# دراسات كيميائية وبيولوجية علي بعض المركبات النشطة حيويا المفصولة اثناء إستخلاص زيت الزيتون


**مقدمة من**

**محمد محمود شعبان حسن**

**بكالوريوس العلوم الزراعية– كلية الزراعة – جامعة الفيوم 2010**

**ماجستير العلوم الزراعية ( صناعات غذائية)– كلية الزراعة– جامعة الفيوم 2017**


**للحصول علي درجة**

**الدكتوراه في العلوم الزراعية (صناعات غذائية)**


**قسم علوم وتكنولوجيا الاغذية – كلية الزراعة – جامعة الفيوم**


**جامعة الفيوم**

**2022**

# الملخص العربي

**مقدمة:-**

شهدت زراعة الزيتون (*Olea europaea*) فى مصر توسعاً وتطوراً كبيراً على مدار الأربعة عقود الأخيرة مما جعلها على رأس قائمة الدول المنتجة للزيتون على مستوى العالم، حيث احتلت مصر المركز الأول متفوقة على إسبانيا خلال موسم 2019-2020حيث بلغ محصول الزيتون 690 ألف طن مقارنة بـ497 ألف طن في موسم 2018-2019، في الوقت الذى تراجعت فيه إسبانيا إلى المركز الثاني عام 2020 بمحصول قدره500 ألف طن مقابل 580 ألف طن 2019، وذلك بانخفاض قدره 16% عن الموسم السابق كما ارتفعت المساحة المنزرعة بالزيتون في مصر من 5 آلاف فدان بنهاية سبعينيات القرن الماضي إلى أكثر من 100 ألف فدان في نهاية التسعينيات، وارتفعت عام 2000 إلى نحو 108 ألف فدان وتجاوزت أكثر من 240 ألف فدان في 2019، بحسب بيانات وزارة الزراعة المصرية.

وقدتم اختيار صنف زيتون (البكوال) في هذه الدراسةنظراً لتوافره في الاسواق المحلية في محافظة الفيوم وذلك خلال موسم 2020/2019 بهدف مقارنة طرق استخلاص زيت الزيتون باستخدام طريقتين من طرق الأستخلاص وهما الطريقة المستمرة ثلاثية المراحل والطريقة التقليدية (الكبس) علي الزيت الناتج وكذلك المخلفاتالناتجة أثناء عملية الاستخلاص نظراً لما تحويه هذه المنتجات الثانويةمثل اوراق الزيتون والماء والكسب (الجفت اوالفيتورة) الناتج من عصر الثمار من مواد نشطة حيويا والتي يمكن الاستفادة منها بغرض رفع القيمة المضافة لهذه المنتجات الثانوية والعمل على تقليل التلوث البيئي منهاخلال إعادة تدويرها والاستفادة منها من خلال إعادة اضافة مستخلصاتهاإلي انواع اخر ى من الزيوت الغذائية لزيادة ثباتها.

كما تم الحصول علي الزيت والمخلفات الناتجة في هذه الدراسة بكلا الطريقتين،بالإضافة إلي دراسة بعض الصفاتالطبيعية والكيميائية لهما،وتقييم مستخلص هذه الموادبيولوجياً من خلال دراسة تأثيرها على فئران التجارب.

**وفيما يلي ُ لخص لاهم النتائج المتحصل عليها:**

**اولاً : تقدير الصفات الطبيعية والكيميائية لزيت الزيتون:**

1 – أوضحت النتائج أرتفاع كمية الزيت المستخلصبالطريقة المستمرة ثلاثية المراحل إلي (13.35 %)مقارنةبالطريقة التقليدية (11.75%).

2 – اظهرت النتائج ان عينة الزيت الناتجة من طريقة الاستخلاص المستمرة ثلاثية المراحل كانت الاعلي من حيث مقاومة الانسيابية (اللزوجة) حيث كانت 4.70 ثانية بينما العينة الناتجة بالطريقة التقليدية أقل في مقاومة الإنسيابية حيث كانت 4.68 ثانية.

3 – اظهرت النتائج ان معامل الانكسار للزيوت الناتجة من كلا الطريقتين ثابت وهو 1.4700±0.00 عند درجة حرارة 25 درجة مئوية.

4 – اظهرت النتائج ان قيمة النسبة المئوية للحموضة مقدرة كحامض اوليك للزيت الناتج من طريقة الاستخلاص المستمرة ثلاثية المراحل وهي (0.55 %) بينما كانت أعلي قليلا في الزيت الناتج عن الطريقة التقليدية (0.60%).

