

유산균에 의한 김치 중 *N*-Nitrosodimethylamine과 그 전구물질의 함량 감소

김상현¹ · 김성현² · 강경훈³ · 김정균³ · 성낙주^{4,5} · 임희경⁶ · 정미자⁶

¹경상대학교 수의학과, ²세계김치연구소
³경상대학교 해양식품공학과·해양산업연구소, ⁴경상대학교 식품영양학과
⁵경상대학교 기초과학연구소, ⁶광주대학교 식품영양학과

Reduction in Concentrations of *N*-Nitrosodimethylamine and Its Precursors in Kimchi by Lactic Acid Bacteria

Sang-Hyun Kim¹, Sung Hyun Kim², Kyung Hun Kang³, Jeong Gyun Kim³,
Nak-Ju Sung^{4,5}, Heekyung Lim⁶, and Mi Ja Chung⁶

¹College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, ²World Institute of Kimchi

³Department of Seafood Science and Technology, Institute of Marine Industry,

⁴Department of Food Science and Nutrition, and

⁵Research Institute of Natural Science, Gyeongsang National University

⁶Department of Food Science and Nutrition, Gwangju University

ABSTRACT To investigate the effects of lactic acid bacteria (LAB), *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, and *Lactobacillus brevis*, commonly found in kimchi, on *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and its precursors such as nitrite, dimethylamine (DMA), nitrate, and biogenic amines, Baechu (Chinese cabbage) kimchi prepared with and without LAB and NaNO₂ was periodically monitored for 20 days to analyze concentrations of NDMA and its precursors. Control was amine and nitrite-rich kimchi. NDMA and its precursors were analyzed to determine differences in concentrations between LAB-fortified kimchi and the control. The amounts of NDMA, nitrite, DMA, and nitrate remaining in LAB-fortified kimchi were significantly reduced compared with those of control kimchi. In addition, biogenic amines were significantly lower in kimchi prepared with *L. sakei*, *L. curvatus*, and *L. brevis*. These results suggest that addition of LAB to the kimchi preparation would be a promising solution for production of NDMA-reduced kimchi.

Key words: amine, kimchi, lactic acid bacteria, *N*-nitrosodimethylamine, nitrite

서 론

니트로사민(*N*-nitrosamines, NA)은 낮은 수준의 농도에서도 암을 일으킬 수 있는 잠재적 발암성과 돌연변이성을 지닌 물질로써 아질산염과 아민류가 반응하여 생성되며, 아질산염과 아민류가 풍부한 식품을 섭취했을 때 사람의 위액 조건(산성)에서도 내인성 니트로사민이 생성된다(1). 배추와 무에 질산염과 아질산염이 다량 함유되어 있고 질산염은 환원 미생물에 의해 아질산염으로 전환될 수 있으며 아민류는 김치 양념으로 사용하는 것갈에 다량 함유되어 있어 이들 전구물질 함량이 김치 중 NA 생성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(2). NA 중에 강력한 발암물질인 *N*-nitrosodimethylamine(NDMA)이 김치 중에 함유되어 있어(2) 이들 함량을 최소화하고자 하는 연구들이 진행되고 있다(3,4).

식품 내 NA 함량 최소화를 위해 가장 많이 연구된 것은 아질산염 소거작용을 가진 천연소재를 이용하여 NA의 전구물질 중 아질산염 감소에 의한 NA 생성 억제에 대한 것이다(1,5). 김치 양념으로 사용되고 있는 마늘이 아질산염 소거작용 및 NDMA 생성 억제 작용이 있는 것으로 알려져 김치 양념소에 의한 아질산염 소거작용을 증가시키는 방법이 김치 내 NA 생성 억제의 한 방법일 것이고 다른 방법은 김치 숙성 중 생성되는 유산균이 될 것이다.

발효식품에서 분리한 *Leuconostoc* 속 및 *Streptococcus* 속 젖산균들이 니트로사민의 일종인 *N*-nitrosodiethylamine (NDEA)에 대하여 강한 항돌연변이 활성을 가지고 있다는 보고가 있고(6), 김치에서 분리된 젖산균에 의해 니트로사민 전구물질인 아질산염을 소거한다는 보고들이 있다(7). *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* 그리고 *Lactobacillus brevis*는 NDMA를 직접 파괴하여 감소시킨다는 연구보고가 있으며(8), *Lactobacillus sakei*는 4°C에서 김치 숙성 중에 우점종으로 김치 발효에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고 *Lactobacillus curvatus*는 4°C에서 김

Received 4 October 2016; Accepted 16 October 2016

Corresponding author: Mi Ja Chung, Department of Food Science and Nutrition, Gwangju University, Gwangju 61743, Korea
E-mail: mijachung@gwangju.ac.kr, Phone: +82-62-670-2049

