J. Fd Hyg. Safety 20(3), 175–178 (2005)

천연소독제 Clean Natural의 *Salmonella typhimurium*에 대한 복귀돌연변이시험

천명선 · 한상욱* · 조윤희** · 임영윤*** · 김의경 · 이후장†

*경상대학교 수의과대학 동물의학연구소, *건양대학교 제약공학과, **전북대학교 수의과대학, ***서남해수어류양식수산업협동조합*

Bacterial Reverse Mutation Test of Clean Natural using *Salmonella typhimurium*

Myung-Sun Chun, Sang-Wook Han*, Yoon-Hee, Cho, Yeong-Yun, Lim***, Eui-Gyung Kim, and Hu-Jang Lee†**

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyengsang National University, Chinju 600-701, Korea

**Pharmaceutical Engineering, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea*

***College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea*

****Southwest Marine Fish-Culture Co-op., Yeosu 550-818, Korea*

(Received May 30, 2005; Accepted August 31, 2005)

ABSTRACT – Clean Natural is a new disinfectant of which main components are propolis and wood vinegar from *Quercus mongolica*. To evauate the bacterial reverse mutation of Clean Natural, the *in vitro* Ames test using *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 and TA1537 were performed with clean natural at the concentrations 0, 5, 2.5, and 1.25 mg/ml/plate. Clean Natural was negative in Ames test with *Salmonella typhymurium* with and without rat liver microsomal enzyme (S-9 fraction). These results indicate that Clean Natural does not cause bacterial reverse mutation.

Key words: Clean Natural, disinfectant, Ames test, reverse mutation, *Salmonella typhimurium*

Clean Natural은 수산용 병원성 세균과 그와 관련된 용구들의 소독을 목적으로 생산된 천연성분의 강력한 소독제이다. 주요 성분으로는 목초액과 프로폴리스로 알려져 있다. 목초액은 오래 전부터, 항균, 살균, 식품의 보존성 향상, 항산화 효과, 가공식품의 향취개선 등을 목적으로 사용하여 왔다.[1-3] 또한, 농업, 축산 및 환경분야에서 목초액의 활용성에 관한 많은 연구가 수행되어 왔는데, 토양살균, 축산분뇨의 탈취, 작물의 해충 기피, 식물생장 촉진, 사료효율증진 등에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다.[4-5]

목초액은 목탄 제조시에 발생하는 증기를 냉각 · 응축시킨 액체로서, 80~90%가 물이며, 나머지 10~20%가 유기화합물이며 이 속에는 유기산류 12종, phenol류 13종, carbonyl 화합물류 19종, alcoho류 9종 등을 포함하여 약 200여종의 성분이 함유되어 강력한 살균력이 있는 것으로 알려져 있다.[6-7]

한편, 천연 항균성물질로 알려진 프로폴리스는 벌들이 다양한 식물의 진액물질을 채취하여 효소를 첨가시켜, 밀납 등을 넣어 몇 개월간 숙성시켜 놓은 물질로서 우수한 항균, 살균, 항염 작용을 하는 성질을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.[8] 프로폴리스 성분으로는 지금까지 약 150종 이상의 화합물이 알려져 있으며 주성분은 polyphenol이며 polyphenol로서는 flavonoid, phenolic acid 등이 있는 것으로 보고되고 있다.[9]

Clean Natural은 천연물질을 이용한 살균소독제로서, 사용시 어체 및 그 가공식품 등에 잔류 가능성을 배제할 수 없는 바, 잔류에 따른 안전성 여부가 확인되지 않은 상태이다. 따라서, 본 연구에서는 천연성분을 이용하여 생산된 살균소독제, Clean Natural의 복귀돌연변이시험을 식품의약품안전청 고시 제2000-63호 "비임상시험 관리기준"[10]와 제 1999-61호 "의약품 등의 독성시험 기준"[11]에 따라 수행함으로서 Clean Natural의 수산용 살균소독제로서의 안전성 여부를 평가하고자 수행하였다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

실험물질

본 시험에 사용된 시험물질은 ㈜성원에서 공급받은 주성분이 목초액과 프로폴리스인 Clean Natural 용액을 사용하였다. 물질은 담갈색이며 사용기간동안 실온에 보관하였다. 양성대조물질인 sodium azide(NaN_3), 2-aminofluorene(2-AF) 및 6-chloro-9-[3-(2-chloroethylamino)propyl-amino]-2-methoxy-acridine(ICR191)은 Sigma Co.에서 구입하였다.

시험균주 및 배지

식품의약품안전청 산하 국립독성연구원 유전독성과에서 분양받아 본 실험실에서 보관 중인 *Salmonella typhymurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 및 TA1537 균주를 이용하여 복귀돌연변이시험을 수행하였다.

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 분주하여 사용하였다.

