

한국 재래식 간장의 니트로소화합물에 관한 연구

성낙주 · 황외자 · 이응호*

경상대학교 식품영양학과 · *부산수산대학 식품공학과

Studies on N-Nitrosamine of Korean Ordinary Soysauce

Nak-Ju Sung, Oe-Ja Hwang and Eung-Ho Lee*

Dept. of Food and Nutrition, Gyeongsang National University Jinju, 660-300, Korea

**Dept. of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan, 608-023, Korea*

Abstract

In recent years, the presence of N-nitrosamine, which was produced by the interaction of nitrite and secondary amine, in the fermented foods has been the subject of considerable interest and controversy.

In this experiment, the levels of N-nitrosamine such as N-nitrosodimethylamine(NDMA), N-nitrosodiethylamine(NDEA) and N-nitrosodipropylamine(NDPA) in the Korean ordinary soysauce, which were added with ascorbic acid, sorbic acid, and sodium benzoate in the making of it were analyzed by low resolution mass spectrometry, and then the changes of dimethylamine(DMA), nitrate and nitrite nitrogen during the fermentation of it were observed. The contents of DMA nitrogen increased during the fermentation of Korean ordinary soysauce, continuously, but those of DMA nitrogen in the soysauce which had been added with ascorbic acid were inhibited, considerably, until the fermentation of 70days. The levels of nitrate nitrogen during the fermentation of Korean ordinary soysauce decreased, while those of nitrite nitrogen increased. The soysauce which had been incorporated with ascorbic acid in the making of it showed low amounts of nitrite. The concentration of NDMA in the control sample were 2.7 and 8.5 μ g/kg after the fermentation of 30 and 60 days, respectively, those of NDMA increased during the fermentation of Korean ordinary soysauce, but NDEA and NDPA in all of the soysauce were not detected. The samples were treated with ascorbic acid, sorbic acid, and sodium benzoate in the making of Korean ordinary soysauce were turn out to be effective in preventing the formation of NDMA. Inhibitive actions from food additives as above were, respectively, 82.2~87.0%(ascorbic acid), 25.9~65.4%(sorbic acid) and 13.2~63.5% (sodium benzoate) in comparison with control sample during the fermentation of Korean ordinary soysauce. NDMA contents were detected below 1.5 μ g/kg in the soysauce, which food additives were mixed to the pure NaCl in the brewing of it. Free amino acids such as glutamic acid, proline, and histidine were proved to be inhibiting the formation of NDMA during the fermentation of Korean ordinary soysauce. This might be due to the reaction above amino acids and nitrite by Van Slyke reaction.

서론

Barnes와 Magee¹⁾가 N-nitrosodimethylamine(N-

DMA) 을 혼합한 사료로 실험동물을 사육한 결과 강한 간독성을 일으킨다는 연구가 N-nitrosamine (NA)에 관한 연구의 시발이었으며, 그후 이들 연구자²⁾에 의해 NDMA를 쥐의 사료에 장기간 투여할

경우 주로 간에 강한 발암성을 나타낸다고 보고하였다.

NA이 식품위생상 주목의 대상이 된 것은 노르웨이에서 산양과 밍크 등의 가축이 아질산나트륨을 첨가한 어분을 먹은 후 이들이 몰사한 대규모 중독 사건이 발생한 1960년 이후 부터이다. 그후 이들 가축의 사인은 NDMA이며, 이는 어분에 존재하는 dimethylamine (DMA)과 방부제로 첨가한 아질산나트륨과의 상호반응에 의해 생성된다고 하였다³⁾

식품중 NA의 생성을 촉진시키는 요인에 관한 연구로서는 Boyland등⁴⁾이 최초로 thiocyanate의 촉매 작용을 보고하였고, 그뒤 Fan과 Tannenbaum⁵⁾이 이 사실을 재확인하였다. 또 thiocyanate외에 요오드, 브롬, 염소, 아세테이트 및 약산의 음이온도 촉매효과가 있다고 보고하였다. 일반적으로 니트로소화의 최적 pH는 3.4인 것으로 밝혀져 있고⁶⁾, 이론적으로 볼 때 알칼리 배지에서는 NA의 생성이 거의 불가능한 것으로 알려져 있으나 실제 식품에서는 가공 및 조리중에 행하는 가열조작, 식품중에 존재하는 미생물 및 공존화합물의 종류 등에 의해 약산성 내지는 약알칼리성에서도 합성이 가능하다. 즉 formaldehyde 및 carbonyl의 존재시 알칼리 배지에서도 DMA 및 diethylamine(DEA) 등을 비롯한 제 2급 아민의 니트로소화반응을 크게 촉진시켜 NA를 생성한다는 보고가 있다⁷⁾. 한편 Lyengar⁸⁾, Crosby⁹⁾은 가열조작에 의해 NDMA로 전환될 수 있음을 입증하였다. NA생성에 주된 인자로 지목되고 있는 미생물은 NA전구물질의 생성 및 합성과 연관함을 들 수 있다. 즉 *E.coli*, *Proteus*, *Serratia*와 같은 세균은 방향족, NA의 합성과 관련이 있고¹⁰⁾, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*는 NA의 주요 전구물질인 아질산염을 생성시키는데 결정적인 역할을 한다는 보고가 있다¹¹⁾.

니트로소화반응의 억제제로서 주목되고 있는 것은 아스코르빈산 및 그 염을 들 수 있는데, Mirvish등¹²⁾은 아스코르빈산염이 아민류의 니트로소화에 억제효과가 있다고 하였는데, Fiddler 등¹³⁾, Fan과 Tannenbaum¹⁴⁾, Dahn 등¹⁵⁾의 연구가 이 사실을 뒷받침하고 있다. Fong과 Chan¹⁶⁾은 중국식 염장어 가공중 몇몇 종의 항생제를 식염에 첨가한 결과 chlorotetracycline, tetracycline 및 oxytetracycline은 니트

로소화반응을 촉진시켰으나 benzoic acid는 NA의 생성을 크게 억제시킨다고 하였다.

