

6143 894 59

U.O.V.S. BIBLIOTEK

HIERDIE EKSEMPLAAR MAG ONDER
GEEN OMSTANDIGHEDEN UIT DIE
BIBLIOTEK VERWYDER WORD NIE

University Free State



34300001320443

Universiteit Vrystaat

Biokatalitiese komponente in sade van enkele spesies uit die families

Fabaceae en Caryophyllaceae

Verhandeling voorgelê ter vervulling van die
vereistes vir die graad

MAGISTER SCIENTAE

In die Fakulteit Natuur- en Landbouwetenskappe

Departement Plantwetenskappe

In samewerking met

die Departement Grond-, Gewas- en Klimaatwetenskappe

UNIVERSITEIT VAN DIE VRYSTAAT
BLOEMFONTEIN

deur

HELENA ALETTA DU PLESSIS

STUDIELEIER: PROF. J.C. PRETORIUS

MEDESTUDIELEIER: DR. G.P. POTGIETER

NOVEMBER 2002

INHOUDSOPGAWE

BLADSYE

HOOFSTUK 1: 1-3

Inleiding en rasionaal vir studie

HOOFSTUK 2: 4-28

Literatuurstudie

2.1	INLEIDING	4
2.2	Die familie Caryophyllaceae	7
2.2.1	Agtergrond, kenmerke en verspreiding van die familie Caryophyllaceae	7
2.2.2	Enkele genusse onder die familie Caryophyllaceae	8
2.2.2.1	<i>Dianthus</i>	8
2.2.2.2	<i>Pollichia</i>	9
2.2.2.3	<i>Silene</i>	9
2.2.2.4	<i>Stellaria</i>	9
2.3	Die familie Fabaceae	10
2.3.1	Subfamilie Mimosoideae	10
2.3.2	Subfamilie Caesalpinioideae	11
2.3.3	Subfamilie Papilionoideae	11
2.4	Die genus <i>Acacia</i> (Subfamilie Mimosoideae)	12

2.5	Algemene gebruike van die <i>Acacia</i> spesies	13
2.6	Fitochemiese en farmakologiese komponente	14
2.7	Plantgroeireguleerders	18
2.8	‘n Kommersiële biostimulant met brassinosteroïede as biokatalities aktiewe komponente	27

HOOFSTUK 3: 29-33

Algemene materiaal en metodes

3.1	INLEIDING	29
3.2	MATERIAAL	29
3.2.1	Plantmateriaal	29
3.2.2	Ander materiaal	30
3.3	METODES	30
3.3.1	Behandeling van saadmateriaal	30
3.3.2	Biotoetse	30
3.3.2.1	Biotoets 1: Effek van saadsuspensies op die respirasietempo van ‘n monokultuur gisselle	30
3.3.2.2	Biotoets 2: Effek van saadsuspensies op die ontkieming van Cress-sade en gevolglike saailinggroei	32
3.3.3	Vorbereiding van ru-saadekstrakte	32

HOOFSTUK 4:

34-50

Sifting ("screening") van wateroplosbare gemaalde

sade vir moontlike biokatalitiese aktiwiteit

4.1	INLEIDING	34
4.2	MATERIAAL EN METODEDES	36
4.2.1	Materiaal	36
4.2.2	Metodes	36
4.2.2.1	Vorbereiding van saadsuspensies	36
4.2.2.2	Biotoets 1:	36
4.2.2.3	Biotoets 2	37
4.3	RESULTATE	37
4.3.1	Effek van gemaalde, etanol behandelde saad- suspensies op die respirasietempo van 'n mono- kultuur gisselle	37
4.3.2	Effek van gemaalde, etanol behandelde saad- suspensies op die ontkieming van Cress-saad	41
4.3.3	Effek van gemaalde, etanol behandelde saad- suspensies op die wortelgroei in jong Cress- saailinge	43
4.3.4	Effek van gemaalde, etanol behandelde saad- suspensies op koleoptielgroei in jong Cress- saailinge	45

4.4	BESPREKING	47
HOOFSTUK 5:		51-61
Aktiwiteitsgerigte fraksionering van 'n		
<i>Acacia erioloba</i> ru- saadekstrak		
5.1	INLEIDING	51
5.2	MATERIAAL EN METODEDES	52
5.2.1	Materiaal	52
5.2.2	Metodes	52
5.2.2.1	Vorbereiding van die ru-ekstrak	52
5.2.2.2	Fraksionering van 'n <i>A. erioloba</i> ru- saadekstrak met behulp van vloeistof-vloeistof ekstraksie	52
5.2.2.3	Kwalitatiewe dunlaag chromatografie (K-TLC)	53
5.2.2.4	Biotoetse	54
5.3	RESULTATE	55
5.3.1	TLC profiel van komponente teenwoordig in 'n <i>Acacia erioloba</i> ru-saadekstrak wat met behulp van 'n vloeistof-vloeistof ekstraksie prosedure gefraksioneer is	55
5.3.2	Effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van <i>Acacia erioloba</i> sade op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle	58

5.3.3	Effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van <i>Acacia erioloba</i> sade op die ontkieming van Cress-saad	62
5.3.4	Effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van <i>Acacia erioloba</i> sade op die wortelgroei van jong Cress-saailinge	64
5.3.5	Effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van <i>Acacia erioloba</i> sade op die koleoptielgroei van jong Cress-saailinge	665
5.4	BESPREKING	66

HOOFSTUK 6: 69-89

**Isolering, suiwering en identifisering van 'n
biokatalities aktiewe komponent uit die etielasetaat
fraksie van 'n *A. erioloba* saadekstrak**

6.1	INLEIDING	69
6.2	MATERIAAL EN METODEDES	70
6.2.1	Materiaal	70
6.2.2	Metodes	70
6.2.2.1	Kolomchromatografiese fraksionering van die aktiewe etielasetaat fraksie	70
6.2.2.2	Preparatiewe dunlaag chromatografiese (P-TLC)	71

	suiwering van komponente in die bioaktiewe gekombineerde kolomfraksies	
6.2.2.3	Identifisering van die groep chemikalieë waaraan gesuiwerde komponente behoort	73
(a)	Alkaloïde	73
(b)	Antraseen derivate	73
(c)	Terpenoïede	74
(d)	Kardiale glikosiede	74
(e)	Fenole	75
(f)	Flavonoïede	75
(g)	Steroïede	76
6.2.2.4	Kernmagnetiese resonans spektroskopie (KMR)	76
6.2.2.5	Biotoetse	76
6.3	RESULTATE	77
6.3.1	TLC-profiel van komponente in dertien gekombineerde semi-gesuiwerde kolom- chromatografiese fraksies van 'n <i>A. erioloba</i> etielasetaat ekstrak wat vooraf met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is	77
6.3.2	Biotoetse uitgevoer met suiwer molekule 4	82
6.3.3	Kernmagnetiese resonans (KMR) spektroskopiese identifikasie van die chemiese struktuur van	85

	komponent 4	
6.3.3.1	Volledige KMR spektrum van komponent 4	85
6.3.3.2	Gedetailleerde profiele in spesifieke areas van die KMR spektrum	85
6.3.3.3	Interpretasie van spektra	86
6.3.3.4	Chemiese struktuur en naam van die gesuiwerde komponent 4	86
6.4	BESPREKING	87
HOOFSTUK 7:		90-96
Algemene Bespreking		
BYLAE		97-99
	• KLEURREAGENSE	97
	• DIELEKTRIESE KONSTANTES	99
BEDANKINGS		100
OPSOMMING		101-102
SUMMARY		103-104
VERWYSINGS		105-113

LYS VAN FIGURE

HOOFSTUK 2:

- FIGUUR 2.1: 26
Algemene A- en B-ringstrukture van Brassinosteroïede

HOOFSTUK 3:

- FIGUUR 3.1: 31
Respirometer wat gebruik is om die effek van
saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur
gisselle te bepaal

HOOFSTUK 4:

- FIGUUR 4.1: 38
Die effek van verskillende konsentrasies *Acacia karroo*
saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur
Saccharomyces cerviseae selle. ComCat[®] en water het as
kontroles gedien
- FIGUUR 4.2: 39
Die effek van verskillende konsentrasies *Acacia erioloba*
saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur

Saccharomyces cerevisiae selle. ComCat[®] en water het as
kontroles gedien.

