酵素法による生あん中のシアン配糖体 (シアン化水素として)の分析法 及び実態調査

(昭和 57 年 12 月 23 日受理)

有賀孝成* 冠 政 光* 中里光男*
藤沼賢司* 西島基弘* 直井家壽太*

Analysis and Survey of Cyanogenic Glucoside (as Hydrogen Cyanide) in Bean Paste by Enzymatic Assay

Takanari ARIGA, Masamitsu KANMURI, Mitsuo NAKAZATO,
Kenji FUJINUMA, Motohiro NISHIJIMA and Yasuta NAOI

(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 24-1, Hyakunincho 3-chome,
Shinjuku-ku, Tokyo, Japan)

A method for the determination of cyanogenic glucoside in bean paste (*nama an*) used in Japanese cakes was established by enzymatic assay. The sample was adjusted to pH 5.0 with citrate buffer and incubated with 2 units of the enzyme (linamarase) for 3 hours. The cyanogenic glucoside was thus hydrolyzed to free cyanide, which was estimated, after steam distillation, by the pyridine-pyrazolone method. The enzyme was obtained by ammonium sulfate fractionation of the aqueous extract from butter beans.

The detection limit by this procedure was 0.3 ppm linamarin (as hydrogen cyanide) in bean paste. The recovery of linamarin added at 20 ppm (as hydrogen cyanide) to the bean paste was more than 92%.

A survey of commercial bean paste by the use of the presented method revealed levels of 0.3 to 97 ppm (as hydrogen cyanide) in 46 out of 115 samples. The presented method is believed to be suitable for the quantitative determination of residues of naturally occurring cyanogenic glucoside in bean paste.

(Received December 23, 1982)

Key words: 生あん bean paste (*nama an*); シアン配糖体 cyanogenic glucoside (*Phaseolus lunatus* Linn.); リナマリ linamarin; シアン化水素 hydrogen cyanide; ピリジン・ピラゾロン法 pyridine-pyrazolone method; グリコシダーゼ glycosidase

生あんの原料として、バター豆、ベビーライマ豆及びサルタニ豆など各種の豆類が東南アジアなどから輸入されている。これらはいずれも *Phaseolus lunatus* Linn. に属し¹⁾、リナマリ及びロタウストラリンなどのシアン配糖体を含有している²⁾。これらのシアン配糖体は製あん工程で、豆自身に含有されている酵素リナマラーゼにより加水分解され、シアン化水素を遊離する³⁾ことから、豆類及び生あんは食品衛生法で成分規格が定めら

れ、それぞれ、シアン化合物の分析法及び検出法の他に生あんの製造基準が呈示されている⁴⁾。従来、この製造方法によればシアン化合物は除去され生あんに残存することはない^{5), 6)}と考えられてきた。しかし、生あんについてはその検出法が遊離シアンを対象としているため、成分規格に適合した生あんであってもシアン配糖体が残存している可能性が考えられる。また、生あんにシアン配糖体が残存した場合、摂取した後分解してシアン化水素を遊離する⁷⁾ことも考えられることから、生あん中の

* 東京都立衛生研究所：東京都新宿区百人町 3-24-1

シアン化合物については遊離シアンの他に、シアン配糖体についても留意する必要がある。

そこで著者らは、生あんに残存する原料由来のシアン配糖体の含有量を知るため、生あんにシアン配糖体含有豆から調製した粗酵素を加え、シアン配糖体を加水分解し、遊離するシアン化水素を測定する方法を検討したところ良好な結果が得られた。また、本法を用いて生あんのシアン化合物の含有量を調査したのでその結果を併せて報告する。

実験方法

1. 試料

赤あん75検体、白あん40検体、合計115検体の生あんに分析に供した。

2. 試薬

1) クエン酸緩衝液: クエン酸 128.1 g 及び水酸化ナトリウム 64.4 g を水に溶解して 1 L とし、用時、水で 10 倍に希釈し、pH 5.0 に調整して使用した。

