

卵白中ビタミンB₂量の検討

—ビタミンB₂三型の分布について—

小 林 ミ サ ヲ
恩 田 京 子

緒 言

卵白中の蛋白質含量は多く、それらに分布する各種アミノ酸の等電点の異なることからある種の蛋白質と特異的に結合するビタミンB₂（以下B₂と略称）^{1),2)}の分離定量は難しい。前報において貯蔵並びに加熱によるB₂総量の変化につき検討したが、その詳細なる機構については不明である。B₂量については堀田ら³⁾により1953年に検討がなされ、その三型分布においてFR^{※1)}単独の存在を報告している。また金森ら⁴⁾、Bain⁵⁾らはコンアルブミンとB₂の結合を論じその結合形態について明らかにしているが、FRとの結合を論じているのみである。

本研究は卵白蛋白質におけるB₂の存在形態を明らかにし、鶏卵の栄養価値判定の一助とするため、まず卵白蛋白質よりB₂の分離、更にはB₂の存在形態すなわちFRのみならず^{※2)}FMN、^{※3)}FADの存在につき検討したのでその詳細を報告する。

実 験 材 料

卵：個体差をなくするためと、卵質を一定にするために、市販成鶏用完全配合飼料により飼育された生後1～1.5年の白色レグホーン種の鶏三羽を選び、秋期間^{※4)}それらより1日1個ずつ10日間計30個を採取し、4°Cの冷蔵庫内に貯蔵、少くとも産卵後1週間以内に実験に供した。なお個体別に1個ずつ同時に測定し、計10回実験を行った。

実 験 方 法

(1) B₂総量の定量

B₂総量の定量はB₂が酸性側で蛋白と遊離すること、オボアルブミンの等電点がPH 4.6～4.8⁶⁾であることを考慮に入れ、一定量に希釈の後PH 4.7に調整しルミフラビン⁷⁾蛍光法により測定した。その詳細を示せば表1のごとくである。

- ※ 1) FR=Free Riboflavin
- ※ 2) FMN=Flavin Mononucleotide
- ※ 3) FAD=Flavin Adenine Dinucleotide
- ※ 4) 41年10月1日～10日

表1 卵白中B₂総量の定量

卵白(1ケ分)+H₂O *aml* → homogenize $\xrightarrow{+H_2O}$ *bml* (7倍稀釈) → pH4.7 (N・HCl) → 80°C, 15分
 (温水浸出) → 遠沈 (3,000r. p. m., 10分) → 上清 $\left\{ \begin{array}{l} \boxed{2 \text{ 倍稀釈}} \\ 2 \text{ ml} \longrightarrow \text{Sample (総量)} \\ \text{残液} \longrightarrow \text{分画定量} \end{array} \right.$

	Addition	Sample	Blank
Sample	1.0	1.0	1.0
H ₂ O	—	1.0	1.0
FR 0.4γ sol.	1.0	—	—
N・NaOH	2.0	2.0	CH ₃ COOH 0.2
	光 分 解	30分	
CH ₃ COOH	0.2	0.2	N・NaOH 2.0
CHCl ₃	7.0	7.0	7.0
振盪、遠沈 3,000 r. p. m., 10分			
Cuvett	5.0	5.0	5.0
fluorometer	A	S	B

$$\text{(計算)} \quad FR \gamma/g = 0.4 \times \frac{S-B}{A-S} \times \frac{7}{1} \times \frac{4}{2}$$

(2) B₂の分画定量

同じく八木らのペーパークロマトグラフィーを用いる方法⁸⁾によった。

すなわち、総量に使用した試料残液にて常法に従い硫酸添加、フェノール濃縮を行った。B₂の塗布は東洋濾紙No.51 (40×4 cm) を使用し、下端より4 cmのところを原点とし、ペーパーの蛍光測定に要する最低塗布量0.078 mlを標準として直径0.5 cmの円内に塗布した。対照としてFAD、FMN、FRの10γ溶液を同量ずつ混合、同じペーパー上に隣接してマイクロピペットにて塗布し比較した。また展開溶媒には一般にB₂誘導体の分画定量に用いられている溶媒の中から R_f 値が比較的離れており、三型分布の確認が容易なもの、すなわち n-ブタノール : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 5 (v/v)、n-ブタノール : n-プロパノール : 水 = 2 : 2 : 1 (v/v)、n-ブタノール : アセトン : イソプロパノール : 飽和硼酸水溶液 = 50 : 15 : 15 : 30 (v/v) の三種を選び上昇法により比較検討した。分画定量の詳細、B₂の塗布及び展開条件の様式を示せば表2、図1のごとくである。

