

牛乳のフラビンの組成に関する研究

—牛乳のフラビン誘導体の簡易定量法の確立—

宇都宮大学農学部教授 菅野 長右門

平成3年度で確立した牛乳のフラビン誘導体の簡易定量法は次の通りである。牛乳、透析牛乳あるいは乳脂肪球皮膜 (MFGM) の1.0gを3分間煮沸し、水道水で冷却後、プロナーゼを試料蛋白質の1/50量を加え、45℃で1時間インキュベートし、その量を最終的に2.0gに10mM NaH₂PO₄ (pH 5.5) で調整し、遠心分離 (12,000×g、10分) 後その上清をろ過し (0.45μm)、これの100μlを高速液体クロマトグラフィー (HPLC、SP-8700) に注入し、分離定量した。C18逆相カラム (4.6×250mm、5μm) を用い、溶出は、40℃で、90%メタノール水溶液の35%から95%までと10mM NaH₂PO₄ (pH 5.5) の65%から5%までの直線勾配で行った。流速は0.8ml/minで、溶出益の蛍光強度は励起波長462nm、蛍光波長520nmで測定した。

HPLCにおいて、フラビンアデニンヌクレオチド (FAD) は4.34分に、フラビンモノヌクレオチド (FMN) は5.65分に、リボフラビン (RF) は8.13分に溶出され (図1)、その蛍光は測定範囲内で直線であった (図2)。

牛乳を試料とした時のFAD、FMN、RFの回収率はいずれも97-99%であり、遊離フラビンを除去した透析乳でも95-100%、またフラビンに富むMFGMでも99-100%であった。方法の再現性 (SD/ \bar{X} ×100) はいずれも5%以下であり、そのHPLCにおける感度はFADで5 pmol、FMNとRFでは2 pmolであった。

本研究の特徴は、

- 1) 牛乳からのフラビンの抽出は、プロテアーゼ消化によって除タンパクと同時にを行った。すなわちトリプシンよりもプロナーゼの方が、またプロナーゼでも試料タンパク質の1/100量よりも1/50量の方が短時間 (1時間) で乳タンパク質を消化することができ、しかもフラビンの抽出率が勝っていた (図3および表1)。
- 2) FADをFMNに変換するピロホスファターゼおよびFMNをRFに変換するホスファターゼを失活させるためには、阻害剤としてEDTAを用いるよりも加熱するこ

とが最適であった。MFGMのピロホスファターゼを失活させるには3分間の煮沸が必要であった。他方、煮沸によるフラビンの分解等はHPLCで分析した限りでは認められなかった。ピロホスファターゼを失活させない試料でのFADの回収率は低く、逆にRFのそれが高い値を示した(表2)。

3) HPLCでのRF、FMN、FADの分離は、シリコンポリマーをコートしたC18逆相カラムおよび90%メタノール水溶液と10mM NaH₂PO₄ (pH 5.5)との溶出により、上記のように、3フラビンを分離することができ(図1)、しかも高い回収率を示した(表3)。

本方法によって定量された牛乳中のフラビン含量は、FADが49.0±14.8、FMNが9.1±0.9、RFが144.2±22.7 μg/100g (n=6)であった。また重量比はそれぞれ24.2±7.3、4.5±0.5、71.3±11.2%であった(表4)。

本方法で定量されたRF含量は、これまでにHPLCで測定された牛乳のRF含量、119±9 (Ashoor et al.)、128±5 (Ashoor et al.)、142 (130-155, Ribarova et al.)、および150 (Johnson et al.) μg/100gと近似していた。しかし、3フラビンの分離定量を報告しているRoughead & McCormickのRF含量は54-64 μg/100gで、全フラビンの35-61%にすぎず、その他に、FADが23-46%、10-(2'-hydroxyethyl) flavinが11-19%、マイナーな成分が含まれている。本方法と顕著に異なる点は、Roughead & McCormickの方法では、FMNが検出されず、10-(2'-hydroxyethyl) flavinが常在していることである。

次年度では、Roughead & McCormickの方法に従ってフラビンの定量を行い、これを本方法と比較し、さらに10-(2'-hydroxyethyl) flavinが出現する要因について検討することを計画している。

表1. プロナーゼおよびトリプシンで消化した乳脂肪球皮膜(MFGM)および透析乳から遊離された全フラビン量

Enzyme	Incubation at 45°C (min)	Dialyzed milk		MFGM	
		Flavin (ng/g milk)	Ratio (%)	Flavin (ng/g sample)	Ratio (%)
Diastase	90	212	100	3912	100
Trypsin	240	223	105.0±8.0	4151	106.1±8.9
Pronase	30	240	113.4±6.0	5061	116.9±0.9
	60	241	113.5±7.8	4459	114.0±5.4
	90	239	112.9±5.4	4203	107.4±8.3

