J. Fd Hyg. Safety 19(4), 193–197 (2004)

산삼배양추출물의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

송시환* · 양덕춘** · 정세영***†
*(주) Chemon, **경희대학교 한방재료가공센터, ***경희대학교 약학대학 위생화학교실

Bacterial Reverse Mutation Test of Wild Ginseng Culture Extract

Si-Whan Song*, Deok Chun Yang, and Se Young Choung*****
*Chemon Inc., 334 Jeil-ri, Yangji-myun, Yongin-si, Gyenggi-do, 449-826, Korea
**Oriental Medicine Material and Processing Center, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea
***Department of Hygenic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul, 130-701, Korea

ABSTRACT – To evaluate the bacterial reverse mutation of wild ginseng culture extract, the *in vitro* Ames test using *Salmonella typhimurium* (TA100, TA1,535, TA98, TA1,537) and *Escherichia coli* (WP2 uvrA) were performed with wild ginseng extract at the concentrations 0, 1.6, 8, 40, 200, 1,000, 2,500 and 5,000 μg/ml/plate. Wild ginseng culture extract was negative in Ames test with both *Salmonella typhimurium* or *Escherichia coli* with and without rat liver microsomal enzyme (S-9 fraction). According to these results, we concluded that wild ginseng culture extract did not cause bacterial reverse mutation.

Key words: wild ginseng culture extract, Ames test, reverse mutation, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*

일반적으로 산삼을 식물학적으로 분류하자면 오가피과, 현화식물, 피자식물에 속하여 기원은 거의 일 억 년 전으로 추정되고 있다. 우리나라 산삼의 기원은 전라남도 모후산에서 최초로 발견된 것으로 전해 내려온다. 산삼은 그 자생조건이 매우 까다롭고 환경조건에 많은 영향을 받기 때문에 환경조건이 적절하지 않은 장소에서는 땅속에 묻힌 채로 오랜 세월을 보내다가 시간이 지나 그 씨앗의 발아조건이 조성되면 비로소 그 싹을 띄운다. 때문에 현재에도 산삼에 대한 분자생물학적, 생리학적 자료들이 부재하고 고서를 토대로 한 효능과 약간의 형태학적 자료들만이 있을 뿐이다. 하지만 산삼의 효능은 그것을 직접 이용하는 사람들에 의해 오랜 기간을 거쳐 입증되어 왔다.[1)]

산삼에는 saponin 등 생리활성 물질이 다량함유되어 있어서 면역기능 항진, 암세포 생장억제, 항당뇨작용, 심장강화 및 혈압조절, 간기능 강화, 위장기능 강화, 강장효과, 뇌기능 강화, 노화억제, 허약체질 개선 등의 효능이 있으며 약리적인 효능이 매우 뛰어나 오랫동안 동양의 신비한 영약으로 알려져 왔다.[2)]

이러한 산삼의 효능 연구를 위해서는 산삼의 유용 생리활성 물질 확보가 필요하다. 이는 산삼의 희귀성 및 재배의 어려움 때문에 더욱 중요하고 어려운 문제가 될 수 있다. 다양한 해결 방안이 있을 수 있지만 산삼 세포배양을 통한 산삼 생리활성물질의 대량 생산도 큰 가능성을 지닌 대안으로 여겨진다. 식물세포배양에 의한 유용물질 생산 연구는 1980년대 후반부터 활기를 띠기 시작한 이래 많은 성과가 있어왔다. 최근 연구결과에서는 시코닌의 최초 상업화[3)]를 시작으로 최근에는 주목세포배양에 의한 항암제 택솔의 대량생산,[4)] 산삼배양추출물의 콜레스테롤 저하 효과[5)]와 미백 효과[1)]가 보고된 바 있다.

최근 조직배양기술의 획기적인 발전에 따라 식물 세포 등을 산업적으로 생산한 연구가 보고되었고,[6)] 산삼의 부정근 대량배양에 관한 연구결과도 알려져 있다.[2)] 식물 세포 및 조직의 대량배양을 위한 생물반응기에 관한 연구가 최근 집중적으로 수행되고 있다.[7)] 이러한 생물반응기를 이용하여 배양된 산삼배양근은 산삼에 비해 재배 기간이 단축되며, 완전히 멸균된 환경에서 대량으로 배양됨으로서 건강보조식품 원료 및 의약품 원료로 사용할 수 있다.

