

碩士學位論文

柑橘類 種子 抽出物의 抗突然變異 活性

濟州大學校 大學院



食品工學科
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

安 容 爽

110 7871

2001年 6月

柑橘類 種子 抽出物의 抗突然變異 活性

指導教授 金 洙 賢

安 容 奭

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2001年 6月



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

安容奭의 工學 碩士學位 論文을 認准함

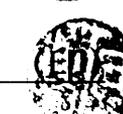
審査委員長 河 璡 桓



委 員 任 尙 彬



委 員 金 洙 賢



濟州大學校 大學院

2001年 6月

Antimutagenic Activity of Extracts of Citrus Seeds

Yong-Seok Ahn

(Supervised by Professor Soo-Hyun Kim)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND ENGINEERING
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2001. 6.

목 차

Summary

I. 서 론	1
II. 연구사	4
1. <i>Salmonella typhimurium</i> LT-2 histidine 요구주	4
2. 식품 유래 돌연변이원	6
3. 식품 중 항돌연변이원성	7
4. 감귤 중의 생리활성 물질	9
III. 재료 및 방법	11
1. 실험재료	11
2. 시료의 추출 및 조제	11
3. 감귤종자 수분함량 측정	12
4. 감귤종자 추출물의 고형분 함량 및 추출수율 측정	12
5. 산귤종자 용매별 추출	13
6. 산귤종자 용매별 추출물의 고형분 함량 및 수율 측정	13
7. 항돌연변이 활성 검색	15
1) 표준돌연변이원	15
2) 시험균주	16

3) 균주의 동정	17
4) 균주의 보관 및 배양	18
5) 표준돌연변이원의 dose-response	19
6) Spot test	20
7) 항돌연변이원성 실험	20
IV. 결과 및 고찰	21
1. 감귤종자 수분함량	21
2. 감귤종자 추출물의 고형분 함량 및 추출수율	21
3. 산귤종자 용매별 추출물의 고형분 함량 및 추출수율	22
4. 표준돌연변이원의 dose-response	23
5. 감귤류 종자 추출물의 (항)돌연변이원성	30
1) 감귤류종자 추출물의 돌연변이원성	30
2) 감귤종자 추출물의 항돌연변이원성	32
6. 산귤 종자 용매별 추출물의 (항)돌연변이원성	43
1) 산귤종자 용매별 추출물의 돌연변이원성	43
2) 산귤종자 용매별 추출물의 항돌연변이원성	45
V. 요약	56
IV. 참고문헌	58

Content of Tables

- Table 1. Scientific name of Citrus varieties
- Table 2. Diagnostic mutagens for confirming reversion properties of tester strains in spot test
- Table 3. Genotype of *S. typhimurium* TA strains used for mutation test
- Table 4. Moisture content of citrus seeds
- Table 5. Solid content and yield of methanol extracts from citrus seeds
- Table 7. Mutagenic activity of methanol extracts from citrus seeds
- Table 8. Antimutagenic effects against ICR-191 with induce mutations of methanol extracts from citrus seeds
- Table 9. Antimutagenic effects against NPD with induce mutations of methanol extracts from citrus seeds
- Table 10. Antimutagenic effects against 4-NQO with induce mutations of methanol extracts from citrus seeds
- Table 11. Mutagenic activity of extracts from *Citrus sunki* with different solvent
- Table 12. Antimutagenic effects against ICR-191 with induced mutation of extracts from *Citrus sunki* with different solvents
- Table 13. Antimutagenic effects against NPD with induced mutation of extracts from *Citrus sunki* with different solvents
- Table 14. Antimutagenic effects against 4-NQO with induced mutation of extracts from *Citrus sunki* with different solvents

Content of Figures

- Fig. 1. Schematic diagram for extraction of citrus seeds with methanol.
- Fig. 2. Schematic diagram for fractionation of extracts from *Citrus sunki*.
- Fig. 3. Dose-response of ICR-191 for *S. typhimurium* TA97 strain.
- Fig. 4. Spot test of ICR-191 for *S. typhimurium* TA97 strain.
- Fig. 5. Dose-response of NPD for *S. typhimurium* TA98 strains.
- Fig. 6. Spot test of NPD for *S. typhimurium* TA98 strain.
- Fig. 7. Dose-response of NPD for *S. typhimurium* TA100 strains.
- Fig. 8. Spot test of NPD for *S. typhimurium* TA100 strain.
- Fig. 9. Dose-response of 4-NQO for *S. typhimurium* TA100 strains.
- Fig. 10. Spot test of 4-NQO for *S. typhimurium* TA100 strain.
- Fig. 11. Dose-response of 4-NQO for *S. typhimurium* TA102 strains.
- Fig. 12. Spot test of 4-NQO for *S. typhimurium* TA102 strain.
- Fig. 13. Inhibition rate against *S. typhimurium* TA97 with ICR-191 of methanol extracts from citrus seeds.
- Fig. 14. Inhibition rate against *S. typhimurium* TA98 with NPD of methanol extracts from citrus seeds.
- Fig. 15. Inhibition rate against *S. typhimurium* TA100 with NPD of methanol extracts from citrus seeds.
- Fig. 16. Inhibition rate against *S. typhimurium* TA100 with 4-NQO of methanol extracts from Citrus seeds.
- Fig. 17. Inhibition rate against TA102 with 4-NQO of methanol extracts from Citrus seeds.
- Fig. 18. Inhibition rate against *S. typhimurium* TA97 with ICR-191 of extracts from *Citrus sunki* seed with different solvents.
- Fig. 19. Inhibition rate against TA98 and TA100 with NPD of extracts from *Citrus sunki* seed with different solvents.
- Fig. 20. Inhibition rate against *S. typhimurium* TA100 and TA102 with 4-NQO of extracts from *Citrus sunki* seed with different solvents.

Summary

Antimutagenic effects of methanol extracts from citrus seeds and the solvent fractions from *C. sunki* against the mutation induced by ICR-191, NPD and 4-NQO using Ames' test were investigated.

Methanol extracts from citrus seeds showed more than 80% of the inhibitory effects against the mutation induced by ICR-191. Especially, the methanol extracts from *C. sunki*, *C. iyo*, *C. junso* and *C. grandis* showed more than 90% of the inhibitory activities. Almost all of the organic solvent fractions, except for distilled water fraction, from *C. sunki* showed more than 70% of the inhibitory effects.

Methanol extracts and the organic solvent fractions from *C. sunki* showed the inhibitory activities 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. The distilled water fraction showed less than 50% of the inhibitory activity, while *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate and *n*-butyl alcohol fractions showed more than 90% of the inhibitory activities.

Almost all of methanol extracts and the solvent fractions showed the inhibitory activities against TA100 and TA102 induced by 4-NQO. Especially, methanol extracts from *C. grandis*, *C. sulcata*, *C. obovoidea*, *C. tangerina*, *C. aurantium* and *Fortunella margarita* showed more than

80% of the inhibitory activities. The distilled water fraction showed approximately 60%, while *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate and *n*-butyl alcohol fractions showed nearly 100% of the inhibitory activities against the mutation induced by 4-NQO.

These methanol extracts and solvent fractions induced no mutation and didn't have genotoxicity. The inhibitory effect of methanol extracts from citrus seeds were the more effective in frameshift mutant(TA97 and TA98) than in base substitution mutant(TA100 and TA102). Almost all of the solvent fractions from *C. sunki* showed high sensitive inhibitory activities against the mutation induced by NPD and 4-NQO.



I. 서론

의료 기술의 진보와 의식주를 비롯한 생활 환경의 개선 등으로 인간의 평균 수명이 매년 증가하는 반면, 악성 신생물(neoplasm)인 암으로 인한 사망률이 증가하고 있다. 암 발생요인은 유전적 요소도 있지만, 주된 요인은 외인성인 환경 인자에 의한 것이며, 그 중에서도 식품이 가장 큰 원인이 되고 있다(黒田, 1993).

식품 중의 발암물질은 식품의 가공, 조리 중 가열 등에 의해서 여러 가지 돌연변이원이 생성되는데, 기호성과 안전성을 높이기 위한 가열 처리가 한편으로는 독성물질을 생성시키는 원인이 되기도 한다. 또한 아미노산 가열 분해로 인한 heterocyclic amine류, 식품 성분의 가열 분해로 생성되는 benzopyrene류, 질산염과 아민류의 반응으로 생성되는 *N*-nitroso 화합물들, 식품 저장 중 곰팡이 대사로 생성되는 aflatoxin류와 같은 변이원성 물질들이 생성되어 이것들은 빠른 속도로 DNA에 돌연변이를 일으켜 암을 유발시킨다(Ames 등, 1975; Chu, 1991; Hosono 등, 1986).

돌연변이원의 발암능을 검정하는 방법에는 *Salmonella typhimurium*의 histidine auxotroph를 이용한 Ames 등(1973)의 방법, *E. coli*의 tryptophan autotroph를 이용한 Green과 Muriel(1976)의 방법, *Bacillus subtilis*의 rec assay를 이용한 Kada 등(1972)의 방법, 기타 곰팡이류, 식물, 곤충을 이용한 방법들이 있으며, 그 중에서 *Salmonella typhimurium* reversion assay는 Ames 등(1975)에 의해서 제안되어 생리활성 물질 검색이나 독성 시험을 간편히 할 수 있는 방법으로서 *S. typhimurium* LT-2로부터 유래한 histidine 요구성 돌연변이주(histidine auxotroph)를 이용한 시험법이다. 돌연변이 균주는 보수계(repair system)를 통하여 본래의 야생형 균주로 복귀(reversion)하여 자체적으로 histidine을 생합성하면서 histidine이 첨가되지

않은 배지에서도 생육하므로 복귀하는 돌연변이(revertant)의 수로써 돌연변이원성 정도를 판별하는 시험법으로서 돌연변이를 유발하는 물질의 약 83%가 발암물질로 알려지고 있다(Ames, 1979; Ames와 McCann, 1982; Barnes 등, 1982; Isono와 Yourno, 1974; Maron과 Ames, 1983).

돌연변이 억제물질은 작용 방식에 따라 세포 내 항돌연변이원성 물질(bioantimutagen)과 세포외 항돌연변이원성 물질(desmutagen)로 구분되는데, 전자는 돌연변이원이 DNA에 도달하는 것을 억제하거나 이미 DNA에 손상이 일어난 경우 세포의 DNA 수복 및 복제과정을 촉진하여 변이의 발생빈도를 낮춰 주는 역할을 하는 물질들로서, polyphenol류 등의 항산화 성분과 산화환원효소 등이 이에 속한다. 후자는 돌연변이원이 DNA에 장해를 일으키기 전에 세포외에서 돌연변이원 자체를 불활성화 시키거나 돌연변이원의 세포 내 흡수를 억제하는 작용과 전구물질이 돌연변이원성 물질로 전환되는 과정을 억제하는 물질들로서 환원력이 있는 항산화제, peroxidase 등의 효소와 식이섬유 등 생체 고분자 물질 등이 포함된다(Kata 등, 1982; Kata 등, 1986).

제주도에서 감귤이 언제부터 재배되었는지 확실한 연대가 밝혀져 있지 않으나 고려사에 의하면 백제 문주왕(476년)때 탐라에서 방물을 헌상 하였다는 기록으로 미루어 봐서 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 항알러지성, 항염성, 항바이러스성, 항암성 등의 활성을 갖는 물질들을 함유하고 있는 것으로 알려지고 있으며, 또한 식이섬유도 다양한 생리

조절기능 때문에 기능성 식품소재로 이용되고 있고(김과 양, 1997), 또한 독특한 향미를 부여하고 다량의 비타민 C를 함유하고 있기 때문에 생과와 과즙음료 형태로 널리 이용되고 있으며(황과 윤, 1995), 한방에서 橘皮를 陳皮라 하여 방향성 건위, 구풍, 거담, 진해약으로서 식욕부진, 구토, 사하, 동통, 해수 등에 처방제로 이용되고 있다(한국약학대학협의회, 1997).

감귤 종자에는 limonoid류와 α -tocopherol 등이 함유되어 있어 항암, 항산화 등의 여러 생리적 기능에 대한 보고가 있지만(조, 1990; 조, 1995; Miller 등, 1994; Vincent 등, 1980), 감귤에 대한 연구는 과육과 과피를 중심으로 이루어지고 있으며, 감귤 종자의 생리활성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 제주산 감귤류 종자에 대한 생리활성물질을 탐색하기 위한 일환으로 항돌변이원성을 검정하고자 하였다.



II. 연구사

1. *Salmonella typhimurium* LT-2 histidine 요구주

Salmonella typhimurium reversion assay는 1975년 Ames에 의해서 제안되어 Ames test로 불리워 지는데, 시험균주는 *S. typhimurium* LT-2로부터 유래한 histidine 요구성 돌연변이주(histidine auxotroph)들이다. Frameshift type 및 base substitution type의 돌연변이주들로서 변이원이 DNA 염기쌍 사이에 삽입되거나 염기와 치환되면, 이들 돌연변이주는 보수계(repair system)를 통하여 본래의 야생형 균주로 복귀(reversion)하여 자체적으로 histidine을 생합성하면서 histidine이 첨가되지 않은 배지에서도 생육하므로 복귀하는 돌연변이(revertant)의 수로써 변이원성 정도를 판별한다(Barnes 등, 1982; Isono와 Yourno, 1974).

이 시험법은 독성시험이나 생리활성 물질 검색시 신속성과 간편성을 지닌 미생물의 유전자 돌연변이를 이용한 시험법으로서 발암물질과 변이원 물질간의 관계에 대한 연구들로부터 돌연변이를 유발하는 물질의 약 83%가 발암물질로 알려지고 있다(Ames, 1979; Ames 등, 1975; Ames와 McCann, 1982; Maron과 Ames, 1983).

*S. typhimurium*을 이용한 변이원성 검정은 초기에는 *S. typhimurium* LT-2 histidine auxotroph 균주의 복귀돌연변이 빈도를 비교 측정하여 돌연변이 유발성을 검정하였으나, 변이원에 대한 감수성을 높이기 위하여 보수결시 돌연변이(repair deficient mutation) 및 세포벽 돌연변이(cell wall mutation)를 도입하였고(Ames 등, 1973), 또한 감수성을 높이기 위해서 R-factor plasmid인 ampicillin 저항인자 pKM101을 도입시킨 TA98과 TA100 균주 및 tetracycline 저항인자 pAQ1(Levin 등, 1982)을 도입시킨 TA102 균주가 분리되어 표준 변이원성 검정에 이용되고 있다. 또한, *in*

*vitro*에서 간접적으로 포유동물의 생체 대사작용과 유사 조건으로 한 비활성물질들이 생체 내에 흡수되어 활성화된 후 돌연변이를 일으킬 가능성 여부를 밝히기 위하여, 포유동물의 간 microsome 효소 복합체(liver microsome enzyme complex)인 S-9를 도입하여 활성인자로 사용하고 있다 (Ames 등, 1975).

시험균주 TA97은 *S. typhimurium* LT-2의 histidine auxotroph 중에서 구조이동성 돌연변이 균주인 hisD6610을 모균으로 하여 hisD6610 돌연변이 부위에 추가적으로 6개의 cytosine을 연결시킨 것으로서, 화학물질에 대한 투과성을 높이기 위해 세포벽의 구성성분인 lipopolysaccharide가 부분적으로 결여된 deep rough(*rfa*) 돌연변이와 DNA 절제 수선시스템(excision repair system)을 코딩하는 유전자를 결여시킨 *uvrB* 절제 능력을 가진 TA1537 균주에 ampicillin 저항인자인 plasmid pKM 101을 도입하여 감수성을 높인 균주이다(Levin 등, 1982).

