

Salmonella typhimurium Strain TA98, 100에서 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물의 돌연변이 억제효과

송현순 · 이현걸 · 강명희*†

한국화학연구소 안정성 연구센터

*한남대학교 식품영양학과

Antimutagenic Effects of Water Extracts of Persimmon Leaf Tea, Green Tea and Oolong Tea on Reversion and Survival of Selected *Salmonella* Tester Strains

Hyun-Soon Song, Hyun-Kul Lee and Myung-Hee Kang*†

Toxicology Research Center, Korea Institute of Chemical Technology, Taejon 305-335, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Han Nam University, Taejon 306-790, Korea

Abstract

Water extracts of persimmon leaf tea(PLTE), green tea(GTE) and oolong tea(OTE), at the concentration used for human consumption, were examined for inhibitory effects on the mutagenicity of major classes of dietary and environmental mutagens including indirect-acting mutagens, B[a]P (benzo[a]pyrene), IQ(2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline), 2-AA(2-aminoanthracene) in the presence of S9 mix and direct-acting mutagen, 4-NQO(4-nitroquinoline-1-oxide) without S9 mix, using the modified Ames *Salmonella*/microsome assay. PLTE, GTE and OTE showed very potent and concentration-dependent antimutagenic effects against indirect-acting mutagens B[a]P and IQ. At the maximum concentration(16,200 μ g/plate) of each tea extract, number of colonies decreased in a dose dependent manner up to 82~100%. Similar inhibition of PLTE, GTE and OTE were seen at higher concentration in the mutagenicity of the 2-AA following an initial increase in the activity at lower concentration. However, the mutagenicity of the direct-acting mutagen 4-NQO were not suppressed at lower concentration of the three tea extracts, and higher concentration of the tea extracts enhanced mutagenic activity of the mutagen. There were no differences in the mode of antimutagenesis between PLTE, GTE, and OTE, in both *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains against the same mutagen. In conclusion, the water extracts of persimmon leaf tea, green tea and oolong tea possess marked antimutagenic potential against a variety of important dietary and environmental indirect-acting mutagens, but the activity was not observed against the direct-acting mutagens. These results suggest that the mode of inhibitory action may not have resulted from direct interaction between tea extracts and the mutagens, but rather from indirect metabolic inactivation of mutagens by tea extracts.

Key words: persimmon leaf tea extract, green tea extract, oolong tea extract, *Salmonella typhimurium*, antimutagenic activity

서 론

일상생활에서 인간은 수많은 물리, 화학적 발암원에 노출되어 살아가고 있으며 역학적으로 관찰해 보면 모든 암의 약 90%가 환경적 요인에 의하여 발생한다(1). 식품 중에도 여러 종류의 돌연변이원성 물질과 발암성 물질이 자연적으로 존재하고 있어 그 중 소량은 일상

의 보통 식이를 통하여 섭취된다. 특히 단백질이나 아미노산이 풍부한 식품인 고기, 생선의 조리과정에서 강력한 돌연변이원성 물질과 발암성 물질로 알려진 많은 heterocyclic amine(HCA)들이 형성되며 다양한 종류가 분리, 동정되어 왔다(2,3). 이들은 체내에서 소화된 후 대사활동에 의하여 변화하여 무해하게 되거나 또는 더욱 유독한 형태로 바뀐다. 발암성 물질이나 돌

* To whom all correspondence should be addressed

연변이원성 물질과 함께 많은 종류의 돌연변이 억제성 물질이나 항암성 물질들도 식품에 자연적으로 존재하고 있으며, 돌연변이원성 물질이 시험계에 가해질 때 그 억제효과를 갖는 화합물도 동시에 식품재료 중에 존재하므로써 자연적으로 함께 섭취하게 된다(4).

역학적으로 녹황색 야채나 과일, whole grain cereal이 암 예방효과를 나타내었고, 차 시료(phenolic compounds)들도 실제로 사람들이 소비하는 농도에서 강한 억제효과를 나타내었으며, 최근에는 사람에게 있어 환경에 의한 돌연변이원성 물질과 발암성 물질에 대한 억제제로서의 차의 가능한 역할에 대하여 관심이 집중되어 역학적 연구와 함께 다양한 연구가 이루어져 왔다.

차(*Camellia sinensis*)는 기호품에 속하는 식품으로서 세계적으로 소비되는 가장 일반적인 음료 중의 하나이다. 원래 후피향목과(厚皮香木科)에 속하는 상록 활엽수의 잎을 지칭하며 그 제조 가공방법에 따라 녹차와 홍차, 우롱차 등으로 나누고 보통 2% 용액(W/V)으로 음용한다. 녹차에는 tannin, caffeine, 비타민 C 등 다양한 혼합물이 함유되어 있으며 해열, 자사, 항산화, 방사선에 대한 보호, 간 독성의 억제능력, 지질 강화 효과 등 여러 가지 약리적, 생리적 효능이 있고(5,6) 또한 돌연변이 억제효과(7-9)와 항암효과(10)도 있다. 그동안 녹차에 대한 연구가 많이 진행되어 온 것에 비해 우롱차에 대한 연구는 비교적 제한되어 있으나 우롱차의 수용성 추출물에 돌연변이 억제 활성이 있음이 보고되고 있다(11,12). 최근에 많이 음용되고 있는 감잎차의 잎에는 비타민 C외에 비타민 A, B₁, D, 엽산, 판토테인산, 엽록소 등과 무기성분이 함유되어 있으며 혈압강하, 지혈 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있고, 동맥경화, 심장병 등의 성인병과 위궤양, 십이지장궤양, 간장병, 당뇨병 등 만성질환에 효과가 있을 뿐아니라 sister chromatid exchange(SCE) 방법에 의한 돌연변이 억제효과가 있음이 보고되고 있어 성인병 예방을 위하여 좋은 식품으로 권장되고 있다(13).

