

## Maillard 반응에서 유래되는 저분자 Carbonyl 화합물의 DNA 손상작용에 대한 활성산소종의 역할

김선봉 · 박성준\* · 강진훈\*\* · 변한석 · 박영호

부산수산대학교 식품공학과

\*오뚜기 중앙연구소

\*\*고신대학 식품영양학과

## Role of Active Oxygens on DNA Damage by Low Molecular Carbonyl Compounds Derived from Maillard Reaction

Seon-Bong Kim, Seong-Jun Park\*, Jin-Hoon Kang\*\*  
Han-Seok Byun and Yeung-Ho Park

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

\*Ottogi Research Center, Anyang

\*\*Department of Food and Nutrition, Kosin University, Pusan

### Abstract

The role of the active oxygens on plasmid DNA damage by carbonyl compounds derived from Maillard reaction was investigated. Plasmid DNA extracted from *E. coli* Hb101 was reacted with carbonyl compounds, such as glyoxal, methyl glyoxal, dihydroxyacetone, diacetyl, glyceraldehyde, glycolaldehyde and furfural with and without the active oxygen scavengers at 37°C for 6 hours, and then the degree of damage was determined by using 1% agarose gel electrophoresis. All of the carbonyl compounds except furfural caused to damage of DNA. Among these, glyoxal, methyl glyoxal and dihydroxyacetone markedly induced the damage of DNA. On the other hand, the DNA damage by the carbonyl compounds was greatly inhibited by catalase, superoxide dismutase and  $\alpha$ -tocopherol it is considered that the damage of DNA is due to active oxygens, such as singlet oxygen, hydrogen peroxide and superoxide anion generated during the autoxidation of carbonyl compounds.

Key words : DNA, low molecular carbonyl compounds, active oxygen, active oxygen scavengers.

### 서 론

식품의 가공 및 저장중에 있어서 식품성분간의 대표적 반응이라고 할 수 있는 Maillard 반응의 생성물은 식품의 향미, 색택 및 보존성 등에 관여할 뿐만 아니라 성인병 및 노화와도 관여하는 것으로

밝혀지고 있어<sup>1)</sup> 크게 주목이 되고 있다.

특히, 이 반응의 주요생성물로서는 고분자의 melanoidin을 비롯하여 저분자의 카르보닐화합물 및 reductone류 등을 들 수 있는데<sup>2)</sup> 이들 생성물들은 산화하게 되면 각종 활성산소종, 즉 superoxide anion( $\cdot O_2^-$ ), 일중항산소( $^1O_2$ ), 과산화

수소( $H_2O_2$ ) 및 수산라디칼( $\cdot OH$ ) 등이 생성된다고 알려지고 있다<sup>3)</sup>. 특히 식품 및 생체내에 있어서 각종 산화환원반응으로 생성되는 활성산소종은 DNA의 손상작용에 관여하는 것으로 밝혀지고 있어<sup>4)</sup> 많은 연구자들에 의하여 관심의 대상이 되고 있다.

즉, Morita 등<sup>4)</sup>은 합성다당류에 의한 bacteriophage  $\phi\times 174$ 의 불활성화는 DNA의 가지절단에 기인하며 이러한 작용에는 과산화수소, superoxide anion, 일중항산소 등이 관여한다고 보고하였다. 또한 Morita 등<sup>5)</sup>은 D-fructose 6-phosphate의 bacteriophage  $\phi\times 174$ 의 불활성화작용에 과산화수소가 크게 관여한다고 하였으며, Morita와 Komano<sup>6)</sup>는 bacteriophage  $\phi\times 174$  DNA를 추출하여 D-fructose 6-phosphate, D-ribose 5-phosphate, 2-amino-2-deoxy-D-glucose 6-phosphate 등의 sugar phosphate와 반응시킨 결과 이들 sugar phosphate종들은 추출한 supercoil상태의 이중나선구조인 상기 phage DNA의 single strand scission에 주로 관여하며 거기에는 superoxide anion과 과산화수소가 크게 관여한다고 보고한 바 있다. 한편 柏村과 森田<sup>3)</sup>은 reductone류의 자동산화에 의하여 생성된 활성산소가 DNA손상작용을 나타내며 이를 reductone류의 자동산화는 1,2-enediol anion을 거쳐 진행되는데 이때 활성산소종이 생성된다고 보고하였다. 그리고 Bucala 등<sup>7)</sup>은 환원성당류가 collagen 및 DNA와作用하여 손상작용을 나타냄으로써 노화를 촉진한다고 하며 이러한 작용에는 환원성당류의 자동산화에 의해 생성되는 활성산소종이 크게 관여한다는 것을 확인한 바 있다. 또한, 활성산소종은 上記한 카르보닐화합물이나 reductone의 산화에 의해서 뿐만 아니라 지질의 자동산화에 의해서도 생성되어<sup>8-11)</sup> 생체단백질 및 DNA에도 손상을 일으키는 것으로 밝혀졌다<sup>12-15)</sup>.

