متوفرة على الموقع: http://www.basra-science-journal.org

ISSN –1817 –2695

دراسة قابلية بعض الفطريات الخيطية على إنتاج مضادات الأكسدة

[1]علي خضير جابرالركابي و [2]عبد الحافظ الدبون و [1]هديل محمد وادي

[1]قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية/كلية الزراعة/ جامعة البصرة

[2]قسم الأحياء البحرية/مركز علوم البحار/جامعة البصرة

الخلاصة

درست قابلية 92 عزلة من الفطريات الخيطية المعزولة من مصادر طبيعية لإنتاج سموم الأفلاتوكسين ، إذ أعطت 9 عزلات للفطر *Aspergillus flavus* نتائج موجبة لإنتاج سموم الأفلاتوكسين ، بينما أعطت 24 عزلة للفطر *A. niger* و 15 عزلة *A. terreus* و 6 عزلات *A. ochraceus* و 5 عزلات *Fusarium oxysporum* و عزلتان *Mucor* sp. و 5 عزلات *Penicillium oxalicum* و 12 عزلة *Penicillium* sp. و 14 عزلة *Rhizopus stolonifer* ولجميع المصادر المعزولة منها نتائج سلبية لإنتاج سموم الأفلاتوكسين. أُختبرت قابلية 83 عزلة من الفطريات الخيطية (غير المنتجة للأفلاتوكسين) لإنتاج مضادات الأكسدة وأُنتخبت 6 عزلات فطرية التي أعطت أفضل فعالية مضادة للأكسدة وهي *A. niger* S1 و *F . oxysporum* S1 و *R. stolonifer* B3 و *Mucor* sp. S1 و *Penicillium* sp. A2 و *A. terreus* S1 ، وكانت العزلة *A. niger* S1 هي الأفضل في قابليتها لإنتاج مركبات مضادة للأكسدة . درست ظروف التخمر المثلى لإنتاج المركبات المضادة للأكسدة لعزلة *Aspergillus niger* S1 المنتخبة وأظهرت النتائج بان الرقم الهيدروجيني الإبتدائي الأمثل كان 7 ، درجة الحرارة المثلى للحضن كانت 30 م ، مدة الحضن المثلى كانت 15 يوماً ، أفضل وسط للتخمر هو الرز. أُختبرت قابلية المذيبات لإستخلاص المركبات المضادة للأكسدة من الرز المتخمر بوساطة عفن *A. niger* S1 وكان أفضل مذيب للإستخلاص هو خلات الأثيل.

الكلمات المفتاحية : الفطريات الخيطية ، مضادات الأكسدة

المقدمة

تستهلك الأغذية الشرقية التقليدية المتخمرة مثل الرز المتخمر Sake و Yakju وفول الصويا المتخمرة Miso و Douch وصلصة الصويا Soy Sauce وغيرها بشكل واسع في البلدان الشرقية منذ وقت طويل ، وقد أشار الباحثون الى القيمة الغذائية لهذه الأغذية لما تحتويه من أحماض أمينية وسكريات وفيتامينات تنتجها الأحياء المجهرية أثناء عملية التخمر [30 ; 26].إن البلدان الشرقية حضرت منتجات الأغذية المتخمرة من الفطريات الخيطية مثل فطريات *Aspergillus* و *Rhizopus* و *Penicillium* التي نقلت الى مزارع صلبة Solid Culture من فول الصويا و الرز والشعير المطبوخ لتحضير بادئات الأحياء المجهرية التي تسمى بالكوجي Koji [6] ، كما أن الأغذية المتخمرة من منتجات فول الصويا مثل ميزو

miso و تيمبا tempeh و ناتو natto الملقحة بـــفطريات *Aspergillus oryzae* و *oligosporus Rhizopus* و بكتريا *Bacillus natto* على التوالي تحتوي على مركبات مضادة للأكسدة تكونت خلال عملية التخمر[14 ; 6] . إن أكسدة الدهون سبب رئيسي لفساد الأغذية بفعل أنواع الأوكسجين الفعالة Reactive Oxygen Species (ROS) التي تظهر في جسم الإنسان وفي الأنظمة الغذائية ، وهذه الجذور تسبب الإصابة بالعديد من الأضرار من خلال أكسدة الجزيئات الحيوية مثل الكاربوهيدرات والبروتينات والدهون مما يؤدي الى موت الخلايا وضرر الأنسجة [29]، لذلك كان لابد من إستعمال مضادات الأكسدة أو الأغذية المحتوية عليها لتساعد جسم الإنسان على إختزال ضرر الأكسدة وتؤخر حدوث عدة أمراض ، لذا أُستعملت مضادات الأكسدة الصناعية مثل BHT و BHA و PG و TBHQ ولكن قيّد إستعمالها في الأنظمة الغذائية لما أُثير عن انتاجها مواد مسرطنة أثناء تحللها ، لذلك جرى البحث عن مضادات الأكسدة الطبيعية التي إزداد الطلب عليها في السنوات الأخيرة [18] ، إذ إستعملت مضادات الأكسدة الطبيعية مثل التوكوفيرول ومستخلصات الأعشاب لكن بصورة محدودة بسبب تكاليفها العالية وتكون ذات نكهات وألوان خاصة ، فضلاً عن إن المصادر النباتية تحتاج الى مساحات واسعة من الأرض عند زراعتها وكميات كبيرة من النباتات للحصول على مضادات الأكسدة [34] ، لذا أُستعملت في الوقت الحاضر تقنيات عديدة في إنتاج مضادات الأكسدة من مصادر طبيعية من الأحياء المجهرية [17] إذ تمتاز هذه التقنيات بكونها إقتصادية وأكثر فعالية وسهولة الحصول عليها [35] ، لذ هدفت هذه الدراسة لعزل وغربلة الفطريات واختبار قابليتها لانتاج مضادات الأكسدة

