تأثير مستخلص بذور نبات عين الديك في الإنبات وفي فعالية بعض الإنزيمات في بذورنبات الذرة الصفراء النابتة (Zea May's)

عبد العظيم السنوسي وأحمد مالو

قسم الكيمياء ــ كلية العلوم ــ جامعة دمشق ــ سورية

تاريخ الإيداع 2010/03/31
قبل للنشر في 2010/08/09

الملخص

يعدُّ نبات عين الديك واحداً من تلك النباتات التي شاع استعمالها في مجال الطب البديل والعلاج بالأعشاب، للوقاية من مرض الملاريا وكمضاد للالتهابات والأورام اسمه العلمي *Abrus precatorius,L* وهو نبات مداري يحتوي على الكثير من المركبات قدرت بنحو ثلاثين مركباً، استخلصت بعض مركباته بالميثانول والكلوروفورم وجرى تفريقهاعلى أعمدة الفصل بتقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الآداء HPLC والكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بمطياف الكتلة GC-MS. دُرس تأثير المستخلص وبعض مكوناته في نمو بذور نبات الذرة الصفراء وذلك بنقع تلك البذور في محلوله ومحاليل المركبات الفعالة المستخلصة والنقية بتراكيز محددة قبل استنباتها، كما نُقعت العينة الشاهدة بالماء والذي اِستُنبتت فيه كل العينات في الشروط المخبرية وشروط التجارب.

استُخلصت مستحضرات البروتيآز والأميلازوالسيلولازونُقيت جُزئياً باستخدام كبريتات الأمونيوم، دُرسَ أثر المستخلص وبعض مكوناته في فعالية الإنزيمات المذكورة وفي استقلاب المواد ونمو النبات في الحالات المختلفة وذلك بالطرائق المخبرية التي تناسب كل حالة، أظهرت النتائج تبايناً في نمط استقلاب المواد واختلافاً في تراكيزها بالمقارنة بالعينات الشاهدة، كما أظهرت تأثيرات متعددة ومتباينة في فعالية الإنزيمات المدروسة، وتأثيرات مورفولوجية أخرى في معدل النمو ونسب الإنبات لنبات الذرة في عينات التجارب نتيجة لتأثير النقع بمحاليل المستخلص ومكوناته في استقلاب بعض المواد وفي فعالية بعض الإنزيمات في نبات الذرة الصفراء Zea May's .

الكلمات المفتاحية: نبات عين الديك Crab's eye، التريغونيلين، الأبراين، استقلاب الذرة الصفراء.Zea May's ، البروتيآز، الأميلاز، السيلولاز.

Effects of crab's eye Extract on germination and some enzymes activities regulation in Zea May's Plant seeds

A. EL Sanosi and A. Malo
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

Received 31/03/2010
Accepted 09/08/2010

ABSTRACT

Abrus precatorius. **L plant is a climbing shrub with woody stems and pinnately compound leaves, common names of this plant include deadly crab's eye, Indian bead, Jequirity bead, Lucky bean, Rosary pea. It has a wide distribution in the tropics including Indonesia, India, China, Sudan and South Africa. Despite their toxicity the seeds are used as a phrodisiacs, Oral contraceptives or emetics, chest pain, fever cough and malaria as ethanopharmacological treatments. The chloroform- methanol extract of the Abrus Seeds (crab's eye), is prepared and analysed by HPLC and GC-MS chromatography for identification and purification of the extract components , a solution of a definite concentration is made from crab's eye extract, and others from it's pure components, seeds of Zea May's plant were soaked in this solution for 6 hours and others Zea May's seeds were soaked in the tap water for the same periods of time as a blank test, germination of seeds showed differences in the pattern of the plant growth.**

Extraction of some enzymes preparations, and partial purification of crud enzymes were carried out for Zea May's plant protease, amylase and cellulase, the enzymes preparations analyzed showed differences in enzymes activities regulations in the plant, some enzymes preparations inhibited protease and cellulase, while the enzymes preparations were relatively enhanced amylase and lipase, in the test samples when compared with the blank. This indicates the deep effects of the crab's eye extract and its pure components on the biochemical activities and metabolic process in Zea May's plant.

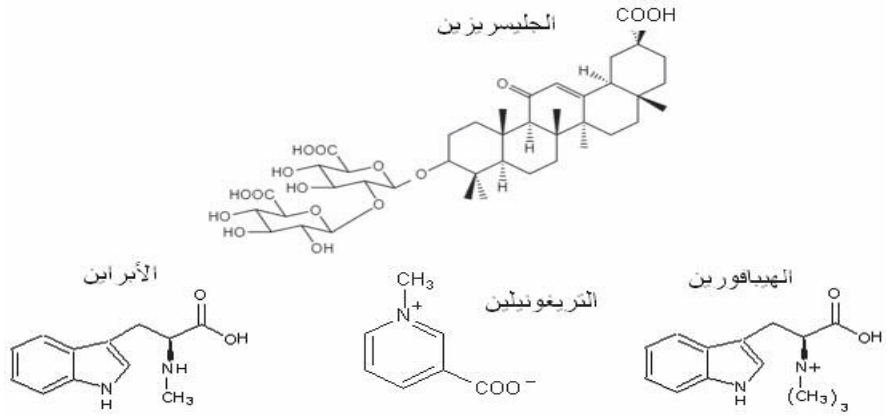
Key words: *Abrus precatorius* L, Zea May's, Trigonelline, A brine, Metaolic enzymes regiolation, Protease, Cellulase, Amylase.

المقدمة

يعدُّ نبات عين الديك Crab's eye واحداً من النباتات التي شاع استعمالها في مجال علاج بعض الأمراض في الطب البديل. اتجه العالم في الآونة الأخيرة إلى ما يمكن أن نسميه الصحوة الكبرى في مجال النباتات الطبية والعلاج بالأعشاب باعتبار أن هذه النباتات تحتوي على الكثير من المركبات الكيميائية التي تشكل مواد أولية في تحضير مركبات علاجية لها قيمتها ويتعذر الحصول عليها بصورة مصنعة. بهذا يتم تلافي الأضرار الجسيمة التي يمكن أن تنجم من خلال تداول استعمالها دون علم ودراية على المستوى الشعبي، كما يؤدي إلى توظيف القدرات العلمية والبحثية بآليات عصرية حديثة ومعتمدة للحصول على أكبر قدر ممكن من الفوائد المرجوة والموجودة في هذا النوع من النباتات التي تمتد آثارها إلى النباتات الأخرى والمحاصيل بجانب الإنسان والحيوان خاصة لهذه المركبات آثارها الفيزيولوجية المهمة حتى أن بعض العلماء والباحثين يعدُّونها هرمونات نباتية.

ينمو نبات عين الديك في كثير من المناطق المدارية وينتشر في أماكن كثيرة من السودان نذكر منها وديان دارفور ومنطقة أعالي النيل[1]، وهو نبات عشبي ينمو على شكل شجيرات متسلقة قد تصل إلى عدة أمتار ارتفاعاً، أوراقه مركبة وأزهاره ذات لون زهري وثماره قرنية وله بذور مميزة بلونيها الأحمروالأسود[2] ويحتوي على الكثيرمن المركبات الكيميائية قدرت بنحو ثلاثين مركباً [3]. *Abrus Precatorious* هوالاسم العلمي لنبات عين الديك ويطلق عليه أسماء شعبية ومحلية أخرى في الدول التي يصادف فيها والتي تتمتع بالمناخ المداري ومن هذه الأسماء Licorice Indian Licorice، Rosary bea، Lucky bean، Love bean، Jequirity [4] وهو ينتمي إلى الفصيلة البقولية *Leguminosae*(*fabaceae*) يستخدم هذا النبات في الطب البديل لعلاج الكثير من الأمراض وكمضاد للأورام والالتهابات والبكتريا والملاريا وخلافها [1]، كما أن للكثير من مكوناته تأثيراً في نمو الجذور في بعض النباتات ويسهم في دورة الخلية النباتية (Cell cycle) وفي تنظيم الضغط الحلولي للنبات Osmoregulatorعند التعرض للملوحة العالية [5]. تنعكس كل هذه التأثيرات على النمو وعلى عملية الاستقلاب في النباتات وعلى الإنزيمات المرتبطة بعملية الاستقلاب. وقد دُرس تأثيرمستخلص بذور هذا النبات في استقلاب البروتينات والسكاريدات والدهون وفي عملية النمو في النبات والإخصاب لدى الحشرات [1]، وفي النشاطات الاستقلابية التي تجرى ضمن الخلية والتى تُسهم فيها وتتأثر بها كل مكونات الخلية من إنزيمات وبروتينات وسكاريدات ودهون وخلافها، وهي تؤثر تأثيراً مباشراً في عملية النمو في النبات [5]. وقد أصبح من الضروري دراسة انعكاسات هذه التأثيرات على فعالية الإنزيمات المساهمة في عملية الاستقلاب مثل الليباز والبروتيناز والأميلاز والسيلولاز خاصة أن معظم التجارب على

