

Browning

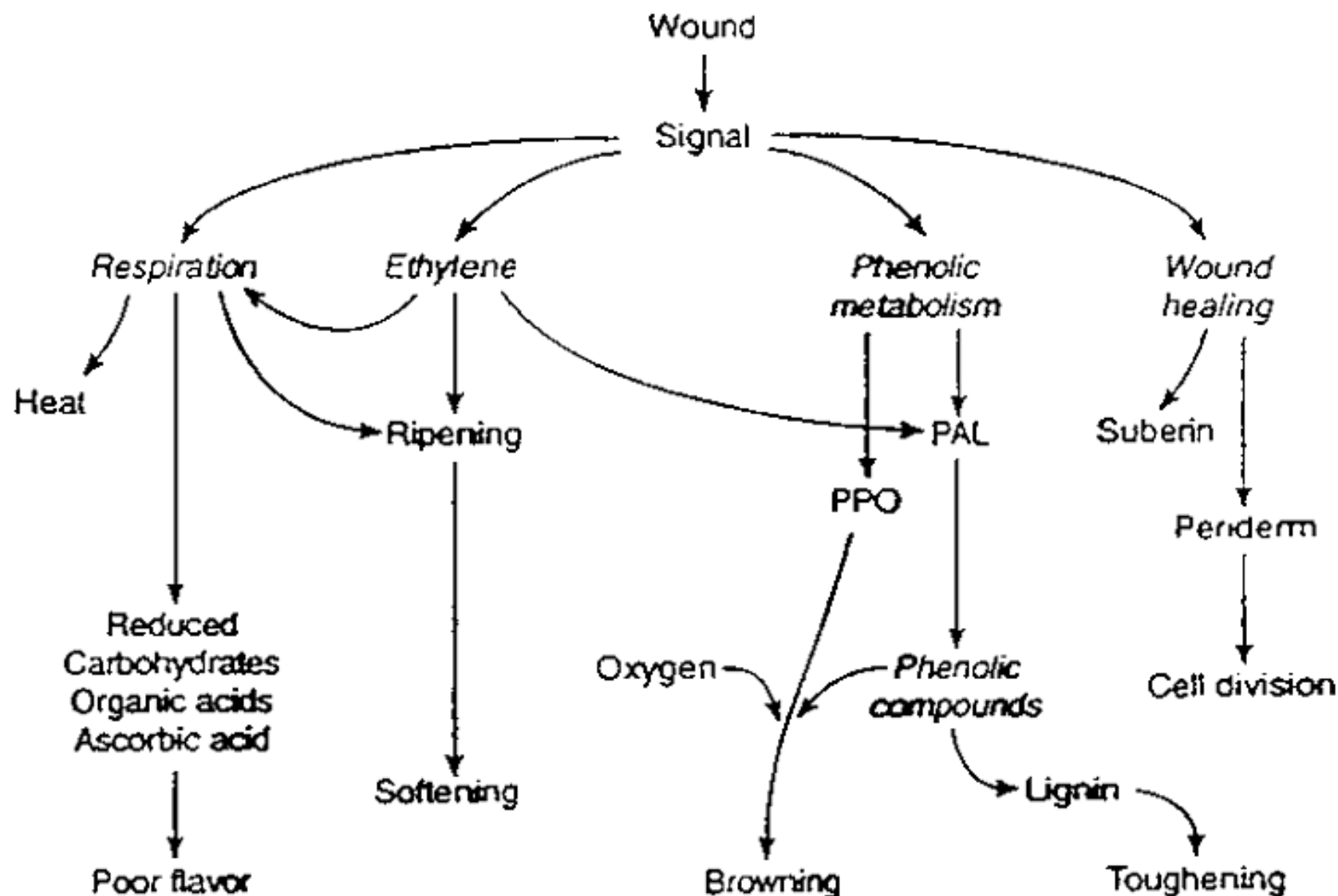


Figure 1 The interrelationship among the many effects of wounding on physiological processes in fresh-cut vegetables. (From Saltveit, 1997.)

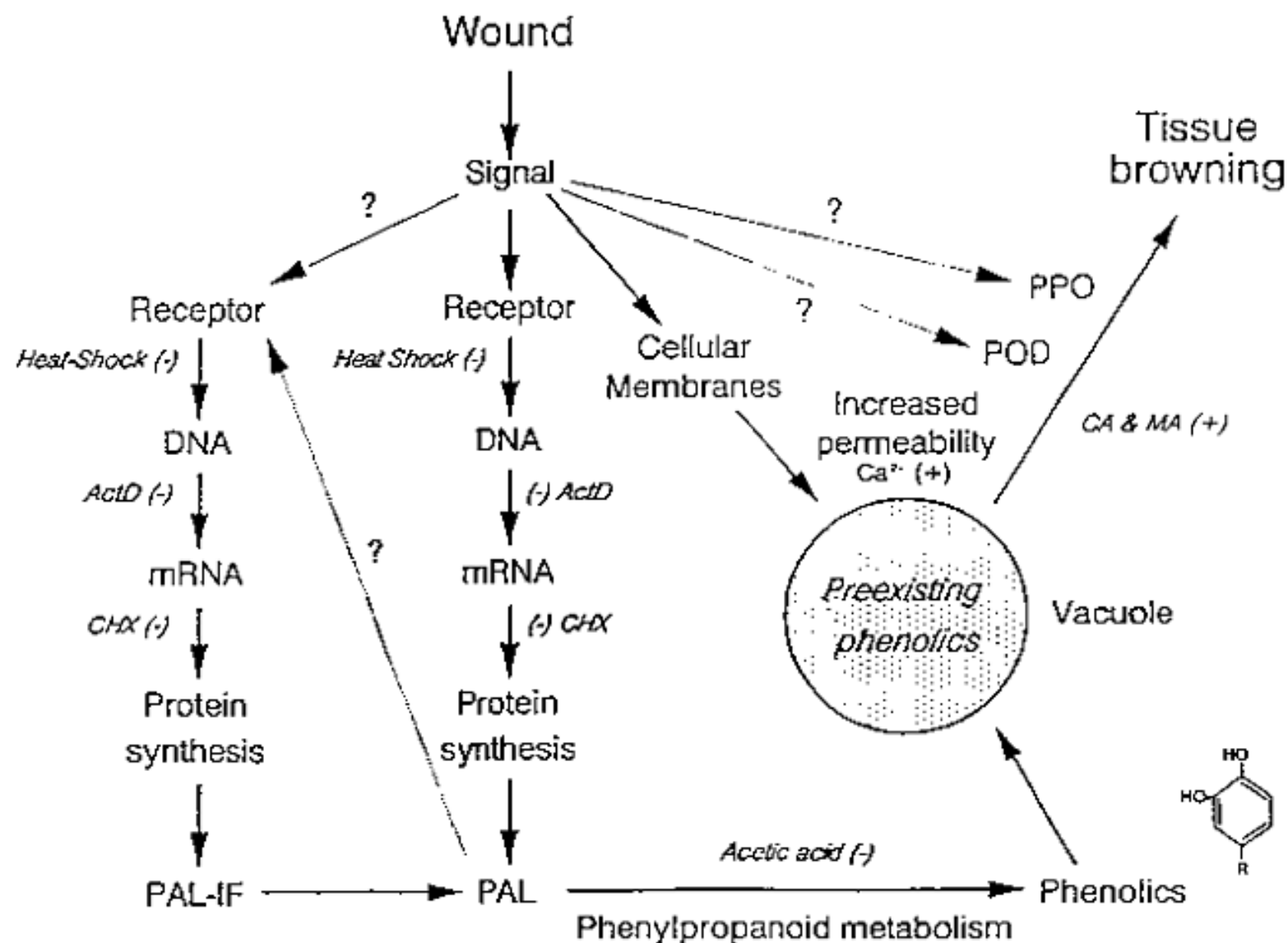
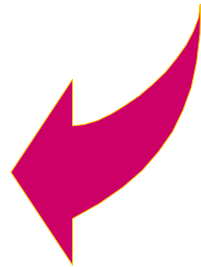


Figure 9 Diagram showing the interrelationships between a wound and the subsequent induced changes in phenolic metabolism that leads to tissue browning. Many control points for postharvest modification of the wound-induced browning processes are evident. The question marks indicate relationships that are still under investigation.

