

Maillard 반응 생성물의 열분해 산물에 대한 돌연변이 유발성 연구

김 숙 영 · 문 자 영 · 이 동 욱 · 박 기 현

한국인삼연초연구소 화학부

Mutagenicity of Maillard Reaction Products in *Salmonella typhimurium*

Sook Young Kim, Ja Yeong Moon, Dong Wook Lee and Ki Hyun Park

Division of Chemistry

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute

(Received Dec. 11, 1988)

Abstract

The mutagenicity of pyrolyzates (at 300°C, 600°C and 750°C) prepared from three kinds of Maillard reaction products, KG-19, KG-24 and KG-32, and that of the tar of cigarettes added these products were determined by using *Salmonella typhimurium* TA 98. The pyrolyzates of Maillard reaction products showed linear increases of revertant colonies according to the increase of pyrolysis temperature and dose of pyrolyzates, respectively. However, there was no difference in revertant colonies between the tar of cigarettes containing these products and those containing imported Maillard reaction products, or not containing any reaction product. It seems due to a little amount of these products added to the cigarettes.

서 론

1912년 Maillard 반응이 처음 보고된 이후¹⁾ 초코렛이나 커피등 각종 식품의 향을 증진시키기 위한 첨가물로서 뿐만 아니라 식품에 다양한 맛을 내는 첨가제로서 Maillard 반응 생성물이 대량으로 생산되어 이용되고 있다.²⁾ Maillard 반응은 효소의 작용을 받지 않고 일어나는 일종의 갈색화 반응으로 xylose, galactose, glucose와 같은 당류와 glycine, methionine, phenylalanine과 같은 아미노산 및 단백질 등 아민류가 120°C 이상의 고온에서 축합 반응을 일으켜 schiff base를 형성한 후 몇 단계의 반응을 거쳐 갈색의 색소를 형성하는 과정이다.³⁾ 사용되는 아미노산이나 당류의 조성, 온도, 시간, 수분함량, pH등 반응 조건의 변화에 따라 다양한 생성물이 얻어지므로 수 천 가지의 Maillard 반응 생성물이 생산되어 사용되고 있다.²⁾

한편, Maillard 반응 생성물의 식품 첨가물로서의 사용이 증가함에 따라 이에 대한 안전성이 논의되어 특히 이러한 반응이 고온에서 진행되는 것이므로 돌연변이 및 발암성 유발 물질의 생성에 관심을 갖게 되었다. Nagao 등⁴⁾과 Sugimura 등⁵⁾은 단백질과 tryptophan 등 아미노산의 열분해 산물이 돌연변이 유발성을 나타낸다고 하였으며, 음식을 가열할 때 생기는 tar도 돌연변이성을 나타내는 것으로 알려졌다.⁶⁾ 한편 Shibamoto⁷⁾는 Maltol/NH₃, Rhamnose/NH₃/H₂S등 Maillard model system에서의 생성물에 의한 돌연변이 유발성을 보고한 바 있으며 amine류의 열분해 산물의 경우 400°C에서 600°C로 열분해 온도가 증가함에 따라 돌연변이성이 관찰된 바 있다.⁸⁾ 특히 담배는 600°C 이상의 고온에서 연소되므로 Maillard 반응 생성물이 첨가물로서 담배에 사용될 경우 그 돌연변이성의 검토가 필요할 것으로 생각된다.

저자들은 앞서의 실험⁹⁾에서 Maillard 반응

생성물 자체의 안전성 및 돌연변이 유발성을 검색한 데 이어 본 실험에서는 Maillard 반응 생성물의 열분해 산물 및 이를 첨가한 제조 담배의 돌연변이 유발성을 *Salmonella typhimurium* TA 98 균주를 사용하여 검토하였다.

재료 및 방법

시 약

NADP, histidine, biotin, glucose-6-phosphate, dimethylsulfoxide (DMSO) 등은 Sigma Chemical Co. 제품을, Aroclor 1254는 Analab Co. 제품을 각각 사용하였다.

