محاضرة مضادات الاكسدة / للدراسات العليا

أ.م.د. علي خضير الركابي

مضادات الاكسدة الميكروبية

مقدمة

تعد عملية التخمر من الطرق الرئيسة المستعملة لحفظ الأغذية منذ آلاف السنين ، فعند نمو الأحياء المجهرية في الأغذية سواء بصورة طبيعية أو عن طريق تدخل الأنسان ستؤدي الى تغيرات كيميائية تؤثر في قوام الأغذية ومن ثم تكّون منتجات يمكن تخزينها لمدد طويلة ، وأثناء عملية التخمر تنتج روائح ونكهات مرغوبة للأغذية ، وقد أُستعملت أنواع مختلفة من البكتيريا والخمائر والأعفان لإنتاج منتجات غذائية متخمرة تعد مصدراً غذائياً للحيوان والإنسان.

فالتخمرFermentation هوعملية إنتاج لمادة مفيدة تتم تحت تأثير الكائنات الحية المجهرية وهو كلمة مشتقة من الفعل اللاتيني Fervere بمعنى فوران وهو يصف تأثير الخميرة على مستخلصات الفواكه والحبوب المنبتة إذ جاءت تسمية الفوران بسبب تكّون فقاعات من ثاني أوكسيد الكاربون خلال التفاعلات الأيضية الهدمية التخمرية للسكريات الموجودة في هذه المستخلصات.

إن البلدان الشرقية حضرت منتجات الأغذية المتخمرة من الفطريات الخيطية مثل أعفان *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 ، كما أن الأغذية المتخمرة من منتجات فول الصويا مثل ميزو miso و تيمبا tempeh و ناتو natto الملقحة بـأعفان *Aspergillus oryzae* و *oligosporus Rhizopus* و بكتريا *Bacillus natto* على التوالي تحتوي على مركبات مضادة للأكسدة تكونت خلال عملية التخمر، إذ أظهر كلٌ من الميزو والتامبا أعلى فعالية لمضادات الأكسدة من منتوج الناتو ، كما إن الأحياء المجهرية المستعملة في تحضير البادئات في الأغذية المتخمرة تمتلك إنزيمات عالية الفعالية منها المحللة للبروتينات proteolytic enzymes وإنزيمات

محللة للسكريات Saccharolytic enzymes التي تعطي ألوان ونكهات خاصة للأغذية المتخمرة .

أستعملت المزارع الصلبة المكونة من مواد طبيعية مثل الحبوب بكثرة في الآونة الأخيرة وذلك لسهولة الحصول عليها وبالإمكان تجهيزها بإستمرار وضمان إنتاج أكبر حجم للكتلة الحيوية فضلاً عن إنها مأمونة من الناحية الصحية وقصر وقت التخمر وإنخفاض الكلفة ، كما إن بعض أنواع الحبوب تحتوي على المركبات الفينولية مثل ferulic acid إذ أظهرت هذه المواد قابلية مضادة للأكسدة التي تمنع إنتاج المواد المسرطنة لحيوانات التجارب وهذه المواد تتحرر أثناء عملية التخمر ، كما يعتبر هذا الحامض من المصادر المهمة لمركبات النكهة في الأغذية المتخمرة مثل Shochu (الرز المتخمر) الذي يمتلك رائحة مميزة ، كما إن فول الصويا تحتوي على مركبات فينولية وأثناء عملية التخمر تتحرر الأكلايكونات aglycones من الكلوكوسايدات آيزوفلافونات isoflavones glucosides مثل daidzein و genestein بوساطة إفراز الأعفان إنزيم β-glucosidase خلال عملية التخمر وهذه أحد العوامل المهمة لزيادة فعالية مضادات الأكسدة لمنتجات التخمر .

