

# 부위가 다른 감귤의 섭취가 노령흰쥐의 항산화능 및 DNA 손상에 미치는 영향\*

김지혜 · 권상희 · 김자경 · 김미경<sup>§</sup>

이화여자대학교 식품영양학과

## Effects of Different Mandarin Formulations on Antioxidative Capacity and Oxidative DNA Damage in Fifteen-Month Aged Rats\*

Kim, Ji Hye · Kwon, Sanghee · Kim, Ja Kyung · Kim, Mi Kyung<sup>§</sup>

Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

### ABSTRACT

This study was performed to investigate the effect of whole mandarin, peel or pulp intake of *Citrus unshiu* Marc. on antioxidative capacity and oxidative DNA damage in fifteen-month aged rats. Forty-eight male Sprague-Dawley rats (621.9 ± 10.1 g) were blocked into four groups according to their body weights as control group, whole mandarin powder group, mandarin peel powder group and mandarin pulp powder group. Rats were raised with diets containing 5% (w/w) freeze dried mandarin formulations for four weeks. Total polyphenol content and total antioxidant status (TAS) of mandarin formulations were highest in peel powder, followed by whole powder and then pulp powder. The 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations of kidney in all mandarin groups were significantly lower than that of control group, and that of mandarin peel group was much lower than whole powder and pulp groups. Plasma TAS levels of all the experimental groups were higher than that of control group, and among mandarin groups, peel group showed higher level than remaining two groups. In conclusion, all the mandarin formulations were effective on antioxidative capacity in fifteen-month aged rats, and the peel was most effective one among three formulations. (*Korean J Nutrition* 39(7) : 610~616, 2006)

**KEY WORDS** : mandarin (*Citrus unshiu* Marc.), antioxidative capacity, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine.

### 서 론

감귤 생산량은 2004년 현재 약 58만 톤으로 한국에서 가장 많이 생산되는 과일이며, 주로 mandarin계의 온주 밀감들이 생산되고 있다.<sup>1)</sup> 이러한 감귤류는 식품산업에 있어서 대부분이 감귤주스나 감귤을 원료로 한 음료에 사용된다.<sup>2)</sup> 그러나 과즙으로의 효율이 과실부계의 약 1/2일 뿐이므로 매우 많은 양의 과피 부산물이 생기며, 한국의 경우, 감귤류 주스 가공과정에서 연간 15만 톤의 과피 부산물이 생겨나고 있어,<sup>3)</sup> 대단위 감귤 가공 공장에서 생기는 폐과피의 효율적

인 이용이 요구되고 있는 실정이다.

이러한 감귤류는 polyphenols, vitamins, limonoids, synephrine 등의 다양한 화합물을 함유하고 있으며,<sup>4)</sup> rutin 및 deosmine과 같은 일반적인 flavonoids 및 hesperidin, naringin과 같은 citrus fruit 특유의 flavonoids, 그리고 채소나 과일에서는 보고되지 않는 감귤류 고유의 tangeretin, nobiletin과 같은 flavonoids가 함유되어 있다.<sup>5)</sup> 특히 감귤 과피에는 phenolic compound가 높은 농도로 존재하기 때문에 flavonoids의 풍부한 공급원이 된다.<sup>6,7)</sup>

또한 감귤에는 carotenoids, vitamin C 및 vitamin E 등 항산화 비타민이 풍부하다. Hwang 등<sup>8)</sup>의 연구에 의하면 *Citrus unshiu* Marc.종 감귤의 총 carotenoids 함량은 과피는 7.0 mg%, 과육은 1.5 mg%이며, 총 carotenoids에 대한 개별 carotenoid들의 조성함량 %는 과피의 경우 violaxanthin 30%,  $\beta$ -cryptoxanthin 20%,  $\beta$ -carotene 1% 등으로 나타났다. 이러한  $\beta$ -cryptoxanthin은 포도나 레몬, 오렌지에

접수일 : 2006년 10월 2일

채택일 : 2006년 10월 18일

\*This research was supported by the grants from Daesang.Co. Ltd. and the second stage of Brain Korea 21 project in 2006.

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail : mkk@ewha.ac.kr

는 거의 포함되어 있지 않은 성분이라고 한다. 한편 동결건조시료 1 g 당 함유되어 있는 vitamin C는 감귤전체에 4.02 mg, 감귤과피에 8.55 mg, 감귤과육에 3.85 mg 함유되어 있어 감귤과피가 감귤과육에 비해 약 2배 높았으며, vitamin E는 감귤전체에 1.95 mg, 감귤과피에 8.98 mg, 감귤과육에 0.27 mg 함유되어 있어 감귤과피에 가장 많이 들어있으며 감귤과육에 비하여 약 33배가량 높았다.<sup>9)</sup>