FIGUUR 4.3:

40

Die effek van verskillende konsentrasies *Dianthus basuticus*
saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur
Saccharomyces cerevisiae selle. ComCat[®] en water het as
kontroles gedien

FIGUUR 4.4:

41

Die effek van verskillende konsentrasies *Pollichia campestris*
saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur
Saccharomyces cerevisiae selle. ComCat[®] en water het as
kontroles gedien.

FIGUUR 4.5 A:

42

Die effek van 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies van gemaalde,
etanol behandelde saadsuspensies van vier verskillende plant-
spesies op die ontkieming van Cress-sade. Water en
ComCat[®] het as kontroles gedien

FIGUUR 4.5 B:

43

Die effek van 0.05 en 0.5 mg L⁻¹ konsentrasies van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies van vier verskillende plantspesies op die ontkieming van Cress-sade. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien

FIGUUR 4.6 A:

44

Die effek van 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies van vier verskillende plantspesies op wortelgroei in Cress-saailinge. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien

FIGUUR 4.6 B:

45

Die effek van 0.05 en 0.5 mg L⁻¹ konsentrasies van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies van vier verskillende plantspesies op wortelgroei in Cress-saailinge. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien

FIGUUR 4.7 A:

46

Die effek van 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies van vier verskillende plantspesies op die koleoptielgroei in Cress-saailinge. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien

FIGUUR 4.7 B:

47

Die effek van 0.05 en 0.5 mg L⁻¹ konsentrasies van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies van vier verskillende plant-spesies op die koleoptielgroei in Cress-saailinge. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien

HOOFSTUK 5

PLAAT 5.1:

55

Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in die ru-ekstrak van *Acacia erioloba* wat met behulp van 'n vloeistof-vloeistof ekstraksie gefraksioneer is

FIGUUR 5.1:

58

Die effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle (*Saccharomyces cerevisiae*) toegedien teen 'n konsentrasie van 50 mg L⁻¹. Water en ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasie van 50 mg L⁻¹, het as kontroles gedien

FIGUUR 5.2:

59

Die effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies

van *A. erioloba* sade op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle (*Saccharomyces cerviseae*) toegedien teen 'n konsentrasie van 5 mg L^{-1} . Water en ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasie van 5 mg L^{-1} , het as kontroles gedien

FIGUUR 5.3:

60

Die effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle (*Saccharomyces cerviseae*) toegedien teen 'n konsentrasie van 0.5 mg L^{-1} . Water en ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasie van 0.5 mg L^{-1} , het as kontroles gedien

FIGUUR 5.4:

61

Die effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle (*Saccharomyces cerviseae*) toegedien teen 'n konsentrasie van 0.05 mg L^{-1} . Water en ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasie van 0.05 mg L^{-1} , het as kontroles gedien

FIGUUR 5.5 A:

62

Die effek van 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies van vier verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sad op die ontkieming van Cress-saad. Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasies, het as kontroles gedien

FIGUUR 5.5 B:

63

Die effek van 0.05 en 0.5 mg L⁻¹ konsentrasies van vier verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op die ontkieming van Cress-saad. Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasies, het as kontroles gedien

FIGUUR 5.6:

64

Die effek van 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies van vier verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op wortelgroei in Cress-saailinge. Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasies, het as kontroles gedien

FIGUUR 5.7 A:

65

Die effek van 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies van vier verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op koleoptielgroeï van Cress-saailinge. Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasies, het as kontroles gedien

FIGUUR 5.7 B:

66

Die effek van 0.05 en 0.5 mg L⁻¹ konsentrasies van vier verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op koleoptielgroeï van Cress-saailinge. Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasies, het as kontroles gedien

HOOFSTUK 6

PLAAT 6.1:

77

Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in 'n etielasetaat fraksie van *A. erioloba* wat vooraf met behulp van vloeistof-vloeistof fraksionering van die saadekstrak bekom is en verder kolomchromatografies geskei is

PLAAT 6.2:	79
K-TLC skeiding van 'n konsentrasiereeks van fraksie 4 ten einde die graad van suiwerheid van die fraksie te toets	
PLAAT 6.3:	80
K-TLC skeiding van 'n konsentrasiereeks van fraksie 6 ten einde die graad van suiwerheid van die fraksie te toets	
FIGUUR 6.1:	82
Die effek van komponent 4 wat uit sade van <i>Acacia erioloba</i> geïsoleer en gesuiwer is op die ontkieming van Cress-sade oor 'n tydperk van 96 uur teen 'n konsentrasie van $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Water en ComCat [®] het as kontroles gedien	
FIGUUR 6.2:	83
Die effek van komponent 4 wat uit sade van <i>Acacia erioloba</i> geïsoleer en gesuiwer is op die wortelgroei van Cress-saailinge oor 'n tydperk van 96 uur teen 'n konsentrasie van $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Water en ComCat [®] het as kontroles gedien	
FIGUUR 6.3:	84
Die effek van komponent 4 wat uit sade van <i>Acacia erioloba</i>	

geïsoleer en gesuiwer is op die koleoptielgroei van Cress-saai-
linge oor 'n tydperk van 96 uur teen 'n konsentrasie van
50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien

LYS VAN TABELLE

HOOFSTUK 5:

TABEL 5.1: 57

Rf-waardes van komponente in 'n metanoliese ru-saadekstrak van *Acacia erioloba* wat met behulp van vloeistof-vloeistof ekstraksie gefraksioneer is

HOOFSTUK 6:

TABEL 6.1: 78

Persentasie ontkieming en wortelgroei van Cress-saailinge na 96 h inkubering by 25 °C in die teenwoordigheid van 50 µg L⁻¹ van elk van die gekombineerde kolomchromatografie fraksies van 'n semi-gesuiwerde *A. erioloba* etielasetaat ekstrak

TABEL 6.2: 81

Identifisering van die groep chemikalieë waaraan komponente wat uit 'n etielasetaat fraksie van *Acacia erioloba* saad geïsoleer en gesuiwer is behoort deur van kleurreagense (Wagner & Blatt, 1996) gebruik te maak

