

## حساسیت پنج رقم سیب به قهوه‌ای شدن

منوچهر حامدی<sup>۱</sup> و جعفر محمدزاده میلانی<sup>۲</sup>  
۱، ۲، دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران  
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۸/۸

### خلاصه

ترکیب‌های فنولی و فعالیت پلی فنول اکسیداز (PPO) در ۵ رقم سیب در رابطه با حساسیت آنها به قهوه‌ای شدن اندازه‌گیری شدند. درجه قهوه‌ای شدن با اندازه‌گیری رنگدانه‌های قهوه‌ای پس از همگون سازی پالپ میوه تعیین شد. تجزیه واریانس سرعت قهوه‌ای شدن، میزان پلی فنولها و فعالیت پلی فنول اکسیداز نشان داد که تنها اثر رقم معنی دار است و بر هم کنش جهت و رقم معنی دار نیست. مقایسه میانگین‌ها (دانکن) در سطح ۱٪ رقم‌ها را از لحاظ سرعت قهوه‌ای شدن به سه دسته قوی (رددلیشس)، ضعیف (ارنگه و گرانی اسمیت)، (گلدن اسموتی) و متوسط (گلدن دلشس) تقسیم کرد. ارنگه به علت داشتن بالاترین میزان مواد جامد محلول و کمترین سرعت قهوه‌ای شدن رقم برتر بود.

### واژه‌های کلیدی: سیب، قهوه‌ای شدن، آنزیم، پلی فنول اکسیداز، مواد فنولی

Gala, McIntosh, Canada, Charden) تقسیم کردند و تنها  
یک رقم (Granny smith) رفتاری متفاوت داشت (۱).

### مواد و روشها

#### واریته‌های سیب

سه رقم رددلیشس، گلدن اسموتی و گرانی اسمیت از باغ میوه دانشکده کشاورزی کرج در جاده محمدآباد و دو رقم دیگر از باغ میوه‌ای در روستای ارنگه در زمان‌های برداشت تجارتي آنها چیده شدند. برای بررسی اثر دو باغ میوه، رقم رددلیشس از باغ آخری نیز مورد آزمایش قرار گرفت.

برای هر رقم سه درخت به طور تصادفی در سه نقطه مختلف باغ انتخاب شد. هر درخت به دو جهت شمالی و جنوبی تقسیم شد. از هر جهت سه دسته چهارتایی سیب چیده شدند و در درون یک کیسه نایلونی قرار داده شدند و روی کیسه نام رقم، شماره درخت و جهت نوشته شد. دو کیسه برای انجام دو تکرار آزمایش و یک کیسه نیز ذخیره شد. برای انتخاب هر یک از این دسته‌های چهارتایی یک سیب از بالای درخت، دو عدد از

### مقدمه

بررسی‌های زیادی درباره قهوه‌ای شدن آنزیمی در میوه‌ها و سبزیها انجام شده است. این پدیده نتیجه اکسایش آنزیمی مواد فنولی به کینونهاست که سپس پلیمری شده فرآورده‌های قهوه‌ای پدید می‌آورند. بسیاری از پژوهشگران در پی برقراری رابطه بین درجه قهوه‌ای شدن، محتوای فنولی، و اکسایش آنزیمی میوه‌ها بوده‌اند (۱، ۴، ۶، ۷).

حساسیت سیبها به قهوه‌ای شدن ر هم کنشهای پیچیده‌ای با بین فعالیت پلی فنول اکسیداز (PPO) و محتوای مواد فنولی نشان می‌دهد. برخی از پژوهشگران نشان دادند که فعالیت آنزیمی عامل اصلی در قهوه‌ای شدن است (۹)، در حالی که دیگران نشان دادند که محتوای فنولی عامل عمده است (۸). پژوهشگران دیگری هر دو عامل را مؤثر در قهوه‌ای شدن می‌دانند (۳) و این عوامل را وابسته به مرحله فیزیولوژیکی میوه‌ها می‌دانند (۵). مطابق با اندازه‌گیریهایی که انجام شد ارقام زارعی را به دو دسته با قابلیت قهوه‌ای شدن ضعیف (Golden, Red delicious, Fuji) و قوی (Mutsu, Florina, Elstar)

بخش میانی و یک عدد هم از قسمت پایینی درخت انتخاب شدند.