상기한 바와같이 식품에 따라 NA의 생성은 불가피하나 이들의 생성을 최소화하는 방안에 많은 학자들이 관심을 쏟고 있는 바 예로부터 우리나라 특유의 조미료로서 상용되어온 재래식 간장을 제조함에 있어 NA의 생성요인을 검토하고 나아가서 이들의 생성을 억제할 수 있는 방안을 모색코져 간장 제조중 NA의 생성 및 이와 관련이 있는 제인자들의 변화를 검토하였다.

재료 및 방법

메주

메주콩으로 많이 이용되는 황두(*Glycinmax. L.*)를 원료로 하여 재래식 방법으로 만든 메주(무게 1.45~1.50 kg. 크기 11×6×8 cm)를 사천군 화암부락에서 구입하였으며, 간장 담금시에는 메주의 속과 겉을 균질화하기 위하여 분쇄한 후 간장담금을 하였다.

간장담금

시판식염 및 순 NaCl의 농도를 각각 22.0%(W/V)가 되도록 조제한 수도수와 균질화된 메주가루 300 g을 유리병에 넣고 Table 1과 같이 시판식염 및 순 NaCl구에 대하여 식품첨가제를 농도별로 가하여 햇볕이 잘드는 곳에서 숙성시키면서 10일 간격으로 시료를 채취하여 여과한 여액을 분석용 시료로 하였다.

일반성분

수분, 조단백질, 조지방, 회분은 상법에 따라 정량

Table 1. Abbreviation and concentrations of food additives used

Abbreviation	Food Additives
Control	Crude salt
C-ASC	Crude salt+150ppm L-ascorbic acid
C-BEN	Crude salt+200ppm sodium benzoate
C-SOR	Crude salt+200ppm sorbic acid
P-ASC	Pure NaCl+150ppm L-ascorbic acid
P-BEN	Pure NaCl+200ppm sodium benzoate
P-SOR	Pure NaCl+200ppm sorbic acid

하였고, 전당은 당도계, pH는 pH meter, 염도는 Mohr 법으로 정량하였다.

Dimethylamine (DMA) 질소

DMA 질소는 Kawabata 등¹⁷⁾에 의한 개량 Cudit-hiocarbamate 법으로 측정하였다.

질산염질소 및 아질산염질소

질산염질소 및 아질산염질소는 Len Kamn 등¹⁸⁾의 방법에 따라 정량하였다.

유리아미노산

채취한 간장 5ml에 1% 피크린산 80ml를 가하여 magnetic stirrer에서 교반추출한 후 원심분리하여 얻어진 상층액을 Dowex 2×8(Cl: 100~200mesh)

칼럼을 통과시켜 피크린산을 제거한 다음 Amberlite CG-120 수지칼럼에 흡착시킨 뒤 물로써 탈염한 후 2N NH₄OH 100ml로 용리시켰으며, 용리액을 30℃ 이하에서 감압농축하여 pH 2.2 구연산 완충액으로서, 25ml로 만들어 아미노산 자동분석기로 정량하였다.

N-nitrosamine (NA)의 정량 및 동정

NA의 정량 및 동정은 Fine 등¹⁹⁾의 방법을 개량한 Hotchkiss 등²⁰⁾의 방법에 준하였다.

아질산염 첨가 실험

유리아미노산과 아질산염과의 반응성을 검토코저 60일간 숙성된 대조구의 간장을 시료로 하여 Fig. 1과 같은 모델실험을 하였다.

NDMA의 생성억제에 대한 모델 실험

70일간 숙성된 대조구의 간장을 시료로 하여 Fig. 2와 같이 아미노산을 제거한 후 아질산염질소(200 ml / kg)를 가하였고 또 별도로 2 group의 시료에 200ml / kg의 아질산염질소를 가하여 잘 혼합한 후

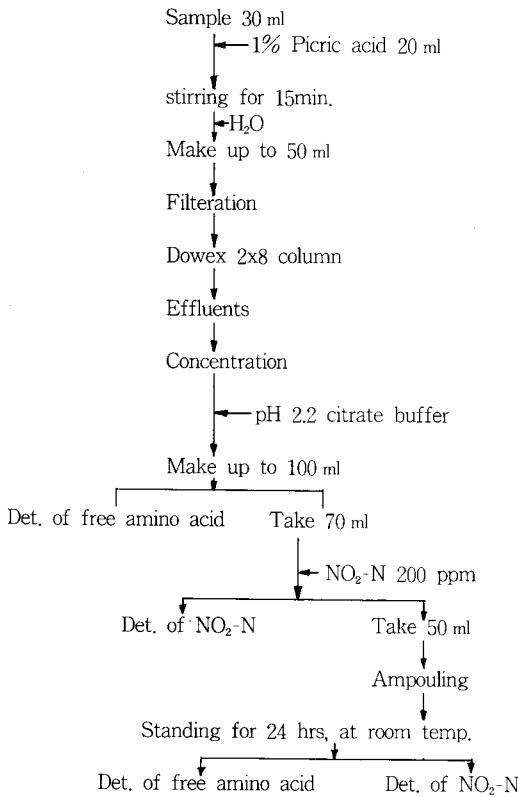


Fig. 1. Scheme for the model experiment on the formation of N-nitrosamine in Korean ordinary soysauce.

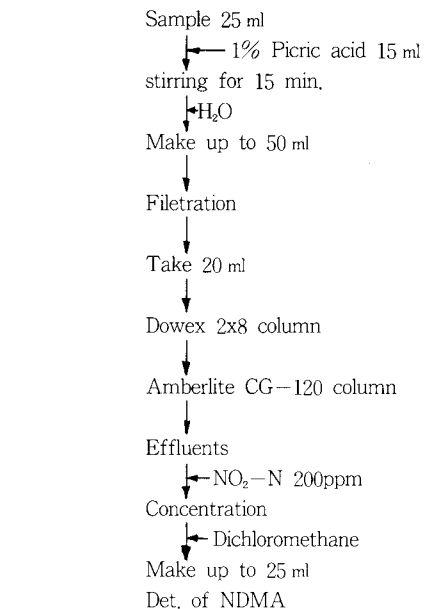


Fig. 2. Scheme for elimination of free amino acid from Korean ordinary soysauce.

