pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 2, pp. 107~112 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.2.107

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

발효 탐라오가피 추출물의 유전독성 연구

조명래 · 김영현 · 김재민 · 이상종[1] · 신현무[2] · 이옥환*
강원대학교 식품생명공학과, [1]㈜에스티알바이오텍, [2]메사추세츠주립대학교의과대학

Genotoxicity Study from the Extracts of Fermented *Acanthopanax koreanum*

Myounglae Cho, Young-Hyun Kim, Jae-Min Kim, Sang-Jong Lee[1], Hyun Mu Shin[2], and Ok-Hwan Lee*
Department of Food science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
[1]STR Biotech Co., LTD, Gangwon 24234, Korea
[2]University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01655, USA
(Received February 5, 2016/Revised February 17, 2016/Accepted February 22, 2016)

ABSTRACT - This study was to determine genotoxicity from the extracts of fermented *Acanthopanax koreanum*. The bacterial reverse mutation assay, the extracts of fermented *A. koreanum* did not induce mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvrA with or without metabolic activation of S-9 mixture. In addition, the micronucleus formation in ICR mice, the extracts of fermented *A. koreanum* treated with dose of 500, 1,000 and 2,000 mg/kg did not affected micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE/2,000 PCE) and polychromatic erythrocytes (PCE)/200 polychromatic erythrocyte+normochromatic erythrocyte (RBC). The cytotoxicity effects using CHO-K1 cells observed no significant changes compared with negative control group ($p < 0.05$). Moreover, the extracts of fermented *A. koreanum* did not cause a significant chromosome aberration on CHO-K1 cells in the chromosome aberration assay. Therefore, these results suggest that the extracts of fermented *A. koreanum* did not induce any harmful genotoxic effects.

Key words: fermented *Acanthopanax koreanum*, genotoxicity, bacterial reverse mutation, micronucleus formation, chromosome aberration

오가피(*Acanthopanax* sp.)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 다년생 낙엽관목으로 우리나라, 중국, 일본, 러시아 등지에서 널리 분포하고 있으며[1], 오가피의 주요 생리활성으로는 항스트레스[2], 항산화[3], 항염증[4], 항당뇨[5] 등이 보고되어 있다. 오가피의 종은 가시오가피(*A. senticosus*), 지리오가피(*A. chiisanensis*), 탐라오가피(*A. koreanum*) 등으로 분류되는데[6], 그 중 하나인 탐라오가피(*A. koreanum*)는 한국의 제주도에 자생하는 종으로, 주요 지표성분으로는 eleutheroside B와 E가 보고되었다[7]. Eleutheroside B는 주로 항암, 항산화, 항피로 등의 생리활성을 나타내며, Eleutheroside E는 염증억제, 피로감소 및 체력 증진 등의 효능을 보인다[8,9].

최근에는 이러한 오가피의 기능성을 향상시키기 위하여 *Lactobacillus* sp., 곰팡이 등의 유익한 미생물을 이용한 발효를 주로 활용하고 있는데, 함 등[10]에 의하면 가시오가피(*A. senticosus*)를 유산균(*Lactobacillus casei*)을 이용하여 발효하였을 때, 발효 전 가시오가피와 비교하여 항당뇨 활성을 촉진한다고 보고되었고, 안 등[11]은 발효가시오가피(fermented *A. senticosus*)가 일반 가시오가피와 비교하여 DPPH free radical 소거능 및 tyrosinase 저해 활성이 더 높다고 보고하였다.

현재까지 연구된 발효 오가피의 안전성 연구는 조 등[12]이 보고한 발효 가시오가피의 단회 독성 및 반복투여 독성평가, 조 등[13]이 보고한 발효 탐라오가피(fermented *A. koreanum)* 추출물의 급성 독성 및 아만성 독성(13-week)이 보고 되었을 뿐, 발효 탐라오가피를 이용한 유전 독성 안전성에 관한 연구는 아직 수행되지 않았다.

