تأثير المعاملات الحرارية في الفعالية الحيوية للكاتكينات المستخلصة من صنفي بذور العنب شدة سوداء وبيضاء

إشراق منير محمد السامرائي نضال محمد صالح الجنابي

الملخص

تم تقدير التركيب الكيميائي لبذور العنب صنفي شدة سوداء وبيضاء وكانت نسبتي الرطوبة 10.65و 8.04 % ونسبتي البروتين5.63و 5.87%ونسبتي الكاربوهيدرات 80.43 و82.21 %ونسبتي الدهون 0.36 و0.39 % و نسبتي الرماد 2.93 و3.49% ونسبتي الألياف 60.72 و67.83 % على التوالي.

أجريت عملية استخلاص مائي للكاتكينات لكل من بذور صنفي العنب بواقع (10:1) (ماء: صلب) وزن/ وزن على التوالي والترشيح والتركيز مع خلات الاثيل (1:1) حجم/حجم على التوالي،ثم التجفيف في درجة حرارة 40 مْ. إضافة إلى اختبار تأثير المستخلصين نحو نمو سبعة أنواع من البكتريا التي شملت *Bacillus subtilis* ، *Bacillus cereus*،*Bacillus stearothermophilus*،*Escherishia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Salmonella typhimurium* و *Pseudomonas fluorescens*، و2 من الخمائر *Kluyveromyces marxianus* و *Candida albicans* بطريقة الانتشار القرصي (Disk diffusion method).

تم كذلك اختبار تأثير ثلاث معاملات حرارية وهي البسترة السريعة (72 مْ/15 ثانية) والتعقيم بالمؤصدة (121 مْ/15 دقيقة) فضلاً عن التعقيم البارد اذ أعطى المستخلصان نتائجاً ايجابية من حيث التأثير التثبيطي اتجاه البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، في حين أبدت الخمائر حساسية اقل أتجاهاً للمستخلصين.

المقدمة

أظهرت الدراسات بان الأشخاص الذين يتناولون الأغذية الحاوية على المركبات الفينولية يحصلون على حماية من مخاطر الإصابة بالعديد من الأمراض (12، 14، 19,16، 21، 23 و28). إذ أن المركبات الكيميائية النباتية في الفاكهة والخضراوات والتوابل والنباتات الطبية التقليدية والعشبية تؤدي فعلاً وقائياً ضد العديد من الأمراض المزمنة للأنسان بما في ذلك أمراض الأوعية الدموية (24)، إذ تسهم أصناف عده من المكونات التي توجد في الفواكه والخضراوات بأداء كبير في الفعاليات المضادة للأحياء المجهرية و المضادة للأكسدة،كما أظهرت بعض الدراسات أن لبعض النباتات فعلاً فسلجياً ودوائياً واسعاً، إذ استعملت لعلاج الكثير من الأمراض الشائعة مثل مرض السكر وضغط الدم وغيرها وان لها القابلية على تثبيط أو قتل الكثير من الأحياء المجهرية المرضية وهي آمنة الاستعمال و الآثار الجانبية التي تحدثها اقل ضرراً مقارنة مع العقاقير المخلقة صناعياً (5، 6و18). وللعنب فوائد عديدة منها تغذوية وأخرى صحية، فالفوائد التغذوية تتمثل بأنه غنياً بالمواد السكرية مثل الكلوكوز والفركتوز التي يعتمد عليها الكبد في وظائفه فضلاً عن الفوائد الأخرى للجسم (3). وتعد قشرة العنب غنية بفيتامين B الذي يساهم في عمليات حيوية عديدة في جسم الإنسان، وهو عامل مهم لسلامة الجهاز العصبي ويحتوي على فيتامين C الذي يزيد من مناعة الجسم ويقلل من احتمالات الإصابة بالأحياء المجهرية، ويعد العنب مصدراً غنياً بالألياف النباتية التي تمنع الإمساك وتنظم مستوى الكولسترول في الجسم وتحميه من الإصابة بمرض السرطان (1).

جزء من رسالة ماجستير للباحث الأول.

