

감마선 조사된 멸치액젓의 유전독성학적 안전성 평가

육홍선^{1*} · 차보숙² · 김동호³ · 이주운³ · 변명우³

¹충남대학교 식품영양학과

²수원여자대학 식품과학부

³한국원자력연구소 방사선식품·생명공학연구팀

Genotoxicological Safety of Gamma-Irradiated Salted and Fermented Anchovy Sauce

Hong-Sun Yook^{1*}, Bo-Sook Cha², Dong-Ho Kim³, Ju-Woon Lee³ and Myung-Woo Byun³

¹Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Dept. of Food Science, Suwon Women's College, Suwon 441-748, Korea

³Team for Radiation Food Science and Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea

Abstract

Gamma irradiations at 5 or 10 kGy were applied to salted and fermented anchovy sauce, for improving the hygiene quality and evaluating the genotoxicological safety. *In vitro* genotoxicological safety of irradiated sauces was evaluated by *Salmonella* Typhimurium (TA98, TA100, TA1535 and TA1537) and *E. coli* WP2 uvrA reversion assay, SOS chromotest (*Escherichia coli* PQ37), and chromosome aberration test (Chinese hamster lung fibroblast cells) in the absence or presence of an exogenous metabolizing system (S9 mix). The gamma-irradiated samples were not significantly different from nonirradiated-control for three *in vitro* tests ($p < 0.05$). *In vivo* micronucleus test using ICR mice (male) was not significantly different from the control at $p < 0.05$. The salted and fermented anchovy sauce exposed to 5 or 10 kGy-gamma ray revealed negative results in these three *in vitro* mutagenetic tests and *in vivo* micronucleus test upto 50,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$, respectively. The results indicated that 5 or 10 kGy gamma-irradiated salted and fermented anchovy sauces did not show any mutagenicity.

Key words: salted and fermented anchovy sauce, gamma irradiation, Ames test, SOS chromotest, chromosome aberration test, micronucleus test

서 론

전통 수산발효식품인 멸치액젓은 소규모 재래식에 의해 제조, 유통되는 경우가 많아 제품이 불균일하게 생산되고 있을 뿐만 아니라 과량의 식염첨가, 비과학적, 비위생적 생산 등의 문제점들과 저장 및 유통과정 중 색택의 변화, 침전물의 생성, 풍미변화 등 품질의 변화가 일어날 수 있어 정밀여과 및 가열살균 등의 위생화 방법이 행해지고 있다(1,2). 그러나 이 역시 제품의 낮은 수율과 비용, 각종 영양성분의 파괴, 냄새나 색 등의 풍미변화를 가져오며, 살균처리 후 재포장하는 과정에서 2차 오염이 발생할 수 있는 등 공정상의 어려움을 갖고 있어 이에 대한 해결 및 연구가 시급히 요구되고 있다(3,4).

한편, 식품의 새로운 위생화 방법인 감마선 조사법은 비가열 식품살균방법의 하나로 강력한 투과력에 의해 제품의 어떠한 완포장 형태라도 연속처리가 가능하며, 살균처리 후 이

차오염의 가능성이 없다. 또한 제품의 품질을 상승시키지 않는 냉온 살균법으로 성분의 파괴를 최소화하고 가열처리가 불가능한 제품을 살균할 수 있으며 화학훈증제 처리와는 달리 유해성분의 잔류 및 독성이 없고 오염유기체의 살균, 살충이 확실하여 살균공정관리가 편리하고 정확하다는 것 등 많은 장점이 있다(5,6). 또한, 방사선을 조사한 식품의 안전성은 이미 세계보건기구(WHO), 국제식량농업기구(FAO), 미국 식품의약품국(FDA) 등의 국제 기관과 학술단체에서 공인된 바 있으며 이를 기초로 그 적용범위도 급격히 확산되고 있는 추세이다(7-11).

따라서 방사선 조사가 멸치액젓의 2차 오염방지 및 대규모 연속처리로 경제성을 향상시킬 수 있는 새롭고 안전한 위생화 방법으로서의 응용을 기대하여 이미 5 kGy 내외의 감마선 조사가 15°C에서 12주간 저장 동안 오염미생물 제어에 효과적이었다는 연구보고가 발표된 바 있다(12). 즉 감마선 조사

*Corresponding author. E-mail: yhsuny@cnu.ac.kr
Phone: 82-42-821-6840, Fax: 82-42-822-8283

된 멸치액젓의 일반성분, pH, 염도, 점도, 유리아미노산 조성, 아미노태질소, 휘발성 염기태질소 및 trimethylamine의 함량은 기존 위생화 방법과 유의적인 차이가 없었으며, 색택에 있어서는 조사선량이 증가함에 따라 색이 밝아지는 등 외관적으로 긍정적인 효과를 보였다. 또, 색, 향, 맛 및 종합적 기호도 등 관능적 측면에서도 대조구와 가열살균 시험구에 비해 높은 선호도를 나타내어 정밀여과 시험구와 마찬가지로 우수한 품질을 나타내었다. 그래서 감마선 조사구가 물리, 화학, 관능적 평가에서 대조구보다 더 우수한 것으로 보고되었다(12). 그러나, 아직까지 방사선 조사된 멸치액젓의 안전성에 대한 결과가 없으며, 본 기술의 활발한 이용을 위해 안전성 평가 자료를 제시하고자 본 연구를 수행하게 되었다.

