

Maillard 반응생성물의 Ozonolysis에 따른 화학적 특성 변화

이기동 · 권중호[†]

경북대학교 식품공학과

Changes in the Chemical Properties of Maillard Reaction Products as Affected by Ozonolysis

Gee-Dong Lee and Joong-Ho Kwon[†]

Dept. of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract

Melanoidins, which were higher polymers with intense brown color, were investigated on their decolorization and degradation by ozonolysis. Amino acids linked up with melanoidins were readily separated by depolymerization of melanoidins with ozonolysis. The IR spectra of ozone-untreated MRPs showed a higher peak at 1665cm^{-1} (C=N) and 1600cm^{-1} (C=C) than the corresponding peaks of ozone-treated MRPs. Ozone-treated melanoidins with molecular weight of above 900 showed the highest nitrogen composition of all melanoidins tested. Ozone-treated melanoidins with molecular weight of 900 to 1000 were separated into five peaks on recycling preparative HPLC chromatogram. Major functional groups in ozone-treated melanoidins with molecular weight of 900 to 1,000 were $-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $-\text{CH}_2-\text{O}-$ and $-\text{CH}_2-$.

Key words: melanoidins, ozonolysis, functional group, depolymerization

서론

비효소적으로 일어나는 Maillard 반응은 갈색화 반응생성물의 하나인 melanoidins 생성의 주된 반응으로서, 그동안 반응특성, 반응 mechanism, 갈변물질 생성, 영양손실, 항산화성, 항돌연변이원성 등에 관한 연구가 계속되어 왔다(1-7).

Melanoidins의 항산화력은 자신이 지니고 있는 수소 또는 전자공여성이나 metal chelating 때문이라고 보고되었다(8,9). 그리고 reductones가 환원성을 가지고 있으므로 melanoidins의 항산화성은 그 reductones 구조에 의한 것으로 추정되고 있다(9). Melanoidins의 항돌연변이원성은 그들의 환원력, 항산화성, 정전기적 결합력 및 melanoidins 분자대의 카르보닐기 때문이라고 보고되고 있다(10). 이러한 여러 기능을 가지고 있는 melanoidins은 ozone으로 탈색 및 저분자화될 경우에도 항산화성과 항돌연변이원성이 줄어들지 않고 오히려 항돌연변이원성은 증가한다고 보고되었다(11).

Hayase 등(12)은 과산화수소를 melanoidins에 처

리시킬 경우 일어나는 melanoidins의 탈색 및 분해에 기인하는 저분자화 및 이에 수반되는 분해생성물은 melanoidins의 당측쇄 C-CO결합 및 NH-CO결합의 절단에 의한다고 하였다. 그리고 Kim 등(10)은 melanoidins에 ozone을 처리함으로써 ozone이 melanoidins과 친전자적으로 반응하여 melanoidins의 탈색과 분해에 크게 기여한다고 하였다.

본 연구에서는 항산화성 및 항돌연변이원성이 우수한 Maillard 반응생성물(Maillard reaction products, MRPs)의 짙은 갈색, 고분자, 제한된 용해도 등을 고려한 ozonolysis에 의한 탈색 및 저분자화가 melanoidins의 작용기 특성에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하였다.

재료 및 방법

MRPs의 아미노산 및 glucose 분석

Maillard 반응전 기질, ozone처리하지 않은 MRPs 및 ozone 처리한 MRPs 각각 1g을 증류수 100ml에 녹

[†]To whom all correspondence should be addressed

인 후 pH를 7로 조절하여 Whatman filter paper No. 40으로 여과한 뒤 C₁₈ cartridge 필터를 통과시켜 아미노산 분석용 시료로 하였으며, HPLC의 column은 Waters amino acid analysis를, detector는 fluorescence model 421를 사용하였다(13). Maillard 반응전 기질, ozone처리하지 않은 MRPs 및 ozone처리한 MRPs의 glucose함량은 각 시료 2g을 증류수 50ml에 녹인 뒤 위와 동일한 처리를 거쳐 sugar-pack 칼럼과 UV detector를 장착한 HPLC로 측정하였다(14).

