استفاده از آنزیم پکتیناز در فرایند تولید چای سیاه ایرانی

شیوا روفی‌گری حقیقت[۱*]، کلثوم چراغی[۱] و سیده مهسا دادپور[۲]

۱-پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران.

۲-دانشجوی سابق دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

* **sh354haghighat@gmail.com**

بیان مسئله

چای خشک، عموماً از جوانه‌های لطیف گیاه *Camellia sinensis* که شامل یک غنچه و دو برگ بوده به دست می‌آید.

تغییراتی که در طعم و کیفیت چای ایجاد می‌شود، بستگی به فعل و انفعالاتی دارد که در فرایند تولید برگ چای صورت می‌گیرد. این فرایند شامل مراحل پلاس، مالش، غربال کردن، تخمیر، خشک کردن، درجه‌بندی و بسته‌بندی می‌باشد (مورگسان و همکاران، ۲۰۰۲).

یکی از فرایندهای مهم در تولید چای سیاه، تخمیر بوده که در این بخش، آخرین تغییرات و فعل و انفعالات شیمیایی و بیوشیمیایی رخ می‌دهد. در طی تخمیر، ترکیبات ساده‌ای چون کاتچین‌ها تحت تاثیر آنزیم‌های اکسیداتیو، پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز قرار گرفته و تبدیل به تئافلاوین (TF) و تئاروبیجین (TR) می‌شوند (موتومانی و کومار، ۲۰۰۷). تئافلاوین‌ها تعیین کننده گسی، درخشندگی و کیفیت خوراکی چای و تئاروبیجین، مسؤول رنگ، طعم و غلظت چای می‌باشد (موتومانی و کومار، ۲۰۰۷). یک فرایند تخمیر مطلوب، منجر به ایجاد یک تعادل مناسب بین تئافلاوین و تئاروبیجین می‌گردد (آنگایارکانی و همکاران، ۲۰۰۲).

سرعت تخمیر بستگی به میزان تماس بین آنزیم و ماده پیش‌زمینه‌ی (سوبسترا) مربوطه دارد که هر دو در بافت برگ چای حضور دارند. اما آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز درون سلول‌های اپیدرمی و آوندی قرار دارند، در حالی که کاتچین (ماده پیش‌زمینه) درون سلول‌های احاطه کننده آوندی وجود دارد (موروگسان و همکاران، ۲۰۰۲). لول کردن برگ چای از طریق غلتاندن، سبب می‌شود تا سلول‌ها دچار تخریب جزیی گردند، درنتیجه، فرایند اکسیداسیون در مرحله تخمیر ناقص انجام خواهد شد. در حالی‌که، کاربرد آنزیم‌های خارجی، دیواره سلولی برگ‌های چای را شکسته و منجر به تخریب کامل سلول‌های برگ چای می‌شوند. بنابراین، کاربرد این آنزیم‌ها، سبب بهبود تخمیر توسط واکنش‌گرها می‌شوند (آنگایارکانی و همکاران، ۲۰۰۲).

پکتیناز یکی از مهم‌ترین این آنزیم‌ها بوده که بر پکتین اثر می‌گذارد و به‌طور کلی این گروه آنزیمی شامل پروتوپکتیناز، استراز و دی‌پلیمراز می‌باشد. آنزیم‌های پکتینولیتیکی به‌طور گسترده در گیاهان، حیوانات و قارچ‌ها

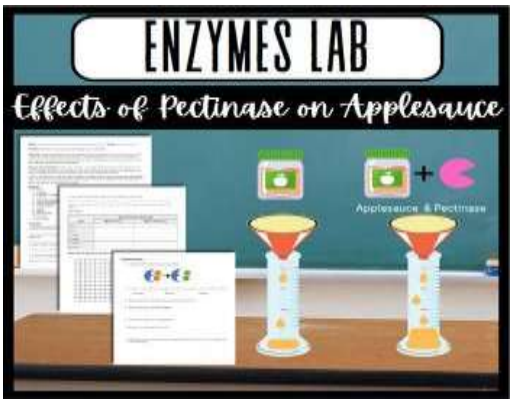
حضور دارند. میزان آنزیم‌های پکتیناز به‌دست آمده از منابع دیگر شامل باکتری‌ها و مخمرها بسیار کم است (جایانی و همکاران، ۲۰۰۵). پکتیناز قارچی، ۲۵ درصد از کل آنزیم‌های تولیدی را در دنیا تشکیل می‌دهد. می‌توان گفت که تقریباً بیش‌تر پکتینازهای تجاری از منابع قارچی به‌دست می‌آیند. میزان اثر بخشی این آنزیم‌ها بسته به این‌که از چه منبعی تهیه شوند متفاوت است (یاداو و همکاران، ۲۰۰۹).

