

## 팔라티노스 및 팔라티노스 시럽에 대한 *in vitro* 변이원성 시험

백남진 · 강재구 · 김정환 · 김달현 · 전영중 · 김제학  
제일제당주식회사 종합연구소

### *In Vitro* Mutagenicity Tests on Palatinose and Palatinose Syrup

Nam-Jin Baek, Jae Ku Kang, Jeong Hwan Kim, Dal Hyun Kim,  
Young Jung Chun and Je Hak Kim  
R&D Center, Cheil Jedang Corporation

#### Abstract

Palatinose is a disaccharide molecule which can substitute sucrose as a sweetening agent. A microbial fermentation technology has been developed to produce palatinose. In order to verify the safety of palatinose products, we have performed 1) bacterial reverse mutation test using *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98 and TA100, and 2) *in vitro* chromosome aberration test using Chinese Hamster Lung (CHL) cell. In bacterial reverse mutation test, both palatinose and palatinose syrup did not induce any significant increase of His<sup>+</sup> revertants up to 10 mg/plate. In *in vitro* chromosome aberration test, palatinose and palatinose syrup also did not cause any significant increase of chromosome aberrant cells up to 5 mg/mL. These results suggest that palatinose products have no mutagenic potential in these *in vitro* mutagenicity tests.

Key words: palatinose, reverse mutation, chromosome aberration

#### 서 론

Palatinose (6-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-D-fructofuranose, isomaltulose)는 포도당과 과당이 한분자씩 결합된 이당류로서 설탕의 구조이성질체이며, 벌꿀이나 사탕수수등에 함유되어 있다. Palatinose의 감미도는 설탕의 40% 정도이고, 칼로리는 설탕과 거의 유사하다.

Ooshima 등<sup>(1)</sup>은 충치원인균인 *Streptococcus mutans*로 감염된 rat를 이용한 실험에서 palatinose가 충치나 치석을 거의 유발하지 않음을 확인한바 있다. Trehalulose (1-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-D-fructofuranose)가 다량 포함되어있는 palatinose syrup의 경우에도 낮은 충치 유발율을 보임이 밝혀졌다<sup>(2)</sup>. 위와 같은 충치예방효과 이외에도, palatinose의 당뇨병식으로서의 유용성도 보고되었다<sup>(3,4)</sup>. 이러한 이유로 인해 palatinose는 설탕의 대체감미료로 각광받고 있다.

Palatinose는 *Protaminobacter rubrum*을 이용하여 주로 생산되어졌으나, 제일제당주식회사에서는 *Erwinia rhapsontici* 균주의 개량 및 배양조건 최적화를 통한 공

업화기술을 개발<sup>(5)</sup>하여 palatinose를 대량생산하게 되었다. 본 연구에서는 palatinose 및 그 제조과정에서 부산물로 얻어지는 palatinose syrup의 안전성을 확인하기 위하여 *in vitro* 변이원성시험을 실시하였다.

#### 재료 및 방법

##### 시험물질의 조제 및 농도

제일제당주식회사 종합연구소에서 생산한 palatinose (Lot No. PN95-01) 및 palatinose syrup (Lot No. PS95-01)을 멸균증류수에 용해 혹은 희석하였다. Palatinose syrup은 trehalulose와 palatinose를 주성분으로 하는 단당류와 이당류의 혼합물이다 (각 성분별 농도(% w/v); fructose: 10.3, glucose 8.9, sucrose: 2.2, palatinose: 13.4, trehalulose: 32.5, isomaltose: 2.6, 기타: 1.6).

미생물을 이용한 복귀돌연변이시험에서는 예비독성시험결과 10 mg/plate의 농도에서 *Salmonella typhimurium* TA100의 복귀돌연변이 집락수의 증가 혹은 감소를 보이지 않았으므로, 10 mg/plate를 본시험에서의 최고농도로 설정하였다. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험에서는 5 mg/mL 용량에서도 세포

Corresponding author: Dal Hyun Kim, R&D Center, Cheil Jedang Corporation, 522-1 Dokpyong-ri, Majang-myon, Ichon-si, Kyonggi-do 467-810, Korea

독성을 보이지 않았으므로, 이를 최고농도로 설정하였다.