치 숙성 초기에 존재하는 유산균이다(9). 본 연구팀은 최근 *L. sakei*, *L. curvatus* 그리고 *Lactobacillus brevis*가 직접 NDMA를 파괴하거나 간접적으로 아질산염 소거에 의해 김치 내 NDMA 및 그 전구물질을 감소시킬 수 있다는 것을 발표하였다(3). 그러나 김치 내 아질산염 함량이 5 mg/kg 이하로 존재하므로(3) NDMA 생성이 잘 될 수 있는 모델계 시스템을 이용하여 이들 결과를 명확하게 증명해 줄 필요성이 있었다. 따라서 본 연구에서는 이들 결과를 더욱 명확하게 증명하기 위해 젓갈 첨가에 의해 아민류가 풍부한 김치에 NaNO_2 를 첨가하여 NDMA 생성이 잘 될 수 있는 모델계 시스템 김치를 제조하여 이것을 대조군(control)으로 하고 이들 대조군에 유산균(*L. sakei*, *L. curvatus*, *L. brevis*)을 각각 접종했을 때 이들 유산균이 다량의 젓갈과 NaNO_2 에 의해 증가한 NDMA 및 그 전구물질도 효과적으로 저감화할 수 있는지 알아보았다.

재료 및 방법

유산균 배양

L. sakei(KCTC13416), *L. curvatus*(KCTC3767) 그리고 *L. brevis*(KCTC13094) 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터(Daejeon, Korea)에서 분양받아 Lactobacilli MRS broth(#288130, Difco, Sparks, MD, USA)에 1.5% agar를 첨가하여 121°C에서 15분 동안 멸균하여 제조한 agar plate에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하여 사용하였다. 액체 배지에 접종 후 실험에 필요한 유산균 수를 얻을 때까지 배양하였다(3).

김치 제조

강원도 평창 배추(포기당 중량 2.5~3.0 kg)를 비가식 부분을 제거하고 이등분하여 절임수의 염도 농도가 약 10%가 되도록 배추 1 kg당 천일염(Sajo Haepyo, Seoul, Korea) 0.135 kg과 물 1.2 kg을 혼합하여 습식법으로 실온에서 16

시간 절였다. 절인 후 흐르는 물에 3회 씻어 실온에서 탈수하였다. 절인 배추는 Table 1과 같은 배합비로 김치를 제조하였다.

부재료로 본 연구에 사용한 Emart 고춧가루(Gwangju, Korea), S사의 멸치젓(Shinan, Korea), S사의 새우젓(Shinan, Korea), 삼양사 큐원 하얀 설탕(Seoul, Korea)은 광주 시내 대형 마트에서 구입하였고, 마늘, 파와 생강은 국내산으로 같은 곳에서 구입하였다.

절임배추 400 g당 니트로사민 전구물질 중 아민류가 다량 함유된 새우젓과 멸치젓을 각각 20 g 더하였고, 다른 전구물질 급원으로 sodium nitrite(NaNO_2)를 더하여 제조한 김치를 대조군(control)으로 하였고, 새우젓, 멸치젓 그리고 sodium nitrite를 제외하고 제조된 김치를 음성 대조군(NC)으로 하였다. 대조군과 같은 김치 양념 조성에서 *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. brevis*를 각각 10^6 CFU/g 접종하여 담은 김치(LS, LC, LB)를 본 실험에 사용하였다. 제조한 김치는 각각 400 g씩 low density polyethylene(LDPE) 필름(폭 25 cm×길이 30 cm)으로 하나씩 포장한 후 김치 통에 넣어 13.5°C로 설정된 삼성 김치냉장고(RP20H3010HY, Samsung, Seoul, Korea)에서 2일 숙성 후(0일차 김치) 같은 냉장고에서 -1°C로 온도를 전환하여 10일차와 20일차 김치를 얻기 위해 보관하거나 즉시 실험에 사용하였다. 바로 실험을 할 수 없을 경우는 -20°C에서 냉동보관 하였다. 김치는 믹서(HMF-3450, Hanil Electric, Seoul, Korea)로 갈아 균질화한 후 실험을 위한 시료로 사용하였다.

DMA 분석

Dyer와 Mounsey(10)의 copper-dithiocarbamate 방법을 응용한 Gou 등(11)의 방법으로 김치에 함유된 DMA 함량을 측정하였다. 즉 제조된 김치를 숙성(13.5°C에서 2일 보관) 후 저장 0, 10, 20일에 채취하여 믹서(Hanil Electric)로 갈아 균질화한 김치 25 g에 찬(4~8°C) 7.5% trichloroacetic acid(TCA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)

Table 1. Composition of kimchi seasoning mixture

Ingredient (g)	NC ¹⁾	Control	LS ²⁾	LC ³⁾	LB ⁴⁾
Salted Chinese cabbage	400	400	400	400	400
Red pepper powder	14	14	14	14	14
Garlic	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
Ginger	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
Green onion	8	8	8	8	8
Sugar	4	4	4	4	4
Salted and fermented anchovy	—	20	20	20	20
Salted and fermented shrimp	—	20	20	20	20
Sodium nitrite	—	0.04	0.04	0.04	0.04
<i>L. sakei</i> (CFU/g)	—	—	10^6	—	—
<i>L. curvatus</i> (CFU/g)	—	—	—	10^6	—
<i>L. brevis</i> (CFU/g)	—	—	—	—	10^6
Water	8	—	—	—	—

¹⁾NC: negative control (kimchi without addition of salted and fermented anchovy, salted and fermented shrimp, sodium nitrite, and lactic acid bacteria).

