

キャピラリー電気泳動法によるイチゴの糖組成分析

佐藤公洋*・堀江秀樹¹⁾・北島伸之

キャピラリー電気泳動法 (CE) によるイチゴの糖組成分析について、キャピラリー管の洗浄方法を検討した。キャピラリー管の洗浄試薬にはメタノールと 1M 水酸化ナトリウムが適した。改良した条件で CE によるイチゴの糖組成分析を行った結果、3種類の糖が分離され、8検体の連続分析における泳動時間の変動係数は1.1%以下であった。果実から糖を水抽出する場合、電子レンジを使用したマイクロ波加熱処理によって糖代謝酵素は失活し、糖組成変化は抑制された。CE を用いてイチゴ3品種の糖組成分析を行った結果、糖含量の品種間差およびシヨ糖比率は既報告と同様の傾向が認められた。これらのことから、CE は低コストで簡便な手法として食味および組成別糖含量の品種間比較に関する活用が期待される。

[キーワード：イチゴ, キャピラリー電気泳動法, 糖組成]

Analysis of Sugar Composition in Strawberry Using Capillary Electrophoresis. SATO Kimihiro, Hideki HORIE and Nobuyuki KITAJIMA (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikusino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 28:56-60 (2009)

A protocol for washing capillary tubes was examined in connection with the analysis of sugars of strawberry using capillary electrophoresis. Methanol and 1M sodium hydroxide were found to be suitable for washing the capillary tube in the analysis of sugars. As a result of analyzing sugars using capillary electrophoresis with the improved washing method, 3 kinds of sugar in strawberry were separated. Coefficient of variation of detection time in 8 times continuous analysis was less than 1.1%. When sugars were extracted from strawberry fruits with water, heat-treatment with a microwave oven made sugar-metabolic enzymes inactive, and the changes in sugar composition were controlled. As a result of analyzing sugar composition of 3 strawberry cultivars using capillary electrophoresis, the differences between strawberry cultivars of sugar content and sucrose ratio (sucrose/sugar content) appeared to be consistent with past reports. It is hoped that the capillary electrophoresis described will be used to compare eating quality and sugar composition among strawberry cultivars as an inexpensive and simple method of sugar analysis.

[Keyword: strawberry, capillary electrophoresis, sugar composition]

緒言

近年、イチゴは「とよのか」、「女峰」による2大品種に代わり「さちのか」、「とちおとめ」、「福岡S6号(以下商標登録名「あまおう」とする)」など、国や各県が育成した多数の品種が栽培され、産地間競争が激化している。この状況の中で、良食味品種が消費者から強く求められており、食味はイチゴ品種の育成や生産・販売戦略の重要な指標となっている。

イチゴの食味に関して飯野ら(1982)は、糖含量が主要因、酸が従属要因であり、糖の増加によって食味が向上することを報告している。また、門馬ら(1991)は糖の種類によって甘味の程度が異なるため、糖組成を明らかにする必要性を指摘している。糖組成の分析については、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による方法が一般的であるが、分析項目によりカラムを変える必要があること、溶離液とする有機溶媒の使用量が多いことなどが問題である。これに対し、ランニングコストの安いキャピラリー電気泳動法(CE)がHPLCの代替法として注目されているが、農産物の糖組成分析に関しては、堀江ら(2006)によるトマト、キュウリなどの分析法が報告されている。

けで、イチゴに関する報告はこれまでにない。

また、イチゴの成分分析においては、サンプルを大量に調整する必要があり、より簡便な抽出操作が望まれる。抽出操作に関して、Ogiwaraら(1999)はHPLCにおいてアルコール抽出法と電子レンジ前処理水抽出法を比較し、電子レンジ処理によって糖代謝酵素が失活したと報告しているが、水抽出との比較は行っていない。

そこで、本研究ではCEによるイチゴに適した分析条件について、キャピラリー管の洗浄方法を検討した。また、試料調製における加熱処理の必要性について検討するとともに、実際にCEを用いたイチゴ3品種の糖組成分析を行い測定結果について検証した。