따라서, 본 연구는 발효 탐라오가피(fermented *A. koreanum*)의 수용성 추출물을 식품 산업에 활용하고자, 유전독성에 대한 평가를 실시하였으며, 발효 탐라오가피의 미생물복귀 돌연변이 시험, 골수세포를 이용한 소핵시험 및 염색체이상시험 등의 연구를 수행하였다.

*Correspondence to: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: 82-33-250-6454, Fax: 82-33-259-5565
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

Materials and Methods

탐라오가피 발효

본 연구에서 사용한 오가피는 탐라오가피(*A. koreanum*)를 사용하였으며, 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 균사체를 이용하여 발효하였다. 영지버섯 균사체는 potato dextrose broth (PDB) 100 mL을 이용하여 30ºC에서 14일간 발효하였으며, 액체발효 후 최초 발효액의 10배(1,000 mL)에 해당하는 증류수를 첨가하여 발효 탐라오가피 수용성 추출물을 제조하였다. 발효 탐라오가피 추출물은 감압농축기를 이용하여 95ºC에서 농축하였으며, 상등액은 filter paper (Advantec, Tokyo, Japan)를 이용하여 필터 후, 동결건조하였다. 최종 발효 탐라오가피 분말은 sieve(< 120 mesh)를 이용하여 미세가루로 만들어 실험에 사용하였다.

미생물복귀돌연변이 시험

발효 탐라오가피 추출물의 미생물복귀돌연변이 실험은 히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537과 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2uvrA를 이용하였다. 미생물 대사활성효소인 S-9 Mix는 기존에 발표된 방법으로 제조하여 사용하였으며[14], 미생물 복귀돌연변이를 유도하는 양성대조물질인 sodium azide (NaN3), 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate (9-AA), 2-Aminoanthracene (2-AA), 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 대사활성계 존재 유무와 관계없이 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA는 5,000 μg/plate 농도부터 2배 희석법을 이용하여 희석하였으며, 음성 대조군은 시료대신 증류수를 첨가하였다. *Salmonella typhimurium* 및 *Escherichia coli* 각 균주는 10 mL의 nutrient broth에 접종하여 37ºC에서 약 10시간 동안 회전식 진탕배양기에서 배양하였다. 조제액 100 μL와 대사활성계 비적용일 때에는 0.1 mol/L 인산완충용액(pH 7.4) 500 μL를, 대사활성계 적용일 때에는 S-9 Mix 500 μL를, 이미 건열 멸균된 시험관에 넣고, 균 현탁액 100 μL를 첨가하여, 37ºC 진탕배양기에서 20 분간 선회 배양하였다. 그 후, 45ºC에 보관된 top agar 2 mL을 첨가하여 잘 혼합한 후 Vogel-Bonner 최소 Glucose 한천평판배지 위에 중층하고 37ºC 배양기에서 48시간동안 배양하였다. 배양 후 페트리디쉬에 발생한 복귀변이 콜로니수는 SUNTEX 570 콜로니카운터(Suntex Instruments Co., Ltd. Taiwan)로 자동 계측 하였다. 용량설정시험 및 본 시험에서 얻어진 복귀돌연변이 결과는 콜로니수의 실측치로 기록하였으며 용량군당 평균과 표준편차를 구하였다. 결과의 판정은 대사활성계 (S-9 Mix) 존재 유무에 관계없이 TA97과 TA100 균주에서는 음성대조군의 2배이상, TA1535에서는 3배 이상이며, 시료의 농도에 따라 재현성있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다[14].

마우스 골수세포를 이용한 소핵시험

발효 탐라오가피 추출물의 발암성 유발 유・무 판단의 기초자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 7주령의 수컷 ICR 마우스 25마리를 ㈜ 샘타코에서 구입 후, 1주일간 동물 사육실 환경에 적응시켜 시험에 사용하였다. 동물사육실은 온도 23 ± 3ºC, 상대습도 50 ± 20%, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 조도 150~300 Lux로 유지하였다. 실험동물은 마우스용 와이어 케이지(260W × 420L × 150H mm)에 5마리씩 넣어 사육하였고, 사료와 음용 소독수(자외선 소독된 지하수)는 자유섭취 시켰다. Cho 등[13]의 연구결과에 의하면 발효 탐라오가피 추출물은 5,000 mg/kg의 농도에서 rat에 대한 독성을 나타내지 않았기 때문에 예비시험을 생략하고, 500, 1,000, 2,000 mg/kg를 시험용량으로 설정하였으며 투여액량은 10 mL/kg로 경구투여 하였다.

