

1.1 المقدمة:

زاد اهتمام العلماء والباحثين في العقود الاخيرة بالنباتات والاعشاب الطبية والتي عرفها الانسان من قديم الزمان واستعملها في طعامه وعلاجه والذي بالتجربة وجد انها تخفف الامه وتداوي جراحه واسقامه ومازال العطارين والعشابيين الى بومنا هذا يصفون الاعشاب لروادهم من المتداوين بالاعشاب، ومازالت فوائدها ظاهرة للعيان. يخضع استخدام الاعشاب الطبية الى التجربة اولا والاعتقاد بفاعليتها وسلامتها من الاضرار الجانبية التي ما انفكت تصاحب الادوية الصناعية ثانيا، فبعد الاستخدام لسنوات قد تعود الابحاث بالتوصية بمنعها لما لها من اثار خطيرة على الصحة وعلى حياة الانسان. في عصر التكنولوجيا وامكانيات البحث المتطورة اصبح بإمكان العلماء والباحثين تقدير فاعلية المستخلصات النباتية، بل وعزل والتعرف على المواد الغعالة في النباتات والاعشاب الطبية والذي في كثير من الاحيان دعم الاستخدام الشعبي واصلّه ووضع له الاطر والحدود العلمية التي زادت من قيمة وسلامة الطب البديل.

2.1 الاعشاب الطبية:

تعتبر الاعشاب الطبية من أقدم اشكال الطب التي عرفها الانسان. فقد كان الدعامة الأساسية للعديد من الحضارات المبكرة وما زال هذا النوع من اكثر اشكال الطب الممارسة في العالم هذه الايام. تحتوي النباتات الصحراوية على مواد كيميائية نباتية مهمة وتعتبر مصدر رخيص للأدوية في المجتمعات المحلية. هذه المواد الكيميائية النباتية هي في الغالب أفضل بكثير من الادوية الاصطناعية بسبب عدم تأثيرها الضار. هناك أكثر من 35000 نوع من النباتات التي تستخدم في الثقافات البشرية المختلفة في جميع أنحاء العالم للأغراض الطبية ووفقا لعمليات المسح الأخيرة والسابقة، الفينولات والبوليفينول والفلافونويدات هي المنتجات المضادة للأكسدة الطبيعية من النباتات وأنها موجودة بتركيزات مختلفة معظمها في النباتات الطبية [1].

تتألف العائلة البقولية Leguminosae (Fabaceae) من حوالي 550 جنس وأكثر من 13000 نوع والتي توفر لنا العديد من النباتات الصالحة للأكل، فضلا عن مجموعة متنوعة من النباتات الطبية التي تستخدم في الطب الشعبي والتي تشكل مصدرا للمواد الخام المستخدمة في الصناعات الدوائية. [2]

3.1 نبات العاقول (*Alhagi maurorum*)

الاسم العلمي: *Alhagi maurorum* Boiss.

الأسماء الشائعة [3]:

العربية: الشوك، العاقول، شوك الجمل، شبريم، ليهلاه

الإنجليزية: Camel thorn bush, Caspian manna, Persian manna

الفرنسية: alhagi des Maures

ألمانية: Kameldorn, Mannastrauch

الهندية: Bharbhara, Jawasa

الإيطالية: Lupinellaalhagi

جنوب أفريقيا: Kameeldoringbos, Volstruisdoring

1.3.1 الوصف والتصنيف العلمي لنبات العاقول:

العاقول هو شجيرة شوكية معمرة متفرعة للغاية خضراء بنية اللون وبلا شعر، يبلغ ارتفاعها حوالي 1.5 إلى 4 أقدام. الشجيرة عميقة الجذور، قد تصل إلى 15m، والأوراق بيضاوية بسيطة ومرتبطة بالتناوب، تخرج من أباط الأشواك وهي بطول 5mm. الأشواك إبرية وبتول 3cm. الزهرة صغيرة تشبه البازلاء، أرجوانية وردية اللون. الثمرة الحمراء البنية توجد بين البذور، تنتهي بشكل المنقار. يوضح الجدول (1) التصنيف العلمي للعاقول [1,4].

الجدول (1): تصنيف نبات العاقول *Alhagi maurorum*

Plantae	المملكة
Spermatophyta	الشعبة
Angiospermae	الشعبية
Fabales	الرتبة
Fabaceae (Leguminosae)	العائلة
Alhagi	الجنس
<i>Alhagi maurorum</i>	النوع



شكل (1): صورة لنبات العاقول

2.3.1 التوزيع الجغرافي

موطن النبات الأصلي كان في شمال أفريقيا والشرق الأوسط وجنوب شرق أوروبا. كما تم العثور عليه في مناطق واسعة بما في ذلك آسيا (أفغانستان وأرمينيا وأذربيجان والبحرين والصين والهند وإيران والعراق وفلسطين والأردن وكازاخستان والكويت ولبنان ومنغوليا وباكستان والمملكة العربية السعودية وسوريا وطاجيكستان وتركيا وتركمانستان والإمارات العربية المتحدة وأوزبكستان واليمن) وأفريقيا (مصر، الجزائر، ليبيا، النيجر، السودان، جنوب أفريقيا) وأمريكا الشمالية (الولايات المتحدة الأمريكية) وأوروبا (الاتحاد الروسي والجمهورية التشيكية وقبرص) وأستراليا [5].

يوجد في اغلب مناطق فزان; في رملة الزلاف وسبها ووادي الاجال والشاطئ و غدامس و غات ومرزق والجفرة وغيرها [4].

3.3.1 المكونات الكيميائية لنبات العاقول:

يوضح الجدول (2) النسب المئوية لبعض المكونات الكيميائية والقيم الفيزيائية التي تشكل المكونات الرئيسية للنبات الجاف، كما يوضح الجدول (3) كمية العناصر المعدنية التي اظهرها التحليل العنصري لعينات النبات [6,7].

جدول (2): بعض المكونات الكيميائية والقيم الفيزيائية بالنسبة للوزن الجاف %:

النسبة %	المكون	النسبة %	المكون
3.33	الالياف	8.76	الرطوبة
6.56	البروتين	4.88	الدهون
12.66-11.20	الرماد الكلي	56.52	الكربوهيدرات
24-23	الذوبان (في الماء)	15- 14	الذوبان (في الكحول)
قيمة الطاقة = 330.51 Kcal/100g			

جدول (3): المكونات المعدنية للعاقول (ppm) :

الكمية (ppm)	المعدن	الكمية (ppm)	المعدن
1292	الماغنيسيوم (Mg)	14991	البوتاسيوم (K)
2234	الكالسيوم (Ca)	14.3	النحاس (Cu)
8.5	الزئبق (Zn)	105.4	الحديد (Fe)
2.5	الكروم (Cr)	650	الصوديوم (Na)
2.5	النيكل (Ni)	0.7	الرصاص (Pb)
		0.2	الكاديوم (Cd)

أظهرت الدراسات السابقة أن *Alhagi maurorum* يحتوي على العديد من منتجات الأيض الثانوية بما في ذلك الفلافونويدات والأحماض الدهنية والكومارينات والجلايكوسيدات والستيرويدات بأنواعها والمنشطات والراتنجات والفيتامينات والقلويدات والكربوهيدرات والتانينات والتربينات الثلاثية. كذلك وجود الجليسيريدات الثلاثية والاسترات الكيتونية والكيثونات الاليفاتية ومشتقات الثيوفينات والتربينات مثل Lupeol والتربين الثلاثي الفعال Glyceryl-n-tetracosan-17-ol-1-oate والعديد من السكريات المعقدة والاحادية واهمها الجلاكتوز وحمض اليورونيك. كما تم دراسة الزيوت الطيارة في

