

## *Streptococcus uberis*에 의한 질산염의 환원 및 Dimethylnitrosamine의 생성에 관한 연구

鄭圭燦·金鍾俠·南景琇

嶺南大學校 藥學大學

(Received December 3, 1985)

### Studies on the Reduction of Nitrate and Formation of N-Dimethylnitrosamine by *Streptococcus uberis* in Human Saliva

Kyu Charn Chung, Jong Hyeup Kim and Kyung Soo Nam

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 632, Korea

**Abstract**—It has been assumed that nitrite, one of the precursor of N-nitrosamine, in human saliva must have been formed from salivary nitrate through the action of microorganism in the oral cavity. In this paper, we have tested the concentration of nitrite and nitrate in human saliva and the degrees of nitrate reduction by oral microflora and identified some bacteria which were able to reduce nitrate. The concentration of nitrite and nitrate was 1.7~9.5ppm and 9.0~28.5ppm respectively. The numbers of total bacteria and nitrate reducing bacteria in four korean human saliva sample were  $15\sim63\times 10^8$  CFU and  $1.0\sim6.0\times 10^8$  CFU and the main nitrate reducing bacteria were *Streptococcus uberis* which was presented in large quantities and showed remarkable reductive activity. Lastly, we knowed that N-dimethylnitrosamine was formed by the reaction between dimethylamine and nitrite in the presence of *St. uberis in vitro*.

오늘날 인간의 생명을 위협하는 각종 질병 중 암을 비롯한 유전적 질환은 수많은 연구자들에 의해 그 원인이 규명되어 가고 있다. 세계 보건 기구에서는 인간의 암 발생요인중 85% 이상이 환경중의 화학물질에 의한 것이라고 추정하며 인간은 항상 이 환경성 화학물질에 노출되어 있다해도 과언이 아니다. 더우기 의식주에 직접 간접적으로 관련성이 있는 기구, 의약품, 화장품, 농약, 살균, 살충제 등도 환경을 오염시키는 물질들이며 특히, 흡연은 자신뿐만 아니라 주위의 환경까지도 오염시켜 환경성 발암의 중요한 요인이 된다.<sup>1-2)</sup>

이들 환경성 화학물질 중 식품첨가제 및 육류 가공 시 발색제로 널리 사용되는 질산염과 아질산염은 생체구성 성분 및 인간의 구강을 통해 흡수되는 많은 2급, 3급 아미노기를 가지는 화합물과 위장내에서 반응하여 발암성을 지닌 N-nitroso화합물이 생성된다. 한편, 질산염은 비교적 무해한 물질로 알려져 있으나 이는 구강 및

장내에 존재하는 일종의 미생물군(nitrate reducing microorganisms)에 의해 아질산염으로 환원되므로 아질산염과 더불어 암발생 요인으로 문제가 되고 있다<sup>3-6)</sup>.

따라서 본 실험에서는 한국인의 타액중에 함유된 질산염과 아질산염의 농도를 측정하고 타액중에 존재하는 질산염 환원성 세균을 분리 동정하는 한편 질산염이 타액 중의 세균과 dimethylamine과 반응하여 N-nitroso화합물인 N-dimethylnitrosamine을 생성하는지를 알아 보았다.

#### 실험 방법

**시료**—타액은 20대 초반의 건강한 남녀 4사람으로부터 채취하였으며, 그 외 실험에 사용한 유기용매, 시약등은 특급 내지 일급품을 사용하였다.

**아질산염<sup>7-8)</sup> 및 질산염의 정량<sup>9)</sup>**—검체 5ml를 취하여 0.1% sulfanilamide 용액 1ml와 N-napthylethylene diamine 용액 1ml(이하 G.R. 시약<sup>10)</sup>)

를 가한 다음 잘 혼합하여 20분 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 질산염의 정량은 카드름 칼람<sup>11)</sup>에 검체를 통과시켜 그 여액을 아질산염의 정량법과 동일한 방법으로 행한 다음 총아질산염의 양을 구해서 여기에서 검체 중의 아질산염의 양을 빼주면 된다. 즉  $[NO_3^-] = [NO_2^- + NO_3^-] - [NO_2^-]$ 이다.

