감마선 조사된 채취 미역의 유전독성학적 안전성 평가

최종일 · 김재훈 · 송범석 · 김재경 · 이주운* · 전병수[1]
안동현[1] · 변명우[2] · 박경숙[3]

한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소, [1]부경대학교 식품생명공학부
[2]우송대학교 식품생물과학과, [3]장안대학교 식품영양학과

Genotoxicological Safety of *Undaria pinnatifida* Gamma-irradiated after Harvest

Jong-il Choi, Jae-Hun Kim, Beom-Seok Song, Jaekyung Kim, Ju-Woon Lee*, Byung-Soo Chun[1], Dong-Hyun Ahn[1], Myung-Woo Byun[2] and Kyung-Sook Park[3]

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea
[1]*Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*
[2]*School of Food Science and Biotechnology, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea*
[3]*Department of Food and Nutrition, Jangan University, Hwaseong 445-756, Korea*

Abstract - This study was conducted to evaluate the genotoxcity of gamma-irradiated *Undaria pinnadifida* after harvest for enhancing the storage and microbial safety during drying process. The harvested seaweed was irradiated with the doses of 1 and 10 kGy. The genotoxicity was evaluated by Ames test (*Salmonella typhimurium* reversion assay) and SOS chromotest. The results from all samples were negative in the bacterial reversion assay with *S. typhimurium* TA98 and TA100. No mutagenicity was detected in the assay, at both with and without metabolic activation. The SOS chromotest also indicated that the gamma-irradiated *U. pinnadifida* did not show any mutagenicity. Therefore, this study indicated that gamma irradiation could be used for extending the shelf-life of *U. pinnadifida*.

Key words : Ames test, Gamma irradiation, Genotoxicity, SOS chromotest, *Undaria pinnadifida*

서 론

오늘날 국가 간 식량교역은 세계 경제의 균형을 유지시켜주며 그 시장은 날로 확대되고 있다. 각국은 국제식량교역에 있어서 안전을 극대화하기 위하여 공중보건법과 검역 관리를 엄격히 다루고 있다. 그러므로 식량교역에 있어서 가장 어려운 점은 수출입 식품의 안전성, 즉 생물학적, 화학적 측면에서의 안전성을 확보하는데 있다 (Robert and Unnevehr 1994). 최근 세계 각국에서 식품에 사용되는 보존제나 ethylene dibromide, ethylene oxide, methyl bromide 등의 훈증처리가 유해성분의 생성 및 잔류로 발암성 등 건강장해와 환경공해를 일으킬 수 있기 때문에. 그 사용이 금지되거나 제한되고 있다. 이에 대한 대체방안으로 국제기구 및 선진 여러 나라에서는 건전성과 경제성이 공인된 방사선 조사기술의 사용을 적극 검토하고 있다 (FAO/IAEA/WHO Study group 1999). 국내도 1987, 1988, 1991 및 1995년에 4차례에 걸쳐 총 18

* Corresponding author: Ju-Woon Lee, Tel. +82-63-570-3204, Fax. +82-63-570-3207, E-mail. sjwlee@kaeri.re.kr

개 품목의 식품조사가 허가되었으며 기존품목을 확대하여 복합조미식품류를 비롯한 7개 품목이 2004년 5월 추가로 허가되었다(KFDA 2004).

최근 식생활수준의 향상에 따라 수산 가공품의 소비가 증가되고 있다. 이중에서 미역(*Undaria pinnatifida*)은 다시마목(Order Laminariales) 미역과(Family Alariaceae)에 속하는 일년생 해조류로서 한국, 일본 및 중국 북부 지방을 중심으로 양식되고 있으며, 채취된 후 생물형태 및 건조된 형태로 많이 소비되고 있다. 이를 이용한 미역국은 한국의 고유한 음식으로서 일상의 식사와 출산 후 산모의 회복 및 유즙 분비 촉진을 위하여 주로 섭취되고 있다. 미역은 Ca, Fe 및 I 등과 같은 무기질이 풍부할 뿐만 아니라 미역의 세포막 구성성분으로 다량 존재하는 알긴산은 콜레스테롤 배출작용, 중금속(Cd)과 방사능 물질(Sr)의 체내 흡수 억제 및 배출작용과 정장작용 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Suzuki *et al*. 1993).

