葉菜類の貯蔵に伴うクロロフィル分解物の変化

収穫後における葉菜類のクロロフィル分解機構 (第5報)

山 内 直 樹*

Chlorophyll Derivatives of Stored Leafy Vegetables

(Mechanism of Chlorophyll Degradation in Harvested Leafy Vegetables Part V)

Naoki YAMAUCHI*

Himeji College of Hyogo, 1-1-12 Shinzaike-honcho, Himeji, Hyogo 670

Changes of chlorophyll derivatives in stored parsley (*Petroselinum sativum* HOFFM., cv Paramount) and mitsuba (*Cryptotaenia Japonica* HASSK., cv Osaka-mitsuba) leaves were studied in order to clarify the mechanism of chlorophyll degradation.

The chlorophylls and their derivatives (pheophytins, chlorophyllides and pheophorbides) were isolated by using thin layer chromatography, and identified by measuring R_f values, visible colors and spectral characteristics. This method is considered to be suitable for the separation of chlorophylls and their derivatives.

Chlorophylls and pheophytin contents decreased with the progress of yellowing of parsley and mitsuba leaves stored at 25°C, but the shifts of absorption spectrum were not observed. In parsley leaves stored at 25°C, small amounts of pheophorbide a and chlorophyllide a were detected, but these contents did not increase with yellowing of leaves. In case of mitsuba leaves, small amounts of chlorophyllide a and pheophorbide a were detected in the fresh leaves, but these contents also did not show any increase with yellowing of leaves.

It is concluded from these results that most of the chlorophylls in stored parsley and mitsuba leaves are degraded directly to the colorless products with the opening of porphyrin.

(Received Jan. 11, 1989)

緒 言

収穫後の葉菜類における品質低下の要因の一つは、葉の黄化現象、すなわちクロロフィルの分解である。筆者らは、これまで、収穫後における葉菜類のクロロフィル分解機構について検討し、Peroxidase ならびに Lipox-ygenase による酸化分解が主要な分解系であることを報告した^{1), 2)}。

また、Chlorophyllase もクロロフィル分解に関与し

ており、柑橘類ではエチレン処理を行うと、Chlorophyllase 活性の増大に伴い、クロロフィルの分解がみられることが報告されている^{3), 4)}。さらに、Luthy ら^{5), 6)}は、脂肪酸の存在下でクロロフィルの分解に作用する酵素である Chlorophyll oxidase が、大麦の葉のクロロプラスト (チラコイド) に存在することを明らかにし、また大麦以外のタバコ、マメなどのチラコイドにも酵素活性がみられることを報告している。

このようなことから本研究は、葉菜類の中で黄化が顕

*兵庫県立姫路短期大学 (〒670 姫路市新在家本町 1-1-12)

著にみられるパセリおよびミツバを使用し、黄化時におけるクロロフィル分解物の変化について調べることにより、葉菜類のクロロフィルがいかなる系により分解されているかについて検討を行ったものである。

実験材料および方法

1. 実験材料

実験材料として、パセリは品種パラマウントを、ミツバは品種大阪ミツバを使用した。貯蔵方法は、収穫後成熟葉のみを集め、密閉した容器に葉菜類を入れ、加湿空気（相対湿度97%以上）を流し（流量170ml/min.）、2℃ならびに25℃に貯蔵した。分析は葉身部を使用した。

2. クロロフィル分解物の調製

クロロフィルリッドの調製は、クロロフィルに Chlorophyllase 処理を行うことにより得た。すなわち、ハウレンソウ（品種ソロモン）からジオキサン処理によって得られた粗クロロフィルに⁷⁾、アセトンパウダー（ハウレンソウ）から0.2% TritonX-100を含む50mMリン酸緩衝液（pH 7.5）で粗酵素を抽出し、セファデックスG-25で低分子物質を除去したものを作用させ、クロロフィルリッドを生成させた。次に、この反応液にn-ヘキササン処理を行い、未分解のクロロフィルを除去した後、遠心分離し、クロロフィルリッドを得た。フェオフィチンは、クロロフィルを塩酸処理することにより、またフェオフォルバイドは、クロロフィルリッドに塩酸処理することにより得た。

3. 色素類の分析

パセリならびにミツバの葉身（4g）を、少量の石英砂ならびに炭酸ナトリウム（pH調整のため約10mg使用、pH7.0）とともに、冷アセトンを用い、乳鉢内で摩砕し、脂溶性色素を抽出した（最終濃度80%アセトン）。抽出液を濾過した後、吸収スペクトルを測定し、同時に薄層クロマトグラフィー（0.25mmメルク製シリカゲルプレート、展開溶媒：n-ペンタン：アセトン：t-ブチルアルコール=16：3：1）により色素を分離し分析を行った。

フェオフィチンaの分析は、薄層クロマトグラフィー展開後、フェオフィチンa画分を80%アセトンで抽出し、411nmの吸光度を測定した。

カロチノイド類の分析は、薄層展開後、エチルアルコールに溶解させ、吸収スペクトル特性を検討することにより行った⁸⁾。

Table 1 Spectral maxima and Rf values of chlorophylls and their derivatives.

