

## Glutamine-Glucose Model System에서 가열조건별 반응생성물과 색의 변화

이 영 근

부산대학교 생명응용과학부

### Study of Reaction Products and Color Changes in Glutamine-Glucose Model System during Heating

Young-Guen Lee

School of Applied Life Science, Pusan National University, Gyeongnam 627-702, Korea

#### Abstract

The product formation and changes in color of glucose/glutamine model system were investigated in relation to heating temperature and time. The mixtures of glucose and glutamine in equal molar ratio were heated at 125, 150 and 175°C for 10, 20 and 30 minute, respectively. Acetic acid, butanoic acid, 2-butenic acid, di-(2-ethylhexyl)phthalate, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one and 5-hydroxymethylfurfural were identified as 6 major compounds, and 1,3-dimethylbenzene, 2-ethylhexanol, furfural, 5-methylfurfural, 2-pyrrolidinone, and 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one as 6 minor compounds by using GC/MS. The contents of acetic acid, 2-ethylhexanol and 2-pyrrolidinone increased with increased heating temperature and time, whereas the formation of the other 9 compounds increased up to heating conditions of 150°C for 10 or 20 min or 175°C for 10 min, and decreased dramatically with heating above those conditions. Color parameter  $L^*$  decreased with increasing heating condition, resulting in dark brown color in final products. Changes of redness parameter  $a^*$  and yellowness  $b^*$  showed similar to those of the contents of 9 compounds mentioned as above.

**Key words:** Maillard, glutamine, glucose, model reaction, color, GC/MS

#### 서 론

식품의 가공 및 저장 중 일어나는 비효소적 갈변반응의 하나인 Maillard반응은 식품의 색, 향 및 맛 등의 품질에 영향을 주는 중요한 반응이며(1,2), acrylamide 및 변이유발물질 형성 등 유해한 면도 있으나 항산화성 물질생성 등의 유익한 점도 부여하는 것으로 알려져 있다(3). 이러한 Maillard 반응은 아미노화합물과 카아보닐화합물간의 반응에서 기인하지만 매우 복잡하고 다양한 반응들의 조합으로 이루어져 있다. 지금까지 많은 모델실험 등을 통하여, 초기단계에서 아미노화합물의 유리아미노기가 당의 카아보닐기와 반응하여 Schiff염기를 형성한 후 곧 보다 안정한 Amadori화합물로 전환되고(4), 중간단계에서 자외선 흡수능이 있는 무색의 화합물들이 지속적으로 생성되며, 초기단계에서 생성된 Amadori화합물들은 형광성의 유색물질 및 가교결합의 중합체들을 생성하며(5-8), 최종단계에서 갈색의 melanoidin과 헤테로사이클화합물을 형성하는 것으로 알려져 있다(9). 그러나 Maillard반응은 온도, pH, 시간, 수분, 반응원료인 당과 아미노화합물의 종류 등 여러 요인에 의하여 반응경로와

생성물이 달라지는 복잡한 반응이어서(5,10) 아직도 많은 연구가 진행되고 있는 대상이다.

또한 Maillard반응에 의하여 진행되는 갈변에 관하여 최종산물인 갈색의 melanoidin이 가장 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있으나, 갈색의 형성과정과 melanoidin의 구조 등은 아직 대부분 밝혀지지 않고 있으며(1,11), 다만 Maillard반응 생성물의 갈색을 이용하여 항산화능(1,12) 또는 acrylamide의 생성(13,14)을 예측하는 부수적인 연구가 이루어지고 있다.