²⁾LS: *L. sakei*-fortified kimchi. ³⁾LC: *L. curvatus*-fortified kimchi. ⁴⁾LB: *L. brevis*-fortified kimchi.

용액을 50 mL 더한 다음 vortex mixer(VM-10, Daihan Scientific Co., Wonju, Korea)로 3분간 격렬히 진탕한 후 Shakers(SHO-1D, Daihan Scientific Co., Seoul, Korea)로 30분간 진동(shaking)하였다. 원심분리(3,000×g, 15 min, 4°C) 하여 얻은 상층액은 1 M NaOH를 이용하여 pH 7.0으로 맞추었고, 모든 시료는 3차 증류수로 60 mL로 정용한 후 DMA 측정을 위한 시료로 사용하였다. 검량선 작성을 위해 일정 농도(5~125 mg/mL)의 DMA(Sigma-Aldrich Co.) 표준용액을 시료와 함께 준비한다.

시료 또는 표준용액 2 mL와 chloroform에 녹인 5% CS₂ 5 mL를 섞은 후 40% NaOH와 NH₄OH 용액 0.2 mL, copper-ammonia reagent 1 mL 그리고 30% acetic acid 1 mL를 더하여 섞었다. 25°C에서 10분간 방치한 후 chloroform 층을 취하고 0.2 g anhydrous sodium sulfate(Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Korea)를 더한 다음 440 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아질산염 분석

Seo 등(12)의 nitrite assay를 변형하여 김치 내 아질산염을 측정하였다. 즉 균질화한 김치 20 g에 증류수 25 mL를 넣고 vortex mixer(Daihan Scientific Co.)를 이용하여 10분간 격렬히 진탕한 후 여과하여 분석용 시료로 사용하였다. 시료의 NO₂ 농도는 100 µL 분석용 시료와 동량의 100 µL Griess reagent[A:B=1:1, A: 0.1% N-1-naphthyl ethylene-diamine dihydrochloride(Sigma-Aldrich Co.) in H₂O, B: 1% sulfanilamide(Sigma-Aldrich Co.) in 5% H₃PO₄]를 잘 혼합하였다. 빛을 차단한 상태로 실온에 10분간 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

질산염 분석

균질화한 김치를 질산염(nitrate) 함량 측정을 위해 사용하였고, 시료 2.5 g에 증류수 22.5 mL를 넣어 vortex mixer(Daihan Scientific Co.)로 3분간 격렬히 진탕한 후 Shakers(SHO-1D, Daihan Scientific Co.)로 30분간 진동하였다. 그다음 60분간 95~100°C에서 증탕하여 식힌 후 15% K₄(Fe(CN)₆) 0.5 mL와 2 M ZnSO₄ 1 mL를 첨가한 다음 여과하였다. 여과된 시료 용액 0.4 mL, 혼합산(H₂SO₄:H₃PO₄=1:1) 3 mL 그리고 0.12% 2,6-dimethylphenol-acetic acid 0.4 mL를 혼합한 후 324 nm에서 흡광도를 측정하였다(13,14).

NDMA 분석

김치 중의 니트로사민을 분석하기 위한 시료의 추출은 Hotchkiss 등(15)과 Chung 등(1)의 방법에 따라 수증기 증류법으로 추출하였다. 즉 균질화한 김치 시료 30 g에 내부표준물질로 NDPA(1 µg/mL) 1 mL 및 증류수 150 mL를 가하여 잘 혼합한 후 수증기 발생장치를 이용하여 증류물이 120 mL가 될 때까지 추출하였다. 증류물은 분액깔때기에 옮겨

dichloromethane(60 mL×3회)에 이행시킨 후 sodium sulfate로 탈수시켰다. 이를 Kuderna-Danish 장치에 옮긴 후 60°C 수욕상에서 4~5 mL가 될 때까지 농축한 다음 질소 가스를 사용하여 다시 최종 부피가 1 mL가 되도록 농축한 후 0.22 µm filter로 여과한 다음 분석용 시료로 사용하였다.

Thermal energy analyzer(GC-TEA; Model 543, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA)로 분석하였으며, 이때 GC-TEA의 조건은 Kang 등(2)이 사용한 조건과 같다. 김치의 NDMA 동정은 분석한 NDMA 표준물질(Chem Service Inc., West Chester, PA, USA) 및 시료의 GC-TEA chromatogram에서 NDMA peak의 머무름 시간과 시료의 NDMA peak가 표준물질 NDMA와 co-injection 했을 때 동일 peak 지점에서 peak 높이와 면적이 증가하는지 알아봄으로 동정하였다.

