

Determination of ethyl carbamate in maesil wine by alcohol content and ratio of maesil (*Prunus mume*) during ripening period

Nan-Young Kim*, Mi-Na Eom, Young-Sook Do, Jung-Beom Kim, Suk-Ho Kang, Mi-Hye Yoon, Jong-Bok Lee

Health Research Planning Team, Gveonggi-do Institute of Health and Environment, Suwon 440-851, Korea

알코올 농도 및 담금비에 따른 숙성 기간별 매실주의 에틸카바메이트 함량조사

김난영* · 엄미나 · 도영숙 · 김중범 · 강석호 · 유미혜 · 이정복 경기도보건환경연구원 보건연구기획팀

Abstract

This study was designed to investigate the formation of ethyl carbamate (EC) during the ripening of Maesil with sugar and Soju (19.5~35% alcohol contents) using a homemade method. Maesil, sugar and Soju were purchased at ordinary market in June of 2012. The preparation of sample for analysis was conducted by method of Henry et al. The analysis of GC/MS was used SIM mode (m/z 89, 74, 62). Quantification was performed in terms of the 62 ion and was based on an internal standard procedure. Good linearity was obtained with a regression coefficient (r² = 0.993). Low detection limits (LOD) was achieved 4.31 ug/kg and recovery for alcohol was 74.8% During 90 days, fermentation with sugar was not detected EC (under LOQ). 15 days ripened Maesil wine contained EC between non detected~32.7 ug/kg and 90 days ripened Maesil wine was 19.7~87.4 ug/kg. Higher proportion of Maesil and Soju increased EC contents. EC levels were increased 32.7 ug/kg to 87.4 ug/kg in the ratio of Maesil to 35% alcohol-Soju (1:1). In the ratio of Maesil to 35% alcohol-Soju (1:3) was increased non detected to 69.7 ug/kg. After 90 days, Maesil wine was filtered Maesil through a seive and ripened by 180 days to investigate the formation of EC compared with non filtered. Treatment of filtered, EC contents was much higher level compared with non filtered. Therefore, this result showed that alcohol contents contribute to increase EC formation more than Maesil.

Key words: ethyl carbamate, Maesil, GC/MS

서 론

매실은 매실주, 매실절임, 매실장아찌 등 다양한 건강식 품으로 각광을 받고 있으며, 6월경에 수확하는 매실은 주로 매실청과 매실주로 담아 각 가정에서 활용되고 있다. 또한 예로부터 매실주는 향기와 맛 그리고 약효가 좋아 궁중시녀 들에게 더위를 잊고 몸을 따듯하게 해주는 음료로 여인의 술로 알려지기도 하였다(1). 매실은 유기산이 풍부한데, 특 히 구연산이 다량 함유되어있고 각종 무기질이 풍부하여 영양식품으로 높게 평가 된다(2). 또한 항산화작용이 강하

고 항균활성도 있어 추출물을 소재로 다양한 기능식품으로 활용되고 있다(3).

최근 우리나라는 경제발전과 함께 고령사회에 접어들어 건강에 대한 관심이 높아진 가운데 식품의 영양소뿐 만 아니라 기능성 및 안전성을 중시하는 등 소비자의 인식은 높아지고 있으며 신종유해물질에 대한 정보와 분석법 개발 로 원료에서 제품까지 위해성에 대한 우려도 높아지고 있다. 에틸카바메이트(ethyl carbamate)는 식품 저장 및 숙성과 정에서 자연 발행하는 물질이다. 효모의 아르기닌(arginine) 분해효소에 의해 생성된 요소(urea), 시안화합물(cyanate), 시트룰린(citrullin) 및 카바밀화합물(carbamyl phosphate)이 에탄올과 반응하여 생성되는 것이다(4). 이는 섭취 후 체내 에서 vinyl carbamate로 대사된 후 epoxidation을 거쳐 DNA

^{*}Corresponding author. E-mail: nyoung012@gg.go.kr Phone: 82-31-250-2583 Fax: 82-31-250-2588

adduct를 형성하여 돌연변이성을 나타내는 것으로 알려져, 국제암연구소(IARC)에서 인간에게 암을 일으킬 수 있는 Group 2A의 발암가능물질로 분류하고 있다(5).