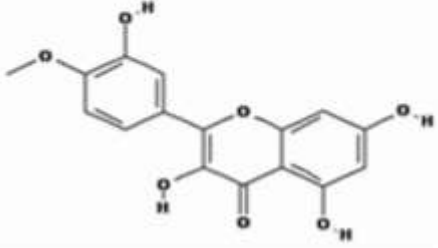
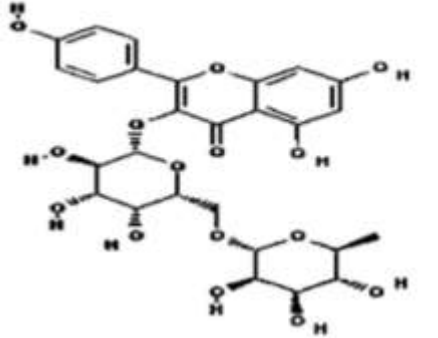
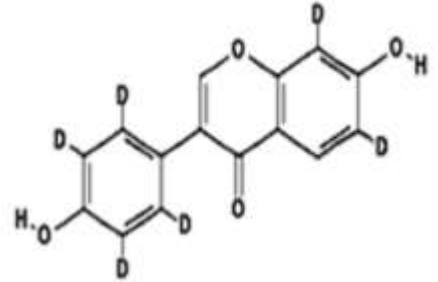
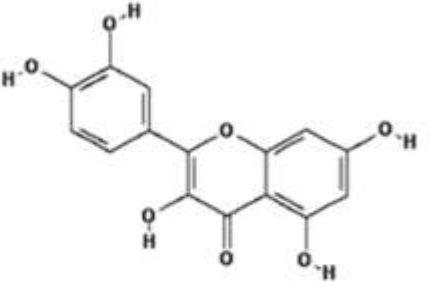
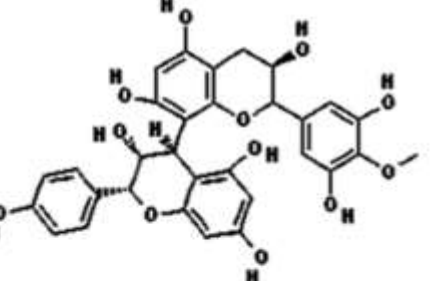
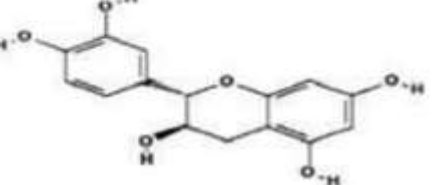
نبات العاقول ووجد انها تتكون من خليط معقد من مواد مختلفة والتي ظهر انها غالبية من التربينات والهيدروكربونات بنسب (اوراق: 26.8%، الجذور: 18.7%) و (اوراق 19.3%، الجذور: 50.6%) على التوالي [1,8,9].

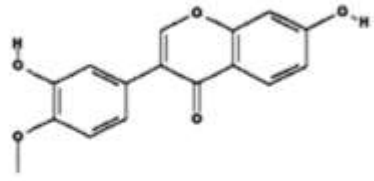
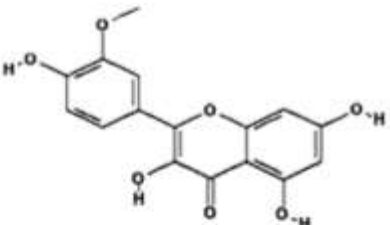
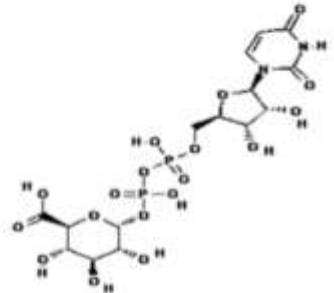
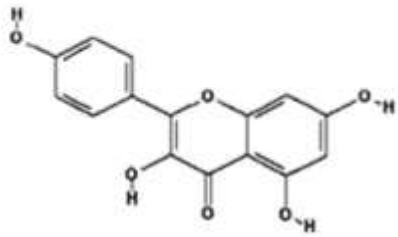
في دراسة حديثة اخرى تم عزل أربعة عشر فلافونويداً، بما في ذلك أربعة من الأجليكون وعشرة جليكوسيدات. من ضمن الفلافونويدات الجليكوسيدية، تسعة تم عزلها للمرة الأولى. ايضاً كانت الفلافونويدات المجموعة الكيميائية الرئيسية التي تم التعرف عليها في مستخلصات جذور النبات. ولقد تم عزل العديد من المركبات الكيميائية من العاقول وهذه بعضها:

Tamarixtin 3-O-dirhamnoside، isorhamnetin 3-O-glucosylneo-hesperidoside، isorhamnetine 3-O-robinoside، isorhamnetin 3-Orotinoside، quercetin 3-O-rhamnoside، kampferol 3-Ogalactoside، querectin، quercetin 3, 7-diglycoside، quercetin 3-O- α -rhamnoside، kaempferol-3-O- β -glucoside، querectin 3-O- β -glucoside and isorhamnetine 3-O- β -rutinoside، isorhamnetin 3- rutinoside، daidzein 7, 4 -dihydroxyisoflavone، calycisin 3 -hydroxyformononetin، and isorhamnetin، tamarxtin glycine's، isorhamnetin-3-O-[- α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-gluco-pyranoside، 3'-O-methylorobol and quercetin 3-O- β -d-glucopyranoside، ، chrysoeriol، isorhamnetin، chrysoeriol-7-Oxylosoid، kaempferol-3-galactorhamnoside and isorhamnetin 3-Ob-D-apio-furanosyl [3].

يوضح الجدول (4) بعض اهم المركبات الغعالة المستخلصة من العاقول [1].

جدول (4): بعض اهم المركبات الفعالة المستخلصة من نبات العاقول

Chemical metabolites	Molecular formula	Chemical structure
Tamarixtin	$C_{16}H_{12}O_7$	
Kaempferol 3-O-galactoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	
Daidzein 7,4-dihydroxyisoflavone	$C_{15}H_{10}O_4$	
Querectin	$C_{15}H_{10}O_7$	
Proanthocyanidins	$C_{31}H_{28}O_{12}$	
Catechin	$C_{15}H_{14}O_6$	

Chemical metabolites	Molecular formula	Molecular formula
Calycisin 3-hydroxyformononetin	$C_{16}H_{12}O_5$	
Isorhamnetin	$C_{16}H_{12}O_7$	
Tamarxtinglycones	$C_{15}H_{22}N_2O_{18}P_2$	
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	

4.3.1 الاستخدامات التقليدية للعاقول:

يستخدم *Alhagi maurorum* عادة في الطب الشعبي باعتباره مطهر وكعلاج لآلام الروماتيزم والبلهارسيا واضطرابات الكبد وأنواع مختلفة من امراض الجهاز الهضمي ومنشط عام وطارد للديدان ولعلاج الإمساك واليرقان والتهاب المفاصل ومعرق وملين. كما يستخدم النبات كمدد للبول ولتنقية الدم وكمضادات للميكروبات ولعلاج الزحار ومشاكل الجهاز التنفسي العلوي والجروح والبواسير ومشاكل الرحم واستخدمت الجذور كمنشط جنسي ويستخدم النبات ايضا في كمسهل وطارد للبلغم. كما يستخدم في علاج الصداع النصفي، والثآليل، كما استعملت الزيوت المستخرجة من الأوراق في علاج الروماتيزم بالاضافة الى استخدام المستخلص الناتج من مغلي بذور العاقول في علاج حصى الكلى. ووفقا للمصادر

فانه يمكن استخدام كل اجزاء النبات بما فيها الجذور في علاج الامراض المختلفة. يستخدم النبات ايضا لعلاج الالتهابات الموضعية المتنوعة والتهابات المثانة البولية ولديه نشاط مضاد للإسهال ويستخدم هذا النبات في علاج قرحة المعدة كما يتم استخدام المستخلص المائي من النبات كله في جنوب غرب إيران لعلاج حرقة المعدة الناجمة عن ارتجاع المعدة [1, 4, 10].

يستخدم النبات ايضا في الاغراض البيطرية لعلاج أمراض الجهاز الهضمي في الحيوانات الأليفة (القطط والأغنام والماعز والجمال) وقد وجد أن ناتج تقطير النبات يمكن ان يعدل في الاس الهيدروجيني (PH) للبول في الماعز في حدود المعدل الطبيعي.

5.3.1 الخواص البيولوجية والصيدلانية:

بعض المركبات المعزولة من العاقول اظهرت فاعليات مختلفة كمضادة للبكتيريا (antibacterial) ومضادة للالتهابات (anti-inflammatory) ومضاد للحمى (antipyretic) مسكن (analgesic) ومضاد للأكسدة (antioxidant) وفي علاجات الجهاز الهضمي (gastrointestinal) وامراض القلب والأوعية الدموية (cardiovascular) ومدرات للبول (diuretic) وبعض الامراض الجلدية (dermatological) .

