استخلاص المركبات الفينولية من أوراق صنفين من الزيتون السوري ودراسة تأثيرها في فعالية إنزيم الكاتلاز في سويقات الذرة الصفراء

أحمد مالو[1] عبيرة معلا [2]

الملخص

دُرِسَ تأثير المركبات الفينولية التي اِسْتُخْلِصَتْ من أوراق صنفين من الزيتون السوري الدان والتفاحي المنتشرين بشكل خاص في ضواحي دمشق في فعالية إنزيم الكاتالاز في خلايا كوليوبتيل الذرة الصفراء. استخدم في العمل المركبات التي اِسْتُخْلِصَتْ بواسطة المحلات العضوية واللاعضوية، وقد مُدِّدَتِ المستخلصات الناتجة إلى ثلاثة تراكيز استخدمت بالعمل هي 25 % 50 % و100% .

استخدم في العمل مقاطع من سويقات نبات الذرة الصفراء بطول 10ملم، بعمر ستة أيام، وقد حُضِّنَتْ 24 ساعة في المحاليل المدروسة، وفي الدرجة $30\ C^0$، ثم اختبرت فعالية الكاتالاز بتحديد كمية الماء الأوكسجيني المتفككة في وسط التفاعل.

بيّنَت النتائج أن المركبات الفينولية لكل من مستخلص الدان والتفاحي بتركيز 50% كانت الأكثر فعالية، إذْ أدت إلى انخفاض فعالية الإنزيم المدروس.

الكلمات المفتاحية: ورق الزيتون، المركبات الفينولية، إنزيمات الأكسدة والإرجاع، إنزيم الكاتالاز.

---

(1) قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة دمشق.

(2) قسم البيولوجيا النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق.

Extraction of phenolic compounds from the leaves of some Syrian olive varieties and study their impact on catalase enzymes in *Zea myse* L.

Ahmad Malo(1) **Abira Moulla**(2)

ABSTRACT

The effect of phenolic compounds, which were extracted from leaves of Dan and Toufahi sorts of Syrian olives, which spread particularly in Damascus country side, on the activity of catalase in the cells of Kolioptyl Zea myse L. was studied.

Solutions of Three different concentrations of phenolic extacts are used in the work : 25%, 50% and 100% and the effects had been studied on catalase enzyme activity by lap for 24 hours in these Solutions. in 30 C^{0}. Effect of catalase were examined by the determination of H_2O_2.

Results showed that the most effective concentration was that of 50% of phenolic extract from the leaves of dan and toufahi by inhepiting the enzymes activity .

Key words: olive leaves, phenolic compound, enzyme of redox reaction, catalase

(1) Department of Chemistry- Faculty of sciences- Damascus University- Syria.

(2) Department of Plant Biology - Faculty of sciences- Damascus University- Syria.

1.المقدمة:

تعدُّ شجرة الزيتون *Olea europea* من الأشجار التي تعامل معها الإنسان منذ أقدم العصور وموطنها حوض البحر الأبيض المتوسط (Guinda et al., 2004).

وهذه الشجرة دائمة الخضرة، وهي تنتمي لنباتات الفصيلة الزيتونية Oleaceae. ووفق الإحصائيات العالمية تقارب المساحة المزروعة بهذه الشجرة ثمانية ملايين هكتار في حوض البحر الأبيض المتوسط (Tabera et al ., 2004).

تبيّن إحصائيات وزارة الزراعة، أن سورية تحتل المرتبة الرابعة عالمياً، والثانية عربياً في زراعة أشجار الزيتون.

ونظراً إلى ما للتركيب الكيميائي للمصادر الغذائية، فقد كان هذا الموضوع مجال اهتمام كثير من الدراسات البحثية، .(Allen V. et al., 2007)

تتمتع شجرة الزيتون بأهمية اقتصادية كبيرة جداً، فزيتها هو مصدر هذه الأهمية، فهو من الناحية الغذائية ذو تركيب مهم، وطعم مميَّز يجعله متفوقاً على زيوت بقية النباتات الزيتية الأخرى.

ومع أن هناك معطيات تاريخية تعود إلى القرن التاسع عشر (عام 1843م)، تشير إلى استخدام أوراق الزيتون في العلاج الطبي الشعبي، إلا أن البحوث في العقود الأخيرة هي التي وجهت الأنظار نحو أوراق هذه الشجرة، إذْ بينّت بوضوح أن مستخلصات أوراق الزيتون تتصف بفعاليات حيوية ذات تأثيرات طبية واسعة، نظراً إلى ما تحتويه من مركبات كيميائية فعالة.

ووفق هذه الدراسات يمكن للمركبات الكيميائية في هذه الأوراق، أن تستخدم في علاج مرض الملاريا (Benavente-Garcõa O et al., 2000)، وفي حالات ارتفاع ضغط الدم وارتفاع الكولسترول والداء السكري، كما استخدمت طبياً في معالجة هشاشة العظام، ومعالجة كل من نزلات البرد، وعدد من الالتهابات البكتيرية والفطرية (Markin et al.,2003) والفيروسية (Lee- Huang et al., 2003)، ولاسيَّما تلك التي تسبب التهاب الكبد، فضلاً عن استخدامها في الطب الوقائي كإضافات غذائية مانعة للأكسدة وكمضادات بكتيرية. (Samuelsson,1951;Gonzalez. 1992) (Appendini and Hotchkiss,2002)

ولهذا عمد الباحثون في المراكز العلمية العالمية إلى دراسة التركيب الكيميائي لأوراق الزيتون، وتحليل المركبات الفعالة حيوياً فيها، بهدف استخدام هذه المواد في الأغراض الطبية.

