

Maillard 반응 由來 저분자 카르보닐화합물의 돌연변이원성과 그 억제기구

김선봉·염동민·도정룡·윤형식·변한석·김인수*·박영호

부산수산대학 식품공학과

*통영수산전문대학 식품영양학과

Mutagenicities of Carbonyl Compounds Derived from Maillard Reaction and their Desmutagenicity Mechanisms

Seon-Bong Kim, Dong-Min Yeom, Jeong-Ryong Do, Hyeung-Sik Yoon, Han-Seok Byun, In-Soo Kim* and Yeung-Ho Park

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Nam-Gu, Pusan

*Department of Food Nutrition and Science, National Tong-Yeong Fisheries Technical College, Chungmu, Kyeong-Nam.

Abstract

The present study was attempted to investigate the mutagenicities of carbonyl compounds (methyl glyoxal, glyoxal, diacetyl, dihydroxyacetone, glycolaldehyde, glyceraldehyde and furfural) derived from Maillard reaction toward *Salmonella typhimurium* TA 100 (base-substitution mutant) without metabolic activation. And for further investigation of mutagenicity mechanism including desmutagenicity, active oxygen scavengers (cysteine, α -tocopherol, tris (hydroxymethyl) aminomethane, catalase, ascorbic acid) and reducing agents (glutathione, sodium bisulfite) were also used. Among carbonyl compounds tested, methyl glyoxal, glyoxal, dihydroxyacetone, glycolaldehyde and glyceraldehyde exhibited mutagenicities, and methyl glyoxal showed the strongest mutagenic activity. On the other hand, the mutagenicities of carbonyl compounds were significantly suppressed by cysteine, tris (hydroxymethyl) aminomethane, glutathione and sodium bisulfite. Also, these active oxygen scavengers and reducing agents alone did not show mutagenicity in the present study.

Kew words: mutagenicity, desmutagenicity, carbonyl compounds

서 론

식품의 가공 및 저장 중에 식품성분간의 상호반응에 의하여 furan, pyrrole 등의 환상화합물을 비롯하여 methyl glyoxal, glyoxal, diacetyl, glycolaldehyde 및 dihydroxyacetone 등의 α -dicarbonyl 화합물 및 α -hydroxycarbonyl 화합물인 각종 저분자 카르보닐화합물이 생성되는데⁽¹⁾, 이들은 돌연변이원성을 나타낸다고 알려져 있다⁽²⁻⁴⁾. 이들 저분자 카르보닐화합물은 Maillard 반응 중 당 및 Amadori 화합물의 탈수나 분해로 생성된다고 알려져 있는데⁽¹⁾, 이 중

diacetyl은 coffee, 맥주 및 버터 등의 주요 휘발성 성분으로 알려져 있으며⁽⁵⁻⁷⁾, 또한 methyl glyoxal은 생체내의 해당과정 중의 중간대사 생성물로서도 잘 알려져 있다⁽⁸⁾.

이와 같이 식품의 가공 및 저장 중에 생성되는 돌연변이원성 물질을 효과적으로 분해 혹은 억제시키는 돌연변이원성 억제인자를 검색하는 것은 식품의 안전성 측면으로 보아 매우 중요하다고 하겠다. Yamaguchi 등⁽⁹⁾은 이들 저분자 카르보닐화합물의 돌연변이원성은 이들의 산화에 의해 생성되는 활성산소종에 기인한다고 추정하여 catalase 나 superoxide dismutase(SOD) 등이, Fujita 등⁽¹⁰⁾은 cysteine 이 각각 돌연변이원성 억제효과가 있다고 보고하고 있으나 돌연변이원성의 발현이나 그 효과적인 억제기구는 제시하지 못하고 있다.

따라서 본 연구에서는 각종 활성산소 소거제 및 환원

Corresponding author : Seon-Bong Kim, Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, 599-1, Daeyeon 3-dong, Nam-gu, Pusan 608-737.

