pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 35, No. 6, pp. 567~573 (2020)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2020.35.6.567

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

풋감 주정 추출물의 유전독성 연구

함영민 · 윤선아 · 현호봉 · 고보람 · 정용환 · 오대주 · 윤원종*
(재)제주테크노파크 생물종다양성연구소

Genotoxicity Study of Immature Green Persimmon Extract

Young-Min Ham, Seon-A Yoon, Ho Bong Hyun, Boram Go, Yong-Hwan Jung, Dae-Ju Oh, Weon-Jong Yoon*
Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark, Seogwipo, Korea

(Received July 2, 2020/Revised July 27, 2020/Accepted November 5, 2020)

ABSTRACT - The persimmon is commonly cultivated in temperate regions of the world, including China, Korea, Japan, Brazil, Turkey, and Italy. In some Asian cultures, consumers are aware of the health claims related to the persimmon and its functional ingredients. The rich phytochemistry of the persimmon has opened new avenues of research on diet-based regimens designed to cure various ailments. This study was conducted to identify the genotoxicity of immature green persimmon (*Diospyros kaki* THUNB.) extract (DKA). The bacterial reverse mutation assay, the chromosomal aberration assay, and the mammalian micronucleus test were performed to determine the DKA genotoxicity. The result of the bacterial reverse mutation assay revealed that the DKA did not induce mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 and *Escherichia coli* WP2*uvrA* with or without metabolic activation of S9 mixture. The oral administration of DKA also caused no significant increase in the number of micronucleated polychromatic erythrocytes or in the mean ratio of polychromatic to total erythrocytes. In addition, DKA did not cause a significant chromosome aberration on CHL cells in the presence or absence of S9 activation. In conclusion, DKA could be considered as a reliable and safe functional food since no toxicity was found under the condition of this study.

Key words: Immature persimmon, Genotoxicity, Reverse mutation, Micronucleus formation, Chromosome aberration

감나무(*Diospyros kaki* THUNB.)는 감나무과(Ebenaceae)에 속하는 다년생 낙엽교목으로 우리나라, 중국, 일본, 브라질, 터키, 이탈리아 등지에 널리 분포하고 있으며[1] 예로부터 감나무 열매와 잎은 한약재로 널리 이용되어 왔다. 감에는 떫은 맛을 내는 탄닌 성분들이 다량 포함되어 있으며 kaki-tannin으로 불리우고 있다[2]. Kaki-tannin은 수용성으로 gallic acid, gallotanin, gallocatechin, gallocatechin gallate이 주성분으로 서로 축합 결합된 고분자이며 특히 덜 익은 감인 풋감에는 고도로 축합된[3] 형태로 완숙감 및 다른 과일에 비해 다량 함유되어 있다. 완숙된 감나무 열매는 오랫동안 섭취하였으나 덜 익은 감나무 열매인 풋감은 떫은 식감으로 인하여 섭취가 어려워 그동안 식품으로서의 가치가 없었지만 풋감에 포함되어 있는 축합형 탄닌들은 지질대사 개선[4], 알코올 대사 촉진[5], 항미생물[6], 항산화[7] 등의 효능이 알려지고 있어 기능성 식품 소재로 개발할 수 있는 가능성이 매우 높다[8]. 제주도의 주요 소득 농산물은 감귤로서 2019년 생산량은 628,937 t이며 매년 판매가격 유지를 위한 적정 생산 조정에 어려움을 겪고 있어 감귤을 대체할 수 있는 새로운 소득 작물 발굴이 절실히 필요한 상황이다. 제주도 내에서 2019년 생산된 감은 375 t으로 감귤 생산량의 0.02%에 불과하나 탐라지(耽羅誌)[9], 남사록(南槎錄)[10] 등의 문헌에 따르면 제주도에 예로부터 감나무가 다량 서식하고 있는 것을 확인 할 수 있어 제주가 감나무를 재배하기에 매우 적합한 환경임을 알 수 있다. 이에 다양한 기능성이 보고된 풋감을 제주의 새로운 소득작물로 발굴하기 위해 건강기능식품 원료화 연구를 수행하고 있다. 현재까지 감의 안전성 연구는 모기 유충 및 bed-bug 등 해충에 대한 독성평가가 있었으나[11] 풋감 주정추출물을 이용한 유전 독성 안전성에 관한 연구