빵, 김치, 젓갈, 장류, 유제품 등 발효를 거치는 식품이라면 미량 함유되어 있으며 특히 발효주의 경우 함량이 높은 것으로 알려져 있다(6). 그중 포도주에 많은 양이 생성된다고 보고되었으며, 캐나다의 경우 이를 30 μ g/kg 수준으로 규제하여 대부분의 국가들이 이를 따르고 있다. 그러나 매실과 같은 핵과류 과일에 포함되어있는 시안화합물이 알코올과 반응하여 다량의 에틸카바메이트가 생성된다고 알려지면서 국민들의 우려는 높아졌으나 아직까지 기준이 제시되지 못하고 있는 실정이다(7).

2008년 국내에서 28,251톤의 매실이 생산 되었고 그 중 9%가 가공업체에서 가공되고 나머지는 음료, 술 장아찌 등 여러 방법으로 소비자에게 이용되었다(8).

최근 들어 에틸카바메이트에 대하여 포괄적인 모니터링 중심으로 연구가 진행 되었을 뿐 매실주에 대한 개별적인 연구는 미흡한 실정이며 가정에서 담그는 방법을 고려하여 연구한 사례는 없었다.

식품의약품안전청은 '식품 중 기준규격 미설정 물질 시험방법'에 에틸카바메이트의 기준 및 시험방법(9)을 고시하고 있는데 포도주에 30 $\mu g/kg$ 으로 설정되어 있을 뿐 여러주류에 대한 모니터링이 이루어졌음에도 불구하고 설정된기준이 없으며, 저감화 방안만을 내놓은 상태이다(10).

Bae(11)의 연구보고에 따르면 국민영양조사를 참조한 우리나라 20~64세 남성 일부의 경우 주류를 통한 섭취만으 로도 에틸카바메이트의 노출량은 우려할 수준이며 비알콜 성 발효식품들의 섭취를 통한 노출량까지 고려할 때 위해도 는 다소 증가할 것이라 하였다.

따라서 본 연구에서는 일반 소비자들이 가정에서 제조하는 방식으로 매실과 알코올 농도 및 담금비를 달리하여 제조한 매실주를 숙성하면서 180일 동안 발생되는 에틸카바메이트의 함량 변화를 조사하여 안전성에 관한 기초자료를 제시하고 올바른 정보를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 쓰인 광양산 청매실, 담금주 및 설탕(CJ Cheil Jedang Corp. Seoul, Korea)은 2012년 6월 경기도 수원시소재 하나로마트에서 구입하여 매실주 제조에 사용하였으며, 담금주는 19.5°, 25°, 30° 및 35° 제품을 주류분석규정의 6-4-1법(12)에 따라 알코올 농도를 확인하여 사용하였다.

매실주는 매실과 담금주의 비를 1:1, 1:2, 1:3으로 무게를 맞추어 일반가정에서 사용하는 2,000 mL 용량의 밀폐용기 (bormioli, Italy)에 넣어 상온(25℃)에서 보관하였으며, 대조

군으로 매실엑기스(매실 : 설탕, 1:1) 및 복분자주(복분자 : 35° 담금주 , 1:1)를 제조하였다.

제조한 매실주는 조제 시점부터 90일까지는 15일 간격으로 에틸카바메이트의 함량 변화를 관찰하였으며 90일 이후 매실 과실을 체(No. 45, 355 µm, ChungGyeSangGongSa, Korea)에 여과시켜 180일까지 숙성 하면서 30일 간격으로 여과하지 않은 매실주와 비교 실험 하였다.