이와 같이 환원당과 아미노산의 Maillard반응의 생성과정 및 생성물의 종류에 관하여 연구방법의 차이에 따라 그 결과가 다르게 나타나고 있으며, 갈변에 관하여서는 다양한 연구가 아직 미흡하다고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 환원당과 아미노산의 Maillard반응에서 가열조건별 반응생성물들의 종류 및 함량변화를 분석하고, 이 반응생성물들이 갈색형성에 미치는 영향을 조사하고자, glucose-glutamine의 모델 시스템을 이용하여 가열온도 및 시간을 달리하여 반응시키고 여기에서 생성된 반응물을 2종의 capillary column을 사용하여 GC/MS로 분석하고, 반응물의 색상을 Hunter color-

imeter로 측정하여 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 모델반응

모델반응 생성물을 얻기 위하여, glutamine monohydrate (Merk Co., Germany) 1.46 g과 glucose(Sigma Co., St. Louis, USA) 1.80 g(molar ratio 1:1)을 200 mL 유리병에 취하여 혼합한 각 시료들에 1.0 mL 증류수를 가한 후, 125, 150 및 175°C의 온도에서 각각 10, 20 및 30분간 오븐에서 가열하였다. 막자사발을 이용하여 반응물을 분쇄하고 각 분쇄시료 300 mg씩의 시료를 취하여 100 mL의 ethyl acetate를 가하고, 500 ppm의 4-decanol(Aldrich Co., USA, 97%) 1 mL를 내부표준물질로 각각 첨가한 후, 30분간 초음파 처리를 하고 4시간동안 진탕추출을 하였다. 추출한 시료용액은 30 g의 무수황산나트륨으로 24시간동안 탈수시키고 뷰흐너깔대기를 이용하여 여과한 후, 회전감압농축기로써 5 mL로 농축하고 0.22 µm membrane filter로 여과한 것을 GC/MS 분석용 시험액으로 하였다.

### 반응생성물 분석

모델반응에서 생성되는 화합물들의 분석을 위하여, 시험액을 GC/MS(HP 6890 series GC system+ HP 5973 MSD, Hewlett Packard Co., USA)에서 FFAP-capillary column(free fatty acid phase; 30 m×0.32 mm i.d. fused silica capillary, film thickness 0.25 µm; J&W Scientific, Agilent, Waldbronn, Germany) 및 HP-5MS 5% phenyl methyl siloxane column(30m×0.25 mm i.d, film thickness 0.25 µm, Hewlett Packard, USA)을 사용하였고, carrier gas는 He(20 mL/min), 오븐 온도조건은 initial temp.(time) 70°C(5 min), rate는 5°C/min, final temp.(time) 220°C(5 min), injector temp. 250°C, interface temp. 240°C, 70 eV의 ionization voltage의 조건으로 분석하였다.

각 화합물들의 동정은 mass spectrum을 해석한 결과를 토대로 Willey library 및 문헌을 참고하였으며, 각 화합물의 정량은 각 피크의 면적을 내부표준물질인 4-decanol과 비교하여 아래의 계산식으로 산출하였으며, 이때의 response factor는 1로 가정하였다.

화합물의 농도(µg/g)={화합물의 피크면적×내부표준물질 첨가량(µg)×1,000}/(내부표준물질 피크면적×시료량(300 mg))

### 색 측정

시료의 색 측정(CIE  $L^* a^* b^*$  colour space)은 반응생성물 분말을 5 mm 두께로 고르게 편 후 Hunter colorimeter (Chroma meter CR-200, Minolta Co., Japan)로 측정하였으며, chromatic reference standard는 white C<sub>2</sub>-15222로 하였을 때 L=92.6, a=0.8, 그리고 b=0.322이었다. 그리고 총 색의

차(total color difference value,  $\Delta E$ )는 상법(15,16)에 따라 다음 식으로 구하였다.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

