

Glucose-아미노산계 Maillard 반응생성물의 니트로사민 생성억제작용

이동호 · 이태기 · 여생규* · 염동민** · 김선봉[†] · 박영호

부산수산대학교 식품공학과

*부산전문대학 식품가공과

**양산전문대학 식품영양과

Inhibitory Action of Maillard Reaction Products Derived from Glucose-Amino Acids on the Formation of N-nitrosamine

Dong-Ho Lee, Tae-Gee Lee, Saeng-Gyu Yeo*, Dong-Min Yeum**, Seon-Bong Kim[†] and
Yeung-Ho Park

Dept. of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

*Dept. of Food Processing, Pusan Junior College, Pusan 616-092, Korea

**Dept. of Food Nutrition, Yangsan Junior College, Yangsan 628-800, Korea

Abstract

The present paper was carried out to investigate the inhibition of carcinogenic N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation by Maillard reaction products and nondialyzable melanoidins, obtained from the glucose-amino acids (Lys, Gly, Arg, His) model systems under different pH conditions (pH 1.2, 4.2 and 6.0). Maillard reaction products and nondialyzable melanoidins, produced from the 4 model systems, had a inhibitory action of N-nitrosodimethylamine formation. The inhibition degree by the nondialyzable melanoidins at pH 1.2 was similar to that at pH 4.2 and that by ascorbic acid at pH 1.2. Inhibitory action of N-nitrosodimethylamine formation by the reduced Maillard reaction products and nondialyzable melanoidins were lower than that of original samples. Accordingly, it is assumed that the inhibition of N-nitrosodimethylamine formation of Maillard reaction products is due to their reducing powers.

Key words : N-nitrosodimethylamine, Maillard reaction products, melanoidin

서 론

식품성분간의 상호반응이나 식품의 가공, 저장 및 조리중에 생성되는 화학적 발암물질 가운데 하나인 니트로사민은 1956년에 Magee와 Barnes¹⁾가 쥐에서 이 물질이 간암을 유발한다고 보고함으로써 N-nitroso화합물의 발암성이 문제가 되기 시작하였다. 최근 니트로사민이 점차 관심의 대상이 되고 있는 것은 니트로사민이 식품 성분간의 상호반응으로 인하여 식품내에서 뿐만 아니라 nitroso화 반응이 인체의 위내의 pH조건과 유사하여 위내에서도 쉽게 생성될 수 있으므로²⁾ 식품의 안전성 측면으로 보아 중요하다고 하겠다.

그리하여 니트로사민의 생성억제에 대하여 많은 연구가 진행되어 Fan과 Tannenbaum³⁾은 L-ascorbic acid의 첨가에 의하여 Massey 등⁴⁾은 pyrrolidine, ascorbic acid, cysteine 및 *p*-cresol에 의하여 Tanaka 등⁵⁾은 sorbic acid에 의하여 Kurechi와 Kikugawa⁶⁾는 지질에 의하여 Gray 등⁷⁾은 α -tocopherol에 의하여 각각 니트로사민의 생성이 효과적으로 억제된다고 보고하고 있다.

이와같이 식품 첨가물에 의한 니트로사민의 생성억제에 대하여는 지금까지 많은 연구가 진행되어 왔지만 식품성분간의 상호반응으로 생성되는 Maillard반응생성물을 이용한 연구는 저자 등⁸⁾의 보고가 있을 뿐이며 이들 물질에 의한 니트로사민의 효과적인 생성억제

[†]To whom all correspondence should be addressed

기구에 대하여는 명확하게 밝혀지지 않고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 식품의 안전성 평가를 위한 수단의 하나로 식품의 가공, 저장 및 조리중에 식품성분간의 상호반응으로 용이하게 생성되는 Maillard반응 생성물과 비투석성 melanoidin을 사용하여 발암성의 N-nitrosodimethylamine (NDMA)의 생성억제작용에 대하여 연구, 검토 하였다.