LYS VAN AFKORTINGS

BL:	brassinolied
BRs:	brassinosteroïede
CO ₂ :	koolstofdiksied
CS:	kastasteroon
DC:	dielektriese konstantes
DEHP:	di-etielheksielftalaat
ETOH:	etanol
FeCl ₃	ysterchloried
GA ₃ :	gibberelliensuur
H ₂ SO ₄ :	swaelsuur
IAA:	indoolasynsuur
KMR:	kernmagnetiese resonans spektroskopie
KOH:	kaliumhidroksied
K-TLC:	kwalitatiewe dunlaagchromatografie
MEHP:	mono-etielheksielftalaat
MeOH:	metanol
NaOH:	natriumhidroksied
NP/PEG:	natuurlike produk-polietileenglikol reagens
P-TLC:	preparatiewe dunlaagchromatografie
PR-proteïene:	“pathogenesis related proteins”

Hoofstuk 1

Inleiding en Rasionaal vir die studie

Ten spyte daarvan dat plante as uitstekende bron van biologies aktiewe natuurlike produkte beskou word, moet die planteryk steeds gesien word as 'n grotendeels onbenutte bron van fitochemikalieë of sekondêre metaboliete. Hostettman en Wolfender (1997) het aangedui dat minder as 10% van die hoërplant spesies op aarde vir biologiese aktiwiteit getoets is en in die meeste gevalle ook net vir 'n enkele aktiwiteit. In hierdie studie is die klem geplaas op die allelopatiese effek wat plante in die natuur op mekaar kan uitoefen en dan spesifiek met betrekking tot groeistimulering en / of – inhibering. Hierna word verwys as biokatalitiese aktiwiteit.

Die rasionaal vir hierdie benadering lê opgesluit in 'n stelling van Ting (1982), naamlik dat dit vir die mens 'n reuse stap vorentoe sal wees indien die tegnologie om plantegroei te beheer ontwikkel kan word en dan veral om verskillende stadiums van ontwikkeling by gewasse te minimaliseer of te maksimaliseer tot voordeel van die mens.

Plante groei en ontwikkel op 'n georganiseerde en 'n geregleerde manier. Hierdie georganiseerde groei word op verskeie maniere deur die abiotiese omgewing, maar ook deur ander lewende organismes of die biotiese omgewing, beïnvloed of selfs geregleer. Een van die belangrikste groeibeherende sisteme wat in die plantwêreld aangetref word is dié van plantgroeireguleerders. 'n Plantgroeireguleerder word tradisioneel gedefinieer as 'n organiese middel wat in die plant vervaardig word en instaat is om teen lae konsentrasies groei te stimuleer, te inhibeer of kwalitatief te modifiseer (Hill, 1980). Alle bekende planthormone voldoen aan hierdie definisie, maar die moontlikheid bestaan dat ander sekondêre metaboliete ook by groeiregulering in plante betrokke kan wees (Ramirez *et al.*, 2000).

Die identifikasie en suiwering van sekondêre metaboliete en ook die vermoë om hul spesifieke fisiologiese en biochemiese biokatalitiese aktiwiteite in die landbou- en kwekerybedryf toe te pas ten einde gewasproduksie biochemies oor die korttermyn te manipuleer, hou groot potensiaal vir die toekomstige voorsiening van voedsel aan 'n groter wordende wêreldbevolking in (Roberts en Hooley, 1988). In hierdie verband is waargeneem dat die meeste plante in 'n spesifieke streek in die suide van Duitsland naby Heidelberg, weens onbekende stremmingsoorsake afgesterf het terwyl slegs spesies van die families Fabaceae en Caryophyllaceae oorleef het (Maxiplant, Duitsland; persoonlike mededeling). Laasgenoemde dui daarop dat spesies uit hierdie twee families waarskynlik geneties aangepas was om die onbekende stremmingsituasie te oorleef. Genetiese aanpassing impliseer egter dat spesifieke chemiese reaksies in een spesie gestimuleer kan word terwyl dit nie die geval in nie-aangepaste spesies is nie. Dit bring waarskynlik mee dat sekere fitochemikalieë (sekondêre metaboliete en/of plantgroeistimuleerders) in die aangepaste spesies se samestelling voorkom terwyl dit afwesig is in die nie-aangepaste spesies.

Die vraag was, in die lig van hierdie moontlike aanpassingsverskille en op grond van moontlike verskille in chemiese samestellings, of die nie-aangepaste plant gemanipuleer kon word met 'n ekstrak van die beter aangepaste plant ten einde eersgenoemde se kans op oorlewing te verhoog. 'n Steekproef behandeling van die nie-aangepaste Europese plante met 'n ru-ekstrak van die aangepaste plante het hierdie vermoede bevestig (Maxiplant, Duitsland; persoonlike mededeling) en aanleiding gegee tot verdere navorsing. Intussen is 'n natuurlike produk, ComCat[®], deur twee maatskappye in Duitsland, te wete Maxiplant en Agraforum, ontwikkel en geregistreer. Daar is eksperimenteel aangetoon dat hierdie natuurlike produk wortelontwikkeling by saailinge stimuleer, natuurlike weerstand teen siektes verhoog en ook tot hoër oesopbrenge by landbougewasse aanleiding kan gee.

In die lig daarvan dat ComCat[®] uit saadmateriaal geproduseer is, is saadsuspensies van enkele Suid-Afrikaanse plantspesies van die families Fabaceae en Caryophyllaceae in hierdie studie vir soortgelyke biokatalitiese aktiwiteit getoets. Dit is ook in die vooruitsig gestel om, indien biokatalitiese aktiwiteit wel in een of meer van hierdie spesies waargeneem sou word, die komponent of komponente verantwoordelik vir die aktiwiteit te isoleer, te suiwer en te identifiseer.

Hoofstuk 2

Literatuurstudie

2.1 Inleiding

Plante bevat chemiese komponente wat 'n belangrike regulerende rol vervul by die aktivering of inhibering van metaboliese reaksies. Hieronder sorteer bekende stowwe soos ensieme en hormone. Hierbenewens bevat plante ook sekondêre metaboliete, wat ten opsigte van hulle funksies in die plant, minder bekend is as die primêre metaboliete. Dit is veral sekondêre metaboliete wat oor die afgelope 20 jaar die verbeelding van plantkundiges en landboukundiges aangegryp het vanweë die verskeidenheid van eienskappe wat reeds in die literatuur opgeteken is. Hieronder sorteer sekondêre metaboliete met antibakteriese (Rabe en van Staden, 1997), antifungale (Afolayan en Meyer, 1997), onkruidodende (Kim *et al.*, 1993), en insekdodende (Richter en Koolman, 1991) eienskappe.

Bioaktiewe komponente afkomstig van plante staan bekend as fitochemikalieë wat 'n toenemende belangrike rol in die voortbestaan van die mens kan speel en wel op verskeie fronte (Nigg en Seigler, 1992). Verskeie bioaktiewe komponente is al uit spesies van die familie Fabaceae geïsoleer (Harborne, 1994). Van hierdie Komponente het hulle ontstaan gekry deur die biologiese en ekologiese interaksie wat daar tussen 'n plant en sy omgewing bestaan en word bykans almal na verwys as sekondêre metaboliete omdat hulle sintese buite die normale primêre metaboliese weë geskied. Sekondêre metaboliete besit die potensiaal om in 'n gesuiwerde of ru-ekstrak vorm deur die mens as kommersiële natuurlike produkte in die landbou asook farmaseutiese praktyke toegepas te word (Rizvi en Rizvi, 1992). Dit is juis hierdie potensiaal wat tot hierdie studie aanleiding gegee het.

