

녹차 추출물의 항돌연변이원성

오창경 · 오명철 · 김수현*

제주산업정보대학 관광호텔조리계열, *제주대학교 식품공학과

Desmutagenic Effects of Extracts from Green Tea

Chang-Kyung Oh, Myung-Cheol Oh and Soo-Hyun Kim*

Division of Tourism Hotel Culinary Art, Cheju College of Technology, Cheju, 690-714, Korea

*Department of food science and Engineering, Cheju national University, Cheju 690-756, Korea

Abstract

Desmutagenic effects of water-soluble and ethanol-soluble extracts of dried green tea toward the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide(4-NQO) and 3-Amino-1,4- dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-1) in streptomycin-dependent SD510 strains of *Salmonella typhimurium* TA98 were investigated. Inhibition effects toward the mutagenicity of 4-NQO and Trp-P-1 of water-soluble and ethanol-soluble extracts from green tea were high as increase of concentration of extracts. Desmutagenic effects toward 4-NQO of water-soluble and ethanol-soluble extracts from green tea harvested in May and August were up to 93% in 1,000 µg of extract/plate. Desmutagenic effects toward Trp-P-1 of ethanol-soluble extracts from green tea were 53.3~92.1%, but the effects of water-soluble extracts decreased as increase of concentration of extracts.

Key words: Desmutagenic effect, 4-NQO, Trp-P-1, green tea, SD510

I. 서 론

식품의 가공, 저장 또는 조리과정 중에 식품성분 상호간의 반응에 의해서 많은 발암 또는 변이원성 물질들이 생성되고 있는데 그 중 가장 대표적인 것이 nitroso 화합물과 heterocyclic amine이다. 이들 화합물들은 저 농도에서 발암을 일으키는 것으로 알려지고 있다¹⁾. 한편 역학자료에 의하면 과실류와 녹황색 채소를 매일 섭취할 경우 일부 암에 노출되는 비율이 감소되고 또한 이들 식품에서 유래되는 인자들에 의해 발암물질 생성을 저해하는 것으로 알려지고 있다²⁾.

항변이원성 물질이 함유되어 있는 것으로 알려지고 있는 식품 중에서 녹차에 관심을 갖게 된 것은 1980년 중반 이후이다. 최근 일본과 중국에서 녹차 물추출물의 항변이 원성, 항종양 및 항암효과³⁻⁷⁾ 뿐만 아니라 녹차의 폴리페놀 성분에 의한 항균, 항바이러스, 항염증, 혈청콜레스테롤 저하작용, 혈압저하 및 혈소판응집작용, 중금속 제거 작용, 항산화 작용 등⁸⁻¹⁴⁾에 대한 많은 효과가 밝혀지고 있다.

녹차는 삼국시대 말기 중국으로부터 불교문화의 도입과 함께 전파되었다. 주로 잎을 사용하는데 중국에서는

보통 옮겨 심은지 3년 정도 지난 후 채엽된 신선한 잎을 고온 가열해서 잎 속의 산화효소 작용을 방지한 후 비벼서 부드럽게 하고 건조, 정제 등의 가공을 통해 녹차를 만든다¹⁵⁾. 녹차의 주성분은 caffeine, catechin, vitamin, essential oil 등이 알려져 있다. Caffeine은 중추신경계, 심장, 신장에 작용해서 신경흥분, 강심, 이뇨작용을 나타낸다¹⁶⁾. Catechin은 차의 주요 생리활성물질로 작용하며 이중 함량이 많은 epigallocatechin gallate (EGCG) 및 epicatechin gallate(ECG)는 떫은맛이 강하고 단백질과의 결합을 지표로 할 때 활성치가 크다. 이들 성분들은 품종, 기온, 일조량 등에 따라 차이가 있어 여름철에 채취한 녹차에서 함량이 높다고 알려지고 있다^{16,17)}.