또한 감귤 과피에는 essential oils가 풍부하다. 감귤의 정유는 감귤과피의 flavedo zone에 있는데, flavedo zone은 천연 wax 층으로 덮인 유실을 포함하는 매우 조밀한 구조를 보여준다.<sup>10)</sup> 감귤 정유 성분은 d-limonene,  $\gamma$ -terpinene,  $\beta$ -elemene, farnesene, hexadecanoic acid,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -myrcene, linalool,  $\beta$ -pinene 그리고  $\alpha$ -terpinolene 등이며, 그 중 d-limonene는 정유의 60~90%를 차지한다.<sup>11)</sup> Hakim 등<sup>12)</sup>에 의하면 citrus peel은 피부암을 줄이는 데에 효과가 있었으나 citrus juice와는 상관관계를 보이지 않았으며, 이러한 결과를 나타낸 이유 중 하나로 citrus peel oil의 90% 이상을 차지하는 d-limonene을 들었다. d-limonoid는 값이 싸고 독성이 없는 이상적인 항암물질로 다른 연구<sup>13-15)</sup>에서도 피부암, 유방암, 간암, 폐암 그리고 위암, 대장암에서 좋은 효과를 보인 것으로 나타났다.

이러한 polyphenols와 항산화 비타민 및 essential oils는 체내의 항산화 효소체계와 함께 자유기로부터 조직을 보호해주는 역할을 한다. 생체 내의 정상적인 대사 과정 및 심한 운동, 노화, 중금속 오염 등은 자유기 및 활성산소종을 생성시킨다.<sup>16)</sup> 이렇게 내부적 혹은 외부적 요인에 의해 생성되는 활성산소종은 핵산을 포함한 macromolecule에 산화적 손상을 일으키고,<sup>17)</sup> 극도로 손상된 세포는 사멸되거나,<sup>18)</sup> 살아남는다. 살아남은 세포의 경우, 손상을 없애기 위해 G1 및 G2 phase를 통해 checkpoint pathway가 활성화 된다.<sup>19)</sup> 만약 DNA 손상이 복구되지 않는다면 높은 비율로 유전자 돌연

변이가 생기게 되고 악성으로 변환된다. 특히 산화적 DNA 손상이 많아지면 GC와 TA의 염기전환을 일으켜 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG)이 되는데 (Fig. 1),<sup>20)</sup> 이는 몇몇 발암물질에 의해 생겨나며, 악성종양세포의 DNA에서 높은 수준으로 존재한다.<sup>21)</sup>

이에 본 연구에서는 제주산 온주감귤 (*Citrus unshiu* Marc.)을 감귤전체, 감귤과피, 그리고 감귤과육을 부위별로 나누어 분말화하고, 이들의 총 polyphenols 함량 및 total antioxidant status (TAS)를 측정하여 부위별 항산화능을 알아보았다. 또한 생후 15개월령의 노령흰쥐에게 감귤전체 및 과피, 과육 건분을 식이무게의 5% 수준으로 섭취시켜 4주간 사육한 뒤, 신장조직의 산화된 DNA 지표인 8OHdG 수준을 측정하여 산화정도를 알아보고, 혈중의 TAS를 측정하여 노령흰쥐에 있어서 부위별 감귤 식이의 섭취가 체내 항산화능 증진에 효과가 있는지 살펴보고자 하였다. 이를 통하여 우리가 흔히 먹는 과육과 폐기되고 있는 과피의 항산화능을 비교함으로써 과피의 활용 가능성도 탐색하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 감귤시료 준비

실험에 사용한 감귤은 신선한 제주산 온주감귤 (*Citrus unshiu* Marc)로서 흐르는 물에서 수세한 후 꼭지를 제거하였다. 이렇게 꼭지를 제거한 것을 전체감귤 (whole mandarin)로 하였다. 일부는 과피 (mandarin peel)와 과육 (mandarin pulp)으로 분리하여 이들 세 가지 실험재료를 총 수분 5%미만으로 동결건조하고, fitz mill (The Fitz Patrick Company, No. DASO6)로 40 mesh를 통과할 수 있도록 분말화하여 실험식이에 5% (w/w) 씩 첨가하였다.

### 2. 감귤분말 시료의 항산화 물질 함량 분석

#### 1) 총 Polyphenols 정량분석

총 polyphenols 함량은 AOAC 공인 방법인 Folin-Denis 법<sup>22,23)</sup>에 의하여 행하였다. 즉, 감귤분말 시료 200 mg을 140 ml 증류수로 5시간 환류 추출한 후 얻어진 분획물 1 ml를 메스플라스크 100 ml 짜리에 넣고 75 ml의 증류수를 가하여 잘 혼합하였다. 그 후 Folin-Denis 시약 5 ml와 탄산나트륨 포화용액 (35%) 10 ml를 넣은 후 증류수로 100 ml 용량으로 채웠다. 이것을 잘 혼합하여 실온에서 30분간 방치시킨 후 760 nm에서 spectrophotometer (Genesys 10 UV)로 흡광도를 측정하였다. 총 polyphenols 함량은 tannic acid (Yakuri pure chemicals Co.)를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 환산하였다.