**타액 중 아질산염과 질산염의 정량**—타액시료 0.5ml를 취하여 암모늄 완충용액 4.5ml를 가한 다음 잘 혼합해서 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 그 양을 측정하였다(위 방법과 동일).

**타액에 의한 질산염의 환원**—타액 2ml와 300  $\mu g$   $NO_3^- - N$  1ml를 37°C에서 30분 간격으로 3시간 반응시켰다.

**타액 중 총 세균수와 질산염 환원성 세균의 측정**<sup>12)</sup>—타액시료를 계단희석한 다음 희석액 0.1ml( $10^4 \sim 10^8$ )를 BHI agar 배지에 균일하게 가한 다음 37°C에서 2일간 배양하여 생성되는 각각의 집락을 다시 질산염이 함유된 BHI agar배지에 접종하여 37°C에서 2일간 배양한다. 배양 후 아질산염의 존재유무를 알아보기 위해 확인시약인 G.R.시약을 가한다. 이때 적색을 띠게 되면 그 집락은 질산염 환원성 세균으로 간주하였으며, 타액 ml당 형성되는 집락수(the number of colony forming units, CFU)를 기록하였다.

**질산염 환원성 세균의 분리 동정**—질산염 환원성 시험결과 임의로 비교적 환원력이 강한 8종류의 균을 대상으로 Sand등<sup>13)</sup>의 방법에 준하여 시행하였다.

**Streptococcus uberis에 의한 질산염의 환원**—3.7% BHI broth내에서 St. uberis 세균부유

액( $10^4$ cells/ml) 2ml와  $NO_3^- - N$ (300 $\mu g$ /ml) 1ml를 37°C에서 2~20시간 반응시켰다.

**Streptococcus uberis 존재하에서 질산염과 dimethylamine과의 반응**<sup>14)</sup>—3.7% BHI broth 중에 St. uberis 세균부유액( $10^4$  cells/ml) 20ml와 반응액(DMA·HCl; 0.5g, BHI; 3.7g,  $KNO_3$ ; 1.0g,  $H_2O$ ; 100ml, pH 7.0) 2ml를 37°C에서 12시간 반응시켜 얻은 반응생성물을 2배의 dichloromethane으로 3회 추출하여 모은 추출액을 무수 황산 나트륨으로 건조시킨 후 kuderna-Danish 농축기로 농축시킨다. 이 농축액(yellow products)을 반응 생성물로 하여 TLC, GC 등으로 각각 확인하였다.

실험결과 및 고찰

한국인의 타액중에 존재하는 질산염과 아질산염의 농도를 식전, 식후 및 하루 중 경시변화를 비교해 볼 때 식전에는 아질산염이 1.7~7.1 ppm, 질산염은 9.0~23.9ppm이었으며 식후에는 아질산염은 2.5~9.5ppm, 질산염은 13.5~28.5ppm으로 나타나는 것으로 보아 타액 중에 존재하는 아질산염과 질산염의 농도는 사람마다 다소의 차이는 있으나 식후에 더 많은 경향을 보였다(Table 1).

하루(06:00~20:00) 중 타액속의 아질산염과 질산염의 농도변화에서는 Fig. 1에서 나타난 것처럼 아질산염의 농도는 큰 변화가 없었으나(7.9~10.7ppm) 질산염은 식후인 오전 10시(41 ppm)와 오후 2시(28.5ppm) 부근에서 높게 나타나고 있음을 알 수 있다. 이와 같이 타액속의

Table I—Nitrite and nitrate concentration in human saliva.