TA98은 *S. typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성 변이주 중 구조이동성 돌연변이원인 hisD3052를 모균으로 하여 *uvrB* 절제 능력을 가진 균주인 TA1538에 ampicillin 저항인 plasmid pKM101의 도입으로 감수성을 높인 균주이다. HisD3052는 histidine dehydrogenase를 코딩하는 hisD 유전자에 돌연변이를 일으킨 것으로 보통 구조이동성 돌연변이(frameshift mutation)가 일어난 부근에 8개의 반복되는 -GC- 잔기들을 가지고 있다 (Isono 등, 1974).

TA100은 *S. typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성 변이주 중 염기치환 변이원(base repair mutant)인 his G46을 모균으로 하여 deep rough(*rfa*) 돌연변이와 *uvrB* 절제 능력을 가진 TA1535에 ampicillin 저항인자인 plasmid pKM 101의 도입으로 감수성을 높인 균주이다. His G46은 histidine 생합성의 최초 효소를 코딩하는 his 유전자에 돌연변이를 유발시

킴으로써 DNA 염기서열(sequence)의 분석시 야생형(wild type)의 -CAC/-CTC-(leucine)이 -GGG/-CCC-(proline)으로 전환되어 있다(Levin 등, 1982).

TA102는 염기치환성 돌연변이 균주인 hisG428을 모균으로 하여 deep rough(*rfa*)와 plasmid인 pKM101와 pAQ1(tetracycline 저항인자)을 도입한 균주이다(Levin 등, 1982).

2. 식품 유래 돌연변이원

인간에게 발생하는 암의 대부분은 생활 환경 인자 중에서도 식품 및 식생활과 밀접한 관계를 가지고 있다(Doll과 Peto, 1981).

발암물질(돌연변이원)은 크게 간접 돌연변이원(indirect mutagen)과 직접 돌연변이원(direct mutagen)으로 구분되는데, 간접 돌연변이원은 인체내에서 돌연변이원성의 발현시 cytochrome P450효소에 의하여 돌연변이원성을 나타내는 물질이며 직접 돌연변이원은 효소에 의한 대사적 활성화 없이 돌연변이원성을 나타내는 물질로서 직접 및 간접돌연변이원을 식품으로부터 검색하는 연구가 진행되어 왔다(Rechieigl, 1995). 식품에서 유래되는 대표적인 돌연변이원들은 식품의 가공, 저장 중에 생성되는 돌연변이원으로 육제품의 가공, 저장 및 훈연처리시 아질산염과 아민과의 반응으로 생성되는 *N*-nitrosamine(Hotchkiss 등, 1981; Pearson과 Dutson, 1990), 식품 저장 중 *Aspergillus flavus* 발육으로 생성되는 aflatoxin 중 aflatoxin B₁은 돌연변이원성이 매우 강한 것으로 알려지고 있고(Pariza 등, 1983), 단백질 식품의 가열, 조리시 생성되는 대표적인 돌연변이원은 benzo[*a*]pyrene과 3-Amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]-indole(Trp-P-1), 2-amino-6-methyl-dipyrido[1,2-3',2'-d]imidazole(Glu-P-1) 등의 amino acid pyrolysate와 carboline류, 2-Amino-3-methylimidazo-[4,5-*f*]quinoline(IQ), 2-Amino-3,4-

dimethylimidazo-[4,5-f]quinoline(MeIQ) 등의 quinoline류와 같은 hetero-cyclic amine류로서 이들 물질은 평면구조를 하고 있기 때문에 DNA의 염기쌍 사이로 끼어 들어가 세포돌연변이를 일으키는 것으로 알려져 있다 (Pariza, 1982; Person과 Dutson, 1990; Sugimura 등, 1988; Turesky 등, 1992).

3. 식품 중 항돌연변이원성

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 낮춰 주는 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 중의 bioantimutagen의 예로는 녹차에서 분리된 epigallocatechin-gallate(EGCg)와 같은 polyphenol 화합물(Kada 등, 1985)이며, desmutagen의 예로는 양배추의 peroxidase에 의한 tryptophan pyrrolisate의 불활성화(Inoue 등, 1981)와 과일, 채소류의 식이섬유에 의한 돌연변이원의 흡수(Kada 등, 1984) 등이 있다. 항돌연변이원성 물질 탐색시 이러한 돌연변이 억제물질의 작용 메카니즘을 고려함으로써 암의 예방적 해석에 기여할 수 있을 것으로 기대되며 식품성분이나 천연물 가운데 이와 같은 메카니즘을 바탕으로 항변이원성을 나타내는 물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

식품 유래 항돌연변이원성 연구를 살펴보면, 들깨잎의 메탄올 추출물에서

aflatoxin B₁에 대한 항돌연변이원성 효과가 강한 물질을 분리, 동정하였다 고 보고하였고(이 등, 1992), 감잎의 aflatoxin B₁에 대해 항돌연변이원성을 갖는 물질을 분리하였다고 보고하고 있으며(Moon 등, 1996), 인삼 saponin이 aflatoxin의 생성을 감소시키며, 생성된 aflatoxin에 대해 구조이동성 돌연변이 균주인 TA98에 대하여 saponin의 양이 증가함에 따라 돌연변이원성을 감소시킨다고 보고하였다(백 등, 1988).

싸리버섯 메탄올 추출물의 간접돌연변이원인 benzo[*a*]pyrene과 aflatoxin B₁과 직접돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)에 돌연변이원성 억제효과를 보고하고 있고(김 등, 1999), *Streptomyces* sp.에서 분리한 streptovaricin이 heterocyclic amine류인 Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1에 *S. typhimurium* TA98과 TA100에 돌연변이원성 억제효과를 보고하였다(Ooka 등, 1999).

과일과 야채에서 추출된 phenolic 화합물들이 돌연변이원성 억제효과 대하여 보고하고 있으며(Malaveille 등, 1996), 쥐 비장 림프구에 β -carotene의 생체내에서의 돌연변이원성 억제효과를 보고하고 있으며(Aidoo 등, 1995), 마늘의 메탄올 추출물에 대한 각 분획물의 aflatoxin B₁에 대한 항돌연변이 시험에서 chloroform의 분획물에서 가장 효과가 높았으며, 크로마토그래피, GC-MS, NMR, FT-IR을 이용하여 분리, 동정된 화합물 중 methyl linoleate가 다량 함유되었으며, 이 물질의 항돌연변이 효과가 매우 크다고 하였다(Kim 등, 1991).

4-NQO, Trp-P-1 및 2-AF에 의하여 유발되는 변이원성에 대한 수리취 추출물의 억제효과에 대해서 보고하였고(함 등, 1997) 실제 음용조건으로 추출한 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물이 간접 돌연변이원 물질 IQ에 대한 억제 효과가 탁월하였으나 직접 돌연변이원 물질에 대해서는 저농도 첨가시에는 큰 변화가 없었다는 결과를 보고하였는데, 음용 조건에서 추출한 차

추출물의 돌연변이 억제효과 기전은 차 추출물들이 변이원 물질과 직접 결합하여 돌연변이를 억제하기보다는 돌연변이 물질의 체내 활성화 대사과정을 억제하는 물질로 작용한다고 하였다(송 등, 1999). 이외에 유산균도 heterocyclic amine류에 대한 항돌연변이원성 효과가 있다고 보고하였다(Hosono 등, 1990).

4. 감귤 중의 생리활성 물질

감귤은 백제 문주왕(476년)때 탐라에서 방물을 헌상하였다는 기록으로 미루어 봐서 제주도에서 옛날부터 감귤이 재배되었음을 알 수 있다(고와 김, 1995). 고문헌에 기록된 재래감귤의 종류로는 감자, 당감자, 유감, 유자, 동정귤, 청귤, 지각, 석금귤, 당금귤, 등자귤, 병귤, 왜귤, 산귤, 금귤 등이 있었으나 현재는 당유자, 유자, 산귤, 병귤, 동정귤, 청귤 및 지각만이 재배되고 있다(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 있다(Eun 등, 1996). 또한 감귤 유래식이섬유도 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).

감귤의 과피와 과육에는 hesperidin, rutin, narirutin, naringin, neo-hesperidin, nobiletin, poncirin 등과 같은 flavonoid가 다량 함유되어 있고

(Eun 등, 1996; 장 등, 1977), 향기성분으로는 *d*-limonene 이외에 여러 가지 limonoid를 다량 함유하고 있으며, 색소성분은 carotenoid계 물질로 알려지고 있다(배, 1997; Johnson 등, 1995).

감귤의 생리활성 및 기능성에 대한 연구로는 hesperidin의 식물세포뿐만 아니라 포유류 동물의 *in vitro*와 *in vivo*에서 여러 가지 생리 및 약리 작용(김과 정, 1990), naringin의 혈압강하작용(Oshiba 등, 1981) 및 항균작용(안 등, 1988), 감귤 메탄올 추출물의 항산화 작용(Tanizawa 등, 1992), 감귤과피 추출물인 limocitrin 3- β -D-glucose, limocitrin-3- α -L-rhamnose, 3,6-di-C- glucosylapigenin 등의 혈압강하 효과(Matsubara 등, 1985), 감귤의 sinensetin, nobiletin은 항혈액응고작용, 항바이러스작용(Veckenstedt, 1976)이 보고되고 있다. 감귤과피 중의 nobiletin 및 tangeretin은 benzo [α]pyrene, 2-amino-fluorene(2-AF) 및 4-NQO에 대해 항돌연변이원성 효과가 높으며(Calomme 등, 1996), quercetin과 tangeretin은 암의 침투와 전이를 막아주고(Jie, 1997; Marc, 1994), limonin, nomilin과 같은 citrus limonoid는 구강암을 억제한다고 보고하고 있다(Lam 등 1994; Miller 등, 1994).

감귤의 일종인 grapefruit의 종자추출물들은 박테리아와 곰팡이에 대한 항균 효과를 갖는 성분이 있어(이 등, 1995), 광범위한 천연 항균제로 그 활용이 기대되고 있다(고 등, 1995; 박 등, 1998).

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), 감귤종류에 따라 차이가 크다. 감귤 종자에는 limonoid와 α -tocopherol 등이 함유되어 있어 항암, 항산화 등의 여러 생리생활 기능이 있을 것이라고 보고되고 있어(조, 1990; 조, 1995; Miller 등, 1994; Vincent 등, 1980) 이에 대한 연구에 관심이 크다고 할 수 있다.

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 실험재료

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.

Tabel 1. Scientific name of Citrus varieties

Varieties	Scientific name
Sankyool	<i>Citrus sunki</i>
Hakyool	<i>Citrus natsudaikai</i>
Iyeakam	<i>Citrus iyo</i>
Yooja	<i>Citrus junos</i>
Dangyooja	<i>Citrusgrandis</i>
Kumkamja	<i>Citrus obovoidea</i>
Sambokam	<i>Citrus sulcata</i>
Peonkyool	<i>Citrus tangerina</i>
Jigak	<i>Citrus aurantium</i>
Kumkam	<i>Fortunella margarita</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 정용하였다. 이 액을 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 항돌연변이원성 시험을 위한 시료로 사용하였다.

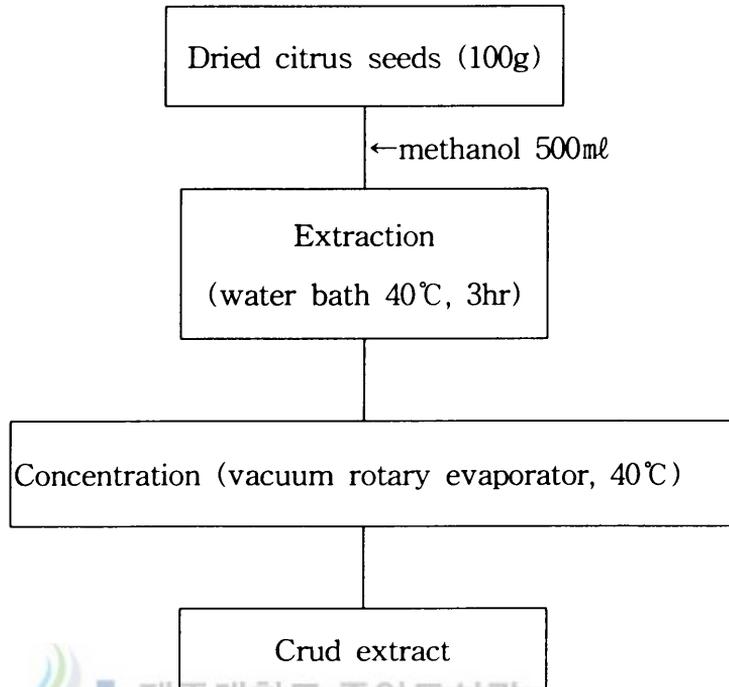


Fig. 1. Schematic diagram for extraction of citrus seeds with methanol.

3. 감귤종자 수분함량 측정

건조된 감귤종자들을 건식분쇄기로 분쇄시킨 시료에 대한 수분함량 측정은 105°C에서 상압가열 건조법으로 측정하였다.

4. 감귤종자 추출물의 고형분 함량 및 추출수율 측정

감귤 종자 메탄올 추출물의 고형분 함량은 휘발법으로 측정하였으며, 추출수율은 각 종자에 대한 수분함량을 보정하여 구하였다.

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

5. 산귤종자 용매별 추출

산귤종자를 용매별로 Fig. 2과 같이 추출하였다. 즉 산귤종자 500g에 메탄올 3ℓ를 가하여 40℃ 수욕상 3시간 동안 추출하여 감압농축한 후 동결건조하였다. 잔사는 극성이 가장 높은 증류수 1ℓ를 가하여 40℃ 수욕상에서 3시간 추출 후 감압 농축시켜 동결건조 하였으며, 이 후 잔사는 극성이 가장 낮은 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부틸 알코올 순으로 40℃ 수욕상에서 3시간 추출한 후 감압 농축한 추출물을 다시 각각의 용매로 250ml 정용하였다.

이들 산귤종자 용매별 분획 추출물들은 증류수 동결건조물 0.2g을 분취하여 25ml로 증류수로 정용하고 0.45μm filter로 여과한 후 항돌연변이원성 시험에 시료로 사용하였다. 그리고 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부틸 알코올 추출물은 각각 50ml씩 분취하여 용매가 완전히 제거될 때까지 감압 농축하여 이 농축액을 DMSO로 50ml 정용하여 0.45μm filter로 여과한 후 항돌연변이원성 시험에 시료로 사용하였다.

