

Ames test를 이용한 감마선 조사 황기, 감초 및 진피의 유전독성학적 안전성 평가

함연호 · 육홍선 · 조성기
한국원자력연구소 방사선식품 · 생명공학기술개발과제팀

Genotoxicological Safety of the γ -ray Irradiated Astragali Radix, Glycyrrhizae Radix and Aurantii nobilis Pericarpium in the Ames Test

Yeon-Ho Ham, Hong-Sun Yook and Sung-Kee Jo
Radiation Food Technology and Bioscience Team,
Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353, Korea

Abstract

The three medicinal herbs, Astragali Radix, Glycyrrhizae Radix and Aurantii nobilis Pericarpium, irradiated with γ -rays have been tested for their possible genotoxicity. The hot water extracts of the 10 kGy γ -ray irradiated herbs were examined in the Salmonella mutagenicity test(histidine reversion assay; Ames test) using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 as tester strains. No mutagenicity was detected in this assay both with and without metabolic activation. The safety of the herbs irradiated with γ -rays at practical doses needs to be evaluated in further tests of genotoxicity *in vivo* and chronic and reproductive toxicity.

Key words : irradiated medicinal herbs, Ames test, mutagenicity, genotoxicity

서 론

지금까지 우리 나라를 비롯하여 세계적으로 식용 작물 및 한방약재 등과 같은 건조농산물의 살충, 살균 및 부패방지 등 장기저장을 위한 제품의 위생화 방법으로 온열처리, 냉장/냉동저장, 화학훈증제(ethylene oxide, methyl bromide 등) 및 화학첨가물(방부제 등) 등이 주로 사용되어 왔다. 그러나 이러한 처리는 낮

은 처리효과와 고가의 처리비용 등의 문제점이 지적되고 있다. 특히 화학적 처리는 환경공해, 작업자의 건강장해, 유해물질 생성 및 잔류성 등과 같은 안전성의 많은 문제점을 내포하고 있어 일부 선진국가에서는 사용이 이미 금지되었거나 점차 금지될 전망이다(1-4).

한약의 수요급증으로 인한 생약재의 수입량과 국내의 생산, 유통량이 급증함에 따라 생약재의 가공, 저장 및 유통을 위한 안전한 위생화 기술이 요구되고 있다. 최근 건조식품에 대한 ethylene oxide 훈증 처리가 금지되고 있는 추세에 따라 생약재의 색과 맛 그리고 형태적 특성을 그대로 보전할 수 있고 해

*Corresponding author : Sung-Kee Jo, Radiation Food Technology and Bioscience team, Korea Atomic Energy Research Institute, Yusung P.O. Box 105, Taejon 305-600, Korea
E-mail: skjo@kaeri.re.kr

충, 기생충, 병원성 세균, 곰팡이 및 효모를 효과적으로 제거할 수 있어 저장기간의 연장 등 유용성이 인정된 방사선 조사기법의 적용가능성이 관심의 초점이 되고 있다(5-7).

방사선 조사식품의 건전성에 관해서는 1980년 국제기구인 조사식품공동전문위원회가 종합평가로서 “평균 10 kGy 이하로 조사된 모든 식품은 독성학적으로 안전하며, 영양학적으로도 문제가 되지 않는다”고 결론을 지었다(8). 그러나 한편으로는 조사식품의 안전성에 대한 논란이 계속되어 1992년 5월 WHO에서는 국제소비자연맹(IOCU)의 대표단과 식품 조사를 반대하는 식품과학 및 식품화학 전공 교수들의 참석하에 회의를 개최한 결과, “조사식품의 안전성 및 영양적 적합성을 재확인하면서 식품을 제조관리수칙에 따라 방사선을 조사할 경우 인간의 건강을 해롭게 하는 어떠한 성분변화나 이물질이 생성되지 않으며, 소비자들에게 미생물학적 위험성을 증가시키지 않는다”고 발표하였다(9).

그러나 방사선 조사식품의 상용화에도 불구하고 소비자들의 불안은 불식되지 않고 있어 조사기술의 적용확대를 위해서는 조사식품의 안전성에 관한 정확한 인식이 선결되어야 할 문제이다.

