

연구노트

Ethyl carbamate 전구체인 *N*-carbamyl 화합물과 에탄올의 반응에 대한 NaCl의 영향

고은미¹ · 권훈정^{1,2,*}

¹서울대학교 생활과학연구소, ²서울대학교 식품영양학과

Effects of NaCl on the Ethanolysis of *N*-Carbamyl Compounds to Form Ethyl Carbamate

Eunmi Koh¹ and Hoonjeong Kwon^{1,2,*}

¹Research Institute of Human Ecology, ²Department of Food and Nutrition, Seoul National University

Abstract Ethyl carbamate, which is also known as a possible human carcinogen, is formed by ethanolysis of *N*-carbamyl compounds such as carbamyl phosphate, urea, or citrulline. NaCl that is highly present in fermented foods was suspected to have an influence on ethyl carbamate formation. This study was designed to determine the effect of NaCl on the chemical reactions upon incubation of ethanol with the *N*-carbamyl compound in a 25% NaCl solution or in the absence of NaCl, and to find a possible association with the formation of ethyl carbamate. While the amount of ethyl carbamate formed in a urea solution with the addition of NaCl was increased up to 26%, the amount formed with citrulline or carbamyl phosphate in the presence of NaCl was decreased up to 30% and 40%, respectively. This indicates that NaCl should be considered as a potential factor influencing the rate of ethyl carbamate formation from its precursors.

Key words: ethyl carbamate, NaCl, citrulline, urea, carbamyl phosphate, ethanol

서 론

동물성 발암물질로 알려져 있는 ethyl carbamate(IARC, group 2B)는 carbamyl group을 가진 시트룰린, urea, carbamyl phosphate 등과 에탄올의 반응으로 생성된다(1,2) (Fig. 1). 이 화합물은 알코올 음료 중 포도주, 청주, 위스키 등에 다량 함유되어 있으며, 또한 간장, 김치, 된장, 식초, 탁주, *miso*, *natto*, 요구르트, 치즈, 차 등 넓은 범위의 발효식품에서 보고되었다(3-10). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives는 청량 음료 내 ethyl carbamate 농도를 제한하고 있으며(11), 캐나다 보건기구는 ethyl carbamate 전구체로 작용하는 urea를 알코올 음료에서 효모 영양분으로 첨가하는 것을 금지하고 알코올 음료에 대한 ethyl carbamate 농도를 규제하였다(12).

Ethyl carbamate는 임의로 첨가되는 물질이 아니고 미생물에 의한 발효산물이 반응하여 생성되는 천연 물질이기 때문에, 생화학적 생성기전, 주요한 전구체, 그리고 그 생성에 영향을 미치는 인자들이 규명되지 않는다면 그 생성량을 줄이기가 불가능하다. 한국인이 섭취하는 발효식품 및 알코올 음료에 ethyl carbamate가 다량 함유되어 있다는 보고들을 고려해 볼 때(5,13), ethyl carbamate 생성에 영향을 주는 인자 및 주요 전구체에 대한 연구가 절

실히 요구된다.

Ethyl carbamate의 생성 기전에 대한 연구는 주로 포도주나 증류주 등 알코올 음료에 대하여 외국에서 활발하게 진행되고 있으나(14-17), 발효식품 중에는 간장이 미비하게 연구되었다(9,10). 기존 연구들은 ethyl carbamate 생성에 영향을 주는 pH, 온도, *N*-carbamyl 화합물을 생성하는 미생물을 보고하였다. 하지만 간장, 된장, 김치, 치즈 등의 발효식품에 다량 함유되어 있는 NaCl이 ethyl carbamate 전구체들의 화학 반응 속도에 미치는 영향에 대한 보고는 아직까지 없다. 따라서 본 연구는 발효식품에 다량 함유되어 있는 NaCl이 ethyl carbamate 전구체인 *N*-carbamyl 화합물과 에탄올과의 화학반응 속도에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

