دراسة كفاءة مضادات الأكسدة المنتجة من الرز بواسطة عفن *Aspergillus niger* في بعض الزيوت

*علي خضير جابر الركابي **عبد الحافظ الدبون *هديل محمد وادي

**قسم علوم الأغذية /كلية الزراعة /جامعة البصرة

***قسم الأحياء البحرية/مركز علوم البحار/جامعة البصرة

الخلاصة

درست خواص المركبات المضادة للأكسدة المنتجة من العفن *Aspergillus niger* (EAERK) لقابليتها على إقتناص الجذر الحر وربط آيون الحديدوز وقوة الإختزال وتقدير المركبات الفينولية الكلية في المستخلص. إختلفت الفعالية المضادة للأكسدة لـ EAERK في عرقلة أكسدة حامض اللينوليك وكانت الفعالية أقل من فعالية مضادي الأكسدة التجاريين BHT و α–tocopherol . إزدادت فعالية EAERK لإقتناص الجذر الحر بزيادة التركيز وقد تفوق مضاد الأكسدة الصناعي BHT في قابليته لإقتناص الجذر الحر. إزدادت قوة الإختزال للمركبات المضادة للأكسدة EAERK بزيادة التركيز ولكنها كانت أقل من قوة الإختزال لكل من مضادي الأكسدة BHT و α–tocopherol ، كما إن قابلية EAERK لربط آيون الحديدوز كانت أقل فعالية مقارنة مع مادة الربط EDTA–2Na . إن المحتوى الكلي للمركبات الفينولية الموجودة في مستخلص خلات الأثيل لرز كوجي المتخمر بوساطة *Aspergillus niger* بلغ 223.8 µg gallic acid / mg extract. درست ثباتية المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص خلات الأثيل للرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *Aspergillus niger* (EAERK) تجاه عدد من العوامل إذ أظهرت المركبات المضادة للأكسدة (EAERK) ثباتاً تحت الظروف المتعادلة ،وإمتلكت المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص خلات الأثيل للرز المتخمر(كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) ثباتاً جيداً تجاه درجات الحرارة العالية إذ تتحمل درجة حرارة 185 م لمدة ساعتين بينما أظهرت المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص خلات الأثيل للرز المتخمر(كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) تأثيراً تعاونياً مع مضادات الأكسدة التجارية وهي α– tocopherol وحامض الستريك ، إذ وجد أن التأثير التعاوني لمعاملات خلائط EAERK مع α– tocopherol كانت الأفضل في تثبيط أكسدة حامض اللينوليك من معاملات خلائط EAERK مع حامض الستريك.إزداد التأثير التثبيطي للمركبات المضادة للأكسدة لمستخلص خلات الأثيل للرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) لإعاقة أكسدة زيت الزيتون وزيت سمك الصبور بزيادة التراكيز

الكلمات المفتاحية : مضادات الأكسدة ، الأعفان ، الزيوت

Study the efficiencyof Antioxidants produced from fermented koji by *Aspergillus niger* on some oils

***Ali Khudhair Jabir Al-Rikabi **Abdol-Hafiz Al-Dubon**
Hadeel Mohammed Wadi
***Department of Food Science**
College of Agriculture –University of Basrah
****Department of Marine Biology**
Marine Scince Center –University of Basrah

Summary

The antioxidative properties of EAERK were studied and were found as follows: the antioxidant activity of EAERK were varied to retard the peroxidation of linoleic acid.The scavenging effect for free radicals of EAERK was increased with concentrations increasing and the scavenging effects of BHT was higher than EAERK.The reducing power of EAERK was increased with the concentrations increasing being lower than both BHT and α-tocopherol , and the chelating ability to ferrous ion of EAERK was lower than EDTA-2Na .The total phenolic compounds of ethyl acetate extracted from rice koji fermented by *A. niger* S1 were 223.8 µg gallic acid / mg extract. The antioxidant stability of EAERK were studied toward many factors and were recorded as follows: EAERK was stable at neutral conditions and was unstable under both acidic and alkaline conditions.EAERK have good thermal stability characteristics and tolerated heating at 185ْ C for 2 h.

EAERK showed synergistic effects with α-tocopherol and citric acid , it has been found that the synergistic effects of EAERK with α-tocopherol were higher in the inhibition of linoleic acid peroxidation system than that of citric acid.The inhibitory effect of EAERK to retard olive oil and fish oil oxidation was increased by increasing their concentrations

Key words : antioxidants , fungi , oils

المقدمة

تلعب مضادات الأكسدة دوراً مهماً كمقتنصات للجذور الحرة وعوامل مختزلة وعوامل ربط (25) ، إذ يعد إستعمال المركب 1,1–Diphenyl–2–Picrylhydrazyl (DPPH) مهماً جداً ، إذ يظهر هذا المركب أقصى إمتصاص عند طول موجي 517 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 (16) ، 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 700 نانوميتر (18) وتعد آيونات المعادن من العوامل المساعدة لأكسدة الدهون بسبب سلسلة من التفاعلات التي تؤدي الى تلف الأغذية (9) نتيجة لتحلل آيونات العناصر المعدنية المتسببة في حدوث أمراض سرطانية وأمراض القلب وتصلب الشرايين (10). درسَ (30) خواص مضادات الأكسدة في الوسط السائل لفول الصويا غير المتخمر والوسط السائل لفول الصويا المتخمر بوساطة أحياء مجهرية مختلفة لمدة حضن 21 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 قدرَ(5) الخواص المضادة للأكسدة لمستخلص الإيثانول بتركيز (50 %) 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} .

المواد وطرائق العمل

أولاً: المواد المستخدمة

1–الأحياء المجهرية:عزل عفن *Aspergillus niger* من التربة بإستعمال طريقة التخافيف العشرية Decimal (Dilution) بإتباع الطريقة الواردة في (1).

2– حامض اللينوليك:أُستعمل حامض اللينوليك لدراسة الفعالية المضادة للأكسدة والمجهز من قبل شركة Fluka الألمانية.

3– بيوتايليتيد هيدروكسي تولوين Butylated Hydroxy Toluene (BHT) تم الحصول عليه من قسم البحث والتطوير/ الشركة العامة للصناعات البتروكيمياوية / محافظة البصرة والمجهز من شركة BDH الإنكليزية ، إذ أُستعمل مضاد للأكسدة صناعي للمقارنة .

ثانياً: طرائق العمل

1– معلق الأبواغ:حضر العالق البوغي بتنشيط الأعفان التي لقحت على وسط MEA المائل Slant 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 (32).

2-عملية التخمر: حضر الرز المتخمر Rice Koji حسب الطريقة الواردة في (11) ، إذ نقع الرز بوزن 50 غم في 100 مل 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 .

