

قارچ خوراکی: قهوهای شدن آنزیمی و روش‌های مهار آن

مهرداد محمدی^۱، مهشید جهادی^۲، کیانوش خسروی دارانی^۳

- ۱- کمیته تحقیقات دانشجویان، انتستیتو 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 خوارسگان (اصفهان)، اصفهان، ایران
۳- نویسنده مسئول: دانشیار گروه تحقیقات صنایع غذایی، انتستیتو 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 می‌شوند و سرانجام رنگدانه ملانین را به وجود می‌آورند. در این مقاله مروی، 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، میکروبویو، مهارکننده‌ها

مقدمه

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 ارتودی فنل‌ها (فعالیت منوفنلаз یا کرسولاز).
- اکسیداسیون ارتودی فنل‌ها به ارتودی کینون‌ها (فعالیت دی فنلаз 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 غشاها داخل سلولی
- فعل شدن پلی‌فنل اکسیداز نهفته.

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز دارای دو حالت نهفته و فعل است که آنزیم نهفته می‌تواند توسط پروتئازها، اسیدها و عوامل باز کننده تاخوردگی (مانند اسیدهای چرب، دترزانها و دیگر دناتوره کنندها) (۴) پیری یا شوک ناشی از اسید یا قلیا، گرمای ملایم، فشار یا انجماد/رفع انجماد فعل شود (۵). فقط ۰.۵٪ از کل پلی‌فنل اکسیداز موجود در سر و پایه قارچ در حالت فعل است و ۹۵٪ بقیه در حالت نهفته است (۴). فعل شدن آنزیم توسط اکسیژن در دسترس، pH و

قارچ‌های دکمه‌ای *Agaricus bisporus* (A.b) حاوی آب، نمک‌های معدنی، ویتامین‌ها، 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 اکسیژن‌نازهای 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 مس دار دارای شکل گلوبولار و دارای جرم مولکولی ۱۲۰/۰۰۰-۱۳۰/۰۰۰ است (۴) و دارای چهار زیر مجموعه و چند شکل به نام ایزو آنزیم است که

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 خلاً ۲۰-۴۰ میلی بار به مدت ۳ دقیقه قرار می‌گیرند و در بسته پلی‌اتیلنی تحت خلاً بسته بندی می‌شوند. قارچ‌های هواگیری شده به منظور غیرفعال شدن آنزیم‌ها، آنزیم‌بری می‌شوند و بعد از پر کردن قارچ‌ها در ظروف شیشه‌ای، این ظروف به منظور غیرفعال شدن میکرووارگانیسم‌ها استریل می‌شوند. در مورد تیمار تحت فشار بالا از یک فشار ۱۰۰۰-۲۰۰۰ مگا پاسکال به مدت ۵ دقیقه و در درجه حرارت اتاق استفاده می‌شود. برای تعیین فعالیت پلی‌فنل اکسیداز، قارچ‌ها با بافر فسفات سدیم ($pH=6/5$) هموژنیزه و سانتریفیوز می‌شوند و فعالیت در محلول استخراج شده با روش کاتشول توسط اسپکتروفوتومتر اندازه گیری می‌شود. ظهور ترکیبات رنگی ناشی از اکسیداسیون آنزیمی کاتشول با استفاده از یک اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه گیری می‌شود.

رنگ قارچ‌ها با یک رنگ‌سنجد 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 اندازه گیری می‌شود.^(۵)

واکنش اکسیداسیون اپی کاتشین در حضور ترکیبات تیولی یعنی ۲-مرکاپتو اتانول (2ME)، سیستئین و DTT (Dithiothreitol) با استفاده از آنزیم پلی‌فنل اکسیداز منجر به تشکیل ترکیبات ۲-هیدروکسی اتیل تیول اپی کاتشین (HETEC) می‌شود. ترکیبات HETEC از واکنش بین اپی کاتشین و ترکیبات تیولی که توسط آنزیم پلی‌فنل اکسیداز کاتالیز می‌گردد، تشکیل می‌شوند و از مشتقات اپی کاتشین 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 ($pH=6/5$) 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 اسید کلریدریک دو نرمال متوقف می‌شود و محصولات واکنش در دمای