따라서 본 연구는 활용빈도가 높은 3가지 생약재, 황기, 감초, 진피를 시험대상으로 천연생약재의 위생화를 위한 감마선 조사기술의 이용가능성을 검토하기 위하여 수행되었다. 황기(*Astragali Radix* : the root of *Astragalus membranaceus*)는 다년초로써 전국에 분포하고, 원기부족, 다한증, 당뇨, 강장 등에 이용하고, 감초(*Glycyrrhizae Radix* : the root of *Glycyrrhiza uralensis*)는 다년초로 주로 중국대륙에 분포하며 뿌리에는 감미 성분인 glycyrrhizin이 6~14%로 함유되어 있으며 補裨益氣, 脾胃虛弱, 거담 등에 효과가 있으며, 진피(*Aurantii nobilis Pericarpium* : the fruit peel of *Citrus unshiu*)는 껍질로써 건위, 소화불량, 진해, 거담 등에 효능을 갖는 것으로 알려져 있다(10).

본 연구에서는 오염유기체 완전 구제선량인 10kGy의 감마선이 조사된 시료의 유전독성학적 안전성을 평가하고자 일차적으로 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험을 실시하였다.

재료 및 방법

공시재료

시험대상 시료로는 여러 생약재 중 우선적으로 민간에서 식품수준으로 많이 이용되고 있는 황기(*Astragali Radix*), 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 진피(*Aurantii nobilis Pericarpium*)를 선택하였으며 경동시장에서 1999년 12월에 구입하였다.

방사선조사

시료의 감마선 조사는 한국원자력연구소에 소재하는 감마선 조사시설(선원: Co-60, 10만 Ci)을 이용하여 실온에서 시간당 2 kGy의 선량율로 10 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 이때 흡수선량을 확인하기 위하여 free radical dosimeter와 ceric cerous dosimeter를 이용하였다.

시료의 추출

감마선조사 및 비조사 생약재 시료 30g에 약 10배량의 증류수를 가하여 약탕기에서 2시간씩 3회 열수 추출하고 여과지(Whatman No. 1)로 여과한 후 감압 농축하여 시료로 사용하였다.

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험

시험을 위한 배지, 시약 및 S9 mix의 조제와 시험 방법은 Maron과 Ames의 방법(11, 12)에 따라 수행하였다. 시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100은 Ames 교수로부터 직접 분양받아 histidine 요구성, deep rough(rfa) 특성, UV에 대한 민감도(uvrB 돌연변이) 및 R-factor에 의한 ampicilline 내성 등의 유전형질을 확인한 후 시험에 사용하였다. 시험은 대사 활성화시키지 않는 경우(standard plate incorporation)와 대사 활성화시키는 경우(preincubation test)로 나누어 시행하였다. S9 분획(13)은 Phenobarbitol과 5,6-benzoflavone으로 유도한 Sprague-Dawley rat(CRJ; 7주령, 수컷)의 간으로부터 분리한 것으로 일본 Oriental Yeast Co., LTD.에서 구입(protein

content : 23.6mg/ml)하였으며, 4% S9 mix를 제조하여 사용하였다.

시험관에 인산원충용액 0.5ml(대사 활성화시키는 경우에는 S9 mix 0.5ml), 시료용액 0.1ml과 Oxoid nutrient broth에서 13시간 배양시킨 균배양액 0.1ml을 가하고 가볍게 섞어준다. 대사 활성화시키지 않는 경우에는 곧바로(대사 활성화시키는 경우에는 30분간 37°C의 shaking incubator에서 예비 배양한 다음) histidine/biotin이 첨가된 top agar(45°C)를 2ml 가하고 3초간 vortex하여 미리 만들어 놓은 minimal glucose agar plate 상에 부어 평판고화시켰다. Incubator(37°C)에서 48시간 배양한 후 revertant colony를 계수하였다.

돌연변이 유발성의 판정은 복귀돌연변이 집락수가 용매대조군의 2배 이상이면서 용량의존성을 갖는 경우를 양성으로 하였다.

결과 및 고찰

본 시험에 사용된 시료로는 오염유기체 완전 구제 선량인 10kGy의 감마선으로 조사된 황기, 감초 및 진피의 열수추출물 이었으며 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100 균주의 복귀돌연변이 시험에서 돌연변이원성을 검증하였다.

실험은 추출물의 농도에 의한 생장억제 농도를 찾아 50%의 균주생장억제를 나타내는 농도를 최고농도(5mg/plate)로 하여 2배수로 0.32mg/plate 까지 5가지의 농도에서 시행하였다. *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100의 복귀돌연변이 집락수를 조사한 결과는 Table 1~3에 나타내었다.

