Name of candidate : Abeer Mohamed Nasser Haroun El-Dakak **Degree : Doctor**
Title of Thesis : Effect of natural antioxidants in grapes and carrots on Cholesterol level.
Supervisors : Prof. Dr. Mona Mohamed Abd El-Magied
Prof. Dr. / Hosny Hemeda **Prof. Dr. Saeb A. Hafez .**
Department : Food Science **Approval : 2 / 3 / 2004**
Branch : Food Science and Technology

ABSTRACT

This investigation was carried out to study the utilization of anthocyanins and β-carotene as natural antioxidants as well as synthetic antioxidant BHT in sunflower oil. The study was extended to elucidate the effect of these antioxidants as hypocholesterolemic agents through the biological evaluation on rats. **The obtained results could be summarized as follows: Extraction and determination of anthocyanin and β-carotene pigments:** Fractionation by HPLC for the extracted and lyophilized anthocyanins pigment showed the presence of 7 fractions. Malvidin 3-*O*-glucoside (Mv-Gl) was recorded the highest concentration. **Utilization of anthocyanins, β-carotene and BHT as antioxidants in sunflower oil:** The oxidative stability of sunflower oil based on Rancimat method was used. The different antioxidants "anthocyanins, β-carotene and BHT were tested either individually or as mixtures in different concentrations. The induction period of sunflower oil with anthocyanin was shorter than sunflower oil containing that for BHT. Meanwhile the highest induction period was with 100ppm of β-carotene. So anthocyanins and β-carotene can react as antioxidants which delayed the onset of oxidation.

Biological evaluation of rats fed with different tested diets with or without natural or synthetic antioxidant: Ten groups of Wistar male rats (185-195g) each containing 6 rats were fed with different tested diets for 10 weeks. G1 fed with basal diet, G2 fed with high fat diet containing 1% cholesterol (HDF + Chol). G3, G4, G5 fed with HFD + Chol, and had anthocyanins daily as 0.71, 1.0, 1.43 mg/ 200g rat/ day respectively. G6, G7, G8 fed with HDF + Chol and had β-carotene daily as 2.5, 5, 10 mg rat/ day. G9 and G10 fed with HFD + Chol and had BHT as 2, 4 mg/ 200g rat/ day. Serum total cholesterol for G3, G4, and G5 had the lowest concentration of total cholesterol. For example G5 recorded cholesterol concentration of (56.31 mg/ dL), which was nearly to that of G1

(61.38 mg/ dL). LDL concentration in rats serum reflect the effectiveness of anthocyanins as natural antioxidant especially G5 which lowered LDL to the largest extent (23.57 mg/ dL). The lowest level of HDL was with G2 (control positive) which recorded (9.51 mg/ dL). Meanwhile G4, G5 and G10 which had 1 mg or 1.43 mg anthocyanins or 4 mg BHT were recorded the highest concentration of HDL (23.06, 25.52 and 23.9 mg/ dL) respectively. β-carotene was more effective than anthocyanin on lowering total cholesterol, total lipids and triglyceride in heart and liver. Rats fed with diet containing β-carotene had the lowest total cholesterol, total lipids and triglyceride. GSH-PX activity in blood of G2 rats recorded only 26.02 U/ ml. Meanwhile, it was 65.78 U/ ml for G1. Groups had anthocyanin was more effective than those had β-carotene. The highest value of malondialdehyde (MDA) was located for G2 of rats which recorded 28.20 nmol/ ml. The groups of rats fed HFD + chol with anthocyanin, β-carotene or BHT were in less values of MDA which appeared the importance of these antioxidant as lowering lipid peroxidation. The natural antioxidants anthocyanins or β-carotene were affected as positive action for reducing the activity of AST or ALT. Meanwhile, synthetic antioxidants showed negative action for these enzymes.