또한 차는 식이의 한 성분으로써 식품의 조리과정에서 생성되는 돌연변이원성 물질들과 함께 섭취하기 쉬우므로 그 생성 가능한 돌연변이 물질들에 대한 차의 억제효과를 평가해 보는 것은 중요한 일이다. 이제까지 여러가지 방법에 의하여 차의 돌연변이 억제효과에 관한 연구들이 이루어져 왔으며 Ames test에 의한 연구들은 다양한 돌연변이 물질에 대한 녹차, 우롱차 및 감잎차의 억제 작용에 관한 연구들이 국외(11,14-19) 혹은 국내(20,21)에서 보고된 바 있다. 국내에서의 연구를 보면 돌연변이 물질을 달리한 녹차, 우롱차 추출물의 돌연변이 억제 작용을 보고한 것(20)과 감잎의 열수

추출물과 tannin의 돌연변이 억제 효과에 관한 연구(21)가 있으나 사람들이 실제로 음용하는 조건으로 추출하여 직접 및 간접 돌연변이 물질 모두를 사용하여 각 차 추출물의 돌연변이 억제효과 및 그 작용기전을 비교한 연구는 이제까지 시도된 바 없다.

따라서 본 연구는 한국산 감잎차, 녹차, 우롱차를 실제로 음용하는 조건에서 추출하였을 때 각 차 종류별로 돌연변이 억제 효과가 얼마나 있는지를 식품의 조리과정 및 환경 오염과정에서 생기기 쉬운 간접 돌연변이 물질들과 직접 돌연변이 물질을 사용하여 비교하고자 하는 목적으로 시도되었다.

재료 및 방법

차 재료 및 차 추출물의 제조

감잎차는 감잎차 100%인 진 식품의 제품(중자차)을, 녹차는 녹차잎 100%인 (주)태평양의 억수 설록차(닦음차), 우롱차도 역시 (주)태평양의 제품을 구입하여 사용하였다. 차의 추출은 일반인의 음용 조건에 맞추어 실시하였다. 즉 각 시료를 20g씩 칭량하여 80°C의 물 120ml로 6분간씩 열수 추출하여 여과지로 흡입 여과시킨 후 0.45μm membrane filter로 제균, 이를 최고농도(16,200 μg/plate)로 3배씩 단계 회석하여 5개 농도를 준비하고 각 plate 당 100μl씩 가하였다.

복귀 돌연변이 시험 및 균주

복귀 돌연변이 시험은 Maron과 Ames의 방법(22)에 준하여 실시하였다. 시험에 사용한 균주 *Salmonella typhimurium* TA100(염기쌍 치환형), TA98(frame shift형)은 Molecular Toxicology Inc.에서 구입하여 형질을 확인한 후 한국화학연구소 안전성센터에서 계대 배양 중인 것을 시험에 사용하였다. 유전형질이 확인된 균주들을 nutrient broth에 접종, 배양하여 혼탁액 1ml당 DMSO를 90μl 가하여 냉동 보관용 시험판에 채워 드라이아이스에서 동결시킨 후 약 -80°C 냉동고(Forma 8317)에 보관하면서 사용하였다. Master plate에 배양한 균주를 25ml의 2.5% nutrient broth에 접종하여 37°C, 200 rpm으로 약 10시간 진탕 배양(K.M.C-8480s, Vision Scientific Co.)한 후 시험에 사용하였다. 필요시 균주의 유전자형 확인을 위해 a) histidine 요구성 여부, b) *uvr B* mutation 유지 여부, c) R-factor 유지 여부, d) *rfa* 돌연변이의 유지 여부, e) spontaneous revertant의 수 등을 확인하는 시험을 실시하였다.

대사활성계(S9 mix)의 조제

간 균질액(S9 fraction)은 Maron과 Ames의 방법(22)에 따라 조제한 것(Lot No. 96-1, 단백질 함량 35.7 mg/ml 함유)을 사용하였다. S9 mix는 상기 S9 fraction과 시판 cofactor(Wako사 309-50611)로 조제하였다. S9 mix 1ml 중의 조성은 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 8 μ mol, KCl 33 μ mol, G-6-P 5 μ mol, NADPH 4 μ mol, NADH 4 μ mol, sodium phosphate buffer(pH7.4) 100 μ mol 및 S9 fraction 45 μ l로 하여 단백질 함량을 1.6mg/ml되게 조제하였다. 처리 농도는 0.5ml/plate로 하였으며, S9 mix의 활성은 B[a]P(benzo[a]pyrene), IQ(2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline) 또는 2-AA(2-aminoanthracene)의 돌연변이 유발로 확인하였다.