이에 본 실험에서는 과량의 선량인 10 kGy를 멸치액젓에 적용시켰을 때 *in vitro* 유전독성학적 안전성 평가의 일환으로 *Salmonella* Typhimurium 균주를 이용한 복귀돌연변이 실험과 *Escherichia coli* PQ37 균주를 이용한 SOS chromotest 및 CHL(Chinese hamster lung fibroblast) 세포를 이용한 염색체 이상시험과 *in vivo* 소핵세포 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

시료 조제

멸치액젓은 2003년도 추자도산 멸치(*Engraulis japonica*)를 구입하여 3% 식염수로 깨끗이 세척하였다. 세척이 끝난 멸치는 중량의 약 30%에 상당하는 소금을 가하여 고루 혼합한 후 숙성 발효용기에 담아 어체가 보이지 않을 정도로 소금을 충분히 도포하였으며 비닐로 표면을 덮어 가급적 공기의 유입이 없도록 하여 뚜껑을 덮었다. 제조 2일 경과 후 표면에 일정한 하중을 가하여 염지 유출액에 멸치가 잠기도록 하였으며, 15°C에서 6개월간 숙성발효를 시킨 후, 베포로 착즙한 멸치액젓 원액을 실험에 사용하였다. 시료는 250 mL용 유리병에 200 mL씩 밀봉포장하여 감마선을 조사하였고, 대조구로는 가공처리를 하지 않은 멸치액젓을 원액으로 사용하여 동결건조한 후 실험에 사용하였다.

멸치액젓의 방사선 조사는 한국원자력연구소내 감마선 조사시설(선원: Co-60, 10만 Ci)을 이용하여 실온에서 시간당 1 kGy의 선량율로 10 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 이 때 흡수선량을 확인하기 위하여 free radical dosimeter와 ceric cerous dosimeter를 이용하였으며 조사 후 흡수선량 오차는 ± 1.2 kGy 범위였다.

복귀 돌연변이 시험 및 균주

복귀 돌연변이 시험은 Maron과 Ames의 방법(13)에 준하여 실시하였다. 사용에 앞서 필요시 *Salmonella* Typhimurium LT2를 친주로 하는 *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주에 있어서는 균주의 유전자형 확인을 위해 histidine 요구성 여부, *uvr* B mutation 유지여부, R-factor 유지여부, *rfa* 돌연변이의 유지 여부, spontaneous

revertant의 수 등을 확인하는 시험을 실시하였고 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 균주에 있어서는 tryptophan 요구성 여부, *uvrA* mutation 유지 여부, spontaneous revertant의 수 등을 확인하는 시험을 실시하였다.

본 시험에 사용된 *S. Typhimurium* 균주는 Molecular Toxicology Inc.(USA)에서 구입하였고, *Escherichia coli* WP2 *uvrA* 균주는 Dr. M.H.L. Green(UK)으로부터 분양받았으며 형질을 확인한 후 한국화학연구소 안전성센터에서 계대 배양 중인 것을 시험에 사용하였다. 유전형질이 확인된 균주들을 nutrient broth에 접종, 배양하여 현탁액 1 mL당 DMSO(dimethylsulfoxide)를 90 μ L 가하여 냉동 보관용 시험관에 채워 드라이 아이스에서 동결시킨 후 약 -80°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다. Master plate에 배양한 균주를 25 mL의 2.5% nutrient broth에 접종하여 37°C, 200 rpm으로 약 10시간 진탕 배양(Vision Scientific Co.)한 후 시험에 사용하였다.

간 균질액(S9 fraction)은 Maron과 Ames의 방법(13)에 따라 조제한 것(단백질함량 22.5 mg/mL 함유, Oriental Yeast Co., Japan)을 사용하였다. S9 mix는 상기 S9 fraction과 시판 cofactor(Wako Co., Japan)로 조제하였다. 처리 농도는 0.5 mL/plate로 하였으며, S9 mix의 활성은 2-AA의 돌연변이 유발로 확인하였다.

시험결과는 각 농도군 당 3 plate로부터 얻은 colony수의 평균과 표준편차로 나타내었고 복귀돌연변이 colony수가 농도의존성을 보이면서 용매대조군의 2배 이상인 경우를 양성으로 하였다.

돌연변이원성 시험

SOS Chromotest는 Quillardet와 Hofnung의 방법(14)에 준하여 수행되었다. 즉 L medium에 5×10^8 CFU/mL 농도로 배양된 종배양액을 2%(v/v)가 되도록 접종하여 37°C에서 약 2시간 진탕배양(5×10^4 CFU/mL)하였다. 직접변이원의 경우 L medium으로 10배(v/v) 희석된 균 부유액을, 간접변이원의 경우 S9 mix(B(a)P; 3%)에 10배(v/v) 희석된 균 부유액에 10배(v/v) 희석된 0.6 mL의 균 배양액을 분주하고 여기에 100 μ g/assay의 시료를 혼합한 다음, 37°C에서 210 rpm으로 2시간 배양하였다. 이 때 첨가된 양성대조물질(돌연변이원)의 사용량은 dose response test를 실시하여 최적의 농도를 설정한 후 사용하였다.

시료 색소로 인한 흡수 spectrum 영향을 차단하기 위하여 배양액을 4°C에서 7,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상침액을 제거한 후 잔사에 0.6 mL의 L medium을 현탁시켰다. 이 현탁액 0.2 mL를 취하여 Quillardet와 Hofnung의 방법(14)과 동일하게 각각의 효소 활성을 측정하였다.