Maillard 반응 생성물의 제조

전형적인 Maillard 반응의 model system 중 하나에 의해 여러가지 아미노산 (DL-alanine, glycine, DL-2-aminobutyric acid 등)과 포도당을 propylene glycol 내에서 혼합한 후 120°C에서 4시간 가열하였다. 동일한 조건 하에서 아미노산과 포도당의 조성을 달리한 갈색화 반응을 통해 KG-19, KG-24, KG-32 등의 세 종류의 생성물을 얻었다.

Maillard 반응 생성물의 열분해

McCummon¹⁰⁾과 박 등¹¹⁾의 방법을 다소 수정한 방법으로 glass capillary drawing machine (Shimadzu GDM-IB)을 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 50 mg의 시료를 석영관(외경 10 mm, 두께 0.5 mm)의 하단부에 넣고 300°C, 600°C, 750°C의 온도에서 각각 2분간 열분해한 후 생성된 gas 분획을 dry ice와 acetone으로 냉각하였다. 그 후 methanol에 용해하여 질소 기류하에서 농축하고 평광한 후 DMSO에 용해하여 돌연변이 유발성 실험의 시료로 사용하였다.

Maillard 반응 생성물 첨가 담배의 제조

위의 방법으로 얻은 Maillard 반응 생성물을 제조 담배에 1분(0.7g) 당 약 14 µg되게 첨가하였다.

돌연변이 유발성 실험

Salmonella typhimurium TA98 균주의 기능을 검정한 후 Ames 등¹²⁾의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 즉, 2ml의 molten top agar (0.6% agar, 0.5% NaCl, 0.05mM histidine, 0.05mM biotin)에 0.1ml의 시료 (0~500 µg/0.1ml)와 0.1ml의 시험 균주액 및 S-9분획, 8 µmole MgCl₂, 33 µmole KCl, 5 µmole glucose-6-phosphate, 4 µmole NADP와 100 µmole sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 포함하고 있는 S-9 혼합액 0.5ml를 잘 혼합하여 minimal glucose agar plate (1.5% agar, 2% glucose와 minimal salt)에 부어 균일하게 한 후 37°C에서 48시간 보온하여 형성된 revertant colony를 관찰하였다. S-9분획은 Maron과 Ames¹³⁾의 방법에 따라 corn oil에 녹인 Aroclor 1254 (500 mg/kg)를 200g의 Sp-D계 웅성 흰 쥐에 1회 주사하고 5일 후 간 microsome 분획을 조제하여 얻었으며 돌연변이 유발성 실험을 위한 Maillard 반응생성물의 대사에 사용하였다.

결과 및 고찰

Maillard 반응은 아미노산과 당류가 축합 반응을 일으켜 새로운 생성물을 형성하는 과정이다. Matsumoto 등은 tryptophan, methionine 등 아미노산의 600°C에서의 열분해 산물이 *S. typhimurium* TA98 균주에 대하여 돌연변이 유발성을 나타냄을 보고하였고,¹⁴⁾ sucrose와

같은 당류는 방향족 아민의 돌연변이 유발성을 증대시키는 것으로 알려졌다.¹⁵⁾ 저자들은 KG-19, KG-24, KG-32 등 세 가지 Maillard 반응 생성물을 흰 쥐에 주사하여 serum에서 일반 독성을 살펴보는 한편 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100 균주를 사용하여 돌연변이 유발성을 검토하여 본 결과 serum enzyme 들은 투여하지 않은 군과 대비하여 활성도의 차이를 나타내지 않았고, Ames test에 의한 돌연변이 유발성 실험의 경우 TA100과 TA98 균주 모두 spontaneous revertant와 유사한 결과를 보여 Maillard 반응 생성물 자체가 유의성있는 독성이나 돌연변이 유발성을 나타내지 않음을 확인하였다.⁹⁾

그러나 Maillard 반응 생성물을 담배의 첨가물로 이용할 경우 담배는 높은 온도에서 연소되므로 이에 따라 고온에서의 열분해 산물에 대한 돌연변이 유발성을 검토하였다.

