

## 쇠고기 스테이크 조리 시 백련 잎 추출물에 의한 Heterocyclic Amine류의 생성 및 돌연변이원성 억제 효과

문승은 · 성지훈 · 신한승\*

동국대학교 식품생명공학과 및 Lotus기능성식품소재연구소

### Inhibitory Effect of *Nelumbo nucifera* Leaf Extracts on the Formation of Heterocyclic Amines and Mutagenicity during Cooking Beef Steak

Seung-Eun Moon, Jihoon Sung, and Han-Seung Shin\*

Department of Food Science and Bioechnology and Institute of Lotus Functional Food Ingredient,  
Dongguk University-Seoul, Seoul 100-715, Korea

#### Abstract

Heterocyclic amines (HCAs) are food mutagens and carcinogens that are found in cooked fish, meat, and protein-rich foods. This study examined the inhibitory effect of marinades containing a *Nelumbo nucifera* leaf fraction on HCA formation in cooked beef steak. As a result of the Ames assay, cooked beef marinated with the *N. nucifera* leaf butanol fraction (2.0 g) cooked at 190°C showed a 61.5% reduction in overall mutagenicity. However, these data revealed no significant difference in mutagenicity in the ethanol, ethyl acetate, or water fractions. Formation of MeIQx (2-amino-3,8 dimethylimidazo[4,5-f]-quinoxalin) and PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine) was inhibited 60.7-63.5%. Cooked beef marinated with the water fraction of the *N. nucifera* leaf significantly ( $p<0.05$ ) reduced the formation of MeIQx, PhIP, and DiMeIQx (2-amino-3,4,8 trimethylimidazo[4,5-f]-quinoxaline) by 65.3, 67.6, and 73.9%, respectively. These results show that marinades containing the *N. nucifera* leaf fraction could be an alternative method for reducing HCA formation in cooked beef steak.

**Key words:** cooked beef steak, heterocyclic amines, mutagenicity, *Nelumbo nucifera* leaf, food safety

#### 서 론

Heterocyclic amines(HCAs)은 두 개 이상의 벤젠고리를 가지는 방향족 화합물로 Ames assay에 의해 잠재적인 돌연변이원으로 알려져 있으며(Van Dyck *et al.*, 1995), 화학 구조에 따라 순수 아미노산의 가열 분해 산물들인 amino-carbolines와 아미노기를 갖는 imidazole 고리가 quinoline 이나 quinoxaline 또는 pyridine에 붙어있는 amino-imidazo-azaarenes으로 분류할 수 있다. 300°C 이상의 조리조건에서 amino-carbolines류가 주로 생성되며 300°C 미만에서는 amino-imidazo-azaarenes류가 생성된다(Sugimura *et al.*, 1981; Wogan, 1992). 현재 25종의 HCAs는 식품과 model system 으로부터 돌연변이원으로 분류되었고 이들의 구조가 밝혀

졌다(Priza *et al.*, 1990). 대부분의 HCAs는 육류, 어류 등과 같은 단백질이 풍부한 식품에서 주 식품조리방법 중 하나인 가열 과정에서 생성되며(Layton *et al.*, 1995), 전구물질인 amino acid, sugar, creatinine 또는 creatine은 HCAs의 생성에 영향을 미친다(Van Dyck *et al.*, 1995). 또한 육류와 어류 등의 종류와 조리 조건, 특히 조리온도, 조리시간은 HCAs의 생성량에 영향을 미치는 주요 요소로 보고되고 있다(Knize *et al.*, 1998).

국제암연구센터(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서는 HCAs를 발암가능물질(possibly carcinogenic to human)로 구분하고 있으며, 특히 MeIQ(2-amino-3,4dimethylimidazo[4,5-f]-quinoline), MeIQx(2-amino-3,8 dimethylimidazo[4,5-f]-quinoxalin), PhIP(2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine)는 2B그룹(인체발암가능물질)으로 분류하고 있다. Layton 등(1995)은 장기간의 동물 실험을 하여 HCAs의 섭취와 암의 상관관계를 밝혔으며, 역학 조사하여 채장암, 결장암, 방광암, 유방암과 같은 여

\*Corresponding author: Han-Seung Shin, Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University-Seoul, Seoul 100-715, Korea. Tel: 82-2-2260-8590, Fax: 82-2-2290-1352, E-mail: spartan@dongguk.edu

