انتاج قلويد الكابسيسين من نباتات الفلفل الحار ومن الكالس المستحدث منها

مزاحم قاسم الملاح
وحدة التقنيات الحياتية-كلية التربية -جامعة الموصل

غادة شرف الدين اليوزبكي
وحدة البحث والتطوير / مصنع ادوية نينوى

تاريخ الاستلام 2004/11/27
تاريخ القبول 2005/4/25

ABSTRACT

Capsaicine was obtained from the alcoholic extracts of different explants of the chili pepper seedlings, callus and fruits. Dragen dorff test was conducted to identify the isolated alkaloid which showed positive reaction. The isolated alkaloid was identified depending on the diagnostic methods including measurement of absorbance values (λ max) by UV Spectrophotometer.

Thin layer chromatograpical technique demonstrated the separation of one spot from each tested sample having the same value of rate flow which coincided with the rate flow value of the control. All samples were then identified by determining its chemical structure using NMR. This test showed similarity between the chemical structures of the isolated alkaloid with the structure of standard capsaicine. The results of the quantitative determination proved differences of capsaicine in explants and calli. Fruits were in first order of containing this alkaloid followed by stems, leaves, leaf petiole and shoot tips. The stimulated callus was identical in its alkaloid content with that of the explant, from which was initiated.

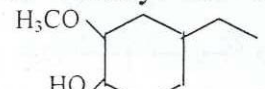
الخلاصة

عزل قلويد الكابسيسين من المستخلصات الكحولية لكل من الثمار، السيقان، اعناق الاوراق، الاوراق، القمم النامية لبادرات الفلفل (الصنف الحار) وانواع الكالس الناشيء منها. لقد اعتمد اختبار دراجن دورف Dragen dorff للكشف عن قلويد الكابسيسين المعزول الذي اظهر ايجابية الكشف لهذا الاختبار. شخصت القلويدات المعزولة باتباع طرائق التشخيص المعتمدة، متضمنة تقدير درجات الامتصاص لأعلى طول موجي (λ max) بالمطياف

الفوتوميتري UV Spectrophotometer والتي اظهرت تطابقها مع بعضها ومطابقتها لدرجة امتصاص أعلى طول موجي (λ max) للعينة الضابطة، واستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) التي أظهرت تطابق معدلات مسافة جريان (RF) البقع المنفصلة مع نظيرتها بقعة الكابسيسين القياسي (العينة الضابطة) والتي بلغت (0.80 سم). وتم تحديد التركيب الكيمياوي للقلويد المعزول بجهاز الرنين النووي المغناطيسي (NMR) وكانت الثمار اكثر الاجزاء احتواءً على القلويد تليها السيقان، الاوراق، اعناق الاوراق واخيرا القمم النامية وكان الكالس مناظرا" في محتواه من القلويد مع محتوى تلك الاجزاء الناشىء منها، مما يؤكد امكانية الافادة من مزارع الكالس للحصول على هذا القلويد.

المقدمة

تمتاز نباتات الفلفل *Capsicum annuum* (الصنف الحار) Solanaceae باحتوائها على قلويد الكابسيسين (المادة الحريفة) مما يترتب عليه استعماله كتوابل (1). وتعد القلويدات من المركبات المهمة في صناعة الادوية والمواد العلاجية، ولها تاثيرات فسيولوجية واضحة على طبيعة ووظيفة الأغشية الخلوية على الرغم من وجودها في النبات بتراكيز منخفضة جدا" (2). وقد وجد ان هذه المادة تتواجد في مختلف اجزاء النبات بتراكيز ضئيلة جدا" في حين توجد بتركيز عالٍ في داخل ثمرة الفلفل الحار (3). يصنف قلويد الكابسيسين ضمن القلويدات الامينية 8-methyl –N- vanillyl –6 – nonenamide



$NH - CO - (CH_2)_4 - CH = CH - CH(CH_3)_2$

وقد لوحظ عند اضافة مادة P-Fluorophenylalanine (PFP) الى وسط المستنبتات الخلوية ان الخلايا المقاومة لهذه المادة تنتج مادة الكابسيسين بمعدلات اعلى من الخلايا الحساسة للمادة عينها (4). ينتج قلويد الكابسيسين بكميات كبيرة في وسط المستنبتات الخلوية الخالي من منظمات النمو والمدعم بمادة فينايل الانين Phenylalanine التي تعد مصدر تصنيع الكابسيسين، ولوحظ ان الضوء يثبط تكوين الكابسيسين في مزارع كالس الفلفل المشتق من قطع السيقان (5). ويعد الكابسيسين من المركبات الطبيعية التي تمتاز بتاثيراتها المختلفة منها تاثيره في الروابط التي تربط جزيئات البروتين، تاثيره على طبيعة تركيب الغشاء الخلوي ومرحلة تنظيمه (6)، ويمتاز بنشاطه الحيوي المضاد للبكتريا (7) ، ويستخدم لعلاج التهاب الاعصاب والآم الظهر والتهاب المفاصل الروماتيزمي وغيرها (10, 9,8).