المواد وطرائق العمل

أولا ًالمواد المستخدمة: عزلت الفطريات من المصادر الطبيعية المختلفة (التربة و الفواكه و الخبز والهواء) وأستعمل وسط مستخلص الشعير الصلب لعزل الفطريات وحفظها والمجهز من قبل شركة Hi-media الهندية ، واستخدم وسط خلاصة جوز الهند الصلب المحضر الوسط حسب طريقة [8] المتضمنة خلط 100 غم من مبروش جوز الهند مع 300 مل من الماء المقطر الساخن في خلاط كهربائي ، ورشح المحلول من خلال قطعة قماش ململ ثم أُكمل الراشح الى 600 مل ماء مقطر وأُضيف الآكار بنسبة 1.5 % ثم عقم الوسط . كما أُضيف للوسط الزرعي المضاد الحيوي البكتيري كلورامفينيكول بمقدار 250 ملغم / لتر قبل التعقيم لمنع النمو البكتيري، واستعمل وسط زابك - الخميرة الصلب حضر حسب الطريقة التي ذكرها [21]

ثانياً طرائق العمل

1-تجهيز العزلات: تم الحصول على العزلات الفطرية من مصادر التربة المختلفة (المنزلية و الصحراوية والنهرية) في محافظة البصرة إذ وضعت في أكياس بولي أثلين ونقلت للمختبر لعزل الفطريات منها أما الخبز والفاكهة (البرتقال و الليمون والطماطة) فقد تم تنمية العفن عليها بصورة مباشرة بعد توفير الظروف الملائمة لنمو الأعفان من درجة حرارة ورطوبة .

2- عزل الفطريات

عزلت الفطريات من التربة بإستعمال طريقة التخافيف العشرية حسب [4]، وعزلت الفطريات من الفاكهة والخبز بصورة مباشرة من المادة الغذائية النامي عليها الفطر وزرعت في أطباق بتري معقمة إحتوت على الوسط الزرعي MEA ، أما العزل من الهواء فقد عرضت الأطباق الحاوية على الوسط الزرعي للهواء لمدة 10 دقائق بعدها حضنت الأطباق في درجة حرارة 30 م لمدة 5 أيام. نقلت الأعفان النامية بوساطة ناقل معدني الى أطباق بتري معقمة أُخرى حاوية على الوسط الزرعي MEA كل على حده وحضنت بنفس

ظروف الزرع وحفظت المستعمرات النقية في أوساط زرعية مائلة عند درجة حرارة 4 م [16]. كما شخصت العزلات الفطرية المعزولة من مصادر محلية مختلفة في مختبر التقنية الحياتية التابع لقسم الأحياء البحرية / مركز علوم البحار / جامعة البصرة ، وفقاً للمراجع العلمية [5 ; 9 ;31 ; 15 ; 28].

3- الكشف عن الأفلاتوكسين: إعتمدت طريقة بخار الأمونيا Ammonia Vapor إستناداً الى [28] لإختبار قابلية العزلات الفطرية التي تم عزلها من المصادر المختلفة في إنتاج الأفلاتوكسين ونشطت هذه العزلات قبل 5 أيام من إجراء التجربة وذلك بزرعها على وسط MEA وبعدها تم نقل جزء من اللقاح الفطري من حافة مستعمرة العزلة المراد إختبارها الى مركز طبق مستخلص جوز الهند CEA ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 م لمدة 5 أيام ، بعدها وضعت أوراق ترشيح مبللة بوساطة 20 % من محلول الأمونيا في غطاء الطبق وحضنت الأطباق بصورة مقلوبة في درجة حرارة 25 م ، وفحصت الأطباق بعد مرور ساعة واحدة و 24 ساعة من الحضن .

4- معلق الأبواغ:حضر العالق البوغي بتنشيط الأعفان التي لقحت على وسط MEA المائل وحضنت في درجة حرارة 30 م لمدة 5 أيام . غمر سطح الوسط بماء مقطر معقم ورج جيداً ثم أُخذ 5 مل من العالق وحسبت عدد الأبواغ بوساطة شريحة عد كريات الدم Haemocytometer وعدل التركيز النهائي بالماء المقطر المعقم ليصبح 1×10^{7} بوغ / مل [36].

5- عملية التخمر:حضر الرز المتخمر Rice Koji حسب طريقة [16] ، إذ نقع الرز بوزن 50 غم في ماء مقطر لمدة ساعة في دورق مخروطي سعة 250 مل وتم تعقيمه في جهاز الموصدة في درجة حرارة 121 م وتحت ضغط 15 باوند / إنج^{2} ولمدة 15 دقيقة بعدها ترك الوسط ليبرد وتم رش سطح الرز المعقم والمبرد بالمعلق البوغي بتركيز 1×10^{7} بوغ / مل وحضن في درجة حرارة 30 م لمدة 15 يوماً.

6- العوامل المؤثرة في عملية التخمر

6-1- الرقم الهيدروجيني: أُستعملت أرقام هيدروجينية مختلفة 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 و11 من وسط الرز الذي لقح بواقع 1×10^{7} بوغ / مل وحضن لمدة 15 يوماً بدرجة حرارة 30 م ، وضبطت الارقام الهيدروجينية باستعمال حامض وقاعدة مخففين بعد التعقيم .

6-2- درجات الحرارة: أستعملت درجات حرارة مختلفة 25 و 30 و 35 م على التوالي إذ لقح وسط التخمر بواقع 1×10^{7} بوغ / مل ورقم هيدروجيني 7 ومدة حضن 15 يوماً على وسط الرز المتخمر

6-3- مدة الحضن:أستعملت مدد زمنية مختلفة 0 و 3 و 5 و 7 و 9 و11 و 13 و 15 و 17 و 19 و 21 يوماً على التوالي وأُستعمل وسط الرز الذي لقح بواقع 1×10^{7} بوغ / مل ورقم هيدروجيني 7 و درجة حرارة 30 م.

6-4- وسط التخمر: أُستعملت أوساط زرعية مختلفة حنطة ونخالة الحنطة و شعير وكسبة فول الصويا و رز إذ لقح الوسط باللقاح الفطري بواقع 1×10^{7} بوغ / مل وحضنت في درجة حرارة 30 م لمدة 15 يوماً ورقم هيدروجيني 7 .

7- عملية الإستخلاص

7-1-نوع المذيب:أُستعملت أنواع مختلفة من المذيبات لأستخلاص المركبات المضادة للأكسدة EAERK التي تضمنت خلات الأثيل و الماء و الإيثانول و الميثانول والهكسان و كلوروفورم وثنائي أثيل إيثر.