表2 卵白中B₂の分画定量

卵白(1ケ分)+H₂O *aml* → homogenize $\xrightarrow{+H_2O}$ *bml* (7倍稀釈) → pH4.7 (N・HCl) → 80°C, 15分

(温水浸出) → 遠沈 (3,000 r. p. m., 10分) → 上清 $\left\{ \begin{array}{l} 2 \text{ ml} \xrightarrow{2 \text{ 倍稀釈}} \text{総量} \\ \text{残液} \longrightarrow \text{分画定量} \end{array} \right.$

残液 + 硫酸 (12 g / 20ml) $\xrightarrow{\text{濾過}}$ 濾液 + フェノール 15ml → 振盪 遠沈 → フェノール層 + エーテル 30ml + H₂O 0.2ml → 振盪、遠沈 → 水層をペーパー上に塗布 → 展開 (18時間) 風乾、各々のスポットを切る → 定量

	FAD	FMN	FR	B
H ₂ O	2.0	2.0	2.0	2.0
N·NaOH	2.0	2.0	2.0	2.0

光分解 30分

CH ₃ COOH	0.2	0.2	0.2	0.2
CHCl ₃	7.0	7.0	7.0	7.0

振盪、遠沈 3,000 r. p. m., 10分

Cuvett	5.0	5.0	5.0	5.0
fluorometer	f ₁ (50)	f ₂	f ₃	f ₄

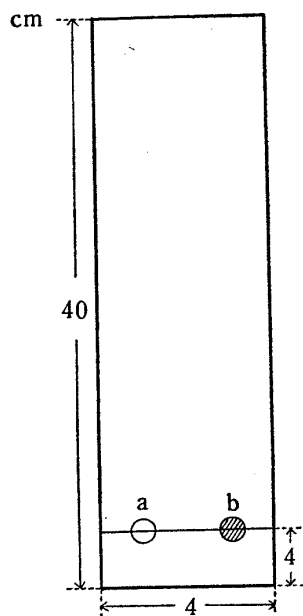
(計算)

$$\text{FAD}(\%) = \frac{(f_1 - f_4) \times 100}{(f_1 - f_4) + (f_2 - f_4) + (f_3 - f_4)}$$

$$\text{FMN}(\%) = \frac{(f_2 - f_4) \times 100}{(f_1 - f_4) + (f_2 - f_4) + (f_3 - f_4)}$$

$$\text{FR}(\%) = \frac{(f_3 - f_4) \times 100}{(f_1 - f_4) + (f_2 - f_4) + (f_3 - f_4)}$$

図1 B₂の塗布及び展開条件



$\left\{ \begin{array}{l} \text{a : standard} \\ \text{b : sample} \end{array} \right.$

(展開条件)

$\left\{ \begin{array}{l} \text{上昇法} \\ \text{室温 18 時間} \end{array} \right.$

(展開溶媒)

$\left\{ \begin{array}{l} \text{(A) n-ブタノール : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 5 (v/v)} \\ \text{(B) n-ブタノール : n-プロパノール : 水 = 2 : 2 : 1 (v/v)} \\ \text{(C) n-ブタノール : アセトン : イソプロパノール : 飽和硼酸水溶液} \\ \quad \quad \quad = 50 : 15 : 15 : 30 (v/v) \end{array} \right.$