최근 식품의 위생화 증진과 저장성을 연장할 수 있는 방사선 조사 기술을 이용한 미역의 저장성에 관한 연구가 보고되었다(Kim *et al*. 2009). 채취한 미역의 감마선 조사로 건조기간 동안의 미생물 제어가 확인되어, 양식업체나 가공업체에 저장성 연장과 함께 소비자까지의 식품 안정성을 증진시킬 수 있었다. 그러나, 감마선 조사 기술을 이용해서 만든 식품, 의약품 및 화장품의 안전성에 대한 소비자들의 부정적인 선입견이 여전히 남아있기 때문에 이를 해결하기 위한 꾸준한 노력도 필요하다(Yook *et al*. 2004).

Ames test는 *Salmonella typhimurium* LT2 strain에서 유래한 히스티딘 요구성 돌연변이주를 이용하여 간단히 복귀돌연변이를 검출할 수 있는 시험법으로 TA100은 base pair substitution mutaion을 TA98은 frameshift mutation을 검출하기 위해 만든 균주이다(Ames *et al*. 1975). 이 시험법은 발암성 물질에 대해 높은 감수성을 나타내어 일본의 경우, 노동성의 노동안전위생법 또는 후생성 · 통산성의 화심법 등에도 채택되고 있다(Han *et al*. 2006).

따라서 본 연구에서는 미역의 저장성 증진을 위해 사용된 감마선 조사기술의 이용을 실용화하기 위하여 채취한 미역의 감마선 조사의 유전독성학적 안전성 평가를 Ames test와 SOS chromotest를 이용하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 감마선 조사

본 연구에서 사용한 미역은 전라남도 완도에서 채취한 다음 흐르는 물로 세정하여 실험에 사용하기 전까지 4°C에 보관하였다. 모든 실험은 3일 이내 보관된 미역만을 사용하였다.

감마선 조사는 한국원자력연구원 방사선과학연구소(Jeongeup, Republic of Korea) 내 선원 11.1 PBq, ^{60}Co 감마선 조사시설(point source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co. Ltd, Ottawa, Canada)을 이용하였다. 준비된 시료인 수확된 미역을 실온에서 시간당 10 kGy의 선량율로 0, 1 및 10 kGy의 흡수선량을 얻도록 하였다. 흡수선량 확인은 alanine dosimeter(5 mm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구(IAEA)의 규격에 준용하여 표준화 한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2% 이내였다.

2. *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀 돌연변이 시험 (Ames test)

복귀 돌연변이 시험은 Ames test(Ames *et al*. 1975; Maron and Ames 1983)를 이용하여 측정하였다. 시험에 사용된 균주는 *Salmonella typhimurium* LT2를 친주로 하는 *S. typhimurium* TA98과 TA100이었고, 이들 균주는 사용에 앞서 필요시 균주의 유전자형 확인을 위해 histidine 요구성 여부, UV에 대한 민감도(*uvr*B 돌연변이), *rfa* 돌연변이의 유지여부 및 R-factor에 의한 ampicillin 또는 tetracycline 내성 등의 유전형질을 확인한 후 시험에 사용하였다.

본 실험에 사용된 균주는 Molecular Toxicology Inc.(Boone, NC, USA)에서 구입하여 형질을 확인한 후 한국화학연구소 안전성 센터에서 계대 배양 중인 것을 시험에 사용하였다. 유전형질이 확인된 균주는 nutrient broth No. 2 (Oxoid Ltd., Hampshire, England, UK)에 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 약 10시간 진탕배양(Vision Scientific Co., Korea)한 후 시험에 사용하였다.

