

【原 著】

アスパラギンと還元糖溶液の 37℃ での長期間インキュベーションによるアクリルアミドの生成

Production of Acrylamide via the Long-Term Incubation of Asparagine and Reducing Sugar Solutions at 37°C

石原克之^{1,2,*}, 米澤弥矢子¹, 古賀秀徳¹, 太田富久²
Katsuyuki ISHIHARA^{1,2,*}, Miyako YONEZAWA¹, Hidenori KOGA¹, Tomihisa OHTA²

¹ カルビー株式会社

² 金沢大学大学院自然科学研究科

【要 旨】

本研究では、Fru+Asn 溶液または Glc+Asn 溶液を 37℃ で長時間インキュベーションすることによる AA 生成について検討を行った。その結果、pH 7.4, pH 12.0 の Fru+Asn 溶液、Glc+Asn 溶液共に AA の生成が認められた。また、同じ pH であれば Fru+Asn 溶液の方が褐変度は高くなる傾向があったが、AA の生成は Glc+Asn 溶液の方が高くなった。これらの結果は、これまで報告されている 120℃ 以上での高温加熱による AA の生成経路とは異なる経路であることが示唆された。また、Glc+Asn 群において pH 7.4, 37℃ で 1 ヶ月間インキュベーションすることにより AA の生成が認められた。このことより生体内の AGEs の一種として AA が生成する可能性が示唆された。

【キーワード】

アクリルアミド, AGEs, メイラード反応, 還元糖, アミノ酸

1. はじめに

2002年にスウェーデンの研究者により炭水化物を多く含む食品を 120℃ 以上の高温で調理することにより、アクリルアミド (AA) が生成されることが発表された¹⁻³⁾。その後、食品中のアスパラギン (Asn) と還元糖とのメイラード反応により AA が生成されることが明らかとなってきた⁴⁻⁶⁾。これはスウェーデンで AA に暴露されている労働者について調査を行ったところ、非暴露の対照者の血液中でも AA-ヘモグロビン付加物が検出されたことが発見のきっかけであった。

また一方で、グルコース (Glc) などの還元糖と、たんぱく質のアミノ基との糖化反応により advanced glycation end-products (AGEs) が生体内で生成し、様々な慢性疾患の直接的な病因物質となっていることが明らかとなった⁷⁻¹³⁾。これらの AGEs は Glc と半減期の長い蛋白質との反応であると考えられていたが、近年では Glc や α -ジカルボニル化合物などが半減期の短い蛋白質や脂質、核酸とも反応し、AGEs を生成していることが明らかとなってきた¹⁴⁻¹⁶⁾。

ここで AA が生体内で起こる糖化反応の生成物である AGEs の 1 つである可能性が考えられた。しかし、高温加熱による AA の生成についての報告⁴⁻⁶⁾はあるが、非高温加熱条件下による AA の生成についての報告はない。そこで、水溶液モデル系にて非高温加熱条件下における

受理日: 2011 年 12 月 19 日

* 〒321-0933 栃木県宇都宮市清原工業団地 23-6 R&DDEセンター 実験研究棟 Tel: 028-670-0766 Fax: 028-670-0767
E-mail: k_ishihara@calbee.co.jp

AA の生成について検討を行った。

2. 材料と方法

2-1. 実験材料

Acrylamide-1-¹³C は CDN Isotopes Co. から購入した。その他の全ての試薬 (和光純薬工業 (株)) は特級またはそれに準ずる試薬を用いた。

2-2. サンプル調製

0.1 M Asn 溶液と 0.1 M Glc 溶液 (Glc+Asn 群) または 0.1 M Asn 溶液と 0.1 M フルクトース (Fru) 溶液 (Fru+Asn 群) となるように 20 mM リン酸緩衝液で調製した。pH は 3.0, 7.4, 12.0 の 3 種類を調製した。その溶液をクリーンベンチの中で滅菌済みの DISMIC (φ0.2 mm, ADVANTEC 製) を用いてフィルター濾過したものを、滅菌済みのネジ口試験管に分注して密栓した。

それぞれの試験管の周りをアルミホイルで包んで光を遮断した。それを 37°C に設定した恒温槽に静置し、0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, そして 8 ヶ月後に分取し、各種分析に供した。

2-3. 褐変度の分析

透過長 10 mm の石英セルにサンプル溶液を入れ、分光光度計 (SHIMADZU, BioSpec-mini) を用いて 420 nm における吸光度を求め、それを溶液の褐変度とした。

