تأثير كل من مستحلبات زيت التويا و α- البينين و α- التوجون على الفعالية الإنزيمية لعدد من إنزيمات الأكسدة والإرجاع وإنزيمات الحلمهة

أزهار أحمد مالك و أحمد مالو و سحر الحريري
قسم الكيمياء- كلية العلوم- جامعة دمشق- سورية

تاريخ الإيداع 2010/02/22
قبل للنشر في 2010/06/28

الملخص

هدف البحث المقدم إلى دراسة الفعالية التحفيزية لعدد من إنزيمات الأكسدة والإرجاع وإنزيمات الحلمهة في خلايا ساق بادرات نبات الذرة الصفراء (ذات النوع: غوطة 80) بتأثير مستحلبات زيت بذور نبات التويا وكلٍ من مركبي α- البينين وα- التوجون النقيين.

تتلخص مراحل المعالجة والمعايرة بنقع بذور الذرة في مستحلبات المركبات المدروسة مدة أربع ساعات ثم استنباتها في الوسط المائي مدة ستة أيام. ومن ثمّ استخلاص المستحضرات الإنزيمية المدروسة من خلايا الساق في البادرات النامية بواسطة المحاليل الموقية (في قيم pH الملائمة لكل إنزيم).

بيّنت النتائج التي تمّ الحصول عليها أنّ الأوساط المدروسة قد زادت من فعالية إنزيمات الأكسدة والإرجاع، في حين أبدت هذه الأوساط تأثيراً مثبّطاً على إنزيمات الحلمهة.

الكلمات المفتاحية: زيت التويا، α- البينين، α- التوجون، إنزيمات الأكسدة والإرجاع، إنزيمات الحلمهة.

The Influence of Thuya Oil, α- Pinene and α-Thujone Emulsions on The Enzymatic Activity of Many Oxidoreductase and Hydrolytic Enzymes

A. Malek; A. Malo and S. Al-hariri
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Damascus, Syria

Received 22/02/2010
Accepted 28/06/2010

ABSTRACT

This research aims to study the effects of some oxidoreductase and hydrolytic enzymes in maize plant stems cells seedlings, (GHOTA 80) under the influence of Thuja Orientals plant seed oil emulsions, and definite solutions of α- pinene and α- thujone compounds.

Maize plant seeds were soaked for four hours in solutions of the study compounds α- pinene and α-thujone and thuja seeds oil emulsions, and germenated in water medium for six days.

Enzymatic preparations of some Oxidoreductase and hydrolytic enzymes were extracted from the studied stem cells in the developing seedling mesochotyles, by buffer solutions methods (in appropriate pH values for each enzyme).

Enzymes preparations extracts were used to study the effects of both emulsions, and solutions of definite compounds and oils used in this study.

The results showed increases in the activities of the Oxidoreductase enzymes, and inhibition effects on the hydrolytic enzymes activities.

Keyword: Thuja oil, α- thujone, α- pinene, Oxidoreductase enzymes, Hydrolase enzymes.

المقـــدمـــة

تشغل دراسة النباتات حيّزاً مهماً من اهتمامات مؤسسات البحث العلمي بغية الحصول على مركبات فعّالة حيوياً لاستخدامها في مجال الطب والمواد الصيدلانية، ويعدُّ نبات التويا أحد هذه النباتات المحتوية على مركبات فعّالة حيوياً والذي ينتشر على نطاق واسع في المناطق المعتدلة والباردة من العالم وتتلاءم زراعته مع جميع أنواع الترب الزراعية، وينتمي إلى الفصيلة السروية (Cupressacase)، ولهذه الشجرة أنواع متعددة حسب منطقة نموها جغرافياً، ويسمى كل نوع بعدة أسماء منها القديم والحديث والشائع [1].

الأسماء القديمة	الأسماء الحديثة	الأسماء الشائعة للشجرة
Thuja koraiensis Nakai	T.koraiensis	arborvitae أو Arbor vitae
Thuja occidentalis	T.occidentalis	white cedar أو Heckenthuj
Thuja orientalis L	T.plicata	Thuya
Thuja plicata	Thuja standishii (Gordon)	d'occidnt Thuja
	Thuja sutchuenensis Franch.	Tuja

يُعدُّ التويا الشرقية Thuja Orientals أكثر الأنواع انتشاراً في سورية.

اكتسبت هذه الشجرة أهميتها بوصفها واحدة من أهم خمسين عشبة أساسية في الطب الصيني [2]، وقد ذكر في إحدى المجلات العلمية [2] معطيات عن استخدام أوراق وبذور نبات التويا الشرقية منذ القدم لمعالجة عدد من الأمراض، مما يدل على غنى هذه الشجرة بمركبات طبيعية قيّمة قد يسمح بالاستفادة منها في مجال العقاقير. تدل التحاليل على وجود كميات كبيرة من المركبات الفعّالة حيوياً التي تنتمي بغالبيتها إلى التربنات terpenes ونذكر منها α- التوجون وα- البينين [4,3]. وتشير البحوث إلى استخدام مكونات زيت بذور التويا في تحضير شراب الأبسينيث absinthe المستعمل لتهدئة الأعصاب [5].

تظهر التأثيرات الفيزيولوجية في الكائنات الحية بنتيجة تفاعلات بوكيميائية تجري ضمن الكائن الحي والتي بدورها تكون حصيلة للفعاليات الإنزيمية في الخلايا الحية. هدف هذا البحث إلى إجراء تجارب تتعلق بدراسة تأثير زيت التويا المستخلص من بذور شجيرات التويا وبعض المركبات النقية ذات الفعالية الحيوية (α-Thujone؛ α-Pinene) في عدد من التفاعلات الإنزيمية التي تجري في بذور وبادرات نبات الذرة الصفراء. نذكر منها التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات الآتية:

- الكاتالاز Catalase (EC 1.11.1.6)
- اللبياز Lipase (EC 3.1.1.3)
- البروتيآز Protease أحد إنزيمات الحلمهة (EC 3.4.)
- الأميلاز Amylase (EC 3.2.1.1)
- غوياكول بيروكسيداز Peroxidase Guaiacol (EC 1.11.1).
- اسكوربات أوكسيداز Ascorbate Oxidase (EC 1.10.3.3).

مواد البحث وطرائقه

1- الزيت المستخلص من بذور التويا التي تمّ الحصول عليها من حدائق جامعة دمــشق، حيث تم استخلاصها في المختبر على البارد بــسحق بــذور التويــا بوجــود محــل الكلورفورم مع التحريك المستمر مدة 15 يوماً ثم الترشيح وتبخير المحل للحــصول على زيت بذور التويا.

2- بذور الذرة الصفراء (غوطة 82) التي تمّ الحصول عليها من مؤسسة إكثار البــذور في مدينة حلب.

3- مركبا α−التوجون α-Thujone وα−البينين α-Pinene (Sigma-Aldrich)؛

4- مركب خافض للتوتر السطحي توين−80 ،80 tween ، (Merck) [6]

5- استخدم في البحث الأجهزة الآتية:

− مقياس الطيف الضوئي في المجال فوق البنسفجي Secomam- (Aethelie) UV.

− مقياس الطيف الضوئي في المجال المرئي (Vis-Spectrophotometer-Vis-7220).