NaCl 용액에서 질소화합물과 에탄올의 반응

반응기질의 화학 반응 조건은 Fig. 2와 같다. *N*-carbamyl 화합물과 에탄올과의 화학반응 속도에 NaCl이 영향을 미치는지 확인해 보려고 각 반응기질별로 NaCl을 첨가한 것과 첨가하지 않은 반응액을 만들었다. NaCl 농도는 전통간장의 염도인 22-30%(18)를 기준으로 하여 25%로 제조되었다. 발효식품에서 ethyl carbamate 전구체로 알려져 있는 *N*-carbamyl 화합물인 시트룰린, urea, carbamyl phosphate를 반응기질로 하였다. 한편 carbamyl 화합물이 아닌 아르기닌이 반응 기질의 대조군으로 사용되었다. 각 기질의 순수한 화학반응 속도를 비교하기 위하여 모든 반응기질의 농도를 동일하게 하였다. 반응 용매인 물에 대한 각 기질의 용해도를 비교하여 용해도가 가장 낮은 시트룰린을 기준으로 모든 기

*Corresponding author: Hoonjeong Kwon, Department of Food and Nutrition, Seoul National University, San 56-1, Shillim-dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
Tel: 82-2-880-6835
Fax: 82-2-884-7555
E-mail: hjkwon@snu.ac.kr
Received May 24, 2006; accepted December 15, 2006

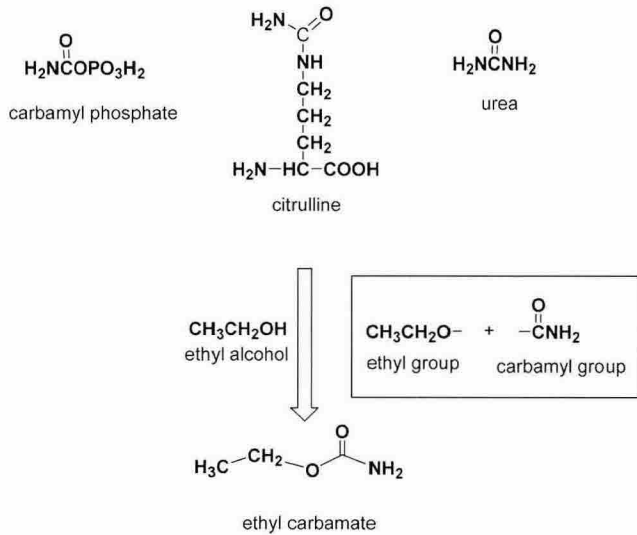


Fig. 1. Proposed pathway for the chemical reaction of *N*-carbamyl compounds with ethanol to form ethyl carbamate.

질 반응액을 0.6 M 농도로 정하였다.

각 *N*-carbamyl 반응액에 에탄올 용액을 첨가하는 시점을 반응 시작으로 하였다. 각 혼합액은 항온기(25°C)에서 교반되면서 반응이 진행되었다. 반응 시작 후 3일과 20일에 ethyl carbamate를 분석하여 각 반응기질의 상대적인 반응성 및 *N*-carbamyl 화합물과 에탄올의 화학반응에 대한 NaCl의 영향을 비교하였다. 한편, carbamyl phosphate는 다른 화합물에 비교하여 반응성이 매우 높기 때문에 반응 시작 3일만에 분석되었다.