CHL 세포를 이용한 염색체이상 시험

시험물질은 세포배양액에 대한 최고용해농도인 0.1 g/mL로 용해하여 여과(공경 0.2 μ m)한 것을 최고농도는 배지 용량

의 10%로 하고 공비 2로 배양액에 희석하여 사용하였다. 활성 대사효소계인 S9 mix는 S9 fraction(단백질함량 22.5 mg/mL 함유, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan)과 시판 cofactor (Wako Co., Tokyo, Japan)로 조제하였다. 음성대조군으로는 용매만을 처리하였으며 양성 대조군으로는 활성대사효소계 부재시 EMS(ethylmethanesulfonate)를, 활성대사효소계 존재시 CPA(cyclophosphamide·H₂O)를 사용하였다. 시험에 사용한 Chinese hamster lung fibroblast(CHL) 세포는 염색체의 수가 25개이며, 1회 세포주기는 15시간으로서 염색체 이상시험에 적합한 조건을 갖춘 세포로서 한국화학연구소로부터 기증받아 사용하였고 실험은 Ishidate 등(15) 및 Dean과 Danford(16)의 방법을 참고해 이에 준하여 실시하였다. 각 플라스크당 제작된 표본 중 염색 상태가 양호한 1매씩을 선정하여, 1,000배의 배율로 관찰, 계수하였다. 염색체 이상의 형태 판별 및 계수는 일본환경변이원학회(JEMS) 포유동물 시험분과회(MMS)판 '염색체이상 아틀라스'(17)에 따랐다. 통계처리는 SAS program을 이용하였으며, p value가 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 또, 시험물질 처리군에 있어서 염색체 이상을 가진 증기상의 빈도가 음성대조군에 비해 확실히 증가하고 그 작용에 재현성이 있으며 용량의존성을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다.

수컷 마우스(ICR) 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험 체중측정은 군분리시, 시험물질 투여시 및 부검시에 실시하고, 일반증상의 관찰은 부검 당일에 부검 전 외관 관찰을 실시하며 동물의 생존 여부를 확인하였다. 골수검체 제작은 Schmid(18)의 방법에 따랐다.

소핵의 빈도를 산출하기 위해 동물당 2,000개의 PCE(polychromatic erythrocyte, 다염성적혈구) 중 나타나는 MNPCE (micronucleated polychromatic erythrocyte, 소핵을 가진 다염성적혈구)의 수를 계수하였다. 계수시 세포 직경의 1/5~1/20의 크기로 주변 유헤세포의 핵과 동일한 염색상을 나타내는 원형 내지 타원형 소체를 소핵으로 계수하였다. 소핵출현 빈도는 개체당 2,000개의 PCE에서 관찰되는 MNPCE수의 평균±표준편차로 나타내었다(19-21).

소핵의 유무에 상관없이 함께 200개의 PCE 및 NCE(normochromatic erythrocyte, 정염성적혈구)를 계수하여 PCE/(PCE+NCE) 비율 즉 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율을 산출해 세포독성의 지표로 하며, PCE의 수를 200으로 나누어 나타내었다.

생존한 동물의 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율이 모두 0.1 이상일 때 시험은 유효한 것으로 하며 각 동물로부터 얻은 기초자료에 대해 통계처리를 실시하여 투여군과 음성대조군과의 차이를 검사하였다. 투여군에서의 MNPCE의 빈도가 통계학적으로 유의하며 용량의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다.

다음 방법으로 통계처리를 실시하고, 그 결과 p<0.05인 경

우에 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 음성대조군-양성대조군의 비교에는 Student's t-test를 이용하였다(22). 모든 동물에 있어서 PCE/(PCE+NCE) 비율이 0.1 이상인 경우 시험이 타당한 것으로 하고(23), MNPCE의 빈도가 통계학적으로 유의하며 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다. 체중에 있어서는 부검시 각 개체의 체중에 대하여 ANOVA test를 실시하여 유의할 경우 Dunnett's test를 실시하였다(24,25).

결과 및 고찰

멸치액젓의 수득율

감마선 조사 및 비조사된 멸치액젓의 수율은 Table 1과 같다. 비조사된 멸치액젓은 각각 35.57 g/100 mL이었으나 감마선 조사된 시료는 5 kGy와 10 kGy가 각각 36.57과 36.95 g/100 mL인 것으로 보아 감마선 조사에 의해 수득율이 다소 증가됨을 알 수 있었다.

Ames test에 의한 방사선 조사된 멸치액젓의 돌연변이 유발능

감마선 조사 및 비조사된 멸치액젓의 현탁액을 첨가하였을 때 *Salmonella* Typhimurium TA98, 100, 1535 및 1537과 *Escherichia coli* WP2 uvrA 균주에 대한 복귀변이 집락수를 조사한 결과는 Table 2~4와 같다. 감마선 조사 및 비조사된 멸치액젓의 예비시험결과에 따라 모든 시료는 최대 포화농도인 50,000 µg/plate를 최고 농도로 설정하여 실험을 수행하였고, 시험에 사용한 5개 균주의 평균수는 흡광도에 의한 측정 결과 1.0~1.8×10⁹/mL로 적정 수준이었다. 각 시험에서 음성대조군의 복귀 돌연변이 집락수는 문헌치(13)의 범위 이내였으며 양성대조 화합물에 의해 복귀돌연변이 집락수가 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 행하여졌음을 알 수 있었다. 활성대사효소계 미적용 및 적용된 감마선 조사 및 비조사된 멸치액젓은 모든 시험균주에서 시험적용 농도인 50,000 µg/plate까지의 농도에서 복귀변이 집락수의 농도 의존적인 증가 혹은 감소를 보이지 않았으며 용매대조구와 비교해서도 차이를 보이지 않았다. 한편, 고농도구에서 약간의 집락수가 증가한 것은 시험물질의 특성상 염도가 높기 때문인 것으로 생각되며 이와 같은 현상은 감마선 조사구와 대조구 모두에게서 나타났다.