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 ملانوژن 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 خوارکی (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 - 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 - 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 اسپکتروفوتومتری 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

تأثیر گرمادهی بر قهوهای شدن

واکنش‌های قهوهای شدن در قارچ‌ها مستقیماً به مقدار پلی‌فلل اکسیداز وابسته است و غیرفعال کردن سریع پلی‌فلل اکسیداز قهوهای شدن را کاهش می‌دهد (۱). در روش گرمادهی متداول، قهوهای شدن با غیرفعال شدن پلی‌فلل اکسیداز در این زمان مطابقت می‌کند. به نحوی که پلی‌فلل 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 پلی‌فلل اکسیداز، محصولات اکسیداسیونی در نمونه باقی مانده و ملاتین تولید کنند (۲). بالا بودن مقدار قهوهای شدن اولیه در روش گرمادهی متداول نسبت به نمونه‌های کنترل به دلیل فعل شدن پلی‌فلل اکسیداز است (۱). در بکار بردن مایکروویو به تنها مقدار بالاتری از قهوهای شدن مشاهده می‌شود که با زمان تابش ثابت می‌ماند و دلیل آن این است که زمان کوتاه عمل آوری، نمی‌تواند پلی‌فلل اکسیداز را کاملاً غیرفعال کند و دیگر اینکه در زمانهای عمل آوری طولانی‌تر پلی‌فلل 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 پلی‌فلل 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 سوبستراهامی احیاکننده

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 تنها می‌درد 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 ۹۲°C به مدت ۲۰ ثانیه آنزیم‌ها کاملاً از بین بروند.

زمان‌های لازم برای غیرفعال کردن پلی‌فلل 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 پلی‌فلل 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 در این مورد مؤثرترین روش است. در مرور 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 پلی‌فلل اکسیداز در تنه قارچ به حضور ایزو آنزیم‌های مختلف با پایداری حرارتی متفاوت مربوط می‌شود. بعد از انجام گرمادهی ملایم، فعالیت پلی‌فلل اکسیداز افزایش خواهد یافت که می‌تواند به دو علت آزاد شدن آنزیم نهفته و فعال شدن آنزیم باشد (۲). فعالیت واکنش‌های منوفنلаз و دی‌فنلaz بعد از عمل آوری گرمایی ملایم افزایش می‌یابد. زیرا تغییرات ساختمانی آنزیم در نتیجه گرمادهی ملایم می‌تواند دست یابی منوفنل‌ها و دی‌فنل‌ها را به جایگاه فعال آنزیم تسهیل کند (۱).

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 انسفر کنترل شده یا اصلاح شده و همچنین روش‌های نوبن فراوری از قبیل میکروویو، پالس‌های میدان الکترومغناطیسی بالا، فشار هیدرولاستاتیک بالا و پرتو دهی (گاما، W) می‌تواند کیفیت مربوط به ترکیبات فنلی را بهبود بخشد (۶).

تکنیک گرمادهی مایکروویو نتایج رضایت‌بخشی 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 قهقهه‌ای 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 ملاحظه‌ای کاهش نمی‌یابند 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 آنتی اکسیدان و افزایش قهقهه‌ای 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 قهقهه‌ای 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).

- 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 و پیزگی‌های 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 "عدمتأ" به اندازه، درجه حرارت 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 مانیتور به عنوان نشانگر

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 نمی‌آورد (۵).

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

هوایگیری کردن از سفتی بافت قارچ‌ها در مقایسه با قارچ‌های تازه کمی می‌کاهد. اما آنزیم‌بری بهوضوح سفتی قارچ‌ها را کاهش می‌دهد. بنابراین پس از انجام آنزیم بری هیچ تفاوت معنی‌داری بین بافت قارچ‌های هوایگیری شده و هوایگیری نشده وجود ندارد. ولی قارچ‌هایی که فشار را تحمل می‌کنند، نسبت به قارچ‌های آنزیم‌بری 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 می‌تواند به عنوان یک روش غیرحرارتی برای نگهداری فرآورده‌های 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 دهنی گاما

