الفصل التاسع

تفاعل الاسمرار

RÉACTION DU BRUNISSEMENT

الدكتور محمد محمد

٩ ـ ١ ـ مقدمة :

تخضع منتجات الخضار والفاكهة خلال المراحل المختلفة لعمليات التحضير والتصنيع والتخزين الى الكثير من التغيرات اللونية المترافقة بتغيرات ملحوظة في الطعم والرائحة والنكهة اضافة الى تغيرات في القيمة الغذائية .

عرفت ظاهرة الاسمرار في الأغذية منذ أمد بعيد ، وقد تناولها الباحثون في دراسات مستفيضة في الكثير من أبحاثهم بغية تحديد العوامل المؤدية اليها والكشف عن طبيعة التفاعلات الكيميائية الحاصلة ليتمكنوا فيما بعد من التدخل المباشر في تسيير التفاعلات الكيميائية المرغوبة وتنشيطها وإيقاف التفاعلات الكيميائية غير المرغوب فيها أو تثبيطها .

إن ظاهرة الاسمرار غير المرغوبة في الأغذية لا تزال حتى وقتنا الحاضر تشكل عقبة رئيسة في حفظ الكثير من المنتجات الغذائية كالبيض المجفف ومنتجات الحليب والفاكهة وغيرها وذلك لكثرة العوامل المؤثرة والمؤيدة الى تشكل المظهر البني أو المسمر لهذه المنتجات .

يقسم الاسمرار في الأغذية الى قسمين رئيسين : اسمرار أنزيمي واسمرار غير أنزيمي وسوف نتناولها بشيء من التفصيل .

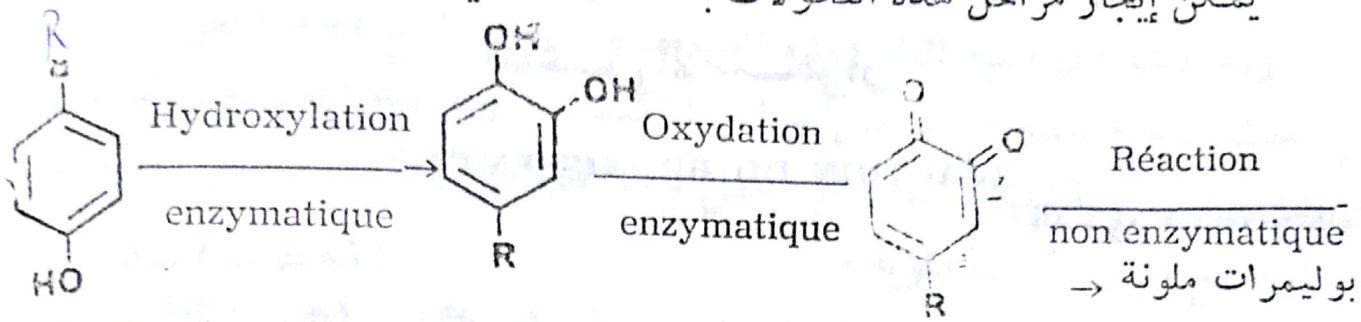
٩ ـ ٢ ـ الاسمرار الانزيمي Brunissement enzymatique

٩ ـ ٢ ـ ١ ـ تعريف :

يعرف الاسمرار الأنزيمي بأنه مجموعة التحولات الانزيمية للمركبات

الفينولية الموجودة في الخضار والفاكهة والمؤدية الى تشكل بوليمرات (Polymers) ملونة (غالباً اللون البني أو الأسمر المسود).

يمكن إيجاز مراحل هذه التحولات بالتفاعلات التالية :



مركب فينول	اورثو داي فينول	اورثو كوينون
(عديم اللون)	(عديم اللون)	(غالباً احمر اللون)

يحدث الاسمرار الانزيمي في الخضار والفاكهة الغنية بالمركبات الفينولية لا سيما في المراحل الأولى من التصنيع (أي عندما تتخرب الخلايا خلال عمليات طحن المواد وتنعيمها) . كما يحدث الشيء نفسه عندما تكون نسج هذه النباتات مريضة أو مصابة بفعل بعض عمليات المعالجة كتجميد الخضار والفاكهة ومن ثم تسييح الثلج عنها . ومن أمثلة الخضار والفاكهة المعنية مباشرة بهذه الظاهرة نذكر البطاطا والتفاح والاجاص والمشمش والدراق والموز وكذلك الفطور .