*Correspondence to: Weon-Jong Yoon, Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark, Seogwipo 63608, Korea
Tel: +82-64-720-2810, Fax: +82-64-720-2801
E-mail: yyjkl@jejutp.or.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 아직 수행되지 않았다. 풋감의 식용 근거 자료 및 안전성 평가 결과에 대한 문헌이 부족하므로 기능성 식품으로서 원료의 안전성을 입증하기 위해 식품의약품안전처 규정[12]에 따라 유전독성시험 결과가 필요하다. 유전독성은 유전물질에 상해성을 나타내는 성질을 포함하는 광범위한 의미로 이용되고 있다[13]. 또한 유전독성시험은 유전자 또는 유전자 담체인 염색체에 미치는 상해작용을 평가하는 시험을 말하며 신약후보물질, 식품첨가물 등의 잠재적 발암성 또는 돌연변이 유발물질을 검출하기 위해 수행하는 시험의 한 종류이다[14]. 따라서, 본 연구에서는 풋감의 주정추출물을 식품 원료로 활용하고자 풋감 주정추출물이 DNA나 염색체에 직접적으로 손상을 주어 형태적 변화, 기능적 이상을 일으키는지 여부를 확인하기 위해 GLP규정[재단법인 한국화학융합시험연구원(Hwasun, Korea)]에 준수하여 유전 독성에 대한 연구를 수행하였으며, 미생물 복귀돌연변이 시험, 골수세포를 이용한 체내 소핵시험, 염색체이상시험 등의 연구를 수행하였다. 한 종류의 유전독성 시험으로 모든 유전독성 기전을 확인하는 것은 어려우므로 국제적으로 표준화된 시험법을 조합하여 OECD Guidelines[15]에 따라 시험을 수행하였다.

Materials and Methods

풋감 주정추출물 제조

본 연구에서 사용한 풋감은 제주도 서귀포시 안덕면에서 재배되어 8월에 수확한 풋감을 사용하였다. 열매를 세척 후 분쇄하여 동결건조 하였으며 동결건조된 풋감 분말을 실온에서 24시간 동안 50% 주정(Woori Ethanol supplies company, Busan, Korea)으로 1회 추출하였다. 여과 및 원심분리(10,000×g, 15분)된 추출액을 감압 농축하여 농축액의 당도를 10-15%규격으로 조절하였으며 마지막으로 동결건조를 수행하여 추출 분말(DKA)을 제작하였다. 풋감 주정추출물의 최종 수율은 풋감 분말 대비 30%(w/w)이다.

풋감 주정추출물의 지표성분(Gallic acid) 함량 분석

표준용액은 gallic acid (Sigma-Aldrich G7384, 99%, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL의 농도로 제조하였고 시험용액은 풋감 주정추출물 3점에 대해 각 200 mg을 칭량하여 1% 초산이 섞인 증류수로 용해시켜 30분간 초음파 추출하고 50 mL로 정용하였으며 0.5 μm syringe filter (Advantec®, PTFE, Tokyo, Japan)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 표준용액과 시험용액에 대해 지표성분 함량을 HPLC (Waters 2695, Milford, MA, USA)로 분석하였으며 검출기는 PDA (Photodiode array detector, Waters 2998, Milford, MA, USA)를 사용하였으며 검출파장은 270 nm로 설정하였다. 분석 컬럼은 Luna Phenyl-Hexyl 100A (5 μm, 250 mm × 4.6 mm, Phenomenex®, Torrance, CA, USA)을 사용하였고 온도는 25°C로 유지하였다. 이동상은 H_2O (0.1% formic acid)와 acetonitrile을 구배용매조성법으로 유속은 0.8 mL/min으로 흘려주었으며 아래 수식을 활용하여 풋감 주정추출물 중 지표성분의 함량을 계산하였다.

Gallic acid (mg/g) = [검량선결과 (μg/mL) × 최종부피 (mL) × 희석배수 ×표준품 순도] /시료채취량 (mg)

