

녹차종자 메탄올추출물의 생리활성

양희선¹ · 김재용¹ · 김홍출² · 노일섭³ · 서권일[†]

순천대학교 식품과학부, ¹경북대학교 식품공학과, ²진주산업대학교 미생물공학과, ³순천대학교 식물생산과학부

Biological Activities of Methanol Extracts from Green Tea Seed

Hee-Sun Yang, Jae-Yong Kim¹, Hong-Chul Kim², Ill-Sup Nou³ and Kwon-Il Seo[†]

Division of Food Sciences, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

¹*Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 750-701, Korea*

²*Department of Microbiological Engineering Jinju National University, Jinju 660-758, Korea*

³*Faculty of Plant Science and Production, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea*

Abstract

This study was to investigate the biological activities of green tea seed methanol extract (GTSME) and compared those of green tea methanol extract (GTME) for using green tea seed as the functional food material. The hydrogen-donating activity of GTSME was over 50% at the 100 µg/mL concentration, the activity of GTME was 21.86% at the 1000 µg/mL concentration compared with that of control. The MDA (malondialdehyde) production was 60 Mol/g and 50 Mol/g in the mouse liver homogenate treated with GTME and GTSME of 1,000 µg/mL concentrations, respectively, and the values were lower than 86 Mol/g of control. GTME and GTSME of 1,000 µg/mL concentration inhibited the proliferation of over 50% and over 20% in A549 and SW480 human cancer cells, respectively. The morphology transformation was shown in the cancer cells treated with GTSME of 500 µg/mL with the decrease of cell numbers lower than that of control cells numbers. The NO production was increased in a dose dependent manner in the RAW264.7 macrophage cells treated with GTME and GTSME of 1, 10, 100 and 1,000 µg/mL concentrations, and the NO production by GTSME was 2.04 µM at 100 µg/mL concentration, and the value was higher than 0.77 µM by GTME.

Key words : green tea, seed, antioxidation, anticancer activity, immuno-activities

서 론

녹차는 세계에서 가장 많이 소비되고 있는 기호 식품 중 가장 오래된 것 중의 하나이며, 예로부터 여러 가지 질병 치료제로 사용되어져 왔다(1). 최근에는 식생활의 서구화로 인하여 비만, 고혈압, 심장질환 등 성인병의 증가로 건강에 대한 인식이 높아짐에 따라 차 소비가 증가 되고 있으며, 또한 여러 가지 성분들의 약리적인 효과가 증명되면서 건강 음료로서의 가치가 새롭게 인식되어 널리 음용되고 있을 뿐만 아니라 녹차국수, 녹차 냉면의 품질 개선 그 외에도 녹차의 천연 향, 색, 맛을 이용한 기능성 식품 및 화장품

등 다양한 분야에서 연구가 진행되고 있다(2-4). 녹차의 주요 기능성분으로는 polyphenol성 화합물인 카테킨류, flavonol 류, 사포닌 등의 수용성 성분과 섬유소, β-carotene 등의 불용성 성분으로 구성되어져 있으며, 이 성분들은 항산화 효과, 암 예방, 항균, 혈당강하, 혈압강하, 혈중 콜레스테롤 저하 및 치매 예방 등의 다양한 효과가 있다고 보고 되고 있다(5). 이와 같이 녹차에 관한 연구에 비하여 녹차종자에 대한 연구로는 녹차종자의 일반성분(6), 몇 종류의 사포닌 구조 동정(7), 종실유의 이화학적 특성 및 지방산 조성 등(8)의 보고가 있다. 또한 차나무의 종자는 친식 등의 효과가 있어 민간요법으로 사용되어져 왔으며, 녹차종자는 해바라기씨, 잇꽃종실 등과 비슷한 지방산을 함유하고 있을 뿐만 아니라 콩보다 3배 정도 많은 사포닌의 함유하고 있어서 식물 유지 및 항종양제 자원으로 활용할 수 있는

[†]Corresponding author. E-mail : seoki@suncheon.ac.kr,
Phone : 82-61-750-3655, Fax : 82-61-750-3650

가치가 있다고 보고 되고 있다(6). 이와 같이 생리활성 등을 고려할 때 그 이용가치가 충분한 것으로 생각되며, 아울러 최근 우리나라에서는 녹차의 수요가 급증함에 따라 종자의 생산량도 함께 증가하고 있는 실정이므로 폐기되고 있는 종자로부터 사포닌 등과 같은 생리활성 물질을 분리하여 식품산업에 이용한다면 높은 부가가치를 기대할 수 있을 것을 사료된다.