제를 사용하여 Maillard 반응 중에 있어서 당 및 Amadori 화합물 등의 분해로 생성되는 methyl glyoxal, glyoxal, diacetyl, glycolaldehyde, glyceraldehyde, dihydroxyacetone 및 furfural 등의 돌연변이원성 발현인자 및 그 억제기구에 대하여 연구 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

Methyl glyoxal(40% 수용액), diacetyl, dihydroxyacetone 및 glyceraldehyde는 半井化學(株)(일본)에서, glyoxal(40% 수용액)과 furfural은 東京化成(株)(일본)에서, glycolaldehyde는 Sigma chem. (USA)에서 각각 구입하여 공시하였다.

또한 catalase 및 tris(hydroxymethyl)aminomethane은 Sigma chem. (USA)에서, superoxide dismutase(SOD)는 Toyobo Co. (일본)에서, α -tocopherol은 US Biochemical corporation에서, cysteine 및 ascorbic acid는 林純藥(株)(일본)에서, L-glutathione은 Fluka AG(Switzerland)에서 sodium bisulfite 및 mannitol은 純正化學(株)(일본)에서 각각 구입하여 공시하였다.

돌연변이원성 시험

돌연변이원성 시험은 Ames 등⁽¹¹⁾의 방법을 개량한 Yahagi 등⁽¹²⁾의 preincubation 법에 따라 대사활성물질 없이 *Salmonella typhimurium* TA 100을 사용하여 행하였다. Preincubation에 앞서 각 농도의 카르보닐화합물을 함유하는 수용액 100 μ l씩을 각각 100°C와 실온에서 20분간 반응시킨 후 반응용액을 돌연변이원성시험에 공시하였다. 공시한 *S. typhimurium* TA 100은 양성대조군으로서 AF-2(0.2 μ g/ml)를 사용하여 배지당 2320 revertant와 115의 자연발생 revertant로 확인된 균주를 사용하였다. 돌연변이원성 억제시험은 preincubation에 앞서서 20 μ l methyl glyoxal, 50 μ l glyoxal, 300 μ l dihydroxyacetone 및 500 μ l glycolaldehyde를 함유하는 각 수용액 50 μ l와 각 농도별로 활성산소 소거제 및 환원제 50 μ l를 37°C에서 20분간 반응시킨 후 돌연변이원성 억제시험에 공시하였다. 돌연변이원성 억제효과는 활성산소 소거제 및 환원제 첨가 전후의 돌연변이원성 물질이 나타내는 돌연변이원성의 백분률로써 나타내었다. 모든 실험은 3

배수로 행하여 실험결과에서 자연발생 revertant를 공제하여 평균치로 나타내었다.

결 과

카르보닐화합물의 돌연변이원성

카르보닐화합물을 100°C와 실온에서 각각 20분간 반응시킨 후의 돌연변이원성을 Fig. 1과 2에 나타내었다.

그 결과 α -dicarbonyl 화합물 중에서는 methyl glyoxal과 glyoxal에서, α -hydroxycarbonyl 화합물 중에서는 dihydroxyacetone, glycolaldehyde 및 glyceraldehyde에서 돌연변이원성이 나타났는데 그 중에서 α -dicarbonyl 화합물인 methyl glyoxal에서 특히 강하게 나타났다. 또한 이들 카르보닐화합물을 100°C에서 20분간 가열한 경우는 첨가 최고농도에서만 돌연변이원성이 나타났다. dihydroxyacetone의 경우는 첨가량이 증가함에 따라 오히려 돌연변이원성이 감소하는 경향을 나타내었다.