7-2- إستخلاص المواد المضادة للأكسدة من الرز المتخمر: أُستعملت طريقة [36] في إستخلاص المواد المضادة للأكسدة ' إذ خلط الرز المتخمرذ في الخلاط الكهربائي لعدة مرات ووضع في قمع الفصل وأُضيف اليه 100 مل من خلات الأثيل للأستخلاص ، رج لمدة 20 دقيقة وجمعت الطبقة العضوية ورشحت ثم أُضيفت كبريتات الصوديوم اللامائية الى الراشح بنسبة 1 % . ركزّ الراشح بوساطة المبخر الدوّار في درجة حرارة 30 م .

8- قياس الفعالية المضادة للأكسدة

أُتبعت طريقة الثايوسيانات التي ذكرها[7] لقياس الفعالية المضادة لأكسدة حامض اللينوليك للمستخلصات المحضرة وكما يأتي : خلط 1 مل من المستخلصات مع 4 مل إيثانول تركيزه 95 % و 4.1 مل حامض اللينوليك تركيزه 2.5 % في الإيثانول و8 مل محلول دارئ (منظم) الفوسفات تركيزه 50 ملي مولاري ورقم هيدروجيني 7 إذ حضّن الخليط في درجة حرارة 40 م لمدة 24 ساعة وأُضيف 0.1 مل من هذا الخليط الى 7,9 مل إيثانول تركيزه 75 % و0.1 مل ثايوسيانات الأمونيوم تركيزه 30 % ثم أُضيف 0.1 مل من كلوريد الحديدوز تركيزه 20 ملي مولاري محضر في 3.5 % حامض الهيدروكلوريك الى خليط التفاعل . حضر نموذج العينة الضابطة Control بنفس الطريقة أعلاه بإستثناء خلط 1 مل من خلات الأثيل بدلاً من العينة. قيس الإمتصاص للنماذج ونموذج العينة الضابطة عند طول موجي 500 نانوميتر في جهاز المطياف الضوئي وحسبت الفعالية المضادة لأكسدة حامض اللينوليك وفقاً للمعادلة التالية :

$$\text{الفعالية المضادة للأكسدة } IP\ \% = [1 - \left(\frac{\text{قراءة الإمتصاص للنموذج}}{\text{قراءة الإمتصاص للعينة الضابطة}} \right)] \times 100$$

(نسبة التثبيط %)

9-التحليل الإحصائي

أُستعمل البرنامج الإحصائي SPSS (1998) في تحليل البيانات إحصائياً باستعمال تصميم C.R.D. وبثلاث مكررات كما أُجريت عملية مقارنة بين المتوسطات بإستعمال أقل فرق معنوي L.S.D عند مستوى إحتمال 0.05[1].

النتائج والمناقشة

1-عزل الفطريات الخيطية وإختبار قابليتها لإفراز سموم الأفلاتوكسين

عزلت 92 عزلة فطرية من مصادر طبيعية مختلفة (التربة والفواكه والخبز والهواء) تعود لخمسة أجناس هي *Aspergillus* و *Fusarium* و *Rhizopus* و *Mucor* و *Penicillium* ، ويوضح الجدول (1) العزلات الفطرية المختبرة ومصادرها وقابليتها على إفراز سموم الأفلاتوكسين. وقد أظهرت نتائج إختبار فحص سموم الأفلاتوكسين إن عزلات الفطريات (*A. niger*,24 و *A. terreus*,15 و 6, *A. ochraceus* و *F. oxysporum*,5 و 2, *Mucor* sp. و 5 , *P. oxalicum* و 12 , *Penicillium* sp. و *R. stolonifer*,14 أعطت نتائج سلبية لإفراز سموم الأفلاتوكسين أما عزلات الفطر 9, *A. flavus* لها القابلية على إفراز سموم الأفلاتوكسين ولوحظت النتيجة عن طريق تغير لون مقلوب وسط مستخلص جوز الهند من اللون الأبيض الى اللون الوردي الذي يدل على إن عزلات الفطر *A. flavus* موجبة لإنتاج الأفلاتوكسين وهذه النتيجة ظهرت عند الحضن في درجة حرارة 25 م بعد مرور 24 ساعة وهذا يتفق مع ما توصل اليه [3]عند إجراء نفس الإختبار.ووجد من النتائج الحالية إن جميع عزلات الفطر *A. flavus* التي أعطت نتائج موجبة لإفراز الأفلاتوكسين أستجابت للإختبار بعد 24 ساعة من الحضن ولم تعطِ أي من العزلات فحصاً موجباً بعد ساعة من الحضن إذ إن زيادة فترة حضن العزلات تعمل على زيادة نسبة العزلات الفطرية المنتجة لسموم الأفلاتوكسين وتعطي نتائج أكثر دقة ووضوح [7] ، وهذا يتفق مع [2]التي بينت إن أعداد العزلات التي أعطت فحصاً موجباً بعد ساعة واحدة من الحضن

كانت نسبتها أقل من العزلات التي أستجابت للإختبار بعد 24 ساعة من الحضن. وتعد هذه النتيجة كشفاً تأكيدياً لقابلية الفطريات على إنتاج سموم الأفلاتوكسين .

2- غربلة وإنتخاب العزلات الفطرية المنتجة لمضادات الأكسدة الفعّالة

أُختبرت 83 عزلة فطرية (غير منتجة لسموم الأفلاتوكسين) المعزولة من مصادر مختلفة حول قابليتها لإنتاج المركبات المضادة للأكسدة ثم اُجريت عملية غربلة أولية للعزلات الفطرية من حيث قابليتها على إنتاج مركبات مضادة للأكسدة ، إذ لوحظ إن بعض العزلات ليس لها القابلية على إنتاج مثل هذه المركبات كما في عزلات التربة المنزلية H1 و H2 و H3 في حين أُستبعدت عزلات فطرية لمصادر أُخرى أعطت فعالية مضادة للأكسدة قليلة جداً مثل عزلة *Aspergillus ochraceus* لجميع المصادر المعزولة منها ، وقد أُنتخبت 6 عزلات فطرية لأنواع مختلفة التي أعطت أعلى فعالية مضادة للأكسدة هي *A. niger* S1 و *A. terreus* S1 و *Penicillium* sp. A2 و *Rhizopus stolonifer* B3 و *Fusarium oxysporum* S1 و *Mucor* sp. S1 وإتفقت هذه النتائج مع [17] إذ لاحظ إن لبعض السلالات التابعة لأنواع من جنس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Rhizopus* لها القابلية على إنتاج مركبات مضادة للأكسدة ، كما وجد إن السلالات التي تعود لنفس النوع تظهر تغايراً واضحاً في أيضها لإنتاج مركبات مضادة للأكسدة.

