

食品中のアクリルアミドの生成抑制 に関する研究

長岡技術科学大学大学院工学研究科
材料工学専攻

小林篤

目 次

第 1 章 序論

1.1 加熱処理と圧力処理	2
1.2 アクリルアミドの性状と人体への影響	3
1.3 食品中でのアクリルアミドの生成機構	5
1.4 食品中のアクリルアミドに関する海外での動向	9
1.5 食品中のアクリルアミドに関する日本国内の動向	12
1.6 日本の伝統食品である米菓のアクリルアミド含有量	16
1.7 アミノ酸との付加反応によるアクリルアミドの低減	19
1.8 有機反応に対する圧力効果	20
1.9 本研究の目的	21
参考文献	23

第 2 章 非遠心分離糖をモデル食品としたアミノ酸共存下でのアクリルアミドの生成抑制

2.1 緒言	35
2.2 実験材料および実験方法	35
2.2.1 試薬および実験材料	35
2.2.2 NCS のアクリルアミド抽出と精製	36
2.2.3 LC-MS/MS によるアクリルアミドの定量分析	37
2.2.4 NCS の還元糖量測定	38
2.2.5 NCS のアミノ酸分析	38
2.2.6 アミノ酸を添加した NCS 水溶液のアクリルアミド生成量の測定	38

2.2.7	NCS 水溶液の pH 調整とシステイン添加によるアクリルアミド生成量の測定	41
2.2.8	pH 測定	41
2.2.9	統計解析	41
2.3	実験結果	
2.3.1	NCS 中でのアクリルアミドの添加回収試験	41
2.3.2	NCS のアクリルアミド含有量	42
2.3.3	NCS の還元糖量及びアミノ酸分析	43
2.3.4	アミノ酸を添加した NCS 水溶液のアクリルアミド生成量	45
2.3.5	システインを添加した NCS 水溶液中でのアクリルアミドの生成抑制	46
2.4	考察	47
2.5	結論	50
	参考文献	52

第 3 章 高压処理によるアクリルアミドの生成抑制

3.1	緒言	58
3.2	実験材料及び実験方法	59
3.2.1	試薬及び実験材料	59
3.2.2	圧力試験装置及び試験方法	60
3.2.3	アクリルアミドの抽出と精製	62
3.2.4	LC-MS/MS によるアクリルアミドの定量分析	63
3.2.5	紫外可視分光光度計によるメラノイジン濃度の測定	64
3.2.6	pH 測定	64
3.2.7	統計解析	64

3.3 実験結果	65
3.3.1 加圧下でのアクリルアミドの生成量	65
3.3.2 加圧下でのメラノイジンの生成量	65
3.3.3 pH測定	66
3.3.4 圧力、アクリルアミド生成量、メラノイジン生成量の相関性	68
3.4 考察	69
3.5 結論	74
参考文献	76

第4章 100 MPa以下の圧力によるアクリルアミドの生成抑制とメイラード反応の制御

4.1 緒言	81
4.2 実験材料及び実験方法	81
4.2.1 試薬及び実験材料	81
4.2.2 試料調製	82
4.2.3 圧力試験装置及び試験方法	82
4.2.4 アクリルアミドの抽出と精製	84
4.2.5 LC-MS/MSによるアクリルアミドの定量分析	85
4.2.6 紫外可視分光光度計によるメラノイジン濃度及び褐変度の測定	86
4.2.7 pH測定	86
4.2.8 統計解析	86
4.3 実験結果	87
4.3.1 加圧下でのアスパラギン - グルコース水溶液のアクリルアミド生成量	87

4.3.2	加圧下でのアスパラギン - グルコース水溶液のメラノイジン生成量	87
4.3.3	pH 測定	88
4.3.4	アクリルアミド及びメラノイジン生成の圧力依存性	88
4.3.5	圧力、アクリルアミド生成量、メラノイジン生成量、pH の相関性	90
4.3.6	システインを添加したアスパラギン - グルコース水溶液のアクリルアミド生成量	93
4.3.7	システインを添加したアスパラギン - グルコース水溶液のメラノイジン生成量	93
4.3.8	システインを添加したアスパラギン - グルコース水溶液の pH 測定	93
4.3.9	NCS 水溶液のアクリルアミド生成量	95
4.3.10	NCS 水溶液の褐変度	96
4.3.11	NCS 水溶液の pH 測定	96
4.4	考察	98
4.5	結論	105
	参考文献	106

第 5 章 総括

5.1	食品加工におけるアクリルアミドに関する課題と本研究成果	112
5.2	本研究成果の応用と今後の展望	114
	公表資料	116
	謝辞	118

第 1 章

序論

1.1 加熱処理と圧力処理

調理とは、食品材料を栄養や嗜好の目的に応じて、衛生的に食品素材に適した処理をして、食べやすく、消化吸収しやすく、おいしくし、さらに、食欲を増すように外観を良くするために手を加えることである。加熱調理の特長は、以下のようにまとめられる¹⁾。

(1) 病原菌、腐敗菌や寄生虫卵を殺菌、殺虫して腐敗を防ぎ、安全な食物にする。

(2) 結合組織や脂肪組織の軟化、デンプンの糊化、タンパク質の熱変性、脂肪の溶融、水分の減少または増加、無機質の減少、ビタミンの減少により、食品の組織や成分に変化を起こす。

(3) 消化吸収率を増加する。

(4) 不味成分の除去、食品のテクスチャーの変化、調味料・香辛料・旨味成分の浸透または付与により、風味を増加する。

一方、熱に替わる新たな食品加工法として、1988年に林が食品への高圧利用を提唱した²⁾。高圧処理 (High-Pressure treatment) は、100 MPa 以上の静水圧を利用する技術であり、有害物質の生成や栄養素の破壊などの恐れが少ない非加熱処理である。熱の利用に比べて、圧力の利用はまだ実用例が少ない調理方法である。圧力処理の特長は、以下のようにまとめられる。

(1) 熱と圧力は、それぞれ独立して物質の状態変化を引き起こし、圧力に特有の変化が生じる。

(2) 高圧処理は、水の圧縮による物理的变化であり、100 MPa での水の体積変化は僅か4%で、その時に発生する圧力エネルギーは0.02 kcal/mol にすぎない³⁾。発生するエネルギーが少ないため、共有結合は開裂せず、熱に比べて栄養素の破壊、異臭や異常物質の生成が少ない。

(3) 圧力は、瞬時に伝達し、容器内での偏りが無く、均一な質的变化が保障できる。

熱の調理への利用は、糊化や消化性の向上のように、食品の品質を向上させることに始まり、微生物を制御して食品の保存期間を延長させるという役割もある。一方で、加熱に伴う発がん性物質の生成などの新たな課題が明らかとなっている。例えば、肉や魚を加熱するとクレアチニンと糖とアミノ酸が反応し、発がん性が疑われる化合物であるヘテロサイクリックアミンが生成する^{4,5)}。また、加熱調理で起こるメイラード反応は、食品の香気成分の生成、着色など食品の品質を左右する重要なものであるが、発がん性が疑われるアクリルアミドの生成にも関与している。

そのため、加熱処理による得失をあらためて理解し、熱と圧力の双方の利点を活かした食品加工技術の確立が必要である。本研究は、加熱処理の過程で生じるアクリルアミドの生成を抑制し、食品の品質と安全性を向上させた新たな食品加工方法の開発を目的としている。

1.2 アクリルアミドの性状と人体への影響

アクリルアミドは、分子量 71.08 の有機化合物であり、常温では無臭白色の結晶で、水に極めて溶けやすい性質を持っている。工業用途としては、アクリルアミドを重合して得られるポリアクリルアミドが、主に原油の三次回収助剤、排水処理用の凝集剤、製紙用の乾燥紙力増強剤、濾水剤、繊維助剤、洗濯糊、接着剤（合成糊）、塗料などに広く用いられている⁶⁾。ポリアクリルアミドは毒性として不活性であるが、ポリマー中へのモノマーの混入により環境へ放出される可能性がある⁶⁾。

アクリルアミドの人体に対する影響として、神経毒性や肝毒性といった中毒

症状が認められるほか、国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer, IARC）では、アクリルアミドをグループ 2A「ヒトに対しておそらく発がん性がある」化学物質として分類している⁷⁾。アクリルアミドの曝露経路は、経口、経皮、吸入であり、体内へ速やかに吸収される。吸収されたアクリルアミドは速やかに代謝され、その代謝物は広範な組織に分布する。アクリルアミドの代謝経路は 2 通り考えられており、1 つは肝臓でグルタチオン-S-トランスフェラーゼによりグルタチオン抱合体を生成し、尿中へ排出される経路である (Fig. 1.1)^{6,8)}。もう 1 つはチトクローム P450 (CYP) 2E1 により反応性の高い代謝物であるグリシドアミドへ変換される経路である^{6,8)}。グリシドアミドもまた、グルタチオン抱合されて尿中へ排出される。アクリルアミドは、ヘモグロビンをはじめ、細胞骨格に関わるタンパク質や精子プロタミンなどと結合する⁶⁾。反応性の高いエポキシドであるグリシドアミドは、ヘモグロビンや DNA と安定な付加体を形成することが示唆されている⁶⁾。これまでの疫学調査では、アクリルアミドがヒトへの曝露と発がんの関連性を示唆する報告はないものの、種々の遺伝毒性試験で陽性結果が得られていること、マウス及びラットを用いた発がん性試験において、アクリルアミドの投与は、発がん頻度の有意な増加を示していることから、ヒトで発がん性を示す可能性が高いと考えられる⁶⁾。また、グリシドアミドの投与試験において、アクリルアミドと同等の投与量で、同様の臓器に発がん性が見られること、遺伝毒性試験において、アクリルアミドが陰性結果を示した試験でも、グリシドアミドは陽性を示したことから、アクリルアミドよりもその代謝物であるグリシドアミドの方が主な発がん性の原因と見られている⁶⁾。最近の疫学調査では、国立研究開発法人国立がん研究センターが行った多目的コホート研究において、日本人の食事由来のアクリルアミド摂取量と各種がん疾患との関連は見られなかった⁹⁻¹⁶⁾。一方で、IARC の研究チーム

は実験的及び汎がんゲノム解析によって、ヒトの発がんにおいてアクリルアミドの曝露が広範囲に関与していることが明らかになったことを公表した¹⁷⁾。アクリルアミドの曝露量とヒトのがん罹患リスクに関して、一貫した傾向はみられていないが¹⁸⁾、その評価研究は未だ限定的であり、食品由来のアクリルアミドの人体への影響が懸念されている。

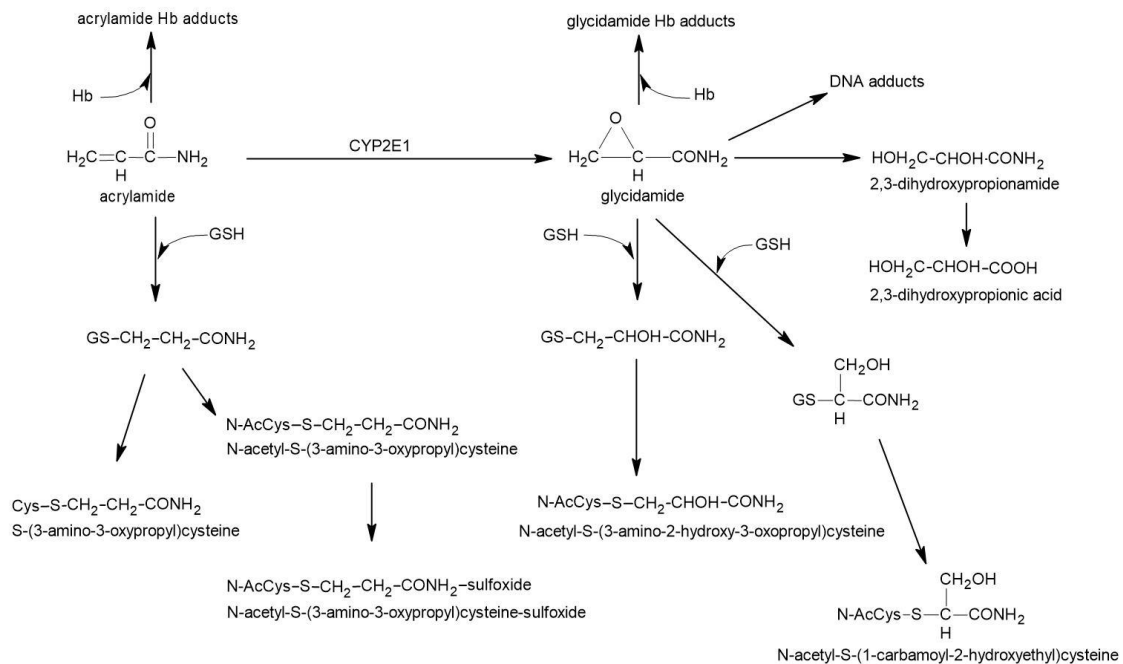


Fig. 1.1. アクリルアミドの代謝の仕組み

GSH = reduced glutathione; Hb = hemoglobin; N-AcCys = N-acetylcysteine

1.3 食品中でのアクリルアミドの生成機構

食品中でアクリルアミドが生成する主な要因として、食品の原材料に含まれているアミノ酸の一種であるアスパラギンとグルコース、フルクトースなどの還元糖を、揚げる、焼く、焙るなどの 120°C 以上に加熱した時に起こるメイラード反応が考えられている (Fig. 1.2)¹⁹⁻²²⁾。アスパラギンと還元糖を前駆物質としたアクリルアミドの主な生成経路では、最初にアスパラギンの α-アミノ基が還

元糖のカルボニル基と反応し、生成した N-グリコシル化合物は高温下で脱水してシッフ塩基を形成する²³⁾。低水分条件下では、N-グリコシル化合物、シッフ塩基ともに比較的安定しているが、高水分条件下では、シッフ塩基が加水分解して前駆体に戻るか、あるいはアマドリ転位によって異性化して安定中間体（アマドリ転位生成物）になる可能性がある^{20,23)}。シッフ塩基は加熱により脱炭酸して比較的安定な中間体を形成し²¹⁾、この脱炭酸シッフ塩基は、3つの経路でアクリルアミドを形成すると考えられている²²⁾。一つ目は、脱炭酸シッフ塩基を前駆体として、イミンの脱離反応を経てアクリルアミドを形成する経路²¹⁾、二つ目は脱炭酸シッフ塩基がアマドリ転位後にβ-脱離反応と炭素-窒素結合の開裂をして形成する経路^{20,23)}、そして三つ目は加水分解により3-アミノプロピオンアミド（3-APA）となり、さらにアンモニアを放出して形成する経路である^{21,22)}。一連の経路で生成するアクリルアミドは、アスパラギンに由来する炭素と窒素で構成されている。理論的には、加熱による脱炭酸反応や脱アミノ反応によって、アスパラギンのみでアクリルアミドを生成することができるが、アスパラギンからアクリルアミドへの効率的な変換には、還元糖に由来するカルボニル化合物の存在が必要である^{20,24)}。

メイラード反応が食品中のアクリルアミドの主要な生成経路とされているが、食品の原材料に含まれているアスパラギンや還元糖以外の成分が原因物質となっている可能性²²⁻²⁶⁾や、メイラード反応以外の反応経路からも生成する可能性^{27,28)}があり、世界中で生成メカニズムを解明するための調査研究が行われている。ケトン類やアルデヒド類のような還元糖以外のカルボニル化合物は、メイラード反応の出発物質としてアスパラギンと反応することができる²²⁻²⁶⁾。さらに、メイラード反応の中期段階で生成するアマドリ転位生成物などの反応中間体の分解や糖の分解により、α-ジカルボニル化合物や、香気成分のアルデヒ

ド類が生成し、これらもアクリルアミドの形成に関与する可能性がある^{24,25)}。メイラード反応以外からの生成経路としては、脂質の熱分解で生成するアクロレイン (2-プロペナール) や、その酸化物であるアクリル酸の関与が考えられている^{27,28)}。アクロレインはアルデヒドの一種であるため、それ自身がカルボニル源としてアスパラギンと反応する可能性がある他、酸化物であるアクリル酸はアミノ酸の分解で生成するアンモニアと高温で反応させると、多量のアクリルアミドが生成する²⁷⁾。還元糖よりもアクリルアミド生成の関与は低いものの、揚げ物や脂質の多い食品には、脂質から生成したアクリルアミドが含まれる可能性もある²⁸⁾。また、カリフォルニア式と呼ばれる方法で製造されるテーブルオリーブ (加熱殺菌したオリーブの実の漬物) は、加熱殺菌前の還元糖量及び遊離アミノ酸量とアクリルアミド生成量に有意な相関がみられず、脂質由来のアクリル酸とアミノ酸の加熱から生成したアンモニアや²⁹⁾、ポリフェノールに結合したペプチド³⁰⁾がアクリルアミド生成の有力な前駆体である可能性が示唆されている。他にも、アクリルアミドの中間体である 3-APA が、コーヒーやココア、ポップコーンなどから検出されている³¹⁾。3-APA は、生のジャガイモにおいても、アスパラギンの酵素的脱炭酸により形成される³²⁾。3-APA は、加熱によるアクリルアミド生成効率がアスパラギンの 12 倍以上であり³³⁾、潜在的に重要なアクリルアミド前駆体であると示唆されている。

アクリルアミドの主な生成経路であるメイラード反応は、常温でも進行する。そのため、製造過程で 120°C 以上の加熱を伴わない食品についても、アクリルアミドが含まれる可能性がある。発酵・熟成の段階でメイラード反応による褐変が起こる味噌と醤油のアクリルアミド含有量調査が報告されている。味噌と醤油を各 50 検体調査し、味噌は 50 検体すべて、醤油は 46 検体が定量限界以下であり、アクリルアミド含有量は低いことが明らかになっている³⁴⁾。一方で、

プラム、アプリコット、デーツなどの乾燥果実やプルーンジュースにアクリルアミドが含まれていることが判明している³⁴⁻³⁶⁾。乾燥プラム及びプルーンジュースのアクリルアミド含有量はそれぞれ最大で 124-332 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^{35,36)}、916 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ³⁷⁾と報告されている。乾燥プラムは長時間の乾燥工程 (70-80°C、24-36 時間)³⁷⁾で、プルーンジュースは煮詰める工程や容器充填後の低温殺菌の工程³⁶⁾でアクリルアミドが生成する。

現時点では、食品中でアクリルアミドが生成する仕組みは完全には解明されておらず、食品中のアクリルアミドの低減と生成抑制を図るために、生成経路の解明が重要な課題となっている。

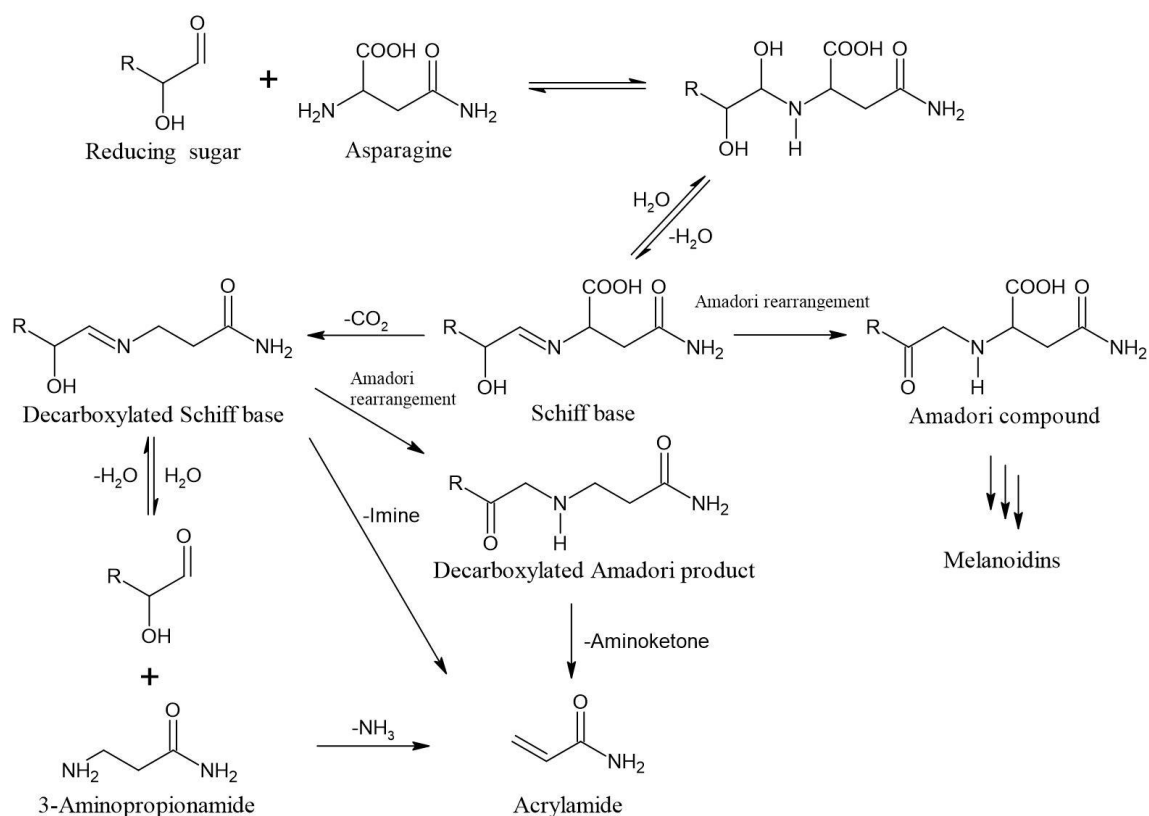


Fig. 1.2. 還元糖とアスパラギンを前駆物質とするアクリルアミドの生成経路

1.4 食品中のアクリルアミドに関する海外での動向

2002年4月にスウェーデン政府は、ストックホルム大学との共同研究の結果として、ジャガイモのような炭水化物を多く含む食材を120°C以上の高温で調理した際にアクリルアミドが生成することを発表した³⁸⁾。この発表以降、特にポテトチップスなどのジャガイモ加工品の摂取量が多い欧米で、加工食品中のアクリルアミド含量に大きな関心が払われてきた。食品に含まれるアクリルアミドが明らかに原因であると特定された健康被害はこれまで報告されていないが、食品汚染物質のリスク評価を行う国際機関であるFAO/WHO合同食品添加物専門家会議（Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA）は、食品を通じて、長期間にわたってアクリルアミドを取り続けることによって健康への悪影響が生じる懸念があると結論づけ、食品のアクリルアミド濃度を低くするために適切な努力を継続すべきであると勧告している^{39,40)}。

国際食品規格の策定などを行う国際機関であるコーデックス委員会では、2003年から食品添加物・汚染物質部会で食品中のアクリルアミドについて検討を開始し、その後、食品汚染物質部会で低減のための実施規範の検討が続けられ、2009年7月の総会で「食品中のアクリルアミド低減のための実施規範」が国際規格として最終採択された⁴¹⁾。

アメリカ食品医薬品局（FDA, Food and Drug Administration）は、2002～2006年、及び2011～2015年にかけて、米国内の食品のアクリルアミド含有実態調査及びトータルダイエットスタディ（危害要因の摂取量の推定）を行い、食品からのアクリルアミド摂取量の調査データを公表した^{42,43)}。2016年には、生産者、製造者、外食事業者が食品中のアクリルアミドを削減するためにとるべき措置をまとめた「事業者向けガイダンス（Guidance for Industry: Acrylamide in Foods）」を公表し、事業者が自身の製造する食品に含まれるアクリルアミドのレベルを

認識して、可能であれば製品中のアクリルアミドを削減する取り組みを検討することを推奨している⁴⁴⁾。

米国カリフォルニア州では、独自の州法として、安全飲料水および有害物質施行法、通称「プロポジション 65」を定め、州が指定する規制対象化学物質の曝露量を上回る製品は、規定のルールに従って警告表示を行い、その製品の使用により健康被害が生じる可能性があることを消費者に開示しなければならないとしている (Fig.1.3)⁴⁵⁻⁴⁸⁾。アクリルアミドについても、対象物質として挙げられており、がんを引き起こす重大なリスクのないレベル (No significant risk level, NSRL) や生殖毒性に影響が出ない最大許容用量レベル (Maximum allowable dose level, MADL) が示されている⁴⁹⁾。「プロポジション 65」の施行において、2021 年の第一四半期で違反通知 (製品がプロポジション 65 の警告要件に違反していると民間の関係者から製造業者に申し立てる法的文書) の最も多かったカテゴリーは食品で、全体の 39%を占めており、対象物質ではアクリルアミドが鉛に次いで 2 番目に多かった⁵⁰⁾。また、2016 年に提出されたプロポジション 65 の違反通知のうち、アクリルアミドに関わるものは 32 件 (全体の 2%) であったが、2020 年には 453 件 (全体の 13%) にのぼり⁵¹⁾、食品中のアクリルアミドをめぐる訴訟の件数は増加傾向にある。

欧州連合 (EU) では、フライドポテトやポテトチップスなどのジャガイモ加工品、パンや朝食用シリアルなどの穀物加工品、コーヒー及び代用コーヒー、ベビーフード及び乳幼児向けシリアル加工品のアクリルアミドを低減する方法を調査研究し、食品・飲料品の業界団体 (Food Drink Europe, FDE) が、中小の事業者でも実施可能な低減技術を、「アクリルアミドツールボックス (Acrylamide Toolbox)」として 2005 年から情報提供している⁵²⁾。また、EU では加盟国内の食品事業者に対し、食品中のアクリルアミドの低減対策を義務化する法案が

2017年に採択され、2018年に発効した⁵³⁾。対象は、「アクリルアミドツールボックス」で低減技術が提供されている食品の事業者である。各食品の最新のアクリルアミド濃度データに基づいて設定されたベンチマーク濃度（アクリルアミドの低減策の有効性を検証するために使用されるパフォーマンス指標）よりも、無理なく到達可能な範囲で、なるべく低いアクリルアミド濃度を達成するために、食品事業者は低減措置を取らなければならないとしている。

