بررسی فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در فرآیند تولید چای سیاه

شیوا روفی‌گری حقیقت[۱*]، و شهرزاد شایگان[۲]

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

۲- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گیلان؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

***sh354haghighat@gmail.com**

بیان مساله

آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در فرآیند تخمیر در طول چایسازی نقش مهمی ایفا می‌کند. تئافلاوین که در کیفیت چای سیاه، بسیار اهمیت دارد؛ با اکسیداسیون فلاوانولها به کمک این آنزیم به دست می‌آید. پلی‌فنل‌اکسیداز با ساختار مس پروتئین در سلول‌های نردبانی اپیدرم برگ سبز چای جا دارد. میزان فعالیت این آنزیم در کلونهای مختلف چای و قسمتهای مختلف سرشاخه بسیار متفاوت است و فعالیت آن طی مراحل چایسازی تغییر می‌کند. بیشترین میزان فعالیت در مرحله تخمیر با اکسیداسیون می‌باشد که با اعمال حرارت در مرحله خشک متوقف می‌شود. اضافه کردن آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در مرحله تولید، باعث بهبود کیفیت چای سیاه می‌شود.

سرشاخه‌های لطیف گیاه چای Camellia sinensis برای چایسازی چیده می‌شوند و با بهره گیری از روش‌های فرآوری تولید چای سیاه مورد مصرف قرار می‌گیرند.

بازارپسندی و ارزش چای به ظاهر چای خشک و خصوصیات نوشابه آن بستگی زیادی دارد. شفافیت، کرم‌دار بودن، مایه‌داری و قابض بودن نوشابه چای در ارزیابی کیفیت آن نقش مهمی دارد. وجود آنزیم‌های درون برگ سبز برای به دست آوردن این خصوصیات کیفی، لازم و ضروری است. تخریب سلولهای برگ در اثر مالش و برش، باعث آزاد شدن آنزیمهای اکسیدوردکتاز مثل پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز می‌شود. آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نقش کلیدی در فرآیند تخمیر در طول عملیات چایسازی دارد و مرحله تخمیر نیز بین مراحل چایسازی، از نظر ایجاد خصوصیات کیفی بسیار حائز اهمیت است. در این فرآیند، پس از آسیب مکانیکی برگ سبز چای عملیات اکسیداسیون و هیدرولیز در حضور جریان هوای ملایم انجام می‌شود. رنگ و گسی مطبوع چای حاصل اکسیداسیون و پلی‌مریزاسیون کاتچینها در حضور آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در این مرحله می‌باشد؛ که منجر به ایجاد تئافلاوین و تئاروبیجین می‌گردد. این ترکیبات علاوه بر این که به تشکیل کرم چای (tea cream) کمک می‌کنند، در ایجاد شفافیت، رنگ و طعم قابض چای نقش مهمی دارند.

کرم چای، رسوب غیر محلولی است که پس از سرد شدن نوشابه چای ظاهر می‌شود. این پدیده در ارتباط با ارزیابی کیفی چای حائز اهمیت است. میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در کلونهای مختلف قسمت‌های مختلف شاخساره و مراحل چایسازی تفاوت دارد و برای تولید چای مطلوب در نظر گرفتن این متغیرها لازم و ضروری است (Halder et al., ۱۹۹۸). در این مقاله سعی شده تا برخی عوامل اثرگذار بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز مورد بررسی قرار گیرد.

آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز

ابتدا تصور می‌شد که آنزیم پراکسیداز باعث اکسیداسیون فلاوانولهای چای می‌شود؛ اما عدم وجود ارتباط بین سرعت تخمیر و فعالیت پراکسیداز توجه محققان را به سوی آنزیم‌های اکسید کننده دیگر مثل پلی‌فنل‌اکسیداز با ساختار پروتئین – مس معطوف نمود تا در سال ۱۹۶۶ برای اولین بار، «بندال» و «جرجوری» آنزیم‌های حاوی مس حلال و با

وزن مولکولی حدود ۱۴۴ هزار دالتون جداسازی و خالص سازی نمودند. این آنزیم، ۰/۳۲ درصد مس دارد و به عنوان یک آنزیم ارتودی‌فنل اکسیژن ردکتاز دسته‌بندی می‌شود. این آنزیم، پیروگالل و کتکول را به سرعت اکسیده و به ارتوکوئینون مربوط به خودشان تبدیل می‌کند. فلاوانولها و استرگالوئیل آنها سوبسترای طبیعی پلی‌فنل‌اکسیداز چای هستند. پلی‌فنل‌اکسیداز در سلولهای نردبانی اپیدرم برگ جای گرفته است. اپیدرم‌های بالایی و پایینی برگهای جوان حاوی آنزیم هستند. در حالی که در برگهای پیر آنزیم تنها در اپیدرم پایینی وجود دارد (Willson and Clifford, 1992).

فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در برگ سبز چای

میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در کلونهای مختلف با یکدیگر متفاوت است. این مقدار، برای برخی کلونها بین ۱۴ تا ۴۶ واحد متغیر بوده است. شرایط آب و هوایی در طول سال نیز روی فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز تأثیر گذار است. در دسترس بودن آب با فعالیت آنزیم ارتباط مثبت دارد (Ravichandran and Parthiban, 1998). میزان فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز با درجه رسیدگی برگ سبز چای در ارتباط است. در برگهای جوان علاوه بر ترکیبات مهم در کیفیت

چای از قبیل پلی‌فنلها اسیدهای آمینه و کافئین، فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز نیز بیشتر از برگهای پیر گزارش شده است که مستقیماً با خصوصیات کیفی چای سیاه در ارتباط است (Wickremasinghe and Perera, 1973). در جدول ۱ تغییرات فعالیت این آنزیم با میزان رسیدگی برگ و ارزشیابی حسی چای نشان داده شده است. کاهش فعالیت آنزیم با افزایش رسیدگی برگ کاملاً مشهود است. امتیاز چشایی با تردی سرشاخه بیشتر می‌شود؛ بنابراین، برگ‌چینی استاندارد دلیل محکمی بر کیفیت و افزایش قیمت چای است. فواصل برداشت و هرس نیز روی فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در برگ سبز تأثیر گذارند. در بوته‌های تازه هرس شده، فعالیت پلی‌فنل‌اکسید از زیاد می‌شود و با گذشتن زمان این فعالیت به تدریج کاهش می‌یابد.

جدول ۱- تغییرات فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز و امتیاز ارزیابی حسی با قسمتهای مختلف شاخساره

نوع شاخساره	فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز	امتیاز حسی
یک غنچه و یک برگ	۳۹	٤١
برگ دوم	۳۴	۳٦
برگ سوم	۳۱	۳۲
برگ چهارم	۲۹	۲٦
ساقه	۹	-

فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در مراحل چایسازی

پلاس: اصولاً کاهش رطوبت در مرحله پلاس باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. هر چه پلاس، شدیدتر اعمال گردد، کاهش فعالیت آنزیم بیشتر است که با رطوبت دهی مجدد در مراحل بعد دوباره فعالیت افزایش می‌یابد (Ravichandran and Parthiban, 1998). میزان فعالیت آنزیم به نوع سیستم پلاس نیز بستگی دارد. فعالیت آنزیم در برگهای پلاس شده در سیستم‌های بدون پوشش اعم از پلاس طبیعی یا پلاس در تراف بدون پوشش، کاهش می‌یابد و اگر دما به ۳۵ درجه سانتی گراد در چنین شرایطی برسد آنزیم غیر فعال می‌شود. در حالی که فعالیت آنزیم در برگ سبز پلاس شده در تراف پوشیده و یا در شرایط مرطوب افزایش می‌یابد. نگهداری برگ در اتمسفر با حضور نیتروژن خنثی و کلرید کلسیم برای خشک کردن هوا، موجب پایدار ماندن آنزیم شده و در انجام به موقع مرحله تخمیر کمک می‌کند. دلیل اینکه چای به دست آمده از چایسازی در محیط حاوی نیتروژن، عطر و طعم چای سیاه را ندارد، فعالیت ضعیف آنزیم در این شرایط است (Kr.Mahanta et al., 1993).

مالش: با شروع این مرحله و تخریب و پارگی سلول‌های برگ سبز چای فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز افزایش می‌یابد میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز را طی این مرحله می‌توان با استفاده از روش‌های اندازه‌گیری جذب اکسیژن در زمان مالش تعیین نمود. آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز با جذب اکسیژن در چای، پلی‌فنل‌ها را به کوئینون تبدیل و با احیا دو اتم اکسیژن تولید آب می‌کنند. در سیستم CTC جذب اکسیژن سریع تر از سیستم روتوروان و ارتدکس است. در سیستم روتوروان برگها از استوانه‌ای که سطح داخلی آن پره‌دار است و یک مارپیچ گردان در وسط آن می‌چرخد عبور داده می‌شوند. در هر دو نوع CTC و روتوروان میزان جذب اکسیژن بیشتر از مالش ارتدکس است یا به عبارتی واکنش اکسیداسیون سریعتر و زودتر اتفاق افتاده است. علت این است که در مالش ارتدکس آسیب سلولی کمتر از CTC می‌باشد در حالی که برش و پارگی در CTC باعث آزاد شدن بیشتر اجزای سلول برگ و آنزیم پلی‌فنل‌اکسید از محلول می‌شود که واکنشهای اولیه تخمیر صورت می‌گیرد (Kr.Mahanta and Kr.Baruah, 1992).