골수세포의 채취는 2일간 마우스에 시험물질을 투여 후, fetal bovine serum을 사용하여 대퇴골에서 골수세포를 수거하였고, 채취한 골수를 4ºC의 원심분리기 1,000 rpm에서 약 5분간 원심분리하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 슬라이드글래스에 낙하하고 도말하여 골수도말검체를 제작하였다. 골수도말검체는 acridine orange (40 μg/mL)를 처리하여 염색 후, 골수세포증식과 다염성 적혈구에 생성된 소핵을 관찰하였다. 소핵빈도를 관찰하기 위하여 군당 약 2,000개의 다염성 적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE)를 관찰하고, 이중 소핵 다염성 적혈구(PCE with one or more micronuclei, MNPCE)의 출연빈도를 측정하였다. 동시에 정상체 적혈구(Normochromatic erythrocyte, NCE)와 다염성 적혈구를 더한 전 적혈구(PCE+NCE, RBC)에 대한 다염성 적혈구의 출연빈도를 구하였다. 결과의 판정은 소핵을 가진 다염성적혈구(MNPCE)의 수가 통계학적으로 유의하며, 농도의존적으로 증가하는 경우와 하나이상의 농도에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다. 동물실험은 대구가톨릭대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 실시되었다(승인번호: IACUC-2014-001호).

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

발효 탐라오가피 추출물의 염색체 이상시험을 평가하기 위하여 Chinese hamster 유래의 난소유아세포(CHO-K1 cell)를 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다. CHO-K1 세포는 10% fetal bovine serum을 포함한 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., USA)을 사용하여 온도 37ºC, 습도 95%, CO_2 농도가 5%로 설정된 CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 세포증식억제시험은 발효 탐라오가피 추출물 시료를 15개의 농도(0.08-5 mg/mL)로 설정하였으며, 세포증식억제시험의 결과에 따라서, 시료의 용량을 결정하였다. 음성대조군은

시료 대신 증류수를 사용하였고, 양성대조군은 대사활성계의 존재(+S-9 Mix)하에는 Cyclophos-phamide (CPA)를 대사활성계의 비존재(-S-9 Mix)하에는 Mitomycin C (MMC)를 사용하였다[15].

염색체이상시험에서 발효 탐라오가피 추출물의 6시간 처리군은 75 cm^2 세포배양용 플레이트에 계대배양된 CHO-K1 세포부유액의 세포수를 2×10^5 cells/mL의 세포 농도로 조정 후, 25 cm^2 세포배양용 플라스크에 5 mL씩 분주하여 3일간 배양하였다. 그 후, 각 플라스크의 기존 배양액을 제거하고, 신선한 배양액 4.4 mL, 각 농도의 시험물질용액 0.1 mL 및 S-9 Mix 0.5 mL를 분주하였다. 대사활성계의 부재군(-S-9 Mix)은 신선한 배양액 4.9 mL와 시험물질용액 0.1 mL만 첨가하였다. 6시간 후, 배양액을 제거하고 신선한 배양액으로 교환 후 18시간동안 추가 배양하였다.

발효 탐라오가피 추출물의 24시간 처리군은 75 cm^2 세포배양용 플레이트에 계대 배양된 CHO-K1 세포부유액의 세포수를 2×10^5 cells/mL의 세포 농도로 조정 후, 25 cm^2 세포배양용 플라스크에 5 mL씩 분주하여 3일간 배양하였다. 그 후, 각 플라스크의 기존 배양액을 제거하고, 신선한 배양액 4.9 mL, 각 농도의 시험물질용액 0.1 mL을 처리 후, 24시간동안 배양하였다.