− مقياس pH (Orion- 420A).

− حاضنة (Philipharris).

− حاضنة هزازة (G.F.L – 3031).

− مثــفلة مبردة (Boeco- U32R).

طرائق البحث

1− تحضير البذور

غُسلت بذور الذرة الصفراء بالماء الفاتر ثم نُقعت في الماء العادي أو في أحد الأوساط التالية مدة أربع ساعات:

• مستحلب زيت بذور التويا بتركيز0.7%

• مستحلب البينين النقي 0.1%

• مستحلب التوجون النقي 0.1%

أضيف إلى المستحلبات السابقة في أثناء تحضيرها 0.1 مل من توين−80 وبعد انتهاء مدة النقع تغسل البذور بالماء المقطر لتزرع.

تزرع البذور في الوسط المائي مدة ستة أيام ضمن الحاضنة بالدرجــة 26^0C وفــي الظلام.

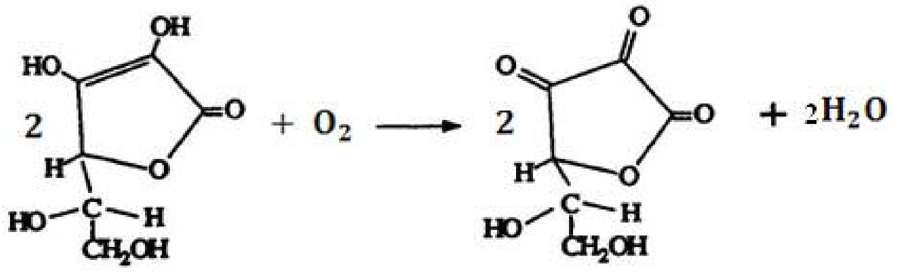
2- تحضير النسيج النباتي

تقطّع البادرات بعد انتهاء مدة الاستنبات وتؤخذ مقاطع من الساق بطول 1.5 سم وعلى بُعد 2ملم أسفل منطقة العقدة وبوزن غرام واحد، وذلك لاستخلاص الإنزيمات منها.

استخلاص إنزيم غوياكول بيروكسيداز واسكوربات أوكسيداز

يسحق غرام واحد من النسيج النباتي المدروس على البارد عند الدرجة $4\,^0C$ ويضاف إليه 10 مل من موقي الفوسفاتي (0.1M، pH=7)، يُمزج الوسط عدة ساعات بواسطة المحرك الكهربائي مع التبريد. ثم يثفل عند الدرجة $4\,^0C$ وبسرعة 5000 rpm وتؤخذ الرشاحة الناتجة عن التثفيل التي تحتوي على مكونات العصير الخلوي بما فيها إنزيما غوياكول بيروكسيداز واسكوربات أوكسيداز[6].

1- تعيين فعالية إنزيم أسكوربات أوكسيداز (ascorbate oxidase) [7]



تحدد واحدة الفعالية لإنزيم أسكوربات أوكسيداز بكمية الإنزيم اللازمة لتحويل 1 ميكرو مول من الأسكوربات في الدقيقة الواحدة في الدرجة 25^0C إلى أسكوربات منقوص الهيدروجين (dehydroascorbate).

لقياس الفعالية الإنزيمية في الخلاصة يُضاف إلى 2 مل من موقي الفوسفاتي/ EDTA (0.1M، pH=5.6)، 0.1 مل من السوبسترات (حمض الأسكوربيك 0.005M) و0.1مل من المستخلص الإنزيمي.

تتألف العينة الشاهدة من 2 مل من موقي فوسفاتي / EDTA (0.1M، pH=5.6)، و0.1مل من السوبسترات (حمض الأسكوربيك 0.005M) و0.1 مل من المحلول الموقي [7].

تُحضن الأنابيب في درجة الحرارة 25^0C مدة 5 دقائق.

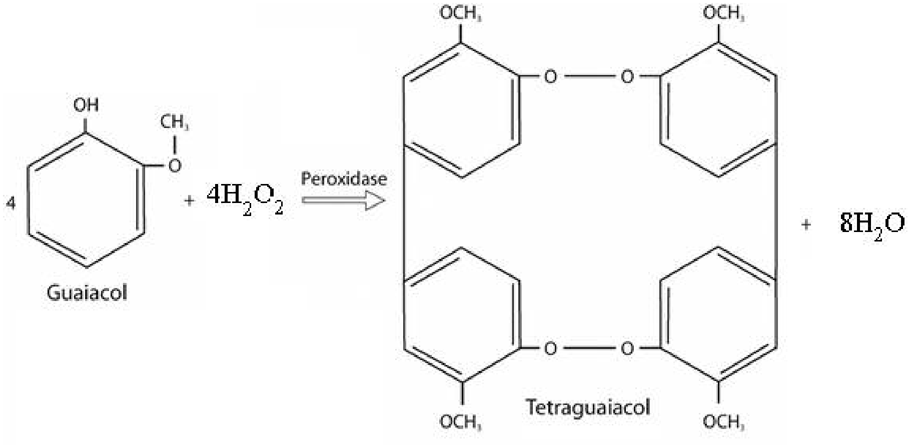
تُقاس الامتصاصية عند طول الموجة 265nm

تقاس الفعالية الإنزيمية بالعلاقة:

$$U = \frac{\Delta A_{265} \times V_t \times d}{V_s \times \varepsilon \times T}$$

(U) هي الفعالية الإنزيمية مقدرة بالوحدات الإنزيمية من أجل غرام من نسيج البادرات.
(ΔA_{265}) هي الفرق بين امتصاصية الشاهد مطروحاً منها امتصاصية العينة .
(Vt) هو حجم العينة المحضونة.
(d) عامل التمديد
(ε).معامل الإطفاء النوعي وقيمته 13.386
(Vs) حجم المستحضر الإنزيمي في التجربة .
(T) زمن الحضن

2− تعيين فعالية إنزيم Guaiacol Peroxidase



تحدد الفعالية الإنزيمية للغوياكول بيروكسيداز بكمية الإنزيم التي تفكك 1 ميكرومول من الماء الأكسجيني في الدقيقة الواحدة بالدرجة $25\ ^0C$.

لقياس الفعالية الإنزيمية يُضاف إلى 2.8 مل من موقي فوسفاتي (pH=7, 0.1M) مقدار 0.05 مل من محلول الغوياكول (0.018 M, Guaiacol) و0.05 مل من السوبسترات (الماء الأكسجيني 0.025%) و0.1 مل من المستحضر الإنزيمي، ولتحضير العينة الشاهدة تؤخذ المقادير السابقة عدا المستحضر الإنزيمي، الذي يُستعاض عنه بإضافة المحلول الموقي [8].

تُحضن العينات مدة 5 دقائق في درجة الحرارة 25^0C وتقاس الامتصاصية على جهاز الامتصاص اللوني عند طول الموجة 436 نانومتراً.

$$U = \frac{\Delta A_{436} \times 4 \times V_t \times d}{V_s \times \varepsilon \times T}$$

(U) هي الفعالية الإنزيمية مقدرة بالوحدات الإنزيمية من أجل غرام من نسيج البادرات.

(ΔA_{436}) هي الفرق بين امتصاصية الشاهد مطروحاً منها امتصاصية العينة الإنزيمية

(Vt) هو حجم العينة المحضونة.