هذا النبات تركزت حول فعالية الأبرين (Abrin) المثبط لاصطناع البروتينات [6]. هناك الكثير من المركبات الأخرى في بذور هذا النبات وأوراقه وجذوره، مثل الغليسيريزين Glycyrehizin في الأوراق والجذور،والأبراين Abrine والتريغونيلين Trigonelline في البذور إلى جانب مركبات أخرى [7]، ويسهم التريغونيلين في حماية سلاسل جزيئات الـ DNA من التقطع لدى تعرض النبات لشروط قاسية في أثناء مرحلة النمو [5]. يؤدي التريغونيلين أحياناً دوراً معاكساً للأوكسينات كما في نبات الميموزا [5] تسهم الإستيرولات الموجودة في هذا النبات في بناء الأغشية الحيوية [7] ولها فعالية مضادة للبكتريا، هذا يعني بالضرورة تأثيرها في فعالية بعض الإنزيمات التي تعدُّ وسيطاً رئيسياً وأساسياً في التفاعلات الحيوية كلّها [6].



الشكل (1) صيغ بعض المركبات الفعالة حيوياً في بذور نبات عين الديك.

أهمية البحث وأهدافه

هدف البحث إلى تعرّف تأثير بعض المركبات ذات الفعالية الحيوية الموجودة في بذور نبات عين الديك مثل التريغونيلين والأبراين في مستخلص البذور على فعالية بعض الإنزيمات في نبات الذرة الصفراء كالبروتيآز والأميلاز والسيلولاز التي تسهم في عمليات الاستقلاب، وعلاقة ذلك بظاهرة النمو وتزايد معدلات نسب الإنبات في نبات الذرة الصفراء *Zea May's*.

مواد البحث وطرائقه

اعتُمد للبحث بذور نبات الذرة الصفراء Zea May's التي تم الحصول عليها من الهيئَة العامة لإكثار البذور بحلب وهي من صنف غوطة –82 (إنتاج جديد).

اِستُعمل في التجارب المركبات الفعالة حيوياً والإنزيمات القياسية بوصفها مواد نقية

من إنتاج شركة (Sigma)، أُجريت التحاليل للمركبات الفعالة الموجودة في البذور وفي مستخلص بذور نبات عين الديك باستخدام الكروماتوغرافيا الغازية GC والمقترنة بمطياف الكتلةGC-MS في هيئة الطاقة الذرية في دمشق وأجهزة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC والكروماتوغرافيا التحضيرية (Preparative chromatography)، لإجراء التحاليل واستخلاص المركبات الفعالة حيوياً كالتريغونيلين والأبراين وغيرهما من مستخلص البذور.

استُعمل في التجارب أيضاً الأجهزة الأخرى المتوافرة في مختبرات قسم الكيمياء مثل جهازَ الطيف الضوئي والمبخر الدوار والمحرك الميكانيكي والخلاط الآلي والحاضنة الآلية وأجهزة التثفيل المبردة والعادية،وجهاز قياس الأُس الهيدروجيني pH وغيرها.

أجريت عملية الاستخلاص لبذورعين الديك، لهذه الغاية يُؤخذ وزن 20 غراماً من مسحوق البذور، ويُضاف إليها مزيج الميثانول- كلوروفورم بنسبة 1: 2. تُستخلص على البارد مدة 18 ساعة باستخدام الخلاط الميكانيكي. ثُم تثفل وترشح. وبعد ذلك أضيف إلى الرشاحة مقدار حجمها من الماء وجرى تبخير المذيب بواسطة المبخر الدوار والحصول على الراسب الجاف المتبقي وهو الخلاصة الخام Crude extract أو مستخلص بذور عين الديك الذي نسميه اصطلاحاً (المستخلص) بلغ وزنه 1.2غراماً وقد استُخدم في التجارب اللاحقة بتراكيز محددة. جرى تفريق مكونات المستخلص على أعمدة جهاز الـ HPLC وتم الحصول على بعض المركبات الفعالة مثل الأبراين والتريغونيلين وكانت تراكيزها 10 و7 ميكروغرام/غرام على التوالي إلى جانب مركبات أخرى.

مخطط التجارب

دُرست فعالية المستخلص والمركبات الفعالة حيوياً الموجودة فيه عن طريق نقع بذور نبات الذرة الصفراء في محاليل المستخلص والتريغونيلين والأبراين بالتراكيز500 مغ/ل، 50 مغ/ل، 50مغ/ل على التوالي، نُقعت العينات الشاهدة بالماء فقط. لهذه الغاية أُجريت عدة تجارب أولية على المستخلص لاختيار التراكيز المناسبة منه بحيث نحصل على فعالية واضحة ومماثلة لتلك التي تُحدثها المركبات الفعالة بتركيز50مغ/ل، وكان التركيز (500 مغ/ل) هو الأفضل للمستخلص لذلك اعتُمد للاستخدام في التجارب اللاحقة.

نُقعت بذور الذرة مدة 6 ساعات في كل محلول من المحاليل المذكورة قبل زراعتها، وبعد ذلك استُنبتت في وسط مائي مدة 6 أيام في درجة حرارة 25 مئوية، لدى دراسة معدل الإنباَت، ومدة 3-6 أيام لدى دراسة فعالية الإنزيمات لأن بعض الإنزيمات تنشط في الأيام الأولى للإنبات.

قبل البدء بالتحاليل أجريت عملية قياس لنمو بادرات النبات وحساب نسبة الإنبات لتحديد التغيرات المورفولوجية الناتجة عن عملية النقع في المحاليل المختلفة بهدف

مقارنتها بالعينات الشاهدة (المنقوعة في الماء فقط). حُسبت أطوال البادرات التي نمت باستخدام وحدة السينتميتر. حُسب معدل الإنبات (نسبة الإنبات) لبذور الذرة الصفراء النابتة والتى نُقعت بذورها في محاليل كل من المستخلص والتريغونيلين والأبراين والماء مدة 6 ساعات ثم استُنبتت بوضعها داخل اوراق الترشيح التي أُعدت بتصميمات خاصة في شكل غُرف مستطيلة مكررة. زُرعت بداخلها البذور بمعدل 50 بذرة في كل غرفة وبعد ذلك تُوضع في أطباق مرطبة، في درجة الحرارة 25C مئوية في الظلام. حُسبت أعداد البذور التي نبتت مُقارنة بالتي لم تنبت (نسبة الإنبات) لكل حالة من حالات النقع بمحاليل المستخلص والمركبات ذات الفعالية الحيوية.

استُخلصت المستحضرات الإنزيمية من نبات الذرة الصفراء Zea May's وفق الأساليب الخاصة باستخلاص الإنزيمات [25.10]. استُخدم للتنقية ملح كبريتات الأمونيوم [34].

1- المستحضر الإنزيمي للبروتيآز:

يؤخذ وزن محدد 20غ من مسحوق البذور في درجة حرارة صفر مئوية ويضاف إليه 40ml من محلول الاستخلاص الذي يتكون من موقي الفوسفات تركيزه 0.05 M (7.5 =PH) و35mM EDTA و10 mM dithiothreitol، يمزج الخليط جيداً مدة 15 دقيقة، بعدها تُجرى له عملية تثفيل مدة 15 دقيقة بسرعة دوران 20000 g. تخضع الرشاحة الناتجة لعملية ديلزة Dialysis مقابل خليط الاستخلاص مدة 16 ساعة في درجة حرارة 4 C، تُعاد عملية التثفيل، تؤخذ الرشاحة وتُحفظ في البراد كمستحضر إنزيمي للبروتيآز الخام إلى حين إجراء المزيد من التنقية.

