

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 می‌شوند 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، پرتوهای 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، 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 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 پلی‌مریزاسیون 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 بازکننده تاخوردگی (مانند اسیدهای چرب، دترژان‌ها و دیگر دنا توره کننده‌ها) (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

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 ملانوزن 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 عمل‌آوری 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 92°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 92°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 اندازه‌گیری می‌شود. بعد از فرایند گرمایی آنها را در آب 20°C به مدت ۲ دقیقه غوطه‌ور می‌کنند تا سرد شوند. در آخر دوباره وزن و اندازه‌گیری 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 شیشه‌ای، 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 ($\text{pH}=6/5$) هم‌وزنیزه و سانتریفوژ می‌شوند و فعالیت در محلول استخراج شده با روش کاتشول توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود. ظهور ترکیبات رنگی ناشی از اکسیداسیون آنزیمی کاتشول با استفاده از یک اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

رنگ قارچ‌ها با یک رنگ‌سنج Minolta در ۱۰ دقیقه پس از گشودن بسته‌های پلاستیکی قارچ‌ها اندازه‌گیری می‌شود. وزن قارچ‌ها در قبل و بعد از انجام تیمار پس از ۵ دقیقه آبکش کردن آنها در یک آبکش، اندازه‌گیری 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 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 30°C انجام می‌شود و مخلوط واکنش دهنده استاندارد شامل ۰/۰۲ مول بافر سولفیت سدیم ($\text{pH}=6/5$) 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 اسیدکلریدریک دو نرمال متوقف می‌شود و محصولات واکنش در دمای

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 ۹۲°C 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 می‌دهد که برای کلاهی 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 کلاهی 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 مورد تنه قارچ نحوه اثرگذاری روش‌ها شبیه به کلاهی 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 منوفلاز و دی‌فنلاز بعد از عمل آوری گرمایی ملایم افزایش می‌یابد. زیرا تغییرات ساختمانی آنزیم در نتیجه گرمادهی ملایم می‌تواند دست‌یابی منوفنل‌ها و دی‌فنل‌ها 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 عمل آوری 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 کلاهی قارچ پایین‌ترین مقدار آنتی اکسیدان (۴۶٪) مربوط به گرمادهی متداول حمام آب داغ ۹۲°C به مدت ۶ دقیقه است و در پوست کلاهی پایین‌ترین 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

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 آنزیم‌بری 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 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 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 مهمی 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 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 آنزیم‌بری 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 ۳۰٪-۴۰٪ رخ می‌دهد. افت وزن و چروکیدگی پس از آن در آنزیم‌بری قارچ‌ها عمدتاً 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 آنزیم‌بری، غلظت مانیتول به عنوان نشانگر

افزایش نفوذپذیری و ورود پلی فنل اکسیدازهای 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 حالی که آنزیم بری متداول تغییرات عمده ای در رنگ در مقایسه با قارچ های تازه به وجود نمی آورد (۵).

با مقایسه داده های حاصل از وزن بعد از هواگیری و فشار وارده بر قارچ ها می توان نتیجه گرفت که فشار به افت وزن قارچ ها منجر می شود. اما هواگیری کردن اثر مثبتی بر نگهداری آب بعد از اعمال فشار دارد. بعد از انجام هواگیری روش آنزیم بری تحت روش فشاری که برای غیرفعال کردن پلی فنل اکسیداز کافی باشد، افت آب یکسانی را به وجود می آورد. بنابراین وزن قارچ های هواگیری شده بعد از اعمال فشار بیشتر از قارچ های هواگیری نشده است (۵).