따라서 본 연구에서는 녹차 종자를 식품 소재로서 이용하기 위하여 녹차 종자 메탄올 추출물에 대한 항산화, 항암 및 면역 활성과 같은 생리활성을 조사하고 그 활성을 녹차 메탄올 추출물의 활성과 비교 하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에서 사용한 녹차 종자 및 녹차는 전남 보성 지역의 다원에서 재배한 것을 구입하였다.

추출물 제조

추출물의 제조는 녹차의 씨를 분쇄한 다음 유지를 추출하고 남은 녹차종자와 녹차 100 g에 1000 mL의 순수 methanol을 첨가하여 80°C에서 9시간 동안 열수추출하고 여과하여 rotary vacuum evaporator로 농축한 후 고형물 함량을 구하여 각종 생리활성 시료로 사용하였다.

수소공여능

메탄올 추출물의 대한 수소공여능은 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazine (DPPH)의 환원성을 이용하여 528 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer로 측정하였다. 즉 추출물 및 대조구로 사용한 BHT 농도를 0.1% 되게 조제하여 조제시료 1 mL와 DPPH 용액 3 mL를 5초 동안 vortex mixer로 혼합하여 증류수에 대한 흡광도를 측정하고, 대조구는 시료대신 에탄올 1 mL을 첨가하여 대조구에 대한 흡광도의 감소비율로 나타내었다(9).

흰쥐의 간 지질과산화 억제기능

간 지질과산화 억제 기능 측정은 흰쥐를 ether로 마취시키고 혈액을 제거한 다음 간을 적출하여 0.15 M ice cold KCl 용액으로 세척한 후 간 무게의 10배 정도의 ice cold KCl를 가하여 간을 세절하고 ice bath상에서 균질화 하였다. 균질물 0.3 mL에 SDS 0.3 mL과 증류수 0.1 mL 및 시료 0.1 mL을 첨가한 후, 37°C에서 8시간 동안 반응시켜 생성된 과산화지질에 20% acetic acid 1.5 mL과 1.2% TBA시약 1 mL을 첨가하였다. 이들 반응 혼합액을 100°C에서 30분간 가열한 뒤 실온에서 냉각시킨 후 원심 분리(2,000 rpm, 15 min, 4°C)하여 상층액을 취하여 540 nm에서 흡광도를 측정

하였다(10).

암세포 증식 억제효과

본 실험에 사용한 인체 폐암세포주인 A549(lung carcinoma; KCLB 10185), 인체 대장암 세포주인 SW480(human colon cancer cells; KCLB 10228)를 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 10% FBS(fetal bovine serum)를 첨가한 RPMI 1640배지를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

Monolayer로 자란 암세포주를 0.25% trypsin-EDTA용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 최종 세포농도가 1×10^5 cell/mL 되도록 희석하여 24well plate에 각 well당 900 μ L씩 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 녹차종자 및 녹차 메탄올추출물 희석액을 100 μ L씩 각 농도별로 첨가하고 48시간 배양한 후 세포증식 정도를 SRB (sulforhodamine)방법으로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(11).

암세포 형태학적 관찰

광학현미경으로 녹차 및 종자메탄올 추출물에 대한 암세포의 손상 정도를 관찰하기 위해 SRB 정량 분석을 하기 전에 대조구와 실험군의 세포모양 변화를 inverted microscope를 관찰 비교한 것을 사진으로 촬영하였다.

일산화질소 측정

안정된 NO산화물인 NO₂(nitrite)는 Griess반응을 이용하여 측정하였다(12). 세포 배양 상층액을 96well plate에 100 μ L씩 넣고 여기에 Griess시약 (0.1% N-1-naphthyl-ethylenediamine in H₂O : 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄ = 1 : 1)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, microplate reader (Titertek Multiscan Plus, Finland)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 32 μ M까지 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다.