MRPs의 ozonolysis와 분획

기질의 제조 및 Maillard 반응의 진행은 이 등(14)의 방법에 따라 탈지대두박과 옥수수전분 가수분해물을 기질로 하여 실시하였으며, Maillard 반응조건은 155°C, 7.15hrs 및 용매 pH 12였다. 반응생성물은 동결건조한 후 질소를 충전하여 -18°C 이하에 보관하면서 ozone 처리실험에 사용하였다. Ozone은 Kim 등(10)의 방법에 준하여 건조한 O₂를 ozone발생기에 통과시켜 얻었으며, 155°C, 7.15hrs 및 용매의 pH 12에서 Maillard 반응으로 생성된 0.25% MRPs용액을 0°C, pH 4.4로 유지하면서 0.02% ozone-oxygen을 0.6l/min의 속도로 시료에 통과시켜 산화시켰다. Ozone 처리된 MRPs의 분자량별 분획은 MRPs 100mg을 Sephadex G 25 column chromatography에 의해 분자량이 1,200~6,500, 900~1,000 및 750~900인 melanoidins을 분획하였고, ozone 처리하지 않은 MRPs 또한 ozone 처리된 melanoidins와 같은 방법으로 분획하여 분자량 1,200~6,500, 900~1,000 및 750~900인 melanoidins을 얻어 분석시료로 사용하였다. Melanoidins를 Sephadex column으로 분획시 용출액은 증류수를 사용하였고, 용출속도는 1.2ml/min이었다.

기기분석

Ozone처리한 MRPs 및 ozone 처리하지 않은 MRPs의 분자량별 분획(분자량 1,200~6,500, 900~1,000 및 750~900인 melanoidins)의 IR spectra는 시료 1mg을 KBr 100mg에 잘 혼합하여 가압정제를 만들어 FT-IR spectrophotometer(Maltson galaxy 6030E, U.S.A)로 측정하였다. 각 시료의 원소분석은 elementary analyzer(Carlo Erba EA-1106R, U.S.A)로 C, H 및 N의 양을 분석하였는데, 그 분석조건은 carrier gas로 He (180ml/min), oxygen(7.0ml/min), 대기압(764.5mmHg), combustion 온도(800°C), reduction 온도(500°C), detection 온도(55°C), bridge current(C: 65mA, H: 65mA 및 N: 110mA) 였다. ¹H NMR spectra는 시료를 D₂O에

용해시켜 300MHz에서 Bruker AM-300 NMR spectrophotometer로 측정하였으며, chemical shift는 ppm × 100(δ)으로 표시하였다.

HPLC에 의한 MRPs 분리

MRPs의 ozone처리 후 분자량이 900~1,000인 melanoidins를 recycle preparative HPLC(LC-908)로 분리하였다. 사용된 column은 Jaigel GS-320이었고, eluent는 AcCN/H₂O(2/1)를 사용하였다. 그리고 검출기는 RI detector(× 128) 및 UV detector(214nm × 0.1)를 사용하였으며, 시료는 분자량이 900~1,000인 ozone처리 melanoidins 20mg을 포함한 시료용액 3ml를 주입하였고 flow rate는 5ml/min으로 하였다.

결과 및 고찰

Ozonolysis에 따른 MRPs 중의 유리아미노산 및 glucose 변화

Maillard 반응기질로서 탈지대두박과 옥수수전분 가수분해물을 사용하여 Maillard 반응생성물을 얻고, MRPs에 ozone을 처리하여 탈색 및 저분자화 시킨 다음 그 용액의 아미노산 조성별 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. Maillard 반응기질로서 탈지대두박과 옥수수전분 가수분해물의 아미노산은 Maillard 반응에 의해 크게 줄어들었다. 그러나 MRPs 용액을 ozone 처리에 의해 탈색 및 저분자화됨에 따라 용액 중의 유리아미노산은 증가되었다. 이것은 당과의 Maillard 반응으로 melanoidins에 일부 축합되어 있던 아미노산이 분리되어 유리되면서 그 함량이 증가되는 것으로 생각된다. Kim 등(10), Hayase 등(12)은 glucose와 glycine의 Maillard 반응으로부터 생성된 melanoidins을 과산화수소로 처리하였을 때 melanoidins으로부터 1.75%의 glycine이 유리되었고, 또한 ozone처리시 1.1%의 glycine이 유리된다고 보고하였다. 그러나 방향족 및 복소환 amino acid인 tyrosine, tryptophan, phenylalanine, histidine 등의 함량은 다소 감소되었다. 한편 옥수수전분 및 탈지대두 가수분해물의 glucose의 함량은 Maillard 반응으로 급격히 줄어들었으며, 또한 MRPs에 ozone을 처리함에 따라 glucose 함량이 줄어들었다.

