pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 3, pp. 228~233 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.3.228

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

세균을 이용한 정제봉독의 복귀돌연변이시험

한상미* · 홍인표 · 우순옥 · 김세건 · 장혜리
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Mutagenicity Study of Purified Bee Venom (*Apis mellifera* L.) by the Bacterial Reverse Mutation Assay

Sang Mi Han*, In Phyo Hong, Soon Ok Woo, Se Gun Kim, and Hye Ri Jang
Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju, Korea
(Received February 22, 2017/Revised March 10, 2017/Accepted May 12, 2017)

ABSTRACT - The aim of the current study was to examine genotoxicological safety of purified bee venom (*Apis mellifera* L.) The bacterial reverse mutation in *Salmonella typhimurium* (TA100, TA1535, TA98, and TA1537) and *Escherichia coli* (WP2 *uvr*A) were evaluated with purified bee venom at concentrations of 0, 1.5, 5, 15, 50, 150, and 500 μg/plate. Purified bee venom was negative in Ames test with both in the presence and absence of rat liver microsomal enzyme. According to these results, we concluded that purified bee venom did not cause bacterial reverse mutation. The safety of the purified bee venom at practical doses needs to be further evaluated in *in vivo* genotoxicity assays.

Key words : *Apis mellifera*, Honeybee Venom, Mutagenicity, Toxicity

고대부터 봉독은 순수 천연물질이면서 강력한 항균, 항염증 효과를 갖고 있으며 부작용과 잔류에 대한 위험성이 적어 봉침요법으로 민간과 한방에서 관절염, 통풍 등의 질환에 사용되어 오고 있다[1,2]. 서양종꿀벌(*Apis mellifera* L.) 일벌의 독인 봉독은 다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있으며, 주 성분인 멜리틴(melittin)은 항염증과[3,4] 항균작용[5], 강력한 진통작용[6], 면역증강[7] 등의 역할을 한다고 알려져 있다. 우리나라에서는 봉독채집장치가 개발되기 전까지는 살아있는 벌을 이용하는 봉침요법으로 사람이나 가축에 직접 벌의 침을 쏘기 때문에 피부에 벌침이 박혀 내장이 분리되어 꿀벌은 죽게 된다. 무엇보다도 봉독의 정량 · 정성 분석이 불가능하기 때문에 효능과 안정성이 임상적으로 입증 되었음에도 불구하고 산업화 되지 못했다. 2005년 본 연구팀에서 봉독채집장치를 개발함에 따라 국내에서도 봉독 채집이 가능하게 되었으며, 채집과정에서 혼입된 흙이나 먼지 등과 같은 이물질을 제거한 순수 정제봉독이 시판 판매됨으로써 다양한 실용화 소재로서 사용하게 되었다[8]. 2010년「축산법 시행규칙」개정을 통해 축산물의 종류에 봉독을 포함하였으며, 국내는 물론 외국에서도 봉독의 다양한 기능성 탐색뿐만 아니라 기전 연구가 활발히 이루어지고 있다[9-11]. 특히 뉴질랜드, 미국 등 많은 국가에서는 봉독이 식용으로 사용이 가능하여 꿀 등 다양한 식품과 혼합된 제품이 판매되고 있으며, 식품 소재로서 연구가 활발히 진행되고 있다[12]. 그러나 국내에서는 봉독이 식품 원료로서 등록되어 있지 않아 식품 또는 식품첨가물로 개발되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 봉독채집장치를 사용하여 채집된 봉독을 정제한 정제봉독의 식용을 위하여 식품의약품안전처의 새로운 식품원료의 안전성 평가 가이드라인[13,14]에 따라 유전독성 평가의 하나인 복귀돌연변이시험을 수행함으로써 정제봉독의 식품원료로서의 안전성 여부를 평가하고자 하였다.