양성 대조물질

양성 대조물질로는 직접 또는 간접 돌연변이 물질을 사용하였다. 간접 돌연변이 물질로는 고단백 식품의 조리과정에서 주로 발생되는 polycyclic aromatic hydrocarbon인 B[a]P과 IQ 그리고 주요한 환경성 돌연변이 물질인 2-AA를 사용하였으며, 직접 돌연변이 물질로는 역시 식품의 조리과정에서 발생되는 4-nitroquinoxoline-1-oxide(4-NQO)를 사용하였다. 본 실험에서 사용한 간접 및 직접 돌연변이 물질들은 모두 DMSO에 녹여 B[a]P은 50 μ g/ml, IQ는 80ng/ml 그리고 2-AA는 20 μ g/ml의 농도가 되게 조제하고 4-NQO는 TA98의 경우 4 μ g/ml, TA100의 경우 0.4 μ g/ml의 농도가 되게 조제하였다. 음성 대조물질로는 양성 대조물질의 용매로 사용한 DMSO를 사용하였다.

양성 대조물질의 농도는 다음과 같이 결정하였다. 즉, B[a]P은 TA98과 TA100을 사용해 0, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 μ g/plate로 비교 시험한 결과 적당한 colony수를 나타낸 한 농도(1.25 μ g/plate)를 설정하였고, IQ는 2.0ng/plate, 2-AA는 0.5 μ g/plate로 그리고 4-NQO는 TA98의 경우 0.1 μ g/plate, TA100의 경우 0.01 μ g/plate로 정하였다.

Plate 제작, 배양 및 colony 수 계수

양성 대조물질의 처리는 각 농도군 당 2개 plate를 사용하여 direct plate incorporation 방법(22)으로 하였다. 양성 대조물질 중 간접 돌연변이 물질을 사용할 때는 S9 mix를 처리해 주었다. 고압 증기 멸균한 top agar를 45°C로 유지하면서 예열한 멸균 tube(Falcon #2058)에 2ml씩 분주한 다음 양성 대조물질 용액 25 μ l, tea extract 100 μ l, 균 배양액 100 μ l, S9 mix 500 μ l를, 4-NQO는

S9 mix 대신 멸균 중류수 500 μ l를 혼합하여 즉시 vortex mixer(Scientific Industries)로 2~3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 하여 굳게 하였다. 음성 대조군은 각 중류수 25 μ l, DMSO 25 μ l 그리고 양성 대조군은 B[a]P, IQ, 2-AA 및 4-NQO를 각각 25 μ l씩을 가하여 같은 방법으로 실시하였다.

생균수 측정실험을 위해서는 각 성분을 모두 혼합한 각 농도별 tube에서 5 μ l씩 취하여(500,000마리가 있을 것으로 추정) 중류수로 몇 단계 희석한 후 100 μ l를 취하여(500마리/plate) top agar 2ml를 가하고 질 혼합하여 nutrient broth agar plate에 부어 굳게 하였다. Top agar가 굳으면 plate를 뒤집어 37°C에서 약 48시간 배양(37°C incubator, Vision Scientific Co. Ltd)한 후 colony 수를 계수하였다. 차 추출물의 자체 독성을 보기 위하여는 돌연변이 물질을 제외한 각 농도별 tea extract 100 μ l, 균 배양액 100 μ l 그리고 S9 mix 500 μ l를 혼합하여 같은 방법으로 실험하였다.

결과의 표시, 판정 및 예비실험

시험결과는 각 농도군 당 2 plate로부터 얻은 colony 수의 평균으로 나타내었다. Colony 계수시 각 plate의 background lawn의 형성 여부를 검사하였으며, 오염 혹은 기타 이상의 발생여부를 점검하였다. 복귀 돌연변이 colony수가 농도의존성을 보이면서 양성 대조군보다 1/2 이상 감소할 때 차 추출물이 시험물질의 독성에 대하여 감소효과가 있는 것으로 판단하였다.

본 실험에 앞서, 차 추출물들 자체의 돌연변이원성과 자체 독성을 검증하기 위하여 예비 확인 시험을 실시하였다. 먼저 돌연변이원성을 검사해 본 결과 TA98 및 TA100에서 차 추출물 자체의 농도 증가에 따른 돌연변이 colony 수의 변화는 볼 수 없었으며, 중류수와 각 차 추출물 농도별로 생성된 colony 수가 비슷하게 나타났다(Table 1). 차 추출물 자체의 세포에 대한 독성을 보기 위하여 차 추출물 농도별로 생균수 측정 실험을 한 결과, 같은 차 추출물 내에서 농도 증가에 따른 생균수의 감소는 보이지 않았다(자료미제시). 예비실험 결과로부터 세 가지 차 추출물 자체에는 돌연변이원성과 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.

