

TL, ESR 및 DNA Comet 분석에 의한 원산지별 땅콩의 방사선 조사 검지 특성

이은영·정재영·조덕조·권중호[†]

경북대학교 식품공학과

Detection Characteristics of TL, ESR and DNA Comet for Irradiated Peanuts by Origins

Eunyoung Lee, Jaeyoung Jung, Deokjo Jo and Joong-Ho Kwon[†]

Dept. of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

Gamma-irradiated peanuts, Korean and Chinese origins, were investigated on detection properties by thermoluminescence (TL), electron spin resonance (ESR), and DNA comet assay (single cell gel electrophoresis). TL measurement showed that the non-irradiated sample revealed a glow curve with low intensity at about 250°C, while the irradiated samples showed higher intensity around at 180°C. TL ratio (TL₁/TL₂) of area for TL₁ glow curve to TL₂ was below 0.05 for the non-irradiated sample and 0.2 or more for the irradiated ones, thus identifying each other. ESR spectroscopy for the irradiated peanuts using outer skin showed negligible signals induced by irradiation, indicating ESR is little applicable to the detection of irradiated peanuts. In DNA comet assay, the non-sample had no or very short tails, whereas the irradiated samples revealed the cells with long tails. Significance in the increase of their lengths depending on irradiation dose ($r=0.761$ /Korean, $r=0.768$ /Chinese) was also found. There was no remarkable difference in detection properties by origins of samples in all determinations. It is concluded that TL analysis or DNA comet assay is suitable for detection of irradiated peanuts and a combined method is recommendable for enhancing the reliability of detection results.

Key words: peanut, TL, DNA comet assay, irradiation

서 론

식품의 방사선 조사 기술은 가열이나 냉동과 비유되는 물리적 처리로써 안전 관리가 보장되는 방법이다. 방사선 조사 식품의 안전성과 기술적 타당성이 국제적으로 공인된 이래 (1,2) 최근에는 39개국에서 식품의 방사선 조사가 상업화되고 있으며, 10 kGy 이상의 조사 선량에 대한 허용이 검토된 바 있다(3,4). 특히 WTO 체제에서 국내 산업의 국제화가 가속화되고 농수산물의 교역이 확대되고 있는 현실이므로, 방사선 조사 식품의 수출입 관리와 국내 시장에서의 유통 관리를 위한 기술적 관리 시스템이 요구되고 있다(5).

중국은 현재 상해, 청도, 심양 등에 상업용 방사선 조사 시설을 갖추고 일부 농산물에 대한 조사를 시행하는 실정이다(5). 더욱이 우리나라는 중국으로부터의 농산물 시장 개방에 따라 수입 품목과 수입량이 점차 증가하는 추세이며(5), 특히 땅콩의 경우 중국으로부터의 수입량이 매우 큰 비중을 차지하는 점(6)과 중국에서 땅콩에 대한 방사선 조사를 허가하고 있는 실정을 감안할 때(4), 수입 관리를 위한 검지 방법의 설정

과 정확한 정보의 제공을 위한 검지 기술의 확립은 필수적이라 할 수 있다.

지금까지 연구된 방사선 조사 식품에 대한 검지 방법에는 물리적인 방법으로 혼입된 미네랄의 열발광 특성을 이용한 thermoluminescence(TL)(7) 및 photostimulated luminescence(PSL)(8), free radical을 측정하는 electron spin resonance(ESR)(9) 등이 있고, 화학적 방법으로 hydrocarbon류(10) 및 2-alkylcyclobutanone류(11)를 검출하는 방법 등이 있으며, 생물학적 방법으로 DNA의 손상과 염기의 변화를 측정하는 DNA comet assay(single cell gel electrophoresis)(12), 미생물 농도를 분석하는 DEFT/APC(13) 등이 있다. 이들 중 땅콩에 대해 연구된 검지 방법은 방사선 유래의 hydrocarbons 및 2-alkylcyclobutanones의 확인(14) 정도로 매우 미약하다.

본 연구에서는 땅콩에 대한 검지 방법을 확보하고자, 비교적 측정이 간편한 TL, ESR 및 DNA comet 분석을 국산 및 중국산 땅콩에 실시하여 원산지별 검지 특성의 비교와 적용 가능한 분석 조건을 마련하고자 하였다.

