Agricultural Sci. J. 45 : 3/1 (Suppl.) : 109-112 (2014) ว. วิทย. กษ. 45 : 3/1 (พิเศษ) : 109-112 (2557)

การทำบริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะของเอนไซม์ chlorophyllase และ pheophytinase ในเปลือกผลมะนาว

Partially Purification and Characterization of Chlorophyllase and Pheophytinase in Lime Peels

นพรัตน์ ทัดมาลา[1] วาริช ศรีละออง[1] สมัคร แก้วสุกแสง[2] ณัฐชัย พงษ์ประเสริฐ[1] และเฉลิมชัย วงษ์อารี[1]

Nopparat Tatmala[1], Varit srilaong[1], Samak Kaewsuksaeng[2], Nutthachai Pongprasert[1] and Chalermchai Wongs-Aree[1]

Abstract

Peel yellowing is the main problem of lime during the postharvest period which limits the marketable life that usually occurs with the progress of chlorophyll degradation. The chlorophyll degradation in lime is induced by the activities of chlorophyllase and pheophytinase. The partially purification of chlorophyllase and pheophytinase was investigated to prove that these two enzymes are not the same enzyme using ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) purification method at concentrations of 0-100 %. The results found that chlorophyllase and pheophytinase activities of 'Paan' and 'Tahiti' lime were highest at 10-20 % and 40-50 % of ammonium sulfate, respectively. The optimum pH of enzyme activity and optimum temperature for incubation of chlorophyllase were 7.0 and 30 °C. Meanwhile, pheophytinase had the highest activity at pH 8.0 and 40 °C. This can prove that chlorophyllase and pheophytinase are not the same enzyme even both enzymes share the same precursor.

Keywords: lime, chlorophyll degradation, enzyme partially purification

บทคัดย่อ

การเปลี่ยนแปลงคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของผลมะนาวคือการเหลืองของเปลือก โดยสาเหตุเกิดจากการสลายตัวของคลอโรฟิลล์อันเนื่องมาจากการทำงานของกิจกรรมเอนไซม์ chlorophyllase และ pheophytinase ทำให้มะนาวไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคและมีอายุการวางจำหน่ายที่สั้น การศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ โดยการทำบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ chlorophyllase และ pheophytinase จากเปลือกผลมะนาว 2 สายพันธุ์ คือพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮิติ ด้วย ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้น 0-100 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามะนาวพันธุ์แป้นและมะนาวพันธุ์ตาฮิติมีกิจกรรมเอนไซม์ chlorophyllase สูงสุดในช่วงระดับความเข้มข้นของ ammonium sulfate ที่ 10-20 เปอร์เซ็นต์ และมีกิจกรรมเอนไซม์ pheophytinase สูงสุดในช่วงระดับความเข้มข้นของ ammonium sulfate ที่ 40-50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของ pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ chlorophyllase เท่ากับ 7.0 ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ pheophytinase เท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ chlorophyllase และ pheophytinase คือ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ บ่งชี้ได้ว่าเอนไซม์ chlorophyllase และ pheophytinase มีคุณสมบัติทางเคมีที่ต่างกันถึงแม้ว่าจะมีการใช้สารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาเอนไซม์ชนิดเดียวกัน

คำสำคัญ: มะนาว, การสลายตัวของคลอโรฟิลล์, การทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์

คำนำ

มะนาวเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปลูกกันมากได้แก่ พันธุ์แป้น (*Citrus aurantifolia* Swingle) โดยผลผลิตจะออกสู่ตลาดในช่วงเดือนกรกฎาคมจนถึงสิงหาคม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2554) สำหรับมะนาวสายพันธุ์ตาฮิติ (*Citrus latifolia* Tan.) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับมะนาวที่ปลูกในประเทศไทย ซึ่งทำการเก็บเกี่ยวในระยะที่สีเปลือกมีสีเขียวเช่นเดียวกันกับมะนาวพันธุ์แป้น การเปลี่ยนแปลงคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของผลมะนาวคือสีเปลือกจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง ทำให้มีอายุการวางจำหน่ายที่สั้น ส่งผลกระทบต่อราคาของมะนาวทำให้ราคาต่ำลงอย่างมาก การสูญเสียสีเขียวของเปลือกผลมะนาวมีสาเหตุมาจากการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ โดยกระบวนการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ถูกกระตุ้นโดยกิจกรรม

