

## 清酒의 酒母醱酵中 Nitrosodimethylamine 關聯物質의 變化

朴莊鉉·洪載植\*·權泰英\*\*·李泰圭\*\*\*·金台榮\*\*\*\*

白花釀造(株) \*全北大學校 農科大學 食品加工學科 \*\*全州大學校 理科大學 化學科  
\*\*\*全州又石大學 食品營養學科 \*\*\*\*農林振興庁 農業技術研究所 農產物 利用科

## Changes of Substance Related Nitroso Dimethylamine During the Fermentation of Rice Wine Starter

Doo-Hyun Park, Jai-Sik Hong\*, Tae-Young Kwon\*\*, Tae-Kyu Lee \*\*\*  
and Tae-Young Kim \*\*\*\*

Baik Hwa Brewing Co. LTD, Kunsan 573-060,

\*Department of Food Science and Technology, Jeonbuk National University, Jeonju 560-756,

\*\*Department of Chemistry College of Science, Jeonju University, Jeonju 560-759,

\*\*\*Department of Food and Nutrition, College of Woosoug, Jeonju 565-800 and

\*\*\*\*Farm Products Utilisation Division, Agricultural Sciences Institute, R.D.A. Suweon 440-707, Korea

**ABSTRACT:** The changes of pH, titrable acidity, nitrite and dimethylamine(DAM) content in the various different kinds of the rice wine starters during the fermentation were studied, and the changes of nitrosodimethylamine(NDMA) contents were also determined by High Pressure Liquid Chromatography. After 24hrs, fermentation rice wine starter, pH was generally decreased to below 5 and after full fermentation the acidities were from 0.51 to 0.89 as succinic acid. After 12hrs, fermentation nitrate contents were rapidly decreased. The large amount of nitrite was formed in the beginning of the fermentation. But by the increase in the acidity due to the further fermentation nitrite contents were gradually disappeared. Generally the DMA contents of each rice wine starter were kept unchanged. On completion of fermentation, NDMA contents of starter added with nitrite and DMA were 472.1 ppb. The starter added with DMA was 329.0 ppb, whereas the other added with nitrite was 229.0 ppb, and control without addition of nitrite and DMA was 24.4 ppb. But the rice wine sold in market was not detected any NDMA at all.

**KEYWORDS:** Dimethylamine, Nitrosodimethylamine, Nitrate, Nitrite, Rice wine.

清酒는 순수한 穀物 釀造酒로서 醱酵過程중에 많은 微生物이 關여하고 있다. 그 중 重要한 微生物은 清酒의 原料가 되는 쌀 고지에서 *Aspergillus oryzae* 와 젖산균이 繁殖하게 되며 담금후에는 *Saccharomyces cerevisiae* 및 젖산균이 繁殖하면서 Alcohol 과 各種 有機酸을 生成하게 된다. 그 외에도 好氣性 細菌이 醱酵 初期에 일부 繁殖하다가 死滅하게 된다. 工業적으로 釀造하는 경우는 清酒의 醱酵에 關係하는 酵母는 우수한 香과 맛을 내는 것을 選定하여 使用하고 있다.

食餌性 發癌物質인 Nitrosodimethylamine (NDMA) (Barnes 등, 1954; Draclcery 등, 1963; Magee 등, 1967; Lijinsity, 1970)은 여러 가지 食品(Crosby 등, 1976)에서 檢出되는 바 Beer (Hotchkiss 등, 1980; Scanlan 등, 1982; Graham 등, 1980; Gott 등, 1979; 眞木俊夫 등, 1980), Whisky(Grahn, 1980), Wine(Ough 등, 1981)같은 酒類에서도 이따금 問題가 發生되고 있으나 清酒에서는 아직 檢出되었다는 報告는 없다. 그러나 清酒도 다음과 같은 理論의 根據에 의해 檢出

가능성을 排除할 수는 없다. 淸酒의 原料인 釀造用水와 쌀 고지는 Nitrosodimethylamine (NDMA)의 전구물질인 Dimethylamine (DMA)이 술덧(酒醪)의 發酵過程에서 극히 낮은 含量이다 (Hill 등, 1973; 양 등, 1979). DMA의 生成이 可能하며 이 경우에 있어서 生成原因菌은 *Lactobacillus*屬이나 *Pediococcus*屬과 같은 젖산菌으로 推定되어지고 있다 (Zee 등, 1981; Bassir 등, 1978). 이 경우 穀類나 果實에 들어 있는 choline이 Trimethylamine (TMA)을 거쳐 DMA가 合成되는 것으로 알려져 있다 (Bassir 등, 1978).

한편 DMA의 Nitroso化 agent로서 Nitrate가 *Acrobacter*屬, *Escherichia*屬, *Favobacter*屬, *Serratia*屬, *Micrococcus*屬, *Pseudomonas*屬, *Enterobacter*屬 등 (荻決長, 1976)에 의해서 還元되어 生成되는 데 일반적으로 淸酒發酵의 主體가 되는 酵母 (日本釀造協會, 1984)나 젖산菌 (Maduagwe 등, 1979)은 Nitrate 還元能力이 없고 술덧에 混入된 好氣性 細菌의 作用으로 알려져 있다 (梅津雅裕, 1960). 그러나 이러한 好氣性 細菌은 耐酸性이 弱해서 pH 5.0 以下에서는 生育이 극도로 抑制되고 있다. 따라서 梅津(1961)은 淸酒 酒母의 發酵過程에서 Nitrite는 發酵 初期에 生成되었다가 消失된다고 報告하였다.

한편 NDMA 合成의 最適 pH는 3.4로 酸性쪽에서 誘發하게 이루어진다 (Mirvish 등, 1975). 그러나 실제 食品에 있어서는 여러가지 要因에 의해 弱酸性내지 中性에서도 生成이 可能하다고 한다. 가장 主된 原因은 食品의 加工 貯藏過程에서 混在하는 各種 微生物이다. 즉 Mills(1976) 등, Ender(1971), Hawksworth(1971) 등, Sander(1968), Klubes(1971, 1972) 등, Hill(1973)과 Yang(1977) 등, Lane(1973), Mottram(1975), Van Broekhoven(1980) 등은 食品이나 척추動物의 內장에서 分離한 各種 酵母와 細菌들이 人工 media上에서 DMA의 Nitroso化를 促進한다고 報告하였다. 그러나 NDMA의 生成에 있어서 微生物의 酵素學的인 反應에 대해서는 밝히지를 못했다.