6. 산귤종자 용매별 추출물 고형분 함량 및 추출수율

산귤종자 용매별 추출물의 고형분 함량은 휘발법으로 측정하였으며, 추출수율은 각 종자에 대한 수분함량을 보정하여 구하였다.

$$\text{Yield}(\%) = \frac{\text{solid content of extracts (g)}}{\text{dried } \textit{Citrus sunki}(\text{g})} \times 100$$

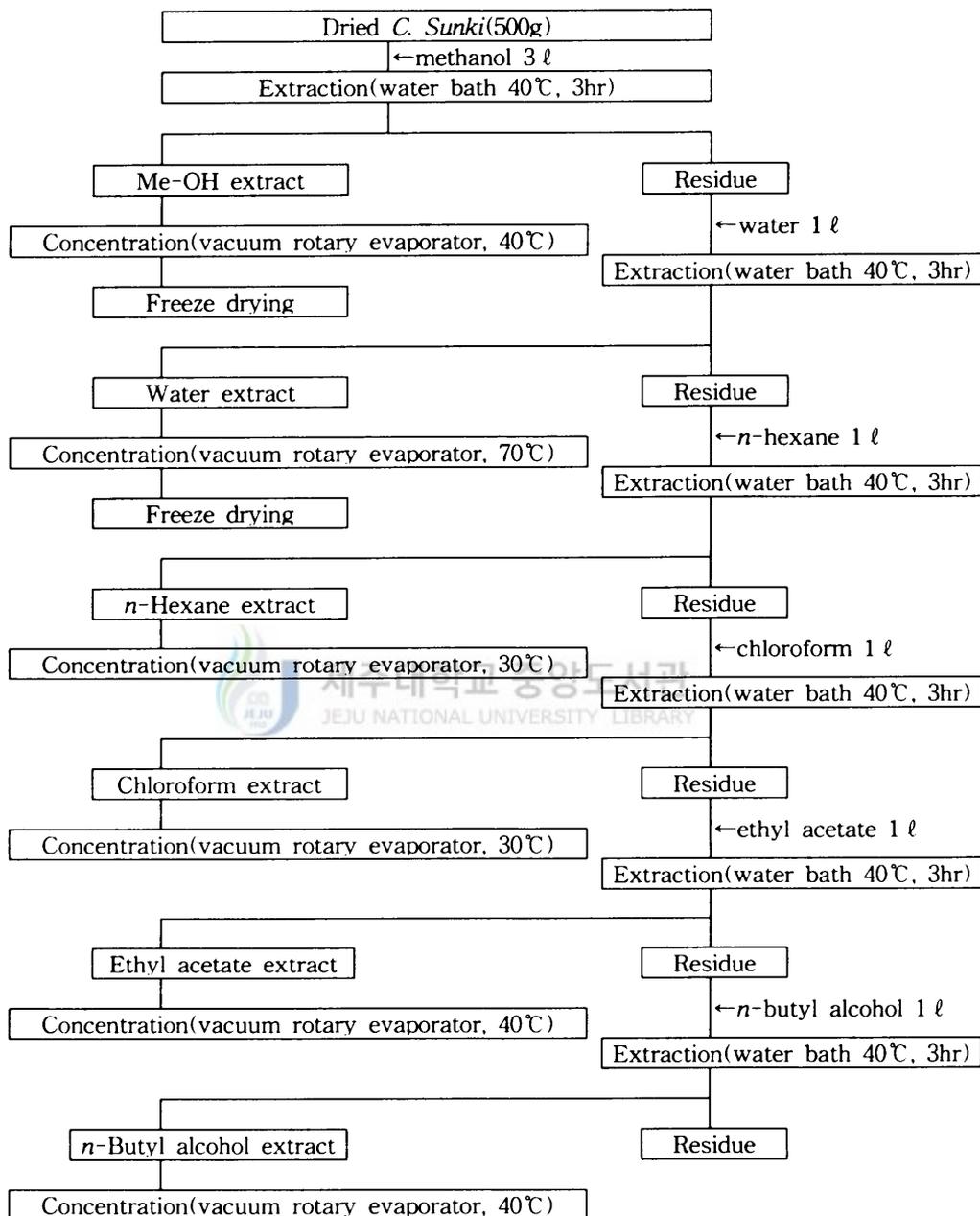


Fig. 2. Schematic diagram for fractionation of extracts from *Citrus sunki*.

7. 항돌연변이원성

1) 표준돌연변이원

Ames 시험법에 사용되고 있는 표준 돌연변이원에 대한 균주에 대한 감수성은 Table 2와 같다

Table 2. Diagnostic mutagens for confirming reversion properties of tester strains in spot test

mutagen	Amount of sportted in 10 μ l	S9	TA97	TA98	TA100	TA102
Daunomycin ^a	5.0 μ g	-	-	+	-	++
Sodium azide	1.0 μ g	-	±	-	++++	-
ICR-191	1.0 μ g	-	++++	+	++	+
Mitomycin C	2.5 μ g	-	inh	inh	inh	+++
2,4,7-TNFone	0.1 μ g	-	++	++++	++	++
NPD	20.0 μ g	-	++	++++	+++	+
4-NQO	10.0 μ g	-	±	++	++++	+++
MMS	2.0 μ l	-	+	-	+++	++++
Dexon	50.0 μ g	-	++++	+++	++	+++
2-AF	20.0 μ g	+	++	++++	+++	+

Symbols for the number of revertants/plate(spontaneous subtracted) : -, <20; +, 20~100; ++, 100~200; +++, 200~500; +++++, >500. Daunomycin and sodium azide were dissolved in water. All other compound were dissolved in DMSO. PCB-induced rat liver S9 was used in a concentration of 20 μ l/plate for the activation of 2-AF.

^aProduces a minimal response in the spot test: should be tested by plate incorporation

Abbreviations : ICR-191, 2-methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)aminopropyl-amino) acridine · 2HCl; 2,4,7-TNFone, 2,4,7-trinitro-9-fluorenone; NPD, 4-nitro-*o*-phenylene- diamine; 4-NQO, 4-nitroquinoline-*N*-oxide; MMS, methyl methanesulfonate; 2-AF, 2-aminofluorene; inh, inhibition of bacterial growth due to toxicity of the mutagen. Form Maron & Ames(1983).

본 실험에 사용된 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*-phenylene-diamine(NPD, Aldrich사)를 사용하여 구조이동성과 염기치환성 돌연변이를 검정하는 표준돌연변이원으로 하였으며, *S. typhimurium* TA100과 TA102에는 4-nitroquino- line-*N*-oxide(4-NQO, Aldrich사)를 염기치환성 돌연변이를 검정하는 표준돌연변이원으로 사용하였다.

2) 시험균주

시험균주는 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성 변이주(auxotroph)인 TA97, TA98, TA100 및 TA102를 사용하였으며, 시험균주의 특성은 Table 3와 같다.

Table 3. Genotype of *S. typhimurium* TA strains used for mutation test

Strain	Histidine mutation	LPS	Repair	R-factor
TA97	hisD6610	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	+R
TA98	hisD3052	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	+R
TA100	hisG46	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	+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 물질의 흡수를 용이하게 만든 Deep rough 돌연변이이며, 이것을 crystal violet에 대한 감수성으로 형질을 시험한다. 하룻밤 배양된 신선한 균주 0.1ml와 45°C로 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°C에서 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 자외선 살균등(15W)을 8초간 조사하고 37°C에서 12~14시간 배양하였다. *uvrB* 돌

연변이 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 검사하였다.

Ampicillin 내성을 검사하기 위해서는 plate 상에 histidine 요구성 확인에 설명된 방법을 사용하여 ampicillin을 함유하는 plate(TA102는 ampicillin과 tetracyclin) 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 oxid 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°C에서 48시간 배양하고, TA102는 ampicillin/tetracycline plate에 도말 배양한 후 단일 colony를 백금이로 취하여 액체배양액에서 다시 배양하여 ampicillin plate 또는 ampicillin/tetracycline plate 위에 백금이로 그은 후 37°C에서 12시간 배양하여 4°C의 냉장고에 보관하였다.

(3) 시험균주의 전 배양

Nutrient broth 12.5g을 증류수 500ml에 용해하여 고압멸균기에서 121°C, 20분간 멸균한 뒤 멸균된 glass test tube에 10ml씩 분주하였다. 여기에 master plate에서 배양된 시험균주를 각각 1 백금이 접종한 후 37°C 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 및 TA102를 이용하여 Maron과 Ames(1983)의 표준평판배지법에 따라 실시하였다.

즉, 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°C에서 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 2ml 를 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. 항돌연변이 활성은 돌연변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율(%)로 나타내었다.

IV. 결과 및 고찰

1. 감귤종자 수분함량

건조된 감귤종자들을 건식분쇄기로 분쇄시킨 후 수분함량을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 감귤종자들의 수분함량은 4.1~6.5%로 대부분 5%이하의 수분함량을 보였으나, 이 중 편귤(*Citrus tangerina*) 6.4%, 지각(*Citrus aurantium*) 6.5%로 다른 감귤종자보다 높게 나타났다.

2. 감귤종자 메탄올 추출물의 고형분함량 및 추출수율

분쇄된 감귤류 종실 100g을 40℃에서 수욕상에서 3시간 동안 메탄올로 추출한 감귤종자 추출물의 고형분 함량은 Table 5와 같다. 감귤종자 메탄올 추출물의 고형분 함량과 추출수율은 각각 2.2~5.5% 및 2.3~5.8이었으며, 이 중 유자가 다른 감귤종자 추출물보다 높은 고형분 함량과 추출수율을 보였다.

Table 4. Moisture content of citrus seeds

Citrus varieties	Moisture content(%)
<i>Citrus sunki</i>	4.7
<i>Citrus natsudaidai</i>	4.4
<i>Citrus iyo</i>	4.2
<i>Citrus junos</i>	5.3
<i>Citrus grandis</i>	4.8
<i>Citrus obovoidea</i>	4.1
<i>Citrus sulcata</i>	4.2
<i>Citrus tangerina</i>	6.4
<i>Citrus aurantium</i>	6.5
<i>Fortunella margarita</i>	4.6

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

Sample	Solid content(%)	Extraction yield(%)
<i>Citrus sunki</i>	3.2	3.3
<i>Citrus natsudaidai</i>	2.2	2.3
<i>Citrus iyo</i>	2.7	2.8
<i>Citrus junos</i>	5.5	5.8
<i>Citrus grandis</i>	2.2	2.3
<i>Citrus obovoidea</i>	3.8	4.0
<i>Citrus sulcata</i>	3.2	3.4
<i>Citrus tangerina</i>	4.3	4.6
<i>Citrus aurantium</i>	3.5	3.7
<i>Fortunella margarita</i>	2.2	2.4

3. 산귤종자 용매별 추출물의 고형분 함량 및 수율

산귤종자 용매별 추출물의 고형분 함량과 추출수율은 Table 6과 같다. 산귤종자 용매별 추출물의 고형분 함량은 0.8~3.2%이었으며, 메탄올 추출물을 제외하고 추출 용매별 고형분 함량은 1%이하였다.

산귤종자의 용매별 추출 수율은 0.4~3.3%이었으며, 추출용매 중 메탄올 추출물이 3.3%로 가장 높은 추출수율을 보였다.

Table 6. Solid content and yield of extracts from *Citrus sunki* with different solvents

Solvent	Solid content(%)	Extraction yield(%)
Methanol	3.2	3.3
Distilled water	0.8	0.4
<i>n</i> -Hexane	0.8	0.4
Chloroform	0.8	0.4
Ethylacetate	0.9	0.5
<i>n</i> -Butyl alcohol	0.7	0.4

4. 표준돌연변이원의 dose-response

구조이동성 돌연변이 검정 균주인 TA97의 양성반응물질로는 ICR-191, TA98에서는 NPD가 양성반응물질로 이용되며, NPD는 염기치환성 돌연변이 검정 균주인 TA100, 4-NQO는 TA100과 TA102에 양성반응물질로 염기치환성 돌연변이 검정에 이용된다(Maron과 Ames, 1983). 이들 양성반응물질의 농도에 따른 revertant colony 수가 다르기 때문에 최대 저지환을 형성하기 직전 돌연변이원의 최적농도를 결정하는 것이 중요하므로 dose-response와 spot test(Fig. 3~12)의 결과로부터 독성이 없고, 육안으로 계수가 용이한 농도를 최적농도로 결정하였다.

TA97균주에 대한 표준돌연변이원 ICR-191의 dose-response는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 농도가 증감함에 따라 $50\mu\text{g}/\text{plate}$ 까지 revertants colony가 지속적으로 증가하고 있으며, 농도 증가에 따른 독성을 확인을 위한 spot test 결과(Fig. 4) ICR-191의 균주에 대한 세포독성을 나타내지 않고 복귀돌연변이 수를 계수하기 용이한 최적농도로 $5\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 선정하였다.

NPD에 대한 TA98 균주의 dose-response는 Fig. 5와 같다. TA98에 대한 NPD 복귀돌연변이 수는 $100\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도까지 직선적인 증가량을 보이고 있으며, spot test 결과(Fig. 6) TA98에 대해 독성이 없고, 복귀돌연변이 수를 계수하기 용이한 $25\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 최적농도로 결정하였다.

NPD에 대한 TA100 균주의 dose-response는 Fig. 7과 같으며, 농도가 $50\mu\text{g}/\text{plate}$ 까지는 복귀돌연변이 수가 증가하고 있지만, 그 이상의 농도에서는 감소 추세를 보였고, 그리고 spot test(Fig. 8)결과 $25\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 균주에 대한 독성이 나타나지 않고, 계수가 용이하여 최적농도로 결정하였다.

4-NQO에 대한 TA100 균주의 dose-response는 Fig. 9와 같다. TA100인 경우는 4-NQO가 $0.5\mu\text{g}/\text{plate}$ 까지는 복귀돌연변이 수가 증가를 보이나, $0.5\mu\text{g}/\text{plate}$ 이상의 농도에서는 복귀돌연변이 수가 감소하는 추세를 보이고 있

다. 이는 농도의 증가에 따른 돌연변이원의 독성작용의 영향으로써 spot test 결과(Fig. 10), 0.5 μ g/plate에서 저해존을 형성하였다. 따라서 dose-response와 spot test를 통하여 독성을 나타내지 않고 계수가 용이한 최적 농도를 0.25 μ g/plate로 선택하였다.

4-NQO에 대한 TA102 균주의 dose-response는 Fig. 11에 나타내었고, TA102는 1.0 μ g/plate까지 복귀돌연변이 수가 계속 증가하고 있으며, spot test 결과(Fig. 5), 균주에 대한 독성이 없으며 계수가 용이한 0.25 μ g/plate를 최적농도로 선택하였다.



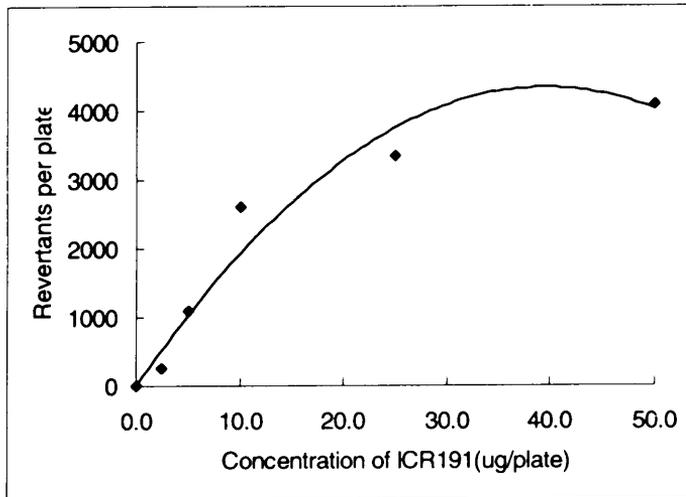


Fig. 3. Dose-response of ICR-191 for *S. typhimurium* TA97 strain (Spontaneous revertants are subtracted).

