

牡蠣含有ビタミン B₁₂ の人工消化試験後測定値に与える水煮調理の影響

橋高 (桂) 博美

Culinary Effect on the Assay Level of Vitamin B₁₂ from Oyster during *in vitro* Gastric Digestion

Hiromi Kittaka-Katsura

The release of free vitamin B₁₂ from ingested food during gastric digestion is the first step for the absorption of vitamin B₁₂. Free vitamin B₁₂ can be bound by salivary haptocorrin under the acidic conditions of the stomach and subsequent processes. Among sea foods, oyster and mackerel are especially rich in vitamin B₁₂. Here, we examined how the culinary treatment of oyster affects their digestion in the gastric phase and the subsequent release of vitamin B₁₂.

Oyster was cooked in boiling water for 0, 10, 20, 30, or 60 minutes. *In vivo* digestion in the gastric phase was simulated by incubating the cooked oyster for 30 min in the presence of pepsin (167 µg/ml) in 0.06 M HCl at 37°C. The digested oyster was centrifuged at 10,000×g for 15 min to obtain a supernatant which was assayed for vitamin B₁₂ content.

Vitamin B₁₂ contents of the soluble B₁₂ fraction was twice as high in the oyster boiled for 20 minutes than in raw oyster. Moreover the 20-min-boiled oyster was rated highest on “taste” in the sensory evaluation. Thus we concluded that boiling oyster for 20 minutes facilitates the absorption of vitamin B₁₂.

(Received September 3, 2007)

1. はじめに

ビタミン B₁₂ (図 1) は、微生物によって合成され、動物組織中や発酵食品に多く存在する。日本を含めアジア地域の人々の食事においては、牡蠣などの魚介類に含まれるビタミン B₁₂ 供給源としての寄与率が高く¹⁾、そのためアジア諸国の人々においてビタミン B₁₂ が不足しにくいといわれている²⁾。しかしながら、これらの魚介類（および動物性食品）に含まれるビタミン B₁₂ のほとんどはタンパク質に結合しており、消化吸收能力の衰えた高齢者においてはビタミン B₁₂ の吸収率が低下し、不足している者が多いことが指摘されている³⁾。ビタミン B₁₂ の不足によってメチオニンシンターゼの活性が低下すると、血中ホモシステインの濃度が上昇し、循環器疾

患のリスクファクターになっていることが知られている³⁾。一方で、調理操作がタンパク質結合型ビタミン B₁₂ の吸収にどのような影響を与えているかはあまり検討されておらず、卵において若干の報告があるのみである⁴⁾。

牡蠣の生息地は、南北両極地方を除く、北緯 64 度から南緯 44 度までの世界中の海に分布しており、潮の満ちひきする潮間帯から水深 30m くらいまでの浅い海の底で主に珪藻類などの植物プランクトンを食べて生息している⁵⁾。これらの藻類の中にはビタミン B₁₂ を多量に含むものも存在しており⁶⁾、それら由来のビタミン B₁₂ を牡蠣は体内に溜め、いわゆる生物濃縮が起こっていると考えられる。牡蠣が体内に蓄えたビタミン B₁₂ の多くはその内臓に含まれると考えられているが、動物性食品の多くが固体を構成する特定の部位のみを食すのに対し、牡蠣はその全てを食すため含まれるビタミン B₁₂ の全てを摂取する