3-قياس الفعالية المضادة للأكسدة

أُتبعت طريقة الثايوسيانات التي ذكرها (3) لقياس الفعالية المضادة لأكسدة حامض اللينوليك للمستخلصات المحضرة

وحسبت الفعالية المضادة لأكسدة حامض اللينوليك وفقاً للمعادلة التالية :

$$\text{الفعالية المضادة للأكسدة IP \%} = [1 - (\frac{\text{قراءة الإمتصاص للنموذج}}{\text{قراءة الإمتصاص للعينة الضابطة}})]\times100$$

(نسبة التثبيط %)

4-تقدير المركبات الفينولية: أُتبعت الطريقة الواردة في (19) لتقدير المركبات الفينولية في مستخلص خلات الأثيل للرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *Aspergillus niger* ، كما حضر المنحنى القياسي بإستعمال حامض الجاليك gallic acid بإستعمال التراكيز 0-500 مايكروغرام / مل .

5- ربط آيون الحديدوز :أُتبعت الطريقة التي ذكرها (6) مع بعض التحوير وتضمنت مايأتي : خلط 1 مل من العينة مع 3.7 مل خلات الأثيل وأُضيف للخليط 0.1 مل كلوريد الحديدوز تركيزه 2 ملي مولاري ، ثم أُضيف 0.2 مل من 8-hydroxyquinoline تركيزه 5 ملي مولاري ثم مزج الخليط وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق وقيس إمتصاص الناتج عند طول موجي 562 نانوميتر في جهاز المطياف الضوئي. كذلك قدرت قابلية ربط آيون الحديدوز للأثيلين ثنائي أمين رباعي حامض الخليك ثنائي الصوديوم لغرض المقارنة و حسبت قابلية الربط وفقاً للمعادلة التالية :

$$\text{قابلية الربط (\%)} = [1 - (\frac{\text{قراءة الإمتصاص للنموذج}}{\text{قراءة الإمتصاص للعينة الضابطة}})]\times100$$

6–قياس قوة الإختزال:قدرت الفعالية الإختزالية للعينات حسب الطريقة الواردة في (9) .

7–إقتناص الجذر الحر :أُستعملت طريقة (26) مع إجراء بعض التحويرات التي أُستعملت لتقدير قابلية إقتناص الجذور الحرة التي تضمنت خلط 1 مل من العينة مع 4 مل ميثانول و 1 مل من محلول Dimethyl sulfoxide (DMSO) المحضّر بتركيز 10 ملي مولاري في الإيثانول . رج الخليط بشدة وترك لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ، قيس الإمتصاص للمحلول الناتج في جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 517 نانوميتر . أُستعملت المعادلة الآتية لحساب فعالية النماذج لإقتناص الجذر الحر :

$$\text{فعالية إقتناص الجذر الحر (\%)} = [1-(\frac{\text{قراءة الإمتصاص للنموذج}}{\text{قراءة الإمتصاص للعينة الضابطة}})] \times 100$$

8– ثباتية فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAERK أُتبعت طريقة (30) إذ تم التحكم بعدة متغيرات للحصول على أعلى فعالية للمركبات المضادة للأكسدة مثل الرقم الهيدروجيني و درجات الحرارة والعامل التعاوني

8–1– تأثير الرقم الهيدروجيني:أُستعملت أرقام هيدروجينية مختلفة لمحاليل منظمة التي شملت محلول السترات المنظم وعلى رقم هيدروجيني 3 و 5 وبتركيز 0.2 مولاري ومحلول الفوسفات المنظم على رقم هيدروجيني 7 و 9 تركيزه 0.2 مولاري لبيان تأثير الرقم الهيدروجيني على ثباتية فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAERK .

8–2– تأثير وقت التعريض لدرجة حرارة 185 م:أُستعملت عينة من EAERK بوزن 3 ملغم ووضعت في دورق زجاجي 10 مل في درجة حرارة 185 م للمدد 0 و 10 و 30 و 50 و 70 و 90 و 120 دقيقة على التوالي ثم برد الدورق الزجاجي في درجة حرارة الغرفة وأُضيف اليها 0.3 مل خلات الأثيل وقيست الفعالية حسب طريقة الثايوسيانات.

8–3– تأثير العامل التعاوني في نظام حامض اللينوليك:أُستعملت أوزان مختلفة لمضاد الأكسدة EAERK 20 و40 و60 مايكروغرام على التوالي وأُضيف لكل دورق مخروطي كما أُستعمل مضاد الأكسدة الطبيعي–α Tocopherol وحامض الستريك بوزن 60 مايكروغرام .

9– قياس التأثير التثبيطي للمركبات المضادة للأكسدة EAERKعلى أكسدة الزيوت

9–1–الزيوت المستخدمة: أُستعمل نوعان من الزيوت : زيت نباتي (زيت الزيتون الخام) تم الحصول عليه من قسم السيطرة النوعية في المنشأة العامة للزيوت النباتية / محافظة ميسان وزيت حيواني (زيت سمك الصبور الخام) الذي تم إستخلاصه من سمك الصبور (Hamilton–Buchanan,1822) *Tenualosa ilisha* حسب (11) بوساطة الطريقة التي ذكرها (3).

9-**2- إعاقة أكسدة الزيوت:** أُتبعت الطريقة التي ذكرها(19) لتقدير قابلية مضادات الأكسدة لإعاقة الأكسدة الذاتية لزيت الزيتون وزيت السمك ، وتضمنت مايأتي : أُذيب 1 غم من الزيت في 24 مل من خليط (الكلوروفورم – الميثانول) بنسبة 2:1 ثم أُضيف للخليط 1 مل من مضاد الأكسدة EAERK والمحضّر بتراكيز 0.02 و 0.04 و 0.06 و 0.08 % على التوالي ، حضن الخليط المتجانس في درجة حرارة 45 م للمدد الزمنية 10 و 20 و 30 و 40 و 50 و 60 و 70 و 80 يوماً على التوالي ، و قدرت قيم البيروكسيد حسب الطريقة التي ذكرها3 خلال هذه المدد الزمنية . عوملت العينة الضابطة بنفس الطريقة أعلاه بإستثناء إضافة 1 مل من خلات الأثيل للخليط بدلاًمن إضافة مضاد الأكسدة EAERK . أُستعمل مضاد الأكسدة الصناعي BHT للمقارنة وبتركيز 0.02 % .

10- التحليل الإحصائي

أُستعمل البرنامج الإحصائي SPSS (1998) في تحليل البيانات إحصائياً كما أُجريت عملية مقارنة بين المتوسطات بإستعمال أقل فرق معنوي L.S.D عند مستوى إحتمال 0.05

النتائج والمناقشة

الفعالية المضادة للأكسدة

يوضح الجدول (1) الفعالية المضادة للأكسدة في نظام تثبيط أكسدة حامض اللينوليك بفعل مركبات EAERK لمستخلص خلات الأثيل للرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* التي قدرت بإستعمال طريقة الثايوسيانات وبالمقارنة مع مضاد الأكسدة الصناعي BHT ومضاد الأكسدة الطبيعي α-tocopherol وبتركيز 200 مايكروغرام / مل.

