[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.61, No. 4, pp. 451~456, 1987]

緑葉のクロロフィラーゼ活性とブランチング時の 色調の変化について

小倉長雄, 上野 護, 松永政也, 佐藤隆英, 中川弘毅
(千葉大学園芸学部農芸化学科)

昭和 61 年 8 月 15 日 受 理

Chlorophyllase Activities and Color Changes of Fresh Green Leaves on Blanching

Nagao OGURA, Mamoru UENO, Masaya MATSUNAGA,
Takahide SATO and Hiroki NAKAGAWA

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Horticulture,
Chiba University, Matsudo 271*

Chlorophyllase activities were found to be high in tea and goosefoot leaves and low in leaves of 10 other plants. The color of the fresh leaves changed from green to bright green during blanching. Chlorophyllide was not detected in these leaves after blanching, and chlorophyllase seemed to be not operated during blanching.

When the fresh leaves were dipped in hot water (60~70°C) for 5~6 min, a large amount of chlorophyllide was produced, especially with goosefoot leaves, but a color change was not observed. It thus appears that the change in color of fresh leaves on blanching can not be ascribed to chlorophyllase activity. Chlorophyllide was unstable in the acetone homogenate of fresh leaves, and purified chlorophyllide was more labile than chlorophyll upon heat treatment.

(Received August 15, 1986)

緒 言

クロロフィラーゼ [EC 3.1.1.14] はクロロフィルを
フィトールとクロロフィライドへの加水分解を触媒する
酵素であり広く緑葉中に分布している。

クロロフィルはハウレンソウなどの緑葉中では葉緑体
のたん白質・脂質などと複合体を作って存在し、そのク
ロロフィル複合体の吸収極大は 693 nm 付近であって、
有機溶媒中の遊離クロロフィルの吸収極大 (660 nm, エ
ーテル中) より長波長側にシフトしている。

緑茶をブランチングすると緑色が鮮やかに固定される
現象が見られるが、これは葉緑体のたん白質の熱変性によ
ってクロロフィルの存在状態に変化が生じた結果と考え
られ、それに伴い吸収極大も 683 nm 付近の短波長側
にシフトすることが見られる (未発表)。

また一方ブランチングの際にはクロロフィラーゼが働

きクロロフィルをクロロフィライドに変化させるとの報
告があり^(1,2), クロロフィルの変化が葉の色調の変化に影
響を及ぼすといわれている。

ブランチングの時間が長くなればクロロフィルは熱に
よりフェオフィチンに分解され、緑葉が褐変化する現象
はよく知られており、この過程での研究は古くから行わ
れてきた⁽³⁻⁶⁾。フェオフィチンへの変化は酸性下で進行
が激しいのでブランチングの際は酸性にならぬ配慮が必
要である。

ここではブランチング初期過程で見られる緑色の色調
の変化に、クロロフィラーゼの働きが影響するか否かを、
ハウレンソウおよびクロロフィラーゼ活性の強いア
カザを用いて検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 材料 千葉大学園芸学部構内および農場に生育

しているものを採取し、ただちに実験に用いた。

2. クロロフィルおよびクロロフィライドの調製法

クロロフィル (a と b の混合物) はホウレンソウより、ジオキサン法⁽⁷⁾で調製し、アセトン溶液として -20°C 暗所に保存した。クロロフィライドはクロロフィルにクロロフィラーゼを作用させて調製した。クロロフィルのアセトン溶液に同量の純水を加え、アセトン濃度を約 50% (v/v) にした溶液にクロロフィラーゼ標品としてのアカザの葉のアセトンパウダーを加え 30°C に約 30 分保ったのち、アセトン濃度が約 75% (v/v) になるようにアセトンを加え反応を停止させて濾過した。濾液と同量の *n*-ヘキサンを加え攪拌し、未反応のクロロフィルを *n*-ヘキサン層に転溶させて除き、下層のアセトン-水層を凍結乾燥した。これをアセトンに溶解したものをクロロフィライドとして使用した。