이상과 같이 활성산소종은 다양한 경로를 통하여 생성될 뿐만 아니라 생리적유해작용의 범위도 넓고 일단 생성되면 기타 식품 및 생체성분의 변화를 빠른 시간내에 일으키기 때문에 이들의 생성의 억제나 DNA손상기구 및 억제에 대한 연구가 시급하다고 하겠다.

따라서 본 연구에서는 Maillard반응에서 유래되는 물질로 알려진 저분자카르보닐화합물을 DNA와 반응시키고 이들의 반응계에 활성산소소거제를 첨가하여 이들 화합물의 DNA 손상작용 및 활성산소종의 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 카르보닐화합물로서 diacetyl, dihydroxyacetone 및 methyl glyoxal(40% in water)은 半井化學藥品(株)(일본)에서, glyoxal(40% in water), furfural 및 glyceraldehyde는 東京化成工業(株)(일본)에서, glycolaldehyde는 Sigma Chem. Co.(USA)에서 구입하여 0°C냉장고에 보관하였다가 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.8)로 농도별로 제조하여 사용하였다. 한편, 활성산소소거제로서 catalase(E. C. 1. 11. 1. 6)는 Sigma Chem. Co.(USA)에서, superoxide dismutase(SOD, E. C. 1. 15. 1. 1)는 Toyobo Chem. Co.(日本),  $\alpha$ -tocopherol은 U.S. Biochem. Co.(USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 실험방법

#### 1. Plasmid DNA의 추출

본 실험에 공시한 *E. coli* Hb 101 plasmid pBR 322 DNA는 Alkaline-SDS法<sup>16)</sup>을 이용하여 추출하였다.

#### 2. DNA와 카르보닐화합물의 반응

상기 조작으로 얻은 DNA(36mg/ml)를 0.1M의 카르보닐화합물과 37°C의 incubator内에서 6시간 반응시켜서 DNA의 손상정도를 전기영동하여 agarose gel상에서 측정하였다. 또한, DNA와 카르보닐화합물의 반응계에 catalase를 1 $\mu$ g/ml, superoxide dismutase를 2 $\mu$ g/ml,  $\alpha$ -tocopherol을 1.5 mM 및 mannitol을 10mM 및 50mM로 조절하여 37°C의 incubator에서 6시간 반응시켜서 DNA의 손상억제정도를 측정하였다.

### 3. DNA 손상의 저해율측정

활성산소소거제의 DNA손상억제효과는 전기영동이 끝난 후 agarose gel상에서 손상을 받지않은 DNA를 gel하단에 만들어 놓은 흄에서 micropipette으로 일정량 분취하여 260nm에서 흄광도를 측정하고 손상을 받지않고 잔존하는 DNA의 양을 대조구에 대한 백분율로서 나타내었다.

### 4. Agarose gel전기영동

Agarose gel 전기영동은 Dillon 등<sup>17)</sup>의 방법에 따라 1% agarose gel을 사용하여 실시하였다.

## 결 과

### 카르보닐화합물의 DNA손상작용

카르보닐화합물인 furfural, dihydroxyacetone, diacetyl, glycolaldehyde, glyoxal, methyl glyoxal 및 glyceraldehyde를 DNA와 반응시켜서 DNA의 손상정도를 Fig. 1 및 Table 1에 각각 나타내었다. DNA만의 반응계(대조구)에서는 DNA(band I)가 거의 손상을 받지 않은 것으로 나타났으나 furfural을 제외한 다른 카르보닐화합물과의 반응계에서는 DNA가 상당히 손상되는 것으로 나타났다. 즉 furfural을 반응시킨 경우 DNA(band I)가 대조구와 같이 거의 손상되지 않은 상태로 검출된 반면, dihydroxyacetone, glyoxal과 methyl glyoxal의 경우에는 band I 이 대부분 손상을 받았다. 한편, diacetyl, glycolaldehyde, glyceraldehyde 등의 경우는 다소 약하나 DNA손상작용이 있는 것으로 나타났다.

따라서 본 실험에 공시한 카르보닐화합물 중 dihydroxyacetone, glyoxal 및 methyl glyoxal이 DNA손상작용이 가장 커으며 furfural은 DNA손상작용이 거의 없는 것으로 나타났다.