مواد وطرائق العمل

(1) عزل قلويد الكابسيسين من المادة النباتية

استخدم الكالس المستحدث من القمم النامية ، السيقان ، الاوراق واعناق الاوراق المستأصلة من بادرات الفلفل (الصنف المحلي) كمصدر لعزل قلويد الكابسيسين (11) كما عزل ايضا" من الاجزاء النباتية عينها لبادرات الفلفل الحار وثماره (12).

- **تحضير المستخلصات الكحولية**

أخذ 50 غم من كل عينة نباتية وجففت بدرجة حرارة 37-40 ^{o}م لمدة 24 ساعة ثم سحقت واضيف اليها 100 مل من الميثانول 70 % وتركت لمدة 24 ساعة. رشحت العينات من خلال ثلاث طبقات من الشاش. اهمل الراشح واضيف الميثانول ثانية الى الراسب الناتج وترك لمدة 24 ساعة بعدئذ تم غليانه بدرجة 50 ^{o}م وترك ليبرد ورشح المزيج وجمع الراشح الناتج لعزل الكابسيسن منه.

- **عزل قلويد الكابسيسين**

وضع الراشح الناتج في وعاء التبخير الدوار Rotary evaporater بدرجة 50 ^{o}م لحين الحصول على المادة المترسبة واضيف اليها 20 مل من حامض الهيدروكلوريك (2N HCl) لإذابتها ثم رشحت واضيف الى الراشح 20 مل خلات الاثيل $CH_3COOC_2H_5$. وضع المزيج في قمع الفصل مع اهمال خلات الاثيل واضافة محلول الامونيا تدريجيا لحين وصول الرقم الهيدروجيني للمحلول pH 9. رشح المحلول من خلال ورقة ترشيح واضيف للراشح 50 مل كلوروفورم في قمع الفصل مع الرج ثلاث مرات يليها عزل طبقة الكلوروفورم ووضع الجزء المتبقي في حمام مائي 50 ^{o}م لتبخير الكلوروفورم. وزن الناتج المتبقي وحفظت العينات في الظلام في درجة حرارة 5 ^{o}م لحين استخدامها (12).

(2)تشخيص قلويد الكابسيسين

اجريت العديد من الاختبارات في الكشف عن وجود القلويد في المستخلصات والتاكد من ان المادة المعزولة هي مركب قلويدي وليست مركبات اخرى وكذلك التعرف على نوعية القلويد المعزول.

• **اختبار دراجن دورف**

اخذت بضع قطرات من محلول المادة المعزولة بعد اذابتها بالكلوروفورم لكل عينة بوساطة ماصة ووضعها على ورق ترشيح بشكل قطرات منفصلة ورشها بمحلول دراجن دورف (13) الذي يعطي دلالة لونية ايجابية في حالة احتواء المحلول على قلويد الكابسيسين (14).

• **تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة Thin layer Chromatography (TLC)**

استخدمت الالواح الزجاجية المغطاة بمادة السيليكاجيل بسمك 0.25 مل وبأبعاد 20 × 20 سم، غسلت هذه الالواح قبل استعمالها بمحلول الفصل وبعد تجفيفها وتحميلها بالعينات وضع اللوح في الحاوية بصورة عمودية ووضعت النهاية التي تم تحميلها بالعينات من الاسفل ملامسة لمحلول الفصل المكون من الكلوروفورم : الايثانول، 95 حجم :5 حجم (15) وتركت في ظروف درجة حرارة المختبر 25 ^{o}م حتى صعود محلول الفصل ووصوله الى النهاية الاخرى للوح. رفع اللوح وبعد تمام جفافه تم تسليط الاشعة فوق البنفسجية (UV) عليه لتحديد مواقع البقع المنفصلة ومقارنتها مع البقعة الضابطة (المقارنة) بعد اظهارها بمحلول دراجن دورف.

• **قياس معدل مسافة الجريان Rate Flow (RF)**

قيست المسافة التي قطعتها كل بقعة من نقطة البداية والى النقطة التي توقفت فيها .وتم قياس معدل مسافة الجريان (RF) لكل مادة من المواد المعزولة على انفراد ومقارنتها مع معدل مسافة جريان العينة الضابطة.

