

감마선 조사된 난백 함유 White Layer Cake의 돌연변이원성 평가

- 연구노트 -

김미정 · 이주운* · 서지현* · 송현파* · 육홍선** · 최정미*** · 변명우*†

안양대학교 식품영양학과, *한국원자력연구소 방사선식품생명공학기술개발

충남대학교 식품영양학과, *건양대학교 미용디자인학과

Safety Evaluation on Mutagenicity of White Layer Cake Containing Gamma-Irradiated Egg White

Mi-Jung Kim, Ju-Woon Lee*, Ji-Hyun Seo*, Hyun-Pa Song*, Hong-Sun Yook**,
Joung-Mi Choi*** and Myung-Woo Byun*†

Dept. of Food and Nutrition, Anyang University, Gyeonggi 430-714, Korea

*Dept. of Radiation Food Science and Biotechnology,

Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-600, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

***Dept. of Fashion and Beauty Design Therapy, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea

Abstract

Mutagenicity of white layer cake including 20 kGy-gamma irradiated egg white manufactured as a research on the practical approaches of gamma irradiation for the reduction of egg allergy was evaluated by *Salmonella typhimurium* reversion assay (Ames test). The water-soluble and organic solvents mixture of methanol:chloroform (2:1)-soluble fractions of the white layer cake including 20 kGy-gamma irradiated egg white were examined in *S. typhimurium* TA98 and TA100. Both with and without metabolic activation, the number of revertant colonies were not increased in each extract compared with negative controls. No significant difference in the formation of the colonies was observed at the non-irradiated and 20 kGy-irradiated samples. The results indicate that there is no evidence of mutagenicity in white layer cake including 20 kGy-gamma irradiated egg white.

Key words: egg allergy-reduced cake, genotoxicity safety, gamma irradiation, egg white

서 론

계란은 높은 영양 가치를 가지는 중요한 식량 자원으로 이용되고 있으나 식품 알러지를 잘 일으키는 주요 식품군(1)이기도 하다. 계란 알러지는 성인보다는 유아나 소아에게서 빈번히 발생되므로 성장기 어린이의 균형적인 영양 공급에 악영향을 끼치며, 원인 식품의 거부로 인한 편식 등을 유발하기도 한다(2,3). 계란 알러지를 억제 또는 저감화시키기 위해 단백질 분해효소를 이용하거나(4) 원인 물질을 분리하여 제거하는 방법(5) 등의 연구가 시도되었으나, 실용적인 방법은 거의 전무한 실정이다.

한편, 방사선 조사 기술을 이용한 계란의 주요 알러젠에 대한 구조변화 실험에서 상당히 긍정적인 결과를 얻을 수 있었다(6-10). 전보(11)에서 방사선 조사 기술을 이용하여 계란의 알러지성을 감소시키기 위한 실증 연구의 일환으로 난백에 감마선을 조사한 후 비교적 난백을 많이 함유하는 가공식

품 중 cake를 제조하여 그 품질 특성을 관찰하였을 때, 최종 제품의 품질에 큰 영향 없이 cake를 제조할 수 있었다.

그러나 실제로 알러지 저감 식품을 개발하기 위해 방사선 조사 기술을 사용할 때는 이들 제품의 안전성에 대한 소비자들의 논란이 여전히 남아 있을 것으로 사료된다. 방사선 조사 시 식품 내에 방사능을 남기지 않는다는 보고(12)가 있음에도 불구하고 소비자들은 조사된 식품에 방사능이 남아 있을 것이라는 생각을 하여 꺼려하고 있는 실정이다. 방사선 조사 식품에 대한 소비자들의 부정적인 선입견(13)을 불식시킬 수 있는 방법은 실험상으로 그 안전성을 검증하여 그 결과를 토대로 소비자들을 교육, 홍보하는 것이다. 이를 위해서는 방사선 조사식품에 대해 유독성 물질의 유발, 영양소의 파괴, 유전변이 물질의 유발, 발암성 물질의 유발, 방사성 물질의 유발, 잔류 내성세균에 의한 유해 등과 같은 문제점에 주안을 두어 다각도로 검토되어야 한다. 특히 방사선 조사 기술을 이용한 알러지 저감 식품 생산기술은 국내·외적으로 아직

†Corresponding author. E mail: mwbyun@kaeri.re.kr
Phone: 82 42 868 8060, Fax: 82 42 868 8043

보고된 바가 없어 이를 실용화하기 위해서는 방사선 조사선 량이나 안전성 점검을 위한 다양한 형태의 연구가 선행되어야 한다.