Table 1. Yield of concentrated extracts from gamma-irradiated salted and fermented anchovy sauce

Irradiation dose (kGy)	Water soluble fraction (g/100 mL) yield
0	35.57±0.53 ¹⁾
5	36.57±0.36
10	36.95±0.72

¹⁾Each value represents the mean±SD of three samples.

Table 2. Revertant colonies in *S. Typhimurium* and *E.coli* WP2 uvrA reversion assay with nonirradiated-salted and fermented anchovy sauce

Test material (kGy)	Dose (µg/plate)	S9	No. of revertant colonies per plate				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	<i>E.coli</i> WP2 uvrA
0	50,000	-	70 ± 21 ¹⁾	286 ± 35	26 ± 3	14 ± 1	17 ± 4
	30,000	-	48 ± 10	210 ± 5	25 ± 4	15 ± 2	12 ± 2
	15,000	-	35 ± 5	138 ± 11	26 ± 7	16 ± 7	11 ± 2
	7,500	-	33 ± 6	141 ± 7	32 ± 6	12 ± 1	9 ± 1
	3,250	-	32 ± 2	107 ± 4	20 ± 6	10 ± 5	11 ± 3
	1,125	-	25 ± 15	130 ± 14	16 ± 8	10 ± 3	7 ± 2
	0	-	28 ± 5	126 ± 14	24 ± 2	14 ± 2	13 ± 1
	10	50,000	-	96 ± 8	290 ± 12	40 ± 7	23 ± 2
30,000	+	55 ± 8	263 ± 16	39 ± 6	22 ± 5	13 ± 2	
15,000	+	43 ± 2	263 ± 24	36 ± 2	20 ± 3	15 ± 3	
7,500	+	41 ± 3	131 ± 8	32 ± 2	18 ± 8	11 ± 1	
3,250	+	33 ± 5	117 ± 4	30 ± 9	19 ± 4	17 ± 2	
1,125	+	46 ± 2	127 ± 11	20 ± 3	13 ± 6	10 ± 1	
0	+	43 ± 3	125 ± 15	29 ± 5	16 ± 3	15 ± 3	
4NQO ²⁾	0.5	-	368 ± 22				132 ± 36
SA	0.5	-		401 ± 56	254 ± 30		
9-AA	50	-				190 ± 21	
2-AA	2	+	326 ± 43	396 ± 35			
2-AA	4	+			265 ± 47	285 ± 71	318 ± 41

¹⁾Each value represents the mean ± SD of three plates and expressed of revertant colonies per plate.

²⁾Sodium azide (SA), 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO), 9-aminoacridine (9-AA) and 2-aminoanthracene (2-AA) were used as positive controls for the corresponding strains.

Table 3. Revertant colonies in *S. Typhimurium* and *E.coli* WP2 uvrA reversion assay with 5 kGy gamma-irradiated salted and fermented anchovy sauce

Test material (kGy)	Dose (µg/plate)	S9	No. of revertant colonies per plate				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	<i>E.coli</i> WP2 uvrA
0	50,000	-	77 ± 12 ¹⁾	142 ± 33	31 ± 6	13 ± 2	20 ± 4
	30,000	-	47 ± 12	142 ± 33	31 ± 6	13 ± 2	20 ± 4
	15,000	-	34 ± 13	131 ± 13	18 ± 5	12 ± 3	13 ± 2
	7,500	-	24 ± 7	139 ± 6	24 ± 4	11 ± 3	15 ± 1
	3,250	-	28 ± 12	122 ± 13	15 ± 9	11 ± 4	16 ± 1
	1,125	-	18 ± 9	98 ± 6	10 ± 3	9 ± 2	12 ± 2
	0	-	19 ± 5	103 ± 17	17 ± 5	13 ± 1	14 ± 2
	10	50,000	+	67 ± 15	313 ± 33	51 ± 3	21 ± 2
30,000	+	52 ± 5	261 ± 20	40 ± 16	21 ± 10	21 ± 3	
15,000	+	48 ± 2	108 ± 11	33 ± 8	17 ± 12	15 ± 2	
7,500	+	41 ± 19	150 ± 3	27 ± 6	18 ± 7	12 ± 1	
3,250	+	37 ± 17	184 ± 15	20 ± 4	18 ± 1	9 ± 2	
1,125	+	28 ± 6	120 ± 17	16 ± 6	19 ± 4	10 ± 2	
0	+	29 ± 3	132 ± 16	26 ± 4	20 ± 2	16 ± 3	
4NQO ²⁾	0.5	-	368 ± 22				132 ± 36
SA	0.5	-		401 ± 56	254 ± 30		
9-AA	50	-				190 ± 21	
2-AA	2	+	326 ± 43	396 ± 35			
2-AA	4	+			265 ± 47	285 ± 72	318 ± 41

¹⁾Each value represents the mean ± SD of three plates and expressed of revertant colonies per plate.

²⁾See the legend of Table 2.

