

녹차, 오룡차 및 홍차 추출물의 돌연변이원성 억제작용

여생규 · 김인수* · 안철우 · 김선봉***† · 박영호**

부산전문대학 식품가공과

*통영수산전문대학 식품영양과

**부산수산대학교 식품공학과

Desmutagenicity of Tea Extracts from Green Tea, Oolong Tea and Black Tea

Saeng-Gyu Yeo, In-Soo Kim*, Cheol-Woo Ahn, Seon-Bong Kim**† and Yeung-Ho Park**

Dept. of Food Processing, Pusan Junior College, Pusan 616-737, Korea

*Dept. of Food Nutrition and Science, National Tong-Yeong Fisheries Technical College,
Tongyeong 650-160, Korea

**Dept. of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

Abstract

Desmutagenicities against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) of tea extracts (steamed green tea, roasted green tea, oolong tea and black tea) were investigated. All the fractions obtained from tea extracts showed strong desmutagenic activity against PhIP and MeIQx toward *S. typhimurium* TA 98 in the presence of the S-9 mix. The crude catechin fraction exhibited the strongest desmutagenic activity. Among these tea extracts, black tea especially exhibited the strongest desmutagenic activity and the activity was 70.9~91.0% against PhIP and 92.2~98.8% against MeIQx at a concentration (0.5~1.0mg/plate) for drinking. The activity of authentic catechins of (-)-EGC, (-)-EGCg, (-)-ECg and (-)-EC were 79.5%, 60.2%, 46.1% and 43.5% against PhIP, and were 52.3%, 11.6%, 8.2% and 22.1% against MeIQx by addition of 1.0mg/plate, respectively. The desmutagenic activity was supposedly due to the (-)-EGCg, (-)-EGC and (-)-EC in tea polyphenols, and the browning materials. The desmutagenicity was stronger when mutagens were preincubated with S-9 mix after reaction with black tea extracts than when preincubated with them after reaction with S-9 mix. The desmutagenicity of tea extracts was rather expressed by reacting directly with mutagens than by deactivating the activated forms of mutagens.

Key words : PhIP, MeIQx, tea, polyphenols, catechin

서 론

식생활의 변화로 죽육 및 어육 등의 동물성 단백질의 섭취가 점차 증가되고 있고, 조리방법도 죽육 또는 어육 등을 굽거나, 삶고 또한 튀김으로써 식감을 즐기면서 맛을 좋게 하기도 한다. 이와 같이 식품의 가열조리 중에는 돌연변이원성 및 발암성물질 등이 생성되는 데, 이에 대한 최초의 연구로는 1956년 Kuratsune에 의한 비스킷에서의 보고¹⁾이다. 그 후 가열식품의 탄부분에서 발암성 hydrocarbon의 존재를 확인²⁾한 이래로 많

은 연구가 이루어져 왔는데, 담배연기³⁾에서, 어육과 죽육의 가열시 생성되는 연기와 탄 부분⁴⁾에서도 확인되었으며, 변이원성 heterocyclic amine으로 DL-tryptophan의 가수분해물에서 Trp-P-1 및 Trp-P-2⁵⁾, L-glutamic acid에서 Glu-P-1 및 Glu-P-2⁶⁾, L-phenylalanine에서 Phe-P-1⁷⁾, L-ornithine에서 Orn-P-1⁷⁾ 등이 각각 분리 동정되었다. 그 후로 어육 및 죽육 중, 구운 정어리에서 IQ 및 MeIQx⁸⁾, 튀긴 쇠고기에서 MeIQx⁹⁾ 및 PhIP¹⁰⁾, 가열한 쇠고기 추출물에서 4,8-DiMeIQx¹¹⁾ 등이 각각 분리 동정되었다. 따라서, 이들 어육 및 죽육에 존재하는 식품성분인 creatine, 당 및 아미노산 등에 의한 모델 실험에서, 이들 가열생성물에는 IQ, MeIQ, MeIQx¹²⁾, 4,

*To whom all correspondence should be addressed

8-DiMeIQx¹³), 7,8-DiMeIQx¹⁴) 및 PhIP¹⁵) 등의 존재를 확인하여, 식품성분이 가열 중 상호반응에 의하여 이를 변이원성 물질이 생성된다는 것을 입증하였다. 그리고 최근에는 구운 쇠고기 중에서 4-CH₂OH-8-MeIQx¹⁶) 및 7,9-DiMeIQx¹⁷)를 각각 분리 동정하였고, 이들의 생물학적 성질을 조사하고 있다. 이와 같이 식품의 조리 과정 중에는 많은 돌연변이원성 및 발암성 물질이 생성되지만, 우리가 일상생활에서 섭취하는 식품 중에는 이를 돌연변이원성 및 발암성 물질을 분해 또는 억제하는 물질도 존재하고 있다. 이에 대한 연구는 과일이나 야채음료 등의 polyphenol 물질이 암발생을 억제시킨다는 보고¹⁸를 비롯하여, 녹차 성분 중에는 ENNG에 의하여 유도된 실험쥐의 십이지장 발암을 억제하며¹⁹, azoxymethane에 의한 쥐 결장암에 대해 차 polyphenol 화합물이 억제 효과가 있다고 보고²⁰하고 있으며, 최근에는 실험쥐를 이용하여 폐와 전위에서 종양 억제 효과²¹ 및 피부암의 초기 과정과 종양발생에 대한 억제 효과²² 등이 있는 것으로 각각 보고되고 있다. 따라서, 본 실험에서는 미생물에 의한 항돌연변이원성 실험을 통해 식품의 조리 중에 생성되는 발암물질인 PhIP와 MeIQx를 사용하여, 한국산 차추출물의 돌연변이원성 억제작용에 대하여 실험을 행하였다.