시험물질 용량 및 대조물질

최고용량은 예비시험의 결과로부터 세포독성을 나타내지 않고 시험법에 명시된 5 mg/plate 이하의 농도인 Clean Natural 원액 5 mg/plate를 최고용량군으로 설정하였으며 공비로 중간용량군(Clean Natural 원액 2.5 mg/plate), 저용량군(Clean Natural 원액 1.25 mg/plate)의 3개군을 설정하였다. 용매대조군(Negative control)으로는 0.9% saline을 사용하였으며, 양성대조물질로는 TA98 균주 및 TA102 균주에서 2-AF(10.0 μg/plate), TA100, TA1535 균주에서 NaN_3(1.5 μg/plate), TA1537 균주에서 ICR191(1.0 μg/plate)를 사용하였다. 또한 각 용량마다 3매의 plate를 사용하였다.

시험방법

시험 시작 전 top agar를 38°C water bath에 넣고 autoclave한 10 ml 시험관에 2 ml씩 분주하여 각각의 시험관에 균액 0.1 ml와 각 단계의 시료를 넣어 vortex mixer로 잘 혼한ㅂ한 다음 최소 영양배지에 접종하였으며, S-9 첨가배지의 경우 S9을 cofactor와 1 : 9의 비율로 섞어 0.5 ml씩 첨가한 다음 vortex mixer로 혼합하여 접종하였다. S-9 mixture는 그 활성이 불과 몇 초 밖에 유지되지 않으므로 균주를 먼저 가한 후 S-9을 첨가하였으며, S9 mixture를 가하고 plate 상에 고루 퍼지게 하기까지의 시간이 20초가 넘지 않도록 주의하였다. 이 plate를 실온에서 30분 방치한 다음 37°C incubator에서 48시간 배양하였다. Colony는 colony counter 위에서 background lawn 보다 큰 colony를 계산하였으며, 복귀돌연변이 시험의 결과 판정은 복귀돌연변이 colony 수가 용량 의존적으로 증가하고 그 수가 음성대조군의 2배 이상이거나 통계학적으로 유의성을 나타낼 ãö 양성으로 판정하게 되며 이를 판단하기 위하여 Salmonella typhymurium TA98, TA100, TA102, TA1535, 및 TA1537 모두에서 음성대조군과 각 용량군 사이에 유의수준 $P<0.05$로 *t*-test를 실시하였다.

결과 및 고찰

Clean Natural은 목초액과 프로폴리스를 주성분으로한 새로운 강력한 소독제 있다.

목초액은 구성성분 중 10~20%가 유기화합물로서, 이 속에는 유기산류 12종, phenol류 13종, carbonyl 화합물류 19종, alcoho류 9종 등을 포함하여 약 200여종의 성분이 함유되어 강력한 살균력이 있는 것으로 보고되어 있다.[6-7] 또한, 프로폴리스의 구성성분으로는 약 150종 이상의 화합물이 있는 것으로 알려져 있으며 주성분은 polyphenol이며 polyphenol로서는 flavonoid, phenolic acid 등이 있어서, 이러한 성분들이 강력한 항균 및 살균 작용을 하는 것으로 보고되어 있다.[9]

현재, 목초액은 살균제 및 환경개선 등으로, 프로폴리스는 항균, 살균 및 항염제 등으로 상용화 되어있는 상황이지만, 이 들에 대한 안전성 검토가 이루어져 있지 않아 본 시험에서는 안전성 시험 중의 한 종류인 돌연변이 유발성 시험을 실시하였다.

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험은 Maron and Ames[12]에 의한 방법에 준하여 시행하였다. 이 방법은, *in vitro*에서 돌연변이 물질 검색법으로 현재 가장 널리 사용되고 있는 시험법이다. 천연물질을 이용한 살균소독제, Clean Natural의 세균에 대한 돌연변이 유발성 검토를 위해 *Salmonella typhimurium*의 TA98, TA100, TA102, TA1535 및 TA1537 균주를 복귀돌연변이 집락수를 조사하였고 그 결과를 Table 1에 나타내었다.

시험 균주인 *Salmonella typhimurium*의 TA98, TA100, TA102, TA1535 및 TA1537 균주에 대한 모든 용량단계에서 복귀돌연변이 colony수는 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성을 보이지 않았으며, 용량 의존적인 반응을 나타내지 않았다. 또한, S-9 첨가의 경우에 있어서도 S-9 미첨가와 마찬가지로 유의적인 변화 및 통계학적인 유의성은 관찰

Table 1. Reverse mutation assay using *Salmonella typhimurium* treated with Clean Natural