[1] สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ 10140

[1] Division of Postharvest Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10140

[2] หน่วยวิจัยพืชเขตร้อนในภาคใต้ สาขาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93110

[2] Southern Tropical Plants Research Unit, Department of Plant Science, Faculty of Technology and Community Development, Thaksin Universiy, Phatthalung 93110

เอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องได้แก่ chlorophyllase, Mg-chelatase, pheophorbidase และ chlorophyll-degrading peroxidase เป็นต้น จากรายงานของ Schelbert *et al*. (2009) ได้พบการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ตัวใหม่ในระดับโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในกลไกการสลายตัวของคลอโรฟิลล์คือ pheophytinase โดยเอนไซม์ชนิดนี้ไปย่อยอนุพันธ์ pheophytin ซึ่งเป็นอนุพันธ์สารตั้งต้นเดียวกันกับเอนไซม์ chlorophyllase แล้วเกิดการสร้างอนุพันธ์ pheophorbide ขึ้น (Aiamla-or *et al*., 2012) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของของเอนไซม์และการทำบริสุทธิ์เอนไซม์บางส่วน ของ chlorophyllase และ pheophytinase เพื่อทราบถึงคุณลักษณะทางเคมีของเอนไซม์ ในมะนาว สายพันธุ์แป้นและตาฮิติ ซึ่งการเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ pheophytinase และ chlorophyllase ที่มีการใช้สารตั้งต้นตัวเดียวกันจะนำมาสู่การเข้าใจกลไกการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ ในมะนาวได้มากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

ในการทดลองครั้งนี้ใช้มะนาวพันธุ์แป้นและตาฮิติ ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ ทำการคัดเลือกผลมะนาวที่มีขนาดผลใกล้เคียงกัน มีสีเขียวสม่ำเสมอ ไม่มีรอยตำหนิ ลักษณะการเกิดโรค นำมาทำความสะอาด ตัดแต่งขั้วผลให้เรียบร้อย ผึ่งให้แห้ง แล้วนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างเปลือกมะนาว 20 กรัม เมื่อสีเปลือกเหลืองสมบูรณ์ในวันสุดท้ายของการเก็บรักษา (วันที่ 18 สำหรับพันธุ์แป้น และ วันที่ 24 สำหรับพันธุ์ตาฮิติ) ในรูปของ Acetone powder เพื่อนำมาทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยสกัดโปรตีนโดยใช้ Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้นตั้ง 0-100 % หลังจากนั้นทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ chlorophyllase และ pheophytinase (Aiamla-or *et al*., 2012) และ pH ที่เหมาะสม (The pH optimum) และอุณหภูมิที่เสถียร (The temperature stability)

ผลและวิจารณ์ผล

การทำบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ chlorophyllase และ pheophytinase ในเปลือกผลมะนาวพันธุ์แป้นและตาฮิติ

มะนาวพันธุ์แป้นและตาฮิติมีกิจกรรมเอนไซม์ chlorophyllase สูงสุดในช่วงระดับความเข้มข้นของ ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ 20-40 เปอร์เซ็นต์ โดยมะนาวพันธุ์แป้นมีกิจกรรมเอนไซม์ chlorophyllase สูงกว่ามะนาวพันธุ์ตาฮิติ (Figure 1A) หลังจากนั้นศึกษาช่วงระดับความเข้มข้นของ ($(NH_4)_2SO_4$) เพิ่มเติม คือ 0-10, 10-20, 20-30, 30-40 และ 40-50 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ 10-20 เปอร์เซ็นต์มีผลต่อการตกตะกอนโปรตีนในมะนาวพันธุ์แป้นและมะนาวพันธุ์ตาฮิติดีที่สุด และมีกิจกรรมเอนไซม์ chlorophyllase สูงที่สุด (Figure 1B)