녹차는 커피, 코코아와 함께 3대 비알코올성 기호음료로서 소비가 점차 증대되고 있으며, 현재 녹차에 대한 여러 가지 기능이 과학적으로 규명됨에 따라 기능성 식품으로서 그 가치가 재평가되고 있다¹⁷⁾.

따라서 본 연구에서는 *Salmonella typhimurium* TA98의 streptomycin 의존성 SD510 균주를 사용하여 차 잎의 채취시기에 따른 녹차의 항변이원성을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 재료는 제주도 남제주군 장원산에 식재되어 있는 차나무(*Thea sinensis*)에서 5월과 8월 순을 채엽한 것을 즉시 건조시킨 후 분쇄기로 분말화하여 사용하였다.

2. 시료의 조제

분말화된 녹차는 증류수 및 에탄올로 추출하였다. 즉 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 환저플라스크에 분말 건조차 25 g에 증류수와 에탄올 각각을 500 ml씩을 넣고 증류수 추출은 녹차를 우려 마시는 상용적인 온도인 80°C에서 5분, 그리고 에탄올 추출은 40°C에서 3시간동안 추출하여 얻은 액을 5,000 rpm으로 원심분리하고 상등액을 GF/C 여지로 여과한 후 동결 건조시켜 검색용 시료로 사용하였다.

3. 지표균주

실험에 사용한 균주는 *Salmonella typhimurium* TA98 균주의 streptomycin 의존성 SD510 균주로서, 변이원성의 판정은 streptomycin 의존성에서 비의존성 균주로의 변환 유무에 따라 판정하였다.

4. 시험배지

1) Oxoid(OX) 액체배지

pH 7.0으로 조정된 2.5% nutrient broth를 autoclave (121°C, 20분)로 멸균처리 하였다. 이 배지를 기초배지로 해서 OX-SM20 액체배지를 조제하였다.

2) OX 한천배지

pH를 조절한 OX 액체배지에 한천 1.5%를 첨가하고, autoclave로 멸균처리 하였다.

3) OX-SM20 액체배지

멸균한 OX 액체배지에 streptomycin 20 µg/ml를 가하였다.

4) OX-SM20 한천배지

멸균을 행한 후, 응고하기 전에 OX 한천배지에 streptomycin 20 µg/ml를 가하였다.

5. Conformation test

시험하기 약 16시간 전에 OX-SM20 액체배지에서 미리 배양한 SD510 균주 배양액을 10²~10⁷이 되도록 인산 완충용액에 희석시킨 후, OX 한천배지에 10²~10⁵ 희석액을, OX-SM20 한천배지 10⁴~10⁷ 희석액을 각각 도말하여 36°C에 48시간 배양하였다. 배양한 후 각

plate의 colony수를 계수하였다. 동시에 희석률에 따른 OX-한천배지와 OX-SM20 한천배지의 colony수가 10³이상 차이가 나고, 또한 자연복귀의 확률이 10³이하의 것이 streptomycin 의존성을 유지하는지를 확인하여 실험에 이용하였다.

6. 돌연변이원성 물질

변이원성 물질인 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-1, Wako, Japan)은 증류수에, 4-nitroquinoline-N-oxide(4-NQO, Sigma, USA)는 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해시켜 사용하였다.

7. Streptomycin 의존성 SD510 균주를 사용한 항변이원성 시험

16시간 배양시킨 SD510 균주를 멸균수로 10³배 희석한 희석액 100 µl와 시료 추출물 및 변이원 물질을 각각 100 µl씩 가해 가볍게 교반한 후 OX-한천배지에 도말하고 Maron과 Ames¹⁸⁾의 표준평판배지법에 따라 36°C에서 48시간 배양하여 revertant colony수를 측정하였다. Trp-P-1에 대한 음성 대조구로는 멸균 증류수를, 4-NQO에 대한 음성 대조구로는 DMSO를 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 4-NQO에 대한 녹차의 항돌연변이 활성

