

감귤류 종자 추출물의 N-nitrosodimethylamine 생성억제에 관한 연구

오혁수* · 안용석 · 나임순 · 오명철** · 오창경** · 김수현†
안산공과대학 호텔조리과*, 제주산업정보대학 관광호텔조리과**, 제주대학교 식품공학과

Inhibition of N-nitrosodimethylamine Formation of Extracts from Citrus Seeds

Hyuk-Su Oh*, Young-Suk An, Im-soon Na, Myung-Cheol Oh**, Chang-Kyung Oh**, Soo-Hyun Kim†
Dept. of Food Science and Engineering, Cheju National University
Dept. of Hotel Culinary Arts, Ansan College of Technology*
Dept. of Tourism Hotel Culinary Arts, Jeju College of Technology**

Abstract

The effect of inhibition on N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation by methanol extracts from 6 kinds of citrus seed (*Citrus sunki*, *Citrus natsudaidai*, *Citrus sulcata*, *Citrus tangerina*, *Citrus grandis* and *Citrus obovoidea*) were investigated. The contents of moisture, crude protein, crude fat, carbohydrate, ash, flavonoid and total phenol in citrus seeds were 4~6, 11~15, 32~46, 22~45, 2~4%, 12~24mg% and 53~133mg%, respectively. The solid contents and yield of citrus seed extracts were 0.8~1.0 and 0.7~1.1%, respectively. 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. 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 5ml, respectively. Therefore, the inhibition effect of NDMA formation by the citrus seed was strengthened as the concentration of extract increased.

Key words: Nitrite, Nitrite-scavenging, N-nitrosodimethylamine, NDMA inhibition, Citrus seed

1. 서 론

현대 문명사회의 발달과 함께 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 있고¹⁾ 또한 그의 전구물질들은 우리들이 생명을 유지하기 위하여 섭취하고 있는 어류나 과채류 식품에 광범위하게 분포되어 있다는 점이다²⁻³⁾. 이러한 N-nitrosamine은 아민류(제1급, 제2급, 제3급 아민

및 제4급 암모늄화합물)와 아질산염의 상호반응에 의하여 생성되는 것으로 밝혀지고 있다⁴⁻⁵⁾.

아질산염은 여러 국가에서 수산물이나 식육제품 등에 사용되고 있는 보존료로서 특징적인 색, 향, 조직감을 부여해주며, 식품유래의 병원균에 대한 미생물학적 보존효과, 즉 *Clostridium botulinum*에 대해 특이한 보호 효과를 제공한다는 면에서 중요하다. 그러나 아질산염은 일정 농도 이상 섭취하게 되면 혈액 중의 헤모글로빈이 산화되어 청색증(methemoglobinemia) 또는 빈혈성 저산소증(anemic hypoxia)을 유발시킬 수 있고⁶⁾, 그 자체로도 염기치환성 돌연변이를 유도하는 직접 작용물질(direct mutagen)로 알려지고 있기 때문에⁷⁾, FAO/WHO에서는 아질산염의 사용을 규제하여 1일 섭취 허용량(acceptable daily intake, ADI)을 60kg의 성인을 기준으로 하여 8mg으로 제한하고 있다²⁾. 또한 아질산염은 육류식품이나 수산식품 등에 존재하는 아

Corresponding author: Hyuk-Su Oh, Ansan College of Technology, 671, Choji-dong, Danwon-gu, Ansan city, Kyunggi-do 425-792, Korea
Tel: 031-490-6104
Fax: 031-490-6100
E-mail: ohsu@act.ac.kr

민류와 반응하여 N-nitrosamine을 생성하는데, 이들 N-nitrosamine은 동물 실험결과 대부분이 강력한 발암성을 나타내는 물질로 밝혀졌다²⁸⁻⁹⁾. 또한 N-nitrosamine의 생성 반응속도는 아민 농도에 그리고 아질산염 농도의 제곱에 비례하며 하기 때문에 아질산염은 발암성 물질인 N-nitrosamine의 생성에 가장 중요한 전구물질로 알려지고 있다¹⁰⁾. 이러한 이유로 N-nitrosamine 생성을 억제시키기 위하여 아질산염과 반응할 수 있는 화합물, 특히 ascorbate, α-tocopherol, 페놀성 화합물, flavonoid류 등과 같은 환원성물질에 의해 생성을 억제시킬 수 있다. 이들 화합물이 아질산염과 반응되면 니트로화 반응에 영향을 미쳐 nitrosamine의 생성을 강력하게 저해한다는 보고가 되면서¹¹⁻¹⁴⁾, 국내에서도 천연식품 추출물에서 아질산염의 소거에 대한 연구가 많이 진행되어 해조류¹⁵⁾, 버섯류¹⁶⁾, 기호음료¹⁷⁾, 차류¹⁸⁾, 약용식물¹⁹⁾, 채소류²⁰⁾ 등의 추출물들에 의한 아질산염 소거능이 보고 되고 있다.