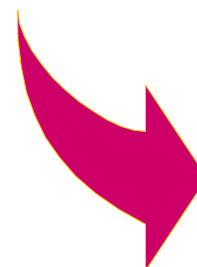
Browning

قهوه‌ای شدن



غیر آنزیمی

Maillard Reaction



آنزیمی

Enzymatic Browning

قهوه‌ای شدن غیرآنزیمی:

الف) کاراملیزاسیون یا پیرولیز قندهای موجود در محصولات در اثر حرارت بالا، که باعث بروز رنگ قهوه‌ای در محصولات می‌شود و ترکیب رنگی حاصله همان کارامل شناخته شده می‌باشد که در صنایع غذایی به عنوان رنگ‌دهنده کاربرد دارد.

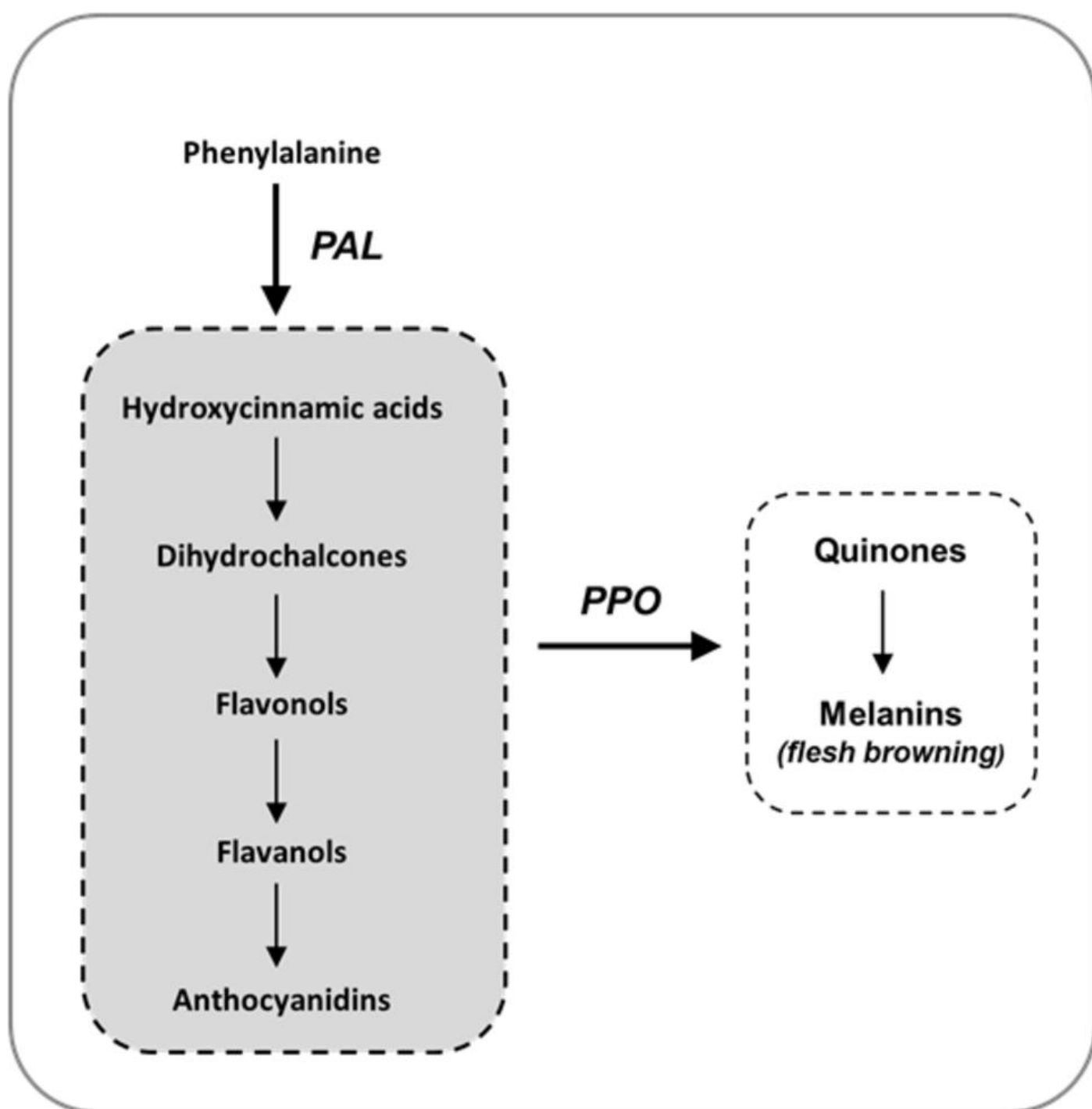
ب) نوع دوم واکنش قهوه‌ای شدن غیرآنزیمی ناشی از تجزیه گرمایی اسید آسکوربیک موجود در محصولات می‌باشد که می‌تواند در حضور هوا و یا شرایط بی‌هوازی رخ بدهد. وقوع این واکنش باعث تخریب کامل این ویتامین ضروری می‌گردد.

ج) نوع سوم و مهم‌ترین نوع واکنش قهوه‌ای شدن غیرآنزیمی واکنش میلارد (نام کاشف فرانسوی واکنش) می‌باشد. این واکنش در طیف وسیعی از مواد غذایی مانند انواع نان و بیسکویت، کیک‌ها، مغزها و گوشت‌ها رخ می‌دهد و فرآورده‌های ناشی از آن وارد رژیم غذایی روزانه افراد جامعه می‌شود. از زمان کشف واکنش قهوه‌ای شدن در سال ۱۹۱۲ توسط میلارد، دانشمندان علوم غذایی بر روی مکانیسم‌های قهوه‌ای شدن، اثرات آن بر خواص ارگانولپتیکی، ظاهری، شیمیایی و صنعتی غذاها تحقیقات بسیاری را انجام داده‌اند، ولی اثرات آنها در تغذیه و سلامت انسان کمتر مورد توجه بوده است. قهوه‌ای شدن غیرآنزیمی یا واکنش میلارد در علم غذا بسیار مهم می‌باشد و نتیجه آن می‌تواند مطلوب یا نامطلوب باشد. این واکنش بیشتر میان پروتئین‌ها و قندهای احیاکننده موجود در محصولات انجام می‌گیرد و در نهایت به ایجاد ترکیبات رنگی و برخی مواد طعم‌زا در ماده غذایی منتهی می‌گردد.

