

大豆中のコリン関連化合物のみそ製造過程中的 変化と生体利用性への影響

東京農工大学大学院 農学研究院

三浦 豊

コリンはビタミンB群に属するビタミン様物質であり、細胞膜リン脂質やアセチルコリンの生合成原料として生体にとって必須の栄養素である。味噌や醤油の主原料である大豆には、脂溶性コリンであるレシチンに加えて、水溶性コリンである遊離コリン、グリセロホスホコリン（GPC）が比較的多く含有されており、コリン給源として優れた食品である¹⁾。多くの食品中には水溶性コリン関連化合物と脂溶性コリン関連化合物の両者が含有されているが、それら複数のコリン関連化合物ごとに消化・吸収・代謝経路が異なるため、生体利用性にも差があると推測されている。しかし、コリン関連化合物がどのように消化・吸収され、生体に利用されているのか詳細には明らかになっていない。さらに食品の製造過程で、コリン関連化合物が変化する可能性や生理的意義の変化に関する研究はほとんど行われていない。

コリンは欧米をはじめとする多くの国で必須栄養素とされており、摂取基準が定められているが^{2, 3)}、我が国では上述のようにビタミン様物質であり、摂取基準の定めはなく、また食品成分表にも収載されていない。コリンはアセチルコリン合成の原料であり、アセチルコリンは脳機能に深く関係している神経伝達物質であることから、コリン摂取と認知機能との関連が研究されており、我々も卵黄コリンの摂取が認知機能の改善につながりうるという結果を得ている⁴⁾。超高齢社会を迎えた我が国においてコリンの重要性は今後さらに高まると予想され、我が国における摂取量の現状の把握やそれに基づく摂取基準の策定などが必要であるが、関連する研究はまだ多くないのが現状である。米国の食品中のコリン含量データベース¹⁾には多くの食品が収載されているが、我が国で多く摂取されている発酵食品、魚卵、海藻類などは記載がない。またこれらの食品がコリン給源としてどのような機能を有するかについてもほとんど知見がない。特に発酵食品に関しては、発酵過程で成分の変化が起きると推察されるが、この点についてもほとんど研究されていない。

みそ製造に使用される麹菌は多数の酵素（グルコシダーゼ、プロテアーゼ、リパーゼなど）を分泌することが知られている。その中にはリパーゼやエステラーゼも含まれていることから、味噌の発酵過程で大豆中のコリン関連化合物は、質的・量的な変動が起きることが予想される。このことは大豆を味噌に変化させることで、コリン給源としての栄養学的意義が変化することを意味し、食品製造学的にだけでなく、栄養学的にも興味深い現象と考えらえる。

そこで本研究では味噌製造過程において、大豆中のコリン化合物がどのように変化するかを経時的に解析すること、レシチンなどの分解に関与する酵素を探索すること、さらに味噌がコリン給源として優れているかを動物実験で評価することを目的とした。大豆レシチンは乳化剤として、GPCはコリン補給用のサプリメントとして利用されているが、本研究によりそれらの質や量の変化を明らかにし、さらに発酵による変化が大豆中のコリンの生体利用性に影響し、ひいては生体機能に与える影響を変化させる可能性を明らかにすることで、大豆および味噌の機能性の新たな側面をあぶりだし、もってその利用拡大につなげることを期待した。

実験方法

1) 味噌の製造

味噌の原料には、東京農工大学産の大豆（エンレイ種）と米麹を用いた。2022年産の大豆500gを5合の水で煮て、充分に柔らかくした後、室温まで冷ましてから豆を潰しながら米麹500gと混合した。その後、塩を265g添加し、さらに良く混合した。殺菌したプラスティック容器に詰め、15°Cの保冷庫で発酵させた。発酵開始時と6週間目、12週目に一部をサンプリングし、4倍量のメタノール中で粉碎し、遠心した上清を測定用サンプルとした。また原料の煮大豆と米麹もサンプリングし、同様にメタノール抽出したものも用意した。

