

ウンシュウミカンの栄養診断のためのヨウ素比色法によるデ ンブロン簡易測定法

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
巻/号	721
掲載ページ	p. 81-84
発行年月	2001年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ノ ー ト

ウンシュウミカンの栄養診断のための
ヨウ素比色法によるデンプン簡易測定法*

杉山泰之**・大城 晃**

キーワード デンプン, 簡易測定法, ヨウ素比色法, ウンシュウミカン

1. 緒言

ウンシュウミカンでは, 秋季から貯蔵養分として樹体内に炭水化物を蓄積することが知られている³⁾. 貯蔵される炭水化物の量はその年の着果負担との関係が深く^{4,5)}, 着果の多少は特に根中のデンプン含量に対する影響が大きいとされている⁵⁾.

静岡県では, 生産現場におけるウンシュウミカンの樹体栄養診断を行うため, 冬季の根中炭水化物含量を測定している. しかし, 炭水化物のうちデンプン測定については従来の過塩素酸抽出法や酵素法では操作が煩雑で時間がかかり, 多数の試料を扱う場合には難点があった.

デンプンの簡易測定法として糖分析計による方法¹⁾, 携帯型屈折糖度計による方法²⁾, ヨウ素デンプン反応による方法^{3,7)}, F-キットスターチによる方法⁷⁾などが検討されてきたが, 精度や分析コスト等の問題点を有していることから, 多くの生産現場に即応できる測定法は確立されていなかった.

そこで, 生産現場で農業改良普及員や農協技術指導員が多数の試料を測定しなければならないことを考慮し, デンプンの抽出方法を簡易化し, 迅速かつ既存の機器で測定可能なヨウ素比色法によるデンプン測定法(以下, 簡易法)を考案した. さらに, ウンシュウミカンの根および枝中のデンプン含量を当场で従来から行われてきた酵素法⁸⁾(以下, 従来法)と簡易法で測定結果を比較し, 分析時間や操作性など実用性を含めた生産現場に適用可能なデンプンの簡易分析法についての考察を行った.

Yasuyuki Sugiyama and Akira Ooshiro: A Simple and Rapid Analysis of Starch Content in Root and Shoot of Satsuma Mandarin by Using Colorimetric Determination

*本報告は平成10年日本園芸学会秋季大会で発表した.

**静岡県柑橘試験場(424-0905 清水市駒越西2-12-10)

2000年5月25日受付・受理

日本土壤肥料学雑誌 第72巻 第1号 p.81~84 (2001)

2. 実験方法

実験材料には, 静岡県各地において栽培されている露地栽培のウンシュウミカン‘青島温州’を用いた. 21園地より1996年11月29日から12月1日にかけて採取した中根(直径約5mm)および枝(長さ約15cm, 目通りの高さ, 着枝角度は水平~やや上向き)を分析試料として供試した. 採取した中根および枝は洗浄後, 80°Cで通風乾燥し, 微粉碎したものをデンプン測定用試料とした. 従来法によるデンプンの測定は次のように行った. すなわち, 試料0.5gに80%エタノール25mLを加え, 可溶性糖類を還流冷却管を付して87°Cで30分間抽出後, 遠心分離により除去した. 残渣に蒸留水10mLを加え, 沸騰湯煎中で30分間加熱し, デンプンを糊化させた. 冷却後, 酵素液〔グルコアミラーゼ(*Rhizopus*, Nagase Biochemicals製, 1×10^4 GUN g^{-1}) 5mgにマルターゼ(粗酵素, 東京化成製) 10mgを加え, pH5の酢酸緩衝液で50mLに定容したもの〕を加え, 40°Cで2時間半加水分解して糖化させた. 除タンパクを行った後, Somogyi-Nelson法で還元糖を定量し, その値に0.9を乗じたものをデンプン含量とした.