감귤은 독특한 향미와 다량의 비타민 C를 함유하고 있기 때문에 제주 특산과일로서 생과와 과즙음료로 널리 이용되고 있다. 또한 flavonoid, limonoid, carotenoid 등이 함유되어 있어서 생리활성물질에 대한 연구 및 기능성식품으로서의 가치가 재조명되고 있다²¹⁾. 감귤의 종자는 만감류에 약 1~20%를 차지하고 있으며²²⁾, 감귤종자에는 limonoid류와 α-tocopherol 등이 함유되어 있어 항암, 항산화 등의 여러 생리적 기능에 대한 일부 보고가 있지만^{23,24)}, 감귤에 대한 연구는 과피와 과육을 중심으로 이루어지고 있으며, 감귤 종자의 생리활성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 제주산 감귤류 종자에 대한 생리기능을 가진 물질을 탐색하기 위한 일환으로 감귤종자 메탄올 추출물이 발암물질인 N-nitrosodimethylamine 생성억제에 미치는 영향을 검정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

제주도 내 과수원에서 직접 수집한 6종류의 감귤 (Table 1)의 종자를 분리하여 24시간 수침하고 물로

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(HY)	<i>Citrus natsudaidai</i>

3~4회 정도 깨끗이 세척한 후, 45℃에서 열풍건조기로 건조시킨 다음 분쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 하였다.

2. 시료의 일반성분 측정

감귤 종자의 수분함량은 상압가열 건조법, 조단백질은 micro kjeldahl법(질소 계수 : 5.30), 조지방은 Soxhet's 추출법, 그리고 조회분은 직접회화법으로 분석하였다²⁵⁾.

3. 시료의 추출 및 조제

Ethyl ether로 탈지시킨 감귤류 종자 100g에 메탄올 500ml를 가하여 40℃ 수욕조에서 3시간 동안 추출한 다음 40℃에서 진공농축기로 메탄올을 제거하였다 (Fig. 1). 여기에 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 가하여 100ml로 만들었으며, 이것을 micro filter(0.45µm)로 여과한 후 아질산염 소거를 위한 시료로 사용하였다.

4. 감귤종자 추출물의 고형분 함량 및 수율

감귤종자 메탄올 추출물의 고형분 함량은 휘발법으로 측정하였으며, 추출 수율은 각 감귤종자에 대한 수분함량을 보정하여 다음의 식에 의하여 구하였다.

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

5. 감귤류 종자의 플라보노이드 및 총 페놀 정량

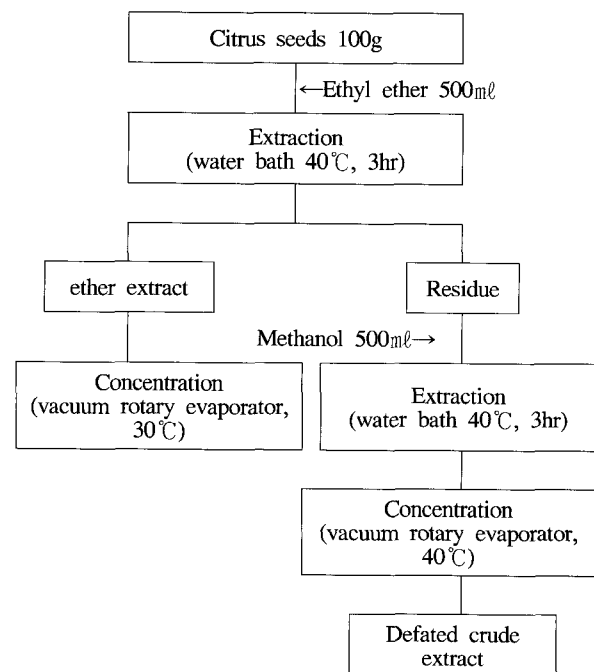


Fig. 1. Schematic diagram for extraction of citrus seeds with methanol.

