فصلنامه‌ی علمی و پژوهشی شریف
زمستان ۱۳۸۴، شماره‌ی سی و دوم، ص. ۴۹-۵۶

الگوی تغییرات تئافلاوین در چای سیاه ایران ـ ارزیابی روش‌های سنتی و CTC در پیچش‌دهی برگ‌های چای

مسعود حافظی (کارشناس ارشد)
فرزانه وهابزاده (استاد)
بهرام ناصرنژاد (دانشیار)
الهام مفرح (کارشناس)
نرگس فلاح (کارشناس)
دانشکده‌ی مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

تخمیر آنزیمی اکسایشی برگ‌های چای در ارزیابی کیفیت و مرغوبیت چای سیاه، مرحله‌یی تعیین‌کننده است. در تحقیق حاضر مدت زمان بهینه برای به انجام رسیدن تخمیر اکسایشی برگ‌های چای در فرایند چای‌سازی کشور تعیین شد. در این زمینه، رنگدانه‌ی اصلی حاصل از تخمیر مبنای اندازه‌گیری مقدار تئافلاوین (TF) تشکیلی بوده است. تخمیر در دمای $۲۰^{\circ}C$ انجام گرفت و روند فیزیکی پیچش‌دهی برگ‌های چای و نیز انسجام‌زدایی بافتی و سلولی برگ‌ها با استفاده از روش سنتی و روش نسبتاً جدیدتر CTC[۱] انجام گرفت. با استفاده از روش استخراج با حلال IBMK، رنگدانه‌ی تئافلاوین TF استخراج و ارزیابی کلی آن با طیف‌سنجی نوری ($\lambda = ۳۸۰nm$) صورت گرفت. با به‌کارگرفتن روش سنتی پیچش‌دهی و نیز CTC، حداکثر مقدار تولید TF در طی تخمیر به ترتیب در مدت زمان ۱۵۰ و ۶۰ دقیقه میسر شد. الگوی زمانی تغییرات TF در طی روند تخمیر و نیز شفافیت رنگ چای مصرفی مبتنی بر تغییرات TF تعیین شد. با استفاده از مبحث رگرسیون چندمتغیره نتایج کسب شده در تحقیق حاضر تحت بررسی و تجزیه و تحلیل مفاهیم قرارگرفته و رابطه(های) معقول در زمینه‌ی توان پیش‌بینی مرغوبیت چای مصرفی به‌واسطه‌ی سنجش متغیرهای شیمیایی، ارائه شد. اهمیت ضریب تعیین همبستگی در این مقوله مورد تأکید قرارگرفت.

مقدمه

برگ سبز چای همانند بسیاری از مواد گیاهی (خوراکی) مختلف نظیر سیب، انگور، کاکائو و... منبعی غنی از فلوانیدها و پلی‌فنل‌ها است. البته محتوای فلوانیدها در ترکیبات غذایی فرایند شده، متأثر از نوع فرایندی است که برای اهدافی خاص بر ماده‌ی غذایی اعمال می‌شود.[۱] مقطع طولی پلی‌فنل‌ها و الگوی حضور این ترکیبات در چای سیاه علاوه بر پیروی از نوع گونه و زیرگونه‌های چای، بسته به درجه‌ی اکسیداسیون آنزیمی، متفاوت از الگوی این مجموعه مواد در برگ تازه‌ی چای (تخمیر ناشده) است. گونه‌های اصلی چای، متشکل از گونه‌ی چینی (با ویژگی خاص مقاومت به سرما) و گونه‌ی هندی (با مشخصه‌ی محتوای پلی‌فنل بالا) هستند که با توجه به منطقه‌ی رویش گیاه، و به دلیل ویژگی‌های ژنتیکی خاصی که پیدا می‌کنند تحت عنوان «کلون[۲]» دسته‌بندی می‌شوند. «اکسیداسیون آنزیمی» فرایندی زیستی است که در حین تخمیر برگ تازه‌ی چای و فرایند تولید چای سیاه به انجام می‌رسد. کتچین[۳]های چای شامل اپی‌کتچین[۴] (EC)، اپی‌گالوکتچین[۵] (EGC)، اپی‌کتچین گالات[۶] (ECG) و اپی‌گالوکتچین‌گالات[۷] (EGCG) است که در طی به اجرا رسیدن واکنش‌های آنزیمی اکسایشی در تخمیر، مولکول‌هایی تشکیل می‌دهند که از نظر ساختاری متراکم و مجتمع‌اند و رنگدانه‌های اصلی چای سیاه و مخلوطی از چند نوع تئافلاوین[۸] (TF) و نیز تئاروبیژین‌ها[۹] (TR) هستند.[۱و۲] (جزئیاتی در این زمینه با توجه به مطالب موجود در مرجع ۲ و ۳ در پیوست ۱ آمده است).

عملیات تخمیر اکسایشی برگ‌های چای مرحله‌یی تعیین‌کننده در ارزیابی کیفیت و مرغوبیت چای سیاه به شمار می‌آید. البته در تولید چای سیاه عمده مراحل در پی برگ‌چینی، اجرای عملیات پیچش‌دهی برگ‌های تازه و پژمرده‌سازی و انسجام زدایی بافتی است که در یکی از دو شکل فرایند سنتی معمول (ORT[۱۰]) و فرایند نسبتاً جدیدتر CTC به انجام می‌رسد.

آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز[۱۱] (PPO) با نقش کاتالیتیک خود در فرایند تخمیر (در تولید چای سیاه)، کاتالیز مجموعه‌یی از واکنش‌های اکسایشی را به عهده دارد و نهایتاً تبدیل پیش‌ماده‌ی کتچین‌ها را میسر می‌سازد. تئافلاوین و تئاروبیژین محصولات اصلی حاصل از واکنش‌های اکسایشی کتچین‌ها، ترکیبات متراکم شده‌ی بسپاری‌اند که مقدار آن، و به واقع میزان و درجه‌ی تشکیل این محصولات در طی فرایند تخمیر، نقشی کلیدی در ارزیابی کیفیت چای سیاه دارد.[۳-۵]

همچنین نقش آنزیم پراکسیداز[12] (POD) در فرایند تخمیر نیز باید مورد توجه قرارگیرد.[5] فعالیت این آنزیم در برگ‌های تازه‌ی چای بیش از ده برابر فعالیت آنزیم PPO گزارش شده است.[6] آنزیم POD به کمک پیش‌ماده‌ی همراه خود، (هیدروژن پراکساید)، کاتالیز اکسایش ارتو-دی‌فنل‌ها به کوئینون‌های مربوطه را به عهده دارد. در مطالعات متعدد، استفاده از TF به‌عنوان شاخص و معیار تعیینِ کیفیتِ چای سیاهِ تخمیری پیشنهاد شده است.[7]

در عملیات تخمیری و در گستره‌ی تغییرات کمی و کیفیِ محصول تولیدی، دما نقشی تعیین‌کننده دارد. در تخمیر اکسایشی برگ چای تجمع بیشتر TF و تولید بالاتر TR به ترتیب در دمای پایین‌تر (15°C) و دمای بالاتر (35°C) گزارش شده است.[7] شرکت نکردن TF در واکنش‌های آنزیمیِ پلیمریزاسیون و متراکم‌سازیِ مولکولی در دمای پایین، به تجمع بیشتر این ماده در برگ‌ها می‌انجامد، و نیز دمای بالاتر، افزایش شدت و سرعت تشکیل TR را به دنبال دارد و لذا مقدار TR تولیدی افزایش می‌یابد. افزایش تجمع TF به ازاء کاهش 25°C دما، در حد ۳۵٪ گزارش شده است.[7] دما در عملیات تخمیر برگ چای نه تنها بر ابراز فعالیت آنزیم PPO، بلکه بر آنزیم POD نیز به‌میزان قابل ملاحظه‌یی تأثیرگذار است. کاهش فعالیت PPO در حین تخمیر امری عادی است، چنانکه گزارش‌ها به افت ۴۰٪ فعالیت در دمای 25°C، پس از ۱۵۰ دقیقه گذر تخمیر اشاره دارند، در حالی که آنزیم POD در تخمیری در دمای بالاتر تا 35°C به میزان ۸۵٪ فعالیت خود را حفظ می‌کند.[6]

در تحقیق حاضر بهینه‌سازی زمان تخمیر برمبنای تشکیل ترکیبات بسیاری TF، TR در فرایند تولید چای سیاه ایران مورد بررسی و مطالعه قرارگرفته است. در این تحقیق همچنین پیچش‌دهی برگ‌ها به روش‌های سنتی و روش CTC مقایسه شد و عملکرد آن در فرایند چای‌سازی ایران بر مبنای بررسی الگوی تغییرات TF و دیگر متغیرهای شیمیایی در چای سیاه مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج کسب شده با به کارگرفتن رگرسیون چند متغیره[13] تحت بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.[8]

بخش تجربی ـ مواد و روش‌ها

تهیه‌ی برگ سبز: در این تحقیق برگ بوته‌های چای از کلون ۱۰۰ ایستگاه چای فشالم در استان گیلان، واقع در عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۲۵ دقیقه‌ی شمالی و طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۲۵ دقیقه‌ی شرقی مورد استفاده قرارگرفته است. منطقه‌ی مزبور در ارتفاع ۷ متری سطح آزاد دریا قرار دارد. در این مرحله، برگ‌چینی به‌صورت چیدن برگ‌های جوان، شامل جوانه و دو برگ بالای گیاه، در صبح اولین روزهای خرداد به انجام رسید.

فرایند چای‌سازی: فراوری برگ‌های سبز چای در ایستگاه تحقیقاتی چای‌سازی «کاشف» واقع در لاهیجان، و در پایلوت آزمایشگاهی به شرح تفصیلی ذیل صورت پذیرفت:

با عبوردهی جریانی از هوای طبیعی و سپس اجباری بر مجموعه برگ‌های پهن شده روی شبکه‌ی مشبک فلزی و در ضخامت ۲cm، در مدت زمان ۱۸ تا ۲۰ ساعت پژمرده‌سازی سنتی و نیز CTC رطوبت برگ‌ها به ترتیب تا حد ۷۰٪ و نیز ۶۰٪ کاهش داده شد.

در ادامه‌ی روند پژمرده‌سازی برگ‌ها، پیچش‌دهی برگ‌ها با درنظر گرفتن روش سنتی و معمول و با استفاده از دستگاه ارتدوکس آزمایشگاهی به ظرفیت کل ۴ کیلوگرم برگ سبز چای به انجام رسید (۶۰ دقیقه پیچش‌دهی). با انتقال برگ‌های پیچش‌دهی شده به سالن تخمیر مجهز به کنترل دما و رطوبت، عملیات تخمیر آغاز شد. در روند چای‌سازی CTC با در نظر گرفتن برنامه‌یی از پیش تعیین شده برای عبوردهی برگ‌ها از دستگاه خردکننده (۳ بار عبوردهی برگ‌ها در مدت زمان ۱ دقیقه) برگ‌ها کاملاً خرد و شکسته شده و قطعه قطعه‌سازی آن در اندازه‌های کم‌تر از ۰/۲mm به انجام رسید. در این تحقیق، تخمیر در دمای 20°C صورت پذیرفته است.

به‌منظور جلوگیری از برقراری اختلافات دمایی بین قسمت‌های مختلف برگ‌های پخش شده در سینی و نیز توزیع اکسیژن در وضعیتی هماهنگ، هم‌زدگی ناحیه‌یی و جابه‌جایی برگ‌ها به‌صورتی منظم و در فواصل زمانی هر ۱۵ دقیقه یک‌بار صورت گرفته است.

تغییرات رطوبتی برگ‌ها در طی تخمیر بسیار ناچیزی بود و بنابراین حفظ رطوبت محیط تخمیر در حد ۵± ۹۰٪ به‌خوبی میسر شد. در فواصل زمانی هر ۳۰ دقیقه یک‌بار در روند تخمیر، از برگ‌ها نمونه تهیه شد و عملیات خشک‌کردن نمونه‌ها در 105°C طی زمان ۴۵ دقیقه به انجام رسید توقف خشک‌کردن در رسیدن رطوبت نمونه تا حد ۳٪ بوده است.