통계처리

실험결과는 평균(mean)±표준편차(SD)로 나타내었고, Student t-test를 이용하여 통계처리한 후 p<0.05, p<0.01 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

수소공여능

녹차종자 및 녹차메탄올추출물에 대한 항산화 활성을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 녹차종자 및 녹차 메탄올추출물을 100, 300, 500 및 1,000 μ g/mL로 처리하여 수소공여

Table 1. Hydrogen-donating activities of methanol extracts from green tea seed and green tea

Sample	Concentration (µg/mL)			
	100	300	500	1000
BHT				96.20±0.23
green tea	50.18±0.34 ¹⁾	60.06±0.43	70.91±0.12	76.14±0.87
green tea seed	8.88±0.11	11.50±1.07	13.86±0.56	21.86±0.99

¹⁾Data values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

능을 측정 한 결과 녹차메탄올추출물은 농도 의존적으로 항산화 효과가 증가 하였으며, 1000 µg/mL 농도 에서 80% 이상의 항산화 활성을 나타내어 대조구인 합성 산화제 BHT와 비슷한 효과를 보였다. 반면에 녹차종자메탄올 추출물은 1000 µg/mL 농도에서 21.86%의 수소공여능을 보여 녹차에 비해 항산화 활성이 낮음을 알 수 있었다.

Kim 등(9)은 녹차 에탄올 및 물 추출물에 대한 수소공여 능을 측정 한 결과 에탄올 추출물(0.1%)에서 74.9%, 물 추출 물(0.1%)은 53.2%의 항산화 활성을 나타내었다고 보고한 바 있어, 본 실험의 녹차메탄올 추출물에서 나타난 항산화 결과와 비슷함을 알 수 있었으며, 항산화 주요성분인 카테 킨의 함량이 녹차종자 메탄올 추출물 보다 녹차메탄올 추출 물에 더 많이 함유되어 있어 이러한 결과를 나타내었다고 생각된다.

쥐의 간 지질과산화 억제기능

녹차종자 및 녹차메탄올추출물에 대한 항산화 효과를 비교하기 위하여, 흰쥐 liver homogenate에 이들 추출물을 첨가한 다음 TBARS 함량을 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, 녹차종자 및 녹차메탄올추출물을 처리한 후 생성되는 MDA를 측정 한 결과 1000 µg/mL 농도에서 대조구의 86

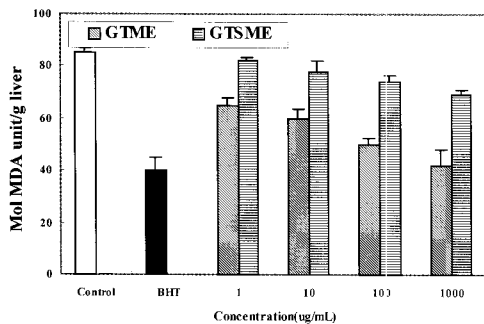


Fig. 1. Effects of methanol extracts from green tea seed and green tea on the MDA value of mouse liver homogenate.

Data values are expressed as mean±SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at *p<0.05 and **p<0.01 by Student t-test.
¹⁾GTME: methanol extract from green tea.
²⁾GTSME: methanol extract from green tea seed.

Mol/g에 비하여 각각 42 및 69 Mol/g 를 나타내었으며, 녹차 메탄올 추출물에서 항산화효과가 높은 것을 알 수 있었다. Kang 등(10)은 흰쥐의 간 microsome을 분리하여 녹차 카테 킨의 처리하였을 때 83.8% 지질과산화 억제 활성을 나타내 었으며, 대조구 BHT(89.8%)와 비슷하게 지질과산화 반응 을 효과적으로 억제하였다고 보고한 바 있다.

따라서 본 실험에서도 녹차메탄올 추출물이 녹차종자 메탄올 추출물 보다 지질과산화 억제 활성을 나타내어, 녹 차메탄올추출물에는 주요 항산화 성분인 카테킨을 어느 정도 함유하고 있다는 것을 추측할 수 있었다.