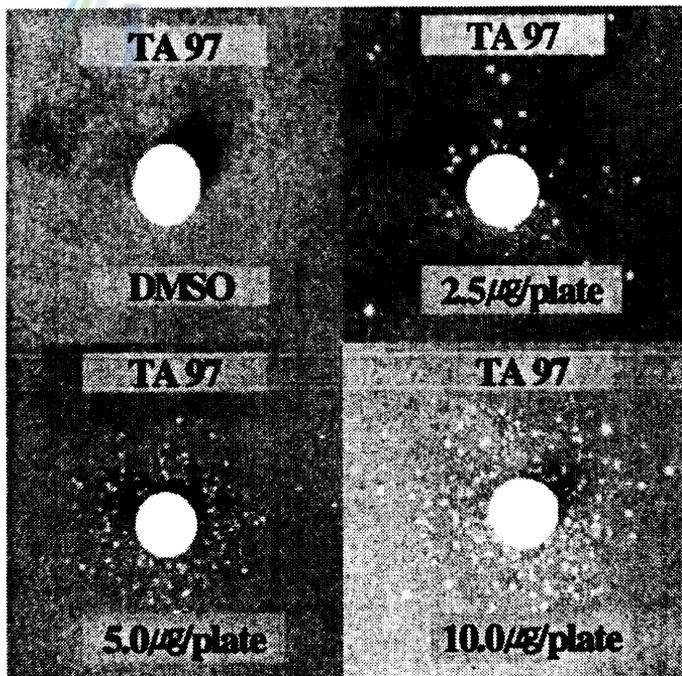


Fig. 4. Spot test of ICR-191 for *S. typhimurium* TA97 strain.

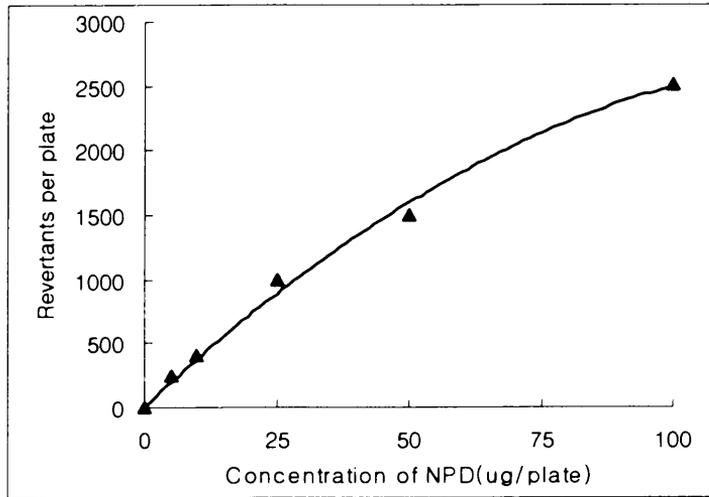


Fig. 5. Dose-response of NPD for *S. typhimurium* TA98 strains (Spontaneous revertants are subtracted).

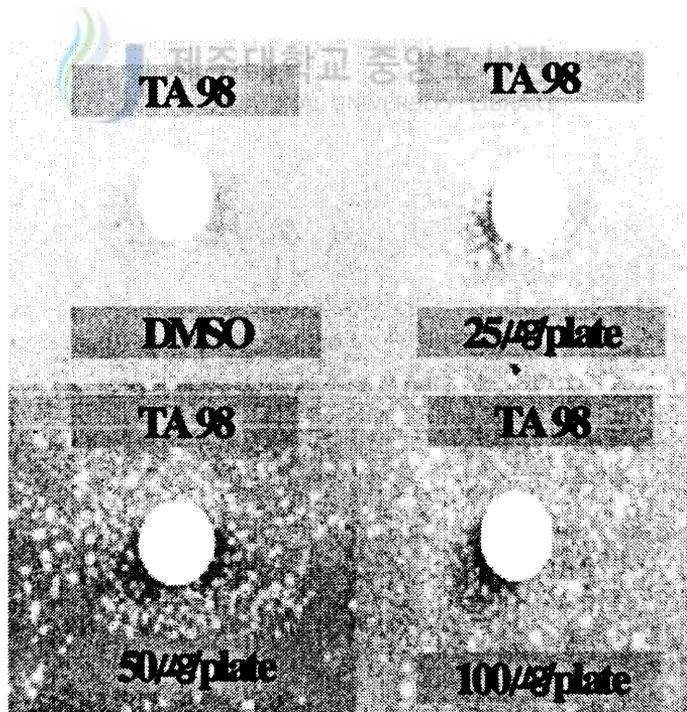


Fig. 6. Spot test of NPD for *S. typhimurium* TA98 strain.

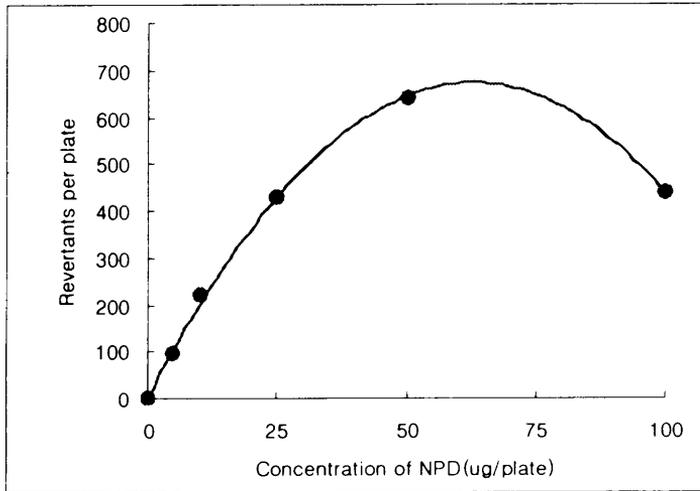


Fig. 7. Dose-response of NPD for *S. typhimurium* TA100 strains (Spontaneous revertants are subtracted).

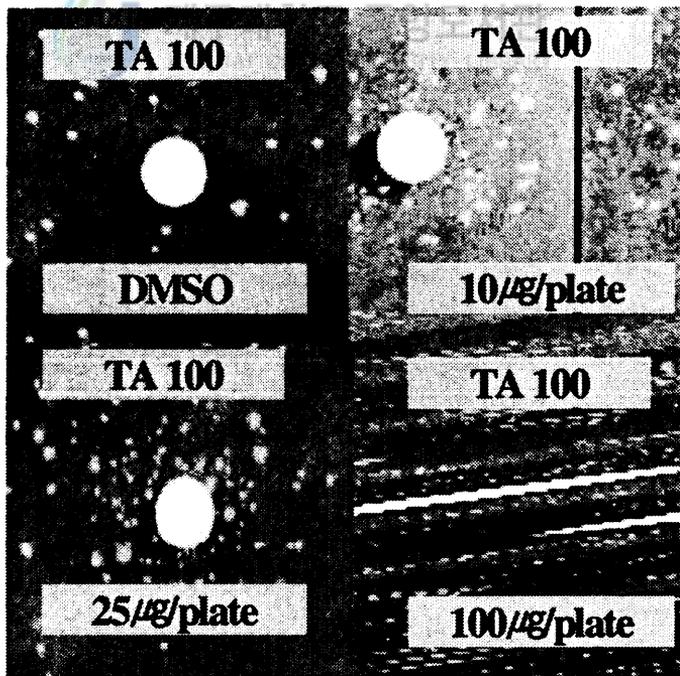


Fig. 8. Spot test of NPD for *S. typhimurium* TA100 strain.

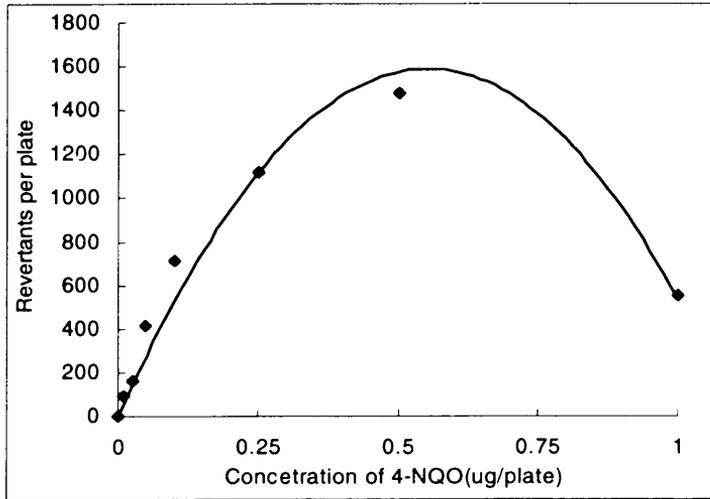


Fig. 9. Dose-response of 4-NQO for *S. typhimurium* TA100 strains (Spontaneous revertants are subtracted).

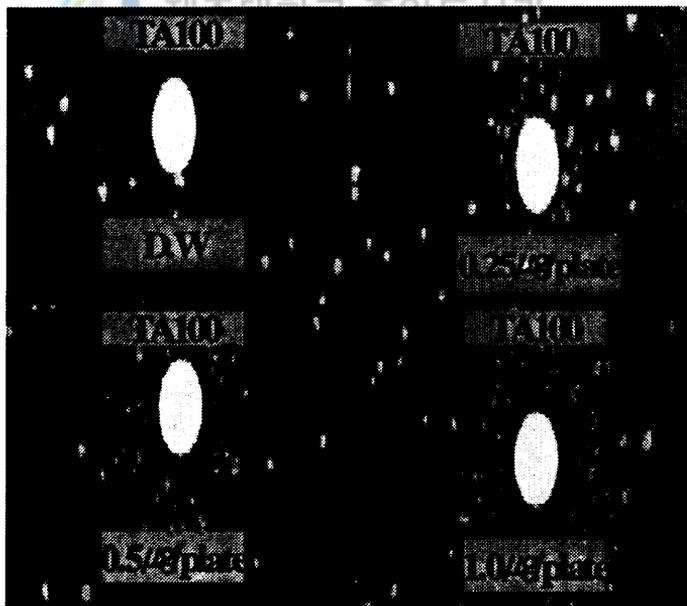


Fig. 10. Spot test of 4-NQO for *S. typhimurium* TA100 strain.

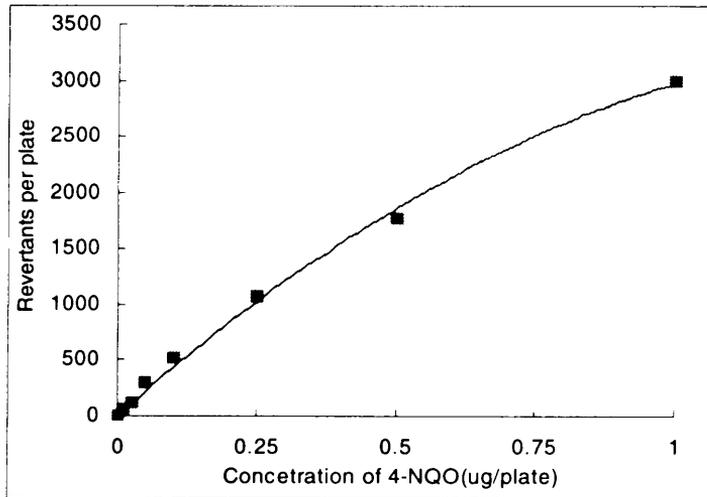


Fig. 11. Dose-response of 4-NQO for *S. typhimurium* TA102 strains (Spontaneous revertants are subtracted).

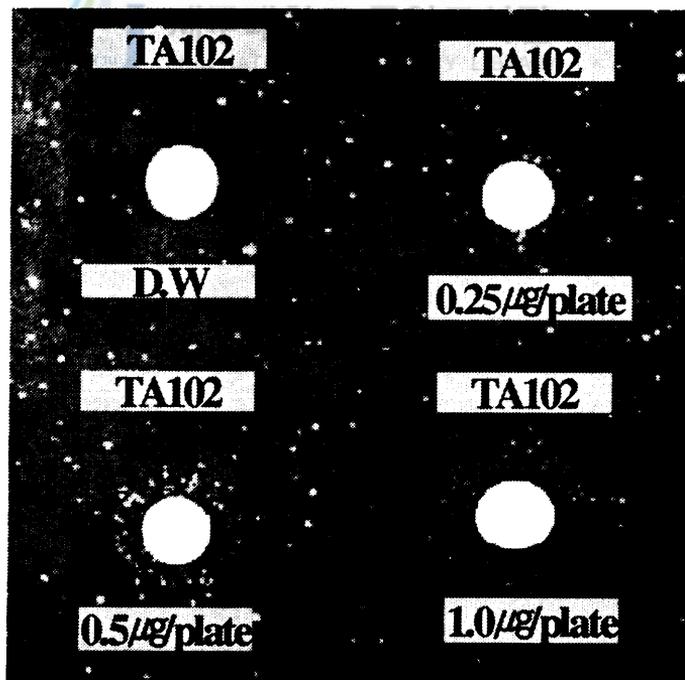


Fig. 12. Spot test of 4-NQO for *S. typhimurium* TA102 strain.

5. 감귤종자 추출물의 (항)돌연변이원성

1) 감귤종자 추출물의 돌연변이원성

감귤종자 메탄올 추출물들에 대한 돌연변이 시험의 목적은 시료 자체의 돌연변이원성 및 추출물의 투여량 증가에 따른 균주에 대한 세포독성효과를 확인하는데 있으며 항돌연변이원성 시험에 적합한 투여량을 결정하기 위한 *S. typhimurium* TA 균주에 대한 돌연변이원성 시험 결과는 Table 7 과 같다.

감귤종자 메탄올 추출물 중 하귤, 이예감, 당유자, 금감자, 삼보감, 편귤 지각 및 금감은 모든 TA 시험균주에 대한 자체 돌연변이원성과 뚜렷한 세포독성을 보이지 않았다.

유자인 경우 *S. typhimurium* TA102에서 plate 당 $100\mu\text{l}$ 투여하였을 때, 복귀돌연변이수가 80 ± 1 로 positive와 negative를 비교한 결과 세포독성이 의심되었지만 독성시험 결과 뚜렷한 세포독성이 나타나지 않았다.

감귤종자 메탄올 추출물 중 산귤은 *S. typhimurium* TA 균주의 돌연변이원에 대한 positive와 용매의 negative를 서로 비교한 결과, *S. typhimurium* TA균주들에 대해 자체 돌연변이원성은 보이지 않았으나, 세포독성 때문에 산귤종자 추출물을 DMSO로 희석하면서 세포독성이 나타내지 않을 때까지 시험하였다. 즉, 산귤종자 메탄올 추출물을 4배 희석하여 항돌연변이원성 시험에 사용하였다.

Table 7. Mutagenic activity of methanol extracts from citrus seeds

	*Dose (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
<i>F. margarita</i>	50	85 \pm 7	22 \pm 7	76 \pm 5		281 \pm 17
	100	56 \pm 4	16 \pm 5	49 \pm 9		154 \pm 15

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)

*Dose : Extract of citrus seeds.

2) 감귤종자 추출물의 항돌연변이원성

(1) ICR-191에 유도된 돌연변이원성의 억제효과

ICR-191에 의해 유도된 *S. typhimurium* TA97에 대한 감귤종자 메탄올 추출물의 항돌연변이원성을 시험한 결과는 Table 8과 Fig. 13과 같다.

감귤종자 메탄올 추출물을 plate당 $50\mu\text{l}$ 투여할 때, 투여량에 대한 첨가농도는 대략적으로 plate당 산귤이 0.38mg, 하귤 1.08mg, 이예감 1.38mg, 유자 2.76mg, 당유자 1.08mg, 금감자 1.92mg, 삼보감 1.62mg, 편귤 2.17mg, 지각 1.74mg, 금귤이 1.10mg이다.

Positive control과 비교한 돌연변이원성 억제활성은 편귤을 제외한 다른 감귤종자 추출물은 50% 이상의 억제활성을 보였으며, 이 중 산귤, 이예감 및 당유자는 90% 이상의 높은 억제 활성을 보였다.

감귤종자 메탄올 추출물을 plate당 $100\mu\text{l}$ 에 대한 투여농도는 대략적으로 산귤이 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, 대부분 80% 이상이 높은 억제효과를 보였으며, 그 중에서도 특히 산귤, 이예감, 유자 및 당유자는 약 95% 이상의 억제효과를 보여 주었다.