Streptomycin 의존성 SD510균주를 이용하여 5월과 8월 순을 채취한 녹차 잎의 수용성 추출물과 알코올 용해

Table 1. Desmutagenic effects of water-soluble and ethanol-soluble extracts from dried green tea toward the mutagenicity of 4-NQO in streptomycin-dependent SD510 strains of *Salmonella typhimurium* TA98

Treatment	Amount of extract(µg/plate)	Revertants/plate	
		May	Aug.
Positive		1615±82	
4NQO +	10	1010±148(-37.4)	735±27(-54.4)
Distilled	100	464±28(-71.2)	406±16(-74.8)
water	1000	114±20(-92.9)	81±5(-95.0)
4NQO +	10	663±51(-62.0)	440±96(-72.7)
Ethanol	100	344±11(-82.0)	239±65(-85.2)
	1000	93±7(-94.2)	53±7(-96.7)

4NQO (4-nitroquinoline-N-oxide) : 0.05 µg per plate.

Spontaneous revertants are subtracted.

The values in parentheses are the inhibition rate(%).

Inhibition rate(%) =

$$\frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertant of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

(), inhibition percentage.

성 추출물이 4-NQO와 Trp-P-1에 의해 유도된 돌연변이의 억제효과를 검토하였다. 녹차 추출물의 농도는 시판 녹차 음료의 고형분 함량과 동물실험에 사용된 양을 기준으로 하여 10~1000 µg/plate 범위로 정하였다. 녹차 추출물이 4-NQO에 의해 유도된 변이원성을 억제하는 효과를 시험한 결과는 Table 1에 나타내었다. 녹차의 수용성 추출물은 투여농도를 증가시킬수록 4-NQO에 의해 유도되는 변이원성을 억제하는 효과가 높았다. 특히, 억제 효과는 추출물을 1,000 µg/plate 투여했을 때 5월 순 녹차에서 93%, 8월 순 녹차에서 95%로 아주 높은 활성을 보였다. 에탄올 추출물도 투여농도가 증가할수록 항변이 활성이 높아, 1000 µg/plate 투여했을 때 94% 이상의 억제하는 효과를 보였다. 채취시기에 따른 녹차 추출물의 항변이 효과는 5월에 채취한 것보다 8월에 채취한 것이 약간 높았으며, 에탄올 용해성 추출물이 수용성 추출물보다 더 높은 활성을 보였다.

2. Trp-P-1에 대한 녹차의 항돌연변이 활성

Trp-P-1은 육류 및 어류의 근육 내 creatinine, 아미노산류, 당 등이 조리과정 중에 열분해 또는 불완전 연소에 의해 생성되는 heterocyclic amine의 일종인 tryptophan 열분해산물로서 주로 간암을 일으키는 물질로 알려져 있다¹⁾.

녹차의 수용성 추출물과 에탄올 용해성 추출물이 Trp-P-1에 의해 유도된 돌연변이원성의 억제효과를 시험한 결과는 Table 2에 나타내었다. 변이원성의 억제효과는 녹차

Table 2. Desmutagenic effects of water-soluble and ethanol-soluble extracts from green tea toward the mutagenicity of Trp-P-1 in streptomycin-dependent SD510 strains of *Salmonella typhimurium* TA98

Treatment	Amount of extract (mg/plate)	Revertants/plate	
		May	Aug.
Positive control		922±45	
Trp-P-1 + Distilled water	10	194±4(-78.9)	218±7(-76.3)
	100	614±14(-33.4)	655±24(-28.9)
	1000	1024±12(+11.0)	1310±110(+42.0)
Trp-P-1 + Ethanol	10	397±5(-56.9)	430±7(-53.3)
	100	212±19(-77.0)	124±20(-86.5)
	1000	72±9(-92.1)	87±15(-90.5)

Trp-P-1 (3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate): 25 µg per plate.

Spontaneous revertants are subtracted.

The values in parentheses are the inhibition rate(%).

Inhibition rate(%) =

$$\frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertant of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

(), inhibition percentage; -, inhibition; +, promotion.

