

桑の落葉と離脱促進葉の遊離アミノ酸

橋永文男・石田和英*・明石 敬**・伊藤三郎

(青果保蔵学研究室)

昭和56年8月10日 受理

Abscission of Mulberry Leaves and Free Amino Acids in the Abscission-Accelerated Leaves

Fumio HASHINAGA, Kazuhide ISHIDA*, Takashi AKASHI** and Saburo ITOO

(Laboratory of Postharvest Physiology and Preservation of Fruits and Vegetables)

緒 言

栽桑分野において従来の条桑収穫法に代わるものとして、植物生長調節物質を散布し、桑葉のみを採集する省力的収穫法の開発が試みられ、なかでもエチレン発生剤である2-クロルエチルホスホン酸(エセホン、エスレルとして市販)の落葉促進効果が注目されている。エセホン散布による落葉促進試験^{12, 19, 20)}、桑の生育に対する影響^{9, 26)}および処理葉を用いたカイコの飼育試験¹²⁾も行われている。

落葉に関する酵素としてはインゲンマメ^{1, 7, 23)}やオレンジ²¹⁾等でセルラーゼが重要な役割を果していることが明らかになったが、しかし桑の落葉機構の生化学的研究ではエセホンによる落葉促進時のセルラーゼ⁸⁾および著者らの細胞壁分解酵素の研究⁶⁾があるに過ぎず、エセホンがセルラーゼ、エキソポリガラクトナーゼ、ヘミセルラーゼの活性を増加させることが示された。

本研究では生育中の桑葉離層部の酵素活性の消長を時期別に測定し、落葉に関与する酵素を研究するとともに、エセホン処理葉の遊離アミノ酸含量の変化および処理葉の貯蔵性を比較検討した。

材料と方法

1. 材料

学内の桑(品種: 収穫一)を用いた。離層部の酵素

本研究の一部は農林水産省特別研究費補助金(昭和52~54年度)による。

*現在 鹿児島県庁

**現在 福岡県新宮農業協同組合

活性の測定には時期別に枝条を採取し、前年夏刈桑は側枝を用い、上部(6~10位葉)と下部(基部より6~10位葉)に分け、当年春刈桑および夏刈桑はさらに中間部の5葉についても測定した。離層部4mmを切りとり、細切した2.0gに水20mlを加え、ガラス製ホモジナイザーを用いて氷冷下で磨砕した。遠沈(4,000 rpm, 10分)して得られた上澄液を酵素液として用いた。

一方遊離アミノ酸の測定には枝条のまま切り取り、エセホン3,000ppm(pH 4.0)を散布したのち、0.06mmのポリエチレン袋に入れ、室温に置いた。対照区は水を噴霧し、同様に処理した。採取時刻は日中変動¹³⁾を考慮して10時にした。

2. 酵素活性の測定

前報⁶⁾に従い、セルラーゼは0.6% CMC-Na塩(0.06Mリン酸緩衝液, pH 6.0)を粘度法と還元糖生成法によって測定した。またポリガラクトナーゼ(0.6%ペクチン, 0.06Mクエン酸緩衝液, pH 6.0)も粘度法(endo-型)と還元基生成法(exo-型)との両方で測定した。ヘミセルラーゼは調製したいなわらの0.6%ヘミセルロース⁹⁾(0.06Mリン酸緩衝液, pH 7.0)に作用させ、生成した還元糖を3,5-ジニトロサリチル酸法⁹⁾を用いて測定した。さらにペクチンエステラーゼの測定には吸光度法による微量定量法を設定し、0.6%ペクチン(0.1M NaCl-0.01%メチルレッド, pH 6.0)を基質として活性を調べた。

3. 全窒素および遊離アミノ酸の測定

桑葉の全窒素の測定には圃場試験で立木散布したところの5月30日と11月27日の桑、および枝条切断後エセホン処理した6月11日の桑を用いた。

桑葉の主脈を除去したのち細切し、そのうち 2.0g をとり、セミマイクロケルダール法によって全窒素を測定した。別に 10g を 80% エタノール抽出し、遊離アミノ酸を測定した。

