

방사선 조사식품의 검지법

김경수 · 양재승* · 권중호**

조선대학교 식품영양학과,

*한국원자력연구소 방사선 조사식품 검지기술 개발, **경북대학교 식품공학과

Method of Detection for Irradiated Foods

Kyung-Soo Kim, Jac-Seung Yang* and Joong-Ho, Kwon**

Department of Food and Nutrition, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

Team for Radiation Food Science and Biotechnology, Korea Atomic

Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea

Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

I. 머리말

최근 식품의 방사선 조사 효과에 대한 인조도가 높아짐에 따라 방사선 조사식품의 검지방법에 대한 관심도 증가하고 있다. 방사선 조사는 향신료, 해산물, 가금류, 육류와 같은 식품의 경우에 미생물에 의해 야기되는 질병을 제거하고, 부패 미생물을 파괴하여 저장기간을 연장시키며, 과일류와 채소류의 경우에 해충 구제를 위하여 화학적 훈증제 대신에 이용될 수 있다. 이와 같이 식품의 방사선 조사는 발아나 숙도를 억제하고 부패를 감소시켜 저장기간을 늘리고 병원성 부패 미생물의 감소와 살균으로 식품의 안전성과 품질 향상에 효과가 크다. 수많은 국가들이 향신료, 곡류, 과일류, 채소류, 육류, 해산물에 방사선 조사를 허용하고 있다. 1981년대에 Joint FAO/IAEA/WHO Expert committee에서 평균 10kGy이하로 조사된 모든 식품은 독성학적으로 안전하며, 영양학적, 미생물학적으로도 문제가 되지 않는다고 하였으며, 1992년 제네바에서 WHO, FAO, IAEA 등 국제기구와 국제소비자연맹 등이 방사선 조사의 안전성을 재확인함으로써 세계적으로 식품조사의 실용화에 대한 관심이 높아졌으며, 식품조사기술의 산업화가 추진되고 방사선 조사식품의 교역이 증가하였다. 특히 조사식품의 검지기술 개발연구는 세계소비자연맹의 요구와 더불어 일부 EU 국가들에 의해서 시작되었으며, 조사식품의 특성 변화들을 대상으로 연구하고 있다.

방사선 조사식품의 검지에는 물리적, 화학적 및 생물학적 검지법이 연구되고 있다. 물리적 검지법으로는 뼈를 함유하거나 섬유소를 포함하고 있는 식품에서 방사선 조사에 의해

생성되는 radical 분석을 위한 electron spin resonance(ESR) 방법이나, 향신료, 건조야채류 등에 함유된 무기질을 이용한 thermoluminescence(TL) 및 photostimulated luminescence(PSL) 방법, viscosity 방법이 있으며, 화학적 검지법으로는 지방을 함유하고 있는 식품의 경우, 방사선 조사에 의해 생성된 hydrocarbon류, 2-alkylcyclobutanone류를 GC 및 GC/MS 분석기기를 이용한 방법이 있으며, 생물학적 방법으로는 DNA comet assay 방법과 ELSIA 방법이 방사선 조사여부를 판별하는 방법으로 제시되고 있다.

II. 물리적 검지방법

1. Thermoluminescence(TL) 검지방법

thermoluminescence은 가장 잘 알려진 luminescence 방법으로 포획에너지를 방출시키는데 열이 이용된다. 식품이나 식품재료에 혼입되어 있는 흙이나 이물질 형태의 무기질(silicate, feldspar, quartz, salt crystal 등)의 발광특성을 응용하는 방법이다. 이때 무기질은 방사선 흡수량에 따라 전자의 에너지 상태가 excited state로 변화되고, 일정조건으로 이 mineral의 온도를 상승시키게 되면 에너지 상태가 다시 ground state로 된다. 이때 흡수된 에너지의 양만큼 light emission 현상이 발생되며, 이는 방사선 흡수선량과 비례하여 TL glow curve를 나타내게 된다. 그래서 이러한 원리를 이용한 TL은 향신료와 다른 여러 식품들의 방사선 조사여부를 확인할 수 있는 중요하고 전망 있는 방법으로, 식품중에 혼입된 미량의 미네랄에 의해서도 측정이 가능하므로 적용 범위가 넓은 검지방법이라 할 수 있다.

TL 측정에 의한 방사선 조사 여부 판별은 TL ratio에 의해서만 결정하는 것이 아니며, glow curve 피크의 모양과 높

Corresponding author : Kyung-Soo, Kim, Department of Food and Nutrition, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea
E-mail : kskim@mail.chosun.ac.kr

이 그리고 피크가 나타나는 온도 등이 모두 고려되어야 한다. TL ratio의 경우 0.1 이하이면 비조사구로, 0.5 이상이면 조사구로 판정하며, 0.1과 0.5사이의 값이 나올 경우 TL glow curve의 모양을 보고 판단한다. TL 측정법으로 식품에 대한 조사여부 판별은 일반적으로 대략 2년까지도 가능하나, 저장기간이 길어질수록 TL glow curve의 피크가 고온부로 이동하여 나타나며, fading effect에 의해 높이가 낮아지므로 시료의 저장온도와 기간을 참고하여 방사선 조사 여부의 판별을 하여야 한다.

TL측정은 무기질을 함유한 식품자체(whole sample)와 검체 식품으로부터 추출된 무기질을 이용하는데 TL측정에 있어서 수분에 의한 영향은 적으나 빛, 온도, 기간 등에 영향을 받으므로 이에 유의하여야 한다.