미생물 복귀돌연변이 시험

풋감 주정추출물에 대한 미생물 복귀돌연변이 유발 여부를 평가하기 위해 OECD Guidelines[15]에 준하여 실험하였으며 히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 4개의 균주와 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2*uvaA*를 이용하여 시험을 실시하였다. 이들 균주는 2019년 9월 24일 Molecular Toxicology, INC. (Boone, NC, USA)에서 구입하여 동결보관하였다(-80°C--60°C). 미생물 대사 활성 효소인 S9 mix는 기존의 시험법을 참고하여 제조하여 사용하였다. 미생물 복귀돌연변이를 유도하는 각 균주에 적합한 변이원성 양성대조물질은 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2, Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan), sodium azide (NaN_3, Sigma-Aldrich), 2-aminoanthracene (2-AA, Sigma-Aldrich), 9-aminoacridine (9-AA, Sigma-Aldrich), benzo(a)pyrene (Sigma-Aldrich)을 사용하였고 음성대조군에는 증류수를 처리하였다. 본 시험에 앞서 농도결정시험을 수행한 결과 대사활성계 미적용(-S9 mix) 및 적용(+S9 mix)에서 시험물질에 의한 균주의 생육저해는 확인되지 않았으며 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니 수는 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았다. 본 실험에서는 시험물질에 음성대조 물질을 가하여 5000 μg/mL로 조제하고 이 용액의 일부를 음성대조 물질로 단계 희석하여 313, 625, 1250, 2500 μg/mL농도로 시험물질을 제조하였다. 시험은 Pre-incubation method를 이용하고, 대사활성계 미적용(-S9 mix) 및 적용(+S9 mix)에서 실시하였다. 균주를 nutrition broth에서 10시간 배양하고 배양액 0.1 mL에 시험물질 0.1 mL, S9 mix 또는 인산완충용액(pH 7.4)을 0.5 mL 혼합하여 37°C에서 배양하였다(pre-incubation). 이 혼합액에 D-biotin-histidine (0.5 mmol/L) 또는 L-tryptophan (0.5 mmol/L)을 함유한 top agar를 2 mL넣어 minimal glucose agar plate위에 중층하여 top-agar가 응고된 후 37°C에서 48시간 배양하고 콜로니를 계수하였다[16]. 음성대조군, 양성대조 및 시험물질의 각 처리에 대하여 3반복 계수한 콜로니 수의 평균값 및 표준편차를 산출하였다. 시험 결과의 평가는 통계학적 검정을 실시하지 않았다.

마우스 골수세포를 이용한 체내 소핵시험

풋감 주정추출물의 발암성 유발 유·무 판단의 기초자료를 얻기 위해 유전독성시험 중 마우스 골수세포를 이용한 체내 소핵시험을 실시하였다(재단법인 한국화학융합시험연구원 화순 동물윤리위원회 승인번호: IAC2019-2280). 6주령 수컷 28마리를 ㈜오리엔트 바이오(Seongman, Korea)에서 구입 후 1주일간 동물 사육실 환경에 적응시켜 시험에 사용하였다. 동물사육실은 온도 21.1±0.5°C, 상대습도 52±6%, 조명시간 12시간(08:00-20:00), 조도 150-300 Lux로 유지하였다. 실험동물은 마우스용 와이어케이지(180W×300D×140H)에 5마리 이하로 넣어 사육하였고, 사료는 방사선 멸균된 Rodent Diet 20 5033 (Labdiet, St. Louis, MO, USA)를 식이시켰으며, 음수는 R/O수를 자유섭취시켰다. 본 시험의 최고 농도는 용량설정시험 결과를 바탕으로 하여 2000 mg/kg bw/day로 설정하였으며 각 군당 5마리의 마우스에 2회(24시간 간격) 경구투여 하였다. 시험물질은 200 mg/mL로 corn-oil에 현탁되었고 혼합하였을 때에 발열, 발포, 변색이 없었으므로 음성대조 물질로 Corn-oil을 사용하였다. 시험물질의 투여량은 500, 1000, 2000 mg/kg으로 설정하였다. 양성대조물질인 cyclophosphamide monohydrate (CPA)는 70 mg/kg bw/day 농도로 단회 복강투여 하였다. 시험물질을 투약하고 24시간 후 마우스 대퇴골의 골수세포를 fetal bovine serum으로 세척하여 세포현탁액을 얻었다. 세포현탁액을 1,000 rpm에서 5분 간 원심분리하고 상등액을 제거한 후 골수 세포를 slide glass에 도말하여 골수도말검체를 제작하였다. 골수도말 검체는 acridine orange 용액(40 μg/mL)으로 잠적시켜 형광으로 염색하고 다염성 적혈구(PCE), 정염성 적혈구 및 소핵을 관찰하였다. 다염성 적혈구는 관찰 시야에서 핵이 없이 적색 형광으로 보이는 것으로 판정하였으며 정염성 적혈구는 관찰시야에서 다염성 적혈구의 크기로 형광을 전혀 나타내지 않고 음영으로만 구분되는 것으로 판정하였다. 소핵은 제일 큰 것은 적혈구 직경의 절반부터 제일 작은 것은 식별이 가능한 것까지로 하였고 주로 원형이나 반원형 등의 형태도 포함시켰다. 또한 근접한 유핵세포의 핵과 동일하게 녹색 형광을 띠는 것으로 판정하였다. 소핵빈도를 관찰하기 위해 군당 약 4,000개의 다염성 적혈구를 관찰하고 이 중 이중 소핵의 출연 빈도를 측정하였다. 동시에 전체적혈구(NCE) 중 다염성 적혈구의 출연 빈도를 구하였다. 결과의 판정은 소핵을 가진 다염성 적혈구의 수가 통계학적으로 유의하며, 농도 의존적으로 증가하는 경우와 하나 이상의 농도에서 재현성이 있는 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다. 소핵유발빈도에 있어서 음성대조군과 시험물질 투여군 간의 경우 Kruskal-Wallis' H-test, 음성대조군과 양성대조군 간의 경우 Mann-Whitney's U test, 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율[(PCE/NCE+PCE)]에 군간 비교는 ANOVA test와 Dunnett's test, Student's t-test 분석을 통해 SPSS program (Ver. 19)을 이용하여 통계처리 하였다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