淸酒의 發酵過程에 있어서 食品化學的 및 微生物學的인 諸般經過나 NDMA의 生成條件을 結付시켜 생각해 볼 때 淸酒 酒母의 發酵 初期에는 NDMA의 전구물질로서 DMA와 Nitrate의 生成이 활발하게 이루어질 수 있으나 그 다음에 젖산菌이 增殖하게 되면 Nitrate는 減少하게 된다. 그러나 酸도가 높아

짐에 따라 DMA의 Nitroso化 속도는 빨라지게 되며 (Mirvish 등, 1975) 아울러서 Yamamoto(1976, 1979) 등의 주장과 같이 各種 有機酸, Alcohol, 還元糖에 의해 NDMA의 生成을 더욱 促進한다고 한다.

이러한 觀點에서 볼 때 淸酒에는 NDMA가 存在하는 것은 必然的이라고 볼 수 있다. 그러나 아직까지는 淸酒에 있어서 NDMA의 檢出에 對한 報告가 거의 없으므로 本 研究에서는 淸酒의 酒母 담금液에 Nitrate, DMA, TMA, Choline 등을 一定量 添加하여 發酵過程중에 pH, 酸度, Nitrate, Nitrite, DMA 등의 變化와 發酵終了후 NDMA를 HPLC를 使用하여 分析 檢討한 結果를 여기에 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 使用菌株

本 實驗에 使用한 菌株은 群山市 白花釀造(株)에 保管中인 *S. cerevisiae* 變異株을 分讓받아 使用하였다.

### 釀造用水

本 實驗에 使用한 釀造用水는 Table I의 成分을 含有한 地下水를 使用하였다.

### 쌀고지의 製造

동정율 77%인 쌀을 水洗한 후 4시간 水浸하여 물

Table I. Ingredients of the under ground water.

Items of analysis	Unit	Contents
Extract	ppm	110.48
pH		7.2
NO <sub>3</sub> -N	ppm	10.0
NO <sub>2</sub> -N	ppm	N. D
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	ppm	trace
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	ppm	N. D
Cl <sup>-</sup>	ppm	11.1
Fe <sup>++</sup>	ppm	0.0018
Ca <sup>++</sup>	ppm	7.75
Mg <sup>++</sup>	ppm	10.13
Ca hardness	CaOmg/100ml	1.09
Mg hardness	MgOmg/100ml	2.36

N.D: Not detected

을 빼고 蒸煮한 蒸米를 고지실에서 채우고 난 후 種麴을 0.1% 살포하여 30~35°C에서 뒤치기, 담기의 操作을 거쳐 43時間 培養한 후 出麴하였다. 이때 고지의 成分은 水分이 26.1% 水浸出酸도가 0.225% (as succinic acid g/100 ml),  $\alpha$ -amylase 105(Wohlgemuth value, 糖化力 32(unit/0.1g) Dimethylamine(DMA)는 0.35 ppm이었다.

**酒 母**

1) 酒母의 醱酵條件

쌀고지 50g에 Table II와 같이 調製한 溶液 150 ml를 500 ml용 유리병에 넣고 斜面培養한 *S. cerevisiae* 變異株를 1백금씩 접종하여 12°C에서 醱酵시켰다.

2) 酒母의 pH

酒母의 pH 測定은 pH meter로 測定하였다.

3) 酒母의 酸度

酒母를 거즈로 여과한 여액 10 ml에 脫炭酸 증류수를 가해서 50 ml로 定容하고 phenolptalein을 指示藥으로 하여 0.1 N-NaOH로 適定하여 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{酸度} = \text{適定 ml數} \times \text{Factor} \times 10 \times 0.0059$$

(as succinic acid g/100 ml)

4) 酒母의 Alcohol

국세청 기술연구소 주류분석규정(한국세정신보사, 1975)에 의해 부평법과 酸化法으로 分析하였다.

5) Nitrate와 Nitrite 定量

醱酵過程중 酒母를 경시적으로 採取하여 Kamm의 方法(1967)에 따라 分析하였다. 즉 거즈로 여과한 酒母 10 ml에 0.5 N-NaOH 5 ml와 10%-ZnSO<sub>4</sub> 5 ml와 증류수를 가해서 100 ml로 定容하여, 증류수로 충분히 세척하여 Nitrite를 除去한 여과지로 여과한 다음 Nitrite는 여액 5 ml에 0.5% Sulfanilamide 용액 2 ml와 6N-HCl 용액 2 ml를 가하고 다시 0.1%  $\alpha$ -Naphthylethylene diamine 0.5

m/를 가하여 15분 후에 540 nm에서(Spectronic-20) 比色定量하였다. Nitrate는 위의 方法으로 여과한 여액을 Cadimium-Column을 통과시켜 Nitrite로 환원시켜 比色定量 하였다.

6) Dimethylamine(DMA) 定量

醱酵期間중 酒母를 경시적으로 採取하여 거즈로 여과한 여액 10 ml에 0.1 N-HCl : ethanol 混合液 (1 : 1) 50 ml를 가하고 다음과 같은 方法으로 수증기 蒸溜하였다. 즉 수증기 蒸溜과정에서 Trimethylamine(TMA)이나 choline으로부터 Dimethylamine(DMA)가 生成됨을 防止하기 위해 5g의 MgO를 가해 弱Alkali化하고 受器에 1N-HCl 10 ml를 가해 100 ml가 될 때까지 수증기 蒸溜하였다. 이 용액 10 ml를 취해서 60°C에서 減壓乾固시킨 다음 德永의 方法(1970)에 따라 定量하였다. 즉 10 ml 용량의 Cap test tube에 試料液 1 ml와 再蒸溜한 n-Amyl alcohol 1 ml를 가한 다음 여기에 50% -KOH 1 ml를 가해 마개를 단단히 막고 50°C의 Water bath上에서 5分間 가열하였다. 2분간 격렬하게 振盪하고 10분간 定置하였다가 n-amy alcohol층을 취해 GLC로 分析하였다. 이때 GLC의 分析條件은 Table III과 같다.