2- المستحضر الإنزيمي للأميلازوالسيلولاز:

نُقعت بذورالذرة الصفراء السليمة بعد تنظيفها وغسلها جيداً ووزنها، مدة 6 ساعات في كل محلول من المحاليل المذكورة قبل زراعتها،وبعد ذلك استُنبتت في وسط مائي بين ورق الترشيح مدة 4 أيام في درجة حرارة 25 مئوية، أُخذت البذور النابتة وجففت مدة 5 ساعات في درجة الحرارة 45 مئوية، سحقت البذور المذكورة بمطحنة كهربائية وحفظ المسحوق في درجة حرارة 4 C مئوية. أجريت عملية استخلاص البروتينات (8) والإنزيمات، لهذه الغاية أُخذ 20 غراماً لكل حالة من طحين الذرة الصفراء في الحالات الأربع (المستخلص والمركبات الفعالة والشاهد) وأُضيف إليه على دفعات 200 مل من محلول كلوريد البوتاسيوم 1M. مزج الخليط بخلاط مغناطيسي مدة 20-30 دقيقة، وتُرك في البراد مدة 24 ساعة ثم رشح المحلول وأجري الطرد المركزي للرشاحة بسرعة rpm (4000) مدة 15 دقيقة. جُزِّيء المحلول بعد تمام عملية الاستخلاص لقسمين بالتساوى حُفظ الجزء الأول في البراد إلى حين إجراء التنقية لمستحضر (السيلولاز) الخام. جرى معالجة الجزء الثاني بموقي الفوسفات 0.05 M درجة حموضته pH = 7 للحصول على مستحضر α – أميلاز وحُفظ في البراد إلى حين إجراء التنقية الجزئية لمستحضر الإنزيم الخام.

3- تنقية مستحضرات الإنزيمات:

استُخدمت طريقة الترسيب بكبريتات الأمونيوم لتنقية مستحضرات البروتياز والأميلاز والسيلولاز [22] في درجة حرارة $21^{\circ}C$ مئوية وكانت درجات التشبع للحالات المختلفة كالآتي: درجة تشبع 35% يرسب الأميلازويُفصل ويُحفظ للتنقية، وعند درجة تشبع65 % يرسب السيلولاز ويُفصل ويُحفظ للتنقية، وعند وصول درجة التشبع إلى 70% يرسب البروتياز ويُفصل ويُحفظ للتنقية، تُفصل الرواسب المتكونة بعد كل إضافة (بدرجة تشبع محددة) باستخدام الطرد المركزي بسرعة دوران خاصة لكل إنزيم مدة 15 دقيقة، يُفصل الأميلاز بسرعة دوران rpm (4000) دورة في الدقيقة، السيلولاز بسرعة دوران (8000 rpm)، البروتياز بسرعة دوران (20000 rpm)، تُهمل الرشاحة، ويُذاب راسب كل إنزيم محدد في أقل كمية ممكنة من الموقى المناسب لكل إنزيم [31]. أجريت عملية ديلزة (Dialysis مقابل الماء المقطر)، استُخدم محلول موقي في درجات حموضة (pH) مختلفة حسب شروط كل إنزيم لإذابة مستَخلص الإنزيم المحدد قبل دراسة الفعالية الإنزيمية لذلك الإنزيم [23].

- فصل البروتيآز وتنقيته بترسيبه بواسطة كبريتات الامونيوم:

أُجريت عملية تنقية جزئية لمستحضر الإنزيم باستخدام ملح كبريتات الأمونيوم الصلب الذي يضاف برفق وباستمرار مع التحريك المستمر لمحلول المستحضر حتى بلوغ درجة تشبع 70% ثم يترك بعدها مدة ساعة واحدة في درجة حرارة صفر مئوية، يُثفل المحلول مدة 15 دقيقة بسرعة دوران 20000rpm، يعاد استخلاص المواد المترسبة بواسطة موقي الفوسفات (PH= 7.5) وتجرى بعد ذَلك عملية ديلزة مقابل الماء المقطر(Dialysis) مدة 16 ساعة في درجة حرارة صفر مئوية، يشكل المستحضر المستخلص 80% من البروتياز [37,22].

- فصل و تنقية α - أميلاز بترسيبه بواسطة كبريتات الامونيوم:

أُجريت عملية تنقية جزئية لمستحضر الإنزيم باستخدام ملح كبريتات الامونيوم الصلب الذي يضاف برفق وباستمرار مع التحريك المستمر لمحلول المستحضر وضبط درجة الحموضة بواسطة موقي الفوسفات عند (PH=7) حتى بلوغ درجة تشبع 35% وفي درجة حرارة $21^{\circ}C$ ثم يترك بعدها مدة ساعة واحدة في درجة حرارة صفر مئوية حيث يُثفل المحلول بالمثفلة المبردة مدة 15 دقيقة بسرعة دوران 4000 rpm، يعاد استخلاص المواد المترسبة بواسطة موقي الفوسفات (PH=7) وتجرى بعد ذلك عملية ديلزَة مقابل الماء المقطر Dialysis مدة 16 ساعة في درجة حرارة صفر مئوية، يشكل المستخلص مستحضر α -أميلاز المُنقى جزئياً (37).

– فصل السيلولاز وتنقيته بترسيبه بواسطة كبريتات الأمونيوم:

استخدمت طريقة الترسيب بكبريتات الأمونيوم لتنقية مستحضر السيلولاز جزئياً، كما تم في حالة البروتياز والأميلاز حيث يتم تركيز الإنزيم باستخدام كبريتات الأمونيوم [24,31] في درجة حرارة 21 C̊ مئوية مع التحريك المستمر حتى بلوغ درجة إشباع 65%[31]،يفصل الراسب بالتثفيل بسرعة 8000 rpm ويذاب في أقل حجم ممكن من المحلول الموقي (موقي الفوسفات درجة حموضته pH=7، ويستخدم لإذابة وتمديد عينات المستحضر الإنزيمي) [23]

طرائق التحليل

جرى معايرة البروتينات بطريقة الكوماسى [8] في حين الهكسوزات والغلوكوز بكاشف الأنثرون [9] أما كمية النشاء وكمية السيلولوز فاستخدم الأنثرون لمعايرتها، بعد الحلمهة. وفي جميع الحالات المذكورة رُسم منحنى معايرة لكل طريقة وحُسبت منه تراكيز السكاريدات والبروتينات للإنزيمات في حالات التفاعلات الإنزيمية المختلفة.

قُدرت فعالية البروتياز بطريقة ميلر [34,37] والأميلاز بطريقة سميث وروري [33,29] والسيلولاز بطريقة Cyanoacetamide[21,36] وجرى التحليل الكمي باستخدام جهاز الامتصاص الضوئي حسب طرائق تحليل الإنزيمات المرجعية [32]، يتم حساب كمية البروتينات في الحالات المختلفة من المنحنى العياري للبروتينات.

1– معايرة فعالية البروتياز في المستحضرات الإنزيمية:

يتحلل البروتين (الكازئين) بواسطة إنزيم البروتيآز إلى ببتيدات صغيرة الوزن الجزيئي في شروط محددة،وتتفاعل الزمرالأمينية الحرة التي ستظهر في أثناء الحلمهة مع حمض 2،4،6–ثلاثي نترو بنزين السلفونيك (TNBS).

تحسب الفعالية الإنزيمية بقياس الامتصاص الضوئي (O.D) في طول الموجة 425nm لعينات التجارب حيث يعطى التفاعل معقداً زهرياً مع حمض 2،4،6 ثلاثي نترو بنزالسلفونيك 0.1% (TNBS). تحسب الفعالية بوحدات قياس الفعالية الإنزيمية التي تعرف بأنها كمية الإنزيم التي تحدث زيادة في الامتصاصية بمقدار 0.01 عن العينة الشاهدة، ويمكن استخدام الفعالية النوعية وهي عدد وحدات الإنزيم/ واحد مليغرام من البروتين.

– **شروط القياس:** يؤخذ من كل محلول إنزيمي 0.1 مل ويضاف إلى وسط الحضن الذي يتكون من 1مل موقى الفوسفات (pH=7.5) أو موقى البورات pH=9 عند استخدام درجة حموضة قلوية، ثم يضاف1 مل من محلول الكازئين ويحضن خليط التفاعل في درجة حرارة 40C̊ مدة ساعة واحدة يضاف بعدها 1مل من حمض البيركلوريك (perchloric acid) أو محلول فينيل ميثيل سلفونيك فلورايد (PMSF) لإيقاف التفاعل، بعدها

يضاف محلول (TNBS %0.1) ويمزج جيداً حتى ظهور اللون الزهري حيث تُقاس الامتصاصية للأنابيب وهي في درجة حرارة صفر مئوية، يضاف في العينة الشاهدة 1مل من حمض البيركلوريك قبل إضافة مستحضر الإنزيم لإبطال مفعوله. تحدد الفعالية حسب الزيادة التي تحدث للامتصاصية والتي تعبر عن معدل حلمهة البروتين. يحضر موقى البورات B.B-9، بحل11.184غ من الـ KCL، و3.092 غ من البورات H_3B_3O و20غ من N_2SO_3، ويمدد الحجم إلى الليتر، يجب أن تكون pH الوسط pH=9. يحضر محلول حمض 2،4،6 ثلاثي نترو بنز السلفونيك 0.1% (TNBS) بحل 100 مغ منه (ماركة سيغما) في الماء المقطر ويمدد الحجم إلى 100 مل ويحفظ في زجاجة معقمة ومغلفة برقائق الألمينيوم من الخارج.