## 결과 및 고찰

모델반응물을 ethyl acetate로 추출하고, FFAP 또는 HP-5MS의 2종 capillary column으로 분리하여 GC/MS로 분석한 결과, Fig. 1과 같이 각 TIC(Total Ion Chromatogram)에서 18~27종의 peak들이 분리되었다. 분리된 각 peak들의 mass spectrum 해석 및 Willey library 조사결과에서 구조가 확인된 것은 FFAP capillary column에서 12종, 그리고 HP-5MS capillary column에서 6종의 화합물들이었다. 각 화합물의 code No.로 나타낸 바와 같이 column의 극성 차이에 따라 분리순서가 다르게 나타났으며, FFAP column에서는 HP-5MS column에서 확인된 6종의 화합물들 이외 6종의 화합물들이 더 검출되었다. 확인된 이 화합물들의 화학명, mass spectrometric data를 Table 1에 나타내었다. 표에 나타난 바와 같이, 확인된 화합물들은 1,3-dimethylbenzene과 di-(2-ethylhexyl)phthalate의 방향족화합물 2종, acetic acid, butanoic acid 및 2-butenic acid의 유기산 3종, 알코올류인 2-ethylhexanol, 당의 카라멜반응 생성물로 알려진 furfural, 5-methylfurfural 및 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF), 질소화합물인 2-pyrrolidinone 그리고 ketone류인

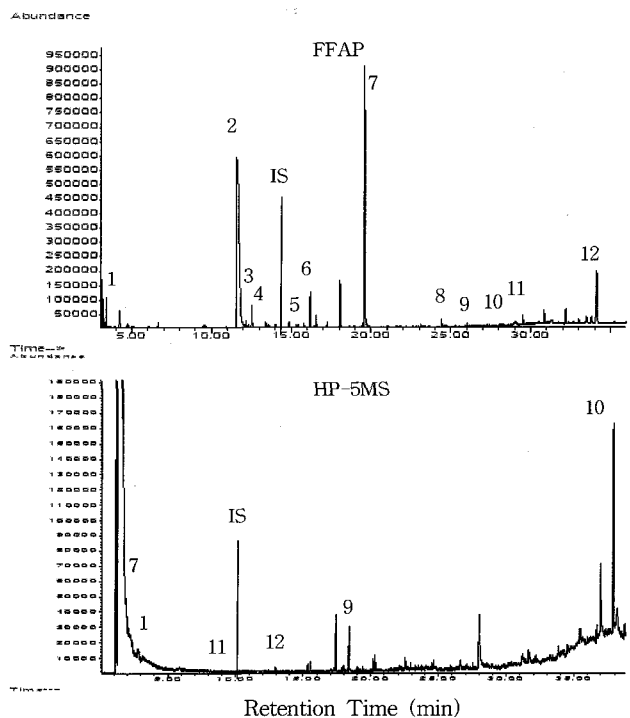


Fig. 1. A typical total ion chromatogram of a sample by GC/MS equipped with FFAP or HP-5MS capillary column.

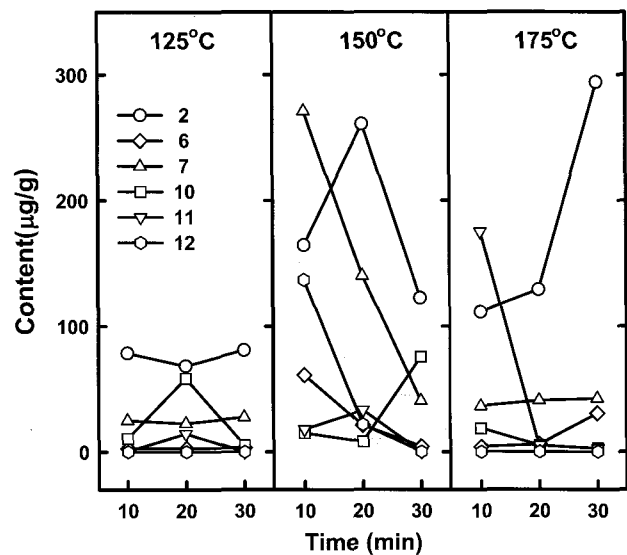
**Table 1. Mass Spectrometric data of compounds identified from the glutamine-glucose model reaction products**