*Correspondence to: Sang Mi Han, Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea
Tel: 82-63-238-2896, Fax: 82-63-238-3832
E-mail: sangmih@korea.kr

Materials and Methods

공시 시료 및 성분 분석

시험물질인 정제봉독은 봉독채집장치를 사용하여 서양종꿀벌로부터 채취한 봉독을 '봉독의 간이정제방법'[8]으로 정제한 정제봉독을 구입하여 사용하였다(Chung Jin Biotech Co., Ansan, Korea). 구입한 정제봉독의 성분 확인을 위하

Table 1. Conditions for Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) analysis of purified bee venom

UPLC condition	
Column	Halo ES-18 (4.6 × 100 mm, 2.7 um)
Flow rate	1.5 mL/min
Injection volume	4 uL
Column temperature	50°C
Sample temperature	5°C
Mobil phase	(A) 20 mM TFA/MeCN*, (B) 20 mM TFA/H_2O (A) 0~3 min, 10~31%; 3~5 min, 31~40%; 5~10 min, 40~45%

*TFA; Trifluoroacetic acid, MeCN; Acetonitrile

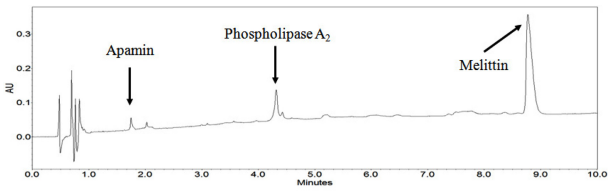

Fig. 1. UPLC chromatogram of purified bee venom. UV is 260 nm. Arrows are melittin, apamin, and phospholipase A_2.

여 4 mg/mL 의 농도로 3차 증류수에 녹여 PTFE 0.2 μm 필터(Sigma-Aldrich, MO, USA)로 여과하여 Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)를 사용하여 분석하였다. 표준품인 멜리틴, 아파민(apamin) 그리고 포스포리파아제 A_2 (phospholipase A_2)는 시그마(Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA)로부터 구입하여 2 mg/mL로 만들어 시험봉독과 동일한 필터를 사용하여 여과하였다. 분석기기는 PDA (photo diode array, Waters, MA, USA)검출기가 장착된 Acquity UPLC I-Class (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하여, Table 1과 같은 컬럼 및 분석 조건으로 260 nm의 검출파장에서 분석하였다. 정제봉독 내의 멜리틴, 아파민 그리고 포스포리파아제 A_2의 함량은 각각의 표준품 수용액 시료에 나타나는 피크와 비교하여 63.9%, 2.3% 그리고 10.9%로 확인되었다(Fig. 1).

시험균주 및 배지

히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98 및 TA1537 [16] 및 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2 *uvr*A [17]를 Molecular toxicology사(Boone, NC, USA) 로부터 구입 후 (주)켐온 비임상연구소(Yongin, Korea)에서 형질전환 후 계대 배양한 것을 시험에 사용하였다. 시험에 사용한 균주의 유전적 특징과 검출 가능한 돌연변이 유형은 Table 2와 같다. 복귀돌연변이 시험을 위한 균주의 전 배양에는 2.5% Oxoid Nutrient broth No. 2 (Thermo Fisher Scientic, Waltham, MA, USA)

Table 2. Genotype of this study used Salmonella and Escherichia tester strains, mutations in their histidine operon plus additional mutations

Tester Strain	Genotype	Mutation	Plasmid	Reversion event
TA100	*his*G46	*rfa uvr*B	pKM101	Base pair substitution
TA1535	*his*G46	*rfa uvr*B	-	Base pair substitution
TA98	*his*D3052	*rfa uvr*B	pKM10	Frameshift
TA1537	*his*C3076	*rfa uvr*B	-	Frameshift
WP2 uvrA	*trp*E	*uvr*A	-	Base pair substitution

를 사용하였다. 최소배지는 1.5% Bacto agar (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)와 Vogal-Bonner medium E (Institute for Systems Biology, Seattle, WA, USA) 및 2% glucose (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA)를 함유한 것을 페트리디쉬에 25 mL씩 분주한 것을 사용하였고, *E. coli*는 0.1% L-trytophan 액(Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA)을 0.25 mL/L로 첨가한 배지를 사용하였다. Top agar는 0.6% Bacto agar와 0.5% NaCl로 조제하였으며, *S. typhimurium* 균주용 top agar에만 100 mL당 0.5 mM histidine-biotin 액(ThermoFisher Scientic, Waltham, MA, USA)을 첨가하여 배양하였다.

균주의 보존 및 형질 확인

배양한 균 배양액 1 mL 당 dimethyl sulfoxide 90 μL를 가하여 냉동 보관용 바이알에 채워 액체질소에 보관하였으며, 형질이 확인 된 균주의 마스터 플레이트를 제작, 시험에 사용하였다. 각 균주 대하여 Maron and Ames의 [16] 방법에 준하여 시험하였다.