Met verloop van miljoene jare het natuurlike seleksie aanleiding gegee tot die ontstaan van verskillende primêre metaboliese weë, soos respirasie en fotosintese, maar ook sekondêre metaboliese weë soos die mevaloonsuur- en sjikeimiensuur reaksieweë. Uiteraard moes hierdie dinamiese chemiese en biologiese evolusie ook aanleiding gegee het tot die ontstaan van nuwe eindprodukte wat vanuit 'n allelopatiese oogpunt vir sommige organismes voordelig maar vir ander nadelig kon wees (Rizvi en Rizvi, 1992).

Allelopatie verwys na die sintese en vrystelling van allelochemikalieë deur een plant aan die omgewing wat 'n voor- of nadelige uitwerking op ander plante in die omgewing kan uitoefen (Rizvi en Rizvi, 1992). Maar, allelochemikalieë wat voordelig vir een plant kan wees deur byvoorbeeld by te dra tot die beskerming van die organisme teen plaë of siektes, kan terselfdertyd nadelig wees vir 'n ander plant in die onmiddellike omgewing. Verder kan toksiene met nadelige gevolge vir die mens en dier ook op 'n evolusionêre wyse hul ontstaan gekry het. Mens en dier het geleer om hierdie plante as voedselbronne te vermy, maar 'n belangstelling in nuwe toepassings van bioaktiewe komponente uit plante, wat toksiene insluit, is vandag aan die orde van die dag (Rizvi en Rizvi, 1992).

Volgens Rizvi en Rizvi (1992) kan die bestudering van beide die biologie en chemie van organismes betrokke by biologiese interaksies inligting verskaf oor die meganismes van biologiese kommunikasie en kan dit ook leidrade verskaf vir die ontdekking van nuwe bruikbare natuurlike produkte wat in geneeskundige- en landboupraktyke toegepas kan word. Hierdie tipe navorsing behoort 'n hoër prioriteit as in die verlede te geniet (Rizvi en Rizvi, 1992).

Die feit dat medisinale plante die ruggraat van tradisionele geneeskunde vorm en plante reeds in onderontwikkelende lande in die landbousektor as plaag- en siektewerende middels gebruik word,

beteken dat miljoene mense druk op natuurlike plantbevolkings plaas (Wiley en Chichester, 1994). Dit blyk dus uiters noodsaaklik te wees om in belang van hierdie gedeelte van die bevolking, maar ook in belang van die ekologiese bewaring van die natuur, plante met bogemiddelde potensiaal te identifiseer en ook hulle agronomiese vereistes te ontsyfer ten einde hulle potensiaal as alternatiewe gewasse te evalueer. Laasgenoemde het die rasonaal vir die studie van die biokatalitiese aktiwiteite wat moontlik in spesies van die families Fabaceae en Caryophyllaceae opgesluit is, verskaf.

In hierdie studie is egter klem gelê op die minder bekende eienskap van onbekende fitochemikalieë naamlik die biokatalitiese eienskap. Alhoewel geen amptelike definisie vir die term “biokatalities” in die literatuur opgespoor kon word nie, het Mathews en van Holde (1996) die term gebruik en die stelling gemaak dat die meeste komponente in plante met biokatalitiese eienskappe proteïene is (ensieme en/of hormone). Hieruit kan die afleiding gemaak word dat die term ‘biokatalities’ verwys na daardie fitochemikalieë wat instaat is om die metabolisme van dieselfde plant of ‘n ander plant in sy omgewing te manipuleer. Laasgenoemde beskrywing herinner aan die definisie vir allelopatie naamlik die sintese en vrystelling van allelochemikalieë deur een plant aan die omgewing wat ‘n voor- of nadelige uitwerking op ander plante in die omgewing kan hê (Rizvi en Rizvi, 1992). Die term biokatalities, soos in hierdie monografie gebruik, beklemtoon egter die voordelige effekte wat een plant op ‘n ander kan uitoefen en dus manipuleringsaspek te beskryf is die term “biostimulant”. In hierdie monografie sal die term “biokatalities” egter gebruik word.

Roth *et al.* (2000) het die indusering van natuurlike weerstand teen die swam *Sphaerotheca fuliginea* [Schlecht ex. Fr.] Poll in komkommers deur ‘n ekstrak van *Lychnis viscaria* beskryf. Die oënskynlike meganisme behels die indusering van die PR-proteïene (‘pathogenesis-related proteins’) peroksidase, chitinase en β -1,3-glukanase wat swaminfeksies in plante teenwerk. Hierdie

is 'n verteenwoordigende voorbeeld van die term 'biokatalities', soos hierbo uiteengesit, asook die toepassing daarvan.

In hierdie studie is daar gesoek na die moontlike biokatalitiese aktiwiteit in sade van twee spesies uit elk van die families Caryophyllaceae en Fabaceae. *Acacia erioloba* en *Acacia karroo* uit die familie Fabaceae en *Dianthus basuticus* en *Pollichia campestris* uit die familie Caryophyllaceae is as verteenwoordigende spesies vir hierdie ondersoek gekies. Hierdie twee families is gekies op grond van 'n persoonlike mededeling (Hüster, Agraforum, Duitsland).

2.2 Die Familie Caryophyllaceae

Die Caryophyllaceae is een van 14 families, wat onder die orde Caryophyllales ressorteer, en wat nagenoeg 10 000 spesies verteenwoordig (Mauseth, 1991). Die families Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae en Portulacaceae is, buiten die Caryophyllaceae, van die bekendste families in die orde (Mauseth, 1991). Alhoewel geen familie oorheersend is nie, sluit die Caryophyllaceae, Aizoaceae en Cactaceae byna twee derdes van die spesies in die orde in (Cronquist, 1981). Die verskillende families van die orde Caryophyllales word sterk verbind deur morfologiese modifikasies en biochemiese eienskappe (Mauseth, 1991).

2.2.1 Agtergrond, kenmerke en verspreiding van die familie Caryophyllaceae

Die familie Caryophyllaceae, wat ook as die Pienk familie bekend staan, bestaan uit nagenoeg 70 genera en 1 750 spesies (Zomlefer, 1994). Spesies word primêr in die noordelike matige temperatuur gebiede van die wêreld aangetref, is volop in die Mediterreense gebiede en skaarser in die suidelike halfronde (Zomlefer, 1994).

Dit is moontlik om die familie Caryophyllaceae in subfamilies te verdeel op grond van die voorkoms van die steunblare, versmelting van die kelkblare en die morfologie van die kroonblare. Kenmerkende eienskappe van die een- of meerjarige kruide in die familie is vurksgewyse vertakking en teenoorstaande, afwisselende of kransgewyse blaarrangskikking. Blare kan sittend of nie-sittend wees (Zomlefer, 1994).

Die blomme van die Caryophyllaceae is meesal eenslagtig, maar soms tweeslagtig. 'n Kransgewyse periant of kelk- en kroonblare kom voor. Kroonblare en meeldrade is teenwoordig in veelvoude van 5 (Mauseth, 1991) en 'n bostandige vrugbeginsel met vrye style is die algemeenste. Vrugte is meestal kapsules wat in soveel dele of twee keer soveel dele as die getal style teenwoordig verdeel kan wees. Die vrug kan 'n bessie of 'n dopvrug wees terwyl die vorm van die sade ook kan varieer (Dyer, 1963).

