الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الهندسة الزراعية

قسم علوم الأغذية

تحديد الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات *"Stevia rebaudiana"* وتطبيقه كمحلي طبيعي في الغذاء.

رسالة مقدمة لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية

(علوم الأغذية)

إعداد المهندسة

براء محمد الخطيب

المشرف العلمي

د .هدى حبّال

أستاذ مساعد في قسم علوم الأغذية

كلية الزراعة- جامعة دمشق

المشرف المشارك

د. فهد البيسكي

باحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية

وزارة التعليم العالي

2023م

قُدّمت هذه الرّسالة استكمالاً لمتطلّبات نيل درجة الماجستير في قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة – جامعة دمشق، وأُجيزت من قبل السّادة أعضاء لجنة الحكم.

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirements for the Master Degree in Department of Food sciences, Faculty of Agriculture-Damascus University. The thesis has been approved by referee committee.

نُوقشت هذه الرّسالة بتاريخ 12 / 3 / 2023

لجنة الحكم على الرّسالة:

أ. د. محمد خير طحلة

عضواً

الأستاذ في قسم علوم الأغذية-كلية الزراعة-جامعة دمشق.

الاختصاص: حفظ وتصنيع الأغذية

أ. د. ريتا منصور

عضواً

الأستاذ في قسم العلوم الأساسية-كلية الزراعة-جامعة دمشق.

الاختصاص: كيمياء تحليلية

د. هدى حبّال

عضواً مشرفاً

الأستاذ المساعد في قسم علوم الأغذية-كلية الزراعة-جامعة دمشق.

الاختصاص: جودة أغذية

Scanned with CamScanner

شهادة

نشهد بأنّ العمل الموصوف في هذه الرسالة:

" تحديد الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات *"Stevia rebaudiana"* وتطبيقه كمحلي طبيعي في الغذاء " جاء نتيجة بحثٍ علميٍ قامت به المرشّحة براء الخطيب بإشراف الدكتورة هدى حبال الأستاذ المساعد في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة-جامعة دمشق، والدكتور فهد البيسكي الباحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية-وزارة التعليم العالي، وأنّ المراجع المستخدمة في هذه الرسالة موثّقة أصولاً ضمن النص.

المرشّحة	المشرف المشارك	المشرف العلمي
براء الخطيب	الدكتور فهد البيسكي	الدكتورة هدى حبال

Certificate

It is hereby certificated that the work described in this thesis:

" Optimization of Stevioside Glucoside Extraction from Stevia rebaudiana and IT'S Application as a Natural Food Sweeteners" is the result of the scientific research done by candidate Baraa Alkhatib under the supervision of Assistant Prof. Hoda Habbal, Food Science Department, Faculty of Agriculture, Damascus University and Dr. Fahed Albiski, Researcher, (NCBT), Ministry of Higher Education, and any reference to other research works has been duly acknowledged in the text.

Candidate	Co-supervision	Supervision
Baraa Alkhatib	Dr. Fahed Albiski	Assistant Prof. Hoda Habbal

Scanned with CamScanner

تصريح

أصرح بان هذا العمل الموصوف في هذه الرسالة المعنون بـ " **تحديد الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات "*Stevia rebaudiana*" وتطبيقه كمحلي طبيعي في الغذاء**" لم يسبق أن قدم من قبل للحصول على أي شهادة ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى، وأن كافة الأعمال، والنتائج المذكورة هي نتاج جهودي الشخصية، وبتوجيه من المشرفين العلميين، وجميع المراجع التي ذكرت في الأطروحة نسبت إلى مصادرها ضمن النص، وهي في قائمة المراجع.

المرشحة

براء الخطيب

Declaration

I declare that the present work entitled " **Optimization of Stevioside Glucoside Extraction from Stevia rebaudiana and IT'S Application as a Natural Food Sweeteners**" is new work and has never been studied by any other researchers for any other degree, and currently, it is not submitted by anyone for any degree. All the mentioned results are my own efforts and done by the direct supervisors of my guides. All the referred literature is cited and well documented in the list of references.

Candidate

Baraa Alkhatib

Scanned with CamScanner

شكر وتقدير

﴿رَبِّ أَوْزِعْنِيٓ أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ ٱلَّتِيٓ أَنْعَمْتَ عَلَيَّ وَعَلَىٰ وَٰلِدَيَّ وَأَنْ أَعْمَلَ صَٰلِحًا تَرْضَىٰهُ وَأَدْخِلْنِى بِرَحْمَتِكَ فِى عِبَادِكَ ٱلصَّٰلِحِينَ﴾

اللهم لك الحمد والشكر كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك وعلو مكانك؛ ولأن شكر الناس من شكر الله وحمده أود أن أشكر السادة الأساتذة في كلية الزراعة، كما أتقدم بخالص الشكر لأعضاء لجنة المناقشة والحكم الأستاذ الدكتور محمد خير طحلة والأستاذة الدكتورة ريتا منصور لإغنائهم البحث بملاحظاتهم وتوجيهاتهم. وأتقدم بخالص الشكر والتقدير للدكتورة هدى حبال التي تعلمنا منها النجاح والمثابرة والتطلع للأعلى دائمًا مهما كانت الظروف. كما أخص بالشكر الدكتور فهد البيسكي على ماقدمه لي من مساعدة في إتمام هذا العمل. شكرًا لأصحاب النفوس الذكية والقلوب النقية شكراً للأخت الغالية الدكتورة تهاني العايدي التي أخجلتني بكرمها..

الحمد لله على منحي أصدقاء كانوا معي دائماً في محنتي وسروري.. معينين لي في السراء والضراء إلى من كانوا لي عوناً وسنداً خلال سنوات دراستي وضحكاتي **" مها، آية، بانة ، آلاء، نهال"**

أهدي نجاحي وثمرة جهودي إلى صاحب القلب الطيب والروح المعطاءة الذي علمني أن ارتقي سلم الحياة بحكمة وصبر إلى من لاينفصل اسمي عن اسمه أبداً **" والدي العزيز"**

إلى مهجة قلبي، التي رأتني بقلبها قبل عينيها إلى من تتذكرنا بالدعاء في ليلها ونهارها إلى من لا نجد لها كلمات توفيها حقها إلى طريق جنتي **" أمي الحبيبة"**

أهل الكرم كثيرين، ولكن لم أشهد في عمري من هم بكرمه وطيبة قلبه وجمال روحه **" خالي أبو كرم "**

إلى من تقاسمت معهم مهد الطفولة وفي رحلة الحياة هم سندي عند الصعاب إلى الغائبين الحاضرين في قلبي إلى من أشعر بالأمان عند رؤيتهم إلى " **إخوتي باسل وأحمد**"

إلى التي مهما نثرت في حبها سطور لم تعبر عن ما بداخلي لها إلى " **أختي الغالية بتول**"

إلى من هم في حياتي حياة إلى عصافير قلبي وشقائق الروح أخواتي "**لانا وسيدرا**"

ولأن ختامها مسك أهدي نجاحي للصديق الوفي والداعم الكبير الذي كان دائماً معي، إلى الذي أطمئن من فكرة وجوده معي وبجانبي في كل وقت إلى شريك عمري " **حبيبي أحمد** "

فهرس المحتويات

الملخص.....

الجزء التمهيدي.....

المقدمة..... 1

تساؤلات البحث 3

فرضيات البحث 3

مبررات وأهداف البحث 4

1- الدراسة المرجعية..... 6

1-1- المُحليات (sweeteners)..... 6

1-1-1- المُحليات المغذية (عالية السعرات الحرارية) Nutritive sweeteners 6

1-1-2- المُحليات غير المغذية (عديمة السعرات الحرارية) Non- nutritive sweeteners..... 7

1-2- الستيفيا كمحلٍ غذائي طبيعي..... 8

1-2-1- الوصف النباتي للستيفيا..... 8

1-2-2- التصنيف العلمي لنبات الستيفيا 8

1-2-3- الدول المنتجة لنبات الستيفيا 9

1-2-4- المركبات المسؤولة عن الطعم الحلو في نبات الستيفيا..... 9

1-2-5- الخصائص الفيزيائية لجلكوزيدات الستيفول.....12

1-2-6- التركيب الكيميائي لأوراق الستيفيا 13

1-2-7- الخصائص الوظيفية لأوراق الستيفيا..... 16

1-3- سلامة جلكوزيد الإستيفوزيد.....17

1-4- الأهمية الطبية لنبات الستيفيا..... 18

1-5- تأثير الستيفيا على مرضى السكري 20

1-6- استخلاص جلكوزيد الإستيفويد وتنقيته.....21

1-7- طرائق الكشف عن جلكوزيد الإستيفوزيد 26

1-8- تطبيقات جلكوزيد الإستيفوزيد في الصناعات الغذائية 29

2- مواد البحث وطرائقه 32

2-1- المواد.....33

2-1-1- أوراق الستيفيا 33

2-1-2- جلكوزيد الإستيفوزيد القياسي 33

2-1-3- المواد الغذائية 33

2-1-4- المواد الكيميائية 33

2-1-5- أجهزة التحليل 34

2-2- طرائق التحليل 35

2-2-1- تحضير عينة أوراق الستيفيا الجافة.....35

2-2-2- الاختبارات الكيميائية لأوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة 35

2-2-2-1- تقدير الرطوبة..... 35

2-2-2-2- تقدير الرماد..... 35

2-2-2-3- تقدير البروتين 36

2-2-2-4- تقدير الكربوهيدرات الكلية 36

2-2-2-4-1- تقدير السكريات المختزلة 36

2-2-2-4-2- تقدير السكريات غير المختزلة..... 37

2-2-2-5- تقدير الدهن..... 37

2-2-2-6- تقدير الألياف الخام 37

2-2-2-7- تقدير الطاقة الكلية 38

2-2-3- تقدير المركبات الفعالة حيوياً لأوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة..... 38

2-2-3-1- تقدير الفينولات الكلية..... 38

2-2-3-2- تقدير النشاط المضاد للأكسدة بطريقة (1-1-picryl hydrazyl-2 diphenyl) DPPH..... 39

2-2-4- استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا الجافة..... 39

2-2-4-1- تحضير المستخلصات.....39

2-2-4-2- تقدير رقم pH 40

2-2-4-3- تقدير المواد الصلبة الذائبة (TSS) 40

2-2-5- طرائق تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد.....40

2-2-5-1- تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد بالطريقة اللونية..... 40

2-2-5-2- تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) 41

2-2-6- تقييم طرائق تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد 42

2-2-6-1- تقدير الخطية..... 42

2-2-6-1-1- تحضير المنحنى المعياري لجلكوزيد الإستيفوزيد بالطريقة اللونية 42

2-2-6-1-2- تحضير المنحنى المعياري لجلكوزيد الإستيفوزيد بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عاليةالأداء(HPLC).....43

2-2-7- تقدير درجة الحلاوة 43

2-2-8- تصنيع بسكويت الشوفان المحلى بالستيفيا..... 43

2-2-9- الاختبارات الفيزيائية للبسكويت 44
2-2-9-1- قطر البسكويت..... 44
2-2-9-2- ثخانة البسكويت..... 44
2-2-9-3- معدل التمدد.....44
2-2-10- الاختبارات الكيميائية للبسكويت..... 45
2-2-10-1- تقدير محتوى الرطوبة..... 45
2-2-10-2- تقدير محتوى الرماد..... 45
2-2-11- الاختبارات الحسية للبسكويت 45
2-3- تصميم التجربة والتحليل الإحصائي..... 46
2-3-1- تصميم التجربة لدراسة أفضل ظروف استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد 46
2-3-2- التحليل الإحصائي..... 47
2-3-2-1- التحليل الإحصائي لأفضل ظروف استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد 47
2-3-2-2- التحليل الإحصائي للمؤشرات الفيزيو كيميائية والتقييم الحسي لعينات البسكويت المدروسة..... 48
3- النتائج والمناقشة 50
3-1- التركيب الكيميائي لأوراق الستيفيا الجافة 50
3-2- الخصائص الفعالة حيوياً لأوراق الستيفيا الجافة..... 52
3-2-1- المحتوى من الفينولات الكلية.....52
3-2-2- النشاط المضاد للأكسدة..... 53
3-3- تقييم طرائق التقدير..... 54
3-3-1- الخطية..... 54

3-4- تأثير نوع المذيب في استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات الستيفيا ريبوديانا 55

3-5- تأثير ظروف الاستخلاص المدروسة في كمية جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة من أوراق الستيفيا ريبوديانا 56

3-5-1- المستخلصات المائية..... 56

3-5-2- المستخلصات الكحولية (الإيثانول 80%)..... 60

3-5-3- المستخلصات الكحولية (الإيثانول المطلق)..... 63

3-6- تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) 66

3-7- تقدير درجة حلاوة المستخلص المائي 70

3-8- المؤشرات الفيزيو كيميائية لعينات البسكويت المدروسة 71

3-9- التقييم الحسي لبسكويت الشوفان المحلى بالستيفيا والبسكويت العادي 71

4- الاستنتاجات والتوصيات..... 74

5- المراجع.....

Abstract.....

قائمة الجداول

الجدول (1) التركيب الكيميائي لجلكوزيدات الستيفول الموجودة في الستيفيا ريبوديانا 11

الجدول (2) قوة تحلية جلكوزيدات الستيفول مقارنة بالسكروز 13

الجدول (3) مكونات تصنيع بسكويت الشوفان 44

الجدول (4) الخصائص النوعية للبسكويت..... 46

الجدول (5) مستويات المتغيرات المستخدمة في استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد لكل مذيب .. 46

الجدول (6) تصميم التجربة لأمثلة استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد..... 47

الجدول (7) المكونات الحلوة لأوراق الستيفيا الجافة 52

الجدول (8) المركبات الفعالة حيوياً في أوراق الستيفيا الجافة 53

الجدول (9) المؤشرات الكيميائية لمستخلصات جلكوزيد الإستيفوزيد وفق ظروف الاستخلاص المدروسة باستعمال الماء 57

الجدول (10) تأثير العوامل المدروسة في استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات الستيفيا ريبوديانا باستعمال الماء إحصائياً 58

الجدول (11) المؤشرات الكيميائية لمستخلصات جلكوزيد الإستيفوزيد وفق ظروف الاستخلاص المدروسة باستعمال الإيثانول 80%..... 61

الجدول (12) تأثير العوامل المدروسة في استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات الستيفيا ريبوديانا باستعمال الإيثانول80% إحصائياً 62

الجدول (13) المؤشرات الكيميائية لمستخلصات جلكوزيد الإستيفوزيد وفق ظروف الاستخلاص المدروسة باستعمال الإيثانول المطلق..... 64

الجدول (14) تأثير العوامل المدروسة في استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات الستيفيا ريبوديانا باستعمال الإيثانول المطلق إحصائياً 65
الجدول (15) تحليل جلكوزيد الإستيفوزيد بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) بالمقارنة مع الطريقة اللونية في المستخلصات المدروسة..... 68
الجدول (16) تقدير درجة حلاوة المستلخص المائي لأوراق الستيفيا المقابل لتركيز 10% سكروز 70
الجدول (17) المؤشرات الفيزيوكيميائية لعينات البسكويت المدروسة..... 71
الجدول (18) التقييم الحسي لبسكويت الشوفان المحلى بالستيفيا والبسكويت العادي..... 73

قائمة الأشكال

الشكل (1) الصيغة الكيميائية لجلكوزيدات الستيفول Glycoside Steviol 10

الشكل (2) الصيغة الكيميائية لجلكوزيد الإستيفوزيد..... 11

الشكل (3) المنحنى القياسي لتقدير الغلوكوز 41

الشكل (4) التركيب الكيميائي لأوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة..... 51

الشكل (5) المنحنى القياسي لجلكوزيد الإستيفوزيد المقدر بالطريقة اللونية 54

الشكل (6) المنحنى القياسي لجلكوزيد الإستيفوزيد المقدر بطريقة HPLC 55

الشكل (7) كمية جلكوزيد الإستيفوزيد في أوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة 56

الشكل (8) الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد في الماء 59

الشكل (9) تأثير درجة الحرارة والزمن في تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة في الماء 60

الشكل (10) الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد في الإيثانول 80% 62

الشكل (11): تأثير درجة الحرارة والزمن في تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة في الإيثانول 80%..... 63

الشكل (12): الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد في الإيثانول المطلق 65

الشكل (13): تأثير درجة الحرارة والزمن في تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة في الإيثانول المطلق 66

الشكل (14) كروماتوغرام جلكوزيد الإستيفوزيد المقدر بطريقة HPLC..... 68

الشكل (15) كروماتوغرام جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلص المائي لأوراق الستيفيا المقدر بطريقة HPLC 69

الشكل (16) كروماتوغرام جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلص الإيثانول 80% لأوراق الستيفيا المقدر بطريقة HPLC.....69
الشكل (17) كروماتوغرام جلكوزيد الإستيفوزيد في مستخلص الإيثانول المطلق لأوراق الستيفيا المقدر بطريقة HPLC.....70
الشكل (18) بسكويت الشوفان المحلى بالسكروز والستيفيا.....73
الشكل (19) التقييم الحسي لبسكويت الشوفان المحلى بالسكروز والستيفيا.....73

قائمة المصطلحات

الاختصار	In English	المعنى العربي
AACC	American Association of Cereal of Chemistry	الرابطة الأمريكية لكيمياء الحبوب
ADI	Acceptable Daily Intake	الكمية المسموح بتناولها يومياً
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	الرابطة الأمريكية للكيمياء التحليلية
CO_2	Carbon Dioxide	غاز ثاني أوكسيد الكربون
EFSA	European Food Safety Authority	هيئة سلامة الأغذية الأوربية
FDA	Food and Drug Administration	إدارة الغذاء والدواء الأمريكية
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	تحويل فوربيه للأشعة تحت الحمراء
GRAS	General Recognized as Safe	معترف به آمن بشكل عام
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء
MS-UHPLC	two different ultra-high-methods with electrospray ionization mass performance liquid chromatography spectrometry	طرق كروموتوغرافيا السائل شديد ارتفاع الدقة الملحق (المرتبط) بمطياف الكتلة الموزع للإلكترونيات المؤينة
NF	Nano filtration membrane	الترشيح الغشائي النانوي
NIRS	Near Infrared Spectroscopy	التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء القريبة
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	الرنين المغناطيسي النووي
RF	Retention Factor	عامل الإعاقة
RP-HPLC	Reversed Phase- High Performance Liquid Chromatography	الطور المعكوس– الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء
RT	Retention Time	زمن البقاء
SCFE	super critical fluid extraction	الاستخلاص بطريقة السائل فوق الحرج
SPE	Soild- Phase Extration	الاستخلاص بالطور الصلب

TLC	Thin Layer chromatography	كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة
WHO	World Health Organization	منظمة الصحة العالمية
HPLC-PDA	High Performance Liquid Chromatography -The photo diode array	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء– باستخدام كاشف الصمام ثنائي الصور

الملخص:

أُجريت هذه الدراسة في مخابر قسم علوم الأغذية –كلية الزراعة– جامعة دمشق ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية– وزارة التعليم العالي في عام 2020–2022م. هدف هذا البحث إلى تحديد التركيب الكيميائي والخصائص الفعالة حيوياً لأوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة المزروعة في كلية الزراعة– جامعة دمشق، وتحديد الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد منها باستخدام ثلاثة أنواع من المذيبات (الماء–الإيثانول المطلق– الإيثانول 80%) عند مستويات مختلفة من درجات الحرارة (30-60-90 مْ)، والزمن (30-60-90 دقيقة) باستخدام التصميم الإحصائي Response Surface Methology(RSM). أظهرت النتائج بأنّ محتوى الأوراق الجافة من الرطوبة، والبروتين، والرماد، والدهن كان 10.11%،11.81%، 14.55%، 4.54%على التوالي. شكلت الكربوهيدرات الكلية المحتوى الأعلى بين المكونات الأساسية لأوراق الستيفيا الجافة (52.61%)، وكانت نسبة الكربوهيدرات الكلية الذائبة، والسكريات المختزلة، والسكريات غير المختزلة، والألياف 16.35%، 5.44%، 10.91%، 16.5% على التوالي. بلغت الطاقة الكلية للأوراق الجافة 298.54 كيلوكالوري/100غ. أما بالنسبة لمحتوى الأوراق من الفينولات الكلية فكانت 3275 مغ مكافئ حمض غاليك/ 100غ، والنشاط الكابح للجذور الحرة المقدر وفق الطريقة اللونية (DPPH) 86.97%. أظهرت نتائج الأمثلة أنّ أفضل مذيب لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا ريبوديانا بالطريقة اللونية كان باستعمال الماء، وأن أفضل مردود لهذا الجلكوزيد كان عند درجة حرارة 90 مْ، وزمن 30 د، بتركيز أعظمي (12.83%). بالمقابل أعطى مستخلص الإيثانول المطلق أعلى تركيز لجلكوزيد الإستيفوزيد (6.6%) بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC). طُبق المستخلص المائي لأوراق الستيفيا في تصنيع بسكويت الشوفان منخفض السعرات الحرارية، وأظهرت النتائج أن إضافة المستخلص المائي للستيفيا إلى

بسكويت الشوفان منخفض السعرات الحرارية لم يؤثر بشكل معنوي في المؤشرات الفيزيو–كيميائية للبسكويت، في حين كان له تأثير معنوي في المؤشرات الحسية (اللون و المظهر) وقد حصلت عينة بسكويت الشوفان المحلى بالستيفيا على أعلى تقييم بالنسبة للقوام والطعم والنكهة والطراوة مقارنةً بالبسكويت العادي.

الكلمات المفتاحية: *Stevia rebaudiana*(bertoni)، جلكوزيد الإستيفوزيد، أمثلة ظروف الاستخلاص، المطياف الضوئي، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداءHPLC، بسكويت الشوفان منخفض السعرات الحرارية.

الجزء التمهيدي

المقدمة (Introduction):

ازداد الطلب في السنوات الأخيرة على المحليات الطبيعية بديلة المحليات الصناعية، نظراً للمشاكل الصحية المرتبطة بالمحليات الصناعية، وعرفت أهمية نبات الستيفيا منذ 1887م وهو نبات عشبي معمر. تعدّ أمريكا اللاتينية المنشأ الأصلي لنبات الستيفيا، وهو يزرع في أنحاء متفرقة من العالم، وتعود الحلاوة في هذا النبات إلى وجود جلكوزيدات الستيفول ثنائية التربين و التي من أهمها جلكوزيد الإستيفوزيد. يتراوح محتوى أوراق الستيفيا الجافة من جلكوزيد الإستيفوزيد بين 4 و13%، وهو الجلكوزيد الأساسي في الأوراق، ويتميز جلكوزيد الإستيفوزيد بقابليته للذوبان في الماء وقوة تحلية عالية تتراوح من 100 إلى 300 مرة مقارنةً بالسكروز. إضافةً إلى أن قيمة الستيفيا والجلكوزيدات الخاصة بها كمُحليات، تمتلك تأثيرات علاجية ضد العديد من الأمراض مثل السرطان والسكري والالتهابات والتليف الكيسي والسمنة وتسوس الأسنان، عدّت هيئة سلامة الأغذية الأوربية (EFSA) جلوكوزيد الستيفول آمناً وبيّنت أن الكمية المسموح بتناولها يومياً (ADI) منه هي 4 مغ/كغ وزن جسم/ باليوم. تعد أوراق الستيفيا من المصادر الغنية بالعناصر الغذائية ومنها الريبوفلافين والمغنزيوم والزنك والكروم والسيلنيوم والكالسيوم والفوسفور والتي لها دور في تقليل ضغط الدم، كما تحتوي أوراق الستيفيا على مركبات البولي فينول التي لها خصائص مضادة للأكسدة مثل الفلافونيدات، الزانتوفيلات، أحماض هيدروكسي سينناميك. يختلف التركيب الكيميائي لنبات الستيفيا باختلاف منطقة الزراعة ونوع التربة والصنف المزروع ، كما تتأثر كفاءة استخلاص الجلكوزيدات المحلية من أوراق الستيفيا بعوامل عدة من أهمها: نوع المذيب ودرجة حرارة الاستخلاص والزمن في كمية الجلكوزيدات المستخلصة، كذلك فإن نسبة المذيب إلى الأوراق تعد عاملاً مؤثراً في كفاءة الاستخلاص، وإن إيجاد طرائق بسيطة وغير مكلفة لتقدير كمية هذه الجلكوزيدات يعد من الأمور المهمة في توفير تكاليف التحليل، ومن الطرائق المستعملة في تحديد تركيز الجلكوزيدات في الستيفيا الطرائق اللونية المطيافية

الضوئية (Spectrophotometer UV-VIS) والكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC. من جهة أخرى تستخدم مستخلصات الستيفيا كبديل عن السكر في العديد من المنتجات الغذائية كالبسكويت منخفض السعرات الحرارية، وهذا يؤثر في الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمنتجات فضلاً عن تقديم فوائد صحية للمستهلكين.

ركز البحث **في الفصل الأول** على أهمية نبات الستيفيا وفوائده الصحية والطبية والتصنعية وعملية استخلاص جلكوزيدات الإستيفوزيد باستعمال أنواع مختلفة من المذيبات لزيادة تركيزها، كما عرض الطرائق المتنوعة لتقدير هذه الجلكوزيدات والكشف عنها وعن تطبيقاتها في مجال التصنيع الغذائي. لتحقيق هذا الهدف تم في **الفصل الثاني** من البحث تقدير التركيب الكيميائي لأوراق نبات الستيفيا ودرس أمثل ظروف استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد وتقييم طرائق الكشف عنها. ثم طبق االمستخلص الأعلى في محتواه من الجلكوزيد في تصنيع بسكويت الشوفان منخفض السعرات الحرارية ودُرس تأثير الإضافة في الخصائص الفيزيوكيميائية والخصائص الحسية. وبينت أهم النتائج في **الفصل الثالث** أن أوراق الستيفيا الجافة المزروعة في كلية الزراعة– جامعة دمشق ذات تركيب كيميائي مشابه للستيفيا المزروعة في العديد من الدول المجاورة ولا سيما مصر، وأن محتواها عالٍ من المحلي الطبيعي جلكوزيد الإستيفوزيد ومن المركبات الفينولية الفعالة حيوياً، وذات نشاط عالٍ لمضادات الأكسدة، كما عُرض تأثير نوع المذيب ودرجة الحرارة والزمن المستخدم في كفاءة عملية الاستخلاص إذ كانت الظروف المثلى للحصول على أعلى كفاءة استخلاص لجلكوزيد الإستيفوزيد عند درجة حرارة 90مْ وزمن 30 دقيقة باستعمال الماء، و30 دقيقة للإيثانول المطلق و 50 دقيقة للإيثانول 80%. إضافةً إلى ذلك تمتع بسكويت الشوفان المحلى بالستيفيا بخصائص فيزيوكيميائية مشابهة للبسكويت العادي، وتفوق عليه في بعض الخصائص الحسية.

أوضح **الفصل الرابع** أهم الاستنتاجات والتوصيات التي توصلنا إليها في هذه الدراسة من حيث التركيب الكيميائي لأوراق الستيفيا وبعض الخصائص الفعالة حيوياً، وتأثير ظروف الاستخلاص على كفاءة الاستخلاص، وأفضل طرائق تقدير ونتائج تطبيق الستيفيا في البسكويت.

ذكر في **الفصل الخامس** المراجع التي تم استخدمت في البحث.

تساؤلات البحث

ماهو التركيب الكيميائي لأوراق الستيفيا المزروعة في سورية؟

مامدى اختلاف تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد باختلاف طريقة التقدير؟

هل يؤثر نوع المذيب ودرجة الحرارة والزمن في كفاءة استخلاص جلكوزيدات الإستيفوزيد؟

ماهي أفضل ظروف لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات الستيفيا؟

ما تأثير إضافة مستخلص نبات الستيفيا كبديل للسكروز على الخصائص الفيزيوكيميائية والحسية في بسكويت الشوفان؟

فرضيات البحث

هل هناك فروقات ذات دلالة إحصائية عند مستوى الدلالة (5%) على المؤشرات الكيميائية من حيث (كمية جلكوزيد الإستيفوزيد، تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية TSS، pH) لظروف الاستخلاص (درجة الحرارة، الزمن) باستعمال ثلاثة أنواع من المذيبات (الماء، الإيثانول المطلق، الإيثانول 80%).

هل هناك تأثير معنوي لإضافة مستخلص نبات الستيفيا كبديل عن السكروز في الخصائص الفيزيوكيميائية والحسية لبسكويت الشوفان منخفض السعرات الحرارية.

