Archive Of SID

مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هفتم، ضمیمه شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۷۱-۶۳

قارچ خوراکی: قهوه‌ای شدن آنزیمی و روش‌های مهار آن

مهرداد محمدی[۱]، مهشید جهادی[۲]، کیانوش خسروی دارانی[۳]

۱- کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)، اصفهان، ایران
۳- نویسنده مسئول: دانشیار گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. پست الکترونیکی: kiankh@yahoo.com

چکیده

قهوه‌ای شدن قارچ دکمه‌ای *Agaricus Bisporus* یک پدیده رایج است که در آن، فنل‌های ملانوژنیک به صورت آنزیمی به کینون‌ها تبدیل می شوند و سرانجام رنگدانه ملانین را به وجود می‌آورند. در این مقاله مروری، روش‌های ممانعت از قهوه‌ای شدن آنزیمی در قارچهای خوراکی شامل: روش‌های گرمادهی، فشار ایزو استاتیک بالا، پرتودهی گاما، ترکیبات تیولی، افزودن کلرید کلسیم به آب آبیاری، ترکیبات احیا کننده و مهارکننده و تأثیر آنها بر قهوه‌ای شدن آنزیمی قارچ دکمه‌ای بررسی می‌گردد.

واژگان کلیدی: قارچ دکمه‌ای، قهوه‌ای شدن آنزیمی، پلی‌فنل اکسیداز، میکروویو، مهارکننده‌ها

مقدمه

قارچهای دکمه‌ای *Agaricus bisporus* (A.b) حاوی آب، نمک‌های معدنی، ویتامین ها، ترکیبات فنلی و آنزیم‌های مختلف از جمله پلی‌فنل اکسیدازها هستند (۱). ماندگاری قارچها در صورتی که حداقل فراوری را متحمل شده باشند به سبب قهوه‌ای شدن آنزیمی به چند روز محدود می‌شود. این واکنش‌های قهوه‌ای شدن به آسیب‌های مکانیکی در حین نقل و انتقال و فراوری، خراش، شستشو، پیری و عفونت‌های باکتریایی مربوط می‌شود و کیفیت غذاهای فراوری شده را کاهش می‌دهد (۲). واکنش‌های قهوه‌ای شدن در سبزیجات و میوه‌ها برای صنعت غذا به ویژه در بخش قارچ خوراکی یک مشکل جدی محسوب می‌گردد (۳، ۲). هر چند در تغییر رنگ آنزیمی قارچها انواع آنزیم‌ها نقش دارند، به طور عمده توسط اکسیژنازهای مس دار به نامهای پلی‌فنل اکسیدازها (لاکازها و. تیروزینازها) و پراکسیدازها انجام می‌شود. اهمیت لاکاز به علت مقدار کم آن، محدود است در حالی که تیروزیناز مهمترین نقش را دارد (۴).

در قارچها پلی‌فنل اکسیداز یا همان تیروزیناز آنزیم اصلی مسئول قهوه‌ای شدن در نظر گرفته می‌شود (۳، ۲). این آنزیم پروتئینی مس‌دار دارای شکل گلوبولار و دارای جرم مولکولی ۱۲۰/۰۰۰-۱۳۰/۰۰۰ است (۴، ۲) و دارای چهار زیر مجموعه و چند شکل به نام ایزو آنزیم است که حساسیت‌های متفاوتی به دما، pH و فشار دارند (۵) و دو واکنش متفاوت مصرف‌کننده اکسیژن مولکولی را کاتالیز می‌کند این دو روش عبارتند از:

- هیدروکسیلاسیون منوفنل‌ها به ارتو دی فنل‌ها (فعالیت منوفنلاز یا کرسولاز).
- اکسیداسیون ارتو دی فنل‌ها به ارتو کینون‌ها (فعالیت دی فنلاز یا کاتشولاز) (۲).

از پلی مریزاسیون کینون‌های تشکیل شده رنگدانه‌های قهوه‌ای تشکیل می‌شوند. نسبت فعالیت کاتشولاز به کرسولاز از ۴۰ به ۱ تا ۱ به ۱ متفاوت است. دو توضیح غیراختصاصی برای این فرایند پیچیده تصور شده است:

- فعل و انفعال بین آنزیم‌ها و سوبستراها بعد از تخریب غشاهای داخل سلولی
- فعال شدن پلی‌فنل اکسیداز نهفته.

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز دارای دو حالت نهفته و فعال است که آنزیم نهفته می‌تواند توسط پروتئازها، اسیدها و عوامل باز کننده تاخوردگی (مانند اسیدهای چرب، دترژان‌ها و دیگر دناتوره کنندها) (۴) پیری یا شوک ناشی از اسید یا قلیا، گرمای ملایم، فشار یا انجماد/ رفع انجماد فعال شود (۵). فقط ۵٪ از کل پلی‌فنل اکسیداز موجود در سر و پایه قارچ در حالت فعال است و ۹۵٪ بقیه در حالت نهفته است (۴). فعال شدن آنزیم توسط اکسیژن در دسترس، pH و

www.SID.ir

Archive Of SID

غلظت ممانعت کننده‌ها کنترل می‌شود و می‌تواند برگشت پذیر یا غیرقابل برگشت باشد (۵).

قهوه‌ای شدن آنزیمی قارچ توسط عواملی کنترل می‌شوند که این عوامل عبارتند از:

- موجودی سوبستراهای فنلی
- مقادیر پلی‌فنل اکسیداز و خصوصاً تیروزیناز
- فعالیت اشکال نهفته آنزیم
- دسترسی سوبستراهای ملانوژنز به آنزیم‌های فعال (۴).