كلية الزراعة– جامعة بغداد–بغداد،العراق.

يحتوي العنب على الحوامض العضوية مثل حامض الماليك (Malic acid) والتارتاريك (Tartaric acid) والستريك (Citric acid) وبعض الأحماض الامينية مثل البرولين (Proline) (1،4و8) والكثير من العلماء يقارنون عصير العنب بلبن الأم ويعدونه لبناً نباتياً،إذ أن لتراً واحداً من العصير يعطي سعرات حرارية تعادل ما يعطيه 1.7لتر حليب بقري، 650غم لحم بقري، 1كغم سمك، 300 غم جبن، 500 غم خبز، 2 – 3 بيضات و1.5كغم تفاح (2). ويحتوي العنب على العديد من المركبات الفعالة من بينها المركبات الفينولية وخاصة الفلافونويدية وتوجد الفلافونويدات في الحمضيات جميعها والتوت والبصل (29) والبقول (15) والبقدونس(20) والشاي وعصير العنب الأحمر.وتحتوي قشرة العنب على كميات كبيرة من الفلافونويد، فضلاً من المركبات ألأخرى متعددة الفينول (22) وكذلك الأمر المتعلق بالعنب الأحمر والأبيض وفول الصويا وغيرها (17).

تمثل بذور العنب مخلفات للصناعات الغذائية يمكن الاستفادة منها في مجالات عدة ،لذا اجري هذا البحث لدراسة التركيب الكيميائي للمكونات الرئيسة لبذور العنب صنفي شدة سوداء وبيضاء فضلا عن إجراء استخلاص مائي لمكوناتها وتقويم فعاليتها كمضادات للأحياء المجهرية. كما درس تأثير المعاملات الحرارية المتمثلة بالبسترة السريعة والتعقيم بالمؤصدة فضلاً عن التعقيم البارد في الفعالية التثبيطية للمستخلصات المائية اتجاه نحو بكتريا وخمائر الاختبار.

المواد وطرائق البحث

جمع العينات

تم اختيار العينات من بستان العنب الواقع في منطقه ألسراجي/قضاء بلد/ محافظه صلاح الدين أثناء مدة التجربة للموسم 2009–2010. تم فصل البذور عن اللب والهيكل لكل النماذج ، إذ تم غسلها بماء الحنفية الجاري ثم جففت بالفرن الكهربائي بدرجة حرارة 40مْ وحفظت في علب معتمة داخل الثلاجة في درجة حرارة 8مْ لحين الاستعمال .

تقدير المكونات الرئيسة لبذور صنفي العنب شدة سوداء وبيضاء

تقدير نسبة الرطوبة: – قدرت النسبة المئوية للرطوبة حسب الطريقة التي ذكرت في A.A.C.C. (9).

تقدير البروتين:قدر البروتين الكلي للنماذج بأتباع طريقة كلدال (Micro- Kjeldhal)(11) .

تقدير المواد الدهنية: اتبعت طريقةA.A.C.C (9) في تقدير المواد الدهنية في جهاز السوكسليت وبواسطه الايثر النفطي .

تقدير نسبة الرماد:قدرت نسبة الرماد حسب الطريقة القياسية المذكورة في A.O.A.C(11).

تقدير نسبة الألياف:قدرت حسب الطريقة المذكورة من قبل دلالي والحكيم (7).

تقدير المركبات الكاربوهيدراتية : قدرت حسب الطريقة الموصوفة من قبل دلالي و الحكيم (7).

الأحياء المجهرية المستعملة في الاختبار

استعملت في هذه الدراسة عزلات أحياء مجهرية (Microorganisms) مختلفة تضمنت أنواع مختلفه من البكتريا والخمائر و الاعفان ، وشملت أنواعا مسببة للمرض ولتلف الأغذية . فقد تم الحصول عليها من الجهات المؤشرة إزاء كل منها :