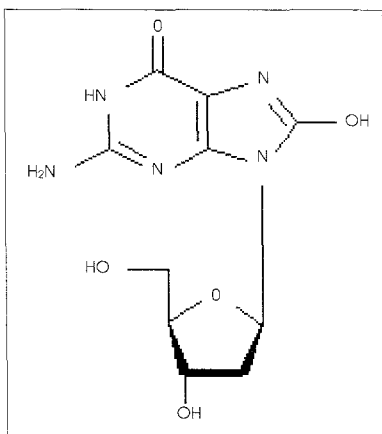


Fig. 1. Molecular structure of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine.

## 2) Total antioxidant status 분석

감귤분말 시료의 TAS는 McCusker 등<sup>24)</sup>과 Marklund 등<sup>25)</sup>의 방법을 응용해서 측정하였는데, 그 측정원리는 다음과 같다. ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline sulphonate])를 peroxidase 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께 배양하면 ABTS<sup>+</sup> 양이온 radical이 생성되는데, 이 radical은 600 nm에서 흡광도 측정시 비교적 안정된 청록색을 가지게 된다. 이러한 청록색은 시료 속에 들어있는 항산화 물질의 양에 비례하여 발색정도가 억제되므로, 억제되는 정도를 이용하여 시료에 들어있는 TAS를 측정한다.

본 실험에서는 TAS kit (ABTSR Radox Lab. Ltd., UK)를 이용하여 분석하였다. 건조된 시료 1 g에 95% ethanol 50 ml을 넣고 90°C에서 2시간 환류 추출하였다. 이를 냉각시킨 후 여과지로 여과하고 원심분리하였다. 이렇게 얻어진 상등액을 0.45 µm filter를 사용하여 재차 여과하고 그 여과액을 측정용 시료로 사용하였다. 시료 20 µl에 발색제 1 ml를 넣고 잘 섞은 다음 spectrophotometer (Genesys 10 UV)로 초기 흡광도를 600 nm에서 측정한 후, 기질 200 µl를 넣고 혼합과 동시에 정확하게 3분 후에 흡광도를 측정하였다. 이 모든 과정은 37°C에서 이루어졌으며, blank는 시료대신 증류수를 사용하며, standard는 kit 내에 포함되어 있는 표준액을 이용하였다.

## 3. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 샘타코 바이오 코리아에 의뢰하여 출생시부터 동일한 환경에서 고품배합사료 [(주)삼육동물실험연구소: 조단백 22%이상, 조지방 4.5%이상, 조섬유 6.0%이하, 조회분 8.0%이하, Ca 0.7%이상, P 0.50%이상]로 사육한 15개월령의 Sprague-Dawley (SD) 중 수컷 흰쥐 48마리를 대상으로 하였다. 실험동물들은 본 동물사육실로 옮긴 후에 1주일간 동일한 고품배합사료 [(주)삼육동물실험연구소]로 적응시킨 후, 체중이 621.9 ± 10.1 g인 쥐들을 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)에 의하여 12마리씩 4군으로 분류하여 4주간 사육하였다.

실험동물은 한 마리씩 stainless steel cage에서 사육하였고 식이와 물은 자유롭게 먹도록 하였으며, 동물사육실은 온도 22 ± 1°C, 습도 45% 내외로 유지시켰으며, lighting cycle은 12시간 주기로 일정하게 하였다.

실험에 사용한 식이의 구성성분은 Table 1과 같았다. 실험에 사용한 식이는 탄수화물 급원으로는 옥수수전분 (corn starch, 대상주식회사)을, 지방 급원으로는 옥수수유 (corn oil, CJ 주식회사)와 대두유 (soybean oil, CJ 주식회사)를 3 : 2 (w : w)의 비율로 섞어 실험식이의 10% (w/w) 수준

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredients	Groups <sup>1)</sup>			
	C	WM	MPE	MPU
Cornstarch	700.7	650.7	650.7	650.7
Casein	150.0	150.0	150.0	150.0
Corn oil <sup>2)</sup>	60.0	60.0	60.0	60.0
Soybean oil <sup>3)</sup>	40.0	40.0	40.0	40.0
Mineral mix <sup>4)</sup>	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin mix <sup>5)</sup>	10.0	10.0	10.0	10.0
Choline chloride	2.5	2.5	2.5	2.5
L-cystine	1.8	1.8	1.8	1.8
Mandarin powder	—	50	50	50
Total	1000	1000	1000	1000

1) C: Control diet (Mandarin free diet)

WM: Experimental diet containing 5% whole mandarin powder

MPE: Experimental diet containing 5% mandarin peel powder

MPU: Experimental diet containing 5% mandarin pulp powder

2) Fatty acids per 100 g total fatty acids of corn oil (%): 16 : 0 10.36, 18 : 0 1.80, 18 : 1 26.59, 18 : 2 60.43, 18 : 3 0.82.

