

녹변화합물의 *Salmonella typhimurium*에 대한 돌연변이성 측정

김한별¹ · 박한울¹ · 이주영¹ · 권훈정^{1,2*}

¹서울대학교 생활과학대학 식품영양학과, ²서울대학교 생활과학연구소

Lack of Mutagenicity of Green Pigments in *Salmonella typhimurium*

Hanbyul Kim¹, Hanul Park¹, Juyoung Lee¹, and Hoonjeong Kwon^{1,2*}

¹Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received December 27, 2010/Revised May 16, 2011/Accepted July 5, 2011)

ABSTRACT - A greening phenomenon has been observed in some plant foods such as chestnut, sweet potato, burdock, and others during processing. The formation of the pigments was postulated as reactions of primary amino compounds with chlorogenic acid or caffeic acid ester, yielding acridine derivatives. Acridine derivatives have been regarded as mutagenetic agents. For the reason, the bacterial reverse mutation test was carried out to evaluate the genotoxicity of green pigment using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. Alanine, arginine, aspartic acid, glycine, lysine, and phenylalanine were reacted respectively with chlorogenic acid to synthesize model compound. Green pigment was extracted from sweet potato. Maximum concentration of 2 and 50 mg/plate was tested for the synthetic green pigments and extracted green pigment respectively, taking bacterial survival, solubility, and color intensity into consideration. There was no significant increase in the reverse mutation either with or without S9 activation system by any test material. Though further studies with other genotoxicity test system are necessary, both synthetic and sweet potato green pigments seemed not to cause mutation despite the acridine moiety in their structures.

Key words: chlorogenic acid, primary amino compound, green pigment, bacterial reverse mutation

서 론

밤, 고구마, 우엉 등의 식물체를 오랜 시간 보관하거나 가공하는 과정에서 표면에 녹변화합물이 형성된다. 이 현상은 식품의 미관상 바람직하지 않으며, 특히 가공식품의 경우 품질 저하로 인식된다. 이 때 형성되는 녹변화합물은 클로로겐산 혹은 카페인산 에스테르와 일차 아미노 화합물이 2:1의 반응비로 알칼리 조건하에서 형성하는 색소이다 (Fig. 1). 2001년 Yabuta 등은 아미노 화합물의 종류와 pH의 조건을 달리하여 녹변화합물 형성 효율을 측정하고, 생성된 각 녹변화합물의 성질에 대하여 연구하여 녹변화합물의 최적 형성 조건을 알아보았다. Yabuta 등에 의하면 일차 아미노 화합물을 포함하는 아미노산 혹은 알킬 아민으로부터 형성된 녹변화합물은 뚜렷한 녹색을 나타내고, 피롤리딘 고리를 가진 프롤린, 싸이올기를 가진 시스테인, β -hydroxyl 그룹을 가진 세린, 트레오닌에서는 녹색을 나

타내지 않았으며, 녹변화합물의 최적 형성 pH는 9~9.5로 나타났다¹⁾. Matsui 등은 온도가 녹변화합물의 형성에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 카페인산 에스테르로 에틸 카페이트, 아미노 화합물로 메틸아민을 선택하여 녹변화합물을 합성한 뒤 온도별로 흡광도를 측정하였다. 그 결과 50°C에서 가장 원활한 형성을 보고하였다²⁾.

감자를 이용한 녹변화합물 형성 연구도 보고된 바 있다. 감자를 삶아 감자에 함유되어 있는 클로로겐산과 글루타민 등의 아미노산을 용출한 후 용출액을 서서히 식히면서 pH에 따른 녹변화합물 형성을 관찰하였고, 그 결과 알칼리

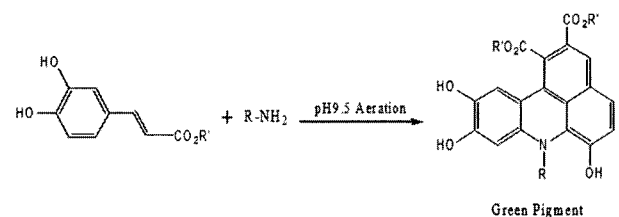


Fig. 1. Formation reaction of Green pigment from caffeic acid and a primary amino compound. Modified and Adapted from Yabuta (2001).

