راهکارهای جلوگیری و کاهش قهوه ای شدن آنزیمی در قارچ خوراکی

The techniques of enzymatic browning inhibition and reduction in mushroom

مهرداد محمدی
m.mohammadi@nnftri.ac.ir

فریبا سید احمدیان
انستیتو علوم تغذیه و صنایع غذایی کشور

Archive of SID

چکیده

قهوه ای شدن قارچ دکمه ای **Agaricus Bisporus** یک پدیده زیان آور تجاری و رایج است که در آن فنل های ملانوژنیک بصورت آنزیمی به کینون ها تبدیل می شوند و سرانجام ملانین ها را بوجود می آورند. هدف از ارایه این مقاله مروری بررسی روشهای ممانعت از قهوه ای شدن آنزیمی در قارچهای خوراکی شامل: روشهای گرمادهی متداول در حمام آب داغ ۹۲ درجه سانتی گراد، مایکروویو تحت تابش ۲/٤٥ گیگا هرتز،و ترکیب مایکروویو-متداول و تاثیر آنها بر قهوه ای شدن ، فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، فعالیت آنتی اکسیدانی کل،افت وزن و چروکیدگی قارچ؛ فشار ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ مگاپاسکال و تاثیر آن بر قهوه ای شدن، فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، رنگ،افت وزن و بافت قارچ؛ پرتودهی گاما؛ ترکیبات تیولی؛ افزودن کلرید کلسیم به آب آبیاری؛ عوامل احیا کننده؛ مهارکننده ها و سدیم اریتوربات می باشد. مایکروویو بعنوان یک روش گرمادهی به منظور آنزیم بری صنعتی قارچها نتایج امید وارکننده ای را نشان می دهد اما محدود کننده ترین عامل برای این منظور، گرادیان های دمایی تولید شده درون نمونه در حین گرمادهی بوسیله مایکروویو است. تفاوت در مدت زمان غیر فعال شدن پلی فنل اکسیداز با استفاده از مایکروویو (۲۰ ثانیه) و عمل آوری گرمایی متداول (٦ دقیقه) برحسب اصول متفاوت گرمادهی این دو روش توضیح داده می شود .نتایج بهتر با استفاده کردن از ترکیب روش گرمادهی مایکروویو با فرآیند گرمادهی متداول بدست می آید.

فشار ایزواستاتیک بالا می تواند بعنوان یک روش غیر حرارتی برای نگهداری

www.SID.ir

فرآورده های غذایی بکار رود.فشار بالا میکرو ارگانیسمها و آنزیمها را غیر فعال می کند بدون اینکه بر مولکولهای کوچک مانند مواد مولد طعم وویتامین هااثر گذارد و علی رغم اینکه قارچهای مذکور درمقایسه با سبزیجات دیگر نسبتا" گرانند ، بهای فرآیند در فشار بالا در قیاس با قیمت کلی این محصول، پائین است. یافته ها حاکی از آن است که ترکیب تیولی 2-mercaptoethanol بعنوان ممانعت کننده از پلی مریزاسیون ارتوکینون،احتمالا" توسط باند شدن به آن و هم بعنوان احیا کننده در تبدیل ارتوکینون به ارتودی هیدروکسی فنل عمل میکند.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

قارچهای دکمه ای Agaricus bisporus حاوی آب ، نمک های معدنی ، ویتامین ها، ترکیبات فنلی و آنزیمهای مختلف از جمله پلی فنل اکسیداز ها هستند[Master & et al] که ماندگاری آنها در صورتیکه حداقل فرآوری را متحمل شده باشند به سبب قهوه ای شدن آنزیمی به چند روز محدود می شود. این واکنشهای قهوه ای شدن به آسیب های مکانیکی در حین نقل و انتقال و فرآوری ، خراش ، شستشو ، پیری و عفونتهای باکتریایی مربوط می شود و کیفیت غذاهای فرآوری شده را کاهش می دهد[Devece & et al]. واکنشهای قهوه ای شدن در سبزیجات و میوه ها برای صنعت غذا بویژه در بخش قارچ خوراکی یک مشکل جدی محسوب می گردد[Sanchez-Hernandez &et al ؛ Devece & et al]. هر چند در تغییر رنگ آنزیمی قارچها انواع آنزیمها نقش دارند ، بطور عمده توسط اکسیژناز های مس دار به نامهای پلی فنل اکسیدازها (لاکازها و. تیروزینازها) و پراکسیدازها انجام می شود. اهمیت لاکاز بعلت مقدار کم آن ، محدود است در حالیکه تیروزیناز مهمترین نقش را دارد[Jolivet & et al]. در قارچها پلی فنل اکسیداز یا همان تیروزیناز آنزیم اصلی مسئول قهوه ای شدن در نظر گرفته می شود[Sanchez-Hernandez & et al ؛ Devece & et al] که پروتئینی مس دار[Devece & et al]، دارای شکل گلوبولار و دارای جرم مولکولی۱۲۰/۰۰۰– ۱۳۰/۰۰۰ است[Jolivet & et al] که در گیاهان درون سلولی ولی در قارچها خارج سلولی است و دارای چهار زیر مجموعه و دارای چند شکل به نام ایزو آنزیم است که حساسیت های متفاوتی به دما ، PH و فشار دارند[Negishi & Ozawa] و دو واکنش متفاوت را که هر دو آنها اکسیژن مولکولی را به مصرف می رسانند کاتالیز می کند :

- **هیدروکسیلاسیون منوفنل ها به ارتو دی فنل ها (فعالیت منوفنلاز یا کرسولاز)**
- **اکسیداسیون ارتو دی فنل ها به ارتو کینون ها (فعالیت دی فنلاز یا کاتشولاز)[Devece & et al]**

از پلی مریزاسیون کینون های تشکیل شده رنگدانه های قهوه ای تشکیل می شوند.

