

CRISPR/Cas9에 의한 유전자교정 토마토의 유전독성평가

강동민¹ · 정우진¹ · 바슈 데브 네우파네¹ · 정유진^{2,3} · 김종미⁴ · 강권규^{2,3} · 안미정^{1*}

¹경상국립대학교 약학대학 약학과, ²한경대학교 생명공학부 원예생명공학전공,
³한경대학교 유전공학연구소, ⁴한국공공관리연구원

A Genotoxicity Study of Transgenic Tomatoes using CRISPR/Cas9

Dong-Min Kang¹, Woo-Jin Jeong¹, Bashu Dev Neupane¹, Yu Jin Jung^{2,3},
Jong Mi Kim⁴, Kwon Kyoo Kang^{2,3}, Mi-Jeong Ahn^{1*}

¹College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

²Division of Horticultural Biotechnology, Hankyong National University, Anseong, Korea

³Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Anseong, Korea

⁴Korea Public Management Institute, Seoul, Korea

(Received June 3, 2024/Revised June 20, 2024/Accepted June 24, 2024)

ABSTRACT - Tomato is a widely distributed, cultivated, and commercialized vegetable crop. Recently, an increasing trend has been observed in the consumption of transgenic crops with enhanced functional components. However, consumer concerns regarding genotoxicity have been increasing. This study examined the genotoxicity of transgenic tomato (LTT) using the CRISPR/Cas9 system through a bacterial reverse mutation assay, chromosomal aberration assay, and mammalian micronucleus test. In the bacterial reverse mutation assay, LTT did not induce mutagenicity in *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, and TA1537, or *Escherichia coli* WP2uvrA, irrespective of the presence or absence of S9. LTT did not cause clastogenic or aneugenic chromosomal abnormalities during metaphase in CHL cells. Moreover, LTT did not increase the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes in the polychromatic erythrocytes. These findings can be used as a foundation to assess the genotoxicity of transgenic crops using the CRISPR/Cas9 system in the future.

Key words: Transgenic tomato, Genotoxicity, Reverse mutation, Chromosome aberration, Micronucleous test

토마토(*Solanum lycopersicum* L.)는 가지과(Solanaceae)에 속하는 작물로 전세계적으로 널리 분포되어 재배되며, 생으로 먹거나 소스, 주스, 통조림 등 여러 형태로 가공되어 다양한 요리 및 식단에 필수적인 재료로 소비되고 있다^{1,2}). 이처럼 토마토가 널리 사용되는 이유는 풍부한 영양소와 건강상의 이점 때문이다. 토마토에는 라이코펜, 베타카로틴, 비타민 C와 E, γ -aminobutyric acid (GABA), 플라보노이드 등 다양한 항산화 물질이 다량 함유되어 있어

항암, 항염증, 심혈관질환 예방 등 여러 면에서 건강에 도움을 준다^{3,4}). 특히, 토마토의 주요 카로티노이드 성분인 라이코펜은 과육에 붉은 색을 부여하며, 토마토 품질의 중요한 지표로 여겨진다⁵). 따라서, 토마토의 품질을 향상시키기 위해서는 과일 내 라이코펜 함량을 늘리는 것이 중요하다⁶). 최근에는 식물유전자 교정기술의 상당한 발전으로 라이코펜 대사경로의 주요 유전자 발현조절이 토마토 중의 라이코펜 함량을 증가시키는 효과적인 방법으로 부각되고 있다^{7,8}). 한편, 토마토의 기능성물질 중 하나인 GABA는 네 개의 탄소 원자로 구성된 비단백질 아미노산으로 L-glutamate와 glutamic acid decarboxylase (GAD)의 탈카복실화에 의해 생성된다. GABA는 중추신경계에서 억제성 신경전달물질로 면역력향상, 성장호르몬 분비조절, 통증완화, 혈압강하 등의 다양한 생리활성을 가지고 있다^{9,10}).

식물유전자 교정기술인 CRISPR/Cas9 시스템은 특정 유전자 부위를 타겟팅하여 교정할 수 있기 때문에 기존 방

*Correspondence to: Mi-Jeong Ahn, College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea
Tel: +82-55-772-2425, * * * * *
E-mail: amj5812@gnu.ac.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.

식에 비해 높은 정확성과 효율성을 가진 장점으로 인해 광범위하게 사용되고 있다¹¹⁾. 기존 genetically modified organism (GMO) 방법은 새로운 외래 유전자를 무작위로 삽입하여 예측하지 못한 위치에서 변화를 일으킬 수 있는 반면에, CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 변이는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이와 유사한 방식으로 이루어지며, 외래 유전자의 비삽입(Non-GMO)으로 간주된다¹²⁾. 해외에서는 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 작물 개발이 활발하게 이루어지고 있다¹³⁻¹⁵⁾. 일본에서는 Sanatech Seed라는 회사가 스트레스완화 효능을 가진 GABA 함량이 증가된 가바토마토를 개발하여 2021년에 세계 최초로 상업화된 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 작물이 판매되고 있다¹⁶⁾. 미국에서는 USDA가 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 식물을 기존 GMO와 동일하게 규제하지 않기로 결정하였고, FAD2-1A와 FAD2-1B 유전자의 감소를 통해 육성한 oleic acid 함량이 높은 대두유를 승인하는 등 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 작물개발 및 연구가 활발하게 진행 중이다¹⁷⁾. 본 연구팀에서는 그동안 토마토의 항산화성분인 라이코펜과 GABA 함량을 늘리기 위한 목적으로 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 유전자교정 토마토를 개발하였다¹⁸⁾. 하지만 다양한 이점에도 불구하고 유전자교정 작물에 대한 과장된 정보로 인한 막연한 불안감과 부정적 시각이 있어 이에 대한 사회 전반에 걸친 수용 및 합의가 필요한 실정이다¹⁹⁾. 이를 위해서는 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 유전자교정 작물의 안전성에 관한 과학적이고 객관적인 자료 확보 및 정보 공유에 대한 인프라가 구축되어야 한다.

본 연구에서는 CRISPR/Cas9 시스템을 활용한 유전자교정 토마토가 DNA나 염색체에 직접적인 손상을 일으키고 형태적 또는 기능적 이상을 유발하는지 여부를 확인하기 위해 유전독성 평가를 수행하였다. 이를 위하여 미생물 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 골수세포를 이용한 체내 소핵시험을 국제적으로 표준화된 OECD Guidelines에 따라 시험을 진행하였다. 이러한 연구를 통해 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 유전자교정 토마토의 안전성을 검증하고, 이를 기반으로 한 기능성 식품의 개발에 기여하고자 한다.

