

63

助成番号 0163

## 食品加工中のメイラード反応初期段階に対する塩類の影響

渡辺寛人<sup>1</sup>、早瀬文孝<sup>2</sup><sup>1</sup>明治大学農学部 <sup>1</sup>生命科学科、<sup>2</sup>農芸化学科

食品を貯蔵、加工する際の主要な成分間反応としてアミノ化合物とカルボニル化合物との間に起きるメイラード反応があげられる。この反応においては、アマドリ化合物やジカルボニル化合物が生成する初期段階、複雑な構造を有するさまざまな物質(AGEs)が生成する後期段階を経て、さらに複雑な構造のメラノイジンが最終的に生成する。メイラード反応は、食品の着色や香気成分の生成などに寄与する一方、タンパク質の栄養価および消化率の低下などを引き起こす。さらには、メイラード反応が生体内においても進行すること、またAGEsの蓄積量が老化や生活習慣病の進行度と関連していることが明らかとなっており、この反応の制御は医学分野でも重要な研究課題となっている。

以上のような背景から、食品加工中において、さらには生体内において起きるメイラード反応制御のための基礎的な知見を得ることを目的として、メイラード反応初期段階におけるジカルボニル化合物の生成に対して遷移金属塩類が与える影響について解析した。ジカルボニル化合物は反応中間体として後期段階進行に大きく影響する因子であり、メイラード反応を理解する上で非常に重要な化合物である。

D-フルクトースを単独あるいはリゾチームとの共存下で50℃、2週間反応させ、生成したジカルボニル化合物を2,3-Diaminonaphthaleneと反応させることによりbenzo[g]quinoxaline誘導体化し、これをHPLCにより分離した。反応液中の微量遷移金属イオンの影響を調べるため、キレート剤としてDiethylenetriamine pentaacetic acid (DETAPAC)を添加した系についても同様の解析を行った。その結果、フルクトースのみの反応により生成するジカルボニル化合物として、D-グルコソン(GLCO)、3-デオキシグルコソン(3DG)、テトロソン(TSO)、3-デオキシキシロソン、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシキシロソン、4-デオキシキシロソンが検出された。このうち3DGの生成量が最も多く、メチルグリオキサールが最も少なかった。DETAPACを添加した場合、3DG以外のジカルボニル化合物の生成量は減少した。このことから3DGは主として非酸化的な経路から、それ以外のジカルボニル化合物は主に酸化的な経路から生成すると推定された。リゾチームの存在下では、フルクトース単独の場合と比較してGLCOとTSOの生成量が増加したが、その他のジカルボニル化合物の生成量は減少した。GLCO、TSOは、還元糖とタンパク質の反応によっても生成すると考えられ、それ以外のジカルボニル化合物はタンパク質と速やかに反応することによりAGEを生成すると推定された。本研究で用いた検出系を利用した詳細な解析により、より好ましい食品加工プロセスを確立するための指針が得られるものと期待される。



## 27

助成番号 0163

## 食品加工中のメイラード反応初期段階に対する塩類の影響

助成研究者：渡辺 寛人（明治大学 農学部生命科学科）  
 共同研究者：早瀬 文孝（明治大学 農学部農芸化学科）

## 1 目的

食品の品質、加工特性などを決定するのは食品成分であるが、食品を貯蔵、加工する際には、さまざまな成分間の反応が起きることが知られている。その代表的な反応がアミノ酸、タンパク質などのアミノ化合物と、還元糖などのカルボニル化合物との間に起きるメイラード反応である。この反応においては、アミノ基とカルボニル基からアマトリ化合物やジカルボニル化合物が生成する初期段階、複雑な構造を有するさまざまな物質（AGEs）が生成する後期段階を経て、さらに複雑な褐色物質（メラノイジン）が最終的に生成する。このような各段階のメイラード反応は、醤油・味噌、焼いたパンなどさまざまな加工食品の着色や香気成分の生成などに寄与し、一般的には好ましい現象と考えられている。しかしながらその一方で、タンパク質の栄養価および消化率の低下や、活性酸素の生成などのマイナス側面も重要である。これらのことから、食品加工・貯蔵中のメイラード反応の制御について、多くの研究がなされている。