إن تشكل هذه الصبغات بنية اللون أو السمراء لا يعد في جميع الحالات أمراً غير مرغوب فيه ، بل على العكس من ذلك فبعض درجات الاسمرار تكون مطلوبة في حالات كثيرة مثل مرحلة نضج ثمار التمر أو عند تحضير مشروب السيدر أو خلال المراحل المختلفة لتخمر أوراق الشاي وتجفيف أوراق الدخان وكذلك تجفيف حبوب الكاكاو المخمرة .

٩ ـ ٢ ـ ٢ ـ المركبات الفينولية المسؤولة عن الاسمرار الانزيمي

تحتوي الخضار والفاكهة على الكثير من المركبات الطبيعية (أحادية أو ثنائية أو عديدة الفينول) المؤدية الى ظهور الاسمرار الانزيمي ، وتختلف هذه المركبات فيما بينها بمدى فعاليتها في ظاهرة الاسمرار والتي تتعلق أساساً بعوامل كثيرة نذكر منها :

١ ـ البنية الكيميائية لكل منها .

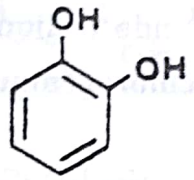
٢ ــ منشأ الانزيم الذي يقوم بأكسدتها .

٣ ــ توافر العوامل المساعدة الأخرى كالحرارة والاوكسجين وغيرها .

إن الجزء الأكبر من هذه المركبات يصنف أساساً من بين المركبات الفينولية الأساسية للنباتات . ومن هذه المركبات نذكر باختصار أهمها :

(١) مركب بيرو كاتيكول Pyrocatéchol ومشتقاته :

يعد مركب بيرو كاتيكول من أبسط المركبات الفينولية المستهدفة في تفاعلات الاسمرار الانزيمي كما يتضح من صيغته .

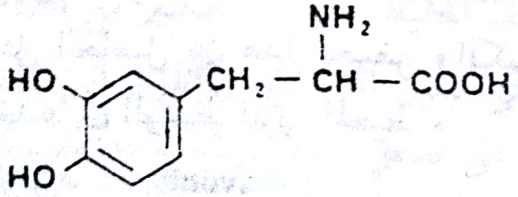


(Pyrocatéchol)

(٢) مركب ٣ ، ٤ ثنائي هيدروكسي فنيل ألانين (DOPA) :

3,4 - dihydroxyphénylalanine

ففي حالة البطاطا يتشكل المركب ٣ ، ٤ ثنائي ــ هيدروكسي فنيل ألانين من الحمض الأميني تايروزين والقابل بدوره للأكسدة الى مشتقه الكينوني دوباكوينون (dopaquinone) .

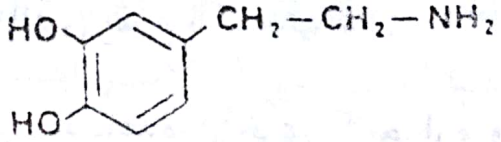


(DOPA)

(٣) مركب ٣ ، ٤ ثنائي هيدروكسي فنيل ايثيل أمين

3,4 - dihydroxyphénol éthylamine

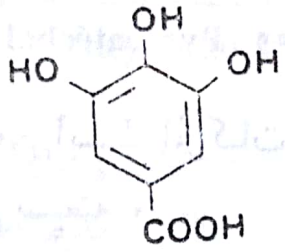
يشكل المركب ٣ ، ٤ ثنائي هيدروكسي ــ فنيل إيثيل أمين المادة الأساسية في الاسمرار الانزيمي في ثمار الجوز .