أظهرت النتائج إن فعالية مضاد الأكسدة الصناعي BHT كانت مرتفعة بشكل معنوي وبلغت نسبة التثبيط 84.73 % ، في حين كانت فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAERK 71.32 % وهذه النسبة هي أقل وبشكل معنوي من نسبة التثبيط لمضاد الأكسدة الطبيعي α-tocopherol إذ بلغت 81.34 % ، إذ بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاً معنوية عند مستوى إحتمال $p < 0.05$ في الفعالية المضادة للأكسدة لمضادات الأكسدة الثلاث.

إن الفعالية المضادة للأكسدة ترتبط بعدد ذرات الهيدروجين المتاحة للوهب بوساطة مجاميع الهيدروكسيل (26) ، كما إن الفعالية العالية لمضادات الأكسدة تنشأ من التأثير التعاوني بين مركبات مضادات الأكسدة الموجودة في المستخلص (11).

إن فعالية مضادات الأكسدة لتثبيط أكسدة حامض اللينوليك تعزى لميكانيكيات مختلفة من بينها إعاقة سلسلة بدء التفاعل وربط أنتقال آيونات الحديد وتحطيم البيروكسيدات ومنع إستمرار إزالة الهيدروجين وقابلية الإختزال وإقتناص الجذور الحرة (7 ; 32) ، كما إن فعالية المواد المضادة للأكسدة تزداد كلما زاد إحتواء

المستخلص على كميات كبيرة من المركبات المضادة للأكسدة و إن فعالية المركبات المضادة للأكسدة تزداد بفعل الآيزوفلافونات النباتية التي تتحرر في أثناء عملية التخمر (23).

جدول (1) : الفعالية المضادة للأكسدة لمركبات EAERK في نظام إعاقة أكسدة حامض اللينوليك ومضادات الأكسدة الصناعية والطبيعية.

نسبة التثبيط IP %*	**العينة
84.73^{a}	BHT
81.34^{b}	α−Tocopherol
71.32^{c}	EAERK

المحتوى الكلي للفينولات

إن المحتوى الكلي للفينولات الموجودة في مستخلص خلات الأثيل للرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *Aspergillus niger* بلغ 223.8 مايكروغرام على أساس حامض الجاليك/ ملغم مستخلص EAERK.

توجد علاقة بين المحتوى الكلي للفينولات في المستخلص وزيادة الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات الموجودة في مستخلص خلات الأثيل لرز كوجي المتخمر بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) ، إذ يزداد المحتوى الكلي للفينولات في المستخلص بعد عملية التخمر وإن الكميات الأكبر المشتقة للمركبات الفينولية تكون بعد عملية التخمر (28) .

إن فعالية المركبات المضادة للأكسدة تزداد بفعل مضادات أكسدة مساعدة التي تتحرر أثناء عملية التخمر والتي تزيد من المحتوى الكلي للفينولات في وسط التخمر (27 ; 15) ، وإن هذه المركبات هي منتجات أيضية ثانوية موجودة في النبات وتكون مرتبطة من خلال مجاميع هيدروكسيلية مع السكر على هيئة كلوكوسايدات glucosides (22).

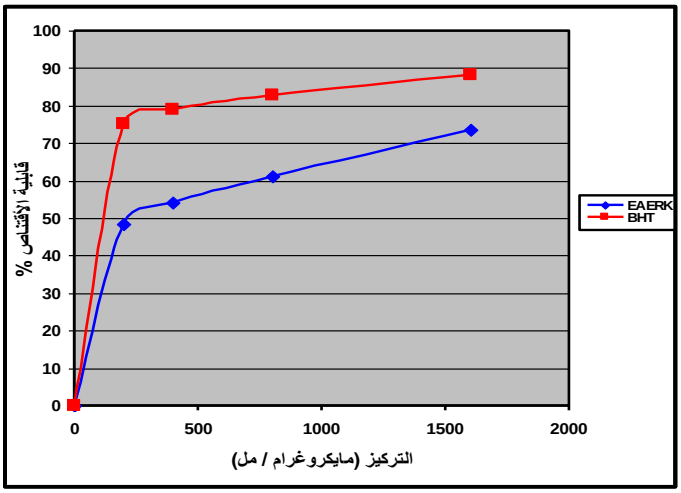
إن الفينولات يمكن أن تكون ذات طبيعة قطبية أو غير قطبية إعتماداً على ظروف إستخلاص هذه المركبات (21) ، كما إن تركيز الفينولات في المستخلصات يعتمد على نوع المذيب المستعمل (23).

إقتناص الجذر الحر

يبيّن الشكل (1) تأثير إستعمال المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) بتراكيز مختلفة لإقتناص الجذر الحر DMSO بالمقارنة مع مضاد الأكسدة الصناعي

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاً معنوية عند مستوى إحتمال $p < 0.05$ في قابلية EAERK لإقتناص الجذر الحرعند التراكيز المختلفة ، إذ إرتفعت فعالية مضاد الأكسدة الصناعي BHT بشكل معنوي ($p < 0.05$) مقارنة بقابلية EAERK لإقتناص الجذر الحر ، كما لوحظ إن قابلية الإقتناص للمركبات المضادة للأكسدة EAERK إزدادت بشكل معنوي بزيادة التركيز وهذا يتفق مع دراسة (2 ; 4 ; 21 ; 5; 24) .

تدل نتائج الدراسة الحالية على إن المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص خلات الأثيل للرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) تحتوي على مجاميع هيدروكسيلية واهبة للهيدروجين قادرة على التفاعل مع الجذور الحرة لتحويلها الى نواتج أكثر ثباتاً ومن ثم إنهاء سلسلة تفاعل الجذر الحر (26) ، وتعزى قابلية المركبات المضادة للأكسدة لإقتناص الجذر الحر للمركبات الفينولية المحتوية على مجاميع الهيدروكسيل التي لها القدرة على منح الألكترون للجذرالحر (29) ومن ثم فإن المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) تخضع للنظرية القائلة بأن المجموعة المانحة للألكترون تزيد فعالية إقتناص الجذور الحرة وإن المجموعة المستقبلة للألكترون تخفض فعالية إقتناص هذه الجذور(8).



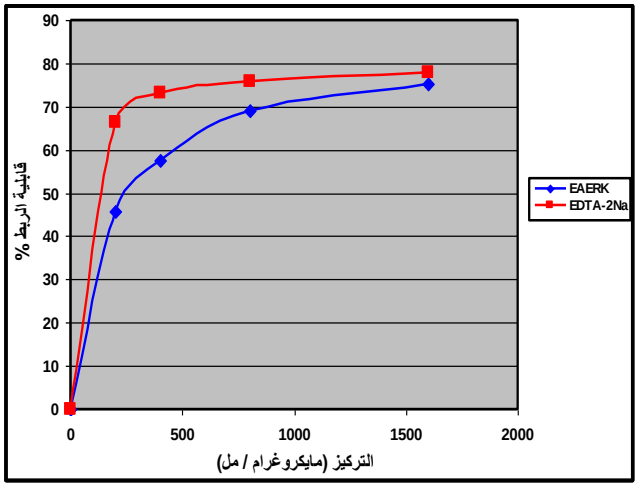
الشكل (1): قابلية المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) لإقتناص الجذر الحر DMSO

ربط آيون الحديدوز Fe^{+2}

يوضح الشكل (2) قابلية المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) لربط آيون الحديدوز بالمقارنة مع EDTA–2Na وبتراكيز مختلفة.

