

굴참나무와 사과나무로부터 제조한 훈연액의 제조온도에 따른 돌연변이원성에 관한 연구

강희곤* · 이경호 · 홍희선** · 박상진 · 김창한

*서울시 보건환경연구원, 건국대학교 축산대학

**카톨릭의대 부속 성모병원 의과학연구원

Mutagenic Activity of Smoke Flavoring Processed from Oak and Apple Wood on Manufacturing Temperature

Hee-Gon Kang*, Keyong-Ho Lee, Hee-Sun Hong**, Sang-Jin Park and Chang-Han Kim

*Seoul Public Health and Environment Research Institute

College of Animal Husbandry, Konkuk University

**The Clinical Research Institute, Catholic Medical Center

Abstract

The study was carried out to screen mutagenicity of smoking materials for the determination of optimum smoking temperature for meat products. Wood materials employed for smoking were oak and apple trees. Temperatures of the generator for manufacturing of smoke flavoring were set to 250°C, 400°C and 500°C, respectively. Mutagenic activities of smoke flavoring were assayed according to Ames test using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. In oak wood smoke flavoring, *Salmonella typhimurium* TA98 without S-9 mix showed strong mutagenic activities at the concentration of 6µg /plate(250°C), 4µg /plate(400°C) and 6µg /plate(500°C). *Salmonella typhimurium* TA100 without S-9 mix showed strong mutagenic activities at the concentration of 10µg /plate(250°C), 20µg /plate(400°C) and 10µg /plate(500°C).

Salmonella typhimurium TA98 with S-9 mix showed strong mutagenic activities at the concentration of 30µg /plate(250°C), 40µg /plate(400°C) and 20µg /plate(500°C). *Salmonella typhimurium* TA100 with S-9 mix showed strong mutagenic activities at the concentration of 30µg /plate(250°C), 50µg /plate(400°C) and 20µg /plate(500°C). In apple wood smoke flavoring, *Salmonella typhimurium* TA98 without S-9 mix showed strong mutagenic activities at the concentration of 6µg /plate(250°C), 4µg /plate(400°C) and 6µg /plate(500°C). *Salmonella typhimurium* TA100 without S-9 mix showed strong mutagenic activities at the concentration of 10µg /plate(250°C), 20µg /plate(400°C) and 20µg /plate(500°C). *Salmonella typhimurium* TA98 with S-9 mix showed strong mutagenic activities at the concentration of 30µg /plate(250°C), 40µg /plate(400°C) and 30µg /plate(500°C). *Salmonella typhimurium* TA100 with S-9 mix showed strong mutagenic activities at the concentration of 30µg /plate(250°C), 20µg /plate(400°C) and 30µg /plate(500°C). From these results, it could be concluded that optimum smoking temperature for meat products should be set below 400°C, that the compounds like benzo[a]pyrene etc. contain a variety of mutagenic potentials, which could be generated at the higher smoking temperature.

Key words : benzo[a]pyrene, mutagenicity, oak, apple.

서 론

훈연에 사용되는 수종은 hickory, mesqu-

Corresponding author : Chang-Han Kim, College of Animal Husbandry, Konkuk University, Mojdong, Kwangjin-ku, Seoul 143-701, Korea.

ite, cherry, walnut, apple 및 oak 등의 경질 나무가 사용되고 있다. 이러한 재료들로부터 훈연과정에서 발생하는 유기화합물의 수는 약 1,000 종으로 추산되고 있으며, 이 중 약 500여 종류가 제품의 향미에 영향을 주는 것으로 알려져 있다⁽¹⁾. 훈연성분은 주로 phenol류, orga-

