

# 牛乳のフラビンの組成に関する研究

## — 牛乳における

### 10-(2'-hydroxyethyl)flavin

#### について—

宇都宮大学農学部教授 菅野 長右エ門

#### 研究目的

牛乳はリボフラビン（ビタミンB<sub>2</sub>、RF）に富む食品である。牛乳にはRFの他に、その誘導体であるフラビンモノヌクレオチド（FMN）・フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）が含まれ、その大部分が遊離の形で、約15%がタンパク質と結合した形で存在している<sup>1)</sup>。フラビンはいずれもRFの形で腸管から吸収され、その後RFの補酵素型に変換したFMNやFADは生体の電子伝達系の基幹酵素である各種フラビン酵素の活性の発現に不可欠であり、これらの作用を通してRFは成長因子として機能している。

牛乳のフラビン誘導体（主にRF、FMN、FAD）の含量と組成はこれまで明確ではなく、このことを明らかにすることは栄養学的観点からも重要であり、それにはフラビン誘導体の簡易な分離・定量法を確立する必要がある。最近、Roughead & McCormick<sup>1)</sup>は牛乳に10-20%の10-(2'-hydroxyethyl)flavin (HEF)が存在し、しかもこのHEFはRFの腸管吸収を阻害するばかりでなく、flavokinaseを拮抗的に阻害することを報告している。我々は、ここ数年間に渡る牛乳のRFについての研究を通して、HEFを検出していない。むしろHEFは彼等の用いた複雑な方法により引き起こされたアーティファクトの可能性が大きいと推察されるが、彼等の方法を追試し、HEFの牛乳での存在の有無を確認する必要がある。

これまでの助成によって、牛乳のフラビン誘導体(RF、FMN、FAD、その他)を簡易に分離定量する方法を確立し<sup>2)</sup>、Roughead & McCormick<sup>1)</sup>による方法を追試し、牛乳にHEFの存在しないことを明確にした。本年度は、我々の定量法<sup>2)</sup>によ

って、1) 牛乳およびその画分における全フラビンおよび結合型フラビンの三態(RF、FMN、FAD)の含量と分布を明らかにした。

## 方 法

### 1) 牛乳の分画

牛乳は、宇大農場のホルスタイン種から分娩後経日的に採取し、超遠心分離によって(100,000xg, 90min, 4°C)、クリーム、ホエー、脱脂乳膜およびカゼイン画分とに分画した。クリームには2.5倍量の蒸留水を加えてチャーンし、バターミルクを回収して、試料とした。カゼイン画分は等量の蒸留水で分散した。

### 2) 全リボフラビンの定量

全RFは、ジアスターゼを用いるRettenmaier and Vuilleumier<sup>3)</sup>の方法で定量した。試料は50mMりん酸緩衝液(pH6.8)に対し、4°Cで60~70時間透析し、残存していたRFを結合型RFとした。

### 3) フラビンのHPLCによる分別定量

フラビンのHPLCによる分別定量は<sup>2)</sup>、試料を沸騰水中で3分間加熱処理し、プロナーゼ(1:50mg/mg, from St. griseus, Calbiochem)で40°Cで60分間消化後、遠心分離して得られた上清(200 $\mu$ l)を、SP8700LCポンプとSP4270インテグレート、CAPCELLPAK C18カラム(5 $\mu$ m, 4.5 x 250 mm)を用いて、90%メタノール(MeOH)と10mMりん酸Na(pH5.5)とで30%→86%MeOH; 8分)となる濃度勾配で、流速0.8ml/min、40°Cで分析した。

## 結果および考察

### 1) 全フラビンおよび結合型フラビンにおけるフラビン三態の変動

泌乳初期における全乳の全フラビンおよび結合型フラビンにおけるフラビン三態の含量と組成を表1に示す。

まず泌乳期を、初乳、移行乳および常乳に分類すると、全乳の全フラビンにおけるRFとFAD含量は、1~3日の初乳において著しく高く、RFは0.72 $\mu$ mole/100g、FADは0.08 $\mu$ mole/100g牛乳で、4日目まで直線的に減少し、その後ほぼ一定値

