.200000X_3X_2 + 331.250000X_3^2$	0.9118	0.0145
Reducing sugar (%)	$Y_{RS} = 19.011154 - 0.075526X_1 - 0.341747X_2 - 50.733974X_3 - 0.004700X_1^2 + 0.009518X_2X_1 - 0.000862X_2^2 + 0.050641X_3X_1 - 0.249679X_3X_2 + 340.625000X_3^2$	0.9003	0.0203

<sup>a)</sup>X<sub>1</sub>: Temperature (°C), X<sub>2</sub>: Time (min), X<sub>3</sub>: Enzyme concentration (%)

**Table 4.** Regression analysis for regression model of turbidity, brown color, soluble solid, total sugar and reducing sugar of pomegranate extract for enzyme treatment condition

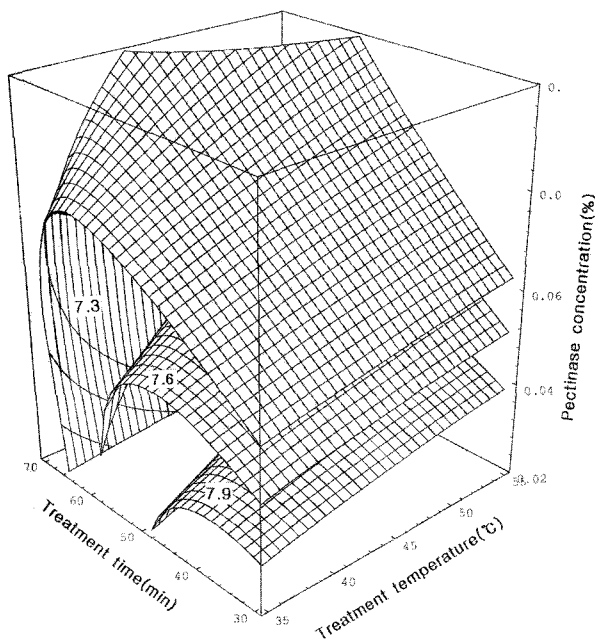
Extraction conditions	F-Ratio				
	Turbidity (OD)	Brown color (OD)	Soluble solid (%)	Total sugar (%)	Reducing sugar (%)
X <sub>1</sub> Treatment temp. (°C)	3.80*	1.48	0.64	5.63**	3.66*
X <sub>2</sub> Treatment time (hr)	3.79*	2.48	1.96	4.56**	3.48*
X <sub>3</sub> Enzyme concentration (%)	11.88***	29.36***	8.63***	4.84**	5.19**

\*Significant at 10% level, \*\*Significant at 5% level, \*\*\*Significant at 1% level

**Table 5.** Predicted level of treatment conditions for the minimum responses of variables by the ridge analysis

Responses	X <sub>1</sub> <sup>a)</sup>	X <sub>2</sub> <sup>b)</sup>	X <sub>3</sub> <sup>c)</sup>	Estimated responses	Morphology
Turbidity (OD)	37.99	60.90	0.08	0.04 (min)	saddle
	47.90	59.35	0.03	0.17 (max)	
Brown color (OD)	45.47	50.68	0.08	0.39 (min)	minimum
	45.63	49.58	0.02	0.53 (max)	
Soluble solid (%)	43.74	37.66	0.09	6.64 (min)	saddle
	39.94	43.03	0.03	8.13 (max)	
Total sugar (%)	51.77	35.55	0.07	4.89 (min)	saddle
	46.91	42.13	0.02	8.11 (max)	
Reducing sugar (%)	38.63	64.60	0.07	4.28 (min)	saddle
	42.96	46.21	0.02	7.22 (max)	