試料タンパク質に対するトリプシンの量は、透析乳では1/7、MFGMでは1/4で、プロナーゼの場合には両者とも1/50であった。プロテアーゼ消化物からの抽出物はHPLCで分析され、FADとFMNはRFに補正され、ジアスターゼ法で測定された全フラビン量と比較された。MFGMのタンパク質含量は9.4 mg/mLであった。また表中の数値は平均値±SD (n=3)で示されている。

表2. 乳脂肪球皮膜(MFGM)の3フラビンの組成に及ぼす加熱処理の影響
7.53 mgのタンパク質を含む1 mLのMFGMが一定時間煮沸し、冷却し、室温に30分間放置後、プロナーゼで消化した。試料タンパク質に対するプロナーゼの量は1/50であった。各フラビンはHPLCで測定され、結果は全フラビンに対する比で示されている。

Heating time (min)	FAD		FMN		RF		Total flavin (μg/g)
	(μg/g)	(%)	(μg/g)	(%)	(μg/g)	(%)	
0.5	0.18	3.7	4.09	83.3	0.64	13.1	4.91
1	1.69	34.7	2.80	57.4	0.39	7.9	4.88
3	2.02	39.8	2.68	52.7	0.39	7.7	5.08
5	1.92	39.1	2.62	53.5	0.38	7.7	4.90
10	1.97	39.8	2.64	53.4	0.39	7.8	5.00

表3. 本方法での全乳(WM)、透析乳(DM)および乳脂肪球皮膜(MFGM)に添加した各種フラビンの回収量。

	Flavin	Flavin in sample	Flavin added	Flavin found	Recovery (%)	Reproducibility ^b (%)
		-----	ng/g	sample ^a	-----	
WM	FAD	666± 57	1250	1866±100	97.4± 5.2	5.4
	FMN	169± 22	174	328± 30	97.5± 5.0	5.2
	RF	1829±111	955	2762±166	99.2± 5.6	5.6
DM ^c	FAD	527± 39	751	1214± 31	95.0± 2.4	2.5
	FMN	65± 51	75	141± 6	100.7± 4.2	4.2
	RF	87± 7	88	169± 9	99.3± 5.1	5.1
MFGM ^d	FAD	1526± 27	2652	4238±187	101.4± 4.5	4.4
	FMN	3327± 46	1508	4942±231	102.2± 4.8	4.7
	RF	204± 5	175	380± 16	99.2± 4.2	4.2

数値は平均値±SD (n=8)で示されている。再現性は相対的標準偏差[(SD/x)100]として示してある。透析乳は透析後に煮沸した。MFGMでの数値は、5.52 mg/mLのタンパク質を含むMFGM懸濁液当たりのngで示されている。

表4. 全乳(WM)および乳脂肪球皮膜(MFGM)のフラビンの濃度およびその組成。
 数値は平均値±SD (n=6)で示されている。

Flavin	$\mu\text{g}/100\text{g}$ milk	Weight %	$\text{nmol}/100\text{g}$ milk	mol %	Relative SD (%)
Whole Milk					
FAD	49.0±14.8	24.2± 7.3	62.4±18.8	13.8±5.0	30.1
FMN	9.1± 0.9	4.5± 0.5	20.0± 2.0	4.3±0.6	10.0
RF	144.2±22.7	71.3±11.2	383.2±60.3	81.9±5.4	15.7
MFGM					
FAD	672.6±290.0	64.4±27.8	856.2±369.5	49.3±8.0	43.2
FMN	350.1± 81.3	33.5± 7.8	767.2±178.2	47.2±7.3	23.2
RF	21.3± 7.3	2.1± 0.7	56.5± 19.4	3.4±0.9	34.2

