果実そ菜における含有脂質とその役割に関する研究

(第2報) 露地トマト果実の成熟・追熟に伴うリン脂質の変化

南出隆久*・上田悦範*・緒方邦安*・釜田英雄**

Lipid of Fruits and Vegetables and its Physiological and Qualitative role

Part II. Changes of phospholipid during maturation of
tomato fruits cultured in the open

TAKAHISA MINAMIDE, YOSINORI UEDA, KUNIYASU OGATA, and HIDEO KAMATA

Changes of contents of phospholipids (PL) and their fatty acid composition in tomato fruits, cultured in the open were investigated during ripening and storage periods.

I) Total amount of PL appeared to increase during the early stage of maturation. When fruits were harvested at breaker stage and stored at 20°C, PL contents showed remarkable decrease 4~5 days after harvest, corresponding to the time of climacteric peak of respiration, then was followed by gradual decrease.

II) Phospholipids were separated with thin layer chromatography and determined with Fiske and Subbarow's method. The phosphatidyl choline (PC) and phosphatidyl ethanolamine (PE) were found as the major constituents showing 60% of the total PL. The PC showed the same tendency as the change of total PL during the ripening and the storage. The PE content decreased 4~5 day after harvest and after that tended to increase. Other compositions did not show marked change.

III) The fatty acid composition of total PL, PC, PE, ph. inositol and cardiolipid were analyzed with gas-liquid chromatography. Oleic acid (C_{18:1}), linoleic acid (C_{18:2}), linolenic acid (C_{18:3}) and palmitic acid (C_{16:0}) were determined as the main fatty acids of the PL and, as a whole, saturated fatty acid increased with progress of storage period. It appeared that higher unsaturated fatty acids, such as C_{18:3}, C_{18:2}, C_{18:1}, were metabolised rapidly during the first part of storage period.

(Received sep. 10, 1969)

リン脂質は中性脂質が組織中で貯蔵的性質を有しているのとは異なり、組織の構成成分、とくに細胞膜などの膜組成として生理上重要な役割を果しているといわれる。したがって果実、そ菜におけるリン脂質の組成やその変化は、成熟あるいは貯蔵に伴う硬度変化やその温度変化に対する耐性などと関連して、果実、そ菜の貯蔵上究明すべき重要な課題と考えられる。前報では、トマト果実の成熟貯蔵中における中性脂質の変化について報告したが、ここでは、中性脂質の変化と関連して、露地トマト

の成熟、追熟中におけるリン脂質の変化について調べた結果を報告する。

実験材料および方法

1. 試料

実験材料として、露地栽培トマト、品種「米寿」を用いた。開花時にラベルを付け、開花後、20日、40日、45日に採取し、その都度分析に供した。開花後45日のトマトは熟度が breaker に相当するもので、これを温度

* 大阪府立大学農学部園芸利用学研究室 (大阪府堺市百舌鳥梅町 4-804)

Laboratory of Processing and Physiology of Horticultural Products, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka.

** 現在カゴメ株式会社 (愛知県名古屋市中区錦 3-14-15)

Present address: Kagome Co. Ltd. Nakaku, Nagoya.

20°C, 湿度 85~90% の恒温室に貯蔵し, 4日, 5日, 11日, 14日, 20日後にそれぞれ分析を行なった。

2. 実験方法

(1) 脂質の抽出

試料を凍結後, 前報どおり, 3個体から200gを取り, 細かくきざみ, クロロフォルム:メタノールを抽出溶剤として用い, FREEMAN ら³⁾の方法により行なった。抽出した粗脂質を極性脂質と中性脂質に区分するため, TAKAYAMA ら²⁾の方法により, シリカゲルカラムを用いて分離を行なった。

(3) リン脂質の定性

シリカゲルカラムで分離した極性脂質を各区分に分画するために, 薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いた。展開溶媒は, クロロフォルム:メタノール:水 (65:22:3)⁸⁾, クロロフォルム:アセトン:メタノール:酢酸:水 (5:2:1:1:0.5)⁴⁾ クロロフォルム:メタノール:アンモニア水 (7N) (65:30:4)⁶⁾ などを用い一次, 二次展開を行なって分離した。同定は, 標準試料の値および各種の発色剤による呈色反応^{6,7)} により行なった。