Materials and Methods

유전자교정 토마토 동결건조물의 제조 및 멸균

유전독성 평가에 사용된 토마토(*S. lycopersicum* L.)는 토마토 품종인 동유250 육종을 CRISPR/Cas9 시스템을 활용하여 다음과 같은 방법으로 유전자 교정하였다¹⁸⁾. CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 라이코펜의 생합성에 관여하는 *SISGR1* 유전자의 3, 5번째 엑손영역에서 single guide RNA (sgRNA)를 작성하였고, GABA의 생합성에 관여하는 *SIGAD2* 유전자의 8번째 엑손 영역에서 sgRNA를 각각 작성하였다. 각각의 sgRNA를 식물형질전환용 벡터인 pKAtC

binary Vector로 도입한 다음, *Agrobacterium*-mediated transformation 방법을 사용하여 재조합벡터 pKAtC를 식물체에 전달하였다. Kanamycin 및 zeatin이 포함된 MS 배지에서 선발된 토마토 식물체는 PCR 분석을 통해 T-DNA 삽입 여부를 확인하였다. 염기서열 분석결과, 염기의 삽입으로 인해 frameshift가 발생하여 이에 따라 생성되는 아미노산 서열이 달라져 조기종결 코돈을 생산하였다. 따라서, 라이코펜 생합성 관련 유전자인 *SISGR1*의 기능을 상실시켜 PSY1의 효소 활성이 증가하였고, 그 결과 라이코펜의 생성 및 축적량이 증가시켰다. 한편, glutamate에 결합하는 GAD2 효소의 C-terminal 부분을 제거하여 GABA의 생성 및 축적량을 증가시켰다. 라이코펜과 GABA 함량이 각각 증가된 유전자교정 토마토(각각 *sgr1* #1-6, *sgr1* #2-4와 *gad2* #1-5 null 계통)를 확보하였다¹⁸⁾.

위와 같이 유전자교정된 토마토를 LMO온실로 허가받은 LML23호-659 격리시설(한경대학교 육종연구실)에서 25±3°C, 습도 60-80% 조건하에서 재배하였다. 일반적으로 소비자가 소비하는 토마토의 숙성 단계인 red ripe stage의 토마토[색이 붉게 변하기 시작하고 7일 후와 10일 후 (breaker stage after 7 days and 10 days, 2022년 7월)를 수확하여 혼합한 뒤 사용하였다. 채취한 과육을 즉시 믹서기로 곱게 갈아서 -80°C 냉장고에서 하루정도 얼린 후 이틀동안 동결건조하여 유전자교정 토마토 동결건조물 (lyophilized transgenic tomato, LTT)을 얻었다. 유전독성의 평가에는 LTT에 멸균증류수를 가한 후 Centrifuge 5430R (Effendorff, Hamburg, Germany) 기기에서 2,000 ×g로 5분간 원심 분리하여 가라앉히고, 5분간 초음파 처리로 기포를 제거해주었다. 다음으로, microwave를 사용하여 700 W 조건에서 40초간 멸균하였다. 조제한 용액을 실온에서 일정 시간동안 식히고 멸균증류수로 희석하여 각 농도별로 실험에 사용하였다.

LTT 중의 기능성성분 분석

LTT 중의 라이코펜을 비롯한 카로티노이드 성분 분석을 위하여 기존에 보고된 방법을 이용하여 LTT 250 mg을 0.01% BHT가 첨가된 아세톤 10 mL로 추출하였다^{20,21)}. HPLC를 이용한 기능성 성분 분석은 Agilent 1260 HPLC system (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany)을 사용하여 이전에 보고된 방법을 따라 수행하였으며, 용매는 gradient 조건 하에서 일부 수정하여 전개하였다. 컬럼은 YMC C₃₀ 카로티노이드 컬럼(3 µm, 4.6×250 mm, YMC Co., Kyoto, Japan)을 사용하여 30°C에서 실험을 진행하였다. 이동상 용매로는 메탄올: methyl-*tert*-butyl ether (MTBE): 물(81:15:4)을 A용액으로, 메탄올:MTBE:물(6:90:4)을 B용액으로 사용하였다. 전개조건은 유속 0.7 mL/min으로 하여, A용액을 100%로 하여 15분간 흘려주었고, 이후 35분 동안 서서히 B용매가 100%가 되도록 흘려준 다음, 10분

간 100% 조건을 유지하였다. 카로티노이드 표준물질인 lutein, all-trans- β -carotene 및 all-trans-lycopene은 Carotenature (Münsingen, Switzerland)에서 구매하였고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 표준물질 피크의 머무름 시간은 violaxanthin, 11.1분; chlorophyll b, 18.8분; lutein, 20.9분; zeaxanthin, 25.8분; chlorophyll a, 26.8분; 13Z- β -carotene, 35.7분; all-trans- β -carotene, 38.4분; 9Z- β -carotene, 39.6분; all-trans-lycopene, 52.6분; 5Z-lycopene, 53.3분이었다.

LTT 중의 GABA 성분분석은 이전에 보고된 분석방법을 응용하여 분석하였다²²⁾. 즉, LTT 250 mg에 70% 에탄올로 10 mL를 넣고 10분간 초음파 처리를 3번하여 추출하였다. 추출물은 실온에서 10분 동안 Centrifuge 5430R 기기에서 5,700 \times g로 원심분리하였고, 상등액 1 mL를 0.22 μ m 필터로 여과하였다. 여과된 추출물은 아미노산 분석기기인 Biochrom 30 plus 아미노산 분석기(Biochrom Ltd., Cambridge, UK)와 Lithium accelerated Resin H-1649 칼럼(Biochrom Ltd.)을 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

반복실험으로 얻은 실험결과를 평균값 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 표기하였으며, 그룹간의 차이는 Microsoft Excel 2019 software (Microsoft, Redmond, WA, USA)의 Student's *t*-test로 분석하였다.