سنجش متغیرهای کیفی: متغیرهای کیفی چای سیاه مطابق روش شناخته شده‌یی مورد سنجش قرار گرفت.[7] مفاهیم A-E مربوط به تعیین ضرایب خاموشی مولار[14] مواد خالص است که در رابطه با روش طیف سنجی و بر طبق روندی مستند و معمول در روش‌های تخمیری برگ چای تعیین شده است. (برای توضیحات تفصیلی مطلب به پیوست ۲ مراجعه شود.)

۱. مقدار معینی از برگ چای خشک شده در حجم مشخصی از آب جوش قرار داده شد (۱۰ دقیقه در دمای جوش). پس از گذراندن چای از صافی، جذب نوری محلول صاف شده با استفاده از طیف‌سنج در طول موج ۴۲۰nm تعیین شد (متغیر A).

۲. مخلوط‌سازی چای از صافی عبور داده شده و ایزوبوتیل متیل‌کتن (IBMK) (۵۰ml>) صورت گرفته و با جداسازی مناسب فاز آبی و آلی از یکدیگر، اندازه‌گیری جذب نوری ۱ ml از فاز آلی

رقیق‌سازی شده با اتانول در طول موج ۳۸۰ nm به انجام رسید (متغیر B).

۳. حجم‌های برابر از لایه‌ی آلی و سدیم هیدروژن فسفات ($NaHPO_4$) مخلوط شده و جذب نوری ۱ml از فاز آلی حاصله رقیق شده با اتانول، در طول موج ۳۸۰ nm اندازه‌گیری شد (متغیر C).

۴. حجم‌های برابر از n-بوتانول و فاز آبی حاصل از مرحله ۲، کاملاً مخلوط شده و سپس ۱ml از هر فاز آلی (متغیر D) و آبی (متغیر E) با اتانول رقیق شده و جذب نوری آنها در ۳۸۰ nm اندازه‌گیری شد.

۵. اندازه‌گیری‌های مقادیر TF، TR و TLC طبق ضرائب و محاسبات ارائه شده مطابق روش (۱۰) به انجام رسید.

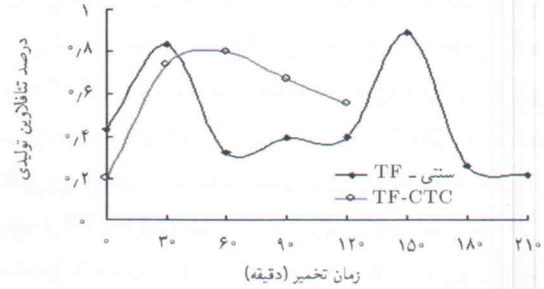
۶. در بررسی و تجزیه و تحلیل نتایج حاصل در مطالعه حاضر مدل رگرسیون چند متغیره به شکل مدل درجه دو و به‌صورت کلی زیر مورد استفاده قرار گرفت:[۸]

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + ... + \beta_P X^P + \varepsilon$$

در رابطه‌ی فوق ε نماد خطای تصادفی[۱۵] و نماد متغیر پیشگویی کننده[۱۶] (متغیر غیر وابسته) است و B_0، B_1 و B_2 نیز ضرایب متغیر X هستند و اینکه متغیر پاسخ به شکل حداقل مربعات پارابولا[۱۷] در نظر گرفته شده است. در مطالعه‌ی حاضر از نرم‌افزارهای Excel۲۰۰۰ و Matlab ۶.۵.۱ استفاده شده است.

نتایج و بحث

الگوی تغییرات مقدار TF کلی طی تخمیر برگ‌های چای در شکل ۱ ارائه شده است. با به‌کار گرفتن روند پژمرده‌سازی سنتی، مقدار TF کلی در دو زمان، طی تخمیر به میزان حداکثر بوده است. تشکیل TF علاوه بر برخورداری ابتدایی از سیری صعودی، با رسیدن به حداکثر مقدار و بدون گذر از موقعیتی ایستایی کاهش یافته است. پس از مدت ۶۰ دقیقه، برقراری موقعیتی ایستایی در سیر کاهشی TF مشاهده شد. الگوی تغییرات TF در ساعت دوم تخمیر (از ۱۲۰ دقیقه تا پایان تخمیر)



شکل ۱. سیر زمانی تغییرات در تولید تئافلاوین در طی تخمیر برگ‌های چای.

به‌شکلی مشابه تغییرات در ساعت اول بوده و روند کار تکرار شده است. اکسیداسیون آنزیمی کتچین‌ها جزء اصلی ترکیبات پلی‌فنلی برگ‌های چای در طی عملیات تخمیر، تشکیل گروه‌های TF را به دنبال دارد. از این رو، تولید TF به‌عنوان محصول واکنش آنزیمی (PPO) در مراحل اولیه‌ی تخمیر (۳۰ دقیقه نخست) به‌صورت افزایشی است. ضمن آن که سیر نزولی TF به‌علت پیش‌ماده بودن آن در دیگر واکنش‌های آنزیمی است. طبیعت واکنش‌های شناخته شده در این مورد از نوع ادغام مولکولی مجتمع‌سازی بوده و حاصل، تشکیل گروه پلیمرهای TR است (پیوست ۱). وجود ناهماهنگی و یکسان نبودن کار پیچش‌دهی سنتی به ابراز مجدد فعالیت آنزیم PPO نهفته در برگ‌های خرد نشده منتهی می‌شود و الگوی تغییرات TF به ترتیبی مشابه با آنچه که پیش‌تر برای ساعت اول تخمیر بیان شد، تکرار می‌شود.