3. クロロフィラーゼ活性の測定法 クロロフィラーゼはきわめて抽出しにくい酵素であるため^(8,9)、緑葉中の活性は前報に準じて測定した⁽¹⁰⁾。すなわち試料の一定量にアセトン濃度が 90% (w/v) になるようにアセトンを加えホモジナイザーでホモジネイトしたのち、このサスペンションと同容の純水を加えて 30°C の恒温槽中で酵素を作用させ、緑葉自身のクロロフィルを分解させた。サスペンションより経時的に 2 ml を採り、アセトン 2 ml, *n*-ヘキサン 4 ml を加えて攪拌し残存クロロフィルを *n*-ヘキサン層に、生成クロロフィライドをアセトン-水層に分配した。ヘキサン層は 5.2 ml, アセトン-水層は 2.8 ml となった。ヘキサン層の吸光度を 663 nm, アセトン-水層の吸光度は 665 nm で測定し、反応前の吸光度と比較し、分解および生成率で表した。以下この測定法をアセトン系法と呼ぶことにする。

生葉をブランピングした際に働くクロロフィラーゼ活性は、ブランピング後の葉中に含まれるクロロフィライド量の生成率で表した。ブランピング後の葉をアセトンでホモジネイトしたのち、クロロフィライドを前述の方法で測定した。

4. 表面色の測定および表示法 緑葉の色調は肉眼で観察するとともに東京電色株式会社の色差計カラーエース、モデル TCA-I を用いて測定した。表示は CIE 色度図から主波長、彩度を求め明度とともに表示した。また L_{ab} 方式による色差を求め NBS 単位として表示した。

5. フェオフィチンの測定法 クロロフィルがフェ

Table I. Distribution of Chlorophyllase in Various Plant Leaves

Material	Chlorophyll content*	Chlorophyllase activity**
Spinach	1.51	1.17
Goosefoot	1.31	5.18
Chinese cabbage	1.02	1.21
White clover	1.25	0.98
Chick weed	1.36	0.96
Aster	1.82	0.15
Tea	1.08	6.14
Cammellia	0.75	0.41
Spindle tree	1.15	0.75
Cherry	1.78	0.88
Maple	1.43	1.26
Pine	1.89	2.42

* mg/g fresh weight.

** mg chlorophyll hydrolyzed/hr/g fresh weight.

オフィチンに変化しても吸収曲線は長波長側にわずかに移るのみで大きな変化は生じない。そこで Dietrich らの方法⁽¹¹⁾に従ってフェオフィチン特有の吸収波長 534 nm とクロロフィルとフェオフィチンの吸収曲線の交点 556 nm の吸光度の比からフェオフィチンへの変化率は次の式によって求めた。

$$\text{フェオフィチンへの変化率} \% = \frac{R_x - R_0}{R_{100} - R_0}$$

R_0 はクロロフィルの 90% アセトン溶液の 534 nm/556 nm の値 (吸光度比) であり、 R_{100} は上記クロロフィル溶液に飽和シュウ酸溶液を約 1% 加え 1 時間放置してクロロフィルを 100% フェオフィチンに変化させたときの吸光度比であり、 R_x が試料の吸光度比である。クロロフィライドの吸収曲線はクロロフィルの吸収曲線と同じであるのでフェオフィチンへの変化も同様に行った。

実 験 結 果

1. 緑葉中のクロロフィラーゼの分布について

各種試料の緑葉中のクロロフィラーゼ活性をアセトン系法で測定した結果を Table I に示す。

すべての試料に活性が見られたが、活性の強さには差がありアカザおよび茶葉に高い活性が見出された。

2. アセトン系法による酵素活性測定法について

活性の強いアカザ葉を用いてアセトン系法で経時的に活性を測定した結果を Table II に示す。

反応初期はクロロフィルの分解量とクロロフィライドの生成量は一致し、消失したクロロフィルはクロロフィ

Table II. Time Course of Hydrolysis of Chlorophyll and Formation of Chlorophyllide in 50% Acetone Homogenate of Goosefoot Leaf

Reaction time (min)	Hexane layer (Chlorophyll)		Acetone-H ₂ O layer (Chlorophyllide)		Total	
	OD ^a	Hydrolyzed (%)	OD ^b	Formed (%)	OD ^c	Recovery (%)
0	2.27	0	0	0	2.27	100
5	2.13	6.1	0.14	6	2.27	100
10	2.0	12	0.27	12	2.27	100
15	1.82	19	0.45	20	2.27	100
30	1.46	35	0.74	33	2.27	100
60	0.89	61.5	1.0	45	1.89	83
90	0.51	77.4	1.08	48	1.59	70
120	0.31	86.2	0.56	25	0.87	39
180	0.21	90.8	0.36	16	0.56	25

OD^a was measured at 663 nm. OD^b was measured at 665 nm. OD^c was added OD^a+OD^b.

