[農化 第 43 卷, 第 7 号, p. 423~428, 1969]

ホウレンソウ貯蔵時における脂質および色素の成分変化*

平 山 修, 大井戸秀年

(島根大学農学部)

昭和 43 年 10 月 4 日 受 理

Changes of Lipid and Pigment Compositions in Spinach Leaves during Their Storage

By Osamu HIRAYAMA and Hidetoshi OIDO

College of Agriculture, Shimane University, Matsue, Japan

This paper describes the changes of lipid and pigment composition in spinach leaves during their storages in various conditions. Leaf lipids and pigments were extracted and determined by separation on thin-layer plates, followed by chemical and spectral analysis, or by direct spectral estimation.

The patterns in change of lipid-soluble component contents in the leaves depended on their storage conditions tested. In the leaves closed in a polyethylene bag, chlorophyll a decomposed at a slower rate than chlorophyll b, while chlorophyll b more slowly in the open storage. In general, lipid contents decreased more rapidly than pigment contents. It was suggested that preliminary heat treatment at 100°C for 3 min stimulated phospholipase D activity and repressed galactolipase and sulfolipase activities in the leaves stored at 37°C. These effects were also observed partially in a storage at -10°C. In fresh leaves, galactolipids, which constitute the main components in chloroplast, began to decompose at higher rates at the earlier stage of the storage. The results suggest that some destruction of photosynthetic apparatus occurs at the earlier stage before discolorations of green leaves in their storage.

(Received October 4, 1968)

緒 言

野菜は収穫後も生活作用を営み、体内成分をたえず変化させて、品質の劣化を招く場合が多い。呼吸作用の強い緑葉野菜類はとくにこの現象が著しく、野菜保蔵の問題として今日広く注目を浴びている。いうまでもなく、緑葉は光合成組織を形成して、これに基づく機能的、構造的特徴も上記劣化現象と密接な関係をもっていることは容易に推察できる。すでに明らかにされているごとく、クロロプラストは蛋白質と脂溶性成分(脂質、色素およびキノン類)のほぼ等量から成り⁽¹⁻³⁾、しかも組織中における色素および脂質は速い代謝回転を示して⁽⁴⁾あ

る動的平衡を保持していると考えられる。したがって、これら脂溶性成分は緑葉のおかれている環境に呼応して鋭敏に変化しうる成分であり、これらの成分変化を調べることは緑葉野菜の劣化機構を知るうえに大切な手がかりを与えるものと推察される。

野菜貯蔵時における色素の成分変化に関しては、すでに部分的な研究⁽⁵⁾が発表されているが、本実験においては脂質および色素の全成分を対象にし、これら成分の分解消失と貯蔵条件との関係について検討、考察を試みた。

実 験 方 法

試料 市場からえた新鮮なホウレンソウを水洗し、濾紙の上で水きりして使用した。

* 光合成組織中におけるリビドおよびリボプロテイン複合体(第6報)

貯蔵方法と条件 上記ハウレンソウの葉身を集めて 100 g を精秤し, 必要な場合はひきつついて加熱処理および殺菌処理を行ってから, そのまま蒸発皿に入れる (開放貯蔵) か, あるいは, ポリエチレンの袋の中に密封して蒸発皿に入れ (封入貯蔵), 所定の温度のもとに所定の時間, 暗所で貯蔵した. 加熱処理は緑葉を沸騰水中に正確に 3 分間浸漬して行ない, つづいて直ちに氷水に入れて冷却した. また殺菌処理は 0.1% 昇汞液に 2 分間つけ, 昇汞液の付着したままポリエチレンの袋に封入して行なった.

色素および脂質の抽出 生葉 100 g にメタノール 300 ml を加えてホモジナイズし, ナイロン布を用いて濾過した. えられる抽出残渣を, さらにクロロホルム/メタノール (1/1, v/v) 混液 300 ml および 200 ml を用いて, 同様に 2 回抽出した. 抽出液は合し, その約 1/5 容の水を加えてクロロホルム層を分離させ, クロロホルム層を再度水洗した後, ロータリーエバポレーターを使用して 25°C 以下で減圧濃縮した. 濃縮物はクロロホルム/メタノール (4/1, v/v) を用いて一定容にし, 脂質および色素の分析に供した.