풋감 주정추출물의 염색체 이상 유발을 평가하기 위해 Chinese hamster lung (CHL)유래 세포를 American Type Culture Collection (ATCC CRL-1935TM)에서 구입하여 사용하였다. CHL세포는 10% fetal bovine serum을 포함한 minimum essential medium (MEM, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) 를 사용하여 온도 37°C, CO_2 농도가 5%로 설정된 CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 예비실험에서 상대세포수 증가(RICC)(55±5) %의 농도로 세포독성 농도를 산출하였으며 $RICC_{55}$는 세포증식율이 55±5%를 사이에 두는 두 농도에 대하여 직선식으로 산출하였다. 예비실험 결과 대사활성계의 존재(+S9 mix)에는 2504.0 μg/mL, 대사활성계 비존재(-S mix)하에는 130.1 μg/mL, 24시간 처리군에서는 138.4 μg/mL으로 $RICC_{55}$ 농도를 산출하였다. 그 결과에 따라 풋감 주정추출물 농도를 32.5-3500 μg/mL로 설정하여 본 실험을 하였다. 풋감 주정추출물은 증류수에 현탁시켜 단계 희석하여 사용하였다. 음성대조군은 시료 대신 증류수를 사용하였고, 양성대조군은 대사활성계의 존재(+S9 mix)하에는 cyclophophamide (CPA)를, 대사활성계의 비존재(-S9 mix)하에는 mitomycin C (MMC)를 사용하였다.[17]

염색체이상시험에서 풋감 주정추출물의 6시간 처리군은 4×10^3 cells/mL로 조제한 세포 부유액을 25 cm^2 세포배양용 플라스크에 5 mL씩 분주하여 3일간 배양하였다. 그 후, 각 플라스크의 기존배양액을 제거하고 배양액 4.0 mL, 각 농도의 시험물질용액 0.5 mL 및 S9 mix 0.5 mL를 분주하였다. 대사활성계의 부재군(-S9 mix)은 배양액 4.5 mL, 시험물질용액 0.5 mL만 첨가하였다. 6시간 후 PBS로 세포 표면을 2-3회 세정하고 새로운 배지 5 mL 첨가하여 18시간 추가 배양하였다.

풋감 주정추출물 24시간 처리군은 4×10^3 cells/mL로 조제한 세포 부유액을 25 cm^2 세포배양용 플라스크에 5 mL씩 분주하여 3일간 배양하였다. 그 후, 각 플라스크의 기존배양액을 제거하고 배양액 4.5 mL, 시험물질용액 0.5 mL을 첨가하여 24시간동안 배양하였다.

각 시료는 처리 종료 2시간 전에 colcemide를 최종농도 0.2 μg/mL이 되도록 첨가하고 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 모아 염색체이상시험을 위한 표본을 제작하였다. 회수된 세포는 원심분리 후 상등액을 제거하고, 37°C의 저장액(0.075 mol/L KCL)을 첨가하여 15분간 37°C에서 방치하고, 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 상등액이 제거된 세포는 냉각고정액(methanol:acetic acid=3:1)에 수회 고정 후 염색체 표본을 제작하고 5% gimesa 용액으로 5분간 염색하였다. 표본은 각 슬라이드당 2매씩 제작하였

다. Gap은 염색분체로 보여지는 비염색 부분의 폭이 염색분체의 폭보다 좁은 것으로 하였다. 다른 이상과 구별하여 기록하고, 구조 이상에는 포함하지 않았다. 염색체 이상의 관찰은 각 슬라이드 중에서 잘 흩어진 100개의 분열중기상 세포를 관찰하여, 염색체 이상이 관찰되는 분열중기상 세포수가 음성대조군에 비하여 확실히 증가하고, 용량 의존성이 인정되는 경우, 또 한 개의 용량에서 확실히 증가되고 재현성이 인정되는 경우 양성으로 판정하고 그 외는 음성으로 판정하였다[18]. 판정 결과 이상세포의 출현빈도가 5% 미만이었기 때문에 통계학적 방법은 이용하지 않았다.

