

資 料

亜鉛強化酵母の抽出エキス中の亜鉛の存在様式について

立屋敷 哲^{*1} 高橋 貴康^{*2} 小土井理恵^{*2} 岡 治^{*2}

Chemical Composition of Zinc in the Extract of Zinc-Enriched Bakers' Yeast

TACHIYASHIKI Satoshi^{*1}, TAKAHASHI Takayasu^{*2}, KODOI Rie^{*2}, OKA Osamu^{*2}

Abstract : Highly zinc-enriched bakers' yeast (5.7% of Zn by dry weight) was extracted with aqueous citrate buffer solution (0.2mol/L, pH5.3) to give dry powdered sample with a composition of $\text{Na}_{4.61}\text{Zn}_{1.00}(\text{citrate})_{1.95}(\text{X})_{0.76}$ (X =organic acids, amino acids, protein, and nucleotide). It contained 9.7% Zn, 55.6% citric acid, 15.7% sodium ion, and minor amounts of amino acids, protein, trehalose, nucleotide, organic acids, etc. In aqueous solution of the powdered extract with pH7.2, 96% to 100% of the total Zn was found to bind with citrate ion to form the metal complex, $[\text{Zn}(\text{citrate})]^-$. Less than 0.3% of the zinc existed as metal complex with nucleotide. The 0.1% of the zinc was estimated to exist as metal complex with amino acids. Free aqua-zinc ion was estimated to be 0.02% of total zinc. Thus, the powdered extract and its aqueous solution differed from water insoluble $\text{Zn}_3(\text{citrate})_2$ and slightly soluble $\text{Zn}_3(\text{citrate})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ both in solid state and in solution.

緒 言

亜鉛は生体必須微量元素のひとつであり，体内で様々な役割を果たしている。亜鉛は300以上の酵素の補因子として機能しており，遺伝情報の複製，転写，翻訳などにも関係している。亜鉛の欠乏では成長阻害，創傷治癒遅延，皮膚炎，性機能低下，味覚障害，免疫機能低下，脳機能低下が知られており，皮膚病，尋常の治癒に亜鉛が効果的であることも知られている^{1, 2)}。

ミネラル補給を目的として利用される亜鉛には化成品としての硫酸亜鉛，グルコン酸亜鉛があるが，食品などへの利用に関しては使用基準が設けられている。一方，天然物・食品由来の亜鉛の供給源の一つとして，古くから食品として利用されてきた安全性の高い酵母に亜鉛を濃縮させたものが食品の一つとして開発されている³⁾。この亜鉛強化酵母は胃液の酸性で容易に亜鉛イオンを放出することがわかっており，健康食品，学校給食，医療食などに利用されている⁴⁾。しかしながら，この亜鉛強化酵母は水溶液では不透明な懸濁液となるために飲料品用の亜鉛供給源としては適さない。また，酵母には特異的な臭いや味もあることが利用上の欠点である。そこで，これらの欠点を持たない食品由来の可溶性の亜鉛源とし

て，亜鉛強化酵母菌体から亜鉛イオンを抽出し噴霧乾燥させた酵母エキス粉末が開発された。抽出にあたっては，抽出率，風味等を考慮し，食品添加物として認められているクエン酸緩衝液が利用されており，抽出液，および酵母エキス粉末はクエン酸以外に酵母由来の多種類の栄養成分を含む多成分複雑系である。

本研究は，多成分複雑系である亜鉛強化酵母エキス粉末に関する基礎的知見として，粉末水溶液中において亜鉛が如何なる化学形で存在するかを明らかにすることを目的とした。亜鉛の溶存化学形に関する知見は，製品の品質管理や安全性，利用性を考える上で重要である。一般に，複雑系の状態分析は容易ではない。本報告は多成分複雑系における亜鉛イオンの溶存状態探求法の一例を提示するものである。

実 験

亜鉛強化酵母抽出エキス粉末（ミネラル酵母エキス Zn）：オリエンタル酵母社製ミネラル酵母 Zn5（亜鉛含有量5.70%）を0.2mol/Lのクエン酸緩衝液（pH5.3）で抽出して得られた清澄液を噴霧乾燥することにより得た。

組成分析：抽出エキス粉末成分のアミノ酸分析，クエン酸分析はHPLC法によった。コリン，トレハロース，

*1 女子栄養大学：Laboratory of Bio-inorganic Chemistry, Kagawa Nutrition University

*2 オリエンタル酵母，食品研究所：Laboratory of Yeast & Fermentation, Food Division, Oriental Yeast Co.