(3) リン脂質の定量

抽出したリン脂質の総量および各区分の含量を調べるため, FISKE and SUBBAROW の改良法^{8,9)} によるリン発色比色法で行なった。

(4) リン脂質の脂肪酸組成の分析

総リン脂質および各区分の脂肪酸組成を調べるためにガス chromatography (GLC) を用いて分析を行なった。脂肪酸のメチルエステル化は, 塩酸性メタル法¹⁰⁾およびアルコラートを用いた迅速法¹¹⁾の両方を用いた。脂肪酸の分析は, 柳本 GLC-550 F, 15%-DEGS A/W (西尾工業) 3ft カラムを用い 180°C で分析した。脂肪酸の量は, 半値幅法¹²⁾によりピーク面積を計算し, 全面積に対する各ピーク面積の割合を百分率で示した。また, 各ピークの同定は, 試料と同一条件で, 既知試料を

分析し, それより算出した保持時間 (Rt) とを比べ同定した。また数種の飽和脂肪酸の Rt から標準曲線を作製し, それにより未知の脂肪酸の炭素数を調べた^{13,14)}。

実験結果

1. リン脂質含量の成熟追熟中の変化

結果は第1表にみられるように, トマト果実のリン脂質含量は, 成熟に伴い増加しているが, 追熟が進むにつれて減少し, 貯蔵後14日では, 収穫時の70%ぐらいに減少した。しかし, 貯蔵後20日には多くなっている。貯蔵後20日のトマトの状態は, 果実全体に水泡が現われ半透明となり, 食べると異味を呈することから, 生体代謝がそれまでのものと異なった状態にあるものと思われる。distearyl lecithin として換算した phosphatide 含量は, 100~150 mg/100 gfw で乾物重当たりのリン脂質の割合は, 1.5~2.0% であった。

2. リン脂質組成の成熟追熟中の変化

TLC で分画 (第1図) したおもな組成6種についてリン定量を行ない, 成熟・追熟中の変化を調べたところ, 第2表のような結果が得られた。phosphatidyle choline (PC), ph. ethanolamine (PE) が全体の約半分を占め,

Fig. 1. Thin-layer chromatography of polar lipids.

Solvent-CHCl₃:CH₃OH:H₂O (70:22:3)

A. reference; B. tomato lipids
1. ph. serine: 2. ph. inositol
3. ph. choline: 4. 5. unknown
6. ph. ethanolamine: 7. unknown
8. cardiolipid: 9. phosphatidic acid: 10. neutral lipid and pigment:

Table. 1. Changes in the contents of lipid-phosphorus and phosphatides in the tomato fruits

	Days after flower opening			Day in storage *1				
	20	40	45	4	5	11	14	20
Stage	small green	mature green	breaker	light pink	full pink	canning ripe	over ripe	rot
Lipid-P *2(mg/100 g.f.w.)	23.19	25.12	26.17	23.96	23.86	20.50	18.12	24.15
Phosphatide*3 (〃)	134.6	145.8	151.9	139.1	138.5	119.0	105.2	140.2

*1 temperature 20°C, humidity 85~90%

*2 ×4.39

*3 assumed to distearyl lecithin

Table 2. Changes in the contents of individual phosphatides of the tomato fruits during ripening

Compound	Days after flower opening			Days in storage				
	20	40	45	4	5	11	14	20
ph. choline	4.84*	4.80	4.81	2.27	2.29	2.15	2.06	3.51
ph. ethanolamine	2.09	2.34	2.61	2.08	2.30	2.27	2.48	3.27
ph. inositol	1.44	1.20	1.16	0.82	0.95	1.14	1.31	1.24
cardiolipid	1.17	0.55	0.97	0.67	0.37	0.66	0.92	1.58
phosphatidic acid	1.51	1.29	1.07	1.40	1.01	1.40	1.31	2.25
ph. serine	0.51	0.67	0.50	0.67	0.52	0.50	0.62	0.96

* Lipid-P mg/100 f.w. ($\times 4.39$)