مبررات البحث وأهدافه

يعد السكر المصدر الرئيسي للطاقة في جسم الإنسان، ونظراً لتزايد استهلاك السكريات وارتباطها بالعديد من المشاكل الصحية كالسمنة وأمراض السكري والقلب كان لابد من إيجاد بديل طبيعي للسكر، منخفض السعرات الحرارية، ذات قيمة غذائية عالية ويمكن استخدامه في الغذاء لسد احتياجات المستهلكين، كما أن المحليات يجب أن تستوفي الشروط المرتبطة بالحالة غير السامة. ويعد جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلص من نبات الستيفيا أحد المُحليات الطبيعية التي تتميز بقدرتها العالية على التحلية واستخداماتها الآمنة، ونظراً للاهتمام حالياً بزراعة الستيفيا في الجمهورية العربية السورية في العديد من المراكز البحثية الذي يعد أحد البدائل الطبيعية للسكروز، وعدم وجود دراسة سابقة لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات الستيفيا وتطبيقه في بسكويت الشوفان كبديل عن السكروز في سوريا فقد هدف البحث إلى:

- دراسة التركيب الكيميائي لأوراق الستيفيا ريبوديانا والخصائص الفعالة حيوياً الموجود في الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق.
- تحديد أفضل ظروف الاستخلاص لجلكوزيد الإستيفوزيد من حيث (الزمن، درجة الحرارة، نوع المذيب) وتقييم طرائق تقديرها.
- تطبيق مستخلص الستيفيا في بسكويت الشوفان ودراسة المؤشرات الفيزيوكيميائية والحسية للبسكويت.

الفصل الأول

الدراسة المرجعية

Review of Literature

1-الدراسة المرجعية (Review of Literature):

1-1-المُحليات (Sweeteners):

تعد المواد الغذائية ذات المذاق الحلو جزءاً أساسياً في النظام الغذائي للإنسان، وقد أدى التقدم في تكنولوجيا الأغذية إلى زيادة استخدام المُحليات من قبل مصنعي الأغذية، وهذا زاد الإنتاج العالمي للسكريات من 8 مليون طناً في عام 1900 إلى 70 مليون طناً في عام 1970 وإلى 128.8 مليون في عام 1998 (Anon, 1998). صنفت المحليات وفق Hyvnen (1990) إلى محليات مغذية ومحليات غير مغذية والتي تستخدم كبديل عن السكر في الغذاء. في حين بيّن James (1993) أن المُحليات تقسم إلى نوعين: مُحليات عالية السعرات الحرارية ومُحليات عديمة السعرات الحرارية، وهي أي مُحلٍ يفوق درجة حلاوته 30 مرة حلاوة السكروز. كما صنف Anonymous (1998) المُحليات إلى نوعين مغذية وغير مغذية بناءً على كمية الطاقة التي توفرها هذه المُحليات.

1-1-1-المُحليات المغذية (عالية السعرات الحرارية) Nutritive sweeteners:

يضم هذا النوع من المُحليات: شراب الذرة عالي الفركتوز، والجلوكوز، والعسل، واللاكتوز، والمالتوز، والسكر المحول، وشراب البلح، والمولاس، وعصائر الفاكهة المركزة، والسكريات الكحولية (الزيلتول . السوربيتول . المانيتول . لاكتيتول) جميع هذه المُحليات تمد الجسم بالطاقة إذ إن استخدام 1 غرام منها يعطي 4 سعرات حرارية، ومن المعروف أن الاستهلاك المفرط للسكريات له تأثير سلبي على صحة الإنسان، ولاسيما زيادة خطر الإصابة بالسمنة ومرض السكري من النوع الثاني وأمراض القلب والأوعية الدموية (Luger *et al.*, 2017). ولهذا فقد أوصت منظمة الصحة العالمية أنه لا ينبغي أن تتجاوز الكمية المتناولة من المحليات عالية السعرات الحرارية 5% من إجمالي الطاقة الكلية (WHO, 2015). على الرغم من ذلك هناك تجاوز لهذه الإرشادات في العديد من البلدان في الكمية المتناولة من المحليات عالية السعرات الحرارية على سبيل المثال،

التقديرات العالمية للأطفال والمراهقين تشير إلى أن متوسط مدخول المحليات عالية السعرات الحرارية بلغ من 12 إلى 14% من الطاقة الكلية في النظام الغذائي (Walton *et al.*, 2021).

1-1-2-المُحليات غير المغذية (عديمة السعرات الحرارية) Non-nutritive sweeteners:

المُحليات منخفضة السعرات الحرارية (يُشار إليها أيضاً باسم المُحليات عالية الكثافة أو المُحليات عالية الفاعلية) وهي نوعان: إما مُحليات طبيعية أو صناعية تتميز بأنها توفر طعماً حلواً يفوق الطعم الحلو للسكروز بأضعاف عدة وبأقل قدر ممكن من السعرات الحرارية. تزايد استخدام هذا النوع من المُحليات في الأغذية كاستراتيجية للحد من المحليات عالية السعرات الحرارية (Gallagher *et al.*, 2021). إذ بلغت الكمية المستهلكة المعلنة من هذه المُحليات 50% من الطلب العالمي (Anonymous, 1998) كما تُعدّ هذه المُحليات من أكثر السلع رواجاً في الأسواق، فهي تستخدم كمواد مضافة للأغذية في مجال الصناعات الغذائية، ولمتبعي الحميات الغذائية لسهولة التحكم في السعرات الحرارية وتحقيق الأهداف الغذائية، أو كبرتوكول لعلاج حالات مزمنة مثل داء السكري أو لمنع تسوس الأسنان، ومن هذه المُحليات الأسبارتام وهو عبارة عن أستر الميثيل لثنائي الببتيد للحمض الأميني الطبيعي L- حمض الإسبارتك وL – فينيل ألانين(Ashwell *et al.*, 2020) . إذ يُعدّ محُلياً صناعياً غير غذائي تعادل حلاوته من 160 إلى 220 مرة مقارنةً بالسكروز، كذلك يعد acesulfame-K محُلياً صناعياً لا يحدث له تمثيل غذائي في الجسم، وقد أشارت بعض الدراسات التغذوية إلى أنه آمن من الناحيتن الصحية والتغذوية إلا أن هناك دراسات أخرى بيّنت أنه قد يكون له تأثير مسرطن على حيوانات التجارب، كما أظهرت الدراسات أن الأشخاص الذين يتناولون المُحليات غير المغذية الصناعية قد يعرضون صحتهم للخطر لما ينتج عنها من مركبات لها تأثير تراكمي خطير على مدى بعيد (FDA, 2007) لأنها تُمتص بشكل سريع ويتم طرحها خارج الجسم ببطء. لذا

تم الاتجاه إلى المُحليات الطبيعية كجلكوزيد الإستيفوزيد الذي يستخلص من نبات الستيفيا، ويتميز بدرجة تحلية من 100 إلى300 مرة مقارنةً بالسكروز (Momtazi-Borojeni *et al*., 2017).

1-2-الستيفيا كمحلٍ طبيعي:

1-2-1-الوصف النباتي للستيفيا: تعرّف الستيفيا بأنها نبات عشبي معمر يصل ارتفاعها لـ 1 متر (Mishra *et al.*, 2010)، وهي متفرعة بكثرة بأوراق متزاوجة صغيرة، أوراقه خضراء لاطئة إهليلجية صغيرة من 2 إلى 4 سم حادة الرأس مسننة الحواف، السطح العلوي للورقة ملتحم قليل الحبيبات (Singh and Rao, 2005)، الجذع خشبي واسع الانتشار، ساقه ضعيفة هشة ملتحمة من الأسفل بالجذر، أزهارها بيضاء مع لون إرجواني شاحب خماسية وصغيرة، تُحمل الأزهار البيضاء على عناقيد مفككة من 2-6 أزهار (Blumenthal, 1996)، يُعدّ نبات الستيفيا من النبات الزهرية منفصلة الجنس غير قادرة على تلقيح نفسها ولا عن طريق الحشرات (Oddone, 1997).

1-2-2-التصنيف العلمي لنبات الستيفيا:

ينتمي نبات الستيفيا إلى العائلة Asteraceae عائلة عباد الشمس والجنس stevia. له أكثر من 200 نوعاً آخر من عائلة هذا النبات من الأعشاب والشجيرات (Mishra *et al.*, 2010). قام العالم السويسري Moisés Santiago Bertoni في عام 1899 لأول مرة بتوصيف نبات الستيفيا بشكل دقيق ومميز، إذ كان تسمية نبات الستيفيا في البداية Eupatorium rebaudianum وغّيره العالم Bertoni في عام 1905م إلى *S. rebaudiana* (Bertoni).

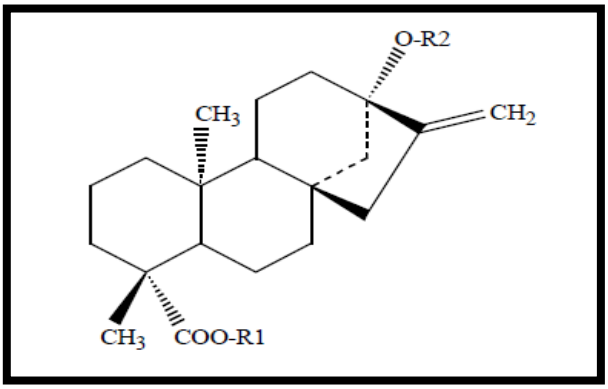
1-2-3-الدول المنتجة لنبات الستيفيا:

يُزرع نبات الستيفيا كشجيرة معمرة في المناطق شبه الاستوائية، وتعرف منطقة Amambay الكائنة في الشمال الشرقي للباراغوي بأنها المنشأ الأصلي لنبات الستيفيا (Soejarto *et al.*, 2002). كما تنتشر زراعته في بلاد مختلفة بحسب الغرض من زراعته (Sharma, 2007)، فمنها من يقوم بزراعته لأغراض تجارية ومن أجل إجراء بحوث زراعية وغير زراعية، ومنه من يكتفي بزراعته لسد احتياجاته الشخصية:

- الدول المصدرة لنبات الستيفيا: تعد الصين المنتج الأول لنبات الستيفيا (Sharma, 2007) إذ بلغت المساحة المزروعة من هذا النبات تقريباً 13400 هكتاراً، كما بلغت كمية الإنتاج من أوراق الستيفيا الخضراء تقريباً 40 ألف طن/ يوم، ومن ثم تُعدّ الصين أكبر مصدر لجلكوزيد الإستيفوزيد في العالم، إضافةً إلى أوكرانيا.
- الدول المنتجة لنبات الستيفيا لأغراض بحثية: تعد إيطاليا، اسبانيا، ألمانيا، أوكرانيا، السويد، والفلبين وكندا وولاية كاليفورنيا وأمريكا الجنوبية من أهم الدول التي أجرت العديد من الأبحاث على نبات الستيفيا(Sivaram and Mukundam, 2003).

1-2-4-المركبات المسؤولة عن الطعم الحلو في نبات الستيفيا:

استخدمت أوراق نبات الستيفيا تقليدياً منذ عشرات السنين لتحلية الشاي، وقد أطلقوا عليه تسميات عدة كورقة العسل، ورقة الحلو، والعشب الحلو (Carakostas *et al.*, 2008)، وهذا يعود إلى وجود المركبات المسؤولة عن الطعم الحلو وهي جلكوزيدات الستيفول (Brandle and Telmer, 2007)، والتي لها الصيغة المشتركة الموضحة في الشكل (1).



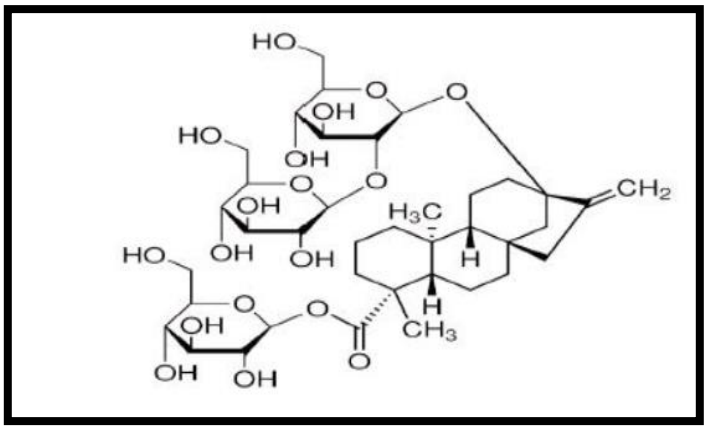
الشكل (1) الصيغة الكيميائية لجلكوزيدات الستيفول Glycoside Steviol (FAO, 2004)

تحتوي أوراق الستيفيا على ثمانية أنواع من الجلكوزيدات هي (A, B, C, D, E) rebaudiosides، كل هذه الجلكوزيدات لها تركيب (Dossier, 1999) stevioside, dulcoside, steviolbioside الجزيء نفسه الأهم وهو (Steviol)، ويعود الاختلاف بينها إلى تركيب الجذور R1, R2 (الجدول 1). وقد بيّن (Momtazi-Borojeni *et al.*, 2017) أن جلكوزيد الإستيفوزيد هو الجلكوزيد الأساسي الموجود في الأوراق الجافة لنبات الستيفيا ويتراوح محتواه بين 4 و 13%، كما يتراوح محتوى أوراق الستيفيا الجافة من جلكوزيد rebaudioside A بين 2 و 4%، وجلكوزيد rebaudioside C بين 1 و 2%، أما جلكوزيد dulcoside فلا تزيد نسبته عن (0.2%) من إجمالي الوزن الجاف، وتشكل باقي الجلكوزيدات حوالي (0.04%) من إجمالي الوزن الجاف (Makapugay *et al.*, 1984).

الجدول (1) التركيب الكيميائي لجلكوزيدات الستيفول الموجودة في الستيفيا ريبوديانا (Jaroslav *et al.*, 2007).

Compound	R_1	R_2
Steviol	H	H
Steviolbioside	H	β-Glc-β-Glc(2-1)
Stevioside	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2−1)
Rebaudioside A	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2−1) β-Glc(3−1)
Rebaudioside B	H	β-Glc-β-Glc(2−1) β-Glc(3−1)
Rebaudioside C	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2−1) β-Glc(3−1)
Rebaudioside D	β-Glc-β-Glc(2−1)	β-Glc-β-Glc(2−1) β-Glc(3−1)
Rebaudioside E	β-Glc-β-Glc(2−1)	β-Glc-β-Glc(2−1)
Rebaudioside F	β-Glc	β-Glc-β-Xyl(2−1) β-Glc(3−1)
Dulcoside A	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2−1)

تم معرفة التركيب الكيميائي لجلكوزيد الإستيفوزيد في عام 1952م وهو عبارة عن جلكوزيد ثنائي التربين يتكون من ثلاثة جزئيات من الجلوكوز مرتبطة بالأجليكون aglycone (كحول كربوكسي ثنائي التربين) كما هو موضح في الشكل (2).



الشكل (2) الصيغة الكيميائية لجلكوزيد الإستيفوزيد (Abou-Arab *et al.*, 2010).

1-2-5-الخصائص الفيزيائية لجلكوزيدات الستيفول:

- **الذوبانية:** تعتبر جلكوزيدات الـ Steviol مشتقات عضوية تحتوي على مجموعات محبة للماء (جلكوزيد) ومجموعات كارهة للماء (ثنائي التربين) (Upreti *et al.*, 2011). قام (Celaya *et al.*, 2016) بدراسة ذوبانية جلكوزيد الستيفول في عدة مذيبات (الماء المطلق،الإيثانول 30%، الإيثانول 70%) ضمن درجات حرارة تتراوح من (5 إلى 50مْ) وبين أن أعلى ذوبانية لجلكوزيد الستيفول كانت باستعمال الإيثانول 30% وقد يعود ذلك إلى وجود مجموعة (ثنائي التربين) الكارهة للماء القابلة للذوبان في الإيثانول. في حين وصفت العديد من الدراسات قدرة جلكوزيد السيتفول بقابليته للذوبان في الماء على نحو يهيئ المجال لعمليات الخلط والمزج والإضافة مع المواد الأخرى (Abou-Arab *et al.*, 2010).
- **الثباتية الحرارية:** تتميز جلكوزيدات الستيفول بالثبات الحراري Heat stability، فهي تظل محافظة على خصائصها عند تعرضها للحرارة العالية أثناء الطهي والخبز والبسترة ونحوها و ضمن مجال واسع من درجات الحموضة pH التي تتراوح بين 3 و 9 (Buckenhuskers and Omran, 1997). قام (Clos *et al.*, 2008) بدراسة الثبات الحراري لجلكوزيد الإستيفوزيد في المشروبات وعدد من الأغذية وبين عدم وجود أي نواتج تحلل لهذا المركب في الأغذية المدروسة . كما أكد (Chang and cook, 1983) أن جلكوزيدات الستيفول تتمتع بثبات حراري عالٍ حتى بعد مرور ساعة من عملية التسخين عند درجة حرارة 100مْ. ومن ناحية أخرى وضّح (Abou-Arab *et al.*, 2010) أن جلكوزيدات stevioside و rebaudioside A لا تتكرمل في أثناء المعاملات الحرارية المستعملة في تصنيع الأغذية وهذا يساعد في إضافة نبات الستيفيا في المشروبات الساخنة والمعجنات والحلويات من دون أن يفقدها خصائصها.

- **الحلاوة:** يتميز جلكوزيد الـ Steviol بقوة تحلية عالية، ويوضح الجدول (2) مقدار قوة تحلية جلكوزيدات الستيفول مقارنة بالسكروز.

الجدول (2) قوة تحلية جلكوزيدات الستيفول مقارنة بالسكروز (Koyama *et al.*, 2003).

اسم المركب	قوة التحلية (مقارنة باللسكروز)
Dulcoside A	50- 120 مرة
Rebaudioside A	250-450 مرة
Rebaudioside B	300-350 مرة
Rebaudioside C	50- 120 مرة
Rebaudioside D	250- 450 مرة
Rebaudioside E	150- 300 مرة
Steviobioside	100- 125 مرة
Stevioside	150- 300 مرة

1-2-6-التركيب الكيميائي لأوراق الستيفيا:

يختلف التركيب الكيميائي لأوراق الستيفيا باختلاف الظروف البيئية ونوع التربة والصنف المزروع وتحتوي أوراقه الجافة على المكونات الأساسية التالية :

- الرطوبة: بيّن (Ahsan *et al.*, 2020) أن محتوى الرطوبة في أوراق الستيفيا الجافة 6.7%. في حين بلغ محتوى الرطوبة في أوراق الستيفيا الجافة 5.37% (Abou-Arab *et al.*, 2010)؛ كما تراوح محتوى الرطوبة في أوراق الستيفيا الجافة من 6.32% إلى 10.73% (Shuvo *et al.*, 2015)؛ Gasmalla *et al.*, 2014).
- الكربوهيدرات: أشار (Marcinek and Krejpcio, 2015) إلى أن محتوى أوراق الستيفيا من الكربوهيدرات الكلية يتراوح من 35.2 إلى 61.9% ، وفي دراسة لـ (Ahsan *et al.*, 2020) بلغت الكربوهيدرات في أوراق الستيفيا الجافة 30.4 %، في حين وصلت إلى 52.61% في الدراسة التي أجرتها (Galal, 2002).

من جهة أخرى، بلغ محتوى أوراق الستيفيا من السكريات المختزلة وغير المختزلة 5.88%، 9.77% على التوالي (Abou-Arab *et al.*, 2010) و 6.43%، 10.13% على التوالي في الدراسة التي أجريت من قبل (Galal, 2002)، في حين بلغ محتوى أوراق الستيفيا من السكريات المختزلة في الدراسة التي أجراها (Gasmalla *et al.*, 2014) 4.5%. حددت (Galal, 2002) نوع السكريات الموجودة في أوراق الستيفيا الجافة بطريقة HPLC وبينت وجود كل من السكروز، الغلوكوز، الفركتوز،(stachyose+reffinose)، حمض الغالاكتورونيك بنسب بلغت 2.81%، 5.94%، 0.91%، 1.87%، 3.45% على التوالي.

- الألياف الخام: تحتوي أوراق الستيفيا على نسبة جيدة من الألياف الخام وقد بين (Marcinek and Krejpcio, 2015) إلى أنها تتراوح من 15 إلى 18.5%، في حين بلغ محتوى أوراق الستيفيا من الألياف الخام في دراسة لـ (Gasmalla *et al.*, 2014) 5.03% و 14.89% في الدراسة التي أجراها (Ahsan *et al.*, 2020).
- البروتينات: يتراوح محتوى أوراق الستيفيا من البروتين بين 9.8 و 20.4% (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012) وتعدّ الستيفيا مصدراً جيداً للأحماض الأمينية إذ تحتوي أوراقها على جميع الأحماض الأمينية الأساسية تقريباً بما في ذلك الثيرونين والسيسئين، في حين يعدّ التربتوفان فقط الحمض الأميني المفقود. درس (Abou-Arab *et al.*, 2010) سبع عشرة حمضاً أمينياً في أوراق الستيفيا وقاموا بتصنيفها إلى أحماض أمينية أساسية (الأرجينين، لايسين، هيستيدين، فينيل ألانين، لوسين، ميثونين، فالين، ثيرونين، إيزو لوسين) وأحماض أمينية غير أساسية (الأسبارتيت، سيرين، غلوتامك، بروبلن، غلايسين، ألانين، السيستين، التيروسين)، في حين أشار (Li *et al.*, 2011) إلى أن العديد من الأحماض الأمينية موجودة في أوراق الستيفيا وتحتوي على نسبة عالية من الحمض الأميني الفالين.
- الدهون: أظهر (Marcinek and Krejpcio, 2015) أن محتوى أوراق الستيفيا من الدهون تتراوح من 1.9 إلى 5.6%، وقد حدد (Tadhani and Subhash, 2006) خمسة أنواع للأحماض الدهنية الموجودة

في أوراق الستيفيا وهي البالمتيك، البالميتوليك، الأوليك، اللينوليك واللينولينيك ، ووجد أن محتوى حمض البالمتيك كان الأعلى من بين الدهون المحددة.

- العناصر المعدنية والفيتامينات: تحتوي الستيفيا على العديد من العناصر المعدنية المهمة كالكالسيوم والمغنزيوم واليوتاسيوم والحديد والزنك والصوديوم (Choudhary and Bandyopadhyay, 1999). ويعد البوتاسيوم من أكثر المعادن الموجودة في الستيفيا إذ تتراوح نسبته من 839 إلى 2510 مغ/ 100غ (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). وكذلك عنصر الزنك الذي يعد مفيداً لتقوية الجهاز المناعي ضد الأمراض الخطيرة التي تهدد الجسم إذ بلغت نسبته 20 مغ/ 100غ (Atteh *et al.*, 2011) وعنصر الحديد الذي يُعدّ أساساً لتقوية الدم الذي بلغ نسبته في أوراق الستيفيا 55.3% (Mishra *et al.*, 2010) وهو يقي من الإصابة بالأنيميا من خلال رفع الهيموغلوبين في الدم وزيادة نسبة كريات الدم الحمراء في الجسم. حدد (Kim *et al.*, 2011) كمية الفيتامينات القابلة للذوبان في الماء لمستخلصات أوراق الستيفيا، إذ كانت مصدراً عالياً لحمض الفوليك (B9) الذي بلغ 52.18 مغ/ 100غ وفيتامين C الذي بلغ 14.98 مغ/ 100غ.
- المركبات الفعّالة حيوياً: تحتوي أوراق الستيفيا على مركبات البولي فينول التي لها خصائص مضادة للأكسدة مثل الفلافونيدات، الزانتوفيلات، أحماض هيدروكسي سيناميك، حمض الكلوروجينك (Tadhani *et al.*, 2007). قيس محتوى الفينولات الكلية لأوراق نبات الستيفيا، والنشاط المضاد للأكسدة في دراسات عدة منها (Tadhani *et al.* 2007) إذ كان محتوى الفينولات الكلية للأوراق 25 مغ/غ، في حين تراوح النشاط المضاد للأكسدة في الأوراق من 33.17% إلى 56.82%. وفي دراسة أخرى لـ (Shukla *et al.*, 2009) بلغ محتوى الفينولات الكلية والنشاط المضاد للأكسدة لأوراق الستيفيا الجافة 36.93 مغ/غ، 61.5% على التوالي.

1-2-7-الخصائص الوظيفية لأوراق الستيفيا:

تعرف الخصائص الوظيفية بأنها تلك الخصائص والصفات التكنولوجية المميزة لأوراق الستيفيا أثناء عمليات التصنيع و الحفظ و تشمل :

- الكثافة الظاهرية (Bulk density): هي خاصية المساحيق والحبيبات والمواد الصلبة. وهي نسبة كتلة المادة الصلبة من المادة بعد تجفيفها إلى حجمها الكلي بما في ذلك الفراغات. بلغت الكثافة الظاهرية لمسحوق أوراق الستيفيا 0.547 غ/ مل (Chughtai *et al.*, 2019)، وفي دراسة أخرى لـ (Mishra *et al.*, 2010) بلغت الكثافة الظاهرية لمسحوق أوراق الستيفيا 0.443 غ/ مل.
- القدرة على الاحتفاظ بالماء (Water holding capacity): نظراً لغنى أوراق الستيفيا بالبروتين والألياف فإنها تتميز بخاصية الاحتفاظ بالماء، وقد أشار (Savita *et al.*, 2004) إلى أن قدرة أوراق الستيفيا على الاحتفاظ بالماء بلغت 4.7 مل/ غ، في حين تراوحت قدرة الاحتفاظ بالماء لدى (Campos *et al.*, 2014) من 2.87 إلى 4.07 مل/ غ، وفي دراسة أخرى لـ (Chughtai *et al.*, 2019) بلغت قدرة أوراق الستيفيا على الاحتفاظ بالماء 3.93 مل/ غ.
- القدرة على امتصاص الدهون (Fat absorption capacity): يُظهر مسحوق أوراق نبات الستيفيا قدرة عالية على امتصاص الدهون. تراوحت قدرة أوراق الستيفيا على امتصاص الدهون في دراسة لـ (Campos *et al.*, 2014) من 6.49 إلى 6.79 مل/ غ، في حين بلغت قدرة امتصاص الدهون لمسحوق أوراق الستيفيا 5 مل/ غ وفق ماأشار إليه (Mishra *et al.*, 2010).
- التأثير المضاد للميكروبات: يمكن استعمال مسحوق أوراق نبات الستيفيا في التعليب المنزلي والصناعي لما له من خصائص مضادة للجراثيم فهي مادة حافظة جيدة. ويستعمل بديلاً جزئياً أو كلياً للسكر في عمليات تصنيع الغذاء كافة إذ تبين أن استبدال السكروز بالستيفيا في عملية التعليب يقلل من خطر تلف

المنتج من العفن والآفات البيولوجية الأخرى (Savita *et al.*, 2004)، وقد أظهر مستخلص الستيفيا نشاطاً مضاداً للبكتيريا التي تنقلها الأغذية بما في ذلك E. coli (Tomita *et al.*, 1997).