(3,4 - dihydroxyphénol - éthylamine)

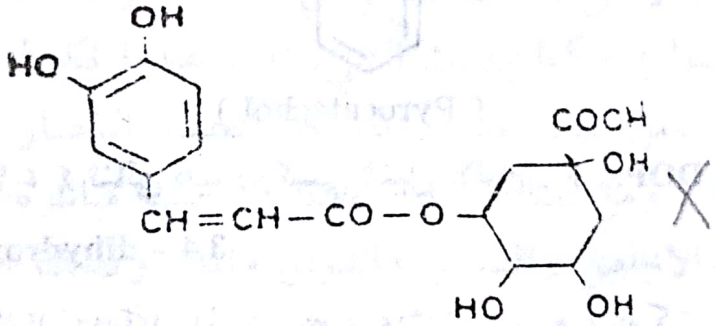
(٤) حمض الغاليك Acide Galique :

يشكل حمض الغاليك مادة التفاعل الأساسية لتفاعلات الاسمرار الانزيمي في الكثير من النباتات .



(Acide Galique)

(٥) حمض الكلوروجنيك Acide chlorogénique :

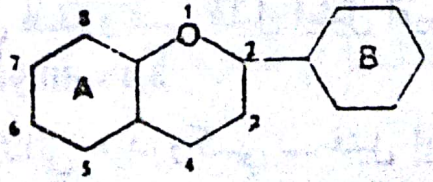


(Acide chlorogénique)

يتواجد هذا الحمض بكثرة في التفاح والاجاص والبطاطا . وهو يلعب دوراً هاماً في تشكل اللون الأزرق المسود الملاحظ أحياناً على ثمار البطاطا خلال عمليات السلق وذلك بسبب التفاعل الحاصل بين هذا الحمض والكميات القليلة جداً من عنصر الحديد الممكن تواجدها في الوسط المائي المحيط .

(٦) مركبات الفلافونويد Flavonides :

وهي مجموعة كبيرة من المركبات التي تنتشر بشكل واسع في النباتات الراقية، ولها الصيغة العامة التالية :

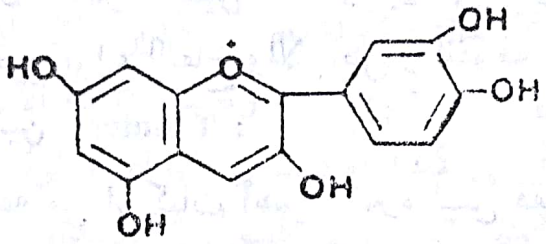


(Flavonoïde)

ومن بين المركبات الهامة التي تتبع هذه المجموعة نذكر بخاصة :

آ ــ مركبات الانتوسيانيدول (Anthocyanidoles) :

وهي مجموعة المركبات المسؤولة عن الألوان الحمراء والبنفسجية والزرقاء للكثير من الأزهار والثمار . وكمثال عن هذه المجموعة من المركبات نذكر الصيغة الكيميائية لأحد المركبات الهامة فيها وهو مركب السيانيدول (Cyanidole) .

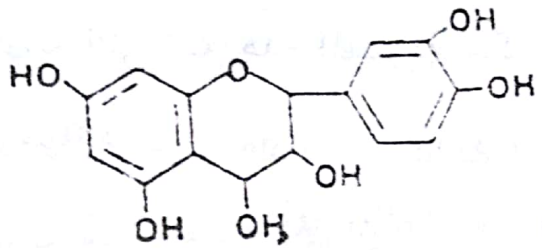


(Cyanidole)

هذه المركبات غالباً ما تتواجد على صورة أنثوسيانوزيد (Anthocyanosides) أي تحتوي في تركيبها على واحد أو أكثر من السكاكر الأحادية التي تنشأ عن فصلها أنزيمياً أو بواسطة الحلمأة الحمضية تغيرات لونية ملحوظة . والجدير بالذكر أن هذه المجموعة من المركبات الملونة تتأثر الى حد بعيد بتغيرات الـ pH للوسط المحيط وبوجود الكثير من العناصر المعدنية التي تنعكس على ألوانها ، ونذكر على سبيل المثال ظهور اللون البنفسجي لعدد من المواد الغذائية المعلبة والناتج عن تفاعل هذه المركبات مع قصدير علب الحفظ (راجع فصل المركبات الملونة) .