乳酸、酢酸、コハク酸はクエン酸濃度 0.100mol/L (3.47%) のエキス D₂O 溶液の NMR スペクトルを測定し (JEOL EX-270 FTNMR), そのスペクトルを基に定量を行った (内部標準物質 0.1mol/L DSS と各成分の NMR シグナルの積分値, シグナル強度を基に計算)。NMR シグナルの帰属は標品との比較により行った。リン、硫黄、亜鉛、ナトリウム量の分析は ICP 発光分析法, 原子吸光分析 (バリアン SpectrAA-220, フレーム法) によった。総窒素量は燃焼式窒素分析法で分析した。たんばく質の分析はピシンコニン酸 (BCA) 法によった⁵⁾。総炭水化物量はアンスロン硫酸法とフェノール硫酸法によった⁶⁾。また, エキス溶液の紫外吸収スペクトルから, たんばく質, ヌクレオチド, リン酸イオンの量を求めた。

ゲルクロマトグラフィー: カラムサイズは 12.5mmφ × 720mm, 充填剤はセファデックス G25, 溶離液は 0.1mol/L NaCl 水溶液である。吸収スペクトルの測定 (300-205nm) と比色分析は光路長 1mm のセルを用いた。画分成分のクエン酸, ヌクレオチドは NMR による化学シフト値, シグナル形状により確認した。

モル比法による錯体組成の決定: クエン酸ナトリウム濃度 0.005mol/L, 硫酸亜鉛濃度 0~0.015mol/L (Zn/クエン酸イオン=0~3.0), 緩衝液 TES (N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane-sulfonic acid) 0.050mol/L (pH7.2)。試料溶液の実測 pH は Zn の 0~0.005mol/L で pH7.14~7.06, Zn の 0.015mol/L で pH6.83 であった (測定溶液のイオン強度は一定ではない)。

亜鉛イオンと結合しているクエン酸量の NMR 法による推定: クエン酸ナトリウム/クエン酸 0.010mol/L (pH7.20), ZnSO₄ 0~0.0125mol/L, TES 緩衝液 0.050mol/L (pH7.2) を含む溶液の NMR スペクトルを測定した。標準物質は DSS 0.01mol/L。測定溶液は D₂O を約 50% 含む (イオン強度は一定ではない)。

結果と考察

I. 酵母エキスの性状と組成分析

酵母エキス粉末は淡黄褐色であり, その 1% 水溶液は微黄色溶液で pH7.2 とほぼ中性であった。乾燥により 6.8% の重量減少が見られた。組成分析の結果を Table 1 と Table 2 に示した。酵母エキス中にはモル比で亜鉛 1 に対して約 2 倍量のクエン酸, 総量で亜鉛の 4.5% にあたる各種のアミノ酸 (Table 2) のほか, 少量の有機酸 (乳酸, 酢酸, コハク酸), 糖 (トレハロース), たんばく質, ヌクレオチド, リン酸, コリン等を含んでいた。

紫外吸収スペクトルに基づくヌクレオチド, たんばく質, リン酸イオンの量の推定: 酵母エキス粉末水溶液の吸収スペクトル (0.172g/5.00mL) を測定し, ヌクレオチド, たんばく質, リン酸イオンの量を推定した。300-

Table 1. Chemical compositions and their amounts (/m mol/100g) of powdered extract of zinc-enriched bakers' yeast.

Compounds or Elements	Contents /%	Contents / (m mol/100g)
Zinc	9.7	148
Citric acid	55.6	289
Acetic acid	0.20	3.3
Lactic acid	0.14	1.6
Succinic acid	0.45	3.8
Treharose	2.0	5.8
Carbohydrate	1.8	—
Choline	0.08	0.8
Total amino acids	1.02	6.7
Nucleotide	1.9	—
Nitrogen	1.02	71.4
Protein	4.0	—
Phosphoric acid	1.71	17.4
Phosphorus	0.72	23.2
Sulfur	0.21	6.6
Sodium	15.7	683

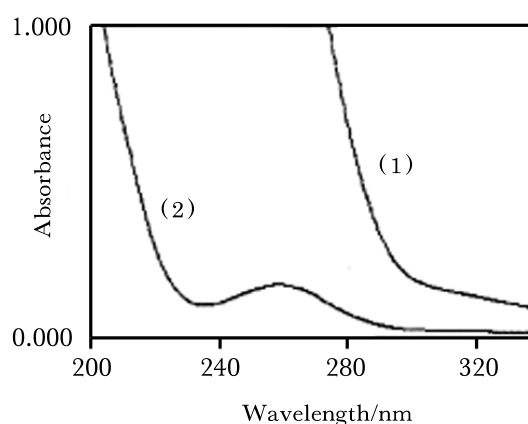


Fig. 1. Absorption spectra of (1) a 3.45% solution of powdered extract of zinc-enriched bakers' yeast, and (2) a 1/10 dilution of (1), in the cell of 1 mm light-path

