

菠菜汁中葉綠素與蛋白質交互作用之研究

A Study on the Chlorophyll-Protein Interaction in Spinach Juice

計畫編號：NSC-87-2313-B-002-065

執行期限：86年8月1日至87年7月31日

主持人：吳瑞碧 國立臺灣大學食品科技研究所

電子信箱位址：jsbwu@ccms.ntu.edu.tw

中文摘要

本研究重點在於探討菠菜汁中葉綠素-蛋白質複合體之存在及其對於葉綠素穩定性之意義。先以膠滲層析法分析菠菜汁，接著在菠菜汁中添加蛋白質、磷酸鹽以及改變酸鹼值後比較葉綠素-蛋白質複合體的穩定性，然後在模式溶液中進行實驗以進一步觀察葉綠素的裂解情形及醇溶蛋白與葉綠素的結合狀況。

結果發現：菠菜汁即使經過殺菁，其中大部分的葉綠素仍以與蛋白質複合的型式存在；蛋白質會加速葉綠素的裂解；提高酸鹼值或添加磷酸鹽有助於菠菜汁葉綠素-蛋白質複合體中葉綠素的保存；在模式溶液中，穀膠蛋白在室溫下即可和葉綠素結合。

關鍵詞：菠菜汁、葉綠素、蛋白質、交互作用。

Abstract

The major purpose of this study was to investigate the presence of chlorophyll-protein complex in spinach juice and its significance on the stability of chlorophyll.

Spinach juice was analyzed by gel filtration chromatography. The stability of chlorophyll-protein complex in spinach juice with or without the addition of protease or phosphate and the alteration in pH value was investigated. Experiments were also carried out in model solutions to observe the degradation of chlorophyll and the formation of complex between chlorophyll and alcohol-soluble protein more closely.

The results showed that most of the chlorophyll in spinach juice was present in the chlorophyll-protein complex even after blanching. Protease accelerated the degradation of chlorophyll. The increase in pH value or the addition of phosphate favored the retention of chlorophyll in the complex form with protein. Gliadin was able to form a complex with chlorophyll in a model solution at room temperature.

Keyword: Spinach juice, chlorophyll, protein, interaction.

計畫緣由與目的

綠色蔬菜中葉綠素的保存，在蔬果加

工學裏，是個重要但尚未能理想地解決的問題。在熱加工以及其後的貯藏期間內，菠菜汁的葉綠素很容易脫鎂而失去原有的綠色。迄今為止，除了提高原汁酸鹼值或採超高溫短時間殺菌外，並無較具可行性的方法來改善這種顏色的劣變。即如上述兩種方法也各有其實際操作上的限制。

文獻中對於綠色蔬菜顏色保存之研究，普遍以葉綠素分子為對象；然而，葉綠素卻是以與蛋白質形成複合體的形式存在於原料蔬菜中（Smith and Pickles, 1941）很可能只因一般在作葉綠素的化學分析時，樣品經均質、過濾、有機溶劑萃取等步驟，葉綠素與蛋白質的鍵結被酵素、機械力、溶劑或者週遭離子種類或濃度等之改變而打斷，之後蛋白質及殘存的葉綠素 - 蛋白質複合體又被過濾掉或留在未萃出部份，致使被蔬果加工學者忽略了這複合體的存在而已。因此，在有關加工過程中葉綠素的保存上，以葉綠素 - 蛋白質複合體為對象的研究是有其必需性的。

本研究先採膠濾層析法分析以證實殺菁前及殺菁後菠菜汁中葉綠素 - 蛋白質複合體之存在；接著在菠菜汁中添加蛋白

、磷酸鹽、或改變酸鹼值，觀察其對葉綠素 - 蛋白質複合體之影響；最後在模式溶液中添加蛋白質，觀察菠菜葉綠素與蛋白質之結合情形。

結果與討論

（一）菠菜汁之膠濾層析

菠菜原汁經 Sephadex S-200 HR 膠濾層析，獲得三個 667nm 吸光波峰。參照以不同分子量蛋白質所作出的標準曲線，可知這三個含葉綠素部分之中，分子量最大者大於 250kDa，居次者約為 108kDa，分