미생물복귀돌연변이시험

미생물복귀돌연변이 유발 여부의 평가는 OECD Guidelines에 따라 진행하였으며²³⁾, 히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 4개 균주와 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2 *uvrA*를 사용하였다²⁴⁾. 이들 균주는 Molecular Toxicology, Inc. (Boone, NC, USA)에서 구입 후 형질확인 후 계대배양한 것을 시험에 사용하였다. S9 mix의 조성은 8 μ mol $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 33 μ mol KCl, 5 μ mol G-6-P, 4 μ mol NADPH, 4 μ mol NADH, 100 μ mol sodium phosphate buffer (pH 7.4) 및 50 μ L S9 (Molecular Toxicology Inc., Boone, NC, USA)으로 하였으며, 조제한 S9 mix는 얼음에 채워 사용하였다. 미생물복귀돌연변이를 유도하는 각 균주에 적합한 변이원성 양성대조물질로 사용한 2-aminoanthracene (2-AA), benzo(α)pyrene (B[α]P), sodium azide (SA), 2-nitrofluorene (2-NF), 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO), acridine mutagen ICR 191 (ICR-191)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고, 음성대조군으로는 멸균 증류수를 사용하였다. LTT를 농도별로 멸균 증류수에 50, 150, 500, 1500, 5000 μ g/mL 농도로 현탁시켜 direct plate incorporation 시험방법을 실시하였다. 시험균주는 master plate로부터 20 mL의 액체배지(2.5% Oxoid Nutrient Broth No. 2)에 접종해 shaking incubator (37 \pm 2°C, 120 rpm)에서 10 시간 전배양하였으며, 전배양을 마친 균주는 600 nm에서 흡광도를 측정하여 생균수를 산출한 후 시험에 사용할

때까지 냉장보관하였다. 온도 45 \pm 2°C를 유지하는 heating block에 꽂은 멸균튜브에 고압증기멸균한 top agar를 2 mL씩 분주한 다음, S9 mix 0.5 mL [대사활성계 비적용 시에는 0.5 mL의 sodium-phosphate buffer (pH 7.4)]를, 균배양액 0.1 mL, LTT 용액 0.1 mL를 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼뜨려 굳게 하였다. 음성대조군은 멸균증류수 0.1 mL를, 양성대조군은 각각의 양성대조물질 용액을 동일한 방법으로 가하여 실시하였다. 처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 평판을 뒤집어 37 \pm 2°C에서 50 \pm 2시간 배양한 후 복귀돌연변이집락(이하 집락)을 육안으로 계수하였다. 시험결과값은 각 농도군당 3개의 평판으로부터 얻은 집락수의 평균 \pm 표준편차 및 음성대조군에 대한 증가배수로 나타내었다.

염색체이상시험

전체적인 염색체이상시험은 OECD guideline에 따라 진행하였다²⁵⁾. 염색체이상 유발을 평가에는 Chinese hamster lung (CHL)유래 세포를 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다(Cat. No. CRL-1935). CHL 세포는 10% fetal bovine serum을 포함한 minimum essential medium (Gibco, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, CO₂ 5% 조건에서 배양하였다. 시료는 멸균증류수에 현탁시켜 농도를 단계별로 희석하여 사용하였으며, 양성대조군은 대사활성계 적용(+S9 mix)시에는 B[α]P를, 대사활성계 비적용(-S9 mix)시에는 4NQO를 사용하였다. 염색체이상시험은 3 그룹[그룹-1: 대사활성계 적용, 6시간 처리 후 -18시간 회복(6+S), 그룹-2: 대사활성계 비적용, 6시간 처리 후 -18시간 회복(6-S), 그룹-3: 대사활성계 비적용, 24시간 처리 후 -0시간 회복(24-S)]으로 나누어 진행하였다. 배양면적 25 cm² 플라스크당 5 \times 10⁴ 개의 세포를 5 mL의 배양액에 파종하여 약 3일간 배양하였다. 그 후, 각 플라스크의 기존배양액을 제거하고 배양액 4.0 mL, 각 농도의 LTT 용액 0.5 mL 및 S9 mix 0.5 mL를 분주하였다. 대사활성계의 비적용군(-S9 mix)은 배양액 4.5 mL와 LTT 용액 0.5 mL만을 첨가하였다. 6시간 후 PBS로 세포 표면을 2-3회 세정하고 새로운 배지 5 mL 첨가하여 18시간 추가 배양하였다. 24시간 처리군은 배양액 4.5 mL, LTT 용액 0.5 mL를 첨가하여 24시간동안 배양하였다. 양성대조군에는 50 μ L의 B[α]P 및 4NQO를 각각 처리하여 총 합계액의 용량을 동일하게 조정하였다. LTT 용액 처리한 시점으로부터 약 22 시간 후에 모든 플라스크에 50 μ L의 콜히친액(Sigma-Aldrich)을 처리(최종농도 1 μ M)한 다음, 2시간 경과 후 진탕법으로 중기세포를 수거하였다. 중기세포를 포함한 배양액을 원심분리한 후, 저장액(75 mM KCl액)으로 처리하고 고정(메틸알콜:빙초산=3:1) 단계를 거쳐 공기건조법으로 염색체 검체를 제작

하고, 5% Giemsa액으로 염색하였다. 중기세포 수거 후 플라스크에 남아있는 세포를 0.1% 트립신액으로 분리 및 계수하여 relative increase in cell counts (RICC, %) 값을 산출하였다. 구조적 이상은 동원체 수가 23-27인 중기상에 대하여 동원체 수 및 염색체 이상의 유무를 관찰하였고, 염색체 이상이 관찰되면 이상의 종류 및 수를 기록하였다. 염색체 이상은 크게 염색체형 절단 및 교환[chromosome break (csb)와 chromosome exchange (cse)]과 염색분체형 절단 및 교환[chromatid break (ctb)와 chromatid exchange (cte)]으로 구별하여 계수하였으며, gap을 포함한 경우와 제외한 경우를 나누어 기록하였다²⁶⁾. 염색체 이상이 10개 이상 (gap 포함, multiple aberration)인 경우와 단편화(fragmentation)의 경우는 기타로 분류하여 1개의 이상으로 계수하였다. 수적 이상은 150 개의 중기상을 계수하면서 동원체의 수에 따라 diploid (23-36 동원체), polyploid (37≤동원체) 및 핵내배화(endoreduplication)로 분류하고, 그 수를 기록하였다.

