ศึกษาผลของ Mg-dechelating Substances และการควบคุมด้วย Heat treatment ต่อการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ในบร็อคโคลี

สมัคร แก้วสุกแสง*

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมเอนไซม์ Mg-dechelation และการเปลี่ยนแปลงของคลอโรฟิลล์และอนุพันธ์ของคลอฟิลล์ในบร็อคโคลี โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 15 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถลดการเปลี่ยนแปลงค่าสี (Hue angle) ปริมาณของคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี และกิจกรรมของเอนไซม์ Mg-dechelation (Chlide) *a* pheophorbide (Pheide) *a* pyropheophorbide (Pyropheide) *a* $C13^2$-hydrocylchlorophyll ($C13^2$-OHChl) *a* และ pheophytin (Phy) *a* พบว่าในวันที่ 6 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ปริมาณ Chlide *a* $C13^2$–OHChl *a* และ Phy *a* ลดลงพร้อมกับการเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดของปริมาณPheide *a* และ Pyropheide *a* ในทางกลับกันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่ามีการสะสมของ Chlide *a* และ Pheide *a* จากการศึกษาข้างต้นพบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถชะลอการสลายตัวของ Chl และอนุพันธ์ในบร็อคโคลี เป็นผลมาจาการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Mg-dechelation และ Chlorophyllase

ส่วนการศึกษาผลของ heat treatment (50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง) ต่อการสลายตัวของคลอโรฟิลล์และอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ รวมทั้งกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ ในระหว่างการทำ heat treatment และระหว่างการเก็บรักษาบร็อคโคลีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส พบว่าระหว่างการทำ heat treatment 2 ชั่วโมง ปริมาณของคลอโรฟิลล์ ได้แก่ Chlide *a* Pheide *a* และ $C13^2$–OHChl *a* ลดลงระหว่างการทำ heat treatment ในขณะที่ไอโซเมอร์ของคลอโรฟิลล์ (Chl a') และ Phy *a* เพิ่มขึ้น การทำ heat treatment 2 ชั่วโมง สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ เช่น chlorophyllase Mg-dechelation และ Chl-degrading peroxidase โดยเฉพาะอย่างยิ่งกิจกรรมเอนไซม์ Mg-dechaelation ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บีลดลงชัดเจนในชุดควบคุมขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์ ในบร็อคโคลีที่มีการทำ heat treatment มีการลดลงเล็กน้อย ส่วนอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์พบว่าปริมาณ Pheide *a* ในชุดควบคุมลดลงระหว่างการเก็บรักษา ในทางกลับกันปริมาณ Chlide *a* ในบร็อคโคลีที่มีการทำ heat treatment สูงกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้ปริมาณ Chlide *a* ในชุดควบคุมลดลงระหว่างการเก็บรักษา ในทางกลับกันปริมาณ Chlied a ในบร็อคโคลีที่มีการทำ heat treatment แทบจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงและพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ Mg-dechaelation ถูกยับยั้งในบร็อคโคลีที่มีการทำ heat treatment ในระหว่างการเก็บรักษามีการสะสมของอนุพันธ์คลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นตัวกลาง (intermediates) ในกระบวนการสลายตัวของคลอโรฟิลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Pheide *a*

การศึกษาลักษณะและบทบาทของเอนไซม์ Mg-dechaelation ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ในบร็อคโคลี โดยสกัดเอนไซม์ออกเป็น 2 ส่วนตามขนาดโมเลกุลได้แก่ โมเลกุลที่มีขนาดน้อยกว่า 5,000 Da (a low molecular weight fraction, LMWF) และโมเลกุลที่มีขนาดมากว่ากว่า 5,000 Da (a high molecular weight fraction,

---

* ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว) คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 107 หน้า.