المواد الكيميائية النباتية الموجودة في مستخلصات النبات المختلفة معروفة جيدا بفاعليتها الدوائية، على سبيل المثال، القلويدات هي عوامل مضادة للبكتيريا ومضادة للملاريا (antimalarial) والسمية الخلوية (cytotoxic agents) وكعوامل مضادات للسرطان (anticancerous agents) [9]. اما الصابونينات فقد وجد ان لها خواص كمبيد للحشرات (insecticidal) والفطريات (fungicidal) وكمضادات حيوية (antibiotic)، اما مركبات الانثراكوينونات فهي عوامل مضادة للبكتيريا ومضادة للفطريات والسمية الخلوية، في حين أن التربينويدات هي عوامل مضادة للملاريا ومضادة للبكتيريا [11]. وقد ثبت أن الفلافونويدات لها أنشطة مضادة للبكتيريا ومضادة للالتهابات ومضادة للحساسية (anti-allergic) ومضادة للفيروسات (antiviral) ومضادة للجراثيم ومضادة للأكسدة ومضادة للتجلط (antithrombotic). وقد أظهرت التانينات ايضا فاعلية عالية كمضادة للفيروسات ومضادة للبكتيريا

اظهر مستخلص الايثانول للعاقول خواص علاجية معوية ضد القرحة الناجمة عن فينيل بوتازون والإندوميثاسين والإيثانول وكذلك زيادة النشاط الحركي والتحفيز الجنسي. ايضا المستخلص المائي للنبات اظهر حماية ضد القرحة في الفئران في نموذجين من قرحة المعدة الناجمة عن الكحول. كما اظهر المستخلص الكحولي للايثانول خواص ضد تأثير الاسبرين على المعدة في الفئران. كذلك اظهرت بعض المركبات المفصولة من النبات مثل Chrysoeriol 7-O- kaempferol-3- galactorhamnoside و xylosoid خواص مضادة للقرحة عند جرعة 100 mg/kg [12, 13].

ايضا تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات لمستخلصات الأوراق والزهور للنبات باستخدام أسلوب نشر القرص ضد طيف واسع من انواع البكتيريا والفطريات وقد أظهرت اغلب المستخلصات نشاطا ملحوظا كمضاد للبكتيريا والفطريات [14].

1.5.3.1 مضادات الاكسدة:

تم تقييم تأثير مضادات الأكسدة للمستخلص المائي من النبات واطهر فاعلية عالية كمضاد للأكسدة مقارنة مع حمض أسيتيل الساليسيليك كمضاد للاكسدة ويبدو ان المستخلص يقلل بشكل كبير من مستوى malondialdehyde. كما انه تم اختبار فعالية مضادات الاكسدة للمستخلص الميثنول بطريقة احتواء الجذور الحرة بأستعمال الـ DPPH وطريقة الفاعلية كمختزل للحديدك FRAP مقارنة مع حمض الاسكوربيك و-α-توكوفيرول وبيوتيليتد هيدروكسي تولولين (BHT) وأظهرت النتائج أن للمستخلص قدرة عالية على احتواء الجذور الحرة فاقت في بعض الحالات المركبات المقارنة، في حين اظهر المستخلص خواص اختزالية متواضعة مقارنة بالمركبات القياسية. وقد استنج باحثون حديثا ان الجلايكونات الحرة من نوع الفلافونولات لها الاثر الاكبر كمضادات للاكسدة [9, 14, 15].

2.5.3.1 تأثير إدرار البول:

تم تقييم الآثار المدرة للبول من مستخلصات الميثانول في جرعة واحدة أو متكررة (1 × 5 أيام)

عن طريق الفم من 500 أو 1000 ملغ / كغ في الفئران مقارنة مع فوروسيميد 20 ملغ / كغ. وظهرت الجرعات من 500 أو 1000 ملغم / كجم تأثير ملحوظ بزيادة حجم البول ومعدل إفراز الصوديوم والبوتاسيوم. وخلص الباحثون إلى أن مستخلصات الميثانول لها قدرة كبيرة على ادرار البول [16].

3.5.3.1 التأثير على الحالب:

اظهرت النتائج في تجارب على الفأران ان إضافة مسحوق مستخلص الإيثانول من جذور النبات وكذلك مركب Glyceryl-n-tetracosan-17-ol-1-oate المفصول من الجذور، قد ادت الى استرخاء الحالب والغت تماما التقلصات الناجمة عن اضافة الهستامين ويبدو أنها تمتلك خواص تساعد على استرخاء الحالب وتخفيف الألم المصاحب والتي يمكن أن تعزز التخلص من الحجارة الكلوية [17].

4.5.3.1 التأثير الوقائي للكبد:

تمت دراسة تأثير مستخلص الايثانول من الأجزاء الهوائية على الفئران ذات الكبد المعطوب المستحدث بواسطة رابع كلوريد الكربون، وظهرت النتائج حماية جيدة ضد تسمم الكبد الناجم عن رابع كلوريد الكربون، وكانت النتائج قابلة للمقارنة مع سيليمارين، والمخدرات الكبدية المرجعية [18]. لقد ثبت أن الالتهاب القاتل الذي يسببه الهستامين والبروستاغلاندين يمكن علاجه بواسطة هذا النبات بسبب تأثيره المثبط على الوسائط المسببة للالتهابات [8].

5.5.3.1 تأثير تثبيط السمية:

تم إجراء اختبار السمية الخلوية باستخدام ميثيل ثيازوليل تترازوليوم (MTT) على خط خلايا سرطان الدم البشري (HL-60) وأظهرت مستخلصات الأوراق والزهور تأثيرا مثبطا لانتشار الخلايا وكان IC50 للعينتين هو 16.0 و 22.0 µg/ml على التوالي [14].

2 الجزء العملي :-

1.2 الكيماويات المستخدمة في الدراسة:

جدول (5): الكيماويات المستخدمة في الدراسة.

الشركة المصنعة	النقاوة %	الوزن الجزيئي g/mol	الصيغة الجزيئية	الكيماويات
CARLO ERBA	99.8	58.08	C ₃ H ₆ O	اسيتون
Romil LTD	99.8	84.93	CH ₂ CL ₂	ثنائي كلورميثان
Alfa Aesar	99.0	88.11	C ₄ H ₈ O ₂	خلات الايثايل
CARLO ERBA	99.9	32.04	CH ₃ OH	ميثانول
VWR PROCABO	////	260.02	C ₁₀ H ₅ NaO ₅ S	كاشف فولن
BDH	99.5	133.34	ALCL ₃	كلوريد الالومنيوم
RIEDEL-DE HAEN AG SEELZE- HANNOVER	99.5	105.99	Na ₂ CO ₃	كربونات الصوديوم
Sigma-Aldrich	99.5	170.12	C ₇ H ₆ O ₅	حامض الجاليك
Aldrich Milwukee	99.5	302.236	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	كريستين
BDH	99.0	1701.25	C ₂₆ H ₅₂ O ₄₆	حمض التانيك

2.2 الأجهزة المعملية المستخدمة:

جدول (6): الأجهزة المستخدمة في الدراسة.

الشركة المصنعة	اسم الجهاز
DHAUS	ميزان حساس
Thermo-ELECTRON CORPORATION EVOLUTION	جهاز المطياف الضوئي UV.Visible Spectrophotometer
Stuart	جهاز الرج الاتوماتيكي
KIKA-WERKE	جهاز المبخر الدوار

3.2 طريقة العمل:-

اعداد العينة:-

تم تجميع عينتي العاقول من مدينة سبها وادري الشاطى وتم تنظيفهما من الشوائب والغبار العالق, ثم تجفيفهما في الظل في مكان جيد التهوية ومن ثم طحنهما بأستخدام المطحن الاوتوماتيكي للحصول على بودرة النباتين المستخدمان في عمليات الاستخلاص.

اعداد المستخلصات:

1- **مستخلص ثنائي كلورو ميثان (DCM ext.)** : تم وزن 100 جرام من بودرة العاقول من عينتي سبها والشاطى كلا على انفراد واستخلصت اولاً بـ 300ml من مذيب البتروليوم ايثر (Petroleum ether) باستخدام جهاز الاستخلاص المستمر (السوكسليت) ولمدة 24 ساعة، قبل ان تستخلص بـ 300ml من الـ DCM باستخدام نفس الجهاز (السوكسليت) ولمدة 24 ساعة وبعد ذلك تم تبخير المذيب بأستخدام جهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة 40°C للحصول علي المستخلص النباتي.

2- **مستخلص خلات الايثيل (EtOAc ext.)** : تم وزن 5 جرام من بودرة العاقول من عينتي سبها والشاطى كلا على انفراد واستخلص بثلاث دفعات من 50ml من المذيب باستخدام جهاز الرجاج الاوتوماتيكي ولمدة 24 ساعة وبعد ذلك تم تبخير المذيب بأستخدام جهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة 40°C للحصول علي المستخلص النباتي.