각 시료는 시험물질 처리시간으로부터 22시간 후에 Colcemid 용액(Gibco, USA)을 최종농도가 0.2 mg/mL가 되게 첨가하고, 2시간 후 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 원심분리 후, 상등액을 제거하고, 37°C의 저장액(75 mM KCl)을 첨가하여 15분간 37°C에서 방치하고, 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 상등액이 제거된 세포는 냉각 고정액(methanol:acetic acid = 3:1)에 3회 고정한 후, 염색체 표본을 제작하고 3% Giemsa(0.1M Sorenson 인산완충액, pH 6.8)로 5분간 염색하였으며, 표본은 각 플라스크당 2매씩 제작하였다. 염색체이상의 관찰은 각 슬라이드 중에서 잘 흩어진 100개의 분열중기세포를 관찰하여, 분열중기상 세포수의 출현율이 음성대조군에 비하여 확실히 증가하고, 용량 의존성이 인정되는 경우, 또 한 개의 용량에서 확실히 증가되고 재현성이 인정되는 경우 양성으로 판정하고 그 외는 음성으로 판정하였다.

통계학적 분석

본 연구에서 통계적 유의성 검정은 5%의 유의수준($p < 0.05$)에서 one-way ANOVA, multiple comparision 분석을 통해 SPSS 19.0K 통계 프로그램을 이용하여 실시하였다. 염색체 이상시험의 경우 Chi-square test 및 Fisher's exact test를 실시하였으며, 유의성이 있는 경우 Cochran-Armitage trend test를 통해 염색체 이상의 발생 빈도에 대한 용량의존성을 확인하였다.

Results and Discussion

미생물복귀돌연변이시험

발효 탐라오가피 추출물의 미생물복귀돌연변이시험은 히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537과 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2uvrA를 이용하였고, 복귀돌연변이활성은 대사활성계의 존재(+S-9 Mix)와 부재하(-S-9 Mix)에서 실험하였다. 시험의 적용용량은 5,000 μg/plate를 최고농도로 하여 0~2,500 μg/plate의 농도를 포함하여 5단계의 농도결정시험을 하였고, 실험결과는 Table 1에 나타내었다. 발효 탐라오가피 추출물의 미생물복귀돌연연이는 Table 1에서 보듯이, 5종의 모든 균주에서 대사활성계의 존재 및 부재하에서 음성대조군과 비교하였을 때 유의적인 생육저해는 없었다. 그러나, S-9 Mix의 부재하에서 양성대조군으로 사용한 NaN3, 4-NQO, 9-AA 및 S-9 Mix의 존재하에서 양성대조군으로 사용한 2-AA는 시료군 및 음성대조군과 비교하였을 때 복귀돌연변이를 유의적으로 증가시켰다. 다른 연구결과에 의하면, 조 등[16]은 탐라가시오가피(*A. koreamun*)의 뿌리 추출물에 대한 항돌연변이원 연구를 수행하였는데, 미생물복귀돌연변이시험에서 탐라오가피 뿌리 추출물은 대사활성계의 유무와 상관없이 음성으로 나타났다. 따라서 발효 탐라오가피 추출물은 *Salmonella typhimurium* 및 *Escherichia coli*에 대한 복귀돌연변이를 나타내지 않았다.

마우스 골수세포를 이용한 소핵시험

소핵의 생성은 마우스 골수 내에서 erythroblast가 최종분열한 후 탈핵 과정을 거쳐 미성숙 적혈구인 다염성 적혈구(PCE)가 되고, 이 다염증 적혈구는 약 10시간 후 성숙 적혈구가 되어 혈관으로 가게 된다. 이때, 핵이 있는 eythrocyte 상태에서 시험물질이 돌연변이를 유발하는 특성이 있다면 염색체 변이가 발생하여 더 이상 분화하지 못하고 파편으로 남아 PCE 내에 있게 되는데 이를 소핵이라 한다[17]. 소핵시험에서 소핵이 많이 관찰될수록 시험물질이 돌연변이를 유발하는 특성이 많다고 판단한다[18].