قهوه‌ای شدن آنزیمی:

واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی، در محصولاتِ چون زردآلو، سیب، هلو، گلابی، موز، انگور و سبزی‌هایی مانند سیب‌زمینی، قارچ، کاهو و فراورده‌های دریایی مانند میگو رخ می‌دهد. ایجاد برش و پوست‌کندن و یا آسیب‌دیدگی و له‌شدگی این محصولات باعث آزاد شدن آنزیم پلی‌فنل اکسیداز موجود در بافت آنها می‌شود، این آنزیم در حضور اکسیژن باعث اکسیده شدن ترکیبات منوفنلی محصولات نامبرده و ایجاد ترکیبات جدیدی به نام کینون‌ها می‌شود. کینون‌ها در نهایت باعث تولید پیگمان‌های رنگی قهوه‌ای یا قرمز یا رنگی شدن محصولات می‌گردند.

یکی از راه‌های جلوگیری از بروز قهوه‌ای شدن آنزیمی در میوه‌جات و سبزیجات جلوگیری از تماس اکسیژن با بافت آسیب دیده می‌باشد. برای مثال قرار دادن سیب‌زمینی پوست‌کنده در داخل آب، همچنین قرار دادن میوه و سبزی در یخچال هم از بروز این واکنش جلوگیری می‌کند. در صنعت هم از روش‌های مختلفی برای جلوگیری از این واکنش استفاده می‌شود. مانند غیرفعال کردن آنزیم یا جلوگیری از تماس اکسیژن با محصول. البته وقوع این واکنش در تهیه محصولاتِ چون چای، قهوه و کاکائو مفید و مطلوب می‌باشد، زیرا رنگ، عطر و طعم مطلوب برای فراورده ایجاد می‌نماید.



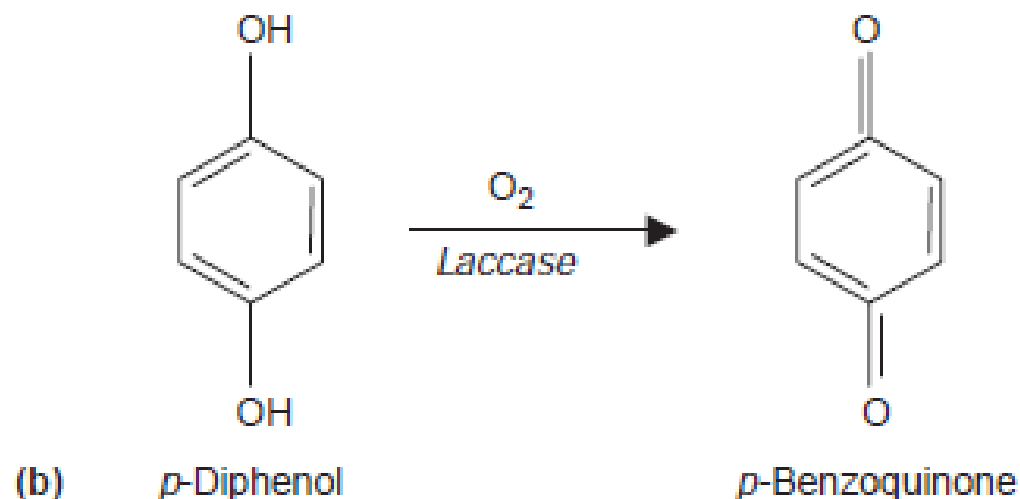
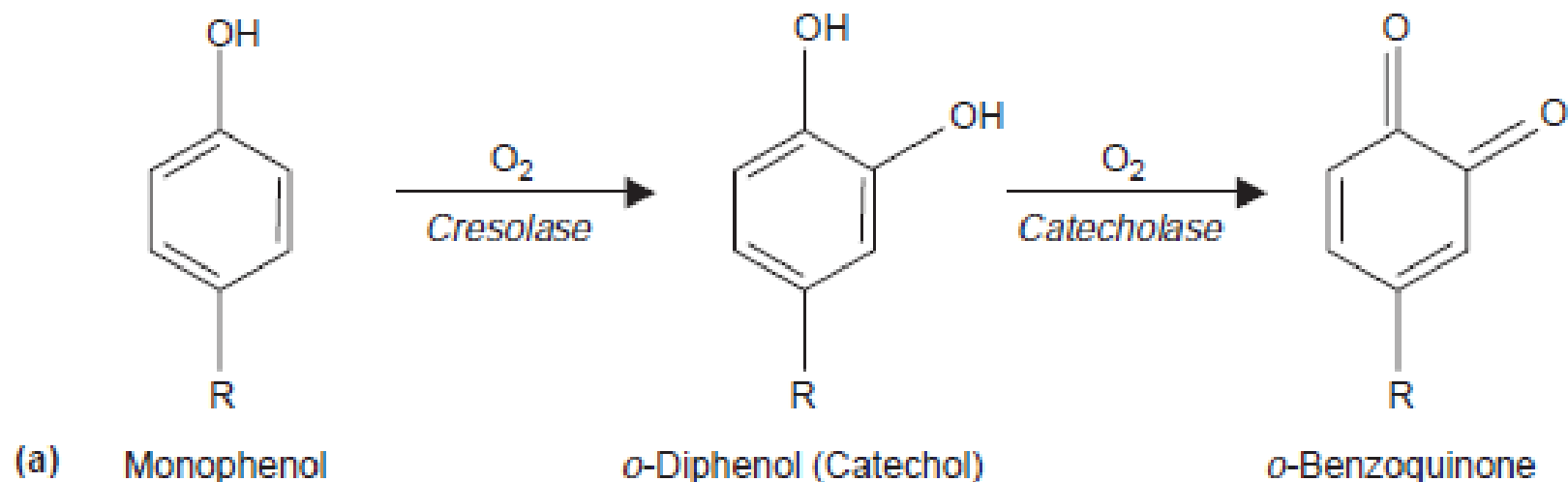
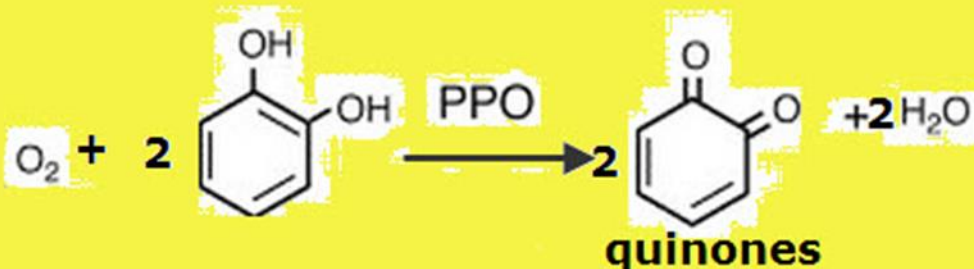


Fig. 12.6 Polyphenol oxidation reactions catalyzed by polyphenol oxidase (PPO): (a) monophenol oxidation pathway catalyzed by cresolase and *o*-diphenol oxidase (catecholase); and (b) *p*-diphenol oxidation catalyzed by *p*-diphenol oxidase (laccase). (Adapted from Marshall et al., 2000.)