一方、メイラード反応が生体内においても進行してAGEsが生成すること、そしてAGEsの蓄積量が老化や、糖尿病および動脈硬化などの生活習慣病の進行度と関連していることが近年明らかとなってきた。さらにはメイラード反応が糖尿病合併症の直接の発症原因の一つであるとの推定もされている。そのため、メイラード反応の制御、およびAGEsによる生体機能の制御機構の解析は、医学分野でも重要な研究課題となっている。

以上のような背景から、食品加工中において、さらには生体内において起きるメイラード反応制御のための基礎的な知見を得ることを目的として本研究を行った。メイラード反応、とくに食品加工中のメイラード反応に寄与する重要な因子として、温度、pH、酸素濃度などについての解析が古くからなされているが、本研究では、遷移金属塩類の与える影響について解析した。

$\text{Cu}^{2+}$ や $\text{Fe}^{3+}$ などの遷移金属イオンが存在すると、メイラード反応においてスーパーオキシドなどの活性酸素種の生成が促進されるとともに、最終段階生成物であるメラノイジンの生成も促進されることは知られている。しかしながら、反応の初期段階におけるジカルボニル化合物群の生成などに対する遷移金属イオンの影響については、詳細な研究がなされていないのが現状である。ジカルボニル類は反応の条件によってその生成・消失速度が変化するが、それぞれが反応中間体として後期段階進行に大きく影響する因子であり、メイラード反応を理解する上で非常に重要な化合物である。例えば、3-デオキシグルコソソ（3DG）はタンパク質のリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基がピロールアルデヒドに修飾されたピラリンやアルギニン残基を修飾したイミダゾロン化合物などが、免疫化学的な手法を用いて生体内で検出さ

れている[1-3]。またグリオキサールやメチルグリオキサールは、タンパク質のリジン残基を修飾することにより GOLD や MOLD といった AGE を形成する。これらの AGE はヒトのレンズタンパク質や血清中で検出されている[4-6]。

本研究では、鋭敏な検出法を用いて、ジカルボニル化合物群の生成における遷移金属塩類の役割を解析するとともに、新奇なジカルボニル化合物の分離・同定を行った。

## 2 方法

### 2. 1 ジカルボニル化合物の調製

0.2M リン酸緩衝液(pH7.4)に、タンパク質としてリゾチーム 10mg/ml、還元糖として D-フルクトース 200mM、抗菌剤として  $\text{NaN}_3$  を 0.02% となるように溶解し、50°C で 2 週間インキュベートした。またフルクトースのみのものを同様の条件で反応させた。さらに、リン酸緩衝液中に微量含まれる遷移金属イオンの影響を調べるため、キレート剤として Diethylenetriamine pentaacetic acid (DETAPAC) を 5.5mM となるよう添加した系についても同様の反応を行った。すなわち、反応は (1) フルクトースのみを反応させたもの (F と略記)、(2) フルクトースとリゾチームを反応させたもの (LF)、(3) フルクトースのみを DETAPAC 存在下で反応させたもの (FD)、(4) フルクトースとリゾチームを DETAPAC 存在下で反応させたもの (LFD) の 4 種類である。これらよりそれぞれ、1, 2, 6, 12 時間、1, 3, 5, 7, 14 日目に反応液をサンプリングし誘導体化反応に供した。

### 2. 2 ジカルボニル化合物の誘導体化

反応溶液 500  $\mu\text{l}$  に、内部標準として終濃度 0.5mM となるよう 1,2-Cyclohexanedione を加えた。この際、DETAPAC を添加していない系 (F、LF) には、この後の操作中にジカルボニル化合物が酸化的に生成するのを防ぐために、終濃度 5.5mM となるよう DETAPAC を添加した。リゾチームを含む系 (LF、LFD) については、反応後の溶液を 10000rpm、20 分、4°C で遠心分離し、その上清 400  $\mu\text{l}$  をウルトラフリー (M.W.5000 cut : MILLIPORE) に供して除タンパクを行い、低分子量画分を得た。