材料および方法

供試材料

供試品種には「あまおう」、「とよのか」および「さちのか」を用いた。これらの苗を福岡県農業総合試験場において、2007年8月22日から夜冷短日処理(日長8hr, 17時から9時までの暗期のみ12.5℃)を行い「とよのか」は9月14日、他の2品種は9月18日に定植し最低温度6℃のハウス内で土耕栽培を行った。試験1と2では12月に8~9分の着色程度で収穫した果実をホルトレイタイプの出荷容器に梱包し、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所へ5℃で冷蔵輸送して分析に供試した。収穫から分析までは3日を要した。試験3では10分に着色した

*連絡責任者

(野菜栽培部: k-sato@farc.pref.fukuoka.jp)

1) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
野菜茶業研究所

頂果房第2～5果を収穫し、果実のガクを取り除いて果重を測定した後-20℃で冷凍し、冷凍輸送して分析に供試した。

試験方法

分析方法

分析は、堀江ら(2006)が野菜の糖分析に用いた方法により次のように行った。糖組成分析にはキャピラリー電気泳動システム(アジレント社製, G1602A)を用いた。電気泳動液は安息香酸ナトリウム(関東化学(株), 特級)およびテトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド(和光純薬工業(株), 特級)をそれぞれ10mM, 0.5mMになるように超純水(日本ミリポア(株), ミリQラボ)に溶解し, 1M水酸化ナトリウム(和光純薬工業(株))でpH12.0に調製したものをを用いた。キャピラリー管は内径0.075mmのフューズドシリカ管(ジーエルサイエンス(株))を80.5cm(有効長72cm)に切断して調製した。分析用試料は50mbarで2秒間注入し, -30kVを印加して分離した。検出は, 検出波長を350nm(バンド幅10nm), 対照波長を225nm(バンド幅10nm)とする間接吸光度法により行った。試験2および3における洗浄条件は, 分析前に0.1M水酸化ナトリウムを1分, 水を0.1分, 電気泳動液を4分流し, 分析後に水を2分, メタノール(和光純薬工業(株), 特級)を3分, 1M水酸化ナトリウムを2分, 水を1分流す設定とした。また, 分析終了後には水を2分, メタノールを3分, 水を0.5分, 0.1M水酸化ナトリウムを4分, 水を1分流してキャピラリー管を洗浄した。連続分析検体数は8検体とし, 調査点数が多い場合は, 8検体毎に分析終了後の設定でキャピラリー管を洗浄した後, 新しい電気泳動液を使用して再度分析を行った。

試験1 キャピラリー電気泳動における洗浄条件の検討

調査には冷蔵輸送された生の「あまおう」を供試した。試料の調製は, ガクを取り除いた果実をビーカーに入れ, 果実の9倍量の蒸留水を加えてラップしたものを, 添加した蒸留水100g当たり1分間の割合で電子レンジによるマイクロ波加熱処理を行った後, ビーチブレンダー(Hamilton Beech社製)でホモジナイズ

し, ろ紙(アドバンテック東洋(株)製)でろ過して行った。この試料を最終的に50倍に希釈したのちメンブランフィルター(アドバンテック東洋(株), DIMIC-13CP, 孔径0.45μm)に通して分析試料とした。CEによる糖組成分析は堀江(2006)が報告した「キャピラリー電気泳動法による野菜成分分析マニュアル」に基づき, 分析前に0.1M水酸化ナトリウムを1分, 水を0.1分, 電気泳動液を3分, 分析後に水を1分, 0.1M塩酸を2分, 水を1分キャピラリー管に流す設定で行った。この条件で, 同一サンプルを4回繰り返し測定してピークの出現時間およびピーク面積を比較した。洗浄条件の検討は, 分析前に電気泳動液を流す時間を3分から4分に, 分析後, 最初に水を流す時間を1分から2分に変更し, 洗浄液に0.1M塩酸, 0.1M水酸化ナトリウム, メタノールと0.1M水酸化ナトリウムおよびメタノールと1M水酸化ナトリウムを用い, 洗浄時間をメタノールは3分, それ以外の洗浄液は2分として行った。