وكما بَيَّنَ الباحث (Duke A,2000) أنّ أوراق الزيتون تحتوي كميات ضخمة من المركبات الفعالة حيوياً، كما هو واضح من الجدول (1)

الجدول (1) التركيب الكيميائي لأهم المركبات الفعالة حيوية في أوراق الزيتون

1-CAFFEYL-GLUCOSE	CATECHOL-MELANIN
3,4 -DIHYDROXYPHENYL-ETHANOL	DIHYDROXYPHENYL-PROPANE
3,4 -DIHYDROXYPHENYL-ETHANOL-4- DIGLUCOSIDE	3,4 -DIHYDROXYPHENYL-ETHANOL-4-MONOGLUCOSIDE
AESCULETIN	BETA-AMYRIN
APIGENIN	APIGENIN-7-GLUCOSIDE
APIGENIN-7-DI-O-XYLOSIDE	CAFFEIC-ACID
CINCHONIDINE	P-COUMARIC-ACID
CRATAEGOLIC-ACID	CYANIDIN-3-GLUCOSIDE
CYANIDIN-3- MONOGLUCOSIDE	CYANIDIN-3-RHAMNOSYL-GLUCOSYL-GLUCOSIDE
CYANIDIN-3-RUTINOSIDE	DIHYDROCINCHONINE
D- ACETOXPINORESINOL	D-1-ACETOXPINORESINOL-4^{11}-O-METHYL-ETHER
KILOCALORIES	LIGUSTROLIDE
LUTEOLIN	LUTEOLIN-41-O-GLUCOSIDE
LUTEOLIN-5-O-GLUCOSIDE	LUTEOLIN-7-O-GLUCOSIDE
LUTEOLINTETRAGLUCOSIDE	OLEOSIDE-7-METHYL-ESTER
OLEUROPEIC-ACID	PAEONIDIN-3-GLUCOSIDE
PAEONIDIN-3-RHAMNOSYL	GLUCOSYL-GLUCOSIDE
PROTOCATECHULIC-ACID	QUERCETIN
QUERCETIN-3-O-RHAMNOSIDE	QUERCETIN-3-RUTINOSIDE
RUTIN	BETA-SITOSTEROL-GLUCOSIDE

وكما يظهر من الجدول أعلاه، أن أوراق الزيتون غنية بمتعددات الفينول البسيطة والمركبة التي تعدُّ من المركبات المتميزة بفاعليتها المضادة للأكسدة الحيوية، (Aytul, 2010; Kosar et al,2007)، وإلى دورها المضاد لنمو البكتريا فضلاً عن إمكانية استخدام هذه المركبات في الطب الوقائي كمضادات أكسدة، ومن هنا جاء تأثير هذه المركبات في الإنزيمات، ومن ثَمَّ في النبات بشكل عام.

2.أهمية البحث:

هَدَفَ هذا البحث إلى استخلاص مزيج المركبات الفينولية الموجودة في أوراق صنف الدان والتفاحي من نبات الزيتون ودراستها، ثم دراسة تأثير هذه المركبات في فعالية إنزيم الأكسدة والإرجاع – الكاتالاز catalase في خلايا سويقة نبات الذرة الصفراء، وللعمل المقدم

أهمية تطبيقية كبيرة جداً وذلك بمعرفة التفاعلات التأكسدية المرافقة للإجهاد الذي تتعرض له الخلايا في السويقات نتيجة عزل هذه المقاطع، ثم البحث عن العوامل التي تخفف من الآثار الضارة نتيجة هذا الإجهاد الذي يترافق عادة بازدياد فعالية الأكسدة والإرجاع (et t al., 2002 Nagda؛ Fuentes et al., 2004). التي تزيد من كمية أنواع الأوكسجين الفعال (ROS) ومنها الماء الأوكسجيني الذي يعدُّ أحد المركبات السامة في الخلايا الحية، إذْ تعمد النباتات إلى تنشيط فعالية إنزيم الكاتلاز الذي يفكك هذا المركب ويخفض من تأثيره السمي، وعندما تعجز التحولات الداخلية الفيزيولوجية عن درء الأخطار الناتجة عن التعرض للإجهاد يصبح من الضروري إضافة عوامل خارجية مساعدة إلى هذه الظاهرة، ومن هذه المركبات المركبات الفينولية ذات القدرة الإرجاعية الموجودة في أوراق الزيتون التي ستساعد في خفض كميات المركبات الأوكسينية الفعالة، وتقلل من حاجة النبات لاستخدام إنزيمات الأكسدة والإرجاع

ينتمي الكاتالاز لإنزيمات الصف الأول (الأكسدة والإرجاع EC 1.11.1.6 – Catalase)، كما يُعدُّ من البروتينات الهيمية الحاوية على شاردة الحديد في زمرته الهيمية.