5 اظهرت النتائج أن قيمة رقم التصبن لزيت الزيتون تتراوح مابين12.79±191.47 إلي 2.86±197 ملليجرام/جرام زيت.

6 – أظهرت النتائج ان زيت الزيتون الناتج عن طريقة الاستخلاص المستمرة ثلاثية المراحل مرتفع فى محتواه من المواد غير الذائبة (0.477±2.239)مقارنةبالزيت الناتج بالطريقة التقليدية(0.0641.402±)

7–واظهرتالنتائج ان الكُسب الناتج من الطريقة التقليدية مرتفع في محتواه من الرطوبة والبروتين حيث وصلت نسبتهما إلي 61.32% ،5.78% علي التوالي بينما في الكسب الناتج عن طريقة الاستخلاص المستمرة ثلاثية المراحل كانت 59.19% ،4.47% علي التوالي.

**ثانياً : استخلاص وتقدير المركبات النشطه حيويا من المخلفات:**

أظهرت النتائج ان قيم الناتج المُتحصل عليه من الكُسب الطريقة المستمرة ثلاثية المراحل ، كسب الطريقة التقليدية وأوراق الزيتون كانتمُثل 7.22 ، 5.38 و 24.57 % على التوالى.

**ثالثاًتقديرالمُركبات الفينولية الكُلية فى مستخلصات النواتج الثانوية:**

أظهرت النتائج أحتواء مستُخلص اوراق الزيتون على أعلى محتوى من الفينولات الكُلية مقدرة كحامض جاليك حيث بلغت نسبتها الى (101.52 ± 0.18) ملليجرام مكافئ حامض جاليك / جرام مادة جافة) مقارنة بالتفل الناتج من طرق الاستخلاص المختلفة بينما لم يلاحظ اى فروق ملحوظة بين طريقتين الاستخلاص من حيث محتوى الفينولات الكلية فى الكسب الناتج من كلا الطريقتين.

**رابعاً :فصل وتفيرالمُركبات النشطة حيوياً فى مستخلص أوراق الزيتون:**

من خلال تفريد محتوى المستُخلص الميثانولى لأوراق الزيتون بواسطة جهاز التحليل الكروماتوجرافي الغازيأظهرت النتائج أن مستُخلص أوراق الزيتون مصدر غنى بالعديد من المركبات الطبيعية ذات النشاط المضاد للأكسدة مثل الهيدروكينون (8.41 %) ، البيتا سيتوستيرول (7.51 %) ،

الاسكوالين (4.11 %) ،التيروزول (1.73 %) ، الهيدروكسى تيروزول (1.6 %) التى يمكنها ان تؤدى الى زيادة ثبات الزيوت الغذائية ضد التزنخ الاكسيدى.

**خامساً : تقييم النشاط المضاد للأكسدة بإستخدام اداى هيدروكسى فينيل هيدرازين:**

أوضحت النتائج من خلال قياس النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات انه بزيادة تركيزجميع المستخلصات أدت الى زيادة نسبة التثبيط ومع أقل تركيز تم استخدامه (31.25 ميكروجرام/ملل) تراوح نشاط كنس الشقوق الحرة من 26.72 % لمستخلص أوراق الزيتون الى 35.49 % لمستخلص الكسب الناتج من الطريقة التقليدية، بينما بزيادة التركيز الى 125 ميكروجرام/ملل ازداد النشاط الى 76.18، 38.25 و 71.25 % لمستخلصات أوراق الزيتون و مستخلص كسب طريقة الاستخلاص المستمرة ثلاثية المراحل والطريقة التقليدية على التوالى، وان المستخلص الذى أظهر نشاطاً مضاداً للأكسدة عالى نسبياً كان مستخلص أوراق الزيتون نتيجة أحتوائه على أعلى محتوى من المركبات الفينولية.

وبصفة عامة فقد اظهرت كل المستخلصات نشاطاً مضاداً للأكسدة وكان أعلي نشاط من بينها هو مستخلص ورق الزيتون حيث وصل $IC_{50}$ إلي 0.66 ميكروجرام/ميكروليتر.

**سادساً : قياس الثبات الأكسيدى لزيت فول الصويا نتيجة إصافة مستخلص أوراق الزيتون مقارنة بمضاد أكسدة صناعى (البيوتيليدت هيدروكسى تولوين).**

**أولاً : تقدير رقم البيروكسيد:**

حيث لوحظ وجود فروق معنوية فى قيم رقم البيروكسيد للعينة الضابطة والعينات المحتوية على 5، 10 ، 50 ،100،200 جزء فى المليون من مستخلص اوراق الزيتون ، 200 جزء من مضاد الأكسدة الصناعى حيث كانت قيم رقم البيروكسيد للعينة الضابطة أعلى من بقية المعاملات كذلك العينات المحتوية على تركيزات أقل من200 جزء فى المليون منمستخلص اوراق الزيتون أظهرت أعلى قيم مقارنة

بتركيز 200 جزء فى المليونمن مستخلص اوراق الزيتون ومضاد الاكسدة الصناعى حيث كانت تقريبا متقاربة.

