مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (33) العدد (4) 2011
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (33) No. (4) 2011

أهمية تقدير الأسترات الألكيلية للأحماض الدهنية وإمكانية استخدامها كمؤشر لتصنيف زيت الزيتون

الدكتور محمود العاصي*

(تاريخ الإيداع 16 / 3 / 2011. قبل للنشر في 3 / 8 / 2011)

□ملخّص □

طورت في هذا البحث طريقة جديدة لتقدير الأسترات الألكيلية حيث عُزلت باستخدام عمود فصل حشوته من السيليكاجل 1غ (SPE) ثم قدرت بجهاز الكروماتوغارفيا الغازية (G.C). قسمت عينات الدراسة إلى 3 مجموعات: زيوت زيتون بكر ممتازة، زيوت ذات عيوب حسية شائعة، وزيوت زيتون مُحللة بواسطة فريق تذوق. حيث إنه في المجموعة الأولى تم تقدير الأسترات في 49 عينة، وأشارت النتائج بأنه في الـ 96% من العينات كانت الكمية الكلية من الأسترات الألكيلية أقل من 75 ملغ\كغ، وبالنسبة للزيوت التي تعلو هذه القيمة فإن العلاقة بين الأسترات (إيتيلية\ميتيلة) كانت أقل من 1,5، ولكن الزيوت التي لاتنطبق عليها الشروط السابقة فإنها تفقد صفة الجودة. أما في المجموعة الثانية فقدّرت الأسترات في 5 عينات زيوت زيتون ذات عيوب حسية شائعة (الهري، والتخمر، والعكر، والعفن، وتزنخ وزيتون مصاب بالصقيع)، وقد وجد أن التغيرات الناتجة عن عمليات أنزيمية أو تخمرية ترافقت بتراكيز مرتفعة من الأسترات الميتيلية (62–777) والإيتيلية (430–1853) والعلاقة بينها (7,3-2,0). بينما في المجموعة الثالثة فقد وجد اختلاف في تصنيف الزيت بين التحليل الحسي والتحليل الكيميائي (تقدير الأسترات) لـ 31 عينة زيت زيتون بكر. لقد توصلنا إلى مؤشر جديد لتوصيف زيت زيتون بكر ممتاز عندما تكون الكمية الكلية من الأسترات الألكيلية أقل من 75 ملغ\كغ أو إذا كانت بين 75 و 150 ملغ\كغ فيجب أن تكون العلاقة بين أسترات الايتيل والميتيل اصغر أو تساوي 1,5. تبين أن الأسترات الألكيلية هي معيار جيد لتحديد جودة زيت الزيتون البكر الممتاز.

الكلمات المفتاحية : زيت زيتون بكر، أسترات ألكيلية، عيوب حسية، جودة.

* دكتور في دائرة الزيت– قسم بحوث الزيتون– الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، ادلب– سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (33) العدد (4) 2011
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (33) No. (4) 2011

The importance of Estimating Alkyl Esters of Fatty Acids and the Possibility of Using It as an Indicator for Olive Oil Classification

Dr. Mahmoud Alassi*

(Received 16 / 3 / 2011. Accepted 3 / 8 /2011)

□ ABSTRACT □

A new method was developed in this research to estimate the alkyl esters by isolating them using a cartridge of silica gel (SPE-1g). They were estimated by GC. The study samples were divided into 3 groups: extra virgin olive oils, oils with common sensory defects, and olive oils analyzed by team test. In the first group, esters were estimated in 49 samples. The results indicated that in 96% of samples, the total amount of alkyl esters were less than 75 mg/kg. For oils having a higher value, the relationship between esters (ethyl/methyl) was less than 1.5; but the oils upon which the above conditions do not apply lose quality status. In the second group, the esters were estimated in 5 olive oil samples with common sensory defects (fusty, winey, muddy sediment, musty, rancid and frosted olives). It was found that the changes resulted from enzymatic or fermentation processes accompanied by high concentrations of methyl (62-777) and ethyl esters (430 -1853), and the relationship between them ranged from 2.0 to 7.3. In the third group, differences were found in oil classification between sensory analysis and chemical analysis (esters estimate) for 31 sample virgin olive oil. We have reached a new indicator to characterize the extra virgin olive oil when the total amount of alkyl esters is less than 75 mg/ kg. If it ranged between 75 and 150 mg/kg, the relationship between ethyl and methyl esters should be smaller or equal to 1,5. The alkyl esters are a good indicator to determine extra virgin olive oil quality.

Keywords: Extra virgin olive oil, Alkyl esters, Sensory defects, Quality.

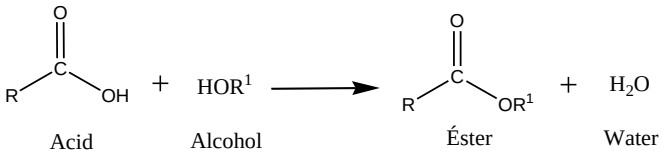
***Doctor, Department of Olive Research, General Commission for Scientific Agricultural Research, Idlib, Syria.**

مقدمة:

يُصنف زيت الزيتون اعتماداً على طرق الحصول عليه والمواصفات الحسية والفيزيائية والكيميائية الواردة في المواصفة التجارية للمجلس الدولي للزيتون (I.O.C, 2009) والمواصفة القياسية الأوربية (R. CE, 640/2008, 702/2007)، إلى عدة أنواع هي: زيت زيتون بكر قابل للاستهلاك البشري: ويشمل البكر الممتاز، والبكر، والبكر العادي. وزيت زيتون بكر غير القابل للاستهلاك البشري كما هو: ويشمل زيت وقاد، وزيت البيرين (ثفل الزيتون) الخام، وزيت بيرين (ثفل) الزيتون. وعموماً، تختلف زيوت الزيتون البكر عن غالبية الزيوت النباتية بأنها تُستحصل بطرق ميكانيكية، والتي من شأنها الحفاظ على تركيبها الكيميائي والرائحة المميزة وبالتالي تُستهلك بدون معاملات.