Subject			Before meal		After meal	
No.	Sex	Age	$NO_2^-$	$NO_3^-$	$NO_2^-$	$NO_3^-$
1	M	25	7.1±1.8	23.9±8.1	9.5±2.1	28.5±2.9
2	M	23	3.8±0.4	10.8±2.9	5.3±3.1	24.5±1.8
3	M	22	3.9±2.1	11.1±3.1	5.9±0.7	23.5±8.1
4	F	22	1.7±0.9	9.0±2.1	2.5±0.3	13.5±1.7

Saliva was collected at 12:30 (before meal) and at 13:30 (after meal). Values are means±S.D. of three determinants.

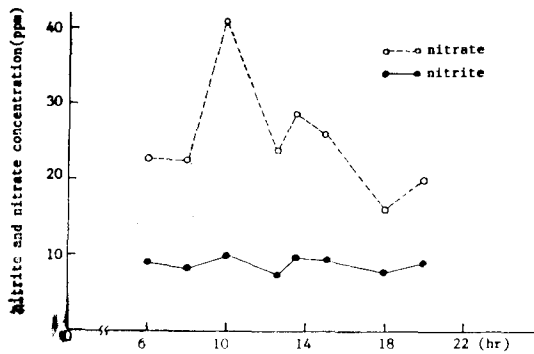


Fig. 1-Each point was plotted the value of nitrite and nitrate in saliva obtained from subject No. 1 at various times.

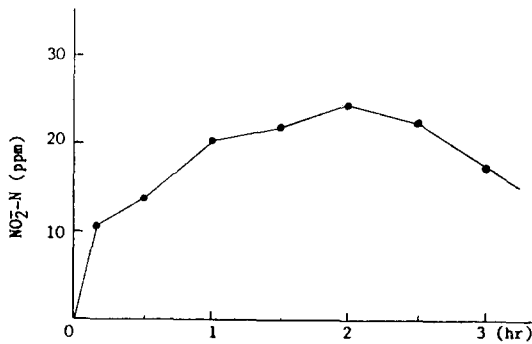


Fig. 2-Reduction of nitrate by human saliva. 2ml of saliva No. 1 and 1ml of 300µg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N solution were incubated at 37°C and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N concentration was measured after indicated incubation time by A.O.A.C. method.

아질산염과 질산염의 농도는 식사 및 음식물의 종류와 상관이 있음을 알 수 있었다.

인체의 구강내에 존재하는 미생물군에 의해 질산염이 아질산염으로 환원된다는 보고<sup>15-16)</sup>에

의해 Fig. 2에 타액에 의한 질산염의 환원성을 알아 보았다. 그 결과 반응 2시간 부근에서 최대치를 나타냈으며, 이때 생성된 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N의 농도는 23.5ppm이었다. 그러므로 본 실험에서 타액에 의한 질산염의 환원은 반응 2시간에서 가장 높은 23.5%를 나타냄을 알 수 있었다.

한국인의 타액 중에 존재하는 총 세균수와 그 중 질산염 환원성 세균수를 측정된 결과(Table 2) 총세균수에 대한 질산염 환원성 세균의 비는 각각 8.0%, 11.3%, 6.3%, 6.3%이었다. 그리고 MacConkey배지에서는 균의 증식이 없는 것으로 보아서 타액속에 대장균은 없으며, 총 세균수는 식후보다 식전에 더 많이 존재함을 알 수 있었다.

4사람의 타액으로부터 분리한 이들 질산염 환원성 세균중 비교적 환원력이 강한 8종류의 균을 대상으로 균을 분리 동정하였다(Table 3). 그 결과 A-2, B-4, C-2, D-20은 *Streptococcus uberis*, A-1, B-1은 *Streptococcus mutans*, 그러나 C-9 및 D-5는 아직 확인하지 못하였다. 그러므로 한국인 타액 중에는 호기성 상태로 배양 시 *Streptococcus spp.*의 세균이 많이 분포함을 알았다. 한편 Muramatsu등<sup>17)</sup>이 조사한 일본인 타액 속의 균의 종류와는 달리 나타남을 보아 타액 중에 존재하는 세균의 종류는 민족에 따라 다르다고 생각되어 진다.