재료 및 방법

시료의 조제

Maillard반응생성물

D-glucose 1M과 각 아미노산(L-arginine, glycine, L-histidine monohydrochloride 및 L-lysine monohydrochloride 이상 Hayashi pure chem. Ind. Co.) 1M (glucose-histidine계는 각각 0.5M) 및 반응촉매제로서 NaHCO₃ 0.25M을 넣고 pH를 6.8로 조절하였다. 이 용액을 100°C항온수조에서 7시간 가열하면서 인위적으로 Maillard반응을 일으켜 얻은 갈변용액을 Maillard반응 생성물로 하였다.

비투석성 melanoidin

상기에서 얻은 Maillard반응생성물을 cellulose반투막(M.W. Cut off 12,000~14,000)에 충전하여 증류수 중에서 24시간 투석한 다음 투석막내액을 진공동결건조하여 비투석성 melanoidin을 얻었다.

환원 Maillard반응생성물

Maillard반응생성물 3ml를 6N NaOH로 pH를 8.0으로 조절하였다. 그 후, sodium borohydride (NaBH₄) 500mg을 가하여 실온에서 12시간 교반하면서 반응시켰다. 반응 후 잔존하는 sodium borohydride는 6N HCl을 사용하여 분해시켜 (반응용액에서 기포가 발생하지 않을 때까지 첨가) 반응을 정지시켰다. 이 용액을 환원 Maillard반응생성물로 하였다.

환원 비투석성 melanoidin

비투석성 melanoidin 300mg을 3ml 증류수에 용해한 후 sodium borohydride 500mg을 가하여 실온에서 12시간 교반하면서 반응시킨 후 6N HCl을 사용하여 반응을 정지시켰다. 그 후 이를 증류수 중에서 24시간 투석시켜 투석막내액을 진공동결건조하여 환원 비투석성 melanoidin으로 사용하였다.

N-nitrosodimethylamine의 생성억제능 측정

30ml용 공전시료병에 2.9M NaNO₂용액 5ml와 소정농도의 시료를 첨가하였다. 그 후 1.5M dimethylamine용액 20ml를 취하여 진한 염산으로 pH를 각각 1.2, 4.2 및 6.0으로 조절한 후 0.1N HCl용액 (pH 1.2) 및 0.2M 구연산 완충용액 (pH 4.2 및 pH 6.0)으로 50ml로 정용한 pH 1.2, pH 4.2 및 pH 6.0의 dimethylamine (DMA)용액 각 50ml중 2.5ml를 아질산-시료추출물 용액중에 가하고 총 부피를 12ml로 한 후에 37°C에서 1시간 동안 반응시켜서 N-nitrosodimethylamine (NDMA)을 생성시켰다. 그 후 ammonium sulfamate를 700mg 가하여 잔존 아질산을 분해시켜서 반응을 정지시킨 다음, 6N NaOH로 반응용액의 pH를 10으로 조정하고 식염 3g과 dichloromethane 30ml를 사용하여 반응용액중에 있는 NDMA를 추출하였다. 추출 후, dichloromethane층을 모아서 무수황산나트륨을 통과시키면서 탈수, 여과시킨 다음, NDMA용액을 얻었다. 이것을 회전식 진공증발기로 25°C에서 감압하여 농축시킨 후 dichloromethane으로 1ml되게 하였다. 이 용액을 GLC (Pye-unicam GC 303)로 분석하였다. 공시험은 이들 시료 대신 완충용액을 사용하여 상기와 같은 조작으로 행하였다. NDMA 생성억제효과는 이들 시료 첨가 전후에 나타나는 면적의 백분율(%)로써 나타내었으며 이 수치가 큰 것일수록 NDMA 생성억제효과가 크다는 것을 의미한다.

Gas-liquid chromatography (GLC)

GLC분석은 10% DEGS chromosorb w(100~120 mesh)를 채운 유리칼럼(3m×4mm i.d.)을 사용하여 칼럼 온도 100°C에서 유속 4ml/min의 질소를 흘려 200°C로 유지된 FID로 행하였다.

