

# ESTUDIO DE ALGUNAS CONDICIONES QUE AFECTAN LA FORMACION DE MUTAGENOS EN EL MAIZ (ZEA MAYZ)

STUDY OF SOME CONDITIONS THAT AFFECT THE MUTAGENS FORMATION IN CORN (ZEA MAYZ)

Margarita Zuleta B.\*  
Jaime Calle O.\*

## RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de la temperatura, la creatina, el afrecho y la tripsina en la formación de mutágenos en el maíz expuesto a altas temperaturas hasta quemarlo. Este es un alimento de alto consumo en el departamento de Antioquia, en donde se acostumbra prepararlo especialmente asado en arepas.

La actividad mutagénica se evaluó con el test de Ames, con *Salmonella typhimurium* cepa TA98. El maíz quemado sin afrecho ni creatina sólo presentó mutagenicidad directa (o sea, que no necesita transformación química por oxigenasas activadoras). Esto puede deberse a que el maíz no tiene la concentración necesaria de precursores capaces de producir, por interacción con el calor, cantidades apreciables de mutágenos indirectos. En cambio, cuando el maíz se suplementó con creatina antes de asarlo, produjo alta mutagenicidad indirecta (solamente en presencia de oxigenasas activadoras contenidas en la fracción microsomal S-9). Esto indica que la creatina es un factor altamente potenciador para formar mutágenos indirectos por interacción con carbohidratos a altas temperaturas.

El afrecho disminuyó en un 10% la actividad mutagénica del maíz quemado. Esto podría deberse a que la fibra del afrecho no destruida por la temperatura retiene irreversiblemente los mutágenos o inhibe parcialmente su formación. El tratamiento con tripsina aumentó varias veces la mutagenicidad del maíz quemado suplementado con creatina. Como explicación se sugiere que los aminoácidos glicina y arginina, si están libres, interactúan más eficazmente con los otros precursores presentes en el alimento para formar mutágenos bajo catálisis térmica.

## ABSTRACT

The corn (*Zea mayz*) roasted is one of the main food sources used for the Colombian population. The influence of fiber, tripsin and creatin in the mutagen formation on corn exposed to approximately 200°C was evaluated in the *Salmonella typhimurium* TA-98 both with and without activation by enzymes contained in mammalian liver microsomal fraction (S-9). Our results demonstrated that enducted mutation without creatine was significative but weak only without S-9 and the corn suplemented with 5% of creatine before heating was highly mutagenic with S-9. The frequency of reversion was 30 to 60 times higher than the spontaneous reversion. These results show that the creatine is essential for the production of indirect mutagens by interaction at high °T with nitrogen compounds and carbohidrates. On the other hand, in the corn with bran treated at high °T we found less mutagenic effect. This may be due either to irreversible retention of the mutagens formed or to a partial inhibition in the mutagens formation by the fiber. When we added tripsyn to corn and exposed it to high °T we found an increasement of mutation in relation to the absence of tripsyn. These results suggest that the amino acids glycine and arginine, will act to make easier the interaction needed to cause a mutagens formation under thermic catalysis.

## INTRODUCCION

Por numerosos estudios epidemiológicos se ha llegado a concluir que los factores de la dieta constituyen una de las causas más importantes de cáncer en humanos, tanto o más que el humo del cigarrillo (Wynder y Gori,

1977; Higginson y Muir, 1979; Doll y Peto, 1981). La detección de mutágenos en alimentos se inició cuando Kuratsune (1956) y Lijinsky y Shubik (1964) descubrieron la formación de hidrocarburos policíclicos aromáticos como el benzo (a) pireno, en bizcocho y carne pirlisados. Por estudios posteriores de Sugimura et al. (1977) y otros,

\* Profesores, Depto de Biología, Univ. de Antioquia, Apartado 1226, Medellín, Colombia.

se detectó la formación de mutágenos en aminoácidos y carnes expuestas a altas temperaturas. Hasta el presente; se han aislado e identificado en diferentes alimentos quemados 20 aminas heterocíclicas mutagénicas (Meester, 1989). La mayoría de estos mutágenos son carcinógenos en ratones (Ohgaki et al., 1984 y 1985) y en ratas (Takayama et al., 1984; Tanaka et al., 1985). Además, se ha observado que estas genotoxinas activan prooncogenes en hepatocitos de ratas (Nagao et al., 1985).