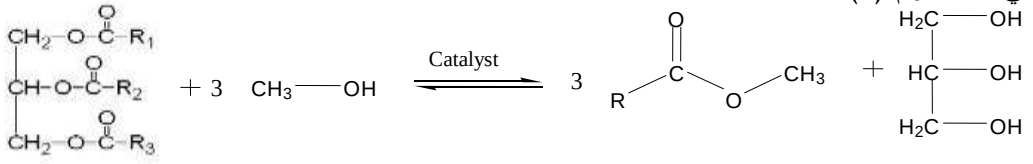
أسترات ألكيل الأحماض الدهنية (FAAEs):

أسترات ألكيل الأحماض الدهنية (FAAEs)، هي مجموعة من الدهون الطبيعية الحيادية تتواجد في زيت الزيتون والتي تشكلت بفعل أسترة الأحماض الدهنية الحرة (FFAs) مع كحولات ذات وزن جزيئي منخفض (مثل الميتانول أو الايتانول أو البروبانول..) (Mariani *et al.* 1986a, Mariani *et al.* 1991b) (Mariani *et al.* 1992c, Fukuda *et al.* 2001)، ويشاهد في الشكل رقم (1)، الطريقة النموذجية والمعروفة لتشكل الأسترات الألكيلية بوجود الوسط الحامضي ووجود الأنزيمات كمحفزات.



شكل رقم (1)، تشكيل أسترات ألكيل الأحماض الدهنية

تعتمد عملية التفاعل هذه على كلٍ من الأحماض الدهنية (FFAs) والكحولات، وأيضاً على درجة الحرارة. في حالة تخزين ثمار الزيتون لعدة أيام قبل عملية الطحن، تزداد كمية الأحماض الدهنية الحرة (FFAs)، بسبب تفكك الغليسيريدات الثلاثية والكحولات، وتتشكل بفعل نشاط الكائنات الحية الدقيقة كنتيجة لذلك أسترات ألكيل الأحماض الدهنية (FAAEs) (Pérez-Camino *et al.* 2002, Ruiz-Méndez *et al.* 2003). تشجع الممارسات الخاطئة أثناء عملية استخلاص زيت الزيتون ورداءة نوعية ثمرة الزيتون على تكوين أسترات ألكيل الأحماض الدهنية كما هو موضح في الشكل رقم (2).



شكل رقم (2)، تحول الغليسيريدات الثلاثية إلى أسترات ميتيل الأحماض الدهنية

عموماً، الأسترات الألكيلية هي مركبات غير قطبية ولتقديرها يجب عزلها عن مركبات أخرى بطريقة معينة، كي لاتسبب مشاكل عند التقدير الكمي للأسترات كأن تتداخل معها عند تقديرها بواسطة جهاز الكروماتوغرافيا الغازية أو حدوث أخطاء في تركيز العينة. لقد تم مؤخراً اكتشاف كميات لايمكن تجاهلها من الأسترات الألكيلية للأحماض

الدهنية: بالميتيك، أوليبك، ولينولييك في بعض زيوت الزيتون (Cert *et al.* 2000). ويعتقد أن هذا يعود إلى أنه قد تم إضافة زيت زيتون منخفض الجودة ومكرر بدرجات حرارة منخفضة نسبياً. إن تركيب أسترات ألكيل الأحماض الدهنية وأهميتها في جودة زيت الزيتون لم تتم دراسته حتى الآن. ولكن زيوت الزيتون البكر الممتازة كما أوضحتها دراسة سابقة تحتوي على كميات منخفضة من أسترات إيتيل وميتيل الأحماض الدهنية، والعلاقة بينهما أيضاً منخفضة (Pérez-Camino *et al.* 2006)، على حين أن الزيوت منخفضة الجودة أو زيوت ثفل الزيتون (البيرين) تحتوي على تراكيز عالية من هذه الأسترات وبشكل رئيسي الأسترات الإيتيلية (نتيجة للتغيرات التي تحدث في الثمار قبل استخلاص الزيت)، علماً أنه لايوجد ترابط كبير بين درجة حموضة الزيت وتركيز الأسترات الإيتيلية (Pérez-Camino *et al.* 2002). ويترتب على ذلك أنه يمكن استخدام المحتوى من الأسترات الألكيلية لتقييم جودة زيت الزيتون (Kocsisová *et al.* 2005). ومن جانبٍ آخر، فقد وجد في زيوت الزيتون منخفضة الجودة والتي تتعرض إلى عملية تكرير بدرجات حرارة منخفضة أن الأسترات الألكيلية للأحماض الدهنية (FAAEs) تبقى حتى بعد التكرير، مما يساعد في الكشف عنها إذا كانت مخلوطة مع زيوت زيتون بكر ممتازة عبر تراكيز هذه الأسترات (Pérez-Camino *et al.* 2008). عموماً، تقدر الأسترات بحسب طريقة المجلس الدولي للزيتون (IOOC/T.20/2007) بواسطة عزلها عبر عمود فصل كروماتوغرافي زجاجي حيث يستخدم 15 غ من السيليكاجل و300 مل من المذيبات، ويتم الحقن في جهاز الكروماتوغرافيا الغازية للتقدير الكمي لها. ولكن هذه الطريقة هي طويلة وذات تكلفة كبيرة نسبياً كما أنه يبقى جزء كبير من مركب الأسكوالين في الطور الحاوي على الأسترات.