لتحضير محلول1.5% فينيل ميثيل سلفونيك فلورايد (PMSF) يُذاب0.15غ من (PMSF) في 10 مل إيتانول ويحفظ في البراد إلى حين الاستخدام. يعمل هذا المحلول بمنزلة مثبط للبروتياز.

– **خطوات العمل التحليلي:** تُستخدم طريقة الكوماسي (8) لتقدير كمية البروتينات، وذلك ب استخدام طول الموجة**595nm** بعد تصفير الجهاز بعينة البلانك. ومن معرفة قيم الامتصاصية للعينات المختلفة نستطيع معرفة تركيز البروتين في العينات بالعودة للمنحنى المعياري،وتقدير فعالية البروتياز النوعية من خلال كمية البروتينات في الإنزيم.

2– معايرة فعالية α – أميلاز:

يتفكك النشاء بالتأثير المشترك لإنزيم α،β– أميلاز إلى مالتوز، وديكسترينات والتي تتحول بواسطة α–أميلاز إلى ديكسترينات ذات وزن جزيئي أصغر وهي لا تتلون باليود. في حالة قياس α– أميلاز فقط يتم التسخين للدرجة 70C وهي كافية لنزع فعالية β – أميلاز ويتم طرح ناتج فعالية α–أميلاز من الفعالية الكلية للأميلاز (α،β أميلاز) للحصول على فعالية β – أميلاز.

تعاير الفعالية الإنزيمية لمستحضرات α وβ أميلاز بكمية المالتوز الناتجة بتأثيرهما على محلول عياري من النشاء (في شروط محددة، درجة الحرارة، pH الوسط) أو بكمية النقص من النشاء المستخدم (سوبسترات) في التجربة، وتعتمد هذه الطريقة على قياس الامتصاصية للنشاء الذي لم يتحلمه بواسطة مستخلص الإنزيم بعد تلوينه باليود وبقياس امتصاصية ناتج التفاعل الإنزيمي من الهكسوزات (الغلوكوز) حسب طريقة ميلر، وتجرى التجربة كالآتي:

1– يضاف في أنبوب التجربة وأنبوب الشاهد (للمقارنة) 1مل محلول نشاء 3% الطازج جرى تحضيره في 0.1 مول موقى الخلات (pH=5).

2– يضاف في الأنبوب الثالث العياري1 مل من المزيج المكون من 50 مل ماءً مقطراً+

0.5 مل من 0.1 نظامي من حمض كلور الماء + 0.1 مل من اليود 0.3%.

3- يضاف إلى كل الأنابيب3 مل من محلول موقى الخلات 0.1 مول (pH=5) و 1 مل من محلول كلوريد الكالسيوم 0.5 مول وتحتضن في الدرجة 40 مئوية مدة (10-15) دقيقة.

4- يضاف في أنبوب التجربة 1مل من مستحضر الإنزيم ويستمر الحضن مدة 10 دقائق أخرى بدرجة الحرارة نفسها.

5- بعد انتهاء الحضن يضاف إلى كل أنبوب 0.5 مل من حمض كلور الماء1 نظامي لتثبيط الإنزيم ويضاف في أنبوب الشاهد والعياري1 مل من المستحضر لمجاراة أنبوب التجربة.

6- ينقل محتوى كل أنبوب إلى حوجلة معايرة سعة 50مل، تحتوي على 0.5 مل محلول حمض كلور الماء 0.1 نظامي و40 مل ماءً فقط.

7- يضاف إلى كل حوجلة 0.1 مل محلول اليود في يود البوتاسيوم (0.3غ يود البوتاسيوم+ 0.3غ يود) ويمدد حتى العلامة بالماء المقطر، تقاس شدة الامتصاص اللوني في طول الموجة**nm** 610 (فلتربرتقالى)، وتحسب الفعالية الإنزيمية من المعادلة:

$$P = [(A - B)/A] \times C$$

إذ:P: شدة الفعالية الإنزيمية، وحدة الفعالية الإنزيمية هي كمية البروتين الذي يحلمه 10 مغ نشاء(في الدقيقة ضمن شروط التجربة).

A: امتصاصية التجربة الشاهدة. B: امتصاصية التجربة الأصلية.

C: كمية النشاء المأخوذة من بداية التجربة.

أمامعايرة فعالية الإنزيم بطريقة ميلر فتكون كالآتي:

1- يضاف في أنبوب التجربة وأنبوب الشاهد (للمقارنة) 20 مل محلول نشاء 2% الطازج والمحضر في 0.1 مول موقى الخلات (pH=5).

2- يضاف إلى أنبوب التجربة والشاهد 3 مل من محلول موقى الخلات 0.1 مول (pH=5).

3- يضاف إلى كل الأنابيب 1مل من محلول كلوريد الكالسيوم 0.5 مول وتحضن في درجة الحرارة 30̊C مدة 10 دقيقة.

4- يضاف في أنبوب التجربة 0.5 مل من مستحضر الإنزيم ويستمر الحضن مدة 10 دقائق أخرى بدرجة الحرارة نفسها.

5- بعد انتهاء الحضن يضاف إلى كل أنبوب 0.5 مل من حمض كلور الماء1 نظامي لتثبيط

الإنزيم ويضاف في أنبوب الشاهد 0.5 مل من المستحضر لمجاراة أنبوب التجربة.

يُؤخذ في أنبوب اختبار 5 مل من كاشف الأنثرون ثم يُبرد في حمام جليدي مدة 5 دقائق حتى نتمكن من إضافة المحلول السكري.

6- يُؤخذ 1مل من كل أنبوب الذي يحتوي على الغلوكوز المتحرر حسب كل حالة ويُضاف وبحذر إلى أنبوب لأنثرون، وتُحضن الأنابيب في حمام مائي بدرجة الغليان ثم تُبرد إلى درجة صفر مئوية وتقاس شدة الامتصاص اللوني للغلوكوز في طول الموجة 660 nm (فلتر أحمر)، تحسب الفعالية الإنزيمية بحساب تركيز الغلوكوز المتحرر باستخدام منحنى الغلوكوز العياري.

تقدر فعالية إنزيم α-أميلاز بوحدات الفعالية الإنزيمية. وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية بأنها كمية الإنزيم اللازم لتحرير واحد ميكرومول من الغلوكوز في الوسط التفاعلي من محلول النشأ في الدقيقة الواحدة وفي شروط التجربة. تُقدر الفعالية النوعية للإنزيم بالنسبة إلى واحد ملغ من البروتين بالوحدة U / mg .

3- قياس فعالية السيلولاز:

يستخدم مسحوق مادة السيلولوز Cellulose أو Carboxy Cellulose methyl (CMC) كمداد لتفاعلات الإنزيم. يقوم السيلولاز بحلمهة السيلولوز إلى سكاريدات حرة من الغلوكوز في شروط التجربة، درجة حرارة 40 C° مئوية ودرجة حموضة الوسط pH = 9، يتفاعل الغلوكوز والسكاريدات الحرة مع *P* - HBAH (*P* - Hydroxy Benzoic acidhyarazide)، ينتج هذا التفاعل معقداً ملوناً، تُقاس امتصاصيته في طول الموجة(410nm)، أو أن يجرى تقدير الغلوكوز بالتفاعل مع الأنثرون وقياس امتصاصية المحاليل الناتجة في طول الموجة 660 nm.

- تحضير محاليل التجربة:

1- محلول الحضن: (0.01 M phosphate) (A):

هو موقي الفوسفات درجة حموضته7=pH، ويستخدم لإذابة عينات المستحضر الإنزيمي وتمديدها.

2- محلول الحضن: (0.1M citrate + 0.1 M Phosphate) (B):

هو محلول موقي من السيترات والفوسفات (0.1 مول) بدرجة حموضة الوسط pH=9 ويستخدم في إذابة وتمديد المداد CMC.

3- محلول الحضن (0.05 M citrate + 0.05 M Phosphate) (C):

موقي السترات والفوسفات 0.05 مولى، بذات درجة حموضة محلول الحضن (B) ويستخدم في إذابة الغلوكوز النقي والعياري وتمديده لرسم منحنى الغلوكوز.