결과 및 고찰

한국산 감잎차, 녹차 및 우롱차의 각 돌연변이 물질에 대한 억제 효과를 본 결과, polycyclic aromatic hydrocarbon인 B[a]P에 의한 reversion colony 생성 수는 세

Table 1. Mutagenicity test of persimmon leaf tea extract(PLTE), green tea extract(GTE), oolong tea extract(OTE) using *Salmonella typhimurium* tester strains

Dose of tea extracts ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Strain					
	His ^r revertants/plate ¹⁾			TA 100		
	GTE	OTE	PLTE	GTE	OTE	PLTE
200	40	31	45	161	200	203
600	32	33	41	179	188	186
1800	32	26	33	165	198	217
5400	26	31	34	185	148	176
16200	33	35	35	191	180	205
D.W. ²⁾	32	29	37	148	186	187

¹⁾Data are means of 2 plates.

²⁾Negative control: 0.1ml/plate

종류 차 추출물 모두 TA98에서 추출물을 최저로 첨가한 농도($200\mu\text{g}/\text{plate}$)에서도 B[a]P만 첨가한 양성 대조군에 비하여 50% 정도 감소하기 시작하여 $5,400\mu\text{g}/\text{plate}$ 첨가시 GTE와 OTE는 100%, PLTE는 93% 감소하다가 최고 농도인 $16,200\mu\text{g}/\text{plate}$ 첨가시 모두 100% 감소하였다. TA100에서도 최저로 첨가한 농도($200\mu\text{g}/\text{plate}$)에서부터 차 농도가 높아짐에 따라 농도의존적인 감소를 보이다가 $5,400\mu\text{g}/\text{plate}$ 첨가시 GTE와 OTE는 97~98% 그리고 PLTE는 79% 감소하였고 $16,200\mu\text{g}/\text{plate}$ 첨가시는 세 가지 차 추출물 모두 97~99% 감소하였다 (Fig. 1). Heterocyclic amine인 IQ에 의한 reversion

colony 생성 수는 세 종류의 차 추출물 모두 최저로 첨가한 농도($200\mu\text{g}/\text{plate}$)에서부터 차 추출물 농도에 따라서서히 농도의존적 감소를 보이다가 TA 98에서 OTE는 $5,400\mu\text{g}/\text{plate}$, PLTE와 GTE는 $16,200\mu\text{g}/\text{plate}$ 첨가시 GTE는 82%, OTE는 94%, PLTE는 100%의 감소 효과를 나타내었으며 (Fig. 2), PLTE는 GTE나 OTE에 비하여 더 고농도로 첨가되었을 때 억제 효과를 나타내었다. 간접 돌연변이 물질인 B[a]P과 IQ에 의한 reversion colony 생성 수는 각 차 추출물들의 첨가 농도 증가에 따라 TA98과 TA100에서 농도의존적인 colony 수의 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 Chen과 Yen (14) 및 Yen과 Chen(17)이 간접 돌연변이 물질을 이용하여 녹차, 우롱차 등을 대상으로 행한 실험에서 돌연변이 억제 효과가 있었던 것과 잘 일치함을 보였다.

2-AA에 의해 생성된 reversion colony 수는 TA98에서 세 가지 차 추출물 모두 $1,800\mu\text{g}/\text{plate}$ 첨가시까지는 차 추출물을 넣지 않은 대조군보다 증가하다가 GTE와 OTE는 $5,400\mu\text{g}/\text{plate}$ 첨가 농도에서 colony 수가 감소하였다. PLTE는 $16,200\mu\text{g}/\text{plate}$ 첨가시 급격히 감소하였고 이 농도에서는 세 가지 차 모두 colony 수가 97~99%나 감소하였으며 TA100에서도 비슷한 경향을 볼 수 있었다 (Fig. 3). 이와 같이 저농도 첨가시에는 reversion colony 생성수가 오히려 증가하여 차 추출물 중의 어떤 성분들이 오히려 co-mutagenic하게 작용하였고, 고농도 첨가시에는 세 가지 차 추출물 모두 TA98

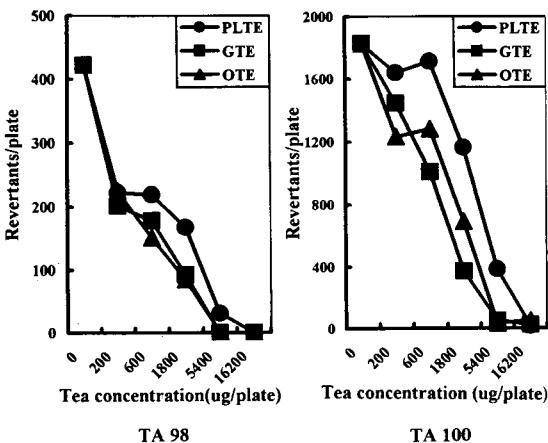


Fig. 1. Suppression effect of PLTE (persimmon leaf tea extract), GTE(green tea extract) and OTE(oolong tea extract) on the reverse mutation induced by B[a]P in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

Values were calculated by subtracting the revertant number of the negative control from those of tea extracts.