### 카르보닐화합물의 DNA손상작용에 대한 활성산소종의 영향

Superoxide dismutase(SOD), catalase 및  $\alpha$ -tocopherol을 DNA와 카르보닐화합물의 반응계에 첨가하여 DNA의 손상에 대한 활성산소종의 영

향을 Fig. 2 및 Table 2에 각각 나타내었다.

Fig. 2는 DNA손상작용이 비교적 크게 나타난 카르보닐화합물과 DNA의 반응계에 catalase를 첨가하여 반응시킨 반응물을 1% agarose gel 전기영동을 실시하여 나타낸 것이다. DNA만의 대조구(lane 1)에서는 DNA가 거의 손상을 받지 않은 상태로 나타난데 반하여 dihydroxyacetone, glyoxal 및 methyl glyoxal을 첨가한 반응계에서는 DNA가 손상되는 것으로 나타났다. 반면에 이를 반응계에 과산화수소소거제인 catalase를 첨가한 경우 공시한 카르보닐화합물의 DNA손상작용은 크게 억제되었다.

또한 카르보닐화합물의 DNA손상에 있어서 활성산소종의 관여를 구체적으로 밝히기 위하여 카르보닐화합물과 DNA의 반응계에 catalase, SOD,  $\alpha$ -tocopherol 및 mannitol을 첨가하여 이들의 DNA손상억제율을 Table 2에 나타내었다. 그 결과 카르보닐화합물의 DNA손상작용에 대하여 활성산소소거제인 catalase, SOD,  $\alpha$ -tocopherol 및 mannitol이 억제효과를 나타내었는데 사용된 활성산소소거제 중 mannitol에서는 억제효과가 미약하였으나 catalase, SOD,  $\alpha$ -tocopherol은 DNA손상억제효과가 다소 큰 것으로 나타났다.

## 고 찰

활성산소종이 DNA의 손상작용에 관여한다는 것은 당질유도체<sup>4-6)</sup>, reductone과 SH화합물<sup>3)</sup>, mitomycin C<sup>18)</sup> 및 지질산화생성물<sup>11, 13, 15)</sup>과 DNA와의 반응을 통하여 밝혀져서 식품 및 생체성분의 산화분해, 면역, 노화나 발암 등과도 상관성이 있는 것으로 알려지고 있다.

본 연구에서는 식품의 가공, 저장 및 조리중에 Maillard반응으로 생성되는 glyoxal, methyl glyoxal, dihydroxyacetone, furfural, glycolaldehyde 및 diacetyl 등의 저분자 카르보닐화합물의 DNA손상작용을 검토한 결과, furfural을 제외한 카르보닐화합물에 DNA손상작용이 나타났고(Fig. 1, Table 1), 특히, dihydroxyacetone, glyoxal 및 methyl glyoxal은 DNA 손상작용이 큰 것으로 밝혀졌다. 이를 methyl glyoxal 등의 저분자 카르보닐화합

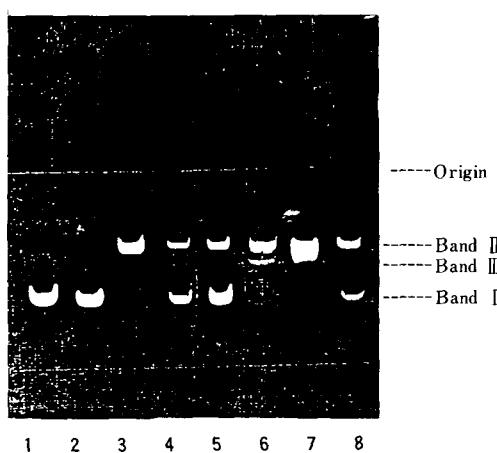


Fig. 1. Agarose gel electrophoretic patterns of plasmid pBR 322 DNA strand scission by carbonyl compounds.

Plasmid DNA was reacted with 0.1M carbonyl compounds at 37°C for 6 hours in 0.05M Tris-HCl buffer (pH 7.8).

- 1, DNA alone ; 2, DNA + furfural ; 3, DNA + dihydroxyacetone ; 4, DNA + diacetyl ; 5, DNA + glycolaldehyde ; 6, DNA + glyoxal ; 7, DNA + methyl glyoxal ; 8, DNA + glyceraldehyde.