色素の分離と分析 スペクトル法によるクロロフィルの定量は Arnon の方法⁽⁶⁾, 全カロチノイドの定量は Goodwin の方法⁽⁷⁾によった. また各色素成分の分離および定量は既報の方法⁽⁸⁾に準じた. すなわち, シリカゲル G のプレートに色素溶液を一定量付し, ヘキサン/ジエチルエーテル/アセトン (60/30/20, v/v) の溶媒系を用いて, 暗所, 5°C で展開させた. えられる色素バンドは手早く削りとして*ガラスフィルターに入れ, 直ちにアセトンを用いて溶出した. ついで溶出液を一定容になし, 日立分光光度計 124 を使用してスペクトルを測定して, これから色素成分を同定, 定量した.

* クロマトグラムを展開槽から出した後直ちにガラス板でおおい, 展開溶媒が蒸発しないうちに削りとした.

脂質の分離と定量 既報の薄層クロマトグラフィーによる方法⁽⁹⁾を主として用いた. 試料を付したシリカゲル G のプレートをクロロホルム/メタノール/酢酸/水 (70/20/2/2, v/v) 混液で展開させ, 1% 沃素アルコール液を噴霧して, えられるバンドを抽出した. ついで抽出液中の糖およびリンの含量を測定し, 糖脂質およびリン脂質の量を算出した. ただし, クロマトグラムにおける各バンドの脂質は各種発色液, 赤外線吸収スペクトル, 標準脂質との R_f 値の比較, 脱アシル化物の検索などによって, あらかじめ同定の上定量した. リンの定量は過塩素酸を用いて灰化後, 渋谷らの方法⁽⁹⁾に従って発色, 比色し, 糖の定量はフェノール硫酸法⁽¹⁰⁾によった.

実験結果

ハウレンソウ生葉の脂質, 色素の含量および組成

供試ハウレンソウ生葉における全脂溶性成分の含量は乾燥重の 7.7% を占め, そしてこの中の 89% が脂質, 残りの 11% が色素から成っていた. 各成分の組成は Table I および Table II に示したとおり, 主成分は糖脂質 (66%), リン脂質 (17%), クロロフィル (9%), カロチノイド (2%) であり, ほかに中性油脂, キノン類などが少量存在していた.

色素および脂質の分解と貯蔵条件

ハウレンソウの貯蔵条件は Table I および Table II

Table I. Decomposition Rates (%) of Pigment Components in Spinach Leaves Stored at Various Conditions

Pigment components	Contents in 100 g original fresh leaves (mg)	Decomposition rate (%) [*]						
		44°C, 25 hr		37°C, 20 hr, closed			-10°C, 30 days, closed	
		open	closed	none	heated	heated, sterilized	none	heated
Total pigments	85	32	84	18	(-3)	24	5	10
Chlorophylls**	70	30	84	18	(-3)	26	3	7
chlorophyll a	52	40	83	15	(-7)	25	0	6
chlorophyll b	18	0	86	28	8	28	9	9
Carotenoids	15	43	75	15	(-1)	14	15	20
β-carotene	4	25	75	10	(-20)	4	11	11
lutein	7	55	75	15	0	11	12	21
zeaxanthin	1	25	75				50	42
violaxanthin	1	50	92	32	25	60	0	0
neoxanthin	2	30	80	17	19	19	28	33

* Decomposition rate (%) = 100(1 - B/A). A, content (mg) in original fresh leaves; B, content (mg) in leaves stored.

Storage condition: closed, closed in polyethylene bags; heated, preliminary heat treatment (100°C, 3 min); sterilized, preliminary sterilization (0.1% HgCl₂).

** Pheophytin a and pheophytin b contents were summed up to chlorophyll a and chlorophyll b contents, respectively.

Table II. Decomposition Rates (%) of Lipid Components in Spinach Leaves Stored at Various Conditions

Lipid components	Contents in 100 g original fresh leaves** (μ mole)	Decomposition rate (%)*						
		44°C, 25 hr		37°C, 20 hr, closed			-10°C, 30 days, closed	
		open	closed	none	heated	heated, sterilized	none	heated
Glycolipids	940***	82	98	68	43	48	62	50
monogalactosyl diglyceride	308	89	98	68	48	62	70	69
digalactosyl diglyceride	328	82	99	78	54	37	52	50
sulfoquinovosyl diglyceride	106	69	96	54	1	46	71	9
cerebroside+sterol glucoside	62	76	93	60	38	43	60	28
Phospholipids	210	54	87	44	67	21	38	40
phosphatidic acid	21	33	33	69	100	6	44	12
diphosphatidyl glycerol	13	60	87	(-30)	7	0	56	28
phosphatidyl ethanolamine	50	60	94	74	64	15	30	64
phosphatidyl glycerol	65	65	89	69	55	26	37	59
lecithin	48	57	97	17	86	33	30	0
phosphatidyl inositol	13	0	90	(-60)	87	28	88	64

* see Table I.