أظهرت النتائج زيادة قابلية EDTA–2Na بشكل معنوي لربط آيون الحديدوز، كما لوحظ أن قابلية المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) لربط آيون الحديدوز إزدادت بشكل معنوي بزيادة التركيز وهذا يتفق مع (4 و14) ، إذ وجدوا إن المركبات المضادة للأكسدة

المايكروبية إزدادت بزيادة التركيز ، إذ بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاً معنوية في كفاءة ربط آيون الحديدوز بين مادة EDTA–2Na والمركبات المضادة للأكسدة المايكروبية EAERK. إن مركب Ferrozine يكّون معقدات مع آيون الحديدوز Fe^{++} وبوجود عوامل مخلبية تفك ربط المعقد المتكّون الذي ينتج عنه نقصان في اللون الأحمر للمعقد إذ إن قياس إختزال اللون يعبر عن مدى قابلية ربط المعادن بوجود عوامل مخلبية Chelator (9).



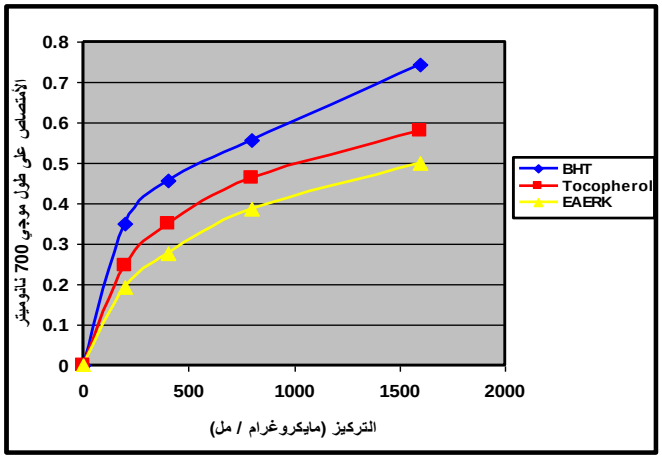
الشكل (2): قابلية المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) لربط آيون الحديدوز

قوة الإختزال

يبين الشكل (3) قابلية المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger*(EAERK) على إختزال آيونات الحديديك Fe^{+++} الى آيونات الحديدوز Fe^{++} بالمقارنة مع مضادي الأكسدة التجاريين BHT و α–Tocopherol وبتراكيز مختلفة.

لوحظ من النتائج إن مضاد الأكسدة الصناعي BHT أعطى أعلى إمتصاص وبشكل معنوي في حين كانت قوة إختزال المركبات المضادة للأكسدة EAERK أقل من قوة إختزال مضادي الأكسدة BHT و α–Tocopherol ، كما لوحظ إن قوة إختزال المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) إزدادت بشكل معنوي بزيادة التركيز ، إذ بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاً معنوية عند مستوى إحتمال $p < 0.05$ في قوة الإختزال بزيادة التراكيز ، وهذا يتفق مع نتائج سابقة عززت قوة الإختزال (2; 30; 4 ;5) .إن سبب زيادة قوة الإختزال للمستخلص يعود لإحتمال وجود مركبات تدعى المركبات المختزلة reductants تكونت خلال عملية التخمرالتي تستطيع التفاعل مع الجذور الحرة لتحويلها الى نواتج أكثر

ثباتاً ومن ثم إنهاء سلسلة تفاعل الجذر الحر ، كما إن المركبات المختزلة تتفاعل مع البيروكسيدات وتمنع تكونها (32) .



الشكل (3) : قوة إختزال المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK)

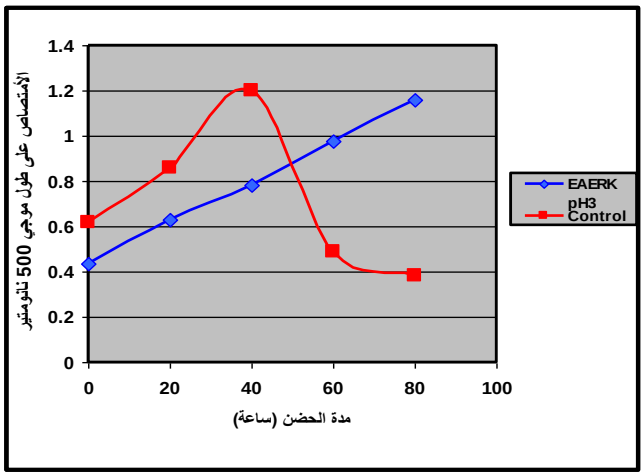
ثباتية فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAERK

الرقم الهيدروجيني

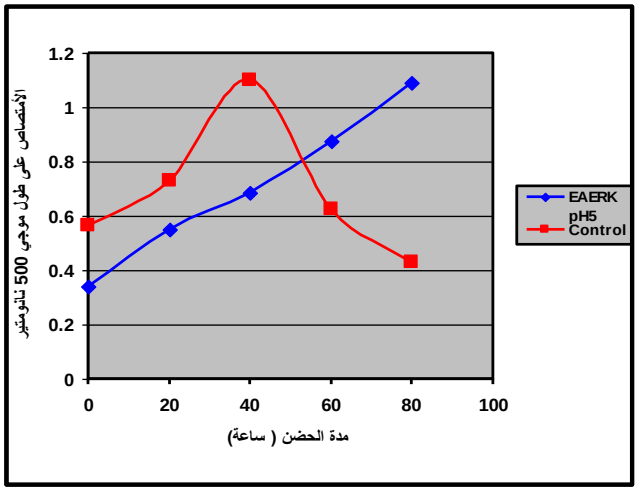
توضح الأشكال (4) و(5) و(6) و(7) تأثير إستعمال أرقام هيدروجينية مختلفة 3 و5 و7 و9 على التوالي في فعالية المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) لتثبيط أكسدة حامض اللينوليك عند الحضن في درجة حرارة 40 م لمدة 95 ساعة. أظهرت النتائج حصول إنخفاض بشكل معنوي في فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAERK وبصورة تدريجية بتقدم مدة الحضن عند الرقم الهيدروجيني الحامضي وبلغت أقصاها بعد 95 ساعة ، إذ بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاً معنوية عند مستوى أحتمال $p < 0.05$ في فعالية المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) لجميع الأرقام الهيدروجينية.