*Corresponding author. E-mail: jhkwon@knu.ac.kr
Phone: 82-53-950-5775, Fax: 82-53-950-6772

재료 및 방법

시료

속껍질만 있는 형태의 땅콩을 시료로 하여, 국산은 1999년 문경 지역에서 수확된 것을 구입하였고, 중국산은 서울 소재 가락동 농수산물 시장의 전문 수입상으로부터 구입하여 각각 상온 암실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

방사선 조사

시료의 방사선 조사는 H연구소의 ^{60}Co 감마선 조사 시설(100 kCi, Nordion, Ontario, Canada)을 이용하였다. 땅콩의 해충 방제 등을 목적으로 허가된 선량을 기준으로 하여 실온에서 시간당 선량률을 일정하게 하면서 0.5~4 kGy의 총 흡수 선량을 얻도록 하였다. 이 때 흡수 선량의 확인에는 ceric-cerous dosimeter를 사용하였다.

TL 분석

시료의 열발광 분석은 껍질을 포함한 땅콩에서 분리된 미네랄을 이용하여 측정하였으며, 미네랄의 분리 및 TL 측정은 CEN 방법(15)에 준하였다. 즉, 시료 일정량에 중류수를 가하여 3분간 sonicator(Bransonic, Branson Ultrasonics Co., USA) 처리하고 여과한 후 정착하였다. 잔사에 존재해 있는 유기물 제거를 위해 2 g/mL의 농도로 준비된 sodium poly-tungstate 5 mL를 가하고 중류수로 세척하였다. 다시 침전 물 중의 carbonate 제거를 위해 1 N HCl을 기포가 발생되지 않을 때까지 가한 후 1 N NH₄OH를 가하여 중화시키고, acetone으로 세척하여 건조하였다. 미네랄은 aluminium disc(ϕ 6 mm)에 옮겨 담고 50°C에서 하룻밤 예열 후 측정하였다. TL spectra 측정은 TLD system(Harshaw TLD-4200, Germany)을 이용하여 preheating temperature 50°C(5 sec), increasing rate 5°C/sec, maximum temperature 400°C의 조건으로 70초의 acquisition time을 가졌고, 400°C에서 5초간 annealing 하였으며, high pure N₂ gas를 훌려보내면서 측정하였다. 1st glow 측정 뒤 1 kGy로 re-irradiation하여 2nd glow를 측정하고 방사선 조사 특유의 peak가 나타나는 150~250°C 범위의 값으로 TL ratio(1st glow/2nd glow)를 구하여 0.05 이하이면 방사선 조사되지 않은 것으로, 0.2 이상이면 조사된 것으로 판단하였다.

ESR 분석

방사선 조사된 땅콩 중 수분 함량이 가장 낮은 부위인 껍질을 취하여 20 mesh로 분쇄하였다. 이를 50°C에서 24시간 건조하여 수분 함량이 국산 4.21%, 중국산 4.13%인 시료 0.4 g을 ESR pyrex tube에 충진하고 ESR spectrometer(JES-TE300, Jeol Co., Japan)를 이용하여 microwave frequency 9.18 GHz, magnetic field 347 ± 0.5 mT, microwave power 0.4 mW, modulation 100 kHz, time constant 0.03 sec, sweep time 30 sec의 조건에서 ESR spectra를 측정하였다(16).

DNA comet assay

Cerdá 등(12)의 방법을 바탕으로 껍질을 제거하여 마쇄한 땅콩 0.3 g에 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4) 5 mL를 첨가하여 500 rpm의 속도로 5분 동안 균질화시키고 200 μm nylon sieve, 125 μm nylon sieve에 각각 통과시킨 후, 혼탁액의 상층액을 분석용으로 사용하였다. 시료 혼탁액 50 μL 를 45°C의 0.8% agarose(low melting point agarose) 100 μL 와 잘 혼합한 후, 그 중 100 μL 를 미리 준비한 pre-coated slide(17)에 cover glass를 이용하여 도포하고 ice bath 위에서 gel을 형성시켰다. 이를 lysis buffer(2.5% SDS in 45 mM tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.4)에 20분 침지한 후, 다시 SDS가 배제된 TBE buffer(tris borate electrophoresis buffer, pH 8.4)에 5분간 침지하고 TBE buffer에서 2 V/cm로 정확하게 2분간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 slide는 종류 수로 세척하고 건조시킨 후 ethidium bromide로 염색하고 595 nm emission filter가 장착된 laser scanning confocal imaging system(MRC-1000, Biorad, USA)을 이용하여 100 \times 배율로 관찰하였다. Tail length는 laser sharp software (Biorad, USA)를 이용하여 핵체 중앙에서 tail 끝까지 측정하였으며, 이때 모든 시료에 대해 2개의 slide를 준비하여 각 slide 당 DNA 50개씩 총 100개의 핵체를 대상으로 측정하였다.