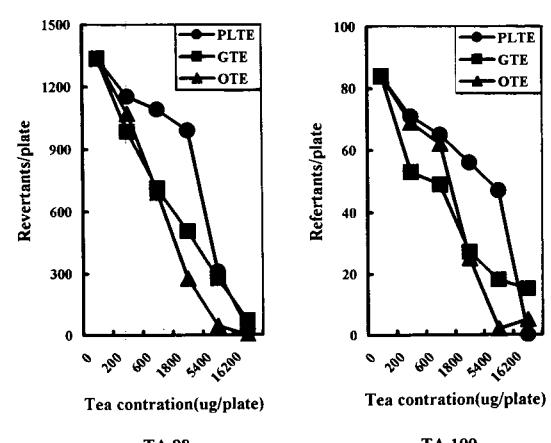
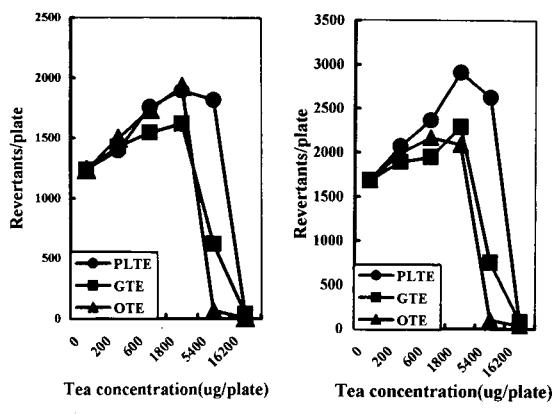


Fig. 2. Suppression effect of PLTE(persimmon leaf tea extract), GTE(green tea extract) and OTE(oolong tea extract) on the reverse mutation induced by IQ(2-amino-3-methyl imidazo[4,5-f]quinoxaline) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

Values were calculated by subtracting the revertant number of negative control from those of tea extracts.



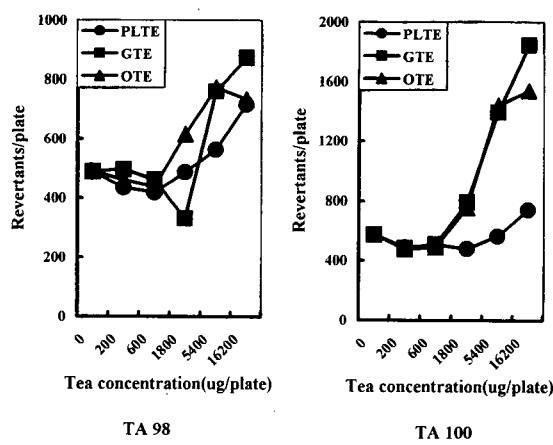
TA 98

TA 100

Fig. 3. Suppression effect of PLTE(persimmon leaf tea extract), GTE(green tea extract) and OTE(oo-long tea extract) on the reverse mutation induced by 2-AA(2-aminoanthracene) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.
Values were calculated by subtracting the revertant number of negative control from those of tea extracts.

과 TA100의 colony 수를 95~99% 감소시키어 강한 돌연변이 억제효과가 있음을 보였다. 이와같은 결과는 Stavric 등(16)이 간접 돌연변이 물질인 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3b]indole(Trp-p-2)과 2-amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5-f]quinoxaline(4,7,8-TriMeIQx)에 대한 녹차와 우롱차의 돌연변이 억제효과를 본 결과, 저농도의 차 추출물 첨가시 돌연변이 효과를 더 강화시켰으나 역시 간접 돌연변이 물질인 8종의 heterocyclic aromatic amine류에 대하여 고농도의 차 추출물들의 첨가로 강한 돌연변이 억제력을 나타내었다는 결과와 잘 일치하였다.

그러나 직접 돌연변이 물질인 4-NQO에 의한 reversion colony 생성수는 TA98과 TA100 모두에서 차 추출물을 낮은 농도로 첨가시 크게 변화가 없었고, 첨가 농도가 높아질수록 오히려 colony 수가 증가하였다 (Fig. 4). 차 추출물을 낮은 농도로 첨가시 colony 생성 수의 변화가 없었던 결과는 Kuroda(23)가 녹차 catechin의 돌연변이 억제효과를 알아보기 위해 배양된 Chinese hamster V79 cell에서 4-NQO를 이용하여 본 결과 4-NQO와 catechin을 동시에 처리하였을 때는 돌연변이 억제효과가 없었다고 보고한 것과 부분적으로 일치하였다. 그러나 차 추출물을 고농도로 첨가시 4-NQO에 의한 colony 생성수가 증가하여 오히려 co-mutagenic하게 작용한 것은 다른 간접 돌연변이 물질에 의한 작용과 달랐으며 이에 관해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다고 본다. Yamada와 Tomita(12)는 홍차와 우롱차를 저농도(500, 1,000ug/plate)로 첨가하



TA 98

TA 100

Fig. 4. Suppression effect of PLTE(persimmon leaf tea extract), GTE(green tea extract) and OTE(oo-long tea extract) on the reverse mutation induced by 4-NQO(4-nitroquinoline-1-oxide) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.
Values were calculated by subtracting the revertant number of negative control from those of tea extracts.