Flavonoid 정량은 메탄올로 추출하여 naringin 비교 정량법으로, 총 페놀은 아세톤으로 추출하여 Follin-Penis법으로 정량하였다²⁶⁾.

6. pH에 따른 아질산염 소거작용

아질산염의 소거작용은 Kato 등²⁷⁾과 강 등¹³⁾의 방법으로 측정하였다. 즉 1mM NaNO₂ 용액 1ml에 감귤종자 추출물을 각각 1, 3 및 5ml씩 가하고 여기에 0.1N HCl 및 0.2M 구연산완충용액을 사용하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.4 및 6.0으로 조정 한 후 증류수를 가하여 총 부피를 25ml로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1, 3 및 5시간 반응시킨 후 각각 1ml를 취하고 여기에 2% 초산용액 5ml, Griess시약(30% 초산으로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것, 사용직전에 조제)을 0.4ml 가하여 잘 혼합시킨 다음 15분간 실온에서 방치시킨 후 520nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 정량하였다. 공시험은 Griess 시약 대신 증류수 0.4ml를 가하여 상기와 동일하게 처리하였다. 아질산염 소거작용은 추출물을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율(%)로 표시하였다.

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

- N : 아질산염 소거율(%)
- A : 시료첨가 반응시킨 후의 흡광도
- B : NaNO₂용액의 흡광도
- C : 시료자체의 흡광도

6. N-nitrosodimethylamine 생성억제 효과

감귤 종자 추출물들의 NDMA 생성억제 효과는 DMA 1ml(1,000ppm)와 NaNO₂ 5ml(1,000ppm)에 감귤종자 메탄올 추출물을 각각 1, 3 및 5ml 농도로 첨가한 후, pH 3.4로 조절하여 37°C에서 12시간 반응시킨 다음 ammonium sulfamate를 가하여 반응을 정지시키고, NDPA 1ml를 내부표준물질로 가하여 Hotchkiss 등²⁸⁾의

Table 2. 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

방법에 따라 스팀증류기를 이용하여 반응용액 중에 있는 NDMA를 추출하였으며 K-D 농축기로 농축하여 GC-TEA(Gas Chromatography-Thermal Analyzer)로 NDMA를 분석하였다. 이 때 GC-TEA의 조건은 Table 2와 같으며, 대조구는 시료 대신 증류수를 사용하여 상기와 동일한 방법으로 실험하였으며, 생성억제 효과는 시료의 첨가 전·후에 나타나는 peak의 백분율(%)로써 환산하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 감귤종자 추출물의 일반성분

감귤 종자를 건식분쇄기로 분쇄시킨 추출용 시료의 일반성분을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 감귤 종자류들의 수분 함량은 4~6%로 대부분 5% 이하였으며, 조단백질 함량은 11~15%, 조지방 함량은 32~46%, 탄수화물 함량은 22~45%, 회분함량은 2~4%이었다.

감귤류 종자 중 산귤(*Citrus sunki*)은 단백질과 지방 함량이 높은 반면 탄수화물 함량을 상대적으로 낮았고, 하귤(*Citrus natsudaidai*)은 지방함량이, 당유자(*Citrus grandis*)는 탄수화물 함량이 각각 상대적으로 높았으며, 삼보감(*Citrus sulcata*)인 경우 단백질과 지방함량이 다른 감귤종자에 비하여 상대적으로 높았다.

2. 감귤종자 추출물의 고형분 함량 및 수율

감귤종자 메탄올추출물의 고형분 함량과 추출수율은 Table 4와 같다. 감귤종자 메탄올 추출물의 고형분 함량은 0.8~1.2%이었으며, 이 중 금감자(*Citrus*

Table 3. Proximate composition of citrus seeds

Sample	Moisture (%)	Crude protein(%)	Crude lipid(%)	Carbohydrate (%)	Ash(%)
KK	4.1	14.1	37.5	39.2	3.2
DY	4.8	11.2	32.6	45.1	2.8
SK	4.7	15.0	42.6	22.5	4.1
SB	4.2	15.0	46.2	30.0	3.5
PK	6.4	13.3	36.2	38.8	2.9
HY	4.4	12.2	40.8	37.8	3.0

Table 4. Solid content and yield of methanol extracts from citrus seeds

Solvent	Solid content(%)	Extraction yield(%)
KK	1.2	1.1
DY	1.0	0.9
SK	1.1	1.0
SB	1.2	1.1
PK	0.9	0.8
HY	0.8	0.8

obovoidea)와 삼보감이 1.2%로 높은 고형분 함량을 보였다. 감귤 종자류의 추출 수율은 0.7~1.1%이었다.

