

# Tepelná degradácia chlorofylu

M. GRODOVSKÝ, M. HRBALOVÁ

Chlorofyl, zelené farbivo rastlín púta pozornosť ako rastlinných fyziológov a biochemikov, tak i potravinárskych technológov, pravda, každého z iného hľadiska. Biochemici skúmajú cesty, po ktorých sa uberá fotosyntéza, s posledným cieľom zlepšiť jej účinnosť, prípadne nahradiť ju syntézou in vitro, aby sa mohol nasýtiť stále rastúci hlad hrozivo sa zväčšujúcej populácii na zemi-guli.

Potravinárskych technológov trápi farebná nestálosť zelených výrobkov, ako sú zelený hrášok, fazuľka a uhorky, najmä v kyslom náleve. Veľa pozornosti sa venuje kinetike týchto zmien, ako tomu nasvedčuje napr. práca Schanderla a spol. (1) a iné. Vypracovali sa analytické metódy, ktoré dovoľujú stanoviť nielen celkový obsah chlorofylu, ale aj jeho komponenty, resp. degradačné produkty (2–6). Táto práca chce byť malým príspevkom k uvedenej problematike, s ktorou sme sa zaoberali pri sledovaní tepelných zmien prebiehajúcich pri pasterizačných a sterilizačných zásahoch na produkty rastlinného pôvodu.

Práca obsahuje niektoré poznatky, získané pri modelových pokusoch s čistými komponentami chlorofylu pri pasterizačných teplotách. Feofytíny vznikajú z príslušných chlorofylov stratou komplexne viazaného horčika najmä po kyslej hydrolýze.

## Pracovný postup

### a) Modelové pokusy

Čisté preparáty chlorofylov *a* a *b*, vhodné pre modelové pokusy sú u nás ťažko dostupné. Pritom aj obchodné preparáty treba čistiť, lebo počas skladovania môže dôjsť ku konverzii na feofytíny. Pripravili sme si preto potrebné čisté preparáty laboratórne (11, 12), v podstate podľa metódy Smitha a Beniteza (2) chromatografiou na stĺpci cukru s prísadou škrobu. Pre analytické účely sme adaptovali delenie na tenkej vrstve silikagelu podľa Horvatovičovej-Haspelovej (7).

Z viacerých skúšaných kombinácií sa nám najlepšie osvedčilo nasledovné zloženie silikagelovej vrstvy:

30 g silikagel CH 5–40

1,5 g  $\text{CaCO}_3$

4,0 g  $\text{CaSO}_4$

90 ml roztoku kyseliny askorbovej  $5 \cdot 10^{-3}$  M.

K dobrému rozdeleniu rastlinných pigmentov dochádzalo behom 10–20 minút. Zloženie pohyblivej fázy je ľahký benzín, izopropylalkohol a voda v pomere 100 : 10 : 0,25.

Čistotu získaných preparátov sme preverovali premeraním spektra v oblasti 400–700 nm, kde sú význačné absorpčné maximá chlorofylov a príslušných feofytínov vo viditeľnej oblasti. Čisté preparáty chlorofylov sme skladovali pri teplote  $-12^\circ\text{C}$  v acetónovom roztoku.

V modelových pokusoch sme sledovali vplyv teploty na chlorofyly pri teplotách 30, 40, 70, 80 a  $90^\circ\text{C}$ . Ako rozpustidlo sme používali pre teploty do  $50^\circ\text{C}$  acetón a cyklohexanón pre teploty nad  $50^\circ\text{C}$ . Obchodné preparáty cyklohexanónu bolo treba pred použitím dôkladne a zdĺhavo zbavovať zvyškov kyselín pretrepávaním s práškovou potašou.

Vhodnú koncentráciu vodíkových iónov sme dosahovali prídavkom 20 ml kyseliny soľnej koncentrácie  $5 \cdot 10^{-3}$  M do 80 ml vhodne zriedeného roztoku pigmentu, aby sa odčítané hodnoty extinkcie pohybovali v rozmedzí 0,2–0,8. Lepšie ako zriedená kyselina soľná, ktorá spôsobovala niekedy zákaly, osvedčil sa nám prídavok kyseliny šťaveľovej v acetóne, resp. v cyklohexanóne. Používali sme koncentráciu 0,05–0,1 molárnu.