일반적으로 돌연변이원성의 판정은 음성대조구 복귀변이 집락수의 2배 이상인 경우를 양성으로 하므로 본 실험의 감마선 조사한 시료 및 조사하지 않은 시료에 대하여 전 시험적 용농도에서 복귀변이를 유발하지 않는 것으로 보아 감마선

조사에 의한 돌연변이원성은 없는 것으로 판단되었다. 따라서 고선량으로 감마선 조사된 멸치액젓이 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 유전독성학적 변이원성시험에서 쇠고기의 감마선 조

Table 4. Revertant colonies in *S. Typhimurium* and *E.coli* WP2 uvrA reversion assay with 10 kGy gamma-irradiated salted and fermented anchovy sauce

Test material (kGy)	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9	No. of revertant colonies (His+) per plate				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	<i>E.coli</i> WP2 uvrA
0	50,000	-	76 \pm 10 ¹⁾	242 \pm 15	41 \pm 4	20 \pm 2	17 \pm 4
	30,000	-	47 \pm 4	237 \pm 12	34 \pm 5	17 \pm 1	14 \pm 1
	15,000	-	31 \pm 4	172 \pm 35	28 \pm 9	15 \pm 4	12 \pm 2
	7,500	-	28 \pm 13	149 \pm 11	31 \pm 5	7 \pm 3	11 \pm 2
	3,250	-	26 \pm 5	155 \pm 7	18 \pm 9	8 \pm 4	13 \pm 1
	1,125	-	22 \pm 3	120 \pm 4	20 \pm 2	9 \pm 1	9 \pm 1
	0	-	21 \pm 4	135 \pm 13	21 \pm 3	8 \pm 2	10 \pm 2
	10	50,000	+	71 \pm 3	321 \pm 33	31 \pm 2	21 \pm 6
	30,000	+	61 \pm 8	221 \pm 24	31 \pm 2	21 \pm 11	16 \pm 2
	15,000	+	48 \pm 9	156 \pm 21	26 \pm 2	15 \pm 7	17 \pm 3
	7,500	+	42 \pm 5	177 \pm 9	33 \pm 7	11 \pm 2	11 \pm 1
	3,250	+	52 \pm 1	159 \pm 5	21 \pm 1	19 \pm 8	15 \pm 2
	1,125	+	44 \pm 7	148 \pm 9	23 \pm 4	12 \pm 4	13 \pm 2
	0	+	30 \pm 3	135 \pm 12	26 \pm 3	16 \pm 3	15 \pm 3
4NQO ²⁾	0.5	-	368 \pm 22				132 \pm 36
SA	0.5	-		401 \pm 56	254 \pm 30		
9-AA	50	-				190 \pm 21	
2-AA	2	+	326 \pm 43	396 \pm 35			
2-AA	4	+			265 \pm 47	285 \pm 72	318 \pm 41

¹⁾Each value represents the mean \pm SD of three plates and expressed of revertant colonies per plate.

²⁾See the legend of Table 2.

사가 돌연변이를 유발하지 않았다는 Mittler(26)와 Kang 등(27)의 결과와 감마선 조사한 생약재가 유전독성학적으로 안전하다는 Jo 등(28)의 보고와도 잘 일치하였다.

SOS Chromotest에 의한 방사선 조사된 장류의 돌연변이 유발능

감마선 조사 및 비조사된 멸치액젓의 현탁액을 첨가하였을 때 *E. coli* PQ37에 대한 돌연변이 유발능을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 각 시험에서 음성대조군의 IF값은 1.5 이하였으며 양성대조 화합물에 의해 IF값이 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 행하여졌음을 알 수 있었다.

먼저 활성대사효소계 미적용구의 경우, 감마선 조사된 멸치액젓의 물 추출물은 시험적용 농도인 50,000 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 까지의 농도에서 대조구와 유사한 범위의 IF값을 나타내었다. 또 대사활성계를 도입한 즉 S9 mixture를 첨가한 상태에서 역시 이들 시험물질에 대해 SOS chromotest 결과 각각의 시험적용 농도에서 대조구와 방사선 조사구 모두 1.5 이하의 유사한 IF값을 보였다. 전체적으로 IF값은 농도 의존적인 증가 혹은 감소를 보이지 않았으며 방사선 조사구의 경우 비조사 대조구와 비교해서도 차이를 보이지 않았다. 감마선 조사된 멸치액젓의 SOS chromotest 실험결과 감마선 조사구 및 비조사 대조구에 대하여 전 시험적용농도에서 돌연변이를 유발하지 않는 것으로 보아 감마선 조사에 의한 돌연변이원성은 없는 것으로 판단되었으며, 따라서 고선량으로 감마선 조사된 멸치액젓이 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않음을 알 수 있었다. 이는 20 kGy로 조사된 장류(29)와 10 kGy로 조사된 녹즙(30)의 SOS chromotest 결과 돌연변이

이원성이 없었다는 보고와도 잘 일치하였다.

CHL 세포를 이용한 방사선 조사된 멸치액젓의 염색체이상시험

포유동물 배양세포계를 이용한 염색체이상시험에서 염색체 이상의 출현은 화학물질과 세포와의 반응결과 생긴 유전물질의 상해가 클 경우, 완전히 회복되지 않고 남아 세포분열에 지장을 줄 뿐만 아니라 세포에 치명적인 요인이 되기도 한다. 본 시험법은 배양세포에서의 염색체이상의 검출을 목적으로 하는 시험계로서 통상적으로 시험물질처리 후 최초의 유사분열시에 세포를 분석하였다.

