

ライマビーン中のシアン蓄積量と β -glucosidase 活性の変化

安部なつみ*・春日重光**・岡部繭子**・後藤哲久*

* 信州大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

** 信州大学農学部附属アルプス圏フィールド科学教育研究センター

要 約

豆類中のシアン化合物分析の公定法では、豆中の β -glucosidase を利用して HCN を遊離している。しかし β -glucosidase 活性が低く、豆中のシアン化合物を十分に検出できない豆の存在が確認された。今回、この β -glucosidase 活性が低いライマビーンを 3 年間栽培し、豆中のシアン蓄積量及び β -glucosidase 活性に違いが見られるか検討した。また、信州大学農学部の構内ステーション及び野辺山ステーションの圃場において、栽培地の違いによる変化も検討した。その結果、豆中のシアン蓄積量及び β -glucosidase 活性に、栽培年次及び栽培地の違いによる差は見られなかった。

キーワード：ライマビーン、シアン化合物、 β -glucosidase、年次変化、栽培地

1. 緒 言

ライマビーン (*Phaseolus lunatus*) にはシアン配糖体が含まれており¹⁾、豆中や動物の腸内細菌の β -glucosidase によりシアン配糖体が加水分解されると人畜に有害なシアン化水素 (HCN) を発生する。HCN は分子量 27.03、沸点 25.7°C の無色の物質であり、ラットにおける経口投与の半数致死量は 4.1 mg CN/kg 体重^{2,3)}、シアンのヒトにおける致死量は HCN として 0.05 g とされている⁴⁾。シアンイオンは、動物の体内でシトクロムオキシダーゼを不活化し、細胞呼吸を阻害して組織中毒性低酸素症となることで中毒症状が示される⁵⁾。ヒトに対するシアン化合物の経口摂取による急性毒性は、呼吸困難、消化器障害、脈薄弱、神経障害などが報告されている⁶⁾。このように有毒なシアン化合物を含有する豆類については食品衛生法で規制されており、シアン化合物を含有していない豆類のみ、流通、販売が可能となっている⁷⁾。また、シアン化合物を含有することが知られているライマビーンやバタービーン等の豆類については、HCN として 500 mg/kg の基準値が設けられ、生あん原料用としてのみ、販売が可能となっている⁷⁾。

豆中のシアン化合物分析に関する日本の公定法では、豆中の β -glucosidase を利用して、シアン配糖体から HCN を遊離させ、検出するように定めてい

る⁸⁾。しかし、 β -glucosidase 活性が不十分で、豆中のシアン化合物量を正確に測定できないライマビーンがあることが判明した⁹⁾。本研究では、信州大学農学部附属農場で栽培した酵素活性が低いライマビーン中のシアン蓄積量と β -glucosidase 活性が、栽培年次あるいは栽培地の違いにより、差が見られるか調査した。

2. 材料及び方法

供試系統として、 β -glucosidase 活性が弱い信州大学保存系統ライマビーンの種類色が赤色 (SRW) と白色 (SWW) のもの、種皮色の突然変異系統 (SMW)、及び β -glucosidase 活性が HCN を遊離するのに十分な活性をもつ長野県中信農業試験場保存系統 (CWW) を用いた。ライマビーン栽培は、信州大学農学部附属 AFC 構内ステーション (南箕輪村、標高 760 m、以降構内ステーション) と、信州大学農学部附属 AFC 野辺山ステーション (南牧村、標高 1350 m、以降野辺山ステーション) 内の圃場で行った。構内ステーションでは上記 4 系統の栽培を行い、2011 年～2013 年に年次変化を調査した。播種した豆は各系統とも、前年に収穫したものをを用いた。また、野辺山ステーションでは 2012 年と 2013 年に SRW を栽培し、構内ステーションで栽培した SRW と比較した。栽培は 5 月中旬～下旬に育苗し、6～7 月に定植して、9 月～10 月に莢が緑から褐色に変化した際に収穫を行った。収穫物は水分含量が約 15% 未満になるまで、ビニール

受付日 2013年11月27日

受理日 2013年12月25日

ハウス内で天日乾燥させた。なお、2013年は播種期の5月中～下旬の旬別平均気温が平年値より2.6～3.0°C高く¹⁰⁾、播種したビニールハウス内で発芽障害が発生し、発芽しなかったため、6月に再度播種を行い、7月に定植し、9月下旬～10月に収穫した。以下の分析では、収穫物を混合後、無作為に抽出して測定した(n=1)。