Biogenic amine 분석

Biogenic amine 표준품인 putrescine, spermidine, tyramine, tryptamine 그리고 cadaverine(Sigma-Aldrich Co.)은 0.1 N 염산에 녹여 1 mg/mL가 되게 하였다. 내부표준원액인 1,7-diaminoheptane 표준품을 정밀히 달아 0.1 N 염산에 녹여 100 mg/mL 농도로 준비하였다. 김치의 biogenic amine의 검출을 위한 전처리는 Yang 등(16)의 방법을 약간 변경하였다. 간 김치 5 g에 0.1 N HCl 15 mL를 가하여 균질화를 위해 vortex 3분하고 30분간 shaking 한 후 원심분리(4,000×g, 4°C, 15 min) 하였다. 상층액을 취하고 2회 반복하여 상층액을 모았다. 0.1 N HCl 25 mL로 정용하여 추출용액으로 사용하였다. 추출용액 1.75 mL를 취하여 내부표준물질(1,7-diaminoheptane, 100 mg/L) 0.25 mL와 포화탄산나트륨(46 g/100 mL) 0.5 mL, 1% dansyl chloride 아세톤 용액 0.8 mL를 가하여 혼합하였다. 혼합용액은 45°C에서 1시간 유도체를 거친 후 10% proline 용액 0.5 mL를 가하여 과잉의 dansyl chloride를 제거하고, ethyl ether 5 mL를 가하여 분액한 뒤 상등액을 위하여 질소 농축하였다. 본 연구에 사용한 표준품의 표준용액도 시료와 동일하게 전처리하였다. Acetonitrile 0.35 mL로 정용한 뒤 0.45 µm syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 기기분석 조건은 Table 2와 같다(17).

통계처리

각 실험은 3회 이상 반복(각 군당 n=3) 실험한 결과에 대하여 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였고, 실험군 간 평균의 차이는 one-way ANOVA로 유의성을 확인한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후 검정하였으며 P<0.05 수준에서 유의성의 여부를 검증하였다. 모든 통계 분석은 SPSS(Statistical Package for the Social Science) version 12.0 프로그램(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다.

Table 2. Operating conditions of HPLC for biogenic amines analysis

Items	Conditions
Instrument	HPLC – Waters 2695
Column	CapcellPak C ₁₈ Column, 250 m×4.6 mm (ID)
Detector	UV, 254 nm
Flow rate	1.0 mL/min
Column temp.	40°C
Mobile phase	A: water, B: acetonitrile
Gradient condition	A:B=45:55, 0~7 min A:B=35:65, 7~11 min A:B=28:72, 11~15 min A:B=25:75, 15~20 min A:B=10:90, 20~28 min A:B=0:100, 28~32 min A:B=45:55, 30 min over
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	10 µL

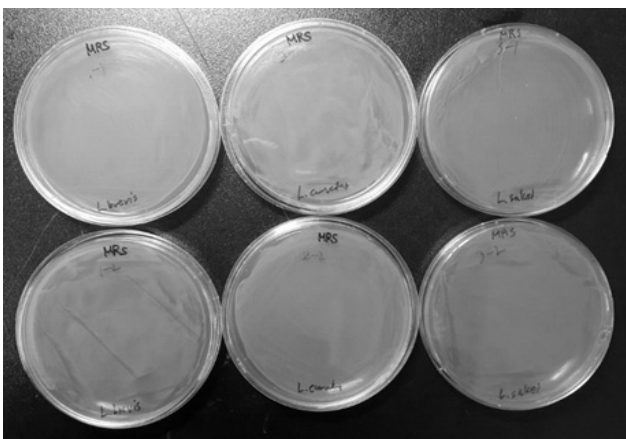
결과 및 고찰

유산균 접종 김치 중 질산염과 아질산염의 함량 감소

L. sakei, *L. curvatus*, *L. brevis*가 -1°C 김치냉장고에서 생존 가능한지를 확인하기 위해 이들 유산균을 배지에 접종한 후 -1°C에서 1일과 7일 동안 배양하여 MRS agar plate에 배양한 결과는 Fig. 1과 같다. 따라서 -1°C 김치냉장고에 김치를 저장하는 중 접종한 유산균이 성장할 수 있으리라는 것을 알 수 있었다.

L. sakei, *L. curvatus*, *L. brevis*를 김치에 접종 후 김치 숙성 중 질산염 함량 변화를 알아본 결과는 Fig. 2A와 같다. 젓갈(새우젓과 멸치젓) 및 NaNO₂를 함유하지 않고 유산균을 접종하지 않은 김치인 음성대조군(NC) 및 유산균 접종 김치(LS, LC, LB) 중 질산염 함량은 유산균을 접종하지 않고 젓갈(새우젓과 멸치젓)과 NaNO₂를 함유한 대조군 김치