ب ــ نذائر الانثوسيانيدول Leucoanthocyanidoles :

وكمثال عن هذه المجموعة نذكر الصيغة الكيميائية للمركب لوكوسيانيدول (Leucocyanidol) .



(Leucocyanidole)

تتميز هذه المجموعة من المركبات عن سابقيها بأنها عديمة اللون وينشأ عن تسخينها في وسط حمضي تفاعل أكسدة مصحوب بنزع جزيء من الماء وتحولها بالتالي الى أنثوسيانيدول المناظر • يميل هذا الأخير الى اللون الزهري أو الآجري المحمر كما في الفول وبعض أنواع التفاح والاجاص والملفوف •

(٧) مركبات الثانين Tannins :

تحتل هذه المجموعة من المركبات أهمية كبيرة ليس فقط من حيث مساهمتها في ظاهرة الاسمرار الانزيمي وإنما أيضاً من خلال الدور الهام الذي تلعبه في قوام المواد الغذائية وطعمها ونكهتها • ومن هذه المجموعة من المركبات يمكننا أن نميز نوعين منها ذوي أهمية خاصة :

آ — مركبات التانين القابلة للحلمأة Pyrogalliques

ب — مركبات التانين المكثفة Catéchiques

ومن الخصائص الهامة لمركبات التانين قدرتها على التفاعل مع البروتينات أو مع بعض العناصر المعدنية وإعطاء نواتج لونية غير مرغوبة •

(٨) مركبات اللجنين Lignines :

وهي بوليمرات فينولية تساهم في إعطاء القوام الصلب للكثير من النسج النباتية •

يطلق بشكل عام على الصبغات المتشكلة بفعل الاسمرار الأنزيمي الاسم ميلانين (Mélanine) . ويأخذ اللون النهائي لهذه الصبغات البني أو البني المسود ومع ذلك تتشكل صبغات أخرى بألوان مختلفة (الزهري أو الأحمر أو الأزرق المسود) تنشأ أساساً عن مركبات الكوينون التي تعزى إليها تفاعلات الاسمرار الانزيمي كما سنرى بعد قليل •

٩ ـ ٢ ـ ٣ ـ انزيمات الاسمرار الانزيمي وآلية عملها

إن ظاهرة الاسمرار الانزيمي تشتمل على نوعين من التفاعلات الانزيمية المختلفة والمتمايزة فيما بينها :

ـ تفاعل إضافة مجموعة هيدروكسيل (OH ـ) الى المركبات الفينولية الأحادية .

ـ تفاعل أكسدة المركبات الفينولية الثنائية .

وعلى الرغم من الاختلاف الواضح بين هذين التفاعلين يعتقد أنه يمكن لأنزيم واحد أن يعمل على تنشيطهما . وتعتمد درجة الاسمرار على تركيز المعقد الانزيمي ونشاطه إضافة الى كمية أوكسجين الهواء المؤثرة بشكل مباشر في آلية التفاعل الثاني . وقد أطلق اسم بولي فينول أوكسيداز (PPO) على الانزيم المسؤول عن هذه الظاهرة . ومع ذلك فقد تبين للباحثين في هذا المجال وجود أكثر من أنزيم مختلف المنشأ (مصادر نباتية مختلفة قادرة على القيام بالعمل ذاته . وتختلف هذه الانزيمات فيما بينها بمعدل محتواها من شوارد النحاس (أحادية التكافؤ Cu+ وثنائية التكافؤ Cu++) .

إن نظام تسمية هذه الانزيمات لا يزال حتى وقتنا الحاضر غير دقيق . ومن أمثلة الأسماء المقترحة نذكر : مونوفينولاز (monophénolase) أو كريزولاز (Crésolase) لما يتعلق بالمرحلة الأولى من التفاعل ، وبولي فينول أوكسيداز (Polyphènol oxydase) أو بولي فينولاز (Polyphènolase) أو كاتيكولاز (Catêcholase) لأنزيمات المرحلة الثانية من التفاعل . ومع ذلك فان الاسم المتعارف عليه للانزيمات المسؤولة عن تفاعل الأكسدة هو أورثو داي فينول أوكسجين أوكسيدو ـ ريدكتاز :

O - diphênol oxygène oxydorêductase (E. C. 1. 10. 3. 1.)