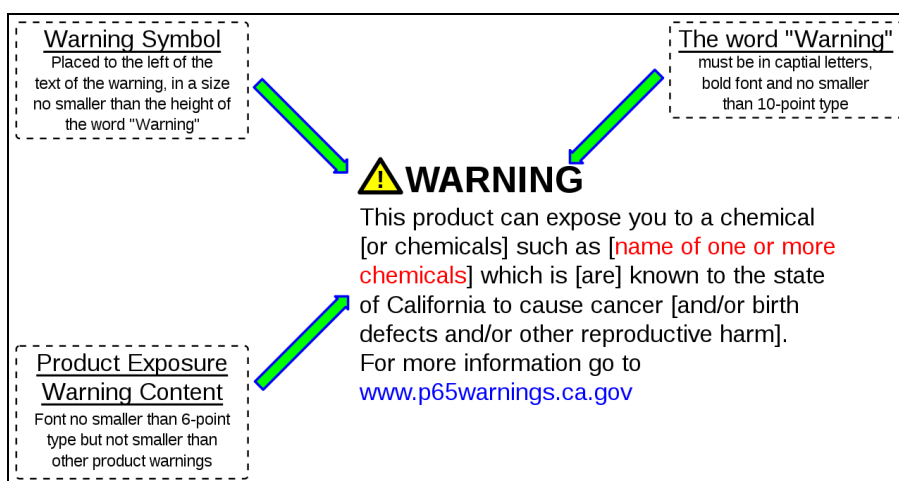


Fig. 1.3. プロポジション 65 の警告表示

上：サンフランシスコの店舗で販売されているコーヒーや焼き菓子には、がんや生殖毒性の原因となる化学物質であるアクリルアミドが含まれていることを警告する看板（abc News, 2013 年 5 月 18 日撮影）。

下：プロポジション 65 の警告表示の方法

1.5 食品中のアクリルアミドに関する日本国内の動向

2002 年 4 月のスウェーデン政府の発表後、厚生労働省が国立医薬品食品衛生研究所に対して加工食品中のアクリルアミドの調査を依頼し、研究班（厚生労働省）が調査を行った。

働科学特別研究)を組織した⁵⁴⁻⁵⁶⁾。また、2002年6月25日～27日にジュネーブで開催された「食品中のアクリルアミドと健康への影響に関する WHO/FAO 専門家会合」に研究班を派遣した⁵⁷⁾。また、独立行政法人食品総合研究所(現独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構)が、食品中のアクリルアミド含量の調査を行い、わが国で販売されている多くの食品にも、諸外国の報告と同様にアクリルアミドが含まれることを報告した⁵⁸⁾。さらに、農林水産省は、平成15年度から市販されている食品中のアクリルアミドの含有実態調査を行っており、平成28年度までの調査で、アクリルアミドが検出された食品には、米菓、即席麺、ほうじ茶、麦茶など日本特有のものも含まれている⁵⁹⁻⁶¹⁾。Table 1.1. にその一例を示す。

日本人のアクリルアミドの曝露量について、内閣府食品安全委員会は、加熱時に生じるアクリルアミドに関わる食品健康影響評価を行い、日本人の食事由来の推定アクリルアミド摂取量は、0.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日であると報告している¹⁸⁾。このうち、アクリルアミド曝露量が高い食品群は、炒めたもやしやフライドポテトなどの高温調理した野菜、コーヒーや緑茶・ウーロン茶・麦茶などの飲料、ポテトスナックや小麦系菓子類、米菓類などの菓子類であった¹⁸⁾。国立がん研究センターの多目的コホート研究において、食事頻度調査票及び28日間の食事記録調査から推定された日本人のアクリルアミド平均摂取量は、0.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日であり、アクリルアミド曝露量が高い食品群は、緑茶やコーヒー・ココアなどの飲料類、菓子類、野菜類、いも及びでんぷん類であった⁶²⁾。いずれの報告でも、日本人のアクリルアミド推定摂取量は、海外と比較して同程度、又は低い値である (Table 1.2.)。

Table 1.1. 日本国内で販売されている加工食品におけるアクリルアミドの含有実態調査結果

食品	最小値 (mg/kg)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
穀類加工品			
パン類	<0.03	0.17	-
即席中華麺	<0.02	0.08	0.03
シリアル食品	<0.005	0.63	0.078
フライドポテト	<0.03	1	0.23
砂糖甘味料類 (含みつ糖)	0.04	1.5	0.44
菓子類			
ビスケット類	<0.03	0.77	0.15
ポテトスナック	<0.03	4.6	0.61
米菓せんべい	<0.03	0.39	0.07
嗜好飲料類			
インスタントコーヒー	0.4	0.87	0.56
ほうじ茶 (茶葉)	<0.03	1	0.25
麦茶 (煎り麦)	0.1	0.65	0.21

Table 1.2. 各調査国、調査機関が報告したアクリルアミド推定摂取量

調査国、調査機関	アクリルアミド推定平均摂取量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日)
日本 (2016年、2018年)	0.12 - 0.24
香港 (2013年)	0.21
欧州 (2015年)	0.4 - 1.9
カナダ (2012年)	0.157 - 0.609
オーストラリア・ニュージーランド (2014)	1 - 4
国際機関 (JECFA [※]) (2011年)	1

※ ; 国連の食糧農業機関 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 及び世界保健機関 (World Health Organization, WHO) による FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA)

また、食品安全委員会は、アクリルアミドは遺伝毒性を有する発がん物質であると判断し、曝露マージン (Margin of exposure, MOE: 動物実験から得られた

影響の現れる用量とヒトの摂取量との大きさの違いを示す指標)を用いてヒトの健康に対するリスク評価を行っている (Table 1.3.)。毒性評価については、非発がん毒性で最も感受性の高いエンドポイントを、ラットの坐骨神経軸索変性に基づいて、有意な影響が 10%増加するベンチマーク用量の 95%信頼区間の下限値 (Benchmark dose lower confidence limit 10, BMDL₁₀) を 0.43 mg/kg 体重/日としている¹⁸⁾。発がん性毒性は、雌ラットの乳腺繊維腺腫における BMDL₁₀ の 0.30 mg/kg 体重/日、及び雄マウスのハーダー腺腫/腺癌における BMDL₁₀ の 0.17 mg/kg 体重/日としている¹⁸⁾。日本人の食事由来の推定アクリルアミド摂取量である 0.24 µg/kg 体重/日から算出した非発がん影響の MOE は、1,792 であり、発がん影響の MOE は、1,250 (マウス) 及び 708 (ラット) であった¹⁸⁾。この数値は、一般的にヒトへの発がん以外の健康影響の懸念が低いとされる「100 以上」より高く、ヒトへの発がん影響の懸念が低いとされる「10,000 以上」よりも低い。JECFA が算出した非発がん影響及び発がん影響の MOE³⁶⁾よりも高いものの、食品安全委員会はアクリルアミドのリスク評価を、ヒトにおける健康影響は明確ではないが、動物実験の結果及び日本人の推定摂取量に基づき、公衆衛生上の観点から懸念がないとは言えないと判断した¹⁸⁾。このため、ALARA (As Low As Reasonably Achievable) の原則に則り、引き続き合理的に達成可能な範囲で、できる限りアクリルアミドの低減に努める必要があるとしている¹⁸⁾。

農林水産省では、国際機関によるリスク評価結果や低減のための実施規範を踏まえて、食品関連事業者が自主的に行う食品中のアクリルアミド低減の取り組みを支援することを目的として、食品関連事業者向けに「食品中のアクリルアミド低減対策の指針(第1版)」を 2013 年 11 月に公表した⁶³⁾。この指針では、原料の調達、保管において、アクリルアミドの前駆物質となる還元糖及びアスパラギン濃度を低く抑えることが示されている。また、加工においては、加熱

温度や加熱時間の調整、食品添加物の活用が示されているが、現状として、他に有効な手法は報告されていない。

Table 1.3. アクリルアミドの非発がん及び発がん影響の曝露マージン

国名	影響及び NOAEL 又は BMDL ₁₀ (mg/kg 体重/日)	アクリルアミド 推定平均摂取量 (µg/kg 体重/日)	曝露マージン (MOE)
日本 (2016)	非発がん		
	坐骨神経軸索変性	0.24	1,792
	BMDL ₁₀ : 0.43 (ラット)		
	発がん		
	乳腺繊維腺腫	0.24	1,250
	BMDL ₁₀ : 0.30 (雌ラット)		
JECFA (2011)	非発がん		
	坐骨神経軸索変性	1	200
	NOAEL: 0.2 (ラット)		
	発がん		
	乳腺繊維腺腫	1	310
	BMDL ₁₀ : 0.31 (雌ラット)		
	ハーダー腺腫/腺癌	0.24	708
	BMDL ₁₀ : 0.17 (雄マウス)		
	ハーダー腺腫/腺癌	1	180
	BMDL ₁₀ : 0.18 (雄マウス)		

NOAEL、無毒性量；BMDL₁₀、有意な影響が 10%増加するベンチマーク用量 95% 信頼下限値；MOE=NOAEL 又は BMDL₁₀/推定アクリルアミド摂取量

1.6 日本の伝統食品である米菓のアクリルアミド含有量

米菓は煎餅、あられ・おかきに大別され、主に粳米、糯米から作られる。米菓生地には、還元糖やアミノ酸が含まれ、生地を乾燥させ、低水分状態にした後に、高温で焼く、揚げるなどの加熱をすることから、アクリルアミドが生成する可能性がある。嗜好品である米菓は、主原料である米の他に味付けなどに

関わる多くの副原料が使用されていて、多様な消費者ニーズに対応するために、その加工方法も一様ではない。農林水産省の平成 28 年度までの含有実態調査の中で、米菓については合計 306 点の結果を公表している^{34,59-61)}。この分析調査では、調査したサンプルの 6 割以上、多い時は全てからアクリルアミドが検出されたと報告している。米菓に対するアクリルアミドのリスク評価を行っていく上で、製造者が主体となり、原料や副原料、加工方法までを考慮した調査と米菓からのアクリルアミドの抽出と前処理の確立、さらにアクリルアミドの低減方法の検討が課題である。

本研究に取り組むにあたり、市販米菓のアクリルアミドの定量分析調査を独自に実施した。Table 1.4.に示すとおり、米菓 14 種の中で 6 種は定量限界値以下である一方、おかき 2 (Rice cracker 5) では 2351.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が検出された。おかき 2 は、原材料に黒糖を使用している点が、分析した他の米菓と異なっていた。比較試料とした黒糖を含む食品であるかりんとう (Japanese deep-fried cookie) は、1321.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が検出された。また、加工黒糖 (Brown sugar) からは 474.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が検出され、比較試料のフライドポテト 2 (Fried potato 2) と同程度のアクリルアミドを含有していた。副材料に黒糖を使用しているおかき 2 やかりんとうの アクリルアミド含量に比べて、加工黒糖のアクリルアミド含量が低いことから、黒糖を使用した米菓はその製造工程でアクリルアミド含量が増加することが示唆された。味付け前の素焼きせんべいでは、35.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、測定した多くの米菓は定量限界値以下であることから、米菓中のアクリルアミド含量は、主に味付けに用いる副原料が大きく影響しており、特に黒糖を使用した場合にアクリルアミド含量が高くなることが明らかとなった。なお、平成 28 年度に農林水産省が実施した米菓中のアクリルアミド含量調査では、原料 (粳米又は糯米)・製法 (焼く又は揚げる) が異なる米菓 153 点のアクリルアミド含量を比較し、

統計的に有意な差が見られなかったと報告している⁵⁸⁾。

Table 1.4. 米菓及び食品中のアクリルアミド含有量

No.	Sample	Acrylamide content ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	Rice cracker 1 (senbei 1, baked)	35.9 ± 4.8
2	Rice cracker 2 (senbei 2, baked, soy sauce)	< 25
3	Rice cracker 3 (senbei 3, baked, soy sauce)	< 25
4	Rice cracker 4 (okaki 1, baked, salt)	204.5 ± 8.3
5	Rice cracker 5 (okaki 2, baked, sweet)	2351.6 ± 43.2
6	Rice cracker 6 (okaki 3, fried, soy sauce)	< 25
7	Rice cracker 7 (okaki 4, baked, sweet)	< 25
8	Rice cracker 8 (okaki 5, baked, cheese)	< 25
9	Rice cracker 9 (senbei 4, baked)	36.9 ± 1.7
10	Rice cracker 10 (okaki 6, baked)	28.9 ± 2.0
11	Rice cracker 11 (okaki 7, baked, mixed with sugar)	<15
12	Rice cracker 12 (okaki 8, baked, mixed with cheese)	299.8 ± 6.9
13	Rice cracker 13 (okaki 9, baked, mixed with soybean)	306.9 ± 16.8
14	Rice cracker 14 (senbei 5, extruded, mixed with cheese)	49.6 ± 3.8
15	Japanese deep-fried cookie (karinto)	1321.0 ± 8.7
16	Brown sugar	474.4
17	Fried potato 1	419.0 ± 65.4
18	Fried potato 2	503.4 ± 60.0
19	Fried potato 3	277.1 ± 44.7
20	Instant coffee	129.1 ± 33.4
21	Soy sauce	trace
22	Fried kelp	26.3 ± 4.3
23	Roasted soybean powder	54.4 ± 1.8
24	Wasanbon	50.6 ± 7.2
25	NCS 1	478.5 ± 9.7
26	NCS 2	164.4 ± 9.8
27	NCS 3	303.1 ± 2.0
28	NCS 4	128.3 ± 1.9

Mean \pm SD (n = 3; only brown sugar, n = 1)
 Acrylamide content in Nos. 1-8 and Nos. 15-20 was determined by LC/MS (LOD = 15, LOQ = 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and that in Nos. 9-14 and Nos. 21-28 was determined by LC-MS/MS (LOD = 5, LOQ = 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

1.7 アミノ酸との付加反応によるアクリルアミドの低減

著者のグループは、本研究に関わる先行研究として、アクリルアミドが生成しづらい 120°C 以下の温度域で、食品成分であるアミノ酸との付加反応によるアクリルアミドの低減を検討した。その結果、求核官能基を持つリジンとシステインを用いたアクリルアミドとの付加反応によって、アクリルアミドを低減できることを明らかにした⁶⁴⁾。アクリルアミドに対するリジン及びシステインの付加反応の反応速度は、アミノ酸濃度、反応温度、及び反応系の pH に依存する。Fig.1.4 は、アクリルアミドとアミノ酸との反応における反応生成物を解析した結果である。アクリルアミドとリジンの反応で、1:1 付加体は同じ m/z 218 で 2 つの成分から成り、アクリルアミドはリジンの α -、 ϵ -NH₂ 基と反応したことを示した。さらに、アクリルアミドとリジンが 2:1 の付加体も検出された。一方、システインは、アクリルアミドと 1:1 の付加体を形成した。また、アクリルアミドの低減量と 1:1 付加体の生成量を比較した結果、アクリルアミドの低減と反応物の生成は同時に起こり、アクリルアミドが、リジンまたはシステインと直接的に反応していることを示している。リジンは、アクリルアミドの捕捉剤としてアルカリ性の pH 領域でより効果的に活用することができ、システインは、中性と酸性の pH 条件下でより効果的にアクリルアミドを捕捉することができる。また、アクリルアミドとアミノ酸との 1:1 の付加体は、食品加工中のアクリルアミド生成の包括的な指標となることが示唆されている。本手法は、既に生成したアクリルアミドの低減において有効であると考えられるが、原料から食品の加工段階におけるアクリルアミドの生成抑制に関する検討が必要である。

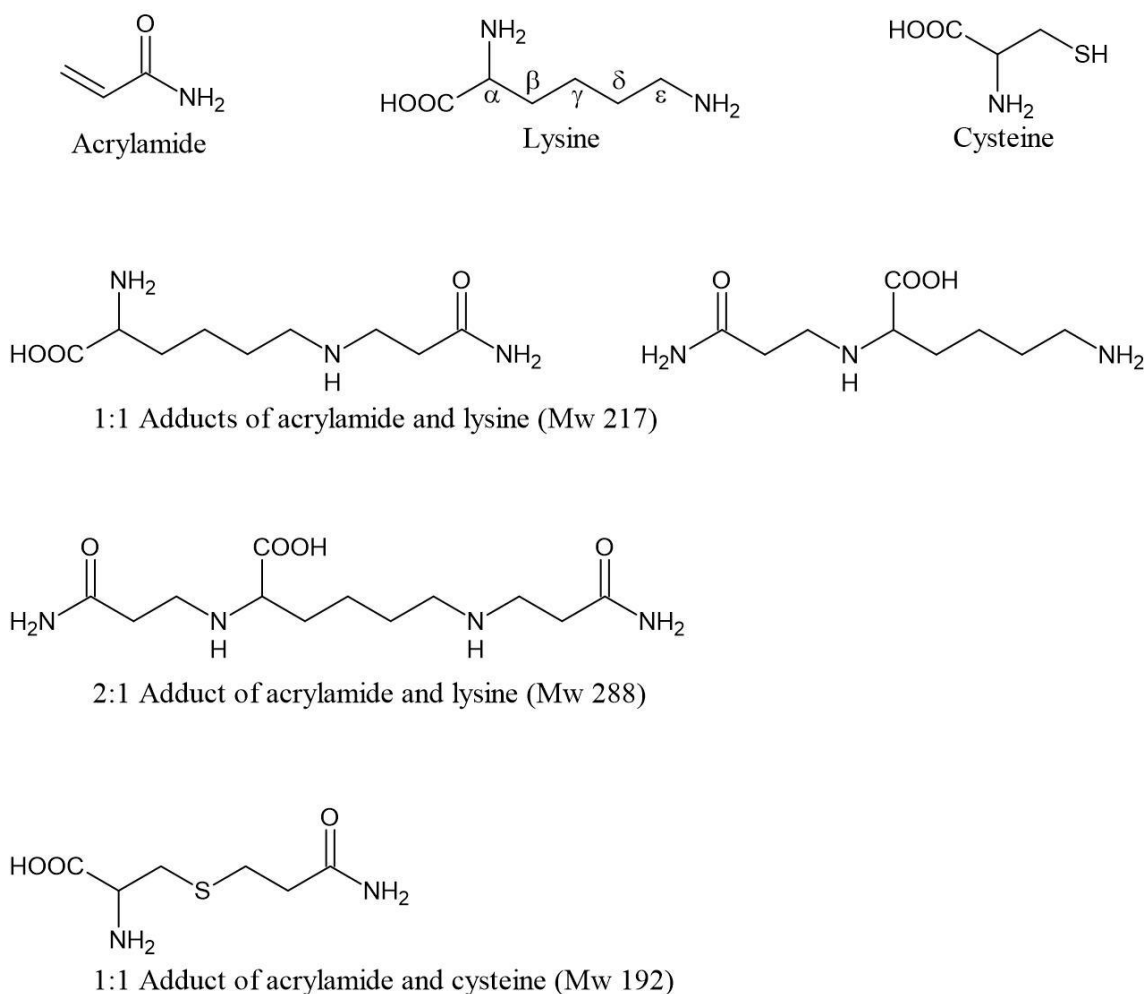


Fig. 1.4. アクリルアミドとアミノ酸の付加反応における反応生成物の構造式

1.8 有機反応に対する圧力効果

著者の所属するグループは、高圧処理の産業利用への視点から、400 MPa 以下の圧力を利用して、食品の物性変換^{65,66)}や機能性成分の増強⁶⁷⁻⁶⁹⁾、微生物の殺菌など^{70,71)}について報告している。食品加工における高圧処理の実施方法として、原材料や最終製品に対して、数分から 10 分程度の処理時間で、必要に応じて加温を組み合わせた条件が用いられる。食品加工に利用される高圧装置の最大圧力は、概ね 800 MPa までの圧力範囲であるが、設備導入と実用性を考慮すると、400 MPa 以下の圧力条件の方が適していると考えられる。

また、最近では、100 MPa 以下の比較的低い圧力で数時間から数日間の長時間の加圧を行うことにより、微生物の増殖を抑制しながら⁷²⁾、酵素分解の促進によって発酵や熟成に利用したり、化学反応を制御することでさまざまな有用物質を増やしたりすることも期待されている。

アクリルアミドが生成しやすい120°C以上の高温と400 MPa以下の圧力を組み合わせた処理や、100 MPa以下の圧力を保持することで有害物質を抑制するという報告事例は確認されていない。温度は反応速度を常に加速するが、圧力には加速効果も減速効果もあり⁷³⁾、加熱で起こる化学反応に加圧を併用すれば、望ましい生成物の収率を上げたり、望ましくない生成物の収率を下げたりすることもできると考えられる。有機反応に用いられる圧力は、通常1,000 MPaまで、液相の反応として取り扱うことができる。圧力と反応速度の関係は、次式で示される。

$$(\partial \ln k / \partial P)_T = -\Delta V^\ddagger / RT$$

ΔV^\ddagger は活性化体積で、原系と遷移状態との体積差を表している。分子の数の減少を伴う反応や環状の遷移状態を経る反応では、活性化体積は負となり、圧力の増大とともに反応速度が増大する。遷移状態での体積減少が大きければ大きいほど、加圧によって加速される⁷⁴⁾。

1.9 本研究の目的

前述のとおり、アクリルアミドは、加熱過程で生成し、発がん性が疑われるとして、国内外でその生成抑制が大きな課題として取り上げられている。各国で規制や低減のための指針が提示されているが、未だに食品加工上での有効な方法はほとんどない。本研究は、アクリルアミドの生成抑制に有効な方法を検討し、食品の品質を低下させることなく、化学的な安全性を高めた新たな食品

加工方法の確立を目指すものである。

第 2 章では、アクリルアミド含有量の多い黒糖類をモデル食品として、食品成分であるリジン、システインの共存下でのアクリルアミドの生成抑制を検討した。第 3 章では、400 MPa 以下の高圧処理を活用したアクリルアミドの生成抑制について示した。第 4 章では、100 MPa 以下の圧力を保持することで、アクリルアミドの生成を抑制し、メイラード反応を制御する方法について示した。

参 考 文 献

- 1) 山崎清子, 島田キミエ (1983). 調理の意義・目的と調理法, 「調理と理論」, 第2編, 同文書院, 東京, pp. 2-31.
- 2) 林力丸 (1989). 高圧下現象の食品分野への利用, 「食品への高圧利用」, 林力丸編, さんえい出版, 京都, pp. 1-30.
- 3) 大杉治郎 (1969). 「高圧実験技術とその応用」, 日本材料学会高圧力部門委員会編, 丸善, 東京, pp. 1-5.
- 4) 平本一幸 (2002). フリーラジカルを経由する環境変異・発がん物質の生成と発現に関する研究, 環境変異原研究, **24**, 91-98.
- 5) Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H. and Nagao, M. (2005). Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.*, **95**, 290-299.
- 6) 財団法人化学物質評価研究機構, 独立行政法人製品評価技術基盤機構, 独立行政法人新エネルギー産業技術総合開発機構 (2007). 化学物質の初期リスク評価書有害性評価書 Ver.1.0, No.35 アクリルアミド.
https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/002riskdoc.pdf
- 7) IARC, International Agency for Research on Cancer (1994). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, **60**, 389-433.
- 8) ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2012). Toxicological profile for acrylamide. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service.

<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp203.pdf>

- 9) Kotemori, A., Ishihara, J., Zha, L., Liu, R., Sawada, N., Iwasaki, M., Sobue, T. and Tsugane, S of the JPHC study group (2018). Dietary acrylamide intake and risk of breast cancer: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Cancer Science*, **109**, 843-853.
- 10) Kotemori, A., Ishihara, J., Zha, L., Liu, R., Sawada, N., Iwasaki, M., Sobue, T. and Tsugane, S of the JPHC study group (2018). Dietary acrylamide intake and the risk of endometrial or ovarian cancers in Japanese women. *Cancer Science*, **109**, 3316-3325.
- 11) Liu, R., Sobue, T., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ishihara, J., Kotemori, A., Zha, L., Ikeda, S., Sawada, N., Iwasaki, M. and Tsugane, S of the JPHC study group (2019). Dietary acrylamide intake and risk of esophageal, gastric, and colorectal cancer: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **28**, 1461-1468.
- 12) Liu, R., Zha, L., Sobue, T., Kitamura, T., Ishihara, J., Kotemori, A., Ikeda, S., Sawada, N., Iwasaki, M. and Tsugane, S. (2020). Dietary acrylamide intake and risk of lung cancer: the Japan Public Health Center based prospective study. *Nutrients*, **12**, 2417-2430.
- 13) Kito, K., Ishihara, J., Kotemori, A., Zha, L., Liu, R., Sawada, N., Iwasaki, M., Sobue, T. and Tsugane, S. (2020). Dietary acrylamide intake and the risk of pancreatic cancer: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Nutrients*, **12**, 3584-3598.
- 14) Zha, L., Sobue, T., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ishihara, J., Kotemori, A., Liu,

- R., Ikeda, S., Sawada, N., Iwasaki, M., Tsugane, S. and for the JPHC group. (2020). Dietary acrylamide intake and the risk of liver cancer: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Nutrients*, **12**, 2503-2515.
- 15) Zha, L., Liu, R., Sobue, T., Kiamura, T., Ishihara, J., Kotemori, A., Ikeda, S., Sawada, N., Iwasaki, M., Tsugane, S. and for the HPHC study group. (2021). Dietary acrylamide intake and the risk of Hematological malignancies: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Nutrients*, **13**, 590-603.
- 16) Ikeda, S., Sobue, T., Kitamura, T., Ishihara, J., Kotemori, A., Zha, L., Liu, R., Sawada, N., Iwasaki, M. and Tsugane, S. on behalf of the JPHC study group. (2021). Dietary acrylamide intake and the risks of renal cell, prostate, and bladder cancers: a Japan Public Health Center-based prospective study. *Nutrients*, **13**, 780-790.
- 17) Zhivagui, M., Ng, A. W. T., Adrin, M., Churchwell, M. I., Pandey, M., Renard, C., Villar, S., Cahais, V., Robitaille, A., Bouaoun, L., Heguy, A., Guyton, K. Z., Stampfer, M. R., McKay, J., Hollstein, M., Olivier, M., Rozen, S. G., Beland, F. A., Korenjak, M. and Zavadil, J. (2019). Experimental and pan-cancer genome analyses reveal widespread contribution of acrylamide exposure to carcinogenesis in humans. *Genome Research*, **29**, 521-531.
- 18) 食品安全委員会 (2016). 評価書 加熱時に生じるアクリルアミド.
https://www.fsc.go.jp/osirase/acrylamide1.data/acrylamide_hyokasyo1.pdf
- 19) Becalski, A., Lau, B. P.-Y., Lewis, D. and Seaman, S. W. (2003). Acrylamide in food: occurrence, sources, and modeling. *J. Agric. Food Chem.*, **51**,

802-808.