(RFは $0.33 \mu\text{mole}/100\text{g}$ 、FADは $0.06 \mu\text{mole}/100\text{g}$ )に達する傾向が認められた。それに対して、FMNは初乳前半(1~3日)の $0.08 \mu\text{mole}/100\text{g}$ から初乳後半(4~7日)の $0.14 \mu\text{mole}/100\text{g}$ にかけて上昇し、そして常乳での一定値の $0.10 \mu\text{mole}/100\text{g}$ に達する傾向が認められた。

全フラビンにおけるフラビン三態の組成は初乳前半でFAD、FMN、RFがそれぞれ12.8、11.0、76.2%で、常乳ではそれぞれ9.5、21.5、69.0であった。FADの組成割合は泌乳期を通じて大きな差は認められなかったが、FMNの組成割合は、初乳前半よりも(11%)初乳後半に増加し(27%)、その後一定値に達した(21.5%)。FMNの増加に伴って、RFの組成は泌乳前半の76%から初乳後半の60%に下降し、移行乳63%、常乳の69%と変動する傾向が認められた。

結合型フラビンの割合は、全体として13~18%で、特に初乳後半においてやや高い傾向は認められるが、有意な差ではなかった。結合型フラビンにおけるフラビン三態の組成は、全般的に、FADが顕著に高く71~80%を占め、FMNが11~18%、RFが5~17%であったが、泌乳期による有意な差は認められなかった。結合型フラビンの割合では、FADの76~98%が結合していて、初乳前半(76%)から移行乳(98%)にかけて増加する傾向が認められたが、これらは有意な差ではなかった。FMNの結合率は8~13%で、RFのそれは1~3%で、FADのそれよりも非常に低かった。

## 2) フラビン三態の牛乳画分における含量と分布

常乳を超遠心分離によりクリーム、ホエー、脱脂乳膜およびカゼイン画分に分画し、全フラビン含量を測定し、それらの組成および結合率を算出した。その結果を表2に示す。

常乳における全フラビンに占めるRFの割合は、全乳で69%であるのに対して、バターミルクでは63%を占めているが、その他の画分では5~11%にすぎなかった。FMNの分布に大きな差はなく、全フラビンにおける割合は、全乳の22%に対して、いずれの画分においても13~23%であった。RFおよびFMNの分布もバターミルク画分で低いが(それぞれ23および13%)、その他の画分ではそれぞれ平均72%および

22～23%（脱脂乳膜を除く）を占めていた。RFの63%はホエーに分布し、その大部分は遊離型で存在していた<sup>4)</sup>。

結合型フラビンの組成のうち、FADがホエーで72%を、バターミルクで45%、脱脂乳膜で52%、カゼイン画分で45%を占めているが、結合型FAD/全FADの割合はそれぞれ62、76、48および94%である。FMNは、ホエーやカゼイン画分（それぞれ12および21%）よりも脱脂乳膜とバターミルク画分では増加（それぞれ43および35%）している。結合型フラビンにおけるRFの割合はバターミルク画分で高く（37%）、その他の画分では低い（0.7～6%）。特に、FADの全結合型フラビンに占める割合は高く、常乳では90%であった。これは、バターミルクおよび脱脂乳膜画分の乳脂肪球膜に存在するキサンチンオキシダーゼ分子を構成しているFADに起因している。

## 要 約

RFが全泌乳期を通じてほぼ60%以上を占めていたが、泌乳期の進行につれてFMNの割合の増加およびFADとRFの減少の傾向が認められた。他方、結合しているフラビンの全含量は泌乳期の進行につれてわずかながら減少する傾向が認められるが、その70～80%はFADが占め、残りはRFとFMNで、FMNは泌乳期の進行とともに増加した。

常乳における全フラビンに占めるRFの割合は、バターミルクを除いた画分では70%以上を占めているが、バターミルクではFADが約63%を占めて、FMNは各画分とも13～23%で大きな差はなかった。全乳のRFの63%はホエーに分布し、その大部分は遊離型で存在していた。