Ozonolysis에 따른 melanoidins의 IR spectra 변화

FT-IR을 사용하여 melanoidins 및 ozone처리된 melanoidins의 작용기를 분석한 결과를 Fig 1~3에 나타

Table 1. Amino acid and glucose compositions of ozone-untreated MRPs and ozone-treated MRPs

(unit : nmol/10 μ l)

Amino acids and glucose	Maillard reaction substrates ¹⁾	Ozone-untreated MRPs	Ozone-treated MRPs
Glycine	14.0174	6.1308	6.9719
Alanine	18.3282	13.3271	14.7474
Serine	14.7738	6.3154	6.5466
Valine	11.5438	8.5019	9.4023
Leucine	7.3101	5.9620	7.0412
Isoleucine	4.9160	4.0025	4.7265
Threonine	10.8012	2.6595	2.6755
Aspartic acid	28.0345	9.5268	10.6495
Glutamic acid	31.0928	0.9264	1.8696
Arginine	16.7125	12.8913	14.9259
Lysine	14.9066	4.6670	12.6035
Cysteine	1.1220	0.6711	0.7815
Methionine	2.7294	1.1475	1.1381
Phenylalanine	8.3105	3.3598	3.2152
Tyrosine	3.5148	2.3941	1.2765
Proline	20.7191	16.7837	20.5653
Tryptophan	7.6621	6.2433	5.5946
Histidine	4.1693	2.0974	1.5914
Glucose	123.1870	14.5300	8.0210

¹⁾Mixture(20ml) of defatted soybean hydrolysate(7.75g), corn starch hydrolysate(2.00g) and distilled water

내었다. MRPs의 분자량이 1,200~6,500에 속하는 고분자 melanoidins은 1,660cm⁻¹부근에서 amide의 C=O, 1,400cm⁻¹부근에서 1차 amide의 C-N 및 1,580cm⁻¹부

근에서 1, 2차 amine과 amide의 N-H가 상대적으로 강한 흡수대를 나타내었다. 그러나 ozone처리된 MRPs에서 분자량이 1,200~6,500에 속하는 고분자 melano-

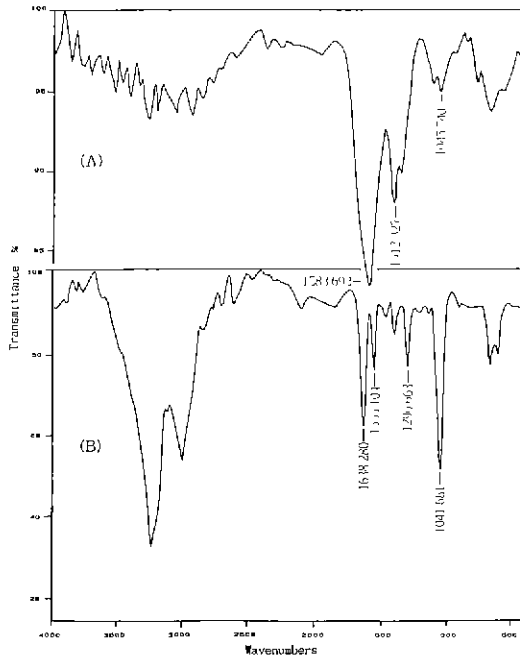


Fig. 1. FT-IR spectra of ozone-untreated melanoidins (A) and ozone-treated melanoidins(B) with molecular weight of 1,200 to 6,500.