1-3-سلامة جلكوزيد الإستيفوزيد:

بعد أن حُظر المُحلي الصنعي السكرين في بداية السبعينيات عُرفت مُحليات نبات الستيفيا في العديد من دول العالم بعد أن اكتشفت في عام 1887م، وانتشرت ثقافة استهلاك الستيفيا في اليابان بوصفه محلياً طبيعياً في العديد من البلدان وإن لم يكن بالقدر الذي تم الإبلاغ عنه. عُرفت مكونات نبات الستيفيا بمذاق شبيه بعرق السوق وطعم حلو متبقٍ مما حد من تطورها التجاري. في السبعينيات والثمانينيات من القرن الماضي انتشر استعمال نبات الستيفيا كأعشاب في متاجر الأغذية الصحية في أمريكا الشمالية وأوربا. لم تسمح إدارة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA, 1995) باستخدام أوراق الستيفيا إلا بوصفه مكملاً غذائياً في الولايات المتحدة منذ إقرار قانون الصحة في عام 1994، وأصدرت إدارة الغذاء والدواء رسائل تحذيرية إلى مصنعي المواد الغذائية أعربت من خلالها عن مخاوفها بشأن الثغرات الموجودة في تقييم سلامة جلكوزيدات الستيفول المرتبط بشكل خاص بالتأثيرات الإنجابية والتحكم في نسبة السكر في الدم وهو أمر غير مسموح به بموجب قانون الصحة. اقترحت هيئة JECFA اليابانية إمكانية الاستخدام الآمن للستيفول بكمية 4 ملغ/ كغ من وزن الجسم كجرعة يومية مقبولة (ADI) والتي تعادل 10 ملغ /كغ من وزن الجسم من الإستيفوزيد، وسمح باستخدامه بوصفه مكملاً غذائياً في البرازيل، كوريا، اليابان وأمريكا، ولكن لم يتم الموافقة عليه في الاتحاد الأوربي وذلك لاعتبارات الآمان(JECFA, 2005)، إذ أثبت بعض الباحثين وجود تغيرات في التركيب التشريحي الخلوي في كبد الفئران التي تناولت جليكوزيد الستيفول، ووجود قدر بسيط من السمية في صغار الفئران التي غذيت به عن طريق الفم، وكذلك في الفئران البالغة وصغار الخنازير، وقد عزيت هذه التغيرات العكسية غير المرغوبة إلى الستيفول المتشكل نتيجة نشاط الكائنات الدقيقة المعوية وليس جلكوزيد السيتفول المكون للمركبات الحلوة

في الستيفيا (Gardana *et al.*, 2003)، لذلك أجريت العديد من الدراسات المتقدمة التي تتعلق بمدى سمية الستيفول، قام (Renwick, 2008) بحساب أكبر كمية متوقع تناولها من جلكوزيدات الستيفول بالنسبة للأطفال والكبار الأصحاء والأشخاص المصابين بداء السكري من النوع الأول والثاني ووجد أن هذه الكمية أقل بكثير من الكمية اليومية المقبولة، ومن ثم تبيّن أن الإستيفوزيد ليس له تأثيرات مطفرة أو مسرطنة، كما بين (Aminha *et al.*, 2014) عدم وجود تفاعلات حساسية عند استخدام جلكوزيد الإستيفوزيد بوصفه محلياً طبيعياً (Jaroslav *et al.*, 2006). فسرت هيئة سلامة الأغذية الأوربية (EFSA, 2010) أن الالتباس الناجم عن الدراسات السابقة يعود إلى استخدام الستيفيا عن طريق الحقن الوريدي، وأنه أعيد إجراء جميع الدراسات بموجب إرشادات الممارسات المخبرية الجيدة والممارسات السريرية الجيدة المعمول بها، وخضعت جميع الأوراق للمراجعة قبل قبولها للنشر، كما جرى تحليل جميع الأسئلة العلمية البارزة بما يتعلق بقبول استعمال جلكوزيدات الستيفول بوصفه محلياً، ومداخلات العديد من الخبراء من جميع أنحاء العالم. وحددت هيئة سلامة الأغذية الأوربية الجرعة اليومية المقبولة لـ Stevioside بـ 5 ملغ/كغ وزن جسم/ يوم، وصرّحت في 14 تشرين الثاني عام 2011م بترخيص استخدام جلكوزيد الستيفول على أنه مادة آمنة (GRAS) وبوصفه محلياً خالياً من السعرات الحرارية في السوق الأوربية وأعطي له الرقم (E960).

1-4-الأهمية الطبية لنبات الستيفيا:

عرف النبات الطبي بأنه ذلك النبات الذي يحتوي على مواد فعالة بتركيز مرتفع أو منخفض وله القدرة الفيزيولوجية على معالجة مرض معين أو التخفيف من أعراض الإصابة بهذا المرض، كما أشير إلى النبات الطبي بكلمة الأعشاب (Herbs) وهي نباتات صغيرة خضراء ورقية ذات رائحة عطرية قوية (Djidel *et al.*, 2009). أصبحت النباتات الطبية مادة إضافية مهمة في بعض المنتجات الغذائية ولاسيما النباتات التي تحتوي على فيتامينات وأحماض أمينية مهمة وأنزيمات تساعد على الهضم، ويتميز نبات الستيفيا بأنه عشبة عطرية

عالية الحلاوة ذات خصائص تغذية عالية، وعرفت أهميته منذ سنوات عديدة، فقد استخدم كغذاء ودواء لأكثر من 1500 عام في اليابان وباراجواي (Pop *et al.*, 2015)، وله تاريخ طويل من الاستخدام كمكمل غذائي معتمد في اليابان وكدواء علاجي في الولايات المتحدة الأمريكية (Carakostas *et al.*, 2008)، إضافة إلى استخدامه مادة هاضمة وعلاجاً موضعياً لشفاء الجروح والأمراض الجلدية، كما أن لنبات الستيفيا العديد من الاستعمالات العلاجية منها:

1- ارتفاع ضغط الدم: إن تناول كميات كبيرة من نبات الستيفيا يمكن أن يؤدي إلى انخفاض ضغط الدم وذلك لأن المواد الموجودة فيه تعمل على توسيع الأوعية الدموية، وتعد الستيفيا من المصادر الغنية بالعناصر الغذائية منها البروتين والريبوفلافين والمغنزيوم والزنك والكروم والسيلنيوم والكالسيوم والفوسفور التي لها دور في تقليل ضغط الدم (Lee *et al.*, 2001). وقد أكّد (Ferri *et al.*, 2006) عدم وجود أي تأثيرات لارتفاع ضغط الدم حتى عند تناول 15 ملغ/ كغ من وزن الجسم/يوم من مستخلص جلكوزيد الستيفول الخام.

2- الوقاية من تسوس الأسنان: تعمل جلكوزيدات الستيفيا على الحد من نمو البكتيريا مقارنةً بالسكروز (Brambilla *et al.*, 2014)، وقد بيّن philipps (1987) أن مستخلصات الستيفيا ريبوديانا المائية والكحولية تثبط العديد من أنواع البكتيريا وهذا يقلل من تسوس الأسنان بما في ذلك *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus vulgaris* إذ وجد أن هذه البكتيريا تنتج حمضًا أقل في مستخلصات الستيفيا مقارنة بالسكروز أو الجلوكوز أو الفركتوز.

3- أمراض السمنة: يقلل نبات الستيفيا من الإصابة بأمراض السمنة نظراً لمحتواه المنخفض من الطاقة إذ يساعد على التحكم بالوزن. وفي دراسة لـ (Savita *et al.*, 2004) بيّن حساب كمية الطاقة في أوراق الستيفيا الجافة ومقارنتها بالمحليات التجارية الأخرى، إذ أعطت الستيفيا 2.7 كيلو كالوري/غ في حين أعطى الأسبارتام 4 كيلو كالوري/غ. كما أشار (Duram Aguero *et al.*, 2015) إلى انخفاض في

الوزن بعد استبدال السكروز بالستيفيا مدة أسبوع، وكذلك الأمر في التجارب السريرية إذ لم يكن هناك أي تأثير معنوي على مؤشر كتلة الجسم (Chan *et al.*, 2000). كما تشير الدراسات إلى أن إحدى وظائف الستيفيا هي التحكم في الوزن لأنها تقلل الرغبة في الجوع والتعب ولأنها تساعد في تحقيق استقرار مستويات السكر في الدم وهي أحد الأسباب الرئيسة لزيادة الوزن. علاوة على ذلك، فإن الستيفيا تعمل بمثابة منشط لزيادة مستويات الطاقة للأشخاص الذين يحاولون فقدان الوزن (Jaroslav *et al.*, 2006).

4- سرطان البنكرياس: يقلل نبات الستيفيا من خطر الإصابة بسرطان البنكرياس بنسبة 23% نظراً لمحتواه العالي من النشاط المضاد للأكسدة مثل المركبات الفينولية التي تكون بمثابة كاسحات للجذور الحرة كونها عوامل مخلبية لأيونات المعادن وخاصة الحديد والنحاس، وهذا يثبط تكوين الجذور الحرة التي تحفزها المعادن (Thomas and Glade, 2010).

1-5-تأثير الستيفيا على مرضى السكري:

أجريت دراسات كثيرة حول تأثير أعشاب مختلفة على مرض السكري، وكان نبات الستيفيا أحد هذه الأعشاب إذ أجري عدد كبير من الدراسات عليه للتحقق من فعاليته (Putri *et al.*, 2020). يُعدّ جلكوزيد الإستيفوزيد من المحليات الطبيعية التي لايمكن للأنزيمات المفرزة من الإنسان والحيوان مثل (α- أميلاز والببسين) تفكيك الروابط الجلكوزيدية الموجودة فيها (Hutapea *et al.*, 1997)، ومن ثم لا يتسبب نبات الستيفيا بتغييرات معتادة عند تناول الطعام ولا يتعارض مع عملية الأيض في الجسم. لذا فهو لا يؤثر على نسبة السكر في الدم ويساعد في منع مرض السكري من النوع الثاني (Narissara *et al.*, 2004). تعد زيادة الوزن وخاصة في منطقة البطن من العوامل الخطرة التي تؤدي إلى الإصابة بمرض السكري لأنها تسبب مقاومة الأنسولين (Shahriari and Eftekhari, 2018). لذلك جرى مراقبة أشخاص أصحاء واستُبدل السكروز في طعامهم بجلكوزيد الإستيفوزيد مدة ثلاثة أيام، وقد لوحظ انخفاض مستويات الجلوكوز والأنسولين بالدم والشعور بالشبع

بعد الأكل (Anton *et al.*, 2010). من ناحية أخرى أجريت دراسات قليلة في التجارب السريرية لمعرفة تأثير الستيفيا على مرضى السكري (Barriocanal *et al.*, 2008) ولم يكن لاستهلاك جلكوزيد الإستيفوزيد بتركيز 1500 مغ في اليوم مدة 3 أشهر تأثير معنوي على هموغلوبين دم صائم السكر، في حين تشير دراسة (Saleh *et al.*, 2016) التي أجريت على ذكور الفئران المصابين بالسكري، إذ أعطيت 300 مغ/ كغ وزن الجسم/ يوم من الستيفيا مدة شهر، إلى حدوث فاعلية في دم الفئران الصائمة، وقد يعود هذا إلى استعمال مستخلص الستيفيا بالكامل (Akbarzadeh *et al.*, 2015)، أو استعمال جلكوزيد الإستيفوزيد بكميات كبيرة، في حين استعملت في الدراسات السريرية بجرعات محدودة مسموح بها (Barriocanal *et al.*, 2008). وفي دراسة لـ (Mathur *et al.*, 2017) بيّن أن الستيفيا آمن لمرضى السكري ويمكن للأشخاص الذين يعانون من مرض السكري استهلاك مجموعة واسعة من الأطعمة المحلاة بمكونات الستيفيا لأن الـ Steviol يخفض من تراكم الغلوكوز، إذ يتم امتصاصه في الكبد بنسبة 90% على شكل Steviol Glucuronide ويتابع طريقه إلى الكلى عبر الدورة الدموية الكبرى، ثم يطرح بشكل Steviol Glucuronide، وهذا يؤدي إلى انخفاض الغلوكوز في مستوى بلازما الدم.

1-6-استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد وتنقيته:

إن أول عملية استخلاص للمركبات الحلوة كانت في عام 1909م، وفي عام 1931م كانت أول عملية تنقية لإنتاج جلكوزيد الإستيفوزيد (Barriocanal *et al.*, 2008)، تعتمد عملية الاستخلاص والتنقية على أربع خطوات أساسية وهي:

- عملية الإذابة: إذابة الجلكوزيدات في الماء المغلي.
- عملية الفصل: تتم عملية الفصل لجلكوزيدات الإستيفوزيد باستعمال التبادل الأيوني
- البلورة والتجفيف

- الترسيب: ترسب بلورات الإستيفوزيد.

يتأثر استخلاص جلكوزيدات الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا بعوامل عدة من أهمها:

- نوع المذيب: بيّن (Celaya *et al.*, 2016) أن قطبية المذيب المستخدم في عملية الاستخلاص تؤثر في كفاءة استخلاص جلكوزيدات الستيفيا، بالرغم من وجود تشابه في قطبية الماء والإيثانول إلا أن الماء أكثر قطبية وله قدرة كبيرة على الإذابة (Kerton, 2013). بيّن (Jackson *et al.*, 2007) أن الماء يمكن أن يعطي نسبة استخلاص تتراوح من 93 إلى 98% من جلكوزيد الإستيفوزيد ويمكن أن يكون هذا عائداً إلى أنه كلما زادت قطبية المذيب زادت كفاءة عملية الاستخلاص. من ناحية أخرى قام (Parpineelo *et al.*, 2001) باستخلاص لجلكوزيدات الإستيفوزيد باستعمال الماء ومذيبات أخرى مثل (الكلوروفوم والميثان والغليسرول والبروبلين جليكول). كما قام (Jackson *et al.*, 2006) باستخلاص جلكوزيدات الستيفول من أوراق الستيفيا بالماء الساخن، و إزالة بعض المركبات النباتية منه عبر مادة ادمصاص حاملة (SPE) من أجل رفع تركيز جليكوزيدات الستيفول. استخلص (Kato *et al.*, 1977) جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة باستعمال الماء الساخن وتنقيته باستعمال أغشية شبه نفوذة حيث أعطى 2.4% من جلكوزيد الإستيفوزيد. استعمل (Liu *et al.*, 1997) الميثانول الساخن مدة 7 ساعات لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة وإزالة المتبقي من الميثانول وإعادة حلّه بالماء، ومن ثم إعادة استخلاصها بوساطة البوتانول إذ تم الحصول على كفاءة استخلاص باستعمال الميثانول تزيد عن 88%. كما استخلص Ahmed and Dobberstein (1992) الجلكوزيدات من أوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة في جهاز Microsoxhlet باستعمال الكلورفورم والميثانول، وتبيّن لهما أن استخدام مزيج من الكلورفورم/الميثانول أعطى نتائج أفضل من استخدام

الكلورفورم لوحده لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد. أشار (Brandle, 1998) إلى أن الميثانول كان أكثر كفاءة من الماء في عملية استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد.

في حين بيّن (Guan *et al.*, 1999) أن كفاءة استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد بالميثانول تراوحت من 35 إلى 65% إذ بلغ تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد 2.5%. كما أشار(Kaur *et al.*, 2014) إلى استعمال الميثانول لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من 3 إلى 4 مرات ومن ثم إزالة اللون الأخضر من المستخلص باستعمال ثنائي إيتيل الإثير وتكرار هذه العملية من 3 إلى 4 مرات حتى زوال اللون. وفي دراسة أخرى لـ (Shamima *et al.*, 2019) أعطى الإيثانول 70% أعلى تركيز لجلكوزيد الإستيفوزيد مقارنةً بالميثانول، في حين كان الميثانول أكثر كفاءة في استخلاص جلكوزيدات الإستيفوزيد من الماء (Sangha, 2011)، ويمكن أن يعزى سبب هذا الاختلاف إلى ظروف التجربة المستخدمة إذ كان الاستخلاص بالميثانول عند درجة حرارة 60مْ وزمن 40 دقيقة، في حين نسبة الاستخلاص 10:1 أوراق الستيفيا(غ) : ميثانول(مل))، أما عند الاستخلاص بالماء فكانت درجة حرارة 90مْ وزمن 120 دقيقة ونسبة الاستخلاص 15:1 أوراق الستيفيا(غ) : ماء(مل)). من جهة أخرى استخلص (Pasquel *et al.*, 2000) جلكوزيدات الستيفول من أوراق الستيفيا الجافة بطريقة السائل فوق الحرج (SCFE) وذلك باستعمال ثاني أوكسيد الكربون مذيباً، والماء/ الإيثانول كمذيباَ مشتركاً، وأعطت نتائج أفضل من طريقة الاستخلاص التقليدية التي استعمل فيها الماء/ الإيثانول لوحده. في حين أشار(Rao *et al.*, 2012) إلى طريقة جديدة لاستخلاص جلكوزيدات الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا الجافة باستعمال الماء الساخن تحت ضغط (PHWE) pressurized hot water extractor، والترشيح الغشائي النانوي (NF) للحصول على نقاوة عالية لجلكوزيدات الإستيفوزيد تصل إلى (98.2%). طوّر Afandi وزملاؤه (2013) طرائق الاستخلاص من خلال استخلاص جليكوزيد الإستيفوزيد من الأوراق المطحونة لنبات الستيفيا باستعمال أنواع مختلفة من

المذيبات مثل الإيثر البترولي والميثانول والإيثانول وثنائي إيثيل الإيثر والبوتانول متبوعة بتنقيتها باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، وتبيّن لهم أن أفضل المذيبات العضوية القطبية في استخلاص جليكوزيد الإستيفوزيد هو الإيثانول الذي يعد الأكثر سلامةً وآمناً للإنسان (Guo-Qing *et al.*, 2005)، في حين انخفض مردود الاستخلاص عندما استخدمت مذيبات عضوية غير قطبية (N–هكسان، إيثر بترول)، ولوحظ أيضاً أنه يمكن الاستفادة من هذه المذيبات لإزالة المركبات غير المرغوب بها، ولكن الاستخدام الكبير منها قد يكون غير آمن، لذلك يفضل استخراج تلك المركبات بالضغط العالي باستعمال CO_2. من ناحية أخرى، بيّن (Deshmukh and Kedari, 2014) أن الاستخلاص بالميثانول والإيثانول 80% كان أكثر كفاءة ولكنه أقل نقاوةً من الاستخلاص بالماء إذ بلغت كفاءة استخلاص جليكوزيد الإستيفوزيد بالإيثانول 80% والميثانول 45%، في حين بالماء 40%.

- درجة الحرارة وزمن الاستخلاص: تؤثر درجة الحرارة وزمن الاستخلاص في كمية الجلكوزيدات الناتجة إذ أشار (Yaqin *et al.*, 2005) إلى أن كمية جلكوزيد Rebaudioside A تزداد مع ارتفاع درجة الحرارة إلى (50 مْ)، ثم تبدأ بعد ذلك بالانخفاض، وقد عزي سبب هذا الانخفاض في المحتوى إلى تعرض الجلكوزيد للأكسدة عند درجة حرارة أعلى من 50 مْ. في حين بيّن (Afandi *et al.*, 2013) أن الدرجة 40 مْ تعطي أفضل نقاوة للمستخلص، وفي دراسة أخرى أجراها (Pol *et al.*, 2007) تبيّن أنه في مجال درجات الحرارة من 70 إلى 160 مْ كان للميثانول قدرة أعلى على استخلاص جلكوزيدات الإستيفوزيد من الماء. كما استعمل (Badr, El-sanat, 2008) درجات الحرارة (40مْ، 50مْ، 60مْ) في استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا الجافة باستعمال الماء بنسبة 25:1 و بلغ تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلصات الناتجة (9.94%، 10.09%، 9.5%) على التوالي. بيّن (Sangha, 2011) أن أفضل درجة حرارة وزمن لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا الجافة باستعمال

الماء كان عند درجة حرارة 76مْ مدة 60 دقيقة إذ بلغ تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد 8.67%، أما عند استعمال الميثانول فكانت أفضل درجة حرارة وزمن لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد 40مْ، 13 دقيقة إذ بلغ تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد 8.90%. من ناحية أخرى كانت درجة الحرارة المثلى والزمن لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد باستعمال الماء 125مْ، مدة 45 دقيقة (Martins, 2017) إذ بلغ تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد 38.67 ملغ/غ. كما أوضح (Muthusamy and Abdul Munaim, 2019) أن أفضل درجة حرارة لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا الجافة باستعمال الإيثانول النقي هي 40مْ؛ إذ إن درجة الحرارة المرتفعة تقلل من كثافة السوائل وبالتالي انخفاض كفاءة الاستخلاص، كما لم يلاحظ أي زيادة في كفاءة استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد باستعمال الأسيتون عند زيادة درجة الحرارة إلى 55مْ، في حين لوحظ زيادة في كفاءة استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد عند ارتفاع درجة الحرارة فوق 50مْ إذ بلغ تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد 10.82%. أشار (Jaitak *et al.*, 2009) إلى أن استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد باستعمال الميكرويف عند استطاعة 80 واط مدة 1 دقيقة كان أفضل من الطريقة التقليدية وذلك بالاستخلاص عند درجة حرارة 25مْ لمدة 12 ساعة، وأن محتوى جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلصات الناتجة كان 8.64%، 6.54% على التوالي.

- نسبة المذيب إلى الأوراق: تعد نسبة المذيب إلى الأوراق عاملاً مؤثراً في كفاءة الاستخلاص، وقد بيّن (Sangha, 2011) أن نسبة 1 غرام من أوراق الستيفيا الجافة إلى 14 مل من الماء أعطت أعلى نسبة استخلاص لجلكوزيد الإستيفوزيد عند درجة حرارة 76 مْ، وزمن 60.6 دقيقة. وفي دراسة قام بها (Abou-Arab, *et al.*, 2010) وجد أن أفضل نسبة للاستخلاص بالنسبة للماء هي 1 غرام من أوراق الستيفيا الجافة إلى 35 مل ماء، وأفضل نسبة للاستخلاص بالميثانول هي 1 غرام من أوراق الستيفيا الجافة إلى 40 مل ميثانول. كذلك حدّد (Rai *et al.*, 2012) الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد باستعمال الماء عند مستويات مختلفة من نسبة الأوراق إلى الماء ودرجات الحرارة والأزمنة المختلفة،

وأظهرت نتائج هذه الدراسة أن النسبة المثلى لاستخلاص الإستيفوزيد باستعمال الماء هي 1 غرام من أوراق الستيفيا الجافة إلى 14 مل ماء عند درجة حرارة 78مْ وزمن 56 دقيقة. وفي دراسة أخرى لـ (Wu *et al.*, 2013) استعمل التصميم الإحصائي Plackett-Burman لمعرفة أفضل ظروف استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد باستعمال الميكرويف إذ كانت النسبة المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد باستعمال الإيثانول 52% هي 1 غرام من أوراق الستيفيا الجافة إلى 25 مل إيثانول52%عند استطاعة 184.8 واط وزمن 60 ثانية. في حين بيّن (Badr *et al.*, 2008) أن كفاءة استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا الجافة باستعمال الماء بنسبة (25:1) بلغ 9.5%، وعند الاستخلاص بالإيثانول النقي بنسبة (40:1) بلغ تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد 9.6%، في حين عند الاستخلاص بالميثانول بنسبة (40:1) بلغ تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد 9.75%.

1-7-طرائق الكشف عن جلكوزيد الإستيفوزيد:

إلى جانب الاهتمام بالتركيب الكيميائي للمركبات الحلوة في نبات الستيفيا كان هناك اهتمام كبير بطرائق الكشف عن الجلكوزيدات وتحديد أنواعها الموجودة في نبات الستيفيا وتركيزها. إن تحديد تركيز الجلكوزيدات يساعد في تحديد الوقت الأمثل للحصاد (Nishiyama *et al.*, 1991)؛ لذلك كان لابد من إيجاد طرق بسيطة وغير مكلفة لتقدير كميتها. استخدم Nishiyama وزملاؤه (1992) تقنية التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء القريبة (NIRS) للتقدير الكمي لجلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا الجافة، وتراوحت كمية جلكوزيد الإستيفوزيد في 64 عينة من 4 إلى 13%، وكانت النتائج متوافقة عند مقارنتها بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC، وقد عدّها طريقة بسيطة ودقيقة لتقدير جلكوزيدات الإستيفوزيد ولديها القدرة على قياس أعداد كبيرة من العينات بسرعة كبيرة. كذلك قام (Boanova *et al.*, 1998) بتقدير محتوى المشروبات المضاف إليها جلكوزيد الإستيفوزيد مثل عصير البرتقال والشاي بطريقة الكروماتوغرافيا

السائلة عالية الأداء HPLC بوساطة وحدات SPE (solid-phase extraction)، استعمل (Abou-Arab *et al.*, 2010) طريقة الأنثرون سلفوريك لتقدير جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة في المستخلص المائي عند نسبة استخلاص 35:1 إذ بلغ تركيزه 7.53% ونسبة الاسترجاع 97.08%. وقد أشارت (Galal, 2002) أنه يمكن تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلص الخام لأوراق الستيفيا الجافة بأكثر من طريقة وهي: طريقة [الأنثرون سلفوريك وطريقة الفينول حمض الكبريت (اللونية)] والمعايرة. كما تم تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد المركز الناتج من الاستخلاص بالماء وجلكوزيد الإستيفوزيد البودر الناتج من الاستخلاص بالميثانول بطريقة HPLC إذ بلغ زمن البقاء RT (12.02، 12 دقيقة) على التوالي، وتركيزه (5.44%، 9.18%) على التوالي. قدّر (Pol *et al.*, 2007) الجلكوزيدات الموجودة في المستخلصات المائية والميثانولية لأوراق الستيفيا الجافة باستعمال الكروماتوغرافيا السائلة الموصولة بكاشف الأشعة فوق البنفسجية وكاشف مطياف الكتلة liquid chromatography followed by ultraviolet (UV) and mass-spectrometric (MS) detections. كما تم تقييم طريقة تقدير الجلكوزيدات الموجودة في أوراق نبات الستيفيا والمحليات التجارية بطريقة UV-NH2-LC التقليدية ومقارنتها مع طريقة الكروماتوغرافيا السائلة فائق الأداء المرتبط بكاشف مطيافية الكتلة، إذ كانت كمية الجلكوزيدات المتحصل عليها من جهاز MS-UHPLC متوافقة مع تلك المأخوذة من طريقة UV-NH2-LC التقليدية (Gardana *et al.*, 2003). كذلك قدّر Inamake وزملاؤه (2010) جلكوزيد الإستيفوزيد بطرائق عدة كروماتوغرافية وتحليلية منها كروماتوعرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)، مطيافية فوربيه للأشعة تحت الحمراء FTIR، التحليل الطيفي بالرنين المغناطيسي النووي (NMR). قام (Jadhao *et al.*, 2011) بتقدير جلكوزيد الإستيفوزيد بطريقة RP-HPLC مع كاشف الـ UV وتقييم هذه الطريقة من خلال الخطية والتكرارية وحد الكشف وحد الكشف الكمي، وقد كان الانحراف المعياري بنتائج التكرارية أقل بـ 2.5% من اليوم السابق، إذ تبيّن أن الطريقة بسيطة، وحساسة، وقابلة للتكرار، لذلك فهي مناسبة لتقدير جلكوزيد الإستيفوزيد بشكل روتيني. وفي دراسة

أخرى لـ (Chaturvedula and Zamora, 2014) عزل فيها جلكوزيدات الستيفول بطريقة RP-HPLC مع كاشف الـ UV عند طول موجة 210 نانومتر ودرجات حرارة مختلفة (20مْ، 40مْ، 60مْ، 79مْ) إذ بلغ زمن البقاء لجلكوزيد الإستيفوزيد (8.015، 9.246، 9.012، 9.069) دقيقة على التوالي. استعمل (Shirwaikar *et al.*, 2011) طريقة HPTLC لتحديد هوية جلكوزيد الإستيفوزيد في العينات التجارية و HPLC لتقدير كمية جلكوزيد الإستيفوزيد، وتميزت الطريقة بتحديد وتقدير سريع للإستيفوزيد في عينات مختلفة، إذ يمكن استعمالها للتحليل الروتيني للإستيفوزيد في العينات التجارية. كذلك استعمل (Samah *et al.*, 2013) طريقة HPLC لتقدير كمية جلكوزيد الإستيفوزيد و rebaudioside A في أوراق الستيفيا ريبوديانا، واقترحت الدراسة استبدال عامود C18 بـ the Capcell Pak C18- MGII Column ليكون أكثر كفاءة. وقد بيّن (Kuntal Das and Raman Dang 2010) في دراسة لتقدير جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلصات المائية بطريقة HPLC إذ استعمل عامود C18 وطور متحرك ميثانول: ماء بنسبة (20:80) وطول موجة 210 نانومتر فكان زمن البقاء 6.01 دقيقة والخطية R^2= 0.9998. وفي دراسة أخرى لـ (Deshmukh and Kedari, 2014) لتقدير جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلصات المائية والكحولية بطريقة الـ HPLC وذلك باستعمال عامود C18 والطور المتحرك اسيتو نتريل عند pH=2.6 وطول موجة 210 نانومتر، إذ بلغ زمن البقاء في المستخلص المائي 8.08 دقيقة في حين لم يتمكن من تحديده في المستخلصات الكحولية، وفي التحليل النوعي لجلكوزيدات الإستيفوزيد فقد قام (Deshmukh and Kedari, 2014) بتقديرها بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) على ألواح هلام السيليكا باستعمال الميثانول: الكلوروفورم: الماء بنسبة (4:65:25) على التوالي، إذ بلغ عامل الإعاقة (RF) لجلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلص المائي 0.30 والمستخلص الإيثانولي 0.89.