nic acids, alcohols, carbonyls, hydrocarbons 등과 같은 화합물로 이루어져 있다⁽²⁻⁵⁾. 이중 benzo[a]pyrene 등과 같은 다환방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons) 및 그 유도체는 돌연변이원성 물질 및 발암성 물질이며^(6,7), 이러한 발암성 물질은 나무의 주성분인 lignin이 350°C 이상의 고온에서 연소 분해될 때 생성된다고 한다⁽⁸⁻¹¹⁾. 훈연식품에 관한 돌연변이원성에 관한 연구로는 목탄에 구운 스테이크와 바비큐 갈비, 훈연쇠고기와 불에 구운 식육⁽¹⁰⁾ 등의 주로 식품에 대한 연구로 이루어졌다. 그러나 이러한 식품에서 돌연변이원성을 일으키는 물질은 거의가 훈연재료에 기인한 것으로 알려져 있다. 돌연변이원성의 검색방법으로는 *in vivo* 검색법과 *in vitro* 검색법으로 나눌 수 있다. *in vivo* 검색법으로는 mice, rats 나 chinese hamsters와 같은 실험동물을 이용하여 염색체의 이상 유무를 검사하는 검색법이 있다. *in vitro* 검색법으로는 동물배양세포를 이용하여 염색체의 이상 유무를 검사하는 방법과 미생물을 이용한 검사법 등이 있다. *in vivo* 검색법은 시험에 소요되는 시간이 길고 비용이 많이 소요되기 때문에 미지의 화학 물질에 대한 발암성 시험에는 어려움이 많다. 따라서 현재 발암물질의 검색 방법으로는 동물배양세포와 미생물을 이용한 돌연변이원성 시험이 많이 이용되고 있다. 이 시험법들은 돌연변이 물질에 의한 인간의 암유발 가능 확률의 예측율이 높고, 특히 미생물을 이용한 돌연변이 시험법(Ames test)은 돌연변이물질 검색에 있어서 기본적으로 수행되고 있는 방법이다^(12,13).

따라서 본 연구에서는 굴참나무와 사과나무를 이용하여 서로 다른 온도에서 제조한 훈연액의 돌연변이원성을 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100을 이용하여 검색하였다.

재료 및 방법

훈연액의 조제

훈연액을 제조하기 위한 generator는 smoke chamber(Model: ASR-ROMBAIR012, Maurer, Germany)의 generator와 동일한 형태로 본 실험을 위하여 별도로 제작하였으며, 이때 연소 장치의 온도를 최고 1,000°C까지 올릴 수 있도록 고안하였다. 훈연액은 굴참나무와

사과나무를 사용하여 제조하였으며, 훈연액 제조시 generator의 온도는 250°C, 400°C 및 500°C로 설정하여 각각의 온도에서의 훈연액을 제조하였다. 제조시간은 굴참나무와 사과나무 건조칩 1kg을 완전연소시킬 때까지로 하였다.

돌연변이원성검사

1) 시험균주 및 특성검사

Salmonella typhimurium TA98 및 TA100은 한국화학연구소 안전성연구센터로부터 분양받았으며, nutrient agar 평판에 계대하면서 사용하였다. 균주특성검사는 1개월에 한 번씩 histidine 요구성, 막편이 *rfa* 변이, 약제내성인자 R-factor plasmid 및 *uvr* B 변이를 조사하였다.

S-9 mix의 조제

1) S-9의 조제

Ames의 방법⁽¹²⁾에 준하여 Sprague-Dawley 계 rat(♂)에 aroclor 1254(Supelco Co. USA)를 체중 1kg 당 500mg을 복강내에 1회 주사하고, 5일 후에 간장을 적출하여 염화칼슘 수용액을 가하여 균질화한 후 9,000×g에서 원심분리한 상등액(S-9)을 3ml씩 분주하여 -80°C에서 보존하면서 사용하였다.

2) S-9 mix의 조제

S-9 분획 2ml, 0.4M MgCl₂ 및 1.65M KCl 수용액 각 1ml, 1M glucose-6-phosphate 용액 0.25ml, 0.1M NADP 수용액 1.2ml, 0.2M phosphate 완충액(pH 7.4) 25ml에 증류수를 가하여 50ml로 하였다.

돌연변이원성 시험

돌연변이원성 시험은 S-9 mix를 첨가하는 간접돌연변이원 시험과 S-9 mix를 첨가하지 않는 직접돌연변이원 시험으로 실시하였다. 즉, ice bath에 시험관을 넣고 S-9 mix 0.5ml (또는 인산완충액 0.5ml), 균주 배양액(1~2×10⁹ cell/ml) 0.1ml, 훈연액 0.1ml을 가한 후, top agar 2ml씩을 붓고 가볍게 균질시킨 후 minimal glucose agar 평판에 부어서 도말한

다음 37℃에서 48시간 동안 배양하여 나타나는 복귀돌연변이(revertant)수를 계수하였다.