أهمية البحث وأهدافه:

يهدف البحث لتطوير طريقة جديدة وسريعة لتقدير الأسترات الألكيلية للأحماض الدهنية (FAAEs) في زيوت الزيتون ودراسة مردوديتها، ودراسة العلاقة بين محتوى الأسترات الألكيلية (الميتيلية والإيتيلية) والعيوب الحسية في زيوت الزيتون، كذلك وضع قيم حدودية لهذه الأسترات لتصبح مرجعية من أجل زيوت الزيتون البكر الممتازة. وتحديد قيم هذه الأسترات في الزيوت ذات الجودة المتوسطة والمنخفضة حسب تصنيف فريق التذوق، وإمكانية اعتبار تقدير هذه الأسترات كبديل عن فريق تذوق زيت الزيتون لتصنيف الزيت.

طرائق البحث ومواده:

1- الزيوت المستخدمة:

تم إجراء هذا البحث في معهد الدهون في إشبيليا–إسبانيا بين عامي 2008 و 2009، واستخدمت زيوت زيتون من أصناف وأنواع مختلفة، تم تصنيفها في 3 مجموعات وهي:

مجموعة1: *زيوت زيتون بكر أحادية الصنف* مزروعة في مناطق مختلفة وتشمل: أربيكينا1، وأربيكينا2، وأربيكينا3، وأربيكينا4، وأربيكينا5، وأربيكينا6، وأربيكينا7، وأربيكينا8، وأوخيبلانكا1، وأوخيبلانكا2، وأوخيبلانكا3، وأوخيبلانكا4، وأوخيبلانكا5، وبيكوال1، وبيكوال2، وبيكوال3، وبيكوال4، وبيكوال5، وبيكوال6، وكورنيكابرا1، وكورنيكابرا2، وكورنيكابرا3، ومانثانيا3، ومانثانيا4، وفيرديال1، وكارولييا، وبلانكيتا، وشملالي، وبلانكيتا، وبيتشولين مغربي، وكوراتينا.

مجموعة2: زيوت زيتون مجهولة الصنف من مناطق مختلفة وتشمل: زيوت مرقمة (M1 -M5) , (0-53)، زيت تركي.

مجموعة3: زيوت زيتون ذات عيوب حسية وتشمل: هري، ومتخمر، وعكارة، ومتعفن، ومتزنخ، وزيتون متجمد، ومتخمر A، ومتخمر B، وهري C.

2- الطريقة التحليلية لتقدير أسترات ألكيل الأحماض الدهنية:

إن أسترات ألكيل الأحماض الدهنية والهيدروكربونات والشموع هي من المجموعات شديدة عدم القطبية في الزيوت. ومن أجل تقدير الأسترات لابد من عزلها عن الغليسيريدات الثلاثية التي يمكن أن تؤثر على تقديرها بواسطة الاستخلاص في الطور الثابت (عمود فصل محشو بالسيليكاجل 1غ "SPE").

تحضير العينة:

تنشيط عمود الفصل: بإضافة التولوين (إزالة الشوائب الموجودة في العمود) ثم إضافة الهكسان لإزالة الشوائب وبقية التولوين. يتم وزن حوالي 1غ من العينة بدقة ±0,001. ثم يضاف المشعرات (C17 "للأسترات" و C32 "للشموع") ويكمل بالهكسان حتى العلامة. ويؤخذ 0,5 مل من العينة المحضرة مع المشعرات وتمرر في العمود SPE. نضيف إلى العمود 200 ميكروليتر من الهكسان بمعدل مرتين. ثم يمرر في العمود 4 مل من مزيج هكسان:تولوين (15:85) لإزالة النسبة الأكبر من الأسكوالين. وهذا الطور يهمل. بعد ذلك يمرر 12 مل من المزيج السابق في العمود. وهذا الطور يؤخذ لأنه يحتوي الأسترات. يتم التبخير بواسطة المبخر حتى الوصول إلى حجم مخفف بحوالي 200 ميكروليتر. وأخيراً يتم التقدير بواسطة جهاز الكروماتوغرافيا الغازية.

التحليل الكروماتوغرافي:

تم استخدام جهاز كروماتوغرافي غازي (Agilent Technologies 6890**N**) ذي كاشف بواسطة اللهب المتأين (FID) والحقن يتم على البارد بواسطة حاقن "On-column".

العمود المستخدم: شعري محشو بالسيليسيوم HP-5: 12 م×0,32 ملم×0,10 ميكروليتر، **حرارة الفرن:** ابتدائية 80ْ م لمدة 1 دقيقة؛ وتبدأ البرمجة الحرارية: 15ْ م/دقيقة حتى 140ْ م ثم 4,5ْ م/دقيقة حتى 335ْ م خلال 16 دقيقة، **حرارة الكاشف:** 350ْ م، **تدفق الغاز الحامل H_2:** 40 مل\دقيقة، **تدفق الغاز المساعد (make up) N_2:** 35 مل/دقيقة، **تدفق الهواء:** 400 مل/دقيقة.