수컷 IRC mice를 이용한 발효 탐라오가피 추출물의 독성을 관찰한 결과 시험 물질 투여 후 사망동물은 나타나지 않았으며, 일반증상 관찰 결과 특이한 이상증상은 발견되지 않았다. 투여에 의한 군간 체중변화 역시 유의한 차이가 없었다. 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험의 결과는 Table 2에 나타내었다. 각 시료별로 약 2,000 여개의 다염성 적혈구(MNPCE/2,000 PCE)를 관찰한 결과, 마우스 골수세포에서 소핵 출현 빈도는 발효 탐라오가피 추출물의 500~2,000 mg/kg 농도에서 약 0.08~0.12%를 보였으나, 유의적인 농도의존적 증가는 보이지 않았다($p < 0.05$). 한편, 전체 적혈구에서 다염성 적혈구의 평균 비율(PCE/

Table 1. Mutagenicity of the water extracts from fermented *A. koreanum* with and without metabolic activation

S-9 Mix	Test materials (μg/plate)	Number of colonies/plate (Mean ± SD)				
		Base substitution			Frameshift	
		TA100	TA1535	*E. coli*	TA98	TA1537
Without S-9 Mix (-)	0	157.3 ± 5.7	34.3 ± 2.1	36.0 ± 2.0	37.3 ± 2.5	13.0 ± 1.0
	312	147.7 ± 8.0	32.0 ± 1.0	34.0 ± 1.0	38.7 ± 3.5	17.7 ± 2.1
	625	156.3 ± 4.0	30.3 ± 3.5	33.7 ± 0.6	38.0 ± 1.7	14.3 ± 2.9
	1250	144.7 ± 11.5	28.3 ± 0.6	33.0 ± 2.7	39.3 ± 3.2	16.3 ± 2.1
	2500	152.7 ± 4.5	29.7 ± 1.2	31.3 ± 1.2	34.0 ± 3.0	15.7 ± 3.2
	5000	166.0 ± 11.5	30.0 ± 1.0	3.7 ± 4.7	41.7 ± 5.1	16.3 ± 1.2
	Positive control (μg/plate)	NaN3	NaN3	4-NQO	4-NQO	9-AA
		1.5	1.5	0.5	0.5	80
		413.0 ± 18.7	294.7 ± 32.1	175.7 ± 12.2	316.7 ± 19.6	285.3 ± 10.1
With S-9 Mix (+)	0	169.0 ± 15.9	26.7 ± 0.6	33.7 ± 3.1	38.7 ± 3.5	15.0 ± 1.0
	312	155.3 ± 13.2	29.0 ± 1.7	37.0 ± 3.0	42.3 ± 8.5	9.7 ± 2.1
	625	145.3 ± 21.5	26.7 ± 3.1	35.3 ± 3.8	42.3 ± 4.9	15.7 ± 1.2
	1250	134.4 ± 1.5	29.0 ± 1.7	35.3 ± 1.5	34.3 ± 4.0	14.0 ± 1.7
	2500	141.3 ± 9.0	25.3 ± 1.5	36.0 ± 2.0	35.7 ± 0.6	14.3 ± 1.5
	5000	139.7 ± 15.8	29.7 ± 1.5	36.0 ± 1.7	41.7 ± 5.5	13.3 ± 2.5
	Positive control (μg/plate)	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		1.0	2.0	10	0.5	2.0
		395.7 ± 8.0	193.3 ± 27.1	257.3 ± 17.8	235.0 ± 15.6	242.7 ± 7.2

Table 2. Effect of the water extracts from fermented *A. koreanum* on micronucleus formation in ICR mice

Samples	Dose (mg/kg)	No. of mice	MNPCE[1] /2,000 PCE[2] (%, mean ± SD)	PCE/200 RBC[3] (%, mean ± SD)
fermented *A. koreanum*	0	5	0.11 ± 0.04	43.4 ± 1.71
	500	5	0.11 ± 0.04	42.1 ± 1.52
	1000	5	0.08 ± 0.05	42.6 ± 1.47
	2000	5	0.12 ± 0.03	41.2 ± 0.76
MMC	2	5	1.51 ± 0.12	41.3 ± 1.04