Table III. Color Changes and Formation of Chlorophyllide in Fresh Leaves by Blanching in the Boiling Water for 1 min

Material	Treatment	Main Wave length (nm)	Saturation (%)	Lightness (%)	Color difference (ΔE)	Formation of chlorophyllide (%)
Spinach	fresh	569	40	9.4	10.0	0
	100°C	559	33	7.5		
Goosefoot	fresh	566	44	10.3	11.8	0
	100°C	557	24	7.2		

The tone of color was indicated from C.I.E. Chromaticity Diagram.

Table IV. Color Changes and Formation of Chlorophyllide in Fresh Spinach Leaves by Blanching in the Boiling 0.5% NaCl and NaHCO₃ Solution for 1 min

Treatment	Main Wavelength (nm)	Saturation (%)	Lightness (%)	Color difference (Δe)	Formation of chlorophyllide (%)
Fresh	564	42	9.6	6.7	0
H ₂ O	555	27	7.7		
0.5% NaCl	557	28	7.0		
0.5% NaHCO ₃	558	28	7.8		

The tone of color was indicated from C.I.E. Chromaticity Diagram.

ライドとして回収された。しかし時間の経過に伴ってクロロフィルの分解はほぼ直線的に進行するが、クロロフィライドの生成量は減少し、とくに1時間を過ぎるころより顕著になった。この現象は生成したクロロフィライドが何らかの作用により分解されるものと思われ、含水アセトンのホモジネイト中では不安定であると考えられた。以上の結果から酵素活性測定にはクロロフィルの分解量を測定するほうが正しい値が出ると思われた。

3. ブランチング時の変色とクロロフィラーゼ活性

ハウレンソウと酵素活性の強いアカザを用いて、ブランチングの条件を変えて変色との関連を検討した。

(1) 沸とう水中で1分間のブランチングしたときの変色

ブランチング後ただちに冷水で冷却した葉の色調とクロロフィライド生成量を測定した結果を Table III に示す。ブランチングを行った葉は生葉に比して外観からは鮮やかな緑色に変色した。色差計の測定結果も主波長が約 10 nm 短波長側に移り青味を帯びたことを示し、色差も 10 と大きな色調の変化が生じたことを示した。しかしブランチング後の葉中にはアカザ、ハウレンソウともクロロフィライドの生成は見られず、したがってクロロフィラーゼはブランチング中に作用しなかったことを

示唆した。

(2) 0.5% 食塩および 0.5% 重曹溶液中でブランチングしたときの变化

ホウレンソウなどを色よくゆでるには食塩や重曹を入れるとよいといわれているので、食塩および重曹の 0.5% 溶液を用いて 1 分間沸とう液中でブランチングを行った結果を Table IV に示す。生葉と比して緑色が鮮やかになる色調の変化は認められたが、水中で加熱したものとはほとんど差はなく、塩類を添加すると色調がとくによくなる結果は認められなかった。またクロロフィライドの生成も認められずクロロフィラーゼの作用およびアルカリ性溶液によりクロロフィルの分解は生じないことが示唆された。

(3) 60~70°C の温水で加熱したときの变化

クロロフィラーゼが作用するといわれる 60~70°C の温水中に 5 分間、生葉を保ったときの結果を Table V に示す。この処理では外観的にはまだ完全にブランチングが完了しておらず生葉に近い状態であった。したがって色差計の表示も生葉に近い値を示し、色差も少なかった。しかし葉中にはクロロフィライドが生成されており、ホウレンソウで 15%、アカザでは 50% 以上のクロロフィルがクロロフィライドに変化していることを認めた。この事実は温水中でクロロフィラーゼが作用したことを示唆している。

4. バキュームインフィльтраシヨンによる変色とクロロフィラーゼ活性

生葉の外観からの色調の変化はブランチングによらずとも、たとえば葉中の空気を除去したときにも見られるのでバキュームインフィльтраシヨン法により、葉中の空気の代りに水を取り込ませた結果を Table VI に示す。