7) Nitrosodimethylamine(NDMA) 定量

醱酵가 다 끝난 酒母를 거즈로 여과한 여액 100 ml에 NaCl 40g을 가하고 200 ml의 ether로 2회 抽出하고 Rotary evaporator에서 ether이 20 ml가 될 때까지 ether를 증발시킨 다음 NDMA의 증발을 방지하기 위해 증류수 50 ml를 가하여 다시 前記의 조건으로 ether를 완전히 증발시킨 후 殘液을 蒸溜 flask에 옮겨 NaCl 40g을 가하여 100 ml가 되도록

**Table II.** Composition of the preparation solution.

Sample	Contents
A	Control
B	NO <sub>2</sub> -N : 10ppm
C	DMA-N : 20ppm
D	TMA-N : 100ppm
E	Choline-N : 100ppm
F	NO <sub>2</sub> -N 10ppm + DMA-N 20ppm

**Table III.** Instrumental conditions for gas-liquid chromatographic analysis of the volatile dimethylamine.

Instrument	Hitachi Model 663-50
Detector	FID
Column	Stainless steel column(2m × 3mm)
Packing material	20% squalane + 2.5% glycerol
Column temperature	+ 2.5% KOH on chromosorb W
Injection port temp	50°C
Flow rate	140°C
Chart speed	25ml/min
	1mm/min

**Table IV.** Conditions for HPLC.

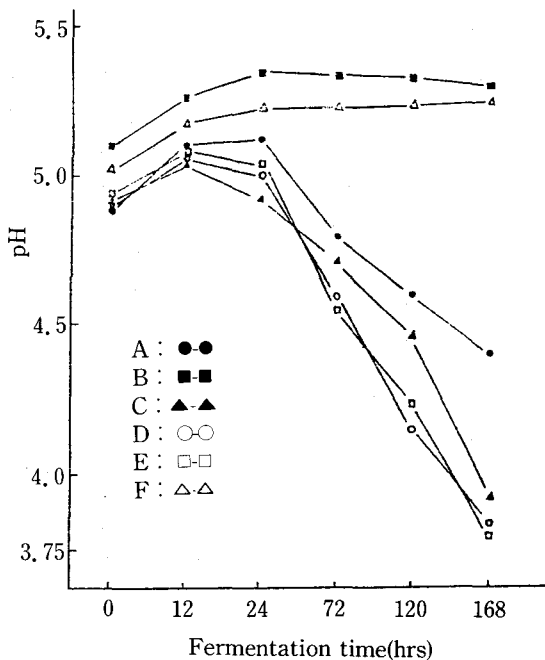
Instruments	Waters Co., HPLC
Detector wave length	214nm
Column	$\mu$ Bondapak C ( $\phi$ 3mm $\times$ 30cm)
Mobile phase	DW/CH <sub>3</sub> CN (95:5) Containing 0.2% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Flow rate	1ml/min

수증기 蒸溜하였다. 이 蒸溜液 4m/를 sep-PAK silica cartridge(water, CO)를 통과시켜 HPLC로 分析하였다. 이때 HPLC의 分析條件은 Table IV와 같다.

**結果 및 考察**

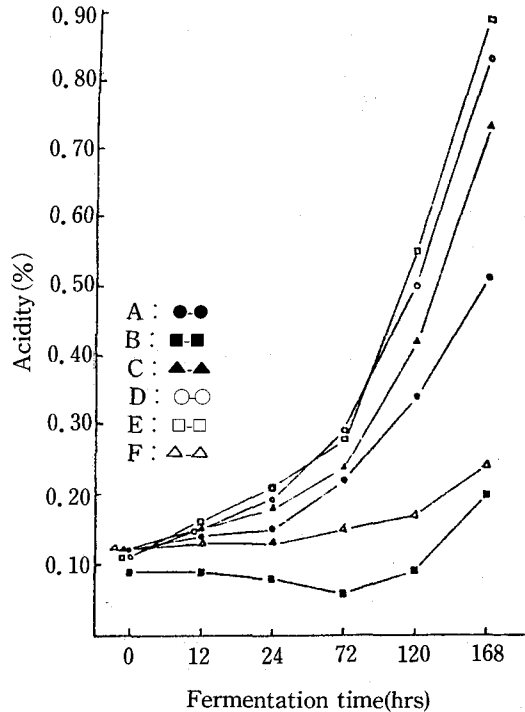
**醱酵過程중 pH, 酸度變化 및 醱酵후 Alcohol 含量**

淸酒의 酒母 담금액의 種類를 달리하여 醱酵過程중 pH와 酸度の 變化를 실험한 結果는 Fig.1 및 2와 같고 醱酵終了후 Alcohol 含量을 조사한 結果는



**Fig.1.** Changes of pH during the fermentation of rice wine starter.

A: control, B: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm, C: DMA-N 20 ppm, D: TMA-N 100 ppm, E: choline-N 100 ppm, F: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm + DMA-N 20 ppm



**Fig.2.** Changes of acidity during the fermentation of rice wine starter(as succinic acid).

A: control, B: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm, C: DMA-N 20 ppm, D: TMA-N 100 ppm, E: choline-N 100 ppm, F: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm + DMA-N 20 ppm

Table II와 같다.

Fig.1에서 보는 바와 같이 쌀고지에 Table II와 같은 方法으로 調製液을 가해 5°C에서 30分間 放置하였다가 測定한 pH는 5.0內外였는데 이는 쌀고지에서 溶出된 酸에 의한 것으로 생각된다.

醱酵過程중에 pH가 약간 上昇한 理由는 鹽基性 化合物의 生成으로 pH가 약간 上昇하는 것으로 생각되어진다.

그리고 Nitrite를 인위적으로 添加한 B와 F區를 除外하고는 담금 24시간후면 모든 處理의 pH는 5.0 이하로 떨어지기 시작하여 醱酵終了후에는 pH 4.0 이하까지 떨어짐을 알 수 있었다. 그러나 B와 F區는 담금시보다 약간 上昇하여 pH 5.2~5.3의 수준에서 머무르고 있다.

이것은 Nitrite에 의해 젖산菌의 生育이 抑制되고 있음을 의미하는 것으로 Fig. 2의 酸量에서도 명확히 알 수 있다. 즉 酸 生成量은 꾸준히 增加하여 168시간(7일) 후에는 0.51~0.89g/100 ml의 수준을 보이고 있는데 Nitrite 處理區인 B와 F區에서는 0.20~0.24g/100 ml로 극히 적은 量에 머무르고 있다.