Table 1. Residual amounts of intact DNA in the reaction systems of DNA and carbonyl compound

Carbonyl compounds	Residual amounts, %
Dihydroxyacetone	7.5
Diacetyl	47.3
Glycolaldehyde	53.2
Glyoxal	6.2
Methyl glyoxal	3.6
Glyceraldehyde	36.2
Furfural	98.0

Table 2. Effect of active oxygen scavengers on DNA damage by carbonyl compounds

Active oxygen scavengers	DNA damage inhibition, %		
	Dihydroxyacetone	Glyoxal	Methyl glyoxal
Catalase	68.2	43.4	50.0
Superoxide dismutase	52.7	48.1	75.3
α-Tocopherol	38.6	37.4	26.4
Mannitol	13.2	22.7	6.3

물은 Maillard반응에 의한 당의 탈수 및 분해와 strecker분해반응에 의하여 생성<sup>2)</sup>될 뿐만 아니라 지질의 산화분해나 식품의 발효에 의해서도 생성되어<sup>19)</sup> 식품의 기호성에 관여하기도 한다. 또한 methyl glyoxal 등은 생체내에서 당대사 중간생성물로서도 널리 알려지고 있다<sup>20)</sup>.

이와 같이 식품 및 생체내에서 성분상호간의 작용에 의하여 생성된 저분자 카르보닐화합물의 DNA손상작용에 있어서 활성산소종의 영향을 밝히기 위하여 superoxide anion소거제(SOD), 일중항산소소거제( $\alpha$ -tocopherol) 및 과산화수소소거제(catalase) 등의 활성산소소거제를 카르보닐화합물과 DNA와의 반응계에 첨가한 결과, DNA손

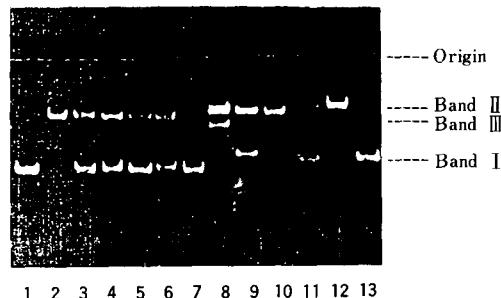


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic patterns of plasmid pBR 322 DNA strand scission by carbonyl compounds with and without catalase.

Final concentrations of carbonyl compounds and catalase are 0.1M and 1 $\mu$ g/ml.  
 1, DNA alone ; 2, DNA + dihydroxyacetone ; 3, 2 + catalase ; 4, DNA + diacetyl ; 5, 4 + catalase ; 6, DNA + glycolaldehyde ; 7, 6 + catalase ; 8, DNA + glyoxal ; 9, 8 + catalase ; 10, DNA + methyl glyoxal ; 11, 10 + catalase ; 12, DNA + glyceraldehyde ; 13, 12 + catalase.

상작용이 크게 억제되는 것으로 밝혀졌으나, 수산라디칼소거제(mannitol)를 첨가한 경우에는 DNA손상억제효과가 적은 것으로 밝혀졌다(Fig. 2, Table 2).

따라서, 카르보닐화합물의 DNA손상작용에는 이들 화합물의 자동산화과정중에 생성되는 superoxide anion, 일중항산소 및 과산화수소 등이 관여하는 것으로 밝혀졌고, 수산라디칼은 크게 관여하지 않는 것으로 나타났다. Brown과 Fridovich<sup>21)</sup>는 환원당으로부터 유래한 활성산소종의 DNA손상 mechanism실험에서 수산라디칼이 DNA내의 공유결합을 절단한다고 하였고, Cadet와 Teoule<sup>22)</sup>은 수산라디칼이 비특이적으로 pyrimidine에, 일중항산소는 guanine염기에 반응한다고 보고하고 있으나, 본 실험에서는 수산라디칼의 작용이 미약한 것으로 보아, 이의 생성량이 적은 것으로 생각된다.

한편, 카르보닐화합물의 DNA손상작용에는 활성산소종 이외에 카르보닐화합물과 DNA와의 직접작용에 의한 부가체의 생성에 의한 DNA 손상작용도 이와 관련되리라고도 생각된다.