** Glycolipids, μ moles as galactose; phospholipids, μ moles as phosphorus.*** Esterified sterol glucoside and others were contained (136 μ moles as galactose).

に示したとおり, 44°C, 37°C, および -10°C の温度のもとに, 開放貯蔵* (open), 封入貯蔵* (closed), また貯蔵前に予備加熱処理をした場合 (heated), および加熱処理とそれにひきついて殺菌処理をした場合 (heated, sterilized) を設定して, 各脂溶性成分の分解傾向を検討した。これらの結果は, 各成分の生葉に対する減少率, すなわち分解率 (%) として表示した (Table I および Table II)。

Table I でみられるように, 生葉を 44°C, 25 時間貯蔵した場合, 色素成分は開放貯蔵より封入貯蔵において高い分解率を示し, また分解傾向のパターンも両条件下において異なっていた。すなわち, 開放貯蔵においてはクロロフィル a がクロロフィル b よりきわめて早く分解するのに対し, 封入貯蔵ではクロロフィル b が一般に高い分解率を示した。また 37°C, 20 時間の封入貯蔵の際, 予備加熱処理は各色素成分の分解を強く抑えており, β -カロチンおよびクロロフィル a においてはその含量をむしろ増加させた。ただしこの加熱効果は, ついて殺菌処理をした場合, および低温貯蔵 (-10°C) の場合にはほとんど認められなかった。キサントフィルの各成分は, 温度その他の貯蔵条件によって成分相互間の相対的分解率を異にし, とくに violaxanthin はこの傾向を強く示した。

脂質成分は, 上記のすべての貯蔵条件において, つね

* 実験方法の項を参照。

に色素成分より早く分解消失した (Table II)。そして生葉貯蔵の場合, 高温, 低温いずれの貯蔵温度においても, 糖脂質がリン脂質に比較して高い分解率を示した。この場合, 糖脂質相互の相対的分解率は貯蔵温度によってかなりの差異を生じた。たとえば, ガラクト脂質においては -10°C 貯蔵で monogalactosyl diglyceride が早く分解し, 反対に 37°C 貯蔵では digalactosyl diglyceride が高い分解率を与えた。予備加熱処理は, 糖脂質とくにスルホリビドの分解を強く抑制したのに反し, 37°C 貯蔵におけるレシチン, phosphatidyl inositol の分解を大きく促進した。一般に, 各リン脂質成分の分解傾向はそれぞれ大きく異なり, リン脂質相互間の代謝的移行を暗示した。昇永液による殺菌処理はリン脂質の分解率を低下させたが, 色素, 糖脂質の分解に対しては抑制効果を示さなかった。

成分分解の時間的推移

生葉および加熱処理葉を 37°C, 20 時間封入貯蔵し, 成分分解の時間的推移を調べた。これらの結果は, 原生葉中の各成分含量を 100 とする相対含量の変化として, Fig. 1, 2, 3 および 4 の各図に示した。

生葉中における色素成分の分解消失は貯蔵初期に緩慢であるが, 後期に促進された (Fig. 1)。これに反し, 糖脂質およびリン脂質は初期から急速に分解され始め, 後期には反応が平衡に近づいた。加熱処理は後期における色素の分解を抑制した。また, 同処理は糖脂質およびリ

Fig. 1. Gross Changes of Pigment and Lipid Contents in Spinach Leaves Stored at 37°C.

Spinach leaves were stored in polyethylene bags, followed by extractions and analyses. Pigment and lipid contents were expressed as relative contents for 100 μ moles in original fresh leaves.

- Chlorophylls
- Carotenoids
- △—△ Glycolipids
- Phospholipids

Broken lines: Preliminary heat treatment (100°C, 3 min).