1) 実験1: 簡易法におけるデンプン抽出方法の検討
試料中のデンプンを簡易に抽出する方法を検討するため, A: デンプンを糊化させるための熱処理法3水準とB: 上澄み液の分離法2水準を組み合わせた2元配置実験計画法として検討した. 5点の異なる試料(根) 0.10gにそれぞれ直接蒸留水10mLを加えた後, A: 熱処理法(3水準①湯煎中100°Cで30分間②オートクレーブ中115°Cで15分間③オートクレーブ中115°Cで30分間)を行い, デンプンを糊化させた. その後, B: 上澄み液の分離法〔2水準①ろ過(ろ紙: No. 2, ϕ 110mm, ADVANTEC製)②遠心分離(3000rpm, 常温で5分間)]で沈殿物と分離した. 得られた上澄み液に6mol L^{-1} の塩酸を駒込ピペットにより3滴加え, さらに0.05mol L^{-1} のヨウ素溶液を2mL加えて反応させた後, 50mLに定容し, 660nmにおける吸光度を分光光度計を用いて測定した. デンプン標品(でんぶん溶性・関東化学製)について求めた吸光度-デンプン濃度の検量線からデンプン含量を求め, これらの結果から抽出方法として検討したA, B2要因の測定値に及ぼす影響を解析した. なお, 対照区は従来法で行い, 各区2反復で行った.

2) 実験2: 簡易法と従来法によるデンプン測定値間の関係

根と枝ともに約40点の試料を用いて, 簡易法では試験1で検討した結果より決定したデンプン抽出方法を用

い、簡易法と従来法でデンプン含量を測定し、両方法による測定値間の関係を検討し、簡易法の実用性について検討した。

3. 結果と考察

量の異なるデンプン標品にそれぞれ蒸留水を加え、沸騰湯煎中で糊化させ、ヨウ素溶液を加えて定容後、660 nm における吸光度を測定したところ、デンプン濃度と吸光度の間に高い相関 ($R^2=0.9997$) が認められ、簡易法における検量線としての使用は十分可能であった (図 1)。

1) 実験 1 : 簡易法におけるデンプン抽出方法の検討
デンプン抽出を行う熱処理方法を比較すると、オートクレーブ中 115°C で 15 分および 30 分処理では、いずれの試料でもほぼ同じデンプン含量値を示し、従来法によるデンプン含量値が約 76 g kg⁻¹ 以下になるとそれに比

べてやや低くなる傾向にあり、約 110 g kg⁻¹ 以上ではやや高くなる傾向にあった。しかし、湯煎中 100°C で 30 分間処理では、いずれの試料中においてもデンプン含量値は従来法より低くなる傾向にあった。一方、上澄み液の分離方法を比較すると、遠心分離をする方がろ過をするよりデンプン含量値は高くなり、従来法での値が約 110 g kg⁻¹ 以上になるとそれより高い値を示す傾向であった (表 1)。

以上より、オートクレーブで熱処理し、遠心分離を行う方法を用いることが、従来法で得られるデンプン含量値により近似した値が得られる結果となった。しかし、湯煎中 100°C で 30 分間熱処理し、ろ過を行う方法では、試料に含まれるデンプンの含量値は従来法に比べて低くなるものの、含量値の高低は的確に表され、また、簡易迅速で特別な機器も使用しないことから生産現場においては実用的であると思われた。そこで実験 2 では、デンプンの抽出方法として湯煎中 100°C で 30 分間熱処理し、ろ過を行う方法を用いることとした。

2) 実験 2 : 簡易法と従来法によるデンプン測定値間の関係

根の試料における簡易法と従来法によるデンプン測定値間には高い相関関係 ($r=0.981^{**}$) が認められ (図 2)、回帰直線 $y=1.21x+0.148$ が推定された。また、回帰式 ($y=ax+b$) の係数 a, b の信頼度 95% 信頼区間は $a=1.21\pm 0.075$, $b=0.148\pm 0.277$, 回帰直線の推定の標準偏差は 0.587 であった。推定値 y の 95% 信頼区間は $y=1.21x+0.148\pm 1.19\sqrt{1.05-0.02x+0.0039x^2}$ で示された。一方、枝の試料においても両者の間には高い相関 ($r=0.962^{**}$) が認められ (図 3)、回帰直線