Fig. 1은 열분해 온도 증가에 따른 돌연변이 유발성 실험 결과로 300°C의 열분해 산물은 열분

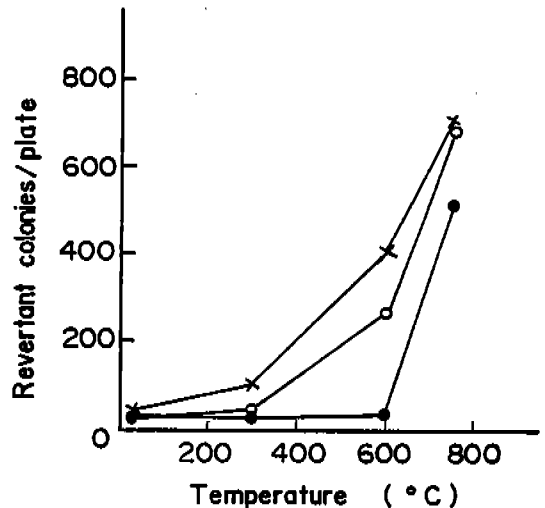


Fig. 1. Effect of pyrolysis temperature on the mutagenic activities of pyrolyzates of Maillard reaction products, KG-19(O-O), KG-24(●-●) and KG-32(x-x). The mutagenicity test was performed using *Salmonella typhimurium* TA98 with pyrolyzates of 500 µg.

해하지 않은 Maillard 반응 생성물 자체와 비교하여 revertant colony의 형성이 크게 증가하지 않았으나 600 °C, 750 °C로 열분해 온도가 증가함에 따라 revertant colony의 수도 증가하여 750 °C 열분해 산물의 경우 spontaneous revertant의 약 25배 증가를 보였다.

음식물이 고온에서 조리되면 돌연변이성을 나타냄이 널리 알려져 있으며,³⁾ 400 °C 이상의 온도에서의 열분해 산물로부터 얻어진 몇 가지 amine류가 돌연변이성을 나타내며 특히 500 °C~600 °C의 고온에서 강력한 돌연변이 유발성을 나타냄이 관찰되었다.⁸⁾

한 편, 시료의 용량 증가에 따른 revertant colony 수의 증가를 확인하는 것은 *Salmonella* 균주를 사용한 돌연변이 유발성 실험에서 그 결과를 판정하는 기준의 하나로 사용된다.¹³⁾ Shibamoto는 browning model system의 몇 가지

Maillard 반응 생성물에 대한 Ames *Salmonella*/microsome assay 결과 Glucose/Lysine browning mixture, Maltol/NH₃ model system, Rhamnose/NH₃/H₂S model system 등에 의해 생성된 Maillard 반응 생성물이 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 등에 대해 투여량 증가에 따라 revertant가 증가하는 반응을 나타냄을 보고하였다.⁷⁾

온도 증가에 따른 검정에서 가장 많은 colony가 형성되었던 750 °C의 열분해 산물에 대하여 그 용량을 증가시키면서 revertant의 형성을 관찰할 결과 (Fig. 2) 용량이 50 µg에서 500 µg으로 증가함에 따라 비례적으로 revertant colony의 형성이 증가하여 Maillard 반응 생성물의 750 °C 열분해 산물이 TA98 균주에 대하여 돌연변이 유발성을 나타냈다.