2.2.2 Enkele genusse onder die familie Caryophyllaceae

2.2.2.1 *Dianthus*

Die genus *Dianthus* bestaan uit 300 spesies wat veral in Europa, Asië en Afrika voorkom. Sewentien spesies kom wydverspreid in Suid-Afrika voor. Die plante is meer- of eenjarige kruide, gepluim en effens houtagtig na onder. Blare is teenoorstaande en smal. Die blomme kom voor in 'n terminale pluim van byskerms. Twee of meer skutblare, ferm, fyn gestreep en 5-tandig omring die blomkelk by die basis. Vyf kroonblare wat getand of gelob is word aangetref. Tien lang, dun meeldrade is kenmerkend. Die vrugbeginsel is eenhokkig met 2 style wat net so lank of langer as die vrugbeginsel kan wees. Die vrug, 'n eivormige tot sillindriese kapsule wat geopen word deur 4 kleppies, is 'n taksonomiese kenmerk. Sade is bolvormig tot eivormig en kompak (Dyer, 1963).

2.2.2.2 *Pollichia*

Hierdie genus word oor die grootste deel van Afrika aangetref en vertoon as 'n grys-groen bos. Vrugte besit 'n wit tot geel kleur. Die vrugte is eetbaar vir mens en dier en 'n tee konkoksie van *Pollichia* word deur verskeie volkere in Afrika gebruik (Zomlefer, 1994).

2.2.2.3 *Silene*

Die genus verteenwoordig 500 spesies wêreldwyd waarvan 14 in Suid-Afrika voorkom. *Silene* is 'n meer- of eenjarige kruid wat kruipend, versprei of gepluim voorkom en inseketende eienskappe besit (Cronquist, 1981). Die blare is teenoorstaande gerangskik en die blomme besit 5 kroonblare wat in die blombodem ingebed is. 'n Lang 'vangarm' en 'kruisarm' kom ook voor en 5 van die 10 meeldrade, teenoor die kroonblare, is soms aan die lang vangarm geheg.

Die vrugbeginsel kom voor op 'n lang ginofoor en is kenmerkend eenhokkig of driehokkig. Twee tot vyf, maar meestal 3 style met dieselfde lengte en slegs in uitsonderlike gevalle langer as die vrugbeginsel, kom voor. 'n Kapsule wat open by die terminale gebied en in 3 tot 6 gedeeltes verdeel, is die kenmerkende vrug. Die sade vertoon netvormig of knopperig en besit 2 vlerke (Dyer, 1963).

2.2.2.4 *Stellaria*

Die genus *Stellaria* bestaan uit 100 spesies, kom wêreldwyd voor maar slegs een spesie, naamlik *Stellaria media*, word in Suid-Afrika aangetref. Die plant is 'n delikate, meer- of eenjarige kruid wat vrylik vertak. *Stellaria* se blare is teenoorstaande, sittend of nie-sittend en plat. Die bloeiwyse is 'n tipiese byskerm en die blom bestaan uit vyf kelk- en kroonblare wat diep gevurk is. 'n Eenhokkige vrugbeginsel, vyf meeldrade en drie style is aanwesig. Die vrug is ook 'n kapsule wat in 6 dele verdeel (Zomlefer, 1994).

2.3 Die familie Fabaceae: Kenmerke, habitat en verspreiding

Die familie Fabaceae bestaan uit 630 genusse en 18 000 spesies (Zomlefer, 1994) en is die tweede grootste van al die bestaande blomplantfamilies. Wêreldwye verspreiding is kenmerkend. Die familie word in drie nou verwante subfamilies verdeel naamlik Mimosoideae, Caesalpinioideae en Papilionoideae alhoewel dit deur sommige taksonome as een familie beskou word (Van der Schijff, 1985).

2.3.1 Subfamilie Mimosoideae

Die Mimosoideae bestaan uit 40 genusse en 2 500 spesies. Bekende genusse sluit in: *Acacia* (die genus waarop klem gelê sal word in hierdie studie), *Albizia*, *Calliandra* en *Mimosa* (Zomlefer, 1994). Hierdie subfamilie kom hoofsaaklik in tropiese en subtropiese gebiede voor en word as die primitiefste familie van die orde beskou (Van der Schijff, 1985).

Plante van die Mimosoideae is gewoonlik bome of struik met blare wat dubbelveervormig saamgesteld en spiraal of kransgewys gerangskik is. Stipules kom voor wat tot dorings gewysig is.

Die bloeiwyse is 'n raseem, spika of kapitolium. Tweeslagtige polissimmetriese blomme is kenmerkend van die subfamilie (Cronquist, 1981). Kelk- en kroonblare wissel van drie tot ses wat vry of vergroei kan wees. 'n Bostandige vrugbeginsel kom meestal voor en word deur 'n ginofoor uitgedra. Stuifmeel wat in tetraades voorkom is kenmerkend en die vrug is 'n een-of meersadige peul (Zomlefer, 1994). 'n Tiperende kenmerk van hierdie subfamilie is polissimmetriese blomme en 'n groot aantal meeldrade (Van der Schijff, 1985).

2.3.2 Subfamilie Caesalpinioideae (“Bird-of-paradise”)

Die Caesalpinioideae bestaan uit 150 genusse en nagenoeg 2 700 spesies. Die belangrikste genusse in die subfamilie is *Bauhinia*, *Caesalpinia*, *Cassia*, *Cercis*, *Delonix*, *Gleditsia*, *Parkinsonia* en *Senna* (Zomlefer, 1994) en kom wydverspreid in tropiese en subtropiese gebiede voor (Van der Schijff, 1985).

Die plante van die Caesalpinioideae is meestal bome. Blare is veervormig saamgesteld, spiraal- of kransgewys gerangskik met stipule. Bloeiwyses is ‘n raseem, spika of ‘n byskerm. Die blomme is tweeslagtig, monosimmetries en pentasiklies. Die periant is in ‘n kelk en ‘n kroon gedifferensieer. Vyf kelkblare, wat vry of vergroei is kom voor, terwyl vyf vry kroonblare aanwesig is.

Die agterste kroonblaar kom dakpansgewys met stygende estivasie voor en staan as die vlag bekend. Twee meeldraadkranses, bestaande uit vyf meeldrade elk, kom by die subfamilie voor. ‘n Bostandige vrugbeginsel word aangetref. ‘n Ginofoor word in die subfamilie goed uitgebeeld. Die vrug is ‘n 2 of meersadige peul (Zomlefer, 1994). Stuifmeelkorrels word as enkelgroepe aangetref. Die Caesalpinioideae is ekonomies belangrik vir timmerhout (*Bauhinia* spp), gom (*Burkea* spp), as ‘n plaasvervanger vir koffie (*Cassia* spp) en ook as veevoer (*Gleditschia* spp) (Zomlefer, 1994).

2.3.3 Subfamilie Papilionoideae

Die Papilionoideae is die grootste van die 3 subfamilies, bestaan uit 429 genusse en 12 615 spesies en kom wêreldwyd voor. ‘n Paar belangrike genusse van die subfamilie is *Astragalus*, *Baptisia*, *Crotalaria*, *Lupinus*, *Phaseolus* en *Pisum* (Zomlefer, 1994). Morfologies is die groeivorm van plante in hierdie familie baie uiteenlopend en kan bome, struik of een- of meerjarige kruide wees (Cronquist, 1981). Blare is veervormig saamgesteld, spiraals of kransgewys gerangskik met stipule. Die bloeiwyse is meestal ‘n raseem terwyl blomme tweeslagtig, monosimmetries en pentasiklies is.

