

トピックス

食品添加物が食品中のビタミン B₁₂ に及ぼす影響

Effect of food additives on vitamin B₁₂ in food

はじめに

ビタミン B₁₂ (B₁₂) は B 群ビタミンのひとつであり、一般的に B₁₂ は上方配位子 (L) にシアノ基が配位したシアノコバラミン (CN-B₁₂) のことを指す (図 1)。一方、補酵素型 B₁₂ は上方配位子 (L) に 5'-デオキシアデノシル基またはメチル基を配位したアデノシルコバラミンおよびメチルコバラミンである (図 1)。アデノシルコバラミンはミトコンドリア内で奇数鎖脂肪酸や分岐鎖アミノ酸の異化代謝において、(R)-メチルマロニル CoA からスクシニル CoA の異性化反応を触媒するメチルマロニル CoA ムターゼ (EC 5.4.99.2) の補酵素として¹⁾、メチルコバラミンは細胞質において N⁵-メチルテトラヒドロ葉酸とホモシステインからメチオニンの生成を触媒するメチオニン合成酵素 (EC 2.1.1.13) の補酵素として機能する²⁾。

B₁₂ は一部の細菌や古細菌でのみ生合成され、食物連鎖を経て高等動物の体内に蓄積されるため、ヒトにおいて畜肉、牛乳、鶏卵、魚介類などの動物性食品が B₁₂ の良質な供給源になる³⁾。これまでに市販の一部の乾燥シイタケやヤマブシタケには B₁₂ のコリン環の一部が修飾を受けた非天然型の B₁₂ [c-lactone] (図 2) が含有されることが明らかになっており⁴⁾⁵⁾、この B₁₂ [c-lactone] は生理活性を示さないと考えられている⁵⁾⁶⁾。また、B₁₂ [c-lactone] は B₁₂ と有機塩素系殺菌剤の一種であるクロラミン T との反応により生成されるが⁷⁾、我が国では食品へのクロラミン T の使用は禁止されている。また、我が国の指定添加物リスト (日本食品化学研究振興財団) には、クロラミン T と類似した有機塩素系の添加物が含まれているが食品中の B₁₂ に及ぼす影響については不明である。食品添加物が食品中の B₁₂ に及ぼす影響を解析することは、「食の安全」の観点からも重要であると考えられる。本稿では、我が国で使用が認められている有機塩素系の添加物ひとつである次亜塩素酸水を含め、選抜された食品添加物が食品中の B₁₂ に及ぼす影響を検討した知見を紹介する。

食品添加物が B₁₂ に及ぼす影響

食品添加物は食品の製造過程や食品の加工・保存の過程で保存料、甘味料、着色料、香料など幅広く取り扱われている。また、我が国では厚生労働省が安全性とその有効性を認めたものしか食品添加物としての使用が許されていないが、食品添加物が B₁₂ をはじめ食品成分に及ぼす影響や食品添加物と食品成分の反応生成物についての情報は極めて少ない。

Okamoto ら⁸⁾ は、指定添加物リストに記載されている次亜塩素酸水 (殺菌料)、ピロ亜硫酸ナトリウム (酸化防止剤)、亜硫酸ナトリウム (漂白剤、保存料、酸化防止剤) と B₁₂ 溶液を混合し、食品添加物が B₁₂ にどのような影響を及ぼすのか検討している。B₁₂ 溶液 (CN-B₁₂, 10 μmol/L) に次亜塩素酸水 (有効塩素濃度 30 ppm) を混合すると、瞬時に B₁₂ 溶液の色が赤色から青紫色に変化を示したことから、B₁₂ と次亜塩素酸水の反応生成物が生じていることが考えられた。また、この反応液の紫外可視吸収スペクトル分析より、反応開始 1 時間で B₁₂ の特徴的な 361 nm および 550 nm の極大吸収スペクトルが消失していた。そこで B₁₂ 溶液と次亜塩素酸水の反応生成物を明らかにするために、B₁₂ 溶液 (CN-B₁₂, 10 μmol/L) と次亜塩素酸水 (有効塩素濃度 10 ppm) の 1 時間反応液を調製し、Sep-Pak C18 カートリッジで脱塩・濃縮し逆相 HPLC で分析を行った。その結果、B₁₂ と異なる 6 つの化合物の存在が確認された。しかし、その内 3 つの化合物は極めて不安定なため単離・精製の段階で消失が確認された。比較的安定であった他の 3 つの化合物 (化合物 A ~ C) について単離・精製後、¹H-NMR により構造解析を試みた。得られた ¹H-NMR の結果より、化合物 A ~ C は B₁₂ のコリン環とジメチルベンズイミダゾール基の両方が修飾を受けていることが推定された。また、化合物 A と化合物 B のスペクトルの類似性から化合物 A と化合物 B は構造異性体の関係であることが推察されたが、化合物 A ~ C の完全な同定には至らなかった。さら