Skúmavky s roztokmi chlorofylov a kyseliny sme zohrievali vo vodnom termostate, pričom vo vhodne zvolených časových intervaloch sa odčítala extinkcia na spektrofotometri VSU-1 firmy Zeiss, Jena. Ako blank slúžil roztok kyseliny rovnakej koncentrácie ako vo vzorke v čistom rozpustidle. Výsledok meraní, vlastne výpočet rýchlostných konštánt z týchto meraní je v tabuľke 1 pre chlorofyl *a* a v tabuľke 2 pre chlorofyl *b*.

Rýchlostné konštanty z týchto tabuliek použili sme na výpočet priemernej hodnoty aktivačnej energie pre rozsah meraných teplôt. Výpočty sú uvedené v tabuľke 3 a 4. Aktivačnú energiu sme počítali podľa vzorca:

$$E = \frac{4,57 \log k_1/k_2}{1/T_1 - 1/T_2},$$

kde  $k_1$ ,  $k_2$  sú rýchlostné konštanty pre teploty  $T_1$  a  $T_2$ ,  
 $T_1$ ,  $T_2$  absolútne teploty v  $^\circ\text{K}$ .

## Diskusia

Rozborom dát získaných pokusmi podľa známych metód používaných pri štúdiu kinetiky (8–10) sme zistili, že kinetika degradácie chlorofylov v modelových roztokoch sa riadi podľa reakcie prvého poriadku, aspoň pokiaľ sú v roztoku vodíkové ióny v nadbytku. Pritom degradácia chlorofylu *a* prebiehala za podmienok pokusu asi 2–3 razy rýchlejšie ako degradácia chlorofylu *b*. Pomalý priebeh degradácie chlorofylu *b*, najmä pri nižších teplotách je príčinou odchýlky v poslednom stĺpci tabuľky 4 pre teploty 30 a  $40^\circ\text{C}$ .

Tab. 1. Rýchlostné konštanty pre chl. a

Teplota °C	k.10 <sup>3</sup> /min.
30	10,25 ± 0,16
40	17,50 ± 0,01
70	116,8 ± 0,01
80	170,6 ± 2,1
90	224,8 ± 1,15

Tab. 2. Rýchlostné konštanty pre chl. b

Teplota °C	k.10 <sup>3</sup> /min.
30	4,03 ± 0,06
40	5,04 ± 0,02
70	31,3 ± 0,06
80	46,5 ± 0,01
90	82,0 ± 0,8

Tab. 3. Výpočet aktivačnej energie E pre chlorofyl a

t °C	T °K	1000/T	ΔT	k <sub>2</sub> /k <sub>1</sub>	lg k <sub>2</sub> /k <sub>1</sub>	$\frac{\log}{\Delta T}$	E
30	303	3,300					
			0,105	1,71	0,2330	2,21	10,1
40	313	3,195					
			0,280	6,67	0,8241	2,94	13,4
70	343	2,915					
			0,082	1,46	0,1644	2,00	9,1
80	353	2,833					
			0,078	1,32	0,1206	1,54	7,0
90	363	2,755					Σ = 39,6
<u>E = 9,9 ± 0,9 · 10<sup>3</sup> cal/mol</u>							

T a b. 4. Výpočet aktivačnej energie E pre chlorofyl b

t °C	T °K	1000/T	$\Delta T$	$k_2/k_1$	$\lg \frac{k_2}{k_1}$	$\frac{\log}{\Delta T}$	E
30	303	3,30					
			0,105	1,25	0,0969	0,92	4,2
40	313	3,195					
			0,280	6,21	0,7931	2,83	12,9
70	343	2,915					
			0,082	1,49	0,1732	2,11	9,6
80	353	2,833					
			0,078	1,76	0,2455	3,15	14,4
90	363	2,755					$\Sigma = 41,1$
$E = 10,28 \pm 1,69 \cdot 10^3 \text{ cal/mól.}$							

Hodnota aktivačnej energie vychádza súhlasne s hodnotou uvádzanou Schanderlom a spol. (1). Nízka hodnota aktivačnej energie indikuje labilnosť chlorofylov voči irreverzibilnej strate horčička vplyvom vodíkových iónov. Je to citlivý indikátor technologických alebo iných zásahov, ktorými surovina prešla pri svojom spracovaní.