試験2 糖成分の抽出方法

冷蔵輸送された「とよのか」を5果供試し, 果実頂部から基部に向かって果実を2等分にした。そのうち1片は試験1と同様にマイクロ波加熱処理を行い試料を調製した。もう1片はマイクロ波加熱処理を省略し, それ以外の抽出処理は試験1と同様に行った。得られた分析試料をそれぞれ加熱抽出液, 水抽出液とし, CEによる糖組成分析を行い, 糖組成の変化について検討した。

試験3 組成別糖含量の品種間差

イチゴ3品種をそれぞれ15果供試した。冷蔵輸送された果実を試験1と同様にマイクロ波加熱処理を行い試料を調製した後, CEによる糖組成分析を行い品種間差について比較検討した。

結果および考察

試験1 キャピラリー電気泳動における洗浄条件の検討

堀江らの条件に従いCEによる「あまおう」の糖組成分析を試みた。その結果, 糖成分は果糖, ブドウ糖,

第1表 洗浄条件によるブドウ糖の泳動時間とピーク面積

洗浄条件		泳動時間(min)					ピーク面積(mAU*S)				
試薬(濃度)	洗浄時間	1回	2回	3回	4回	変動係数	1回	2回	3回	4回	変動係数
HCl (0.1M)	2min	7.4	8.1	8.9	9.5	10.8%	111	124	131	142	10.3%
NaOH (0.1M)	2min	7.1	8.0	8.7	9.4	11.7%	114	120	131	144	10.6%
MeOH + NaOH (0.1M)	3min	6.9	7.2	7.4	7.5	3.5%	111	113	115	117	2.4%
	2min										
MeOH + NaOH (1M)	3min	7.0	6.9	7.0	7.1	0.8%	109	109	107	106	1.4%
	2min										

注) 分析後の洗浄は各洗浄条件の前後に水を1分流して行った。

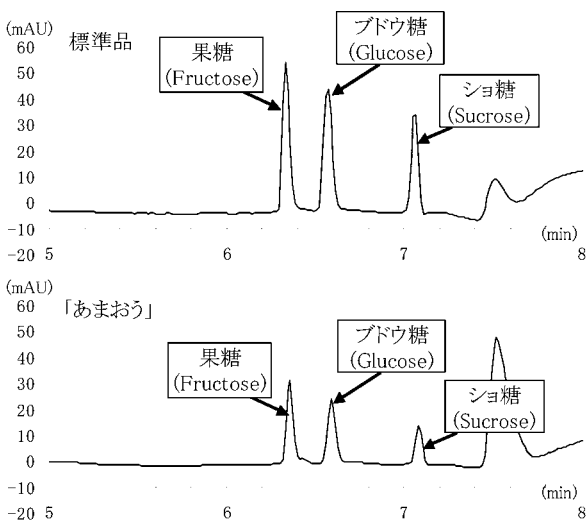
ショ糖の順に検出され、イチゴにおいても3種類の糖が分離可能であった。

第1表にCEにおける洗浄条件による泳動時間とピーク面積および変動係数を示した。各洗浄条件による泳動時間の変動係数は、0.1M塩酸で10.8%、0.1M水酸化ナトリウムで11.7%であったのに対し、メタノールと0.1M水酸化ナトリウムでは3.5%、メタノールと1M水酸化ナトリウムでは0.8%と小さくなった。またピーク面積の変動係数は泳動時間と同様の傾向を示し、0.1M塩酸で10.3%、0.1M水酸化ナトリウムで10.6%であったのに対し、メタノールと0.1M水酸化ナトリウムで2.4%、メタノールと1M水酸化ナトリウムでは1.4%であった。

堀江らの方法では糖組成分析後の洗浄に0.1M塩酸を用いている。しかし、イチゴの場合は、この方法で分析を繰り返すと泳動時間の遅延とピーク面積の増加により、再現性が低下した。CEにおいては、成分の泳動時間が遅くなるとピーク面積が増加することが知られており、分析の再現性を高めるためには泳動時間の変動を小さくする必要がある。また、堀江ら(2005)はCEによる有機酸分析において、泳動時間の変動は測定試料によるキャピラリー管の汚染が原因

であり、洗浄液の変更によって改善できることを報告している。そこで分析後のキャピラリー管洗浄に使用する試薬の種類および濃度について検討した。その結果、イチゴの糖組成分析において、分析後のキャピラリー管洗浄にメタノールを用いると泳動時間の遅れが改善され、特にメタノールと1M水酸化ナトリウムを組み合わせると泳動時間の変動係数が0.8%以下となり、再現性を高めることができた。