Results and Discussion

풋감 주정추출물의 지표성분 함량

풋감 주정추출물 3점의 시료에 대해 지표성분으로 선정한 gallic acid 함량을 분석하여 평균값을 구하였으며 평균값의 80-120% 범위인 3.150-4.724 mg/g으로 지표물질의 함량범위를 규격화 하였다. 본 연구에서 사용한 풋감 주정추출물의 gallic acid 함량은 4.61 mg/g으로 분석되어 풋감 주정추출물의 표준화 규격에 적합한 것으로 확인하였다.

미생물 복귀돌연변이시험

풋감 주정추출물의 미생물 복귀돌연변이시험은 식품의약품안전처 독성시험기준을 준용하여 수행하였으며 히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1533 및 TA1537과 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2*uvrA*를 이용하였고, 복귀돌연변이활성은 대사활성계의 존재(+S9 mix)와 부재하(-S9 mix)에서 실험하였다. 시험의 적용용량은 5,000 μg/plate를 최고 농도로 하여 0-2500 μg/plate의 농도를 포함해 5단계의 농도결정시험을 하였고 본 시험 실험결과는 Table 1에 나타내었다. 실험결과 풋감 주정추출물의 미생물 복귀돌연변이는 5종의 모든 균주에서 대사활성계의 존재에 관계없이 음성대조군과 비교하였을 때 유의적인 생육 저해는 관찰되지 않았다. 또한 시험물질은 대사활성계 적용 유무에 관계없이 모든 농도에서 석출되지 않았다. 반면, 양성대조물질에서 유발된 복귀돌연변이 콜로니 수는 대사활성계 적용 유무에 관계없이 모든 균주에 대해서 현격히 증가되는 양성 결과를 보였다. 이상의 결과로부터 시험물질 풋감 주정추출물은 *Salmonella typhimurium* 및 *Escherichia coli*에 대한 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

마우스 골수세포를 이용한 체내 소핵시험

수컷 ICR mice를 이용한 풋감 주정추출물의 독성을 관찰한 결과 시험 물질 투여 후 사망 동물은 나타나지 않았으며 일반 증상 관찰 결과 특이한 이상 증상은 발견되지

Table 1. Mutagenicity of DKA without and with metabolic activation

Tester strain	Samples	Dose (μg/plate)	Colonies/plate (Mean ±S.D.[1)])	
			Without S9 mix	With S9 mix
Salmonella typhimurium TA98	DKA[7)]	0	24±1	33±2
		313	27±3	34±2
		625	24±3	31±3
		1250	25±3	34±3
		2500	22±1	31±2
		5000	26±1	31±4
	AF-2[2)]	0.1	534±6	-
	B(a)P[3)]	2.5	-	275±9
Salmonella typhimurium TA100	DKA	0	119±8	134±3
		313	116±7	133±3
		625	118±9	133±2
		1250	119±7	134±5
		2500	118±3	138±1
		5000	113±6	136±3
	AF-2	0.01	461±6	-
	B(a)P	2.5	-	1130±78
Salmonella typhimurium TA1535	DKA	0	9±1	11±1
		313	10±2	11±2
		625	12±1	11±2
		1250	9±2	11±3
		2500	9±4	8±2
		5000	10±2	11±2
	NaN_3[4)]	0.5	362±8	-
	2-AA[5)]	2.0	-	187±6
Salmonella typhimurium TA1537	DKA	0	9±1	9±1
		313	10±2	9±2
		625	10±0	11±2
		1250	8±1	10±1
		2500	9±1	9±2
		5000	10±2	10±2
	9-AA[6)]	40.0	277±6	-
	2-AA	2.0	-	206±3
Escherichia coli WP2uvrA	DKA	0	50±3	56±2
		313	43±1	54±2
		625	44±3	55±3
		1250	48±3	54±3
		2500	46±2	53±2
		5000	47±1	56±4
	AF-2	0.01	393±3	-
	2-AA	10.0	-	385±6.1

[1)]S.D. Standard deviation, [2)]AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, [3)]B(a)P: benzo[a]pyrene, [4)]Na_3N: sodium azide, [5)]2-AA: 2-aminoanthracene, [6)]9-AA: 9-aminoacridine, [7)] DKA: Immature green persimmon (*Diospyros kaki* THUNB.) extract.