*Correspondence to: Hoonjeong Kwon, Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
Tel: 82-2-880-6835; Fax: 82-2-884-0305
E-mail: hjkwon@snu.ac.kr

성에서는 녹색을 유지하는 반면 pH가 떨어질수록 노란색을 띠다가 산성에서는 적갈색을 나타낸다고 보고되었다³⁾.

녹변화합물의 형성에 관한 연구와 함께 구조와 특성에 대한 연구도 함께 진행되었지만 아직 정확한 구조와 특성은 밝혀지지 않았다. 다만, 현재까지 몇몇 연구를 통해 일부 밝혀져 novel trihydroxy benzacridine 유도체임이 밝혀져 있다¹⁾. 이 구조의 모태가 되는 acridine은 복수고리 아민의 분자구조를 갖고 있으며 DNA의 염기배열에 돌연변이를 일으키는 발암물질로 acridine의 유도체들 역시 돌연변이 활성을 나타낼 가능성을 내포하고 있다⁴⁾. 이에 해당하는 유도체들은 benzacridine을 포함하여 dibenzacridine, proflavine, acridine orange 등이 있다. 이 중 dibenzacridine은 IARC (International Agency for Research on Cancer)에서 group 2B로, benzacridine, acridine orange는 group 3으로 규정되어 있다. Group 2B는 인체 연구에서 제한적 증거를 보이며 인체 발암가능성이 있는 물질들을 일컫고, group 3은 인체나 실험동물 자료가 불충분하여 인체 발암물질로 분류할 수는 없지만 발암물질이 아니라고 단정 지을 수 없는 물질을 일컫는다. 실제로 acridine과 acridine 유도체들의 돌연변이성에 대한 연구들은 상당부분 진행되어 있다. Ferguson and Denny에 의하면 1991년까지 보고된 acridine자체의 돌연변이성에 관한 연구는 46건이 있고, 9-aminoacridine은 416건, proflavine 380건, acridine orange 426건, quinacrine 181건, ICR-170 271건, ICR-191 326건이 있다⁵⁾. 이는 acridine과 acridine의 주요 유도체에 관련한 연구들만을 나타낸 것이고 기타 유도체들까지 더 많은 수의 연구들이 이에 해당된다.

본 연구에서는 우리가 쉽게 접할 수 있는 식물체나 식품에서 형성될 수 있는 녹변화합물 역시 유전독성 가능성을 내포한 acridine 유도체로서, 식물체와 식품에 함량이 높은 아미노산을 사용하여 녹변화합물을 합성하고 유전독성 시험 중 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험을 통해 발암성 및 변이원성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

Green pigment 합성 및 추출

Green pigment 합성

시험에 사용한 알라닌은 Amresco (Solon, OH, USA), 아르기닌, 아스파르트산, 글라이신, 라이신, 페닐알라닌, 클로로겐산은 Sigma (St.Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 여섯 종류의 아미노산과 클로로겐산을 각각 20 mM의 수용액으로 제조하고 0.1 M의 탄산/중탄산 완충용액(pH 9.5)와 1:1:1 비율로 혼합한 후, 50°C의 항온수조(BS-21, Lab Companion, Daejeon, Korea)에서 90 rpm으로 교반하면서 두 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 동결건조기(Clean

Vac 8, Biotron, Gangneung, Korea)에 동결건조시켜 실험에 사용하기 전까지 -80°C에 보관하였다.

Green pigment 추출

고구마의 껍질을 두껍게 벗긴 후 전자레인지(MR-M207V, LG, Seoul, Korea)에 조리하여 익히고, 0.1 M 탄산/중탄산 완충용액(pH 9.5)에 두 시간 침지 후 공기 중에서 하루 동안 녹변 시켰다. 녹변부위만 수집한 후 다시 동일 완충용액에 넣어 녹변화합물을 용해시킨 뒤, 원심분리(Combi-514R, Hanil Science Industry, Korea)하여 상층액을 모았다. 모인 상층액에 아세톤을 넣어 단백질을 응집시키고 감압필터를 이용하여 단백질과 기타 불순물을 제거하였다. 위 과정이 끝나면 합성한 녹변화합물과 마찬가지로 동결건조시켜 실험에 사용하기 전까지 -80°C에 보관하였다.