결 과

Maillard반응생성물의 N-nitrosodimethylamine 생성억제작용

Table 1은 Maillard반응생성물에 의한 NDMA의 생성억제효과를 나타낸 표이다. 소정농도의 Maillard반응생성물을 첨가하여 NDMA생성억제능을 검토한 결과 glucose-glycine계 Maillard반응생성물 300μl를 첨가하였을 때 pH 1.2에서 46.5%의 NDMA생성억제능을 나타내었고, pH 4.2에서는 20.6%, pH 6.0에서는 66.6%로 나타났다. 그리고 첨가하는 시료의 농도증가와 더불어

어 각 pH영역에서의 NDMA의 생성억제능도 증가하는 경향으로 나타났다. 또한, 다른 종류의 Maillard반응생성물에서도 이와 유사한 경향을 나타내었다.

Maillard반응생성물의 N-nitrosodimethylamine의 생성억제작용에 미치는 환원인자의 영향

Maillard반응생성물의 NDMA생성억제에 관여하는 인자를 검색하기 위한 방법의 하나로 Maillard반응생성물에 미치는 영향을 검토하였다. Table 2에서와 같이 환원능을 소실시키고 난 후의 Maillard반응생성물의 NDMA생성억제능은 4종류의 시료 모두에서 현저하게 감소하였다. 특히, glucose-glycine계 Maillard반응생성물의 경우, pH 1.2에서 환원처리 전에는 46.5%의 NDMA생성억제능을 보였으나 환원능을 소실시키고 난 후의 시료는 환원능의 소실에 의하여 약 80% 정도 NDMA의 생성억제능이 감소되는 경향을 나타내었다. 나머지 시료에서도 환원능 소실에 의하여 모

두 NDMA생성억제능이 50에서 70%정도 감소되었다.

비투석성 melanoidin의 N-nitrosodimethylamine 생성억제작용

Table 3은 비투석성 melanoidin의 NDMA생성억제능에 대하여 검토한 결과를 나타낸 표이다. 4종류의 비투석성 melanoidin을 각각 10, 20 및 30mg씩 첨가하여 NDMA생성억제효과를 검토한 결과 glucose-lysine계 비투석성 melanoidin의 NDMA생성억제능이 가장 높게 나타났는데 30mg을 첨가한 경우 pH 1.2, 4.2 및 6.0에서 각각 36.5, 24.1 및 57.9%의 NDMA생성억제능을 나타내었고, 첨가한 시료의 농도가 증가할수록 DNMA생성억제능도 증가하는 것으로 나타났다. 또한 다른 종류의 비투석성 melanoidin에 있어서도 glucose-lysine계 비투석성 melanoidin의 경우와 유사한 결과를 나타내었다.

Table 1. Inhibition of N-nitrosodimethylamine formation by Maillard reaction products under different pH conditions

Reaction systems	Amount of Maillard reaction products added, μ l	Inhibition, %		
		pH 1.2	pH 4.2	pH 6.0
Glucose-lysine	100	14.9	7.8	46.4
	200	29.7	30.7	58.9
	300	49.8	41.2	66.2
Glucose-arginine	100	15.5	8.0	15.2
	200	23.9	43.4	59.8
	300	34.3	59.5	68.5
Glucose-glycine	100	25.3	10.4	53.3
	200	32.5	16.8	63.2
	300	46.5	20.6	66.6
Glucose-histidine	200	18.7	15.2	48.7
	400	26.5	28.0	54.9
	600	34.5	46.5	61.7

Table 2. Effects of reducing ability on the inhibition of N-nitrosodimethylamine formation of Maillard reaction products (MRP)

Reaction systems	Maillard reaction products ^a	Inhibition, %		
		pH 1.2	pH 4.2	pH 6.0
Glucose-lysine	MRP	49.8	41.2	66.2
	Reduced MRP ^b	17.5	14.2	-
Glucose-arginine	MRP	34.3	59.5	68.5
	Reduced MRP	15.2	15.0	-
Glucose-glycine	MRP	46.5	20.6	66.6
	Reduced MRP	8.0	7.2	-
Glucose-histidine ^c	MRP	34.5	46.5	61.7
	Reduced MRP	20.2	14.1	-

^a 300 μ l of MRP and reduced MRP were incubated with 2.9M NaNO₂ and 0.6M dimethylamine at 37°C for 1hr