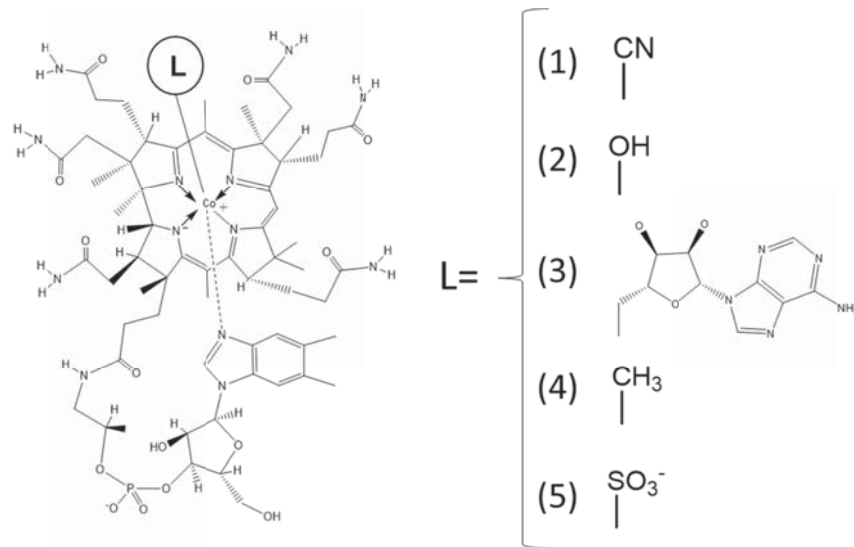


図1 ビタミン B₁₂ 化合物の化学構造

- (1) シアノコバラミン (ビタミン B₁₂), (2) ヒドロキソコバラミン, (3) アデノシルコバラミン, (4) メチルコバラミン, (5) スルフィトコバラミン.

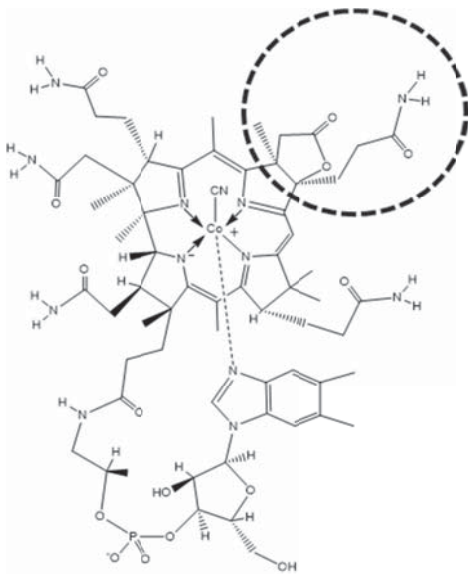


図2 ビタミン B₁₂ [c-lactone] の化学構造

に B₁₂ 依存性大腸菌 *Escherichia coli* 215 を用いたバイオオートグラム法でこれら3つのコリノイド化合物の生物活性を検討したところ、いずれのコリノイド化合物も B₁₂ 活性を示さなかった⁸⁾。

一方、B₁₂ 溶液 (CN-B₁₂, 10 mmol/L) に終濃度 0.01% (w/v) になるようにピロ亜硫酸ナトリウムおよび亜硫酸ナトリウムを溶解させた場合では、B₁₂ の紫外可視

吸収スペクトルに変化がみられなかった。しかし、逆相 HPLC で反応液を分析したところ、ピロ亜硫酸ナトリウムおよび亜硫酸ナトリウムは CN-B₁₂ と反応し天然にも存在するスルフィトコバラミン (SO₃⁻-B₁₂) (図1) を生成させることが確認された⁸⁾。このスルフィトコバラミンは食品中に含有されており⁹⁾、ヒトにおいて生理活性を示す。

食品添加物が食品中の B₁₂ 含量に及ぼす影響

選抜された食品添加物が食品中の B₁₂ 含量に及ぼす影響を検討するために、次亜塩素酸水 (有効塩素濃度 30 ppm), 0.1% (w/v) ピロ亜硫酸ナトリウム溶液, 0.1% (w/v) 亜硫酸ナトリウム溶液, 蒸留水 (コントロール) をそれぞれ 1 mL 添加したアルゼンチン赤エビのパテ (3×3×1 cm³) を作製し、4℃で48時間保存した。*Lactobacillus delbrueckii* ATCC7830 を用いた微生物学的定量法で B₁₂ 含量を測定した結果、コントロール (4.4 μg/100 g wet weight) と比較して各食品添加物を添加した赤エビのパテの B₁₂ 含量 (4.1 μg/100 g wet weight) に有意な変化はみられなかった。また、有効塩素濃度 30, 60, 80 ppm の次亜塩素酸水および蒸留水 (コントロール) を 1 mL 加えた牛肉のパテ (3×3×1 cm³) を作製し、4℃で48時間保存後、B₁₂ 含量を測定した。その結果、コントロール (2.7 μg/100 g wet weight) と比較して牛肉パテ中の次亜塩素酸水の有効塩素濃度を上げても、牛肉パテの B₁₂ 含量 (1.9-2.7 μg/100 g wet weight)