Ethyl carbamate 분석

Methylene chloride, Celite 545(not acid washed), sodium sulfate는 Fisher Scientific(Fair Lawn, NJ, USA)에서 구입하였다. Ethyl carbamate와 *n*-propyl carbamate는 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA)와 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입되었다. Aluminum oxide(activated, neutral, 5-200 μm)는 ACROS organics(Geel, Belgium) 제품을 사용하였다. Kim 등(5)의 방법에 따라 ethyl carbamate 함량을 분석하였다. 불활성화시킨 aluminum oxide(activated, neutral, 5-200 μm) 10 g, 무수황산나트륨 40 g을 순차적으로 유리칼럼(3 × 5 cm)에 채우고, *n*-propyl carbamate를 내부 표준물질로 첨가한 간장 15 g에 700°C에서 16시간 이상 구운 Celite 15 g과 섞어 맨 위층에 충전하였다. Methylene chloride 100 mL를 흘려 얻어진 용출액을 30°C 이하에서 감압 농축하였다. 플라스크를 methylene chloride로 씻어 2 mL v-vial에 옮긴 후 질소가스를 이용하여 0.5 mL까지 농축하고 gas chromatography-mass spectrometry-selected ion mode(GC-MS-SIM)에서 ethyl carbamate를 정량하였다. 분석 조건은 DB WAX(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, J&W Scientific Co., Folsom, CA, USA) 칼럼을 장착한 Hewlett Packard 6890 II GC와 Hewlett Packard 5973 MSD를 사용하였다. 오븐 온도는 60°C에서 5°C/min으로 135°C까지 가열시킨 후 10°C/min 속도로 220°C까지 가열하여 4분간 유지시켰으며, 주입구 온도는 210°C, 검출구 온도는 220°C로 하였다. Splitless 방법으로 시료를 주입하고, 70 eV의 에너지로 전자 이온화 방법을 사용할 때의 이온화원의 온도는 150°C였다. 먼저 scan mode로 표준 용액과 간장의 총이온 크로마토그램을 얻은 후 분리된 ethyl carbamate 피크의 머무름 시간과 mass fragmentation

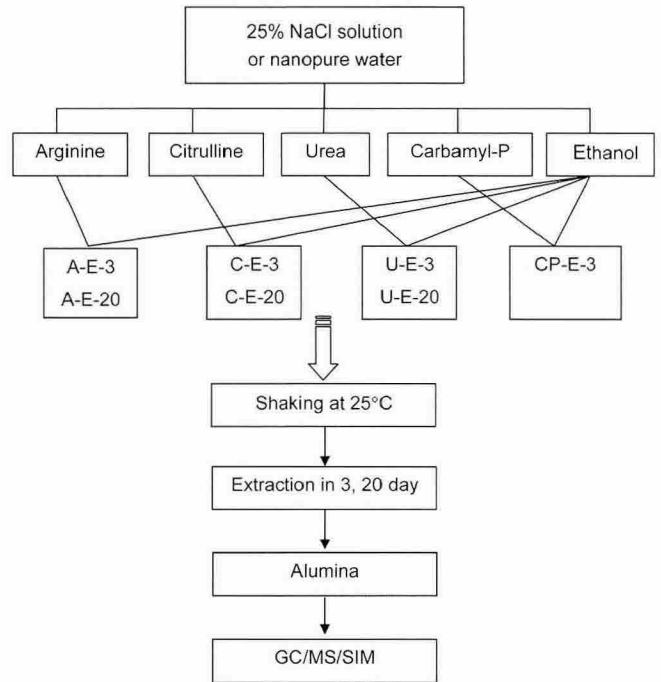


Fig. 2. Scheme for the incubation of ethanol with *N*-carbamyl compounds. Reactions of 0.6 M *N*-carbamyl compounds with 0.6 M ethanol were carried out in 25% NaCl solution (w/v) or nanopure water at 25°C. The chemical reaction was stopped by analyzing the samples at 3 and 20 day.

pattern으로 성분을 확인하고, 선택이온 측정법(GC-MS-SIM)으로 *m/z* 62에서 분석하였다. Ethyl carbamate 농도 계산은 Pierce 등(19)이 사용한 내부 표준 물질 방법을 기초로 하였다. 농도비(ethyl carbamate/propyl carbamate)를 가로축으로 하고 피크 면적비(ethyl carbamate/propyl carbamate)를 세로축으로 하는 표준 곡선을 작성한 후, 간장 시료의 피크 면적비를 표준선에 내삽함으로써 ethyl carbamate 농도를 계산하였다.