3) Fatty acids per 100 g total fatty acids of soybean oil (%): 16 : 0 10.45, 18 : 0 4.11, 18 : 1 23.17, 18 : 2 55.18, 18 : 3 7.08

4) Mineral mix (AIN-93M-MX) (g/kg mixture): Calcium carbonate, anhydrous 357, Potassium phosphate, monobasic 250, Sodium chloride 74, Potassium sulfate 46.6, Potassium citrate, tri-potassium, monohydrate 28, Magnesium oxide 24, Ferric citrate 6.06, Zinc carbonate 1.65, Manganous carbonate 0.63, Cupric carbonate 0.3, Potassium iodate 0.01, Sodium selenate, anhydrous 0.01025, Ammonium paramolybdate 0.00795, Sodium meta-silicate, 9 hydrate 1.45, Chromium potassium sulfate, 12 hydrate 0.275, Boric acid 0.0815, Sodium fluoride 0.0635, Nickel carbonate 0.0318, Lithium chloride 0.0174, Ammonium vanadate 0.0066, Powdered sucrose 209.806.

5) Vitamin mix (AIN-93-VX) (mg/kg mixture): Nicotinic acid 3000, Calcium Pantothenate 1600, Pyridoxine-HCl 700, Thiamin-HCl 600, Riboflavin 600, Folic acid 200, D-Biotin 20, Vitamin B<sub>12</sub> (cyanocobalamin) (0.1% in mannitol) 2.5, Vitamin E (all-rac- $\alpha$ -tocopheryl acetate) (500 IU/g) 1500, Vitamin A (all-trans-retinyl palmitate) (5,000,000 IU/g) 800, Vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) (400,000 IU/g) 250, Vitamin K (Phylloquinone) 75, Powdered sucrose 974.655 g

으로 사용하였고, 단백질 급원으로는 casein (edible acid casein, Murry Goulburn Co-operative Co., Australia)을 식이무게의 15% 수준으로 사용하였다. 무기질과 비타민은 시약급을 사용하여 혼합한 것 (AIN-93M<sup>26)</sup>을 각각 식이무게의 3.5%와 1% 수준으로 식이에 섞어 공급하였다. 감귤전체 및 과피, 과육 건분은 식이무게의 5% 수준으로 식이에 섞어 공급하였다.

식이섭취량은 일주일에 3회 일정한 시각에 측정하였고, 체중은 일주일에 1회 같은 시각에 측정하였으며, 식이 섭취에서 오는 갑작스런 체중의 변화를 막기 위하여 체중 측정 2시간 전에 식이 그릇을 빼주었다.

## 4. 혈액 및 장기의 채취

사육기간이 종료된 실험동물은 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 개복한 후 10 ml 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 이때 주사기는 3.8% sodium

citrate 용액 0.1 ml로 내부를 coating하여 사용하였다. 채취한 혈액은 응고되는 것을 방지하기 위해 heparin (25000 I.U./5 ml)이 들어있는 polystyrene 원심분리관에 담아 ice bath에 20분간 방치시킨 후, 원심분리기 (refrigerated multipurpose centrifuge union 55R Hanil)로 2,800 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 아래층의 적혈구와 위층의 혈장을 분리하고, 혈장은 -70°C deep freezer에 보관하였다.

신장은 혈액을 채취한 후 즉시 ice bath 위에서 떼어내어 ice cold saline에 넣어 세척한 다음 여지로 물기를 제거한 후, 무게를 정확히 측정하고 이것을 바로 -70°C deep freezer에 보관하여 8OHdG 분석에 사용하였다.

5. 생화학적 분석

1) 신장조직의 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 수준

신장조직의 DNA는 DNA Extractor Wako kit (Wako, Osaka, Japan)을 이용하여 추출·분리<sup>27)</sup>하였다. 분리된 DNA는 Helbock 등의 방법<sup>27)</sup>에 의하여 nucleoside 수준으로 가수분해시켜 HPLC 분석에 사용하였다. 즉, DNA 50~100 µg/50 µl D.W.를 40 mM sodium acetate (pH 5.0) 50 µl에 녹인 후 nuclease P1 (Sigma N8630) 1 unit을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 1 M Tris-HCl (pH 8.5) 10 µl를 첨가하여 반응액을 pH 8.0으로 맞추고 다음 alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim, Germany) 1 unit을 첨가하고 킨친히 잘 섞은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이들 효소의 활성을 종료시키기 위하여 3 M sodium acetate (pH 5.0) 10 µl와 50 mM EDTA 10 µl를 첨가한 후 10,000 Da의 membrane filter tube (Millipore, MA, USA)를 이용하여 여과시키고, 이를 4°C, 10,000 × g에서 5분간 원심분리한 후, HPLC 분석에 사용하였다. HPLC에 의한 8OHdG의 분석은 Waters 2690 Separation Module에서 Supelcosil™ LC-18-S column (5 µm, 4.6 mm × 25 cm; Supleco, Bellefonte, PA, USA)에 LC-18-DB precolumn cartridge를 미리 장착하여, 이동상 (10% methanol, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer solution; flow rate 0.5 ml/min)이 UV detector (UVD, 254 nm)와 Waters 464 pulsed Electrochemical Detector (ECD, +800 mV)를 순차적으로 지나도록 연결하여 사용하였다. 신장조직의 DNA 손상정도는 10분개의 정상 deoxyguanosine (dG, Sigma D7145) 당 존재하는 8OHdG (Sigma H5653)의 수로 나타내었다.