La temperatura y la composición de los alimentos son factores decisivos en la formación de mutágenos, especialmente el contenido de proteínas y creatina. A este respecto, se ha observado que la adición de creatina a una salsa antes de su cocción incrementa en 40 veces su actividad mutagénica (Nes, 1986). También se ha demostrado, por medio de la producción de mutágenos en diferentes combinaciones de aminoácidos, creatina y azúcares expuestos al calor, que la creatina es esencial para la formación del anillo imidazo en los mutágenos del tipo aminoimidazoarenas (AIA) (Jgerstad et al., 1983 y 1984; Negishi et al., 1984 y 1985; Jones y Wenburgen, 1988; Knize et al., 1991).

En los alimentos también se encuentran factores que contribuyen a la disminución de la actividad mutagénica y tal es el caso de las fibras contenidas en el afrecho. Takeuchi et al. (1988) observaron que dichas fibras retienen los mutágenos.

Teniendo en cuenta que para prevenir la exposición a los carcinógenos es importante estudiar profundamente las condiciones que contribuyen a la formación de estos agentes en alimentos, se hizo el presente estudio sobre la producción de mutágenos en el maíz preparado en arepas asadas, y la influencia de la creatina, el afrecho y algunos aminoácidos libres en la formación de mutágenos en dicho alimento.

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales

El maíz entero y el trillado se adquirieron en un mismo supermercado local. El benzo (a) pireno, el óxido 4-nitroquinolina (4-NQO), la creatina, la tripsina, el NADP, la glucosa-6-fosfato y la resina XAD-2, en SIGMA, Chemical Company, USA.

### Preparación de extractos

Se prepararon diez (10) diferentes extractos de maíz amarillo, con afrecho y sin él, de acuerdo con las siguientes condiciones: a. Maíz crudo sin tripsina y sin creatina; b. Maíz quemado; c. Maíz quemado suplementado con

creatina (5%); d. Maíz quemado tratado con tripsina; e. Maíz quemado suplementado con creatina y tripsina. Para la obtención de los extractos, el maíz se cocinó hasta quedar apropiado para moler. Las porciones sometidas a tripsina (5%) y/o creatina (5%) permanecieron durante 2 h con estas soluciones. Se armaron las arepas de igual peso y tamaño que luego se expusieron a brasas de carbón (220°C) durante 20 min por un lado y 5 min por el otro lado hasta la obtención del material quemado, que luego se trituró. De este material se tomaron 10 g, se homogeneizaron en metanol al 60% y se centrifugaron a 9000 rpm a 4°C. Este paso se repitió tres veces. Los tres sobrenadantes se rotaevaporaron hasta secarlos completamente. El extracto seco se disolvió en agua destilada. Luego se esterilizó por filtración y se guardó a -20°C hasta la realización de los ensayos mutagénicos.

### Pruebas mutagénicas

La actividad mutagénica de los extractos se examinó por medio del test de Ames con *Salmonella typhimurium*. En esta prueba se detecta mutación reversible his<sup>-</sup> a his<sup>+</sup> que se reconoce porque las bacterias his<sup>+</sup> crecen en medio mínimo sin histidina. El test se procesó de acuerdo con las instrucciones de Maron y Ames (1983). Se utilizó la cepa de *S. typhimurium* TA98 por ser ésta la más sensible a las genotoxinas formadas en alimentos por la acción del calor (Sugimura et al., 1976). En resumen, el procedimiento es como sigue: Los cultivos bacterianos se dejan crecer durante 16 h en caldo nutritivo OXOID 2. Luego se adiciona en tubos estériles (13 x 100 mm), colocados en hielo, 0.50 ml de oxigenasas activadoras contenidas en la mezcla S-9 (si no se desea activación, se agrega buffer). Después se agrega 0.10 ml del cultivo bacteriano, que tiene un número aproximado de 10<sup>8</sup> células. A continuación se adiciona la dosis del extracto o de los controles y se preincuba a 37°C durante 20 min. Luego se siembra en medio mínimo sólido (por duplicado). Después de 48 h de incubación a 37°C, se cuentan visualmente las colonias revertantes.