L. brevis (1 day) *L. curvatus* (1 day) *L. sakei* (1 day)

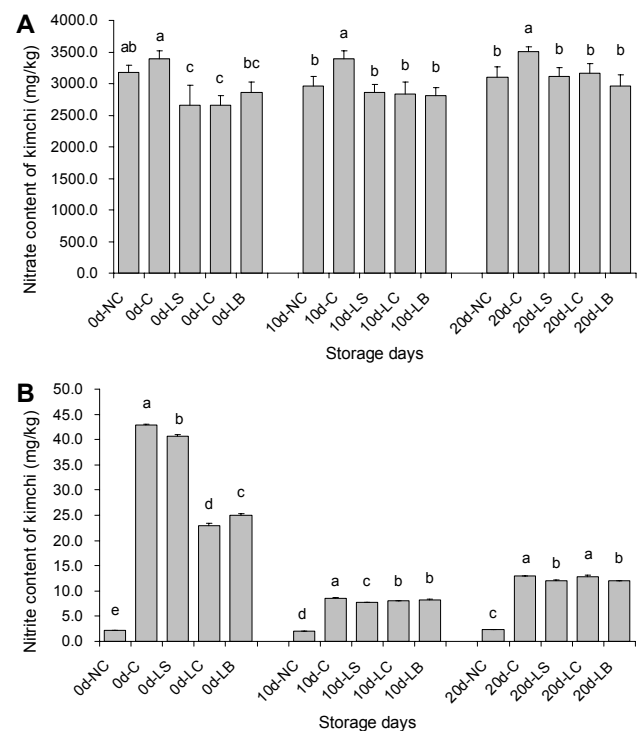


L. brevis (7 days) *L. curvatus* (7 days) *L. sakei* (7 days)

Fig. 1. Lactic acid bacteria (LAB) species in MRS agar plate after LAB culture in MRS broth at -1°C for 1 day and 7 days.

(C)보다 저장 중 함량이 낮았다(Fig. 2A). 유산균 균종에 따른 차이는 없었다.

아민류의 급원인 젓갈이 풍부하고 NaNO₂(100 mg/kg)를 첨가한 대조군(C) 0일차 김치의 아질산염 함량은 42.8 mg/kg이었고, 저장 10일차와 20일차는 현저히 감소하였다(Fig. 2B). 유산균 접종에 의해 이들 아질산염 함량은 현저히 감소하였고 0일차에는 *L. sakei* 접종 김치(LS)보다 *L. curvatus*와 *L. brevis* 접종 김치(LC와 LB)에서 더 효과적으로 아질산염 함량 감소 효과를 보여 주었지만, 10일차와 20일차에서는 *L. sakei* 접종 김치(LS)에서 두 유산균 접종 김치(LC와 LB)보다 더 효과적이거나 유사한 수준의 아질산염 함량 감소 효과를 보여 주었다(Fig. 2B). 10일차와 20일차 유산균 접종 김치 중 아질산염 함량은 대조군과 비교하여 소폭 감소하였다. 10일차와 20일차 유산균 접종 김치 내 아질산염 함량이 유산균을 접종하지 않은 대조군(C)이나 음성대조군(NC)과의 차이가 크지 않은 것은 접종하지 않아도 이들 유산균들이 김치에 존재하므로 자연적으로 성장하여 아질산염을 소거하기에 적당한 유산균 수가 되었기 때문이라고 생각된다.

**Fig. 2.** The effect of *L. sakei*, *L. curvatus*, and *L. brevis* on nitrate and nitrite concentrations in kimchi during 0-, 10-, and 20-day storage. Values are expressed as mean±SD (n=3). Means with different letters on the same day are significantly different from each other (P<0.05), as determined by Duncan's multiple range test. NC: negative control (kimchi without addition of salted and fermented anchovy, salted and fermented shrimp, sodium nitrite, and lactic acid bacteria), C: control (kimchi containing salted and fermented anchovy and shrimp with NaNO₂), LS: *L. sakei*-fortified kimchi, LC: *L. curvatus*-fortified kimchi, LB: *L. brevis*-fortified kimchi.

음성대조군보다 대조군의 질산염 함량이 높은 것은 것갈에 질산염이 함유되어 김치 내 질산염 함량을 증가시킬 수 있고 첨가한 NaNO₂에 의해 아질산염이 질산염으로 산화되었을 수 있기 때문이라 생각된다(18). 유산균은 아질산염 소거작용이 있는 것으로 알려져 있는데, Kim 등(3)의 보고에 의하면 *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. brevis*는 배지 내에서 그리고 김치 내 아질산염 함량을 감소시켰으며, 이들 유산균과 NaNO₂를 15°C 배지에 3일간 배양하였을 때 90% 이상 아질산염 함량이 감소하였고 -1°C에서 7일 배양하였을 때 *L. sakei*는 80% 이상, *L. curvatus*와 *L. brevis*는 60% 이상 아질산염 감소 효과가 있었다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 유산균 접종 김치의 아질산염 함량 감소는 접종한 유산균의 영향에 의한 것으로 생각된다.