اصلاح ژنتیکی گیاه به منظور کاهش آنزیم پلی‌فنل اکسیداز به دلیل مشکلات مربوط به رشد و دفاع گیاه همیشه روش امکان‌پذیری نیست (۶). بنابراین به منظور ممانعت از قهوه‌ای شدن آنزیمی باید آنزیم پلی‌فنل اکسیداز غیرفعال شود که در این مقاله روش‌های گرمادهی، فشار، ترکیبات تیولی، عوامل احیاکننده و ممانعت کننده‌های آنزیمی بررسی می‌شود. جلوگیری کردن از قهوه‌ای شدن در قارچ خوراکی (که از عوامل مهم ضایعات این محصول با ارزش می‌باشد) ماندگاری آن را طولانی و به افزایش مصرف سرانه آن در کشور کمک می‌کند.

روش‌های آنزیم‌بری

به منظور آنزیم‌بری قارچ‌های A.b سه روش عمل آوری شامل گرمادهی متداول با استفاده از حمام آب داغ، مایکروویو و روش مایکروویو ـ گرمادهی متداول با هم مقایسه می‌شود. در روش متداول، قارچ در حمام آب داغ ۹۲°C و در روش مایکروویو تحت تابش ۲/۴۵ گیگا هرتز قرار می‌گیرد. در روش ترکیب مایکروویو ـ گرمادهی متداول از تابش ۲/۴۵ گیگا هرتز و بدنبال آن قرار دادن قارچ در آب داغ ۹۲°C به مدت ۲۰ ثانیه استفاده می‌شود. تأثیر گرمادهی بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل به صورت اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۱۴ نانومتر سنجیده می‌شود. برای تعیین تأثیر گرمادهی بر چروکیدگی، قارچها قبل از انجام آزمایش وزن و بر چسب زده می‌شوند و قطر کلاهک آنها اندازه گیری می‌شود. بعد از فرایند گرمایی آنها را در آب ۲۰°C به مدت ۲ دقیقه غوطه‌ور می‌کنند تا سرد شوند. در آخر دوباره وزن و اندازه گیری می‌شوند (۲).

فرایند متداول نگهداری قارچها شامل چندین مرحله است به نحوی که قارچها بعد از شستن، اتوکلاو می‌شوند تا هوای داخل قارچ تخلیه شود. این عمل به بهتر شدن رنگ، کاهش چروکیدگی و افت آب در مراحل بعدی گرمایی منجر می‌شود و برای انجام آن از آب شیر استفاده می‌شود که در بعضی از آزمایشات به ۱۰۰ لیتر آب شیر ۵۰ گرم سولفیت سدیم و ۱۰۰ گرم اسید سیتریک اضافه می‌کنند تا به سبب کاهش pH، غیرفعال شدن آنزیم پلی‌فنل اکسیداز بیشتر شود. سپس قارچها تحت خلأ ۴۰-۲۰ میلی بار به مدت ۳ دقیقه قرار می‌گیرند و در بسته پلی اتیلینی تحت خلأ بسته بندی می‌شوند. قارچهای هواگیری شده به منظور غیرفعال شدن آنزیم‌ها، آنزیم‌بری می‌شوند و بعد از پر کردن قارچها در ظروف شیشه ای، این ظروف به منظور غیرفعال شدن میکروارگانیسم‌ها استریل می‌شوند. در مورد تیمار تحت فشار بالا از یک فشار ۱۰۰۰-۲۰۰ مگا پاسکال به مدت ۵ دقیقه و در درجه حرارت اتاق استفاده می‌شود. برای تعیین فعالیت پلی‌فنل اکسیداز، قارچها با بافر فسفات سدیم (pH=۶/۵) هموژنیزه و سانتریفوژ می‌شوند و فعالیت در محلول استخراج شده با روش کاتشول توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری می‌شود. ظهور ترکیبات رنگی ناشی از اکسیداسیون آنزیمی کاتشول با استفاده از یک اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه گیری می‌شود.

رنگ قارچها با یک رنگ‌سنج Minolta در ۱۰ دقیقه پس از گشودن بسته‌های پلاستیکی قارچها اندازه گیری می‌شود. وزن قارچها در قبل و بعد از انجام تیمار پس از ۵ دقیقه آبکش کردن آنها در یک آبکش، اندازه گیری می‌شود و بافت قارچها با یک بافت سنج Stable Micro Systems اندازه‌گیری می‌شود (۵).

واکنش اکسیداسیون اپی کاتشین در حضور ترکیبات تیولی یعنی ۲-مرکاپتو اتانول (2ME)، سیستئین و Dithiothreitol (DTT) با استفاده از آنزیم پلی‌فنل اکسیداز منجر به تشکیل ترکیبات ۲-هیدروکسی اتیل تیول اپی‌کاتشین (HETEC) می‌شود. ترکیبات HETEC از واکنش بین اپی کاتشین و ترکیبات تیولی که توسط آنزیم پلی‌فنل اکسیداز کاتالیز می‌گردد، تشکیل می‌شوند و از مشتقات اپی‌کاتشین هستند که توسط باقیمانده ترکیبات تیولی جانشین می‌شوند. واکنش اکسیداسیون در دمای ۳۰°C انجام می‌شود و مخلوط واکنش دهنده استاندارد شامل ۰/۰۲ مول بافر سولفیت سدیم (pH =۶/۵) و ۳ میلی مول سوبسترا و ۵/۷ میلی مول 2ME و ۴۰ میکرولیتر محلول آنزیمی است. واکنش توسط اضافه کردن محلول آنزیمی آغاز و با اضافه کردن ۴ میکرولیتر از اسیدکلریدریک دو نرمال متوقف می‌شود و محصولات واکنش در دمای

www.SID.ir

Archive Of SID

۲۳°C توسط دستگاه HPLC مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد (۷).