시약 및 표준용액

전처리를 위한 유기용매로 디클로로메탄(Dichloromethane, B&J)을 사용하였으며, NaCl, MgSO4는 특급시약(Wako pure chemical industries Ltd., Japan)을 사용하였다. 표준물질 에틸카 바메이트 및 내부표준물질 부틸카바메이트(buthyl carbamate) 는 Sigma Chemicals(St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 LC grade 아세톤(J.T Baker, Center Valley, PA, USA)에 녹여 표준 원액을 조제하였으며 buthyl carbamate 200 µg/kg의 농도에 에틸카바메 이트 10, 40, 100, 200, 400 μg/kg의 표준품 용액을 조제하여 정량을 위해 사용하였다. 검출은 SIM(selective ion monitoring) 방식으로 선택이온 질량(m/z; 89, 74, 62)을 사용하였으며 시험 용액의 에틸카바메이트 선택이온의 상대비를 표준물질의 선택 이온과 비교하여 그 비율이 ± 20% 범위일 때 에틸바메이트가 존재하는 것으로 정성확인하고 정량은 선택이온 중 m/z 62를 이용하였다. 검정곡선은 검량곡선 표준용액에서 얻어진 표준 물질과 내부표준물질의 m/z 62의 피크에 대한 면적비를 Y축으 로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량곡선을 작성하고 시험용액의 면적비를 Y축에 대입하여 에틸카바메이트의 농도 를 계산하였다.

실험방법

Henry 등(13)의 방법을 참조하여 디클로로메탄용매로 에 틸카바메이트를 다음과 같이 추출하였다. 매실주 약 10 g과 내부표준물질 1 mL와 포화염화나트륨 용액 20 mL를 분획여 두에 넣고 2분간 흔든 다음 분리시켰다. 디클로로메탄 80 mL를 넣어 다시 2분간 흔든 후 분리시켜 하층액인 디클로로메탄층을 40 g의 무수 황산나트륨을 첨가한 filter paper (Whatman No.1, Maidstone, England)를 사용하여 여과하였으며 이러한 추출과정을 2회 더 반복하였다. 이 추출액을 rotary evaporator를 사용하여 30℃에서 1 mL가 될 때까지 농축하고 플라스크에 남아있는 농축액은 acetone으로 헹구어 눈금 tube에 옮겨 담아 1 mL로 헹구어 최종 농축액이 2 mL가 되도록 보정한 뒤 GC/MS 분석용 시료로 사용하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

결과 및 고찰

회수율 및 검출ㆍ정량한계

30% 에탄올에 400 μg/kg 농도의 표준물질을 첨가하여

디클로로메탄 추출하여 GC/MS로 분석한 결과 에틸카바메이트의 회수율은 74.3%이고 검량선 작성에 쓰인 표준물질 5개 농도범위(10, 40, 100, 200, 400 μ g/kg)에서 측정·분석한 결과 상관계수 R^2 는 0.993인 직선성을 나타내었다. 검출 및 정량한계는 4.3 μ g/kg, 13.1 μ g/kg으로 Park 등(14)의 연구에서 규조토 컬럼(Chem elute 50 mL)을 사용하였을 때 회수율 85.2~87.9% 보다는 낮았으며, 정량한계 10 μ g/kg 보다는 높은 수준이었다.

Table 1. GC-MS analytical condition

Instrument	Thermo Finnigane GCQ				
Inlet	splitless, 1 uL inject $180^{\circ}\mathrm{C}$				
Column	DB-WAX (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)				
Oven temp.	$40^{\circ}\text{C}(0.75 \text{ min}) \rightarrow 10^{\circ}\text{C/min}$				
	\rightarrow 60 °C \rightarrow 3 °C/min \rightarrow 150 °C(5 min)				
	5° C/min \rightarrow 220 $^{\circ}$ C(4.25 min)				
Carrier gas	He, 0.9 mL/min				
Detector	Electron impact at 70 eV				
Ion source temp.	230℃				
Scan range	62, 74, 89				

알코올 농도 및 담금비에 따른 숙성 기간별 에틸카바메이 트함량

매실주에서의 에틸카바메이트 검출 크로마토그램 및 스펙트럼은 Fig. 1 과 Fig. 2와 같으며, 알코올 농도 및 담금비에 따른 에틸카바메이트 검출결과는 Table 2와 같다.