**Table V.** Contents of ethanol after fermentation of 168 hrs.

(unit: % (W/V))

Sample	Contents
A	8.9
B	0.5
C	7.9
D	8.8
E	9.0
F	0.8

A: Control B: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm  
 C: DMA-N 20 ppm D: TMA-N 100 ppm  
 E: Choline-N 100 ppm  
 F: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm+DMA-N 20 ppm

또한 Table V의 Alcohol 생성량에 있어서도 Nitrite 無添加區는 8.9~9.0g/100 ml의 Alcohol이 생성되었는데 反해서 Nitrite 添加區는 0.5~0.8g/100 ml의 극히 적은 量이었다. 그 理由는 NO<sub>2</sub>-N이 酵母의 Alcohol 醱酵을 抑制하였다고 볼 수 있다.

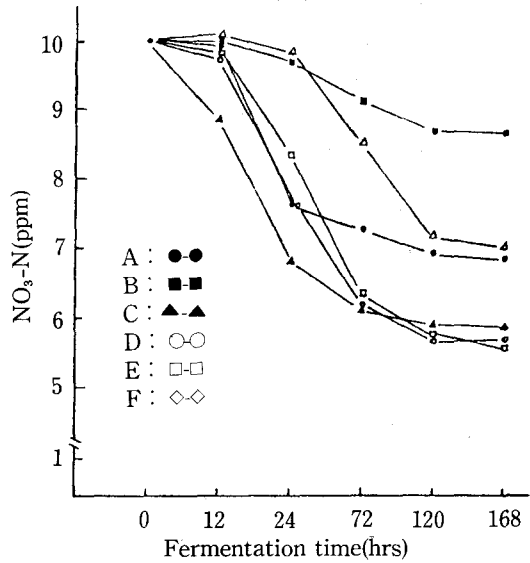
Nitrite는 抗菌作用이 있기 때문에 食品의 保存물질로 使用하고 있는데 이들의 抗菌力은 10 ppm 정도에서는 菌의 生育 抑制力이 별로 강하지는 않으나 본 實驗에서와 같이 pH가 낮은 條件에서는 낮은 濃度の Nitrite도 충분히 Alcohol 醱酵을 抑制할 수 있다고 생각된다. Nitrite를 添加하지 않는 區에서도 酸의 生成量은 약간 차이가 있으나 DMA, TMA, choline과 같은 Amine類의 添加區가 酸生成量도 많고 pH도 낮아서 젖산菌의 生育이 보다 왕성했음을 알 수 있다. 이것은 이들 有機 鹽基性 窒素化合物이 젖산菌의 성장인자로 利用되며 또한 耐酸力도 增加했기 때문에 생각된다(梅津雅裕, 1962).

이상의 結果로 미루어 볼 때 모든 Nitrite 無添加區는 正常的인 醱酵이 이루어짐을 알 수 있고 Nitrite 添加區인 B와 F區에서는 pH 變化는 크지 않고 일정수준을 維持하고 있음을 볼 때 腐敗菌의 繁殖에 의해 醱酵過程중 암모니아를 비롯한 多量の 有機鹽基性 窒素化合物인 DMA가 多量 生成되어 NDMA의 生成量의 增加한다는 것을 의미한다.

**醱酵중 Nitrate와 Nitrite의 含量變化**

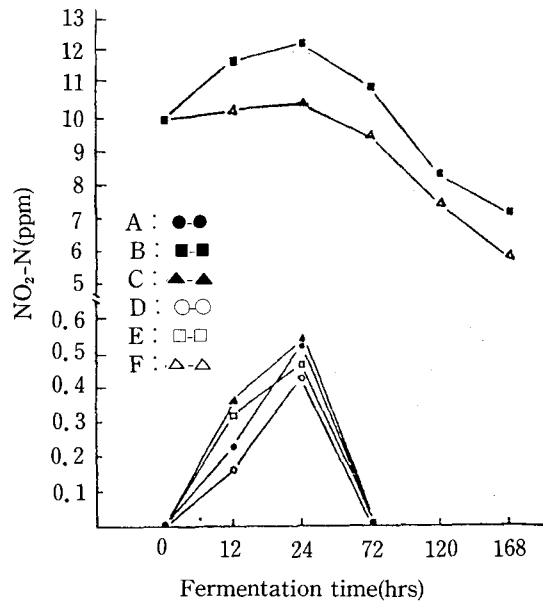
淸酒의 酒母醱酵過程에서 Nitrate와 Nitrite의 含量變化를 檢討한 結果는 Fig. 3, 4와 같다.

Fig. 3과 같이 醱造用水에 10 ppm 수준의 NO<sub>3</sub>-N을 含有하고 있던 것이 Nitrite 添加區를 제외하고는



**Fig.3.** Changes of nitrates during the fermentation of rice wine starter.

A: Control, B: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm, C: DMA-N 20 ppm, D: TMA-N 100 ppm, E: choline-N 100 ppm, F: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm+DMA-N 20 ppm



**Fig.4.** Changes of nitrites during the fermentation of rice wine starter.

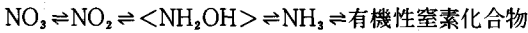
A: Control, B: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm, C: DMA-N 20 ppm, D: TMA-N 100 ppm, E: choline-N 100 ppm, F: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm+DMA-N 20 ppm

醱酵 12시간까지는 일반적으로 급격히 減少의 추세를 보이다가 120시간 이후에는 거의 變化가 없었다.

또한 Fig. 4에서 보는 바와 같이 B와 F區를 除外하고는 담금후 醱酵의 경과에 따라 增加하여 24시간 후에는 0.43~0.54 ppm으로 最高値에 이르렀다가 그후부터 급격히 減少하여 消失되었다.

그러나 Nitrite를 添加한 B와 F區에서는 無添加區에 비해서 Nitrite 含量變化가 완만한 경향을 보였으며 Nitrite 含量이 약간 增加하였다가 서서히 減少하여 168시간 이후에는 B區에서는 7.16 ppm, F區에서는 5.75 ppm이 殘存하였다.

自然界에 있어서 窒素化合物의 순환은



의 經路를 밝게 되는데 經路運行의 主體는 植物과 微生物이며 Nitrate reductase나 Nitrite reductase의 活性에 따라서 Nitrate나 Nitrite의 蓄積量에는 상당한 차이가 있다고 Payne(1973) 및 Smith(1971), Leece(1972) 등이 報告하였다.