러 종류의 암과 육류, 어류 등의 섭취량간의 관계를 보고 하였다(Felton *et al.*, 2001). Ushiyama 등(1991)은 HCAs에 대한 노출량을 평가하기 위해 각각 다섯 명의 남성(33-80세), 여성(13-67)을 대상으로 하여 24시간된 소변 샘플을 분석한 결과 HCAs의 검출 농도가 0.03-47 ng/24-h urine의 수준이었으며, 한 사람 당 MeIQx, PhIP는 각각 0.3-3.9, 0.005-0.3 µg 정도 섭취량을 보였다. 반대로 24시간 동안 식품섭취를 하지 않고 비 경구 경로로 영양분을 공급받은 사람들에게는 HCAs가 검출되지 않았다. Rohrmann과 Becker(2002)의 연구에서 인간은 하루 평균 103-160 ng의 HCAs를 섭취한다고 보고하였고, PhIP, MeIQx, DiMeIQx(2-amino-3,4,8 trimethylimidazo[4,5-f]-quinoxaline)의 섭취량은 각각 63, 34, 2 ng/d로 나타났다. 식품에 존재하는 발암가능물질은 미량이지만 지속적인 식품 섭취에 의한 정기적으로 노출은 발암 위험성을 높인다. 이들은 일상 생활에서의 HCAs 노출 정도를 줄이라고 권장하고 있으며, 최근에는 돌연변이원성, 발암성 물질을 분해 또는 억제시키는 돌연변이원성 억제인자를 찾는 것이 중요해졌다(Shin, 2005). 탁월한 항산화 효과와 경제성 등의 이유로 합성 항산화제가 널리 사용되었지만 발암 가능성이 제기되면서 천연 항산화제에 대한 연구가 활발해졌다. 천연 약용식물인 백련 잎은 예로부터 출혈성 위궤양, 위염, 치질, 출혈, 설사, 야뇨증에 효과가 있으며 각종 독성 물질에 대한 중화작용을 하는 것으로 알려져 민간치료제로 사용되어 왔다(Lee *et al.*, 2006). 최근에는 백련 잎의 생리활성, 성분 분석에 대한 연구가 이루어지고 있으며(Kim *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2009), 백련 잎, 연근, 연자육 등의 분획물에 따른 항산화효과(Park *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2009), 백련 잎의 항균 효과(Lee *et al.*, 2006) 등이 연구되어 왔다.

이러한 백련 잎의 항산화 효과에 대한 사전 연구 결과를 바탕으로, 본 연구에서는 백련 잎 추출물이 가열한 쇠고기 스테이크에서의 HCAs 형성과 돌연변이원성에 미치는 영향에 대하여 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

본 연구에 사용된 백련 잎은 전남 무안에서 구입하였으며, 진간장, 청주, 후추, 양파, 생강, 참기름, 배, 설탕, 통깨, 마늘, 레몬주스, 올리고당, 쇠고기 등심(호주산)은 서울에 위치한 롯데마트(Korea)에서 구입하였다. 3종의 HCAs 표준물질(MeIQx, DiMeIQx, PhIP)은 Toronto Research Chemicals Inc.(Canada)에서 구입하였으며, Polysulfonic acid(PRS) Bond Elute Columns(500 mg), C-18 cartridge (100 mg), Extrelut-20 columns은 Varian (USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 내부표준물질인 caffeine은 Sigma사(USA)에서 구입하였다.

### 백련 잎 추출물과 유기용매 별 분획물 및 소스제조

조분쇄된 백련 잎 25 g에 10배의 80% 에탄올 250 mL을 첨가한 후 soxhlet 장치를 이용하여 환류 냉각하며 3시간 동안 80°C 수욕 상에서 3회 반복 추출하였다. 이 용액을 40°C에서 rotary vacuum evaporator(Korea Bio-Tech Inc., Korea)를 이용하여 감압 농축한 후 동결 건조하여 백련 잎 에탄올 추출물을 제조하였다. 이 에탄올 추출물에 물을 녹여 분획할때기에 넣고 ethyl acetate를 첨가하여 ethyl acetate 층과 물 층을 분획한 후, 감압 농축하여 분획물을 얻었다. 동일 방법으로 부탄올 분획물을 얻었으며 최종 남은 용액은 물 분획물이라 칭하였다. 얻어진 분획물들은 감압농축 및 동결 건조하여 사용하였다.

소스는 Table 1에 나타낸 재료와 분획물을 첨가하여 제조하였다. 돌연변이원성 실험에는 butanol fraction(0.5, 1.0, 2.0, 4.0 g), ethyl acetate(2.0 g), ethanol(2.0 g), water fraction(2.0 g)을 첨가하여 각각의 소스를 제조하였고 발암가능성 물질 HCAs의 생성 억제 실험을 위해 water fraction(2.0, 4.0, 8.0 g)을 첨가하여 농도 별로 기능성 소스를 제조하였다.

