

ササニシキの生産性と炭水化物

第2報 グルコスタットによる水稻中の可溶性糖分析の検討

斎藤 公夫・中鉢 富夫・長谷川 栄一

(宮城県農業センター)

The Carbohydrates of the Rice Plant Variety "Sasanishiki" with Relation to the Productivity

2. The analysis of soluble sugar of rice plants using glucostat method

Kimio SAITO, Tomio TYUBATI and Eiichi HASEGAWA

(Miyagi Prefectural Agricultural Research Center)

1 はじめに

ササニシキは他の品種に比べ出穂時の乾物重が小さく、収量は登熟期の同化生産に大きく依存する。このことは出穂前の同化蓄積力が弱く、穂肥に当たっては細心の注意を払わないと窒素過多の軟弱徒長の生育に陥りやすいことを示す。また、それだけ幼穂の生育が天候不順の悪影響を受けやすいことを示す²⁾。したがってササニシキの生産力を安定させるには炭水化物の消長の把握が重要であると考えられる。本報告は水稻風乾試料中の可溶性糖の抽出条件、及び酵素反応によるグルコースとシュクロースの定量について検討し、稲の炭水化物生産を明らかにするのに役立たせようとしたものである。

2 方法

(1) 可溶性糖の抽出 風乾微粉砕稲体試料 0.1~0.2 g を 50ml 遠沈管にとり、40ml の 80% エタノールを加えて 1 hr 往復振とうする。80% エタノールで 50ml 定容とし、上澄みを遠心分離し、抽出液とする。

(2) エタノール除去、除タンパク処理 5~10ml の抽出液を、約 40℃ で乾固させないようにしてエタノールが 2 ml 以下になるまで濃縮する。1% ストマイを 1~2 滴加え、0.3 MZnSO₄、BaOH を各々 0.5 ml 加えて濁りを落とす。水で 10 ml 定容とし、上澄みを遠心分離し可溶性糖の分析に供する。

(3) グルコスタットフロー分析によるグルコース (Glu)、シュクロース (Suc) の定量 グルコスタット法¹⁾を図 1 示すフロー構成でオートアナライザーに組み込んだ。サンプルは R₁ (グルコスタット試薬) と混合、38℃ で 7 分間

反応を行わせた後、505 nm で発色が測定される。

1) Glu の定量 ニューグルコスタット (ウオーシントン)* 50ml バイアルに 35ml の水と一滴の 30% Brij 35 を加えて R₁ とする。検量は 0~80 ㎩ Glu を用いて行う。

2) Suc の定量 R₁ 液 10ml 当たり約 20 ㎩ の Invertase (シグマ、400 u/㎩) を添加することによりフロー内で Suc → Glu → 発色の反応を行わせる。本条件での GluC → Glu 転換率 (K) は 96% であった。検量に Glu を用いた場合 Suc 濃度は次の様にして求められる。Suc ㎩ = (1.9/K) × (A - B) A ; Invertase 添加時の Glu ㎩, B ; 無添加時 Glu ㎩, 1.9 = Suc / Glu 分子量比

3 方法の検討結果

(1) グルコスタットフロー分析における添加物の影響 試液中の酸度の変化、エタノール、防腐剤の影響についてみたのが表 1 である。試料中の酸度の変化は 0.02 NH⁺ ~ 0.02 NOH⁻ の範囲、エタノール濃度は 20% まで許容できる。防腐剤等についても大きな影響は認められないが、アスコルビン酸のような酸化還元に関する物質は強く妨害するので注意する。

(2) Invertase による Suc → Glu 転換

50 ㎩ Suc 液 1 ml 当たり Invertase 0.4 ㎩ を添加し、経時的に転換 Glu の量をグルコスタットにより追ってみた。(表

表 1 グルコスタットフロー分析における添加物の影響 - 60 ㎩ Glu 液について

添 加 条 件*			比率*	* 無添加 60 ㎩ Glu に対する吸光度の比率
無	添	加	100	
	HCl	0.05 N	95.3	
	"	0.02 N	99.5	
	NaOH	0.05 N	97.5	
	"	0.02 N	99.4	
ア	ル	コ	5 %	
	"	10 %	102.3	
	"	20 %	103.4	
	"	40 %	101.6	
	"	40 %	140	
安	息	香	0.02 %	100.3
S	ト	マ	40 ㎩	100.3
S	u	c	200 ㎩	101.9
F	r	u	200 ㎩	101.3
A	s	c	10 ㎩	76.1