Code	Compound	m/z (relative intensity)
1	1,3-dimethyl benzene	106(52), 105(28), 91(100), 77(13), 65(6), 62(3), 51(9)
2	acetic acid	60(90), 45(99), 43(100), 42(13), 29(12)
3	furfural	96(100), 95(91), 67(7), 40(14), 39(44), 29(15),
4	2-ethylhexanol	112(4), 98(10), 83(25), 70(26), 57(100), 43(44), 41(48), 29(13)
5	5-methylfurfural	110(100), 109(78), 81(10), 53(32), 50(11), 43(9), 39(7), 29(8)
6	butanoic acid	88(3), 73(44), 71(4), 60(100), 55(8), 45(12), 42(19), 41(18), 29(10)
7	2-butenic acid	86(100), 71(12), 69(39), 68(36), 45(22), 41(42), 39(43), 37(7), 29(6)
8	2-pyrrolidinone	85(100), 56(12), 44(22), 42(41), 41(40), 40(49), 39(6)
9	2,6-di (t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one	236(6), 221(13), 205(10), 193(10), 180(78), 165(100), 151(11), 137(44), 57(80)
10	di-(2-ethylhexyl)phthalate	279(21), 167(39), 149(100), 113(10), 83(8), 71(15), 57(23), 43(14)
11	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	144(68), 126(2), 115(3), 101(48), 73(28), 55(24), 44(51), 43(100)
12	5-hydroxymethylfurfural	126(66), 109(8), 97(100), 69(30), 53(16), 41(44), 39(37)

2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one과 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one이었다.

이들 중 acetic acid는 glucose의 C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> 결합 또는 C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> 결합의 개열로 형성되는 것으로 추측되며(17), 이와 마찬가지로 butanoic acid 및 2-butenic acid의 유래도 glucose 또는 glucose와 아미노산이 결합한 N-glycosylamine의 C-C 개열에 의하여 형성된 것으로 추정되었다. Maillard반응의 주요 생성물인 furfural과 5-HMF는 N-glycosylamine 또는 N-fructosylamine이 Amadori전이를 거치고 탈아미노반응으로 생성된 deoxyosones에서 파생되며(2,17), 아미노화합물이 없어도 탄수화물의 산 가수분해로도 형성되는 것(18)으로 알려져 있다. 그리고 2-pyrrolidinone은 당과 아미노산의 모델반응을 이용한 여러 연구결과들(1,3,4,10,11,19,20)에서 검출된 적이 없었으나 감자즙의 가열과정에서 검출되었다는 보고(21)가 있어 본 연구결과와 일치하였다.

모델반응에서 분리 확인된 화합물들의 가열조건별 함량변화를 Fig. 2와 3에 나타내었다. 함량이 50 µg/g 이상인 다량 화합물들의 함량변화를 나타낸 Fig. 2에서 전반적으로 가장 생성량이 많은 화합물은 acetic acid이며, 가열온도가 높을수록 그리고 오래 가열할수록 대체로 증가하였으나, 2-butenic acid는 150°C에서 10분간 가열하였을 때를 정점으로 온도와 시간을 증가할수록 감소되어 가열의 증가에 의하여 분해되거나 고분자의 타 화합물에 고착되는 것으로 추측되었다. 그리고 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one는 125°C에서보다 150°C로 가열온도가 높을수록 조금씩 증가하지만 시간의 영향은 거의 받지 않다가 175°C에서 10분간 가열시 최대량인 175 µg/g이 생성된 후 시간이 지날수록 급격히 감소되었다. 이 화합물은 당의 탈수 및 2,3-enol화로 생성되고 Maillard반응 생성물이며 maltol과 2-methyl-3,5-dihydroxy-4H-pyran-4-one의 주요한 전구체로 알려져 있어(17,18), 175°C의 고온에서 다량 생성된 이 화합물이 가열시간의 경과에 따라 신속하게 전환되는 것으로 추정할 수 있지만 전환 생성물로 제시한 두 화합물들을

**Fig. 2. Effect of heating condition on the content of major compounds identified from model reaction products.**

Symbol abbreviation represents compound code as, 2: acetic acid, 6: butanoic acid, 7: 2-butenic acid, 10: di-(2-ethylhexyl)phthalate, 11: 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one, 12: 5-hydroxymethylfurfural.

본 연구결과에서는 확인할 수 없었다.