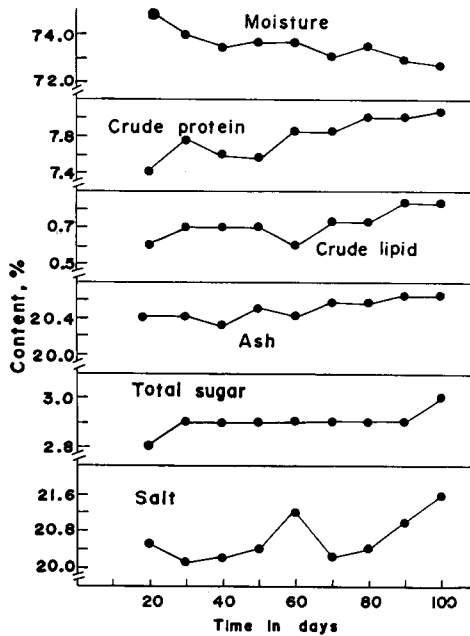


Fig. 3. Changes in moisture, crude protein, crude lipid, ash, total sugar, and salt content during the fermentation of Korean ordinary soysauce.

ascorbic acid 및, sorbic acid를 각각 300ml/kg 첨가하여 상온에서 80시간 정치시킨 후 NDMA을 정량하였다.

결과 및 고찰

일반성분의 변화

간장 숙성중 대조구 시료의 일반성분 현화는 Fig. 3과 같다. 수분은 이론적으로 볼때 숙성초기에 비해 숙성 후반기에 메주로부터 각종 수용성물질의 용출 및 수분증발등으로 인해 수분의 함량이 크게 감소될 것으로 예상되었으나 숙성초기에 비해 2.0%의 감소에 불과하였는데 이같은 현상은 간장담금시 배주를 분쇄하여 이용하였기 때문에 숙성초기에 대부분의 가용성 물질이 빨리 용출된 것이 그 원인이라고 생각된다.

간장 숙성중 조단백질 및 조지방은 간장의 숙성 기간에 따라 서서히 증가하여 숙성 20일에 조단백질의 함량이 7.0%였으나 숙성 100일 후엔 8.3%로써 1.3%나 증가하였고, 또 조지방은 숙성 20일에

Table 2. Changes in pH during the fermentation of Korean ordinary soysauce

Food additives	Fermentation days									
	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Control	5.3	5.2	5.3	5.3	5.1	4.8	4.5	4.4	4.4	
C-ASC	5.3	5.4	5.3	4.7	4.8	4.6	4.6	4.3	4.4	
C-BEN	5.3	5.2	5.3	5.0	5.2	5.0	4.7	4.5	4.5	
C-SOR	5.3	5.3	5.3	5.3	4.8	4.8	4.8	4.7	4.6	
P-ASC	5.3	5.3	5.4	5.4	5.0	4.8	4.9	4.7	4.7	
P-BEN	5.4	5.3	5.3	5.3	5.1	4.9	4.8	4.9	4.8	
P-SOR	5.4	5.3	5.4	5.3	4.9	4.9	5.0	4.8	4.7	

0.6%였으나 숙성 90일 이후부터는 0.8%로 증가 하였다. 그리고 회분 및 전당은 숙성중 불규칙한 변화를 나타내면서 다소 증가하는 경향을 보였다.

간장 숙성중 염도는 다소간 불규칙한 변화를 보였으나 대체로 숙성과 더불어 완만한 증가를 나타내었다. 수도수에 대하여 식염을 22.0%(W/V)의 농도를 가하였음에도 불구하고 숙성초기에 염도가 이 농도에 미달된 것은 메주가루의 첨가가 그 원인으로 생각되고, 숙성후기에 염도가 높아진 것은 수분의 증발에 의한 것으로 생각된다.

pH의 변화

간장 숙성중 pH는 Table 2에서 보는 바와 같이 pH 5.4~4.4의 범위였고, 대조구와 식품첨가제구 간의 차이는 없었다. 이들 모두 간장이 숙성됨에 따라 pH가 서서히 산성화되어 숙성 100일후에는 대조구의 pH 4.4, 그리고 식품첨가제 처리구의 pH 4.8~4.4의 범위였다. 이처럼 간장이 숙성됨에 따라 산성화되는 현상은 한국 채래식 간장, 개량식 간장 및 일본 간장에서도 매우 비슷한 결과를 나타내었다²¹⁾. 간장의 숙성중 서서히 산성화되는 것은 니트로소화 반응의 최적 pH 3.4라는 점을 감안할 때 pH는 간장중 NA생성에 중요한 인자로 기록된다.

dimethylamine(DMA) 질소의 변화

간장 숙성중 DMA 질소의 변화는 Table 3과 같다. 대조구 및 식품첨가제 처리구 모두 숙성기간에 따라 다소간 불규칙한 변화를 보이긴 하였으나 대체로 숙성과 더불어 증가하는 경향을 나타내었다.

대조구의 경우 숙성 20일에 2.27 ppm였던 것이

Table 3. Changes in dimethylamine nitrogen during the fermentation of Korean ordinary soysauce

(ppm)

Food additives	Fermentation days									
	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Control	2.27	3.58	4.08	4.28	3.70	3.94	4.00	4.55	4.45	
C-ASC	2.22	2.09	2.52	2.95	2.55	2.29	4.43	4.27	4.45	
C-BEN	1.70	2.32	2.92	2.39	2.75	3.86	3.80	4.29	4.15	
C-SOR	2.60	3.00	3.31	3.83	3.60	3.69	4.52	4.80	5.74	
P-ASC	2.58	2.49	2.05	2.46	2.15	3.44	4.30	4.81	4.55	
P-BEN	1.75	2.06	2.41	2.39	2.05	2.43	3.51	4.95	4.94	
P-SOR	2.19	2.65	2.52	3.28	2.29	3.58	4.04	4.59	6.00	

숙성과 더불어 계속 증가하여 숙성 90일에 4.55 ppm으로써 최고치를 나타내었다. Ascorbic acid 및 sodium benzoate 처리구의 DMA질소는 숙성초기에는 대조구에 비해 상당히 낮은 함량치를 보였으나 숙성후반기에는 대조구와 비슷한 함량을 나타내었다. 그러나, sorbic acid 처리구에서는 숙성 80일 이후부터는 오히려 높은 함량으로 정량되었다. 이같은 현상은 이들 첨가제가 숙성초기에는 어느정도 DMA의 생성과 관련한 미생물의 생육을 억제시켰거나 혹은 이와 관련된 효소의 역가를 감소시킬 수 있었으나 숙성후반기에는 그 작용이 미약해진 결과로 추정된다. 동물식품 첨가제에 식염(시판식염 및 순 NaCl)의 종류를 달리할 경우 각 시험구간에 별다른 함량차가 없었는데 이같은 결과는 식염의 종류가 DMA생성에 큰 영향을 미치지 못한다는 결론을 내릴 수 있다.