- **تحضير عينات المداد (1%):** يُؤخذ1غ من مسحوق السيلولوز ويُذاب على دفعات قليلة جداً في كمية مناسبة من محلول الحضن (B) مع التحريك المستمر مدة ساعة كاملة حتى ذوبان المسحوق ثم يكمل بالماء المقطر إلى100 مل.

تحضير عينات المستحضر الإنزيمي: يضاف100 مغ من مستحضر الإنزيم إلى كمية مناسبة من محلول الحضن(A)، يحرك حتى تمام الذوبان ثم يكمل إلى100 مل بواسطة ذات المذيب.

تحضير محلول *P*−HBAH (*P*.Hydroxy Benzoic Acid Hydrazine): يُحضر بإذابة 5غ من المادة المذكورة في80 مل حمض كلور الماء (0.5N HCL)، يكمل إلى100 مل بواسطة المذيب ذاته، ثم يُحضر محلول جديد باستخدام جزء من محلول *P*−HBAH مع محلول هيدروكسيد الصوديوم (6.5NNaOH) بنسبة 1: 4 على التوالي ليكون بدرجة حموضة غير مناسبة لنشاط الإنزيم ويُستخدم لإيقاف تفاعل الإنزيم. يشكل محلول *P*−HBAH معقداً ملوناً مع السكاريدات التي يحررها الإنزيم (Colour Reagent) تُقاس امتصاصيته بواسطة جهاز قياس الامتصاصية.

- **طريقة التحليل:**

1- يُؤخذ في أنابيب التجربة (T)، والبلانك(B) والقياسية(SD)، الشاهد والكنترول (C) مقدار 0.5 مل من المداد (1%) المحضر مسبقاً (سوبسترات).

2- يضاف إلى كل الأنابيب 0.5 مل من محلول موقى الحضن (B) pH=7 وتُحضن في المحم بدرجة حرارة 40 C° مئوية مدة 10 دقائق مع التحريك.

3- يُضاف إلى الأنابيب ما عدا أنبوب تجربة البلانك(B) الشاهدة، 100 ميكروليتر مستحضر الإنزيم لأنبوب التجربة والكمية نفسها من الغلوكوز القياسي لأنبوب الغلوكوز العياري ولأنبوب (C)على التوالي، تمُزج محتويات الأنابيب وتوضع في محم في درجة الحرارة 40 C° مدة 30 دقيقة.

4- يُضاف 3 مل من محلول *P*−HBAH وتحضن الأنابيب في حمام مائي بدرجة الغليان لإيقاف التفاعل.

5- بعد التأكد من إيقاف التفاعل تضاف 100 ميكروليتر من المستحضر الإنزيمي إلى عينة البلانك لحفظ التوازن مع التحريك والخلط المستمر.

6- يعاد وضع العينات في محم مائي بدرجة الغليان مدة 15دقيقة، وبعد ذلك تبرد مدة 10 دقائق مع التحريك والخلط المستمر.تُقاس شدة الامتصاصية على الجهاز بطول الموجة 410nm، في حالة استخدام المحلول *P*−HBAH 5%، تُحسب كمية الغلوكوز المتحرر باستخدام منحنى الغلوكوز العياري لمعرفة فعالية الإنزيم والتي يعبر عنها بعدد ميكرومولات الغلوكوز المتحررة في الدقيقة الواحدة، (1=IU) في شروط التجربة.

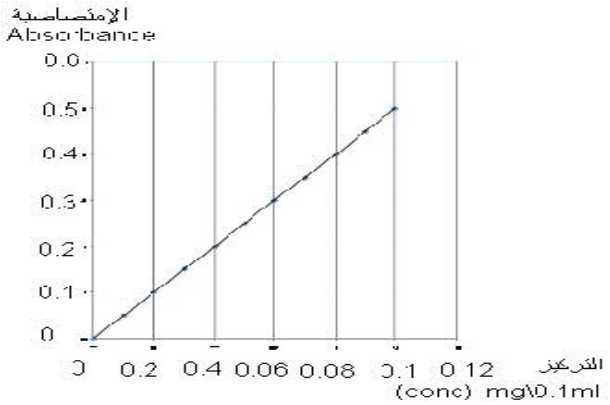
- المنحنى المعياري للبروتين:

المحلول الأساسي: يُذاب 0.1 غرام من الكازئيين النقي في محلول NaCL 5 % ويُكمل الحجم إلى 100 مل و يُحضرمنه المحاليل التالية (الجدول 2) و(الشكل 2):

الجدول(2) امتصاصية التراكيز المختلفة لمحاليل البروتينات (المنحنى المعياري)

رقم الأنبوب	التركيز (mg\ml) حجم محلول الكازئيين 1 ml	حجم محلول NaCL %5	التركيز ملغ /0.1 مل محلول الكازئيين 2	الامتصاصية على طول الموجة 595 nm
1	0	10	0	0
2	1	9	0.01	0.05
3	2	8	0.02	0.1
4	3	7	0.03	0.15
5	4	6	0.04	0.2
6	5	5	0.05	0.25
7	6	4	0.06	0.3
8	7	3	0.07	0.35
9	8	2	0.08	0.4
10	9	1	0.09	0.45
11	10	0	0.1	0.5

تُحدد الامتصاصية باستخدام طريقة الكوماسي: يُؤخذ **2.5** مل من الكوماسي بتركيز 100مغ/ل ويُضاف إلى أنابيب التجارب التي تحتوى كل واحدة منها على 0.1 مل من محلول الكازئيين، تمزج محتويات الأنابيب، تُقاس شدة الامتصاصية لكل أنبوب على الجهاز بطول الموجة 595nm، يُرسم المنحنى العياري للبروتين الامتصاصية بدلالة التركيز.



الشكل (2) المنحنى المعياري للبروتين (الامتصاصية بدلالة التركيز)

تُستخرج قيمة التركيز المقابلة للامتصاصية من المنحني المعياري للبروتين في حالة البروتينات. ومن المنحنى العياري للغلوكوز في حالة قياس فعالية السيلولاز.

الدراسة الإحصائية

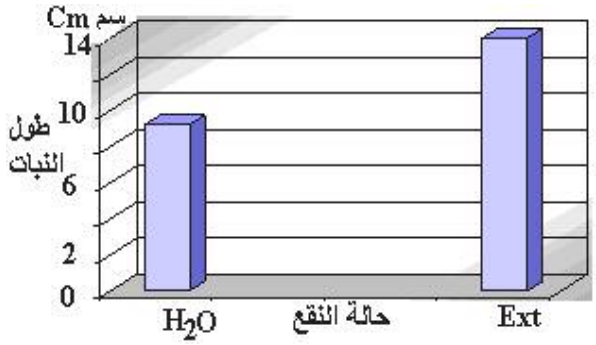
أُجريت كل تجربة ثلاث مرات، وفي كل تجربة كان عدد العينات المدروسة لكل نوع من المعالجة من 2-3 عينة، وأخذ متوسط الحسابات والنسب المئوية والانحراف المعياري للبيانات المتعلقة بكل تجربة ودرست العلاقة المئوية، عولجت البيانات باستخدام اختبار T-test الإحصائي وأدرجت في النتائج.

النتـــائـــج

تستخدم الرموز (H_2O) للإشارة إلى حالة النقع في الماء و(Ab) في محلول الابراين (T) في محلول التريغونيلين و(Ext) في محلول مستخلص بذور نبات عين الديك الذي يشار إليه أيضاً (بالمستخلص) وذلك بالتراكيز 50مغ/ل,500مغ/ل على التوالي للمركبات الفعالة (T،Ab) والمستخلص Ext.(مغ) للمليغرام.

1- تأثير نقع بذور الذرة في محلول مستخلص من بذور عين الديك بتركيز 500 مغ/ل مدة 6 ساعات في نمو بادرات الذرة

يُعرض الشكل (3) تأثير نمو البادرات في الماء وفي حالة وجود مستخلص من نبات عين الديك

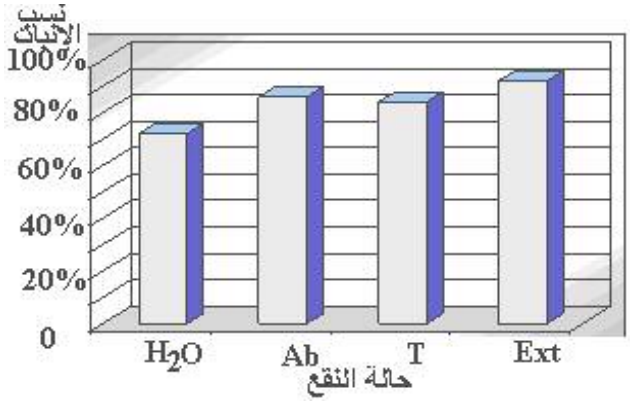


الشكل (3) نموالبادرات في الوسط المائي (1) وفي مستخلص بذورعين الديك (4)

كما هو واضح من الشكل (3) يؤدي نقع بذور الذرة في مستحضر بذور عين الديك بتركيز (500 مغ /ل) إلى نمو البادرات خلال ستة أيام من الزراعة بمقدار 40% زيادة عن نموها في الوسط المائي، الشيء الذي يدل على الفعالية الهرمونية التي تتميز بها مكونات المستخلص المستخدم.