2) リン酸緩衝液: リン酸一カリウム 3.40 g 及びリン酸二ナトリウム 3.35 g を水に溶解して 1 L とし、pH 6.8 に調整して使用した。

3) クロラミンT溶液: クロラミン T 1.25 g を水に溶解して 100 ml とした。

4) ピリジン・ピラゾロン試液: 1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン 0.25 g を 75° の温水 100 ml に溶解し、冷後、0.1% ビス-(1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン) ピリジン溶液 20 ml を混和した。

5) 5.0 mM リナマリン溶液: サルタニ豆から分離精製したリナマリン 61.8 mg をクエン酸緩衝液に溶解して 50 ml とした。なお、本液は冷暗所で保存した。

6) シアン標準溶液: シアン化カリウム 251 mg を水に溶解して 100 ml とした後、0.01 N 硝酸銀溶液でシアン含有量を標定した。次に、シアン化水素 10 mg 相当量を分取し、4% 水酸化ナトリウム溶液 100 ml を加えた後、水を加えて 1 L としたものをシアン標準原液とした。用時、シアン標準溶液を水で10倍に希釈してシアン標準溶液として使用した。なお、本液 1 ml 中には 1 µg のシアン化水素を含有する。

7) 硫酸アンモニウム: 和光純薬工業(株)製、酵素抽出用を用いた。

8) セルロースチューブ: Visking 社製

9) シリカゲル: Kiesel Gel 60, 40~60 µm (メルク社製)

10) カラムクロマトグラフィー (CC) 用シリカゲル: Kiesel Gel 60, 230~400 µm (メルク社製)

11) 薄層クロマトグラフィー (TLC) 用プレート: Kiesel Gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm (メルク社製)

特にメーカー名、品質を記載してない試薬はいずれも和光純薬工業(株)製、特級品を用いた。

3. 装置

- 1) 自記分光光度計: (株)日立製作所製 EPS-3T 型
- 2) 赤外分光光度計: (株)日立製作所製 285 型
- 3) 核磁気共鳴装置: 日本電子(株)製 JNM-FX 270 型
- 4) 遠心分離機: (株)トミー精工製 RD-20 II 型
- 5) コンプレッサー: 蕪木科学器械工業(株)製 KRK ミニボン

4. リナマリンの分離精製

粉碎したサルタニ豆 100 g にメタノール 1 L を加えて 1 昼夜浸漬した後、グラスウールでろ過した。残渣にメタノール 1 L を加えて同様の操作を 2 回行った。ここに得たろ液を合わせ、減圧下で溶媒を留去した後、残留物にメタノール 30 ml を加えてよく振とうし、ろ過した。ろ液にシリカゲル 3 g を加え、減圧下で溶媒を留去し、CC 用試料とした。次に、ガラスカラム管 (5×30 cm) に少量のグラスウールをつめ、海砂を約 1 cm、次いで CC 用シリカゲルをクロロホルム-メタノール (5:1) 混液で約 15 cm 充てんして調製したカラムに CC 用試料をのせ、クロロホルム-メタノール (5:1) 混液をコンプレッサーで加圧しながら流速 40 ml/min で流し、溶出液を 20 ml ずつ分取した。各 CC 画分のそれぞれ 5 µl を TLC 用プレートに塗布し、クロロホルム-メタノール (5:1) 混液で約 10 cm 展開後、20% 硫酸を噴霧し、電熱器にかざして R_f 0.2 付近に黒かっ色のスポットを呈する CC 画分を合わせ、溶媒を留去した。残留物にメタノール 10 ml を加えて溶解した後、さらにシリカゲル 0.5~1 g を加え、溶媒を留去して CC 用試料とし、先に示したと同様の CC 及び TLC を行った。TLC で R_f 0.2 付近に単一のスポットを呈する CC 画分は合わせ、スポットが単一でない CC 画分については再度同様の操作を行った。TLC で単一のスポットを示すすべての CC 画分を合わせ、溶媒を留去した後、エタノール-*n*-ヘキサン (1:1) 混液で再結晶した。