활성산소 소거제 및 환원제의 돌연변이원성 억제작용

각종 활성산소 소거제 및 환원제를 사용하여 전항에서 돌연변이원성이 크게 나타난 methyl glyoxal, glyoxal, dihydroxyacetone 및 glycolaldehyde와

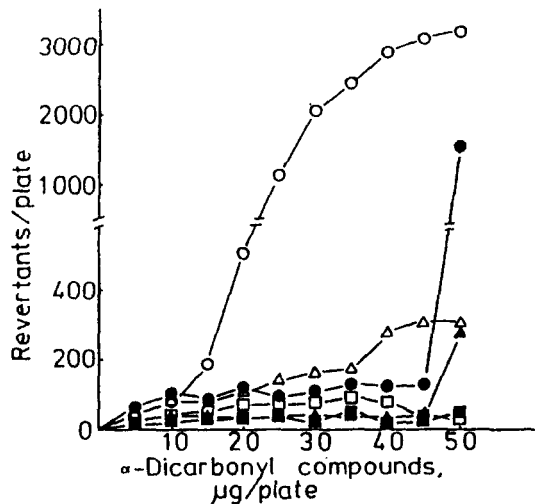


Fig. 1. Mutagenicity of α -dicarbonyl compounds toward *S. typhimurium* TA100 without S-9 mix. α -dicarbonyls were incubated with test strain before (\circ , Δ , \square) and after (\bullet , \blacktriangle , \blacksquare) the heat treatment (100°C, 20 min) prior to preincubation.

\circ ; Methyl glyoxal, \square ; Diacetyl Δ ; Glyoxal

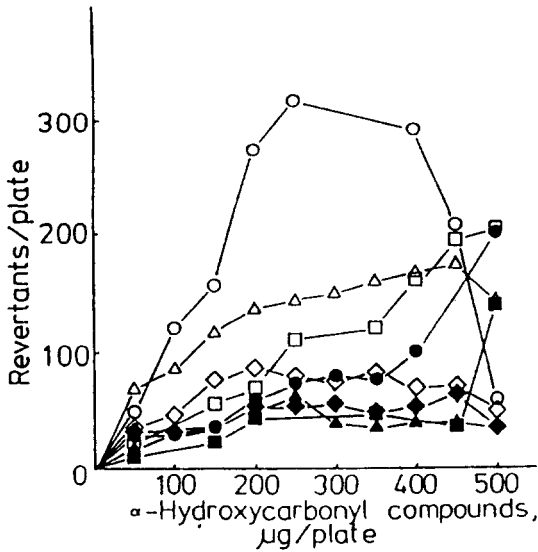


Fig. 2. Mutagenicity of α -hydroxycarbonyl compounds toward *S. typhimurium* TA100 without S-9 mix. α -hydroxycarbonyls were incubated with test strain before ($\circ, \square, \triangle, \diamond$) and after ($\bullet, \blacksquare, \blacktriangle, \blacklozenge$) the heat treatment (100°C, 200min) prior to preincubation. \circ ; Dihydroxyacetone, \square ; Glycolaldehyde, \triangle ; Glyceraldehyde, \diamond ; Furfural

37°C에서 20분간 반응시킨 후 돌연변이원성 억제작용을 살펴본 결과를 Table 1에 나타내었다.

일중항산소 소거제로서 cysteine과 α -tocopherol의 돌연변이원성 억제작용을 살펴본 결과, cysteine은 모든 경우에 있어서 95% 이상의 억제작용을 나타내었으나 α -tocopherol의 경우는 methyl glyoxal에서 78%, dihydroxyacetone에서 54%의 억제작용을 나타내었을 뿐 glyoxal과 glycolaldehyde에서는 첨가량의 증가와 함께 오히려 억제작용이 감소하는 것으로 나타났다.

또한, 수산 radical 소거제로서 tris(hydroxymethyl) aminomethane과 mannitol의 돌연변이원성 억제작용을 시험한 결과, tris(hydroxymethyl) aminomethane의 경우는 methyl glyoxal과 dihydroxyacetone에서 98%, glyoxal과 glycolaldehyde에서 90% 정도의 억제작용을 나타내었으나, mannitol의 경우는 glyoxal과 glycolaldehyde에서만 각각 66, 32% 정도의 억제작용을 나타내었다.