まず桑葉からの遊離アミノ酸の抽出条件を検討した。8月17日の桑 10g を 90% エタノール 40ml と乳鉢で磨砕し、1.5 時間室温に放置後遠沈し、さらに 80% エタノールで再抽出した (フラクション I)。つづいて 2 回再抽出したものをフラクション II とし、最後に 1 夜放置して 2 回抽出し (フラクション III)、それぞれのアミノ酸を比較した。

アミノ酸の測定には全自動アミノ酸分析機 (日本電子 JLC-6AH) を用いた。分析条件は青果物の遊離アミノ酸測定用として新しく設定したもので、クエン酸ナトリウムとクエン酸リチウムを用いる方法である (著者ら未発表)。

エセホン処理葉の遊離アミノ酸は 80% エタノール中で磨砕し、1 夜放置して抽出し、さらに 2 回再抽出したものを合わせて減圧濃縮し、0.25N クエン酸リチウムで定容後アミノ酸分析機に注入した。

4. 桑葉の貯蔵

エセホン処理 4 日目の離脱した桑葉と対照区の桑葉

をそれぞれ重ねてポリエチレン袋 (0.03mm) に別々に入れ、密封して 4°C の暗所に 30 日間保存した。

実験結果

1. 離層部酵素の時期別変化

約 1 か月おきに離層部の酵素活性を測定した結果、Table 1 に示したように、セルラーゼとエキソポリガラクトクロナーゼの活性が 9 月中旬から 12 月中旬にかけて急激に増加すること、および下位葉離層部の酵素活性の方が強いことが明らかになった。しかしエンドポリガラクトクロナーゼ、ペクチンエステラーゼ、ヘミセルラーゼ活性は経時的には顕著な増加が認められず、しかも上位葉と下位葉との差もなかった。セルラーゼとエキソポリガラクトクロナーゼは秋が深まり気温が低下し、伸長生長が停止する頃急増するのに対し、ヘミセルラーゼは木の齢が進むほど活性が増加した。

2. エセホン処理葉の全窒素

5 月と 6 月の桑ではエセホン処理葉の方が全窒素含量が高くなり、立木散布および切断枝条での散布とも同じ傾向を示した (Fig. 1)。しかし 11 月の桑葉では逆に処理区の方が減少することが認められた。

Table 1. Seasonal changes of enzyme activities in abscission zones of mulberry leaves

Enzymes	Items measured	Leaf positions	Pruning season						
			Previous summer			Spring			Summer
			June 7	July 6	Aug. 9	Aug. 6	Sep. 13	Oct. 24	Dec. 17*
Cellulase	Viscosity (%)	Upper	9.8	16.4	12.1	6.3	9.3	30.6	72.5
		Middle	—	—	—	7.9	9.5	32.6	76.0
		Lower	13.4	22.3	15.5	7.6	14.0	56.2	—
	Glucose (mg/ml)	Upper	68	67	70	55	30	185	432
		Middle	—	—	—	50	60	195	422
		Lower	80	72	95	55	110	295	—
Polygalacturonase	Viscosity (%)	Upper	22.5	32.8	27.0	20.1	21.7	19.1	17.0
		Middle	—	—	—	21.4	26.1	20.7	26.5
		Lower	26.1	30.2	24.4	17.4	22.0	22.4	—
	Galacturonic acid (mg/ml)	Upper	268	261	215	105	140	715	1170
		Middle	—	—	—	122	180	835	1035
		Lower	275	246	225	113	138	720	—
Pectinesterase	(OD ₅₂₀ /OD ₄₂₀)	Upper	0.18	0.17	0.13	0.15	0.24	0.19	0.31
		Middle	—	—	—	0.13	0.28	0.22	0.28
		Lower	0.25	0.17	0.18	0.15	0.21	0.15	—
Hemicellulase	Xylose (mg/ml)	Upper	32	36	40	20	35	35	25
		Middle	—	—	—	15	33	35	22
		Lower	22	30	25	29	22	31	—