3. 감귤종자의 플라보노이드 및 총 페놀 함량

감귤종자의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 Table 5와 같다. 감귤 종자류의 폴리페놀 중 플라보노이드 함량은 12~24mg% 함량을 나타내었으며, 특히 하귤과 삼보감, 그리고 당유자에서 20mg% 이상의 높은 함량을 나타내었다. 총 페놀 함량은 20.9~53.1mg%이었으며 당유자가 53.1mg%, 하귤이 33.7mg%으로 다른 감귤종자에 비해 높은 페놀함량을 보였다. 페놀성 물질들은 phenolic hydroxyl 그룹이 단백질 또는 효소단백질, 기타 큰 분자와 결합해서 효소활성을 저해하거나 단백질의 침전을 초래하고 떼은맛을 주어 식욕을 저하시키는 것으로 알려지고 있다²⁹⁾. 그러나 이들 이들 화합물들은 항산화성, 항균성, 항돌연변이성 및 아질산염 소거능^{13,30)} 등 생리활성이 큰 물질로 보고되고 있다.

Table 5. Content of flavonoids and total phenolics from citrus seeds

Citrus seeds	Flavonoids(mg%)	Total phenolics(mg%)
KK	13.7	24.5
DY	22.4	53.1
SK	11.5	28.1
SB	23.5	22.0
PK	14.1	20.9
HY	22.4	33.7

Table 6¹. 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
KK	1	40.1	61.6	68.3
	3	35.2	58.3	64.2
	5	36.7	67.5	76.6
DY	1	21.2	36.4	55.8
	3	23.7	48.2	72.5
	5	22.3	42.1	64.9
SK	1	32.1	41.6	57.6
	3	36.9	80.3	94.1
	5	34.0	77.1	87.9
SB	1	23.8	63.4	81.5
	3	29.3	85.0	96.9
	5	22.6	78.6	93.4
PK	1	17.5	32.4	36.7
	3	14.0	36.6	42.7
	5	7.5	33.7	38.3
HY	1	21.6	49.6	60.7
	3	15.8	55.4	57.4
	5	19.2	34.5	46.9

1. Mean of triplicate experiments.

4. pH에 따른 아질산염 소거효과

감귤 종자류 메탄올추출물들을 pH 1.2, 3.4 및 6.0에서 각각 1, 3 및 5시간 반응시켰을 때 아질산염의 소거효과는 반응용액의 pH, 시간, 감귤종자 및 추출물의 첨가량에 따라 차이를 보였으며 그 결과는 Table 6, 7 및 8에 나타내었다.

위액의 pH와 비슷한 pH 1.2에서 감귤종자 메탄올 추출물의 아질산염 소거효과는 첨가량이 증가할수록, 그리고 반응시간이 길수록 증가하였다(Table 6). 즉, pH 1.2에서 감귤종자 메탄올추출물을 각각 5ml씩 첨가하여 1시간 반응시켰을 때 36.7~81.5%의 아질산염 소거효과를 보였으나, 3시간 반응 시 42.7~96.9%의 높은 아질산염 소거능을 보였으며 특히 산귤과 삼보감 추출물에서 90% 이상의 높은 소거능을 나타내었다. 5시간 반응시켰을 때는 46.9~93.4%의 아질산염 소거능을 보여 3시간 반응시켰을 때보다 약간 감소하였다.

아질산염과 제2급 아민과 반응하여 nitrosamine을 생성시키는 최적 pH인 pH 3.4에서의 아질산염의 소거효과는 감귤종자 메탄올 추출물을 각각 5ml씩 첨가하여 1시간 반응시켰을 때 32.5~67.9% 범위였으며, 3시간 및 5시간 반응시켰을 때 각각 36.7~70.2% 및 34.0~64.9%로 첨가량이 증가할수록 소거효과는 증가하였지만 반응시간을 5시간으로 조절하였을 때에는 3시간 반응 시 보다 아질산염 소거능이 감소하는 경향을 보였다(Table 7).