(d) عامل التمديد

(ε) معامل الإطفاء النوعي وقيمته 25.5

(Vs) حجم المستحضر الإنزيمي في التجربة.

3- تعيين فعالية الكاتالاز

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

إنزيم الكاتالاز من البروتينات الهيمية التي فيها تحمل زمرة الهيم ايون الحديد يعتمد مبدأ معايرة الإنزيم وفق ما أورده بلشكوف [9]، على قياس كمية الماء الأكسجيني المتفككة خلال 30 دقيقة بتأثير الإنزيم.

حيث تؤخذ كمية معينة من الماء الأكسجيني وتُفاعل مع الإنزيم 30 دقيقة وتعاير الكمية المتبقية من الماء الأكسجيني بمحلول برمنغنات البوتاسيوم 0.1N.

تقدر الفعالية الإنزيمية بالفرق في حجم البرمنغنات بين ماتستهلكه التجربة والشاهد. بهدف تحديد كمية الماء الأكسجيني المتفككة في أثناء مدة الحضن في الدقيقة الواحدة.

تحضير المستحضر الإنزيمي:

يؤخذ 5 غ من المادة النباتية الطازجة وتسحق مع 0.3غ من $CaCO_3$، ويضاف إليها 20 مل من الماء ويتابع السحق حتى تتشكل كتلة متجانسة.

ينقل المزيج المتجانس إلى دورق سعة 100 مل ويكمل الحجم بالماء المقطر، ثم بعد 30 دقيقة يرشح المحلول أو يثفل. تؤخذ عينتان من الرشاحة (بمقدار 20 مل) وتوضع في دوارق سعة 100 مل يُغلى محتوى أحد الدورقين مدة 2-3 دقائق، بهدف تخريب الإنزيم، ثم يُبرد.

يُصب في كل من الدورقين 20 مل من الماء و3 مل محلول الماء الأكسجيني 1%، ويتم حضن الدورقين مدة 30 دقيقة.

يُضاف إلى محتوى كل من الدورقين بعد انتهاء الحضن 4-5 مل من محلول H_2SO_4%10 (كوسيط للتفاعل)، ويعاير بواسطة محلول $KMnO_4$ (0.1N) حتى ظهور اللون الوردي- الخفيف (والذي يجب أن يثبت مدة دقيقة) [9].

ويتم الحساب بالنسبة إلى 1غرام من المادة النباتية المدروسة وفق المعادلة الآتية:

$$x = \frac{(a - b) \times 1.7 \times P}{H \times T}$$

إذ:

x فعالية الكاتالاز مقدرة بـــ ملغ H_2O_2 التي تتفكك في الدقيقة الواحدة محسوبة لــ 1 غــرام مــن المــادة النباتية المدروسة.

H وزن المادة المدروسة.

a عدد الميلي لترات من محلول $KMnO_4$ (0.1 N) المستهلك لمعايرة التجربة الشاهدة.

b عدد الميلي لترات من محلول $KMnO_4$ (0.1 N) المستهلك لمعايرة التجربة مع الإنزيم الفعال.

P معامل تصحيح محلول البرمنغنات (0.1 N) المستعمل للمعايرة.

T زمن الحضن.

1.7 عدد الميلي غرامات H_2O_2 المكافئة إلى 1 مل من $KMnO_4$ (0.1 N)

استخلاص إنزيم الليباز

يُسحق غرام واحد العينات المدروسة (بذور أو بادرات ساق الذرة الصفراء) بشكل جيد، ويضاف إليها ضعفا حجمها من موقي فوسفاتي (0.1M، pH=7). وبعد المزج الجيد مدة ساعة كاملة على خلاط مغناطيسي مع التبريد إلى درجة الحرارة 4^0C+. ترشح العينة على قطعة من القماش لإزالة البقايا الصلبة ثم تثفل باستخدام المثفلة المبردة للدرجة 4^0C+ مدة 20 دقيقة وبسرعة (5 آلاف دورة/ دقيقة).

تفصل الطبقة العليا وتجمع في وعاء مبرد. يُجمع الراسب المتبقي في أنبوب التثفيل مع الراسب فوق طبقة القماش ويضاف إليهما كمية جديدة من موقي فوسفاتي (0.1M، pH=7). ويُتابع المزج والتحريك ثم التثفيل، كما في السابق وتكرر العملية عدة مرات حتى عدم تشكل الطبقة الشحمية لدى التثفيل.

تجمع الطبقة العليا التي نتجت عن عمليات التثفيل المتعاقبة معاً ويضاف إليها حجم مماثل من محلول كلوريد الصوديوم المشبع، يخلط المزيج جيداً ويضاف إليه الكمية اللازمة من الإيتر الإيتيلي بهدف استخلاص الشحوم وغيرها من المركبات المنحلة بالمذيبات المنخفضة القطبية. يترك المزيج الناتج مدة ساعة كاملة في البراد، يثفل المزيج بعد ذلك بسرعة 2 ألف دورة/ دقيقة، فتتشكل في أنابيب التثفيل ثلاث طبقات وراسب، يتجمع الإنزيم في الطبقة الوسطى منها، حيث يتم فصله وحفظه على البارد.

تُعاد على الراسب في أنابيب التثفيل المراحل التي أُجريت على الطبقة الشحمية أعلاه مرة ثانية وثالثة حتى الوصول إلى مرحلة عدم تشكل الطبقة الإنزيمية الوسطى.

تُعرّض الطبقة الوسطى الإنزيمية التي جُمعت لعملية الديلزة. ويُجمع المحلول اللزج المتبقي ليستعمل في التجارب اللاحقة مباشرة [10].

1- تعيين فعالية الليباز في الأنسجة المدروسة

تعتمد هذه الطريقة على معايرة الزيادة في الحموض الحرة التي تنشأ عن غليسريدات الركيزة (زيت دوار الشمس) تحت تأثير إنزيم الليباز. حيث يتم مزج 250 ملغ من محلول الإنزيم اللزج مع 0.1 مل من موقي التريس pH=8 وكمية فائضة من السوبسترات، مع 1.4 مل ماء ويُحرك المزيج جيداً. نخفض درجة حموضة الوسط إلى 4.2 بواسطة حمض الخل 0.1N. يُحضن المزيج مدة 30 دقيقة في الدرجة ^{0}C 40، ثم يضاف إليه 5 مل من الإيتانول المطلق لتثبيط الإنزيم. تتم عملية المعايرة بواسطة هيدروكسيد الصوديوم 0.1 نظامي حتى الوصول إلى pH=8.5 وذلك إما بمقياس pH متر أو بواسطة مشعر تيمول فتالئين 1% في الغول (يمكن استخدام فينول فتالئين كمشعر للمستحضرات الإنزيمية غير الملونة) وتعبّر عن فعالية الليباز [11] بعدد ميليلترات القلوي اللازمة لتعديل الحموض الدسمة المتحررة عن 1 غرام من زيت دوار الشمس المستخدم كركازة، نتيجة الحلمهة الإنزيمية بالعلاقة الآتية:

$$X = \frac{NV_2 - NV_1}{T}$$

X فعالية الليباز مقدرة بعدد ميليلترات القلوي اللازمة لتعديل الحموض الدسمة المتحررة عن 1 غرام من الزيت، نتيجة الحلمهة الإنزيمية.