결과 분석

TL과 ESR은 3회 반복 실시하였고, DNA comet assay는 100개 comet의 tail length를 측정하였다. 측정 결과는 Origin (18)에 의해 분석하였고, 유의성 검증은 SAS(19)에 의한 분산분석과 Duncan's multiple range test를 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

TL 검지 특성

감마선을 처리하지 않은 땅콩에서 분리한 미네랄의 TL glow curve를 Fig. 1에 나타내었다. 시료는 250~300°C 범위에서 열발광 특성을 보여주었으며, signal intensity는 매우 미약한 수준이었다. 그러나 본 실험의 최저 선량인 0.5 kGy 이상의 조사 시료에서는 방사선 조사 유래의 특이한 glow curve가 180°C 부근에서 나타났으며, 이 signal intensity는 비조사 시료의 10배 이상으로 조사 선량의 증가에 비례하여 증가되었다. 원산지별 시료들의 signal intensity를 비교하였을 때 중국산이 국산에 비해 더 높은 signal intensity를 나타내었으며(Fig. 2), 이는 시료 자체에 혼입되어 있는 미네랄 조성에 따른 차이로 생각된다(20-22). 일반 농지 표토와 풍호 먼지(wind-transported dust)에서 확인되는 열발광 미네랄은 feldspar(장석), quartz(석영), limestone(석회암) 등이며, 이 중 feldspar와 limestone의 TL signal은 매우 강해서 그 조성물이 소량 존재하더라도 다른 미네랄들의 TL signal

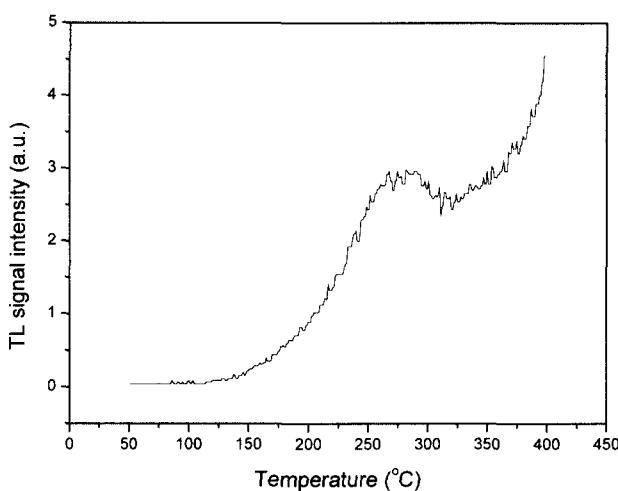


Fig. 1. Typical TL glow curve of mineral separated from non-irradiated Korean peanut.

을 덮어버리는 경향이 알려지고 있다(23).

이상에서 확인된 TL glow curve의 위치, 모양 및 높이에 의해서도 조사 시료와 비조사 시료의 구별은 가능하였으나, TL 측정의 신뢰성을 높이기 위하여 normalization을 실시하였다. TL 측정시 최고 온도에 달하면 400°C에서 5초간 annealing 함으로써 시료 미네랄 내 모든 TL 특성은 사라지게 되므로, 측정 시료를 1 kGy로 재조사하여 TL ratio(TL_1/TL_2)를 산출하였다(Table 1). 비조사 시료에서 국산 및 중국산 시료의 TL ratio는 각각 0.004와 0.002로 본 연구에서 설정한 비조사 시료의 TL threshold value 0.05 이하보다 낮은 값을 나타내었다. 그리고 0.5 kGy 이상 조사 시료는 국산 0.250 이상, 중국산 0.520 이상으로, 기 설정된 threshold value 0.20 이상보다 높은 수치를 보여 각각 비조사 시료와 조사 시료로 구별이 가능하였다. 시료의 원산지별 TL ratio 변화는 일관되지 않았으나 조사 여부의 확인은 모두 가능하였다. 이상의 결과로 볼 때 땅콩은 TL glow curve의 모양과 TL ratio

값의 비교로써 방사선 조사 여부의 구별이 용이하였으므로 TL 분석은 방사선 조사된 땅콩의 신뢰성 있는 검지 방법의 하나임을 확인하였다.