Die periant is in 'n kelk en kroon gedifferensieer. Die vyf kelkblare is vry of vergroei terwyl die vyf kroonblare vry kan wees of die agterste twee kan in 'n vlag vergroei. Die vlag is die sterkste ontwikkel en vou oor sydelingse parallel geplaasde kroonblare, naamlik die vlerke. 'n Kiel word gevorm wanneer die vlerke oor die 2 voorste kroonblare, wat aan hul voorkante vergroei kan wees, vou (Zomlefer, 1994).

Meestal tien maar soms vyf tot nege meeldrade, wat vry of vergroei kan wees, word in hierdie familie aangetref. 'n Bostandige vrugbeginsel wat deur 'n ginofoor uitgedra word is tipies vir hierdie subfamilie. Die vrug is 'n peul wat tydens rypheid langs 2 nate oopspring (Van der Schijff, 1985).

Die Papilionoideae is ekonomies belangrik as timmerhout (*Virgilla* spp.), veevoer (*Lupinus* spp.) en olie (*Glycine* spp.). Stikstofbevattende bakterieë kom tipies op die wortels van die subfamilie voor en help om stikstof uit die lug te fikseer en aan die plant beskikbaar te stel vir onder andere die vervaardiging van proteïene (Vincent, 1982).

2.4 Die genus *Acacia* (Subfamilie Mimosoideae)

Die genus *Acacia* verteenwoordig die grootste groep spesies (750 tot 800) in die subfamilie Mimosoideae en die tweede grootste in die familie Fabaceae (Zomlefer, 1994). Die genus is ook een van die wydste verspreide en belangrikste genusse in Afrika (Ross, 1979). Spesies is oor die hele Afrika kontinent versprei maar kom veral in die tropiese en subtropiese gebiede voor (Ross, 1979). Veertig spesies onder die genus maak deel uit van die savanna bioom wat 408 876 km² (33.49%) van Suid-Afrika beslaan (Smith, 1999).

Slegs 75 spesies van die genus *Acacia* besit ekonomiese waarde en slegs 50 hiervan kan agronomies verbou word. Sommige spesies ontwikkel in klein, stadig-groeiende struik wat wind en water erosie help voorkom (Allen en Allen, 1981). Hierdie stadig-groeiende spesies word in strandgebiede aangeplant omdat die bome instaat is om soutsproei goed te hanteer en sandduine te stabiliseer (Allen en Allen, 1981).

In hierdie studie is twee *Acacia* spesies, naamlik *Acacia karroo* en *Acacia erioloba* vanweë hulle bekikbaarheid, arbitrêr gekies en vir hulle biokatalitiese potensiaal getoets.

2.5 Algemene gebruike van die *Acacia* spesies

Die meeste van die *Acacia* spesies word gebruik as vuurmaakhout. Veral die spesies met besondere digte kernhout word ook gebruik in die vervaardiging van houtskool. Sommige van die groter spesies, bv. *A. erioloba*, *A. galpinii* en *A. xanthophloea*, se hout word vandag gebruik vir die vervaardiging van meubels. *A. nigrescens* het besondere harde hout en word suksesvol gebruik in myne as ondergrondse stutte. In verskeie dele van Afrika word die hout van *Acacia* spesies gebruik as konstruksie materiaal vir die bou van hutte en skuilings. *A. ataxacantha* se stamme word verdeel en gebruik vir die maak van gevlegte mandjies. Die besondere stekelrige *Acacia* spesies, bv. *A. tortilis* en *A. erubescens*, se takke word by die bou van krale gebruik om vee teen predatore te beskerm. Met die toenemende aantal buitelandse toeriste wat Suid-Afrika besoek, het die houtbeeldwerk industrie baie uitgebrei en die hout van verskeie *Acacia* spesies word ook hiervoor gebruik (Smith, 1999).

Vrugte en bas van sommige *Acacia* spesies, bv. *A. karroo* (bas) en *A. nilotica* (peule en bas), bevat tanniene wat in die kleurproses van leer gebruik word. *A. mearnsii*, 'n Australiese spesie, se bas word in Suid-Afrika gebruik vir die kommersieële ekstrahering van tanniene. Die vrugte, blomme,

bas, blare en wortels van sommige *Acacia* spesies word tradisioneel as medisyne en voedsel deur die plaaslike bevolking gebruik (Van Wyk en Gericke, 2000). *A. caffra* se blare word gekou vir maagpyn. Die bas van *A. erioloba* word gebrand, fyngemaak en gebruik vir die behandeling van hoofpyn. 'n Waterige konkoksie van *A. erioloba* blare word gedrink en gebruik teen longinfeksies. 'n Ekstrak van *A. hebaclada* se blare word gebruik vir die genesing van maagpyn en slegte spysvertering. 'n Wortel aftreksel van laasgenoemde plant word ook vir borskwale gedrink. Die bas van *A. xanthophloea* word gebruik vir koors en oogkwale (Grant en Grant, 1998).

Die saad van *Acacia* spesies word in tye van voedselskaarste deur verskeie landelike volke geëet. Houtboorlarwes, wat in die dooie hout van *A. robusta* gevind word, dien ook as voedsel vir verskeie volke. Blomme van spesies soos *A. ataxacantha*, *A. caffra*, *A. karroo*, *A. mellifera*, *A. robusta* en andere is 'n belangrike bron van nektar vir bye en die heuning industrie (Smith, 1999).

Een van die belangrikste produkte wat vanaf die *Acacia* spesies verkry word is gom. *A. karroo* en *A. nilotica* lewer goeie kwaliteit gom wat deur maatskappye gebruik word in die vervaardiging van kleefmiddels. Gom van *A. senegal* word vir die verdikking van farmaseutiese stowwe, in die kosmetiese industrie en ook vir vervaardiging van drukkersink en waterverf gebruik. *A. burkei* se bas en die peule van *A. nilotica* word gebruik om geel kleurstowwe te vervaardig (Bruneton, 1995).

2.6 Fitochemiese en farmakologiese komponente in die familie Fabaceae

Die familie Fabaceae is in die verlede al intensief ondersoek vir die teenwoordigheid van sekondêre metaboliete vanweë die familie se wye praktiese gebruike. 'n Paar duisend natuurlike komponente is uit spesifieke spesies van die familie Fabaceae geïsoleer en gekarakteriseer. Agt en twintig persent van alle bekende flavonoïede en 95% van alle bekende isoflavonoïede aglikane kom in die

Fabaceae voor. Al die klasse van bekende fenoliese verbindings word ook in die Fabaceae aangetref terwyl antosianien, 'n flavonoïed, wyd verspreid in blomweefsel voorkom. Flavonol glikosiede is ook uit blom- en blaarweefsel van hierdie familie geïsoleer. Proantosianidien (gekonsentreerde tanniene) kom hoofsaaklik in houtagtige spesies voor en is uit blare, bas en hout geïsoleer. Flavonoïed oligomere is afwesig in kruidagtige spesies alhoewel dit soms in sade mag voorkom (Harborne, 1994).

Isoflavonoïde is byna uniek tot die Fabaceae en die meeste van die komponente is beperk tot die subfamilie Papilionoideae. Die voorkoms van isoflavonoïde buite die Fabaceae is baie beperk. Laasgenoemde kom meestal in die vrye staat voor en is geïsoleer uit bas, saad, stam en wortels, eerder as uit blomme en blare. Uit 'n funksionele oogpunt bestaan daar 2 klasse isoflavonoïede, naamlik induseerbare en saamgestelde isoflavonoïede. Rotenoïede is tipiese saamgestelde isoflavonoïde wat belangrike insekdodende en antimikrobiese eienskappe besit. Geïnduseerde isoflavonoïede, bekend as fitoaleksiene, word in blare gevorm as 'n resultaat van fungale inokulering en besit dan ook antifungale eienskappe (Harborne, 1994).