생육저해시험

시험에 적용할 녹변화합물의 최대용량은 생육저해시험과 용해도, 680 nm ~ 690 nm에서의 흡광도를 고려하여 설정하였다. 고구마에서 추출한 녹변화합물의 용해도는 500 mg/ml이 최대였고, 이때의 흡광도 값을 합성 녹변화합물과 맞추어 최대용량을 50 mg/plate(추출 green pigment)와 2000 µg/plate(합성 green pigment)로 설정하였다.

정해진 녹변화합물의 최대 용량으로 충분한 히스티딘을 제공하여 생육저해시험을 수행하였다. 히스티딘은 돌연변이 시험에서 사용하는 0.5 mM 히스티딘/바이오틴 용액 농도의 다섯 배인 2.5 mM의 히스티딘/바이오틴 용액을 사용하였다. 생육저해시험결과 추출 녹변화합물 50 mg/plate와 합성 녹변화합물 2000 µg/plate에 의한 생육저해가 관찰되지 않아 최대용량으로 확정하였다.

아미노산과 클로로겐산 시험군 설정

녹변화합물 형성 과정에서 반응에 참여하지 못하고 녹변화합물 용액에 포함되어 있을 수 있는 아미노산과 클로로겐산을 시험군으로 설정하여 복귀돌연변이시험을 수행하였다. 아미노산과 클로로겐산이 1:2로 반응하는 것과 각각의 분자량 100(평균값), 354를 고려하여, 녹변화합물의 최대용량 2000 µg/plate에 상응하도록 250 µg/plate, 1750 µg/plate로 설정하였다.

복귀돌연변이시험

Salmonella typhimurium 균주 중 구조이동형(frame-shift) 돌연변이 검색을 위해 TA98, 염기치환형(base-pair substitution) 돌연변이 검색을 위한 TA100 두 균주를 이용하여 녹변화합물에 대한 복귀돌연변이시험을 수행하였다. 시험에 사용할 균주는 KT&G 중앙연구원 분석과학 연구소 안전성평가 팀으로부터 양도받았다. 시험 전 이들 균주의 히스티딘 요구성, *rfa*돌연변이, *uvrB*돌연변이 및 R factor의 유전형질을

확인하였다. 균주는 영양배지 No.2(Oxoid)에 접종, 배양하여 현탁액 0.9 ml당 DMSO 0.1 ml을 가하여 -80°C 에 보관하면서 사용하였다. 실험에 사용할 때는 균주를 영양배지에 1%의 농도로 접종하여 37°C , 210 rpm으로 설정된 진탕 배양기(SI-600R, EIOtech, Korea)에서 10~12시간 동안 진탕 배양 하여 $1\sim 2 \times 10^9$ cells/ml의 밀도가 되도록 한 후 실험에 사용하였다. 모든 물질에 대한 시험은 대사활성화계(S9 mix)를 적용한 경우와 적용하지 않은 경우로 나누어 실험을 수행하였고, 모든 과정은 국립독성연구소의 표준작업지침서(6)와 OECD Test Guideline No.4717)에 따라 수행하였다.

대사활성계를 이용하는 방법에서는 2-aminoanthracene (2-AA, Sigma)를, 대사활성계를 이용하지 않는 방법에서는 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO, Sigma)와 Sodium azide (SA, Samchun)를 각각 양성대조군으로 사용하였다. 2-AA와 4-NQO는 DMSO (Amresco)에, SA는 증류수에 용해시켜 각각 $2.5 \mu\text{g}/\text{plate}$, $10 \mu\text{g}/\text{plate}$, $2.0 \mu\text{g}/\text{plate}$ 의 농도로 처리하였다.

복귀돌연변이시험을 위한 배지 및 시약의 조제는 Maron and Ames의 방법에 따라 수행하였다. 대사활성계를 이용한 실험을 위한 S9은 Moltax (Boone, NC, USA)사로부터 구입하였다. Aroclor 1254를 투여한 수컷 Sprague Dawley rat의 간을 균일화하여 얻은 것으로, 구입 후 -80°C 에 동결보관하였고 실험 직전에 Maron and Ames의 방법대로 보조효소를 혼합하여 사용하였다⁶⁾.