V_1 حجم هيدروكسيد الصوديوم اللازم لمعايرة العينة الشاهدة

V_2 حجم هيدروكسيد الصوديوم اللازم لمعايرة العينة المدروسة

T زمن الحضن

تعيين فعالية إنزيم الأميلاز

تعتمد الطريقة على قياس امتصاص النشاء المتبقي في المحلول الذي لم يتحلمه إنزيمياً بعد تلوينه بمحلول اليود [12] وتتلخص طريقة العمل بسحق 5غ من المادة النباتية (بذور أو بادرات الذرة الصفراء) مع50 مل من محلول الفوسفات الموقي (0.005M، pH=7.4) تُجرى العملية في جو مبرد مع التحريك. يثفل المزيج للحصول على المستخلص الإنزيمي.

ولقياس الفعالية الإنزيمية تؤخذ ثلاثة أنابيب إحداها للتجربة، والثاني كشاهد (مقارنة)، والثالث كعينة عيارية.

يؤخذ في أنبوب التجربة والشاهد 1مل محلول النشاء (3%) الطازج والمحَضر في موقي الخلات (0.1M، pH=5).

ويؤخذ في الأنبوب الثالث العياري (العينة الفارغة) 1مل من المزيج ذي التركيب الآتي:

(50 مل ماءً مقطراً +0.5 مل من 0.1 نظامياً من حمض كلور الماء +0.1 مل من اليود (I_2) 0.3%).

يضاف إلى كل من الأنابيب الثلاثة أعلاه 3 مل من محلول موقي الخلات 0.1 M (pH=5) و1مل من محلول كلوريد الكالسيوم 0.5M وتحضن في الدرجة 40 مئوية مدة 10دقيقة.

ثم يضاف في أنبوب التجربة 1 مل من المستحضر الإنزيمي ويستمر الحضن مدة عشر دقائق أخرى بدرجة الحرارة نفسها.

بعد انتهاء الحضن يضاف إلى كل من الأنابيب 0.5 مل من حمض كلور الماء 1 نظامياً لتثبيط الإنزيم ويضاف في الأنبوب الشاهد والعياري 1 مل من المستحضر الإنزيمي للمقارنة بأنبوب التجربة.

ينقل محتوى كل أنبوب إلى حوجلة معايرة سعة 50 مل تحتوي على 0.5 مل من محلول حمض كلور الماء 0.1 نظامياً و40 مل ماءً مقطراً يضاف إلى كل حوجلة 0.1 مل من محلول اليود في يوديد البوتاسيوم (3% من KI + 0.3% من I_2) ويكمل الحجم بالماء المقطر.

تقاس شدة الامتصاص اللوني عند طول الموجة 610 نانومتراً (فلتر برتقالي) وتحسب الفعالية الإنزيمية من المعادلة[12]:

$$P = \frac{(A - B)}{A} \times \frac{C}{3} \times \frac{1}{T}$$

P تقابل واحدة الفعالية للأميلاز: كمية المستخلص الإنزيمي الذي يحلمه 10 ملغ من النشاء في الدقيقة وفي الشروط المحددة بالتجربة.

A شدة امتصاص المحلول الأصلي من النشاء الذي حُضن دون الإنزيم (العينة الشاهدة).

B شدة امتصاص محلول النشاء المتبقي بعد تأثير الإنزيم في عينة التجربة (العينة المدروسة).

C كمية النشاء المأخوذة في بداية التجربة مقدرة (ملغ).

T زمن الحضن.

استخلاص إنزيم البروتيآز

يُسحق غرام واحد من ساق بادرات الذرة الصفراء ويضاف إليها 20 مل محلول KCl (1M)، وتمزج مدة ساعة كاملة، ثم يثفل وينقل محلول البروتينات إلى دورق معايرة، ويعالج الراسب بكمية جديدة من المحلول الملحي KCl ويحرك ثم يثفل. تعاد عملية الاستخلاص 4ــ5 مرات حتى يصبح تفاعل الكوماسي سلبياً على آخر مستخلص. يمدد حجم المستحضر البروتيني الملحي إلى 50 مل بواسطة المحلول الملحي نفسه KCl، ويطلق عليه اسم "الغلوبولينات المنحلة بـ KCl" [13].

ولفصل إنزيم البروتيآز استخدمت طريقة الترسيب بكبريتات الأمونيوم [13] حتى بلوغ نسبة إشباع تصل نحو 44%، يفصل الراسب المتشكل بعد كل إضافة (بدرجة تشبّع

محددة) باستخدام الطرد المركزي، بسرعة (5000rpm) مدة 15 دقيقة، تُهمل الرشاحة، يُذاب الراسب الملحي في أقل كمية ممكنة من موقي البورات PH=9. أجريت الديلزة للمحلول الإنزيمي مقابل الماء المقطر، واستخدم المحلول لدراسة الفعالية الإنزيمية في الحالات المختلفة.

1- قياس فعالية إنزيم البروتيآز:

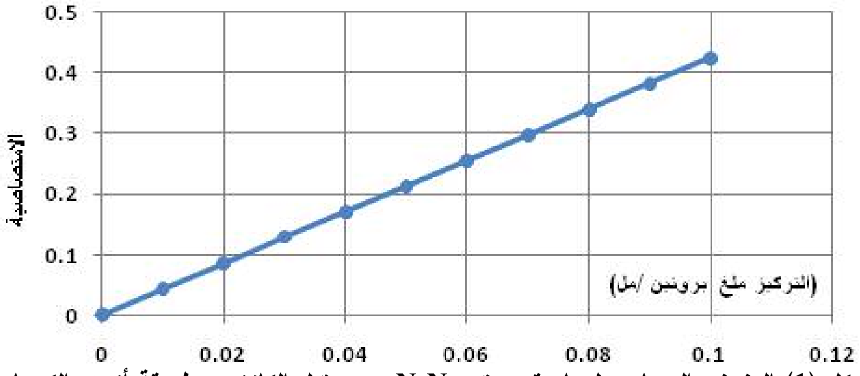
يُضاف إلى أنبوب التجربة 3 مل من موقي البورات PH=9 و2 مل من المستخلص الإنزيمي 1 مل من محلول المادة المدروسة أو الماء، ويضاف إلى أنبوب الشاهد4 مل من موقي البورات PH=9 و2 مل من المستخلص الإنزيمي المثبط مسبقاً بالغليان[14]، حيث يصل الحجم النهائي لأوساط الحضن إلى6 مل.

تحضن الأنابيب في حمام مائي درجة حرارته $50^{O}C$ مدة 2 دقيقة بعد ذلك نضيف إلى الأنابيب 2 مل من محلول N-N دي ميتيل الكازئين 0.4% ونستمر بالحضن مدة 25 دقيقة بعد ذلك نُضيف إلى الأنابيب المحضونة 5 مل من الماء المثلج لإيقاف التفاعل قبل نقلها إلى حمام ثلجي [14].

يتم حساب فعالية إنزيم البروتيآز بمعايرة كمية الركيزة البروتينية (محلول الكازئين) التي تتفكك خلال دقيقة واحدة مستخدمين طريقة أزرق الكوماسي التي اقترحها R.K.Scopes [15-13] .