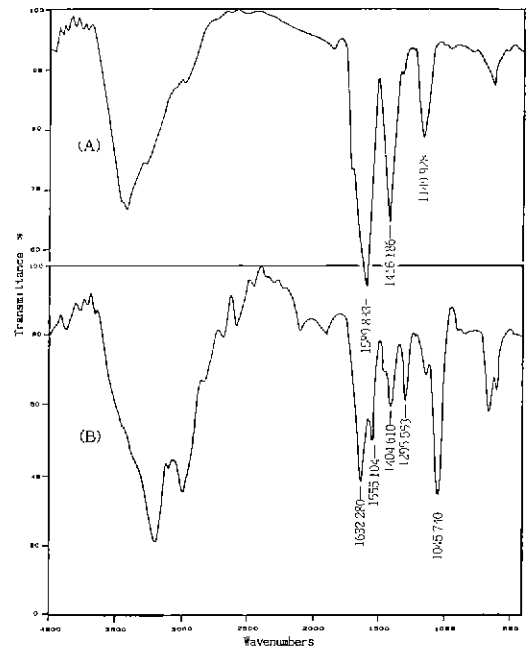


Fig. 2. FT-IR spectra of ozone-untreated melanoidins (A) and ozone-treated melanoidins(B) with molecular weight of 900 to 1,000.

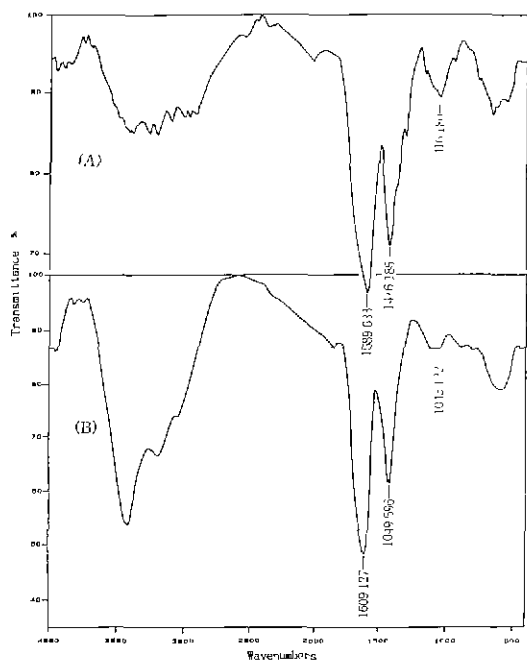


Fig. 3. FT-IR spectra of ozone-untreated melanoidins (A) and ozone-treated melanoidins(B) with molecular weight of 750 to 900.

idins는 1,580cm⁻¹부근에서 1, 2차 amine 및 amide의 N-H. 1,400cm⁻¹부근에서 1차 amide의 C-N이 상대적으로 약한 흡수대를 나타내었는데, 이러한 결과는 ozone처리에 따라 amide 결합이 산화적으로 분해되는 것으로 생각된다. Kim 등(10), Hayase 등(12)은 melanoidins에 과산화수소 및 ozone처리시 glycine이 melanoidins으로부터 유리되었는데, 이것은 amide 결합의 산화적 분해에 기인된다고 하였다.

그리고 ozone처리하지 않은 MRP에서 분자량이

Table 2. Elementary analyses of ozone-untreated melanoidins and ozone-treated melanoidins (unit: mg/100mg)

Melanoidins	Elements			
	N	C	H	Others
Ozone-untreated MRPs	5.8974	34.7698	4.7636	54.5692
Ozone-treated MRPs	5.2875	28.9497	4.4104	61.3524
MW 1200 to 6500	6.9719	30.4982	4.6613	57.8686
MW 1200 to 6500(O ₃) ¹⁾	7.5612	28.6439	7.0756	56.7193
MW 900 to 1000	3.7234	37.7108	4.8385	53.7273
MW 900 to 1000(O ₃)	7.1924	30.4217	6.4683	55.9176
MW 750 to 900	5.6566	33.6165	4.8253	55.9016
MW 750 to 900(O ₃)	4.5526	14.5641	2.8189	78.0644

¹⁾Ozone-treated melanoidins with molecular weight of 1,200 to 6,500

1,200~6,500에 속하는 고분자 melanoidins은 1665cm⁻¹ 부근에서 C=N과 1,600cm⁻¹부근에서 C=C의 신축진동이 강하게 나타났으나, ozone처리된 MRP에서 분자량이 1,200~6,500에 속하는 고분자 melanoidins은 1,665cm⁻¹ 부근에서 C=N, 1,600cm⁻¹부근에서 C=C 신축진동이 사라졌다. 이것은 ozone이 melanoidins의 주요 발색단(11)으로 알려진 melanoidins 분자내에 있는 C=C, C=N 등의 π 전자를 친전자적으로 공격함으로써 그 결합이 절단된 것으로 사료된다.

