

博士學位論文

감귤류 종자 추출물의 생리활성에
관한 연구



濟州大學校 大學院

食品工學科

吳 赫 洙

2003年 12月

博士學位論文

감귤류 종자 추출물의 생리활성에
관한 연구



濟州大學校 大學院

食品工學科

吳 赫 洙

2003年 12月

감귤류 종자 추출물의 생리활성에 관한 연구

指導教授 金 洙 賢

吳 赫 洙

이 論文을 工學 博士學位 論文으로 提出함

2003年 12月

吳赫洙의 工學 博士學位 論文을 認准함.



審査委員長 宋 大 鎮 印

委 員 成 洛 珠 印

委 員 河 璉 桓 印

委 員 高 榮 煥 印

委 員 金 洙 賢 印

濟州大學校 大學院

2003年 12月

Study on the Biological Activities of Extracts from Citrus Seeds

Hyuk-Su Oh

(Supervised by Professor Soo-Hyun Kim)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND ENGINEERING
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

DECEMBER 2003

목 차

Summary

I. 서 론	1
II. 연구사	4
1. 천연소재 중 생리활성물질	4
2. 식품 중의 돌연변이원 및 항돌연변이원성	5
3. 식품 중의 <i>N</i> -nitrosamine 생성 및 억제	8
4. 식품성분의 아질산염 소거	10
5. 식품의 항산화와 항균성	12
6. 감귤류의 생리활성	14
III. 재료 및 방법	16
1. 실험재료	16
1) 추출용 시료의 조제	16
2) 시료의 추출 및 조제	17
2. 시료의 일반성분 측정	18
3. 감귤종자 추출물의 고형분 함량 및 추출수율 측정	8
4. 감귤류 종자의 플라보노이드 및 총 페놀 함량	8
5. 감귤종자 추출물의 항돌연변이원성 검색	20
1) 표준돌연변이원	20
2) 시험균주	20
3) 균주의 동정	21

4) 균주의 보관 및 배양	23
5) 표준돌연변이원의 dose-response	24
6) Spot test	25
7) 항돌연변이원성 실험	25
6. 감귤종자 추출물의 NDMA 생성 억제 검색	26
7. 감귤종자 추출물의 아질산염 소거 실험	29
1) 시료의 추출 및 조제	29
2) 아질산염 소거실험	31
8. 감귤종자 추출물의 항균성	32
1) 시험균주	32
2) 항균성 검정	32
9. 감귤종자 추출물의 항산화 효과 검색	33
1) 전자공여능 측정	33
2) Hydroxyl radical 소거활성 측정	33
3) Hydrogen peroxide 소거활성 측정	34
4) Superoxide anion 소거활성 측정	34
IV. 결과 및 고찰	35
1. 감귤종자 추출물의 일반성분	35
2. 감귤종자 추출물의 고형분 함량 및 수율	37
3. 감귤종자 추출물의 플라보노이드 및 총 페놀함량	38
4. 표준돌연변이원의 dose-response	40
5. 감귤 종자 추출물의 (항)돌연변이원성	47

1) 감귤 종자 추출물의 돌연변이원성	47
2) 감귤 종자 추출물의 항돌연변이원성	49
(1) ICR-191에 유도된 TA97에 대한 항돌연변이원성	49
(2) NPD에 유도된 TA98과 TA100에 대한 항돌연변이원성	53
(3) 4-NQO에 유도된 TA100과 TA102에 대한 항돌연변이원성	53
6. 감귤종자 추출물의 NDMA 생성 억제 효과	55
7. 감귤종자 추출물이 아질산염의 소거에 미치는 영향	59
1) pH 1.2에서 아질산염 소거효과	59
2) pH 3.4에서 아질산염 소거효과	62
3) pH 6.0에서 아질산염 소거효과	65
8. 감귤종자 추출물의 항균활성	70
1) 세균 및 효모에 대한 감귤종자 추출물의 항균활성 효과	70
2) 식중독균에 대한 감귤종자 추출물의 항균활성 효과	73
9. 감귤종자 추출물의 항산화 효과	75
1) 전자공여 활성	75
2) Hydroxyl radical 소거활성	77
3) Hydrogen peroxide 소거활성	78
4) Superoxide anion 소거활성	80
V. 요약	82
참고문헌	84

List of Figures

- Fig. 1. Scheme for extraction of citrus seeds with methanol
- Fig. 2. Calibration curve of flavonoid(naringin)
- Fig. 3. Calibration curve of total phenolics(Folin-Dennis method).
- Fig. 4. Scheme for the preparation of N-nitrosamines for GC-TEA analysis
- Fig. 5. Scheme for extraction of citrus seeds with methanol
- Fig. 6. Dose-response of ICR-191 for *S. typhimurium* TA97 strains
- Fig. 7. Spot test of ICR-191 for *S. typhimurium* TA97 strain
- Fig. 8. Dose-response of NPD for *S. typhimurium* TA98 strains
- Fig. 9. Spot test of NPD for *S. typhimurium* TA98 strain
- Fig. 10. Dose-response of NPD for *S. typhimurium* TA100 strains
- Fig. 11. Spot test of NPD for *S. typhimurium* TA100 strain
- Fig. 12. Dose-response of 4-NQO for *S. typhimurium* TA100 strains
- Fig. 13. Spot test of 4-NQO for *S. typhimurium* TA100 strain
- Fig. 14. Dose-response of 4-NQO for *S. typhimurium* TA102 strains
- Fig. 15. Spot test of 4-NQO for *S. typhimurium* TA102 strain
- Fig. 16. GC-TEA chromatograms of N-nitrosamines
- Fig. 17. Antibacterial activities of citrus seed extracts

List of Table

- Table 1. Scientific name of citrus varieties
- Table 2. Genotype of the *S. typhimurium* TA strains used for mutation test
- Table 3. Conditions for GC-TEA analysis of *N*-nitrosamine
- Table 4. Proximate composition of citrus seeds(%)
- Table 5. Solid content and yield of methanol extracts from citrus seeds(%)
- Table 6. Content of flavonoid and total phenolics from citrus seeds
- Table 7. Mutagenic activity of different solvent extracts of citrus seeds
- Table 8. Antimutagenic effects forward ICR-191 with induce mutations of methanol extracts from citrus seeds
- Table 9. Antimutagenic effects forward NPD with induce mutations of methanol extracts from citrus seeds
- Table 10. Antimutagenic effects forward 4-NQO with induce mutations of methanol extracts from citrus seeds
- Table 11. Inhibition activity of citrus seeds Extracts Addition amount on NDMA formation
- Table 12. Nitrite scavenging effect of citrus seed extracts at pH 1.2 by reaction time and amount of addition
- Table 13. Nitrite scavenging effect of citrus seed extracts at pH 3.4 by reaction time and amount of addition
- Table 14. Nitrite scavenging effect of citrus seed extracts at pH 6.0 by reaction time and amount of addition

- Table 15. Antibacterial activities of citrus seed extract for bacterium and yeast
- Table 16. Antibacterial activities of citrus seed extract for food poisoning bacteria
- Table 17. The activity of DPPH radical scavenging from citrus seeds extract
- Table 18. The activity of Hydroxyl radical scavenging from citrus seeds extract
- Table 19. The activity of Hydrogen peroxide scavenging from citrus seeds extract
- Table 20. The activity of Superoxide anion scavenging from citrus seeds extract



Summary

The biological activities of methanol extracts from 9 kinds of Citrus Seeds (*Citrus obovoidea*, *Citrus grandis*, *Citrus sunki*, *Citrus sulcata*, *Citrus tangerina*, *Citrus natsudaidai*, *Citrus iyo*, *Citrus junos* and *Citrus aurantium*) were investigated.

1. The contents of moisture, crude protein, crude fat, carbohydrate, ash, flavonoid and total phenol in citrus seeds were 4~6, 12~15, 32~46, 22~45, 2~4%, 11~48mg% and 20~53mg%, respectively. The solid contents and yield of citrus seed extracts were 0.8~1.2 and 0.7~1.1%, respectively.

2. Antimutagenic effect of methanol extract from citrus seeds the mutation induced by ICR-191, NPD and 4-NQO using Ame's test were investigated. Methanol extract from citrus seeds showed more than 80% of the inhibitory effect against the mutation induced by ICR-191.

Methanol extract from citrus seeds showed the inhibitory effect against TA98 and TA100 induced by NPD. Especially, these extracts showed more than 90% of the inhibitory activities against TA98, but showed approximately 60% of the activities against TA100. Almost all of methanol extract from citrus seeds showed more than 80% of the inhibitory activities against TA100 and TA102 induced by 4-NQO.

3. The inhibition effect of NDMA formation by the citrus seed was strengthened as the amount of extract increased. The inhibition rate of methanol extracts from citrus seeds on NDMA formation showed 1.2~39.8%, 21.3~60.1% and 47.4~94.0%, according to add 1, 3 and 5

mL, respectively. Therefore, the inhibition effect of NDMA formation by the citrus seed was strengthened as the concentration of extract increased.

4. Nitrite-scavenging activity by methanol extracts from citrus seeds increased with increasing extract dosage. Furthermore, the nitrite scavenging activity was pH dependent being the highest at pH 1.2 (42.7~96.9%) and the lowest at pH 6.0 (19.9~62.6%). Scavenging effects of nitrite by reaction time showed high effects under 3hr reaction time.

5. Almost all of the methanol extracts from citrus seeds exhibited growth inhibiting activities for most of microorganisms tested. The methanol extracts from *Citrus grandis*, *C. sunki*, *C. sulcata* showed the growth inhibitory effects against *Escherichia coli* O26 and *Staphylococcus aureus* 6358. The methanol extracts from *C. obovoidea*, *C. sulcata*, showed the growth inhibitory effects against *Saccharomyces cerevisiae* IBM 4274, *Bacillus Licheuiformis* 9945a. and *Alcoligenes faecalis*. Among this especially, Showed growth inhibiting activity of the methanol extracts from *Citrus sulcata* that about microorganisms investigated.

6. The Antioxidative activities of the methanol extract from citrus seeds(*Citrus grandis*, *C. sunki*, *C. sulcata*) that about DPPH radical scavenging activity, Hydroxyl radical scavenging activity, Hydrogen peroxide scavenging activity, Superoxide anion scavenging activity investigated. Almost all of the sample showed more than 20~50% of the inhibitory effect against the antioxidative activities.

I. 서론

최근 인류의 생명에 관계된 연구결과 보고에 의하면, 암을 비롯한 각종 성인병의 주된 요인은 술과 담배, 식생활, 스트레스 등의 외인성 환경인자에 기인한다(Doll과 Peto, 1981; Nagago와 Sugimura, 1993; 박 등, 1995). 특히 우리의 식생활과 밀접한 관련이 있는 N-nitrosamine 등의 발암물질들은 주로 식품의 가공, 저장 또는 조리과정 중에서 생성되어 인체의 유전자에 손상을 초래하여 암이나 각종 종양을 유발하는 것으로 확인되고 있다(Mirvish, 1975).

암의 원인과 예방은 우리 몸을 유지하기 위해 섭취하고 있는 음식물과 밀접한 관계를 갖고 있으며, 잘못된 식습관을 바로잡기 위하여 식생활 조절은 물론 건강기능성 식품의 활용에 의한 암과 성인병 예방 및 치료효과를 기대하고 있다(유, 1991). 이처럼 생리활성기능을 지닌 식품에 대한 관심이 고조되면서 천연의 식품재료 중에서 다양한 기능성을 갖는 물질을 발굴하려는 시도가 증가하고 있다(Hyun 등, 1994; Park 등, 1988).

이와 같은 관점에서 대표적인 건강기능성 식품소재로 알려지고 있는 감귤은 *Citrus* 속으로 독특한 풍미와 풍부한 과즙을 지녀서 생과일 뿐만 아니라 과즙음료의 재료로 비교적 널리 우리생활에서 애용되고 있다.

우리나라의 감귤은 세계의 감귤나무 재배지 중에서 기상적, 지리적으로 볼 때 가장 북단에 위치하고 있으며, 따라서 그 품종도 감귤 중 가장 낮은 온도에서도 생육할 수 있는 mandarin 계인 온주밀감(*Citrus reticula*)이 주종을 이루고 있는데 주로 제주지역에서 재배되고 있다. 제주지역에서 재배되고 있는 감귤은 온주밀감, 하귤, 병귤, 청견을 비롯하여 오렌지류 등의 만감류의 생산이 이루어지고 있지만, 생과를 소비하는 온주계통의 감귤에만

주력하고 있는 실정이다. 그러나 최근 들어 은주밀감의 과잉생산으로 인한 가격폭락 문제로 인하여, 대체용 만감류의 생산 및 감귤가공식품의 개발과 생산에 관심을 가지게 되었다.

감귤의 과육이나 과피에는 다량의 비타민 C와 flavonoid, limonoid 및 carotenoid(황과 윤, 1995; 김 등, 1996) 등이 함유되어 있으며, 이들의 생리 활성물질로서 항알러지성, 항염성, 항바이러스성, 항산화성 및 항암성 등의 기능이 알려지고 있다(Calomme 등, 1996; 은 등, 1996; 김과 정, 1990; Oshiba와 Kato, 1981).

국내의 감귤에 관한 연구는 감귤의 화학성분(박 등, 1968; 양 등, 1967), 감귤의 품종별 화학성분 및 당과 산 함량의 시기적 변화 등에 관한 연구(한 등, 1970), 감귤의 저장에 따른 화학성분에 대한 연구(박 등, 1967), 감귤주스의 풍미성분(이와 정, 1986) 등의 과육에 관한 연구와 과피를 효율적으로 이용하기 위하여 폐과피를 이용한 펙틴제조방법(장 등, 1977) 및 식초 제조법(문 등, 1982) 등이 있다.

대부분의 감귤에 대한 연구는 주로 감귤의 과즙 또는 과피에 관련된 것들로 이루어져 있으며, 종자를 이용한 실험은 Grapefruit의 종자추출물에서 항균 및 항산화 효과(조 등, 1990; 최 등, 1990; 박 등, 1995)에 대한 보고가 있었을 뿐 다른 종류의 감귤종자에 대한 연구는 현재까지 전무한 상태이다.

감귤은 한방약이나 생약의 원료로 사용되고 있음에서도 알 수 있듯이 기능성이나 유효한 약효성분이 다량 함유되어 있는 과실이다. 감귤의 과피는 진피, 귤피, 지실 등의 이름으로 예전부터 한방처방의 원료인 동시에 비타민, 식이섬유 및 유기산 등의 성분으로 인하여 건강식품의 소재로서도 각광을 받고 있다. 그러나 약재나 식품가공 소재로서 산업적으로 사용되는 것은 과즙이나 과피에 한정되어 있고, 만감류 감귤의 3~20%를 차지하고 있는 종자는 대부분 활용가치가 없어 그대로 폐기되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 현재 제주에서 재배되고 있는 만감류 중에서 종자율이 비교적 높은 9종을 선택하여 이들의 종자를 용매로 추출한 후 항돌연변이원성, NDMA 생성억제, 아질산염 소거능, 항산화, 항균 효과 등을 검정하여 감귤종자 중에 존재하는 생리활성물질에 대한 기능성을 구명하여, 활용가능성을 확인함과 동시에 현재 소량재배 및 약재 사용 중 폐기되고 있는 만감류 및 잡감류 활용과 부가가치를 높이는 방안을 모색하고자 하였다.



II. 연구사

1. 천연소재 중 생리활성 물질

현대인의 식생활이 기호식 또는 편의식 위주로 변화하면서 새로운 성인병이 유발되고 있다. 특히 순화계 질환인 암, 당뇨 등 성인병 등이 문제가 되고 있는데, 이를 예방 및 치료하기 위한 연구들이 최근 많이 이루어지고 있다(노와 전, 2001).

식품의 원료가 되는 천연의 동·식물성 소재에는 다양한 기능을 지닌 물질들이 분포되어 있다. 식품의 생리활성에 대한 연구로는 인삼의 생리작용에 대한 보고(김 등, 1977) 등을 기점으로 하여 다양한 식품성분에 대한 연구가 진행되었다. Trock 등(1990)은 식이섬유와 채소가 항암작용이 있다고 하였고, Oshiba와 Kato(1981) 그리고 김과 정(1990)은 플라보노이드의 약리작용을 확인하였으며, 이와 이(1994)는 식물성 식품 중의 페놀성 화합물의 항돌연변이 및 항균성을 보고함에 따라, 이러한 성분들을 지닌 식품들의 생리활성에 관한 연구도 진행되어 오갈피, 오미자, 구기자 및 당귀의 생리활성(오 등, 1990), 각종 식품에 풍미를 더해 주는 양념채소류가 가지고 있는 항암효과, 항혈전효과, 항동맥경화효과 등의 보고(김, 1998)가 있었으며, 마늘, 보리추출물, 들깨, 콩 등에서도 항균 등 여러 가지의 생리활성효과가 입증되었다(임과 김, 1997; 김 등, 1997; 강과 김, 1998; 권, 1999). 또한 녹차의 기능성(문과 박, 1995)과 약용식물 자원의 생리활성 연구도 진행되어 생약추출물의 생리활성 효과(김 등, 1995; 이 등 1995), 손바닥선인장을 이용

한 약리작용에 관한 보고도 있다(최 등, 2001).

일반적으로 동물이나 인간에게 저해 인자로서 알려진 많은 변이원성물질과 발암성인자들은 유리기를 발생하여 생세포에 변이원 등 독(毒)작용을 하게 된다. 천연식품 소재에 존재하는 항산화성분들을 섭취함으로써 항암작용을 기대할 수 있으며, 식용식물 중의 페놀성분은 이러한 항산화 작용에 관계하는 중요한 인자라고 알려지고 있다(Ames, 1983). 또한 flavonoids는 대부분 당류와 결합하여 배당체로 식물조직 표피에 존재하며 항돌연변이, 혈압강하 기능을 가진 생리활성물질로 알려져 있다(Bate-smith 등, 1954; 손 등, 1992). 이와 같이 많은 연구들을 종합하여 고려해 볼 때, 천연의 식품소재의 생리기능성 물질에 의해 현대의 성인병을 예방 및 치료의 가능성에 많은 기대를 하고 있으며 또한 식품 중의 생리활성물질 탐색 및 활용에 대한 연구가 끊임없이 이루어져야 할 것이다.



2. 식품 중의 돌연변이원 및 항돌연변이원성

식품 중의 돌연변이원은 크게 간접 돌연변이원(indirect mutagen)과 직접 돌연변이원(direct mutagen)으로 구분되는데, 간접 돌연변이원은 인체 내에서 돌연변이원성의 발현 시 cytochrome P450 효소에 의하여 돌연변이원성을 나타내는 물질이며 직접 돌연변이원은 효소에 의한 대사적 활성화 없이 돌연변이원성을 나타내는 물질이며, 이러한 직접 및 간접 돌연변이원을 식품으로부터 검색하는 방법이 오래 전부터 연구개발이 활발히 진행되어 오고 있다(Rechieigl, 1995).

식품에서 유래되는 대표적인 돌연변이원들은 식품의 가공, 저장 중에 생성되는 돌연변이원으로 육제품의 가공, 저장 및 훈연처리 시 아질산염과 아민과의 반응으로 생성되는 *N*-nitrosamine (Lijinsky, 1987; Pearson과 Dustson, 1990), 식품의 저장 중 *Aspergillus* 발육으로 생성되는 aflatoxin 중 aflatoxin B₁은 돌연변이원성이 매우 강한 것으로 알려지고 있고(Pariza 등, 1983), 단백질 식품의 가열, 조리 시 생성되는 대표적인 돌연변이원은 benzo[*a*]pyrene과 amino acid pyrolysate와 carboline 류, 그리고 heterocyclic amine 류 들로서 이들 물질은 평면구조를 하고 있기 때문에 DNA의 염기쌍 사이로 끼어 들어가 세포돌연변이를 일으키는 것으로 알려져 있다(Pariza, 1982; Pearson과 Dustson, 1990).

이에 반해서 식품 중 돌연변이 억제물질은 작용 방식에 따라 세포 내 항돌연변이원성 물질(bioantimutagen)과 세포 외 항돌연변이원성 물질(desmutagen)로 구분되는데, 전자는 변이원이 DNA에 도달하는 것을 억제하거나 이미 DNA에 손상이 일어난 경우 세포의 DNA 수복 및 복제과정을 촉진하여 변이의 발생빈도를 낮춰주는 역할을 하는 물질이며, 후자는 변이원이 DNA에 장해를 일으키기 전에 세포외에서 변이원 자체를 불활성화 시키거나 변이원의 세포 내 흡수를 억제하는 작용 및 전구물질이 변이원성 물질로 전환되는 과정을 억제하는 물질이다(Kata 등, 1982; Kata 등, 1986).

식품 중에 포함되어 있는 bioantimutagen의 예로서는 녹차에서 분리된 EGCG(epigallocatechin gallate)와 같은 polyphenol 화합물(Kada 등, 1985) 등이 있으며, 또한 desmutagen의 예로서는 양배추의 peroxidase에 의한 tryptophan pyrolysate의 불활성화(Inoue 등, 1981)와 과일, 채소류의 식이섬유에 의한 돌연변이원의 흡수(Kada 등, 1984) 등이 있다. 돌연변이 및 항돌연변이원성 물질을 탐색함에 있어 이러한 돌연변이 억제물질의 작용 기작을 고려함으로써 암의 예방적 해석에 기여할 수 있을 것으로 사료되며,

현재 천연식품의 성분 가운데 이와 같은 메카니즘을 바탕으로 항변이원성을 나타내는 물질에 대한 연구가 상당히 활발히 이루어지고 있다(백 등, 1988; 김 등, 1999; Ooka 등, 1999; 송 등, 1999).

식품 중의 항돌연변이원성 연구를 결과를 보면, 들깨잎의 메탄올 추출물에서 aflatoxin B₁에 대한 항돌연변이원성 효과가 강한 물질을 분리, 동정하였으며(이 등, 1992), 또한 감잎의 aflatoxin B₁에 대해 항돌연변이원성을 갖는 물질을 분리하였다고 보고하고 있으며(Moon 등, 1996), 인삼의 saponin이 aflatoxin의 생성을 감소시킨다고 보고하였다(백 등, 1988). 또한 과일과 야채에서 추출된 페놀성 화합물들이 돌연변이원성 억제효과에 대하여 보고하고 있으며(Malaveille 등, 1996), 실제 음용조건으로 추출한 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물이 간접 돌연변이원 물질에 대한 억제 효과가 탁월하였으나 직접 돌연변이원 물질에 대해서는 저 농도 첨가 시에는 큰 변화가 없었던 결과를 보고하였는데, 음용조건에서 추출한 차 추출물의 돌연변이 억제 효과 기전은 차 추출물들이 변이원물질과 직접 결합하여 돌연변이를 억제하기 보다는 돌연변이 물질의 체내 활성화 대사과정을 억제하는 물질로 작용한다고 하였다(송 등, 1999).

이와 같은 결과에서 볼 때 암의 예방을 위해서는 식품에 돌연변이를 촉진시키는 물질과 돌연변이를 억제시키는 물질들의 메카니즘을 분석하고 이해하는 노력이 요구되고 있다.

3. 식품 중의 *N*-nitrosamine 생성 및 억제

식품 중의 발암물질은 여러 가지 원인들에 의해 생성되는 경우가 많은데, 특히 질산염과 아민류의 반응으로 생성되는 *N*-nitroso 화합물은 1890년대 이전에는 주로 산업분야의 용매로써 이용(Hugues 등, 1996)되어져 오다가, Freund(1937)에 의해 *N*-nitrosodimethylamine (NDMA)의 독성이 최초로 보고 되면서 이에 대한 연구를 시작하였다.

그 후 식품 중의 *N*-nitrosamine 존재에 대해 관심을 갖게 된 가장 큰 동기는 Ender 등(1964)이 1957년 노르웨이에서 발생한 산양과 멍크 등의 가축 폐사사건이 계기가 되었는데, 폐사 원인이 청어를 원료로 한 어분사료에 dimethylamine과 보존료로 첨가한 아질산염의 상호반응에 의해서 생성된 NDMA가 원인물질로 밝혀지면서부터이다.

Sen 등(1969)에 의해서 아질산염을 처리한 식품에서 NDMA의 생성이 증명된 이후 식품과 생체 내에서 NDMA의 생성과 위험성에 대한 연구까지 꾸준히 진행되어 Mirvish 등(1972)이 최초로 아질산염과 아민을 급여한 동물에 있어 종양의 형성을 감소시키는 ascorbic acid의 효능에 대해 보고 하기에 이르렀다. 이어서 고농도의 BHA, BHT 그리고 propylgallate가 rat에 있어 아질산염과 NDMA의 급이에 의한 간독성 예방 효과가 있다고 보고 되었으며(Astill과 Mulligan, 1977), 페놀성 화합물이 아질산과의 반응에 의한 돌연변이 활성을 방어하는 효과가 있음이 보고 되었다(Stich 등, 1982).

식품에서 가장 많이 발견되는 *N*-nitrosamine은 NDMA, NDEA, NPYR 및 NPIP의 순서이며 그 대부분은 가공어류나 육제품에서 많이 생성된다(Walker, 1990; Tricker 와 Preussmann, 1991).

한편 국내에서의 *N*-nitrosamine에 대한 연구는 1970년대 초부터 시작되었는데, 분석장비의 미비로 일부 연구자들을 중심으로 주로 식품 중의 전구물질인 질산염 및 아질산염의 함량 변화 및 NDMA의 생성에 대한 연구가 진행되었다(문 등, 1973; 임 등, 1973; 권, 1974; 변 등, 1976; 안 등, 1979).