يُؤخذ 1مل من كل أنبوب ويضاف إليه 5مل من محلول الكوماسي، وبعد التحريك الجيد تترك الأنابيب لتهدأ عشر دقائق ويكتمل تشكل المعقد ذي اللون الأزرق المطلوب. تقاس الامتصاصية عند طول الموجة 595nm بالمقارنة بعينة شاهدة مكونة من 5 مل من الكوماسي في 1 مل من الماء المقطر.

رُسم المنحنى العياري باستخدام بروتين N-N دي ميتيل الكازئين وكان له الشكل الآتي:



الشكل (1) المنحنى المعياري لمعايرة بروتين N-N دي ميتيل الكازئين بطريقة أزرق الكوماسي

النتائج ومناقشتها

1- إنزيم اسكوربات أوكسيداز (Ascorbate Oxidase)

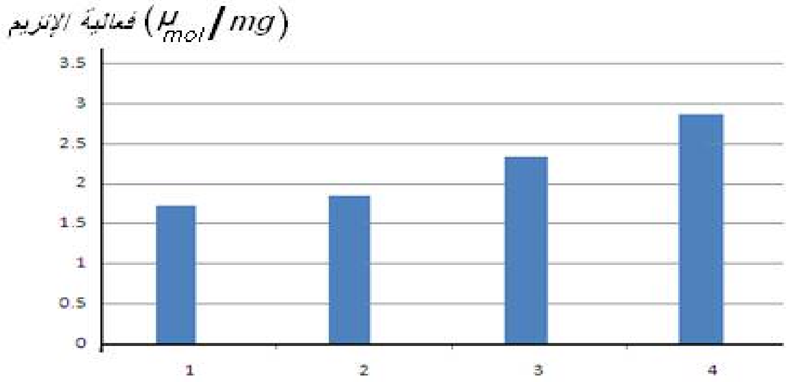
يبين الجدول (1) والشكل (2) فعالية إنزيم اسكوربات أوكسيداز في خلايا ساق بادرات الذرة التي نقعت بذورها في الماء وفي مستحلبات الأوساط المدروسة مدة 4 ساعات بالدرجة $26\ ^0C$ بالظلام والمستنبتة مدة ستة أيام في وسط مائي، وقد جرى التعبير عن الفعالية الإنزيمية بعدد ميكرو مولات حمض الأسكوربيك التي تتأكسد إلى دي هيدرو أسكوربات بواسطة 100ملغ من المستحضر الإنزيمي في الدقيقة الواحدة وفي الدرجة 25^0C.

أظهرت التجارب أن فعالية الإنزيم المستخلص من ساق بادرات الذرة المنقوعة بالماء كانت أقل مما هي عليه في ساق بادرات الذرة المنقوعة بذورها في باقي المستحلبات بشكل عام.

حيث ازدادت فعالية الإنزيم المستخلص من بادرات ساق الذرة المنقوعة بذورها بمستحلب زيت التويا 1.07 ضعفاً. وازدادت الفعالية الإنزيمية بنحو 1.3 ضعفاً في بادرات ساق الذرة المنقوعة بذورها بمستحلب البينين. وبمقدار 1.6 ضعفاً في ساق بادرات الذرة المنقوعة بذورها بمستحلب التوجون.

الجدول (1) فعالية إنزيم اسكوربات أوكسيداز وفق شروط التجربة

وسط النقع	الماء	زيت التويا	α-البينين	α-التوجون
فعالية الإنزيم (ميكرو مول/ملغ)	1.74	1.86	2.35	2.87



الشكل (2) فعالية الإنزيم مقدرة بعدد ميكرو مولات حمض الأسكوربيك التي تتحول بواسطة 100 ملغ من المستحضر الأنزيمي في الدقيقة الواحدة وبدرجة الحرارة 25^0C في ساق بادرات الذرة المستنبة في ستة أيام والمنقوعة بذورها في:1-الماء، 2- في زيت التويا 0.7%، 3- فيα-البينين0.1%، في α-التوجون0.1%.

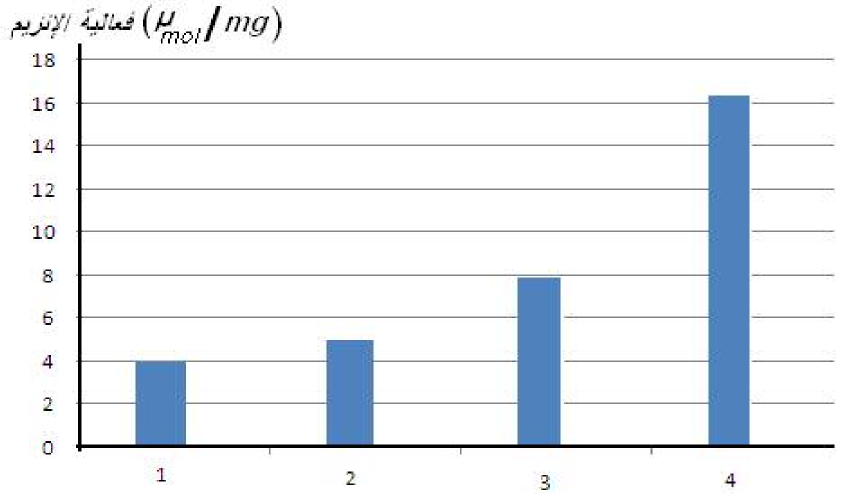
2- إنزيم غوياكول بيروكسيداز Peroxidase Guaiacol:

يبيّن الجدول(2) والشكل (3) فعالية إنزيم غوياكول بيروكسيداز في خلايا ساق بادرات الذرة التي نقعت بذورها مسبقاً في الماء وفي مستحلبات الأوساط المدروسة مدة 4 ساعات بالدرجة $26\ ^0C$ بالظلام والمستنبتة مدة ستة أيام في وسط مائي. وقد جرى التعبير عن الفعالية الإنزيمية بعدد ميكرو مولات الماء الأكسجيني التي تتفكك بواسطة 100ملغ من المستحضر الأنزيمي في الدقيقة الواحدة وفي الدرجة 25^0C

إنّ فعالية الإنزيم المستخلص من ساق بادرات الذرة المنقوعة بالماء كانت أقل مما هي عليه في ساق بادرات الذرة المنقوعة بذورها في باقي المستحلبات، حيث ازدادت الفعالية بمقدار 1.2 ضعفاً لدى الإنزيم المستخلص من بادرات ساق الذرة المنقوعة بذورها بمستحلب زيت التويا، وأصبحت ضعف قيمتها لدى الإنزيم المستخلص من بادرات ساق الذرة المنقوعة بذورها بمستحلب البينين. أما الفعالية الإنزيمية لإنزيم غواياكول بيروكسيداز في ساق بادرات الذرة المنقوعة بذورها بمستحلب التوجون فقد كانت عالية جداً مقارنة بغيرها حيث زادت بما يعادل 4.1 ضعفاً عما هي عليه في بادرات ساق الذرة المنقوعة بالماء.