اسم الكائن ألمجهري	مصدره
Bacillus subtilis	كلية العلوم/جامعة بغداد
Bacillus cereus	كلية العلوم/جامعة بغداد
Escherichia coli	كلية العلوم/جامعة بغداد
Staphylococcus aureus	كلية العلوم/جامعة بغداد
Pseudomonas flourescens	كلية الزراعة/جامعة بغداد
Salmonella typhimurium	كلية الزراعة/جامعة بغداد
Bacillus stearothermophilus	كلية الزراعة/جامعة بغداد
Candida albicans	كلية العلوم/جامعة بغداد
Kluyveromyces marxianus	كلية الزراعة/جامعة بغداد

استخلاص الكاتكينات

وضع 10غم من مسحوق بذور صنفي العنب كلاً على انفراد في وعاء زجاجي حجم 250 مل وأضيف إليها 100 مل ماء مقطر مغلي ثم مزجت بمحرك مغناطيسي في درجة حرارة95 مْ لمدة 30 دقيقة ، رشح المستخلص بورق الترشيح (**Whatman No.1**) باستعمال قمع بخنر مع التفريغ، وركز الراشح الناتج إلى الربع بالمبخر الدوار في درجه 40مْ ثم أضيف له خلات الاثيل وبكمية مساوية لحجم المستخلص،تبعها فصل بأقماع الفصل، أهملت الطبقة المائية وجمعت الطبقة الحاوية على خلات الاثيل وكررت هذه العملية ثلاث مرات متتالية ركز بعدها المستخلص بالمبخر الدوار في درجة حرارة 40مْ بهدف التخلص من المذيب والحصول على المستخلص المتبقي المتمثل بالكاتكينات **Catechins**) (13) جفف المستخلص المركز بالفرن الكهربائي في درجة حرارة (40)مْ ثم أعيد إذابته بإضافة 5مل ماء مقطر وتم تعقيمه بإمراره على أوراق ترشيح مايكروبايولوجية ذات فتحات بقطر 0.45 مايكرومتر .

تأثير المعاملات الحرارية في الفعالية التثبيطية لمستخلصات بذور العنب شدة سوداء وبيضاء إتجاه نمو بكتريا وخمائر الاختبار

تم اختبار تأثير ثلاث معاملات حرارية وهي البسترة السريعة (72 مْ/15 ثانية) والتعقيم بالمؤصدة (121 مْ/15دقيقة) فضلاً عن التعقيم البارد بواسطة وحدة الترشيح للأحياء المجهرية وتقدير تأثيرها في فعل التثبيطي للمستخلصات قيد الدراسة نحو بكتريا وخمائر الاختبار

التحليل الإحصائي

استعمل البرنامج **SAS**(27) لدراسة تأثير العوامل في الصفات المختلفة وقورنت الفروق المعنوية بين النسب المدروسة باختبار أقل فرقاً معنوياً **L.S.D** عند مستوى احتمال 0.05%.

النتائج والمناقشة

التقدير الكيميائي لمكونات بذور صنفي العنب شدة سوداء وبيضاء

يظهر جدول (1) تحليل المكونات الأساس لبذور العنب (الشدة السوداء والبيضاء)، إذ وجد أن النسبة المئوية للرطوبة كانت 10.65و 8.04 % على التوالي وكانت نسبة البروتين في النماذج هي 5.63و 5.87%على التوالي.إما الكاربوهيدرات فبلغت نسبتها80.43 و82.21%على التوالي ،إذ تعد الكاربوهيدرات من العناصر الغذائية المهمة لما تحتويه من السكريات ومشتقاتها المختلفة مثل السليلوز والمواد البكتينية لأنها المصدر الأساس في تجهيز الجسم بالطاقة الحرارية ، وجرى تقدير الدهون الموجودة في النماذج وكانت النسبة 0.36 و0.39% على التوالي. وقدرت نسبة الرماد في النماذج فكانت2.93 و3.49% على التوالي وقدرت نسبة الألياف وبلغت 60.72 و67.83 % على التوالي أيضاً ، جدول (1).