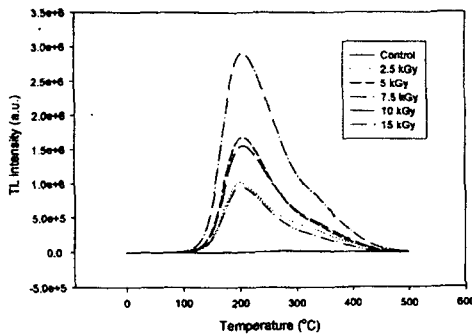


fig. 1. TL glow curves of white ginseng powder irradiated.

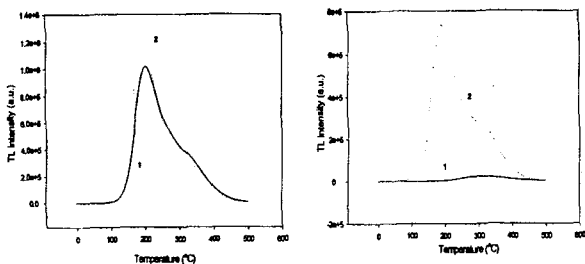


fig. 2. TL glow curves of white ginseng powder on-irradiated(left) and 2.5kGy irradiated(right). 1 : glow curve before re-irradiation, 2 : glow curve after 1kGy re-irradiation.

검체 식품으로부터 무기질을 추출하기 위하여 시료에 증류수 일정량을 가해 현탁액을 만들고 ultrasonic agitator에서 처리하여 여과하고 증류수로 잘 세척한 후 정지한다. 여기서 얻어진 잔사에 sodium polytungstate solution을 가하고 혼합한 후 원심 분리하여 유기물을 제거한다. 이때 회수된 무기질을 증류수와 HCl로 세척한 다음 암모니아로 중화시키고 아세트산으로 건조시켜 분석시료로 사용한다.

무기질 분리한 시료의 TL 측정은 최고온도와 가온률(heating rate, °C/sec)을 설정하여 실온에서부터 검체의 온도

를 상승시키면서 반복 측정한다. 방사선 조사식품 검지시 TL reader의 기종에 따라 다를 수 있으나, 일반적으로 최고 온도는 350-500°C, 가온률은 5-10°C로 설정한다. 측정용 시료는 aluminum disc에 충전하고 planchette에 loading 한 다음 가열하면서 TL emission의 TL 강도를 기록하고 TL1 glow curve라고 한다. 가열처리한 같은 시료를 재조사하여 TL2 glow curve를 측정한다.

2. Photostimulated Luminescence(PSL) 검지방법

식품을 구성하고 있는 뼈나 각질과 식품에 묻어 있는 토양에 함유된 무기질은 방사선조사에 의하여 에너지를 흡수하여 보유하고 있게 되며, 이 에너지는 광자극에 의하여 빛으로 방출된다. Photostimulated luminescence(PSL)는 방사선 조사에 의해 물질에 포획된 저장에너지를 적외선으로 자극하여 조사된 물질로부터 방사되어 나오는 빛에너지를 측정함으로써 조사유무를 확인하는 방법이다. 즉, 대부분의 식품에서 발견되는 silicate나 bioinorganic materials이 방사선에 노출되었을 때 구조적인 trap에 갇혀서 에너지가 저장되고, 광학적 자극이 가해지면 에너지가 방출되는 원리를 이용한 방법으로 방사선 조사에 의하여 흡수된 에너지를 적외선으로 자극하여 방출되는 빛의 정도를 photon count로 측정한다. 측정된 photon counts가 T₁ 이하이면 방사선 조사하지 않은 것으로 판단하고, T₂ 이상이면 방사선 조사한 것으로 판단한다.

이 장치를 이용하여 식품의 방사선 조사 여부를 검지하는 방법은 시료의 전처리가 필요하지 않으며 비파괴 검사로써 방사선 조사 여부 검지가 필요한 시료를 단시간 내에 수 차례 검사할 수 있으며, 장치 구입에 드는 비용도 비교적 저렴하다. 따라서 PSL은 시료의 방사선 조사여부를 신속하게 확인할 수 있고, 고체, 분말 상태의 모든 조사식품에 대하여 적용이 가능하다. 그러나 이 방법은 뼈나 각질 등을 함유한 것을 제외하고는 식품 구성성분에 의하여 나타나는 반응을 측정하는 것이라기보다는 여기에 묻은 무기질에 대한 반응이기 때문에 무기질의 종류에 따라 다른 반응을 나타낸다는 점을 고려해야 한다.

Table 1. Photostimulated luminescence determinations for irradiated white ginseng powder at different doses(unit : photon count)

Sample	Irradiation dose (kGy)					
	0	2.5	5	7.5	10	15
White Ginseng Powder	243(-) ¹⁾	209676(+)	186702(+)	122432(+)	109306(+)	343762(+)
	516(-)	440749(+)	610053(+)	202952(+)	228215(+)	389166(+)

¹⁾Threshold values : T₁ = 700 T₂ = 5000, -- <T₁; T₁ <M <T₂; + > T₂

시료는 씻거나 닦아내지 않는 그 자체를 사용하되, 다른 시료나 토양이 묻지 않도록 분히하여 측정할 때까지 암소에 보관한다. 시료는 빛에 대한 노출을 최대한으로 줄이고, 오염을 피하면서 disposable petri-dish에 담은 후 PSL system의 시료 chamber에 넣은 후, cycle time과 cycle 횟수를 설정하여 PSL photon counts를 측정한다. 시료 chamber를 비운 상태에서 광자극 없이 photon count를 측정하여 dark count라 하고, 시료 chamber에 ^{14}C -source와 같은 reference light source를 넣어 light count를 측정한다. Dark count는 20-30, ^{14}C -source에 대한 light count는 141,000~146,000정도이다. 시료에 대하여 측정하기 전 매번 시료 chamber를 비운 상태에서 photon count를 측정하여 오염 상태를 점검하고, 시료 측정 후에는 공기청소장치로 chamber를 청소한다. 측정하고자 하는 시료에 대하여 하위 분계점(lower threshold: T_1)과 상위 분계점(upper threshold: T_2)를 설정한다. Threshold value T_1 은 비조사 시료 중 가장 높은 값을 취하고 T_2 는 적용 가능한 조사선량에서 조사한 시료 중 가장 낮은 값을 취하여 측정결과에 사용한다.