유산균 접종 김치 중 DMA의 함량 감소

L. sakei, *L. curvatus*, *L. brevis*를 김치에 접종 후 김치 숙성 중 DMA 함량을 분석한 결과 이들 *L. sakei*와 *L. curvatus* 접종 김치는 DMA 함량이 현저히 감소하였으나 *L. brevis*는 영향력이 없거나 미비하였다(Fig. 3). 음성대조군(NC)이 대조군(C)보다 DMA 함량이 낮은 것은 음성대조군은 것갈을 첨가하지 않은 김치고 대조군은 것갈을 첨가한 김치이므로 것갈에 DMA가 많이 함유되어 있기 때문이라 생각된다. Kim 등(3)은 유산균 접종 김치 중 DMA 함량이 감소하였고 *L. sakei*와 *L. curvatus* 접종 김치 중 DMA 함량 감소가 *L. brevis* 접종 김치 중 함량 감소보다 더 효과적이라고 보고하였는데, 이는 본 연구 결과와 유사하였다. 이들 유산균에 의한 니트로사민의 직접적 전구물질인 아질산염 소거작용은 보고되었으나(3), 아민류를 소거한다는 연구보

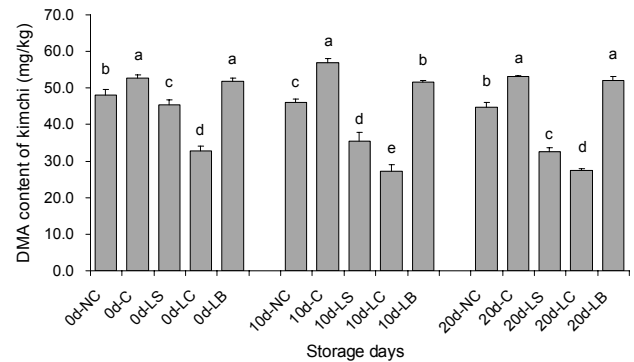


Fig. 3. The effect of *L. sakei*, *L. curvatus*, and *L. brevis* on DMA concentrations in kimchi during 0-, 10-, and 20-day storage. Values are expressed as mean±SD (n=3). Means with different letters on the same day are significantly different from each other (P<0.05), as determined by Duncan's multiple range test. Abbreviations: See Fig. 2.

고는 없어 아민류의 함량 변화의 원인을 분석하는 연구들이 진행되어야 할 것이다.

유산균 접종 김치 중 biogenic amines의 함량 감소

L. sakei, *L. curvatus*, *L. brevis*를 김치에 접종 후 김치 숙성 중 biogenic amines 함량을 분석한 결과 이들 유산균 접종 김치는 유산균을 접종하지 않으면서 아민류의 급원인 다량의 것갈과 아질산염을 함유한 대조군 김치(control)보다 전체적으로 biogenic amine 함량이 감소하였다(Table 3). Tryptamine은 0일차에 대조군과 비교하여 *L. curvatus*를 접종한 김치(LC)에서 감소하였으나 10일차와 20일차에는 *L. sakei*, *L. curvatus* 또는 *L. brevis*를 접종한 김치들

Table 3. The effect of *L. sakei*, *L. curvatus*, and *L. brevis* on biogenic amine concentrations in kimchi during 0-, 10-, and 20-day storage

Kimchi groups ¹⁾	Days	Biogenic amines (mg/kg)				
		Tryptamine	Putrescine	Cadaverine	Tyramine	Spermidine
NC	0	tr ^{d2)}	tr ^b	tr ^b	tr ^d	tr ^{ns3)}
Control	0	3.9±0.2 ^b	4.9±0.5 ^a	10.5±2.2 ^a	40.2±3.2 ^b	tr
LS	0	3.2±0.4 ^b	tr ^b	10.0±2.5 ^a	tr ^d	tr
LC	0	1.8±0.2 ^c	tr ^b	tr ^b	21.5±5.2 ^c	tr
LB	0	8.2±2.2 ^a	tr ^b	tr ^b	47.7±4.3 ^a	tr
NC	10	tr ^c	tr ^c	tr ^d	tr ^b	tr ^{ns}
Control	10	4.9±0.5 ^a	12.7±2.5 ^b	61.1±5.3 ^a	43.1±0.5 ^a	tr
LS	10	tr ^c	tr ^c	tr ^d	tr ^b	tr
LC	10	2.5±0.1 ^b	tr ^c	31.6±3.1 ^b	tr ^b	tr
LB	10	2.2±0.2 ^b	15.9±3.2 ^a	11.5±1.5 ^c	42.1±6.1 ^a	tr
NC	20	tr ^c	tr ^d	tr ^b	tr ^{ns}	tr ^{ns}
Control	20	12.1±3.2 ^a	12.3±2.1 ^b	18.5±1.2 ^a	tr	tr
LS	20	4.7±0.3 ^b	tr ^d	tr ^b	tr	tr
LC	20	tr ^c	9.3±3.5 ^c	19.9±2.1 ^a	tr	tr
LB	20	tr ^c	16.7±2.1 ^a	tr ^b	tr	tr

¹⁾NC: negative control (without addition of salted and fermented anchovy, salted and fermented shrimp, sodium nitrite, and lactic acid bacteria), LS: *L. sakei*-fortified kimchi, LC: *L. curvatus*-fortified kimchi, LB: *L. brevis*-fortified kimchi.

²⁾tr: traces. ³⁾ns: not significant.