تخمیر (اکسیداسیون): در ابتدای این مرحله با فراهم بودن شرایط اعم از جریان هوا، رطوبت، دما و ماده اولیه در دسترس بودن میزان فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز افزایش می‌یابد. در این مرحله تعیین زمان اکسیداسیون بسیار اهمیت دارد. طولانی شدن اکسیداسیون باعث افت کیفیت چای، بی مزگی و تیرگی می‌شود. زمان تخمیر بهینه برای برگ کم پلاس تا برگ کاملاً پلاسیده و نوع مالش متفاوت است. این زمان برای چای CTC تا نصف مدت زمان تخمیر چای ارتدکس کاهش می‌یابد که علت آن آسیب دیدن بیشتر سلول برگ و در دسترس بودن بیشتر مواد اولیه برای عمل آنزیم می‌باشد (Kr.Mahanta and Kr.Baruah, 1992). طبق گزارش‌ها انجام عملیات چایسازی در مرحله مالش و تخمیر در pH پائین باعث تولید چای سیاه با مقادیر بیشتری از تئافلاوین که عامل مهمی در خصوصیات کیفی چای است می‌شود. محققان علت آن را حضور آنزیم پراکسیداز در کنار آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز می‌دانند. به این ترتیب در pH برابر با ۵/۵ (pH برگ مالش خورده) که بهترین pH برای فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز است با اکسید شدن کاتچین‌ها آب اکسیژنه (H_2O_2) ایجاد می‌گردد. از طرفی آنزیم پراکسیداز در حضور آب اکسیژنه تئافلاوین را اکسید می‌کند و به رنگدانه دیگر چای (تئاروبیجین) تبدیل می‌نمایید. بنابر این افزایش تئافلاوین در pH پائین (۴/۵) به علت کمتر بودن میزان آب اکسیژنه، کاهش فعالیت پراکسیداز و در نتیجه کاهش تبدیل تئافلاوین به تئاروبیجین می‌باشد (Subramanian et al., 1999). گزارش شده است اضافه کردن پوست لیمو به عنوان یک افزودنی متداول در هنگام مالش چای به دستگاه CTC و سپس گذراندن مرحله تخمیر با آن باعث افزایش نسبت فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز به پراکسیداز شده که منجر به ایجاد تئافلاوین بیشتر در چای می‌شود (Kr.Mahanta and Kr.Baruah, 1992).

خشک کردن: وقتی زمان تخمیر کامل شد رطوبت برگ با عملیات خشک تا سه درصد کاهش می‌یابد. در ابتدای مرحله خشک به خاطر افزایش ناگهانی دما میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز زیاد می‌شود و در این زمان برخی از ترکیبات فنلی با پایداری کمتر توسط آنزیم به تئاروبیجین تبدیل می‌شوند و در دماهای بالاتر به طور غیر آنزیمی این تبدیل صورت می‌گیرد. تغییر ماهیت آنزیم به خاطر حرارت بالا (حدود ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد) باعث توقف فعالیت آن

می‌شود. البته گزارش شده که فعال ماندن پلی‌فنل‌اکسیداز در چای خشک شده و نگهداری شده در انبار باعث تخریب کیفیت آن می‌شود. بنابراین فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز در تمام مراحل تولید، ارتباط مستقیمی با کیفیت محصول و قیمت آن دارد (Ravichandran and Parthiban 1998).

اضافه کردن آنزیم

تحقیقات نشان داده است که فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز را می‌توان با راههای مختلفی از قبیل قرار دادن برگ سبز در مقابل نور قرمز استفاده از مس در خاک و اتیلن در ریشه افزایش داد، اما افزایش پلی‌فنل‌اکسیداز به برگ در حال تخمیر به وضوح افزایش کیفیت را نشان می‌دهد. به طوری که اضافه کردن ۰/۱ درصد پلی‌فنل‌اکسیداز از منشاء میکروبی در این مرحله، علاوه بر کاهش زمان تخمیر باعث بهبود رنگ نوشابه چای به خصوص تئافلاوین و تئاروبیجین شده است (Kato et al 1987). اثر افزودن پلی‌فنل‌اکسیداز در آغاز مرحله تخمیر روی شاخصهای کیفی چای سیاه CTC و ارتدکس در جدول ۲ آورده شده است. افزایش پیگمانهای رنگی تئافلاوین و تئاروبیجین، شاخص رنگ کل، مواد جامد محلول در آب (عصاره آبی)، شاخص کرم و امتیازات ارزیابی حسی در مورد هر دو نوع چای CTC و ارتدکس پس از اضافه کردن آنزیم کاملاً مشهود است. در این میان عطر تغییری نمی‌کند ولی در نهایت ارزش چای سیاه افزایش می‌یابد (Ravichandran and Parthiban, 1998). ترکیبات پکتینی در زمان دم آوردن چای ممکن است باعث محدود شدن فرآیند دم آوری شوند. افزودن آنزیمهای پکتیناز و سلولاز همراه آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در شروع مرحله تخمیر باعث افزایش سرعت دم آوردن می‌شود و نوشابه‌ای با رنگ، درصد مواد جامد محلول و امتیاز حسی بهتری ایجاد می‌کند. بنابراین افزودن توام این آنزیمها کیفیت و قیمت را افزایش می‌دهد گرچه عمل آنها متفاوت است. در واقع آنزیمهای پکتیناز و سلولاز به آزاد سازی بهتر ترکیبات موجود در سلولهای برگ کمک می‌کنند (Ravichandran and Parthiban, 1998).