Todas las pruebas se hicieron en presencia y en ausencia de oxigenasas activadoras que se obtuvieron a partir de la fracción microsomal de hígado de rata macho (Spragne Dawley), inducido con arochlor 1254 cinco días antes de sacrificar el animal. Para obtener la fracción microsomal, se homogeneizó el hígado y luego se centrifugó durante 10 min a 9000 rpm a 4°C. Unos minutos antes de procesar la prueba mutagénica se preparó la mezcla S-9, que tiene la siguiente composición por mililitro: 0.56 ml de agua destilada; 0.10 ml de sobrenadante con la fracción microsomal de hígado; 0.02 ml de MgCl<sub>2</sub> 0.4M; 0.02 ml de KCl 165M; 0.10 ml de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADP) 0.04M; 0.10

ml de glucosa-6-fosfato 0.05 M; y 0.10 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1M.

### Controles

Como control positivo se usó el 2-amino fluoreno (ZAF) en una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{caja}$ . Este mutágeno, por ser indirecto, sirve para comprobar la actividad de las oxigenasas contenidas en la mezcla S-9. Como control positivo para mutagenicidad directa (que no necesita activación) se utilizó óxido 4-nitroquinolina (4-NQO) en una concentración de 0.50  $\mu\text{g}/\text{caja}$ . Como control negativo, se utilizaron los solventes dimetilsulfóxido (DMSO) y agua.

### Selección de dosis

Para las pruebas de mutagenicidad se escogieron las siguientes concentraciones de los extractos de maíz: 50, 25, 12 y 6 mg, equivalentes al peso del maíz quemado utilizado para preparar el extracto. La selección de estas dosis se hizo a partir de las mayores concentraciones no tóxicas. Como indicador de toxicidad se usó la viabilidad bacteriana de cultivos tratados con diferentes concentraciones del extracto.

Se tomó como respuesta positiva (mutagénica) aquella en la que los resultados mostraron incremento de mutación dependiente de la dosis y este incremento era reproducible. También se adoptó el criterio sugerido por la Organización Mundial de la Salud (Coulston y Dunne, 1980). En este caso se considera que el resultado es positivo si el número de revertantes aumenta tres veces o más en relación con el control negativo. Se considera mutagénesis débil o dudosa, si el aumento de revertantes sólo supera ligeramente el número doble de mutaciones del control.

### RESULTADOS

La tabla 1 muestra la actividad mutagénica de los diferentes extractos de maíz. Puede observarse que las concentraciones de 50 y 25 mg del extracto de maíz quemado sin afrecho ni creatina presentó mutagenicidad directa (no necesita activación), con un aumento de 5.12 veces la mutagenicidad espontánea. También puede verse en esta tabla y en las figuras 1 y 2 que el suplemento con creatina potenció considerablemente la formación de mutágenos indirectos (que dependen de la activación) en todos los extractos de maíz.

La adición de tripsina estimuló la formación de mutágenos especialmente en el maíz trillado, en el que aumentó la mutagenicidad hasta 3.3 veces con relación al maíz sin tripsina (fig. 2).

Al observar los datos de la tabla 1 y la figura 2, también puede notarse que el afrecho disminuyó notablemente la actividad mutagénica de los extractos de maíz quemado. Por ejemplo, la mutagenicidad del maíz con afrecho quemado, suplementado con creatina (QC), disminuyó hasta en un 50% en relación con el maíz sin afrecho, pero la disminución llegó hasta un 81% en los extractos de maíz con afrecho quemado suplementado con creatina y tripsina (QCT), al comparar su efectividad mutagénica con los extractos de maíz sin afrecho.

En la figura 3 se presenta el efecto de ocho concentraciones de la mezcla S-9 (0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 y 2.00 ml/caja) sobre la mutagenicidad de 50 mg de extracto de maíz entero o trillado quemado y suplementado con creatina (QC). Tanto en el maíz con afrecho como en el trillado (sin afrecho), se observó un incremento de la inducción de mutaciones dependiente de la dosis de la mezcla S-9. Por cada 0.50 ml de S-9 aumentó la actividad mutagénica en unas cinco veces.