### 조리조건

쇠고기 등심 100 g을 이용하여 대조군(백련 잎 추출물을 첨가하지 않음)과 각각의 분획물이 첨가된 발암가능성 물질 생성 억제 기능성 소스들에 채워 4시간 동안 0°C에서 냉장 숙성한 실험 군을 준비하였다. 이 시료들은 표면 온도가 190°C와 225°C인 Teflon-coated electric frying pan(Cheflin Corp., Korea)에 양면을 10분간 가열하였다. 조리 시간 중 프라이팬의 가열 온도 측정에는 철 표면온도계를 사용하였고, 쇠고기의 내부온도는 surface temperature thermometer(Trend Instruments Inc., USA)를 사용하여 측정하였다. 가열된 고기는 잘게 자른 뒤 -70°C deep freezer에 3시간 동안 냉동한 후, 동결건조기(Labconco, Kansas City, MO, USA)를 이용하여 건조시킨 다음, 막자사발과 블렌더(Hanil Electronics, Korea)를 이용하여 잘게 부수었다.

### 돌연변이원성 시험

돌연변이원성 시험은 Ames 등(1975)의 방법에 따라 S-9 mixture(Molecular Toxicology Inc., USA)존재 하에서 *S. Typhimurium* TA98(Molecular Toxicology Inc., USA)를 균주로 사용하여 행하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO)는 negative control(spontaneous revertant colonies)로서 사용되었고 2-aminoanthracene은 *S. Typhimurium* TA98 균주의 positive control로 사용되었다. 돌연변이원성의 결과 분석은 Moore와 Felton(1983)의 방법에 따라 실시되었으며 용량반응곡선의 liner portion은 가열된 육류의 역돌연변이 집락을 나타내는데 사용되었다.

### 발암가능성 물질 HCAs 추출 및 정제

동결 건조된 고기에서 HCAs을 정제 추출하기 위해서 Gross와 Gruter(1992)의 고체상 추출방법을 변형하여 사용하였다. 시료를 4 g을 취하고 1 M NaOH 16 mL을 가하여 3시간 동안 sonication(JAC Ultrasonic 2010, Kodo Co., Japan)을 한 뒤, 내부표준물질인 caffeine(5 µg/mL)을 spiking 하여 homogenizer(Omni macro homogenizer, Omni Co., USA)로 균질화하였다. Chem Elut Extraction cartridge에 균질된 용액을 가하여 10분 동안 잘 흡착되도록 한 뒤, 0.1 M HCl 6 mL과 0.1 M MeOH:0.1 M HCl(6:4, v/v)을 5 mL씩 3회 가한 후 H<sub>2</sub>O 2 mL을 첨가하여 미리 활성화시킨 Bond-Elut PRS 컬럼에 통과시켰다. 그 다음 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Toluene(95:5, v/v)을 Chem Elut Extraction cartridges에 20 mL 씩 3회 가하여 활성화된 Bond-Elut PRS 컬럼에 용출된 분석물을 통과하도록 하였다. Bond-Elut PRS 컬럼에 H<sub>2</sub>O를 5 mL씩 3회 가하여 washing한 후 MeOH 5 mL와 H<sub>2</sub>O 5 mL로 미리 활성화시킨 C-18 cartridge을 연결시키고 0.5 M AcONH<sub>4</sub>(pH 8) 20 mL을 가하여 용출시켰다. 용출이 끝나면 C-18 cartridge에 H<sub>2</sub>O 2 mL를 가한 뒤 MeOH:NH<sub>3</sub>(9:1, v/v) 0.8 mL로 남은 분석물을 용출시켰다. 이 용액을 40°C에서 질소 농축(MGS-2200, Tokyo Rikakikai Co., Japan)한 뒤 1 mL의 MeOH로 mass up하여 LC/MS에 주입하였다.

### HCAs 분석 조건

가열된 쇠고기에서의 HPLC 분석을 위해 사용된 HPLC 장비는 Agilent 1100 series(Agilent Technologies, USA)이었다. 가열된 쇠고기에서의 HCAs의 분석을 위한 크로마토그래피 분리를 위한 LC 분석조건은 다음과 같다. Zorbax RX-C8 column(Agilent Technologies, Narrow-Bore 2.1×150 mm, 5 µL)을 사용하였고 column temperature는 25°C이며, 샘플의 injection volume은 5 µL이었다. 각 표준 물질의 분리를 위해 0.2 mL/min의 유속으로 설정하였으며 이동상 A는 30 mM ammonium formate buffer(pH 3.7)를 사용하였고 이동상 B는 acetonitrile이었으며 기울기 용매 조건을 사용하였다. 기울기 용매조건 초기와 0-15분 동안에는 이동상 A를 88%, 15-25분 동안에는 50%, 25-33분 동안에는 88%로 설정하여 흘러주었으며, 컬럼의 재평형을 위해 15분간 88%로 흘러주었다. 사용된 질량 분석기는 Agilent 1100 series LC-MSD이었으며, 이온화는 양이온(positive ion) 방법의 전자 분무 이온화(electrospray ionization, ESI)이었다. quadrupole mass analyzer와 연결된 질량분석기를 사용하였으며, capillary voltage와 nebulizer pressure은 4 kV와 30 psig이었고 drying gas flow와 drying gas temperature는 600 L/h와 350°C이었다.