کیسه‌ها در سبدهای پلاستیکی به سردخانه گروه باغبانی منتقل و در رطوبت نسبی ۹۵٪ و دمای ۱ °C تا انجام آزمایش‌ها نگهداری شدند.

چهار عدد سبب از هر بسته پس از شستشو پوست‌گیری شدند و بی‌درنگ ۵۰ گرم از گوشت میوه را در بشر ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و فوراً به مخلوط کن (Braun) منتقل و به مدت ۱ دقیقه همگون گردید (۲).

#### اندازه‌گیری قهوه‌ای شدن

مخلوط همگون شده را مدت ۱ ساعت درون بشری در دمای اتاق قرار داده سپس ۱۰ میلی‌لیتر از مایع شفاف رویی را به لوله آزمایش منتقل کرده ۱۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ افزوده کاملاً مخلوط کرده مدت ۱۵ دقیقه در ۸۰۰ سانتی‌فویژ ( BHG optima II) گردید. جذب مایع رویی در طول موج ۴۴۰ nm در اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-160 A) نشانه سرعت قهوه‌ای شدن نمونه بود (۲). باید اشاره کرد که خواندن جذب تقریباً ۸۵ دقیقه پس از همگون‌سازی انجام شد، زیرا پس از این مدت جذب به کندی کاهش می‌یافت.

#### مواد جامد محلول

با استفاده از رفراکتومتر (Bellingham & Stanley) مواد جامد محلول مایع رویی تعیین شد.

#### استخراج و خالص‌سازی ترکیب‌های فنولی

از هر یک از چهار عدد سبب پس از پوست‌گیری حدود ۳/۷۵ گرم و در جمع ۱۵ گرم گوشت میوه توزین و بی‌درنگ به درون ۱۶۰ گرم استون یخی ریخته و با مخلوط کن به مدت ۱ دقیقه همگون گردید. سپس از کاغذ صافی واتمن شماره یک در خلاء صاف گردید و باقی مانده با ۳۰ میلی‌لیتر اتر نفت (۴۰-۶۰ °C) شستشو داده شد تا رنگدانه‌ها حذف شوند (۱، ۴).

#### تهیه عصاره آنزیمی و تعیین فعالیت PPO

باقیمانده نامحلول در استون در دمای ۴۰ °C و فشار اتمسفر خشک گردید. ۲۰۰ میلی‌گرم از آن را با ۱۰ میلی‌لیتر تامپون فسفات ۰/۱ مولار، pH= ۶/۲ با شیکر (Retch) کاملاً آمیخته و عصاره آنزیمی به دست آمده را با کاغذ صافی معمولی صاف کرده آنگاه به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰ سانتی‌فویژ شد. ۲

میلی‌لیتر از عصاره زلال شده را با ۰/۱ میلی‌لیتر کاتکول ۰/۱ مولار درون کووت ریخته و تغییر دانسیته نوری به مدت ۳ دقیقه به فاصله‌های ۱۰ ثانیه در برابر شاهد (آب مقطر کاتکول ۰/۱ مولار) خوانده شد و سپس فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول ریاضی محاسبه گردید:

$$\text{میزان فعالیت آنزیمی} = \frac{A \times W \times 10}{0.001 \times 15 \times 2 \times 0.2}$$

A = عدد خوانده شده در دستگاه

W = وزن آنزیم حاصل از ۱۵ گرم سبب

بر طبق فرمول بالا یک واحد فعالیت آنزیمی عبارت بود از:

تغییر OD به میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه در ۱ ml عصاره آنزیم (۲، ۴).