分析後の洗浄にメタノールと1M水酸化ナトリウムを用いたCEにおける標準品と「あまおう」のフェログラムを第1図に、連続分析における糖の泳動時間の変動係数を第2表に示した。標準品、「あまおう」ともに3種類の糖が分離され、その泳動時間はほぼ一致した。また、分析時間は、分析前後の洗浄を含めて22分程度であった。この条件で標準品1検体とイチゴ7検体の計8検体について連続分析を行ったところ、果糖、ブドウ糖およびショ糖の泳動時間の変動係数は0.6%以下であった。2回目の8検体連続分析を行った時の泳動時間の変動係数は1.1%以下となり、1回目よりも変動係数が増加した。堀江ら(2006)はタマネギを油炒めした試料の連続分析において、泳動時間の変動係数は0.6%以下であり、十分連続分析に耐えれると報告している。本研究では、泳動時間の変動係数は1.1%以下であり、堀江らの結果よりわずかに高いものの、イチゴの糖組成分析では8検体までは連続分析が可能であると考えられた。一方、2回目の連続分析における変動係数は最初よりも増加していることから、連続分析間の洗浄ではキャピラリー管が初期状態まで洗浄されていないことが懸念されるため、今後、内部標準の設定などについても検討する必要があると考えられた。



第1図 キャピラリー電気泳動法によるイチゴにおける糖の分離

注) 各標準品の濃度は1,000ppm

第2表 連続分析における各糖類の泳動時間の変動係数

糖	変動係数	
	1回目	2回目
果糖	0.53%	0.99%
ブドウ糖	0.55%	1.01%
ショ糖	0.60%	1.06%

注1) 連続分析検体数は8検体

2) 1~2回日の連続分析間に水を2分、メタノールを3分、水を0.5分、0.1M水酸化ナトリウムを4分、水を1分流した

試験2 糖成分の抽出方法

水抽出と加熱抽出による組成別糖含量を第3表に示した。果糖およびブドウ糖含量は、水抽出では3.2%および2.8%であるのに対し、加熱抽出では2.3%および2.0%で、水抽出では加熱抽出より果糖およびブドウ糖が有意に多かった。ショ糖含量は水抽出が0.4%であったのに対し加熱抽出が2.1%であり、水抽出では加熱抽出よりショ糖が有意に少なかった。果糖、ブドウ糖およびショ糖を合計した全糖含量は、水抽出、加熱抽出ともに6.5%であり、抽出法による全糖含量の差は認められなかった。HPLCでは、酵素作用を抑制するためアルコールで抽出した試料を分析に供試す

第3表 抽出法による組成別糖含量

抽出方法	果糖 (%)	ブドウ糖 (%)	ショ糖 (%)	全糖 (%)
水抽出	3.2	2.8	0.4	6.5
加熱抽出	2.3	2.0	2.1	6.5
分散分析	** ¹⁾	**	**	n.s.

注1)**は1%水準で有意差あり (n=5)。n.s.は有意差無し

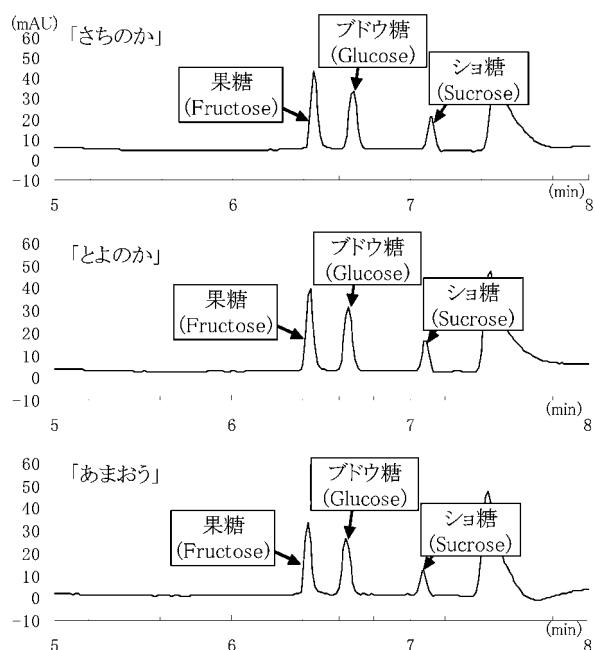
2) 供試品種は「とよのか」

場合が多いが、CEにおいては有機溶媒が分析の障害となるため、水による抽出を行うことが多い。しかし、水で抽出した場合には、酵素も活性を有したまま試料中に混在することとなり、酵素作用により糖組成変化が生じる可能性がある。