재료 및 방법

시료 차의 종류

본 실험에 사용한 시료는 발효정도가 각각 다른, 시판되는 한국산 차를 사용하였는데, 비발효차인 녹차로서 증제차와 블랙차 그리고 반발효차인 오룡차 및 발효차인 홍차를 각각 부산 북구 소재 T회사 대리점에서 구입하여 사용하였다. 녹차 및 오룡차는 엽차, 홍차는 일회용 봉지 상태의 것을 각각 실험에 사용하였다.

사용균주 및 Mutagen

돌연변이원성 시험에 사용된 균주는 histidine 요구 변이주로서 *Salmonella typhimurium* TA 98을 한국과학기술원유전공학연구소 유전자은행에서 제공받아 사용하였다. 돌연변이원성 물질으로는 PhIP(2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine)와 MeIQx(2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline)을 일본 국립암센터 연구소에서 구입하여, 생화학용 dimethyl sulfoxide에 녹여 실험에 사용하였다.

시료의 추출 및 분획

수용성 혼분 및 메탄올 가용성 혼분의 조제

비발효차인 녹차(증제차 및 블랙차) 240g과 반발효차인 오룡차 480g을 각각 취하여 끓인 후 70~75°C로 식힌 증류수를 240ml 및 480ml를 가하여 3분간 방치한 다음 여과자로 여과한 것을 1차 추출물로 하였으며, 잔사를 같은 방법으로 재 추출한 것을 각각 2차 및 3차 추출물로 하였다. 또한 발효차인 홍차는 450g을 취해 100°C에서 끓인 증류수에 넣어 2분간 방치한 후 역시 상기와 같은 방법으로 추출하여 1, 2 및 3차 추출물로 하였다. 여기서 얻어진 각각의 추출액을 진공증발농축기로 농축시킨 후 진공동결건조기로 건조시켜 수용성 혼분으로 하였다. 메탄올 가용성 혼분은 1, 2 및 3차 추출물의 건조된 분말 6g씩 각각 취하여 75% 메탄올 600ml를 가하여 12시간 추출하여 4,000×g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하고 잔사에 다시 600ml의 메탄올을 가하여 같은 방법으로 추출한 것을 농축하여 메탄올 가용성 혼분으로 하였다.

조 catechin 혼분의 조제

차의 polyphenol 화합물인 조catechin 혼분은 原 등²³의 방법에 따라 조제하였다. 즉, 차 분말시료인 증제차, 블랙차 및 오룡차를 각각 120g, 그리고 홍차의 경우 150g을 취해 끓인 증류수 1,000ml를 가하여 3분 동안 침출시킨 후 여과자로 여과한 추출액을 분액 깔대기에 넣고 caffeine을 제거하기 위하여 동량의 chloroform을 가해 추출하여 chloroform을 제거한 물층을 얻었다. 여기서 얻은 물층에 동량의 ethyl acetate를 가하여 3회 반복 추출한 다음, ethyl acetate층을 감압 농축하여 건고시켜, 여기에 소량의 증류수를 가해 다시 감압 농축시킨 것을 동결건조하여 조catechin 혼분을 얻었다. 상기의 추출된 시료는 멸균 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

갈변도, 방향족 화합물 및 총 페놀 함량 측정

조제한 차추출물의 각 혼분 별 시료를 모두 0.1%의 용액이 되도록 증류수에 녹여 분광광도계를 사용하여 420nm에서 갈변도를 측정하였으며, 또한 방향족 화합물의 함량을 알아보기 위하여 280nm에서의 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량의 분석은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색 반응을 나타내는 현상을 이용한 것으로 Folin-Denis법²⁴을 개량하여 다음과 같이 정량하였다. 조제된 각 혼분에 증류수를 가

하여 1%의 용액이 되게 하여, 이 시료용액을 시험관에 0.5ml를 취하고 여기에 중류수 2.5ml 가한 다음, Folin-Denis시약 2ml을 넣고 다시 포화 sodium carbonate 5ml를 가해 1시간 방치한 후, 분광광도계를 사용하여 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 분석은 차추출물을 추출횟수에 따라 각각 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었고, 측정된 흡광도는 tannic acid를 이용하여 미리 작성한 검량곡선에 의하여 총 폐놀 함량을 구하였다.

Catechin 화합물의 정량

Catechin 화합물의 정량은 상기 방법에 의해 추출된 조catechin을 일정량 씩 취해 ethyl acetate에 녹여 다음과 같이 행하였다. 표준용액은 고순도의 栗田社(日本) 제품인 (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECg 및 (-)-EGCg 10mg을 각각 ethyl acetate 1ml에 녹여 회색시켜 4 종류의 표준용액으로 조제하였으며, 이를 각 표준용액으로부터 5μl 씩 취하여 HPLC(Waters Associates HPLC system; Column, μBondapak C18 ; Detector, UV 280nm ; Mobile phase, acetonitrile : acetic acid : methanol : H₂O= 130 : 5 : 20 : 862)에 주입하여 얻은 크로마토그램의 농도와 면적비의 상관관계 검량선을 작성하여 이 검량선으로부터 catechin류의 함량을 구하였다.

