J. Fd Hyg. Safety 14(3), 259–264 (1999)

Xylooligosaccharide의 복귀돌연변이시험

오화균† · 박윤제 · 이운택 · 이지완 · 이창승 · 류보경 · 양창근 · 윤세왕 · 강부현*

*대한제당(주) 중앙연구소, *한국화학연구소 안전성연구센터*

Bacterial Reverse Mutation Assay of Xylooligosaccharide

Oh Hwa Gyun†, Park Youn-Je, Lee Un Taek, Lee Ji Wan, Lee Chang Seung, Rhew Bo Kyoung, Yang Chang Kun, Yoon Se Wang and Kang Bu Hyun*

Dept. of Fermentation, R&D Center, TS Corp., Inchon 400-201, Korea

**Toxicology Research Center, KRICT, Taejon 305-600, Korea*

ABSTRACT – To evaluate the bacterial reverse mutation of xylooligosaccharide(XO)s the *in vitro* Ames test using *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) and *Escherichia coli* (WP2 uvrA) was performed. XO was negative in Ames test with *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with and without rat liver microsomal enzyme (S-9 fraction). According to the results, XO does not cause bacterial reverse mutation.

Key words □ Xylooligosaccharide, Ames test

Xylooligosaccharide는 xylose가 β-1,4 결합된 구조로 xylobiose와 xylotriose가 주성분인 올리고당이다.[6] 이 올리고당은 주로 corncob와 같은 천연 식물체로부터 효소분해에 의해 생산되며 설탕의 40%에 해당하는 감미도를 지니며 산과 열에 안정하다.[8] 기능성 측면에서는 난소화성 특징이 있으며 소량첨가로도 높은 bifidus 활성을 나타낸다.[3-4] 또한 사람 변 중의 수분함량을 80% 전후로 유지시켜 변 개선효과도 가지고 있다.[7-8] 하지만 이러한 장점을 가지고 있음에도 불구하고 올리고당은 일본내에서는 고가로 상용화되고 있으나 국내에서는 아직 개발단계에 있으며 시제품 정도가 본 연구진에 의해 생산되고 있다.[5]

본 연구의 시험물질인 xylooligosaccharide는 분쇄된 corncob를 알칼리 처리하여 xylan을 추출하고 이를 건조한 후 효소반응으로 제조한 것으로 xylobiose와 xylotriose가 주성분으로 되어있으며 전술한 바와 같이 국내에서는 xylooligosaccharide 생산 초기단계에 있기 때문에 이들에 대한 독성시험은 아직까지 보고되어 있지 않다.

이에 본 연구는 국내에서 개발된 xylooligosaccharide의 안전성 평가를 위하여 세균을 이용한 돌연변이 유발성을 관찰하고 평가하고자 하였다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

시험은 Maron and Ames(1983)의 방법에 준하여 실시하였다.

균주

염기쌍치환형(base-pair substitution type) 돌연변이 검색을 위하여는 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535 및 *Escherichia coli* WP2 uvrA를, frame-shift형 돌연변이 검색을 위해서는 *S. typhimurium* TA98과 TA1537 등 모두 5개 균주를 사용하였다. *Salmonella* 4개 균주는 Molecular Toxicology Inc.(111 Gibralter avenue, Annapolis, MD21401, USA)에서 구입한 것을, *E. coli* WP2 uvrA 균주는 Dr. M.H.L. Green (University of Sussex, Falmer, Brighton, UK)으로부터 분양받은 것을 한국화학연구소 안전성연구센터에서 형질을 확인한 후 계대배양 중인 것을 사용하였다.

배지

시험균주들은 각각 master plate로부터 25 ml의 액체배지(2.5% Oxoid nutrient broth No. 2)에 접종해 shaking incubator(37°C, 200 rpm)에서 약 10시간 동안 전배양 하였다. 최소배지(minimal glucose agar plate)는 1.5% Bacto

agar(Difco)와 Vogel-Bonner medium E 및 2% glucose를 함유한 것을 페트리디쉬(Falcon #1029)에 25 ml씩 분주하여 사용하였으며, 대장균(*E. coli*)을 이용한 시험에는 위와 동일한 최소배지에 0.1% tryptophan 액 0.25 ml/L를 첨가한 것을 사용하였다. Top agar는 0.6% agar와 0.5% NaCl로 조제하였으며, 살모넬라 4개 균주용 top agar에만 0.05 mM의 histidine-biotin을 첨가하였다.

