

## 研究報文

# 長期保存食品中ビタミン B<sub>12</sub> の保存による変化

桂 博美, 中上 奈緒

Effect of storage on vitamin B<sub>12</sub> in long-term storage foods

Hiroimi Katsura and Nao Nakagami

### Abstract

Vitamin B<sub>12</sub> is bound to proteins in foods. In order to be absorbed by the body, after food is chewed and mixed with saliva, vitamin B<sub>12</sub> is liberated in the stomach. The vitamin B<sub>12</sub> binds with haptocorrin, which is secreted from salivary gland. Elderly people have reduced digestion and absorption potential. It is possible to make processed in which vitamin B<sub>12</sub> is easily released in the stomach. In addition, long-term storage food is indispensable to lives for the elderly, who have been called “shopping refugee”. However, it is not known whether long-term storage of food affects the ease of absorption of vitamin B<sub>12</sub> contained in the foods. In this study, we analyzed the percentage of free vitamin B<sub>12</sub> and amount of vitamin B<sub>12</sub> in canned mackerel in water that had been stored for 4–330 days and in long-life milk that had been stored for 1–70 days. We found that the amount of vitamin B<sub>12</sub> in long-life milk of the same lot was reduced by about 40% by day 70 compared with that immediately after production. In addition, the proportion of free vitamin B<sub>12</sub> in the canned mackerel was reduced significantly at 9–11 months after production compared with that at 4–10 days after production.

(Received September 26, 2013)

## I. はじめに

ビタミン B<sub>12</sub> は、ヘム色素に似たテトラピロール骨格を持ち、中心にコバルトを配した分子量の大きなビタミンであり (図1)、微生物によって合成される。コバルトの上方配位子は、主に4種であるが、

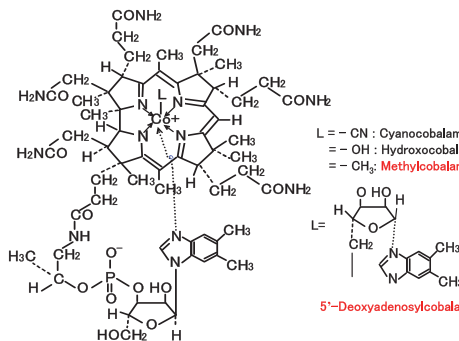


図 1. ビタミン B<sub>12</sub> の構造

ヒトの体内では、メチル基とアデノシル基を配する場合のみ、補酵素として働くことができる。ビタミン B<sub>12</sub> を含むサプリメントの多くは、シアノコバラミン (シアノ基を配するビタミン B<sub>12</sub>) のみを含むが、シアノコバラミンは、その他の3種よりも補酵素型への変換効率が低いとされており、非シアノコバラミンを多く含む食品をビタミン B<sub>12</sub> 供給源とすることは望ましい。ビタミン B<sub>12</sub> は、動物性食品や発酵食品に含まれるが、多量に含まれる食品は非常に限定されている。その上、これらの動物性食品に含まれるビタミン B<sub>12</sub> のほとんどはタンパク質に結合している。図2に示したようにこのビタミンの吸収は、胃酸とペプシンによって食品の塊やビタミン B<sub>12</sub> 結合タンパク質が分解を受けて胃内で遊離したビタミン B<sub>12</sub> と唾液腺由来のハプトコリンが結合することから始まる<sup>1)</sup>。次いで、十二指腸でハプトコリンが部分分解を受けて再び遊離したビタミン B<sub>12</sub> は次に胃壁細胞由来の内因子と結合する。ビタミン B<sub>12</sub>-内因子複合体は回腸上皮細胞から突き出た多機能受容体であるキュビリンと結合して、腸管細胞に取り込

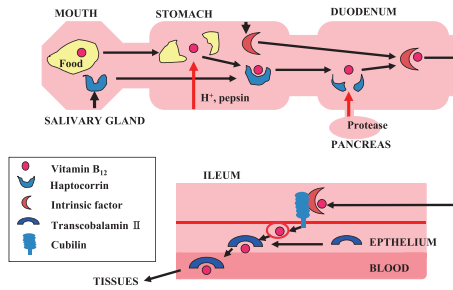


図2. 食物からのビタミン B<sub>12</sub> の吸収経路

口腔内に取り込まれたビタミン B<sub>12</sub> は、胃に運ばれて胃酸とペプシンの作用により結合タンパク質が分解されると遊離し、唾液腺由来のハプトコリンと結合する。次に十二指腸に運ばれて膵プロテアーゼの作用を受け、ハプトコリンが部分分解を受けると再び遊離し、胃壁細胞由来の内因子と結合する。その後、回腸上皮細胞表面に存在する多機能レセプターであるキュビリンに結合し体内に取り込まれる。

