국내외기술정보

Amino-carbonyl반응 생성물의 항산화 기능

김 영 언
농산물이용연구부

식품의 가공, 저장, 조리의 경우에 성분간 반응이 일어나는 것에 대해서는 잘 알려져 있다. 그중에서도 대표적인 반응은 아미노기와 카르보닐기 사이에 일어나는 반응으로서 아미노-카르보닐 반응이라 부른다. 이 반응은 1912년 France의 생화학자인 Maillard에 의해 발견되었기 때문에 마이얄 또는 Maillard 반응이라고도 한다. 또 이반응은 효소작용에 의하지 않고 갈변현상이 일어나는 반응이기 때문에 비효소적 갈변반응이라고도 한다(이하 AC반응으로 한다).

AC반응은 일반적으로 아미노기를 가진 단백질, 펩타이드, 아미노산, 아민 등의 아미노 화합물과 카르보닐기를 가진 환원당 및 지질의 분해 생성물과의 반응이다. 그러나 ascorbic acid의 산화형인 DHA 혹은 식물중에 광범위하게 분포되어 있는 phenol성 화합물의 산화형인 quinone도 반응성이 높은 카르보닐 화합물이다. 따라서 대부분의 식품중에 AC 반응이 일어날 가능성이 있으며 이 반응이 식품의 맛, 향기, 영양가에 큰 영향을 준다는 것은 잘 알려져 있다.

또 이 반응생성물이 항산화성, 항균성 및 항변이원성을 나타낸다는 것도 알려져 있다. 그래서 본고는 모델계, 식품계 및 생체계에서의 AC 반응 생성물의 항산화성 발현에 관해 해설해 보고자 한다.

1. 아미노-카르보닐 반응(AC 반응)의 반응기구

AC 반응기구는 복잡하여 아직 명확하지 않는 점이 많으나 반응기구의 개요는 다음과 같다. 아미노화합물과 환원당과의 반응에는 우선 축합물의 질소배당체(glycosylamine)가 생성된다. 그후 Schiff 염기가 형성되고 아마도리 전위에 의하여 1, 2-enaminol을 경유하여 아마도리 전위생성물이 생성된다. Hexose의 경우는 안정한 pyranose형으로 분리되는 경우가 많지만 때로는 keto형으로 분리될 때도 있다.

아마도리 전위 생성물은 안정한 상태이나 enaminol은 aminoreductone의 일종으로 불안정하다. 질소배당체 생성까지의 반응은 가역적이고, 수용액중에서 평형상태가 되는데 아마도리 전위가 일어나면 원래 상태로 돌아가지 않는 불가역 반응이 된다. 여기까지의 반응을 흔히 초기단계라고 한다. 아마도리 전위 생성물은 약알카리성으로 강한 환원력을 나타내지만 이것은 enaminol의 형성에 의한 것이다.

Glucose와 아미노산의 아마도리 전위 생성물인 monofructose amino acid가 다시 1분자의 glucose와 결합하면 difructose amino acid가 생성된다.

이 화합물은 중요한 중간체로 쉽게 분해된다. 그 위에 아마도리 전위 생성물인 ketone기와 다시 1분자의 아미노산이 결합하면 endiamine이 되는 것으로 추정하고 있다. 현재 AC 반응의 초기단계에서 radical이 생성된다는 것도 알려져 있다. 그리고나서 반응의 후기단계로서는 enaminol, endiamine 및 difructose amine이 분해되어 카르보닐 화합물이 생성된다. 우선 enaminol과 difructose amino acid는 aminoreductone이라서 산소와 접촉하면 쉽게 산화되고 계속해서 가수분해되어 osone류가 생성된다. 또 enaminol, endiamine, difructose amine으로부터 생성된 3-deoxyosone의 enol형을 경유하여 3-deoxyosone이 생성된다. 이 화합물은 AC 반응의 중요한 중간체이고, 아미노화합물과의 반응에서 환원당의 종류에 의해 다른 3-deoxyosone류가 생성된다. Osone류가 다시 탈수되면 furfural 또는 hydroxymethylfurfural(HMF)이 되고, 아미노화합물과 반응하면 N-alkylpyrrole-2-aldehyde가 생성된다. 이러한 화합물의 대부분은 반응성이 큰 중간체이다. 특히 반응의 최종단계에서는 이러한 중간 생성물이 중합하거나 또는 아미노 화합물과 반응하거나 하여 최종적으로 갈색 화합물인 melanoidin이 생성된다.

