

## 감마선 조사 홍삼의 안전성에 관한 유전독성학적 연구

조성기<sup>†</sup> · 육홍선 · 변명우

한국원자력연구소

## Genotoxicological Safety of the Gamma-Irradiated Korean Red Ginseng *In vitro*

Sung-Kee Jo<sup>†</sup>, Hong-Sun Yook and Myung-Woo Byun

Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353, Korea

### Abstract

This experiment was performed to determine the safety of the Korean red ginseng irradiated with gamma rays with respect to genotoxicity. Ethanol extracts of the 5 and 10 kGy gamma-irradiated red ginseng were examined in two short-term *in vitro* tests : (1) *Salmonella typhimurium* reversion assay(Ames test) in strain TA 98, TA 100 and TA 102 (2) Micronucleus test in cultured Chinese hamster ovary(CHO) cells. No mutagenicity was detected in the two assays with or without metabolic activation. It was suggested that the Korean red ginseng irradiated with gamma rays did not cause genotoxicity *in vitro*. Further tests of genotoxicity *in vivo*, chronic and reproductive toxicity should be carried out to determine whether it is safe to irradiate Korean red ginseng with practical doses of gamma rays.

**Key words:** irradiated red ginseng, Ames test, micronucleus test, CHO cells

### 서 론

방사선 조사 식품의 전전성에 관해서는 1980년 국제기구인 조사식품공동전문위원회(FAO/IAEA/WHO Expert Committee on the Wholesomeness of Irradiated Foods, JECFI)가 종합평가로서 “평균 10 kGy 이하로 조사된 모든 식품은 독성학적으로 안전하며, 영양학적으로도 문제가 되지 않는다”고 결론을 지었다(1). 그러나 방사선 조사 식품에 대한 소비자들의 불안은 불식되지 않았다. 한편, 1992년 5월 WHO에서는 국제소비자연맹(IOCU)의 대표단과 식품조사를 반대하는 식품과학 및 식품화학 전공 교수들의 참석하에 회의를 개최한 결과, 조사 식품의 안전성 및 영양적 적합성을 재확인하면서 식품을 제조관리수칙에 따라 방사선을 조사할 경우 인간의 건강을 해롭게 하는 어떠한 성분변화나 이물질이 생성되지 않으며, 소비자들에게 미생물학적 위험성을 증가시키지 않는다고 발표하였다(2). 따라서 국제기구와 주요 선진국에서는 방사선 조사기법의 효과와 잠재력을 인정하여 식품위생화를 위한 대체방안으로서 이 기술의 실용화 확대를 적극

추진하고 있으며, 현재 37개국에서 식품의 방사선 조사를 허가하였고 이중 25개국에서 상업적으로 실용화되고 있다(3). 국내에서도 상업적 방사선 조사 시설 1기가 1987년 6월부터 가동되고 있으며, 1996년 현재 13개 식품 품목군에 대한 방사선 조사가 보건복지부로부터 허가되었다. 최근 건조식품에 대한 ethylene oxide 훈증처리가 금지됨에(1991년 7월 1일) 따라 식품산업에서 방사선 조사기술의 수요가 증가되고 있다.

홍삼은 엄격한 제조공정과 품질관리 하에 생산되고 있으나, 장기 저장이나 고온다습한 기후에서 유통시킬 때에는 생물학적 품질저하를 일으킬 수 있는 소지가 있다. 이에 따라, 한국담배인삼공사에서는 초고압 살균, 자외선 살균, microwave 살균, 오존 살균 등을 실험적으로 평가해 본 결과, 품질 변화 및 살균력 측면에서 만족스럽지 못한 것으로 보고되었다(4).

따라서 저자 등은 홍삼의 위생화를 위한 감마선 조사기술의 이용 가능성을 검토하기 위해 이미 미생물학적, 이화학적 안전성을 확인하였고(5), 본보는 감마선 조사된 홍삼의 유전독성학적 안전성을 평가하고자, 1차적으로 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

연변이 시험 및 Chinese hamster ovary(CHO) 세포를 이용한 소핵시험 등의 *in vitro* 시험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 홍삼 extract 조제

홍삼은 1995년 2월 한국인삼연초연구원에서 한국산 6년근 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)으로 제조한 제품을 구입하였다.