aerobic oxidation of a monohydroxy phenol by PPO



aerobic oxidation of a dihydroxy phenol by PPO



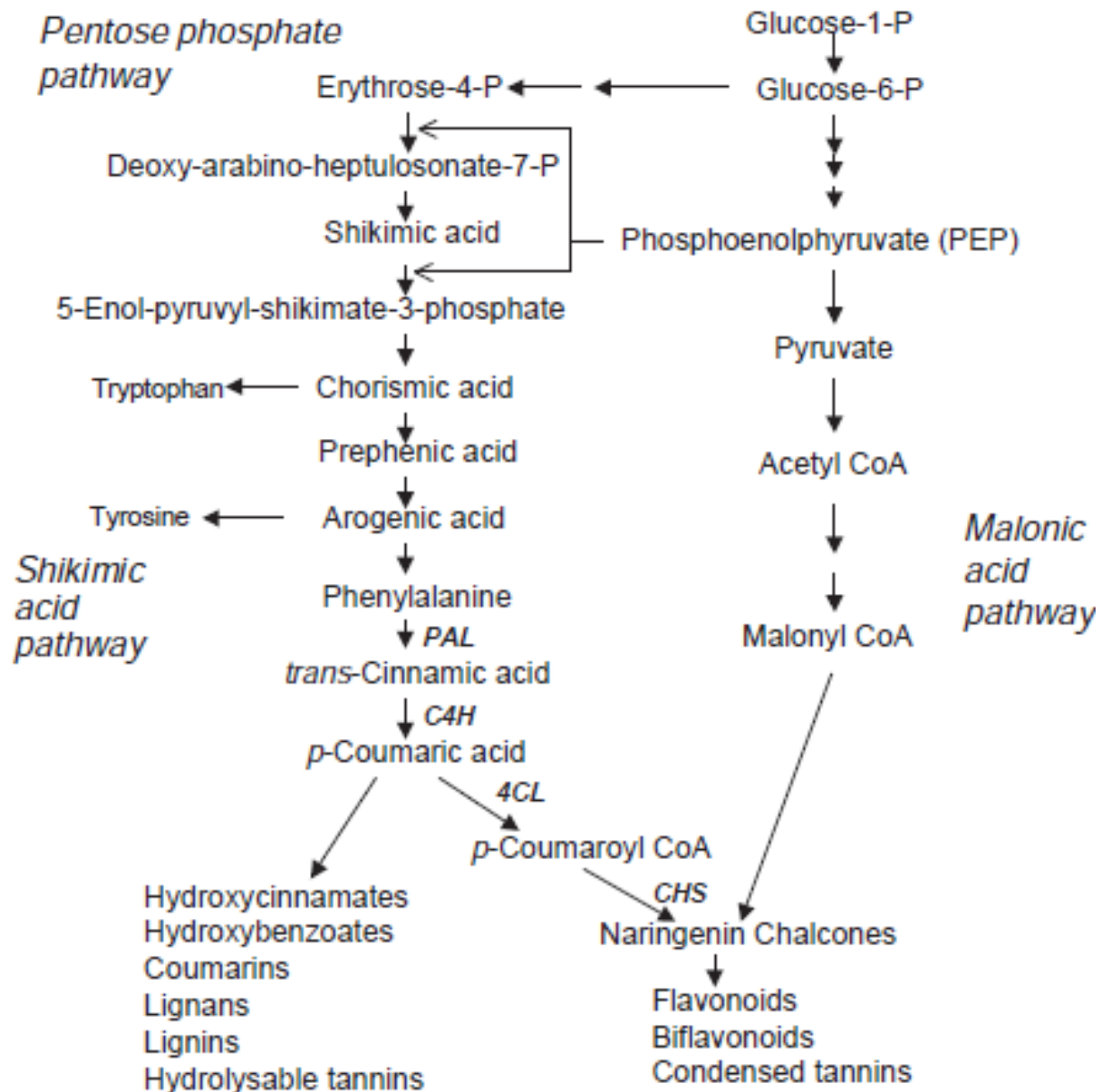


Fig. 12.2 Biosynthetic pathways of major polyphenolic groups present in fruits. Indicated enzymes are as follows: PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-hydroxycinnamoyl CoA ligase; CHS, chalcone synthase.