برای تعیین مقدار مناسب از اشعه گاما و دمای نگهداری و همچنین مدت نگهداری قارچ‌های دکمه‌ای A.b آزمایش‌هایی صورت گرفت. قارچ‌ها در مقدار ۰/۵ KGy، 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 مورفولوژیکی و خصوصیات آنزیمی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که مقدار ۲ KGy تابش و دمای نگهداری ۱۰°C به مدت ۱۰ روز مانع از باز شدن چتر

اگر قارچ‌ها قبل از اعمال فشار هوایگیری شوند قهوهای شدن در مقایسه با قارچ‌های هوایگیری نشده از شدت کمتری برخوردار است. چون در حین فرایند هوایگیری، 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 هوایگیری 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 هوایگیری شده و هوایگیری نشده تفاوت عمده‌ای وجود ندارد. برای غیرفعال کردن کامل آنزیم پلیفنل اکسیداز اعمال فشار بالاتر در زمانهای طولانی تر یا درجه حرارت ۶۰-۵۰ 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 ۶۰۰۰ یا ۸۰۰ مگا پاسکال بر قارچ‌های هوایگیری 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 ۶۰۰۰ مگا پاسکال باعث افزایش فعالیت پلیفنل اکسیداز می‌شود ولی فشار بالاتر این فعالیت را کاهش و نفوذ پذیری غشاء را افزایش می‌دهد که به هر حال به قهوهای کمرنگ منتهی نمی‌شود و دیگر اینکه فشار ایزو استاتیک بالا به کریستاله شدن فسفولیپیدها در غشاء و بدنبال آن تخریب غشاء می‌انجامد که پیامد آن

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 مربیزاسیون 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 مربیزاسیون ترکیبات فنلی که به قهوهای شدن می‌انجامد جلوگیری می‌کند. سیستئین با کینون به صورت غیرآنژیمی 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).

افزوondن 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 مقطار موجب افزودن کلرید کلسیم به آب آبیاری قارچ شد. به طوری که قارچ‌های A.b کنترل با آب شیر و تیمارها با ۰/۰۱٪ و ۰/۰۵٪ کلرید کلسیم افزوده شده به آب آبیاری، کشت داده شدند. قارچ‌های برداشت شده در دمای ۱۳۰°C نگهداری و بعد از ۲، ۴، ۰، ۷ یا ۸ روز ارزیابی شدند. تا اثرات تیمار بر کیفیت و ماندگاری تعیین شود. در غلظت ۰/۰۱٪، کلرید کلسیم هیچ اثر معنی‌داری بر بازده تولید، کیفیت یا ماندگاری نداشت. اما در غلظت بالاتر یعنی ۰/۰۵٪، کلرید کلسیم بازده پخت را کاهش و ماندگاری را افزایش داد. در غلظت ۰/۰۵٪، بازده تولید تا ۱۶٪ کاهش یافت. اما محتوی جامدات قارچ‌های برداشت شده تا ۱۶٪ افزایش و ماندگاری عمده‌تاً 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 اسکوربیات و یا NADH که چرخه مورد نظر را به سمت تشکیل ارتو دی فنل بر می‌گرداند، انجام داد. ضمناً می‌توان ارتو کینون را با

کلاهک و تخریب خصوصیات بافتی و آنزیمی می‌شود (۱۰) و نتایج بکاربردن ۲ 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 /h ۴/۵ KGy h ۳۲ KGy دارد و کمترین مقدار ترکیبات فنلی در نمونه /h کنترل است. فعالیت آنزیم پلیفنل اکسیداز در مورد 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 فللهای واکوئی و به سبب وارد شدن اکسیژن مولکولی به درون سیتوپلاسم سلول است. اثر سینرژیستیک باقیمانده فعالیت پلیفنل اکسیداز و اکسیژن مولکولی در تماس با فنلهای افزایش میزان اکسیداسیون را میسر می‌سازد و مسبب قهوهای شدن بیشتر در مورد ۳۲ KGy/h 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 نیتروی 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 Radikalهای کینون توسط واکنش Oxidative 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 Radikalهای متعلق به 2ME یا دیگر ترکیبات تیولی فوراً با Radikal ارتوکینون 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 مقدار اضافه‌تر ترکیبات تیولی دارای عوامل احیاکننده، از مهار آنزیم‌های سولفیدزیل (گروههای SH در جایگاه فعال آنزیم به کینون‌های تولید شده توسط پراکسیداز متصل می‌شوند)

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 هیدروژن و پلی فنل اکسیداز جلوگیری می کند (۱۴) قارچ های شسته شده به این روش در مقدار آمینواسیدهای آزاد کاهش و در مقدار سدیم افزایش نشان می دهد. ولی هیچ نشانه ای 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).