### Z á v e r

Sledovali sme rýchlosť straty horčička a premenu chlorofylov na príslušné feofytíny v modelových pokusoch, ako závisí na teplote a to v rozsahu 30–90 °C. Z pokusných dát sme vypočítali rýchlostné konštanty, pričom sme zistili, že premena chlorofylov na feofytíny za podmienok panujúcich v pokusoch prebieha podľa reakcie prvého poriadku. Chlorofyl a sa pritom trikrát rýchlejšie menil na príslušný feofytín ako chlorofyl b.

Vypočítané aktivačné energie pre oba chlorofyly sú prakticky rovnaké a majú hodnotu približne  $1.10^4 \text{ cal/mól}$ . Nízka hodnota aktivačnej energie indikuje labilitu väzby horčička v chlorofylovej molekule.

## Súhrn

V modelových pokusoch sme sledovali kinetiku degradácie chlorofylov na príslušné feofytíny v rozmedzí teplôt 30–90 °C, vypočítali sme rýchlostné konštanty a priemerné hodnoty aktivačnej energie pre oba chlorofyly.

Premena chlorofylov na feofytíny sa riadi podľa reakcie prvého poriadku. Aktivačné energie pre oba chlorofyly (*a*, *b*) sú prakticky rovnaké. Nízke hodnoty aktivačnej energie poukazujú na labilitu väzby horčika v molekule chlorofylu.

## Literatúra

1. Schanderl S. H., Chichester C. O., Marsh G. L.: *Org. Chemistry* 27, 3865, (1962)
2. Smith J. H. C., Benitez A.: *Peache — Tracey — Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, sv. 4, str. 144 (1955)
3. Dietrich W. C.: *Food Technology* 12, 428 (1958)
4. Mackinney G.: *J. Biol. Chem.* 140, 315 (1941)
5. Vernon L. P.: *Anal. Chem.* 32, 1144 (1960)
6. Šesták Z., Ullmann J.: *Rostlinná výroba* 10, 1197 (1964)
7. Horvátová-Haspelová A., Frič F.: *Biológia* 19, 820 (1964)
8. Brdička R.: *Základy fyzikální chemie*, Praha, str. 525 (1962)
9. Kellö V., Tkáč A.: *Fyzikálna chémia II.*, Bratislava, (1966) 125
10. Jungers J. C. a kol.: *Chemická kinetika*, Praha (1963)
11. Grodovský M., Hrbáľová M.: *Bulletin ÚVÚPP* 5, 23 (1966)
12. Grodovský M., Hrbáľová M.: *Bulletin ÚVÚPP* 6, 1 (1967)

## Теплотная деградация хлорофилла

### Выводы

В модельных опытах мы исследовали кинетику деградации хлорофилла на соответствующие феофитины в границах температуры от 30—90 °C. Мы вычислили константы скорости и средние величины активационной энергии для оба хлорофилла.

Перемена хлорофиллов на феофитины руководствуется по реакции первого порядка. Активационные энергии для хлорофиллов (*a*, *b*), практически те же самые. Низкие величины активационной энергии свидетельствуют о неустойчивости связи магния в молекуле хлорофилла.

## The Thermic Degradation of Chlorophyl

### Summary

In model experiments degradation kinetic of chlorophyl on respective pheophytins in the range of temperature from 30–90 °C was followed and, velocity constants and average valeus of activation energy for both chlorophyls were calculated.

The transformation of chlorophyls to pheophytins is according to the reaction of the first order. Activation energies for both chlorophyls (*a*, *b*) are practically equal. The low values of activation energy point to the lability of the bond of magnesium in a molecule of chlorophyl.