### 통계처리

모든 실험 data는 3회 반복한 것이며 window용 Sigma-Stat 2.0(Jandel Co., USA)를 이용하여 실험 군 간의 통계학적 분석이 이루어졌다. 각 군간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)를 시행하였으며 유의성은 신뢰구간  $p < 0.05$ 에서 의미를 부여하였다. 결과의 비교를 위해 Student-Newman-Keuls test를 이용하였으며 돌연변이원성 시험은 용량반응곡선의 선형회귀분석(linear regression analysis)을 통해 육류의 역 돌연변이 집락을 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 백련 잎을 활용한 기능성 소스의 돌연변이원성 억제 평가

본 연구에서는 백련 잎을 이용하여 마리네이드 소스가 첨가된 쇠고기에서의 돌연변이원성 억제능력과 발암가능성 물질인 HCAs의 생성 억제 효과를 알아보았다. Choi 등(2009)의 연구에서와 같은 추출 방법으로 백련 잎의 ethanol, ethyl acetate, butanol, water fraction을 얻을 수 있었다.

Bjeldanes 등(1983)에 의하면 frame shift 돌연변이를 측정할 때 쓰이는 TA98 균주가 base pair 돌연변이 측정 시 사용되는 TA100 보다 HCAs의 돌연변이를 알아볼 때 더 많이 쓰이는 것으로 고찰된다. Table 1에 나타낸 재료들에 butanol fraction 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 g을 첨가한 마리네이드 소스에 쇠고기 스테이크를 재워 0°C에서 4시간 동안 냉장 숙성시켜 225°C에서 가열한 뒤, *Salmonella* Typhimurium TA98(Molecular Toxicology Inc., USA)을 균주로 한 돌연변이원성 억제효과 실험의 결과를 Table 2에 나타내었다. Butanol fraction 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 g을 첨가하였을 때 각각 49.8, 51.0, 61.5, 64.9%의 농도 의존적인 돌연변이원성 억제효과를 나타내었으며, butanol fraction 첨가군 중에서

**Table 1. Ingredients of marinade sauce added with fractions of *Nelumbo nucifera* leaf**

Ingredients	Contents (g or mL)
Garlic	15 (g)
Ginger	5 (g)
Lemon juice	15 (mL)
Oionon	75 (g)
Oligosaccharide	22 (mL)
Pear	45 (g)
Pepper	3 (g)
Refined rice wine	15 (mL)
Sesame	5 (g)
Sesame oil	30 (mL)
Soy sauce	120 (mL)
Sugar	15 (g)
Water	45 (mL)

**Table 2. Effects of butanol fraction of *Nelumbo nucifera* leaf on the mutagenicity measured by *Salmonella* Typhimurium TA98**

Sample (g)	Frying temp. 225°C	
	Mutagenicity (Revertants/g of meat) <sup>1)</sup>	Inhibition (%)
Control	1987±86 <sup>a</sup>	0.0
0.5	997±68 <sup>b</sup>	49.8
1.0	974±68 <sup>b</sup>	51.0
2.0	765±61 <sup>c</sup>	61.5
4.0	698±51 <sup>c</sup>	64.9

<sup>1)</sup>Data represent the mean and standard deviation (n=3).

Means in the same columns bearing different superscripts differ significantly ( $p<0.05$ ) by Student-Newman-Keuls methods.

특히 2.0 g 이상을 첨가하였을 때 통계적으로 유의한( $p<0.05$ ) 돌연변이원성 억제효과를 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 ethanol, ethyl acetate, water fraction 2.0 g을 각각 첨가한 마리네이드 소스를 제조하여 쇠고기 스테이크를 위와 같은 조건으로 조리하여 돌연변이원성 억제효과를 평가하였으며 butanol fraction을 첨가한 결과와 비교하였다. 각 용매 분획물의 마리네이드 소스를 처리한 고기를 225°C에서 가열한 결과 butanol fraction의 돌연변이원성 억제효과는 61.5%의 값을 나타내었고 ethyl acetate, ethanol, water fraction은 각각 55.9, 55.7, 55.1%의 억제효과를 보여줌으로써, 용매 별 fraction의 돌연변이원성 억제효과는 유의적인 차이가 없다고 사료된다(Table 3). Kikugawa(2004)는 가열된 고기에서 돌연변이를 최소화하는 방법 중 하나로 Maillard reaction 초기단계에서 pyrazine cation radical의 형성 억제를 보고하였으며 이는 polyphenol 화합물들이 관여하는 것으로 여겨진다. 이러한 폐놀성 물질은 백련 잎의 butanol, ethanol, ethyl acetate, water fraction에서 122.72-341.39 µg/g 만큼 존재하는 것으로 보고되었다(Choi *et al.*, 2009). 이에 따라 백련 잎 용매 분획물을 첨가하여 가열된 쇠고기의 높은 돌연변이원성 억제효과는 총 폐놀 성분 함량과 연관되는 것으로 사료된다.