권²²⁾의 보고에 의하면 간장중 DMA의 함량이 6.13ppm으로 이들 생성의 주원인은 메주라고 보고하였다. 간장 숙성중 DMA질소의 생성은 숙성과정중에 새로이 생성된다기 보다 메주로부터 용출된다는 설이 지배적이나 이상 발효 등으로 pH의 변화가 생길 경우 DMA질소가 생성될 수 있고, 메주중의 DMA모체는 TMAO가 TMA로 환원되면서 DMA를 생성하는 것으로 추정된다. 권²²⁾은 10종의 채래식 간장중 TMAO질소는 평균 0.42 ppm, TMA질소는 5.15ppm, 그리고 DMA질소가 3.75~11.99 ppm의 범위라 하였는데 이같은 결과로 보건데 간장중에 검출된 DMA질소의 모체는 TMAO인 것으로 판단된다.

질산염질소 및 아질산염질소의 변화

질산염질소의 변화: 간장 숙성중 질산염질소의 변화는 Table 4에서 보는 바와 같이 대조구 및 식품첨가제처리구 모두 숙성과 더불어 감소하는 경향을 나타내었다.

대조구의 경우 숙성 20일에 29.9 ppm였으나 숙성 60일 이후부터는 20 ppm미만으로 감소하였고, 숙성 100일 후에는 8.9 ppm에 불과하였다. 식품첨가제 처리구의 경우도 역시 비슷한 경향을 나타내어 숙성 50일 이후부터 20 ppm이하로 감소하였고, 숙성 100일 후에는 6.9~10.4 ppm의 범위였다. 그러나 순 NaCl을 이용한 간장에서는 숙성 20일에 16.2~17.9 ppm으로써 질산염질소의 함량이 시판식염을 이용한 간장에 비해 약 2/3에 불과한 함량이었다. 이같은 현상은 시판식염중에 불순물로 존재하는 질산염질소의 탓으로 생각된다.

간장숙성중 질산염질소의 감소 pattern은 시판식염을 이용한 간장과 순 NaCl을 이용한 간장간에 별다른 차이가 없었다. 일반적으로 대조구 보다는 식품첨가제 처리구에서 ascorbic acid, sodium benzoate 및 sorbic acid 처리구의 순으로 효과적이었고, 질산염질소의 함량을 최소화 한다는 측면에서 볼때 시판식염보다는 순NaCl을 이용하는 것이 훨씬 바람직하다는 결과를 얻었다.

Fong과 Chan¹⁶⁾은 시판 염건어중에서 50 ppm의 질산염질소를 검출하였는데, 주원인은 시판식염중에 불순물로 존재하는 질산염으로부터 유래된 것이라고 하였고, 또 권²²⁾은 간장중에 존재하는 질산염은 주로 간장 담금용 용수로부터 유래되며, 우물물의 경우 실험대상 시료중 88.1%가 수질기준 10 ppm

Table 4. Changes in nitrate levels during the fermentation of Korean ordinary soysauce

(ppm)

Food additives	Fermentation days								
	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Control	29.9	22.9	24.1	20.1	18.9	19.6	18.9	10.9	8.9
C-ASC	26.5	19.2	21.2	18.5	18.6	16.9	18.7	12.2	10.4
C-BEN	25.8	21.5	20.3	18.4	18.7	15.6	15.8	11.9	10.3
C-SOR	29.1	22.3	23.0	19.1	14.8	13.8	10.6	10.7	7.6
P-ASC	17.3	16.7	17.6	16.6	12.2	10.8	7.2	7.6	6.9
P-BEN	17.9	18.3	14.4	15.4	14.1	11.7	6.3	7.5	7.1
P-SOR	16.2	14.1	15.7	15.3	13.0	12.1	9.4	8.7	8.8

을 초과하여 평균 20.26 ppm나 검출된다고 보고한 바 있다. 이와 같은 보고들로 미루어 보건데 본 실험중의 질산염질소는 간장담금용 용수 및 시판식염 등이 중요한 근원이라 추정된다.

인체는 다량의 질산염을 섭취하게 되면 위암을 비롯한 각종 소화기계 질병의 발병률이 높다는 사실 외에,^{23,24)} 과다한 이노작용 및 methemoglobinemia 등을 초래하는 보고²⁵⁾, 또 NA의 전구물질이 아질산염으로 환원된다는 점등으로 볼때 간장중 질산염질소의 검출은 식품위생상 중요한 의미를 갖는다고 생각된다^{11,12)}.

아질산염질소의 변화: 간장 숙성중 아질산염질소의 변화는 Table 5와 같다. 대조구의 경우 숙성기간에 따라 다소간 불규칙한 함량을 나타내었으나 대체로 숙성과 더불어 약간 증가하는 경향을 보였는데 이는 질산염 질소의 함량과 상관관계가 있다고 생각된다. 즉 간장이 숙성됨에 따라 간장중에 존재하는 질산염환원균이 생성한 효소에 의해 질산염질소가 어느정도 환원되었기 때문에 질산염질소는 감소하고

반면에 아질산염질소가 증가된 것으로 추정된다. 상기결과를 뒷받침할 수 있는 보고로써는 생¹¹⁾, Fong과 Chan¹⁶⁾의 보고가 있다.