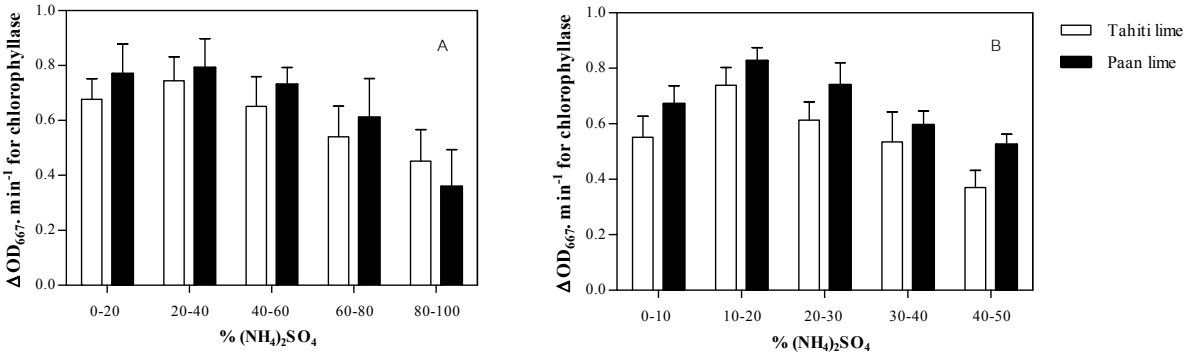

Figure 1 Concentrations of ammonium sulfate at 0-100% (A) and ammonium sulfate at 0-40% (B) used for purification of chlorophyllase activity in limes cvs. Paan and Tahiti at 25 ºC. Data represents ± SE, of three replications.

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์บางส่วน pheophytinase พบว่าการตกตะกอนของโปรตีนและมีกิจกรรมเอนไซม์ pheophytinase สูงที่สุดอยู่ในช่วง 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยมะนาวพันธุ์แป้นมีกิจกรรมเอนไซม์ pheophytinase สูงกว่าพันธุ์ตาฮิติ (Figure 2A) และทำการศึกษาเพิ่มเติมในระดับความเข้มข้นของ ($(NH_4)_2SO_4$) ได้แก่ 30-40, 40-50, 50-60, 60-70 และ 70-80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าระดับความเข้มข้นของ ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ 40-50 เปอร์เซ็นต์มีผลต่อการตกตะกอนโปรตีนในมะนาวพันธุ์แป้น

และมะนาวพันธุ์ตาฮิติดีที่สุด และมีกิจกรรมเอนไซม์ pheophytinase สูงที่สุด (Figure 2B) Aiamla-or *et al*. (2012) ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ chlorophyllase และ pheophytinase ในบร็อกโคลี่โดยใช้ ($(NH_4)_2SO_4$) อิ่มตัวสำหรับทำให้โปรตีนตกตะกอน โดยพบว่าการใช้ ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ช่วงความเข้มข้น 20-40 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมเอนไซม์ chlorophyllase สูง ในส่วนของกิจกรรมของเอนไซม์ pheophytinase พบว่าการใช้ ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ช่วงความเข้มข้น 40-60 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าช่วงระดับความเข้มข้นอื่น ดังนั้นจากการทดลองสามารถบ่งชี้ได้ว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นเอนไซม์หรือโปรตีนต่างชนิดกัน นอกจากนี้จะเห็นได้ว่ามะนาวพันธุ์แป้นมีกิจกรรมเอนไซม์ chlorophyllase และ pheophytinase สูงกว่ามะนาวพันธุ์ตาฮิติ ส่งผลให้การสลายตัวของคลอโรฟิลล์หรือการเหลืองของมะนาวพันธุ์แป้นเกิดขึ้นเร็วกว่ามะนาวพันธุ์ตาฮิติ ซึ่งตามการทดลองของนพรัตน์และคณะ (2556)