لم تظهر فروقاً معنوية ($p > 0.05$) في الفعالية عند الرقم الهيدروجيني المتعادل إذ لوحظ حصول إنخفاض طفيف في الفعالية المضادة للأكسدة وهذا يتفق مع 6 ، وإن سبب ذلك يعود لقابلية المركبات المضادة للأكسدة للإختزال على الرقم الهيدروجيني المتعادل (13).ولوحظ من الشكل (7) إن معدل فعالية المركبات المضادة للأكسدة قد إنخفض بشكل معنوي عند الرقم الهيدروجيني القاعدي. كما لوحظ إن هناك تباين كبير في إمتصاص العينة الضابطة control إذ بدأت بالإنخفاض السريع بعد مدة حضن 45 ساعة وقد يعود ذلك الى تحطم البيروكسيدات المتكونة أثناء عملية أكسدة حامض اللينوليك(18).

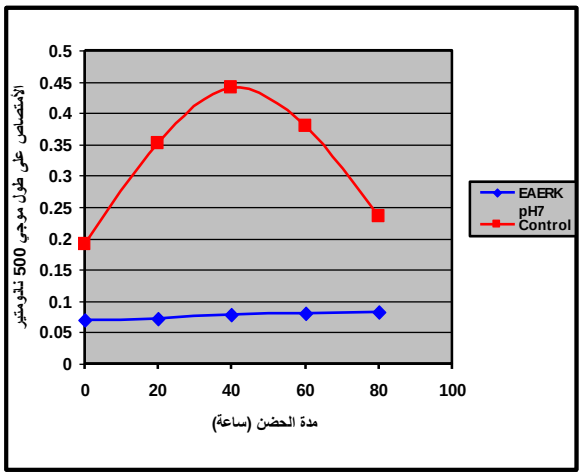
تدل نتائج الدراسة الحالية على ثباتية المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) تحت الظروف المتعادلة إلا إنها غير ثابتة تحت الظروف الحامضية والقاعدية مما قلل من الفعالية المضادة لأكسدة المركبات المتكونة ويرجع سبب زيادة الفعالية المضادة للأكسدة في الظروف المتعادلة إنها تساعد على حصول عملية تنشيط للمركبات المتكونة (15). أما إنخفاض الفعالية تحت الظروف الحامضية والقاعدية فقد يعود لتفكك المركبات المضادة للأكسدة(7 ; 32).



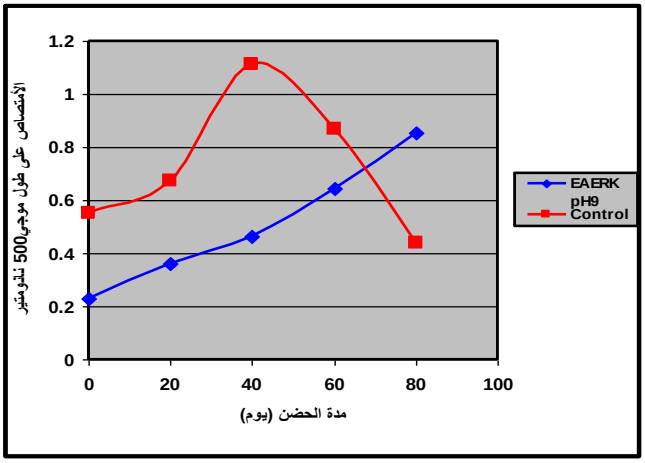
الشكل(4): تأثير الرقم الهيدروجيني 3 في فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAERK لمستخلصات كوجي لمدد حضن مختلفة في درجة حرارة 40 م



الشكل(5): تأثير الرقم الهيدروجيني 5 في فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAERK لمستخلصات كوجي لمدد حضن مختلفة في درجة حرارة 40 م



الشكل (6): تأثير الرقم الهيدروجيني 7 في فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAERK لمستخلصات كوجي لمدد حضن مختلفة في درجة حرارة 40 م



الشكل (7): تأثير الرقم الهيدروجيني 9 في فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAERK لمستخلصات كوجي لمدد حضن مختلفة في درجة حرارة 40 م

تأثير وقت التعريض لدرجة حرارة 185 م

يوضح الجدول 2 تأثير المعاملات الحرارية على فعالية المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) عند التسخين على درجة حرارة 185 م للمدد 0 و 10 و 30 و 50 و 70 و 90 و 120 دقيقة على التوالي كما قدّرت فعالية المركبات المضادة للأكسدة المتبقية بعد عملية التسخين. بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاً معنوية ($p < 0.05$) في فعالية المركبات المضادة

للأكسدة لمدد التسخين من 30 دقيقة ولغاية الدقيقة 120 عدا مدة التسخين من 0 ولغاية 10 دقائق لم تظهر فروقاً معنوية في الفعالية المضادة للأكسدة بدرجة حرارة 185 م ، إذ لوحظ من خلال النتائج حصول إنخفاض طفيف في الفعالية عند التسخين لغاية 10 دقائق وبعدها حصل إنخفاض و بشكل معنوي في فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAERK بصورة تدريجية بتقدم الوقت حتى بلغت نسبة التثبيط 73.21 % عند الدقيقة 120 وبإنخفاض الفعالية إنخفضت الكمية المتبقية للمركبات المضادة للأكسدة بعد التسخين وبلغت 95.68 % بعد مرور ساعتين ، إن سبب إنخفاض فعالية مضادات الأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) قد يعود لتفكك المركبات المضادة للأكسدة بزيادة وقت التعريض لدرجات الحرارة (5).

يلاحظ من خلال النتائج إن المركبات المضادة للأكسدة EAERK تمتلك صفات جيدة تتحمل التسخين على درجة حرارة 185 م لمدة ساعتين والسبب يعود الى إحتوائها على مركبات فينولية ثابتة تجاه الحرارة مقارنة بمضادات الأكسدة الصناعية التي تكون غير ثابتة تجاه درجات الحرارة العالية وهذا ما أكده (17) إن مضادات الأكسدة الصناعية BHA و BHT و PG و TBHQ تفقد فعاليتها عند التسخين على درجة حرارة 185 م لمدة ساعة إذ كانت نسبة التثبيط لكل منها 42.8 و 20.4 و 37.1 و 47.7 % على التوالي.