• **تقدير درجة الامتصاص (λ max)**

وضعت كل عينة من العينات المختبرة وبشكل مستقل في خلية الجهازووضع الكلوروفورم باعتباره عينة ضابطة وتم قراءتها بجهازالمطياف الفوتوميتري (Shimadzu Double-Beam Spectrophotometer UV-210A).

(3) تحديد التركيب الكيمياوي بجهاز الرنين النووي المغناطيسي (NMR)

اخذ 0.5 ملغم من كل عينة من العينات المختبرة على نحو مستقل وقيست بوساطة جهاز NMR بعد اذابتها بالكلوروفورم وتم تسجيل البيانات خطياً على ورق الجهاز مظهرا" التركيب الكيمياوي للمادة.

النتائج

(1) عزل قلويد الكابسيسين من المستخلصات الكحولية للكالس والعينات النباتية

اكدت النتائج وجود مركب قلويدي في المستخلصات الرائقة لكل من الثمار والاجزاء النباتية المختلفة وامتاز القلويد المعزول بلونه البرتقالي وطبيعته اللزجة والتصاقه باسطح اوعية العزل بهيئة طبقة رقيقة تم ازالتها ووزنها.واكدت النتائج وجود المركب القلويدي في كافة انواع الكالس وقد امتاز بالصفات عينها التي امتاز بها القلويد المعزول من الثمار والاجزاء النباتية المختلفة.

• الكشف عن القلويد المعزول بوساطة اختبار دراجن دورف

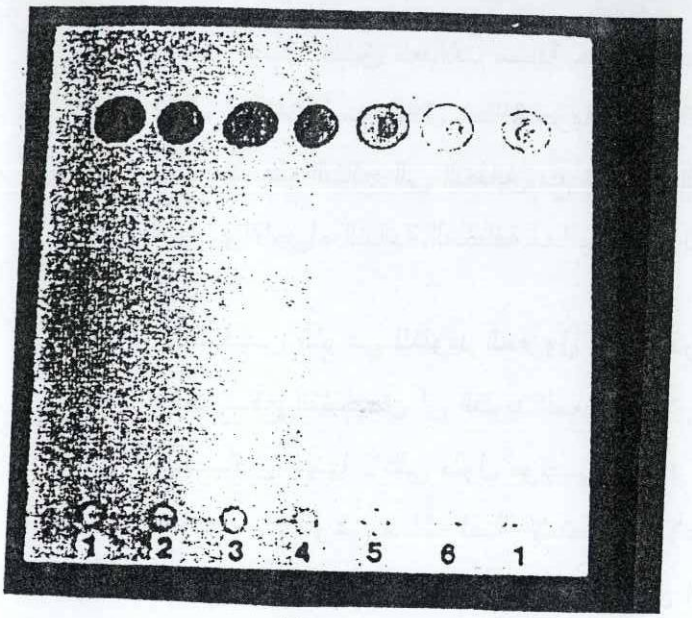
اكدت نتائج الكشف عن القلويد المعزول من الثمار والاجزاء النباتية المختلفة ايجابية هذا الاختبار ، اذ اعطت لونا برتقاليا عند اضافة محلول دراجن دورف اليها كما اظهرت النتائج ايجابية الاختبار عند الكشف عن القلويد المعزول من انسجة الكالس المستحدث من الاجزاء النباتية المختلفة.

• الكشف عن القلويد المعزول باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

