ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46297

CHLOROPHYLL DEGRADATION IN VACUOLES OF POSTHARVEST JAPANESE BUNCHING ONION (*Allium fistulosum* L. cv. Kujyo)

MISS ALISA SOONTORNWAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (POSTHARVEST TECHNOLOGY)
SCHOOL OF BIORESOURCES AND TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI
2011

b 00256183

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46297

Chlorophyll degradation in vacuoles of postharvest Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L. cv. Kujyo)

Miss Alisa Soontornwat B. Sc. (Food Technology)

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for
The Degree of Master of Science (Postharvest Technology)
School of Bioresources and Technology
King Mongkut's University of Technology Thonburi
2011

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

Thesis Committee

Sirichai Kanlayanarat ..... Chairman of Thesis Committee
(Assoc. Prof. Sirichai Kanlayanarat, Ph.D.)

Varit Srilaong ..... Member and Thesis Advisor
(Asst. Prof. Varit Srilaong, Ph.D.)

Naoki Yamauchi ..... Member and Thesis Co-Advisor
(Prof. Naoki Yamauchi, Ph.D.)

Chalermchai Wongs-Aree ..... Member
(Asst. Prof. Chalermchai Wongs-Aree, Ph.D.)

Samak Kaewsuksaeng ..... Member
(Lect. Samak Kaewsuksaeng, Ph.D.)

Copyright reserved

Thesis Title	Chlorophyll degradation in vacuoles of postharvest Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L. cv. Kujyo)
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Alisa Soontornwat
Thesis Advisors	Asst.Prof. Dr. Varit Srilaong
	Prof. Dr. Naoki Yamauchi
Program	Master of Science
Field of Study	Postharvest Technology
Department	Postharvest Technology
Faculty	School of Bioresources and Technology
B.E.	2011

Abstract

E46297

The yellowing at a tip of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L. cv. Kujyo) during storage is usually observed and this problem relates to the loss of external quality due to chlorophyll degradation. The chlorophyll catabolisms of Japanese bunching onion have been reported that it occurred in the chloroplast, however it may also occur inside the vacuole. Therefore, this experiment was subjected to study the changes of chlorophyll contents and its derivatives in Japanese bunching onion during storage. The vacuoles from Japanese bunching onion were separated for analyzing the chlorophyll catabolites. The purification of vacuoles from 1×10^5 protoplasts yielded vacuoles at 10 to 20%. The contamination of other organelles in purified vacuole was found a low activity of the maker enzyme including catalase, NADH cytochrome C reductase, NADH malate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase. Whereas, the maker

E46297

enzymes of vacuole including acid phophatase and β-glucosidase had high activity. This indicated that the purified vacuoles were good enough for further step of analysis. *In vitro* test of vacuole and protoplasts extracted from Japanese bunching onion containing the reaction mixture was incubated for 0, 3, 6, 18, 24 hr. The formation of chlorophyllide *a*, pheophorbide *a*, pyropheophorboie *a* and C13^2-hydroxychlorophyll *a* in protoplasts was higher than that in the vacuoles whereas the vacuoles shown higher formation of pheophytin *a* than that in the protoplasts. From the result of *in vitro* test found that chlorophyll catabolite were also found in vacuole of Japanese bunching onion. Therefore, *in vivo* test was initiated to study the changes of color, chlorophyll contents and chlorophyll derivative contents in Japanese bunching onion during storage at 4 °C and 25 °C. The hue angle level of Japanese bunching onion was declined during storage at 25 °C, whereas leaves storage at 4 °C shown unchanged of the hue angle level. The chlorophyll *a* and chlorophyll *b* contents of Japanese bunching onion were decreased in leaves storage at 25 °C faster than that of stored at 4 °C. Chlorophyll derivatives (chlorophyllide *a*, pheophytin *a*, C13^2-hydroxychlorophyll *a*, pheophorbide *a* and pyropheophorbide *a*) in vacuoles of bunching onion stored at 25 °C increased on day 1 while the vacuole of Japanese bunching onion storage at 4 °C showed a slowly increased of chlorophyll derivatives during storage. From the results, the accumulation of chlorophyll catabolite was observed in vacuole of Japanese bunching onion during storage. This indicated that the chlorophyll degradation may also occur in the vacuole especially at high temperature, while the storage at 4 °C retarded the chlorophyll catabolism in Japanese bunching onion.