ESR 검지 특성

땅콩 껌질의 ESR 측정 결과 비조사 시료는 식물성의 phenol 성분으로 인한 대칭적이고 비특이적인 ESR signal을 보여주었고, g -value는 2.00이었다. 조사 시료에서는 비조사 시료에서 나타난 대칭적인 signal 외에는 방사선 조사 유래의 특이적인 peak가 확인되지 않아 조사 시료와 비조사 시료 간의 구분이 불가능하였다(Fig. 3). 원산지별 비교에서 국산의 경우 선량의 증가에 따라 ESR signal intensity가 다소 증가하는 경향이었으나, 중국산은 선량에 따른 차이가 크지 않았다(Fig. 4). 이 같은 결과는 cherry, peach, apple, grape, pear 등의 ESR 분석에서 방사선 조사 유래의 특이적인 peak가 발견되지 않았다는 보고(16)와 유사한 것으로써, 땅콩 시료의 자실이나 껌질에는 free radical이 trap될 가능성이 낮음을 시사하였다.

DNA comet assay

일반적으로 방사선 조사되지 않은 세포는 tail이 없거나 아주 짧은 intact cell을 보여주는 반면, 방사선 조사된 세포에서는 조사에 의해 생성된 DNA 절편들이 head로부터 멀리 끌리어 tail을 형성하므로 'comet' 모양이 관찰되고, 조사 선량이 증가함에 따라 DNA 손상 정도가 달라지면서 tail length가 길어지는 경향을 보인다(12,24).

땅콩 핵체의 현미경 관찰 결과, 비조사 시료에서는 5 μm

Table 1. Thermoluminescence ratio of mineral separated from peanut

Origin	Irradiation dose (kGy)				
	0	0.5	1.0	2.0	4.0
Korean	0.004	0.250	0.610	0.850	1.570
Chinese	0.002	0.520	0.570	1.500	1.520

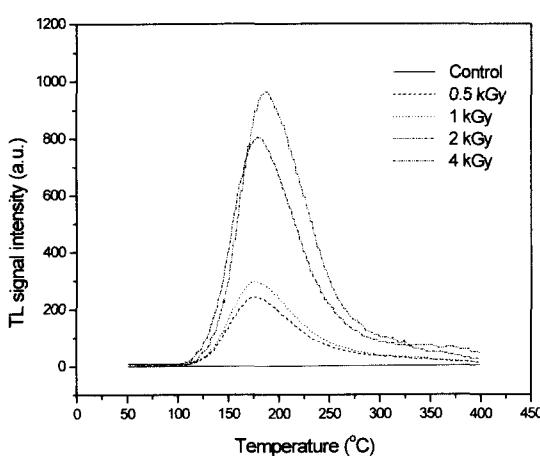
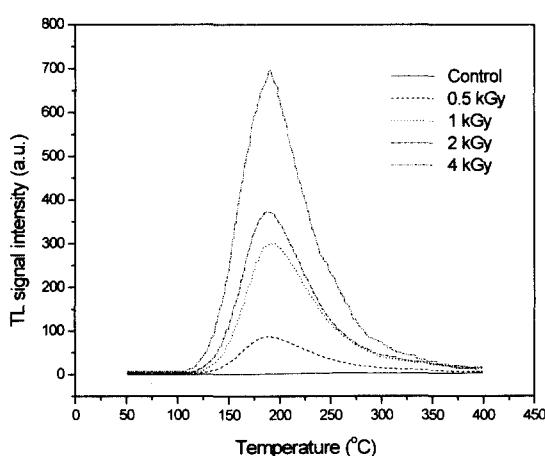


Fig. 2. TL glow curve of mineral from irradiated peanut (left: Korean, right: Chinese).