*Dates of measurement

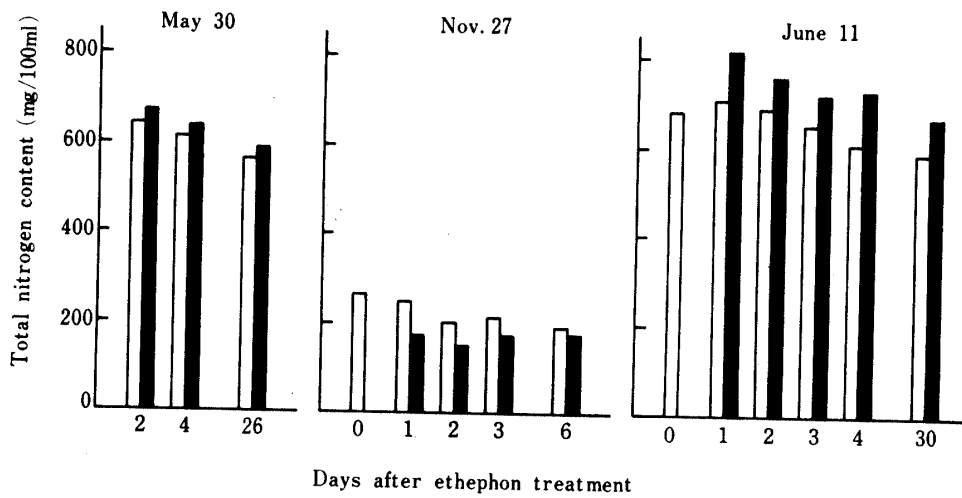


Fig. 1. Effect of ethephon on total nitrogen content in mulberry leaves. Ethephon-treated leaves: ■, untreated leaves: □

Table 2. Extraction rate of free amino acids from mulberry leaves

Amino acids	Fraction I		Fraction II		Fraction III		Total amino acids (mg/100ml)
	Content (mg/100ml)	Yield (%)	Content (mg/100ml)	Yield (%)	Content (mg/100ml)	Yield (%)	
Aspartic acid	21.4	80.1	4.2	15.7	1.1	4.1	26.7
Threonine	5.6	91.8	0.3	4.9	0.2	3.3	6.1
Serine	11.8	87.4	1.4	10.4	0.3	2.2	13.5
Asparagine	32.2	85.0	4.3	11.3	1.4	3.7	37.9
Glutamic acid	55.2	88.6	5.9	9.5	1.2	1.9	62.3
Glutamine	16.4	91.6	1.3	7.3	0.2	1.1	17.9
Proline	2.4	100.0	tr	—	tr	—	2.4
Alanine	20.2	94.8	1.0	4.7	0.1	0.5	21.3
Valine	3.2	97.0	0.1	3.0	—	—	3.3
Isoleucine	1.8	94.7	0.1	5.3	—	—	1.9
Tyrosine	1.8	94.7	0.1	5.3	—	—	1.9
Phenylalanine	3.4	97.1	0.1	2.9	—	—	3.5
γ-Aminobutyric acid	25.0	92.3	1.9	7.0	0.2	0.7	27.1
Histidine	1.2	80.0	0.3	20.0	tr	—	1.5
Arginine	2.9	90.6	0.3	9.4	—	—	3.2
Other amino acids	5.5	90.2	0.4	6.6	0.2	3.2	6.1
Total amino acids	210.0	88.6	21.7	9.2	5.2	2.2	236.9

Sampling: August 17

3. 桑葉遊離アミノ酸の抽出条件の検討

桑葉の遊離アミノ酸の抽出割合を Table 2 に示したが、4回抽出（フラクションIとII）で97.8%の抽出率になった。抽出し易いアミノ酸としてプロリン、フェニールアラニンがあり、次にアラニン、イソロイシン、チロシンであった。反対に比較的抽出困難なも

のとして、アスパラギン酸があり、つづいてセリン、アスパラギン、グルタミン酸、ヒスチジンであった。8月の桑の遊離アミノ酸含量は最も多いのがグルタミン酸（全遊離アミノ酸の40%）で、ついでアスパラギン、γ-アミノ酪酸、アスパラギン酸、アラニン、グルタミン、セリンの順であった。