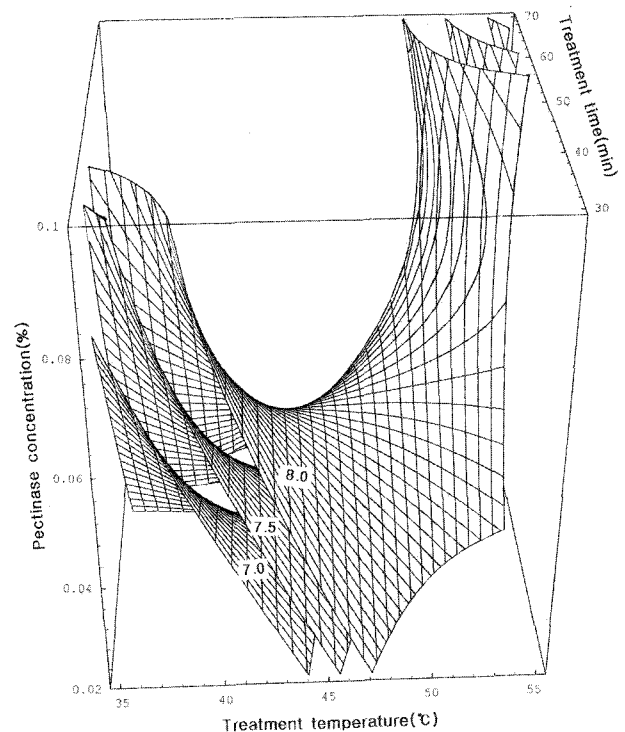
<sup>a)</sup>Temperature (°C), <sup>b)</sup>Time (min), <sup>c)</sup>Enzyme concentration (%)



**Fig. 3.** Response surface for soluble solid of pomegranate extract at constant values (soluble solid: 7.3, 7.6, 7.9 %) as conditions of treatment temperature, time and enzyme concentration.

고 있음을 알 수 있었다.

**가용성 고형분 함량.** 효소처리조건별 석류추출액의 가용성 고형분 함량 변화는 Table 2와 같다. 가용성 고형분의 함량은 조건에 따라 6.93~8.02%로 나타났으며, 반응표면에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup>는 0.8698이었고 5% 이내에서 유의성이 인정되었다. 고형분 함량의 최대값은 8.13%로 예측되었으며 이 때의 효소처리조건은 온도 39.94°C, 시간 43.03분 및 농도 0.03%로 나타났다. 가용성 고형분 함량에 대한 효소처리조건에의 영향은 Fig. 3



**Fig. 4.** Response surface for total sugar of pomegranate extract at constant values (total sugar: 7.0, 7.5, 8.0 %) as conditions of treatment temperature, time and enzyme concentration.

과 같이 효소의 농도가 낮을수록 높아지는 것으로 나타났다. 이는 탁도와는 반대의 경향성을 나타내어 효소처리가 생석류추출액의 고형분 감소에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

**총당 함량.** 석류추출액에 효소를 조건에 따라 다르게 처리한 결과 총당함량 변화에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup>는 0.9118이었고 유의

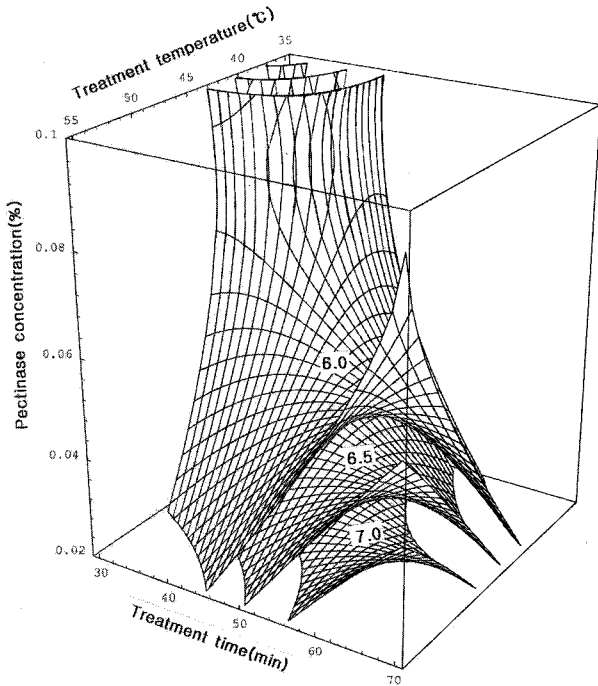


Fig. 5. Response surface for reducing sugar of pomegranate extract at constant values (total sugar: 6.0, 6.5, 7.0 %) as conditions of treatment temperature, time and enzyme concentration.