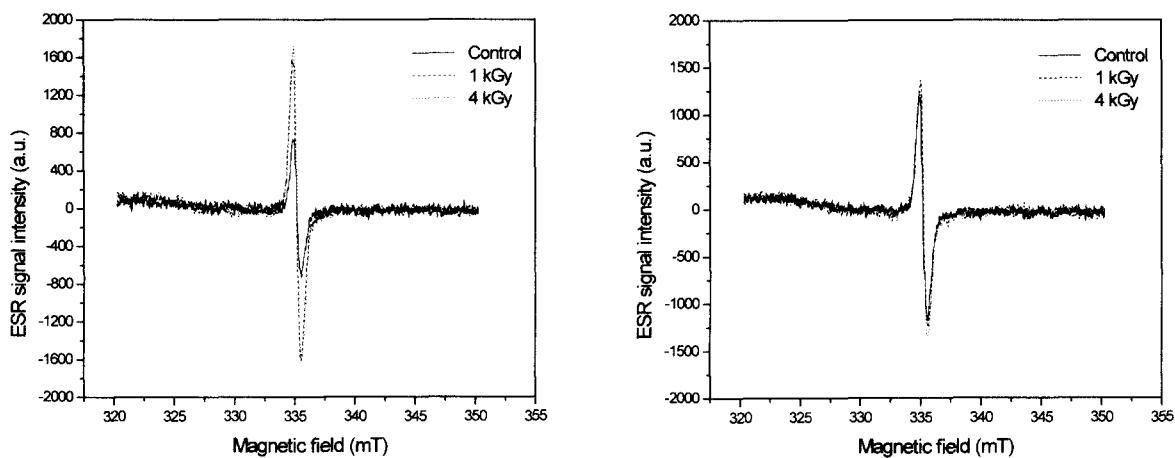


Fig. 3. Typical ESR spectrum of irradiated peanut at different doses (left: Korean, right: Chinese).

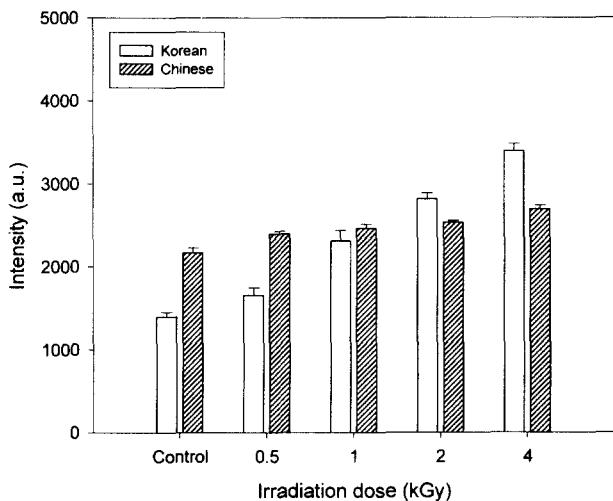


Fig. 4. Change in ESR signal intensity of irradiated peanut by different origins.

내외의 tail length를 나타내는 전형적인 DNA가 관찰되었다. 한편 조사 시료에서는 원형 모양의 핵도 관찰되었으나 그 비율이 아주 낮았고, 대부분의 핵이 긴 tail을 가지고 있었으며 조사 선량이 증가할수록 tail이 길어지거나 끊어지는 현상이 관찰되었다(Fig. 5, 6). Comet 양상 관찰 후 tail length 측정 결과, 비조사 시료와 1 kGy 이상 조사 시료는 tail length 차이가 뚜렷하여 조사 여부의 구분이 가능하였다. 또한 0.5 kGy 조사 시료는 intact cell과 comet cell이 동시에 관찰되어 넓은 범위의 표준 편차와 표준 오차를 나타내었지만, 비조사 시료에 비해 비교적 긴 tail을 가진 cell들이 많이 관찰되어 조사 여부 판별이 가능하였다(Fig. 7). 한편, 대두의 comet assay 실험에서 비조사 시료와 0.1 kGy 조사 시료는 comet 양상이 다양하고 tail 길이가 균일하지 않아 평균값에 대한 표준 편차가 상대적으로 크게 나타났다고 보고된 바 있다(25). 조사 선량에 대한 tail 길이의 유의성 검증 결과, 1 kGy까지는 조사 선량에 대한 tail 길이가 유의적인 차이를 나타내었으나(국산

: $p < 0.05$, 중국산 : $p < 0.10$), 2 kGy 이상의 선량에서는 차이가 없었다. 또한 조사 선량과 tail 길이의 상관 관계에서 국산의 경우 $r = 0.761$, 중국산의 경우 $r = 0.768$ 로 정(+)의 상관 관계를 나타내어 조사 선량이 tail 길이에 영향을 미침을 알 수 있었으며, 모든 시료에서 원산지별 차이는 크지 않았다.