Ozone처리되지 않은 MRP에서 분자량이 1,200~6,500에 속하는 고분자 melanoidins의 1, 2, 3차 alcohol기의 신축진동(C-OH, 1,040cm⁻¹)은 약한 흡수대를 나타내었고, ozone처리된 melanoidins의 alcohol 및 carbonyl기의 신축진동은 상대적으로 흡수대가 두드러지게 나타내어 ozone에 의한 산화가 진행되었음을 볼 수 있었다. 그러나 분자량이 900~1,000에 속하는 ozone처리되지 않은 melanoidins에서 alcohol기의 신축진동이 상대적으로 강한 흡수대를 나타내었고, ozone처리된 melanoidins에서 alcohol(C-OH) 및 carbonyl(C=O)기의 신축진동이 두드러졌다. 그리고 ozone처리된 melanoidins에서 분자량이 750~900인 저분자 melanoidins은 carbonyl(C=O)기의 신축진동이 상대적으로 강한 흡수대를 나타내었고, alcohol(C-O)기의 신축진동은 약한 흡수대를 나타내었다. 이와같이 melanoidins이 ozone에 의해 산화되고 저분자화 될수록 melanoidins의 carbonyl기는 상대적으로 증가하였으며, alcohol기는 분자량이 클수록 melanoidins의 주요한 작용기로 남아 있었으나 저분자화 될수록 carbonyl기로 산화되거나 분해되면서 감소하였다.

Ozonolysis에 따른 melanoidins의 원소 변화

Melanoidins을 C,H,N 원소분석기를 사용하여 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. Melanoidins을 ozone처리하여 탈색 및 저분자화함에 따라 탄소, 수소, 질소의 비율은 감소하고, 상대적으로 산소의 비율은 증가하였다. 분자량이 1,200~6,500인 고분자 melanoidins은 ozone처리된 것이 ozone처리하지 않은 것보다 질소는 약간 증가하였다. 분자량이 900~1,000인 melanoidins은 ozone처리에 따라 질소가 크게 증가하였는데, 이와 같은 결과는 Kirigaya 등(15)이 고분자 melanoidins일수록 질소함량이 높다는 보고와 일치하는 것으로서 분자량이 1,200~6,500인 고분자 melanoidins에서 ozone에 의해 탈색과 동시에 저분자화가 진행되나 질소를 많이 함유한 고분자 melanoidins은 ozone처리에 의하여 쉽게 저분자물질로 분해되지 않고 ozone분해에 저항성

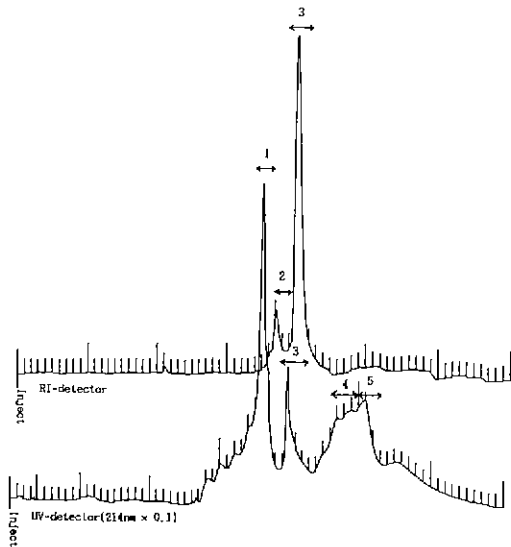


Fig. 4. Recycling preparative HPLC chromatograms(RI-detector and UV-detector) of ozone-treated melanoidins with molecular weight of 900 to 1,000.

을 가지고 있는 것으로 사료된다. 분자량이 750~900인 저분자 melanoidins은 ozone처리로 질소와 수소함량이 줄어들었는데, 이것은 고분자 melanoidins이 분해되면서 저분자물질이 되지만 질소함량이 낮은 부분이 주로 분리되어 저분자화 되는 것으로 여겨진다.