نتیجه گیری:

به منظور آنژیم بری صنعتی قارچ ها، مایکروویو به عنوان یک روش گرمادهی نتایج امیدوار کننده ای را نشان می دهد ولی عامل محدود کننده این روش، گرادیان های 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 می آید. فشار ایزواستاتیک بالا می تواند به عنوان یک روش غیرحرارتی برای نگهداری فرآورده های غذایی به کار رود. فشار بالا، میکرو ارگانیسم ها و آنژیم ها را غیرفعال می کند بدون اینکه بر مولکول های کوچک مانند مواد مولد طعم و ویتامین ها اثر گذارد علی رغم اینکه قارچ های مذکور در مقایسه با سبزیجات دیگر نسبتاً گرانند، بهای فرایند در فشار بالا در قیاس با قیمت کلی این محصول، پایین است. یافته ها حاکی از آن است که ترکیب تیولی-۲-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 ارتو دی هیدروکسی فنل عمل می کند.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی استخراج شده است. بدینوسیله از کمیته تحقیقات دانشجویی به دلیل حمایت های مالی تشکر می شود.

ترکیباتی نظیر پرولین یا ۲- نیترو-۵-تیو بنزوئیک اسید به دام انداخت (۴).

آپو آنژیم یا همان آنژیم بدون مس، غیرفعال است و بعد از افزودن یون مس می تواند فعال شود (۴). حتی می توان فعالیت آنژیم پلی فنل اکسیداز غیرفعال شده توسط اسید اگزالیک را با افزودن یون مس بازیافت (۱۲). مس با دارا بودن $0/3-0/2$ درصد وزن آنژیم پلی فنل اکسیداز قارچ، تشکیل متالو آنژیم می دهد و خیلی محکم به پروتئین متصل می شود و صرفاً 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 به EDTA، مشتقات تیو اوره مثل فنیل تیو اوره، دی اتیل دی تیو کاربامات، مرکاپتو نیزوتیازول، کوچیک اسید، و تروپولون (Tropolone) مهار کننده قوی تری هستند. تروپولون مهار کننده قوی و اختصاصی پلی فنل اکسیداز است. سوبستراهای بدلی شامل آروماتیک اسیدها، فنل های مختلف و مشتقات آنها و تعدادی ترکیبات غیر آروماتیک مهار کننده های رقابتی هستند. پلی وینیل پیرولیدون (Polyvinylpyrrolidone) و فنیل هیدرازین جاذب فنل هستند و به عنوان مهار کننده واکنش کاتشولاز (ارتودی فنیلаз) عمل می کند (۴).

سدیم اریتوربات به عنوان ممانعت کننده از قهوهای شدن

ممکن است استفاده از پراکسید هیدروژن به عنوان ماده ضد میکروبی در یک سیستم شستشو منجر به تحریک فرآیند قهوهای شدن شود. نتایج نشان داد با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن از $3/3\%$ به $5/5\%$ ، 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 $4/4\%$ سدیم اریتوربات و $0/01\%$ کلرید سدیم است به صورت اسپری به کار برده می شود. به کار بردن سدیم اریتوربات / کلرید سدیم ارزانتر است زیرا کلرید سدیم

• 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, Wickers HJ, Pelon G. Agaricus bisporus 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 bisporus*). *International Journal of Food Science and Nutrition* 1998; 49(1): 5–10.
- 11- Beaulieu M, D'Aprano 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 bisporus*) 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.

Agaricus Bisporus: Enzymatic browning and its inhibition methods

Mohammadi M¹, Jahadi M², 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 enzymatically 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 compounds, 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