였을 때 직접 돌연변이 물질인 4-NQO에 의하여 생성된 colony 수를 약 30% 정도 감소시켰다고 보고하였으나 그 이상의 농도에서는 실험하지 않았으므로 본 실험 결과와 비교하기는 어려웠다.

차 추출물이 돌연변이 억제효과를 나타내는 양상은 각 차류에 함유되어 있는 물질의 함량에 따라, 또는 돌연변이 물질의 종류나 균주에 따라 다르다(19). 이와같은 돌연변이 억제효과가 추출물 중 어느 성분에 기인하는가에 관하여는 성분별 돌연변이 억제효과를 본 것이 아니므로 자세히 알 수 없으나 그동안의 선행 연구들을 통해 볼 때 각 차에 함유되어 있는 물질인 catechin, tannin, 기타 phenolic compounds 및 ascorbic acid와 같은 수용성 물질, 그리고 beta-carotene, tocopherol 등 항산화력을 가진 지용성 물질의 함량과 관계 있는 것으로 생각된다. 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물의 경우, 돌연변이 억제효과 양상이 각 차 종류에 따라 큰 차이를 보이지 않아 같은 돌연변이 물질에 대하여는 감잎차, 녹차, 우롱차 모두 비슷한 경향을 보였으며, TA98과 TA100 등 균주에 따른 차이도 볼 수 없었으나 돌연변이 물질에 따라서는 많은 차이를 보였다. 즉 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물이 돌연변이 억제효과를 나타내는 양상은 각 차의 함유물질의 종류나 균주보다는 실험에 사용한 돌연변이 물질의 종류에 따라 더 큰 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

화학적 돌연변이 물질은 그 성질에 따라 두 가지로 분류되는데, 그 하나는 대사 활성화 과정을 거친 후 그 대사산물이 돌연변이를 유발하는 간접 돌연변이 물질

로 B[a]P, IQ와 2-AA 등이 이에 해당되고, 다른 하나는 물질 그 자체로서 돌연변이를 유발하는 직접 돌연변이 물질로 4-NQO가 이에 해당된다. 차의 돌연변이 억제효과를 보기 위하여 그동안 다른 연구자들이 사용하여 온 간접 돌연변이 물질로는 단백질 식품의 조리과정 중 발생되는 돌연변이 물질인 polycyclic aromatic hydrocarbon인 B[a]P, heterocyclic amine인 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b] pyridine(PHIP), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline(MeIQx), 2-amino-3-methyl imidazo[4,5-f]quinoline(IQ), 2-amino-6-methyl-dipyrido[1,2-a:3',2'-d] imidazole(Glu-P-1), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b] indole (Trp-P-1)과 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b] indole(Trp-p-2) 등이 있으며, 조리과정 중 발생하는 돌연변이 물질은 아니나 환경성 돌연변이 물질인 2-AA 가 있다(17,18). 직접 돌연변이 물질은 많이 사용되지 않고 있으나 식품의 조리과정 중 발생하는 물질인 4-NQO와 N-methyl-N'-nitro-N-nitro-guanidine(MN-NG) 등이 사용되어 왔다.

본 연구 결과, 간접 돌연변이 물질인 B[a]P과 IQ에 대하여는 농도 의존적으로, 그리고 2-AA에 대하여는 고농도로 첨가되었을 때 그 돌연변이력을 거의 완전히 소멸시키는 탁월한 억제효과를 보여 주었다. 그러나 직접 돌연변이 물질인 4-NQO에 대해서는 차 추출물의 돌연변이 억제 효과를 볼 수 없었다. 이는 세 가지 차 추출물의 경우, 차 추출물 중의 어떤 성분이 직접 돌연변이 물질과 결합하여 돌연변이 억제 작용을 보였기보다는 돌연변이 물질의 대사 활성화 과정을 저해함으로써 돌연변이 억제효과를 보인 것으로 여겨진다.

차 추출물의 돌연변이 억제 효과 기전에 대해서는 아직 확실히 밝혀지지 않고 있다. Kada(24)은 차 추출물 중 어떤 성분이 유전자 공격 전 단계에서 화학 물질이나 효소와 상호작용하여 promutagen을 불활성화시키는 작용, 즉 cytochrome P-450의 대사 과정을 차단하여 B[a]P이나 IQ 등이 mutagenic metabolite form으로 되는 것을 막아 주는 작용을 하며 이를 "desmutagen"이라고 부를 것을 제안하였다. Bu-Abbas 등(15)은 polycyclic aromatic hydrocarbon류와 heterocyclic amine과 같은 mutagen들이 선택적으로 체내 cytochrome P-450에 의해 활성화되는데, 녹차 추출물이 cytochrome P-450의 활성을 저해한 것을 관찰하여 이 기전의 가능성을 확인하였으며, Sasaki 등(25)도 녹차 추출물을 S9 mix 존재하에 B[a]P 및 MMC와 동시 처리하였을 때 나타난 돌연변이 억제효과가 녹차 추출물들의 desmutagenic activity에 의한 것일 가능성을 언급하였다. 본

연구에서 cytochrome P450를 측정하지는 않았지만 polycyclic aromatic hydrocarbons인 B[a]P와 heterocyclic amine인 IQ로 인한 돌연변이 활성이 S9 mix와 함께 처리한 세 가지 차 추출물들에 의해 억제되는 효과가 나타난 것은 promutagen의 대사적 활성화를 차 추출물이 방해한 결과에 기인한 것으로 생각된다.