は有意な減少を示さなかった⁸⁾。これらの結果より、食品中の B₁₂ 含量は選抜した食品添加物の影響を受けないことが明らかになった。この要因として、食品中の B₁₂ はタンパク質結合型 B₁₂ として存在するため、食品添加物の影響を受けにくいことが推察された(図 3)。

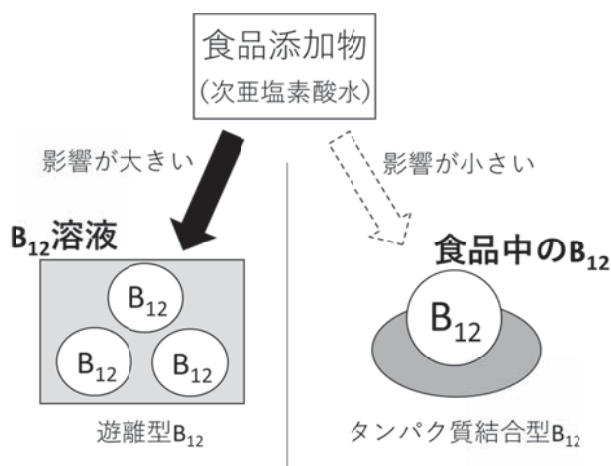


図 3 次亜塩素酸水がビタミン B₁₂ に及ぼす影響

おわりに

現在では液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置の発展・拡充により、食品中のコリノイド化合物の精密分析が比較的容易になってきた。それに伴い、食品中にも非天然型のコリノイド化合物が含有されることが明らかになってきている。今後更なる食品中のコリノイド化合物が同定され、B₁₂ 欠乏症の発症予防に繋がることを期待する。

Key words :corrinoid, food additives, sulfitocobalamin, vitamin B₁₂, vitamin B₁₂[c-lactone]

Department of Agricultural, Life and Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680-8553, Japan

Tomohiro Bito

鳥取大学農学部生命環境農学科

美藤 友博

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2020.10.21 受付)

文 献

- 1) Banerjee R (2001) Radical peregrinations catalyzed by coenzyme B₁₂-dependent enzymes. *Biochem* **40**, 6191-6198
- 2) Kennedy DG, Cannavan A, Molloy A, O'harte F (1990) Methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) and methionine synthetase (EC 2.1.1.13) in the tissues of cobalt-vitamin B₁₂ deficient sheep. *Br J Nutr* **64**, 721-732
- 3) Watanabe F, Bito T (2017) Vitamin B₁₂ sources and microbial interaction. *Exp Biol Med* **243**, 148-158
- 4) Bito T, Teng F, Ohishi S, Takenaka S, Miyamoto E, Sakuno E, Terashima K, Yabuta Y, Watanabe F (2014) Characterization of vitamin B₁₂ compounds in the fruiting bodies of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) and bed logs after fruiting of the mushroom. *Mycoscience* **55**, 462-468
- 5) Teng F, Bito T, Takenaka S, Yabuta Y, Watanabe F (2014) Vitamin B₁₂[c-lactone], a biologically inactive corrinoid compound, occurs in cultured and dried lion's mane mushroom (*Hericium erinaceus*) fruiting bodies. *J Agric Food Chem* **62**, 1726-1732
- 6) Stabler SP, Brass EP, Marcell PD, Allen RH (1991) Inhibition of cobalamin-dependent enzymes by cobalamin analogues in rats. *J Clin Invest* **87**, 1422-1430
- 7) Bonnett R (1963) The chemistry of the vitamin B₁₂ group. *Chem Rev* **63**, 573-605
- 8) Okamoto N, Bito T, Hiura N, Yamamoto A, Iida M, Baba Y, Fujita T, Ishihara A, Yabuta Y, Watanabe F (2020) Food additives (hypochlorous acid water, sodium metabisulfite, and sodium sulfite) strongly affect the chemical and biological properties of vitamin B₁₂ in aqueous solution. *ACS Omega* **5**, 6207-6214
- 9) Farquharson J, Adams JF (1976) The forms of vitamin B₁₂ in foods. *Br J Nutr* **36**, 127-136