	λ max (nm) in 80% acetone	Rf value* (x 100)	Visible color	
Chl a**	431.0	663.5	69	Blue-green
b	459.0	647.0	59	Yellow-green
Cd a	431.5	663.5	13	Blue-green
b	460.0	649.0	8	Yellow-green
Py a	411.0	666.0	76	Gray
b	435.0	654.0	69	Yellow-brown
Po a	411.0	666.0	21	Gray
b	436.0	654.0	14	Yellow-brown

* Rf values of thin layer chromatography

Silica gel plate (0.25mm), Solvent ; n-Pentane :

Acetone : t-Butyl alcohol = 16 : 3 : 1

** Chl-Chlorophyll, Cd-Chlorophyllide, Py-Pheophytin, Po-Pheophorbide

実験結果および考察

1. クロロフィルならびにクロロフィル分解物の薄層クロマトグラフィーによる分離

Table 1 は、クロロフィルならびにその分解物を薄層クロマトグラフィーで分離し、可視部吸収極大位置、Rf値および色調についてみたものである。可視部吸収極大位置は、クロロフィルリッドaおよびbは、クロロフィルaならびにbとほぼ一致しており、またフェオフィチンとフェオフォルバイドも同様に一致していた。色調についても、クロロフィルとクロロフィルリッド、フェオフィチンとフェオフォルバイドがそれぞれ同様の色調を示した。

一方、Rf値は高い方から、フェオフィチン、クロロフィル、フェオフォルバイド、クロロフィルリッドの順であった。しかしながら、クロロフィルaとフェオフィチンbおよびクロロフィルリッドaとフェオフォルバイドbのRf値がほぼ同じ値を示した。ただ、これらの色素は吸収極大位置が非常に異なっているため、分離後、吸収スペクトルを測定することにより、色素の混在をある程度検討することが可能であると考えられた。

吉浦ら⁷⁾も、薄層クロマトグラフィーによるクロロフィル類の分析は簡便で迅速な方法であり、UV光下での発色をみることにより、10⁻⁹gまで検出可能であると報告している。本研究においても、薄層クロマトグラフィーによるクロロフィル類の分離は、一部色素の重なりがみられるものの、簡便であり、クロロフィル分解物の検討に充分適用できるものと思われた。

Fig. 1 Changes of absorption spectrum in acetone extract of parsley leaves during storage at 25°C.
—initial extract,extract after 2 days of 25°C storage, — · — · —extract after 4 days of 25°C storage.

Fig. 2 Changes of absorption spectrum in acetone extract of mitsuba leaves during storage at 25°C.
—initial extract,extract after 2 days of 25°C storage, — · — · —extract after 4 days of 25°C storage.

2. 葉菜類の貯蔵に伴うクロロフィル分解物の変化

パセリならびにミツバを貯蔵すると、25°Cにおいて貯蔵3日頃から両葉菜で葉の黄化が認められた。一方2°Cでは貯蔵期間中、ほとんど葉の黄化は認められなかった。

Fig. 1 および Fig. 2 は、パセリならびにミツバの25°C貯蔵に伴うアセトン抽出物の吸収スペクトルの変化についてみたものである。両葉菜の貯蔵に伴い、660nmならびに430nm付近の吸収ピークの減少がみられ、特に貯蔵

Fig. 3 Thin layer chromatogram of acetone extract in parsley leaves stored for 4 days.
The plate (0.25mm silica gel) was developed with n-pentane-acetone-t-butyl alcohol (16:3:1), and the pigments were detected under visible and UV lights. Py-Pheophytin, Chl-Chlorophyll, Po-Pheophorbide, Cd-Chlorophyllide, Unknown-An chlorophyll derivative
* These chlorophyll derivatives were not almost detected under visible light, but detected under UV light.