يوضح الشكل (1) فعالية المركبات المضادة لأكسدة حامض اللينوليك لمستخلصات خلات الأثيل للرزالمتخمر (كوجي) بوساطة العزلات الفطرية المذكورة أعلاه بدرجة حرارة 30 م لمدة حضن 21 يوماً ، إذ اُجريت عملية غربلة ثانوية للعزلات الست من حيث قابليتها لإنتاج أعلى فعالية للمركبات المضادة للأكسدة وكانت عزلة *A. niger* S1 الأكثر كفاءة في قابليتها لإنتاج المركبات المضادة للأكسدة اذ بلغت نسبة التثبيط 70.12 % بعد مدة حضن 15 يوماً مقارنة بالعزلات الخمس الاُخرى اذ بلغت نسبة التثبيط لكل من عزلات *Penicillium* sp. A2 و *Rhizopus stolonifer* B3 و *Fusarium oxysporum* S1 و *Mucor* sp. S1 و *A. terreus* S1 37.98 و 27.88 و 13.56 و 19.87 و 18.01 % على التوالي بعد مدة حضن 15 يوماً ، وهذا أتفق مع دراسة [34] إذ غربل 10 عزلات فطرية لمصادر مختلفة ووجد إن أعفان *A. candidus* و *P. oxalicum* و *Aspergillus* sp. تعد مصادر جيدة لإنتاج مضادات الأكسدة الفعّالة ولكن أظهر عفن *A. candidus* أفضل فعالية لمضادات الأكسدة من العزلات الأخرى ، كما أتفقت مع دراسة [11] إذ غربل 30 عزلة فطرية لعفن *Aspergillus* من مصادر مختلفة وأظهرت عزلة واحدة كفاءة عالية في قابليتها على إنتاج مركبات مضادة للأكسدة تعود للفطر *A. saitoi* .

جدول(1) : العزلات الفطرية المختبرة ومصادرها وقابليتها على إفراز سموم الأفلاتوكسين.

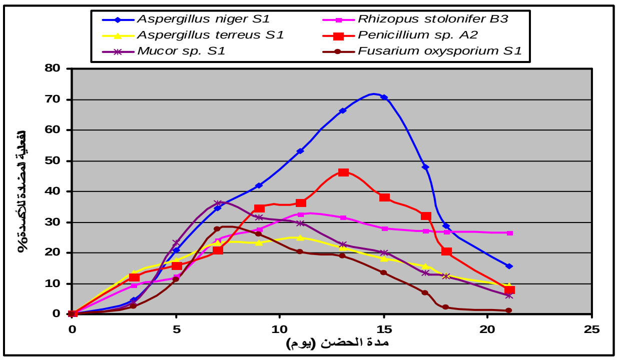
المجموع	هواء			طماطة (محلية)			خبز (محلي)			ليمون (محلي)			برتقال (محلي)			تربة نهرية			تربة منزلية			تربة صحراوية			المصادر / العزلات الفطرية
	A3	A2	A1	T3	T2	T1	B3	B2	B1	L3	L2	L1	O3	O2	O1	R3	R2	R1	H3	H2	H1	S3	S2	S1	
9	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	1	1	1	***Aspergillus flavus** **
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	***Aspergillus niger***
15	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-	1	-	1	1	1	1	1	***Aspergillus terreus***
6	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1	1	***Aspergillus ochraceus***
5	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	***Fusarium oxysporum***
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	***Penicillium oxalicum***
12	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	-	1	***Penicillium* sp.**
14	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	1	1	1	1	1	-	***Rhizopus stolonifer***
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	***Mucor* sp.**
92	14			3			6			13			14			10			10			22			المجموع

- : يمثل عدم وجود العزلات الفطرية

*: يمثل العزلات الفطرية المنتجة للأفلاتوكسين

لوحظ من نتائج الدراسة الحالية إن عزلة *A. niger* S1 إعطت أعلى فعالية مضادة للأكسدة إذ بلغت نسبة التثبيط 70.12 % بعد مدة حضن 15 يوماً وهي أعلى فعالية مقارنةً بالعزلات الأخرى وهذا يتفق مع [20] إذ وجد إن عفن *A. niger* A-12 له القابلية على إنتاج مركبات مضادة للأكسدة ذات فعالية عالية.

كما لوحظ إن هناك تبايناً في فعالية المركبات المضادة للأكسدة لكل عزلة خلال مدة حضن 21 يوماً بدرجة حرارة 30 م ويعود ذلك الى تباين قدرة كل عزلة لإنتاج المركبات المضادة للأكسدة الفعّالة نتيجة لإحتواء بعض العزلات على مركبات مضادة للأكسدة أقل من عزلات أُخرى [34] .كما لوحظ من خلال النتائج الحالية أن فعالية المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص خلات الأثيل للرز المتخمر (كوجي) بوساطة عزلة *A. niger* S1 في درجة حرارة 30 م بدأت بالزيادة تدريجياً أثناء مدة التخمر الى أن بلغت أعلى فعالية مقدارها 70.12 % عند اليوم الخامس عشر وهذا يتفق مع [34] و [10] و [36]، ثم بدأت الفعالية بالتناقص مع تقدم مدة الحضن حتى 21 يوماً . إن زيادة مدة الحضن في أثناء عملية التخمر ينتج عنه إنخفاض في فعالية المركبات المضادة للأكسدة ويعزى ذلك الى تحلل المركبات المضادة للأكسدة أو قد يرجع السبب الى تكوين بعض المركبات المثبطة للمركبات المضادة للأكسدة ، أما قلة مدة الحضن تؤدي الى إنخفاض فعالية المركبات المضادة للأكسدة نتيجة لقلة نمو العفن الذي يؤثر على المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في المستخلص وهذا يتفق مع [24] إذ لاحظا أن الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص فول الصويا المتخمر بوساطة عفن *R. oligosporus* لمدة 10 أيام كانت الفعالية منخفضة ثم بدأت بالزيادة في اليوم الرابع من الحضن وبعدها بلغت الفعالية أقصاها في اليوم العاشر ، كما أتفقت النتائج مع ماوجده [27] إذ لاحظوا إن الباقلاء المتخمرة بوساطة عفن *R. oligosporus* خلال 20 يوماً أعطت فعالية مضادة للأكسدة منخفضة في الأيام الأولى حتى اليوم الثامن من التخمر بعدها بدأت بالزيادة تدريجياً بتقدم مدة الحضن ، إن سبب هذه الإختلافات في مدة التخمر يعتمد على نوع الأحياء المجهرية المستعملة كبادئات وطبيعة المادة المستعملة كوسط للتخمر [22].