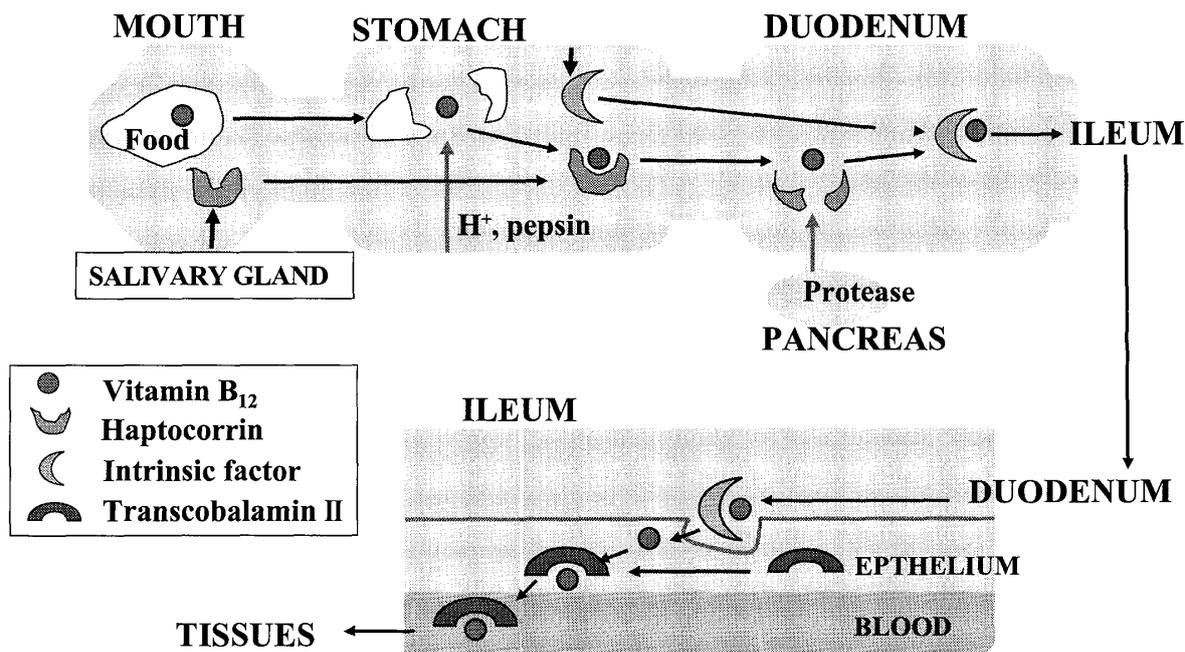


図1 食物からのビタミン B₁₂ の吸収経路

ことができ、優れた供給源となると言われている⁷⁾。五訂増補日本標準食品成分表によれば生の牡蠣100g中には28.1μgのビタミン B₁₂ を含んでいるとされ、牡蠣1個分約20gに換算すると約5.6μgとなる。よって牡蠣1個を食せば、日本人の食事摂取基準の1日あたりの推奨量2.4μgを満たすことになる。

前述のように、牡蠣は優れたビタミン B₁₂ 供給源である。しかし、ビタミン B₁₂ は、動物性食品中でのほとんどがタンパク質と結合して存在していると言われており、低タンパク質症を示すような消化吸収能力が衰えた高齢者において、結合タンパク質をうまく消化できないことから、ビタミン B₁₂ の摂取不足がおこる³⁾。特に、ビタミン B₁₂ の吸収においては、萎縮性胃炎などが影響するといわれている。なぜなら、ビタミン B₁₂ は、図2に示すような複雑な経路によって吸収されているからである。動物性食品に含まれているビタミン B₁₂ は、まず、口腔内において小片に咀嚼され、ハプトコリン（以下 HC、R- バインダーともいう）を含む唾液と混ぜられた後、胃まで運ばれる（図1）。食物が入った刺激により胃酸（HCL）およびペプシンが分泌されると、食物小片は分解される。ビタミン B₁₂ と結合していたタンパク質が消化を受けた後、低い pH でビタミン B₁₂ に強い親和性を示す HC にビタミン B₁₂ が結合する。HC と結合したビタミン B₁₂ は、十二指腸で膵プロテアーゼによって分解を受け、また、中性付近

の pH でビタミン B₁₂ と親和性の高い胃壁細胞由来の内因子（以下、IF）と結合し、回腸に運ばれた後、受容体を介してビタミン B₁₂ のみが腸上皮細胞に取り込まれる。この経路において、まずは、第一段階の胃においてビタミン B₁₂ が HC に受け渡されることが非常に重要となる。