### DISCUSION

En este trabajo se observó que las altas concentraciones examinadas (50 y 25 mg/caja) de extracto de maíz trillado quemado sin creatina, produjeron efecto mutagénico en ausencia de actividad metabólica. En cambio, no se observó mutagenicidad indirecta (dependiente de la activación con oxigenasas) en ninguno de los extractos de maíz quemado sin suplementar con creatina. Estos resultados pueden explicarse a la luz de la composición del maíz. Debe tenerse en cuenta que las proteínas y la creatina son los elementos más importantes para la formación de potentes mutágenos indirectos en alimentos expuestos a altas temperaturas y que el maíz sólo tiene hasta 10% de proteínas (ICA, comunicación personal) y carece de creatina. En cambio, contiene hasta 83% de almidón. Por tanto, es razonable concluir que el maíz no contiene la concentración ni la calidad apropiada de los precursores capaces de producir mutágenos indirectos por la acción del calor, y que los mutágenos directos que se formaron en muy pequeñas cantidades (puesto que sólo se alcanzaron a detectar en las muestras con las mayores concentraciones del extracto), posiblemente resultaron como subproductos de la descomposición térmica de los carbohidratos del maíz expuestos a temperaturas mayores de 200°C. Esto puede sustentarse con el hallazgo de Nishi et al. (1989) quienes observaron que uno de los subproductos por pirólisis de los carbohidratos, el furfural (2-furancarboxialdehído), produce clastogenicidad en las células de hámster V79 en ausencia de activación metabólica. El furfural también produjo mutagenicidad en *Salmonella* TA100 sin la mezcla S-9 (Zdzie-

**Tabla 1.** Número de mutaciones reversibles/caja producidas en *Salmonella typhimurium* TA98 tratada con diferentes concentraciones de extractos de maíz entero y trillado, en diversas condiciones, con activación metabólica y sin ella.

		Número de revertantes por tratamiento por caja									
Condiciones	Tipo maíz	Concentración del extracto en mg/caja *								H <sub>2</sub> O	
		50		25		12		6			
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Crudo	Entero	39	33	48	24	44	28	42	36	36	24
	Trillado	49	35	47	32	48	29	39	33	26	22
Quemado	Entero	38	48	40	40	43	36	52	25	36	36
	Trillado	22	143	27	128	26	31	32	23	24	23
Quemado con Creatina	Entero	151	38	319	33	603	31	760	27	30	33
	Trillado	327	30	497	33	1251	16	1546	21	24	23
Quemado con Creatina y tripsina	Entero	153	37	378	21	1404	25	1121	19	22	23
	Trillado	810	62	1652	28	2030	19	2134	17	26	20
Quemado con tripsina	Entero	28	50	23	36	30	27	29	14	22	23
	Trillado	36	112	33	77	44	22	38	23	24	19

\* Las concentraciones están dadas en el equivalente al peso del material seco original. El (+) indica que se agregaron enzimas activadoras (S-9) al tratamiento y el (-) indica que se agregó buffer. El número de revertantes es el promedio de tres experimentos independientes cada uno sembrado por duplicado. En todos los experimentos se utilizó como control positivo 2-aminofluoreno (2AF) a una concentración de 10 µg/caja y se obtuvo un promedio de 1935 revertantes por caja cuando se le agregó S-9 y sólo de 34 por caja cuando se usó buffer.

nicka et al., 1978) y clastogenicidad en las células de hámster chino (CHO) (Stich et al., 1981).

Umano y Shibamoto (1984) hallaron que el almidón, cuando se calienta, produce 2-hidroxi-3-metil-2-ciclopenteno-1-ona y maltol, los cuales al calentarse con amonio presentan actividad mutagénica. Shibamoto (1980) y Shibamoto et al. (1981) postularon que el almidón se degrada por acción del calor y da lugar a la producción de cetonas y aldehídos, los cuales reaccionan con compuestos nitrogenados hasta formar mutágenos.

Es posible que la mayoría de los mutágenos directos formados en el maíz quemado sin creatina se hayan per-

dido durante la preparación de los extractos, debido quizás a que la metodología empleada en el presente experimento no era la apropiada para retenerlos. Para no caer en una conclusión falsa y negativa y para conocer mejor el riesgo real que implica el maíz quemado, es necesario hacer nuevos estudios mutagénicos del maíz, empleando una diferente metodología de extracción.

Con el suplemento del 5% de creatina, el maíz quemado produjo alto efecto mutagénico indirecto, hasta de 60 veces la mutagenicidad espontánea. Estos resultados demuestran una vez más que la creatina es el más potente precursor para formar mutágenos indirectos por interacción a altas temperaturas con proteínas y/o carbohidratos. Esto ha sido demostrado por varios investigado-