홍삼의 방사선 조사는 한국원자력연구소에 소재하는 감마선 조사시설(선원 : Co-60, 10만 Ci)을 이용하여 실온에서 시간당 1 kGy의 선량율로 5, 10 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 이때 흡수선량을 확인하기 위하여 free radical dosimeter와 ceric cerous dosimeter를 이용하였다.

감마선 조사 및 비조사 홍삼 40g에 10배량의 80% ethanol을 가해 60°C water bath에서 8시간씩 2회 추출하고 여지(Whatman No.5)로 여과한 후 김압농축하여 85° Brix의 홍삼 extract를 제조하였다.

### *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험

시험을 위한 배지, 시약 및 S9 mix의 조제와 시험방법은 Marton과 Ames의 방법(6)에 따랐다. S9 분획은 Microbiological Associates(Bethesda, Maryland, U.S.A.)에서 구입하였다. 시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102는 한국국립보건안전연구원으로부터 분양받았다. 각 균주는 histidine 요구성, deep rough(*rfa*) 특성, UV에 대한 민감도(*uvrB* 돌연변이), R-factor에 의한 ampicillin 또는 tetracycline 내성 등의 유전형질을 확인한 후 시험에 사용하였다.

시험은 대사활성화시키지 않는 경우(standard plate incorporation test)와 대사활성화시키는 경우(preincubation test)로 나누어 시행하였다. 시험판에 인산완충 용액 0.5ml(대사활성화시키는 경우에는 S9 mix 0.5ml), 시료용액 0.1ml과 Oxoid nutrient broth에서 하룻밤 배양시킨 균배양액 0.1ml를 넣어 가볍게 vortex하였다. 대사활성화시키는 경우에는 30분간 37°C에서 예비배양한 다음(대사활성화시키지 않는 경우에는 바로) histidine/biotin이 첨가된 top agar(45°C)를 2ml 가하고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate 상에 부어 평판고화시켰다. 37°C에서 48시간 배양한 후 revertant colony를 계수하였다. 돌연변이 유발성의 판정은 원저의 제시에 따라 복귀변이 집락수가 용매 대조군의 2배 이상이면서

용량의존성을 갖는 경우를 양성으로 하였다.

### 포유류 배양세포를 이용한 소핵시험

시험에 사용된 Chinese hamster ovary(CHO) 세포는 서울대학교 보건대학원 정해원 교수로부터 분양받았다. 배지는 10% fetal bovine serum, 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin,  $5 \times 10^{-5}$  2-mercaptoethanol 및 20mM HEPES buffer를 첨가시킨 McCoy's 5A 배지를 사용하였으며, 모두 GIBCO BRL, Inc.(U.S.A.)에서 구입하였다. 배양은 포화 상대습도 조건하에서 5% CO<sub>2</sub>를 공급하는 37°C의 CO<sub>2</sub> Incubator에서 수행하였다.

시험방법은 CHO 세포  $3.5 \times 10^5$ 개를 100mm dish에 파종하여 2일간 배양한 후, 시험물질을 첨가하고 24시간 후에 세포를 수거하여 표본을 만들었다. Fenech 와 Morley의 cytokinesis-block(CB) 방법(7)에 따라 cytochalasin B(Cyt-B ; 3μg/ml, Aldrich)를 시험물질과 함께 첨가하였다. Trypsin-EDTA(0.05%)용액으로 세포를 수집하여 원심분리한 다음, 75mM KCl 용액에 잘 혼탁시켜 5분간 방치한 다음, 고정액(methanol : acetic acid, 3 : 1)으로 3회 고정시킨 후 공기건조법으로 세포표본을 만들었다. 3% Giemsa 염색액(pH 6.5)으로 15분간 염색하여 광학현미경으로 400배에서 관찰하였다. Cyt-B는 DMSO에 2mg/ml로 녹여 -70°C에 보관하고, 사용하기 직전에 녹여 Hanks' balanced salt solution으로 회석하여 사용하였다. 대사활성 존재하의 시험은 같은 방법으로 세포를 배양한 후, 시험물질과 S9 mix(배지의 20% 비율)를 첨가하여 6시간 동안 배양한 다음, 신선한 배지로 교환하고 Cyt-B를 첨가하여 18시간 더 배양한 후 세포를 수거하였다.