このようにして得られたリゾチーム添加系 (LF、LFD) 低分子画分およびリゾチーム無添加系 (F、FD) に含まれるジカルボニル化合物を Fig. 1 に示したようにベンゾキノキサリン誘導体化した [7]。それぞれの反応溶液に終濃度 0.5mM となるように 2,3-Diaminonaphthalene (DN) を加え、50°C で 1 時間誘導体化反応を行った [7]。誘導体化反応の水溶性不純物の除去、および濃縮を目的として Sep-Pak C18 Cartridge に反応溶液を吸着させ、80%アセトニトリル溶出画分を HPLC 分析に用いた。HPLC カラムとしては逆相系 Puresil C18 を用い、ピーク検出には 268nm の吸収を用いた。

### 3 結果および考察

糖としてフルクトース、タンパク質としてリゾチームを用いて、メイラード反応初期に生成するジカルボニル化合物の定量的解析を行った。Fig. 2にフルクトースとリゾチームの反応において生成したジカルボニル化合物のベンゾキノキサリン誘導体のクロマトグラムの例を示した。10個以上のピークが検出されたが、これらのうち6個のピークは標品の誘導体の保持時間との比較から、グルコソン (GLCO)、3-デオキシグルコソン (3DG)、3-デオキシキシロソン (3DX)、テトロソン (TET)、グリオキサール (GLO)、メチルグリオキサール (MG) のそれぞれベンゾキノキサリン誘導体であると同定された。一方、Fig. 2の3DTと4DTと表したピークについては当初構造が不明であったので、これを単離・精製した後、FAB(+)-MS分析および各種NMR分析(データ省略)を行った。その結果、これらはそれぞれ、3-デオキシテトロソン (3DT)、4-デオキシテトロソン (4DT) のベンゾキノキサリン誘導体であると推定した。フルクトースのみを反応させた系では3DGの生成量が最も多く、メチルグリオキサールが最も少なかった。このことから、3DGは主要な生成物であり、AGE生成に対して重要な役割をもつことが示唆された。

各種反応系における経時的なジカルボニル化合物生成量の変化を検討した結果を Fig.3~7に示した。DETAPACを加えた場合(FD)では、3DG以外のジカルボニル化合物の生成量は減少した。このことからフルクトースより生成するジカルボニル化合物のほとんどは、遷移金属イオンの触媒作用による酸化開裂反応により生成することが示唆された。一方、3DGは主に非酸化的な経路から生成すると考えられる。

タンパク質(リゾチーム)存在下で反応させた場合(LFおよびLFD)は、フルクトース単独で反応させた場合(FおよびFD)と比較して、GLCO、TSOの生成量は増加したが、その他のジカルボニル化合物の生成量は減少した。タンパク質共存下で増加したジカルボニル化合物については、還元糖とタンパク質の反応により生成する経路の存在が示唆された。一方、タンパク質の共存下で減少したジカルボニル化合物は、タンパク質との反応性が高く、速やかにAGEへと変化することが示唆された。以上の定量的分析の結果と、これまでに報告されているジカルボニル化合物の反応機構とを考慮に入れ、フルクトースからのジカルボニル化合物の推定生成経路をFig. 8に模式的に示した。主な生成物として3DGが非酸化的にフルクトース単独から生成し、多くのジカルボニル化合物は酸化的に、フルクトース単独またはハインズ転位やアマドリ転位を経て生成すると推定した。

### 4 今後の課題

グルコースより生成するジカルボニル化合物について検討や、ジカルボニル化合物より生成するAGEについての解析を行うことで、より詳細なメイラード反応の反応機構が明らかになると考えられる。さらにこれらのメイラード反応解析は、より好ましい食品加工プロセスを確立するための指針を与えるものと期待される。