1-8-تطبيقات جلكوزيد الإستيفوزيد في الصناعات الغذائية:

تشكل السكريات بالنسبة إلى كثير من الأشخاص جزءاً كبيراُ مما يستهلكونه يومياً؛ على الرغم من تأثيراتها السلبية كالإصابة بالسمنة وزيادة التعرض لداء السكري وتصلب الشرايين و تسوس الأسنان (Brambilla *et al.*, 2014)، وتجنباً لتأثيرات السكر ازداد اهتمام كثير من الباحثين بإيجاد بدائل للسكر ولاسيما البدائل الطبيعية منخفضة السعرات الحرارية وغير السامة، ويُعدّ جلكوزيد الإستيفوزيد أحد هذه المُحليات الطبيعية الخالية من السعرات الحرارية والتي لها مؤشر الجلايسمي صفر (Atteh *et al.*, 2011)، ويتميز هذا المحلِّ بأنّه ثابت حرارياً حتى درجة حرارة 200مْ وهذا يجعله قابلاً للاستخدام في العديد من الصناعات التي يستخدم فيها درجات الحرارة العالية كالمخبوزات ومختلف أنواع الأغذية المطبوخة (Tanaka, 1988). قام (varanuj and chatachai, 2009) بإضافة جلكوزيد الإستيفوزيد إلى الخضر المخللة والأغذية البحرية المجففة وأكّد أنّ استعمال درجات الحرارة العالية لم يؤثر في تفكك جلكوزيد الإستيفوزيد. وبناءً على ذلك تمت إضافته إلى العديد من الصناعات الغذائية:

- عصائر الفواكه والمشروبات الغازية: طُبّق جلكوزيد الإستيفوزيد بوصفه مُحلياً طبيعياً في عصائر الفواكه والمشروبات الغازية (Goyal *et al.*, 2010) وبوصفه مُحلياً في المشروب الغازي غير الكحولي المعروف "Coca-Cola" بموافقة إدارة الأغذية والعقاقير FDA كمكمل غذائي للتحلية (Žlabur *et al.*, 2013). وقد بيّنت (Galal, 2002) أنه يمكن استعمال جلكوزيد الإستيفوزيد المركز في عصير الفراولة حتى 75% استبدال من السكروز بدون وجود فروق معنوية إذ لم يكن له تأثير على لون وشكل العصير ودرجة القبول العام.
- الفواكه والصلصات والذرة الحلوة (Wallin, 2007) تعدّ دراسة (Kroyer, 2010) من أكثر الأبحاث أهمية في إنتاج الفواكه المجففة إذ استبدل سكر الفواكه الطبيعي عالي السعرات الحرارية بجلكوزيد

الإستيفوزيد من أجل تقليل السعرات الحرارية المتناولة وهذا شجع (Garcia-Noguera *et al.*, 2010) على استبدال سكر الفاكهة في الفريز بجلكوزيد الإستيفوزيد من أجل الحفاظ على حلاوتها. وفي دراسة لـ (Muenprasitivej *et al.*, 2022) استعمل فيها 0.09 غ/ 100مل من جلكوزيدات الستيفول المقابل لتركيز 14% سكروز إلى الآيس كريم إذ حصل على مجموع تقييم حسي 92%من قبل المستهلكين ولم يلاحظ أي تأثير معنوي لإضافة جلكوزيدات الستيفول على درجة الحلاوة واللون والقوام ودرجة التحبب والطعم المر المتبقي بعد التذوق للآيس كريم.

- المربيات: استبدل (Nigm *et al.*, 2004) السكروز في مربى المشمش بكميات مكافئة لدرجة الحلاوة من المحلي الطبيعي جلكوزيد الإستيفوزيد منخفض السعرات الحرارية، وجرى تخزين المربى المنتج مدة ستة أشهر، كما اختُبرت جودة المربى من الناحية الكيميائية والحسية في أثناء فترة التخزين، وأظهرت النتائج تأثيراً طفيفاً على نسبة الحموضة، لأن حمض الإسكوربيك انخفض بدرجة ملحوظة مع فترة التخزين في كل المعاملات، أما المربى المحلّى بالإستيفوزيد فأظهر انخفاضاً أقل في مستوى حمض الإسكوربيك، وكذلك لوحظ انخفاض في السعرات الحرارية بمعدل (28%) مع الاستبدال الكلي للسكروز بجلكوزيد الإستيفوزيد. من ناحية أخرى أظهرت نتائج التقييم الحسي للمربى تغيرات واضحة لدرجة اللون وكان ذلك مرتبطاً بفترة التخزين. كما استبدل السكروز بجلكوزيد الإستيفوزيد المركز بنسبة 75% في مربى الفراولة ولم يكن هناك أي فرق معنوي في اللون ودرجة القبول العام (Galal, 2002).
- الحلويات والبسكويت: صُنعت شوكولا حليب محلاة بالستيفيا مع إضافة الإنولين أو البولي ديكستروز التجاري كمثخن قوام ودُرست الخصائص الفيزيائية والكيميائية والريولوجية والحسية لها، فأعطت نتائج مشابهة لخصائص شوكولا الحليب المحلاة بالسكروز (Shah *et al.*, 2010)، وفي دراسة أخرى (Lauro *et al.*, 2009) استبدل السكروز بجلكوزيد الإستيفوزيد في الشوكولا، وأظهرت النتائج في التقييم الحسي للشوكولا أن استبدال السكروز بجلكوزيد الإستيفوزيد لم يؤثر في صفات الشكل العام، واللون،

ودرجة التحبب، والنكهة. في حين قام Abd El-Baky (1999) باستبدال السكروز بجلكوزيد الإستيفوزيد لإنتاج شوكولا لمرضى السكري وتخزينه في الثلاجة مدة 6 أشهر، إذْ تأثر التركيب الكيميائي للشوكولا بشكل معنوي طفيف نتيجة لظروف التخزين وكان هناك فروق معنوية في الطعم والرائحة والإحساس بعد المضغ ولم يظهر لون الشوكولا أي فرق معنوي. استُعمل جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا الجافة والستيفيا النقية (الباودر) بوصفه بديلاً جزئياً للسكروز في إنتاج الكيك والكوكيز (فرحان، وعبد اللطيف، 2018)، إن إضافة أوراق الستيفيا الجافة أثر معنوياً في وجود بعض الطعم المر واللون إذ ظهرت القصرة واللبابة بلون داكن في حالة الاستبدالات المختلفة من أوراق الستيفيا الجافة في الكيك والكوكيز مقارنةً بالعينة القياسية، وكذلك تبيّن عدم وجود فرق معنوي في لون قصرة لبابة الكيك المصنع بالاستبدالات المرتفعة من الستيفيا النقية. كما إن إضافة أوراق الستيفيا الجافة أدى إلى انخفاض معنوي في الرطوبة بالمقارنة مع العينة القياسية الذي يعود إلى التخزين. وفي عام (2002) استعمل Salem و Besheit مستخلص الستيفيا بتركيز 5% كبديل للسكروز بنسب مختلفة (25-50-75-100%) في تصنيع البسكويت والكيك، إذ لوحظ انخفاض قليل في الكربوهيدرات والرماد، أما بالنسبة للتقييم الحسي فكان هناك قبول عام لجميع الصفات الحسية عند الاستبدال بنسبة (25–50%)، وكذلك عند نسبة (75–100%) كان هناك قبول عام لجميع الصفات الحسية ماعدا الطعم. درس (Hassan, 2000) إمكانية استعمال جليكوزيد الإستيفوزيد في البسكويت بنسب مختلفة (25-50-75-100%) إذ أعطت نسبة 75% قبول عام عند استعمال في الصفات الحسية من حيث الطعم والرائحة والملمس واللون والقبول والإحساس عند المضغ. كما أشار (Salem, 2005) إلى تأثير استبدال الماء والسكروز بمستخلص الستيفيا في الخصائص الريولوجية والطبيعية لعجائن الدقيق، أدى زيادة معدل الاستبدال بمستخلص الستيفيا إلى زيادة المقاومة للمطاطية والمرونة وإنتاج الغاز.

الفصل الثاني

مواد البحث وطرائقه

Materials and methods

2-مواد البحث وطرائقه Materials and Methods:

2-1- المواد:

2-1-1- أوراق الستيفيا: جُمعت أوراق نبات الستيفيا الطازجة من مزرعة الهيئة العامة للتقانة الحيوية في كلية الزراعة: جامعة دمشق في الشهر السادس عام 2022م.

2-1-2- جلكوزيد الإستيفوزيد القياسي: تم الحصول على المادة القياسية من جلكوزيد الإستيفوزيد (98%) من شركة (Sigma-aldrich).

2-1-3- المواد الغذائية:

- شوفان، فانيلا، بكينغ باودر، زبدة نباتي، بيض: أُحضرت هذه المواد من السوق المحلي لمدينة دمشق في عام 2022م.

2-1-4- المواد الكيميائية:

- حمض كبريت مركز 96 % (H_2SO_4) Sulfuric Acid المصدر Riedel-de Haën.
- مساعدات هضم البروتين عبارة عن خليط بنسبة 1:9 من كبريتات البوتاسيوم (K_2SO_4)+ كبريتات النحاس ($CuSO_4$). (Cupper Sulfate+ Potassium Sulfate)
- هيدروكسيد الصوديوم (98%) Sodium Hydroxide (NaOH).
- حمض البوريك Boric Acid (H_3BO_3) المصدر Riedel-de Haën.
- مشعر دليل أحمر الميثيل Methyl Red 0.2%.
- حمض كلور الماء Hydrochloric Acid (0.1N) (HCL).
- محلول الفينول Phenol المصدر (Sigma) ألمانيا.
- نظامي الهكسان Hexan المصدر Riedel-de Haën.

- 1-1-diphenyl 2-picryl hydrazyl (DPPH) المصدر (Sigma) ألمانيا.
- محلول فهلنغ A كبريتات النحاس المائية، ومحلول فهلنغ B وهو طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم في وسط قلوي.
- حمض الغاليك (98%) المصدر (Sigma).
- جلوكوز نقي المصدر (Sigma).
- إيثانول مطلق (99.8%) المصدر Riedel-de Haën.
- ميثانول مطلق(99.5%) المصدر Riedel-de Haën.
- أسيتو نتريل (99.9%) المصدر Panreac.
- ماء منزوع الشوارد.
- حمض الفوسفور المصدر Riedel-de Haën.

2-1-5- أجهزة التحليل:

- فرن تجفيف ألماني الصنع ماركة Memmert.
- ميزان حساس ألماني الصنع ماركة Sartorius.
- جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer UV-VIS المصدر Optizim 3000 plus (فرنسا).
- مثفلة ألمانية الصنع ماركة Funke gerber.
- جهاز سوكسلت Soxhelt صيني الصنع ماركة (BiobaseSY- 1L4H WATER BATHS).
- جهاز كلداهل: وحدة التقطير والهضم.
- حمام مائي ألماني الصنع ماركة (Memmert).
- مازج أنابيب (vortex) ماركة (Intllab).
- الرفراكتومتر ألماني الصنع ماركة (Carl Roth-DR 201-95).

- جهاز مقياس الحموضة pH meter (Precisa PH-900).
- حمام مائي عند الأمواج فوق الصوتية Ultrasonic.
- جهاز HPLC ماركة Jasco مع كاشف UV Visible.
- فرن كهربائي ماركة ساشو.

2-2- طرائق التحليل:

2-2-1- تحضير عينة أوراق الستيفيا الجافة:

استخدمت أوراق نبات الستيفيا الطازجة من الهيئة العامة للتقانة الحيوية في جامعة دمشق التي وصلت إلى أقصى مرحلة نمو (قبل مرحلة الإزهار)، وجُففت على درجة حرارة الغرفة في ضوء المخبر مدة (48 ساعة)، ثم طُحنت على شكل مسحوق وحُفظت في أكياس من البولي ايتيلن لحين إجراء التحاليل المطلوبة.

2-2-2- الاختبارات الكيميائية لأوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة:

2-2-2-1- تقدير الرطوبة Determination of Moisture:

قُدرت النسبة المئوية للرطوبة في أوراق الستيفيا المجففة هوائياً وفق(AOAC, 2000)، إذ ضُبط فرن التجفيف على درجة حرارة 105 مْ، ووُضعت العينات في الفرن على درجة 105 مْ مدة ثلاث ساعات، ثمّ حُسبت النسبة المئوية للرطوبة من المعادلة:

% الرطوبة= (العينة قبل التجفيف – العينة بعد التجفيف/ وزن العينة)× 100.

2-2-2-2- تقدير الرماد Determination of Total Ash:

قُدرت النسبة المئوية للرماد وفق (AOAC, 2000). وأُخذ (5 غ) من أوراق الستيفيا ووضُعت في جفنات الترميد على درجة حرارة احتراق 550 مْ مدة 4 ساعات، حتى الحصول على لون رمادي فاتح.

حسبت النسبة المئوية للرماد من المعادلة الآتية:

% الرماد= (وزن البوتقة+العينة بعد الاحتراق) –(وزن البوتقة فارغة)/ وزن العينة× 100.

2-2-2-3- تقدير البروتين Determination of Total Protein:

قُدر النتروجين الكلي في أوراق الستيفيا الجافة بطريقة كلداهل Crude Protein- Kjeldahl وفق (AOAC, 2000)، ثم حسب البروتين الكلي باستخدام معامل التحويل 6.23.

2-2-2-4- تقدير الكربوهيدرات الكلية Determination of total sugar:

قُدرت الكربوهيدرات الكلية وفق الطريقة الواردة (AOAC, 2005) إذ وُزن 1غ من أوراق نبات الستيفيا الجافة لاستخلاص السكريات وذلك عن طريق الغليان مدة نصف ساعة، ثم رشح الناتج وأكمل إلى 100 مل بالماء المقطر. قسمت الكمية إلى قسمين (A) و (B)، حُلمهأ القسم الأول A وذلك بإضافة 5 مل من حمض كلور الماء المركز، ومن ثم وضعت في حمام مائي على درجة حرارة 72 مْ مدة 7 دقائق، بُردت بماء الصنبور مدة دقيقتين ومن ثم عُدل الحمض بإضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم المحضر بتركيز 20%، أُكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر، وأُخذ 5 مل من العينة بعد حلمهتها (أضيف إلىا 5 مل من فهلنغ A و5 مل من فهلنغ B) ومن ثم أجري له عملية تسخين وإضافة مشعر أزرق الميتلين وبمجرد الغليان نعاير الزائد من محلول فهلنغ بمحلول العينة . و حسبت % للسكريات الكلية من خلال إجراء الخطوات السابقة نفسها على محلول الغلوكوز القياسي (0.2%).

2-2-2-4-1- تقدير السكريات المختزلة Determination of Reducing Sugar :

أُخذ 5 مل من المحلول (B)، وأُضيف إلى (5 مل من محلول فهلنغ A و5 مل من محلول فهلنغ B) ، وسُخن حتى الغليان، وعند لحظة الغليان أًضيف مشعر أزرق الميتلين أضيف محلول العينة حتى نهاية المعايرة واختفاء اللون الأزرق لمحلول فهلنغ وحسبت % للسكريات المختزلة بالمقارنة مع المحلول القياسي للغلوكوز0.2%.

2-2-2-4- تقدير السكريات غير المختزلة Determination of non- Reducing Sugar:

قُدرت السكريات غير المختزلة وفق طريقة (AOAC, 2008) من خلال المعادلة الآتية:

(السكريات غير المختزلة = السكريات الكلية- السكريات المختزلة).

2-2-2-5- تقدير الدهن Determination of Total Fat:

قُدرت الدهون في أوراق الستيفيا الجاقة على البارد وفق (AOAC, 2008) وذلك بوضع (5غ) من أوراق الستيفيا وهي جافة في 30 مل من نظامي الهكسان مدة 24 ساعة، وتم الترشيح في دورق سابق وزنه، ومن ثم تم التخلص من المذيب على درجة حرارة 60مْ حتى ثبات الوزن، وحسبت النسبة المئوية للدهن من المعادلة الآتية:

% للدهن= (وزن الدورق مع الدهن) -(وزن الدورق فارغاً)/ وزن العينة× 100.

2-2-2-6- تقدير الألياف الخام Determination of Crude Fiber:

قُدرت الألياف الخام في أوراق الستيفيا الجافة حسب طريقة ويندي وفق الطريقة الرسمية الواردة في (AOAC, 1990) مع إجراء بعض التعديلات فأُخذ 1 غ من أوراق الستيفيا الجافة ووضعت في بوتقة زجاجية مزودة بفلتر في قعرها وثُبتت في جهاز استخلاص الألياف تحت المكثف، وأضيف لها 50 مل من حمض الكبريت تركيز (1.25%)، بعد ذلك يُرشح المحلول من خلال الفلتر الموجود أسفل البوتقة الزجاجية الموصول بمخلية تحت الضغط، تكرر عملية الاستخلاص السابقة بإضافة 10 مل من ماءات الصوديوم (1.25%) ويُرشح المحلول من خلال الفلتر الموجود أسفل البوتقة الزجاجية بضغط المخلية. يُغسل المتبقي 3 مرات بالماء الساخن ومرتين بالأستيون. جُففت العينة داخل البوتقة مدة 8 ساعات في مجفف عند الدرجة 105مْ ووزنت البوتقة بعد التقطير ويكون الوزن W ثم تُرمد عند الدرجة 550مْ مدة ساعتين وبُردت في المجفف الزجاجي (الديسكتير) ثم أخيراً تُوزن البوتقة ويكون الوزن $W_{Crucible+ash}$ ومن ثم حسبت نسبة الألياف الخام:

$$\%\ \text{للألياف الخام} = [(W - W_{Crucible+ash}) / W_S] \times 100$$

بحيث W: وزن الألياف المتبقية مع البوتقة الزجاجية بعد التجفيف.

$W_{Crucible+ash}$: وزن البوتقة مع الرماد. W_S: وزن العينة

2-2-2-7- تقدير الطاقة الكلية:

قُدرت الطاقة الكلية لأوراق الستيفيا الجافة وفق ماذكره (Gasmalla *et al.*, 2014) وذلك بأن كل 1غ من الكربوهيدرات تعطي 4 كيلوكالوري، وأن 1غ من البروتين تعطي 4 كيلوكالوري، و 1غ من الدهن تعطي 9 كيلو كالوري وفق المعادلة الآتية:

كمية الطاقة الكلية (**kcal/100g**)= % للدهن×9 + % للبروتين×4 + % للكربوهيدرات×4.

2-2-3- تقدير المركبات الفعالة حيوياً لأوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة:

2-2-3-1- تقدير الفينولات الكلية:

اسُتخلصت الفينولات الكلية لأوراق الستيفيا ريبوديانا وفقاً لطريقة (Wada and Ou, 2002) مع إجراء بعض التعديلات إذ أُخذ 2غ من أوراق الستيفيا الجافة ووُضع عليها 20 مل من الميثانول المطلق ومزجت جيداً مدة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة ثم ثُفلت العينة بجهاز طرد مركزي مخبري (3000 دورة/د) ثم أُخذ السائل الرائق ومُدد بنسبة (10:1). عينت الفينولات كمياً باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu المستخدمة من قبل (Spanos and Wrolstad, 1992) مع بعض التعديلات فأُخذ 1 مل من المستخلص الممدد وأُضيف له 5 مل من كاشف فولن بنسبة (10:1)، ثم أُضيف 4 مل من محلول كربونات الصوديوم 7% وترك مدة 20 دقيقة على درجة حرارة الغرفة في الظلام، ثم قيست الامتصاصية بالمطياف الضوئي عند طول موجة 765 نانومتر، وحُضّر محلول قياسي من حمض الغاليك بتركيز (0.05-0.25مكغ/مل)، وكانت معادلة الخط المستقيم للمنحنى العياري المحضر $y=7.6367x+0.1025$.

2-2-3-2- تقدير النشاط المضاد للأكسدة بطريقة (1-1-diphenyl 2-picryl hydrazyl) DPPH:

قُدّر النشاط الكابح للجذور الحرة لأوراق الستيفيا الجافة وفق الطريقة الموضحة من قبل (Chen *et al.*, 2006) مع إجراء بعض التعديلات إذ أخذ 2 غ من أوراق الستيفيا الجافة وأُضيف لها 20 مل ميثانول مُزجت لمدة 30د على درجة حرارة الغرفة، وأُخذ 0.1 مل من المستخلص الناتج وأضيف له 2.9 مل من محلول DPPH (60 ميكرومول/ 100مل) وخلط المزيج السابق بخلاط الأنابيب (vortex) وترك مدة 20 دقيقة على درجة حرارة الغرفة في الظلام، ثم قيست الامتصاصية على طول موجة 517 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي. عبر عن النشاط المضاد للأكسدة بحساب النسبة المئوية لتثبيط الجذر الحر للـ DPPH من المعادلة:

$$\% \text{ النشاط الكابح للجذور الحرة} = \frac{(A` - A)}{A} \times 100$$

حيث A تعبر عن امتصاص الشاهد Á: تعبر عن امتصاص العينة.

2-2-4- استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا الجافة:

2-2-4-1- تحضير المستخلصات:

حضرت مستخلصات أوراق الستيفيا باستعمال ثلاثة أنواع من المذيبات (الماء النقي، الإيثانول80%، الإيثانول المطلق) بنسبة 14:1 (أوراق الستيفيا(غ) : مذيب (مل))، باستخدام ثلاث درجات حرارة (30-60-90 مْ) على التوالي لكل مذيب، وبأزمنة مختلفة (30-60-90 دقيقة) وفق التصميم الإحصائي Response (RSM) Surface Methology.

2-2-4-2- تقدير رقم pH:

قُدرت درجة الحموضة في المستخلصات المحضرة سابقاً لأوراق الستيفيا ريبوديانا بنسبة (14:1) أوراق الستيفيا(غ)/ ماء (مل) على درجة حرارة (25 ± 1مْ) وفق (Shuvo *et al*., 2015) باستعمال pH meter.

2-2-4-3- تقدير المواد الصلبة الذائبة (TSS):

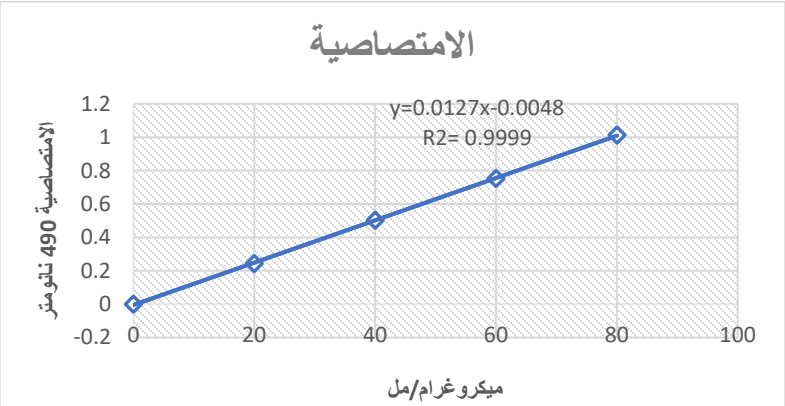
قُدرت المواد الصلبة الذائبة وفق (Abou-Arab, *et al*., 2010) مع إجراء بعض التعديلات إذ قيست تركيز المواد الصلبة الذائبة في المستخلصات المحضرة سابقاً بنسبة (14:1) أوراق الستيفيا(غ)/ ماء(مل) على درجة حرارة (25 ± 1مْ) للمستخلصات المائية، في حين استُبدل الإيثانول بالماء المقطر في المستلخصات الكحولية ومن ثم القياس باستعمال جهاز الرفراكتومتر.

2-2-5- طرائق تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد:

قُدّر جلكوزيد الإستيفوزيد بالطريقة اللونية باستعمال جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer UV-VIS) وبطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC.

2-2-5-1- تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد بالطريقة اللونية:

قُدرت الكربوهيدرات الكلية وفق الطريقة المشار إليها من قبل (Dubois *et al*., 1956) إذ أُخذ 1 مل من المستخلصات المحضرة سابقاً وأُضيف إليها 5 مل من حمض الكبريت المركز (96%) و1 مل من الفينول (5%) ثم المزج السريع للمكونات باستخدام مازج الأنابيب. تُركت الأنابيب في حمام مائي على درجة حرارة 30مْ لمدة 20 دقيقة وقيست بعدها الامتصاصية عند طول موجة 490 نانومتر باستعمال جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer UV-VIS)، كما حُضر منحنى قياسي من الغلوكوز النقي بتركيز (0-800 ميكروغرام/مل)، ورسُمت العلاقة بين الامتصاصية الضوئية والتراكيز المختلفة من الغلوكوز النقي كما في الشكل (3).



الشكل (3): المنحنى القياسي لتقدير الغلوكوز.

بعد أن حُسبت الكربوهيدرات الكلية بطريقة (Dubois *et al.*, 1956) قُدر محتوى Stevioside من مستخلص نبات الستيفيا من خلال المعادلة التي تربط بين محتوى الكربوهيدات الكلية ومحتوى الـ Stevioside والمذكورة من قبل (Nishiyama *et al.*, 1991)

$$TC=7.56+0.96ST$$

TC: محتوى الكربوهيدرات الكلية. ST : محتوى جلكوزيد الإستيفوزيد.

2-2-5-2- تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC):

قُدّر جلكوزيد الإستيفوزيد بطريقة HPLC-UV وفق الطريقة المشار إليها من قبل (Afandi, 2015) عبر الشروط الآتية مع إجراء بعض التعديلات على حرارة العمود وطول الموجة وpH الطور المتحرك والموضحة كما يأتي:

- عمود من ستالس ستيل ODS-C18 (250×4.6 mm)
- حرارة العمود: 30 مْ.
- معدل التدفق: 1.5 مل/ دقيقة، الحقن (20 µl)
- طول الموجة: 205 نانومتر.
- الطور المتحرك: أسيتونتريل: ماء (80:20) عند pH=2.65.

- **تحضير العينة القياسية: (Standard Preparation)**

أُذيب (0.008 غ) من جلكوزيد الإستيفوزيد النقي في (10 مل) ميثانول بتركيز 800 ppm، ثم حُقنت العينة في جهاز HPLC بمقدار (20 µl).

- **تحضير الطور الحامل: (Preparation of the mobile phase)**

مُزج الاسيتونتريل مع ماء منزوع الشوارد بنسبة (20:80) ثم تم تخليته من الغازات باستخدام حمام (Ultrasonic) لمدة 30 دقيقة، وضُبط الـ pH عند 2.65 باستعمال حمض الفوسفور.

2-2-6- تقييم طرائق تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد:

2-2-6-1- تقدير الخطية:

قُيّمت طريقتا تقدير جلوكوزيد الإستيفوزيد من خلال تقدير الخطية إذ إن خطية الطريقة التحليلية هي تعبير عن قابليتها لإعطاء نتائج قياس متناسبة طرداً مع تركيز المادة المحللة في العينة ضمن المجال المعطى لها. عُيّنت خطية طريقة القياس وذلك بالرجوع إلى المنحنى القياسي المستخدم في الطريقة اللونية وطريقة HPLC، وحُسب معامل التحديد R^2 للتحقق من وجود علاقة ارتباط بين التراكيز والامتصاصية (Peters *et al.*, 2007).

2-2-6-1-1-تحضير المنحنى المعياري لجلكوزيد الإستيفوزيد بالطريقة اللونية:

حُضر محلول من جلكوزيد الإستيفوزيد بتركيز 10مغ/ 100مل ميثانول وعُد محلول أم (Mother solution) حُضرت منه سلسلة عيارية من جلوكوزيد الإستيفوزيد بتراكيز (0-800 ميكروغرام/مل) وبمعدل 3 مكررات لكل تركيز، ورسمت العلاقة بين الامتصاصية والتركيز.

2-2-6-1-2-تحضير المنحنى المعياري لجلكوزيد الإستيفوزيد بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC):

حضرت سلسلة عيارية من جلكوزيد الإستيفوزيد باستخدام الميثانول المطلق بتراكيز تتراوح من (100-800) ppm. حقنت التراكيز السابقة بجهاز HPLC بمقدار 20 ميكروليتر وبمعدل 3 مكررات لكل تركيز وفق الشروط المذكوزرة في الفقرة **(2-2-5-2)**.

2-2-7- تقدير درجة الحلاوة:

قُدّرت درجة الحلاوة النسبية لمستخلص الستيفيا المائي بطريقة تقدير درجة الحلاوة المطلقة (isima and kakayama, 1976) مع إجراء بعض التعديل، إذ تذوق 10 أفراد التراكيز المختلفة من المستخلص المائي لأوراق الستيفيا الجافة التي تتراوح مابين درجة حلاوة 100-200-250 مرة وذلك بإضافة (0.1غ، 0.05غ، 0.04غ)/ 100 مل من الستيفيا المقابل لتركيز 10% سكروز.