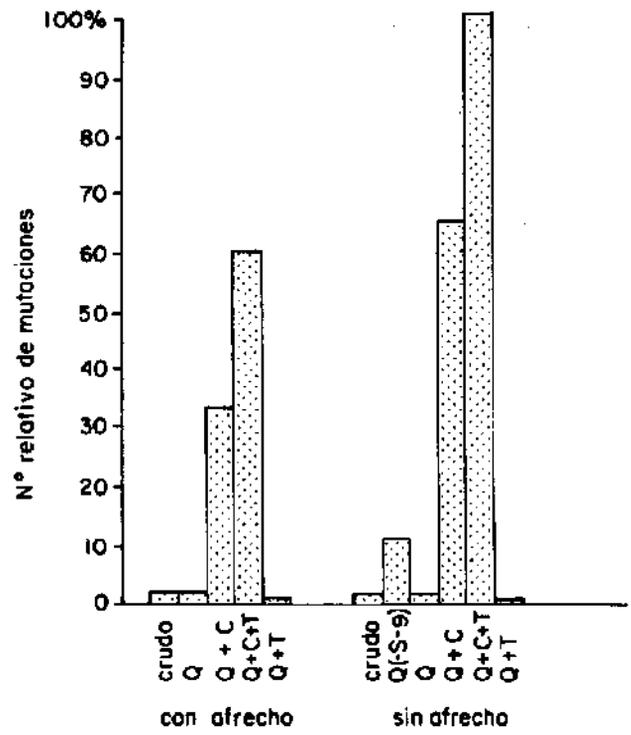


Fig. 1. Mutagenicidad relativa en *Salmonella typhimurium* de 12 mg de extracto de maíz con afrecho y sin afrecho, quemado (Q), quemado con creatina (Q+C) y quemado con creatina y tripsina (Q+C+T). En el maíz quemado sin afrecho los mutágenos son directos (no necesitan activación metabólica por adición de enzimas microsomaes, S-9). En los demás casos la mutagenicidad es indirecta.

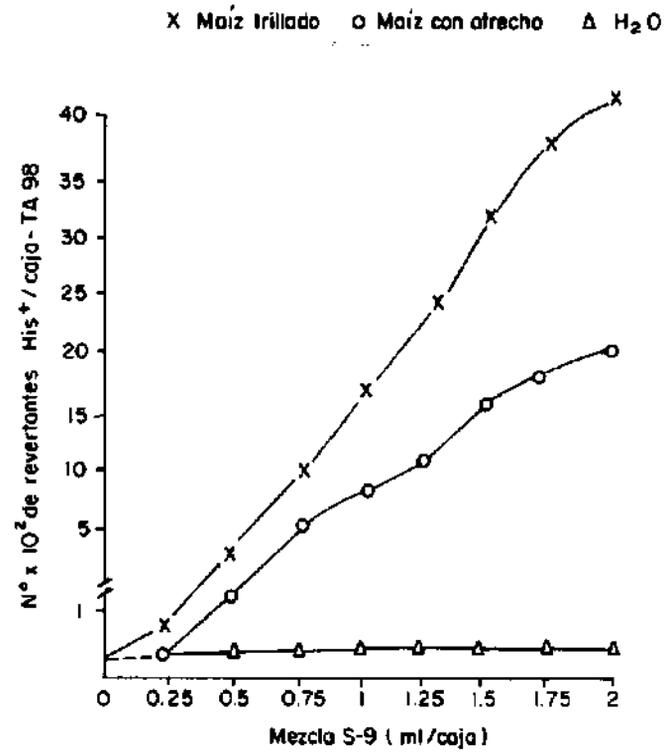


Fig. 3. Efecto de diferentes concentraciones de la mezcla S-9 sobre la actividad mutagénica de 50 mg de extracto de maíz suplementado con 5% de creatina y quemado en brasas de carbón. Todos los datos representan el promedio de tres experimentos independientes en *Salmonella typhimurium* TA-98.