- 20) Yaylayan, V. A., Wnorowski, A. and Locas, C. P. (2003). Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1753-1757.
- 21) Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Pizzi, G. P. and Villagran, M. D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4782-4787.
- 22) Stadler, R. and Studer, A. (2015). Acrylamide formation mechanisms. In "Acrylamide in food. Analysis, content and potential health effects," ed. Gökmen, V., Academic Press, Cambridge, pp. 1-17.
- 23) Blank, I., Robert, F., Goldmann, T., Pollien, P., Varga, N., Devaud, S., Saucy, F., Huynh-Ba, T. and Stadler, H. (2005). Mechanisms of acrylamide formation: Maillard-induced transformation of asparagine. In "Chemistry and safety of acrylamide in food. Advances in Experimental Medicine and Biology," Vol. 561, eds. Friedman, M. and Mottram, D., Springer, New York, pp. 171-189.
- 24) Eriksson, S. (2005). Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology. Doctoral thesis, Department of Environmental Chemistry, Stockholm University, Sweden.
<https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:197454/FULLTEXT01.pdf>
- 25) Ishihara, K., Matsunaga, A., Miyoshi, T., Nakamura, K., Nakayama, T., Ito, S. and Koga, H. (2005). Formation of acrylamide in a processed food model

- system, and examination of inhibitory conditions, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **46**, 33-39.
- 26) Tsutsumiuchi, K., Hibino, M., Kambe, M., Okajima, N., Okada, M., Miwa, J. and Taniguchi, H. (2005). Effect of carbohydrates on formation of acrylamide in cooked food models. *J. Appl. Glycosci.*, **52**, 219-224.
- 27) Gertz, C. and Klostermann, S. (2002). Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **104**, 762-771.
- 28) Ehling, S., Hengel, M. and Shibamoto, T. (2005). Formation of acylamide from lipids. In "Chemistry and safety of acrylamide in food. Advances in Experimental Medicine and Biology," Vol. 561, eds. Friedman, M. and Mottram, D., Springer, New York, pp. 223-233.
- 29) Casado, F. J. and Montaña, A. (2008). Influence of processing conditions on acrylamide content in black ripe olives. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 2021-2027.
- 30) Montaña, A., Casado, F. J. and Carle, R. (2015). Acrylamide in table olives. In "Acrylamide in food. Analysis, content and potential health effects," ed. Gökmen, V., Academic Press, Cambridge, pp. 229-251.
- 31) Granvogl, M. and Schieberle, P. (2007). Quantification of 3-aminopropionamide in cocoa, coffee and cereal products. Correlation with acrylamide concentrations determined by an improved clean-up method for complex matrices. *Eur. Food Res. Technol.*, **225**, 857-863.
- 32) Granvogl, M., Jezussek, M., Koehler, P. and Schieberle, P. (2004). Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes: a minor but potent

- precursor in acrylamide formation. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4751-4757.
- 33) Granvogl, M. and Schieberle, P. (2006). Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5933-5938.
- 34) 農林水産省 (2012). 有害化学物質含有実態調査結果データ集 (平成 15 ~22 年度).
https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/pdf/chem_15-22.pdf
- 35) Surma, M., Sadowska-Rociek, A. and Cieřlik, E. (2018). Assessment of thermal processing contaminant levels in dried and smoked fruits. *European Food Res. Tech.*, **244**, 1533-1543.
- 36) Becalski, A., Brady, B., Feng, S., Gauthier, B. R. and Zhao, T. (2011). Formation of acrylamide at temperatures lower than 100°C: the case of prunes and a model study. *Food Addit. Contam. Part A*, **28**, 726-730.
- 37) Montevecchi, G., De Paola, E. L., Simone, G. V., Masino, F., Garbini, D., Bardanera, M. and Antonelli, A. (2015). Development of a method for acrylamide determination in dried fruits and edible seeds available on the Italian market. Euro Food Chem XVIII, Madrid, October 13-16.
- 38) Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. and Törnqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4998-5006.
- 39) JECFA (2006). Acrylamide. *Safety evaluation of certain contaminants in food, WHO Food Additives Series 55, FAO Food and nutrition paper 82*, the

64th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, pp. 1-156.

- 40) JECFA (2011). Acrylamide (addendum). *Safety evaluation of certain contaminants in food, WHO Food Additives Series 63, FAO JECFA Monographs 8*, the 72nd meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, pp. 1-151.
- 41) FAO/WFO (2009). 食品中のアクリルアミド低減に関する実施規範。
https://www.maff.go.jp/j/syouan/kijun/codex/standard_list/pdf/cac_rcp67.pdf
- 42) FDA, Food and Drug Administration. (2018). Survey Data on Acrylamide in Food: Total Diet Study Results.
<https://www.fda.gov/food/chemical-contaminants-food/survey-data-acrylamide-food-total-diet-study-results>
- 43) FDA, Food and Drug Administration. (2019). Survey Data on Acrylamide in Food.
<https://www.fda.gov/food/chemical-contaminants-food/survey-data-acrylamide-food>
- 44) FDA, Food and Drug Administration. (2016). Guidance for Industry Acrylamide in Foods.
<https://www.fda.gov/media/87150/download>
- 45) OEHHA, Office of Environmental Health Hazard Assessment. (2021). About Proposition 65.
<https://oehha.ca.gov/proposition-65/about-proposition-65>
- 46) abc News. (2018). What to know about California's Prop. 65.

<https://abcnews.go.com/US/californias-prop-65/story?id=54123221>

- 47) OEHHA, Office of Environmental Health Hazard Assessment. (2021). Coffee and Proposition 65: Frequently asked questions.

<https://www.p65warnings.ca.gov/fact-sheets/coffee-and-proposition-65-frequently-asked-questions>

- 48) SheetLabels.com. (2018). Prop 65 warning labels-compliance deadline.

<https://www.sheetlabels.com/blog/category/label-industry/cosmetic-product-labeling/>

- 49) OEHHA, Office of Environmental Health Hazard Assessment. (2021). Proposition 65 No Significant Risk Levels (NSRLs) for Carcinogens and Maximum Allowable Dose Levels (MADLs) for Chemicals Causing Reproductive Toxicity.

<https://oehha.ca.gov/media/downloads/proposition-65/safeharborlist032521.pdf>

- 50) ビューローベリタスジャパン株式会社. (2021). カリフォルニアプロポジション 65 の新判例および施行動向 (2021 年 6 月現在)

<https://cps.bureauveritas.jp/news/210629.html>

- 51) State of California Department of Justice Office of the Attorney General. (searched at 2021.8.19). 60-Day Notice Search.

<https://oag.ca.gov/prop65/60-day-notice-search>

- 52) FDE, Food Drink Europe. (2019). Acrylamide Toolbox 2019.

https://www.fooddrinkeurope.eu/wp-content/uploads/2021/05/FoodDrinkEurope_Acrylamide_Toolbox_2019.pdf

- 53) EU, European Union (2017). Commission regulation (EU) 2017/2158 of 20 November 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food. *Official Journal of the European Union*, **60**, 24-44.
- 54) Nemoto, S., Takatsuki, S., Sasaki, K. and Maitani, T. (2002). Determination of acrylamide in foods by GC/MS using ¹³C-labeled acrylamide as an internal standard. *J. Food Hyd. Soc. Japan*, **43**, 371-376.
- 55) Takatsuki, S., Nemoto, S., Sasaki, K. and Maitani, T. (2003). Determination of acrylamide in processed foods by LC/MS using column switching. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **44**, 89-95.
- 56) 高附巧, 根本了, 佐々木久美子, 米谷民雄 (2004). 農産物の加熱調理によるアクリルアミドの生成, 食品衛生学雑誌, **45**, 44-48.
- 57) FAO/WHO (2002). FAO/WHO Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food, Geneva, June 25-27.
- 58) 吉田充, 小野裕嗣, 亀山眞由美, 忠田吉弘, 箭田浩士, 小林秀誉, 石坂眞澄 (2002). 日本で市販されている加工食品中のアクリルアミドの分析, 日本食品科学工学会誌, **49**, 822-825.
- 59) 農林水産省 (2014). 有害化学物質含有実態調査結果データ集 (平成 23 ~24 年度).
https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/pdf/chem_23-24_.pdf
- 60) 農林水産省 (2016). 有害化学物質含有実態調査結果データ集 (平成 25 ~26 年度).

https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/pdf/chem_25-26.pdf

- 61) 農林水産省 (2018). 有害化学物質含有実態調査結果データ集 (平成 27 ~28 年度).

https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/pdf/chem_27-28.pdf

- 62) Kotemori, A., Ishihara, J., Nakadate, M., Sawada, N., Iwasaki, M., Sobue, T. and Tsugane, S. for the JPHC FFQ validation study group. (2018). Validity of a self-administered food frequency questionnaire for the estimation of acrylamide intake in the Japanese population: the JPHC FFQ validation study, *J. Epidemiol.*, **28**, 482-487.

- 63) 農林水産省 (2013). 食品中のアクリルアミドを低減するための指針.
https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/acryl_amide/a_gl/pdf/131127_acrylamide_full.pdf

- 64) Kobayashi, A., Gomikawa, S., Yamazaki, A., Sato, S., and Konishi, T. (2014). Elimination of acrylamide by moderate heat treatment below 120°C with lysine and cysteine. *Food Sci. Technol. Res.*, **20**, 979-985.

- 65) 笹川秋彦, 杵淵美倭子, 山崎彬, 山田明文 (1994). 高圧処理を利用した米菓の製造, 「高圧バイオサイエンス」, 功刀滋, 鈴木敦士, 嶋田昇二, 林力丸編, さんえい出版, 京都, pp. 336-343.

- 66) 山崎彬, 杵淵美倭子, 山本和弘, 山田明文 (1996). 高圧処理を施した浸漬米の炊飯後の微細構造と物性, 高圧力の科学と技術, **5**, 168-178.

- 67) 杵淵美倭子, 関谷美由紀, 山崎彬, 山本皓二 (1999). 高圧処理を利用

- した玄米中への γ - アミノ酪酸 (GABA) の蓄積, 日本食品科学工学会誌, **46**, 323-328.
- 68) 杵淵美倭子, 関谷美由紀, 山崎彬, 山本皓二 (1999). 高压処理により γ - アミノ酪酸 (GABA) を蓄積させた玄米の一般生菌数の変化と加工玄米の性質, 日本食品科学工学会誌, **46**, 329-333.
- 69) 笹川秋彦, 内木由美子, 長島誠一, 山倉美穂, 山崎彬, 山田明文 (2006). 圧力処理を利用した GABA 富化玄米の製造とその特徴, *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 27-33.
- 70) 小林篤, 川村麻梨子, 大原絵里, 荻野美由紀, 星野純, 山崎彬, 西海理之 (2014). 高压処理の無菌化食品への利用, 高压力の科学と技術, **24**, 48-51.
- 71) 荻野美由紀, 西海理之 (2015). 高压処理とその後の加熱処理との組み合わせによる耐熱性芽胞の殺菌, 高压力の科学と技術, **25**, 334-342.
- 72) Ogino M., Nishiumi T. (2018). Control of the generation time of microorganisms by long-term application of hydrostatic pressure of 50 MPa or less. *Food Sci. Technol. Res.*, **24**, 289-298.
- 73) 中原勝 (1991). 液相反応に対する圧力効果はなぜ起こるか, 「高压科学と加圧食品」, 林力丸編, さんえい出版, 京都, pp. 41-57.
- 74) 上原忠夫, 齋藤研一, 山本嘉則 (1989). 高压での有機合成反応の新展開. 有機合成化学協会誌, **47**, 321-329.

第 2 章

非遠心分離糖をモデル食品とした
アミノ酸共存下でのアクリルアミドの生成抑制

2.1 緒言

非遠心分離糖 (Non-centrifugal cane sugar, NCS) は、サトウキビ搾汁を濃縮し、分蜜せずに作られる製品で、マスコバド、パネラ、黒糖といった名称で知られている^{1,2)}。その濃厚な甘さと独特な香りから、NCS は菓子などの様々な加工食品に用いられている。NCS を特徴づける独特の風味と色調は、製造工程中の加熱で生じる^{3,4)}。その加熱工程で、NCS の持つ抗酸化能に起因する抗酸化性化合物の一部がメイラード反応から生じる^{5,6)}。同時に、このメイラード反応の過程でアクリルアミドが生成し、NCS に蓄積される⁷⁾。さらに、NCS にはサトウキビ由来の還元糖やアミノ酸が多く含まれているため^{8,9)}、NCS を原材料とした食品は加工の際に、さらにアクリルアミドが生成する可能性がある。NCS のようなアクリルアミドが生成し易い食品に対して、アクリルアミドの生成を抑制する方法を検討することで、幅広い食品に応用できる可能性がある。

本章では、NCS 水溶液をモデル食品とし、アミノ酸共存下での加熱反応に伴うアクリルアミドの生成抑制を検討し、アミノ酸添加によるアクリルアミドの生成抑制を明確にして、食品加工上での有効性を評価した。

2.2 実験材料および実験方法

2.2.1 試薬および実験材料

アクリルアミド (ultra pure, >99.9%) は、関東化学(株) (日本) から購入した。内標準物質 (Internal Standard, IS) の ¹³C₁-アクリルアミド (>98%) は CDN Isotopes Inc. (カナダ) から購入した。上記以外の試薬は、すべて和光純薬工業(株) (日本) から試薬特級を購入した。水は、すべてヤマト科学(株) (日本) の Auto Pure WT101 UV により精製した超純水を用いた。

NCS のアクリルアミド含有量の分析は、市販の 4 種類の NCS (NCS A, B, C, D)

を用いた。NCS A と D は、三幸食品株式会社（日本）、NCS B と C は、キリン協和フーズ株式会社（日本）から購入した。また、還元糖及び遊離アミノ酸の定量分析は、4 種類の NCS を含めた 7 種類の黒糖類（糖蜜、黒糖液、加工黒糖）を用いた。糖蜜と黒糖液は森田フードシステム株式会社（日本）、加工黒糖は株式会社ミヨシ（日本）から購入した。各試料は、分析まで室温で保存した。

2.2.2 NCS のアクリルアミド抽出と精製

アクリルアミドの抽出と精製は、Delatour ら¹⁰⁾の方法を改変して実施した。NCS は乳鉢で磨砕、均質化し、2 g を 30 mL 容のポリプロピレン製遠沈管に精秤し、超純水 10 mL を加えて攪拌した。試料に内標準物質の¹³C₁-アクリルアミド 100 µg/mL を 20 µL、加えて攪拌した。その後、試料に 0.36 M ヘキサシアノ鉄(II)酸カリウム 3 水和物 (Carrez 試薬 I) および 1.86 M 硫酸亜鉛 7 水和物水溶液 (Carrez 試薬 II) を各 1 mL 添加して攪拌後、15,000 G で 20 分間、10°C で冷却遠心分離 (RS-18IV, 榊トミー精工, 東京都) した。上清 5 mL を 30 mL 容のガラス製遠沈管に回収し、塩化ナトリウム 1.5 g を加えて溶解した。酢酸エチル 10 mL を加えて 1 分間激しく攪拌し、1,100 G で 10 分間遠心分離 (himac CT-15D, 日立工機, 東京都) した後、上層の酢酸エチルを 100 mL 容のナスフラスコに回収した。再度、水層に酢酸エチル 10 mL を加えて、同様の抽出操作を 3 回実施した。回収した酢酸エチル抽出液は、循環式アスピレーターを接続したロータリーエバポレーター (N-N series, 東京理化器械(株), 東京都) を用いて 40°C で濃縮し、残渣は水 2 mL で再度、溶解した。予めメタノール 3 mL および水 6 mL で平衡化させた固相抽出カートリッジ Isolute Multimode 500 mg (International Sorbent Technology, イギリス) に溶解液を全量通過させ、通過液を 10 mL 容のガラス製バイアルビンに回収した。固相抽出カートリッジを水 1 mL で洗浄し、合わせて

回収した。回収液は 40°C 以下で窒素ガスを吹き付けて 0.5 mL 以下に濃縮した。濃縮液は、0.20 μm フィルターユニットで濾過し、分析試料とした。

2.2.3 LC-MS/MS によるアクリルアミドの定量分析

NCS 中のアクリルアミドの定量分析は、トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8030 (株式会社島津製作所、京都府、日本) を用いて実施した。試料の注入量は 10 μL とした。分離は C18 カラム (Synergi Hydro-RP, 250 mm \times 2 mm i.d., 4 μm , phenomenex Inc., アメリカ) を用いた。カラムオーブンの温度は 40°C とした。移動相には 0.1 vol% 酢酸/メタノール = 98/2 (v/v) を用い、流速 0.2 mL/分のアイソクラチック条件で溶離した。溶出したアクリルアミドは ESI+ でイオン化した。イオン源は以下のように操作した。すなわち、ネブライザーガス流量が 3 L/分、インターフェイス電圧が 4.5 kV、脱溶媒管 (DL) 温度が 250°C、ヒートブロック温度が 400°C、ドライイングガス流量が 15 L/分、衝突誘起解離 (CID) ガスが 230 kPa、検出器電圧が 1.74 kV である。アクリルアミドおよび内標準物質は、それぞれの $[\text{M}+\text{H}]^+$ のプロダクトイオン m/z 72.10 $>$ 54.85、 m/z 73.10 $>$ 55.90 を多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring, SRM) モードで検出し、同定した。アクリルアミド含量はアクリルアミド (0 ~ 1000 ng/mL) の内標準物質 (1000 ng/mL) とのピーク面積の比で作成した検量線を使って行った。分析は 3 回以上行い、その平均値と標準偏差を試料の分析値として示した。本分析方法での検出限界と定量限界は、一般的に用いられている S/N (シグナル/ノイズ) 比の 3 倍と 10 倍とし、質量検出部の汚染に依存するが、それぞれおよそ 5 ppb および 15 ppb であった。

2.2.4 NCS の還元糖量測定

NCS を含めた黒糖類の還元糖量はソモギーネルソン法^{11,12)}により測定した。黒糖 0.25 g または黒糖液 0.5 g を精秤し、水に溶解して 25 mL 容のメスフラスコで定容した。試料液は、必要に応じて水で希釈した。標準物質はグルコースを用い、還元糖量はグルコース相当量として算出した。

2.2.5 NCS のアミノ酸分析

黒糖 1 g または黒糖液 1 g を 15 mL 容量のポリプロピレン製チューブに精秤し、水 2 mL を加えて溶解した。エタノールを加えて全量を 10 mL とし、ボルテックスミキサで攪拌抽出した。抽出液を 1,100 G で 20 分間遠心分離し、上澄み液 5 mL を 100 mL 容のナスフラスコに回収した。上澄み液は、循環式アスピレーターを接続したロータリーエバポレーターを用いて 40°C で濃縮し、残渣は pH 2.2 クエン酸リチウム緩衝液で洗い出して、10 mL 容のメスフラスコで定容した。その後、0.45 μm フィルターで濾過し、アミノ酸分析用試料とした。

アミノ酸の定量分析は、高速液体クロマトグラフ C-R7A/LC-10A (株島津製作所) のアミノ酸分析システムを用いた。試料の注入量は 10 μL とした。分離は Li 型プレカラム (Shim-pack ISC-30/S0504Li, 50 mm × 4 mm i.d., 株島津ジーエルシー、日本) を装備した Li 型分析用カラム (Shim-pack Amino-Li, 100 mm × 6 mm i.d., 株島津ジーエルシー) を用いた。アミノ酸標準混合液には、和光純薬株のアミノ酸標準混合液 (AN-2 型と B 型) および L-アスパラギンを用いた。

2.2.6 アミノ酸を添加した NCS 水溶液のアクリルアミド生成量の測定

NCS 中のアクリルアミド分析の結果、最もアクリルアミド含有量が高かった試料 (Table 2.2 の NCS D) をモデル食品とし、リジン又はシステインの添加によ

るアクリルアミドの生成量を測定した。NCS を乳鉢で磨砕、均質化し、2 g を 15 mL 容のポリプロピレン製チューブに精秤した。試料は、水 1.5 mL を加えて、攪拌、溶解した後、20 又は 100 mM アミノ酸水溶液 0.5 mL を加えて攪拌混合した。アミノ酸を添加しない試料は、代わりに超純水を用いた。作製した試料は、直ちに密栓して、60°C から 100°C に設定したオイルバスで 60 分間加熱した。加熱後、直ちに氷水で 15 分間冷却して反応を停止した。反応後の試料は、適宜水で希釈溶解し、希釈液 10 mL を 30 mL 容のポリプロピレン製遠沈管に回収した。これに内標準物質の $^{13}\text{C}_1$ -アクリルアミド 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を 20 μL 加えて攪拌し、以降は前述の「2.2.3 LC-MS/MS によるアクリルアミドの定量分析」と同様の手順に従い、LC-MS/MS 分析 (LCMS-8030, 株式会社島津製作所) に供した。Fig. 2.1 に NCS とアミノ酸の混合水溶液の加熱反応と、アクリルアミドの抽出と精製に関わる手順を示す。

<p>Weigh 2 g of homogenized sample, add 1.5 mL of water into a 15mL PP tube. Shake, add 0.5 mL of amino acid solution, swirl and capped.</p>
<p>Heat at 60-100°C for 60 min in a oil bath.</p>
<p>Cool in icewater for 15 min to stop reaction.</p>
<p>Add 4 mL of water, swirl and decant into a 30 mL PP tube.</p>
<p>Rinse a 15mL PP tube with 2 mL of water, and decant into a 30 mL PP tube. Repeat it three times.</p>
<p>Add 20 µmL of ¹³C₁-acrylamide solution (100 µg/mL).</p>
<p>Add 1mL of Carrez I , swirl, add 1 mL of Carrez II and shake vigorously for 1 min.</p>
<p>Centrifuge at 10°C, 15,000 G for 20 min.</p>
<p>Transfer 5 mL of the supernatant into a glass tube containing 1.5 g NaCl, swirl until solubilization.</p>
<p>Add 10 mL ethyl acetate and shake vigorously (1 min).</p>
<p>Centrifuge at 1,100 G for 10 min.</p>
<p>Transfer the organic phase of into a evaporating flask.</p>
<p>Repeat the ethyl acetate extraction two more times.</p>
<p>Evaporate the organic phase (40°C)</p>
<p>Add 2 mL of water to dissolve residue.</p>
<p>Condition the SPE cartridge (Multimode 500 mg) with 3 mL methanol prior to 6 mL water.</p>
<p>Load the aqueous extract onto the SPE cartridge, elute rinse with 1 mL water. Collect both fractions.</p>
<p>Reduce the extract volume to <i>ca.</i> 500 µL (N₂, 40°C).</p>
<p>Pass through the extract with a 0.20 µm filter unit. Proceed to LC-MS/MS analysis (10 µL injected).</p>

Fig. 2.1. LC-MS/MS を用いたアクリルアミド分析における非遠心分離糖の前処理・アクリルアミド抽出・洗浄手順

2.2.7 NCS 水溶液の pH 調整とシステイン添加によるアクリルアミド生成量の測定

pH を約 3-9 に調整した NCS 水溶液について、システイン添加によるアクリルアミドの生成抑制効果を検討した。NCS を乳鉢で磨砕、均質化し、2 g を 15 mL 容のポリプロピレン製チューブに精秤した。NCS 試料に、pH 調整液（0.5 M 塩酸または 0.5 M 水酸化ナトリウム）と溶媒を、合わせて 1.5 mL 加えて、攪拌、溶解した後、100 mM システイン水溶液 0.5 mL を加えて攪拌混合した。システインを添加しない試料は、代わりに同量の超純水を用いた。作製した試料は、直ちに密栓して、100°C に設定したオイルバスで 60 分間加熱した。以降は前述と同様の手順に従い、LC-MS/MS 分析に供した。

2.2.8 pH 測定

pH の測定は、ガラス電極を備えた pH メーター（D-55, 堀場製作所, 日本）を用いた。

2.2.9 統計解析

統計解析はウェルチの t 検定を用い、有意水準を $p = 0.05$ とした。

2.3 実験結果

2.3.1 NCS 中でのアクリルアミドの添加回収試験

Table 2.1 は、NCS D を用いて、アクリルアミドの添加濃度を 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （低濃度区）または 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （高濃度区）として、NCS 中での添加回収試験を行った結果を示す。この方法でのアクリルアミドの添加回収率は、93.8 ~ 95.2% の範囲であり、AOAC（Association of Official Agricultural Chemists）ガイドラインの許

容範囲内にあることを確認した¹³⁾。いずれの濃度区においても分析の併行精度 (RSDr) は、5%未満であり、AOAC ガイドラインの許容範囲内にあることを確認した¹⁴⁾。

Table 2.1. LC-MS/MS 法による NCS 中でのアクリルアミドの添加回収率

Sample	Added acrylamide ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSDr (%)	Recovery (%)
NCS D	0	310.8	14.4	4.6	—
	300	592.1	21.8	3.7	93.8
	500	786.7	34.4	4.4	95.2

n = 6

SD : Standard deviation

RSDr : Relative standard deviation of repeatability

2.3.2 NCS のアクリルアミド含有量

Table 2.2.は、4種類の NCS 中のアクリルアミド含量を示す。NCS のアクリルアミド含量は、0.13 ~ 0.48 mg/kg であった。最もアクリルアミド含量の高かった試料は、NCS D であった。これより、2.3.4 と 2.3.5 では NCS D をモデル食品として試験に供した。

Table 2.2. NCS のアクリルアミド含有量

Sample	Acrylamide content (mg/kg)
NCS A	0.16 ± 0.01
NCS B	0.30 ± 0.00
NCS C	0.13 ± 0.00
NCS D	0.48 ± 0.01

Mean ± SD (n = 3).