يعتمد مبدأ معايرة فعالية هذا الإنزيم على تحديد كمية الماء الأكسجيني المتفككة خلال مدة زمنية من الحضن.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{الكاتالاز}} O_2 + 2H_2O$$

3. مواد البحث وطرائقه:

استخدم في هذا البحث أوراق شجرة الزيتون من الصنف "الدان والتفاحي" تم الحصول عليها من غوطة دمشق، وحدائق جامعة دمشق.

كما استخدم في البحث بذور الذرة المعقمة من صنف "الغوطة 82" التي تم الحصول عليها من مؤسسة إكثار البذار(وزارة الزراعة) .

كاشف فولين(إنتاج شركة ميرك الألمانية)

مذيبات عضوية: الميتانول؛ الإيتانول؛ ايتر البترول؛ الكلوروفورم

مركبات لاعضوية: الماء الأوكسجيني؛ برمنغنات البوتاسيوم؛ كربونات الصوديوم؛ كربونات الكالسيوم.

1.3. الأجهزة المستخدمة:

المبخر الدوار R-110 إنتاج شركة BUCHI

حاضنة هزازة

جهاز الامتصاص اللوني VIS- 7220 SPECTROFOTOMETR

2.3. طرائق العمل:

1.2.3. معالجة أوراق الزيتون:

لفصل المركبات الفينولية من أوراق الزيتون المستخدمة، اِسْتُخْدِمَتْ طريقة الاستخلاص على مراحل بواسطة المذيبات اللاقطبية، ثم المذيبات القطبية، وفق الطريقة التي اقترحها Kosar et al 2007و)، والتي تشمل المراحل الآتية:

– يؤخذ وزن معين من أوراق الزيتون ويغسل جيداً بالماء للتخلص من الأتربة والعوالق، ثم يجفف بتيار من الهواء بعيداً عن الضوء المباشر قبل طحنها على شكل مسحوق ناعم، ثم يوزن ويوضع في حوجلة لمتابعة الاستخلاص.

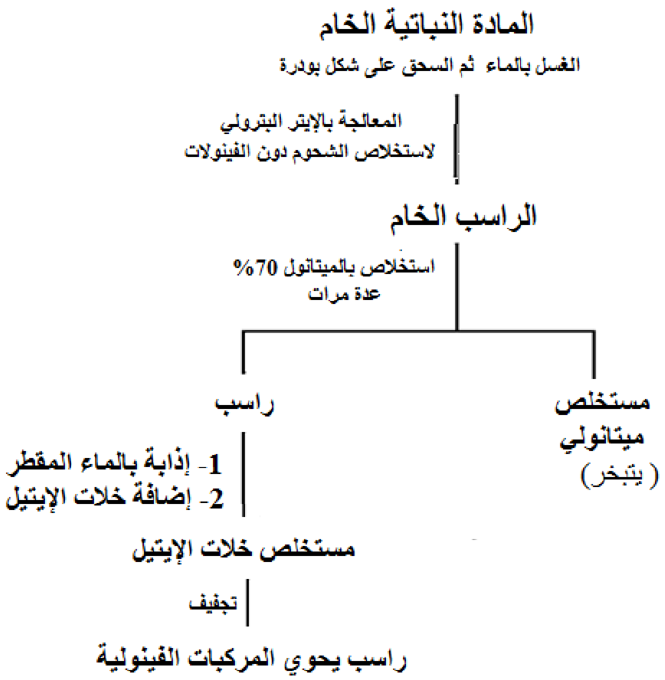
– يضاف 100 مل من إيتر البترول إلى كل 10 ميلي غرام من مسحوق أوراق الزيتون الجافة مع التحريك باستخدام خلاط كهربائي مغناطيسي مدة 24 ساعة مع التحريك؛ وذلك لاستخلاص المركبات الدسمة من العينات المدروسة دون المساس بالمركبات الفينولية . يعالج الراسب الناتج بعد الترشيح بكمية جديدة من إيتر البترول، وتكرر العملية حتى يصبح المحلول الإيتيري عديم اللون.

– يجفف الراسب الناتج بالهواء لمتابعة عملية الاستخلاص. وذلك بإضافة محلول الميتانول المائي بتركيز 70% بنسبة 100مل إلى كلّ 6 غ من العينات المجففة. وتحضن بالدرجة 40 C°، مع التحريك باستخدام خلاط مغناطيسي مدة 30 دقيقة، ثم يرشح.

– بعد الترشيح تعاد عملية الاستخلاص 3 مرات. تجمع محاليل المستخلصات الميتانولية المائية الناتجة عن الاستخلاص معاً، وتبخر باستخدام المبخر الدوار بالدرجة40 C°.

يحوي المستخلص الصلب الناتج على مركبات عديدة منحلة في الماء حسب Zalacain) et al., 2003). بإذابة مكونات الراسب بـ 75 مل من الماء المقطر، ثم استخلصت المركبات الفينولية بخلات الإيتيل، وذلك باستخدام قمع الفصل، وكررت العملية ثلاث مرات.