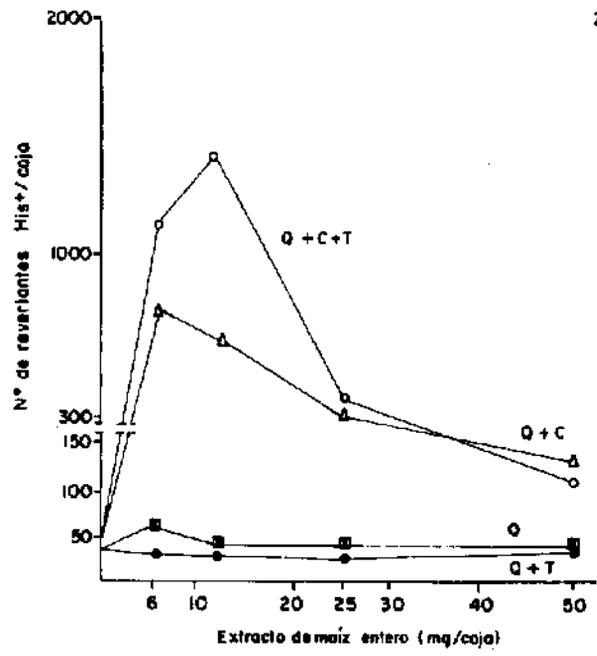
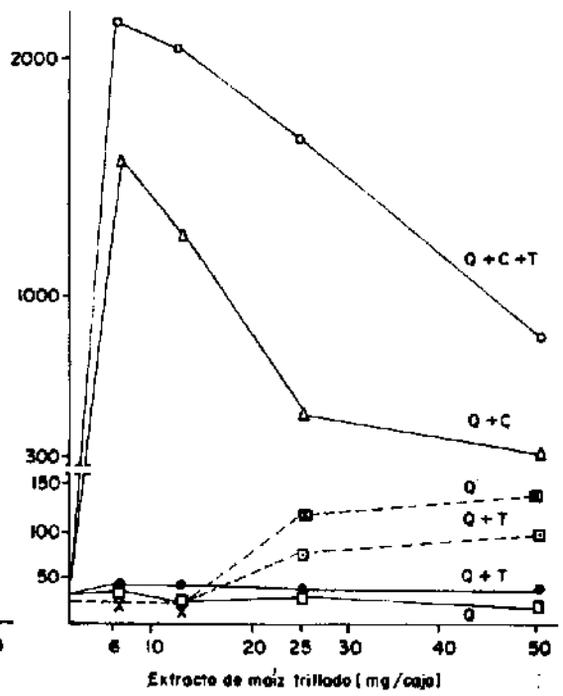


Fig. 2. Efecto de la creatina (C), la tripsina (T) y el afrecho sobre la mutagenicidad del maíz quemado (C) en la cepa TA-98 de *Salmonella typhimurium*. Los puntos representan valores promedios obtenidos de tres experimentos independientes. Las curvas se inician en el valor promedio de revertantes espontáneos. (—) = resultados obtenidos con activación metabólica (S-9); (---) = resultados sin S-9. La concentración del extracto de maíz está dada en el equivalente al peso del material seco.



res. Por ejemplo, Kikugawa y Kato (1987) encontraron que la carne del marisco sepia o jibia, que contiene pequeñas trazas de creatina menores que 0.01 mg/g, no presenta mutagenicidad significativa después de quemarla a 200°C; en cambio, las carnes del pez llamado bonito, la del atún y la de res, que contienen entre 4 y 5 mg/g de creatina, presentaron alta mutagenicidad al asarlas a altas temperaturas. También se ha demostrado que los mutágenos producidos con creatina contienen el anillo imidazo y son del tipo aminoimidazoarenas (AIA), tales como IQ, MeIQx y DiMeIQx (Kasai et al., 1981; Felton et al., 1984; Knize et al., 1985).

La adición de tripsina al maíz quemado suplementado con creatina, aumentó significativamente la actividad mutagénica de estos extractos. Este aumento podría atribuirse a que los aminoácidos lisina y arginina, cuando quedan libres por la hidrólisis de la tripsina, interactúan más fácilmente con los demás precursores para formar los mutágenos bajo la catálisis térmica. Se notó además que el afrecho reduce la formación de mutágenos en el maíz quemado, hasta en un 50%. Dicha disminución podría explicarse asumiendo que la fibra interfiere las interacciones necesarias para formar los mutágenos o que no se haya quemado totalmente la fibra, y quedan residuos capaces de retener mutágenos. Takeuchi et al. (1988) encontraron que el salvado de maíz refinado posee una efectiva capacidad para adsorber dinitropireno, además de varios tipos de mutágenos pirolisados. El mecanismo de retención no ha sido todavía esclarecido aun-

que Barnes et al. reportaron en 1983 que la unión *in vitro* del IQ al salvado de trigo se debió a un mecanismo de intercambio de cationes; y Morotoni y Mutai (1986) también reportaron que la unión del trp-P-2 a una fibra del maíz dependía del pH.

