牛肉中の亜鉛の存在形態の消化による変化

池田 小夜子

神戸学院大学栄養学部

Functionality Changes in Dietary Zinc by the Enzymatic Digestion of Beef Meat

Sayoko IKEDA

Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University, Tarumi, Kobe

The present study was conducted to evaluate the biological effectiveness of Zn released from beef meat with proteolytic digestion. Cooked beef meat was hydrolyzed with pepsin at pH 1.0 for 3.5 hr, and subsequently the pH was adjusted to pH 7.6, and the suspension of the meat after pepsin digestion was further hydrolyzed for 2 hr with trypsin. During the course of the peptic digestion, considerable amount of Zn in cooked meat was released into its digestion medium. Nevertheless, over half of this solubilized Zn was transferred into the undigestive residue by the subsequent tryptic digestion. The observed change of solubility of Zn seems to be caused by alterations in pH. Fractionation of the hydrolyzates with pepsin, or pepsin and trypsin, by Sephadex G-100 column chromatography, indicated that Zn in these hydrolyzates might bind to proteinaceous substances. These results allow us to speculate that the most amount of ingested Zn, being bound to protein-like substances, may be transported into intestinal lumen before absorption.

(Received May 14, 1980)

亜鉛は数十種類の酵素の活性発現に不可欠な因子であり、ヒトの生理上重要な機能を果たしている¹⁾。またたん白質性のホルモンであるインシュリンは、亜鉛によりその作用が著しく増強される。これは最近古武弥人らの研究により明らかになった。古武らは、トリプトフェンの代謝産物であるキサンツレン酸（以下 XA と略記）が糖尿病発現作用を有する事実を明らかにし²⁾³⁾、その生理作用の重要性から XA に関する研究を進めてきた⁴⁾⁵⁾。最近、XA とインシュリンの相互作用を解明する研究から、亜鉛イオンがインシュリンの活性中心部位に結合していると考えられるいくつかの実験的事実を得た⁶⁾⁷⁾。Hendricks と Mahoney⁸⁾ は、ラットで亜鉛欠乏時にグルコースを腹腔内に投与した場合著しく耐糖能が損われる現象を観察した。したがって、食餌性の亜鉛が、インシュリンの生理的機能の発現に関与していることが示唆された。

近年、米国をはじめ数カ国において、亜鉛の推奨所要量が決められてきており^{9)~11)}、食物からの摂取量に注意が払われるようになってきた。一方、食餌性の亜鉛の消

化吸収率はかなり低い数値を示す¹²⁾¹³⁾。さらに、Price ら¹⁴⁾は食餌のたん白質含量が亜鉛の体内での吸収および貯蔵に影響を与える、すなわち食餌の亜鉛レベルを一定にした条件下で高たん白質の食餌を与えると、亜鉛の体内貯蔵がかなり高まることを認めている。亜鉛がたん白質または数種のアミノ酸等と一定の条件下で比較的にやすく結合するという報告は幾つか見られる¹⁵⁾¹⁶⁾。したがって、食品中、とくに食品亜鉛の主たる供給源である動物性たん白質食品に含まれる亜鉛の生体内での利用率に関する知見を得るためには、そのたん白質の消化吸収に伴う亜鉛の挙動を検討することが必要と考えられる。

本研究は、日本人が日常よく食しかつ亜鉛を多く含む代表的な動物性たん白質食品の一つである牛肉について、そのたん白質消化過程における亜鉛の存在形態の変化を検討し、その栄養的効率を論じたものである。

実験方法

1. 材料

実験材料として、市販の新鮮な牛肉ミンチを用いた。供試した牛肉ミンチの亜鉛およびたん白質含量は、新鮮

重当たりのおのの $4.36 \pm 0.28 \text{ mg\%}$ および $17.32 \pm 0.85\%$ (Means $\pm$ S.D.) であった。豚胃ペプシン (2 回結晶化, 3050 IU/g protein) および牛すい臓トリプシン (2 回結晶化, 11,700 BAEE units/mg protein) は, Sigma 社製を使用した。