2. 모델계에 의한 AC 반응 생성물의 항산화성의 발현

AC반응생성물의 항산화성에 관한 연구역사는 오래되어 1954년 Franzke등은 glycine과 glucose와의 갈변반응 생성물이 유지에 대하여 산화억제 효과가 있다고 보고하였다. 마가린에 대해서 1.5%를 첨가하면 마가린의 안정성이 좋아지고 더구나 이 효과는 반응액의 가열시간을 길게 할수록 강해진다는 사실도 알게 되었다. 그들은 이 항산화성을 나타내는 것이 반응생성물의 고분자 갈색색소로 추정하였다. 그후 모델실험으로서, 桐ヶ谷등은 각종 아미노산과 환원당의 수용액을 가열하여 갈변반응액을 조제하고 methyl linoleate에 대해 항산화성을 조사한 결과 당의 종류에 의한 항산화력의 차이는 별로 없었지만, 아미노산에서는 arginine, histidine, cysteine이 강한 효과를 나타내었다. 특히 이 갈색반응액은 pH가 높을 수록, 또 질소화합물을 많이 함유할 수록 항산화성이 강하였다. 아직 질소를 함유하지 않은 caramel색소에는 항산화성이 확인되지 않고 있기 때문에 AC반응 생성물의 항산화성 발현에는 질소 원자가 관계하고 있는 것으로 추측되고 있다. 또 島崎등은 각종 아미노산과 glucose 혹은 xylose등의 혼합 수용액을 가열하여 생성된 반응 생성물을 대두유에 0.5% 첨가하여 항산화성을 조사하였다. 그 결과 valine, leucine, isoleucine등의 소수성 아미노산의 반응 생성물이 강한 항산화성을 나타내었다. 이러한 소수성 아미노산의 생성물도 소수성이 높기 때문에 유지에 용해가 쉽고 그로 인하여 강한 항산화성을 나타낸다고 생각 되어진다. 또 Lingnert등은 각종 아미노산과 환원당과의 반응에 대해서 모델계로 반응조건과 항산화성과의 관련에 대해 조사하였다. 그결과 arginine, histidine, lysine이 중성 혹은 약알카리성의 조건하에서 가열하면 강한 항산화성을 나타내고 환원당 농도를 높이는것 보다는 아미노산 농도를 높이는 편이 항산화성이 더 강해지는 것으로 나타났다. 이러한 실험 결과는 桐ヶ谷등의 결과와 일치하고 있다. 더구나 AC반응의 원료인 환원당 뿐만 아니라 AC반응의 중간체인 3-deoxyglucosone, 3-deoxyosone과 아미노산과의 반응 생성물도 항산화성을 나타내었다. 또 아미노 화합물에서는 아미노산 뿐만 아니라 아민, 펩타이드, 단백질 가수분해 생성물 및 단백질과 환원당과의 반응 생성물도 항산화성을 나타내었다. 특히 환원당과의 반응에서 아미노산 보다도 短鎖펩타이드 쪽이 강한 항산화성을 나타낸다고 하였다. 그리고 그 강도는 펩타이드를 구성하는 아미노산의 종류에 의해 결정된다. 일반적으로 환원당과 반응하는 단백질의 항산화성은 그렇게 강하지 않다.