آسپرژیلوس‌ها یکی از مهم‌ترین منابع قارچی بوده که در تولید آنزیم پکتیناز نقش دارند. این جنس شامل بیش از ۱۵۰ گونه مختلف است که در طبیعت به‌طور بسیار وسیعی پراکنده هستند. گونه‌های این قارچ به علت ترشح آنزیم‌های مختلف قادرند روی محیط‌های غذایی مختلف رشد کنند. بسیاری از گونه‌های این جنس از نظر صنعتی دارای اهمیت بوده و در زندگی انسان نقش مهمی را ایفا می‌کنند (مرتضوی، خانی پور و حسینی‌پرور، ۱۳۸۶).

این پژوهش به منظور ارتقای خواص کیفی چای، با افزودن آنزیم‌های میکروبی با منبع قارچی در مرحله تخمیر چای و تعیین نوع و میزان اثر بخشی آن‌ها انجام گرفت.

مواد و روشها

جهت تهیه آنزیم پکتیناز از دو گونه *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* استفاده شد. قارچ‌های مورد نظر به صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچی ایران خریداری شدند. پس از طی مرحله فعال‌سازی قارچ آسپرژیلوس، کشت و تلقیح آن در محیط حاوی ترکیبات پکتین،L –آسپارژین، سولفات منیزیم و دی پتاسیم هیدروژن فسفات، تولید آنزیم به مدت ۶ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت (یاداو و همکاران، ۲۰۰۸). از دو روش سانتریفوژ و جداسازی سه فازی به کمک آمونیم سولفات و t– بوتانل برای استخراج آنزیم استفاده گردید (دنیسون و لورینت، ۱۹۹۷).



فراوری چای در کارخانه تحقیقاتی کاشف، روی برگ سبز چای هیبرید بومی منطقه فشالم انجام شد. نمونه عصاره‌های آنزیمی استخراج شده به همراه آنزیم تجاری پکتیناز و بافر حامل آن، روی برگ زیر غربالی از مالش دور اول، اسپری شد. نسبت ترکیب آنزیم– بافر بر اساس فعالیت آنزیمی تنظیم گردید (آنزیم خام به بافر به نسبت یک به پنج و آنزیم خالص به بافر به نسبت یک به ۲۵ و آنزیم تجاری (۵۰ U) به بافر به نسبت یک به ۱۰۰) پس از اسپری کردن، نمونه چای در اتاق تخمیر با دمای ۲۷ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۰ تا۹۰ درصد قرار گرفت. از شروع مرحله مالش تا پایان تخمیر مدت ۲ ساعت زمان طی شد. عملیات چای‌سازی با فرایند خشک‌کردن در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خاتمه یافت. خصوصیات کیفی چای شامل درصد تئافلاوین، تئاروبیجین، رنگ کل و شفافیت (ماهانتا و باروا، ۱۹۹۲)، درصد کافئین (لاکین، ۱۹۸۹) و خصوصیات حسی (استاندارد ملی ایران،۱۳۸۰) مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها بر اساس طرح کاملا تصادفی با شش تیمار در سه تکرار و با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. تیمارها شامل چهار عصاره آنزیمی از دو گونه آسپرژیلوس (دو عصاره خام و دو عصاره خالص شده نسبی)، یک عصاره آنزیم پکتیناز تجاری و بدون آنزیم (شاهد) بودند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD انجام شد. برای مقایسه بین منابع متفاوت آنزیمی از مقایسات ارتوگونال استفاده گردید.