마우스 골수세포를 이용한 소핵시험

OECD guideline에 따라 LTT의 생체내 염색체 이상의 유발 또는 유사분열기구에 대한 이상 유발 여부를 수컷 ICR 마우스의 체내 골수세포에서 소핵유발성을 지표로 하여 평가하였다²⁷⁾. 실험동물윤리규정에 따라 2010년 AAALAC International의 인증을 얻은 코아스템캠온(주) 비임상연구소 실험동물운영위원회의 승인(승인번호: CHEM-2023-IA0067-00)을 얻은 후 실험을 진행하였다. 동물은 온도 22±3°C, 상대습도 55±15 %, 조명시간 12시간(08:00-20:00), 조도 150-300 Lux로 사육하였다. 사료는 Teklad certified irradiated global 18% protein rodent diet (2918C, Envigo, Indianapolis, IN, USA)를 자유롭게 섭취하도록 하였다. LTT 용액의 투여량은 1250, 2500, 5000 mg/kg/day로 2일간 경구 투여용 존대를 장착한 주사기를 이용하여 위 내에 직접 투여하였고, 양성대조군인 cyclophosphamide monohydrate (CPA, Sigma-Aldrich)는 70 mg/kg bw/day 농도로 단회 복강투여하였다²⁸⁾. 골수검체는 보고된 방법에 따라 제작하였으며²⁹⁾, 최종투여로부터 24시간 후 대퇴골을 적출하여 Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)으로 골수를 씻어내어 세포현탁액을 220 ×g로 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 침전된 골수세포를 slide glass에 도말하여 메탄올에 5분간 고정 후 사용하였다. 형광염색액은 보고된 방법을 응용하여 제작하였으며³⁰⁾, 0.05% acridine orange base 수용액 (Sigma-Aldrich)을 Sorensen buffer (pH 6.8)로 희석하여 염색에 사용하였다. 형광현미경 하에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)는 적색으로 보이고, 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)는 형광이 거의 없으며 어두운 회색으로 보인다. 소핵이 있을 경우 적색 바탕에 녹색 점으로 나타난다³⁰⁾. 동물당 4000개의 PCE를 계수하면서 그 중 micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE,

소핵을 가진 다염성적혈구)의 수를 계수하였다. 소핵출현 빈도는 개체당 4000개의 PCE에서 관찰되는 MNPCE 수의 평균±표준편차로 나타내었다. 소핵유무에 상관없이 500 개의 RBC (red blood cell, PCE+NCE)를 계수하여 PCE/RBC(%), 평균±표준편차)를 산출해 세포독성의 지표로 하였다. 통계분석에는 SPSS 28 프로그램을 사용하였으며, $P<0.05$ 일때 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 소핵유발빈도는 비모수적 Kruskal-Wallis H-test를 실시하여 얻었다. 음성대조군과 양성대조군의 자료는 Mann-Whitney U-test로 유의성을 검정하였다. 농도의존성은 카이제곱검정의 선형대선형결합으로 검정하였다. PCE/RBC에는 One-way ANOVA를 적용하였고, 분산의 동질성은 Levene test로 검정하였으며, 음성대조군과 양성대조군 평균의 차이는 Student's *t*-test로 분석하였다.

Results and Discussion

LTT 중의 기능성성분 분석

LTT 중의 기능성성분의 함량을 분석한 결과 총 카로티노이드 함량이 728.7±23.6 µg/g DW이었으며, 그 중 lycopene 이 424.5±13.5 µg/g DW로 가장 많은 양을 함유하고 있었다(Fig. 1). 그 외에는 β-carotene (30.3±1.6 µg/g DW), lutein (6.4±0.3 µg/g DW)을 함유하고 있었다(Table 1). 유리아미노산을 분석한 결과, 총 아미노산 함량(51.1±0.4 mg/g DW) 중에 GABA의 함량이 18.7±0.1 mg/g DW로 높은 비중을 차지하고 있는 것을 확인하였다. 이들의 함량은 유전자교정 전의 wild type인 동유 250호 중의 라이코펜 함량 340.6±21.5 µg/g DW와 GABA 함량 7.8±0.1 mg/g DW에 비해 라이코펜 함량이 1.3배, GABA 함량이 2.4배 증가하였다. 이러한 결과는 이전에 보고된 라이코펜과 GABA 함

Table 1. Antioxidant constituents in the wild type tomato and LTT

Items	Dongyu 250ho (wild type)	LTT
Lutein (µg/g)	9.2±0.1	6.4±0.3***
β-Carotene (µg/g)	36.4±2.7	30.3±1.6*
Lycopene (µg/g)	340.6±21.5	424.5±13.5**
Other carotenoids (µg/g)	266.5±20.4	267.5±8.2
Total carotenoids (µg/g)	652.7±44.7	728.7±23.6*
GABA (mg/g)	7.8±0.1	18.7±0.1***
Total amino acids (mg/g)	44.4±1.1	51.1±0.4***

Data are expressed as the mean (the average value of content for dry weight) and SD (the standard deviation value) of three independent experiments.