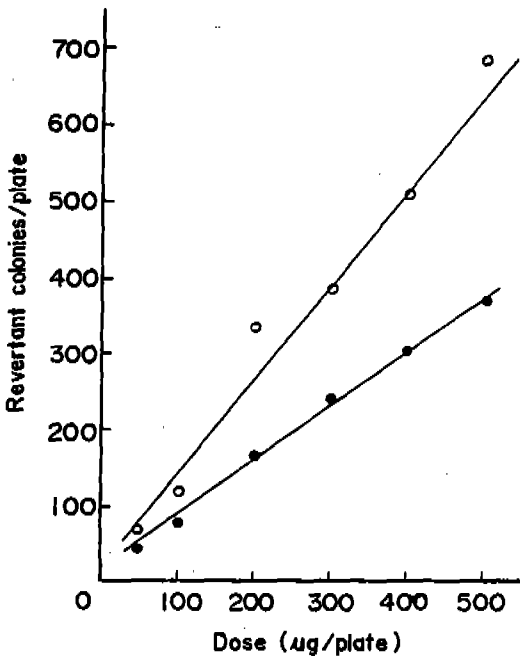


Fig. 2. Dose-response curve of mutagenic activities of pyrolyzates from Maillard reaction products. KG-19 (○-○) and KG-32 (●-●) at 750 °C. *Salmonella typhimurium* TA98 was used and the number of spontaneous revertant colonies was 29.

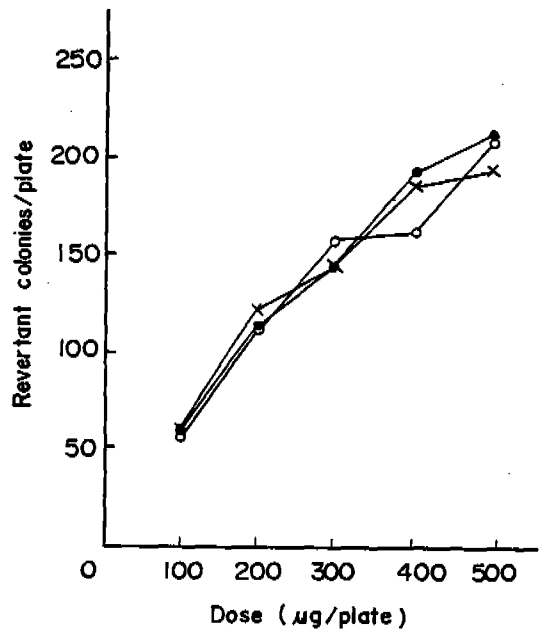


Fig. 3. Mutagenic activities of tar obtained from cigarettes containing Maillard reaction products for flue-cured tobaccos. *Salmonella typhimurium* TA98 was used and the number of spontaneous revertant colonies was 32. ○-○: added domestic Maillard reaction products ●-●: not added control x-x: added foreign Maillard reaction products

그러나 Maillard 반응 생성물을 제조 담배에 첨가하여 무첨가, 또는 외산 Maillard 반응 생성물을 첨가한 담배등과 *Salmonella* 균주에 대한 돌연변이 유발성을 비교한 결과 유의성있는 revertant 형성의 차이를 나타내지 않았다. (Fig. 3, Fig. 4) 시제 담배는 담배 1본(0.7g) 당 Maillard 반응 생성물 14 μ g을 첨가하여 사용하였다.

Lee 등¹⁶⁾ 은 갈색화 반응을 받은 egg albumin을 장기간(12개월) 흰 쥐에 투여하여 돌연변이의 생성을 조사하였으나 이를 일으키지 않음을 관찰한 바 있다.

이러한 결과와 제조 담배에 Maillard 반응 생성물을 첨가하여 Ames *Salmonella* test를 실시하였을 때에 무첨가 또는 외산 Maillard 반응 생성물 첨가 담배와 비교하여 형성된 revertant colony의 유의성 있는 차이가 나타나지 않는 것으로 미루어 국산 개발 Maillard 반응 생성물이 외산의 그것과 *Salmonella* 균주에 대한 돌연변이성에 차이가 없으며 아울러 Maillard 반응 생성물을 제조 담배에 첨가하는 양이 매우 소량이므로 이 생성물의 첨가가 흡연시 담배의 연소에 의한 돌연변이 유발성에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다. 그러나 만성 독성 실험 및 다양한 유전 독성 실험을 통하여 Maillard 반응 생성물의 안전성이 다각적으로 확인되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

KG-19, KG-24, KG-32 등 Maillard 반응 생성물의 300, 600, 750 $^{\circ}$ C 열분해 산물 및 이들 생성물을 첨가한 제조 담배의 *Salmonella typhimurium* TA98 균주에 대한 돌연변이 유발성을 검색하여, Maillard 반응 생성물의 열분해 산물이 열분해 온도가 증가함에 따라, 그리고 투