シアン化合物の定性、定量試験及び β -glucosidase活性の測定では、リナマラーゼ(β -glucosidase; EC 3.2.1.21)、消泡剤(antifoam SI)と

-

ニトロフェニル β -D-グルコピラノシドは和光純薬(大阪)、それ以外の試薬は関東化学(東京)から購入したものをを用いた。

豆中のシアン化合物の定性試験では、ピクリン酸紙法を用いた⁸⁾。ピクリン酸紙は、ピクリン酸飽和水溶液にろ紙(20×400 mm No.50; ADVANTEC, 東京)を浸し、乾燥後、2×5 cmの大きさに切ったものをを用いた。200 mL容三角フラスコに粉碎した豆10 gとpH5.9クエン酸緩衝液50 mL, 1 U/mLリナマラーゼ溶液1 mLを加え、予め10% Na₂CO₃水溶液で潤したピクリン酸紙を吊るしたコルク栓で密栓して静かに混合した。30°Cで30分ごとに静かに混合しながら3時間静置した。反応後、2 gの酒石酸を加えて密栓し、55°Cで15分ごとに混合しながら1時間置いた。その後、ピクリン酸紙を風乾してろ紙の色の変化を観察した。

豆中のシアン化合物の定量試験は、基本的には、リナマラーゼ添加-ピリジンカルボン酸・ピラゾロン法に従って行った⁹⁾。粉碎した豆7.5 gにpH5.9クエン酸緩衝液100 mL, 3 U/mLリナマラーゼ溶液1 mL及びトルエン数滴を加え、38°Cで24時間酵素反応させた。この溶液に超純水50 mLと消泡剤を15滴程度加え、2% KOH水溶液10 mLを捕集液として直接蒸留を行った。蒸留後、ピリジンカルボン酸・ピラゾロン法により発色し、638 nmの吸光度を測定した。

豆中の β -glucosidase活性の測定は宇田ら¹¹⁾の方法を基にした。豆5 gに水50 mLを加え、16 speed blender (Oster, USA)で3分間破砕抽出し、22,000 ×gで40分間(4°C)遠心分離した。上清を硫酸分画し、45-85%飽和硫酸沈殿画分を回収した。沈殿を0.05 mol/Lクエン酸緩衝液(pH5.2)に溶解させた後、同じ緩衝液で4°Cで1日透析を行った。透析外液は4回交換した。生じた沈殿を10,000 ×gで15分間(4°C)遠心分離し、その上清を酵素液とした。この酵素液20 μ Lをp-ニトロフェニル β -D-グルコピラノシドを基質として反応させ、400 nmの吸光度を測定した。

3. 結 果

(1) 気象状況

2011年～2013年の3年間の伊那(北緯35度49.6分, 東経137度57.2分)、及び2012年と2013年の野辺山(北緯35度56.9分, 東経138度28.3分)の栽培期間中の月別平均気温を図1に、月別合計降水量を表1

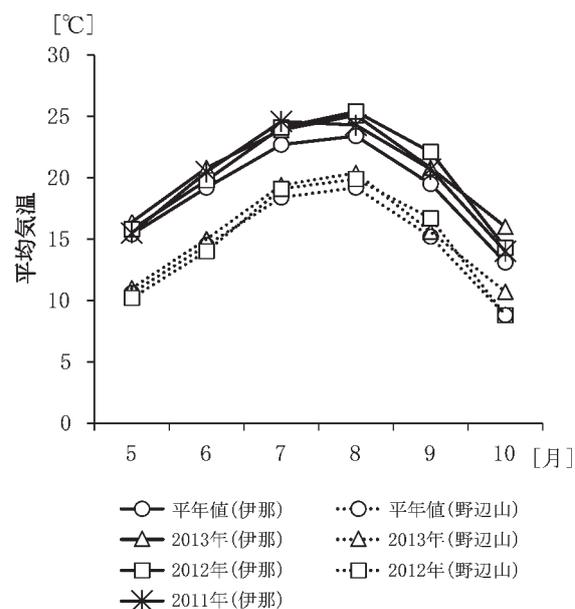


図1 栽培期間における月別平均気温

表1 栽培期間における月別合計降水量

		合計降水量 (mm)					
		5	6	7	8	9	10
伊那	平年値	158.6	193.8	187.5	133.6	169.9	138.2
	2011年	349.0	125.0	167.0	197.5	238.0	132.5
	2012年	62.5	190.0	249.0	37.0	101.5	115.5
	2013年	46.5	192.5	131.0	150.5	164.5	185.0
野辺山	平年値	127.5	174.9	202.1	176.0	210.5	136.7
	2012年	98.0	194.5	253.0	96.5	179.5	81.0
	2013年	71.5	203.5	88.0	69.5	218.0	247.0