التقدير الكمي:

تم التقدير باستخدام مشعر داخلي لتقدير الأسترات الألكيلية وهو هيبتاديكانات الميتيل C17:0 بكمية 500 ميكروليتر ذي تركيز 0,2 ملغ/كغ، ومشعر داخلي لتقدير الشموع وهو لاوريل اراكيدات C32 بكمية 500 ميكروليتر ذو تركيز 0,4 ملغ/كغ. واستعملت المعادلة التالية لحساب تركيز الاستر.

$$\text{تركيز إستر ألكيلي (ملغ\كغ)} = \frac{1000 \times m_s \times A_x}{A_s \times m}$$

A_x: المساحة المتعلقة بقمة (بيك) الاستر C16 و C18 بشكل فردي ، **A_s:** القمة المتعلقة بقمة (بيك) المشعر C17:0

m_s: كمية المشعر C17:0 مقدراً بـ ملغ، **m:** كمية العينة مقدرة بـ غ.

2-1- دراسة دقة الطريقة التحليلية:

تم أخذ 5 أصناف زيوت زيتون بكر (أربيكينا1، وكورنيكابرا1 "لديه صفة حسية الهري"، وبيكوال1 "لديه صفة حسية التخمر"، ومانثانيا3 و أوخيبلانكا1) بتراكيز مختلفة من الأسترات الألكيلية، وبمعدل مكررين لكل زيت. تم تقدير كمي ونوعي للأسترات الميتيلية والإيتيلية.

2-2- دراسة تشاركية للطريقة التحليلية:

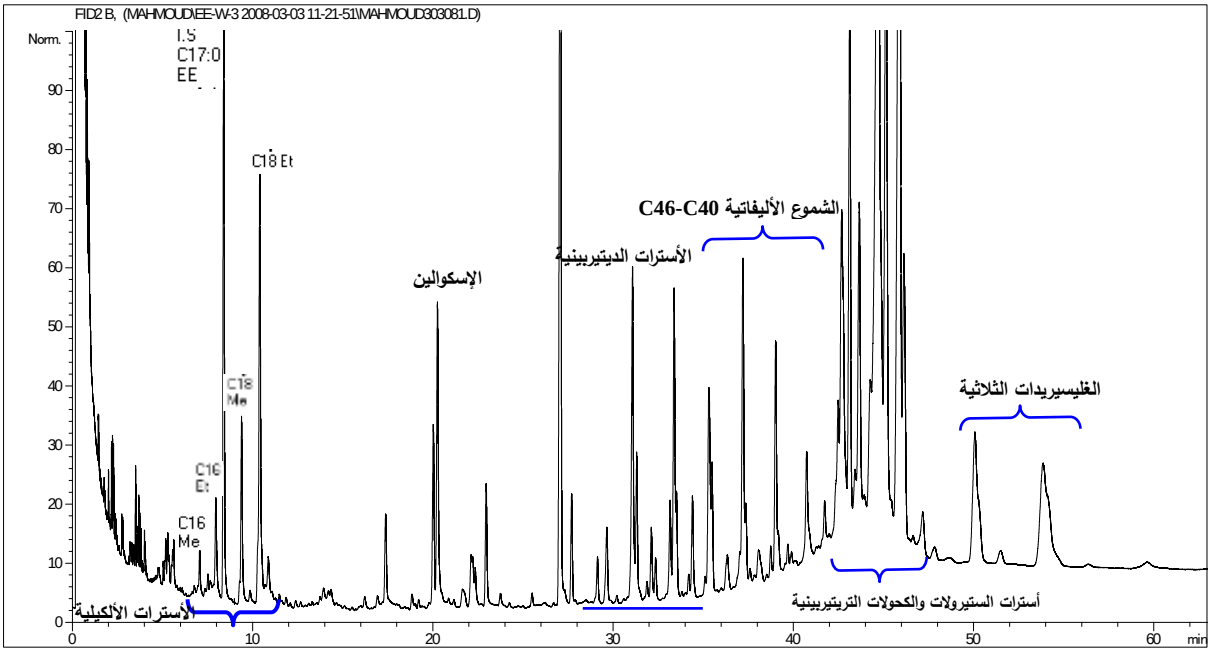
خضعت الطريقة التحليلية المطورة إلى دراسة تشاركية، حيث اشترك فيها 28 مخبراً عالمياً معتمداً: 7 إسباني و2 فرنسي و2 يوناني و14 إيطالي و1 سلوفاكي و1 مغربي و1 تركي. فقد تم إرسال 5 عينات زيت زيتون بتراكيز مختلفة من الأسترات (محللة بالطريقة التحليلية المطورة في مخبرنا) إلى هذه المخابر العالمية لتقدير كمية الأسترات في العينات ذاتها بواسطة الطريقة المطورة. والعينات المحللة هي: (M1) زيت زيتون بكر، (M2) زيت زيتون بكر ممتاز + 20% زيت زيتون مكرر تركي، و(M3) زيت زيتون بكر ممتاز تجاري إيطالي، و(M4) زيت زيتون بكر ممتاز صنف كوراتينا و(M5) زيت زيتون بكر ممتاز تجاري إيطالي.