돌연변이원성 시험

각 시료 자체의 돌연변이원성을 확인하기 위하여 군주에 대하여 시료농도의 별위 내에서 Maron과 Ames²⁵⁾의 방법을 일부 개량한 preincubation 방법에 의하여 실시하였다. 즉, cap tube에 각각의 시료 혼분을 소정 농도로 첨가하고 여기에 전배양된 균배양액 100μl와 대사활성 물질인 S-9 mixtures 500μl를 가한 다음, 가볍게 vortex하여 37°C shaking water bath에서 20분간 preincubation한 뒤 45°C에서 보관 중이던 top agar를 3 ml씩 넣고 잘 혼합한 후 최소한천배지상에 굳일하게 도포하여 37°C에서 48시간 배양하여 나타난 His⁺ revertant 숫자를 계측하여 대조군과의 비교로 돌연변이원성의 유무를 확인하였다. 돌연변이원성 억제시험은 먼저 돌연변이 유발물질의 농도를 예비실험을 통하여 PhIP 400ng/plate 및 MelQx 20ng/plate 농도로 하여 시료의 돌연변이원성 억제시험에 알맞은 농도로 사용하였으며, 상기의 방법과 동일하게 실험하여 37°C에서 48시간 배양하여 나타난 His⁺ revertant 숫자를 계측하여 발암물질의 활성에 대한 시료의 억제율(%)로서 나타내었다.

결 과

차추출물의 갈변도, 방향족 화합물 및 총 폐놀 함량

차추출물의 갈변도, 방향족 화합물 및 총 폐놀 함량은 수용성, 메탄올 사용성 및 조catechin 혼분으로 나누어 갈변도는 420nm, 방향족화합물은 280nm에서 각각 흡광도로서 나타내었다. 전 시료 모두 수용성 혼분 및 메탄올 사용성 혼분에서 높은 갈변도를 나타내어, 비발효차인 증제차 및 볶음차에서는 비슷한 갈변도를 나타내었다. 특히 발효차인 홍차의 경우에 있어서는 전반적으로 갈변도가 높았으며, 수용성 혼분과 조catechin 혼분에서 가장 높은 갈변도를 나타내었다 (Table 1). 방향족 화합물의 함량(Table 2)은 각 혼분의 농도를 0.1%로 하였을 때, 전 시료 모두 조catechin 혼분에서 가장 높은 흡광도를 나타내었다. 특히 각 혼분 모두 280nm에서 높은 흡광도를 나타내었을 경우, 폐놀 함량(Table 3)도 대체적으로 많은 것으로 나타났다.

차추출물의 catechin 함량

차추출물의 조catechin 혼분에서 차 polyphenol 화합

Table 1. Browning intensities (at 420nm) of water-soluble, methanol-soluble and crude catechin fractions obtained from tea extracts

Kind of tea	Water-soluble	MOH-soluble	Crude catechin
Steamed green tea	0.15	0.12	0.09
Roasted green tea	0.15	0.15	0.09
Oolong tea	0.27	0.22	0.15
Black tea	0.53	0.35	0.53

Table 2. The absorbance at 280nm of water-soluble, methanol-soluble and crude catechin fractions obtained from tea extracts

Kind of tea	Water-soluble	MOH-soluble	Crude catechin
Steamed green tea	9.78	8.78	16.79
Roasted green tea	11.54	9.02	17.55
Oolong tea	8.76	8.57	17.76
Black tea	10.01	7.85	16.54

Table 3. Total phenol contents of water-soluble, methanol-soluble and crude catechin fractions obtained from tea extracts (mg/100g)

Kind of tea	Water-soluble	MOH-soluble	Crude catechin
Steamed green tea	1.71	2.34	3.91
Roasted green tea	1.54	1.45	3.88
Oolong tea	0.96	0.98	3.50
Black tea	0.89	0.68	2.00

물인 catechin류를 분석해 본 결과, 전 시료 모두 다음과 같은 4종류의 catechin류 즉, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECg 및 (-)-EGCg의 catechin 화합물이 각각 동정되었다 (Table 4). 이 중 (-)-EGCg가 반효차인 홍차를 제외한 전 시료에서 가장 많이 검출되었다. 그리고 (-)-EGC, (-)-ECg 및 (-)-EGCg의 함량은 비발효차인 종제차와 봄음차에서, 반발효차인 오룡차에서 가장 높았다. 이에 비하여 발효차인 홍차는 다른 차와는 달리 (-)-ECg의 함량이 177.4 μ g/mg으로 가장 많이 함유하였다.

차추출물의 돌연변이원성

본 실험에 사용한 각 회분별 차추출물의 종류 및 농도에 따른 돌연변이원성 유무를 확인하기 위하여 Ames test를 실시한 결과, Table에서 나타내지 않았지만

Table 4. Catechin contents of crude catechin fraction obtained from tea extracts (μg/100g)

Division	(-) - EC	(-) - ECg	(-) - EGC	(-) - EGCg
Steamed green tea	75.4±2.2	112.1±1.3	182.4±1.6	387.7±1.3
Roasted green tea	76.4±0.0	118.3±2.7	202.7±2.7	363.5±10.9
Oolong tea	70.7±1.0	109.3±0.9	116.1±4.1	477.1±3.1
Black tea	82.2±2.6	177.4±3.0	87.8±2.0	62.9±8.7