식품첨가제 처리구중 아질산염질소의 함량을 보면 시판식염을 이용한 경우보다 순NaCl을 이용한 간장에서 아질산염의 함량이 훨씬 낮은 경향을 보였고, 첨가제의 종류별로 볼때 ascorbic acid를 처리한 시료에서 월등한 효과가 있어 시판식염을 이용한 경우는 0.2~0.8 ppm, 순NaCl을 이용한 시료에서는 0.5 ppm미만이었다. 이처럼 ascorbic acid처리구에서 아질산염질소의 함량이 현저히 낮은 것은 ascorbic acid와 아질산염과의 반응에 의한 것으로 추정된다. 그리고 순NaCl을 이용한 간장보다 시판식염을 이용한 간장에서 아질산염의 함량이 높은 것은 식염중에 존재하는 질산염의 함량이 높은 것이 주된 원인이라 판단된다.

N-nitrosamine(NA)의 생성

회수율 및 NA의 등정: 3종 NA(NDMA, NDEA, NDPA)에 대한 회수율은 Table 6과 같이 최고 97%

Table 5. Changes in nitrite levels during the fermentation of Korean ordinary soysauce

(ppm)

Food additives	Fermentation days								
	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Control	1.1	1.5	1.6	1.4	1.6	1.7	1.8	1.6	2.0
C-ASC	0.6	0.4	0.3	0.5	0.2	0.3	0.5	0.6	0.8
C-BEN	1.1	1.5	1.5	1.0	1.6	1.6	1.8	1.4	1.9
C-SOR	1.3	1.2	1.3	1.4	1.3	1.5	1.6	1.9	1.8
P-ASC	trace	0.1	trace	0.4	0.3	0.4	0.2	0.3	0.4
P-BEN	0.9	1.1	0.8	0.9	0.7	0.8	0.9	0.9	1.1
P-SOR	0.5	0.5	0.7	0.6	0.5	0.7	0.7	0.8	0.9

Table 6. Percentage recovery from Korean ordinary soysauce spiked with 10 μ g/kg of each volatile N-nitrosamine

N-Nitrosamine(1)	X	S
NDMA	75	7.02
NDEA	94	4.16
NDPA	97	3.92

(1) n=5

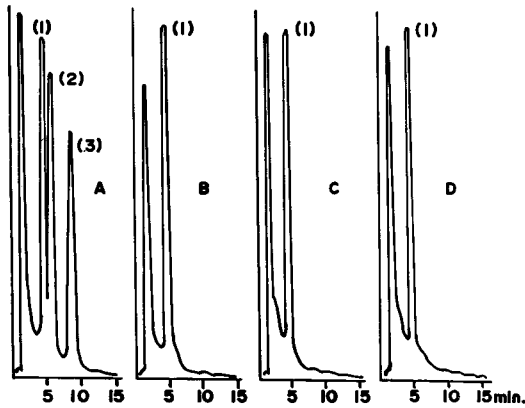


Fig. 4. GC-TEA chromatograms of standard (A), fermented soysauce for 60 days (B), for 90 days (C), and for 100 days in the control sample (D). (1) NDMA, (2) NDEA, (3) NDPA

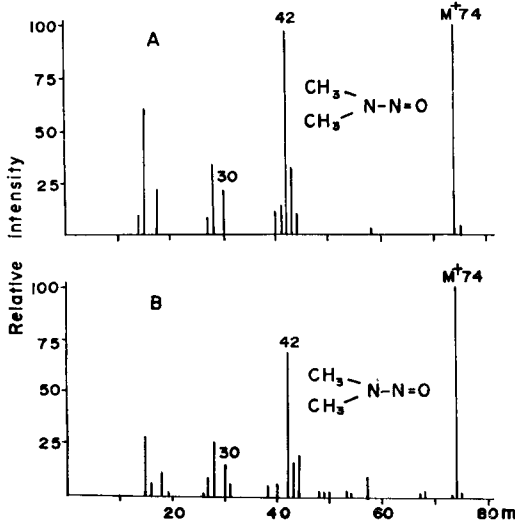


Fig. 5. Mass spectra of NDMA; A, standard; B, fermented soysauce for 90 days in the control sample.

(NDMA) 최저 75%로써 Fine등¹⁹⁾이 보고한 결과와 비슷한 값이었다.

GC-TEA의 chromatogram은 Fig. 4와 같다. 간장시료에서 NDMA는 상당량 검출되었으나 NDEA 및 NDPA는 검출되지 않았으며, NDMA를 GC-MS로 확인한 결과의 spectra는 Fig. 5와 같다. NDMA의 parent ion은 M/Z 74, diagnostic ion은 M/Z 30, 42로써 표준물질과 잘 일치하였다.

간장숙성중 NA의 변화: 간장숙성중 NA의 변화는 Table 7과 같다. 대조구의 NDMA변화를 보면 숙성 30일에 2.7 μ g/kg, 숙성 60일에 8.5 μ g/kg으로써 숙성 30일의 간장에 비해 약 3.7배 증가하였다. 권²⁰⁾은 5종의 재래간장을 선정하여 GLC로 분석한 결과 NDMA, NDEA, NPIP(N-nitrosopiperidine) 및 NPYR(N-nitrosopyrrolidine)를 검출하였고, NDMA는 혼적량에서 59 μ g/kg나 검출된다고 하였다. NDEA, NPIP 및 NPYR은 본 실험에서 검출되지 않았다.

비록 적은 함량이지만 하나 NDMA가 간장에서 검출되었다는 것은 이물질이 강력한 발암성을 나타낸다는 점에서, 또 우리나라 사람들이 조미료로써 간장을 사용한다는 것을 고려할때 매우 중요한 의미를 갖는다고 생각되며, NDMA의 생성은 간장담금용 용수 및 시판식염으로 부터 유래된 아질산염과 간장숙성중 간장덧으로부터 서서히 용출된 DMA와 반응하여 NDMA가 생성된 것으로 판단되고, 숙성중 NDMA가 증가되는 이유는 전구물질의 함량이 숙성함에 따라 어느 정도 비례적으로 증가한다는 사실과, 또 NA생성의 최적 pH는 3.4라는 점, 그리고 간장중에 존재하는 TMAO과 TMA로 환원되면

Table 7. Changes in N-nitrosamine during the fermentation of Korean ordinary soysauce

Food additives	Fermentation days			
	30	60	90	100
Control	2.7	8.5	10.7	10.0
C-ASC	trace*	1.1	1.9	1.8
C-BEN	1.9	3.1	8.4	9.2
C-SOR	2.0	3.0	3.7	5.4
P-ASC	ND	trace	0.6	0.5
P-BEN	trace	1.2	1.5	1.4
F-SOR	trace	0.9	1.3	1.4

trace : below 0.005 μ g/kg

NDEA and NDPA were not detected.