2. 亜鉛の定量

被検試料を, 硫酸, 過酸化水素を用いた湿式法で分解し, 灰化液を適当な濃度に定容した後, 日立 208 型原子吸光度計を用いて, 亜鉛の定量を行なった。

3. 牛肉のたん白質消化

たん白質消化は, 食品鉄の利用率を試算する目的で行なわれた実験方法を参考として以下のように行なった¹⁷⁾¹⁸⁾。牛肉は通常何らかの加熱処理を受けて食されるため, ミンチ肉約 1g を秤量し, 20 倍量 (v/w) の沸とう蒸留水中に懸濁し, 5 分間加熱した。冷却後, 懸濁液を塩酸溶液を用いて pH を約 1.0 に調整し, 一定容にした。これに, ペプシン溶液を加え, 37°C で酵素反応を行なった。反応組成は, ペプシン 1,000 IU, 塩酸 1.21×10^{-3} moles からなり, 全量を 21 ml とした。反応終了時に消化懸濁液を氷冷下に置き, 速やかに遠心分離 (10,000 g, 20 分間) を行なった。上澄液と沈下について, おのの亜鉛量およびたん白質量を求めた。ペプシン消化に続いてトリプシン消化を行なう場合は, 牛肉ミンチのペプシン消化を 3.5 時間行なった後, ただちに 2 M トリス緩衝液 (pH 7.6) 3 ml を加え, pH を 7.6

に調整後, 10^{-3} M 塩酸にあらかじめ溶解させておいたトリプシン液を添加し, 37°C で反応させた。反応組成は, トリプシン 560 BAEE units, トリス緩衝液 6.0×10^{-3} moles および塩化カルシウム 6.0×10^{-3} moles からなり, 反応終了後, ペプシン消化の時と同様に処理し分析に供した。

4. たん白質の定量

たん白質の定量は, ミクロケルダール法¹⁹⁾ ($N \times 6.25$) またはビウレット法²⁰⁾で行なった。

5. 電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は, Davis の方法²¹⁾に従って行なった。たん白質の染色は, アミドブラック 10B で行ない, 染色後のゲルを Ozumar 802 型デンシトメーターを用いて分析した。また, 泳動させたゲルの亜鉛含有画分を検出する場合は, ゲルを約 3mm の長さにスライスし, 薄片ゲルを 10% トリクロル酢酸で抽出し, その亜鉛量を測定した。

実験結果

1. 牛肉に含まれる亜鉛の水または酸性溶液への溶解

Fig. 1 は, 牛肉ミンチを加熱処理し, 水溶液中および塩酸溶液 (約 pH 1.0) 中に懸濁した場合に溶出されてくる亜鉛量を経時的に示したものである。Fig. 1A からわかるように, 水溶液中へ溶出される亜鉛量は, 全体の約 3% であり, ほとんどの亜鉛は, 水不溶性画分に存在

Fig. 1. Time course of solubilization of zinc from ground beef meat into water (A) or HCl solution (B).

Two one-gram of ground beef meats were heated for 5 min in boiling water, and subsequently incubated at 37°C in distilled water or HCl solution (a final concentration of 0.06 M), respectively. Aliquots of the incubates were taken at appropriate intervals, and then centrifuged. The supernatants and precipitates obtained were assayed for the zinc and protein contents, respectively. Protein content was determined by the Biuret method.

○, zinc in supernatant; ●, zinc in insoluble residue; and ◐, protein in supernatant.

Table 1. Release of zinc and proteins from ground beef meat on consecutive proteolytic digestion by pepsin and trypsin.

	Zinc	Proteins
Soluble fraction	$31.0 \pm 2.5\%$	$39.0 \pm 3.5\%$
Undigestive residue	$62.0 \pm 4.5\%$	$57.4 \pm 4.4\%$

The detailed conditions for the consecutive proteolytic digestion are given in the text. Protein content was determined by the micro-Kjeldahl method. Values are the means $\pm$ S.D.

Fig. 2. Time course of the release of soluble zinc from ground beef meat on peptic digestion.