Die voorkoms van 'n verskeidenheid plant alkaloiëde is al vir die Fabaceae aangemeld. Die volopste en bekendste is die lupien alkaloiëde wat verantwoordelik is vir die vergiftiging van diere. Hierdie alkaloiëde is reeds in 5 tribusse van die subfamilie Papilionoideae gevind. Ander alkaloiëde klasse in die Fabaceae sluit in pirrolisidien (bv. krotalarien uit *Crotalaria* geïsoleer), indole (bv. fisostigmien uit *Physostigmata*) en isokinolien (bv. eritratidien uit *Erythrina* geïsoleer). Die alkaloiëde kastanospermien, geïsoleer uit *Castanospermum australe*, is alombekend in die mediese wêreld vir die antivirale eienskap waaroor dit beskik, en die moontlikheid is reeds uitgespreek dat kastanospermien by die behandeling van VIGS gebruik kan word (Harborne, 1994). Virusverwante siektes (soos VIGS) is steeds aan die toeneem en is dit steeds noodsaaklik om nuwe beter antivirale

middels te ontwikkel. Bekende antivirale middels het steeds 'n nou spektrum van aktiwiteit, beperkte terapeutiese gebruike en 'n variasie in toksisiteit (Elisabetsky en Posey, 1994). Laasgenoemde feite maak die chemiese analise van plante en isolasie van aktiewe bestanddele wat tot die ontstaan van verbeterde genees- en antivirale middels kan lei des te meer belangrik (Nigg en Seigler, 1992).

Terpenoïede kom ook wydversprei in verteenwoordigers van die Fabaceae voor. Die mees bestudeerde is diterpeensure wat uit die houtharpuis van *Copaifera* en *Hymenaea* spesies geïsoleer is. Diterpeen groeireguleerders in die gibberelliensuur reeks is ook uit die sade van *Pisum sativum* en *Phaseolus coccineus* geïsoleer. Nie minder nie as 23 bekende gibberelliene kom voor in plante van die familie Fabaceae en die meeste is kenmerkend vir hierdie familie. Triterpenoïed saponiene word wydverspreid aangetref in spesies van die familie wat as veevoer gebruik word. Karotenoïede is geïdentifiseer in die blomme van sekere Fabaceae spesies (Harbone, 1994).

Ander aktiewe komponente wat gekarakteriseer is binne die Fabaceae familie is kinone. Bensokinon en ander verwante neoflavanoïede is in die hout van *Dalbergia* en *Machaerium* spesies gevind. Antrakinoon, bv. emodien en ander antrone met purgerende eienskappe, is uit die peule, blare en wortels van *Cassia*, *Chamaecrista* en *Senna* spesies geïsoleer (Harbone, 1994).

Furanokoumariene word in die sade en blare van verskeie Fabaceae genera, veral in *Coronilla* en *Psoralea*, aangetref. Verskeie hidroksiekoumariene is ook in verskeie genera van die familie Fabaceae gevind (Harborne, 1994). Hieronder volg 'n uiteensetting van spesifieke chemiese komponente wat uit *Acacia erioloba*, een van die twee Fabaceae spesies bestudeer in hierdie studie, geïsoleer is (Harborne, 1994).

Allifatiese natuurlike produkte:

Akasiepetalien (uit blare)

Heterodendrien (uit blare)

9,12-Heksadekanoësuur (Palmitiensuur) (saad)

Flavonoïede:

Katesjien (bas)

Mollisakasidien (bas)

Aminosure en peptiede:

Djenkolsuur (R-R) –vorm N-Ac (uit saad)

Djenkolsuur (R-R) vorm (uit saad)

Djenkolsuur sulfoksied (uit saad)

N- γ -Glutamiel-djenkolsuur (uit saad)

2-Piperidienkarboksielsuur (S)-vorm (uit saad)

Alkaloïede:

4-Hidroksie-2-piperidienkarboksielsuur (uit saad)

Harborne (1994) maak egter geen melding van die funksies van hierdie chemikalieë in *A. erioloba* nie.

Die spesifieke rolle van hierdie verbindings in die metabolisme van die plant bly steeds 'n raaisel. As gevolg van die feit dat die verbindings in lae konsentrasies aangetref word in spesifieke organe, word 'n moontlike rol as reguleerders van stikstofmetabolisme uitgesluit (Bell, 1980). Nog studies is nodig om die chemiese data en taksonomiese verwantskappe bymekaar uit te bring en genera en spesies wat nog nie ondersoek is nie sal by die studies betrek moet word (Harborne, 1994).

2.7 Plantgroeireguleerders

Hoewel die bestaan van groeibevorderende stowwe in plante reeds deur Darwin en ander navorsers voor hom in die 19 de eeu vermoed is, het 'n Deen, Boysen-Jenson, in 1910 die eerste bewyse daarvoor gelewer. Hy het vasgestel dat 'n fototropiese buiging van die stingeltjies van hawerkiemplantjies opgehou het as die groeipunte verwyder is, maar dat die buiging weer begin het as 'n blokkie gelatien met die afgesnyde groeipunt daarop, op die stingels geplaas is. Sy gevolgtrekking was dat een of ander stof uit die groeipunt van die stingel deur die gelatienblokkie na die stingel moes diffundeer en groei daar veroorsaak het (Brum *et al.*, 1994).

Fritz Went het in 1926 vasgestel dat die groeistimulus wat Boysen-Jenson ontdek het, 'n chemikalie was (Brum *et al.*, 1994). Eersgenoemde het, soos Darwin, die groeistimuleerder uit groeipunte en in agar laat diffundeer en die agar op koleoptiele van plantjies, waarvan die groeipunte verwyder is, geplaas. As kontrole is gewone agar op koleoptiele sonder groeipunte geplaas. Die resultaat was dat die kontrole koleoptiele, waarop die gewone agar geplaas is, geen verlenging getoon het nie terwyl dié waarop die groeistimulant bevattende agar geplaas is, almal 'n verlenging getoon het. Sommige het egter reguit opwaarts verleng terwyl ander koleoptiele 'n buiging getoon het. Laasgenoemde is toegeskryf aan die diffusiepatroon van die groeistimulant. In die geval waar die koleoptiel oopwaarts verleng het, het die groeistimulant egalig opwaarts in die koleoptielweefsel gediffundeer. In die geval waar die koleoptiel 'n buiging getoon het, het meer van die groeistimulant aan die teenoorgestelde kant van die buiging versamel. Die naam ouksien, wat 'vermeerderstof' beteken is, aan die stimulant toegeken (Brum *et al.*, 1994).

Later is ook ander groeistimulante naamlik Sitokiniene, Gibberelliene en Etileen ontdek. Almal word vandag na verwys as planthormone omdat hulle nie op die plek van produksie nie, maar elders in die organisme 'n uitwerking het. Volgens Mauseth (1991) bind die hormoon aan 'n reseptor

molekuul in 'n spesifieke membraan by die gebied van respons en deur die binding word die spesifieke respons ontlok. Baie keer word nie-teiken gebiede ook aan die spesifieke hormoon blootgestel, maar as gevolg van die afwesigheid van 'n reseptor molekuul vind geen reaksie in hierdie weefsel plaas nie. Hier volg 'n kort bespreking van die vernaamste bekende groeistimuleerders en of biokataliste en hul spesifieke funksies.