Table 3. Changes in the composition of fatty acids of the total phosphatide fraction in the tomato fruits

peak No.	Cn*	Days after flower opening			Days in storage			
		20	40	45	5	11	14	20
1	12:0	tr**	3.6*	1.0	2.9	tr	tr	tr
2					10.3	tr	tr	tr
3	14:0	1.0		tr	8.6	tr	1.4	6.8
4	15:0	tr		tr	20.1		tr	3.3
5	16:0	15.8	19.9	18.5	18.4	31.7	25.0	46.7
6		1.0	6.1		9.3		tr	tr
7	18:0	7.4	3.7	8.1	9.3	5.2	4.4	20.1
8	18:1	4.8	4.5	3.9	9.6	9.2	10.1	14.5
9	18:2	39.8	24.6	30.7	11.5	36.3	33.6	4.5
10	18:3	28.3	16.2	36.4	tr	17.6	25.4	
S.F.A.**4		25.5	31.5	27.6	39.2	36.9	30.8	73.8
U.F.A.**5		74.5	68.5	72.4	60.8	63.1	69.2	26.4
S.F.A./U.F.A.		0.34	0.46	0.38	0.64	0.59	0.45	2.79

*1 The ratio shown is the number of carbon atoms to the number of double bonds in the molecule.

** tr...a trace amount.

**3 % of total fatty acid

**4 S.F.A....saturated fatty acid

**5 U.F.A....unsaturated fatty acid

PC については、成熟中はあまり変化がないが、貯蔵後4日すなわち climacteric peak が現われるところに急激に減少し、収穫当日のものに比べ約半減している。追熟中はやや減少気味であるが貯蔵後20日には増大している。これは総リン脂質の変化とよく似ている。また、PE については、成熟中は増加傾向にあることが認められ、貯蔵後4日には、PC と同様に減少し、その後、追熟が進むにつれて増加する。他の組成については、あまり著しい変化はないが、貯蔵後20日には全体に含量が多くなっている。

3. リン脂質の構成脂肪酸組成

(1) 総リン脂質の構成脂肪酸組成

総リン脂質の構成脂肪酸組成として十数種の脂肪酸が検出され、そのおもなものはリノール酸(C_{18:2})、リノレン酸(C_{18:3})、パルミチン酸(C_{16:0})、オレイン酸(C_{18:1})、ステアリン酸(C_{18:0})で、果実の成熟、老化に伴ってかなり変化することが認められた。とくに C_{18:2} は開花後20日には40%前後あったものが、貯蔵後5日で12%に減少し、後再び35%前後に増加する。しかし貯蔵末期には顕著に減少し、5%ぐらいになった。また、clim-

Table. 4. Changes in the composition of fatty acids of the ph. inositol fraction in the tomato fruits

peak No.	Cn*1	Days after flower openning		Days in storage			
		20	45	5	11	14	20
1	12:0	3.6*3	7.4	tr*2	1.0	tr	3.8
2		3.6	tr		1.0	1.4	8.0
3	14:0		2.9	8.0	2.5	2.2	
4	16:0	21.7	20.7	30.1	28.4	27.4	13.6
5				20.2			3.4
6	18:0	21.3	3.7	16.0	26.5	17.7	10.1
7	18:1	25.5	20.3	25.7	16.4	25.6	24.0
8	18:2	13.2	25.8	tr	18.8	9.6	30.1
9	18:3		7.4		5.6		
S.F.A.*4		52.1	38.6	54.1	57.5	49.1	23.7
U.F.A.*5		47.9	61.4	45.9	42.5	50.9	76.3
S.F.A./U.F.A.		1.08	0.62	1.17	1.35	0.96	0.31

*1,*2,*3,*4,*5 ... as described for Table 3.