نسبت فعالیت کاتشولاز به کرسولاز از ٤٠ به ١ تا ١ به ١ متفاوت است.

دو توضیح غیر اختصاصی برای این فرآیند پیچیده تصور شده است :

- **فعل وانفعال بین آنزیمها و سوبسترا ها بعد از تخریب غشاهای داخل سلولی**
- **فعال شدن پلی فنل اکسیداز نهفته .**

آنزیم پلی فنل اکسیداز یا در حالت نهفته است و یا در حالت فعال است که آنزیم نهفته می تواند توسط پروتئازها ، اسیدها و عوامل باز کننده تاخوردگی (مانند اسیدهای چرب ،دترژانها و دیگر دناتوره کنندها)[Jolivet & et al] پیری یا شوک ناشی از اسید یا قلیا ، گرمای ملایم ، فشار یا انجماد/ رفع انجماد فعال شود [Negishi & Ozawa]. فقط ۵٪ از کل پلی فنل اکسیداز موجود در سر و پایه قارچ در حالت فعال است و ۹۵٪ بقیه در حالت نهفته است[Jolivet & et al] . فعال شدن آنزیم توسط اکسیژن در دسترس ، PHو غلظت ممانعت کننده ها کنترل می شود و می تواند برگشت پذیر یا غیر قابل برگشت باشد[Negishi & Ozawa] .

Archive of SID

www.SID.ir

قهوه ای شدن آنزیمی قارچ توسط عواملی اداره می شود که عبارتند از :

- موجودی سوبسترا های فنلی
- مقادیر پلی فنل اکسیداز و خصوصا" تیروزیناز
- فعالیت اشکال نهفته آنزیم
- دسترسی سوبستراهای ملانوژنز به آنزیمهای فعال[Jolivet & et al] .

اصلاح ژنتیکی گیاه به منظور کاهش آنزیم پلی فنل اکسیداز به سبب مشکلات مربوط به رشد و دفاع گیاه همیشه روش امکان پذیری نیست[Tomas-Barberan & Espin]. بنابراین به منظور ممانعت از قهوه ای شدن آنزیمی باید آنزیم پلی فنل اکسیداز غیر فعال گردد که در این خصوص روشهای گرمادهی، فشار، ترکیبات تیولی، عوامل احیاکننده و ممانعت کننده های آنزیمی بررسی می شود. امید است با جلوگیری کردن از قهوه ای شدن در قارچ خوراکی که از عوامل مهم ضایعات این محصول با ارزش می باشد ماندگاری آن را طولانی و به افزایش مصرف سرانه آن در کشور کمک کرد.

روش مطالعه

به منظور آنزیم بری قارچهای A.b سه روش عمل آوری شامل گرمادهی متداول حمام آب داغ ، مایکروویو، و روش مایکروویو-گرمادهی متداول با هم مقایسه می شود. در روش متداول ، قارچ در حمام آب داغ ^{oC} ۹۲ و در روش مایکروویو تحت تابش ۲/٤٥ GHZ قرار می گیرد . در روش ترکیب مایکروویو-گرمادهی متداول از تابش ۲/٤٥ GHZ و بدنبال آن قرار دادن قارچ در آب داغ ^{oC} ۹۲ بمدت ۲۰ ثانیه استفاده می شود. تاثیر گرمادهی بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل بصورت اسپکتروفتومتری و با استفاده از روش پیشنهاد شده توسط Cano در طول موج ٤١٤ نانومتر سنجیده میشود. برای تعیین تاثیر گرمادهی بر چروکیدگی، قارچها قبل از انجام آزمایش وزن و بر چسب زده می شوند و قطر کلاهک آنها اندازه گیری می شود. بعد از فرآیند گرمایی آنها را در آب ^{oC} ۲۰ بمدت ۲ دقیقه غوطه ور می کنند تا سرد شوند. در آخر دوباره وزن و اندازه گیری می شوند[Devece & et al].

فرآیند متداول نگهداری قارچها شامل چندین مرحله است بنحوی که قارچها بعد از شستن، اتوکلاو می شوند تا هوای داخل قارچ تخلیه شود این عمل به بهتر شدن رنگ، کاهش چروکیدگی و افت آب در مراحل بعدی گرمایی منجر می شود و برای انجام آن از آب شیر استفاده می شود که در بعضی از آزمایشات به ۱۰۰ لیتر آب شیر ۵۰ گرم سولفیت سدیم و ۱۰۰ گرم اسید سیتریک اضافه می کنند تا به سبب کاهش PH غیر فعال شدن آنزیم پلی فنل اکسیداز بیشتر شود سپس قارچها تحت خلاء ۲۰-٤۰ میلی بار بمدت ۳ دقیقه قرار می گیرند و در بسته پلی اتیلینی تحت خلاء بسته بندی می شوند. قارچهای هواگیری شده به منظور غیر فعال شدن آنزیمها، آنزیم بری می شوند و بعد از پر کردن قارچها در ظروف شیشه ای، این ظروف به منظور غیر فعال شدن میکروارگانیسم ها استریل می شوند. در مورد تیمار تحت فشار بالا از یک فشار ۲۰۰-۱۰۰۰ مگا پاسکال بمدت ۵ دقیقه و در درجه حرارت اتاق استفاده می شود. برای تعیین فعالیت پلی فنل اکسیداز ، قارچها با بافر فسفات

Archive of SID

www.SID.ir

سدیم (PH=٦/٥) هموژنیزه و سانتریفوژ می شوند و فعالیت در محلول استخراج شده با روش کاتشول و توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری می شود .همچنین ظهور ترکیبات رنگی ناشی از اکسیداسیون آنزیمی کاتشول با استفاده از یک اسپکتروفتومتر در طول موج ٤٢٠ نانومتر اندازه گیری می شود.