本研究の結果では、水抽出は糖組成の変化が確認されたが、電子レンジによる加熱処理はOgiwaraら(1999)の報告と同様にシヨ糖の加水分解を抑制したものと考えられた。ルーチン分析では簡易な試料調製が望まれるが、イチゴの糖組成分析で水抽出を行う場合には、マイクロ波加熱処理は省略できないことが確認された。

試験3 糖含量の品種間差

第2図にCEによる「あまおう」、「とよのか」および「さちのか」のフェログラムを示した。全ての品種において、3種の糖が分離され、その泳動時間はほぼ一致した。品種間による泳動時間の差がなかったことから、いずれの品種においても同様に糖組成分析が



第2図 キャピラリー電気泳動法によるイチゴ3品種における糖の分離

第4表 イチゴ3品種の組成別糖含量

	果糖 (%)	ブドウ糖 (%)	シヨ糖 (%)	全糖 (%)	シヨ糖比率
あまおう	2.0 a	1.9 a	2.1 b	6.1 b	35%
とよのか	2.2 b	1.9 a	1.6 a	5.7 a	28%
さちのか	2.1 ab	1.9 a	2.4 c	6.4 b	37%

注1) 異なる英文字間には Tukey 検定により 5%水準で有意差有り (n=15)

2) シヨ糖比率は全糖含量中に占めるシヨ糖含量の割合

可能であると考えられた。次に、イチゴ3品種の組成別糖含量を第4表に示した。全糖含量は「さちのか」と「あまおう」は同等で「とよのか」が最も少なく、それぞれ6.4%、6.1%、5.7%であった。シヨ糖含量は「さちのか」、「あまおう」、「とよのか」の順に多く、それぞれ2.4%、2.1%、1.6%であった。果糖含量は2.0~2.2%の範囲で分布し、ブドウ糖含量は3品種とも1.9%で、品種による含量の差は小さかった。また、全糖含量中のシヨ糖含量(以下シヨ糖比率とする)は「さちのか」および「あまおう」は37%および35%であり、「とよのか」の28%よりも高かった。

糖含量に関して、森下ら(1997)は「さちのか」は「とよのか」より糖度が高いことを、三井ら(2003)は「福岡S6号」の糖度は「とよのか」と同等かやや高く、「さちのか」と同等であることを報告しており、本報告の結果はこれらの報告とほぼ一致した。また、糖組成について、荻原ら(1998)は全糖含量に対する組成別糖含量の割合は品種特性を示す指標であると報告している。本研究で供試した3品種では、果糖およびブドウ糖含量の差は小さく、シヨ糖含量の差が大きかったことから、シヨ糖比率は品種間差を最も良く示すと考えられた。これまでに各品種におけるシヨ糖比率は「とよのか」では約30%(三浦ら1988, Ogiwaraら1999)、「さちのか」では約32%(曾根ら2002)、「あまおう」では35~50%(堤ら2005)と報告されており、本研究の結果でもほぼ同様の傾向が認められた。さらに、曾根ら(1999)は食味が優れる品種は全糖含量およびシヨ糖比率が高いと報告している。本報告でも、一般的に「とよのか」より食味が優れるとされる「あまおう」および「さちのか」は全糖含量およびシヨ糖比率が高かった。