대사활성계

S9 mixture는 Aroclor-1254 (Molecular toxicology Inc., Boone, NC, USA)로 유도된 수컷 Spragure-Dawley 랫드의 간을 사용하였고, 단백질 함량은 35.5 mg/mL 이였으며, –15°C에서 보관하였다. Cofactor는 Wako Pure Chem (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)을 사용하였고, 냉장보관(–1~10°C)하였다. S9 mixture 1 mL의 조성은 8 μmol $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 33 μmol potassium chloride, 5 μmol G-6-P, 4 μmol 3-oxoacyl-[acyl transport protein] reductase, 100 μmol sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 하였으며, 조제한 S9 mixture는 얼음에 채워 사용하였다.

시험물질 처리 평판 제작

정제봉독의 처리 농도는 예비시험에서 본 시험과 같은 방법으로 5 종의 균주에 대하여 농도군당 1 개의 평판을

Table 3. Concentration of purified bee venom in plates

Tester strains	S9 mixture	Concentration (μg/plate)					
TA100	+	1.5	5	15	50	150	500
TA1535 TA98	-	0.15	0.5	1.5	5	15	50
TA1537	+	5	15	50	150	500	1500
WP2 *uvr*A	-	1.5	5	15	50	150	500

사용하여 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였다(Data not shown). 예비시험에서는 5~5000 μg/plate의 8 단계 농도를 처리하였으며, 시험물질 처리 시 top agar와 혼합할 때 및 집락 계수 시 평판에 침전 생성 여부를 관찰하였다. 따라서, 본 연구에서는 Table 3과 같이 시험군을 구성하고, 음성 및 양성대조군을 포함하며, 농도군 당 3 개의 평판을 사용하여 시험하였다.

시험물질 처리 및 평판 제작

시험물질의 처리는 direct plate incorporation 방법으로 실시하였다. 시험균주는 master plate로부터 20 mL의 액체 배지(2.5% Oxoid Nutrient Broth No. 2)에 접종해 shaking incubator (37 ± 2°C, 120 rpm)에서 10 시간 전 배양 하였으며, 전 배양을 마친 균주는 파장 600 nm에서 흡광도 측정으로 생균수를 산출한 후 시험에 사용할 때까지 냉장 보관하였다. 온도 45 ± 2°C를 유지하는 dry bath에 꽂은 멸균 tube (12 × 75 mm)에 고압증기 멸균한 top agar를 2 mL씩 분주한 다음, S9 mixture 0.5 mL (대사활성계 비적용 시에는 S9 mixture 대신 0.5 mL의 sodium-phosphate buffer, pH 7.4), 균배양액 0.1 mL, 봉독 용액 0.1 mL을 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼뜨려 굳게 하였다. 음성대조군은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 mL을, 양성대조군은 양성대조물질 용액을 동일한 방법으로 가하여 실시하였다. 시험물질 및 S9 mixture의 무균성 확인을 위해 봉독 시험물질 최고 농도액 0.1 mL 및 S9 mixture 0.5 mL을 각각 2 mL의 top agar에 혼합하여 평판을 제작하였다. 처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 평판을 뒤집어 37 ± 2°C에서 50 ± 2 시간 배양한 후 복귀돌연변이 집락을 육안으로 계수하였다.

관찰 항목

시험물질인 정제봉독 처리 시 정제봉독은 top agar에 혼합할 때 침전 생성 여부를 관찰하였다. 육안으로 확인 가능한 입자가 관찰되면 침전으로 판단하였다. 복귀돌연변이집락은 육안으로 계수하였다. 집락 계수 시 각 평판의 기본 성장균층의 형성 여부를 음성대조군과 비교하여 검사하였으며, 오염 혹은 기타 이상의 발생여부를 점검하였다. 기본 성장균층이 엷어지거나 없어지면서 집락수의 감소가 나타날 때 또는 미세집락(microcolony)이 나타난 경우를 세포독성이 있는 것으로 판단하였다. 집락수의 '감소'에 대해서는 공통된 기준이 없으므로, 본 시험에서는 편의상 집락수가 음성대조군에서 나타난 집락 수 평균치의 50% 미만으로 감소한 경우 혹은 증가 경향이 역전되는 경우를 세포독성으로 판단하였다.

결과의 평가

통계분석은 실시하지 않았으며, 대사활성계 적용 여부에 상관없이 최소 1 개 균주에서 시험물질 처리군의 평균 집락 수가 농도 의존적으로 증가하거나 1 개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다. 양성판정 기준을 만족하지 못할 경우 음성으로 판정하였으며, 시험물질은 본 시험에 사용한 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단하였다. 생물학적 연관성 또한 판정에 참고하였다.