그 후 김과 이(1982)의 김치에서의 *N*-nitrosamine 생성에 대한 보고를 기점으로 하여 발효식품과 수산식품에 대한 연구가 본격적으로 이루어지게 되었다. 현재까지의 발표된 문헌을 식품에 따라 분류해 보면 김치(박 등, 1993; 김과 신, 1995; 구 등, 1999), 장류(김 등, 1985; 성 등, 1988), 젓갈류 등의 발효식품(김 등, 1990; 김 등, 1994; 김, 1995; 김 등, 1998), 수산식품 및 그 가공품(성, 1986; 임, 1994; 김과 오, 1995; 김, 1996; 오, 1997; 성 등, 1997; 이 등, 1998; 이, 1999)과 식육류 및 그 가공품(김, 1995; 김, 1996; 박 등, 1998), 알코올음료(정, 1996), 등에 관한 보고가 있었으며, 이들의 생성을 억제하기 위한 연구로는 토마토 중의 페놀화합물과 아스코르브산에서 NDMA의 생성억제효과(이, 1998), 붉은 칠커리에서 니트로소화 반응을 억제시키는 물질을 분리 동정하였으며(박, 1999), 향신료 추출물에서 니트로자민 생성억제 효과(임, 1999), 김 등(1987)은 마늘, 생강, 양파, 파 및, 당근 등의 추출물에서, 최(2001)은 녹차 및 매실추출물에서, 김(2001)은 마늘추출물에서 니트로화 반응을 억제시키는 물질을 분리하는 데 성공하였다고 보고한 바 있다.

상기의 결과를 분석해 볼 때, *N*-nitrosamine에 대한 문제의 심각성이나 억제방안에 대한 연구는 비교적 많이 이루어졌으나, 식품 중에 존재하는 *N*-nitrosamine의 적절한 규제 조치나 국민건강과 관련된 식이요법 등에 대한 연구는 의외로 적다. 따라서 앞으로 이런 분야의 연구가 절실히 요구되고 있다.

4. 식품성분의 아질산염 소거

현대 문명사회의 발달과 함께 환경 중에서 발견되는 수많은 발암물질 중 *N*-nitrosamine은 식품 가공 및 저장 중에 생성될 우려가 매우 큰 유전 독성물질로서 현세는 물론 차세대의 위생관리를 위하여 이의 대책을 위한 연구는 매우 중요하다. 그 이유는 다른 발암물질에 비하여 발암성이 강력하여 극미량으로도 인체 내에 암을 유발할 수 있고(Lijinsky, 1984) 또한 이들의 전구물질들은 사람의 생명을 유지하기 위하여 섭취하고 있는 어류나 과채류 등에 광범위하게 분포되어 있기 때문이다(Cassens, 1995; Kawabata 등, 1979). 이들 전구체의 하나인 아민류(제1급, 제2급, 제3급 아민 및 제4급 암모늄화합물)는 아질산염의 상호반응에 의하여 *N*-nitrosamine을 생성하는 것으로 밝혀져 있다(Lijinsky 와 Singer, 1974; Ishibashi 등, 1984).

또 다른 전구물질인 아질산염은 보존료로서 색소를 고정할 뿐만 아니라 향, 조직감 등을 개선하며, 또 식중독 중 치사율이 가장 높은 *Clostridium botulinum*의 생육 등에 억제효과가 뛰어나 아직도 여러 나라에서 수산물이나 식육가공 시 식품첨가제로 허용되어 있다. 그러나 아질산염은 일정 농도 이상 섭취하게 되면 청색증(methemoglobinemia)이나 빈혈성 저산소증(anemic hypoxia)을 유발시킬 수 있고(Lippsmyer 등, 1990), 그 자체로도 염기치환성 돌연변이를 유도하는 것(direct mutagen)으로 알려져 있기 때문에(Balimandawa 등, 1994.) FAO/WHO에서는 아질산염의 사용을 규제하여 1일 섭취 허용량(acceptable daily intake, ADI)을 60kg의 성인을 기준으로 하여 8mg으로 제한하고 있다(Cassens, 1995). 또한 아질산염은 육류식품이나 수산식품 등에 존재하는 아민류와 반응하여 *N*-nitrosamine을 생성하는데, 이들 *N*-nitrosamine은 동물 실험결과 대부분이 강력한 발암성을 나타

내는 물질로 밝혀졌다(Cassens, 1995; Peter, 1975; Wolff와 Wasserman, 1972).

식품에서 *N*-nitrosamine의 생성은 아질산염 농도의 제공에 비례하기 때문에 *N*-nitrosamine의 생성에 주된 전구물질로 알려져 있다(Mirvish 등, 1972). 이러한 이유로 *N*-nitrosamine 생성은 아질산염과 반응할 수 있는 화합물, 특히 ascorbate, α -tocopherol, 페놀성 화합물, flavonoid류 등과 같은 환원성물질에 의해 억제시킬 수 있다. 즉, 이들 화합물이 아질산염과 반응하면 니트로화 반응에 영향을 미쳐 *N*-nitrosamine의 생성을 강력하게 억제하게 되므로(Gray 와 Dugan, 1975; Cooney와 Ross, 1978; 강 등, 1996; Lee와 Choi, 1993), 이를 근거로 하여 국내에서도 천연식품 추출물에서 아질산염의 소거에 대한 연구가 많이 진행되어 해조류(김 등, 1987b), 버섯류(이 등, 1997; 정, 1998), 기호음료(도 등, 1993), 차류(여 등, 1994; 정 등, 1999), 약용식물(이 등, 2000), 채소류(정, 2000) 등의 추출물들에 의한 아질산염의 소거능 방안에 대한 대안을 제시하고 있다. 가공식품에 의한 아질산염 소거능에 대하여 오(1997)는 김치에 있는 유산균이 아질산염 소거능이 있는 것을 확인 하였고, 김(1995)은 멸치젓과 새우젓의 숙성 중 아질산염과 아스코르빈산이 *N*-nitrosamine의 생성에 미치는 영향에 대하여 보고하였으며, 젓갈류 중 아질산염에 의한 *N*-nitrosamine 생성에 관한 보고 (김 등, 1990; 김 등, 1996)로 인하여 페놀성 화합물 및 flavonoid 등을 통해 그 대책을 세우려는 시도가 더욱 활발히 진행하게 되었다(강 등, 1996; Lee와 Choi, 1993).

이와 같이 아질산염 소거능은 페놀류나 플라보노이드 등에 의해 크게 영향을 받는 것으로 보아 이와 관련된 식품의 조리 및 가공 등에 적극 활용함으로써 아질산염에 의한 *N*-nitrosamine의 생성을 최소화 할 수 있는 방안이 모색되어져야 할 것이다.

5. 식품의 항산화와 항균성

식품의 가공 및 저장 중에 일어나는 지방질의 산화는 식품의 품질 저하 및 DNA손상을 통한 암의 유발과 노화와 관계가 있고, 이러한 것 등을 방지 또는 지연시키는 기능을 갖고 있는 항산화물질은 주로 식물의 줄기, 뿌리, 잎, 꽃 등의 식물체 내에서 존재하고 있는 것으로 알려지고 있다(Pratt, 1992). 이러한 기능을 가진 항산화제로서 사용되고 있는 BHA, BHT 등은 합성 항산화제로서 간비대 및 체내 흡수물질의 일부가 독성 또는 발암성 물질화한다는 우려에 따라 천연으로부터의 항산화제를 얻고자 하는 노력이 이어지고 있다(Branen, 1975; Kasuga 등, 1988; 장 등, 1996).

이와 더불어 식품의 가공, 저장, 유통 및 조리 중에 발생하는 식중독은 대부분이 병원성 미생물에 의한 것이며, 이러한 사건 등으로 말미암아 식품의 조리에 있어서 위생적인 관리의 중요성이 대두되고 있다(김, 1997). 국립보건원의 감염발생 정보(1994)에 의하면 근래에 발생되었던 세균성 이질을 비롯하여 병원성 대장균인 O157:H7 균에 의한 식중독 사건이 상당수 발생한 것으로 나타났다. 더욱이 식품위생법상 보존료는 소르빈산나트륨, 안식향산나트륨, 아질산염 등 총 13종의 화학합성품이 종류별 사용기준이 설정되어 사용되고 있으나, 이들을 지속적으로 섭취할 경우 체내 축적이 되어 만성중독, 발암성, 돌연변이 유발성 등의 우려가 있다(양 등, 1995). 이에 따라 많은 연구자들이 식품의 안전성에 문제가 없는 천연소재의 항균제 및 항균물질의 탐색에 관한 활발한 연구를 진행하고 있으며, 특히 식물성 생리활성 성분에 대한 연구를 통해 항산화, 항균활성효과가 밝혀지고 있다(안과 유, 1988).

자연계에 천연적으로 존재, 분포되어 있는 동물이나 식물류 중에는 생체

를 조절하는 기능을 가지고 성분이 함유된 식품이 많이 있다는 것이 최근 연구에 의해 밝혀짐에 따라 이에 관계된 식품소재의 발굴 및 생리활성물질 규명에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 이러한 연구자들에 의해 각종 식물류에 항산화 및 항균효과가 있음이 보고 되고 있다(정, 2000; 김 등, 1999; 노 등, 1996; 장 등, 1996).

천연물질 중에는 산화를 방지하는 기능을 가진 물질이 상당수 존재하는데 가장 주목받고 있는 것은 생약 중의 페놀성 물질인데 그 이유는 이 페놀성 물질이 항산화성을 가진 대표적인 물질로 보고 있기 때문이다(Avena와 Hinoay, 1977; Kozłowska와 Zadernowski, 1983).

일반적으로 유지를 많이 함유한 식물종자에는 항산화 물질이 함유되어 있다고 알려져 있는데, 참깨 밖에는 sesamol, samolinol, sesaminol 등이 함유되어 항산화 효과가 있음이 보고된 바 있으며(박 등, 1990), 더덕(맹과박, 1991), 녹차(이와 신 1993; 이 등, 1998), 알로에(우 등, 1995), 오미자(장 등, 1996), 양파(나 등, 1997), 솔잎추출물(김 등, 1999) 등 식물성 천연물질과(최 등, 1992) 해조류(박 등, 1991), 그리고 생약재(김 등, 1997) 등에서 그 항산화성이 검증되었다. 현재까지 알려진 천연 항산화 물질로는 아스코브르산, 토코페롤류, 플라보노이드와 그 유도체(Naohiko, 1984), 갈변반응 생성물, 아미노산 및 단백질 등이 알려져 있다(Beckel, 1983; Mitsuo, 1982).

이와 더불어 최근 항균효과를 나타내고 있는 천연식물에 대한 연구도 꾸준히 진행되어 왔는데, 녹차(노 등, 1996), 포도(이 등, 1997), 계피(정 등, 1998), 손바닥 선인장(정, 2000) 등이 대표적이며, 이러한 식품들은 대부분 항산화 및 항균효과를 나타내고 있으며 각 식품에 따라 정도의 차이가 있어 특별히 좋은 효과를 보이는 것은 항균제의 재료로서 활용되고 있다. (이 등, 2000).

6. 감귤류의 생리활성

운향과(芸香科, Rutaceae)에 속하는 감귤류의 열매는 유기산과 당분의 독특한 향미와 풍부한 과즙을 지닌 과실로서, 생과 및 과즙음료의 원료로서 널리 이용되고 있으며, 고려사에 의하면 백제 문주왕(476년)때 탐라에서 방물을 헌상 하였다는 기록으로 미루어 보아 제주도에서 오래 전부터 감귤이 재배되었음을 알 수 있다(고와 김, 1995). 문헌에 기록된 재래감귤의 종류로는 감자, 당감자, 유감, 유자, 동정귤, 청귤, 지각, 석금귤, 당금귤, 등자귤, 병귤, 왜귤, 산귤, 금귤 등이 있었으나, 기호성이 낮고, 감귤 품종개량 등에 의해서 현재는 당유자, 유자, 산귤, 병귤, 동정귤, 청귤 및 지각만이 남아 있고, 한방이나 민간요법으로 이용되고 있는 실정이다(제주감귤농업협동조합, 2000).

감귤은 독특한 향미와 다량의 비타민 C를 함유하고 있기 때문에 제주 특산과일로서 생과와 과즙음료로 널리 이용되고 있다. 또한 flavonoid, limonoid 및 carotenoid 등이 함유되어 있어서 생리활성물질에 대한 연구 및 기능성식품으로서의 가치가 재조명되고 있으며(황과 윤, 1995), 특히 감귤류에 존재하는 flavonoid는 항알러지성, 항염성, 항바이러스성, 항암성 등의 활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있고(은 등, 1996), 또한 감귤 유래 식이섬유도 다양한 생리조절 기능 때문에 기능성 식품소재로 이용되어 왔으며(김과 양, 1997), 예로부터 한방에서는 橘皮를 건조시켜 방향성 건위, 구풍, 거담, 진해약으로 식욕부진, 구토, 사하, 동통, 해수 등에 이용되고 있다(한국약학대학협의회, 1997). 감귤에는 hesperidin, rutin, narirutin, naringin, neohesperidin, nobiletin, poncirin 등과 같은 flavonoid가 다량 함유되어 있고(은 등, 1996), 향기성분으로는 *d*-limonene 이외에 여러 가지 limonoid를

다량 함유하고 있으며, 색소성분은 carotenoid계 물질로 알려지고 있다(배, 1997; Johnson 등, 1995). Hesperidin은 식물세포뿐만 아니라 포유류 동물의 *in vitro*와 *in vivo*에서 여러 가지 생리 및 약리 작용(김과 정, 1990), naringin은 혈압강화작용(Oshiba와 Kato, 1981) 및 항균작용(안 등, 1988), 항산화 작용(Tanizawa 등, 1992), limocitrin-3- β -D-glucose, limocitrin-3- α -L-rhamnose, 3,6-di-C-glucosylapigenin 등은 혈압강화 효과(Matsubara 등, 1985), sinensetin, nobiletin은 항혈액응고작용, 항바이러스작용(Veckenstedt와 Horn, 1976), nobiletin 및 tangeretin은 항돌연변이원성 효과가 높으며(Calomme 등, 1996), quercetin과 tangeretin은 암의 침투와 전이를 막아주고(Jie, 1997; Marc와 Eric, 1994), limonin, nomilin과 같은 citrus limonoid는 구강암을 억제한다고 보고하고 있다(Lam 등 1994; Miller 등, 1994).

감귤류의 기능성에 관한 연구 중 우선 감귤 주스로 이루어진 보고를 보면, 주스의 이화학적 성상(이 등, 1987), 헤스페리딘과 나린진의 함량(송 등, 1998) 등의 영향으로 감귤류 주스가 발암물질인 니트로자민의 생성을 억제한다는 연구보고(송, 2000; Yumiko 등, 1991)가 있었고, 과피를 이용한 연구보고에 의하면 항암(좌, 2001) 및 항균효과(김 등, 1999)가 있음이 확인되었다. 감귤의 종자는 주로 만감류에 존재하며, 이들 종실율은 산귤이 20.3%, 삼보감 5.0%, 당유자 3.5%, 하귤 2.5%, 금귤자 1.7%, 스타치(sudachi) 1.1%, 이에감 0.9%, 금감 2.1%로(김, 1994), 감귤종자에는 limonoid류와 α -tocopherol 등이 함유되어 있어 항암, 항산화 등의 여러 생리적 기능에 대한 보고가 있지만(조 등, 1990; 조 등, 1995; Miller 등, 1994), 감귤에 대한 연구는 과육과 과피를 중심으로 이루어지고 있으며, 감귤 종자의 생리활성에 대한 연구는 그레이프후루츠의 종자 추출물을 이용한 항균효과가 보고 되었고, 이것을 이용하여 항균제로서도 활용되고 있다(최 등, 1990; 조 등, 1991; 이 등, 1995).

III. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 추출용 시료의 조제

제주도 내 과수원에서 직접 수집한 감귤류(Table 1)에서 종자만을 분리하여 24시간 수침지하고 물로 3~4회 정도 깨끗이 세척한 후, 45℃에서 열풍 건조기에서 건조시켜 분쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 하였다.

Table 1. Scientific name of citrus varieties

Varieties	Scientific name
Kumkamja(KK)	<i>Citrus obovoidea</i>
Dangyooja(DY)	<i>Citrus grandis</i>
Sankyool(SK)	<i>Citrus sunki</i>
Sambokam(SB)	<i>Citrus sulcata</i>
Peonkyool(PK)	<i>Citrus tangerina</i>
Hakyool(HK)	<i>Citrus natsudaikai</i>
Iyegam(IY)	<i>Citrus iyo</i>
yuja(YJ)	<i>Citrus junos</i>
Jigak(JK)	<i>Citrus aurantium</i>

2) 시료의 추출 및 조제

감귤류 종자 각각 100g에 메탄올 500ml를 가하여 40℃ 수욕조에서 3시간 동안 추출하여, 이것을 감압농축하여 메탄올을 제거하였다(*Fig. 1*). 여기에 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 가하여 각 50ml로 정용하여 이 용액을 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 실험용 시료로 사용하였다.

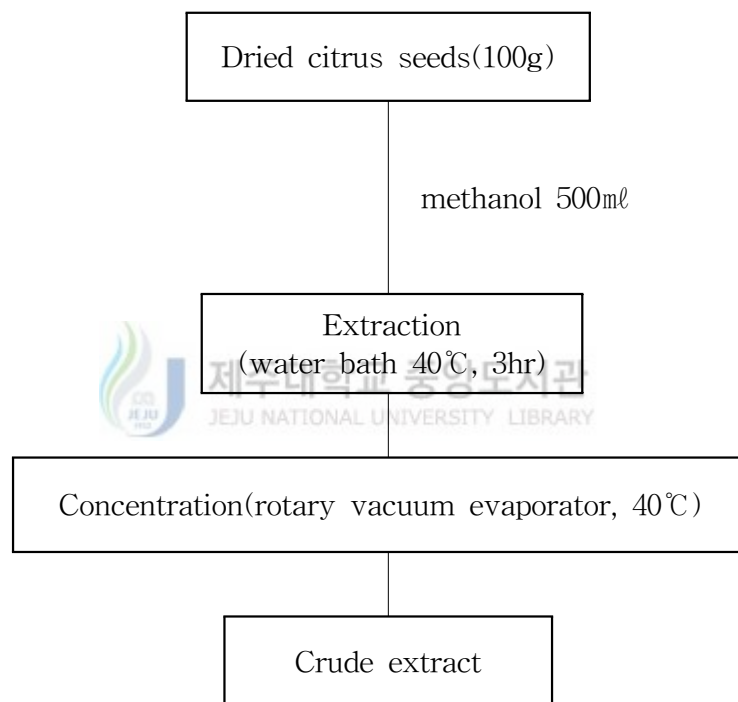


Fig. 1. Scheme for extraction of citrus seeds with methanol.

2. 시료의 일반성분 측정

감귤 종자를 수분은 상압가열 건조법, 조단백질은 micro kjeldahl법(질소 계수 : 5.30), 조지방은 Soxhlet 지방추출법, 조섬유는 AOAC법, 조회분은 직접회화법으로 분석하였다(주 등, 1991).

3. 감귤종자 추출물의 고형분 함량 및 추출수율 측정

감귤종자 메탄올추출물의 고형분 함량은 휘발법으로 측정하였으며, 추출수율은 각 종자에 대한 수분함량을 보정하여 구하였다.

$$\text{Yield(\%)} = \frac{\text{solid content of extracts (g)}}{\text{dried citrus seeds (g)}} \times 100$$

4. 감귤류 종자의 플라보노이드 및 총 페놀 함량

flavonoid는 메탄올로 추출하여 naringin 비교정량법으로 정량하였고, 총 phenol은 아세톤으로 추출하여 Folin-Dennis법으로 정량하였으며, 이 때 구한 검량선은 각각 Fig. 2 및 Fig. 3과 같다(AOAC, 1995).

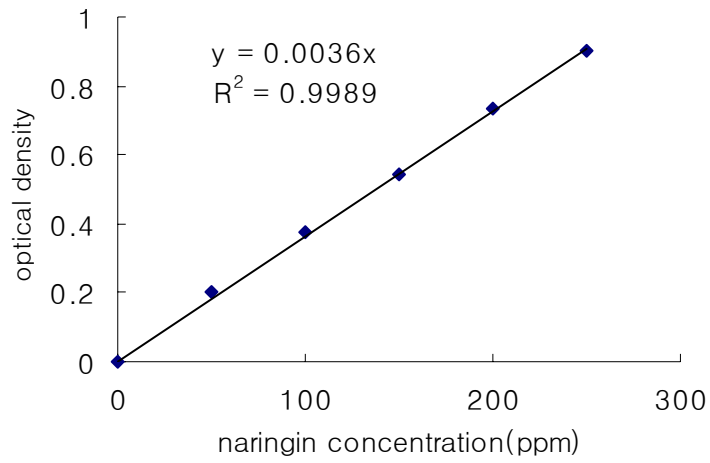


Fig. 2. Calibration curve of flavonoid(naringin).

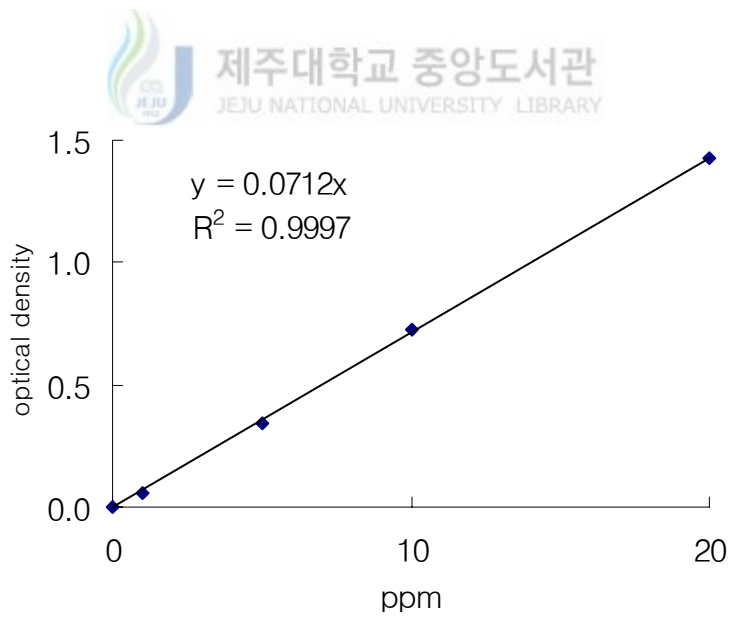
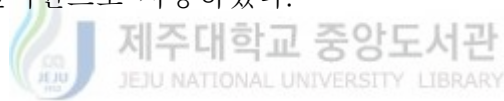


Fig. 3. Calibration curve of total phenolics(Folin-Dennis method).

5. 감귤종자 추출물의 항돌연변이원성 검색

1) 표준돌연변이원

감귤종자 추출물의 항돌연변이원성 검색을 위해 실시한 실험 중 Ames 시험법에서 사용한 돌연변이원들은 *Salmonella typhimurium* TA97에는 2-methoxychloro-9-(3-(2-chloroethyl)amino-propylamino)acridine(ICR-191, Sigma사)를 표준돌연변이원으로 구조이동성 돌연변이를 검정하는데 사용하였고, *S. typhimurium* TA98과 TA100에는 4-nitro-*o*-phenylenediamine (NPD, Aldrich사)를 사용하여 구조이동성과 염기치환성 돌연변이를 검정하는 표준돌연변이원으로 하였으며, *S. typhimurium* TA100과 그리고 TA102에는 4-nitroquino-line-*N*-oxide(4-NQO, Aldrich사)를 염기치환성 돌연변이 검정하는 표준돌연변이원으로 사용하였다.



2) 시험균주

본 실험에서 사용한 시험균주는 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성 변이주(auxotroph)인 TA97, TA98, TA100 및 TA102를 사용하였으며, 시험균주의 특성은 Table 2와 같다.

Table 2. Genotype of the *S. typhimurium* TA strains used for mutation test

Strain	Histidine mutation	LPS	Repair	R-factor
TA97	hisD6610	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+R
TA98	hisD3052	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+R
TA100	hisG46	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+R
TA102	hisG428(pAQ1)	<i>rfa</i>	+	+R

All strains were originally derived from *S. typhimurium* LT-2. Wild-type genes are indicated by a +. The deletion(Δ) through *uvrB* also includes the nitrate reductase and biotin(*bio*) genes. The *rfa* mutation eliminate the peolysaccharide side chain of the LPS that coats the bacterial surface. from Ames et al(1983).



3) 균주의 동정

(1) Histidine과 biotin 요구성

검정균주들의 histidine을 합성하지 못하는 형질은 선택 agar plates에서 성장하는 동안 histidine 요구성 여부로 확인되었다. TA102를 제외한 모든 표준검정균주들은 *bio* 유전자를 통해 확장된 *uvrB* 결시 균주이므로 biotin을 요구한다. 각각의 plate는 0.1M L-histidine 0.1ml와 0.5mM biotin 0.1ml를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 최소배지에 각각의 균주를 도말하여 배양했을 때 histidine이 첨가된 배지에서는 생육하나 histidine이 첨가되지 않은 배지에서는 생육하지 않는 균을 선택하였다.