Table 3. Effect of ethephon on free amino acids in mulberry leaves

(mg/100ml)

Amino acids	Days after ethephon treatment									
	0		1		2		3		4	
	Control	Control	Test	Control	Test	Control	Test	Control	Test	
Aspartic acid	16.0	22.6	18.0	22.7	22.9	25.0	25.2	28.0	29.5	
Threonine	2.5	2.5	2.6	2.7	2.8	3.3	3.3	3.5	3.3	
Serine	4.1	4.8	3.6	6.5	5.5	9.7	7.3	10.7	10.4	
Asparagine	5.1	5.2	8.1	17.4	27.7	33.2	48.1	36.2	67.8	
Glutamic acid	59.8	58.6	59.7	64.4	64.0	63.0	64.5	59.4	79.7	
Glutamine	11.0	11.0	16.6	11.1	14.2	11.6	14.3	13.1	18.5	
Proline	6.3	5.4	6.1	6.2	6.4	7.1	8.8	7.9	9.5	
Glycine	0.6	0.4	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
Alanine	8.5	7.2	6.9	8.2	7.8	7.4	7.8	8.2	8.1	
Valine	3.0	3.2	5.1	3.9	5.9	6.0	8.6	6.2	9.1	
Methionine	0.7	0.6	0.5	0.8	1.0	0.7	0.5	0.7	0.8	
Isoleucine	1.7	1.8	2.4	1.7	2.7	2.5	3.2	2.6	3.1	
Leucine	0.8	0.6	0.9	0.4	0.8	0.4	0.7	0.4	0.9	
Tyrosine	1.1	0.9	0.9	0.7	0.7	0.7	0.6	0.5	0.5	
Phenylalanine	2.1	1.8	1.6	2.2	2.0	3.3	2.1	3.7	2.4	
γ -Aminobutyric acid	21.7	18.0	18.0	17.4	17.8	16.8	16.4	15.5	16.3	
Tryptophan	1.5	1.5	2.3	1.7	3.3	4.2	4.4	4.4	4.7	
Total amino acids	146.5	146.1	153.8	168.3	185.8	195.2	216.1	201.3	264.9	

Minor amino acids: arginine, histidine, α -aminobutyric acid, ornithine and lysine.

Other compounds: ethanolamine (3.2~1.5mg/100ml) and ammonia (1.9~5.2mg/100ml)

4. エセホン処理葉の遊離アミノ酸の変化

最も顕著な変化を示したのはアスパラギンの増加であった (Table 3)。処理当日 5.1mg/100ml であったが、4日目には対照区で 36.2mg/100ml と急増した。

一方、処理区ではさらにその約2倍 (67.8mg/100ml) にも達した。そのほかグルタミン酸、バリン、イソロイシン、ロイシン、トリプトファンなどの増加も認められ、フェニルアラニンのみがわずかに減少していた。合計量も処理後の日数が経過するにつれて増加し、また処理区の増加の方が顕著であった。

5. エセホン処理葉の貯蔵

対照区の貯蔵葉は外見的には貯蔵前と変らなかった。しかしエセホン処理区の桑葉はすべて葉柄部のみが褐変していた。Fig. 2 に示したように遊離アミノ酸を葉柄と主脈を除いた部分で測定した結果、全遊離アミノ酸はさらに増加し (処理前の約3倍)、とくにアスパラギンの増加が顕著であった。しかもエセホン処理区の方がより多くなった。とくにアスパラギン、グル

タミンが処理区で増加することが認められた。

考 察

桑葉のみを機械的に採集するためにはエセホン処理による離脱促進が効果的である²⁰⁾。桑葉の離脱過程における酵素的変化を明らかにする目的で自然落葉における離層部の種々の細胞壁分解酵素活性を測定した。細胞壁を構成するセルロース、ペクチン、ヘミセルロースの分解酵素のうち、ペクチンを分解するペクチンリアーゼの活性は検出されなかった。