The detailed conditions for peptic digestion are given in the text. After incubation, analytical conditions were essentially the same as described in Fig. 1.

○, zinc in supernatant; ●, zinc in insoluble residue; and ○, protein in supernatant.

していた。一方、加熱牛肉ミンチから塩酸溶液中へ溶出される亜鉛量が、経時的に増加していく現象 (Fig. 1B) が観察された。酸性溶液に懸濁後3時間で、抽出される亜鉛の割合は全体の約87%に達した。また加熱牛肉ミンチの酸可溶性たん白質の割合は、経時的にいくぶん増加し、懸濁後1時間ではほぼ平衡に達した。上記の結果から、加熱牛肉ミンチのたん白質がペプシン消化を受けるさい、その条件下では、亜鉛が比較的たやすく可溶性画分へ溶出されてくることが示唆された。

2. 牛肉たん白質消化過程での亜鉛の挙動

Fig. 2 は、加熱処理した牛肉ミンチをペプシン消化させたときのミンチ肉から溶出されてくる亜鉛量および

Fig. 3. Classification of total zinc of ground beef meat with respect to solubility and dialysis on proteolytic digestion.

Proteolytic digestion was made under the fixed conditions described. The hydrolyzate solutions after centrifugation were exhaustively dialyzed against distilled water for 2 days. The zinc content of the dialyzates was determined by the procedure given in the text.

(A) incubation in distilled water for 3.5 hr at 37°C without either pepsin or trypsin, (B) digestion for 3.5 hr at 37°C with pepsin, (C) consecutive digestion for 3.5 hr and subsequent 2 hr at 37°C with both pepsin and trypsin.

たん白質量を経時的に図示したものである。たん白質消化は本条件下で反応開始後3.5時間で約30%に達した。一方、亜鉛の可溶化が、Fig. 1Bに認められた結果とほぼ同様な形式で進行していくことが判明した。

ついで、牛肉ミンチのトリプシン消化過程における亜鉛の挙動を検討した。Table 1は、加熱牛肉ミンチをペプシンで3.5時間消化後、続いてトリプシンで2時間消化させた場合に、可溶化される亜鉛量、未消化残渣中に存在する亜鉛量、およびそれら二つの画分に含まれるたん白質量を測定した結果である。トリプシン消化過程で可溶化される亜鉛量は全体の約31.0%であった。この数値は、ペプシン消化時に可溶化される亜鉛量の約半分以上である。ところで、常法に従って加熱ミンチ肉のペプシン消化を行ない、続いて消化懸濁液をpH 7.6に調整後、トリプシンを加えないこと以外はトリプシン消化と同条件で、2時間、37°Cでインキュベートさせる実験を行なった。その結果、上記のトリプシン消化時で得られた結果とほぼ同様に、可溶性亜鉛量がペプシン消化時の約半分以上の量に減少する結果が得られた。このことから、トリプシン消化時において、未消化残渣中の亜鉛

Fig. 4. Gel filtration patterns of the incubates with or without proteinases on a Sephadex G-100 column.

Proteolytic digestion was made under the fixed conditions described. A Sephadex G-100 column (1.8×90 cm) was previously equilibrated with 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 3.0) in case of (A) and (B), or 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) in case of (C) and (D). The chromatograms were obtained by applying the following 8 ml portion on the column:

(A) of the soluble fraction from the incubate at pH 1.0 with pepsin; (B) of the soluble fraction from the incubate at pH 1.0 without pepsin; (C) of the soluble fraction from the incubate of peptic-hydrolyzing suspension at pH 7.6 with trypsin; and (D) of the soluble fraction from the incubate of peptic-hydrolyzing suspension at pH 7.6 without trypsin.

The sample portion corresponded to 0.5 g of the meat in (A) and (B), and to 0.4 g of the meat in (C) and (D), respectively. Solid line, zinc concentration; broken line, absorbance at 280 nm; arrows a and b indicates pepsin and trypsin, respectively.