결과 및 고찰

에탄올과 carbamyl phosphate와 혼합액을 3일동안 반응시킨 후 가스크로마토그래피/질량분석기로 얻은 크로마토그램을 Fig. 3에 나타내었다. 15분대에서 검출된 피크가 질량 스펙트럼에서 ethyl carbamate의 특징적인 이온인 *m/z* 89, 74, 62을 가지고 있어서 성분이 확인되었다. 따라서 ethyl carbamate와 내부표준물질인 *n*-propyl carbamate에서 감도가 가장 높은 *m/z* 62의 선택적 이온 모드(selected ion mode)에서 얻은 크로마토그램의 피크 면적비와 농도비를 이용하여 시료내 ethyl carbamate가 정량되었다.

발효식품에 존재하는 NaCl이 ethyl carbamate 전구체인 *N*-carbamyl 화합물과 에탄올의 화학반응에 영향을 주는지 확인해 보았다. 에탄올과 *N*-carbamyl 화합물(carbamyl phosphate, urea, 시트룰린) 및 대조기질(아르기닌) 혼합액의 pH, ethyl carbamate 생성량, 수율을 Table 1에 나타내었다. Urea, 시트룰린, 아르기닌 반응액에서는 3일 동안 반응 후에 ethyl carbamate가 생성되지 않았다. 반면에, 에탄올에 대한 반응성이 가장 높을 것으로 예상되었던 carbamyl phosphate는 3일만에 다량의 ethyl carbamate가 생성되었다. 대조기질로 사용된 아르기닌은 carbamyl기가 없는 화합물이기 때문에 20일까지 ethyl carbamate가 전혀 생성되지 않았

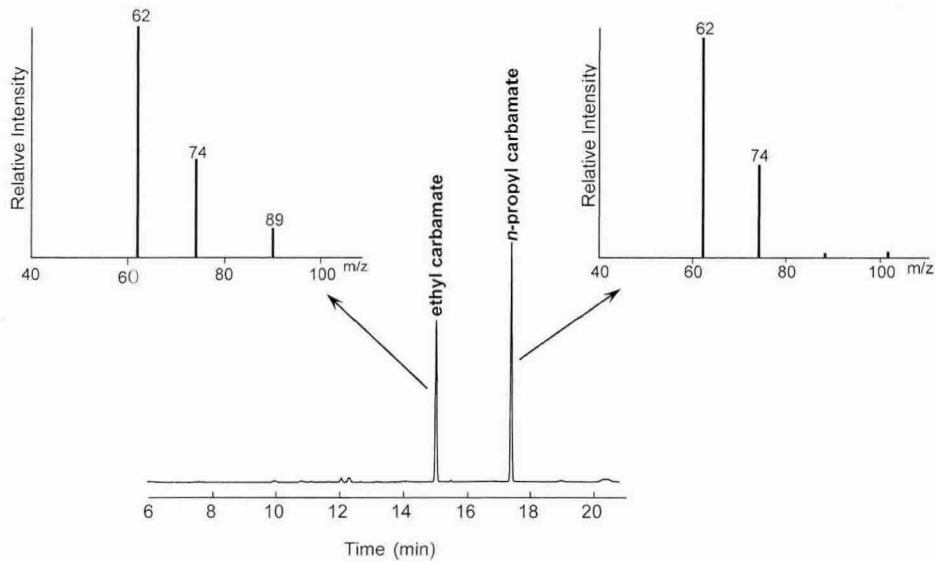


Fig. 3. Total ion chromatogram of ethyl carbamate formed after the incubation with carbamyl phosphate and ethanol, and mass spectra of ethyl carbamate and *n*-propyl carbamate used as an internal standard.

다. 각 *N*-carbamyl 화합물과 에탄올간의 화학반응 속도를 비교해 보면, carbamyl phosphate, urea, 시트룰린 순서로 감소되었다. Ough 등(2)은 격렬한 조건에서 urea 또는 시트룰린과 에탄올을 반응시킨 후 ethyl carbamate 생성량을 비교한 결과, urea가 시트룰린보다 반응성이 더 높다고 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다.