* Significantly different from the wild type at $P<0.05$

** Significantly different from the wild type at $P<0.01$

*** Significantly different from the wild type at $P<0.001$

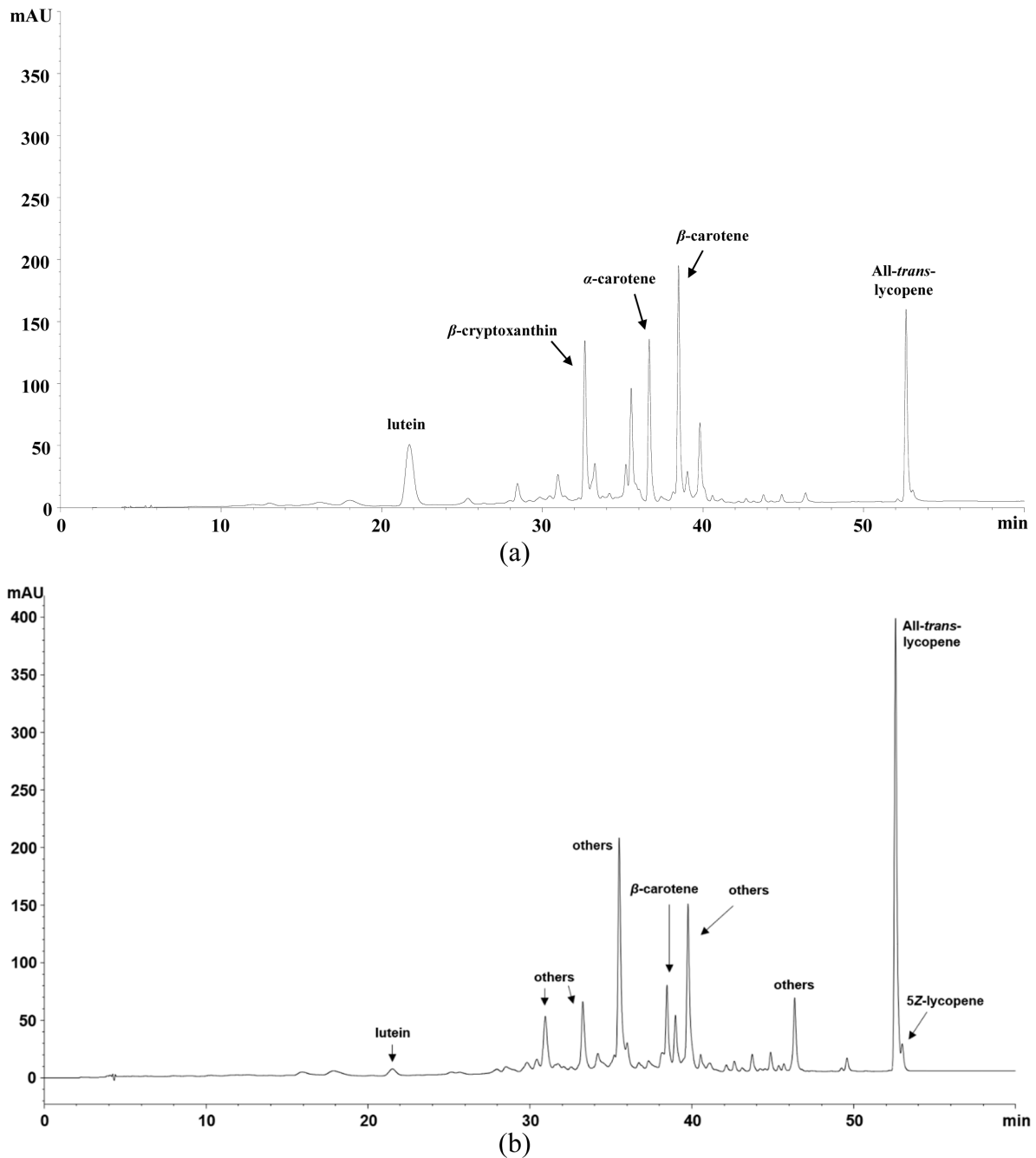


Fig. 1. HPLC chromatograms of standard solution (a, 20 µg/mL) and the LTT (b) (450 nm).

량이 늘어난 유전자교정 토마토의 함량 분석과 유사한 결과를 나타내었다¹⁸⁾.

미생물복귀돌연변이시험

복귀돌연변이시험은 염기쌍 치환 돌연변이로 변형된 균주(*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, *Escherichia coli* WP2 *uvrA*)와 틀밀림 돌연변이(frameshift)로 변형된 균주(*S. typhimurium* TA98, TA1537)를 이용하여 히스티딘 및 트립토판 요구성 균주로 되돌아가는 복귀변이원을 확

인하는 방법으로, 다양한 화학물질의 변이원성을 민감하게 검출할 수 있다. 살모넬라 TA균주의 *rfa* 돌연변이는 세포벽의 지질다당체 장벽의 합성에 관련된 유전자에 일어난 돌연변이로서, 이 돌연변이로 인한 장벽의 손상은 일부 큰 분자량의 화학물질에 대한 세포벽의 투과성을 높여준다. DNA 손상의 절제회복에 관련된 유전자에 일어난 *uvrA* 혹은 *uvrB* 돌연변이는 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 높여준다. 또한, 대사활성제인 설치류 간의 S9를 사용하여 시험물질과 그 대사물의 유전독성을 확인할 수 있다³¹⁾.

Table 2. Reverse mutagenicity assay with transgenic tomatoes (LTT)

Strain	Chemical treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate	
			Without S9 mix	With S9 mix
<i>S. typhimurium</i> TA 100	Negative control	0	96 \pm 3	96 \pm 4
	LTT	50	89 \pm 9	85 \pm 9
		150	92 \pm 4	103 \pm 7
		500	89 \pm 7	104 \pm 5
		1500	106 \pm 6	98 \pm 9
		5000	120 \pm 2	111 \pm 5
	2-AA ¹⁾	1.0	1885 \pm 101	-
SA ²⁾	0.5	-	391 \pm 23	
<i>S. typhimurium</i> TA 1535	Negative control	0	14 \pm 1	12 \pm 2
	LTT	50	16 \pm 2	12 \pm 1
		150	12 \pm 2	13 \pm 2
		500	12 \pm 2	10 \pm 3
		1500	13 \pm 1	10 \pm 1
		5000	15 \pm 1	15 \pm 2
	2-AA	1.0	281 \pm 17	-
SA	0.5	-	443 \pm 30	
<i>S. typhimurium</i> TA 98	Negative control	0	32 \pm 4	25 \pm 2
	LTT	50	25 \pm 5	21 \pm 2
		150	28 \pm 5	20 \pm 3
		500	30 \pm 5	20 \pm 4
		1500	28 \pm 4	20 \pm 4
		5000	27 \pm 5	23 \pm 2
	B[α]P ³⁾	1.0	202 \pm 15	-
2-NF ⁴⁾	0.5	-	443 \pm 24	
<i>S. typhimurium</i> TA 1537	Negative control	0	15 \pm 3	15 \pm 2
	LTT	50	13 \pm 2	13 \pm 1
		150	14 \pm 2	12 \pm 1
		500	12 \pm 2	12 \pm 2
		1500	14 \pm 6	12 \pm 1
		5000	12 \pm 4	13 \pm 2
	2-AA	1.0	276 \pm 19	-
ICR-191 ⁵⁾	0.5	-	143 \pm 13	
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	Negative control	0	19 \pm 2	19 \pm 2
	LTT	50	22 \pm 2	21 \pm 1
		150	20 \pm 2	17 \pm 2
		500	20 \pm 3	18 \pm 2
		1500	19 \pm 3	21 \pm 3
		5000	17 \pm 2	15 \pm 2
	2-AA	1.0	171 \pm 18	-
4NQO ⁶⁾	0.5	-	132 \pm 13	

¹⁾2-AA: 2-aminoanthracene, ²⁾SA: sodium azide, ³⁾B[α]P: benzo[α]pyrene, ⁴⁾2-NF: 2-nitrofluorene, ⁵⁾ICR-191: acridine mutagen ICR 191, ⁶⁾4NQO: 4-nitroquinoline-1-oxide.

LTT의 최고농도(5000 µg/mL)와 S9 mix 용액의 무균성을 확인하기 위한 예비실험에서 agar plate 상에 미생물 오염으로 인한 집락이 관찰되지 않았으므로 해당 농도를 최고 농도로 하여 복귀돌연변이 시험에 사용하였다. 시험 결과, LTT 처리군은 모든 시험 균주에서 대사활성계 적용 및 비적용 시 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 집락 수의 증가를 나타내지 않았고, 농도 의존적으로 집락 수가 증가하지 않았다(Table 2). 한편, 대사활성계 적용시 양성대조군으로 사용한 2-AA, B[α]P 처리군에선 음성대조군에 비해 약 6-20배의 분명한 복귀돌연변이 집락이 관찰되었다. 또한, 대사활성계 비적용시 양성대조군으로 사용한 SA, 2-NF, ICR-191, 4NQO 처리군에서는 음성대조군에 비해 약 4-35배의 분명한 복귀돌연변이 집락이 관찰되었다. 시험에 사용한 5개 균주는 흡광도 600 nm 파장에서 생균수를 측정 한 결과 1.35-1.68×10⁹ (TA균주) 및 1.38×10⁹ (*E. coli*) CFU/mL이었으며, 모든 플레이트당 처리된 생균수는 0.5×10⁸ CFU 이상이였다. 따라서, 이전의 연구논문 결과³²⁾와 비교하여 본 연구에 사용된 유전자교정토마토인 LTT는 *Salmonella typhimurium*과 *Escherichia coli*에 대한 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단하였다.