Maron 등(11)에 의하면 자연 복귀돌연변이에 의한 음성대조군의 균주 집락수는 TA98에서는 30~50개 정도, TA100에서는 120~200개 정도로 나타나며 약간의 차이를 나타낼 수 있다고 설명하였다. 각 시험에서 음성대조군의 복귀돌연변이 집락수는 문헌치(11, 12, 14-16)의 범위보다 약간 작게 나타났으나 실험상의 차이에 의한 것으로 생각되며 문제는 없는 것으로 판단된다. 또한 양성대조화합물에 의한 복귀돌연변이 집락수가 현저하게 증가되어 나타남으로써 본 실험이 적합하게 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

황기, 감초 및 진피의 열수 추출물 시료에 대한 실험결과를 살펴보면 대사 활성화를 시키지 않은 경우와 대사 활성화를 시킨 경우 모두에서 감마선 조사 시료의 추출물에 의한 복귀돌연변이 집락수의 증가를 인정할 수 없었으며 또한 각 시료의 용량 단계에서 감마선 조사군과 비조사군의 집락수도 차이가 없었다.

Table 1. Revertant colonies of *S. typhimurium* in the test with water extract of γ -irradiated Astragali Radix

Test material	Irradiation ¹⁾	S9 mix	Dose (mg/plate)	No. of revertant colonies(His ^r) per plate ²⁾	
				TA98	TA100
H ₂ O	-	-		19, 29, 25 (24)	182, 184, 183 (183)
Astragali	-	-	5	28, 27 (28)	186, 157 (172)
Radix	-	-	2.5	29, 23 (26)	173, 184 (179)
	-	-	1.25	23, 26 (25)	172, 175 (174)
	-	-	0.63	29, 22 (26)	176, 175 (176)
	-	-	0.32	17, 20 (19)	190, 165 (178)
	+	-	5	24, 24 (24)	191, 192 (192)
	+	-	2.5	19, 25 (22)	152, 171 (162)
	+	-	1.25	22, 21 (22)	188, 177 (183)
	+	-	0.63	22, 25 (24)	190, 205 (198)
	+	-	0.32	25, 20 (23)	196, 182 (189)
NPD*	-	-	0.02	2042, 2068 (2055)	
Na-Azide*	-	-	0.0015		1235, 1258 (1247)
H ₂ O	-	-		20, 21, 26 (22)	178, 171, 202 (184)
H ₂ O	-	+		29, 24, 36 (30)	204, 196, 188 (196)
Astragali	-	+	5	34, 32 (33)	227, 191 (209)
Radix	-	+	2.5	28, 33 (31)	173, 194 (184)
	-	+	1.25	34, 31 (33)	199, 167 (183)
	-	+	0.63	28, 26 (27)	193, 161 (177)
	-	+	0.32	28, 32 (30)	191, 172 (182)
	+	+	5	24, 37 (31)	198, 192 (195)
	+	+	2.5	24, 23 (24)	208, 178 (192)
	+	+	1.25	29, 33 (31)	178, 189 (184)
	+	+	0.63	25, 22 (24)	166, 190 (178)
	+	+	0.32	33, 23 (28)	174, 168 (171)
2-AF*	-	+	0.010	1183, 1207 (1195)	723, 757 (740)

¹⁾ Irradiation(10 kGy of Co-60 γ -ray) was treated to the sample before extraction.

²⁾ Data present the number of colonies in each plate and the numbers in parenthesis are the mean of two or three plates.

* Positive control: NPD(4-nitro-o-phenylenediamine), Na-Azide and 2-AF(2-aminofluorene).

Table 2. Revertant colonies of *S. typhimurium* in the test with water extract of γ -irradiated Glycyrrhizae Radix

Test material	Irradiation ¹⁾	S9 mix	Dose (mg/plate)	No. of revertant colonies(His ^r) per plate ²⁾	
				TA98	TA100
H ₂ O	-	-		22, 20, 23 (22)	183, 208, 197 (196)
Glycyrrhizae Radix	-	-	5	26, 18 (22)	221, 212 (216)
	-	-	2.5	24, 24 (24)	191, 173 (182)
	-	-	1.25	25, 23 (24)	179, 177 (178)
	-	-	0.63	23, 21 (22)	188, 189 (189)
	-	-	0.32	21, 23 (22)	160, 192 (176)
Test materials (irradiated)	+	-	5	25, 29 (27)	194, 205 (200)
	+	-	2.5	19, 24 (22)	209, 190 (200)
	+	-	1.25	16, 20 (18)	177, 185 (181)
	+	-	0.63	22, 18 (20)	187, 187 (187)
	+	-	0.32	24, 26 (25)	187, 198 (193)
NPD*	-	-	0.02	2089, 2130 (2110)	
Na-Azide*	-	-	0.0015	1120, 1159 (1140)	
H ₂ O	-	-		26, 19, 22 (22)	170, 181, 195 (182)
H ₂ O	-	+		24, 26, 21 (24)	221, 209, 207 (212)
Glycyrrhizae Radix	-	+	5	26, 28 (27)	237, 185 (211)
	-	+	2.5	24, 23 (24)	201, 172 (187)
	-	+	1.25	32, 29 (31)	170, 173 (172)
	-	+	0.63	25, 26 (26)	163, 156 (160)
	-	+	0.32	29, 27 (28)	162, 176 (169)
	+	+	5	26, 29 (28)	210, 204 (207)
	+	+	2.5	28, 14 (21)	225, 202 (214)
	+	+	1.25	20, 18 (19)	172, 187 (180)
	+	+	0.63	38, 23 (31)	171, 158 (165)
	+	+	0.32	28, 18 (23)	188, 157 (173)
2-AF*	-	+	0.010	1204, 1229 (1217)	