과산화수소 소거제로서 catalase의 돌연변이원성 억제작용을 살펴본 결과, methyl glyoxal에서 89%,

dihydroxyacetone에서 80%, glyoxal에서 63%, glycolaldehyde에서 49%로 나타나 glycolaldehyde에서 보다는 methyl glyoxal, glyoxal 및 dihydroxyacetone에서 그 억제작용이 좋은 것으로 나타났다.

Superoxide anion 소거제로서 ascorbic acid와 SOD의 돌연변이원성 억제작용을 살펴본 결과, ascorbic acid의 경우는 glyoxal에서 81%, dihydroxyacetone에서 94%의 억제작용을 나타내었으며 methyl glyoxal과 glycolaldehyde에서는 각각 56%와 43% 이하로 그 억제작용이 다소 낮은 것으로 나타났으며 glycolaldehyde에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. SOD의 경우는 dihydroxyacetone과 glycolaldehyde에서만 각각 48, 42%의 억제작용을 나타내었으며 methyl glyoxal과 glyoxal에서는 거의 억제작용을 나타내지 않았으며 ascorbic acid 보다는 그 억제작용이 낮은 것으로 나타났다.

그리고 환원제로서 glutathione과 sodium bisulfite의 돌연변이원성 억제작용을 살펴본 결과, glutathione의 경우는 methyl glyoxal, glyoxal 및 dihydroxyacetone에서 95% 이상, glycolaldehyde에서 82%의 억제작용을 나타내었으며 sodium bisulfite의 경우도 공시된 모든 카르보닐화합물에서 96% 이상의 억제작용을 나타내었다.

이상의 결과에서 각종 활성산소 소거제 및 환원제의 돌연변이원성 억제작용이 매우 큰 것으로 나타났는데 특히, cysteine, tris(hydroxymethyl)aminomethane, glutathione 및 sodium bisulfite의 돌연변이원성 억제작용이 매우 큰 것으로 나타났으며, methyl glyoxal, glyoxal 및 dihydroxyacetone은 cysteine, tris(hydroxymethyl)aminomethane, glutathione 및 sodium bisulfite에 의해, glycolaldehyde는 cysteine, α -tocopherol 및 sodium bisulfite에 의해 돌연변이원성이 크게 억제되는 것으로 나타났다. 한편, 이들 각종 활성산소 소거제 및 환원제 단독의 돌연변이원성을 조사하여 본 결과(Table 2), 공시된 모든 활성산소 소거제 및 환원제는 공시 최고농도에서도 돌연변이원성은 없는 것으로 나타났다.

고 찰

식품의 가공, 저장 및 조리 중에 Maillard 반응에 의하여 당의 분해로 생성되는 저분자 카르보닐화합물은 대사활성화 없이 염기치환돌연변이를 유발한다고 알려

Table 1. Inhibition of the mutagenicity of carbonyl compounds by desmutagenic factors

Desmutagenic factors	Amount of desmutagenic factors (mg/plate)	Desmutagenicity, %			
		Methyl glyoxal	Glyoxal	Dihydroxy-acetone	Glycol-aldehyde
Cysteine	1	98	99	90	100
	3	98	95	100	99
	5	98	96	100	97
α -Tocopherol	1	1	47	26	100
	3	35	67	39	100
	5	76	25	53	50
Mannitol	1	0	54	0	27
	3	0	56	0	16
	5	0	66	0	32
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	1	98	92	89	71
	3	97	94	88	83
	5	98	90	98	90
Catalase	1	45	50	76	0
	3	80	61	69	9
	5	89	63	80	49
Ascorbic acid	1	38	86	92	40
	3	51	91	93	43
	5	56	81	94	12
Superoxide dismutase	0.04	0	3	36	43
	0.12	0	0	24	35
	0.2	7	4	48	42
Glutathione	1	99	100	99	82
	3	100	100	100	78
	5	100	100	100	77
Sodium bisulfite	1	97	100	100	100
	3	99	100	98	100
	5	98	96	97	97