감귤종자의 메탄올추출물을 pH 6.0에서 반응시켰을

Table 7¹. 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
KK	1	3.6	38.1	63.0
	3	5.7	52.0	63.5
	5	5.0	41.4	64.9
DY	1	23.0	42.3	51.3
	3	17.0	40.6	54.7
	5	5.7	15.5	46.0
SK	1	1.7	28.2	32.5
	3	2.3	24.0	53.6
	5	2.1	26.6	34.0
SB	1	0.5	19.6	47.1
	3	18.1	47.6	70.2
	5	0	36.6	58.4
PK	1	6.7	27.6	33.8
	3	6.5	30.8	36.7
	5	6.3	24.4	35.4
HY	1	19.1	51.5	67.9
	3	7.2	52.6	59.6
	5	6.7	35.9	41.9

1. Mean of triplicate experiments.

때 아질산염의 소거효과는 시험된 모든 종자 추출물에 대하여 첨가량 증가할수록 증가하였으나, 반응시간이 길어질수록 대부분 감귤종자 추출물들에 의한 아질산염의 소거능이 감소하는 경향을 보였다(Table 8). 즉, 감귤종자 메탄올추출물을 각각 5ml씩 첨가하여 pH 6.0에서 1시간 반응시켰을 때 8.1~48.3%, 3시간 및 5시간 반응시켰을 때 각각 19.9~62.6% 및 31.3~51.2%이었다.

이상의 결과로부터 감귤종자 메탄올추출물에 의한 아질산염의 소거효과는 추출물 첨가량이 증가할수록 그 소거율이 증가하였으며, pH 의존성이 커서 pH 1.2에서 가장 높은 소거능을 보였지만, pH가 증가할수록 감소하는 경향이 뚜렷하였으며, 아질산염을 소거하는 반응시간은 3시간 반응시켰을 때 가장 높은 아질산염 소거능을 보였다.

여 등¹⁸⁾은 pH에 따른 아질산염의 소거작용은 위내의 pH와 유사한 pH 1.2에서 가장 높고, pH가 높아질수록 아질산염 분해 작용은 감소하는 경향이었는데, 특히 이런 현상은 페놀 함량이 높은 확분에서 더 민감한 것으로 보아 아질산염 소거에 영향을 주는 물질은 주로 페놀화합물이라고 하였다. 강 등¹³⁾은 phenol 성 화합물의 아질산염의 소거능은 pH 1.2에서 가장 좋았다고 보고하였으며, 이와 최¹⁴⁾는 catechin, chlorogenic acid, morin, luteolin, luteolin-n-O-glucoside, narigenin 등의 flavonoid류가 아질산염 소거에 상당한 효력이 있다고 보고하였다. 정²⁰⁾은 채소 주스의 아질

산염 소거작용은 반응용액의 pH가 낮을수록, 시료첨가량이 높을수록 효과적이었다고 보고하였으며, 또한 이 등¹⁹⁾도 해조류(김, 미역, 청각)의 메탄올 추출물들이 pH 1.2에서 가장 좋은 아질산염 소거효과를 보고하고 있다.

이와 같이 아질산염 소거능은 페놀류, 플라보노이드 또는 SH 화합물 등의 환원력이 큰 물질에 의해 소거능에 크게 관여하는 것으로 보아 감귤류 종자 추출물에 의한 아질산염 소거능은 종자에 함유되어 있는 플라보노이드 또는 페놀화합물에 의한 영향인 것으로 추정된다.

5. 감귤종자 메탄올 추출물의 NDMA 생성 억제 효과

감귤종자 메탄올추출물을 각각 1ml, 3ml 및 5ml씩 첨가하였을 때의 NDMA 생성억제효과는 Table 9와 같다. 감귤종자 메탄올추출물을 1ml씩 첨가하였을 때 편귤종자와 산귤종자에서 약 40%의 NDMA 생성억제효과를 보였지만 다른 감귤종자류에서는 그 생성억제효과가 비교적 낮았다. 감귤종자 메탄올추출물을 3ml첨가한 시료의 경우에는 편귤에서 60%, 삼보감과 산귤이 40%가 넘는 억제율을 보였고, 나머지 시료 대부분이 추출물 1ml를 첨가했을 때보다 다소 높은 억제율을 보였다. 감귤종자 메탄올추출물을 5ml 첨가하였을 때, 삼보감에서 94%의 NDMA 생성억제효과를 보였으며, 편귤에서 72%, 당유자가 64%로 비교적 높은 NDMA 생성 억제효과가 나타났다. 이것은 삼보감과 당유자가 다른 감귤종자에 비해 높은 플라보노이드를 함유하고 있고 또한 아질산염 소거능도 다른 감귤종자 추출물 보다 높게 나타나는 것으로 보아 플라보노이드에 의한 영향으로 추정되며, 이와 반대로 편귤은 다른 감귤종자 보다 총페놀 함량이 높아 이것에 의한 영향으로 추정된다. 따라서 감귤종류에 다소간의 차이는 있지만, NDMA 생성 억제율은 첨가량이 증가할수록 높게 나타났으며 페놀 보다는 플라보노이