그러나 산삼배양근의 식품 및 의약품으로서의 안전성 여부가 확인되지 않아 이를 활용한 제품 개발에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 식물조직배양 기술을 이용하여 생산된 산삼배양추출물의 유전독성 시험 즉 복귀돌연변이 시험을 식품의약품안전청 고시 제2000-63호 "비임상시험 관리기준"[8)]와 제1999-61호 "의약품 등의 독성시험기준"[9)]에 따라 수행함으로서 산삼배양추출물의 식품원로로

†Author to whom correspondence should be addressed.

서의 안전성 여부를 평가하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시료조제

야생 산삼으로부터 유도한 산삼 배양근을 영양배지에서 4주간 배양한 후 배양근을 수거하여 물로 3회 수세하고 45°C 건조기에서 12시간 건조하였다. 건조된 산삼 배양근 1 kg에 대하여 1차 증류수 150 L(1:10)를 첨가하고 85°C의 수조에서 4시간 동안 추출하고 회전진공농축기를 사용하여 brix 60 이상으로 농축하여 산삼배양 추출물을 조제하였으며, 냉장 보관하면서 시험에 사용하였다.

시험균주 및 배지

염기쌍치환형(base-pair substitution type) 돌연변이 검색을 위해서 Salmonella typhimurium TA100, TA1535 및 *E. coli* WP2 *uvrA*를, frame-shift형 돌연변이 검색을 위해서 TA98, TA1537 등 모두 5개 균주를 사용하였다. *Salmonella* 4개 균주는 Molecular Toxicology Inc.(111 Gibralter avenue, Annapolis, MD21401, USA)에서 시판하는 것을, *E. coli* WP2 *uvrA* 균주는 Dr. M.H.L Green(University of Sussex, Falmer, Brighton, UK)가 제공한 것을 사용하였다. 위 5개 균주들은 한국 화학연구원 부설 안전성 평가 연구소를 경유하여 분양받은 것이며 모든 균주는 (주) 켐온 전임상연구센터에서 형질확인 후 계대배양한 것을 시험에 사용하였다.

시험균주들은 각각 mater plate로부터 20 ml의 액체배지(2.5% Oxoid Nutrient broth No. 2)에 접종해 shaking incubator(37°C, 200 rpm)에서 약 10시간 전에 배양하였으며, 전배양을 마친 균주는 시험에 사용할 때까지 실온에 보관하였다. 최소배지는 1.5% Bacto agar(Difco)와 Vogel-Bonner medium E 및 2% glucose를 함유한 것을 페트리디쉬에 25 ml씩 분주해 사용하였으며, *E. coli*을 이용한 시험에는 위와 동일한 최소배지에 0.1% 트립토판액을 0.25 ml/L로 첨가한 것을 사용하였다.

Top agar는 0.6% agar와 0.5% NaCl의 조성으로 조제하였으며, *Salmonella typhimurium* 4개 균주용 top agar에만 0.05 mM의 histidine-brotin을 첨가하였다.

균주의 보관 및 형질확인

배양한 균배양액 1 ml당 DMSO 90 μl를 가하여 냉동보관용 바이알에 채워 액체질소 내에 냉동 보관하였으며, 형질이 확인된 균주의 mater plate를 제작, 시험에 사용하였다.

균주 유전자형 확인을 위해 *Salmonella typhimurium* TA 균주들의 경우는 histidine 요구성 여부, uvrB mutation 유지 여부, R-factor 유지 여부, rfa 돌연변이의 유지여부, spontaneous revertant의 수 등을 검사하였고, *E. coli* WP2 *uvrA* 균주에서는 트립토판 요구성 여부, uvrA mutation 유지 여부, spontaneous revertant의 수 등을 Maron and Ames방법[10]에 준하여 확인하였다.

대사활성계

S-9은 Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간(111 Gibralter avenue, Annapolis, MD21401, USA)를 사용하였고 단백질함량은 36.40 mg/ml, -20°C에서 보관하였다.

Cofactor는 Wako Pure Chem. Ind. Ltd,(japan)을 사용하였고, 4°C 냉장 보관하였다.