(2) Deep rough(*rfa*) 돌연변이

S. typhimurium TA균주들은 세포벽 성분 중 lipopolysaccharide를 제거하여 고분자 물질이 흡수를 용이하게 만든 Deep rough 돌연변이이며, 이것을 crystal violet에 대한 감수성으로 형질을 시험한다. 하룻밤 배양된 신선한 균주 0.1ml와 45℃로 유지된 top agar 2ml를 시험관에 넣고 3초간 혼합한 후 nutrient agar plate에 부어 plate상에 잘 퍼지도록 하여 수분이 지난 후 top agar가 굳으면 crystal violet 10 μ l를 직경 6mm의 멸균여지에 흡수시킨 뒤 균이 접종된 nutrient agar상에 떨어뜨리고 37℃에서 12시간 배양하였다. Deep rough형은 crystal violet의 독성 작용으로 균주가 사멸하기 때문에 disc 주위에 저해존이 생성되나 야생형(wild type) 균주는 저해존이 나타나지 않는다. Deep rough 균주는 대략 14mm 정도의 저해존을 형성하는 균주를 선택하였다.



(3) *uvrB* 돌연변이

uvrB 돌연변이는 이들 균주들이 UV에 대해 민감함을 입증함으로써 확인되었다. Nutrient agar plate 상에 균주를 도말하여 33cm의 거리에서 15W 자외선 살균등을 8초간 조사하고 37℃에서 12~14시간 배양하였다. *uvrB* 돌연변이 균주는 UV 비조사 부분에서만 성장하기 때문에 비조사 부위에서 성장하는 균주를 선택하였다. TA102는 UV에 대한 감수성이 없는 균주이기 때문에 UV를 조사하여도 plate 상에서 성장하는 균주를 선택하였다.

(4) R-factor 돌연변이

R-factor 균주는 plasmid가 약간 불안정하여 종종 그 형질을 잃어버리는 수가 있기 때문에 ampicillin 내성 인자의 존재에 대하여 정기적으로 검

사하였다.

Ampicillin 내성을 검사하기 위해서는 plate 상에 histidine 요구성 확인에 설명된 방법을 사용하여 ampicillin을 함유하는 plate(TA102는 ampicillin과 tetra- cyclin) 상에 균주를 도말하고 12~24시간 동안 배양한 후 plate 상에서 성장하는 균주를 선택하였다.

4) 균주의 보관 및 배양

(1) 냉동보존

시험 균주는 Ames와 McCann의 방법(1982)에 따라 동결저장을 할 수 있는 frozen permanent를 제조하여 -80℃의 냉동고에 보관하면서 시험에 사용하였다. 즉 Ames로부터 제공받은 TA97, TA98, TA00 및 TA102를 oxoid broth에서 37℃ incubator에서 10시간 배양한 후 멸균된 DMSO 용액을 배양액 1ml당 90 μ l를 가하고 완전히 혼합한 후 멸균된 2ml의 eppendorf tube에 분주하여 -80℃ 냉동고에서 급속 동결하였다.

(2) Master plate의 제조

매 실험 직전, 자연 복귀돌연변이(spontaneous revertant) 수가 정상에서 벗어날 경우, 유전 형질을 잃어버린 경우 및 표준돌연변이원에 대한 민감성이 떨어질 때 frozen permanent로부터 배양액을 꺼내 master plate를 제조하였다. 냉동 보관 균주를 1개씩 실온에 녹인 후 멸균된 백금으로 단일 colony를 분리하여 TA97, TA98 및 TA100은 ampicillin plate상에 도말하여 37℃에서 48시간 배양하고, TA102는 ampicillin/tetracycline plate에 도말 배양한 후 단일 colony를 백금으로 취하여 액체배양액에서 다시 배양하여 ampicillin plate 또는 ampicillin/tetracycline plate 위에 백금으로 그은

후 37℃에서 12시간 배양하여 4℃의 냉장고에 보관하였다.

(3) 시험균주의 전 배양

Nutrient broth 12.5g을 증류수 500ml에 용해하여 고압멸균기에서 121℃, 20분간 멸균한 뒤 멸균된 glass test tube에 10ml씩 분주하였다. 여기에 master plate에서 배양된 시험균주를 각각 1 백금이 접종한 후 37℃ 진탕배양기에서 7~10시간 배양하였다. 배양시간에 따른 흡광도가 0.25~0.30이 되었을 때 실험에 사용하였으며, 또한 생육시간은 12시간을 초과하지 않도록 하였다.

5) 표준돌연변이원의 dose-response

감귤류 종실 메탄올 추출물 및 산귤종실 용매별 추출물의 변이원성 실험은 *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102를 이용하여 Maron과 Ames(1983)의 표준평판배지법에 따라 실시하였다. 돌연변이원성 시험에는 표준 변이원물질인 2-methoxychloro-9-(3-(2-chloroethyl)amino-propylamino) acridine (ICR-191, Sigma사), 4-nitro-*o*-phenylenediamine(NPD, Aldrich사), 4-nitroquino-line -*N*-oxide(4-NQO, Aldrich사)를 사용하였다.

각 농도별 발암물질을 미리 멸균시킨 glass cap tube에 각각 100 μ l씩 가하고 여기에 배양된 균주 100 μ l를 가한 다음 0.2M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 μ l가 되도록 하였다. 이것을 histidine/biotin이 첨가된 top agar에 2ml씩 가하여 골고루 퍼지도록 한 후 미리 준비해 둔 minimal glucose agar plate 상에 도말하고 평판 고화시켰다. 고화된 plate는 37℃에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이(*his*⁺ revertant colony) 수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

6) Spot test

미리 조제된 minimal glucose agar plate 상에 멸균된 glass cap tube에 균주를 $100\mu\text{l}$, histidine/biotin이 첨가된 top agar를 2ml를 가하여 잘 혼합한 후 plate상에 도말하여 고화시킨 후 멸균된 disc 여지를 멸균 핀셋으로 정 중앙에 놓아 살짝 눌러준다. 그리고 각각의 농도별 돌연변이원물질을 $60\mu\text{l}$ 씩 마이크로 피펫으로 취한 뒤 disc 여지에 살짝 떨어뜨린다. 이것을 37°C 에서 48시간 배양하여 균주의 성장이 유도되는지 혹은 저해가 되는지를 확인하였다.

7) 항돌연변이원성 시험

항돌연변이원성 시험을 위해 표준 돌연변이원 물질인 4-NQO, NPD 및 ICR191을 사용하였다. 각 시료를 미리 멸균시킨 glass cap tube에 각각 $50\mu\text{l}$, $100\mu\text{l}$ 씩 가하고 여기에 배양된 균주 $100\mu\text{l}$ 를 가한 다음 돌연변이원 물질을 각각 $100\mu\text{l}$ 씩 가하고, 0.2M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 $700\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이것을 37°C 에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 수를 측정하여 항돌연변이원성 유무를 판정하였다. 항변이 활성은 돌연변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율(%)로 나타내었다.

6. 감귤종자 추출물의 NDMA 생성 억제 검색

감귤종자 추출물의 NDMA 생성억제 효과 실험은 Fig. 4와 같이 실시하였다. 우선 DMA 1ml(1000ppm)와 NaNO₂ 5ml(1000ppm)에 추출시료를 농도별로 각각 1ml, 3ml 및 5ml를 첨가한 후 pH 3.4로 조절하여, 37℃에서 12시간 반응시켰다. 반응 후 ammonium sulfamate를 가하여 반응을 정지시키고 sodium azide 200 μ l와 내부표준액으로 NDPA 1ml(1ppm)를 가하여 반응용액을 추출하였으며, 이것을 무수황산나트륨으로 탈수시켜 농축한 것을 GC-TEA(Gas Chromatography-Thermal Analyzer)로 NDMA를 분석하였고, 이 때 GC-TEA의 분석조건은 Table 3과 같다. 대조구는 시료대신 증류수를 사용하여 상기와 동일한 방법으로 처리하였으며, 생성억제 효과는 시료의 첨가 전·후에 나타나는 peak의 백분율(%)로써 환산하여 나타내었다.



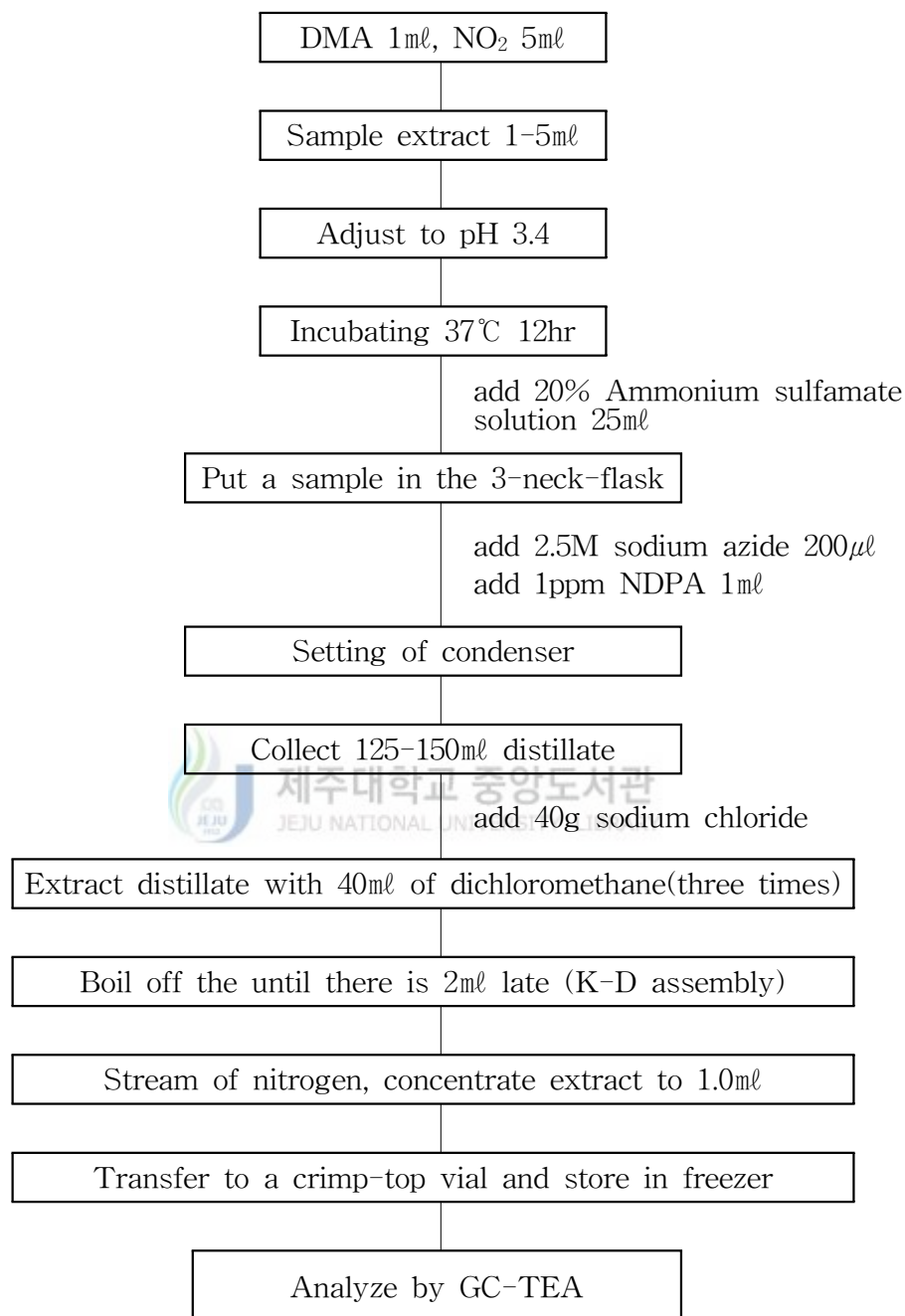


Fig. 4. Scheme for the preparation of *N*-nitrosamines for GC-TEA analysis.

Table 3. Conditions for GC-TEA analysis of *N*-nitrosamine

Items	Conditions
Instrument	GC, Hewlett-Packard Model 5890A TEA, Thermo Electron Corp. Model 543
Column	10ft × 2mm I. d. glass column
Packing material	10% Carbowax 12M/80-100 Chromosorb WHP
Carrier & flow rate	He, 25ml/min
Oven temp.	140-170°C, at 5°C/min
Injection temp.	180°C
Pyrolizer temp.	550°C
Interface temp.	200°C
Analyzer pressure	1.9 torr
Chart speed	0.5 cm/min



7. 감귤종자 추출물의 아질산염 소거 실험

1) 시료의 추출 및 조제

감귤종자 추출물의 아질산염 소거 실험을 위한 시료는, 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정할 때 탁도로 인한 실험오류를 방지하여 실험의 정확도를 높이기 위하여 우선 감귤류 종자를 각각 에테르로 지방질만을 추출하여 탈지시킨 후 시료 조제에 사용하였다.

즉 감귤종자 100g에 에테르 500ml를 가하여 40℃의 수욕조에서 3시간동안 추출하여 지방질을 탈지시킨 후 남은 잔사를 건조시켜 다시 메탄올 500ml를 가하여 40℃ 수욕조에서 3시간 동안 추출하여, 이것을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여 메탄올을 제거하였다(*Fig. 5*). 그리고 여기에 Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 가하여 각 100ml로 정용하였으며, 이 액을 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 아질산염 소거작용 실험을 위한 시료로 사용하였다.

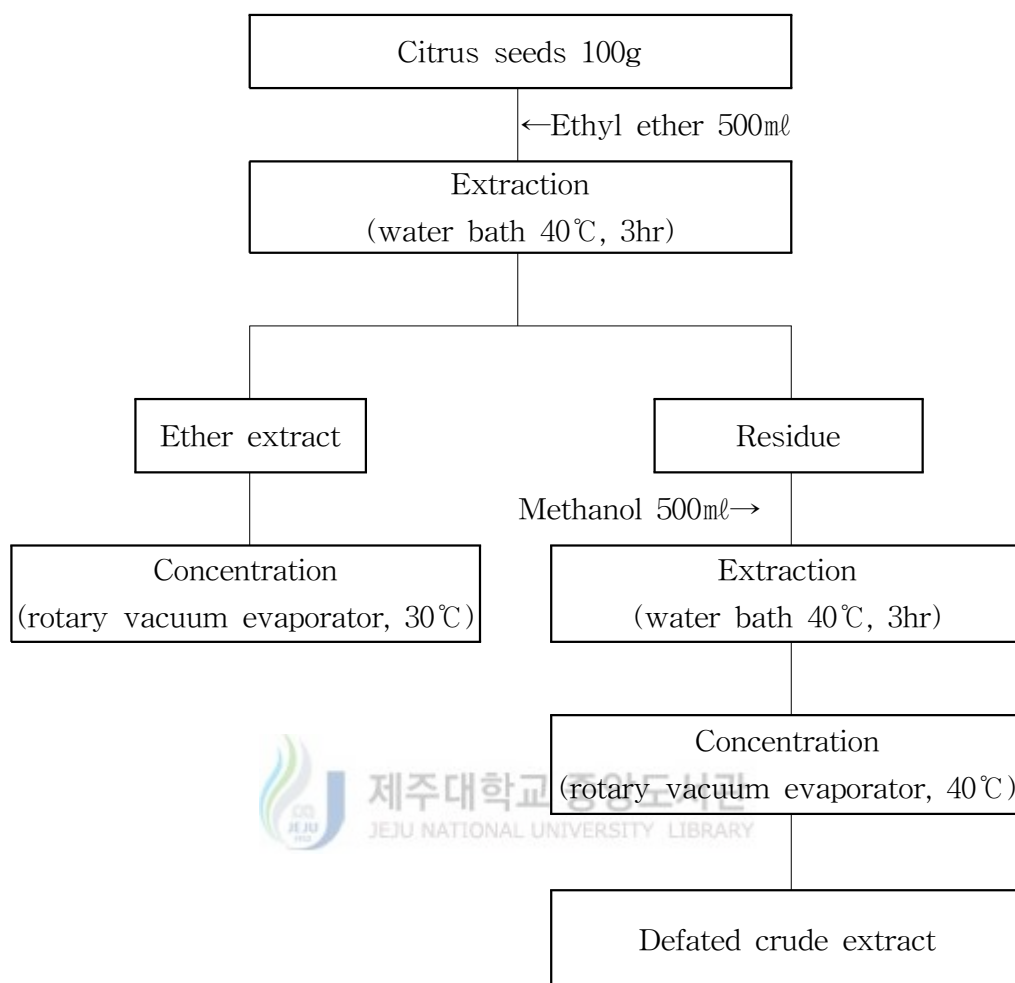


Fig. 5. Scheme for extraction of citrus seeds with methanol.

2) 아질산염 소거실험

아질산염 소거작용은 Kato 등(1987)과 강 등(1996)의 방법으로 측정하였다. 1mM NaNO₂ 용액 1ml에 감귤종자 추출물을 1, 3, 5ml 가하고, 여기에 0.1N 염산 및 0.2M 구연산완충용액을 사용하여 반응용액의 pH를 각각 2.2, 3.4 및 6.0으로 조정한 후 총 부피를 25ml로 하였다. 이 용액을 37℃에서 1, 3, 5시간 반응시킨 후 1ml를 취하고 여기에 2% 초산용액 5ml, Griess시약(30% 초산으로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것, 사용직전에 조제) 0.4ml를 가하여 잘 혼합시켜 15분간 실온에서 방치시킨 후 분광광도계를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 정량하였다. 그리고 대조구는 Griess 시약 대신 증류수를 0.4ml를 가하여 상기와 동일하게 처리하였다. 아질산염 소거작용은 화합물을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율(%)로 표시하였다.



$$N(\%) = \left(1 - \frac{A - C}{B} \times 100\% \right)$$

N : 아질산염 소거율(%)

A : 1mM NaNO₂용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B : NaNO₂용액의 흡광도

C : 시료자체의 흡광도

8. 감귤종자 추출물의 항균성

1) 시험균주

추출물의 항균성 검정은 식중독과 관계가 있는 대장균과 포도상구균, 그리고 식품저장 시 식품에 변패를 초래할 수 있는 효모 등을 선택하였으며 사용균주는 gram 양성균으로서 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus Licheniformis* ATCC 9945a, gram 음성균으로서 *Escherichia coli* ATCC 026, 진핵생물인 *Saccharomyces cerevisiae* IBM ATCC 4274, *Alcaligenes faecalis*를 한국중균협회에서 분양 받아 사용하였다.

2) 항균성 검정

감귤종자 메탄올 추출물의 항균성 검정은 nutrient broth(NB, Difco) 배지를 사용하였으며, 공시균주를 24시간 진탕 배양하여 paper disc법으로 측정하였다. 즉, 배지에 일정 시료를 함유한 직경 8mm의 paper disc(Toyo, Japan)를 올려놓고, 일정기간 배양하여 형성된 생육 저지환의 직경의 크기로 항균성을 평가하였다.

9. 감귤종자 추출물의 항산화 효과 검색

1) 전자공여능 측정

감귤종자 추출물의 항산화 활성도는 Blois(1958)의 방법을 변형하여 전자공여능으로 측정하였다. 각 시료 2ml에 DPPH solution (3×10^{-5} M) 2ml를 넣고 vortex한 후 30분 동안 방치한 다음, 517nm에서 흡광도(UV/VIS spectrophotometer; Opron 3000, Hanson Tech Co. Ltd., Seoul, Korea)를 측정하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(100 - \frac{\text{시료첨가구의흡광도}}{\text{무첨가구의흡광도}} \right) \times 100$$



2) Hydroxyl radical 소거활성 측정

감귤종자 추출물의 Hydroxyl radical의 소거활성 측정은 2-deoxyribose oxidation method(Chung, 1997)로 측정하였다. 시험관에 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10mM), EDTA(10mM)과 2-deoxyribose (10mM), 시료액 0.2ml와 0.1M phosphate buffer solution(pH7.4) 1.8 ml, H_2O_2 (10mM) 2ml를 가하고 37°C 수욕조에서 4시간 반응시킨 후 1mL의 TCA용액(2.8%)을 가하여 반응을 중지시키고, 1.0% TBA(thiobarbituric acid) 용액 1ml를 가하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 급속히 냉각하고 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Hydrogen peroxide 소거활성 측정

Muller(1985)의 방법에 따라 96 well micro plate에 PBS 100 μ l에 시료 20 μ l를 가한 후, 1.0mM의 H₂O₂ 20 μ l를 가하고 5분 방치 후 1.23mM ABTS (30 μ l, 1.25mM)와 peroxidase (30 μ l, 1 unit/mL)를 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader(ELISA processor II, Behring Co. Germany)로 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Superoxide anion 소거활성 측정

Marklund 와 Marklund(1974)의 방법에 따라 각 시료 2.6ml에 pH8.5로 보정한 tris HCl buffer(50mM tris+1mM EDTA) 3ml와 7.2mM pyrogallol 0.2ml를 가하고 10분간 방치한 다음 1N HCl 1ml로 반응을 정지시킨 후 325nm에서 흡광도를 측정하였다.



IV. 결과 및 고찰

1. 감귤종자 추출물의 일반성분

건조된 감귤종자들을 건식분쇄기로 분쇄시킨 추출용 시료의 일반성분을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 감귤종자들의 수분함량은 4~6%로 대부분 5%이하의 수분함량을 보였으나 이 중 편귤(*Citrus tangerina*)과 지각(*Citrus aurantium*)이 각각 6.4, 6.5%로 높았고, 감귤종자의 단백질함량은 11~15%이며, 이 중 산귤(*Citrus sunki*), 삼보감(*Citrus sulcata*)이 높은 함량을 보였고, 지방함량은 32~46%이었으며, 이 중 산귤(*Citrus sunki*), 삼보감(*Citrus sulcata*), 하귤(*Citrus natsudaidai*), 그리고 이에감(*Citrus iyo*)이 40%이상의 높은 지방함량은 보인 반면 당유자(*Citrus grandis*)가 가장 낮은 함량을 나타내었다. 탄수화물함량은 22~45%이었으며 산귤이 22.5%로 가장 낮았고, 당유자가 45.1%으로 가장 높은 탄수화물 함량을 보였다. 그리고 회분함량은 2~4%이었으며 산귤과 유자가 각각 4.1% 및 4.4%로 가장 높은 회분함량을 나타내었다.

감귤류 종자 중 산귤은 단백질과 지방함량이 높은 반면 탄수화물 함량은 상대적으로 낮았으며, 하귤은 지방함량이 상대적으로 높고, 당유자는 단백질과 지질함량이 다른 감귤류 종자에 비해 낮았지만, 탄수화물 함량은 상대적으로 높았으며, 삼보감인 경우 단백질과 지방함량이 상대적으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 결과적으로 추출용 시료로 사용하기 위해 건조하였기 때문에 수분함량이 낮고, 단백질, 지방, 탄수화물 함량이 상대적으로 높

았으며, 특히 지방함량은 대두 17.8%(수분함량 9.7%일 때)에 비해 높았으며 들깨 44.4%(수분함량 5.0%일 때), 땅콩 45.2%(수분함량 7.7%일 때)보다 상대적으로 낮은 지질함량을 보여주었다(농촌진흥청, 1996).

Table 4. Proximate composition of citrus seeds

(%)

Sample	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude fiber	Ash
<i>C. obovoidea</i>	4.1	14.1	37.5	39.2	3.2
<i>C. grandis</i>	4.8	11.2	32.6	45.1	2.8
<i>C. sunki</i>	4.7	15.0	42.6	22.5	4.1
<i>C. sulcata</i>	4.2	15.0	46.2	30.0	3.5
<i>C. tangerina</i>	6.4	13.3	36.2	38.8	2.9
<i>C. natsudaoidai</i>	4.4	12.2	40.8	37.8	3.0
<i>C. iyo</i>	4.2	12.1	41.9	31.2	3.1
<i>C. junos</i>	5.3	13.2	39.7	42.1	4.4
<i>C. aurantium</i>	6.5	11.8	35.4	28.9	3.2

2. 감귤종자 추출물의 고형분 함량 및 수율

건조하여 분쇄된 감귤종자 100g을 40℃의 수욕조에서 3시간 동안 메탄올로 추출한 감귤종자의 고형분 함량과 추출수율은 Table 5와 같다. 감귤종자의 고형분 함량은 2.1~5.5%로 나타났고, 이 중에서 편귤과 유자가 높은 고형분 함량을 나타내었으며, 추출수율은 2.2~5.7%로 나타났다.

Table 5. Solid content and yield of methanol extracts from citrus seeds (%)

Sample	Solid content	Extraction yield
<i>C. obovoidea</i>	3.84	3.96
<i>C. grandis</i>	2.16	2.26
<i>C. sunki</i>	3.17	3.32
<i>C. sulcata</i>	3.24	3.38
<i>C. tangerina</i>	4.34	4.62
<i>C. natsudaoidai</i>	2.16	2.26
<i>C. iyo</i>	2.65	2.75
<i>C. junos</i>	5.52	5.76
<i>C. aurantium</i>	3.47	3.73

3. 감귤종자 추출물의 플라보노이드 및 총 페놀함량

감귤종자 추출물의 플라보노이드 함량과 총 페놀 함량을 정량한 결과는 Table 6과 같다. 전체적으로 10mg/100g 이상의 함량을 나타내었으며, 특히 하귤과 삼보감, 그리고 당유자에서 20mg/100g 이상의 높은 함량을 나타내고 있음을 알 수 있다.

감귤종자 추출물의 페놀 함량을 살펴보면, 전체적으로 20mg% 이상의 높은 함량을 보이는 가운데, 당유자가 가장 높게 나타났으며 하귤과 산귤이 그 다음으로 높은 함량을 나타내 보이고 있다.