اسم الطالب : عبير محمد ناصر هارون الدرجة : الدكتوراة

عنوان الرسالة : دراسة تأثير المواد المضادة للأكسدة الطبيعية في العنب والجزر وعلاقتها بمستوي الكولستيرول

المشرفون : ا.د / مني محمد عبد المجيد ا.د / حسني محمد حميده ا.د / صائب عبد المنعم

قسم : الصناعات الغذائية فرع : تاريخ منح الدرجة :

اختصت هذه الدراسة بدراسة نوعين من اهم الصبغات الطبيعيه وهما صبغة الانثوسيانين من العنب والبيتا كاروتين من الجزر كمضادات اكسدة فى زيت عباد الشمس مع مقارنتها مع احد مضادات الاكسدة الصناعيه وهو الـ BHT . كذلك تم استخدامها فى تجربة تغذيه علي الفئران لمعرفة تأثيرها كمضادات اكسدة وايضا كمواد مخفضة للكوليستيرول . **وكانت اهم النتائج المتحصل عليها ما يلي اولا: استخلاص وتقدير صبغة الانثوسيانين و البيتا كاروتين:** كانت الكميه المستخلصه من الانثوسيانين من تفل (بقايا عصر) العنب الاحمر هى ١١٥,٥٩ ملجم/ ١٠٠جم. كذلك اوضحت نتائج التفريد باستخدام التحليل الكروماتوجرافى (HPLC) للمستخلص والصبغه المجفده وجود ٧ مكونات فى هذه الصبغه وكان اعلاها فى التركيز هو Malvidin-3-*O*-glucoside (Mv-Gl) . احتوى مخلف تصنيع الجزر (تفل الجزر) على ٥٩,٣٧ جزء فى المليون من البيتاكاروتين بينما احتوت الصبغه المجفده على ٨٣,٨% بالوزن من البيتاكاروتين. **ثانيا: استخدام مضادات الاكسده الطبيعيه (الانثوسيانين والبتاكاروتين) وكذلك مضادات الاكسده الصناعيه (BHT) فى زيت عباد الشمس:** ثم تقدير الثبات الاكسيدي لزيت عباد الشمس بطريقة الرانسيمات وقد تم اختبار تأثير مضادات الاكسده وهي الانثوسيانين والبيتكاروتين والـBHT كل على حده او فى مخاليط بتركيزات مختلفه كذلك اوضحت النتائج ان Induction period للانثوسيانين كانت اقصر من Induction period للـBHT ، اما اعلى Induction period فقد لوحظت باستخدام البيتاكاروتين بتركيز ١٠٠ جزء فى المليون . **ثالثا: التقييم البيولوجي لفئران التجارب المغذاه على وجبات مختلفه خاليه او محتويه على مضادات الاكسده الطبيعيه والصناعيه:** استخدم في هذه التجربه ١٠ مجموعات من ذكور فئران Wistar (١٨٥- ١٩٥ جم) بحيث تحتوي كل مجموعه على ٦ فئران وقد تم تغذيتها لمدة ١٠ اسابيع. غذيت المجموعه الاولى (G1) على وجبه عاديه (basal diet) اما المجموعه الثانيه G2 فتغذت على وجبه عاليه المحتوى الدهنى محتويه على ١% كوليستيرول. اما المجموعات الثالثه والرابعه والخامسه (G3, G4, G5) فقد غذيت على وجبه عاليه المحتوى الدهنى ومحتويه على الكوليستيرول