90일 저장기간 동안 알코올 농도에 따른 기간별 매실주의 에틸카바메이트 함량을 비교·분석하면, 설탕만으로 숙성한 매실 엑기스와 복분자주에서는 에틸카바메이트가 검

출되지 않았다. 그러나 알코올과 숙성되었을 때, 19.5° 담금 주 숙성은 60일부터, 25° 담금주는 45일부터 검출되기 시작하였는데 30° 및 35° 담금주에서는 15일부터 18.4 μ g/kg, 32.7 μ g/kg 수준으로 생성되기 시작했다.

숙성 90일이 되었을 때 19.5° 담금주는 19.7 μg/kg, 25° 담금주는 24.6 μg/kg 검출되었으며, 30° 담금주는 45.0 μg/kg, 35° 담금주는 87.4 μg/kg으로 30° 담금주 보다는 2배가까이, 19.5° 담금주보다는 4.5배가량 높은 수준의 에틸카바메이트가 생성되었다. 그러므로 매실과 담금주의 동일 담금비를 비교했을 때 알코올 농도가 에틸카바메이트 생성에 기여하는 것을 알 수 있었다. 이는 Hwang 등(15)의 연구결과와 비교했을 때 보다는 낮은 수준이었으나, 알코올의 함량이 높을수록 에틸카바메이트의 생성량이 증가하는 것은 같은 경향을 보이고 있다.

또한 에틸카바메이트 발생에 관여하는 요인 중 매실의 양과 알코올의 영향을 비교하기 위하여 매실 : 담금주(30° 및 35°)의 담금비 1:1, 1:2, 1:3으로 제조한 매실주의 에틸카바메이트 발생량을 조사한 결과, 15일부터 90일간 숙성를 거치면서 매실과 30° 담금주 1:1 담금비에서는 15일 18.4 μg/kg에서 45.0 μg/kg으로 35° 담금주 보다 2배 낮은 수준의 에틸카바메이트가 생성되었으며 1:3 담금비에서는 60일 25.3 μg/kg에서 90일 29.8 μg/kg로 35° 담금주를 사용하였을때 보다 훨씬 낮은 수준으로 생성되는 것을 관찰하였다. 또한 1:2~1:3 담금비에서 매실이 차지하는 무게가 1/3, 1/4로 적어지는 것에 비하면 상대적으로 많은 양의 에틸카바메이트가 검출되는 것을 보이고 있다.

35° 담금주 숙성에서 뚜렷한 경향을 보여주고 있는데, 1:1 담금비 매실주의 경우 30일 숙성시점을 기준으로 43.5 μg/kg에서 90일 87.4 μg/kg으로 2배가량 증가하였고 1:3 담금비는 25.1 μg/kg에서 67.9 μg/kg으로 약 2.8배 증가하였는데, 이는 1:1 담금주의 77% 가량 증가한 것이다.

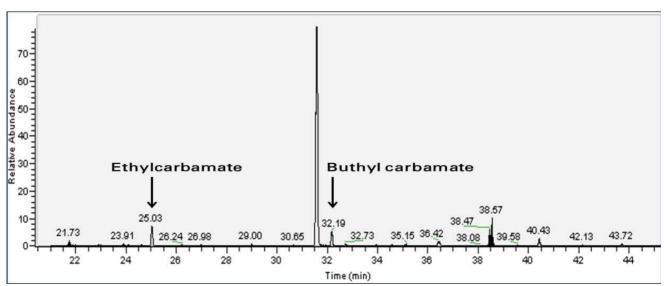


Fig. 1. GC/MS chromatogram of analysis sample.

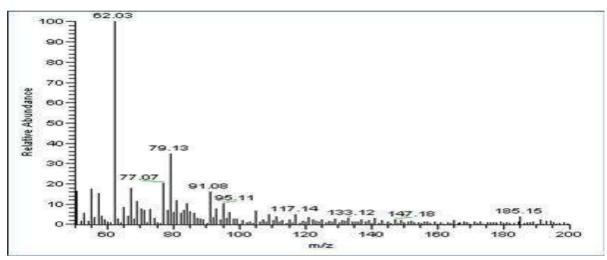


Fig. 2. Spectrum of ethyl carbamate in Maesil wine.