تجفف خلات الإيتيل الناتجة للحصول على راسب المركبات الفينولية الذي يترسب بلون أصفر والمؤلف من التانينات القابلة للحلمهة وفق المخطط:



(الشكل 1) مراحل استخلاص المركبات الفينولية من المصادر النباتية

1.1.2.3. حلمهة المركبات الفينولية ومعايرتها:

عُولِجَ مسحوق أوراق الزيتون المستخلص بالإيتر الايتيلي مع حمض كلور الماء بتركيز 1.2 جزيئي؛ وذلك بهدف تفكيك الروابط الاستيرية بين جزيئات الحموض العفصية في حال وجودها، وتحضن في حمام مائي مسخن للدرجة 80 C° مدة ساعة، ثم يرشح المستخلص بعد التبريد ويبخر الايتر الاتيلي من الرشاحة، وتستخلص الفينولات من الطورالمائي بواسطة خلات الايتيل في قمع الفصل (تعاد عملية الاستخلاص ثلاث مرات). وتقطر خلات الايتيل تحت الضغط المنخفض باستخدام جهاز المبخر الدوار بالدرجة C° 40، ويعالج راسب الفينولات من أجل الدراسات اللاحقة (Justesen et al.,1998)

لإجراء معايرة المركبات الفينولية تستخدم الطريقة التي قدمها الباحثون (Justesen , Knuthsen & Leth 1998) والتي تستلزم حلمهة هذه المركبات في المستخلص المدروس.

أجريت حلمهة المركبات الفينولية بإذابة الراسب المستخلص بواسطة محلول الميتانول المائي 50% بنسبة 30 ميلي غرام مسحوق، في وسط حمضي، وذلك بالدرجة 80 C° مدة 60 دقيقة في جهاز مزود بمبرد مرتد.

– يبرد المحلول الناتج ويرشح، ثم يبخر الميتانول باستخدام المبخر الدوار، حيث يتبقى الطور المائي الذي يعالج بخلات الإيتيل ضمن قمع الفصل لاستخلاص المركبات الناتجة عن الحلمهة. ثم تبخر خلات الإيتيل، فيتشكل راسب يميل إلى اللون الأصفر، (يستخدم لإجراء المعايرة عليه).

2.1.2.3. مراحل المعايرة:

يذاب 1غ من مسحوق الفينولات بالماء، وتعاير الفينولات بطريقة فولين التي اقترحها (Gamez-meza et al., 1999) ، والتي تعتمد على استخدام كاشف فولين وفق الخطوات الآتية:

1– إضافة 5 مل من محلول كربونات الصوديوم بتركيز (20%)، وذلك للتفاعل مع الفائض من كاشف فولين.

2– إضافة 5 مل من كاشف فولين إلى العينة المدروسة.

3– تقاس الامتصاصية بعد مرور 60 دقيقة عند الدرجة C° 20 ، وبطول موجة 725 nm على جهاز الامتصاص اللوني مقابل عينة شاهدة من الماء المقطر.

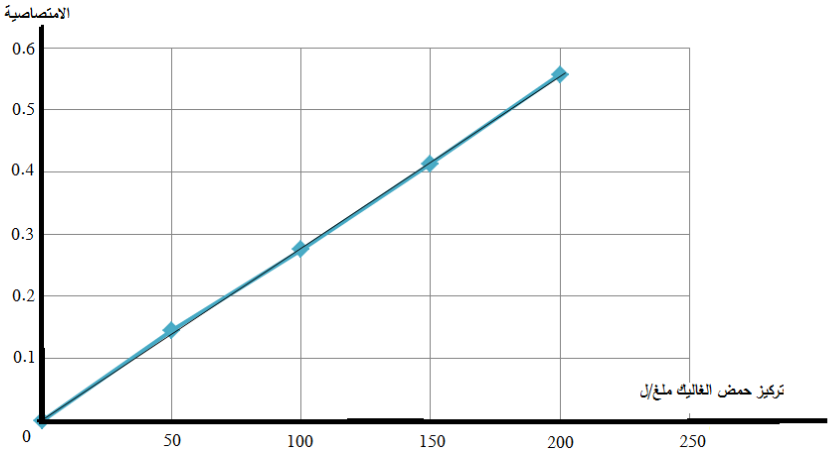
3.1.2.3. المنحنى العياري لحمض الغاليك:

حضر محلول عياري من حمض الغاليك بتركيز (1000ملغ/ل)، ثم حضر منه سلسلة عيارية بتراكيز (50–100–150– 200) ملغ/ل باستخدام محل الميتانول 60 %، ثم تعاير هذه المحاليل بكاشف فولن وفق طريقة Folin–Ciocalteu لمعايرة الفينولات [Asses N et al., . 2009].

يبيّن الجدول (1) امتصاصية محاليل السلسلة العيارية لحمض الغاليك، كما يبيّن الشكل (1) المنحنى العياري لمعايرة حمض الغاليك بطريقة Folin–Ciocalteu.