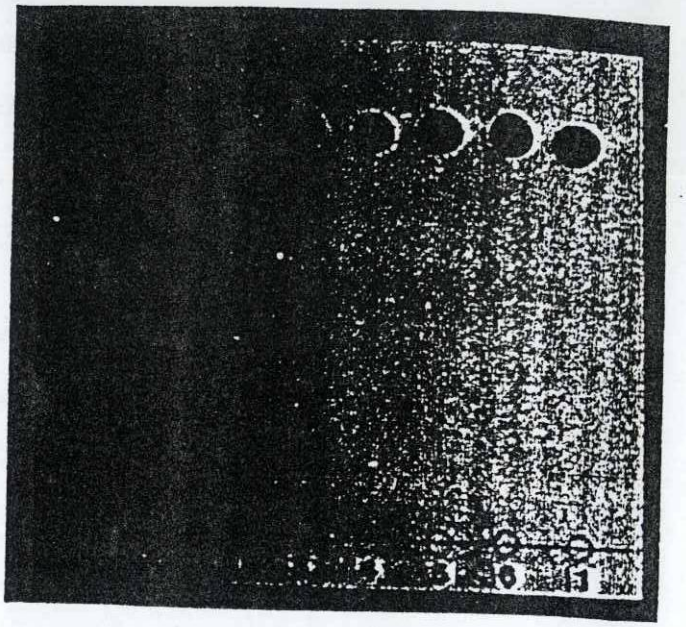
اكدت نتائج الكشف باستخدام تقنية TLC وجود مركب واحد من القلويدات بدلالة انفصال بقعة واحدة (الشكل A.1) من كل عينه مستخدمة (الثمار، السيقان، اعناق الاوراق، الاوراق، القمم النامية)، كما اشارت نتائج الكشف عن القلويد المعزول من المستخلصات المختلفة لانواع الكالس وجود مركب واحد فقط من القلويدات بدلالة تكون بقعة واحدة من كل مستخلص ومقارنتها مع بقعة عينة الكابسيسين القياسي (الشكل B . 1) وكان نمط البقع المنفصلة من كافة العينات متماثلاً من حيث حجمها وقطرها.

(2) تشخيص القلويد المعزول

اثبتت طرائق التشخيص المتبعة ان القلويد المعزول هو قلويد الكابسيسين. حيث اكدت النتائج تطابق معدلات مسافة الجريان (RF) للبقع المنفصلة للقلويدات المعزولة من عينات الثمار والاجزاء النباتية المختلفة مع بعضها البعض وتطابقها مع معدل مسافة جريان بقعة محلول الكابسيسين القياسي (المقارنة) ، اذ بلغ معدل مسافة جريان كل بقعة من البقع المعزولة من العينات 0.8سم وهي متطابقة تماماً مع قيمة معدل مسافة جريان بقع الكابسيسين القياسي التي بلغت 0.8سم .



B



A

الشكل1. تشخيص وتقدير قلويد الكابسيسين المعزول من نباتات الفلفل (الصنف الحار) بتقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (A) الأجزاء النباتية (B) الكالس المشتق منها
1.الكابسيسين القياسي (المقارنة) 2. الثمار 3. السيقان أو كالسها 4. اعناق الأوراق أو كالسها 5. الأوراق أو كالسها 6. القمم النامية أو كالسها

الجدول 1 . معدلات قيم مسافة جريان (RF) البقع المنفصلة من القلويد المعزول من الثمار، الاجزاء النباتية والكالس الناشيء منها في نباتات الفلفل *C. annuum* (الصنف الحار).