تطور مضادات الأكسدة المايكروبية

Development of microbial antioxidants

عزلت مواد فعّالة من الفطريات الخيطية بعد تنميتها في وسط سائل لمدة ٤ أيام بدرجة حرارة ٣٠ م وذلك بغربلة ١٤ سلالة إذ أعطت سلالتين منها نتائج أيجابية ورمزها A-380 وA-257 إذ أنتجت مواد فعّالة تمتلك مجاميع هيدروكسيلية ، كما درسوا الخواص الكيميائية للمواد الفعّالة المنتجة من السلالتين والناتجة من تخمر الوسط السائل بوساطة هذه الفطريات والمستخلصة بوساطة خلات الأثيل ، كما عزلوا حامض Curulic من عفن .sp *Penicillium*الذي أظهر فعّالية عالية كمضاد أكسدة .

و عند البحثَ عن مضادات الأكسدة من مصادر مايكروبية ، وجد إن عفن *P. roquefortii* IFO 5956 له القابلية على إنتاج مضادات الأكسدة عند تنميته على مزارع سائلة ، وشخص المركب 2,3-dihydroxybenzoic acid بإمتلاكه فعالية مضادة للأكسدة والتي كانت مقاربة لفعالية مضاد الأكسدة الصناعي BHA .

كما درست ١٠ سلالات من الأعفان لتحديد قدرتها على إنتاج مضادات الأكسدة الطبيعية في المزارع السائلة إذ أظهرت ثلاثة أجناس لأعفان مختلفة القدرة على إنتاج مضادات أكسدة فعّالة وهي *Aspergillus candidus* CCRC 31543 و *P. oxalicum* CCRC 31670 و *Aspergillus* sp. CCRC 31742 ، إذ أظهر مستخلص خلات الاثيل لعفن *A. candidus* CCRC 31543 مواد مضادة للأكسدة ذات فعالية أعلى من المواد الموجودة في مستخلصات الأعفان الأُخرى وكانت ذات فعّالية مساوية لفعالية مضاد الأكسدة الصناعي BHA وأعلى من فعالية مضاد الأكسدة الطبيعي α-tocopherol وبالتركيز نفسه .

عزلَت مضادات أكسدة من مستخلص الميثانول لفول الصويا المتخمر بوساطة سلالات مختلفة لعفن *Rhizopus oligosporus* IFO 32002 ، وقد شخص المركب (HAA) 3-hydroxyanthranilic acid كمضاد أكسدة الذي إمتلك فعالية عالية في منع أكسدة زيت فول الصويا وطحين فول الصويا ولا يوجد هذا المركب في مستخلص الميثانول لفول الصويا غير المتخمرمما يدل على إن العفن له القابلية على إنتاج هذه المواد المضادة للأكسدة خلال عملية التخمر .

كما عزلت مركبات تمتلك مجاميع هيدروكسيلية ناتجة من نمو عفن *A. repens* MA 0197 النامي في مزارع سائلة وأظهرت هذه المركبات ذات المجاميع الهيدروكسيلية فعالية عالية كمضادات أكسدة وشخص المركب Neoechinulin A الذي إمتلك فعالية مضادة للأكسدة أعلى من مضاد الأكسدة الطبيعي α-tocopherol.

كما عزلت وشخصت المركبات المضادة للأكسدة لعفن *A. candidus* CCRC 31543 المنمى في مزارع سائلة والمستخلصة بمذيب خلات الأثيل ، إذ عزلت ثلاثة مركبات مضادة للأكسدة هي 3,3-dihydroxyterphenyllin و 3-hydroxyterphenyllin و candidusin B إذ كانت نسبة تثبيطها في نظام أكسدة حامض اللينوليك أعلى من ٩٥ % وهذه الفعالية مساوية لفعالية مضاد الأكسدة الصناعي BHA وأعلى من فعالية مضاد الأكسدة الطبيعي α-tocopherol .

كما عزلت وشخصت المركبات المضادة للأكسدة في مستخلص خلات الأثيل لرز كوجي المتخمر بوساطة عفن *A. candidus* CCRC 31543 وشخصت المركبات المضادة للأكسدة 3,3-dihydroxyterphenyllin و 3-hydroxyterphenyllin و candidusin B بتقنية مطياف الكتلة Mass Spectrum (MS) و الرنين المغناطيسي النووي Nuclear Magnetic Resonance (NMR) إذ أظهر مستخلص خلات الأثيل للرز

المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. candidus* CCRC 31543 القابلية لتثبيط أكسدة حامض اللينوليك بنسبة ٩٠ % وهي مساوية لفعالية مضاد الأكسدة الصناعي BHA وبالتركيز نفسه .