Table 2. Contents of ethyl carbamate in maesil wine by ratio of maesil to soju (alcohol contents) and storage period

Ratio of	Ethyl carbamate contents (μg/kg)						
	15day	30day	45day	60day	75day	90day	
Maesil(1):Sugar(1)	-	-	-	-	-	-	
Maesil(1):19.5 ^o (1)	-	-	-	16.8	18.0	19.7	
Maesil(1):25º(1)	-	-	16.9	19.9	23.1	24.6	
Maesil(1):30°(1)	18.4	26.2	34.1	39.7	43.6	45.0	
Maesil(1):30°(2)	-	14.5	26.7	38.2	39.2	40.7	
Maesil(1):30°(3)	-	-	-	25.3	28.8	29.8	
Maesil(1):35°(1)	32.7	43.5	54.2	69.9	74.1	87.4	
Maesil(1):35°(2)	15.6	27.1	42.6	55.2	57.1	79.8	
Maesil(1):35°(3)	-	25.1	42.7	45.0	45.9	67.9	
Rubus coreanus(1):35º(1)	-	-	-	-	-	-	

따라서 매실의 함량보다는 담금주의 알코올 농도가 에틸 카바메이트의 생성에 더 큰 영향을 미치는 것을 보여주고 있으며 이는 매실의 함량이 높을수록 매실의 과육 및 수분 에 의해 알코올이 희석되기 때문으로 여겨진다.

여과의 효과

각 가정에서는 대부분 매실 엑기스나 매실주를 보관 중 100일 이내 건지는 경우가 많으며 식품의약품안전청에서도 매실 씨앗의 시안화합물의 용출을 우려하여 침출기간을 100일 이내로 할 것을 권장하고 있다(16). 그래서 90일 숙성기간을 거친 매실주의 매실을 여과하여 저장한 것과 여과처리 없이 계속 저장한 것에 대한 에틸카바메이트 생성량에 대하여 비교실험 하였다(Fig. 3~5).

90일 이후 120일~180일까지 매실을 여과한 매실주의 알 코올 농도에 따른 에틸카바메이트의 30일 간격 함량변화를 살펴보면(Fig. 3), 설탕만으로 숙성한 매실 엑기스와 복분자 주에서는 여과 처리 후에도 검출되지 않았으며, 19.5° 담금 주 숙성은 여과하지 않았을 때 19.9 μ g/kg에서 30.5 μ g/kg로 1.5배 증가하지만 여과처리를 하면 22.5 μ g/kg에서 58.2 μ g/kg까지 거의 2.6배 증가하였다. 25° 담금주 숙성에서 역시 여과 하지 않았을 때 28.4 μ g/kg에서 43.6 μ g/kg으로 증가하지만 여과 하였을 때는 45.5 μ g/kg에서 94.9 μ g/kg까지 증가한다.

30° 담금주 1:1 담금비의 경우(Fig. 4), 여과 하지 않았을 때 120일 54.0 μg/kg에서 180일 65.2 μg/kg으로 1.2배, 1:3의 경우 29.8 μg/kg에서 48.9 μg/kg으로 1.6배 증가하나 여과한 경우 1:1에서는 120일 72.3 μg/kg에서 180일 128.6 μg/kg까지, 1:3의 경우 42.5 μg/kg에서 79.3 μg/kg까지 약 1.7~1.8배 증가하였다.

35° 담금주(Fig. 5)도 역시 여과 하지 않았을 때 120일 71.2~99.1 μg/kg부터 180일 80.2~111.4 μg/kg으로 1.1배 중 가한 반면 여과처리를 하였을 경우 120일 72.7~112.5 μg/kg으로 무처리군보다 1.2배 가량 높은 수준에서 180일에는 94.0~139.9 μg/kg으로 120일보다 1.2배 증가하였는데 이는 무처리군에 비하여 2배 가량 높은 수준이다.