[1)]MMPCE, micronucleated polychromatic erythrocyte
[2)]PCE, polychromatic erythrocyte
[3)]RBC, polychromatic erythrocyte+normochromatic erythrocyte

200 RBC)은 발효 탐라오가피 추출물에서 약 41.2~42.6%를 나타내었다. 발효 탐라오가피 추출물의 소핵시험 결과를 음성 대조군과 비교하면, 소핵다염증 적혈구(0.11%)와 전 적혈구(43.4%)의 수치는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나, 양성 대조군으로 사용한 MMC는 발효 탐라오가피 추출물 및 음성 대조군과 비교하여 전 적혈구 (41.3%)는 유사하게 나타났으나, 소핵다염성 적혈구(1.51%)가 유의적인 증가($p < 0.05$)를 보였다. 따라서, 발효 탐라오가피 추출물은 마우스 골수 세포에 대한 소핵 유발성이 없는 것으로 판단된다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

발효 탐라오가피 추출물의 염색체 이상시험은 대사활성계의 존재(+S-9 Mix) 및 부재(-S-9 Mix) 하에서 CHO-K1 세포를 이용하여 수행하였으며, 본 연구를 수행하기 전 CHO-K1 세포의 성장을 억제하는 농도를 최고농도로 설정하기 위하여 XTT assay를 수행하였다. 그 결과, 발효 탐라오가피 추출물은 대사활성계의 존재 6시간 처리군 5 mg/mL 농도에서 56%, 대사활성계 부재 6시간 처리군은 4.16 mg/mL 농도에서 50%, 대사활성계 부재 24시간 처리군은 0.32 mg/mL 농도에서 53%의 세포성장억제 효과를 관찰하여 이 농도를 최고농도로 결정하였다(Table 3). Table 4에

Table 3. Cytotoxicity activity of the water extracts from fermented *A. koreanum* on CHO-K1 cells

Samples	hr	S-9 Mix	Dose (mg/mL)	Cell growth rate (%)
fermented *A. koreanum*	6	+	0	100
			0.16	99
			1.25	78
			5	56
	6	-	0	100
			0.16	97
			2.5	76
			4.16	50
	24	-	0	100
			0.08	100
			0.24	71
			0.32	53

서 보듯이 발효 탐라오가피 추출물의 염색체이상 발생빈도는 대사활성계 존재 6시간 처리군의 0.16, 1.25 및 5 mg/mL 농도에서 각각 gap을 포함하여 1.0, 1.0, 1.5%로 나타났으며, 염색체이상의 유무에 대한 판정 기준이 되는 gap을 포함하지 않은 염색체이상 발생빈도는 각각 1.0, 1.0, 0.5% 이었다. 그러나, 양성대조군으로 사용한 CPA (15 μg/mL)의 염색체이상 발생빈도는 gap을 포함하여 24.0%, gap을 포함하지 않은 상태에서는 21.5%로 음성대조군(gap 포함 1.0%, gap 미포함 0.5%) 및 시료군과 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 한편, 대사활성계의 부재 6시간 처리군에서 염색체 수적이상인 배수체는 음성대조군을 포함하여 모든 농도에서 관찰되지 않았으며, 염색체 구조적이상 발생빈도는 gap을 포함하여 0.16, 2.5 및 4.16 mg/mL 농도에서 각각 0.5, 0.5, 1.0%이었으며 음성대조군은 2.0%이었다. Gap을 포함하지 않은 염색체이상 발생빈도는 각각 0.0, 0.5, 0.5%로 나타났으며, 음성대조군은 0.5%이었다. 대사활성계 부재 24시간 처리군의 염색체이상 발생빈도는 gap을 포함하여 0.08, 0.24 및 0.32 mg/mL 농도에서 각각 1.5, 2.0, 1.0%이었으며, gap을 포함하지 않은 염색체이상 발생빈도는 각각 0.5, 0.5, 1.0%이었다. 그러나, 양성대조군으로 사용한 MMC (0.15 μg/mL)는 gap를 포함하여 24.0%, gap를 포함하지 않은 상태에서 22.0%의 염색체이상 발생빈도를 보이며 발효 탐라오가피 추출물과는 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 따라서, CHO-K1 세포를 이용하여 염색체 이상 시험을 수행한 결과, 발효 탐라오가피 추출물은 염색체 이상을 유발하지 않았다.