روش‌های گرمادهی

روش‌های متفاوت گرمادهی تصاویر گرمایی متضادی از قارچ به نمایش می‌گذارد. در روش متداول، گرمادهی سطحی و نفوذ حرارت از آب داغ در سرتاسر قارچ عامل اصلی در فرایند گرمادهی متداول است. اما توزیع درجه حرارت در قارچ به هنگام استفاده از مایکروویو به تنهایی در دمای ۸۵°C به مدت ۱ دقیقه نشان می‌دهد که گرمادهی داخلی است و توزیع گرما به توزیع میدان الکتریکی درون نمونه بستگی دارد. در این حالت به علت تبخیر آب، سطح قارچ سردتر از مرکز آن است این سرد شدن از غیرفعال شدن آنزیم در پوست (سطح) جلوگیری می‌کند. پس می‌توان انتظار داشت که با ترکیب روش مایکروویو ۸۵°C به مدت ۱ دقیقه به علاوه روش متداول آب داغ °C ۹۲ به مدت ۲۰ ثانیه آنزیم‌ها کاملاً از بین بروند.

زمان‌های لازم برای غیرفعال کردن پلی‌فنل اکسیداز در بافت‌های مختلف قارچ با استفاده از سه روش مذکور نشان می‌هد که برای کلاهک قارچ در روش متداول ۶ دقیقه، در روش مایکروویو ۲ دقیقه و در ترکیب دو روش ۲۰ ثانیه زمان لازم است تا پلی‌فنل 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 مؤثرترین روش است. درمورد تنه قارچ نحوه اثرگذاری روش‌ها شبیه به کلاهک است. در این مورد فعالیت باقیمانده برای روش متداول حدود ۶٪ و برای روش مایکروویو حدود ۳٪ است که غیرفعال شدن کمتر پلی‌فنل اکسیداز در تنه قارچ به حضور ایزو آنزیم‌های مختلف با پایداری حرارتی متفاوت مربوط می‌شود. بعد از انجام گرمادهی ملایم، فعالیت پلی‌فنل اکسیداز افزایش خواهد یافت که می‌تواند به دو علت آزاد شدن آنزیم نهفته و فعال شدن آنزیم باشد (۲). فعالیت واکنش‌های منوفنلاز و دی فنلاز بعد از عمل آوری گرمایی ملایم افزایش می‌یابد. زیرا تغییرات ساختمانی آنزیم در نتیجه گرمادهی ملایم می‌تواند دست یابی منوفنل‌ها و دی فنل‌ها را به جایگاه فعال آنزیم تسهیل کند (۱).

تأثیر گرمادهی بر قهوه‌ای شدن

واکنش‌های قهوه‌ای شدن در قارچ‌ها مستقیماً به مقدار پلی‌فنل اکسیداز وابسته است و غیرفعال کردن سریع پلی‌فنل اکسیداز قهوه‌ای شدن را کاهش می‌دهد (۱). در روش گرمادهی متداول، قهوه‌ای شدن با غیرفعال شدن پلی‌فنل اکسیداز در این زمان مطابقت می‌کند. به نحوی که پلی‌فنل اکسیداز قبل از اینکه کاملاً از بین برود، فعال است و در این مدت ترکیبات اکسیداسیونی بی‌شماری از قبیل ارتوکینون تولید می‌شوند که ممکن است با ترکیبات فنلی واکنش داده و بعد از غیرفعال شدن پلی‌فنل اکسیداز، محصولات اکسیداسیونی در نمونه باقی مانده و ملانین تولید کنند (۲). بالا بودن مقدار قهوه‌ای شدن اولیه در روش گرمادهی متداول نسبت به نمونه‌های کنترل به دلیل فعال شدن پلی‌فنل اکسیداز است (۱). در بکار بردن مایکروویو به تنهایی مقادیر بالاتری از قهوه‌ای شدن مشاهده می‌شود که با زمان تابش ثابت می‌ماند و دلیل آن این است که زمان کوتاه عمل آوری، نمی‌تواند پلی‌فنل اکسیداز را کاملاً غیرفعال کند و دیگر اینکه در زمانهای عمل‌آوری طولانی‌تر پلی‌فنل اکسیداز غیرفعال می‌شود. 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، قهوه‌ای شدن به شدت کاهش می‌یابد و نسبت به زمان عمل آوری ثابت می‌ماند. غیرفعال کردن سریع پلی‌فنل اکسیداز با استفاده از این روش از اکسیداسیون ترکیبات فنلی جلوگیری می‌کند و آنزیم نمی‌تواند محصولات اکسیداسیونی تولید کند (۲).