2-4. AA 分析

既報¹⁷⁾ に従い、¹³C 標識した Acrylamide-1-¹³C を内部標準として用いて臭素誘導体化後に GC/MS にて分析を行った。分析条件は、

カラム : DB-WAX, 0.25 mmID×30 m, 0.25 μm

注入口温度 : 250°C

カラム温度 : 45°C で 1.5 分保持後、250°C まで 12°C/min 昇温

キャリアガス : He

ガス流量 : 1 ml/min

イオン源温度 : 230°C

イオン化電圧 : 70 eV

イオン化法 : EI (ポジティブモード)

分析モード : SIM 測定 (m/z 149, 150)

とした。

2-5. 還元糖分析

既報¹⁸⁾ に従い、サンプル溶液を DISMIC (φ0.2 mm, ADVANTEC 製) を用いてフィルター濾過したものを

HPLC にて分析を行った。分析条件は、

カラム : Zorbax Carbohydrate Analysis, 4.6 mmID×150 mm, 5 μm

移動相 : アセトニトリル/水 = 75/25

流速 : 1.4 ml/min

カラムオープン温度 : 30°C

検出器 : 示差屈折率検出器 (Agilent 1100 RID) とした。

2-6. アミノ酸分析

既報¹⁹⁾ に従い、サンプル溶液を DISMIC (φ0.2 mm, ADVANTEC 製) を用いてフィルター濾過したものを、 α -フタルアルデヒドと 9-フルオレニルメチルクロロフォルメートで誘導体化後に HPLC にて分析を行った。分析条件は、

カラム : Zorbax Eclipse AAA, 4.6 mmID×150 mm, 3.5 μm

移動相 : A 液 : 40 mM NaH₂PO₄

B 液 : アセトニトリル/メタノール/水 = 45/45/10

流速 : 2.0 ml/min

カラムオープン温度 : 40°C

検出器 : 蛍光検出器 (Agilent 1100 FLD)

とした。

3. 結果

3-1. 褐変度の変化

各インキュベーション時間による褐変度を Fig. 1 に示した。その結果 pH 12.0 の Fru+Asn 群と Glc+Asn 群においては、0.5 ヶ月のインキュベーションですでに褐変が認められ、褐変度はそれぞれ 4.40, 3.89 であった。その後、インキュベーションの時間が長くなるにつれてさらに褐変がすすみ、8 ヶ月になると褐変度はそれぞれ 15.11, 14.90 と非常に高い値を示した。また pH 7.4 の Fru+Asn 群は 3 ヶ月で褐変度が 0.59 と最大を示し、その後褐変は進まなかった。一方 Glc+Asn 群はインキュベーションの時間が長くなるにつれて褐変が進んだ。pH 3.0 においては Fru+Asn 群では 3 ヶ月以降、Glc+Asn 群では 8 ヶ月でわずかな褐変が見られた。同じ pH 条件下では、Glc+Asn 群よりも Fru+Asn 群の方が褐変度は高くなる傾向が認められた。

3-2. 遊離還元糖含有量の変化

Fig. 2 に遊離還元糖含量の変化を示した。その結果、Fru+Asn 群において pH 3.0, pH 7.4 では Fru 含量はインキュベーションの時間による大きな変化は見られなかった。pH 12.0 では初期の時点で既に 0.082 M に減少してお