평균한 10 mM의 탄산/중탄산 완충용액(pH 9.5)로 단계별 희석을 하여 각 농도의 시험물질 용액을 제조하였고, MILLEX-GV 0.22 μm (Millipore, Bedford, MA, USA.)를 이용하여 필터링한 후 시험에 사용하였다.

복귀돌연변이시험은 전배양 방법으로 하였다. 녹변화합물 0.1 ml과 배양된 균주 0.1 ml, S9 mix(혹은 0.1 M 인산염 완충용액, pH 7.4) 0.5 ml를 시험관에 넣고 가볍게 흔든 후 진탕 배양기에서 37°C 로 30분간 사전배양을 하였다. 45°C 정도의 연한천 100 ml당 10 ml의 0.5 mM 히스티딘/바이오틴

Table 1. Reverse mutation assay using *Salmonella typhimurium* treated with Green pigment

Green pigment	His ⁺ revertants/plate				
	Doses ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	TA98		TA100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
G (Ala)	2000	28 \pm 8	21 \pm 5	145 \pm 16	175 \pm 29
	200	20 \pm 2	27 \pm 3	153 \pm 8	181 \pm 20
	20	20 \pm 1	20 \pm 2	137 \pm 16	175 \pm 19
G (Arg)	2000	21 \pm 4	20 \pm 3	149 \pm 10	184 \pm 24
	200	18 \pm 2	22 \pm 5	149 \pm 20	188 \pm 21
	20	20 \pm 4	22 \pm 5	153 \pm 11	187 \pm 10
G (Asp)	2000	19 \pm 6	25 \pm 2	140 \pm 19	168 \pm 14
	200	18 \pm 5	24 \pm 5	159 \pm 13	175 \pm 8
	20	22 \pm 3	26 \pm 6	171 \pm 17	187 \pm 27
G (Gly)	2000	19 \pm 2	22 \pm 2	146 \pm 9	159 \pm 15
	200	18 \pm 4	22 \pm 3	161 \pm 5	187 \pm 18
	20	21 \pm 4	20 \pm 4	157 \pm 24	153 \pm 22
G (Lys)	2000	19 \pm 4	27 \pm 6	156 \pm 10	177 \pm 10
	200	23 \pm 2	22 \pm 4	161 \pm 13	156 \pm 4
	20	20 \pm 4	25 \pm 5	158 \pm 9	188 \pm 4
G (Phe)	2000	22 \pm 5	22 \pm 4	163 \pm 20	189 \pm 23
	200	21 \pm 5	22 \pm 3	147 \pm 19	171 \pm 22
	20	20 \pm 3	22 \pm 4	160 \pm 4	171 \pm 19
G (Sweet potato extract)	50000	21 \pm 2	25 \pm 7	142 \pm 11	180 \pm 11
	5000	19 \pm 2	22 \pm 2	156 \pm 23	183 \pm 41
	500	21 \pm 4	24 \pm 4	149 \pm 12	183 \pm 17
Positive		2461 \pm 151	2235 \pm 538	1136 \pm 186	2456 \pm 323
Negative		23 \pm 4	23 \pm 4	154 \pm 19	171 \pm 19

G : Green pigment

2-AA ($2.5 \mu\text{g}/\text{plate}$) was used as positive control for both strains in pro-activation studies, and 4-NQO ($10 \mu\text{g}/\text{plate}$) and SA ($2 \mu\text{g}/\text{plate}$) were used in direct mutation studies for TA98 and TA100 respectively.

Data represent the mean revertants \pm S.D. The numbers of revertants those are equal or above two-fold of those of negative control are regarded as the positive response.