تأثیر گرمادهی بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل

در کلاهک قارچ پایین ترین مقدار آنتی اکسیدان (۴۶٪) مربوط به گرمادهی متداول حمام آب داغ ۹۲°C به مدت ۶ دقیقه است و در پوست کلاهک پایین ترین مقدار آنتی اکسیدان (۶۰٪) به سبب گرمادهی مایکروویو به میزان ۸۵°C به مدت ۳ دقیقه می‌باشد و در ترکیب دو روش یعنی تابش مایکروویو به مدت ۱ دقیقه به علاوه غوطه‌ور شدن در آب داغ ۹۲°C به مدت ۲۰ ثانیه مقدار آنتی اکسیدان کل برای همه بافت‌ها در بیشترین مقدار (۹۶٪-۹۱٪) می‌باشد (۲). کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی در روش گرمادهی متداول دو علت دارد:

- مستقیم: از طریق اکسیداسیون سوبستراهای احیاکننده

www.SID.ir

Archive Of SID

• غیرمستقیم از طریق اکسیداسیون اسید اسکوربیک توسط کینون‌ها و محصولات اکسیداسیونی تولید شده در اکسیداسیون آنزیمی

مقایسه نمونه‌های کنترل و حرارت دیده به روش متداول نشان می‌دهد به علت فعالیت اولیه پلی‌فنل اکسیداز در نمونه‌های حرارت دیده محصولات اکسیداسیون در نمونه باقی می‌ماند و مقدار آنتی اکسیدان را کاهش می‌دهد. پس ارتباط مستقیم بین فعالیت پلی‌فنل اکسیداز و کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی کل تأیید می‌شود (۱). این یافته با مشاهدات حاصل از شکل قسمت‌های A، B و C مطابقت دارد (۲) و نشان دهنده اهمیت پیدا کردن روش‌های سریع برای غیرفعال کردن پلی‌فنل اکسیداز است تا محتوی تغذیه‌ای قارچها محفوظ بماند (۱).

تأثیر گرمادهی بر افت وزن، چروکیدگی ویژگی‌های کیفی

در حین گرمادهی، قارچها آب از دست می‌دهند که به تغییرات در بافت منجر می‌شود و تأثیر زیادی در بازده فرایند دارد ولی در هنگام هواگیری کردن، به دلیل آن که آب جایگزین هوا می‌شود وزن به مقدار زیادی افزایش می‌یابد که این آب اضافی در حین آنزیم بری قارچها به روش متداول از دست می‌رود. افت وزن یا چروکیدگی به علت تبخیر آب مشکل عمده در عملیات کنسرو کردن قارچها است. افت وزن محصول کنسرو شده در حین عملیات آنزیم‌بری و فرایند گرمایی معمولاً ۴۰٪-۳۰٪ رخ می‌دهد. افت وزن و چروکیدگی پس از آن در آنزیم‌بری قارچها عمدتا" به اندازه، درجه حرات گرمادهی و زمان گرمادهی بستگی دارد. بنابراین کاهش زمان عمل‌آوری در روش مایکروویو باید به بهبود در چروکیدگی و افت وزن قارچ منتهی شود و در ترکیب دو روش افت وزن بهینه می‌شود و هر چروکیدگی به علت عمل گرمادهی متداول است (۲). در فرایند کنسرو کردن قارچها، آنزیم‌بری بر وضعیت نهایی قارچها اثر مهمی دارد. به طوری که افت وزن را کاهش و رنگ را بهبود می‌بخشد (۸).

متابولیت‌های ثانویه فنلی نقش مهمی در کیفیت غذاهای گیاهی بازی می‌کنند. مثلاً آنها بر روی ویژگیهای کیفی از قبیل خواص ظاهری و طعم اثر می‌گذارند و محتوی آنها در غذاها توسط عوامل زیادی که بر تخریب، بیوسنتز و پایداری فنل‌ها اثر دارند، تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۶). در خلال آنزیم بری، غلظت مانیتول به عنوان نشانگر متابولیت‌های ثانویه محلول در آب، در مایع آنزیم‌بری افزایش می‌یابد که تابعی از زمان و دمای آنزیم‌بری است (۹). برخی از تیمارها پس از برداشت از قبیل انبار سرد و اتمسفر کنترل شده یا اصلاح شده و همچنین روش‌های نوین فراوری از قبیل میکروویو، پالس‌های میدان الکتریک بالا، فشار هیدرواستاتیک بالا و پرتو دهی (گاما، W) می‌تواند کیفیت مربوط به ترکیبات فنلی را بهبود بخشد (۶).

تکنیک گرمادهی مایکروویو نتایج رضایت بخشی را به منظور آنزیم بری صنعتی در موارد کیفیت محصول و کوتاه کردن زمان فرایند نشان می‌دهد. نتایج بهتر در موارد توزیع درجه حرارت، غیرفعال کردن آنزیم پلی‌فنل اکسیداز، کاهش چروکیدگی و افت وزن، مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی کل و قهوه‌ای شدن نمونه‌ها با استفاده از ترکیب تکنیک گرمادهی مایکروویو با فرایند گرمادهی متداول بدست می‌آید. اما افت وزن و تخریب بافت، هیچکدام به طور قابل ملاحظه ای کاهش نمی یابند و این بدون شک دلیل اصلی است که آنزیم‌بری صنعتی توسط مایکروویو جز برای کاربردهای خاص موفقیت آمیز نیست (۲). برای حفظ کیفیت قارچها ضروری است تا زمان لازم برای در معرض قرار گرفتن نمونه‌ها به تابش مایکروویو، کوتاه باشد (۱). کاهش در زمان فراوری، افت وزن و چروکیدگی قارچ را کاهش می‌دهد. کاهش مقدار آنتی‌اکسیدان و افزایش قهوه‌ای شدن در نمونه‌های عمل‌آوری شده با روش ترکیب مایکروویو متداول نسبت به نمونه‌های کنترل، حداقل است (۲).