Table 2. Effect of the DKA on micronucleus formation in ICR mice

Sex	Samples	Dose mg/kg bw/day	NO. of animals	MNPCE[1)]/4000PCE[2)] (Mean±S.D., %)	PCE/(PCE+NCE[3)]) (Mean±S.D., %)
Male	Con-oil (Control)	0	5	0.11 ± 0.02	51.61 ± 0.75
	DKA[5)]	500	5	0.11 ± 0.02	51.61 ± 1.33
		1000	5	0.09 ± 0.01	53.05 ± 0.58
		2000	5	0.09 ± 0.01	52.95 ± 1.20
	CPA[4)]	70	5	6.22 ± 0.40*	45.50 ± 0.92*

*: Significant difference as compared with control (P<0.05).
[1)]MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte.
[2)]PCE: Polychromatic erythrocyte.
[3)]NCE: Normochromatic erythrocyte.
[4)]CPA: cyclophosphamide monohydrate (positive control).
[5)]DKA: Immature green persimmon (*Diospyros kaki* THUNB.) extract.

Table 3. Result of chromosomal aberration

Samples	Dose (μg/mL)	S9 mix	Trt-Rec Time[11)] (h)	Number of structural aberrations (Frequencies %)					Total (Cells%)	gap	Number of numerical berrations (%)		Total (%)
				ctb[1)]	cte[2)]	csb[3)]	cse[4)]	other[5)]			Pol[6)]	Endo[7)]	
DKA[8)]	0	-	6-18	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	32.5	-	6-18	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	65	-	6-18	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	130	-	6-18	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	150	-	6-18	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
MMC	0.1	-	6-18	3(1.0)	57(19.0)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	61(20.3)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
DKA	0	+	6-18	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	625	+	6-18	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	1250	+	6-18	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	2500	+	6-18	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	3000	+	6-18	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
CPA[9)]	5	+	6-18	3(1.0)	58(19.3)	2(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	63(21.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
DKA	0	-	24-0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	35	-	24-0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	70	-	24-0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	140	-	24-0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	160	-	24-0	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
MMC[10)]	0.05	-	24-0	5(1.7)	53(17.7)	2(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	60(20.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

[1)]ctb: chromatid type break, [2)]cte: chromatid type exchange, [3)]csb: chromoso-type break, [4)]cse: chromosome type exchange, [5)]other: fragmentation etc., [6)]Pol: Polyploids, [7)]Endo: Endoreduplication, [8)]DKA: Immature green persimmon (*Diospyros kaki* THUNB.) extract, [9)]CPA: cyclophosphamide (Positive control), [10)]MMC: mitomycin C (positive control), [11)]Treatment recovery time.

않았다. 투여에 의한 구간 체중변화 역시 유의한 차이가 없었다. 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험의 결과는 Table 2에 나타내었다. 각 시료 별 약 4,000 여개의 다염성 적혈구(MNPCE/4,000 PCE)를 관찰한 결과 마우스 골수세포에서 소핵 출현 빈도는 풋감 주정추출물의 500-2000 mg/kg bw/day 농도에서 약 0.09-0.11%를 보였으나, 유의적인 농도의존적 증가는 보이지 않았다. 한편 양성대조군의 소핵 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적을 유의하며 현저한 증가가 나타났다(P<0.05).

세포독성 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 풋감 주정추

출물의 500-2000 mg/kg bw/day 농도에서 45.5-53.05% 이었으며 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 따라서, 풋감 주정추출물은 마우스 골수 세포에 대한 소핵 유발성이 없는 것으로 판단된다.

염색체이상시험

풋감 주정추출물의 염색체이상시험은 대사활성계의 존재(+S9 mix) 및 부재(-S9 mix)하에서 CHL 세포를 이용하여 수행하였으며 본 연구를 수행하기 전 농도결정시험에서 시험물질의 세포독성이 농도의존적으로 증가함을 확인하여 본 시험의 시험물질 처리 농도를 결정하였다.

단시간처리법 시험의 시험물질 처리 개시 시에 전체 처리군에서 시험물질의 침전이 확인되었으나 배지의 pH 변화는 없었다. 관찰결과, -S9 mix 처리군의 0, 32.5, 65, 130 및 150 μg/mL 농도에서 염색체구조 이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.3, 0.0 및 0.0% 로 관찰되었으며, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0% 로 관찰되었다. 그리고, +S9 mix의 0, 625, 1250, 2500 및 3000 μg/mL에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 0.0, 0.0, 0.3, 0.0 및 0.0% 로 관찰되었으며, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0% 로 관찰되었다. 각 처리조건의 음성대조군에서 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5% 미만으로 확인되었고, 양성대조군의 경우 구조이상 세포의 출현빈도는 10% 이상으로 확인되었다. 연속처리시험법에서도 시험물질의 침전이 확인되었으나 배지의 pH 변화는 관찰되지 않았다. 표본관찰 결과, 0, 35, 70, 140 및 160 μg/mL에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.3% 로 관찰되었고 염색체수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0% 로 관찰되었다. 음성대조군의 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5% 미만으로 확인되었고 양성대조군의 경우 구조이상세포의 출현빈도는 10% 이상으로 확인되었다. 이상의 결과로 미루어 풋감 주정추출물은 CHL세포에 대하여 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 확인되었다.