표유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

LTT의 염색체이상시험 시험은 대사활성계 적용 및 비적용 하에서 염색체형과 염색체분형의 교환 및 절단이 확인되는 염색체이상의 계수를 통한 염색체 수나 구조의 변

화를 보이는 중기상의 빈도를 평가하였다. 염색체이상시험에 앞서, LTT의 CHL 세포에 세포독성을 확인하였다. 그 결과 대사활성계 적용 여부와 관계없이 LTT 처리군 모든 농도군에서 RICC 86-106% 이내로 세포독성은 관찰되지 않았으며, 혼탁 및 침전이 관찰되는 500 µg/mL을 최고농도로 결정하였다(Table 3).

구조적이상 중기상은 염색체형 절단 및 교환(csb, cse)과 염색체분형 절단 및 교환(ctb, cte), 기타(염색체이상이 10개 이상인 경우와 단편화)를 합친 값이며, 수적이상 중기상은 PP+ER를 계수하였다. 단시간처리법 시험(6+S와 6-S)에서, 대사활성계 적용시(6+S)에 LTT 125, 250 및 500 µg/mL의 구조적이상 중기상의 빈도는 각각 0.33, 0.00, 0.00 및 0.00%였으며, 수적이상 중기상의 빈도는 0.00, 0.00, 0.33 및 0.00%였다(Table 4). 대사활성계 비적용시(6-S)에 LTT 125, 250 및 500 µg/mL의 구조적이상 중기상의 빈도는 각각 0.33, 0.00, 0.00 및 0.00%였으며, 수적이상 중기상의 빈도는 0.00, 0.00, 0.00 및 0.33%였다. 연속처리법 시험(24-S)에서 LTT 125, 250 및 500 µg/mL의 구조적이상 중기상의 빈도는 각각 0.00, 0.00, 0.00 및 0.00%였으며, 수적이상 중기상의 빈도는 0.00, 0.33, 0.00 및 0.00%였다.

모든 계열의 LTT 처리군에서 염색체의 구조적 및 수적 이상을 가진 중기상의 출현빈도가 음성대조군에 비해 통계적으로 유의미한 증가를 나타내지 않았다. 한편, 양성대조군으로 사용한 B[α]P와 4NQO 한 처리군에서는 분명한 구조적 이상중기상 (6+S: 10.67%, 6-S: 6.33%, 24-S:

Table 3. Cytotoxicity activity of transgenic tomatoes (LTT) on CHL cell line

Chemical treated	Dose (µg/mL)	S9 mix	Trt-Rec Time	RICC ¹⁾ (%)
Negative control	0			100
LTT	125	+	6-18	101
	250			105
	500			106
B[α]P ²⁾	20			75
Negative control	0			100
LTT	125	-	6-18	97
	250			96
	500			98
4NQO ³⁾	0.4			70
Negative control	0			100
LTT	125	-	24-0	92
	250			88
	500			86
4NQO	0.4			72

¹⁾RICC (%): relative increase in cell count (%) = $\frac{\text{cell count of treated flask} - \text{initial cell count}}{\text{cell count of control flask} - \text{initial cell count}} \times 100$

²⁾B[α]P: benzo[α]pyrene (positive control), ³⁾4NQO: 4-nitroquinoline-1-oxide (positive control).

Table 4. Chromosome aberration assay with transgenic tomatoes (LTT)

Chemical treated	Dose (µg/mL)	S9 mix	Trt-Rec Time ¹⁾	Number of structural aberrations					PP ²⁾ +ER ³⁾		Number of aberrant metaphases	
				csb ⁴⁾	cse ⁵⁾	ctb ⁶⁾	cte ⁷⁾	Others ⁸⁾	Gaps ⁹⁾	No.	+Gaps	-Gaps
Negative control	0			0	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5
	125			0	0	0	0	0	0	0	0	0
	LTT	250	+	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0
	500			0	0	0	0	0	0	0	0	0
B[α]P ¹⁰⁾	20			0	1.5	1.5	18	0	0	0.5	16	16
Negative control	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0
	125			0	0	0	0	0	0	0.5	0	0
	LTT	250	-	6-18	0	0	0	0	0	0	0	0
	500			0	0.5	0	0	0	0	0	0.5	0.5
4NQO ¹¹⁾	0.4			0	2	0	13	1	0	1	9.5	9.5
Negative control	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0
	125			0	0	0	0	0	0	0.5	0	0
	LTT	250	-	24-0	0	0	0	0	0	0	0	0
	500			0	0	0	0	0	0	0	0	0
4NQO	0.4			0	2.5	5.0	9.5	1.0	0	0.5	9.5	9.5

¹⁾Treat recovery time, ²⁾PP: polyploid, ³⁾ER: endoreduplication, ⁴⁾csb: chromosome type break, ⁵⁾cse: chromosome type exchange, ⁶⁾ctb: chromatid type break, ⁷⁾cte: chromatid type exchange, ⁸⁾Others: metaphases with more than 10 aberrations (inclusive of gaps) or with chromosome fragmentation, ⁹⁾Gaps: chromosome type + chromatid type gaps, ¹⁰⁾B[α]P: benzo[α]pyrene (positive control), ¹¹⁾4NQO: 4-nitroquinoline-1-oxide (positive control)

6.33%)을 관찰하였다. 따라서, 이전의 연구논문 결과³³⁾와 비교하여 본 연구에 사용된 유전자교정토마토인 LTT는 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단하였다.

마우스 골수세포를 이용한 소핵시험

적혈모세포는 마우스 골수 내에서 탈핵 과정을 지나 다염성 적혈구(PCE)가 되며, 이후 성숙 적혈구가 되어 혈관으로 이동하게 된다. 이 과정에서, 돌연변이 유발원이 있다면 핵이 있는 적혈모세포의 염색체 변이가 발생하여 더 이상 분화하지 못하고 유전자 조각이 파편으로 다염성 적혈구 내에 남게 된다. 이렇게 생성된 작은 핵을 소핵이라 하며, 소핵은 암 등을 유발할 수 있어 유전독성의 측정방법으로 사용된다. 소핵이 많이 관찰될수록 시험물질이 돌연변이를 유발한다고 평가한다³⁴⁾.