2-2-8- تصنيع بسكويت الشوفان المحلى بالستيفيا:

صُنع بسكويت الشوفان المُحلى بالستيفيا وذلك باستبدال السكروز بمستخلص الستيفيا بنسبة تعادل درجة حلاوة السكروز وفقاً للمكونات الموضحة في الجدول (3) من خلال إضافة المكونات وعجنها جيداً حتى تجانسها، وتركت للإراحة مدة 10 دقائق من أجل أن يأخذ البسكويت شكله الصحيح، ومن ثم نقلت إلى صفيحة تحميص البسكويت المغلّفة بورق الزبدة، وفُردت بثخانة تتراوح من 8 إلى 15 مم، بعدها قُطعت باستخدام قاطع دائري، وخُبزت باستخدام فرن كهربائي على درجة حرارة 180 مْ مدة 10 دقائق، وعند وصول درجة حرارة البسكويت إلى درجة حرارة الغرفة عبء في أكياس وتُرك إلى حين التحليل والاستهلاك.

الجدول (3) مكونات تصنيع بسكويت الشوفان

عجينة بسكويت الشاهد (السكروز)	عجينة بسكويت الشوفان المحلى بالستيفيا
80 غ شوفان ناعم	80 غ شوفان ناعم
20 غ شوفان خشن	20 غ شوفان خشن
2 غ فانيلا	2 غ فانيلا
3 غ بكينغ باودر	3 غ بكينغ باودر
50 مل زبدة نباتية	50 مل زبدة نباتية
20 غ سكروز/ 4 مل ماء	4 مل مستخلص ستيفيا

تم القيام بمجموعة من الاختبارات لتقدير أهم خصائص البسكويت بعد إضافة التراكيز المدروسة من السكروز والمستخلص المائي للستيفيا وتشمل الاختبارات الحسية (الشكل العام، القوام ، اللون، الطعم والنكهة، الطراوة، الإحساس بعد المضغ) والاختبارات الفيزيائية (القطر، الثخانة، معدل التمدد) والاختبارات الكيميائية (الرطوبة، الرماد).

2-2-9- الاختبارات الفيزيائية للبسكويت:

2-2-9-1-قطر البسكويت:

وضعت 6 قطع بسكويت الحافة على الحافة وقيس قطرها مرتين بفارق 90 درجة وحسب المتوسط (سم) وفق طريقة الزبيدي (2009).

2-2-9-2-ثخانة البسكويت:

قيست ثخانة البسكويت وفق طريقة الزبيدي (2009) بوضع 6 قطع من البسكويت فوق بعضها وقياس ارتفاعها ومن ثم إعادة ترتيبها مرة أخرى والقياس وحساب المتوسط (سم).

2-2-9-3-معدل التمدد:

حُسب وفق الطريقة المذكورة في الزبيدي (2009) وذلك بقسمة قطر البسكويت على ثخانته.

2-2-10- الاختبارات الكيميائية للبسكويت:

قُدر كل من (الرطوبة والرماد) لكل من بسكويت الشوفان العادي وبسكويت الشوفان المُحلى بالستيفيا.

2-2-10-1- تقدير محتوى الرطوبة:

قُدرّت نسبة الرطوبة بوزن 5 غ من كل عينة في طبق بتري، ووضعت الأطباق في فرن تجفيف على درجة حرارة 105 مْ حتى ثبات الوزن (AACC, 2000).

2-2-10-2- تقدير محتوى الرماد:

وذلك بحرق المادة العضوية، إذ أُخذ 2 غ من كل عينة ضمن بوتقة مجففة وموزونة ووضُعت في المرمدة على درجة حرارة احتراق (550 مْ) حتى ثبات الوزن مدة تتراوح من 5 إلى 6 ساعات (AACC, 2000)، حتى يصبح الرماد أبيض أو رمادياً فاتحاً.

2-2-11-الاختبارات الحسية للبسكويت:

أُجري تقييم حسي للصفات الحسية للبسكويت المُحلى بالستيفيا ومقارنته بالبسكويت العادي وفق الطريقة المعتمدة من قبل (AACC, 2000) مع إجراء بعض التعديل إذ استُبدلت خاصية مظهر السطح العلوي بالإحساس بعد المضغ وتقييمه من قبل فئات عديدة 30 شخصاً (أعضاء هيئة التدريس بكلية الزراعة، طلاب الدراسات العليا بكلية الزراعة) وفق الجدول (4).

الجدول (4) الخصائص النوعية للبسكويت المعتمدة من قبل AACC (2000).

الخصائص النوعية	الدرجة
المظهر	20
القوام	10
اللون	10
الطعم والنكهة	20
الطراوة	20
الإحساس بعد المضغ	20
المجموع	100

2-3- تصميم التجربة والتحليل الإحصائي:

2-3-1- تصميم التجربة لدراسة أفضل ظروف استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد:

دُرس تأثير ثلاثة أنواع من المذيبات (ماء، إيثانول مطلق، إيثانول 80%) لتحديد الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد المسؤول عن الطعم الحلو في أوراق الستيفيا باستعمال المتغيرين (درجة الحرارة، والزمن)، ودُرس كل متغير عند ثلاثة مستويات(-1 ،0 ،+1)، كما هو مبيّن في الجدول (5).

الجدول (5) مستويات المتغيرات المستخدمة في استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد لكل مذيب

المتغير	المستويات		
	1+	0	1-
درجة الحرارة	90	60	30
الزمن	90	60	30

استخدم تصميم التجارب المتقدم Response Surface Methodology (RSM) باستخدام برنامج Minitab Optimization Method لدراسة تأثير كل عامل على حدة وتأثير العوامل المتفاعلة مع بعضها بعضاً، وتضمن التصميم 14 معاملة و متغيرين (درجة الحرارة، والزمن) لكل نوع من المذيبات (ماء، إيثانول مطلق، إيثانول 80%) كماهو موضح في الجدول(6).

الجدول(6) تصميم التجربة لأمثلة استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد.

عدد المعاملات	القطاعات	الزمن	درجة الحرارة
1	1	30	30
2	1	30	90
3	1	90	30
4	1	90	90
5	1	60	60
6	1	60	60
7	1	60	60
8	2	60	30
9	2	60	90
10	2	30	60
11	2	90	60
12	2	60	60
13	2	60	60
14	2	60	60

2-3-2-التحليل الإحصائي:

2-3-2-1-التحليل الإحصائي لأفضل ظروف استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد:

عُبر عن العلاقة بين العامل المدروس (تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد) والمتغيرين (درجة الحرارة، الزمن) لكل مذيب بمعادلة من الدرجة الثانية كما يأتي:

$$Y=a+bX_1+cX_2+dX_1^2+eX_2^2-fX_1*X_2$$

$$Y=7.840+1.848\ X_1+1.385\ X_2+2.345\ X_1^2+0.495\ X_2^2-1.082X_1X_2$$

حيث:

Y: المعامل المدروس Response (تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد).

X_1: درجة الحرارة.

X_2: الزمن.

a: المعامل الثابت constant

b, c: المعاملات الخطية (Liner effect).

d, e: المعاملات المنحنية (Squares effect).

f: المعاملات المتداخلة (Interaction effect).

كما أُجري تحليل الانحدار Regression وتحليل التباين للمعاملات المدروسة.

2-3-2-2-التحليل الإحصائي للمؤشرات الفيزيوكيميائية والتقييم الحسي لعينات البسكويت المدروسة:

نُفذت التجارب بمعدل ثلاثة مكررات للاختبارات الفيزيوكيميائية وحُسبت المتوسطات والانحراف المعياري واستعمل اختبار Fisher's LSD unprotected لحساب أقل فرق معنوي والمقارنة بين المتوسطات وذلك عند مستوى ثقة 95% باستعمال برنامج Genstat 12.

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

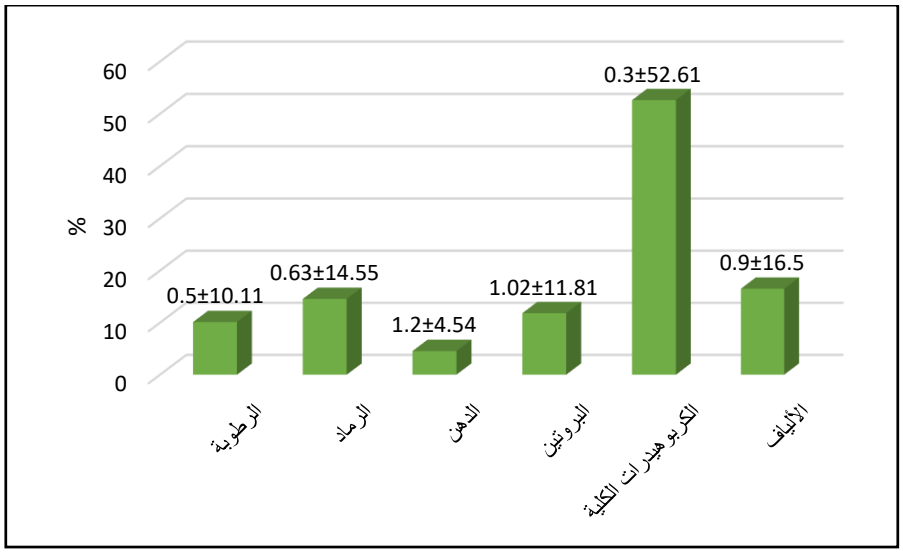
Results and Discussion

3-النتائج والمناقشة Results and Discussion :

3-1-التركيب الكيميائي لأوراق الستيفيا الجافة:

إن تقدير التركيب الكيميائي لأوراق الستيفيا الجافة عامل رئيس لتقييم جودة النبات. يوضح الشكل (4) التركيب الكيميائي لأوراق الستيفيا ريبوديانا المدروسة، إذ احتوت أوراق الستيفيا الجافة على رطوبة 10.11% وكانت متقاربة مع ما وجده (Gasmalla *et al.*, 2014) التي بلغت 10.73%، في حين لم تتوافق مع ما وجده (Abou-Arab *et al.*, 2010) ؛ (Goyal and Samsher, 2010) ؛ (Shuvo *et al.*, 2015) إذ بلغت 5.37%، 15.89%، 6.32% على التوالي؛ وهذا قد يكون عائداً إلى اختلاف ظروف التجفيف لأوراق الستيفيا ودرجات الحرارة المستخدمة. إذ جُفّفت الأوراق المستخدمة في هذا البحث على درجة حرارة الغرفة في حين قام (Shuvo *et al.*, 2015) بالتجفيف على درجة حرارة 200مْ مدة 5 ساعات. كما بيّن الشكل (4) محتوى الرماد والدهن في أوراق الستيفيا الجافة الذي بلغ 14.55، 4.54 % على التوالي، تقاربت نتائج الرماد والدهن مع (Tadhani and Sabhash, 2007) إذ كان الرماد 13.1% أما الدهن 4.34%، واختلفت هذه النتائج مع (Goyal and Samsher, 2010) إذ كان محتوى الرماد والدهن 6.3%، 1.9% على التوالي، ويمكن أن يكون هذا عائداً إلى اختلاف المحتوى الرطوبي. كما بلغ محتوى أوراق الستيفيا الجافة على نسبة البروتين 11.81% الشكل (4)، وتقاربت هذه النتيجة مع دراسة (Abou-Arab *et al.*, 2010)؛ (Galal, 2002) إذ كان البروتين 11.41%، 11.20% على التوالي. وفي دراسة أخرى قام بها كل من Tadhaniو Sabhash (2007) كانت أعلى قيمة للبروتين لنبات الستيفيا ريبوديانا 20.4%، وأدنى قيمة للبروتين كانت 11.2% (Goyal *et al.*, 2010). من ناحية أخرى تراوحت نسبة البروتين في الستيفيا المزروعة في المكسيك (Campos *et al.*, 2014) من 12.11 إلى 15.05%، وقد يكون هذا الاختلاف في النتائج عائداً إلى الصنف المزروع والظروف المناخية التي زُرع فيها نبات الستيفيا وإلى عوامل بيئية أخرى، مثل التربة والمياه ودرجة الحرارة، أثرت في التركيب الكيميائي لنبات الستيفيا (Chughtai, 2019). شكلت الكربوهيدرات الكلية المحتوى الأعلى بين المكونات

الأساسية للستيفيا الشكل (4)، إذ بلغت نسبة الكربوهيدرات الكلية 52.61% وهي متوافقة مع ما أشار إليه (Shuvo *et al.*, 2015)؛ (Serio, 2010)؛ (Galal, 2002). في حين كان محتوى أوراق الستيفيا المدروسة أقل مما وجده (Chughtai, 2019)؛ (Badr, El-sanat, 2008) إذ بلغ محتوى الكربوهيدرات في أوراق الستيفيا الجافة 63.59%، 69.18% على التوالي. يبّين الجدول (7) أن محتوى أوراق الستيفيا الجافة من السكريات المختزلة والسكريات غير المختزلة كانت 5.44%، 10.91% على التوالي، وتقاربت هذه النتائج مع ماتوصل إليه (Abou-Arab *et al.*, 2010) حيث أفادوا أن السكريات المختزلة والسكريات غير المختزلة في أوراق الستيفيا كانت 5.88%، 9.77% على التوالي، في حين كان محتوى أوراق الستيفيا الجافة من السكريات المختزلة والسكريات غير المختزلة أكبر مقارنةً مع دراسة (Shuvo *et al.*, 2015) إذ كانت 3.62%، 7.11% على التوالي. وكذلك يبين الشكل (4) أن محتوى أوراق الستيفيا المدروسة من الألياف الخام 16.5 % إذ تقاربت نتيجة الألياف مع كل من (Abou-Arab *et al.*, 2010)؛ (Galal, 2002) التي بلغت 15.52%، 15.63% على التوالي، في حين لم تتوافق مع (Khalil *et al.*, 2015) إذ كانت الألياف الخام 11.5% ويمكن أن يكون هذا عائداً إلى الظروف المناخية للستيفيا المدروسة نظراً لاستعمالهم الستيفيا من منشأ صيني.



الشكل (4): التركيب الكيميائي لأوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة.

كما أظهر الجدول (7) محتوى أوراق الستيفيا الجافة من الطاقة الكلية لأوراق الستيفيا الجافة التي بلغت 298.54 kcal/100g، وهذا لم يتوافق مع (Gasmalla *et al.*, 2014) إذ كانت الطاقة الكلية لأوراق الستيفيا الجافة 362.29 kcal/100g. ويمكن أن يعود هذا الاختلاف إلى ارتفاع كمية الكربوهيدرات والدهن والبروتين في أوراق الستيفيا الجافة إذ كانت 63.10%، 6.13%، 13.68% على التوالي. من هنا يمكن أن نستنتج أن الستيفيا تعد مصدراً جيداً للطاقة.

الجدول (7) المكونات الحلوة لأوراق الستيفيا الجافة (المتوسط الحسابي± الانحراف المعياري).

المكونات	القيم (%)
السكريات المختزلة	0.63±5.44
السكريات غير المختزلة	0.54±10.91
الطاقة الكلية (kcal/100g)	1.27 ± 298.54

3-2-الخصائص الفعالة حيوياً لأوراق الستيفيا الجافة:

3-2-1- المحتوى من الفينولات الكلية:

تعد أوراق الستيفيا من المصادر الجيدة للمركبات الفعالة حيوياً كالفينولات (Jahan *et al.*, 2010). يبّين الجدول (8) محتوى أوراق الستيفيا الجافة من الفينولات الكلية إذ كان 32.75 مغ/غ، وكانت كمية الفينولات الكلية أكبر مقارنة مع ماتوصل إليه (Tadhani and Sabhash, 2007) اللذان وجدا أن كمية الفينولات الكلية لأوراق الستيفيا الجافة كان 25.18 مغ/غ، وهذا عائد إلى طريقة استخلاص Tadhani and Sabhash للفينولات الكلية إذ طبقا طريقة الاستخلاص على الساخن. في حين كانت كمية الفينولات الكلية أقل مقارنةً بما وجده (Shukla *et al.*, 2009) إذ بلغت 61.50 مغ/غ، ويمكن أن يكون هذا عائداً إلى استعمال الإيثانول في الاستخلاص. وفي دراسة أخرى لـ (Khalil *et al.*, 2015) قام بتقدير الفينولات الكلية للستيفيا باستعمال طرائق تجفيف مختلفة وأصناف مختلفة إذ وجدوا فروقاً معنوية للفينولات الكلية بطرائق التجفيف، ولكنها كانت أكثر تأثراً في اختلاف الأصناف

إذ بلغت أعلى نسبة للفينولات الكلية لستيفيا الصنف الصيني المجفف بالهواء الطلق (18.8مغ/غ)، في حين كانت أقل نسبة للفينولات الكلية (13.2مغ/غ) في صنف الستيفيا الإسباني عند التجفيف بالفرن على درجة حرارة 60مْ.

3-2-2- النشاط المضاد للأكسدة:

قُدّر نشاط المواد المؤكسدة المستخلصة بوساطة الميثانول لأوراق الستيفيا الجافة معبراً عنه بالمللي مكافئ غرامي من حمض الغاليك إذ كان النشاط المضاد للأكسدة 86.97% الجدول (8). ويعود غنى الستيفيا بمضادات الأكسدة إلى ارتفاع تركيز المركبات الفعالة حيوياً فيها (Sohag Howlader *et al.*, 2016). لم تتوافق هذه النتائج مع (Shukla *et al.*, 2011) إذ احتوى المستخلص المائي على 64.26% من مضادات الأكسدة، في حين كانت قيمة مضادات الأكسدة الناتجة من أوراق الستيفيا في المستخلص الإيثانولي (Shukla *et al.*, 2009) 62.76%. كما كانت أكبر مما توصل إليه (Tadhani and Sabhash, 2007) إذ بلغت قيمة مضادات الأكسدة الناتجة من أوراق الستيفيا في المستخلص المائي 55.42%، وكانت قيمة مضادات الأكسدة في المستخلص الإيثانولي لأوراق الستيفيا 67.08% (2010) Ahmad *et al.*, . في حين بلغت قيمة مضادات الأكسدة في المستخلص الميثانولي لأوراق الستيفيا 96.91% (2010) Muanda *et al.*, . تشير هذه النتيجة العالية للنشاط المضاد للأكسدة في المستخلص الميثانولي إلى القطبية العالية التي يمتاز بها الميثانول وقدرته على استخلاص مركبات الفينول بكمية أعلى مقارنةً بالمذيبات الأخرى (Cai *et al.*, 2004) إذ إن وجود مركبات الفينول قد يسهم بشكل مباشر كمضادات أكسدة.

الجدول (8) المركبات الفعالة حيوياً في أوراق الستيفيا الجافة (المتوسط الحسابي± الانحراف المعياري).

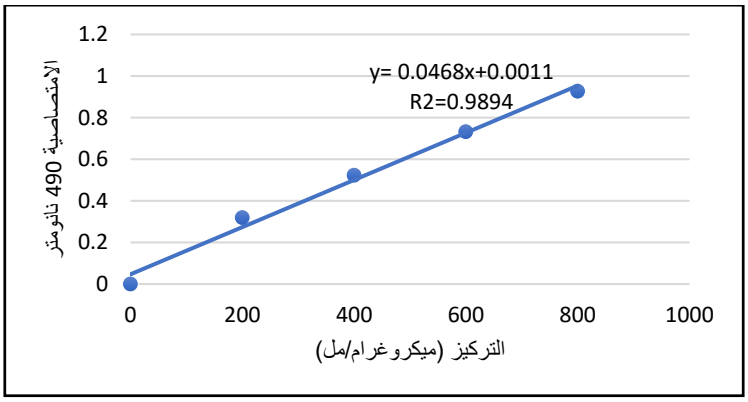
المكونات	القيم
الفينولات الكلية (مغ/ غ)	2.45±32.75
النشاط المضاد للأكسدة (%)	1.27±86.97

3-3-تقييم طرائق التقدير:

قيمت الطرائق المستخدمة (اللونية والكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء) في تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد وذلك عن طريق الخطية:

3-3-1-الخطية:

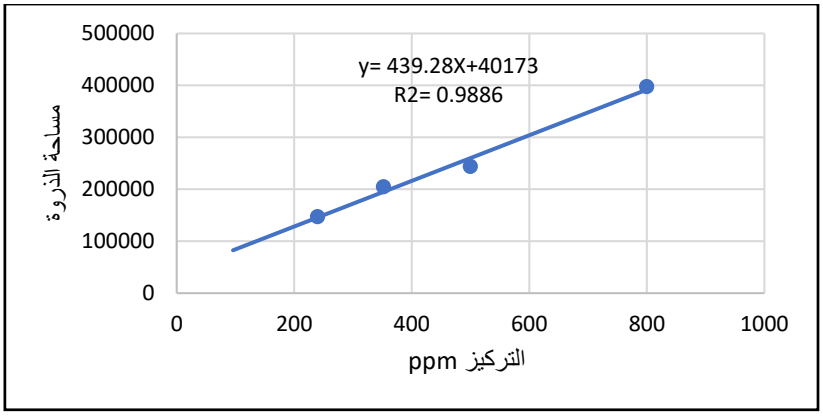
أظهرت نتائج تحليل المنحنى القياسي لجلكوزيد الإستيفوزيد المقدر بالطريقة اللونية. الموضحة بالشكل (5) وجود علاقة خطية جيدة ضمن مجال التراكيز المختارة (0-800 ميكروغرام/مل)، إذ كان هناك زيادة في قيم الامتصاصية بزيادة التركيز وبلغت قيمة معامل الارتباط R^2=0.9894 والميل 0.0468. اتفقت النتائج مع ما توصل إليه (Galal, 2002) بوجود علاقة خطية ضمن المجال (1-10 مكغ/مل) وكان معامل الارتباط R^2=0.998.



الشكل (5): المنحنى القياسي لجلكوزيد الإستيفوزيد المقدر بالطريقة اللونية.

كما تشير نتائج المنحني القياسي لجلكوزيد الإستيفوزيد المقدر بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC والموضحة بالشكل (6) إلى وجود علاقة خطية جيدة ضمن مجال التراكيز المستخدمة (100-800) ppm، إذ كان هناك زيادة في مساحة الذروة بزيادة التركيز، وبلغت قيمة معامل الارتباط 0.9886= R^2 والميل 439.28. كانت النتائج متوافقة مع ما أشار إليه الباحث (Man Kim *et al.*, 2021) بوجود علاقة خطية جيدة عند تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد ضمن المجال (1-50 مكغ/مل) وكانت قيمR^2 = 0.999 ، كما أوضح الباحث

Congmin Yu *et al.*, (2011) وجود علاقة خطية أيضاً عند تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد ضمن المجال (500-2500 مغ/كغ) وكانت قيمة R^2 =0.999.



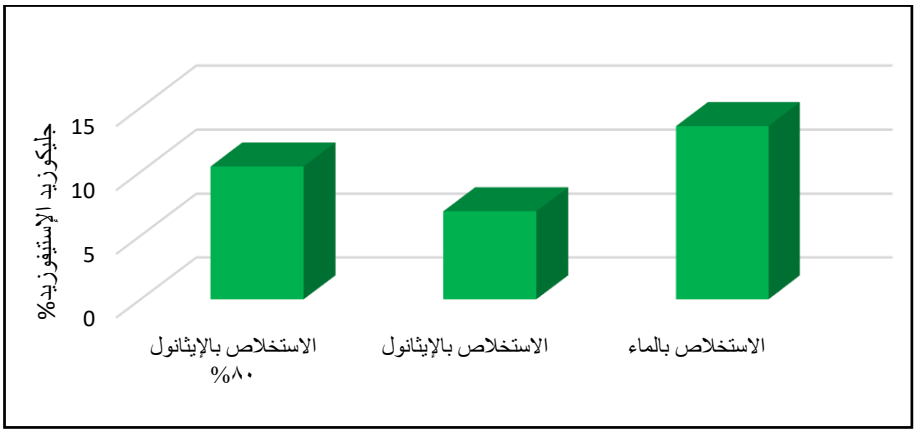
الشكل (6): المنحنى القياسي لجلكوزيد الإستيفوزيد المقدر بطريقة HPLC.

مما سبق نلاحظ أنه يمكن تقدير الإستيفوزيد باستعمال الطرائق المدروسة، وبالمقارنة بين الشكل (5 و6) نلاحظ أن الطريقة اللونية أعطت نتائج دقيقة وبسيطة، كما يمكن تحليل العديد من العينات بوقت واحد إذ تُعدّ طريقة غير مكلفة اقتصادياً مقارنةً بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء وبالتالي لا حاجة لتقدير جلكوزيد الإستيفوزيد بطريقة HPLC بوجود الطريقة اللونية.

3-4-تأثير نوع المذيب في استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات الستيفيا ريبوديانا:

تتأثر كفاءة استخلاص الجلكوزيدات بعوامل متعددة مثل الوقت ودرجة الحرارة و قطبية المذيب، وقد تكون آثارها إما مستقلة أو تفاعلية. يوضح الشكل (7) أن الاستخلاص بالماء أعطى أعلى تركيز لجلكوزيد الإستيفوزيد بالمستخلص الناتج إذ بلغ 13.56% ، يليه الإيثانول 80% (10.41%)، ثم الإيثانول المطلق (6.91%)، وهذا يتوافق مع ماوجده (Jackson *et al.*, 2007) وقد أكّد (Afandi, 2015) أنه كلما زادت قطبية المذيب زادت كفاءة الاستخلاص وأن أعلى تركيز لجلكوزيدات الستيفيا كان عند الاستخلاص بالماء ومن ثم الإيثانول 50% يليه الإيثانول المطلق. كما توافقت هذه النتائج مع ماأشار إليه (Badr, El-sanat, 2008) بأن تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد باستعمال الإيثانول 50% و الإيثانول المطلق بلغ (9.98%، 9.60%) على التوالي. في حين

اختلفت النتائج المدروسة مع ماوجده (Muthusamy, Abdul Munaim, 2019) بأن الإيثانول المطلق أعطى أعلى تركيز لجلكوزيد الإستيفوزيد 12.48% ويمكن أن يكون هذا عائد أيضاً إلى اختلاف درجات الحرارة المستعملة (40 مْ) وزمن الاستخلاص (60 دقيقة) ونسبة الاستخلاص إذ تم الاستخلاص بنسبة 1غ ستيفيا إلى 25 مل إيثانول.



الشكل (7): كمية جلكوزيد الإستيفوزيد في أوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة.

3-5- تأثير ظروف الاستخلاص المدروسة في كمية جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة من أوراق الستيفيا ريبوديانا:

دُرس تأثير كل من درجة الحرارة والزمن في كفاءة استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد الناتج من مستخلصات أوراق الستيفيا باستعمال ثلاثة أنواع من المذيبات (الماء النقي، الإيثانول80%، الإيثانول المطلق) بنسبة 14:1 (أوراق الستيفيا(غ) : مذيب (مل)) وفق التصميم الإحصائي Response Surface Methology (RSM) ، وكان تأثير كل من الحرارة والزمن وتأثيراتها المتداخلة للمستخلصات المائية والكحولية كما يلي :

3-5-1-المستخلصات المائية:

تبيّن النتائج في الجدول (9) المؤشرات الكيميائية لتركيب المستخلصات الناتجة من حيث (كمية جلكوزيد الإستيفوزيد، تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية TSS، pH)، إذ تراوح تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلصات المائية من 6.15% إلى 13.56% وهذا يتوافق مع (Sangha, 2011) كما نلاحظ أنَّ إجمالي

المواد الصلبة الذائبة الكلية الموجودة في المستخلصات المائية زاد تركيزها من 3.7 إلى 4.2 بزيادة الزمن ودرجة الحرارة (90 دقيقة، 90 مْ) بالرغم من انخفاض تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد، وهذا يتوافق مع (Sangha, 2011) إذ كانت قيمة TSS في المستخلص المائي لأوراق الستيفيا تزداد بزيادة درجة الحرارة والزمن وتنخفض بانخفاضهما؛ الذي فسر ذلك بزيادة كمية الشوائب أو تحلل الإستيفوزيد بزيادة درجة الحرارة والزمن، في حين لم يتوافق مع (Badr and El-sanat, 2008) الذي بيّن أنه لم يكن لدرجة الحرارة تأثير معنوي في قيمة المواد الصلبة الذائبة TSS . كذلك يبيّن الجدول (9) تأثير كل من الزمن ودرجة الحرارة في درجة الحموضة إذ تراوحت من 5.2 إلى 5.7 في المستخلصات المائية وكان هناك علاقة ارتباط سلبية ضعيفة (r= -0.2)، وتوافقت هذه النتائج مع (Shuvo *et al.*, 2015) في حين أشار (Sangha, 2011) الى وجود علاقة ارتباط قوية (r= 0.92) بين كل من (الزمن ودرجة الحرارة) ودرجة الحموضة للمستخلصات الناتجة ، ويمكن أن يُعزى سبب هذا الاختلاف إلى استعمال نسب استخلاص مختلفة من أوراق الستيفيا: ماء.

الجدول (9) المؤشرات الكيميائية لمستخلصات جلكوزيد الإستيفوزيد وفق ظروف الاستخلاص المدروسة باستعمال الماء.