**Table 3. Effects of fractions (2 g) of *Nelumbo nucifera* leaf on the mutagenicity measured by *Salmonella* Typhimurium TA98**

Sample (g)	Frying temp. 225°C	
	Mutagenicity (Revertants/g of meat) <sup>1)</sup>	Inhibition (%)
Control	1987±86 <sup>a</sup>	0.0
Butanol	765±61 <sup>b</sup>	61.5
Ethylacetate	797±58 <sup>b</sup>	59.9
Ethanol	881±48 <sup>b</sup>	55.7
Water	892±45 <sup>b</sup>	55.1

<sup>1)</sup>Data represent the mean and standard deviation (n=3).

Means in the same columns bearing different superscripts differ significantly ( $p<0.05$ ) by Student-Newman-Keuls methods.

### 백련 잎을 활용한 기능성 소스의 HCAs 형성 억제 평가

동결 건조된 쇠고기를 고체상 추출방법(SPE)을 이용하여 정제 추출하였고 이 정제추출물을 이용하여 쇠고기의 HCAs 형성 억제효과 평가를 알아보았다. 첨가한 백련 잎 fraction은 식용이 가능한 water fraction을 사용하였다. 백련 잎 water fraction을 첨가하지 않은 쇠고기 100 g에 HCAs의 표준용액을 spike하여 전처리를 한 후, 회수율을 구하였다. 전체회수율은 31-76%이며, PhIP는 37±4%의 낮은 회수율을 나타내었고 그 밖에는 약 70% 이상의 회수율을 보여주었다. Knize 등(1997)의 연구결과에서는 MeIQx, PhIP, DiMeIQx의 회수율이 67, 30, 72%이었고, Abdulkarim과 Smith(1998)에서는 42.0, 30.5, 45.7%의 회수율을 나타내었다.

표면온도가 190°C인 프라이팬에서 쇠고기를 가열한 경우 PhIP가 26.05±1.2 ng/g로 가장 많이 검출되었고, MeIQx는 12.23±1.9 ng/g 검출되었다(Table 4). 백련 잎의 water fraction 2.0, 4.0, 8.0 g을 첨가한 마리네이드 소스로 처리한 쇠고기 스테이크를 위와 같은 조건으로 가열한 결과, 각 농도에서 MeIQx는 30.9, 48.4, 63.5%, PhIP는 31.6, 47.4, 60.7%의 농도의존적인 억제효과를 나타내었다(Table 4). Trp-P-1(3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido-[4,3-b]indole), AaC(2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole), MeAaC(2-amino-3-methyl-5H-pyrido-[1,2-a:3,2-d]imidazole), MeIQx, DiMeIQx, PhIP, IQ(2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline)는 다양한 조건에 따라 처리된 쇠고기 패티에서 나타나는 돌연변이원으로 알려져 있다. 하지만 본 연구와 같이 약 200-300°C인 높은 온도에서 쇠고기를 조리할 경우에는 MeIQx, DiMeIQx, PhIP이 검출되는 것으로 사료된다(Felton *et al.*, 1986).

표면온도가 225°C인 프라이팬에서 쇠고기를 가열한 결과 MeIQx는 21.41±3.2 ng/g 검출되었고 DiMeIQx, PhIP는 각각 14.61±1.4, 38.21±3.7 ng/g이 검출되어 190°C에서 조리한 경우보다 많이 검출되었다(Table 5). 발암가능물질인 HCAs 형성에 있어서 조리온도는 매우 중요한 요소 중 하나이다. Shin과 Ustunol(2004)은 약 200°C까지는 조리온

**Table 4. Effects of water fraction of *Nelumbo nucifera* leaf on the formation of heterocyclic amine in cooked meats at 190°C**

Sample (g)	MeIQx (ng/g) <sup>1)</sup>	Inhibition (%)	PhIP (ng/g)	Inhibition (%)
Control	12.23±1.9 <sup>a</sup>	0.0	26.05±1.2 <sup>a</sup>	0.0
2.0	8.45±1.4 <sup>a</sup>	30.9	17.81±1.4 <sup>a</sup>	31.6
4.0	6.31±1.7 <sup>a</sup>	48.4	13.70±1.0 <sup>b</sup>	47.4
8.0	4.46±1.3 <sup>b</sup>	63.5	10.24±0.8 <sup>b</sup>	60.7

<sup>1)</sup>Values are expressed on a cooked beef basis.