جدول (2): تأثير وقت التعريض لدرجة حرارة 185 م في فعالية المركبات المضادة للأكسدةEAERK لمستخلصات كوجي

وقت التسخين (دقيقة)	الفعالية المضادة للأكسدة (نسبة التثبيط %)*	المتبقي من مضادات الأكسدة الفعالة **
0	76.51^{a}	100
10	76.38^{a}	99.83
30	76.01^{b}	99.34
50	75.22^{c}	98.31
70	74.76^{d}	97.71
90	74.08^{e}	96.82
120	73.21^{f}	95.68

*** تدل الأحرف المختلفة على وجود فروقاً معنوية عند مستوى إحتمال $p < 0.05$**

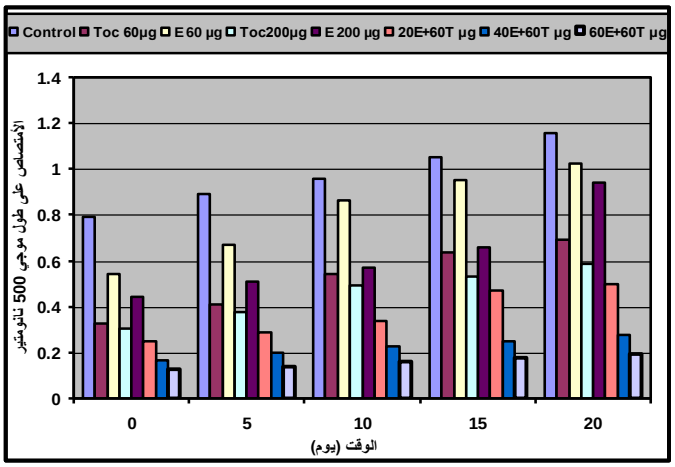
تأثير العامل التعاوني

يوضح الشكلان (8) و (9) التأثير التعاوني لخلائط (α–tocopherol + EAERK) و (EAERK + حامض الستريك) للمدد 0 و 5 و 10 و 15 و 20 يوماً على التوالي في درجة حرارة حضن 40 م . يلاحظ من الشكل (8) زيادة تأثير العامل التعاوني لخلائط (α–tocopherol + EAERK) مع زيادة كمية المركبات المضادة للأكسدة EAERK ، وأظهرت النتائج أنّ المعاملة لخليط (60 مايكروغرام EAERK + 60 مايكروغرام α–tocopherol) كانت الأفضل من بين المعاملات الأُخرى المتكونة من إتحاد(20 و 40 مايكروغرام EAERK + 60 مايكروغرام α–tocopherol) إذ تفوق هذا الخليط معنوياً ($p < 0.05$) على بقية الخلائط التي إنخفضت فيها الفعالية وبشكل معنوي بزيادة مدة الحضن ، وقد أعطت معاملات الخلائط أفضل فعالية في عرقلة أكسدة حامض اللينوليك من إضافة مضادات الأكسدة على إنفراد الى الأغذية وهذا يتفق مع 23 إذ وجد إن عفن A–12 *Aspergillus niger* له القابلية لإنتاج مواد مضادة للأكسدة ذات تأثير تعاوني عند إتحادها مع مضاد الأكسدة الطبيعي α–tocopherol ، إذ بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاً معنوية ($p < 0.05$) بين معاملات خلائط EAERK مع مضاد الأكسدة الطبيعي α–tocopherol في عرقلة أكسدة حامض اللينوليك.

و تبين نتائج الدراسة الحالية إن المركبات المضادة للأكسدة تمتلك قابلية وهب ذرات الهيدروجين ويعود سبب التأثير التعاوني للمركبات المضادة للأكسدة لخليط (EAERK + α–tocopherol) الى ميكانيكية الأكسدة والإختزال والمتضمنة إختزال المركب الوسطي لجذر α–tocopheroxyl بوساطة المركبات المضادة للأكسدة EAERK ليكون α–tocopherol (30).

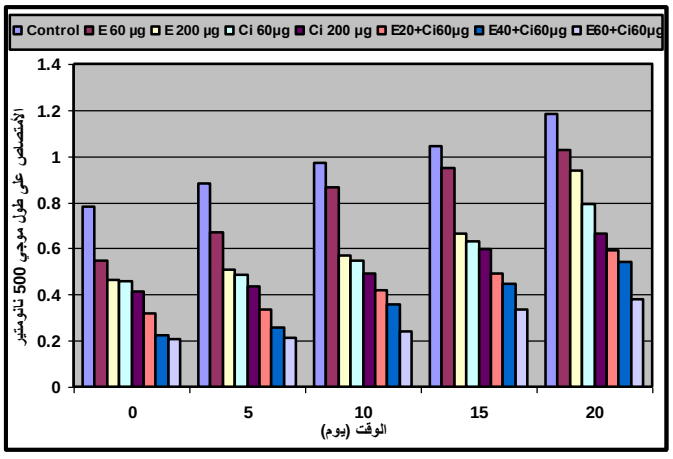
يوضح الشكل (9) التأثير التعاوني لخلائط (EAERK + حامض الستريك) المتكونة من (20 و 40 و 60 مايكروغرام EAERK) مع (60 مايكروغرام حامض الستريك) فقد إزدادت الفعالية المضادة لأكسدة حامض اللينوليك بزيادة كمية EAERK ، وأظهرت النتائج أنّ المعاملة لخليط (60 مايكروغرام EAERK + 60 مايكروغرام حامض الستريك) كانت الأفضل من بين المعاملات الأُخرى وإنخفضت نسبة التثبيط بشكل معنوي بتقدم مدة الحضن ، وقد أعطت معاملات الخلائط أفضل فعالية في عرقلة أكسدة حامض اللينوليك من إضافة مضادات الأكسدة على إنفراد الى الأغذية ، وبينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاً الفعالية المضادة للأكسدة للخلائط المستعملة وهذا يتفق مع (29) إذ وجد إن خلائط معاملات مضاد الأكسدة الطبيعي وحامض الستريك مع مضادات الأكسدة المايكروبية EAEAC كانت الأفضل من إضافة مضادات الأكسدة على إنفراد الى الأغذية.

أثبتت نتائج الدراسة الحالية وجود تأثير تعاوني بين EAERK ومضادات الأكسدة التجارية المختبرة في تأخير أكسدة حامض اللينوليك إذ أظهرت المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص خلات الأثيل لرز كوجي المتخمر بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) تأثيراً تعاونياً مع α–tocopherol وحامض الستريك وهذا يتفق مع ماذكره(28) في إن المركبات المضادة للأكسدة من أصل مايكروبي فعّالة تعاونياً مع بعض مضادات الأكسدة المعروفة مثل α–tocopherol وحامض الستريك .



α– tocopherol : Toc EAERK : E*

الشكل (8): تأثير العامل التعاوني في فعالية المركبات المضادة للاكسدة EAERK لمستخلصات كوجي مع α– tocopherol والمحضن في درجة حرارة 40 م



Citric acid : Ci EAERK : E *

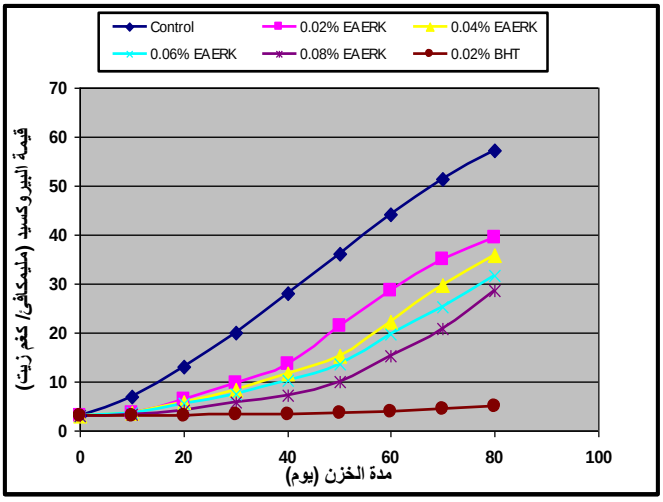
الشكل(9): تأثير العامل التعاوني في فعالية المركبات المضادة للأكسدة EAERK لمستخلصات كوجي مع حامض الستريك والمحضن بدرجة حرارة 40 م