Table 2. Mutagenicity^{a)} of active oxygen scavengers and reducing agents as desmutagenic factors

Desmutagenic factors	Amount of sample added (mg/plate)	Revertants per plate
Cysteine	5	270
α -Tocopherol	5	242
Mannitol	5	141
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	5	143
Catalase	5	162
Ascorbic acid	5	168
Superoxide dismutase	0.2	130
Glutathione	5	199
Sodium bisulfite	5	90

a) Mutagenicity was assayed with the preincubation method using *S. typhimurium* TA 100 without S-9 mix.

져 있다⁽⁴⁾. 이들 화합물은 불안정하여 자동산화 하계되면 일중항산소, superoxide anion, 과산화수소, 수산 라디칼 등의 각종 활성산소종이 생성된다⁽¹³⁾.

이들 카르보닐화합물의 돌연변이원성이 자동산화에 의해 생성되는 활성산소종에 기인하는지, 아니면 그 자체의 반응성에 기인하는지를 알아보는 것은 카르보닐화합물의 돌연변이원성이나 그 억제기구 및 억제인자의 검색에 있어서 뿐만 아니라 식품의 안전성 평가에 있어서도 매우 중요한 문제라 할 수 있다.

따라서, 각종 활성산소 소거제 및 환원제를 사용하여 카르보닐화합물의 돌연변이원성과 그 억제기구에 대하여 살펴본 결과, 카르보닐화합물의 돌연변이원성은 glyceraldehyde 등의 α -hydroxycarbonyl 화합물보다 glyoxal 등의 α -dicarbonyl 화합물이 큰 것으로 나타났으며, 그 중에서도 methyl glyoxal이 가장 큰

것으로 밝혀졌다. 또한 이들 카르보닐화합물은 휘발성이 강하여 가열에 의해 쉽게 휘발되나 일정농도 이상에서는 수용액 상태에서 가열을 할지라도 그 잔존량에 의하여 돌연변이원성이 나타나는 것으로 밝혀졌다.

또한 활성산소 소거제와 환원제에 의한 돌연변이원성 억제작용을 살펴본 결과, 활성산소 소거제 및 환원제의 종류에 따라 그 억제작용이 다르며, 억제되는 정도도 다른 것으로 밝혀져 이들 카르보닐화합물은 다소 서로 다른 기구에 의해 돌연변이원성을 나타내는 것으로 생각된다.

한편, 사용된 활성산소 소거제 및 환원제 단독으로는 돌연변이원성이 없는 것으로 밝혀졌다.

그러나 전반적으로 cysteine, glutathione 및 sodium bisulfite 등에 돌연변이원성 억제작용이 큰 것으로 미루어 카르보닐화합물의 돌연변이원성 발현에는 일중항산소(1O_2)와 카르보닐화합물 자체의 반응성이 크게 관여하는 것으로 밝혀졌고, 이들의 돌연변이원성에는 한 종류의 활성산소종이나 그 자체의 반응성만에 의하여 나타나는 것이 아니라 두 종류 이상의 활성산소종과 그 자체의 반응성과의 상호 복합적인 반응에 의하여 나타나는 것으로 생각된다. 또한 카르보닐화합물의 돌연변이원성은 첨가된 활성산소 소거제에 의하여 카르보닐화합물의 자동산화로 생성된 일중항산소, 수산라디칼, 과산화수소 및 superoxide anion 등의 소거 및 환원제에 의하여 카르보닐화합물의 반응성의 소실로 인하여 억제되는 것으로 생각된다. 식품 중에 생성된 이들 카르보닐화합물은 식품 중에 존재하는 활성산소 소거제 및 환원제 등에 의하여 돌연변이원 활성이 용이하게 봉쇄된다고 생각된다.