Table 2. Reverse mutation assay using *Salmonella typhimurium* treated with amino acids and chlorogenic acid

Chemicals	Doses($\mu\text{g}/\text{plate}$)	His ⁺ revertants/plate			
		TA98		TA100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
Alanine	250	21 \pm 6	28 \pm 5	172 \pm 20	176 \pm 18
Arginine	250	22 \pm 4	21 \pm 6	185 \pm 26	177 \pm 12
Aspartic acid	250	20 \pm 3	23 \pm 4	180 \pm 14	212 \pm 16
Glycine	250	23 \pm 6	29 \pm 7	167 \pm 14	191 \pm 12
Lysine	250	21 \pm 7	23 \pm 7	189 \pm 14	189 \pm 31
Phenylalanine	250	22 \pm 3	22 \pm 3	172 \pm 24	145 \pm 16
Chlorogenic acid	1750	23 \pm 4	28 \pm 6	177 \pm 10	191 \pm 27
Positive		2461 \pm 151	2235 \pm 538	1136 \pm 186	2456 \pm 323
Negative		23 \pm 4	23 \pm 4	154 \pm 19	171 \pm 19

2-AA (2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$) was used as positive control for both strains in pro-activation studies, and 4-NQO (10 $\mu\text{g}/\text{plate}$) and SA (2 $\mu\text{g}/\text{plate}$) were used in direct mutation studies for TA98 and TA100 respectively.

Data represent the mean revertants \pm S.D. The numbers of revertants those are equal or above two-fold of those of negative control are regarded as the positive response.

용액을 첨가한 후 2 ml씩 각 시험관에 붓고 교반 후 최소 글루코스 한천 평판 배지에 부어 고루 퍼뜨린 후 굳혔다. 그 후 평판배지를 뒤집어 37°C의 항온배양기(BI-1000M, Jeio Tech., Korea)에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 결과로 형성된 콜로니를 육안으로 계수하였다. 결과는 각 농도군당 삼반복하여 얻은 콜로니수의 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 복귀돌연변이 콜로니수가 용량 의존적으로 증가하며, 음성대조군 결과의 2배 이상으로 증가하고, 시험결과의 재현성이 있을 때 돌연변이 유발 양성으로 판정하였다.

결 과

합성 녹변화합물과 추출 녹변화합물에 대한 본시험의 시험결과는 Table 1에 제시하였다. *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 균주를 이용한 전배양 복귀돌연변이시험에서 대사활성화 적용 및 비 적용시 합성 녹변화합물과 추출 녹변화합물 모두에서 농도 의존적으로 콜로니 수가 증가하는 경향은 관찰되지 않았다. 또 음성대조군과 비교하여 두 배 이상의 콜로니 수도 나타나지 않아 이들 물질의 TA98, TA100 균주에 대한 돌연변이능은 음성으로 판단된다. 반응물질인 아미노산과 클로로겐산도 돌연변이성을 나타내지 않았으며 그 결과는 Table 2에 제시하였다.

생육저해시험과 용해도, 흡광도를 고려하여 결정된 2000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 와 50 mg/plate를 최고 농도로 한 합성 및 추출 녹변화합물과 음성, 양성대조군으로 시험군을 설정하여 복귀돌연변이시험을 수행한 결과 대사활성제 적용 여부와 상관없이 양성 판정 기준을 만족할 정도의 콜로니의 증가는 나타나지 않아서 모든 시험군에서 음성으로 판정하였다.

고 찰

밤, 고구마, 우엉 등의 식물체 표면에 생성되는 녹변화합물이 유전독성 가능성을 내포한 novel trihydroxy benzacridine 유도체로서, 유전독성 시험 중 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험을 통해 발암성 및 변이원성을 확인하였다. 식물체와 식품에 함량이 높은 amino acid들을 선정, 녹변화합물을 합성하고, 녹변화합물 뿐 아니라 합성에 이용된 아미노산과 클로로겐산을 시험군으로 설정하여 처리하였다. 유전독성시험법으로는 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험을 수행하였다. 균주는 TA98, TA100 을 이용하였으며 대사활성제 적용 및 비적용의 경우 모두에서 시험을 수행하였다.

모든 시험군에서 처리 농도에 의존적으로 콜로니 수가 증가하는 경향은 관찰되지 않았으며, 음성대조군 수치와 비교하여 두 배 이상의 콜로니 수도 나타나지 않았다. 이상의 결과로부터 클로로겐산과 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 글라이신, 라이신, 페닐알라닌을 이용하여 합성한 녹변화합물과 각 아미노산, 클로로겐산, 그리고 고구마에서 추출한 녹변화합물은 해당균주에 대하여 복귀돌연변이를 유도하지 않는 것으로 판정하였다.