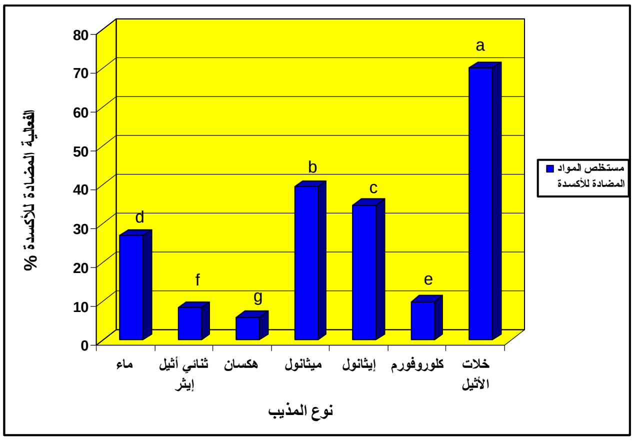
الشكل (1) : فعالية المركبات المضادة لأكسدة حامض اللينوليك لمستخلصات خلات الأثيل للرزالمتخمر (كوجي) بوساطة العزلات الفطرية المشخصة والمحضنة في درجة حرارة 30 م لمدة حضن 21 يوما

3- إنتاج المركبات المضادة للأكسدة الفعّالة EAERK

بعد تلقيح الرز المطبوخ ببادئات عفن *Aspergillus niger* S1 وهي العزلة المنتخبة لفعاليتها العالية لإنتاج مضادات الأكسدة والمحضن بدرجة حرارة 30 م لمدة 15 يوماً بدأت الخيوط الفطرية بالنمو بعد يومين وظهرت على سطح الرز بصورة مرئية وواضحة وبتقدم مدة الحضن أصبح نمو العفن بشكل وفير مع ظهور الأبواغ السوداء بوضوح على سطح الرز وبعد 15 يوماً من الحضن أصبح الرز عبارة عن كتلة عجينية سوداء مغطاة تماماً بأبواغ العفن *A. niger* S1. خلال النمو أثناء عملية التخمر فإن الأعفان لها القابلية على إنتاج منتجات أيضية ثانوية في وسط التخمر هذه المركبات الناتجة لها فعالية مضادة للأكسدة التي تزداد خلال عملية التخمر [36] ، وهذا يتفق مع ماوجده [11]و [25] إن الأعفان لها القابلية على إنتاج مضادات الأكسدة في المزارع الصلبة أثناء عملية التخمر. أن الحبوب تحتوي على مركبات فينولية مثل ferulic acid وآيزوفلافونات التي تتحرر أثناء عملية التخمر بفعل أنزيمات تفرزها الأعفان والتي تساعد على زيادة فعالية المواد المضادة للأكسدة في وسط التخمر [36 ; 23].

4- إستخلاص المركبات المضادة للأكسدة EAERK

يوضح الشكل (2) تأثير إستعمال مذيبات مختلفة لإستخلاص المركبات المضادة للأكسدة للرز المتخمر(كوجي) بوساطة عفن *Aspergillus niger* S1 (EAERK) لمدة حضن 15 يوماً في درجة حرارة 30 م .أظهرت النتائج إن الفعالية المضادة للأكسدة إرتفعت بشكل معنوي ($p < 0.05$) عند الإستخلاص بوساطة مذيب خلات الأثيل وبلغت نسبة التثبيط 70.12 % ، وقد إنخفضت فعالية المركبات المضادة للأكسدة بشكل معنوي عند الإستخلاص بوساطة مذيب الهكسان وبلغت نسبة التثبيط 5.98 % كما بينت نتائج التحليل الأحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى إحتمال $p < 0.05$ في فعالية المركبات المضادة للأكسدة عند إستعمال مذيبات مختلفة. يلاحظ من خلال نتائج الدراسة الحالية وجود إختلافات في فعالية المركبات المضادة للأكسدة بإختلاف المذيبات المستعملة لإستخلاص المركبات المضادة للأكسدة ويعود ذلك لإختلاف الطبيعة الكيميائية لمجاميع المركبات الفعالة في المستخلصات المختلفة وأختلاف درجة قطبية المذيبات ويعتمد ذلك على الطبيعة الذائبية للمركبات الفينولية في المذيب [19]. إن مذيب خلات الأثيل ذو كفاءة عالية في إستخلاص المركبات المضادة للأكسدة EAERK أكثر من المذيبات الأخرى [10] إن إستعمال خلات الأثيل لإستخلاص المركبات المضادة للأكسدة من الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* S1 يتفق مع ماتوصل اليه [12] إذ إستخلصوا مركب 2,3-dihydroxybenzoic acid من عفن *Penicillium roquefortii* بإستعمال خلات الأثيل و يتفق أيضاً مع [13] إذ إستعملوا خلات الأثيل لإستخلاص المركبات المضادة للأكسدة من فطريات *Moretierella* sp. وإستخلص [35] المركبات المضادة للأكسدة 3,3-dihydroxyterphenyllin و 3-hydroxyterphenyllin و candidusin B من عفن *A. candidus* بوساطة مذيب خلات الأثيل.