이와 같이 4사람의 타액으로 부터 분리 동정한 8종류의 세균에 대하여 4사람 모두에게 공동으로 존재하는 *Streptococcus uberis*를 대상으로 반응시간에 따라 질산염의 환원력을 조사하였다(Fig. 3). 도표에서 나타난 것처럼 *St. uberis*에

Table II-Count of total bacteria and nitrate reductase bacteria in human saliva.

Number of bacteria	Saliva sample (sex, age)					
	Medium	1(♂, 25)	2(♂, 23)	3(♂, 22)	4(♀, 22)	
total bacteria (×10 <sup>8</sup> C.F.U./saliva ml)	MacConkey agar	*N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	
	BHI agar	**after	6.1±1.5	3.5±0.9	4.7±0.1	4.1±1.0
	BHI agar	***before	15±3.0	53±5.0	63±11.0	16±7.0
nitrate reductase bacteria (×10 <sup>8</sup> C.F.U./saliva ml)	BHI agar	before	1.2±0.6	6.0±1.9	4.0±2.2	1.0±0.6

\*N.G.; no growth, \*\*after; after meal, \*\*\*before; before meal. Values are means±S.D. of three determinants.

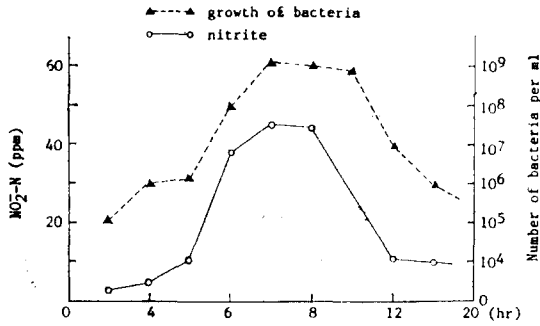


Fig. 3-Reduction of nitrate by *St. uberis* in vitro. 2ml of cell suspension ( $10^4$  cell/ml) and 1ml of  $300\mu\text{g NO}_3^-$ -N were incubated at  $37^\circ\text{C}$ .

의해 환원된 아질산염의 양은 균의 증식곡선에서 증식이 가장 활발한 대수기와 定常期에서 가장 많았으며, 사멸기로 갈수록 *St. uberis*의 군수가 줄어들므로 인해 아질산염의 생성이 차츰 적어짐을 알았다.

이와 같이 인간의 타액 중에 존재하는 세균 중 *St. uberis*를 분리 同定하고 이 세균이 질산염 환원력이 있음을 알았다. *In vitro*에서 *St. uberis*와 질산염 그리고 디메틸아민을 함께 배양시켰을 때 *St. uberis*에 의해 환원된 아질산염이 2급 아민인 디메틸아민과 반응하여 발암물질인 N-dimethylnitrosamine을 생성하는 지를 표준 N-dimethylnitrosamine과 비교하여 알아 보았다. 그 확인 방법으로 먼저 TLC를 행한 것을 Fig. 4에 나타내었다. 표준 dimethylnitrosamine과 동

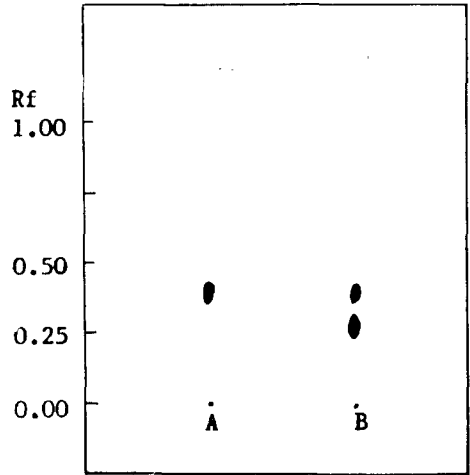


Fig. 4-Thin-layer chromatogram of the reaction product and N-dimethylnitrosamine. Developed with n-hexane: diethylether: dichloromethane (4:3:2 v/v) on silica gel HF<sub>254</sub> and visualized with ultraviolet light or Griess reagent plus ultraviolet light. A: Dimethylnitrosamine (DMNA) B: Reaction product.