2- تأثير النقع في الحالات المختلفة في نسبة الإنبات:

دُرست حالات مختلفة جرى فيها نقع البذور بمحاليل تتضمن مركبات مشتقة (مستخلصة) من نبات عين الديك، نعرض في الشكل (4) النتائج التي تم الحصول عليها.

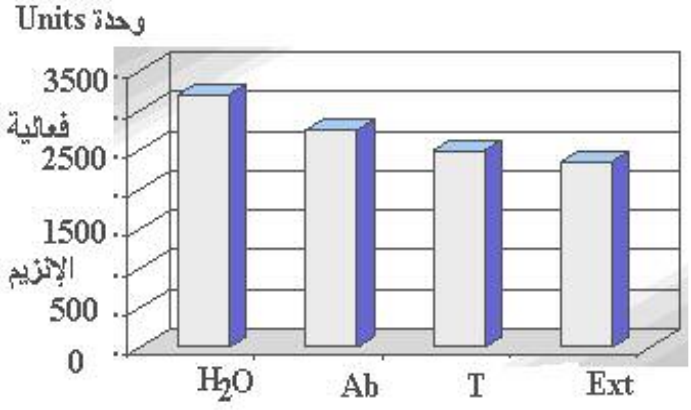


نمو البادرات 40%، معدل الإنبات 27%. نسبة الإنبات في الماء 72%

الشكل (4) نسب الإنبات في حالات النقع بالماء ومحاليل الأبراين والتريغونيلين والمستخلص بتركيز500 مغ /ل.

3- تأثير النقع بمحاليل المركبات الفعالة والمستخلص والماء في فعالية بعض الإنزيمات المساهمة في استقلاب نبات الذرة الصفراء *Zea may's*، بعد الاستنبات:

يشير الشكل (5) إلى وجود فعالية مرتفعة نسبياًلإنزيم البروتيآز في الوسط المائى.



الشكل (5)

- جدول تأثير النقع في فعالية البروتيناز وفق شروط التجربة.

يشير الجدول **(3)** إلى وجود فعالية مرتفعة لإنزيم البروتيآز في الوسط المائي.

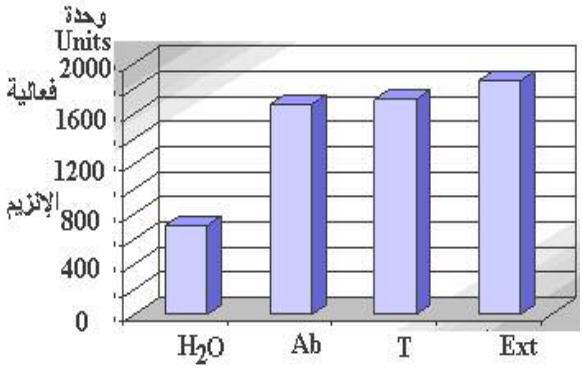
الجدول (3) فعالية البروتيازفي حالات النقع المختلفة مقدرة بوحدات قياس الفعالية الإنزيمية.لعينات التجارب المختلفة للبروتيآز (وحدةفعالية الإنزيم): هي كمية الإنزيم التي تحدث زيادة في الامتصاصية بمقدار 0.01 على الشاهد

مستحضر الإنزيم المعالج	الأمتصاصية	تركيز البروتين (ملغ)	الفعالية الكلية (وحدة)
العينة H2O	0.33	90	3200
الابراين Ab	0.29	90	2750
التريغونيلينTRG	0.27	90	2490
المستخلصExt	0.26	90	2350

يبدو من الشكل (5) والجدول (3) أثر النقع بمحاليل المركبات الفعالة ومستخلص البذور في فعالية إنزيم البروتياز، يلاحظ ازدياد فعالية الإنزيم في حالة النقع بالماء مقارنة بحالات النقع الأخرى، كما يبدي الإنزيم نقصاً في الفعالية، في حالات النقع بالمستخلص والأبراين والتريغونيلين وهذا النقص يكون أوضح في حالة النقع بالمستخلص حيث بلغت نسبته مقارنة بحالة النقع بالماء26.6%، في حين كانت هذه النسبة في حالة الأبراين 14.1% والتريغونيلين 22.2% وهذا يشير إلى أن النقع في محاليل المركبات الفعالة والمستخلص يؤدي إلى نقص في فعالية البروتياز، إذا ماقُورن بحالة نقع البذور في الماء (قبل استنباتها).

4- **تأثير النقع بمحاليل المركبات الفعالة والمستخلص والماء في فعالية الأميلاز.**

يُعرض الشكل (6) والجدول (4) تأثير النقع بالمركبات الفعالة بتركيز50مغ/ل والماء ومستخلص البذور بتركيز 500مغ/ل، في فعالية الأميلاز. إذ يُلاحظ ازدياد في حالة النقع بمحاليل المركبات الفعالة والمستخلص مقارنة بحالة النقع بالماء فقط، قبل الاستنبات.



الشكل (6) تأثير النقع بالمركبات الفعالة بتركيز50مغ/ل والماء ومستخلص البذور بتركيز500مغ/ل، في فعالية الأميلاز

يُعرض الجدول (4) تأثير النقع بمستخلص بذور عين الديك والمركبات الفعالة والماء في فعالية الأميلاز يلاحظ ازدياد الفعالية الإنزيمية في حالة النقع بالمستخلص نسبياً.

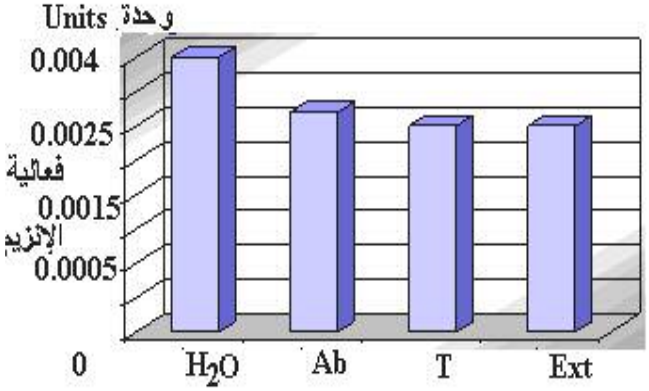
الجدول(4) تأثير النقع بمستخلص بذور عين الديك والمركبات الفعالة والماء في فعالية الأميلاز.

حالة النقع	الماء H2O	الأبراين AB	التريغونيلين T	المستخلص EXT
فعالية الإنزيم بالوحدات	710	1672	1710	1860
mg البروتين في المستحضر	55	55	55	55

يبدو واضحاً أن النقع بالمستخلص أدى إلى زيادة أكبر في نشاط الإنـــزيم بالمقارنـــة بحالة المركبات الفعالة، من الأبراين والتريغونيلين، رغم أن الزيـــادة ليـــست ذات قيمـــة معنوية من الناحية الإحصائية، في حين كانت نسب الزيادة في نشاط الأميلاز فـــي حالـــة النقع بالمستخلص نحو 61.9% عنها في الماء و10.2% للأبـــراين 8.1% للتريغـــونيلين مقارنة بحالة النقع بالمستخلص.

5- تأثير النقع بمحاليل المركبات الفعالة والمستخلص والماء في فعالية السيلولاز:

يعُرض الشكل (7) والجدول(5) تأثير النقع بالمركبات الفعالة بتركيز50مغ/ل والمـــاء ومستخلص البذور بتركيز500مغ/ل، في فعالية السيلولاز. إذ يُلاحظ انخفاض في فعاليـــة الإنزيم في حالة النقع بالمستخلص ومشتقاته من المركبات ذات الفعالية الحيويـــة مقارنـــة بحالة النقع بالماء فقط.