3- **مستخلص الاسيتون (Acetone ext.)** : تم وزن 5 جرام من بودرة العاقول من عينتي سبها والشاطى كلا على انفراد واستخلص بثلاث دفعات من 50ml من المذيب باستخدام جهاز الرجاج الاوتوماتيكي ولمدة 24 ساعة وبعد ذلك تم تبخير المذيب بأستخدام جهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة 40°C للحصول علي المستخلص النباتي.

4- **مستخلص الميثانول (MeOH ext.)** : تم وزن 50 جرام من بودرة العاقول من عينتي سبها والشاطى كلا على انفراد واستخلص بثلاث دفعات من 500ml من المذيب باستخدام جهاز الرجاج

الايوتوماتيكي ولمدة 24 ساعة وبعد ذلك تم تبخير المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة اقل من 55°C للحصول علي المستخلص النباتي.

5- **مستخلص الميثانول بعد ازالة الدهون (MeOH2 ext.)** : تم استخدام المادة النباتية الناتجة من عملية الاستخلاص بـ DCM و Pet. Ether واستخلصت بثلاث دفعات من 500ml من الميثانول باستخدام جهاز الرجاج الاوتوماتيكي ولمدة 24 ساعة وبعد ذلك تم تبخير المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة 55°C للحصول علي المستخلص النباتي.

6- **المستخلص المائي (H₂O)** : تم وزن 5 جرام من بودرة العاقول من عينتي سبها والشاطي كلا على انفراد واستخلص بثلاث دفعات من 50ml من الماء المقطر باستخدام جهاز الرجاج الاوتوماتيكي ولمدة 24 ساعة وبعد ذلك تم تبخير المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة 55°C للحصول علي المستخلص النباتي.

4.2 تقدير المحتوي الكلي من الفينولات و الفلافونيدات والتانينات:

1.4.2 تحضير المحاليل:

➤ **كاشف فولن Folin reagent 10%:**

أخذَ 10ml من كاشف فولن واضيف اليها 90ml من الماء المقطر في دورق 100ml.

➤ **محلول كربونات الصوديوم Na₂CO₃ 5%:**

أخذَ 5 جرام من كربونات الصوديوم وأذيببت في قليل من الماء المقطر في دورق 100ml, ثم اضيف اليها الماء المقطر حتى العلامة القياسية.

➤ **محلول كربونات الصوديوم Na₂CO₃ 35%:**

أخذَ 35 جرام من كربونات الصوديوم وأذيببت في قليل من الماء المقطر في دورق 100ml, ثم اضيف اليها الماء المقطر حتى العلامة القياسية.

➤ **حامض الجاليك, Gallic acid [0.30 mg/ml]:**

أخذَ 0.015 جرام من حامض الجاليك وأذيببت في 50ml من الميثانول في دورق 50ml.

➤ محلول كلوريد الألومنيوم 2% $AlCl_3$:

أخذَ 2 جرام من كلوريد الألومنيوم وأذيبت في قليل من الماء المقطر في دورق 100ml, ثم أضيف إليها الماء المقطر حتى العلامة القياسية.

➤ محلول الكريستين [0.40 mg/ml] Quercetin solution

أخذَ 0.01 جرام من الكريستين وأضيف إليه 25ml من الميثانول في دورق 25ml.

2.4.2 محاليل المستخلصات :

أخذَ وزن محدد من المستخلص يعادل ما استخلصَ من واحد جرام من النبات الجاف وأذيب في 10ml من الميثانول في دورق قياسي سعة 10ml.

3.4.2 تقدير محتوى الفينولات الكلي Total Phenolic Content [19]:

تم التقدير الكمي للفينولات الكلية بالطريقة الطيفية باستخدام كاشف فولن, وحامض الجاليك كفينول قياسي وتمت متابعة التغير في اللون الناتج باستخدام جهاز UV-Visible Spectrophotometre بقراءة الامتصاصية عند طول موجي 750 nm.

خطوات العمل :

- 1- تم تحضير سلسلة من المحاليل القياسية لحامض الجاليك (0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.3) mg/ml وأخذ بالضبط 2001 μ من كل منها في أنابيب اختبار بلاستيكية.
- 2- أضيف الي كلا منها 1.5ml من كاشف فولن المخفف 10 مرات وتركت في مكان مظلم لمدة 5 دقائق.
- 3- أضيف الى هذه السلسلة بعد 5 دقائق 1.5ml من محلول Na_2CO_3 5% وتركت في مكان مظلم لمدة ساعتين.
- 4- تم قياس الامتصاصية عند الطول الموجي 750 nm، واستخدم الماء المقطر في ضبط الجهاز.
- 5- أخذ ايضا 200 μ l من محاليل المستخلصات وطُبق عليها نفس الخطوات التي طُبقت مع السلسلة

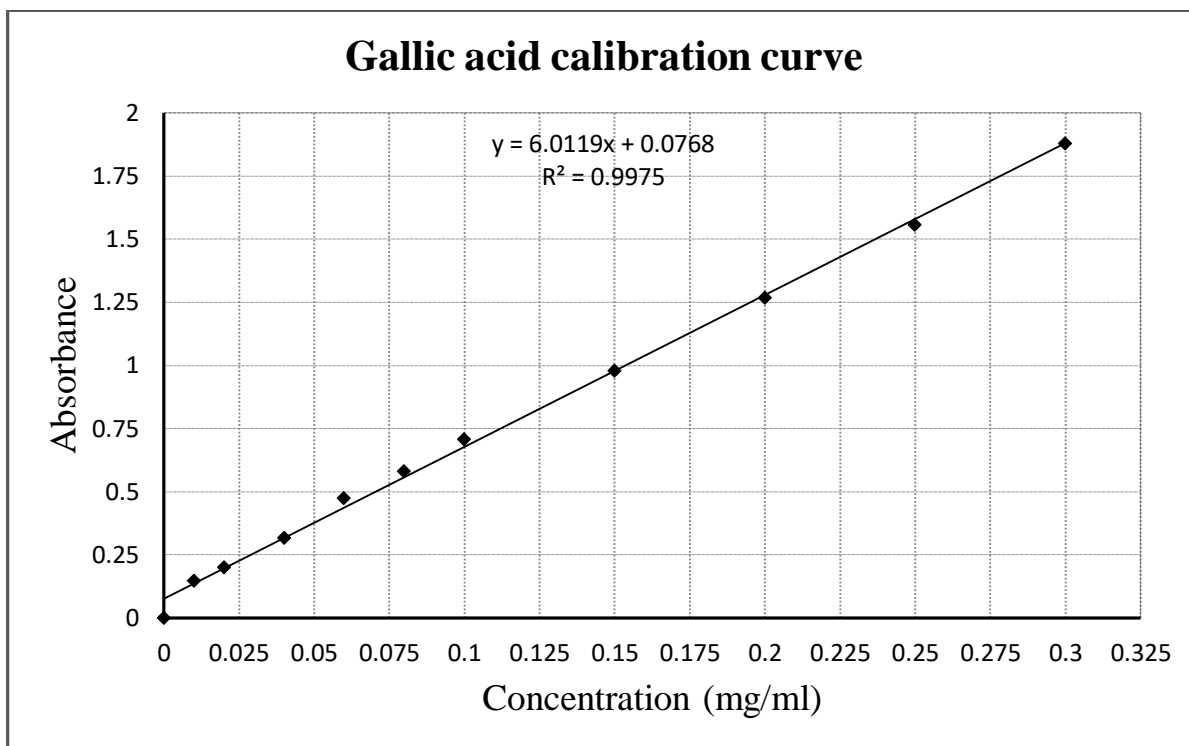
العيارية لحمض الجالنيك.

6- ايضا تم تحضير العينات الضابطة (blank) للمستخلصات المختلفة بنفس الطريقة التي تم بها تحضير المستخلصات مع استبدال كمية الكاشف بالماء المقطر.