균주의 보관 및 형질 확인

균주의 보관은 배양한 균배양액 1 ml당 dimethyl sulfoxide(DMSO) 90 μl를 가하여 냉동보관용 tube에 채워 dry ice에서 동결시킨 후 액체질소 내에 보관하였고, 형질이 확인된 균주의 경우는 master plate를 제작, 시험에 사용하였다. 균주의 유전자형 확인을 위해 *S. typhimurium* 균주의 경우는 a) histidine 요구성 여부 b) uvrB mutation 유지 여부 c) R-factor 유지 여부 d) rfa 돌연변이의 유지 여부 e) spontaneous revertant의 수 등을 검사하였고, *E. coli* WP2 uvrA 균주에 있어서는 a) tryptophan 요구성 여부 b) uvrA mutation 유지 여부 c) spontaneous revertant의 수 등을 Maron and Ames(1983)에 준하여 확인하였다.

시험물질 및 대조물질

본 시험에 사용한 시험물질은 대한제당(주) 중앙연구소에서 corncob xylan을[12] xylanase를[1] 이용하여 효소전환한 후 생산된 xylooligosaccharide를[5] 정제하여 70 Brix로 농축한 후 4°C 냉장보관하며 사용하였다.

시험물질은 증류수에 쉽게 용해되어 음성 대조물질로 주사용 증류수(중외제약, Korea)를 사용하였으며 양성 대조물질은 의약품 등의 독성시험기준에는[10-11] 양성 대조물질명이 언급되어있지 않으므로, 국립환경연구원의 '화학물질 유해성 시험 연구기관의 지정 등에 관한 규정'에[9] 예시된 것들을 선택하여 대사활성계 미적용시와 적용시로 구분하여 사용하였다. 대사활성계 미적용시에는 sodium azide(SA, Sigma, USA)를 *S. typhimurium* TA100 및 TA1535(0.5 μg/plate)에, 4-Nitroquinoline-1-oxide(4NQO, WAKO, Japan)를 *S. typhimurium* TA98 및 *E. coli* WP2 uvrA(0.5 μg/plate)에, 9-Aminoacridine(9-AA, Sigma, USA)를 *S. typhimurium* TA1537(50 μg/plate)에 사용하였으며 대사활성계 적용시에는 2-Aminoanthracene(2-AA, WAKO, Japan)을 *S. typhimurium* TA100 및 TA98에 2 μg/plate씩, *S. typhimurium* TA1535, TA1537 및 *E. coli* WP2 uvrA에 4 μg/plate씩 사용하였다.

시험물질 및 대조물질의 조제

시험물질 조제는 시험물질 적량에 전술한 증류수를 가해 최고농도군의 용액을 조제하고, 이를 동일한 증류수로 1:1 단계희석하여 각 농도의 용액을 조제하였다. 음성 대조물질로는 시험물질의 조제에 사용한 DMSO(Aldrich Chem. Co. Inc.,)를 사용하였다. 양성 대조물질인 SA는 증류수에 용해하였으며 2-AA, 9-AA 및 4NQO는 DMSO에 용해하여 조제하였다.

대사활성계(S-9 mix)

S-9 분획은 Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫트의 간에서 유래한 것을 Molecular Toxicology Inc.에서 구입하여 -20°C에서 보관하며 사용하였다.

보조인자로 사용된 시약은 Wako Pure Chem. Ind. Ltd.(Japan)에서 구입하였으며 S-9 mix 1 ml의 조성(S-9 5% v/v)은 8 μmol $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 33 μmol KCl, 5 μmol G-6-P, 4 μmol NADPH, 4 μmol NADH, 100 μmol sodium phosphate buffer(pH 7.4) 및 50 ml S-9으로 하였다.

조제한 S-9 mix는 얼음에 채워 사용하였다. S-9 mix는 0.5 ml/plate로 처리했으며, 그의 활성은 2-AA의 돌연변이 유발로 확인하였다.

시험물질 처리 및 Plate 제작

시험물질의 처리는 direct plate incorporation 방법으로 하였다. 고압증기멸균한 top agar를 dry bath에서 45℃로 예열한 멸균 tube(Falcon #2058)에 2 ml 씩 분주한 다음 시험물질 용액 0.1 ml, S-9 mix(or pH 7.4의 sodium-phosphate buffer) 0.5 ml, 균배양액 0.1 ml 씩을 top agar에 혼합하고 바로 vortex mixer로 2-3 초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부은 후 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 하여 굳게 하였다. 음성 대조군은 시험물질 용액 대신 용매 0.1 ml을, 양성대조군은 양성 대조물질 용액을 같은 방법으로 가하여 실시하였다. 각 plate의 구별을 위해 plate의 일정 위치에 유성펜으로 시험번호, 균주명, 농도, S-9 mix 처리여부 등을 기입하였다. 시험물질 및 S-9 mix의 무균성 확인을 위해 시험물질 최고농도액 0.1 ml과 S-9 mix 0.5 ml을 각각 2 ml의 top agar에 혼합하여 plate를 제작하였다.