Table. 5. Changes in the composition of fatty acids of the ph. choline fraction in the tomato fruits

peak No.	Cn*1	Days after flower openning		Days in storage			
		20	45	5	11	14	20
1	12:0	2.4*3	3.2	tr*2	3.0		
2		tr	5.2	2.7		2.6	4.5
3			4.2		6.8	11.1	
4	14:0	4.0		3.7			6.0
5			6.6	tr	4.8	17.9	
6	16:0	12.4	21.3	24.8	19.3	24.8	20.5
7			5.2	14.7	tr	tr	tr
8	18:0	36.6	6.6	7.2	13.4	14.7	16.4
9	18:1	14.6	tr	tr	9.7		16.4
10	18:2	17.6	17.7	27.2	20.7	6.7	17.2
11	18:3		23.6	16.4	12.0	tr	tr
S.F.A.*4		55.3	36.3	39.0	35.7	39.6	46.7
U.F.A.*5		44.7	63.7	61.0	64.3	60.4	53.3
S.F.A./U.F.A.		1.23	0.56	0.64	0.55	0.65	0.87

*1,*2,*3,*4,*5, ... as described for Table 3.

climacteric peak が現われる貯蔵後 5 日には peak No. 2, 4, 6 などの低級脂肪酸が多く検出された。このことは、climacteric peak 時に C_{18:3}, C_{18:2} などの高度不飽和脂肪酸が利用されていることがうかがわれる。脂肪酸中の飽和脂肪酸 (SFA) と不飽和脂肪酸 (UFA) の占める割合をみると、全体として UFA が高く、60%~75%である

のに対して SFA は 25~40% であるが、成熟・追熟が進むにつれて SFA が多くなる傾向がみられた(第 3 表)。

(2) ph. inositol の脂肪酸組成

構成脂肪酸組成として C_{18:1}, C_{18:0}, C_{18:2}, C_{16:0}, が多く、総リン脂質のと異なり C_{18:3} はほとんど検出されなかった。追熟中の変化は、C_{18:2} が顕著で、貯蔵後

日にはほとんど検出されず、その後再び多くなり貯蔵後20日では30%も検出された。 $C_{18:1}$, $C_{16:0}$ は、著しい変化はない。SFA と UFA の割合をみると、成熟が進むにつれ、UFA が大きくなり、貯蔵後5日には76%を占める(第4表)。

(3) ph. choline の脂肪酸組成

第5表に示したように、ph. choline の脂肪酸組成は、ph. inositol や総リン脂質と異なり、 $C_{18:1}$ がほとんど

検出されず、開花後20日と貯蔵後20日に15%前後検出されただけである。開花後20日のものでは、 $C_{18:0}$, $C_{16:0}$ などの SFA が多くを占めているが、追熟が進むに従い UFA が多くなり、とくに貯蔵後14日には、 $C_{18:3}$, $C_{18:2}$ などの高度不飽和脂肪酸がほとんど検出されず、peak No 3, 5 などの低級脂肪酸が多くなっている。

(4) ph. ethanolamine の脂肪酸組成

PE は、成熟・追熟を通じて、その構成脂肪酸にはあまり著しい変化が認められなかった(第6表)。

(5) Cardiolipid の脂肪酸組成

Cardiolipid の脂肪酸組成は第7表に示したように、 $C_{18:0}$, $C_{18:1}$, $C_{16:0}$ がおもな脂肪酸で、 $C_{18:3}$ は climacteric peak が現われるころ、多く検出された。 $C_{18:3}$ も $C_{18:2}$ とよく似た傾向を示している。いっぽう $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ などの SFA は、追熟が進むにつれ増加した。

考 察

果実、そ菜の脂質に関する研究は、たとえば、MAZLIAK¹⁵⁾ NEUBELLER¹⁶⁾ MONDY¹⁷⁾ WHEELDON¹⁸⁾ MCARTHUR¹⁹⁾ の報告があるが、果実の成熟・追熟中の脂質代謝についての研究は少ない。DOLENDO²⁰⁾ は脂質含量の多いアボガトを用いて、呼吸の climacteric 現象と果実の軟化についてペクチン物質や脂質の変化を調べているが、彼らは、プロトペクチンの減少と可溶性ペクチンの増加により果実が軟化するが、その過程では脂質はほとんど代謝されないと報告している。いっぽう、脂質