酒母의 경우는 Nitrate나 Nitrite의 환원의 主體가 되는 微生物의 種類는 아직 밝혀진 바 없으나 醱酵의 主役인 *S. cerevisiae*와 같은 酵母는 일반적으로 Nitroso 化合物의 還元能力은 없다.

따라서 酒母의 醱酵過程에서 계속 減少하고 Nitrite가 生成 消失됨은 醱酵중 酵母나 젖산菌이외의 微生物의 作用으로 생각할 수 있는데 이들 微生物들이 Nitroso 化合物을 환원시키는 主目的은 營養源으로서가 아니라 嫌氣的 條件하에서 呼吸作用에 의해 生成된 수소의 acceptor로서 Nitroso 化合物의 酵素를 利用하는 것이다(Payne 등, 1973; Smith 등, 1971; Leece 등, 1972). 따라서 酒母의 경우 Nitrite 生成量은 Nitroso 化合物의 환원細菌의 生育程度 및 溶存酸素量에 따라 달라질 것이다.

그러나 溶液의 pH가 5.0 부근에 이르면 Nitroso 化合物의 含量에는 큰 變化가 있을 수 없다.

沈菜類에 대한 李 等(1983)의 報告에 따르면 pH 5.0 이하에서 Nitrite의 主된 消失原因은 酸性條件에서 鹽의 형태로 존재하면 Nitrate가 유리擴散되는 것으로 보인다. 이러한 사실에 반해서 Maduagwu(1981) 등은 야자醱酵酒에 있어서 Nitrite를 窒素量으로 10~100 ppm으로 添加하였던 바 급격히 減少하였음을 報告하였는데 이 경우 淸액의 pH가 淸酒의 酒母보다 높아 이러한 變化가 가능했던 것으로 推定된다.

그러므로 淸酒의 酒母에 있어서 Nitrite의 生成은 酸度때문에 醱酵初期에만 可能하다고 할 수 있다.

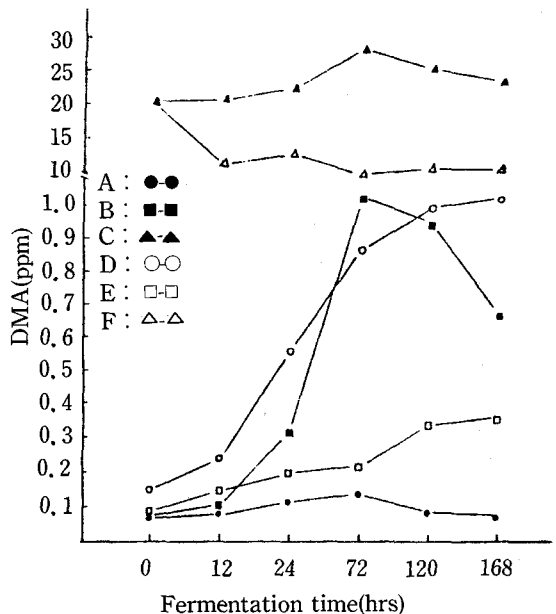
예비實驗에서는 Nitrite의 生成量에 큰 차이가 없었으며 Nitrite를 添加하지 않은 경우에서도 술덧에 生成된 Nitrite는 완전히 消失되었고 正常的인 경우도 酸度 때문에 再生成은 되지 않았다. 淸酒와 같은 穀物酒類는 원료에 DMA의 전구체인 choline이 多量含有되어 있고 이들 鹽基性 窒素化合物은 젖산菌에 利用되므로 DMA의 生成은 필연적이라 할 수 있기 때문에(Hill 등, 1973; Zee 등, 1981; 梅津雅裕 등, 1960, 1961; Yang 등, 1977; 梅津雅裕 등, 1975; 河村太郎 등, 1971) 淸酒에 있어서 Nitrosodimethylamine 生成面에서 條件을 살펴보면 DMA 合成에 適合한 酸性條件을 갖추었다는 점에서 Nitrosodimethylamine 合成物質은 Nitrite라 할 수 있다.

그러나 Nitrite의 生成은 醱酵初期에 pH 5.0 이상의 條件에서만 가능했기 때문에 만약 淸酒에 發癌性物質인 Nitrosodimethylamine이 檢出된다면 Nitrite에 原因이 있다고 推定할 수 있다.

**醱酵期間중 Dimethylamine(DMA)의 含量變化**

醱酵過程중 DMA의 含量變化는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 A와 B區에서는 술덧 醱酵過程중 DMA의 含量이 점차 增加하여 72시간



**Fig. 5.** Changes of DMA during the fermentation of rice wine starter.

A: Control, B: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm, C: DMA-N 20 ppm, D: TMA-N 100 ppm, E: choline-N 100 ppm, F: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm + DMA-N 20 ppm

후 最高値에 달하였다가 減少하였다.

그러나 DMA의 전구체로서 TMA나 choline을 添加한 D와 E區에서는 계속적으로 增加하는 傾向을 보였는데 이것은 이들 化合物로부터 DMA가 生成되었기 때문으로 생각된다. 微生物에 의한 DMA 生成은 主된 原因은 지금까지 밝혀진 바로는 Methyl tropps에 의한 energy原으로서 이들 菌種은 대부분 Pseudomonas屬 (Colby 등, 1972, 1973, 1974; Eady 등, 1968; Tarman 등, 1972) 등 소수의 好氣性 細菌에 국한되어 있다. 그러나 *Lactobacillus* sp.에 속하는 菌種에는 DMA를 비롯한 amine類의 生成菌株가 있는데 이들 菌種은 이들 混合物의 Growth factor라고 Zee 등(1981)이 報告하였다. DMA를 添加한 C區에서는 醱酵 72시간까지는 서서히 增加하다가 그후 약간 減少하였으며, F區에 있어서 醱酵初부터 12시간까지는 DMA가 급격히 減少하였는데 이는 Nitrite와 結合하여 NDMA가 生成되었기 때문이라고 생각된다.

**醱酵終了후 Nitrosodimethylamine(NDMA)의 檢出**

醱酵終了후 各 處理區에 대한 NDMA의 檢出量은 TableVI과 같고 HPLC로 分析한 standard 및 sample의 chromatogram은 Fig. 6~12와 같다. Table VI에서 보는 바와 같이 NDMA가 모두 檢出되었다.