서 DMA뿐만 아니라 NA생성에 강력한 촉매작용을 하는 물질들이 생성되기 때문이라 생각된다.

NDMA가 증가하는 또 다른 이유는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 전구물질인 아민류의 종류에 따라서 NA가 최종산물이 되기도 하고, 또 계속적인 반응이 일어날 수도 있다는 것이다. 즉 제1급 방향족 아민은 토오트메리현상에 의해 diazohydroxide를 거쳐서(반응 B단계) diazonium염을 생성하고, 지방족 1급 아민은 반응 D를 거쳐 carbonium ion을 형성한 후 부가반응, 제거반응 및 자리옮김반응 등에 의해 각종 탈아민화 물질을 생성하게 된다(반응 E 단계). 그러나 제2급 아민의 경우는 상기 아민과는 달리 아질산과 반응하여 A단계에 표시된 것처럼 NA가 생성되어 더 이상 어떤 반응을 유발치 않는 매우 안정한 최종산물이라는 것이다. 때문에 간장의 경우 NDMA가 숙성과 더불어 계속 증가하는 경향을 나타낸 것으로 사료된다.

식품첨가제가 NDMA의 생성에 미치는 영향을 보면 시판식염으로 제조한 간장의 경우 대조구에 대

한 NDMA이 생성억제효과는 ascorbic acid 처리구(82.2~87.0%), sorbic acid 처리구(25.9~65.4%) 및 sodium benzoate 처리구(13.2~63.5%)의 순이었다. 이들 첨가제가 NDMA의 생성을 억제시키는 이유는 ascorbic acid의 경우는 아질산염의 농도를 감소시킨 결과로 추정되고, sorbic acid 및 sodium benzoate는 미생물의 생육억제 특히 질산염환원균의 생육을 어느 정도 억제하기 때문이라 생각된다. 순NaCl로 제조한 간장의 경우 NDMA의 억제효과는 팔목할만한 결과를 보여 ascorbic acid 처리구는 불검출에서 0.5 μ g/kg, sorbic acid 처리구는 혼적량에서 1.4 μ g/kg였다. 이같은 결과는 순NaCl로 간장을 담글 경우 일단은 시판식염으로부터 유래되는 아질산염질소의 혼입을 배제할 수 있었다는 것과 상기한 식품첨가제의 효과가 가세되어 NDMA의 생성을 크게 억제하였다고 판단된다. ascorbic acid가 NA의 생성을 억제시킨다는 연구로는 Kamm 등²⁶⁾, Fiddler 등²⁷⁾, Kawabata 등²⁸⁾의 보고가 있고, 몇몇 식품첨가제에 관한 연구로는 成¹¹⁾, Fong과 Chan¹⁶⁾의 보고가 있다.

Table 8. Changes in free amino acid contents during the fermentation of Korean ordinary soysauce

Amino Acid (A.A)	Fermentation days					
	30		60		90	
	mg%	% to Total A.A	mg%	% to Total A.A	mg%	% to Total A.A
Asp	198.1	6.5	345.7	10.7	415.2	11.2
Thr	137.7	4.5	127.4	3.9	123.9	3.3
Ser	108.1	3.5	123.9	3.8	111.3	3.0
Glu	793.9	26.1	897.0	27.7	1029.6	27.7
Pro	238.3	7.8	167.0	5.2	172.5	4.6
Gly	62.2	2.0	69.4	2.1	81.8	2.2
Ala	102.4	3.4	111.7	3.4	141.1	3.8
Cys	5.9	0.2	13.7	0.4	20.0	0.5
Val	141.2	4.6	145.6	4.5	168.6	4.5
Met	51.6	1.7	56.7	1.7	69.0	1.9
Ileu	89.6	2.9	101.0	3.1	116.4	3.1
Leu	143.4	4.7	147.7	4.6	181.0	4.9
Tyr	30.1	1.0	trace	.	18.7	0.5
Phe	124.1	4.1	115.8	3.6	150.7	4.1
His	304.1	11.2	344.1	10.6	394.3	10.6
Lys	413.5	13.6	462.0	14.3	492.8	12.9
Arg	65.5	2.2	13.3	0.4	25.0	0.8
NH ₃	97.8		120.6		120.5	
Total	3045.7	100.0	3242.0	100.0	3711.9	100.0

간장숙성중 NDMA의 생성에 영향을 미치는 인자

유리아미노산의 변화: Table 8에서 보는 바와 같이 간장 숙성중 검출된 유리아미노산은 총 17종이며 이들은 숙성과 더불어 계속 증가하는 경향을 보였다. 간장중 함량이 많은 유리아미노산은 glutamic acid, lysine, histidine 및 aspartic acid였고, 이중 glutamic acid는 특히 높은 함량치를 보여 총 유리아미노산에 대하여 26.1~27.7%였다.

숙성중 유리아미노산의 조성에는 변화가 없었으나 양적변화는 다소간 있어 숙성중 증감이 불규칙한 아미노산은 serine, proline, tyrosine, phenylalanine 및 arginine, 감소하는 유리아미노산은 threonine였으나, 그외 aspartic acid외 10종은 계속해서 증가하였다. 이처럼 아미노산의 종류에 따라 증감이 불규칙한 현상은 미생물의 생육과 밀접한 관계가 있는

것으로 추정되며, 계속해서 증가하는 이유는 간장덧으로부터 단백질이 분해되어 유리아미노산을 생성하고 이들이 숙성과정 중 계속해서 용출되기 때문이라 생각된다.