هواگیری کردن از سفتی بافت قارچ ها در مقایسه با قارچ های تازه کمی می کاهد. اما آنزیم بری به وضوح سفتی قارچ ها را کاهش می دهد. بنابراین پس از انجام آنزیم بری هیچ تفاوت معنی داری بین بافت قارچ های هواگیری شده و هواگیری نشده وجود ندارد. ولی قارچ هایی که فشار را تحمل می کنند، نسبت به قارچ های آنزیم بری شده به روش متداول، سفتی بیشتری دارند. پس می توان نتیجه گرفت که فشار در مقایسه با آنزیم بری کمتر باعث افت بافت قارچ می گردد که دلیل آن را می توان 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 ارگانیزمها و آنزیم ها را غیرفعال می کند. بدون اینکه بر مولکول های کوچک مانند مواد مولد طعم و ویتامین ها اثر گذارد و علی رغم اینکه قارچ های مذکور در مقایسه با سبزیجات دیگر نسبتاً گراند، 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 قارچ های دکمه ای A.b آزمایش هایی صورت گرفت. قارچ ها در مقادیر ۵ KGy، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ تحت تشعشع قرار گرفتند و در دماهای مختلف ۴۰C، 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 ۱۰C به مدت ۱۰ روز مانع از باز شدن چتر

اگر قارچ ها قبل از اعمال فشار هواگیری شوند قهوه ای شدن در مقایسه با قارچ های هواگیری نشده از شدت کمتری برخوردار است. چون در حین فرایند 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، قارچ ها را با آب حاوی اسید سیتریک و سولفیت سدیم هواگیری می کنند بنابراین pH پایین، سرعت غیرفعال شدن پلی فنل اکسیداز را در فشار بالا شدت می بخشد و در نتیجه قهوه ای شدن کمتر رخ می دهد (۵).

فشار تأثیر زیادی بر فعالیت پلی فنل اکسیداز دارد. به طوری که در فشار ۶۰۰ مگا پاسکال افزایشی در فعالیت دیده می شود که احتمالاً به علت تغییر شکل آنزیم از حالت نهفته به حالت فعال است. فشار بالاتر به سبب دناتوره کردن آنزیم پلی فنل اکسیداز آن را به طور غیرقابل برگشت غیرفعال می کند. اما حتی در فشار ۹۵۰ مگا پاسکال هنوز فعالیت باقیمانده ای وجود دارد که در این خصوص، بین قارچ های هواگیری شده و هواگیری نشده تفاوت عمده ای وجود ندارد. برای غیرفعال کردن کامل آنزیم پلی فنل اکسیداز اعمال فشار بالاتر در زمانهای طولانی تر و یا درجه حرارت ۵۰-۶۰C ضروری است (۵). فشار تا ۹۵۰ مگا پاسکال برای غیرفعال کردن آنزیم پلی فنل اکسیداز ضروری است و بافتهای قارچ های تحت فشار نسبت به قارچ های آنزیم بری شده به روش متداول، تا حدی بهتر است. اما بازده و غیرفعال شدن آنزیم پلی فنل اکسیداز در هر دو روش یکسان است.

فشار ایزواستاتیک بالا و تأثیر آن بر رنگ، افت وزن و بافت

سفیدی قارچ های تازه زمانی که تحت فشار قرار می گیرند در مقایسه با قارچ های آنزیم بری شده، کاهش می یابد و رنگ قهوه ای می شود. اعمال فشار ۶۰۰ یا ۸۰۰ مگا پاسکال بر قارچ های هواگیری شده، رنگ قهوه ای تیره را به وجود می آورد. ولی در فشار بالاتر یعنی ۹۵۰ مگا پاسکال رنگی ملایم تر اما هنوز قهوه ای شدید به وجود 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 به هر حال به قهوه ای کمرنگ منتهی نمی شود و دیگر اینکه فشار ایزواستاتیک بالا به کریستاله شدن فسفولیپیدها در غشاء و بدنبال آن تخریب غشاء می انجامد 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 کوچیک اسید است و از گلوکاتیون و سیستمین 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. سیستمین از قهوه‌ای شدن آنزیمی که توسط پلی فنل اکسیداز کاتالیز می‌شود، ممانعت می‌کند. اما از اکسیداسیون ترکیبات فنلی توسط پلی فنل اکسیداز ممانعت نمی‌کند. بلکه از پلی مریزاسیون ترکیبات فنلی که به قهوه‌ای شدن می‌انجامد جلوگیری می‌کند. سیستمین با کینون به صورت غیر آنزیمی واکنش می‌دهد تا کانزوگیت‌های 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 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 اسکورات و یا NADH که چرخه مورد نظر را به سمت تشکیل ارتودی فنل بر می‌گرداند، انجام داد. ضمناً می‌توان ارتودی فنل را با