Table 5. Desmutagenic effects of water-soluble, methanol-soluble and crude catechin fraction of teas on the mutagenicity of PhIP toward *Salmonella typhimurium* TA 98 in the presence of S-9 mixtures

Kind of tea	Dose (mg/plate)	Inhibition (%)		
		Water-soluble	MOH-soluble	Crude catechin
Steamed green tea	0.1	2.8	22.2	11.7
	0.5	43.1	64.0	45.9
	1.0	72.2	82.8	77.0
	1.5	86.1	86.2	93.8
	2.0	93.4	94.6	96.9
Roasted green tea	0.1	5.1	20.8	13.7
	0.5	49.0	53.6	53.0
	1.0	79.7	85.2	86.0
	1.5	85.4	88.9	91.2
	2.0	93.9	94.6	>100.0
Oolong tea	0.1	9.1	18.6	20.2
	0.5	49.0	65.6	71.6
	1.0	72.7	71.0	90.7
	1.5	86.8	87.3	94.8
	2.0	97.7	93.8	96.8
Black tea	0.1	4.5	10.8	10.9
	0.5	70.9	57.4	76.6
	1.0	91.0	93.9	99.0
	1.5	91.5	99.0	>100.0
	2.0	97.4	99.3	>100.0

Revertants induced from PhIP (400ng/plate) as positive control were 960 (subtracted spontaneous revertants 28)

균 control의 *His*^r revertant colony수와 각각의 차추출물을 첨가한 경우의 revertant colony수를 비교해 볼 때 차추출물의 농도를 증가시켜도 revertant colony수가 증가되지 않는 것으로 보아 본 실험에 사용한 차추출물의 농도에서 시료 자체에 의한 돌연변이원성은 없는 것으로 나타났다.

PhIP에 대한 돌연변이원성 억제작용

차추출물의 돌연변이 억제작용을 검토하기 위하여 Ames test에서 양성반응을 나타내며, 벌암물질로 알려진 PhIP를 사용하여 차추출물의 회분별 및 농도에 따른 돌연변이원성 억제작용을 살펴보았다. PhIP에 의해 유도된 변이원성에 대한 각 시료 회분의 첨가량에 따른 억제작용은 시료 모두 돌연변이원성 억제작용이 있었으며, 또한 시료 농도를 증가할수록 돌연변이원성 억제작용도 증가하는 것으로 나타났다. 각 회분에 따른 돌연변이원성 억제작용은 높은 농도에서는 거의 비슷한 억제작용을 나타내지만, 전반적으로 살펴볼 때, 조catechin회분 > 메탄올 > 수용성 회분 > 수용성 회분의 순으로 나타났다. 차의 수용성 회분에서, 우리가 일상 생활에서 음용하는 조건 (0.5~1.0mg/plate)에서는 비발효차인 종제차 및 봄음차의 경우 43.1~72.2% 및 49.0~79.7%, 반발효차인 오룡차의 경우 49.0~72.7%, 발

효차인 홍차의 경우 70.9~91.0%로 각각 나타나, 이 종 홍차가 가장 높은 돌연변이원성 억제작용을 나타내었다. 또한 돌연변이원성 억제작용이 가장 우수한 홍차 중에서도 조catechin 혼분에서 돌연변이원성 억제작용이 가장 높게 나타나, 76.6~99.0%의 높은 돌연변이 원성 억제작용을 나타내었다(Table 5).

MelQx에 대한 돌연변이원성 억제작용

MelQx에 의해 유도된 변이원성에 대한 각 시료 혼분의 첨가량에 따른 억제활성을 PhIP에서와 같이 모든 시료에서 돌연변이원성 억제작용이 있으며, PhIP에 의한 돌연변이원성 억제작용 보다 더 높은 것으로 나타났고, 또한 시료의 농도가 증가할수록 돌연변이원성 억제효과도 증가되는 것으로 나타났다. 그리고 농도에 따른 돌연변이원성 억제작용이 커서, 0.5mg/plate 이상의 농도에서는 높은 돌연변이원성 억제작용을 나타내었다. 각 차의 종류 중 수용성 혼분에서, 우리가 일상생활에서 음용하는 조건(0.5~1.0mg/plate)에서는 증제차 및 볶음차의 경우 76.9~91.4% 및 52.3~92.6%, 오롱차의 경우 65.2~89.1%, 홍차의 경우 92.2~98.8%로 나타나, 홍차의 경우 90% 이상의 높은 돌연변이원성 억제작용을 나타내었다. 또한 홍차의 경우, 전항과 마찬가지로 돌연변이원성 억제작용이 가장 높게 나타난

회분은 조catechin 혼분으로서 93.0~98.4%로 높은 돌연변이원성 억제작용을 나타내었다(Table 6).

Catechin 표준용액 및 반응조건에 따른 돌연변이 원성 억제작용

차에 함유되어 있는 polyphenol 화합물인 catechin류의 표준용액 즉, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECg 및 (-)-EGCg을 각각 사용하여 돌연변이원성 억제작용을 살펴보았다. PhIP 및 MelQx에 대한 돌연변이원성 억제작용에는 차 catechin류가 모두 관여하는 것으로 나타났으며, PhIP에 대하여는 주로(-)-EGC 및 (-)-EGCg가 돌연변이원성 억제작용을 나타내어, 1.0mg/plate의 농도에서 각각 79.5% 및 60.2%의 돌연변이원성 억제작용을 나타내었다(Table 7). 그러나 MelQx에 대하여는 (-)-EGC 및 (-)-EC가 주로 돌연변이원성 억제작용을 나타내어, 52.3% 및 22.1%의 돌연변이원성 억제작용을 나타내었다(Table 8).