미량으로 검출된 6종 화합물들의 가열조건별 함량변화를 Fig. 3에서 보면, 125°C에서는 대부분 화합물들의 생성량이 적었으며, 1,3-dimethylbenzene의 경우 150°C 10분간에서 최대량을 생성하고 그 이후 시간의 경과에 따라 급속하게 감소하며 175°C에서는 거의 소멸되었고, 2-ethylhexanol도 150°C 10분간을 정점으로 시간의 증가에 따라 점차 감소하지만 175°C에서는 오래 가열할수록 다소 증가하였다. 그밖에 furfural, 5-methylfurfural 및 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one의 경우 150°C 20분간을 정점으로 최대량을 생성하였는데, furfural류가 여러 가지 휘발성화합물의 전구체라고 제안한 Shibamoto(22)의 보고를 감안하면 생성된 furfural류가 2차적 반응에 의하여 타 화합물로 전환되어가는 것으로 추정된다.

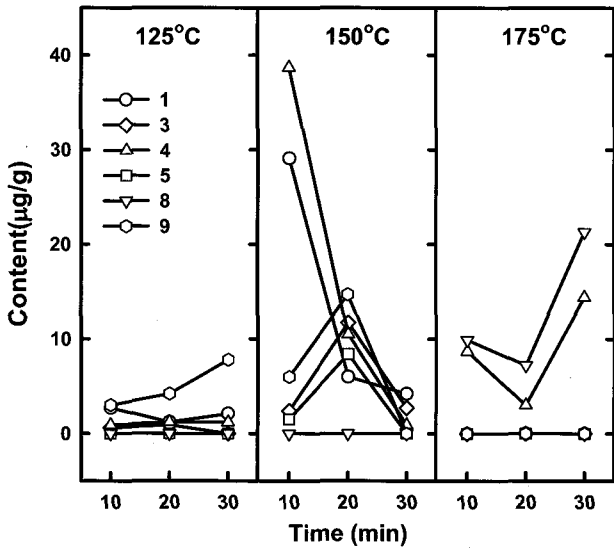


Fig. 3. Effect of heating condition on the content of minor compounds identified from model reaction products. Symbol abbreviation represents compound code as, 1: 1,3-dimethyl benzene, 3: furfural, 4: 2-ethylhexanol, 5: 5-methylfurfural, 8: 2-pyrrolidinone, 9: 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one.

Glucose와 glutamine의 모델시스템에서 가열온도와 시간을 달리하여 생성된 반응물의 색을 Hunter값으로 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다. L\*값은 흑색의 0에서 백색의 100까지의 범위를 나타내는 값으로, 예측한바와 같이 온도와 시간의 증가에 따라 반응생성물의 L\*값 감소가 뚜렷하게 나타났지만 150°C에서 20분 이상 그리고 175°C에서는 시간이 경과하여도 감소속도는 크게 둔화되었다. 녹색과 적색을 나타내는 a\*값은 -80(녹색)과 +100(적색)의 범위를 갖는 것으로 그림과 같이 125°C에서는 가열시간이 10분에서 20분까지 경과함에 따라 적색이 증가하지만 20분 이후에는 증가속도가 완만하고 150 및 175°C에서는 20분 및 10분을 각각 정점으로 증가에 연이어 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Maillard반응에서 a\*값은 초기에 증가 후 감소하며 이 값이 반응의 중간체들에 의하여 발현된다고 제시한 Pedreschi 등의 보고(14)와 일치하였다. 청색(0)과 황색(+70)을 나타내는 b\*값은 실험의 모든 온도에서 가열초기에 증가하다가 10분 또는 20분 이후 크게 감소하여 b\*값 역시 반응초기에 생성되다가 반응경과에 따라 타 화합물, 특히 melanoidin류와 같은 중합체로 전환될 반응중간체에 의하여 나타나는 것으로 추정된다. Maillard반응에 의한 색 형성에 관하여 Fogliano 등(11)은 반응 중 형성된 저분자의 유색물질은 곧 고분자의 중합체에 고착된다고 하였으며, Hofmann(23)은 구체적으로 단백질에 가교결합을 한다고 하였다. 따라서 본 실험의 결과에서도 나타난 바와 같이, 가열할수록 증가하는 Maillard반응 생성물의 암갈색은 적색과 황색을 나타내는 a\*값과 b\*값이 아닌 L\*값에 의하여 표현된다고 생각된다.