رنگ قارچها را با یک رنگ سنج **Minolta** در ۱۰ دقیقه پس از گشودن بسته های پلاستیکی قارچها اندازه گیری می شود. وزن قارچها در قبل و بعد از انجام تیمار پس از ۵ دقیقه آبکش کردن آنها در یک آبکش اندازه گیری می شود و بافت قارچها با یک بافت سنج**Stable micro systems** اندازه گیری می شود[**Negishi & Ozawa**].

واکنش اکسیداسیون اپی کاتشین در حضور ترکیبات تیولی یعنی ۲-مرکاپتو اتانول(**2ME**)، سیستئین،و **Dithiothreitol** (**DTT**) با استفاده از آنزیم پلی فنل اکسیداز منجر به تشکیل ترکیبات ۲-هیدروکسی اتیل تیول اپی کاتشین(**HETEC**)می شود. ترکیبات **HETEC** از واکنش بین اپی کاتشین و ترکیبات تیولی که توسط آنزیم پلی فنل اکسیداز کاتالیز می گردد تشکیل می شوند و از مشتقات اپی کاتشین هستند که توسط باقیمانده ترکیبات تیولی جانشین می شوند. واکنش اکسیداسیون در دمای ^{oC} ۳۰انجام می شود و مخلوط واکنش دهنده استاندارد شامل ۰/۰۲ مول بافر سولفیت سدیم (**PH** =٦/٥) و ۳ میلی مول سوبسترا و ۵/۷ میلی مول **2ME** و ٤٠ میکرولیتر محلول آنزیمی است. واکنش توسط اضافه کردن محلول آنزیمی آغاز و با اضافه کردن ٤ میکرولیتر از اسیدکلریدریک دو نرمال متوقف می شود و محصولات واکنش در دمای ^{oC} ۲۳ توسط دستگاه **Hplc** مورد تجزیه و تحلیل قرار می گیرد[**Rodrigues-Lopes & et al**].

یافته ها و بحث

روشهای گرمادهی

روشهای متفاوت گرمادهی تصاویر گرمایی متضادی از قارچ به نمایش می گذارد. در روش متداول، گرمادهی سطحی و نفوذ حرارت از آب داغ در سرتاسر قارچ عامل اصلی در فرآیند گرمادهی متداول است اما توزیع درجه حرارت در قارچ به هنگام استفاده از مایکروویو به تنهایی در دمای ^{oC} ۸۵ بمدت ۱ دقیقه نشان می دهد که گرمادهی داخلی است و توزیع گرما به توزیع میدان الکتریکی درون نمونه بستگی دارد در این حالت بعلت تبخیر آب ، سطح قارچ سردتر از مرکز آن است این سرد شدن از غیر فعال شدن آنزیم در پوست (سطح) جلوگیری می کند پس می توان انتظار داشت که با ترکیب روش مایکروویو ^{oC} ۸۵ بمدت ۱ دقیقه بعلاوه روش متداول آب داغ ^{oC} ۹۲ بمدت ۲۰ ثانیه آنزیمها کاملا" از بین بروند .

زمانهای لازم برای غیر فعال کردن پلی فنل اکسیداز در بافتهای مختلف قارچ با استفاده از سه روش مذکور نشان می هد که برای کلاهک قارچ در روش متداول ٦ دقیقه، در روش مایکروویو ۲ دقیقه و در ترکیب دو روش ۲۰ ثانیه زمان لازم است تا پلی فنل اکسیداز غیر فعال شود . برای پوست کلاهک روش مایکروویو زمان بیشتری نزدیک به دو برابر نسبت به روش متداول نیاز دارد تا آنزیمها را غیر فعال کند اما روش ترکیب دراین مورد موثرترین روش است . درمورد تنه قارچ نحوه اثرگذاری روشها شبیه به کلاهک است در این مورد

Archive of SID

www.SID.ir

فعالیت باقیمانده برای روش متداول حدود ٦٪ و برای روش مایکروویو حدود ۳٪ است که غیر فعال شدن کمتر پلی فنل اکسیداز در تنه قارچ به حضور ایزو آنزیمهای مختلف با پایداری حرارتی متفاوت مربوط می شود . بعد از انجام گرمادهی ملایم فعالیت پلی فنل اکسیداز افزایش خواهد یافت که می تواند به دو علت آزاد شدن آنزیم نهفته و فعال شدن آنزیم باشد[Devece & et al]. فعالیت واکنشهای منوفنلاز و دی فنلاز بعد از عمل آوری گرمایی ملایم افزایش می یابد زیرا تغییرات ساختمانی آنزیم در نتیجه گرمادهی ملایم می تواند دست یابی منو فنل ها و دی فنل ها را به جایگاه فعال آنزیم تسهیل کند[Master & et al] .