#### 시약 및 양성대조물질

양성대조물질인 sodium azide (SAZ), 9-aminoacridine hydrochloride (9-AA), methylmethane sulfonate (MMS), benzo[a]pyrene (B[a]P) 등은 Sigma Chemical Co. (USA)에서, 2-nitrofluorene (2-NF)은 Aldrich Chemical Co. (USA)에서, 2-aminoanthracene (2-AA)은 Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Japan)에서 구입하여 사용하였다.

Aroclor 1254는 Supelco Inc. (USA)에서, nutrient broth No.2는 Oxoid Ltd. (UK)에서, fetal bovine serum 및 colcemid는 Life Technologies Inc. (USA)에서 각각 구입하였다.

#### S-9 mix의 조제

Maron과 Ames<sup>(6)</sup>의 방법에 따라 S9 분획을 얻었다. 체중 약 200 g의 Sprague-Dawley rat에 Aroclor 1254를 500 mg/kg 용량으로 복강내 투여하였다. 5일 째에 간을 적출하여 3배 volume의 0.15 M KCl 용액을 넣고 균질화하였다. 원심분리(9,000 g, 10 분)한 후 상청액을 취하여 S9 분획을 얻었다. S9 mix의 조성은 다음과 같다: 10% (v/v) S9, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 33 mM KCl, 5 mM glucose-6-phosphate, 4 mM NADP, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). 단, 염색체이상시험에서는 S9 농도를 30%로 하였다.

#### 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험

Maron과 Ames<sup>(6)</sup>의 방법에 따라 *Salmonella typhimurium* 4 균주(TA1535, TA1537, TA98, TA100)를 이용하여 복귀돌연변이시험을 실시하였다. 100, 50, 25, 12.5, 6.25 mg/mL의 시험물질 용액 0.1 mL, 10시간 배양한 시험균 0.1 mL, S9 mix 혹은 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 0.5 mL을 37°C에서 20분간 반응시켰다. 여기에 top agar 2 mL을 혼합하여 minimal glucose agar plate에 증충하였다. 37°C에서 48시간 배양후 복귀돌연변이 집락의 수를 계측하였다. 복귀변이 집락의 수는 plate 3매의 평균치로 나타내었으며, 음성대조군과 비교하여 복귀변이 집락수가 2배 이상을 보이거나 용량상관성이 있는 경우에 양성으로 판정하였다.

#### 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

Dean과 Danford<sup>(7)</sup>의 방법에 따라 Chinese Hamster

Lung (CHL) cell을 이용하여 *in vitro* 염색체이상시험을 실시하였다. 세포는 10% fetal bovine serum이 포함된 Eagle's minimal essential medium (EMEM)을 이용하여 배양(5% CO<sub>2</sub>, 포화습도, 37°C)하였다.

5×10<sup>4</sup> cells/mL의 CHL cell 부유액을 지름 6 cm plate에 5 mL씩 분주하였다. 24시간동안 배양한 후, palatinose 및 palatinose syrup의 stock solution을 세포 배양액에 첨가하여 최종농도가 5, 2.5, 1.25 mg/mL되게 하였다. 대사활성화법의 경우에는 약물과 함께 S9 mix를 처리하고 6시간후에 신선한 배지로 교환하였다. 직접법 및 대사활성화법 모두의 경우에, 약물처리 개시부터 22시간 후에 colcemid를 0.25 g/mL되게 첨가하고 2시간 더 배양하였다. 0.25% trypsin 처리 및 원심분리(1000 rpm, 5 min)에 의해 cell을 회수한후, 0.075 M KCl 용액에 현탁하여 37°C에 15분동안 방치하였다. 미리 냉각된 고정액(methanol:acetic acid=3:1, v/v)으로 현탁 및 원심분리를 3회 반복하여 세포를 완전히 고정시켰다. 최종 원심분리후 세포를 적당한 농도가 되도록 고정액에 현탁하고, 깨끗한 slide glass에 떨어뜨려 자연건조하였다. 10% Giemsa (in PBS, pH 7.4)에 15분 염색하고 물로 씻어낸 후 건조하였다.