이상의 결과에서 차 종류에 따른 돌연변이원성 억제작용에는 발효차인 홍차가 가장 효과가 뛰어나, 홍차의 조catechin 혼분을 사용하여 반응조건을 달리하였을 때의 돌연변이원성 억제작용을 살펴보았다. 변이원 물질을 S-9 mixtures로 활성화시킨 후 시료를 첨가한 반응구와 변이원 물질에 시료를 첨가한 다음, S-9 mix-

Table 6. Desmutagenic effects of water-soluble, methanol-soluble and crude catechin fraction of teas on the mutagenicity of MelQx toward *Salmonella typhimurium* TA 98 in the presence of S-9 mixtures

Kind of tea	Dose (mg/plate)	Inhibition (%)		
		Water-soluble	MOH-soluble	Crude catechin
Steamed green tea	0.1	30.9	6.2	32.0
	0.5	76.9	59.1	78.0
	1.0	91.4	78.7	93.1
	1.5	92.1	84.6	94.7
	2.0	96.3	92.5	99.8
Roasted green tea	0.1	6.7	4.7	20.9
	0.5	52.3	71.9	62.8
	1.0	92.6	84.1	87.5
	1.5	97.2	87.9	95.9
	2.0	99.2	96.8	98.3
Oolong tea	0.1	5.4	11.7	8.4
	0.5	65.2	40.0	61.6
	1.0	89.1	69.4	83.6
	1.5	95.4	82.8	95.8
	2.0	97.5	96.4	98.6
Black tea	0.1	11.9	31.0	20.8
	0.5	92.2	64.8	93.0
	1.0	98.8	93.0	98.4
	1.5	99.4	96.7	99.5
	2.0	99.9	99.4	>100.0

Revertants induced from MelQx (20ng/plate) as positive control were 1,121 (subtracted spontaneous revertants 54)

tures로 활성화시킨 반응구에 있어서는 서로 다른 돌연변이원성 억제작용을 나타내었는데, 변이원 물질을 S-9 mixtures로 활성화시킨 다음 시료를 첨가한 반응구에서는 PhIP 및 MelQx에 대하여 28.4% 및 69.8%로 낮은 돌연변이원성 억제작용을 나타낸 반면, 변이원 물질에 시료를 첨가한 다음, S-9 mixtures로 활성화시킨 반응구에 있어서는 96.4% 및 88.7%의 높은 돌연변이원성 억제작용을 나타내었다(Table 9).

Table 7. Desmutagenic effects of authentic catechins on the mutagenicity of PhIP toward *Salmonella typhimurium* TA 98 in the presence of S-9 mixtures

Catechins	Revertants/plate		
	0.1mg	0.5mg	1.0mg
(-)-EC	870(33.1)	762(42.0)	743(43.5)
(-)-ECg	873(32.9)	856(34.3)	711(46.1)
(-)-EGC	416(70.2)	395(71.9)	302(79.5)
(-)-EGCg	597(55.4)	552(59.1)	539(60.2)

Revertants induced from PhIP(400ng/plate) as positive control were 1,225 (subtracted spontaneous revertants 51)

Numbers in parenthesis indicate values of inhibition rate

Table 8. Desmutagenic effects of authentic catechins on the mutagenicity of MelQx toward *Salmonella typhimurium* TA 98 in the presence of S-9 mixtures

Catechins	Revertants/plate		
	0.1mg	0.5mg	1.0mg
(-)-EC	1,498(0.0)	1,137(17.2)	1,092(22.1)
(-)-ECg	1,372(0.0)	1,332(2.3)	1,208(8.2)
(-)-EGC	885(38.7)	854(38.8)	676(52.3)
(-)-EGCg	1,349(1.0)	1,266(7.3)	1,210(11.6)

Revertants induced from MelQx(400ng/plate) as positive control were 1,225 (subtracted spontaneous revertants 51)

Numbers in parenthesis indicate values of inhibition rate

Table 9. Changes of desmutagenicity on reaction conditions with mutagens and crude catechin fraction obtained from black tea extracts

Reaction conditions	Inhibition(%)	
	PhIP	MelQx
A	>100.0	99.5
B	28.4	69.8
C	96.4	88.7

A : Mutagens were incubated with S-9 mixtures and sample at 37°C for 20min

B : Mutagens were incubated with S-9 mixtures at 37°C for 20min and then, preincubated with sample at 37°C for 20min

C : Mutagens were incubated with sample at 37°C for 20min and then, preincubated with S-9 mixtures at 37°C for 20min