결 과

굴참나무 훈연액의 돌연변이원성

연소온도 250℃, 400℃ 및 500℃로 하여 각각 제조한 훈연액을 시험균주 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100을 이용하여 돌연변이원성 조사는 S-9 mix를 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우에 대하여 조사를 하였다.

S-9 mix를 첨가하지 않은 경우, 자연 복귀돌연변이원수(spontaneous revertant)는 *Salmonella typhimurium* TA98에서는 32 /plate, *Salmonella typhimurium* TA100에 있어서는 128 /plate이었고, S-9 mix를 첨가한 경우에는 *Salmonella typhimurium* TA98 및 *Salmonella typhimurium* TA100에서 각각 47 /plate 및 151 /plate이었다.

S-9 mix를 첨가하지 않은 경우, *Salmonella typhimurium* TA98에서는 250℃와 400℃에서 제조된 훈연액 각각 6μg /plate에서 돌연변이원수는 62 /plate와 69 /plate를 나타냈고, 500℃에서 제조된 훈연액 4μg /plate에서 돌연변이원수는 82 /plate를 나타냈다(Fig. 1a). *Salmonella typhimurium* TA100에서는 250℃와 400℃에서 제조된 훈연액 20μg /plate에서 돌연변이원수는 각각 196 /plate와 283 /plate를 나타냈고, 500℃에서 제조된 훈연액은 10μg /plate에서 돌연변이원수 396 /plate로 높은 돌연변이원성을 나타냈다(Fig. 1b).

S-9 mix를 첨가한 경우, *Salmonella typhimurium* TA98에서는 250℃, 400℃ 및 500℃에서 제조한 훈연액 30μg /plate, 40μg /plate 및 20μg /plate에서 돌연변이원수는 각각 95 /plate, 115 /plate 및 115 /plate를 나타냈다(Fig. 2a). *Salmonella typhimurim* TA100에서는 250℃, 400℃ 및 500℃에서 제조한 훈연액 30μg /plate, 50μg /plate 및 20μg /plate에서 돌연변이원수는 각각 214 /plate, 367 /plate 및 396 /plate로 최고치를 나타냈다(Fig. 2b).

사과나무 훈연액의 돌연변이원성

S-9 mix를 첨가하지 않은 경우, 자연 복귀돌연변이원수(spontaneous revertant)는 *Sal-*

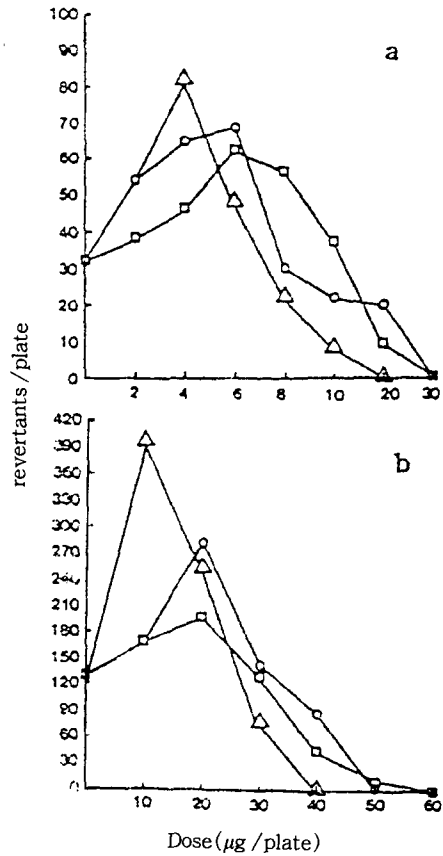


Fig. 1. Mutagenic activity of smoke flavoring extracted from oak wood on *Salmonella typhimurium* TA98(a) and TA100(b) inactivated S-9 mix.

250℃ : □, 400℃ : ○, 500℃ : △

monella typhimurium TA98에서는 32 /plate, *Salmonella typhimurium* TA100에 있어서는 128 /plate이었고, S-9 mix를 첨가한 경우에는 *Salmonella typhimurium* TA98 및 *Salmonella typhimurium* TA100에서 각각 47 /plate 및 151 /plate이었다.