은 등(1996)은 조생종 감귤의 과육 및 과피에서 플라보노이드의 함량을 정량하였는데, 감귤 과육 중의 중요 플라보노이드는 hesperidin과 naringin이었으며 이들의 함량은 각각 6.53 및 2.95mg/100g이었다. 감귤 과피에서는 이 두 종류 플라보노이드의 양이 현저히 높은 것으로 나타났는데, hesperidin과 naringin이 각각 38.90 및 10.77mg/100g 이었다.

Ogawa 등(1990)은 다른 감귤 주스의 hesperidin을 조사한 결과 레몬은 20~39mg/100g, 유자는 11~17mg/100g 정도 함유하고 있다고 보고하였다.

그러나 본 실험에서 대상으로 한 제주산 잡감류와 종류도 다르고, 또한 과육이나 과피가 아닌 종실에서의 실험결과이므로 절대적인 비교평가가 어렵지만, 대체적으로 20mg/100g 이상의 함량을 보인 것은 과육이나 과피의 플라보노이드함량과는 차이가 있지만 대체적으로 이용가능성이 높은 정도의 함량을 나타내고 있는 것으로 판단된다.

Table 6. Content of flavonoid and total phenolics from citrus seeds
(mg/100g)

Sample	Flavonoid	Total phenolics
<i>C. obovoidea</i>	13.7	24.5
<i>C. grandis</i>	22.4	53.1
<i>C. sunki</i>	11.5	28.1
<i>C. sulcata</i>	23.5	22.0
<i>C. tangerina</i>	14.1	20.9
<i>C. natsudaidai</i>	22.4	33.7
<i>C. iyo</i>	48.5	25.8
<i>C. junos</i>	35.6	16.1
<i>C. aurantium</i>	21.8	22.1

4. 표준돌연변이원의 dose-response

4-NQO는 염기치환성 돌연변이원으로서 TA100과 TA102를 이용한 돌연변이 검정시 양성반응물질로, ICR-191은 구조이동성 돌연변이원으로 TA97를 이용한 돌연변이 검정시에 양성반응물질로, NPD는 구조이동성 돌연변이원 TA98과 염기치환성 돌연변이원 TA100을 이용한 돌연변이 검정에 이용되고 있는데(Maron과 Ames, 1983), 돌연변이원은 농도에 따른 revertant colony 수가 다르기 때문에 최대 저지환을 형성하기 직전의 돌연변이원의 최적농도를 결정하는 것이 중요하므로 dose-response와 spot test(Fig. 6~15)의 결과로부터 독성이 없고, 육안으로 계수하기 용이한 최적농도를 결정하였다.

TA97에 대한 표준돌연변이원 ICR-191의 시험균주 dose-response는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 50 μ g/plate까지 revertants colony가 지속적으로 증가하고 있으며, ICR-191에 대한 spot test 결과로부터 이 돌연변이원 물질이 ICR-191의 균주에 대한 세포독성을 나타내지 않고 복귀돌연변이 수를 계수하기 용이한 최적농도를 5 μ g/plate로 선정하였다.

표준돌연변이원 NPD에 대한 시험균주 TA98과 TA100에 대한 dose-response는 각각 Fig. 8 및 Fig. 10과 같다. TA98에 대한 NPD 복귀돌연변이 수는 100 μ g/plate 농도까지 직선적인 증가량을 보이고 있으며, spot test 결과로부터 TA98에 대해 독성을 보이지 않으며, 복귀돌연변이 수를 계수하기 용이한 25 μ g/plate을 최적농도로 결정하였고, TA100인 경우는 농도가 50 μ g/plate까지는 복귀돌연변이 수가 증가하고 있지만, 50 μ g/plate 이

상의 농도에서는 감소하고 있으며, spot test 결과로부터 25 μ g/plate에서 균주에 대한 독성이 보이지 않고, 계수하기 용이하여 최적농도로 결정하였다.

표준돌연변이원 4-NQO에 대한 시험균주 TA100과 TA102의 dose-response는 각각 Fig. 12 및 Fig. 14에 나타난 바와 같다. TA100인 경우는 4-NQO가 0.5 μ g/plate까지는 복귀돌연변이 수가 증가를 보이나, 0.5 μ g/plate 이상의 농도에서는 복귀돌연변이 수가 감소하는 추세를 보이고 있다. 이는 농도의 증가에 따른 돌연변이원의 독성작용의 영향으로서 spot test 결과로부터 0.5 μ g/plate에서 저해존을 형성하는 것을 볼 수 있다. 따라서 dose-response와 spot test를 통하여 독성을 나타내지 않고 계수하기 용이한 최적농도를 0.25 μ g/plate로 선택하였다. TA102에 대한 4-NQO의 dose-response로부터 1.0 μ g/plate까지 계속적으로 증가를 보이는 것을 볼 수 있고, spot test 결과에서도 균주에 대한 독성을 나타내지 않아 복귀돌연변이 수를 계수하기 용이한 0.25 μ g/plate를 최적농도로 선택하였다.



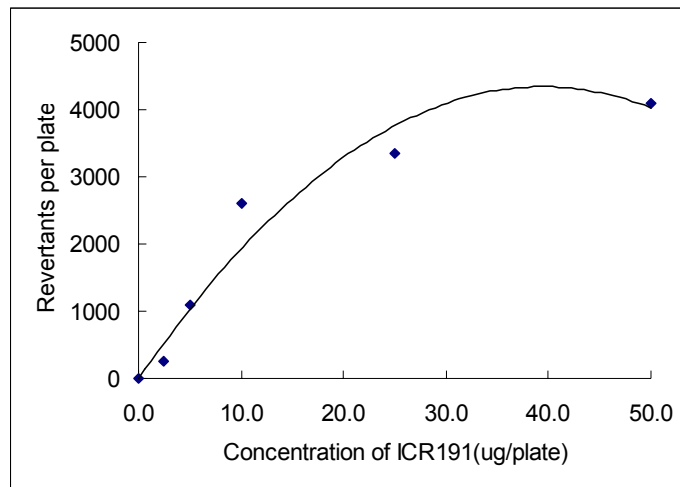


Fig. 6. Dose-response of ICR-191 for *S. typhimurium* TA97 strains (Spontaneous revertants are subtracted).

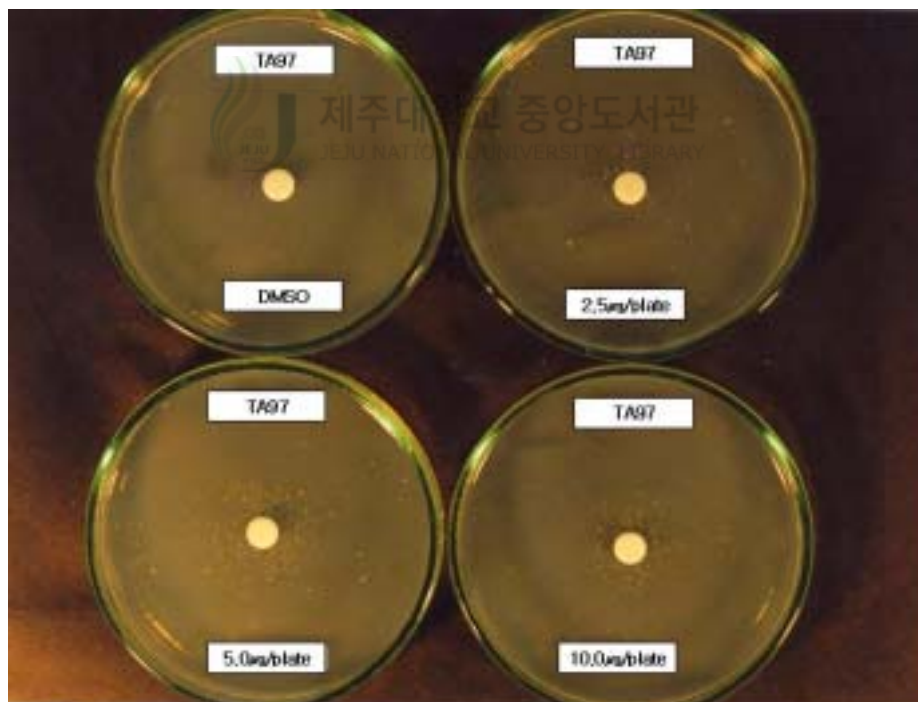


Fig. 7. Spot test of ICR-191 for *S. typhimurium* TA97 strain.

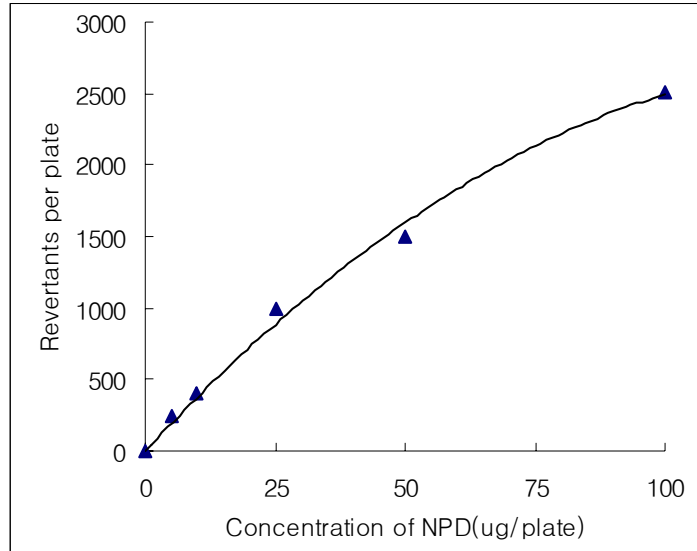


Fig. 8. Dose-response of NPD for *S. typhimurium* TA98 strains (Spontaneous revertants are subtracted).



Fig. 9. Spot test of NPD for *S. typhimurium* TA98 strain.

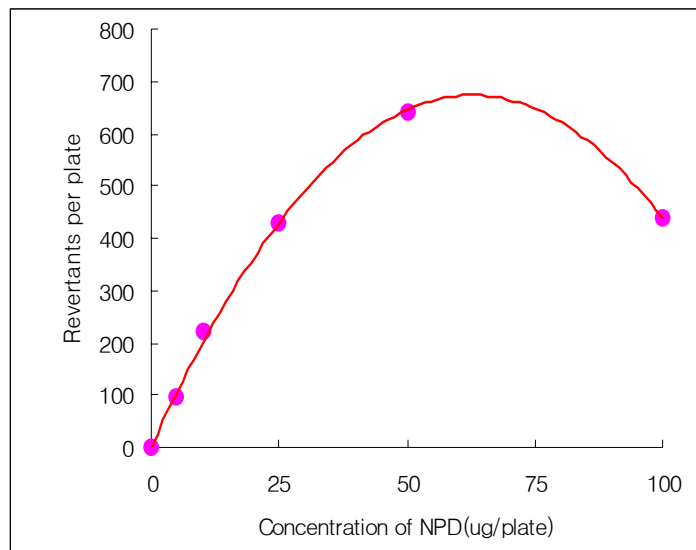


Fig. 10. Dose-response of NPD for *S. typhimurium* TA100 strains (Spontaneous revertants are subtracted).

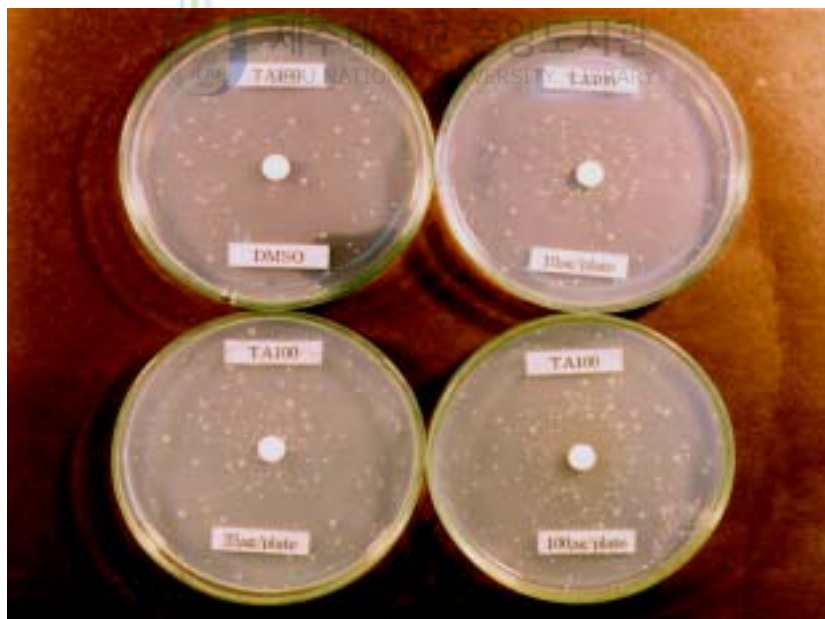


Fig. 11. Spot test of NPD for *S. typhimurium* TA100 strain.

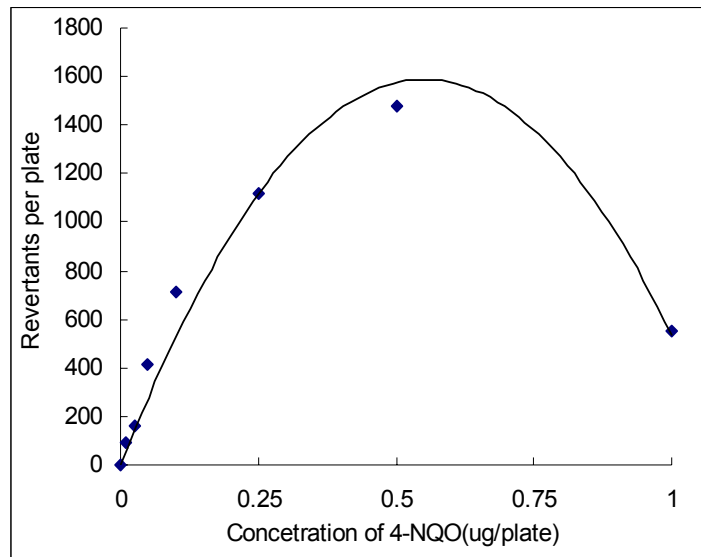


Fig. 12. Dose-response of 4-NQO for *S. typhimurium* TA100 strains (Spontaneous revertants are subtracted).

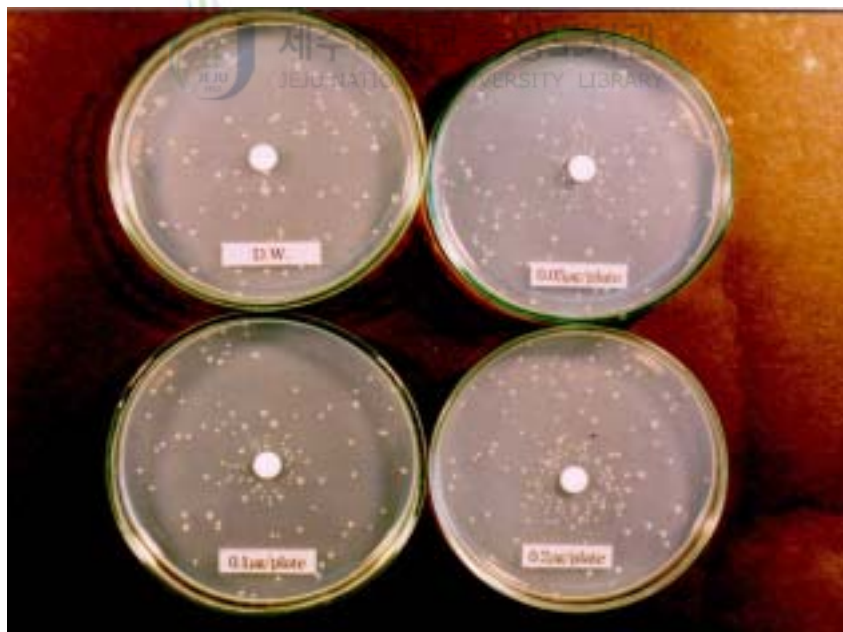


Fig. 13. Spot test of 4-NQO for *S. typhimurium* TA100 strain.

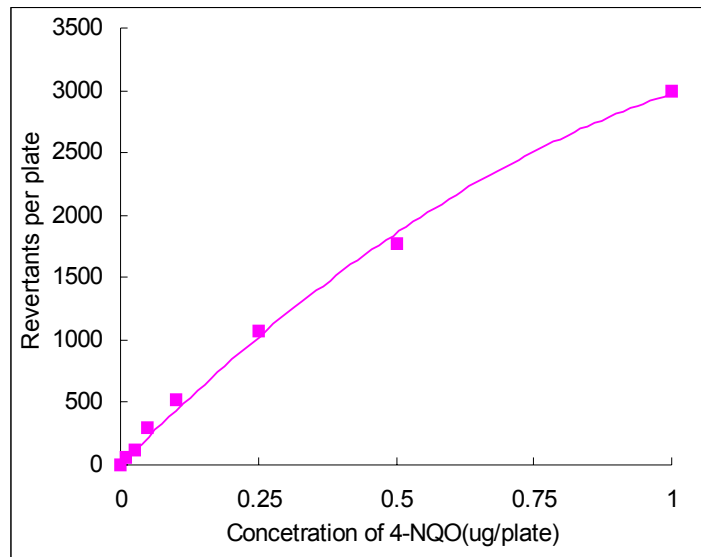


Fig. 14. Dose-response of 4-NQO for *S. typhimurium* TA102 strains (Spontaneous revertants are subtracted).

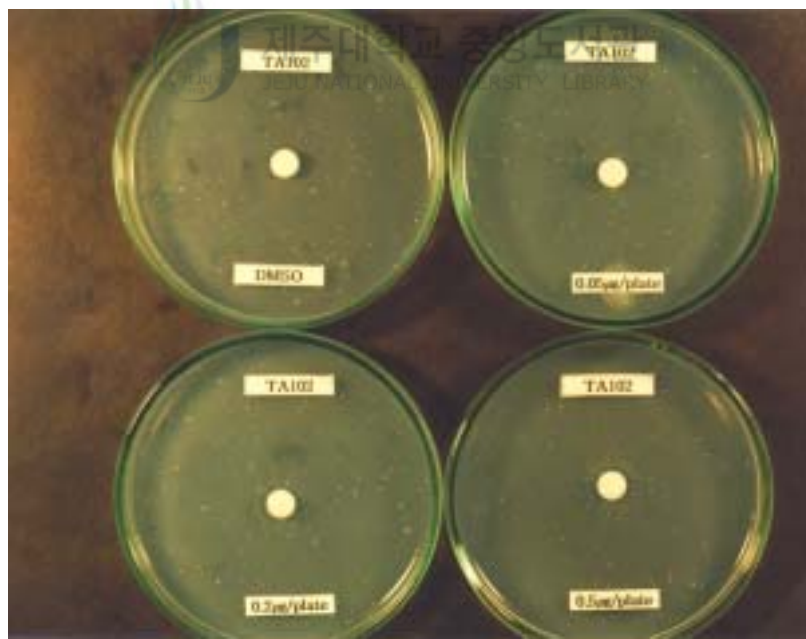


Fig. 15. Spot test of 4-NQO for *S. typhimurium* TA102 strain.

5. 감귤 종자 추출물의 (항)돌연변이원성

1) 감귤 종자 추출물의 돌연변이원성

감귤 종실 추출물들에 대한 돌연변이 시험의 목적은 시료 자체의 돌연변이원성을 확인하고 첨가량 증가에 따른 균주에 대한 세포독성효과를 확인하여 항돌연변이원성 시험에 적합한 첨가량을 확인하기 위하여 실시하였다. 감귤 종실 메탄올 추출물들의 *S. typhimurium* TA 균주에 대한 돌연변이원성 시험 결과는 Table 7에 나타내었다.

산귤 메탄올 추출물을 *S. typhimurium* TA 균주의 돌연변이원에 대한 positive와 용매의 negative를 서로 비교한 결과 *S. typhimurium* TA균주에 대해 자체 돌연변이원성은 보이지 않았으나 강한 세포독성을 보이기 때문에 산귤 종실 메탄올 추출물을 DMSO로 희석하면서 독성이 나타내지 않을 때까지 시험하였는데, 최종적으로 4배 희석되었을 때 균주에 대한 세포독성을 보이지 않아 항돌연변이원성 시험에 사용하였으며, 하귤, 이예감, 당유자, 금감자, 삼보감, 편귤 지각, 금감도 각각의 균주에 대한 자체 돌연변이원성과 뚜렷한 세포독성을 보이지 않았다. 유자의 경우 *S. typhimurium* TA102에서 plate 당 $100\mu\text{l}$ 첨가구에서 복귀돌연변이수가 80 ± 1 로 positive와 negative를 비교한 결과 세포독성이 의심되기 하지만 독성시험에서 뚜렷한 세포독성이 보이지 않아 항돌연변이원성 시험에 사용하였다.

Table 7. Mutagenic activity of different solvent extracts of Citrus seeds

Citrus seed	Extracts (μl /plate)	Revertants per plate				
		TA97	TA98	TA100	TA102	
Positive control	100	858 \pm 46	959 \pm 35	452 \pm 47	1059 \pm 53	1209 \pm 85
Negative control	D.W.	76 \pm 12	21 \pm 6	91 \pm 18		233 \pm 22
	DMSO	54 \pm 9	19 \pm 8	78 \pm 27		186 \pm 29
<i>C. sunki</i>	50	69 \pm 11	21 \pm 2	69 \pm 5		186 \pm 14
	100	35 \pm 6	10 \pm 1	66 \pm 6		176 \pm 30
<i>C. natsudaidai</i>	50	75 \pm 8	18 \pm 1	87 \pm 4		167 \pm 5
	100	53 \pm 3	15 \pm 2	66 \pm 5		124 \pm 7
<i>C. iyo</i>	50	58 \pm 6	20 \pm 2	87 \pm 6		227 \pm 24
	100	39 \pm 9	11 \pm 1	45 \pm 4		172 \pm 8
<i>C. junos</i>	50	85 \pm 11	25 \pm 3	90 \pm 6		263 \pm 13
	100	49 \pm 16	11 \pm 2	61 \pm 4		193 \pm 7
<i>C. grandis</i>	50	61 \pm 13	19 \pm 3	68 \pm 3		171 \pm 11
	100	31 \pm 13	14 \pm 3	50 \pm 3		80 \pm 1
<i>C. obovoidea</i>	50	83 \pm 13	22 \pm 7	74 \pm 12		268 \pm 33
	100	58 \pm 16	15 \pm 6	52 \pm 7		159 \pm 6
<i>C. sulcata</i>	50	87 \pm 5	26 \pm 7	71 \pm 10		264 \pm 16
	100	58 \pm 15	18 \pm 4	50 \pm 11		157 \pm 22
<i>C. tangerina</i>	50	65 \pm 3	33 \pm 9	120 \pm 7		216 \pm 12
	100	54 \pm 4	20 \pm 2	100 \pm 13		163 \pm 5
<i>C. aurantium</i>	100	85 \pm 3	30 \pm 3	113 \pm 13		205 \pm 21
	100	61 \pm 5	19 \pm 2	97 \pm 8		164 \pm 8

Each value represents the mean \pm S.D. of four plates.

Negative control : 100 μl of DMSO or D.W. per plate was added instead from citrus seeds extract.

Mutagen : ICR-191(TA97), NPD(TA98 and TA100), 4-NQO(TA100 and TA102)

2) 감귤 종자 추출물의 항돌연변이원성

(1) ICR-191에 유도된 TA97에 대한 항돌연변이원성

Table 8은 ICR-191에 의해 유도된 *S. typhimurium* TA97의 구조이동성 돌연변이원성에 대하여 감귤종실 메탄올 추출물의 항돌연변이원성을 시험한 결과이다.

감귤종실 메탄올 추출물의 plate당 50 μ l 투여할 때, 투여량에 대한 첨가농도는 대략적으로 plate당 산귤 0.38mg, 하귤 1.08mg, 이예감 1.38mg, 유자 2.76mg, 당유자 1.08mg, 금감자 1.92mg, 삼보감 1.62mg, 편귤 2.17mg, 지각1.74mg, 금귤 1.10mg이며, positive control과 비교한 돌연변이원성 억제활성은 편귤을 제외한 다른 감귤종실 추출물은 50% 이상의 억제활성을 보였으며, 이 중 산귤, 이예감, 당유자는 90% 이상의 높은 억제 활성을 보였으며, 감귤종실 메탄올 추출물을 plate당 100 μ l에 대한 첨가농도는 대략적으로 산귤 0.79mg, 하귤 2.16mg, 이예감 2.65mg, 유자 5.52mg, 당유자 2.16mg, 금감자 3.84mg, 삼보감 3.24mg, 편귤 4.34mg, 지각 3.47mg, 금귤 2.19mg이며, 삼보감, 금감, 지각을 제외한 나머지 감귤류는 80% 이상이 높은 억제효과를 보이고 있다. 그 중에서도 산귤, 이예감, 유자, 당유자는 약 95% 이상의 억제효과를 보여주고 있다. ICR-191은 반응기가 DNA의 guanine의 7-N 위치에 결합해서 독성을 나타내는 acridine 유도체로서 구조이동성 돌연변이 유발하지만 염기치환성 돌연변이는 유발하지 않는 양성돌연변이원성 물질이다(Drake, 1973; Levin 등, 1982).

구조이동성 돌연변이 균주인 *S. typhimurium* TA97에서는 산귤, 하귤, 이예감 추출물이 강한 항돌연변이원성 활성을 나타내었다. 박(1994)은 미역, 다시마 및 톳 추출물의 용매별 추출물 중 에틸에테르, 헥산 추출물에서 강한 돌연변이 억제 활성을 보고하였고, 정(1999)는 톳 메탄올 추출물을 용매별로 분획하여 시험한 결과 hexane 분획물에서 강한 억제활성이 있었다고 보고하고 있다.