子量最小的那一部分則約在 18kDa 左右。

另將原汁以 Sephadex G-15 膠濾層析。因此材料可區分分子量在 1.5kDa 以下之成分，葉綠素之分子量約 0.9kDa，若菠菜原汁中有游離葉綠素存在，則應該會進入膠體，而在 void volume (Vo) 之後出現波峰。但是分析結果並無此等波峰存在，可見菠菜原汁中葉綠素幾乎全以葉綠素 - 蛋白質複合體的形式存在，很難找到游離葉綠素。

再將菠菜原汁以 80 - 10 分鐘的條件殺菁後，經 Sephadex S-200 HR 膠濾層析，結果依然存在三個波峰，分子量也沒有改變，唯葉綠素吸光值都有顯著下降，蛋白質總量也減少了 40% 左右。將殺菁後菠菜汁經 Sephadex G-15 膠濾層析，發現一個原汁中所沒有的小分子量的波峰。顯示加熱殺菁可能分解部分葉綠素 - 蛋白質複合體而使葉綠素或葉綠素的裂解產物，如 pheophytin 和 pyropheophytin（Schwartz *et al.*, 1981；Schwartz and von Elbe, 1982）等，游離出來，但是大部分葉綠素 - 蛋白質複合體仍然留存。

（二）添加蛋白 對菠菜汁葉綠素 - 蛋白質複合體之影響

以 1 mg/1 ml 的比例分別添加抽自 *Streptomyces griseus* 之 Pronase E 或抽自 *Aspergillus oryzae* 之 Type II Protease 於菠菜原汁中，在 30 下作用 12 小時後，借助色差儀分析其色澤指標（Hunter -a/b）之變化，並以 Sephadex S-200 HR 膠濾層析之。另取一部分經蛋白 作用之菠菜汁在 80 下加熱 4、8 或 12 分鐘，然後參考 Lajollo 等人（1971）所提出的方法分析葉綠素 a、b 含量的變化。

實驗結果發現：添加蛋白 之菠菜汁

在 30 °C 下，Hunter *a/b* 值之降低較未添加者（對照組）迅速，也就是說，蛋白質會加速葉綠素的裂解。葉綠素 - 蛋白質複合體中的蛋白質受蛋白質水解，使得葉綠素不穩定化，是很可能的原因。經蛋白質作用過之菠菜汁，其 Sephacryl S-200 HR 膠滲層析圖與原汁之膠滲層析圖相比較，波峰數目由三增加為四，顯示蛋白質可以水解複合體中之蛋白質，導致分子種類的增多。經蛋白質作用之菠菜汁在 80 °C 下加熱 12 分鐘的過程中，葉綠素 a 及葉綠素 b 的裂解速率均較未添加蛋白質之對照組為高。綜合以上，可作申論：葉綠素與蛋白質的適當複合能夠提高葉綠素的穩定性。

（三）添加磷酸鹽及改變酸鹼值對菠菜汁葉綠素 - 蛋白質複合體之影響

在菠菜原汁中添加 10% 氫氧化鈉水溶液以調高酸鹼值至 8.0，或先添加 1% 磷酸二鈉，再以 10% 氫氧化鈉水溶液調高酸鹼值至 8.0。將菠菜原汁（對照組）及這兩種經過處理的菠菜汁在 80 °C 下各自保溫 10 分鐘後，作 Sephadex G-50 膠滲層析，收集葉綠素 - 蛋白質複合體，分別測定其中葉綠素吸光值及蛋白質含量。結果發現：調整酸鹼值同時有利於複合體中葉綠素部分及蛋白質部分的保存；添加磷酸二鈉者表現尤佳，顯示調高酸鹼值及添加磷酸鹽這兩種保存葉綠素方法的作用機制與葉綠素 - 蛋白質複合體的穩定化有所關連。Clydesdale 等人（1971）於菠菜汁中添加 Triton X-100 加熱後推論：磷酸鹽可能和葉綠素形成較穩定的綠色複合物，從而促進綠色的保持。但此磷酸鹽 - 葉綠素之存在未經實驗證實；由磷酸鹽與葉綠素的結構式看來，兩者形成複合物的可能性甚小，空間難以排列即是一大原因；而磷酸

鹽與蛋白質之交互作用，例如磷酸鹽常能增加蛋白質的保水性、起泡性、成膠性、溶解性等（Ellinger, 1977），則廣為人知，所以應以磷酸鹽修飾葉綠素 - 蛋白質複合體中蛋白質部分的觀點來解釋較為恰當。