S-9 mix를 첨가하지 않은 경우, *Salmonella typhimurium* TA98에서는 250℃, 400℃ 및 500℃에서 제조한 훈연액에서 6μg /plate, 4μg /plate, 6μg /plate에서의 돌연변이원수는 각각 45 /plate, 49 /plate 및 78 /plate를 나타냈다(Fig 3a). *Salmonella typhimurium* TA100에서는 250℃에서 제조한 훈연액 10μg /plate에서 돌연변이원수는 156 /plate를 나타냈고,

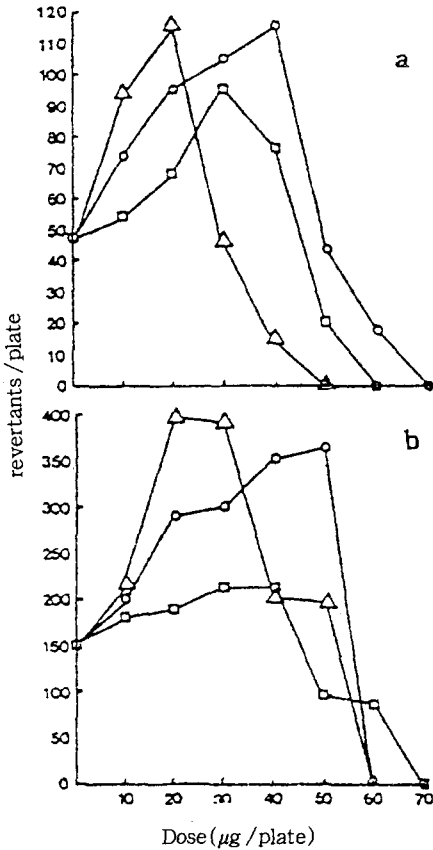


Fig. 2. Mutagenic activity of smoke flavoring extracted from oak wood on *Salmonella typhimurium* TA98(a) and TA100(b) activated S-9 mix.

250°C : □, 400°C : ○, 500°C : △

400°C 및 500°C에서 제조한 훈연액 20µg / plate에서의 돌연변이원수는 각각 203 /plate 및 327 /plate를 나타냈다(Fig. 3b).

S-9 mix를 첨가한 경우, *Salmonella typhimurium* TA98에서는 250°C, 400°C 및 500°C에서 제조한 훈연액 30µg /plate, 40µg /plate 및 30µg /plate에서 돌연변이수는 각각 56 /plate, 101 /plate 및 102 /plate를 나타냈다(Fig. 4a). *Salmonella typhimurium* TA100에서는 250°C, 400°C 및 500°C에서 제조한 훈연액 30µg /plate, 20µg /plate 및 30µg /plate에서 돌연변이수는 각각 224 /plate, 238 /plate 및 283 /plate를 나타냈다(Fig. 4b).

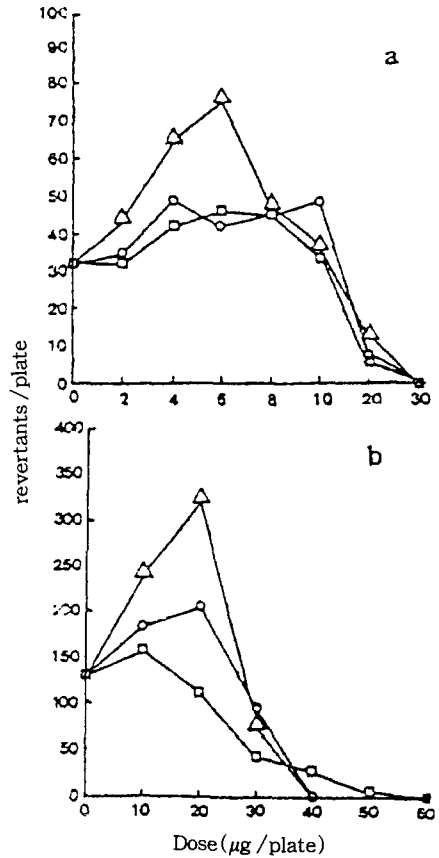


Fig. 3. Mutagenic activity of smoke flavoring extracted from apple wood on *Salmonella typhimurium* TA98(a) and TA100(b) inactivated S-9 mix.