واعطيت لها يوميا جرعة من الانثوسيانين مقدارها ٠,٧١، ١، ١,٤٣ ملجم/ ٢٠٠جم وزن فأر على التوالي . اما بالنسبه للمجموعات السادسه والسابعه والثامنه (G6, G7, G8) فقد غذيت على وجبه عاليه المحتوى الدهنى ومحتويه على الكوليستيرول واعطيت لها يوميا جرعة من البيتاكاروتين مقدارها ٢,٥، ٥، ١٠ ملجم/ ٢٠٠جم وزن فأر على التوالي . اما بالنسبه للمجموعتين التاسعه والعاشره (G9, G10) فقد غذيت على وجبه عاليه الدهن ومحتويه على الكوليستيرول ولكن زودت يوميا بجرعة من الـBHT مقدارها ٢، ٤ ملجم/ ٢٠٠جم وزن فأر على التوالي. **واوضحت الدراسة ما يلى:** حدث انخفاض فى تركيز الكوليستيرول الكلى فى السيرم للمجاميع الثالثه والرابعه والخامسه. بالاضافه لذلك فأن المجموعتين التاسعه والعاشره قد اظهرت انخفاضافي تركيز الكوليستيرول الكلى مقارنة بالمجموعة السادسة (G6) وكانت الفروق معنويه. بقياس تركيز LDL فى سيرم دم الفئران يعكس مدى فاعلية الانثوسيانين كمادة مضادة للاكسدة . كان اقل تركيز فى الـHDL فى المجموعه الثانيه ويعقبها فى الترتيب المجموعة السادسة والسابعة. اما المجموعات الرابعه والخامسة والعاشرة فقد سجلت اعلى تركيز للـHDL . اظهرت مجموعات الفئران المغذاه على الانثوسيانين بتركيزات ١,٤٣ ملجم يوميا وكذلك تلك المغذاه على البيتاكاروتين بتركيز ٥ ملجم يوميا قدرتها على خفض الكوليستيرول الكلى فى الكبد مقارنة بتلك المجاميع المغذاه على الـBHT بتركيز ٢ ملجم او ٤ ملجم، وقد كانت البيتاكاروتين ذو تأثير اكثر فعاليه. كما ان البيتاكاروتين كان اكثر فاعليه من الانثوسيانين فى هذه الخاصيه. و بتقدير نشاط انزيم الجلوتاثيون بيروكسيديز فى الدم فقد سجلت المجموعه الثانية نشاطا مقداره ٢٦,٠٢ وحدة فقط لكل مل دم بينما نشاطه فى المجموعه الاولى ٥٦,٧٨ وحده لكل مل وقد كانت المجاميع المغذاه على الانثوسيانين اكثر فاعليه فى النشاط الانزيمى مقارنة بالمجموعات المغذاه على البيتا كاروتين.اما بالنسبه لقيم المالونالدهيد فقد كان تركيز هذا المركب منخفضا فى مجاميع الفئران المغذاه على وجبات عاليه من الدهن ومحتويه على الكوليستيرول ومغذاه اضافيا بالانثوسيانين او البيتا كاروتين او الـBHT مما يعكس اهمية هذه المواد المضادة للاكسدة وفعلها فى تخفيض الاكسدة البيروكسيديه للدهون. كذلك وجد ان مضادات الاكسده الطبيعيه (الانثوسيانين والبيتا كاروتين) لها تأثير ايجابي على خفض نشاط كل من انزيمات الكبد AST ، ALT بينما وجد ان مضادات الاكسده الصناعيه لها تأثير سلبى على هذه الانزيمات.