فشار ایزو استاتیک بالا و تأثیر آن بر قهوه‌ای شدن و فعالیت پلی‌فنل اکسیداز

فشار ایزو استاتیک بالا به عنوان یک تکنیک غیرگرمایی برای نگهداری مواد غذایی به کار می‌رود. فشار بالا، میکرو ارگانیسم‌ها و آنزیم‌ها را غیرفعال می‌کند. بدون اینکه بر مولکول‌های کوچک مانند مواد مولد طعم و ویتامین‌ها 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 غیرفعال می‌کند، ممکن است با شرایط لازم برای حفظ رنگ و بافت مغایرت داشته باشد. علی‌رغم اینکه قارچهای A.b در مقایسه با سبزیجات دیگر محصولی نسبتاً گرانند، بهای فرایند در فشار بالا در مقایسه با قیمت کلی این محصول نسبتاً پایین است (۵).

www.SID.ir

Archive Of SID

اگر قارچها قبل از اعمال فشار هواگیری شوند قهوه‌ای شدن در مقایسه با قارچهای هواگیری نشده از شدت کمتری برخوردار است. چون در حین فرایند هواگیری، هوای موجود در حفرات سلولی با آب جایگزین می‌شود. در نتیجه غلظت اکسیژن لازم برای انجام واکنش قهوه‌ای شدن کاهش می‌یابد. در صنعت، قارچها را با آب حاوی اسید سیتریک و سولفیت سدیم هواگیری می‌کنند بنابراین pH پایین، سرعت غیرفعال شدن پلی‌فنل اکسیداز را در فشار بالا شدت می‌بخشد و در نتیجه قهوه‌ای شدن کمتر رخ می‌دهد (۵).

فشار تأثیر زیادی بر فعالیت پلی‌فنل اکسیداز دارد. به طوری که در فشار ۶۰۰ مگا پاسکال افزایشی در فعالیت دیده می‌شود که احتمالاً به علت تغییر شکل آنزیم از حالت نهفته به حالت فعال است. فشار بالاتر به سبب دناتوره کردن آنزیم پلی‌فنل اکسیداز آن را به طور غیرقابل برگشت غیرفعال می‌کند. 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 غیرفعال کردن کامل آنزیم پلی‌فنل اکسیداز اعمال فشار بالاتر در زمانهای طولانی تر و یا درجه حرارت ۵۰-۶۰ ضروری است (۵). فشار تا ۹۵۰ مگاپاسکال برای غیرفعال کردن آنزیم پلی‌فنل اکسیداز ضروری است و بافتهای قارچهای تحت فشار نسبت به قارچهای آنزیم بری شده به روش متداول، تا حدی بهتر است. اما بازده و غیرفعال شدن آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در هر دو روش یکسان است.

فشار ایزو استاتیک بالا و تأثیر آن بر رنگ، افت وزن و بافت

سفیدی قارچهای تازه زمانی که تحت فشار قرار می‌گیرند در مقایسه با قارچهای آنزیم بری شده، کاهش می‌یابد و رنگ قهوه‌ای می‌شود. اعمال فشار ۶۰۰ یا ۸۰۰ مگا پاسکال بر قارچهای هواگیری شده، رنگ قهوه‌ای تیره را به وجود می‌آورد. ولی در فشار بالاتر یعنی ۹۵۰ مگاپاسکال رنگی ملایم‌تر اما هنوز قهوه‌ای شدید به وجود می‌آید که به دو علت است. یکی اینکه فشار ۶۰۰ مگا پاسکال باعث افزایش فعالیت پلی‌فنل اکسیداز می‌شود ولی فشار بالاتر این فعالیت را کاهش و نفوذ پذیری غشاء را افزایش می‌دهد که به هرحال به قهوه‌ای کمرنگ منتهی نمی شود و دیگر اینکه فشار ایزواستاتیک بالا به کریستاله شدن فسفولیپیدها در غشاء و بدنبال آن تخریب غشاء می‌انجامد که پیامد آن افزایش نفوذپذیری و ورود پلی‌فنل اکسیدازهای خارج سلولی به داخل سلول و واکنش آنها با فنل‌ها است که به افزایش قهوه‌ای شدن در حین اعمال فشار منجر می‌شود. در حالی که آنزیم‌بری متداول تغییرات عمده‌ای در رنگ در مقایسه با قارچهای تازه به وجود نمی آورد (۵).

با مقایسه داده‌های حاصل از وزن بعد از هواگیری و فشار وارده بر قارچها می‌توان نتیجه گرفت که فشار به افت وزن قارچها منجر می‌شود. اما هواگیری کردن اثر مثبتی بر نگهداری آب بعد از اعمال فشار دارد. بعد از انجام هواگیری روش آنزیم‌بری تحت روش فشاری که برای غیرفعال کردن پلی‌فنل اکسیداز کافی باشد، افت آب یکسانی را به وجود می‌آورد. بنابراین وزن قارچهای هواگیری شده بعد از اعمال فشار بیشتر از قارچهای هواگیری نشده است (۵).