Acknowledgement

본 연구는 2012년 산학연공동기술개발 국제사업(과제번호: C1008942-01-01)의 일환으로 수행된 것으로 연구비를 지원하여 주신 중소기업청의 한국산학연협회에 감사드립니다.

Table 4. Effect of the water extracts from fermented *A. koreanum* on chromosomal aberration of CHO-K1 cells

Group	hr	Test materials (mg/mL)	Number of colonies/plate (Mean ± SD)							Decision
			gap	Chromatid		Chromosome		Total aberrations		
			g	ctb	cte	Csb	cse	T(-g)	T(+g)	
Sample with (+) S-9 Mix	6	0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5 ± 0.71	1.0 ± 0.00	-
		0.16	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0 ± 0.11	1.0 ± 0.00	-
		1.25	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	-
		5	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5 ± 0.71	1.5 ± 0.71	-
CPA		15 (μg/mL)	2.5	8.0	5.5	3.5	4.5	21.5 ± 2.12	24.0 ± 2.83	+
Sample Without (-) S-9 Mix	6	0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5 ± 0.71	2.0 ± 0.00	-
		0.16	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 ± 0.00	0.5 ± 0.71	-
		2.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5 ± 0.71	0.5 ± 0.71	-
		4.16	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5 ± 0.71	1.0 ± 1.41	-
MMC		0.5 (μg/mL)	2.5	7.0	7.0	3.5	3.5	21.0 ± 0.00	23.5 ± 0.71	+
Sample Without (-) S-9 Mix	24	0	0.5	1.5	0.0	0.0	0.0	1.5 ± 0.71	2.0 ± 0.00	-
		0.08	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5 ± 0.71	1.5 ± 0.71	-
		0.24	1.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5 ± 0.00	2.0 ± 0.00	-
		0.32	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	-
MMC		0.15 (μg/mL)	2.0	10.0	4.5	3.5	4.0	22.0 ± 1.41	24.0 ± 1.41	+

국문 요약

본 연구는 발효 탐라오가피(fermented *A. koreanum*) 추출물의 유전독성을 연구하기 위하여, 미생물복귀돌연변이 시험, 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험, 염색체 이상시험을 연구하였다. 미생물복귀돌연변이 연구에서 발효 탐라오가피 추출물은 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537와 *Escherichia coli* WP2uvrA에 대하여 대사활성계의 존재(+S-9 Mix) 및 부재(-S-9 Mix) 하에서 돌연변이 유도를 보이지 않았다. 또한, ICR 마우스를 이용한 소핵실험에서 발효 탐라오가피 추출물은 500, 1,000, 2,000 mg/kg 농도에서 MNPCE/2,000 PCE 와 PCE/200 RBC의 소핵형성을 유발하지 않았다. 한편, CHO-K1 세포를 이용한 염색체 이상실험에서 발효 탐라오가피 추출물은 대사활성계의 존재 6시간 처리군, 대사활성계 부재 6시간 처리군 및 대사활성계 부재 24시간 처리군에서 염색체 이상을 보이지 않았다. 따라서, 본 연구결과 발효 탐라오가피 추출물은 유전독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