시험물질은 세포배양배지로 회석하였으며, 최고 농도에서 배양용량의 1/10로 하였다. 음성 대조군으로는 회석액인 세포배양배지를, 양성 대조군으로는 직접법에서는 증류수에 녹인 mitomycin C(Sigma)를 0.04 μg/ml로, 대사활성화법에서는 DMSO에 녹인 benzo(a)pyrene(Sigma)을 0.02mg/ml로 첨가하였다.

Micronucli(MN)의 판독은 Almássy 등(8)의 기준에 따랐다. 1,000개의 binucleated CB세포들 중 MN을 갖는 세포를 계수하였다.

### 결과 및 고찰

#### 돌연변이원성 검증

대상물질이 천연생약재임을 고려하여 세포의 생장

Table 1. Revertant colonies of strain TA 98 in the *Salmonella typhimurium* reversion assay with nonirradiated and gamma-irradiated Korean red ginseng extract

Concentration (mg/plate)	S9 mix	Irradiation dose (kGy)		
		0	5	10
0	-	30±2	-	-
0.3	-	26±1	28±1	28±8
1.0	-	34±2	32±2	32±2
3.0	-	33±2	31±1	30±7
10.0	-	33±3	38±2	37±7
30.0	-	43±3	44±2	36±2
NPD <sup>1)</sup>	-	3513±123	-	-
0	-	31±1	-	-
0	+	34±1	-	-
0.3	+	33±2	36±6	36±4
1.0	+	31±2	40±5	36±4
3.0	+	35±2	41±2	36±1
10.0	+	41±4	41±0	40±1
30.0	+	44±2	44±4	43±0
2-AF <sup>2)</sup>	+	1471±38	-	-

The top agar containing test compound(0.1ml), test strain(fresh overnight culture, 0.1ml) and S9 mix(0.5ml) was poured onto minimal glucose agar plate. The compound was tested with or without S9 mix. In the test with S9 mix, preincubation at 37°C for 30min preceded addition of the top agar. After incubation at 37°C for 48h, revertant colonies were counted.

Values represent mean±S.D. of revertant colonies per plate in duplicate experiments except for negative control groups (triplicate)

<sup>1)</sup>NPD(4-nitro-o-phenylenediamine): 20μg/plate

<sup>2)</sup>2-AF(2-aminofluorene): 10μg/plate

저해 등 세포독성작용이 나타나지 않는 최고 농도 30mg/plate 이하로 하여, *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 및 TA102의 복귀돌연변이 집락수를 조사한 결과를 Table 1, 2 및 3에 나타내었다. 각 균주에서 음성 대조군의 복귀변이 집락수는 문헌치(6,9)의 범위 이내이었고, 양성 대조화합물에 의해 복귀변이 집락수가 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 행하여졌음을 알 수 있었다. 홍삼 extract 첨가량의 증가에 따라 집락수가 다소 증가한 것은 홍삼 extract에 포함된 유리아미노산인 histidine에 의한 증식작용에 기인한 것으로 사료된다. 각 용량에서 비조사군과 감마선 조사군의 집락수는 거의 동일하였다. 대사활성화시키지 않은 경우나 시킨 경우에도 감마선 조사 홍삼 extract에 의한 각 균주의 복귀돌연변이 집락수의 증가를 인정할 수 없어, 감마선 조사 홍삼이 직접 변이원이나 간접변이원으로서 세포 핵분열 중에 이상을 유발하지 않음을 알 수 있었다. 이 결과는 하 등(10)이 방사선 조사 백삼분말의 유전독성학적 안전성 평가의 일환으로 염색체 이상 유발성을 시험한 결과와 유사하였다.