2日から4日にかけて、その減少が顕著に認められた。しかしながら、貯蔵に伴い吸収極大位置のシフトを伴うスペクトルの変化は認められなかった。

次に、薄層クロマトグラフィーにより、クロロフィルならびにクロロフィル分解物の変化について検討を行った。Fig. 3は、パセリの貯蔵4日のアセトン抽出物の薄層クロマトグラムを示している。貯蔵当日は、2°Cの結果とほぼ同様で、主要な色素としてβ-カロチン、フェオフィチンa、クロロフィルa、クロロフィルb、ルテイン、ビオラキサンチン、ネオキササンチンがそれぞれ検出された。25°C貯蔵に伴いクロロフィルaならびにb、フェオフィチンaの減少 (Fig. 4) がみられた。25°C4日のもので、UV下においてのみ、わずかにフェオフィロバイドaとクロロフィルリッドaと思われる二つのクロロフィル分解物が検出された。図には示していないが、25°C2日のものでも、UV下でのみ両分解物が検出された。一方、2°Cでは、これら両分解物は認められなかった。

さらに、ミツバの貯蔵4日の薄層クロマトグラムについてみたところ (Fig. 5)、2°Cでの色素の分離は貯蔵当日と同じであり、また検出された色素はパセリとほぼ同

Fig. 4 Changes of pheophytin a in parsley and mitsuba leaves during storage at 25°C.

Fig. 5 Thin layer chromatogram of acetone extract in mitsuba leaves stored for 4 days. The plate (0.25mm silica gel) was developed with n-pentane-acetone-t-butyl alcohol (16:3:1), and the pigments were detected under visible and UV lights. Py-pheophytin, Chl-Chlorophyll, Po-Pheophorbide, Cd-Chlorophyllide
*Pheophorbide a was not almost detected under visible light, but detected under UV light.

様であった。25°C貯蔵に伴い、クロロフィルaならびにb, フェオフィチンaの減少 (Fig. 4) が認められた。ミツバの場合、少量であるが、貯蔵当日からクロロフィルリッドaとUV下でのみ、わずかにフェオフォルバイド

aが検出された。25°C 4日および2°C 4日においても、両分解物の存在はみられたが、含量の顕著な増大は両温度区ともみられなかった。

このように、パセリ、ミツバにおけるクロロフィル分解物として、フェオフィチンa, クロロフィルリッドaならびにフェオフォルバイドaが確認された。クロロフィルリッドa画分には、フェオフォルバイドbの混在も考えられたが、葉菜類の黄化時でのクロロフィルの分解はクロロフィルaの減少が顕著であることから考えると^{9), 10)}, この画分にはクロロフィルリッドaが主に含まれているものと推察された。また、フェオフィチンaは両葉菜とも貯蔵当日から検出され、貯蔵に伴い減少し、以前ハウソソウで報告した結果と同様であった¹¹⁾。さらに、クロロフィルリッドaならびにフェオフォルバイドaの含有は少量であり、25°C貯蔵中著しい増加は認められなかった。これらの結果から、クロロフィルの分解は、主として、ポルフィリンの開環を伴うクロロフィルから直接無色の物質へと分解されるものと考えられた。

Amir-shapira¹²⁾らは、エチレン処理されたタンジェリン果実の催色に伴い、Chlorophyllase活性が増大し、同時にクロロフィル含量の減少とクロロフィルリッド含量の増加がみられることを報告している。柑橘果実でのエチレン処理に伴うChlorophyllaseの増大とクロロフィル含量の減少とがBarmore³⁾ならびにShimokawaら⁴⁾によっても報告されているが、Purvis¹³⁾によれば、エチレン処理せずに自然に催色した場合、かならずしもクロロフィル含量の低下とChlorophyllase活性の増大という一致した関係がみられず、催色していない果実のChlorophyllase活性が、催色したものより高い場合もみとめられたと報告している。

本実験でも、葉菜類の黄化に伴い、クロロフィルリッドの顕著な増大はみられなかった。このようなクロロフィルリッドの増大は、エチレン処理された柑橘類のクロロフィル分解時に生じる現象と思われる。

一方、Luthyら⁵⁾は、Chlorophyll oxidaseがクロロフィルの分解に関与していることを報告している。この酵素の作用時には、リノレン酸のような不飽和脂肪酸の存在が必要であるが、ただオレイン酸、ステアリン酸でも活性がみられ、この点がLipoxygenaseとは異なっている。さらに、Chlorophyll oxidaseが作用した場合、クロロフィル分解物としてクロロフィルa-1 (10-Hydroxychlorophyll a) が形成されることがSchochら¹⁴⁾により認められており、実際の葉の黄化時でクロロフィルa-1の存在が確認されている¹⁵⁾。本実験でクロロフ

イル a-1 が存在した場合、クロロフィル a と b の中間の位置 (Rf 0.63~0.65) に検出される¹⁰⁾。しかしながら、パセリにおいて Rf 0.72 の位置にクロロフィル分解物と思われる未知物質が認められたが、両葉菜でクロロフィル a-1 は検出されなかった。Amirshapira ら¹²⁾は、またパセリの黄化に伴いフェオフィチン a ならびにフェオフィチン a と同じ吸収スペクトルを持つクロロフィル分解物の増大を報告しているが、本実験ではそのような傾向が認められなかった。