References

1. Sun Y.L., Liu L.D., Hong S.K.: *Eleutherococcus senticosus* as a crude medicine: Review of biological and pharmacological effects. *J. Med. Plants Res.*, **5**, 5946-5952 (2011).
2. Gaffney B.T., Hugel H.M., Rich P.A.: *Panax ginseng* and *Eleutherococcus senticosus* may exaggerate an already existing biphasic response to stress via inhibition of enzymes which limit the binding of stress hormones to their receptors. *Med. Hypotheses*, **56**, 567-572. (2001).
3. Choi J.M,, Ahn J.B.: Functional properties of 50% methanol extracts from different parts of *Acanthopanax sessiliflorus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**, 373-377 (2012).
4. Dowling E.A., Redondo D.R., Branch J.D., Jones S., McNabb G., Williams M.H.: Effect of *Eleutherococcus senticosus* on submaximal and maximal exercise performance. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **28**, 482-489 (1996).
5. Watanabe K., Kamata K., Sato J., Takahashi T.: Fundamental studies on the inhibitory action of *Acanthopanax senticosus* Harms on glucose absorption. *J. Ethnopharmacol*., **132**, 193-199 (2010).
6. Kim Y.H., Bae D.B., Park S.O., Lee S.J., Cho O.H., Lee O.K.: Method validation for the determination of eleutherosides and β-glucan in *Acanthopanax koreanum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **42**, 1419-1425 (2013).
7. Kim Y.H., Bae D.B., Lee J.S., Park S.O., Lee S.J., Cho O.H., Lee O.H.: Determination of eleutherosides and β-glucan content from different parts and cultivating areas of *A. senticosus* and *A. koreanum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **42**, 2082-2087 (2013).
8. Huang L.Z., Wei L., Zhao H.F., Huang B.K., Rahman K., Qin L.P.: The effect of eleutheroside E on behavioral alterations in murine sleep deprivation stress model. *Eur. J. Pharmacol*., **658**, 150-155 (2011).
9. Huang L.Z., Zhao H.F., Huang B.K., Zheng C.J., Peng W., Qin L.P.: *Acanthopanax senticosus*: review of botany, chemistry and pharmacology. *Pharmazie*, **66**, 83-97 (2011).
10. Ham S.H., Lim B.L., Yu J.H., Ka S.O., Park B.H.: Fermentation increases Antidiabetic effects of *Acanthopanax Senticosus*. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.*, **22**, 340-345 (2008).
11. Ahn H.Y., Cha J.Y., Cho Y.S.: Biological activity and chemical characteristics of fermented *Acanthopanax senticosus* by mold. *J. Life Sci.*, **22**, 1704-1711 (2012).
12. Cho J.H., Park I.J., Paik S.O., Choi S.Y., Choi G.H.: Single- and repeated-dose toxicities of *Acanthopanax senticosus* fermentation products in rats. *Korean J. Food Sci. Technol*. **46**, 249-255 (2014).
13. Cho M.L., Shin G.H., Kim J.M., Lee J.H., Park S.O., Lee S.J., Shin H.M., Lee B.Y., Kang I.J., Lee O.K.: Acute and subchronic (13 week) toxicity of fermented Acanthopanax koreanum extracts in Sprague Dawley rats. *Regul. Toxicol. Pharm*., **77**, 93-99 (2016).
14. Lee S.H., Ryu J.M., Seo I.K., Lee T.H., Kim Y.B., Moon S.K., Jung K.H., Park K.R., Hwang S.Y.: Genotoxicity study of *Magnolia obovata* extracts. *J. Toxicol. Pub. Health*, **23**, 79-78 (2007).
15. Lee S.S., Park Y.H., Sohn Y., Ryu S.J., Surh Y.J.: Genotoxicity of capsaicin in cultured human lymphocytes. *Environ. Mutagen. Carcinogen*., **15**, 81-87 (1995).
16. Cho M.C., Hong C.E., Lyu S.Y.: Antimutagenic study on *Acanthopanax koreanum* Nakai. *J. Fd Hyg. Safety*, **25**, 215-219 (2010).
17. Hong S.G., Chung S.G., Hyun S.H.: The micronucleus test of the diglyceride preparation with conjugated linoleic acid by using mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**, 853-857 (2008).
18. Kim I.B., Jeong J.S., Yoon T.J., Kim J.B.: Safety evaluation of Korean mistletoe extract. *Korean J. Food Nutr.*, **26**, 383-390 (2013).