そこで、本研究においてはビタミン B₁₂ の有効な供給源である牡蠣を加熱調理する際に、含まれるビタミン B₁₂ が胃内で最も遊離しやすい条件について検討することを目的とし、胃内人工消化試験後の測定値を比較検討した。さらに、加熱の長さが牡蠣の嗜好性に及ぼす影響について官能検査を行い併せて評価を行った。

II. 方 法

1. 材料・試薬

牡蠣は、広島県佐伯郡沖見町の河野氏より新鮮な1個30g程度の大粒のものを平成12年4月に購入した。購入後、塩水でよく振り洗いし、1個ずつ個別に冷凍保存し、解凍して実験に用いた。また、官能検査に用いた牡蠣は平成12年11月の検査前日に1個25g程の大きさのもの購入し、5°Cで保存したものを用いた。

標準ビタミン B₁₂ はシグマ社（アメリカ合衆国）より、ペプシン（1:10000）はナカライテスク株式会社（京都）より、ビタミン B₁₂ 定量用基礎培地は、

日水製薬株式会社（東京）より、その他一般的な試薬は関東化学株式会社（東京）のものを用いた。

また、牡蠣の粉碎には AceHOMOGENIZER（日本精機株式会社）を使用し、その他一般的な機器を使用した。

2. 試料の調製

本実験に使用した牡蠣に含まれるビタミン B₁₂ 量および牡蠣に含まれるビタミン B₁₂ の個体内の分布の偏りを調べるために、1 個体全体、または、ひだ状の部分と大きく膨らんだ腹部分に分け、それぞれホモジナイザーで粉碎した。これらの牡蠣試料に同量の蒸留水を加えてホモジナイズ（1500r.p.m., 30 秒）し、0.02% KCN を含む 0.25 mol/L の酢酸緩衝液（pH4.9）10ml、蒸留水 30ml を加えて混和し、沸騰水浴中で 20 分間加熱し、シアノ化熱水抽出を行った。これらを遠心分離し、その上清に含まれるビタミン B₁₂ を微生物法により定量した。

水煮加熱調理が人工消化試験後の牡蠣のビタミン B₁₂ 測定量に及ぼす影響について検討するための試料調製は、次のように行った。ピーカーに牡蠣および牡蠣と同量の重量の蒸留水を加え、沸騰水浴中で 0, 10, 20, 30, 60 分間加熱を行った。加熱後、煮汁を回収し、牡蠣に再び同量の蒸留水を加えてホモジナイザーで粉碎した。これを遠心分離（3500r.p.m., 15 分）し、上清（水層）と沈殿に分けた。この沈殿に HCL とペプシンによる胃内人工消化試験を施した。沈殿 5g に 0.06mol/L の HCL 溶液 45ml を加えて混和した。これを 5ml ずつ試験管に分取し恒温槽 35°C に保温した後 0.1% ペプシン溶液 1ml を加えて 30 分間保温し、人工消化を行った。30 分後 0.3mol/L のトリクロロ酢酸溶液 10ml を加えて反応を止め、遠心分離（3500r.p.m., 15 分）を行い、その上清 5ml を試験管に分取した。これを NaOH 水溶液を用いて中和し、中和後再び、前述の条件で遠心分離を行って上清（水層）を回収し、上清（水層）中に含まれるビタミン B₁₂ をシアノ化した。具体的には上清（水層）0.7ml に対し 0.02% KCN を含む 0.25 mol/L の酢酸緩衝液（pH4.9）0.3ml の割合で混和し、沸騰水浴中で 20 分間加熱した後、冷凍保存し、ビタミン B₁₂ の定量を行った。また、煮汁および消化試験を行う前の遠心後の上清（水層）も同様にシアノ化操作を行った。消化試験後の沈殿（固体層）については、沈殿（固体層）5g に対し、0.02% KCN を含む 0.25 mol/L の酢酸緩衝液（pH4.9）10ml、蒸留水 30ml を加えて混和し、沸騰水浴中で 20 分間加熱し、シアノ化熱水抽出を行った。さらに遠心分離を行って上

清（固体層からのシアノ化熱水抽出液）を冷凍保存し、ビタミン B₁₂ の定量を行った。水層のビタミン B₁₂ 測定値は、消化試験前の上清と消化試験後の上清を合わせて評価した。