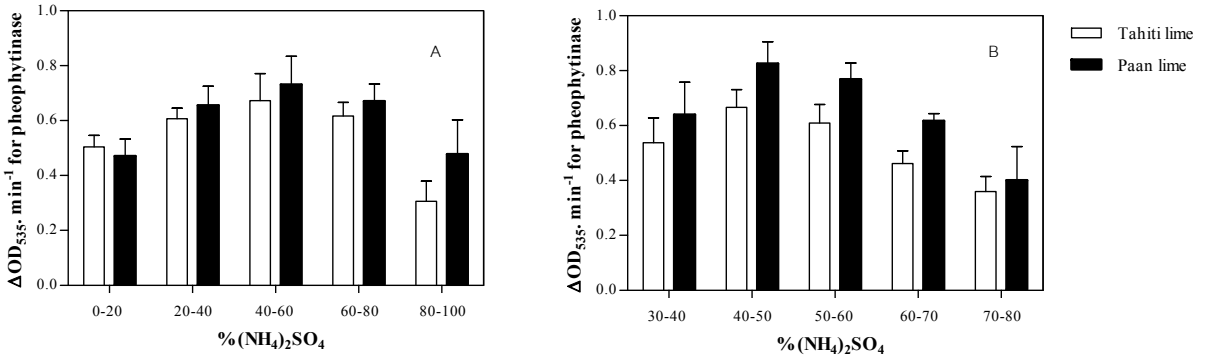

Figure 2 Concentrations of ammonium sulfate at 0-100% (A) and ammonium sulfate at 0-40% (B) used for purification of pheophytinase activity in limes cvs. Paan and Tahiti at 25 ºC. Data represents ± SE, of three replications.

พีเอชที่เหมาะสม (pH optimum) ต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ chlorophyllase และ pheophytinase

พบว่าการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ chlorophyllase เพิ่มสูงสุด เมื่อ pH ของสารละลาย phosphate buffer (50 mM KCl และ 0.12% TritonX-100) เท่ากับ 7.0 โดยมะนาวพันธุ์แป้นมีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงกว่ามะนาวพันธ์ตาฮิติ (Figure 3A) ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ pheophytinase มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อ pH ของ phosphate buffer (50 mM KCl และ 0.12% TritonX-100) เท่ากับ 8.0 และมะนาวพันธุ์แป้นจะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่ามะนาวพันธุ์ตาฮิติ (Figure 3B)

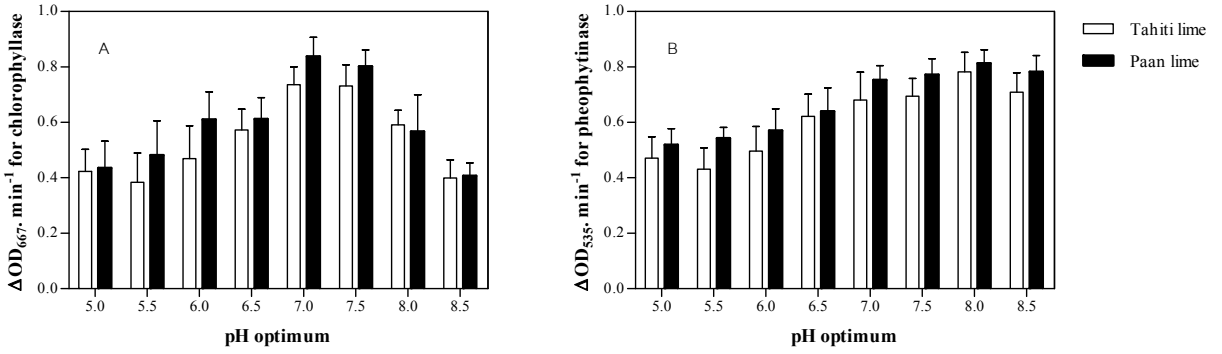

Figure 3 pH optimum changes of chlorophyllase (A) and pheophytinase activities (B) in limes cvs. Paan and Tahiti at 25 ºC. Data represents ± SE, of three replications.