التحليل الإحصائي:

تم باستخدام تحليل التباين (ANOVA للتجارب العاملية وحيدة الاتجاه) لعينات مكررة عند مستوى معنوية 5%. نفذ هذا التحليل بواسطة برنامج (SPSS 12.5, Inc., Chicago, USA). حيث تم حساب المتوسط، الانحراف المعياري ($LSD_{0,05}$)، والانحراف المعياري التكراري ($SD_{0,05}$)، ومعامل الاختلاف التكراري (RSD%). واستخدم التحليل الإحصائي حسب طريقة (Test of Cochran & Grubbs [ISO 5725/1994] لتحليل البيانات الناتجة عن الدراسة التشاركية.

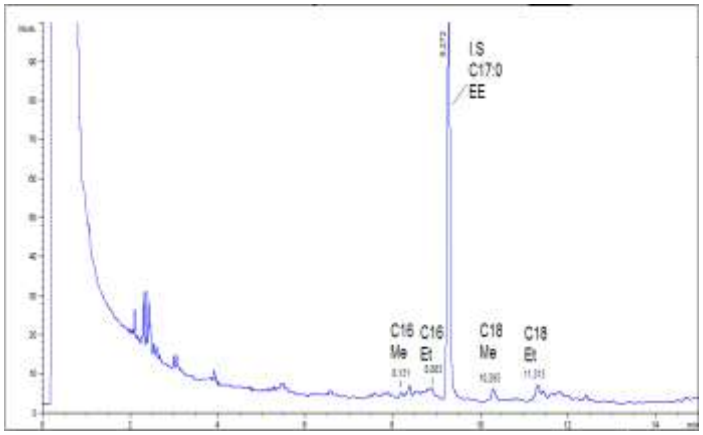
النتائج والمناقشة:

يوضح الشكل رقم (3) منحني كروماتوغرافي G.C لعينة زيت زيتون يظهر فيه الأسترات الألكيلية

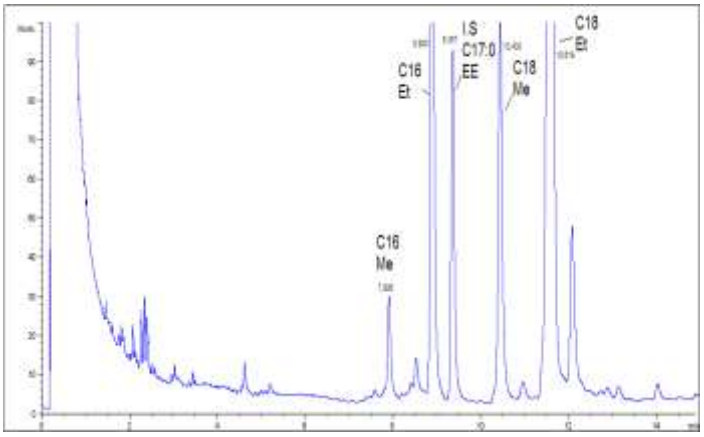


شكل رقم (3). منحنى كروماتوغرافي G.C للطور غير القطبي لزيت زيتون بكر، حاوي على أسترات ميتيل وإيتيل الأحماض الدهنية. حيث: Me ميتيل، و Et إيتيل

إذا كبرنا المنطقة بين 5 و 12 دقيقة، تظهر الأسترات الألكيلية مفصلة. ويوضح الشكلان البيانيان رقم (4 و5) منحنيين كروماتوغرافيين لزيتي زيتون: منخفض (12 ملغ/كغ) ومرتفع (1200 ملغ/كغ) التركيز من الأسترات الألكيلية على التوالي. حيث يُشاهد فقط بيك (قمة) كروماتوغرافي للأسترات الميتيلية للأحماض الدهنية ذات 16 ذرة كربون (C16) " بالميتيك و بالميتولييك"، وكذلك للأسترات الإيتيلية للأحماض الدهنية ذات 16 ذرة كربون. ومن جانب آخر، الأسترات الميتيلية والإيتيلية للأحماض الدهنية ذات 18 ذرة كربون (C18) " استيارييك و أولييك ولينولييك".



شكل رقم (4). منحنى كروماتوغرافي G.C لطور أسترات ألكيل الأحماض الدهنية في زيت زيتون بكر ممتاز ذو محتوى منخفض من هذه الأسترات (12 ملغ/كغ). حيث: Me ميتيل، و Et إيتيل



شكل رقم (5). منحنى كروماتوغرافي GC لطور أسترات ألكيل الأحماض الدهنية في زيت زيتون بكر ممتاز ذو محتوى مرتفع من هذه الأسترات (1200 ملغ/كغ). حيث: Me ميتيل، و Et إيتيل

نتائج تكرارية الطريقة التحليلية المطورة:

يظهر الجدول رقم (1) نتائج تكرارية الطريقة التحليلية المطورة لـ 5 أصناف زيوت زيتون بكر.

جدول رقم (1)، الدراسة الإحصائية لتكرارية الطريقة التحليلية في تقدير أسترات ألكيل الأحماض

الدهنية بواسطة SPE-GC في 5 أصناف زيوت زيتون بكر.