تاثیر گرمادهی بر قهوه ای شدن: واکنشهای قهوه ای شدن در قارچها مستقیما" به مقدار پلی فنل اکسیداز وابسته است و غیر فعال کردن سریع پلی فنل اکسیداز قهوه ای شدن را کاهش می دهد[Master & et al]. در روش گرمادهی متداول ، قهوه ای شدن با غیر فعال شدن پلی فنل اکسیداز در این زمان مطابقت می کند بنحوی که پلی فنل اکسیداز قبل از اینکه کاملا" از بین برود فعال است و در این مدت ترکیبات اکسیداسیونی بی شماری از قبیل ارتو کینون تولید می شوند که ممکن است با ترکیبات فنلی واکنش داده و بعد از غیر فعال شدن پلی فنل اکسیداز، محصولات اکسیداسیونی در نمونه باقی مانده و ملانین تولید کنند[Devece & et al]. بالا بودن مقدار قهوه ای شدن اولیه در روش گرمادهی متداول نسبت به نمونه های کنترل به سبب فعال شدن پلی فنل اکسیداز است[Master & et al]. در بکار بردن مایکروویو به تنهایی مقادیر بالاتری از قهوه ای شدن مشاهده می شود که با زمان تابش ثابت می ماند و به دو علت است یکی اینکه زمان کوتاه عمل آوری ، نمی تواند پلی فنل اکسیداز را کاملا" غیر فعال کند و دیگر اینکه در زمانهای عمل آوری طولانی تر پلی فنل اکسیداز غیر فعال می شود اما گرمادهی مایکروویو ممکن است فشار داخل سلولی را افزایش دهد و به گسیختگی ، افت محتویات سلول و واکنشهای تخریبی منتهی شود. با استفاده از روش ترکیب ، قهوه ای شدن بشدت کاهش می یابد و نسبت به زمان عمل آوری ثابت می ماند. غیر فعال کردن سریع پلی فنل اکسیداز با استفاده از این روش از اکسیداسیون ترکیبات فنلی جلوگیری می کند و آنزیم نمی تواند محصولات اکسیداسیونی تولید کند[Devece & et al].

تاثیر گرمادهی بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل: در کلاهک قارچ پائین ترین مقدار آنتی اکسیدان (٤٦٪) مربوط به گرمادهی متداول حمام آب داغ ^{oC} ۹۲ بمدت ٦ دقیقه است و در پوست کلاهک پائین ترین مقدار آنتی اکسیدان (٦۰٪) به سبب گرمادهی مایکروویو به میزان^{oC} ۸۵ بمدت ۳ دقیقه می باشد و در ترکیب دو روش یعنی تابش مایکروویو بمدت ۱ دقیقه بعلاوه غوطه ور شدن در آب داغ ^{oC}۹۲ بمدت ۲۰ ثانیه مقدار آنتی اکسیدان کل برای همه بافت ها در بیشترین مقدار (۹۱٪-۹٦٪) می باشد[Devece & et al]. کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی در روش گرمادهی متداول دو علت دارد :

- مستقیم از طریق اکسیداسیون سوبسترا های احیاکننده
- غیر مستقیم از طریق اکسیداسیون اسید اسکوربیک توسط کینون ها و محصولات اکسیداسیونی تولید شده در اکسیداسیون آنزیمی

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه نمونه های کنترل و حرارت دیده به روش متداول نشان می دهد که بعلت فعالیت اولیه پلی فنل اکسیداز در نمونه های حرارت دیده محصولات اکسیداسیون در نمونه باقی می ماند و مقدار آنتی اکسیدان را کاهش می دهد پس ارتباط مستقیم بین فعالیت پلی فنل اکسیداز و کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی کل تائید می شود[Master & et al]. این یافته با مشاهدات حاصل از شکل قسمت های A وB ، C مطابقت دارد[et al Devece &] و نشان دهنده اهمیت پیدا کردن روشهای سریع برای غیر فعال کردن پلی فنل اکسیداز است تا محتوی تغذیه ای قارچها محفوظ بماند[Master & et al] .

تاثیر گرمادهی بر افت وزن و چروکیدگی : در حین گرمادهی ، قارچها آب از دست می دهند که به تغییرات در بافت منجر می شود و تاثیر زیادی در بازده فرآیند دارد ولی در هنگام هواگیری کردن چونکه آب جایگزین هوا می شود وزن به مقدار زیادی افزایش می یابد که این آب اضافی در حین آنزیم بری قارچها به روش متداول از دست می رود. افت وزن یا چروکیدگی بعلت تبخیر آب مشکل عمده در عملیات کنسرو کردن قارچها است . افت وزن محصول کنسرو شده در حین عملیات آنزیم بری و فرآیند گرمایی معمولا" ۳۰٪-٤۰٪ رخ می دهد. افت وزن و چروکیدگی پس از آن در آنزیم بری قارچها عمدتا" به اندازه ، درجه حرات گرمادهی و زمان گرمادهی بستگی دارد بنابر این کاهش زمان عمل آوری در روش مایکروویو باید به بهبود در چروکیدگی و افت وزن قارچ منتهی شود و در ترکیب دو روش افت وزن بهینه می شود و هر چروکیدگی بعلت عمل گرمادهی متداول است[Devece & et al]. در فرآیند کنسرو کردن قارچها، آنزیم بری بر وضعیت نهایی قارچها اثر مهمی دارد بطوریکه افـــت وزن را کـــاهش و رنـــگ را بهبود می بخشد[Vivar- & etal Quintana].

تاثیر گرمادهی بر کیفیت : متابولیت های ثانویه فنلی نقش مهمی در کیفیت غذاهای گیاهی بازی می کنند مثلا" آنها بر روی ویژگیهای کیفی از قبیل خواص ظاهری و طعم اثر می گذارند و محتوی آنها در غذاها توسط عوامل زیادی که بر تخریب، بیوسنتز و پایداری فنل ها اثر دارند، تحت تاثیر قرار می گیرند[Espin & Tomas-Barberan]. در خلال آنزیم بری، غلظت مانیتول بعنوان نشانگر متابولیت های ثانویه محلول در آب، در مایع آنزیم بری افزایش می یابد که تابعی از زمان و دمای آنزیم بری است[Biekman & et al]. برخی از تیمارهای پس از برداشت از قبیل انبار سرد و اتمسفر کنترل شده یا اصلاح شده و همچنین روشهای نوین فرآوری از قبیل میکروویو ، پالس های میدان الکتریک بالا، فشار هیدرواستاتیک بالا و پرتو دهی (گاما،W) میتواند کیـفـیت مربوط به ترکیـبات فـنلی را بهـــبود بخشد [Tomas-Barberan & Espin].