각 농도당 100개의 잘 퍼진 중기염색체를 1000배의 배율로 검경하여 이상염색체의 출현 여부를 관찰하였다. 구조적 이상은 gap (chromatid and chromosome gap), ctb (chromatid break), cte (chromatid exchange), csb (chromosome break), cse (chromosome exchange), frg (fragmentation)으로 구분하여 그 수를 기록하였다. 숫적이상에 대해서는 4배수체 이상만을 기록하였다. 염색체이상이 있는 세포의 출현빈도가 5% 미만을 음성, 5% 이상 10% 미만을 의양성, 10% 이상을 양성으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험

Table 1과 2에서 보는 바와 같이, palatinose 및 palatinose syrup을 10 mg/plate까지 처리하더라도 4가지 시험균주에서 용매대조군에 비하여 유의한 정도의 복귀돌연변이 colony 수의 증가를 나타내지 않았다. 양성대조물질의 처리시에는 모두 많은 복귀돌연변이 colony가 나타나 본 시험의 민감성 및 S9 mix의 대사활성 존재를 알 수 있게 하였다.

따라서 본 시험조건에서 palatinose 및 palatinose syrup은 미생물에서 돌연변이를 유발하지 않음을 확인할 수 있었다.

**Table 1. Reverse mutation test of palatinose in *S. typhimurium***

Compound <sup>1)</sup>	Dose (µg/plate)	S9 Mix	No. of His <sup>+</sup> revertants/plate			
			TA1535	TA1537	TA98	TA100
Solvent control		-	21±4	15±3	37±1	178±8
Palatinose	10,000		17±2	13±2	37±6	181±14
	5,000		17±3	16±2	36±2	177±9
	2,500		15±2	13±3	29±3	166±14
	1,250		20±6	13±1	30±3	173±15
	625		16±5	15±2	36±4	192±18
SAZ	0.5		846±183	NT <sup>2)</sup>	NT	901±75
9-AA	50		NT	1143±534	NT	NT
2-NF	1		NT	NT	584±228	NT
Solvent control		+	16±2	15 7	53±5	191±21
Palatinose	10,000		19±6	19±3	56±5	197±5
	5,000		23±6	15±6	54±8	201±8
	2,500		17±3	20±8	59±10	183±6
	1,250		19±1	16±2	53±4	181±11
	625		16 5	17±4	45±6	186±1
2-AA	0.5		NT	NT	120±5	NT
	1		NT	NT	NT	665±338
	2		163±62	152±35	NT	NT

<sup>1)</sup>SAZ: sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride, 2-NF: 2-nitrofluorene, 2-AA: 2-aminoanthracene.

**Table 2. Reverse mutation test of palatinose syrup in *S. typhimurium***

Compound <sup>1)</sup>	Dose (µg/plate)	S9 Mix	No. of His <sup>+</sup> revertants/plate			
			TA1535	TA1537	TA98	TA100
Solvent control		-	12±2	8±1	16±8	102±10
Palatinose	10,000		9±3	10±2	18±4	106±23
syrup	5,000		10±3	9±4	15±2	109±8
	2,500		12±3	12±4	17±6	109±10
	1,250		13±3	13±4	22±2	108±16
	625		12±3	7±2	14±1	105±11
SAZ	0.5		880±180	NT <sup>2)</sup>	NT	745±19
9-AA	50		NT	635±44	NT	NT
2-NF	1		NT	NT	1335±565	NT
Solvent control		+	10±4	16±3	41±11	122±14
Palatinose	10,000		21±4	11±4	43±5	122±14
syrup	5,000		11±6	13±3	42±5	124±10
	2,500		16±1	15±4	31±4	123±15
	1,250		10±3	12±5	34±11	111±10
	625		9±4	14±5	45±4	97±23
2-AA	0.5		NT	NT	148±14	NT
	2		211±8	212±4	NT	NT

<sup>1)</sup>SAZ: sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride, 2-NF: 2-nitrofluorene, 2-AA: 2-aminoanthracene.

#### 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

Palatinose 및 palatinose syrup에 대하여 CHL 세포에서 염색체이상시험을 실시하여 Table 3과 같은 결과를 얻었다.