소핵시험은 개체당 4000개의 다염성적혈구에서 관찰된 소핵을 가진 다염성 적혈구(MNPCE)의 발생빈도를 확인하였다(Table 5). 음성대조군에서 MNPCE가 관찰되지 않았으며, LTT 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day 처리군에서의 MNPCE 값은 각각 1.17, 0.83 및 0.67이었다. 모든 LTT 처리군에서 음성대조군과 비교하여 소핵의 발생빈도가 통계적으로 유의미한 증가를 나타내지 않았다. 양성대조군인 CPA 처리군에서는 소핵 발생빈도가 86.33으로, 음성대

조군에 비해 분명한 증가가 관찰되었다($P < 0.01$).

세포독성의 지표인 다염성적혈구/적혈구(PCE/RBC)의 비율은 500개의 적혈구를 계수하여 산출되었다. PCE/RBC 비율은 LTT 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day 처리군에서는 각각 52.0, 49.5 및 50.3%로, 모든 LTT 처리군에서 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의미한 변화는 없었다. 양성대조군에서는 PCE/RBC 비율이 47.5%로, 음성대조군에 비하여 통계적으로 유의미한 감소가 나타났다($P < 0.05$). 따라서, LTT는 마우스 체내 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 확인되었다. 이전에 보고된 연구에 따르면, 토마토와 라이코펜은 HepG2 세포에서 소핵을 발생시키지 않았다³⁵⁾.

이상으로 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 라이코펜과 GABA 함량을 증가시킨 유전자교정 토마토(LTT)는 복귀 돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험에서 유전독성을 유발하지 않는 것으로 평가되었다. 이러한 결과는 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 새로운 유전자교정작물이 기존 농작물과 비교해서 인체에 위험을 일으키지 않는다는 Nicolia 등³⁶⁾의 연구결과와 일치한다. 일본에서는 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 GABA 함량이 증가된 가바토마토를 개발하여 2021년에 세계 최초로 상업화되었고, 미국과 영국, 캐나다 등에서도 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 작물이

Table 5. Micronucleus assay with transgenic tomatoes (LTT)

Sex	Chemical Treated	Dose (mg/kg/day)	Number of animals	MNPCE ¹⁾ /PCE ²⁾ (%, mean ± SD)	PCE/RBC ³⁾ (%, mean ± SD)
Male	Negative control	0	6	0.83 ± 0.98	52.2 ± 3.60
		1250		1.17 ± 1.17	52.0 ± 2.37
	LTT	2500		0.83 ± 0.98	49.5 ± 3.73
		5000		0.67 ± 0.52	50.3 ± 3.88
	CPA ⁴⁾	70		86.33 ± 20.75**	47.5 ± 2.88*

* Significantly different from the control group at $P < 0.05$.

** Significantly different from the control group at $P < 0.01$.

¹⁾MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocyte.

²⁾PCE: polychromatic erythrocyte.

³⁾RBC: red blood cells [polychromatic erythrocyte (PCE)+normochromatic erythrocyte (NCE)].

⁴⁾CPA: cyclophosphamide monohydrate (positive control).

판매되고 있다. 하지만 우리나라는 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 개발된 작물에 대한 안전성문제로 아직까지 허가가 나오지 않은 실정이다. CRISPR/Cas9 시스템도 off-targets와 같은 극복해야 할 문제가 있기는 하지만, 막연한 불안보다는 안전성에 대한 과학적 자료를 뒷받침하는 것이 필요하다. 이러한 측면에서 본 연구결과는 향후 CRISPR/Cas9 시스템을 활용한 유전자교정 작물의 유전독성을 평가하는 기초 자료로 사용될 수 있을 것이다. CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 고기능성 항산화물질함유 토마토는 향후 단회투여독성시험, 4주 및 13주 반복투여 독성시험 등의 추가적인 독성평가를 통해 안전성이 확보된다면 기능성 소재로서의 활용을 기대할 수 있다.

Acknowledgments

이 논문은 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 2021R111A4A0105729511)의 지원을 받아 수행하였으며, 유전독성시험 분석은 비임상시험수탁전문기관(CRO)인 코아시스템캠온(주)의 도움을 받아 진행되었습니다. 이에 감사드립니다.

국문요약

최근 전세계적으로 기능성 성분이 강화된 유전자교정 작물의 생산 및 소비가 증가하고 있다. 하지만 유전자교정 작물의 유전독성에 관한 소비자의 우려도 증가하고 있어 과학적인 자료 확보 및 정보 공유에 대한 인프라가 필요한 실정이다. 본 연구에서는 CRISPR/Cas9 시스템을 활용한 유전자교정 토마토 동결건조물(LTT)이 DNA나 염색체에 직접적인 손상을 일으키고 형태적 또는 기능적 이상을 유발하는지 여부를 확인하기 위해 유전독성 평가를 수행하였다. 이를 위하여 미생물 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 골

수세포를 이용한 체내 소핵시험을 국제적으로 표준화된 OECD Guidelines에 따라 시험을 진행하였다. 복귀돌연변이 시험에서 LTT는 S9의 존재 여부와 관계없이 *Salmonella typhimurium* 균주 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537, 그리고 *Escherichia coli* WP2 *uvrA*에서 복귀돌연변이를 유발하지 않았다. LTT는 CHL 세포의 수적이상 증기상과 구조적 이상 증기상 등의 염색체 이상을 유발하지 않았다. 또한, LTT는 다염성 적혈구에서 소핵화된 다염성 적혈구의 빈도를 증가시키지 않았다. 이러한 연구를 통해 CRISPR/Cas9 시스템을 활용한 유전자교정 토마토의 안전성을 검증하고, 향후 CRISPR/Cas9 시스템을 활용한 유전자교정 작물의 유전독성을 평가하는 기초 자료로 사용될 수 있을 것이다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Dong-Min Kang <https://orcid.org/0000-0002-3190-792X>
 Woo-Jin Jeong <https://orcid.org/0009-0008-1711-0210>
 Bashu Dev Neupane <https://orcid.org/0009-0000-9179-3998>
 Yu Jin Jung <https://orcid.org/0000-0002-2134-8335>
 Kwon Kyoo Kang <https://orcid.org/0000-0002-5887-0741>
 Mi-Jeong Ahn <https://orcid.org/0000-0002-1201-0746>

References

- Bhowmik, D., Kumar, K.P.S., Paswan, S., Srivastava, S., Tomato a natural medicine and its health benefits. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, **1**, 33-43 (2012).
- Borguini, R.G., Ferraz Da Silva Torres, E.A., Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. *Food Rev. Int.*,