7- تم اعداد المنحنى العياري لحمض الجالنيك :

الجدول (7): قراءات الامتصاصية والمتوسط والانحراف المعياري لحمض الجالنيك

Concentration (mg/ml)	Absorbance			Average	St. D
	1	2	3		
0	0	0	0	0	0.000
0.01	0.139	0.157	0.145	0.147	0.009
0.02	0.205	0.202	0.199	0.202	0.003
0.04	0.308	0.328	0.318	0.318	0.010
0.06	0.474	0.47	0.484	0.476	0.007
0.08	0.588	0.584	0.572	0.581	0.008
0.10	0.718	0.711	0.693	0.707	0.013
0.15	1.00	0.999	0.944	0.981	0.032
0.20	1.192	1.316	1.297	1.268	0.067
0.25	1.563	1.607	1.505	1.558	0.051
0.30	1.87	1.879	1.89	1.880	0.010



الشكل (2): المنحنى العياري لحمض الجاليك

الجدول (8): قراءات الامتصاصية والمتوسط والانحراف المعياري للمستخلصات (سبها)

extract	Absorbance			Average	St. D
	1	2	3		
Acetone ext.	1.627	1.672	1.60	1.633	0.036
EtOAc ext.	0.781	0.857	1.066	0.901	0.148
DCM ext.	1.231	1.279	1.206	1.239	0.037
MeOH ext.	0.673	0.697	0.671	0.680	0.014
MeOH2 ext.	0.718	0.73	0.743	0.730	0.013
H ₂ O ext.	0.559	0.559	0.562	0.560	0.002

الجدول (9): قراءات الامتصاصية والمتوسط والانحراف المعياري للمستخلصات (الشاطئ)

extract	Absorbance			Average	St. D
	1	2	3		
Acetone ext.	1.607	1.535	1.877	1.673	0.180
EtOAc ext.	1.457	1.629	1.362	1.483	0.135
DCM ext.	0.232	0.222	0.231	0.228	0.006
MeOH ext.	0.477	0.477	0.484	0.479	0.004
MeOH2 ext.	0.916	0.966	0.941	0.941	0.025
H ₂ O ext.	0.799	0.797	0.809	0.802	0.006

1.3.4.2 حساب كمية الفينولات الكلية

لحساب كمية الفينولات الكلية تم تطبيق العلاقة التالية:

$$\text{TPC (mg/g)} = C * \text{DF} * V / P$$

حيث: C: تركيز المستخلص المكافئ لحمض الجاليك, المُتَّحَصَّل عليه من معادلة ميل المنحنى القياسي لحمض الجاليك.

DF: معامل التخفيف بالنسبة للمستخلصات.

V: الحجم المذاب فيه المستخلصات الخام (10 ml).

P: الكتلة الابتدائية للنبات الجاف.

TPC: كمية الفينولات الكلية سُجِّلَت بوحدة الـ mg GAE/g بالنسبة للنبات الجاف. اي عدد مليجرامات

الفينولات المكافئة لحمض الجاليك الموجودة في جرام من النبات الجاف.

4.4.2 تقدير محتوى الفلافونيدات الكلي Total Flavonoid Content [20]:

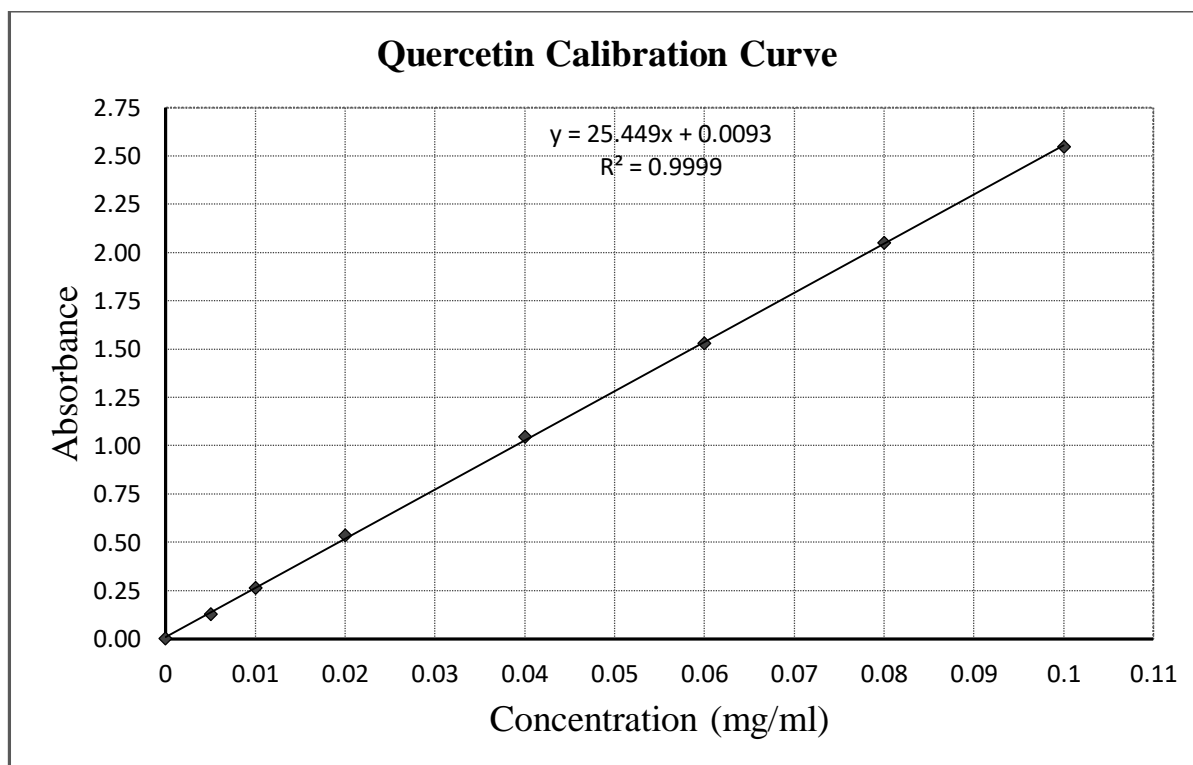
تم التقدير الكمي للفلافونيدات الكلية بالطريقة الطيفية باستخدام كلوريد الألومنيوم والكريستين كفلافونويد قياسي وتمت متابعة التغير في اللون الناتج باستخدام جهاز UV-Visible Spectrophotometre بقراءة الامتصاصية عند طول موجي 415 nm.

خطوات العمل :

- 1- تم تحضير سلسلة من المحاليل القياسية لمحلول الكريستين (0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10) mg/ml، وأخذ بالضبط 1ml من كل منها في أنابيب اختبار بلاستيكية سعة 10ml.
- 2- أُضيف الي كلا منها 1ml من كلوريد الألومنيوم 2% و تركت لمدة 10 دقائق .
- 3- تم قياس الامتصاصية بعد 10 دقائق عند طول 415nm، واستخدم الميثانول في ضبط الجهاز.
- 5- أخذ ايضا 1ml من محاليل المستخلصات وطُبق عليها نفس الخطوات التي طُبقت مع السلسلة العيارية لمحلول الكريستين.
- 6- ايضا تم تحضير العينات الضابطة (blank) للمستخلصات المختلفة بنفس الطريقة التي تم بها تحضير المستخلصات مع استبدال كمية الكاشف بالماء المقطر.
- 6- تم اعداد المنحنى العياري للكريستين :

الجدول (10): قراءات الامتصاصية والمتوسط والانحراف المعياري للكريستين

Concentration (mg/ml)	Absorbance			Average	St. D
	1	2	3		
0	0	0	0	0.000	0.000
0.005	0.124	0.13	0.128	0.127	0.003
0.01	0.268	0.258	0.257	0.261	0.006
0.02	0.521	0.55	0.53	0.534	0.015
0.04	1.033	1.048	1.049	1.043	0.009
0.06	1.514	1.55	1.526	1.530	0.018
0.08	2.091	2.032	2.027	2.050	0.036
0.10	2.525	2.549	2.562	2.545	0.019



الشكل (3): المنحنى العياري للكريستين

الجدول (11): قراءات الامتصاصية والمتوسط والانحراف المعياري للمستخلصات (سبها)

extract	Absorbance			Average	St. D
	1	2	3		
Acetone ext.	3.023	2.965	2.704	2.897	0.170
EtOAc ext.	0.928	0.888	0.827	0.881	0.051
DCM ext.	1.921	1.855	1.817	1.864	0.053
MeOH ext.	2.283	2.281	2.238	2.267	0.025
MeOH2 ext.	2.233	2.226	2.197	2.219	0.019
H ₂ O ext.	1.271	1.277	1.258	1.269	0.010

الجدول (12): قراءات الامتصاصية والمتوسط والانحراف المعياري للمستخلصات (الشاطئ)

extract	Absorbance			Average	St. D
	1	2	3		
Acetone ext.	1.292	1.319	1.331	1.314	0.020
EtOAc ext.	1.539	1.441	1.406	1.462	0.069
DCM ext.	0.441	0.365	0.373	0.393	0.042
MeOH ext.	1.184	1.148	1.192	1.175	0.023
MeOH2 ext.	1.649	1.631	1.647	1.642	0.010
H ₂ O ext.	1.287	1.271	1.245	1.268	0.021

1.4.4.2 حساب كمية الفلافونيدات الكلية

لحساب كمية الفلافونيدات الكلية تم تطبيق العلاقة التالية:

$$\text{TFC (mg/g)} = C * \text{DF} * V / P$$

حيث: C: تركيز المستخلص المكافئ للكريستين, المُتَّحَصَّل عليه من معادلة ميل المنحنى القياسي للكريستين مسجل بـ **mg/ml**.