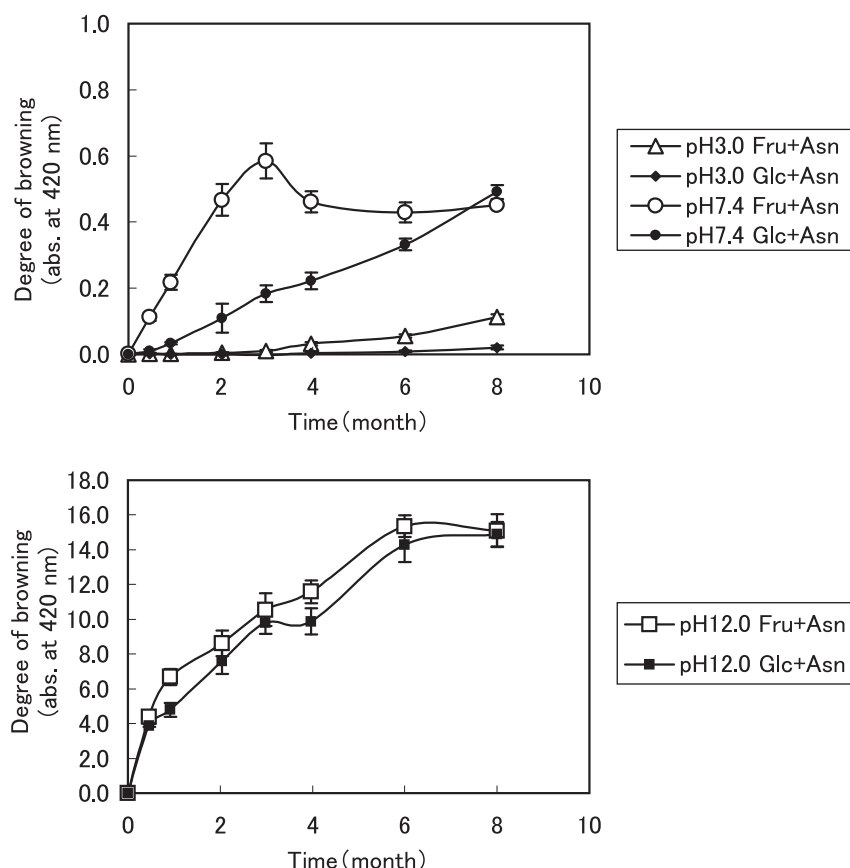


Fig. 1 Change in the browning degree

△, ◆, ○, ●, □ and ■ represent the Fru+Asn group at pH 3.0, the Glc+Asn group at pH 3.0, the Fru+Asn group at pH 7.4, the Glc+Asn group at pH 7.4, the Fru+Asn group pH 12.0, and the Glc+Asn group at pH 12.0, respectively. Each value represents mean $\pm$ S.D. over triplicate determinations.

り、添加していない Glc が 0.014 M 検出された。さらに 0.5 ヶ月で Fru は 0.007 M へと急激に減少した。この Fru が減少している原因の一つとして、pH 12.0 という強アルカリにさらされることで、Fru は速やかに Glc へと異性化していることが示唆された。つまりサンプル調製してから分析にかかるまでの僅かな時間の間にすでにこの反応が進んでしまったことが示唆された。また Fru や Glc の自動酸化や分解産物により glyoxal や methylglyoxal や 3-deoxyglucosone などのジカルボニル化合物が生成されたことが示唆された^{6,20,21)}。Glc+Asn 群において pH 3.0, pH 7.4 では Glc 含量は 0.5 ヶ月のインキュベーションで僅かに減少したが、それ以後は大きな減少は確認できなかった。一方、pH 12.0 においては、Fru+Asn 群と同様に初期の時点で Glc の異性化によるものだと考えられる Fru が確認され、0.5 ヶ月のインキュベーションにおいて 0.007 M と急激に減少した。

3-3. 遊離アミノ酸含有量の変化

Fig. 3 に遊離アミノ酸含量の変化を示した。pH 3.0,

pH 7.4 の Fru+Asn 群, Glc+Asn 群において遊離 Asn 含量は 2 ヶ月のインキュベーションで約 0.075 M 程度まで減少していることが確認できた。pH 12.0 では Fru+Asn 群, Glc+Asn 群は、0.5 ヶ月でそれぞれ 0.057 M, 0.059 M 程度まで減少した。さらに、4 ヶ月後にはそれぞれ 0.023 M, 0.022 M まで減少していることが確認できた。しかし、添加していないはずの Asp が確認できたことから Asn が pH 12.0 という強アルカリ条件化において Asp へと転換されたのだと示唆された。また各 pH において Fru+Asn 群と Glc+Asn 群における違いは認められなかった。また、Asn, Asp 以外の遊離アミノ酸（グルタミン酸、セリン、グルタミン、ヒスチジン、グリシン、スレオニン、シトルリン、アルギニン、アラニン、 γ -アミノ酪酸、チロシン、シスチン、バリン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、イソロイシン、オルニチン、ロイシン、リジン、そしてプロリン）は検出されなかった。