따라서 본 연구는 난백을 비교적 많이 함유한(원료 대비 19.6%) white layer cake의 제조시 20 kGy로 감마선 조사된 난백을 원료로 사용하여 생산된 최종 제품을 대상으로 복귀돌연변이 시험의 안전성 평가를 수행하여 방사선 조사된 난백을 함유한 white layer cake의 안전성에 대한 염려 및 의구심을 과학적으로 해명함으로써 국민적 이해증진 및 소비자의 수용성 증대에 기여하고자 실시하였다.

재료 및 방법

시험 시료의 준비

전보(11)에서 제조한 pound cake, sponge cake, white layer cake 중 난백을 가장 많이 함유한 white layer cake를 돌연변이원성 측정용 시험구로 정하여 감마선 조사된 난백을 함유한 가공제품의 독성학적 안전성을 평가하였다. 시험시료는 20 kGy로 감마선 조사된 난백을 함유한 white layer cake를 처리구로 사용하였고, 대조구로는 비조사 난백을 함유한 white layer cake로 하였다. 난백에 대한 감마선 조사는 Co-60을 선원으로 하여 시간당 10 kGy의 선량율로 시료 10 kg이 20 kGy의 흡수선량을 받도록 감마선 조사시설(IR-79, Nordion International Ltd., Ontario, Canada)에서 조사하였다. 조사 후 난백을 냉장보관하면서 cake 제조 실험에 사용하였다. White layer cake 제조를 위한 원료 배합비는 Table 1과 같다. White layer cake의 제조는 호바터 믹서기(NVM2-14, Daeyung Bakery Machinery Ind. Co., Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 쇼트닝을 부드럽게 하여 소금, 설탕, 유화제를 넣고 적당한 크림상태로 만든 후, 흰자와 주석염을 조금씩 첨가하면서 부드러운 크림상태로 만들었다. 전체 물 분량 중 1/2를 크림상태의 혼합물에 조금씩 넣으면서 저속, 중속으로 혼합하고, 베이킹파우더, 박력분, 탈지분유를 가볍게 섞어 나머지 물을 넣고 혼합하여 부드러운 반죽을 만들었다. 반죽은도

23°C, 비중 0.8±0.05로 조정하였으며, 반죽은 원형 팬(Φ 24 cm×4 cm)에 550 g panning한 후 오븐에서 190°C로 25분간 굽기를 하였다. 실온에서 방냉한 후 시험시료로 사용하였다.

시험용액의 조제

시험용액을 제조하기 위해 Yook 등(14)의 방법을 사용하였다. 즉, 시료를 분쇄한 후 각각 10 g의 시료를 30 mL의 증류수(물추출물)나 혼합유기용매(용매추출물, methanol:chloroform = 2:1)가 들어있는 삼각 flask에 넣고 3분간 균질하였다. 균질물을 shaking incubator(Bio-shaker BR-40LF, TAITEC, Tokyo, Japan)에서 4°C, 20 rpm으로 하룻밤 추출하였다. 추출물을 9,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 조작을 3회 반복하여 얻은 상층액을 동결건조하였다. 동결건조한 시료 중 물추출물은 증류수로 녹여 멸균한 여과지(0.45 µm filtration kit, MILLEX-HV, Millipore, Molsheim, France)로 여과한 후 5,000 µg/plate부터 313 µg/plate의 농도로 준비하여 복귀돌연변이 시험에 사용하였다. 용매추출물은 물 대신 DMSO(Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, USA)를 사용하여 용해시킨 후 물추출물과 같은 방법으로 여과 후 시험에 사용하였다.