## 5 文献

- [1] Hayase, F., Nagaraj, R. H., Miyata, S., Njoroge, F. G., Monnier, V. M. (1989) Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during Maillard reaction in vivo. *J. Biol. Chem.* 264, 3758-3764.
- [2] Hayase, F., Hinuma, H., Asano, M., Kato, H., and Arai, S. (1994) Identification of novel fluorescent pyrrolopyridium compound formed from Maillard reaction of 3-deoxyglucosone and butylamine. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1936-1937.
- [3] Niwa, T., Katsuzaki, T., Miyazaki, S., Miyazaki, T., Ishizaki, Y., Hayase, F., Tatemichi, N., Takei, Y. (1997) Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. *J. Clin. Invest.* 99, 1272-1280.
- [4] Frye, E. B., Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R., and Baynes, J. W. (1998) Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins: advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 18714-18719.
- [5] Chellan, P. and Nagaraj, R. H. (1999) Protein crosslinking by the Maillard reaction: dicarbonyl-derived imidazolium crosslinks in aging and diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.* 368, 98-104.
- [6] Sady, C., Jiang, C. L., Chellan, P., Madhun, Z., Duve, Y., Glomb, M. A., and Nagaraj, R. H. (2000) Maillard reactions by alpha-oxoaldehydes: detection of glyoxal-modified proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1481, 255-264.
- [7] Yamada, H., Miyata, S., Igaki, N., Yatabe, H., Miyauchi, Y., Ohhara, T., Sasaki, M., Shoda, H., Oimomi, M., and Kasuga, M. (1994) Increase in 3-deoxyglucosone levels in diabetic rat plasma: specific in vivo determination of intermediate in advanced Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* 269, 20275-20280.

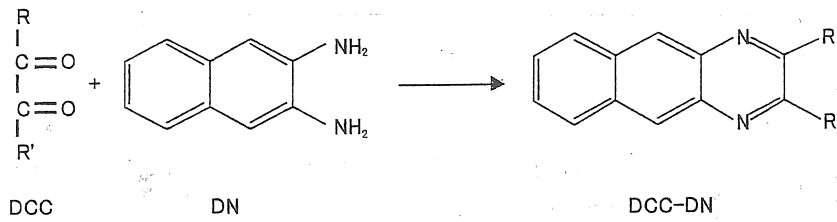


Fig. 1 Benzo[g]quinoxaline derivatives(DCC - DN) formed by reaction between 2,3-diaminonaphthalene(DN) and dicarbonyl compounds (DCC).

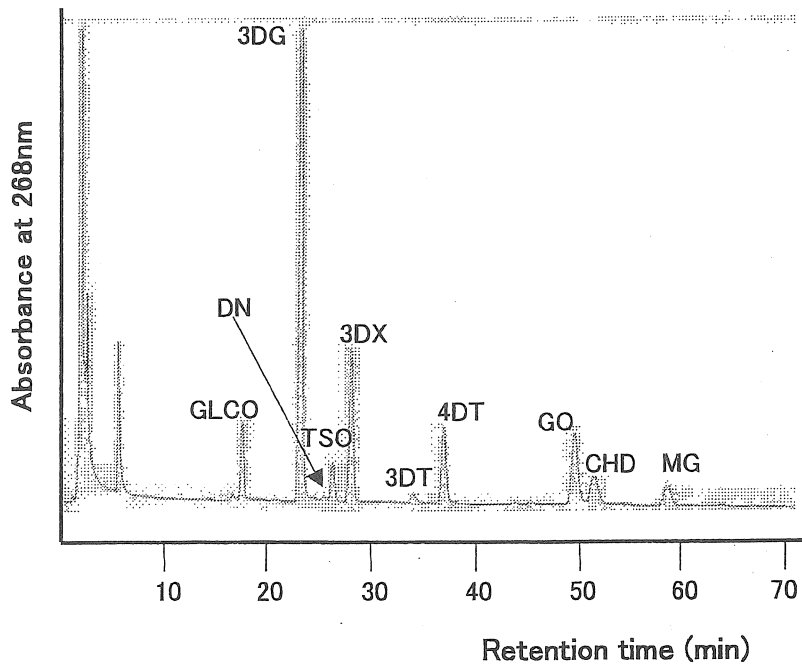


Fig. 2 HPLC Pattern of Benzo[g]-quinoxaline Derivatives of Dicarbonyls in Fructose Incubated at 50°C for 7days.