암세포 성장 억제 효과

녹차종자 및 녹차메탄올추출물을 처리하여 24시간 동안 A549, SW480 암세포주 성장 억제 효과를 조사한 결과 이들

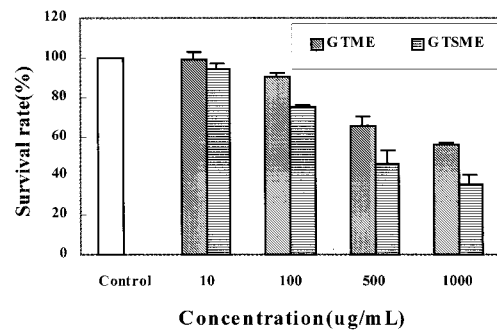


Fig. 2. Effects of methanol extracts¹⁾ from green tea seed and green tea on the proliferation of A549 by SRB assay.

Data values are expressed as mean±SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at *p<0.05 and **p<0.01 by Student t-test.
¹⁾GTME: methanol extract from green tea.
²⁾GTSME: methanol extract from green tea seed.
³⁾Methanol extracts were treated for 48 hr.

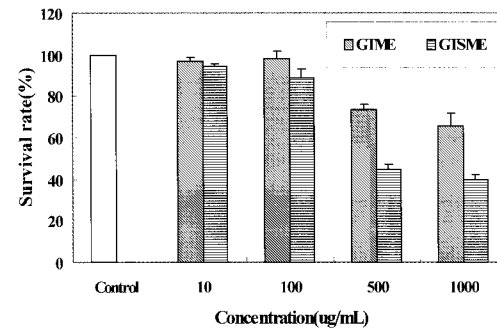


Fig. 3. Effects of methanol extracts¹⁾ from green tea seed and green tea on the proliferation of SW480 by SRB assay.

Data values are expressed as mean±SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at *p<0.05 and **p<0.01 by Student t-test.
¹⁾GTME: methanol extract from green tea.
²⁾GTSME: methanol extract from green tea seed.
³⁾Methanol extracts were treated for 48 hr.

추출물 농도에 따라 세포 성장이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2,3). 녹차메탄을 추출물을 10, 100, 500 및 1000 µg/mL 농도로 첨가 시 A549 세포주의 증식 억제율은 각각 1.6, 7.7, 35.1 및 44.1% 으로 나타났으며, 녹차종자 메탄추출물을 같은 농도로 첨가 시 1.3, 13.5, 45.5 및 54.1%로 나타났다.

또한 SW480 세포주에 대하여 녹차 메탄을 추출물을 같은 농도로 첨가 시 각각 1.5, 1.3, 24.5 및 30.2% 의 억제율을 나타내었으며, 녹차종자 메탄을 추출물은 각각 1.4, 8.5, 44.5 및 52.3%의 억제율을 나타내어 이들 추출물을 1000 µg/mL 농도로 처리 시 대조구에 비하여 각각 30, 50% 이상의 암세포 성장을 억제 하였으며, 녹차종자메탄을 추출물 첨가 시 그 효과가 더욱 높게 나타나는 것을 알 수 있었다.

Huh 등(14)은 녹차로부터 추출한 EGCG를 SKOV-3 및 OVCAR-3 난소암세포주에 25, 50 및 100 µM 농도로 6일간 처리하여 암세포 성장 억제효과를 측정 한 결과 대조구에 비하여 각각 농도에서 48.8, 82.5, 99.2% 및 53.9, 84.8, 97.7% 난소암세포 성장을 감소한다고 보고하였다.

Yoon 등(9)은 종자의 물 추출물 및 70% 에탄올 추출물을 100 µg/mL 농도로 각종 암세포에 대한 증식억제효과를 측정 한 결과 피부암 세포(67.1%), 후두암세포(92.4%), 난소암 세포(97.1%)의 증식억제 효과를 나타내었으며, 이들 활성은 차나무 종자의 사포닌류에 의한 것이라고 추정하였다. 따라서 본 연구에서도 녹차종자메탄을 추출물에서 암세포 성장억제를 유도하는 것을 확인 할 수 있으나, 앞으로 녹차종자로부터 사포닌을 분리 및 정제하여 항암효과의 기전과 그 효과에 대한 보다 구체적인 과학적 접근이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

암세포 형태학적 관찰

암세포 성장 억제 효과를 유도한 녹차종자 및 녹차 메탄을추출물을 A549 및 SW480 세포에 500 µg/mL 농도로 처리 하여 48시간 반응 시킨 후 암세포의 형태학적 변화를 광학 현미경으로 관찰한 결과는 Fig 4, 5와 같다. 즉 대조구의 세포는 세포막을 유지하며 배양용기 기벽에 부착되어 성장을 촉진 하였으나, 녹차종자 및 녹차 메탄추출물 처리군에서는 상대적인 세포수의 감소 및 배양용기에서 떨어져 부유하는 세포들의 형태학적인 변화를 관찰 할 수 있었다.