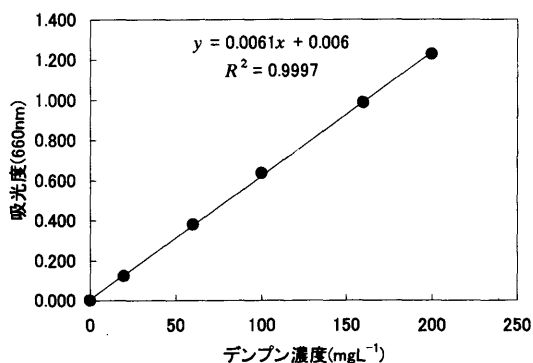


図 1 ヨウ素比色法におけるデンプン標品濃度と吸光度との関係

表 1 簡易法における異なる熱処理および上澄み液分離方法がデンプン測定値に及ぼす影響 (g kg⁻¹)

A : 熱処理方法	B : 分離方法	サンプル番号				
		A	B	C	D	E
湯煎・煮沸30分	遠心分離	3.78	33.3	69.3	98.6	190.4
	ろ過	2.94	27.8	57.4	74.3	154.8
オートクレーブ115°C・15分	遠心分離	5.07	39.0	78.6	120.3	208.9
	ろ過	4.10	31.9	63.4	112.9	177.4
オートクレーブ115°C・30分	遠心分離	4.90	36.0	79.1	145.0	205.6
	ろ過	4.48	29.8	63.9	114.2	180.5
従来法		7.1±1.9 ^a	41.2±2.5	76.4±0.5	110.1±3.2	184.0±5.6
分散分析	熱処理	**	**	**	**	**
	分離方法	**	**	**	**	**
	交互作用	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

^a 平均値±標準偏差。** : 1%水準で有意, n.s. : 有意差無し。

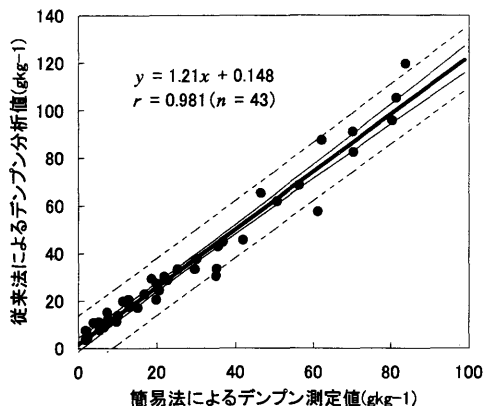


図2 従来法および簡易法によるウンシュウミカンの根中デンプン測定値間関係

回帰直線の95%信頼区間——, 推定値 y の95%信頼区間----, 測定値●.

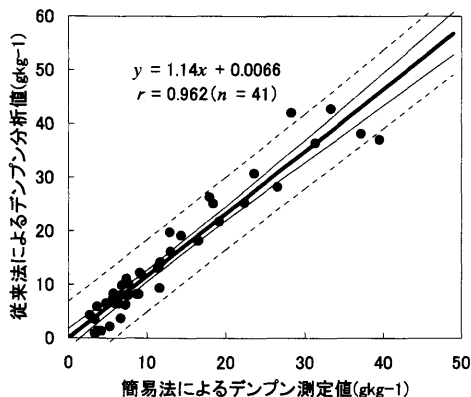


図3 従来法および簡易法によるウンシュウミカンの枝中デンプン測定値間関係

回帰直線の95%信頼区間——, 推定値 y の95%信頼区間----, 測定値●.

$y = 1.14x + 0.0066$ が推定され, 回帰係数 a , b の信頼度95%信頼区間ならびに回帰直線の推定の標準誤差(s)は, それぞれ $a = 1.14 \pm 0.075$, $b = 0.0066 \pm 0.173$, $s = 0.272$ であった. また, 推定値 y の95%信頼区間は $y = 1.14x + 0.0066 \pm 0.663 \sqrt{1.07 - 0.067x + 0.026x^2}$ で示された.