5. 粗酵素液の調製

細砕したバター豆 800 g に水 4 L を加えて 4° で 18 時間放置した後、4° で 25,000×g、20 分間遠心分離して上澄液を分取し粗抽出液とした。粗抽出液に硫酸アンモニウムを 60% 飽和になるように加え、4° で 1 時間放置した後、遠心分離して上澄液を分取した。上澄液にはさらに硫酸アンモニウムを加え 70% 飽和とし、同様に放置した後遠心分離し、得られた沈殿物を少量の水でセルロースチューブに移し、約 20 時間流水透析を行った。透析内液は遠心分離した後、上澄液を分取し、粗酵素液とした。粗酵素液は -20° で凍結して保存し、用時、必要量を室温で溶解して使用した。

6. 酵素活性の測定

5.0 mM リナマリン溶液 1.0 ml にクエン酸緩衝液 3.5 ml を加え、30° で 5 分間放置し、粗酵素液 0.5 ml

を加え、30° で 15 分間放置した後、エタノール 10 ml を加えて反応を停止した。これに 0.05 N 水酸化ナトリウム溶液 3.5 ml を加えて pH を 6.8 付近に調整した後、水を加えて 20 ml とした。以下の操作は 7. (2) の項に述べる方法で遊離したシアン化水素量を測定し、酵素単位を求め、1 単位をリナマリンから 1 分間に 1 μ mol のシアン化水素を遊離する酵素量として表した。

7. シアン化合物の試験法

1) 試験溶液の調製

i) 総シアン：試料 5~25 g の一定量を 500 ml の二けいフラスコに秤取し、クエン酸緩衝液 50 ml 及び粗酵素液 2 単位を加え、密栓して 25° で 3 時間放置した後、クエン酸緩衝液 50 ml を加え、水蒸気蒸留を行った。なお、冷却器の先端にはボールフィルター (G2) を取付け、あらかじめ 1% 水酸化ナトリウム溶液 30 ml を入れた受器にボールフィルターの部分が液面下になるように装置し、留液が 90 ml になるまで蒸留した。留液は 10% 酢酸で中和後、水で 100 ml とし総シアン用試験溶液とした。

ii) 遊離シアン：試料 25 g を秤取し、クエン酸緩衝液 100 ml を加えた後、直ちに水蒸気蒸留を行った。留液は 10% 酢酸で中和後、水で 100 ml とし遊離シアン用試験溶液とした。

2) 測定

総シアン用試験溶液及び遊離シアン用試験溶液のそれぞれ 1~20 ml を分取し、水を加えて 20 ml とした後、リン酸緩衝液 10 ml 及びクロラミン T 溶液 0.25 ml を加え、直ちに密栓して静かに混和し、5 分間放置した後、ピリジン・ピラゾロン試液 15 ml を加え 20 分間放置し、波長 620 nm で吸光度を測定した。

シアン標準溶液 1~7 ml を同様に操作し、得られた検量線によりシアン化水素量を算出した。なお、総シアン量は空試験値を差し引いて求めた。

生あん中のシアン配糖体 (シアン化水素として) の含有量は総シアン含有量から遊離シアン含有量を差し引いて求めた。

結果及び考察

1. リナマリンの加水分解酵素

生あん中のシアン配糖体を酵素法によって分析するためには原料豆に含有されているシアン配糖体の大部分を占めるリナマリンを分解する酵素を得る必要がある。そこで、基質としてサルタニ豆から分離精製したリナマリンを用い、バター豆、ベビーライマ豆及びサルタニ豆から調製した粗酵素の他に、市販されている酵素剤 (アントシアナーゼ、ナリンギナーゼ、ヘスペリジナーゼ、ペクチナーゼ、スクラーゼ及びエムルシンなど) についてリナマリンに対する酵素活性を調査した。すなわち、シアン化水素として 300 μ g のリナマリンにクエン酸緩衝液 50 ml を加え、酵素剤 0.5 g を添加し、25° で 5 時間反

応させた。その結果、ナリンギナーゼ及びペクチナーゼには明らかな酵素活性が認められたが、リナマリンの分解率は 40~50% 程度であった。また、アミグダリンを加水分解するエムルシンには全く活性が認められず、その他の酵素剤もリナマリンの分解率はいずれも 5% 以下であった。これに対して、バター豆、ベビーライマ豆及びサルタニ豆から調製した粗酵素ではいずれもリナマリンの分解率はほぼ 100% であった。また、シアン配糖体含有豆から調製した粗酵素液に含まれているリナマラーゼはリナマリンの他にロタウストラリンも分解することが報告されている²⁾。これらのことから、酵素は製あん原料として多く用いられているバター豆から調製することとした。