まれる(図2)。このような複雑な吸収経路を辿るのは、ビタミン B<sub>12</sub> が微量である事に加え、その構造(図1)が複雑であり、テトラピロール骨格のみならず、コバルトの下方に配する5,6-ジメチルベンズイミダゾールも判別して吸収しようと試みているためであると考えられている。

萎縮性胃炎など消化吸収能力の衰えた高齢者においては、胃内におけるタンパク質の消化能力が低下するためビタミン B<sub>12</sub> を遊離することができず、ビタミン B<sub>12</sub> の吸収率が低下する<sup>2)-5)</sup>。これは、食物結合型ビタミン B<sub>12</sub> 吸収不全(タンパク質結合型ビタミン B<sub>12</sub> 吸収不全)と呼ばれる。このような吸収不全によって、ビタミン B<sub>12</sub> が不足し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となる。ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症として知られる巨赤芽球貧血の発症は極めて稀であるが、欠乏症には至る前の、不足の状態が長期化して引き起こされる高ホモシステイン血症は高齢者においてしばしば見られ、改善が望まれている。そこで高齢者がビタミン B<sub>12</sub> 不足に陥らないための情報が必要とされる。しかし、具体的には、食品ごとおよび調理・加工形態ごとにビタミン B<sub>12</sub> の体内への吸収のしやすさが異なっていることから、これらを明らかにしていく必要がある。

ところで近年、地域の事情により、自動車という交通手段を持たない高齢者が買い物難民と呼ばれるなど、食品を頻繁に購入できない高齢者が存在する。そのような高齢者にとっては、長期保存食品は買い

置きができるものであり、非常に便利である。しかしながら、長期保存食品を長期保存している際のビタミン B<sub>12</sub> の量的変化や吸収のしやすさへの影響については、情報が少ない。そこで、長期保存食品中のビタミン B<sub>12</sub> の量について保存期間中の変動を検討することを目的とした。また、長期保存食品は長期の保存を可能にするために加圧加熱を行うが、その処理がビタミン B<sub>12</sub> の吸収にどのような影響を与えるのか、さらにビタミン B<sub>12</sub> 吸収への加圧加熱の影響が長期保存によってどのように変化するのかについても興味を持たれる。ビタミン B<sub>12</sub> はその特異な吸収経路から、胃内において塩酸とペプシンでタンパク質が消化されて、ビタミン B<sub>12</sub> が遊離し、唾液腺由来のハプトコリンと結合するための準備がなされることが吸収の第一段階として重要である。このため、胃内の状況を再現するために胃内人工消化試験を行い、胃内における総ビタミン B<sub>12</sub> 量に占める遊離型ビタミン B<sub>12</sub> 割合を決定することで、吸収のしやすさとして評価できる。そこで、長期保存食品に含まれるビタミン B<sub>12</sub> の吸収のされやすさに与える長期保存の影響を明らかにするために、これらの食品を長期保存し、遊離型ビタミン B<sub>12</sub> の割合の経時的変化を検討することを目的とした。

本研究は、日本人のビタミン B<sub>12</sub> 供給源として寄与率の高い<sup>6)</sup> 魚介類(84%)・乳類(6%)の中で、長期保存食品として知られているサバ水煮缶詰およびロングライフ牛乳(LL乳)をに着目し、<実験1>LL乳の長期保存期間中のビタミン B<sub>12</sub> 量の変化を検討、<実験2>サバ缶詰の胃内人工消化試験前後の遊離型ビタミン B<sub>12</sub> 割合について検討を行った。

## II. 方法

### 1. 材料・試薬

LL乳はA社より、市販前の製造直後で同じロットのものを提供していただき、常温で保存し、経日変化を追うため製造日より1~70日目まで1~数日おきに開封して試料とした。また、市販のLL乳は、京都市内のスーパーマーケットで入手した4社の4商品を購入し、市販されているLL乳に含まれるビタミン B<sub>12</sub> 量を明らかにするために実験に用いた。