CONTENTS

1.INTRODUCTION---------- 1

2.REVIEW OF LITERATURE---------- 5

The colorants ---------- 5

Natural and natural identical color additives---------- 5

Chlorphylls---------- 6

Anthothyanins---------- 6

Biosynthesis of anthocyanin---------- 7

Carotenoids---------- 9

Biosynthesis of carotenes---------- ---------- 12

Dietary sources of β-carotene:---------- 12

Factors that influence β-carotene status:---------- 15

Extraction of natural colorants---------- 17

Extraction of anthocyanins---------- 17

Determination and fractionation of anthocyanins---------- 19

Extraction of carotenoids---------- --- 20

Determination and fractionation of carotenoids---------- 23

Biosynthetic process of retinol from carotene---------- 25

Role of β-carotene and anthocyanin pigments as antioxidants--- 31

Anthocyanin as antioxidant for oil---------- 34

Beta-carotene as oil's antioxidant---------- 39

Free radical, oxidative stress and antioxidants in human health and disease---------- 45

Anthocyanins as antioxidants---------- 54

Carotenoids as antioxidants---------- 56

Role of antioxidant as hypochlesterlemic in the body---------- - 62

Effect of grape seed on cholesterol level---------- 68

Effect of β-carotene on the level of tissue cholesterol---------- 73

3. MATERRIALS AND METHODS---------- 77

3.1 Materials---------- 77

3.2 Methods---------- 77
Extraction and concentration of anthocyanins pigment--------- 77
Extraction of anthocyanins pigment from grape marc---------- 77
Colorimetric determination of anthocyanin pigment----- 78
Fractionation and determination of anthocyanins (HPLC)---------- 80
Extraction and concentration of carotenoids---------- 80
HPLC analysis of carotenoids---------- 81
Concentration of added anthocyanins, Carotenoids (β- carotene), and BHT, for sunflower oils ---------- 81
Effectiveness of antioxidant activity in sunflower oil---------- 83
Physico-chemical properties of sunflower oil---------- 84
Biological evaluation---------- 87
Experimental design---------- 88
Serum assay---------- 93
Determination of glutathione peroxidase activity in whole blood- 93
Determination of malondialdehyde (MDA)---------- 95
Determination of serum total cholesterol---------- 96
Determination of HDL–Cholesterol---------- 97
Determination of LDL-cholesterol---------- 98
Determination of serum triglycerides---------- 99
Determination of serum total lipds---------- 100
Determination of liver function enzymes (blood serum transominases)---------- 101
I) Alanine Amino Transferase (ALT)---------- 101
II) AspartateAmino Transferase (AST)---------- 102
Organs assay---------- 103
Determination of glutathione peroxidase (GSH-Px) and total protein---------- 103
Determination of total cholesterol, triglycerides and total lipids- 104
Statistical analysis---------- 104

4. RESULTS AND DISCUSSION---------- 105

Total anthocyanins in red grape marc:

Fractionation and determination of anthocyanins by HPLC-------- 105

Determination of β-carotene in carrot pulp waste and lyophilized pigment by HPLC---------- 109

Physical and chemical properties of sunflower oil---------- 111

Fatty acids composition of sunflower oil---------- 111

Oxidative stability of sunflower oil as affecting by different antioxidants---------- 114

Physical and chemical changes during storage of sunflower oil as affected by anthocyanins, β-carotene or BHT as antioxidants---- 120

Peroxide value (PV)---------- 120

Thiobarbituric acid value (TBA)---------- 123

Refractive index (RI)---------- 127

Biological evaluation of rats fed on different tested diets with or without natural or synthetic antioxidants---------- 127

Food intake and body weight of different tested rats---------- 130

Effect of different tested diets on the organs weights of rats 130

Effect of different antioxidants "anthocyanin, β-carotene and BHT" on total cholesterol, HDL, LDL, Triglyceride and Total lipids in serum of rats---------- 133

Effect of different concentration of anthocyanins, β-carotene and BHT on total cholesterol, triglycerides and total lipids in the liver of hypercholesterolemic rats---------- 135

Effect of different concentration of anthocyanin, β-corotene and BHT on total cholesterol, total lipids and triglyceride in heart of hypercholesterolemic rats---------- 147

Glutathione peroxidase activity in blood and different organs "brain, kidney and liver" of different experimental rats---------- 154

Lipid peroxidation level [malondialdehyde (MDA nmol/ ml)] in serum of rats fed high fat diet with or without anthocyanins, β-carotene or BHT---------- 160

Aspartate aminotransferase (AST) and Alanine aminotransferase (ALT) enzymes in serum of rats fed high fat diet with or without anthocyanins, β-carotene or BHT for ---------- 167

5. SUMMARY AND CONCLUSION---------- 176

6. REFERENCES---------- 180

***ARABIC SUMMARY**