생성된 ethyl carbamate를 기준으로 각 반응 기질액의 화학 반응에 대한 NaCl의 영향을 살펴보면, 시트룰린 반응액과 carbamyl phosphate 반응액은 NaCl에 의해 ethyl carbamate 생성량이 각각 34, 40%씩 감소되었으며 urea 반응액은 오히려 26% 증가되었다 (Fig. 4). 이것은 시트룰린과 carbamyl phosphate는 NaCl에 의해 에탄올과의 반응이 저해된 반면에, urea는 NaCl에 의해 에탄올과의 반응이 오히려 촉진되었음을 의미한다. 하지만 이런 상반된 영향은 각 *N*-carbamyl 화합물과 에탄올과의 화학 반응에 대한 NaCl의 역할을 결론짓기 어렵게 하였다.

발효식품 중 김치 시료에서 NaCl 함량(1.19-4.95%, w/v)이 낮을수록 ethyl carbamate 농도가 증가하는 경향을 보였지만 유의적이지 않다고 보고되었다(3). 김치의 NaCl 함량이 본 연구(25%)보다 훨씬 낮았기 때문에 뚜렷한 상관관계를 보여주지는 않았지만, NaCl이 ethyl carbamate 생성을 억제한다는 본 연구 결과와 일치하였다. 한편, 90일 숙성된 간장의 경우 ethyl carbamate 농도와

NaCl 함량(15-37%, w/v) 사이에 연관성이 없다고 보고되었다(4). 하지만 다양한 NaCl 농도에서 간장 숙성 중 ethyl carbamate 전구체의 농도를 모니터링한다면 전구체 사이의 화학 반응 속도에 대한 NaCl의 역할이 확인될 수 있을 것으로 사료된다. 간장 발효에 중요한 역할을 하는 *Bacillus subtilis* J1와 *Zygosaccharomyces rouxii* Y101의 아르기닌 대사기전에 관한 연구에서(20), 전구체로는 urea보다는 시트룰린과 carbamyl phosphate가 그리고 대사효소의 활성이 높은 *B. subtilis*가 ethyl carbamate 생성에 주역할을 할 것이라고 제시되었다. 간장발효 초기에 *B. subtilis*가 시트룰린과 carbamyl phosphate를 생성한 후에도 고농도로 존재하는 NaCl 때문에 전구체 사이의 화학반응이 매우 느리게 일어나 ethyl carbamate 농도가 서서히 증가될 것으로 사료된다. 실제로 이전 연구에서 매년 간장을 달이면서 수십 년 동안 보존한 재래식 간장의 ethyl carbamate 농도는 다른 재래식 간장보다 수십 배 높았다(5). 그 이유는 매년 달이는 과정에서 전구체 사이의 화학반응이 촉진되었거나 또는 고농도로 존재하는 NaCl에 의해 전구체의 화학반응이 억제됨으로써 ethyl carbamate 생성이 수십 년 동안 매우 느리게 진행되었기 때문일 것으로 사료된다.

본 연구에서는 발효식품에 높게 함유되어 NaCl이 ethyl carbamate 전구체간의 화학반응 속도에 영향을 미치는지 확인하는데 목

Table 1. Ethyl carbamate formation after the incubation of ethanol with *N*-carbamyl compounds or arginine at 25°C in the 25% NaCl solution or in the absence of NaCl¹⁾

	Citrulline		Urea		Carbamyl-P ²⁾		Arginine	
	Control ³⁾	NaCl ⁴⁾	Control	NaCl	Control	NaCl	Control	NaCl
pH	6.47	6.18	7.58	7.68	5.62	5.49	5.72	5.98
Ethyl carbamate	105 ± 6.4	69 ± 2.7	349 ± 30.3	439 ± 44.1	221 ± 4.2	123 ± 10.1	0	0
Yield (mg/mg)	3.3 × 10 ⁻⁷	2.2 × 10 ⁻⁷	3.2 × 10 ⁻⁶	4.1 × 10 ⁻⁶	1.2 × 10 ⁻³	6.7 × 10 ⁻³	-	-

¹⁾0.6 M ethanol was added to 0.6 M *N*-carbamyl compounds, citrulline or urea, and 0.6 M arginine. After 20 days of incubation at 25°C with an exception of carbamyl phosphate, each mixture was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry detector. Data are expressed as means (ng) ± standard deviation (n = 3).