S-9 mix 1 ml의 조성은 8 μmol $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 33 μmol KCl, 5 μmol glucose-6-phosphate, 4 μmol NADPH, 4 μmol NADH, 100 μmol sodium phosphate buffer(pH 7.4) 및 0.3 ml S-9 mix로 하였으며, 그의 활성은 2-aminoanthracene의 돌연변이 유발로 확인하였다.

시험물질 및 양성대조물질의 조제

시험물질 적량을 멸균생리식염수로 단계별 희석을 하여 각 농도의 용액을 조제하였다. 음성대조물질로는 시험물질의 조제에 사용한 멸균생리식염수를 사용하였다. 양성대조물질은 sodium azide(SA)는 멸균 증류수에 용해하였으며, 2-aminoanthracene(2-AA), 9-aminoacridine(9-AA) 및 4-nitro-quinoline-1-oxide (4NQO)는 DMSO에 용해하여 조제하였다.

시험방법

시험물질의 처리는 direct plate incorporation 방법으로 하였다. 고압증기 멸균한 top agar를 dry bath에서 45°C로 예열한 멸균 tube에 2 ml씩 분주한 다음 시험물질 용액 0.1 ml, S-9 mix(혹은 pH 7.4의 sodium-phosphate buffer) 0.5 ml, 균배양액 0.1 ml를 top agar에 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 하여 굳게 하였다.

음성대조군은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 ml를, 양성대조군은 양성대조물질 용액을 동일한 방법으로 가하여 실시하였다. 각 평판의 구별을 위해 평판의 일정위치에 유성펜으로 시험번호, 균주명, 농도(기호), S-9 mix 처리여부 등을 기입하였다. 시험물질 및 S-9 mix의 무균성 확인을 위해 시험물질 최고농도액 0.1 ml와 S-9 mix 0.5 ml를 각각 2 ml의 top agar에 혼합하여 평판을 제작하였다. 처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 평판을 뒤집어 37°C에서 약 48시간

배양한 후 복귀돌연변이 집락을 계수하였다.

본시험의 처리 최고농도를 결정함과 아울러 복귀돌연변이 유발성 여부도 알아보기 위해 예비시험을 실시하였다. 예비시험에서는 대사활성계 적용(+S) 및 미적용 (-S)하에 본시험에 준하여 시험하되 농도군당 1개의 평판을 사용하였으며, 시험물질 1.6, 8, 40, 200, 1,000, 2,500 및 5,000 μg/plate와 음성 및 양성대조군으로 시험군을 구성하여 시험하였다.

그 결과 대사활성계 적용 및 미적용시 공히 모든 균주에서 최고농도인 5,000 μg/plate까지 집락이 관찰되었으며, 음성대조군에 비해 집락수의 현저한 증가나 감소는 관찰되지 않았고, 모든 농도군에서 시험물질 용액이 top agar와 혼합할 때 혼탁은 생성되지 않았으며 기타 특이점도 관찰되지 않았다.

위 결과를 근거로 하여, 각각의 균주에 대하여 5000 μg/plate를 본시험의 최고농도로 하고, 공히 공비를 3으로 한 5단계 농도군과 음성 및 양성대조군으로 시험군을 구성하여 본시험을 실시하였다.

결과의 표시

본시험의 결과는 각 농도군당 3개의 평판으로부터 얻은 집락수의 평균±표준편차(Mean±S.D.) 및 음성대조군에 대한 증가 배수로 나타냈으며, 집락수의 실측치도 아울러 나타내었다.

관찰 항목 및 판정

집락 계수시 각 평판의 기본 성장균층(background lawn)의 형성여부를 검사하였으며 오염 혹은 기타 이상의 발생여부를 점검하였다. 무균성 확인을 위한 평판에서는 미생물의 생장으로 인한 집락 생성 유무를 확인하였다.

대사활성계 적용 여부에 상관없이 최소 1개 균주에서 평판당 복귀돌연변이 집락 수가 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때를 양성으로 판정하였다. 집락수의 용량상관성 및 음성대조군에 비해 증가하는 정도 또한 고려하였다.