فشار ایزو استاتیک بالا:

فشار ایزو استاتیک بالا بعنوان یک تکنیک غیر گرمایی برای نگهداری مواد غذایی بکار می رود. فشار بالا میکرو ارگانیسمها و آنزیمها را غیر فعال می کند بدون اینکه بر مولکولهای کوچک مانند مواد مولد طعم و ویتامین ها اثر مهی بگذارد. برای ارزیابی اثرات فشار باید PH و ترکیب شیمیایی غذا در نظر گرفته شود بنابراین نتایج بدست آمده در محلولهای بافر همیشه قابل استفاده در سیستمهای غذایی نیستند. شرایط فشار که آنزیمها یا میکرو ارگانیسمها را غیر فعال می کند ممکن است با شرایط لازم برای حفظ رنگ و بافت مغایرت داشته باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

علی رغم اینکه قارچهای A.b در مقایسه با سبزیجات دیگر محصولی نسبتا" گرانند بهای فرآیند در فشار بالا در مقایسه با قیمت کلی این محصول نسبتا" پائین است[Negishi & Ozawa].

تاثیر فشار بر قهوه ای شدن: اگر قارچها قبل از اعمال فشار هوا گیری شوند قهوه ای شدن در مقایسه با قارچهای هواگیری نشده از شدت کمتری برخوردار است چون در حین فرآیند هواگیری، هوای موجود در حفرات سلولی با آب جایگزین می شود در نتیجه غلظت اکسیژن لازم برای انجام واکنش قهوه ای شدن کاهش می یابد. در صنعت قارچها را با آب حاوی اسید سیتریک و سولفیت سدیم هواگیری می کنند بنابراینPH پائین ، سرعت غیر فعال شدن پلی فنل اکسیداز را در فشار بالا شدت می بخشد و در نتیجه قهوه ای شدن کمتر رخ می دهد[Negishi & Ozawa].

تاثیر فشار بر فعالیت پلی فنل اکسیداز: فشار تاثیر زیادی بر فعالیت پلی فنل اکسیداز دارد بطوریکه در فشار ۶۰۰ مگا پاسکال افزایشی در فعالیت دیده می شود که احتمالا" بعلت تغییر شکل آنزیم از حالت نهفته به حالت فعال است. فشار بالاتر به سبب دناتوره کردن آنزیم پلی فنل اکسیداز آن را بطور غیر قابل برگشت غیر فعال می کند اما حتی در فشار ۹۵۰ مگا پاسکال هنوز فعالیت باقیمانده ای وجود دارد که در این خصوص بین قارچهای هواگیری شده و هواگیری نشده تفاوت عمده ای وجود ندارد. برای غیر فعال کردن کامل آنزیم پلی فنل اکسیداز اعمال فشار بالاتر در زمانهای طولانی تر و یا درجه حرارت ۵۰-۶۰ ضروری است[Negishi & Ozawa].

تاثیر فشار بر رنگ: سفیدی قارچهای تازه زمانیکه تحت فشار قرار می گیرند در مقایسه با قارچهای آنزیم بری شده ، کاهش می یابد و رنگ قهوه ای می شود. اعمال فشار ۶۰۰ یا ۸۰۰ مگا پاسکال بر قارچهای هواگیری شده ، رنگ قهوه ای تیره را بوجود می آورد ولی در فشار بالاتر یعنی ۹۵۰ مگاپاسکال رنگی ملایم تر اما هنوز قهوه ای شدید بوجود می آید که به دو علت است یکی اینکه فشار ۶۰۰ مگا پاسکال باعث افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز می شود ولی فشار بالاتر این فعالیت را کاهش و نفوذ پذیری غشاء را افزایش می دهد که بهرحال به قهوه ای کمرنگ منتهی نمی شود و دیگر اینکه فشار ایزواستاتیک بالا به کریستاله شدن فسفولیپید ها در غشاء و بدنبال آن تخریب غشاء می انجامد که پیامد آن افزایش نفوذپذیری و ورود پلی فنل اکسیداز های خارج سلولی به داخل سلول و واکنش آنها با فنل ها است که به افزایش قهوه ای شدن در حین اعمال فشار منجر می شود در حالیکه آنزیم بری متداول تغییرات عمده ای را در رنگ در مقایسه با قارچهای تازه بوجود نمی آورد[Negishi & Ozawa].

تاثیر فشار بر افت وزن: با مقایسه داده های حاصل از وزن بعد از هواگیری و فشار وارده بر قارچها می توان نتیجه گرفت که فشار به افت وزن قارچها منجر می شود اما هواگیری کردن اثر مثبتی بر نگهداری آب بعد از اعمال فشار دارد. بعد از انجام هواگیری روش آنزیم بری یاروش تحت روش فشاری که برای غیرفعال کردن پلی فنل اکسیداز کافی باشد، افت آب یکسانی را بوجود می آورد بنابراین وزن قارچهای هواگیری شده بعد از اعمال فشار بیشتر از قارچهای هواگیری نشده است[Negishi & Ozawa].

Archive of SID

www.SID.ir

تاثیر فشار بر بافت: هواگیری کردن از سفتی بافت قارچها در مقایسه با قارچهای تازه کمی می کاهد اما آنزیم بری به وضوح سفتی قارچها را کاهش می دهد بنابراین هیچ تفاوت معنی داری بین بافت قارچهای هواگیری شده و هواگیری نشده پس از انجام آنزیم بری وجود ندارد ولی قارچهایی که فشار را تحمل می کنند نسبت به قارچهای آنزیم بری شده به روش متداول، سفتی بیشتری دارند بنابراین فشار به افت بافت کمتری در مقایسه با آنزیم بری منجر می شود. Stute و همکارانش بهبود سختی سبزیجاتی را که توسط فشار عمل آوری می شوند بعلت دمتیلاسیون آنزیمی پکتین می دانند[Negishi & Ozawa].