DF: معامل التخفيف بالنسبة للمستخلصات.

V: الحجم المذاب فيه المستخلصات الخام (10 ml).

P: الكتلة الابتدائية للنبات الجاف.

TFC: كمية الفلافونيدات الكلية سُجِّلَت بوحدة الـ mg QE/g بالنسبة للنبات الجاف. اي عدد مليجرامات الفلافونيدات المكافئة للكريستين الموجودة في جرام من النبات الجاف.

5.4.2 تقدير محتوى التانينات الكلي Total Tannin Content [21]:

تم التقدير الكمي للتانينات الكلية بالطريقة الطيفية باستخدام كاشف فولن وحمض التانيك كتانين قياسي وتمت متابعة التغير في اللون الناتج باستخدام جهاز UV-Visible Spectrophotometre بقراءة الامتصاصية عند طول موجي 700 nm.

خطوات العمل :

1- تم تحضير سلسلة من المحاليل القياسية لمحلول حمض التانيك

(0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10) mg/ml، وأخذ بالضبط 100µl من كل منها في أنابيب

اختبار بلاستيكية سعة 10ml.

2- أُضِيفَ الى كل منها 7.5ml من الماء المقطر.

3- أُضيف اليها بعد ذلك 0.5ml من كاشف الفولن.

2- أُضيف الي كلا منها 1ml من كربونات الصوديوم 35% وخففت الى حجم 10ml بالماء المقطر وتركت في الظلام لمدة 30 دقيقة.

3- تم قياس الامتصاصية بعد 30 دقيقة عند طول 700nm، واستخدم الماء في ضبط الجهاز.

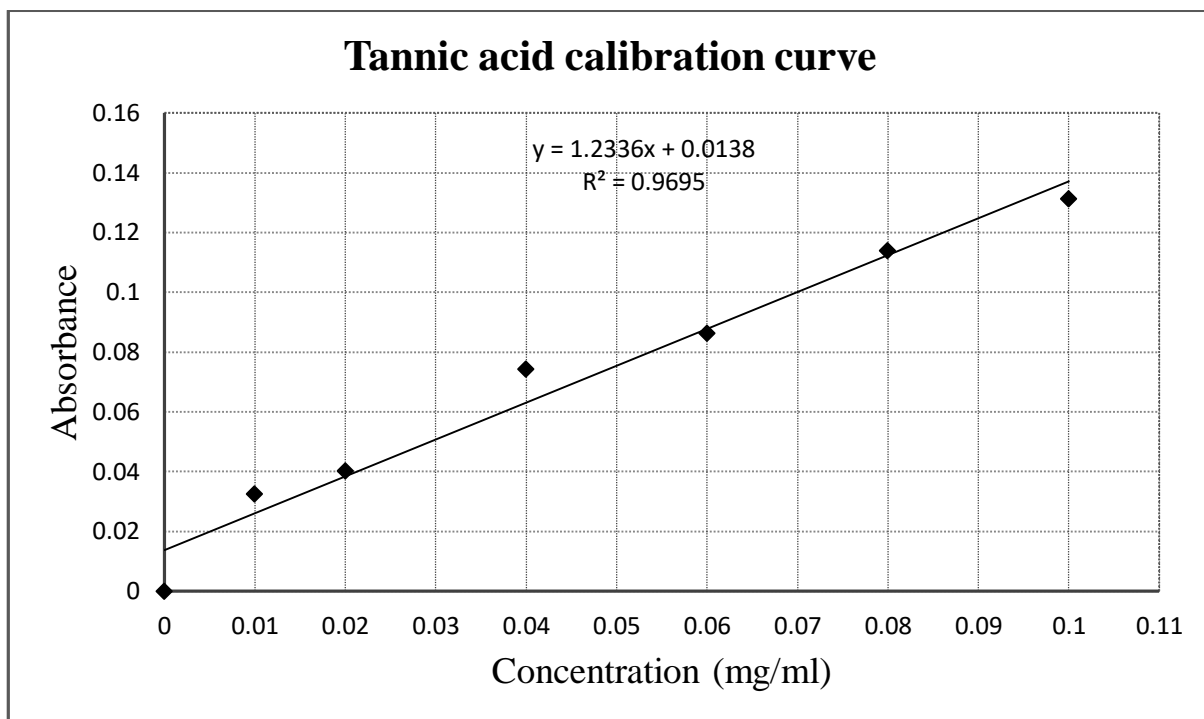
5- أخذ ايضا 100µl من محاليل المستخلصات وطُبق عليها نفس الخطوات التي طُبقت مع السلسلة العيارية لمحلول حمض التانيك.

6- ايضا تم تحضير العينات الضابطة (blank) للمستخلصات المختلفة بأخذ 100µl من المستخلصات واستكمال الحجم الى 10ml بالماء المقطر.

6- تم اعداد المنحنى العياري لحمض التانيك :

الجدول (13): قراءات الامتصاصية والمتوسط والانحراف المعياري لحمض التانيك.

Concentration (mg/ml)	Absorbance			Average	St. D
	1	2	3		
0	0	0	0	0	0
0.01	0.037	0.031	0.03	0.033	0.004
0.02	0.035	0.041	0.045	0.040	0.005
0.04	0.07	0.075	0.078	0.074	0.004
0.06	0.085	0.089	0.085	0.086	0.002
0.08	0.126	0.105	0.111	0.114	0.011
0.10	0.129	0.132	0.133	0.131	0.002



الشكل (4): المنحنى العياري لحمض التانيك

الجدول (14): قراءات الامتصاصية والمتوسط والانحراف المعياري للمستخلصات (سبها)

extract	Absorbance			Average	St. D
	1	2	3		
Acetone ext.	00.05	0.044	0.053	0.049	0.005
EtOAc ext.	00.03	0.032	0.031	0.031	0.001
DCM ext.	0.036	0.042	0.031	0.036	0.006
MeOH ext.	0.116	0.119	0.123	0.119	0.004
MeOH2 ext.	0.131	0.128	0.121	0.127	0.005
H ₂ O ext.	0.093	0.101	0.109	0.101	0.008

الجدول (15): قراءات الامتصاصية والمتوسط والانحراف المعياري للمستخلصات (الشاطئ)

extract	Absorbance			Average	St. D
	1	2	3		
Acetone ext.	0.076	0.06	0.068	0.068	0.008
EtOAc ext.	0.048	0.047	0.049	0.048	0.001
DCM ext.	0.033	0.03	0.029	0.031	0.002
MeOH ext.	0.088	0.093	0.083	0.088	0.005
MeOH2 ext.	0.143	0.149	0.15	0.147	0.004
H ₂ O ext.	0.128	0.136	0.123	0.129	0.007

1.5.4.2 حساب كمية التانينات الكلية

لحساب كمية التانينات الكلية تم تطبيق العلاقة التالية:

$$TTC (mg/g) = C * DF * V / P$$

حيث: C: تركيز المستخلص المكافئ لحمض التانيك, المُتحصل عليه من معادلة ميل المنحنى القياسي

لحمض التانيك مسجل بـ **mg/ml**.

DF: معامل التخفيف بالنسبة للمستخلصات.

V: الحجم المذاب فيه المستخلصات الخام (10 ml).

P: الكتلة الابتدائية للنبات الجاف.