Table 8. Antimutagenic effects forward ICR-191 with induced mutations of methanol extracts from citrus seeds

Citrus seed	Extracts (μl /plate)	Revertants per plate
		TA97-ICR191
Positive control		1099 \pm 3
<i>C. sunki</i>	50	38 \pm 8(97)
	100	0 \pm 0(100)
Positive control		847 \pm 94
<i>C. natsudaiddai</i>	50	227 \pm 36(73)
	100	134 \pm 25(84)
<i>C. iyo</i>	50	69 \pm 8(92)
	100	40 \pm 8(95)
<i>C. junos</i>	50	286 \pm 22(66)
	100	49 \pm 9(94)
<i>C. grandis</i>	50	97 \pm 12(89)
	100	33 \pm 13(96)
Positive control		760 \pm 49
<i>C. obovoidea</i>	50	318 \pm 34(58)
	100	135 \pm 7(82)
<i>C. sulcata</i>	50	263 \pm 33(65)
	100	170 \pm 23(78)
<i>F. margarita</i>	50	343 \pm 41(55)
	100	256 \pm 17(66)
Positive control		727 \pm 36
<i>C. tangerina</i>	50	647 \pm 37(11)
	100	75 \pm 13(90)
<i>C. aurantium</i>	50	354 \pm 50(50)
	100	190 \pm 14(74)

Each value represents the mean \pm S.D. of four plates.

Negative control : 100 μl of DMSO per plate was added instead from *citrus seeds* extract.

Spontaneous revertants are subtracted.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertants of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

(2) NPD에 유도된 TA98과 TA100에 대한 항돌연변이원성

S. typhimurium TA98과 TA100 균주를 이용하여 감귤종실로부터 온 메탄올 추출물이 NPD에 의해 유도되는 돌연변이원성을 억제하는 효과를 검색한 결과는 Table 9에 나타내었다. Table 9에서 보는 바와 같이 TA98에서 NPD에 의해 유도된 구조이동성 돌연변이원성에 대한 감귤종실 메탄올 추출물의 억제활성은 plate당 50 μ l 투여하였을 때 모든 감귤류에서 약 80% 이상의 억제효과를 나타내었는데, 그 중에서도 특히 산귤, 이예감, 당유자는 약 95% 이상의 높은 억제효과를 보였다. 감귤종실 메탄올 추출물을 plate 당 100 μ l 투여하였을 때 모든 감귤류는 약 85% 이상이 높은 억제효과를 보였는데, 그 중에서도 산귤, 하귤, 이예감, 유자, 당유자, 편귤, 지각은 약 95% 이상의 높은 억제효과를 보여 주고 있다.

Table 10에서는 TA100에서 NPD에 의해 유도된 염기치환성 돌연변이원성에 대한 감귤종실 메탄올 추출물의 억제활성은 plate당 50 μ l 투여하였을 때 이예감, 당유자, 삼보감, 편귤 약 50% 이상의 억제효과를 나타내었으며, 그 중에서도 당유자는 88% 정도의 높은 억제효과를 보였다. 감귤종실 메탄올 추출물을 plate당 100 μ l 투여하였을 때 모든 감귤류는 약 50% 이상이 억제효과를 보이고 있으며, 그 중에서도 산귤, 이예감 유자, 당유자, 삼보감, 금감, 편귤은 약 70% 이상의 높은 억제효과를 보여 주고 있다.

백(1988)등은 인삼 saponin이 구조이동성 균주인 TA98에 대하여 항돌연변이 활성이 있으며 saponin 양이 증가함에 따라 활성이 증가하였다고 보고하였고, Okabe 등(1996)은 토란 추출물의 Trp-P-2에 의해 유도된 TA98에 억제활성을 보고하였으며, Lee(1997) 등은 십자화과 채소류의 메탄올 추출물이 표준돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)에 의해 유도된 TA98과 TA100에 대해 높은 억제활성을 보고하고 있다.

Table 9. Antimutagenic effects forward NPD with induced mutations of methanol extracts from citrus seeds

Citrus seed	Extracts (μl /plate)	Revertants per plate	
		TA98-NPD	TA100-NPD
Positive control		774 \pm 14	519 \pm 13
<i>C. sunki</i>	50	18 \pm 2(97)	498 \pm 19(4)
	100	0 \pm 0(100)	90 \pm 33(83)
Positive control		1139 \pm 44	531 \pm 94
<i>C. natsudaoidai</i>	50	79 \pm 7(93)	395 \pm 100(26)
	100	47 \pm 8(96)	230 \pm 32(57)
<i>C. iyo</i>	50	16 \pm 4(99)	253 \pm 94(52)
	100	2 \pm 1(100)	146 \pm 67(72)
<i>C. junos</i>	50	83 \pm 11(93)	326 \pm 53(39)
	100	20 \pm 7(98)	110 \pm 29(79)
<i>C. grandis</i>	50	18 \pm 4(98)	61 \pm 12(88)
	100	2 \pm 2(100)	25 \pm 14(95)
Positive control		1093 \pm 16	454 \pm 27
<i>C. obovoidea</i>	50	207 \pm 63(81)	325 \pm 30(29)
	100	127 \pm 44(88)	164 \pm 23(64)
<i>C. sulcata</i>	50	182 \pm 56(83)	236 \pm 77(48)
	100	114 \pm 62(90)	127 \pm 94(72)
<i>F. margarita</i>	50	253 \pm 47(77)	263 \pm 70(42)
	100	138 \pm 42(87)	138 \pm 15(70)
Positive control		828 \pm 64	301 \pm 54
<i>C. tangerina</i>	50	121 \pm 14(85)	150 \pm 11(50)
	100	0 \pm 13(100)	36 \pm 14(88)
<i>C. aurantium</i>	50	145 \pm 43(82)	222 \pm 60(26)
	100	0 \pm 5(100)	113 \pm 51(62)

Each value represents the mean \pm S.D. of four plates.

Negative control : 100 μl of DMSO per plate was added instead from *citrus seeds* extract.

Spontaneous revertants are subtracted.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertants of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

(3) 4-NQO에 유도된 TA100과 TA102에 대한 항돌연변이원성

표준돌연변이원 4-NQO에 의해 유도된 *S. typhimurium* TA100과 TA102 균주 대한 감귤종실 메탄올 추출물에 돌연변이원성 억제효과를 Table 10에 나타내었다.

Table 10에 보는 바와 같이 TA100에서 NPD에 의해 유도된 돌연변이원성에 대한 억제효과는 감귤종실 메탄올 추출물을 plate당 50 μ l 투여하였을 때 산귤, 유자, 당유자, 삼보감, 금감, 편귤, 지각 약 50% 이상의 억제효과를 나타내었으며, 그 중에서도 삼보감, 편귤, 지각은 약 80% 이상의 높은 억제효과를 나타내었다. 감귤종실 메탄올 추출물을 plate당 100 μ l 투여하였을 때 모든 감귤류는 약 70%이상이 억제효과를 보였으며, 그 중에서도 하귤, 금감자, 삼보감, 금감, 편귤, 지각은 약 90% 이상의 높은 억제효과를 보였다.

표준돌연변이원인 4-NQO에 의해 유도된 TA102 균주에 대한 감귤종실 메탄올 추출물의 억제효과는 plate당 50 μ l 투여하였을 때 삼보감, 편귤, 지각 약 50% 이상의 억제효과를 보여주고 있으며, 그 중에서도 편귤 약 80% 정도의 높은 억제효과를 보였다(Table 10). 감귤종실 메탄올 추출물을 plate당 100 μ l 투여하였을 때 모든 감귤류는 약 50% 이상이 억제효과를 나타내었으며, 그 중에서도 당유자, 금감자, 삼보감, 금감, 편귤 지각은 약 80% 이상의 높은 억제효과를 보였다.

정(1999)은 톳의 용매별 추출물에 대한 4-NQO에 의해 유도된 염기치환성 돌연변이균주인 TA100과 TA102 돌연변이원성 억제시험에서 메탄올, 헥산, 에틸아세테이트, 클로로포름 추출물에서 강한 억제활성을 보고하였고, Borob'eva (1995a, 1995b) 등은 *B. bifidum*의 2-nitrofluorene와 4-NQO에 대한 항돌연변이원성 보고하였으며, 이와 지(1996)는 Bifidobacterium이 4-NQO에 대한 억제효과를 보고하였으며, 함(1997)은 목이 및 석이 메탄올 추출물의 4-NQO에 의해 유도된 TA100과 TA102에 대한 돌연변이원성 억제효과를 보고하였고, 황과 함(1999)은 참취뿌리 에탄올 추출물이 4-NQO에 유도된 TA100에 강한 억제활성을 나타내었다고 보고하고 있다.

Table. 10. Antimutagenic effects forward 4-NQO with induced mutations of methanol extracts from citrus seeds

Citrus seed	Extracts (μl /plate)	Revertants per plate	
		TA100-4-NQO	TA102-4-NQO
Positive control		990 \pm 35	1405 \pm 90
<i>C. sunki</i>	50	326 \pm 16(67)	1051 \pm 7(25)
	100	297 \pm 8(70)	700 \pm 55(50)
Positive control		1119 \pm 74	1159 \pm 26
<i>C. natsudaiddai</i>	50	854 \pm 32(24)	723 \pm 21(38)
	100	114 \pm 6(90)	456 \pm 23(61)
<i>C. iyo</i>	50	644 \pm 29(42)	599 \pm 16(48)
	100	267 \pm 13(76)	494 \pm 23(57)
<i>C. junos</i>	50	576 \pm 12(49)	762 \pm 23(34)
	100	258 \pm 32(77)	558 \pm 24(52)
<i>C. grandis</i>	50	535 \pm 34(52)	588 \pm 27(49)
	100	140 \pm 6(88)	180 \pm 11(85)
Positive control		1218 \pm 55	1062 \pm 195
<i>C. obovoidea</i>	50	534 \pm 26(56)	671 \pm 120(37)
	100	87 \pm 9(93)	210 \pm 70(80)
<i>C. sulcata</i>	50	220 \pm 57(82)	429 \pm 125(60)
	100	58 \pm 10(95)	174 \pm 13(84)
<i>F. margarita</i>	50	525 \pm 61(61)	606 \pm 38(43)
	100	79 \pm 16(94)	170 \pm 37(84)
Positive control		907 \pm 45	1210 \pm 27
<i>C. tangerina</i>	50	45 \pm 12(95)	213 \pm 13(79)
	100	0 \pm 12(100)	82 \pm 18(92)
<i>C. aurantium</i>	50	19 \pm 15(98)	410 \pm 18(59)
	100	0 \pm 9(100)	122 \pm 37(88)

Each value represents the mean \pm S.D. of four plates.

Negative control : 100 μl of DMSO per plate was added instead from *citrus seeds* extract.

Spontaneous revertants are subtracted.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertants of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

6. 감귤종자 추출물의 NDMA 생성 억제 효과

감귤종자의 메탄올추출물을 각각 1ml, 3ml 및 5ml씩 반응계에 첨가하였을 때의 NDMA 생성억제효과는 GC-TEA로 분리 정량하여 Fig. 16과 같이 나타난 것을 백분율로 환산하여 그 첨가량에 따른 억제율을 Table 11에 나타내었다.

감귤종자 메탄올추출물을 1ml씩 첨가하였을 때 편귤종자와 산귤종자에서 약 40%의 NDMA 생성억제효과를 보였지만 다른 감귤 종자류에서는 그 생성억제효과가 비교적 낮았다. 감귤종자 메탄올추출물을 3ml첨가한 시료의 경우에는 편귤에서 60%, 삼보감과 산귤에서는 40%이상의 억제효과를 보였으나, 나머지 시료 대부분이 추출물 1ml를 첨가했을 때보다 약간 높은 억제율을 보였다. 감귤종자 메탄올추출물을 5ml 첨가하였을 때, 삼보감에서 94%의 NDMA 생성억제효과를 보였으며, 편귤에서 72%, 당유자가 64%로 비교적 NDMA 생성 억제효과가 높은 편이었다. 이것은 삼보감과 당유자가 다른 감귤종자에 비해 많은 양의 플라보노이드를 함유하고 있고 또한 아질산염 소거효과도 다른 감귤종자 추출물 보다 높게 나타난 것으로 보아 플라보노이드에 의한 영향으로 추정되며, 이와 반대로 편귤은 다른 감귤종자 보다 총페놀 함량이 높아 이것에 의한 영향이라 생각된다.

따라서 감귤종류에 다소간의 차이는 있지만, NDMA 생성 억제율은 첨가량이 증가할수록 높게 나타났으며, 페놀 보다는 플라보노이드에 의한 영향이 큰 것으로 추정된다. 그러나 밀감, 오렌지 및 금귤에 대한 NDMA 생성 억제효과는 아스코르빈산 희분 보다는 페놀희분에서 95%이상의 높은 NDMA 생성억제효과를 나타낸다는 보고(송, 2000)도 있다.

NDMA 생성억제의 대표적인 물질은 ascorbic acid, α -tocopherol, 페놀성 화합물 등(Stich 등, 1982; Kuenzig 등, 1984; Schweinsberg와 Schott-kollaf,

1976)이며, 특히 ascorbic acid는 수용액 상태에서 pH 2~5 또는 그 이상의 범위에서도 아질산을 급속히 환원시켜 산화질소를 생성하고, 동시에 자신은 dehydroascorbic acid로 환원되어 NDMA의 생성을 억제시킨다고 하였다 (Fiddler 등, 1972).

또한 Gray와 Dugan(1975)은 모델계 실험에서 탄닌산 유도체를 식품 보존료 및 *N*-nitrosamine 생성 저해제로 사용하였으며, Theiler 등(1984)은 식육에 아질산염을 첨가하여 만든 모델계 실험에서 페놀성 물질이 *N*-nitrosamine 생성억제를 확인하였다. 그러나 페놀성화합물은 산성조건에서 니트로화 반응을 강력히 억제하나(Pignatelli 등, 1984), 알카리 반응조건에서는 오히려 NDMA 생성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Walker 등, 1982).

한편 phenol, guaiacol, resorcinol 등은 니트로화 반응을 촉진시키나, hydroquinone과 catechol은 강력히 억제시킨다고 보고하였고, caffeic acid, ferulic acid는 아질산염과 급속하게 반응함으로써 *N*-nitrosamine 생성을 억제시키며(Challis와 Bartlett, 1975), 천연식물성분이 NDMA 생성억제작용은 반응용액의 pH가 산성일수록, 시료의 첨가농도가 높을수록 억제효과가 크다고 하였다(이 등, 2000).

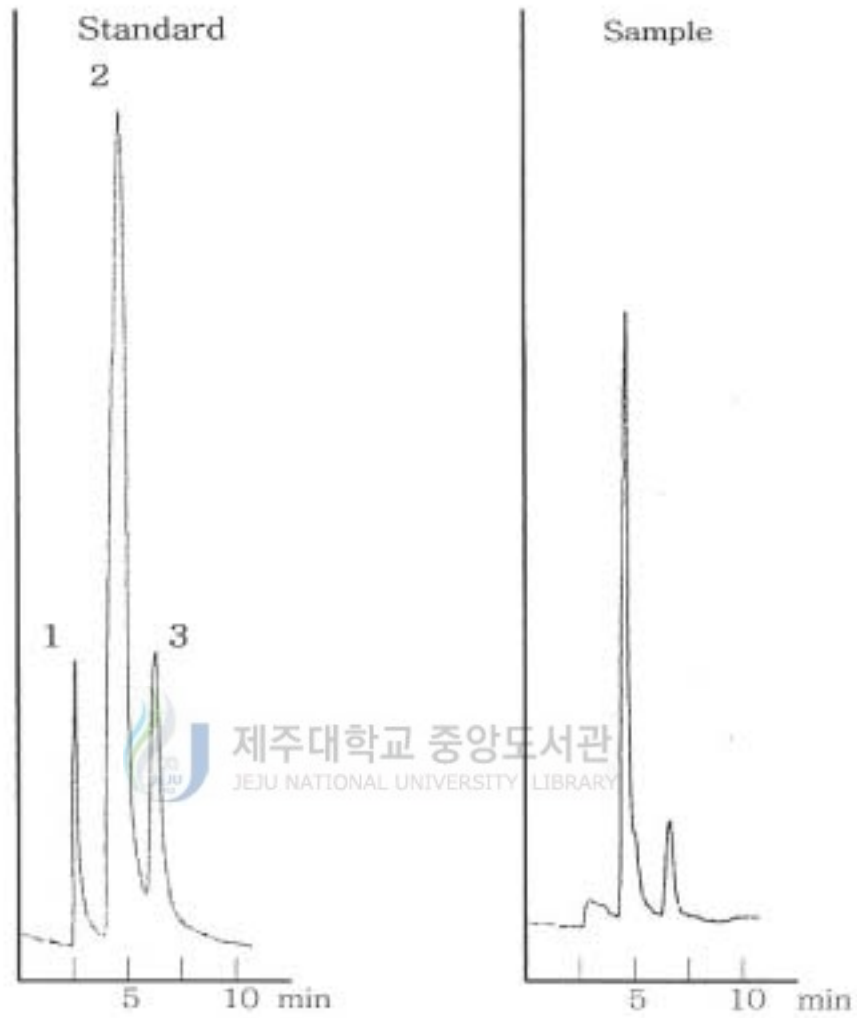


Fig. 16. GC-TEA chromatograms of *N*-nitrosamines.
1,Solvent; 2,NDMA; 3,NDPA

Table 11. Inhibition activity of citrus seed extracts addition amount on NDMA formation

(%)

Citrus	Amount of extract added(ml)		
	1	3	5
<i>C. obovoidea</i>	19.7	21.3	53.6
<i>C. grandis</i>	16.7	26.8	64.4
<i>C. sunki</i>	39.8	46.0	52.5
<i>C. sulcata</i>	1.2	44.5	94.0
<i>C. tangerina</i>	39.9	60.1	72.2
<i>C. natsudaidai</i>	34.0	39.4	47.4
<i>C. iyo</i>	26.4	29.7	30.5
<i>C. junos</i>	12.5	29.7	38.8
<i>C. aurantium</i>	21.0	37.1	55.6

7. 감귤종자 추출물이 아질산염의 소거에 미치는 영향

1) pH 1.2에서 아질산염 소거효과

감귤종자 메탄올추출물을 pH 1.2에서 행한 모델계 실험에서 아질산염의 소거효과에 대한 실험결과는 Table 12와 같다. 모든 종자 추출물에서 아질산염의 소거작용은 반응용액의 pH, 시간, 첨가량에 따라 상당한 차이를 보였다.

감귤종자 메탄올추출물을 각각 1ml, 3ml 및 5ml 첨가하여 각각 1시간에서 5시간동안 반응시켰을 때의 결과를 살펴보면, 우선 1시간 반응시켰을 때 금감자 35~64%, 당유자 21.2~55.8%, 산귤 32.1~57.6%, 삼보감 22.6~81.5% 이었고, 편귤 6.5~33.8%, 하귤은 15.8~46.9%, 이예감은 1.6~37.6%, 유자는 4.3~9.1%, 지각은 9.4~26.3%이었으며, 삼보감이 가장 높은 소거율을 보이고 있는 것이 확인 되었으며, 그 다음으로 산귤과 당유자 각각 57.6% 및 55.8%의 소거율을 보이고 있다.

3시간 반응시켰을 때의 소거효과는 금감자 36.7~68.3%, 당유자 23.7~64.9%, 산귤 34.0~87.9%, 삼보감 23.8~93.4%, 편귤 7.5~38.3%, 하귤 19.2~59.6%, 이예감 6.1~45.0%, 유자 10.2~36.7%, 지각은 9.8~27.8%이었으며, 역시 가장 높은 소거율을 보인 것은 삼보감(93.4%), 산귤(87.9%), 당유자(64.9%) 순으로 나타났다.

5시간 반응시켰을 때의 소거효과를 보면, 금감자 40.1~76.6%, 당유자는 22.3~72.5%, 산귤 36.9~94.1%, 삼보감 29.3~96.9%이었으며, 편귤 17.5~42.7%, 하귤 21.6~60.7%, 이예감 13.0~70.4%, 유자 17.3~38.7%, 지각은 17.6~37.0%이었으며, 삼보감과 산귤이 90%이상의 아주 높은 소거율을 보이고 있으며, 당유자와 이예감이 70%이상으로 높은 소거율을 보였다.

강 등(1996)은 pH 1.2~4.2부근에서 (+)catechinn, gentisic acid 및 gallic acid가 높은 아질산염 소거율을 보인다고 보고하였고, 정(2000)은 딸기, 마늘 케일 주스의 아질산염 소거작용은 반응용액의 pH가 낮은 수록, 시료첨가량이 높을수록 효과적이었다고 보고하였으며, 김 등(1987)은 김, 미역 및 청각의 메탄올 추출물을 pH 1.2, 4.0, 6.0에서 반응시킨 결과 pH 1.2에서 가장 높은 소거효과를 보인다고 하였다.

사람의 위내 pH와 비슷한 pH 1.2에서 감귤종자 메탄올 추출물의 아질산염 소거효과는 첨가량이 증가할수록 소거효과가 증가하였는데, 특히 시간에 따른 아질산염 소거효과를 확인한 결과 반응시간이 길수록 아질산염 소거율이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

특히 산귤과 삼보감은 첨가량이 증가할수록 반응시간이 길수록 90%이상의 아질산염 소거효과를 보였으며, 그 다음으로 당유자가 70%가 넘는 소거효과를 보이고 있다. 이에 반해 유자와 지각 등은 소거율이 그다지 높지 않았는데, 이 같은 현상은 이 두 종류의 감귤종자가 다른 감귤종자에 비해 총 페놀 함량이 낮은 데서 오는 결과로 예측되며, 이는 강 등(1996)과 Lee와 Choi(1993)의 주장대로 페놀성화합물과 아질산염소거효과와의 연관성이 있다는 보고를 뒷받침해 주고 있다.

이와 같이 아질산염 소거능은 페놀류나 플라보노이드 등에 의해 크게 영향을 받는 것으로 연관지어 판단할 수 있는데, 이를 바탕으로 이러한 성분을 가진 식품에 대한 조리 가공연구를 통해 실제적으로 가정이나 산업적인 부분에서 활용될 수 있도록 하는 지속적인 연구와 끊임없는 노력이 요구된다 하겠다.

Table 12. Nitrite scavenging effect of citrus seed extracts at pH 1.2 by reaction time and amount of addition

Sample	Reaction time(hr)	Amount of addition(ml)		
		1	3	5
<i>C. obovoidea</i>	1	35.2	58.3	64.2
	3	36.7	61.6	68.3
	5	40.1	67.5	76.6
<i>C. grandis</i>	1	21.2	40.6	55.8
	3	23.7	42.1	64.9
	5	22.3	48.2	72.5
<i>C. sunki</i>	1	32.1	41.6	57.6
	3	34.0	77.1	87.9
	5	36.9	80.3	94.1
<i>C. sulcata</i>	1	22.6	63.4	81.5
	3	23.8	78.6	93.4
	5	29.3	85.0	96.9
<i>C. tangerina</i>	1	6.5	27.6	33.8
	3	7.5	33.7	38.3
	5	17.5	36.6	42.7
<i>C. natsudaoidai</i>	1	15.8	35.9	46.9
	3	19.2	49.6	59.6
	5	21.6	55.4	60.7
<i>C. iyo</i>	1	1.6	20.9	37.6
	3	6.1	22.0	45.0
	5	13.0	64.2	70.4
<i>C. junos</i>	1	4.3	7.1	9.1
	3	10.2	18.2	36.7
	5	17.3	20.9	38.7
<i>C. aurantium</i>	1	9.4	20.1	26.3
	3	9.8	21.5	27.8
	5	17.6	27.2	37.0

2) pH 3.4에서 아질산염 소거효과

감귤종자 메탄올추출물을 pH 3.4에서 행한 모델계 실험에서 아질산염의 소거효과에 대한 실험결과는 Table 13과 같다. 모든 종자 추출물에서 아질산염의 소거작용은 반응용액의 pH, 시간, 첨가량에 따라 상당한 차이를 보였다.

pH 3.4에서 감귤종자 메탄올추출물을 1ml, 3ml 및 5ml 첨가하여 각각 1시간에서 5시간까지 반응시켰을 때의 결과를 살펴보면, 우선 1시간 반응시켰을 때 금감자 3.6~63.0%, 당유자 16.7~48.3%, 산귤 1.7~32.5%, 삼보감 0.5~41.2%, 편귤 6.7~30.9%, 하귤 15.8~41.9%이었고, 이에감은 1.1~12.4%, 유자는 0~6.1%, 지각은 3.2~19.3%이었는데, 금감자와 당유자가 각각 63% 및 48.3%로 가장 높은 소거효과를 보였으며, 역시 이에감과 유자가 가장 낮은 소거율을 보이고 있다.

다음으로 pH 3.4에서 3시간 반응시켰을 때에는 소거효과가 금감자 5.4~63.5%, 당유자 16.2~49.2%, 산귤 2.3~53.6%, 삼보감 10~58.4%, 편귤 6.9~36.7%, 하귤 19.2~57.4%이었고, 이에감은 10.2~53.6%, 유자는 3.7~17.3%, 지각은 8.2~24.3%이었는데, 금감자가 63.5%로 가장 높은 소거율을 보였고 그 다음으로 삼보감과 하귤이 각각 58.4% 및 54.7%의 비교적 높은 소거효과를 보이고 있었다.