Results and Discussion

예로부터 봉독은 살아있는 꿀벌로부터 직접 사람이나 가축에 직접 독을 쏘도록 하는 봉침요법으로 면역증강 또는 다양한 질환의 치료에 사용해 오고 있었다[1,2]. 그러나 살아있는 꿀벌을 이용했을 때에는 정량 및 정성 분석이 불가능 할 뿐더러 심한 통증과 더불어 알러지까지 유발할 수 있다는 문제점 들을 갖고 있어 산업화 되지 못했다. 봉독채집장치가 개발되고 휘발성 성분이 제거된 균일한 성분이 유지되는 정제봉독이 생산됨에 따라 이를 이용한 다양한 식의약소재 개발과 기능성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 본 연구팀에서는 정제봉독에 대한 피부자극시험[18], 안점막자극시험[18], 누적첩포자극시험, 광독성[19] 및 광감작성시험 등을 수행하여 정제복독을 피부에 도포했을 경우엔 무독성임이 확인되어 화장품의 원료로 사용되고 있다. 봉독은 독일, 뉴질랜드와 호주 등 양봉산업 선진국에서는 이미 식품으로 사용하고 있으며, 우리나라의 양봉농가에서도 꿀과 함께 복용하기도 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 아직까지 정제봉독은 식품의약품안전처의 식품원료로서 등재되지 않아 식용은 물론 정제봉독을 함유한 첨가제, 가축 사료 등으로 개발하는데 제약을 받고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 민간에서 복용하고 있으며 선진국에서도 식용으로 허락된 정제봉독을 식품원료로서 등록하기 위하여 필요한 안전성 시험을 수행하고자 하였다.

본 연구에서는 유전독성 시험 중의 하나인 세균을 이용한 복귀돌연변이시험을 수행하였다. 시험에 사용한 정제봉독은 부형제로 사용한 멸균생리식염수에 용해되었으며 모든 농도군의 조제물에서 침전은 관찰되지 않았으며, 정

Table 4. Reverse mutation assay using *Salmonella typhimurium* treated with purified bee venom

Tester Strain	Treated Chemical	With S9 mixture		Without S9 mixture	
		Dose (μg/Plate)	Colonies/plate[Factor]a	Dose (μg/Plate)	Colonies/plate[Factor]a
TA100	purified bee venom	0	148 ± 4	0	143 ± 11
		1.5	112 ± 3 [0.8]	0.15	128 ± 5 [0.9]
		5	117 ± 6 [0.8]	0.5	132 ± 9 [0.9]
		15	118 ± 14 [0.8]	1.5	123 ± 12 [0.9]
		50	108 ± 15 [0.7]	5	116 ± 13 [0.8]
		150	68 ± 13 [0.5]	15	125 ± 12 [0.9]
		500	-	50	-
TA1535	purified bee venom	0	11 ± 3	0	11 ± 1
		1.5	9 ± 3 [0.9]	0.15	13 ± 1 [1.2]
		5	8 ± 3 [0.8]	0.5	11 ± 2 [1.0]
		15	10 ± 2 [0.9]	1.5	8 ± 1 [0.8]
		50	8 ± 2 [0.7]	5	10 ± 1 [0.9]
		150	8 ± 2 [0.8]	15	9 ± 2 [0.8]
		500	-	50	-
TA98	purified bee venom	0	28 ± 2	0	21 ± 1
		1.5	25 ± 1 [0.9]	0.15	16 ± 2 [0.8]
		5	27 ± 4 [1.0]	0.5	18 ± 2 [0.9]
		15	24 ± 4 [0.8]	1.5	23 ± 2 [1.1]
		50	24 ± 2 [0.9]	5	21 ± 4 [1.0]
		150	24 ± 4 [0.9]	15	19 ± 2 [0.9]
		500	-	50	-
TA1537	purified bee venom	0	11 ± 2	0	11 ± 1
		5	11 ± 1 [1.0]	1.5	10 ± 2 [0.9]
		15	13 ± 3 [1.1]	5	9 ± 3 [0.8]
		50	14 ± 2 [1.2]	15	9 ± 2 [0.8]
		150	11 ± 3 [1.0]	50	7 ± 3 [0.6]
		500	15 ± 3 [1.3]	150	4 ± 1 [0.4]
		1500	-	500	-
Positive control					
TA100	2-AA	1.0	961 ± 36 [6.5]		
TA1535	2-AA	2.0	149 ± 11 [13.9]		
TA98	B[a]P	1.0	270 ± 20 [9.7]		
TA1537	2-AA	1.0	153 ± 4 [13.5]		
TA100	SA			0.5	613 ± 11 [4.3]
TA1535	SA			0.5	214 ± 14 [19.5]
TA98	2-NF			2.0	305 ± 23 [14.5]
TA1537	ICR-191			0.5	162 ± 6 [14.3]