250°C : □, 400°C : ○, 500°C : △

고 찰

독일의 경우는 훈연육제품의 경우, 다환방향족 탄화수소 중의 benzo[a]pyrene의 검출량을 1.0µg /kg 이하로 규정하고 있어(14), 이에 따른 훈연온도의 설정의 기준을 삼고 있으나 국내의 경우는 전무한 실정이다. 따라서 국내에서도 훈연육제품의 benzo[a]pyrene의 생성 허용기준량과 훈연적정온도 기준이 필요하다고 본다. 이와 같이 훈연온도에 의해서 돌연변이를 일으킬 수 있는 benzo[a]pyrene의 생성량이 좌우되므로 훈연식품의 제조시 적절한 훈연

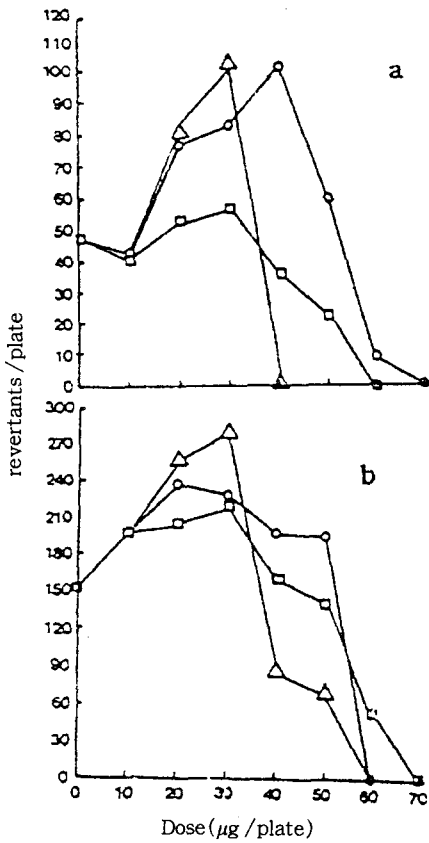


Fig. 4. Mutagenic activity of smoke flavoring extracted from apple wood on *Salmonella typhimurinum* TA98(a) and TA100 (b) activated S-9 mix.

250°C : □, 400°C : ○, 500°C : △

온도의 설정이 중요하다고 할 수 있겠다.

본 연구에서는 이에 대한 기준설정의 참고를 위하여 훈연재료별의 훈연온도에 따른 돌연변이원성을 검색하였다. 굴참나무와 사과나무를 서로 다른 온도에서 제조한 훈연액의 돌연변이원성은 S-9 mix 첨가에 관계없이 높은 온도에서 제조한 훈연액일수록 낮은 농도에서 돌연변이원성을 나타냈으며, *Salmonella typhimurinum* TA98이 *Salmonella typhimurinum* TA100보다 민감한 돌연변이원성을 나타냈다. 따라서 훈연액 제조 온도가 높을수록 돌연변이원성을 나타내는 benzo[a]pyrene 등의 물질이 많이 생성된다고 할 수 있다. 각기 다른 온도에서 제조한 훈연액 모두 S-9 mix 첨가하지 않은 시험구에

서 두 균주에 완전 생육저해를 나타낸 농도에서 S-9 mix 첨가시는 높은 돌연변이원성을 나타낸 것이 매우 특이할만하다고 할 수 있다. 이것은 훈연액 중에 돌연변이원으로 알려진 benzo[a]pyrene는 직접, 간접 돌연변이원성 물질이기 때문이라 할 수 있다. 이러한 훈연액의 돌연변이원성 물질의 생성은 두 가지 훈연재료에 따라서는 별다른 차이를 보이지 않았으나, 두 가지 훈연재료 모두 훈연온도에 따라서는 돌연변이원성의 차이를 나타냈다. 이와 같은 연구 결과로는 250°C에서 훈연을 실시하는 것이 돌연변이원성이 적은 것으로 나타났다. 본 논문에는 결과를 제시하지 않았지만, 온도에 따른 benzo[a]pyrene의 생성량을 보면 500°C에서 훈연제품을 제조하여 조사한 결과, 두 가지 훈연재료 모두에서 독일의 허용기준치 (1µg/kg)를 초과하였다⁽¹⁵⁾. 따라서 400°C와 500°C에서는 두 가지 훈연재료 모두 돌연변이원성의 차이는 없었지만, 250°C와 400°C 혹은 500°C에서는 250°C에서 제조한 훈연액이 400°C와 500°C에서 제조한 훈연액에서 보다 약한 돌연변이원성을 나타냈다. 따라서 훈연제품의 적절한 훈연온도는 400°C 이하가 적합한 것으로 사료된다.