^b Obtained from MRP treated with NaBH₄ under alkaline pH condition

^c 600 μ l of MRP and reduced MRP were incubated with 2.9M NaNO₂ and 0.6M dimethylamine at 37°C for 1hr

Table 3. Inhibition of N-nitrosodimethylamine formation by nondialyzable melanoidins under different pH conditions

Reaction systems	Amount of melanoidins added, mg	Inhibition, %		
		pH 1.2	pH 4.2	pH 6.0
Glucose-lysine	10	15.5	8.6	43.9
	20	23.9	15.6	50.7
	30	36.5	24.1	57.9
Glucose-arginine	10	12.8	10.0	25.4
	20	19.7	12.2	35.8
	30	28.4	21.3	44.7
Glucose-glycine	10	15.2	7.2	37.1
	20	22.7	13.2	55.4
	30	32.3	19.0	67.4
Glucose-histidine	10	16.2	10.6	37.4
	20	22.4	15.5	39.8
	30	33.2	20.3	69.2

비투석성 melanoidin의 N-nitrosodimethylamine의 생성억제능 정도

비투석성 melanoidin의 NDMA생성억제능을 상대적으로 평가하기 위하여 NDMA의 생성억제능이 우수한 것으로 널리 알려져 있는 ascorbic acid와 비교 검토하여 Table 4에 나타내었다. Ascorbic acid 30mg을 첨가하였을 경우 pH 1.2, 4.2 및 6.0에서 NDMA생성억제능이 각각 37.8, 30.1 및 72.6%로 나타나 비투석성 melanoi-

Table 4. Inhibition of N-nitrosodimethylamine formation by L-ascorbic acid and glucose-lysine system nondialyzable melanoidins under different pH conditions

Sample	Amount of sample added, mg	Inhibition, %		
		pH 1.2	pH 4.2	pH 6.0
L-ascorbic acid	30	37.8	30.1	72.6
Melanoidins	30	36.5	24.1	57.9

din과 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다.

비투석성 melanoidin의 N-nitrosodimethylamine의 생성억제작용에 미치는 환원인자의 영향

비투석성 melanoidin의 NDMA생성억제에 관여하는 인자를 검색하기 위한 방법의 하나로 비투석성 melanoidin에 존재하는 환원능이 NDMA생성억제능에 미치는 영향을 검토하여 Table 5에 나타내었다. 그 결과 환원능이 소실되고 난 후의 비투석성 melanoidin의 NDMA생성억제능은 환원처리 전보다 NDMA생성억제능이 급격히 감소하였는데 glucose-lysine계 비투석성 melanoidin의 경우 환원능이 소실되기 전의 NDMA생성억제능이 pH 1.2에서 36.5%이고 환원능이 소실되고 난 후는 10.0%로 나타나 NDMA생성억제능이 70%정도 감소하였고 나머지 다른 시료에서도 이와 유사한 경향을 나타내었다.

Table 5. Effects of reducing ability on the inhibition of N-nitrosodimethylamine formation of nondialyzable melanoidins (NM)

Reaction systems	Nondialyzable melanoidins ^a	Inhibition, %		
		pH 1.2	pH 4.2	pH 6.0
Glucose-lysine	NM	36.5	24.1	57.9
	Reduced NM ^b	10.0	15.4	-
Glucose-arginine	NM	28.4	21.3	44.7
	Reduced NM	14.2	7.0	-
Glucose-glycine	NM	32.3	19.0	67.4
	Reduced NM	16.2	10.0	-
Glucose-histidine	NM	33.2	20.3	69.2
	Reduced NM	14.6	8.2	-

^a 300μl of NM and reduced NM were incubated with 2.9M NaNO₂ and 0.6M dimethylamine at 37° C for 1hr

^b Obtained from NM treated with NaBH₄ under alkaline pH condition

고 찰

화학물질중에는 생체내에서 산화적 대사에 의해 활성화되어 돌연변이원성이나 발암성을 나타내는 경우가 많다. 니트로사민도 그 중의 하나로서 생체내의 산화소수에 의하여 활성화 되면 diazoalkane ($\text{RCH}_2\text{-N}^+\equiv\text{N}$)으로 변환되고 이것이 alkyl cation (RCH_2^+)을 생성하는데 이러한 alkyl cation이 DNA를 알킬화 함으로써 발암성을 나타낸다고 한다¹⁰.