대사활성을 위한 간 균질액(S9 fraction)은 Sprague-Dawley rat의 간으로부터 분리한 것으로 Oriental Yeast Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, 5%(v/v)의 S9 mixture를 제조하여 사용하였다. S9 mixture는 0.5 ml plate^{-1}로 처리했으며, 그의 활성은 2-aminoanthracene(2-AA)의 돌연변이 유발로 확인하였다. 음성대조물질로는 시험물질의 조제에 사용한 증류수를 사용하였으며, 양성대조물질로는 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO), sodium azide (SA) 및 2-AA를 Sigma사(St Louis MO, USA)로부터 구입하여 이용하였다. 복귀돌연변이 시험은 미역의 열수 추출물을 멸균 식염수에 10진 희석법으로 10배 희석하여 용해한 후 각각 1,250～5,000 μg의 농도로 시험구당 2개

의 plate를 사용하여 direct plate incorporation 방법으로 실시하였다(Maron and Ames, 1983).

시험물질의 처리는 대사활성계 적용(+S) 및 미적용(−S)하여 direct plate incorporation 방법으로 하였으며, 각 농도군당 2개 plate를 사용하였다. 시험물질 0.1 ml과 S9 mixture (또는 멸균증류수) 0.5 ml에 배양액 0.1 ml을 top agar에 혼합하여 minimal glucose agar plate에 부어 고화시킨 다음, 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 집락수를 계수하였다.

시험 결과는 복귀돌연변이 집락수의 평균과 표준편차로 나타내었으며, 돌연변이 유발성의 판정은 복귀변이 집락수가 용매 대조군의 2배 이상이면서 용량의존성을 갖는 경우를 양성으로 하였다.

3. SOS chromotest

1) 실험균주 및 균주의 형질확인

실험에 사용된 균주는 *Escherichia coli* GC4436으로부터 유래된 *E. coli* PQ37로써 균주는 30% glycerol과 LB broth에서 하룻밤 배양한 균액을 1 : 1로 혼합하여 −20 °C에 보관하였다. 사용균주는 6개월마다 새로 준비하였으며 그때마다 *uvrA* mutation, *rfa* mutation과 PHO^c gene의 constitutivity 및 *sftA::lacZ* fusion의 inducibility를 검사하였다.

2) 돌연변이원 실험

Frame shift mutation과 point mutation을 동시에 측정할 수 있는 이 실험에서 Quillardet와 Hofnung의 방법(1985)을 변형시킨 Baik과 Ham의 방법(1990)을 이용하였다. 냉동 보관된 PQ37균액 50 µl를 12 ml LB medium (peptone 4 g, yeast extract 2 g 및 sodium chloride 4 g을 증류수 400 ml에 용해)에 접종하고 37°C에서 A_{600} 측정치가 1.0에 이를 때까지 2시간 정도 진탕 배양하였다. 얻어진 균액을 LB medium에 1/4로 희석하여 각 농도별로 준비된 시료 20 µl와 돌연변이원인 Mitomycin C (Sigma사)를 30 µl 혼합하여 90분간 37°C에서 배양하여 SOS 반응을 유도한 후 한쪽에는 β-galactosidase의 활성 측정을 위하여 B-buffer 1.8 mL을 첨가하여 37°C에서 5분간 배양한 다음 o-nitrophynyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) 400 µl을 첨가하였고, 다른 쪽에는 alkaline phosphate의 활성 측정을 위해 P-buffer 1.8 ml을 첨가하여 37°C에서 5분간 배양한 후 P-nitrophenyl phosphate disodium (PNPP) 400 µl를 첨가하였다. 그 다음 37°C에서 30분간 발색시킨 후 β-galactosidase는 1.5 M Na_2CO_3 1.6 ml로 alkaline phosphate는 2.5 N HCl 0.8 ml 및 2 M Tris 0.8 ml로 효소에 의한 발색 반응을 정지시킨 다음 분광광도계(UV 1600 PC, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 420 nm에서 측정하였다. 측정된 수치를 이용하여 enzyme unit으로 나타낸 후 R-factor로 환산하여 최종적으로 유도지수(IF= Induction Factor)로 나타냈다. 측정식은 다음과 같다.