الأسترات (ملغ/كغ)	العوامل الإحصائية	عينات الزيت				
		1 أربيكينا1	2 كورنيكابرا1	3 بيكوال1	4 مانثانيا3	5 أوخيبلانكا1
الميتيلية FAMEs	متوسط (ملغ/كغ)	20,4	68,0	66,4	129,3	56,3
	$SD_{0,05\ (n=2)}$	1,05	0,20	0,95	2,70	0,40
	$LSD_{0,05\ (n=2)}$	1,46	0,28	1,32	3,74	0,55
	RSD %	5,15	0,29	1,43	2,09	0,71
الإيتيلية FAEEs	متوسط (ملغ/كغ)	28,7	130,5	222,0	26,9	82,2
	$SD_{0,05\ (n=2)}$	1,06	0,21	0	1,13	3,47
	$LSD_{0,05\ (n=2)}$	1,47	0,29	0	1,57	4,81
	RSD %	3,69	0,16	0	4,20	4,22
الكلية FAAEs	متوسط (ملغ/كغ)	49,2	198,5	287,4	155,7	137,9
	$SD_{0,05\ (n=2)}$	0,42	0,57	2,76	3,46	2,19
	$LSD_{0,05\ (n=2)}$	0,58	0,79	3,83	4,80	3,04
	RSD %	0,85	0,29	0,96	2,22	1,59
علاقة إيتيليةاميتيلية FAEEs /FAMEs	متوسط	1,4	1,9	3,3	0,2	1,5
	$SD_{0,05\ (n=2)}$	0,16	0,01	0,04	0,01	0,07
	$LSD_{0,05\ (n=2)}$	0,22	0,01	0,06	0,01	0,10
	RSD %	11,43	0,53	1,21	5,00	4,67

*النتائج المأخوذة هي متوسط لمكررين.

النتائج المأخوذة من هذا الجدول، والقيم المستحصلة لمكررين من نفس العينة وباستخدام نفس الطريقة التحليلية، تشير إلى **أن** الطريقة التحليلية المطورة في تقدير الأسترات الألكيلية هي **دقيقة.**

دراسة تشاركية بين مخابر عالمية حول تقدير أسترات ألكيل الأحماض الدهنية في زيوت الزيتون:

يوضح الجدول رقم (2) نتائج التحليل الإحصائي للأسترات الكلية FAAEs تبعاً للنتائج المستخلصة من المخابر المشتركة حسب Test of Cochran & Grubbs.

جدول رقم (2)، الدراسة الإحصائية لتقدير الأسترات الكلية FAAEs في عينات الزيت الخمس.

العوامل		العينات				
		M1	M2	M3	M4	M5
المخابر المشتركة		23	23	23	23	23
المخابر المستبعدة		3	4	2	5	4
المتوسط لمكررين (ملغ/كغ)		95,42	67,40	296,46	17,15	5,64
تكرارية في المخبر الواحد	$SD_{r\ 0,05\ (n=2)}$	3,83	2,99	14,29	1,01	15,78
	$LSD_{0,05\ (n=2)}$	10,72	8,37	40,01	2,83	2,37
	RSD %	4,01	4,44	4,82	5,90	2,37
تكرارية بين المخابر المشتركة	$SD_{R\ 0,05\ (n=2)}$	16,17	12,71	93,46	10,94	154,46
	$LSD_{0,05\ (n=2)}$	95,27	35,58	261,68	30,62	23,15
	RSD_R %	16,94	18,85	31,52	63,78	23,15
	Ho_R	0,74	0,79	1,64	2,16	1,17

*النتائج المأخوذة من كل مخبر هي متوسط لمكررين.

تشير النتائج المأخوذة من الجدول، والقيم المستحصلة لمكررين من نفس العينة وباستخدام نفس الطريقة التحليلية سواءً في المخبر الواحد أم بين مخابر مختلفة، إلى أن الطريقة التحليلية الجديدة هي **مقبولة**.

من الجدير بالذكر أيضاً أن معامل هورات (Horrat)، والذي يأخذ بعين الاعتبار ترتيب حجم تركيز المركب المحلل، إذا كانت القيم مساوية أو أقل من 1 يشير إلى أن المنهج أو الأسلوب التحليلي لديه تكرارية جيدة، وبالتالي دقة الأسلوب يمكن أن تعتبر جيدة. ويُلاحظ من الجدول السابق أن معامل هورات في 3 عينات هو جيد (0,74-1,17)، وفي عينة ليس مرتفعاً كثيراً (1,64) بينما في عينة أخرى هو مرتفع جداً (2,16) وقد يعود هذا إلى أن متوسط القيم لهذه العينة هو منخفض مما يسبب اختلافات كبيرة في تقدير الأسترات الألكيلية. بشكلٍ عام، إن طريقة تقدير الأسترات الألكيلية (FAAEs) تظهر **تكرارية جيدة**.

نتائج تطبيق الطريقة التحليلية:

1- زيوت زيتون بكر ممتازة أصلية:

تم تقدير أسترات ألكيل الأحماض الدهنية في 49 عينة زيت زيتون (أصناف: أربيكينا1 و كورنيكابرا2، وزيوت 0-28 وزيت تركي)، هذه العينات تُكمّل حسب المواصفات والتشريعات الموضوعة كل عوامل الجودة الكيميائية والحسية كزيوت زيتون بكر ممتازة أصلية. وقد تراوحت قيم الأسترات فيها:

-الأسترات الميتيلة FAMEs (ملغ/كغ) = 2-50.

-الأسترات الإيتيلية FAEEs (ملغ/كغ) = 2-53.

-الأسترات الكلية FAAEs (ملغ/كغ) = 5-103.