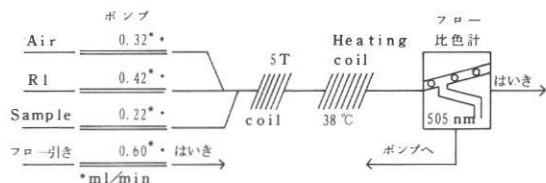


図 1 グルコースシュクロース定量フロー構成

* 藤沢薬品工業、1985. グルコースオキシダーゼ法によるグルコース測定 - ニューグルコスタット。

2)。その結果、転換はすみやかで、室温30分放置で99%以上の転換が得られる。pHが4~7の範囲では影響が認められない。なお、Invertase 0.4 mg/ml以上の添加によって転換が早まることはなかった。Invertase 添加グルコスタットフロー分析での転換率は96%で一定した。

表2 InvertaseによるSuc 50 μ mのGluへの転換

反 応 条 件	Glu μ m		平均転換 %
	pH 7	pH 4	
室温 20℃ 2 min 後	25.3	24.9	95.5
Invertase 10 min "	25.8	25.3	97.3
0.4 mg/ml 25 min "	25.3	25.7	99.0
2 hr "	26.5	26.0	100
Invertase 添加フロー分析			
0.5 mg / ml RI	25.6	24.9	95.8
2 "	25.6	25.0	96.3

注. 50 μ m Sucが完全に転換すれば26.3 μ m Gluである。

(3) 可溶性糖抽出条件の検討

1) 磨砕処理の有無、振とう時間、抽出回数

0.2 gの風乾微粉碎試料に対し40 mlの80%エタノールの抽出条件において①試料をそのまま1hr振とう、遠心分離、②セライトを加え乳鉢で少量のアルコールを加えて磨砕、80%エタノール添加後、直ちに遠心分離、又は1hr、3hrの振とう後に遠心分離 — により得た第一抽出液、更にこれらの残渣の80%エタノール、1hr振とうにより得た第2回抽出液についてSuc濃度を調べた(表3)。どの条件でも2回目の抽出で回収される糖は1回目の2~4%であり実際上無視できる。振とう時間については、なしの場合は若干回収が悪いが、1hrと2hrに差は認められない。加熱還流3hrによる抽出も試みたが、特に回収が良くなることはなかった。したがって抽出は方法に述べた条件

表3 風乾微粉碎試料の可溶性糖の抽出に対する磨砕処理、振とう時間、抽出回数の効果

試 料	抽出回	Suc mg / 0.1 g 試料				
		磨砕 振とう	なし		あり	
			1hr	なし	1hr	3hr
葉 身	1		3.9	3.7	4.0	3.9
出穂期	2		0.14	0.17	0.14	0.17
葉 鞘	1		5.8	5.3	5.8	5.8
減分期	2		0.23	0.15	0.10	0.10
玄 米	1		0.99	0.82	0.88	0.88
	2		0.02	0.016	0.016	tr

注. Sucroseの定量はレゾルシン法による。

で十分であると結論した。

2) 水抽出による可溶性糖分析

エタノール抽出液は保存性は良いが、定量に先立ち脱エタノールを行わねばならない。この必要のない水抽出について検討してみた。方法; 0.1~0.2 gの試料を磨砕し、水40mlで1hr振とう、以下エタノール抽出と同様に可溶性糖を定量する。エタノール抽出との比較を見たのが表4である。その結果葉身、穂については、エタノール抽出に比べ水抽出のGluが高くSucが低い傾向があるが、全体として両者の相関はよい。水抽出も簡便法として有用性があると思われる。

表4 80%アルコール抽出、水抽出による可溶性糖

試 料	mg / 0.1 g 試料			
	アルコール抽出		水 抽 出	
	Glu	Suc	Glu	Suc
葉 身 出穂期	0.79	2.44	0.95	1.80
葉 鞘 減分期	0.86	3.80	0.80	3.67
玄 米	0.40	1.03	0.34	0.99
葉 身 ₂ 出穂期	0.82	2.03	1.00	1.68
葉 鞘 "	1.10	3.32	1.26	3.38
穂 "	0.84	1.22	1.15	0.99
かん基 "	1.78	8.79	2.01	8.86

4 ま と め

(1) グルコスタット法をフロー分析化することにより、グルコース分析の精度向上と迅速化に非常に良い結果が得られた。また、フロー分析でグルコスタットにインペルターゼを添加することによりグルコース共存下のシュクロース濃度は差し引きにより容易に求められた。

(2) 風乾微粉碎試料0.1~0.2 gに対し40 mlの80%エタノールで室温1時間振とう後、遠心分離の1回操作により、96~97%の可溶性糖の抽出を得た。水抽出でもほぼ同等の抽出力があり、簡便法として採用できる。

引 用 文 献

- 1) 福井作蔵. 1969. 酵素または生物を利用する還元糖の定量. 生物化学実験法1—還元糖の定量法. 学会出版センター. p. 135.
- 2) 斎藤公夫, 中鉢富夫. 1985. ササニシキの生産性と炭水化物(第1報). 東北農業研究 37:31-32.