الجدول (1) السلسلة العيارية لحمض الغاليك

تركيز حمض الغاليك مقدراً بـ ملغ/ل	50	100	150	200
شدة الامتصاص	0.145	0.275	0.413	0.557



(الشكل 2) المنحنى العياري لحمض الغاليك

تقاس شدة الامتصاصية للعينات الفينولية المدروسة، ويحسب تركيز الفينولات فيها من المعادلة:

$$Y = \frac{C \times V}{W} \times 10^{-1}$$

إذْ:

Y: تركيز الفينولات في الوزن المأخوذ

C: تركيز المستخلصات من الإسقاط على المنحنى المعياري.

V: حجم المستخلص مقدراً بـ (مل).

W: وزن العينة المأخوذة بـ (غ).

2.2.3. تحضير محلول الفينولات للدراسة:

يحضر محلول مائي وزني من راسب الفينولات بتركيز معين، ومن هذا المحلول يحضر بالتمديد تركيزان آخران بنسبة 50%، 25% من المحلول المحضر.

3.2.3. تحضير البذور للدراسة:

تغسل بذور الذرة المعقمة بالماء عدة مرات، ثم تنقع مدة 3 ساعات عند الدرجة $50\ C^{o}$ بالماء العادي، وتستنبت مدة 6 أيام في حاضنة حرارية عند الدرجة $30\ C^{o}$ في الظلام مع التهوية المستمرة (بلشكوف 1968).

بانتهاء مرحلة النمو تؤخذ مقاطع من السويقات النامية بطول 15 ملم وعلى بعد 2 ملم أسفل منطقة العقدة، بوزن 1غ لكل عينة في أوعية بتري لتحضن في محاليل مستخلص الفينولات بالتراكيز الآتية: 100%، 50%، 25 % والماء كعينة شاهدة.

تحضن العينات المحضرة في الدرجة C° 30 مدة 24 ساعة ضمن حاضنة حرارية.

4.2.3. استخلاص إنزيم الكاتلاز من مسحوق خلايا سويقات الذرة الصفراء:

يعالج 1غ من خلايا سويقات الذرة الصفراء بعمر 6 أيام بالسحق مع 0.3 غ من كربونات الكالسيوم و 20 مل من الماء المقطر عند الدرجة C° 4، حتى تتشكل كتلة متجانسة، ينقل بعدها المزيج الناتج إلى دورق سعة 100 مل، و يكمل الحجم بالماء المقطر. يترك المزيج مدة 40 دقيقة في البراد لِيُسْتَخْلَصَ الإنزيم، وتعدُّ الرشاحة الناتجة بعد الترشيح كمستحضر إنزيمي لدراسة الفعالية الوظيفية له. [بلشكوف , 1968]

5.2.3. معايرة فعالية الكاتلاز في أوراق الزيتون من صنفي الدان والتفاحي:

استخدمت الطريقة التي اقترحها بلشكوف (1968) لمعايرة الإنزيم المدروس في نوعي أوراق الزيتون. التي تعتمد على حضن المستحضر الإنزيمي بمحاليل فوق أكسيد الهيدروجين بتراكيز محددة، ثم معايرة الكمية التي تفككت منها بواسطة الإنزيم المدروس.

تُجْرَى المعايرة بواسطة برمنغنات البوتاسيوم لتحديد فعالية الإنزيم المدروس، وتحسب فعالية الإنزيم في 1غ من المادة النباتية المدروسة وفق المعادلة التي اقترحها (بلشكوف عام 1968).

$$p = \frac{(A - B) \cdot 0.17}{T \cdot H}$$

إذْ:

P: فعالية الكاتالاز مقدرة بعدد ملغرامات الماء الأوكسجيني المتفككة خلال دقيقة (ملغ/ د)

A: حجم برمنغنات البوتاسيوم (0.01N) المستهلك لمعايرة الماء الأكسجيني في التجربة الشاهدة مقدراً بالـ مل.

B: حجم برمنغنات البوتاسيوم (0.01N) المستهلك لمعايرة الماء الأكسجيني المتبقي في تجربة العينة مقدراً بالـ مل.

H: وزن العينة النباتية المأخوذة لدراسة الإنزيم فيها (بلشكوف،1968)

0.17: عدد الميلي غرامات من H_2O_2 المكافئة إلى 1 مل من $KMnO_4$ (N 0.01)

T: زمن الحضن.

4. النتائج المناقشة:

1.4. كمية الفينولات في أوراق نوعي الزيتون الدان والتفاحي

بيّنت النتائج التي تم التوصل إليها، كما يبيّن الجدول -2، أن أوراق الزيتون من النوع التفاحي تحوي كمية من الفينولات أعلى من الفينولات في أوراق الدان

الجدول (2) كمية الفينولات الكلية في أصناف أوراق الزيتون المدروسة (ملغ/غ)

نوع الزيتون	تركيز المركبات الفينولية (ملغ/غ)
الدان	190.12±1.17
التفاحي	193.15±1.16

ولكن عند إجراء الدراسة على فعالية الكاتلاز اِسْتُخْدِمَتْ تراكيز متساوية من الفينولات من كلا النوعين.