ظروف الاستخلاص				المؤشرات الكيميائية		
المعاملات	Block	الزمن	درجة الحرارة	%stevioside*	TSS (Brix)	Ph
1	1	30	30	6.15	3.7	5.7
2	1	30	90	11.68	3.8	5.6
3	1	90	30	12.36	3.7	5.7
4	1	90	90	**13.56**	**4.2**	**5.6**
5	1	60	60	8.58	3.8	5.5
6	1	60	60	7.68	3.9	5.4
7	1	60	60	6.37	3.9	5.5
8	2	60	30	7.49	3.9	5.7
9	2	60	90	11.85	4	5.6
10	2	30	60	7.71	3.8	5.5
11	2	90	60	7.93	4.1	5.2
12	2	60	60	8.21	3.7	5.5
13	2	60	60	8.62	3.8	5.4
14	2	60	60	8.61	3.9	5.6

*(غ/ 100غ أوراق جافة)

أثرت درجة حرارة الاستخلاص تأثيراً معنوياً في كفاءة استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلص من أوراق الستيفيا، إذ تشير النتائج الموضحة في الجدول (10) إلى أن التأثير الخطي و(درجة الحرارة)^2 كان معنوياً بالنسبة للاستخلاص بالماء، كما تشير النتائج إلى وجود معادلة من الدرجة الثانية ومعنوية بين ارتفاع درجة الحرارة ومحتوى جلكوزيد الإستيفوزيد وذلك نتيجة التأثير المعنوي لـ (درجة الحرارة)^2 في جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلص من أوراق الستيفيا ريبوديانا حيث كانت قيمة ($P < 0.05$). كما بيّنت نتائج التحليل الإحصائي الموضحة في الجدول (10) أن تأثير(الزمن)^2 في الاستخلاص بالماء لم يكن معنوياً ($P>0.05$)، بل كان له تأثير خطي معنوي ($P < 0.05$) على جلكوزيد الإستيفوزيد.

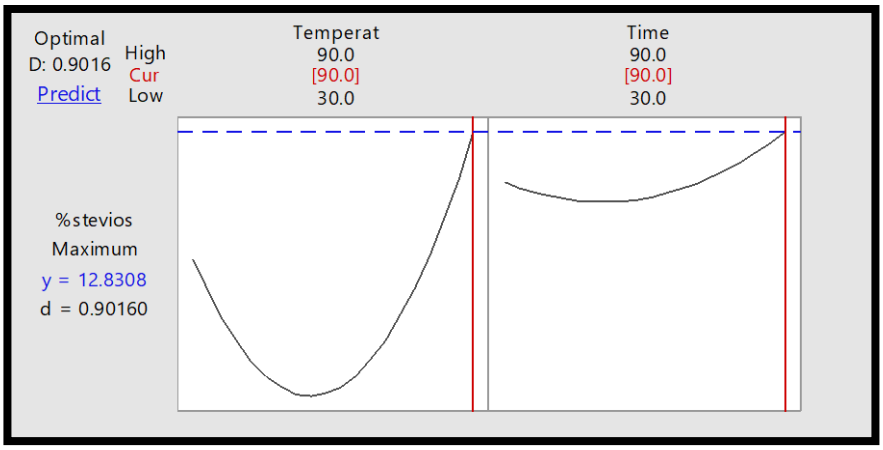
الجدول (10) تأثير العوامل المدروسة في استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات الستيفيا ريبوديانا باستعمال الماء إحصائياً.

العامل	Coef	SE Coef	T	P
الثابت	7.840	0.442	17.76	0.000
درجة الحرارة(X_1)	1.848	0.470	3.93	**0.004**
الزمن(X_2)	1.385	0.470	2.95	**0.019**
درجة حرارة*درجة حرارة$(X_1)^2$	2.345	0.684	3.43	**0.009**
الزمن*الزمن$(X_2)^2$	0.495	0.684	0.72	0.490
درجة الحرارة*الزمن (X_1*X_2)	-1.082	0.576	-1.88	**0.047**

يبيّن التحليل الإحصائي في الجدول (10) وجود علاقات تداخل (Interaction effect) بين المتغيرين (الزمن، درجة الحرارة) بالنسبة لكمية جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة بوساطة الماء من أوراق الستيفيا ريبوديانا، إذ كانت العلاقة بين درجة حرارة الاستخلاص والزمن معنوية ($P < 0.05$). كما بلغت قيمة معامل التحديد (R^2 = 84.92%)؛ وهذا يدل على أن العوامل المتغيرة المدروسة مسؤولة عن (R^2= 84.92%) من مقدار التغير في كمية جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة بالماء. وبالاعتماد على الجدول (10) يمكن كتابة المعادلة التي تربط بين المتغيرات المدروسة (X) مع جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلص(Y) كما يأتي:

$$Y=8.40- 0.179\ X1+ 0.052\ X2+0.002606\ X1^2+ 0.000550\ X2^2- 0.001203\ X1*X2$$

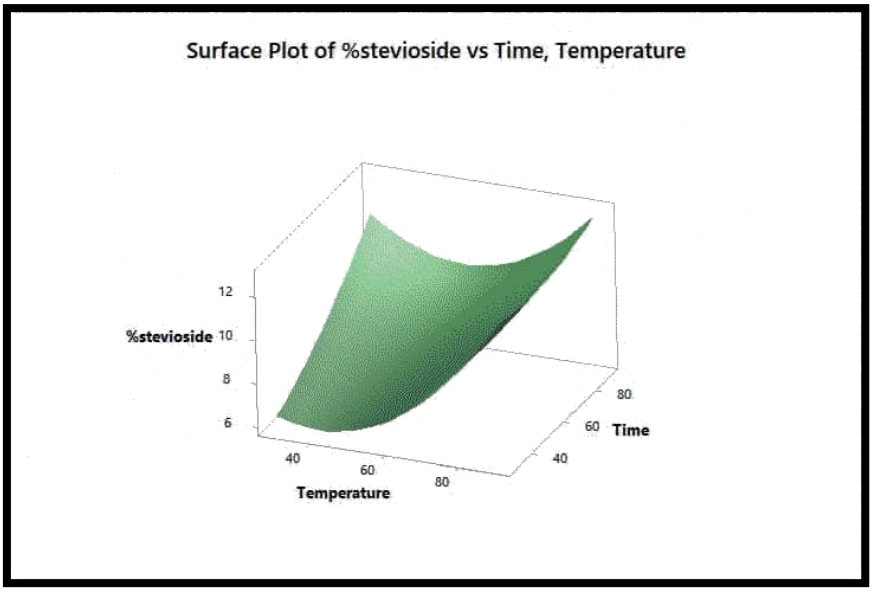
أظهر التحليل الإحصائي الموضح بالشكل (8) أن الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا بالماء كانت عند درجة حرارة (90 مْ) وزمن (90 دقيقة)؛ إذْ بلغت قيمة جلكوزيد الإستيفوزيد (12.83%) وهو أعلى مما توصل إليه (Khalil *et al.*, 2015) إذ بلغت قيمة جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلص المائي 6.22%، ويمكن أن يعود هذا الاختلاف إلى ظروف الاستخلاص التي طبقها الباحثون في تجربتهم ، فكانت نسبة الاستخلاص 50:1 (أوراق الستيفيا(غ) : ماء(مل)) و درجة الحرارة65 مْ مدة 3 ساعات.



الشكل (8): الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد في الماء.

يبين الشكل (9،8) أن زيادة درجة الحرارة من 30مْ إلى 60مْ أدى إلى انخفاض في تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد يليه ارتفاع في تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد بزيادة درجة الحرارة من (60مْ إلى 90مْ). ويمكن أن يعزى انخفاض محتوى المستخلص من جلكوزيد الإستيفوزيد عند ارتفاع درجة الحرارة من 30مْ إلى 60مْ إلى تأثير الزمن، وهذا مايبينه الجدول (10) الذي يشير إلى وجود تأثير معنوي للتفاعل بين (درجة الحرارة*الزمن). من جهة أخرى بدأ محتوى المستخلص من جلكوزيد الإستيفوزيد بالانخفاض من زمن 30 دقيقة ولغاية 60 دقيقة الشكل (9،8)، كما نلاحظ من الشكل (9،8) أن زيادة الزمن من (60-90 دقيقة) أدى إلى زيادة معنوية في كفاءة استخلاص

جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا، وهذا يتوافق مع (Jentzer *et al.*, 2019) الذي بيّن أن زيادة الزمن تزيد من فرصة تماس المذيب مع المادة ومن ثم زيادة كفاءة استخلاص جلكوزيدات الستيفيا.



الشكل (9): تأثير درجة الحرارة والزمن في تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة في الماء.

3-5-2- المستخلصات الكحولية (الإيثانول 80%):

يبين الجدول (11) المؤشرات الكيميائية لتركيب المستخلصات الناتجة من حيث (كمية جلكوزيد الإستيفوزيد، تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية TSS، pH). إذ يبين الجدول (11) أنّ أعلى تركيز لجلكوزيد الإستيفوزيد يمكن الحصول عليه وفق الظروف المحددة هو **10.41%** عند الاستخلاص بالإيثانول 80% بدرجة حرارة 90مْ وزمن 60 دقيقة، إذ كان تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية TSS (2.5) و pH 6.02، وقد لوحظ الجدول (11) أنه لم يكن هناك أي تأثير لدرجة الحرارة والزمن على تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية وعلى درجة الحموضة.

الجدول (11) المؤشرات الكيميائية لمستخلصات جلكوزيد الإستيفوزيد وفق ظروف الاستخلاص المدروسة باستعمال الإيثانول80%.

ظروف الاستخلاص				المؤشرات الكيميائية		
المعاملات	Block	الزمن	درجة الحرارة	%stevioside*	TSS (Brix)	pH
1	1	30	30	4.22	3.9	6.01
2	1	30	90	9.17	3.2	6.05
3	1	90	30	4.87	2	6.03
4	1	90	90	8.57	3.4	6.02
5	1	60	60	7.33	3.2	5.89
6	1	60	60	5.25	2.2	5.86
7	1	60	60	5.27	2.4	5.89
8	2	60	30	4.73	2.4	6.01
9	2	60	90	**10.41**	**2.5**	**6.02**
10	2	30	60	6.92	2.7	5.86
11	2	90	60	6.54	2.8	5.94
12	2	60	60	6.89	2.2	5.84
13	2	60	60	7.73	2.3	5.89
14	2	60	60	9.41	2.9	6.01

*(غ/ 100غ أوراق جافة)

أظهر الجدول (12) وجود علاقة تفاعل متبادل معنوي بين درجة الحرارة وكمية جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة باستعمال الإيثانول 80% ($P < 0.05$) في حين كانت باقي العلاقات (الزمن(X_2)، درجة حرارة*درجة حرارة (X_1)^2، الزمن*الزمن(X_2)^2، درجة الحرارة*الزمن (X_1*X_2)) غير معنوية ($P>0.05$) في تأثيرها على كمية جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلص من أوراق الستيفيا، وبلغت قيمة معامل التحديد (R^2= 84.80%)؛ وهذا يدل على أن (درجة الحرارة) مسؤولة عن (R^2= 84.80%) من مقدار التغير في كمية جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة بالإيثانول 80% .

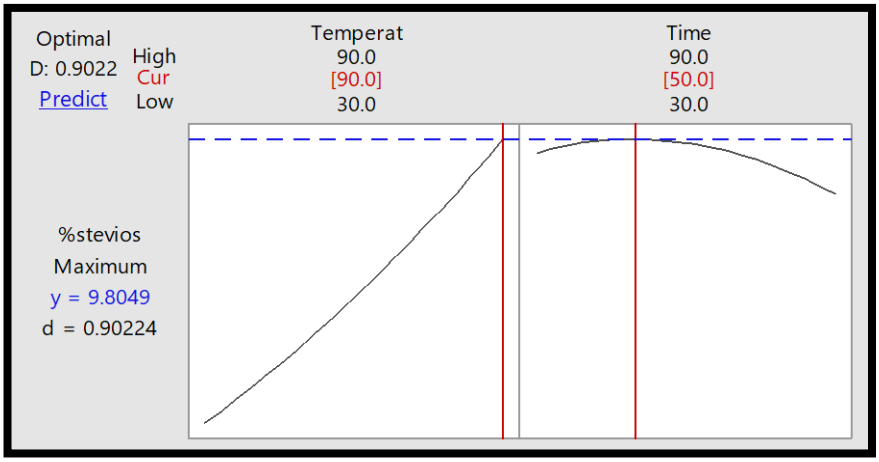
الجدول (12) تأثير العوامل المدروسة في استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات الستيفيا ريبوديانا باستعمال الإيثانول80% إحصائياً.

العامل	Coef	SE Coef	T	P
الثابت	7.052	0.497	14.18	0.000
درجة الحرارة(X_1)	2.388	0.529	4.51	**0.002**
الزمن(X_2)	-0.055	0.529	-0.10	0.920
درجة حرارة*درجة حرارة(X_1^2)	0.302	0.770	0.39	0.705
الزمن*الزمن(X_2^2)	-0.538	0.770	-0.70	0.504
درجة الحرارة*الزمن (X_1*X_2)	-0.313	0.648	-0.48	0.643

بالاعتماد على نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (12) يمكن كتابة المعادلة الرياضية الآتية التي تبيّن تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلص من نبات الستيفيا باستعمال محلول إيثانول 80%:

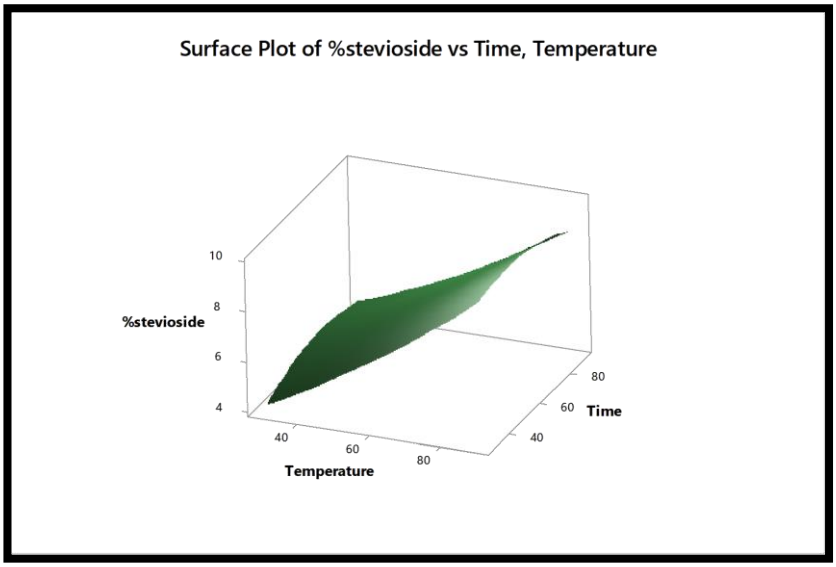
$$Y=0.19+ 0.060\ X1+ 0.091X2+ 0.000335X1^2- 0.000598X2^2- 0.000347\ X1*X2$$

أظهر التحليل الإحصائي والموضح في الشكل (10) الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات الستيفيا باستعمال الإيثانول 80%. إذ كان الزمن المثالي لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد باستعمال الإيثانول 80% هو (50 د)؛ وذلك ضمن درجة الحرارة المثالية للتجربة (90 مْ) إذْ وصل التركيز الأعظمي لجلكوزيد الإستيفوزيد إلى (9.80%).



الشكل (10): الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد في الإيثانول 80%.

يوضح الشكل (11) تأثير العوامل المدروسة (درجة الحرارة والزمن) في تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة باستعمال الإيثانول 80%، إذ أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (11،10) أن زيادة درجة حرارة الاستخلاص أدت إلى زيادة تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد وكان أعلى تركيز له عند درجة حرارة 90مْ، وقد تُعزى الزيادة في تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد عند درجات حرارة عالية إلى زيادة سرعة التفاعل، ومن ثم سهولة فصل الإستيفوزيد من الشوائب الأخرى (Sangha, 2011). كما لوحظ من الشكل (11،10) أن كمية جلكوزيد الإستيفوزيد تزداد بزيادة الزمن من (30 إلى 60 دقيقة)، في حين تنخفض عند ازدياد الزمن من (60 إلى 90 دقيقة) وذلك عند درجة حرارة 90مْ ولكنها غير معنوية (الجدول 12)، وأظهر Sangha (2011) أن ازدياد الزمن مع زيادة درجة الحرارة يمكن أن يؤدي إلى تحلل الستيفوزيد.



الشكل (11): تأثير درجة الحرارة والزمن في تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة في الإيثانول 80%.

3-5-3-المستخلصات الكحولية (الإيثانول المطلق):

يبيّن الجدول (13) المؤشرات الكيميائية لمستخلصات الإيثانول المطلق من حيث (كمية جلكوزيد الإستيفوزيد، تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية TSS، pH). تراوح تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلصات الإيثانولية المطلقة من **1.28%** إلى **6.91%** الذي كان أعلى تركيز لجلكوزيد الإستيفوزيد يمكن الحصول عليه وفق

الظروف المحددة بدرجة حرارة 90مْ وزمن 30 دقيقة. من جهة أخرى يبيّن الجدول (13) أنه لم يكن هناك أي تأثير لدرجة الحرارة والزمن على تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية الموجودة في مستخلصات الإيثانول المطلق، كذلك يبيّن الجدول (13) تأثير كل من الزمن ودرجة الحرارة على درجة الحموضة إذ كان هناك انخفاض حاد في درجة الحموضة في المستخلصات الإيثانولية المطلقة كلما زادت درجة الحرارة، وكان هناك علاقة ارتباط سلبية قوية بين درجة الحرارة ودرجة الحموضة في المستخلصات الإيثانولية المطلقة (r= -0.7).

الجدول (13) المؤشرات الكيميائية لمستخلصات جلكوزيد الإستيفوزيد وفق ظروف الاستخلاص المدروسة باستعمال الإيثانول المطلق.

ظروف الاستخلاص				المؤشرات الكيميائية		
المعاملات	Block	الزمن	درجة الحرارة	%stevioside*	TSS (Brix)	pH
1	1	30	30	1.71	3.3	5.2
2	1	30	90	**6.91**	**2.4**	**4.9**
3	1	90	30	2.99	3.8	5.1
4	1	90	90	6.44	2.1	4.8
5	1	60	60	2.99	2.2	4.9
6	1	60	60	2.60	2.5	4.8
7	1	60	60	3.84	2.7	4.9
8	2	60	30	1.28	3.1	5.2
9	2	60	90	6.15	2.1	4.7
10	2	30	60	4.56	2.8	4.9
11	2	90	60	2.43	2.9	4.6
12	2	60	60	4.63	2.2	4.8
13	2	60	60	3.07	2.6	4.9
14	2	60	60	4.39	2.3	4.9

*(غ/ 100غ أوراق جافة)

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي الموضحة في الجدول (14) إلى أن تأثير (درجة الحرارة)^2 في الاستخلاص بالإيثانول النقي لم يكن له أي تأثير معنوي ($P> 0.05$) في حين كان لدرجة الحرارة تأثير خطي معنوي في الاستخلاص بالإيثانول المطلق ($0.05 > P$)، كما نلاحظ من الجدول (14) أنَّ باقي العلاقات كانت غير معنوية ($P> 0.05$) في تأثيرها على كمية جلكوزيد الإستيفوزيد. بلغت قيمة معامل الارتباط ($R^2 = 82.20\%$)؛

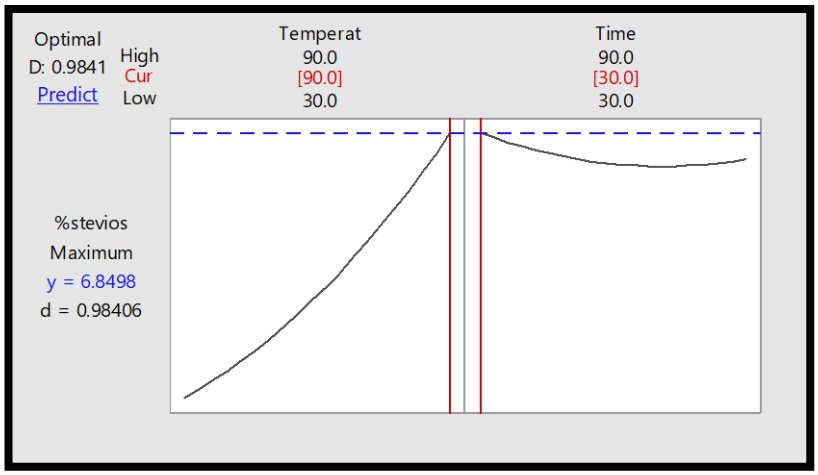
وهذا يدل على أن (درجة الحرارة) مسؤولة عن (R^2 = 82.20%) من مقدار التغير في كمية جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة بالإيثانول المطلق. وبالاعتماد على الجدول (14) يمكن كتابة المعادلة التي تربط بين المتغيرات المدروسة (X) مع جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلص (Y) كما يأتي:

$$Y=1.83+ 0.0147\ X1- 0.0328\ X2+ 0.000608\ X1^2+ 0.000363X2^2- 0.000208X1*X2$$

الجدول (14) تأثير العوامل المدروسة في استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من نبات الستيفيا ريبوديانا باستعمال الإيثانول المطلق إحصائياً.

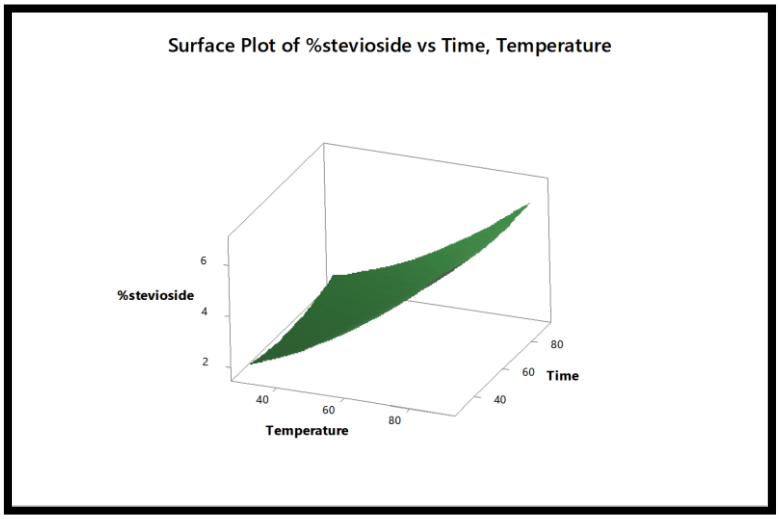
العامل	Coef	SE Coef	T	P
الثابت	3.482	0.362	9.62	0.000
درجة الحرارة(X_1)	2.253	0.385	5.85	**0.001**
الزمن(X_2)	-0.053	0.385	-0.14	0.893
درجة حرارة*درجة حرارة(X_1)^2	0.547	0.561	0.98	0.358
الزمن*الزمن(X_2)^2	0.327	0.561	0.58	0.576
درجة الحرارة*الزمن (X_1*X_2)	-0.187	0.472	-0.40	0.701

أظهر التحليل الإحصائي أن الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من الأوراق باستعمال الإيثانول المطلق كانت عند درجة حرارة 90 مْ ولمدة 30 دقيقة إذ وصل تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد إلى 6.85%، كما نلاحظ من الشكل (12).



الشكل (12): الظروف المثلى لاستخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد في الإيثانول المطلق.

يوضح الشكل (13) تأثير درجة الحرارة والزمن في تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلص باستعمال الإيثانول المطلق كوسط للاستخلاص. أظهرت النتائج أنّ رفع درجة الحرارة من 30 إلى 90 مْ عند جميع أزمنة الاستخلاص المدروسة أسهم في زيادة تركيز جلكوزيدات الإستيفوزيد المستخلصة، وكان التركيز الأعلى من جلكوزيد الإستيفوزيد عند درجة حرارة 90مْ ولمدة 30 دقيقة. وقد تُعزى الزيادة في محتوى الإستيفوزيد عند درجات حرارة عالية إلى زيادة سرعة التفاعل ومن ثم سهولة فصل الإستيفوزيد من الشوائب الأخرى (Sangha, 2011)، وقد لوحظ من الشكل (12، 13) أن زيادة الزمن من 60 إلى 90 دقيقة أدى إلى انخفاض تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد ولكن هذا الانخفاض غير معنوي (الجدول 14)، وهذا لم يتوافق مع Muthusamy and Abdul Munaim (2019) إذ وجدا أن الزمن (60 دقيقة) باستعمال الإيثانول المطلق أعطى أعلى تركيز من الإستيفوزيد، ويمكن أن يعزى هذا الاختلاف إلى استخدام درجة حرارة منخفضة (40مْ).



الشكل (13): تأثير درجة الحرارة والزمن في تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد المستخلصة في الإيثانول المطلق.

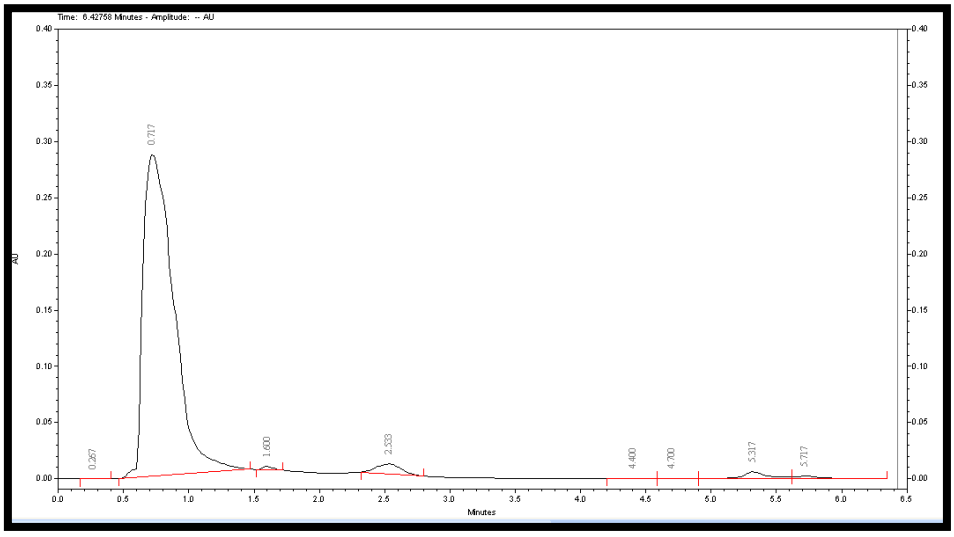
3-6-تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC):

يبيّن الجدول (15) نتائج تحليل جلكوزيد الإستيفوزيد في كل من المستخلصات (المائي، الإيثانول 80%، الإيثانول المطلق) بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)، إذ بلغ زمن بقاء جلكوزيد الإستيفوزيد القياسي 2.53 دقيقة الشكل (14) وهذا توافق مع Muthusamy and Abdul Munaim (2019) الذي بلغ زمن

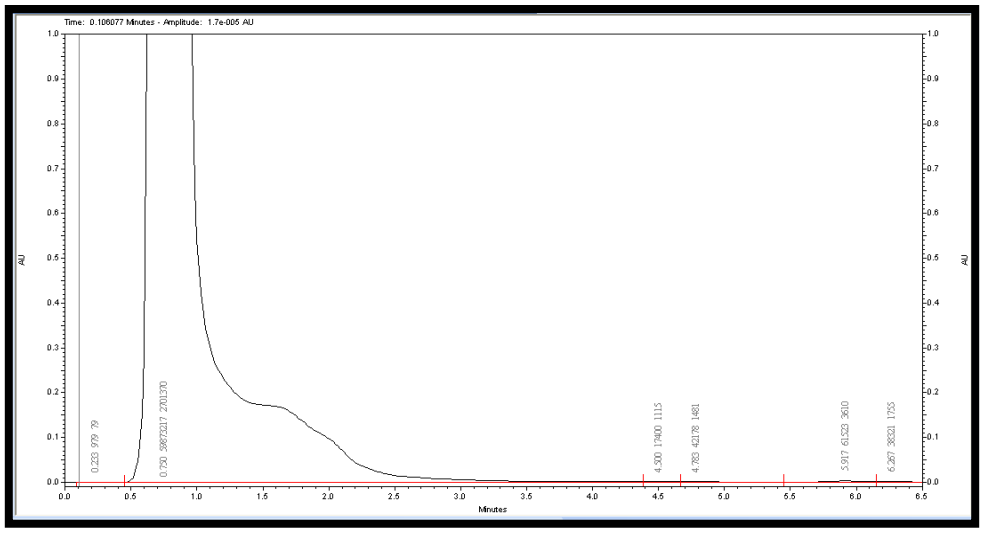
البقاء لجلكوزيد الإستيفوزيد القياسي 2.23 دقيقة، في حين لم تتوافق هذه النتيجة مع (Abou-Arab *et al.*, 2010) الذي كان زمن بقاء جلكوزيد الإستيفوزيد القياسي 9.35 دقيقة وقد يكون هذا عائداً إلى اختلاف طبيعة الطور المتحرك حيث استعمل الميثانول، كما لم تتوافق مع (Afandi, 2015) إذ بلغ زمن البقاء لجلكوزيد الإستيفوزيد القياسي 3.3 دقيقة ويمكن أن يكون هذا عائد إلى اختلاف في حرارة العمود (27مْ) وطول الموجة المستعملة (210 نانومتر) ودرجة pH الطور المتحرك (3). كما يبيّن الجدول (15) أن تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد في مستخلص الإيثانول 80% ، الإيثانول المطلق (5.31%، 6.6%) على التوالي. في حين لم يعطِ المستخلص المائي أية نتائج الشكل (15)، توافقت هذه النتائج مع Muthusamy and Abdul (Munaim, 2019) إذ أعطى الإيثانول بطريقة UV- HPLC أعلى تركيز لجلكوزيد الإستيفوزيد مقارنةً بالماء. كما قام (Martins, 2017) بتقدير جلكوزيد الإستيفوزيد بطريقة HPLC-PDA في كل من المستخلص (المائي، الإيثانول 70%، الإيثانول 90%) إذ بلغ تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد (2.17%، 2.80%، 2.47%)، كما قام بتقدير كفاءة استخلاص كل من المذيبات (المائي، الإيثانول 70%، الإيثانول 90%) للجليكوزيدات الموجودة في أوراق الستيفيا فكانت (245%، 177%، 144%) على التوالي، ويمكن أن يكون هذا عائداً إلى انخفاض كفاءة تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلص المائي بطريقة الـ HPLC-PDA (Martins *et al.*, 2017). من ناحية أخرى قدر (Abou-Arab *et al.*, 2010) جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلص المائي والميثانولي بطريقة الـ UV– HPLC وقد أعطى المستخلص الميثانولي تركيزاً أعلى مقارنةً بالماء. من ناحية أخرى لوحظ أن إضافة الماء قد أدت إلى انخفاض كفاءة التقدير بطريقة UV– HPLC لجلكوزيد الإستيفوزيد بنسبة 45.82% عند استعمال الإيثانول 80% وإلى 100% عند الاستخلاص بالماء النقي، في حين لوحظ تقارب في النتائج المتحصل عليها بكلا طريقتي التقدير (HPLC واللونية) عند استعمال الإيثانول المطلق في عملية الاستخلاص حيث بلغ تركيز جلكوزيد الإستيفوزيد 6.6%، 6.84% على التوالي.