-العلاقة: إيتيلية\ميتيلة FAMEs \FAEEs = 0,1-5,3.

وجد بشكلٍ عام أن متوسط القيم هو مساوٍ لـ 35,9 ملغ/كغ، وأعلى قيمة وجدت هي 103 ملغ/كغ. وتشير النتائج بأنه في الـ 96% من عينات زيوت الزيتون البكر الممتازة الأصلية كانت الكمية الكلية من الأسترات الألكيلية أقل من 75 ملغ/كغ. وبالنسبة للزيوت التي تعلو هذه القيمة فإن العلاقة بين الأسترات الإيتيلية والميتيلية (إيتيلية\ميتيلة) كانت أقل من 1,5. وبناءً على هذه النتائج تم وضع قواعد لزيوت الزيتون البكر الممتازة:

أ-	مجموع الأسترات الميتيلية والإيتيلية (FAME+FAEE) يجب أن تكون ≥ 75 ملغ/كغ
ب-	إذا كان مجموع الأسترات الميتيلية والإيتيلية 75 < (FAME+FAEE) ≥ 150 ملغ/كغ، يجب أن تكون العلاقة إيتيلية\ميتيلية (FAEE/FAME) ≥ 1,5.

أما الزيوت التي لاتنطبق عليها الشروط السابقة فإنها تفقد صفة الجودة (ممتازة أصلية)، وبالتالي وضعت قواعد لهذه الفئة من الزيوت وهي:

ج-	مجموع الأسترات الميتيلية والإيتيلية (FAME+FAEE) يجب أن تكون > 150 ملغ/كغ
د-	إذا كان مجموع الأسترات الميتيلية والإيتيلية 75 < (FAME+FAEE) < 150 ملغ/كغ، يجب أن تكون العلاقة إيتيلية/ميتيلية (FAEE/FAME) > 1,5.

2- زيوت زيتون ذات عيوب حسية:

تم تقدير الأسترات الألكيلية في زيوت زيتون ذات عيوب حسية شائعة: الهري والتخمر والعكر والعفن وتزنخ وزيتون متجمد (مصقوع). والنتائج مأخوذة في الجدول رقم (3).

جدول رقم (3)، الأسترات الألكيلية في زيوت زيتون ذات عيوب حسية شائعة.

الزيت	أسترات ألكيل الأحماض الدهنية				تصنيف حسب فريق التذوق
	ميتيلية (ملغ/كغ)	إيتيلية (ملغ/كغ)	كلية (ملغ/كغ)	علاقة إيتيليةاميتيلية	
الهري	777	1853	2630	2,4	وقاد
تخمر	62	430	492	7,0	وقاد
عكر	161	1178	1339	7,3	وقاد
عفن	2,0	1081	723	358	وقاد
تزنخ	1,8	138	88	50	وقاد
زيتون متجمد	1,7	18	11	7	بكر ممتاز

*النتائج هي متوسطات لمكررين.

أسترات ميتيلية (C16 + C18)، أسترات إيتيلية (C16 + C18)

يُلاحظ من الجدول رقم (3) أن التغيرات الناتجة عن عمليات أنزيمية أو تخمرية مثل الهري والتخمر والعكر والعفن تترافق بتراكيز مرتفعة من الأسترات الميتيلية (62–777) والإيتيلية (430–1853) للأحماض الدهنية، وبشكلٍ خاص تلك الأخيرة، وبالتالي، ترتفع كمية الأسترات الألكيلية الكلية والعلاقة بين الميتيلية والإيتيلية (2,0-7,3). ومن جانبٍ آخر لا تنتج تغييرات حسية أخرى مثل تزنخ وزيتون متجمد زيادات كبيرة في أسترات ألكيل الأحماض الدهنية (18–138).

3- زيوت زيتون أخرى محللة بواسطة فريق تذوق:

للتأكد من إمكانية وجود ارتباط بين المحتوى من الأسترات الألكيلية والتصنيف الحسي لزيوت محللة بواسطة فريق تذوق، تم تقدير الأسترات الألكيلية في 31 زيت زيتون بكر ومحللة حسياً بواسطة فريق تذوق معهد الدهون في اشبيليا (أصناف: فيرديال1، وأوخيبلانكا5، ومانثانيا4، وأربيكينا7، وأربيكينا8، وكورنيكابرا3، وزيوت مجهولة الصنف: ذات أرقام 29–53)، والنتائج تُبين في الجدول رقم (4).

جدول رقم (4)، نتيجة التحليل الكيميائي بطريقة تقدير الأسترات الألكيلية والحسي لـ 31 عينة زيت زيتون.

	التصنيف	
	طريقة الأسترات المطورة	***فريق التذوق***
31 زيت زيتون مختبر	**13 بكر ممتاز**	6 بكر ممتاز 5 بكر 1 عادي 1 وقاد
	17 ليس بكر ممتاز	13 بكر 4 وقاد 1 بكر ممتاز

ووفقاً للبيانات، يبدو أن الأسترات الألكيلية في بعض الزيوت تقع ضمن الحدود الموضوعة حسب القاعدة الجديدة الموضوعة في هذا البحث على أنها زيوت بكر ممتازة، ولكن هذه الزيوت لم تصنف على هذا النحو بواسطة فريق التذوق. وذلك لأن هناك تغيرات مثل تزنخ وزيتون متجمد لا تؤدي إلى ارتفاع هذه الأسترات، وبالتالي هناك اختلاف في تصنيف الزيوت بين التحليل الحسي وبين التحليل المستخدم في تقدير الأسترات كيميائياً مما يشير بشكل واضح إلى عدم إمكانية الاستغناء عن التحاليل الحسية بواسطة فريق التذوق في تصنيف الزيوت.