$$\text{Enzyme unit} = \frac{1000 \times \text{O.D. at } 420\,\text{nm}}{\text{Reaction time } (30\,\text{min})}$$

$$\text{R-factor} = \frac{\beta\text{-galactosidase unit}}{\text{alkalinephosphatase unit}}$$

$$\text{Induction Factor} = \frac{\text{실험군의 R-factor}}{\text{대조군의 R-factor}}$$

4. 통계 분석

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며, 얻어진 결과들은 SPSS software (version 10, 1970)에서 프로그램된 general linear model procedure을 수행하고 유의적인 차이가 보일 때 평균값 간의 차이를 Duncan의 multiple range test 법을 사용하여 평가하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. Ames test

감마선 조사한 미역 추출물을 첨가하였을 때 *S. typhimurium* TA98와 TA100에 대한 복귀돌연변이 집락수를 조사한 결과를 Table 1에 제시하였다. 실험에 사용된 두 균주의 생균수는 $1.8 \times 10^9\ \text{ml}^{-1}$ 수준이었으며, 예비시험 결과에 따라 모든 시료는 5,000 µg plate^{-1}를 최고농도로 설정하여 복귀돌연변이 시험을 수행하였다. 우선 대사활성 부재 시의 경우, 모든 시험균주에서 시험 적용 농도인 1,250 ~ 5,000 µg plate^{-1}의 범위에서 복귀돌연변이 집락수가 용매대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 대사활성계(S-9 mixture)를 도입하였을 때 시험물질에 대해 *S. typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험 결과에서 시험한 모든 검체는 적용 농도에서 복귀돌연변이 집락수간의 유의적인 차이가 없었다. 일반적으로 돌연변이원성의 판정은 음성대조군 복귀변이 집락수의 2배 경우를 양성으로 하므로 감마선 조사된 미역에 대한 시험적용 농도에서 복귀변이를 유발하지 않는 것으로 보아 감마선 조사에 의한 돌연변이원성은 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 유전독성학적 변이원성 시험에서 감귤 정유(Kim *et al*. 2005) 및 비파 메탄올 추출물(Kim *et al*. 2006)에 대한 감마선 조사는 돌연변이를 유발하지 않았다는 결과와 감마선 조

Table 1. Revertant colonies in the *Salmonella typhimurium* reversion assay of the gamma irradiated *Undaria pinnatifida*

Sample	Irradiation dose (kGy)	Dose (μg plate^{-1})	Number of revertant colonies (His+) per plate			
			TA98 (−S9)	TA98 (+S9)	TA100 (−S9)	TA100 (+S9)
Undaria pinnatifida	0	1,250	32±5[a]	28±4	215±18	217±27
		2,500	31±1	31±8	222±11	224±44
		5,000	30±1	26±3	211±9	218±12
	1	1,250	26±3	26±6	151±10	162±23
		2,500	33±4	31±4	129±16	206±16
		5,000	23±1	32±4	171±11	211±12
	10	1,250	31±5	36±4	160±24	162±21
		2,500	32±2	34±4	178±25	191±11
		5,000	29±1	31±1	153±11	190±13
Negative control	distilled water		31±2	33±3	265±35	300±28
Positive control	4-NQO	0.5	734±4			
	2-AA	2		1051±6		
	SA	0.5			692±61	
	2-AA	2				1477±398

Abbreviations: 4-NQO, 4-Nitroquinoline-1-oxide; SA, Sodium azide; 2-AA, 2-Aminoanthracene.
[a]Values are the mean±S.D. ($P<0.05$).

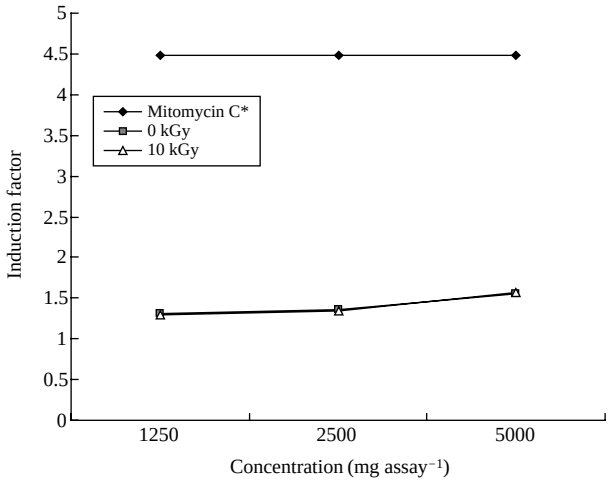

Fig. 1. Genotoxicity of the gamma irradiated *Undaria pinnatifida* in *Escherichia coli* PQ37. The mitomycin C concentration is 0.01 mg ml^{-1}.