HPLC 및 ¹H-NMR에 의한 작용기 분석

Ozone처리된 melanoidins 가운데 분자량이 900~1,000인 melanoidins를 다시 recycle preparative HPLC에 의하여 분획한 chromatogram을 Fig. 4에 나타내었다.

Recycle preparative HPLC chromatogram 상에서 다섯개의 peaks를 확인할 수 있었으며, 분리된 주요 피크는 1, 2, 3번 피크였으며 4, 5번 피크는 명확히 분리되지 않았다. 또한 각 피크에 대한 ¹H-NMR spectrum을 구해본 결과 Fig. 5에 나타난 바와 같이 피크의 패턴은 거의 비슷하였으며, 1, 2번 피크는 aromatic기(8.5 ppm) 및 aldehyde기(9.6ppm)가 있었으나, 3, 4, 5번 피크에서는 나타나지 않았다. Namiki(8)는 melanoidins이 aromatic 부분을 가지고 있다고 보고한 바 있다. 그리고 -CH₂-CO-, -CH₂-O- 및 -CH₂-기의 H 피크는 1번과 2번의 ¹H-NMR spectra에서 거의 유사하게 나타났다. 그러나 3, 4, 5번 피크의 -CH₂-CO-, -CH₂-O- 및 -CH₂-기의 H 피크는 1번과 2번에서의 -CH₂-CO-, -CH₂-O- 및 -CH₂-기의 H 피크보다 강하게 나타났다. 특히 무색에 가까운 3번 피크의 spectrum에서는 -CH₂-

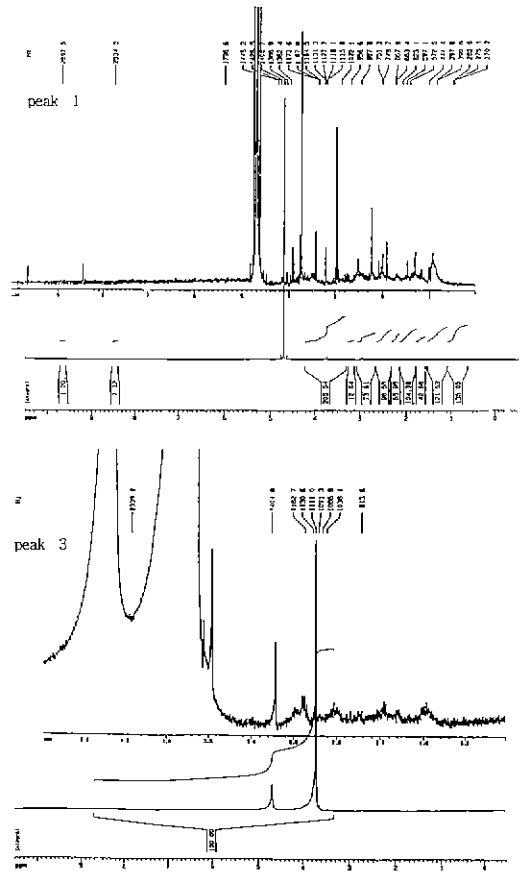


Fig. 5. ¹H-NMR spectra of peak 1 and peak 3 of ozone-treated melanoidins(MW 900~1,000) isolated by recycling preparative HPLC.

CO-, -CH₂-O- 및 -CH₂-기의 H 피크가 아주 강하게 나타나 recycle preparative HPLC chromatogram에서 주된 피크를 형성하였는데, 이것은 depolymer화 및 탈색으로 -CH₂-CO-, -CH₂-O- 및 -CH₂-기가 현저하게 증가한 것으로 생각된다.