3. Electron Spin Resonance(ESR) 검지 방법

식품과 방사선의 상호작용은 분자 결합을 붕괴시키고 자유 라디칼이나 이온을 생성한다. 짝이 없는 전자는 자장에 줄을 서서 자가모멘트가 자장에 수평이거나 반수평 상태로 된다. 이들 두 상태는 서로 다른 에너지 상태로 있어 단파장 에너지를 흡수하여 낮은 상태에서 높은 상태의 에너지로 여기 된다. 이것이 전자스핀공명의 기초로서 시료를 전자선의 극점사이에 놓고 전자장이 변함에 따라 전자스펙트럼의 9GHz 대역에서 단파장 흡수를 조사한다. 짝이 없는 전자의 정보는 이 스펙트럼의 위치와 형태로 알 수 있다. 자유 라디칼은 일반적으로 물과 같은 다른 물질과 쉽게 결합하여 사라지지만, 일부는 상대적으로 건조하고 단단한 뼈나 각피 같은 결정 구조 고체 모체에 포획되어 그 식품의 수명과 거의 비슷하거나 더 오랜 기간 존재한다. 이 라디칼들을 ESR 기기로 측정하는 것이다. 방사선 조사식품에 검지에 이용되는 식품의 종류는 검지하는 radical의 종류에 따라 크게 3가지로 나눌 수 있다. 즉, Cellulose radical을 함유하는 식품, crystalline sugar 유래의 multicomponent signal을 가지는 radical을 함유하는 식품 그리고 뼈를 구성하는 hydroxyapatite 유래의 radical을 함유하는 식품이다. Cellulose radical은 수분 등 저장조건에 따라 없어지므로 조사유무는 알 수 있어도 선량까지 예측하기는 힘들다. 건조과일의 sugar radical은 안정하나 수화로 없어질 수 있다. 석회질 세포에서 방사선 신호의 안정화는 정성과 정량 모두에 적당하다. 이들 안정화된 신호는 처음에는 방사선 선량에 따라 직선적으로 증가하며 선량-효과 곡선의 경사도는 세포의 석회질화 결정화의 정도에 따른다.

ESR 검지방법은 자유 라디칼을 안정화시킬 고체모체만 있으면 모든 식품에 적용할 수 있는 방법이며, 라디칼의 정량화로 조사공정의 흡수선량을 측정할 수 있다. ESR 검지방법은 적은 시료, 비파괴측정, 빠른분석 등 많은 이점이 있지만, 비교적 장비가 비싸고 잘 훈련된 인력이 있어야 한다.

걸어준 자장(magnetic field)과 microwave frequency 값들의 비인 g-value로 ESR 특성을 나타내는데 비조사된 시료는 대칭적인 signal을 나타낸다(Figure 3). 반면 방사선 조사된 육류를 포함한 뼈는 g-value가 2.002와 1.998인 전형적인 비대칭 신호를 나타낸다(Figure 4). 이 신호의 크기는 조사선량이 증가함에 따라 증가된다.



Fig. 3. ESR spectrum of typical non-irradiated sample.

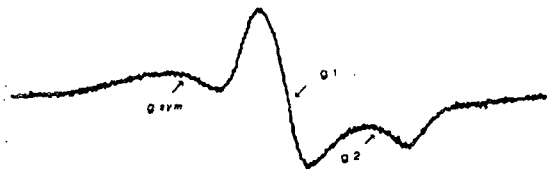


Fig. 4. ESR spectrum of typical irradiated bones.

Cellulose를 포함하는 식품의 조사된 시료는 비조사구에 나타나는 대칭적인 unspecific central ESR signal의 왼쪽(at lower field)과 오른쪽(at higher field)에 cellulose radical에 의해서 생성되는 한 쌍의 peak가 약 6.0 mT의 공간을 두고 나타나며(Figure 5), 이 signal의 크기는 조사선량이 증가함에 따라 증가된다.

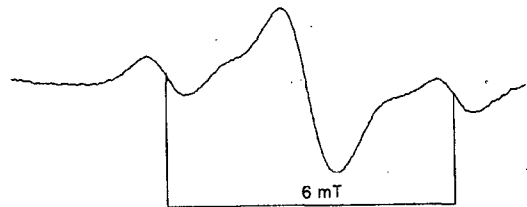


Fig. 5. ESR spectrum of typical irradiated cellulose-containing foods.

Crystalline sugar를 함유하는 식품의 방사선 조사된 시료는 비조사구에서 보이지 않던 multicomponent signal을 가지는 특이적인 signal을 나타내고, 이 signal의 크기는 조사선량이

증감함에 따라 증가한다(Figure 6).

육류, 가금류, 어류, 과일류, 향신료, 향초류, 건조버섯 등에 적용이 어느 정도 가능하며, 각각 고유한 라디칼 생성에 의해 특이한 ESR signal을 나타내며, 이를 통해 흡수선량에 측을 할 수 있다.