처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 plate를 뒤집어 37°C에서 약 48 시간 배양 후 복귀돌연변이 집락(이하 집락)을 계수했으며 본 시험에서는 3 개의 plate를 사용하였다.

농도결정

본 시험의 처리 최고농도를 결정함과 아울러 복귀돌연변이 유발성 여부를 시험하기 위해 예비시험을 실시하였다.

Table 1. Results of bacterial reverse mutation assay with xylooligosaccharide. (Group summary)

Strain	Chemical Treated[a]	Dose (μg/plate)	Colonies/plate (Mean ± S.D., Factor[b])	
			Without S-9 mix	With S-9 mix
TA100	XO	0	138 ± 11	147 ± 2
		313	156 ± 6 (1.1)	151 ± 9 (1.0)
		625	145 ± 13 (1.1)	154 ± 7 (1.0)
		1250	143 ± 8 (1.0)	151 ± 15 (1.0)
		2500	154 ± 15 (1.1)	144 ± 8 (1.0)
		5000	154 ± 5 (1.1)	161 ± 7 (1.1)
TA1535	XO	0	17 ± 3	14 ± 5
		313	18 ± 5 (1.0)	13 ± 5 (1.0)
		625	12 ± 2 (1.1)	11 ± 1 (0.9)
		1250	13 ± 3 (0.7)	14 ± 3 (0.8)
		2500	13 ± 3 (0.8)	14 ± 1 (1.0)
		5000	12 ± 2 (0.8)	11 ± 2 (0.8)
TA98	XO	0	19 ± 3	26 ± 3
		313	13 ± 3 (0.7)	27 ± 8 (1.0)
		625	17 ± 2 (0.9)	22 ± 2 (0.8)
		1250	20 ± 0 (1.1)	25 ± 4 (1.0)
		2500	12 ± 2 (0.6)	24 ± 6 (0.9)
		5000	15 ± 3 (0.8)	31 ± 4 (1.2)
TA1537	XO	0	7 ± 1	11 ± 3
		313	7 ± 2 (1.0)	10 ± 1 (0.9)
		625	7 ± 2 (1.0)	10 ± 0 (0.9)
		1250	5 ± 2 (0.7)	13 ± 4 (1.2)
		2500	9 ± 2 (1.3)	10 ± 1 (0.9)
		5000	6 ± 1 (0.9)	10 ± 2 (0.9)
E.coli	XO	0	9 ± 3	9 ± 2
WP2 uvrA		313	7 ± 2 (0.8)	11 ± 3 (1.2)
		625	6 ± 2 (0.7)	7 ± 2 (0.8)
		1250	7 ± 1 (0.8)	8 ± 3 (0.9)
		2500	6 ± 1 (0.7)	7 ± 1 (0.8)
		5000	6 ± 3 (0.7)	6 ± 1 (0.7)
Positive control				
TA100	SA	0.5	576 ± 59 (4.2)	-
TA1535	SA	0.5	432 ± 42 (25.4)	-
TA98	4NQO	0.5	233 ± 46 (12.3)	-
Ta1537	9-AA	50	252 ± 51 (36.0)	-
WP2 uvrA	4NQO	0.5	185 ± 23 (20.6)	-
TA100	2-AA	2	-	759 ± 51 (5.2)
TA1535	2-AA	4		299 ± 18 (21.4)
TA98	2-AA	2	-	473 ± 27 (18.2)
Ta1537	2-AA	4		394 ± 14 (35.8)
WP2 uvrA	2-AA	4	-	652 ± 41 (72.4)

[a]XO: Xylooligosaccharide, SA: Sodium azide, 4NQO: 4-Nitroquinoline-1-oxide, 2-AA: 2-Aminoanthracene
[b]No. colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate.