2) 혈장 내의 total antioxidant status 수준

혈장의 TAS 수준은 TAS kit<sup>24,25)</sup> (Randox Co., UK)를 이

용하여 분석하였다. 채취한지 14일 이내의 heparin 처리된 혈장 20 µl에 발색제 1 ml를 넣고 잘 섞은 다음 spectrophotometer (Genesys 10 UV)로 600 nm에서 초기 흡광도를 측정 후, 기질 200 µl를 넣고 혼합과 동시에 정확히 3분 후에 흡광도를 측정하였다. 이 모든 과정은 37°C에서 이루어졌으며, blank는 혈장대신 증류수를 사용하며, standard는 kit 내에 포함되어 있는 표준액을 이용하였다.

6. 통계처리

모든 실험 분석 결과는 SAS program을 이용하여 각 군의 평균과 표준오차를 계산하였고 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)을 한 후 α = 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

실험결과 및 고찰

1. 감귤시료의 총 Polyphenols 함량 및 항산화능

본 실험에서 사용한 감귤분말 시료 내에 함유된 총 polyphenols 함량 및 TAS 분석 결과는 Table 2와 같았다. 각 시료의 동결건조 분말 1 g에 들어있는 총 polyphenols의 함량을 측정하였을 때, 감귤과피 분말 내 함량이 전체감귤이나 감귤과육 분말보다 월등히 높았으며 감귤과육 분말에 비해서는 3배 이상 높았다. Gorinstein 등<sup>23)</sup>의 연구와 비교해 보면 감귤과피는 레몬과피, 오렌지와피, 그리고 포도과피에 비하여 총 polyphenols 함량이 높았으며, 감귤과육 내 총 polyphenols 함량은 이들의 과육과 비슷하였다. Li 등의 연구<sup>29)</sup>에서도 감귤과피가 오렌지와피에 비하여 약 2배 정도의 phenolic compounds를 함유하고 있는 것으로 나타났다.

또한 감귤분말 시료 자체의 총 항산화능을 알아보기 위하여 TAS를 측정된 결과, 감귤분말시료 1 g의 TAS 수준은 감귤전체가 3.76 mmol/L, 감귤과피가 4.12 mmol/L, 그리고 감귤과육이 2.52 mmol/L로 감귤과피 분말이 가장 높은 항산화능을 가진 것으로 나타났다.

그런데 Aldini 등<sup>30)</sup>에 의하면 본 연구에서 측정된 TAS와 비슷한 원리인 혈장에서의 총 항산화능을 알아보는 TRAP (total reactive antioxidant potential)과 FRAP (ferric re-

Table 2. Total polyphenol contents and total antioxidant status in mandarin formulations

Constituents	Type of mandarin			
	powder	Whole	Peel	Pulp
Total polyphenols (mg/g powder)	50.82	94.22	25.76	
Total antioxidant status (mmol/L)	3.76	4.12	2.52	

ducing ability of plasma) 등의 방법은 수용성 용매에서만 작용하는 기질 및 free radical generator를 사용하기 때문에 lipophilic phase에 있는  $\beta$ -carotene은 거의 검출되지 않는다는 것이다. 이를 뒷받침하는 연구로 Garry 등<sup>31)</sup>의 연구를 들 수 있는데 FRAP으로 총 항산화능과 과일즙으로부터 추출한 vitamin C, phenols, 그리고 carotenoids와의 상관관계를 각각 살펴본 결과, vitamin C가 0.90, phenols가 0.99로 항산화능과 아주 높은 상관관계를 보이는데 반하여 carotenoids는 -0.05로 항산화능과의 상관관계가 없었다. Hwang 등<sup>8)</sup>의 연구에 의하면 *Citrus unshiu* Marc.종 감귤의 총 carotenoids 함량은 과피는 7.0 mg%, 과육은 1.5 mg%으로 감귤전체 및 과육에 비하여 과피 내  $\beta$ -carotene의 함량이 월등히 높았고, 또한 동결건조한 감귤전체 분말 1 g에는  $\beta$ -carotene이 8.63  $\mu$ g, 감귤과피에는 41.31  $\mu$ g, 감귤과육에는 1.78  $\mu$ g이 함유되어 있어서<sup>9)</sup> 감귤과피의  $\beta$ -carotene 함유량이 감귤과육에 비하여 높은 것을 알 수 있다. 따라서 감귤과피의 TAS 수준은 실제보다 과소평가 되었을 가능성도 있다.