الشكل (2) : تأثير إستعمال مذيبات مختلفة على فعالية المركبات المضادة للأكسدة للرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* S1 (EAERK) لمدة حضن 15 يوماً في درجة حرارة 30 م

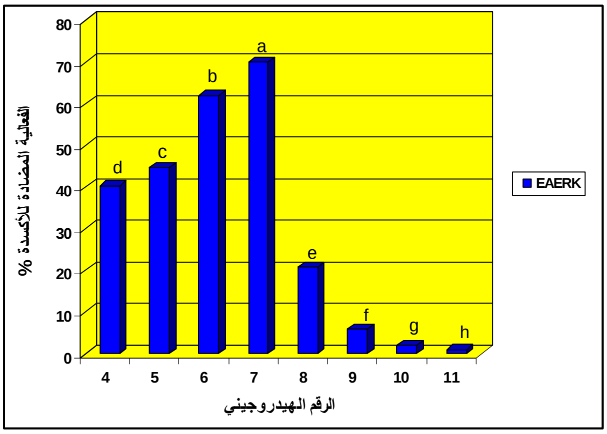
5- العوامل المؤثرة في عملية التخمرلانتاج مضادات اللاأكسدة

5-1- الرقم الهيدروجيني الأبتدائي

يوضح الشكل (3) تأثير إستعمال أرقام هيدروجينية مختلفة 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 و 11 على التوالي في إنتاج المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص خلات الأثيل للرز المتخمر(كوجي) بوساطة عفن *Aspergillus niger* S1 (EAERK) لمدة حضن 15 يوماً في درجة حرارة 30 م.

لوحظ من خلال نتائج الدراسة الحالية إن معدل فعالية المواد المضادة للأكسدة EAERK أخذت بالإرتفاع بشكل معنوي ($p < 0.05$) عند الرقم الهيدروجيني 4 وكان أعلى معدل للفعالية عند الرقم الهيدروجيني 7 إذ بلغت نسبة التثبيط 70.12 % ، إذ كان أفضل نمو للعفن عند الظروف المتعادلة الذي أعطى أعلى فعالية مضادة للأكسدة ، إذ بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) في قابلية العزلة لإنتاج المركبات المضادة للأكسدة عند الأرقام الهيدروجينية ، كما لوحظ إن معدل الفعالية المضادة للأكسدة قد إنخفض بشكل معنوي ($p < 0.05$) عند الرقم الهيدروجيني 8 وبلغ أقل معدل للفعالية عند الرقم الهيدروجيني 11 إذ بلغت نسبة التثبيط 1.01 % نتيجة لعدم ملائمة الرقم الهيدروجيني القاعدي الذي أدى الى قلة نمو الفطر وبالتالي إنخفاض الفعالية المضادة للأكسدة في مستخلص خلات الأثيل .

تبين هذه النتائج إن أفضل رقم هيدروجيني إبتدائي لإنتاج المركبات المضادة للأكسدة الفعّالة لمستخلص خلات الأثيل للرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* S1 (EAERK) لمدة حضن 15 يوماً في درجة حرارة 30 م هو الرقم الهيدروجيني 7 أي تحت الظروف المتعادلة.

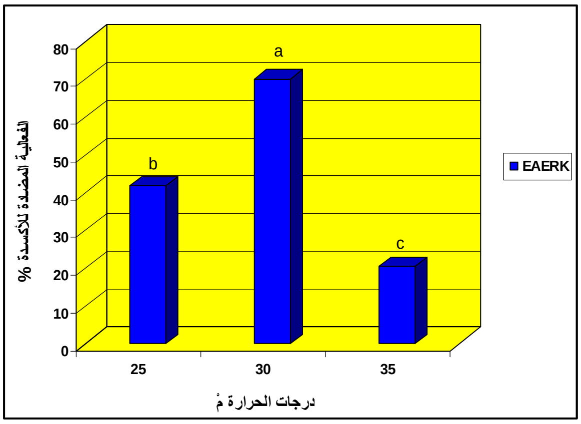


الشكل (3) : تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج المركبات المضادة للأكسدة للرز المتخمر (كوجي) بوساطة فطر *A. niger* S1 (EAERK) لمدة حضن 15 يوماً في درجة حرارة 30 م

5-2- درجات الحرارة

يوضح الشكل (4) تأثير درجات حرارة الحضن المختلفة 25 و 30 و 35 م في قابلية إنتاج المركبات المضادة للأكسدة الفعّالة باستخدام الرز كوسط للتخمر و خلات الأثيل للرز المتخمر(كوجي) كوسط للاستخلاص بوساطة فطر *Aspergillus niger* S1 (EAERK) لمدة حضن 15 يوماً.أظهرت النتائج إن فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAERK في نظام تثبيط أكسدة حامض اللينوليك كانت واطئة عند درجة حرارة حضن 25 م وبلغت نسبة التثبيط 41.76 % ، بينما أرتفعت الفعالية المضادة للأكسدة بشكل معنوي عند درجة حرارة حضن 30 م إذ بلغت الفعالية أعلى مستوياتها عند هذه الدرجة الحرارية وكانت نسبة التثبيط 70.12 % ، وقد أظهرت العزلة إنخفاظاً ملحوظاً في معدل فعالية المركبات المضادة للأكسدة عند درجة حرارة حضن 35 م إذ بلغت نسبة التثبيط 20.45 % ، إذ بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى إحتمال $p < 0.05$ في قابلية العزلة على إنتاج المركبات المضادة للأكسدة.

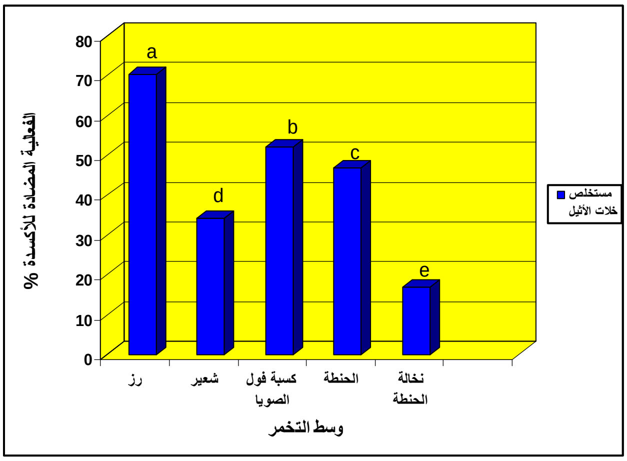
إختلفت فعالية المركبات المضادة للأكسدة بإختلاف درجات حرارة الحضن التي أثرت في قابلية الأحياء المجهرية على النمو فكانت درجة حرارة حضن 30 م هي الأفضل في نمو العفن الذي ينتج عنه زيادة قابلية إنتاج المركبات المضادة للأكسدة للمستخلص في حين إنخفضت الفعالية المضادة للأكسدة عند درجتي حرارة 25 و35 م نتيجة لقلة نمو العفن وهذا يتفق مع ماوجده [22] إذ وجدوا إن الأعفان لها القابلية على إنتاج المركبات المضادة للأكسدة عند درجة حرارة 30 م في حين انخفضت الفعالية المضادة للأكسدة عند درجتي حرارة 25 و35 م . إن درجة حرارة الحضن المثلى لنمو الأعفان تعتمد على نوع السلالة والخصائص الوراثية لها [32] ، ومن ثم تعد درجة حرارة الحضن 30 م هي الأفضل للنمو وإنتاج أعلى فعالية مضادة للأكسدة في نظام تثبيط أكسدة حامض اللينوليك لمستخلص خلات الأثيل للرزالمتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* S1 (EAERK).