## 結 論

Roughead & McCormick<sup>1)</sup>は、牛乳にはHEFが存在し、FMNは検出されず、全フラビンに対するRFの比率が減少していることを報告している。これらはこれまでの報告とかなり異なっている。我々が昨年度にRoughead & McCormick法<sup>1)</sup>を追試した実験においても、FMNは検出されるが、HEFは検出されないことを確認した。

更に、泌乳期を通して、全乳ならびに分画した画分におけるフラビンの分別定量を行った。しかし、この詳細な実験でもRoughead & McCormick<sup>1)</sup>によって指摘されたような、1) FMNは検出されない、2) 牛乳にHEFの様なアンチビタミン効果を持つ物質が存在するという事は確認することはできなかった。

また定量法を、国際誌であるJ. Food Scienceに投稿したところ、レフリーにより、Roughead & McCormick<sup>1)</sup>との差を指摘されたが、我々の主張が認められ、印刷されることになった<sup>2)</sup>。

我々の結論は、牛乳にはHEFの様なアンチビタミン効果を持つ物質は存在しない、ということである。

## 文 献

- 1) Roughead, Z. K. & D. B. McCormick, J. Nutr., 120, 382-388(1990)
- 2) Kanno, C., K. Shirahuji, & T. Hoshi, J. Food Sci., 56, 678-681(1991)
- 3) Rettenmaier, R. & J. P. Vuilleumier, Int. J. Vit. Nutr. Res., 53:32-35(1983)
- 4) Kanno, C., N. Kanehara, K. Shirahuji, R. tannji, & T. Imai, J. Nutr. Sci. Vitaminol., 37, 15-27(1991)

表 1. 泌乳初期の全乳の全フラビンおよび結合型フラビンにおける各フラビン三態の含量と組成

泌乳 日数	フラビン	全フラビン		結合型フラビン		結合型フラビン の割合 (%)
		$\mu$ mole/ 100 g milk	組成 (%)	$\mu$ mole/ 100 g milk	組成 (%)	
1-3 (n=9)	FAD	0.11±0.03	12.8±1.8	0.084±0.030	71.9±9.9	75.9±19.2
	FMN	0.08±0.04	11.0±7.3	0.015±0.011	11.3±5.5	12.5±9.9
	RF	0.72±0.39	76.2±8.6	0.024±0.020	16.8±9.4	3.1±2.1
	Total	0.91±0.39	—	0.122±0.057	—	13.8±5.1
4-7 (n=11)	FAD	0.07±0.03	13.5±2.8	0.060±0.018	79.7±9.7	87.1±12.9
	FMN	0.14±0.04	27.0±4.7	0.010±0.006	12.6±5.5	7.7±4.6
	RF	0.31±0.08	59.5±6.1	0.006±0.005	7.7±5.8	1.9±1.5
	Total	0.52±0.13	—	0.076±0.023	—	17.7±3.1
8-14 (n=12)	FAD	0.06±0.01	11.2±2.7	0.056±0.018	79.9±8.4	97.6±19.7
	FMN	0.13±0.02	25.7±3.1	0.013±0.009	15.2±7.4	10.1±7.6
	RF	0.33±0.06	63.1±3.7	0.004±0.002	4.9±2.0	1.2±0.8
	Total	0.51±0.08	—	0.072±0.028	—	14.2±5.6
20-30 (n=6)	FAD	0.05±0.01	9.5±1.2	0.040±0.008	70.6±12.1	90.3±26.2
	FMN	0.10±0.01	21.5±3.7	0.012±0.007	17.6±7.4	11.4±8.0
	RF	0.34±0.10	69.0±4.6	0.008±0.008	11.8±8.9	3.0±3.6
	Total	0.49±0.10	—	0.060±0.020	—	13.4±7.3