고 츠

발암성 헤테로고리 화합물들은 촉육이나 어육 등의 가열조리시 생성되는데, 이 중에서도 특히 PhIP와 MelQx는 150~200°C 정도에서 생성될 뿐만 아니라 발암성이 강한 것으로 알려지고 있다¹⁵⁾. 사람이 200g 정도의 가열조리된 촉육이나 어육을 섭취할 때 노출되는 헤�테로고리 화합물의 농도는 MelQx의 경우는 0.2~2.6μg 정도이며, PhIP는 0.1~13.8μg의 정도로 각각 추정하고 있다²⁶⁾. 헤�테로고리 화합물들 중 본 실험에 사용한 PhIP 및 MelQx 등은 그 자체는 직접적인 돌연변이원성을 나타내지 않으나, 지금까지 알려진 바에 의하면 이들 구조 중 아미노기가 생체내 cytochrome P-450 등의 산화효소군에 의하여 N-hydroxy²⁷⁾, N-sulfate 및 N-acetox²⁸⁾ 등의 유도체를 형성한 이 물질이 DNA 염기 중 guanine C-8 위치에 특이적으로 결합하여 DNA 부가체를 형성²⁹⁾하므로써 비로소 돌연변이원성 및 발암성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 이와 같이 가열조리 식품에서 유래하는 강력한 발암성 물질인 PhIP 및 MelQx를 각각 사용하여 한국산 차 종류에 따른 돌연변이원성 억제작용에 대해 살펴보았다. 전 시료 및 각 획분 모두 돌연변이원성 억제작용을 나타내었으며, 시료 농도가 증가할수록 돌연변이원성 억제작용도 강한 것으로 나타났다(Table 5, 6). 또한 각 획분에서의 돌연변이원성 억제작용은 조catechin, 메탄을 가용성 및 수용성 획분의 순으로 나타났는데, 앞에서 살펴본 바와 같이 여러가지 기능특성이 우수한 차 polyphenol 화합물인 조catechin 획분에서 PhIP 및 MelQx에 대하여 가장 강한 돌연변이원성 억제작용을 나타내었다. 이 획분 중 실제 음용하는 조건(1mg/plate)의 농도에서 비발효차인 녹차(중재차 및 볶음차)에서도 높은 돌연변이원성 억제작용을 나타내었지만, 특히 발효차인 홍차에서 가장 높은 돌연변이원성 억제작용을 나타내었다. 따라서, 이들 차의 성분 중 어떤 인자가 돌연변이원성 억제작용에 관여하는지 알아보기 위해 갈변도(Table 1), 방향족(Table 2) 및 폐놀 화합물(Table 3)의 함량을 살펴보았다. 그 결과, 돌연변이원성 억제작용이 가장 뛰어난 조catechin 획분에서 방향족 및 폐놀 화합물의 함량이 가장 많은 것으로 나타나, 돌연변이원성 억제작용에는 차 polyphenol 화합물이 주된 인자로 작용하는 것으로 생각되었다. 또한 차종류 중 발효차인 홍차에서 강한 돌연변이원성 억제작용을 나타내었는데, 이는 홍차 중에 함유되어 있는 polyphenol 화합물 외에, 홍차의 갈변도가 제일 높은 것으로 보아, 홍차

제조시 생성되는 갈변물질도 크게 관여하는 것으로 추정되었다. 또한, 차 polyphenol 화합물인 catechin류와 돌연변이원성 억제작용과의 관계를 살펴보기 위해 차 중에 함유되어 있는 catechin류의 함량을 살펴 본 결과 (Table 4), 전 catechin류 함량이 비발효차인 녹차(중재 차 및 봄음차)에는 많이 함유되어 있지만, 발효가 어느 정도 진행된 반발효차인 오룡차 및 발효차인 홍차에서는 catechin류 함량이 적은 것으로 나타났다. 이에 비해 돌연변이원성 억제작용은 오히려 반발효차인 오룡차 및 발효차인 홍차가 비발효차인 중재차 및 봄음차 보다 다소 높은 돌연변이원성 억제작용을 나타내었다 (Table 5, 6). 이는 차추출물의 돌연변이원성 억제작용에는 차 polyphenol 화합물인 catechin류 외에도 갈변물질이 강한 돌연변이원성 억제작용을 나타내는 주된 인자라고 생각된다. 이러한 사실은 차 polyphenol 화합물인 catechin류 이외에 차의 제조과정 중 polyphenol (flavonol 등) 화합물의 산화, 중합으로 생성된 polyphenol 화합물³⁰⁾과 갈변반응 생성물³¹⁾과 Maillard 반응 생성물질³²⁾ 등이 돌연변이원성 억제작용을 나타내고 있다는 보고와 결부시켜 볼 때, 홍차의 돌연변이원성 억제작용에는 차 catechin류 외에 홍차 제조시 생성되는 갈변물질도 크게 관여하는 것으로 추정되었다. 그리고 돌연변이원성 억제작용이 뛰어난 차 polyphenol 화합물 중 어여쁜 catechin류가 직접적인 인자로 작용하는지를 살펴보기 위해 catechin 표준용액에서의 돌연변이원성 억제작용을 살펴 본 결과, 전반적으로 모든 catechin가 관여하는 것으로 나타났는데, 그 중에서 PhIP에 대해서는 주로 (-)-EGC 및 (-)-EGCg 등 (Table 7)이, MelQx에 대해서는 주로 (-)-EGC와 (-)-EC 등 (Table 8)이 돌연변이원성 억제작용에 관여하는 것으로 나타났다. 이는 ellagic acid, tannic acid 등과 같은 phenol 화합물이³³⁾ PhIP, MelQ 및 DiMelQx에 대한 항돌연변이 효과³⁴⁾ 등을 고려해 볼 때, 차 polyphenol 화합물인 catechin류는 모두 돌연변이원성 억제작용에 관여하는 것으로 추정되었다. 또한, 이들 차추출물이 어떤 작용기구에 의해 돌연변이원성 억제작용을 나타내는지 알아보기 위해, 돌연변이원성 억제작용이 가장 강한 발효차인 홍차의 조catechin 혼분을 사용하여 변이원 물질인 PhIP 및 MelQx에 대하여 S-9 mixtures로 대사 활성화시키기 전과 후의 각각의 반응조건에서 돌연변이원성 억제작용을 살펴보았다. 그 결과, 변이원 물질을 S-9 mixtures로 활성화시킨 다음, 시료(홍차)를 첨가한 반응구 보다 변이원 물질에 시료를 첨가한 후 S-9 mixtures로 활성화시킨 반응구에서 돌연변이원성