220nm の吸収スペクトルの形状と, 260nm の吸光度/280nm の吸光度 = $A_{260}/A_{280} = 2.30$ より (Fig. 1), モノ・オリゴヌクレオチドが含まれていると推定された (A_{260}/A_{280} は RNA では約 2.0; DNA では約 1.8.)⁸⁾ A_{260}/A_{280} が 2.0 より大きいので芳香族アミノ酸はわずかしき存在しない (Table 2)。224-236nm の吸光度差 (Fig. 1)⁵⁾ がすべてペプチド結合に基づくとなると, $A_{224} - A_{236} = 0.07 \times 100$ (10 倍希釈, 1mm セルで測定) = 7 よりたんばく質量は 1.26mg/1mL⁵⁾, たんばく質含有率として 1.26mg/mL × 5 mL/0.172g × 100 = 3.7% が得られた。

Table 2. Composition of amino acids (/ppm) and their amounts (/m mol/100 g) of powdered extract of zinc-enriched bakers' yeast, formation constants K_1 ($\log K_1$) with Zn (II), and acid dissociation constants, pK_{a1} ($-\log K_{a1}$) of citric acid and the amino acids.⁷⁾

(Amino acids)	Contents/ppm	Contents /m mol/100 g	$\log K_1$	$\log K_2$	$\log \beta_2$	pK_{a1}
(Citric acid)	(55.6%)	(289)	4.98	2.98*		5.7
Glutamic acid	3,200	2.18	5.7	3.2	8.9	9.4–9.5
2-Aminoadipic acid	430	0.27				
Proline	140	0.12				10.5
Glycine	300	0.40				9.6–9.7
Alanine	1,180	1.32	4.7	3.9	8.6	9.9
Valine	320	0.27				9.6
Cystine	500	0.21				
(Cystein)						8.8, 10.5
Methionine	60	0.04				9.0–9.2
Isoleucine	200	0.15				9.7
Leucine	340	0.26	5.8	3.3	9.1	9.7
Tyrosine	300	0.17				9.2
Phenylalanine	520	0.31				9.3–9.4
4-Aminobutylic acid	330	0.32				
3-Methylhistidine	270	0.16	6.4	5.4		(9.1)**
Ornithine	120	0.09			7.6	8.75, 10.73
Lysine	640	0.44			7.3	9.06, 10.54
Amino acids, total	10,240	6.71 m mol***				
Amino acid content	1.02%	4.5% of Zn				

* Formation constant K_1 of $Hcitrate^{2-}$ with Zn (II).

** The pK_{a1} value of histidine.

*** Total N of amino acid is $6.71 + 0.21 + 0.32 + 0.09 + 0.44 = 7.77$ m mol/100 g, $7.77 \times 14 \text{ mg}/100 \text{ g} = 108.8 \text{ mg}/100 \text{ g} = 0.109\%$ (10.7% of total N).

260 nm の吸光度 $A^{260} = 0.163 \times 100 = 16.3$, $A^{260} = 1.0$ が RNA の $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ に対応するので⁸⁾, $16.3 \times 40 \mu\text{g}/\text{mL} \times 5 \text{ mL} = 3.26 \text{ mg}$ 。よって、酵母エキスパウダー中のヌクレオチド (RNA 換算) の含有率として、 $3.26 \text{ mg}/0.172 \text{ g} \times 100 \div 1.9\%$ が得られた。

核酸塩基 A-U の 4 種類のヌクレオチド 1 個あたりの平均分子量 326.5 と平均の窒素原子 N の数 3.5×14 からヌクレオチド中の N の含有率 15.0% が得られた。よって、酵母エキスパウダー中のヌクレオチド由来の N は $1.9\% \times 0.15 = 0.285\%$ 。アミノ酸 N + 核酸 N = 0.109 (Table 2) + $0.285 \div 0.39\%$ 。従って、N の残量をたんばく質とすれば、たんばく質 N = $1.02 - 0.39 = 0.63\%$ 。換算率 6.25 を乗じると、たんばく質含有率として 3.9% が得られた (224–236 nm の吸光度差からは 3.7%, ピシニコニン酸法からは 4.2%)。

同様にして、リン原子 P の含有率を求めると、ヌクレオチド中の P の含有率は $31/326.5 = 9.5\%$ 。酵母エキスパウダー中のヌクレオチド由来の P は $1.9\% \times 0.095 = 0.18\%$ (0.0058 mol , 亜鉛含有量の 3.9%)。総リン含有率 = 0.72

% (Table 1) より、酵母エキスパウダー中のリン酸イオンのリン含有率 = $0.72 - 0.18 = 0.54\%$ ($0.54/31 = 0.0174 \text{ mol}/100 \text{ g}$, リン酸として 1.71%) が得られた。紫外吸収スペクトルを基に求めたこれらの値も Table 1 に示した。

II. 亜鉛酵母エキス溶液中における亜鉛イオンの存在状態の検討

1. ゲルクロマトグラフィーによる亜鉛イオンとクエン酸イオン、ヌクレオチドとの相互作用の検討:

エキス溶液中における亜鉛イオン Zn^{2+} とクエン酸イオン、ヌクレオチドとの相互作用について検討するために、エキス溶液のゲルクロマトグラフ分析を行った (Fig. 2)。 $V/V_0 = 1.3 \sim 2.0$ の画分の吸収スペクトル (Fig. 3. (1)) と ^1H NMR スペクトル (2.6–2.8 ppm に quartet シグナル, Fig. 7) によりクエン酸を確認した。Fig. 2 中で 260 nm の吸光度は主としてヌクレオチドの吸収に対応していることから (Fig. 3. (2), $V/V_0 = 2.4 \sim 2.9$ の吸収スペクトル; たんばく質のモル吸光係数はヌクレオチドの $1/10$ である⁹⁾), クロマトグラム中で、 $V/V_0 = 1$

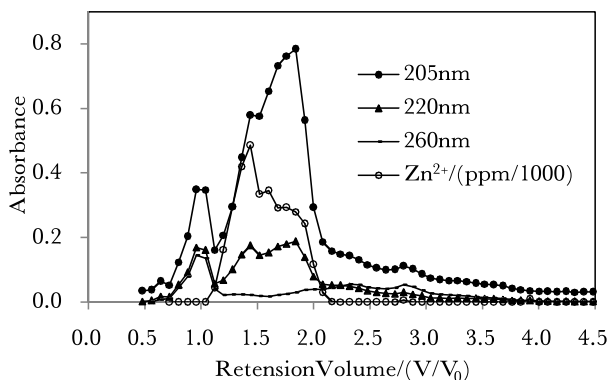


Fig. 2. Gel chromatogram of powdered extract of zinc-enriched bakers' yeast (Sephadex G-25, eluent 0.1mol/L NaCl).

The ●, ▲, and — indicate absorbances at 205, 220, and 260nm, respectively, and ○ shows Zn^{2+} concentration/(ppm/1000).

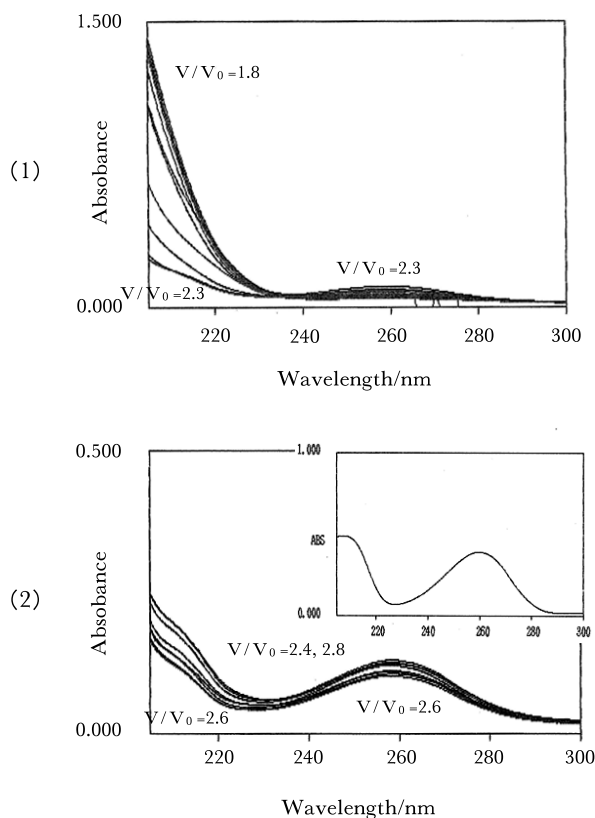


Fig. 3. Absorption spectra of the eluates in Fig. 2: (1) $V/V_0 = 1.3 \sim 2.3$, (2) $V/V_0 = 2.4 \sim 2.9$. Insert in (2) is an absorption spectrum of sodium adenylate.

の溶出帯はブルーデキストラン, $V/V_0 = 1.2 \sim 2.1$ はクエン酸 (亜鉛錯体), $2.2 \sim 3.2$ はヌクレオチドに対応することがわかった。

ゲルクロマトグラフィーの画分中, Zn^{2+} はクエン酸部分と重なって存在したことから (Fig. 2), 画分中においても Zn^{2+} はクエン酸錯体として存在すると判断された。

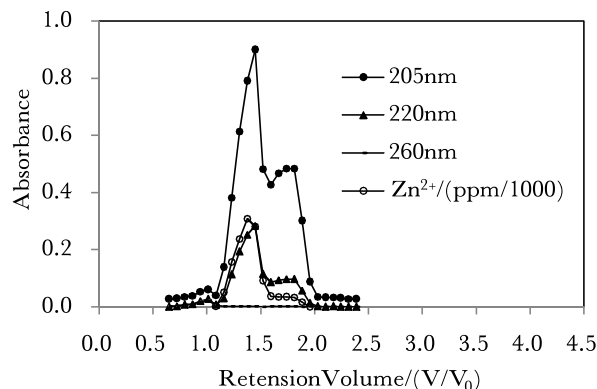


Fig. 4. Gel chromatogram of citrate- Zn^{2+} (Experimental conditions and notations are the same as in Fig. 2.)