2) コリン関連化合物の測定

コリン関連化合物の測定はLC-MSおよびLC-MS/MSを用いて行った。その概要を下記のTable 1に示した。水溶性コリンであるコリン、ホスホコリン、GPC、ベタインは標準品を用いた検量線法で、脂溶性コリンであるホスファチジルコリン(PC)は、天然に存在しないPCをサンプルに添加して、その濃度との比を用いて計算する内部標準法で測定した。

Table 1 コリン関連化合物の定量法

測定機器：LC：日立LC2000、質量分析計micrOTOF-Q II (BRUKER社)

水溶性コリン含量の測定 (LC-MSによる精密質量数測定)

・HPLC条件 (日立LC2000)

使用カラム：XBridge® HILIC 3.5 μm, 2.1 x 100 mm (Waters)

流速：0.2 ml/min、カラム温度：30°C、サンプル温度：10°C、サンプル注入量：5 μL、

バッファーの組成：A; 5 mM 酢酸アンモニウム pH 4.0, B; 100% アセトニトリル、

分析時間：20 min

バッファーのグラジエント条件：0min～：A. 18.5%, B. 81.5%→3.2min～：A. 80%, B. 20%→5min～：A. 80%, B. 20%→14min～：A. 18.5%, B. 81.5%→14.1min～：A. 18.5%, B. 81.5%

・MS条件

イオン化モード (ESI/positive)

検出イオンのm/z：コリン104.1070、ホスホコリン184.0733、GPC 258.11011、Ach 146.2074、Bet 118.0878

PC含量の測定 (LC-MS/MS)

・HPLC条件 (日立LC2000)

使用カラム：OSAKA SODA、CAPCELL PAK C8, Type:UG120 5μm、SIZE: 1.5 mm I. D.×150 mm

流速：0.2 ml/min、カラム温度：30°C、サンプル温度：10°C、サンプル注入量：5 μL、

バッファーの組成：A; 5 mM 酢酸アンモニウム pH 4.0, B; 100% アセトニトリル、分析時間：30 min

バッファーのグラジエント条件：0min～：A. 95%, B. 5%→1min～：A. 40%, B. 60%→5min～：A. 15%, B. 85%→10min～：A. 5%, B. 95%→17min～：A. 5%, B. 95%→27min～：A. 95%, B. 5%→27.2min～：A. 95%, B. 5%

・内部標準法：標準品とサンプルを1:9の比率で混合し、内部標準のピーク面積より検出されたPCの濃度を算出。

標準品：PC, Avanti社製、PC (12:0/12:0) 生体内に存在していないリン脂質を使用。

3) 動物実験による味噌のコリン給源としての評価

発酵によるコリン関連化合物の変化が、コリン給源としてどのような栄養学的意義を有するかを明らかにするため、ラットを用いた動物実験を実施した。味噌を主とした食餌を調製し、標準20%カゼイン食(20C)と比較した。今回作成した味噌は農工大産の味噌と同じ組成で作成しているため、農工大味噌を飼料原料として用いた。本味噌にはタンパク質10.5%、脂質3.8%、炭水化物33.1%と表示されている。この表示をもとに飼料を作成した。詳細な飼料組成は、Table 2に示したが、味噌の水分含量や塩分を加味して、飼料中

の含量を 30% とし、その量の味噌中のタンパク質、脂質、炭水化物量を調整すると同時に、1)で測定した味噌中のコリン総量を計算し、その分のコリンを調整した。なお、味噌が水分を含有しているため、組成表の総重量は 20C と異なり、100 になつていない。

Table 2 Composition of Diets

%	20C	MISO
味噌	0	30
β コーンスターチ	40.05	30.12
カゼイン	20	16.85
α コーンスターチ	13.2	13.2
シュクロース	10	10
コーン油	7	5.86
セルロースパウダー	5	5
ミネラルミックス	3.5	3.5
ビタミンミックス	1	1
重酒石酸コリン	0.25	0.24
Total	100	115.77

4 週齢の Wistar 系雄性ラットを購入し（日本 SLC）、1 週間の予備飼育の後、試験食を 3 週間自由摂取させた。飼育期間中水は水道水を自由に摂取させた。飼育期間中の食餌摂取量、体重変化には有意な差は見られなかった（データ示さず）。また飲水量や尿量にも差はなく、味噌中の塩分の影響はないものと考えられた。