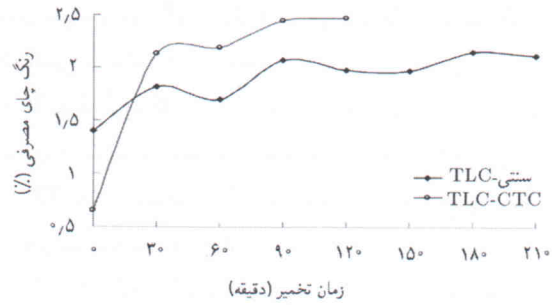
از زاویه‌یی دیگر، باید به چیدن برگ‌های جوان و برگ‌های رسیده (سطح بالاتر فیزیولوژیک) با هم، به شکل برگ‌چینیِ درهم در برداشتِ چای در شمال کشور اشاره کرد. حد و میزان فعالیت کل و نیز فعالیت ویژه‌ی آنزیم PPO در جوانه و برگ‌های جوان در برگ‌چینی در بوته‌ی چای، در مقایسه با این فعالیت‌ها در برگ‌های رسیده از نظر فیزیولوژیکی گیاه، به ترتیب بیش از ۳ و ۲۰ برابر گزارش شده است.[۹و۱۰] از این رو چیدن برگ‌های بیشتر، برگ‌هایی با سطح فیزیولوژیک بالاتر، کاهش بیشتری از فعالیت آنزیم PPO و لذا تولید کم‌تر TF را به همراه دارد. چیدن جوانه و دو برگ از برگ‌های جوان واقعاً در همبستگی قابل ملاحظه‌یی با تولید TF و مقدار آن قرار دارد. ضمن آن که آنزیم POD، دیگر آنزیمِ کلیدی در تخمیر برگ‌های چای با داشتن فعالیت تخمیری و شکست حلقه فلوروگلوسینول[۱۸] ترکیب TF، در تشکیل مؤثر TF نقشی تأثیرگذار و کاهشی دارد.[۵و۶] به واقع پیشی گرفتن شدت و سرعت مصرف TF از میزان تولید آن در حین تخمیر، تنها ناشی از شرکت کردن TF در واکنش‌های پلیمریزاسیون و ادغام و تراکم مولکولی نیست، بلکه ابراز فعالیت POD با توجه به جنبه‌ی تخریب ساختاری TF، به نوعی به مصرف نامطلوب آن اشاره دارد.

همچنین کمیت TF با چیدن پنج برگ به همراه جوانه، یا چیدن جوانه به‌تنهایی به بیش از دو برابر کاهش می‌یابد.[۱۱] در تهیه‌ی نمونه‌های مورد آزمایش در تحقیق حاضر، از روش برگ‌چینیِ درهم استفاده شده است. عدم رعایت استاندارد و معیار شناخته شده‌ی جهانی (یک غنچه و دو برگ)، در برگ‌چینی در منطقه‌ی شمال کشور خود در نامعمول بودن الگوی تغییرات TF حاصله نقش دارد (شکل ۱) به واقع برای بهبود روند خرد و ریزسازی برگ‌های چای در سال‌های اخیر، امکان استفاده از سیستم آنزیمی قارچی (پکتینازها) نیز مورد ملاحظه قرار گرفته است. با آبکافت (هیدرولیز) آنزیمی ترکیبات بسپاری نظیر سلولز، همی‌سلولز و پکتین موجود در برگ‌های چای، ریزسازی برگ‌ها با هماهنگی بهتری

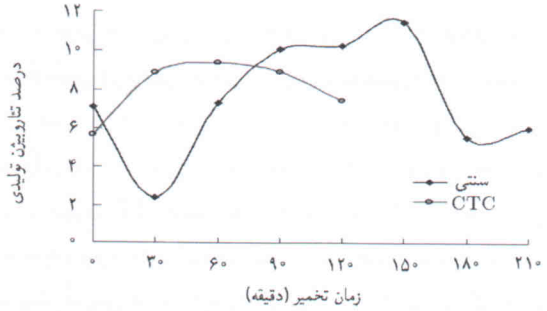
به انجام می‌رسد و در نتیجه، عملیات تخمیری بهبود می‌یابد.[۷] استفاده از آنزیم قارچی حتی با خلوص کم‌تر در مرحله‌ی تخمیر برگ‌های چای، تولید TF را به میزان ۶۳-۴۴٪ موجب شده است. ضمن آنکه اضافه کردن آنزیم‌های پکتیناز در خلوص بیشتر بر افزایش میزان TF تولیدی تأثیر کم‌تری داشته است.[۷]

با استفاده از روش CTC در پژمرده‌سازی برگ‌های چای، رفتاری متعارف در روند تخمیر مشاهده شد (شکل ۱). در مدت ۶۰ دقیقه، سطح TF تولیدی به حداکثر مقدار رسیده است. ضمن آنکه در روش CTC و در مقایسه با روش سنتی، روند کاهش $(\Delta TF/\Delta t)$TF در زمان‌های معادل، از وضعیت کندتری برخوردار است (به‌ترتیب ۰٫۰۰۴٪ TF/min در روش CTC و ۰٫۰۱۷٪ TF/min در روش سنتی).

در شکل ۲ الگوی تغییرات رنگ چای ارائه شده است. علاوه بر آن سیر افزایشی تولید TR در روند تخمیر در شکل ۳ مشاهده می‌شود. TRتولیدی نقشی تعیین کننده بر رنگ چای دارد. البته در تخمیرهای طولانی مدت، کاهش مقدار TR پس از $2\frac{1}{2}$ ساعت و همراه با افت میزان مواد جامد محلول، گزارش شده است.[۶] در مطالعه‌ی حاضر با استفاده از پژمرده‌سازی به روش CTC در چای‌سازی، حداکثر رنگ



شکل ۲. سیر زمانی تغییرات در رنگ چای مصرفی در طی تخمیر برگ‌های چای (به‌توضیح ارائه شده در متن شکل ۱ توجه شود.)



شکل ۳. سیر زمانی تغییرات در تولید تئاروبیژن در طی تخمیر برگ‌های چای (به‌توضیح ارائه شده در متن شکل ۱ توجه شود.)

جدول ۱. تأثیر گونه چای بر عملیات تخمیر برگ‌های چای مبتنی برنسبت TF : TR*.

گونه چای	روش پیچش‌دهی	TF:TR*
آسام	CTC	۰٫۰۷۸۹
کنیا	CTC	۰٫۰۸۲۲
سیلان	سنتی	۰٫۰۳۷۳
چین	سنتی	۰٫۰۳۶۲
دارجلینگ	سنتی	۰٫۰۳۴۸
ایران (۱۰۰ کلون)	CTC	۰٫۰۸۵۱
ایران(۱۰۰ کلون)	سنتی	۰٫۰۳۵ (۰٫۰۷۷۷)**

* در محاسبه‌ی نسبت TF:TR از مقادیر TF و TR ارائه شده در مرجع ۱۳ استفاده شده است.