Fig. 5. The image of DNA migration of Korean peanut (left: non-irradiated, right: 4 kGy).



Fig. 6. The image of DNA migration of Chinese peanut (left: non-irradiated, right: 4 kGy).

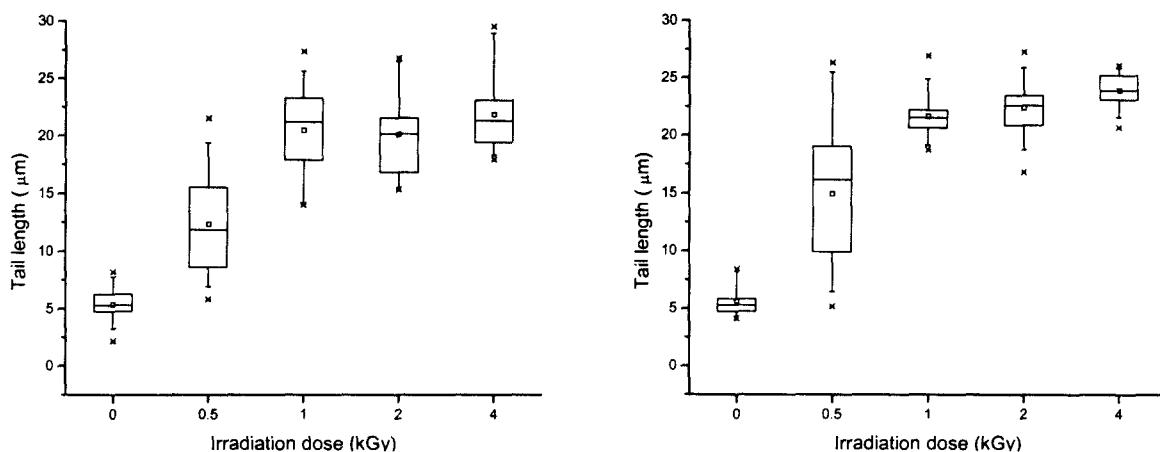


Fig. 7. Dose VS. tail length (μm) of the comet from 100 nuclei of irradiated peanut by different origins. Values shown are mean (•), standard error (box) and standard deviation (bar). (left: Korean, right: Chinese).

요 약

현재 중국으로부터 수입량이 증가하고 있는 땅콩을 대상으로 국산과 중국산 시료의 TL, ESR, DNA comet(single cell gel electrophoresis) 분석을 실시하여 원산지별 특성을 비교하였다. Density separation 방법으로 추출한 미네랄의 TL 측정 결과, 감마선 조사되지 않은 시료는 250°C 부근에서 intensity가 낮은 glow curve를 나타내었고, 조사 시료는 180°C 부근에서 아주 강한 intensity의 glow curve를 보여주었다. 첫 번째 측정된 glow curve(TL_1)의 normalization을 위하여 재조사 방법에 의해 TL_2 를 측정하여 TL ratio(TL_1/TL_2)를 비교해 본 결과, 비조사 시료는 0.05 이하, 조사 시료는 0.2 이상으로 방사선 조사 여부의 판별이 가능하였다. 땅콩 겹질을 사용한 ESR 측정에서는 조사 유래의 특이적인 signal이 나타나지 않아 적용 가능성이 낮았다. DNA comet assay 결과, 비조사 시료는 tail이 없거나 아주 짧은 전형적인 intact cell을 나타낸 반면, 조사 시료는 long tail을 가진 comet을 나타내면서 선량 의존적으로 ($r=0.761/\text{Korean}, r=0.768/\text{Chinese}$) tail length가 증가하여 조사 여부의 확인이 가능하였다. 모든 실험에서 원산지별 차이는 크지 않았다. 이상의 결과로 볼 때 땅콩의 방사선 조사 여부 확인에는 TL 분석 및 DNA comet assay가 적용 가능하였다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행하는 농림기술개발사업의 일환으로 수행되었으며, 지원에 감사 드립니다.