억제작용이 더 우수한 것으로 나타났다 (Table 9). 이러한 사실로 미루어 볼 때, 차추출물의 돌연변이원성 억제작용 기구는 시료 자체가 직접적으로 변이원 물질에 대하여 강하게 불활성화시키며, 또한 약한 정도지만 S-9 mixtures에 의해 활성화된 유도체에 대해서도 불활성화하므로써 돌연변이원성 억제작용을 나타내는 것으로 추정되었다. 이와 같이 PhIP 및 MelQx는 식품의 가열 조리 중에 생성되는 강력한 발암성 물질로서 그 자체는 돌연변이원성을 나타내지 않지만, 특히 이를 섭취할 경우 생체내에서 강력한 발암성을 나타내는 물질로 알려져 있다. 따라서 이들 변이원성 물질에 대하여 차추출물이 효과적으로 불활성화시키므로 일상 생활에서의 차의 음용은 현대사회에서 많이 발생되는 암을 예방할 수 있는 우수한 가능성 식품으로 이용될 수 있으리라 기대된다.

요 약

차추출물의 돌연변이원성 억제작용은 아주 우수한 것으로 나타났으며, 이 중 조catechin 혼분에서 가장 높았다. 또한 농도가 증가할수록 억제작용도 증가하는 것으로 나타났다. 차 종류 중 발효차인 홍차의 수용성 혼분에서 음용조건인 0.5~1.0mg/plate의 농도에서 PhIP에 대하여 70.9~91.0%, MelQx에 대하여는 92.2~98.8%로 돌연변이원성 억제작용이 높게 나타났다. 돌연변이원성 억제작용에 관여하는 주된 인자는 차 polyphenol 화합물인 catechin류 중 PhIP에 대하여 주로 (-)-EGC 및 (-)-EGCg와 MelQx에 대하여는 (-)-EC와 (-)-EGC이 관여하며, 또한 갈변물질도 관여하는 것으로 나타났다. 돌연변이원성 억제작용 기구는 시료 자체가 직접적으로 변이원 물질을 불활성화시킴으로써 돌연변이원성 억제작용을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

문 헌

- Kuratsune, M. : Benzo[a]pyrene content of certain pyrogenic materials. *J. Natl. Cancer Inst.*, **16**, 1485 (1956)
- Lijinsky, W. and Shubik, P. : Benzo[a]pyrene and other polynuclear hydrocarbons in charcoal-broiled meat. *Science*, **145**, 53 (1964)
- Sato, S., Seino, Y., Ohka, T., Yahagi, T., Nagao, M., Matsushima, T. and Sugimura, T. : Mutagenicity of smoke condensates from cigarettes, cigars and pipe tobacco. *Cancer Lett.*, **3**, 1 (1977)
- Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T. and Sugimura, T. : Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer Lett.*, **2**,