### 소핵 유발성 검증

CHO 세포 배양에서 50%의 세포 증식억제를 보인 시험물질의 5mg/ml을 최고 농도로 하여, binucleated

cells 중에 형성된 소핵을 조사한 결과를 Table 4에 나타내었다. 음성 대조군의 경우 1,000개의 binucleated cells 중에 형성된 소핵은 22±5.7개 즉 2.2±0.57%로서 문헌치(11-13)의 수준이었고, 양성 대조화합물에 의해 소핵 수가 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 행하여졌음을 알 수 있었다. 대사활성화시키지 않은 경우나 시킨 경우에도 감마선 조사 홍삼 extract에 의한 소핵 수의 증가를 인정할 수 없었으며, 각 용량 단계에서 모두 3% 이하의 소핵 빈도를 보여 음성으로 판정되었다. 즉, 감마선 조사 홍삼이 직접 변이원이나 간접변이원으로서 세포 핵분열 중에 이상을 유발하지 않음을 알 수 있었다. 이 결과는 하 등(10)이 방사선 조사 백삼분말의 유전독성학적 안전성 평가의 일환으로 염색체 이상 유발성을 시험한 결과와 유사하였다.

소핵은 polychromatic erythrocytes에서 관찰되는 과립 즉 Howell-Jolly body로 혈액학자들에 의해 알려졌으며 염색체 상해와 관련되어 세포핵으로부터 나온 것으로 믿어졌다. 인위적인 소핵유발은 감마선이나 fast neutron으로 조사된 콩의 뿌리끝에서 관찰되었다. 그후 돌연변이원성 물질을 검색하기 위하여 설치류의 골수에서의 소핵형성 시험이 이용되기 시작하였으며, 최근에는 배양된 동물세포를 이용한 소핵 시험

**Table 2.** Revertant colonies of strain TA 100 in the *Salmonella typhimurium* reversion assay with nonirradiated and gamma-irradiated Korean red ginseng extract

Concentration (mg/plate)	S9 mix	Irradiation dose(kGy)		
		0	5	10
0	—	200±20	—	—
0.3	—	211±16	200±1	192±13
1.0	—	194±5	199±1	210±7
3.0	—	198±11	199±1	190±0
10.0	—	215±34	212±1	222±17
30.0	—	254±19	261±1	254±13
Sodium azide <sup>1)</sup>	—	1307±45	—	—
0	—	211±13	—	—
0	+	196±5	—	—
0.3	+	191±6	194±3	201±14
1.0	+	196±19	195±3	211±21
3.0	+	202±9	198±12	206±12
10.0	+	199±16	196±2	205±0
30.0	+	223±2	206±13	209±7
2-AF <sup>2)</sup>	+	583±35	—	—

The top agar containing test compound(0.1ml), tester strain(fresh overnight culture, 0.1ml) and S9 mix(0.5ml) was poured onto minimal glucose agar plate. The compound was tested with or without S9 mix. In the test with S9 mix, preincubation at 37°C for 30min preceded addition of the top agar. After incubation at 37°C for 48h, revertant colonies were counted

Values represent mean±S.D. of revertant colonies per plate in duplicate experiments except for negative control groups (triplicate)

<sup>1)</sup>Sodium azide: 1.5μg/plate

<sup>2)</sup>2-AF(2-aminofluorene): 10μg/plate

**Table 3.** Revertant colonies of strain TA 102 in the *Salmonella typhimurium* reversion assay with nonirradiated and gamma-irradiated Korean red ginseng extract