의 수용성 추출물의 경우 10 µg/plate 투여했을 때 5월 순 녹차가 78.9%, 8월 순 녹차가 76.3%를 나타내었으나, 수용성 추출물의 투여농도를 증가시킬수록 항변이 활성이 떨어지는 것으로 보아 다량의 녹차를 음용하는 경우 변이원성이 유발될 가능성을 추론할 수 있었다.

에탄올 용해성 추출물의 항변이 효과는 5월과 8월에 채취한 녹차에서 각각 56.9~92.1%와 53.3~90.5%의 활성을 보였으며, 수용성 추출물과는 달리 투여농도가 증가할수록 Trp-P-1에 의해 유도된 돌연변이를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

여 등¹⁹⁾은 녹차의 물 추출물들이 heterocyclic amine인 PhIP 및 MelQx에 의해 유도된 돌연변이에 대하여 높은 억제효과가 있다고 하였으며, Wang 등²⁰⁾은 녹차 물추출물들이 benzo(α)pyrene, aflatoxin B1, 2-aminofluorene에 의해 유도된 돌연변이를 억제 효과가 높은 것으로 보고하고 있다. 또한 nitrosamine에 의해 유도된 돌연변이에 대한 항돌연변이 활성이 있으며²¹⁾, 중금속인 카드뮴을 제거 효과²²⁾, 스트레스성 심이지케양에 항케양 효과가 높은 것으로 보고되고 있다²³⁾. 이와 같은 녹차의 생리활성 효과는 주로 카테킨류에 의한 것으로 밝혀지고 있으며 이외에 플라보놀, 비타민 C와 E를 함유하고 있고, 불소와 아연 같은 무기질에 의해 충치예방과 피부염방지 등의 효과가 있다²⁴⁾.

이상의 결과로부터 녹차의 수용성 추출물은 4-NQO에 의해 유도된 돌연변이에 대해서는 투여농도가 높을수록, Trp-P-1에 대해서는 저 농도의 수용성 추출물이 돌연변이 활성을 보다 더 억제시키는 것으로 판단된다. 에탄올 용해성 추출물은 채취시기에 따른 시료 추출물간의 돌연변이 억제효과에 대한 차이는 거의 찾아볼 수 없었으나 수용성 추출물과는 달리 4-NQO 및 Trp-P-1에 의해 유도된 돌연변이에 대하여 추출물의 투여 농도가 높을수록 돌연변이 활성을 억제시키는 효과가 큰 것으로 나타났다. 그러나 이러한 결과는 단편적인 것으로 이들 효과에 대한 종합적인 판단을 하기 위해서는 물질규명을 비롯한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

IV. 요 약

Salmonella typhimurium TA98의 streptomycin 의존성 SD510 균주를 사용하여 녹차의 수용성 추출물과 에탄올 용해성 추출물에 대한 항변이 효과를 검토하였다. 4-NQO에 대한 항변이 활성은 수용성 추출물과 에탄올 용해성 추출물 모두에서 추출물의 투여량이 증가할수록 높았으며, 억제효과는 5월과 8월 순 녹차 추출물을 1,000 µg/plate 투여했을 때 각각 93% 및 95%로 나타

났다. Trp-P-1에 대한 항변이 활성은 에탄올 용해성 추출물의 경우 53.3~921.‰로서 투여농도가 증가할수록 억제 효과가 높았다. 그러나 수용성 추출물은 투여농도가 증가할수록 항변이 활성이 감소하였다.