** رقم داخل پرانتز مربوط به زمان ۱۵۰ دقیقه تخمیر، و رقم دیگر مربوط به زمان تخمیر ۳۰ دقیقه است.

چای تهیه شده در زمان ۱۲۰ دقیقه ۲٫۴۷٪ بوده که در مقایسه با تولید رنگ برای چای حاصل از روش سنتی پیچش‌دهی برگ‌ها حدود ۲۵٪ افزایش را نشان می‌دهد. (شکل ۲) در مقایسه‌ی سرعت تشکیل رنگدانه‌ها $(\Delta TLC/\Delta t)$ و تولید رنگ در چای تهیه شده به دو روش پیچش‌دهی برگ چای به روش سنتی و روش CTC به ترتیب به مقادیر ذیل اشاره می‌شود: ۰٫۰۰۴۱، ۰٫۰۱۵۱ TLC /min٪. از این رو تسریع در تشکیل رنگ چای تهیه شده در چای‌سازی با روش CTC بیش از ۳٫۵ برابر بوده است. در تحقیق حاضر برای فرایند چای‌سازی با استفاده از روش پیچش‌دهی CTC برای برگ‌ها، مدت زمان بهینه‌ی تخمیر ۶۰ دقیقه پیشنهاد می‌شود.

تأثیر گونه‌ی چای بر ترکیبات پلی‌فنلی (کتچین‌ها)، TF و TR به طور تفصیلی مورد مطالعه قرارگرفته است و در تهیه این گزارش از نتایج حاصل از چهل سال کار تحقیقاتی در خصوص چای استفاده شده است.[۱۲] گونه‌های چای ایران عمدتاً دارای مشخصات فیزیولوژیک گونه چینی است و زیرگروه خاصی از این گونه به نام ۱۰۰ cloneدارای خصوصیات ژنتیکی منحصر به‌فرد منطقه‌ی گیلان است.[۱۹] جدول ۱ نشانگر موقعیت گونه‌ی چای ایران در ارتباط با سایر گونه‌های چای است. تأثیر مستقیم TF و TR بر رنگ و طعم و مزه‌ی چای را می‌توان به‌عنوان شاخص مناسبی بر چگونگی انجام عملیات تخمیر برگ‌های چای به کار گرفت، اگرچه اجزاء مختلف تشکیل‌دهنده‌ی تئافلاوین بر طعم، مزه و عطر چای تأثیر یکسانی ندارند. نقش تئافلاوین‌دی‌گالات[۲۰] و تئافلاوین‌منوگالات[۲۱] بر طعم و مزه‌ی چای، در مقایسه با طعم و عطر حاصله از TF به ترتیب بیش از ۶ و ۲ برابر ارزیابی شده است.[۱۳] در تهیه جدول ۱ از نسبت TF:TR استفاده شده است. در بهترین حالت تخمیر این نسبت به عدد ۰٫۱ نزدیک می‌شود که شاخص بیشترین

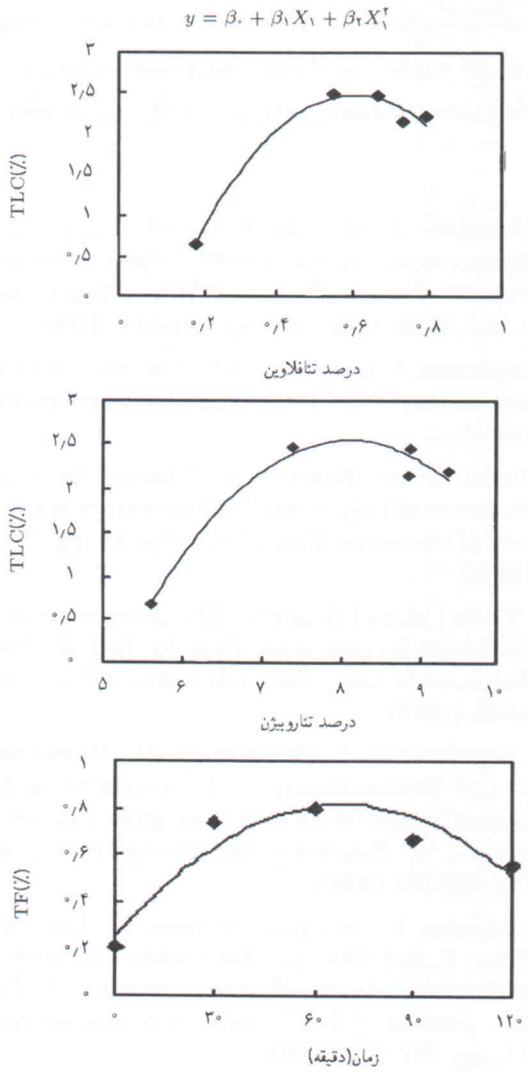
مقدار TF تولیدی و لذا کیفیت بهتر چای است.[۱۴و۱۵] طولانی‌تر شدن عملیات تخمیر در روش سنتی تا زمان ۱۵۰ دقیقه، نسبت به زمان ۳۰ دقیقه، به بیشتر شدن این نسبت می‌انجامد.

سلیقه‌ی طیف مصرف‌کننده‌ی چای ضمن آن که موضوعی فرهنگی است، در بازار پذیرش و فروش محصول چای و لذا ملاحظات اقتصادی در این زمینه تأثیر ویژه‌یی دارد. در تحقیق حاضر اثر روند پژمرده‌سازی سنتی و CTC بر رنگ چای (شفافیت رنگ) که در تعیین کیفیت و مرغوبیت چای در بازار فروش عاملی شناخته شده است، به‌صورت رگرسیون بررسی شده و میزان وجود همبستگی میان زمان تخمیر برگ‌های چای و متغیرهای شیمیایی چای مصرفی مورد ارزیابی قرارگرفت. از این رو، ارائه‌ی رابطه(ها) در زمینه‌ی توان پیش‌بینی مرغوبیت چای مصرفی به واسطه‌ی سنجش متغیرهای شیمیایی، توجیهی معقول دارد.[۷و۱۳] عموماً کمیت TLC(٪) را تابعی از مقدار تئافلاوین و تئاروبیژین برشمرده‌اند که تشکیل آنها به زمان تخمیر بستگی دارد.[۱۴] در مطالعه‌ی حاضر رگرسیون خطی ساده برای بیان ارتباط و همبستگی میان متغیرهای شیمیایی در تعیین کیفیت و مرغوبیت چای، و نیز به منظور جمع‌بندی نتایج و ارائه‌ی نمودار بهینه‌سازی شده‌یی از نتایج پاسخ‌گو نبود.[۱۶] با استفاده از رگرسیون چند متغیره‌ی درجه دو، جمع‌بندی نتایج به‌صورت مناسبتری میسر شد(۹): $y=\beta_0 + \beta_1 + X_1 + \beta_2 X_1^2$