#### تعیین مقدار پلی‌فنولها

عصاره استون - اتری در تبخیر کننده دوار (Buchi) در فشار ۶۶۰ میلی‌متر جیوه خلاء و دمای ۴۰ °C تبخیر شد تا حلالهای آلی آن کاملاً حذف شوند. باقیمانده از صافی واتمن شماره ۱ عبور داده و در بالن ۲۰۰ میلی‌لیتر با چند بار شستشو با آب مقطر به حجم رسانده شد. ۱ میلی‌لیتر از آن را با ۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیوکالتوی ۱۰ حجم رقیق شده و ۴ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷/۵٪ کاملاً آمیخته پس از ۱ ساعت ماندن در دمای اتاق در برابر شاهد شامل ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و واکنش‌های دیگر مشابه نمونه در طول موج ۷۶۵nm جذب آن خوانده شد. با توجه به اینکه بهترین سوبسترای طبیعی PPO سیب و ترکیب فنولی غالب آن اسید کلروژنیک است (۱)، (۴) منحنی استاندارد از این ماده به غلظت‌های ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میکروگرم در لیتر رسم گردید و به وسیله آن میزان ترکیب‌های فنولی تام بر حسب اسید کلروژنیک تعیین و مقدار آن در ۱۵ گرم گوشت میوه سیب با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۴).

$$\text{پلی‌فنولهای تام} = \frac{2 \times A}{15}$$

= پلی‌فنولهای تام

A = عدد خوانده شده در اسپکتروفوتومتر

#### آنالیز آماری داده‌ها

برای مقایسه رقم‌ها از لحاظ میانگین چهار صفت: بریکس، سرعت قهوه‌ای شدن، میزان پلی‌فنولها و فعالیت PPO از آزمون فاکتوریل شامل دو عامل: رقم در شش سطح و جهت در دو

بین جهت شمالی و جنوبی اختلاف معنی‌داری در سرعت قهوه‌ای شدن مشاهده نشد و همچنین اثر متقابل نیز بین جهت و رقم ملاحظه نگردید.

رقم‌های رد دلشس ۱ و ۲ که یک رقم در دو باغ متفاوت بودند از این لحاظ اختلاف معنی‌داری نشان ندادند که به معنی موثر نبودن موقعیت مکانی آنهاست ولی اختلاف آنها با رقم‌های دیگر به شدت معنی‌دار بود.

**مقدار پلی فنولها**

جدول ۱ نشان می‌دهد که رقم‌های گلدن اسموتی و رد دلشس ۱ به ترتیب کمترین و بیشترین میزان پلی فنولها را دارا بودند. در این رابطه اختلاف معنی‌داری بین رد دلشس ۲ و ۱ مشاهده نشد. همچنین بین دو جهت شمالی و جنوبی و نیز اثر متقابل بین جهت و رقم به دست نیامد.

**فعالیت PPO**

اگر چه رقم‌ها اختلاف معنی‌داری از لحاظ فعالیت PPO داشتند، کمترین فعالیت در رقم ارنگه و بیشترین فعالیت در گرانی اسمیت و رد دلشس مشاهده شد. تفاوت فعالیت PPO بین رد دلشس ۱ و رد دلشس ۲ معنی‌دار نبود (جدول ۱). بین دو جهت شمالی و جنوبی اختلاف فعالیت PPO معنی‌دار نبود و اثر متقابل نیز بین جهت و رقم مشاهده نشد.

نتایج حاصل از تحلیل رگرسیون در رقم‌های رد دلشس ۱ و ۲ و گلدن دلشس تنها وارد شدن میزان پلی فنولها را در معادله نشان داد (شکل‌های ۱، ۲، ۳). در ارقام ارنگه و گرانی اسمیت تنها میزان فعالیت PPO وارد معادله رگرسیون شد (شکل‌های ۴، ۵).