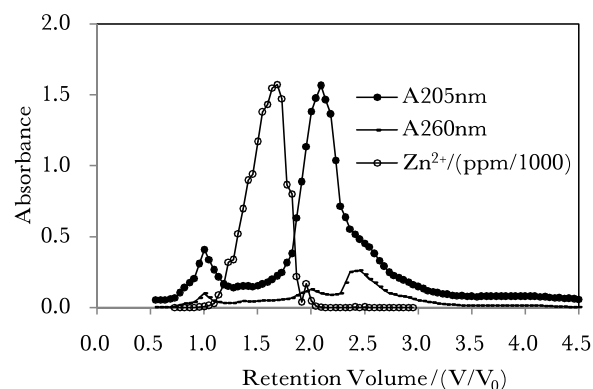


Fig. 5. Gel chromatogram under acidic condition (Sephadex G-25, eluent 0.02mol/L HCl+0.08mol/L NaCl, notations are the same as in Fig. 2.)

この領域における画分中の Zn^{2+} とクエン酸イオン cit の濃度比 $[\text{Zn}^{2+}]/[\text{cit}]$ は $V/V_0 = 1.2 \sim 1.4$ で一番大きく, その後, $V/V_0 = 1.9$ まで Zn^{2+} の比率が減少し, その後クエン酸濃度の減少に合わせて Zn^{2+} の存在量も大きく減少している。このことは, $V/V_0 = 1.2 \sim 1.4$ では Zn^{2+} とクエン酸イオンが $\text{Zn}^{2+} \cdot \text{cit}$ 錯体として存在していることを示している。一方, Zn^{2+} を含む全画分・ Zn^{2+} 溶出帯でもその末尾部分までクエン酸が Zn^{2+} に比べて過剰量存在した。平衡定数に基づく考察から, この条件でも Zn^{2+} は大部分がクエン酸錯体として存在すると判断された。 $\text{Zn}^{2+} \cdot \text{cit}$ 錯体は置換活性であり, カラム溶液中では結合と解離を繰り返しているが, 溶出帯の pH が前方に比して後方では低くなり, 前方に比して錯形成している時間がより短くなることから, Zn^{2+} の溶出帯が広がった原因と考えられた。

Zn^{2+} , クエン酸塩 (pH 7.2) のそれぞれを独立にゲルクロマトグラフィーを行ったところ, 両者の保持体積は同一であった ($V/V_0 = 1.75$)。 Zn^{2+} とクエン酸塩を混合した溶液 (pH 7.2) のゲルクロマトグラム (Fig. 4) では, Fig. 2 に対応する形状・特徴がほぼ得られており, 錯形成により亜鉛錯体の保持体積が小さくなっていることがわかった。

Zn^{2+} は $V/V_0 = 2.7 \sim 2.9$ にもわずかながら含まれてい

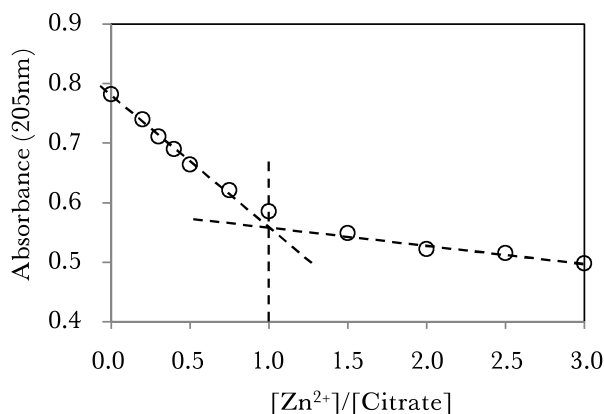


Fig. 6. Plot of absorbance at 205nm of the solutions of Zn^{2+} -citrate system against $[\text{Zn}^{2+}]/[\text{cit}]$ at pH7.2

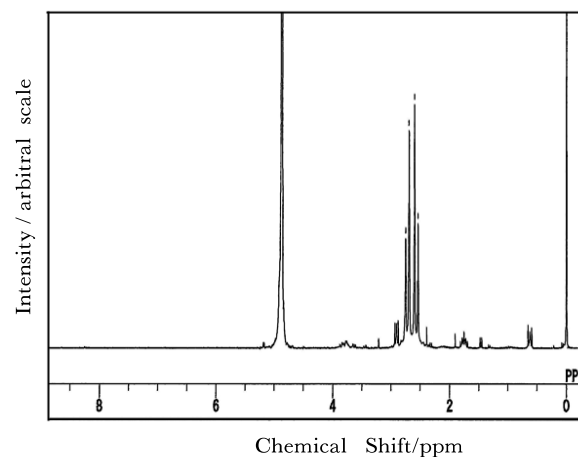


Fig. 7. ^1H NMR spectrum of a D_2O solution of powdered extract of zinc-enriched bakers' yeast (3.1% solution, $\text{DSS}=0.1\text{ mol/L}$)