¹⁾ Irradiation(10 kGy of Co-60 γ -ray) was treated to the sample before extraction.

²⁾ Data present the number of colonies in each plate and the numbers in parenthesis are the mean of two or three plates.

* Positive control: NPD(4-nitro-o-phenylenediamine), Na-Azide and 2-AF(2-aminofluorene).

따라서, 감마선이 조사된 황기, 감초 및 진피의 열수 추출물이 직접돌연변이원이나 간접돌연변이원으로 작용하지 않음을 알 수 있었다. 이 결과는 하 등(15)이 방사선 조사 백삼분말을 시험한 결과와 일치하였다.

시료의 유전독성을 판정하기 위한 시험은 세균의 유전자 돌연변이 시험, 포유류 세포의 염색체 이상 시험 등의 시험관내 시험법과 설치류에서의 소핵 시험 및 우성치사 시험, 초파리에서의 반성열성치사

Table 3. Revertant colonies of *S. typhimurium* in the test with water extract of γ -irradiated Aurantii nobilis Pericarpium

Test material	Irradiation ¹⁾	S9 mix	Dose (mg/plate)	No. of revertant colonies(His ^r) per plate ²⁾	
				TA98	TA100
H ₂ O	-	-		21, 25, 21 (22)	186, 169, 152 (169)
Aurantii nobilis	-	-	5	29, 24 (27)	169, 178 (174)
	-	-	2.5	29, 19 (24)	146, 160 (153)
Pericarpium	-	-	1.25	25, 25 (25)	174, 164 (169)
	-	-	0.63	24, 25 (25)	160, 148 (154)
	-	-	0.32	29, 24 (27)	147, 162 (155)
Test materials (irradiated)	+	-	5	28, 22 (25)	150, 176 (163)
	+	-	2.5	24, 23 (24)	135, 158 (147)
	+	-	1.25	21, 16 (19)	174, 155 (165)
	+	-	0.63	25, 21 (23)	125, 142 (134)
	+	-	0.32	19, 21 (20)	153, 139 (146)
NPD*	-	-	0.02	1963, 1987 (1975)	
Na-Azide*	-	-	0.0015	1017, 1052 (1035)	
H ₂ O	-	-		21, 18, 21 (20)	174, 166, 167 (169)
H ₂ O	-	+		27, 28, 27 (27)	170, 195, 166 (177)
Aurantii nobilis	-	+	5	18, 28 (23)	190, 185 (188)
	-	+	2.5	28, 20 (24)	175, 179 (177)
Pericarpium	-	+	1.25	28, 26 (27)	179, 182 (181)
	-	+	0.63	22, 30 (26)	165, 177 (171)
	-	+	0.32	29, 31 (30)	173, 176 (175)
	+	+	5	26, 23 (25)	181, 176 (179)
	+	+	2.5	21, 20 (21)	186, 191 (189)
	+	+	1.25	18, 25 (22)	167, 197 (182)
	+	+	0.63	22, 28 (25)	183, 165 (174)
	+	+	0.32	26, 21 (24)	173, 158 (166)
2-AF*	-	+	0.010	1089, 1132 (1111)	

¹⁾ Irradiation(10 kGy of Co-60 γ -ray) was treated to the sample before extraction.

²⁾ Data present the number of colonies in each plate and the numbers in parenthesis are the mean of two or three plates.

* Positive control: NPD(4-nitro-o-phenylenediamine), Na-Azide and 2-AF(2-aminofluorene).

시험, 포유류 골수세포의 유전학적 시험 등의 생체 시험법이 있다(17, 18). 저자 등은 1차적으로 세균의 유전자 돌연변이 시험들 중 대표적인 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험을 시행하여, 감마선 조사 생약의 추출물이 직접변이원이나 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.