항균성은 기본 성장균층이 엷어지거나 없어질 때 혹은 집락수가 음성대조군에 비해 현저하게 감소하는 것으로 판단하였다. 집락수의 '현저한 감소'에 대해서는 공통된 기준이 없으므로, 본 시험에서는 편의상 집락수가 음성대조군에서 나타난 집락 수 평균치의 50%이하로 감소한 경우를 항균성으로 판단하였다.

결 과

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험은 Maron and Ames[10]에 의하여 개발된 것으로 그 신속성, 간편성으로 인하여 *in vitro*에서 돌연변이 물질 검색법으로 현재 가장 널리 사용되고 있는 시험법이다. 산삼배양추출물의 세균에 대한 돌연변이 유발성 검토를 위해 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개 균주와 대장균 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 *uvrA*균주를 이용한 복귀돌연변이 집락

Table 1. Reverse mutation assay using *Salmonella typhimurium* treated with wild ginseng culture extract

Tested Strain	Treated Chemical(μg/plate)	Dose	Colonies/plate(MeanS.D.)[Factor][a]			
			With S-9mix		Without S-9mix	
TA100	Wild ginseng culture extract	0	190 5		177 6	
		62	184 3	[1.0]	181 5	[1.0]
		185	185 8	[1.0]	163 4	[0.9]
		556	141 11	[0.7]	171 26	[1.0]
		1667	145 3	[0.8]	186 19	[1.1]
		5000	157 14	[0.8]	176 4	[1.0]
TA1535	Wild ginseng culture extract	0	14 5		13 1	
		62	13 1	[0.9]	13 8	[1.0]
		185	18 2	[1.3]	13 4	[1.0]
		556	8 0	[1.6]	14 2	[1.1]
		1667	14 3	[1.0]	14 1	[1.1]
		5000	15 3	[1.1]	13 2	[1.0]
TA98	Wild ginseng culture extract	0	36 8		25 2	
		62	34 8	[0.9]	30 5	[1.2]
		185	48 9	[1.3]	26 4	[1.0]
		556	37 7	[1.0]	22 5	[0.9]
		1667	45 12	[1.3]	33 8	[1.3]
		5000	38 12	[1.1]	24 3	[1.0]
TA1537	Wild ginseng culture extract	0	17 6		14 3	
		62	21 3	[1.2]	13 2	[0.9]
		185	16 1	[0.9]	11 3	[0.8]
		556	16 3	[0.9]	10 1	[0.7]
		1667	27 6	[1.6]	14 2	[1.0]
		5000	25 3	[1.5]	17 4	[1.2]
Positive controls						
TA100	2-AA	0.5	984 107	[5.2]		
TA1535	2-AA	2	189 5	[13.5]		
TA98	2-AA	0.5	920 124	[25.6]		
TA1537	2-AA	1	134 19	[7.9]		
TA100	SA	0.5			660 105	[3.7]
TA1535	SA	0.5			428 23	[32.9]
TA98	4NQO	0.5			398 51	[15.9]
TA1537	9-AA	50			242 13	[17.3]

[a] No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate 9-AA:9-Aminoacridine, 4NQO:4-Nitroquinoline-1-oxide, 2-AA:2-Aminoanthracene, SA:Sodium azide

Table 2. Reverse mutation assay using *E. coli* treated with wild ginseng culture extract

Tested Strain	Treated Chemical	Dose (μg/plate)	Colonies/plate(MeanS.D.)[Factor][a)] With S-9mix		Without S-9mix	
E. *coli* WP2 *uvrA*	Wild ginseng culture extract	0	372		342	
		62	357	[0.9]	323	[0.9]
		185	368	[1.0]	362	[1.1]
		556	435	[1.2]	282	[0.8]
		1667	344	[0.9]	314	[0.9]
		5000	393	[1.1]	2913	[0.9]
Positive controls						
WP2 *uvrA*	2-AA	2	675	[1.8]		
WP2 *uvrA*	4NQO	0.5			14411	[4.2]

[a)] No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate 4NQO:4-Nitroquinoline-1-oxide, 2-AA:2-Aminoanthracene

수를 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. 음성대조군에 비해 집락수의 현저한 증가나 감소는 관찰되지 않았다.