حيث يلعب الأوكسجين الجزيئي دور العامل المستقبل لإيونات الهيدروجين . وتجدر الاشارة الى أن خلايا النسج الحيوانية (الفقاريات) تحتوي على

أنزيم نوعي على درجة عالية من التخصص يدعى تايروزيناز (Tyrosinase) يعمل على تحريض تشكل مركبات الاسمرار : دوبا (DOPA : ٣ ، ٤ ثنائي هيدروتسي فينيل الانين) ودوبا كوينون (Dopaquinone) .

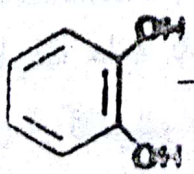
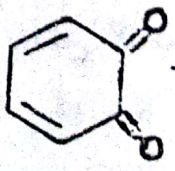
إن أنزيمات بولي فينول أوكسيداز المنتشرة في الكثير من الأنسجة النباتية كالموز والدراق والشاي والدخان . تعمل وبشكل متخصص على تحريض أكسدة المركبات الفينولية الثنائية (diphénoles) فقط . ولكن في المقابل فان أنزيمات بولي فينول ــ أوكسيداز المتواجدة في التفاح والاجاص والبطاطا والفطور تمتلك نشاطاً اضافياً ينحصر في تسيير المرحلة الأولى من تفاعل الاسمرار (إضافة مجموعة هيدروكسيل OH–) . ومهما يكن من أمر فان أنزيمات بولي فينول أوكسيداز (PPO) ، المنتشرة على نطاق واسع في الانسجة النباتية تتصف بالمميزات التالية :

١ ــ تحتوي على نسبة عالية من شوارد النحاس تصل الى ٢ر٠٪ .

٢ ــ ذات وزن جزيئي مرتفع (بالمتوسط ١٤٤٠٠٠) .

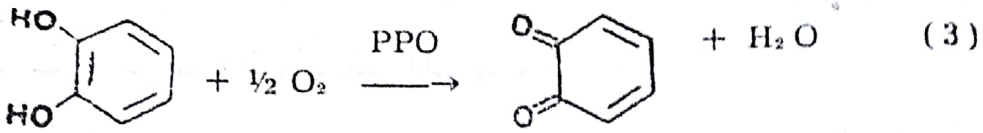
٣ ــ يقع نشاطها الأعظمي في الوسط الحمضي الخفيف (pH= ٥ر٥) .

إن آلية أكسدة الفينولات الثنائية (diphénoles) لا تزال غير معروفة بدقة . ومع ذلك فقد اقترح عدد من الباحثين المخطط التالي لتوضيح التفاعلات الحاصلة :

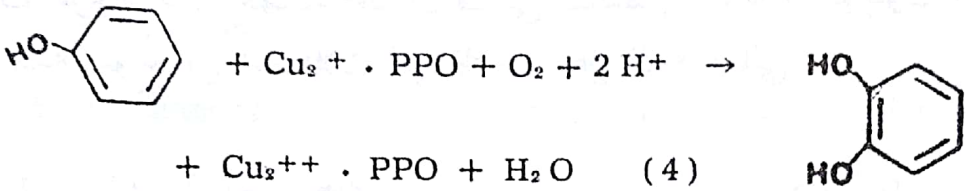
$$Cu_2{}^{++} \cdot PPO + \text{  } \rightarrow Cu_2{}^{+} \cdot PPO + \text{  } + 2H^+ \qquad (1)$$

$$Cu_2{}^{+} \cdot PPO + \tfrac{1}{2} O_2 \rightarrow Cu_2{}^{++} \cdot PPO + O^{--} \qquad (2)$$

وكمحصلة نهائية لهذين التفاعلين نجد :



ومن أجل إعطاء فكرة واضحة ومتكاملة عن طبيعة التفاعلات الحاصلة فعلاً في ظاهرة الاسمرار الانزيمي يجب اضافة التفاعل الذي تتم بموجبه إضافة مجموعة هيدروكسيل الى مركبات الفينول الأحادية لإعطاء فينولات ثنائية كما هو مبين أدناه :