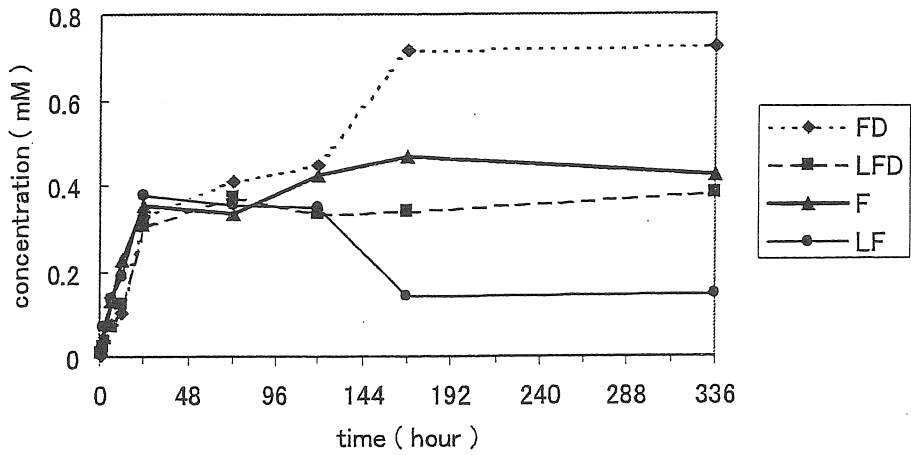


Fig. 3 Amounts of 3-deoxyglucosone in each reaction system.

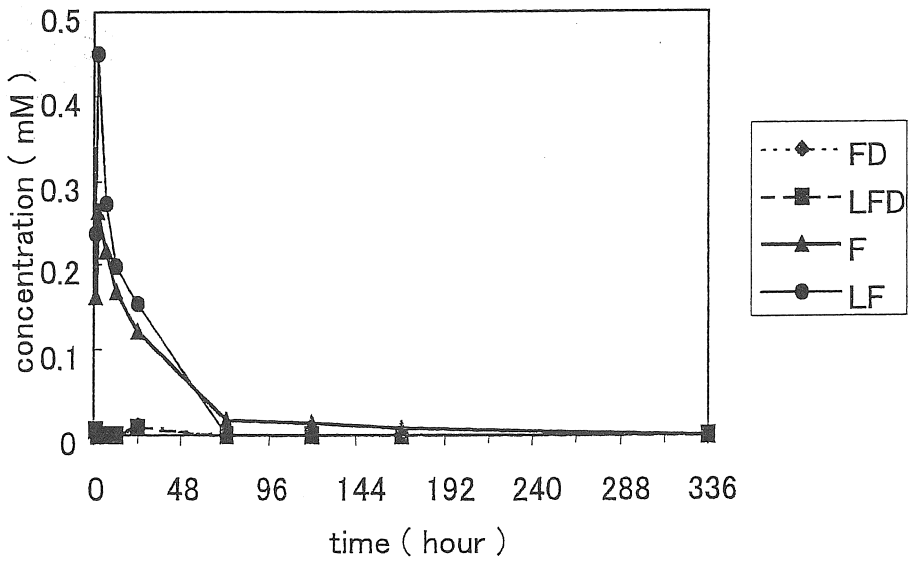


Fig. 4 Amounts of glucosone in each reaction system.