**ثانياً : تقدير رقم حامض الثيوباربتيوريك:**

حيث لوحظ ان قيم رقم حامض الثيوباربتيوريك لجميع المعاملات أرتفع مع زيادةفترة التحضين وكان قيمة العينة الضابطة هى الأعلى عن بقية المعاملات حتى 24 ساعة كما لوحظ تذبذب قيم رقم حامض الثيوباربتيوريك خلال ال 72 ساعة بعدها كانت قيم رقم حامض الثيوباربتيوريك للمعاملات أقل من العينة الضابطة.

**سابعاً : فصل وتفريد تركيب الاحماض الدهنية:-**

من خلال تفريد الاحماض الدهنية بواسطة جهاز التحليل الكروماتوجرافي الغازي وجد ان حامض الأوليك هوالحامض الدهنى السائد فى زيت الزيتون وتاثرت نسبته بطريقة الاستخلاص حيث اظهرت النتائج بصفة عامة ان زيت الزيتون المستخلص بالطريقة التقليدية مرتفع في محتواه من الاحماض الدهنية احادية عدم التشبع والتي وصلت نسبتها إلي (88.88 %) من اجمالي الاحماض الدهنية الموجودة بالزيت بينما كانت في زيت الزيتون الناتج من طريقة الاستخلاص المستمرة ثلاثية المراحل اقل حيث وصلت نسبتها إلي (83.44 %)كما وجد ان الزيت الناتجبطريقة الاستخلاص المستمرة ثلاثية المراحل اقل في محتواه من حامض الاوليك حيث بلغت نسبته(74.11%) بينما بلغت نسبتهافي الطريقة التقليدية (79.11%) بينما كان حامض البالميتيك بتركيز(13.9 – 9.56 %)، اللينوليك (6.94- 8.30 %)، الأستياريك ( 1.56 – 2.36 %)، البالميتواوليك (0.75 – 1.66 %) على التوالى.

**ثامناً : الدراسة البيولوجية:-**

استخدم 30 فأر ذكر من نوع (البينو)وزنها 240 ± 20 جراملدراسة وتقييم التأثير البيولوجى لمستخلصات اوراق الزيتون، كماتم تقسيمها إلي خمسة مجموعات كل مجموعة احتوت علي خمسة فئران علي اساس التغذية علي الغذاء الاساسي مع الاحلال بزيوت ودهون مختلفة كالتالى:-

**المجموعة الاولى (الضابطة):** تم تغذيتها على عليقة تحتوى على 7% زيت جنين الذرة.

**المجموعة الثانية:** تم تغذيتها على عليقة تحتوى على 7% زيت جنين الذرة مع مستخلص اوراق الزيتون بتركيز 100 ملليجرام / كيلو (تجريع) عن طريق الفم.

**المجموعة الثالثة:** تم تغذيتها على عليقة تحتوى على 7% زيت جنين الذرة (الضابطة).

**المجموعة الرابعة:** تم تغذيتها على عليقة تحتوى على 7% ويت زيتون.

**المجموعة الخامسة:** تم تغذيتها على عليقة تحتوى على 7%دهن حيوانى مع مستخلص اوراق الزيتون بتركيز 100 ملليجرام / كيلو (تجريع) عن طريق الفم.

بصفة عامة من خلال متابعة المجاميع أثناء اجراء التجربة لم يلاحظ عليها اي اعراض مرضية او تغيرات في الشهية والقدرة عليتناول العليقة بينما لوحظ بعض التغيرات في معدل النمو حيث انخفضتأوزان الفئران في المجموعة الثالثة ووصلت نسبة النقص في الوزن إلي (5.78%) من الوزن الاساسي، بينما لوحظ زيادة في أوزان المجموعات الأخرىوتراوحت نسبة الزيادة ما بين (11.83 إلي 18.59%).