Table 6. Changes in the composition of fatty acids of the ph. ethanolamine fraction in tomato fruits

peak No.	Cn*1	Days after flower opening	Days in storage			
		20	5	11	20	
1	12:0	3.4*3	3.5	tr*2	4.5	
2	14:0	4.3	3.6	1.6	7.1	
3	15:0	3.0	1.7	tr	5.8	
4	16:0	25.3	27.4	36.1	19.5	
5	18:0	18.0	10.8	6.4	13.0	
6	18:1	20.2	14.6	13.2	25.2	
7	18:2	8.8	22.5	27.8	15.6	
8	18:3		5.4	8.0		
9	20:0		7.9	3.2	tr	
S.F.A.*4		53.9	53.2	47.3	50.0	
U.F.A.*5		46.1	46.8	52.7	50.0	
S.F.A./U.F.A.		1.16	1.13	0.89	1.00	

*1, *2, *3, *4, *5 as described for Table 3.

Table 7. Changes in the composition of fatty acids of the cardiolipid fraction in tomato fruits

peak No.	Cn*1	Days after flower opening		Days in storage			
		20	45	5	11	14	20
1	14:0	3.6*3	4.3	1.7	4.4	2.1	5.7
2	15:0	tr*2	3.3	tr	2.5	tr	1.6
3	16:0	12.5	14.2	26.6	35.7	30.8	30.9
4	18:0	22.0	3.3	15.3	23.4	26.7	14.0
5	18:1	20.4	3.1	12.1	12.9	27.3	28.0
6	18:2	9.3	16.9	25.0	10.9	8.2	4.4
7	18:3	tr	39.4	16.1	4.3	tr	
S.F.A.*4		40.5	25.7	43.9	63.4	59.7	58.1
U.F.A.*5		59.5	74.3	56.1	36.6	40.3	41.9
S.F.A./U.F.A.		0.67	0.34	0.78	1.73	1.47	1.38

*1, *2, *3, *4, *5 as described for Table 3.

含量の少ない果実、そ菜においては成熟貯蔵中脂質はかなり利用され、とくに高度不飽和脂肪酸が活発に代謝されるという報告がある^{21,22)}。トマト果実についても climacteric peak 前後に脂質が利用されていることが認められた。また、トマト果実のリン脂質の組成は、リンゴ²³⁾、キャベツ¹⁸⁾やホウレンソウ²⁴⁾などとよく似ており、PC がもっとも多く、PE, PG, PI などが存在している。脂質の構成脂肪酸組成は、MIRIC ら²⁵⁾がトマトの種子の成熟に伴う脂肪酸の変化を調べているが、それによると、C_{18:2} がもっとも多く総脂肪酸の 50 % を占め C_{18:1}, C_{16:0} の順になっており、果実の成熟に伴い脂質含量や脂肪酸組成にはほとんど変化がないという。しかし、トマト果実のリン脂質の脂肪酸組成は、種子と異なり C_{18:3} がかなり多く含まれており、成熟追熟中の変化も SFA の増加と climacteric peak 時の C_{18:3} C_{18:2} などの高度不飽和脂肪酸の減少などかなり脂肪酸が代謝されていることがわかった。さらに、追熟に伴って SFA が多くなるが、とくに貯蔵後 20 日には SFA が多くなり、そのときの果実は水泡状態で、臭味を呈することなどから、RHEE ら²⁶⁾が報告しているように preoxidase, catalase や lipoxidase などによる脂肪酸の分解が考えられるが、この点については次報で述べる。このようなことから、トマト果実のリン脂質の消長は、呼吸の climacteric 現象や果実の軟化と密接に関連するものであり、さらに味覚などにも重要な役割を果たしているものと思われるが、これらの点についてはなお検討中である。

要 約

(1) 露地栽培トマト、品種「米寿」を用い、成熟追熟中に伴うリン脂質の変化を調べた。

(2) 総リン脂質については、成熟が進むにつれて増加し、貯蔵 4～5 日後 climacteric peak が現われるところに著しく減少し、その後追熟が進むにつれ漸次減少するが、貯蔵末期の果実が水泡状態になったものでは、増加を示した。