ضرائب β_2 و β_1 و β_0 در جدول ۲ ارائه شده است. علامت مثبت ضریب نشانگر اینست که با افزایش متغیر (X) (برای مثال TF(٪)) مقدار متغیر پاسخ (TLC٪ برای مثال) افزایش می‌یابد، در حالی که علامت منفی ضریب بیانگر افزایش y با کاهش X است. چنان که TF(٪) با گذشت زمان تخمیر کاهش می‌یابد که خود نشانگر تبدیل TF به TR و در نتیجه ازدیاد TR است؛ و این مجموعه تغییر افزایش رنگ چای را به‌همراه دارد. در شکل ۴ این تغییرات به‌صورت نمودار حاصل از رگرسیون چندمتغیره‌ی درجه دو ارائه شده است. ضریب تعیین همبستگی[۲۲] نیز در جدول ۲ ارائه شده است. این ضریب بیانگر درصدی از اختلافات موجود در متغیر وابسته‌ی Y است که با توجه به وجود همبستگی با متغیر X قابل تعریف و توجیه است.[۸] برای مثال در مورد مشخصه‌ی شفافیت رنگ چای مصرفی در رابطه با متغیر

جدول ۲. بهینه‌سازی نتایج حاصل از پیچش‌دهی برگ‌ها با روش CTC در مطالعه حاضر با استفاده از رگرسیون چند متغیره‌ی درجه دو.

متغیر X در مقابل Y	ضرایب رابطه بهینه‌سازی شده			ضریب همبستگی
	β_0	β_1	β_2	R^2
TLC v.s. TF	-۱۰٫۵۸۶	۱۲٫۹۵۹	-۱٫۵۰۵	۰٫۹۸۴
TLC v.s. TR	-۰٫۳۰۲۳	۴٫۹۲۴	-۱۷٫۵۰۹	۰٫۹۶۳۱
زمان v.s. TF	-۰٫۰۰۰۱	۰٫۰۱۶۴	۰٫۲۵۰۳	۰٫۸۹۴



شکل ۴. نمودار رگرسیون چند متغیره‌ی درجه دو برای جمع‌بندی و بهینه‌سازی نتایج حاصل از مطالعه حاضر (به توضیح ارائه شده در متن شکل ۱ توجه شود).

شیمیایی TF تولیدی در طی تخمیر، اظهار بر این است که بیش از ۹۹٪ از تغییر و اختلافات موجود در متغیر رنگ تولیدی به‌واسطه‌ی وجود همبستگی آن با TF، توسط این متغیر شیمیایی قابل تعریف و توضیح است.

نتیجه‌گیری

مقدار ترکیبات پلی‌فنلی در گونه‌های مختلف چای در سطح جهانی متفاوت است و با تنظیم شرایط عملیات تخمیر و استفاده از روش پیچش‌دهی CTC در فرایند چای‌سازی TF و نیز TR در مقادیر مختلفی تولید می‌شود. مرغوبیت چای در ارتباط با تأمین نظر مصرف‌کننده امری فرهنگی است و لذا نسبت TF:TR در محدوده‌یی نسبتاً وسیع

می‌تواند در تغییر باشد. با شناخت هرچه بیشتر ارزش آنتی‌اکسیدان‌ها در تأمین سلامت انسان و پدیدار شدن گرایش راستین به مصرف چای در سطح جهانی، بازنگری بر بازار داخلی مصرف چای ضروری است.

در انجام این مهم واضحاً ملاحظات علمی بر فرایند چای‌سازی کشور باید بر بهبود روش‌ها و به‌ویژه در پیچش‌دهی و نیز عملیات تخمیر متمرکز شود.

پانوشت

1. Cut, Tear & Curl
2. clone
3. catechin
4. epicatechin
5. epigallocatechin
6. epicatechin gllate
7. epigallocatechin gallate
8. theaflavin
9. thearubigin
10. conventional process (orthodox)
11. polyphenol oxidase:oxygen oxidoreductase;(E C_o 1. 10. 3. 1-1 ,2)
12. peroxidase(POD)
13. polynomial regression model
14. molar extinction coefficients
15. random error
16. predictor(s)
17. least squares parabola
18. phioroglucinoi
19. سطح و مقدار ترکیبات پلی‌فنلی گونه چای چینی در حد پایینی است (۳۴۹۹ میلی‌گرم به ازاء صد گرم چای خشک)؛ در حالی‌که مقدار پلی‌فنل‌ها در گونه دارجلینگ ۵۸۴۳ میلی‌گرم به ازاء صد گرم چای خشک می‌باشد (مرجع ۱۲).
20. theaflavin digallate
21. theaflavin monogallate
22. coefficient of determination