ICR-191은 반응기가 DNA의 guanine의 7-N 위치에 결합해서 독성을 나타내는 acridine 유도체로 구조이동성 돌연변이를 유발하지만 염기치환성 돌연변이는 유발하지 않는 양성돌연변이원성 물질이다(Drake, 1973; Levin 등, 1982).

구조이동성 돌연변이 균주인 *S. typhimurium* TA97에서는 산귤, 하귤, 이예감 메탄올 추출물이 강한 항돌연변이원 활성을 나타내었으며, 박(1994)은 미역과 다시마의 에틸에테르와 헥산추출물, 정(1999)은 톳 메탄올 추출물이 ICR-191에 대한 강한 항돌연변이원 활성을 갖는 것으로 보고하였다.

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

	*Dose	Revertants per plate
	(μl /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. natsudaidai</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 or D.W. per plate was added instead from citrus seeds extract.

Spontaneous revertants are subtracted.

*Dose : Extract of citrus seeds.

(), inhibition rate

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

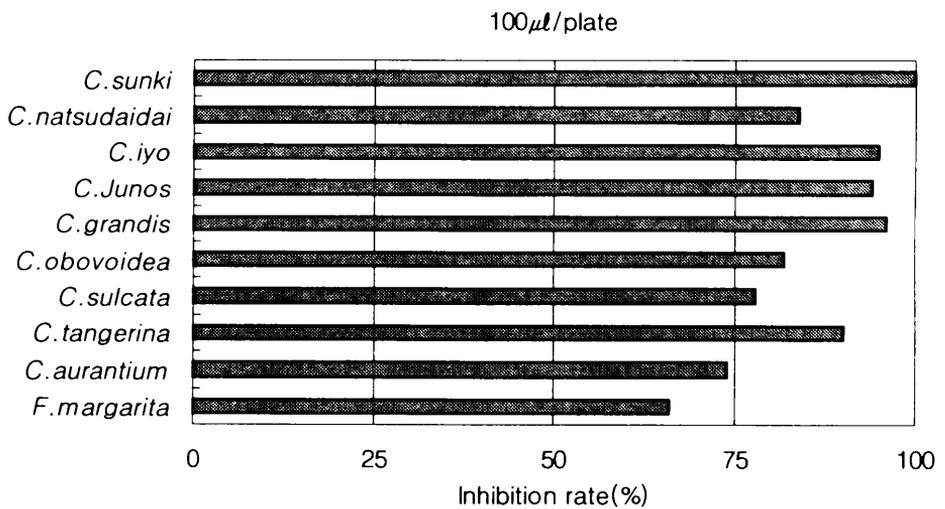
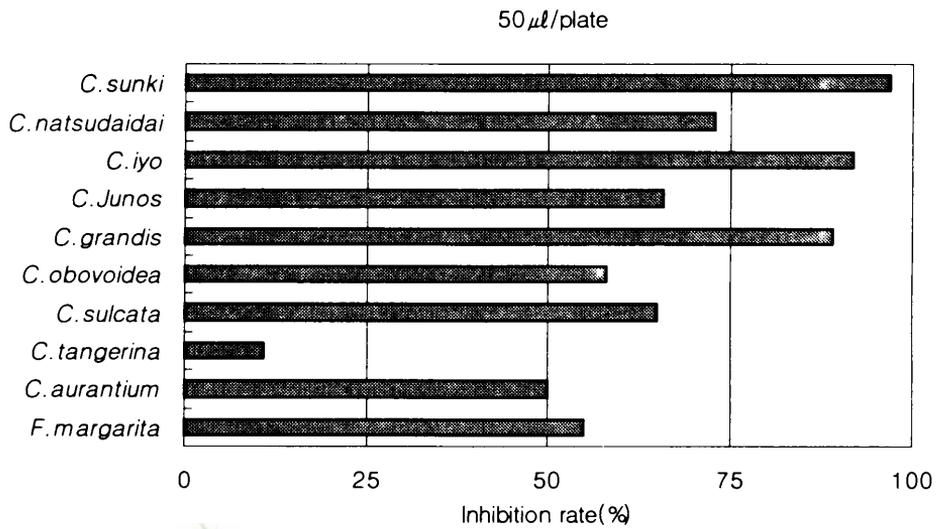


Fig. 13. Inhibition rate against *S. typhimurium* TA97 with ICR-191 of methanol extracts from citrus seeds.

(2) NPD에 유도된 돌연변이원성의 억제효과

S. typhimurium TA98과 TA100 균주를 이용하여 감귤종자 메탄올 추출물이 NPD에 의해 유도되는 돌연변이원성을 억제하는 효과를 검색한 결과는 Table 9와 Fig. 14~15에 나타내었다.

TA98에서 NPD에 의해 유도된 구조이동성 돌연변이원성에 대한 감귤종자 메탄올 추출물의 억제활성은 plate당 $50\mu\text{l}$ 투여하였을 때, 모든 감귤종자에서 약 80% 이상의 억제효과를 나타내었으며, 그 중에서도 특히 산귤, 이예감 및 당유자가 약 95% 이상의 높은 억제효과를 보였다. 감귤종자 메탄올 추출물을 plate 당 $100\mu\text{l}$ 투여하였을 때, 모든 감귤종자에서 약 85% 이상이 높은 억제효과를 보였는데, 특히 산귤, 하귤, 이예감, 유자, 당유자, 편귤 및 지각이 약 95% 이상의 높은 억제효과를 보였으며 이들 메탄올 추출물들은 투여량의 농도가 높을수록 강한 억제효과를 보였다.

구조이동성 돌연변이원에 대한 억제효과가 큰 식품은 인삼 saponin(백 등, 1988), 토란추출물(Okabe 등, 1996), 양상치, 양배추, 배추와 같은 채소류(이 등, 1997) 등이 보고되고 있다.

NPD에 의해 유도된 염기치환성 돌연변이원성에 대한 감귤종자 메탄올 추출물의 억제활성은 TA100 균주에 plate당 $50\mu\text{l}$ 투여하였을 때, 이예감, 당유자, 삼보감과 편귤은 약 50% 이상의 억제효과를 나타내었으며, 그 중에서도 당유자는 88%의 높은 억제효과를 보였다. 감귤종자 메탄올 추출물을 plate당 $100\mu\text{l}$ 투여하였을 때, 모든 감귤류는 약 50% 이상이 억제효과를 보이고 있으며, 그 중에서도 산귤, 이예감 유자, 당유자, 삼보감, 금감, 편귤은 약 70% 이상의 억제효과를 보였다.

이상의 결과로부터 NPD에 유도된 돌연변이에 대한 감귤종자 메탄올 추출물들은 염기치환성 돌연변이 보다 구조이동성 돌연변이에 강한 억제활성을 보이는 것으로 사려된다.

Table 9. Antimutagenic effects against NPD with induce mutations of methanol extracts from citrus seeds

	*Dose	Revertants per plate	
	(μl /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. natsudaidai</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 or D.W. per plate was added instead from citrus seeds extract.

Spontaneous revertants are subtracted.

*Dose : Extract of citrus seeds.

(), inhibition rate

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

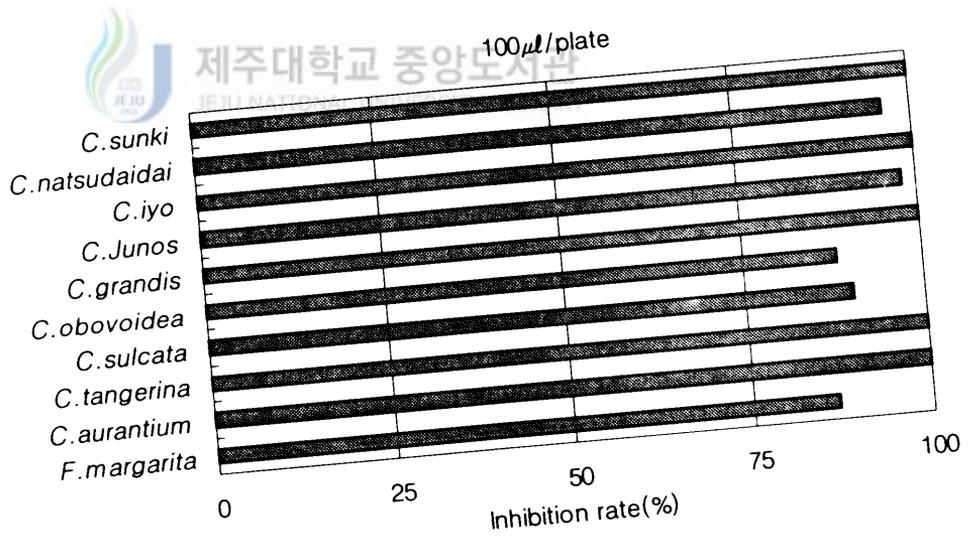
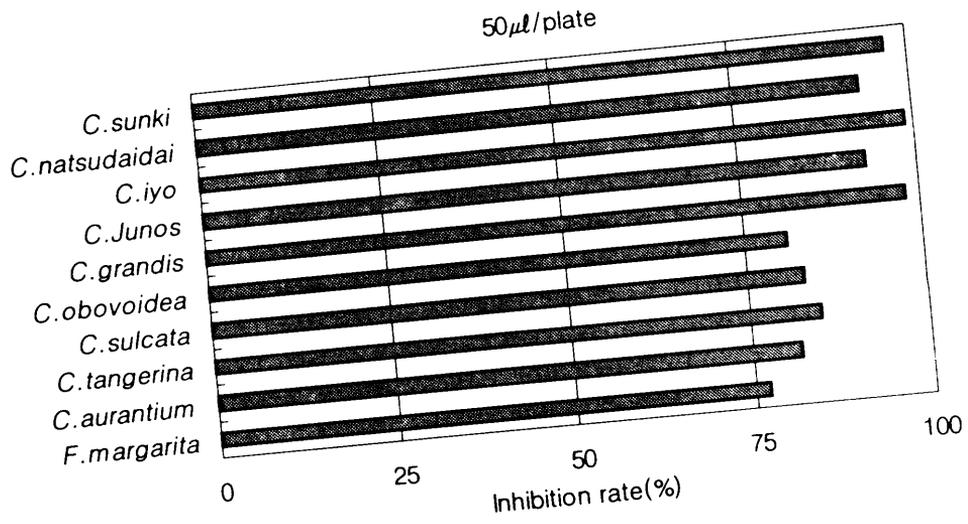


Fig. 14. Inhibition rate against *S. typhimurium* TA98 with NPD of methanol extracts from citrus seeds.

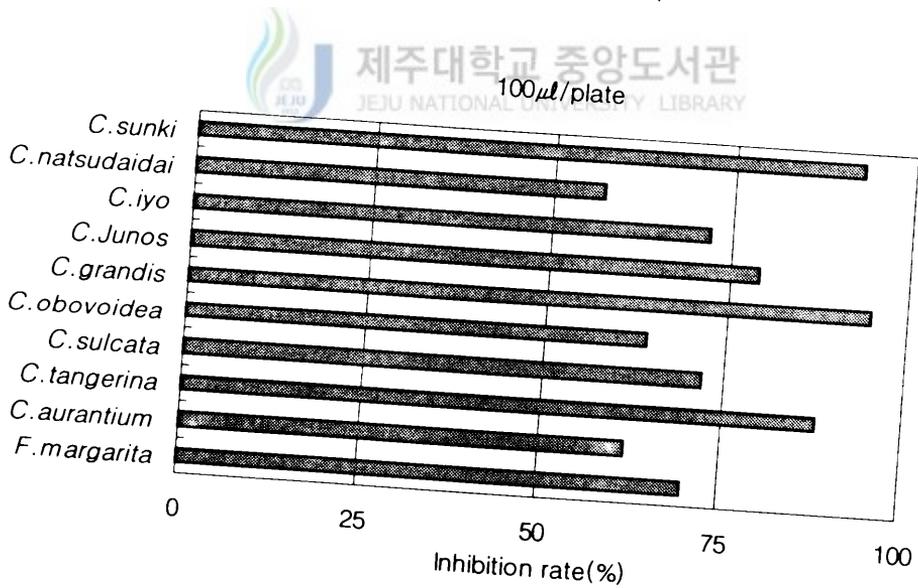
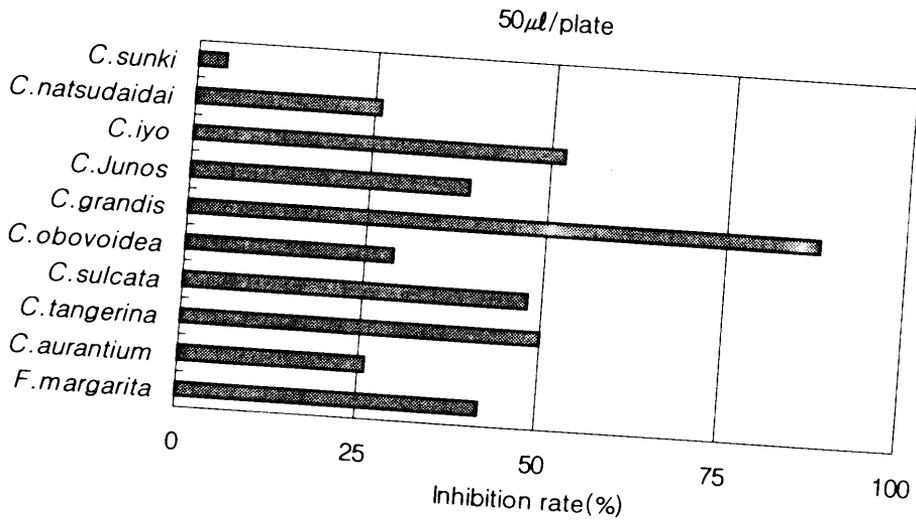


Fig. 15. Inhibition rate against *S. typhimurium* TA100 with NPD of methanol extracts from citrus seeds.

3) 4-NQO에 유도된 돌연변이원성의 억제효과

표준돌연변이원 4-NQO에 의해 유도된 *S. typhimurium* TA100과 TA102 균주를 이용하여 감귤종자 메탄올 추출물들이 4-NQO에 의해 유도된 돌연변이를 억제하는 효과는 Table 10과 Fig. 16~17에 나타내었다.

TA100에서 4-NQO에 의해 유도된 돌연변이원성은 감귤종자 메탄올 추출물을 plate당 50 μ l 투여하였을 때, 산귤, 유자, 당유자, 삼보감, 금감, 편귤, 지각 약 50% 이상의 억제효과를 나타내었으며, 그 중에서도 삼보감, 편귤 및 지각은 약 80% 이상의 높은 억제효과를 나타내었다. 감귤종자 메탄올 추출물을 plate당 100 μ l 투여하였을 때, 모든 감귤류는 약 70%이상이 억제효과를 보였으며, 그 중에서도 하귤, 금감자, 삼보감, 금감, 편귤 및 지각은 약 90% 이상의 높은 억제효과를 보였다.

TA102에서 4-NQO에 의해 유도된 돌연변이원성은 감귤종자 메탄올 추출물을 plate당 50 μ l 투여하였을 때, 삼보감, 편귤 및 지각만이 약 50% 이상의 억제효과를 보여주고 있으며, 그 중에서도 편귤 약 80% 정도의 높은 억제효과를 보였다. 감귤종자 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% 이상 높은 항돌연변이 활성을 보였다.

4-NQO에 의해 유도된 염기치환성 돌연변이에 대한 강한 억제활성을 갖는 것으로 보고된 식품으로는 톳(정, 1999), 목이버섯과 석이버섯(함, 1997), 참취뿌리(황과 함, 1999), 김치와 김치 부재료(오, 1997)등이 있으며, *B. bifidum*(Borob'eva 등, 1995a,b) 및 *Bifidobacterium*(이 등, 1996)과 같은 유산균도 억제활성이 높은 것으로 보고되고 있다.