사한 육제품이 유전독성학적으로 안전하다는 Jo *et al.* (2005)의 결과, 그리고 수산 자숙액의 유전독성학적 안정성을 평가한 Kim *et al.* (2008)의 결과와도 일치하였다.

2. SOS chromotest

SOS chromotest에 사용되는 *E. coli* PQ37은 *uvrA* 돌연변이와 *rfa* 돌연변이로 되어 있어 돌연변이원이 균주내로 용이하게 침투할 수 있어 SOS 반응이 증폭되어 *sifA*의 발현이 일어나면 β-galactosidase의 활성으로 발색이 일어나게 되는데 이 때 발색수준을 흡광도로 측정하여 유도지수로 환산하여 돌연변이 유발능을 알아볼 수 있다 (Ohta *et al.* 1984; Rueff *et al.* 1986). SOS chromotest는 비록 식품 내 일부 당 함량에 의해 영향을 받을 수도 있지만, 흡광도를 측정하여 판정하므로 객관성이 유지되며, DNA 손상을 주는 유전독성물질의 검색에 편리하게 이용되고 있다. 또한 Ames test에서 밝혀진 돌연변이물질의 약 90%가 SOS 유발물질이었으며 이 두 방법간에 정량적인 상관관계가 있다고 보고되었다 (Quillardet *et al.* 1982; Quillardet *et al.* 1985). 본 실험에서도 Ames test와 SOS chromotest의 상관관계가 확인되어졌다. 감마선 조사한 미역을 첨가하였을 때 *E. coli* PQ37에 대한 돌연변이원성을 조사한 결과를 Fig. 1에 제시하였다. 시험적 용농도는 예비실험을 통하여 5,000 mg assay^{-1}를 최고농도로 설정하여 수행하였다. 실험결과 모든 시험적용농도에서 감마선 조사된 미역에 대한 유도지수 수치는 1.30~1.58로 나타났다. 또한 방사선 조사에 따른 유도지수의 증가는 나타나지 않았다. 본 시험에서 사용한 돌연변이원인 mitomycin C (0.01 mg ml^{-1})의 유도지수가 4.48 나타난 것을 볼 때 감마선 조사에 의한 돌연변이원성은 없는 것으로 판단되었다. 이는 감마선 조사한 쇠고기 (Ha *et al.* 1994), 장류 (Yook *et al.* 2001) 그리고 수산 자숙액 (Kim *et al.* 2008) 등이 SOS chromotest에 의한 유전독성학적 안전성 평가에서 안전성이 입증되었다는 결과와 일치하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, *in vitro* 상에서 Ames test 및 SOS chromotest를 이용한 안전성 평가 결과 저장성 증진을 위해 수확된 상태에서 감마선을 조사한 미역

에서는 돌연변이원성이 관찰되지 않는 것으로 나타나 감마선 조사 기술을 미역 등의 해조류에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

미역의 수확 후 미생물 오염에 대한 제어 방안으로 수확된 미역의 감마선 조사에 대한 유전독성학적 안전성 평가를 하였다. 감마선 조사한 미역 추출물의 *S. typhimurium* TA98 및 TA100에 대한 복귀돌연변이 집락수를 조사한 결과 대사활성계 도입 및 부재시 모두 시험적용 농도인 1,250～5,000 μg plate^{-1}의 범위에서 돌연변이가 일어나지 않았으며, *E. coli* PQ37에 대한 돌연변이원성을 알아본 결과 1,250～5,000 mg assay^{-1}의 범위 안에서 감마선 조사에 의한 돌연변이원이 관찰되지 않았다. 따라서 시험에 이용된 선량의 감마선이 조사된 미역은 독성을 일으키지 않고, 식품 및 공중보건산업의 소재로서 유용하게 사용할 수 있다고 판단된다.