2.4. تأثير مستخلص فينولات أوراق الدان في فعالية إنزيم الكاتالاز في خلايا الذرة الصفراء:

قُورِنَتْ فعالية إنزيم الكاتالاز في خلايا سويقات الذرة الصفراء المحضونة في الماء، أو في كل من ثلاثة تراكيز وزنية مختلفة من مستخلص الفينولات، هي 0.25غ/100 مل و0.50غ/100 مل 1.00غ/100 مل، وقد أُجْرِيَ الاستنبات قبل الحضن في وسط مائي مدة ستة أيام والدرجة C° 28 في الظلام وبشروط التهوية الجيدة.

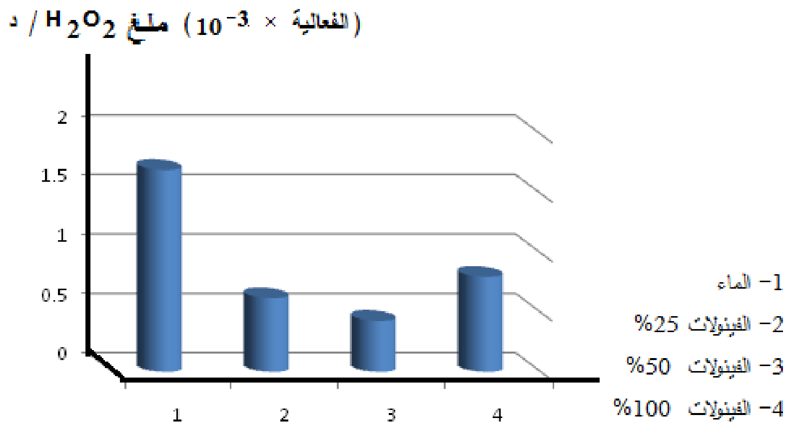
أُخِذَتْ من السويقات المستنبتة قطع بطول 15ملم على بعد 2 ملم أسفل العقدة، جمعت القطع في بيشر يحوي ماءً مقطراً؛ ثم وزعت المقاطع على أوعية بتري الحاوية على 20 مل من الماء المقطر، أو أحد المحاليل المذكورة أعلاه.

وقد أخذ من كل حالة من حالات الحضن ثلاثة مكررات، وحسبت متوسط الأرقام التي تم الحصول عليها. كما أُخِذَتْ عينة ثالثة من كل حالة، تم تثبيط الفعالية الأنزيمية في خلاياها بالتسخين حتى الغليان قبل مدة الحضن بوصفها عينة شاهدة .

حُضِّنَتِ العينات التي تم حُضِّرَتْ بالشروط المذكورة أعلاه مدة 20 ساعة بالدرجة C° 25 وفي الظلام.

الجدول(3) متوسط نتائج فعالية الكاتلاز في سويقات الذرة الصفراء المستنبتة في تراكيز مختلفة للفينولات من أوراق الدان

تركيز الفينولات في وسط الحضن %	كمية $KMnO_4$ المستهلكة				متوسط فعالية الكاتالازملغ H_2O_2 /د $10^{-3}\times$	الانحراف المعياري	الفعالية النسبية %
	في الشاهد	مع الانزيم					
0عينة مائية	1.4	0.6	0.6	0.6	1.700	±0	100.00
1	1.3	1.0	0.9	0.8	1.063	±2.13E-04	62.50
0.5	1.2	1.0	1.0	1.0	0.850	±1.33E-19	50.00
0.25	1.5	1.1	1.1	1.0	0.708	±1.23E-04	41.67



(الشكل 3) فعالية الكاتالاز في سويقات الذرة الصفراء المستنبتة في تراكيز مختلفة للفينولات من أوراق الدان

يتبيّن من النتائج المبينة أعلاه في الجدول (3) أن وجود المركبات الفينولية في وسط حضن سويقات الذرة قد أدى إلى انخفاض في فعالية إنزيم الكاتالاز المقاوم لتفاعلات الأكسدة الخلوية كعامل للإجهاد التأكسدي (Oxidative Stress) وأن هذا التأثير الإيجابي قد ازداد عندما ارتفع تركيز هذه الفينولات من 25 %إلى 50%، إلا أن هذا التأثير الإيجابي قد

توقف عند استخدام الفينولات بتركيز أعلى من (50غ/100 مل)، وقد يعزى السبب إلى عوامل مختلفة:

- تفاعل المركبات الفينولية مع البروتين الإنزيمي وإحداث تغير في بنية المركز الفعال لبنية الإنزيم
- أو قد يكون السبب وجود تأثير للتركيز المرتفع من المركبات الفينولية المستخدمة في الضغط الحلولي بين الخلايا ووسط الحضن.
- أو للحصول على عامل آخر مختلف الذي يحتاج إلى العديد من التجارب الإضافية التي تُسْتَخْدَمُ بها تراكيز متدرجة من الفينولات بين 50 و 100.

3.4. معايرة فعالية الكاتلاز في أوراق الزيتون صنف التفاحي

شملت مجموعة التجارب التالية دراسة فعالية إنزيم الكاتالاز بتأثير المستخلص الفينولي من أوراق شجرة الزيتون من النوع التفاحي كاملة النمو، اِسْتُخْلِصَ بالطريقة نفسها المذكورة أعلاه وبشروط مطابقة تماماً لمراحل العمل في المجموعة السابقة من التجارب، واستخدمت في العمل تراكيز المركبات الفينولية (ملغ/ مل) نفسها. وزمن الحضن ووزن المقاطع النباتية.