본 실험에서 측정된 감귤시료의 혈액 중 총 항산화능(TAS)에 영향을 미치는 인자로는 여러 연구에서 밝혀졌듯이 polyphenols, 항산화 비타민 등이 있겠으나, 감귤 내에 함유되어 있는 가용성 물질 중의 하나인 essential oils도 항산화능에 기여할 것으로 사료된다. Kim 등<sup>32)</sup>은 *Citrus unshiu* Marc.의 껍질로부터 정유를 분리하고 분석하였는데 건조 과피 중의 정유 함유량은 1.00~1.16% (w/w)였으며, 이것을 신선물로 보면 신선 과실의 약 0.17~0.20% (w/w)에 해당하는 정유를 얻을 수 있었다고 하며, Joseph 등<sup>33)</sup>은 *Citrus unshiu* Marc.의 과피 내 함유되어 있는 essential oils의 90.3%가 limonene이었으며,  $\gamma$ -terpinene이 4.3%, myrcene이 1.7%,  $\alpha$ -pinene이 0.5%였고, 나머지 essential oil 들은 미량으로 포함되어 있었다고 한다. 또한 Tian 등<sup>34)</sup>은 감귤과피 내의 limonoid가 혈 중 콜레스테롤 수준을 낮춰주며, 항종양 효과를 가진 것으로 보고하고 있다. 아직 감귤 내 함유하고 있는 essential oils와 항산화능에 관한 연구가 많지 않아 감귤과피 내의 essential oils에 대해서도 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 2. 노령흰쥐의 항산화능에 미치는 영향

자유기와 활성산소종은 생체 내에서 끊임없이 만들어지며, 생체 내에서 산화적 손상을 일으킨다. DNA는 산화적 공격에 가장 중요한 대상이며 산화적 손상을 계속적으로 입은 DNA는 대장암, 유방암, 직장암, 전립선암과 같은 노화와 관련된 암의 원인이 된다.<sup>35)</sup>

**Table 3.** Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cellular DNA of kidney tissue of fifteen-month aged Sprague-Dawley rats fed diets containing different mandarin formulation

Groups <sup>1)</sup>	8OHdG/10 <sup>5</sup> dG
C	7.09 $\pm$ 0.89 <sup>2), 3)</sup>
WM	4.48 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>
MPE	3.47 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>
MPU	4.51 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>

1) C: Control diet (Mandarin free diet)

WM: Experimental diet containing 5% whole mandarin powder

MPE: Experimental diet containing 5% mandarin peel powder

MPU: Experimental diet containing 5% mandarin pulp powder

2) Mean  $\pm$  standard Error (n = 12)

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at  $\alpha = 0.05$  by Duncan's multiple range test

Richter<sup>36)</sup>에 의하면 노화가 DNA에 산화적 손상을 증가시키며, 이것은 노화에 따른 활성산소종의 증가, 항산화물질의 감소, 그리고 전사, 번역의 감소 및 DNA 변형의 증가에 따른 것이라고 한다. 한편 Schmerold 등<sup>37)</sup>은 SD 중 수컷 흰쥐의 여러 조직에서 DNA를 추출하여 8OHdG를 분석한 결과, 오직 간과 신장조직에서 만이 8OHdG 수준이 나이에 따라 유의적으로 증가되었고, 5개월과 30개월간의 8OHdG 수준의 증가가 간에서는 1.8배, 신장에서는 3.72배로 나타나 간에서보다 신장에서 차이가 더욱 크게 나타났다고 보고하였다.

본 연구에서 노화에 따른 산화적 손상의 결과물이라 할 수 있는 신장의 8OHdG를 측정된 결과는 Table 3과 같았다. 신장조직의 8OHdG의 함량은 감귤분말 시료를 섭취한 실험군들이 대조군과 비교하여 유의적으로 낮았으며, 유의적이지는 않았지만 실험군들 중에서 감귤과피 섭취군이 가장 낮은 8OHdG 함량을 나타내었다.

Noroozi 등<sup>38)</sup>은 flavonoids와 vitamin C가 DNA 손상을 낮춰준다고 보고하였다. 이들은 human lymphocytes를 flavonoids (luteolin, myricetin, quercetin, kaempferol, quercitrin, quercetin-3-glucoside, apigenin, rutin)와 vitamin C를 처리한 배양액에서 배양시킨 결과, 대조군에 비하여 flavonoids와 vitamin C를 처리한 실험군들 모두가 DNA 손상을 감소시킨 것으로 나타났다. 그 중 감귤과피에 함유되어 있는 것으로 알려진 rutin과 quercetin을 처리한 군은 DNA 손상을 각각 82%, 22% 감소시켰으며, vitamin C를 처리한 군은 DNA 손상을 78% 감소시켰다. 이것으로 보아 감귤과피에 다량 함유되어 있는 flavonoids 및 vitamin C가 DNA 손상을 방지하는데 어느 정도 기여하였을 것으로 생각된다.

Lee 등<sup>39)</sup>이 사람을 대상으로 홍삼 및  $\beta$ -carotene, vitamin E, vitamin C를 4주간 공급한 결과 vitamin E, 홍삼,  $\beta$ -carotene, 그리고 vitamin C 섭취군의 8OHdG 수준이

**Table 4.** Plasma total antioxidant status levels in fifteen-month aged Sprague-Dawley rats fed diets containing different mandarin formulation

Groups <sup>1)</sup>	Total antioxidant status (mmol/L plasma)
C	1.06 ± 0.04 <sup>2),c3)</sup>
WM	1.35 ± 0.06 <sup>2)</sup>
MPE	1.49 ± 0.03 <sup>2)</sup>
MPU	1.25 ± 0.09 <sup>2)</sup>