外観的には葉は黒味を帯びた緑色に変色をしたが、色差計からは、主波長は変化せず彩度の低下として表れた。色差はホウレンソウがアカザより大きく示されたが、これはホウレンソウの葉中に空気の含まれる量が多いためによると思われる。処理後の葉中にはクロロフィライドは見られず、処理によりクロロフィラーゼが作用することはなかったものと思われる。

以上ブランチングなどの処理と色調の変化を検討した結果、クロロフィラーゼの作用は色調の変化とはまったく関連がないと考えられた。色調が鮮やかに変化するのには、ブランチングにより生ずる葉緑体のたん白質の熱変性によりクロロフィルの状態変化が生じ、主波長のシフトが起こるためである。加熱のないバキュームインフィльтраシヨンによる変色が主波長に変化がない点もこの考えを裏付けている。その他変色にはブランチングで生ずる組織内の脱気、組織の若干の破壊、水ぬれなども関与しているものと思われる。

Table V. Color Changes and Formation of Chlorophyllide in Fresh Leaves by Dipping in the Water at 60-70°C for 5 min

Material	Treatment	Main wave length (nm)	Saturation (%)	Lightness (%)	Color difference (ΔE)	Formation of chlorophyllide (%)
Spinach	fresh	566	42	10.4		
	70°C	564	39	9.0	2.9	15
Goosefoot	fresh	563	41	8.4		
	60°C	564	37	8.5	1.6	65
	70°C	561	41	9.1	1.7	50

The tone of color was indicated from C. I. E. Chromaticity Diagram.

Table VI. Color Changes and Formation of Chlorophyllide in Fresh Leaves by Vacuum Infiltration

Material	Treatment	Main wave length (nm)	Saturation (%)	Lightness (%)	Color difference (ΔE)	Formation of chlorophyllide (%)
Spinach	fresh	569	40	9.4		
	vacuum infiltration	570	29	6.1	8.6	0
Goosefoot	fresh	565	46	10.0		
	vacuum infiltration	565	51	6.1	3.2	0

The tone of color was indicated from C. I. E. Chromaticity Diagram.

5. クロロフィライドの安定性について

実験2の結果からクロロフィライドは葉のアセトンホモジネイト中では不安定であることが示されたが、生体外の純粋なクロロフィライドの熱安定性を純粋なクロロフィルと比較した。各試料を30%アセトン溶液とし、種々温度で1時間保ったのちの分解をフェオフィチン、フェオフォルバイドへの変化としてFig.1に示した。

クロロフィルは80°C中でも比較的安定であったのに対しクロロフィライドは温度の上昇とともに分解が進み、フェオフォルバイドへの変化率で求めると80°Cでは約60%に達した。

この結果はクロロフィルよりもクロロフィライドのほうが熱に対して不安定であることを示した。

考 察

クロロフィラーゼは茶葉の芽を除いては非常に抽出されにくい酵素であるため⁽¹²⁾、著者らが考案したアセトン系法で種々の緑葉中の酵素活性を測定した。活性は広く緑葉中に分布していたが、活性値には大きな差があり、アカザ、茶葉の活性が高く、ハウレンソウなどは低かった。

アカザ葉ホモジネイトを用いた場合、反応初期はクロロフィルの分解量とクロロフィライドの生成量がほぼ同じであったが、時間の経過とともに生成クロロフィライドの量が減少していく現象が見られた。これは生成クロロフィライドが何らかの原因により分解消失するためと思われた。

また生葉中のクロロフィラーゼは加熱時にも作用することがWeastらにより報告されており⁽¹⁾、Jonesらは緑色野茶の加熱・塩蔵時のクロロフィルの変化を報告し⁽²⁾、クロロフィラーゼの作用を示唆した。

しかし本実験の結果よりブランチングによってクロロフィライドは生成されないことから、クロロフィラーゼの作用はないものと考えられた。また他の野菜類を大量の湯を用いてブランチングした場合も、色調の青色化は見られるがクロロフィラーゼの作用はほとんど認められなかった(未発表)。

クロロフィラーゼは加熱により活性化されることが報告されているので^(1,2)、生葉を60~70°Cの温水中に5~10分浸漬したのちの葉中のクロロフィル類を分別した。この条件での加熱では緑葉はまだ湯通しが十分でなく、生葉に近い状態であり、色調も生葉に近く変色も少な

Fig.1. Effect of Heat Treatment on Chlorophyll and Chlorophyllide Stability. Each 30% acetone solution were incubated at various temperatures for 1 hr and conversion of pigments were determined.