유리아미노산과 아질산염과의 반응성 검토: Fig. 1과 같은 모델을 설정하여 반응전후의 유리아미노산 및 아질산염질소의 함량변화를 실험한 결과는 Table 9와 같다. arginine 및 tyrosine을 제외한 15종의 유리아미노산은 모두 반응전에 비해 반응후에 현저히 감소하는 경향을 보였는데 특히 glutamic acid, proline 및 histidine은 반응전의 함량에 비해 각각 9.4%, 57.0% 및 15.5%의 감소를 보였다. 또 첨가한 아질산염질소도 174.5ppm 감소하였다. 그러나 암모니아질소는 오히려 0.086mg/ml의 증가를 보였다.

상기한 바와 같이 대부분의 유리아미노산과 첨가한 아질산염질소의 감소와 암모니아의 증가는 유리

Table 9. Changes of free amino acid composition in Korean ordinary soysauce by treatment with sodium nitrite^{1,2)} (mg/ml)

Amino acid	Composition of free amino acid before reaction(A)	Composition of free amino acid after reaction(B)	Difference (B-A)
Asp	3.457	3.236	-0.221
Thr	1.274	0.900	-0.374
Ser	1.239	1.113	-0.126
Glu	8.970	8.128	-0.842
Pro	1.670	0.718	-0.952
Gly	0.694	0.646	-0.048
Ala	1.117	1.091	-0.026
Cys	0.137	0.119	-0.018
Val	1.456	1.341	-0.115
Met	0.567	0.182	-0.385
Ileu	0.010	0.996	-0.014
Leu	1.477	1.448	-0.029
Tyr	trace	trace	-
Phe	1.158	1.081	-0.077
His	3.441	2.909	-0.532
Lys	4.620	4.469	-0.151
Arg	0.133	0.138	0.005
NH ₃	1.206	1.292	0.086
NO ₂ (ppm)	202.1	27.6	-174.5
total	32.420	28.515	-3.905

1) Reaction condition ; incubated at room temperature for 24 hrs.
 2) The amount of sodium nitrite used : 200 ppm

Table 10. Formation of N-nitrosamine¹⁾ in Korean ordinary soysauce stored at room temperature for 80 hours after additon of nitrite

	Added nitrite-N (mg / kg)	Added food additives (mg / kg)	NDMA (ug / kg)	Blocking (%)
Control ²⁾	-	-	10.7	-
Control	200	-	43.9	-
Elimination sample of FAA ³⁾ from control	200	-	57.2	-30.3
Control+L-ascorbic acid	200	300	15.9	63.8
Control+sorbic acid	200	300	30.6	30.3

1) NDEA and NDPA were not detected

2) Control sample was Korean ordinary soysauce fermentation for 70 days

3) FAA: Free amino acid

아미노산과 아질산염과의 반응성을 검토할 수 있는 좋은 자료로 생각된다. 즉 유리아미노산이 니트로소화합반응의 억제여부를 예측할 수 있었다. 유리아미노산의 감소는 아미노산의 탈아미노반응, 당 아미노산갈변반응 및 첨가된 아질산염과 반응하는 세 가지 가능한 경로를 생각할 수 있는데 본실험 결과를 보건데 아미노산의 일부는 당 아미노산갈변반응 및 탈아미노반응에 의해 감소되었고, 일부는 Van Slyke 반응에 의해 아질산과 반응하였다는 결론을 얻을 수 있었다. 왜냐하면 감소된 유리아미노산의 함량차에 비해 생성된 암모니아가 지나치게 적은 점, 또 Table 10에서 유리아미노산을 제거할 경우 대조구보다 NDMA가 30.3%나 증가한다는 사실, 그리고 첨가될 아질산염질소가 반응후에 불과 13.7%의 잔존에 불과하다는 자료가 이를 잘 뒷받침해 주고 있다.

식품가공이나 저장중 아질산염이 유리아미노산과 반응하여 NA의 생성을 억제시킨다는 성¹¹⁾의 보고 자료로 보건데 간장중의 유리아미노산은 NDMA의 생성억제에 상당한 효과를 나타낸다는 결론을 얻었다.

NDMA생성억제율의 실험: 70일간 숙성된 간장을 대

조구로 하여 아질산염질소를 200mg / kg첨가한 후 ascorbic acid, sorbic acid 및 유리아미노산이 NDMA의 생성에 어떤 영향을 미치는가를 실험한 결과 Table 10과 같은 결과를 얻었다.

70일간 숙성시킨 대조시료에 아질산염을 첨가할 경우 NDMA가 43.9 μ g / kg나 검출되었는데 이같은 결과는 간장중에 존재하는 DMA가 아질산과 항시 반응할 수 있는 조건을 갖추고 있다는 결과로 해석된다. 金²⁰⁾은 김치에 아질산염을 첨가할 경우 NDMA가 54.0mg / kg이나 검출된다고 보고한 바 있다.

아미노산을 제거한 시료에 아질산염을 첨가할 경우 대조구보다 약 13.3 μ g / kg나 많은 NDMA가 검출되었다. 이미 언급한 바와 같이 간장중에 존재하는 유리아미노산이 NDMA의 생성을 억제시키는 주요인자라는 것을 재확인한 결과다. 특히 glutamic acid, proline 및 histidine 이 주목되는 아미노산으로서 이들은 유리아미노산이 존재치 않거나 그 함량이 낮은 식품을 조리, 가공 및 저장시 NDMA의 억제제로써의 효과가 기대된다. 成¹¹⁾은 글비가공중 glycine, leucine 및 glutamic acid가 NA의 생성억제에 중요한 인자라고 하였다.

유리아미노산을 제거할 경우 NDMA가 대조구에 비해 증가하는 반면 ascorbic acid 및 sorbic acid를 첨가한 시험구에서는 각각 63.8% 및 30.3%의 억제효과를 나타내었다. sorbic acid보다 ascorbic acid가 훨씬 높은 억제효과를 나타낸 것은 아질산염과 즉시 반응할 수 있는 식품첨가제가 미생물의 생육을 억제시켜 효가를 기대하는 식품첨가제보다 효과적이라는 것을 간접적으로 알 수 있었다. 상기의 결과는 Table 7의 결과에서도 찾아볼 수 있었다.