والجدير بالذكر أن مركبات الفينول الثنائية الناتجة عن التفاعل المشار إليه أعلاه (تفاعل رقم 4) تعمل على تحريض التفاعل نفسه الحاصل من خلال تشكل أنزيم بولي فينول أوكسيداز بشوارد نحاس أحادية التكافؤ (Cu_2^+ . PPO) كما ورد في التفاعل (1) . كما أن زيادة تركيز المركب النهائي لمجمل التفاعلات السابقة (الكوينون quinone) تؤدي الى تثبيط التفاعلات الحاصلة .

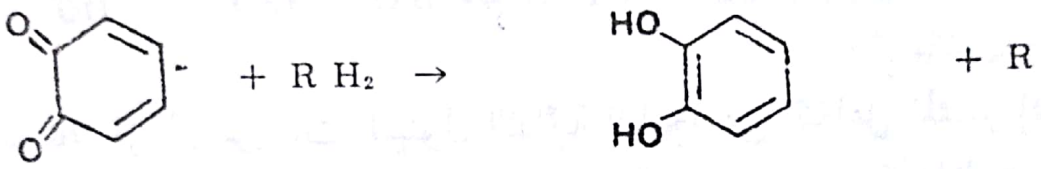
إن شدة ظاهرة الاسمرار الانزيمي الملاحظة في النسج النباتية تتعلق في أغلب الأحيان بتركيز مواد التفاعل وليس بتركيز أنزيمات بولي فينول أوكسيداز التي تتواجد أساساً بتراكيز منخفضة (ففي الفطور على سبيل المثال يصل تركيز هذه الانزيمات الى ٤٠ مغ/كغ) . كما أن سرعة تفاعل الاسمرار ترتبط ارتباطاً وثيقاً بدرجة الـ pH المثلى لنشاط الانزيم . تقع هذه الدرجة في معظم تفاعلات الاسمرار الانزيمي في حدود (٦ ــ ٦٫٥)، وينخفض النشاط الانزيمي سريعاً عند درجات الـ pH المنخفضة، ومن أجل قياس الفعالية الانزيمية لظاهرة الاسمرار فقد أوجدت طرق كثيرة نذكر منها :

آ ــ درجة امتصاص مركبات الكوينون •

ب ــ قياس كمية الاوكسجين المستهلك في التفاعل •

جـ ــ قياس الامتصاص الاعظمي عند موجة طولها ٤٧٠ نانومتراً لبعض الأصباغ المتشكلة في المراحل النهائية •

ومن الجدير ذكره أن تكون مركبات الكوينون بفعل النشاط الأنزيمي السابق ذكره يتبع بتفاعل أكسدة غير أنزيمي (تفاعل نزع الهيدروجين) لبعض المركبات المرجعة ذات جهد اختزال قياسي منخفض مقارنة بالكوينون • ويمكن تمثيل هذا النوع من التفاعلات المرتبطة بالتفاعل العام التالي :



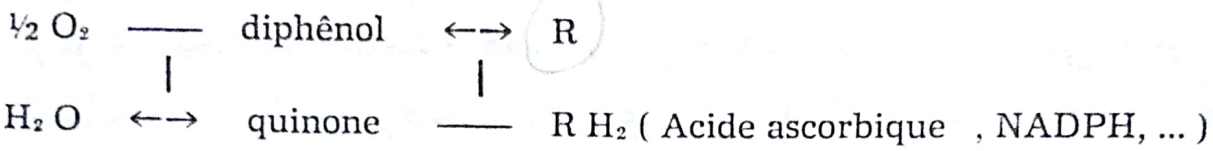
وبناء على ما تقدم فان حمض الاسكوربيك والمركب نيكوتيناميد أدنين ثنائي النيوكليوتيد المرجع ($NADH_2$) وحمض السيستين والبيتيد الثلاثي جلوتاثيون المرجع اضافة الى مركبات الانثوسيانيدول تخضع جميعاً الى تفاعل الأكسدة السابق الذي يتم من خلاله إرجاع مركبات الكوينون الى فينولات ثنائية مع استهلاك كمية من الأوكسجين الجزيئي •