요 약

식품의 안전성 평가를 위한 기초자료로서 각종 활성산소 소거제 및 환원제를 사용하여 식품성분간의 상호 반응에 의하여 당의 분해로 생성되는 저분자 카르보닐화합물의 돌연변이원성과 그 억제기구를 검토하였다.

그 결과, 카르보닐화합물의 돌연변이원성은 glyceraldehyde 등의 α -hydroxycarbonyl 화합물보다 glyoxal 등의 α -dicarbonyl 화합물이 큰 것으로 나타났으며, 그 중에서 methyl glyoxal이 가장 큰 것으로 밝혀졌다. 각종 활성산소 소거제 및 환원제의 돌연변이원성 억제작용은 cysteine, glutathione 및 sodium bisulfite의 억제작용이 큰 것으로 나타나 이들 카르보

닐화합물의 돌연변이원성은 주로 산화에 의해 생성되는 일중항산소(1O_2) 및 그 자체의 반응성에 크게 기인하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 이들 카르보닐화합물의 돌연변이원성은 첨가된 활성산소 소거제에 의하여 카르보닐화합물의 자동산화로 생성된 일중항산소, 수산라디칼, 과산화수소 및 superoxide anion 등의 소거 및 환원제에 의하여 카르보닐화합물의 반응성의 소실로 인하여 억제되는 것으로 생각된다. 한편, 공시한 각 활성산소 소거제 및 환원제 단독으로는 돌연변이원성이 없는 것으로 나타났다.

문 헌

- Hodge, J.E., F.D. Millis and B.E. Fisher: Compounds of browned flavor derived from sugar-amino reaction. *Cereal Sci. Today*, **17**, 34-40 (1972)
- Bjeldanes, L.F. and H. Chew: Mutagenicity of 1,2-dicarbonyl compounds: Maltol, kojic acid, diacetyl and related substances. *Mutation Res.*, **67**, 367-371 (1979)
- Kasai, H., K. Kumano, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, M. Nagao, Y. Fujita, T. Sugimura, H. Nukaya and T. Kosuge: Mutagenicity of methyl glyoxal in coffee. *Gann*, **73**, 681-683 (1982)
- Kim, S.B., F. Hayase and H. Kato: Desmutagenic effect of α -dicarbonyl and α -hydroxycarbonyl compounds against mutagenic heterocyclic amines. *Mutation Res.*, **177**, 9-15 (1987)
- Winter, M., M. Stoll, E.W. Warnhoff, F. Greufer and G. Bachi: Volatile carbonyl constituents of daily butter. *J. Food Sci.*, **28**, 554-562 (1963)
- Gianturco, M., A. Giammarino and P. Friedel: Volatile constituents of coffee. *Nature(London)*, **210**, 1358-1359 (1966)
- Polo, V. and H. Ilkova: Direct gas chromatographic estimation of lower alcohols, acetone and diacetyl in milk products. *J. Chromatogr.*, **53**, 363-367 (1970)
- Han, L.-P. B., L.M. Davison and D.L.V. Jagt: Purification and kinetic study of glyoxalase-I from rat liver, erythrocytes, brain and kidney. *Biochem. Biophys. Acta.*, **445**, 486-499 (1976)
- Yamaguchi, T. and K. Nakagawa: Mutagenicity of and formation of oxygen radicals by trioses and

- glyoxal derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, **47**(11), 2461-2465 (1983)
10. Fujita, Y., K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura: Characteristics of major mutagenicity of instant coffee. *Mutation Res.*, **142**, 145-148 (1985)
11. Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian*-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, **31**, 347-364 (1975)
12. Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada: Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutation Res.*, **48**, 121-130 (1977)
13. 柏村直樹·森田潤司: 核酸を切斷する糖質誘導體. 有機合成化學, **42**(6), 523-535 (1984)

(1989년 3월 20일 접수)