ン脂質の相対的分解速度を変化させたが、分解の時間的推移の傾向にはあまり大きな影響を与えなかった。

色素の各個の成分の変化は、Fig. 2 に示すとおり、クロロフィル a, クロロフィル b, および violaxanthin が生葉貯蔵の後期に至って急速な分解を受け、そして加熱貯蔵をするとクロロフィル a, クロロフィル b, および β -カロチンの分解傾向が著しく変えられた。

生葉貯蔵時におけるガラクト脂質の分解において、monogalactosyl diglyceride は貯蔵時間とともに直線的に分解が進むのに対し、digalactosyl diglyceride は貯蔵初期から急速に分解消失し、そして後期に至って平衡に近づいた (Fig. 3)。また、スルホリピドは加熱処理によって貯蔵期間中における分解が強く抑えられた。

Fig. 4 でみられるとおり、生葉貯蔵時におけるリン脂質の分解パターンは、phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl glycerol, phosphatidic acid が分解消失するのに対し、diphosphatidyl glycerol, phosphatidyl

Fig. 2. Changes of Pigment Component Contents in Spinach Leaves Stored at 37°C.

Experimental procedure is the same as described in Fig. 1.

- (1) ○—○ Chlorophyll a
- (2) ●—● Chlorophyll b
- (3) △—△ β -Carotene
- (4) □—□ Lutein
- (5) ■—■ Neoxanthin
- (6) ×—× Violaxanthin

Broken lines: Preliminary heat treatment.

Fig. 3. Changes of Glycolipid and Sulfolipid Contents in Spinach Leaves Stored at 37°C.

Experimental procedure is the same as described in Fig. 1.

- Monogalactosyl diglyceride
- △—△ Digalactosyl diglyceride
- Cerebroside and sterol glucoside
- Sulfoquinovosyl diglyceride

Broken lines: Preliminary heat treatment.

Fig. 4. Changes of Phospholipid Contents in Spinach Leaves Stored at 37°C.

Experimental procedure is the same as described in Fig. 1.

- Phosphatidic acid
- Diphosphatidyl glycerol
- △—△ Phosphatidyl ethanolamine
- ▲—▲ Phosphatidyl glycerol
- Lecithin
- Phosphatidyl inositol

Broken lines: Preliminary heat treatment.

inositol 量は大きく増加して、これら 2 群のリン脂質間に代謝移行があることを示唆した。また加熱貯蔵をすると、生葉貯蔵時と傾向が部分的に異なるが、より明確な分解過程を示した。すなわち、レシチン、phosphatidyl inositol が分解消失するとともに diphosphatidyl glycerol, phosphatidyl glycerol が形成され、ついでこれら酸性リン脂質の消失とともに phosphatidic acid が急増した。

考 察

緑葉野菜を暗所空气中に貯蔵する場合、緑葉中の脂質および色素の分解消失は、内在酵素、微生物、空気酸化などの諸要素によって惹起されると推察される。しかしながら、上記実験結果でみたように、殺菌処理がリン脂質以外の成分の分解抑制に対して効果を示さず^{*}、また各成分の分解傾向が貯蔵条件によって特異的に変化した

ことは、これら成分の分解パターンが大部分緑葉中の内在酵素によって支配されていることを暗示していると考えられる。

色素成分の分解において、クロロフィル a および b 相互の相対的分解率は開放あるいは封入貯蔵によって大きな変化を示した。これは、緑葉中の水分量あるいは周囲のガス組成などの要素によって支配される現象と推察され、クロロフィラーゼの性質と関連して興味深い。また、カロチノイド成分のうち、とくに violaxanthin が貯蔵条件に敏感に呼応して分解傾向を変化させたことは、本成分の特異な生理的役割を示唆しているといえよう。

緑葉中に phospholipase D が存在し^(11,12)、しかもこの酵素が他の酵素に比較して熱に安定であることは、すでに知られている⁽¹³⁾。本実験 (Table II および Fig. 4) において、生葉の加熱処理がリン脂質とくにレシチンの分解を強く促進したことは、phospholipase D 活性が加熱貯蔵におけるリン脂質の分解パターンと密接に関連していることを示している。また Fig. 4 の結果は、加熱貯蔵におけるリン脂質の代謝系として次のような分解経路の存在を暗示している：