Acridine과 acridine 유도체의 유전독성에 대하여 수행된 연구들을 살펴보면, 9-aminoacridine은 DNA사이에 삽입되어 T4 phage의 r11부분과 lambda 유전자의 cI부분에서 구조이동형 돌연변이를 일으킨다⁸⁾. *Escherichia coli* 또는 *Salmonella typhimurium*에서도 다양한 유전자에 돌연변이를 일으키는 것으로 밝혀져 있으며^{9,10)}, V79 Chinese hamster cells에서도 자매염색분체교환 돌연변이를 일으킨다고 보고되었다¹¹⁾. 하지만 9-aminoacridine에 대한 V79 Chinese hamster cells

에서의 염기치환형 돌연변이 시험결과는 음성으로 판정되었고¹²⁾, human fibroblasts에서도 돌연변이 유발을 하지 않는 것으로 밝혀졌다¹³⁾.

Terzaghi에 의하면 proflavine은 T4 phage의 라이소자임에 염기서열 추가돌연변이를 일으키는 것으로 보고되었다¹⁴⁾. 그러나 *Salmonella typhimurium*에서는 균주와 조건에 따라 구조이동형 돌연변이를 유발하기도 하고 유발하지 않기도 하였다¹⁵⁾. *Saccharomyces cerevisiae* strain D4에서는 유사분열중인 유전자에 돌연변이를¹⁶⁾, V79 Chinese hamster cells에서는 자매염색체교환을 유발하였으나¹³⁾, L5178Y mouse lymphoma cells에서는 돌연변이를 유발하지 않았다¹⁷⁾.

Dibenzacridine은 *Salmonella typhimurium* TA100 균주의 대사활성화 조건하에서만 염기치환형 돌연변이를 일으키고, 대사활성화 비작용 조건과 TA98 균주에서는 유전독성을 나타내지 않았다. 또 V79 Chinese hamster cells에서도 대사활성화 조건에서만 돌연변이를 일으켰다¹⁸⁾.

이처럼 acridine 유도체임에도 불구하고 그 종류와 시험 수행 조건에 따라 유전독성시험 결과가 양성인 경우도, 그렇지 않은 경우도 있다. 유전독성이란 시험물질이 DNA나 염색체에 직·간접적으로 손상을 주어 형태적 변화나 기능적 이상을 일으키는 독성으로 그 메커니즘이 매우 다양하여 한 종류의 시험결과만을 근거로 유전독성유발 여부를 확정할 수 없다. 따라서 유전독성평가에 주로 이용되는 여러 시험법 중 한 가지만을 수행한 본 연구결과로 그 화학물질의 비 유전독성을 확정하기에는 다소 무리가 있으므로 녹변화합물의 유전독성여부를 확정하기 위해서는 본 연구에서 수행한 복귀돌연변이시험 이외의 다른 유전독성시험 역시 필요할 것이다.

요 약

밤, 고구마, 우엉 등의 일부 식물체를 오랜 시간 보관하거나 가공하는 과정에서 표면에 녹변화합물이 형성된다. 본 연구에서는 이때 형성되는 녹변화합물이 유전독성 가능성을 내포한 novel trihydroxy acridine 유도체로서, 녹변화합물에 대한 복귀돌연변이시험을 수행하였다. 시험은 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 균주를 이용하였고 대사활성계 적용 유무에 따른 시험을 모두 수행하였다. 시험에 사용된 녹변화합물은 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 글라이신, 라이신, 페닐알라닌과 클로로겐산을 사용한 합성 및 고구마를 매트릭스로 하여 녹변화합물을 형성한 후 추출하는 두 가지 방법을 통하여 준비하였다. 합성 녹변화합물과 추출 녹변화합물의 최대 처리 용량은 생육저해시험과 용해도, 흡광도를 고려하여 각각 2000 µg/plate, 50 mg/plate로 결정하였다. 녹변화합물 합성 과정 후 잔존하는 아미노산들과 클로로겐산의 영향을 배제하고자 이들을 또 다른 시험군으로 설정하고 각각 250 µg/plate, 1750 µg/plate의 농도로 처리하

여 복귀돌연변이시험을 수행하였다. 시험결과 두 균주에서 농도에 의존적으로 콜로니 수가 증가하는 경향은 관찰되지 않았으며, 음성대조군 수치와 비교하여 두 배 이상의 콜로니 수도 나타나지 않았다. 이상의 결과를 종합할 때, 합성 녹변화합물과 추출 녹변화합물은 본 시험 조건에서 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 확인되었다.