복귀돌연변이 시험

시험방법은 Maron과 Ames(15)의 방법에 준하여 실시하였다. 시험에 사용된 균주는 *Salmonella typhimurium* LT2를 친주로 하는 *S. typhimurium* TA98과 TA100으로 한국화학연구소 안전성센터에서 분양 받아 형질을 확인 후 사용하였다. 대사활성화를 위한 간 균질액(S9 fraction)은 Sprague-Dawley rat의 간으로부터 분리한 것으로 Oriental Yeast Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, 5%(v/v)의 S9 mix를 제조하여 사용하였다. S9 mix는 0.5 mL/plate로 처리했으며, 그의 활성은 2-Aminoanthracene(2-AA)의 돌연변이 유발로 확인하였다. 음성대조물질로는 시험물질의 조제에 사용한 증류수를 사용하였으며, 양성대조물질로는 4-Nitroquinoline-1-oxide(4NQO), Sodium azide(SA) 및 2-AA를 Sigma사(Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA)로부터 구입하여 이용하였다.

시험물질의 처리는 대사활성계 적용(+S) 및 미적용(-S) 하에 direct plate incorporation 방법으로 하였으며, 각 농도군당 3개 plate를 사용하였다. 시험물질 0.1 mL과 S9 mix(혹은 멸균 증류수) 0.5 mL에 nutrient broth에서 12시간 배양시켜 대수기(약 2×10⁹ cells/mL)상태에 이르도록 한 배양액 0.1 mL을 top agar에 혼합하여 minimal glucose agar plate에 부어 고화시킨 다음, 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 집락수를 계수하였다.

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

Table 1. Formula of white layer cake

Ingredient	Content (g)	Percentage (%)
Cake flour (14% mb)	600	22.8
Sugar	720	27.3
Shortening	360	13.7
Salt	12	0.5
Emulsifier	18	0.7
Water	348	13.2
Non fat dry milk	36	1.4
Baking powder	18	0.7
Egg white ¹⁾	516	19.6
Cream of tartar	3	0.1
Total	2631	100

¹⁾Egg white for treatments was separated from whole egg and irradiated at 20 kGy of absorbed dose prior to addition and that for control was used without irradiation.

결과 평가 및 통계처리

각 항목에 대해 동일한 실험을 5회 반복 실시하였으며, 얻어진 결과들을 SAS[®] software(16)에서 프로그램된 general linear model procedures, least square 평균값을 Duncan의 multiple range test법을 사용하여 평가하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

감마선(20 kGy) 조사된 난백 함유 white layer cake의 세균에 있어서 돌연변이 유발성 여부를 검색하기 위하여 *S. typhimurium*의 histidine 요구성 균주 TA98과 TA100을 이용하여 복귀돌연변이 시험을 실시하였다. 대상시료가 균주생장 억제력을 거의 나타내지 않음을 예비시험에서 확인하였다. 따라서 본 시험에서는 의약품 등의 독성시험 기준(17)에 준하여 최고농도를 5,000 µg/plate로 하고, 공비를 2로 한 5 단계 농도군(5,000, 2,500, 1,250, 625 및 313 µg/plate)으로 본 시험을 실시하여 복귀돌연변이 집락수를 조사한 결과를 Table 2와 3에 나타내었다.

각 균주의 음성대조군 복귀변이 집락수는 문헌치(15) 범위 이내였고, 양성대조화합물에 의해 복귀변이 집락수가 현저

Table 2. Revertant colonies in the Ames test on the water-soluble fraction of white layer cake containing 20 kGy gamma-irradiated egg white

Irradiation	S9 Mix	Dose (µg/plate)	Number of revertant colonies per plate	
			TA98	TA100
+			40±2 ^a	130±19 ^a
			53±6 ^a	131±17 ^a
		5,000	30±9	160±13
		2,500	32±1	147±6
		1,250	31±9	135±7
		625	34±1	132±9
		313	35±5	123±11
		5,000	41±2	153±18
		2,500	38±2	155±8
		1,250	40±6	160±5
		625	34±4	147±10
		313	40±4	125±16
		5,000	40±11	171±11
		2,500	38±0	164±13
		1,250	31±3	169±9
		625	34±1	171±10
		313	32±6	159±20
		5,000	58±2	173±5
		2,500	43±3	175±3
		1,250	32±6	163±13
		625	41±4	149±2
		313	45±1	139±6
		5,000	389±45 ^b	772±94 ^c
		2,500	798±25 ^d	1408±82 ^d
		1,250	32±6	163±13

Each value represents the mean±standard deviation of the results obtained from experiments repeated with five times ($p < 0.05$).