อุณหภูมิที่เสถียร (temperature stability) ต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ chlorophyllase และ pheophytinase

พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ chlorophyllase และมีกิจกรรมสูงที่สุดเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ทั้งมะนาวพันธุ์แป้นและมะนาวพันธุ์ตาฮิติ (Figure 4A) ในขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ pheophytinase ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮิติเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส (Figure 4B) ก่อนหน้านี้มีการศึกษา

คุณลักษณะของเอนไซม์ Mg-dechelating substance ในบร็อคโคลี่ ได้แก่ โดยใช้ความเข้มข้นของ ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้น 20-60 เปอร์เซ็นต์ ให้กิจกรรมสูงสุด pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิที่เสถียรในการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส (Kaewsuksaeng, 2007) จะเห็นได้ว่าเอนไซม์แต่ละชนิดในกระบวนการสลายตัวของคลอโรฟิลล์จะมีคุณลักษณะทางเคมีที่แตกต่างกัน

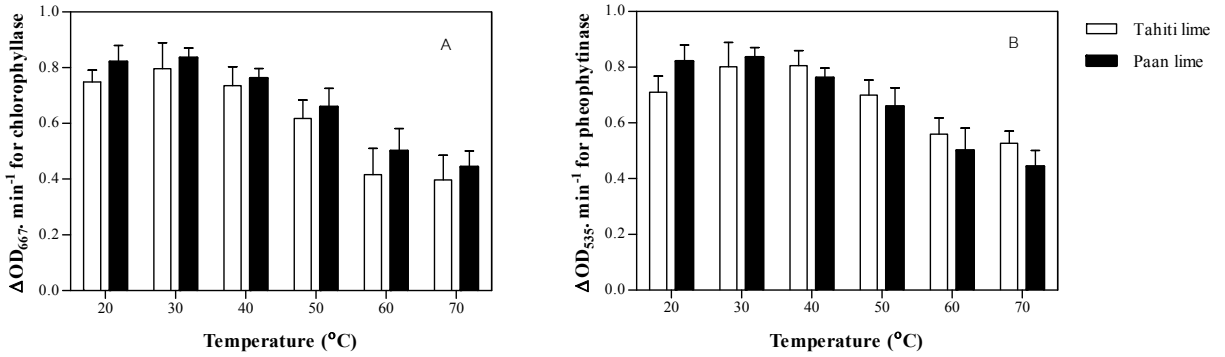

Figure 4 Temperature stability changes of chlorophyllase (A) and pheophytinase activiies (B) in limes cvs. Paan and Tahiti at 25 ºC. Data represents ± SE, of three replications.

สรุป

การทำบริสุทธิ์บางส่วนของโปรตีนในมะนาวพันธุ์แป้นและตาฮิติพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ chlorophyllase และ pheophytinase สูงสุดในช่วงระดับความเข้มข้นของ ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ 20-40 เปอร์เซ็นต์ และ 40-50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ chlorophyllase เท่ากับ 7.0 ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ pheophytinase เท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ chlorophyllase เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ pheophytinase เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ทั้งมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮิติ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สาขาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และสาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ที่อนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2554. ศูนย์ข้อมูลและข่าวสารการส่งออกมะนาว. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 28 หน้า.

นพรัตน์ ทัดมาลาม วาริช ศรีละออง, สมัคร แก้วสุกแสง, ณัฐชัย พงษ์ประเสริฐและเฉลิมชัย วงษ์อารี. 2556. การสลายตัวของครอโรฟิลล์และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮิติ. ว.วิทย.กษ. 44(3 พิเศษ): 89-92.

Aiamla-or, S., N. Tetsuya, M. Shigyo and N. Yamauchi. 2012. Pheophytinase activity and gene expression of chlorophyll degrading enzymes relationg to UV-B treatment in postharvest broccoli (*Brassica oleracea* L. Italica Group) florets. Postharvest Biol. Technol. 63: 60–66.

Kaewsuksaeng, S. 2007. Involvement of Mg-chelating substances in chlorophyll degradation of broccoli. Ph.D. dissertation. King Mongkut's University of Technology Thonburi. 107 pages.

Schelbert, S., S. Aubry, B. Burla, B. Agne, F. Kessler, K. Krupinska and S. Hörtensteiner. 2009. Pheophytin pheophorbide hydrolase (Pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in Arabidopsis. Plant Cell. 21: 767 – 785.