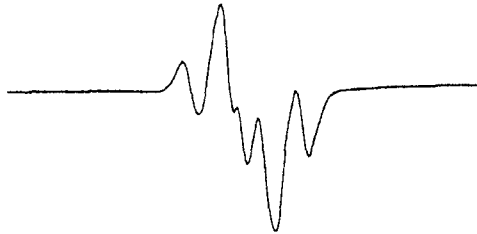


Fig. 6. ESR spectrum of typical irradiated crystalline sugar-containing foods.

뼈를 포함한 시료는 살과 결합조직 그리고 골수를 완전히 제거하고, 과일의 씨나 견과류의 껍질은 적당한 크기로 자르고, 건조채소류 및 향신료를 분쇄하고 건조하여 수분과 단수명 ESR center를 제거한다. 이 시료를 ESR tube에 넣은 후, ESR spectrometer에 있는 cavity에 넣고 ESR spectrometer 측정 조건을 달리하여 radical을 반복 측정한다. 이때 비조사 리료와 조사 시료의 spectra를 각각 측정하여 방사선 조사에 의해 유래된 자유 라디칼 peak을 확인하고 signal 강도를 측정한다. ESR은 microwave radiation: 9.5GHz, center fields 342mT, sweep width 20mT, modulation frequency 100kHz, modulation amplitude 0.2mT-0.4mT, time constant 50ms-200ms, sweep rate 2.5mT/min-10mT/min, Gain: 1.0×10^5 - 1.0×10^6 , Temperature: room temperature에 준하여 측정하며, hydroxyapatite 유래의 radical 측정시에는 microwave power 10mW-12.5mW, cellulose radical 측정시에는 microwave power 0.4mW, crystalline sugar radical 측정시에는 microwave power 5mW를 이용하여 측정한다.

4. Viscosity 측정법

Viscosity 측정법은 단순한 방법으로, 젤라틴화를 위한 shear rate나 pH의 변화를 구별하는데 도움이 된다. 식품중에 다량 함유된 다당류(atarch, pectin, cellulose)는 방사선조사에 의하여 ether 결합의 일부가 분해되어 저분자의 dextrin, maltose, glucose가 생성되며 더욱더 산화를 받아 glucose의 산화물이나 pentose로 변환되는 것으로 알려져 왔다. 이와 같이 전분류가 방사선의 조사를 받으면 전분이 분해되어 단당류로 변환됨과 동시에 물에 대한 용해도가 증가하고 팽윤력과 점도가 감소하므로 점도를 측정함으로써 건조 식품류에 대한 방사선 조사여부와 조사선량을 간접적으로 추정할 수 있다. 묽은 전분 용액은 Newton 유체이므로 점도 측정은 수직

유화형의 유리모세관 점도계인 Ostwald 점도계와 Ubbelohde 점도계가 사용된다. 한편, 전분 농도가 높은 전분물은 비 Newton 유체이기 때문에 전분물의 점도측정에는 Couette형 점도계, Macmichael 점도계, Stormer형 점도계, Brookfield형 점도계, Visco-Amylograph, Rheometer등이 사용된다.

방사선 조사 후 전분식품의 점도 측정을 위하여 일정 크기의 분말로 만든 후 일정량의 증류수를 가하여 suspensions를 만든다. 균질화된 시료액에 NaOH를 가하여 pH를 12~13으로 조정하고, 가열호화시킨 다음, 일정 시간 항온기에 보관한 후 현탁액의 viscosity를 측정한다.

Ostwald 점도계 측정법에서 점도는 물에 대한 상대 점도로 표시된다. 우선 일정량의 물을 넣고 그 물을 a의 위선까지 빨아올린 후 물을 자유 낙하시켜 수면이 a를 통과할 때부터 a'을 통과하는 시간을 측정하며 이 때 점도계는 a의 위선까지 항온수조에 담근다. 다음에 점도계를 세척, 건조하여 상기와 같은 방법으로 피검액을 넣고 낙하 시간을 측정한다. 이 때 기준이 되는 물의 점도를 η , 피검액의 점도를 η' 이라 하면 $\frac{\eta'}{\eta} = \frac{\rho' t'}{\rho t}$ 의 관계식이 얻어진다.

(이때 ρ , t 는 물의 밀도와 낙하시간 ρ' , t' 는 피검액의 밀도와 낙하시간).

따라서, 피검액의 점도는 $\eta' = \eta \frac{\rho' t'}{\rho t}$ 로 표시된다.

RVDV-II + brookfield Viscometer를 이용하여 가열호화된 시료현탁액을 항온기에서 보관한 후 현탁액의 viscosity를 실온에서 3회 반복 측정한다. 시료의 전분함량 측정은 somogyi 변법 등을 이용하여 전분함량을 측정한 다음 전분계수 0.9를 곱하여 구하고 평균값으로 구하였다. 방사선 조사시료의 점도변화를 측정하여 조사여부를 결정함에 있어서 비조사 시료가 없어도 시료 현탁액을 고온 및 pH12-13으로 조정하여 점도를 측정하고 아래 식에 의하여 specific parameter (threshold value)를 설정·적용한다면 미지시료에 대한 조사여부의 확인이 가능하게 된다.

$$\text{Specific Parameter} = \frac{\text{Viscosity of 10\% suspension(mpa} \cdot \text{s)}}{\text{Starch amount in 1g of sample(g)} \times \text{Viscosity of 5\% starch(mpa} \cdot \text{s)}}$$

이 specific parameter value가 일정한 값 이상을 나타내면 방사선 조사되지 않은 시료로, 그리고 일정한 값 이하를 나타내면 방사선 조사된 것으로 판단한다.