2.3.3 NCS の還元糖量及びアミノ酸分析

Table 2.3.は、7種の黒糖類中の還元糖量及び遊離アミノ酸分析の結果を示す。黒糖類の還元糖量は、100 g あたり 1.6 ~ 35.2 g であった。最も還元糖量の高い試料は、糖蜜 (molasses) であった。遊離アミノ酸分析では、測定した7種の黒糖類のうち5種において、検出されたアミノ酸の中でアクリルアミドの前駆物質であるアスパラギンが最も含有量が多かった。また、アスパラギンの含有量は、試料によって大きく異なり、100 g あたりのアスパラギン含有量は、2.4 ~ 307.4 mg の範囲であり、総アミノ酸量に対するアスパラギン量の割合は 22.9 ~ 68.8% であった。最もアスパラギン含有量と総アミノ酸に対するアスパラギン量の割合の高かった試料は、NCS A であった。なお、NCS B, D, 黒糖液 (Syrup) はアスパラギンとグルタミン酸のピーク分離が不十分であった。ピークトップの保持時間がアスパラギンの保持時間と一致するため、アスパラギンがグルタミン酸より多量であるとみなした。黒糖のアスパラギンとグルタミン酸の比率は 94 対 4 との報告から¹⁵⁾、NCS B, D, 黒糖液のアスパラギンとグルタミン酸量を算出した。

Table 2.3. 黒糖類（100g あたり）の還元糖、遊離アミノ酸量

	NCS				Molasses	Syrup	Brown sugar
	A	B	C	D			
Reducing sugar (g)	2.9	2.9	1.6	4.1	35.2	14.6	2.0
Amino acid (mg)	446.6	161.3	6.1	240.7	20.5	399.9	26.8
Tau	1.3	4.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0
Asp	49.3	27.4	2.7	33.8	8.5	74.5	5.6
Thr	3.1	1.7	0.0	2.0	0.0	2.3	0.0
Ser	11.6	3.2	0.2	4.0	0.2	7.8	0.4
Asn	307.4	92.1*	2.4	148.2*	4.7	251.4*	13.7
Glu	22.4	5.9*	0.3	9.5*	0.0	16.0*	0.6
Gly	2.1	0.5	0.0	1.8	0.1	2.5	0.2
Ala	24.6	8.0	0.4	19.3	3.5	17.3	2.8
Val	6.8	8.0	0.2	10.8	2.1	8.7	1.6
Cys	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Met	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ile	3.4	4.5	0.0	4.4	0.5	4.9	0.5
Leu	2.1	0.0	0.0	1.5	0.3	1.8	0.3
Tyr	2.2	1.1	0.0	1.7	0.4	2.5	0.4
Phe	2.0	0.7	0.0	0.9	0.0	2.3	0.3
β-Ala	0.9	3.0	0.0	1.0	0.0	1.4	0.0
GABA	7.6	1.4	0.0	1.7	0.2	3.8	0.4
His	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3-Methyl His	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0
Lys	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Arg	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

*The Glu peak could not be separated from the Asn peak. The concentration of Glu was calculated from the ratio of Glu to Asn that was 6 to 94 in brown sugar reported by Hirose *et al* (2015).

2.3.4 アミノ酸を添加した NCS 水溶液のアクリルアミド生成量

アミノ酸を添加して 60°C 又は 100°C で 60 分間加熱した NCS D 水溶液中のアクリルアミド含量を Table 2.4. に示す。アミノ酸を添加しない試料を 60°C で加熱した場合には、アクリルアミド含量はほとんど変化しなかったが、100°C で加熱した場合は、加熱前に比べて 6.9 倍に増加した。アミノ酸を添加しない試料に比べて、5 及び 25 mmol/kg のリジンを添加した試料では、60°C 及び 100°C いずれでも、アクリルアミド含量が増加した。特に、高濃度 (25 mmol/kg) のリジンを添加した試料は、100°C 加熱において、アミノ酸を添加しない試料よりも 1.8 倍のアクリルアミドが生成した。対照的に、高濃度 (25 mmol/kg) のシステインを添加した試料では、100°C においてアクリルアミドの生成が抑えられ、そのアクリルアミド濃度は、アミノ酸を添加しない試料に比べて 0.6 倍であった。各アミノ酸添加の効果は、添加濃度が高い方が顕著に現れた。なお、Table 2.4. に示した NCS D のアクリルアミド含量は、Table 2.2. で示した同試料の測定値と異なるのは、試験に供した黒糖のロットが異なるためである。

Table 2.4. NCS 水溶液中でのアクリルアミド生成に対するアミノ酸添加の効果

Heating temp. (°C)	Acrylamide content (mg/kg)				
	no amino acid	Lys		Cys	
		5 mmol/kg	25 mmol/kg	5 mmol/kg	25 mmol/kg
No treatment	0.30 ± 0.02	-	-	-	-
60	0.32 ± 0.01	0.38 ± 0.00*	0.43 ± 0.03*	0.36 ± 0.03	0.30 ± 0.02
100	2.11 ± 0.16**	2.40 ± 0.10*	3.71 ± 0.04*	2.08 ± 0.08	1.20 ± 0.02*

加熱時間は 60 分

値は平均値±標準偏差を示す(n = 3)

*同加熱温度のアミノ酸無添加の試料に対して有意差あり ($p < 0.05$)

**無処理の試料に対して有意差あり ($p < 0.05$)

2.3.5 システインを添加した NCS 水溶液中でのアクリルアミドの生成抑制

システインのアクリルアミド生成抑制効果に対する pH の影響を調べるため、NCS 水溶液の pH を調整して、加熱後のアクリルアミド含量を測定した。Fig. 2.2. に示すように、すべての試料で加熱後の NCS 水溶液のアクリルアミド含量は増加した。加熱前の pH が高いほどアクリルアミドの生成量は増加した。システインを添加した場合に、無添加に比べて、pH4 以上でアクリルアミドの生成が抑制され、特に pH6 以上では約 70%の抑制率を示した。

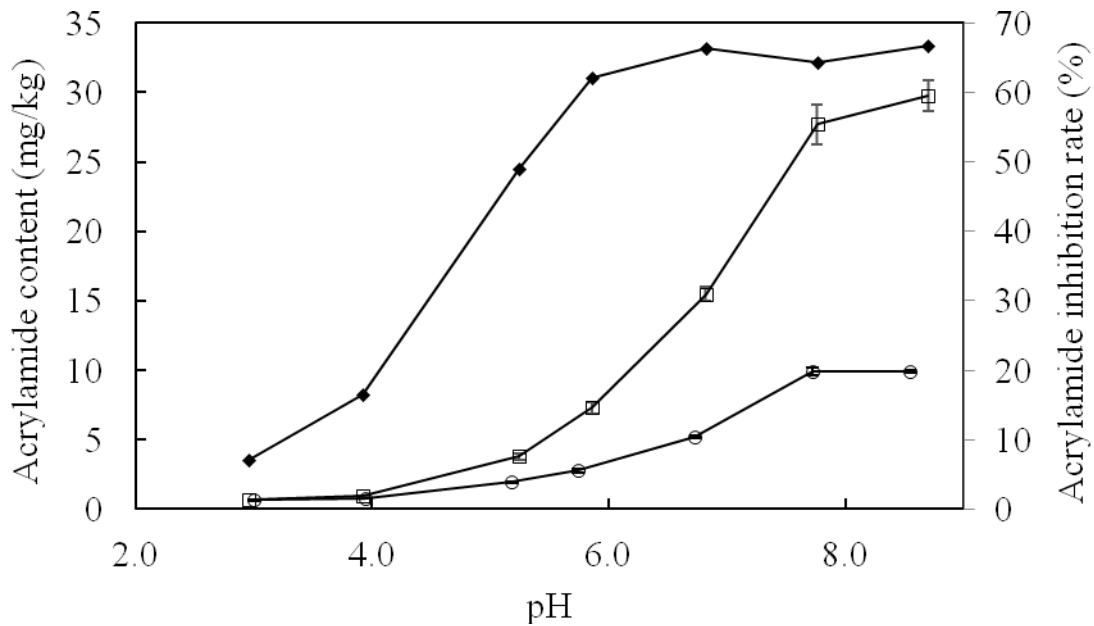


Fig. 2.2. NCS 水溶液を 100°C で 60 分間加熱した時のアクリルアミド生成量に対するシステイン添加と pH の効果

pH は、加熱前の NCS 溶液の pH を示す。

記号は対照のアクリルアミド含量 (□)、25 mmol/kg のシステインを添加した試料のアクリルアミド含量 (○)、アクリルアミド抑制率 (◆) を示す。

2.4 考察

本研究では、NCS をモデル食品として、アミノ酸添加によるアクリルアミド生成抑制を検討した。

Table 2.2. に示すように、測定した 4 種の NCS は相当量のアクリルアミドを含んでおり、最大で 0.48 mg/kg であった。この結果は、黒糖および含みつ糖を用いた食品に相当量のアクリルアミドが含まれているとの報告と一致する¹⁶⁾。これは、NCS の製造過程でアクリルアミドが生成することを示しており、Table 2.3. に示すように、NCS は、アクリルアミドの前駆物質であるアスパラギンと還元糖を多く含むためと推察できる。NCS を原料とする加工食品では、NCS に由来するアクリルアミドが含まれ、その製造過程で加熱することでアクリルアミド

がさらに生成する可能性がある。

Table 2.4.に示すとおり、100°C で 60 分間の加熱で、NCS 水溶液のアクリルアミド含量が増加したことから、一般的にアクリルアミドが生成するとされる 120°C よりも低い温度でも、NCS からアクリルアミドが生成することを明らかにした。Becalski ら(2011)は、アスパラギン、還元糖、有機酸などを含む模擬的なプルーンジュースを調製し、密栓して 120°C で 1 時間の加熱をした時にアクリルアミドは生成しないが、実物のプルーンジュースを同条件で加熱した時は、アクリルアミド含量が元の濃度から 2 倍に増加したことを報告している¹⁷⁾。このように、アクリルアミドの反応物を含む単純な組成のモデル食品において、120°C 以下の穏やかな条件ではアクリルアミドが生成し難いが、実際の食品では、同じ条件でも容易にアクリルアミドが生成することを示している。従って、実際の食品中では、アスパラギンと還元糖以外の成分もアクリルアミドの生成機構に複雑に関与していることが推測される。これを踏まえ、本研究の黒糖を用いたモデル系において、容易にアクリルアミドが生成した要因は、以下のように考えられる。すなわち、(1) アクリルアミド付加体の分解、(2) アクリルアミド中間体からの変換、(3) より反応性の高い反応物からの生成、(4) 触媒の存在である。まず、NCS の製造中に生成したアクリルアミドは、貯蔵中に他の化合物と付加体を形成することで見かけ上は低減し、再度加熱することで顕在化すると考えられる。NCS のアクリルアミド濃度は、製造直後からその保管中に顕著に低減していくことが報告されている⁷⁾。さらに、アクリルアミドは、アミノ酸を含む求核化合物とマイケル付加反応すること¹⁸⁾、アクリルアミドとアミノ化合物の反応は可逆で、そのマイケル付加体から加熱によってアクリルアミドが生成すること¹⁹⁾が報告されている。これらの報告は、NCS を加熱することによって付加体となっていたアクリルアミドが顕在化するという考えを裏付

けるものである。次に、NCS は比較的安定なアクリルアミド生成経路の中間体、例えば脱炭酸アマドリ化合物や 3-アミノプロピオンアミドなどを含むことが考えられ、これらが加熱によりアクリルアミドへと変化した可能性がある²⁰⁻²³⁾。3 番目に、2-ヒドロキシ-1-ブタナール、ヒドロキシアセトン、3-デオキシグルコソールなど、原料や製造工程中のメイラード反応に由来する反応性の高いカルボニル化合物が、アスパラギンと反応してアクリルアミドが生成したと考えられる^{22,24-27)}。最後に、アクリルアミド生成反応を触媒する成分の存在が考えられる。例えばクロロゲン酸は 3-アミノプロピオンアミドの脱アミノ化の活性化エネルギーを下げ、アクリルアミド生成を促す²⁸⁾ことが報告されており、NCS 中のアクリルアミドは、共存する成分の複雑な影響を受けて生成することが考えられる。

NCS 水溶液に対するアミノ酸添加の効果は、システインとリジンで大きく異なり、システインはアクリルアミドの生成を抑制し、リジンはアクリルアミドの生成を促進した。しかし、リジンおよびシステインは、ともにアクリルアミドの形成を阻害するという報告がある²⁹⁻³¹⁾。Rydberg ら(2003)の報告では、アスパラギン以外のアミノ酸をジャガイモに添加することでアクリルアミド含量を低減させており、これはアスパラギンとの競合反応を促進したり、生成したアクリルアミドと結合して除去・分解したりすることを示唆している³²⁾。本研究では、システインおよびリジンを添加した NCS 水溶液の pH は、それぞれ 5.1~5.2 と 5.3~5.8 であるため、酸性下でアミノ酸の求核性は著しく低下したと考えられる。中性アミノ酸であるシステインは、高濃度添加 (25mmol/kg) をして 100°C で加熱した場合のみ、アスパラギンとの競合作用によってアクリルアミドの生成を抑制したと考えられる。塩基性アミノ酸であるリジンは、いずれの添加濃度と加熱温度でもアスパラギンとの競合反応が起こらなかったために、ア

クリルアミドの生成が抑制されなかったと考えられる。むしろ、リジンは、高濃度添加（25mmol/kg）した場合に pH が上昇し、アクリルアミドの生成を促進した可能性がある。

NCS 水溶液において、システインは広範囲な pH でアクリルアミドの生成抑制効果を示した。システインの共存下でも、アクリルアミドの生成抑制は、水溶液の pH に大きく依存することが示された。また、NCS 水溶液の pH を低下させることがアクリルアミドの生成抑制に対して有効であり、これはジャガイモで pH を低下させることが有効であるという報告と一致する^{32,33)}。pH の低下が、食品の品質に影響する場合には、システインの添加によってアクリルアミドの生成抑制が期待できる。食品をアルカリ性の条件で抽出すると、食物マトリクスからアクリルアミドが放出されるが、これはメイラード反応中間体から形成される可能性が示されている³⁴⁾。本研究のアルカリ性域でのアクリルアミドの生成量の増大は、メイラード反応中間体からもアクリルアミドの形成が引き起こされることを示唆している。システインはアルカリ性域でも強いアクリルアミドの生成抑制を示すことから、システインはこの中間体からアクリルアミドが生成する反応を抑制できる可能性がある。

2.5 結論

NCS は、アクリルアミド及びその基質であるアスパラギンと還元糖を多く含有し、一般的にアクリルアミドが生成するとされる 120°C より低い温度でもさらにアクリルアミド量が増加した。NCS 中のアクリルアミドは、その前駆物質であるアスパラギンと還元糖以外の成分からの影響を受けて生成することが示され、食品中での複雑な反応機構が推測された。NCS 水溶液をモデル食品として、アクリルアミドの生成抑制効果を検討した結果、システインの添加と酸性

域への pH 調整が有効であることがわかった。アルカリ性域では、NCS を加熱すると顕著にアクリルアミドが生成したが、システインの添加によって pH6~9 の範囲でアクリルアミドの生成量を 70%抑制することができた。これらの手法は、NCS のようにアクリルアミドとその前駆物質を多く含む食品において、アクリルアミドの生成を抑制する有効な方法であると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Jaffé, W. R. (2012). Health effects of non-centrifugal sugar (NCS): A review. *Sugar Tech*, **14**, 87-94.
- 2) Jaffé, W. R. (2015). Nutritional and functional components of non centrifugal cane sugar: A compilation of the data from the analytical literature. *J. Food Compos. Anal.*, **43**, 194-202.
- 3) Tokitomo, Y., Kobayashi, A. and Yamasishi, T. (1984). Aroma components of fresh sugar cane juice. *Agric, Biol. Chem.*, **48**, 2869-287.
- 4) 奥村 丞司 (1993). メイラード反応とフレーバーの生成, 日本醸造協会誌, **88**, 178-187.
- 5) 山口直彦, 山田篤美 (1981). 黒糖の抗酸化性について, 日本食品工業学会誌, **28**, 303-308.
- 6) Takara, K., Otsuka, K., Wada, K., Iwasaki, H. and Yamashita, M. (2007). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory effects of constituents of sugarcane molasses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 183-191.
- 7) 漆山哲生, 吉野麻美, 山田友紀子 (2013). 含みつ糖 (黒糖、加工黒糖、赤糖) 中のアクリルアミド濃度とその貯蔵安定性の調査, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, B-09.
https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/papers_posters/pdf/106th_eisei1.pdf
- 8) 沖縄県農業研究センター農業システム開発班 (2008). 沖縄県産黒糖の成分比較, 平成 20 年度沖縄県試験研究成果情報, pp. 35-36.

- 9) 仲宗根洋子, 池間洋一郎, 小林彰夫 (1990). 黒糖の製造工程におけるアミノ酸の変動, 琉球大学農学部学術報告, **37**, 35-39.
- 10) Delatour, T., Peisset, A., Goldmann, T., Riediler, S. and Stadler, R. H. (2004). Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chromatography tandem mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4625-4631.
- 11) Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
- 12) Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-380.
- 13) AOAC International (2002). Accuracy. In “AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals,” AOAC International, Gaithersburg, pp. 18-21.
- 14) AOAC International (2002). Repeatability precision (sr, RSDr). In “AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals,” AOAC International, Gaithersburg, pp. 21-22.
- 15) 広瀬直人, 前田剛希, 高良健作, 和田浩二 (2015). 沖縄産黒糖の常温保存における物理化学的およびフレーバー特性の変化, 日本食品保存科学会誌, **41**, 6, 253-259.
- 16) 農林水産省 (2012). 有害化学物質含有実態調査データ集 (平成 15~22 年度).
https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/pdf/chem_15-22.pdf
- 17) Becalski, A., Brady, B., Feng, S., Gauthier, B. R. and Zhao, T. (2011). Formation of acrylamide at temperatures lower than 100°C: the case of prunes and a model

- study. *Food Addit. Contam. Part A*, **28**, 726-730.
- 18) Adams, A., Hamdania, S., Van Lancker, F., Mějri, S. and De Kimpe, N. (2010). Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1517-1522.
 - 19) Zamora, R., Delgado, R. M. and Hidalgo, F. J. (2010). Model reactions of acrylamide with selected amino compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 1708-1713.
 - 20) Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi, G. P. and Villagran, M. D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4782-4787.
 - 21) Granvogl, M., Magnus, J., Koehler, P. and Schieberle, P. (2004). Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes. A minor but potent precursor in acrylamide formation. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4751-4757.
 - 22) Stadler, R. H., Robert, F., Riediker, S., Varga, N., Davidek, T., Devaud, S., Goldmann, T., Hau, J. and Blank, I. (2004). In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5550-5558.
 - 23) Granvogl, M. and Schieberle, P. (2006). Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5933-5938.
 - 24) Blank, I., Robert, F., Goldmann, T., Pollien, P., Varga, N., Devaud, S., Saucy, F., Huynh-Ba, T. and Stadler, H. (2005). Mechanisms of acrylamide

- formation: Maillard-induced transformation of asparagine. In “Chemistry and Safety of Acrylamide in Food. Advances in Experimental Medicine and Biology,” Vol. 561, eds. Friedman, M. and Mottram, D., Springer, New York, pp. 171-189.
- 25) Ehling, S., Hengel, M. and Shibamoto, T. (2005). Formation of acrylamide from lipids. In “Chemistry and safety of acrylamide in food. Advances in Experimental Medicine and Biology,” Vol. 561, eds. Friedman, M. and Mottram, D., Springer, New York, pp. 223-233.
- 26) Ishihara, K., Matsunaga, A., Miyoshi, T., Nakamura, K., Nakayama, T., Ito, S. and Koga, H. (2005). Formation of acrylamide in a processed food model system, and examination of inhibitory conditions. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **46**, 33-39.
- 27) Tsutsumiuchi, K., Hibino, M., Kambe, M., Okajima, N., Okada, M., Miwa, J. and Taniguchi, H. (2005). Effect of carbohydrates on formation of acrylamide in cooked food models. *J. Appl. Glycosci.*, **52**, 219-224.
- 28) Cai, Y., Zhang, Z., Jiang, S., Yu, M., Huang, C., Qiu, R., Zou, Y., Zhang, Q., Ou, S., Zhou, H., Wang, Y., Bai, W. and Li, Y. (2014). Chlorogenic acid increased acrylamide formation through promotion of HMF formation and 3-aminopropionamide deamination. *J. Hazardous Materials*, **268**, 1-5.
- 29) Claeys, W. L., De Vleeschouwer, K. and Hendrickx, M. F. (2005). Effect of amino acid on acrylamide formation and elimination kinetics. *Biotechnol. Prog.*, **21**, 1525-1530.
- 30) Kim, C. T., Hwang, E.-S. and Lee, H. J. (2005). Reducing acrylamide in fried snack products by adding amino acids. *J. Food Sci.*, **70**, C354-C358.
- 31) De Vleeschouwer, K., Plancken, I. V., Loey, A. V. and Hendrickx, M. E. (2006).

Impact of pH on the kinetics of acrylamide formation/elimination reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 7847-7855.

- 32) Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L. and Törnqvist, M. (2003). Investigation of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7012-7018.
- 33) Mestdagh, F., Maertens, J., Cucu, T., Delporte, K., Van Peteghem, C. and De Meulenaer, B. (2008). Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms. *Food Chem.*, **107**, 26-31.
- 34) JECFA (2011). Acrylamide (addendum). *Safety evaluation of certain contaminants in food, WHO Food Additives Series 63, FAO JECFA Monographs 8*, the 72nd meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, pp. 1-151.

第3章

高圧処理によるアクリルアミドの生成抑制

3.1 緒言

高圧処理は、数十から数百 MPa の静水圧を利用する食品加工技術である。高圧処理は、水の圧縮によって食品に物理的変化を引き起こし、加熱処理に比べて食品に与えるエネルギーが少ないため、食品の化学的な変性がほとんどない。そのため、高圧処理は非加熱加工方法として、微生物の殺菌¹⁾、物性の変化^{2,3)}、機能性成分の増加⁴⁾などに用いられてきた。近年は、圧力と熱を併用した食品加工方法の安全性と品質が研究されている⁵⁾。これまでに、圧力下でのメイラード反応の影響^{6,7)}や、メラノイジンとその中間体、揮発性成分の生成に関する報告がある⁸⁾。また、等モル濃度のアスパラギンとグルコースの混合水溶液を用いて、アクリルアミドを含むメイラード型化合物の生成に対する高温高圧(100-115°C、400-700 MPa、0-60 分) 反応の影響が報告されている⁹⁾。しかし、400 MPa 以下の圧力効果については、これまでに報告例がない。食品産業での高圧利用に関して、主に 100~600 MPa までの圧力が利用されているが、高圧装置に関する設備投資を考慮すると、400 MPa 以下の圧力条件での活用が有効である。また、缶詰やレトルト食品などの容器包装詰加圧加熱殺菌食品は、中心部温度を 120°C で 4 分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法であることが定められている。これらの食品の中には、加熱処理中に多量のアクリルアミドが発生するものがある^{10,11)}。加熱殺菌食品について、アクリルアミドの発生を抑制するために、低温での熱処理やアスパラギナーゼの添加では、製品の安全性や品質を保持できない可能性がある。高圧処理と加熱処理を組み合わせることで食品加工に適用することができれば、食品の品質を維持しながら、加工食品中のアクリルアミドの生成を抑制できると考えられる。

本研究では、高圧処理により食品の品質を保持しつつ、アクリルアミドの生成を抑制することを目的とし、等モル濃度に調整したアスパラギンとグルコー

スの混合水溶液を用いて、高圧力下での加熱によるアクリルアミドの生成量を測定した。また、メイラード反応の進行の指標として、その最終生成物であるメラノイジンの生成量と加熱反応後の pH を測定し、高圧下でのアクリルアミド生成量との相関性を調査した。

3.2 実験材料及び実験方法

3.2.1 試薬及び実験材料

アクリルアミド (ultra pure, >99.9%) は関東化学株式会社 (日本) から、内標準物質 (IS) の $^{13}\text{C}_1$ -アクリルアミド (>98%) は CDN Isotopes Inc. (カナダ) から入手した。L-アスパラギン 1 水和物 (99.0%)、D(+)-グルコース (98.0%)、ヘキサシアノ鉄 (II) 酸カリウム 3 水和物、硫酸亜鉛 7 水和物、塩化ナトリウム、酢酸エチル、2-モルホリノエタンスルホン酸・一水和物 (MES) 及び *N*-[トリス (ヒドロキシメチル) メチル] -3-アミノプロパンスルホン酸 (TAPS)、移動相の LCMS 用グレードの超純水、メタノール及び酢酸は和光純薬工業株式会社 (日本) から入手した。すべての反応に使用した水は、ヤマト科学株式会社 (日本) の Millipore, Auto Pure WT101 UV により得た。

加圧加熱試験は、L-アスパラギンと D-グルコースの等モル濃度 (0.125 M) の水溶液で実施した。溶媒は、緩衝液成分がアクリルアミドの形成に与える影響を避けるため¹²⁾、超純水を用いた。これを非緩衝液での反応系とし、試料調整後の pH は 5.0 であった。また、加圧に伴う pH 変化の影響を抑えるため、MES 緩衝液及び TAPS 緩衝液を選択した^{13,14)}。MES 緩衝液及び TAPS 緩衝液を用いた試料の調整後の pH は、それぞれ 5.0 と 9.0 であった。