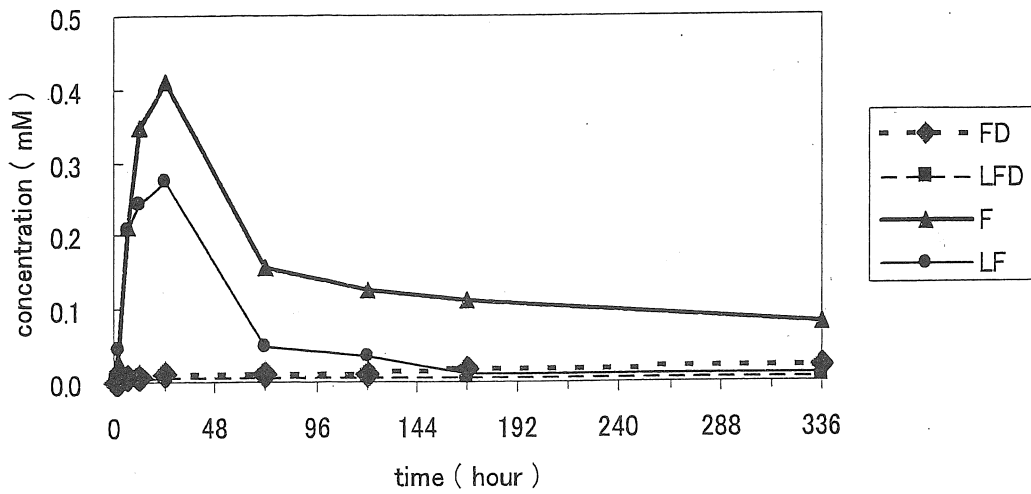


Fig. 5 Amounts of 3-deoxyxylosone in each reaction system.

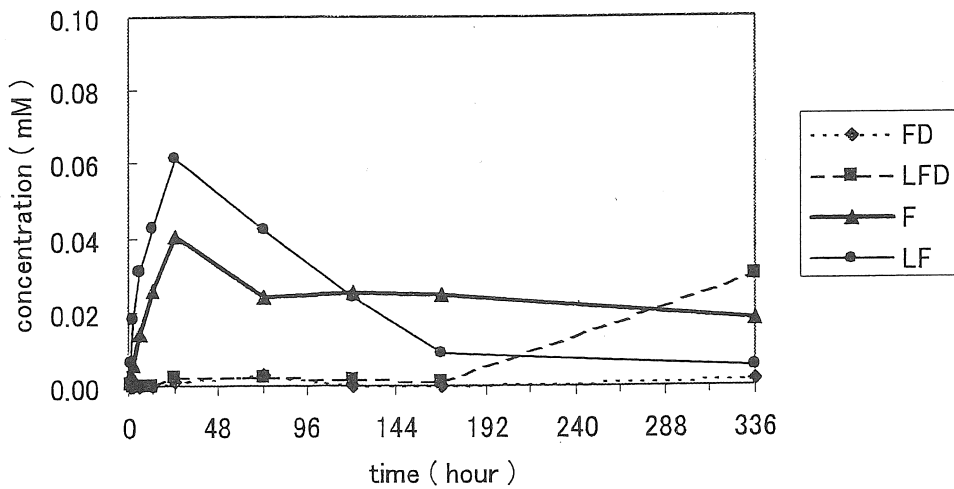


Fig. 6 Amounts of tetosone in each reaction system.

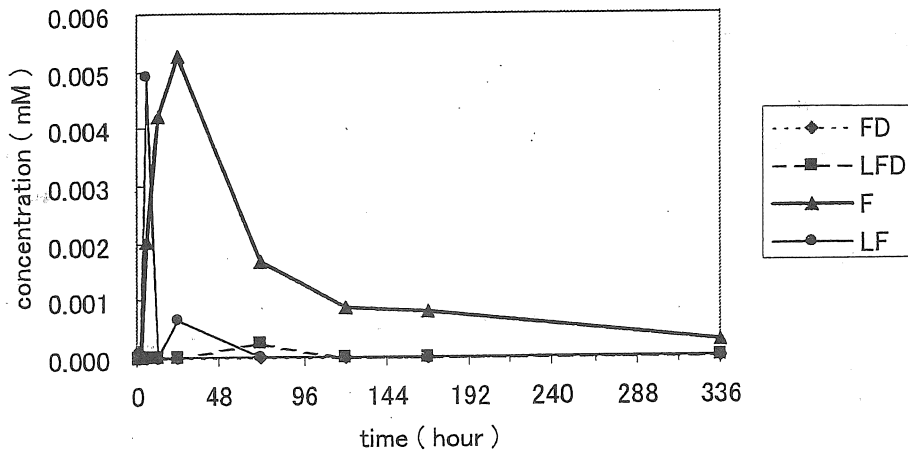


Fig. 7 Amounts of methylglyoxal in each reaction system.