الجدول (15) تحليل جلكوزيد الإستيفوزيد بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) بالمقارنة مع الطريقة اللونية في المستخلصات المدروسة:

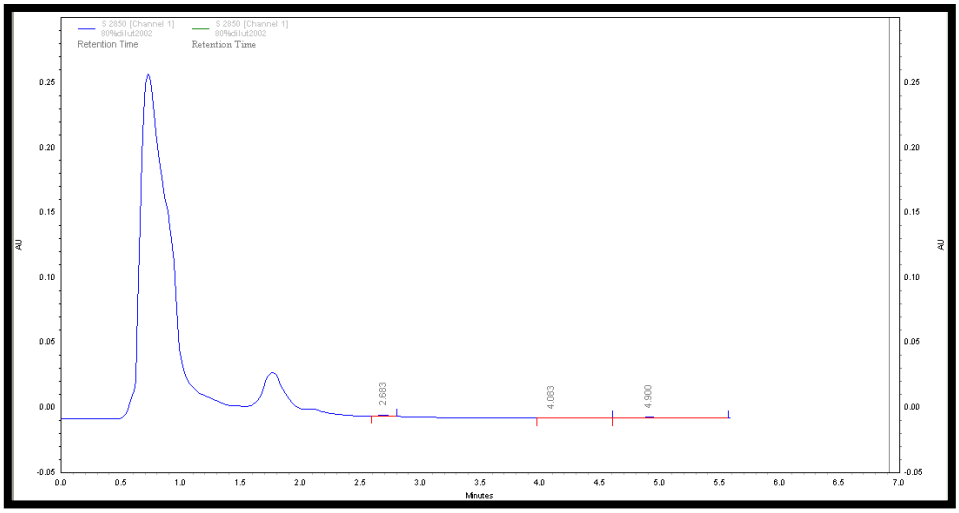
رقم القمة	المكونات	زمن البقاء (RT)	التركيز% بطريقةHPLC	التركيز%بالطريقة اللونية
1	جلكوزيد الإستيفوزيد القياسي (98%)	2.53	–	–
2	مستخلص مائي	لا يوجد	لا يوجد	12.83
3	مستخلص إيثانول 80%	2.66	5.31	9.80
4	مستخلص إيثانول مطلق	2.68	6.6	6.84



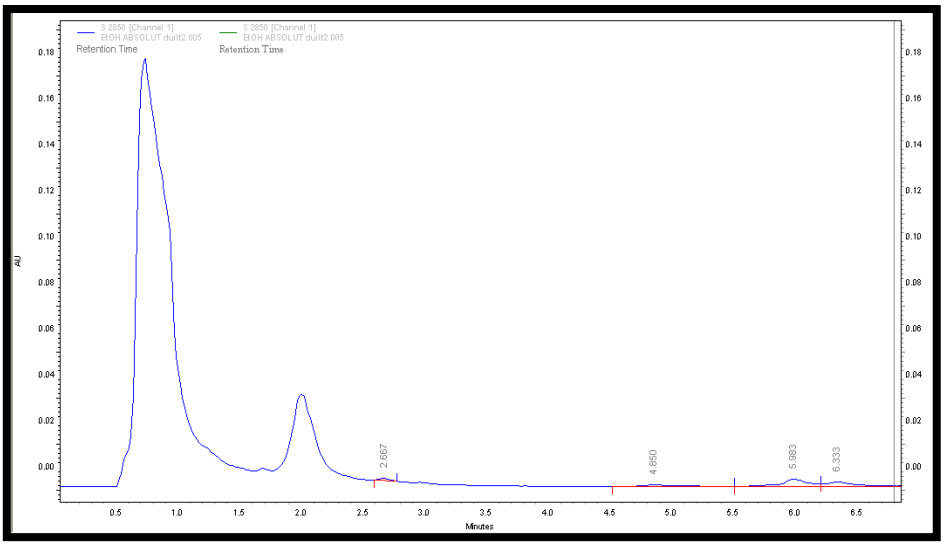
الشكل (14) كروماتوغرام جلكوزيد الإستيفوزيد القياسي المقدر بطريقة HPLC.



الشكل (15) كروماتوغرام جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلص المائي لأوراق الستيفيا المقدر بطريقة HPLC.



الشكل (16) كروماتوغرام جلكوزيد الإستيفوزيد في المستخلص الإيثانول80% لأوراق الستيفيا المقدر بطريقة HPLC.



الشكل (17) كروماتوغرام جلكوزيد الإستيفوزيد في مستخلص الإيثانول المطلق لأوراق الستيفيا المقدر بطريقة HPLC.

3-7-تقدير درجة حلاوة المستخلص المائي:

يوضح الجدول (16) درجة الحلاوة النسبية للمستخلص المائي لأوراق الستيفيا المقابلة لتركيز 10% سكروز. ويبين نتائج الاختبار الحسي أن التركيز المقابل لدرجة حلاوة المحلول السكري 10% هو 0.05 غ/ 100مل، أي إنَّ درجة حلاوة المستخلص المائي تعادل 200 مرة درجة حلاوة السكروز وذلك وفق تقييم (60%) من الأفراد الذين قاموا بالاختبارات الحسية. واتفقت هذه النتائج مع (Cramner and Ikan, 2006) في تقييم درجة الحلاوة لنبات الستيفيا في حين لم تتفق هذه النتائج مع (الزهراني، 2011) إذ كانت درجة الحلاوة النسبية للستيفيا 250 مرة عند تركيز 0.02/ 100 مل المقابل لتركيز السكروز 5%، ويمكن أن يعزى هذا الاختلاف إلى المنطقة المزروعة (السعودية) إذ تختلف درجة حلاوة الستيفيا تبعاً للظروف المناخية السائدة (Chughtai *et al.*, 2019).

الجدول (16) تقدير درجة حلاوة المستلخص المائي لأوراق الستيفيا المقابل لتركيز 10% سكروز.

تركيز المستلخص المائي لأوراق الستيفيا الجافة	درجة الحلاوة النسبية	% لنتائج التقييم
0.1 غ/ 100مل	100 مرة	10%
0.05 غ/ 100مل	200 مرة	60%
0.04 غ/ 100مل	250مرة	30%

3-8-المؤشرات الفيزيوكيميائية لعينات البسكويت المدروسة:

أوضحت نتائج الجدول (17) عدم وجود فروق معنوية في المؤشرات الفيزيائية للبسكويت مثل الثخانة والقطر ومعدل التمدد الشكل (18). أما بالنسبة للمؤشرات الكيميائية (الجدول 17) لم يلاحظ وجود أي فرق معنوي بين محتوى البسكويت من حيث الرطوبة والرماد إذ بلغت الرطوبة في البسكويت العادي و البسكويت المحلى بالستيفيا 5.9، 5.7 على التوالي. في حين بلغ الرماد لعينة البسكويت العادي والبسكويت المحلى بالستيفيا 1.4، 1.9 على التوالي، وهذا يتوافق مع (الزهراني، 2011) في حين لم يتوافق مع (فرحان، عبد اللطيف، 2018) إذ أثرت الستيفيا معنوياً في الرطوبة والرماد، ويمكن أن يعود هذا الاختلاف إلى استخدام أوراق الستيفيا بدلاً من مستخلص أوراق الستيفيا.

الجدول (17) المؤشرات الفيزيوكيميائية لعينات البسكويت المدروسة (المتوسط الحسابي± الانحراف المعياري).

	المؤشرات الفيزيائية			المؤشرات الكيميائية	
العينة	الثخانة	القطر	معدل التمدد	الرطوبة	الرماد
البسكويت العادي	0.15±6.3[a]	4.07±35.1[a]	0.74±5.6[a]	0.1±5.7[a]	0.2±1.4[a]
البسكويت المحلى بالستيفيا	0.2±6.7[a]	2.02±32.7[a]	0.15±4.8[a]	0.04±5.9[a]	0.09±1.9[a]
L.S.D	0.87	5.10	1.47	0.44	0.89

*L.S.D : قيمة أقل فرق معنوي عند مستوى ثقة $P \leq 0.05$.

تشير الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد إلى عدم وجود فروقٍ معنويةٍ بين المتوسطات عند مستوى ثقة $P \leq 0.05$.

3-9-التقييم الحسي لبسكويت الشوفان المحلى بالستيفيا والبسكويت العادي:

يبين التحليل الإحصائي لنتائج التقييم الحسي لعينة بسكويت الشوفان المحلى بالستيفيا (الجدول 18) أن إضافة مستخلص الستيفيا قد أثر بشكل معنوي سلبي في مظهر ولون البسكويت ($P < 0.05$)، إذ أعطت عينة البسكويت العادي والبسكويت المحلى بالستيفيا تقييم من حيث المظهر 17.15، 16.51 على التوالي. كما يبيّن (الجدول 18، الشكل 19) وجود فرق معنوي في اللون لنتائج التقييم الحسي لبسكويت الشوفان المضاف إليه المستخلص

المائي للستيفيا كبديل عن السكروز إذ كان اللون كريمياً غامقاً في حين أعطت عينة البسكويت العادي لوناً كريمياً مصفراً فاتحاً (الجدول 18، الشكل 18)؛ وذلك بسبب أصباغ الكلورفيل الموجودة في نبات الستيفيا (Abou-Arab *et al.*, 2010)، إذ سجل البسكويت المحلى بالستيفيا 7.95 بانحراف معياري (±2.81)، في حين كان البسكويت العادي 9.45 بانحراف معياري (±0.60) بدلالة إحصائية (0.75). من ناحية أخرى أثر إضافة مستخلص الستيفيا إلى بسكويت الشوفان بشكل إيجابي في كل من القوام والطعم والنكهة والطراوة، إذ لم يكن هناك فروق معنوية بالنسبة للقوام بين البسكويت العادي والبسكويت المحلى بالستيفيا ؛ ويمكن أن يعود ذلك إلى أن جلكوزيد الإستيفوزيد لا يغير من خواص الأغذية (Chatudthipong and Nuamprasat, 2009). كما لوحظ وجود فرق معنوي بالنسبة للطعم والنكهة (الجدول 18، الشكل 19) إذ سجل البسكويت المحلى بالستيفيا قيمة أعلى من البسكويت العادي إذ بلغت القيم (17.8، 17.05) بانحراف معياري (±1.96، ±1.98) على التوالي بدلالة إحصائية (0.57). بينما حصل انخفاض في درجات تقييم الطراوة بالنسبة للبسكويت العادي مقارنةً بالبسكويت المحلى بالستيفيا؛ وهذا عائد إلى ارتفاع المحتوى الرطوبي لعينة البسكويت العادي الذي يؤدي إلى ازدياد القساوة إذ إن العجينة ذات المحتوى الرطوبي الأعلى تنتج بسكويتاً أقسى (Ajila *et al.*, 2008). من ناحية أخرى أضيف مؤشر الإحساس بعد المضغ إذ لايظهر الطعم المر للستيفيا مباشرة عند تذوق البسكويت المحضر ولكن يوجد إحساس بالمرارة داخل الفم عقب التذوق، وقد أعطى البسكويت المحلى بالستيفيا درجات تقييم أعلى من البسكويت العادي بالنسبة للإحساس بعد المضغ (الجدول 18، الشكل 19) وهذا عائد إلى جلكوزيدات الستيفول التي تعطي طعماً حلواً متبقياً (Carakostas *et al.*, 2008).

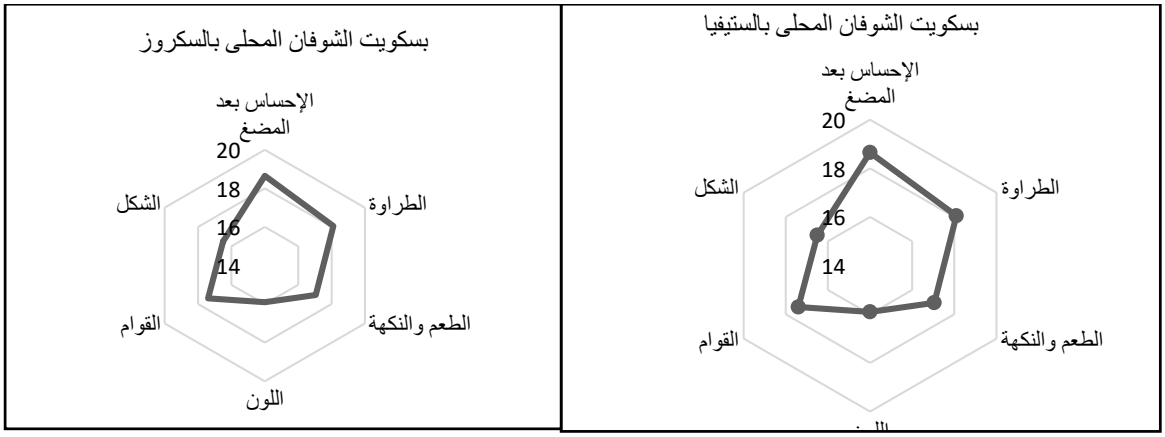
الجدول (18) التقييم الحسي لبسكويت الشوفان المحلى بالستيفيا والبسكويت العادي (المتوسط الحسابي± الانحراف المعياري).

العينة	المظهر	القوام	اللون	الطعم والنكهة	الطراوة	الإحساس بعد المضغ
البسكويت العادي	1.56 ± 17.15^{b}	0.67 ± 8.65^{c}	0.60 ± 9.45^{b}	1.96 ± 17.05^{a}	1.72 ± 15.85^{a}	1.94 ± 13.9^{a}
البسكويت المحلى بالستيفيا	1.79 ± 16.51^{a}	0.80 ± 8.71^{c}	2.81 ± 7.95^{a}	1.98 ± 17.8^{b}	0.71 ± 18.10^{b}	0.87 ± 18.65^{b}
L.S.D	0.61	0.39	0.75	0.57	0.77	0.95

*L.S.D : قيمة أقل فرق معنوي عند مستوى ثقة $P \leq 0.05$.

تشير الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى وجود فروقٍ معنويةٍ بين المتوسطات عند مستوى ثقة $P \leq 0.05$.

الشكل(18) بسكويت الشوفان المحلى بالسكروز والستيفيا.



الشكل(19) التقييم الحسي لبسكويت الشوفان المحلى بالسكروز والستيفيا.

الفصل الرابع

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions& Recommendation

4-1- الاستنتاجات Conclusions:

- تحتوي أوراق الستيفيا الجافة على تركيز عالٍ من المركبات الفينولية الفعالة حيوياً، كما أن لها نشاطاًعالياً لمضادات الأكسدة.
- يؤثر نوع المذيب في كفاءة استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد من أوراق الستيفيا، وكلما زادت قطبية المذيب زادت كفاءة الاستخلاص.
- تؤثر درجة الحرارة والزمن معنوياً في كفاءة استخلاص جلكوزيد الإستيفوزيد بالماء، في حين كان لدرجة الحرارة فقط التأثير المعنوي في الاستخلاص بالإيثانول 80% والإيثانول النقي.
- إن الظروف المثلى للحصول على أعلى كفاءة استخلاص لجلكوزيد الإستيفوزيد عند درجة حرارة 90ْ وزمن 30 دقيقة باستعمال الماء ، و30 دقيقة للإيثانول النقي و 50 دقيقة للإيثانول 80%.
- وجود علاقة ارتباط إيجابية لكل من الزمن ودرجة الحرارة على تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية في المستخلصات المائية، في حين لم يكن هناك أي تأثير معنوي لدرجة الحرارة والزمن على تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية في المستخلصات الكحولية.
- كان لدرجة الحرارة تأثير أكبر على درجة الحموضة في المستخلصات الإيثانولية إذ أعطت علاقة ارتباط سلبية قوية (r= -0.7) مقارنة بالزمن (r= -0.3)، في حين لم يكن للزمن ودرجة الحرارة علاقة ارتباط بدرجة الحموضة في المستخلصات المائية والإيثانولية 80%.
- يمكن الاعتماد على الطريقة اللونية في تقدير جلكوزيد الإستيفوزيد الذي كان معامل الارتباط فيه R^2=0.9894، في حين بلغ معامل الارتباط R^2 =0.9886 بطريقة HPLC.
- يمكن استبدال السكروز بمستخلص الستيفيا في بسكويت الشوفان مع محافظة المنتج النهائي على مواصفات فيزيوكيميائية وتقييم حسي جيد.

4-2- التوصيات Recommendation:

- العمل على تنقية المستخلص المائي لأوراق الستيفيا الجافة وبلورته واستخدامه مُحليّاً وإدخاله في الصناعات الغذائية عوضاً عن السكر كمادة حافظة نظراً لتمتعه بخصائص وظيفية جيدة.
- دراسة الجدوى الاقتصادية لإمكانية تصنيع محلي ستيفيا بالحالة الصلبة مَحلياً.

الفصل الخامس

المراجع

References

5- المراجع References:

- الزبيدي ، عباس حسن حسين (2009) **الكتاب العملي في تصنيع الحبوب**. الدار الجامعية للطباعة والنشر بغداد، جمهورية العراق 123 ص.
- الزهراني. آمال (2011) **الاستفادة من مستخلص أوراق نبات الإستيفيا كبديل للسكروز في إعداد بعض الحلويا ت المحلية.** رسالة دكتوراة. المملكة العربية السعودية، جامعة أم القرى.
- فرحان .ماجدة عبد الجليل، عبد اللطيف. بثينة محمد عبدالله (2018). **استخدام أوراق نبات الستيفيا في إنتاج بعض منتجات المخبوزات.** مجلة العلوم الزراعية والبيئية والبيطرية. العدد الثالث – المجلد الثاني.

- A.O.A.C. (2005) **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 17 thEd. Published by the Association of Official Analytical Chemists. USA.
- A.O.A.C. (2008) **Offical Methods of Analysis 18th ed. Association of Official Analytical Chemists**. International Arligton, Virginia, USA.
- AACC (2000**), American Association of Cereal of Chemistry**. Approved methods of analysis, 8 th Ed St Paul, Minnesota, U.S.A.
- Abd El-Baky, A.A. (1999). **Studies on production of chocolate for diabetis.** M. Sci, Thesis, Faculty of Agriculture Moshtohor, Zagazig University, Egypt.
- Abou-Arab, A.E., Abou-Arab, A.A. and Abu-Salem, M.F. (2010) **Physicochemical assessment to natural sweeteners steviosides produced from Stevia rebaudiana bertoni plant**. African Journal of Food Science, 4, 269-281.
- Afandi A, Sarijan S and Shaha R K. (2013) **Optimization of Rebaudioside a Extraction from Stevia rebaudiana (Bertoni) and Quantification by High Perfomance Liquid Chromatography Analysis**. J. Tropi. Resources and Sustainable Sci. 1(1):62-70.
- Afandi A. (2015) **Optimization of Rebaudioside A Yield From Stevia Rebaudiana Cultivated On BRIS Soil And Its Biological Activities.** Faculty of Agro Based Industry UNIVERSITI MALAYSIA KELANTAN**.**
- Ahmad N, Fazal H, Abbasi and Farooq S. (2010): **Efficient free radical scavenging activity of Ginkgo biloba, Stevia rebaudiana and Parthenium hysterophorous leaves through DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).** International J. Phytomedicine. 2:231–239.
- Ahmed MS, and Dobberstein RH (1992) **Stevia reb. II. HPLC separation and quantitation of stevioside, rebaudioside A and rebaudioside C.** J Chromatogr 236: 523-26.
- Ahsan F, Bashir S, Shah F. (2020**). Nutritional and Medicinal Properties of Stevia Rebaudiana.** Current Research in Diabetes & Obesity Journal. Volume 13 Issue 4.

- Ajila C.M., Leelavathi K., Prasada Rao U.J.S. (2008). **Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder.** J. of Cereal Sci. (48) 319–326.
- Akbarzadeh S, Eskandari F, Tangestani H, *et al*., (2015). **The effect of Stevia rebaudiana on serum omentin and visfatin level in STZ-induced diabetic rats.** J Diet Suppl.;12:11-22.DOI:10.3109/19390 211.2014.901999. PMID:24689449.
- Aminha S. A, Raju V.G, Goud B.M, Irfath M, Quadri SAP, (2014); **Isolation and extraction of artificial sweetner(Stevia).** World Journal of Pharmaceutical Research, 3: 481-486.
- Anon. (1998**). Use of nutritive and non- nutritive sweeteners**. Position of DNA.J.Am. Diet Assoc., 98, p.580-587.
- Anonymous (1998). **Sugars and sweeteners**. Web sit: Sugar and sweeteners- ask the Dietitian Microsoft Internet Exepor.
- Anton. S.D; Corby.K.M; Hongmei.H;Sandra.C; William.T.C; Paula.G and Donald.A.W. (2010) : **Effects of Stevia, Aspartame, and Sucrose on Food Intake, Satiety, and Postorandial Glucose and Insulin Levels.** Appetite 55 37-43.
- AOAC, (1990) **Fiber (Acid Detergent) and Lignin in Animal Feed. (973.18).** 15th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Ashwell, M., Gibson, S., Bellisle, F., Buttriss, J., Drewnowski, A., Fantino, M., … Hardman, C. A. (2020). **Expert consensus on low-calorie sweeteners: Facts, research gaps and suggested actions**. Nutrition Research Reviews, 33(1), 145–154.
- Association of Official Analytical Chemists. (2000) **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 17th edition. Gaithersburg, United States of America: AOAC.
- Atteh, J., Onagbesan, O., Tona, K., Buyse, J., Decuypere, E., Geuns, J. (2011) **Potential use of Stevia rebaudiana in animal feeds.** Arch. Zootec., 60, 133–136.
- Badr. I. Alaa, , El-sanat. Y.A. Samir., (2008). **Optimization of extraction, clarification and crystallization of stevioside extracted from Stevia rebaudiana Bertoni**. J. Agric. Res. Kafrelsheikh Univ ., 34 (1): 183-203.
- Barriocanal. L.A, Palacios. M, Benitez.G; Benitez. S, Jimenez.J. T and Jimenez. N. (2008) : **Apparent Lack Of Pharmacological Effect Of Steviol Glycosides Used As Sweeteners In Humans**, A Pilot Study Of Repeated Exposures In Some Normotensrve And Hypotensive Individuals and in Type 1 and Type 2 Diabetics.Regulatory Toxicology and Pharmacology,51. 37-41.
- Bernal, J., Mendiola, J., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2011): **Advanced analysis of nutraceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 55, 758–774.
- Blumenthal, M. (1996). **Perspectives of FDA'S new Stevia Policy, After four years, the agency lifts its ban-but only partially**. Whole Foods Magazine, Febraury 1–5.
- Boanová, L. and Baxa, E. B. S. (1998**). HPLC determination of stevioside in plant material and food samples.**

- Brambilla E, Cagetti MG, Ionescu A, Campus G, Lingstrm P. (2014) **An in vitro and in vivo comparison of the effect of stevia rebaudiana extracts on different caries-related variables: a randomized controlled trial pilot study.** Caries Res; 48:19–23.
- Brandle J.E., Telmer P.G. (2007): **Steviol glycoside biosynthesis.** Phytochemistry 68 (14): 1855–1863.
- Brandle JSA (1998). **Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties (Review).** Can. J. Plant Sci. 78: 527-536.
- Buckenhuskers HJ, Omran HT (1997). **Stevia rebaudiana Bertoni and stevioside Sugar and S. Subst. in Food** Proc. Nutr., Ismailia, Oct. pp. 157-178.
- Cai, Y., Z.; Luo, Q.; Sun, M. and Corke, H. (2004). **Antioxidant activity and phenolic compounds of traditional Chinese medicinal plants associated withanticancer**. Life Sci., 74: 2157-2184.
- Campos. Maira Segura, Martín. Enrique Barbosa, Basto. Ángel Matus, Amaro. Diana Cabrera, Olmedo. María Murguía, Ordoñez. Yolanda Moguel, Ancona. David Betancur. (2014) **Comparison of Chemical and Functional Properties of Stevia rebaudiana (Bertoni) Varieties Cultivated in Mexican Southeast.** American Journal of Plant Sciences, 2014, 5, 286-293.
- Carakostas.M.C. Curry. L.L; Boilea. A.C. and Brusick D.J. (2008) **Overview: The History, Technical Function and Safety of Rebaudioside A, a Naturally Occurring Sterol Glycoside, for Use in Food and Beverages**. Food and Chemical Toxicology. 46.S1-S10.
- Celaya S, Liliana. K, Eugenio, and Kolb N (2016) **Solubility of Stevioside and Rebaudioside A in water, ethanol and their binary mixtures**. International Journal of Food Studies. Volume 5. 158-166.
- Chan.P, Tomlinson. B, Chen. Y, Liu. J, Hsieh. M.and Chrng. J. (2000): **A Double-Blind Placebo-Controlled Study of the Effectiveness and Tolerability of Oral Stivioside in Human Hypertension.** Brit J. Clin. Pharmacol. 50,215-220.
- Chang SS and Cook JM. (1983) **Stability studies of stevioside and rebaudioside A in carbonated beverages.** J Agric Food Chem, 31, 409-412.
- Chatsudthipong .V and Muanprasat C.(2009): **Stevioside And Relted Compounds: Therapeutic Benefits beyond Sweetness.** Pharmacology and Therapeutics ،121(1): 41- 54.
- Chaturvedula V.S.P, and Zamora J (2014) **Reversed-Phase HPLC Analysis of Steviol Glycosides Isolated from Stevia rebaudiana Bertoni.** Food and Nutrition Sciences, 1711-1716.
- Chen Wu Li-, Hsiu-Wen Hsu, Yun-Chen Chen, Chih-Chung Chiu, Yu-In Lin & Ja-an Annie Ho. (2006) **Antioxidant and Antiproliferative activities of red pitaya.** Food Chemistry, vol. 95, pp. 319-327.
- Choudhary KA, and Bandyopadhyay NG (1999). **Preliminary studies on the inorganic constituents of some indigenous hyperglycaemic herbs on oral glucose tolerance test.** J. Ethnopharmacol., 64: 179-184.
- Chughtai MFJ, Pasha I, Butt MS, Asghar M. (2019) **Biochemical and nutritional attributes of Stevia rebaudiana grown in Pakistan.** Supplement 2: 210-222.
- Clos, J. F., Dubois, G.E., Prakash, I (2008): **Photostability of Rebaudioside A and Stevioside in Beverages.** J. Agric. Food Chem. 56, 8507–8513.