الجدول (2) فعالية إنزيم غواياكول بيروكسيداز وفق شروط التجربة

وسط النقع	الماء	زيت التويا	α-البينين	α-التوجون
فعالية الإنزيم(ميكرومول/ملغ)	3.97	5	7.87	16.36



الشكل (3) فعالية الإنزيم مقدرة بعدد ميكرو مولات الماء الأكسجيني التي تتحول بواسطة 100ملغ من المستحضر الأنزيمي في الدقيقة الواحدة وبدرجة الحرارة 25^0C. في ساق بادرات الذرة المستنبتة في ستة أيام والمنقوعة بذورها في:1- الماء، 2- زيت التويا 0.7%، 3- α-البينين 0.1%، 4- α-التوجون 0.1%.

3- دراسة فعالية الكاتالاز

يبيّن الجدول (3) والشكل (4) فعالية إنزيم الكاتالاز في خلايا ساق بادرات الذرة التي نقعت بذورها في الماء وفي مستحلبات الأوساط المدروسة مدة 4 ساعات بالدرجة $26\ ^0C$ بالظلام والمستنبتة مدة ستة أيام في وسط مائي مقدرة بعدد ميليغرامات الماء الأكسجيني المتفككة في دقيقة واحدة من الحضن محسوبة بالنسبة إلى غرام واحد من نسيج الساق في البادرات.

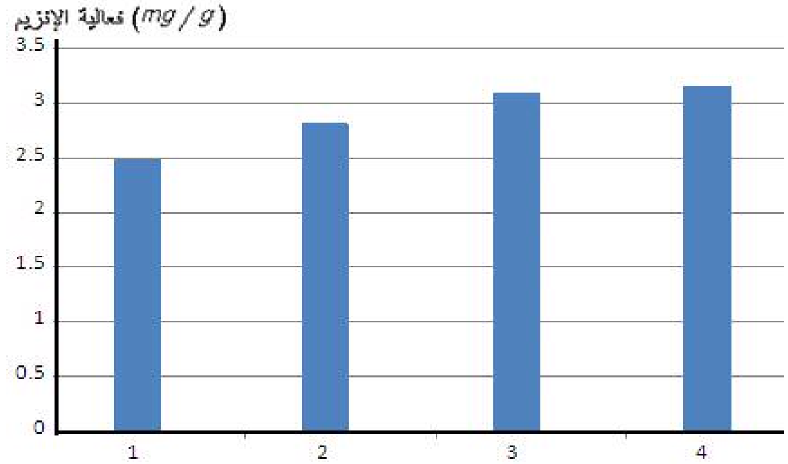
تُبين النتائج التي تمّ الحصول عليها أنّ تأثير حضن البذور في مستحلب زيت التويا مقارنة بالحضن في الوسط المائي قد نشّط الفعالية الإنزيمية بنسبة لاتتجاوز 12%. وكذلك الحال مع تأثير مستحلب البينين

الذي زاد من فعالية الإنزيم بنسبة 20% مقارنة بفعالية الإنزيم في العينات المنقوعة بذورها في الماء.

وكذلك الأمر بالنسبة إلى مركب التوجون، إذ أدى حضن البذور في مستحلب هذا المركب إلى ازدياد فعالية إنزيم الكاتالاز بنسبة وصلت إلى 21.4% مما هي في العينات المنقوعة بذورها في الماء.

الجدول (3) فعالية إنزيم الكاتالاز وفق شروط التجربة

وسط النقع	الماء	زيت التويا	α-البينين	α-التوجون
فعالية الإنزيم(ملغ/غ)	2.49	2.83	3.11	3.17



الشكل (4) فعالية إنزيم الكاتالاز في ساق بادرات الذرة بعمر 6 أيام بعد نقع البذور في مستحلبات متنوعة مقدرة بملغ H_2O_2 المتفككة/1 غ من نسيج الساق: 1-في الماء، 2- في الزيت 0.7%، 3- في α-البينين 0.1%، 4 – في α-التوجون 0.1%.

4- دراسة فعالية الليباز

دُرست فعالية إنزيم الليباز تحت تأثير مكونات زيت التويا في الحالتين الآتيتين:

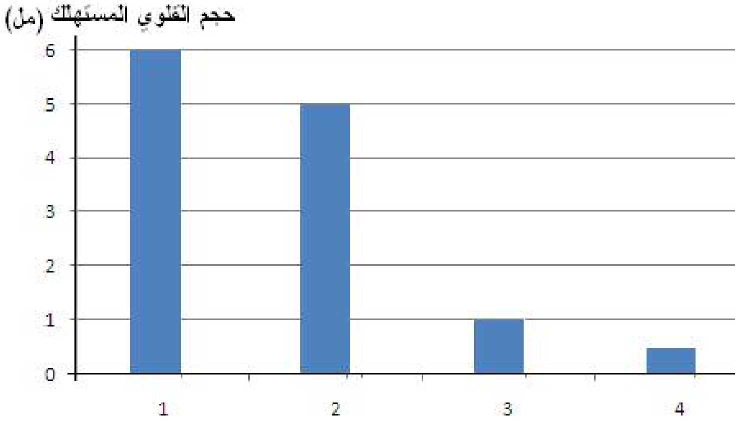
1- في البذور: تمّ فيها معايرة الليباز في البذور مباشرة بعد نقعها في الماء والمستحلبات المختلفة الأخرى مدة أربع ساعات بالظلام وفي الدرجة $26\ ^0C$.

يبين الشكل (5) والجدول (4) فعالية إنزيم الليباز في بذور الذرة المنقوعة في الماء وفي مستحلبات الأوساط المدروسة مقدرة بعدد ميليلترات القلوي اللازمة لتعديل الحموض الدسمة المتحررة عن 1 غرام من زيت دوار الشمس المستخدم كركازة، تحت تأثير إنزيم الليباز.

تُظهر النتائج أن فعالية إنزيم الليباز في البذور المنقوعة في مستحلبات زيت التويا والتوجون والبينين كانت أخفض من فعاليته في البذور المنقوعة بالماء، حيث بلغ انخفاض الفعالية الإنزيمية في البذور المنقوعة بمستحلب التوجون 91.66% مقارنة بما هي عليه في البذور المنقوعة في الماء بينما وصل الانخفاض في فعالية الإنزيم المستخلص من البذور المنقوعة بمستحلب البينين 83.33% مقارنة بفعالية الإنزيم المستخلص من البذور المنقوعة في الماء، أمّا في البذور المنقوعة بمستحلب الزيت فقد كانت الفعالية الإنزيمية قريبة من فعالية الإنزيم المستخلص من البذور في الماء إذ بلغت نسبة انخفاض الفعالية 16.66%.

الجدول (4) فعالية إنزيم الليباز في بذور الذرة الصفراء

وسط النقع	الماء	زيت التويا	α-البينين	α-التوجون
حجم القلوي المستهلك (مل)	6	5	1	0.5



الشكل (5) فعالية إنزيم الليباز في بذور الذرة الصفراء بعد نقعها في: 1-في الماء، 2- في الزيت 0.7 %، 3- في α-البينين 0.1%، 4- في α-التوجون0.1%.