نتایج و بحث

تئافلاوین که اولین محصول پایدار اکسیداسیون

پلی‌فنل‌ها می‌باشد، با ایجاد رنگ زرد شفاف در شفافیت رنگ نوشابه چای و در نتیجه افزایش شاخص رنگ چای (نسبت تئافلاوین به تئاروبیجین) نقش مهمی دارد و به همین علت تیمارهای آزمایش برای سه صفت تئافلاوین، تئاروبیجین و نسبت تئافلاوین به تئاروبیجین رفتار مشابه نشان داده‌اند. عدم ایجاد اختلاف معنی‌دار بین شاهد و تیمارهای آنزیمی نشان می‌دهد، کاربرد آنزیم در مقدار و نوع مصرف آن در این آزمایش نتوانسته در بهبود خواص نوشابه‌ای چای موثر واقع شود. بررسی میانگین صفات کیفی نشان می‌دهد که دو تیمار نایجر خالص و فلاووس خام همواره مقادیر بالاتری از درصد تئافلاوین، شفافیت، نسبت تئافلاوین به تئاروبیجین و امتیاز حسی داشته‌اند، اما این تفاوت معنی‌دار نبوده است. در شکل ۱ مقدار نسبت در نمونه‌ها مقایسه شده است. در کار مشابهی که توسط محققین روی چای سی‌تی‌سی انجام شده، استفاده از عصاره آنزیمی پکتیناز از منابع قارچی موجب افزایش مقدار تئافلاوین، تئاروبیجین و رنگ کل شده است (آنگاریاکانی و همکاران، ۲۰۰۲). به نظر می‌رسد، عدم تطابق نتایج حاضر با تحقیق فوق به دلیل تفاوت در نوع چای می‌باشد. چون از یک طرف کلون چای مورد استفاده در پژوهش فوق نوع آسام (UPASI-3) بوده که مقدار پلی‌فنل و آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در آن بیشتر از هیبرید چینی است. به همین دلیل زمانی که آنزیم پکتیناز افزوده می‌شود، در شرایط یکسان هیدرولیز آنزیمی می‌تواند مقدار بیشتری آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز را در دسترس سوبسترای بیشتر (پلی‌فنل) در کلون آسام قرار دهد. بنابراین احتمال وقوع اکسیداسیون بیشتر، منجر به ایجاد ترکیبات کیفی بیشتری در نوشابه چای می‌شود. از طرف دیگر در چای ارتدکس شدت مالش کمتر از چای سی‌تی‌سی است. یعنی میزان تخریب دیواره سلولی و پارگی سلول‌ها که نتیجه آن تماس بیشتر سوبسترا و آنزیم می‌باشد در چای سی‌تی‌سی بیشتر از چای ارتدکس است. در دستگاه سی‌تی‌سی برگ‌های سبز پلاس شده به کمک سطوح برش، بریده و ریز می‌شوند. اما در دستگاه‌های مالش ارتدکس برگ‌ها تنها با فشار بر روی یک سطح برجسته پیچیده و لول می‌شوند. بنابراین شدت مالش در این دو سیستم کاملاً متفاوت است و به این ترتیب امکان در دسترس بودن آنزیم و سوبسترا در چای سی‌تی‌سی بیشتر از چای ارتدکس است. نتایج پژوهشی که افزودن آنزیم پکتیناز تجاری را روی هر دو نوع چای سی‌تی‌سی و ارتدکس مورد بررسی قرار داده بود نشان داد در چای کلون چینی SA-6 که مقدار پلی‌فنل و آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در آن به نسبت دو کلون آسام (UPASI-3) و کامبوجی(TRI-2024) به مقدار قابل توجهی کمتر بوده است، خصوصیات کیفی نوشابه چای با افزودن آنزیم در چای سی‌تی‌سی نتیجه بهتری نسبت به چای ارتدکس نشان داده است. در این تحقیق اضافه کردن آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز به چای ارتدکس کلون چینی به‌طور معنی‌داری بر خواص نوشابه‌ای چای موثر بوده است (راویچاندران و پارتیبان، ۱۹۹۸).

نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد آنزیم‌های قارچی تنها در افزایش مقدار کافئین چای موثر بوده است و به‌طور میانگین ۰/۴۹ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داده است (شکل ۲). پکتیناز تجاری نیز بر مقدار کافئین نسبت به عصاره‌های قارچی بی‌تاثیر بوده است و مقدار کافئین در تیمار پکتیناز تجاری تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نشان نداده است. از این نتایج چنین استنباط می‌شود که عصاره‌های استخراج شده از منابع قارچی که دارای ترکیباتی از محصولات میکروارگانیزم‌ها می‌باشند می‌توانند موجب سنتز کافئین در مرحله تخمیر شوند.