جدول ۲- اثر اضافه کردن آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در کیفیت چای

عوامل کیفی	چای سی تی سی		چای ارتدکس
	شاهد	تیمار	شاهد	تیمار
خصوصیات شیمیایی:				
تئافلاوین	۰/۹	۱/۲	۰/۸	۱/۳
تئاروبیجین	۹/۷	۱۰/۳	۸/۵	۱۰/
ترکیبات پلی‌فنلی	۶/۷	۸/۰	۶/۰	۷/۷
کافئین	۳/۳	۳/۳	۳/۴	۳/۳
شاخص رنگ	۵/۲	۶/۶	۵/۵	۷/۳
شاخص گسی	۲۱/۴	۲۶/۷	۱۹/۰	۲۸/۳
کل رنگ نوشابه	۲/۹	۳/۱	۲/۶	۲/۸
مواد جامد محلول	۳۷/۳	۴۳/۴	۳۵/۱	۴۰/۳
تعداد فنجان چای در واحد مشخص	۲۴۷	۲۶۴	۲۲۸	۲۴۴
شاخص کرم	۷/۸	۹/۹	۶/۹	۸/۲
شاخص عطر و طعم	۱/۴	۱/۵	۱/۷	۱/۸
ویژگی‌های حسی:				
بافت	۵/۰	۵/۰	۴/۵	۴/۵
گسی	۴/۵	۵/۵	۵/۰	۵/۵
کیفیت	۴/۰	۴/۵	۵/۰	۵/۵
شفافیت	۴/۰	۵/۰	۴/۵	۵/۵
عطر	۲/۵	۳/۰	۳/۵	۴/۰

پیام ترویجی

یکی از مهمترین عوامل تشکیل عطر، رنگ و طعم مطلوب در چای سیاه واکنشی است که در مرحله اکسیداسیون در فرایند چایسازی رخ می‌دهد. کلید اصلی تسریع و تشدید این واکنش، آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز است که در برگ‌های جوان و در شرایط مناسب حمل برگ به بیشترین میزان فعال باقی می‌ماند. دمای متعادل پلاس، جریان هوای ملایم و مرطوب مالش و اکسیداسیون به فعالیت هرچه بیشتر این آنزیم و داشتن محصولی با کیفیت کمک می‌کند.

فهرست منابع منتخب

Halder, J., Tamuli, P, and Bhaduri, A. N. (1998). Isolation and characterization of polyphenol oxidase from Indian tea leaf (Camellia sinensis). J. Nutr. Biochem., 9 (February):75-80.

Kato, M., Okamoto, J., Omori, M., Obata, Y. and Saijo, R. (1987). Effect of microbial polyphenol oxidase on the colour of black tea infusions. J. Agric. Chem. Soc. Japan, 61(5):599-601.

Kr. Mahanta, P. and Kr.Baruah, H. (1992). Theaflavin pigment formation and polyphenol oxidase activity as criteria of fermentation in Orthodox and CTC teas. J. Agric. Food Chem. 40(5):860-863,

Kr.Mahanta, P. Boruah, S. K., Boruah.H. K. and Kalita, J. N.(1993), Changes of polyphenol oxidase and peruxidase activities and pigment composition of some manufactured black teas (Camellia sinensis L.). 3.Agric Food Chem. 41(2):272-276.

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

Subramanian, N., Venkatesh, P., Ganguli, S., and Sinkar, V. P.(1999). Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. J. Agric. Food Chem. 47(7):2571-2578.

Wickremasinghe, R. L and Perera, K.P.W.C. (1973). Factors affecting quality, strength and colour of black tea liquors. J. National Sci. Council of Sri Lanka. 1(2):111-121.

Willson, K. C., and Clifford, M. N.(1992). Tea Cultivation to Consumption. Chapman and Hall London. 768p.