HMWF) พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ Mg-dechaelation ทั้ง 2 ขนาดโมเลกุล โดยใช้สารตั้งต้นทำปฏิกิริยาทั้ง chlorophyllin (Chlin) *a* และ Chlide *a* กิจกรรมของเอนไซม์ Mg-dechaelation ในบร็อคโคลีที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสนาน 4 วัน (บร็อคโคลีเหลือง) มีค่าสูงกว่าบร็อคโคลีที่เก็บรักษาในวันที่ 0 (บร็อคโคลีเขียว) ส่วนพีเอชที่เหมาะสม (pH optimum) ค่าความเสถียรของพีเอช (pH stability) และความเสถียรของอุณหภูมิ (temperature stability) ของปฏิกิริยาคือ 8.0 8.5 และ 40 องศาเซลเซียสตามลำดับทั้งในบร็อคโคลีเขียวและบร็อคโคลีเหลือง นอกจากนี้กิจกรรมเอนไซม์ Mg-dechelating สามารถถูกยับยั้งด้วยสารประกอบ Chelating compounds สาร radical scavengers และ reducing agents เช่น Ascorbate และสารประกอบพวก flavonol ซึ่งได้แก่ kaempferol และ quercetin ทั้งในบร็อคโคลีเขียวและบร็อคโคลีเหลือง เมื่อนำ HMWF ที่มี Mg-dechelating มาทำให้บริสุทธิ์ (partially purified) ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ที่อิ่มตัว 20-60 เปอร์เซ็นต์แล้วต่อเนื่องด้วยวิธีการ molecular exclusion chromatography (Sephacryl S-200) พบว่ากิจกรรมของ Mg-dechelating เพิ่มขึ้นในวันที่ 6 ของการเก็บรักษาและกิจกรรมถูกยับยั้งในบร็อคโคลีที่ผ่านการทำ heat treatment โดยสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยามีการใช้ทั้ง Chlide *a* และ Chlin *a* จากนั้นนำเอนไซม์ Mg-dechelating ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Anionic exchange chromatography (DEAE-650M) วิธี Hydrophobic interaction chromatography (Butyl-650M) และวิธี Molecular exclusion chromatography (HW-55F) พบว่าเอนไซม์ Mg-dechelating ไม่ปรากฏ isozyme และมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 70 KDa เมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE อย่างไรก็ตามเอนไซม์ Mg-dechelating ที่บริสุทธิ์ทำปฏิกิริยากับ Chlin *a* ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่มีในกระบวนการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ จากการศึกษาข้างต้นสรุปได้ว่าสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายตัวของคลอโรฟิลล์

Involvement of Mg-dechelating Substances in Chorophyll Degradation of Broccoli (*Brassica oleracea* L. Italica Group) Florests and Its Control by Heat treatment

Samak Kaewsuksaeng*

Abstract

Yellowing, the most visible deterioration is the loss of sepal greenness in broccoli that usually occurs with the progress of chlorophyll (Chl) degradation. The objectives of this research are to study temperature and heat treatment affecting the changes in Chl and its derivatives during storage of broccoli florets with also deal the characterization of Mg-dechelating substances in stored broccoli florets to clarify its physiological role in Chl degradation.

Changes in Chl and its derivatives of broccoli (Brassica oleracea L.) florets during storage were determined in the first experiment. The hue angle levels of broccoli florets declined during storage at 15 °C, whereas those levels showed almost no change at 4 °C. Chls a and b contents in broccoli florets decreased greatly after 4 days of storage at 15 °C, whereas the content at 4 °C hadly showed any change for the first 3 days of storage at 4 °C and then decrease slightly. Chlorophyllide (Chlide) *a*, pheophobide (Pheide) *a,* pyropheophobide (Pyropheide) *a*, $C13^2$-Hydroxychlorophyll ($C13^2$-OHChl) a and pheophytin (Phy) *a* as Chl *a* derivatives were detected during storage by HPLC analysis. Chlide a, $C13^2$-OHChl a and Phy *a* levels in broccoli florets decreased concomitantly with the enchancement of Pheide a and Pyropheide a levels during storage at 15 °C. The Mg-dechelating activity increased after 4 days of storage at 15 °C, while the activity at 4 °C decreased. These findings suggest that Mg-dechelating action together with chlorophyllase could be involved in Chl degradation in stored broccoli florets.