منابع

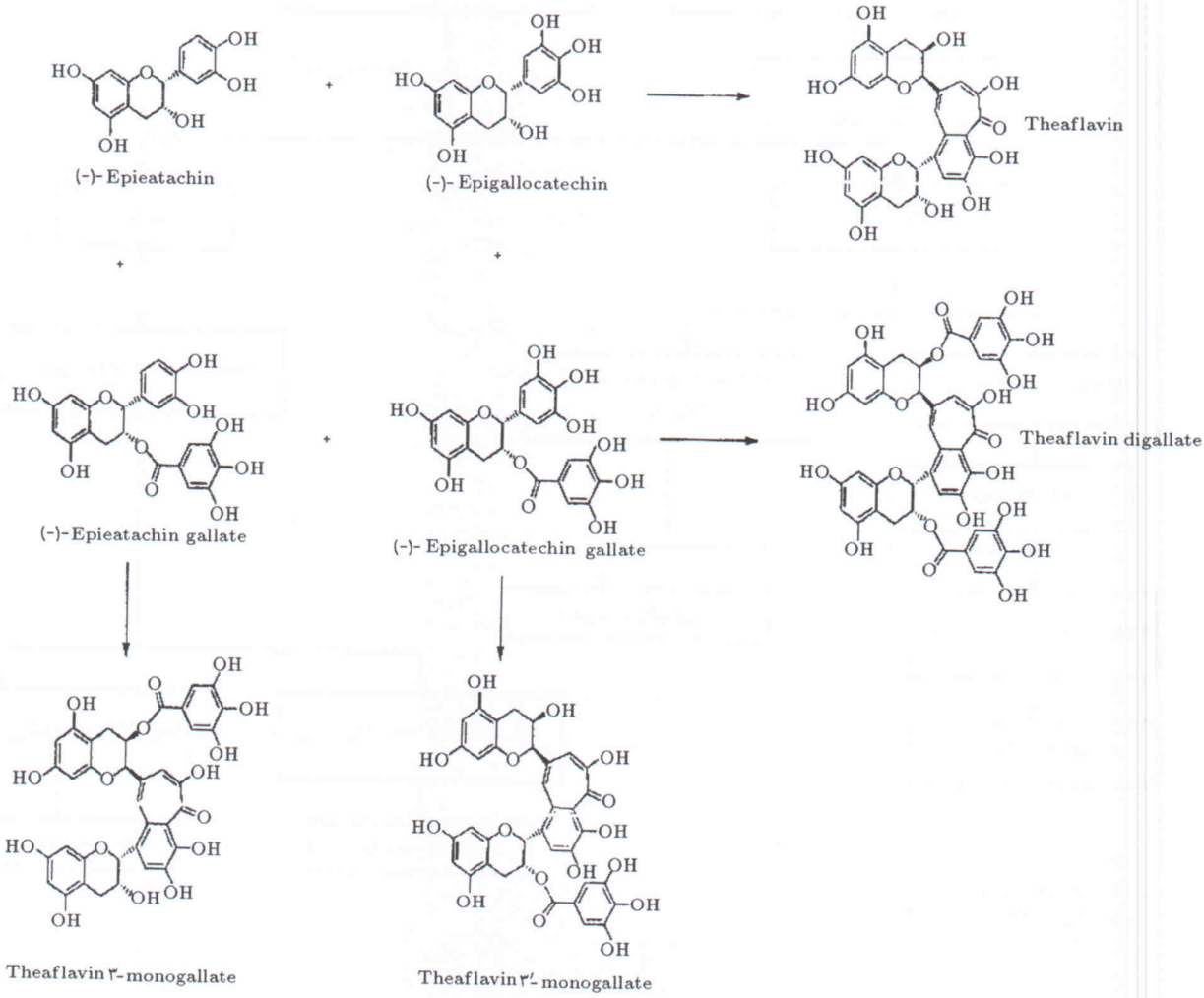
1. Iskin N. M., Biochemistry of Foods, 2nd ed., Academic Press (1990).
2. Robertson A. & Bendall D. S., Production and HPLC analysis of black tea theaflavin and thearubigins during INVITRO oxidation, *Phytochemistry*, **22**, (4), pp.883-887 (1983).
3. Bailey R.G., and McDowell I. et al, Use of an HPLC Photodiode-Array Detector in the Study of the Nature of a Black Tea Liquor, *J. Sci. Food Agric*, **52**, pp. 509-525 (1990).
4. Owuor P. O., Changes in Theaflavin Composition and Astringency during black tea fermentation, Food Chemistry, **51**, pp. 251-254 (1994).
5. Finger A., In-vitro studies on the Effect of Polyphenol Oxidase and Peroxidase on the Formation of Polyphenolic Black Tea Constituents, J. Food Agric., 66, pp. 293-305 (1994).
6. Cloughley J. B., The Effect of Temperature on Enzyme Activity during the Fermentation phase of Black Tea Manufacture, *J. Sci. Food Agric.*, **31**, pp. 920-923 (1980)
7. Cloughley J. B., The Effect of Fermentation Temperature on the Quality Parameters and Price Evaluation of Central African Black Teas, *J. Sci. Food Agric.*, **31**, pp. 911-919 (1980).
8. Vardeman, S. B., Statistics for Engineering Problem Solving, PWS Publishing Company, Boston, (1994).
9. Takeo T. and Baker J. E., Changes in multiple forms of Polyphenol Oxidase during maturation of tea leaves, *Food Chemistry,* **12**, pp. 21-24 (1973).
10. Tufekci M. and Guner S. , The Determination of Optimum Fermentation Time in Turkish Black Tea manufacture, *Food Chemistry,* **60** (1), pp. 53-56 (1997).
11. Angayarkanni J., Palaniswamy M., Murugesan, S. and Swaminathan, K., Improvement of Tea Leaves Fermentation with Aspergillus spp. Pectinase, *J. of Bioscience and Bioengineering,* **94**, (4), 299-303 (2002).
12. Peterson J., Dwyer, J., Jacques, P., Rand, W., Prior, R. and Chui, K., Tea Variety and brewing techniques influence flavonoid content of Black tea, *Journal of Food composition and analysis,* **17**, pp. 397-405 (2004).
13. Owuor P.O. and Obanda M. , Clonal Variation in the individual theaflavin leaves and their impact on astringency and sensory evaluations, *Food Chemistry,* **54**, pp. 273-277 (1995).
14. Owuor P. O. and Reeves S. G., Optimising fermentation time in black tea manufacture, *Food Chemistry,* **21**, pp. 195-203 (1986).
15. Obanda M. and Owuor P. O., Changes in thearubigin fraction and theaflavin levels due to variation in processing conditions and their influence on black tea liquor brightness and total colour, *Food Chemistry,* **85**, pp.163-173 (2004).
16. حافظی مسعود، «بررسی نقش آنزیم‌ها در مرحله تخمیر به‌منظور بهینه‌سازی کیفیت چای سیاه ایران»، پایان‌نامه کارشناسی ارشد مهندسی شیمی ـ بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، (۱۳۸۳).
17. Bonnely, S., Adrienne, L., Lewis, J. and Astill, C. A model oxidation system to study oxidized phenolic compounds present in black tea, Food Chemistry, **83**, pp. 485-492 (2003).