예비독성시험에서 결정된 5,000 μg/plate를 최고농도로 하고 5단계 농도군(5,000, 1,667, 556, 185 및 62 μg/plate)과 음성, 양성대조군으로 시험군을 설정하여 시험한 결과 대사활성계 적용 여부와 관계없이 산삼배양추출물은 5개 시험균주 모두에서 시험물질을 처리한 모든 군에서 양성 판정 기준을 만족할 정도의 집락수의 증가는 나타나지 않아서 음성으로 판정하였다.

고 찰

산삼배양추출물의 세균에 있어서의 유전자돌연변이 유발성 여부를 검색하기 위하여 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개의 균주와 대장균 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 *uvrA*를 이용해 복귀돌연변이 시험을 실시하였다.

시험물질은 멸균생리식염수에 용해하여 처리하였으며, 대사활성계 적용(+S) 및 미적용(-S)하에 5단계의 농도군과 음성 및 양성대조군으로 시험군을 구성해 본 시험을 실시하였다. 시험에 사용한 5개 균주의 생균수는 파장 600 nm에서 흡광도에 의한 측정 결과 0.3~3.9×10^9/ml이었다.

TA1537(+S)의 경우, 1,667 μg/plate에서 집락수가 음성대조군의 약 1.6배, 5,000 μg/plate에서 집락수가 음성대조군의 약 1.5배 정도로 증가를 나타내었으나 양성대조군과는 큰 차이가 있어 음성으로 판단된다.

모든 균주에 있어서 시험물질을 처리한 5개 농도군 이상에서 집락 계수가 가능하였고, 최고농도에서 항균성은 관찰되지 않았으며, 최고농도에 이르기까지 집락수의 현저한 증가 또한 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합할 때, 시험물질 산삼배양추출물은 본 시험조건 하에 사용한 시험균주들의 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

국문요약

산삼배양추출물의 세균에서의 돌연변이 유발성 검색을 위하여 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개의 균주와 대장균 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 *uvrA*를 이용해 복귀돌연변이 시험을 실시하였다. 시험물질은 멸균생리식염수에 용해하여 처리하였다. 대사활성계 적용 및 미적용시 모든 균주에 대해 0, 62, 185, 556, 1,667 및 5,000 μg/plate의 범위를 설정하고 각각 음성 및 양성대조군으로 시험군을 구성해 본 시험을 실시하였다. 시험 결과 모든 균주에서 최고농도에 이르기까지 집락수의 일관성 있는 증가는 나타나지 않았다. 이상의 결과를 종합할 때, 시험물질 산삼배양추출물은 본 시험조건 하에 사용한 시험균주들의 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 신미희: 산삼의 배양 및 그 응용에 관한 연구. 대한화장품학회지, 27, 45-56 (2001).
2. Yoo, B. S., Chang, M. S. and Byun, S. Y.: Characterization of cell cultures and ginsenoside production by cultured ginseng

and mountain ginseng. *Kor. J. Biotechnol Bioeng.*, **18**, 133-139 (2003).
3. Curtin, M. E.: Harvesting profitable products from plant tissue culture. *Bio/Technology.*, **1**, 649-657 (1983).
4. Kwon, I. C., Yoo, Y. J., Lee, J. H. and Hyum, J. O.: Enhancement of taxol production by *in situ* recovery of product, *Process Biochem.*, **33**,701-708 (1998).
5. Lee, E. J., Jhao, H. L., Li, D. W., Jung, C. S. and Kim, Y. S.: Effect of MeOH extract of adventious root culture of *Panax ginseng* on hyperlipidemic rat induced by high fat-rich diet. *Korean J. Pharmacogn.*, **34**, 179-184 (2003).
6. Fujita, Y., Hara, Y., Ogino, T. and Suga, C.: Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of Lithospermum erythrorhizon. I. Effect of nitrogen sources on the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Rep.*, **50**, 148-151 (1981).
7. Smart, N. J. and Flowler, M. W.: An airlift colume bioreactor suitable for large-scale cultivation of plant cell suspensions. *J. Exp. Bot.*, **35**, 531-53(1984).
8. 식품의약품안전청: 고시 제2000-63호, 비임상시험관리기준 (2000).
9. 식품의약품안전청: 고시 제1999-61호, 의약품등의 독성시험기준 (1999).
10. Maron, D. M. and Ames, B. N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173-215 (1983).