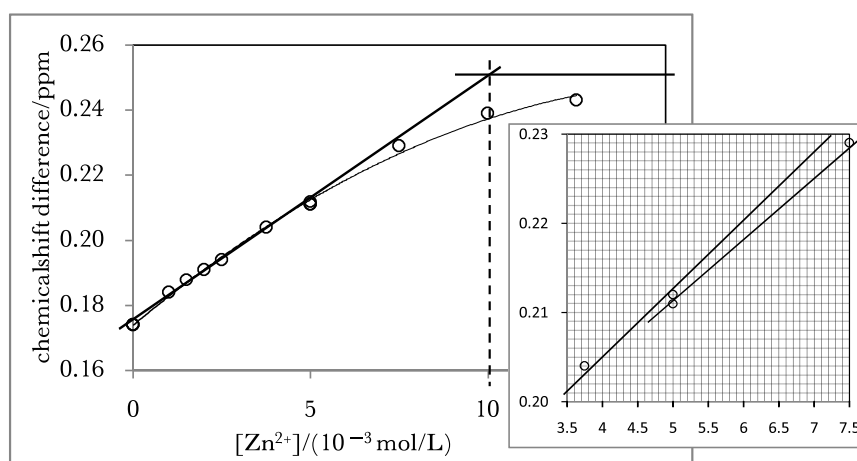


Fig. 8. Plot of ^1H NMR chemical shift difference (/ppm) between two outermost peaks of a quartet signal of a citrate (Fig. 7) against $[\text{Zn}^{2+}]$ ($/10^{-3}\text{ mol/L}$) ($[\text{cit}]=1\times 10^{-2}\text{ mol/L}$). At $[\text{Zn}^{2+}]=5\times 10^{-3}\text{ mol/L}$ lower value of two observed points is that of the extract. Insert is an expansion of the figure.

たことから (Fig. 2), Zn^{2+} のごく一部 ($<1\%$) はヌクレオチドと相互作用する形で存在しているものと考えられた。約4%含まれるたんぱく質と結合した Zn^{2+} の存在に関しては、ゲルクロマトグラムの保持体積 $V/V_0=1$ 近傍に目立った Zn^{2+} 量の増大が見られないことから確認できなかった。

酸性条件下 ($0.02\text{ mol/L HCl}+0.08\text{ mol/L NaCl}$) でのセファデックス G25 によるゲルクロマトグラフ分析を行うと, Zn^{2+} ($V/V_0=1.7$), クエン酸 ($V/V_0=2.1$), ヌクレオチド ($V/V_0=2.4$) の順に各バンドがほぼ分離して溶出した (Fig. 5)。G100 を用いた場合も同様であったが, クエン酸とヌクレオチドの分離は悪かった。酸性条件では Zn^{2+} とクエン酸, ヌクレオチドは錯体を作っていないことを示している。

2. モル比法による亜鉛-クエン酸錯体の組成の確認:

Zn^{2+} とクエン酸イオンが, エキス溶液と同じ pH, 同

じモル濃度領域で作る錯体の組成について, モル比法を用いて検討した。Fig. 6 で屈曲点が Zn^{2+} とクエン酸のモル比 1.0 の所にあることから, この条件で生じる錯体は 1:1 であると結論された。亜鉛-クエン酸錯体は文献的にも 1:1 錯体であることが知られている⁷⁾。

3. 酵母エキス中での亜鉛-クエン酸錯体の生成量についての ^1H NMR 法による検討:

酵母エキス水溶液中の亜鉛-クエン酸錯体の生成比率を知るために, クエン酸イオン cit の NMR シグナル化学シフトの Zn^{2+} 濃度依存性を検討した。クエン酸の NMR は A_2B_2 タイプで 4 本のシグナルが観察された (Fig. 7. 2.5~2.8 ppm)。その両端の 2 本のシグナル間の化学シフト差の Zn^{2+} 濃度依存性を調べた (Fig. 8)。図中で Zn^{2+} 濃度 0.005 mol/L における測定値が 2 個示されているが, 化学シフトが小さい方が酵母エキス溶液であり, Zn^{2+} が 0.005 mol/L でクエン酸イオンが 0.010