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

	*Dose (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. natsudaidai</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 or D.W. per plate was added instead from citrus seeds extract.

Spontaneous revertants are subtracted.

*Dose : Extract of citrus seeds.

(%), inhibition rate

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

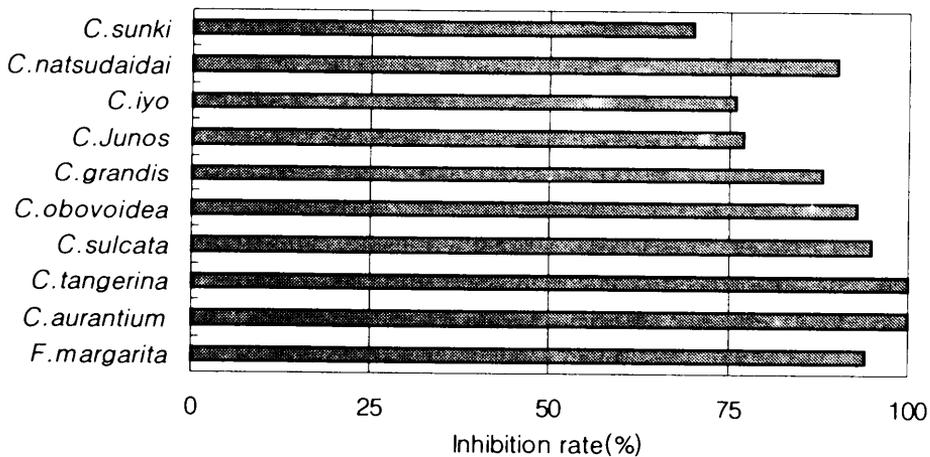
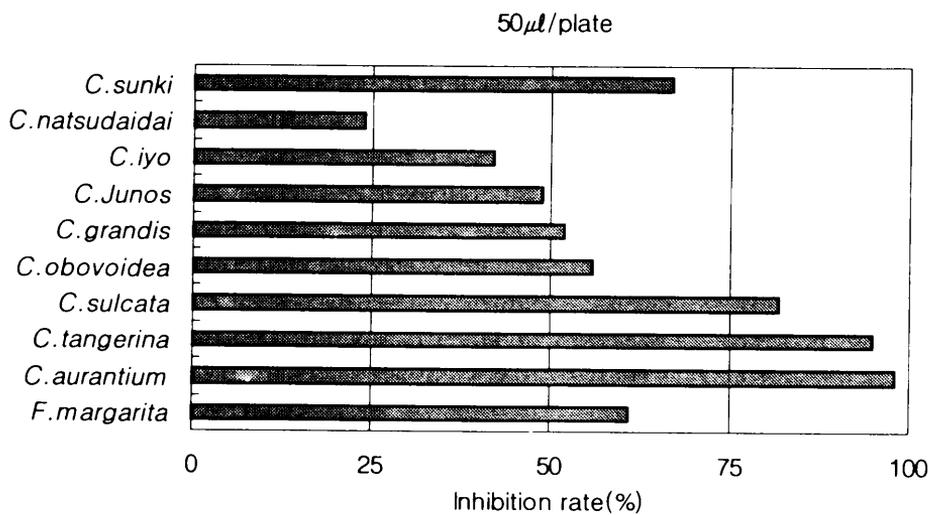


Fig. 16. Inhibition rate against *S. typhimurium* TA100 with 4-NQO of methanol extracts from Citrus seeds.

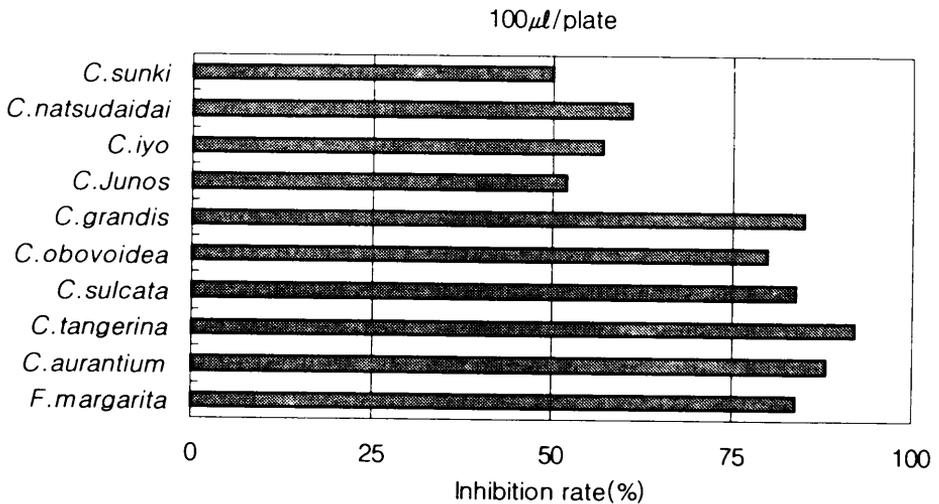
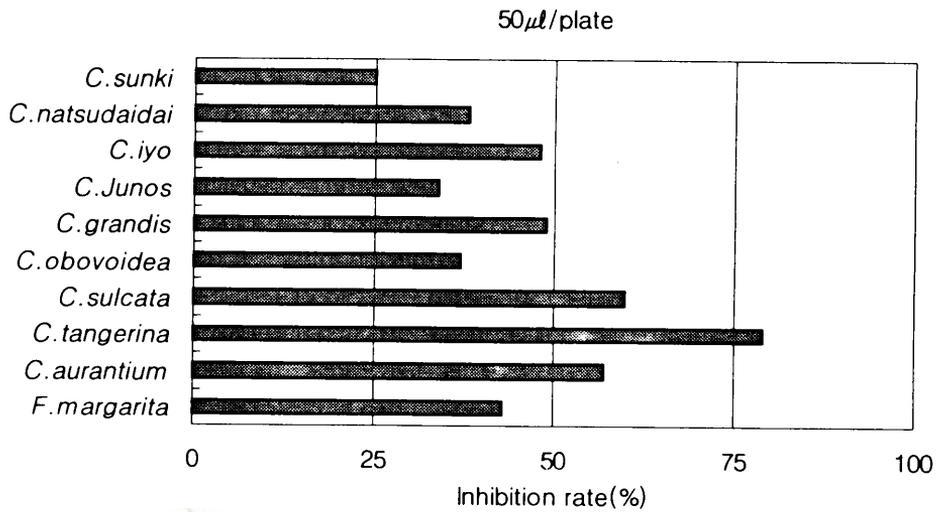


Fig. 17. Inhibition rate against TA102 with 4-NQO of methanol extracts from Citrus seeds.

6. 산귤종자 용매별 추출물의 (항)돌연변이원성

1) 산귤종자 용매별 추출물의 돌연변이원성 효과

시료 첨가량 증가에 따른 균주에 세포독성 및 항돌연변이원성 시험에 적합한지 확인하기 위하여 산귤(*Citrus sunki*)종자 용매별 분획물의 *S. typhimurium* 시험 균주에 대한 돌연변이원성을 시험한 결과는 Table 11과 같다.

산귤종자에 대한 증류수, *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 *n*-butyl alcohol 분획물들의 항돌연변이원성 시험에 적합한 첨가량을 결정하기 위하여 각 용매의 분획물들을 plate당 50 μ l 및 100 μ l로 첨가하여 세포독성 여부를 확인한 결과, 균주에 대한 세포독성이 나타나지 않았으며, negative control의 영역과 거의 비슷한 자연복귀돌연변이를 보여, 용매별 분획물의 항돌연변이원성 시험에 시료의 투여량을 plate당 50 μ l와 100 μ l로 결정하였다.

산귤종자 용매별 분획물의 투여량에 따른 농도는 대략적으로 plate당 50 μ l일 때, 증류수 분획물은 0.4mg/plate, *n*-hexane 분획물이 0.38mg/plate, chloroform 0.4mg/plate, ethyl acetate 0.47mg/plate 및 *n*-butyl alcohol 분획물은 0.35mg/plate이다.

Table 11. Mutagenic activity of extracts from *Citrus sunki* with different solvents

	*Dose (μl /plate)	Revertants per plate				
		TA97	TA98	TA100	TA102	
Positive control		1141 \pm 132	1138 \pm 139	449 \pm 56	642 \pm 90	1081 \pm 152
Negative control	D.W.	62 \pm 16	23 \pm 2	69 \pm 16		192 \pm 25
	DMSO	47 \pm 11	16 \pm 3	54 \pm 19		178 \pm 22
D.W.	100	42 \pm 11	19 \pm 2	53 \pm 7		188 \pm 14
<i>n</i> -Hexane	50	57 \pm 2	18 \pm 5	55 \pm 2		205 \pm 11
	100	51 \pm 4	11 \pm 2	31 \pm 8		171 \pm 15
Chloroform	50	62 \pm 4	14 \pm 3	72 \pm 9		189 \pm 8
	100	44 \pm 3	9 \pm 1	49 \pm 7		151 \pm 11
Ethyl acetate	50	54 \pm 9	14 \pm 1	62 \pm 12		188 \pm 13
	100	39 \pm 7	10 \pm 1	58 \pm 7		172 \pm 16
<i>n</i> -Butyl alcohol	50	52 \pm 12	19 \pm 4	61 \pm 10		216 \pm 12
	100	42 \pm 8	11 \pm 1	45 \pm 3		163 \pm 5

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 fraction *C. sunki* seed extract.

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

*Dose : Solvent fraction of *c. sunki* seed extract.

2) 산균종자 용매별 추출물의 항돌연변이원성

(1) ICR-191에 유도된 돌연변이원성의 억제효과

표준돌연변이원 ICR-191에 의해 유도된 *S. typhimurium* TA97 구조이동성 돌연변이 균주를 이용한 산균종자 용매별 분획물의 억제효과는 Table 12과 Fig. 18에 나타내었다.

산균종실 용매별 분획물들을 $50\mu\text{l}/\text{plate}$ 로 투여하였을 때, ICR-191에 의해 유도된 돌연변이에 대하여 55~69%의 억제효과를 보였다. 투여량을 높여 $100\mu\text{l}/\text{plate}$ 로 투여하였을 때, 돌연변이원성 억제효과는 D.W.가 31% *n*-hexane 79%, chloroform 84%, ethyl acetate 78% 및 *n*-butyl alcohol은 81%의 돌연변이 억제효과를 보여 산균종자 분획물들의 농도가 높을수록 항돌연변이 효과가 큰 것으로 나타났다.

Table 12. Antimutagenic effects against ICR-191 with induced mutation of extracts from *Citrus sunki* with different solvents

	*Dose (μl /plate)	Revertants per plate <i>S. typhimurium</i> TA97
Positive control		1044 \pm 85
D.W.	100	719 \pm 37(31)
Positive control		1237 \pm 179
<i>n</i> -Hexane	50	558 \pm 59(55)
	100	256 \pm 60(79)
Chloroform	50	491 \pm 56(60)
	100	268 \pm 36(78)
Ethyl acetate	50	378 \pm 40(69)
	100	195 \pm 36(84)
<i>n</i> -Butyl alcohol	50	437 \pm 74(63)
	100	223 \pm 59(81)

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

Negative control : 100 μl of DMSO per plate was added instead from fraction *C. sunki* seed extract.

Spontaneous revertants are subtracted.

*Dose : Solvent fraction of *c. sunki* seed extract.

(), inhibition rate

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

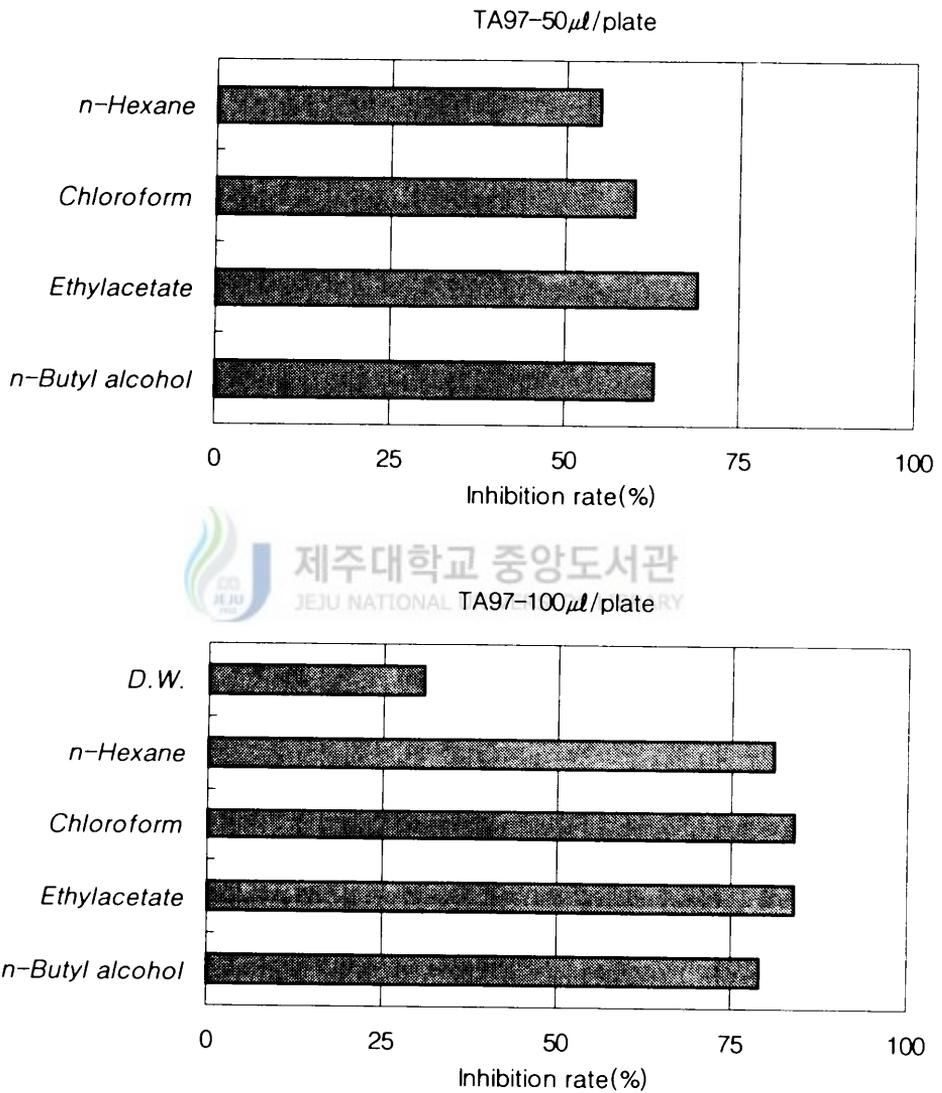


Fig. 18. Inhibition rate against *S. typhimurium* TA97 with ICR-191 of extracts from *Citrus. sunki* seed with different solvents.

(2) NPD에 유도된 돌연변이원성의 억제효과

표준돌연변이원인 NPD에 의해 유도된 *S. typhimurium* TA98과 TA100 균주의 돌연변이원성에 대한 억제효과를 Table 13과 Fig. 19에 나타내었다.

NPD에 의해 유발된 TA98 균주에 대한 구조이동성 돌연변이원성에 대한 산갈종자 용매별 분획물을 50 μ l/plate로 투여하였을 때, *n*-hexane 분획물이 94%, chloroform 96%, ethyl acetate 94% 및 *n*-butyl alcohol은 91%를 나타내었다. 100 μ l/plate로 투여하였을 때, *n*-hexane이 97%, chloroform 98%, ethyl acetate 97% 및 *n*-butyl alcohol 97%의 높은 항돌연변이 활성을 보였으나 증류수 분획물에서는 항돌연변이 활성을 기대할 수 없었다.