筆者ら^{1), 2), 17)}は、これまで Peroxidase の作用によるフェノール化合物の酸化や、Lipolytic acyl hydrolase と Lipoyxygenase の作用による不飽和脂肪酸の過酸化が、クロロフィルの分解に関与していることを報告してきている。不飽和脂肪酸の過酸化物が関与した場合、Chlorophyll oxidase と同様、クロロフィル a-1 の形成を伴うものと推察されるが、今後これら Peroxidase ならびに Lipoyxygenase によりクロロフィルが分解された場合、どのような分解物が生じるかについて検討を行う必要があると思われる。

摘 要

本研究は、パセリ、ミツバを使用し、貯蔵に伴うクロロフィル分解物の変化を調べることにより、葉菜類でのクロロフィル分解機構について検討を行ったものである。

1. クロロフィルならびにクロロフィル分解物 (フェオフィチン、クロロフィルリッド、フェオフォルバイド) を調製し、薄層クロマトグラフィーにより分離を行い、Rf 値、可視部吸収極大位置ならびに色調を調べたところ、一部色素の重なりがみられたものの、薄層クロマトグラフィーがクロロフィル分解物の検討に充分適用できることがわかった。

2. パセリの 25℃ 貯蔵に伴い吸収スペクトルの減少がみられ、クロロフィル分解物としてフェオフィチン a、フェオフォルバイド a ならびにクロロフィルリッド a が検出されたが、これら分解物の貯蔵に伴う増大は認められなかった。

3. ミツバの 25℃ 貯蔵に伴い、吸収スペクトルの減少がみられた。ミツバでは、貯蔵当日からフェオフィチン a、クロロフィルリッド a と微量のフェオフォルバイド a とが検出されたが、これらの分解物もパセリ同様、貯蔵に伴う顕著な増大はみられなかった。

以上の結果から、葉菜類の 25℃ 貯蔵に伴うクロロフィルの分解は、クロロフィルリッドおよびフェオフィチンを経る系も存在するものの、主要な分解系はクロロフィルから直接無色の物質へ変るものであると推察した。

本研究は 1986 年園芸大会春季大会で発表した。

引用文献

- 1) YAMAUCHI, N. and MINAMIDE, T. : *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **54**, 265 (1985)
- 2) YAMAUCHI, N., IIDA, S., MINAMIDE, T. and IWATA, T. : *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **55**, 510 (1987)
- 3) RAEMORE, C. R. : *HortSci.*, **10**, 595 (1975)
- 4) SIMOKAWA, K., SHIMADA, S. and YAEAO, K. : *Scientia Hort.*, **8**, 129 (1978)
- 5) LÜTHY, B., MARTINOIA, E., MATILE, P. and THOMAS, H. : *Z. Pflanzenphysiol.*, **11**, 423 (1984)
- 6) LÜTHY, B., THOMAS, H. and MATILE, P. : *J. Plant Physiol.*, **123**, 203 (1986)
- 7) 吉浦昌彦・人山啓治：蛋白質 核酸 酵素, **24**, 612 (1979)
- 8) DAVIES, B. H. : *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Vol. 2 (T. W. Goodwin ed, Academic Press, New York), p. 38 (1976)
- 9) 山内直樹・浜口辰治・緒方邦安：園学雑 **49**, 414 (1980)
- 10) YAMAUCHI, N., IIDA, S., MINAMIDE, T. and IWATA, T. : *J. Japan. Soc. Food Sci. Technol.*, **32**, 814 (1985)
- 11) 山内直樹・飯田修一・南出隆久・岩田 隆：園芸学会春季大会発表要旨, p. 464 (1981)
- 12) AMIR-SHAPIRA, D., GOLDSCHMIDT, E. E. and ALTMAN, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 1901 (1987)
- 13) PURVIS, A. C. : *Plant Physiol.*, **66**, 624 (1980)
- 14) SCHOCH, S., RÜDIGER, W., LÜTHY, B. and MATILE, P. : *J. Plant Physiol.*, **11**, 85 (1984)
- 15) MAÜNDERS, M. J., BROWN, S. B. and WOOLHOUSE, H. W. : *Phytochem.*, **22**, 2443 (1983)
- 16) 山内直樹：未発表
- 17) YAMAUCHI, N., IIDA, S., MINAMIDE, T. and IWATA, T. : *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **55**, 355 (1986)

(平成元年 1 月 11 日受理)