の増加を引き起こす要因の一つとして、酵素反応条件下の pH 変化が考えられた。

3. 牛肉たん白質消化過程で生じた可溶性亜鉛の存在形態

加熱牛肉ミンチの酵素的たん白質分解過程で、可溶化される亜鉛の存在形態を検討した。Fig. 3 は、可溶化された亜鉛の透析性および非透析性を検討した結果を図示したものである。図から明らかなように、ペプシン消化時に可溶化される亜鉛量は約 87% で、透析性の成分はその約 86% を占めていた。一方、ペプシン-トリプシン連続消化過程で生じた可溶性亜鉛は全体の約 31% であり、そのうち透析性の成分が約 19% の割合で存在す

ることが判明した。

Fig. 4 は、セファデックス G-100 を用いたゲル濾過の溶出パターンで、たん白質消化過程で生じてきた可溶性亜鉛の存在形態を比較検討した結果である。ペプシン消化過程の可溶性亜鉛のゲル濾過 (Fig. 4A) は、含まれるほとんどの亜鉛がほぼ同じ位置に溶出されることを示している。その溶出パターンは、酸抽出された亜鉛のそれ (Fig. 4B) とかなり類似していた。またそれらの溶出位置から、両者の亜鉛がいずれも分子量 10,000 以上の成分と結合していることが推定できた。他方、ペプシン-トリプシン連続消化時の可溶性亜鉛のゲル濾過溶出パターンは、トリプシンを加えることなくペプシン消

Fig. 5. Ultraviolet absorption spectra of fraction I.

Absorption was determined in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0).

Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of fraction I.

Run in pH 8.7, at 2 mA/tube in 7.5% gel. After gel was stained with Amido Black 10 B, followed by destaining, the gel was monitored at 610 nm by a densitometer.

化懸濁液を pH 7.6 でインキュベートしたときの可溶性亜鉛のそれと比較的類似していた (Fig. 4C, D)。すなわち両者ともクロマトグラフ的におよそ二つの画分に分別された。またこの2画分とも、その溶出位置から分子量 10,000 以上と算出され、したがってこの場合も亜鉛が比較的高分子性の物質に結合していることが推定された。

ところで、上記のゲル濾過操作での亜鉛の回収率は、 $93.5 \pm 2.6\%$ であった。このこととゲル濾過の溶出パ

ターンは、牛肉のたん白質消化時の可溶性亜鉛が、無機イオンの形ではほとんど存在しないことを示している。

次に、トリプシン消化過程の可溶性亜鉛をゲル濾過 (Fig. 4C) することで得た溶出画分のうち、大半の亜鉛を含有する画分、すなわち先に溶出されてくる画分 (I) について、その幾つかの性質の検討を行なった。Fig. 5 は、I の紫外部における吸収スペクトルを測定した結果である。図から明らかなように、本成分は典型的なたん白質の吸収スペクトルを示した。Fig. 6 は、I のポリアクリルアミドゲル-ディスク電気泳動図である。図に示されるように、I は 7.5% ゲル内で早移動性を示す一つの主たん白質と数多くの微量たん白質成分から成っていた。そして、亜鉛の大半がその早移動性の主たん白質成分に検出された。一方、Fig. 4C のゲル濾過で後方に溶出される亜鉛画分 (II) の紫外部吸収スペクトルを測定した結果、吸収極大が 251 nm に、極小が 237 nm に見られ、また 285 nm 付近に微かな肩が認められた。II のポリアクリルアミドゲル-ディスク電気泳動を行なった結果は、本成分が、Fig. 6 に示された I と、亜鉛が同様に早移動性のたん白質成分中に検出される点などかなり類似していた。