**دراسة شكل دهون السيرم:**

تم دراسة قياس الكوليسترول الكلى للبلازما، الكوليسترول مرتفع ومنخفض الكثافة كمقياس اوعلامات على حدوث تصلب الشرايين، حيث كان تصلب الشرايين احد اكبرالاسباب المؤدية للوفاة فى الدول الغربية، وقد أوضحت النتائج المتحصل عليها ان:

1- كانت مستوى الجلسريدات الثلاثية فى الدم للفئران فى المجموعةالرابعة الأعلى وبلغتنسبتها (122± 7.48 ملليجرم لكل ديسيلتر) بالمقارنة ببقية المجاميع، بينما بلغت النسبة فيالمجموعة الخامسة (99.67 ± 6.55 ملليجرام/ ديسيلتر)،مما يوضح تأثير مستخلص اوراق الزيتون فى خفض مستوى الجلسريدات الثلاثية فى الدم.

2- لم يلاحظ اى فروق معنوية فى مستوى الكوليسترول مرتفع الكثافة في جميع المجاميع حتى نهاية التجربة.

3تر اوحمستوى الكوليسترول منخفض الكثافةفي جميع المجاميع حتى نهاية التجربة ما بين 29.4 الى 35.67 ملليجرام/ ديسيلتر، فيما عدا المجموعة الرابعة أرتفع نسبتهإلى 40.2 ملليجرام/ ديسيلتر.

4- لم يلاحظ اى فروق ملحوظة فى مستوى الكوليسترول منخفض الكثافة جدا حتى نهاية التجربة فى المجاميع المختلفة، باستثناء المجموعةالرابعة كان محتواها مرتفعاً (22.8 ملليجرام/ ديسيلتر) و هى نفس المجموعة المرتفعة فى محتواها من الجلسريدات الثلاثية.

5-ارتفاع محتوى سيرم الدممن الدهون الكلية فى المجموعة الرابعة، بينما كانت المجموعة الثالثة اقل المجاميع فى محتوى السيرممن الدهون الكلية.

**التغير فى وظائف الكلى:**

أوضحت النتائج ان محتوى نيتروجين يوريا الدموالكرياتينين فى سيرم دم فئران التجاربللمجاميع المختلفة ان المجموعة الثانية والخامسة اظهرت اقل قيمة (23.53 ± 3.29و 22.65 ± 2.62) على التوالى بالمقارنةببداية التجربة وبنهاية التجربة كانت المجموعة الاولى (الضابطة) اعلى قيمة بين جميع المعاملات (26.00 ± 1.63)

**التغيرفى وظائف الكبد:**

أوضحت نتائج قياس مستوى انزيم الانين ترانساميناز انخفاضه فى المجموعة الثانية (33.00±2.16) مقارنة بالمجموعة الضابطةوان اضافة مستخلص اوراق الزيتون الى الدهن ادى الى خفضه من 49.00 ± 7.12 الى 41.00 ±1.63نتيجة مضادات الاكسدة الطبيعية الموجودة فى مستخلص اوراق الزيتون وفى نفس الوقت أدى إضافة مستخلص أوراق الزيتون الى زيت جنين الذرةالى خفض الانين ترانس امينيز من 50.00 ± 5.72 الى 33.00 ± 2.16.

**تاسعاً : نتائج الدراسة الهستولوجية:**

أظهرت النتائج انه لا يوجد أى فروق معنوية بين أوزان الأعضاء الداخلية للفئران او اى أثار جانبية نتيجة التغذية بمستخلص الاوراق بالتركيز المستخدم في المجموعات المختلفةالمقسمة بناءً علي نوع الزيوت أو الدهون المختلفة.

**التغيرفى وظائف القلب:**

اوضحت النتائج التشريحية الهستولوجية ان انسجة قلب فئران التجارب التى تم عمل شرائح منها واختبارها ميكروسكوبياً بعد تغذيتها علي الغذاء الاساسي مع احلال زيت الزيتون والدهون الحيوانية المشبعةأن الصور الخاصة بالمجموعة الثالثة والخامسةالتي تغذت علي نسبة عالية من الاحماض الدهنية

احادية عدم التشبع و الدهون المشبعة المحتوية علي مستخلص الورق اظهرت عدم حدوث اي تغيرات فى النسيج الداخلي للقلب بالمقارنة مع المجموعة المرجعية.

**من خلال ما سبق من نتائج توصلت الدراسة إلي ضرورة الاستفادة من المنتجات الثانوية الناتجة اثناء عمليات إنتاج زيت الزيتون، وذلك لإرتفاع محتواها من المواد ذات القيمةالحيوية العالية والتي يمكن فصلها للاستفادة منها في الناحية الغذائية او الصحية، علاوة على تقليل الأضرار البيئية التي تُحدثها تلكالمنتجات الثانويةاذا ما تُركت دون الاستفادة منها.**