جدول1: النسب المئوية للمكونات الأساس لبذور العنب شدة سوداء وبيضاء

المكون الأساس		النسبة المئوية%	
		بذور العنب الأسود	بذور العنب الأبيض
الرطوبة	Moisture	10.65	8.04
البروتين	Crude Protein	5.63	5.87
الدهن	Fat	0.36	0.39
الكاربوهيدرات الكلية	Total Carbohydrate	80.43	82.21
الرماد	Ash	2.93	3.49
الألياف	Crude Fiber	60.72	67.83

تشير النتائج في جدول (2) إلى تأثير المعاملات الثلاثة في الفعالية التثبيطية لمستخلص بذور العنب الأسود، إذ لا توجد فروق معنوية ($p<0.05$) بين المعاملتين الحراريتين المستعملتين والمتمثلتين بالبسترة السريعة (72مْ /15 ثانية) والتعقيم بالمؤصدة (121 مْ /15 دقيقة) وكذلك التعقيم البارد لمستخلص بذور العنب الأسود في الدور التثبيطي إتجاه نمو بكتريا وخمائر الاختبار باستثناء بكتريا *P. flourescens* و*Sal typhimurium*، إذ لوحظ وجود فروق معنوية ($p<0.05$) من خلال ملاحظة معدل قطر هالة التثبيط ،فبلغت 4 ،10 و10 ملم و14 ،13 و 10 ملم على التوالي . إما مستخلص بذور العنب الأبيض فقد لوحظ وجود فروق معنوية ($p<0.05$) بين مستخلصات المعاملة في عملها التثبيطي نحو نمو البكتريا السالبة لصبغة غرام مع عدم وجود فروق معنوية ($p<0.05$) لها ضد نمو بكتريا *Bacillus cereus* و*Bacillus subtilis* إذ بلغ معدل قطر هالة التثبيط 11 ،10 و10ملم و11، 11 و9 ملم على الترتيب كما في الجدول(3) ،قد يكون السبب في ذلك بان المستخلص يحتوي على الكاتكين (C) كمركب فعال في تركيبة الذي يتحلل حرارياً إلى الكاتيكول (25) لذلك يرجح بان التعرض الإضافي للحرارة يؤدي إلى تحلل جزء منه وتقليل فعاليته.فيما يخص المستخلص ذاته فلا توجد فروق معنوية ($p<0.05$) بين المعاملات الثلاثة للمستخلصين نحو نمو خميرة *Candida albicans* والفرق معنوي ($p<0.05$) بخصوص خميرة *Kluyveromyces marxianus*. كان تحسس الخمائر ضعيفاً إتجاه المستخلصين ، إذ إن خميرة *Kluyveromyces marxianus* كانت الأقل تحسساً إتجاه المستخلصين من بين الأحياء المستعملة في هذه الدراسة ،إذ كان معدل قطر التثبيط 7 و 6 ملم، وجاءت النتائج متوافقة مع ما توصل إليه Naidu (26) من أن مستخلص كاتكين الشاي الأخضر (GTC) (بتركيز 4 ملغم/ مل لا يمتلك تأثيراً مثبطاً إتجاه خميرة *Candida albicans* و *Kluyveromyces fragi1* ويعزى اختلاف المستخلصين في مقدار

الفعالية التثبيطية لهما تجاه الأحياء المجهرية إلى اختلاف الطبيعة الكيميائية للمركبات الفعالة المتمثلة بالكاتكينات، وهذا يتفق مع ما أشارت إليه الدراسات بهذا الخصوص من ان هناك علاقة كبيرة بين التركيب الكيميائي للنبات والفعالية التثبيطية نحو الأحياء المجهرية وتختلف هذه الفعالية للمستخلصات النباتية تبعاً لنوع النبات وغالبا ما تعود إلى واحد من مكوناته الكيميائية (30).