²⁾The reactions of 0.6 M carbamyl phosphate with 0.6 M ethanol were stopped at third day because carbamyl phosphate was known to be very reactive to ethanol. Data are expressed as means (μg) ± standard deviation (n = 3).

³⁾The mixtures were incubated in nanopure water.

⁴⁾The reactions were carried out in 25% NaCl solution (w/v).

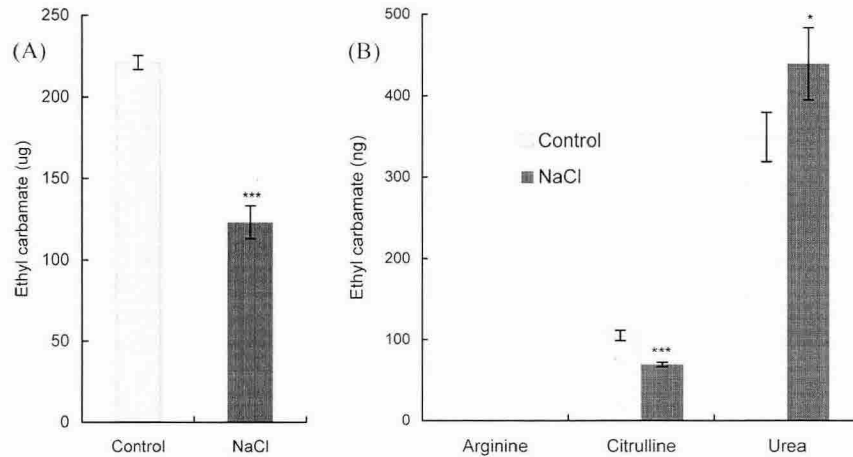


Fig. 4. Differences of ethyl carbamate formed after the incubation of ethanol with *N*-carbamyl compounds at 25°C in the 25% NaCl solution or in the absence of NaCl (control). The concentrations of precursors were adjusted to 0.6 M, which was based on citrulline with the lowest solubility in water. A: the mixture of carbamyl phosphate and ethanol after 3 days of incubation at 25°C, B: the mixture of arginine (control for the substrate), citrulline, or urea with ethanol after 20 days of incubation at 25°C. Data are expressed as means ± standard deviation (n = 3). ***: significantly different from control ($p < 0.001$), *: ($p < 0.05$).

적을 두었다. 앞으로 발효과정에서 NaCl이 전구체간의 화학반응을 억제하는 기전과 발효 미생물의 생육 및 미생물 효소의 활성에 미치는 영향에 대한 연구가 계속 진행되어 ethyl carbamate 생성에 대한 NaCl의 역할이 총체적으로 규명되어야 할 것이다.

요 약

발효식품에 다량 함유되어 있는 NaCl이 ethyl carbamate 전구체인 *N*-carbamyl 화합물과 에탄올과의 화학반응에 영향을 주는 것으로 확인되었다. *N*-carbamyl 화합물과 에탄올의 화학반응 속도를 비교한 결과, carbamyl phosphate, urea, 시트룰린 순서로 ethyl carbamate의 생성 속도가 감소되었다. 또한 NaCl은 ethyl carbamate의 주요한 전구체로 추정되는 carbamyl phosphate 또는 시트룰린과 에탄올의 화학반응을 억제한 반면에, urea와 에탄올과의 반응은 오히려 촉진하였다. 앞으로 발효식품에서 ethyl carbamate 및 그 전구체의 생화학적 생성 기전뿐만 아니라 전구체간의 화학반응에 대한 NaCl의 역할에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 Korea Health 21 R&D Project(HMP-00-B-22000-0148)의 지원으로 수행되었음에 이에 감사하는 바입니다.