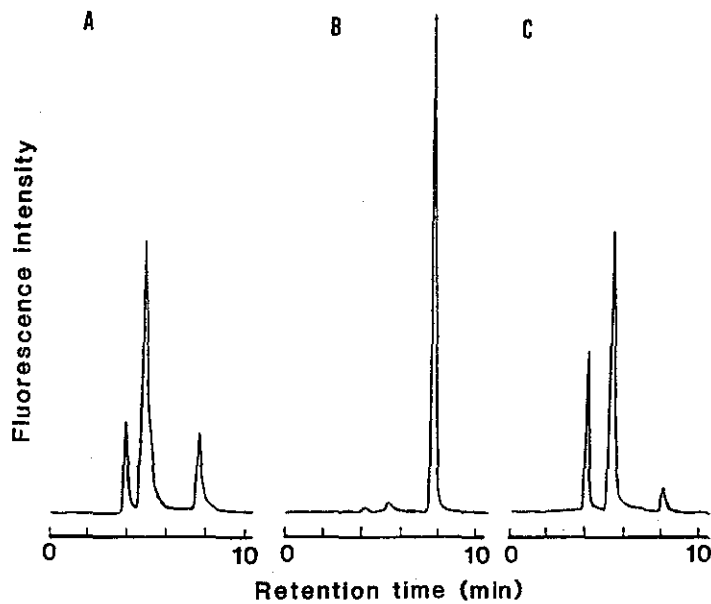


図1. フラビン標準品(A)、全乳(B)、乳脂肪球皮膜(C)フラビンの逆相カラムにおけるHPLCのクロマトグラム。
 (A)フラビン標準品(AT=16におけるFAD,107.8 pmol; FMN, 66.8 pmol; RF, 22.0 pmol)、(B)全乳フラビン(AT=64における FAD,15.3 pmol; FMN, 11.0 pmol; RF, 229.4 pmol)、(C)乳脂肪球皮膜フラビン(AT=32におけるFAD,133.6 pmol; FMN, 103.8 pmol; RF, 5.9 pmol)。AT,感度。

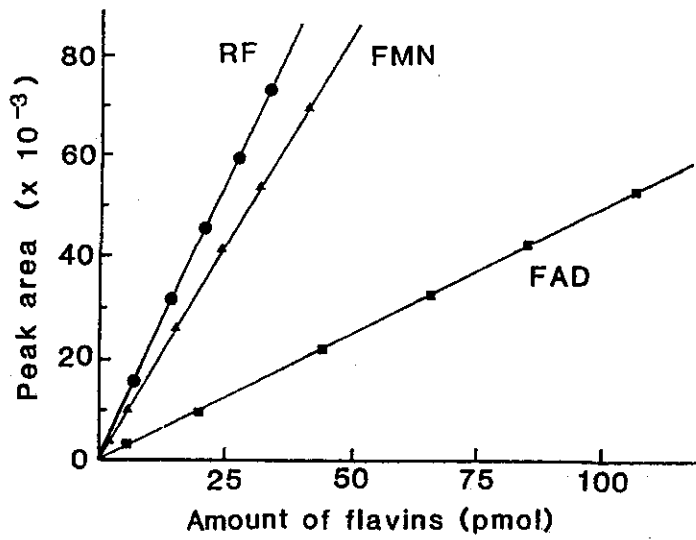


図2. 蛍光のピーク面積に対するFAD、FMNおよびRFの標準曲線。
 100 μ Lの各種フラビンが注入され、溶出されたフラビンの蛍光のピーク面積が積分されている。回帰式は、RF (pmol) = (A-0.424)/5.47; FMN (pmol) = (A-0.424)/4.22; FAD (pmol) = (A+0.85)/1.24であった。Aはピーク面積を示す。

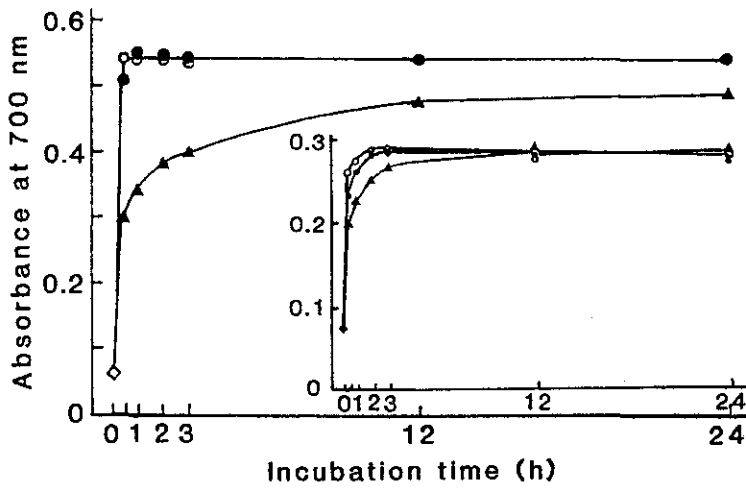


図3. 45°Cにおける透析乳および乳脂肪球皮膜(挿入図)のプロテアーゼ消化における時間の効果。
 試料タンパク質に対するプロテアーゼの比率は 1:50 (○-○)および1:100 (●-●)でトリプシンの場合は1:7 (▲-▲)である。