차 추출물의 돌연변이 억제 효과에 대한 다른 기전으로 차 추출물 중의 어떤 성분이 bio-antimutagen으로 작용하여 돌연변이 물질에 의하여 유전자가 공격을 받은 후에 돌연변이가 고정되는 단계를 막아주기 때문일 가능성도 제시되고 있다(7,24). 먼저 mutagen을 처리한 후 차 추출물을 후처리 방식으로 처리하였을 때 돌연변이 억제효과가 나타나면 이 성분은 bio-antimutagen으로 작용한 결과라고 볼 수 있을 것이다(18). 본 연구에서는 차 추출물과 mutagen을 동시에 처리하는 방식으로 실험하였으나, 직접 돌연변이 물질인 4-NQO에 의해서는 차 추출물의 돌연변이 억제효과가 나타나지 않았으므로 차 추출물의 돌연변이 억제효과가 이 기전에 의한 것이라고 생각하기는 어려웠다.

직접 돌연변이 물질을 사용하였을 경우 차 추출물이 오히려 co-mutagenic하게 작용한 것에 비해, 간접 돌연변이 물질을 사용하였을 때에는 세 가지 차 추출물 모두 돌연변이 억제작용이 강하게 나타난 것으로 보아 본 실험에서 사용한 세 가지 차 추출물은 돌연변이 물질과 직접 결합하여 돌연변이를 억제한다기보다는 각 차 추출물들이 돌연변이 물질의 체내 활성화 대사과정을 억제하는 desmutagen으로 작용했던 것으로 보여진다. 그러나 이를 확인하기 위해서는 앞으로 cytochrome P-450의 대사 과정이나 세포내 효소활성의 변화까지를 추적하는 연구가 요구된다. Bu-Abbas 등(15)은 녹차 열수 추출물의 돌연변이 억제효과를 간접 돌연변이 물질과 직접 돌연변이 물질들을 사용하여 실험해 본 결과, 모두에게서 돌연변이 억제 효과를 볼 수 있어 녹차의 경우는 위의 두 가지 기전이 모두 작용함을 확인하여 본 연구에서와 다소 다른 결과를 보고하였다. 앞으로 본 실험에서 사용한 한국산 세 가지 차 추출물의 자세한 돌연변이 억제 기전에 대해서는 세포내 각 효소들의 활성 연구를 포함한 더욱 깊은 연구가 필요하다고 본다.

요 약

실제 음용 조건으로 추출한 한국산 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물의 돌연변이 억제효과를 보기 위하여 간접 돌연변이 물질로 polycyclic aromatic hydrocarbon인

B[a]P, heterocyclic amine인 IQ, aromatic amine인 2-AA, 그리고 직접 돌연변이 물질인 4-NQO에 대하여 *Salmonella/microsome assay*를 응용하여 실험하였다. 실험 결과, 음용하는 조건으로 추출한 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물에는 간접 돌연변이 물질에 의한 colony 생성에 미치는 돌연변이 억제 효과가 탁월함을 볼 수 있었다. 간접 돌연변이 물질 중 B[a]P이나 IQ의 경우는 차 추출물의 농도 증가에 따라 돌연변이 물질에 대하여 농도 의존적으로 colony 생성을 억제시키었으나 2-AA의 경우는 저농도 첨가시 co-mutagenic하게 작용하여 colony 수를 증가시키다가 고농도 첨가시 colony 생성을 억제시킴을 보였다. 이와는 달리 직접 돌연변이 물질인 4-NQO의 경우는 저농도 첨가시에는 큰 변화가 없다가 고농도 첨가시 colony 생성을 더 증가시키는 결과를 보였다. 돌연변이 억제효과의 작용 양상을 보면, 각 차 추출물에 따른 차이는 크게 볼 수 없었으며 TA98과 TA100 등 균주에 따른 경향의 차이도 볼 수 없었으나 돌연변이 물질의 종류에 따라서는 많은 차이를 보였다. 본 실험 결과 실제 음용하는 조건으로 추출한 한국산 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물이 간접 돌연변이 물질들에 대하여 억제효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 직접 돌연변이 물질에 대해서는 억제효과를 볼 수 없었다. 이 결과로부터 본 연구에서 사용한 차 추출물의 돌연변이 억제효과 기전은 각 차 추출물들이 돌연변이 물질과 직접 결합하여 돌연변이를 억제한다기보다는 돌연변이 물질의 체내 활성화 대사과정을 억제하는 물질로 작용하는 것으로 생각되었다.