예비시험에서는 대사활성계 적용 및 미적용하에 TA100 및 TA98의 2 개 균주를 사용해 0, 8, 40, 200, 1000 및 5000 μg/plate의 범위로 시험하였다. 그 결과 두 균주 공히 집락 수의 유의한 증가는 나타나지 않았으며, 최고농도군에

Table 2. Results of bacterial reverse mutation assay with xylooligosaccharide (Individual data)

Strain	Chemical Treated[a]	Dose (μg/plate)	Colonies/plate					
			Without S-9 mix			With S-9 mix		
TA100	XO	0	130	133	151	145	148	148
		313	150	157	162	142	150	160
		625	133	144	158	148	152	162
		1250	134	147	147	140	146	168
		2500	141	150	171	135	147	150
		5000	150	153	160	153	163	166
TA1535	XO	0	14	17	19	10	12	20
		313	13	20	22	10	10	18
		625	10	12	14	10	12	12
		1250	11	12	16	12	14	17
		2500	10	12	16	13	14	15
		5000	10	11	14	10	10	14
TA98	XO	0	17	19	22	23	26	28
		313	11	13	16	20	27	35
		625	15	18	19	0	22	24
		1250	20	20	20	22	24	30
		2500	10	11	14	18	23	30
		5000	12	16	18	27	33	34
TA1537	XO	0	6	6	88	12	13	
		313	5	7	8		11	
		625	6	6	10	10	10	10
		1250	4	4	7	10	13	17
		2500	7	10	10	9	10	11
		5000	5	7	7	8	10	11
E.coli	XO	0	6	10	11	8	9	10
WP2 uvrA		313	6	6	10	8	13	13
		625	4	6	7	5	8	9
		1250	6	6	8	6	8	11
		2500	5	6	7	6	7	8
		5000	4	4	10	5	6	6
Positive control								
TA100	SA	0.5	508	606	614	-	-	-
TA1535	SA	0.5	400	416	480	-	-	-
TA98	4NQO	0.5	198	216	286	-	-	-
Ta1537	9-AA	50	216	230	310	-	-	-
WP2 uvrA	4NQO	0.5	160	188	206	-	-	-
TA100	2-AA	2	-	-		700	788	789
TA1535	2-AA	4	-	-		280	302	316
TA98	2-AA	2	-	-	-	450	466	502
Ta1537	2-AA	4	-	-	380	396	407	
WP2 uvrA	2-AA	4	-	-	607	660	688	

[a]XO: Xylooligosaccharide, SA: Sodium azide, 4NQO: 4-Nitroquinoline-1-oxide, 2-AA: 2-Aminoanthracene.

서도 항균성이 관찰되지 않았다.

위 결과를 근거로, 5000 μg/plate를 최고농도로 하고 공비를 2로한 5 단계 농도군(313, 625, 1250, 2500 및 5000 μg/plate)과 음성, 양성대조군으로 시험군을 구성해 본 시험

을 실시하였다.

관찰 항목 및 판정

집락 계수시 각 plate의 background lawn의 형성 여부를 검사하였으며 오염 혹은 기타 이상의 발생 여부를 점검하였다. 무균성 확인을 위한 plate에서는 미생물의 생장으로 인한 집락 생성 유무를 확인하였다.

관찰결과의 판정은 대사활성계 적용 여부에 상관 없이 최소 1 개 균주에서 plate당 복귀돌연변이 집락 수가 1 개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였으며, 집락 수의 증가 경향이 있을 경우 용량상관성 및 음성 대조군에 비해 증가하는 정도 또한 고려하였다.

항균성은 background lawn이 엷어지거나 집락 수가 음성 대조군에 비해 현저히 감소하는 것으로 판단하였다.

시험 결과는 각 농도군당 3 plate로부터 얻은 집락 수의 평균±표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

Xylooligosaccharide는 자연계에서 죽순 등에 함유되어 있는 성분으로 사람이 일상적으로 섭취하고 있는 식물섬유에 함유되어 있는 xylan이 대장내의 장내세균에 의해 발효되어 xylan→xylooligosaccharide→xylose→유기산으로 대사되는 중간체로 여겨지며 산업적으로는 corncob 등의 식물섬유에서 xylanase를 이용하여 제조되므로 안전성이 높은 올리고당으로 여겨진다.[8] Xylooligosaccharide은 현재 일본내에서 상용화 되어있는 상황이지만 국내에서는 xylooligosaccharide 생산이 초기단계에 있을 뿐만 아니라 안전성 검토도 이루어져 있지 않아 안전성 시험 중의 한 종류인 돌연변이 유발성 시험을 실시하였다.

Xylooligosaccharide의 세균에 대한 돌연변이 유발성 검토를 위해 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4 개 균주와 대장균 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 uvrA 균주를 이용하여 복귀돌연변이 집락수를 조사하였고 그 결과를 Table 1~2에 나타내었다.