Table 2. Viscosity changes in gamma-irradiated samples with different doses (Unit : cp)

Sample	Irradiation dose(kGy)						R ^c
	0	2.5	5.0	7.5	10.0	15.0	
Ginger	8000.0 ^a	7168.0 ^b	6649.3 ^a	4075.3 ^b	1240.0 ^c	352.0 ^c	0.9271
Ginseng	8000.0 ^a	2528.0 ^b	1525.3 ^c	1042.7 ^b	328.0 ^c	256.0 ^c	0.6223

^{abcde}Means in the same row with different superscripts are significantly different($p < 0.05$).

III. 화학적 검지방법

1. Hydrocarbon류 검지방법

방사선 조사에 의해서 식품에 함유되어 있는 중성 지방은 carbonyl group의 α 탄소와 β 탄소 위치에서 결합이 끊어져 원래의 지방산보다 탄소수가 1개 적거나, 2개 적으면서 첫 번째 탄소 위치에 새로운 이중결합을 가진 hydrocarbon류가 생성된다. 식품의 주요 지방산인 palmitic acid(C16:0)로부터 pentadecane(C15:0)과 1-tetradecene(C14:1), stearic acid로부터 heptadecane(C17:0)과 1-hexadecene(C16:1), oleic acid로부터 8-heptadecene(C17:1)과 1,7-hexadecadiene(C16:2), Linoleic acid로부터 6,9-heptadecadiene(C17:2)과 1,7,10-hexadecatriene(C16:3) 이 각각 생성되며, 이들 hydrocarbon류는 식품의 방사선 조사 여부를 검지방하는 marker로 사용된다.

방사선 조사에 의해 생성된 hydrocarbon류는 gas chromatography(GC)와 gas chromatograph/mass spectrometry(GC/MS)를 이용하여 분석한다. 분석에 의하여 분리된 각 peak의 성분 분석 결과와 표준물질의 분석에 의한 retention time and mass spectrum을 비교하여 확인하고, 첨가된 internal standard를 정량한다.

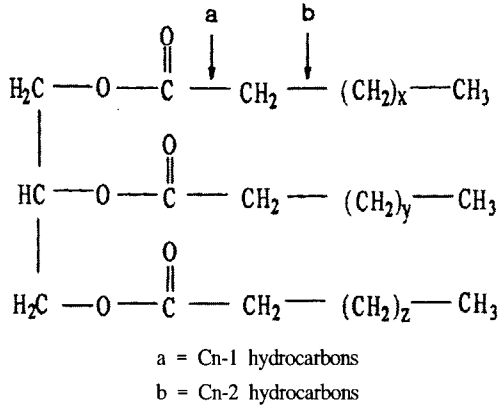


Fig. 7. Hydrocarbons formed from triglycerides irradiated.

Hydrocarbon류 분석은 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 등 육류와 치즈, 버터, 달걀, 일부 과시류, 어류 등일 식품의 방사선 조사 여부 및 방사선 조사 흡수선량의 추정이 가능하다.

지방함유 식품을 방사선 조사시킨 후, 지방추출은 Pentane/isopropanol 혼합용매, 가열용해, Soxhlet 방법을 사용한다. 지방을 추출한 뒤 3% water로 불활성화시킨 florisil을 충전한 column에 internal standard와 지방을 가하여 hydrocarbon류를 분리하고 농축하여 분석용 시료로 하여 GC-FID 및 GC/MS로 분석한다.

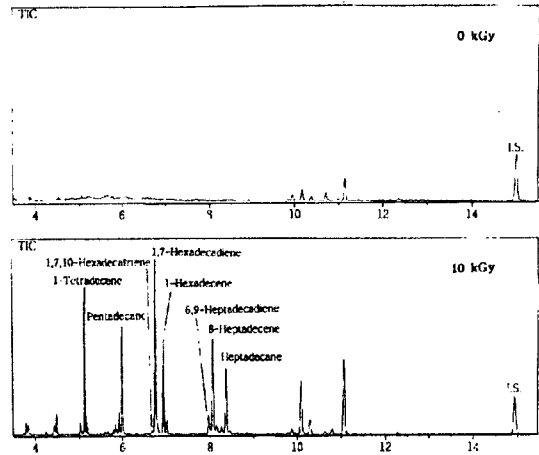


Fig. 8. Chromatograms of radiation-induced hydrocarbons of non-irradiated and 10kGy irradiated in beef.

2. 2-Alkylcyclobutanone류 검지방법

방사선 조사에 의해 식품에 함유되어 있는 지방산이나 중성지방의 carbonyl 기에 존재하는 산소로부터 전자 손실이 일어난 뒤, 원래의 지방산과 동일한 탄소수를 가지면서 C2 위치에 alkyl기를 가진 cyclic 화합물인 2-alkylcyclobutanone류가 생성된다. 식품에 많이 함유되어 있는 palmitic acid로부터 2-dodecylcyclobutanone, stearic acid로부터 2-tetradecylcyclobutanone, oleic acid로부터 2-(5'-tetradecenyl) cyclobutanone, linoleic acid로부터 2-(5',8'-tetradecadienyl)cyclobutanone가 각각 생성된다. 이렇게 방사선 조사에 의해 유된 2-alkylcyclobutanone류는 GC/MS 분석에 의하여 식품의 방사선 조사 여부를 검지방하는 marker로 사용한다.