참고문헌

1. Yabuta, G., Koizumi, Y., Namiki, K., Hida, M. and Namiki, M.: Structure of green pigment formed by the reaction of caffeic acid esters (or chlorogenic acid) with a primary amino compound. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**(10), 2121-30 (2001).
2. Matsui, T.: Greening pigments produced reaction of ethyl caffeine with methylamine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*, **27**(6), 573-82 (1991).
3. Adams, J.B.: Green Color Development in Potato Cooking Water. *Food. Chem.*, **49**(3), 295-298 (1994).
4. Moutschen, J.: Introduction to genetic toxicology. Wiley, pp. 70-72 (1985).
5. Ferguson, L.R. and Denny, W.A.: The genetic toxicology of acridines. *Mutat. Res.*, **258**(2), 123-60 (1991).
6. 국립독성연구소 식품 의약품 안전청.: KFDA 표준작업지침서(II), 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험, NITR/SOP/GNT, pp. 17-31 (1999).
7. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Bacterial Reverse Mutation Test (TG 471) (1997).
8. Orgel, A. and Brenner, S.: Mutagenesis of Bacteriophage T4 by Acridines. *J. Mol. Biol.*, **3**(6), 762-768 (1961).
9. McCoy, E.C., Rosenkranz, E.J., Petrullo, L.A. and Rosenkranz, H.S.: Frameshift Mutations - Relative Roles of Simple Intercalation and of Adduct Formation. *Mutat. Res.*, **90**(1), 21-30 (1981).
10. Pons, F.W. and Muller, P.: On the Glucose Effect in Acridine-Induced Frameshift Mutagenesis in *Escherichia-Coli*. *Mutat. Res.*, **210**(1), 71-77 (1989).
11. Nishi, Y., Hasegawa, M.M., Taketomi, M., Ohkawa, Y. and Inui, N.: Comparison of 6-Thioguanine-Resistant Mutation and Sister Chromatid Exchanges in Chinese-Hamster V79 Cells with 40 Chemical and Physical Agents. *Cancer. Res.*, **44**(8), 3270-3279 (1984).
12. Rogers, A.M. and Back, K.C.: Comparative Mutagenicity of 4 DNA-Intercalating Agents in L5178y Mouse Lymphoma-Cells. *Mutat. Res.*, **102**(4), 447-455 (1982).
13. Wilson, W.R., Harris, N.M. and Ferguson, L.R.: Comparison of the Mutagenic and Clastogenic Activity of Amsacrine and Other DNA-Intercalating Drugs in Cultured V79 Chinese-Hamster Cells. *Cancer. Res.*, **44**(10), 4420-4431 (1984).
14. Terzaghi, E. et al.: Change of a Sequence of Amino Acids in Phage T4 Lysozyme by Acridine-Induced Mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **56**(2), 500-507 (1966).
15. Skopek, T.R. and Hutchinson, F.: Frameshift Mutagenesis of Lambda Prophage by 9-Aminoacridine, Proflavin and Icr-191. *Mol. Gen. Genet.*, **195**(3), 418-423 (1984).

16. Fahrig, R.: Acridine-Induced Mitotic Gene Conversion (Paramutation) in *Saccharomyces - Cerevisiae* - Effect of 2 Different Modes of Binding to DNA. *Mutat. Res*, **10**(5), 509-514 (1970).
17. Deluca, J.G., Krolewski, J., Skopek, T.R., Kaden, D.A. and Thilly, W.G.: 9-Aminoacridine - Frameshift Mutagen for *Salmonella-Typhimurium* Ta-1537 Inactive at Bgp_rt Locus in Human Lymphoblasts. *Mutat. Res*, **42**(2), 327-330 (1977).
18. Bonin, A.M. et al.: The Mutagenicity of Dibenz[*a*,*j*]Acridine, Some Metabolites and Other Derivatives in Bacteria and Mammalian-Cells. *Carcinogenesis*, **10**(6), 1079-1084 (1989).