요 약

예부터 우리나라 특유의 조미료로 상용되어온 재래식 간장을 제조함에 있어 강한 발암성 물질인 N-nitrosamine(NA)의 생성유래를 밝히고, 나아가서 이들의 생성을 억제시키는 방안의 일환으로써 몇몇종의 식품첨가제를 이용하여 NA생성에 미치는 영향을 검토하였고, 동시에 NA생성과 밀접한 관계가 있는 유리아미노산, dimethylamine(DMA), 질산염 및 아질산염의 변화를 검색하였다. 간장숙성중 DMA

질소는 다소간 불규칙한 변화를 보이고 있으나 대체로 숙성과 더불어 증가하는 경향이였다. DMA의 억제효과는 ascorbic acid 및 sodium benzoate 처리구가 DMA생성을 숙성초기에 크게 억제시켰으나 숙성말기에는 큰영향을 미치지 못하였다. 질산염질소는 간장이 숙성되는 과정중 계속해서 감소하는 추세였으나, 반면 아질산염질소는 증가하였다. 아질산염의 생성을 최소화하기 위해서는 ascorbic acid가 가장 효과적인 식품첨가제였다. N-nitrosodimethylamine (NDMA)은 간장숙성중 증가하는 경향을 보여 대조구의 경우 숙성 30일에 $2.7\mu\text{g}/\text{kg}$, 숙성 90일에 $10.7\mu\text{g}/\text{kg}$ 검출되었다. 그러나 N-nitrosodiet-hylamine(NDEA) 및 N-nitrosodipropylamine(NDPA)은 전혀 검출되지 않았다. 식품첨가제가 NDMA의 생성에 대한 억제효과는 시판식염으로 제조한 간장에서는 대조구에 비해 ascorbic acid 처리구가 82.2~87.0%, sorbic acid 처리구 25.9~65.4% 및 sodium benzoate 처리구에서는 13.2~63.5%의 억제효과를 보였다. 그리고 순 NaCl로 제조한 간장중 NDMA의 함량은 ascorbic acid 처리구가 $1.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하로서 대조구에 비해 NDMA의 생성이 크게 억제되었다. 간장중에 존재하는 유리아미노산이 NDMA의 생성을 억제시킨다는 것이 본 실험에서 밝혀졌고, 이중 특히 glutamic acid, proline 및 histidine이 주된 아미노산으로 추정되며 모델실험결과 간장중 유리아미노산을 제거할 경우 NDMA의 생성을 30.3%나 촉진시켰다.

<본 논문은 한국과학재단의 지원에 의한 연구결과임>

문헌

- Barnes, J.M. and Magee, P.N : *Br. J. Ind. Med.*, 11, 167(1954).
- Magee, P.N and Barnes, J.M : *Br. J. Cancer*, 10, 114(1956).
- Ender, F., Havre, G., Helgebostad, A., Koppang, N., Madsen, R and Ceh, L : *Naturwissenschaften*, 51, 637(1964).
- Boyland, E., Nice, E. and Williams, K. : *Fd Cosmet, Toxicol.*, 9, 639(1971).
- Fan, T.Y. and Tannenbaum, S.R. : *J. Agric. Food Chem.*, 21, 237(1973).
- Mirvish, S.S. : *J. Nat. Cancer Inst.*, 44, 644(1970).
- Keefer, R.K. and Roller, P. P. : *Science*, 181, 1245(1973).
- Lynegar, J.R., Panalks, T., Miles, W. F and Sen, N.P : *J. Sci. Food Agri.* 27, 527(1976).
- Crosby, N.T., Foremann, J.K., Palframan, J. F and Sawyer, R : *Nature*. 238, 342(1972).
- Sander V.J : *Hoppseyler's Z. Physiol. Chem.* 349, 429(1968).
- 성낙주 : 고려대학교 대학원 농학박사 학위논문 (1986).
- Mirvish, S.S., Wallcave, L., Eagen, M. and Shubik, P. : *Science*, 177, 65(1972).
- Fiddler, W., piotrowski, E.g., pensabean, J.W., Doerr, R.C. and Wassermann, A.E. : *J. Food Sci.* 37, 668(1972).
- Fan, T.Y. and Tannenbaum, S.R. : *J. Food Sci.*, 38, 1067(1973)
- Dahn, H., Loewe, L. and Buntin, C.A. : *Ubersicht und Diskussion der ERgebnisse, helv. Chim. Acta*, 43, 320(1960).
- Fong, Y.Y. and Chan, W.C. : *Fd Cosmet. Toxicol.* 14, 95(1976)
- Kawabata, T., Ishibashi and Nakamura, M. : *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 14, 31(1973).
- Len Kamm, McKeown, G.G. and Smith, D. M. : *J. A. O. A. C.* 48, 892(1965).
- Fine, D.H., Rufeh, F., Lieb, D. and Rounbehler, D.P. : *Anal. Chem.*, 47, 1188(1975).
- Hotchkiss, J.P., Libbey, L.M. and Scanlan, R. A. : *Association of official Analytical Chemists, Inc.* 63, 75(1980).
- 김종규 : 동국대학교 대학원 공학박사학위논문 (1979).
- 권태영 : 전북대학교 대학원 농학박사학위논문 (1983).
- Duplessis, L.S., Nunn, J.F and Roach, W.A : *Nature*, 222, 1198(1969).
- Hill, M.J., Hawksworth, G and Tattersall, G : *Birth. J. Cancer.* 28, 562(1973).
- 宮嶋昭 : 日本食品衛生研究. 27, 45(1977).
- Kamm, J.J., Conney, A.H. and Burns, J.J. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 747(1973).
- Fiddler, W., Pensabean, J.W., Piotrowski, E. g., Doerr, R.C. and Wassermann, A.E. : *J. Food Sci.*, 38, 1084(1973).
- Kawabata, T., Shazuki, H. and Inhibashi, T. : *Soc. Sci. Fish.*, 40, 1251(1974).
- 김수현 : 부산수산대학 대학원 박사학위논문 (1982).

(Received April 14, 1988)