پرتو دهی گاما:

برای تعیین مقدار مناسب از اشعه گاما و دمای نگهداری و همچنین مدت نگهداری قارچهای دکمه ای A.bآزمایشهایی صورت گرفت. قارچها در مقادیر KGy ۵/۵،۱،۰/۵،۲،۱/۲ تحت تشعشع قرار گرفتند و در دماهای مختلف ^{oC}۱۰،٤و۲۰ و بمدت حدود ۱۵ روز نگهداری شده و سپس از نظر مورفولویکی و خصوصیات آنزیمی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که مقدارKGy ۲ تابش و دمای نگهداری ^{oC}۱۰ بمدت ۱۰ روز مانع از باز شدن چتر کلاهک و تخریب خصوصیات بافتی و آنزیمی می شود[Gautam & et al] و نتایج بکاربردن KGy ۲ پرتو دهی گاما در دو سرعت متفاوت KGy/h ٤/۵ و KGy/h ۳۲ به منظور افزایش ماندگاری قارچ خوراکی A.b نشان داد که مورد KGy/h ٤/۵ بیشترین ترکیبات فنلی را نسبت به مورد h / KGy ۳۲ دارد و کمترین مقدار ترکیبات فنلی در نمونه کنترل است. فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در مورد h/ ۳۲KGy پائین تر است گرچه میزان ترکیبات فنلی آن بالاتر است. مشاهده دیوار سلولی قارچ توسط میکروسکپ الکترونی نشان دهنده استحکام بهتری در مورد KGy/h ٤/۵ است. تصور می شود که قهوه ای شدن مشاهده شده در مورد KGy/h ۳۲ به سبب رها سازی فنلهای واکوئلی و به سبب وارد شدن اکسیژن مولکولی به درون سیتوپلاسم سلول است. اثر سینرژیستیک باقیمانده فعالیت پلی فنل اکسیداز و اکسیژن مولکولی در تماس با فنلها افزایش میزان اکسیداسیون را میسر می سازد و مسبب قهوه ای شدن بیشتر در مورد h / ۳۲KGy است[Beaulieu & et al].

ترکیبات تیولی:

با انجام مقایسه ای مشخص می شود که DTT نسبت به 2ME و 2ME نسبت به سیستئین احیا کننده قویتری است بطوریکه تشکیل شدن ارتوکینون توسط نیروی احیا کننده سیستئین کاملا" مهار نمی شود. بر پایه این یافته ها مکانیسم فرض شده برای مهار قهوه ای شدن آنزیمی توسط ترکیبات تیولی بدین گونه است که در غیاب 2ME ارتو دی فنل توسط پلی فنل اکسیداز اکسید می شود و رادیکالهای کینون توسط واکنش Oxidative coupling پلیمریزه شده و به پدیده قهوه ای شدن می انجامد اما از آنجایی که 2ME یک احیاء کننده است بخشی از ارتوکینون را به ساختمان اصلی ینی ارتو دی هیدروکسی فنل احیاء می کند و از سوی دیگر رادیکالهای متعلق به 2ME یا دیگر ترکیبات تیولی فورا" با رادیکال ارتو کینون واکنش داده ترکیباتی مانند HETEC و سیستنیل دوپا را تشکیل می دهند بنابراین قهوه ای شدن ناشی ازپلی فنل اکسیداز مهار خواهد شد.

Archive of SID

www.SID.ir

این مکانیسم به تشخیص نقش دیگری برای ترکیبات تیولی منجر شد بطوریکه در حضور مقادیر اضافه تر ترکیبات تیولی دارای عوامل احیاکننده، از مهار آنزیمهای سولفیدریل (گروههای SH در جایگاه فعال آنزیم به کینون های تولید شده توسط پراکسیداز متصل می شوند)جلوگیری می شود [Rodrigues-Lopes & et al]. اسید اگزالیک فعالیت ضد قهوه ای شدن قوی دارد و الگوی مهار کنندگی آن رقابتی است و تاثیر آن همانند کوجیک اسید است و از گلوتاتیون و سیستئین موثرتر است[Son & et al].

افزودن کلرید کلسیم به آب آبیاری قارچ:

مشاهده عمر مفید و کیفیت بهتر قارچهای شسته شده با آب سخت در مقایسه با قارچهای شسته شده با آب مقطر موجب افزودن کلرید کلسیم به آب آبیاری قارچ شد بطوریکه قارچهای A.b کنترل با آب شیر و تیمارها با ۰/۱٪،۰/۵٪ کلرید کلسیم افزوده شده به آب آبیاری، کشت داده شدند. قارچهای برداشت شده در دمای 13^{oC} نگهداری و بعد از ۰،۲،٤،۷یا۸ روز ارزیابی شدند تا اثرات تیمار بر کیفیت و ماندگاری تعیین شود. در غلظت ۰/۱٪ کلرید کلسیم هیچ اثر معنی داری بر بازده تولید، کیفیت یا ماندگاری نداشت اما در غلظت بالاتر یعنی ۰/۵٪ کلرید کلسیم بازده پخت را کاهش و ماندگاری را افزایش داد. در غلظت ۰/۵٪ بازده تولید تا ١٦٪ کاهش یافت اما محتوی جامدات قارچهای برداشت شده تا ١٦٪ افزایش و ماندگاری عمدتا" به سبب کاهش نرخ رشد باکتریایی و کاهش توام قهوه ای شدن سطحی در حدود ٦٤٪ افزایش یافت[Barden & et al].