AC반응 생성물에 의한 항산화성 발현 인자로 생각되는 것은 reductone류와 melanoidin이다. Reductone이란 Tillman시약(2, 6-dichlorophenol indophenol)을 환원 탈색하는 강한 환원성 물질의 총칭이다. AC반응 생성물 중에는 reductone류가

존재한다. 예를 들면 아마도리 전위 생성물의 enol형은 amino-reductone이다. Reductone류는 강한 환원력과 수소 공여성에 의해 항산화성을 나타낸다고 생각되어진다. 또 갈변반응 생성물의 항산화성과 환원력과는 밀접한 관계를 나타낸다는 것도 알려져 있다. 그리고 질소를 함유하지 않은 reductone보다도 질소를 함유하고 있는 amino-reductone쪽이 항산화성이 강하고 같은 몰 농도에서는 BHA보다도 효과가 있다고 하였다. AC반응 생성물의 항산화성에는 reductone류의 기여가 중요하지만 melanoidin도 중요한 역할을 하고 있다. 일반적으로 AC반응의 갈변도와 항산화성과는 상관관계를 나타낸다.

山口등은 glycine과 xylose와의 반응 생성물을 sephadex G-15로 분획하여 그 항산화성을 조사한 결과 저분자 생성물 보다도 고분자 생성물의 melanoidin쪽이 강한 항산화성을 나타내었다. 이 결과에서 항산화성을 나타내는 AC반응 생성물에 있어 reductone류 보다도 melanoidin쪽이 보다 중요하다는 것이 판명되었다.

桐ヶ谷등은 ammonia와 glucose와의 갈변 반응액에 대해 전기영동을 통해 melanoidin의 정제를 시험하였다. 그 결과 항산화성은 단일 획분에만 존재 하는 것이 아니고 상당히 광범위한 melanoidin 획분에 분포되어 있음을 보고 하였다. Melanoidin 분자량의 분포는 범위가 넓어 보통 500~10000이라고 알려져 있다.

Melanoidin과 여러가지 시판 항산화제와의 효력비교(단위 중량에 대한 항산화력)는 〈그림 1〉에 나타내었다. Melanoidin은 BHA와 유사한 항산화성을 나타냈으나 BHT보다는 약간 떨어졌다. 또 melanoidin은 δ-tocopherol과 강한 상승효과를 보였다. 실제 마가린에 첨가한 경우에도 melanoidin과 δ-tocopherol간에 현저한 상승효과가 확인되었다(표 1). Melanoidin은 철, 동 등의 중금속과 강하게 결합한다. 이러한 성질이 melanoidin의 항산화성을 더욱 강하게 한다고 생각되고 있다.

Melanoidin은 갈색으로 착색되어 있는 탓으로 식품에의 응용은 제약을 받게된다. 山口는 melanoidin을 오존 또는 미생물로 탈색을 시도하여 그 동결 건조물을 검토해 보았다. 그 결과 melanoidin의 항산화성은 탈색후에도 남아 원래의 melanoidin과 비슷한 정도의 항산화력을 나타내고 있음을 알았다. 이 결과로 오존 또는 미생물로 탈색하여도 melanoidin중의 항산화성을 나타내는 부위에는 변화가 거의 없었다고 생각된다.

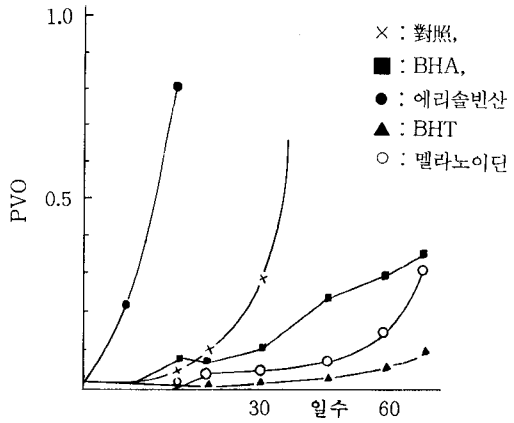

그림 1. Melanoidin과 몇가지 항산화제와의 효력비교

표 1. Melanoidin과 tocopherol동족체와의 상승성

	Tocopherol	Melanoidin	Tocopherol + Melanoidin
dl-Alpha	1.5	12	10
dl-Beta	6	12	24
d-Gamma	8	12	38
d-Delta	11	12	45

표중의 숫자는 유도기간일수

3. 식품계에 있어서 AC반응물의 항산화성의 발현

지금까지 산화를 억제하기 위해 사용되어온 AC반응생성물은 3가지 형태로 식품에 첨가되고 있다.