Keywords: Japanese Bunching Onion/ Yellowing/ Chlorophyll Degradation/ Chlorophyll Derivatives

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ในแวคคิวโอของต้นหอมญี่ปุ่น ระหว่างการเก็บรักษา
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นางสาวอลิษา สุนทรวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. วาริช ศรีละออง
	ศ. ดร. นาโอกิ ยามาอุจิ
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว
สายวิชา	เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว
คณะ	ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
พ.ศ.	2554

E46297

บทคัดย่อ

ปัญหาสำคัญของต้นหอมญี่ปุ่นระหว่างการเก็บรักษา คืออาการเหลืองของใบโดยเฉพาะบริเวณปลายใบ ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ มีรายงานว่าการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ในต้นหอมญี่ปุ่นเกิดขึ้นภายในคลอโรพาสต์ และคาดว่าสามารถเกิดภายในแวคคิวโอด้วย งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์และอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ในแวคคิวโอของต้นหอมญี่ปุ่นระหว่างการเก็บรักษา โดยทำการสกัดแวคคิวโอจากโปรโตรพลาสของต้นหอมญี่ปุ่น พบว่าโปรโตรพลาสจำนวน 1×10^5 เซลล์ สามารถสกัดแวคคิวไอได้ 10-20 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนโปรโตรพลาสทั้งหมด เมื่อนำแวคคิวโอที่ได้มาทำการตรวจสอบกิจกรรมของ Maker enzyme ที่เป็นตัวบ่งชี้ของออร์แกเนลล์อื่นๆ ประกอบด้วย Catalase NADH cytochrome C reductase NADH malate dehydrogenase และ Alcohol dehydrogenase พบว่ามีกิจกรรม ของ Maker enzyme ที่เป็นตัวบ่งชี้ของออร์แกเนลล์อื่นๆ ในระดับต่ำ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแวคคิวโอที่สกัดได้มีการปนเปื้อนออร์แกเนลล์อื่นๆ ในปริมาณน้อย จากการตรวจสอบกิจกรรมของ Maker enzyme ที่บ่งชี้อยู่ในแวคคิวโอ ประกอบด้วย Acid phophatase และ β-glucosidase พบว่ามีกิจกรรมของ Maker enzyme ที่บ่งชี้อยู่ในแวคคิวโอที่สกัดได้ในระดับสูง แสดงว่าแวคคิวโอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปใช้ทำการทดลองต่อไป

E46297

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ได้แก่ Chlorophyllide *a* Pheophytin *a* $C13^2$-hydroxychlorophyll *a* Pheophorbide *a* และ Pyropheophorbide *a* ในแวคคิวโอ และโปรโตพลาสของต้นหอมญี่ปุ่นในสภาวะ *in vitro* โดยนำแวคคิวโอและโปรโตรพลาสมาบ่มเป็นเวลา 0 3 6 8 และ 24 ชั่วโมง พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ในโปรโตรพลาสสูงกว่าในแวคคิวโอ เนื่องจากภายในโปรโตรพลาสมีออร์แกเนลล์ชนิดต่างๆบรรจุอยู่ เช่น คลอโรพลาสแต่ปริมาณของ pheophytin *a* ในแวคคิวโอมีปริมาณสูงกว่าในโปรโตรพลาส จากผลการทดลองแสดงว่ามีการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ทั้งภายในโปรโตพลาสและ แวคคิวโอ ดังนั้นจึงทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในต้นหอมญี่ปุ่นระหว่างการเก็บรักษา โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า Hue angle ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี และอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ในแวคคิวโอ ของต้นหอมญี่ปุ่นในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียล พบว่าค่า Hue angle ลดลงในต้นหอมญี่ปุ่นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียล ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล มีการเปลี่ยนแปลงของค่า Hue angle เพียงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บีของต้นหอมญี่ปุ่นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บีลดลงเร็วกว่าต้นหอมญี่ปุ่นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล และมีอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในขณะที่แวคคิวโอของต้นหอมญี่ปุ่นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล มีอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการสลายตัวของคลอโรฟิลล์สามารถเกิดขึ้นได้ภายในในแวคคิวโอของต้นหอมญี่ปุ่น โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล สามารถชะลอการเหลืองอันเนื่องมาจากการสลายตัวของคลอโรฟิลล์