산갈종자 용매별 분획물을 plate당 50 μ l 투여하였을 때 모든 용매별 분획물에서 약 90% 이상의 억제효과를 나타내었으며, plate당 100 μ l 투여하였을 때 증류수 분획물을 제외한 나머지 용매별 분획물들은 95% 이상이 높은 억제효과를 보였다.

NPD에 유도된 TA100 균주에 대한 염기치환성 돌연변이원성에 대해 산갈종자 용매별 분획물을 50 μ l/plate로 투여하였을 때, *n*-hexane 99%, chloroform 97%, ethyl acetate 98% 및 *n*-butyl alcohol 100% 억제효과를 보였으며, 100 μ l/plate로 투여하였을 때, 증류수 52% *n*-hexane 100%, chloroform 100%, ethyl acetate 100% 및 *n*-butyl alcohol 100% 억제효과를 나타내었다.

산갈종자 용매별 분획물을 plate당 50 μ l 및 100 μ l 투여하였을 때 증류수 분획물을 제외한 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 *n*-butyl alcohol 분획물 모두 투여량에 관계없이 95% 이상의 높은 억제효과를 나타냈다.

Table 13. Antimutagenic effects against NPD with induced mutation of extracts from *Citrus sunki* with different solvents

	*Dose (μl /plate)	Revertants per plate	
		TA98	TA100
Positive control		1153 \pm 108	451 \pm 63
D.W.	100	946 \pm 76(18)	216 \pm 40(52)
Positive control		1122 \pm 170	446 \pm 48
<i>n</i> -Hexane	50	69 \pm 58(94)	4 \pm 14(99)
	100	36 \pm 6(97)	0 \pm 3(100)
Chloroform	50	47 \pm 19(96)	12 \pm 19(97)
	100	20 \pm 16(98)	0 \pm 7(100)
Ethyl acetate	50	65 \pm 9(94)	8 \pm 10(98)
	100	31 \pm 10(97)	0 \pm 9(100)
<i>n</i> -Butyl alcohol	50	96 \pm 33(91)	0 \pm 11(100)
	100	39 \pm 12(97)	0 \pm 5(100)

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

Negative control : 100 μl of DMSO per plate was added instead from fraction *C. sunki* seed extract.

Spontaneous revertants are subtracted.

*Dose : Solvent fraction of *c. sunki* seed extract.

(), inhibition rate

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

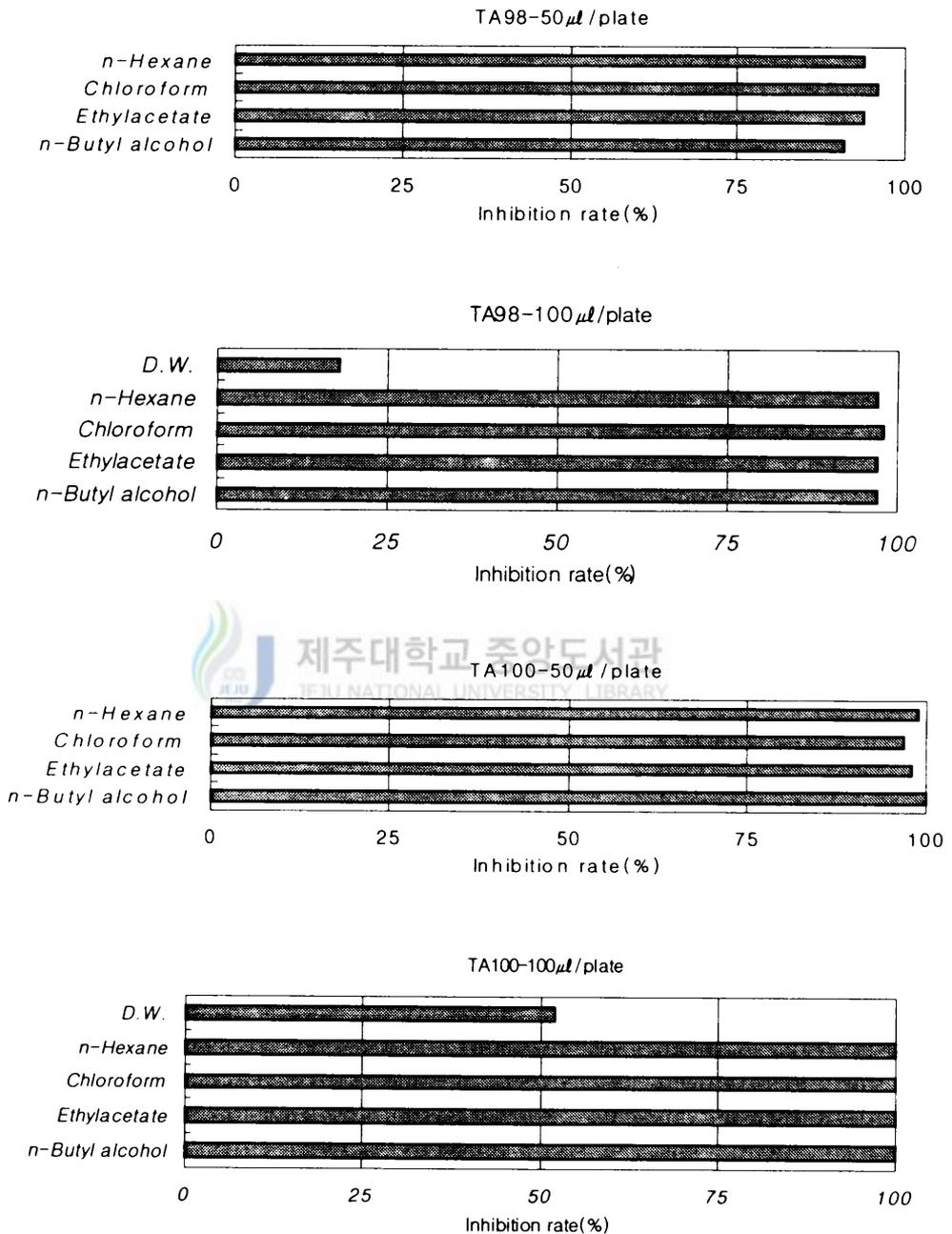


Fig. 19. Inhibition rate against TA98 and TA100 with NPD of extracts from *Citrus. sunki* seed with different solvents.

(3) 4-NQO에 유도된 돌연변이원성의 억제효과

표준돌연변이원 4-NQO에 의해 유도된 *S. typhimurium* TA100과 TA102 균주의 염기치환성 돌연변이에 대한 산갈종자 용매별 분획물의 억제효과는 Table 14와 Fig. 20에 나타내었다.

4-NQO에 의해 유발된 TA100 균주의 돌연변이원성에 대한 산갈종자 용매별 분획물의 억제효과는 50 μ l/plate로 투여하였을 때, *n*-hexane 분획물이 94%, chloroform 98%, ethyl acetate 97% 및 *n*-butyl alcohol 91%의 억제효과를 보였으며, 100 μ l/plate로 투여하였을 때, 증류수 37%, *n*-hexane 100%, chloroform 100%, ethyl acetate 100% 및 *n*-butyl alcohol 100%의 억제효과를 나타내었다.

산갈종자 용매별 분획물을 plate당 50 μ l, 100 μ l 투여하였을 때 증류수 분획물을 제외한 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 *n*-butyl alcohol 투여량에 상관없이 90% 이상의 높은 억제효과를 보였다.

4-NQO에 의해 염기치환성 돌연변이가 유발되는 TA102 균주에 대한 산갈종자 용매별 분획물의 억제효과를 Table 13과 Fig. 20에 나타내었으며, 산갈종자 용매별 분획물을 50 μ l/plate로 투여하였을 때, *n*-hexane 86%, chloroform 85%, ethyl acetate 91% 및 *n*-butyl alcohol 91% 억제효과를 나타내었다. 100 μ l/plate로 투여하였을 때, 증류수 52%, *n*-hexane 100%, chloroform 95%, ethyl acetate 100% 및 *n*-butyl alcohol 100% 억제효과를 보이고 있다.

산갈종자 용매별 분획물을 plate당 50 μ l 투여하였을 때, 85% 이상의 억제효과를 보이며, plate당 100 μ l 투여하였을 때, 증류수 추출물을 제외한 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 *n*-butyl alcohol 추출물은 95% 이상이 높은 항돌연변이 활성을 보였다.

Table 14. Antimutagenic effects against 4-NQO with induced mutation of extracts from *Citrus sunki* with different solvents

	*Dose ($\mu\text{l}/\text{plate}$)	Revertants per plate	
		TA100	TA102
Positive control		621 \pm 24	952 \pm 276
D.W.	100	390 \pm 24(37)	357 \pm 129(52)
Positive control		663 \pm 156	1210 \pm 27
<i>n</i> -Hexane	50	42 \pm 54(94)	39 \pm 25(86)
	100	0 \pm 45(100)	0 \pm 8(100)
Chloroform	50	11 \pm 18(98)	41 \pm 36(85)
	100	0 \pm 8(100)	15 \pm 21(95)
Ethyl acetate	50	22 \pm 14(97)	26 \pm 19(91)
	100	0 \pm 9(100)	0 \pm 22(100)
<i>n</i> -Butyl alcohol	50	58 \pm 21(91)	24 \pm 10(91)
	100	0 \pm 12(100)	0 \pm 25(100)

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

Negative control : 100 μl of DMSO per plate was added instead from fraction *C. sunki* seed extract.

Spontaneous revertants are subtracted.

*Dose : Solvent fraction of *c. sunki* seed extract.

(), inhibition rate

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

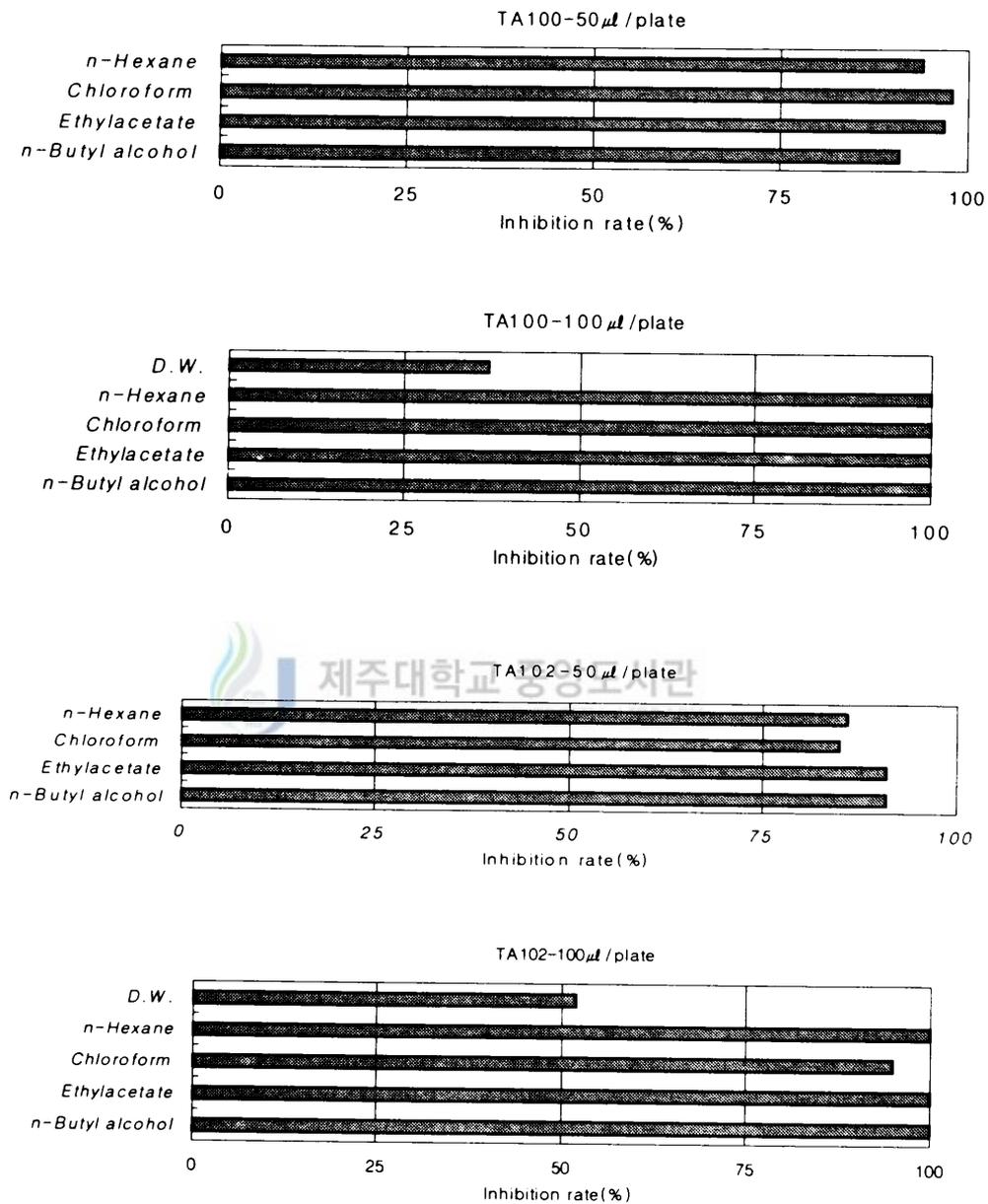


Fig. 20. Inhibition rate against *S. typhimurium* TA100 and TA102 with 4-NQO of extracts from *Citrus sunki* seed with different solvents.

이상의 감귤종자 메탄올 추출물과 산귤종자 용매별 분획물에 대한 항돌연변이 검색결과, 감귤종자 메탄올 추출물들은 구조이동성 돌연변이 균주에 대하여 강한 항돌연변이 활성을 보였으며, 산귤종자 용매별 분획물들은 특히 NPD 및 4-NQO에 대하여 강한 돌연변이 억제효과를 나타냈다.

최근 식품을 비롯한 각종 천연물을 대상으로 하여 돌연변이원을 억제시키는 생리활성 물질들의 검색이 활발히 이루어지고 있으며, 항돌연변이원성 및 항암효과 인자를 보면 녹황색 채소의 β -carotene과 비타민 A, E, C 등의 비탄닌류(Shinohara 등, 1988), 녹차의 catechin(Steele 등, 1985), 식이섬유류(Lai 등, 1980), chlorophyll 및 chlorophyllin 등의 색소류(Ong 등, 1986), 약용식물의 tannins과 flavonoid(Hayatsu 등, 1988) 등이 보고되고 있다.



감귤에는 hesperidin, rutin, narirutin, naringin, neohesperidin, nobiletin, poncirin, nomilinic acid, deacetylnoilinic acid, isolimonic acid, limonin, nomilin, obacunone, deacetylnomilin 등과 같은 flavonoid와 limonoid 물질들이 함유되어 있다(배, 1997, Manthey와 Grohmann, 1996; Johnson 등, 1995; Vincent 등, 1980).