الشكل (7) تأثير النقع بمحاليل المركبات الفعالة والمستخلص والماء في السيلولاز

يوضح الجدول (5) فعالية مستحضر الإنزيم بوحدات قياس الفعالية الإنزيمية للسيلولاز

الجدول(5) (وحدة الفعالية): يعبرعن وحدة الفعالية للسيلولاز بعدد ميكرومولات الغلوكوز التي يحررها الإنزيم في الدقيقة الواحدة في شروط التجربة (IU=1).

حالة النقع	الماء H2O	الأبراين AB	التريغونيلين T	المستخلص EXT
فعالية السيلولاز بوحدات الفعالية الإنزيمية	4×10^{-3} U	3×10^{-3} .2 U	3×10^{-3} U	3×10^{-3} U

بلغت نسبة النقص في الفعالية 25% في حالة النقع بالمستخلص والتريغونيلين، في حين كان النقص 20% في حالة النقع بالأبراين، مقارنة بحالة النقع بالماء.

مناقشة النتائج

ساعدت عملية نقع بذور الذرة الصفراء (*Zea may's*) مدة 6 ساعات في محلول مستخلص بذور نبات عين الديك بتركيز500مغ/مل، قبل استنباتها في الوسط المائي، في زيادة عملية النمو في النبات بالمقارنة بحالة النقع والاستنبات في الوسط المائي فقط. كما أدت إلى زيادة في نسب الإنبات مقارنة بالحالة ذاتها إضافة إلى بعض التأثيرات في استقلاب المواد في نبات الذرة.حدث نقص في تركيز السكاريدات وزيادة في تركيز البروتينات في بادرات نبات الذرة الصفراء لدى نقع بذوره في محاليل المركبات الفعالة والمستخلص بالتراكيز المستخدمة في التجارب [26 ،27]. إن الزيادة في نشاط وفعالية بعض الإنزيمات المساهمة في استقلاب السكاريدات والذي يبدو واضحاً في ازدياد فعالية إنزيم الأميلاز بشكل عام في كل حالات النقع بالمركبات الفعالة والمستخلص إذا ما قورن بفعالية الإنزيم في عينات النقع والاستنبات في الوسط المائي فقط، يتوافق مع ما توصلت بعض الدراسات إلى حقيقة ازدياد نشاط بعض الإنزيمات في أثناء مرحلة النمو في النبات ومنها الأميلاز[30] والليباز [28] وهذا يبدو واضحاً في تجارب دراسة أثر النقع في فعالية تلك الإنزيمات. كما يلاحظ نقصان في فعالية البروتياز والسيلولاز الشكل (5، 7)، وهذا يتوافق أيضاً مع البحوث والدراسات التي توصلت إلى نتائج مشابهة[35]، تمثلت في زيادة نسب البروتينات والسيلولوز ونقص نسب الدهون في حالات نقع البذور في محاليل المركبات الفعالة والمستخلص بالمقارنة بحالات النقع في الماء[27]. إنّ تثبيط البروتياز غالباً يؤدي إلى زيادة تركيز البروتينات، كما أن تثبيط السيلولاز قد يؤدي إلى زيادة بعض السكاريدات البنائية مثل السيلولوز. ويبدو أن نقصان بعض السكاريدات الادخارية مثل النشاء مرتبط بالزيادة التي حدثت في فعالية الأميلاز. لوحظ أيضاً من خلال هذه البحوث أن ازدياد التراكيز المستخدمة في حالات النقع بالمستخلص لأكثرمن (500ملغ/ل) يؤدي إلى زيادة نشاط السيلولاز بدلاً من تثبيطه. من جهة أخرى تبين التجارب والنتائج التي تم الحصول عليها أن النقع في التراكيز المُستخدمة مع العوامل الأخرى المرافقة لذلك تؤدي إلى تنشيط النمو وزيادة تركيز البروتين الكلي وتفكك الدهون والنشاء والسكاريدات الإدخارية واستهلاك السكاريدات المنحلة والحموض الدسمة وازدياد السيلولوز

والسكاريدات البنائية، الأمر الذي يتوافق مع ما توصلت إليه بحوث أخرى [11]. ربما تسهم هذه التأثيرات في تسريع عملية النمو وزيادة نسب الإنبات في نبات الذرة.

تُبين نتائج التحليل الكروماتوغرافي بواسطة جهاز HPLC أن تراكيز المركبات الفعالة هي 10 و7ميكروغرام/غرام للأبراين والتريغونيلين على التوالي وهي أقل من التراكيز المستخدمة في تجارب المركبات الفعالة ولكنها أعطت نتائج أفضل منها (حالة النقع بالمستخلص)، وهذا يدعونا للاعتقاد بوجود مركبات أخرى، ضمن المستخلص لديها فعالية حيوية إضافة إلى الأبراين والتريغونيلين وتسهم هي الأخرى في تحسين عملية النمو والإنبات في الذرة الصفراء، مثل المركبات الستيروئيدية وخلافها،لذلك فإن المركبات الأخرى الموجودة ضمن مكونات مستخلص بذور نبات عين الديك تحتاج إلى المزيد من الدراسة.

آلية عمل المستخلص والمركبات الفعالة المقترحة:

إن ازدياد فعالية بعض الإنزيمات مثل الأميلاز والنقص الذي حدث في فعالية إنزيمات أخرى مثل البروتيآز والسيلولاز، فضلاً عن ازدياد سرعة النمو ونسب الإنبات، والاختلاف الذي حدث في استقلاب بعض المواد تُعد الاستجابة الواضحة لتأثير مستخلص بذورعين الديك ومكوناته من الأبراين والتريغونيلين والهيبافورين وثنائى ميثيل التريبتوفان والمركبات الستيروئيدية، في عملية النمو في نبات الذرة الصفراء، وهذا دفعنا لاستقصاء آلية عمل تلك المركبات.

نعتقد أنه لدى نقع بذور الذرة في المستخلص وفي محاليل المركبات الفعالة، فإن هذه المركبات تنفذ إلى داخل الخلايا، شأنها في ذلك مثل سائر الأوكسينات والهرمونات النباتية [19,20] ويبدو أنها ترتبط داخل الخلية أو داخل النواة بجزيئة مستقبلة أو بروتين ما، وهذا ربما يُؤدي إلى تأثيرات على المستوى الجزيئى تنتسخ في الحمض الريبي RNA من الـ DNA وتؤدي إلى اصطناع بعض البروتينات الوظيفية التي تعمل على تنشيط بعض الإنزيمات، مثل الليباز والأميلاز وربما تعمل على تثبيط إنزيمات أخرى مثل البروتيازوالسيلولازأو تُؤدي إلى إنتاج بروتينات وإنزيمات جديدة ومتخصصة [16]. أوضح بعض الباحثين أن الأوكسينات تنشط اصطناع جميع نماذج الـRNA في أثناء النمو [12]. كما أن معظم المركبات الموجودة في مستخلص البذور تتضمن حلقات أندولية في تركيبها الكيميائي ومعظمها يحتوي على مجموعة من الميثيل أو أكثر، والتي ربما تُسهم في الآلية التي توثر بها هذه المركبات في أنشطة الخلايا بعد عملية النقع والتي ربما تؤدي إلى تنشيط بعض هرمونات النمو وتنشيط بعض المركبات [5]. نذكر منها حمض النيكوتين والنيكوتين أميد والتربتوفان، والتي تعدُّ من نواتج تفكك التريغونيلين والأبراين على التوالي. ربما تتحول المركبات مثل (حمض النيكوتين والنيكوتين أميد) إلى مركبات

أخرى منها تميم الإنزيم (NAD) نيكوتين أميد أدينين ثنائى النوكليوتيد[13]. وهو مرافق إنزيمي في تفاعلات الأكسدة والاختزال ويقوم بالتخلص من نواتج الاستقلاب الضارة مثل الجذور الحرة وخلافها مما يُسرع عملية الاستقلاب. يدخل المركب (NAD) في تركيب الكثير من إنزيمات الأكسدة والاختزال ويعمل على تنشيط استقلاب المواد والتمثيل الضوئي والغذائي في خلايا النبات[14]. يُعد البيروفات كيناز Pyruvate kinase من الإنزيمات التي يقوم المستخلص بتنشيطها وزيادة ثباتها الحراري حسب البحوث السابقة [15]. وهو من ضمن سلسلة الإنزيمات المساهمة في الأكسدة اللاهوائية للغلوكوز في عملية الغليكوليز (glycolysis) والتي تعمل على تنشيط استقلاب المواد والتمثيل الغذائي في النبات لدخولها إلى حلقة كريبس (Creb's ycle) مما يؤدي إلى استهلاك ونقص السكاريدات المنحلة والادخارية وهذا يتوافق مع ماتوصل إليه بعض الباحثين من وجود تناسب عكسي بين كمية النشاء والنيكوتين أميد أدينين ثنائى النوكليوتيد (17,20). كما يعمل الـNAD على زيادة فعالية الأميلاز المسؤول عن تفكك النشاء.إلى جانب ذلك تحتاج عملية المثيلة (Methylation) التي تحدث للحموض النووية (DNA،RNA) إلى إنزيمات خاصة من نوع الإنزيمات الناقلة لجذور الميثيل، المركبات الناتجة عن تفكك مكونات المستخلص ربما تسهم في توفير مصادر إضافية للميثيل وجذور الميثيل [18]. مما يساعد في تنشيط عملية النمو عن طريق تنشيط بعض الإنزيمات والهرمونات المهمة في زيادة النمو في النبات.