^aDeionized distilled water was use as a negative control.

^b ^dPositive control agents: ^b4 Nitroquinoline 1 oxide (0.5 µg/plate),

^cSodium azide (0.5 µg/plate), ^d2 Aminoanthracene (0.4 µg/plate).

히 증가하여 본 시험이 적합하게 행하여졌음을 알 수 있었다. 본 시험 결과 시험물질을 처리한 균주의 모든 농도군에서 복귀변이 집락수의 증가 경향은 나타나지 않았다. 감마선 조사 시료와 비조사 시료 처리군 간의 비교에서 유의한 집락수의 차이는 나타나지 않았으며, 또한 대사활성화시키지 않은 경우와 시킨 경우 모두에서도 복귀변이 집락수의 농도 의존적인 증가 경향은 보이지 않았다.

일반적으로 돌연변이원성의 판정은 음성대조군 복귀변이 집락수의 2배 이상인 경우를 양성으로 판정한다(18). 예를 들어 TA98의 양성대조물질로 사용한 2-AF 및 2-NF는 각각 50배 이상의 복귀변이 집락수의 증가를 보여 강한 돌연변이원성을 나타낸 반면, 시험물질로 사용한 20 kGy 조사된 난백을 함유한 white layer cake는 전 시험적용농도에서 복귀돌연변이수가 증가하지 않았다. 이 결과는 이전에 보고된 방사선 조사된 식품류에 대한 유전독성학적 안전성을 검증한 결과들(19-21)과 일치하였고, WHO(22)에서도 보고한 고선량으로 방사선이 조사된 식품의 영양학적, 유전독성학적 단·

Table 3. Revertant colonies in the Ames test on the organic solvents mixture^a-soluble fraction of white layer cake containing 20 kGy gamma-irradiated egg white

Irradiation	S9 Mix	Dose (µg/plate)	Number of revertant colonies per plate	
			TA98	TA100
+			40±2 ^b	130±19 ^b
			53±6 ^b	131±17 ^b
		5,000	32±6	162±15
		2,500	27±2	150±16
		1,250	35±1	145±12
		625	36±4	134±20
		313	34±0	140±9
		5,000	41±13	164±11
		2,500	41±2	158±11
		1,250	49±3	161±13
		625	46±4	155±15
		313	44±1	148±3
		5,000	30±6	171±3
		2,500	33±1	172±10
		1,250	30±2	166±14
		625	29±9	144±13
		313	30±6	142±14
		5,000	58±2	174±8
		2,500	43±3	169±9
		1,250	42±6	170±4
		625	41±4	165±4
		313	45±1	148±6
		5,000	389±45 ^c	772±94 ^d
		2,500	798±25 ^e	1408±82 ^e
		1,250	32±6	163±13

Each value represents the mean±standard deviation of the results obtained from experiments repeated with five times ($p < 0.05$).

^aOrganic solvents mixture was prepared with the mixing rate of 2 to 1 of methanol to chloroform, respectively.

^bDeionized distilled water was use as a negative control.

^c ^ePositive control agents: ^c4 Nitroquinoline 1 oxide (0.5 µg/plate), ^dSodium azide (0.5 µg/plate), ^e2 Aminoanthracene (0.4 µg/plate).

장기 안전성 평가결과에서도 이미 입증된 사실이다. 이상의 결과를 종합할 때, 감마선(20 kGy) 조사 난백 함유 white layer cake은 본 시험 조건 하에 사용한 균주들에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

결론적으로 감마선 조사기술을 이용하여 계란 알레르기를 없앤 가공식품의 생산에서 안전성 검증은 소비자의 수용성 측면에서 매우 중요하다(13). 안전성에 대한 열려 및 의구심을 과학적인 평가로 명확하게 함으로써 국민적 이해증진 및 생산성 향상에 기여할 수 있을 것이다.