3. ビタミン B₁₂ の定量方法

ビタミン B₁₂ の定量は、ビタミン B₁₂ 要求菌である *Lactobacillus leichmannii* (ATCC7830 株) の増殖活性を利用した微生物学的定量法を用いて行った。なお、本法は日本標準食品成分表の定量において採用されている方法であり、ビタミン B₁₂ 定量用培地に前培養した前述の菌を接種して 18 時間培養した後、菌の増殖活性（770nm、濁度；100-%T）を測定した。また、アルカリ耐性因子と呼ばれるビタミン B₁₂ 以外の菌の増殖因子を除外するため、シアノ化した試料 0.05ml に対し 0.1mol/L の NaOH 1.1ml を加えて混和し、オートクレーブで 120°C 30 分加熱した。これを室温に戻した後に 1mol/L の酢酸溶液を用いて中和した。このアルカリ処理を行った因子についても上記の菌の増殖活性を測定し、アルカリ処理を行っていない試料の B₁₂ 定量値から差し引き、真のビタミン B₁₂ 量を求めた。

4. 水煮した牡蠣の試料調製および官能検査

牡蠣を塩水でよく振り洗いし、沸騰した湯に投入し、0, 10, 20, 30, 60 分牡蠣を水煮調理した。この時、牡蠣を各加熱時間別に投入し、調理終了時間が同時になるよう調整した。加熱後、包丁でひだ部と腹部とを切り分けた。実験には腹部のみを用いたが、大きさや形ができるだけ同じになるように注意して縦に 4 分割し、その 1 片を 1 人分とし、提供の際にさらにそれを 2 等分した。このように切り分けた試料をあ～おの印をつけた 5 枚の皿に並べ、官能検査の試料とした。その際、牡蠣と皿の印の組み合わせは被験者には知らせずに記録しておいた。

官能検査は、文献⁸⁾ に従って行った。評価項目は、「硬さ」「味の強さ」「嗜好的な好ましさ」の 3 項目とし、「最も硬いもの」「最も味の強いもの」「最も嗜好的に好ましいもの」を 1 として 1～5 の順位法で評価してもらった。評価 1 は 5 点、評価 2 は 4 点、評価 3 は 3 点、評価 4 は 2 点、評価 5 は 1 点として集計し、クレーマーの検定表に従って検定した。1 回の官能検査におけるパネル数は 10 とし全て 20 歳代の女性（牡蠣が嫌いなものは官能検査が成立しないため含まない）に依頼した。検査は日を変えて 3 回、それぞれの日の昼食前に行った。

III. 結果および考察

1. 牡蠣に含まれるビタミン B₁₂ 量と、牡蠣個体内のビタミン B₁₂ 分布の偏りについて

今回実験に用いた牡蠣に含まれるビタミン B₁₂ 量を測定したところ、表 1 に示すように 100g あたり 34.6±5.6 μg であった。5 訂日本食品標準成分表での記載値は、100g あたり 28.1 μg であり、今回用いた牡蠣は標準的な量のビタミン B₁₂ を含んでいたと考えられる。研究の背景でも前述したように、牡蠣が栄養的に優れた食品であると言われているのは、この食品が内臓部分まで含めて全体を食す食品であるからだと考えられている。ビタミン B₁₂ についても動物性食品の多くでは、肝臓や腎臓などの内臓部分に多く含まれているため、牡蠣でもそのような食品個体内における分布が予測された。そこで、牡蠣を内臓が多く含まれる腹部とひだ状の部分（ひだ部）に分け、それぞれについてシアノ化熱水抽出を行い、微生物学的定量法によりビタミン B₁₂ を定量した。

表 1 牡蠣に含まれるビタミン B₁₂ 量および個体内の分布

| 部位 | ビタミン B ₁₂ 含有量 μg/100g |
|------|----------------------------------|
| 牡蠣全体 | 34.6±5.6 |
| ひだ部 | 25.8±3.8 |
| 腹部 | 30.3±5.5 |