درست فعالية مضادات الأكسدة في مستخلص الميثانول للرز المتخمر (كوجي) بوساطة أنواع مختلفة من عفن *Aspergillus* sp. لغرض تقييم وظائفها وإستعمالها في إنتاج الأغذية المتخمرة في التصنيع الغذائي ، إذ عزل وشخص المركب المضاد للأكسدة Pyranonigrin –A من مستخلص الميثانول للرز المتخمر (كوجي) بوساطة أنواع من عفن *Aspergillus*.

العوامل المؤثرة في عملية التخمر Factors Affecting on Fermentation

من المعروف إن الأحياء المجهرية تنمو طبيعياً وإن منتجاتها الأيضية تعتمد على طبيعة التغذية والظروف البيئية ولتحسين الإنتاج لابد من توفير ظروف تنمية مثلى ومناسبة ويتطلب ذلك تغذية جيدة للأحياء المجهرية ، إذ أن الأحياء المجهرية لها القابلية على تحليل بيروكسيد الدهون وإستعماله كغذاء. إكتسبت الفطريات الخيطية وبشكل خاص *Aspergillus* و *Mucor* و *Rhizopus* و *Penicillium* أهمية كبيرة في مجال تخمرات الحالة الصلبة وذلك لقابلية الفطريات الخيطية على النمو بنطاق واسع في حالة غياب الماء الحر free water .يوجد عدد قليل من الدراسات التي إهتمت بدراسة الظروف الزرعية المثلى لإنتاج المركبات المضادة.

درسَت الظروف الزرعية المثلى لتحفيز إنتاج مضادات الأكسدة الفعالة من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2373 إذ درس تأثير درجات الحرارة المختلفة (٢٥ و ٣٠ و٣٧ م) في تحفيز إنتاج مضادات الأكسدة الفعالة إذ كانت أفضل درجة حرارة حضن عند ٣٠ م ولمدة ٨ أيام إذ أعطت أفضل نمو للخميرة وأفضل فعالية لمضادات الأكسدة المنتجة من خميرة *S. cerevisiae* بينما كانت أقل فعالية لمضادات الأكسدة عند درجة حرارة حضن ٢٥ و ٣٧ م رافقها إنخفاض في عدد الخلايا ، كما درسوا تأثير الرقم الهيدروجيني على قابلية إنتاج مضادات الأكسدة من الخميرة *S. cerevisiae* IFO 2373 إذ إن الرقم الهيدروجيني الإبتدائي القاعدي والمتعادل للوسط أعطى أقل فعالية لمضادات الأكسدة فضلاً عن إنخفاض في نمو الخلايا بينما إزدادت الفعالية عند الرقم الهيدروجيني الإبتدائي الحامضي الذي يعد الأفضل لنمو خميرة *S. cerevisiae* IFO 2373 وإنتاج مضادات أكسدة فعالة .

أختبرَ تأثير درجات الحرارة المختلفة ٢٥ و ٣٠ و ٣٥ م في فعالية مضادات الأكسدة والمحتوى الكلي للفينولات لمستخلص الميثانول لفول الصويا المتخمر بوساطة عفن *Aspergillus awamori* إذ لاحظوا تأثير إختلاف درجات الحرارة على النمو والمحتوى الكلي للفينولات إذ وجد إن أعلى فعالية لمضادات الأكسدة كانت عند درجة حرارة ٣٠ م لمدة ٣ أيام رافقها زيادة في نمو العفن والمحتوى الكلي للفينولات بينما كانت أقل فعالية عند درجتي حرارة ٢٥ و٣٥ م .