سطح در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها به وسیله آنالیز واریانس و روش دانکن انجام شد. رابطه میان سرعت قهوه‌ای شدن با میزان پلی فنولها و میزان فعالیت آنزیمی از راه ضریب همبستگی پیرسون محاسبه شد و اثر دو صفت میزان پلی فنولها و فعالیت PPO بر سرعت قهوه‌ای شدن از راه رگرسیون بررسی گردید.

**نتایج و بحث**

**مواد جامد محلول**

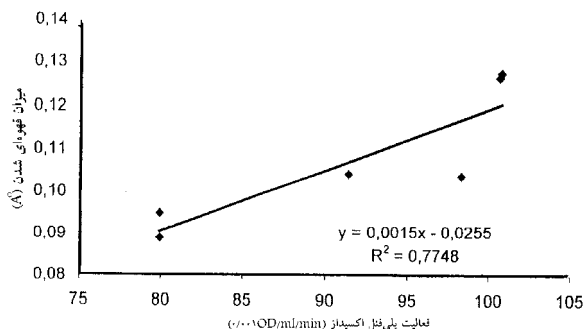
از نظر درصد مواد جامد محلول بین برخی ارقام اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. رقم‌های گلدن دلشس و ارنگه بیشترین و رقم‌های رد دلشس ۱ و ۲ و گلدن اسموتی کمترین میزان بریکس را داشتند (جدول ۱). ولی تفاوت معنی‌داری بین رد دلشس ۱ و رد دلشس ۲، گلدن اسموتی و گرانی اسمیت نشان نداد. تجزیه واریانس وجود اختلاف معنی‌دار بین دو جهت شمالی و جنوبی و نیز بیشتر بودن آن در جهت جنوبی و نبود اثر متقابل بین جهت و رقم را نشان داد. علت مؤثر بودن جهت می‌تواند بهره‌گیری بیشتر سمت جنوب از آفتاب باشد.

**سرعت قهوه‌ای شدن**

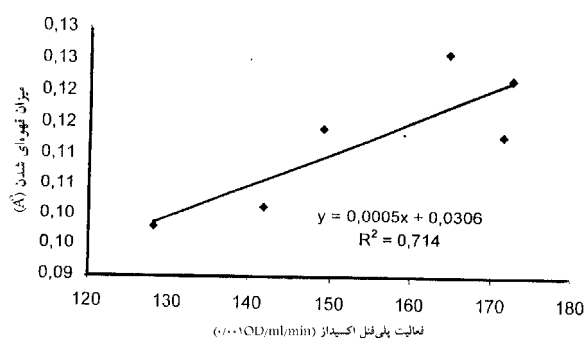
در تجزیه واریانس به عمل آمده وجود اختلاف معنی‌دار بین رقم‌ها مشاهده شد. بیشترین اختلاف و در عین حال کمترین سرعت قهوه‌ای شدن را رقم‌های ارنگه، گرانی اسمیت و گلدن اسموتی داشتند (جدول ۱) که به دلیل بالاترین میزان مواد جامد محلول به عنوان رقم برتر برای فرآوری معرفی می‌شود.