کلاهایک و تخریب خصوصیات بافتی و آنزیمی می‌شود (۱۰) و نتایج بکاربردن ۲ Kgy پر تو دهی گاما در دو سرعت متفاوت ۴/۵ Kgy/h و ۳۲ Kgy/h به منظور افزایش ماندگاری قارچ خوراکی A.b نشان داد که مورد ۴/۵ Kgy/h بیشترین ترکیبات فنلی را نسبت به مورد ۳۲ Kgy/h دارد و کمترین مقدار ترکیبات فنلی در نمونه کنترل است. فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در مورد ۳۲ Kgy/h پایین‌تر است. گرچه میزان ترکیبات فنلی آن بالاتر است. مشاهده دیوار سلولی قارچ توسط میکروسکپ الکترونی نشان دهنده استحکام بهتری در مورد ۴/۵ Kgy/h است. تصور می‌شود که قهوه‌ای شدن مشاهده شده در مورد ۳۲ Kgy/h 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 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 سیستمین احیا کننده قوی‌تری است. به طوری که تشکیل شدن ارتوکینون توسط نیروی احیا کننده سیستمین 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، ارتودی فنل توسط پلی فنل اکسیداز اکسید می‌شود و رادیکالهای 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 ارتودی هیدروکسی فنل احیاء می‌کند و از سوی دیگر رادیکالهای متعلق به 2ME یا دیگر ترکیبات تیولی فوراً با رادیکال ارتودی کینون واکنش داده ترکیباتی مانند HETEC و سیستمینل دوپا را تشکیل می‌دهند. بنابراین قهوه‌ای شدن ناشی از پلی فنل 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)

ارزانتر از سیستمین $HCL +$ یا دی سدیم EDTA است. محلول سدیم اریتورات یک آنتی اکسیدان است و از کاهش ترکیبات فنلی در اثر اکسیداسیون توسط پراکسید هیدرون 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 دهند. 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 $3-4^{\circ}C$ حفظ کردند (۱۴).

نتیجه گیری:

به منظور آنزیم بری صنعتی قارچ ها، میکروویو به عنوان یک روش گرمادهی نتایج امیدوار کننده ای را نشان می دهد ولی عامل محدود کننده این روش، گردان های دمایی تولید شده درون نمونه در حین گرمادهی است. تفاوت در مدت زمان غیرفعال شدن پلی فنل اکسیداز با استفاده از میکروویو (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 میکروویو 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 آنزیم 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 گراند، 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 ارتودی 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 آنزیم یا همان آنزیم بدون مس، غیرفعال است و بعد از افزودن یون مس می تواند فعال شود (۴). حتی می توان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز غیرفعال شده توسط اسید اگزالیک را با افزودن یون مس بازیافت (۱۲). مس با دارا بودن $0.3-0.7$ درصد وزن آنزیم پلی فنل اکسیداز قارچ، تشکیل متالوآنزیم 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) 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 غیرآروماتیک مهارکننده های رقابتی هستند. پلی وینیل پیرولیدون (Polyvinylpyrrolidone) و فنیل هیدرازین جاذب فنل هستند و به عنوان مهارکننده واکنش کاتشولاز (ارتو دی فنلاز) عمل می کند (۴).

سدیم اریتورات به عنوان ممانعت کننده از قهوه ای شدن

ممکن است استفاده از پراکسید هیدرون به عنوان ماده ضد میکروبی در یک سیستم شستشو منجر به تحریک فرایند قهوه ای شدن شود. نتایج نشان داد با افزایش غلظت پراکسید هیدرون از ۳٪ به ۵٪، قهوه ای شدن بیشتر انجام می شود. اما این مشکل با افزودن یک ماده ممانعت کننده از قهوه ای شدن به نام سدیم اریتورات مرتفع می شود. این محلول که شامل ۴٪ سدیم اریتورات و ۱٪ کلرید سدیم است به صورت اسپری به کار برده می شود. به کار بردن سدیم اریتورات/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- Devecé 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, Devecé 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, 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, Devecé 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 extension 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.

8- Vivar-Quintana AM, Gonzalez-San Jose ML,

***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