일한 R<sub>f</sub>치에서 반응생성물에서도 spot가 나타났으며 G.R. 시약으로 이들을 발색시킨 결과 N-nitroso화합물 특유의 분홍색을 관찰할 수 있었다. 반응생성물을 GC로 분석한 결과(Fig. 5) 반응생성물에서의 피이크는 표준 dimethylnitrosamine과 동일한 유지시간(2분 대)을 나타내었다. 이러한 실험성적을 종합해 볼 때 타액에서 분

Table III-Identification of nitrate reductase bacteria isolated from human saliva.

*Biochemical test	Gram stain	Catalase test	6.5% NaCl	Inulin	Mannitol	Lactose	**5% Sucrose agar
Strains							
A-1	cocci	—	—	+	+	—	+
A-2	cocci	—	—	+	+	—	—
B-1	cocci	—	—	+	+	—	+
B-4	cocci	—	—	+	+	—	—
C-2	cocci	—	—	+	+	—	—
C-9	Bacilli	+	—	—	—	—	—
D-5	cocci	—	—	—	+	—	—
D-20	cocci	—	—	+	+	—	—

\*Characteristics included in Sands' algorithm based on Facklam RR. \*\*5% Sucrose agar for nonadherence of mucoid colonies.

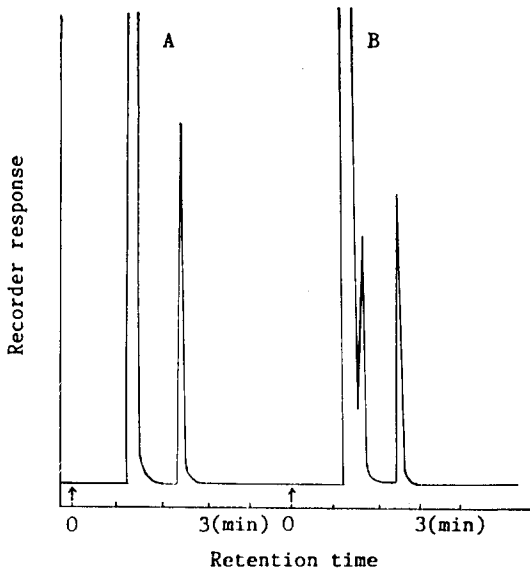


Fig. 5-Gas chromatogram of N-dimethylnitrosamine and reaction product.

A: N-dimethylnitrosamine, B: Reaction product. Instrument, Varian Model 3700; column, 15% PEG, 60~80 mesh, 3mm×1.5m stainless column, 180°C; carrier gas, N<sub>2</sub> 20ml/min; detector, FID.

리한 *St. uberis*는 질산염을 환원시켜 아질산염으로 만들며 이 아질산염은 2급 아민인 디메틸아민과 반응하여 발암물질인 N-dimethylnitrosamine을 생성함을 알 수 있었다. 실제 인간의 구강내에서 아질산염과 2급 및 3급 아민이 반응해서 어느 정도의 N-nitroso 화합물이 생성하는지는 불확실하다해도 *in vitro* 실험에서는 N-nitroso화합물이 생성되며, N-nitroso화합물의 반응 최적 pH는 산성측에 있기 때문에 위내에서의 반응이 중요시되고 있다.

## 결 론

1. 타액 중에 함유된 아질산염과 질산염의 농도는 각각 1.7~9.5, 9.0~28.5ppm 정도였으며 식전보다 식후에 더 많은 경향을 보였다.

