

치자 황색색소에 대한 변이원성 시험

김 회 구

부산대학교 미생물학과

Mutagenic Test of Gardenia Yellow Pigment

Hee-Goo Kim

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

Gardenia yellow pigment produced by *Gardenia jasminoides* Ellis was tested for reverse mutagenic test in *Salmonella typhimurium* strains TA1535, TA1537, TA98 and TA100 at concentrations ranging from 6.25 to 200 μg /ml per plate. No significant reverse mutagenic activity was observed in any of the *S. typhimurium* strains, in either presence or absence of S9 mix. There was no toxicity to the bacteria. These result indicate that yellow pigment doesn't have mutagenicity.

Key words : gardenia yellow pigment, reverse mutagenic test.

서 론

오늘날, 인류의 문화가 발달하고 경제적인 여유가 생기면서 식품은 양적인 증대와 더불어 질적인 개선을 가져왔고 소비자의 선택기준은 내적인 품질 못지 않게 외형적인 면에 비중을 더해가고 있으며, 각종 가공식품의 발달로 인하여 식품의 관능성과 상품성을 높이기 위하여 다양한 종류의 각종 색소들이 식품에 사용되고 있다¹⁻²⁾.

식품의 색은 종류에 따라 제각기 독특한 빛깔을 나타내고 있어 식품의 관능적인 품질을 결정하는 중요한 인자로 사용되어지고 있다³⁾. 일반적으로 식품의 색은 그 선도나 가공조건 및 저장환경에 따라 변화하여 품질의 차이가 일어나므로 이것을 방지하기 위하여 식품의 가공시에 식용색소를 인위적으로 첨가하는 방법이 사용되고 있다⁴⁻⁷⁾.

우리나라의 경우, 아직까지는 색소에 관한 관리는 별도의 규정을 두지 않고 단지 식품첨가물의 범주에서만 관리되고 있으며, 아직까지는 천연색소에 비하여 합성색소의 사용량이 월등히 많은 편이다. 그러나 김치, 고추장, 된장, 쇠고기 등 15종의 식품에 대해서는 타르게 색소의 사용이 전면 금지되어 있다. 따라서

최근에는 안전성이 높은 천연색소에 대한 관심이 증가되고 있는 추세이며, 천연물로부터 각종 식용색소를 개발하려는 노력이 계속되고 있다⁸⁻⁹⁾. 각종 천연색소중 치자 황색 색소는 1980년대 일본에서 Yoshizumi¹⁰⁻¹¹⁾ 등이 치자 색소를 이용하여 캔디류, 아이스크림, 어묵, 음료 등에 적용하는 실험을 행하였고, 우리나라의 경우는 최근에 와서야 식품에 소량 사용하고 있는 실정이다.

본 실험에서는 치자로부터 황색색소를 분리하여, 치자 황색 색소의 유전 독성 여부를 검색하기 위하여 *Salmonella typhimurium* 변이주를 이용한 염기쌍 치환형 또는 후레임 슈프트형의 돌연변이 유무를 검출하는 복귀돌연변이 시험을 식품의약품안전본부고시 제96-8호 "의약품 등의 독성시험기준(1996년 4월 16일 제정)"¹²⁾에 준하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질인 치자 황색 색소는 전보¹³⁾에서 추출한 것을 사용하였으며 -4℃의 냉암소에 보관하면서 본 실험에 사용하였고 투여시에는 주사용 생리식염수에

희석시켜 사용하였다.

2. 대조물질

시험물질인 치자 황색 색소를 생리식염수에 적당한 농도로 희석하여 사용하였으며 양성대조물질로는 복귀돌연변이시험에서는 2-aminoanthracene(2-AAM, Sigma), methyl methanesulphonate (MMS, Sigma), N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine(EN-NG, Sigma), 9-aminoacridine (9-AA, Sigma) 및 2-nitrofluorene(2-NF, Sigma)을 사용하였다. 양성대조물질은 methyl methanesulphonate를 제외하고 2% DMSO용액에 용해하였으며, methyl methanesulphonate는 멸균 초정제 증류수에 용해하여 사용하였다.