1) C: Control diet (Mandarin free diet)  
 WM: Experimental diet containing 5% whole mandarin powder  
 MPE: Experimental diet containing 5% mandarin peel powder  
 MPU: Experimental diet containing 5% mandarin pulp powder  
 2) Mean ± standard Error (n = 12)  
 3) Values with different alphabet within the column are significantly different at  $\alpha = 0.05$  by Duncan's multiple range test

각각 33.8%, 31.7%, 19.8%, 그리고 18.1% 감소하였다. 그리고 vitamin E와 홍삼은 이들의 섭취기간이 길어질수록 8OHdG 수준이 감소하는 것이 확연히 나타났다. 본 실험에서 신장의 8OHdG 수준은 대조군에 비하여 감귤전체군이 36.8%, 감귤과피군은 51.1%, 그리고 감귤과육군은 36.4% 감소하였다. 이러한 결과는 여러 연구<sup>28)</sup>에서 혈장 내의 총 carotenoids 수준 및 vitamin C, E 수준이 감귤과피군에서 가장 높았던 것과 일치되는 결과이다.

이러한 각 군별 신장 DNA 손상 결과는 혈장 내의 TAS 수준을 반영하는 것으로 보인다. 즉, 혈장 내의 TAS는 Table 4에서 보는바와 같이 감귤실험군들이 대조군에 비하여 유의적으로 모두 높았으며, 그 중에서 감귤과피군이 가장 높았고 감귤과육군이 낮았다. 또한 동결건조한 감귤시료 (감귤전체, 과피, 과육)를 섭취한 실험동물군들의 혈중 vitamin A, C, E 및 총 carotenoids 수준이 대조군에 비하여 높았으며, 특히 감귤과피군의 혈 중 vitamin A, C 및 총 carotenoids 수준은 대조군에 비하여 유의적으로 높았다.<sup>29)</sup> 이러한 결과로 볼 때, 감귤시료에 함유되어 있는 polyphenols 및 항산화 비타민들이 자유기 및 활성산소종을 소거시키므로써 혈액 내 TAS 수준을 높이고 신장의 산화된 DNA의 수준을 낮춘 것으로 생각된다.

### 요약 및 결론

본 연구에서는 제주산 온주감귤 (*Citrus unshiu* Marc.)의 감귤전체, 과피, 그리고 과육의 동결건조 시료를 준비하여 이들의 총 polyphenols 함량과 TAS를 측정하였다. 또한 생후 15개월령의 노령흰쥐에게 감귤전체 및 과피, 과육 건분을 식이무게의 5% 수준으로 섭취시켜 4주간 사육한 뒤, 신장조직의 8OHdG 수준과 혈중의 TAS를 측정하여 노령흰쥐에 있어서 감귤 식이의 섭취가 체내 항산화능 증진에 효과가 있는지 살펴보고자 하였다.

1) 감귤의 항산화 물질로 알려진 총 polyphenols 함량 및 TAS를 측정한 결과, 이들 모두 감귤 과피분말에서 가장 높게 나타났으며, 감귤전체, 감귤과육 순이었다.

2) 신장의 DNA 손상 정도를 살펴보면, 8OHdG의 함량이 감귤분말 시료를 섭취한 실험군들이 대조군에 비하여 유의적으로 낮았으며, 실험군들 중에서는 큰 차이가 없었으나 감귤 과피 섭취군이 가장 낮은 8OHdG 함량을 나타냈다.

3) 혈장 내의 TAS 수준은 실험군들이 대조군에 비하여 유의적으로 모두 높았으며 실험군들 중에는 그 수준이 가장 높은 감귤과피군과 가장 낮은 감귤과육군 간에 유의적인 차이가 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면, 감귤전체, 감귤과피, 감귤과육의 세가지 감귤시료 중에서 총 polyphenols 및 TAS 모두 감귤과피분말이 가장 높게 나타났으며, 다음으로 감귤전체, 감귤과육 순이었다. 생후 15개월령의 노령 흰쥐에게 세가지 감귤분말 식이를 섭취시켰을 경우, 신장의 DNA 손상이 감소되었고, 혈장 내의 TAS는 증가하였다. 즉, 감귤시료 중 감귤과피분말이 가장 큰 항산화능을 나타내었고, 다음으로 감귤전체, 감귤과육 순이었다. 이러한 결과로 볼 때, 감귤은 활성산소종 및 자유기 등에 의해 발생하는 만성질환을 예방하는데 효과적일 것으로 생각된다. 특히 감귤과피는 기능성 항산화 식품소재로서의 활용가능성이 클 것으로 기대된다.