その結果、ひだ部と腹部で含有量に大きな差が見られなかった（表 1）。さらに、今回用いた 1 個体あたりのひだ部の重量平均値が 17.8g であり、腹部の重量平均値が 16.7g であったことから、これらの部位における B₁₂ の栄養源の期待（寄与率）としては、重量においてもビタミン B₁₂ 含有率においてもほぼ同じであることが示された。

2. 水煮加熱時間が人工消化試験後の牡蠣のビタミン B₁₂ 測定量に及ぼす影響

水煮した牡蠣が、口腔内で咀嚼を受け、胃で胃酸とペプシンによる作用を受けた後、唾液腺由来のハプトコリンと結合するためには胃内で遊離する必要がある。この状態を試験管内で検討するために、胃内人工消化試験を行うこととした。また、その影響が胃酸のみでも働くのか、ペプシンもあわせて必要なのか検討した。操作は、実験方法に示した通り行った。図 2 には、胃内人工消化試験を行っていない場合の結果を示した。加熱時間が長くなる程、総ビタミン B₁₂ 測定値が低下していた。また、生の場合、個体中の水溶性部分（水層）に多く含まれていたビタミン B₁₂ は、加熱によって不溶性の個体部分（固体層）に一部が移行することがわかった。さらに煮汁に含まれるビタミン B₁₂ 量は加熱時間が長いほど増加していた。次に胃酸（HCl）のみの処理を行った場合を図 3 に示した。図 3 における傾向は、図 2 とは異なり、加熱時間 20 分で総ビタミン B₁₂ 測定値が最高値に達していた。中でも HCl のみの消化試験