Table 8¹. 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
KK	1	0.5	9.3	28.0
	3	5.4	25.1	45.2
	5	18.0	37.7	51.2
DY	1	0	17.5	48.3
	3	16.2	30.3	49.2
	5	5.7	15.5	46.0
SK	1	0	13.6	27.0
	3	1.8	19.2	32.1
	5	2.2	7.2	24.5
SB	1	0	15.1	41.2
	3	5.2	35.2	62.6
	5	0	4.7	36.5
PK	1	5.2	6.0	8.1
	3	0	23.4	36.0
	5	6.9	23.2	30.9
HY	1	1.6	4.3	18.0
	3	1.8	11.2	19.9
	5	7.5	23.7	31.3

1. Mean of triplicate experiments.

Table 9¹. Inhibition rate of citrus seeds extracts on N-nitrosodimethylamine formation(%)

Sample	amount of addition(ml)		
	1	3	5
Kumkamja(KK)	19.7	21.3	53.6
Dangyooja(DY)	16.7	26.8	64.4
Sankyool(SK)	39.8	46.0	52.5
Sambokam(SB)	1.2	44.5	94.0
Peonkyool(PK)	39.9	60.1	72.2
Hakyool(HY)	34.0	39.4	47.4

1. Mean of triplicate experiments.

드에 의한 영향이 큰 것으로 추정된다. 그러나 송³¹⁾은 밀감, 오렌지 및 금귤에 대한 NDMA 생성억제효과는 아스코르빈산 획분 보다는 페놀획분에서 95%이상의 높은 NDMA 생성억제효과를 보고하였다.

NDMA 생성억제의 대표적인 물질은 ascorbic acid, α -tocopherol, 폴리페놀 등이 알려지고 있는데³²⁻³⁴⁾, ascorbic acid는 수용액 상태에서 pH 2~5 또는 그 이상의 범위에서도 아질산을 급속히 환원시켜 산화질소를 생성하고, 동시에 자신은 dehydroascorbic acid로 되어 NDMA의 생성을 억제시킨다고 하였다³⁵⁾. 또한 Gray와 Dugan³⁶⁾은 모델계 실험에서 탄닌산 유도체를 식품 보존료 및 N-nitrosamine 생성 저해제로 사용하였으며, Theiler 등³⁷⁾은 식육에 아질산염을 첨가하여 만든 모델계에서 페놀성 물질이 N-nitrosamine 생성억제를 확인하였다. 그러나 페놀성화합물은 산성조건에서 니트로화 반응을 강력히 억제하나³⁸⁾, 알칼리 반응조건에서 NDMA 생성을 촉진시키는 것으로 알려지고 있다³⁹⁾. 또한 phenol, guaiacol, resorcinol 등은 니트로화 반응을 촉진시키나, hydroquinone과 catechol은 강력히 억제시킨다고 보고하였다. 또한 caffeic acid, ferulic acid는 아질산염과 급속하게 반응함으로써 N-nitrosamine 생성을 억제시키며⁴⁰⁾, 천연식물성분이 NDMA 생성억제작용은 반응용액의 pH가 산성일수록, 시료의 첨가농도가 높을수록 억제효과가 크다고 하였다⁴¹⁾.

감귤종자에는 flavonoid, 페놀화합물 이외에 limonoid 등이 함유되어 있어 기능성 식품 이용소재로 그 가치가 높다고 하겠다. 따라서 감귤종자의 생리활성물질을 탐색하여 기능성 식품 및 기능성식품조리의 소재, 또는 의약품 소재로 이용가능성에 대한 연구에 대한 더 많은 진척이 요구된다.