إذْ دُرِسَتْ فاعلية إنزيم الكاتالاز في خلايا الذرة الصفراء والمستنبتة في وسط مائي مدة ستة أيام والدرجة 28 C° في الظلام، وبشروط التهوية الجيدة.

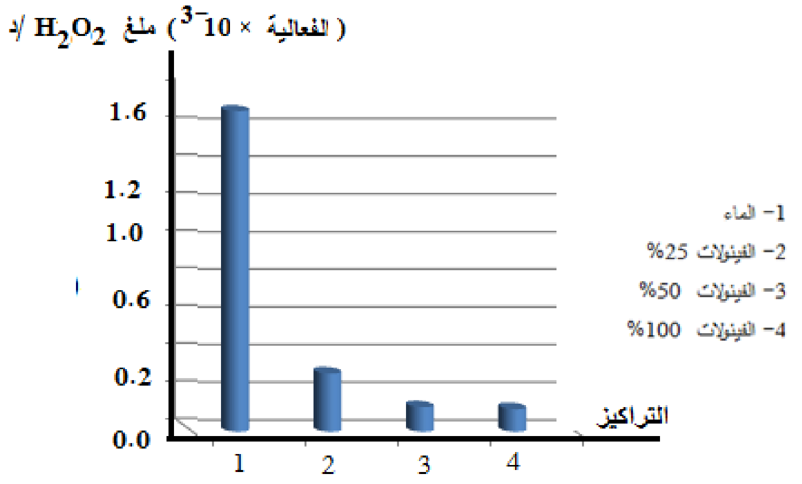
أُخذت من السويقات المستنبتة مقاطع بطول 15ملم على بعد 2 ملم أسفل العقدة، جمعت المقاطع في بيشر يحوي ماءً مقطراً، ثم وزعت هذه المقاطع على أوعية بتري الحاوية على 20 مل من الماء المقطر، أو أوعية بتري الحاوية على كمية من الفينولات المستخلصة بتركيز 0.25 ملغ/ مل، أو 0.50 ملغ/ مل و 1.00ملغ/ مل محلول الفينولات المستخلصة.

وقد أُخِذَتْ من كل حالة من حالات الحضن عينتان مكرران وحسب متوسط الأرقام التي تم الحصول عليها. كما أخذت عينة ثالثة من كل حالة حضن سُخِّنَتْ بالغليان قبل مدة الحضن بوصفها عينة شاهدة

حُضِّنَتِ العينات التي حُضِّرَتْ مدة 20 ساعة بالدرجة 25 C° وفي الظلام. بانتهاء مدة الحضن عُويِرَتْ فعالية الكاتالاز في العينات المحضونة، ويبيّن الجدول (4) نتائج فعالية الكاتالاز في صنف التفاحي.

الجدول (4) متوسط نتائج فعالية الكاتلاز في شروط التجربة (صنف التفاحي)

تركيز الفينولات في وسط الحضن %	كمية $KMnO_4$ المستهلكة				متوسط فعالية الكاتالازملغ H_2O_2 /د $\times 10^{-3}$	الانحراف المعياري	الفعالية النسبية %
	في الشاهد	مع الأنزيم					
0عينة مائية	1.4	0.4	0.4	0.4	2.125	±0	100.00
1	1.8	0.3	0.3	0.6	2.125	±0.000368	100.00
0.5	1.4	0.8	0.8	0.9	1.204	±0.000123	56.67
0.25	1.6	1.1	1	1	0.779	±0.000123	36.67



(الشكل 4) تأثير التراكيز المختلفة للفينولات المستخلصة من أوراق (تفاحي) في فعالية الكاتالاز

تبيّن النتائج التي تم التوصل إليها أن فعالية إنزيم الكاتلاز في وسط الحضن الحاوي على المستحضر الفينولي 0.25 ملغ/ مل قد انخفضت إلى 18% عماهي عليه في الوسط المائي، وعند ازدياد تركيز الفينولات في وسط الحضن إلى 0.5 ملغ/ مل ازداد الانخفاض في الفعالية الإنزيمية لتصل إلى 7.6%، وعند ارتفاع تركيز الفينولات في المستخلص الفينولي إلى 1.00 ملغ/ مل لم يلاحظ أي تغير في الفعالية الإنزيمية في خلايا السويقات عما كان عليه هذا التركيز بنسبة 0.50 ملغ/ مل، الشيء الذي يحتاج إلى دراسات لاحقة لتفهم آلية عمل هذه الفينولات.

5. الاستنتاجات والتوصيات:

1- يؤدي نمو الخلايا النباتية في أوساط تحوي على المركبات الفينولية إلى مقاومة الإجهاد التأكسدي في خلايا هذه النباتات.

2- أبدت المركبات الفينولية المستخلصة من أوراق الزيتون تأثيراً واضحاً في مقاومة التفاعلات التأكسدية عند النباتات.