احیاکننده ها:

می توان به منظور مهار واکنش قهوه ای شدن آنزیمی، ارتو کینون تولید شده را از محیط واکنش برداشت و این کار را با استفاده از عوامل احیا کننده مانند اسکوربات و یا NADH که چرخه مورد نظر را به سمت تشکیل ارتو دی فنل بر می گرداند انجام داد. ضمنا "می توان ارتو کینون را با ترکیباتی نظیر پرولین یا ۲- نیتروه۵-تیو بنزوئیک اسید به دام انداخت[Jolivet & et al].

مهار کننده ها:

آپو آنزیم یا همان آنزیم بدون مس، غیر فعال است و بعد از افزودن یون مس می تواند فعال شود[Jolivet & et al] حتی می توان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز غیر فعال شده توسط اسید اگزالیک را با افزودن یون مس بازیافت [Son & et al]. مس با دارا بودن ۰/۲-۰/۳ درصد وزن آنزیم پلی فنل اکسیداز قارچ ، تشکیل متالوآنزیم می دهد و خیلی محکم به پروتئین متصل می شود و صرفا" توسط عوامل قوی ضد کمپلکس مانند ۱۰ میلی مول سیانید هیدروژن برداشته می شود. مهار کننده های پلی فنل اکسیداز عواملی هستند که یا به یون مس متصل می شوند و یا بر جایگاه متصل شدن فنل عمل می کنند. ترکیبات کمپلکس کننده یون مس شامل منوکسید کربن، یونهای آزید(Azid) و سیانید همگی نسبت بهEDTA، مشتقات تیو اوره مثل فنیل تیو اوره ، دی اتیل دی تیو کاربامات ، مرکاپتو نیزوتیازول، کوجیک اسید، و تروپولون(Tropolone) مهارکننده قوی تری هستند. تروپولون مهارکننده قوی و اختصاصی پلی فنل اکسیداز است. سوبستراهای بدلی شامل آروماتیک اسیدها، فنل های مختلف و مشتقات آنها و تعدادی ترکیبات غیر آروماتیک مهارکننده های رقابتی هستند. پلی

Archive of SID

www.SID.ir

وینیل پیرولیدون (Polyvinylpyrolidone) و فنیل هیدرازین جاذب فنل هستند و بعنوان مهارکننده واکنش کاتشولاز(ارتو دی فنلاز)عمل می کند[Jolivet & et al].

Archive of SID

www.SID.ir

سدیم اریتوربات:

استفاده از پراکسید هیدرون (H202)به عنوان ماده ضد میکروبی در یک سیستم شستشو ممکن است منجر به تحریک فرآیند قهوه ای شدن شود. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت H202 از ۳٪ به ۵٪ قهوه ای شدن بیشتر صورت می گیرد اما این مشکل با افزودن یک ماده ممانعت کننده از قهوه ای شدن به نام سدیم اریتوربات مرتفع می شود.این محلول شامل ٤٪ سدیم اریتوربات و ۰/۱٪ کلرید سدیم بصورت اسپری بکار برده می شود. بکار بردن سدیم اریتوربات/کلرید سدیم از آنجایی که کلرید سدیم ارزانتر از سیستئین + HCL یا دی سدیمEDTA است، ارزانتر است. محلول سدیم اریتوربات یک آنتی اکسیدان است و از کاهش ترکیبات فنلی در اثر اکسیداسیون توسط H202 و پلی فنل اکسیداز جلوگیری می کند[Sapers & et al 2001] قارچهای شسته شده به این روش در مقدار آمینواسیدهای آزاد کاهش و در مقدار سدیم افزایش نشان می دهند ولی هیچ نشانه ای را که ناشی از تغییر در مزه، بافت یا رنگ نشان ندادند[Sapers & et al 1999].همچنین در طی انبارداری ظاهر تازه خود را ۷ الی ۱۰ روز در دمای ^{o}C ٤-۳ حفظ کردند در حالیکه قارچهای شسته شده صرفا" توسط در مدت ٤-٦ روز بعد از نگهداری انواع فساد را نشان دادند[Sapers & et al 2001].

نتیجه گیری

تکنیک گرمادهی مایکروویو نتایج رضایت بخشی را به منظور آنزیم بری صنعتی در موارد کیفیت محصول و کوتاه کردن زمان فرآیند نشان می دهد. نتایج بهتر در موارد توزیع درجه حرارت ، غیر فعال کردن آنزیم پلی فنل اکسیداز، کاهش چروکیدگی و افت وزن، مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی کل و قهوه ای شدن نمونه ها با استفاده از ترکیب تکنیک گرمادهی مایکروویو با فرآیند گرمادهی متداول بدست می آید. اما افت وزن و تخریب بافت ، هیچکدام بطور قابل ملاحظه ای کاهش نمی یابند و این بدون شک دلیل اصلی است که آنزیم بری صنعتی توسط مایکروویو جز برای کاربردهای خاص موفقیت آمیز نیست[Devece & et al].

برای حفظ کیفیت قارچها ضروری است تا زمان لازم برای در معرض قرار گرفتن نمونه ها به تابش مایکروویو کوتاه باشد[Master & et al].

کاهش در زمان فرآوری، افت وزن و چروکیدگی قارچ را کاهش می دهد. کاهش مقدار آنتی اکسیدان و افزایش قهوه ای شدن در نمونه های عمل آوری شده با روش ترکیب مایکروویو- متداول نسبت به نمونه های کنترل در حداقل است[Devece & et al].