جدول ۱- مقایسه میانگین‌ها TSS، سرعت قهوه‌ای شدن، میزان پلی فنولها در واریته‌ها

رقم	TSS%		سرعت قهوه‌ای شدن		پلی فنولهای تام		PPO
	میانگین	دانکن (٪۵)	میانگین	دانکن (٪۱)	میانگین	دانکن (٪۱)	
رد دلشس ۱	۴/۹۱۷	شمال ۴/۵۵۰ جنوب C	۰/۱۸۶۰	A	۱۱۷۹/۰	A	۱۴۷/۱
رد دلشس ۲	۴/۹۷۷	شمال ۴/۶۸۳ جنوب C	۰/۱۷۸۲	A	۱۱۴۶/۰	AB	۱۵۲/۵
گلدن دلشس	۵/۴۱۷	شمال ۴/۸۵۰ جنوب A	۰/۱۴۴۰	B	۱۰۳۶/۰	ABC	۱۲۵/۵
ارنگه	۵/۲۶۷	شمال ۵/۱۴۳ جنوب AB	۰/۱۰۷۸۰	C	۱۰۶۹/۰	ABC	۹۱/۸۷
گرانی اسمیت	۵/۰۴۰	شمال ۵/۰۲۰ جنوب BC	۰/۱۱۲۳۳	C	۱۰۰۹/۰	BC	۱۵۴/۷
گلدن اسموتی	۴/۸۳۳	شمال ۴/۶۸۳ جنوب C	۰/۱۲۸۰	BC	۹۶۸/۸	C	۱۱۵/۲



شکل ۴- رابطه خطی بین سرعت قهوه‌ای شدن (y) و میزان پلی فنول اکسیداز (x) در واریته ارنگه

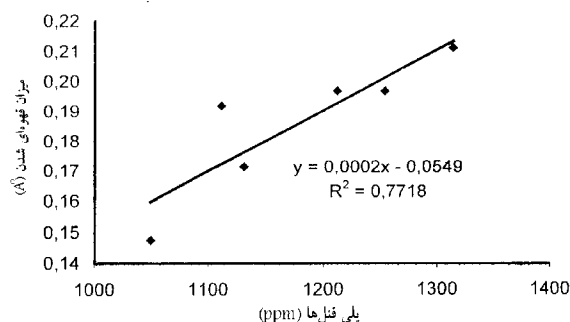


شکل ۵- رابطه خطی بین سرعت قهوه‌ای شدن (y) و میزان پلی فنول اکسیداز (x) در واریته گرانی اسمیت

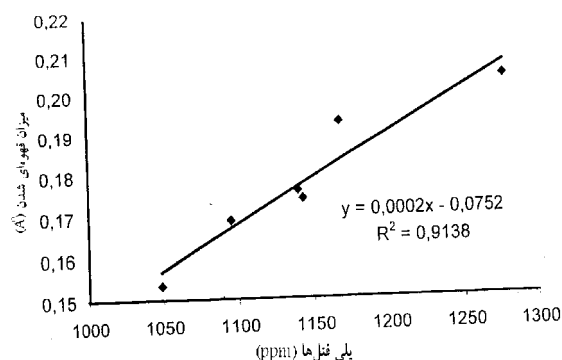
از هفت رقم سیبی که Coseteng و Lee (۱۹۸۷) آزمایش کردند درجه قهوه‌ای شدن در چهار رقم (هیچ یک با ارقام آزمایشی ما مشابهتی نداشتند) با فعالیت PPO و سه رقم دیگر (تنها یک رقم، گلدن دلشس، با ارقام آزمایشی ما وجه تشابه داشت) با غلظت مواد فنولی رابطه مستقیم نشان داد. Klein (۱۹۸۷) رقم سیب نیوزیلندی را مورد آزمایش قرار داد که نتایج فعالیت PPO و محتوای مواد فنولی دو رقم مشترک آنها با ما (گرانی اسمیت و گلدن دلشس) با درجه قهوه‌ای شدن همبستگی نشان نداد. بنابراین نتایج کار ما با یک رقم مشترک Coseteng همخوانی ولی با دو رقم مشترک Klein ناهمخوانی دارد.

### سپاسگزاری

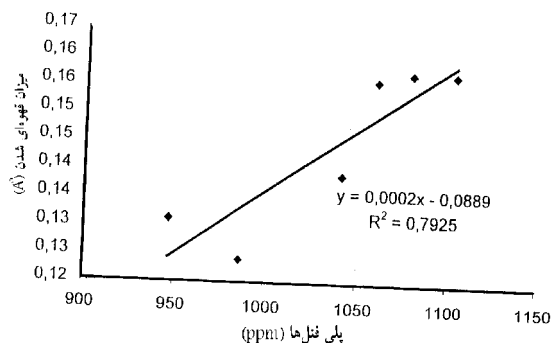
هزینه‌های اجرای این طرح را معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران تأمین کرده‌اند.