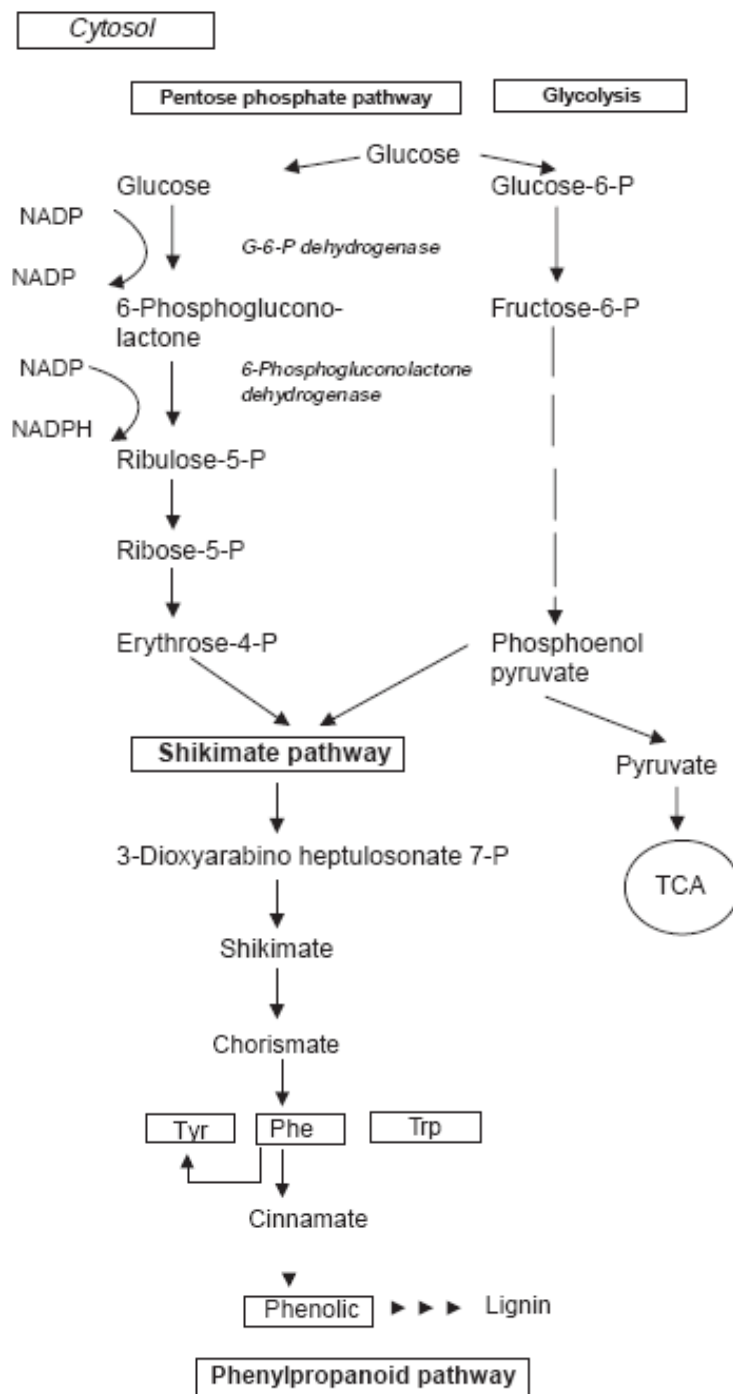
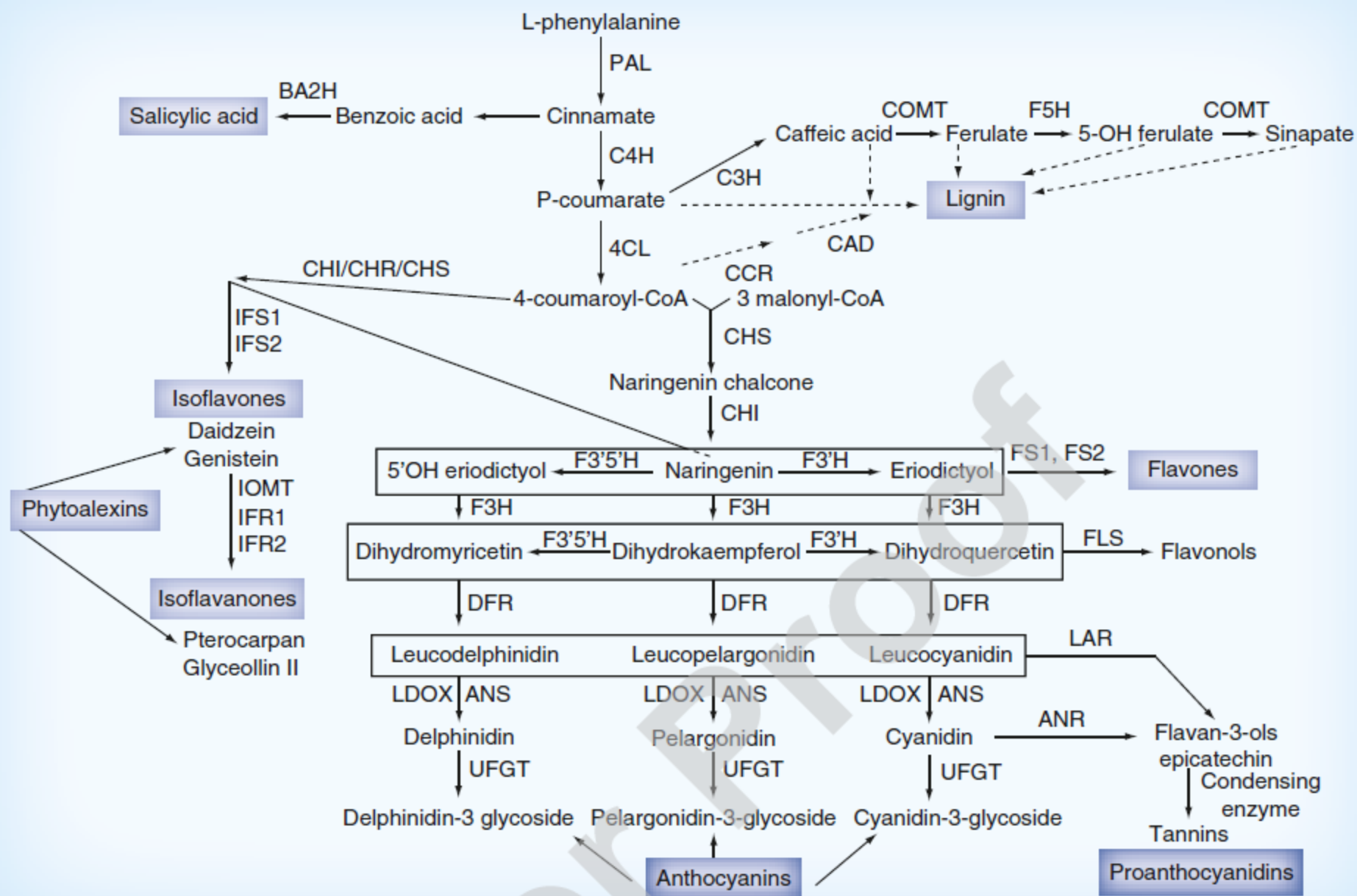
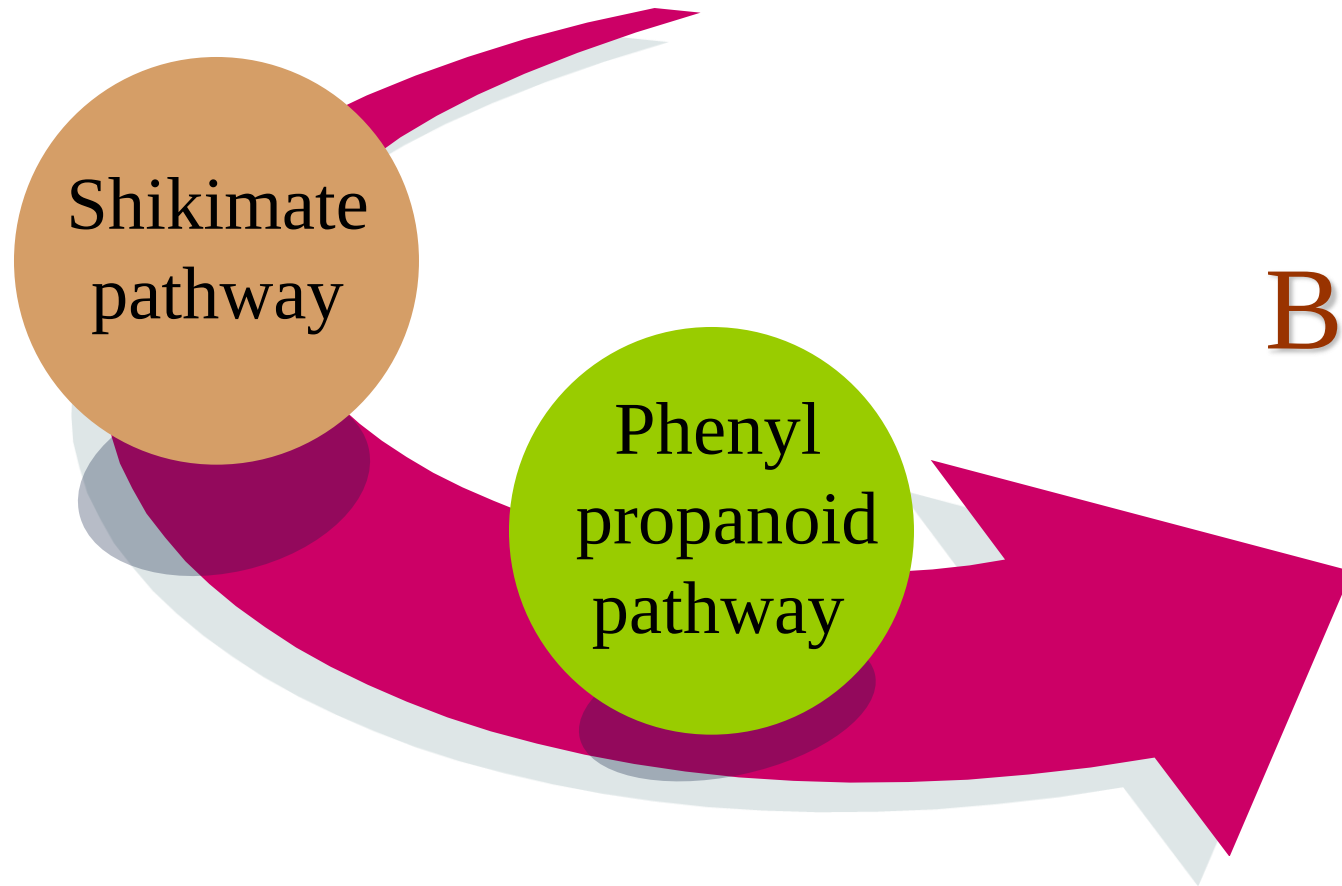


Fig. 16.1 Biosynthesis of phenolic phytochemicals.