هواگیری کردن از سفتی بافت قارچها در مقایسه با قارچهای تازه کمی می‌کاهد. اما آنزیم‌بری به وضوح سفتی قارچها را کاهش می‌دهد. بنابراین پس از انجام آنزیم بری هیچ تفاوت معنی‌داری بین بافت قارچهای هواگیری شده و هواگیری نشده وجود ندارد. ولی قارچهایی که فشار را تحمل می‌کنند، نسبت به قارچهای آنزیم بری شده به روش متداول، سفتی بیشتری دارند. پس می‌توان نتیجه گرفت که فشار در مقایسه با آنزیم‌بری کمتر باعث افت بافت قارچ می‌گردد که دلیل آن را می‌توان به دمتیلاسیون آنزیمی پکتین باشد (۵). فشار ایزواستاتیک بالا می تواند به عنوان یک روش غیرحرارتی برای نگهداری فرآورده های غذایی به کار رود. فشار بالا میکرو ارگانیسمها و آنزیم‌ها را غیرفعال می‌کند. بدون اینکه بر مولکول‌های کوچک مانند مواد مولد طعم و ویتامین‌ها اثر گذارد و علی‌رغم اینکه قارچهای مذکور در مقایسه با سبزیجات دیگر نسبتاً گرانند، بهای فرایند در فشار بالا در قیاس با قیمت کلی این محصول، پایین است (۵).

پرتو دهی گاما

برای تعیین مقدار مناسب از اشعه گاما و دمای نگهداری و همچنین مدت نگهداری قارچهای دکمه‌ای A.b آزمایش‌هایی صورت گرفت. قارچها در مقادیر KGy ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ تحت تشعشع قرار گرفتند و در دماهای مختلف ۴°C، ۱۰ و ۲۰ و به مدت حدود ۱۵ روز نگهداری شده و سپس از نظر مورفولویکی و خصوصیات آنزیمی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که مقدار KGy ۲ تابش و دمای نگهداری ۱۰°C به مدت ۱۰ روز مانع از باز شدن چتر

www.SID.ir

Archive Of SID

کلاهک و تخریب خصوصیات بافتی و آنزیمی می شود (۱۰) و نتایج بکاربردن KGy ۲ پرتو دهی گاما در دو سرعت متفاوت KGy/h ۴/۵ و KGy/h ۳۲ به منظور افزایش ماندگاری قارچ خوراکی A.b نشان داد که مورد KGy/ h ۴/۵ بیشترین ترکیبات فنلی را نسبت به مورد h/ KGy ۳۲ دارد و کمترین مقدار ترکیبات فنلی در نمونه کنترل است. فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در مورد h/ ۳۲KGy پایین‌تر است. گرچه میزان ترکیبات فنلی آن بالاتر است. مشاهده دیوار سلولی قارچ توسط میکروسکپ الکترونی نشان دهنده استحکام بهتری در مورد KGy/h ۴/۵ است. تصور می‌شود که قهوه‌ای شدن مشاهده شده در مورد h/ ۳۲KGy به سبب رها سازی فنلهای واکوئلی و به سبب وارد شدن اکسیژن مولکولی به درون سیتوپلاسم سلول است. اثر سینرژیستیک باقیمانده فعالیت پلی‌فنل اکسیداز و اکسیژن مولکولی در تماس با فنلها، افزایش میزان اکسیداسیون را میسر می‌سازد و مسبب قهوه‌ای شدن بیشتر در مورد KGy/h ۳۲ است (۱۱).

ترکیبات تیولی

با انجام مقایسه‌ای مشخص می‌شود که DTT نسبت به 2ME و 2ME نسبت به سیستئین احیا کننده قوی‌تری است. به طوری که تشکیل شدن ارتوکینون توسط نیروی احیا کننده سیستئین کاملاً مهار نمی‌شود. بر پایه این یافته‌ها مکانیسم فرض شده برای مهار قهوه‌ای شدن آنزیمی توسط ترکیبات تیولی بدین گونه است که در غیاب 2ME، ارتو دی فنل توسط پلی‌فنل اکسیداز اکسید می‌شود و رادیکالهای کینون توسط واکنشOxidative coupling پلیمریزه شده و به پدیده قهوه‌ای شدن می‌انجامد. اما از آنجایی که 2ME یک احیاء کننده است، بخشی از ارتوکینون را به ساختمان اصلی یعنی ارتو دی هیدروکسی فنل احیاء می‌کند و از سوی دیگر رادیکالهای متعلق به 2ME یا دیگر ترکیبات تیولی فوراً با رادیکال ارتو کینون واکنش داده ترکیباتی مانند HETEC و سیستنیل دوپا را تشکیل می‌دهند. بنابراین قهوه‌ای شدن ناشی از پلی‌فنل اکسیداز مهار خواهد شد.

این مکانیسم به تشخیص نقش دیگری برای ترکیبات تیولی منجر شد. به طوری که در حضور مقادیر اضافه‌تر ترکیبات تیولی دارای عوامل احیاکننده، از مهار آنزیم‌های سولفیدریل (گروههای SH در جایگاه فعال آنزیم به کینون‌های تولید شده توسط پراکسیداز متصل می‌شوند) جلوگیری می‌شود (۷). اسید اگزالیک فعالیت ضد قهوه‌ای شدن قوی دارد و الگوی مهار کنندگی آن رقابتی است و تأثیر آن همانند کوجیک اسید است و از گلوتاتیون و سیستئین موثرتر است (۱۲).

ترکیب ۲- مرکاپتو اتانول (2ME) هم به عنوان ممانعت کننده از پلی مریزاسیون ارتوکینون عمل می‌کند و هم به عنوان یک عامل احیاکننده در تبدیل ارتوکینون به ارتودی هیدروکسی فنل نقش دارد. سیستئین از قهوه‌ای شدن آنزیمی که توسط پلی‌فنل اکسیداز کاتالیز می‌شود، ممانعت می‌کند. اما از اکسیداسیون ترکیبات فنلی توسط پلی‌فنل اکسیداز ممانعت نمی‌کند. بلکه از پلی مریزاسیون ترکیبات فنلی که به قهوه‌ای شدن می‌انجامد جلوگیری می‌کند. سیستئین با کینون به صورت غیرآنزیمی واکنش می‌دهد تا کانژوگیت‌های بیرنگ تشکیل دهد و در فراوری غذا موثرتر از نمک‌های هالید یا اسیدهای کربوکسیلیک آروماتیک واکنش قهوه‌ای شدن را مهار می‌کند و از سولفیت‌ها کم‌خطرتر است (۷).