TTC: كمية التانينات الكلية سُجلت بوحدة الـ **mg TAE/g** بالنسبة للنبات الجاف. اي عدد مليجرامات

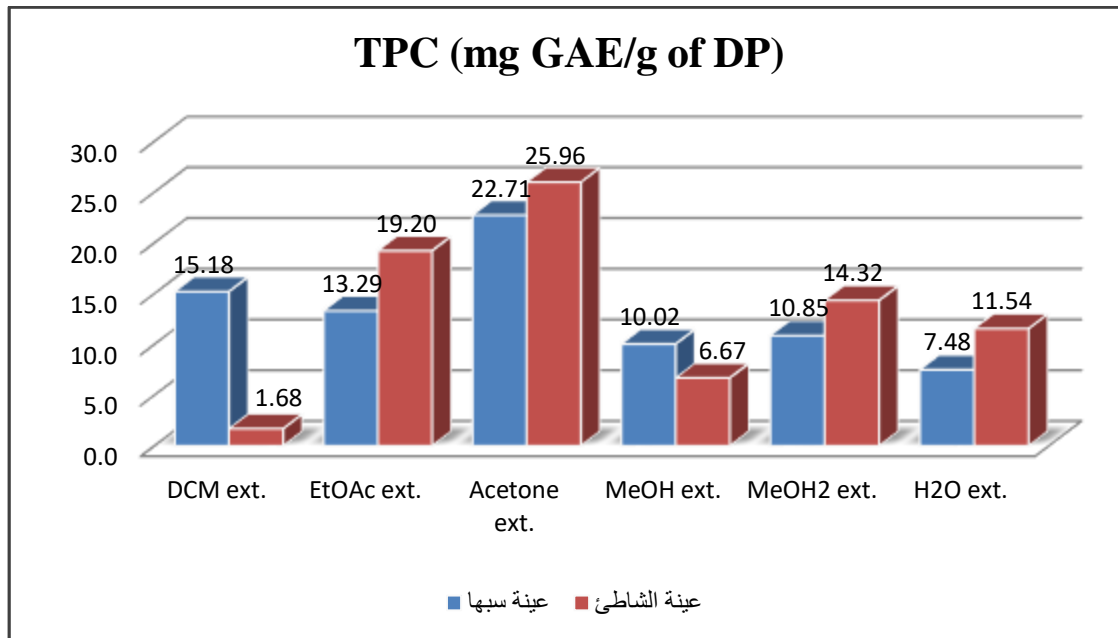
التانينات المكافئة لحمض التانيك الموجودة في جرام من النبات الجاف.

3 النتائج و المناقشة:

1.3 نتائج تقدير المحتوى الفينولي الكلي TPC:

جدول (16): محتوى الفينولات الكلية في المستخلصات (mg GAE/g of DP).

المستخلص النباتي	TPC mg/g of dry plant	
	عينة سبها	عينة الشاطئ
Acetone ext.	22.71	25.96
EtOAc ext.	13.29	19.20
DCM ext.	15.18	1.68
MeOH ext.	10.02	6.67
MeOH2 ext.	10.85	14.32
H ₂ O ext.	7.48	11.54



الشكل (5): التمثيل البياني لنتائج محتوى الفينولات الكلية في مستخلصات سبها والشاطئ

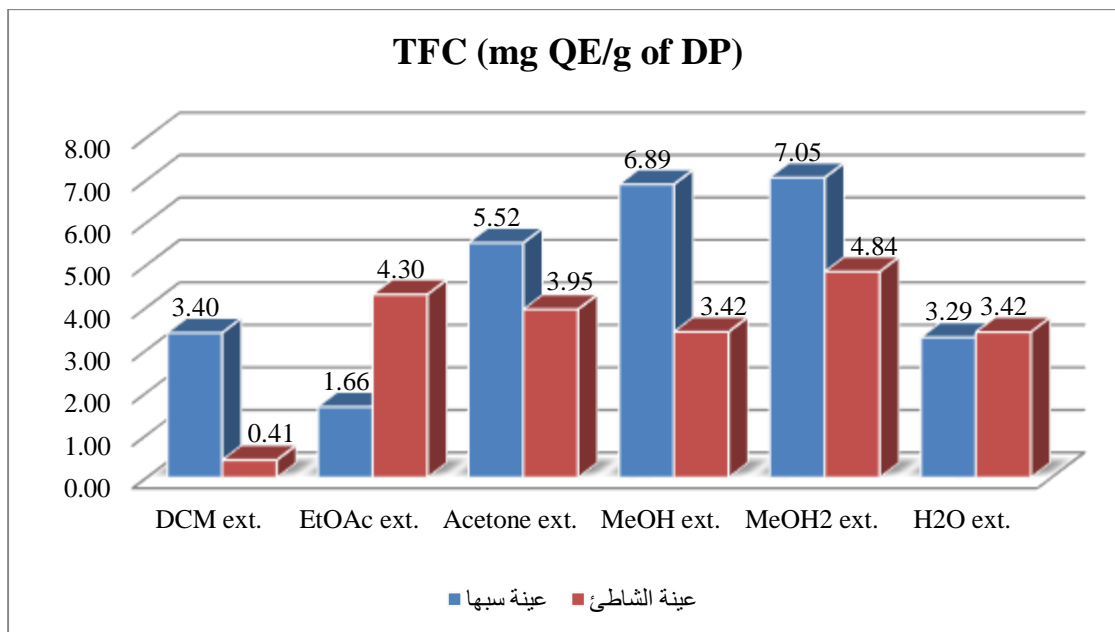
أظهرت نتائج تقدير المحتوى الفينولي، ان عينة الشاطئ كانت اعلى في اغلب المستخلصات عدا في مستخلصي الـ DCM و MeOH فقد كانت اعلى في عينة سبها وبفارق كبير في مستخلص الـ DCM. اظهرت النتائج بوضوح ان الاسيتون له القدرة الاكبر على استخلاص المحتوى الفينولي للنبات.

النتائج تقترح ان محتوى الفينولات في النبات تميل الى ان تكون غير شديدة القطبية وذلك بملاحظة ان مستخلصات الـ H₂O و MeOH و MeOH₂ كانت اقل في المحتوى الفينولي من المذيبات العضوية متوسطة القطبية.

2.3 نتائج تقدير المحتوى الفلافونيدي الكلي TFC:

جدول (17): محتوى الفلافونيدات الكلية في المستخلصات (mg QE/g of DP).

المستخلص النباتي	TFC mg/g of dry plant	
	عينة سبها	عينة الشاطئ
Acetone ext.	5.52	3.95
EtOAc ext.	1.66	4.30
DCM ext.	3.40	0.41
MeOH ext.	6.89	3.42
MeOH ₂ ext.	7.05	4.84
H ₂ O ext.	3.29	3.42



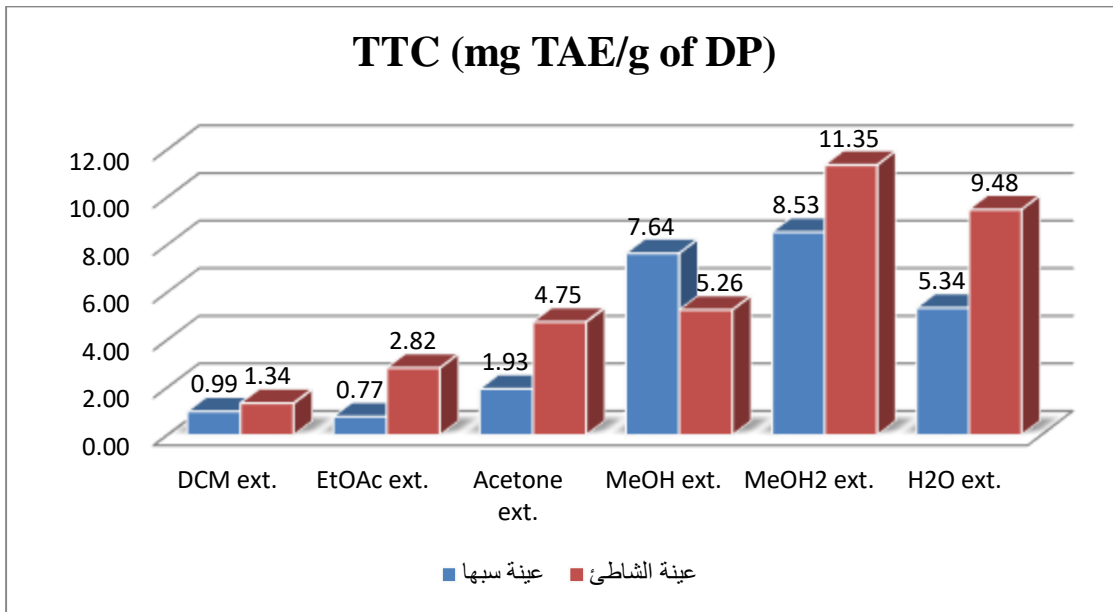
الشكل (6): التمثيل البياني لنتائج محتوى الفلافونيدات الكلية في مستخلصات سبها والشاطئ

أظهرت نتائج تقدير المحتوى الفلافونيدي ان عينة سبها تحتوي كمية اعلى من الفلافونيدات في اغلب المستخلصات. النتائج اوضحت ان مستخلصات الـ MeOH و MeOH2 و Acetone تمتلك المحتوى الاعلى من الفلافونيدات. تشير النتائج الى ان الفلافونيدات الموجودة في عينة سبها اغلبها مركبات شبه قطبية، ذلك ان مستخلصات الـ MeOH و MeOH2 و Acetone اظهرت أفضلية هذه المذيبات العضوية على باقي المذيبات، في حين ان عينة الشاطئ اظهرت مزيج معتدل من الفلافونيدات القطبية وشبه القطبية حيث كان المحتوى فيها متقارب في اغلب المستخلصات.