3.2.2 圧力試験装置及び試験方法

高圧装置の概要図を Fig. 3.1 に示す。高圧装置は、圧力容器（内径 49 mm、外径 148 mm、高さ 156 mm、特注品、越後製菓(株)、日本）、加圧ポンプ（WUP-21M, 理研精機(株)、日本）と圧力調整ポンプ（37-5. 76-60-Tefron, High Pressure Equipment Company, アメリカ）、圧力センサー（P2VA2/5000bar, Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, ドイツ）及び圧力容器内外の温度センサー（SCHS1-0 KT128G637, 株式会社チノー、日本）で構成されている。この装置は、センサーで検出した圧力、温度の数値をマルチ入力データロガー（NR-500, 株式会社キーエンス、日本）に接続したコンピュータに記録することができる。本装置の最大圧力は、400 MPa である。本研究では 100 MPa、200 MPa、300 MPa の圧力条件で実施した。試料を 10 mL 容ステンレス製反応容器（特注品、越後製菓(株)、日本）に満たし、空気の混入を避けて密封した。反応容器は、ステンレス製の容器と中央に穴の開いたステンレス製のねじ込み式の蓋、そして圧力を伝えるためのシリコンシート（厚さ 1 mm）で構成されている。圧力容器の加熱は、廃液コック付き 6.8 L 容ステンレス製容器（特注品、越後製菓(株)、日本）と IH ヒーター（KZ-PH32, 株式会社山善、日本）から構成されるオイルバスを用いた。圧力容器内の圧力媒体、及びオイルバスの加熱媒体は、食用油を用いた。

試料を満たした反応容器は、約 90°C に予熱しておいた食用油で満たされた圧力容器に入れた。圧力容器を密閉し、設定した圧力まで加圧した後、圧力容器内の温度が約 120°C になるまでオイルバスを加熱した。この時、圧力容器内の温度が 115°C に到達した時点を実験開始とし、その時点からの 60 分間を反応時間とした。120°C に到達した後は、温度を維持しながら加熱反応を実施した。加熱開始から反応終了まで、圧力が一定になるように圧力調整ポンプで調整した。反応終了後、オイルバス内の食用油を直ちに排出し、事前に -40°C に冷却した

食用油をオイルバスに入れることで圧力容器を冷却した。圧力容器内の温度が 95°C まで下がったことを確認後、減圧を開始し、大気圧まで徐々に減圧した。減圧後は、圧力容器内から反応容器を取り出し、直ちに氷水で冷却した。反応後の試料液は、水と MES 緩衝液は薄褐色、TAPS 緩衝液は黒褐色を呈していた。一連の試験に要した時間は、加圧開始から反応開始までの時間が約 30 分間、圧力と温度の保持時間が 60 分間、冷却開始から減圧完了までは約 20 分間であった (Fig. 3.2)。試験は、同一条件について、3 回反復した。対照は、120°C での水の飽和蒸気圧を上回るように 5.0 MPa まで加圧して加熱反応を行った。反応後の試料は室温まで冷却した後にメラノイジン生成量と pH を測定し、アクリルアミド分析に供するまで -18°C で冷凍保存した。

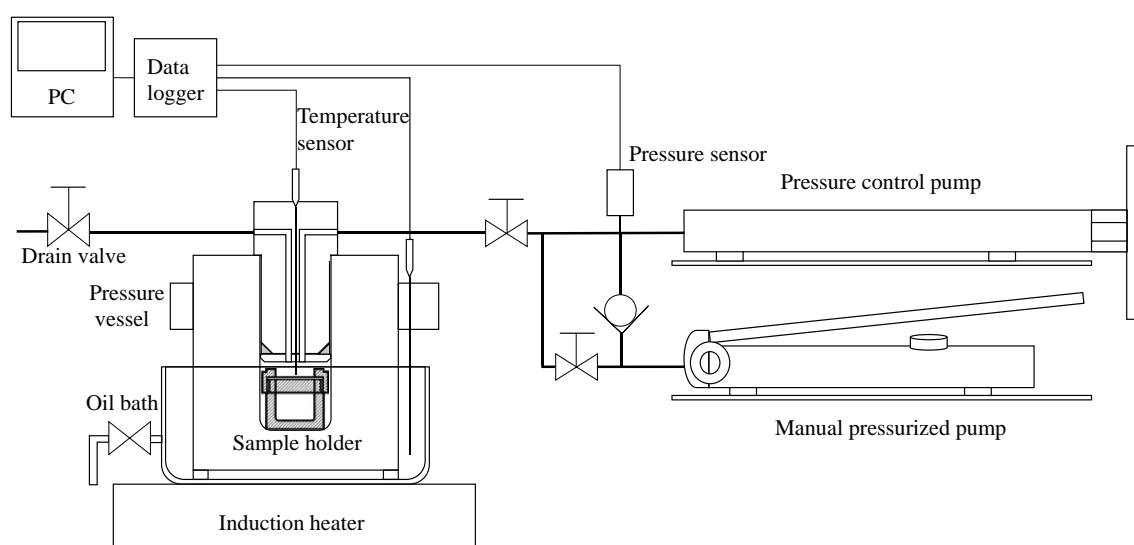


Fig. 3.1. 高温・高圧反応装置の概略図

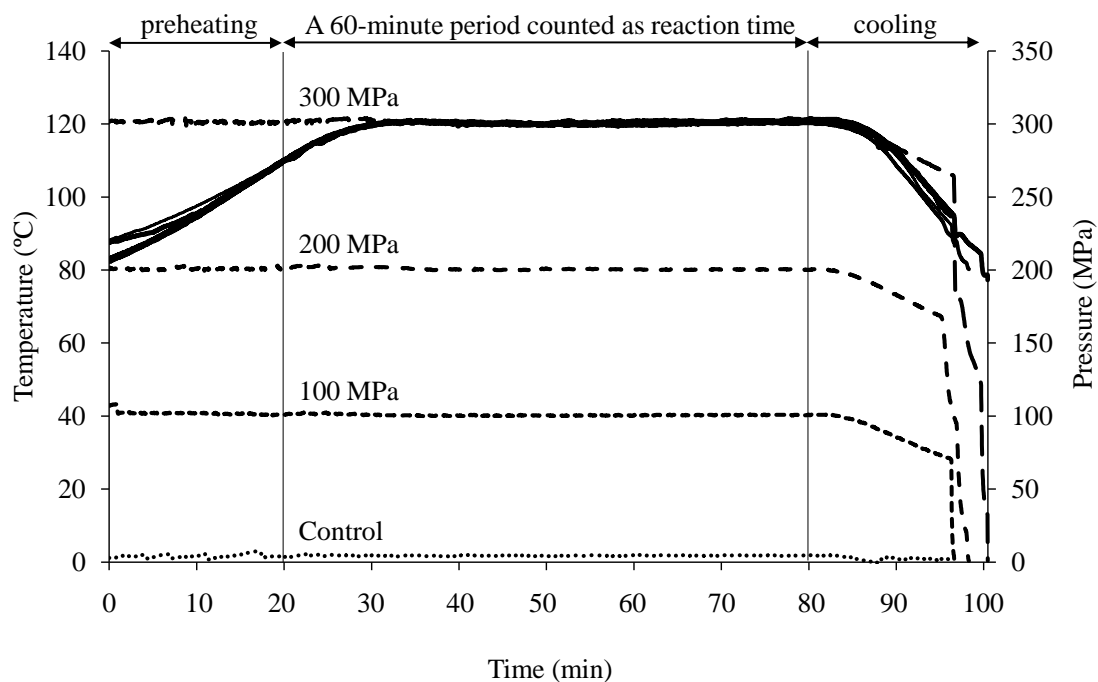


Fig. 3.2. 高温高压実験での温度（実線）及び圧力（破線）の履歴

3.2.3 アクリルアミドの抽出と精製

アクリルアミドの抽出と精製は、Delatour ら¹⁵⁾の方法を改変して実施した。非緩衝液試料及びMES緩衝液試料は1 mL、TAPS緩衝液試料は超純水で希釈した希釈液1 mLを30 mL容のポリプロピレン製遠沈管に採取し、超純水9 mLと内標準物質の¹³C₁-アクリルアミド100 µg/mLを10 µL加えて攪拌した。その後、試料に0.36 Mヘキサシアノ鉄(II)酸カリウム3水和物(Carrez試薬I)および1.86 M硫酸亜鉛7水和物水溶液(Carrez試薬II)を各1 mL添加して攪拌後、15,000 Gで20分間、10°Cで冷却遠心分離(RS-18IV, 株トミー精工, 東京都)した。上清5 mLを30 mL容のガラス製遠沈管に回収し、塩化ナトリウム1.5 gを加えて溶解した。酢酸エチル10 mLを加えて1分間激しく攪拌し、1,100 Gで10分間遠心分離(himac CT-15D, 日立工機株, 東京都)した後、上層の酢酸エチルを100 mL容のナスフラスコに回収した。再度、水層に酢酸エチル10 mLを加え

て、同様の抽出操作を 3 回実施した。回収した酢酸エチル抽出液は、循環式アスピレーターを接続したロータリーエバポレーター (N-N series, 東京理化工機株式会社、東京都) を用いて 40°C で濃縮し、残渣は水 2 mL で再度、溶解した。予めメタノール 3 mL および水 6 mL で平衡化させた固相抽出カートリッジ Isolute Multimode 500 mg (International Sorbent Technology, イギリス) に溶解液を全量通過させ、通過液を 10 mL 容のガラス製バイアルビンに回収した。固相抽出カートリッジを水 1 mL で洗浄し、合わせて回収した。回収液は 40°C 以下で窒素ガスを吹き付けて 0.5 mL 以下に濃縮した。濃縮液は、0.20 µm フィルターユニットで濾過し、分析試料とした。

3.2.4 LC-MS/MS によるアクリルアミドの定量分析

NCS のアクリルアミドの定量分析は、トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8030 (株島津製作所、京都府、日本) を用いて実施した。試料の注入量は 10 µL とした。分離は C18 カラム (Synergi Hydro-RP, 250 mm × 2 mm i.d., 4 µm, phenomenex Inc., アメリカ) を用いた。カラムオーブンの温度は 40°C とした。移動相には 0.1 vol% 酢酸/メタノール = 98/2 (v/v) を用い、流速 0.2 mL/分のアイソクラチック条件で溶離した。溶出したアクリルアミドは ESI+ でイオン化した。イオン源は以下のように操作した。すなわち、ネブライザーガス流量が 3 L/分、インターフェイス電圧が 4.5 kV、脱溶媒管 (DL) 温度が 250°C、ヒートブロック温度が 400°C、ドラインガス流量が 15 L/分、衝突誘起解離 (CID) ガスが 230 kPa、検出器電圧が 1.74 kV である。アクリルアミドおよび内標準物質は、それぞれの [M+H]⁺ のプロダクトイオン m/z 72.10 > 54.85、m/z 73.10 > 55.90 を多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring, SRM) モードで検出し、同定した。アクリルアミド含量はアクリルアミド (0 ~ 1000 ng/mL) の内標準物質

(1000 ng/mL) とのピーク面積の比で作成した検量線を使って行った。分析は 3 回以上行い、その平均値と標準偏差を試料の分析値として示した。本分析方法での検出限界と定量限界は、それぞれ 13 ppb および 40 ppb であった。

3.2.5 紫外可視分光光度計によるメラノイジン濃度の測定

試料の褐変は、紫外可視分光光度計 (UV mini-1240, 株島津製作所) を使用して、470 nm の吸光度を測定した。試料は、必要に応じて超純水で希釈した後に測定した。アスパラギンとグルコースから形成されるメラノイジン濃度は、Knol ら¹⁴⁾の示した吸光係数 $282 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて、測定した吸光度からランベルト - ベールの式で算出した。メラノイジンの濃度は、モル消光係数を用いて、取り込まれたグルコース分子の数で表すことができる^{16,17)}。メラノイジンは様々な分子の複雑な混合物であるが、多くの研究により、メラノイジンはこの方法で定量可能であることが報告されている^{9,18-20)}。

3.2.6 pH 測定

試料の pH は、ガラス電極を備えた pH メーター (D-55, 株堀場製作所, 日本) を用いて測定した。

3.2.7 統計解析

有意差の統計解析はスチューデントの t 検定を用い、実施圧力を含む各データの直線関係は、Microsoft Excel 2013 を用いてピアソンの相関係数で表した。有意水準は $p = 0.05$ 及び 0.01 とした。

ピアソンの相関係数 r は次式で求めた。

$$r = \frac{s_{xy}}{s_x s_y}$$

$$= \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=0}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=0}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

変数 1 は x 、変数 2 は y 、データ数は n 、 s_{xy} は x と y の共分散、 s_x は x の標準偏差、 s_y は y の標準偏差、 \bar{x} は x の平均、 \bar{y} は y の平均である。

3.3 実験結果

3.3.1 加圧下でのアクリルアミドの生成量

Fig. 3.3 の A、B、C は、それぞれ非緩衝液試料、MES 緩衝液試料、TAPS 緩衝液試料を 120°C、60 分間の加熱反応を実施した時のアクリルアミド濃度を示す。非緩衝液試料は、圧力が高いほどアクリルアミド生成量は抑制された。MES 緩衝液試料は対照のアクリルアミド生成量が少なかったが、その対照と比べて、200 及び 300 MPa の圧力下では、アクリルアミドの生成量が抑制された。TAPS 緩衝液試料のアクリルアミド生成量は、圧力下では有意に低下したが、非緩衝液試料及び MES 緩衝液試料と比べて、10 倍以上の生成量であった。また、100 MPa と 300 MPa は同程度のアクリルアミド生成量となり、200 MPa の生成量は、それよりも多くなった。

3.3.2 加圧下でのメラノイジンの生成量

Fig. 3.3 の D、E、F は、それぞれ非緩衝液試料、MES 緩衝液試料、TAPS 緩衝液試料を 120°C、60 分間の加熱反応を実施した時のメラノイジン濃度を示す。非緩衝液試料及び MES 緩衝液試料のメラノイジン生成量は、アクリルアミド生成量と同様に、圧力の増加に伴い減少する傾向を示した。これらの結果から、緩衝作用の有無に関わらず、pH 5.0 におけるメイラード反応は、圧力が高いほ

ど抑制されることが示唆された。また、MES 緩衝液の成分は、アクリルアミド及びメラノイジンの生成量の増加に対して、見かけ上は影響を及ぼさなかった。TAPS 緩衝液試料のメラノイジン生成量は、いずれの圧力条件でも有意差は認められず、300 MPa でわずかに増加した。また、アクリルアミド生成量と同様に、非緩衝液試料及び MES 緩衝液試料と比べて、メラノイジン生成量は 10 倍以上であった。

3.3.3 pH 測定

Fig. 3.3 の G、H、I はそれぞれ非緩衝液試料、MES 緩衝液試料、TAPS 緩衝液試料を 120°C、60 分間の加熱反応を実施した時の反応後の pH を示す。非緩衝液試料及び MES 緩衝液試料の反応後の pH は、対照に比べて圧力下では上昇が抑制され、300 MPa で最も pH 変化が小さくなった。TAPS 緩衝液試料の反応後の pH は、いずれも反応前の pH より低下し、圧力が高いほど低くなった。

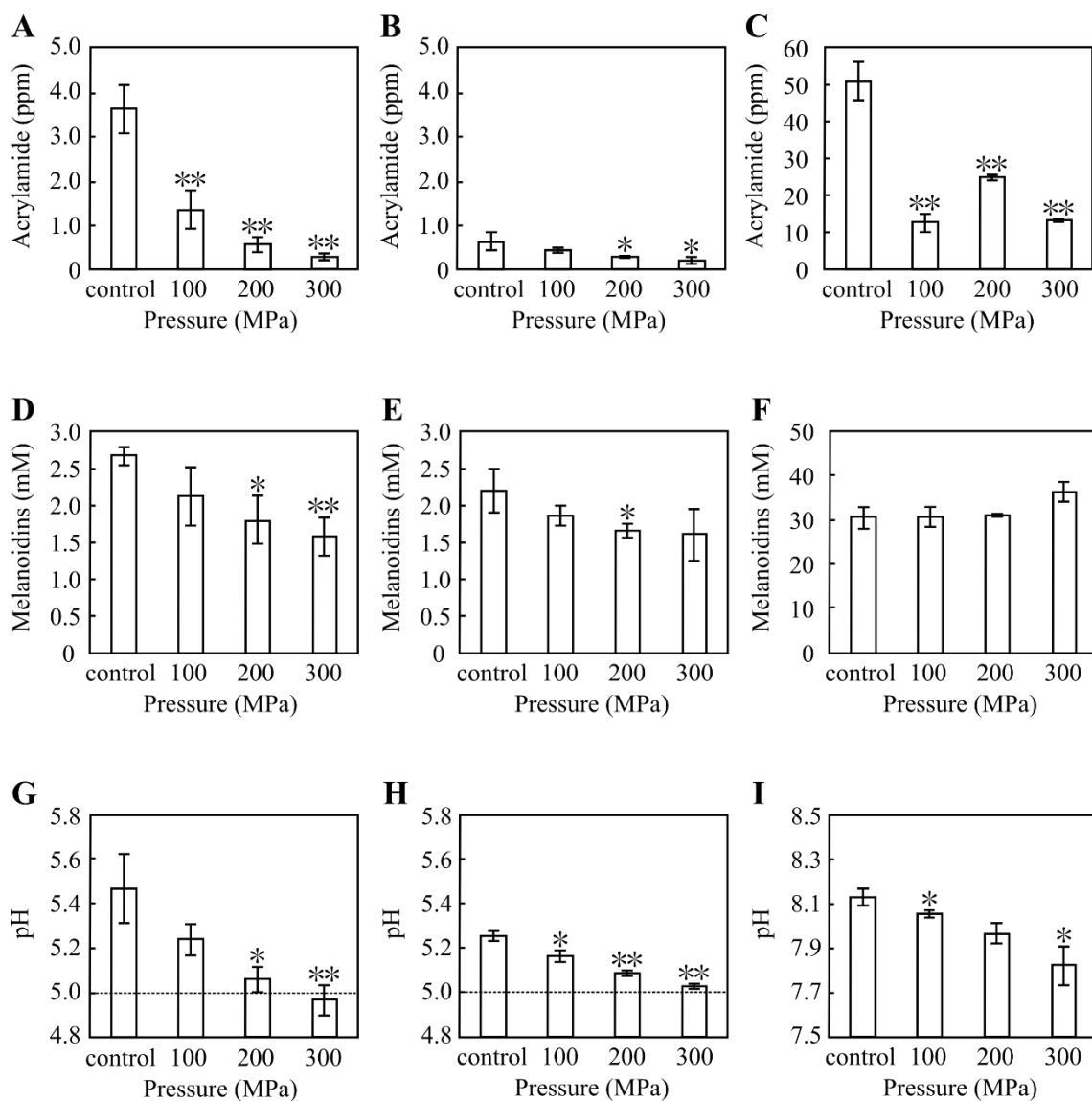


Fig. 3.3. 超純水 (A、D、G)、MES 緩衝液 (B、E、H)、TAPS 緩衝液 (C、F、I) 中でアスパラギン - グルコース水溶液を 120°C で 60 分間加熱した時のアクリルアミド生成量、メラノイジン生成量、反応後の pH

G、H の破線は、それぞれ超純水と MES 緩衝液の反応前の pH (5.0) を示す。

*、**は対照 (Control) に対して有意差があることを示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

3.3.4 圧力、アクリルアミド生成量、メラノイジン生成量の相関性

Table 3.1 はそれぞれ非緩衝液試料、MES 緩衝液試料、TAPS 緩衝液試料の圧力、アクリルアミド濃度、メラノイジン濃度の相関性を示す。非緩衝液試料と MES 緩衝液試料の相関性は、類似する傾向が見られた。圧力とアクリルアミド濃度、圧力とメラノイジン濃度には負の相関性が認められた。また、アクリルアミド濃度とメラノイジン濃度の間には、正の相関性が認められた。また、圧力とアクリルアミド濃度の相関性は、圧力とメラノイジン濃度の相関性よりも高くなった。TAPS 緩衝液では、圧力とアクリルアミド濃度の間には負の相関性が認められ、圧力とメラノイジン濃度には正の相関性が認められた。圧力とアクリルアミド濃度、圧力とメラノイジン濃度の相関性は低く、これは、非緩衝試料と MES 緩衝液試料と比較して低かった。アクリルアミド濃度とメラノイジン濃度の間には、相関性が確認できなかった。

Table 3.1. 各因子間の相関係数

Water (initial pH 5.0)				
	Pressure (MPa)	Acrylamide (ppm)	Melanoidins (mM)	pH
Pressure (MPa)	1			
Acrylamide (ppm)	-0.897*	1		
Melanoidins (mM)	-0.840*	0.900*	1	
0.1 M MES buffer (initial pH 5.0)				
	Pressure (MPa)	Acrylamide (ppm)	Melanoidins (mM)	pH
Pressure (MPa)	1			
Acrylamide (ppm)	-0.852*	1		
Melanoidins (mM)	-0.724*	0.909*	1	
0.1 M TAPS buffer (initial pH 9.0)				
	Pressure (MPa)	Acrylamide (ppm)	Melanoidins (mM)	pH
Pressure (MPa)	1			
Acrylamide (ppm)	-0.651*	1		
Melanoidins (mM)	0.631*	-0.301	1	

* Significant correlation at the 0.05 level.

3.4 考察

本研究では、超純水 (pH 5.0)、MES 緩衝液 (pH 5.0) 及び TAPS 緩衝液 (pH 9.0) 中にアスパラギン、グルコースを溶解した水溶液を圧力下で加熱した時のアクリルアミド生成量を測定し、いずれの水溶液系でも圧力によるアクリルアミドの生成抑制が認められた。また、各要素間の相関性の強さは、水溶液系の pH で異なることから、アクリルアミド生成を抑制する仕組みが酸性 (pH 5.0) とアルカリ性 (pH 9.0) で異なると推測した。Fig. 3.4 に示すように、メイラード反応の初期段階は、アミノ酸と還元糖などのカルボニル化合物の反応から始まり、シッフ塩基が形成される。シッフ塩基は、不可逆反応であるアマドリ転位によって安定なアマドリ化合物になり、中期段階と複雑な後期段階を経てメラノイジン生成する^{17,21)}。一方、アクリルアミドの主な生成経路は、アスパラギンと

還元糖から形成された Schiff 塩基の脱炭酸を経る^{22,23)}。加圧によって、メラノイジン生成経路は変わらないため⁷⁾、圧力は、他の化合物を生成する反応を起こすのではなく、メイラード反応の初期段階の反応の一部を遅らせることで、アクリルアミドの生成を抑制したと考えられる。

pH 5.0 の非緩衝液試料と MES 緩衝液試料では、圧力上昇に伴ってアクリルアミドとメラノイジンの生成が抑制されていることから、両化合物の生成に共通する反応、即ちグルコースとアスパラギンの縮合反応が圧力によって遅くなったと推察される。

非緩衝液試料において、この反応速度の低下は、加圧に伴う水溶液の pH の低下に起因すると考えられる。まず、pH に関して、糖及びアミノ酸の活性型、即ち直鎖型の糖とアミノ酸の非プロトン型アミノ基は、pH が高い方が優勢になるため¹⁷⁾、pH の低下は反応物の活性を下げる。この反応物の活性に対する pH 依存性は、メイラード反応の pH 依存性を定性的に説明する¹⁷⁾。

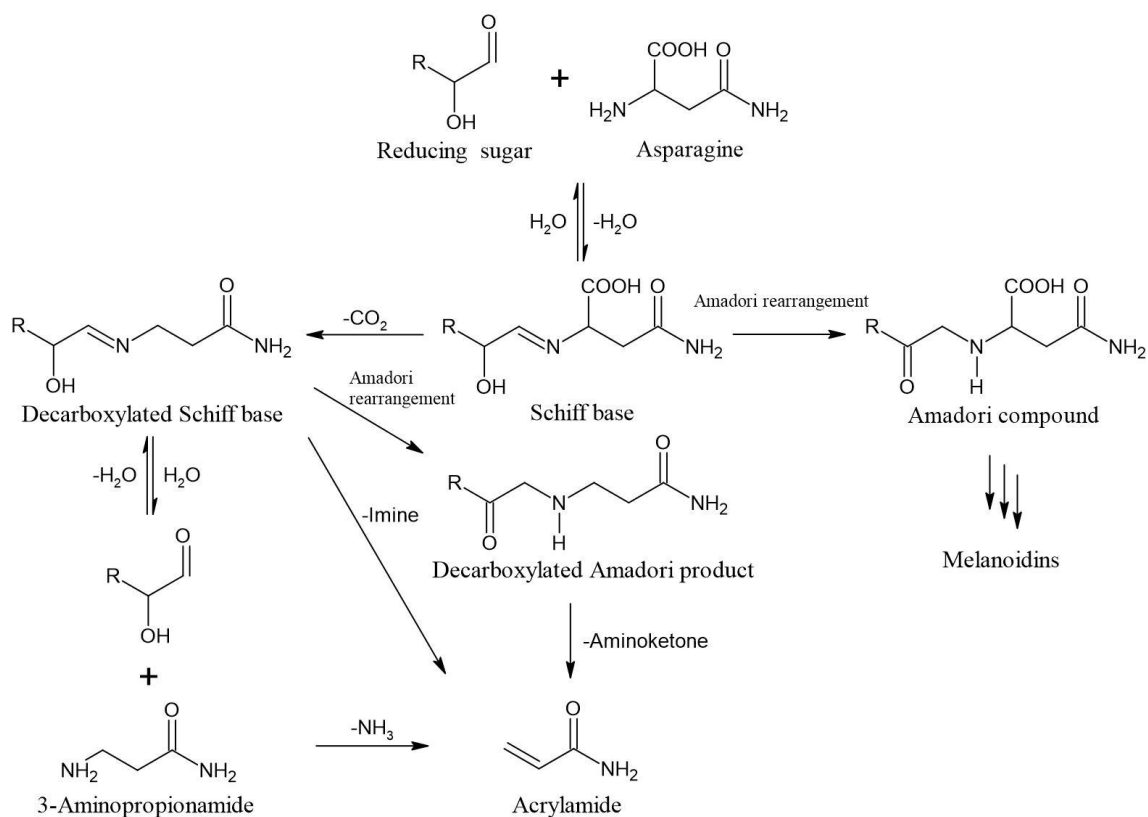


Fig. 3.4. メイラード反応における還元糖とアスパラギンからのアクリルアミドの生成経路

次に、圧力は、水や化合物のイオン化の進行と、それに起因した水溶液の pH 変化を引き起こし、減圧後は pH が元に戻る²⁴⁾。例えば、水の pH は、100 MPa 毎に 0.39 から 0.73 ユニット低下する²⁵⁾。功刀¹³⁾と谷口¹⁴⁾は、水と緩衝液のプロトン解離に伴う体積変化をまとめており、体積変化が大きい緩衝液は圧力で酸解離定数が大きく変化し、大きい pH シフトを起こす。これらの報告^{13,14)}によると、MES、TAPS 緩衝液は圧力による体積変化が小さいため pH 変化が小さく、これらに比べて、水は圧力による体積変化が大きいため pH が大幅に低下する。また、基質のアスパラギンも、上述の溶液と同様に圧力の影響を受けて解離平