3-4. AA 生成量

Fig. 4 に各溶液の AA 濃度変化を示した。今回の検討

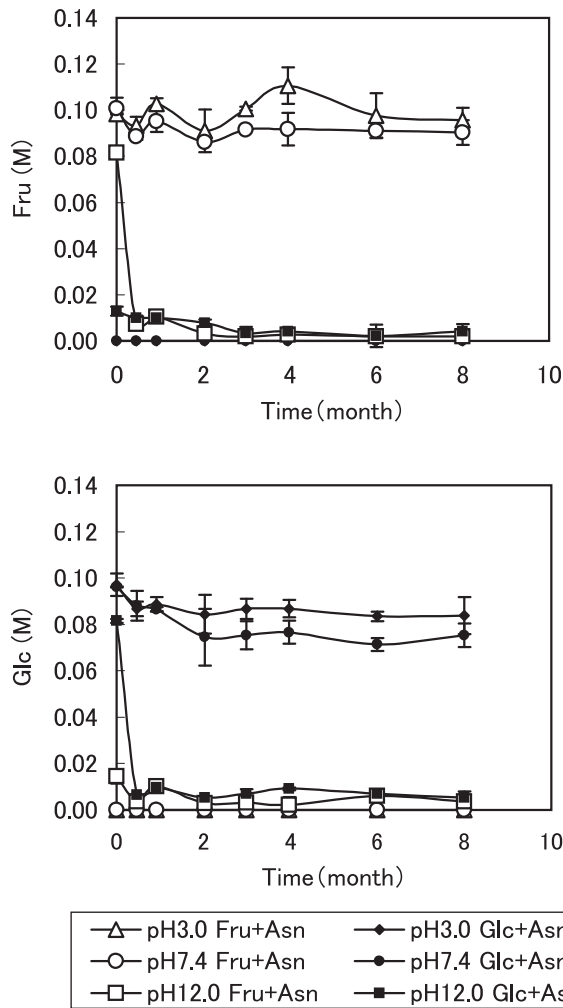


Fig. 2 Change in the free reducing sugar content

△, ◆, ○, ●, □ and ■ represent the Fru+Asn group at pH 3.0, the Glc+Asn group at pH 3.0, the Fru+Asn group at pH 7.4, the Glc+Asn group at pH 7.4, the Fru+Asn group at pH 12.0, and the Glc+Asn group at pH 12.0, respectively. Each value represents mean±S.D. over triplicate determinations.

の結果から、pH 7.4 の Glc+Asn 群が最も生成量が多く、次いで pH 7.4 の Fru+Asn 群、pH 12.0 の Glc+Asn 群、pH 12.0 の Fru+Asn 群の順であった。pH 3.0 では両群とも検出限界以下 (10 ppb 以下) であった。

pH 7.4, pH 12.0 の両群においていずれも 6 ヶ月で最大となり、インキュベーション 8 ヶ月で少し低くなることから分かった。これは AA の生成よりも分解の反応が進むことが原因と考えられた。

また、最も濃度が高くなったのが、pH 7.4 の Glc+Asn 群の 6 ヶ月であり、その濃度は 840 (ppb) であった。このときの Asn に対する AA 生成率は 0.0064% であった。Mottram, D. S. らの報告⁴⁾によると Glc と Asn の等モル水溶液を 170°C・20 分間加熱した場合、Asn に対する AA