پیوست۱

اجزاء مختلف کتچین‌های برگ‌های تازه و جوان گیاه چای به شرح جدول ۱ پیوست ۱ است. در تشخیص روند تشکیل مجتمع‌های مولکولی نظیر TF در حین تخمیر اکسایشی برگ چای از مدلی آنزیمی استفاده شده است. به شکلی که شبیه‌سازی تغییرات مولکولی در تولید چای سیاه به طور موفقیت آمیز توسط این مدل قابل تشخیص است. شرکت کتچین‌ها در واکنش‌های تخمیری طبق یافته‌های مدل آنزیمی به شرح ارائه شده در شکل ۱ پیوست ۱ است. کمیت‌ها به‌طور نسبی تعیین و گزارش شده است. در تعیین دقیق‌تر و بیان کمیت‌ها به‌صورت مطلق، تغییرات جزئی در مقادیر دیده می‌شود.

جدول ۱. اجزاء متشکله‌ی کتچین‌های برگ چای.

کتچین	مقدار(٪)
(+) ـ گالوکتچین(+GC)	۱٫۶
(-) ـ اپی گالوکتچین(EGC)	۱۹٫۳
(-) ـ اپی کتچین(EC)	۶٫۴
(-) ـ اپی گالوکتچین گالات(EGCG)	۵۹٫۱
(-) ـ اپی کتچین گالات(ECG)	۱۳٫۷



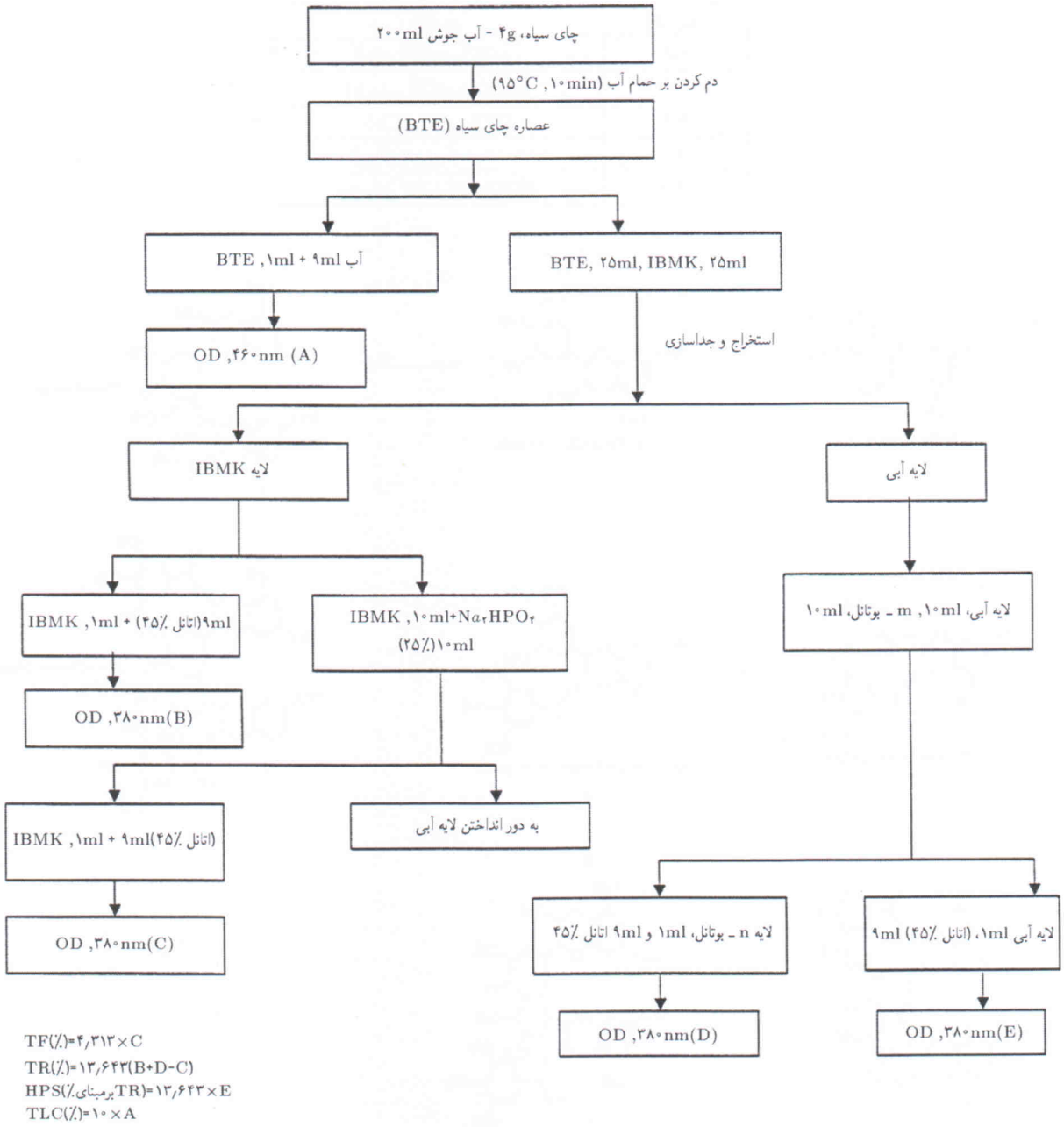
شکل ۱. تشکیل TFs در تخمیر اکسایشی برگ چای (طبق مدل آنزیمی پیشنهادی[۱۷]).

پیوست ۲

روش استخراج با حلال (متغیرهای شیمیایی تعیین‌کننده کیفیت چای)[۱۰]

IBMK: ایزوبوتیل ــ متیل کتن (isobutyl-methyl ketone)

اتانل:Eth:



شکل ۲. روش استخراج با حلال (متغیرهای شیمیایی تعیین‌کننده کیفیت چای).