- 25, 313-325 (2009).
3. Toor, R.K., Savage, G.P., Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Res. Int.*, **38**, 487-494 (2005).
 4. Rivero, A.G., Keutgen, A.J., Pawelzik, E., Antioxidant properties of tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by cultivar and processing method. *Horticulturae*, **8**, 547 (2022).
 5. Fraser, P.D., Truesdale, M.R., Bird, C.R., Schuch, W., Bramley, P.M., Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (evidence for tissue-specific gene expression). *Plant Physiol.*, **105**, 405-413 (1994).
 6. Li, X., Wang, Y., Chen, S., Tian, H., Fu, D., Zhu, B., Luo, Y., Zhu, H., Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Front. Plant Sci.*, **9**, 559 (2018).
 7. Rosati, C., Aquilani, R., Dharmapuri, S., Pallara, P., Marusic, C., Tavazza, R., Bouvier, F., Camara, B., Giuliano, G., Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J.*, **24**, 413-419 (2000).
 8. Galpaz, N., Wang, Q., Menda, N., Zamir, D., Hirschberg, J., Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *Plant J.*, **53**, 717-730 (2008).
 9. Wu, X., Jia, Q., Ji, S., Gong, B., Li, J., Lü, G., Gao, H., Gamma-aminobutyric acid (GABA) alleviates salt damage in tomato by modulating Na⁺ uptake, the GAD gene, amino acid synthesis and reactive oxygen species metabolism. *BMC Plant Biol.*, **20**, 465 (2020).
 10. Nonaka, S., Arai, C., Takayama, M., Matsukura, C., Ezura, H., Efficient increase of γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Sci. Rep.*, **7**, 7057 (2017).
 11. Lino, C.A., Harper, J.C., Carney, J.P., Timlin, J.A., Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.*, **25**, 1234-1257 (2018).
 12. Liu, Q., Yang, F., Zhang, J., Liu, H., Rahman, S., Islam, S., Ma, W., She, M., Application of CRISPR/Cas9 in crop quality improvement. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 4206 (2021).
 13. Lusser, M., Parisi, C., Plan, D., Rodriguez-Cerezo, E., Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nat. Biotechnol.*, **30**, 231-239 (2012).
 14. Gaj, T., Gersbach, C.A., Barbas, C.F. III., ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.*, **31**, 397-405 (2013).
 15. Ricroch, A., Clairand, P., Harwood, W., Use of CRISPR systems in plant genome editing: Toward new opportunities in agriculture. *Emerg. Top. Life Sci.*, **1**, 169-182 (2017).
 16. Waltz, E., GABA-enriched tomato is first CRISPR-edited food to enter market. *Nat. Biotechnol.*, **40**, 9-11 (2022).
 17. Combs, R., Bilyeu, K., Novel alleles of *FAD2-1A* induce high levels of oleic acid in soybean oil. *Mol. Breeding*, **39**, 79 (2019).
 18. Kim, J.Y., Kim, J.H., Jang, Y.H., Yu, J., Bae, S., Kim, M.S., Cho, Y.G., Jung, Y.J., Kang, K.K., Transcriptome and metabolite profiling of tomato SGR-knockout null lines using the CRISPR/Cas9 system. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 109 (2023).
 19. Kim, J.M., Park, H.R., Plan for establishing cooperative governance of biotechnology policy-focusing on enhancing social acceptance of gene editing technology. *Korean Public Manag. Rev.*, **37**, 145-167 (2023).
 20. Kang, D.M., Kwon, J.M., Jeong, W.J., Jung, Y.J., Kang, K.K., Ahn, M.J., Antioxidant constituents and activities of the pulp with skin of Korean tomato cultivars. *Molecules*, **27**, 8741 (2022).
 21. Kim, H.J., Park, W.S., Bae, J.Y., Kang, S.Y., Yang, M.H., Lee, S., Lee, H.S., Kwak, S.S., Ahn, M.J., Variations in the carotenoid and anthocyanin contents of Korean cultural varieties and home-processed sweet potatoes. *J. Food Compost. Anal.*, **41**, 188-193 (2015).
 22. Tilahun, S., Choi, H.R., Baek, M.W., Cheol, L.H., Kwak, K.W., Park, D.S., Solomon, T., Jeong, C.S., Antioxidant properties, γ -aminobutyric acid (GABA) content, and physicochemical characteristics of tomato cultivars. *Agronomy*, **11**, 1204 (2021).
 23. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 2020. Test No. 471: bacterial reverse mutation test, OECD Publishing, Paris, France, pp. 1-11.
 24. Maron, D.M., Ames, B.N., Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173-215 (1983).
 25. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 2016. Test No. 473: *In Vitro* mammalian chromosomal aberration test, OECD Publishing, Paris, France, pp. 1-22.
 26. Japanese Environmental Mutagen Society- Mammalian Mutagenicity Study Group (JEMS-MMS), 1988. Atlas of chromosome aberration by chemicals, Tokyo, Japan.
 27. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 2016. Test No. 474: mammalian erythrocyte micronucleus test, OECD Publishing, Paris, France, pp. 1-21.
 28. Stroda, K.A., Murphy, J.D., Hansen, R.J., Brownlee, L., Atencio, E.A., Gustafson, D.L., Lana, S.E., Pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide in cats after oral, intravenous, and intraperitoneal administration of cyclophosphamide. *Am. J. Vet. Res.*, **78**, 862-866 (2017).
 29. Schmid, W., The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9-15 (1975).
 30. Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M.Jr., An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.*, **120**, 241-247 (1983).
 31. Ku, J., Hwang, J.H., Genotoxicity evaluation using reversion mutation test of SU-Eohyeol pharmacopuncture. *J. Physiol. Pathol. Korean Med.*, **36**, 113-119 (2022).
 32. Kim, H.B., Park, H.U., Lee, J.Y., Kwon, H.J., Lack of Mutagenicity of green pigments in *Salmonella typhimurium*. *J. Food Hyg. Safety*, **26**, 242-247 (2011).
 33. Yun, J.H., Park, I.J., Park, S.H., Choi, G.H., Kim, H.J., Cho, J.H., Genotoxicity study of *Litsea japonica* fruit flesh extract. *J. Food Hyg. Saf.*, **33**, 207-213 (2018).
 34. Hong, S.G., Chung, S.G., Hyun, S.H., The micronucleus test of the diglyceride preparation with conjugated linoleic acid by using mice. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**, 853-857 (2008).
 35. Scolastici, C., Alves de Lima, R.O., Barbisan, L.F., Ferreira, A.L., Ribeiro, D.A., Salvadori, D.M., Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicol In Vitro*, **22**, 510-514 (2008).
 36. Nicolai, A., Manzo, A., Veronesi, F., Rosellini, D., An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Crit. Rev. Biotechnol.* **34**, 77-88 (2014).