여 용량이 증가함에 따라 비례적으로 revertant colony가 증가하는 결과를 얻었다. 그러

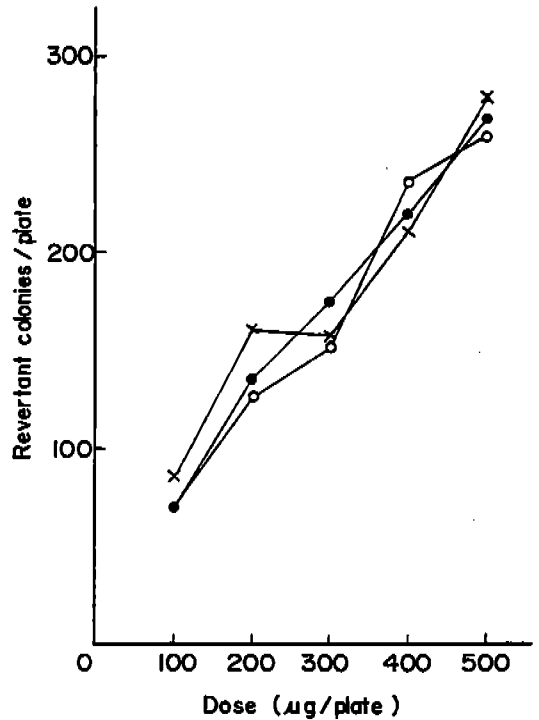


Fig. 4. Mutagenic activities of tar obtained from cigarettes containing Maillard reaction products for burley type tobacco. *Salmonella typhimurium* TA98 was used and the number of spontaneous revertant colonies was 37. ○-○; enhancer added
×-×; not added control
●-●; added domestic Maillard reaction products

나 생성물을 첨가한 제조 담배는 무첨가 및 외산 Maillard 반응 생성물 첨가 담배와 revertant colony의 차이를 나타내지 않았는데 이는 Maillard 반응 생성물의 제조 담배의 첨가량이 소량이기 때문인 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Maillard, L.C., Compt. Rend. 154, 66 (1912)

2. Danehy, J.P. and Wolhak, B. in The Maillard Reaction in Foods and Nutrition (Waller, G.R. eds), American Chemical Society Symposium series pp. 303-313 (1983)
3. Kawamura, S. in Ibid pp. 7-8 (1983)
4. Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T. and Sugimura, T., Cancer Lett. 2, 335 (1977)
5. Sugimura, T., Nagao, M., Kawachi, T., Honda, M., Yahagi, T., Sato, S., Matsukura, N., Shirai, A., Sawamura, M. and Matsumoto, H. Cell Prolif. 4, 1561 (1977)
6. Hodge, J.E., J. Agric. Food Chem. 1, 928 (1953)
7. Shibamoto, T., Food Technology-March 1982, 59 (1982)
8. Sugimura, T., Nagao, M., Wakabayashi, K., Environ. Carcinog. Sel. Methods Anal. 4, 251 (1981)
9. Yang, K.K., Moon, J.Y. and Park, K.H., Korea J. of Toxicology 3, 111 (1987)
10. McCammon, C.S., Amer. Ind. Hyg. Assoc. J., 37, 489 (1976)
11. Park, J.Y., Kim, O.C. and Park, J.W., J. Kor. Soc. Tob. Sci. 4, 63 (1982)
12. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., Mutation Res., 31, 347 (1975)
13. Maron, D.M. and Ames, B.N., Mutation Res., 113, 173 (1983).
14. Matsumoto, T., Yoshida, D., Mizusaki, S. and Okamoto, H., Mutation Res. 48, 279 (1977)
15. Okamoto, H., Mizusaki, S., Yoshida, D. and Matsumoto, T., Agric. Biol. Chem. 32, 1433 (1979)
16. Lee, T.C., Kimiagar, H., Pintauro, S.J. and Chichester, C.O., Prog. Food Nutr. Sci. 5, 243 (1981)