직접법, 대사활성화법에서 palatinose 및 palatinose syrup의 5, 2.5 및 1.25 mg/mL 처리군 모두 2% 이하의

염색체이상을 나타내어 음성의 결과를 보였다. 반면 직접법의 양성대조물질인 MMS와 대사활성화법의 양성대조물질인 B[a]P는 모두 CHL 세포에서 높은 빈도의 염색체이상을 유발하였다. 따라서 palatinose 및 palatinose syrup은 CHL 세포에서 음성대조군에 비하여 염색체이상의 증가를 유발하지 않음을 확인하였다.

**Table 3. Chromosome aberration test of palatinose and palatinose syrup in CHL cell**

Compound <sup>1)</sup>	Dose (mg/ml)	S9 mix	Time (hr) <sup>2)</sup>	No. of cells scored	No. of aberrations <sup>3)</sup>							Aberrant cells (%) <sup>4)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	frg	num	TA	TAG
Palatinose	0	-	24-0	100	3	0	0	0	1	0	1	1	4
	5				0	0	1	1	0	0	0	2	2
	2.5				0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.25				0	0	0	0	0	0	0	0	0
MMS	0.02				2	9	34	0	1	0	0	33	34
Palatinose	0	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5				1	1	0	0	0	0	0	1	2
	2.5				2	0	0	0	0	0	0	0	2
	1.25				0	0	0	0	0	0	0	0	0
B[a]P	0.02				9	9	15	0	1	0	1	20	26
Palatinose syrup	0	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5				0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.5				1	0	0	0	0	0	0	0	1
	1.25				0	0	0	0	0	0	1	0	0
MMS	0.02				2	13	24	1	0	0	0	25	26
Palatinose syrup	0	+	6-18	100	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	5				0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.5				1	0	0	0	0	0	0	0	1
	1.25				0	0	0	0	0	0	0	0	0
B[a]P	0.02				2	6	18	0	0	0	0	17	18

<sup>1)</sup>MMS: methylmethane sulfonate, B[a]P: benzo[a]pyrene.

<sup>2)</sup>Treatment time - Expression time.

<sup>3)</sup>gap: chromatid gap + chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, frg: fragmentation, num: numerical aberration.

<sup>4)</sup>TA: total structural aberration, TAG: total structural aberration including gap.

## 요 약

제일제당주식회사에서는 미생물발효법을 이용하여 palatinose를 대량생산하게 되었다. Palatinose 산물의 안전성을 확인하기 위하여 1) *Salmonella typhimurium* 을 이용한 미생물복귀돌연변이시험, 2) Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 *in vitro* 염색체이상시험을 실시하였다. Palatinose 및 palatinose syrup은 미생물복귀돌연변이 시험에서 10 mg/plate의 용량까지 복귀돌연변이를 유발하지 않았으며, CHL 세포에서도 5 mg/mL 농도에서 염색체이상을 유발하지 않았다. 이 결과는 palatinose 산물들이 위의 *in vitro* 변이원성시험계에서 돌연변이원성을 나타내지 않음을 보여준다.

## 문 헌

1. Ooshima, T., Izumitani, A., Sobue, S. and Hamada, S.: Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **36**(4), 219 (1983)

2. Ooshima, T., Izumitani, A., Minami, T., Fujiwara, T., Nakajima, Y. and Hamada, S.: Trehalulose does not induce dental caries in rats infected with mutans streptococci. *Caries Res.*, **25**(4), 277 (1991)

3. Kawai, K., Okuda, Y. and Yamashita, K.: Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. *Endocrinol. Jpn.*, **32**(6), 933 (1985)

4. Kawai, K., Yoshikawa, K., Murayama, Y., Okuda, Y. and Yamashita, K.: Usefulness of palatinose as a caloric sweetener for diabetic patients. *Horm. Metab. Res.*, **21**(6), 338 (1989)

5. 윤종원, 오광근, 김정환, 전영중, 이재홍: *Erwinia rhamnontici*의 고정화에 의한 palatinose의 생산. *한국생물공학회지*, **7**(1), 79 (1992)

6. Maron, D.M. and Ames, B.M.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983)

7. Dean, B.J. and Danford, N.: Assays for the detection of chemically induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In *Mutagenicity testing*, Venitt, S. and Parry, J.M. (eds.), IRL Press, Oxford, p.187 (1984)

(1996년 9월 18일 접수)