以上の結果から、トリプシン消化過程の可溶性亜鉛は、含まれるたん白質性の成分 (推定分子量; 10,000 以上) に大部分結合しているものと断定できた。

考 察

亜鉛は、牛肉に限らずこのミネラルを含む動物性たん白質食品が消化される過程では、たん白質あるいはある種のアミノ酸に結合した状態で存在すると思われる。亜鉛は通常摂取した量の僅少しか吸収されない⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽²²⁾。穀・豆類に含まれるフィチンのような亜鉛の吸収に影響を与える外因性物質およびその相互作用については比較的良好に知られている⁽²³⁾⁽²⁴⁾が、食事性亜鉛の消化時あるいは吸収時前の形態の詳細は不明である。定性的に推量できる形態は、Cousins⁽²⁵⁾ の考え方に代表される、すなわち無機の亜鉛イオンおよびたん白質性物質との結合亜鉛の共存形態であるが、その実態は明らかでない。Suso ら⁽²⁶⁾ は、ニワトリ小腸内の可溶性消化物のセファデックス G-10 を用いるゲル濾過を行なっている。その溶出パターンから、亜鉛が小腸内でたん白質またはある種のアミノ酸に結合している可能性が認められる。

筆者の牛肉を用いた実験結果が示すように、たん白質がペプシン消化を受けるさいに、含まれる亜鉛の約 87% が可溶化された (Fig. 2)。そしてその可溶性亜鉛が分子量 10,000 以上のたん白質と結合していることが推定された (Fig. 4A)。一方、続くトリプシン消化時には、可溶性亜鉛の割合がペプシン消化時の半分以下に減少し、

未消化残渣中に約 56% の亜鉛が移行した (Fig. 3)。この亜鉛の存在形態の変化を引き起こす要因の一つとして、たん白質消化過程の pH 変化が考えられた。またトリプシン消化時の可溶性亜鉛は、大きく 2 成分に分画 (Fig. 4C) され、いずれも電気泳動上で早移動性を示す分子量 10,000 以上のたん白質と結合していることが明らかとなった (Fig. 5, 6)。同時に、たん白質消化過程で可溶化した亜鉛には、無機亜鉛イオンが含まれていないことがわかった。亜鉛がたん白質やある種のアミノ酸と、特定の条件下で結合しやすいことはよく知られている。West¹⁶⁾ は、pH 5.6~6.0 では被検アミノ酸の中でヒスチジンが亜鉛と高い反応性を有することを観察している。ヒスチジンに加えて、亜鉛とシステインの高い反応性を示す報告²⁷⁾もある。電気泳動上で早移動性を示した亜鉛含有たん白質成分 (Fig. 6) がヒスチジン等に富む塩基性たん白質であるか否か、またたん白質消化時ににゆえ亜鉛が数種の特定のたん白質成分にだけ検出される (Fig. 4) のか、亜鉛の栄養の有効性解明のために、これらのたん白質成分の化学的性質の検討が必要と考えられる。

亜鉛の吸収機構は、その体内代謝と密接な関係にあると推定されるにもかかわらず、明らかになっていない²⁾。一方、前述のように食事性亜鉛の吸収率は低く、かつ吸収されない大半の亜鉛は糞便に排泄される²²⁾。また小腸での亜鉛の吸収とそれを促進する低分子リガンド類 (ヒスチジンを含む)^{25)26)28)~30)}の関係は興味深い。亜鉛がたん白質性物質またはアミノ酸と結合した状態で小腸内へ流出し、そして吸収される段階で、上記の低分子リガンド類と、亜鉛担体として働いたたん白質性物質との化学的親和力が問題になると考えられる。

いずれにしても、食事性亜鉛の栄養の有効性を解明するためには、消化後のペプチドや、吸収を促進する低分子リガンド類、さらににはアミノ酸の能動輸送系とのおおの相互作用を解明することが必要と考えられる。

要 約

牛肉のたん白質消化に伴う食品亜鉛の存在形態およびその変化を検討した。牛肉のペプシン消化 3.5 時間後に、含まれる亜鉛の大半が可溶化した。一方、続くトリプシン消化 2 時間後では、可溶化した亜鉛の約 56% が再び未消化残渣に移行する結果となった。亜鉛のこの形態変化を引き起こす要因の一つとして、たん白質消化条件下の pH 変化が考えられた。牛肉のたん白質消化時に可溶化した亜鉛が、ゲル濾過の結果から、分子量 10,000 以上のたん白質に結合していることが判明した。一方、可溶性亜鉛には無機亜鉛イオンは含まれていなかった。以上の結果は、牛肉に含まれる亜鉛が、その消化時