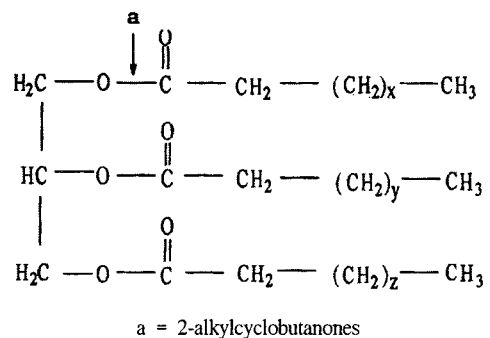


Fig. 9. 2-Alkylcyclobutanone formed from triglycerides irradiated.

2-Alkylcyclobutanone류는 정량 분석하기 위하여 selected ion monitoring(SIM) 방법을 이용하는데, 이는 각 지방산에서 생성된 2-alkylcyclobutanone류가 이온화되어 서로 다른 fragment를 나타내는데, 이들의 특정 m/z 를 설정하여 분석 후, 검량선 및 표준물질과의 retention time과 ion ratio

를 비교, 확인하는 방법이다. 방사선 조사에 의해 생성된 2-alkylcyclobutanone 류 분석은 지방을 함유하는 식품 즉, 육류와 유제품, 달걀, 일부 과일류, 어류 등과 같은 모든 식품의 방사선 조사여부 및 방사선 조사 흡수선량을 추정할 수 있다.

지방함유 식품을 방사선 조사시킨 후, 지방추출은 pentane/isopropanol 혼합용매, 가열용해, Soxhlet 방법을 사용하였다. 지방을 추출한 뒤 20% water로 불활성화 시킨 Florisil을 충전한 column에 internal standard와 지방을 가하여 2-alkylcyclobutanone류를 분리하였다. 정량 분석하기 위하여 GC/MS의 selected ion monitoring(SIM) 방법을 이용하였다. internal standard와 표준물질을 0.25~5 ppm($\mu\text{g}/\text{ml}$ n-hexane)으로 조제한 후 Florisil column으로 위의 방법과 같이 분리한 후 SIM 방법으로 분석하여 표준 검량선을 작성한다. 1-Dodecylcyclobutanone, 2-tetradecylcyclobutanone, 2-(5'-tetradecenyl)cyclobutanone과 같은 표준물질을 0.1~5 ppm($\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 조제한 후 표준 검량선을 작성하였고, SIM mode에서 2-dodecylcyclobutanone과 2-tetradecylcyclobutanone은 ion m/z 98, 112, 69, 84를 2-(5'-tetradecenyl)cyclobutanone은 ion m/z 67, 81, 98, 109를 설정하여 standard 물질과의 retention time과 ion ratio를 비교, 확인하여 정량하였다. 이들 2-alkylcyclobutanone류의 mass spectrum은 GC/MS의 full scan mode로 분석하여 확인하였다.

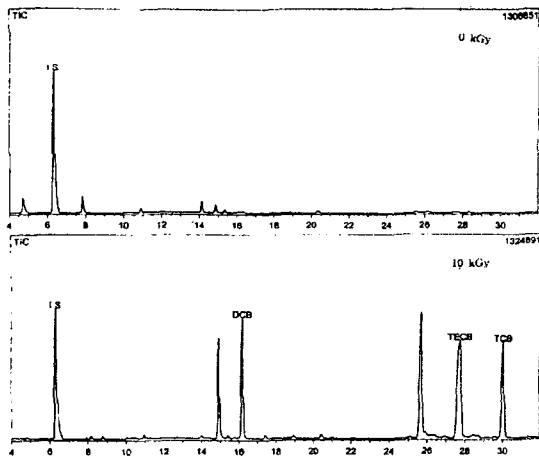


Fig. 10. Chromatograms of radiation-induced 2-alkylcyclobutanones of non-irradiated and 10kGy irradiated beef. DCB : 1-Dodecylcyclobutanone, TECEB : 2-(5'-Tetradecenyl)cyclobutanone, TCB : 2-Tetradecylcyclobutanone.

IV. 생물학적 검지방법

1. DNA Comet assay

DNA Comet assay는 방사선 조사에 의해 생성된 손상 DNA

절편을 정량화하는 방법이다. DNA 손상이 증가할수록 DNA가 핵으로부터 anode 쪽으로 많이 이동하며 손상된 세포에서 comet의 머리부분과 꼬리부분이 밝은 형광색을 띠는데 꼬리부분의 형광강도와 길이는 절단된 나선의 수에 비례한다. 손상되지 않은 세포는 꼬리가 없는 원형 그대로의 핵모양을 유지하고 있다. Comet의 길이와 농도, 핵의 DNA 손상 강도 등을 분석함으로써 방사선 조사여부를 정량화 할 수 있다.

핵 내의 DNA는 환상구조로서 뉴클레오솜이 나선모양으로 꼬여 있다. 세포의 핵 단백질이 고농도의 염에 용해되면 DNA는 핵 모양대로 남아 있으나, 핵 DNA가 절단되면 엉킨 구조가 풀리면서 응축것이 밖으로 이동하여 후광을 나타낸다. 후광을 나타내는 핵의 반경을 측정하여 DNA 크기를 알 수 있다. 세포 핵안에 단단하게 말려있는 DNA는 중성 및 알칼리 조건에 의해 이중나선 및 단일나선이 절단되면 DNA의 고차구조가 풀린다. 전기영동은 엉킴이 풀어진 DNA의 환상 모양을 anode 쪽으로 이동하게 된다. 절단된 DNA 분자끝은 (-)로 하전되어 전장에서 anode 쪽으로 이동함으로써 comet의 형태를 나타내는데 DNA 이동력은 DNA의 크기와 이동할 수 있는 DNA 절편수로 결정된다. DNA의 손상정도가 낮으면, 절편들의 이동보다는 DNA 나선이 늘어져 나오며 DNA의 손상정도가 커서 절편의 수가 증가하면, 이들의 comet의 꼬리쪽으로 자유롭게 이동하여 머리와 꼬리가 분리되기도 한다.