خواص مضادات الأكسدة المايكروبية

Properties of Microbial Antioxidants

تلعب مضادات الأكسدة دوراً مهماً كمقتنصات للجذور الحرة وعوامل مختزلة وعوامل ربط ، إذ يعد إستعمال المركب 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) مهماً جداً ، إذ يظهر هذا المركب أقصى إمتصاص عند طول موجي ٥١٧ نانوميتر في جهاز المطياف الضوئي بسبب إحتوائه على ألكترون مفرد أما عند تفاعل المركبات المضادة للأكسدة مع الجذر الحر الثابت يصبح الألكترون زوجاً عند منحه ألكترون آخر ومن ثم ينخفض الإمتصاص ، أما الخاصية الأُخرى لمضادات الأكسدة هي قابليتها لإختزال آيون الحديديك المعقد Fe^{+3} الى صورة الحديدوز Fe^{+2} وقيست قوة الإختزال وفقا لتكون اللون الأزرق الداكن عند طول موجي مقداره ٧٠٠ نانوميتر وتعد آيونات المعادن من العوامل المساعدة لأكسدة الدهون بسبب سلسلة من التفاعلات التي تؤدي الى تلف الأغذية نتيجة لتحلل آيونات العناصر المعدنية المتسببة في حدوث أمراض سرطانية وأمراض القلب وتصلب الشرايين .

درسَت خواص مضادات الأكسدة في الوسط السائل لفول الصويا غير المتخمر والوسط السائل لفول الصويا المتخمر بوساطة أحياء مجهرية مختلفة لمدة حضن ٢١ يوماً ، إذ لاحظوا إن الوسط السائل لفول الصويا المتخمر يمتلك خواص مضادة للأكسدة أعلى من الوسط السائل لفول

الصويا غير المتخمر ويعود ذلك الى قابلية الأحياء المجهرية في إنتاج مواد أيضية خلال عملية التخمر تمتلك صفات مضادة للأكسدة.

كما قدرَت الخواص المضادة للأكسدة لمستخلص الإيثانول بتركيز (٥٠ %) للفول الأحمر المتخمر بوساطة عفن *Aspergillus oryzae* علماً إن هذه الخواص تختلف بإختلاف الأحياء المجهرية المستعملة إذ وجدوا إن فعالية مضادات الأكسدة إزدادت بزيادة تركيز المستخلص ، كما أظهر المستخلص القابلية على إقتناص الجذر الحر الثابت من المركب DPPH ، أما قابلية الإختزال للمستخلص فقد كانت أقل من قوة إختزال مضادات الأكسدة التجارية المعروفة مثل-α tocopherol و BHT ، ولكنه كان الأفضل فيما يتعلق بقابليته لربط آيون الحديدوز Fe^{+2} .

درسَت فعالية مضادات الأكسدة المستخلصة بإستعمال الأسيتون من الخيوط الفطرية لعفن *A. candidus* CCRC 31543 المنمى في مزارع سائلة ، وتبين إن مستخلص الأسيتون لخيوط الفطر *A. candidus* يمتلك قابلية عالية لإقتناص الجذر الحر الثابت من المركب DPPH كما يمتلك قوة إختزال عالية .

قدرَت خواص المركبات المضادة للأكسدة والمحتوى الكلي للفينولات المتعددة Polyphenolic والفلافونويدات Flavonoides لمستخلص فول الصويا المتخمر بوساطة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* خلال مدة حضن ٢٤ ساعة والمستخلصة بوساطة خليط من مذيبي الإيثانول والماء وبنسبة ١:١ ، إذ وجدوا إن المحتوى الكلي للفينولات المتعددة في المستخلص الجاف كانت بحدود ٧٨٩.٥٤ ملغم على أساس حامض الجاليك /غم مستخلص جاف والمحتوى الكلي للفلافونات كانت بحدود ١٦٩.٤٧ ملغم على أساس حامض الجاليك /غم مستخلص جاف ، كما وجدوا إن المركبات الفينولية المتعددة لها القابلية على إختزال آيون الحديديك التي كانت بنسبة ٩١.١٨ % وهي أقل من قابلية إختزال مضاد الأكسدة الصناعي BHA التي كانت بنسبة ٩٢.١٧ % أما قابلية المركبات الفينولية المتعددة لإقتناص الجذر الحر الثابت كانت أعلى من قابلية إقتناص مضاد الأكسدة الصناعي BHA التي كانت بنسبة ٧٩.٣٠ و ٧٣.٨ % على التوالي .