Concentration (mg/plate)	S9 mix	Irradiation dose(kGy)		
		0	5	10
0	—	359±11	—	—
0.3	—	366±8	369±2	382±4
1.0	—	378±4	377±3	391±6
3.0	—	387±9	395±3	375±7
10.0	—	321±8	401±10	382±5
30.0	—	352±8	305±9	312±7
Mitomycin C <sup>1)</sup>	—	4354±118	—	—
0	—	322±17	—	—
0	+	412±22	—	—
0.3	+	408±3	424±6	425±4
1.0	+	405±22	397±26	439±9
3.0	+	432±18	388±6	400±26
10.0	+	410±1	383±9	432±4
30.0	+	385±31	422±6	415±5
2-AF <sup>2)</sup>	+	564±4	—	—

The top agar containing test compound(0.1ml), tester strain(fresh overnight culture, 0.1ml) and S9 mix(0.5ml) was poured onto minimal glucose agar plate. The compound was tested with or without S9 mix. In the test with S9 mix, preincubation at 37°C for 30min preceded addition of the top agar. After incubation at 37°C for 48hours, revertant colonies were counted

Values represent mean±S.D. of revertant colonies per plate in duplicate experiments except for negative control groups (triplicate)

<sup>1)</sup>Mitomycin C: 0.5μg/plate

<sup>2)</sup>2-AF(2-aminofluorene): 10μg/plate

**Table 4. Frequency of micronuclei(MN) in cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells following treatment with nonirradiated or gamma-irradiated Korean red ginseng extract**

Test materials	Concentration (mg/ml)	S9	No. of cells without MN	Frequency distribution of the number				No. of MN	No. of MN/1,000 cells (Mean±S.D.)
				1	2	3	4		
(-) Control	-	-	2,937	60	3	0	0	66	22.0± 5.7
Ginseng(0 kGy)	5	-	2,919	78	3	0	0	84	28.0± 3.1
	2.5	-	2,926	69	5	0	0	79	26.3± 4.0
	1.25	-	2,919	79	2	0	0	83	27.7± 3.7
Ginseng(5 kGy)	5	-	2,919	77	4	0	0	85	28.3± 2.5
	2.5	-	2,925	73	2	0	0	77	25.7± 2.9
	1.25	-	2,920	76	4	0	0	84	28.0± 4.0
Ginseng(10 kGy)	5	-	2,924	75	1	0	0	77	25.7± 3.2
	2.5	-	2,922	73	5	0	0	83	27.7± 3.8
	1.25	-	2,924	73	3	0	0	79	26.3± 3.9
Mitomycin C	0.1μg/ml	-	2,698	266	30	5	1	345	115.0±12.6
(-) Control	-	+	2,930	66	4	0	0	74	24.7± 4.1
Ginseng(0 kGy)	5	+	2,925	67	8	0	0	83	27.7± 3.7
	2.5	+	2,919	75	6	0	0	87	29.0± 3.8
	1.25	+	2,924	71	5	0	0	81	27.0± 3.5
Ginseng(5 kGy)	5	+	2,925	68	7	0	0	82	27.3± 3.2
	2.5	+	2,929	64	7	0	0	78	26.0± 3.4
	1.25	+	2,921	75	4	0	0	83	27.7± 2.9
Ginseng(10 kGy)	5	+	2,920	75	5	0	0	85	28.3± 4.5
	2.5	+	2,923	75	2	0	0	79	26.3± 3.3
	1.25	+	2,923	73	4	0	0	81	27.0± 2.8
Benzo(a)pyrene	0.02	+	2,634	324	35	6	1	415	138.3±19.4
DMSO	-	+	2,925	70	5	0	0	80	26.7± 4.6

In the test without S9, CHO cells of 2-day culture were treated with test compound and cytochalasin B(3μg/ml) and incubated for 24h

In the test with S9, the cells incubated with test compound and S9 mix for 6h were refreshed with medium containing cytochalasin B, and incubated for 18h. The harvested cells were stained with Giemsa solution, and investigated under microscope(400 X)

1,000 binucleated cells were scored in each of triplicate experiments

법이 이용되기 시작하였다. 소핵 시험은 clastogen 뿐만 아니라 spindle 형성에 영향을 주는 물질도 검색할 수 있는 유전독성의 좋은 지표이며, 돌연변이원성 물질을 쉽고 빨리 검색할 수 있는 방법으로 보고되어 있다(8,11-14).