즉 1) 아미노화합물과 환원당을 식품제조전에 첨가하여, 그 식품의 가열공정에 의해 AC 반응생성물이 생성될 수 있도록 한다. 2) 아미노 화합물과 환원당과의 혼합반응물을 식품에 첨가한다. 3) melanoidin을 식품에 첨가한다. 응용예로서는 加藤등이 leucine과 glucose를 각 0.2M 농도가 되도록 유지에 가하고 시료온도가 175℃에 도달한 시간으로 부터 5분간 유지하며 갈변유를 조제하였다. 이 갈변유는 시판 참기름 정도의 색깔을 나타내며 강한 탄내를 가지고 있다. 이렇게 제조한 갈변유에 감자칩을 180~200℃로 2분간 튀겨 그 안정성을 살펴본 결과는 〈그림 2〉에 나타내었다. 갈변유를 사용하여 튀긴 감자칩의 경우가 보통 기름의 경우보다도 안정하였다.

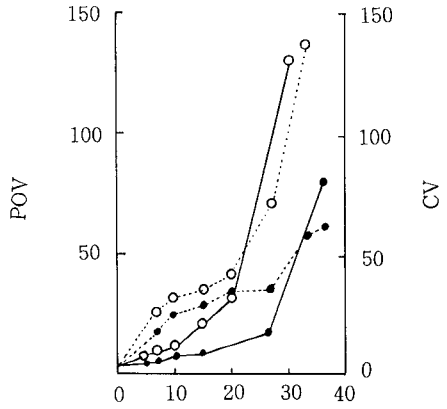

그림 2. Effects of browning reaction products for the autoxidation of potato chips at 50℃

Potatoes were sliced and deep-fat-fried in soybean oil with or without browning reaction products.

○——○ POV and ○·····○ CV of soybean oil in potato chips (control), ●·····● CV of soybean oil ± browning reaction products (10%) in potato chips.

Arrows indicate the development of oxidized flavor.

또 Lingnert등은 쿠키 원료에 histidine-glucose 반응물과 histidine, glucose 그 자체를 첨가하여 쿠키를 제조하고 산화정도를 검토한 결과, histidine, glucose 자체를 첨가한 쿠키가 산화에 대해 더 안정하였다(그림 3). 더우기 그들은 소세지에 AC 반응생성물을 첨가한 경우에도 같은 결과를 얻었다고 보고하였다. 또한 melanoidin은 마가린 및 버터등에 0.005% 농도로 첨가된 예가 있다.

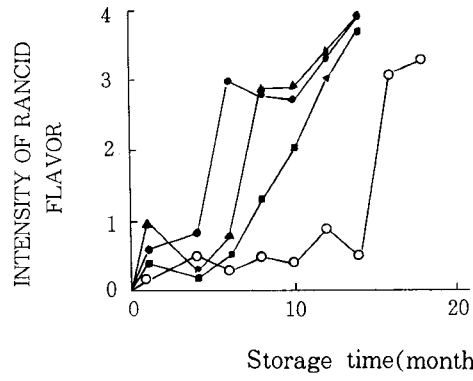

그림 3. Development of rancid flavor in cookies containing lard

Each point is based on 5 values (5 judges : 1 replicate)

Symbol Addition to the dough

●——● no addition

○——○ 0.1% L-histidine monohydrochloride monohydrate+1.0% D-glucose

▲——▲ 0.1% Maillard reaction mixture (calculated as dry matter), obtained by refluxing 25 mmol L-histidine monohydrochloride monohydrate and 50 mmol D-glucose in 25ml 0.1 M potassium phosphate buffer. pH 7.0, for 5h.