الشكل (4) : تأثير درجات الحرارة في إنتاج المركبات المضادة للأكسدة للرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن S1 *A. niger* (EAERK) لمدة حضن 15 يوماً

5-3- وسط التخمر

يوضح الشكل (5) تأثير إستعمال أوساط زرعية مختلفة من الرز والشعير وكسبة فول الصويا والحنطة ونخالة الحنطة المتخمرة بوساطة عفن *Aspergillus niger* S1 لمدة حضن 15 يوماً في درجة حرارة 30 م . أظهرت النتائج إن الفعالية المضادة للأكسدة أرتفعت بشكل معنوي عند تنمية عفن A. *niger* S1 على وسط الرز وبلغت نسبة التثبيط 70.12 % وهذا يتفق مع [36] و [25]إذ إستخدموا وسط الرز لإنتاج المركبات المضادة للأكسدة بوساطة الأعفان ، في حين أظهرت العزلة إنخفاظاً ملحوظاً في فعالية المركبات المضادة للأكسدة على وسط نخالة الحنطة و بلغت نسبة التثبيط 16.73 % ، إذ بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى إحتمال $p < 0.05$ في فعالية المركبات المضادة للأكسدة للأوساط الزرعية المختلفة.إن الرز من المواد الغنية بالكاربوهيدرات التي تحتاجها الأحياء المجهرية كمصادر للطاقة إذ تقوم الأعفان بإفراز إنزيمات تقوم بهضم النشأ في الحبوب خلال عملية التخمر وتحويله الى سكر بسيط بعملية التسكر Saccharification التي تعطي ألواناً ونكهات خاصة للأغذية المتخمرة [25]. أن الرز يحتوي على مركبات فينولية مثل الفلافونات و ferulic acid التي تتحرر أثناء عملية التخمر بفعل إنزيمات تفرزها الأعفان التي تزيد من فعالية المركبات المضادة للأكسدة وتعود هذه الفعالية الجيدة للتأثير التعاوني بين هذه المركبات النباتية والمركبات المضادة للأكسدة(EAERK) لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن S1 *niger* *A.* [36].



الشكل (5): تأثير إستعمال أوساط زرعية مختلفة في إنتاج المركبات المضادة للأكسدة المتخمرة بوساطة عفن *A. niger* S1 لمدة حضن 15 يوماً في درجة حرارة 30 م

المصادر References

1- **الراوي ، خاشع محمود وخلف الله ، محمد عبد العزيز(2000)**.تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة الموصل ، مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر.

2- **الشربة ، نجلاء سعيد علي أكبر (2007)**. عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لأجواء المطاحن والكشف عن قابلية بعض أنواع الفطر *Aspergillus* على إفراز الأفلاتوكسين مختبرياً. رسالة ماجستير، كلية العلوم / جامعة البصرة. 62 صفحة.

3- **المرياني ، مهدي سيد شخينب.(2006)**. عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لبعض الأعشاب الطبية المستخدمة في العراق وإختبار قدرة عزلات الفطر *Aspergillus flavus* على إنتاج الأفلاتوكسينات. رسالة ماجستير، كلية العلوم / جامعة البصرة. 67 صفحة.

4-**American Public Health Association.(1978)**. Standard methods for the examination of dairy products. 14th ed. Washingtion, DC, USA. pp:183.

5- **H.L .Barnett, and Hunter,B.B.(1972).** Illustrated genera of imperfect fungi, 3rd ed. Burgess Publishing Company , USA. pp: 241.

6- **E. Berghofer,; Grzeskowiad,B.; Mundigler,N.; Sentall,W.B. and Walcak, J. (1998)**. Antioxidative properties of faba bean, soybean and oat tempeh. Int. J. Food Sci. Nutr. 49: 45-54.

7- **P. Bersuder,; Hole,M. and Smith,G.(1998)**. Antioxidants from a heated histidine-glucose of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by High performance Liquid Chromotography. J.Am.Oil. Chem. 75: 181-187.

8- **N.D. Davis,; Lyer,S.K.; Diener,U.L.(1987)**. Improved method of screening for aflatoxin with coconut agar medium. Appl. Environ. Microbial. 53: 1593-1595.

18- G.K. Jayaprakasha,; Tamil Selvi and Sakariah,K.K.(2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extract. Food Research International. 36:117-122.

19- M.S. Jimenez,; Velarte,R. and Castillo,R.(2006). Direct determination of phenolic compounds and phospholipids in virgin olive oil by micellar liquid chromatography. Food Chemistry.100:8-14.

20- Y. Kawai,; Oeda, Y.; Otaka,M.; Kasakawa,T.; Inoue,N. and Shinano,H.(1993). Screening and identification of antioxidant-production strains in food- borne fungi. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 44:141-146.

21- M.A. Klich, (2002). Identification of common *Aspergillus* sp. Ponsen and Looijen.Wageningen.The Netherlands. pp: 116.

22- C.H. Lin,; Wei,Y.T. and Chou,C.(2006a). Enhanced antioxidative activity of soybean Koji prepared with various filamentous fungi. Food Microbiol. 23: 628 - 633.