시료의 유전독성을 판정하기 위한 시험은 세균의 유전자 돌연변이 시험, 포유류 세포의 염색체 이상 시험 등의 시험판내 시험법과 설치류에서의 소핵 시험 및 우성치사 시험, 초파리에서의 반성열성치사 시험, 포유류 골수세포의 유전학적 시험 등의 생체 시험법이 있다(14). 저자 등은 1차적으로 세균의 유전자 돌연변이 시험들 중 대표적인 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험과 포유류 배양세포를 이용한 소핵 시험을 시행하여, 감마선 조사 홍삼이 직접변이 원이나 간접변이원으로 작용하지 않음을 알 수 있었다. 유전독성의 평가는 지표가 다른 여러가지 시험계에서 얻은 결과로부터 종합적으로 판정되어야 한다고 사료되므로, 생체내 시험이 추가로 시행되어야 할 것

으로 생각된다. 나아가서 만성독성 시험 및 생식독성 시험 등이 추가된다면 감마선 조사 홍삼의 안전성을 명확히 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

감마선 조사 홍삼의 유전독성학적 안전성을 평가하고자 하였다. 5 kGy 및 10 kGy의 감마선이 조사된 홍삼의 ethanol 추출물을 대상으로 *in vitro* 단기 시험인 *Salmonella typhimurium*을 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험(Ames test)과 배양된 Chinese hamster ovary (CHO) 세포를 이용한 소핵시험 결과, 감마선 조사 홍삼이 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않음을 알 수 있었다. 이 결과로 보아 생체내 유전독성 시험, 만성독성시험 및 생식독성시험 등이 추가된다면 감마선 조사 홍삼의 안전성을 명확히 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

## 문 헌

1. WHO : Wholesomeness of irradiated food. Report of a joint FAO/IAEA/WHO expert committee on the wholesomeness of irradiated food. Technical Report Series 659(1981)
2. Daferstein, F. K. : Food irradiation ; The position of the World Health Organization. 36th General Conference of the International Atomic Energy Agency, Scientific session, Vienna, 23 Sept. 1992(1992)
3. Ahmed, M. : Food irradiation, Up-to-date status. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, IAEA 6626F, Vienna, 27, Nov. (1991)
4. 변명우 : 식품산업에서 원자력 기술의 이용. 동위원소 회보, 9, 32(1993)
5. 변명우, 조성기, 조한우, 육홍선, 김성애, 최강주 : 홍삼의 품질개선을 위한 감마선 이용. 한국식품위생·안전성 학회지, 9, 151(1994)
6. Marton, D. M. and Ames, B. N. : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113, 173(1983)
7. Fenech, M. and Morley, A. A. : Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.*, 147, 29 (1985)
8. Almássy, Z., Krepinsky, A. B., Bianco, A. and Koteles, G. J. : The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl.*

*Radiat. Isot.*, 34, 241(1987)

9. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test*. *Mutation Res.*, 31, 347(1975)
10. 하광원, 정해관, 오혜영, 허옥순, 손수정, 한의식, 정성철, 최부영, 김영미, 김필선, 문화희 : 방사선조사 인삼의 유전독성에 관한 연구. 한국식품위생·안전성 학회지, 9, 67(1994)
11. Lasne, C., Gu, Z. W., Venegas, W. and Chouroulinkov, I. : The *in vitro* micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen-carcinogens : comparison with the *in vitro* sister-chromatid exchange assay. *Mutation Res.*, 130, 273(1984)
12. Wakata, A. and Sasaki, M. S. : Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells : comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutation Res.*, 190, 51(1987)
13. Lin, R. H., Wu, L. J., Lee, C. H. and Lin-Shiau, S. Y. : Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res.*, 319, 197(1993)
14. Brusick, D. : Genetic toxicology. In *Principles and Methods of Toxicology*, Hayes, A. W.(ed.), 3rd ed., Raven Press, New York, p.545(1994)

(1996년 3월 27일 접수)