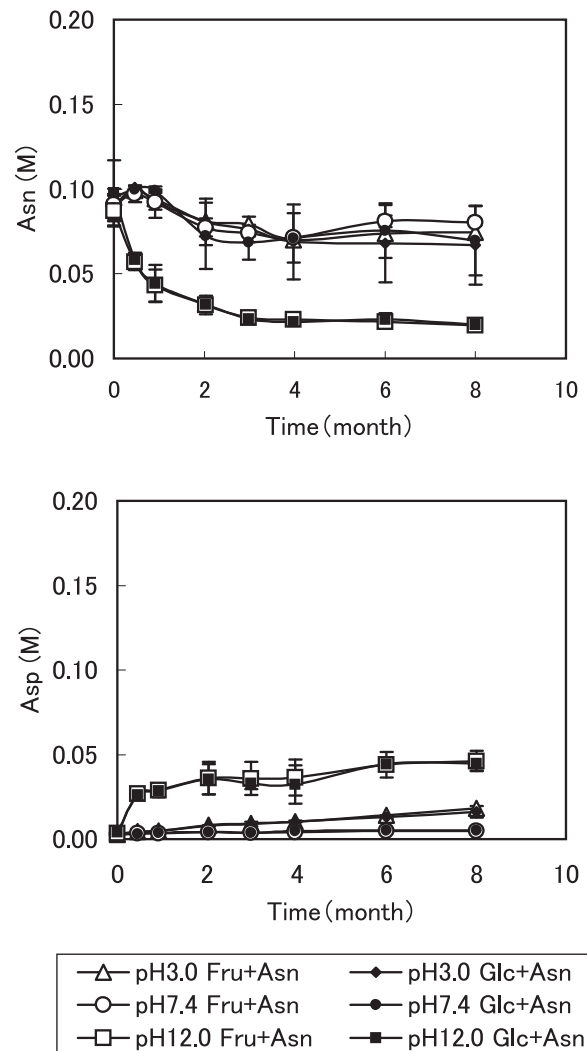


Fig. 3 Change in the free amino acid content

△, ◆, ○, ●, □ and ■ represent the Fru+Asn group at pH 3.0, the Glc+Asn group at pH 3.0, the Fru+Asn group at pH 7.4, the Glc+Asn group at pH 7.4, the Fru+Asn group at pH 12.0, and the Glc+Asn group at pH 12.0, respectively. Each value represents mean±S.D. over triplicate determinations.

生成率は約 0.34% であった。また、我々はこれまで行ってきた検討⁶⁾によると Glc と Asn の等モル溶液をガラス繊維濾紙に染み込ませて 180°C で 1 分間フライした場合、Asn に対する AA 生成率は約 0.1% であった。また、もやしを 200°C に加熱したフライパンで 4 分間攪拌しながら加熱調理した場合では、Asn に対する AA 生成率は約 0.085% であった²²⁾。これらの値と比較すると、今回の 37°C で長期間インキュベーションすることによる AA 生成率は低いものであった。

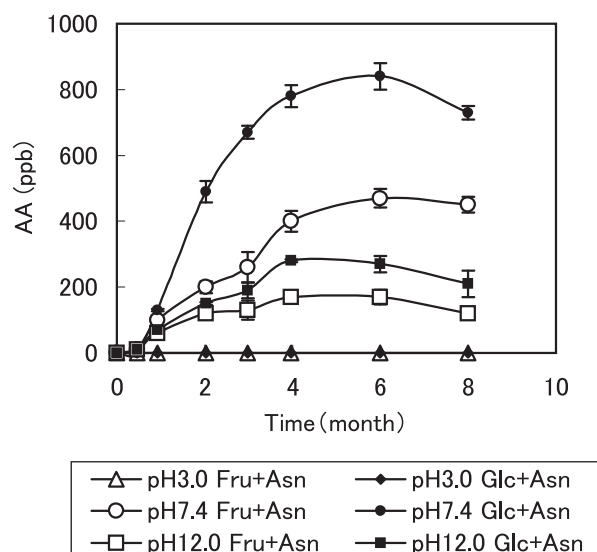


Fig. 4 Change in the AA production

△, ◆, ○, ●, □ and ■ represent the Fru+Asn group at pH 3.0, the Glc+Asn group at pH 3.0, the Fru+Asn group at pH 7.4, the Glc+Asn group at pH 7.4, the Fru+Asn group at pH 12.0, and the Glc+Asn group at pH 12.0, respectively. Each value represents mean±S.D. over triplicate determinations.

4. 考 察

本研究では、生体に含まれる Glc と Asn のメイラード反応により AGEs の一種として AA が生成される可能性について検討を行った。

今までの報告⁶⁾では、還元糖と Asn を 120℃ 以上に加熱することで AA が生成すること、また還元糖の中でも Fru の方が Glc よりも、Asn と加熱した場合に褐変度が高くなり、AA の生成率も高くなることが知られている。しかし、本研究においては 120℃ 以上に加熱することなく 37℃ で長期間インキュベーションすることによりアクリルアミドが生成することが明らかとなった。さらに各 pH において Fru+Asn 群の方が Glc+Asn 群よりも褐変度は高くなったが AA の生成率は低くなることが明らかとなった。これらのことから食品を高温加熱することによる AA の生成経路とは違う別の生成経路があることが示唆された。

また、Glc+Asn 群において pH 7.4, 37℃ で 1 ヶ月間インキュベーションすることによって AA の生成が認められた。ここで、ヒトの血液にも Glc や Asn が存在している。これらの物質は常に新陳代謝されているので、反応速度についてのさらなる検討が必要ではあるが、生体内で AGEs の一種として AA が生成される可能性が示唆された。

5. 結 論

本研究において、アスパラギンと還元糖溶液を高温加熱することなく 37℃ で長期間インキュベーションすることによりアクリルアミドが生成することを明らかにした。また、生体内において、Glc と Asn とのメイラード反応により AGEs の一種として AA が生成される可能性が示唆された。