그리고 pH 3.4에서 5시간 반응시켰을 때 소거효과는 금감자 18.0~64.9%, 당유자 17.0~54.7%, 산귤 7.2~53.6%, 삼보감 18.1~70.2%, 편귤 14.0~38.3%, 하귤 21.6~60.7%이었고, 이에감은 27.7~68.5%, 유자는 15.8~37.9%, 지각은 8.5~33.3%인 것으로 나타났는데, 여기에서는 삼보감과 이에감이 각각 70.2% 및 68.5%로 비교적 높은 소거효과를 보였다.

이를 종합적으로 판단해 볼 때 pH 3.4에서는 삼보감과 당유자가 꾸준한 소거율을 보이고 있는 것은 아질산염과 저급 아민류가 반응하여 N-nitroso

화합물을 생성시키는 최적 pH가 3.4부근이라고 보고한 것(Peter, 1975; Pivnick 등, 1987; Fox와 Acherman, 1968; Wolff와 Wasserman, 1972)을 미루어 보아 pH 1.2보다 비교적 소거효과가 낮게 나타나도록 영향을 미친 것으로 추측된다.

강 등(1996)은 아질산염 소거작용에 대한 실험에서 항산화의 효과가 높은 ascorbic acid 및 천연물중에 존재하는 페놀성 화합물의 역할에 대한 연구 보고를 하였다.

니트로화 반응의 최적 pH인 pH 3.4에서 아질산염의 소거작용은 시료추출물의 첨가량이 많을수록 소거효과가 증가함을 보이고는 있지만 반응시간에 따라 매우 불안정한 결과를 보였는데, 특히 몇몇 종자 추출물들은 반응시간이 경과함에 따라 아질산염의 소거작용이 오히려 감소하는 경향을 보였다. 그러나 금감자 종자추출물은 반응시간에 관계없이 아질산염의 소거작용이 높아 실험된 시료 중에서 그 안정성이 가장 좋은 것으로 판단된다.



Table 13. Nitrite scavenging effect of citrus seed extracts at pH 3.4 by reaction time and amount of addition

Sample	Reaction time(hr)	Amount of addition(ml)		
		1	3	5
<i>C. obovoidea</i>	1	3.6	41.4	63.0
	3	5.4	52.1	63.5
	5	18.0	58.2	64.9
<i>C. grandis</i>	1	16.7	36.4	48.3
	3	16.2	30.3	49.2
	5	17.0	43.2	54.7
<i>C. sunki</i>	1	1.7	28.2	32.5
	3	2.3	26.6	53.6
	5	7.2	28.2	53.6
<i>C. sulcata</i>	1	0	15.1	41.2
	3	10.0	36.6	58.4
	5	18.1	47.6	70.2
<i>C. tangerina</i>	1	6.7	23.2	30.9
	3	6.9	30.8	36.7
	5	14.0	33.7	38.3
<i>C. natsudaoidai</i>	1	15.8	34.5	41.9
	3	19.2	49.3	57.4
	5	21.6	55.2	60.7
<i>C. iyo</i>	1	1.1	9.6	12.4
	3	10.2	46.8	53.6
	5	27.6	53.1	68.5
<i>C. junos</i>	1	0	4.4	6.1
	3	3.7	9.6	17.3
	5	15.8	20.8	37.9
<i>C. aurantium</i>	1	3.2	12.1	19.3
	3	8.2	19.9	24.3
	5	8.5	24.1	33.3

3) pH 6.0에서 아질산염 소거효과

감귤종자 메탄올추출물을 pH 6.0에서 행한 모델계 실험에서 아질산염의 소거효과에 대한 실험결과는 Table 14와 같다. 모든 종자추출물에서 아질산염의 소거작용은 반응용액의 pH, 시간, 첨가량에 따라 상당한 차이를 보였다.

pH 6.0에서 감귤종자메탄올추출물을 1ml, 3ml 및 5ml 첨가하여 각각 1시간에서 5시간까지 반응시켰을 때의 결과를 살펴보면, pH 6.0에서 1시간 반응시켰을 때 아질산염 소거효과는 금감자 0.5~28.0%, 당유자 5.7~46.0%, 산귤 0~32.1%, 삼보감 0.5~36.5%, 편귤 0~8.1%, 하귤 0~18.0%이었고 이예감은 0.6~9.4%, 유자는 0~5.2%, 그리고 지각은 1.1~13.7%로 나타났는데, 당유자와 삼보감이 각각 46.0% 및 36.5%로 가장 높게 소거효과를 보였으며, 이에 반해 이예감과 유자는 아주 미미한 소거반응효과를 나타내었다.

pH 6.0에서 3시간 반응시켰을 때 소거효과는 금감자 5.0~45.2%, 당유자 17.0~51.3%, 산귤 1.8~34%, 삼보감 5.2~62.6%, 편귤 6.0~35.4%, 하귤 15.8~31.3%이었고, 이예감은 1.8~42.6%, 유자는 0~8.1, 지각은 6.6~27.0%로 나타났는데, 역시 당유자와 삼보감, 그리고 금감자와 이예감이 40~50% 이상으로 높은 소거율을 나타낸 반면, 유자에서는 거의 소거효과를 찾아 볼 수 없었다. pH 6.0에서 5시간 반응시켰을 때의 아질산염 소거효과가 금감자 5.7~51.2%, 당유자 23.0~48.5%, 산귤 3.1~34.0%, 삼보감 12.0~41.2%, 편귤 6.3~32.7%, 하귤 19.2~18.9%이었고, 이예감은 6.8~47.7%, 유자는 10.6~31.7%, 지각은 8.8~23.0%로 나타났었는데, 전체적으로 pH가 높아지면서 소거율이 감소하는 경향을 보였다..

정(2000)은 딸기, 마늘, 케일 주스는 pH 2.5, 4.2 및 6.0에서 아질산염 소거작용이 효과적이었으며, 특히 pH 6.0에서 ascorbate가 메탄올 추출물보다 아질산염 소거작용이 높았다고 보고하였다.

pH 6.0에서는 첨가량이 증가할수록 아질산염 소거효과는 증가하였지만, 반응시간에 따른 변화는 극히 미비하였으며, 특히 이들 중 금감자, 당유자, 삼보감이 높은 아질산염 소거효과를 보여주고 있었지만, 오히려 삼보감 등 대부분의 시료에서 3시간 반응보다 5시간 반응에서 낮은 소거율을 보였다.

아질산염의 소거효과가 산성 pH에서는 반응시간의 길이에 거의 정비례하여 증가하였으나, pH 3.4부터는 반응시간이 경과함에 따라 점점 감소하다가, pH 6.0에서는 반응시간이 길어질수록 아질산염의 소거효과가 오히려 떨어지는 결과를 보여주고 있다.

강 등(1996)은 pH 1.2~4.2부근에서 (+)catechinn, gentisic acid 및 gallic acid가 높은 아질산염 소거율을 보인다고 보고하였고, 정(2000)은 딸기, 마늘 케일 주스의 아질산염 소거작용은 반응용액의 pH가 산성일수록, 시료첨가량이 많을수록 효과적이었다고 보고하였으며, 김 등(1987)은 해조류(김, 미역, 청각) 메탄올 추출물을 pH 1.2, 4.0, 6.0에서 실험한 결과 pH 1.2에서 가장 높은 소거효과를 보고하였는데, 이는 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보였다.

Table 14. Nitrite scavenging effect of citrus seed extracts at pH 6.0 by reaction time and amount of addition

Sample	Reaction time(hr)	amount of addition(ml)		
		1	3	5
<i>C. obovoidea</i>	1	0.5	9.3	28.0
	3	5.0	25.1	45.2
	5	5.7	37.7	51.2
<i>C. grandis</i>	1	5.7	15.5	46.0
	3	17.0	42.1	51.3
	5	23.0	42.3	48.5
<i>C. sunki</i>	1	0	19.2	32.1
	3	1.8	24.0	34.0
	5	3.1	28.2	34.0
<i>C. sulcata</i>	1	0.5	4.7	36.5
	3	5.2	19.6	62.6
	5	12.0	35.2	41.2
<i>C. tangerina</i>	1	0	6.2	8.1
	3	6.0	23.4	35.4
	5	6.3	24.4	32.7
<i>C. natsudaoidai</i>	1	0	0	18.0
	3	15.8	11.2	31.3
	5	19.2	34.5	18.9
<i>C. iyo</i>	1	0.6	4.5	9.4
	3	1.8	28.0	42.6
	5	6.8	31.5	47.7
<i>C. junos</i>	1	0	1.7	5.2
	3	0	5.5	8.1
	5	10.6	16.3	31.7
<i>C. aurantium</i>	1	1.1	6.5	13.7
	3	6.6	18.0	27.0
	5	8.8	23.8	23.0

이상과 같이 감귤종자 메탄올추출물에 대한 아질산염 소거효과를 살펴본 결과는 pH 1.2, 3.4 및 6.0에서 아질산염 소거효과는 첨가량이 증가할수록 그 소거율이 증가하였는데, 특히 강산성인 pH 1.2에서 반응시간이 길어질수록 높은 소거효과를 보여주고 있지만, pH 3.4, 6.0에서는 반응시간이 경과함에 따라 아질산염의 소거작용이 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이는 식물체의 추출물에서 아질산염 소거작용을 실험한 김(2001)의 보고와 마찬가지로 반응계의 pH가 산성화 될수록 아질산염 소거능이 우수해 졌다는 사실과 감귤종자 추출물의 아질산염 소거효과에서 반응시간과 시료추출물의 첨가농도에 따른 아질산염의 증감패턴이 거의 일치하고 있음을 알 수 있었다.

강 등(1996)은 각종 페놀성 화합물의 아질산염 소거능을 pH 1.2, 3.0, 4.2 및 6.0에서 실험한 결과 pH 1.2에서 gentisic acid 및 gallic acid가 아질산염 소거작용에 효과적이었으나, pH 6.0에서 phenolic acid는 아질산염 소거작용이 낮았다고 보고하였다. Lee와 Choi(1993)는 catechin, chlorogenic acid, morin, luteolin, luteolin-n-O-glucoside, narigenin 등의 flavonoid류가 아질산염의 소거율이 상당히 높다고 보고하였고, 여 등(1994)은 pH에 따른 아질산염 소거작용은 위내의 pH와 유사한 pH 1.2에서 가장 높고, 알칼리 조건의 pH에서는 아질산염의 분해작용이 감소하는 경향을 보였는데, 이 같은 현상은 페놀 함량이 높은 획분에서 더 민감한 것으로 보아 아질산염 소거에 영향을 주는 물질은 주로 페놀화합물이라고 하였는데, 이는 아질산염 소거효과가 페놀성 화합물의 함량과 상관관계가 있다는 노 등(2002)의 주장과도 일치되고 있다.

천연물이 아질산염 소거작용에 대한 연구 결과를 살펴보면 해조추출물 및 야채추출물(김 등,1987a, 1987b), 표고, 영지 및 양송이, 석이와 같은 버섯추출물(이 등, 1997; 정, 1998), 결명자, 들깨, 대추, 모과, 오미자, 오갈피,

생강 및 녹차와 같은 차류(도 등, 1993; 여 등 1994), 두충, 어성초, 삼백초, 백화사설초 등과 같은 약용식물(이 등, 2000), 딸기, 마늘 케일, 신선초, 당근, 녹즙과 같은 주스류(정, 2000; 정 등, 1999), 볶음보리, 대두, 메주 및 된장 추출물(김 등, 1990; 최 등, 1998) 등의 보고가 있고, 이들 논문에서 아질산염을 효과적으로 소거시킬 수 있는 물질로는 비타민 C, 페놀 화합물 및 SH 화합물 등의 환원물질에 의한 것으로 고찰되어 있다.

감귤에는 hesperidin, rutin, narirutin, naringin, neohesperidin, nobiletin, poncirin, nomilinic acid, deacetylnoilinic acid, isolimonic acid, limonin, nomilin, obacunone, deacetylnomilin 등과 같은 flavonoid와 limonoid 물질이 함유되어 있으며(배, 1997; Johnson 등, 1995; Vincent 등, 1980), 또한 감귤 종자에는 limonoid, α -tocopherol이 다량 함유되어 있어(조 등, 1995) 감귤종자 메탄올추출물의 항돌연변이 활성이 큰 것으로 보고 되어 있는데(안과 김, 2001), 이는 감귤종자 중 아질산염의 소거작용이 뛰어난 페놀성 화합물 및 플라보노이드와 같은 물질과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

8. 감귤종자 추출물의 항균활성

1) 세균 및 효모에 대한 감귤종자 추출물의 항균활성 효과

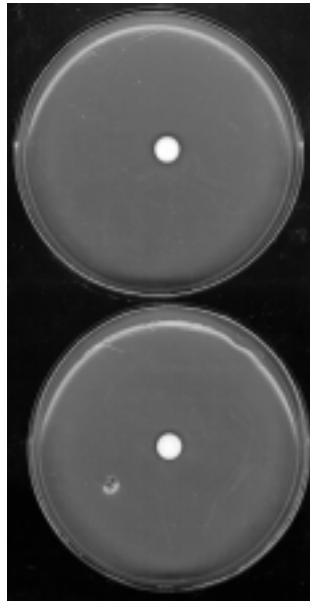
감귤종자 추출물이 세균에 대한 항균활성 결과를 보면 대체적으로 높은 활성을 보이고 있는데 *Alcaligenes faecalis*에 대한 항균 활성은 삼보감과 산귤, 금감자 등이 각각 18mm, 16mm 및 15mm의 저지환을 형성하여 높은 활성을 나타내었고, *Bacillus Licheniformis ATCC 9945a*에서는 하귤과 삼보감, 그리고 이예감과 지각이 각각 18mm, 17mm, 15mm, 15mm 등으로 높은 활성을 보인 반면, *Saccharomyces cerevisiae IBM 4274*에서는 산귤, 이예감, 유자, 지각 등이 8-9mm 정도로 비교적 낮은 활성을 나타내고 있다. 이는 차(2001)가 주장한 감귤류 플라보노이드의 생리활성 효과와 *Bacillus Licheniformis ATCC 9945a*에서 높은 활성을 보였던 하귤, 삼보감, 이예감, 지각 등이 높은 플라보노이드 함량을 나타내고 있음과 일치하는 결과를 나타낸 것으로 역시 플라보노이드의 항균능력이 뛰어난을 확인시켜 주고 있다.

자연계에 천연적으로 존재, 분포되어 있는 동물이나 식물류 중에는 생체를 조절하는 기능을 가진 성분이 함유된 식품이 많이 있다는 것이 최근 연구에 의해 밝혀짐에 따라 이에 관계된 식품소재의 발굴 및 생리활성물질 규명에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 이러한 연구자들에 의해 각종 식물류에 항산화 및 항균효과가 있음이 보고되고 있는데, 정(2000)은 손바닥 선인장의 메탄올 추출물에서 우수한 항균활성을 보고하였고, 김 등(1999)은 영귤의 과즙과 과피에서 항균활성을 보았는데, 그 항균물질이 천연적으로 존재하는 citric acid에 기인된 것이며, 그 함량에 따라 항균활성이 증가한다고 하였다.

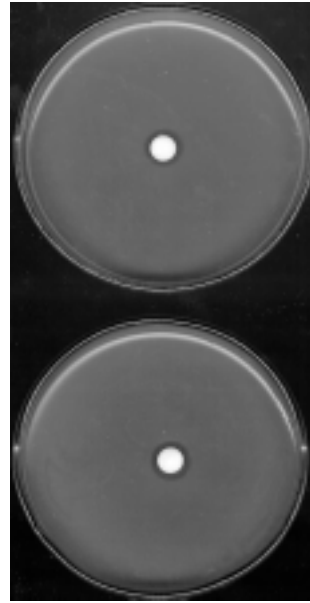
Table 15. Antibacterial activities of citrus seed extract for bacterium and yeast¹⁾

Sample	Clear zone diameter(mm) ²⁾		
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 9945a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IBM 4274
Control(DMSO)	8.3±0.5	10.3±0.5	8.5±0.6
<i>C. obovoidea</i>	15.3±1.3**	14.5±0.6**	12.8±1.0*
<i>C. grandis</i>	12±0.8*	13.0±0.8*	9.5±0.6
<i>C. sunki</i>	15.3±0.5**	14.5±0.6**	8.8±0.5
<i>C. sulcata</i>	19.5±1.9**	16.8±1.0**	11.3±0.5*
<i>C. tangerina</i>	8.8±1.0	14.5±0.6**	11.8±1.0*
<i>C. natsudaoidai</i>	10.8±0.5	18.8±1.0**	9.3±0.5
<i>C. iyo</i>	11.3±0.5*	15.8±1.0**	8.3±0.5
<i>C. junos</i>	10.5±0.6	11.3±0.5	9.5±0.6
<i>C. aurantium</i>	14.5±0.6**	15.3±0.5**	8.3±0.5

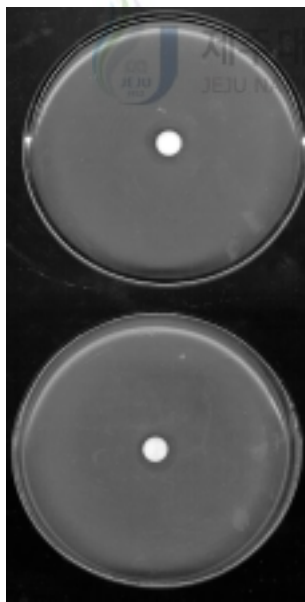
¹⁾Antibacterial activity(growth inhibiting activity) was indicated as diameter of clear zone surrounding paper disc absorbing 40 μ l of soluble solid of pine needle methanol extracts on nutrient agar plate inoculated with test microorganisms. ²⁾Values are means±S.D. of triplication. *Significantly different from the control at the P<0.05 level. **Significantly different from the control at the P<0.01 level



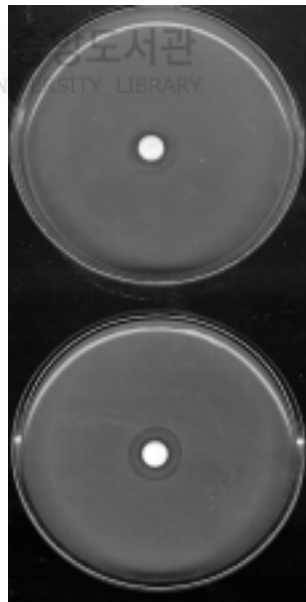
DMSO



Citrus aurantium



Citrus obovoidea



Citrus sulcata

Fig. 17. Antibacterial activities of citrus seed extracts.

2) 식중독균 에 대한 감귤종자 추출물의 항균활성효과

식중독에 관련된 대장균 및 포도상구균에 대한 감귤종자 추출물의 항균 활성 효과를 보면 대체적으로 대장균에 대하여 보다 더 강한 활성을 보였는데, 특히 *Escherichia coli* ATCC 026에서 삼보감, 당유자, 산귤 등이 각각 21mm, 17mm, 14mm 정도의 큰 저지환을 보여 높은 활성을 나타내었다. 포도상구균인 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538에서는 지각과 금감자와 당유자가 각각 15mm, 14mm 등으로 비교적 높은 활성을 보였으나 하귤과 이예감, 유자 등은 비교적 낮은 활성을 보였다. 유자는 대장균과 포도상구균 모두에게서 낮은 활성을 나타내었다.

이는 페놀성분의 함량이 높은 종류가 식중독에 관계된 균에 대해 항균성을 보이고 있음이며, 식물성 페놀성분이 항균에 작용한다는 이와 이(1994)의 보고와도 상당히 일치하는 경향이 있음을 알 수 있다.

조 등(1990)은 Grapefruit의 종자 추출물에서 항균활성 및 살균효과를 보고하였는데, 이는 ascorbic acid의 환원작용 결과 생성된 세포독성 물질인 hydroxy radical 등에 기인할 수 있는 것으로 검토될 수 있다고 하였다.

또한 정 등(1998)은 계피추출물의 항균작용을 보고하였는데, 에탄올 추출물에서의 항균효과가 가장 높았다고 하였다. 그 외에도 노 등(1996)은 녹차추출물에서, 이 등(1997)은 오배자와 포도껍질 추출물에서 항균활성을 보고하였고, 조 등(1995)은 Grapefruit의 종자 추출물에서 이 등(2000)은 해조류 추출물에서 검정된 항균력을 이용하여 항균제 등으로 응용하려는 시도를 보이고 있다. 이에 본 실험에서 높은 항균활성을 나타낸 감귤류의 종자들의 이용방안을 연구하여 응용하도록 해야 할 것으로 판단된다.

Table 16. Antibacterial activities of citrus seed extract for food poisoning bacteria¹⁾

Sample	Clear zone diameter(mm) ²⁾	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 026	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
Control(DMSO)	9.5±0.6	8.3±0.5
<i>Citrus obovoidea</i>	10.5±0.6	13.5±0.6**
<i>Citrus grandis</i>	16.5±0.6**	12.2±0.8*
<i>Citrus sunki</i>	13.5±0.6**	11.5±0.6*
<i>Citrus sulcata</i>	20.5±1.3**	13.0±0.8**
<i>Citrus tangerina</i>	11.5±0.6*	12.5±0.6*
<i>Citrus natsudaiddai</i>	12.0±0.8*	9.5±0.6
<i>Citrus iyo</i>	11.8±1.0*	8.8±0.5
<i>Citrus junos</i>	9.5±0.6	9.3±0.5
<i>Citrus aurantium</i>	11.0±0	15.3±1.0**

¹⁾Antibacterial activity(growth inhibiting activity) was indicated as diameter of clear zone surrounding paper disc absorbing 40 μ l of soluble solid of pine needle methanol extracts on nutrient agar plate inoculated with test microorganisms. ²⁾Values are means±S.D. of triplication. *Significantly different from the control at the P<0.05 level. **Significantly different from the control at the P<0.01 level

9. 감귤종자 추출물의 항산화 효과

1) 전자공여능 활성

감귤종자 추출물의 항산화성 실험 중의 하나로 전자공여능을 측정한 결과는 Table 17과 같다. 감귤종자 추출물 모두 20% 이상의 효과가 있는 것으로 나타났으며, 특히 아질산염 소거효과가 좋았던 당유자가 50% 이상의 효과를 보이고 있다. 또한 시료의 농도를 높였을 때 더욱 높은 전자공여능을 보이고 있으며, 이는 기존의 항산화제인 BHT, BHA 그리고 토코페롤 등과 비교해 볼 때 시료들의 전자공여 작용은 상당히 우수한 것으로 판단되었다.

김 등(1995)은 국내산 생약추출물의 항산화작용을 보았는데, 시료의 농도가 증가할수록 전자공여 작용이 강하며, 아질산염의 소거능도 증가한다고 하였는데 이는 본 실험의 결과와도 일치하는 결과라고 판단된다.

전자공여 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 식품 중의 지방질 산화를 억제하는 목적으로 사용되고 있을 뿐만 아니라, 인체 내에서 활성라디칼에 의한 노화를 억제하는 작용의 목적으로 이용되고 있다(최와 오, 1985).

천연항산화제는 토코페롤 이외에는 인체독성 및 경제적 이유 때문에 거의 합성항산화제를 사용하고 있다. 그러나 거의 모두가 인체독성을 가진다고 보고되고 있어 대부분 사용규제를 받고 있고, 현재 사용 중인 페놀계 항산화제인 BHA, BHT 등은 50mg/kg/day 이상을 사람이 섭취할 경우에 생체효소 및 지방의 변화로 암 등이 유발될 수 있다고 보고되고 있다(Branen, 1975; Fujimoto와 Kaneda, 1980). 따라서 인체에 무해한 천연항산화제에 관한 연구가 절실히 요구되는 현실에서 감귤종자의 추출물에서의 항산화성은 주목받을 만 하다고 사료된다.

Table 17. The activity of DPPH radical scavenging from citrus seeds extract

Sample	Scavenging activity(%)
BHT (0.01mg/ml)	63.24 ± 0.66
BHA (0.01mg/ml)	73.92 ± 0.52
α-tocopherol (0.01mg/ml)	82.27 ± 0.33
<i>C. sulcata</i> (0.01mg/ml)	22.32 ± 1.20
<i>C. grandis</i> (0.01mg/ml)	52.33 ± 1.33
<i>C. sunki</i> (0.01mg/ml)	20.21 ± 1.20
<i>C. sulcata</i> (0.05 mg/ml)	66.47 ± 1.66
<i>C. grandis</i> (0.05 mg/ml)	81.47 ± 1.51
<i>C. sunki</i> (0.05 mg/ml)	60.97 ± 1.42

2) Hydroxyl radical 소거활성

식물체 추출물들의 지방산화 촉진인자인 Fe^{2+} 이온과 활성산소 중 지방산화를 일으키는데 주요한 역할을 하는 Hydroxyl radical($\cdot OH$)에 대한 감귤종자 추출물의 소거효과를 Table 18에 나타내었다. 항산화제와 같은 첨가량에서 모든 시료가 30% 이상의 효과를 나타내었고, 특히 삼보감이 42%의 효과를 보이고 있는 것은 강력한 항산화효과를 가지고 있음으로 판단된다. 김 등(1995)은 유기용매별 대두추출물의 항산화 실험에서 전반적으로 메탄올 추출물에서 항산화효과가 우수하다고 보고하였는데, 이는 감귤종자 추출물과도 마찬가지로 식물체의 추출물들이 항산화성을 갖는다는 사실을 뒷받침해 주고 있는 것으로 생각된다.