3.3 نتائج تقدير محتوى التانينات الكلي TTC:

جدول (18): محتوى التانينات الكلية في المستخلصات (mg TAE/g of DP).

المستخلص النباتي	TTC mg/g of dry plant	
	عينة سبها	عينة الشاطئ
Acetone ext.	1.935	4.753
EtOAc ext.	0.773	2.822
DCM ext.	0.989	1.337
MeOH ext.	7.636	5.258
MeOH2 ext.	8.528	11.348
H ₂ O ext.	5.339	9.476



الشكل (7): التمثيل البياني لنتائج محتوى التانينات الكلية في مستخلصات سبها والشاطئ

أظهرت نتائج تقدير محتوى التانينات ان عينة الشاطئ تحتوي كمية اعلى من التانينات في كل المستخلصات بالمقارنة مع عينة سبها، عدا مستخلص الميثانول المباشر (MeOH ext.). النتائج اوضحت ان مستخلصات الـ MeOH و MeOH2 و H₂O في عيني سبها والشاطئ كانت الاعلى في محتوى التانينات. تشير النتائج الى ان التانينات الموجودة في كلا من عيني سبها والشاطئ هي مركبات تميل للقلبية، وان محتوى المستخلصات من التانينات تناقص مع تناقص قطبية المذيبات.

1.4 الاستنتاج:

نتائج تقدير المحتوى الكلي من الفينولات والفلافونيدات والتانينات في كلا من عينتي سبها والشاطئ، اوضحت ان عينة عاقول الشاطئ كانت اعلى في محتوى الفينولات والتانينات الكلية بينما كانت عينة عاقول سبها اعلى في محتوى الفلافونيدات الكلية. اظهرت النتائج ان الاسيتون هو المذيب الافضل في استخلاص الفينولات من النبات الجاف، في حين ان الميثانول متبوعا بالاسيتون هو المذيب المثالي في استخلاص الفلافونيدات متوسطة القطبية، بينما مذيب الميثانول والماء كانت الافضل في استخلاص التانينات. مقارنة استخلاص المكونات المختلفة من النبات بالميثانول مباشرة او بالميثانول بعد نزع الدهون لم يُظهر اختلاف جوهري في كمية المواد المستخلصة عدا في استخلاص التانينات، التي ظهر فيها ان نزع الدهون قبل الاستخلاص بالميثانول قد أدى الى تحسين كمية الاستخلاص.

2.4 التوصيات:

- 1- إجراء دراسات لعزل وتشخيص المركبات الفينولية والفلافونويدية والتانينات الموجودة في النبات.
- 2- دراسة الفاعلية البيولوجية في المجالات المختلفة للمستخلصات والمركبات المعزولة من النبات.
- 3- إجراء دراسات اعماق لسمية وسلامة هذه المصادر.

- [1] Ahmad, N., Bibi, Y., Saboon, Raza, I., Zahara, K., Saiba idrees, Khalid, N., Bashir, T., Tabassum, S. and Mudrikah. (2015), Traditional uses and pharmacological properties of *Alhagi maurorum*: a review. Asian Pac. J. Trop. Dis. 5(11), 856–861.
- [2] Scalbert, A., Johnson, I. T. and Saltmarsh, M. (2005), Polyphenols: antioxidants and beyond. Am. J. Clin. Nutr. 8(1), 215S-217S.
- [3] Al-Snafi, A. E. (2015), *Alhagi maurorum* as a potential medicinal herb: an overview. Int. J. Pharm. Rev. Res. 5(2), 130-136.
- [4] Fawzy Taha Kotb Hussein, Medicinal plants in Libya, Arab Encyclopedia House, First print run, 1985, p-174.
- [5] Srivastava, B., Sharma, H., Dey, Y. N., Wanjari, M. M. and Jadhav, A. D. (2014) *Alhagi pseudalhagi*: a review of its phyto-chemistry, pharmacology, folklore claims and Ayurvedic studies. Int. J. Herb. Med. 2(2), 47-51.
- [6] Encyclopedia of medicinal plants in UAE. Health Authority Abu Dhabi. Zaied Center for Traditional Medicine and Herbs Researches 2005, 15-20.
- [7] Zain Ullah, Baloch, M. K., Khader, J. A., Baloch, I. B., Riaz Ullah, AbdElsam, N. M. and Noor, S. (2013), Proximate and Nutrient Analysis of Selected Medicinal Plants of Tank and South Waziristan Area of Pakistan. Middle-East J. Sci. Res. 13(10), 1345-1350.
- [8] Okoli, C. O., Akah, B. A. and Ezugworie, U. (2005), Anti -inflammatory activity of extracts of root bark of *Securidaca longipedunculata* Fres (Polygalaceae). Afr. J. Trad. CAM. 2(3), 54-63.
- [9] Nadheerah, F. N. (2012) A Pharmacological evaluation of aqueous extract of *Alhagi maurorum*. Glob. J. Pharmacol. 6(1), 41-46.
- [10] Vijendra, N. and Kumar, K. P. (2010), Traditional knowledge on ethno-medicinal uses prevailing in tribal pockets of Chhindwara and Betul Districts, Madhya Pradesh, India. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 4(9), 662-670.
- [11] Abd-Ellatif, S., Abdel Rahman, S. M., and Deraz, S. F. (2011), Promising antifungal effect of some folkloric medicinal plants collected from El-hammam habitat, Egypt against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. ARPN J. Agric. Biol. Sci. 6(9), 25-32.
- [12] Marashdah M. S., Al-Hazimi H. M., Abdallah, M. A. and Mudawi, B. M. (2008) Pharmacological activity of the new compound 5, 500 00-dipropyl-2, 20:50,200:500,200 0:500 0,200 00-pentathienyl and octocosanoic acid, 28-hydroxy-20, 30-dihydroxy propyleste isolated from *Alhagi maurorum* roots. Arab. J. Chem. 1(1), 61-66.
- [13] El-Sayed, N. H., Ishak, M. S., Kandil, F. I. and Mabry, T. J. (1993),

Flavonoids of *Alhagi graecorum*. Pharmazie, 48(1), 68-69.

- [14] Sulaiman G. M. (2013), Antimicrobial and cytotoxic activities of methanol extract of *Alhagi maurorum*. Afr. J. Microbiol. Res. 7(16), 1548-1557.
- [15] Oskoueian, A., Oskoueian, E., Hendra, R., Farida, Z., Samadi, F., and Karimi, E. (2011) Antioxidant activity and bioactive compounds in *Alhagi maurorum*. Clin. Biochem. 44, S343-S344.
- [16] Atta, A. H., Nasr, S., Mouneir, S. M., Alwabel, N. A., and Essawy, S. S. (2010), Evaluation of the diuretic effect of *Conyza dioscorides* and *Alhagi maurorum*. Int J Pharmcy and Pharm Sci, 2(3), 162-165.
- [17] Marashdah, M. S. (2014), New natural compound for the enlargement of the ureter. Arab. J. of Chem. 7(3), 381–383
- [18] Shaker, E., Mahmoud, H., and Mnaa, S. (2010), Anti-inflammatory and anti-ulcer activity of the extract from *Alhagi maurorum* (camelthorn). Food Chem. Toxicol., 48(10), 2785-2790.
- [19] Hossain, M. A., AL-Raqmi K. A. S., AL-Mijizy Z. H., Weli A. M. and Al-Riyami, Q. (2013), Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 3(9), 705-710.
- [20] Gursoy, N., Sarikurkcu C., Tepe B., and Solak M. H. (2010), Evaluation of Antioxidant Activities of 3 Edible Mushrooms: *Ramaria flava* (Schaeff.: Fr.) Quéf., *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. Fries., and *Russula delica* Fr. Food Sci. Biotechnol. 19(3): 691-696.
- [21] Haile, M. and Kang, W. H. (2019), Antioxidant Activity, Total Polyphenol, Flavonoid and Tannin Contents of Fermented Green Coffee Beans with Selected Yeasts. Fermentation. 5(29), 1-13.