사 사

본 연구는 한국원자력연구원 기본연구사업 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

Ames BN, McCann J and Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**:347-364.

Baik CW and Ham SS. 1990. Antimutagenic effects of browning products reated with polyphenol oxidase extracted from apple by using SOS chromotest. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**:618-624.

FAO/IAEA/WHO Study group. 1999. High dose irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. pp. 1-9. *In*: WHO Technical Report Series 890. World Health Organization, Geneva.

Ha KW, Jung HK, Oh HY, Heo OS, Sohn SJ, Han ES, Jung SC, Choi BY, Kim YM, Kim PS and Moon HH. 1994. Studies on the genotoxicity of the gamma-irradiated *Panax Ginseng Radix in vitro* and *in vivo*. *J. Food Hyg. Safety* **9**: 67-74.

Ha SM, Kim HM, Jeung SK, Lee JW, Byun MW and Kanf IJ. 2006. Genotoxicological safety of high-dose gama-irradiated cereal powders. *Korean J. Food Preserv.* **13**(4):524-529.

Jo C, Lee NY, Kang HJ, Hong SP, Kim YH, Kim HJ and Byun MW. 2005. Radio-sensitivity of pathogens in inoculated prepared foods of animal origin. *Food Microbiol.* **22**:329-336.

KFDA. 2004. Food Code. Munyoungsa, Seoul, Korea.

Kim HJ, Jo C, Lee NY, Son JH, An BJ, Yook HS and Byun MW. 2005. Effect of gamma irradiation on physiological activity of citrus essential oil. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**(6): 797-804.

Kim HJ, Jo C, Kim TH, Kim DS, Park MY and Byun MW. 2006. Biological evaluation of the methanolic extract of *Eriobotrya japonica* and its irradiation effect. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**(5):684-690.

Kim HJ, Choi J, Lee HS, Kim JH, Byun MW, Chun BS, Ahn DH, Yook HS, Kim KH and Lee JW. 2008. Genotoxicological safety of the ethanol extract from seafood cooking drips by gamma irradiation. *J. Radiat Ind.* **2**:21-26.

Kim HJ, Choi J, Kim JH, Chun BS, Ahn DH, Kim GH, Byun MW and Lee JW. 2009. Improvements in storage stability of *Undaria pinnatifida* after gamma irradiation. *Korean J. Food Preserv.* **16**:1-4.

Maron DM and Ames BN. 1983. Revised methods for Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**:1013-1030.

Ohta T, Nakamura N, Moriya M, Shirai T and Kada T. 1984. The SOS-function-inducing activity of chemical mutagens in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* **131**:101-109.

Quillardet P, Bellecomide CD and Hofnung M. 1985. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutat. Res.* **147**:79-95.

Quillardet P and Hofnung M. 1985. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins. *Mutat. Res.* **147**:65-78.

Quillardet P, Huisman OD, Ari R and Hofnung M. 1982. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:5971-5975.

Roberts T and Unnevehr L. 1994. New approaches to regulating food safety. *Food Rev.* **17**:2-8.

Rueff JA, Borba LH, Chaveca T, Gomes MI and Halpern M. 1986. Genetic toxicology of flavonoids: The role of metabolic conditions in the induction of reverse mutation. SOS function and sister-chromatid exchanges. *Mutagenesis* **1**: 179-183.

SPSS. 1970. Statistical Package for the Social Csiences, Norman.

Suzuki T. 1993. Effect of sodium alginates rich in gulurocin acid and mannuronic acids on cholesterol levels and diges-

tive organs of high-cholesterol-fed rats. *Nippon Suisan Gakkishi* **59**:545-551.

Yook HS, Kim DH, Lee JW, Cha BS and Byun MW. 2001. Toxicological safety of gamma-irradiated Korean soybean fermentation foods by SOS chromotest. *Korean J. Food Hyg. Safety* **16**(2):133-138.

Manuscript Received: March 4, 2011
Revision Accepted: March 7, 2011