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. به طوری که قارچ‌های A.b کنترل با آب شیر و تیمارها با ۰/۱٪ و ۰/۵٪ کلرید کلسیم افزوده شده به آب آبیاری، کشت داده شدند. قارچ‌های برداشت شده در دمای ۱۳°C نگهداری و بعد از ۰،۲، ۴، ۷ یا ۸ روز ارزیابی شدند. تا اثرات تیمار بر کیفیت و ماندگاری تعیین شود. در غلظت ۰/۱٪، کلرید کلسیم هیچ اثر معنی‌داری 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 ۱۶٪ کاهش یافت. اما محتوی جامدات قارچ‌های برداشت شده تا ۱۶٪ افزایش و ماندگاری عمدتاً به سبب کاهش نرخ رشد باکتریایی و کاهش توأم قهوه‌ای شدن سطحی در حدود ۶۴٪ افزایش یافت (۱۳).

ترکیبات احیاکننده و مهار کننده قهوه‌ای شدن

به منظور مهار واکنش قهوه‌ای شدن آنزیمی، می‌توان ارتوکینون 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 می‌گرداند، انجام داد. ضمناً می‌توان ارتو کینون را با

www.SID.ir

Archive Of SID

ترکیباتی نظیر پرولین یا ۲- نیترو۵-تیو بنزوئیک اسید به دام انداخت (۴).

آپو آنزیم یا همان آنزیم بدون مس، غیرفعال است و بعد از افزودن یون مس می‌تواند فعال شود (۴). حتی می‌توان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز غیرفعال شده توسط اسید اگزالیک را با افزودن یون مس بازیافت (۱۲). مس با دارا بودن ۰/۳-۰/۲ درصد وزن آنزیم پلی‌فنل اکسیداز قارچ، تشکیل متالوآنزیم می‌دهد و خیلی محکم به پروتئین متصل می‌شود و صرفاً توسط عوامل قوی ضد کمپلکس مانند ۱۰ میلی مول سیانید هیدروژن برداشته می‌شود. مهار کننده‌های پلی‌فنل اکسیداز عواملی هستند که یا به یون مس متصل می‌شوند و یا بر جایگاه متصل شدن فنل عمل می‌کنند. ترکیبات کمپلکس کننده یون مس شامل منوکسید کربن، یونهای آزید (Azid) و سیانید همگی نسبت به EDTA، مشتقات تیو اوره مثل فنیل تیو اوره، دی اتیل دی تیو کاربامات، مرکاپتو نیزوتیازول، کوجیک اسید، و تروپولون (Tropolone) مهارکننده قوی‌تری هستند. تروپولون مهارکننده قوی و اختصاصی پلی‌فنل اکسیداز است. سوبستراهای بدلی شامل آروماتیک اسیدها، فنل‌های مختلف و مشتقات آنها و تعدادی ترکیبات غیرآروماتیک مهارکننده‌های رقابتی هستند. پلی وینیل پیرولیدون (Polyvinylpyrolidone) و فنیل هیدرازین جاذب فنل هستند و به عنوان مهارکننده واکنش کاتشولاز (ارتو دی فنلاز) عمل می‌کند (۴).

سدیم اریتوربات به عنوان ممانعت کننده از قهوه‌ای شدن

ممکن است استفاده از پراکسید هیدرون به عنوان ماده ضد میکروبی در یک سیستم شستشو منجر به تحریک فرآیند قهوه‌ای شدن شود. نتایج نشان داد با افزایش غلظت پراکسید هیدرون از ۳٪ به ۵٪، قهوه‌ای شدن بیشتر انجام می شود. اما این مشکل با افزودن یک ماده ممانعت کننده از قهوه‌ای شدن به نام سدیم اریتوربات مرتفع می شود. این محلول که شامل ۴٪ سدیم اریتوربات و ۰/۱٪ کلرید سدیم است به صورت اسپری به کار برده می شود. به کار بردن سدیم اریتوربات/کلرید سدیم ارزانتر است زیرا کلرید سدیم ارزانتر از سیستئین +HCL یا دی سدیم EDTA است. محلول سدیم اریتوربات یک آنتی اکسیدان است و از کاهش ترکیبات فنلی در اثر اکسیداسیون توسط پراکسید هیدرون و پلی فنل اکسیداز جلوگیری می کند (۱۴) قارچهای شسته شده به این روش در مقدار آمینواسیدهای آزاد کاهش و در مقدار سدیم افزایش نشان می دهند. ولی هیچ نشانه‌ای ناشی از تغییر در مزه، بافت یا رنگ نشان ندادند (۱۵). و طی انبارداری، ظاهر تازه خود را ۷ الی ۱۰ روز در دمای ۳-۴°C حفظ کردند (۱۴).