2. リナマリンの分離精製

リナマリンの抽出は粉碎したサルタニ豆をメタノールに 1 昼夜浸漬する方法で 3 回抽出を行い、分離精製は短時間で優れた分離能を示すフラッシュクロマトグラフィー³⁾で行った。各 CC 画分中のリナマリンの確認は Bissett ら⁹⁾がキャッサバ (*Manihot esculenta* Crantz) 中のリナマリンとロタウストラリンの分離に用いた TLC 条件で行い、20% 硫酸を噴霧して呈色させた。また、同時に展開した別の薄層プレートからそれぞれのスポットに相当する R_f 部分を削り取り、それぞれにクエン酸緩衝液及び粗酵素液を加えた後、シアン化水素の遊離を判定した結果、リナマリンの R_f 値は 0.2 付近で、Bissett らの報告⁹⁾と一致した。なお、リナマリン及びロタウストラリンの加熱後の呈色は他のスポットに比較して著しく遅いため判定の際に留意した。TLC でリナマリンに相当するスポットが単一であることが確認

Fig. 1. Thin layer chromatogram of MeOH extracts and pure linamarin from sultani bean

1, MeOH extracts; 2, purified linamarin; Plate, Kiesel Gel 60 F-254; developing solvent, chloroform-MeOH (5:1); chromogenic reagent, 20% H₂SO₄

できた CC 画分を合わせ、エタノール-*n*-ヘキサン (1:1) 混液で再結晶し、得られた白色結晶について、IR, ^1H NMR 及び ^{13}C NMR を測定した結果、測定値はいずれも文献値^{10)~12)}と一致したことからリナマリンと決定した。Fig. 1 に精製したリナマリン及び抽出物のメタノール可溶部の薄層クロマトグラムを示した。

3. 粗酵素液の調製

バター豆から得た粗抽出液を硫酸アンモニウムで10~90% 飽和まで段階的に塩析して調製した各画分のリナマリンに対する酵素活性を Table 1 に示した。酵素活性は 40~90% 飽和の各画分で認められたが、60~70% 飽和の画分が最も高い活性を示した。そこで、以後の実験はこの画分を粗酵素液として用いることとした。なお、粗酵素液 2 単位中にはシアン化水素として 2 μg 程度のシアン化合物が残留したが、空試験を行うことで実用上問題はなかった。

4. 酵素の反応条件

1) 粗酵素の至適 pH 及び安定性

基質としてリナマリン溶液を用い、pH 2.5~8.0 のクエン酸緩衝液で粗酵素を 30 $^{\circ}\text{C}$ 、15分間反応させたときの pH 活性曲線を Fig. 2 に示した。粗酵素の至適 pH は 5.0 付近であることが分かった。

次に、粗酵素の pH 安定性について検討した。すなわ

Table 1. Relative Activity of Butter Bean Linamarase During Ammonium Sulphate (AS) Fractionation

Fraction	Activity (%)
0-40% AS fraction	0.5
40-50% AS fraction	5.1
50-60% AS fraction	13.2
60-70% AS fraction	71.5
70-80% AS fraction	7.8
80-90% AS fraction	1.9

Fig. 2. pH dependence of butter bean linamarase

The enzyme was incubated with 5 mM linamarin for 15 min in citrate buffers of pH 2.5 to 8.0 at 30 $^{\circ}\text{C}$.

ち、粗酵素を pH 2.5~8.0 の各クエン酸緩衝液で 30 $^{\circ}\text{C}$ 、3時間処理した後、pH 5.0 で酵素活性を測定し、未処理の粗酵素の活性を 100% とし、処理後の活性の割合を Fig. 3 に示した。粗酵素は pH 5.0~7.0 の間で比較的安定であることが分かった。そこで、至適 pH 及び pH 安定性の点から、シアン配糖体の分解には pH 5.0 のクエン酸緩衝液を用いることとした。