## 요 약

Plasmid pBR322 DNA와 Maillard 반응생성물 중 카르보닐화합물인 glyoxal, methyl glyoxal, dihydroxyacetone, diacetyl, glyceraldehyde, glycolaldehyde 및 furfural 등과 각각 37°C에서 반응시켰을 때 나타나는 DNA 손상능과 활성산소소거제에 의한 DNA손상억제작용을 agarose gel 전기영동을 통하여 살펴 보았다. 카르보닐화합물을 37°C에서 6시간 동안 반응시켰을 경우, furfural을 제외한 모든 카르보닐화합물에 DNA손상능이 나타났는데, 그 중에서도 glyoxal, methyl glyoxal 및 dihydroxyacetone 이 diacetyl, glyceraldehyde 및 glycolaldehyde보다 DNA의 손상능이 크게 나타났다. 또한 plasmid DNA와 카르보닐화합물의 반응계에 각종 활성산소소거제의 첨가를 통하여 이들 카르보닐화합물에 대한 DNA의 손상을 검토한 결과 일중항산소, 과산화수소, superoxide anion 등이 주요원인물질로 밝혀졌으며, hydroxyl radical은

그 작용이 미약하거나 거의 영향을 나타내지 않는 것으로 나타났다.

## 문 헌

1. Kim, S. B., Hayase, F. and Kato, H. : Desmutagenic effect of  $\alpha$ -dicarbonyl and  $\alpha$ -hydroxycarbonyl compounds against mutagenic heterocyclic amines. *Mutation Res.*, 177, 9(1987)
2. Hodge, J. E., Millis, F. D. and Fisher, B. E. : Compounds of browned flavor derived from sugar-amine reaction. *Cereal Sci., Today*, 17, 34(1973)
3. 柏村直樹・森田潤可：核酸を切断する糖質誘導體。有機合成化學, 42, 523(1984)
4. Morita, J., Kashimura, N. and Komano, T. : The mechanism of inactivation of bacteriophage  $\phi$ X174 by autoxidizable synthetic polysaccharides. *Agri. Biol. Chem.*, 44(12), 2971 (1980a)
5. Morita, J., Kashimura, N. and Komano, T. : Inactivation of bacteriophage  $\phi$ X174 by D-fructose 6-phosphate. *Agri. Biol. Chem.*, 44(4), 883(1980b)
6. Morita, J. and Komano, T. : Induction of strand break in DNA by reducing sugar phosphate. *Agri. Biol. Chem.*, 47(1), 11(1983)
7. Bucala, R., Model, P. and Cerami, A. : Modification of DNA by reducing sugar. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 105(1984)
8. 宮川高明：酸素酸化反応とその機構。 *New Food Industry*, 26, 49(1984)
9. Kellogg, E. W. and Fridovich, I. : Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.*, 250(22), 8812(1975)
10. Tien, M., Svingen, B. A. and Aust, S. D. : Superoxide dependent lipid peroxidation. *Federation Proceedings*, 40(2), 179(1981)
11. 강진훈, 염동민, 최수안, 김선봉, 박영호 : Linoleic acid 산화에 의한 활성산소종의 생성. *한국식품과학회지*, 19, 471(1987)
12. Asada, K. : Damage of protein by active oxygen. *Nippon Noyekagaku Kaishi*, 62(7), 1100 (1988)
13. 김선봉, 강진훈, 이용우, 김인수, 박영호 : Linoleic acid 산화생성물의 DNA 손상작용에 있어서의 활성산소종의 역할. *한국식품과학회지*, 19, 311(1987)
14. 中山勉・兒玉昌彦：發癌・制癌と活性酸素。

- 化學と生物, 23, 771(1985)
15. 김선봉, 강진훈, 박영호 : 지질산화생성물의 DNA손상작용과 그 억제기구. 한국수산학회지, 20, 419(1987)
  16. Rodriguez, R. L. and Tait, R. C. : Rapid isolation of plasmid DNA(miniscreen). In "Recombinant DNA techniques : An Introduction", Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts, p. 50(1983)
  17. Dillon, J. R., Benzonson, G. S. and Yeung, K. H. : Gel electrophoresis. In "Recombinant DNA Methodology", Dillon, J. R., Nasin, A. and Nestman, E. R.(eds.), Willy and Sons Inc., New York, p. 13(1985)
  18. Ueda, K. and Komano, T. : Induction of single strand scission in  $\phi \times 174$  RFI DNA by D-isogluconosamine. Agri. Biol. Chem., 49(1), 459 (1985)
  19. 梶本五郎 : 油脂の酸化と營養. "總合地質科學", 鹿山光編, 恒星社厚生閣, 日本, p. 580 (1989)
  20. Han, L. P. B., Davison, L. M. and Jagt, D. L. V. : Purification and kinetic study of glyoxalase-I from rat liver, erythrocyte, brain, and kidney. Biochim. Biophys. Acta, 445, 486(1976)
  21. Brawn, K. and Fridovich, I. : DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. Arch. Biochem., Biophys., 206, 414(1981)
  22. Cadet, J. and Teoule, R. : Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. Photochem. Photobiol., 28, 661(1978)

(1990년 8월 2일 접수)