保存期間の影響を検討したサバの水煮缶詰はB社より、市販前の製造直後のものを提供していただき、常温で保存し経日変化を追うため製造日より4~330日まで数日から数十日おきに開缶し、煮汁(煮汁試料)と固体に分けて重量測定を行い、固体には同量の蒸留水を加えて15000 rpmで5秒間粉碎し、

遠心分離 (3100 rpm, 15分) 後、上澄み (固体試料) を回収し以後の実験に用いた。また、市販のサバ缶詰は、京都市内のスーパーマーケットにて5社の11商品 (みそ煮, 味付, 水煮) を購入して保存せずに市販されているサバ缶詰の購入時のビタミン $B_{12}$ 含有量を明らかにするための実験に用いた。なおこの実験は固体、煮汁に分画して行った。

標品ビタミン $B_{12}$ 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 $B_{12}$ 定量用基礎培地は、日本製薬株式会社 (東京) より、ATCC7830株は、American Type Culture Collection (アメリカ合衆国) より購入した。その他一般的な試薬はナカライテスク株式会社 (東京) のものを用いた。また、サバの粉碎にはBLAS-101 (日本精機株式会社) を使用し、ゲル濾過用のカラムはAmersham Biosciences社のPD-10 Columnを、プロテインアッセイCBB溶液 (5倍濃縮) および牛血清アルブミンはナカライテスク株式会社より購入して用いた。その他一般的な機器を使用した。

## 2. LL 乳のビタミン $B_{12}$ 定量方法

A社より購入し1~70日間常温保存したLL乳または市販のLL乳70 mlに0.02% KCN含む0.25 mol/l酢酸緩衝液 (pH 4.9) 30 mlを加えて混和し、沸騰水浴中で1時間シアノ化熱水抽出を行った。冷却後は、重ねたガーゼでこし、遠心分離 (3000 rpm, 5分) を行って上清を得て小分けして冷凍保存し、定量の際に随時解凍し、定量用試料とした。

ビタミン $B_{12}$ の定量は、ビタミン $B_{12}$ 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 $B_{12}$ 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 (770 nm, 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 $B_{12}$ 以外の菌の増殖因子を除外するため、シアノ化した試料0.05 mlに対し0.1 mol/lのNaOH 1.1 mlを加えて混和し、オートクレーブで120℃ 30分加熱した。これを室温に戻した後に1 mol/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 $B_{12}$ 定量値から差し引き、真のビタミン $B_{12}$ 量を求めた。

## 3. サバ缶詰の胃内人工消化試験および遊離型ビタミン $B_{12}$ 割合の決定方法

常温で4~330日間保存し、開缶後煮汁試料および固体試料に分け、それぞれ人工消化試験を行った。胃内人工消化試験は、アンソン法をもとに一部改変して行った。食品1 gを褐色試験管に取り、0.01% ペプシン溶液2 mlおよび0.06 M-HCL溶液29 mlを加え、恒温槽で30分間消化した。1 M-NaHCO<sub>3</sub>溶液5 mlを加えて反応を停止し、水中で5分間冷却した後、遠心分離 (3100 rpm, 15分間) してその上清を胃内人工消化後試料とした。人工消化試験前後の煮汁試料および固体試料のそれぞれ0.5 mlにグリセリン0.15 mlを加えて混和し、PD-10を用いてゲル濾過し、ろ液を0.5 mlずつ回収し24本に分画した。24本の各画分についてビタミン $B_{12}$ を前述の方法に準じてシアノ化して定量し、さらにCBB溶液を用いた色素結合法によりタンパク質を定量した。高分子であるタンパク質結合型ビタミン $B_{12}$ はフラクション7前後に溶出し、遊離型ビタミン $B_{12}$ はフラクション11前後に溶出したことを予め確認していたことから、先の定量結果から得られた溶出パターンとピークの位置より、タンパク質結合型ビタミン $B_{12}$ 割合および遊離型ビタミン $B_{12}$ 割合を決定した。