Means in the same columns bearing different superscripts differ significantly ( $p<0.05$ ) by Student-Newman-Keuls methods.

Data represent the mean and standard deviation (n=3).

**Table 5.** Effects of water fraction of *Nelumbo nucifera* leaf on the formation of heterocyclic amine in cooked meats at 225°C

Sample (g)	MeIQx (ng/g) <sup>1)</sup>	Inhibition (%)	DiMeIQx (ng/g)	Inhibition (%)	PhIP (ng/g)	Inhibition (%)
Control	21.41±3.2 <sup>a</sup>	0.0	14.61±1.4 <sup>a</sup>	0.0	38.21±3.7 <sup>a</sup>	0.0
2.0	13.25±3.6 <sup>a</sup>	38.1	9.23±1.8 <sup>a</sup>	36.8	29.05±3.1 <sup>b</sup>	33.9
4.0	9.14±2.8 <sup>b</sup>	57.3	7.50±1.6 <sup>a</sup>	48.6	20.24±3.8 <sup>bc</sup>	47.0
8.0	7.43±2.1 <sup>b</sup>	65.3	3.81±1.2 <sup>b</sup>	73.9	12.37±1.2 <sup>c</sup>	67.6

<sup>1)</sup>Values are expressed on a cooked beef basis.

Means in the same columns bearing different superscripts differ significantly ( $p<0.05$ ) by Student-Newman-Keuls methods.

Data represent the mean and standard deviation (n=3).

도가 증가할수록 돌연변이원성도 증가하며, 200-250°C의 온도범위에서는 돌연변이원성의 증가가 적었으나 300°C 이상일 때 급격하게 상승하는 것으로 보고하였다. Knize 등(1994)은 조리온도를 150, 190, 230°C로 설정하여 쇠고기 패티에서의 HCAs 함량 분석한 결과 온도가 증가함에 따라 HCAs의 생성도 증가하는 것을 나타내었고 또한 Ahn과 Grun(2005a)은 180-220°C에서 가열한 쇠고기 패티의 HCAs의 함량을 분석하여 220°C에서 가장 높은 검출빈도를 보여주었다. 백련 잎을 첨가한 마리네이드 소스의 HCAs의 생성억제 효과를 보기 위해 water fraction 2.0, 4.0, 8.0 g을 첨가하여 쇠고기를 가열한 결과 DiMeIQx의 경우 각 농도에서 36.8, 48.6, 73.9%로 가장 억제효율이 좋았고 다음으로 PhIP(33.9-67.6%), MeIQx(38.1-65.3%) 순으로 HCAs 형성이 억제되었다(Table 5).

백련 잎에는 생리활성 성분으로서 nelumboside, nuciferine, coclaurine 등의 alkaloid류, gallic acid와 methyl gallate 등의 aromatic acid류 및 luteolin, quercetin, isoquercitrin, hyperoside, rutin, kaempferol 등의 flavonoid류가 있다(Kim *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2006). DPPH radical 소거능을 분석한 결과 p-hydroxybenzoic acid, luteolin 및 quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside가 가장 우수한 항산화 효과를 나타냈으며, 특히 luteolin은 대조군으로 사용된 ascorbic acid보다 강력한 DPPH radical 소거능을 보였다(Ahn and Grun, 2005b). Choi 등(2009)의 연구에서는 백련 잎에는 총 페놀 함량 분석에 의해 페놀성 물질이 상당히 존재한다는 것을 알 수 있었으며, DPPH radical 소거능, ABTS cation radical 소거능을 통해 확인할 수 있는 항산화 능력이 페놀 성분과 연관성이 있다고 보고하였다. Flavonoid와 같은 페놀성 성분들은 HCAs 형성 과정 중 maillard reaction의 초기 단계에서 생성되는 free radical을 억제함으로써 반응의 산물인 pyrazine, pyridine, pyridazine의 생성을 막는다(Namiki, 1998). 즉 free radical에 전자를 공여함으로써 산화를 제한하여 HCAs 생성을 억제하는 것으로 고찰된다.

따라서 백련 잎 추출물은 heterocyclic amine류 형성과 돌연변이원성을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타나 고단백질 식품 섭취시 안전성 측면에서 긍정적인 영향을 미

칠 것으로 판단된다.