3 週間後に麻酔下で、腹部大動脈より全採血し、血清を調製した。血清中のコリン関連化合物濃度は、血清 20 μ l にメタノール 180 μ l を添加し、良く混合した後、氷上で 10 分間静置後、遠心した上清を測定サンプルとし、2)に記載の方法により測定した。

4) 統計処理

血清中のコリン関連化合物濃度は平均値土標準誤差で表し、繰り返しのない Student's *t* 検定により有意差（危険率 5%）を検定した。

実験結果と考察

1) 味噌の発酵過程におけるコリン関連化合物の変化

Table 3 に味噌の原料である煮大豆、麹、味噌発酵開始時、12 週目のコリン関連化合物含量の結果をまとめた。なお、各化合物の含量は mg/100 g で表記した。コリン総量は各化合物の合計であり、各々分子量が異なるため、発酵によりコリン全体の量が減少していくように見えるが、モル数での計算では変化はほとんどない。

発酵開始直後の味噌におけるコリン、ホスホコリン、PC の含量は、原料である大豆と麹がほぼ 1:1 の比率で混合された値となっている。一方でベタインと GPC に関しては原料

から推測される値よりも小さい値となっているが、この原因は不明である。

次に 12 週目の味噌においては興味深い変化が観察された。すなわち PC の含量が大きく減少し、コリン含量が増加した。GPC もわずかに増加したが、その変化はわずかなものであった。ベタイン、ホスホコリンも変化が見られるが、その含量は発酵開始時においても低いものなので、大きな変化とはなっていない。

Table 3. The content of choline-related compounds in samples

	Betaine	Free choline	GPC	P-choline	PtdCho & SPM	Total Choline
Food	(mg/100 g wet weight)					
Soybean	1.36	33.73	5.08	0.60	165.76	205.17
Koji	12.26	5.97	0.08	0.13	5.44	11.61
Miso (0wk)	0.12	24.91	0.28	0.22	85.60	111.01
Miso (12wks)	0.23	36.21	2.18	0.02	2.99	41.40
<i>Ref.</i>						
Soy Sauce	1.00	21.48	0.03	0.01	0.23	21.74
Koji Miso	0.32	32.62	1.27	0.01	5.02	38.92

なお、表中には参考として醤油（丸大豆）、市販の麹味噌の測定結果も表示した。原料の測定値が不明なため、厳密に議論することはできないが、やはり作製した味噌と同様に PC が少なく、その分コリンが増加している様子が見られた。

今回の実験においては、発酵 6 週目のサンプルについても測定を行ったので、その値を含めて各成分の発酵期間中における変化を表したもののが、Figure 1 である。