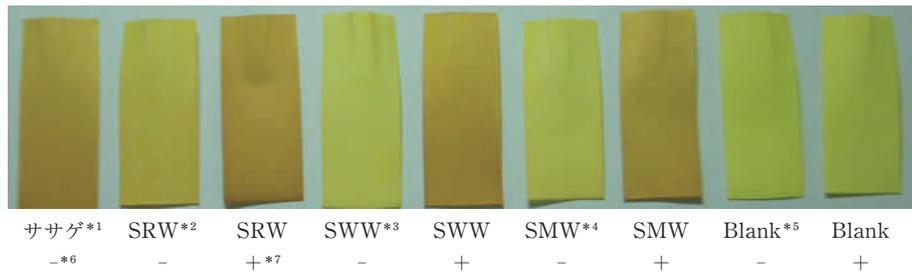


図2 ライマビーン中のシアン化合物定性試験の結果

- *1: シアン化合物を含有しないササゲに10 mg/kgの HCN に相当する KCN を添加
 *2: 信大保存系統 (赤) *3: 信大保存系統 (白) *4: 種皮色の突然変異系統
 *5: 豆を添加しないで試験した結果
 *6: リナマラーゼを添加しないで試験した結果
 *7: リナマラーゼを添加して試験した結果

に示した¹⁰⁾。構内ステーション及び野辺山ステーションにおける月別平均気温は3年間ともに平年並から平年より高い値で推移した。構内ステーションでは、2011年は莢の結実・登熟期の8～9月に降水量が多く、莢及び種子にカビの感染が多く、収穫できた子実重は1株当たり50g前後と少なかった。2012年は結実・登熟期の降水量が少なく、収穫した子実重が1株当たりおよそ200～300gと3年間の中で最も多収となった。2013年は播種の遅れにより収穫期が遅くなったため、収穫した子実重は1株当たりおよそ100～150gであった。野辺山ステーションについては、2013年は収穫期の遅れと、収穫期の9月～10月の降水量が平年値よりも多かったため、同時期の降水量が平年値よりも少なかった2012年の子実重(1株当たりおよそ50g)と比較して、子実重は1株当たり20g前後と少なかった。また、野辺山ステーションは構内ステーションと比較して気温が低く、全体的に収穫できた子実重は少なかった。

(2) 豆中のシアン化合物の定性試験

β -glucosidase 活性が低いライマビーン (SRW, SWW, SMW) にリナマラーゼを添加した場合と添加しない場合の、シアン化合物の定性結果を図2に示した。シアンが検出されると、ピクリン酸紙は黄色から茶褐色に色が変化する。この3系統のライマビーンではリナマラーゼを添加しないとシアン化合物はほとんど検出されなかった。

(3) 豆中のシアン蓄積量と β -glucosidase 活性の年次変化

SRW, SWW, SMW, CWW の各系統における2011～2013年のシアン化合物蓄積量及び β -glucosidase 活性を表2に示した。3年間の栽培において、リナマラーゼを添加して分析した場合のシアン化合物の検出量は、HCN量に換算して、

表2 ライマビーン中のシアン化合物量 (HCN 換算) と β -glucosidase 活性の年次変化

	年	HCN (mg/kg)		β -glucosidase 活性
		-*1	+*2	U/g dw
SRW*3	2011	34	38	0.064
	2012	0.85	38	0.022
	2013	1.7	36	0.064
SWW*4	2011	4.7	47	0.062
	2012	24	33	0.024
	2013	9.1	39	0.078
SMW*5	2011	2.0	48	0.040
	2012	15	40	0.018
	2013	0.75	31	0.037
CWW*6	2011	21	20	2.0
	2012	25	30	2.5
	2013	26	27	4.0