Discussion

감은 오랫동안 섭취되고 있으나 덜 익은 감인 풋감에 대한 섭취 근거가 없고 풋감 주정추출물(DKA)에 대한 안전성평가 연구 결과가 부족한 실정이므로 OECD guidelines에 따라 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험, 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험, CHL 세포를 이용한 염색체이상시험을 실시하여 DKA의 유전독성을 평가하였다. 복귀돌연변이시험에 이용된 균주는 히스티딘 요구성인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537과 트립토판 요구성인 *Escherichia coli* WP2uvaA로 대사활성화 존재하 및 비존재하의 경우에 대해 각각 검토하였다. 본시험에서 시험물질은 5000 μg/mL를 최고용량으로 이하 단계 희석하여 총 6 농도로 설정하여 시험을 시행하였다. 시험결과 대사활성계 유무에 관계없이 음성대조군과 비교하였을 때 유의적인 생육 저해가 관찰되지 않았으며 양성대조군에서는 대사활성계 유무와 관계없이 모든 균주에 대해서 현저히 증가하였다. 이상의 결과로 DKA의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단하였다.

마우스를 이용한 체내 소핵시험은 수컷 ICR mice를 이용하여 DKA 단회 경구투여를 실시하였으며 음성대조 물질은 corn oil을 경구투여하고 양성대조군 CPA는 복강내 투여를 진행하였다. 시험물질은 500-2000 mg/kg bw/day 농도로 설정하였으며 투약하고 24시간 후 골수를 채취하였다. 시험 결과 PCE중 MNPCE 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았으며, PCE/(PCE+NCE) 비율도 음성대조군과 비교시 유의한 차이가 관찰되지 않았고, 양성대조군에서는 PCE중 MNPCE 출현빈도가 유의하게 증가하였다. 이러한 결과로 미루어 DKA는 마우스 골수 세포의 소핵유발에 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다.

염색체이상시험에서 CHL/IU 세포주를 이용하였으며 본 시험의 용량 설정을 위한 예비실험 결과 RICC55 농도가 대사활성계 존재하에서는 2504.0 μg/mL, 대사활성계 비존재하에서는 130.1 μg/mL, 24시간 처리군에서는 138.4 μg/mL로 산출되었다. 이에 본시험에서는 DKA 처리농도를 32.5-3500 μg/mL로 설정하였으며 시험결과 모든 처리 계열에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이도 관찰되지 않았다. 양성대조군에서는 구조이상 세포의 출현빈도가 10% 이상으로 확인되었다. 이상의 결과로 DKA는 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단하였다.

이상의 결과는 DKA의 유전독성에 대한 안전성을 입증하는 연구결과를 확보하게 된 것으로 추후 기능성 식품원료의 안전성을 확보하게 되는 기초자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

국문요약

감은 중국, 한국, 일본, 브라질, 터키, 이탈리아 등을 포함하는 온대지역에서 널리 재배되고 있으며 일부 아시아권 소비자들에게는 건강에 유익한 기능성 원료로 인식되고 있다. 또한 감에 포함된 풍부한 파이토케미컬들은 감을 섭취함으로써 건강과 관련된 다양한 문제점을 개선하기 위한 연구의 가능성을 제시한다. 본 연구에서는 감의 미숙과인 풋감추출물(DKA)의 유전독성을 확인하고자 한다. 미생물복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 포유류 소핵발생

시험을 수행하여 풋감추출물(DKA)의 유전독성을 평가하였다. 미생물복귀돌연변이시험에서 DKA는 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 와 *Escherichia coli* WP2*uvrA*에서 S9 대사활성계의 존재에 상관없이 돌연변이 유도를 보이지 않았다. 또한 마우스를 이용한 소핵시험은 풋감추출물(DKA)처리군에서 소핵을 가진 다염성 적혈구와 전체적혈구 중 다염성 적혈구의 비율의 증가는 볼 수 없었으며 통계학적 유의성도 나타나지 않았다. 한편, CHL 세포를 이용한 염색체이상시험에서 모든 세포주의 처리시간 및 S9 대사활성계 존재유무에 상관없이 염색체이상을 보이지 않았다. 따라서 본 연구결과에 의하면 풋감추출물(DKA)은 유전독성을 유발하지 않는 안전한 기능성 식품 원료로서 활용 가능하다고 판단된다.