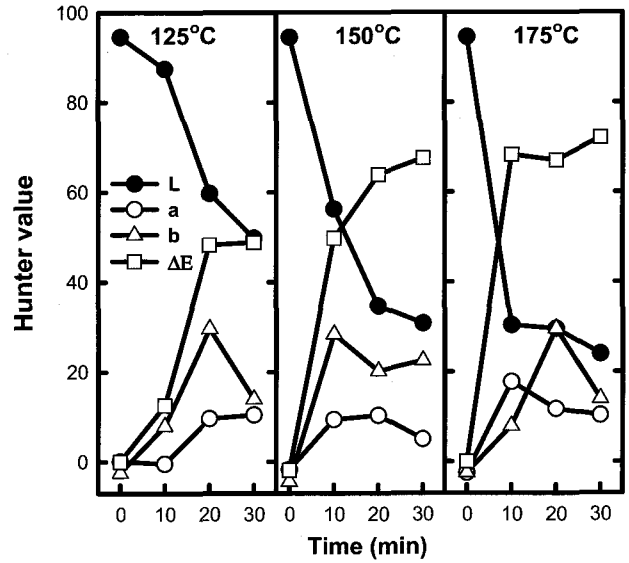


Fig. 4. Changes in Hunter color value and total color difference value ( $\Delta E$ ) of glutamine-glucose model reaction products at various heating conditions.

그리고, 모델반응 생성물의 Hunter값들의 변화를 Fig. 2와 3에 나타난 반응생성물의 함량변화와 비교하면 반응온도와 시간의 증가에 따라 전반적으로 함량이 증가한 acetic acid, 2-ethylhexanol 및 2-pyrrolidinone을 제외한 나머지 9종의 화합물들은 저온에서 생성량이 적었다가 최대 생성된 150°C, 10분 및 20분 또는 175°C의 10분간 가열을 정점으로 온도를 높이거나 시간을 늘릴수록 감소하여, Hunter a\* 및 b\*값의 변화 양상과 유사한 것으로 나타났다. 따라서 이 9종의 화합물들은 반응초기 및 중기의 적색과 황색의 증가에 기여하다가 후기에 고분자의 화합물에 고착되어 흑색을 발현하는 것으로 추정되었다.

요 약

Glucose-glutamine 모델반응에서 생성물의 종류와 갈변에 의한 색의 변화를 조사하기 위하여, 가열조건을 125, 150 및 175°C에서 각각 10, 20 및 30분간 가열하고 반응물의 색을 Hunter colorimeter로 측정 후, ethyl acetate로 추출하여 GC/MS로 생성물을 분석하였다. GC/MS 분석에서 acetic acid, butanoic acid, 2-butenic acid, di-(2-ethylhexyl) phthalate, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one 및 5-hydroxymethylfurfural의 6종의 다량 생성물과 1,3-dimethylbenzene, 2-ethylhexanol, furfural, 5-methylfurfural, 2-pyrrolidinone 그리고 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one 6종의 미량 생성물이 확인되었다. 최대 생성물인 acetic acid와 미량 생성물인 2-ethylhexanol 및 2-pyrrolidinone은 온도 및 가열시간의 경과에 따라 전반적으로 증가하였으나, 그 외 9종의 화합물들은 125°C부터 생성량이 증가하지만 150°C 또는

175°C를 정점으로 그 이상 온도, 또는 가열시간을 증가할수록 생성량은 감소하였다. 반응생성물의 Hunter L\*값은 온도 및 시간의 증가에 따라 지속적으로 감소하여 암색이 반응의 최종산물에 의한 색으로 나타났으며, a\* 및 b\*은 125°C에서 낮고 150°C 또는 175°C, 10분에서 최고점을 나타낸 후 온도 및 시간의 증가에 따라 감소하여 적색과 황색은 반응 중간생성물에 의한 발현이며 반응후기에는 고분자의 화합물에 고착되어 암색을 발현하는 것으로 추정되었으며, 가열조건의 변화에 따른 a\* 및 b\*값의 변화는 앞서 언급한 9종 화합물들의 생성 변화와 유사하였다.