- *1: リナマラーゼの添加をしない場合の HCN 量
 *2: リナマラーゼの添加をした場合の HCN 量
 *3: 信大保存系統 (赤) *4: 信大保存系統 (白)
 *5: 種皮色の突然変異系統 *6: 中信農試保存系統

SRW で36～38 mg/kg, SWW で33～47 mg/kg, SMW で31～48 mg/kg, CWW で20～30 mg/kg と、全ての系統で年による差は見られなかった。また、リナマラーゼを添加しないで、豆中のリナマラーゼを利用して分析したシアン化合物の検出量は、HCNに換算して、SRWで0.85～34 mg/kg, SWWで4.7～24 mg/kg, SMWで0.75～15 mg/kg, CWWで21～26 mg/kgであった。この内、SRWで2011年に、SWWとSMWで2012年に収穫したもので、他の年と比較してやや高いシアン化合物の検出量であった。 β -glucosidase 活性は、SRWで0.022～0.064 U/g dw, SWWで0.024～0.078 U/g dw, SMWで0.018～0.040 U/g dw, CWWで2.0～4.0 U/g dwであった。 β -glucosidase 活性が約0.3 U/g dw以

表3 信大保存系統 SRW ライマビーンのシアン化合物量 (HCN 換算) と β -glucosidase 活性の栽培地間差

年	HCN (mg/kg)				β -glucosidase 活性 (U/g dw)	
	-*1		+*2		構内	野辺山
	構内	野辺山	構内	野辺山		
2012	0.85	2.2	38	28	0.022	0.036
2013	1.7	1.4	36	16	0.064	0.022

*1: リナマラーゼの添加をしない場合の HCN 量

*2: リナマラーゼの添加をした場合の HCN 量

下のものは、 β -glucosidase 活性が低すぎるため、比色分析による正確な分析が困難で、バラつきが大きかった。いずれの系統でも、 β -glucosidase 活性の年による差は認められなかった。

(4) 豆中のシアン蓄積量と β -glucosidase 活性の栽培地間差

2012年と2013年に SRW を構内ステーションと野辺山ステーションで栽培したライマビーン中のシアン蓄積量と β -glucosidase 活性の測定量を表3に示した。2年間の試験において、リナマラーゼを添加して分析した場合のシアン化合物検出量は、構内ステーションで栽培したものは HCN 換算で38, 36 mg/kg, 野辺山ステーションで栽培したものは28, 16 mg/kgと、野辺山ステーションで栽培したものは構内ステーションと比べてシアン化合物の検出量がやや低い傾向は見られたが、大きな差は見られなかった。また、リナマラーゼを添加しないで分析した場合のシアン化合物の検出量は、構内ステーションで0.85, 1.7 mg/kg, 野辺山ステーションで2.2, 1.4 mg/kgといずれも大きな差はなかった。 β -glucosidase 活性についても、構内ステーションのものが0.022, 0.064 U/g dw, 野辺山ステーションのものが0.036, 0.022 U/g dw と大きな差は見られなかった。

4. 考 察

2011~2013年の3年間、構内ステーションで4系統のライマ豆を栽培した結果、豆中のシアン蓄積量及び β -glucosidase 活性は年次間で大きな差は見られなかった。また、 β -glucosidase 活性の低い SRW を、構内ステーションと野辺山ステーションの2か所で2年間栽培した結果、豆中のシアン蓄積量は構内ステーションと比較して、野辺山でやや低い傾向は見られたが、 β -glucosidase 活性と同様に、栽培地による大きな差は見られなかった。しかし、3年間の年次変化では、リナマラーゼを添加せず、

豆中のリナマラーゼを利用してシアン化合物を検出した場合に、 β -glucosidase 活性の測定値が低い豆でも、リナマラーゼを添加した場合と近いシアン化合物量が得られることがあった。この原因は不明であるが、今回用いた β -glucosidase 活性の測定の際に、酵素の精製で失活した可能性や、検出で用いている酵素基質が実際のシアン配糖体と違っている点など、測定系に問題があることが考えられる。また、併行試験で、SMW のシアン蓄積量は RSD が3.6% (n=6) と同じ系統の豆で大きな差は見られなかったが、リナマラーゼを添加しないで HCN 量を検出した場合、RSD が0.6~41.5 mg/kg (n=6) とばらつきが大きかった。この時も β -glucosidase 活性は0.026~0.036 U/g dw で RSD が12% (n=6) と大きな差は認められなかった。