대식세포의 NO 생성능 측정

녹차종자 및 녹차 메탄추출물이 대식세포의 일산화질소 생산에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 대식세포주인 RAW264.7에 이들 추출물을 농도별로 처리하여 48 시간 배양 한 후, 배양액 중의 대식세포가 생산한 일산화질소로부터 산화된 NO₂⁻농도를 측정 한 결과 대조군(0.367 µM)에 비하여 녹차종자 및 녹차메탄추출물 100 µg/mL 의 농도 처리 군에서 대식세포의 NO생성을 각각 0.77 µM



Fig. 4. Inverted photomicrograph of A549 cells after treatment of methanol extracts from green tea and green tea seed for 48 hr (×200).

(A):Control
(B):Treated with 500 µg/mL methanol extract from green tea
(C):Treated with 500 µg/mL methanol extract from green tea seed.

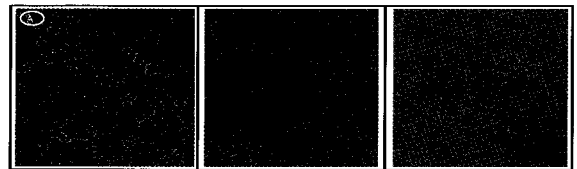


Fig. 5. Inverted photomicrograph of SW480 cells after treatment of methanol extracts from green tea and green tea seed for 48 hr. (× 200).

(A):Control.
(B):Treated with 500 µg/mL methanol extract from green tea.
(C):Treated with 500 µg/mL methanol extract from green tea seed.

와 2.04 µM로 유도하였으며, 녹차메탄을 추출물 보다 녹차종자 메탄을 추출물에서 그 효과가 현저히 높음을 알 수 있었다. 그러나 1000 µg/mL 고농도로 처리 시 오히려 NO의 생성을 억제하는 경향을 나타내었다(Fig 6).

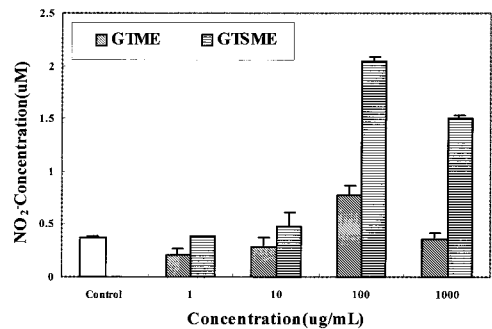


Fig. 6. Effects of methanol extracts¹⁾ from green tea seed and green tea on the generation of nitric oxide in macrophage cell lines.

Data values are expressed as mean ± SD from triplicate determinations. Significant differences were compared with control at *p<0.05 and **p<0.01 by Student t-test.

☐ GTME: methanol extract from green tea.

▨ GTSME: methanol extract from green tea seed.

¹⁾Methanol extracts were treated for 48 hr.

Park 등(15)은 대두로부터 분리한 사포닌은 10 µg/mL 농도에서 NO 생성을 유도 하는 것으로 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서도 녹차메탄을 추출물에서 더 많은 NO 생성량을 나타내었는데, 이것은 종자에 함유되어 있는 사포닌의 영향으로 추측할 수 있으나, 보다 구체적인 연구가 추후에 수행해야 할 것으로 사료된다.