요 약

감마선 조사 기술을 이용하여 계란의 알러지성을 감소시키기 위한 실증 연구의 일환으로 제조한 감마선 조사된 난백 함유 white layer cake의 독성학적 안전성을 검증하고자 본 시험을 실시하였다. 시험 시료의 물 가용분 및 methanol 가용분을 대상으로 *in vitro* 단기 시험인 *S. typhimurium* TA98과 TA100을 이용한 유전자 복귀돌연변이시험(Ames tset) 결과, 감마선 조사 난백 함유 white layer cake이 직접변이원이거나 간접변이원으로 작용하지 않음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 원자력 중장기 연구개발과제의 지원으로 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Breneman JC. 1978. *Basis of Food Allergy*. C. C. Thomas, Springfield. p 18 36.
2. Hefle SL. 1996. The chemistry and biology of food allergens. *Food Technol* 50: 86 92.
3. David TJ. 1993. *Food and food additive intolerance in childhood*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. p 157 159.
4. Matsuda T, Tsuruta K, Nakabe Y, Nakamura R. 1985. Reduction of ovomucoid immunogenic activity on peptic fragmentation and heat denaturation. *Agric Biol Chem* 49: 2237 2241.
5. Yunginger JW. 1997. Food antigens. In *Food allergy: adverse reactions to food and food additives*. Blackwell Scientific Publications, Boston. p 50 53.

6. Lee YK, Matsuhashi S, Kume T. 1999. Change in carbohydrates of chicken and quail ovomucoids by gamma radiation. *Radiat Phys Chem* 54: 285 290.
7. Kume T, Ishii T, Matsuda T. 1994. Immunochemical identification of irradiated chicken eggs. *J Sci Food Agric* 65: 1 4.
8. Kume T, Matsuda T. 1995. Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. *Radiat Phys Chem* 46: 225 231.
9. Kim MJ, Lee JW, Yook HS, Lee SY, Kim MC, Byun MW. 2002. Changes in the antigenic and immunoglobulin E binding properties of hen's egg albumin with the combination of heat and gamma radiation treatment. *J Food Prot* 65: 1192 1195.
10. Lee JW, Lee KY, Yook HS, Lee SY, Kim HY, Byun MW. 2002. Allergenicity of hen's ovomucoid gamma irradiated and heated under different pH conditions. *J Food Prot* 65: 1196 1199.
11. Lee JW, Seo JH, Kim YH, Choi JM, Yook HS, Ahn HJ, Byun MW. 2003. Quality properties of cakes containing gamma irradiated egg white. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 311 314.
12. Thayer DW. 1994. Wholesomeness of irradiated foods. *Food Technol* 48: 58 67.
13. Bruhn C. 1995. Consumer attitudes and market response to irradiated food. *J Food Protect* 58: 175 181.
14. Yook HS, Lee EM, Kim DH, Lee KH, Lee HJ, Lee YN, Byun MW. 2000. Genotoxicological safety on water soluble fraction of gamma irradiated Korean soybean fermentation foods. *J Food Hyg Safety* 15: 297 303.
15. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res* 113: 173 215.
16. SAS. 1988. *SAS/STAT: User's Guide*. 6th edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
17. Korea Food and Drug Administration. 1999. Standard for evaluation of toxicology of drugs. Notice No. 1999 61, KFDA (22. Dec. 1999).
18. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/Mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res* 31: 347 364.
19. Jo SK, Yook HS, Byun MW. 1996. Genotoxicological safety of the gamma irradiated Korean red ginseng *in vitro*. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 491 496.
20. Kang IJ, Park JH, Kang YH, Lee HK, Byun MW. 1999. Hygienic quality and genotoxicological safety of gamma irradiated pork. *J Korean Soc Food Nutr* 28: 1092 1098.
21. Lee HJ, Kang KO, Yook HS. 2001. *In vitro* genotoxicological safety of fresh vegetable extract juice by gamma irradiation. *J Korean Soc Food Nutr* 30: 1227 1236.
22. World Health Organization. 1999. High dose irradiation: Wholesomeness of food irradiation with doses above 10 kGy. *WHO Technical Report Series 890* Geneva, Switzerland.

(2003년 4월 11일 접수; 2003년 9월 4일 채택)