3. *S. typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험¹⁴⁾

1) 사용균주

시험균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA 1535, TA1537은 한국화학연구소로부터 분양받아 계대배양을 유지하며 사용하였다. 본 시험법은 생물학적 제제의 변이원성을 비교적 단기간에 예측하는데 가장 유용한 시험법이기 사용하였다. 특히 TA100, TA1535주는 염기대 치환형(base change)의 변이원의 검색에, TA98, 1537주는 frame shift 형의 변이원 검색에 널리 이용되기에 본 균주를 선택하였다. 균주의 형질확인에는 Maron & Ames (Mutation research, 113, 173-275, 1985)에 제시된 방법에 따라, 본 시험에 앞서 ① Histidine 요구성, ② Crystal violet 감수성, ③ UV 감수성, ④ Ampicillin 내성 ⑤ 자발복귀변이의 정도 등의 유전독성을 확인하였다. 각 균주는 -70°C의 DMSO 동결 보존으로부터 직접 15ml의 2.5% nutrient broth에 접종하여 120rpm 37°C 수조에서 약 10~12시간 진탕배양한 후 시험에 사용할 균 현탁액으로 하였다.

균주의 특성검사는 균주 구입시 본 균주의 histidine요구성은 배양액을 ① plate당 0.1M L-histidine 0.1ml를 첨가한 최소 glucose 한천배지, ② 0.5ml biotin 0.1 ml만을 첨가한 최소 glucose 한천배지에 각각 분주하여 37°C에서 24~48시간 배양한 다음 균의 생육 여부를 조사함으로써 확인하였다.

2) 시험균액

동결보존중인 균주액으로부터 미량의 균액을 채취하여 0.8% nutrient broth 용액(pH 7.0~7.5) 5~

10ml에 접종한 다음 37°C에 16시간동안 진탕 배양하였다. 배양시간과 진탕 속도는 $1\sim 2 \times 10^9$ /ml의 균 농도가 얻어지는 조건을 설정하고 배양한 균액은 시험 직전까지 냉장 보존하였다.

3) 사용배지

유전독성 검색용의 배지로써 Vogel-Bonner medium E에 1.5% Bacto-Difco agar와 2% glucose를 함유한 Minimal glucose agar medium이다. Plate당 용량은 25ml이며 plate는 7선 멸균제품(Corning 100mm × 20mm)을 사용하였다. Vogel-Bonne liter 당 조성은 더운 증류수(45°C) 670ml에 MgSO₄·7H₂O 10g, citric acid monohydrate 100g, K₂HPO₄ 500g 및 NaH₂PO₄·4H₂O 176g이다. Top agar는 0.6% Difco agar와 0.5% NaCl을 함유하였다. 사용에 앞서 microwave oven에서 녹인 후 top agar 100ml 당 10ml의 0.5mM L-histidine HCl /biotin용액을 첨가하여 사용하였다. Nutrient broth는 시험용 균주의 액체배양에 사용하며 Oxoid nutrient broth No. 2를 2.5% 함유하였다. 이상 각 배지의 멸균은 고압증기멸균(121°C, 15 min)에 의하였다.