문 현

- Weinstein, I. B. : The origins of human cancer: Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. Twenty seventh G.H.A. clowes memorial award lecture. *Cancer Res.*, **48**, 4135-4143(1988)
- Becher, G., Kniize, M. G., Nes, I. F. and Felton, J. S. : Isolation and identification of mutagens from a fried Norwegian meat product. *Carcinogenesis*, **9**, 247-253 (1988)
- Adamson, R. H., Gustafsson, J. A., Ito, N., Nagao, M., Sugimura, J., Wakabayashi, K. and Yamazoe, Y. : Heterocyclic amines in cooked foods. Proceedings of the 23rd International symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Princeton Scientific Publication Co., Princeton, N. J. P.(1995)
- Kada, T., Morita, K. and Inoue, T. : Antimutagenic action of vegetable factors on the mutagenicity of the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Res.*, **53**, 351-353(1978)
- Lin, Y. L., Cheng, C. Y., Lin, Y. P., Lau, Y. W., Juan,

- I. M. and Lin, J. K. : Hypolipidemic effect of green tea leaves through induction of antioxidant and phase II enzymes including superoxide dismutase, catalase, and glutathione s-transferase in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1893-1899(1998)
- Bokuchava, M. A. and Skobeleva, N. I. : The biochemistry and technology of tea manufacture. *CRC Crit Rev. Food Sci. Nutr.*, **12**, 303-370(1980)
- Lee, I. P., Kim, Y. H., Kang, M. H., Roberts, C., Shim, J. S. and Roh, J. K. : Chemopreventive effect of green tea(*Camellia sinensis*) against cigarette smoke-induced mutations(SCE) in humans. *J. Cell Biochem Suppl.*, **27**, 68-75(1997)
- Wang, Z. Y., Cheng, S. J., Zhou, Z. C., Athur, M., Khan, W. A., Bickers, D. R. and Mukhtar, H. : Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutation Res.*, **223**, 273-285(1989)
- Yen, G. C. and Chen, H. Y. : Comparison of antimutagenic effect of various tea extracts(green, oolong, pu-erh and black tea). *J. Food Pro.*, **57**, 54-58(1994)
- Katiyar, S. K., Agarwal, R., Zaim, M. T. and Mukhtar, H. : Protection against *N*-nitrosodiethylamine and benzo[a]pyrene-induced forestomach and lung tumorigenesis in A/J mice by green tea. *Carcinogenesis*, **14**, 849-855(1993)
- Apostolides, Z. and Weisburger, J. H. : Screening of tea clones for inhibition of PhIP mutagenicity. *Mutation Res.*, **326**, 219-225(1995)
- Yamada, J. and Tomita, Y. : Antimutagenic activity of water extracts of black tea and oolong tea. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2197-2200(1994)
- Song, H. S., Lee, H. K., Jang, H. D., Kim, J. I., Park, O. J., Lee, M. S. and Kang, M. H. : Antimutagenic effects of persimmon leaf tea extracts in sister chromatid exchange(SCE) assay system. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **25**, 232-239(1996)
- Chen, H. Y. and Yen, G. C. : Possible mechanisms of antimutagens by various teas as judged by their effects on mutagenesis by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and benzo[a]pyrene. *Mutation Res.*, **393**, 115-122(1997)
- Bu-Abbas, A., Nunez, X., Clifford, M. N., Walker, R. and Ioannides, C. : A comparison of the antimutagenic potential of green, black and decaffeinated teas: contribution of flavonols to the antimutagenic effect. *Mutagenesis*, **11**, 597-603(1996)
- Stavric, B., Matula, T. I., Klassen, R. and Downie, R. H. : The effect of teas on the *in vitro* mutagenic potential of heterocyclic aromatic amines. *Food Chem. Toxicol.*, **34**, 515-523(1996)
- Yen, G. C. and Chen, H. Y. : Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agr. Food Chem.*, **43**, 27-32(1995)
- Kada, T. K., Kaneko, S., Matsuzaki, T. M. and Hara, Y. : Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens : A case of green tea factor. *Mutation Res.*, **150**, 127-132(1985)
- Yen, G. C. and Chen, H. Y. : Relationship between antimutagenic activity and major components of various teas. *Mutagenesis*, **11**, 37-41(1996)

20. Yeo, S. G., Kim, I. S., Ahn, C. W., Kim, S. B. and Park, Y. H. : Desmutagenicity of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 160-168(1995)
21. Moon, S. H. and Park, K. Y. : Antimutagenic effects of boiled water extract and tannin from persimmon leaves. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 880-886(1995)
22. Maron, D. M. and Ames, B. N. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**, 173-215(1983)
23. Kuroda, Y. : Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells. *Mutation Res.*, **361**, 179-186(1996)
24. Kada, T. : Mechanisms and genetic implications of environmental antimutagens. In "Environmental mutagens and carcinogens" Sugimura, T., Kondo, S. and Takebe, H.(eds.), Univ. of Tokyo Press, Tokyo and Loss, New York, pp.355-359(1982)
25. Sasaki, Y. F., Yamada, H., Shimoi, K., Kator, K. and Kinae, N. : The clastogen-suppressing effects of green tea, Po-lei tea and Rooibos tea in CHO cells and mice. *Mutation Res.*, **286**, 221-232(1993)

(1999년 2월 20일 접수)