- Congmin Yu, Kun Xu, Yan Shi, (2011): **The spectrum model established for measuring the contents of Rebaudioside A and Stevioside quickly in the leaves of Stevia rebaudiana Bertoni.** Energy Procedia 5 (2011) 855–861.
- Crammer, B.; Ikan, R. (2006): **Sweet glycosides from the stevia plant.** Chem. Br. 22, 915–917. 3. Can, Z.; Baltas, N. Bioactivity and enzyme inhibition properties of Stevia rebaudiana. Curr. Enzym. Inhib., 12, 188–194.
- Deshmukh S R and Kedari V R. (2014): **Isolation, purification and characterization of sweetners from Stevia rebaudiana (bertoni) for their anticancerous activity against colon cancer World J. Pharm. and Pharma. Sci.** 3(5):1394-1410.
- Djidel, S., Khennouf, S., Baghiani, A., et al. (2009). **Medicinal plants used traditionally in the Algerian folk medicine for gastrointestinal disorders and hypertension: total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity.** In: XIII International Conference on Medicinal and Aromatic Plants, 854: 59-65.
- Dossier A (1999). **Applications for using stevioside, extracted are refined from Stevia rebaudiana Bertoni leaves, as a sweetener**. SCF Dossier EC 161.01 (1997), submitted by Specchiasol SRL, Italy
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) **Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.** Anal. Chem. 28: 350-356.
- Duran A. S, Vasquez L. A, Morales I. G, et al. (2015**) Association between stevia sweetener consumption and nutritional status in university students**. Nutr Hosp.;32:362-6. DOI:10.3305/nh.2015.32.1.8961. PMID:26262739.
- European Food Safety Authority. (2010) **Scientific opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive**. EFSA J; 8:1–84.
- FDA, (1995). **Letter Department of Health and Human Services**. Food and Drug Administration to Patrick Noonan, Washington, DC
- FDA, (2007) and Drug ,Administration: **Letter Department of Hialth and Human Services.** Food and Drug Administration to Hain Celestial Group Inc. Washington. Dc Www.Fda.Gov/Foi/Warning _Letters/S6500c/Htm.
- Ferri LA, Alves-Do-Prado W, Yamada SS, Gazola S, Batista MR and Bazotte RB,(2006): **Investigation of the antihypertensive effect of oral crude stevioside in patients with mild essential hypertension, Phytother Res** 20, 732-736.
- Galal. W.(2002): **Natural stevioside sweetener production characteristics and utilization in food**. PhD. In Food science and Technology ،Fac. Of Agric. Cairo. Univ.
- Gallagher A. M, Ashwell. M, Halford. J. C, Hardman. C. A, Maloney. N. G, Raben, A. (2021): **Low-calorie sweeteners in the human diet: Scientific evidence, recommendations, challenges and future needs.** A symposium report from the FENS 2019 conference. Journal of Nutritional Science, 10.
- Gallagher A.M and Logue C (2019) **Biomarker approaches to assessing intakes and health impacts of sweeteners: challenges and opportunities**. Proc Nutr Soc 78, 463–472.

- Garcia-Noguera, J., L.Weller C., Oliveira, F.,I.,P., Rodrigues, S., Fernandes, F.,A.,N (2010). **Dual-stage sugar substitution in strawberries with a Stevia-based sweetener.** Innovative Food Science and Emerging Technologies 11, 225–230.
- Gardana. C., Simonetti. P., Canzi. E., Zanchi. R., and Pieta. P. (2003): **Metabolism of Stevioside and Rebaudioside A From Stevia Rebaudiana Extracts Bv Human Microflora.J Agric Food Chem.** 51(22).6618-6622.
- Gasmalla MAA, Yang R, Amadou I, and Hua X. (2014) **Nutritional Composition of Stevia rebaudiana Bertoni Leaf: Effect of Drying Method.** Trop J Pharm Res. 13:61-65. DOI: 10.4314/tjpr. v13i1.9.
- Goyal S., and Samsher R. (2010) **Stevia a bio-sweetener: a review**. Inter. J. Food Scienc. and Nutr. 61:1–10. Haider-Ali, Ahmed H, Marwat K B., and Lu C. 1993. The use of Thidiazuran in tissue culture. In vitro cell development. Biol. Plant. 29:92-96.
- Goyal, S., Samsher, S. and Goyal, R. (2010). **Stevia a bio-sweetener: A review.** Int. J. of Food Sci. & Nutr. 61:1-10.
- Guan, Zhijian, Chen, Weimin and Yao, X. (1999**). Process for separating and concentrating high- quality stevioside**. Faminy Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN 1,238, 341. [C.F. Chem Abst. Vol. 133 No. 8. 105251A (2000)].
- Guo-Qing, H., Hao-Ping, X., Qi-He, C., Ruan, H., Zhao-Yue, W. and Traore, L. (2005). **Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (Humulus lupulus L.)**. Journal of Zhejiang University SCI 6B (10): 999-1004.
- Hassan, H.K. (2000). **Studies on the utilization of stevia plant in some Bakery products. M.SC. Thesis, Faculty of Agriculture Mosshtohor.** Zigzag university.
- Hutapea AM, Tuskulkao C, Buddhasukh D, Wilairat P, Glinsukon T. (1997) **Digestion of stevioside, a natural sweetener, by various digestive enzymes**. J Clin Biochem Nutr;23: 177–186.
- Hyvonen, L. (1990). **"Synergism between sweeteners in: carbohydrate sweetener in foods and Nutrition Koivistoinen"** Academic, London P:312-340.
- Inamake MR, Shelar PD, Kulkarni MS, Katekar SM and Tambe R (2010): **Isolation And Analytical Characterization Of Stevioside From Leaves Of Stevia Rebaudiana Bert; (Asteraceae).** Int J Res in Ayur and Pharm 1(2): 572-81.
- Isima ،N and Kakayame ،H. (1976). **Sensory evaluation of stevioside as a sweetener.** National Food Research Institute ،31، 80- 85.
- Jackson, A., Tata, A., Wu, Ch., Perry, R., Haas, G., West, L. (2006). **Direct analysis of Stevia leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry**. Analyst, 134, 867–874.
- Jackson, M.C.; Francis, G.J.and Chase, R.G., (2007) **High yield method of producing rebaudioside A.**
- Jadhao D.B, Katekhaye S.D and Thorat B.N (2011): **Improved Rp-Hplc Method For Quantitative Estimation Of Stevioside In Stevia Rebaudiana Bertoni Burm**. Int J Phytopharmacy 1(2):27-34.

- Jahan. I, Mostafa. M, Hossain. H, Nimmi. I, Sattar. A, Alim. A and Iqbal Moeiz.S. (2010) **Antioxidant activity of Stevia rebaudiana Bert. Leaves from Bangladesh**. Bangladesh Pharmaceutical Journal; Vol. 13, No. 2.
- Jaitak V, Gupta AP, Kaul VK and Ahuja PS, (2009): **Validated highperformance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in Stevia rebaudiana.** J Pharmaceut Biomed Anal, 47 (4-5), 790-794.
- James. H. Giese (1993). **Alternative sweeteners and bulking Agents**. Food tech. January 1:14-126.
- Jaroslav P, Barbora H, and Tuulia H. (2006) **Characterization of Stevia rebaudiana by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry.** J. Chromatogr. A. 1150:85-92.
- Jaroslav P, Elena V, Pavel K, Michal R, Karolínka B, Pavla K, Josef Č. (2007) **Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from Stevia rebaudiana: methanol versus water.** Anal Bioanal Chem 388:1847–1857.
- JECFA, Joint FAO\WHO Expert Committee On Food Additives (2005)**: Steviol Glycosides [Addendum to Stevioside]. In: Safety Evaluation of Certain Food Additives**: Sixty-Third Meeting of the Joint FAO\WHO Expert On Food Additives, June 8-17,2005, Geneva. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO\World Health Organization (WHO); Geneva. WHO Food Additives Series Series, No.54, PP.117-144&638.
- Jentzer. J.b, Alignan.M, Garcia.C, Rigal.L, Vilarem.G. (2019**): Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from Stevia rebaudiana Bertoni leaves**. HAL Id: hal-02063665.
- Kato. R, Sakaguchi.y and Naotake. M (1977). **Extraction and purification of stevioside**. Japan kokai, 76/53, 245. [C.F chem. Abst. Vol. 88, 110519a (1978)].
- Kaur G, Pandhair V and Cheema G S. (2014**)**: **Extraction and characterization of steviol glycosides from Stevia rebaudiana bertoni leaves.** J. Med. Plants Studies. 2(5):41-45.
- Kerton, F. M. (2013). **Introduction. In James H. Clark & George A. Kraus (Ed.), Alternative solvents for green chemistry** (2) (pp. 1–30). The Royal Society of Chemistry. doi:10.1039/9781849736824-00001.
- Khalil, S.R.A., Mohamed, E,S., Attia,A,E., (2015**) PRODUCTIVITY AND QUALITY OF STEVIA AND THE EFFECTS OF DRYING ON STEVIOSIDES AND ITS USAGE IN BAKERY**. J. Food and Dairy Sci., Mansoura Univ., Vol. 6 (10): 591 – 611.
- Kim I, Yang M, Lee O and Nam-Suk K. (2011): **The antioxidant activity and the bioactive compound content of stevia rebaudiana water extracts**. L W T-food Sci. Technol. 44: 1328-1332.
- Koyama. E. ;Kitazawa. K. ;Ohori.Y;.Izawa, Kakegawa, K.and Fujino.A. l. (2003) **: In Vitro Metabolism of the Glycosidic Sweeteners.** Stivia Mizture and Enzymatically Modified Stevia in Human Intestinal Microflora. Food chem Toxicol 41(5). 875-883.
- Kroyer, G (2010). **Stevioside and Stevia-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients.** J. Verbr. Lebensm.(Journal of Consumer Protection and Food Safety) 5:225– 229.

- Kumari, N. Abeysinghe, D.C. Dharmadasa R.M. (2016) **Distribution of Phytochemicals and Bioactivity in Different Parts and Leaf Positions of Stevia Rebaudiana (Bertoni) Bertoni- a Non-caloric, Natural Sweetener**. World Journal of Agricultural Research, Vol. 4, No. 6, 162-165.
- Kuntal Das, Raman Dang (2010**) Influence of biofertilizers on stevioside content in Stevia rebaudiana grown in acidic soil condition.** Scholars Research Library Archives of Applied Science Research, 2 (4): 44-49.
- Lauro, L. M. M; Helena, M. A. and Priscilla.E.(2009) :**Sensory profile, acceptability, and their relationship for diabetic/ reduced calorie chocolate** ..Food Quality and Preference, 20:138-143.
- Lee, C.N., Wong, K., Lin, J., Chen, Y., Chen, J., Chan, P., (2001) **Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension. Planta Med.** 67, 796– 799.
- Lemus-Mondacaa, R., Vega-Gálveza, A., Zura-Bravoa, L., AhHend, K (2011): **Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects**. Food Chemistry Volume 132, Issue 3,Pages (2012)1121–1132.
- Li, Y.; Di, D.; Bai, Q.; Li, J.; Chen, Z.; Lou, S.; Ye, H. (2011): **Preparative separation and purification of rebaudioside a from steviol glycosides using mixed-mode macroporous adsorption resins.** J. Agric. Food Chem. 59, 9629–9636.
- Liu J, Li JW and Tang J (2010): **Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from Stevia rebaudiana Bertoni and identification of extracts.** Food and Biop proc 88: 215–221.
- Liu J, Ong CP and Li SFY (1997) **Subcritical fluid extraction of Stevia sweeteners from Stevia Rebaudiana.** J Chromatogr Sci 35: 446-50.
- Luger, M., Lafontan, M., Bes-Rastrollo, M., Winzer, E., Yumuk, V., & Farpour-Lambert, N. (2017). **Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: A systematic review from 2013 to 2015 and a comparison with previous studies.** Obesity Facts, 10(6), 674–693.
- Makapugay H, Nanayakkara N and Kinghorn A. (1984): **Improved high performance liquid chromatographic eparation of the Stevia rebaudiana sweet diterpene glycosides using linear gradient elution. J. Chromatography.** 283: 390–395.
- Man Kim. J., Ho Koh. J., Min Park. J. (2021) **Validation of an HPLC Method for Pretreatment of Steviol Glycosides in Fermented Milk.** Foods, 10, 2445.
- Marcinek K and Krejpcio Z.(2015).**Stevia rebaudiana Bertoni–chemical composition and functional properties.** Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 14(2): 145–152.
- Martins, N. , (2017) :"**Glycosides extraction**". Journal of Chinese Pharmaceuticals, 5(7), 210-258.
- Mathur, S., Bulchandani, N., Parihar, S., Shekhawat, S, G. (2017) **Critical Review on Steviol Glycosides: Pharmacological, Toxicological and Therapeutic Aspects of High Potency Zero Caloric Sweetener**. Int, J, Pharmacol., 13: 916- 928.
- Meireles. M. Angela A, Wang. Gui-Min, Hao. Zai-Bin, Shima. Kasumi, Jaime A. Teixeira da Silva. (2006) **Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni): Futuristic View of the Sweeter Side of Life.** 46. 416-425.

- Mishra, P., Singh, R., Kumar, U., Prakash, V (2010): **Stevia rebaudiana – A magical sweetener.** Global Journal of Biotecnology & Biochemistry, 5, pp. 62–74.
- Momtazi-Borojeni AA, Esmaeili S-A, Abdollahi E, Sahebkar A (2017). **A review on the pharmacology and toxicology of steviol glycosides extracted from Stevia rebaudiana**. Curr Pharm Des;23:1616–22.
- Muanda, F., Soulimani, R., Diop, B., & Dicko, A. (2010). **Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from Stevia rebaudiana Bertoni leaves.** LWT – Food Science and Technology. doi:10.1016/ j.lwt.2010.12.002.
- Muenprasitivej, N., Tao, R., Nardone, S., Cho, S., (2022**) The Effect of Steviol Glycosides on Sensory Properties and Acceptability of Ice Cream.** Foods 2022, 11, 1745.
- Muthusamy Kalaiarasan , Abdul Munaim Mimi Sakinah., (2019) **Investigation of Factors Affecting Extraction of Rebaudioside A & Stevioside from Stevia Leaves**. ISSN: 2462-1269 (Online) Vol.6 (1) Universiti Malaysia Pahang.
- Narissara L;Vitoon,s;Julie.S;Chaivat.T.and Erik.h.(2004): **Effects of Stevioside on Glucose Transport Activity in Insulin-Sensitive and Insulin-Resistant Rat Skeletal Muscle Metabolism**, Vol 53, No 1 : pp 101-107.
- Nigm, M.S; Amal, H.M; Badr, F.H; Sitohy, M.Z and AL Badawi, A.A. (2004) **: Calorie Apricot Jam Based On Stevioside Sweetener.Keeping Quality Tests**.Egypt.J.Agnic.Res.82(3).
- Nishiyama P, Alvarez M, Vieira LG (1992). **Quantitative analysis of stevioside in the leaves of Stevia rebaudiana by near infrared reflectance spectroscopy.** J. Sci. Food Agric. 59: 277-281.
- Nishiyama, P.; Kusumoto. I.T; Costa. Sc; Alvarez. M, and vierira, L. Ge. (1991) **Correlation between total carbohydrate contain and stevioside content in stevia rebaudiana (Bertoni) leaves.** Arquivos-de-Biological 34: 3 -4, 425- 434.
- Oddone, B. (1997). **How to grow stevia. Technical manual.** Guarani Botanicals, Pawtucket, CT.
- Parpinello, G. P.; Vasari, A; Castellari, M., & Galassi, S. (2001) :**Stevioside as a replacement of sucrose in peach Juice**: Sensory evaluation. Journal of Sensory Studies, 16(5), 471-484.
- Pasquel A, Meireles MAA, Marques MOM, Petenate AJ. (2000): **Extraction of stevia glycosides with CO2 plus water, CO2 plus ethanol, and CO2 plus water plus ethanol.** Brazilian Journal of Chemical Engineering 17, 271-282.
- Peters JC, Wyatt HR, Foster GD, Pan Z, Wojtanowski AC, Vander Veur SS et al. (2007**): The effects of water and non-nutritive sweetened beverages on weight loss during a 12-week weight loss treatment program.** Obesity (Silver Spring); 22: 1415–1421.
- Phillips, K.C. (1987) **Stevia: Steps in developing a new sweetener**. Pages 1-43 in T.H. Grenby ed. Developments in sweeteners. Volume3. Elsevier Applied Science, London.
- Pol J, Ostra EV, Karasek P, Roth M, Benesova K, Kotlarikova P and Caslavsky J (2007) **Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from Stevia rebaudiana: methanol versus water.** Anal Bioanal Chem 388: 1847–57.

- POP. A, MUSTE .S, PĂUCEAN. A, MUREȘAN. C, SALANȚĂ. L, MAN S.(2015**): A COMPREHENSIVE REVIEW ON STEVIA (Stevia rebaudiana) IN TERMS OF FOOD APPLICATIONS AND FUNCTIONALITY**. ISSN 2360 – 0179 print, ISSN 2360 – 0187 electronic.
- Putri MD, Wiboworini B, Dirgahayu P. (2020) **The effect of strawberry on type 2 diabetes mellitus: A review.** Int J Nutr Sci;5:1-6. DOI:10.30476/ IJNS.2020.84050.1041.
- Rai C, Majumdar GC and Sirshendu D (2012) : **Optimization of Process Parameters for Water Extraction of Stevioside using Response Surface Methodology**. Sep Sci and Technol 47: 1014–22.
- Rao A B, Prasad E, Roopa G, Sridhar S and Ravikumar Y V L. (2012): **Simple extraction and membrane purification process in isolation of steviosides with improved organoleptic activity.** Advances Biosci. and Biotechnol. 3:327-335.
- Renwick, A.G.,(2008) : **The Use of A sweetener Substitution Method to Predict Dietary Exposures for the Intense Sweetener A. Food Chem. Toxicology.** 46, S61- S69.
- Saleh OM, Awad NS, Soliman MM, et al. (2016) **Insulinmimetic activity of stevioside on diabetic rats: biochemical, molecular and histopathological study**. Afr J Tradit Complement Alternat Med.; 13:156-63. DOI:10.4314/ajtcam.v 13i2.19.
- Salem.M. Eman (2005) : **Influence Of Stevioside As Natural Sweetener On THE Quality Of Baked Muffins.** J. Agric.Sci. Mansoura Univ; 30(2); 977-989.
- Salem.M.Eman and Besheit, Y.Samir (2002) : **Effect Of Substituting Sucrory Properties of Cake and Biscuits**.4th International Confererce for Food Industries Quality Control.
- Samah NA, Hisham ADA and Rahim SA (2013): **Determination of Stevioside and Rebaudioside A in Stevia Rebaudiana Leaves via preparative High Performance Liquid Chromatography (prep-HPLC**). Int J Chem and Env Engng 4(2): 86-89.
- Sangha, G. (2011). **STUDIES ON EXTRACTION OF STEVIOSIDE FROM STEVIA (Stevia rebaudiana Bertoni) LEAVES**. M. Sc, Submitted to the Punjab Agricultural University.
- Savita S, Sheela K, Sunanda S, Shankar A and Ramakrishna P. (2004). **Stevia rebaudiana – A functional component for food industry**. J. Human Ecol. 15:261–264.
- Serio L. (2010) **La Stévia, une alternative au sucre et à l'aspartame. Phytothérapie**; 8: 26–32.
- Shah., A.,B.,Jones, G.,P., & Vasiljevic, T (2010). **Sucrose-free chocolate sweetened with Stevia rebaudiana extract and containing different bulking agents–effects on physicochemical and sensory propertiesInternational Journal of Food Science and Technology**. 45, 1426–1435.
- Shahriari S, Eftekhari MH,. (2018) **The effect of vitamin D supplementation in overweight or obese type 2 diabetic patients with vitamin D deficiency and dyslipidemia**. Int J Nutr Sci.;3:185-91.
- Shamima A.K., Hoque A.MD., Bhuiyan M. N (2019) **Isolation of Stevioside and related compounds from two types of Stevia rebaudiana (Bertoni) species from Bangladesh**. International journal of Chemistry, Mathematics and Physics (IJCMP). Vol-3, Issue-5.
- Sharma N, Mogre R. (2007): **Effect of stevia intervention on lipid profile. In: On serving farmers and saving farming—India imperative and global perspective**, GBPUA&T, Pantnagar, 10–12 January, 85pp.

- Shirwaikar A, Parmar V, Bhagat J and Khan S (2011) **Identification and estimation of stevioside in the commercial samples of stevia leaf and powder by HPTLC and HPLC.** Int J Pharm and Life Sci 2(9):1050-58.
- Shukla, S., Mehta, A., Mehta, P., & Bajpai, V. (2011). **Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bert.** Experimental and Toxicologic Pathology. doi:10.1016/j.etp .2011.02.002.
- Shukla. S; Archana. M; Vivek.K and Savita. S. (2009): **In Vitro Activity and Total Phenolic Content of Ethanolic Leaf Extract of Stevia Rebaudiana Bert.** Food And Chemical Toxicology 47 2338-2343.
- Shuvo MMA, Al–Mamun M, Chowdhury T, Absar N, Hasanuzzaman M (2015) **An assessment of major nutritional components and some secondary metabolites of in vitro propagated stevia rebaudiana (cultured in Bangladesh) plant leaves dry powder.** Int J Applied Sci Biotechnol 3: 721-26.
- Singh S D and Rao G P. (2005): **Stevia: The herbal sugar of 21st century**. Sugar Tech. 7:17-24.
- Sivaram L and Mukundan U. (2003): **In vitro Culture studies on Stevia rebaudiana. In vitro Cellular and Developmental Biology of Plant**. 39(5):520-523.
- Soejarto, D. D., Compadre, C. M., Medon, P. J., Kamath, S. K. and Kinghorn, A. D. (2002) **Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting Stevia species**. Economic Botany 37(1): 71-79.
- Sohag Howlader. Md., Ahmed S.R., Kubra K., Bhuiyan.MD. (2016**) Biochemical and phytochemical evaluation of Stevia rebaudiana.** Asian Journal of Medical and Biological Research ISSN 2411-4472 (Print) 2412-5571 (Online)**.**
- Spanos GA, Wrolstad RE. Wrolstad, (1992) **phenolic of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage**. J Agr Food Chem.; 40:1478- 1487.
- Tadhani M B and Subhash R. (2006): **Preliminary studies on Stevia rebaudiana leaves: proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening**. J. Med. Sci. 6(3): 321–326.
- Tadhani M B, Jadeja R P and Rena S. (2006**): Micropopagation of Stevia rebaudiana Bertoni using multiple shoot culture.** J. Cell Tissue Res. 6:545-548.
- Tadhani, M. B; Patel,V. H. and Subhash,R.(2007) : **In vitro Antioxidant Activities Stevia rebaudiana leaves and Callus.** Journal of food Composition And Analysis,20:323-329.
- Tanaka O. (1988). **Isolation of sweetener from Stevia rebaudiana.** Japanese Kokai 63:177-764.
- Thomas, J., & Glade, M. (2010). **Stevia: It's not just about calories**. The Open Obesity Journal, 2, 101–109.
- Tomita, T., Sato, N., Arai, T., Shiraishi, H., Sato, M., Takeuchi, M., et al. (1997). **Bactericidal activity of a fermented hot-water extracts from Stevia rebaudiana Bertoni and other food-borne pathogenic bacteria.** Microbiology and Immunology, 41, 1005–1009.

- Upreti, M., Strassburger, K., Chen, Y. L., Wu, S., & Prakash, I. (2011). **Solubility Enhancement of Steviol Glycosides and Characterization of Their Inclusion Complexes with Gamma-Cyclodextrin.** International Journal of Molecular Sciences, 12 (11), 7529– 7553. doi:10.3390/ijms12117529
  US patent application 0083838.
- Varanuj .C and Chatchai. M. (2009) **: Stevioside and Related Compounds: Therapeutic Benefits Beyond Sweetness .**Pharmacology & Therapeutics 121. 41-54.
- Wada, L., and Ou, B. (2002). **Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(12), 3495-3500.
- Wallin, H. (2007). **Steviol glycosides.** 63rd Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) – Chemical and Technical Assessment (CTA) (pp. 1–8).
- Walton, J., Bell, H., Re, R., & Nugent, A. P. (2021). **Current perspectives on global sugar consumption: Definitions, recommendations, population intakes, challenges and future direction.** Nutrition Research Reviews, 1–22.
- WHO (2007). **Food and Agriculture organization of the United Natins L World Health Organization. Energy and protein Requierments.** reports o a joint FAO/ WHO Export Consolation. Technical Report Series No. 724.
- WHO (2015). **Guidelines on Sugars Intake for Adults and Children**. Retrieved from https://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugars_int ake/en/.
- Wu Z, Ruan H, Wang Y, Chen Z and Cui Y(2013): **Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Puerarin from Radix Puerariae using Response Surface Methodology**. Sep Sci and Technol 48: 1657–64.
- Yaqin, X., Rui, Z. and Hong, F. (2005). **Studies on the optimal process to extract flavonoids from red-raspberry fruits.** Nature and Science 3(2): 43-46.
- Zhang SQ, Kumar A, Kutowy O. (2000): **Membrane-based separation scheme for processing sweeteners from stevia leaves.** Food Research International 33, 617-620.
- Žlabur.JS, VOĆA.S, DOBRIČEVIĆ. N, JEŽEK. D, BOSILJKOV.T, BRNČIĆ.M. (2013): **Stevia rebaudiana Bertoni - A Review of Nutritional and Biochemical Properties of Natural Sweetener** Agriculturae Conspectus Scientifi cus . Vol. 78 (2013) No. 1 (25-30).

Abstract

This study was done in the laboratories of Food Science Department- College of Agriculture - Damascus University and Biotechnology - Ministry of Higher Education during 2020- 2022 AD. The aim of this research is to determine the chemical composition and biologically active properties of dry Stevia rebaudiana leaves grown in the College of Agriculture - Damascus University, and to determine the optimal conditions for extracting the stevioside glucoside of Stevia rebaudiana leaves using three types of solvents (water-pure ethanol-ethanol 80%) at different levels. Different temperatures (30-60-90 C) and different times (30-60-90 minutes) using Response Surface Methology (RSM). The results showed that the dry leaves content of moisture, protein, ash, and fat were 10.11%, 11.81%, 14.55%, and 4.54%, respectively. Total carbohydrates constituted the highest content among the main components of dry stevia leaves (52.61%), and the percentage of total soluble carbohydrates, reducing sugars, non-reducing sugars, and fibers, respectively, were 16.35%, 5.44%, 10.91%, and 16.5%. The total energy of dry leaves was 298.54 kcal/100g. As for the content of the leaves of total phenols, it was 3275 mg gallic acid equivalent / 100 g, and the inhibiting activity of free radicals estimated according to the colorimetric method (DPPH) was 86.97%. The results of the examples showed that the best solvent for extracting stevioside glycoside from Stevia rebaudiana leaves by colorimetric method was by using water and that the best yield of this glycoside was at a temperature of 90 °C and a time of 30 minutes, with a maximum concentration of (12.83%). On The other hand, the pure ethanol extract gave the highest concentration of stevioside glucoside (6.6%) by high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The aqueous extract of stevia leaves has been applied in the manufacture of low-calorie oat biscuits. and the results showed that adding the aqueous extract of stevia to low-calorie oat biscuits did not have a significant effect on the physico-chemical indicators of the biscuits, while it had a significant effect on the sensory indicators (color and appearance).

The sample of oat biscuits sweetened with stevia obtained the highest evaluation in terms of texture, taste, flavor and softness compared to regular biscuits.

Key words: *Stevia rebaudiana* (bertoni), stevioside glucoside, extraction conditions, spectrophotometer, High performance liquid chromatography (HPLC), low-calorie oat biscuits**.**

Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Agriculture
Dep. Of Food Science

Optimization of Stevioside Glucoside Extraction from *"Stevia rebaudiana"* and IT'S Application as a Natural Food Sweeteners.

Dissertation submitted for obtaining a master's degree in Agricultural engineering

(Food Science)

By

Baraa Alkhatib

Supervisor

Dr. Hoda Habbal
Assistant Professor
Dep. Of Food Science
Faculty Agriculture

Co-supervisor

Dr. Fahed Albiski
researcher at
(NCBT)
Ministry of Higher Education.

2023