### 감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

### 문헌

- Sumaya-Martinez MT, Thomas S, Linard B, Binet A, Guerard F. 2005. Effect of Maillard reaction conditions on browning and antiradical activity of sugar-tuna stomach hydrolysate model system. *Food Research International* 38: 1045-1050.
- Van Boekel MAJS. 2006. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances* 24: 230-233.
- Ajandouz EH, Tchiakpe LS, Ore F, Benajiba A, Puigserver A. 2001. Dose effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *J Food Science* 66: 926-931.
- Jing H, Kitts D. 2002. Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1007-1015.
- Ames JM. 1990. Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends in Food Sci Technol* 1: 150-154.
- Morales FJ, Romero C, Jimenez-Perez S. 1996. Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. *Food Chemistry* 57: 423-428.
- Van Boekel MAJS. 1998. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry* 62: 403-414.
- Van Boekel MAJS. 2001. Kinetic aspects of the Maillard reaction; A critical review. *Nahrung* 45: 150-159.
- Friedman M. 1996. Food browning and its prevention; An overview. *J Agric Food Chem* 44: 631-653.
- Wijewickreme AN, Krejpcio Z, Kitts DD. 1999. Hydroxyl scavenging activity of glucose, fructose, and ribose-lysine model Maillard products. *J Food Science* 64: 457-461.
- Fogliano V, Monti SM, Musella T, Randazzo G, Ritieni A. 1999. Formation of coloured Maillard reaction products in a gluten-glucose model system. *Food Chemistry* 66: 293-299.
- Morales FJ, Jiménez-Pérez S. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry* 72: 119-125.
- Pedreschi F, Moyano P, Kaak K, Granby K. 2005. Color changes and acrylamide formation in fried potato slices. *Food Research International* 38: 1-9.
- Pedreschi F, Kaak K, Granby K. 2006. Acrylamide content and color development in fried potato strips. *Food Research International* 39: 40-46.
- Berns RS. 2001. *Principles of color technology*. 3rd ed. John Wiley & Sons Inc., New York. p 82-87.
- John W. 1980. *Developments in food colours-1*. Applied Science Publishers Ltd., London. p 27-45.
- Kim SB, Park YH. 1986. Maillard reaction products formed from D-glucose-glycine, system and their formation mechanism. *Bull Korean Fish Soc* 19: 45-51.
- Shaw PE, Tatum JH, Berry RE. 1967. Acid-catalyzed degradation of D-fructose. *Carbohydr Res* 5: 266-273.
- Yaylayan VA, Haffenden Luke JW. 2003. Mechanism of imidazole and oxazole formation in [<sup>13</sup>C-2]-labelled glycine and alanine model systems. *Food Chemistry* 81: 403-409.
- Hofmann T. 1998. Characterization of the chemical structure of novel colored Maillard reaction products from furan-2-carboxaldehyde and amino acids. *J Agric Food Chem* 46: 932-940.
- Dauids SJ, Yaylayan VA, Turcotte G. 2003. Effect of thermal treatment of incubated potato juice on the formation of Maillard volatiles. *International J Food Sci Technol* 38: 849-856.
- Shibamoto T. 1980. Heterocyclic compounds found in cooked meats. *J Agric Food Chem* 28: 237-243.
- Hofmann T. 1998. 4-Alkylidene-2-imino-5-[4-alkylidene-5-oxo-1,3-imidazol-2-ynyl] aza-methylidene-1,3-imidazoline. A novel colored substructure in melanoidins formed by Maillard reaction of bound arginine with glyoxal and furan-2-carboxaldehyde. *J Agric Food Chem* 46: 3896-3901.

(2006년 5월 9일 접수; 2006년 6월 1일 채택)