그러므로 여과처리를 했을 경우 전반적으로 무처리군 보다 약 1.2~2배 가량의 에틸카바메이트가 생성되는 것을 알 수 있었다.

이는 매실을 건져낸 후 남은 알코올과 매실주의 성분이 반응하여 에틸카바메이트의 생성이 증대되는 것으로 생각되며, Park 등(16)의 연구에서 매실과 알코올의 담금비를 달리한 숙성 중 성분변화에서 3~4개월 까지 일정기간 매실주의 유기산 및 항산화 성분이 증가하다가 알코올 농도에따라 유지하거나 이후 감소하는 경향을 나타낸다고 보고하였는데, 이번 연구결과 매실이 그대로 남아 숙성을 지속한경우 매실내의 영양성분 및 항산화 성분 등의 상호작용으로산화를 억제하고, 과육과 매실씨의 분해효소에 의해 생성된 에틸카바메이트를 분해시키는 것으로 여겨진다.

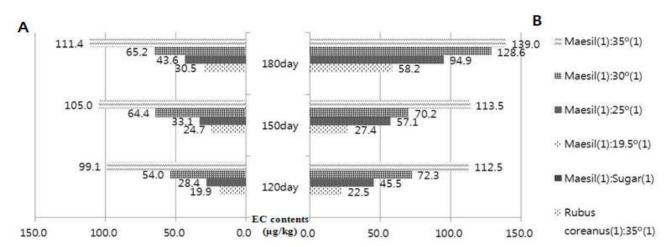


Fig. 3. Comparison of ethyl carbamate content in *Maesil* wine by filtering treatment and storage period.

A: Non filtered B: Filtered at 90 day.

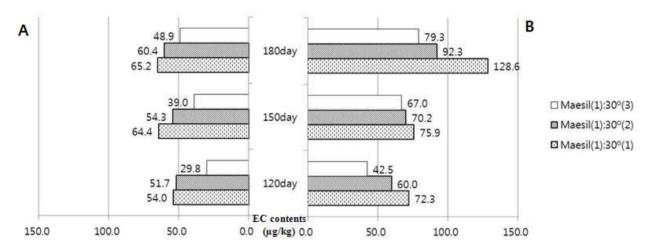


Fig. 4. Comparison of ethyl carbamate content in *Maesil* wine(ripened with 30% alcohol content *Soju*)

A: Non filtered B: Filtered at 90 day.

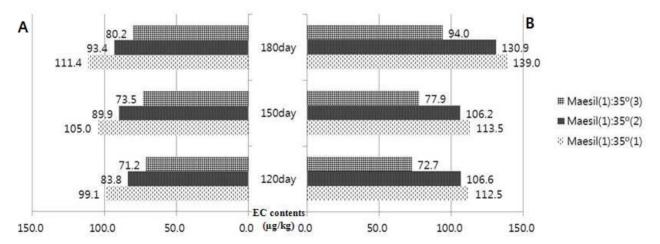


Fig. 5. Comparison of ethyl carbamate content in *Maesil* wine(ripened with 35% alcohol content *Soju*)
A: Non filtered B: Filtered at 90 day.

본 연구의 결과는 캐나다의 검출범위(30~4330 $\mu g/kg$)보다 낮은 수준이었으며, 논의되고 있는 캐나다의 과실주 허용기준치 $400~\mu g/kg(7)$ 와 비교하여 보았을 때 안전한 수준으로 평가할 수 있으나 Sarah 등(17) 영국에서의 발효식품에틸카바메이트 실태조사 보고에 의한 체리와 같은 과실증류주의 검출수준(불검출~6131 $\mu g/kg$)보다 낮고 와인의검출수준(40~164 $\mu g/kg$)보다 높은 수준을 나타내고 있다.

이러한 조사결과를 바탕으로 전통주의 안전성을 확보하고 매실 등 *Prums*속 과실주의 합리적인 기준이 제시되어야할 것으로 생각 된다.