본 실험에서 식품의 가공, 저장 및 조리중에 식품성분간의 상호작용으로 용이하게 생성되는 Maillard반응생성물의 NDMA생성억제능을 검토한 결과, 공시한 Maillard반응생성물에 모두 NDMA의 생성억제 효과가 입증되었다. 니트로사민 생성은 pH의존성이 크므로 Maillard반응생성물에 의한 니트로사민의 생성억제 효과의 pH의존성을 검토한 결과, 아질산염 분해효과와는 달리¹¹ pH 6.0에서 억제효과가 높게 나타났고, pH 1.2와 pH 4.2에서는 서로 비슷한 억제효과를 보였다. 이는 아질산염 분해작용에서 나타난 것과는 상반된 결과로 보이지만 GLC분석결과, pH 1.2에서는 니트로소화 반응이 빨라, pH 1.2에서 니트로사민 생성량을 100으로 기준했을때, pH 4.2에서는 92, pH 6.0에서 10 정도로 나타나 니트로사민의 생성량도 많고, 시료 첨가 후에 나타나는 니트로사민생성억제 절대량도 많으므로, 실제로는 시료추출물에 의한 N-nitrosodimethylamine 생성억제효과는 pH 1.2에서 가장 크다는 것이 입증되었다. 또한, 본 실험에서 Maillard반응생성물이 나타내는 NDMA생성억제능이 어느 정도인가를 상대적으로 평가하기 위하여 NDMA의 생성억제제로서 널리 알려져 있는 ascorbic acid의 NDMA생성억제능과 비교 검토한 결과 ascorbic acid의 NDMA생성억제능과 비투석성 melanoidin의 NDMA생성억제능이 pH 1.2에서 동등한 효과를 가지고 있는 것으로 나타나서 그 억제효과가 뛰어나다는 것이 입증되었다.

Maillard반응생성물의 NDMA생성억제인자를 검토하기 위한 방법의 하나로 NaBH_4 로 시료의 환원능을 소실시킨 후 NDMA생성억제능을 본 결과, 환원능을 소실시키고 난 후의 시료에서 모두 환원능을 소실시키기 전보다 NDMA생성억제능이 크게 감소하는 것으로 나타나 이들 시료에 존재하는 환원능이 NDMA생성억제에 있어서 주요인자로서 관여한다는 것이 밝혀졌다. Kawabata 등¹²은 환원력이 강한 ascorbic acid의 NDMA생성억제에 관한 보고에서 HNO_2 -dimethylamine의 반응계에서 ascorbic acid가 한편으로는 NO_2^- 의 손실을

일으키고 다른 한편으로는 dimethylamine의 이온화를 촉진시켜서 NDMA생성억제에 관여한다고 보고하고 있다. 저자 등^{9,11}은 Maillard반응생성물의 아질산염 분해능이 강하다고 보고한 바 있고, 이들 아질산염 분해에는 Maillard반응생성물의 환원력이 관여한다고 밝힌 바 있다. Maillard반응생성물이 나타내는 NDMA생성억제기구도 ascorbic acid와 비슷하게 Maillard반응생성물의 환원능으로 인한 NaNO_2 의 분해 및 dimethylamine의 이온화 등으로 진행될 것으로 생각된다. 또한, Maillard반응생성물 중에는 최종생성물로서 melanoidin이 다량 함유되어 있고, 이들 melanoidin 역시 환원력 및 항산화력이 강하므로^{8,13} Maillard반응생성물의 아질산염 분해 및 NDMA생성억제에 melanoidin의 역할이 크다는 것이 본 실험을 통하여 밝혀졌다.

일반적으로 항산화능을 가진 화합물이 니트로사민의 생성억제에 커다란 효과가 있다는 것도 이미 알려져 있다²⁷. Melanoidin을 비롯하여 Maillard반응생성물의 항산화능도 저자 등¹³에 의하여 이미 보고된 바 있다.