تحقیقاتی در زمینه تولید کافئین طبیعی در چای برای افزایش راندمان استخراج انجام شده است و نتایج نشان داده است که اضافه کردن منابع میکروبی به‌خصوص قارچ *Aspergillus niger* به چای و فراهم نمودن شرایط مساعد می‌تواند موجب سنتز کافئین در چای گردد.

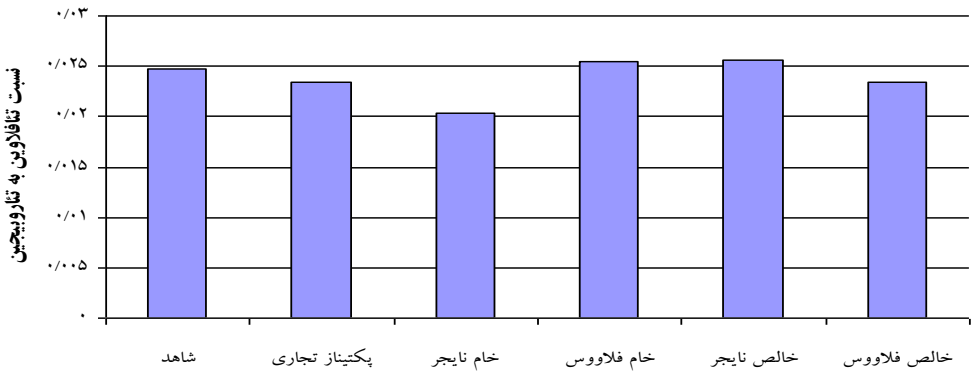
در این تحقیق، مسیر سنتز کافئین از طریق تاثیر عصاره‌های میکروارگانیزم‌ها در متیلاسیون ترکیب متیل گزانتوزین و ایجاد تئوفیلین و سپس کافئین شناخته شده است. این مسیر با روش سنتز کافئین در برگ سبز متفاوت است. در برگ سبز کافئین با متیلاسیون تئوبرومین سنتز می‌گردد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۸).

مقایسه گروهی بین عصاره‌های آنزیمی مورد مطالعه در این پروژه نشان داد، افزودن عصاره آنزیمی خالص شده نسبی منبع قارچی *Aspergillus niger* و عصاره خام منبع قارچی *Aspergillus flavus* به برگ چای در مرحله تخمیر می‌تواند بر افزایش ترکیبات کیفی رنگ چای موثرتر

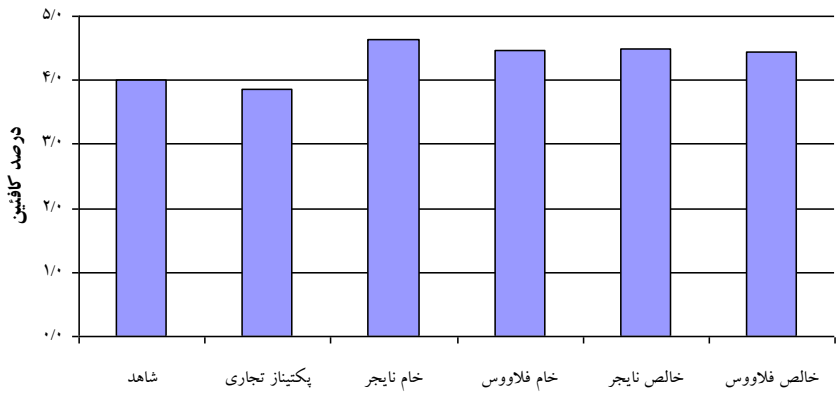
از منابع آنزیمی دیگر در این پروژه باشند. زیرا عصاره خالص آنزیمی قارچ *Aspergillus niger* نسبت به عصاره خالص آنزیمی قارچ *Aspergillus flavus* از فعالیت بیشتری برخوردار بود از طرفی عصاره‌های خام آنزیمی حاوی ترکیبی از آنزیم‌ها مانند سلولاز، همی‌سلولاز، پروتئیناز همراه با پکتیناز است. زمانی که این کمپلکس آنزیمی روی برگ در حال تخمیر اسپری می‌شود همه‌ی ترکیبات پلی‌مریک مانند سلولز، همی سلولز و پکتین هیدرولیز شده و نتیجه آن خروج بیشتر شیره سلولی از برگ در هنگام تخمیر است (آنگاریاکانی و همکاران،۲۰۰۲).