この経路は、最近 Dawson が発表している phospholipase D の transferase activity⁽¹⁴⁾ と関連して興味をもたれる。

Sastry & Kates⁽¹⁵⁾ は、ガラクト脂質を分解する酵素 (galactolipase) が緑葉に存在することを発見し、さらに、Helmsing⁽¹⁶⁾ はホウレンソウから galactolipase を調製し、その貯蔵時において digalactosyl diglyceride から monogalactosyl diglyceride に対して活性が移行することを報告した。Table II および Fig. 3 におけるガラクト脂質の組成変化は、まさにこの galactolipase 活性に基づくことを示すものであり、本酵素の *in vivo* における性質が部分的にうかがわれる。また同様に、本実験のデータから、スルホリピドを分解する酵素 (sulfolipase) がホウレンソウ中に存在し、しかもこの酵素が熱に不安定であることも容易に推察された。

* リン脂質に対する分解抑制も、殺菌効果によるとするよりも、むしろ昇温がリン脂質分解酵素の活性を阻害した、と考える方が妥当であろう。

上述のように, ガラクト脂質はクロロプラストを構成する主成分であり, かつ, この成分は色素成分に比して生葉貯蔵の初期からかなり急速な分解消失をみせた. これらの事実, は, 緑葉野菜の貯蔵の際, 緑葉の変色(黄化)に先立って光合成組織の破壊反応がかなり早くから進行していることを強く示唆するものであり, この面からの詳細な研究がまたれる.

要 約

ハウレンソウを種々の条件下に貯蔵し, 貯蔵中における脂質および色素の成分変化を調べた.

(1) ポリエチレン袋による封入貯蔵は, 貯蔵温度44°Cにおいて各成分の分解を促進した. 封入と開放の両条件下では分解のパターンも異なり, 封入貯蔵ではクロロフィルbが, また開放貯蔵ではクロロフィルaがより早く分解された. violaxanthinの分解率は貯蔵条件にとくに大きく支配された.

(2) 脂質は貯蔵初期から色素より高い分解率を示した. 生葉貯蔵において, 糖脂質はリン脂質よりもつねに早く分解消失した.

(3) 貯蔵前の予備加熱処理(100°C, 3分間)は色素, 糖脂質の分解を抑制し, 他方, リン脂質の分解を促進した. -10°C貯蔵においても, この加熱効果は部分的に認められた.

(4) 加熱処理葉の貯蔵において次のようなリン脂質の分解経路がみられた.

(5) 貯蔵中における緑葉野菜は, その変色に先立って光合成組織の破壊を大きく進めていることを推察した.

- (1) R. B. Park and Pon : *J. Mol. Biol.*, **6**, 105 (1963).
- (2) H. K. Lichtenthaler and M. Calvin : *Biochim. Biophys. Acta*, **79**, 30 (1964).
- (3) 平山 修 : 脂質生化学研究 (第10回日本脂質生化学会報告, 1968).
- (4) R. A. Ferrari and A. A. Benson : *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 185 (1961).
- (5) 邨田卓夫, 上田悦範, 緒方邦安 : 園芸学会 (昭和41年度秋) 講演要旨集, p.309; 邨田卓夫, 緒方邦安 : 農化大会 (昭和43年度) 講演要旨集, p.308.
- (6) D. I. Arnon : *Plant Physiol.*, **24**, 1 (1949).
- (7) T. W. Goodwin : *Biochem. J.*, **68**, 503 (1958).
- (8) O. Hirayama and T. Suzuki : *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 549 (1968).
- (9) I. Shibuya, H. Honda and B. Maruo : *ibid.*, **31**, 111 (1967).
- (10) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith : *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1955).
- (11) L. Acker, W. Diemair and R. Jäger : *Biochem. Z.*, **322**, 471 (1952).
- (12) M. Kates : *Can. J. Biochem. Physiol.*, **32**, 571 (1954).
- (13) F. M. Davidson and C. Long : *Biochem. J.*, **69**, 458 (1958).
- (14) R. M. C. Dawson : *ibid.*, **102**, 205 (1967).
- (15) P. S. Sastry and M. Kates : *Biochemistry*, **3**, 1280 (1964).
- (16) P. J. Helmsing : *Biochim. Biophys. Acta*, **144**, 470 (1967).