食品衛生法ではシアン化合物が不検出の豆のみ流通、販売が可能となっており、栽培条件によってシアン化合物を低減されることが期待されたが、3年間の年次及び異なる栽培地での2年間の調査では、豆中のシアン蓄積量に大きな変化が見られなかった。今後はさらに多様な栽培条件でシアン蓄積量及び β -glucosidase 活性に変化が見られるか検討していく必要がある。

引用文献

- 1) 近藤龍雄・川城 巖・古橋詩子 (1967), *p*-Nitrobenzaldehyde 及び *o*-Dinitrobenzene を用いる比色法による食品中のシアンの微量定量について, 食品衛生学雑誌 8(4): 331-334
- 2) B. Ballantyne (1983), The influence of exposure route and species on the acute lethal toxicity and tissue concentrations of cyanide. In: Developments in the science and practice of toxicology: proceedings of the Third International Congress on Toxicology held in San Diego, California, U.S.A., August 28-September 3, 1983. Editors, A. Wallace Hayes, R. Craig Schnell, Tom S. Miya,

- New York, NY, Elsevier Science Publishers, pp 583-586
- 3) 独立行政法人製品評価技術基盤機構・財団法人化学物質評価研究機構 (2008), 化学物質の初期リスク評価書No.129無機シアン化合物 (錯塩及びシアン錯塩を除く)
http://www.safe.nite.go.jp/risk/files/pdf_hyoukasyo/108riskdoc.pdf#search='%E5%8C%96%E5%AD%A6%E7%89%A9%E8%B3%AA%E3%81%AE%E5%88%9D%E6%9C%9F%E3%83%AA%E3%82%B9%E3%82%AF%E8%A9%95%E4%BE%A1%E6%9B%B8No.129%E7%84%A1%E6%A9%9F%E3%82%B7%E3%82%A2%E3%83%B3%E5%8C%96%E5%90%88%E7%89%A9'
 - 4) 日本薬学会編 (2010), 衛生試験法・注解, 金原出版 pp 267
 - 5) IPCS (2004), Hydrogen cyanide and cyanides: human health aspects. Geneva, Switzerland, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Concise International Chemical Assessment Document 61)
<http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad61.pdf#search='Hydrogen+cyanide+and+cyanides%3A+human+health+aspects.+Geneva%2C+Switzerland%2C+World+Health+Organization%2C'>
 - 6) 食品安全委員会 (2010), 清涼飲料水評価書シアン
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20030701815&fileId=021>
 - 7) 食品衛生法 (1959), 食品, 添加物等の規格基準 (昭和34年厚生省告示第370号)
 - 8) 厚生労働省 (2005), 食品衛生検査指針理化学編 2005, 社団法人 日本食品衛生協会, pp 707-712
 - 9) 安部なつみ・春日重光・岡部繭子・後藤哲久 (2013), β -glucosidase 活性が不十分な豆のシアン定量法の妥当性確認, 第106回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 pp 97
 - 10) 気象庁 (2014), 過去の気象データ検索
<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>
 - 11) 宇田 裕・伊藤智子・冠 政光・直井家壽太 (1984), 酵素法によるシアン配糖体の分析 (第1報) β -グルコシダーゼによるシアン配糖体の加水分解, 衛生化学30(5): 290-294

Changes of cyanide accumulation and β -glucosidase activity in lima beans

Natsumi ABE*, Shigemitsu KASUGA**, Mayuko OKABE** and Tetsuhisa GOTO*

*Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Shinshu University

**Education and Research Center of Alpine Field Science, Faculty of Agriculture, Shinshu University

Summary

The Japanese official method to determine cyanide in beans utilizes endogenous enzyme β -glucosidase to liberate HCN. However, several beans are found to contain insufficient levels of β -glucosidase activity to evaluate their levels of cyanide. In this study, we cultured lima beans that lack sufficient level of β -glucosidase activity and compared cyanide accumulation and β -glucosidase activity over a three year period. Also, we examined those differences by production site, using beans cultured at the Minaminowa Campus Station (elevation 760 m) and Nobeyama Station (elevation 1350 m) of the Faculty of Agriculture, Shinshu University. No significant variations of cyanide accumulation and β -glucosidase activity was observed over the three year period and from the two cultured sites.

Key words : lima bean, cyanide, β -glucosidase, annual variation, cultured sites