### Literature cited

- 1) National Agricultural Products Quality Management Service. 「Crop Statistics 2004」, 2005
- 2) Spiegel RP, Goldschmidt EE. Biology of Citrus, Cambridge University Press, Cambridge, UK, p.13, pp.32-33, 39-43, 88-93, 108-109, 1996
- 3) Kang HJ, Chawla SP, Jo C, Kwon JH, Byun MW. Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresource Technology* 97: 614-620, 2006
- 4) Laura B. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Rev* 56(11): 317-333, 1998
- 5) Cha JY, Kim SY, Jeong SJ, Cho YS. Effects of hesperetin and naringenin on lipid concentration in orotic acid treated mice. *Kor J Life Science* 9: 389-394, 1999
- 6) Manthey JA, Grohmann K. Phenols in citrus peel byproducts: concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses, *J Agric Food Chem* 49: 3268, 2001
- 7) Rouseff RL, Martin SF, Youtsey CO. Quantitative survey of naringin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. *J Agric Food Chem* 35: 1027, 1987
- 8) Hwang HJ, Yoon KR. Carotenoid pigment of Citrus fruits cultivated in Korea. *Korean J Food Sci Technol* 27(6): 950-957, 1995
- 9) Kim JH, Kim MK. Effect of different part of mandarin intake on antioxidative capacity in 15-month-old rats. *Korean J Nutrition*

- 36(6) : 559-569, 2003
- 10) Cháfer M, González-Martínez C, Chiralt A, Fito P. Microstructure and vacuum impregnation response of citrus peels. *Food Res International* 36: 35-41, 2003
  - 11) Lota ML, Serra DR, Tomi F, Casanova J. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochemical Systematics Ecology* 29: 77-104, 2001
  - 12) Iman AH, Robin BH, Cheryl R. Citrus peel use is associated with reduced risk of squamous cell carcinoma of the skin. *Nutrition Cancer* 37(20) : 161-168, 2000
  - 13) Giri RK, Parija T, Das BR. d-Limonene chemoprevention of hepatocarcinogenesis in AKR mice: inhibition of c-jun and c-myc. *Oncol Rep* 6: 1123-1127, 1999
  - 14) Yano H, Tatuta M, Iishi H, Baba M, Sakai N. Attenuation by d-limonene of sodium chloride-enhanced gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Int J Cancer* 82: 665-668, 1999
  - 15) Kawamori T, Tanaka T, Hirose M, Mori H. Inhibitory effects of d-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F-344 rats. *Carcinogenesis* 17: 369-372, 1996
  - 16) Ames BN. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radical Res Commun* 7: 121-128, 1989
  - 17) Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 531: 523, 2003
  - 18) Matsuzawa A, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 7: 472-481, 2005
  - 19) Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22: 5834-5847, 2003
  - 20) Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo. *Free Radic Biol Med* 33: 875-885, 2002
  - 21) David JH, Laura AB, Chris AP. Oxidative DNA damage in mouse heart, liver, and lung tissue due to acute side-stream tobacco smoke exposure. *Arch Biochemistry Biophysics* 352(2) : 293-297, 1998
  - 22) Thompson LU, Yoon JH, Jenkins DJ, Wolever TM, Jenkins AL. Relationship between polyphenol intake and blood glucose response of normal and diabetic individuals. *Am J Clin Nutr* 39(5) : 745-751, 1984
  - 23) Official Methods of Analysis. 16th Ed. AOAC international USA, 1995
  - 24) McCusker CA, Fitzgerald SP. Measurement of total antioxidant status in beverages using a rapid automated method. Randox Laboratory Ltd., Ardmore, Diamond road, Crumlin, Co., 1996
  - 25) Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469, 1974
  - 26) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute Nutrition Ad Hoc Weighting Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951, 1993
  - 27) Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN. 8-hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers as oxidative DNA damage. In: *Methods in Enzymology* vol 300 'oxidants and antioxidants part B' ed. Lester packer p156-163, Academic press, 1999
  - 28) Gorinstein S, Martín-Belloso O, Park YS, Haruenkit R, Lojek A, Číž M, Caspi A, Libman I, Trakhtenberg S. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry* 74: 309-315, 2001
  - 29) Li BB, Smith B, Hossain MD. Extraction of phenolics from citrus peels I Solvent extraction method. *Separation Purification Technology* 48: 182-188, 2006
  - 30) Aldini G, Yeum K, Russell R, Krinsky N. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radical Biology Med* 31(9) : 1043-1050, 2001
  - 31) Gardner P, White T, McPhail D, Duthie G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem* 68: 471-474, 2000
  - 32) Kim YK, Hyun SW, Ko YH. Analysis of essential oils from the peel of mandarin (*Citrus unshiu* Marc. Var. Okitsu). *Kor J Food Sci Technol* 31(5) : 1178-1183, 1999
  - 33) Lota ML, Dominique S, Félix T, Casanova J. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochemical Systematics Ecology* 29: 77-104, 2001
  - 34) Tian Q, Miller E, Ahmad H, Tang L, Patil B. Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutr Cancer* 40(2) : 180-184, 2001
  - 35) Halliwell B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutrition studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr* 72: 1082-1087, 2000
  - 36) Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 27(7) : 647-653, 1995
  - 37) Schmerold I, Niedermuller H. Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cellular DNA from 12 tissue of young and old Sprague-Dawley rats. *Experimental Gerontology* 36(8) : 1375-1386, 2001
  - 38) Noroozi M, Angerson W, Lean M. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 67: 1210-1218, 1998
  - 39) Lee BM, Lee SK, Kim HS. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C,  $\beta$ -carotene and red ginseng). *Cancer Lett* 132: 219-227, 1998