문 헌

- WHO : Wholesomeness of irradiated food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. *Technical Report Series*, 659, Geneva, Switzerland (1981)

2. Codex Alimentarius Commission : 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 (1984)
3. WHO : Review of data on high dose (10~70 kGy) Irradiation of Food. *International Consultative Group on Food Irradiation*. WHO, Food Safety Unit (1997)
4. IAEA : International atomic energy agency homepage. www.iaea.org/icgfi (2001)
5. Kwon, J.H., Chung, H.W. and Kwon, Y.J. : Infrastructure of quarantine procedures for promoting the trade of irradiated foods. Paper presented at Symposium of The Korean Society of Postharvest Science and Technology of Agricultural Products on Irradiation Technology for the Safety of Food and Public Health Industries and Quality Assurance, Daejon, 13 October, p.209~254 (2000)
6. KATI : Korea agricultural trade information homepage. www.kati.co.kr (2001)
7. Oduko, J.M. and Spyrou, N.M. : Thermoluminescence of irradiated foodstuffs. *Radiat. Phys. Chem.*, 36, 603~607 (1990)
8. Sanderson, D. : Photostimulated luminescence (PSL). A new approach to identifying irradiated foods. BCR workshop, 13~15 February (1990)
9. Raffi, J. and Stocker, P. : Electron paramagnetic resonance detection of irradiated foodstuffs. *Appl. Magn. Reson.*, 10, 357~373 (1996)
10. Morehouse, K.M. and Ku, Y. : Identification of irradiated foods by monitoring radiolytically produced hydrocarbons. *Radiat. Phys. Chem.*, 42, 359~362 (1993)
11. Stewart, E.M., Moore, S., Graham, W.D., McRoberts, W.C. and Hamilton, J.T.G. : 2-Alkylcyclobutanone as markers for the detection of irradiated mango, papaya, camembert cheese and salmon meat. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 121~130 (2000)
12. Cerda, H., Delincee, H., Haine, H. and Rupp, H. : The DNA 'comet assay' as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat. Res.*, 375, 167~181 (1997)
13. Wirtanen, G., Sjoberg, A.M., Boisen, F. and Alanko, T. : Microbiological screening methods for identification of irradiation of spices and herbs. A BCR collaborative study. *J. AOAC Int.*, 76, 674~681 (1993)

14. Lee, H.J., Lee, M.Y. and Kim, K.S. : Detection of radiation-induced hydrocarbons and 2-alkylcyclobutanones from peanuts. *J. Food. Sci. Nutr.*, **4**, 240-275 (1999)
15. European Committee for standard : Detection of irradiated food from which silicate minerals can be isolated. Method by thermoluminescence. English version of DIN EN 1788 (1997)
16. Desrosiers, M.F. and McLaughlin, W.L. : Examination of gamma-irradiated fruits and vegetables by electron spin resonance spectroscopy. *Radiat. Phys. Chem.*, **34**, 895-898 (1989)
17. Jeong, S.K., Park, J.H., Ji, S.T., Park, K.J., Kim, H.H., Hyun, C.K. and Shin, H.K. : Discrimination of irradiated beef using comet assay. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **32**, 747-754 (2000)
18. Origin : *Origin tutorial manual*. Version 6.0, Microcal Software, Inc., Northampton, MA, p.20-45 (1999)
19. SAS : *SAS Users Guide*. SAS Institute Inc., Cary, NC (1986)
20. Schreiber, G.A., Ziegelmann, B., Quitzsch, G., Helle, N. and Bögl, K.W. : Luminescence techniques to identify the treatment of foods by ionizing radiation. *Food Structure*, **12**, 385-396 (1993)
21. Schreiber, G.A., Hoffmann, A., Helle, N. and Bögl, K.W. : An interlaboratory trial on the identification of irradiated spices, herbs, and spice-herb mixtures by thermoluminescence analysis. *J. AOAC International*, **78**, 88-93 (1995)
22. Kwon, J.H., Jeong, J., Chung, H.W. and Byun, M.W. : Thermoluminescence characteristics of minerals from irradiated potatoes with different producing districts. Paper presented at 11th International Meeting on Radiation Processing, 110, Avignon, France, March, p.25-30 (2001)
23. Autio, T. and Pinnioja, S. : Identification of irradiated foods the thermoluminescence of mineral contamination. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **191**, 177-180 (1990)
24. Kim, C.K., Yang, J.S. and Lee, H.J. : Detection of irradiated grains using DNA 'comet assay'. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**, 906-911 (1999)
25. Oh, K.N., Kim, K.E. and Yang, J.S. : Detection of irradiated beans using the DNA comet assay. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 843-848 (2000)

(2001년 9월 15일 접수)