Comet 분석은 단일세포에서 DNA 손상정도를 직접 측정할 수 있어 특정 처리방법에 대한 종양반응을 예견할 수 있으며 다양한 실험 조건하에서 DNA 손상과 회복을 조사하는 데에도 이용할 수 있다. Comet 분석의 장점은 분석에 필요한 시료의 양이 적으며(10^4 정도의 세포) 세포간 DNA 손상 정도와 회복의 차이점을 알 수 있고, 분석결과도 sgkfn안에 얻을 수 있다는 데 있다. 또, 이미지 분석기를 제외한다면 분석에 소요되는 비용이 매우 저렴하다.

Comet assay를 위하여 Precoated 아가로오스 겔 슬라이드를 준비하고, 시료를 세포에 손상을 주지 않을 정도로 부드럽게 마쇄 후 PBS(phosphate buffered saline)용액을 가해 균질화 시킨 현탁액을 여과시킨다. 이 여과액을 각 시료마다 최적 시간을 정해 방치시켜 침전 후 재여과시키고 다시 ice-cold 상에 방치시켜 상층액을 취하여 comet 분석용으로 사용한다. 제조된 세포 현탁액을 슬라이드에 고정시켜 세포 겔을 형성한 후, lysis buffer에 침지시켜 세포의 핵막과 단백질을 용해시킨다. 중성 및 알칼리 lysis buffer 용액은 각각 이중나선과 단일나선의 절단 검출에 사용된다. 단백용해 용액에 용해된 슬라이드를 TBE buffer에 담근 후 물기를 제거하고 전기영동수조의 anode 쪽으로 향하도록 나란히 놓은 후 TBE buffer를 채우고 전기영동한다. 전기영동 후 세척하고 건조한 슬라이드를 이미지로 분석하기 위하여 DNA 결합성 형광염색이나 silver staining으로 염색하여 현미경으로 DNA comet을 관찰한다.

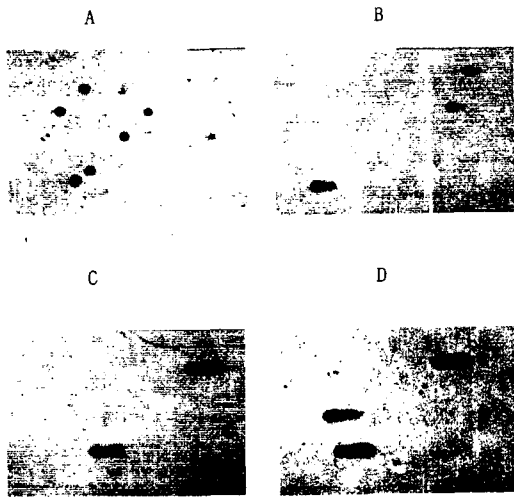


Fig. 11. The typical comets of frozen beef (Silver staining).
A : non-irradiated, B : 0.1kGy, C : 0.5kGy, D : 0.7kGy.

2. ELISA법

식품의 방사선 조사 과정에서 생성되는 일차산물인 유리기는 이차적으로 식품 성분에 작용하여 여러 변화를 일으킨다. 저선량 조사시에는 식품 단백질이 유리기에 의해 분해되어 저분자화하며, 고선량 조사시에는 중합하여 고분자화되어 조사전과는 다른 2차구조를 나타낸다.

방사선 조사에 의한 식품 단백질의 구조 변화는 항원항체 반응을 이용한 ELISA법을 사용하여 측정할 수 있다. ELISA법은 특정 식품단백질(항원)에 대한 특이성이 높은 항체를 유도하여 항원인 식품 단백질과 특이 항체간의 반응성을 측정하는 것이다. 항체는 식품 단백질의 특정 부위인 항원결정기를 인식하여 반응하게 되는데, 방사선 조사에 의한 식품단백질의 구조 변화는 항원결정기에도 영향을 주어 항체에 대한 반응성에 영향을 미친다. 즉 동일한 항체에 대해 방사선 조사 식품에서 분리한 단백질은 비조사 식품에서 분리된 단백질에 비해 낮은 반응성을 나타내게 되므로 조사 식품의 검출이 가능하다. ELISA법은 반응이 매우 빠르고 특이성이 높으며 감도가 뛰어난 우수한 검출방법으로 일회에 수백개의 시료를 동시에 분석할 수 있어 시료의 수가 많은 조사식품에 효율적인 분석방법이다.

방사선 조사식품의 검출법으로 competitive ELISA를 사용하면 식품의 방사선 조사 여부를 판별 할 수 있으며, 항체와의 반응성 감소 정도를 측정할 수 있어 조사 선량의 정량에도 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Figure 12는 경합 항원이 well에 coating된 단백질(항원)과 항체와의 결합을 저해하는 저해율을 나타낸 것이다. 그래프에서 50% 저해율을 보이는 경합 항원의 농도(IC₅₀)를 구하면, 0kGy에서는 10-6mg/ml, 5kGy에서는 105mg/ml, 10kGy에서는 1004mg/ml이다. IC₅₀을 사용하여 반응성의 감소 정도를 산출하면 5kGy, 10kGy를 조사한 식품 단백질의 반응성은 각

각 10배, 100배 감소하게 된다. 이와 같이 방사선을 조사하면 식품 단백질의 항체에 대한 반응성이 감소하여 IC₅₀이 고농도로 이동하게 되고 조사선량이 높아짐에 따라 IC₅₀은 점점 고농도로 이동하여 항체와의 반응성이 크게 감소된다.