a) Three plates/dose were used. No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate
Abbreviations : 2-AA, 2-aminoanthracene; SA, sodium azide; B[a]P, benzo[a]pyrene; ICR-191, acridine mutagen ICR 191
−: uncountable

제봉독 조제물을 top agar와 혼합할 때 모든 농도군에서 혼탁이나 침전이 관찰되지 않았다. 집락계수 시에도 모든 플레이트에서 침전이나 기타 이상은 관찰되지 않았으며, 정제봉독은 최고농도 및 S9 mixture의 무균성을 확인하기 위한 플레이트에서 미생물 오염으로 인한 집락은 나타나지 않았다. *S. typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535 및 TA98 의 대사활성계 적용 시 500 μg/plate에서, 비적용에서는 50 μg/plate에서 세포독성이 관찰되었으며 TA1537에서는 대사활성계 적용 시 1,500 μg/plate에서, 비적용에서는 500 μg/plate 에서 세포독성이 관찰되었다(Table

Table 5. Reverse mutation assay using *E. coli* treated with purified bee venom

Tester Strain	Treated Chemical	With S9 mixture		Without S9 mixture	
		Dose (μg/Plate)	Colonies/plate[Factor]a	Dose (μg/Plate)	Colonies/plate[Factor]a
WP 2 uvrA	purified bee venom	0	24 ± 3	0	22 ± 2
		5	22 ± 2 [0.9]	1.5	22 ± 4 [1.0]
		15	23 ± 4 [1.0]	5	20 ± 3 [0.9]
		50	29 ± 2 [1.2]	15	13 ± 2 [0.6]
		150	25 ± 2 [1.1]	50	21 ± 3 [1.0]
		500	26 ± 2 [1.1]	150	11 ± 3 [0.5]
		1500	-	500	-
Positive control					
WP 2 uvrA	2-AA	6.0	123 ± 21 [5.2]		
WP 2 uvrA	4NQC			0.5	92 ± 8 [4.3]

a) Three plates/dose were used. No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate
Abbreviations : 2-AA, 2-aminoanthracene; 2-NF, 2-Nitrofluorene.
–: uncountable

4). *E. coli* WP2 *uvr*A에서는 대사활성계 적용 시 1,500 μg/plate에서, 비적용 시 500 μg/plate 에서 세포독성이 관찰되었다(Table 5). 한편 모든 양성대조군에서는 분명한 양성의 결과를 얻었다. 시험에 사용한 5 개 균주는 파장 600 nm에서의 흡광도 기준으로 생균수 측정 결과 0.53~3.51 $\times 10^9$(TA균주) 및 1.18×10^9 (*E. coli*) CFU/mL 이었으며, 모든 플레이트 당 처리된 생균수는 0.5×10^8 CFU 이상이었다. 시험타당성 기준은 모두 만족하였으며, 모든 시험균주에서 대사활성계 적용 여부에 상관없이 시험물질 처리군의 평균 집락 수는 증가를 나타내지 않았으며, 이 결과는 양성판정 기준을 만족시키지 못하였다. 따라서, 시험물질인 정제봉독은 본 시험조건 하에 사용한 시험 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료되어 향후 염색체돌연변이, 소핵시험 등 안전성 시험을 추가 한다면, 식품 소재로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

Acknowledgement

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업 (과제번호: PJ01132503)에 의하여 수행되었으므로 감사를 드립니다.