جدول2: تأثير المعاملات الحرارية لمستخلص بذور العنب شدة سوداء نحو بكتريا وخمائر الاختبار

الكائن المجهري	معدل قطر مناطق تثبيط النمو (ملم)*			
	بذور العنب الأسود			LSD
	تعقيم بارد	بسترة سريعة	تعقيم بالمؤصدة	
E. coli	15	14	14	ns 2.31
P .fluorescens	14	10	10	*2.58
Sal .typhimurium	14	13	10	*2.36
Staph. aureus	15	14	14	ns 2.31
B. cereus	14	14	13	ns 2.03
B. subtilis	13	13	13	ns 0
B.staerothermophilus	12	10	10	ns 2.11
C. albicans	7	6	6	ns 1.76
K.marxianus	7	5	5	ns 2.06

($P<0.05$) ، كل رقم يمثل معدل مكررين ، * بضمنها قطر القرص 4 ملم

جدول 3: تأثير المعاملات الحرارية لمستخلص بذور العنب شدة بيضاء نحو بكتريا وخمائر الاختبار

الكائن ألمجهري	معدل قطر مناطق تثبيط النمو (ملم)**،*			
	بذور العنب الأبيض			LSD
	تعقيم بارد	بسترة سريعة	تعقيم بالمؤصدة	
E. coli	14	14	8	*2.49
P .fluorescens	11	11	8	*2.27
Sal .typhimurium	11	11	7	*2.64
Staph. aureus	12	11	8	*2.61
B. cereus	11	10	10	ns 1.83
B. subtilis	11	11	9	ns 2.15
B.staerothermophil-us	10	10	6	*2.43
C. albicans	6	6	6	0 ns
K.marxianus	6			*1.50

* ($P<0.05$) ، كل رقم يمثل معدل مكررين ، * بضمنها قطر القرص 4 ملم ، ** الإشارة (–) تعني عدم ظهور فعالية مؤثر

المصادر

1- الأشرم، محمد عبد الحليم وصالح عبدول كريم (1985).الأسس العلمية والفسيولوجية لنبات العنب. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي– جامعة صلاح الدين .

2- جراد، علاء الدين (2003). زراعة وإنتاج العنب. دمشق،سورية.مطبعة دار علاء الدين.

3- السعيدي، إبراهيم حسن (2000).أنتاج الأعناب. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي- كلية الزراعة- جامعة الموصل ، العراق.

4- العاني، عبد الإله مخلف عبد الهادي؛ ناصر مطلوب عدنان وحنا يوسف يوسف (1989). عناية وتخزين الفواكه والخضر. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. بغداد. مطبعة بيت الحكمة

5- العثماني، فراس غسان مطلك (1997). عزل واختبار المادة الفعالة في مستخلص نبات الروجة ***Hygericum turra triquetrifolium*** ضد نمو فطرين ممرضين للنبات . رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد، العراق.

6- حجاوي،غسان؛حياة حسين المسيمي ورولا محمد جميل قاسم (1999). علم العقاقير والنباتات الطبية . مكتبة دار الثقافة للنشر والتوزيع. مطبعة الأرز. عمان – الأردن.

7- دلالي، باسل كامل وصادق حسن الحكيم (1987).تحليل الأغذية.وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – كلية الزراعة–جامعة الموصل، العراق.

8- كارليه، لاونس (1963). خصائص الخضراوات والفواكه الغذائية والعلاجية. ترجمة هاشم كاظم مستوفي. بغداد – العراق.

9- **A.A.C.C. (2000). Approved Methods of American Assoiation of Cereal Chemists .10th Ed.St .Paul , Minnesota .U.S.A.**

10- **A.O.A.C. (1980). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Washington, U.S.A.**

11- **A.O.A.C. (2005). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.18 th Ed .Gaithersburg, Maryland, U.S.A**

12- **Bayadar, N.G.; G. Özkan and O. Sagdic (2004) .Total phenolic contents and antibacterial activities of grapes (*Vitis vinifera* L.) extracts. Food Control, 15(5):335-339.**

13- **Brich, A.J. ; J.W. Clark and A.V. Robertson (1957).The relative and absolute configuration of catechins and epicatechin . Chem.Soc.,35:86.**

14- **Eberhardt, M.V.; C.Y. Lee and R.H. Liu (2000). Antioxidant activity of fresh apples. Nature,405(6789): 903-904.**

15- **Ewald, C.; S. Fjelkner-Modig; K. Johansson; I. Sjöholm and B. Åkesson. (1999). "Effect of processing on a major flavonoids in processed onions, green beans, and peas". Food Chem., 64: 231–5.**