Enzymatic Browning pathway



Browning

Shikimate pathway

فسفو انول پیرووات و اریتروز ۴ فسفات ترکیب

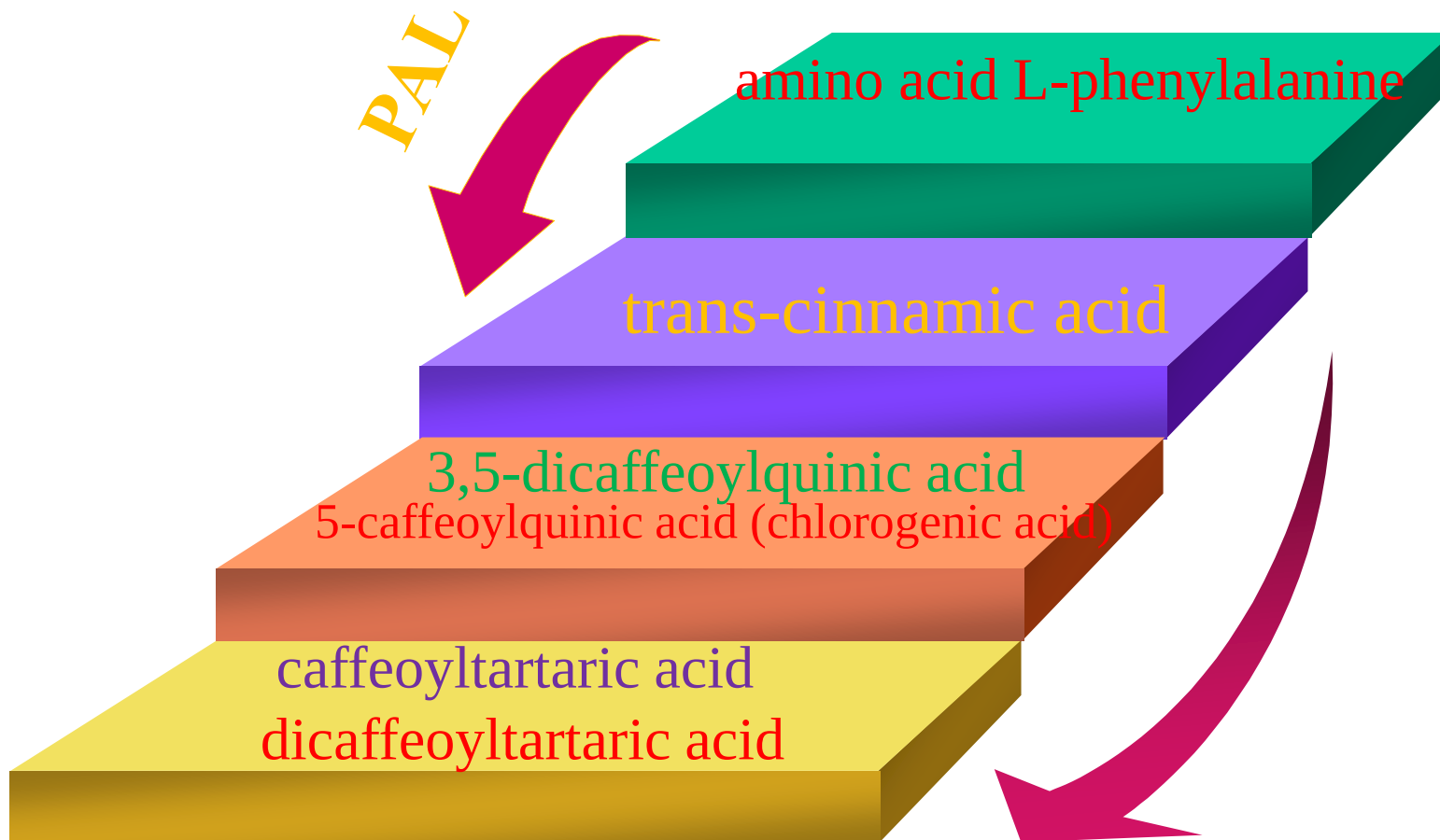


تولید ترکیبات حدواسط



تولید L- فنیل آلانین به عنوان سابستریت برای
آنزیم PAL

مسیر Phenyl propanoid



تحریک مسیر فنیل پروپانوئید و افزایش تولید ترکیبات فنلی
در هر دو بافت برش یافته و در معرض اتیلن