문 헌

- Ough CS, Crowell EW, Mooney LA. Formation of ethylcarbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. *Am. J. Enol. Viticult.* 39: 243-249 (1988)
- Ough CS, Crowell EW, Gutlove BR. Carbamyl compound reactions with ethanol. *Am. J. Enol. Viticult.* 39: 239-242 (1988)
- Koh E, Kwon H. Determination of fermentation specific carcinogen, ethyl carbamate, in Kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 421-427 (1996)
- Chung HJ, Kwon H. Dependence of ethyl carbamate formation on the fermentation variable in Korean traditional soysauce. *Korean J. Soc. Food Sci.* 13: 92-98 (1997)
- Kim YK, Koh E, Chung HJ, Kwon H. Determination of ethyl carbamate in some fermented Korean foods and beverages. *Food Addit. Contam.* 17: 469-475 (2000)
- Zimmerli B, Schlatter J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutat. Res.* 259: 325-350 (1991)
- Battaglia R, Conacher HBS, Page D. Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review. *Food Addit. Contam.* 7: 477-496 (1990)
- Canas BJ, Harvey DC, Robinson LR, Sullivan MP, Joe Jr FL, Diachenko GW. Ethyl carbamate levels in selected foods and beverages. *J. Assoc. Off. Ana. Chem.* 72: 873-876 (1989)
- Hasegawa Y, Nakamura Y, Terasawa S, Ito Y, Chiyama M. Determination of ethyl carbamate in various fermented foods by selected ion monitoring. *J. Food Protect.* 53: 1058-1061 (1990)
- Matsudo T, Aoki T, Abe K, Fukuta N, Sasaki M, Uchida K. Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor. *J. Agric. Food Chem.* 41: 352-356 (1993)
- Diachenko GW, Canas BJ, Joe FL, DiNovi M. Ethyl carbamate in alcoholic beverages and fermented foods. In: *Food Safety Assessment*. Finley JW, Robinson SF, Armstrong DJ (eds). American Chemical Society, Washington DC, USA, p. 419 (1992)
- Conacher HBS, Page BD, Lau BPY, Lawrence JF, Bailey R, Calway P, Hanchay JP, Mori B. Capillary column gas chromatographic determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Ana. Chem.* 70: 749-751 (1987)
- Ha MS, Hu SJ, Park HR, Lee HM, Kwon KS, Han EM, Kim KM, Ko EJ, Ha SD, Bae DH. Estimation of Korean adult's daily intake of ethyl carbamate through Korean commercial alcoholic beverages based on the monitoring. *Food Sci. Biotechnol.* 15: 112-116 (2006)
- Arena ME, de Nadra MCM. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 155-161 (1999)
- Azevedo Z, Couto JA, Hogg T. Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 32-36 (2002)
- Kodama S, Suzuki T, Fujinawa S, Yotsuzuka F. Urea contribution to ethyl carbamate formation in commercial wines during storage. *Am. J. Enol. Viticult.* 45: 17-24 (1994)
- Liu SQ, Pritchard GG, Hardman MJ, Pilone GJ. Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic bacteria *Leuconostoc oenos*

- and *Lactobacillus buchneri*. Am. J. Enol. Viticult. 45: 235-242 (1994)
18. Jang JH. Studies on the minerals, nitrogen compounds and sensory characteristics of Korean traditional soy sauces. MS thesis, Seoul National University, Seoul, Korea (1995)
19. Pierce WM, Clark AO, Hurst HE. Determination of ethyl carbamate in distilled alcoholic beverages by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. J. Assoc. Off. Ana. Chem. 71: 781-784 (1988)
20. Koh E, Kim YK, Kwon H. Arginine metabolism by *Bacillus subtilis* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from Korean soy-sauce. Food Sci. Biotechnol. 12: 62-66 (2003)