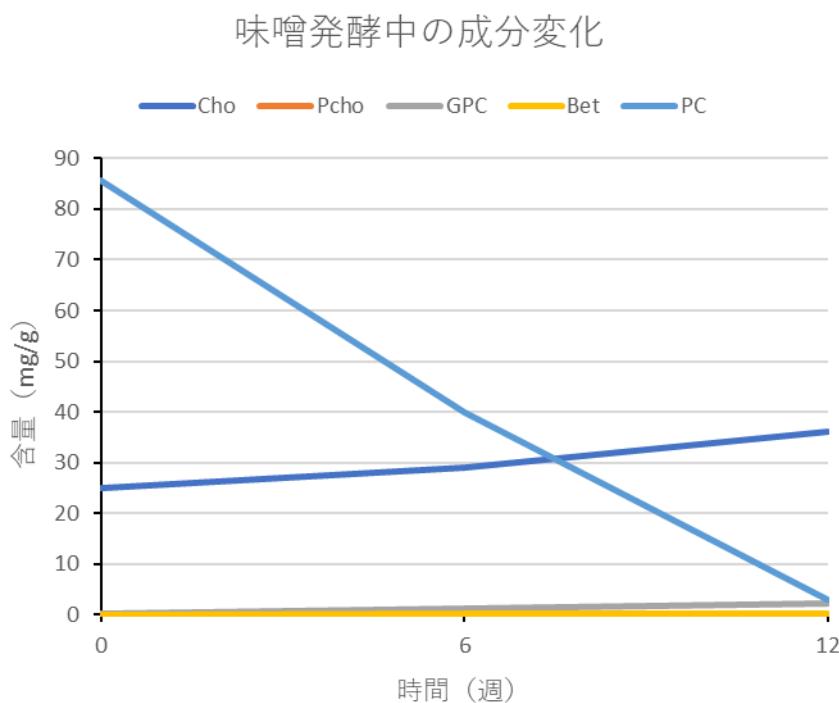


Figure 1. 発酵期間中におけるコリン関連化合物の経時的変化

以上の結果から以下のように考察する。PC が減少したのは大豆レシチンが麹により分泌されたリパーゼ（おそらくホスホリパーゼ）の作用により分解したためであり、コリンの増加はコリンを遊離させるホスホリパーゼ D 様の作用を有する酵素が作用したと考えられる。GPC もわずかに増加していることから、PC に結合している 1 位と 2 位の脂肪酸を遊離させるホスホリパーゼ A₁ および A₂ 様の活性を持つリパーゼも関与していると予想される。今回の検討では麹菌が分泌するリパーゼの活性測定や麹菌ゲノム情報に基づくリパーゼの検索までは行っていないため、詳細は不明であるが、味噌製造過程で大豆レシチンが分解され、コリンの含量が味噌では増加することが明確となった。今後、麹菌分泌酵素のリパーゼ活性の測定を行い、どのような酵素がコリン関連化合物の成分変化に関与しているかを明らかにしていく必要があると考える。

2) ラットを用いた味噌のコリン給源として評価

上述のように、味噌を含有する食餌をラットに 3 週間与え、血中コリン関連化合物の変化を、標準 20% カゼイン食を対照として比較した。その結果を Figure 2 に示した。