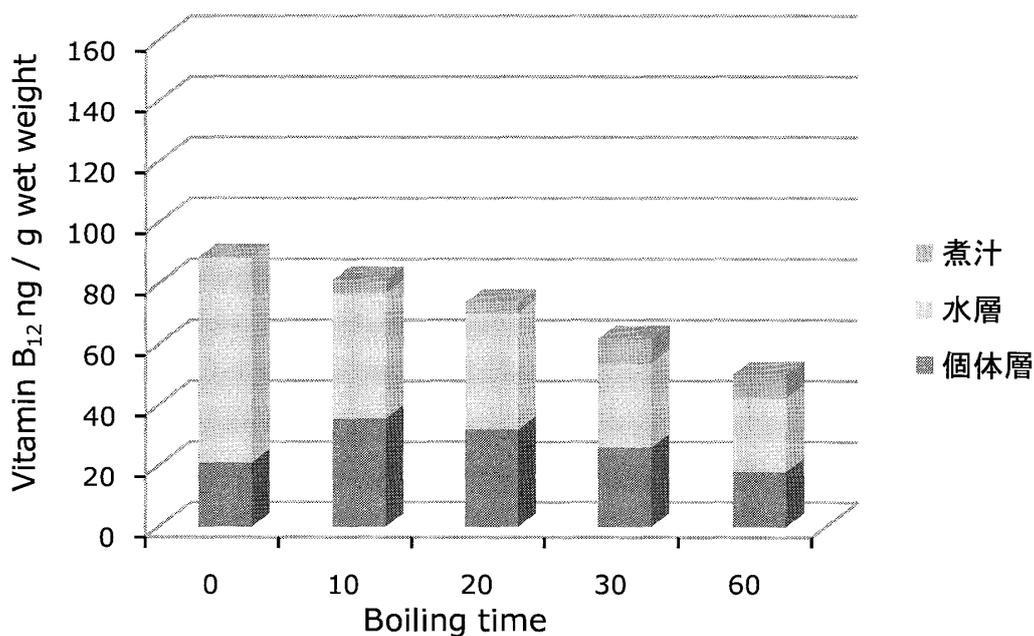


図 2 0, 10, 20, 30, 60 分間水煮調理した牡蠣（未消化）に含まれるビタミン B₁₂ の動向

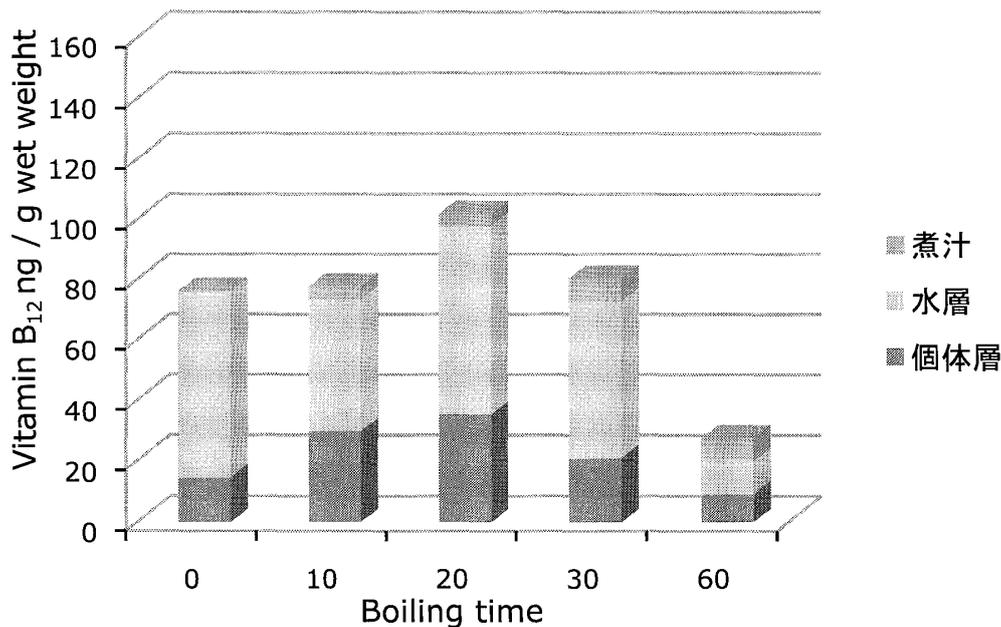


図 3 0, 10, 20, 30, 60 分間水煮調理した牡蠣 (HCl 処理) に含まれるビタミン B₁₂ の動向

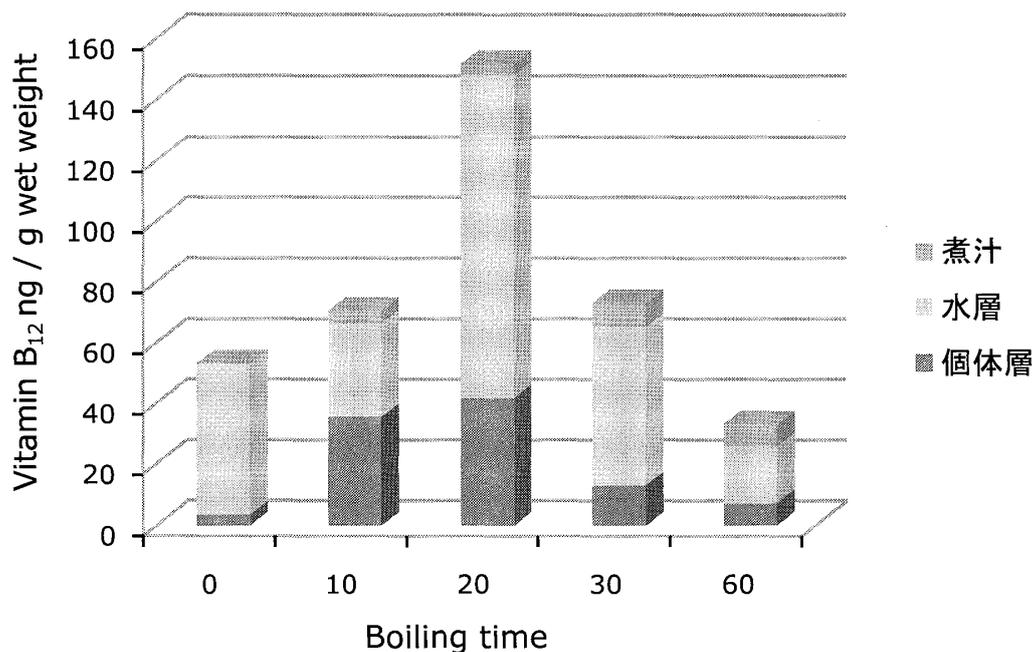


図 4 0, 10, 20, 30, 60 分間水煮調理した牡蠣 (HCl-ペプシン処理) に含まれるビタミン B₁₂ の動向

後の測定値が図 2 に比べて増加していた。また、加熱時間 30 分においても図 2 の同じ加熱時間の結果に比べ水層の測定値が増大していた。さらに、胃酸 (HCl) およびペプシンの処理を行った場合を図 4 に示した。図 4 における傾向は、図 3 の傾向をさらに増大させたものだった。つまり、加熱時間 20 分を最大として、加熱時間 10 分から 60 分において水層

のビタミン B₁₂ 測定値がそれぞれ図 2 の結果より増加していた。これらの結果は次のように考察することができる。つまり、消化試験を行っていない場合は加熱時間にもないビタミン B₁₂ 測定値は低下するが、加熱時間が長くなるほどタンパク質の熱変性が進み消化を受けやすくなりビタミン B₁₂ のシアノ化熱水抽出の抽出効率上がる。その結果として、

表 2 水煮調理した牡蠣の官能検査

| 検査項目 | 水煮加熱時間 (分) | | | | |
|----------|------------|-----|------|----|-----|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 60 |
| 硬さ | 97 | 101 | 96 | 91 | 61* |
| 味の強さ | 125* | 100 | 78 | 85 | 62* |
| 嗜好的な好ましさ | 68* | 102 | 120* | 89 | 71* |

* : 5%の危険率で有意差が認められたものを示す。