2. 타액 ml당 함유된 총 세균의 수는 식전(15~63×10<sup>8</sup> CFU)이 식후(3.5~6.1×10<sup>8</sup> CFU)보다 많이 존재하였으며 이들 중 질산염 환원성

세균의 수(식전)는 1.0~6.0×10<sup>8</sup> CFU였다.

3. 4사람의 타액으로부터 분리한 8종류의 세균을 동정한 결과 A-2, B-4, C-2, D-20은 *Streptococcus uberis*, A-1, B-1은 *Streptococcus mutans*로 판정되었다.

4. *In vitro*에서 *streptococcus uberis* 존재 하에서 질산염은 디메틸아민과 반응하여 N-dimethylnitrosamine이 생성됨을 TLC 및 GC로 확인하였다.

## 문 헌

- 1) 堀口, 環境ガン職業ガン化學ガン, 三共出版社, 9, (1983).
- 2) Ames, B.N.: Identifying environmental chemicals causing mutations cancer. *Science*, **204**, 587, (1979).
- 3) Walters, C.L., Hart, R.J., Keefer, L.K., and Newberne, P.M.: The sequential determination of nitrite, N-nitrosocompounds and nitrate its application. *IARC*, **16**, 389 (1979).
- 4) Ishiwata, H., Tanimura, A., and Ishidate, M.: Metabolic fate of nitrate and nitrite. *Eisei Kagaku*, **28**, 171 (1982).
- 5) Inoue, Y.: Hygienic studies on nitrate and nitrite in food (II). 廣島大學醫學雜誌, **20**, 347 (1972).
- 6) 材松紘一, 丸山節子, 西澤節二: Nitrate-reducing activity of human saliva. *J. Food Hyg. Soc.* **21**, 123 (1980).
- 7) Kaneda, Y., and Iwaida, M.: Determination of nitrate and nitrite in Whey Cheese. *J. Food Hyg. Soc.* **18**, 470 (1977).
- 8) Ishiwata, H., Mizushiro, H., Sakai, A., and Tanimura, A.: Distribution, secretion and metabolism of nitrate in the rat lower digestive tract. *J. Food Hyg. Soc.* **22**, 520 (1981).
- 9) Hayashi, N., Kodaka, H., Tanimura, A., and Kurata, H.: Formation of nitrite in the stomach contents of Monkeys administrated sodium nitrate solution orally in relation to the stomach microflora. *J. Food Hyg. Soc.* **20**, 370 (1979).
- 10) Walter, C.L., Johnson, E.M., Ray, N., and Woolford, G.: Nonvolatile nitrosamine from biolog-

- ical precursors and their detection. *IARC*, 79 (1972).
- 11) *Association of Official Analytical Chemists*, Nitrite in cheese. 14th, Virginia, p.310 (1984).
  - 12) Fishbein, L.: Chromatography of environmental hazards, (I) carcinogens, mutagens and teratogens 37 (1972).
  - 13) Magee, P.N., and Barnes, J.M.: Carcinogenic nitroso compounds. *Adv. cancer Research*, 10, 163 (1967).
  - 14) Ishiwata, H., Tannimura, A., and Ishidate, M.: Studies on *In vitro* formation of nitroso compounds (VI). *J. Food Hyg. Soc.* 17, 59 (1976).
  - 15) Lijinsky, W., and Greenblatt, M.: Carcinogen dimethylnitrosamine produced *in vivo* from nitrite and aminopyrine. *Nature New Biology*, 236, 177 (1972).
  - 16) Chen, J., and Raisfeld-Danse, I.H.: Drug interactions II. Formation of nitrosamines from therapeutic drugs. Properties and kinetics of the formation of N-nitroso propranolol hydrochloride. *The journal of pharmacology and Experimental Therapeutics*, 225, 705 (1983).
  - 17) Koichi, M., Setsuko, M., and Setsuji, N.: Nitrate-reducing bacterial flora its ability to reduce nitrate in human saliva. *J. Food Hyg. Soc.* 20, 106 (1979).