4) S-9 mix의 조제

대사효소로서 S-9의 제조는 국립보건안전연구원의 "독성시험 표준작업지침서(1993)"에 따라 S-9분획을 다음과 같이 조제하여 사용하였다. 즉 *in vitro* 대사 활성화를 위하여 SPF 수컷 SD계(Sprague-Dawley) 랫드(8주령, 약 200g)에 corn oil에 희석시킨 Aroclor 1254(200mg/ml)를 1회 복강내 투여(500 mg/kg)하여 4일째 경주탈골에 의하여 도살하였다. 간을 적출하고 간 중량의 3배량의 냉각한 0.15M KCl용액에 넣어 균질화하고, 9,000g에서 10분간 원심분리 후 그 상등액을 S-9분획으로 사용하였다. 이상의 모든 과정은 고압 증기 멸균한 용액과 초자료를 사용하여 무균적으로 행하고, 조제한 S-9분획 0.1ml를 top agar와 함께 유전독성 검색용 배지에 plating하여 무균성을 확인하였다. S-9 mix의 조성은 8mM MgCl₂·6H₂O, 2.33mM KCl, 5mM glucose-6-phosphate-di-sodium salt 및 4mM NADP-di-sodium salt이다. 각각의 보조인자들을 0.05 M phosphate buffer(pH 7.4) 1ml에 녹이고 한곳에 모아 0.2M phosphate buffer(pH 7.4) 1ml를 가하여 5ml로 만든 후 S-9 분획 0.5ml를 가하여 전체를 5.5ml로 만들어 사용하였다. 보조인자는 0.05M

phosphate buffer(in ice, pH 7.4)에 0.45 μ m filter로 filtration(멸균)하여 4시간 이내에 사용하였다.

5) 예비독성시험(용량설정 근거)

TA100을 사용하여 DMSO를 용매로 S-9 mix를 넣을 때와 안 넣었을 때로 구분하여 랫드에서의 LD₅₀인 체중 kg당 250 μ g과 propylene glycol에 기인한 삼투압의 증가로 인한 문제를 피하기 위하여 세균의 최대한 노출이 가능한 농도를 참조하여 본 시험에서 6.25, 12.5, 25, 50, 100 및 200 μ g/ml의 6 용량단계를 설정하였다. 음성 대조군으로서 생리식염수를 사용하고 양성 대조물질로는 이미 알려진 변이원 물질을 사용하는데 그 물질과 용량은 Table 1과 같다.

6) 시험방법

His⁺과 tryp⁺ 복귀돌연변이 colony수는 히스티딘과 트립토판을 plate에 가하는 것과 관계가 있다. Gardenia yellow pigment는 히스티딘과 트립토판 등의 아미노산을 함유하고 있기 때문에, 시험은 Ames의 원법을 변형한 preincubation법에 따라 실시하였다. 예비독성 시험에서 결정된 최적 농도로 TA98과 TA100, TA1535, TA1537에서 실험하였다. 분주용 한천을 고압증기멸균하고 약 50 $^{\circ}$ C로 냉각시킨 후, 100ml의 한천에 대하여 10ml의 0.5mM L-histidine/biotin을 가하여 항온 수조내에서 45 $^{\circ}$ C로 유지하였다. S-9 mix를 제조하여 고정용량 분주기(예 BCL Cat. No 1053-0.5ml)에 넣어 방냉보존하였다. 시험물질을 측정하여 독성시험에 의해 결정된 용량으로 희석하였다. 모든 시험조작은 갈색광원이 설치된 클린벤치내에서 수행하였다. 멸균시험관에 균배양액(약 2 \times 10⁹ cells/ml) 0.1ml에, 여러 농도의 yellow pigment 희석액 0.1ml 및 인산완충액(pH 7.4) 0.5ml를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 20분간 진탕 혼합하였다(이

때 S-9에 의한 대사를 행한 경우에는 인산완충액 대신 S-9 mix를 첨가하였다.). 다음에 45 $^{\circ}$ C에서 용해한 top agar(연한천 용액) 2ml를 첨가하여 잘 혼합한 후 하층배지(Vogel-Bonner 최소한천 배지) 위에 증층하여 부은 다음 사알레 표면에 한천이 고루 전개되도록 평판을 회전시켰다. 연한천이 굳은 후 평판을 뒤집어 37 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양한 후 복귀변이성 콜로니 수를 계측하였다. 이 때 균의 생육저해 및 시험물질의 침전, 분출의 관찰은 육안 및 실체현미경으로 실시하였다.