表2. 常乳の各画分における全フラビンと結合型フラビンの含量と組成の分布

牛乳画分 および フラビン	全フラビン		結合型フラビン		結合型フラビン の割合 (%)
	含量 $\mu$ mole/100 g milk	組成 (%)	含量 $\mu$ mole/100 g milk	組成 (%)	
Whole milk (n=6)					
FAD	0.046 $\pm$ 0.010	9.5 $\pm$ 1.2	0.040 $\pm$ 0.008	70.6 $\pm$ 12.1	90.3 $\pm$ 26.2
FMN	0.103 $\pm$ 0.014	21.5 $\pm$ 3.7	0.012 $\pm$ 0.007	17.6 $\pm$ 7.4	11.4 $\pm$ 8.0
RF	0.341 $\pm$ 0.090	69.0 $\pm$ 4.6	0.008 $\pm$ 0.008	11.8 $\pm$ 8.9	3.0 $\pm$ 3.6
Total	0.490 $\pm$ 0.104	—	0.060 $\pm$ 0.020	—	13.4 $\pm$ 7.3
Butter milk (n=3)					
FAD	0.011 $\pm$ 0.004	63.3 $\pm$ 2.6	0.008 $\pm$ 0.005	45.3 $\pm$ 30.4	76.3 $\pm$ 42.0
FMN	0.003 $\pm$ 0.003	13.4 $\pm$ 8.4	0.008 $\pm$ 0.007	34.8 $\pm$ 20.4	21.5 $\pm$ 59.4
RF	0.004 $\pm$ 0.001	23.2 $\pm$ 7.8	0.004 $\pm$ 0.005	19.9 $\pm$ 18.7	36.6 $\pm$ 169.
Total	0.017 $\pm$ 0.007	—	0.021 $\pm$ 0.012	—	91.2 $\pm$ 22.2
Whey (n=6)					
FAD	0.013 $\pm$ 0.005	4.7 $\pm$ 2.2	0.008 $\pm$ 0.005	71.7 $\pm$ 10.6	61.7 $\pm$ 27.3
FMN	0.065 $\pm$ 0.015	22.8 $\pm$ 3.3	0.001 $\pm$ 0.001	12.3 $\pm$ 8.8	2.3 $\pm$ 2.1
RF	0.214 $\pm$ 0.071	72.5 $\pm$ 3.4	0.002 $\pm$ 0.001	15.9 $\pm$ 11.9	0.7 $\pm$ 0.3
Total	0.292 $\pm$ 0.086	—	0.011 $\pm$ 0.005	—	4.0 $\pm$ 2.1
Skim milk membrane (n=2)					
FAD	0.003 $\pm$ 0.000	11.3 $\pm$ 1.0	0.003 $\pm$ 0.001	52.4 $\pm$ 13.1	48.3 $\pm$ 4.5
FMN	0.004 $\pm$ 0.000	16.7 $\pm$ 3.6	0.002 $\pm$ 0.001	42.9 $\pm$ 12.2	46.9 $\pm$ 1.3
RF	0.019 $\pm$ 0.005	72.0 $\pm$ 4.6	0.000 $\pm$ 0.000	4.7 $\pm$ 3.5	1.4 $\pm$ 1.1
Total	0.026 $\pm$ 0.005	—	0.006 $\pm$ 0.002	—	14.2 $\pm$ 0.6
Casein (n=6)					
FAD	0.006 $\pm$ 0.002	5.9 $\pm$ 1.0	0.005 $\pm$ 0.001	45.9 $\pm$ 6.0	94.3 $\pm$ 33.8
FMN	0.022 $\pm$ 0.005	22.6 $\pm$ 8.9	0.002 $\pm$ 0.001	20.6 $\pm$ 7.3	10.8 $\pm$ 2.8
RF	0.080 $\pm$ 0.032	71.4 $\pm$ 9.0	0.004 $\pm$ 0.002	33.5 $\pm$ 10.5	5.6 $\pm$ 2.7
Total	0.109 $\pm$ 0.035	—	0.012 $\pm$ 0.002	—	12.0 $\pm$ 4.1