คำสำคัญ: ต้นหอมญี่ปุ่น/ การสลายตัวของคลอโรฟิลล์/ อนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to acknowlede the contribution of following persons for outstanding support and assistance over the research. Firstly, I would sincerely thank my supervisors, Asst. Prof. Dr. Varit Srilaong for supported, advice, and proofread my of thesis. I would like to sincerely thank to my co- supervisors Prof. Dr. Naoki Yamauchi of the Laboratory of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Japan, for advice, to teach technical in this research, encouragement and provided time to discussion. I would like to thank Prof. Dr. Masayoshi Shiyo of the Laboratory of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Japan. I would like to thank Dr. Sukanya Aiamla-or for valuable suggestions, encourage and guidance of technical with my thesis. I would like to sincerely for my thesis committee, Assoc. Prof. Dr. Sirichai Kanlayanarat and Asst. Prof. Dr. Chalermchai Wongs-Aree, the Division of Postharvest Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology, Thonburi and Dr. Samak Kewsuksaeng, Faculty of Technology and Community Development, Thaksin University, Phatthalung campus, for their valuable assistances, helpful suggestions and constructive comments. Gratitude is assisted for friend and Thai students in Yamaguchi University. Lastly, to my family who gave encouragement and the Japan Student Services Organization (JASSO) scholarship was awarded to scholarship for my research in Japan.

CONTENTS

	PAGE
ENGLISH ABSTRACT	i
THAI ABSTRACT	iii
ACKNOWLEDGMENT	v
CONTENTS	vi
LIST OF TABLE	x
LIST OF FIGURE	xi
CHAPTER	
1. INTRODUCTION	1
1.1 Background	1
1.2 Objective of study	3
1.3 Scope of study	4
1.4 Benefits	5
2. LITERATURE REVIEWS	6
2.1 General information of Japanese bunching onion	6
2.1.1 Foliage leaf structure of Japanese bunching onion	7
2.1.2 Postharvest Senescence of Japanese bunching onion	8
2.2 Chlorophyll	10
2.2.1 Chlorophyll Structure	10
2.2.2 Chlorophyll Derivative	11
2.2.3 Chlorophyll Degradation pathway	12

2.3 Change of plastid during leaf senescence 20

2.3.1 Senescence-related changes in the ultrastructure of plastid 20

2.3.2 The degrading of thylakoid membrane 20

2.3.3 Plastoglobuli 21

2.3.4 Change of the chloroplast of Japanese bunching onion during senescence 23

2.4 Postharvest treatment for retarding chlorophyll degradation in plant 26

2.4.1 Heat treatment 26

2.4.2 Ultraviolet irradiation treatment 26

2.5 Storage temperature 27

2.5.1 Storage temperature on quality of vegetable 28

2.6 Isolation and purification of cellular organelles 30

2.6.1 Cell disruption 31

2.6.2 Method of cell disruption 31

2.6.3 Methods for cell separation and purification 35

2.6.4 Assessment of samples purity 43

2.7 Cell protoplasts and Extraction of protoplasts 46

2.8 Vacuoles and Isolation of vacuoles 47

3. MATERIAL AND METHODS 49

3.1 Plant Material 49

3.2 Experimental Designs 49

3.2.1 Experiment 1 Vacuole preparation from Japanese bunching onion leave 49

3.2.2 Experiment 2 Analysis of chlorophyll derivative in protoplasts and vacuoles of Japanese bunching onion 56

3.2.3 Experiment 3 Chlorophyll degradation in vacuoles of Japanese bunching onion 57

4. RESULTS AND DISCUSSION 40

4.1 Experiment 1 Vacuole preparation from Japanese bunching onion leave 59

4.1.1 Preliminary of exaction protoplast from Japanese bunching onion leave 59

4.1.2 Accurate protoplast exaction from Japanese bunching onion leave 62

4.1.3 Protoplast purification by Ficoll density gradient centrifugation 65

4.1.4 Preliminary of isolation vacuole from purify protoplast 69

4.1.5 Accurate vacuole isolation and purification from purify protoplast 73

4.1.6 Study of hydrolytic enzyme in purification vacuole 81

4.2 Experiment 2 Analysis of chlorophyll derivative in protoplasts and vacuoles of Japanese bunching onion 83

4.2.1 Change of chlorophyll derivatives level in protoplasts and vacuoles of Japanese bunching onion 83

4.2.2 Change of chlorophyll derivatives level in boiled protoplasts and vacuoles of Japanese bunching onion 86

4.3 Experiment 3 Chlorophyll degradation in vacuoles of Japanese bunching onion 89

4.3.1 Change of surface color, hue angle and chlorophyll content 89

4.3.2 Change of Chl *a* and its derivatives levels in vacuole 91

5. CONCLUSIONS 94

REFERENCES 96

CURRICULUM VITAE 105

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
4.1 Number of protoplasts extracted from Japanese bunching onion by method A (using enzyme concentration 2% (w/v) cellulase and 0.3% (w/v) macerozyme and digestion 1 hr 30 min) and method B (using enzyme concentration 4% (w/v) cellulase and 1.5% (w/v) macerozyme and digestion 3 hr)	64
4.2 The Ficoll gradients for purify the protoplasts	67
4.3 Polybase procedure for various bunching onion method A (method for purified vacuole was modified from Boudet et al., 1981)	75
4.4 Polybase procedure for various bunching onion method B (method for purified vacuole was modified from Asami et al., 1985)	77
4.5 Enzyme activity in vacuole of the Japanese bunching onion (The maker enzyme in other organelles)	82
4.6 Enzyme activity in vacuole and protoplasts of the Japanese bunching onion (The maker enzyme in vacuoles)	82