- 221 (1977)
5. Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Okamoto, T., Shudo, K., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Itaka, Y. and Itai, A. : Mutagenic principle(s) in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products. *Proc. Jpn. Acad.*, **53**, 58 (1977)
 6. Yamamoto, T., Tsuji, K., Kosuge, T., Okamoto, T., Shudo, K., Takeda, K., Itaka, Y., Yamaguchi, K., Seino, Y., Yahagi, T., Nagao, M. and Sugimura, T. : Isolation and structure determination of mutagenic substances in L-glutamic acid pyrolysate. *Proc. Jpn. Acad.*, **54B**, 248 (1978)
 7. Yokota, M., Narita, K., Kosuge, T., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yamaguchi, K., Shudo, K., Itaka, Y. and Okamoto, T. : A potent mutagen isolated from a pyrolysate of L-ornithine. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1473 (1981)
 8. Kasai, H., Yamaizumi, Z., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Spingarn, N. E., Weisburger, J. H. and Nishimura, S. : Potent novel mutagens produced by broiling fish under normal conditions. *Proc. Jpn. Acad.*, **56B**, 278 (1980)
 9. Gross, G. A., Philipossian, G. and Aeschbacher, H. U. : An efficient and convenient method for the purification of mutagenic heterocyclic amines in heated meat products. *Carcinogenesis*, **10**, 1175 (1989)
 10. Felton, J. S., Knize, M. G., Shen, N. H., Lewis, P. R., Andresen, B. D., Happe, J. and Hatch, F. T. : The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef ; 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*, **7**, 1081 (1986)
 11. Takahashi, M., Wakabayashi, K., Nagao, M., Yamaizumi, Z., Sato, S., Kinae, N., Tomita, I. and Sugimura, T. : Identification and quantification of 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (4,8-DiMeIQx) in beef extract. *Carcinogenesis*, **6**, 1537 (1985)
 12. Grivas, S., Nyhammar, T., Olsson, K. and Jagerstad, M. : Isolation and identification of the food mutagens IQ and MeIQx from a heated model system of creatinine, glycine and fructose. *Food Chem.*, **20**, 127 (1986)
 13. Negishi, C., Wakabayashi, K., Yamaizumi, Z., Saito, H., Sato, S., Sugimura, T. and Jagerstad, M. : Identification of 4,8-DiMeIQx, a new mutagen. *Mutation Res.*, **147**, 267 (1985)
 14. Negishi, C., Wakabayashi, K., Tsuda, M., Sato, S., Sugimura, T., Saito, H., Maeda, M. and Jagerstad, M. : Formation of 2-amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline, a new mutagen, by heating a mixture of creatinine, glucose and glycine. *Mutation Res.*, **140**, 55 (1984)
 15. Shioya, M., Wakabayashi, K., Sato, S., Nagao, M. and Sugimura, T. : Formation of a mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in cooked beef, by heating a mixture containing creatinine, phenylalanine and glucose. *Mutation Res.*, **191**, 133 (1987)
 16. Kim, I. S., Wakabayashi, K., Kurosaka, R., Yamaizumi, Z., Jinno, F., Koyota, S., Tada, A., Nukaya, H., Tak-2a-hashi, M., Sugimura, T. and Nagao, M. : Isolation and identification of a new mutagen, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (4-CH₂OH-8-MeIQx), from beef extract. *Carcinogenesis*, **15**, 21 (1994)
 17. Nukaya, H., Koyota, S., Jinno, F., Ishida, H., Wakabayashi, K., Kurosaka, R., Kim, I. S., Yamaizumi, Z., Ushiyama, H., Sugimura, T., Nagao, M. and Tsuji, K. : Structural determination of a new mutagenic heterocyclic amine, 2-amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-*g*]quinoxaline(7,9-DiMeIQx), present in beef extract. *Carcinogenesis*, **15**, 1151 (1994)
 18. Mukhtar, H., Wang, Z. Y., Katiyar, S. K. and Agarwal, R. : Tea components ; Antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Preventive Medicine*, **21**, 351 (1992)
 19. Fujita, Y., Yamane, T., Tanaka, M., Kuwata, K., Okuzumi, J., Takahashi, T., Fujiki, H. and Okuda, T. : Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse duodenum. *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 503 (1989)
 20. Yamane, T., Hagiwara, N., Tateichi, M., Akachi, S., Kim, M., Okuzumi, J., Kitao, Y., Inagake, M., Kuwata, K. and Takahashi, T. : Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats by green tea polyphenol fraction. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1336 (1991)
 21. ZKatiyar, S. K., Agarwal, R., Zaim, M. T. and Mukhtar, H. : Protection against N-nitrosodiethyl-amine and benzo[a]pyrene-induced forestomach and lung tumorigenesis in A/J mice by green tea. *Carcinogenesis*, **14**, 849 (1993)
 22. Santosh K., Rajesh, A., Susan, E., Gary, S. W. and Hasan, M. : Protection against 12-O-tetradeca-noylphorbol-13-acetate-caused inflammation in SENCAR mouse ear skin by polyphenolic fraction isolated from green tea. *Carcinogenesis*, **14**, 361 (1993)
 23. 原 征彦, 石上 正 : 茶ポリフェノール類の食中毒細菌に対する抗菌活性. 日本食品工業學會誌, **36**, 996 (1989)
 24. A.O.A.C. : *Official methods of analysis*. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., p.703 (1990)
 25. Maron, D. M. and Ames, B. N. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**, 173 (1983)
 26. Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H. and Sugimura, T. : Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res. (Suppl.)*, **52**, 2092s (1992)
 27. Kaderlik, K. R., Mulder, G. J., Turesky, R. J., Lang, N. P., Teitel, C. H., Chiarelli, M. P. and Kadlubar, F. F. : Glucuronidation of N-hydroxy heterocyclic amines by human and rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, **15**, 1695 (1994)
 28. Buonarati, M. H., Turteltaub, K. W., Shen, N. H. and Felton, J. S. : Role of sulfation and acetylation in the activation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine to intermediates which bind DNA. *Mutation Res.*, **245**, 185 (1990)
 29. Ochiai, M., Nagaoka, H., Wakabayashi, K., Tanaka, Y.,

- Kim, S. B., Tada, A., Nukaya, H., Sugimura, T. and Nagao, M. : Identification of N²-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- β]-quinoxaline 3', 5'-diphosphate, a major DNA adduct, detected by nuclease P1 modification of the ³²P-postlabeling method, in the liver of rats fed MelQx. *Carcinogenesis*, **14**, 2165 (1993)
30. 小島盛夫, 三輪信夫, 森美智子, 大崎雅洋, 小西宏明 : ウーロン茶の突然変異原性抑制作用. 食品衛生學誌, **30**, 233 (1989)
31. 배창원, 함충서 : 사과 polyphenol oxidase에 의한 효소갈변반응 생성물의 항돌연변이 효과. 한국식품과학회지, **22**, 625 (1990)
32. 김선봉, 염동민, 도정룡, 윤형식, 변한석, 김인수, 박영호 : Maillard 반응유래 저분자 카르보닐 화합물의 돌연변이원성과 그 억제기구. 한국식품과학회지, **21**, 435 (1989)
33. Michael, S., Nielsen, P. A. and Larsen, J. C. : Food and cancer prevention : Chemical and Biological Aspects ; Effects of ellagic acid, tannic acid and quercetin on the mutagenic activity of cooked food mutagens in the *Salmonella* strain TA 98. Royal Society of Chemistry, p.92 (1993)

(1994년 12월 7일 접수)