감마선 조사 및 비조사된 멸치액젓의 현탁액을 첨가하였을 때 chinese hamster 유래 폐섬유아세포(CHL)를 이용하여 염색체이상시험을 수행한 결과는 Table 6과 같다. 먼저 활성대사효소계 미적용구의 경우, 방사선 조사 및 비조사구 모두 6시간 처리군에 있어서 이상중기상 및 염색체이상의 빈도는 음성대조군을 비롯하여 50,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군까지 모두 0~1 범위였으며, 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 음성대조군의 polyploid의 빈도는 0.0이었으며 핵내배화는 관찰되지 않았고, 시험물질 처리군의 polyploid 및 핵내배화 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 한편 양성대조군에서는 이상중기상의 빈도에서 통계학적으로 유의하며 확실한 증가가 관찰되었다($p < 0.05$). 24시간 처리군에 있어서 방사선 조사 및 비조사구 모두 이상중기상 및 염색체이상의 빈도는 음성대조군을 비롯하여 50,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군까지 모두 0~2 범

Table 5. SOS induction in *E. coli* PQ37 by salted and fermented anchovy sauce in the absence and presence of an exogenous metabolizing system

	µg/assay	S9 mix	β-gal ¹⁾ (unit)	ap ²⁾ (unit)	Ratio	IF ³⁾
D.W		-	2.10	9.29	0.23	1.00
0 kGy	50,000	-	2.93	10.00	0.23	1.29
	30,000	-	2.89	12.40	0.29	1.06
	15,000	-	2.85	10.00	0.29	1.26
	7,500	-	3.64	12.73	0.29	1.03
	3,250	-	3.88	12.87	0.30	1.33
5 kGy	50,000	-	3.63	11.93	0.30	1.34
	30,000	-	2.81	11.20	0.25	1.11
	15,000	-	3.13	10.87	0.29	1.27
	7,500	-	3.64	12.53	0.29	1.28
	3,250	-	3.48	12.20	0.28	1.26
10 kGy	50,000	-	2.93	11.00	0.27	1.18
	30,000	-	2.85	11.80	0.24	1.07
	15,000	-	2.88	10.27	0.28	1.24
	7,500	-	2.96	10.61	0.28	1.24
	3,250	-	3.23	11.89	0.27	1.20
4-NQO ⁴⁾		-		21.9	11.90	1.84
D.W		+	4.91	16.77	0.29	1.00
0 kGy	50,000	+	5.77	16.65	0.35	1.18
	30,000	+	5.42	15.92	0.34	1.16
	15,000	+	5.37	16.28	0.33	1.13
	7,500	+	5.49	17.14	0.32	1.09
	3,250	+	5.44	15.88	0.34	1.17
5 kGy	50,000	+	5.41	15.88	0.34	1.16
	30,000	+	5.51	16.34	0.34	1.15
	15,000	+	5.59	15.44	0.36	1.24
	7,500	+	5.37	17.22	0.31	1.07
	3,250	+	6.05	17.15	0.35	1.21
10 kGy	50,000	+	6.06	18.13	0.33	1.14
	30,000	+	5.50	16.22	0.34	1.16
	15,000	+	5.82	15.77	0.37	1.26
	7,500	+	5.27	15.74	0.33	1.14
	3,250	+	5.61	15.92	0.35	1.20
B(α)P ⁵⁾		+		14.28	0.31	3.77

¹⁾β-gal: β-galactosidase. ²⁾ap: alkaline phosphatase. ³⁾IF: induction factor.
⁴⁾4-NQO: 4-nitroquinoline-N-oxide. ⁵⁾B(α)P: benzo(α)pyrene.

위였으며, 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상증기상의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 음성대조군의 polyploid의 빈도는 0~2 범위였으며 핵내배화는 관찰되지 않았다. 시험물질 처리군의 polyploid 및 핵내배화 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 한편 양성대조군에서는 이상증기상의 빈도에서 통계학적으로 유의하며 확실한 증가가 관찰되었다(p<0.05).

활성대사효소계 적용구의 경우, 이상증기상 및 염색체 이상의 빈도는 음성대조군을 비롯하여 50,000 µg/mL 처리군까지 방사선 조사 및 비조사구 모두 0~3 범위였으며, 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상증기상의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의적인 증가를 나타내지 않았다. 또, 음성대조군의 polyploid의 빈도는 0이었고, 시험물질 처리군의 polyploid 및 핵내배화 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 한편 양성대조군에서는 이상증기상의 빈도에서 통계학적으로 유의하며 확실한 증

가가 관찰되었다(p<0.05).

결과적으로, 포유류 배양세포를 이용하여 방사선 조사 및 비조사된 멸치액젓의 염색체 이상시험을 수행한 결과 대사활성계의 부재 및 존재하 모두 음성의 결과를 나타내어 이상의 실험결과로 미루어 보아 멸치액젓의 위생화를 위해 방사선 조사를 이용하는 방법은 포유동물 배양세포에 대해 직접 변이원으로서 뿐만 아니라 간접변이원으로서도 작용하지 않는 안전한 방법이라 사료된다.

따라서 10 kGy의 고선량으로 감마선 조사된 멸치액젓은 *in vitro*에서 유전독성학적 안전성 평가 결과 돌연변이원성이 없음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 방사선 조사된 식품 중 쇠고기(26), 생약재(28), 녹즙(30), 인삼(31) 등이 유전독성학적 안전성 평가에서 안전성이 입증되었다는 보고와도 잘 일치하였다.