이상의 결과로 미루어 보아 Maillard반응생성물에 의한 NDMA생성억제작용은 Maillard반응생성물에 존재하는 비투석성 melanoidin이 크게 관여하고 있으며 Maillard반응생성물이 나타내는 아질산염 소거능, 환원능 및 항산화성 등에 기인한다고 생각된다. 또한 식품성분간의 상호반응으로 glucose-아미노산 반응계에서 용이하게 생성되는 Maillard반응생성물의 NDMA생성억제효과가 우수한 것으로 밝혀져 식품 및 생체, 특히 위내에서의 발암성 니트로사민의 생성억제에 크게 기여한 것으로 기대된다.

요 약

Glucose-아미노산 (Lys, Gly, His, Arg)모델계 반응을 통해 생성된 Maillard반응생성물과 비투석성 melanoidin의 NDMA생성억제능에 대한 영향을 검토하였는데 그 결과를 요약하면 다음과 같다. 1. Maillard반응생성물과 비투석성 melanoidin의 모든 시료에서 NDMA생성억제능이 나타났으며, 환원능을 소실시키고 난 후의 NDMA생성억제능은 환원능이 소실되기 이전보다 1/2이하로 감소하여 이들 시료에 존재하는 환원능이 NDMA생성억제에 있어서 주요 인자로 나타났다. 2. Melanoidin과 ascorbic acid를 동량 첨가하였을 때, NDMA생성억제능은 ascorbic acid와 비슷한 경향을 나타내어 비투석성 melanoidin의 NDMA생성억제능이 우수한 것으로 나타났다. 3. Maillard반응생성물에

의한 NDMA생성억제작용은 Maillard반응생성물에 존재하는 비투석성 melanoidin이 크게 관여하고 이들 억제작용에는 Maillard반응생성물의 환원능이 크게 관여하는 것으로 나타났다.

문 헌

- Magee, P. N. and Barnes, J. M. : The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *J. Cancer*, **10**, 114 (1956)
- Mirvish, S. S. : Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.*, **44**, 633 (1970)
- Fan, T. Y. and Tannenbaum, S. R. : Natural inhibitors of nitrosation reactions. The concept of available nitrite. *J. Food Sci.*, **38**, 1067 (1973)
- Massey, R. C., Crews, C., Davis, R. and McWeeny, D. J. : A study of the competitive nitrosations of pyrrolidine, ascorbic acid, cystein and *p*-cresol in a protein based model system. *J. Sci. Fd. Agric.*, **29**, 815 (1978)
- Tanaka, K., Chung, K. C., Hayastu, H. and Kadal, T. : Inhibition of nitrosamine formation in vitro by ascorbic acid. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **16**, 209 (1979)
- Kurechi, T. and Kikukawa, K. : Nitrite reaction in aqueous system inhibitory effects on N-nitrosamine formation. *J. Food Sci.*, **44**, 1263 (1979)
- Gray, J. I., Reddy, S. K., Drice, J. F., Mandagere, A. and Wilkens, W. F. : Inhibition of N-nitrosamines in bacon. *Food Tech.*, **36**, 39 (1982)
- 김선봉 : Maillard 반응생성물의 화학적 해석과 생물작용. *식품과학*, **19**(3), 25 (1986)
- Kato, H., Lee, I. H., Chuyen, N. V., Kim, S. B. and Hayase, F. : Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1333 (1987)
- Barnes, J. M. and Magee, D. N. : Carcinogenic nitroso compounds. *Adv. Cancer Res.*, **10**, 163 (1967)
- 김선봉, 이동호, 염동민, 도정룡, 박영호 : Glucose-아미노산계 Maillard반응생성물의 아질산염 소거작용. *한국식품과학회지*, **20**(3), 453 (1988)
- Kawabata, T., Shazuki, H. and Ishibashi, T. : Effect of ascorbic acid on the formation of N-nitrosodimethylamine in vitro. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.*, **40**, 1251 (1974)
- 金善奎, 朴榮浩, 朴震宇, 早瀬文孝, 加藤博通 : D-glucose-glycine系 Maillard 反應生成物の 抗酸化作用. *韓水誌*, **20**(1), 52 (1987)

(1993년 12월 14일 접수)