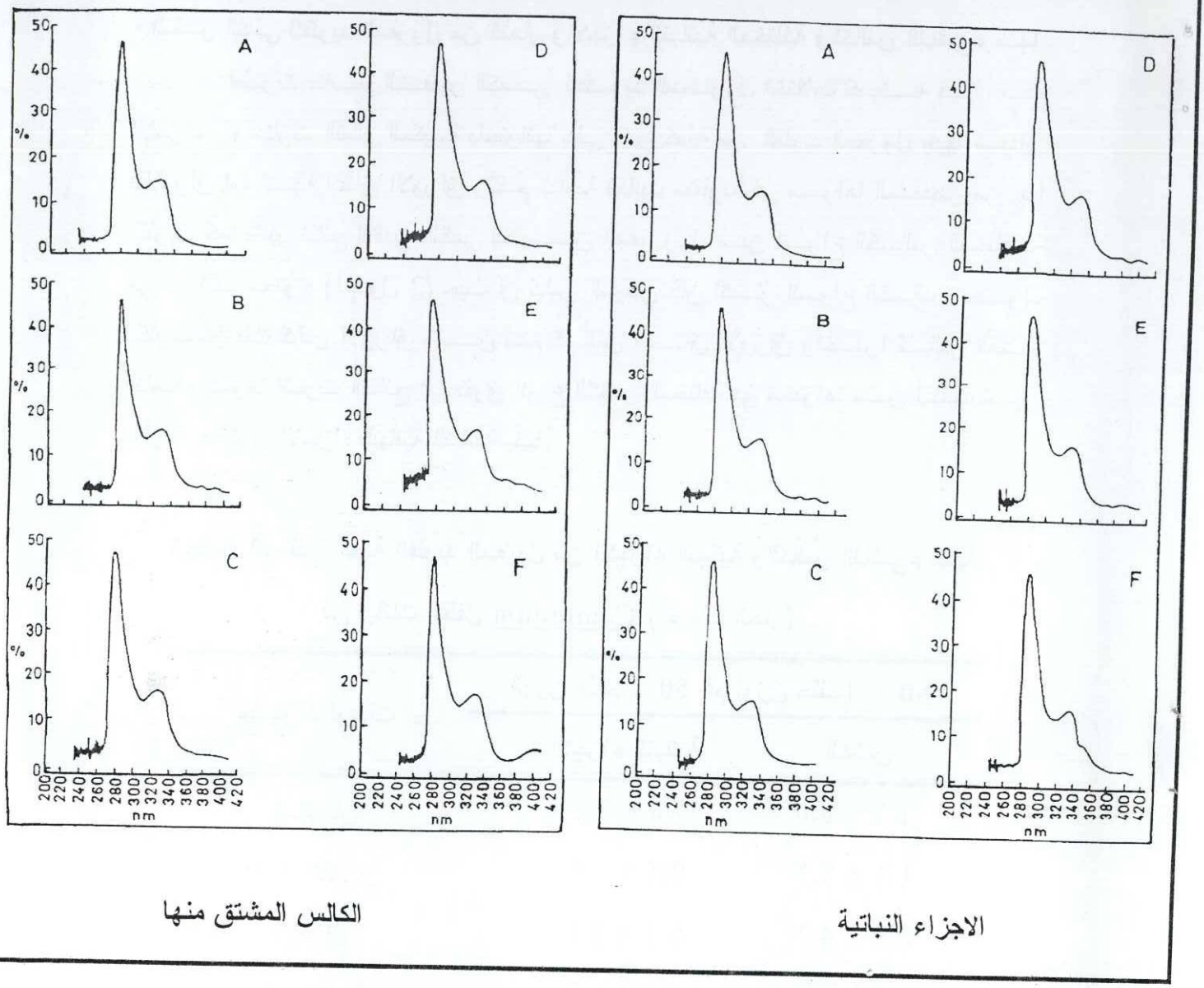
مصدر القلويدات	معدل مسافة الجريان (سم) ± (S D)	
	الاجزاء النباتية	الكالس
الكابسيسين القياسي (مقارنة)	0.80 ±0.002	0.80 ±0.002
الثمار	0.80 ±0.003	0.80 ±0.003
السيقان	0.80 ±0.005	0.80 ±0.003
اعناق الاوراق	0.80 ±0.007	0.80 ±0.008
الاوراق	0.80 ±0.009	0.80 ±0.009
القمم النامية	0.80 ±0.006	0.80 ±0.009

RF : معدل مسافة الجريان (Rate flow). SD : الأنحراف القياسي (Standard devation)

وظهر ايضا" تطابق معدلات مسافة جريان البقع المنفصلة من القلويدات المعزولة من انـــواع الكالس المختلفة مع معدل مسافة جريان بقعة المحلول القياسي لقلويد الكابسيسين (الجـــدول 1) واشارت هذه النتائج الى التطابق مع مثيلاتها التي تم الحصول عليها من البقع المنفصلة مـــن الثمار والاجزاء النباتية المختلفة مما يؤكد ان المركب المعزول هو قلويد الكابسيسين.

• **التشخيص النوعي للقلويد المعزول بتقدير درجة الامتصاص (λ max)**

اكدت نتائج التشخيص ان القلويد المعزول من الثمار والاجزاء النباتية المختلفـــة لـــه قمـــة الامتصاص عينها لاعلى طول موجـــي λ max (الشـــكل 2) اذ بلغـــت قمـــة الامتصـــاص 280 نانوميتر وهي مماثلة لقمة الامتصاص لأعلى طول موجي λ max لمحلول الكابسيســـين القياسي وتشير البيانات (الشكل 2) الى التماثل التام في قمة الامتصاص لاعلى طول موجـــي λ max للقلويد المعزول من انواع الكالس مع قمة الامتصاص لاعلى طول موجـــي لمحلـــول الكابسيسين القياسي فقد بلغت 280 نانوميتر وهي مطابقة تماما مع قمـــة امتصـــاص القلويـــد المعزول من الثمار والاجزاء النباتية المختلفة اذ ان الامتصاص حصل عند اعلى طول موجـــي وبصورة مماثلة لمنحنى الامتصاص للعينات المختبرة وتوكد هذه النتـــائج ثانيـــة ان القلويـــد المعزول هو الكابسيسين.



الشكل (2): درجات امتصاص القلويد المعزول من الثمار و الاجزاء النباتية (A) والكالس المشتق منها (B) لنباتات الفلفل *C. annuum* (الصنف الحار) مقاسة بالمطياف الفوتومتري UV Spectrophotometer .