요 약

녹차종자를 기능성 식품소재로서 이용하기 위하여 녹차종자 메탄올추출물의 생리활성을 녹차 메탄올추출물의 생리활성과 비교하였다. 녹차 메탄올추출물의 수소공여능은 100 µg/mL 농도 이상에서 50% 이상의 활성을 나타내었으나, 녹차종자 메탄올추출물은 1000 µg/mL 농도에서 21.86%의 활성을 나타내었다. 또한 녹차종자 및 녹차 메탄올추출물이 1000 µg/mL 농도로 처리된 흰쥐의 간 균질물에서 MDA의 생성량이 대조구의 86 Mol/g에 비하여 각각 60 및 50 Mol/g로 낮게 나타내어 이들 추출물은 항산화 효과가 있음을 알 수 있었다. 녹차종자 및 녹차 메탄올추출물은 1000 µg/mL 농도에서 A549 및 SW480 세포에 대하여 각각 20%, 50% 이상의 성장 억제율을 나타내었다. 또한 녹차종자 메탄올추출물이 500 µg/mL의 농도 처리된 암세포는 대조구에 비하여 상대적인 세포 수의 감소되었으며, 심한 형태학적인 변화를 보여주었다. 대식세포 RAW264.7에 녹차 및 녹차종자 메탄올추출물이 1, 10, 100 및 1000 µg/mL의 농도로 처리 하였을때, 이들 추출물은 100 µg/mL 농도까지 농도 의존적으로 NO(nitric oxide)의 생성을 유도 하였으며, 100 µg/mL의 농도에서 그 농도는 각각 0.77와 2.04 µM로서 녹차종자 메탄올추출물이 녹차 메탄올추출물보다 그 효과가 크게 나타났다.

참고문헌

1. Park, Y.H., Woun, E.K. and Son, D.J. (2002) Effect of pH on the stability of green tea catechins. *Korean J. Food Hyg. Safety*, 17, 117-123
2. Kang, T.J. (2003) The present position and future prospect of Korean green tea industry. *Korean academy of marketing science*, 1, 239-243
3. Cho, W.K. (2001) The components and medicinal effects of Green tea. *Dept. of Food & Nutrition, Gachongil College*, 28, 137-153
4. Sung, K.C. (2006) A study on the pharmaceutical characteristics and analysis of green-tea extract. *J. of Korean Oil Chemists*, 23, 115-124
5. So, S. (1999) Function of Biological activity from green tea. *Korean J. Food. Nutr.*, 5-18
6. Chuen, B.S. and Lee, M.Y. (2002) Cancer cell line is

sensitive to toxins extracted from kombucha (fungi), green tea and soybean milk. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 17, 452-455

7. Rah, H.H., Baik, S.O., Han, S.B. and Bock, J.Y (1992) Chemical compositions of Korean green tea plant. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 35, 272-275
8. Yosioka, I., Nishimura, T., Matsuda A. and Kitagawa, I. (1970) Saponin and saponenol, II. Seeds saponenols of *Thea sinensis* L (2). *Theasaponenol A. Chem. Pharmacol. Bull.*, 18, 1621-1632
9. Yoon, W.H., Choi, J.H., Lee, K.H. and Kim C.H (2005) Antimicrobial and antitumor activities of seed extracts of *Camellia sinensis* L. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 37, 108-112
10. Kim, S.M., Cho, Y.S., Sung, S.K., Lee, Il., Lee, S.H. and Kim, D.G.(2002) Antioxidative and Nitrite scavenging activity of pine needle and green tea extracts. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, 22, 13-19
11. Kang, W.S., Lee, Y.H., Chung, H.H., Kang, M.K., Kim, T.J., Hong, J.T. and Yun, Y.P. (2001) Effects of green tea catechins on the lipid peroxidation and superoxide dismutase. *J. Food Hyg. Safety*, 16, 41-47
12. Skehan, P., Storeng, S., Studiero, D., Monke, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J., Bodesh, H., Kenny, S. and Boyd, M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *National cancer institute*, 82, 1107-1112
13. Green, L.C., Wanger, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, 126, 131-138
14. Huh, S.W., Bae, S.M., Han, C.H., Choi, J.H., Kim, C.K., Park, E.K., Ro, D.Y., Lee, J.M. and Namkoong, S.E. (2004) Anti-tumor effects of epigallocatechin-3-gallate extracted from green tea on ovarian cancer cell lines. *Korean Society of Obsterics and Gynecology*, 47, 634-648
15. Park, KU., Wee, J.J., Kim, J.Y., Jeon, C.H., Kang, KS., Cho, Y.S. and Seo K.I (2005) Anticancer and immuno-activities of edible crude saponin from soybean cake. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 34, 1509-1513

(접수 2006년 9월 11일, 채택 2006년 11월 24일)