（四）模式溶液中葉綠素與蛋白質之結合情形

葉綠素不溶於水，難以在水溶液中和蛋白質進行反應，所以用丙酮萃取菠菜汁葉綠素，揮發至乾後，將之溶於乙醇，然後添加醇溶性的穀膠蛋白（gliadin）以便與之反應。部分樣品再以氫氧化鈉溶液調其酸鹼值至 8.0，或先添加磷酸二鈉，之後再調酸鹼值。將未調整酸鹼值這組樣品及有調整酸鹼值的另外二組樣品同在室溫下置放或在 80 °C 下保溫 15 分鐘後，以 Sephadex LH-20 膠層分析偵測葉綠素 - 蛋白質複合體的存在、以 HPLC 法定量葉綠素、以 Lowry *et al.*（1951）法定量蛋白質。

實驗結果，發現含穀膠蛋白而未調整酸鹼值也未添加磷酸二鈉者，在室溫下，葉綠素與蛋白質的複合不顯著，但經 80 °C 保溫 15 分鐘後，可以測得葉綠素 - 蛋白質複合體，原因可能是加熱促成疏水性鍵結的產生（Enami *et al.*, 1989；Paulsen *et al.*, 1993）。至於調高酸鹼值者，無論有否添加磷酸二鈉，均能在室溫下發生葉綠素與蛋白質的複合反應。推論當酸鹼值的升高會造成穀膠蛋白某種程度的變性或構形上的改變，使得葉綠素容易受到蛋白質的包覆而結合。推測添加磷酸鹽也具有相似的作用。Ellinger（1977）指出磷酸根能夠打開（unfolding）蛋白質的 peptide 鍵結，使 peptide 間距變大，原本包藏在內的部分暴露出來，可以形成氫鍵的位置增多。理論

上來說，蛋白質內部結構暴露開來之後，能夠形成疏水性鍵結的部位也會增加。由此可見，磷酸根很可能因改變蛋白質的構形，使葉綠素容易被包覆，使疏水性交互作用機會增大，促進葉綠素 - 蛋白質複合體的產生。比較膠層分析圖上葉綠素 - 蛋白質複合體出現波峰部分（peak fraction）加熱前後的蛋白質含量變化，發現添加添加磷酸鹽能夠保存較多量的蛋白質，這結果支持了磷酸鹽是經由與葉綠素 - 蛋白質複合體中蛋白質部分的作用而保護葉綠素的理論，也支持了藉提高葉綠素 - 蛋白質複合體的穩定性來保存葉綠素的構想。

計畫成果自評

本研究計畫執行結果，證實蔬菜汁中葉綠素 - 蛋白質複合體的存在，對於蔬菜汁中葉綠素 - 蛋白質交互作用的現象及其在葉綠素保存方面的意義有開創性的現。衡之以僅花台幣伍拾玖萬的研究經費及僅有壹年的研究期間，這樣的研究成果，應該不差了。

參考文獻

Clydesdale, F.M., Fleischman, D.L. and Francis, F.J. 1971. Maintenance of colour in processed green vegetables. *Food Product Development* 4(5): 127.

Ellinger, R.H. 1977. Phosphates in food processing. In "Handbook of Food Additives", 2nd ed. Furia, T.E. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Enami, I., Kamino, K., Shen, J., Satoh, K.

Enami, I., Kamino, K., Shen, J., Satoh, K. and Katoh, S. 1989. Isolation and characterization of photosystem II

complexes which lack light-harvesting chlorophyll a/b proteins but retain three extrinsic proteins related to oxygen evolution from spinach. *Biochim. Biophys. Acta* 977: 33.

Lajollo, F.M., Tannenbanm, S.R. and Labuza, T.P. 1971. Reaction at limited water concentration- chlorophyll degradation. *J. Food Sci.* 36: 850.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.

Paulsen, H., Finkenzenller, B. and Kuhlein, N. 1993. Pigment induce folding of light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 215: 809.

Schwartz, S.J. and von Elbe, J.H. 1982. High-performance liquid chromatography of plant pigments- a review. *J. Liq. Chromatog.* 5: 43.

Schwartz, S.J., Woo, S.L. and von Elbe, J.H. 1981. High-performance liquid chromatography of chlorophylls and their derivatives in fresh and processed spinach. *J. Agric. Food Chem.* 29: 553.

Smith, E.L. and Pickles, E.G. 1941. The effect of detergents on the chlorophyll-protein compound of spinach as studied in the ultracentrifuge. *J. Gen. Physiol.* 24: 753.