백련 잎 이외의 페놀성 물질을 함유하는 식품 소재에 관하여 많은 연구가 보고되었다. Tsen 등(2006)의 연구에서는 로즈마리 추출물을 농도 별로 첨가한 쇠고기 패티를 191, 204°C에서 5분씩 양면을 가열한 결과 MeIQx, PhIP, Norharman(9H-pyrido[3,4-b]indole), Harman(1-methyl-9H-pyrido[3,4-b] indole)의 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 로즈마리가 페놀성 항산화제로서 free radical을 제거하는 능력이 크기 때문에 식품에서의 HCAs 형성을 감소시키는 것으로 사료된다(Tsen *et al.*, 2006). 이 밖에 페놀성 물질을 많이 함유하고 있는 식품으로 라즈베리, 블랙베리(Pantelidis *et al.*, 2006), 포도 씨앗(Ahn and Grun, 2005b), 올리브 잎(Ha *et al.*, 2009)이 존재한다. Salmon 등(1997)의 연구에서는 당, 올리브유, 식초, 마늘, 레몬 주스, 식염 등을 이용한 마리네이드 소스를 첨가하여 가열한 chicken에서 92%의 HCAs 생성억제효과를 나타내었다. 이 밖에도 붉은 와인(Busquets *et al.*, 2006), 향신료, 백리향, 마늘(Murkovic *et al.*, 1998), 올리고당(Shin *et al.*, 2003) 등이 첨가된 쇠고기에서 발암가능성 물질인 HCAs의 생성이 억제된다고 보고되었다.

## 요 약

일상 생활에서 섭취하는 가열한 생선, 육류 등의 고단백질 식품에서는 돌연변이원, 발암가능성 물질인 heterocyclic amine류가 생성된다. 안전성 측면을 고려하고자 백련 잎을 이용한 마리네이드 소스를 첨가하여 쇠고기의 HCAs의 형성억제효과와 돌연변이원성 억제효과를 알아보았다.

Ames assay 결과 백련 잎 butanol fraction을 2.0 g 첨가하여 가열한 쇠고기 스테이크에서 61.5%로 높은 돌연변이원성 억제효과를 나타내었지만 용매 별 fraction 첨가군 사이에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

가열 전 쇠고기 마리네이드 소스에 식용이 가능한 백련 잎 water fraction(2.0, 4.0, 8.0 g)을 첨가한 후 190°C에서 가열한 결과 MeIQx(2-amino-3,8 dimethylimidazo[4,5-f]-quinoxalin)는 30.9-63.5%, PhIP(2-amino-1-methyl-6-phenyl-

imidazo[4,5-*b*]-pyridine)는 31.6-60.7% 억제되었다. 225°C에서의 가열된 쇠고기에서는 MeIQx가 38.1-65.3%, DiMeIQx (2-amino-3,4,8 trimethylimidazo[4,5-*f*]-quinoxaline)는 36.8-73.9%, PhIP는 33.9- 67.6%의 억제효과를 보였다. 따라서 백련 잎 추출물은 heterocyclic amine류 형성과 돌연변이 원성을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타나 고단백질 식품 섭취시 안전성 측면에서 긍정적인 영향을 미칠 것으로 판단된다.