衡が変化する。弱酸性の pH では、アスパラギンのカルボキシ基は、圧力によってプロトン解離が促進されるため、pH の低下に寄与する^{7,8)}。加えて、アスパラギンは、アスパラギン酸へ加水分解する際にアンモニアを放出し、溶液の pH を上昇させるが²⁰⁾、Fig. 3.3 G に示すように、圧力の上昇に伴い pH 上昇が抑えられていることから、圧力がこの反応の平衡を変えることでアンモニアの放出を抑制し、pH の上昇を抑えたと推測できる。アスパラギンのアスパラギン酸への変換は、即ち基質濃度の低下であり、pH の上昇によるアスパラギンの α アミノ基の非プロトン化によって、反応性の高いアスパラギン量の増加を引き起こす可能性がある。そのため、本研究の非緩衝液試料の圧力上昇に伴う大幅なメイラード反応の速度の低下は、圧力が引き起こす溶液成分の解離平衡の変化に起因すると考えられる。

このように、圧力はその上昇に伴って pH を変化させ、メイラード反応の進行に大きな影響を与える。その一方で、メイラード反応は、複数の反応経路と中間生成物から構成されるため、個々の反応に対する圧力の影響は、それぞれ異なると考えられる⁹⁾。Martinez-Monteagudo ら²⁴⁾は、メイラード反応中の個々の反応に対する圧力効果を活性化体積で示し、活性化体積が負の値を示す糖の開環、縮合反応、メラノイジン形成などは圧力によって促進され、活性化体積が正の値を示す反応であるアマドリ転位、糖の加水分解や 3-デオキシグルコソンなどの生成する化合物の一部がアクリルアミド生成の基質となる断片化は抑制されると報告している。非緩衝液試料では、加圧に伴う pH の低下に起因したアクリルアミドの生成抑制の方が、糖の活性化や縮合反応の進行によるアクリルアミドの生成促進よりも強く現れたと推測できる。

また、非緩衝液試料と同様に、圧力による pH 変化が小さい MES 緩衝液^{13,14)}試料でも、グルコースとアスパラギンの縮合反応の速度の低下を、圧力による

化学平衡の変化として説明できる。即ち、非緩衝液試料及び MES 緩衝液試料中では、反応後の pH 値が反応前に比べて高くなり、高い圧力ほど反応後の pH の変動が抑制されたことから (Fig. 3.3 G, H)、圧力がアスパラギン側鎖からのアンモニアの放出を抑制し、結果的に pH の上昇を抑制してグルコースとアスパラギンの縮合反応を遅らせたと考えられる。あるいは、アンモニウムイオンの酸の解離反応 ($-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2 + \text{H}^+$) の平衡は、圧力でわずかに左にシフトすることから^{7,8)}、アスパラギンのアミノ基のプロトン化によるアスパラギンの非活性化が圧力でわずかに促進され、その結果、グルコースとの反応が抑制された可能性がある。

一方、TAPS 緩衝液試料では、圧力下でアクリルアミドの生成が抑制されたが、メラノイジンの生成に明白な影響は与えなかった。その上、TAPS 緩衝液試料では、アクリルアミド濃度とメラノイジン濃度の間に相関性が認められず、圧力とアクリルアミド濃度及びメラノイジン濃度との間の相関性が、酸性試料液よりも低くなった。これらのことから、アルカリ性条件下では、グルコースとアスパラギンの縮合反応の抑制ではなく、それ以後の反応が圧力で抑制されたこと、あるいは生成したアクリルアミドの分解・重合反応が圧力で促進されたことが考えられる。一般的に、結合の開裂を伴う化学反応の活性化体積は正の値をとるため²⁶⁾、圧力は、Fig. 3.4 で示したアクリルアミドの前駆体からの脱離反応を遅らせたと考えられる。この圧力の直接的な作用は、主要ではないものの、酸性条件下でも起きていると推測される。一般的に、反応系の pH が高いほど褐色物質の生成速度が速くなること⁷⁾、およびメイラード反応は pH の相当な低下をもたらすことが知られており²¹⁾、本実験でもメラノイジンの生成抑制と、同時に反応後の pH の著しい低下が認められ、一層複雑な結果をもたらしたと考えられる。また、アルカリ条件下では圧力 (400 MPa と 600 MPa) がメイラード反

応を促進するとの報告がある一方で^{7,8,21)}、適用圧力が 300 MPa 以下である本研究では、圧力によるメラノイジン形成の明確な促進効果は認められなかった。圧力が高くなるにつれて、各反応の平衡がより変化し、メラノイジン生成が増大する可能性がある。

加熱反応後の pH の低下はメイラード反応の過程で生成する有機酸に由来しているため、メイラード反応の進行程度の指標として利用できる⁹⁾。しかしながら、非緩衝液試料及び MES 緩衝液試料中では、反応後の pH 値が反応前に比べて高くなり、高い圧力ほど反応後の pH の変動が抑制された。この pH の上昇は、アスパラギンがアスパラギン酸へ変換する際の側鎖の脱アミドが原因であると考えられる²⁰⁾。圧力が高いほどアスパラギンからのアンモニア放出を抑制し、その結果、pH の上昇が抑制されてアクリルアミド生成やメラノイジン生成に影響を及ぼした可能性がある。酸性試料液において反応後の pH が対照で最も高くなったのは、メイラード反応による有機酸の生成量よりも、アスパラギンの脱アミド量の方が多かったと考えられる。一方、TAPS 緩衝液試料中では、高い圧力ほど反応後の pH が反応前より低下した。TAPS 緩衝液試料では、非緩衝液試料と MES 緩衝液試料よりもメイラード反応が促進され、緩衝能を超える多くの有機酸が生成したため、大きな pH の低下が生じたと考えられる。

以上より、100 - 300 MPa の圧力下での 120°C の加熱は、常圧下での加熱に比べて、アクリルアミドの生成量が顕著に抑制されることを見出した。

3.5 結論

本研究では、産業上での利用を前提として 400 MPa 以下の圧力下で高温加熱することで、酸性又は塩基性のいずれでも、アクリルアミドの生成が抑制できることを明らかにした。圧力下でのアクリルアミドの生成抑制は、反応溶液の

pH によって異なり、加圧に伴う pH 変化や反応経路に対する直接的な圧力の作用によって引き起こされると推察した。特に、アクリルアミドが生成しやすいアルカリ域においては、メラノイジンを指標としたメイラード反応の進行を阻害することなく、圧力下で顕著にアクリルアミドの生成が抑制された。この結果は、アクリルアミドの生成を抑制する食品加工方法として、圧力を併用した加熱処理が有効であることを示すものである。

参 考 文 献

- 1) 園池耕一郎 (1997). 高压殺菌技術—その実用化における課題, 日本食品科学工学会誌, **44**, 522-530.
- 2) 山崎彬, 杵淵美倭子, 山本和弘, 山田明文 (1996). 高压処理を施した浸漬米の炊飯後の微細構造と物性, 高压力の科学と技術, **5**, 168-178.
- 3) 室越章 (2004). 牡蛎むき身装置の開発, 日本水産学会誌, **70**, 671-673.
- 4) 笹川秋彦, 内木由美子, 長島誠一, 山倉美穂, 山崎彬, 山田明文 (2006). 圧力処理を利用した GABA 富化玄米の製造とその特徴, *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 27-33.
- 5) Van der Plancken, I., Verbeyst, L., De Vleeschouwer, K., Grauwet, T., Heiniö, R.-L., Husband, F.A., Lille, M., Mackie, A.R., Van Loey, A., Viljanen, K. and Hendrickx, M. (2012). (Bio)chemical reactions during high pressure/high temperature processing affect safety and quality of plant-based foods. *Trends Food Sci. Technol.*, **23**, 28-38.
- 6) Tamaoka, T., Itoh, N. and Hayashi, R. (1991). High pressure effect on Maillard reaction. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2071-2074.
- 7) Hill, V. M., Ledward, D. A. and Ames, J. M. (1996). Influence of high hydrostatic pressure and pH on the rate of Maillard browning in a glucose-lysine system. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 594-598.
- 8) Ames, J. M. (1998). Application of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chem.*, **62**, 431-439.

- 9) De Vleeschouwer, K., Van Der Plancken, I., Van Loey, A. and Hendrickx, M. E. (2010). The effect of high pressure-high temperature processing conditions on acrylamide formation and other Maillard reaction compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 11740-11748.
- 10) JECFA (2011). *Acrylamide (addendum). Safety evaluation of certain contaminants in food, WHO Food Additives Series 63, FAO JECFA Monographs 8*, the 72nd meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, pp. 1-151.
- 11) 農林水産省 (2012). 有害化学物質含有実態調査データ集 (平成 15~22 年度).
https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/pdf/chem_15-22.pdf
- 12) Bell, L. N. (1997). Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration. *Food Chem.*, **59**, 143-147.
- 13) 功刀滋 (1991). 酵素反応と圧力, 「高圧科学と加熱食品」, 林力丸編, さんえい出版, 京都, pp. 74-83.
- 14) 谷口吉弘 (1992). 高圧下の水溶液と生物科学・工学, 材料, **41**, 839-848.
- 15) Delatour, T., Peisset, A., Goldmann, T., Riediler, S. and Stadler, R. H. (2004). Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chromatography tandem mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4625-4631.
- 16) Knol, J. J., Van Loon, W. A. M., Linssen, J. P. H., Ruck, A.-L., Van Boekel, M. A. J. S. and Voragen, A. G. J. (2005). Toward a kinetic model for acrylamide formation in a glucose-asparagine reaction system. *J. Agric. Food Chem.*, **53**,

6133-6139.

- 17) Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F. and Van Boekel, M. A. J. S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci. Technol.*, **11**, 364-373.
- 18) Brands, C. M. J., Wedzicha, B. L. and Van Boekel, M. A. J. S. (2002). Quantification of melanoidin concentration in sugar-casein systems. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1178-1183.
- 19) Martins, S. I. F. S. and Van Boekel, M. A. J. S. (2003). Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine Maillard reaction. *Food Chem.*, **83**, 135-142.
- 20) De Vleeschouwer, K., Van der Plancken, I., Van Loey, A. and Hendrickx, M. E. (2008). The kinetics of acrylamide formation/elimination in asparagine-glucose systems at different initial reactant concentrations and ratios. *Food Chem.*, **111**, 719-729.
- 21) Nursten, H. (2005). "The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and Implications." The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- 22) Yaylayan, V. A., Wnorowski, A. and Locas, C. P. (2003). Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1753-1757.
- 23) Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi, G. P. and Villagran, M. D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4782-4787.

- 24) Martinez-Montegudo, S. I. and Saldaña, M. D. A. (2014). Chemical reaction in food systems at high hydrostatic pressure. *Food Eng. Rev.*, **6**, 150-127.
- 25) Hayert, M., Perrier-Cornet, J. M. and Gervais, P. (1999). A simple method for measuring the pH of acid solutions under high pressure. *J. Phys. Chem. A*, **103**, 1785-1789.
- 26) 玉岡徹, 伊東典一, 林力丸 (1991). 食品に関連した化学反応に対する圧力効果, 「高圧科学と加圧食品」, 林力丸編, さんえい出版, 京都, pp. 58-73.
- 27) Stadler, R. H., Robert, F., Riediker, S., Varga, N., Davidek, T., Devaud, S., Goldmann, T., Hau, J. and Blank, I. (2004). In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5550-5558.
- 28) Stadler, R. H. and Studer, A. (2015). Acrylamide formation mechanisms. In “Acrylamide in Food. Analysis, Content and Potential Health Effects,” ed. Gokmen, V., Academic Press, Cambridge, pp. 1-17.

第 4 章

100 MPa 以下の圧力によるアクリルアミドの
生成抑制とメイラード反応の制御

4.1 緒言

100 MPa 以下の比較的低い圧力を長時間保持することで、化学的・生物学的な有害性を抑制しながら、食品の品質を向上させることが可能である。この方法は、加工に長時間を要する発酵や熟成に有効であり、加圧保持中での微生物の増殖能と無菌化について報告されている¹⁾。加圧下でのメイラード反応の進行に関する報告は幾つかある²⁾⁻⁴⁾が、アクリルアミドの生成についての報告は少ない⁵⁾。本章では、アスパラギンとグルコースを等モル濃度で混合した水溶液を用い、100 MPa 以下の圧力を保持することによるメイラード反応の反応速度の変化とアクリルアミドの生成抑制について検討した。また、第 2 章でアクリルアミドの生成抑制効果を見出したシステインをアスパラギンとグルコースの混合水溶液に添加し、100 MPa 以下の圧力保持に伴うメイラード反応とアクリルアミド生成の変化についても検討を行った。さらに、非遠心分離糖 (NCS) 水溶液にシステインを添加し、100 MPa 以下の圧力を保持することで、アクリルアミドの生成抑制を検討した。

4.2 実験材料及び実験方法

4.2.1 試薬及び実験材料

アクリルアミド (ultra pure, >99.9%) は関東化学株式会社 (日本) から、内標準物質 (IS) の ¹³C₁-アクリルアミド (>98%) は CDN Isotopes Inc. (カナダ) から入手した。上記以外の試薬は、すべて和光純薬工業(株) (日本) から試薬特級を購入した。すべての反応に使用した超純水、移動相の LCMS 用グレードの超純水、メタノール及び酢酸も同社から入手した。NCS (黒糖、波照間製糖(株)、日本産) は市販品を購入した。

4.2.2 試料調製

加圧下での反応試験は、L-アスパラギンと D-グルコースの等モル濃度 (0.125 M) の水溶液で実施した。L-アスパラギン 1 水和物は 1.876 mg、D(+)-グルコースは 2.252 mg (各 12.5 mmol)、TAPS は 2.432 mg (10.0 mmol) を精秤し、各試薬を共に超純水で溶解した。2 M 水酸化ナトリウム約 8 mL を用いて pH 9.0 に調整した後、100 mL 容メスフラスコで定容した。

また、システインを添加した加圧下での試料は、上述の L-アスパラギンと D-グルコースの等モル濃度 (0.125 M) の水溶液を調整する時に、0.151 mg (1.25 mmol) の L-システインを加えて調製した。L-システインの終濃度は 0.0125 M である。

加圧下での NCS 水溶液の反応試験は、システインを添加した水溶液系と同様に行った。NCS は乳鉢で磨砕、均質化し、12 g をガラスビーカーに精秤した。20 mM 又は 100 mM システイン 3 mL、及び超純水 9 mL を加えて攪拌し、NCS を溶解して試料とした。NCS 水溶液中の L-システインの最終添加量は、低用量で 0.06 mmol、高用量で 0.3 mmol であった。無添加試料はシステイン水溶液 3 mL を同量の超純水に置き換えて調製した。

4.2.3 圧力試験装置及び試験方法

高圧装置の概要図を Fig.4.1 に示す。高圧装置は、圧力容器 (内径 100 mm、外径 158 mm、高さ 428 mm、特注品、越後製菓(株)、日本)、加圧ポンプおよび圧力調整ポンプ (P-1B-S2, 理研精機(株)、日本)、圧力センサー (PG-2TH, (株)共和電業、日本) 及び圧力容器内外の温度センサー (SCHS1-0 KT128G637, (株)チノー、日本) で構成されている。この装置は、センサーで検出した圧力、温度の数値を検出器 (オムロン(株)、日本) に表示する。本装置の最大圧力は、100 MPa であ

る。本研究では 60 MPa、90 MPa の圧力条件で実施した。圧力容器は、低温恒温水槽（ユニエースバス NCB-2600、東京理化学器械(株)、日本）から伝熱媒体を圧力容器の周囲に循環させて加熱した。圧力容器内の圧力媒体、及び低温恒温水槽の伝熱媒体は、ナイブライン Z₁（株MOREDCO、日本）を用いた。

試料を 10 mL 容量のヘッドスペース用スクリーバイアル（バイアル口径 11mm、キャップサイズ 18mm、外径 22.5mm、高さ 46mm、ガラス製、ジーエルサイエンス(株)、日本）に満たし、セプタム付マグネティックスクリーキャップ（キャップサイズ 18mm、セプタムサイズ 17.5mm、キャップ穴サイズ 8mm、キャップ材質スチール、セプタム材質 PTFE/シリコン、セプタム厚さ 15mm、ジーエルサイエンス(株)）で空気の混入を避けて密封した。試料を満たしたバイアルを軟質性樹脂袋に入れ、72°C に加熱した蒸留水 20 mL と共に封入した。この袋を 70°C に予熱しておいた圧力媒体で満たされた圧力容器に入れた。圧力容器を密閉し、設定した圧力（60 MPa もしくは 90 MPa）まで加圧した。目的の圧力に到達した時点を実験開始時間とした。加圧下での反応試験の反応時間は、16 時間、24 時間、48 時間、72 時間の 4 条件とし、システインを添加した反応試験はすべて 24 時間の 1 条件とした。反応開始から反応終了まで、圧力は一定になるよう圧力調整ポンプで調整した。反応終了後、直ちに減圧弁を開いて圧力容器内を減圧し、圧力容器内からバイアル入り樹脂袋を取り出して氷水で冷却した。圧力対照試験は、試料を満たしたバイアルを蒸留水と共に封入した樹脂袋を 70°C の水浴槽に入れて加熱反応を行った。反応後の試料は室温に戻した後でメラノイジン生成量または褐変度と pH の測定、及びアクリルアミド抽出に供した。

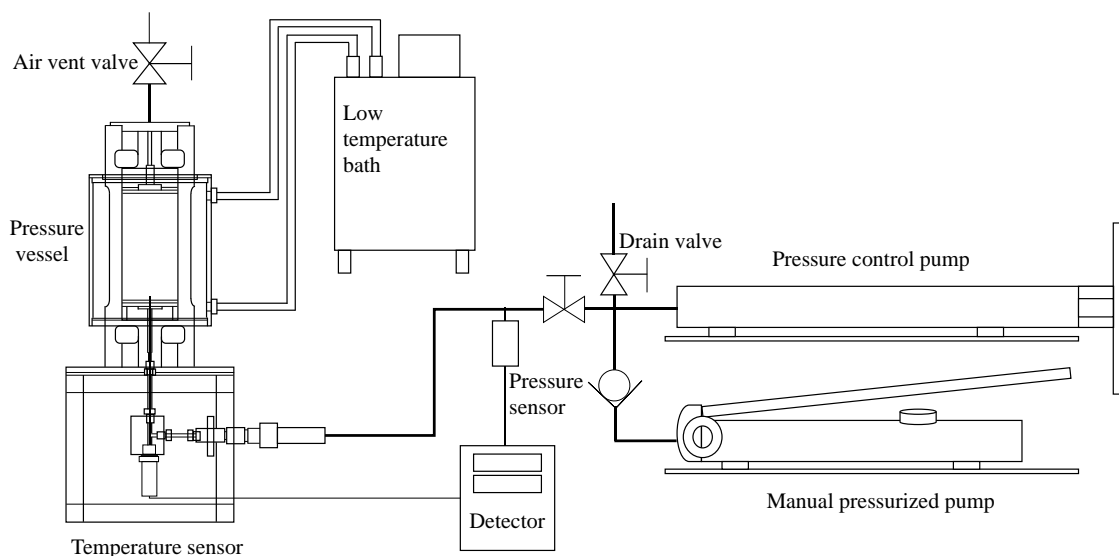


Fig. 4.1. 高圧装置の概略図

4.2.4 アクリルアミドの抽出と精製

アクリルアミドの抽出と精製は、Delatour ら⁶⁾の方法を改変して実施した。アスパラギン - グルコース水溶液は超純水で希釈した希釈液 1 mL を、NCS 水溶液は 1 g を精秤して、それぞれ 30 mL 容のポリプロピレン製遠沈管に採取し、超純水 9 mL と内標準物質の $^{13}\text{C}_1$ -アクリルアミド 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を 10 μL 加えて攪拌した。その後、試料に 0.36 M ヘキサシアノ鉄 (II) 酸カリウム 3 水和物 (Carrez 試薬 I) および 1.86 M 硫酸亜鉛 7 水和物水溶液 (Carrez 試薬 II) を各 1 mL 添加して攪拌後、15,000 G で 20 分間、10°C で冷却遠心分離 (RS-18IV, (株)トミー精工, 東京都) した。上清 5 mL を 30 mL 容のガラス製遠沈管に回収し、塩化ナトリウム 1.5 g を加えて溶解した。酢酸エチル 10 mL を加えて 1 分間激しく攪拌し、1,100 G で 10 分間遠心分離 (himac CT-15D, 日立工機(株), 東京都) した後、上層の酢酸エチルを 100 mL 容のナスフラスコに回収した。再度、水層に酢酸エチル 10 mL を加えて、同様の抽出操作を 3 回実施した。回収した酢酸エチル抽出液は、循

環式アスピレーターを接続したロータリーエバポレーター (N-N series, 東京理化器械(株)、東京都) を用いて 40°C で濃縮し、残渣は水 2 mL で再度、溶解した。予めメタノール 3 mL および水 6 mL で平衡化させた固相抽出カートリッジ Isolute Multimode 500 mg (International Sorbent Technology, イギリス) に溶解液を全量通過させ、通過液を 10 mL 容のガラス製バイアルビンに回収した。固相抽出カートリッジを水 1 mL で洗浄し、合わせて回収した。回収液は 40°C 以下で窒素ガスを吹き付けて 0.5 mL 以下に濃縮した。濃縮液は、0.20 μ m フィルターユニットで濾過し、分析試料とした。

4.2.5 LC-MS/MS によるアクリルアミドの定量分析

アスパラギン - グルコース水溶液、及び NCS 水溶液中のアクリルアミドの定量分析は、トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8030 (株島津製作所、京都府、日本) を用いて実施した。試料の注入量は 10 μ L とした。分離は C18 カラム (Synergi Hydro-RP, 250 mm \times 2 mm i.d., 4 μ m, phenomenex Inc., アメリカ) を用いた。カラムオープンの温度は 40°C とした。移動相には 0.1 vol% 酢酸/メタノール = 98/2 (v/v) を用い、流速 0.2 mL/分のアイソクラチック条件で分離した。溶出したアクリルアミドは ESI+ でイオン化した。イオン源は以下のように操作した。すなわち、ネブライザーガス流量が 3 L/分、インターフェイス電圧が 4.5 kV、脱溶媒管 (DL) 温度が 250°C、ヒートブロック温度が 400°C、ドラインガス流量が 15 L/分、衝突誘起解離 (CID) ガスが 230 kPa、検出器電圧が 1.74 kV である。アクリルアミドおよび内標準物質は、それぞれの $[M+H]^+$ のプロダクトイオン m/z 72.10 > 54.85、 m/z 73.10 > 55.90 を多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring, SRM) モードで検出し、同定した。アクリルアミド含量はアクリルアミド (0 ~ 1000 ng/mL) の内標準物質 (1000 ng/mL) とのピーク面積の

比で作成した検量線を使って行った。分析は 3 回以上行い、その平均値と標準偏差を試料の分析値として示した。本分析方法での検出限界と定量限界は、それぞれ 5 ppb および 15 ppb であった。

4.2.6 紫外可視分光光度計によるメラノイジン濃度及び褐変度の測定

試料の褐変は、紫外可視分光光度計 (UV mini-1240、(株)島津製作所) を使用して測定した。

アスパラギンとグルコースを混合した反応試料は、必要に応じて超純水で希釈した後に、470 nm の吸光度を測定した。アスパラギンとグルコースから形成されるメラノイジン濃度は、Knol ら⁷⁾の示した吸光係数 $282 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて、測定した吸光度からランベルト - ベールの式で算出した。

NCS 水溶液は前田ら⁸⁾の方法に準じて褐変度を測定した。NCS 水溶液を 10 倍希釈し、1,100 G で 15 分間遠心分離した上清について、470 nm の吸光度を測定した。

4.2.7 pH 測定

試料の pH は、ガラス電極を備えた pH メーター (D-55、(株)堀場製作所、日本) を用いて測定した。

4.2.8 統計解析

有意差の統計解析は、スチューデントの t 検定を用い、反応時間毎の各データの直線関係は、Microsoft Excel 2013 を用いてピアソンの相関係数で表した。

ピアソンの相関係数 r は次式で求めた。

$$r = \frac{s_{xy}}{s_x s_y}$$

$$= \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

変数 1 は x 、変数 2 は y 、データ数は n 、 s_{xy} は x と y の共分散、 s_x は x の標準偏差、 s_y は y の標準偏差、 \bar{x} は x の平均、 \bar{y} は y の平均である。

また、繰り返しのある二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行い、加圧とシステイン添加の間に交互作用があるものについては、テューキーの多重比較検定を行った。有意水準は $p = 0.05$ 及び 0.01 とした。

4.3 実験結果

4.3.1 加圧下でのアスパラギン - グルコース水溶液のアクリルアミド生成量

Fig. 4. 2(A)は、アスパラギンとグルコースを混合した水溶液を 70°C で 16~72 時間の圧力保持を実施した時のアクリルアミド生成量を示す。いずれの圧力条件でも、アクリルアミドの生成量は経時的に増加した。各反応時間で生成したアクリルアミドは 16 時間で 0.69 ~ 0.84 ppm、24 時間で 1.42 ~ 1.69 ppm、48 時間で 3.32 ~ 3.80 ppm、72 時間で 4.78 ~ 5.75 ppm であった。常圧 (0.1 MPa) と比べ、60 MPa で圧力保持した試料のアクリルアミド生成量は、16 時間及び 24 時間の反応時間で有意に高くなり ($p < 0.01$)、72 時間で僅かに低下した。また、90 MPa で圧力保持した試料のアクリルアミド生成量は、16 時間及び 24 時間の反応時間では差はないが、48 時間及び 72 時間で有意に低くなった (それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)。