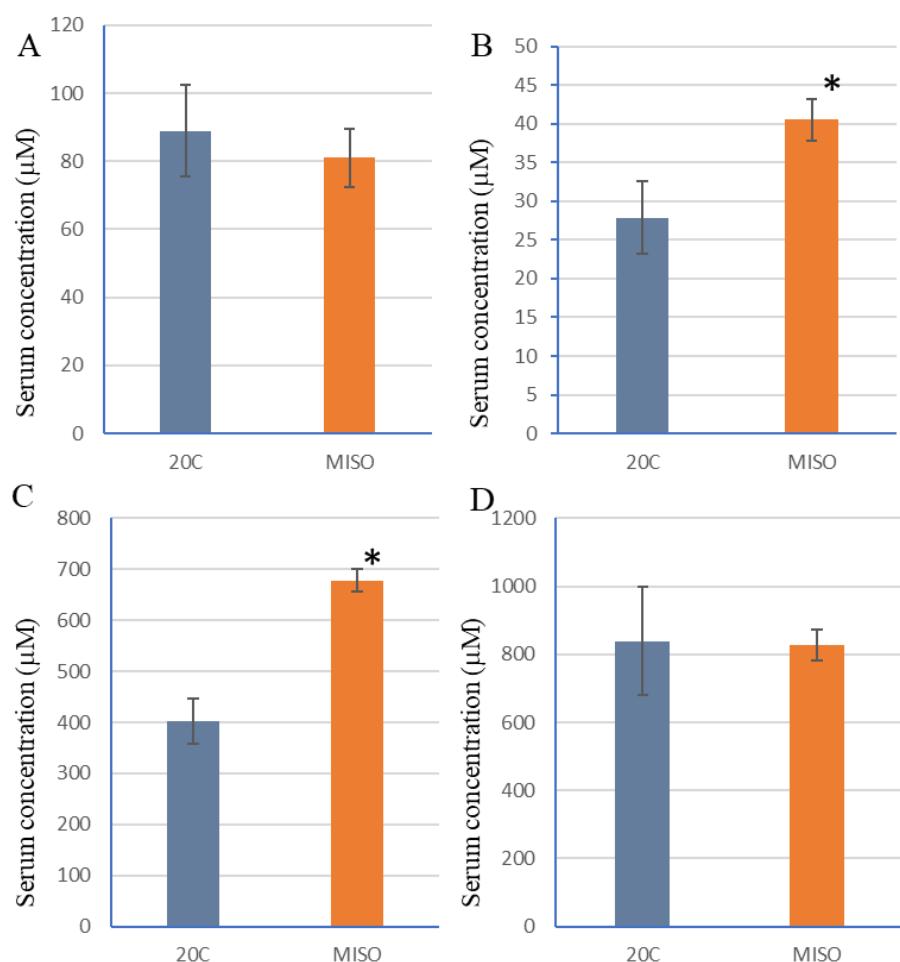


Figure 2. コリン関連化合物の血中濃度

A:コリン、B:GPC、C:ベタイン、D:PC

図中の * は 5% の危険率で統計学的に有意差があることを示す。

図に示したようにコリンと PC の濃度には有意な変化は見られなかった一方で、GPC とベタインは味噌飼料において有意な増加が観察された。味噌由来のコリン関連化合物の量は、重酒石酸コリンに比べて、わずかであるため味噌中の成分の変化はこの結果には直接影響しておらず、味噌に含まれている成分が GPC とベタインの増加に関与していると考えられる。GPC は脳に運ばれ、コリンに変換され後、アセチルコリンに合成されることが知られるコリン供給物質であり、米国などでは認知機能を高めうるサプリメントとして応用されている⁵⁾。味噌含有食において GPC が有意に増加したことは、味噌による認知機能に何らかの影響が与えられる可能性を示唆するものであり、非常に興味深い。ベタインについては味噌に含まれる量はわずかであるため、内因性のベタイン合成が促進されているものと考えられるが、その調節機構や生理的意義は現時点では不明である。今後、煮大豆を主原料とする食餌についても同時に検討することで、さらなる詳細が明らかになることが期待される。

以上のように味噌製造過程において大豆中のコリン関連化合物は大きく変化し、コリン供給源としての役割も変わりうることが明らかとなった。

要約

本研究では味噌製造過程における大豆中のコリン関連化合物の成分変化とその栄養学的意義を検討した。発酵過程を経ることで、麹菌由来のリパーゼによるレシチンの分解が観察され、コリンの大幅な増加と GPC の微増が観察された。麹菌由来リパーゼの詳細については検討できなかったが、レシチンとコリンは消化・吸収過程が異なり、生体利用性に違いがあることが知られているため、コリン給源としての性質も発酵により変化していることが明らかとなった。実際に味噌含有食をラットに摂取させると血中の GPC とベタイン濃度の有意な増加が観察された。今回の研究では麹菌由来酵素の詳細や味噌含有食のより詳細な栄養学的意義については検討できなかったが、今後さらなる検討を行うことで、味噌中のコリン関連化合物の栄養学的特性を明らかにしたいと考えている。

味噌・醤油に代表される発酵食品は我が国の食生活を考えるうえで、欠かすことができない食品であり、認知機能を始めとする生理機能を有するコリンおよびその関連化合物の供給源として、栄養学的な意義を検討していくことは重要と考えられ、今後さらに検討を進める予定である。

参考文献

- 1) Patterson KY, Bhagwat SA, Williams JR, Howe JC, and Holden JM. (2008) "USDA Database for the Choline Content of Common Foods: Release Two". <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>
- 2) Alejandra M. Wiedeman, Susan I. Barr, Timothy J. Green, Zhaoming Xu, Sheila M. Innis, David D. Kitts (2018) "Dietary Choline Intake: Current State of Knowledge Across the Life Cycle", *Nutrients*, 10 · 10
- 3) Zeisel SH, Da Costa KA, Franklin PD, Alexander EA, Lamont JT, Sheard NF, Beiser A. (1991) "Choline, an essential nutrient for humans." *FASEB J*, 5, 2093-2098.
- 4) Yamashita S, Kawada N, Wang W, Susaki K, Takeda Y, Kimura M, Iwama Y, Miura Y,

Sugano M, and Matsuoka R. (2023) "Effects of egg yolk choline intake on cognitive functions and plasma choline levels in healthy middle-aged and older Japanese: A Randomized double-blinded placebo-controlled parallel-group study." *Lipids in Health and Disease*, **22**, 75.

5) Zeisel SH, Niculescu MD. (2006) "Perinatal choline influences brain structure and function." *Nutr Rev.*, **64**, 197-203.