実験結果

(1) B₂含量の比較

前記の方法に従い、個体別に1個ずつ計10回B₂量を測定した。その結果を示せば表3のご

とくである。

すなわち、総量はNo.1の卵では4.2 γ /g、No.2では4.1 γ /g、No.3では4.4 γ /gとなり、平均4.2 γ /gという結果を得た。

B₂の三型分布においては、展開溶媒が(A)では FAD 32.4%、FMN32.1%、FR 35.6%であり、(B)では FAD 32.4%、FMN 31.3%、FR 36.5%であった。また(C)では FAD 32.2%、FMN 31.9%、FR 35.9%となり、三種とも平均 FAD 32.0%、FMN 31.5%、FR 36.0%前後という結果を得た。

表3 卵白中B₂量の比較 (X=10)

卵No.	展開溶媒 三型値 (%) 総量(γ /g)	(A) n・ブタノール:酢酸:水 =4:1:5 (v/v)			(B) n・ブタノール:n・プロ パノール:水=2:2: 1 (v/v)			(C) n・ブタノール:アセトン: イソプロパノール:飽和 硼酸水溶液 =50:15:15:30(v/v)		
		FAD	FMN	FR	FAD	FMN	FR	FAD	FMN	FR
1	4.2	31.2	32.2	36.7	33.0	31.4	35.4	31.1	31.4	37.5
2	4.1	33.0	32.2	35.0	31.2	30.3	38.7	33.3	30.5	36.3
3	4.4	32.9	32.0	35.1	32.6	32.1	35.4	32.3	34.0	33.8
平均	4.2	32.4	32.1	35.6	32.4	31.3	36.5	32.2	32.0	35.9

(2) Rf 値の比較

三型の Rf 値を対照のそれと比較した値を表4に示した。

表4 卵白中B₂三型の Rf 値の比較

展開溶媒		FAD	FMN	FR
(A)	Standard	0.03	0.10	0.30
	Sample	0.03	0.10	0.25
(B)	Standard	0.00	0.04	0.20
	Sample	0.00	0.04	0.20
(C)	Standard	0.06	0.15	0.34
	Sample	0.06	0.15	0.29

これより展開溶媒(A)と(C)のFRが対照のそれよりやや低い値を示したが、FAD、FMNは

対照のそれと一致した。

考 察

以上のごとく卵白中のB₂総量、更にB₂の三型分布につき検討した結果、卵白中にはFRだけでなくFAD、FMNも存在していることがわかった。

先に堀田³⁾らは各種鳥類卵のB₂含有量について検討し、例外なく全部遊離型でありエステル型、すなわちFADやFMNは全然ないと述べているが、本実験においてはFRと同様FAD、FMNにも明らかな存在を認めた。この事実はB₂が生体内で活性化されてFRからFMN、FADとなりその作用を発揮することを考慮すれば鶏卵の栄養効率を論ずる上に大いに意義あることと思われる。

また前田⁴⁾ら、Bain⁵⁾らはコンアルブミンとB₂の結合形態をFRのみとしているが、これはコンアルブミンの単離過程における諸因子の影響も考えられるので、この点については更に検討を加える必要がある。

なお、B₂総量を左右すると思われる蛋白質の分解率との関係、並びに新鮮度による三型比率の変化については今後更に検討を加える予定である。

結 論

卵白中B₂量の三型分布につき検討した結果、卵白中にはFRだけでなく、FRとほぼ等量のFMN、FADの存在することが判明した。

本文の要旨は第12回家政学会中部支部会にて発表した。

文 献

- 1) 小林ミサヲ：本学紀要，1，199（1965）
- 2) 小林ミサヲ，恩田京子，本学紀要2，1（1966）
- 3) 堀田一雄，坂井一男：現代医学，3（1），65（1953）
- 4) 金森正雄，前田一郎：農化，32，337（1958）
- 5) J. A. Bain, H. F. Deutsch：J. Biological. Chem., 172，547（1948）
- 6) H. L. Fevold：Advances in Protein Chem., Vol. VI（1951）
- 7) K. Yagi：J. Biochem., 43，635（1956）
- 8) K. Yagi, H. Kondo, J. Okuda., J. Biochem., 51（3），231（1962）