Group	S-9 mix	No. of revertant per plate (Mean±S.D.)				
		TA98	TA100	TA1535	TA1537	TA102
Negative control	-	19.3±4.2	136.0±9.2	11.9±4.2	27.0±5.6	184.0±32.6
High(5mg/plate)	-	13.3±3.5	129.0±14.6	13.0±3.8	30.7±5.5	217±20.8
Mid(2.5mg/plate)	-	15.7±2.5	131.7±7.1	12.5±1.4	26.8±8.1	179.7±26.7
Low(1.25mg/plate)	-	14.0±5.3	130.3±12.2	12.2±1.0	25.7±1.5	189.0±23.3
2-AF (10.0mg/plate)	-	159.0±17.0*	NT[a]	NT	NT	631.3±44.1*
NaN_3(1.5mg/plate)	-	NT	820.3±41.8*	381.0±13.5*	NT	NT
ICR191(1.0mg/plate)	-	NT	NT	NT	334.0±34.8*	NT
Negative control	+	27.7±8.0	130.0±15.0	24.7±4.0	27.3±2.3	233.0±14.2
High(5mg/plate)	+	31.0±4.6	147.7±19.1	30.7±3.1	31.7±5.5	241.0±40.2
Mid(2.5mg/plate)	+	29.3±2.1	139.7±10.0	25.0±8.4	26.7±8.1	229.0±27.9
Low(1.25mg/plate)	+	26.0±3.6	141.3±15.6	29.0±5.2	25.7±3.5	247.7±52.1
2-AF(10.0mg/plate)	+	611.0±78.6*	NT	NT	NT	916.0±92.1*
NaN_3(1.5mg/plate)	+	NT	420.7±65.1*	275.3±25.9*	NT	NT
ICR191(1.0mg/plate)	+	NT	NT	NT	282.3±35.4*	NT

NT: not tested.
* Significantly different from negative control ($p<0.05$)

되지 않았다. 그러나, 양성대조물질인 sodium azide, 2-aminoflurorene, 9-aminoacridine의 복귀 돌연변이 빈도는 S-6 첨가와 미첨가 모두 복귀돌연변이 집락수가 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, Clean Natural은 본 시험 조건 하에 사용한 균주들에 대하여 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 평가되었다.

국문요약

Clean Natural은 주성분이 참나무로부터 추출정제한 목초액과 프로폴리스로 구성된 새로운 천연 살균소독제이다. *Salmonella tyhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 및 TA1537 등의 5종의 균주를 이용한 복귀돌연변이성 시험을 수행한 결과, 모든 균주에서 대조군과 비교하여 시험용량군 사이에 돌연변이 유발성이 관찰되지 않았다. 그러나, 양성대조물질에서는 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 균주의 증가가 관찰되었다. 따라서, 시험물질인 천연 살균소독제, Clean Natural은 돌연변이 유발 가능성이 없는 것으로 평가되었다.

참고문헌

1. Tóth, L. and Potthast, K.: Chemical aspects of the smoking of meat and meat products. *Adv. Food Research*, **29**, 87-158 (1984).
2. Pszczola, D. E.: Tour highlights production and uses of smoke-based flavors. *Food Technol.*, **49**, 70-74 (1995).
3. Guillén, M. D. and Manzanos, M. J.: Study of the components of an aqueous smoke flavoring by means of Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography with mass spectrometry and flame ionization detectors. *Adv. Food Sci.*, **18**, 121-127 (1996).
4. Guillén, M. D. and Ibargoitia, M. L: New components with potential antioxidant and organoleptic properties, detected for the first time in liquid smoke flavoring preparations. *J. Agric. Food chem.*, **46**(4), 1276-1285 (1998).
5. Yatagai, M., Unrimin, G. and Sugiura, G.: By-products of wood carbonization. Tars from mangrove, sugi ogalite, wheat straw and chishima-sasa. *Mokuzai Gakkaishi*, **32**, 467-471 (1986).
6. 김진석, 최정섭, 김태준, 김성문, 조광연, 김진철: 목초액으로부터 제초활성물질의 분리 및 동정. 한국잡초학회지,

21(4), 357-365 (2001).
7. Yatagai, M., Unrinine, G. and Ohira, T.: By-products of wood carbonization Ⅳ. Components of wood winegars. *Mokuzai Gakkaishi*, **34**, 184-188 (1988).
8. 박형기: 천연항생물질 프로폴리스의 특성과 효용에 대한 고찰. 한국양봉학회지, **9**(3), 168-177 (1994).
9. 라정찬, 이종은, 송대섭, 권남훈, 박봉균, 박용호: 천연물을 이용한 살균 및 살바이러스 효과에 관한 연구. 한국식품위생안전성학회지, **18**(4), 183-188 (2003).
10. 식품의약품안전청: 고시 제 2000-63호, 비임상시험관리기준 (2000).
11. 식품의약품안전청: 고시 제 1999-61호, 의약품등의 독성시험기준 (1999).
12. Maron, D. M. and Ames, B. N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res*., **113**, 173-215 (1983).