شکل ۱- رابطه خطی بین سرعت قهوه‌ای شدن (y) و میزان پلی فنولها (x) در واریته رد دلشس ۱



شکل ۲- رابطه خطی بین سرعت قهوه‌ای شدن (y) و میزان پلی فنولها (x) در واریته رد دلشس ۲



شکل ۳- رابطه خطی بین سرعت قهوه‌ای شدن (y) و میزان پلی فنولها (x) در واریته گلدن دلشس

در حالی که، در رقم گلدن اسموتی هیچ یک از این دو صفت وارد معادله رگرسیون نشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عامل اصلی قهوه‌ای شدن در برخی از رقم‌ها مانند رد دلشس و گلدن دلشس مقدار پلی فنولها و در ارقامی مانند ارنگه و گرانی اسمیت میزان فعالیت PPO است. در حالی که، در ارقامی مانند گلدن اسموتی هیچ یک از این دو عامل نقش غالب را در قهوه‌ای شدن ندارند.

**REFERENCES**

1. Amiot, M. J ; Tacchini, M., Aubert, S. and Nicolas J. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.*, 57: 958-962.
2. Coseteng, M. Y. and Lee, C. . 1987. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *J. Food Sci.* 52: 985-989.
3. Harel, E., Myer, A. M. and Shain, Y. 1966. Catechol oxidase from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiol. Plant.*, 17: 921.
4. Klein, J. D. 1987. Relationship of harvest date, storage conditions, and fruit characteristics to bruise susceptibility of apple, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 112(1): 113-118.
5. Macheix, J. J. 1970. Role de differents facteurs intervenant dans le brunissement enzymatique des pommes pendant la croissance, *Physiol. Veg.* 8 : 585.
6. Macheix, J. J: Fleuriet, A. and Billot, J. 1990. Fruit phenolics. CRC press. Inc. Boca Raton. F1.
7. Murata, M., Noda, I. and Homma, S. 1995. Enzymic browning of apples on the market: Relationship between browning, polyphenol content, and polyphenol oxidase. *J. Japanese soc. food sci. and Technol*, 42(10): 820-826.
8. Prabha, T. N. and Patwardhan, M. V. 1985. A comparison of the polyphenolic patterns in some Indian varieties of apples and their endogenous oxidation. *I. J. of Food Sci. and Tehcnol. India*, 22(6): 431-433.
9. Vamos – vityazo, L., Gajzago, I : Nadudvari – markus, V. and Mihalyi, K. 1976. Studies into the enzymic browning and the polyphenol: Polyphenol oxidase complex of apple cultivars. *Confructa*, 21: 24-35.

## **Susceptibility of Five Apple Cultivars to Browning**

**M. HAMED<sup>1</sup> AND J. MOHAMMAD ZADEH MILANI<sup>2</sup>**

**1, 2, Associate Professor and Former Graduate Student, Faculty of Agriculture,  
University of Tehran, Karaj, Iran**

**Accepted Oct. 30, 2002**

### **SUMMARY**

Phenolic compounds and polyphenol oxidase (ppo) activity in five apple cultivars were assessed in relation to browning susceptibility. The degree of browning was determined by measuring brown pigments in homogenised pulp. The analysis variance of the browning rate, polyphenol content and ppo activity showed that only the effect of cultivar was significant while the interaction of location and cultivar not of significance. Comparison of means (Duncan) classified the cultivars in view of browning rate in three groups ( $P < 0.01$ ): Strong (Red Delicious), weak (Arangeh and Granny Smith), and mild (Golden Delicious). Arangeh was the superior variety due to its highest total soluble solids and lowest browning rate.

**Key words:** Apple, Browning, Enzyme, Polyphenol oxidase, Cultivar, Phenolics.