□——□ 0.0016% BHA+BHT

4. 생체계에 있어서 AC 반응 생성물의 항산화성 발현

AC 반응 생성물은 식품계에서 항산화성을 나타

내는 것 만이 아니고 생체내에서도 항산화성을 나타낸다는 것이 최근에 알려졌다. 규엔(グュエン) 등은 arginine-glucose 혼합액을 100℃에서 2시간 가열한 후 이것을 동결·분말화하여 사료에 6% 첨가하였다. Wistan계 쥐에 2개월간 자유섭취 사육후 적혈구 용혈율 및 간중의 과산화지질(TBA치)의 양을 측정하였다. 그 결과 arginine-glucose 생성물을 첨가함에 의해 적혈구의 용혈율 및 TBA치가 유의적으로 낮은 수치를 나타내어 AC 반응생성물은 생체내에서도 항산화성을 나타냄을 알게 되었다.

또 같은 실험에서 생체내에서도 식품계와 같이 AC 반응 생성물에 있어 중성 아미노산인 glycine 보다는 염기성 아미노산인 histidine, arginine, lysine쪽이 환원당과의 반응에서 강한 항산화성을 나타내었다(표 2). 이 항산화성은 쥐사료의 비타민E 농도 4 또는 8ppm의 조건에서 생체내에 강한 상승효과를 나타내었다(표 3). 또 아미노산 뿐만 아니라 단백질, 펩타이드 등도 환원당과의 반응 생성물이 생체내에서 항산화성을 나타내어 과산화지질의 생성을 억제함을 알게 되었다.

표 2. Liver TBA Values* of Rats Fed with Maillard Reaction Products.

Group	Control	His	Lys	Gly	Arg
TBA (nmol MDA/ lg wet liver)	69.4 ±1.3	33.3 ±1.7**	47.5 ±1.6**	63.6 ±1.6***	43.9 ±1.5**
Inhibition(%)	—	52.0	31.6	8.4	36.7

MDA = Malondialdehyde
* : Mean ± SE(n = 4)
** : Statistically significant($p < 0.01$) against control
*** : 〃 〃 ($p < 0.05$) 〃 〃

AC 반응생성물, 예를들면 arginine-glucose 반응생성물은 활성산소의 과산화 수소를 소거하고, 또 peroxyradical, alkoxy radical등에 대해 포착(捕捉)작용을 나타내었다.

한편 melanoidin은 hydroxyradical(·OH), superoxide(O_2^-) 및 과산화수소에 대하여 강한 소거작용을 나타내었다. 루 등은 radical 포착제(捕捉劑)로서 DMPO를 사용하여 수용액에 감마선 조사에 의해 생성된 ·OH 및 ·H와 melanoidin과의 관계를 ESR로 조사하였다. 그결과 0.3%의 melanoidin을 수용액에 첨가함에 의해 ·OH 및 ·H가 현저하게 감소함을 알았다(그림 4).

또 0.03~0.06%의 melanoidin도 superoxide에 강한 소거작용을 나타내었다(표 4).

뿐만아니라 n-butylamine과 glucose 또는 아미노산·펩타이드와 glucose에 의해 합성된 아마도리 전위생성물도 강한 과산화수소 소거작용을 나타내었다.

표 3. Hemolysis and Liver TBA Values of Rats Fed with His-Glc Reaction Products.