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAEG
2.1 Structures formulae of chlorophyll ; (A) Tatrapyrrole rings , (B) phytol tail	10
2.2 Chlorophyll degradation pathway in higher plants	14
2.3 Hypothetical compartmentation of the chlorophyll (Chl) degradation pathway	18
2.4 Putative pathway of peroxidase-mediated chlorophyll degradation	19
2.5 Thin section electron micrograph of a young tobacco chloroplast	24
2.6 Degrading of chloroplast in Japanese bunching onion in day 0	25
2.7 Degrading of chloroplasts and enlarged plastoglobuli in vacuole	25
2.8 Techniques of cell disruption for isolated cellular organelles	31
2.9 Methods for purification of cellular organelles	35
2.10 Methods for measurement of purification organelles	44
4.1 Photographs of the extraction protoplasts of Japanese bunching onion leaves: A, digestion for 30 min (×40); B, digestion for 40 min (×40); C, digestion for 50 min (×40); D, digestion for 60 min (×40)	60
4.2 Photographs of filtration protoplast thought 1 layer of Miracloth then 1layer 40 μm of nylon net : A, protoplasts after filtration(×40); B,Protoplasts fix in nylon net layer(×40)	61

4.3 Photographs of Filtration protoplast thought 2 layer of Miracloth then1 layer 40 μm of nylon net : A, protoplasts after filtration(×40); B, Protoplasts fix in nylon net layer(×40) 61

4.4 Photographs of: A, protoplasts preparation from method A (using enzyme concentration 2% (w/v) cellulase and 0.3% (w/v) macerozyme and digestion 1 hr 30 min) ; B, protoplasts preparation from method B(using enzyme concentration 4% (w/v) cellulase and 1.5% (w/v) macerozyme and digestion 3 hr 30 min) 64

4.5 Photographs of: A, Protoplasts taken from the 2,5% ficoll interface of the discontinuous gradient; B, Protoplasts taken from the 5,10% ficoll interface of the discontinuous gradient 68

4.6 Photographs of: A, Protoplasts taken from the 10,15% ficoll interface of the discontinuous gradient ; B, protoplasts were stained with even blue 68

4.7 Photographs of: A, Sonicate for 3 min (×10); B, Sonicate for 6 min (×10) C, Sonicate for 10 min (×10); D, Sonicate for 20 min (×10) pink color is vacuole stain with neutral red dye 69

4.8 Photographs of: A, vacuoles take from 2, 5% Ficoll interface layer of discontinuous gradient (×40); B, vacuoles take from 5, 20% Ficoll interface layer of discontinuous gradient (×40); C, vacuoles take from 5, 20% Ficoll interface layer of discontinuous gradient (×100) pink color is vacuole stain with neutral red dye 71

4.9 Photographs of: A, Extraction vacuoles were gentle swirling in DEAE dextran for 1 min (×10); B, Extraction vacuoles were gentle swrling in DEAE dextran for 5 min(×10); C, Extraction vacuoles were gentle swirling in DEAE dextran for 40 min (×10); D, Extraction vacuoles were gentle swrling in DEAE dextran for 20 min (×10) pink color is vacuole stain with neutral red dye 72

4.10 Photographs of: A; The solution obtain after DEAE dextran/dextran sulfate lysis without purification; B and D, Vacuoles after purification by vacuoles were stained with neutral red 80

4.11Change of chlorophyll catabolits in non boiled vacuoles and protoplasts of Japanese bunching onion during incubation for 0, 3, 6, 18, 24 hr at 25°C 85

4.12 Change of chlorophyll catabolits in boiled vacuoles and protoplasts of Japanese bunching onion during incubation for 0, 3, 6, 18, 24 hr at 25°C 88

4.13 Change of hue angle value in Japanese bunching onion leaves during storage at 4 and 25 °C 90

4.14 Change of chlorophyll *a* and *b* content in Japanese bunching onion leaves during storage at 4 and 25 °C 90

4.15 Change of chlorophyll catabolites in Japanese bunching onion during storage at 4 and 25°C 93