## 4. 市販サバ缶詰に含まれるビタミン $B_{12}$ 量の定量

5社11商品の市販サバ缶詰 (みそ煮, 味付, 水煮) から分画した固体、煮汁は、固体試料と煮汁試料として定量を行った。固体試料は、25 gを計量し、水55 mlと0.02% KCN含む0.25 mol/l酢酸緩衝液 (pH 4.9) 30 mlを加えて、沸騰水浴中で30分シアノ化熱水抽出を行い、3100 rpmで15分間加熱して上清を回収し、ビタミン $B_{12}$ の定量用試料とした。煮汁試料は、70 ml計り取り、これに0.02% KCN含む0.25 mol/l酢酸緩衝液 (pH 4.9) 30 mlを加え、シアノ化熱水抽出は固体試料と同様に行った。ビタミン $B_{12}$ の微生物学的定量は、ビタミン $B_{12}$ 要求菌である*Lactobacillus leichmannii* (ATCC7830株) の増殖活性を利用しLL乳の項に記載した方法で行った。

## Ⅲ. 結果および考察

### 1. LL 乳に含まれるビタミン $B_{12}$ 量の長期保存期間中の変化

製造直後のLL乳を入手し、1日目から70日目まで常温で保存したLL乳に含まれるビタミン $B_{12}$ 量の変化を検討した。その結果を図3に示した。LL乳は、135~150℃で2~4秒間滅菌が行われた後に遮光

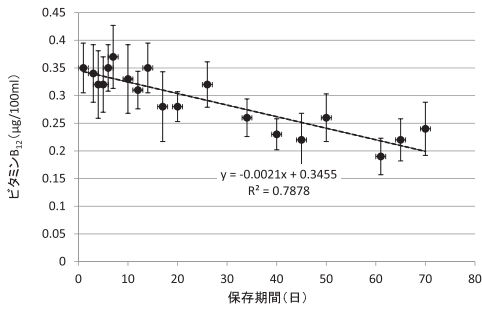


図3. LL乳に含まれるビタミンB<sub>12</sub>量の長期保存中の変化

製造直後のLL乳を入手し、1日目から70日目まで常温で保存したLL乳のビタミンB<sub>12</sub>量の変化を検討した。その結果、LL乳中のビタミンB<sub>12</sub>量は70日目には製造直後の約60%まで減少していた。値は、平均値±標準偏差で示した (n=3)。

可能な紙パックに無菌充填包装されるため、常温保存可能であり賞味期限が長い。しかしながら、同じロットのLL乳を長期保存した結果、製造直後(0.35 µg/100 ml)に比べて70日目までにビタミンB<sub>12</sub>は、製造直後の60% (0.20 µg/100 ml)まで減少した。牛乳中のビタミンB<sub>12</sub>の分解については、超高温短時間殺菌乳(UHT乳)について渡辺らの報告<sup>7)</sup>があるが、その際は、店頭販売の際の照明によるリポフラビンの光分解によって生じるフリーラジカルが関与していると説明されていた。しかしながら、LL乳については遮光パックが採用されており、光以外の原因が考えられる。LL乳の保存中の品質に関しては、1984年に財団法人日本乳業技術協会より報告<sup>8)</sup>されているが、その中で遮光パック中のリポフラビンは、長期保存においてもほとんど消失していなかったことが示された。また、同文献によれば、30℃で保存した場合には、90日間でビタミンCが大部分消失し、ビタミンB<sub>12</sub>は50%に減少していたと報告されていた。このアスコルビン酸の酸化分解がビタミンB<sub>12</sub>の減少に影響した可能性も考えられる。このようにLL乳などの長期保存可能食品であってもビタミンB<sub>12</sub>は安定ではなく減少していく事から、できるだけ早く消費される方が望ましいことが明らかにされた。

## 2. サバ水煮缶詰の遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合の長期保存期間中の変化

次に、サバ水煮缶詰の魚肉に含まれるビタミンB<sub>12</sub>の遊離型割合の長期保存に伴う変動を検討した。その際、ビタミンB<sub>12</sub>吸収の仕組みを考慮し、胃内人

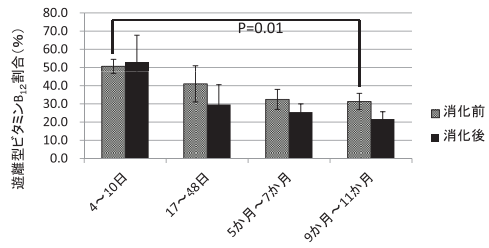


図4. サバ缶詰の遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合の長期保存期間中の変化

サバ缶詰の魚肉に含まれる総ビタミンB<sub>12</sub>に占める遊離型ビタミンB<sub>12</sub>の割合は、胃内人工消化試験前には、製造直後と9~11か月保存のもので有意に低下していた。値は、平均値±標準偏差で示した (n=3)。