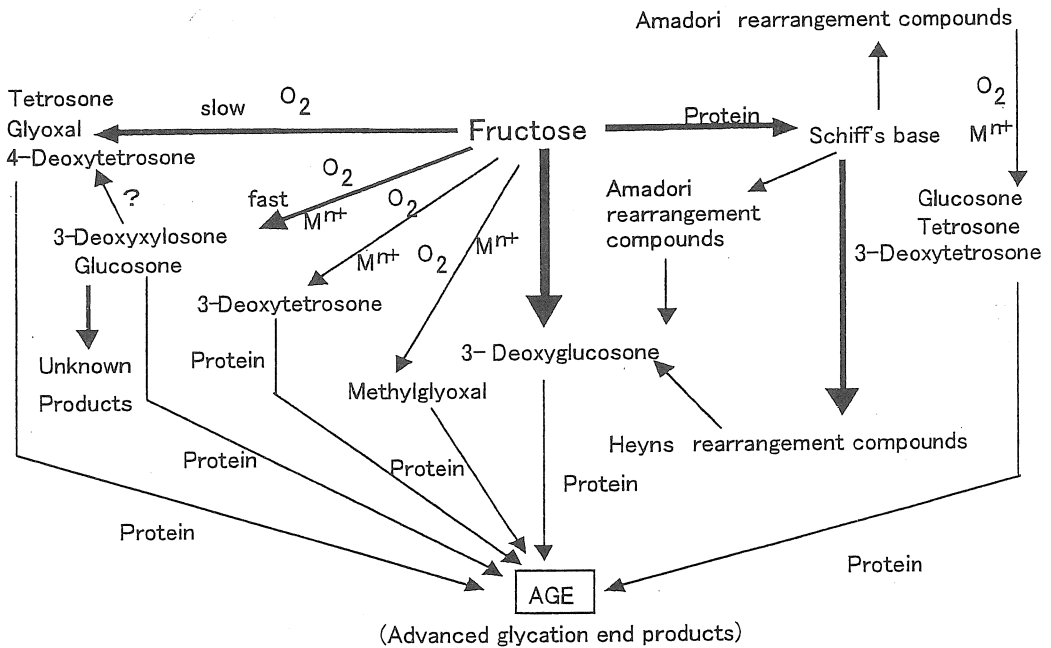


Fig. 8 Proposed pathways of AGE production via dicarbonyl compounds in fructose-protein system.

## Effects of transition metals on the early stage of Maillard reaction during food processing

Hirohito Watanabe<sup>1</sup> and Fumitaka Hayase<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Science, and <sup>2</sup>Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,  
Meiji University

### Summary

Typical nonenzymatic reaction occurring among food components is caused by amino and carbonyl compounds, called Maillard reaction. Dicarbonyl compounds, such as 3-deoxyglucosone (3-DG) and glyoxal are generated in the early stage of Maillard reaction and they react rapidly with proteins to form advanced glycation end products (AGEs). The generation of these compounds in the early stage of the reaction was investigated. Fructose was incubated in the absence or presence of lysozyme for 14 days at 50 °C in 0.2 M sodium phosphate buffer at pH 7.4. Dicarbonyls generated from each reaction system were incubated with 2, 3-diaminonaphthalene, and the benzo[g]quinoxaline derivatives of dicarbonyls were analyzed by reverse-phase HPLC. It revealed that 3-DG was predominant in this reaction system, whereas lower amount of other dicarbonyls (3-deoxyxylosone, glyoxal, glucosone, tetrosone, methylglyoxal, 3-deoxytetrosone, and 4-deoxytetrosone) were also generated. These results suggest the important role of 3-DG in the formation of AGEs.

In order to evaluate the effect of transition metal ions contained in the buffer, diethylenetriamine pentaacetic acid (DETAPAC) was used to chelate metals. Depletion of metals resulted in the considerable reduction of glucosone, tetrosone, 3-DX, and glyoxal, suggesting these dicarbonyls arise from the oxidative pathway. Whereas the amounts of 3-DG were not reduced, suggesting 3-DG is generated from the non-oxidative pathways. Analysis using this method should reveal the generation mechanisms of dicarbonyl compounds and their contribution to the formation of AGEs.