(3) 総リン脂質を TLC で各組成に分画し、そのおもな組成について定量した結果、PC, PE が全体の約 60 % を占め、PC は成熟中は、ほとんど変化ないが、貯蔵後 4～5 日ごろ、急激に減少し、その後漸次減少している。

PE は成熟中やや増加し、貯蔵後 4 日に減少しその後増加している。他の組成については、あまり著しい変化は認められない。

(4) リン脂質を構成している脂肪酸を、総リン脂質、

PI, PC, PE, Cardiolipid について、GLC を用いて調べたところ、C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{16:0} などが多く検出され、SFA は追熟が進むにつれ多くなり、climacteric peak が現われる貯蔵後 5 日には、C_{18:3}, C_{18:2}, C_{18:1} などの高度不飽和脂肪酸が活発に利用されることが認められた。本研究の要旨は、昭和 44 年 5 月園芸学会春季大会で発表した。

文 献

- 1) FREEMAN, A.C., GOOD, P., DAVIS, H.F., CHISUM, P. and FOWLER, S.D.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **43**, 223 (1966).
- 2) TAKAYAMA, K.K., and MUNETA, P.: *J. Agr. Food Chem.*, **13**, (3), 269 (1966).
- 3) WAGNER, H., HÖLZL, J., SCHMID, A. and HÖRHAMMER, L.: *Naturwissenschaften*, **50**, 230 (1963).
- 4) LEPAGE, M.: *Lipid.*, **2** (3), 244. (1964).
- 5) HORROCKS, L.A.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **40**, 235, (1963).
- 6) DITTMER, J.C. and LESTER, R.L.: *J. Lipid Research*, **5**, 126, (1964).
- 7) MAMGOLD, H.K.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 708. (1961).
- 8) FISKE, C.H. and SUBBAROW, Y.: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375, (1925).
- 9) SINHA, D.B. and GABY, W.L.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 3668. (1964).
- 10) VANDENBASCH, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 328. (1965).
- 11) 高木 徹：ガスクロマトグラフィーの油脂工業への応用-油脂成分分析法-, p. 25 (1966).
- 12) 日本化学会編：実験化学講座 9 ガスクロマトグラフィー (丸善出版), p. 135 (1965).
- 13) HOFSTETTER, H.H. and SEN, N.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **42**, 537. (1965).
- 14) WOODFORD, F.P. and VANGOUT, C.M.: *J. Lipid Research*, **1** (2), 188. (1960).
- 15) MAZLIAK, P.: *Fruits*, **20**, (2), 49. (1965); *Chem. Abstr.*, **62**, 13768 b.
- 16) NEUBELLER, J.: *gartenbauwissenschaft*, **28**, (2), 199 (1963); *Chem. Abstr.*, **60**, 3422 d.
- 17) MONDY, N.I., MATTICK, L.R. and OWENS, E.: *J. Agri. and Food Chem.*, **11**, (4), 328 (1963).
- 18) WHEELDON, L.W.: *J. Lipid Research*, **1**, 439 (1960).
- 19) MCARTHUR, J.A., MARSHO, T.V. and NEWMAN, D.W.: *Plant Physiol.*, **39**, 551. (1964).
- 20) DOLEND, A.L., LUH, B.S. and PRAIT, H.K.: *J. Food Sci.*, **31**, 332 (1966).
- 21) MEIGH, D.F. and HULME, A.C.: *Phytochem.*, **4**, 863 (1963).
- 22) ROMANI, R.J., BREIDENBACH, R.W. and VANKOBY, J.G.: *Plant Physiol.*, **39**, 561 (1964).
- 23) GALLIARD, T.: *Phytochem.*, **7**, 1915. (1968).
- 24) ROTSCH, E. and DEBUCH, H.: *Z. Physiol. Chem.*, **343**, 135 (1965); *Chem. Abstr.*, **64**, 13093 c.
- 25) MIRIC, M.O. and CUPIC, Z.: *Hrana Ishrana*, **6**, (5), 267 (1965); *Chem. Abstr.*, **64**, 8640 e.
- 26) RHEE, K.S. and WATTS, B.M.: *J. Food Sci.*, **31**, 675 (1966).

(1969 年 9 月 10 日受理)