4.3.2 加圧下でのアスパラギン - グルコース水溶液のメラノイジン生成量

Table 4.1 は、アスパラギンとグルコースを混合した水溶液を 70°C で 16~72

時間の圧力保持を実施した時の 470 nm における吸光度である。この値から算出したメラノイジン量を Fig. 4.2(B)に示す。メラノイジン生成量は経時的、圧力依存的に増加した。各反応時間で生成したメラノイジンは、16 時間で 0.03 ~ 0.06 mM、24 時間で 0.07 ~ 0.18 mM、48 時間で 0.38 ~ 0.77 mM、72 時間で 0.76 ~ 1.46 mM であった。いずれの反応時間でも、60 MPa と 90 MPa で圧力保持した試料は、常圧 (0.1 MPa) と比べてメラノイジンの生成量は有意に多くなった (いずれも $p < 0.01$)。特に 90 MPa で圧力保持した試料のメラノイジン生成量は、常圧 (0.1 MPa) と比較して、いずれの反応時間でも約 2 倍となり、圧力下でメイラード反応が促進されることを示した。

4.3.3 pH 測定

Fig. 4. 2(C)は、アスパラギンとグルコースを混合した水溶液を 70°C で 16~72 時間の圧力保持を実施した後の pH を示す。60 MPa で 24 時間、及び 90 MPa で 16 時間反応した後の pH は、それぞれの時間の常圧 (0.1 MPa) に比べて有意に低下した (それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)。圧力下で 48 時間反応した後の pH は、常圧 (0.1 MPa) に比べて、大きく低下した (いずれも $p < 0.01$)。圧力下で 72 時間反応した後の pH は、常圧 (0.1 MPa) に比べて低下したが、60 MPa 及び 90 MPa では 48 時間反応した後の pH よりも高くなった。

4.3.4 アクリルアミド及びメラノイジン生成の圧力依存性

Fig. 4.3 は、アクリルアミド及びメラノイジンの生成反応の反応速度定数 k の圧力依存性を示す。各成分の反応速度定数 k は、反応時間あたりの生成量から算出し、いずれも 0 次反応として観測された。各成分の生成反応の活性化体積 (ΔV^\ddagger) は、圧力に対する $\ln k$ をプロットした直線の傾きから算出した。算出

された活性化体積は、アクリルアミドは $+5.4 \text{ mL} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、メラノイジンは $-21.6 \text{ mL} \cdot \text{mol}^{-1}$ であった。

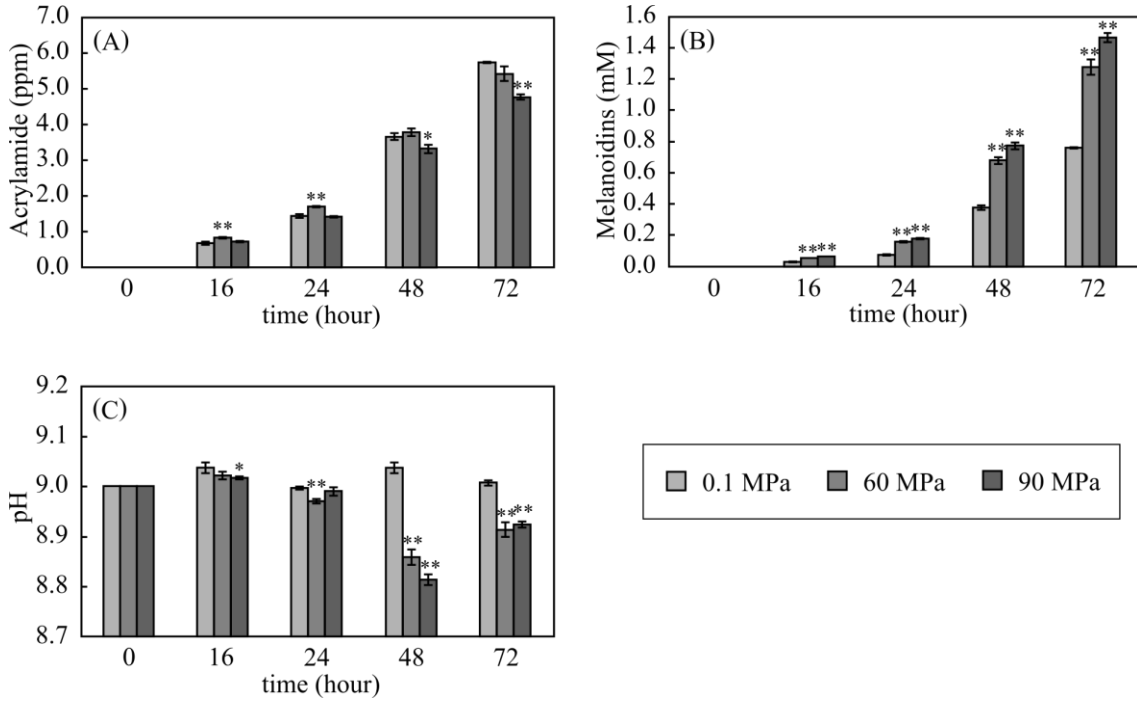


Fig. 4.2. TAPS 緩衝液中でアスパラギン - グルコース混合物を 70°C で加熱した時の (A) アクリルアミド生成量、(B) メラノイジン生成量、(C) 反応後の pH 値は平均値 \pm 標準偏差を示す ($n = 3$)。

*、**は、常圧 (0.1 MPa) に対して有意差があることを示す ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$)。

Table 4.1. TAPS 緩衝液中でアスパラギン - グルコース混合物を 70°C で 24 時間加熱した時の 470nm における吸光度

Time (hour)	A_{470}		
	0.1 MPa	60 MPa	90 MPa
0	0	0	0
16	0.074 ± 0.021	0.147 ± 0.003	0.172 ± 0.002
24	0.204 ± 0.019	0.450 ± 0.010	0.504 ± 0.013
48	1.062 ± 0.045	1.912 ± 0.061	2.174 ± 0.066
72	2.134 ± 0.009	3.598 ± 0.144	4.128 ± 0.078

Mean ± SD (n = 3)

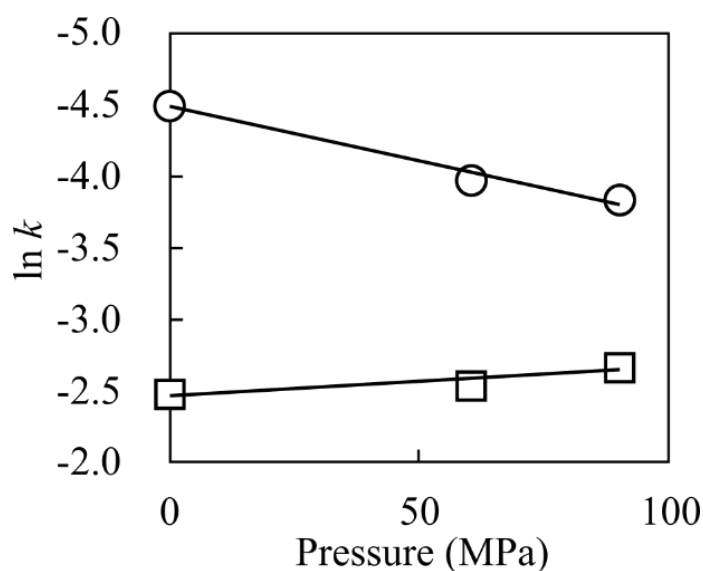


Fig. 4.3. 70°Cにおけるアクリルアミド生成 (□) とメラノイジン生成 (○) の反応速度に対する圧力効果

4.3.5 圧力、アクリルアミド生成量、メラノイジン生成量、pH の相関性

Table 4.2 は、各反応時間における圧力、アクリルアミド生成量、メラノイジン生成量、反応後の pH の相関性を示す。いずれの反応時間でも、圧力とメラノイジン生成量は有意に強い正の相関性が認められた (16, 24, 48, and 72 hours: $r =$

0.969, 0.982, 0.989, and 0.993)。また、反応時間が長くなるにつれて、圧力とアクリルアミド生成量及びアクリルアミド生成量とメラノイジン生成量の相関性は弱い正から負へと変化し、72 時間で有意に強い負の相関性が認められた (pressure vs. acrylamide: $r = 0.387, 0.130, -0.494, \text{ and } -0.899$, acrylamide vs. melanoidins: $r = 0.453, 0.289, -0.369, \text{ and } -0.845$)。圧力と反応後の pH 及びメラノイジン生成量と反応後の pH は、24 時間を除いた反応時間で強い負の相関性が認められた (pressure vs. pH: $r = -0.803, -0.384, -0.985, \text{ and } -0.891$, melanoidins vs. pH: $r = -0.717, -0.523, -0.995, \text{ and } -0.927$)。

Table 4.2. 各因子間の相関係数

Reaction time of 16 hours				
	Pressure (MPa)	Acrylamide (ppm)	Melanoidins (mM)	pH
Pressure (MPa)	1			
Acrylamide (ppm)	0.387	1		
Melanoidins (mM)	0.969*	0.453	1	
pH	-0.803*	-0.474	-0.717*	1
Reaction time of 24 hours				
	Pressure (MPa)	Acrylamide (ppm)	Melanoidins (mM)	pH
Pressure (MPa)	1			
Acrylamide (ppm)	0.130	1		
Melanoidins (mM)	0.982*	0.289	1	
pH	-0.384	-0.857*	-0.523	1
Reaction time of 48 hours				
	Pressure (MPa)	Acrylamide (ppm)	Melanoidins (mM)	pH
Pressure (MPa)	1			
Acrylamide (ppm)	-0.494	1		
Melanoidins (mM)	0.989*	-0.369	1	
pH	-0.985*	0.359	-0.995*	1
Reaction time of 72 hours				
	Pressure (MPa)	Acrylamide (ppm)	Melanoidins (mM)	pH
Pressure (MPa)	1			
Acrylamide (ppm)	-0.899*	1		
Melanoidins (mM)	0.993*	-0.845*	1	
pH	-0.891*	0.619	-0.927*	1

* Significant correlation at the 0.05 level.

4.3.6 システインを添加したアスパラギン - グルコース水溶液のアクリルアミド生成量

Fig. 4. 4(A)は、システインを添加したアスパラギン - グルコース水溶液を 70°C、24 時間の圧力保持を実施した時のアクリルアミド生成量を示す。システインは、アクリルアミド生成量を約 80%抑制した (two - way ANOVA, $p < 0.01$)。一方、90 MPa の圧力保持について、アクリルアミド生成量に有意な効果は認められなかった。また、圧力保持とシステイン添加の条件間で、アクリルアミド生成に対する交互作用は認められなかった。

4.3.7 システインを添加したアスパラギン - グルコース水溶液のメラノイジン生成量

Table 4.3 は、システインを添加したアスパラギン - グルコース水溶液を 70°C、24 時間の圧力保持を実施した時の 470 nm における吸光度である。この値から算出したメラノイジン量を Fig. 4.4(B)に示す。メラノイジンの生成に対し、圧力保持とシステイン添加は、いずれも有意に効果を示し、有意な交互作用も認められた (two - way ANOVA、それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)。全群の多重比較を行ったところ、常圧 (0.1 MPa) では、システインの添加がメラノイジンの生成を促進したが、90 MPa の圧力保持では、システインの添加がメラノイジンの生成を抑制し、メラノイジンの生成に対する圧力の作用は、システイン添加により抑制された。

4.3.8 システインを添加したアスパラギン - グルコース水溶液の pH 測定

Fig. 4. 4(C)は、システインを添加したアスパラギン - グルコース水溶液を 70°C、24 時間の圧力保持を実施した後の pH を示す。反応前後の pH の変化に対し、圧

力保持とシステインの添加は、いずれも有意な効果を示し、有意な交互作用も認められた (two-way ANOVA、全て $p < 0.01$)。全群の多重比較の結果、システインを添加した試料は、90 MPa の圧力保持と常圧 (0.1 MPa) のいずれでも、システインを添加しない試料に比べて反応後の pH が高くなった。また、システインを添加した試料において、90 MPa の圧力保持は、常圧 (0.1 MPa) よりも pH の変化が少なかった。

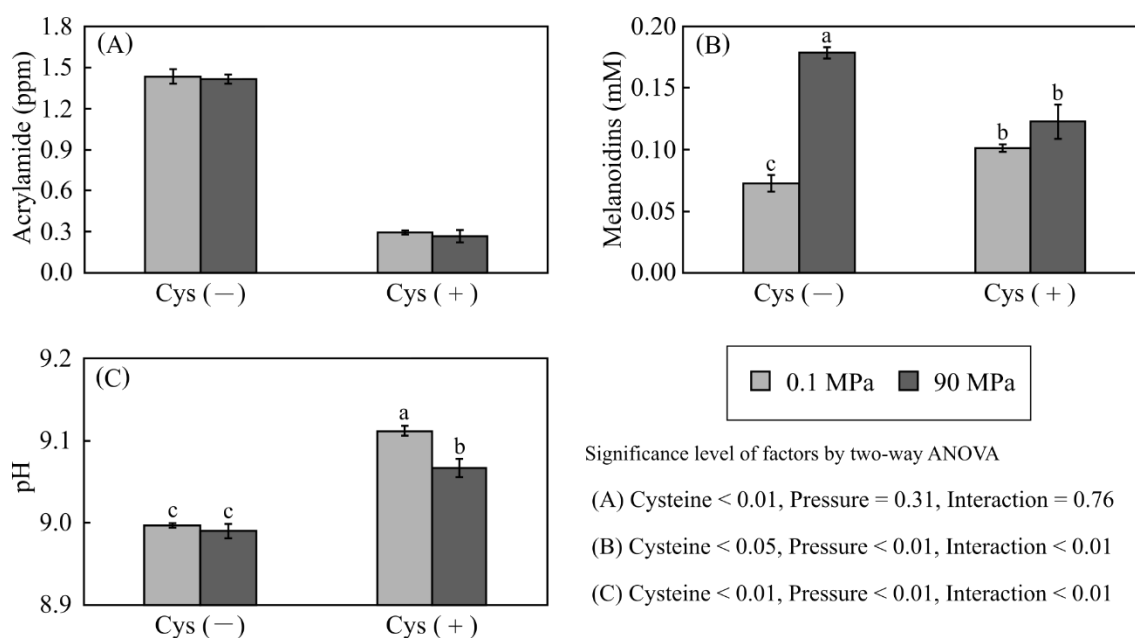


Fig. 4.4. TAPS 緩衝液中でアスパラギン - グルコース混合物を 70°C で 24 時間加熱した時の (A) アクリルアミド生成量、(B) メラノイジン生成量、(C) pH に対するシステイン添加と圧力の効果

値は平均値 ± 標準偏差を示す (n = 3)。

システインの最終濃度は以下の通り ; Cys (-) = 0 M、Cys (+) = 0.0125 M。データは二元配置分散分析を行い、圧力とシステイン添加の間に有意な相互作用が認められた場合は Tukey の多重比較検定を適用し、異なる文字はグループ間の有意差を示す ($p < 0.05$)。

Table 4.3. TAPS 緩衝液中でシステインを添加したアスパラギン - グルコース混合物を 70°C で 24 時間加熱した時の 470nm における吸光度

Cys conc. (M)	A_{470}	
	0.1 MPa	90 MPa
0	0.204 ± 0.019	0.504 ± 0.013
0.0125	0.286 ± 0.009	0.346 ± 0.039
Mean ± SD (n = 3)		

4.3.9 NCS 水溶液のアクリルアミド生成量

Fig. 4. 5(A)は、NCS 水溶液及びシステインを添加した NCS 水溶液を 70°C、24 時間の圧力保持を実施した時のアクリルアミド生成量を示す。加熱をしない無処理の NCS 水溶液（標準試料、Control）のアクリルアミド含量は、0.143 ppm であった。システインを添加しない試料と低濃度のシステインを添加した試料は、標準試料に比べて、アクリルアミドが増加した（スチューデント t-検定、 $p < 0.01$ ）。また、低濃度のシステインを添加した試料は、システインを添加しない試料に比べて、アクリルアミドの生成を抑制した。一方で、高濃度のシステインを添加した試料は、標準試料に比べて、アクリルアミドが減少した（ $p < 0.01$ ）。これらの結果から、システインはアクリルアミドの生成を強く抑制する効果と既存のアクリルアミドを減少する効果が認められた。また、圧力保持とシステイン添加はいずれも、NCS 水溶液中のアクリルアミド量に有意な効果を示し、有意な交互作用も認められた（標準試料を除く two-way ANOVA、 $p < 0.01$ ）。いずれの圧力条件でも、システインは濃度依存的にアクリルアミドの増加を抑える効果を示した（Tukey の方法、全て $p < 0.05$ ）。一方で、圧力によるアクリルアミドの消長は、システイン添加の有無により変化した。システインを添加しない試料では、圧力はアクリルアミド生成を促進し、反対に高濃度のシステインを添加した試料では、圧力はアクリルアミドの生成を抑制した（いずれも $p <$

0.05)。低濃度のシステインを添加した試料では、圧力は有意な効果を示さなかった ($p > 0.05$)。

4.3.10 NCS 水溶液の褐変度

Fig. 4. 5(B)は、NCS 水溶液及びシステインを添加した NCS 水溶液を 70°C、24 時間の圧力保持を実施した時の 470 nm における吸光度を示す。加熱しない無処理の NCS 水溶液 (標準試料、Control) の褐変度は、0.466 の吸光度を示した。標準試料と比較すると、高濃度のシステインを添加して 90 MPa で圧力保持した試料のみ、褐変度が有意に低下した (スチューデント t-検定、 $p < 0.05$)。圧力保持とシステイン添加はどちらも、NCS 水溶液の褐変度に有意な効果を示し、有意な交互作用も認められた (標準試料を除く two-way ANOVA、 $p < 0.01$)。常圧では、システインの濃度に依存して褐変度が低下した (Tukey の方法、いずれも $p < 0.05$)。90 MPa の圧力下では、高濃度のシステインを添加した試料の褐変度が、無添加及び低濃度添加よりも低下した (90 MPa, Cys(-) vs. Cys (high); $p < 0.05$ 、Cys (low) vs. Cys (high); $p < 0.05$ 、Cys (-) vs. Cys (low); $p > 0.05$)。また、システインを添加しない試料と高濃度添加した試料において、圧力は褐変を抑制した (いずれも $p < 0.05$)。その一方で、低濃度のシステインを添加した試料において、圧力は褐変を促進した ($p < 0.05$)。

4.3.11 NCS 水溶液の pH 測定

Fig. 4. 5(C)は、NCS 水溶液及びシステインを添加した NCS 水溶液を 70°C、24 時間の圧力保持を実施した後の pH を示す。加熱しない無処理の NCS 水溶液 (標準試料、Control) の pH は、5.52 であった。標準試料の pH と比較すると、いずれの試料でも反応後の pH は有意に低下した (スチューデント t-検定、いずれも

$p < 0.01$)。また、高濃度のシステインを添加して 90 MPa の圧力保持をした試料の pH が、最も低下した。圧力保持とシステイン添加はいずれも、NCS 水溶液の pH 変化に有意な効果を示し、交互作用も認められた (標準試料を除く two-way ANOVA、 $p < 0.01$)。いずれの圧力条件でも、システインは濃度依存的に pH を下げる効果を示した (Tukey の方法、全て $p < 0.05$)。圧力は、高濃度のシステインを添加した試料のみ、pH を下げる効果を示した ($p < 0.05$)。

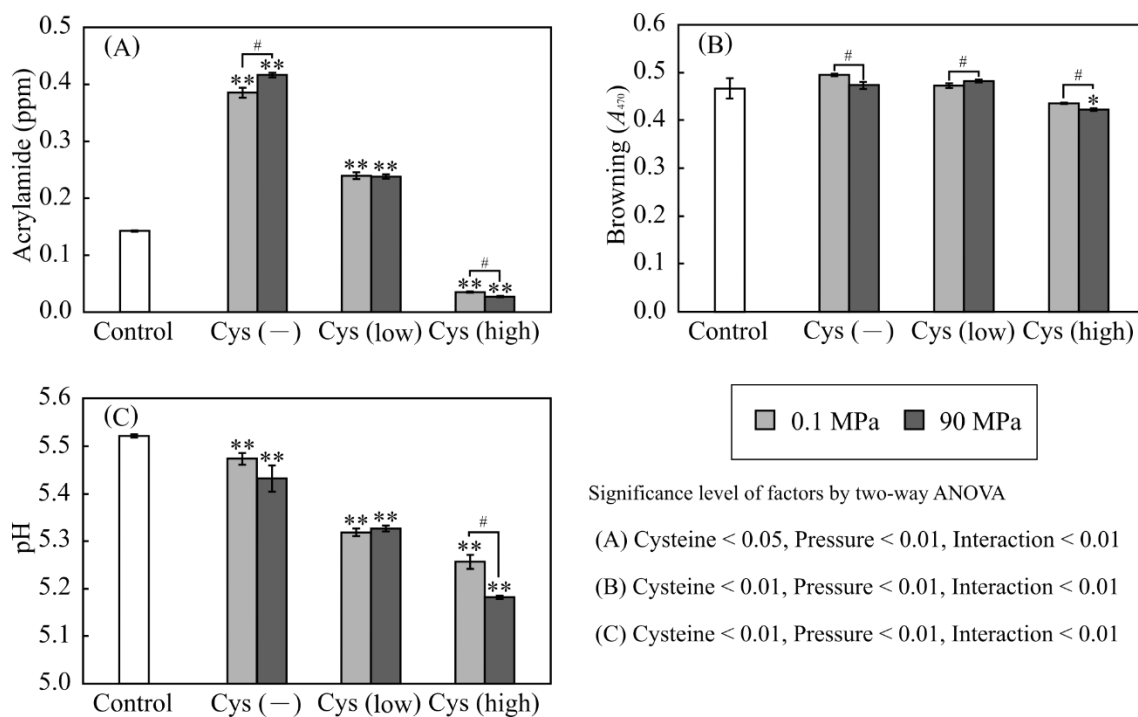


Fig. 4.5. NCS 水溶液を 70°C で 24 時間加熱した時の (A) アクリルアミド生成量、(B) 褐変度、(C) pH に対するシステイン添加と圧力の効果

値は平均値 ± 標準偏差を示す (n = 3)。

NCS 水溶液へ添加したシステインの物質質量 ; Cys (-) = 0 mmol、Cys (low) = 0.06 mmol、Cys (high) = 0.3 mmol。

標準試料 (Control) との比較は、Student-t 検定を用いて行った ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$)。標準試料以外のデータは、二元配置分散分析を行い、圧力とシステイン添加の間に有意な交互作用が認められた場合は、各システイン濃度および各圧力における有意性を Tukey の多重比較検定で判定した ($#p < 0.05$)。

4.4 考察

本研究では、100 MPa 以下の圧力を保持することで、アクリルアミドの生成抑制効果を検討した。加圧加熱実験は、70°C の温和な加熱を行いながら、最大で 72 時間まで実施した。

アスパラギン - グルコース混合水溶液を 60 及び 90 MPa の圧力で反応させた場合、pH9.0 において、圧力はアクリルアミド生成の抑制効果とメラノイジン生成の促進効果を示した (Fig. 4.2 A, B)。メラノイジンの生成経路は圧力の有無によって変わらない³⁾ことから、圧力は、他の化合物を生成する反応を起こしていないと考えられる。グルコースとリジンを用いた加圧加熱実験から、褐変速度に対する圧力の作用は pH により変化し、圧力は酸性、中性、アルカリ性で、それぞれ遅延効果、効果なし、促進効果を示すと報告されている^{3,4)}。また、同様の実験系でメイラード反応の各段階が圧力の影響を受けることが報告されており、pH 10.2 の溶液で、400 MPa の圧力はアマドリ化合物の形成とその後の分解を促進し、中期段階と後期段階の反応生成物の増加に至るとある⁹⁾。

Table 4.2 より、いずれの反応時間においても、圧力値とメラノイジン生成量との相関性は、圧力値とアクリルアミド生成量との相関性よりも高い。このことから、アルカリ性条件下では、90 MPa 以下の圧力はメラノイジンの形成に至るメイラード反応の中期・後期段階に大きく影響し、アクリルアミドの生成に関わる反応への影響は小さいと推察した。第 3 章の Fig. 3.4 に示すように、アクリルアミドの生成とメラノイジンの生成は、シッフ塩基の形成までは共通しており、シッフ塩基がアマドリ転位するとメイラード反応の中期段階へ至り、シッフ塩基が脱炭酸するとアクリルアミド形成経路へ至る。圧力は、シッフ塩基からアマドリ化合物への変換を促進することでメラノイジンの生成を促進し、その結果としてシッフ塩基から脱炭酸シッフ塩基への変換量を減らすことでアクリルアミドの生成を抑制したと考えられる。あるいは、圧力は生成したアクリルアミドの分解や重合反応を促進したことが考えられる。

また、Table 4.2 より、圧力値とアクリルアミド生成量の相関性、及びアクリルアミド生成量とメラノイジン生成量の相関性が経時的に負の方向へ強くなっ

ていることから、圧力のアクリルアミド生成に対する抑制効果は、反応時間が長くなる、即ちメイラード反応が進行するにつれて顕著になったことを示している。

加圧反応後の pH は標準試料 (Control) よりも低くなる傾向が見られた (Fig. 4.2C)。反応後の pH が圧力やメラノイジン生成量との間に比較的強い相関性がある (Table 4.2) が、pH の低下の程度は 0.2 未満のため、因果関係の判断はできなかった。

以上より、pH9.0 のアスパラギン - グルコース水溶液を 90 MPa 以下で圧力を保持しながら加熱することで、アクリルアミド生成を抑制しながら、メラノイジンを効率的に生成することが可能であり、メイラード反応が進行するにつれてこの効果が顕著になることが明らかになった。