セルラーゼ活性は抽出法に依存する例^{4, 10, 16)} もあるので種々検討したが、桑葉離層部では効果がなかった。離脱に関与する酵素としてセルラーゼ^{1, 2, 7, 21, 22)} とペクチナーゼ^{18, 24)} が報告され、さらにインゲンマメの離層のセルラーゼは等電点の異なる2つのアイソザイムから成り、作用様式も異なることが認められている^{15, 17, 23)}。前報⁵⁾ に示したように桑葉離層部のセルラーゼも2つのアイソザイムから成り、いずれもエセホン処理後増加することが明らかになった。

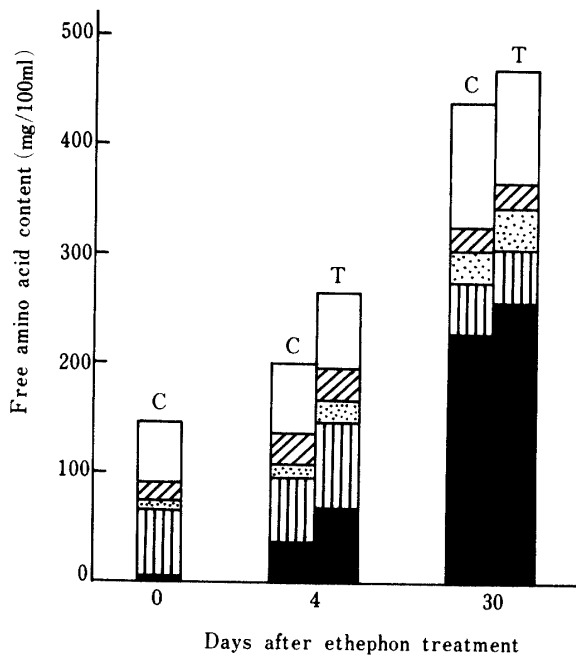


Fig. 2. Effect of storage on free amino acids in mulberry leaves treated with ethephon (June 11).

Asparagine: ■, glutamic acid: ▨, glutamine: ●, aspartic acid: ▩
T: ethephon-treated leaves, C: untreated leaves.

ヘミセルラーゼ活性は葉位による差があまり認められなかったのに対し、枝の齢が進むにつれて漸増することが見出された。一方セルラーゼとエキソポリガラクトナーゼは枝の齢とは関係なく、葉位が増すほど、また秋が深まるほど急激な活性増加を示した (Fig. 1) ことから、これらの酵素が桑葉の離脱に関与しているものと考えられる。

エセホンで落葉促進した桑葉を用いて蚕の飼育試験が行われているが¹²⁾、桑葉成分の比較はなされていない。処理葉の外観は対照区と全く差異が認められなかった。しかし全窒素を測定すると成熟・老化の促進が行われたと推定される結果 (Fig. 1) が得られた。これは新梢において全遊離アミノ酸が増加し、さらに発育が進むにつれて減少するという報告¹³⁾によっても支持される。桑葉の組織は比較的硬く、遊離アミノ酸の抽出が困難であった。桑葉を細切と磨砕によって抽出したものを比較すると磨砕の方が細切抽出より10%以上効率がよかった。

蚕の飼育試験の結果からエセホンには毒性がなく、また処理直後の葉は無処理区と変わらないが、貯蔵により葉質悪化をきたすといわれる¹²⁾。本実験で貯蔵葉を

比較すると無処理区がほとんど変化しなかったのに対し、処理区は葉柄のみであるが、褐変し、貯蔵性が劣ることが明らかになった。さらにアスパラギンが低温ポリ包装貯蔵により全遊離アミノ酸の50%以上を占めるようになった。レタス貯蔵においてもアスパラギン酸の増加が認められているが²⁵⁾、窒素代謝や呼吸作用に異常が生じたことが考えられる。しかし詳細なアスパラギンの蓄積機構については不明であり、現在研究中である。

要 約

桑葉の離脱に伴う離層部の細胞壁分解酵素の活性を葉位別、時期別に測定するとともに、エセホン処理によって離脱促進された桑葉および貯蔵葉の遊離アミノ酸と全窒素を無処理区と比較検討した。