mol/L となるように濃度調整して緩衝液 TES を加えたものの測定結果である。

溶液中の 0.010 mol/L のクエン酸イオンが 0.005 mol/L の Zn^{2+} と共存していれば、測定される化学シフトは Zn^{2+} -クエン酸試料溶液の Zn^{2+} 濃度が 0.005 mol/L における化学シフトを示すはずである（平衡定数を用いた考察では Zn^{2+} は 100% 錯形成している）。測定した酵母エキス溶液では Zn^{2+} の分析濃度を 5 m mol/L に調整してあるので、0.005 mol/L 分の化学シフトをしていなければ、酵母エキス溶液中でクエン酸イオンが錯形成している Zn^{2+} 量は 0.005 mol/L より少ない、つまり、エキス中では他のものが Zn^{2+} の一部と錯形成していることを意味する。そこで、クエン酸と錯形成している Zn^{2+} の量・酵母エキスが示す化学シフトと同じ化学シフトを示す Zn^{2+} 濃度を Fig. 8 の横軸から読みとると、酵母エキスの Zn^{2+} 濃度は 0.0048 mol/L に対応した（Fig. 8 の挿入図参照）。これより、酵母エキス中では Zn^{2+} の約 96 % (0.0048/0.0050×100, 実験誤差を考慮すると～100%) がクエン酸錯体となっていると結論された。Fig. 8 から求めた亜鉛錯体の Zn^{2+} /クエン酸イオンのモル比はほぼ 1.0 となり、比色法によるモル比法の結果（Fig. 6）と一致した。

以上の結果から、酵母エキスの 3.5% 水溶液中では、 Zn^{2+} は $[\text{Zn}(\text{cit})]^-$ として存在しており、全亜鉛イオン量に占めるクエン酸錯体の割合は 96% 以上（～100%）と結論された。

4. ヌクレオチド（モノマー、オリゴマー）と亜鉛イオンとの錯体形成の可能性について：

酵母エキス溶液中には、たんぱく質は 4 % 以下しか含まれておらず、紫外吸収の元となる物質はクエン酸イオン以外では、ヌクレオチドが主であった。

A^{260} よりヌクレオチド（RNA 換算）含有率は 1.9 % (Table. 1)、酵母エキス中の核酸塩基はオリゴマー、モノマーの混合物であると判断されたが、ヌクレオチドが存在するクロマトグラフ画分中の Zn^{2+} は $V/V_0=2.8$ 前後でのみ検出された（Fig. 2）。ヌクレオチドと Zn^{2+} の錯形成の安定度定数を考慮すると $V/V_0=2.8$ のヌクレオチドは ATP である可能性が示唆される（ヌクレオチドの錯形成定数はアデノシン-5-リン酸で $K=10^{2.4\sim 2.7}$ とクエン酸錯体より小さい；ATP では $K=10^{4.8}$ とクエン酸と同程度である⁷⁾）。Fig. 2 で $V/V_0=2.8$ 前後の画分の Zn^{2+} 量は全亜鉛イオン量の 0.3% に過ぎず、 Zn^{2+} のごくわずかのみがヌクレオチドと錯形成していると結論された。

5. アミノ酸と亜鉛イオンとの錯体形成について：

酵母エキス溶液中にはグルタミン酸、アラニンをはじめとする Zn^{2+} と錯形成できるアミノ酸群が 1.0 % 存在する。4-アミノ酪酸を除く錯形成可能なアミノ酸量は全亜鉛イオン量の 4.3% に対応する（Table. 2）。下記のク

エン酸錯体との安定度定数の比較考察から（Table. 2）、エキス溶液中では全アミノ酸量の 3 % のみ（全亜鉛イオンの 0.13 %）が錯形成していると推定された。

グルタミン酸 Hglu の酸解離定数 K_a と亜鉛錯体の生成定数 K_1 はそれぞれ、 $K_a=[\text{glu}][\text{H}^+]/[\text{Hglu}]=10^{-9.4}$ 、 $K_1=[\text{Zn}(\text{glu})]/[\text{Zn}^{2+}][\text{glu}]=10^{5.7}$ である。従って、pH7.2 ではグルタミン酸の亜鉛錯体の条件生成定数は $\log K_1'=5.7-(9.4-7.2)=3.5$ ($[\text{glu}]/[\text{Hglu}]=10^{-9.4+7.2}=10^{-2.2}=0.00631$ 、 $[\text{Zn}(\text{glu})]/[\text{Zn}^{2+}][\text{Hglu}]=[\text{Zn}(\text{glu})]/[\text{Zn}^{2+}][\text{glu}]\times[\text{glu}]/[\text{Hglu}]=10^{5.7}\times 10^{-2.2}=10^{3.5}$.) pH 7.2 ではクエン酸の 97% が cit^{3-} だからクエン酸-亜鉛錯体の条件生成定数 $\log K_1'=4.97$ 。従って、この条件ではクエン酸錯体がアミノ酸錯体より 30 倍でしやすい。