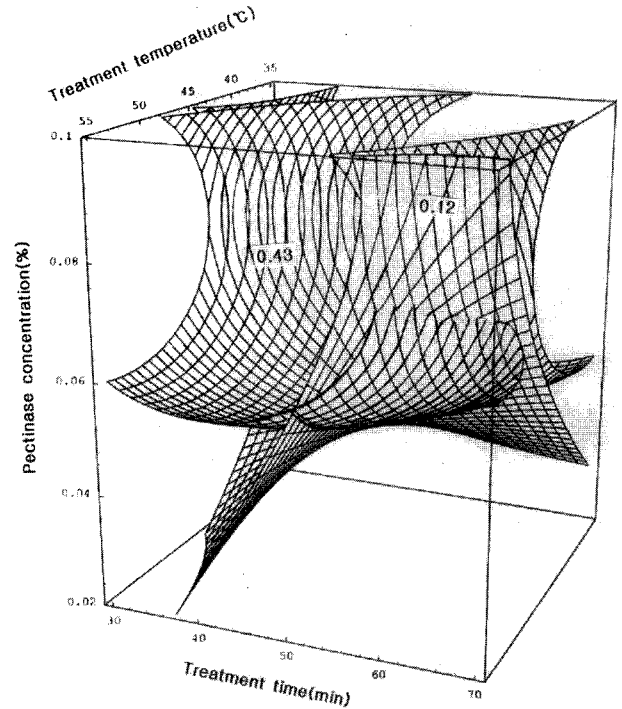


Fig. 6. Superimposed response surface for optimization of turbidity (0.12 OD) and brown color (0.43 OD) in clarification of pomegranate extract by enzyme.

성은 5%이내의 수준에서 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 실시하여 본 결과 최대값은 8.11%로 나타났다. 이 때의 처리조건은 Table 5에서와 같이 온도 46.91°C, 시간 42.13분 및 농도 0.02%이었다. 총당 함량은 Fig. 4와 같이 효소농도, 온도 및 시간 모두에 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 청징효과를 높임에 따라 총당함량은 다소 낮아지는 것으로 나타나 탁도는 감소하면서 기타성분의 함량은 높일 수 있는 효소반응 조건의 최적점을 찾는 것이 좋을 것으로 사료된다.

**환원당 함량.** 중심합성계획에 의한 각각의 처리조건에 따른 환원당 함량의 변화는 Table 2에 나타내었고, 그 결과에 대한 회귀식은 Table 3과 같다. 효소처리조건에 대한 석류추출액의 환원당 함량의 변화에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup>는 0.9003이었으며 1% 이내의 수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점이었으며 능선분석을 실시한 결과 최대값은 7.22%로 나타났다. Fig. 5에서와 같이 추출온도가 높고 효소의 농도가 낮으며 처리시간이 길수록 환원당 함량이 높게 나타났으며 온도와 시간보다는 효소의 농도에 보다 많은 영향을 받고 있는 것으로 나타났다.

**효소처리조건 최적화.** 석류추출액의 청징화를 위한 효소처리 조건 최적화를 위하여 청징효과에 큰 영향을 미치는 값인 탁도와 갈색도가 모두 낮은 최소점을 구하고자 4차원 반응표면을 그려 본 결과 Fig. 6과 같이 나타났다. 탁도가 낮으면서 갈색도가 낮은 조건을 만족시켜주는 효소처리 조건은 온도 45~50°C, 시간 50~60분 및 효소농도 0.06~0.08%로 나타났으며(Table 6), 이 범위내의 임의의 조건(온도 50°C, 시간 60분 및 농도 0.07%)에서의 탁도는 0.098(O.D)로 예측되었으며, 효소를 처리한 석류추출액의 저장에 따른 변화와 효소처리에 의한 관능적

Table 6. The range of optimum condition for minimum response variables by superimposing response surfaces of turbidity and brown color of pomegranate extract for enzyme treatment condition

Enzyme treatment condition	Range of predicted condition
Temperature (°C)	45~50
Time (hr)	50~60
Concentration (%)	0.06~0.08

특성 등 품질특성의 변화에 대하여 추후 연구되어질 필요성이 있는 것으로 사료된다.