جمع بندی

چای سیاه حاصل اکسیداسیون پلی‌فنل‌های برگ سبز چای، طی فرایند چای‌سازی است. از جمله عوامل افزاینده‌ی این واکنش، افزایش امکان مجاورت بیشتر آنزیم و ماده پیش زمینه است که با اضافه نمودن آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی برگ میسر می‌گردد. پکتینازها در این مهم نقش موثری دارند. بررسی خصوصیات کیفی در چای سیاه نشان داد، کاربرد آنزیم‌های قارچی در افزایش مقدار کافئین چای تا میزان ۰/۴۹ درصد نسبت به شاهد موثر بوده است، درحالی‌که بر افزایش سایر ترکیبات کیفی تاثیر معنی‌داری نداشته است ($p<0/05$). مقایسه عصاره‌های آنزیمی با یکدیگر نشان داد، عصاره خالص از گونه niger Aspergillus تاثیر بیشتری بر افزایش تئافلاوین، شفافیت و نسبت تئافلاوین به تئاروبیجین دارد. درحالی‌که، عصاره خام Aspergillus flavus بر روی دو صفت تئاروبیجین و شفافیت نتیجه بهتری از خود نشان داد.



شکل ۱- نسبت تئافلاوین به تئاروبیجین در نمونه‌های آزمایشی



شکل۲- درصد کافئین در نمونه‌های آزمایشی

تشکر و قدردانی

در اینجا جا دارد نویسندگان از تمامی همکاران که در اجرای پروژه تحقیقاتی همکاری داشتند تشکر و قدردانی نمایند.

پیام ترویجی

کافئین یکی از اجزای مهم چای است که در خصوصیات چشایی چای نقش مهمی دارد و به عنوان یک پارامتر مهم برای ارزیابی تجاری چای تلقی می‌شود. بر اساس نتایج این تحقیق، کاربرد آنزیم‌های قارچی در فرآیند تولید چای سیاه به منظور افزایش مقدار کافئین چای سیاه و برخی ویژگی‌های کیفی قابل توصیه است.

فهرست منابع

مرتضوی، ع.، خانی‌پور، الف. و حسینی‌پرور، ه. (۱۳۸۶). اطلس میکروبیولوژی مواد غذایی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (۱۳۸۰). روش تهیه نوشابه برای ارزیابی چشایی. شماره ۵۶۰۸.

Angayarkanni, J., Palaniswami, M., Murugesan, S. and Swaminathan, K. (2002). Improvement of tea leaves fermentation with *Aspergillus spp.* pectinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(4): 299-303.

Dennison, C. and R. Lovrient. (1997). Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expression and Purification*. 11(2):149-161.

Jayani, R. S., Saxena, S. and Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40(9): 2931-2944.

Lakin, A. (1989). Food Analysis. Practical Handout. Reading University, UK.

Mahanta, P. and S. Barouah. (1992). Changes in pigments and phenolics and their relationship with black tea quality. *J. Sci. Food Agric.*, 59:21-26.

Murugesan, G. S., Angayarkanni J. and Swaminathan, K. (2002). Effect of tea fungal enzymes on the quality of black tea. *Food Chemistry*, 79: 411-17.

Muthumani, T. and Kumar, R. S. S. (2007). Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea. *Food Chemistry*, 101(1): 98-102.

Ravichandran, R. and Parthiban, R. (1998). Changes in enzyme activities (polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase) with type of tea leaf and during black tea manufacture and the effect of enzyme supplementation of dhool on black tea quality. *Food Chemistry*, 62(3): 277-281.

Wang, X., Hu, S., Wan, X. and Pan, C. (2008). Study on the increase mechanism of the caffeine content during the fermentation of tea with microorganisms. *Journal of Food Chemistry*, 107(3): 1086-1091.

Yadav, S., P. Kumar Yadav, D. Yadav and K. D. Singh Yadav. (2008). Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. *Process Biochemistry*, 43(5): 547-552.

Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D. and Singh Yadav, K. D. (2009). Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry*, 44(1): 1-10