グルタミン酸の pH7.2 での条件生成定数は $K_1'=[\text{Zn}(\text{glu})]/[\text{Zn}^{2+}][\text{glu}]=10^{3.5}$ 。従って、 $[\text{Zn}(\text{glu})]/[\text{glu}]=[\text{Zn}^{2+}]\times 10^{3.5}$ 。3.5% エキス溶液中では亜鉛イオン総濃度=0.050 mol/L、 $\text{Zn}^{2+}\gg$ グルタミン酸（Table 1, 2）より、クエン酸が存在しない場合は $[\text{Zn}^{2+}]\approx 0.050$ mol/L。この場合、 $[\text{Zn}(\text{glu})]/[\text{glu}]=0.050$ mol/L $\times 10^{3.5}=158$ 、クエン酸がない場合はグルタミン酸の $158/159\times 100=99.4\%$ が錯形成する。一方、0.100 mol/L のクエン酸共存下（ Zn^{2+} に対し 2 倍量のクエン酸イオンが共存）では、 $[\text{Zn}(\text{glu})]/[\text{glu}]=[\text{Zn}(\text{cit})]/[\text{cit}]$ $K_1'_{\text{glu}}/K_1'_{\text{cit}}\approx 0.05/0.05\times 10^{3.5}/10^{5.0}=10^{-1.5}=0.032$ （クエン酸の $\log K_1'\approx 5.0$ ）。つまり、glu の 3.2% のみが錯形成する。エキス中の全アミノ酸（全亜鉛イオン量の 4.3%）が glu と同じ比率で錯形成しても錯体量は全亜鉛イオン量の 0.14% しか存在しない。

6. アクア亜鉛イオンの存在量について：

3.5% 酵母エキス水溶液中（亜鉛イオン総濃度 0.050 mol/L）では、亜鉛イオンの総濃度/クエン酸の総濃度=1/2（Table. 1）より、 Zn^{2+} と錯形成していないクエン酸イオン cit は 0.05 mol/L である。すると、 $[\text{Zn}^{2+}]/[\text{Zn}(\text{cit})]=[\text{cit}]/10^{-5.0}=0.05/10^{-5.0}=5\times 10^3$ （クエン酸錯体の生成定数 $K_1=10^{5.0}$ （Table 2））。従って、3.5% の酵母エキス溶液中では、錯形成していない Zn^{2+} 濃度は亜鉛イオンの総濃度の $1/5,000=0.02\%$ にすぎない。

7. 抽出エキス溶液中における亜鉛イオンの化学形と体内への吸収：

亜鉛強化酵母エキス水溶液中において Zn^{2+} はほぼ全てクエン酸錯体となっていることから、強酸性の胃液中では錯体は解離し、 Zn^{2+} は水和イオンとして存在する。pH6.5～7.5 の小腸ではクエン酸錯体に戻ることになる。小腸内では、クエン酸イオンが腸膜から吸収されるに伴い、 Zn^{2+} も錯体として、または錯体から解離して Zn^{2+} として膜内に吸収されるものと推定される（Table 1, 2 より、 $[\text{Zn}(\text{cit})]/([\text{Zn}^{2+}][\text{cit}])=10^{4.98}$ 、クエン酸総濃度は亜鉛イオンの総濃度の 2 倍あるので、クエン酸イオンが小腸中で 1,000 倍 (0.00010 mol/L) に薄まったとして

も, $[\text{Zn}(\text{cit})]/[\text{Zn}^{2+}] = 10^{4.98} [\text{cit}] = 10^{4.98} \times 0.00005 \approx 5$, と Zn^{2+} の 80% 以上はクエン酸錯体のままで, ただし結合と解裂を繰り返す動的平衡状態で, 存在する)。

以上, 本研究では, クエン酸の NMR シグナルの亜鉛イオン濃度依存性を解析することにより, 多成分の複雑系である亜鉛強化酵母のクエン酸抽出エキス粉末水溶液中において, 亜鉛イオンがクエン酸イオンと錯体を形成していること, 及びその比率を明らかにできた。本報告は複雑系の状態分析の一方法論を提示したものとしても意義深いと考えられる。

参考文献

- 1) 池田 稔, 生井明浩: 味覚障害と亜鉛欠乏, Biomed. res. trace elem., **18**, 10-14 (2007).
- 2) 深田俊幸 他: 免疫機構における亜鉛の役割, 日本医事新報, **4343**, 63-69 (2007).
- 3) 安藤正康, 中島亮一, 一言 撰: 亜鉛高含有酵母. 特開平, 8-332082 (1996).
- 4) 鈴木啓三, 神前 健, 岡 治, 松尾雄志: 亜鉛強化ミネラル酵母の開発とその特徴, 生物試料分析, **31**(2), 139-146 (2008).
- 5) 日本生化学会 編: 新生化学実験講座 1, 5 章 タンパクの定量, 東京化学同人 (東京), pp.93-94 (1990).
- 6) 菅原龍幸, 前川昭夫 監修: 新食品分析ハンドブック, 建帛社 (東京), pp.103-104 (2000).
- 7) Stability Constants of Metal-Ion Complexes Supplement No.1, The Chemical Society (London), (1971).
- 8) 泉 美治, 中川八郎, 三輪田俊夫 編: 生化学実験のてびき 3. 核酸の分離・分析法, 化学同人 (京都), p.120 (1986).