には、亜鉛と高い反応性を示すたん白質性の物質に結合した状態で消化管内を移行することを示唆した。

この研究を行なうにあたり、古武弥人教授のご指導を心より深謝いたします。またご協力下さいました古武弥三教授および岸本律子講師に感謝します。

文 献

- 1) Prasad, A.S.: Essential Elements, in "Trace Elements and Iron in Human Metabolism," p. 251 (1978), Plenum Pub. Co. (New York)
- 2) Kotake, Y. and Inada, T.: *J. Biochem.*, **40**, 291 (1953)
- 3) Kotake, Y. and Inada, T.: *J. Biochem.*, **40**, 295 (1953)
- 4) Kotake, Y., Sotokawa, Y., Murakami, E., Hisatake, A., Abe, M. and Ikeda, Y.: *J. Biochem.*, **63**, 578 (1968)
- 5) Murakami, E. and Kotake, Y.: *J. Biochem.*, **72**, 251 (1972)
- 6) Kotake, Y., Ueda, T., Mori, T., Murakami, E. and Hattori, M.: *J. Biochem.*, **77**, 685 (1975)
- 7) Ueda, T., Goda, K., Mori, T., Murakami, E. and Kotake, Y.: *J. Biochem.*, **82**, 67 (1977)
- 8) Hendricks, D.G. and Mahoney, A.W.: *J. Nutr.*, **102**, 1079 (1972)
- 9) 国民栄養振興会・日本栄養改善学会: 栄養学雑誌, **35**, 263 (1977)
- 10) 国民栄養振興会・日本栄養改善学会: 栄養学雑誌, **36**, 39 (1978)
- 11) Mertz, W.: *J. Am. Dietet. Assoc.*, **64**, 163 (1974)
- 12) King, J.C., Raynolds, W.L. and Margen, S.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**, 1198 (1978)
- 13) Sandstead, H.H.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **26**, 1251 (1973)
- 14) Price, N.O., Bunce, G.E. and Engel, R.W.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **23**, 258 (1970)
- 15) Scott, M.L. and Ziegler, T.R.: *J. Agric. Food Chem.*, **11**, 123 (1963)
- 16) West, L.G. and Greger, J.L.: *Nutr. Rep. Int.*, **18**, 117 (1978)
- 17) Narasinga Rao, B.S., Hon, B. Sc. and Prabhavathi, T.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**, 169 (1978)
- 18) 吉野芳夫, 島田利子, 島田敏夫: 栄養と食糧, **23**, 114 (1970)
- 19) Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists (Horwitz, W. ed., 12th ed.), p. 927 (1975), Association of Official Analytical Chemists (Washington, D.C.)
- 20) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M.: *J. Biol. Chem.*, **117**, 751 (1949)
- 21) Davis, B.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
- 22) Forbes, R.M.: Studies of Zinc Metabolism, in "Newer Methods of Nutritional Biochemistry with Applications and Interpretations" (Albanese, A.A. ed.), Vol. 3, p. 339 (1967), Academic Press (New York and London)
- 23) Halsted, J.A., Smith, J.C., Jr. and Irwin, M.I.: *J. Nutr.*, **104**, 347 (1974)

- 24) Davies, N.T. : *Proc. Nutr. Soc.*, **38**, 121 (1979)
- 25) Cousins, R.J. : *Nutr. Reviews*, **37**, 97 (1979)
- 26) Suso, F.A. and Edwards, H.M., Jun. : *Nature*, **236**, 230 (1972)
- 27) Prasad, A.S. and Oberleas, D. : *J. Lab. Clin. Med.*, **76**, 416 (1970)
- 28) Schricker, B.R. and Forbes, R.M. : *Nutr. Rep. Int.*, **18**, 159 (1978)
- 29) Eckert, C.D., Sloan, M.V., Duncan, J.R. and Hurley, L.S. : *Science*, **195**, 789 (1977)
- 30) Song, M.K. and Adham, N.F. : *Am. J. Physiol.*, **234**, E99 (1978)

(昭和 55 年 5 月 14 日受理)