Table 18. The activity of hydroxyl radical scavenging from citrus seeds extract

Sample	Scavenging activity(%)
BHT (0.01mg/ml)	65.06 ± 0.45
BHA (0.01mg/ml)	73.92 ± 0.21
α -tocopherol (0.01mg/ml)	74.72 ± 0.24
<i>C. sulcata</i> (0.01mg/ml)	42.12 ± 1.22
<i>C. grandis</i> (0.01mg/ml)	33.79 ± 0.98
<i>C. sunki</i> (0.01mg/ml)	32.18 ± 1.71
<i>C. sulcata</i> (0.05 mg/ml)	63.12 ± 1.35
<i>C. grandis</i> (0.05 mg/ml)	73.79 ± 1.03
<i>C. sunki</i> (0.05 mg/ml)	54.18 ± 1.36

3) Hydrogen peroxide 소거활성

감귤종자 추출물의 hydrogen peroxide 소거활성 효과는 Table 19에 나타내었다. 시료의 첨가량을 0.01mg/ml로 하였을 때 모든 시료가 10% 내외의 효과를 보였으나 이는 대조구로 사용된 인공 항산화제도 수치가 낮음을 감안해 볼 때 항산화 효과가 적다고 할 수는 없는 결과로 생각된다. 첨가량이 0.05mg/ml일 때 모든 시료가 20~30% 이상의 높은 항산화성을 나타내었다.

Avena와 Hinoay(1977)와 Kozłowska와 Zadernowski(1983)의 보고에 의하면, 천연물질 중에는 산화를 방지하는 기능을 가진 물질이 상당수 존재하는데 가장 주목받고 있는 것은 생약 중의 페놀성 물질로서 그 이유는 이 페놀성 물질이 항산화성을 가진 대표적인 물질로 보고 있기 때문이라고 하였는데, 감귤종자에도 적지 않은 양의 페놀성 화합물들이 있어 항산화효과를 나타내는데 기인된 것으로 사료된다.

일반적으로 유지를 많이 함유한 식물종자에는 항산화 물질이 함유되어 있다고 알려져 있는데, 참깨 박에는 sesamol, samolinol, sesaminol 등이 함유되어 항산화 효과가 있음이 보고된 바 있으며(박 등, 1990), 더덕(맹과 박, 1991), 녹차(이와 신 1993; 이 등, 1998) 등에서 각 추출물을 이용한 항산화효과의 결과에서의 항산화 효과도 페놀성 화합물에 기인한다고 하는 보고가 감귤종자의 항산화성이 페놀성 화합물과 연관이 있다는 사실을 뒷받침 해 주고 있는 것으로 판단된다.

Table 19. The activity of hydrogen peroxide scavenging from citrus seeds extract

Sample	Scavenging activity(%)
BHT (0.01mg/ml)	30.43 ± 0.67
BHA (0.01mg/ml)	54.63 ± 0.52
α-tocopherol (0.01mg/ml)	58.56 ± 0.34
<i>C. sulcata</i> (0.01mg/ml)	11.38 ± 1.05
<i>C. grandis</i> (0.01mg/ml)	12.11 ± 1.21
<i>C. sunki</i> (0.01mg/ml)	10.31 ± 1.34
<i>C. sulcata</i> (0.05 mg/ml)	20.11 ± 1.45
<i>C. grandis</i> (0.05 mg/ml)	31.33 ± 1.52
<i>C. sunki</i> (0.05 mg/ml)	24.33 ± 1.42

4) Superoxide anion 소거활성

감귤종자 추출물의 항산화성을 보기위한 실험 중 Pyrogallol의 자동산화 반응을 이용하여 감귤종자 추출물들의 superoxide anion 소거활성을 측정 한 결과는 Table 20과 같다. 삼보감, 당유자 및 산귤 에서 20% 이상의 superoxide anion 소거활성을 보였지만, 대조구인 인공항산화제에 비해 그 효과가 적었으며 또한, DPPH 및 hydroxyl radical의 소거활성보다도 비교적 낮은 소거율을 보이고 있는 것으로 나타났다.

우 등(1995)은 알로에 추출물의 유지에 대한 항산화 효과를 보고하면서 천연항산화제와 비교하였는데, 항산화 방법마다 소거율의 차이가 있는 것으로 나타났고 하였다. 장 등(1996)은 오미자에서, 나 등(1997)은 양파 껍질에서, 김 등(1999)은 솔잎추출물에서 각각 용매별 항산화성을 보고하였는데, 모두 메탄올 추출물에서 항산화효과가 가장 좋았고, 이러한 것들은 식물성 천연물질(최 등, 1992), 해조류(박 등, 1991), 그리고 생약재(김 등, 1997) 등에서의 보고로 인하여 그 항산화성이 다시 한 번 검증되었다.

현재까지 알려진 천연 항산화 물질로는 아스코브르산, 토코페롤류, 플라보노이드와 그 유도체(Naohiko, 1984), 갈변반응 생성물, 아미노산 및 단백질 등(Beckel, 1983; Mitsuo, 1982)이 있는데, 본 실험에서는 플라보노이드와 그 유도체에 의해 나타난 항산화효과라 추측된다.

Table 20. The activity of superoxide anion scavenging from citrus seeds extract

Sample	Scavenging activity(%)
BHT (0.01mg/ml)	29.11 ± 0.67
BHA (0.01mg/ml)	45.11 ± 0.52
α -tocopherol (0.01mg/ml)	55.01 ± 0.60
<i>C. sulcata</i> (0.01mg/ml)	15.15 ± 1.22
<i>C. grandis</i> (0.01mg/ml)	10.22 ± 1.21
<i>C. sunki</i> (0.01mg/ml)	17.66 ± 1.32
<i>C. sulcata</i> (0.05 mg/ml)	20.11 ± 1.66
<i>C. grandis</i> (0.05 mg/ml)	28.33 ± 1.52
<i>C. sunki</i> (0.05 mg/ml)	20.11 ± 1.81



이상의 결과에서 나타난 바와 같이 삼보감과 당유자, 그리고 산귤에 있어서 항산화 효과는 비교적 높은 것으로 보인다. 이것은 이미 항돌연변이원성 및 NDMA 생성억제효과, 아질산염 소거능 및 항균 활성 등의 실험결과를 통해 보았던 것처럼 높은 효과를 보였던 시료들로서는 당연한 결과라고 할 수 있는 것이다. 이 세 가지의 감귤 중 특히 당유자는 차로서 많이 이용되고 있고 산귤은 진피로서 한약재에 껍질만 사용되고 있지만, 이러한 생리활성을 지닌 좋은 식품소재로서의 가치가 재조명 된다면 그 활용도는 상당히 확대되어질 것으로 사료된다.

V. 요약

제주산 감귤류에 속하는 9종의 감귤류(금감자, 당유자, 산귤, 감보감, 편귤, 하귤, 이예감, 유자, 지각)의 종자에 대한 생리활성기능을 알아보기 위하여 일반성분 및 플라보노이드, 총페놀함량 등을 정량하고, 항돌연변이 활성, NDMA 생성억제, 아질산염소거 효과, 그리고 항산화 및 항균 실험 등을 실시하였다.

1. 감귤종자들의 수분함량은 4~6%로 대부분 5% 이하였고, 단백질은 12~15%, 지방함량은 32~46%이었으며, 탄수화물은 22~45%이었고, 회분함량은 2~4%이었다. 플라보노이드 함량은 11~48mg%, 총 페놀함량은 20~53mg% 정도로 나타났다. 감귤종자 추출물의 고형분 함량은 0.8~1.2%이었으며, 추출수율은 0.7~1.1%이었다.

2. Ames 시험법으로 항돌연변이 활성을 검색한 결과 ICR-191에 의해 유도된 TA97에 대한 돌연변이원성 억제효과는 모든 감귤종자에서 80% 이상의 높은 활성을 나타내었다.

NPD에 의하여 유도된 TA98과 TA100에 돌연변이원성에 대해서는 모든 감귤종자 추출물들이 TA100에 약 60%의 활성을 나타내었으며, 특히 TA98에서는 90% 이상이 높은 억제활성을 보였다.

4-NQO에 의해 유도된 TA100과 TA102에 대한 항돌연변이 효과는 특히 당유자, 삼보감, 금감자, 편귤, 지각 등에서 80% 이상의 높은 활성을 나타내었다.

3. NDMA 생성억제 실험 결과는 감귤종자 메탄올추출물을 1ml씩 첨가하였을 때 편귤과 산귤에서 약 40%의 NDMA 생성억제효과를 보였지만 다른 감귤 종자류에서는 비교적 낮게 나타났고, 추출물을 3ml 첨가한 시료의 경

우에는 편굴에서 60%, 삼보감과 산굴이 40%가 넘는 억제율을 보였으며, 나머지 시료 대부분이 추출물 1ml를 첨가했을 때보다 다소 높은 억제율을 보였다. 감귤종자 메탄올추출물을 5ml 첨가하였을 때, 삼보감에서 94%의 NDMA 생성억제효과를 보였으며, 편굴에서 72%, 당유자가 64%로 비교적 높은 NDMA 생성 억제효과가 나타났다.

4. 감귤종자 추출물에 대한 아질산염 소거효과는 pH 1.2, 3.4, 및 6.0에서 아질산염 소거효과는 첨가량이 증가할수록 그 소거율이 증가함을 보여주고 있으며, 특히 강산성인 pH 1.2에서 반응시간이 길수록 높은 소거효과를 보였다. pH 3.4와 6.0에서는 반응시간에 따른 변화는 보였지만 소거효과는 증가하지 못하는 것으로 나타났다.

5. 감귤종자 추출물의 항균활성 효과를 보면, 식품의 부패에 관여하는 효모나 세균에 대한 활성은 삼보감, 하귤, 산굴 등에서 높게 나타났으며, 식중독균에 대한 활성은 삼보감, 당유자, 산굴 등이 높은 활성을 보였다.

6. 여러 가지 생리활성기능 중 효과가 가장 크게 나타났던 산굴, 삼보감 및 당유자에 대한 항산화 실험 즉 전자공여능 측정, hydroxyl radical 소거활성 측정, hydrogen peroxide 소거활성 측정, superoxide anion 소거활성을 측정한 결과 모든 시료에서 20~50% 정도의 소거활성으로 기존의 인공 항산화제에 가까운 항산화효과를 나타내었다.

참고문헌

- Ames, B.N., and J. McCann, 1982. Validation of the *Salmonella* Test, *Cancer Res.* 41, 4192~4193.
- Ames, B.N., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens (oxygen radicals and degenerative disease). *Science*, 221, 1256.
- 안철우, 최수안, 박영호, 1979. 적색육 어류의 저장 및 가공 중의 amine의 변화, (1) 고등어, 정어리 염장 및 건제품의 DMA와 TMA함량. 한국수산학회지. 12(4) :245~253.
- 안성순, 유일준, 1988. 한국산 천연 naringin의 항균작용 및 안정성에 관한 연구. 한국균학회지, 16, 1~7.
- 안용석, 2001. 감귤류 종자 추출물의 항돌연변이 활성. 제주대학교 대학원 석사학위논문.
- AOAC, 1995. Official Method of Analysis. 16th ed., Association of Official Analysis Chemists, Washington, DC.
- Astill, B.D and I.T. Mulligan, 1977. Phenolic Antioxidants and the inhibition of hepatotoxicity from N-dimethylnitrosamine formed in situ in the rat stomach. *Food Cosmetics Toxicol.* 15, 167-171.
- Avena, S.L and L.V.Hinoay, 1977. Ferulic acid and other phenolics in oat seeds. *J. Food Sci*, 42, 551.
- 백형석, 구재관, 전흥기, 1988. *Aspergillus parasiticus*의 aflatoxin 생성과 돌연변이 유발능에 미치는 인삼 saponin의 영향. *PNUJ. of Mol. Biol.*, 4, 51~55.

- 배기환, 1997. 감귤 가공산업 육성을 위한 심포지엄 : 귤피의 성분과 약효. 제주감귤연구소, pp.61~77.
- Balimandawa, M.C, de Meester and A. Leonard, 1994. The mutagenicity of nitrite in the salmonella/microsome test system. *Mutat Res*, 321, 7~11.
- Bate-smith, E.C., 1954, Flavonoid compounds in food. In "Advanced in food research", Academic Press, New York, 5, 261.
- Beckel, R. W., 1983. Antioxidantive arginine-xylose maillard reaction products. *J. Food Sci*, 48, 996.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199~1204.
- Borob'vea, L.I., T.A. Cherdyntseva and S.K. Abilev, 1995a. Antimutagenic action of bacterial culture liquid on mutagenesis induced by 2-nitrofluorene in *Salmonella typhimurium* strains. *Gentika*(Russian), 31, 901~902.
- Borob'vea, L.I., T.A. Cherdyntseva and S.K. Abilev, 1995b. Antimutagenic action of bacteria on mutagenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide in *Salmonella typhimurium*. *Microbiologiya* (Russian), 64, 228~230.
- Branen, A.L., 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *J. Amer. Oil Chem. Soc*, 52, 59.
- 변재형, 정보영. 황금소, 1976. 멸치 젓갈 숙성중의 dimethylamine의 생성. *한국수산학회지*. 9(4), 223~231.
- Calomme, M.L. Pieters, Vlietinck and D.V. Berghe,, 1996. Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. *Planta Med*, 62, 222~226.

- Cassens, R.C., 1995. Use of sodium nitrite in cured meats today. *Food Technology*, 6, 72~80.
- 차재영, 2001. 감귤류 플라보노이드의 생리기능 활성. *한국생명과학회지*, 31(1), 19~24.
- Challis, B and C.D. Bartlett, 1975. Possible cocarcinogenic effect of coffee constituents. *Nature*, 254, 532.
- 장은희, 표영희, 안명수, 1996. 오미자 추출물의 항산화 효과. *한국조리과학회지*, 12(3), 372~376.
- 장호남, 서종화, 1977. 한국산 감귤과피의 효율적 이용에 관한 연구(I). *한국식품과학회지*, 9, 25.
- 최계선, 임선영, 최재수, 1998. 대두, 메주, 된장의 항산화 효과와 아질산염 소거 효과. *생명과학회지*, 8(5), 473~478.
- 최진호, 오성기, 1985. 고려인삼의 노화억제 작용에 관한 연구. *한국식품과학회지*, 17, 506.
- 최종덕, 서일원, 조성환, 1990. Grapefruit 종자추출물의 항균성에 관한 연구. *한국수산학회지*, 23(4), 297~302.
- 최종원, 이정규, 이영철, 문영인, 박희준, 한용남, 2001. 손바닥 선인장 열매 및 줄기 추출물의 생리활성(I)-일반약리검색. *한국생약학회지*, 32(4), 330~337.
- 최선영, 2001. 녹차 및 매실 추출물이 인체 내 N-nitrosamine의 생성에 미치는 영향. *경상대학교 대학원 석사학위논문*.
- 최웅, 신동화, 장영상, 신재익, 1992. 식물성 천연 항산화물질의 검색과 그 항산화력 비교. *한국식품과학회지*, 24(2), 142~148.
- 조성환, 이상열, 김재원, 고경혁, 서일원, 1995. Grapefruit 종자추출물로부터 광범위 항균제 개발 및 응용에 관한 연구.-Grapefruit 종자추출물의

- 항균력 검색- 한국식품위생안전성학회지, 10(1), 33~39.
- 조성환, 이현철, 서일원, 김재욱, 장영상, 신재익, 1991. Grapefruit 종자추출물을 이용한 밀감의 저장효과. 한국식품과학회지, 23(5), 614~618.
- 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생, 1990. 수산물에 대한 Grapefruit 종자추출물의 항균 및 항산화효과. 한국수산학회지, 23(4), 289~296.
- Chung, S.K., 1997. Hydroxyl radical-scavenging effect of spice and scavengers from brown mustard. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 118~123.
- 정은재, 1998. 석이버섯 용매 추출물의 항산화 및 아질산염 소거작용. 한국식품과학회지, 44(4), 426~430.
- 정은탁, 박미연, 이종갑, 장동석, 1998. 계피추출물의 항균작용과 항돌연변이원성. 한국식품위생안전성학회지, 13(4), 337~343.
- 정해정, 2000. 손바닥 선인장의 항산화 및 항균특성. 한국조리과학회지, 16(2), 160~166.
- 정미자, 1996. 알코올음료 중의 N-nitrosamine의 검출. 경상대학교 대학원 석사학위논문.
- 정미자, 2000. 식이조성이 사람의 내인성 N-nitrosamine의 생성에 미치는 영향. 경상대학교 대학원 박사학위논문.
- 정소영, 김낙경, 윤 선, 1999. 녹즙추출물의 아질산염 소거능에 대한 연구. 한국식품영양과학회지, 28(2), 342~347.
- 정창화, 1999. 톳 메탄올 추출물의 항돌연변이 활성. 제주대학교 대학원 석사학위논문, 29~39.
- Cooney. R.V and R.D. Ross, 1978. N-nitrosation and nonitration of morpholine by nitrogen dioxide in aqueous solution : Effects of vanillin and related phenols. *J. Agric Food Chem*, 35, 789~793.

- 도정룡, 김선봉, 박영호, 박영범, 김동수, 1993. 기호음료 성분의 아질산염 소거작용. 한국식품과학회지. 25(2), 530.
- Doll, R and R. Peto, 1981. The cause of cancer, quantitative estimate of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66, 1191~1308.
- Drake, J.W., 1973. The Molecular Basis of Mutation. 九善株式會社, pp.138~139.
- Ender, F., Harve, G., Helgebostad, A., Koppang, N., Madsen, R., and Che, L., 1964. Isolation and identification of hepatotoxic factor in herring meat produced from nitrite preserved herring. *Naturwissenschaften*, 51, 637.
- 은종방, 정영민, 우건조, 1996. 감귤과육 및 과피의 식이섬유와 플라보노이드 검색 및 정량. 한국식품과학회지, 28(2), 371~377.
- Fiddler, W., E.G. Piotrowski, J.W. Pensabean, R.C. Doerr, and A.E. Wassermann, 1972. Effect of sodium nitrite concentration on N-nitrosodimethylamine formation in Frankfurters. *J. Food Sci*, 37, 668.
- Fox, J.B and S.A. Ackerman, 1968. Formation of nitric oxide myoglobin : Mechanisms of the reaction with various reductants. *J. Food Sci*, 33, 364.
- Freund, F.A., 1937. *Ann. Intern, Med*, 10, 1144.
- Fujimoto, K and T. Kaneda, 1980. Screening test for antioxygenic compounds from marine algae and fractionation from *Eisenia bicyllis* and *Undaria pinnatifida*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 46, 1125.
- Gray, J and J. R. Dugan, 1975. Inhibition of N-notrosamine formation

- in model system. *J. Food Sci*, 40, 981~985.
- 함승시, 한홍식, 최근표, 오덕환, 1997. 각종 변이원들에 의해 유도된 돌연 변이원성에 대한 수리취 추출물의 억제작용. *한국식품영양과학회지*, 26(3), 528~533.
- 함승시, 김득하, 이득식, 1997. 목이 및 석이 메틸 알콜 추출물의 항돌연 변이원성. *한국식품과학회지*, 29(6), 1281~1287.
- 한해룡, 김한림, 강순선, 1970. 제주산 감귤의 산 및 당함량의 시기별 변화에 관한 연구. *한국원예학회지*, 7, 35.
- 한국약학대학협의회, 약전분과회 편저, 1997. *대학약전 제6개정 1부*, 문성사, pp.975~976.
- Hotchkiss, J.H., D.C. Havery and T. Fazio, 1981. Rapid method for estimation of *N*-nitrosodimethylamine in malt beverage. *J. AOAC*, 64(4), 929~932.
- Hugues, B., P. Brigitte. and D. Gerard, 1996. *N*-nitroso Compounds in hand book of food analysis. In, volume 2. (Nollent, M. L. ed.). Marcel Dekker. Inc. New York, USA. pp.1603~1640.
- Hyun, J.W., Lim, K.H., Shin, J.E., Sung, M.S., Won, Y.J., Kim. Y.S., Kang, S.S., Chang, I.M., Woo, W.S and Paik, W.H., 1994. Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants(in Korean). *Kor. J. Pharmacogn*, 25, 171.
- Inoue, T., K. Morita and T. Kada, 1981. Purification and Properties of plant desmutagenic factor for the mutagenic principal of tryptophan pyrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 45, 345~353.
- Ishibashi, T., T. Kawabata, and M. Matsui, 1984. Nitrosation of some asymmetric tertiary amine and quaternary ammonium compounds

with nitrite or nitrogen dioxide gas. *Bull Japan Soc Sci Fish*, 50, 1425~1429.

제주감귤농업협동조합, 2000. 제주 감귤과 주요 품종. 3~14.

Jie, C., M.M. Antonio and W.W. Wilbur, 1997. Two new polymethoxylated flavones, a class of compounds with potential anticancer activity isolated from cold pressed Dancy tangerine peel oil solids. *J. Agric Food Chem.*, 45, 364~368.

Johnson, P.L., A.K. Htoon and K.J. Shaw, 1995. Detection of orange pell extract in orange juice. *Food Australia*, 47, 426~432.

주현규, 조황연, 박충균, 조규성, 채수규, 마상조, 1991. 식품분석법. 유림문화사, pp.151~285.

좌승미, 2001. 감귤 과피로부터 발암 Promotion 억제 활성성분의 분리. 제주대학교 대학원 석사학위논문.

Kada, T., M. Kato, K. Aikawa and S. Kiriya, 1984. Adsorption of pyrolysate mutagens by vegetable fibers. *Muta. Res.* 141, 149~152.

Kada, T.K. Kaneko, S. Matsuzaki, T. Matsuzaki and Y. Hara, 1985. Detection and Chemical identification of natural bio-antimutagens, a case of green tea factor. *Mutat. Res.* 16, 165~174..

강희정, 김정상, 1998. 들깨의 생리활성. *식품산업과 영양*, 3(2), 65~72.

강윤한, 박용곤, 이기동. 1996. 페놀성 화합물의 아질산염 소거 및 전자공여작용. *한국식품과학회지*. 28, 232-239.

Kasuga, A., Y. Aoyagi and T. Sugahara, 1988. Antioxidants activity of edible plant. *日本食品工業學會誌*, 35, 22

Kata, T., T. Inoue and M. Namiki, 1982. Environmental desmutagenesis and antimutagens, *In Environmental Mutagenesis*

- and Plant Biology*. Klerkowski, E.J.(Ed.), Praeger, New York. 134~151.
- Kata, T., T. Inoue and Y. Shirasu, 1986. Antimutagens and their modes of action, *Shanker D. II. et al(EDs.)*, Plenum, New York. 181~196.
- Kato, H., I. E. Lee, N. V. Chuyen, S. B. Kim and F. Hayase, 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melonoidin, *Agric. Bio. Chem.*, 51, 1333~1338.
- Kawabata, T.H. Oshima, J. Uibu, M. Nakamura, M. Matsui and M. Hamano, 1979. Occurrence, formation, and precursors of N-nitroso compound in japanese diet. In, Miller, EC, et al eds, : Naturally occurring carcinogens -mutagens and modulators of carcinogenesis, Japan Sci, Soc, Press, Tokyo/univ, Park Press, Baltimore, 195-209.
- 김병주, 1994. 제주산 감귤류의 가공적성에 관한 연구. 제주대학교 대학원 석사학위논문.
- 김병주, 김효선, 고정삼, 강영주, 1996. 제주산 감귤 품종별 carotenoid, 색도, UV 스펙트럼, 유기산 및 유리당 함량. 농산물저장유통학회지, 3(1), 23~32
- 김창종, 정진모, 1990. Flavonoids의 약리작용(I). 대한약학회지, 34, 348~364.
- 김종규, 1997. 식중독 발생의 사례를 통해 본 집단급식의 문제점 분석. 한국식품위생안전성학회지, 12(3), 240~253.
- 김동수, 안방원, 염동민, 이동호, 김선봉, 박영호, 1987a. 천연식품성분에 의한 발암성 니트로사민 생성인자 분해작용. 1. 야채 추출물의 아질산염 분해작용. 한국수산학회지, 20(5), 463~468.

- 김해중, 남성희, 김형수, 이석건, 1977. 한국 인삼성분에 관한 연구. 한국 식품과학회지, 9, 19.
- 김훈, 조도현, 박현희, 이춘영, 이양희, 1980. 밀감주스 향기형분의 정량. 한국농화학회지, 23, 106.
- 김형식. 2001. 마늘 추출물로부터 니트로화 반응을 억제시키는 물질의 분리 및 구조분석. 경상대학교 대학원 석사학위논문.
- 김현정, 이인선, 이갑량, 1999. 싸리버섯 추출물의 항돌연변이성 및 암세포성장 억제 효과. 한국식품영양과학회지, 28(6), 1321~1325.
- 김현구, 김영언, 도정룡, 이영철, 이부용, 1995. 국내산 생약추출물의 항산화 효과 및 생리활성. 한국식품과학회지, 27(1), 80~85.
- 김준환, 1995. 김치 발효 중 N-nitrosamine의 생성과 억제. 동국대학교 대학원 박사학위논문.
- 김정균, 1995. 멸치 및 새우젓 숙성 중 아질산염과 아스코르빈산이 N-nitrosamine의 생성에 미치는 영향. 경상대학교 대학원 박사학위논문.
- 김정상, 1998. 양념 채소류의 생리활성. 인제식품과학 FORUM 논총, 6, 5~35.
- 김준환, 신호선, 1996. 가열에 의한 식육 및 식육제품 중 니트로사민의 생성량 변화. 한국식품위생안전성학회지. 11(1), 1~5.
- 김경란. 1998. 발효식품의 인공소화 시 N-nitrosamine의 생성에 영향을 미치는 인자. 경상대학교 대학원 석사학위논문.
- 김미경, 양윤정, 1997. 감귤과피로부터 분리한 식이섬유의 포도당, 담즙산, 카드뮴 투과억제에 관한 *In vitro* 연구. 한국영양과학회지, 30(2), 210~219.
- 김미성, 고무식, 김태영, 1985. 재래 간장 젖 숙성 식염농도와 nitrate 함량에 따른 nitrosamine 관련물질의 변화. 한국영양식량학회지, 14(4),

329~338.