En este trabajo se encontró que en el maíz quemado suplementado con creatina la mutagenicidad disminuyó drásticamente a medida que se usaban las más altas concentraciones de extractos, aunque éstas no fueran tóxicas. Por ejemplo, con 50 mg de extracto por caja, la mutagenicidad disminuyó hasta en 89% al comparar con el efecto mutagénico alcanzado con dosis de 12 y 6 mg/caja. Esto puede deberse a que en altas concentraciones de extractos también aumenta la cantidad de compuestos inhibidores de las enzimas; o a que aumentan las genotoxinas contenidas en el extracto, lo que conduce a una inhibición alostérica negativa, por la unión de muchas moléculas a la enzima y se disminuye entonces la rata de la reacción. Estas hipótesis fueron sustentadas en el presente trabajo al demostrarse que el efecto mutagénico de una concentración constante de sustrato se incrementa intensamente con el aumento de las oxigenasas activadoras contenidas en la mezcla S-9. Teniendo en cuenta lo anterior, se sugiere que la concentración de enzimas activadoras puede ser uno de los factores que inciden para que la respuesta mutagénica presente gran variabilidad en los diferentes organismos expuestos a la misma dosis de un genotóxico.

## LITERATURA CITADA

- Barnes, W. S., J. Maiella and J. H. Weiburger. 1983. *In vitro* binding of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo-(e,5-t) quinoline to dietary fibers. *J. Natl. Inst. Cancer.* 70:757-760.
- Coulston, F. and J. F. Dunne. 1980. The potential carcinogenicity of nitrosatable drugs. W.H.O. Symposium. Geneva, Ablex Publ. Corp., Norwood, N. J. USA. p. 1-14.
- Doll, R. and R. Peto. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Inst. Cancer.* 66:1193-1300.
- Felton, J. S., M. G. Knize, C. Wood, B. J. Wuebles, S. K. Healy, D. H. Stermer, L. F. Bjeldanes, B. J. Kimble and F. T. Hatch. 1984. Isolation and characterization of new mutagens from fried ground beef. *Carcinogenesis* 5:95-102.
- Higginson, J. and C. S. Muir. 1979. Environmental carcinogenesis: misconceptions and limitations to cancer control. *J. Natl. Inst. Cancer.* 63:1291-1298.
- Igerstad, M., A. Laser, R. Ste and A. Dahqvist. 1983. Creatinine and maillard reaction products as precursors of mutagenic compounds formed in fried beef. *In: Waller, G. R. and M. S. Feather (eds). The maillard reaction in foods and nutrition.* Amer. Chem. Soc. Washington, DC. 507-519.
- Igerstad, M., K. Olsson, S. Grivas, C. Negihshi, K. Wakabayashi, M. Tsuda, S. Sato and T. Sugimura. 1984. Formation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo 4,5-f quinoxaline in a model system by heating creatinine, glycine and glucose. *Mutat. Res.* 126:239-244.
- Jones, R. C. and J. H. Wenburger. 1988. Inhibition of aminoimidazoquinoxaline-type and aminoimidazol-4-one type mutagen formation in liquid reflux models by L-tryptophan and other selected indoles. *Gann* 79:222-230.
- Kasai, H. Z., Z. Yamaizumi, T. Shiomi, S. Yokayama, T. Miyazawa, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura and S. Nishimura. 1981. Structure of a potent mutagen isolated from fried beef. *Chem. Lett.* 485-488.
- Kikugawa, K. and T. Kato. 1987. Formation of mutagens, 2-amino-3,8-dimethylimidazo, -4,5-f quinoxaline (MeIQx) and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo-4,5-f quinoxaline (4,8 DiMeIQ), in heated fish meats. *Res.* 179:5-14.