يسهم التريغونيلين في زيادة فعالية إنزيم البوليميراز (Polymerase) [27,5]. ويعمل على تنشيط بعض مسارات الاستقلاب [5]. مما يؤدي إلى تحفيز عملية اصطناع البروتينات الجديدة والبروتينات الخاصة والإنزيمات [16]. ويؤدي دوراً مهماً في عملية الاستقلاب في الخلية النباتية كما يسهم في تنشيط بعض مسارات استقلاب الدفاع عن النفس، ومسارات الاستقلاب الثانوي عند تعرض النبات للشروط القاسية. إن تأثير المستخلص وبعض مكوناته الفعالة في نمو النبات ومعدل الإنبات وفي استقلاب السكاريدات والبروتينات والزيادة التي حدثت لسكاريدات المركبات الجدارية والنقص الذي حدث في نسب بعض الدهون، إما أن يكون نتيجة لتحفيز اصطناع عدد أكبر من إنزيمات اصطناع السكاريدات المركبة والبروتينات وإنزيمات حلمهة الدهون والشحوم وخلافها، أو تكون نتيجة لزيادة تنشيط الإنزيمات الموجودة أصلاً.

REFRENCES المراجع

(1) Ahmed, Y. (M,2007). Astudy on natural sweeteners from some Sudanese plants, M. SC. thesis, University of Khartoum, Sudan

(2) Frohne, D., Fander, H. H. (1983) .AcolourAtlas of poisonous plants, Wolfe publishing, London.

(3) N. Z. Dimetry, S. A. Amer. (2005). Biological effects of some isolated *Aprus precatorius* L. alkaloids. *J. Biomedical and life sciences*, 65,23-25.

(4) Davis, J. H. (1978). *Apru sprecatorius* (Rosary pea), the most common lethal plant poisonous, *J. FLO. medical*. ASS., 65, 189-191.

(5) Peter, V. Minorsiky.(2002). The Hot and The classic, plant biology, 128, 7-8.

(6) Sjur Olsnes, Karin Refsnes. (1974). Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin, Norsk Hydro Institute for cancer research Ols. 249, 627-631.

(7) Choi, J. M, Lee. EO, Lee Hj, Kim. Kh. (2007). Identification of Campesterol from coronarium Chrysanthemum L. and its antaingoinic activities, phytother Res. 9, 49-51

(8) Robert, K. Scopes. (1994). Protein purification, Text in chemistry.*third ed*, Springer-verlagBerlin Heidelberg, 50- 51.

(9) Martin, C. Charles, A.White, J. F. Kenedy. (1989). Carbohydrates Analysis, 2, 37- 39.

(10) Sawheney, S, k and Singh, R. (2005). Introductory practical Biochemistry. Narosa publishing house. London.

(11) V. V. Polevoy, A. Malo, A. A. Fedsoseenko.(1973). Effects of auxin and some cations on decomposition of sections of maize mesochotyles and in homogenates *J*.plant physiology, 20. no.3 .academy of sciences, USSR.

(12) Malo, A. Polevoy. W.(1974). Effects of auxin on growth and the aging of segment of maize mesochotyles *J. Rost and hormonal regulation on plant life*, Siberian Institute of plant biochemistry, USSR.

(13) X-Q. Zheng, E. Hayashibe, H. Ashihara. (2005). Change in trigonelline (N-methyle nicotinic acid) content and nicotinic acid metabolism during germination of Mungabean seed, *J.EXP.botany*, 56, 1615-1623.

(14)Tianle, Y, Anthony, S. (2006). Metabolic regulation in stress and toxicity *J.plant and cell physiology*, 47, 1678-1682.

(15)Chomerilan, A. Jones Gp. Paleg, Lg. (1991). Invitro thermal and salts stability of Pyruvate-kinase are increased by proline and analogs and trigonelline *J.plant physiology*,18, 279-286.

(16)Muzzuca, S. Bitonti. Mb, Innocenti. A. M, Frances. D. (2000). Inactivation of DNA replication origins by the cell cycle regulator, *J. Sativa planta*, 211, 127-132.

(17)Berglund, T. (1994). Nicotinamide a missing link in the early stress responses in eukaryotic cells, a hypothesis with special references to oxidative stress in plants, *J. FEBS-LETT*, 353, 145-149.

(18)Kraska, T. Schonbede Fj. (1993). About changes in the chromatin structure after resistance induction in Hordeum vulgare L. *J Phytopathol*, 137, 10-14.

(19) A. Abdul-Baki, Peter, M. Ray. (1971). Regulation by auxin of carbohydrates metabolism involved in cell wall synthesis by pea stem tissue, *J.plant physiology*,47,537-544.

(20) Helen, L. Jener. (2001). NAD malic enzyme and control of carbohydrates metabolism in Potato tubers, *J.plant physiology*,126,1139-1199.
(21) Theberge, M. (1992). Cellulose Producing actinomycetes, Cellulose Produced Therform and Method of Producing the same by Cyno- acetamide Method. Applied and Enviromental microbiology, vol. 58, No. 3, 815_820
(22)) Segel, I. P. (1976). Biomedical calculation. Jon Willey and Sons,Inc. New Yourk. ROBERT,K.SCOPES,1994-Proteinpurification,Text in chemistry. *third ed*, Springer-verlagBerlin Heidelberg, 1- 8.
(23) Al.Hassnawi, A. N. A. (2006). Isolation, purification and characterization of B-glactosidase from local chiken liver and its medical application. A Thesis of ph. D. m Biochemistry.university of Baghdad, Iraqu.
(24) Muuoz, R. Barrelo, R. A. (1995). Enzymes in: hand Book of food analysis, 2, 317-319. Marcel Dekker. New Yourk.
(25) Whitaker, J. R. (2004). Lipoxygenase .in oxidative enzyme in foods, D. S. Robinson and N. A. Eskin (ED). 175-180, Elsavir Applied-SCI. London.
(26) Ejiri, S., Abe, H. and Katsnmate, T. (1977). Agric -Biol-Chem, 41, 2091-2095.
(27) Nartey, P., Moller, B. L. and Anderson, M. R. (1974). Economic Botaney, 28, 145-147.
(28) St. Angelo, A. J. and Altschul A. M. (1964). Plant physiology. 39, 880-883
(29) Robin, H. L, Smith A. A, Rory, R. T. (1978). A Starch hydrolysis Procedure by enzymatic method, Nutr, Res J, 17, 423-433.
(30) Allfrey, J. M. and Northcote, D. H. (1977). New Phyto. 54, 547-549
(31) Schmander, H. P. (1997). Peroxidase methods in Biotechonology.Taylor and Francis. London, England.
(32) Macedo, H. A. (1995). Production, Purification, Charachterization and application of Lipase from Geotrichum *sp htt p://www.Scielo .br/ Scielo.ph p* (accessed December 21,2005).
(33) Rotta, Chemische Fabric Theodor, Rotta Gmbh and Co. Kg. Novo Nordisk. (1985). Manual Procedure for Determination of Amylase activity in enzyme Preparations and Detergents. *Physiology, 5, 212-215.*
(34) P. C. Ram, K. N. Srivastava, M. L. Lodha. (1986). Purification and Characterization of Proteolytic enzymes from normal and Opaque-2 zea mays. L. developing endosperms, *J. Bio Sci.* 10, Nom 2, 257-266. New Delhi, India.
(35) Penning De Vries, F. Wt. And Van Laar H. H. (1975). Enviorn. eff. crop. Physiology, 5. 217-219
(36) Gross K. C. (1982). A rapid and sensitive spectrometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. HortScience. 17, 933–934.
(37) Miller, B. L. and Huffaker, R. C. (1981). Plant Physiology, Indian J. of Exp. Biol. NO. 15, 91. 68-71.