수컷마우스(ICR) 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험 감마선 조사된 멸치액젓의 유전독성학적 안전성을 평가하고자 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 약

Table 6. The chromosome aberrations in cultured CHL cells treated with fermented anchovy sauce

Test material	Treatment			Abnormalities ¹⁾					Aberrant Metaphases	Total Aberrations
	Concentration (µg/plask)	Times (hours)	S9 mix	CsB	CsE	CtB	CtE	Other PP+ER		
Control	-	6	-	0	0	1	0	0	1	1
	-	24	-	1	0	0	0	0	1	1
	-	6	+	0	0	1	1	0	2	2
0 kGy	50,000	6	-	0	0	0	0	1	1	1
	30,000	6	-	0	0	1	0	0	1	1
	15,000	6	-	0	0	1	0	0	1	1
	50,000	24	-	0	0	2	0	0	2	2
	30,000	24	-	1	0	0	0	1	2	2
	15,000	24	-	0	0	0	0	0	0	0
	50,000	6	+	0	0	0	1	1	2	2
	30,000	6	+	0	0	2	0	0	2	2
	15,000	6	+	0	0	1	0	0	1	1
10 kGy	50,000	6	-	0	0	2	0	0	2	2
	30,000	6	-	1	0	0	1	0	2	2
	15,000	6	-	0	0	0	0	0	0	0
	50,000	24	-	0	0	1	0	1	2	2
	30,000	24	-	0	0	1	0	0	1	1
	15,000	24	-	0	0	1	0	0	1	1
	50,000	6	+	0	0	1	2	0	3	3
	30,000	6	+	0	0	0	1	0	1	1
	15,000	6	+	1	0	0	0	0	1	1
EMS	400	6	-	20*	0	0	39*	0	46*	59*
	300	24	-	14*	0	24*	9*	7*	41*	53*
CPA	50	6	+	4*	3	15*	37*	12*	60*	71*

¹⁾CsB, Chromosome break; CsE, Chromosome exchange; CtB, Chromatid break; CtE, Chromatid exchange; PP, Polyploid; ER, Endoreduplication.

*Significantly different from the control at $p < 0.05$.

7주령의 수컷 마우스에 감마선 비조사 혹은 조사된 멸치액젓 추출물을 2,000 µg/kg의 용량으로 단회 경구투여하고, 투여 후 약 24시간에 골수세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가하였다.

일반증상을 보면 모든 시험군에서 부검 당일까지 사망 동물은 없었다. 체중은 각 군의 부검시 체중을 비교한 결과는 Table 7과 같다. 즉, 감마선 비조사 혹은 조사된 멸치액젓 추출물 투여군 모두 평균 체중 약 33~34 g을 유지하였고 약간의 증가 혹은 감소의 경향은 있었으나 통계학적인 유의성은 없었다($p < 0.05$).

한편, 소핵 유발빈도 및 세포독성에 관한 결과는 Table 8과 같다. 개체당 2,000개의 PCE에서 관찰된 소핵을 가진 PCE의 빈도는 음성대조군, 비조사 2,000 µg/kg 투여군, 감마

선 조사 2,000 µg/kg 투여군 및 양성대조군의 순으로 평균 1.67, 1.67, 1.75 및 32.3이었다. 시험물질 투여군의 소핵 빈도에 대하여 음성대조군과의 차이를 조사한 결과 어느 투여군에서도 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았다. 한편 양성대조군에서는 소핵 빈도에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났다($p < 0.05$). 세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 위와 같은 순서로 평균 0.23, 0.23, 0.23 및 0.24였으며, 어느 투여군에서도 음성대조군에 비해 통계학적인 차이는 없었다.

본 시험에 적용한 용량범위 내에서 개체당 2,000개의 PCE를 대상으로 소핵을 계수한 결과 시험물질을 투여한 어느 투여군에서도 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비

Table 7. Body weights of male ICR mice

Test material	Dose (µg/kg)	Body weight (mean ± SD) at the time of	
		Administration (No. of animals)	Sacrifice (No. of animals)
H ₂ O	0	33.55 ± 1.26 ¹⁾ (4)	34.12 ± 1.23 (4)
0 kGy	2000	33.22 ± 1.54 (4)	33.25 ± 1.25 (4)
10 kGy	2000	34.31 ± 1.24 (4)	34.18 ± 1.36 (4)
CPA ²⁾	30	34.21 ± 1.14 (4)	33.35 ± 1.65 (4)

¹⁾Values are mean ± SD.

²⁾CPA: Cyclophosphamide · H₂O (positive control).

Table 8. Micronucleus test of salted and fermented anchovy sauce in male ICR mice

Test material	Dose (µg/kg)	No. of animal	MNPCE ³⁾ /2000 PCE's ⁴⁾	PCE/(PCE+NCE ⁵⁾)
NC ¹⁾	0	4	1.67±1.50 ⁶⁾	0.23±0.11
0 kGy	2000	4	1.67±0.58	0.23±0.10
10 kGy	2000	4	1.75±0.58	0.23±0.05
CPA ²⁾	30	4	32.3±17.9*	0.24±0.11

¹⁾NC: Distilled water (negative control). ²⁾CPA: Cyclophosphamide·H₂O (positive control).
³⁾MNPCE: PCE with one or more micronuclei. ⁴⁾PCE: Polychromatic erythrocyte. ⁵⁾NCE: Normochromatic erythrocyte.
⁶⁾Values are mean±SD.
 *Significantly different from the control at p<0.05.

율은 시험물질을 투여한 모든 군에서 평균 0.23 이상이었고, 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의적인 감소를 나타내지 않았다.