これらのことから、CEによるイチゴの糖組成分析結果は食味および組成別糖含量の品種間比較に活用できると考えられた。

総合考察

本研究ではCEによるイチゴの糖組成分析について洗浄方法を検討した。特に、堀江らの示した従来法でイチゴの糖組成分析を行ったところ、電気泳動時間の変動が大きく、再現性が得られなかったため、このことへの対応方法として分析間におけるキャピラリー管の洗浄方法の改変を試みた。その結果、イチゴ果実を検体とする場合、キャピラリー管の洗浄にメタノールおよび1M水酸化ナトリウムを使用すると泳動時間の再現性が高くなることが明らかとなった。また、果実から成分を水抽出する際には、電子レンジによる加熱処理が必要であることが確認された。これらの方法を用いてCEによるイチゴの糖組成分析を行った結果、糖含量およびシヨ糖比率に関して、これまでの報告と同様の品種間差が認められた。

CEでは細いキャピラリー管内で電気泳動を行うため、分析に供試する試料の

量は数 μ l程度あれば十分であり、HPLCよりも微量の試料で分析が可能である。また、HPLCでは溶離液を分析中ずっと流し続けるため1検体分析するのに20ml程度の溶離液が必要であるが、CEでは8検体の連続分析でも電気泳動液の量は1ml以下で十分である。使用する電気泳動液が少ないため廃液量も少なく、CEはHPLCよりも安いランニングコストで分析が可能となる。さらに、CEはHPLCと比較して分析時間が短いこと、試料調製が簡便であることなどが利点であり、CEを使用することで官能評価した果実の残りをすぐに組成分析することが可能であると思われる。イチゴに良食味が求められる中、今後は食味と組成別糖含量との関連性についてデータベース化を進めるなど、良食味品種の選抜手法としてCEの活用が期待される。

引用文献

- 堀江秀樹・伊藤秀和(2006)キャピラリー電気泳動法による野菜中の糖分析. 野菜茶業研究所研究報告 5: 1-6
- 堀江秀樹・木矢博之・伊藤秀和・一法師克成・東敬子(2005)キャピラリー電気泳動法によるハウレンソウ中の硝酸イオンおよび主要有機酸の同時分析. 園学研 4: 95-98
- 堀江秀樹(2006)キャピラリー電気泳動法による野菜成分分析マニュアル. 野菜茶業研究所
- 飯野久栄・大和田隆夫・小沢百合子・山下市二(1982)果実類の糖および酸含量と嗜好に関する研究, 第4報. イチゴ・トマトについて. 食総研報 40: 71-77
- 石原良行・高野邦治・植木正明・栃木博美(1996)イチゴ新品種「とちおとめ」の育成. 栃木農試研報 44: 109-123
- 三井寿一・藤田幸一・末吉孝行・伏原肇(2003)イチゴ新品種「福岡S6号」, 「福岡S7号」の育成. 福岡農総試研報 22: 61-68
- 三浦周行・施山紀男・清水明美・今田成雄(1988)イチゴ果実の発育・成熟に伴う糖濃度の推移. 園学要旨 昭63秋: 414-415.
- 門馬信二・高田勝也(1991)イチゴ果実の糖度および酸度の遺伝. 園学雑 59(4): 719-726.
- 森下昌三・望月龍也・野口裕司・曾根一純・山川理(1997)促成栽培用イチゴ新品種「さちのか」の育成経過とその特性. 野茶試報 12: 91-115.
- 萩原勲・宮本亮・羽布津真典・鈴木雅人・箱田直紀・志村勲(1998)イチゴ果実内の糖含量・糖組成の品種, 収穫年次, 成熟期および作型による相違. 園学雑 67: 400-405
- Ogiwara, I. Ohtsuka, Y. Yoneda, Y. Sakurai, K. Hakoda, N and Shimura, I (1999) Extraction Method by Water followed by Microwave Heating for Analyzing Sugars in Strawberry Fruits. J. Japan. Soc. Hort 68(5): 949-953
- 曾根一純・望月龍也・野口裕司(1999)イチゴ果実の食味と糖・有機酸の含量及び組成との関係. 園学雑 68別1: 247
- 曾根一純・望月龍也・野口裕司(2002)イチゴにおける果実中の糖および有機酸の組成別含量の品種間差異および遺伝力. 野菜茶業研研報 1: 241-254
- 堤智博・山下純隆・大森薫(2005)イチゴ「あまおう」の品質特性 第1報 収穫時期, 着色程度別の果実品質. 福岡農総試研報 24: 1-4