검출량은 Nitrite와 DMA 동시 添加區인 F區가 가장 많아 472.1ppb이었고 그 다음은 DMA 添加區인 C區, Nitrite 添加區인 B區 순이었다.

**Table VI.** Contents of NDMA after fermentation of 168 hrs.

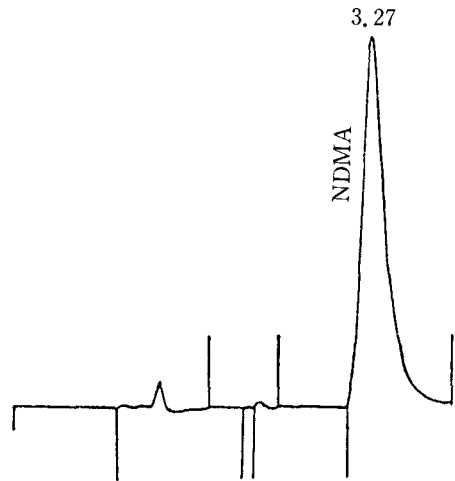
(unit : ppb)

Sample	Contents
A	24.4
B	229.0
C	329.0
D	33.1
E	45.6
F	472.1

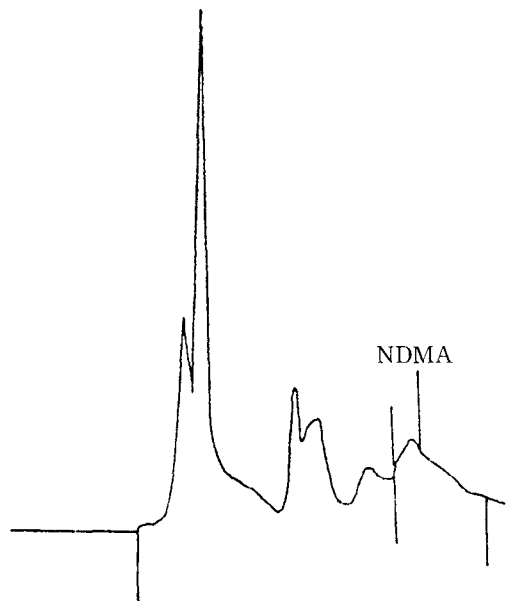
A: Control B: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm  
 C: DMA-N 20 ppm D: TMA-N 100 ppm  
 E: Choline-N 100 ppm  
 F: NO<sub>2</sub>-N 10 ppm+DMA-N 20 ppm

가장 중요한 사실은 正常的인 酒母製造區인 A區에서도 NDMA가 檢出되었다는 점이다.

이미 Beer(1982), Whisky(Crosby 등, 1976; Graham, 1980)와 같이 穀物을 主原料로 하는 酒類에서도 NDMA(Barnes 등, 1954; Drucrcrey 등, 1963; Magee 등, 1967)의 存在가 確認되었고 그것이 含量은 대략 10 ppb 내외로 食品衛生上 문제점은 없다고 본다.



**Fig.6.** Chromatogram of authentic nitrosodimethylamine.



**Fig.7.** Chromatogram of sample A.

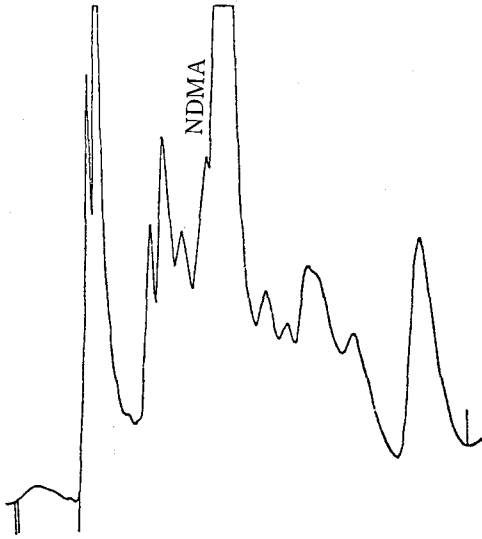


Fig.8. Chromatogram of Sample B.

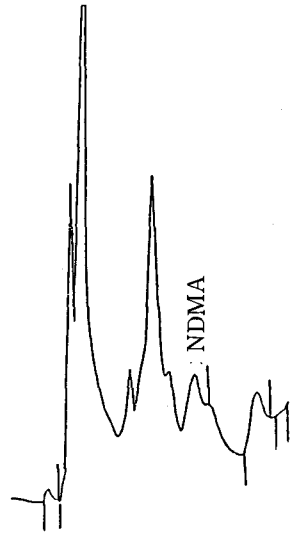


Fig.10. Chromatogram of Sample D.

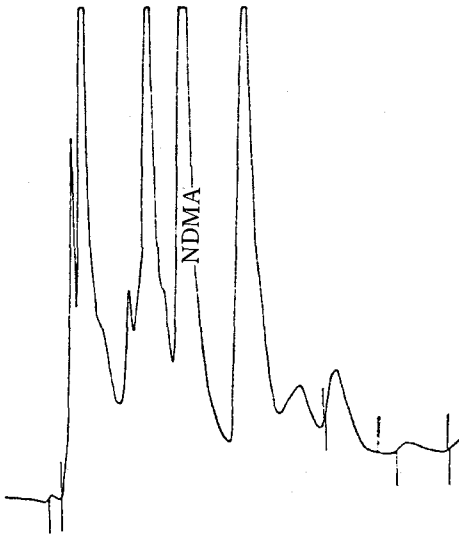


Fig.9. Chromatogram of Sample C.

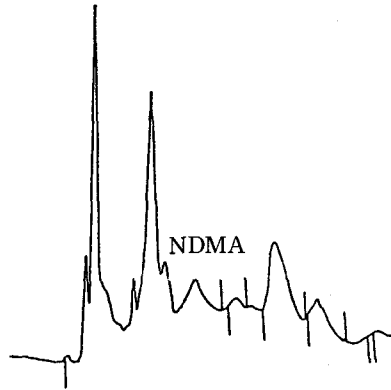


Fig.11. Chromatogram of Sample E.