1. 桑葉離層部の酵素のうち落葉に関与する酵素はセルラーゼとエキソポリガラクトナーゼおよびヘミセルラーゼであると推定され、とくにセルラーゼとエキソポリガラクトナーゼは下位葉の酵素活性が強く、また枝の齢とは関係なく10月に急増することを見出した。

2. エセホン処理葉の全窒素は対照区に比べ、5月と6月では増加し、秋には逆に減少することが明らかになり、エセホンは葉のエイジを促進することが認められた。

3. 桑葉の遊離アミノ酸はグルタミン酸 (全遊離アミノ酸の40%)、アスパラギン、 γ -アミノ酪酸、アスパラギンの順に多く含まれていた。またアスパラギン酸、セリン、アスパラギン、グルタミン酸、ヒスチジン等は比較的抽出されにくいアミノ酸であった。

4. エセホン処理葉はアスパラギンの増加が顕著であり、つづいてグルタミン、バリン、ロイシン、イソロイシン、チロシンが増加した。さらに5°C、30日間貯蔵により、エセホン処理区の葉柄が褐変した。貯蔵葉はアスパラギンの増加が著しく、全遊離アミノ酸の50%以上に達した。

謝 辞

本研究を行うにあたり、有益な御助言を頂いた本学農学部岩堀修一助教授および桑を提供して頂いた熱帯作物学教室へ謝意を表す。

文 献

- 1) Abeles, F.B.: Abscission: the role of cellulase. *Plant Physiol.*, **44**, 447-452 (1969)
- 2) Abeles, F.B., Leather, G.R., Forrence, L.E. and