감귤에 함유되어 있는 flavonoid 성분들은 혈압강하(Matsubara 등, 1985), 항산화(Tanizawa 등, 1992), 항균성(안 등, 1988)과 여러 가지 생리 및 약리작용(김과 정, 1990)을 가지고 있으며, 특히 sinensetin, nobiletin은 항혈액응고작용, 항바이러스작용(Veckenstedt와 Hron, 1976), quercetin과 tageretin은 암의 침투와 전이를 막아주며(Marc와 Eric, 1994; Jie 등, 1997), nobiletin과 tangeritin은 강한 항돌연변이원성 활성(Calomme 등, 1996)을

그리고 limonin이 구강암에 대한 억제효과(Miller 등, 1994; Lam 등 1994) 등이 보고되고 있다. 또한 감귤 종자에는 limonoid, α -tocopherol이 함유되어 있어(조, 1995), 항산화 효과가 기대되며, 조 등(1990)과 최 등(1990)은 자몽 종자 추출물들이 항균, 항진균, 항곰팡이 효과를 보고한 바 있다.

이상의 결과로 부터 제주도 재래 감귤인 만감류에는 1~20%의 종실을 함유하고 있고(김, 1994), 감귤 종자 추출물들이 항돌연변이 활성이 큰 것으로 밝혀져, 감귤 종자에는 항돌연변이 활성이 큰 물질들이 존재하는 것으로 기대되며, 이들 물질 규명 및 생리활성 작용에 대한 체계적인 연구가 필요하다고 사려된다.



V. 요약

감귤류 종자를 메탄올 추출물과 유기용매 분획물들을 대상으로 Ames시험 방법으로 ICR-191, NPD 및 4-NQO에 의해 유도된 돌연변이원성에 대한 항돌연변이 활성을 검색하였다.

ICR-191에 의해 유도된 TA97에 대한 돌연변이원성 억제효과는 모든 감귤종자의 메탄올 추출물에서 80% 이상의 높은 활성을 나타내었으며, 특히 산귤, 이예감, 유자 및 당유자가 90% 이상의 강한 억제 활성을 보였다. 산귤의 용매별 분획물 중 증류수 분획물은 37%로 돌연변이원성 억제활성이 낮았지만, *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 *n*-butyl alcohol 분획물들은 70% 이상의 억제효과를 나타내었다.

NPD에 의하여 유도된 TA98과 TA100에 돌연변이원성에 대해서는 모든 감귤종자 추출물들이 TA100에 약 60%의 활성을 나타내었으며, 특히 TA98에서는 90% 이상이 높은 억제활성을 보였다. 산귤종자 분획물 중 증류수 분획물은 약 50%의 낮은 억제활성을 보인 반면, *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 *n*-butyl alcohol 분획물은 TA98과 TA100에 대하여 90% 이상의 높은 억제활성 나타내었다.

4-NQO에 의해 유도된 TA100과 TA102에 대한 항돌연변이 효과는 모든 감귤종자의 메탄올 추출물과 산귤종자의 용매별 분획물에서 나타내었으며, 감귤종자의 메탄올 추출물 중 특히 당유자, 삼보감, 금감자, 편귤, 지각 및 금감은 80% 이상의 높은 활성을 나타내었다. 산귤종자의 용매별 분획물 중 증류수 분획물은 약 60%의 억제효과를 보였으며, 특히 *n*-hexane,

chloroform, ethyl acetate 및 *n*-butyl alcohol 분획물은 100%에 가까운 강한 향돌연변이 활성을 나타내었다.

감귤종자의 메탄올 추출물과 산귤종자의 용매별 분획물은 자체 돌연변이 원성과 독성을 나타내지 않았으며, 특히 감귤종자 메탄올 추출물들은 향돌연변이 효과는 염기치환성 돌연변이보다 구조이동성 돌연변이에 더 높은 향돌연변이 활성을 보였고, 산귤종자의 용매별 분획물은 NPD와 4-NQO에 대한 강한 향돌연변이 활성을 나타내었다.



VI. 참고문헌

- Aidoo, A., L.E. Lyncook, S. Lensing, M.E. Bishop and W. Wamer, 1995. *In vivo* antimutagenic activity of beta-carotene in rat spleen lymphocytes. *Carcinogenesis*, 16(9), 2237-2241.
- 안성순, 유일준, 1988. 한국산 천연 naringin의 항균작용 및 안정성에 관한 연구. *한국균학회지*, 16, 1~7.
- Ames, B.N., 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, 204, 587~595.
- Ames, B.N., F.D. Lee and W.E. Durston, 1973. An improve bacterial test system for the decetion and classification of mutagens and carcinogens. *Mutat. Rse.*, 70(3), 782~786.
- Ames, B.N. and J. McCann, 1982. Validation of the *Salmonella* test, *Cancer Res.* 41, 4192~4193.
- Ames B.N., J. McCann and E. Yamasaki, 1975. Methods for detection carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31, 347-364.
- Ames, B.N., W.E. Duston, and F.D. Lee, 1973. An improve bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70(3), 782~786.
- Barnes, W., E. Tuleyand and E. Eisenstadt, 1982. Base-sequence analysis of hist revertants of the his G 46 missense mutation for *Salmonella typhimurium* Environ. *Mutagen.* 4, 297-298.
- 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*. *Microbiologia*(Russian), 64, 228~230.
- Calomme, M., L. Pieters, Vlietinck and D.V. Berghe, 1996. Inhibition of bacterial mutagenesis by *Citrus* flavonoids, *Planta Med.*, 62, 222-226.
- 장호남, 남경은, 허종화, 1977. 한국산 감귤과피의 효율적 이용에 관한 연구 (2). *한국식품과학회지*, 9(4), 251-254.
- 정창화, 1999. 톨 메탄올 추출물의 항돌연변이 활성. 제주대학교 대학원 석사학위논문, 29~39
- 제주감귤농업협동조합, 2000. 제주 감귤과 주요 품종. 3~14.
- 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생, 1990. 수산물에 대한 Grapefruit 종자추출물의 항균 및 항산화 효과. *한국수산학회지*, 23(4), 289~296.
- 조용계, 1995. 운향과 식물 종자의 항산화성 물질에 관한 연구. *한국음식문화연구원논총*, 517~530.
- 최종덕, 서일원, 조성원, 1990. Grapefruit 종자추출물의 항균 및 항산화효과. *한국수산학회지*, 23(4), 297~302.
- Chu, F. S., 1991. Mycotoxins; food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutat. Res.*, 259, 291~294.
- Doll, R and R. Peto, 1981. The causes of cancer, qualitative estimates of avoidable risk 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, 138-139.
- Eun, J.B., Y.M. Jung and G.J. Woo, 1996. Identification and determination of dietary fibers and flavonoids and peel of Korean Tangerine(*Citrus aurantium* var.). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28(2), 371-377.
- Green, M.H.L. and W.J. Muriel, 1976. Mutagen testing using Trp^r

- reversion in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, 38, 3~32.
- 黒田行昭, 1993. 食品中の抗変異原物質. *食品工業*, 30(1), 16~27.
- 함승시, 한홍식, 최근표, 오덕환, 1997. 각종 변이원들에 의해 유도된 돌연변이원성에 대한 수리취 추출물의 억제작용. *한국식품영양과학회지*, 26(3), 528-533.
- 함승시, 김득하, 이득식, 1997. 목이 및 석이 메틸 알콜 추출물의 항돌연변이원성. *한국식품과학회지*, 29(6), 1281~1287.
- 한국약학대학협의회, 약전분과회 편저, 1997. 대학약전 제6개정, 1,2부, 문성사, p. 975.
- Hayatsu, H., S. Arimoto and T. Negishi, 1988. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 202, 429~446.
- Hosono, A., E. Omote, Y. Izawa, F. Tokita and T. Kada, 1986. Isolation of spontaneous induced-streptomycin dependent mutants of *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains and desmutagenicity tests in vitro of cultured milk. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 19, 161~163.
- Hosono, A., R. Wardojo and H. Otani, 1990. Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1639~1643.
- 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.
- 황혜정, 윤광로, 1995. 한국산 감귤의 Carotenoid계 색소. *한국식품과학회지*, 27(6), 950~957.
- 황보현주, 함승시, 1999. 참취뿌리 에탄올 추출물의 항돌연변이성 및 암세포 성장억제효과. 31(4), 1065~1070.
- 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.
- Isono, K. and J. Yourno, 1974. Chemical carcinogens as frameshift, *Salmonella* DNA sequence sensitivity to mutagenesis by polycyclic carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 1612-1624.
- 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 peel extract in orange juice. *Food Australia*, 47, 426~432.
- 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.* 150, 127-132.
- Kada, T., K. Tutikawa and Y. Sadaie, 1972. In vitro and mediated rec-assay procedures for screening chemical mutagens and phloxime, a mutagenic red dye detected. *Mutat. Res.*, 16, 165~174.
- Kada, T., M. Kato, K. Aikawa and S. Kiriya, 1984. Adsorption of pyrolysate mutagens by vegetable fibres. *Mutat. Res.* 141. 149-152.
- Kata T., T. Inoue and M. Namiki, 1982. Environmental desmutagens 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.
- 김창종, 정진모, 1990. Flavonoids의 약리작용(I). 약학회지, 34, 348~364.
- 김현정, 이인선, 이갑량, 1999. 싸리버섯 추출물의 항돌연변이성 및 암세포 성장 억제 효과. 한국식품영양과학회지, 28(6), 1321-1325.
- 김미경, 양윤정, 1997. 감귤과피로부터 분리한 식이섬유의 포도당, 담즙산, 카드폼 투과억제에 관한 *In vitro* 연구. 한국영양학회지, 30(2), 210-219.

- 김병주, 1994. 1994. 제주산 감귤류의 가공적성에 관한 연구. 제주대학교 석사학위논문, pp. 21~23.
- Kim, S.H., J.O. Kim, S.H. Lee, K.Y. Park, H.J. Park and H.Y. Chung, 1991. Antimutagenic compounds identified from the chloroform fraction of garlic(*Alliumsativum*). *Korean Soc. Food Nutr.*, 20(3), 253~259.
- 고정삼, 김성학, 1995. 제주산 감귤류의 성분과 그 특성. *한국농화학회지*, 38(6), 541~545.
- 고경혁, 이근희, 조성환, 1995. Grapefruit 종자추출물의 안전성 검사. *한국영양식량학회지*, 24(5), 690-694.
- Lai, C.H., M.N. Butler and T.S. Matney, 1980. Antimutagenic activities of common vegetable and their chlorophyll content. *Mutat. Res.*, 77, 245~246.
- Lam, L.K.T., J. Zhang and S. Hasegawa, 1994. Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis. *Food Technol.*, 48, 104.
- 이경임, 박건영, 이숙희, 1992. 아플라톡신 B₁과 4-NQO에 대한 녹황색 채소류의 항돌연변이효과. *한국영양식량학회지*, 21(2), 143~148.
- 이태호, 정숙정, 이상열, 김재원, 조성환, 1995. Grapefruit 종자추출물이 *Enterobacter pyrinus*의 생리기능에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, 27(6), 985-990.
- 이세경, 지근억, 1996. Bifidobacterial에 의한 항돌연변이 효과. *한국식품과학회지*, 28(4), 796~799.
- 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.
- 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.
- 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.
- Maron, D.M., and B.N. Ames, 1983. Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 175~215.
- Matsubara, Y., H. Kumamota, 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.
- 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.
- 오창경, 1997. 김치의 (항)돌연변이원성과 유산균에 의한 아질산염 소거. 제주대학교 대학원 박사학위 논문, pp. 84~96.
- 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.
- Ong, T.M., W.Z. Whong, J. Stewart and H.E. Brockman, 1986.

- Chlorophyllin; a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture. *Mutat. Res.*, 173, 111~113.
- 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 Kyo*, 29, pp. 1-8.
- 배기환, 1997. 감귤 가공산업 육성을 위한 심포지움 : 귤피의 성분과 약효. 제주감귤연구소, pp. 61~77.
- 박재석, 1994. 톳, 미역, 다시마 추출물의 항돌연변이 및 항균효과. 제주대학교 대학원 석사학위 논문, pp. 23~24.
- 백형석, 구재관, 전흥기, 1988. *Aspergillus parasiticus*의 aflatoxin 생성과 돌연변이 유발능에 미치는 인삼 saponin의 영향. *PNUJ. of Mol. Biol.*, 4, 51~55.
- Pariza, M.W., 1982. Mutagens 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.
- 박우포, 조성환, 이동선, 1998. Grapefruit seed extract와 ascorbic acid의 혼합처리가 콩나물 변패 미생물과 저장 품질에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*, 27(6), 1086-1093.
- Pearson, A.M. and T.R. Dutson, 1990. Toxic compounds produced during cooking and meat processing, In *Meat and Health, Advances in Meat Research*, Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York. 6, 121-148.
- Rechieigl, J.M., 1995, Toxic Chemical Constituents, *In Handbook of naturally occurring food toxicants*. CRC Press, Inc., Washington, DC

3-161.

- Shinohara, K., S. Kuroki, M. Miwa, Z.L. Kong and H. Hosoda, 1988. Antimutagenicity of dialyzates of vegetables and fruits. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1369~1370.
- 손홍수, 김현숙, 권태봉, 주진순, 1992. 감귤류의 bioflavonoids분리, 정제 및 혈압강하효과, *한국영양식량학회지*, 21, 136.
- 송현순, 이현걸, 강명희, 1999. *Salmonella typhimurium* strain TA98, TA100에서 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물들의 돌연변이 억제효과. *한국식품영양과학회지*, 28(3), 599~606.
- Steele, C.M., M. Lilies and C. Ioannides, 1985. Inhibition of the mutagenicity of aromatic amines by the plant flavonoid (+)-catechin. *Cancer Res.*, 45, 3573~3577.
- Sugimura, T., S. Sato and K. Wakabayashi. 1988. Mutagens/carcinogens in pyrolysates of amino acids and proteins and in cooked foods: heterocyclic aromatic amines. IN: Y-T. Woo, D.Y. Lai, J. C. Arcos, and M. F. Argus(eds.), *Chemical Induction of Cancer, Structural Bases and Biological Mechanisms, San Diego: Academic Press*, 3C, 681~710.
- 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.
- Turesky, R.J., S.C. Rossi, D.H. Welti, J.O. Lay, and F.F. Kadlubar, 1992. Characterization of DNA adducts formed in vitro by reaction of *N*-hydroxy-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline and *N*-hydroxy-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline at the C-8 and N² atoms of guanine. *Chem Res. Toxicol.*, 5, 479.
- 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.

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.



감사의 글

학문의 길로 인도하여 항상 미흡한 저를 세심한 배려와 격려로 지도해 주신 金洙賢 指導教授님께 깊은 感謝를 드립니다.

바쁘신 가운데도 좋은 논문이 되도록 상세하게 검토하여 아낌없는 고견을 주시고 세심하게 다듬어 주신 河璉桓 教授님, 任尙彬 教授님, 그리고 애정어린 관심으로 용기를 주신 宋大鎭 教授님, 학위과정 중 많은 학문적 조언과 관심을 아끼지 않으신 金在河 教授님, 姜永周 教授님, 高榮煥 教授님께 깊은 感謝를 드립니다.

본 研究를 시작하면서 항상 가까이에서 物心兩面으로 도움을 주시고 마지막까지 교정에 힘써주신 산업정보대학 오창경 교수님과 오명철 교수님께 진심으로 感謝를 드립니다. 그리고 평소에 옆에서 용기를 주신 한라대학 오혁수 교수님과 오영주 교수님, 나임순 선생님, 고정립 선생님, 정완석 박사님, 좌미경 선생님, 김성미 선생님께 감사드립니다. 그리고 食品工學科 대학원의 모든 선생님들께 감사드립니다. 실험실에서 도움을 준 식품화학 실험실 후배님들께도 감사드립니다.

오늘이 오기까지 어려운 여건 속에서도 뒷바라지 해 주신 할머니, 아버지, 어머니, 작은아버지, 작은어머니, 누님, 동생들과 친구들에게 깊은 감사를 드리며, 이 작은 결실을 드립니다.