○, chlorophyll; ●, chlorophyllide.

い。しかし葉中のクロロフィルの半分以上(アカザ葉)はすでにクロロフィライドに変化しており、ハウレンソウでも約15%のクロロフィルがクロロフィライドに変化していた。すなわちこの条件下ではクロロフィラーゼが作用したことを示した。このように考えると色調の変化とクロロフィラーゼ活性とは直接関連がないように思われる。これを裏付けるためにバキュームインフィルトレーション法を用いて葉中の空気を抜き、その代りに水を入れた葉は外観上からは生葉とは異なり緑黒色に見え異なった色調を示したが、クロロフィライドの生成は見られなかった。

これらの実験からブランチングで緑色が鮮やかに固定される現象はクロロフィラーゼの作用ではなく、加熱によるたん白質の変性によりクロロフィルの状態変化が生じるため、クロロフィルの吸収が異なってくると同時に色調の主波長も短波長側に移動してくるが見られるものと思われた。その他加熱による組織内の脱気、表面組織の破壊による“ぬれ”なども原因であろうと考えられる。

また60~70°Cに浸漬した葉をそのまま取り出し室温中に放置すると褐変が進む現象が見られた。これはこれらの条件下で葉の一部の組織が損傷を起こすが、熱処理が不完全のためクロロフィラーゼが働くと同時に他の酵素類も作用するためと思われた。

ハウレンソウなどをブランチングする際に少量の沸と

う水中に大量の材料を入れた場合、温度が低下し 60～70℃中に保つことになることは考えられるが、ハウレンソウやコマツナなどはクロロフィラーゼ活性が弱いのでこの際もわずかに作用するのみであると思われた。

クロロフィラーゼが加熱の際に働く現象は、葉中の組織が破壊されてクロロフィルと接触するため生ずるのであろうが、この現象はアカザ葉を加熱乾燥する際にも見られ 80℃ 1 時間の乾燥で約 70% のクロロフィルがクロロフィライドに変化することを認めている (未発表)。クロロフィラーゼは加熱により活性化する興味ある酵素であるが色調の変化とは直接関連しないと思われた。

要 約

(1) アセトン系法で緑葉中のクロロフィラーゼ活性を測定したところ、多くの植物葉中に活性が見出されたが強さの差は大きく、アカザ・茶葉に活性が高かった。

(2) ハウレンソウ・アカザ葉を沸とう水中でブランチングすると、葉色は鮮やかな緑色に変色するが、この間クロロフィラーゼは作用しなかった。

(3) ハウレンソウ・アカザ葉を 60～70℃ の温水中に浸漬すると、クロロフィラーゼは作用し葉中のクロロフィルをクロロフィライドに変化させた。しかし葉はまだ生葉に近く色調の変化は少なかった。

(4) 生成クロロフィライドはアセトン系中および葉中では不安定のように思われた。また純粋なクロロフィライドもクロロフィルより不安定であった。

以上ブランチングによると色調の変化とクロロフィラーゼ活性の間には直接関連はないものと思われた。

- (1) C. A. Weast and G. Mackinny : *J. Biol. Chem.*, **133**, 551 (1940).
- (2) I. D. Jones, R. C. White and E. Gibbs : *J. Food Sci.*, **28**, 437 (1963).
- (3) G. Mackinny and C. A. Weast : *Ind. Eng. Chem.*, **32**, 392 (1940).
- (4) S. M. Gupte and F. J. Francis : *Food Technol.*, **23**, 1645 (1964).
- (5) S. T. Schwartz and J. H. Von Elbe : *J. Food Sci.*, **48**, 1303 (1983).
- (6) F. M. Lajole and V. M. Marovez : *J. Food Sci.*, **47**, 1995 (1982).
- (7) K. Iriyama, N. Ogura and A. Takamiya : *J. Biochem.*, **76**, 901 (1974).
- (8) C. Ardao and B. Vennesland : *Plant Physiol.*, **35**, 368 (1960).
- (9) M. Holden : *Biochem. J.*, **78**, 358 (1961).
- (10) N. Ogura : *Plant Cell Physiol.*, **13**, 971 (1969).
- (11) W. C. Dietrich : *Food Technol.*, **12**, 428 (1953).
- (12) N. Ogura : *Bot. Mag. Tokyo*, **82**, 392 (1969).