2) 粗酵素の至適温度

リナマリン溶液を基質として用い、クエン酸緩衝液中で粗酵素を 20~60 $^{\circ}\text{C}$ の間で1時間反応させたときの温度活性曲線を Fig. 4 に示した。粗酵素の至適温度は 45 $^{\circ}\text{C}$ 付近であることが分かった。しかし、高温になるに従い、反応中に遊離したシアン化水素が大気中に揮散し、40 $^{\circ}\text{C}$ でも回収率に影響することから、反応温度は 25~30 $^{\circ}\text{C}$ の範囲で行うこととした。

3) 粗酵素の添加量及び反応時間

生あん中にシアン配糖体がシアン化水素として 100

Fig. 3. Stability of butter bean linamarase at different pH values

The enzyme was incubated for 3 hour at 30 $^{\circ}\text{C}$ in citrate buffers of pH 2.5 to 8.0. The enzyme activity was assayed at pH 5.0.

Fig. 4. Temperature dependence of butter bean linamarase

The enzyme was incubated with 5 mM linamarin for 1 hour in citrate buffer pH 5.0 at 20 to 60 $^{\circ}\text{C}$.

Fig. 5. Effect of incubation time on the rate of linamarin hydrolysis

The reaction mixture contained, linamarin (500 μg as HCN) and enzyme (units indicated below) in citrate buffer pH 5.0, total volume 50 ml and incubated for 1 to 5 hours at 25°C.

Amount of enzyme: —○—, 0.5 unit; —●—, 1 unit; —△—, 1.5 unit; —▲—, 2 unit; —□—, 2.5 unit

ppm 程度残存する場合でも十分適用できる反応条件を検討した。すなわち、シアン化水素として 500 μg のリナマリンを基質として用い、本法に従い、粗酵素の 0.5~2.5 単位を添加し、25° で 1~5 時間反応させたときのリナマリンの加水分解率を Fig. 5 に示した。粗酵素量が 0.5 及び 1 単位では 5 時間後でも反応は進行中であるが、1.5 単位では 3 時間で、2 単位及び 2.5 単位では 2 時間で加水分解は完了した。そこで、以後の実験における粗酵素の添加量は 2 単位とし、反応時間は 3 時間とした。

4) 水蒸気蒸留時の pH

試料にクエン酸緩衝液を加え水蒸気蒸留を行う際の緩衝液の pH について検討した。すなわち、シアン標準原液 10 ml を 10% クエン酸溶液で中和した後、pH 2.0~8.0 のクエン酸緩衝液 100 ml を加えて水蒸気蒸留を行った。その結果、pH 7.0 以下ではほぼ 100% 回収された。また、リナマリンは硫酸あるいは塩酸とともに加熱すると一部が加水分解することから、蒸留時の pH は総シアンの測定における酵素反応の pH と同様 5.0 とした。

Table 2. Recoveries of Linamarin from Bean Paste

Added linamarin (μg as HCN)	Found (μg as HCN)	Recovery (%)
50	51.2	102
	46.9	94
	49.1	98
500	481	96
	462	92
	475	95

5. 添加回収実験

あらかじめシアン化合物の検出されないことを確認した生あんにリナマリンを添加し、回収実験を行った結果を Table 2 に示した。回収率は 92~102% と良好であった。また、本法によるシアン配糖体及び遊離シアンの確認限度は試料 25 g の場合それぞれ、シアン化水素として 0.3 及び 0.1 ppm であり、実用上十分適用できると考える。

6. 生あん中のシアン化合物の含有量調査

東京都内の製あん所で、昭和54年8月から同年9月までの間に製造された生あん 115 検体について、生あんの成分規格試験の他に、遊離シアン及びシアン配糖体（シアン化水素として）の含有量を調査した。その結果、生あんの成分規格試験では 115 検体のすべてが陰性であった。また、遊離シアンも全く検出しなかった。これに対して、シアン配糖体は Table 3 に示したとおり 46 検体に残存していた。赤あんでは 75 検体中シアン配糖体を含有するものが 24 検体あった。それらのうち、シアン化水素として 20 ppm を上回るものが 3 検体あり、含有量はそれぞれ、シアン化水素として 22, 71 及び 97 ppm であった。また、白あんでは 40 検体中 22 検体に残存していた。それらのうち、シアン化水素として 20 ppm を上回るものが 4 検体あり、含有量はそれぞれ、シアン化水素として 21, 28, 47 及び 48 ppm であった。