これらのことから, ウンシュウミカンの根および枝から調製した試料を湯煎中 100°C で30分間熱処理し, ろ過を行う方法でデンプンを抽出し, ヨウ素比色法を用いてデンプンを測定する簡易法では, 煩雑なデンプン抽出および精化操作の必要もなく, 多点の試料を短時間に測定することが可能となり, 従来法と比べて測定値はやや低くなるものの相関が高いことが明らかとなったことから, 多くの生産現場に即応できる測定方法と考えられた.

以上の結果から, 迅速で, 特別な薬品や機器を用いることなくウンシュウミカンの根および枝中のデンプンを簡単に測定できる簡易法の操作手順を以下のように考えた.

①採取した根および枝を十分洗浄した後, 80°C で通風乾燥後, 微粉砕する.

②粉砕試料 0.10g に蒸留水 10mL を加え, 沸騰湯煎中で30分間加熱し, デンプンを糊化させる.

③糊化したデンプンを含む上澄み液と沈殿物を分離するためにろ過を行い, ろ紙上の残渣を数回洗浄後, ろ液を 50mL のメスフラスコ中に入れる.

④ 6mol L^{-1} の塩酸を駒込ピペットにより3滴加えて

微酸性とし, さらに 0.05mol L^{-1} のヨウ素溶液を 2mL 加えて反応させた後, 蒸留水で 50mL に定容する.

⑤分光光度計を用いて試料溶液の 660nm における吸光度を測定する.

⑥溶性デンプン標品について求めた吸光度-デンプン濃度の検量線から試料中のデンプン濃度を求める.

なお, 試料1点当たりの測定時間は従来法では9時間要したのに比べ簡易法では1時間程度と著しく短縮され, 1日当たり100点以上の分析が可能であった.

本県ではすでにこの簡易法を用い, 生産現場の技術指導員等が自ら個々の園地のウンシュウミカンの樹体栄養診断を行い, 栽培・肥培管理指導に活用している.

謝辞 本稿に対し貴重な助言をいただいた千葉大学小原均博士に厚くお礼申し上げます.

文 献

- 1) 伊藤 治・岡野邦夫・黒岩美代子・戸塚 績: 糖分析計による植物葉中のグルコース, シュクロース, デンプンの簡易測定法, 土肥誌, **54**, 424~426 (1983)
- 2) 川野信寿: ハウスミカンの生産安定と品質向上 (1), 農及園, **62**, 1393~1400 (1987)
- 3) 久保田取治・福井春雄・本山栄一: 瀬戸内ミカン園の施肥合理化に関する研究 (第2報) 温州ミカン樹幼木の器官別体内組成の周年的変化, 四国農試報, **14**, 37~52 (1966)
- 4) 岡田正道・小中原実: ウンシュウミカンにおける樹体養分と生産性との関係, 園学要旨, 昭60春, p. 38~39 (1985)
- 5) 清水達夫・鳥潟博高・鳥居鎮男: 温州ミカンの着果負担に関する研究 (第3報) 葉果比が収穫期の樹体内炭水化合物含量ならびに翌春の着果数・新葉数に及ぼす影響, 園学雑, **43**, 423~429 (1975)
- 6) 杉山和美・久田秀彦・岡田長久・鈴木晴夫: ウンシュウミ

-
- カンの隔年結果と貯蔵養分に関する研究 (第 1 報) 青島温州幼木における冬季の炭水化物および窒素化合物の形態・存在部位, 静岡柑橘試研報, **24**, 61~70 (1992)
- 7) 杉山泰之・大城 晃: 温州ミカンの根中および枝中デンプンの簡易測定法 (第 1 報) 屈折糖度計, ヨウ素デンプン反応, F-キットスターチの利用による測定法, 同上, **28**, 11~18 (1999)
-