Shikimate pathway

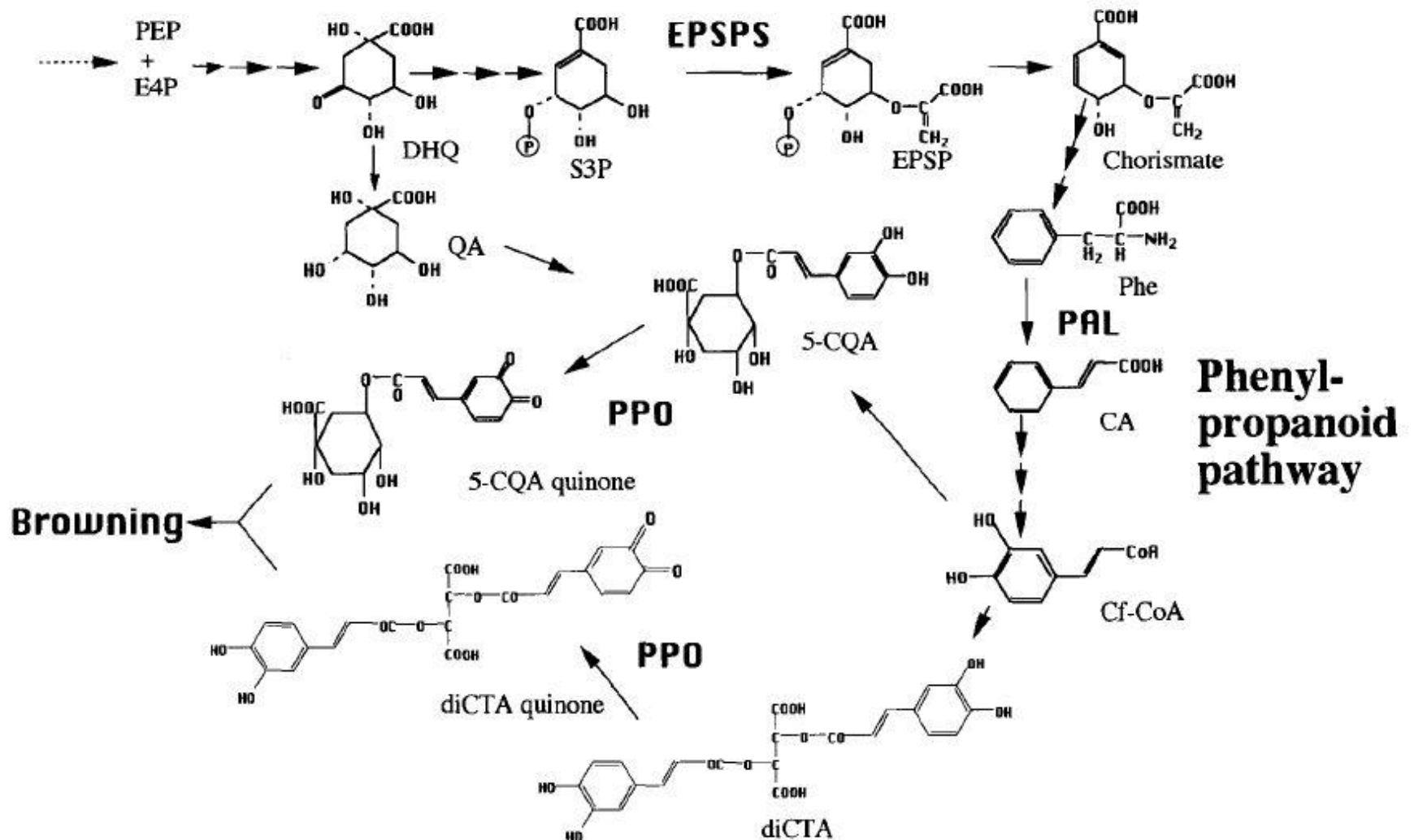


Table 12.3 Different phenolic substrates of PPO in fruits

Fruit	Polyphenolic substrates for PPO
Apple	Chlorogenic acid, catechol, catechin, caffeic acid, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), 3,4-dihydroxy benzoic acid, <i>p</i> -cresol, 4-methyl catechol, leucocyanidin, <i>p</i> -coumaric acid, flavonol glycosides
Apricot	Isochlorogenic acid, caffeic acid, 4-methyl catechol, chlorogenic acid, catechin, epicatechin, pyrogallol, catechol, flavonols, <i>p</i> -coumaric acid derivatives
Avocado	4-Methyl catechol, dopamine, pyrogallol, catechol, chlorogenic acid, caffeic acid, DOPA
Banana	3,4-Dihydroxyphenylethylamine (dopamine), leucodelphinidin, leucocyanidin
Grape	Catechin, chlorogenic acid, catechol, caffeic acid, DOPA, tannins, flavonols, protocatechuic acid, resorcinol, hydroquinone, phenol
Mango	Dopamine-HCl, 4-methyl catechol, caffeic acid, catechol, catechin, chlorogenic acid, tyrosine, DOPA, <i>p</i> -cresol
Peach	Chlorogenic acid, pyrogallol, 4-methyl catechol, catechol, caffeic acid, gallic acid, catechin, dopamine
Pear	Chlorogenic acid, catechol, catechin, caffeic acid, DOPA, 3,4-dihydroxy benzoic acid, <i>p</i> -cresol
Plum	Chlorogenic acid, catechin, caffeic acid, catechol, DOPA

Adapted from Marshall et al. (2000).

Table 12.1 The major classes of phenolic compounds present in fruits

Number of carbons	Carbon skeleton	Class and subclass	Example
6	C ₆	Simple phenols	Catechol
7	C ₆ —C ₁	Hydroxybenzoates (phenolic acids)	Gallic acid, protocatechuic acid, syringic acid, gentisic acid, <i>p</i> -hydroxybenzoic acid
9	C ₆ —C ₃	Hydroxycinnamates (phenolic acids)	Caffeic, <i>p</i> -coumaric, ferulic, isoferulic
		Coumarins	Scopoletin, aesculetin, umbelliferone, limmettin, herniarin
10	C ₆ —C ₄	Naphthoquinones	Juglone
13	C ₆ —C ₁ —C ₆	Xanthones	Mangiferin, mangostin, gartanins
14	C ₆ —C ₂ —C ₆	Stilbenes	Resveratrol
15	C ₆ —C ₃ —C ₆	Flavonoids	
		Flavanone	Naringenin, hesperetin, neohesperidin, eriodictyol, citromitin, pinostrobin
		Flavone	Luteolin, apigenin, tangeretin, nobiletin, sinensetin
		Flavonol	Quercetin, kaempferol, myricetin
		Flavan-3-ol	Catechin, epicatechin, gallocatechins, epigallocatechin, epicatechin gallate
		Anthocyanins	Cyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin, petunidin, pelargonidin
		Dihydrochalcones	Phloretin, phloridzin
18	(C ₆ —C ₃) ₂	Lignans	Secoisolaricresinol, matairesinol
30	(C ₆ —C ₃ —C ₆) ₂	Biflavonoids	Amentoflavone
<i>n</i>	(C ₆ —C ₃) _{<i>n</i>}	Lignins	Guaiacyl lignins
<i>n</i>	(C ₆ —C ₁) _{<i>n</i>} : Glu	Hydrolysable tannins	Gallotannins, ellagitannins, castalagin, corilagin, chebulagic acid
<i>n</i>	(C ₆ —C ₃ —C ₆) _{<i>n</i>}	Condensed tannins (flavolans)	Procyanidins (catechin polymers)

Adapted from Harborne (1980).

Table 12.2 Concentrations (mg/100 g fresh weight) of phenolics of selected fruit crops

Fruit	Total phenols	Hydroxycinnamic acid derivatives	Anthocyanins	Flavonols	Flavan-3-ols	Tannins
Apples	50–1,100	6–134	10–2,160 (P ^a)	18–41 (P)	0.2–16	400–3,500
Blueberry	381–4,651	188–211	160–503	2.4–2.9	5–20	
Cranberry			46–172	14–33	6–20	100
Grape (white)	350 (P)	1.3–87 (P)	0	8.1–8.2	1.4–53 (P)	17 (P)
Grape (red)	900–950	10–109 (P)	8.388	1.9–10	220–370	32–78 (P)
Orange	831	14–16	050–100			
Peach	28–180	8–75	0	0.4–1	5.3–14	90–120
Pear	123–400	170	5–10 (P)	4–160 (P)	0.1–6.2	53
Plum	167–200	12–94	2–5.3	2–5.2	1.8–6.1	76–150
Strawberry	85	1.4–3.1	28–70	2.1–17	2.4–9.6	110–150

Adapted from Kalt (2001).

^a“P” indicates the peel tissue.

Factors important for enzymatic browning

The most important factors that determine the rate and intensity of enzymatic browning are the activity of enzyme, concentration of specific polyphenols present in the tissue, oxygen availability, the pH, and the temperature (Martinez and Whitaker, 1995). Browning reactions are also dependent on the mechanical integrity of cell membranes (Dornenburg and Knorr, 1997). In addition to this, the subsequent nonenzymatic browning also influences the PPO activity. The optimum pH and temperature for PPO activity varies with the source of the enzyme and the substrate (Vamos-Vigyazo, 1981). Thermotolerance of the PPO depends on the substrate specificity, pH, and also the source of the enzyme. Short exposures of the tissues to a temperature range of 70–90°C are sufficient for partial or complete destruction of PPO activity.

- Enzymatic browning in fruits, for example, apples, can be controlled by blanching, a pretreatment, which results in inactivation or destruction of PPO. In a recent study, it has been found that treatment at 75°C for 5 min and treatment at 90°C for 10 s is sufficient to control the enzymatic browning in apple (Rupasinghe et al., unpublished). However, the thermal treatment may result in a loss of phenolic compounds, vitamins, and other water-soluble nutrients and also affect the product quality such as flavor, color, taste, and texture (Biekman et al., 1996). To prevent these changes, nonthermal methods such as application of chemical inhibitors have been devised for inactivation of PPO (Sapers et al., 1990; Sisler and Serek, 1997; Son et al., 2001; Rupasinghe et al., 2005).