- 김수현, 1982. 김치 熟成中 N-NTROSAMINE의 生成要因에 관한 研究. 부산수산대학교 대학원 박사학위논문.
- 김수현, 현재석, 오창경, 오명철, 박제석, 강순배. 1994. 멸치젓 첨가 김치 숙성 중 제 2급, 제 3급 아민 및 제 4급 암모늄 화합물의 함량 변화와 N-nitrosamine의 생성. 한국영양식량학회지, 23(4), 704~710.
- 김수현, 강순배, 이응호. 1990. 자리젓 중 N-nitrosamine 생성에 관한 연구. 한국식품영양학회지, 19(1), 65~72.
- 김수현, 오명철, 1995 : 배소 어류의 N-nitrosamine 함량, 제주대학교 산업기술연구소 논문집, 6, 15~20.
- 김수현, 오명철, 오창경, 1995. 육류 배소방법에 따른 N-nitrosamines 함량에 관한 연구, 제주대학교 산업기술연구소 논문집, 6, 21~26.
- 김수민, 김은주, 조영석, 성삼경, 1999. 제조방법별 솔잎추출물의 항산화성 검토. 한국식품과학회지, 31(2), 527~534.
- 김선봉, 안방원, 염동민, 이동호, 박연호, 김동수, 1987b. 천연식품성분에 의한 발암성 니트로사민 생성인자 분해작용. 2. 해조추출물의 아질산염 분해작용. 한국수산학회지, 20, 469~475.
- 김선봉, 도정룡, 이용우, 구연숙, 김창남, 박영호, 1990. 가공조건에 따른 볶음보리 추출물의 아질산염 소거작용. 한국식품과학회지, 22(7), 748~752.
- 김성수, 오창경, 오명철, 송대진, 김수현. 1996. 오징어젓 숙성 중 N-nitrosamine 생성에 관한 연구. 제주대학교 산업기술연구소 논문집. 7(1), 13~21.
- 김유영, 정승희, 구성자, 1997. 보리추출물의 생리 활성에 관한 연구. 한국조리과학회지. 13(2). 251.

- 김영동, 김유진, 오세욱, 강영주, 이영철., 1999. 영귤(*Citrus sudachi*) 과
 즙과 과피 용매 추출물의 항균 효과. 한국식품과학회지, 31(6), 1613~
 1618.
- 김영언, 이영철, 김현구, 김철진, 1997. 몇 가지 생약재의 열수추출물에 대한
 Ethanol 분획물의 항산화 효과. 한국식품영양학회지, 10(2), 141~144.
- 고정삼, 김성학, 1995. 제주산 감귤류의 성분과 그 특성. 한국농화학회지,
 38(6), 541-545.
- 구경숙, 신정혜, 정미자, 이수정, 성낙주. 1999. 시판 무김치 중의
 N-nitrosamine. 한국식품영양과학회지. 28(1), 28~32.
- Kozłowska, H. and R. Zadernowski, 1983. Phenolic acids in rape seed
 and mustard. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 60, 1119.
- Kuenzig, W. Chau, J. Norkus, E. Holowaschenko, H. Newmark, H.
 Mergens, W and Conney, A. H, 1984. Caffeic and ferulic acid as
 blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis*, 5(3), 309-313.
- 국립보건원, 1994. 감염발생정보. 5, 2~3.
- 권호정, 1999. 콩의 생리활성물질과 혈관신생조절. 한국콩연구학회지,
 16(1), 63~68.
- 권혁희, 1974. Nitrosamine에 관한 연구, (제 1보) - 한국식품(김치류) 및
 인타액 중 아질산염, 질산염 등의 함량에 대하여 - 한국영양학회지,
 7(4) : 21~23.
- Lam, L.K.T., J. Zhang and S. Hasegawa, 1994. Citrus limonoid
 reduction of chemically induced tomorigenesis. *Food Technol.*, 48,
 104~105.
- Lee, J.H. and J.S. Choi, 1993. Influence of some flavonoids on
 N-nitrosoproline formation in vitro and in vivo. *J. Korean Soc Food*

Nutr, 22, 226-229.

Lee, S.M., S.H. Lee and K.Y. Park, 1997. Antimutagenic effect of various cruciferous vegetables in salmonella assaying system. *J. Fd. Hyg. Safety*, 12(4), 321 ~ 327.

이세경, 지근억, 1996. Bifidobacterial에 의한 항돌연변이 효과. *한국식품과학회지*, 28(4), 796 ~ 799.

이은, 최무영, 박희준, 차배천, 조순현, 1995. 해동피의 화학성분 및 생리활성. *한국생약학회지*, 26(2), 122 ~ 129.

이학성, 서정호, 서근학., 2000. 해조류 추출물로부터 항균제의 제조 및 항균효과. *한국수산학회지*, 33(1), 32 ~ 37.

이현유, 1986. 한국산 감귤주스의 풍미성분. 중앙대학교 대학원 박사학위 논문.

이현유, 석호문, 남영중, 정동호, 1987. 한국산 감귤주스의 이화학적 성상. *한국식품과학회지*, 19(4), 338 ~ 341.

이인숙, 1998. 토마토 중의 페놀 화합물과 아스코르브산 희분이 N-nitrosodimethylamine의 생성에 미치는 영향. 경상대학교 대학원 석사학위논문.

이정희, 이서래, 1994. 식물성 식품 중 페놀성 물질의 몇 가지 생리활성. *한국식품과학회지*, 26(3), 317 ~ 323.

이주원, 신호선, 1993. 녹차 물추출물의 항산화효과. *한국식품과학회지*, 25(6), 759 ~ 763.

이기동, 장학길, 김현구. 1997. 버섯류의 항산화성 및 아질산염 소거작용. *한국식품과학회지*, 29(3), 432 ~ 436.

이경임, 박건영, 이숙희, 1992. 아플라톡신 B₁과 4-NQO에 대한 녹황색 채소류의 항돌연변이 효과. *한국영양식량학회지*, 21(2), 143 ~ 148.

- 이만중, 김관필, 김성호, 정낙현, 임무현, 1997. 오배자와 포도껍질 추출물의 항균 활성에 관한 연구. 한국식품영양학회지, 10(2), 174~179.
- 이수정, 1999. 천연성분의 첨가가 염건조기의 인공 소화시 *N*-nitrosamine의 생성과 돌연변이원성에 미치는 영향. 경상대학교 대학원 박사학위논문, 60~61.
- 이수정, 신정혜, 소명환, 성낙주. 1998. 염건조기(굴비)의 가공조건이 *N*-nitrosamine(NA)의 생성에 미치는 영향, -제 2보, 염건조기의 가공 및 저장 중 NA의 변화-. 한국식품영양학회. 11(4), 452~459.
- 이수정, 신정혜, 정미자, 성낙주. 2000. 천연식물성분이 *N*-nitrosodimethylamine 생성억제에 미치는 영향. 한국식품위생안전성학회지. 15(2), 95~100.
- 이태호, 정숙정, 이상열, 김재원, 조성환, 1995. Grapefruit 종자추출물이 *Enterobacter pyrinus*의 생리기능에 미치는 영향, 한국식품과학회지. 27(6), 985~990.
- 이영자, 안명수, 오원택, 1998. 녹차, 우롱차 및 홍차의 용매별 추출물의 카테킨류 함량 및 항산화효과에 관한 연구. 한국식품위생안전성학회지, 13(4), 370~376.
- Levin, D.E., E. Yamasaki and B.N. Ames, 1982. A new *salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens: A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutat. Res.*, 94, 315~330.
- Levin, D.E., M. Hollstein, M. Christman, E.A. Schwiers, and B.N. Ames. 1982. A new *Salmonella* tester strain(TA102) with A:T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 7445~7449.
- Lijinsky, W. and M. Singer, 1974. Formation of *N*-nitrosamine from tertiary amines and nitrus acid. In, Pogovsk, P and Walker, EA,

- (eds.) : Nitroso compounds in the environment. IARC Scientific Publication., 14, 111~116.
- Lijinsky, W., 1984. Species differences in nitrosamine carcinogenesis. *J. Cancer Res Clin Oncol.*, 108, 46~55.
- Lijinsky, W. 1987. Structure-activity relations in carcinogenesis by *N*-nitroso compounds. *Cancer and Metastasis Reviews*, 6: 301~356.
- 임채영, 1994. 고등어 염장 중 N-nitroso 화합물의 생성에 대한 아질산염의 영향. 경상대학교 대학원 석사학위논문.
- 임경재, 1999. 향신료 추출물에 의한 항산화 활성 및 Nitrosamine 생성억제효과. 건국대학교 대학원 석사논문.
- 임상국, 윤명호, 권숙담. 1973. 식품중의 Nitrosamine에 관한 연구. *한국영양식량학회지*, 5(3), 169~173.
- 임승우, 김태호, 1997. 한국산 마늘로부터 분리한 Alliin과 에탄올 추출물의 *In Vitro* 계 생리활성. *한국식품과학회지*, 29(2), 348~354.
- Lippsmyer, B.C, M.L. Tracy and G. Moller, 1990. Ion-exchange liquid chromatographic determination of nitrate and nitrite in biological fluids. *J. AOAC*, 73: 457~462.
- 맹영선, 박혜경, 1991. 더덕 에탄올추출물의 항산화효과. *한국식품과학회지*, 23(3), 311~316.
- Malaveille, C.A. Hautefeuille, B. Pignatelli, G. Talaska, P. Vineis and H. Bartsch., 1996. Dietary phenolics as anti-mutagens and inhibitors of Tobacco-related DNA adduction in the urothelium of smokers. *Carcinogenesis*, 17(10), 2193~2200.
- Marc, E.B. and A.B. Eric, 1994. Citrus flavonoid effects on tumor

- invasion and metastasis. *Food Technol.*, 48, 121~124.
- Markund, S and G. Markund, 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem*, 47, 468~474.
- Maron, D.M., and B.N. Ames, 1983. Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 175~215.
- Matsubara, Y., H. Kumamoto, Y. Lizuka, T. Murakami, K. Okamoto, H. Miyake and K. Yokoi., 1985. Structure and hypotensive effects of flavonoid glycosides in *Citrus unshiu* peeling. *Agric Biol Chem.*, 49, 909~914.
- Miller, E.G., A.T. Gonzales-Sanders, A.M. Convillon, W.H. Binnie, S. Hasegawa and L.K.T. Lam, 1994. Citrus limonoids as inhibitors of oral carcinogenesis. *Food Technol*, 48, 110~114.
- Mirvish, S.S., L. Wallcave, M. Eagen and P. Shubik, 1972. Ascorbate-nitrite reaction; Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science*, 177, 65~68.
- Mirvish, S.S., 1975. Formation of N-nitroso compounds. chemistry, kinetics and in vitro occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 31, 325.
- Mitsuo, N., 1982. Antioxidant effect of the reaction mixture of dehydroascorbic acid with tryptophan. *Agric. Biol. Chem.* 46, 1199.
- 문수재, 손경희, 윤선, 이명해, 이명희, 1982. 한국산 감귤류 껍질내의 펙틴 함량과 펙틴의 특성에 관한 연구. *한국식품과학회지*, 14, 63.
- Moon, S.H., J.O. Kim and K.Y. Park, 1996. Antimutagenic compounds identified from chloroform fraction of Persimmon leaves. *J. Food*

- Sci. Nutr.*, 1(2), 203~207.
- 문범수, 김복성, 이재관, 이상규. 1973. 식품중의 Nitrosamine에 관한 연구 (제1보). 1. 식품중의 질산염 및 아질산염의 함량. 국립보건연구보, 10, 277~283.
- 문제학, 박근형, 1995. 차의 기능성 성분과 생리활성. 한국차학회지. 1(1), 175~191.
- Muller, H.E., 1985. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS-peroxidase medium, *Zentralbl Bakteriol. Microbio. Hyg*, 259, 151~155.
- Nagago, M. and T. Sugimura, 1993. Carcinogenic factor in food with relevance to colon cancer development. *Mut. Res*, 290, 45~51.
- 나경수, 서형주, 정수현, 손종연, 1997. 양파껍질에서 분리된 용매 추출물의 항산화효과. 한국식품과학회지, 29(3), 595~600.
- Naohiko, Y., 1984. Antioxidant preparations from nonsalted soybean Miso. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 31, 278.
- 노현정, 신용서, 이갑상, 신미경, 1996. 쌀밥 부패미생물에 대한 녹차 물추출물의 항균 활성. 한국식품과학회지, 28(1), 66~71.
- 노광석, 양미옥, 조은자, 2002. 미나리과 산채의 아질산염 소거능. 한국조리과학회지, 18(1), 8~12.
- 농촌진흥청, 1996. 식품성분표(제5개정판). 상록사, pp.66~73.
- 노완섭, 전은자, 2001. 식생활과 건강. 훈민사, pp.181~183.
- Ogawa, H., K. Fukuhisa, H. Fukumoto and K. Fukutani, 1990. Changes in soluble hesperidin content in clarified satsuma mandarin juice. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37, 214.
- 오창경. 1997. 김치의 (항)돌연변이원성과 유산균에 의한 아질산염 소거.

제주대학교 대학원 박사학위논문.

오명철. 1997. 어패류 중 *N*-nitrosamine과 그 전구물질의 분석법 개선 및 응용. 제주대학교 대학원 박사학위논문.

오상룡, 김성수, 민명용, 정동효, 1990. 구기자, 당귀, 오미자, 오갈피 추출물의 유리당, 유리아미노산, 유기산 및 탄닌의 조성. 한국식품과학회지, 22, 76.

Okabe, Y., T. Tsushida, and S. Tokoda, 1996. Antimutagenicity of the extract from taro corps on the Trp-P-2 induced mutagenicity to *Salmonella typhimurium* TA98. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, 43(1), 36~39.

Ooka, K., M.Tanaka, T. Ishikawa and F. Kato, 1999. An antimutagenic metabolite, streptovaricin C, isolated from *Streptomyces* sp., *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 22(1), 107~110.

Oshiba J. and M. Kato, 1981. Nutritional Regulation III, Depression of cardiac action by the isolated naringin, *Mukogawa Joshidaigaku Kiyo*, 29, 1~8.

Pariza, M.W., 1982. Mutagen in heated food. *Food Technol*, 36, 53~61.

Pariza, M.W., L.J. Loretz, J.M. Strokson and Holland, 1983. Workshop conference on nutrition in cancer causation and prevention. *Cancer Res.*, 43(5). 2444~2446.

Park, H.A., M. H. Kweon, H. M. Han, H. J. Sung and H. C. Yang, 1988. Effect of the glycoprotein isolated from *Pteridium aquilinum* on the immune function of mice(in Korean). *Korean J. Food Sci.*

- Technol.* 30, 976.
- 박건영, 전영수, 1993. 김치 발효 중 질산염, 아질산염 및 니트로소아민 생성에 관한 연구. 한국음식문화연구원 논집, 4, 332~352.
- 박계란, 신정혜, 이수정, 임상선, 성낙주, 1998. 시판 식육제품 중 N-nitrosamines의 생성. 제 2보. 조리 방법이 햄 및 소시지의 N-nitrosamines 생성에 미치는 영향, 한국식품위생안전성학회지. 13(4), 406~411.
- 박 훈, 김영변, 1967. 한국산 감귤류의 화학성분에 관한 연구(II). 한국농화학회지, 9, 41.
- 박 훈, 양차범, 김재욱, 이춘명, 1968. 한국산 감귤류의 화학성분에 관한 연구(III). 한국농화학회지, 9, 97.
- 박현서, 이영순, 구성자, 한명주, 조여원, 1995. 식생활과 건강. 효일문화사, pp.262~265.
- 박현숙, 안빈, 양차범, 1990. 참깨와 들깨 단백질의 기능성에 관한 연구. 한국식품과학회지, 22, 76.
- 박재한, 강규찬, 백상봉, 이운형, 이규순, 1991. 식용해조류에서 항산화 물질의 분리. 한국식품과학회지, 23(3), 256~261.
- 박재석, 1994. 툃, 미역, 다시마 추출물의 항돌연변이 및 항균효과. 제주대학교 대학원 석사학위 논문, pp. 23~24.
- 박상동, 1999. 적치커리 중 니트로소화 반응을 억제시키는 물질의 분리 및 구조 동정. 경상대학교 대학원 석사학위논문.
- 박세원, 전재흥, 김현순, 정혁, 1995, 그레이프프룻 종자 추출물이 Penicillium 발생 억제와 감자 기내소괴경 형성에 미치는 영향, 한국원예학회지, 36(2), 179~184.
- Pearson, A.M. and T.R. Dustson, 1990. Toxic compounds produced

- during cooking and meat and Health, *Advances in Meat Research*, Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York. 6, 121~148.
- Peter, F.S., 1975. The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *J. Sci, Food Agric*, 26, 1761~1963.
- Pignatelli, B., R. Scriban, G. Descotes and H. Barrisch, 1984. Modifying effect of polyphenols and other constituents of beer on the formation of N-nitroso compound. *J. Am. Soc. Brew. Chem*, 42, 18.
- Pivnick, H., J. Rubin, H. W. Barnett, H. R. Nordin, P. A. Ferguson and H. Perrin, S. Poirier, H. Ohshima, G. Dethe, A. Hubert, M. C. Bourgade and H. Bartsch, 1987. Volatile nitrosamine levels in common foods from Tunisia, South China and Greenland. high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma(NPC). *International Journal of Cancer*. 39, 293~296.
- Pratt, D.E., 1992. Natural antioxidants from plant materials. In, Phenolic compounds in food and their effects on health(II). Huang, M. T., Ho, S. T. and Lee, C. Y. eds. Am. Chem. Soc. Washington D.C. p.54.
- Rechieigl, J.M., 1995. Toxic Chemical Constituents, *In Handbook of naturally occurring food toxicants*. CRC Press, Inc., Washington, D.C. pp.3~161.
- Schweinsberg, F. and P. Schott-kollaf, 1976. Effect of vitamin A on formation, toxicity and carcinogenicity of Nitroso-N-methyl benzylamine. IARC Scientific Publication, 14, 453~459.
- Sen, N.P., D. C. Smith, L. SchWinghamer and J. J. Marleau, 1969.

- Diethylnitrosamine and other N-nitrosamines in foods. A.O.A.C. 52, 47.
- 신정혜, 2002. 한국인의 대중식품 중 N-nitrosamine의 생성과 제어. 경상대학교 대학원 박사학위논문, pp.161~174
- 송은영, 최영훈, 강경희, 고정삼, 1998. 제주산 감귤류의 숙기에 따른 유리당, 유기산, 헤스페리딘, 나린진, 무기물 함량의 변화. 한국식품과학회지, 30(2), 306~312.
- 송현순, 이현걸, 강명희, 1999. *Salmonella typhimurium* strain TA98, TA100에서 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물들의 돌연변이 억제효과. 한국식품영양과학회지, 28(3), 599~606.
- 송미향. 2000. 감귤류의 주스가 N-nitrosamine의 생성에 미치는 영향. 경상대학교 대학원 석사학위논문.
- 손흥수, 김현숙, 권태봉, 주진순, 1992. 감귤의 Bioflavonoids 분리, 정제 및 혈압강하효과. 한국영양과학회지, 21(2), 136~142.
- Stich, H.F., M. P. Rosin, and L. Bryson, 1982. Inhibition of Mutagenicity of a model nitrosation reaction by naturally occurring phenolics, coffee and tea. *Mut. Research*, 95, 119~128.
- 성낙주, 1986. 굴비 가공 중 N-nitrosamine의 생성에 관한 연구. 고려대학교 대학원 박사학위논문.
- 성낙주, 이수정, 신정혜, 김정균. 1997. 오징어의 건조방법이 N-nitrosamine의 생성에 미치는 영향, 한국식품영양과학회지, 26(4), 614~619.
- 성낙주, 황외자, 이응호, 1988. 한국 재래식 간장의 니트로소화합물에 관한 연구. 한국영양과학회지, 17(2), 125~135.
- Tanizawa, H., Y. Ohkawa, Y. Takino, T. Miyase, A. Ueno, Y. Kageyama and S. Hara., 1992. Studies on natural antioxidants in

- Citrus species. I. Determination of antioxidative activities of Citrus fruits, *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 1940~1942.
- Theiler, R.F. Sato, K. Aspelund, T.G and Miller, A.F, 1984. Inhibition of N-nitrosamine formation in a cured ground pork belly model system. *J. Food Sci*, 49, 341.
- Tricker, A.R. and R. Preussmann, 1991. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: Occurrence, formation and carcinogenic potential. *Mut. Research*, 259, 277~289.
- Trock, B., E. Lanza and P. Greenwald, 1990. Review; Dietary fiber, vegetables and colon cancer : Critical review and meta-analyses of epidemiologic evidence. *JNCI*, 82: 650-661.
- Veckenstedt, A. and M. Horn, 1976. Testing of antiviral compounds against mengo virus infection of mice : A-2 step porcedure of *in vivo* screening Z. Allg. *Microbiol.*, 19, 57~60.
- Vincent, P.M., S. Hasengwa, R.D. Bennett, C.L. Echols, 1980. Limonin and Limonoids : Chemistry, Biochemistry and Juice Bitterness. Citrus Nutrition and Quality. Based on a symposium sponsored by the Division of Agricultural and Food Chemistry at the 179th Meeting of the American chemical society, Houston, Texas, March 26, 63~821.
- Walker, E.A., B. Pignatelli and M. Friesen, 1982. The role of phenols in catalysis of nitrosamine formation. *J. Sci. Food Agric*, 33, 81~88.
- Walker, R. 1990. Nitrates. nitrites and N-nitroso compounds : a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implication. *Food Add. Contam.*, 7(6), 717~768.

- 황보현주, 함승시, 1999. 참취뿌리 에탄올 추출물의 항돌연변이성 및 암세포 성장억제효과. 31(4), 1065~1070.
- 황혜정, 윤광로, 1995. 한국산 감귤의 Carotenoid 계 색소. 한국식품과학회지, 27(6), 950~957.
- Wolff, I.A and A.E. Wasserman, 1972. Nitrites, nitrates, and nitrosamines. *Science*, 177, 15~19.
- 우나리아, 안명수, 이기영, 1995. Aloe 추출물의 유지에 대한 항산화 효과. 한국조리과학회지, 11(5), 536~541.
- 양차범, 박 훈, 김재운, 1967. 한국산 감귤류의 화학성분에 관한 연구(I). 한국농화학회지, 8, 29.
- 양민석, 하영래, 남상해, 최상욱, 장대식, 1995. 국내 자생식물의 항균활성. 한국농화학회지, 38(6), 584~589.
- 여생규, 염동민, 이동호, 안철우, 김선봉, 박영호, 1994. 녹차 추출물의 아질산염 분해작용. 한국영양식량학회지, 23(2), 287~292.
- 유병호, 1991. 암을 예방하는 식생활. 한국식품영양학회지, 4(2), 213~229.
- Yumiko, A., T. Kada, K. Namiki, 1991. Inhibition of N-nitrosomorpholine Formation by lemon Juice. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 38(9), 826~830.

감사의 글

여러모로 부족했던 저를 이 자리에 설 수 있도록 사랑과 배려로서 세심하게 지도해 주셨던 김수현 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 아울러 학업 중에 열의를 가지게 하셨던 김재하 교수님, 항상 환한 미소로 격려를 주셨던 송대진 교수님, 언제나 잔잔하게 마음에 평안을 주셨던 강영주 교수님, 늘 진심어린 조언으로 마음에 위로를 주셨던 하진환 교수님과 열성적인 모습으로 귀감이 되셨던 고영환 교수님, 그리고 아낌없는 성원과 위로를 보내주셨던 임상빈 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 바쁘신 중에도 부족한 논문을 다듬어 주시고 또한 GC-TEA로 분석을 할 수 있도록 실험실을 통째로 내어주셨던 경상대학교 성낙주 교수님께도 고개 숙여 깊은 감사의 인사를 드리며, 아울러 경상대학교 식품영양학과 식품위생학실험실의 정미자, 신정혜 선생님, 그리고 강문정 선생님과 실험실 식구들에게도 감사의 마음을 전합니다.

본 논문을 위한 실험 중에 조언과 더불어 아낌없는 도움을 주셨던 제주 산업정보대학의 오창경, 오명철 교수님과 제주대학교 해양과학대학의 전유진 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 실험기간 내내 자신의 일처럼 실험을 도와주었던 식품생화학실험실의 안용석, 고정림, 좌승미 선생님에게도 감사를 드립니다.

공부를 핑계로 제대로 모시지 못한 아들과 또한 못난 사위를 사랑으로 감싸주셨던 부모님들께 머리 숙여 감사와 사죄의 말씀을 드립니다. 그리고 수시로 격려와 위로를 해 주었던 형제들에게도 고마움을 전합니다.

제가 힘들고 지칠 때마다 위안이 되어주고 헌신해 주었던 사랑하는 나의 아내 곽정희와 어느덧 불쑥 자라버린 나의 귀한 보배인 치영과 세영, 그리고 에술에게 이 작은 결실을 드리며, 이 모든 영광을 하나님께 돌립니다.

2003년 12월

吳 赫 洙