工消化試験前および胃内人工消化試験後の試料を用意して行った。なお、保存期間は、4, 6, 10, 17, 34, 48, 150, 180, 210, 270, 300, 330日後とし、結果を4~10日, 17~48日, 5~7か月, 9~11か月に区分して平均値で図4に示した。実験結果より、胃内人工消化試験前の試料の保存期間9~11か月において製造直後の4~10日のものより有意に遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合が減少していることが分かった。また、全体を通して保存期間が長くなるにつれて遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合の減少が見られる。このことは、タンパク質結合型ビタミンB<sub>12</sub>の方が遊離型より安定であり、より長期の保存に耐え得ることを示している。缶詰に含まれるビタミンB<sub>12</sub>は、缶の遮光性によって光によるビタミンB<sub>12</sub>への影響を避けることができるが、遊離型ビタミンB<sub>12</sub>は安定しているとは言えない状況であることが分かった。サバの缶詰の賞味期限は3年間とされているが、1年あまりでも変化があることが分かり、ビタミンB<sub>12</sub>の吸収のしやすさの上では、長期保存食品ではあってもできるだけ早めの消費が望ましいことが示唆された。さらに、サバの水煮は今回の実験と同条件の胃内人工消化前後を通じて80%~90%の遊離型ビタミンB<sub>12</sub>が含まれており(論文投稿中)、高齢者にとっては、缶詰よりも鍋で調理されたサバの方がビタミンB<sub>12</sub>供給源としてより有効である。

## 3. 市販のサバ缶詰およびLL乳に含まれるビタミンB<sub>12</sub>量

京都市内の一般的なスーパーマーケットで入手が可能であった5社11商品のサバ缶詰について、固体試料100g中に含まれるビタミンB<sub>12</sub>量および、固体試料100gに相当する缶詰内の煮汁試料あたりのビタミンB<sub>12</sub>量を定量した。その結果を、表1にまと

表 1. 市販のサバ缶詰に含まれるビタミン B<sub>12</sub> 量

種類	メーカー	固体試料	煮汁試料	固体試料 平均値 ± SD
		ビタミン B <sub>12</sub> (µg/ サバ 100g)		
みそ煮	C 社-1	4.87	2.06	3.91 ± 0.67
	C 社-2	4.41	1.44	
	D 社	2.96	2.1	
	E 社	3.53	1.08	
	F 社	3.79	0.96	
味付	C 社	8.97	2.91	8.51 ± 4.09
	C 社(寒サバ)	14.9	1.32	
	D 社	3.99	2.69	
	G 社	6.17	2.28	
水煮	C 社	3.21	1.67	3.40 ± 0.19
	D 社	3.58	3.28	

表 2. 市販の LL 乳に含まれるビタミン B<sub>12</sub> 量

商品	ビタミン B <sub>12</sub> (µg/100ml)	平均値 ± SD
a	0.25	0.32 ± 0.06
b	0.27	
c	0.35	
d	0.39	

めた。これらの結果から、サバ缶詰に含まれるビタミン B<sub>12</sub> 量は、最小値と最大値の間で約 4 倍も異なることが分かった。しかし、最大値を示した C 社の商品は今回用いた 11 商品の中で唯一、寒サバを使用しているものであり、サバの種差が影響したと考えられた。種類別では、味付で他よりビタミン B<sub>12</sub> 量が高いものがあったが、有意差は見られなかった。味付の調味料に魚介エキスなどのビタミン B<sub>12</sub> 含有量の高い調味料が用いられているとの表示はなされていないので、他より高い原因は分からない。また、煮汁に溶出したビタミン B<sub>12</sub> の割合は、D 社で高く、これは加圧加熱殺菌時間が他社より長い可能性が考えられる。

次に、4 社 4 商品の市販の LL 乳 100ml に含まれるビタミン B<sub>12</sub> 量を定量し、表 2 にまとめた。その範囲は 0.25 ~ 0.39 µg/100 ml であった。市販の LL 乳の保存期間は概ね 2 週間から 1 カ月程度であったが、保存期間とビタミン B<sub>12</sub> 量に相関性は見られなかったが、これは産地、メーカーごとの殺菌条件の詳細、ビタミン B<sub>12</sub> 含有量など原乳の状況が異なるためであると考えられる。