٩ ــ ٢ ــ ٤ ــ الدور الفيزيولوجي لانزيمات بولي فينول أوكسيداز وتفاعلات الاسمراد الانزيمي :

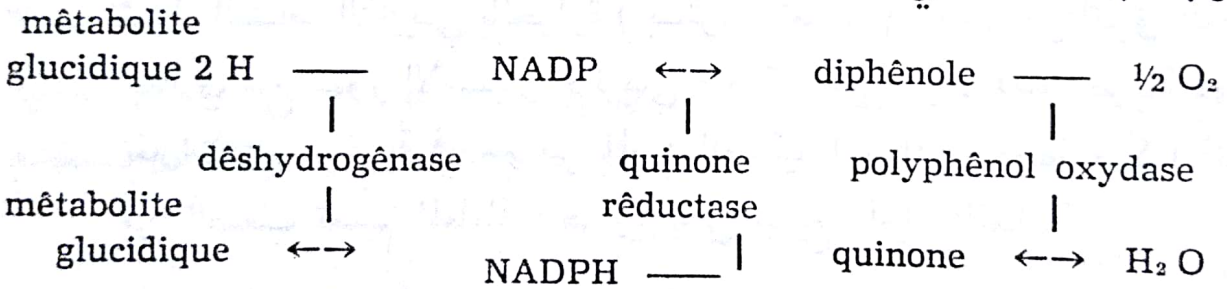
لا تحتوي بعض الفاكهة مثل الحمضيات والأناناس ، كما تشير التحاليل ، على أنزيمات مؤكسدة من نوع بولي فينول أوكسيداز (PPO) كما أن محتواها من المركبات الفينولية منخفض جداً • وهناك أنواع أخرى من الفاكهة (الدراق مثلاً) التي تحتوي على الانزيمات المؤكسدة آنفة الذكر ولكنها بالمقابل لا تحتوي على مادة أو مواد التفاعل الضرورية لنشاطها • وحتى في الخضار والفاكهة القابلة

بطبيعتها للاسمرار لا يلاحظ أي أثر لتفاعلات الاسمرار طالما بقيت الأنسجة سليمة وكاملة • وقد يعود السبب في ذلك الى اختلاف وتمايز أمكنة تواجد كل من الانزيمات ومواد تفاعلها داخل الأنسجة النباتية •

إن تفاعلات الاسمرار والانزيمات المحرضة لها تلعب دوراً فيزيولوجياً هاماً من خلال أكسدتها لعدد من المركبات المتواجدة داخل الخلية الحية • وإ التفاعلات الحاصلة هي من طبيعة ازدواجية ، أي أن ناتج التفاعل الأول هو مادة التفاعل للتفاعل الثاني • ويمكن تمثيل هذه التفاعلات الازدواجية بالمخطط التالي :



انتفاعل الأكسدة المحرض من قبل أنزيم بولي فينول أوكسيداز يمكن أن يتدخل في نهاية سلسلة الانتقال الالكتروني (السلسلة التنفسية) بشكل مشابه لآلية عمل أنزيم سايتوكروم أوكسيداز (Cytochrome oxidase) الذي يحتوي في تركيبه أيضاً على شوارد النحاس ، ويمكن تمثيل مجمل هذه التفاعلات المترابطة بالمخطط التالي :



ففي البطاطا على سبيل المثال يعتقد أن نحو ثلث ظواهر الأكسدة التنفسية يعزى الى نشاط أنزيم بولي فينول أوكسيداز •

ومن الوظائف الفيزيولوجية الهامة التي تعزى الى تفاعلات الاسمرار دورها في حماية النسج النباتية من فعل الكائنات الحية الدقيقة • وفي هذا السياق يعتقد أن التشكل السريع للصبغات الملونة إثر تعرض الأنسجة النباتية للجروح أو

الكدمات من شأنه أن يشكل حاجزاً أو عائقاً يحول دون دخول الكائنات الحية الدقيقة ويحد بالتالي من تكاثرها .