第 3 章にて、pH9.0 の TAPS 緩衝液を用いて L-アスパラギン、D-グルコースを溶解した水溶液を 100~300 MPa の圧力を保持しながら、120°C で 60 分間の加熱を実施した場合には、アクリルアミドの生成は顕著に抑制されたが、メラノイジンの生成量は圧力による有意な増減は見られなかった。本章で実施した反応条件 (70°C、90 MPa 以下、最大 72 時間) では、90 MPa で 48 時間以降の圧力保持でアクリルアミドの生成が抑制され、メラノイジンの生成量は圧力上昇に伴い顕著に増加していた。また、第 3 章の加熱条件 (120°C、1 時間) の対照 (5 MPa) で生成したメラノイジン量は、本章の加熱条件 (70°C、72 時間) の対照 (0.1 MPa) の約 42 倍であった。そのため、双方の加熱条件におけるメイラード反応の進行度の著しい差が、それぞれの条件におけるアクリルアミドとメラノイジン生成に対する圧力の効果に違いを生じさせたと推測した。

メイラード反応は、アミノ酸と還元糖などのカルボニル化合物の反応から始まる初期段階、中間体であるアマドリ転位生成物の分解が起こる中期段階、ス

トレッカー分解や重合などによってメラノイジンを生成する後期段階に大別される^{10,11)}。液相での反応速度に対する圧力の影響は、活性化体積 (ΔV^\ddagger) として以下の式で表される¹²⁾。

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial P}\right)_T = -\frac{\Delta V^\ddagger}{RT}$$

ここでは、 k は反応速度定数、 P は圧力、 R は気体定数、 T は絶対温度である。反応速度定数 k の算出において、アクリルアミドとメラノイジンの生成反応は、メイラード反応の評価としてしばしば用いられている 0 次反応と仮定することで高い近似性が得られた (Fig. 4.3)¹³⁾。活性化体積が負の値をとるときに、イオン化や分子数の減少を伴う反応は圧力で促進され、正の値をとるときには、結合の開裂といった分子数の増加を伴う反応は抑制される¹²⁾。メイラード反応のそれぞれの段階で起こる個々の化学反応に対して、圧力は活性化体積が示す正負の値に基づき、促進もしくは抑制の異なる効果を示す¹⁴⁾。Fig. 4.3 から算出される活性化体積は、メラノイジンが $-21.6 \text{ mL} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、アクリルアミドが $+5.4 \text{ mL} \cdot \text{mol}^{-1}$ であった。これは、メラノイジンの生成は促進され、アクリルアミドの生成は抑制される方向に圧力が作用することを示している。メラノイジンの生成において、シッフ塩基は、アマドリ転位の後に糖の脱水や断片化を受ける¹¹⁾。アマドリ転位およびその生成物の分解は、圧力で遅くなる可能性が高い¹³⁾が、pH 10.2 ではアマドリ転位も圧力によって促進されるとの報告もある⁹⁾。加えて、アマドリ転位化合物の分解生成物からメラノイジンを生成する反応は、重合反応といった分子数の減少を伴うため、圧力によって促進される可能性が高い¹⁴⁾。結果として、メラノイジン生成反応の活性化体積は負の値を示したといえる。対照的に、アクリルアミド生成はいずれの経路においても、シッフ塩基から分子数の増える反応を経るため、その生成反応の活性化体積は正の値を

示したと考えられる。

圧力のメラノイジン生成に対する促進効果が観察できるのは、褐変の増加がメイラード反応の進行と相関関係にある場合だけであると考えられる。穏やかにメイラード反応が進行した本章の研究では、メイラード反応の進行度とメラノイジンの増加がほぼ一致するとみなせるため、メラノイジン生成に対する圧力の促進作用が観測できたと考えられる。一方のメイラード反応が著しく進行する第 3 章の研究の反応条件では、メラノイジンの重合が進行して一部不溶化し、圧力のメラノイジン生成に対する作用を過小評価した可能性がある。即ち、急激なメイラード反応の進行は、褐色物質の不溶性化を引き起こし、褐変とメイラード反応の相関関係が崩れるため、メラノイジン生成に対する圧力の効果が観察できなくなる。メラノイジンの生成とは対照的に、アクリルアミドの生成は、メイラード反応が進行するにつれて圧力による抑制効果が顕著になった。これは、アクリルアミドの生成反応への圧力効果がメラノイジンの生成反応よりも小さく、アクリルアミドの生成量が微量であるためと推測した。それぞれの加圧加熱条件におけるアクリルアミドとメラノイジンの生成量に対する圧力効果の違いは、各条件でのメイラード反応の進行度の違いに起因すると考えられる。

TAPS 緩衝液 (pH9.0) 中に L-アスパラギン、D-グルコース及び L-システインを溶解した水溶液を 100 MPa 以下の圧力を保持しながら、70°C で加温した時のアクリルアミド生成量とメラノイジン生成量、反応後 pH を測定した結果、システインはアクリルアミド生成を含むメイラード反応に作用し、その作用の一部は圧力の影響を受けることが認められた (Fig. 4.4A, B)。システインはアクリルアミドの生成を抑制する効果があり、この効果は主としてアスパラギンとの競合反応によると考えられる^{15,16)}。システインがアクリルアミドの生成抑制に高

い効果を示し (Fig. 4.4A)、圧力によるアクリルアミドの生成抑制効果が顕著になるのは 90 MPa で 48 時間以上反応した場合であった (Fig. 4.2A) ことから、システインの関与するアクリルアミド生成反応に対する圧力の効果が本実験系においては顕在化しなかったと考えられる。その一方で、システインはメラノイジン生成に対する圧力効果に影響を及ぼした (Fig. 4.4B)。システインはメイラード反応による着色を抑制する効果があることが知られており、これはシステインのチオール基がカルボニル化合物と付加体を形成するためと考えられ¹⁷⁾、システイン由来の低分子色素成分も明らかになっている¹⁷⁾。このようなシステインが関与するメイラード関連生成物が新たな化学平衡を生じ、メラノイジン形成に対する圧力の影響を変化させたことが考えられる。なお、システイン添加により反応後の pH が若干上昇していたものの、メイラード反応の進行にどの程度影響を及ぼしたのかは判断できなかった。

第 2 章において、NCS 水溶液中のアクリルアミド生成は、システインとの共存下で抑制されることを確認できたので、NCS のようなアクリルアミドの生成し易い食品に対し、圧力保持とシステイン添加を適用することで、アクリルアミド生成の抑制を試みた。システイン無添加及び低濃度のシステインを添加した NCS 水溶液を 70°C で 24 時間加熱した結果、反応前よりもアクリルアミド含量が増加した (Fig. 4.5A)。第 3 章の結果より、アスパラギン - グルコース混合物を MES 緩衝液 (pH 5.0) 中で加圧加熱 (≤ 300 MPa、120°C、1 時間) すると、アクリルアミド及びメラノイジンの生成は TAPS 緩衝液 (pH 9.0) 中よりもはるかに少なかった。これは、弱酸性の条件では、アスパラギンとグルコースの縮合反応が起こりにくいことを示唆しており、この反応で生じるアクリルアミドは、NCS 水溶液 (pH は約 5.5) 中ではごくわずかであると考えられる。NCS はアスパラギンと還元糖以外にも、アクリルアミド中間体やアクリルアミド付加

体、アスパラギンとの反応性が高いカルボニル化合物などのアクリルアミドを生成する化合物を含んでいると考えられることから¹⁸⁻²⁵⁾、これら化合物からアクリルアミドが生成したと推測した。

また、システインの添加は、NCS 水溶液中で顕著にアクリルアミドの生成抑制効果を示した (Fig. 4.5A)。この効果は、上述のアスパラギンとの競合反応として説明できる^{15,16)}。さらに、システインは上述のアクリルアミド中間体などとも反応してアクリルアミド生成を抑制すると推察される。一方で、NCS 水溶液中のアクリルアミド生成に対する圧力の効果は、システインよりもかなり弱かった。また、圧力は NCS 水溶液中のアクリルアミド生成を促進したが、高濃度のシステイン共存下の NCS 水溶液中では、アクリルアミド生成を抑制した。これらの結果は、圧力は、NCS 水溶液中のアクリルアミド中間体からのアクリルアミド形成を促進し、同時にシステインによるアクリルアミドの生成抑制も促進することを示唆している。システインが高濃度存在するときには、圧力はアクリルアミド形成の促進効果よりも阻害効果に有利に作用したと推察した。

NCS 水溶液の褐変に関して、圧力保持とシステイン添加は褐変を抑制する傾向があったが、無処理の NCS 水溶液と比べて褐変度の変化は少なかった (Fig. 4.5B)。これは、本実験条件 (70°C、24 時間) で加熱した NCS 水溶液中では、メラノイジン生成に至るメイラード反応の進行がわずかであったことを示唆しており、アクリルアミドが生成したこととは対照的である。NCS は常温貯蔵中にメイラード反応が進行して着色度が増加する²⁶⁾と同時に、アクリルアミド濃度が低下する²⁷⁾。褐変度とアクリルアミドの関係性から、一般的に、澱粉質の加工食品の色調は、アクリルアミド量の基準として用いることができるが、NCS 水溶液中のアクリルアミドは不安定なので、着色度がアクリルアミド含量の目安にはならない。また、システインの抗酸化作用²⁸⁾が、主に加熱により生成す

るメラノイジンとカラメル様物質、その他フェノール化合物の酸化重合体や低分子量の着色物質^{29,30)}から成る黒糖の褐変色素を還元して、褐変を抑制した可能性がある。加えて、酸性条件下において、圧力は褐変を抑制することも褐変度の低下に関与していると考えられる^{3,4)}。

反応後の pH に関して、圧力保持とシステイン添加は NCS 水溶液の pH を低下する作用を示していた (Fig. 4.5C)。これはシステインのチオール基の酸化が原因と考えられる。

以上より、NCS 水溶液を穏やかに加熱することにより生じるアクリルアミドは、システインの添加によって抑制できることが明らかとなった。圧力はシステインとの併用によりアクリルアミド生成や褐変を抑制できることが示唆された。

4.5 結論

アスパラギンとグルコースを等モル濃度で混合したアルカリ性 (pH 9.0) 水溶液を、100 MPa 以下の圧力を保持しながら温和な加熱を行うことで、メイラード反応は促進され、アクリルアミド生成は相対的に抑制できることを明らかにした。システインの添加は、等モルのアスパラギンとグルコースのアルカリ性水溶液と NCS 水溶液のいずれでも、アクリルアミド生成を強く抑制した。NCS 水溶液における圧力効果は、システイン添加の効果よりも弱いものの、併用することでアクリルアミド生成や褐変を抑制できることが明らかになった。

100 MPa 以下の圧力を保持しながら加熱を行うことで、長時間の加工を要する発酵や熟成に関わるメイラード反応を促進し、かつアクリルアミド生成を抑制することが期待できる。

参 考 文 献

- 1) Ogino M. and Nishiumi T. (2018). Control of the generation time of microorganisms by long-term application of hydrostatic pressure of 50 MPa or less. *Food Sci. Technol. Res.*, **24**, 289-298.
- 2) 玉岡徹, 伊東典一, 林力丸 (1991). 食品に関連した化学反応に対する圧力効果, 「高圧科学と加圧食品」, 林力丸編, さんえい出版, 京都, pp. 58-73.
- 3) Hill, V. M., Ledward, D. A. and Ames, J. M. (1996). Influence of high hydrostatic pressure and pH on the rate of Maillard browning in a glucose-lysine system. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 594-598.
- 4) Ames, J. M. (1998). Application of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chem.*, **62**, 431-439.
- 5) De Vleeschouwer, K., Van Der Plancken, I., Van Loey, A. and Hendrickx, M. E. (2010). The effect of high pressure-high temperature processing conditions on acrylamide formation and other Maillard reaction compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 11740-11748.
- 6) Delatour, T., Peisset, A., Goldmann, T., Riediler, S. and Stadler, R. H. (2004). Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chromatography tandem mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4625-4631.
- 7) Knol, J. J., Van Loon, W. A. M., Linssen, J. P. H., Ruck, A.-L., Van Boekel, M. A. J. S. and Voragen, A. G. J. (2005). Toward a kinetic model for acrylamide formation in a glucose-asparagine reaction system. *J. Agric. Food Chem.*, **53**,

6133-6139.

- 8) 前田剛希, 下地格, 手登根正, 下地浩之, 上地克美, 伊志嶺弘勝, 砂川正幸, 知念潤, 出花幸之介, 宮城克浩, 荻貴之 (2018). 梢頭部汁を混合して製造した黒糖と茎汁のみで製造した黒糖の比較, 沖縄県農業研究センター研究報告, **12**, 14-20.
- 9) Moreno, F. J., Molina, E., Olano, A. and Lopez-Fandino, R. (2003). High-pressure effects on Maillard reaction between glucose and lysine. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 394-400.
- 10) Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F. and Van Boekel, M. A. J. S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci. Technol.*, **11**, 364-373.
- 11) Nursten, H. (2005). "The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and Implications." The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- 12) 中原勝 (1991). 液相反応に対する圧力効果はなぜ起こるか, 「高圧科学と加圧食品」, 林力丸編, さんえい出版, 京都, pp. 41-57.
- 13) 川井清司, 萩原知明, 高井陸雄, 鈴木徹 (2005). ガラス状態にある凍結乾燥食品のメイラード反応速度に及ぼす還元糖の影響, 日本食品工学会誌, **6**, 59-64.
- 14) Martinez-Montegudo, S. I. and Saldaña, M. D. A. (2014). Chemical reaction in food systems at high hydrostatic pressure. *Food Eng. Rev.*, **6**, 150-127.
- 15) Claeys, W. L., De Vleeschouwer, K. and Hendrickx, M. F. (2005). Effect of amino acid on acylamide formatoin and elimination kinetics. *Biotechnol. Prog.*, **21**, 1525-1530.

- 16) Kim, C. T., Hwang, E.-S. and Lee, H. J. (2005). Reducing acrylamide in fried snack products by adding amino acids. *J. Food Sci.*, **70**, C354-C358.
- 17) 村田容常 (2020). 酵素的褐変ならびにメイラード反応に関する食品化学的研究, 日本食品科学工学会誌, **67**, 1-12.
- 18) Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi, G. P. and Villagran, M. D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4782-4787.
- 19) Granvogl, M., Magnus, J., Koehler, P. and Schieberle, P. (2004). Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes. A minor but potent precursor in acrylamide formation. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4751-4757.
- 20) Stadler, R. H., Robert, F., Riediker, S., Varga, N., Davidek, T., Devaud, S., Goldmann, T., Hau, J. and Blank, I. (2004). In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5550-5558.
- 21) Granvogl, M. and Schieberle, P. (2006). Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5933-5938.
- 22) Blank, I., Robert, F., Goldmann, T., Pollien, P., Varga, N., Devaud, S., Saucy, F., Huynh-Ba, T. and Stadler, H. (2005). Mechanisms of acrylamide formation: Maillard-induced transformation of asparagine. In "Chemistry and Safety of Acrylamide in Food. Advances in Experimental Medicine and Biology," Vol. 561, eds. Friedman, M. and Mottram, D., Springer, New York, pp. 171-189.

- 23) Ehling, S., Hengel, M. and Shibamoto, T. (2005). Formation of acrylamide from lipids. In “Chemistry and safety of acrylamide in food. Advances in Experimental Medicine and Biology,” Vol. 561, eds. Friedman, M. and Mottram, D., Springer, New York, pp. 223-233.
- 24) Ishihara, K., Matsunaga, A., Miyoshi, T., Nakamura, K., Nakayama, T., Ito, S. and Koga, H. (2005). Formation of acrylamide in a processed food model system, and examination of inhibitory conditions. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **46**, 33-39.
- 25) Tsutsumiuchi, K., Hibino, M., Kambe, M., Okajima, N., Okada, M., Miwa, J. and Taniguchi, H. (2005). Effect of carbohydrates on formation of acrylamide in cooked food models. *J. Appl. Glycosci.*, **52**, 219-224.
- 26) 広瀬直人, 前田剛希, 高良健作, 和田浩二 (2015). 沖縄産黒糖の常温保存における物理化学的およびフレーバー特性の変化, 日本食品保存科学会誌, **41**, 253-259.
- 27) 漆山哲生, 吉野麻美, 山田友紀子 (2013). 含みつ糖 (黒糖, 加工黒糖, 赤糖) 中のアクリルアミド濃度とその貯蔵安定性の調査, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, B-09.
http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/papers_posters/pdf/106th_eisei1.pdf
- 28) 本田沙理, 増田俊哉 (2015). ポリフェノール, 化学反応を基盤とする機能性物質, 化学と生物, **53**, 442-448.
- 29) 氏原邦博, 吉元誠, 和田浩二, 高橋誠, 須田郁夫 (2013). サトウキビ糖蜜の抗酸化活性に及ぼす加熱加工の影響, 日本食品科学工学会誌, **60**, 159-164.
- 30) Jaffé, W. R. (2015). Nutritional and functional components of

non centrifugal cane sugar: A compilation of the data from analytical literature. *J.*

Food Compos. Anal., **43**, 194-202.

第 5 章

総括

5.1 食品加工におけるアクリルアミドに関する課題と本研究成果

アクリルアミドは、食品製造の加熱過程で意図せずに、副産物として生成する。2002年にスウェーデン政府が、食品中でアクリルアミドが生成することを発表して以降、世界各国で課題として取り上げられており、アクリルアミドの低減と生成抑制に向けた有効な手法が求められている。

本研究は、日本の伝統食品である米菓について、製造工程中にアクリルアミドが生成する可能性があることから、そのリスク評価と低減を図ることが必要と考え、取り組みを始めたものである。アクリルアミドの微量分析において、食品の性状を考慮した前処理が必要であり、澱粉質食品である米菓の前処理方法の検討と分析精度の確認を実施し、市販米菓のアクリルアミド含有量の調査を開始した。その中で1000 µg/kg以上のアクリルアミドが検出される検体があり、副原料として黒糖類を使用するもので特に高い数値となることを明らかにした。黒糖中のアミノ酸分析により、アクリルアミドの前駆物質であるアスパラギンが最も多いことが明らかとなった。米菓中のアクリルアミドは、他の加工食品に比べて極端に高いということはないが、黒糖などの副原料に由来する成分に大きく影響されることが推察された。

食品中のアクリルアミドの低減方法として、アクリルアミドが生成しづらい120°C以下の温度でシステインおよびリジンを反応させることで、アクリルアミドを低減できることを本研究に関わる著者の先行研究として報告した。このアクリルアミドとシステインおよびリジンの付加反応は、温度依存性、アミノ酸の濃度依存性、pH依存性を示し、アクリルアミドとアミノ酸は1:1の付加体を形成した。本手法は、既に生成したアクリルアミドを低減させることに有効であり、これを踏まえて、本研究では、アクリルアミドの生成抑制について検討した。

第 2 章では、アクリルアミドとその前駆物質を多く含む黒糖をモデル食品として、システインおよびリジンを添加して加熱することで、システインはアクリルアミドの生成を抑制し、リジンはアクリルアミドの増加を促進した。食品中でのアクリルアミドの存在形態や、アスパラギンや還元糖以外のアクリルアミド生成要因などもあり、食品中での複雑な反応系が示唆されたが、食品成分であるアミノ酸の添加によってアクリルアミドの生成を抑制できることを明らかにした。

第 3 章では、高圧処理を利用したアクリルアミドの生成抑制を検討した。400 MPa 以下の圧力下で高温加熱した時、酸性又は塩基性のいずれでも、アクリルアミドの生成が抑制できることを明らかにした。圧力下でのアクリルアミドの生成抑制は、反応溶液の pH によって異なり、加圧に伴う pH 変化やメイラード反応を構成する素反応に対する圧力の作用によって、反応が起こりにくくなると推察した。アクリルアミドの生成を抑制する食品加工方法として、圧力を併用した加熱処理が有効であることを示すものである。

第 4 章では、100 MPa 以下の圧力を保持することで、アクリルアミドの生成抑制とメイラード反応の制御を試みた。本手法では、加圧によってメイラード反応は促進されて、アクリルアミドの生成は抑制される傾向が見られた。黒糖の加工や、発酵、熟成を要する食品において、圧力と加温を併用することで、メイラード反応を促進しながら、アクリルアミドの生成を抑制することができるものと考えられる。

以上の結果を総括して、本研究では、国内外で重要な課題となっている食品中のアクリルアミドについて、アミノ酸添加と高圧処理による生成抑制の効果を明らかにし、アクリルアミドの生成を抑制する新たな手法を示すことができた。

5.2 本研究成果の応用と今後の展望

本研究で取り上げたアクリルアミドは、欧米人の主食である小麦やじゃがいも加工品に比較的多く含まれるものであり、特に欧州諸国では消費者のアクリルアミドに関する認知度が高く、行政機関、食品事業者が一体となって、食品中のアクリルアミドの低減に取り組んでいる。米国では、カリフォルニア州で事業者に対して警告表示や低減を義務付けるなど厳しい対応がとられており、2013年にはFDAが食品事業者向けに「アクリルアミドに関するガイダンス」を公表した。このような背景からもアクリルアミドの低減技術の確立は、日本だけでなく、海外への技術移転が期待できるものである。

高圧処理は、食品の品質と安全性を向上させる加工技術として、日本が世界に先駆けて開発した技術であるが、国内よりも海外の方が高圧処理の産業利用が進んでいる。2013年に米国で高圧処理を利用したフレッシュジュースが大手メーカーから発売され、現在、世界的に高圧処理が再びブームとなっている。高圧処理を利用した新しい技術は、あらゆる食品で課題となるアクリルアミドの低減、生成抑制技術として、世界的に利用できる可能性がある。日本の食品産業技術の一つとして高圧処理が活用され、将来には日本の技術貿易の中核が食品加工技術で構成されることを期待している。

また、本研究にて、圧力と加熱を組み合わせた化学反応を実施するにあたり、100°C以上の温度と400 MPaまでの圧力を組み合わせた高圧装置を開発した。圧力を長時間保持することで、化学反応を促進あるいは抑制し、食品において微生物の増殖を抑制しながら、熟成を促進することができる。著者の会社では、高圧技術の産業利用をソフト、ハードの両面から支援することを事業として「High-Pressure Support 株式会社」を2015年に設立し、高圧技術の推進を図って

いる。高圧装置に関して、食品加工用途だけでなく、医学・創薬などの研究・開発用途で圧力と温度を自由にコントロールできる高圧装置を事業展開している。本研究を通して、圧力の新たな価値を見出すことができ、今後も高圧関連産業の発展に貢献したい。

公表資料（発表論文・学会発表）

学位論文の基礎となる論文

1. Atsushi Kobayashi., Satoko Gomikawa., Asami Oguro., Satoshi Maeda., Akira Yamazaki., Shinji Sato., Hirofumi Maekawa., The Effect of High Hydrostatic Pressure on Acrylamide Generation in Aqueous Reaction Systems Using Asparagine and Glucose, *Food Science and Technology Research*, **25**(4), 578-596 (2019).
2. Atsushi Kobayashi., Satoko Gomikawa., Asami Oguro., Satoshi Maeda., Akira Yamazaki., Shinji Sato., Hirofumi Maekawa., Effects on Acrylamide Generation under Heating Conditions by Addition of Lysine and Cysteine to Non-centrifugal Cane Sugar, *Food Science and Technology Research*, **26**(5), 673-680 (2020).
3. Atsushi Kobayashi., Satoko Gomikawa., Asami Oguro., Akira Yamazaki., Shinji Sato., Hirofumi Maekawa., Inhibition of acrylamide generation by hydrostatic pressure and the cysteine addition, *Japan Journal of Food Engineering*, **22**(4), 87-101 (2021).

【学会発表】

1. Atsushi Kobayashi., Satoko Gomikawa., Asami Oguro., Satoshi Maeda., Akira Yamazaki., Shinji Sato., Tetsuya Konishi., Hirofumi Maekawa., The elimination of acrylamide by the formation of amino acid adducts and the inhibition of acrylamide generation using high pressure treatment, The 9th International Meeting on Biomolecules under Pressure (IMBP2017) , Kyoto, August 21-24, 2017.

2. 小林 篤, 五味川里子, 小黒麻美, 前田 聡, 山崎 彬, 佐藤眞治, 前川博史, 圧力下でのメイラード反応とアクリルアミドの生成抑制, 第 33 回日本分析化学会関東支部新潟地区部会研究発表会, 新潟大学, 2019 年 9 月 20 日.
3. 小林 篤, 五味川里子, 小黒麻美, 山崎 彬, 佐藤眞治, 前川博史, 食品加工におけるアクリルアミドの生成抑制に関する研究, 日本食品工学会第 21 回 (2020 年度) 年次大会, 三重大学 (オンライン開催), 2020 年 8 月 7 日~19 日.
4. 小林 篤, 五味川里子, 小黒麻美, 山崎 彬, 佐藤眞治, 前川博史, 高圧処理によるアクリルアミドの生成抑制, 第 61 回高圧討論会, 2020 年 12 月 2 日~4 日, オンライン開催.

謝辞

本研究の遂行と本論文を纏めるにあたり、長岡技術科学大学 前川博史教授からご指導と御校閲を賜りました。深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、LC-MS 及び LS-MS/MS によるアクリルアミドの定量分析についてご指導を頂きました新潟薬科大学応用生命科学部 佐藤眞治教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行についてご示唆を頂きました新潟薬科大学名誉教授 小西徹也先生に深く感謝申し上げます。

長岡技術科学大学でこのような研究の機会を頂きました越後製菓株式会社 取締役 山崎彬名誉会長、代表取締役 星野一郎会長、代表取締役 吉原忠彦社長に深く感謝申し上げます。

本研究に関わる圧力利用に関してご示唆を頂きました越後製菓株式会社 常務取締役 前田聡氏、High-Pressure Support 株式会社 取締役 荻野美由紀氏に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に多大なご協力を賜りました共同研究者である越後製菓株式会社総合研究所の五味川里子氏、新規事業部次長の小黒麻美氏に心より感謝申し上げます。

2022年3月吉日