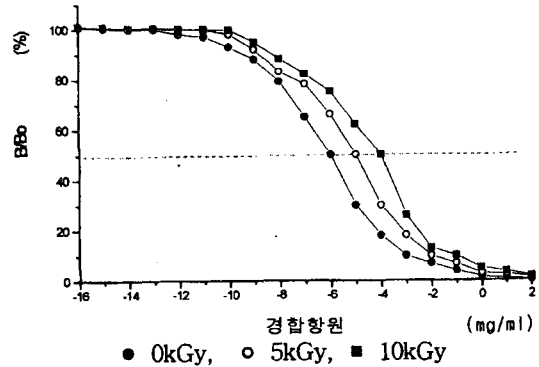


Fig. 12. Response of food protein for antibody.

Competitive ELISA를 실시하여 방사선 조사 식품을 검출하며 모든 반응은 실온에서 실시한다. 방사선을 조사하지 않은 식품에서 분리한 단백질을 coating용 완충용액에 용해시켜 ELISA plate에 가하여 coating한 후, PBS-Tween을 가하여 coating되지 않은 단백질을 씻어낸다. 식품에서 분리한 단백질인 경합항원을 PBS-Tween으로 여러 농도로 희석하여 첨가한다. 항체를 PBS-Tween으로 일정한 농도로 희석하여 첨가하고 경합 반응시킨 후, PBS-Tween을 가하여 씻는다. 2차항원인 AP conjugated anti-rabbit IgG를 가하여 반응시키고, PBS-Tween를 가하여 씻는다. 발색용액으로 반응시킨 후, NaOH를 첨가하여 발색을 정지시킨다. ELISA reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정한다. 경합 항원이 coating된 단백질(항원)과 항체와의 결합을 저해하는 저해율을 다음과 같이 산출하여 반대수 그래프로 나타내고, 50% 저해율(B/B₀)을 보이는 경합 항원의 농도(IC₅₀)를 구하고, IC₅₀을 사용하여 다음과 같이 반응성의 감소 정도를 산출한다.

$$\text{Specific Parameter} = \frac{\text{경합 항원이 존재할 때의 흡광도}}{\text{경합 항원이 존재하지 않을 때의 흡광도}}$$

$$\text{Specific Parameter} = \frac{\text{조사 식품에서 분리한 단백질의 IC}_{50}}{\text{비조사 식품에서 분리한 단백질의 IC}_{50}}$$

참고문헌

1. Diehl, J.F. (1995) Potential and current applications of food irradiation. In Safety of Irradiated Foods. 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York, USA, p291-338
2. WHO (1981) Wholesomeness of irradiated food, Report of

- a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. Technical Report Series 659, Geneva, Switzerland
3. 정형욱, 권중호 (1998) Thermoluminescence 측정에 의한 감자와 마늘의 방사선 조사 유무 확인. 한국식품과학회지. 30, 283-287
 4. 황금택, 엄태봉, UTe Wagner, Georg, A. Achreiber (1998) 열발광기를 이용한 양파와 마늘의 방사선 조사 여부 검지. 한국식품영양과학회지. 27, 68-68
 5. 정형욱, Henry Delincoe, 권중호 (2000) 방사선 조사 백사분말의 PSL-TL 다중검지법, 한국식품과학회지. 32, 265-270
 6. 정형욱, 정재영, 권중호 (1999) ESR spectroscopy를 이용한 방사선 조사 효소 분말의 검지와 흡수선량 예측. 한국식품과학회지. 31, 1159-1163
 7. 양재승, 김충기, 이해정 (1999) 닭고기, 돼지고기 및 쇠고기의 방사선 조사 유무 판별을 위한 ESR Spectroscopy의 활용. 한국식품과학회지. 31, 606-611
 8. 정형욱, 정재영, 권중호 (1999) 점도측정법을 이용한 방사선 조사 건조농산품의 검지 가능성. 한국식품과학회지, 28, 1082-1086
 9. 김경수, 김은아, 이해정, 박은령, 양재승, 변명우, 김선민, 이명렬 (1999) 쇠고기와 닭고기로부터 방사선 조사에 의해 유도된 2-alkylcyclobutanone류의 정량적 비교 분석. 한국식품과학회지. 31, 1495-1502
 10. 김경수, 김은아, 이해정, 양재승, 변명우 (1999) 쇠고기, 돼지고기, 닭고기로부터 방사선 조사에 의해 유도된 Hydrocarbon류의 정량적 비교 분석. 한국식품과학회지. 31, 301-307
 11. 오경남, 박준영, 김경은, 양재승 (2000) DNA Comet Assay를 이용한 과일의 방사선 조사 확인. 한국식품과학회지. 32, 531-537
 12. 정석규, 박종흠, 지승택, 박금주, 김해홍, 현창기, 신현길 (2000) Comet assay를 이용한 방사선 조사육의 판별. 한국식품과학회지. 32, 747-754
 13. 김경수, 권중호, 신현길, 양재성, 유영재, 이경애, 황금택 (2000) 식품영양실험현대북-수입식품의 검지 및 안전성 평가. 한국식품영양과학회

(접수 2003년 6월 9일, 채택 2003년 8월 20일)