Group	N	C	E_1	E_1C	E_2	E_2C
Hemolysis	81.2 ±6.9	68.2 ±11.7	28.2 ±5.8**	11.6 ±5.6**	9.2 ±1.8**	4.3 ±1.5**
TBA (nmol MDA/ lg wet liver)	59.1[a] ±6.1	49.6[b] ±3.6	49.7 ±6.1	33.5[c] ±4.8	47.2[d] ±5.4	30.3[e] ±4.5
Inhibition(%)	—	16.0	15.9	43.3	20.1	48.7

Hemolysis was measured by the using of Dilauric acid(1mg/ml) after incubation at 37℃ for 30 min. O.D. was read at 540 nm.
N = Control, C = His − Glc, E_1 = Vitamin E (4ppm), E_1C = (His − Glc + E_1), E_2 = Vitamin E (8ppm), E_2C = (His − Glc + E_2)
* Mean ± SE (n = 4). ** Statistically significant ($P < 0.01$) against control.
MDA = Malondialdehyde
a, c = Statistically significant between a and c ($p < 0.05$) ;
a, b, d, e = Statistically signigicant between a and e ($p < 0.01$) ;
b and e ($p < 0.05$) ; d and e ($p < 0.05$).

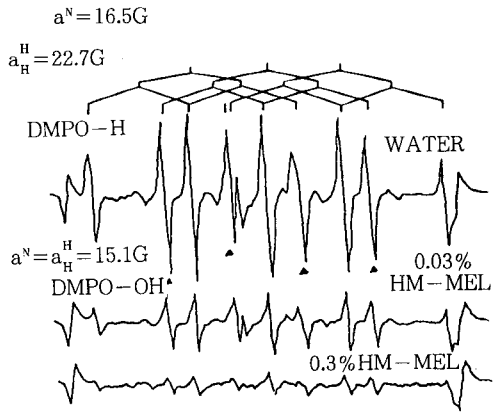

그림 4. ESR spectra of DMPO spin adducts formed by gammairradiation(10kGy) of water with or without melanoidins.

표 4. Effect of melanoidins on superoxide generated from the NADPH-PMS-NBT reaction system* under aerobic conditions

Scavenger	inhibition %
Control	0
HM-MEL(0.03%)	61
HM-MEL(0.06%)	74
Superoxide dismutase(16UNIT/ml)	83

HM-MEL : nondialyzable melanoidins

* : NADPH + H* + PMS → + NADP* + $PMSH_2$

$PMSH_2 + 2O_2 \rightarrow 2O_2^- + 2H^* + PMS$

$NBT + 2Cl^- + 4O_2 + 4H^+ \rightarrow$

diformazan + $4O_2$ + 2HCl

이상의 연구결과로부터 AC 반응생성물은 생체내에서 산화반응에 관여하고 있는 활성산소종을 소거하고, radical을 포착(捕捉)하며 비타민E와 상승효과를 나타냄에 의해 과산화지질의 생성을 억제한다고 생각되어 진다.

5. 식품개발에 있어서 AC 반응생성물의 이용 전망

위에 서술한 것처럼 AC반응은 대부분의 식품에서 일어나고, 어느 형태로든 식품의 품질에 영향을 준다. 이 반응은 양면성을 가져 부정적인 면과 긍정적인 면이 있다. 부정적인 면에는 AC 반응에 의한 식품의 변색, 변이원의 생성, 영양가의 저하등이 있고 긍정적인 면으로는 향, 색, 항균성, 항산화성, 항변이원성이 있다. 따라서 식품제조시에는 이 AC 반응을 억제할 필요가 있다. 어떤 방법으로 부정적인 면을 억제시키고 긍정적인 면을 발현 시킬 것인가 하는 것이 과제이다. 최근의 연구성과에는 부정적인 면보다도 긍정적인 면이 큰데 특히 AC 반응생성물의 항산화성, 항변이원성, 혈중 콜레스테롤 저하작용등을 들 수 있다.

갈변 단백질, melanoidin은 각종 식품중에 존재하며, 안정성이 높고 생리작용도 다양하다. 지금 이후로는 AC 반응의 제어법, 생리작용의 해석 및 실제 식품에의 응용이 기대된다.

〈출처 : 식품と 開發(1993), Vol. 28, No.10〉