16- **Frankel, E.N.; A.L. Waterhous and P.L. Teissedre(1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. Agricultural and Food Chemistry, 43(4): 890-894.**

17- **Harborne, J.B.; T.J. Mabry and H. Mabry (1975). The flavonoids . Part 1, Chapman and Hall . London. pp.631.**

18- **Jahodar, L. (1993). Plants with hypoglycemic effects. Gesk farm, 42(6):251-259.**

19- **Jayaprakasha, G.K.; T. Selvi and K.K. Sakaria (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape *(Vitis vinifera*) seed extracts. Food Research International, 36(2):117-122.**

20- **Justesen, U. and P. Knuthsen(2001). "Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes". Food Chem., 73: 245–50.**

21- **Kanner, J.; E. Frankel; R. Granit; B. Germ and J.E .Kinsella (1994). Natural antioxidants in grapes and wine. Agricultural and Food Chemistry, 42(1): 64-**

69.

22- Kenned, J.A.; M.A. Matthews and A.L. Waterhouse (2002)."Effect of Maturity and Vine Water Status on Grape Skin and Wine Flavonoids". Enol. Vitic., 53 (4): 268–74.

23- Koga, T.; K. Moro; K. Nakamori; J. Yamakoshi ; H. Hosoyama; S. Kataoka and T. Ariga (1999). Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral. administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. Agricultural and Food Chemistry , 47(5) : 1892-1897.

24- Kuppusamy, K.; K. Panneerselvam and P. Viswanathan (2008). Antioxidant efficacy of flavonoid-rich fraction from Spermacoce *hispida in hyperlipidemic-rats* . J. Appl. Biomed. ,6(1214- 0287): 165–176.

25- Long, T.Z.; R. Geun- Mu; K. Byoung-Mog and L. Won- Ha (2008). Anti-inflammatory effects of catechols in lipopolysaccharide-stimulated microglia cells: Inhibition of microglial neurotoxicity. European Journal of Pharmacology, 588(1) :106-113.

26- Naidu, A.S. (2000). Natural Food Antimicrobial Systems, CRC Press Baca Raton London New York Washington, D.C.

27- SAS (2004) . SAS / STAT Users Guide for Personal Computers. Release 7.0. SAS Institute Inc., Cary, NC., USA. (SAS = Statistical Analysis System).

28- Shoji , T.; M. Mutsuga; T. Nakamura; T. Kanada; H. Akiyama and Y. Goda (2003). Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature NMR. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(13): 3806-3813.

29- Slimestad, R.; T. Fossen and IM. Vagen (2007). "Onions: a source of unique dietary flavonoids". Agric. Food Chem., 55 (25): 10067–80.

30- Zaika, (1988). Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. J. Food Safety, 9 (2): 97-118.

EFFECT OF HEAT TREATMENTS ON BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACTED CATECHINS FROM GRAPES SEED BLACK AND WHITE VARIETIES

A.M. M. Alsamerie **N.M. S.Al-Janabi**

ABSTRACT

The chemical composition of grapes seed of black and white varieties was studied. The main compounds were as follows , 10.65 and 8.04%, moisture , 5.63 and 5.87% protiens,. 80.43 and 82. 21% carbohydrates, 0.36 and 0.39 % fat . 2.93 and 3.49% ash, 60.72 and 67.83% fiber respectively.

Catechins were extracted separately with water from both varieties by (10:1),(water:solid) w/w respectively ,filtered and concentrated by ethyl acetate (1:1) v / v respectively and dried at 40 C^0.

The activities of both extracts towards seven bacterial types *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus stearothermophilus, Escherishia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium and Pseudomonas fluorescens and two type of yeast which were Candida albicans and Kluyveromyces marxianus.* The diffusion method was employed.

The effect of three type of thermal treatments were examined that were HTST (72C^0/15 seconds), Autoclaving (121C^0/15 minutes) and cold pasteurization. both extracts showed positive results as for inhibitory effect toward gram positive and gram negative bacteria, Yeast showed less respond toward both extracts.

Part of M.Sc. Thesis for the first author.
College of Agric. –Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.