#### 4. まとめ

サバの缶詰や LL 牛乳などの商品は、長期保存を可能にするため加圧加熱殺菌が行われる。この加圧

加熱は、加熱にさらに圧力が加わりタンパク質周囲の水が排除され体積が減少し、また、疎水的な会合などが起こるため消化性が低下する可能性がある。また、保存期間中にビタミン B<sub>12</sub> 量は低下し、吸収しやすい遊離型ビタミン B<sub>12</sub> の割合も保存期間とともに低下していくことが今回明らかにされた。長期保存食品は、常温で長期間保存できることから買い物に困難な地域の高齢者を一時的に助けるものであるが、一方でビタミン B<sub>12</sub> の吸収を考える上では、長期保存された長期保存食品は高齢者にとってより望ましい食品とは言えない可能性が示唆された。加圧加熱殺菌を伴わない長期保存食品としては、冷凍保存食品が挙げられる。今後は冷凍食品の長期保存におけるビタミン B<sub>12</sub> 量やその吸収のされやすさなどの冷凍保存期間による影響を検討し、加圧加熱処理された長期保存食品との比較を行っていきたい。

#### IV. 要約

ビタミン B<sub>12</sub> 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、消化吸收能力が低下した高齢者などにおいて効率よくビタミン B<sub>12</sub> 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。また、買い物難民と呼ばれる高齢者にとって長期保存食品は生活に欠かせないものであるが、これらの食品に含まれるビタミン B<sub>12</sub> の吸収のしやすさに与える保存の影響は検討されてこなかった。そこで本研究では、LL 乳は 1 ~ 70 日目まで、サバの水煮缶詰は 4 ~ 330 日まで保存し、それぞれに含まれるビタミン B<sub>12</sub> の量または遊離型ビタミン B<sub>12</sub> 割合を検討した。その結果、同じロットの LL 乳のビタミン B<sub>12</sub> 量は 70 日目までに製造直後の約 60% に低下した。また、サバ缶詰に含まれる遊離型ビタミン B<sub>12</sub> の割合は保存期間 9 ~ 11 か月において製造直後の 4 ~ 10 日のものより有意に減少していた。

#### V. 謝辞

本研究は、平成 19 年度の科学研究費補助金および平成 21 年度までの京都女子大学の個人研究費を使用して行いました。製造直後で市販前の LL 乳およびサバ缶詰をそれぞれご提供いただいたメーカーの方々に心より御礼申し上げます。本研究に協力して下さった桂 (橋高) 研究室の学生諸姉に感謝の意

を表します。

## 文献

- 1) Castle WB and Hale TH, "The Vitamins, Fundamental Aspects in Nutrition and Health"(3<sup>rd</sup> ed) ed by Gerald F. Combs, Jr., pp381-398, 2008 Elsevier Academic Press, Burlington, MA (USA)
- 2) Baik HW and Russell RM, "Vitamin B<sub>12</sub> deficiency in the elderly" *Annu Rev Nutr*, **19** p357-377, 1999
- 3) Carmel R. "Malabsorption of food cobalamin" *Baillieres Clin. Haematol*, **8**(3), p639-655, 1995
- 4) Alison K. Campbell, Joshua W. Miller, Ralph Green, Mary N. Haan and Lindsay H. Allen, "Plasma Vitamin B<sub>12</sub> Concentrations in an Elderly Latino Population are Predicted by Serum Gastrin Concentrations and Crystalline." *J. Nutr.* **133**(9), 2770-2776, 2003
- 5) 渡辺文雄, "ビタミン B<sub>12</sub> と高齢者" *ビタミン* **83**, 369-373, 2009
- 6) Yoshino, K. Inagawa M. Oshima M, Yokota K, Umesawa M, Endo M, Yamagishi K, Tanigawa T, Saito S, Shimamoto T, Iso H. "Trends in dietary intake of folate, vitamin B<sub>6</sub>, and vitamin B<sub>12</sub> among Japanese adults in two rural communities from 1971 through 2001." *J. Epidemiol* **15**: 29-37, 2005
- 7) Watanabe, F, Katsura H, Abe K, Nakano Y. "Effect of light-induced riboflavin degradation on the loss of cobalamin in milk." *J. Home Econ. Jpn.* **51**(3), 231-234, 2000
- 8) (財)日本乳業技術協会 "ロングライフミルクの品質に関する調査研究" *乳技協資料* **33**(5), 30-40, 1984