요 약

건조 생약재인 황기, 감초 및 진피의 감마선 조사 위생화의 가능성을 검토하기 위하여 감마선 조사 후 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100 균주를 이용한 유전 독성학적인 안전성을 평가하고자 하였다. 시험 대상은 오염유기체 완전 구제 선량인 10kGy의 감마선으로 조사된 시료의 열수 추출물을 대상으로 하였으며 시험농도는 대상물질이 생약재임을 고려하여 50%의 균주생장억제를 나타내는 농도를 최고 농도로 하였다. 시험은 대사 활성화시키지 않는 경우와 대사 활성화시킨 경우에서 복귀돌연변이 집락을 계수하였다. 그 결과 각 시료에 의한 집락수의 증가를 인정할 수 없었으며, 각 용량단계에서 감마선 비조사군과 조사군 간의 차이도 볼 수 없으므로 음성으로 판정하였다. 따라서 감마선 조사된 각 시료가 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않음을 확인할 수 있었다. 이 결과로 보아 생체내 유전독성, 만성독성 및 생식독성 시험 등이 추가된다면 감마선 조사 생약재의 안전성을 명확히 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 과학기술부의 원자력 연구개발 사업의 일환으로 수행된 연구의 결과이며, 그 자원에 감사드립니다.

참고문헌

- Jung, G.T., Ju, I.O. and Choi, J.S. (1998) Studies on drying and preservation of Omija (*Schizandra chinensis* Baill). *Korean J. Post-harvest Sci. Technol.*, 5, 217-223
- Anon (1993) Food Safty. *Food irradiation newsletter.* 17, 4-10
- 조성기 (1997) 감마선 조사 생약재의 안전성에 관한 유전독성학적 평가. *한국식품위생·안전성 학회지*, 12(3), 217-227
- 유영범, 조성기 (2000) 감마선조사 당귀의 유효 성분 안정성 및 유전독성 안전성 연구, *한 국식품영양과학회지*, 29(2), 300-306
- Kwon, J.H., Byun, M.W. and Lee, S.J. (1994) Comparative effects of gamma irradiation and ethylene oxide fumigation on sorption properties and microbiological quality of white ginseng powder. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26, 272-277
- Kwon, J.H., Belanger, J.M.R., Sigouin, M., Lanthier, J., Willemot, C. and Pare, J.R.J. (1990) Chemical constituents of Panax ginseng exposed to γ -irradiation. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 830-833
- Juri, M.L., Ito, H., Watanabe, H. and Tamura, N. (1986) Distribution of microorganism in spices and their decontamination by gamma-irradiation. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 347-350
- WHO (1981) *Wholesomeness of irradiated food.* Report of a joint FAO/IAEA/WHO expert committee on the wholesomeness of irradiated food. Technical Report Series, 659
- Daferstein, F. K. (1992) *Food irradiation.* The position of the World Health Organization. 36th General Conference of the International Atomic Energy Agency, Scientific session, Vienna, 23, Sept.
- 육창수 (1997) 아세아 생약도감, 도서출판 경원, 273-274, 282, 305
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113, 173~215
- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutation Res.*, 31, 347

13. Ashwood-Smith, M. J. (1980) Stability of frozen microsome preparations for use in the Ames *Salmonella* mutagenicity assay. *Mutation Res.*, **69**, 199
14. 조성기, 육홍선, 변명우(1997), 복귀돌연변이를 이용한 감마선조사 생약재의 안전성에 관한 유전독성학적 평가, *한국식품영양과학회지*, **26**(5), 958-964
15. 하광원, 정해관, 오혜영, 허옥순, 손수정, 한의식, 정성철, 최부영, 김영미, 김필선, 문화회 (1994) 방사선조사 인삼의 유전독성에 관한 연구, *한국식품위생·안전성학회지*, **9**, 67-74
16. 조성기, 유영법, 오현, 곽연길, 변명우 (2000) 감마선조사 생약재(어성초, 구기자)의 안전성에 관한 유전독성학적 평가, *한국농산물저장유통학회지*, **7**(1), 68-73
17. Brusick, D. (1994) Genetic toxicology. In "Principles and methods of toxicology" Hayes, A. W.(ed.), 3rd ed., Raven Press, New York, p.545
18. Department of Health (1989) Guidelines for the testing of chemicals for mutagenicity. Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Report on Health and Social Security, HMSO, London, No. 35

(접수 2000년 12월 15일)