- Craker, L.E.: Abscission: regulation of senescence, protein synthesis and enzyme secretion by ethylene. *HortScience*, **6**, 371-376 (1971)
- 3) Borel, E., Hostettler, F. and Deuel, H.: Quantitative Zuckerbestimmung mit 3,5-Dinitrosalicylsäure und Phenol. *Helvetica Chimica Acta*, **35**, 115-120 (1952)
 - 4) Byrne, H., Christou, N.V., Verma, D.P.S. and MacLachlan, G.A.: Purification and characterization of two cellulases from auxin-treated pea epicotyls. *J. Biol. Chem.*, **250**, 1012-1018 (1975)
 - 5) 福本寿一郎・辻坂好夫・竹西繁行：ヘミセルラーゼに関する研究（第1報）*Aspergillus niger* のヘミセルラーゼの精製とその性質. 農化, **44**, 447-456 (1970)
 - 6) 橋永文男・岩堀修一・西 保則・伊藤三郎：2-クロロエチルホスホン酸による柔葉離層部の細胞壁分解酵素活性の変化, 農化, **55**, 1217-1223 (1981)
 - 7) Horton, R.F. and Osborne, D.J.: Senescence, abscission and cellulase activity in *Phaseolus vulgaris*. *Nature*, **214**, 1086-1088 (1967)
 - 8) 岩堀修一・返田助光・大山勝夫：エスレル処理によるクワの落葉と離層におけるセルラーゼ活性の変化. 日蚕雑, **43**, 206-210 (1974)
 - 9) 岩田 益・中川 泉：生育中の桑に対する 2-Chloroethylphosphonic acid 散布の影響について, 蚕糸研究, **78**, 24-43 (1971)
 - 10) Koehler, D.E., Leonard, R.T., Vanderwoude, W.J., Linkins, A.E. and Lewis, L.N.: Association of latent cellulase activity with plasma membranes from kidney bean abscission zones. *Plant Physiol.*, **58**, 324-330 (1976)
 - 11) Koehler, D.E. and Lewis, L.N.: Effect of ethylene on plasma membrane density in kidney bean abscission zones. *Plant Physiol.*, **63**, 677-679 (1979)
 - 12) 小境泰典・市川柳仁・宮林満雄・栗林茂治：エスレルによる桑の脱葉とその葉によるカイコの飼育. 蚕糸研究, **92**, 46-59 (1974)
 - 13) 久保田収治・本山栄一：温州ミカンの窒素代謝に関する研究 第1報 葉と果汁中遊離アミノ酸濃度の日中変動. 四国農試報, **25**, 83-92 (1972)
 - 14) 黒瀬 邁・松崎 巖：発芽前後の桑樹の各部位における遊離アミノ酸組成. 蚕糸研究, **111**, 27-34 (1979)
 - 15) Lewis, L.N., Lew, F.T., Reid, P.D. and Barnes, J.E.: Isozymes of cellulase in abscission zone of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Growth Substances* (D.J. Carr, ed.), p. 234-239, Springer-Verlag, Berlin (1970)
 - 16) Lewis, L.N. and Varner, J.E.: Synthesis of cellulase during abscission of *Phaseolus vulgaris* leaf explants. *Plant Physiol.*, **46**, 194-199 (1970)
 - 17) Linkins, A.E., Lewis L.N. and Palmer, R.L.: Hormonally induced changes in the stem and petiole anatomy and cellulase enzyme patterns in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.*, **52**, 554-560 (1973)
 - 18) Morre, D.J.: Cell wall dissolution and enzyme secretion during leaf abscission. *Plant Physiol.*, **43**, 1545-1559 (1968)
 - 19) 大山勝夫：栽桑の分野におけるケミカルレギュレーション. 植物の化学調節, **13**, 44-55 (1978)
 - 20) 大山勝夫・返田助光：エスレルによる桑葉の離脱促進. 植物の化学調節, **7**, 39-44 (1972)
 - 21) Pollard, J.E. and Biggs, R.H.: Role of cellulase in abscission of citrus fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **95**, 667-673 (1970)
 - 22) Ratner, A., Goren, R. and Monselise, S.P.: Activity of pectin esterase and cellulase in the abscission zone of citrus leaf explants. *Plant Physiol.*, **44**, 1717-1723 (1969)
 - 23) Reid, P.D., Strong, H.G., Lew, F.T. and Lewis, L.N.: Cellulase and abscission in Red Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Physiol.*, **53**, 732-737 (1974)
 - 24) Riov, J.: A polygalacturonase from citrus leaf explants. *Plant Physiol.*, **53**, 312-316 (1974)
 - 25) 鈴木忠直・久保直哉・萩沼之孝・田村真八郎・山本博道：レタス、ハクサイおよびキュウリの CA 貯蔵中における遊離アミノ酸含量の変化. 食総研報, **38**, 46-55 (1981)
 - 26) 矢野義人：エチレン発生剤 2-Chloroethylphosphonic acid が桑の生育におよぼす影響. 蚕糸研究, **81**, 1-6 (1971)

Summary

Some activities of the cell-wall-degrading enzymes in the abscission zones of mulberry leaves were determined, at different leaf positions, from June to December, and the amounts of free amino acids and total nitrogen in the ethephon-treated leaves were compared with those in the untreated leaves.

1. The enzymes which were participated in the abscission of mulberry leaves were considered to be cellulase, exo-polygalacturonase and hemicellulase. The activities of cellulase and exo-polygalacturonase were higher in the lower leaves, increasing rapidly in October regardless of the age of shoots.

2. In May and June total nitrogen content in mulberry leaves was made to be increasing by ethephon treatment, in comparison with that in the untreated leaves, but it decreased in fall. It was ascertained that the aging of mulberry leaf was accelerated by ethephon.

3. The chief free amino acid of mulberry leaves was glutamic acid (40% of total free amino acids), accompanied with smaller amounts of aspartic acid, γ -aminobutyric acid and asparagine.

Aspartic acid, serine, asparagine, glutamic acid and histidine were relatively difficult to be extracted from mulberry leaves.

4. The ethephon-treated mulberry leaves showed a rapid increase of asparagine, followed by those of glutamic acid, valine, leucine, isoleucine and tyrosine. The petiole of mulberry leaves treated with ethephon turned brown after one month storage. Asparagine in the leaves showed a remarkable increase during the storage, reaching 50% of the total amino acids.