A. المحلول القياسي لقلويد الكابسيسين (مقارنة)
B. الثمار
C. السيقان او كالسها
D. اعناق الاوراق او كالسها
E. الاوراق او كالسها.
F. القمم النامية او كالسها.

• **التقدير الكمي للقلويد المعزول من الثمار والاجزاء النباتية المختلفة والكالس الناشىء منها**

اظهرت نتائج التقدير الكمي للقلويد المعزول اختلاف كميته في هذه الاجزاء. وامتازت الثمار المكيسة باحتوائها على اكبر كمية من القلويد المعزول يليها السيقان فالاوراق اما انسجة اعناق الاوراق والقمم النامية فكانت متقاربة في محتواها المنخفض من هذا القلويد. كما تشير نتائج التقدير الكمي للكابسيسين المعزول من انواع الكالس المختلفة الى اختلاف محتواه (الجدول 2) حيث ان كالس السيقان كان اكثر انواع الكالس احتواءً للكابسيسين يليه كالس الاوراق ومن ثم كالس اعناق الاوراق واخيراً كالس القمم النامية.وعموما اشارت النتائج الى تفوق انواع الكالس المختلفة في محتواها من الكابسيسين مقارنة بمحتوى الاجزاء النباتية الناشئة منها.

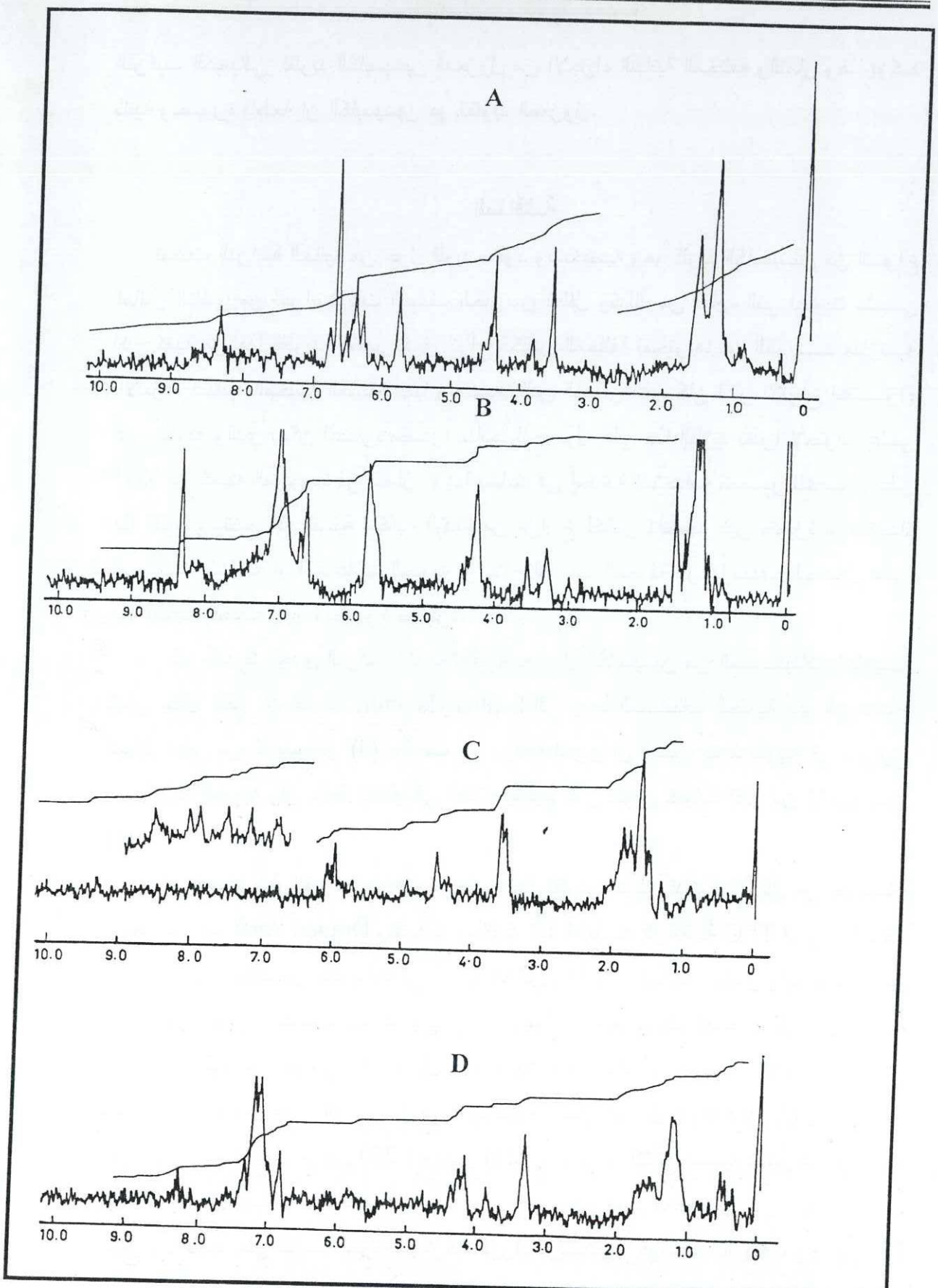
الجدول 2: تقدير كمية القلويد المعزول من الاجزاء النباتية والكالس الناشىء منها في نباتات الفلفل C. annuum (الصنف الحار).