요 약

매실주의 숙성 중 에틸카바메이트의 발생을 알아보고자일반 가정에서 담그는 방식으로 매실주와 복분자주를 담아저장하면서 발생량을 측정하였다. 매실주는 매실과 설탕 및 19.5°~35° 담금주의 담금비를 달리하여 담아, 15일부터 180일까지 15~30일 간격으로 에틸카바메이트의 함량을 분석한 결과 숙성 90일 까지 매실을 설탕만으로 숙성한 경우와 복분자주에서 에틸카바메이트는 발생하지 않았으나 매실의 알코올의 농도가 높을수록 에틸카바메이트의 생성량이 증가하였다. 매실과 담금주의 비율을 달리한 결과, 매실보다는 알코올 함량이 에틸카바메이트 발생에 더 큰 영향을 미치는 것을 확인하였으며 120~150일 숙성기간이 지나면서 에틸카바메이트 발생량은 점차 감소하는 경향을 보였으나 90일 숙성 후 여과처리 하였을 경우 여과하지 않았을 경우보다 180일까지 2배가량 높은 에틸카바메이트가 발생하였으나 이들 모두 안전한 수준이었다.

References

- Donguibogam (2000) Geunyoung publishing company, Seoul, Korea
- Cha HS, Pack YK, Park JS, Park MW, Jo JS (1999) Changes in firmness, mineral composition and pectic substances of mume(*Prunus mume* sieb. et Zucc) fruit during maturation. Korean J Postharvest Sci Technol, 6, 488-494
- Seo KS, Huh CK, Kim YD (2008) Comparison of antimicrobial and antioxidant activities of *Prunus mume* fruit in different cultivars. Korean J Food Preserv, 15, 288-292

- 4. Ough GH (1976) Ethyl carbamate in beverages and foods. J Agric Food Chem 24, 323-331
- 5. IARC (1974) Urethane: evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. IARC Monograph 7, 111-140
- 6. Lim HS, Lee KG (2011) Development and validation of analytical methods for ethyl carbamate in various foods. Food Chem, 126, 1373-1379
- 7. R Battaglia, HBS Conacher, BD Page (1986) Food additives and Contaminations. 4, 477-796
- 8. Korea Alcohol Liquor Industry Association (2011) Alcohol Liquor Industry magazine New year issue
- KFDA (2007) Analytical method for Hazardous Substances without Standards/Specifications 2007-10 Korea Food & Drug Administration
- KFDA. (2012) Food additive Code Standards for Food Additive Use in Foods 2012-210 Korea Food & Drug Administration
- Bae DH (2006) Preparation of database for regulation of ethyl carbamate contents in alcoholic beverages through monitoring imported products. The annual report of KFDA, 10, 9-10
- 12. Henry BS, Page D, Lau BPY, Lawrence JF, Bailey R, Calway P, Hanchay JP, Mori B (1987) Capillary column gas chromatographic determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. J Assoc Off Ana Chem Int, 70, 749-751
- Park SK, Yoon TH, Choi DM (2008) Analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages. Anal Sci Tech, 21, 53-57
- 14. Hwang LH, Kim AK, Park KA Hwang IS, Chae YZ (2009) The effect of raw material, alcohol content, and *trans*-resveratrol on the formation of ethyl carbamate in Plum wine. J Fd Hyg safety, 24, 194-199
- 15. KFDA (2011) B2-2011-1-001 Ethyl Carbamate Preventative Action Manual
- Park LY, Chae MH, Lee SH (2007) Effect of ratio of Maesil (*Prunus mume*) and alcohol on quality changes of Maesil Liqueur during leaching and ripening. Korean J Food Presery, 14, 645-649
- Sarah H, Colin C, Nicholas P, Julie C, Danny C, Thomas B, Wendy M, Barry W, Krishna P (2007) Survey of ethyl carbamate in food sold in the United Kingdom in 2004.
 J Agric Food Chem, 55, 2755-2759