3- تتباين كمية المركبات الفينولية بين الأنواع المختلفة من أوراق الزيتون، إذْ كانت كميتها في أوراق النوع التفاحي أعلى منها في أوراق نوع الدان.

4- إن النتائج التي تم التوصل إليها من خلال العمل المقدم عن دور المركبات الفينولية ذات أهمية حيوية كبيرة، إذ أبدت هذه المركبات مقاومة للعوامل التأكسدية في النبات؛ وذلك بخفضها للحاجة إلى إسهام الإنزيمات المقاومة للأكسدة في النبات.

5- من الضروري إجراء العديد من التجارب التي تساعد على تفهم الدور الوظيفي للفينولات في الخلايا الحية؛ وذلك بمعايرة إنزيمات أخرى.

6- من المهم إجراء تجارب متعددة لدراسة الحد الأدنى من تراكيز المركبات الفينولية لإظهار الفعالية الحيوية.

7- دراسة تراكيز المركبات الفينولية وفعاليتها في أوراق الأنواع الأخرى من الزيتون.

المراجع

1.6. المراجع باللغة الروسية

–بلشكوف، كتاب العملي في بيوكيمياء النبات، 1968 مؤسسة العلوم، موسكو (المرجع باللغة الروسية).

2.6. المراجع باللغة الإنكليزية

1- Allen V. Barker; D. J. Pilbeam (2007). *Handbook of plant nutrition*. CRC Press. pp. 4–. ISBN 978-0-8247-5904-9. Retrieved 17 August 2010.
2- Asses, N., L. Ayed, H. Bouallagui, S. Sayadi, and M. Hamdi, 2009. Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by Geotrichum candidum Int. Biodeter. Biodegr. 63: 407-413
3- AppendiniP , Hotchkiss JH..2002. Revew of anti microbial food packaging. Lnnovative Food Science and Emerging Technologies; 3(2) : 113-126.
4- Aytul,K 2010. Antimicrobial and Antioxidant Activities OF Olive Leaf Extract And Its Master Of Science ,Izmir p 51- 52
5- Benavente-Garcõa O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A, Del Rio JA. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves. Food Chemistry; 68: 457-462.
6- Duke james A, 2000. _ Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants. First edition-CRC pess- USA- 654
7- EC 1.11.1.6 - catalase. BRENDA: The Comprehensive Enzyme Information System. Department of Bioinformatics and Biochemistry, Technische Universität Braunschweig .Retrieved 2009-05-26
8- Gamez-Meza, N.; Noriega-Rodrيguez, J.A.; Medina-Juarez, L.A.; Ortega-Garca, J.; Cazares- Casanova, R. &Angulo-Guerrero, O. (1999). Antioxidant activity in soybean oil ofextracts from thompson grape bagasse. Journal of American Oil Chemists Society,76(12), 1445–1447. ISSN: 0003-021X.
7- Gonzalez, M.; Zarzuelo, A.; Gamez, M. J.; Utrilla, M. P.; Jimenez, J.; Osuna, I. 1992. Hypoglycemic activity of olive leaf. Planta Med 58, 513-515.
8- Guinda, A.; Albi, T.; Camino, M. C. P.; Lanzón, A. 2004. Supplementation of oils with oleanolic acid from the olive leaf (Olea europaea). Eur. J. Lipid Sci. Technol., 106, 22–26.
9- Fuentes, A., Llorens, M., Saez, J., Aguilar, M.I., Ortuño, J.F., and Meseguer, V.F. 2004. Phytotoxicity and heavy metals speciation of stabilized sewage sludges. Journal of Hazardous Materials, 108:161-169.

10-Justesen,U Knuthsen,P Leth,T. 1998." Quantitative analaysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverage by HPLC with photo-diode array and mass spectrometric detection". Journal of Chromatography A; 799(1998), PP. 101-110

11-Kosar,M. ,Bozan,B.Temelli,F and Baser,K 2007. Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (Rhus coriaria L.) extracts. Food Chem., V:103:Issue3,p: 952-959

12-Markin D, Duek L, Berdicevsky I. 2003. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Mycoses.; 46: 132–136.

13-Nagda, G. K.,. Diwan, A. M., & Ghole, V. S.2006. Seed Germination Bioassays To Assess Toxicity Of Molasses Fermentation Based Bulk Drug Industry Effluent, EJEAFChe, 5 :1598-1603.

14- Lee-Huang S., Zhang L., Huang P.L., Chang Y.T. and Huang P.L. 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. Biochemical and Biophysical Research Communications 307:1029–1037.

15-Omar, S. H. 2010. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects, Sci Pharm, 78, 133-1

16-Samuelsson, G, 1951. The blood pressure lowering factor in leaves of Olea europaea. Farmacevtisk Revy, 15, 229–239

17-Tabera, J.; Guinda, A.; Ruiz-Rodriguez, A.; Senorans, J. F.; Ibanez, E.; Albi, T., Reglero, G. 2004. Countercurrent Supercritical Fluid Extraction And Fractionation Of High-Added-Value Compounds From A Hexane Extract Of Olive Leaves. J. Agric. Food Chem, 52, 4774–4779.

18-Zalacain et et al., 2003. Handbook of Models for Human Aging https://books.google.com/books?