The effect of heat treatment on Chl degradation, the information of Chl derivatives and Chl-degrading enzyme activities in stored broccoli florets were also determined in the second experiment. The Chl *a* level changed. Chlide *a*, Pheide a, $C13^2$-OHChl *a*, Chl *a*', an isomer of Chl *a*, and Phy *a* were detected as a Chl derivative during heat treatment and during storage after the treatment. The Chlide *a*, Pheide *a*, and $C13^2$-OHChl a levels decreaded during a 2-h heat treatment (50 ° C), whereas the Chl *a*' and Phy *a* levels increased. The Chl-dechelating enzyme activities, in particular, the Mg-dechelation activity, were effectively suppressed after 2 h of heat treatment. The content of Chls *a* and *b* in the control broccoli florets desreased greatly during storage at 15 ° C, while the content in heat-treatment broccoli florets hardly changed at all. In the Chl derivatives, the Phiide *a* level in broccoli florets treated with or without heat treatment, especially the former, increased appreciably during storage.

The Chlide *a* level in the control florets decreased markedly during. On the other hand, the Chlide *a* level in heat-treated broccoli florets did not change during storage. The Mg-dechelating activity in the control florets markedly increased after 4 days of storage at 15 °C, but the enchancement of the activity was suppressed by heat treatment.

---

* Doctor of Philosophy (Postharvest Technology), Faculty of School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi. 107 pages.

These finding suggest that the Chl derivertives, especially Pheide *a*, are accumulated as intermediates in heat-treated broccoli florets and Mg-chelating action, in conjunction with that of chlorophyllase and Chl-degrading peroxidase, could be involved in Chl degradation in stored broccoli florets.

The characterization of Mg-dechelation activity of stored broccoli florets was investigated to clarify the mechanism of Chl degradation in the last experiment. Mg-dechelation activity in floret extracts was found in two different molecular weight fractions – a low molecular weight (>5,000) fraction (LMWF) and a high molecular weight (>5,000) fraction (HMWF), which seemed to be Mg-dechelatase, using chlorophyllin (Chlin) a or Chlide *a* as a substrate. Mg-dechelation activity of the extracts from broccoli florets, which were stored for 4 days at 15 ° C, was higher than that of extract from fresh broccoli florets using Chlin a or Chlide *a* as a substrate. The pH optimum and stability of Mg-dechelation activity were 8.0 and 8.5, respiratively. The temperature stability was 40 ° C in fresh and yellow broccoli extracts. Chelating compounds, radical scavengers and reducing agents had different inhibitory effects. Ascorbate, and especially flavanol group, kaempferol and quercetin had more effective inhibitiory activity on both yellow and fresh broccoli extracts. The activity of the HMWF, which was partially purified by $(NH_4)_2SO_4$ precipitation (20-60% saturation) and molecular exclusion chromatography (Sephacry S-200) and using either Chlide *a* or Chlin *a* as a substrate, increased in yellowing broccoli florets after 6 day of storage, whereas heat treatment reduced the enhancement of the activity concurrently with the inhibition of yellowing. Anionic exchange chromatography (DEAE-650M), hydrophobic interaction chromatography (Butyl-650M) and molecular exclusion chromatography (HW- 55F) were further purified. Only one peak of the activity was detected in fresh broccoli extract and no other isozyme with Mg- dechelating action was found in the yellow broccoli extract and molecular mass was about 70 KDa. This high-molecular weight substance showsstrong activity with artificial substrate, Chlin *a*, but hardly have an activity with native substrates, Chlin *a*. This means that high-molecular weight substance (HMWS) does not have an activity with Chlin *a*. It is interpreted by the results Obtained in this study. HMWS is not involved in Chl degradation pathway of broccoli florets. It is necessary to purify low molecular substance and clarify the characterization in a future.