각 용량당 2장의 plate를 이용하여, plate당 복귀변이성 콜로니 수의 평균치를 평가대상으로 하였다. 시험물질을 처리한 모든 군에 있어 복귀변이체수가 음성대조군의 2배 이상이며, 용량-반응관계가 인정되며, 재현성이 있을 경우 등의 3조건을 만족할 경우, 시험물질은 복귀변이 유발능 양성으로 판정하였다. 모든 조건을 만족하지 않을 경우 시험물질은 복귀변이유발능 음성이라 판정하였다.

7) 통계학적 처리

소핵의 발생빈도에 대하여 χ^2 (chi-square) 검정을 이용하여 음성대조군과 처리군의 유의성 차를 검정하며, p<0.05인 경우에 유의성을 검정하였다. 정염성 적혈구와 다염성 적혈구의 비율(NCE/PCE)의 각 군간 유의차는 Student's t-test로 $\alpha=0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. S. typhimurium을 이용한 복귀돌연변이시험

Gardenia yellow pigment의 세균에 대한 치사효과나 침전 등의 독성은 관찰되지 않았으며, 시험에 사용한 4균주는 모두 대사활성계의 유무에 관계없이 복귀돌연변이 colony 수는 음성대조군의 colony 수

Table 1. Positive control of reverse mutation test of gardenia yellow pigment using *Salmonella typhimurium*

	Strain	Compound	Concentration (μ g /plate)
S9 Mix (+)	TA 98	2-Amionanthracene	0.5
	TA 100	2-Amionanthracene	0.5
	TA 1535	2-Amionanthracene	2
	TA 1537	2-Amionanthracene	2
S9 Mix (-)	TA 98	2-Nitrofluorene	1
	TA 100	Methyl methanesulphonate	200
	TA 1535	N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	5
	TA 1537	9-Aminoacridine	20

Table 2. Number of colonies per plate in reverse mutation test of gardenia yellow pigment using *Salmonella typhimurium*

Substance	S-9 Mix	Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Number of revertants (No. of colonies /plate)			
			Base-pair exchange type		Frame shift type	
			TA 100	TA 1535	TA 98	TA 1537
0.9% saline	-	500	8.7 ± 5.4	11 ± 2.1	25 ± 5.9	11 ± 3.9
Yellow pigment	-	6.25	95 ± 12.2	11 ± 5.3	16 ± 7.1	10 ± 3.2
	-	12.5	98 ± 6.5	12 ± 3.7	15 ± 5.4	9 ± 2.8
	-	25	93 ± 7.5	11 ± 6.1	18 ± 6.9	8 ± 3.1
	-	50	91 ± 10.2	13 ± 6.4	15 ± 4.7	11 ± 4.2
	-	100	89 ± 11.4	10 ± 3.6	13 ± 6.4	10 ± 5.7
	-	200	83 ± 8.2	9 ± 3.3	12 ± 4.9	9 ± 7.4
0.9% saline	+	500	91 ± 9.4	14 ± 4.2	37 ± 8.2	18 ± 4.6
Yellow pigment	+	6.25	85 ± 8.1	15 ± 5.7	35 ± 6.3	20 ± 5.5
	+	12.5	91 ± 5.4	16 ± 4.2	31 ± 10.2	16 ± 4.4
	+	25	86 ± 6.2	15 ± 3.9	29 ± 7.5	15 ± 3.4
	+	50	81 ± 7.3	14 ± 5.2	27 ± 4.3	14 ± 4.0
	+	100	79 ± 11.2	12 ± 6.3	24 ± 5.4	13 ± 6.2
	+	200	74 ± 12.3	11 ± 5.7	22 ± 7.5	12 ± 5.9
Positive control	S-9 Mix (-)	Name	MMS	ENNG	2-NF	9-AA
		Dose level ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	200	5	1	20
		No. of colonies / plate	192 ± 15.7	118 ± 17.4	$1,524 \pm 74.5$	223 ± 32.8
	S-9 Mix (+)	Name	2-AAN	2-AAN	2-AAN	2-AAN
		Dose level ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.5	2	0.5	2
		No. of colonies 9 /plate	653 ± 45.6	85 ± 24.1	574 ± 16.9	92 ± 10.3

Values are the mean \pm S.D. of the data from three plates. MMS: methyl methanesulphonate, ENNG: N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, 2-NF: 2-nitrofluorene, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AAN: 2-aminoanthracene.