시험물질 처리시 혼탁 생성 등의 특이한 점은 관찰되지 않았으며, 시험물질 최고농도 용액 및 S-9 mix의 무균성을 확인하기 위한 plate에서는 미생물의 오염에 의한 집락은 나타나지 않았다. 시험에 사용한 5 개 균주의 생균 수는 흡광도에 의한 측정 결과 1.0-1.7×10^9/ml로 적정 수준이었으며 모든 양성 대조군에서는 집락수가 음성 대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었다.

예비독성시험에서 결정된 5000 μg/plate를 최고농도로 하고 공비를 2로한 5 단계 농도군(313, 625, 1250, 2500 및 5000 μg/plate)과 음성, 양성대조군으로 시험군을 설정하여 시험한 결과 대사활성계 적용 여부와 관계없이 xylooligosaccharide는 5 개 시험균주 모두에서 시험물질을 처리한 모든 군에서 양성 판정 기준을 만족할 정도의 집락 수의 증가는 나타나지 않아서 음성으로 판정하였으며 이러한 결과는 일본에서 *S. typhimurium* TA100, TA98 균주를 이용하여 xylooligosaccharide의 변이원성시험을[7] 한 결과와 동일하였다.

이상의 결과를 종합할 때, xylooligosaccharide은 본 시험 조건 하에 사용한 균주들에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 특정연구개발사업 중 선도기술개발사업(G7; #98-G-08-03-A-06) 연구비의 지원을 받아 수행된 연구의 일부로서 이에 감사드립니다.

국문요약

Xylooligosaccharide의 세균에 대한 돌연변이 유발성을 검색하기 위하여 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4 개 균주와 대장균 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 uvrA를 이용해 복귀돌연변이시험을 실시하였다. 시험물질은 증류수에 용해하여 처리하였으며, 대사활성계 미적용 및 적용하에 5000 μg/plate를 최고농도로 하고 공비 2로서 5 단계 농도군(313, 625, 1250, 2500 및 5000 μg/plate)과 음성 및 양성대조군으로 시험군을 구성해 본 시험을 실시하였다. 시험 결과 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 복귀돌연변이 집락 수는 음성대조군과 비슷한 정도로 관찰되었다. 이상의 결과에서, xylooligosaccharide는 본 시험 조건 하에 사용한 균주들에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Koo, B.J., Oh, H.G., Cho, K.H., Yang, C.K., Jung, K.H., and Ryu, D.Y.: Purification and Characterization of Clostridium thermocellum Xylanase from Recombinant *Escherichia coli. J. Microbiol. Biotechnol*, **6**, 414-419 (1996).
2. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutat. Res., **113**, 173-215 (1983).
3. Masako, O., Hirofumi, K., Reiko, I., Shigeaki, F., and Nobuya, M.: *In vitro* Digestibility and *in vivo* Utilization of Xylobiose.. 日本榮養・食糧學會誌, **44**, 41-44 (1991).
4. Masako, O., Shigeaki, F., and Nobuya, M.: Effect of Xylooligosaccharide on the Growth of Bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora* **9**, 77-86 (1990).
5. Oh, H.G., Lee, J.W., Lee, C.S., Park, Y.J. Lee, U.T., Yang, C.K., and Yoon, S.W.: Production of Xylooligosaccharide from the Corncob Xylan using the Clostridium thermocellum Xylanase from Recombinant *Bacillus subtilis. KSAM Fall Scientific Meeting, Oct.*, p. 332 (1998).
6. Shigeaki, F., Masako, O., Nobuya, M., and Kunimasa, K.: Properties and Production of Xylooligosaccharide. 澱粉科學 **37**, 69-77 (1990).
7. Takumi, K., Masako, O., Shigeaki, F., and Kunimasa, K.: Effect of Xylooligosaccharides on Feces of Men. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **65**, 1651-1653 (1991).
8. 菓子總合技術センター: 飮食料品機能性素材有效利用技術シリーズ, No.12, 三勇社, 東京, pp. 1-11 (1992).
9. 국립환경연구원: 고시 제1998-41호(1998년 12월 23일), 화학물질유해성시험연구기관의지정등에관한규정 (1998).
10. 식품의약품안전청: 고시 제1998-17호(1998년 4월 16일), 의약품안전성시험관리기준 (1998).
11. 식품의약품안전청: 고시 제1998-116호(1998년 12월 8일), 의약품등의독성시험기준 (1998).
12. 이지완, 박윤제, 오화균, 이창승, 이운택, 양창근, 윤세왕: 옥수수심(Corncob)으로부터 Xylan 추출, 한국생물공학회 춘계학술 *Proceeding, April*, pp. 466-469 (1999).