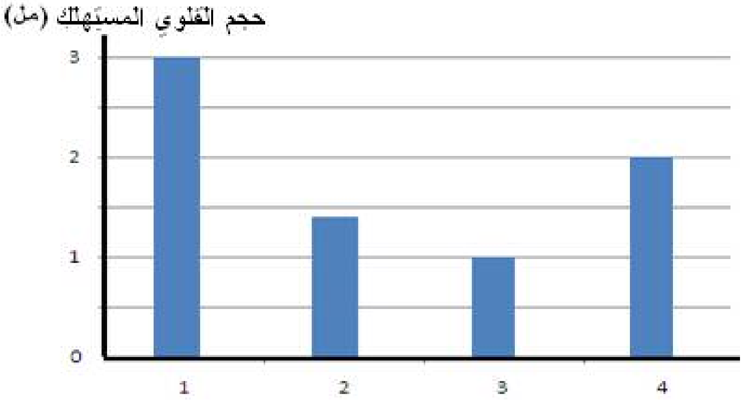
2- في البادرات: وتمّ فيها معايرة اللبياز في ساق بادرات الذرة المنقوعة بذورها في الماء والمستحلبات المختلفة السابقة والمستنبتة مدة ستة أيام في وسط مائي.

يبيّن الشكل (6) والجدول (5) فعالية إنزيم اللبياز في خلايا ساق بادرات الذرة التي نُقعت بذورها في الماء وفي أوساط المستحلبات المختلفة بالدرجة 26^0C وفي الظلام، والمستنبتة مدة ستة أيام في وسط مائي بالظلام مقدرة بعدد ميليلترات القلوي اللازمة لتعديل الحموض الدسمة المتحررة عن 1غرام من زيت دوار الشمس المستخدم كركازة، تحت تأثير إنزيم اللبياز.

يُلاحظ من النتائج أنّ فعالية اللبياز في مستحلب زيت التويا قد انخفضت إلى نصف قيمتها في خلايا الساق التي نقعت بذورها في الوسط المائي، وإلى أقل من ذلك في خلايا الساق التي نقعت بذورها في مستحلب البينين، أما في خلايا الساق التي نقعت بذورها في مستحلب التوجون فقد وصل انخفاض الفعالية اللبيازية إلى 33%.

الجدول(5) فعالية إنزيم اللبياز في بادرات بذور الذرة الصفراء

وسط النقع	الماء	زيت التويا	α-البينين	α-التوجون
حجم القلوي المستهلك (مل)	3	1.4	1	2



الشكل (6) فعالية إنزيم اللبياز في ساق بادرات الذرة بعمر 6 أيام بعد نقع البذور في: 1-في الماء، 2- مستحلب الزيت 0.7%، 3- مستحلب α- البينين 0.1%، 4- مستحلب α-التوجون 0.1%.

5- قياس فعالية إنزيم الأميلاز:

درست فعالية إنزيم الأميلاز تحت تأثير مكونات زيت التويا على مستخلص الإنزيم في الحالتين الآتيتين:

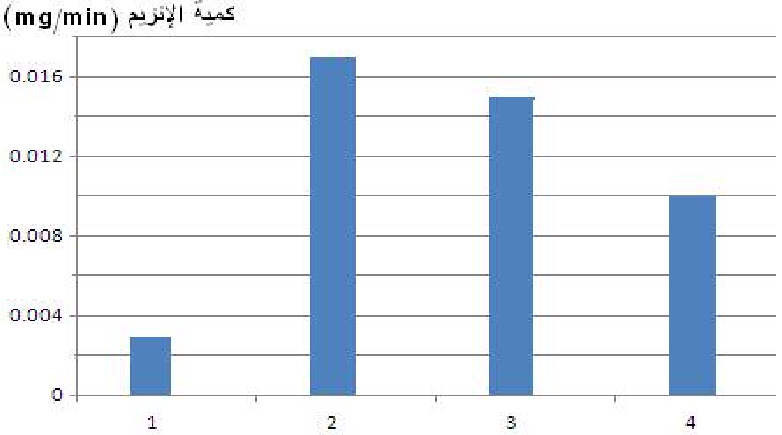
1- في البذور المنقوعة في الماء وفي مستحلبات الأوساط المدروسة مدة 4 ساعات وفي الظلام وفي الدرجة $26\,^0C$.

يبيّن الشكل (7) والجدول(6) فعالية إنزيم الأميلاز لبذور الذرة الصفراء مقدرة بكمية الإنزيم اللازمة لحلمهة 10 ملغ من النشاء في الدقيقة الواحدة.

تبيّن النتائج أنّ فعالية الإنزيم كانت مرتفعة عند نقع بذور الذرة بالماء مقارنة بالحالة التي نقعت فيها بباقي المستحلبات، فهي تزيد بمقدار 5.6 ضعفاً على قيمتها في البذور المنقوعة بمستحلب زيت التويا، و5 أضعاف عن فعالية البذور المنقوعة بمستحلب α- البينين، و3.3 أضعاف عن فعالية البذور المنقوعة بمستحلب α- التوجون.

الجدول(6) فعالية إنزيم الاميلاز في بذور الذرة الصفراء

وسط النقع	الماء	زيت التويا	α-البينين	α-التوجون
كمية الإنزيم (ملغ/دقيقة)	0.003	0.017	0.015	0.01



الشكل (7) فعالية إنزيم الأميلاز مقدرة بكمية الإنزيم (ملغ) اللازمة لحلمهة 10 ملغ من النشاء في الدقيقة الواحدة في بذور الذرة الصفراء المنقوعة في: 1-الماء، 2- مستحلب زيت التويا0.7%، 3- مستحلب α-البينين 0.1%، 4-مستحلبα-التوجون 0.1%.

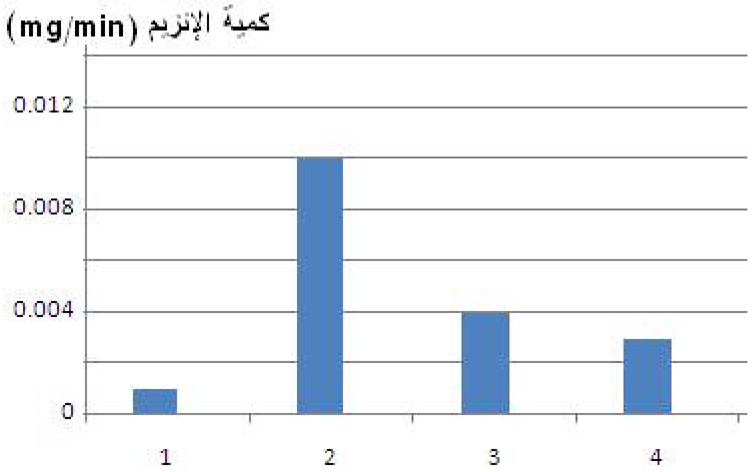
2- في بادرات ساق الذرة الصفراء بعد نقع بذورها مدة 4 ساعات في الظلام في الماء وفي مستحلبات الأوساط المدروسة والمستنبتة مدة 6 أيام في وسط مائي.

يبيّن الشكل (8) والجدول (7) فعالية إنزيم الأميلاز في ساق بادرات الذرة الصفراء مقدرة بكمية الإنزيم اللازمة لحلمهة 10 ملغ من النشاء في الدقيقة الواحدة.