국문요약

서양종 꿀벌의 일벌의 독을 채취하여 정제한 정제봉독에 대한 세균에서의 돌연변이 유발성 검색을 위하여 *S. typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98, 그리고 TA1537의 균주와 대장균 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 *uvr*A를 이용해 복귀돌연변이시험을 실시하였다. 정제봉독은 부형제로 사용한 멸균생리식염수에 용해되었으며 모든 농도군의 조제물에서 침전은 관찰되지 않았으며, 정제봉독 조제물을 top agar와 혼합할 때 모든 농도군에서 혼탁이나 침전이 관찰되지 않았다. 대사활성계 적용 TA100, TA1535, TA98 균주에 대해 0, 1.5, 5, 15, 50, 150 및 500 μg/plate의 범위를 설정하고 미 적용시엔 0, 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15 및 50 μg/plate의 범위로 설정하였다. TA1537과 WP2 *uvr*A균주에 대한 농도 범위은 대사활성계 적용시엔 0, 5, 15, 50, 150, 500 및 1,500를 미 적용시엔 0, 1.5, 5, 15, 50, 150 및 500 μg/plate 범위로 설정하여 시험을 수행하였다. 그 결과 모든 시험균주에서 대사활성계 적용 여부에 상관없이 정제봉독 처리군의 평균 집락 수는 증가를 나타내지 않았으며, 양성판정 기준을 만족시키지 못하였다. 따라서, 정제봉독은 본 시험조건 하에 사용한 시험 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료되었다.

References

1. Bogdanov, S.: Bee Venom: Composition, Health, Medicine: A Review. Bee Products Science. April 2016, www.bee-hexagon.net. (2016).
2. Kim, H.W., Kwon, Y.B., Ham, T.W., Roh, D.H., Yoon, S.Y., Lee, H. J., Han, H.J., Yang, I.S., Beitz, A.J., Lee, J.J.: Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. *J. Vet. Med. Sci*. **65**, 349-355 (2003).
3. Piek, T.: Venoms of the Hymenoptera. London, Academic Press (1986).
4. Habermann, E., Reiz, K.G.: On the biochemistry of bee venom pep-tides, melittin and apamin. *Biochemistry* **343**, 192-203 (1965).
5. Fennell, J.F., Shipman, W.H., Cole, L.J.: Antibacterial action of a bee venom fraction(melittin) against a penicillin-resistant Staphylococcus and other microorganisms. *Res. Dev. Tech. Rep.* **5**, 1-13 (1967).

6. Curcio-Vonlanthen, V., Schneider, C.H., Frutig, K., Blaser, K.H., Kalbacher, H.: Molecular parameters in melittin immunogenicity. *J. Pept. Sci.* **3**, 267-276 (1997).
7. Rudenko, S.V., Nipot, E.E.: Modulation of melittin-induced hemolysis of erythocytes. *Biokhimiia*. **61**, 2116-2124 (1996).
8. Han, S.M., Lee, G.K., Yeo, J.H., Woo, S.O., Kweon, H.Y.: A simplified purificating method of bee venom. 10-075881. Patent. Korea (2007).
9. Lee, W.R., Pak, S.C., Park, K.K.: The protective effect of bee venom on fibrosis causing inflammatory diseases. Toxins. **16**, 4758-4772 (2015).
10. Maurice N, Deltheil T, Melon C, Degos B, Mourre C, Amalric M, Kerkerian-Le Goff L.: Bee Venom Alleviates Motor Deficits and Modulates the Transfer of Cortical Information through the Basal Ganglia in Rat Models of Parkinson's Disease. *PLoS One*. **16**, e0142838 (2015).
11. Park, S., Erdogan, S., Hwang, D., Hwang, S., Han, E.H., Lim, Y.H.: Bee Venom Promotes Hair Growth in Association with Inhibiting 5α-Reductase Expression. *Biol Pharm Bull*. **39**, 1060-1068 (2016).
12. Yoirishm, N.: Curative properties of honey and bee venom. University press of the Pacific Honolulu, Hawaii, pp. 144-171 (2001).
13. KFDS: Good Laboratory Practice, Osong, Korea (2014).
14. KFDS: Guideline of toxicological testing for drugs, Osong, Korea (2014).
15. Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures, Edited by David J. Kirkland, Cambridge University Press, ISBN 0-521-39347-7 (1990).
16. Maron, D.M., Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-215 (1983).
17. Green, M.H.L., Muriel, W.J.: Mutagen testing using trp+ reversion in *Escherichia coli*., *Mutat. Res*. **38**, 3-32 (1976).
18. Han, S.M., Lee, K.G., Yeo, J.H., Pak, S.C.: Dermal and ocular irritation studies of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *Am. J. Chin. Med*. **40**, 795-800 (2012).
19. Han, S.M., Hong, I.P., Woo, S.K., Kim, S.G., Jang, H.R.: Antigenicity of Purified Bee Venom Gel from Honeybee (*Apis mellifera* L.) in Guinea Pigs. *Yakhak Hoeji*. **60**, 53-57 (2016).