IV. 요약

감귤 6종류의 종자를 메탄올로 추출하여 이들 추출물에 의한 N-nitrosodimethylamine(NDMA) 생성억제효과를 검정하였다. 감귤류 종자의 수분함량은 4~6%, 조단백질 함량 11~15%, 조지방 32~46%, 탄수화물 함량은 22~45%이었으며, 회분함량은 2~4%, 플라보노이드는 12~24mg%, 폴리페놀함량은 22~53mg%이었다. 감귤종자 메탄올 추출물의 추출수율은 0.7~1.1%, 고형분 함량은 0.8~1.2%이었다. 감귤종자 메탄올추출물에 의한 아질산염의 소거효과는 추출물의 첨가량이 증가할수록 그 소거율이 증가하였다. 또한 아질산염 소거능은 pH 의존성이 커서, pH 1.2(42.7~

96.9%)에서 높은 가장 높은 소거효과를 보였으며 pH 6.0(19.9~62.6%)에서 가장 낮은 효과를 보였다. 게다가 반응시간에 따른 아질산염 소거효과는 3시간 반응시켰을 때 가장 높았다. NDMA 생성 억제효과는 감귤종자 추출물의 농도가 증가할수록 컸다. 즉 감귤종자 추출물을 각각 1, 3 및 5ml 첨가하였을 때 NDMA 생성 억제율은 각각 1.2~39.8%, 21.3~60.1% 및 47.4~94.0%이었다.

감사의 글

본 논문은 2003년도 제주대학교 첨단기술연구소의 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로서 이에 감사드립니다.

V. 참고문헌

- Lijinsky, W : Species differences in nitrosamine carcinogenesis. *J. Cancer Res Clin Oncol.*, 108:46-55, 1984
- Cassens, RC : Use of sodium nitrite in cured meats today. *Food Technology.*, 6:72-80, 1995.
- Kawabata, TH, Oshima, J, Uibu, M, Nakamura, M and Matsui M, Hamano : 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, 1979
- Lijinsky, W and Singer, M : Formation of N-nitrosamine from tertiary amines and nitrous acid. In, Pogovsk, P and Walker, EA, (eds.) : Nitroso compounds in the environment., IARC Scientific Publication., 14:111-116, 1974
- Ishibashi, T, Kawabata, T and Matsui, M : Nitrosation of some asymmetric tertiary amine and quaternary ammonium compounds with nitrite or nitrogen dioxide gas. *Bull Japan Soc Sci Fish.*, 50:1425-1429, 1984
- Lippsmyer, BC, Tracy, ML and Moller, G : Ion-exchange liquid chromatographic determination of nitrate and nitrite in biological fluids. *J. AOAC.*, 73: 457-462, 1990
- Balimandawa, M, de Meester, C and Leonard, A : The mutagenicity of nitrite in the salmonella/microsome test system. *Mutat Res.*, 321: 7-11, 1994
- Peter, FS : The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *J. Sci Food Agric.*, 26:1761-1963, 1975
- Wolff, IA and Wasserman, AE : Nitrites, nitrates, and nitrosamines., *Science.*, 177:15-19, 1972
- Mirvish, SS, Wallcave, L, Eagen, M and Shubik, P : Ascorbate-nitrite reaction; Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science*, 177: 65-68, 1972
- Gray, J and Dugan, JR : Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J Food Sci.*, 40:981-985, 1975