التأثير التثبيطي للمركبات المضادة للأكسدة EAERK لإعاقة أكسدة الزيوت

التأثير التثبيطي لإعاقة أكسدة زيت الزيتون

يوضح الشكل (10) التأثير التثبيطي للمركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) لإعاقة الأكسدة الذاتية لزيت الزيتون بتراكيز مختلفة 0.02 و 0.04 و 0.06 و 0.08 % على التوالي وللمدد الخزنية 0 و 10 و 20 و 30 و 40 و 50 و 60 و 70 و 80 يوماً على التوالي عند درجة حرارة 45 م وبالمقارنة مع مضاد الأكسدة الصناعي BHT بتركيز 0.02 % والعينة الضابطة Control.

أظهرت النتائج إن التأثير التثبيطي لمستخلص خلات الأثيل لرز كوجي المتخمر بوساطة عفن *Aspergillus niger* (EAERK) قد إزداد بشكل معنوي بزيادة التراكيز المستعملة إذ تفوق التركيز 0.08 % معنوياً ($p < 0.05$) مقارنة مع بقية التراكيز، إذ إنه أعاق أكسدة الزيت لغاية 50 يوماً من الخزن إذ بلغت قيمة البيروكسيد 10 مليمكافئ / كغم زيت دلالة على قابلية مضادات الأكسدة لإختزال البيروكسيدات المتكونة خلال هذه المدة وتفاعلها مع الجذور الحرة وتكوين معقدات مع آيونات المعادن وقد تعود هذه الفعالية الجيدة لوجود التأثير التعاوني بين المركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) والمواد الكيميائية النباتية مثل الأيزوفلافونات (20) ، وهذا يدل على إن للمركبات المضادة للأكسدة EAERK القابلية على وهب الهيدروجين وذات ثباتية تجاه الجذور الحرة (10) ضمن مدة حضن 50 يوماً ، بعدها حصلت زيادة سريعة في قيم البيروكسيد لمدد الخزن اللاحقة وهذه دلالة على إنخفاض الفعالية التثبيطية للتركيز بتقدم مدد الخزن بسبب عدم ثباتية المركبات المضادة للأكسدة EAERK ، أما بقية التراكيز 0.02 و 0.04 و 0.06 % على التوالي لم تظهر فعالية تثبيطية واضحة مقارنة بالتركيز 0.08 % إذ أعاقت أكسدة الزيت حتى 30 يوماً بعدم تجاوز قيمة البيروكسيد ماتوصي به المواصفة القياسية لنوعية الزيوت الصالحة للإستهلاك والبالغة10 مليمكافئ / كغم زيت وبعدها إزدادت قيم البيروكسيد بصورة واضحة وسريعة وتجاوزت القيم المقبولة للنوعية الجيدة للزيوت لمدد الخزن البالغة 40 و 50 و 60 و 70 و 80 يوماً على التوالي دلالة على إنخفاض التأثير المضاد للأكسدة عند هذه التراكيز مما يؤدي لفقدان مضادات الأكسدة فعاليتها نتيجة لتحلل بعض المركبات الكيميائية الموجودة في المستخلص وهذا يوضح سبب تفاوت الفعالية التثبيطية وذلك إن بعض المركبات الموجودة في المستخلص المتخمر قد تتأثر بطول مدة الخزن (10) ، وكانت قيم جميع المعاملات أقل من العينة الضابطة التي كانت أسرع وصولاً لأقصى قيمة للبيروكسيد مما يدل على أكسدة الأحماض الدهنية الموجودة في عينة الزيت. أما مضاد الأكسدة الصناعي BHT فقد أعطى أعلى فعالية تثبيطية من خلال ملاحظة قيم البيروكسيد المنخفضة مقارنة بالنماذج الأُخرى ولم تكن معنوية خلال مدد الحضن.



الشكل (10) : التأثير التثبيطي للمركبات المضادة للأكسدة EAERK لمستخلصات كوجي لإعاقة أكسدة زيت الزيتون لمدد خزنية مختلفة على درجة حرارة حضن 45 م

التأثير التثبيطي لإعاقة أكسدة زيت السمك

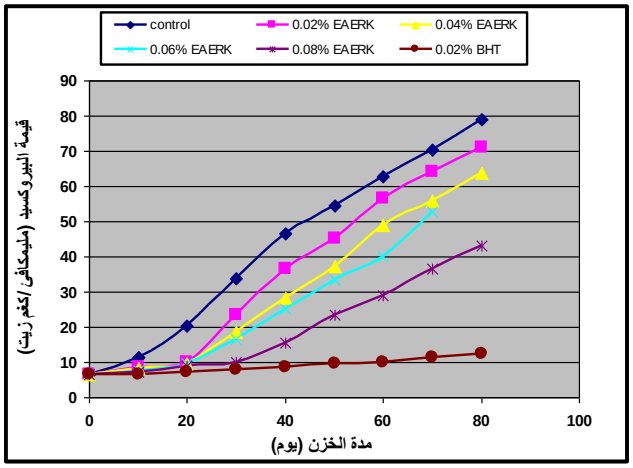
يوضح الشكل (11) التأثير التثبيطي للمركبات المضادة للأكسدة لمستخلص الرز المتخمر (كوجي) بوساطة عفن *A. niger* (EAERK) لإعاقة أكسدة زيت سمك الصبور بتراكيز 0.02 و 0.04 و 0.06 و 0.08 % زيت على التوالي وللمدد الخزنية 0 و 10 و 20 و 30 و 40 و 50 و 60 و 70 و 80 يوماً على التوالي وبدرجة حرارة 45 م وبالمقارنة مع مضاد الأكسدة الصناعي BHT بتركيز 0.02 % والعينة الضابطة.

لوحظ من خلال النتائج إن التأثير التثبيطي للمركبات المضادة للأكسدة لمستخلصات رز كوجي EAERK إزداد بشكل معنوي ($p < 0.05$) عند تركيز 0.08 % على بقية التراكيز في الفعالية التثبيطية لإعاقة أكسدة زيت الأسماك لمدة 30 يوماً إذ حافظ الزيت على قيم مقبولة من البيروكسيد والبالغة 10 مليمكافئ / كغم زيت للزيوت المقبولة للإستهلاك بعدها حصلت زيادة سريعة في الأكسدة للمدد الأخيرة من الخزن 50 و 60 و 70 و80 يوماً على التوالي ، أما بقية التراكيز 0.02 و 0.04 و 0.06 % لم تظهر تأثيراً ملموساً إذ أعاقت الأكسدة الذاتية لمدة 20 يوماً فقط بمعنى عدم قدرة هذه التراكيز لخفض مستويات البيروكسيد المتكونة نتيجة لحصول الأكسدة للزيت أثناء مدة الخزن ، أما مضاد الأكسدة الصناعي BHT فقد تفوق معنوياً ($p < 0.05$) إذ أعطى أعلى فعالية تثبيطية لخفض مستويات البيروكسيد المتكونة بتقدم مدد الخزن ، عموماً لوحظ من خلال النتائج الحالية الزيادة المستمرة لقيم البيروكسيد مع إستمرار مدد الخزن لجميع المعاملات بصورة عامة .