何らかの消化試験を行った図 3 および図 4 ではビタミン B₁₂ の測定値が増大した。また、消化作用は胃酸 (HCl) のみでも一定の効果はあるが、ペプシンと併用することでタンパク質の消化が更に進んだ。水層のビタミン B₁₂ 測定値に対するペプシンによる効果 (図 3 から図 4 への増加率) は、加熱 10 分で約 20%、加熱 20 分では約 60%であり、加熱時間 20 分が最も消化がよいと考えられた。また、加熱時間 20 分は消化後の総ビタミン B₁₂ 測定値において最大となっており、ビタミン B₁₂ の供給源としてもっとも望ましい調理条件である可能性が考えられた。

3. 水煮加熱時間が牡蠣の嗜好性に及ぼす影響について

先の結果より、加熱時間 20 分が最もビタミン B₁₂ の供給源として期待できる可能性が考えられたが、通常の牡蠣の調理においては、「加熱し過ぎないことが重要」と言われており 20 分の加熱は嗜好性を考慮すると長すぎる可能性もある。鍋料理や揚げ物などでは、比較的短時間で熱を通したものが好まれる一方で、牡蠣ご飯や牡蠣のしんじょうといった料理においてはその加熱時間は 30 分程度と長い。そこで水煮加熱時間が牡蠣の嗜好性に及ぼす影響について検討を行った。

官能検査の方法は、先に示した通りおこなった結果を表 2 に示したが、水煮後の「硬さ」について、官能検査の結果からは、10 分から 20 分にかけて最も硬く、60 分も加熱するとかえって柔らかくなることが分かった。しかし、0 分から 30 分までの間で有意差は見られなかった。加熱時間が長くなればなるほど牡蠣は硬くなると予想していたがこの結果は予想に反するものであった。次に「味の強さ」については、加熱時間 0 分 (生牡蠣) において有意に強く、加熱時間 60 分において有意に低いという結果となった。全体としては加熱時間が短いほど牡蠣の味が強いということが分かった。さらに「嗜好的な好ましさ」については、0 分、60 分が有意に好ましく

なく、20 分が有意に好まれていた。生牡蠣 (0 分加熱) は生牡蠣の食習慣の有無などにより差が生じる可能性もあるが、パネルは牡蠣が食べられないというものが含まれていない (官能検査が成立しないため)。この中で 20 分が有意に好ましいとされたことは非常に興味深い結果であった。