12. Cooney, RV and Ross, RD : N-nitrosation and nonnitration of morpholine by nitrogen dioxide in aqueous solution : Effects of vanillin and related phenols. *J Agric Food Chem.*, 35: 789-793, 1978
13. Kang, YH, Park, YK and Lee, GD : The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol.*, 28:232-239, 1996
14. Lee, JH and Choi, JS : Influence of some flavonoids on N-nitrosoproline formation in vitro and in vivo. *J. Korean Soc Food Nutr.*, 22:226-229, 1993
15. Kim, SB, Ahn, BW, Yeum, DM, Lee, DH, Park, YH and Kim, DS : Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural food components. 2. Nitrite-scavenging effects of seaweed extracts. *Bull Korean Fish Soc.*, 20:469-475, 1987
16. Lee, GD, Chang, HG and Kim, HK : Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29:432-436, 1997.
17. Do, JR, Kim, SB, Park, YH, Park, YB and Kim DS : The nitrite-scavenging effects by the component of traditional tea materials. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 23:287-534, 1993
18. Yeo, SG, Yeum, DM, Lee, DH, Ahn, CW, Kim, SB and Park, YH : The nitrite-scavenging effects by components of green tea extracts. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23:287-292, 1994
19. Lee, SJ, Chung, MJ, Shin, JH and Sung, NJ : Effect of natural plant components on the nitrite-scavenging. *J. Fd Hyg. safety*, 15(2):88-94, 2000
20. Chung, MJ : Effect of diet composition on endogenous formation of N-nitrosamine in humans. Doctoral thesis, The Kyungsang University of Korea, 2000
21. Whang, HJ and Yoon, KR : Carotenoid pigment of fruits cultivated in korea. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27:950-957, 1995
22. Kim, BJ : Studies on the processing characteristics of citrus fruits produced in cheju. Master thesis, The Cheju University of Korea, 1994
23. Cho, SH, Seo, IW, Choi, JD and Joo, IS : Antimicrobial and antioxidant activity of grapefruit and seed extract on fishery products. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 23:289-296, 1990
24. Miller, EG, Gonzales-Sanders, AT, Convillon, AM, Binnie, WH, Hasegawa, S and Lam, LKT : Citrus limonoids as inhibitors of oral carcinogenesis. *Food Technol.*, 48:110-114, 1994
25. 채수규, 강갑석, 마상조, 방광웅, 오문현 : 표준식품분석학. 지구문화사, 서울, 207-275, 1998
26. AOAC, Official Method of Analysis. 16th ed., Association of Official Analysis Chemists, Washington, DC, 1995
27. Kato, H, Lee, IE, Chuyen, NV, Kim, SB and Hayase F : Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melonoidin. *Agric Bio Chem.*, 51:1333-1338, 1987
28. Hotchkiss, JH, Harvey, DC and Fazio, T : Rapid method for estimation of N-nitrosodimethylamine in malt beverages. *J. AOAC.*, 64(4):929-932, 1981
29. Kumar, R and Singh, M : Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. *J. Agric. Food Chem.*, 32:447-451, 1984
30. Lee, JH and Lee, SR : Some Physiological Activity of Phenolic Substances in Plant Foods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26(3):317-323, 1994
31. Song, MH : Effect of citrus fruit juice on N-nitrosamine formation. Master thesis, The Kyungsang University of Korea, 2000
32. Stich, HF, Rosin, MP and Bryson, L : Inhibition of Mutagenicity of a model nitrosation reaction by naturally occurring phenolics, coffee and tea. *Mut. Research.*, 95:119-128, 1982
33. Kuenzig, W, Chau, J, Norkus, E, Holowaschenko, H, Newmark, H, Mergens, W and Conney, AH : Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis.*, 5(3):309-313, 1984
34. Schweinsberg, F and Schott-kollaf, P : Effect of vitamin A on formation, toxicity and carcinogenicity of Nitroso-N-methyl benzylamine. IARC Scientific Publication., 14:453-459, 1976
35. Fiddler, W, Piotrowski, EG, Pensabeau, JW, Doerr, RC and Wassermann, AE : Effect of sodium nitrite concentration on N-nitrosodimethylamine formation in Frankfurters. *J. Food Sci.*, 37:668. 1972
36. Gray, J and Dugan, JR : Inhibition of N-nitrosamine formation in model system. *J. Food Sci.*, 40:981, 1975
37. Theiler, RF, Sato, K, Aspelund, TG and Miller, AF : Inhibition of N-nitrosamine formation in a cured ground pork belly model system. *J. Food Sci.*, 49:341, 1984
38. Pignatelli, B, Scriban, R, Descotes, G and Barrisch, H : Modifying effect of polyphenols and other constituents of beer on the formation of N-nitroso compound. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 42:18, 1984
39. Walker, EA, Pignatelli, B and Friesen, M : The role of phenols in catalysis of nitrosamine formation. *J. Sci. Food Agric.*, 33:81-88, 1982
40. Challis, B and Bartlett, CD : Possible cocarcinogenic effect of coffee constituents. *Nature.*, 254:532, 1975
41. Lee, SJ, Shin, JH, Chung, MJ and Sung, NJ : Effect of Natural Foods on the Inhibition of N-Nitrosodimethylamine Formation. *J. Fd Hyg. Safety.*, 15(2):95-100, 2000

(2003년 8월 30일 접수, 2003년 10월 9일 채택)