초 록

효소처리조건에 따른 석류추출액의 청징화특성을 조사하기 위하여 효소반응온도(35~55°C), 시간(30~70분) 및 농도(0.02~0.10%)를 중심합성계획법에 의한 16개 구간으로 설정하여 탁도, 갈색도, 가용성 고형분 함량, 총당 및 환원당 함량 등을 반응 표면분석법으로 모니터링하였다. 탁도는 주로 효소반응시간에 의하여 영향을 받고 있었으며, 처리온도 37.99°C, 처리시간 60.90분, 효소농도 0.08%일 때 탁도의 최소값이 0.04(O.D)로 나타났다. 갈색도는 효소농도에 가장 많은 영향을 받는 것으로 나타났으며, 처리온도와 처리시간에 대해서는 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며, 총당의 함량은 처리온도, 처리시간, 효소농도에 대해 모두 영향을 받고 있었으며, 처리온도 39.28°C, 처리시간 42.04분, 효소농도 0.03%일 때 최대값 8.37%을 나타내었다. 환원당 및 고형분 함량의 경우 효소농도에 가장 많은 영향을 받고 있었으며, 환원당은 처리온도 42.96°C, 처리시간 46.21분, 효소농도 0.02%일 때 최대값 7.22%를 나타내었고, 고

형분 함량은 처리온도 46.91°C, 처리시간 42.13분, 효소농도 0.02%일 때 최대값 8.13%으로 나타났다. 각 변수에 대한 회귀식을 구한 후 탁도 및 갈색도의 최소값에 대한 최적효소처리조건을 superimposing 한 결과 효소처리 조건은 온도 45~50°C, 시간 50~60분 및 농도 0.06~0.08%이었다.

**Key words:** 석류, 효소, 청징, 탁도, 반응표면분석

## 문헌

1. Lee, J. H., Kim, S. D., Lee, J. Y., Kim, K. N. and Kim, H. S. (2005) Analysis of flavonoids in concentrated pomegranate extracts by HPLC with diode array detection. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 171-174.
2. Kim, N. B., Mehta, R., Yu, W., Neeman, I., Livney, T., Amichay, A., Poirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W., Mansel, R., Ramachandran, C., Rabi, T., Kaplan, B. and Lansky, E. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **71**, 203-217.
3. Shim, S. M., Choi, S. W. and Bae, S. J. (2001) Effects of *Punica granatum* L. fractions on quinone reductase induction and growth inhibition on several cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 80-85.
4. Lee, S. W., Kim, K. S. and Kim, S. D. (1974) Studies on the compositional changes of pomegranate fruit during maturity (1) Changes in sugars, organic acids, amino acids and the amount of respiration. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **15**, 57-63.
5. Wynder, E. L. and Gori, G. B. (1977) Contribution of environment to cancer incidence: an epidemiologic exercise. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 825-832.
6. Wakabayashi, K., Nagao, M., Esuni, H. and Sugimura, T. (1992) Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res.* **52**, 2092-2096.
7. Kim, S. D., Park, N. S. and Kang, M. S. (1996) Softening related changes in cell wall polysaccharides of persimmon. *Korean J. Food Sci. Technol.* **18**, 158-167.
8. Ishii, S. and Yokotsuka, T. (1972) Clarification of fruit juice by pectin trans-eliminase. *J. Agric. Food Chem.* **20**, 787-791.
9. Nelson, P. E. and Tressler, D. K. (1980) In *Fruit and vegetable juice processing technology*. AVI Publishing Company, Westport, CT.
10. Sohn, K. S., Lee, J. H. and Ha, Y. S. (2002) Clarification of mixed fruit and vegetable juices using enzyme treatment. *Food engineering progress.* **6**, 214-247.
11. Hur, B. S. and Kim, Z. U. (1989) Clarification of fruit juice by the use of polygalacturonase and gelatin. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **32**, 367-373.
12. Jeong, Y. J., Lee, G. D., Lee, M. H., Yea, M. J., Lee, G. H. and Choi, S. Y. (1999) Monitoring on pectinase treatment conditions for clarification of persimmon vinegar. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 810-815.
13. Myers, R. H. (1971) In response surface methodology, Allyn and Bacon Inc., Boston pp. 127-139.
14. Martha, L. A. and James, P. B. (1992) In *The mathematica handbook*, Compatible with mathematica version 2.0, Academic press. Inc. Harcourt Brace & Co., Massachusetts. pp. 15-511.
15. Nam, K. J. (1995) Application to orange juice of prepared chitosan from red crab shell. M. S. Thesis, Gyeong-Sang University.
16. Dubois, M., Gillers, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, J. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal. Chem.* **28**, 350-352.
17. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.