Values are expressed as mean±SD (n=3). Means with different letters on the same day are significantly different from each other (P<0.05), as determined by Duncan's multiple range test.

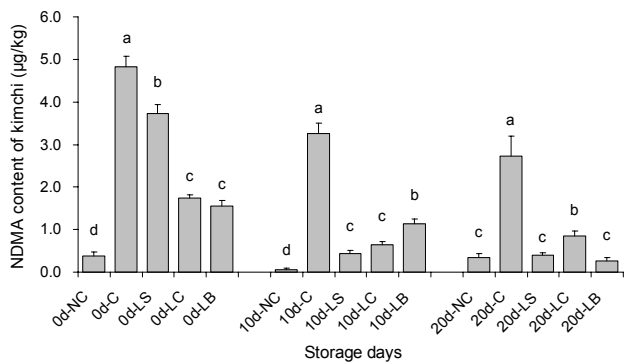


Fig. 4. The effect of *L. sakei*, *L. curvatus*, and *L. brevis* on NDMA concentrations in kimchi during 0-, 10-, and 20-day storage. Values are expressed as mean±SD (n=3). Means with different letters on the same day are significantly different from each other ($P<0.05$), as determined by Duncan's multiple range test. Abbreviations: See Fig. 2.

(LS, LC, LB)에서 대조군(control)보다 현저하게 감소하였다. Putrescine은 10일차와 20일차 LB를 제외하고 유산균 처리에 의해 현저하게 감소하였다. Cadaverine은 대조군과 비교하여 0일차 LS와 20일차 LC에서 변화가 없었지만 다른 유산균 접종 김치에서는 감소하였다. Tyramine은 *L. brevis*를 접종한 김치(LB)에서 대조군과 비교하여 함량 감소가 나타나지 않았지만, *L. sakei* 또는 *L. curvatus*를 접종한 김치(LS와 LC)에서 저장 0일과 10일에 대조군보다 그 함량이 현저히 감소하였다. Spermidine은 모든 처리군과 저장 기간 동안 흔적량이었다.

Cho 등(19)의 보고에 의하면 배추김치 중 biogenic amines 중에 putrescine과 tyramine 함량이 높았다고 하였는데 본 연구 결과와 유사하였으며, 본 연구에서는 tryptamine과 cadaverine 함량도 높았다. Cho 등(19)은 국내산 김치의 평균 tyramine이 49.4 mg/kg이라 하였고, Kalač 등(20)은 20 mg/kg 이하라고 보고하였는데 본 연구에서는 0일차와 10일차 대조군 김치에서 각각 40.2와 43.1 mg/kg 검출되어 Cho 등(19)의 연구 결과와 유사하였다. 김치에 함유된 biogenic amines은 김치의 부재료로 사용하는 젓갈에 의한 것으로 알려져 있으며(19), 본 연구에서도 사용한 멸치젓과 새우젓에 의해 biogenic amines이 유래된 것으로 생각된다. 따라서 젓갈이 함유되지 않은 NC군에서는 biogenic amines이 흔적량 검출되었다.

유산균 접종 김치 중 NDMA의 함량 감소

김치 양념소에 NaNO_2 를 넣어 젓갈에 함유한 아민류와 반응하여 니트로사민 형성이 잘 될 수 있는 모델계 김치를 제조하였고 이들 김치에 유산균을 접종한 후 저장 기간 NDMA 함량을 알아본 결과 저장 0, 10, 20일 모두 유산균 접종 김치 중 NDMA 함량이 대조군보다 현저히 감소하였다(Fig. 4). 유산균 접종 후 김치 저장 10일째부터 *L. brevis*를 접종한 10일째 저장 김치(LB, 10 days)를 제외하고 모두

1 µg/kg 이하의 NDMA가 검출되었다. Kim 등(3)의 보고에 의하면 이들 유산균이 NDMA를 직접 파괴할 수 있고 또한 아질산염 소거작용을 가지고 있으므로 직접적 또는 간접적 영향에 의해 김치 내 NDMA 함량을 감소할 수 있다고 하였는데, 본 연구 결과들도 유사한 원인에 의해 김치 내 NDMA가 감소하였을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 NDMA 형성이 더욱 잘 될 수 있는 NaNO_2 첨가 모델계 시스템을 이용하여 유산균이 김치 중 NDMA 및 그들 전구물질 함량 감소에 미치는 영향을 알아보았고 일반 김치에서 일어나는 결과들을 보다 명확하게 증명할 수 있었다.

요 약

김치에 함유된 *N*-nitrosodimethylamine(NDMA) 및 그 전구물질들인 아질산염, dimethylamine(DMA), 질산염 그리고 biogenic amines 함량에 *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. brevis*가 미치는 영향력을 알아보기 위해 아민류(젓갈)와 아질산염(NaNO_2 첨가)이 풍부한 김치에 유산균을 접종하여 20일 동안 저장하면서 NDMA와 그 전구물질의 함량 변화를 알아보았다. 유산균을 접종한 김치 중 NDMA, 아질산염, DMA, 질산염 함량이 대조군과 비교하여 현저히 감소하였다. 더하여 biogenic amines도 *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. brevis*를 접종한 김치에서 현저히 감소하였다. 이들 결과는 유산균을 김치에 접종하는 것이 NDMA 저감화 김치 생산을 위한 해결책이 될 수 있으리라는 것을 제시하였다.