مصدر القلويدات	الوزن ملغم / 50 غم (وزن جاف) ± SD	
	الاجزاء النباتية	الكالس
السيقان	3.2 ± 0.8	8.0 ± 1.7
اعناق الاوراق	1.8 ± 0.1	3.3 ± 1.1
الاوراق	2.4 ± 0.3	4.7 ± 0.9
القمم النامية	1.3 ± 2.3	2.6 ± 0.7
الثمار	25.0 ± 2.3	ـــــ

± SD : الأنحراف القياسي (Standard devation) ، (___) لم تختبر

(3) تحديد التركيب الكيميائي للقلويد المعزول بجهاز الرنين النووي المغناطيسي (NMR)

اكدت النتائج ان القلويد المعزول من ثمار الفلفل الحار ومن الاجزاء النباتية هو قلويد الكابسيسين ،كما اشارت النتائج ان القلويد المعزول من انواع الكالس هو قلويد الكابسيسين مع وجود اختلافات طفيفة في مستواه في العينات التي عزل منها (الشكل 3) وتؤكد هذه النتائج مرة أخرى تطابق التركيب الكيميائي للكابسيسين المعزول من انواع الكالس المختلفة مع



الشكل (3): التركيب الكيماوي لقلويد الكابسيسين القياسي (A) والمعزول من الثمار (B) الاجزاء النباتية (C) والكالس (D) لنباتات الفلفل *C. annuum* محددة بجهاز NMR.

التركيب الكيميائي لقلويد الكابسيسين المعزول من الاجزاء النباتية المختلفة والثمار وهذا يؤكد ثانية وبصورة قاطعة ان الكابسيسين هو القلويد المعزول.

المناقشة

تمكنت الدراسة الحالية من عزل قلويد منفرد وتشخيصه وهو قلويد الكابسيسين من انواع الكالس الناشئ من اجزاء نباتات الصنف الحار من الفلفل وكذلك من ثماره التي احتوت على اكبر كمية من هذا القلويد. وظهر تفوق انواع الكالس المختلفة بمحتواها من القلويد مقارنة بالاجزاء النباتية المختلفة المشتقة منها وخاصة كالس السيقان الذي كان اكثر الانواع احتواءً على القلويد والذي يمكن اعتباره مصدراً مناسباً للحصول على هذا القلويد نظراً لأحتوائه على 31% من كميته الموجودة في الثمار. وهذا يساعد في إمكانية استخدامه كمصدر للحصول على هذا القلويد. وتتيح هذه النسبة إمكانية الإفادة من مزارع الكالس كأنسجة غير متميزة او استخدام المستنبتات الخلوية او المفاعلات الحيوية او انتاج النباتات المحولة وراثياً بهدف الحصول على هذا القلويد بكميات اكبر وبصورة مستمرة.

لقد أشارت إحدى الدراسات المتعلقة بعزل الكابسيسين من المستنبتات الخلوية لثمار الفلفل الحار ان إضافة L-phenylalanine الى وسط المستنبتات الخلوية أدى الى إنتاج كميات أعلى من الكابسيسين (4). ولوحظ في دراسة اخرى ان الضوء يثبط تكوينه في مزارع المستنبتات الخلوية وان حفظ الخلايا في الظلام يشجع على تكوين كميات اكبر من الكابسيسين (5).