これらのことから、生あんは成分規格試験で陰性であっても、多量のシアン配糖体が残存している場合があることが明らかとなった。また、調査した生あんの 40% にシアン配糖体が残存し、最も高いものではシアン化水素として 97 ppm のシアン配糖体が残存していたことは食品衛生上注目すべき問題であると考えられる。

Table 3. Analytical Result of Cyanogenic Glucoside in Bean Paste

Type of bean paste	No. of sample	No. of sample with cyanogenic glucoside concn. (ppm as HCN)					
		<0.3	0.3-1.0	1.0-10	10-20	20-50	50<
Red	75	51	8	8	5	1	2
White	40	18	9	9	—	4	—

ま と め

生あんに残存する原料由来のシアン配糖体の含有量を知る目的で、シアン配糖体含有豆から粗酵素液を調製し、酵素法によるシアン配糖体の分析法を検討した。

1) 酵素法の検討に必要なリナマリンはサルタニ豆からメタノールで抽出し、フラッシュクロマトグラフィーにより分離精製して得た。

2) 粗酵素液はバター豆、ベビーライマ豆及びサルタニ豆のいずれの豆から調製したものもリナマリンに対して強い活性を示し、シアン化水素として 500 μg のリナマリンは2単位の粗酵素を添加し、25°で2時間作用させることで十分分解されることが分かった。

3) 生あん中の総シアン含有量は粗酵素を加えてシアン配糖体を加水分解した後、遊離したシアン化水素を水蒸気蒸留し、ピリジン・ピラジロン法により測定し定量した。一方、遊離シアン含有量は粗酵素を加えず水蒸気蒸留を行い定量した。また、シアン配糖体（シアン化水素として）の含有量は総シアン含有量から遊離シアン含有量を差し引いて求めた。

4) 本法によるリナマリンの添加回収率は 92~102%，確認限度は試料 25 g の場合シアン化水素として 0.3 ppm であった。これらのことから、本法は生あん中のシアン配糖体（シアン化水素として）の分析法として十分適用できると思われる。

5) 生あん 115 検体について、シアン化合物の含有量を調査した結果、生あんの成分規格試験ではすべて陰性であり、遊離シアンはいずれの検体からも検出されなかった。しかし、シアン配糖体は調査した生あんの 40% に残存しており、最高値はシアン化水素として 97 ppm

であった。

なお、本研究の要旨は日本食品衛生学会第38回学術講演会（1979年11月，仙台）において発表した。

文 献

- 1) 農林省熱帯農業研究センター：“熱帯の有用作物” 第 1 版 p. 521 (1975) 農林統計協会。
- 2) Seigler, D. S.: *Phytochem.* **14**, 9~29 (1975).
- 3) 川城 巖, 川田公平: *食品衛生研究* **8** (6), 45~52 (1958).
- 4) 厚生省食品衛生課, 乳肉衛生課, 食品化学課監修：“食品衛生小六法” p. 197~199 (1979) 新日本法規出版。
- 5) 小島康平: *食品衛生研究* **12** (5), 17~19 (1962).
- 6) 相沢孝亮, 村 清司, 小崎道雄, 小原哲二郎: *日食工誌*. **23**, 565~567 (1976).
- 7) 小柳達男：“食品と解毒の化学” p. 186 (1972) 共立出版。
- 8) Still, W. C., Kahn, M., Mitra, A.: *J. Org. Chem.* **43**, 2923~2925 (1978).
- 9) Bissett, F. H., Clapp, R. C., Coburn, R. A., Ettlinger, M. G., Long, L. Jr.: *Phytochem.* **8**, 2235~2247 (1969).
- 10) Clapp, R. C., Bissett, F. H., Coburn, R. A., Long, L. Jr.: *ibid.* **5**, 1323~1326 (1966).
- 11) Davis, R. H., Nahrstedt, A.: *Comp. Biochem. Physiol.* **64B**, 395~397 (1979).
- 12) Smith, C. R. Jr., Weisleder, D., Miller, R. W.: *J. Org. Chem.* **45**, 507~510 (1980).