- Knize, M., H. Shen and Y. Felton. 1991. A comparison of mutagen production in fried ground chicken and beef: effect of supplemental creatine. *Mutagenesis* 503-508.
- Kuratsune, M. 1956. Benzo (a) pyreno content of certain pyrogenic materials. *J. Natl. Inst. Cancer* 16:1485-1496.
- Lijinsky, W. and P. Shubik. 1964. Benzo (a) pyreno and other polynuclear hydrocarbons in charcoal-broiled meat. *Science* 145:53-54.
- Maron, S. and B. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 11:173-215.
- Meester, de C. 1989. Bacterial mutagenicity of heterocyclic amines found in heat-processed food. *Mutat. Res.* 227:235-262.
- Morotomi, M. and M. Mutai. 1986. *In vitro* binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacterial. *J. Natl. Inst. Cancer* 77:195-201.
- Nagao, M., M. Ochiai, T. Tahira, F. Ishikawa, K. Hayashi, N. Ohgaki, N. Tsuchida, N. Tereda and T. Sugimura. 1985. Activation of K-ras and oncogenes other than ras family, in rat fibrosarcomas initiated by 1,8 dinitropyrene. *Cancer Lett.* 29:119-125.
- Negishi, C., K. Wakabayashi, M. Tsuda, S. Sato, T. Sugimura, H. Saito, M. Maeda and M. Jgerstad. 1984. Formation of 2-amino-3,7,8-trimethylimidazo 4,5-f quinoxaline, a new mutagen, by heating a mixture of creatinine, glucose and glycine. *Mutat. Res.* 140:55-59.
- Negishi, C., K. Wakabayashi, J. Yamaizumi, H. Saito, S. Sato, T. Sugimura and M. Jgerstad. 1985. Identification of 4,8-DiMeIQx, a new mutagen. *Mutat. Res.* 147:267-268.
- Nes, I. F. 1986. Mutagens formation in fried meat emulsion containing various amounts of creatine. *Mutat. Res.* 175:145-148.
- Nishi, Y., Y. Miyakawa and K. Kato. 1989. Chromosome aberrations induced by pyrolysates of carbohydrates in chinese hamster V79 cells. *Mutat. Res.* 227:117-123.
- Ohgaki, H., C. Negishi, K. Wakabayashi, K. Kusama, S. Sato and T. Sugimura. 1984. Induction of sarcomas in rats by subcutaneous injection of dinitropyrenes. *Carcinogenesis* 5:583-585.
- Ohgaki, H., H. Hasegawa, T. Kato, C. Negishi, S. Sato and T. Sugimura. 1985. Absence of carcinogenicity of 1-nitropyrene, correction of previous results, and new demonstration of carcinogenicity of 1,6-dinitropyrene in rats. *Cancer Lett.* 25:239-245.
- Shibamoto, T. 1980. Mutagenicity of 1,5 (or 7) dimethyl-2,3,6,7 tetrahydro-1H, 5H-biscyclo penta pyrazine obtained from a cyclotene NH<sub>3</sub> browning model system. *J. Agric. Food Chem.* 28: 883.
- Shibamoto, T., O. Nishimura and S. Mihara. 1981. Mutagenicity of products obtained from maltol-ammonia browning model system. *J. Agric. Food. Chem.* 29:543.
- Stich, H. F., M. P. Rosin, C. Wu and W. D. Powrie. 1981. Clastogenicity of furans found in food. *Cancer Lett.* 13:89-95.
- Sugimura, T., S. Sato, M. Nagao, T. Yahagi, T. Matsushima, Y. Seino and T. Takeuchi. 1976. Overlapping of carcinogens and mutagens. *In: Magee, R. N. (eds). Fundamentals in cancer prevention.* Univ. of Tokyo Press. 191-215.
- Sugimura, T., M. Nagao, T. Kawachi, M. Honda, T. Yahagi, Y. Seina, S. Sato, N. Matsukura, M. Matsushima, A. Shirai, M. Sawamura and H. Matsumoto. 1977. Mutagen-carcinogens in foods, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. *In: Hiatt, H. H., J. D. Watson and J. A. Winsten (eds). Origins of human cancer.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1561-1576.
- Takeuchi, M., M. Hara, T. Inoue and T. Kada. 1988. Adsorption of mutagens by refined corn bran. *Mutat. Res.* 204:263-267.
- Takayama, S., M. Matsuda, M. Mogami, H. Ohgaki, S. Sato and T. Sugimura. 1984. Induction of cancer in the intestine, liver and various other organs of rats by feeding mutagens from glutamic acid pyrolysate. *Gann* 207-213.
- Tanaka, T., W. S. Barnes, G. M. Williams and J. Weisburger. 1985. Multipotential carcinogenicity of the fried food mutagen 2-amino-3-methylimidazo 4,5-f quinoxaline in rats. *Japan J. Cancer Res. (Gann).* 76:570-576.
- Umamo, K. and T. Shibamoto. 1984. Chemical studies on starch heated alone or with glycine. *Agric. Biol. Chem.* (In press).
- Wynder, E. L. and B. B. Gori. 1977. Contribution of environment to cancer incidence: an epidemiologic exercise. *J. Natl. Inst. Cancer.* 58:825-832.
- Zdzienicka, M., B. Tudek, M. Zielenska and T. Szyunczyk. 1978. Mutagenic activity of furfural in *Salmonella typhimurium* TA100. *Mutat. Res.* 58:205-209.