参 考 文 献

- 1) Rosén J, Hllenäs K. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *The Analyst* 2002; 127: 880–882.
- 2) Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, et al. Acrylamide: A Cooking Carcinogen? *Chem Res Toxicol* 2000; 13: 517–522.
- 3) Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, et al. Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 4998–5006.
- 4) Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 2002; 419: 448–449.
- 5) Stadler RH, Blank I, Vagga N, et al. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002; 419: 449–450.
- 6) Ishihara K, Matsunaga A, Miyoshi T, et al. Formation of Acrylamide in a processed Food Model System, and Examination of Inhibitory Conditions. *J Food Hyg Soc Japan* 2005; 46: 33–39.
- 7) Monnier VM, Sell DR, Wu X, et al. The prospects of health and longevity from the inhibition of the Maillard reaction in vivo. *International Congress Series* 2002; 1245: 9–19.
- 8) Takeuchi M, Makita Z, Yanagisawa K, et al. Detection of Noncarboxymethyllysine and Carboxymethyllysine Advanced Glycation End Products (AGE) in Serum of Diabetic Patients. *Molecular Medicine* 1999; 5: 393–405.
- 9) Takeuchi M, Makita Z, Bucala R, et al. Immunological Evidence that Non-carboxymethyllysine Advanced Glycation End-products Are Produced from Short Chain Sugars and Dicarbonyl Compounds in vivo. *Molecular Medicine* 2000; 6: 114–125.
- 10) Kikuchi S, Shinpo K, Takeuchi M, et al. Glycation-a sweet tempter for neuronal death. *Brain Res Rev* 2003; 41: 306–323.
- 11) Münch G, Thome J, Foley P, et al. Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 1997; 23: 134–143.
- 12) Yang CW, Vlassara H, Peten EP, et al. Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9436–9440.
- 13) Stitt AW, Li YM, Gardiner TA, et al. Advanced Glycation End Products (AGEs) Co-Localize with AGE Receptors in the Retinal Vasculature of Diabetic and of AGE-Infused Rats. *Am J Pathol* 1997; 150: 523–531.
- 14) Baynes JW. Pyridoxamine, a versatile inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions. *International Congress Series* 2002; 1245: 31–35.

- 15) 今泉 勉, 山岸昌一. AGEs 研究の最前線. 東京. メディカルレビュー社出版. 2004: 15–25.
- 16) 今泉 勉, 山岸昌一. AGEs 研究の最前線. 東京. メディカルレビュー社出版. 2004: 51–59.
- 17) Nemoto S, Takatsuki S, Sasaki K, et al. Determination of acrylamide in foods by GC/MS using ^{13}C -labeled acrylamide as an internal standard. *J Food Hyg Soc Japan* 2002; 43: 371–376.
- 18) Ishihara K, Matsunaga A, Nakamura K, et al. Examination of Conditions Inhibiting the Formation of Acrylamide in the Model System of Fried Potato. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70: 1616–1621.
- 19) Rainer S. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1988; 431: 271–284.
- 20) Ponder GR, Richards GN. Pyrolysis of inulin, glucose, and fructose. *Carbohydr Res* 1993; 244: 341–359.
- 21) Martins SIFS, Marcelis ATM, Van Boekel MAJS. Kinetic modeling of Amadori N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-glycine degradation pathways. Part I-Reaction mechanism. *Carbohydr Res* 2003; 338: 1651–1663.
- 22) Ishihara K, Nara K, Yonezawa M, et al. Acrylamide Content in Vegetables Home-cooked by Heating. *J Cookery Sci Jpn* 2009; 42: 32–37.

ABSTRACT

Production of Acrylamide via the Long-term Incubation of Asparagine and Reducing Sugar Solutions at 37°C

Katsuyuki ISHIHARA^{1,2}, Miyako YONEZAWA¹, Hidenori KOGA¹, Tomihisa OHTA²

¹ CALBEE, Inc.

² Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

In this study, we examined whether AA can be produced in Fru+Asn and Glc+Asn solutions that are incubated at 37°C for a long time. Acrylamide was observed in both solutions at pH 7.4 and pH 12.0. The Fru+Asn group became a deeper brown, but had a lower AA production rate than the Glc+Asn group at each pH. This suggests the presence of an acrylamide production pathway different from those in related high-temperature processes. Moreover, the generation of acrylamide at pH 7.4 in the Glc+Asn solution at 37°C suggests that acrylamide can be produced as an advanced glycation end product in the living body.

Key words: acrylamide, advanced glycation end-products, Maillard reaction, reducing sugar, amino acid