따라서 本 實驗의 목적은 穀物釀造酒인 淸酒에서 이들 Nitrosodimethylamine系 化合物의 존재를 確認함에 있으나 수차례에 걸친 예비 實驗結果 市販 淸酒에서는 檢出되지 않았다. 그것은 淸酒釀造過程에서 釀造用水를 純水 處理하여 사용하며 또한 酒母 製造시 好氣性 細菌, 곰팡이들이 生育하지 못하도록 젖산을 添加하여 製造하며, 釀造過程인 酒母製造 初添, 中添, 留添, 調味液 添加, 加水, 여과, 火入 製成過程을 통하여 NDMA가 揮散하여 減少 消失되는 것으로 추측된다.

그러나 淸酒釀造의 基礎段階인 酒母의 醱酵過程에서 NDMA에서 NDMA의 生成 가능성을 確認하였다. 本 實驗에서는 醱酵 168시간 후 244 ppb가 檢出되었는데 Bassiv 等(1978), Maduagwu(1979)가 行한 實驗에서 果實酒의 醱酵過程중 NDMA의 含量은 動的이어서 醱酵가 進行되면서 減少하고 있음을 보여주고 있기 때문이다. 따라서 이들의 實驗結果로 미루어 생각해 보면 本 實驗에서 檢出된 NDAM의 含量은 상당량 減少될 것으로 생각되어지는 바 앞으로 이에 대한 보다 細密한 實驗이 要求되고 있다.



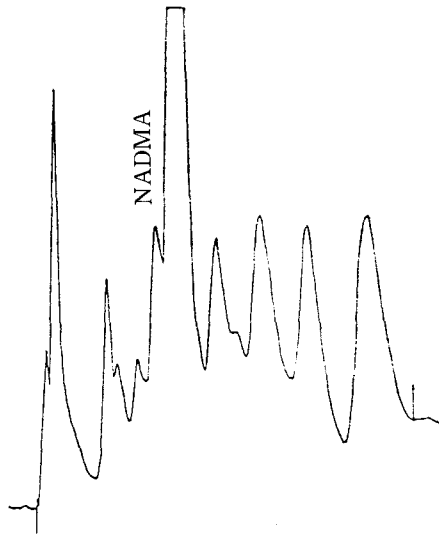


Fig.12. Chromatogram of Sample F.

근래에는 清酒釀造工業의 發達과 優良酵母使用, 酸도가 높은 酵母를 사용함으로써 Nitrite의 生成을 극도로 抑制시키고 또한 여러가지 工程을 거쳐서 製造됨으로서 NDMA의 含量은 극히 낮아지거나 혹은 檢出되지 않을 것으로 생각되며, 따라서 清酒는 NDMA의 有害性이 없는 것으로 사료된다.

### 摘 要

清酒의 酒母담금液을 달리하여 醱酵過程중에 pH, 酸度, Nitrate, Nitrite, DMA의 變化와 醱酵終了 후의 NDMA를 檢討한 結果를 要約하면 다음과 같다.

醱酵期間중 pH는 醱酵 24시간 이후부터 일반적으로 pH 5.0 이하로 떨어졌고 醱酵終了 후의 酸도는 0.51~0.89 이었다.

酒母醱酵過程중 Nitrate의 含量은 12시간 이후부터 급격히 減少되었고 Nitrite는 酸도의 影響으로 醱酵 初期에 多量生成되었다가 완전히 消失되었으며 DMA는 各 實驗區別 차이는 있으나 一定한 水準을 유지하였다.

醱酵終了 후 NDMA는 Nitrite와 DMA 添加區에서 472.1 ppb, DMA에서는 329.0 ppb, Nitrite에서는 229.0 ppb 對照區에서는 24.4 ppb 이었으나 市販 清酒에서는 檢出되지 않았다.

### 參考文獻

- Barnes, J.M. and Magee, P.N.(1954): Dimethylnitrosamine. *Brit. J. Industry Med.* **11**: 167.
- Bassir, O. and Maduagwu, E.N.(1978): Occurrence of nitrate, nitrite, dimethylamine and dimethylnitrosamine in some fermented Nigerian beverages. *J. Agric. Food Chem.* **16**: 200.
- Colby, J. and Zatman, L.J.(1972): Hexose phosphate synthase and tricarboxylic acid cycle enzymes in bacterium 4 B 6. *Biochem. J.* **128**: 1373.
- Colby, J. and Zatman, L.J.(1973): TMA metabolism in obligate and facultative methylotrops. *Biochem. J.* **132**: 101.
- Colby, J. and Zatman, L.J.(1974): Purification and properties of the trimethylamine dehydrogenase of bacterium 4 B 6. *Biochem. J.* **143**: 555.
- Crosby, N.T. and Sawyer, R.(1976): Nitrosamine. *Advances in Food Res.* **22**: 1.
- Druckrey, H., Preussmann, P. and Schmahl, D. (1963): Carcinogenicity and chemical structure of nitrosamines. *Acta Union Internat. Contr. Cancer.* **19**: 510.
- Eady, R.R. and Lasge, P.J.(1968): Purification and properties of an amine dehydrogenase from Pseudomonas AMI and its role in growth on methylamine. *Biochem. J.* **106**: 245.
- Ender, F. and Ceh, L.(1971): Conditions and chemical reaction mechanisms by which nitrosamines may be formed in biological products with reference to their possible occurrence in food products. *Z. Lebensmittel-untersuch. Forsch.* **145**: 133.
- Goff, E.U. and Fine, D.H.(1979): Analysis of volatile N-nitrosamines in alcoholic Beverages. *Food Cosmet. Toxicol.* **17**(6): 571.
- Grahan, H.D.(1980): The Safety of Foods. AVI Publishing company, INC. Westport connecticut: p.319.
- Hawksworth, G.M. and Hill, M.J.(1971): Bacterial and the N-nitrosation of secondary amines. *Brith. J. Cancer.* **25**: 520.
- Hawksworth, G.M. and Hill, M.J.(1971): The formation of nitrosamines by human intestinal bacteria. *proceedings of the Biochemical Soc.* **122**: 28.
- Hill, M.J., Hawksworth, G. and Tattersall, G.