이상의 결과는 양성판정기준을 만족시키지 못하였으며, 따라서 감마선 조사된 멸치액젓은 본 시험조건 하에서 마우스 골수 세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

요 약

감마선 조사(10 kGy)된 멸치액젓의 유전독성학적 안전성 시험을 수행하기 위해 *Salmonella* Typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537과 *E. coli* WP2 uvrA 균주를 사용한 복귀돌연변이시험과 *Escherichia coli* PQ37을 이용한 SOS chromotest 및 CHL 세포를 이용한 염색체 이상시험을 활성 대사효소계 미적용 및 적용하에 실시하였고, ICR 마우스의 골수세포를 이용한 *in vivo* 소핵세포실험을 수행하였다. 감마선 조사(10 kGy)된 멸치액젓은 위의 3가지 *in vitro* 실험에서 비조사된 멸치액젓과 마찬가지로 음성으로 나타났다. 또, 감마선 조사 및 비조사된 멸치액젓의 *in vivo* 소핵세포실험에서도 소핵이 발견되지 않았다. 따라서 10 kGy까지 감마선 조사된 멸치액젓은 위 수행된 *in vitro* 및 *in vivo* 유전독성시험을 실시한 결과, 음성을 나타낸 것으로 보아 유전독성학적으로 돌연변이원성이 없는 것으로 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2003-042-C00118).

문 헌

- Kim YM. 1996. Processing technique and quality control of fermented seafood. *Bulletin of Food Technology* 9: 65-86.
- Park YH, Chang DS, Kim ST. 1997. *Seafood processing*. 2nd ed. Hyung Seol Publisher, Seoul. p 771-788.
- Choi YJ, Kim IS, Cho YJ, Seo DH, Lee TG, Park YB, Park JW. 1999. Peptide properties of rapid salted and fermented anchovy sauce using various protease. *J Korean Fish Soc* 32: 488-494.
- Oh KS. 1999. Quality characteristics of salt-fermented anchovy sauce and sandlance sauce. *J Korean Fish Soc* 32:

- 252-255.
- Byun MW. 1994. Application of irradiation techniques to food industry. *Radioisotope News* 9: 32-37.
- Roberts T, Unnevehr L. 1994. New approaches to regulating food safety. *Food Rev* 17: 2-8.
- WHO. 1981. Wholesomeness of irradiated food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. Tech. Rep. 651. World Health Org., Geneva.
- Codex Alimentarius Commission. 1984. Codex general standard for irradiated foods and recommended international code of practice for the operation of radiation facilities used for the treatment of foods. CAC/VOL. XV, FAO, Rome.
- WHO. 1992. Global health situation and projections estimates. World Health Organization, Geneva.
- WHO. 1992. Review of the safety and nutritional adequacy of irradiated food. WHO/HPP/FOS/92.2.
- ICGFI. 1994. Summary report, Eleventh Meeting of the International Consultative Group on Food Irradiation. 2-4 Nov. 1994, FAO/IAEA/WHO.
- Kim JH, Ahn HJ, Kim JO, Ryu GH, Yook HS, Lee YN, Byun MW. 2000. Sanitation and quality improvement of salted and fermented anchovy sauce by gamma irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1035-1041.
- Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
- Quillardet P, Hofnung M. 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat Res* 147: 65-78.
- Ishidate M Jr, Sofuni T, Yoshikawa K. 1981. Chromosomal aberration tests *in vitro* as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. *GANN Monograph on Cancer Res* 27: 95-107.
- Dean BJ, Danford N. 1984. Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In *Mutagenicity testing - a practical approach*. Venitt S, Parry JM, eds. IRL Limited, Oxford, England. p 187-232.
- JEMS-MMS. 1988. Atlas of chromosome aberration by chemicals, Japanese environmental mutagen society-mammalian mutagenicity study group. Tokyo, Japan.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutat Res* 31: 9-15.
- KFDA. 1998. A law no. 1998-17 of KFDA.
- KFDA. 1999. A law no. 1999-61 of KFDA.
- NIER. 1998. A law no. 1998-41 of NIER.
- Lovell DP, Anderson D, Albanese R, Amphlett GE, Clare G, Ferguson R, Richold M, Papworth DG, Savage JRK. 1989. Statistical analysis on *in vivo* cytogenetic assays. In *Statistical evaluation of mutagenicity test data*. Kirkland DJ, ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p 184-232.
- Heddl JA, Stuart E, Salamone MF. 1984. The bone marrow micronucleus test. In *Handbook of mutagenicity test procedures*. 2nd ed. Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, Ramel

- C, eds. Elsevier Science Publishers, BV. p 441-457.
24. SAS Institute. 1989. *SAS/STAT User's Guide*. Version 6, 4th ed. Cary, NC, USA. Vol 1.
 25. SAS Institute. 1989. *SAS/STAT User's Guide*. Version 6, 4th ed. Cary, NC, USA. Vol 2.
 26. Mittler S. 1979. Failure of irradiated beef and ham to induce genetic aberrations in drosophila. *Int J Radiation Biology* 35: 583-588.
 27. Kang IJ, Kwak HJ, Lee BH, Kim KH, Byun MW, Yook HS. 1998. Genotoxicological and acute toxicological safeties of gamma irradiated beef. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 775-780.
 28. Jo SK, Yook HS, Byun MW. 1997. Genotoxicological safety of the gamma-irradiated Korean red ginseng *in vitro*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 958-964.
 29. Yook HS, Kim DH, Lee JW, Cha BS, Byun MW. 2001. Toxicological safety of gamma-irradiated Korean soybean fermentation foods by SOS chromotest. *J Food Hyg Safety* 16: 133-138.
 30. Lee HJ, Kang KW, Yook HS. 2001. *In vitro* genotoxicological safety of fresh vegetable-extract juice by gamma irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1227-1236.
 31. Ha KW, Jung HK, Oh HY, Heo OS, Sohn SJ, Han ES, Jung SC, Choi BY, Kim YM, Kim PS, Moon HH. 1994. Studies on the genotoxicity of the gamma-irradiated *Parax Ginseng Radix in vitro* and *in vivo*. *J Food Hyg Safety* 9: 67-74.

(2004년 5월 6일 접수; 2004년 8월 5일 채택)