نتیجه‌گیری:

به منظور آنزیم‌بری صنعتی قارچها، مایکروویو به عنوان یک روش گرمادهی نتایج امیدوار کننده‌ای را نشان می‌دهد ولی عامل محدود کننده این روش، گرادیان‌های دمایی تولید شده درون نمونه در حین گرمادهی است. تفاوت در مدت زمان غیرفعال شدن پلی فنل اکسیداز با استفاده از مایکروویو (۲۰ ثانیه) و عمل آوری گرمایی متداول (۶ دقیقه) به علت اصول متفاوت گرمادهی این دو روش است. نتایج بهتر با استفاده کردن از ترکیب روش گرمادهی مایکروویو با فرایند گرمادهی متداول بدست می‌آید. فشار ایزواستاتیک بالا می‌تواند به عنوان یک روش غیرحرارتی برای نگهداری فرآورده های غذایی به کار رود. فشار بالا، میکرو ارگانیسم‌ها و آنزیم‌ها را غیرفعال می‌کند بدون اینکه بر مولکول‌های کوچک مانند مواد مولد طعم و ویتامین‌ها اثر گذارد علی‌رغم اینکه قارچهای مذکور در مقایسه با سبزیجات دیگر نسبتاً گرانند، بهای فرایند در فشار بالا در قیاس با قیمت کلی این محصول، پایین است. یافته‌ها حاکی از آن است که ترکیب تیولی۲- مرکاپتو اتانول (2ME) به عنوان ممانعت کننده از پلی مریزاسیون ارتوکینون، احتمالاً توسط باند شدن به آن و هم به عنوان احیا کننده در تبدیل ارتوکینون به ارتودی هیدروکسی فنل عمل می‌کند.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان‌نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی استخراج شده‌است. بدینوسیله از کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی به دلیل حمایت‌های مالی تشکر می‌شود.

www.SID.ir

Archive Of SID

- **References**

1- Master AM, Knott ER, Teunissen PGM, Bartels PV. Effects of high isostatic pressure on mushrooms. Journal of Food Engineering 2000; 45(1): 11–16.

2- Devece C, Rodrigues-Lopes JN, Fenoll LG, Tudela J, Catalá JM, de Los Reyes E, et al. Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1999; 47(11): 4506–4511.

3- Sánchez-Hernández D, Devece C, Catalá JM, Rodríguez-López JN, Tudela J, García-Cánovas F, et al. Enzyme inactivation analyses for industrial blanching applications employing 2450 MHZ monomode microwave cavities. Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy 1999; 34(4): 239–252.

4- Jolivet S, Arpin N, Wichers HJ, PelonG. Agaricus bisprorus browning: a review. Mycological Research 1998; 102(12): 1459–1483.

5- Negishi O, Ozawa T. Inhibition of enzymatic browning and protection of sulfhydryl enzymes by thiol compounds. Phytochemistry 2000; 54(5):481–487.

6- Tomas-Barberan FA, Espin JC. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. Journal of The Science of Food and Agriculture 2001; 81(9): 853–876.

7- Rodríguez-López JN, Fenoll LG, Tudela J, Devece C, Sánchez-Hernández D, de Los Reyes E, et al. Thermal inactivation of mushroom polyphenoloxidase employing 2450 MHz microwave radiation . Journal of Agricultural and Food Chemistry 1999; 47(8): 3028–3035.

8- Vivar-Quintana AM, Gonzalez-San Jose ML, Collado-Fernandez M. Influence of canning process on colour, weight and grade of mushrooms . Food Chemistry 1999; 66(1): 87–92.

9- Biekman ESA, Kroese-Hoedeman HI, Schijvens EPHM. Loss of solutes during blanching of mushrooms (Agaricus bisporus) as a result of shrinkage and extraction. Journal of Food Engineering 1996; 28(2): 139–152.

10- Gautam S, Sharma A, Thomas P. Gamma irradiation effect on shelf-life, texture, polyphenol oxidase and microflora of mushroom (Agaricus bisprorus). International Journal of Food Science and Nutrition 1998; 49(1): 5–10.

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

12- Son SM, Moon KD, Lee CY. Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2000; 48(6): 2071–2074.

13- Barden CL, Beelman RB, Bartley CE, Schisler LC. The effect of calcium chloride added to the irrigation water on quality shelf life of harvested mushrooms. Journal of Food Protection 1990; 53(9): 759–762.

14- Sapers GM, Miller R.L, Pilizota V, Kamp F. Shelf-life extention of fresh mushrooms (Agaricus bisprorus) by application of hydrogen peroxide and browning inhibitors. Journal of Food Science 2001; 66(2): 362–366.

15- Sapers GM, Miller RL, Choi SW, Cooke PH. Structure and composition of mushrooms as affected by hydrogen peroxide wash. Journal of Food Science 1999; 64(5): 889–892.

www.SID.ir

Archive Of SID

Agaricus Bisporus: Enzymatic browning and its inhibition methods

Mohammadi M[1], Jahadi M[2], Khosravi-Darani K [*3]

1- Students` Research Committee, Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Assistant Prof. Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Khorasgan (Isfahan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

*3- *Corresponding author: Associate prof (in Research), Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: kiankh@yahoo.com*

Abstract

Browning button mushroom of *Agaricus Bisporus* is a common phenomenon which enzymaticaly convert melonogenic phenols to quinones and eventually produce melanin pigments. Browning button mushroom is detrimental to business of agriculture and food business. This review article surveys methods of inhibiting the enzymatic browning *Agaricus Bisporus* include: thermal inactivation, high isostatic pressure, gamma irradiation, thiol componds, calcium chloride added to the irrigation water, inactivators and inhibitors and its effects on enzymatic browning of Agaricus Bisporus.

Keywords: *Agaricus bisporus*, Enzymatic browning, Polyphenol oxidase, Microwave, Inhibitors

www.SID.ir