إن اعتماد الطرائق القياسية في تشخيص هذا القلويد، حيث أكدت نتائج كل من اختبار دراجن دورف Dragen dorff وتقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC في الكشف وتشخيص نوع واحد من القلويدات في أنسجة الكالس والأجزاء النباتية المشتق منها فضلاً عن وجوده في الثمار، واكدت بيانات تقدير الكابسيسين بالمطياف الفوتوميتري ان قيمة λ max لاعلى طول موجي كانت تماثل قيمة λ max في نتائج الدراسات الأخرى التي تمكنت من تشخيص قلويد الكابسيسين في انسجة ثمار الفلفل *C. annuum* بالمطياف الفوتوميتري عند طول موجي 280 نانوميتر (16). واظهرت النتائج الحالية تناظرها مع نتائج دراسات اخرى حيث تمكنت تلك الدراسات من عزل وتنقية قلويد الكابسيسين من ثمار الفلفل الحار بالاعتماد على تقنية الكروماتوكرافيا الورقية وباستخدام كواشف القلويدات وجهاز IR وجهاز المطياف الفوتوميتري (17)، كما اشارت نتائج التقدير الكمي للقلويد الى اختلاف كميته

باختلاف الجزء النباتي الذي عزل منه ، وجاءت نتائج جهاز الرنين النووي المغناطيسي NMR لتؤكد نهائياً وبصورة قاطعة ان الكابسيسين هو القلويد المعزول.

يستنتج من هذه الدراسة امكانية الافادة من مزارع كالس النباتات الطبية في الحصول على المركبات الفعالة ذات القيمة الدوائية أو العلاجية من نباتات الفلفل أو غيرها من النباتات. فعلى سبيل المثال تمكنت إحدى الدراسات من عزل مادتي الهايوسين (الاتروبين) والهايوسيامين (البسكوبان) من مزارع الكالس والنباتات الناتجة منه والتي أكدت أفضلية الكالس في محتواه من هاتين المادتين (18)، عليه تعد هذه الدراسة مشجعة جداً لاجراء دراسات اخرى على هذه النباتات أو نباتات طبية أخرى شائعة في البيئة العراقية من خلال تطويع هذه النباتات أو خلاياها لإنتاج هذه المواد بمستويات يمكن اعتمادها كمصادر رئيسية لتوفير هذه المواد من خلال استخدام المزارع المستمرة أو الحصول على النباتات المحولة وراثياً بهدف رفع مستويات هذه المواد فيها (9).

المصادر

1. حسين ، فوزي طه قطب. النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها. مطبعة دار المريخ للنشر، الرياض (1981)

2. Hesse M. Alkaloid Chemistry. John Wiley and Sons , INC. New York (1981).

3. Chakravarty H. L. Plant Wealth of Iraq (A dictionary of economic plants). Ministry of Agriculture and Agrarian Reform , Baghdad. Iraq (1976).

4. Salgado-Gareiglia R. and Ochoa-Alejo N. Plant Cell Repts. 8:617-620 (1990).

5. Weathers P. J. , Fadzillah N. A. M. and Cheetham R. D. Planta Med. 58 : 278-279 (1992).

6.Aranda F. J. , Villalain J. and Gomez-Fernandez J.C. Biochem. Biophys. Acta 123 : 225-234 (1995).

7.Cichewicz R.H. and Thorpe P. A. J. Ethnopharm. 52: 61-70 (1996).

8.Virus R.M. and Gebhart G.F. Life Sci. 25 : 1273 - 1284 (1979).

9. Vazquez-Olivencia W. , Shah P. and Pitchumoni C. S. J. Am. Coll. Nutr. 11 : 228-231 (1992).

10.Surh Y. J. and Lee S. S. Food Chem. Toxicol. 34 : 313-316 (1996).

11. اليوزبكي ، غادة شرف الدين ،الملاح ,مزاحم قاسم. مجلة ابحاث التقانة الحيوية العدد(2): 34-44 (2001).

12.Usmanghani K. , Najmussaqib Q. and Ahmad V. J. Chem. Soc. Pak. 4 : 285-287 (1982).

13. Kirchner J. G. Thin layer Chromatography. John Wiley and Sons, INC. New York (1967).

14.Wagner H. , Bladt S. and Zgainski E. M. Plant Drug Analysis. A Thin layer Chromatography Atlas. Springer. Verlage. Berlin (1984).

15. Svendsen A. B. and Verpoorte R. Chromatography of Alkaloids. Part A: Thin-layer Chromatography. Elsevier Scientific Publishing Company New York (1983).

16.Suzuki T. , Fujiwake H. and Iwai K. Plant & Cell Physiol. 21 : 839-853 (1980).

17.Roshchina V.V. , Ruzieva R. Kh. and Mukhin E. N. Appl. Biochem. Microbio. 22: 403 - 408 (1986).

18.Al-Mallah M. K. and Younis A. W., J. Educ. & Sci., 53: 59-72 (2001).