Conflict of interests

The author declares that there is no conflict of interests regarding the publication of this article

ORCID

Young-Min Ham	https://orcid.org/0000-0001-9887-3552
Seon-A Yoon	https://orcid.org/0000-0002-4251-6297
Ho Bong Hyun	https://orcid.org/0000-0001-9782-3887
Boram Go	https://orcid.org/0000-0002-0048-6229
Yong-Hwan Jung	https://orcid.org/0000-0003-2606-8663
Dae-Ju Oh	https://orcid.org/0000-0003-2110-8341
Weon-Jong Yoon	https://orcid.org/0000-0001-6640-7282

References

1. Itamura, H., Zheng, Q., Akaura, K., Industry and research trend of Japanese persimmon. *Acta Horticult.*, **685**, 37–44 (2005).
2. Tomoaki, M., Saburo, I., The chemical structure of kaki-tannin from immature fruit of the persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Agric. Biol. Chem*., **42**, 1637-1643 (1978).
3. Matsumoto, K., Kadowaki, A., Ozaki, N., Takenaka, M., Ono, H., Yokoyama, S., Gato, N., Bile acid-binding ability of kaki-tannin from young fruits of persimmon (*Diospyros kaki*) in *vitro* and in *vivo*. *Phytother. Res.,* **25,** 624-628 (2011).
4. Gorinstein, S., Bartnikowska, E., Kulasek, G., Zemser, M., Trakhtenberg, S., Dietary persimmon improves lipid metabolism in rats fed diets containing cholesterol. *J. Nutr.*, **128,** 2023-2027 (1998).
5. Kim, S.G., Lee, Y.C., Suh, K.G., Choi, H.S., Acetaldehyde dehydrogenase activator from persimmon and its processed foods. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.,* **30,** 954-958 (2001).
6. Harada, M., Sakagami, R., Watanabe, T., Onitsuka, T., Katoh, H., Nagai, A., Antibacterial and deodorizing effect of persimmon tannin. *Jpn. J. Conserv. Dent.,* **48,** 314-319 (2005).
7. Lee, Y.C., Sa, Y.S., Jeong, C.S., Suh, K.G., Choi, H.S., Anticoagulating activity of persimmon and its processed foods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **30,** 949-953 (2001).
8. Butt, M.S., Sultan, M.T., Aziz, M., Naz, A., Ahmed, W., Kumar, N., Imran, M., Persimmon (*Diospyros kaki*) Fruit: Hidden phytochemicals and health claims. *EXCLI Journal,* **14,** 542-561 (2015).
9. Rural Women's Newspaper, (2020, March 5). Edible, medicinal, dyeing, etc. Jeju traditional persimmon., http://www.rwn.co.kr/news/articleView.html?idxno=25604
10. Slow food Korea, (2020, March 5). Ark of tatste., https://08a4dd78- 854f-472a-a421-62edf5db5e3f.filesusr.com/ugd/932ab3_29359d415e4b4934923612f536393d9e.pdf
11. Sadiq, A., Khan, S., Shah, S.M.H., Larvicidal, insecticidal, brine shrimp cytotoxicity and anti-oxidant activities of *Diospyros kaki* (L.) reported from Pakistan. *Pak. J. Pharm. Sci*., **28**, 1239-1243 (2015).
12. Ministry of Food and Drug Safety, (2020, March 5). Regulations concerning recognition of func tional of ingredients and standards and specifications for health functional foods., https://www.mfds.go.kr/brd/m_211/view.do?seq=14506&srchFr=&srchTo=&srchWord=% EA%B1%B4%EA%B0%95%EA%B8%B0%EB%8A%A5%EC%8B%9D%ED%92%88&srchTp=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&Data_stts_gubun= C9999&page=1
13. National institute of food and drug safety evaluation, (2020., March 5). Guidance document for toxicological testing guideline., https://mfds.go.kr/ brd/m_210/view.do?seq=12255&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=101
14. Ministry of Food and Drug Safety, (2020, March 5). Standard for Toxicity Study of Pharmaceuti cals., https://www.mfds.go.kr/brd/m_211/view.do?seq=10128&srchFr=&srchTo=&srchWord=%EB%8F%85%EC%84%B1%EC%8B%9C%ED%97%98&srchTp=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&Data_stts_ gubun=C9999&page=1
15. Organization for Economic Cooperation and Development, (2020, March 5). OECD guideline testing of chemical NO.471 Bacterial Revers Mutation Test., https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/ 1948418.pdf
16. Maron, D.M., Ames, B. N., Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res*., **113**, 173-215 (1983).
17. 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).
18. Wakata, A., Sasaki, M.S., Measurement of micronuclei by cytotokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: Comparison with types and rates of chromosome aberration. *Mutat. Res*., **190**, 51-57 (1987).