감사의 글

이 연구는 세계김치연구소 기관고유사업(KE1501-3)의 연구비 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Chung MJ, Lee SH, Sung NJ. 2002. Inhibitory effect of whole strawberries, garlic juice or kale juice on endogenous formation of *N*-nitrosodimethylamine in humans. *Cancer Lett* 182: 1-10.
2. Kang KH, Lee SJ, Ha ES, Sung NJ, Kim JG, Kim SH, Kim SH, Chung MJ. 2016. Effects of nitrite and nitrate contents of Chinese cabbage on formation of *N*-nitrosodimethylamine during storage of kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 117-125.
3. Kim SH, Kang KH, Kim SH, Lee SH, Lee SH, Ha ES, Sung NJ, Kim JG, Chung MJ. 2017. Lactic acid bacteria directly degrade *N*-nitrosodimethylamine and increase the nitrite-scavenging ability in kimchi. *Food Control* 71: 101-109.
4. Choi SY, Chung MJ, Sung NJ. 2002. Volatile *N*-nitrosamine inhibition after intake Korean green tea and Maesil (*Prunus mume* SIEB. et ZACC.) extracts with an amine-rich diet in subjects ingesting nitrate. *Food Chem Toxicol* 40: 949-957.
5. Choi SY, Chung MJ, Lee SJ, Shin JH, Sung NJ. 2007. *N*-Nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and *N*-nitrosamine formation by

- functional compounds in strawberry and garlic. *Food Control* 18: 485-491.
6. Hosono A, Wardojo R, Otani H. 1990. Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines. *Agric Biol Chem* 54: 1639-1643.
 7. Ko JL, Oh CK, Oh MC, Kim SH. 2009. Depletion of nitrite by lactic acid bacteria isolated from commercial kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 892-901.
 8. Nowak A, Kuberski S, Libudzisz Z. 2014. Probiotic lactic acid bacteria detoxify N-nitrosodimethylamine. *Food Addit Contam Part A* 31: 1678-1687.
 9. Cho KM, Math RK, Islam SMA, Lim WJ, Hong SY, Kim JM, Yun MG, Cho JJ, Yun HD. 2009. Novel multiplex PCR for the detection of lactic acid bacteria during kimchi fermentation. *Mol Cell Probes* 23: 90-94.
 10. Dyer WJ, Mounsey YA. 1945. Amines in fish muscle: II. Development of trimethylamine and other amines. *J Fish Res Board Can* 6d: 359-367.
 11. Gou J, Lee HY, Ahn J. 2010. Effect of high pressure processing on the quality of squid (*Todarodes pacificus*) during refrigerated storage. *Food Chem* 119: 471-476.
 12. Seo J, Lim H, Chang YH, Park HR, Ham BK, Jeong JK, Choi KS, Park SB, Choi HJ, Hwang J. 2015. Effect of Jeju *Citrus unshiu* peel extracts before and after bioconversion with cytolase on anti-inflammatory activity in RAW264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 331-337.
 13. Kim JD, Lee OH, Lee JS, Jung HY, Kim B, Park KY. 2014. Safety effects against nitrite and nitrosamines as well as anti-mutagenic potentials of kale and *Angelica keiskei* vegetable juices. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1207-1216.
 14. Raikos N, Fytianos K, Samara C, Samanidou V. 1988. Comparative study of different techniques for nitrate determination in environmental water samples. *Fresenius Z Anal Chem* 331: 495-498.
 15. Hotchkiss JH, Barbour JF, Scanlan RA. 1980. Analysis of malted barley for N-nitrosodimethylamine. *J Agric Food Chem* 28: 678-680.
 16. Yang HJ, Jeong SJ, Jeong SY, Heo JH, Jeong DY. 2015. Screening of biogenic amine non-producing yeast and optimization of culture conditions using statistical method for manufacturing black raspberry wine. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 592-601.
 17. Yoon HH, Son RH, Ryu EH, Jung JH. 2015. Analysis of biogenic amines content and the main volatile flavor compounds in black raspberry wine using traditional yeast. *Korean J Food Cook Sci* 31: 296-303.
 18. Choi IS, Wiesmann U. 2007. Influence of ammonia and dissolved oxygen concentrations on nitrite accumulation in a MBR. *J Korean Soc Environ Eng* 29: 922-929.
 19. Cho TY, Han GH, Bahn KN, Son YW, Jang MR, Lee CH, Kim SH, Kim DB, Kim SB. 2006. Evaluation of biogenic amines in Korean commercial fermented foods. *Korean J Food Sci Technol* 38: 730-737.
 20. Kalač P, Špička J, Křížek M, Steidlová S, Pelikánová T. 1999. Concentrations of seven biogenic amines in sauerkraut. *Food Chem* 67: 275-280.