عموماً إن مضادات الأكسدة المحبة للماء تصبح أقل تأثير في المستحلب الدهني نتيجة لتحللها في الطور المائي أما مضادات الأكسدة الكارهة للماء تتكيف في الزيت وتشكل حماية لطور الزيت من الأكسدة (27) كما إن حجم جزيئات مضادات الأكسدة وتفاعل المركبات الفينولية مع وسط الأستحلاب يعطي كفاءة أفضل لتثبيط الأكسدة (15) .

يلاحظ من خلال النتائج الحالية إرتفاع قيم البيروكسيد لنماذج زيت السمك بشكل أكبر من نماذج زيت الزيتون إذ إن هناك إختلافات واضحة في قيم البيروكسيد لكل من نماذج زيت الزيتون وزيت السمك دلالة على حدوث الأكسدة الذاتية في زيت السمك بشكل أكبر من زيت الزيتون لإحتواء هذا الزيت على نسبة كبيرة من الأحماض الدهنية غير المشبعة بدرجة عالية وذات 4-6 أواصر مزدوجة وتقدر نسبتها بحوالي 79-83 % ومن هذه الأحماض Docosahexanoic acid و Eicosapentanoic acid التي تكون أكثر عرضة للأكسدة من

بقية الأحماض الدهنية ، أما زيت الزيتون فأنه يحتوي على نسبة عالية من الأحماض الدهنية غير المشبعة الأحادية التي تقدر بحوالي 73 % وكذلك تحتوي على أحماض دهنية مشبعة والتي تقدر بحوالي 15 % وجميع هذه الأحماض الدهنية أقل عرضة للأكسدة من الأحماض الدهنية غير المشبعة المتعددة (22).



الشكل (11) : التأثير التثبيطي للمركبات المضادة للأكسدة EAERK لمستخلصات كوجي لإعاقة أكسدة زيت سمك الصبور لمدد خزنية مختلفة على درجة حرارة حضن 45 م

References

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

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

3- Bersuder,P.; 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.

4- Chou,S.T.; Chang,C.T.; Chao,W.W. and Chung,Y.C.(2002). Evaluation of antioxidative and mutagenic properties of 50% ethanolic extract from red bean fermented by Aspergillus oryzae. J. Food Prot.65: 1463-1469.

5- Chung,Y.C.; Chang,C.T.; Chao,W.W.; Lin,C.F. and Chou,S.T.(2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by Bacillus subtilis IMR-NK1. J. Agric. Food Chem. 50: 2454-2458.

6- Daker, M.; Abdullah,N.; Vikineswary,S. and Kuppusamy,U.R.(2009). Production of antioxidants by Marasmiellus sp. Via solid substrate fermentation. Am. J. Food Tech. 4(1) : 36-46.

7- Diplock,A.T.(1997). Will the good fairies please proves to us that vitamin E lessens human degenerative of disease ? Free Radical Research. 27: 511-532.

8- Farhoosh,R.; Gholam,A.; Mohammad,G. and Khodaparast,H.(2006). Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes. Food Chem. 100: 231-236.

9- Gordon,M.H.(1990). The mechanisim of antioxidant action in vitro. In : Hudson, B.J.F. (Ed.) , Antioxidants. Elsevier Applied Science, London, New York. pp: 1-18.

10- Halliwell,B.; Murcia,M.A.; Chirico,S. and Aruoma,O.I.(1995). Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. CRC. Crit. Rev. Food Sci Nutr. 35: 7- 20.

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

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

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

14-Lin,C.H.; 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.

15-Lopes,G.K.; Schulman,H.M. and Hermes-Lima,M.(1999). Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction bycomplexing ferrous ions. Biochim. Biophys. Acta.1472:142-152.

16-Miller,H.E.; Rigelhof,F.; Marquart,L.; Prakash,A. And Kanter, M.(2000). Antioxidant content of whole grain breakfast cereal, fruits and vegetables. J. American College of Nutrition .19:312-319.

17-Oyaizu,M.(1986). Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamin. Jpn. J. Nutr. 44: 307-315.

18-Quettier-Deleu,C.; Gressier,B.; Vasseur,J.; Dine,T.; Brunet,C.; Luyckx,M.;Cazin,M.; Cazin,J.C.; Bailleul,F. and Trotin,F.(2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) hulls and flour. J. Ethnopharmacol. 72:35-42.

19-Randhir,R.; 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.

20-Rivera,J.;Navarro,A. and Valdivia,M.A.(2005). Mexican lime peel: Comparative study on contents of dietary fibre and associated antioxidant activity. Food Chem. 89:57-61.

21-Robbins,R.(1980). Medical and nutritional aspects of citrus bioflavonoids. In:

Nagy,S.;Attaway,J.(Eds.), Citrus Nutrition and Quality.Am. Chem. Soc. Washington, DC. pp.43-59.

22-Romero,A.M.; Doval,M.M.; Sturla,M.A. and Judis, M. A.(2004). Antioxidant properties of polyphenolic –containing extract from soybean fermented with Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Lipid Sci.Technol. 106:424-431.

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

24-Shahidi,F. and Wanasundara,P.K.(1992). Phenolic antioxidant. Crit. Food Sci. Nutr. 32: 67- 103.

25-Shimada,K.; Fujikawa,K.; Yahara,K. and Nukamura,T.(1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil incyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem. 40:945-948.

26-Shimada,K.; Fujikawa,K.; Yahara,K. and Nukamura,T.(1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil incyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem. 40:945-948.

27-Vattem,D. and Shetty,K.(2002). Solid- state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by Rhizopsoh oligosporus.Food Biotechnol. 16: 189 – 210.

28-Wu,H.C.; Cheng,H.M. and Schiau,C.Y.(2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). Food Res. Int. 36:949-957.

29-Yang,J.H.; Mau,J.L.; Ko,P.T. and Huang,L.C.(2000). Antioxidant properties of fermented soybean broth. Food Chem. 71:249-254.

30-Yaldirim,A.; Mavi,A. and Kara,A.A.(2001). Determination of antoxidant and antimicrobial activities of Rumaxs crispus L. extracts.J. Agric. Food Chem. 49:4083-4089.

31- Yang,J.H.; Lin,H.C. and Mau,J.L.(2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. Food Chem.77:229-235.

32-Yen,G.C.;Chang,Y.C. and Chen,J.P.(2002). Antioxidant activity of mycelia from Aspergillus candidus. J. Food Science. 67(2):567-572.