에 비해 유의한 증가가 나타나지 않았으며, 용량 의존적으로 증가하거나 음성대조군의 2배 이상의 복귀변이 colony 수의 증가를 나타내지 않았다(Table 2).

요 약

세균을 이용한 복귀돌연변이 시험계는 *Salmonella typhimurium* 히스티딘 요구성 변이주를 이용하여 염기대치환(base change)의 돌연변이를 검출하는 *S. typhimurium* TA100, TA1535와 frameshift형의 돌연변이를 검출하는 *S. typhimurium* TA98, TA-1537로 구성되어 있으며, 화학물질의 변이원성에 의

하여 히스티딘 비요구성으로 복귀하는 돌연변이를 검출하는 시험계로 널리 이용되고 있다¹³⁾. 시험결과, Yellow pigment는 *S. typhimurium*에 대한 독성도 나타나지 않았으며, 배지 1ml당 200 μg 이하의 모든 농도에서 S-9 Mix(대사활성계)의 유무에 관계없이 *S. typhimurium* 모든 변이주에서 히스티딘 요구성에 대한 복귀돌연변이를 유발하지 않는 물질로 판단되었다. 이상의 결과로부터 치자황색색소는 *S. typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험에서 유전독성이 없는 물질로 사료되었다.

참고문헌

1. Itaru Tamura : 斜料のラエテイ-化と 着色料, *A technical J. on Food Chemistry & Chemicals*, 10(11), 41-45 (1994).
2. 조양희, 함태식 : 착색료의 안전사용 및 각국의 관리현황, *Bulletin of Food Technology*, 10, 28~54 (1997).
3. 김선재, 임종환, 이란숙, 이준설 : Extraction and characteristics of purple sweet potato pigment, *Korean J. of Food Science and Technology*, 28(2), 345-351 (1996).
4. Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A. and Speers, R. A. : Anthocyanins as food colorants-A Review, *J. Food Biochem*, 11, 201-206 (1987).
5. Jackman, R. L., Yada, R. Y., and Tung, M. A. : Separation and chemical properties of Anthocyanins used for their quantitative analysis, *J. Food Biochem.*, 11, 279-284 (1987).
6. 유경수, 한대석, 유승조, 정보섭, 성충기 : 천연물화학, 영림출판사 (1989).
7. Mazza, G. and Miniati, E. : Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. CRC Press (1933).
8. Takatoshi, K. and Osamu, M. : 天然着色料 安全性新應用技術, *A Technical J. on Food Chemistry & Chemicals*, 10(11), 19-24 (1994).
9. 食品添加物 マニュアル : 日本食品添加物協會, 東京 (1991).
10. Yoshizumi, S., Okuyama, H. and Toyoma, R. : Physicochemical properties and safety of the use of enzyme treated pigments from *Gardenia jasminoides*, *Shokuhin Kogyo*, 23(22), 41 (1980).
11. Yoshizumi, S., Okuyama, H. and Toyoma, R. : Physicochemical properties of *Gardenia* enzyme-treated red essential colors, *Fureguransu Janaru*, 8 (6), 104 (1980).
12. 식품의약품안전본부고시 제96-8호 “의약품등의 독성시험기준 (1996. 4. 16)”
13. Ames, B. N., McCann, and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogenes and mutagens with the Salmonella /mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*, 31, 347-364 (1975).

(1997년 12월 19일 접수)