درست فعالية مضادات الأكسدة لمستخلص الميثانول للمزارع الصلبة المتخمرة بوساطة الفطريات الخيطية والتي شملت *A. oryzae* و *A. sojae* و *A. awamori* و *Actinomucor taiwanensis* و *Rhizopus sp.* ، إذ وجد من خلال الدراسة إن عفن *A. awamori* أظهر أعلى قابلية لإقتناص الجذر الحر الثابت DPPH وقابلية ربط آيون الحديدوز وقوة الإختزال من الفطريات الأخرى المختبرة.

درسَت قابلية مضادات الأكسدة في مستخلص خلات الأثيل للمزارع السائلة المتخمرة بوساطة عفن *A. candidus* MTCC 2202 لإقتناص الجذر الحر الثابت DPPH إذ أظهرت فعالية عالية للإقتناص وكانت بنسبة 96.65 % عند تركيز ١ ملغم / مل فضلاً عن إمتلاكه لقوة إختزال جيدة كما قدر المحتوى الكلي للفينولات في المستخلص ، وقد أظهر المستخلص فعالية مضادة للأكسدة مقاربة لفعالية مضاد الأكسدة BHA.

قدرت خواص مضادات الأكسدة والمحتوى الكلي للفينولات لمستخلص الميثانول للوسط المحتوي على المادة الأساس الذرة والمتخمر بوساطة فطر *Marasmiellus* sp. وأضيف للوسط مواد مدعمة وكانت بنسبة ٤ % لكل من مستخلص الشعير ومستخلص الخميرة ونخالة الذرة على التوالي وأظهر المستخلص قابلية عالية لأقتناص الجذور الحرة وكانت كمية المحتوى الكلي للفينولات بمقدار ٣١.٤١ ملغم على أساس حامض الجاليك / غم مستخلص.

ثباتية مضادات الأكسدة المايكروبية

Stability of Microbial Antioxidants

إن إستعمال مضادات الأكسدة المايكروبية في الأنظمة الغذائية يعتمد على عوامل مختلفة مثل تركيب الدهون وقيمة الرقم الهيدروجيني والثباتية تجاه العمليات الحرارية المستعملة أو تأثير المواد التعاونية في الأنظمة الغذائية ، إذ درست هذه العوامل لفهم الإستعمال العملي لمضادات الأكسدة المايكروبية في الأنظمة الغذائية.

تتطلب مضادات الأكسدة درجات حرارة بمدى ١٨٠-٢٠٠ م عند قلي الزيوت أو الدهون وحوالي ٥ م لمنتجات مثل الماركرين أو المايونيز التي تحفظ بالتبريد إذ أُستعملت مضادات الأكسدة بتركيز ٠.٠٢ % في الدهون والزيوت أو الأغذية المحتوية عليها.

درسَ تأثير المعاملات الحرارية في المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص خلات الاثيل والناتجة من تخمر الوسط السائل بوساطة عفن *Aspergillus candidus* (EAEAC) إذ أظهرت ثباتية جيدة عند التسخين على درجة حرارة ١٨٥ م لمدة ساعتين كما لاحظا إنخفاضاً طفيفاً للفعالية مع زيادة وقت التسخين ومن ثم فإن EAEAC إحتفظت بفعاليتها المضادة للأكسدة

بنسبة تثبيط ٩٩.٦ % بعد التسخين مقارنة مع مضادات الأكسدة الصناعية التي تكون غير ثابتة في درجات الحرارة العالية وذات قابلية عالية على التطاير. كما درسا فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAEAC لقيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني إذ أظهر EAEAC فعالية عالية عند الأرقام الهيدروجينية المتعادلة والحامضية في حين لم تكن الفعالية ثابتة عند الأرقام الهيدروجينية القاعدية في نظام أكسدة حامض اللينوليك. كما درسا تأثير العامل التعاوني في الأنظمة الغذائية لمضاد الأكسدة EAEAC مع مضادات الأكسدة المعروفة مثل التوكوفيرول وحامض الستريك إذ إزداد تأثير العامل التعاوني بزيادة التركيز .