本研究において、消化能力が衰えた高齢者などにおいて、ビタミン B₁₂ の供給源として最も望ましい水煮調理時間は 20 分であることが考えられた。ビタミン B₁₂ は、牡蠣内でタンパク質と結合して存在しているため、煮汁への溶出も少なく、熱による分解も受けにくい。30 分以上の長い加熱では煮汁への溶出も 25 から 30%に達し、ビタミン B₁₂ の分解も進むことが明らかにされた。さらに 20 歳代の女性 (牡蠣が嫌いなものは含まない) の嗜好性においては、水煮加熱時間 20 分が最も好まれていた。よって、ビタミン B₁₂ 供給源としての期待および嗜好性の両面から、最適な水煮加熱時間は 20 分であると考えられた。

今後さらなる研究として、ビタミン B₁₂ の測定値のみならず、胃内消化後のビタミン B₁₂ 結合タンパク質からのビタミン B₁₂ の遊離についてゲルろ過法を用いて検討していくことが望まれる。

IV. 要 約

ビタミン B₁₂ は、食品中でタンパク質と結合した状態で存在しているが、体内で吸収されるためには、唾液と混ぜられて咀嚼された後、胃に移行して消化作用を受けて遊離し、唾液腺由来のハプトコリンと結合する必要がある。よって、消化吸収能力が低下した高齢者などにおいて効率よくビタミン B₁₂ を吸収するためには胃において遊離しやすい状態に調理加工することが望まれる。そこで本研究では、水煮加熱時間の長さ (0 分から 60 分) が牡蠣含有ビタミン B₁₂ の遊離におよぼす影響について検討するために、胃内人工消化試験 (0.06M-HCl, 167 μg/ml ペプ

シン, 37°C, 30 分) を行った試料の測定値の変化について検討した。その結果, 未消化の状態では加熱時間が長くなるにつれて総ビタミン B₁₂ 量の減少が見られた。胃酸 (HCl) 処理を行うと, 加熱時間 20 分を最大に水層のビタミン B₁₂ 測定量が増大した。胃酸 (HCl) にペプシンを加えて処理を行うとその傾向が強くなり, 加熱時間 10 分および 20 分における測定値はさらに大きくなり, 加熱時間 20 分では生の 2 倍にまで増加した。また, 嗜好性について官能検査を行った結果, 加熱時間 20 分が危険率 5% において有意に好まれていた。よって, ビタミン B₁₂ 供給源としての期待および嗜好性の両面から, 最適な水煮加熱時間は 20 分であると考えられた。

V. 謝 辞

本研究は, 平成 12 ~ 13 年度広島女子大学 (現, 県立広島大学) の教員研究費によって行われた。また, 本研究に協力して下さった同大学梶井康代さんならびに日野靖子さんに感謝の意を表す。

(平成 19. 9. 3. 受付)

引用文献

- 1) F. Watanabe, H. Katsura, S. Takenaka, T. Enomoto, E. Miyamoto, T. Nakatsuka and Y. Nakano: *International J. Food Sci. & Nutr.*, 52, 263-268 (2001)
- 2) Sally P. Stabler and Robert H. Allen: *Annu. Rev. Nutr.*, 24, 299-326 (2004)
- 3) J. M. Howard, C. Azen, D. W. Jacobsen, R. Green and R. Carmel: *Eur. J. Clin. Nutr.*, 52, 582-587 (1998)
- 4) Alberto Del Corral and Ratph Carmel: *Gastroenterology*, 98, 1460-1466 (1990)
- 5) 新川英明: 牡蠣の生化学, pp. 110-113, 共文社株式会社 (1978)
- 6) F. Watanabe, S. Takenaka, H. Kittaka-Katsura, S. Ebara and E. Miyamoto: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 48, 325-331 (2002)
- 7) 荒川好満, 山崎妙子: 牡蠣—その知識と調理の実際, pp. 58-84, 柴田書店 (1977)
- 8) 山野善正, 山口静子: おいしさの科学, pp. 81-97, 朝倉書店 (1994)