- The enzyme activity gets inhibited by the presence of acids, halides, sulfites, chelating agents, and reducing agents such as ascorbic acid, quinine couplers such as cysteine, and various substrate-binding compounds. The role of metal ions influencing the enzymatic browning has also been investigated by several researchers. According to Aydemir (2004), Cu^{2+} and Fe^{3+} ions at 10 mM concentration, both Cu^{2+} and Fe^{3+} ions acted as poor inhibitors of PPO. Colak et al. (2007) and Kolcuoglu et al. (2007) have recently found that Cu^{2+} at 1 mM concentration was sufficient to inhibit PPO activity. As well, the reported literature on the effects of different metal ions on the PPO activity is varying. Interestingly, a strong correlation ($r^2 = 0.92$) between copper content of fruit and PPO activity has been reported (Joshi et al., 2007). However, further investigations need to be carried out to understand the role and concentration-dependent effect of metal elements on PPO activity and enzymatic browning.

آنزیم‌های موثر در قهوه‌ای شدن

➤ فنیل آلانین آمونیا لایاز (PAL (Phenylalanine ammonia-lyase)
(موثر در سنتز فنل‌ها)

➤ پلی فنل اکسیداز (PPO (Polyphenol oxidase)
(باعث اکسید شدن ترکیبات فنلی)

➤ پراکسیداز (POD (Peroxidase
(نقش در تشکیل ملانین‌ها اما نقش آن بستگی به حضور H_2O_2 در سلول دارد)

خصوصیات آنزیم‌های قهوه‌ای شدن



✓ PAL در گیاهان، بعضی مخمرها و قارچ‌ها

✓ جرم مولکولی ۲۷۰-۳۳۰ کیلو دالتون

✓ متعلق به خانواده لیاها و شکستن

پیوندهای کربن-نیتروژن

✓ القا فعالیت در پاسخ به محرک‌هایی مثل

زخمی شدن بافت، حمله پاتوژن‌ها، نور و

دمای کم

✓ مورد توجه در درمان بیماری Phenyl

ketonuria

✓ آنزیم کاتالیز کننده سنتز ترکیبات

پلی فنلی

✓ به‌طور گسترده در

گیاهان

✓ اکسید کردن ترکیبات

فنلی در حضور مقدار

کمی پراکسید هیدروژن

✓ مونو و دی فنل‌ها

به‌عنوان سوبسترا

✓ نقش آن در قهوه‌ای

شدن هنوز سوال برانگیز

✓ پلی فنل اکسیداز یک

اکسیدور دوکتاز که اکسید شدن

فنل‌ها در حضور اکسیژن را کاتالیز

می‌کند.

✓ پلی فنل اکسیداز در منابع مختلف

شامل باکتری، قارچ، بندپایان،

پستانداران و گیاهان وجود دارد.

✓ در گیاهان PPO در پلاستیدها به

فرم محلول و در membrane-

bound یافت می‌شوند.

مهارکننده‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی:

(a) سولفات‌ها: سولفات‌ها در کنترل قهوه‌ای موثر هستند. عوامل سولفات‌ه کردن (دی‌اکسید سولفور، سولفات سدیم، بی‌سولفات پتاسیم) و بسیاری از غذاها اضافه می‌شوند تا از قهوه‌ای شدن آنزیمی و غیرآنزیمی جلوگیری کنند و رشد میکروارگانیسم‌ها در محصولات کنترل نمایند که به‌عنوان عامل‌های از دست رفتن رنگ در آنتی‌اکسیدان‌ها عمل می‌کنند و عملکردهای فنی آن را منتقل می‌کنند.

سولفات‌ها به‌عنوان بازدارنده‌های عمل می‌کنند و عکس‌العمل نشان می‌دهد تا از شکل‌گیری رنگ‌ها جلوگیری کنند. سولفات‌ها به‌وسیله عکس‌العمل کربنیل از قهوه‌ای شدن غیرآنزیمی جلوگیری می‌کنند بنابراین از شکل‌گیری رنگیزه‌های قهوه‌ای جلوگیری می‌کند. سطوح اصلاح سولفات گسترده است و این وابسته به کاربرد است.

(b) اسید آمینه سیستئین:

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 پلیمریزاسیون ترکیبات فنلی که به قهوه‌ای شدن می‌انجامد جلوگیری می‌کند. سیستئین با کینون به‌صورت 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.

مهارکننده‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی:

(C) ترکیبات تیول:

ترکیبات تیول (SH-) از جمله گلوتاتیون مشابه اسید آمینه سیستئین، سولفیت‌ها و برخی گازها از جمله SO_2 می‌توانند با اورتوکینون که به‌صورت ناپایدار است واکنش داده و ترکیبات بدون رنگ پایداری را تولید کنند.

مهارکننده‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی:

(d) اسیدهای آلی:

اسیدهای آلی (مثل اسیدهای آسکوربیک، اگزالیک، سیتریک، مالیک، فسفریک، استیک، مالونیک، بوریک و غیره) با خارج کردن دامنه فعالیت pH آنزیم پلی فنل اکسیداز (رنج مطلوب ۶ تا ۷) به زیر ۶ می‌توانند سبب کاهش فعالیت آنزیم شوند. علاوه بر این برخی اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک و اسید اگزالیک می‌توانند با تشکیل کمپلکس با یون مس آنزیم باعث از بین رفتن گروه پروستتیک آنزیم و در نتیجه باعث کاهش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز شوند. همچنین اسید آسکوربیک با خاصیت احیاکنندگی که دارد می‌تواند باعث احیای ارتوکینون تولید شده از NADH محیط شود و چرخه مورد نظر را به سمت تشکیل ارتو دی فنل برگردانده و موجب مهار واکنش قهوه‌ای شدن آنزیمی گردد.

مهارکننده‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی:

(e) بازدارنده‌های آنزیم پلی فنل اکسیداز:

- بازدارنده‌های رقابتی که روی بخش فعال (active site) تاثیر گذاشته و در صورتی که محدودیتی برای سوبسترا وجود داشته باشد موجب کاهش فعالیت آنزیم می‌شوند. اگر سوبسترا به اندازه کافی در محیط وجود داشته باشد اینها نمی‌توانند موثر باشند. از این گروه می‌توان به اسیدهای کربوکسیلیک آروماتیک مثل اسید بنزوئیک و اسید سینامیک را اشاره کرد.
- بازدارنده‌های غیررقابتی آنزیم که سبب کلاته شدن یون مس موجود در آنزیم و در نتیجه سبب غیرفعال شدن آنزیم پلی فنل اکسیداز می‌شوند. ترکیباتی مانند آزید (azide)، سیانید (cyanide)، اسپوریکس (sporix)، هالیدها (organic halids) و اتیل دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) به این روش عمل می‌کنند.
- بازدارنده‌های NAA، ABA و AVG که بازدارنده آنزیم پلی فنل اکسیداز بوده و موجب کاهش فعالیت آنزیم می‌شوند.

مهارکننده‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی:

(f) سایر روش‌ها:

- سفید کردن (Blanching) سبب غیرفعال شدن آنزیم می‌شود البته بستگی به دما، زمان، اندازه و نوع محصول دارد
- تیمار گرمایی
- حذف یا کاهش اکسیژن از طریق استفاده از خلاء یا MAP
- ترکیباتی که با استفاده از آنزیم متیل ترانسفراز و یک دهنده (Donor) سبب متیله شدن سوبسترای آنزیم می‌شوند
- ترکیباتی که با سوبسترا تشکیل کمپلکس می‌دهند مانند β -cyclodextrin که با فنل‌ها تشکیل کمپلکسی داده که آنزیم دیگر نمی‌تواند موجب اکسید شدن آنها شود و در نتیجه موجب کاهش قهوه‌ای شدن می‌شود.