요 약

Melanoidins의 질은 갈색, 고분자 특성 등을 고려하여 ozonolysis에 의한 탈색 및 저분자화가 melanoidins의 작용기 특성에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. Melanoidins에 결합되어 있는 대부분의 아미노산은 ozone처리에 의한 melanoidins의 저분자화에 따라 melanoidins으로부터 분해되어 쉽게 유리되었다. Melanoidins은 IR spectra에서는 1,665cm⁻¹부근에서 C=N, 1,600cm⁻¹부근에서 C=C 등의 피크가 상대적으로 강하게 나타났으나, ozone처리된 MRP에서의 C=N과 C=C

는 탈색과 함께 사라졌다. Melanoidins을 ozone처리하여 탈색 및 저분자화합에 따라 산소의 비율은 증가하였으며, melanoidins의 주요한 구성원소로 알려진 질소는 ozone처리된 고분자 melanoidins(MW 900 이상)에서 많이 함유되어 있었다. 분자량이 900~1,000인 ozone처리된 melanoidins은 recycle preparative HPLC chromatogram 상에서 다섯개의 피크가 확인되었으며, melanoidins의 depolymer화 및 탈색으로 $-CH_2-CO-$, $-CH_2-O-$ 및 $-CH_2-$ 기가 melanoidins의 주요한 구성 작용기였다.

감사의 글

본 논문은 1995년도 한국과학재단 핵심전분연구과제(951-0603-082-1) 연구결과의 일부이며 지원에 감사드립니다.

문헌

- Lee, C. Y. : Browning Reaction. In "Enzymatic Encyclopedia of Food Sci. Technol" Huu, Y. H (ed.), John Sons. Inc., p.223(1982)
- Hayashi, T. and Namiki, M. : Role of sugar fragmentation in the Maillard reaction In "Amino-carbonyl reactions in food and biological systems" Proceeding of the 3rd International Symposium on the Maillard Reaction, Susono, Shizuoka, Japan, p.29(1985)
- Hayase, F. and Kato, H. : Low-molecular Maillard reaction products and their formation mechanisms. In "Amino-carbonyl reactions in food and biological systems". Proceeding of the 3rd International Symposium on the Maillard Reaction, Susono, Shizuoka, Japan, p.39(1985)
- Sheldon, S., Russell, G. F. and Shibamoto, T. : Photochemical and thermal activation of model Maillard reaction systems. In "Amino-carbonyl reactions in food and biological systems" Proceeding of the 3rd International Symposium on the Maillard Reaction, Susono, Shizuoka, Japan, p.145(1985)
- Ledl, F., Fritsch, G., Hiebl, J., Pachmayr, O. and Severin, T. : Degradation of Maillard products. In "Amino-carbonyl reactions in food and biological systems" Proceeding of the 3rd International Symposium on the Maillard Reaction, Susono, Shizuoka, Japan, p.173(1985)
- Feather, M. and Huang, R. D. : Some studies on a Maillard polymer derived from L-alanine and D-glucose. In "Amino-carbonyl reactions in food and biological systems" Proceeding of the 3rd International Symposium on the Maillard Reaction, Susono, Shizuoka, Japan, p.183(1985)
- Tressl, R., Helak, B., Martin, N. and Rewicki, D. : Formation of proline specific Maillard products. In "Amino-carbonyl reactions in food and biological systems" Proceeding of the 3rd International Symposium on the Maillard Reaction, Susono, Shizuoka, Japan, p.235(1985)
- Namiki, M. : Chemistry of Maillard reactions. recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Adv Food Res*, **32**, 115(1988)
- Bailey, M. E. and Um, K. W. : Maillard reaction products and lipid oxidation. In "Lipid oxidation in food" Angelo, J. St(ed.), ACS Symposium Series 500. Am. Chem. Soc., Washington, DC. p.122(1992)
- Kim, S. B., Hayase, F. and Kato, H. : Decolorization and degradation products of melanoidins on ozonolysis. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 785(1985)
- 김선봉 : Maillard 반응생성물의 화학적 해석과 생물작용. *식품과학*, **19**, 1(1986)
- Hayase, F., Kim, S. H. and Kato, H. : Decolorization and degradation products of melanoidins by hydrogen peroxide. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2711(1984)
- 이철호 : 장류제품의 아미노산 조성과 그 단백질 품질평가에 관한연구. *한국식품과학회지*, **5**, 210(1973)
- 이기동, 김정숙, 권중호 : 반응표면분석에 의한 Maillard 반응기질의 동적변화 모니터링. *한국식품과학회지*, **28**, 212(1996)
- Kirigaya, N., Kato, H. and Fujumaki, M. : Studies on antioxidant activity of nonenzymatic browning reaction products (II) Antioxidant activity of nondialyzable browning reaction products. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **43**, 484(1969)

(1997년 7월 7일 접수)