- (1973): Bacteria, nitrosamines and cancer of the stomach. *Brith, J. Cancer.* **18**: 562.
- Hotchkiss, J.H., Barbour, J.F. and Scanlan, R.A. (1980): Analysis of malted barley for N-nitrosodimethylamine. *J. Agric. Food Chem.* **28**: 678.
- Jarman, T.R. and Large, P.J.(1972): Distribution of the enzymes oxidizing secondary and tertiary amines in *Pseudomonas amino vorans* and its role in growth on trimethylamine. *Biochem. J.* **140**: 253.
- Kamm, L., Mickeown, G.C. and Smith, D.M.(1967): Food additives, new colorimetric method for the determination of the nitrate and nitrite content of baby Foods. *J. ASS. Off. Anal. Chem.* **48**: 892.
- Klubes, P., Cerna, I., Rabinowitz, A.D. and Jondorf, W.R.(1972): Factors affecting dimethylnitrosamine formation from simple precursors by rat intestinal bacteria. *Food Cosmet. Toxicol.* **10**: 757.
- Klubes, P. and Jondorf, W.R.(1971): Dimethylnitrosamine formation from sodium nitrite and dimethylamine by bacterial flora of rat intestine. *Res. Commun. Chem. pathol. pharm.* **2**: 24.
- Lane, R.P. and Bailey, M.E.(1973): The effect of pH on dimethylnitrosamine formation in human gastric juice. *Food Cosmet. Toxicol.* **11**: 851.
- Leece, D.R., Dilley, D.R. and Kenworthy, A.L. (1972): The occurrence of Nitrate reductase in leaves of *Prunus* sp. *Plant physiol.* **49**: 725.
- Lijinsky, W. and Epstein, S.S.(1970): Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature.* **225**: 21.
- Maduagwu, E.N. and Bassir, O.(1979): Appearance and disappearance of dimethylamine during the fermentation of palmsap enriched with some nitrogen compounds. *J. Agric. Food Chem.* **27**: 60.
- Magee, P.N. and Barnes, J.M.(1967): Carcinogenic nitroso compounds. *Advances in Cancer Res.* **10**: 163.
- Mills, A.L. and Alexander, M.(1976): N-nitrosamine formation by cultures of several microorganisms. *Appl. Environ. Microbio.* **31**: 892.
- Mirvish, S.S.(1975): Formation of N-nitroso compounds. chemistry, kinetics, and *in vivo* occurrence. *Toxicol. Appl. pharm.* **31**: 325.
- Mottram, D.S., Patterson, R.L.S., Hodes, D.N. and Gorgh, T.A.(1975): Influence of ascorbic acid and pH on the formation of N-nitrosodimethylamine in cured pork containing added dimethylamine. *J. Sci. Food Agric.* **26**: 47.
- Ough, C.S., Daudt, C.E. and Crowell, E.A.(1981): Identification of new volatile amines in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.* **29**: 938.
- Payne, W.J.(1973): Reduction of nitrogenous oxidase by micro-organisms. *Bacteriol. Rev.* **37**: 407.
- Sander, Von J.(1968): Nitrosaminsynthese durch Bakterien. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349**: 429.
- Smith, F.W. and Thompson, J.F.(1971): Regulation of nitrate reductase in excised barley roots. *Plant Physiol.* **48**: 219.
- Van Broekhoven, L.W. and Davies, J.A.(1980): Prevention of artifact formation during the analysis of N-nitrosamines in the rumen fluid of cows. *J. Agric. Food Chem.* **28**: 957.
- Yamamoto, M., Yamada, T. and Tanimura, A. (1976): Studies on the formation of nitrosamines(V). The effects of Nitrate, tartrate and thiocyanate on the rates of nitrosation. *J. Food Hyg. Soc.* **17**: 363.
- Yamamoto, M., Yamada, T. and Tanimura, A. (1979): The effects of ethanol, glucose and sucrose on nitrosation of secondary amines following alkalization of reaction mixture. *J. Food Hyg. Soc.* **20**: 15.
- Yang, H.S., Okun, J.D. and Archer, M.C.(1977): Nonenzymatic microbial acceleration of nitrosamine formation. *J. Agric. Food Chem.* **25**: 1181.
- Zee, J.A., Simard, R.E. and Desmarais, M.(1981): Biogenic amines in Canadian, American and European beers. *Can. Inst Food Sci. Technol. J.* **14**: 119.
- Zee, J.A., Simard, R.E. and Roy, A.(1981): A Modified automated ion-exchange method for the separation and quantitation of biogenic amines. *Can. Inst. Food Technol. J.* **14**: 71.
- 芦決長(1976): 日本酒醸造の神祕 日本醸造協會誌, **71**(6): 424.
- 日本製造協會(1984): 清酒製造技術. 日本醸造協會. p.133.
- 梅津雅裕(1960): 清酒醸造中におけるアミノ酸類及びアミン類の消長について(第三報). 日本醸造工

- 學雜誌 38: 241.
- 梅津雅裕(1961) : 清酒醸造中におけるアミノ酸類及びアミン類の消長について(第四報), 日本醸酵工學雜誌 39: 233.
- 梅津雅裕, 柴田彩, 三浦修司(1975) : 清酒の揮發性アミン類に関する研究(第二報), 日本醸酵協會誌 33: 411.
- 河村太郎, 界境一, 宮決文雄, 和田裕, 伊藤 志勇, 谷村顯雄(1971) : 食品中のニトロソアミンに関する研究, 日本食衛誌 12: 192.
- 徳永俊夫(1970) : 魚類血合肉中のトリメチルアミンオキシサイドならびにその分解(II). 貯藏中における DMA, TMAの生成, 日本水産學會誌 36: 510.
- 梅津雅裕(1962) : 清酒醸造とアミノ酸及びアミン類について, 日本醸造協會誌 57(5): 359.
- 眞木俊夫, 田村行弘, 島村保洋, 小關正道, 西垣進, 直井家壽太(1980) : ビル中のニトロソアミンとその成因について, 日本食衛誌 21(3): 184 - 188.
- 양희천, 권태영(1979) : 醬類에 있어서 2級 amine의 形成. 第2報 재래식 간장 숙성중 2級 amine의 動態. 한국식품과학회지 11(1): 32.
- 이태규, 권태영, 양희천(1983) : High Pressure Liquid Chromatography에 의한 김치중의 Nitrosodimethylamine의 검출. 우석대논문집 5: 735.
- 한국세정신보사(1975) : 주세실무요람, 한국세정신보사, p.182 - 197.

Accepted for Publication 7 August