فشار تا ۹۵۰ مگاپاسکال برای غیر فعال کردن آنزیم پلی فنل اکسیداز ضروری است و بافتهای قارچهای تحت فشار نسبت به قارچهای آنزیم بری شده به روش متداول تا حدی بهتر است اما بازده و غیر فعال شدن آنزیم پلی فنل اکسیداز در هر دو روش یکسان است.

فشار ایزواستاتیک بالا می تواند بعنوان یک روش غیر حرارتی برای نگهداری فرآورده های غذایی بکار رود. فشار بالا میکرو ارگانیسمها و آنزیمها را غیر فعال می کند بدون اینکه بر مولکولهای کوچک مانند

Archive of SID

www.SID.ir

مواد مولد طعم و ویتامین ها اثر گذارد وعلی رغم اینکه قارچهای مذکور درمقایسه با سبزیجات دیگر نسبتا گرانند ، بهای فرآیند در فشار بالا در قیاس با قیمت کلی این محصول ،پایین است[Negishi & Ozawa].

۲- مرکاپتواتانول(2ME) هم بعنوان ممانعت کننده از پلی مریزاسیون ارتوکینون عمل می کند و هم بعنوان یک عامل احیاکننده در تبدیل ارتوکینون به ارتودی هیدروکسی فنل نقش دارد.

سیستئین از قهوه ای شدن آنزیمی که توسط پلی فنل اکسیداز کاتالیز می شود، ممانعت می کند اما از اکسیداسیون ترکیبات فنلی توسط پلی فنل اکسیداز ممانعت نمی کند بلکه از پلی مریزاسیون ترکیبات فنلی که به قهو ه ای شدن می انجامد جلوگیری می کند.

سیستئین با کینون بصورت غیر آنزیمی واکنش می دهد تا کانژوگیت های بیرنگ تشکیل دهد و در فرآوری غذا موثرتر از نمک های هالید یا اسیدهای کربوکسیلیک آروماتیک واکنش قهوه ای شدن را مهار می کند و از سولفیت ها کم خطر تر است [Rodrigues-Lopes & et al].

تشکر و قدردانی

این مقاله با راهنمایی های ارزنده سرکار خانم دکتر پروین زندی استاد گروه آموزشی علوم و صنایع غذایی تهیه گردیده است. بدینوسیله از ایشان صمیمانه سپاسگذارم.

فهرست منابع

1-Barden,C.L.et al. 1990. The effect of calcium chloride added to the irrigation water on quality shelf life of harvested mushrooms. Journal of Food Protection. 53(9), 759-762.

2-Beaulieu,M.; Aprano,G.D.; Lacroix,M . 2002. Effect of dose rate of gamma irradiation on biochemical quality and browning of mushrooms Agaricus bisporus. Radiation Physics and Chemistry . 63(3-6), 311-315.

3-Biekman,E.S.A.; Kroese-Hoedeman,H.I.; Schijvens,E.P.H.M . 1996. Loss of solutes during blanching of mushrooms (Agaricus bisporus) as a result of shrinkage and extraction. J.Food Eng . 28(2), 139-152.

4-Devece ,C.;Rodrigues-Lopes,J.N.;Fenol,L.G.et al. 1999. Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave , conventional , and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity.J.Agric . Food Chem. 47,4506-451.

5-Gautam,S.; Sharma, A.; Thomas ,P. 1998. Gamma irradiation effect on shelf-life, texture, polyphenol oxidase and microflora of mushroom (Agaricus bisprorus). International Journal of Food Science and Nutrition . 49, 5-10.

6-Jolivet,S.; Arpin ,N.; Wichers ,H.J.; Pelon,G. 1998. Agaricus bisprorus browning: a review. Mycological Research . 102, 1459-1483.

7-Master,A.M.;Knott,E.R.;Teunissen,P.G.M.;Bartels,P.V . 2000. Effects of high isostatic pressure on mushrooms. J. Food Eng. 45,11-16.

8-Negishi,O.;Ozawa,T. 2000. Inhibition of enzymatic browning and protection of sulfhydryl enzymes by thiol compounds. Phytochemistry. 54,481-487.

Archive of SID

www.SID.ir

9-Rodrigues-Lopes,J.N.;Fenoll,L.G.;Tudela,J.et al. 1999. Thermal inactivation of mushroom polyphenoloxidase employing 2450 MHz microwave radiation .J. Agric .Food Chem. 47,3028-3035.

10-Sanchez-Hernandez,D.;Devece,C.;Catala,J.M. ;Rod riguez-Lopez ,J.N. et al. 1999. Enzyme inactivation analyses for industrial blanching applications employing 2450 MHZ monomode microwave cavities .Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy. 34(4),239-252.

11-Sapers,G.M.;Miller,R.L.;Choi,S.W.;Cooke,P.H. 1999. Structure and composition of mushrooms as affected by hydrogen peroxide wash .J .Food Sci. 64(5),889-892.

12-Sapers,G.M.;Miller,R.L.;pilizota,V.; Kampe , F. 2001. Shelf-life extention of fresh mushrooms (Agaricus bisprorus) by application of hydrogen peroxide and browning inhibitors. J .Food Sci. 66(2),362-366.

13-Son,S.M.;Moon,K.D.;Lee,C.Y. 2000. Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning .J .Agric .Food CHEM. 48(6),2071-2074.

14-Tomas-Barberan,F.;Espin,J.C. 2002 . Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. Journal of The Science of Food and Agriculture. 81 (9),853-876.

15-Vivar-Quintana ,A.M.; Gonzalez-San Jose ,M.L.; Collado-Fernandez ,M . 1999. Influence of canning process on colour, weight and grade of mushrooms . Food Chemistry . 66(1), 87-92.

Archive of SID

www.SID.ir