참고문헌

1. Bailey, G. S. and Williams, D. E. : Potential mechanisms for food-related carcinogens and anticarcinogens, *Food Technology*, **2**:105, 1993
2. Wattenberg, L. W. : Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic compounds. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **32**:461, 1990
3. Kada, T., Kaneko, K., Matsuzaki, T., Hara, Y. : Detection and Chemical identification of natural bio-antimutagens: A case of the green tea factor. *Mutation Res.*, **50**:243, 1985
4. Fujita, Y., Yamane, T., Tanaka, M., Kuwata, K., Okuzumi, J., Takahashi, T., and Fujiki, H. : Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse duodenum. *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**:503, 1985
5. Hiroshi, N., Masahide, O., Yasushi F., Mitsuo, N., Shinji, Nishiwaki., Masami, S., Hisataka, M. and Yasutoshi M. : Inhibitory Effects of (-)-Epigallocatechin Gallate on Spontaneous Hepatoma in C3H/HeNcrj Mice and Human Hepatoma-derived PLC/PRF/5 Cells. *Jpn. J. Cancer Res*, **85**:221, 1994
6. Yoshihiro, F., Tetsuro, Y., Masumi, T., Katsuya, K., Junichi, O., Toshio, T., Hirota, F. and Takuo O. : Inhibitory Effect of (-)-Epigallocatechin Gallate on Carcinogenesis with N-Ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in Mouse Duodenum. *Jpn. J. Cncer Res*, **80**:503, 1989
7. Wang, Z. Y., Wang, L. D., Lee, M. J., Ho, C. T., Huang, M. T., Conney, A. H. and Yang, C. S. : Inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats by green and black tea. *Carcinogenesis*, **6**(9):2143, 1995
8. Namiki, P., Yamanaka, M., Tateyama, C., Igarashi, M. and Namiki, M. : Platelet aggregation inhibitory activity of tea extract. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **38**(3):189, 1991
9. Hara, Y. and Ishigami, T. : Antibacterial activities of tea polyphenols against foodborne pathogenic bacteria. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **36**(12):996, 1989

10. Inger, S., Aage, T., Kari, S. and Olav, P. E. : Tea consumption, relationship to cholesterol, blood pressure, and coronary and total mortality. *Prev. Med.*, **21**,546, 1992
11. Nakayama, M., Suzuki, K., Toda, M., Okubo, S., Hara, Y., Shimamura, T. : Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res.*, **21**: 289, 1993
12. Takako, Y., Hikokichi, O., Senji, S., Shoichi, I. and Mujo, K. : Depressor effect of tannin in green tea on rats with renal hypertension. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**:855, 1994
13. Weisburger, J. H. : Beneficial effects of tea in chronic disease prevention. *식품과 산업*, **28**(4):2, 1995
14. Lunder, T. L. : Catechins of green tea: Antioxidant activity. In: *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health*. 2. M. T. Huang, C. T. Ho, and C. Y. Lee(Eds.), ACS Symposium Series 507, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 115, 1992
15. 김동연 : 한국산 녹차의 현황과 전망. *식품과 산업*, **22**(3):2, 1989
16. 신미경 : 녹차의 과학. *한국식생활문화학회지*, **9**(4): 433, 1994
17. 山西 貞 : お茶の科學. 裳華房, 1992
18. Maron, D. M. and Ames, B. N. : Revised methods for the Salmonella Mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**: 175, 1983
19. 여생규, 김인수, 안철우, 김선봉, 박영호 : 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물의 돌연변이원성억제 작용. *한국영양식량학회지*, **24**(1):160, 1995
20. Wang, Z. Y., Cheng, S. J., Zhou, Z. C., Athar, M., Khan, W. A., Bickers, D. and Mukhtar, H.: Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutation Res.*, **223**:273, 1989
21. 黒田行昭: 食品中の抗變異原物質, *食品工業*, **1.30**:16, 1993
22. 김미지, 이순재 : 한국산 녹차, 우롱차 및 홍차 음료의 Cadium 제거작용에 관한 연구. *한국영양식량학회지*, **23**(5): 784, 1994
23. 최성희, 김순희, 이병호 : 녹차추출액이 Cysteamine투여 흰쥐의 항십이지장염에 미치는 영향. *한국영양식량학회지*, **22**(4):374-380, 1993
24. 오상룡: 차의 생리활성. *식량자원연구소논문집*, **4**(1):157-158, 1992

(2000년 8월 2일 접수)