الاستنتاجات والتوصيات:

- إن مؤشر الأسترات الألكيلية للأحماض الدهنية هو مؤشر ضروري ولكن غير كافٍ من أجل تصنيف الزيت كزيت زيتون بكر ممتاز.

- إن الكمية الكلية من الأسترات الألكيلية هي معيار جيد من اجل تحديد جودة زيت الزيتون البكر الممتاز، **<u>حيث:</u>**

1- في حالة زيت البكر الممتاز الأصيل فإن الكمية الكلية من أسترات ألكيل الأحماض الدهنية يجب أن تكون أقل من 75 ملغ\كغ أو في حالة أن تكون بين 75 و 150 ملغ\كغ يجب أن تكون العلاقة بين أسترات الإيتيل والميتيل أصغر أو تساوي 1,5.

2- أما الزيوت التي لا تنطبق عليها الشروط السابقة فإنها تفقد صفة الجودة (ممتازة أصلية)، وبالتالي وضعت قواعد لهذه الفئة من الزيوت وهي:

الكمية الكلية من أسترات ألكيل الأحماض الدهنية يجب أن تكون أكبر من 150 ملغ\كغ أو في حالة أن تكون أكبر من 75 وأصغر من 150 ملغ\كغ يجب أن تكون العلاقة بين أسترات الإيتيل والميتيل أكبر من 1,5.

- لا يمكن استخدام معيار تقدير الأسترات الألكيلية للأحماض الدهنية كبديل عن فريق التذوق.

- يمكن تقدير الأسترات الألكيلية بآن واحد مع الشموع وفق الطريقة التحليلية المطورة، وبالتالي نحصل على مؤشر جديد دون زيادة عدد التحاليل المطلوبة لتوصيف الزيت.

- لابد من استكمال البحث في هذا المجال ودراسة كمية الأسترات الألكيلية في زيوت بلدان حوض المتوسط الأعضاء في المجلس العالمي للزيتون بما فيها الزيوت السورية لتحديد مجال وقيم هذه المركبات في الزيوت البكر لأصناف مختلفة.

المراجع:

1- CERT, A.; MOREDA, W.; PÉREZ-CAMINO, M. C. *Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils*. J. Chromatogr. A. 881, 1-2, 2000, 131–148.

2- CERT, A.; MOREDA, W.; PÉREZ-CAMINO, M. C. *Methods of preparation of fatty acid methyl esters (FAME). Statistical assessment of the precision from a collaborative trial.* Grasas Aceites. 51, 2000, 447-456.

3- FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. *Biodiesel fuel production by transesterification of oils.* J. Biosci. Bioeng.; 92, 5, 2001, 405-416.

3- International Olive Council. 10 Sep. 2007. *Olive oil, Designations and definitions of olive oils*. http://www.internationaloliveoil.org/.

4- International Olive Council. *Trade standard applying to olive oil and olive-pomace oil.* IOOC/T.15/NC nº 3, 2009, Rev.4.

5- International Olive Council. *Determination of the content of waxes, fatty acid methyl and ethyl esters and stigmastadienes by capillary gas chromatography.* IOOC/T.20/Doc nº 11, 2007, 1-6.

6- International Organization for Standardization. *Accuracy (trueness and precision) of measurements methods and results*. ISO 5725. 1994, parts 1-6.

7- KOCSISOVÁ, T.; CVENGRO, J.; LUTISAN, J. *High-temperature esterification of fatty acids with metanol at ambient pressure.* Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107, 2005, 87-92.

8- MARIANI, C.; FEDELI, E. *Detection of extraction oils in pressure ones. Note 1.* Riv. Ital. Sostanze Gr. 63, 1986, 3-17.

9- MARIANI, C.; FEDELI, E.; GROB, K. *Evaluation of free and esterified minor components in fatty materials*. Riv. Ital. Sostanze Gr. 68, 1991, 233-242.

10- MARIANI, C.; VENTURINI, S.; BONDIOLI, P.; FEDELI, E. *Evaluation of the variations produced by bleaching process on more meaningful minor components free and esterified in olive oil*. Riv. Ital. Sostanze Gr. 69, 1992, 393-399.

11- PÉREZ-CAMINO, M. C.; CERT, A.; ROMERO-SEGURA, A.; CERT- TRUJILLO, R.; MOREDA, W. *Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils*. J. Agric. Food Chem. 56, 15, 2008, 6740-6744.

12- PÉREZ-CAMINO, M. C.; MOREDA, W.; MATEOS, R.; CERT, A. *Determination of esters of fatty acids with low molecular weight alcohols in olive oils*. J. Agric. Food Chem. 50, 2002, 4721-4725.

13- REGULATION (EC). *The characteristics of olive oils and olive-pomace and them analysis methods.* Nº 640, 2008.

14- REGULATION (EC). *The characteristics of olive oils and olive-pomace and them analysis methods.* Nº 702, 2007.

15- RUIZ-MÉNDEZ, M. V.; RAMOS-HINOJOSA, A. E. *Fatty acid esters with short-chain alcohols in two-phase olive pomace oils*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105, 7, 2003, 346-350.