요 약

훈연액에 다량 존재하는 다환 방향족 탄화수소는 돌연변이 및 암을 일으키는 요소로 알려져 있다. 따라서 온도에 따른 훈연액의 돌연변이원성을 *Salmonella typhimurinum* TA98과 *Salmonella typhimurinum* TA100을 이용하여 조사하였다.

훈연액 제조는 굴참나무와 사과나무를 연소 온도 200°C, 400°C 및 500°C로 설정하여 각각 제조하였다. 굴참나무와 사과나무 훈연액의 돌연변이원성은 훈연액 제조 온도가 높을수록 돌연변이원성이 높았으며, 또한 훈연액 제조온도와는 상관없이 S-9 mix를 첨가하지 않은 시험구에서는 낮은 농도에서 돌연변이원성을 나타냈으나, S-9 mix를 첨가한 시험구는 S-9 mix를 첨가하지 않은 시험구보다 높은 농도에서 돌연변이원성을 나타냈다. 이러한 결과로 미루어 보아 훈연액 제조시 높은 온도에서는 돌연변이를 일으키는 benzo[a]pyrene 등의 물질이

다량 발생하는 것으로 사료된다. 그렇지만 훈연재료간의 들연변이원성은 차이를 보이지 않았다. 따라서 훈연제품의 제조시 적절한 훈연온도의 설정이 중요하다고 할 수 있으며, 본 연구의 결과로부터 400℃이하로 훈연을 하는 것이 바람직하다고 사료된다.

참고문헌

1. Tilgner, D. J. : Fortschritte in der Raucher technologie. *Fleischwirtschaft*, 57, 42 (1977).
2. IARC : Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of the chemical to man certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. Lyon, International Agency for Research on Cancer 3 (1973).
3. Miler, K. : Further observations on the presence of cocarcinogens in curing smokes. *Techologia mesa*. Spec. Ed. p. 33 (1962).
4. Sugimura, T. and Nagao, M. : The use of mutagenicity to evaluate carcinogenic hazards in our daily lives, J. A. Heddle (ed), *Mutagenicity* ; New horizons in Genetic Toxicology, Academy Press., New York, p. 73 (1982).
5. Sugimura, T. and Sato, S. : Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer Res.*, (Suppl.) 43, 2415 (1983).
6. Sarkar, S., Nagabhshan, M., Soman, C. S., Trickler, A. R. and Bhidde, S. V. : Mutagenicity and carcinogenicity of smoked meat from Nagaland a region of India prone to a high incidence of nasopharyngeal. *Carcinogenesis*, 10, 733 (1989).
7. Becher, G., Knize, M.G. and Felton, J. S. : Identification and synthesis of new mutagens from a fried Norwegian meat product. *Vär Foda.*, 42, 85 (1989).
8. Sugimura, T. : Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process. *Mutation Res.*, 150:33 (1985).
9. Felton, J. S., Knize, M. G., Shen, N. H., Andresen, B.D., Bjeldanes, L. F. and Hatch, F. T. : Identification of the mutagens in cooked beef. *Environ. Health Perspect.*, 67, 17 (1986).
10. Kiyomi, K., Tetsuta, K. and Hikoya, H. : Formation of mutagenic substances during smoking-and-drying (Balkan) of bonito meat. *Eisei Kagaku.*, 5, 379 (1986).
11. Ingrid, B., Övervik, E., Nord, C. and Gustafesson, J. : Mutagenic activity in smoke formed during broiling of lean pork at 200, 250 and 300℃. *Mutation Res.*, 207, 199 (1988).
12. Ames, B. N., McCann, J. and Yamaski, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella /mammalian. *Mutation Res.*, 31, 347 (1975).
13. 天野鐵夫 : 安衛法における變異原性試験. 第1版, 労働省安全衛生部, p. 7 (1991).
14. Vaessoon, H. A. M. G., Schuller, P. L., Jekel, A. A. and Wilbers, A. A. MM. : Polycyclic aromatic hydrocarbons in selected foods; Analysis and occurrence. *Toxicological and Enviromental Chemistry*, 7, 297 (1984).
15. 강희곤, 이명섭, 이광형, 김창한 : 훈연공정이 훈연액 중의 다환방향족 탄화수소의 함량에 미치는 영향. 한국축산식품학회지, 18(1), 42 (1998).

(1998년 6월 8일 접수)