## 참고문헌

- Abdulkarim, B. G. and Smith, J. S. (1998) Heterocyclic amines in fresh and processed meat products. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 4680-4687.
- Ahn, J. and Grun, I. U. (2005a) Heterocyclic amines: 1. Kinetics of formation of polar and nonpolar heterocyclic amines as a function of time and temperature. *Food Chem. Toxicol.* **70**, 173-179.
- Ahn, J. and Grun, I. U. (2005b) Heterocyclic amines: 2. Inhibitory effects of natural extracts on the formation of polar and nonpolar heterocyclic amines in cooked beef. *Food Chem. Toxicol.* **70**, 263-268.
- Ames, B. N., Mccann, J., and Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**, 347-364.
- Bjeldanes, L. F., Morris, M. M., Timourian, H., and Hatch, F. T. (1983) Effects of meat composition and cooking conditions on mutagen formation in fried ground beef. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 18-21.
- Busquets, R., Puignou, L., Garceran, M. G., and Skog, K. (2006) Effect of red wine marinades on the formation of heterocyclic amines in fried chicken breast. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8376-8384.
- Choi, H. Y., Jung, K. H., and Shin, H. S. (2009) Antioxidant activity of the various extracts from different parts of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertner.). *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 1051-1054.
- Felton, J. S., Knize, M. G., Salmon, C. P., Malfatti, M. A., and Kulp, K. S. (2001) Human exposure to heterocyclic amine food mutagens/ carcinogens: relevance to breast cancer. *Environ. Mol. Mutagen.* **39**, 112-118.
- Felton, J. S., Knize, M. G., Shen, N. H., Andresen, B. D., Bjeldanes, L. F., and Hatch, F. T. (1986) Identification of the mutagens in cooked beef. *Environ. Health Perspect.* **67**, 17-24.
- Gross, G. A. and Gruter, A. (1992) Quantitation of mutagenic/ carcinogenic heterocyclic aromatic amine in food products. *J. Chromatogr.* **592**, 271-278.
- Ha, J. Y., Goo, S. Y., Sung, J. S., and Shin, H. S. (2009) Antioxidant and cytoprotective activity of the olive leaf (*Olea europaea* L. Var. Kalamata) extracts on the mouse embryonic fibroblast cell. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 965-970.
- Kikugawa, K. (2004) Prevention of mutagen formation in heated meat and model system. *Mutagenesis* **19**, 431-439.
- Kim, S. B., Rho, S. B., Rhyu, D. Y., and Kim, D. W. (2005) Effect of *Nelumbo nucifera* leaves on hyperlipidemic and atherosclerotic Bio F1B hamster. *Kor. J. Pharmacog.* **36**, 229-234.
- Knize, M. G., Dolbeare, F. A., Carroll, K. L., Moore, D. H., and Felton, J. S. (1994) Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food Chem. Toxicol.* **32**, 595-603.
- Knize, M. G., Salmon, C. P., Hopmans, E. C., and Felton, J. S. (1997) Analysis of foods for heterocyclic aromatic amine carcinogens by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **763**, 179-185.
- Knize, M. G., Sinha, R., Brown, E. D., Salmon, C. P., Levander, O. A., Felton, J. S., and Rothman, N. (1998) Heterocyclic amine content in restaurant-cooked hamburgers, steaks, ribs and chicken. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4648-4651.
- Layton, D. W., Bogen, K. T., Knize, M. G., Hatch, F. T., Johnson, V. M., and Felton, J. S. (1995) Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. *Carcinogenesis* **16**, 39-52
- Lee, K. S., Oh, C. S., and Lee, K. Y. (2006) Antimicrobial effect of the fractions extracted from a lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 219-223
- Moore, D., and Felton, J. S. (1983) A microcomputer program for analyzing Ames test data. *Mutat. Res.* **119**, 95-102
- Murkovic, M., Steinberger, D., and Pfannhauser, W. (1998) Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *Z. Lebensm Unters Forsch A* **207**, 477-480.
- Namiki, M. (1998) Chemistry of Maillard reactions: Recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Adv. Food Res.* **32**, 115-184.
- Ono, Y., Hattori, E., Fukaya, Y., Imai, S., and Ohizumi, Y. (2006) Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 238-244.
- Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., and Diamantidis. (2006) Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and cornelian cherries. *Food Chem.* **102**, 777-783.
- Park, C. H., Hur, J. M., Song, K. S., and Park, J. C. (2007) Phenolic compounds from the leaves of *Nelumbo nucifera* showing DPPH radical scavenging effect. *Kor. J. Pharmacog.* **38**, 263-269.
- Priza, M. W., Aeschbacher, H. U., Felton, J. S., and Sato, S. (1990) Mutagens and carcinogens in the diets. Wiley-Liss, NY.
- Rohrmann, S. and Becker, N. (2002) Development of a short questionnaire to assess the dietary intake of heterocyclic aromatic amines. *Public Health Nutr.* **5**, 699-705.
- Salmon, C. P., Knize, M. G., and Felton, J. S. (1997) Effects of marinating on heterocyclic amine carcinogen formation in grilled chicken. *Food Chem. Toxicol.* **35**, 433-441.

28. Shin, H. S. (2005) Influence of food ingredients on the formation of heterocyclic aromatic amine in cooked pork patties. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 572-575.
29. Shin, H. S., Park, H. K., and Park, D. W. (2003) Influence of different oligosaccharides and inulin on heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in fried ground beef patties. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6726- 6730.
30. Shin, H. S. and Ustunol, Z. (2004) Influence of honey-containing marinades on heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in fried beef steak and chicken breast. *J. Food Sci.* **69**, 147-153.
31. Sugimura, T., Nagao, M., and Wakaayashi, K. (1981) Metabolic aspects of the comutagenic action of norharman. *Adv. Exp. Med. Biol.* **136**, 1011-1025.
32. Tsen, S. Y., Ameri, F., and Smith, J. S. (2006) Effects of rosemary extracts on the reduction of heterocyclic amines in beef patties. *J. Food Sci.* **71**, 469-473.
33. Ushiyama, H., Wakabayashi, K., Hirose, M., Itoh, H., Sugimura, T., and Nagao, M. (1991) Presence of carcinogenic heterocyclic amines in urine of healthy volunteers eating normal diet, but not of inpatients receiving parenteral alimentation. *Carcinogenesis* **12**, 1417-1422.
34. Van Dyck, M. M. C., Rollmann, B., and De Meester, C. (1995) Quantitative estimation of heterocyclic aromatic amines by ion-exchange chromatography and electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* **697**, 377-382.
35. Wogan, G. N. (1992) Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: Recent progress and avenues for future research. *Environ. Health Perspect.* **98**, 167-178

---

(Received 2011.4.11/Revised 2011.7.13/Accepted 2011.7.14)