23- C.H. Lin,; Wei,Y.T.; Yu,R.C. and Chou,C.C.(2006b). Cultivation temperature and length affect the antioxidant activity and total phenolic content of soybean koji prepared with *Aspergillus awamori.* J. Food and Drug Analysis. 14(1):74-79.

24- P. McCue, and Shetty, K.(2003). Role of carbohydrate- cleaving enzymes in phenolic antioxidant mobilization from whole soybean fermented with Rhizopus oiligosporus. Food Biotechnol. 17(1): 27 – 37.

25- Y. Miyake,; Ito,C.; Itoigawa,M. and Osawa,T.(2007). Isolation of the antioxidant pyranonigrin – A from rice mold starters used in the manufacturing

9- K.H. Domsch,; Game,W. and Anderson,T.H.(1980). Compendium of soil fungi. London : Academic Press. PP : 859.

10- H. Esaki,; Onozaki,H.; Kawakishi,S. and Osawa,T.(1996).New antioxidants isolated from tempeh. J. Agric. Food Chem. 44: 696-700.

11- H. Esaki,; Onozaki,H.; Kawakishi,S. and Osawa,T.(1997). Antioxidative activity and isolation from soybeans fermented with *Aspergillus* spp. J. Agric. Food Chem. 45(6): 2020 -2024.

12- K. Hayashi,; Suzuki,K.; Kawaguchi,M.; Nakajima,T.; Suzuki,T.; Numata, M. and Nakamura,T.(1995). Isolation of an antioxidant from *penicillium roquefortii* IFO 5956. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59: 319 - 320.

13- A. Hirota; Morimitsu,Y. and Hojo,H.(1997). New antioxidative indophenol- reducing phenol compounds isolated from the *Moretierella* sp. fungus. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61: 647- 650.

14- De. Hooge, G.S. and Guarro,J.(1995). Atlas of clinical fungi, cente albureau voor Shimmel- Cultures and Universitat Rovirai Virgili. Spain**.** pp: 720.

15- De. Hooge, G.S. and Guarro,J.(1995). Atlas of clinical fungi, cente albureau voor Shimmel- Cultures and Universitat Rovirai Virgili. Spain**.** pp: 720.

16- M.B. Hoppe,; Jha.H.C. and Egge,H.(1997). Structure of an antioxidant from fermented soybeans (Tempeh). J. Am. Oil Chem. Soci. 74:477-479.

17- Y. Ishikawa, (1992). Development of new types of antioxidants from microbial origin. J. Jpn. Oil Chem. Soc. 41: 762 -767.

dimethylbenz [a] anthracene in rats. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69:1898 - 1904.

31- **J.A. Von, (1981).** The genera of fungi sporulating in pure culture, 3rd ed. J. Gramer, Germany. pp:424.

32- **R.M. Walsh, and Martin,P.A.(1977).** Growth of *Saccharomyces* cerevisiae and Saccharomyces uvarum in a temperature gradient incubator.J. Inst. Brew.83:169-172.

33- **H.L. Wang,; Ellis,J.J. and Hesseltine,C.W.(1972)**. Antibacterial activity produced by molds commonly used in oriental food fermentation. Mycologia. 64:218- 221.

34- **G.C. Yen, and Lee,C.A.(1996).** Antioxidant activity of extracts from molds. J. Food Prot. 59(12):1327-1330.

35- **G.C. Yen,; Chang,Y.C. and Su,S.W.(2003).** Antioxidant activity and active compounds of rice Koji fermented with *Aspergillus candidus.* Food Chem. 83: 49- 54.

36- **G.C. Yen,; Chang,Y.C.; Sheu,F. and Chiang,H.C.(2001).** Isolation and characterization of antioxidant compounds from *Aspergillus candidus* broth filtrate. J. Agric. Food Chem. 49:1426-1431.

process of fermented food. Biosci. Biotechnol. Biochem.71:1-7

26- **S. Parvez,; Malik,K.A.; Ah kang,S. and Kim,H.Y.(2006).** Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J. Appl. Microbiol. 100:1171 -1185.

27- **R. Randhir,; Vattem, D.; and Shetty, K. (2004).** Solid- state bioconversion of favabean by *Rhizopus oilgosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and L- DOPA. Innovative food Sci. Emerg. Technol. 5:235-244.

28- **M. Saito, and Mechida,S.(1999).** A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by ammonia vapor. Mycoscience. 40:205-208.

29- **L.A. Santiago,; Hiramatsu,M. and Mori,A.(1992).** Japanese soybean paste miso scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 38:297-304.

30- **T. Sasaki,; Abe,M.; Nakayama,S.; Moriyama,K.; Tahara,H. and Takita,T. (2005).** Novel application of shochu distillery by- products to prophylaxis against mammary carcinogenesis induced by 7,12-

A study on The Ability of Some Filamentous Fungi to Produce Antioxidants

[1]Ali Khudhair Jabir Al-Rikabi [2]Abdol-Hafiz Al-Dubon Hadeel Mohammed Wadi
[1]Department of Food Science & Biotechnology
College of Agriculture –University of Basrah
[2]Department of Marine Biology
Marine Scince Center –University of Basrah

Summary

The ability of 92 isolates of filamentous fungi isolated from *Aspergillus niger* (24) , *A. terreus* (15), *A. ochraceus* (6) , *Fusarium oxysporum* (5) , *Mucor* sp. (2), *Penicillium oxalicum* (5), *Penicillium* sp. (12) and *Rhizopus stolonifer* (14). The ability to produce aflatoxins were studied. All strains of *A. flavus* produced aflatoxins , while the other isolates gave negative results. The ability of 83 (non- toxic isolates) were tested for antioxidants production, only 6 strains were selected for good capability to producing antioxidants which were *A. niger* S1, *F. oxysporum* S1, *R. stolonifer* B3, *A. terreus* S1, *Mucor* sp. S1 and *Penicillium* sp. A2. It has been found that *A. niger* S1 is the best antioxidants producer from rice koji extracted by ethyl acetate (EAERK).The optimum fermentation conditions for antioxidants production were studied for the selected fungal isolate *A. niger* S1 and were recorded as follows:the optimum initial pH was 7,the optimum incubation temperature was 30°C,the optimum incubation period was 15 days.The best fermentation medium was rice.Ethyl acetate was the best solvent for antioxidants extraction from *A. niger* S1 using rice koji.