تُظهر النتائج المنحى نفسه الخاص بالبذور المنقوعة. فقد كانت الفعالية الأميلازية لبادرات ساق الذرة المنقوعة بالماء مرتفعة مقارنة بباقي المستحلبات، فهي تزيد 10 أضعاف على ما هو الحال في بادرات ساق الذرة المنقوعة بمستحلب زيت التويا، و4 أضعاف على ما هو في بادرات ساق الذرة المنقوعة بمستحلب البينين، و3 أضعاف على ما هو الحال في بادرات ساق الذرة المنقوعة بمستحلب التوجون.

الجدول(7) فعالية إنزيم الأميلاز في بادرات ساق نبات الذرة الصفراء

وسط النقع	الماء	زيت التويا	α-البينين	α-التوجون
كمية الإنزيم (ملغ/دقيقة)	0.001	0.01	0.004	0.003



الشكل (8) فعالية إنزيم الأميلاز مقدرة كمية الإنزيم (ملغ) اللازمة لحلمهة 10 ملغ من النشاء في الدقيقة الواحدة في في بادرات بذور الذرة الصفراء المنقوعة بذورها في: 1-الماء، 2- الزيت 0.7%، 3- α-البينين النقي0.1%، 4- α-التوجون النقي0.1%.

6- تأثير مستحلبات زيت التويا والبينين والتوجون في وسط الحضن على فعالية إنزيم البروتيآز:

تمّ في هذه المجموعة من التجارب استطلاع التأثيرات المباشرة المحتملة لكل من مستحلب α-البينين وα-التوجون بتركيز 0.1% ومستحلب زيت بذور التويا 0.7%. في أوساط الحضن على فعالية إنزيم البروتيآز المستخلص من خلايا ساق البادرات بعد نقع بذور الذرة الصفراء في الماء مدة أربع ساعات واستنباتها مدة ستة أيام في وسط مائي.

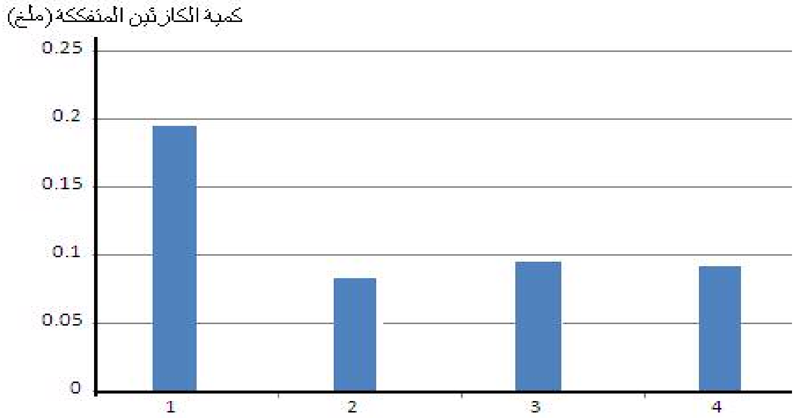
تمت معايرة إنزيم البروتيآز بوجود المركبات الفعالة حيوياً في أوساط الحضن على شكل مستحلبات.

يبيّن الجدول (8) والشكل (9) فعالية إنزيم البروتيآز مقدرة بكمية الركيزة البروتينية (محلول الكازئين) المتفككة خلال دقيقة واحدة من زمن الحضن، مستخدمين طريقة أزرق الكوماسي التي اقترحها R.K.Scopes.

توضح النتائج أنّ فعالية الإنزيم قد انخفضت انخفاضاً كبيراً عند وجود مستحلبات المواد المدروسة في أوساط الحضن (بنسبة تقترب من 47%) مقارنة بما هي عليه في الوسط المائي.

الجدول (8) فعالية إنزيم البروتيآز مقدرة بكمية الكازئين المتفككة في شروط التجربة

أوساط الحضن	فعالية الإنزيم مقدرة بكمية الكازئين المتفككة (ملغ)
الوسط المائي	0.196
مستحلب زيت التويا	0.084
مستحلب α- البينين	0.096
مستحلب α - التوجون	0.092



الشكل (9) فعالية البروتيآز مقدرة بكمية الكازئين التي تتفكك عند الحضن مدة دقيقة واحدة في: 1- الماء، 2- مستحلب زيت التويا0.7%، 3- مستحلب البينين0.1%، 4- مستحلب التوجون 0.1%.

مما سبق نستنتج أن معالجة بذور الذرة الصفراء عن طريق نقعها في مستحلبات متنوعة أدت إلى تنشيط بعض الإنزيمات ذات العلاقة بمراحل نمو البادرات (إنزيمات الأكسدة والإرجاع) في حين تأثرت إنزيمات الحلمهة الأمر الذي أدى إلى انخفاض نشاطها.

REFERENCES المراجع

1- Naser, B., Bodinet, C., Tegtmeier, M., & Lindequist,U. (2005), "Thuja occidentalis (Arbor vitae): A Review of its Pharmaceutical, Pharmacological and Clinical Properties .eCAM 2. (1), 69–78.

2- Duke, J. A, & Ayensu. E. (1985), Details of over 1,200 medicinal plants of China and brief details of their uses. Often includes an analysis, or at least a list of constituents. Medicinal Plants of China Reference Publications, Inc.

3- Nickavar, B., Amin, G., & Parhami, S. (2003), "Volatile Constituents of the Fruit and Leaf Oils of Thuja orientalis L. Grown in Iran". Z. Naturforsch. 58c: 171-172.

4-Tsiri, D., Graikou, K., Olech, P., L., Baranowska, K., M., Spyropoulos, C. &Chinou, I. (2009). "Chemosystematic Value of the Essential Oil Composition of Thuja species Cultivated in Poland- Antimicrobial Activity". Molecules. (14).

5- Lachenmeier, Dirk W., J. Emmert, T. Kuballa, and G. Sartor. (2006), "Thujone—Cause of absinthism?". *Forensic Science International* 158: 1-8.

6- Singh, P., H., Batish, R., D., Kaur, S., Arora, K., & Kohli, K. R. (2006), "alpha-Pinene Inhibits Growth and Induces Oxidative Stress in Roots." Oxford journals 98, (6) ،1261-1269.

7- Oberbacher, M. F., Vines. H. M. (1963). "Assay Procedure for Ascorbate Oxidase." Nature 197, 1203.

8- Bergmeyer, H. U. (1974). "Methods of Enzymatic Analysis 1."Academic Press 2nd Edition, 495.

9- بلشكوف، كتاب العملي في بيوكيمياء النبات. (1968). موسكو.

10- Enujiugha, N. V., Thani, A. F., Sanni, M. T, & Abigor. R. D. (2004). "Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (pentaclethra macro phylla Benth)." Food chemistry 88(3), 405-410.

11- ory, R. L., Angelo, St. J. A., & Altschul, M. A. (1962), "The acid Lipase of the castor bean Properties and substrate specificity." J. Lipid Research 3, 1.

12- روبين، ب.أ.، عملي الفيزيولوجيا النباتية، (1978)، بطرسبورغ .

13-SCOPES, K., R. (1994), "Protein purification". *Springer-verlagBerlin Heidelberg*, 1-8. .

14-MILIN. (1999). "14060ZymoLift MD doen. doc", *Via dell'Artigianato*.

15-Instructions Coomassie® Protein Assay Reagent 23200. PIERCE, Biotechnology.