Ouksiene

Ouksiene was die eerste van die planthormone wat ontdek is en is as indool-3-asynsuur of IAA deur Kögl in die vroeë 19 de eeu geklassifiseer (Mauseth, 1991). Na die ontdekking van IAA is 'n aantal verwante verbindings, naamlik indooletanal en indooletanol ontdek wat as voorlopers van IAA geïdentifiseer is en wat deur spesifieke ensieme in die plant na IAA omgeskakel word. Sover bekend is IAA die enigste natuurlik vervaardigde oksien in plante. IAA word nie altyd as 'n vrye suur in plantdele aangetref nie, maar kom dikwels in assosiasie met proteïene, aminosure of suikers voor (Hill, 1980).

IAA word primêr vanaf triptofaan gesintetiseer en die vernaamste gebiede van biosintese is blaarprimordia en ontwikkelende sade. Die vervoer van IAA is 'n aktiewe proses wat in die plant van sel tot sel teen 'n konsentrasie gradient plaasvind en altyd vanaf die punt van biosintese na die gebied waar groei gestimuleer word (Raven *et al.*, 1992). Volgens die Cholodny-Went hipotese word IAA weg van lig af na die skadukant van die plant getranslokeer (Ting, 1982) waar dit groei stimuleer. Die hormoon beïnvloed die groei van stamme in die rigting van lig sodat plante lig optimaal kan benut in gevalle waar dit deur ander plante oorskadu word (Brum *et al.*, 1994).

Ander funksies van oksiene sluit die bevordering van lengtegroei, die stimulering van wortelvorming en die gepaardgaande verhoging in die opname van water en minerale, apikale

dominansie en die inhibering van blaarafsnoering in. Ouksiene stimuleer ook etileen produksie en is aktief betrokke by RNA en proteïen sintese (Bidwell, 1979).

Die uitwerking van ouksiene op die groei van plante is konsentrasie afhanklik (Salisbury en Ross, 1992). Verder is eksperimenteel aangetoon dat ander planthormone ook betrokke is by die effekte wat deur ouksiene veroorsaak word. Die groei en ontwikkeling van 'n plant is dus nie die gevolg van stimulering deur 'n spesifieke hormoon alleen nie, maar die kombinasie van hormone wat spesifieke response prikkel (Brum *et al.*, 1994).

Sitokiniene

Alle sitokiniene is adenien derivate. Die eerste sitokinien is in die laat vyftigerjare uit kokosneut melk geïsoleer (Ting, 1982). Twee ander sitokiniene is later ontdek, as zeatin en isopenteniel adenien geïdentifiseer en daar is ook waargeneem dat hulle hoofsaaklik in die wortelpunte gesintetiseer word (Raven *et al.*, 1992).

Die metaboliese berging en translokering van sitokiniene is nog nie duidelik nie (Mauseth, 1991), maar daar word vermoed dat vervoer via die xileem van wortels na die bogrondse dele van die plant geskied (Raven *et al.*, 1992).

Die hoof funksie van sitokiniene is die stimulering van seldeling in stamme en die inhibering daarvan in wortels (Brum *et al.*, 1994) asook die induksie van selvergroting in blare. In die endosperm kom hoë konsentrasies sitokiniene voor wat betrokke is by die beheer van die ontwikkeling en morfogenese van die embrio en saad (Salisbury en Ross, 1992).

Gibberelliene

Die fungus *Gibberella fujikuroi* veroorsaak 'n siekte in rys wat in Japan bekend staan as 'bakanae'. Besmette plante toon nominale stamverlenging in vergelyking met onbesmette rysplante. In 1926 het Kurosawa bewys dat die reaksie herhaalbaar is as plante met 'n filtraat van *Gibberella fujikuroi* behandel word. Japannese navorsers het in die opvolgende 30 jaar sterk gekonsentreer op die identifisering en karakterisering van die spesifieke aktiewe komponent wat die verlenging induseer (Stowe *et al.*, 1961). In 1934 het Yabuta daarin geslaag om die spesifieke molekules te isoleer en het dit Gibberelliensuur (GA_3) genoem (Ting, 1982).

Soortgelyke fisiologiese effekte van GA_3 op ander plante het aangetoon dat dieselfde chemikalieë in hoër plante aanwesig moet wees. Daarna is verskillende gibberelliene geïsoleer, gesuiwer en gekarakteriseer asook metabolies bestudeer (Hedden *et al.*, 1978). Vandag is ten minste 62 verskillende gibberelliene bekend wat, omdat daar so baie is, genummer is in die ontdekkingsvolgorde (GA_3 - GA_{62}). Elke plantspesie bevat 6 tot 10 verskillende gibberelliene waarvan sommige biologies aktief en ander onaktief is (Mauseth, 1991). Gibberelliene varieër in hul spesifieke aktiwiteit in verskillende spesies. Die spesifieke konsentrasies van die hormoon in plante word deur omgewingseine beïnvloed (Salisbury en Ross, 1992).

Die gebied van biosintese in plante is die jong weefsels van groeipunte en sade. Wortels mag ook moontlik 'n gebied van biosintese wees. Gibberelliene word vervoer in die xileem en floeëm van plante (Raven *et al.*, 1992). Die funksies van gibberelliene sluit in selverlenging, die mobilisering van reserwe voedsel in saad, inhibering van saadvorming, stimulering van blom en stuifmeel groei en vergroting van vrugte (Brum *et al.*, 1994).

Etilleen

Die effek van etileen is reeds in 1910 deur 'n skeepskaptein Cousins waargeneem toe hy opgemerk het dat die aanwesigheid van oorryp appels by 'n krat groen piesangs die rypwording van die piesangs versnel het (Krogmann, 1973). Gane het in 1934 bewys dat sekere rypwordende vrugte etileengas vrystel. Dit was egter eers in die 1950's dat etileen erken is as 'n natuurlike groei-reguleerder (Ting, 1982).

Etilleen is bekend om die verouderingsprosesse in selle aan die gang sit. Dit is die enigste planthormoon wat as 'n gas voorkom en deur die intersellulêre openinge beweeg. 'n Hoë konsentrasie etileen word vrygestel met rypwording van klimakteriese vrugte. Die gas word in die industrie gebruik om klimakteriese vrugte soos piesangs, appels, mangoes en avokado's kunsmatig ryp te maak (Bennett *et al.*, 1987).

Etilleen kan as finale effektor vir ouksiene optree deurdat ouksiene in 'n teikengebied die produksie van etileen stimuleer. Etilleen, omdat dit 'n gas is, diffundeer vinnig na die aanliggende gebied en veroorsaak 'n respons wat vinniger is as wat ouksien self instaat is om 'n respons te veroorsaak (Mauseth, 1991). Verder inhibeer etileen verlenging van stamme, stimuleer diktegroei asook blaaren vrugaf snoering (Salisbury en Ross, 1994).

Brassinosteroïede (BRs)

Brassinosteroïede (BRs), 'n nuwe familie planthormone, is in verskeie plantspesies en organe ontdek. 'n Wye reeks effekte, naamlik weerstand indusering (Schnabl *et al.*, 2001) selverdeling en selverlenging (Krizek en Mandava, 1983), hipokotielverlenging (Mandava, 1988), toename in laminagrootte asook verhoogde varsmassa van groeiopunte (Meudt *et al.*, 1983) word deur BRs geïnduseer (Cao en Chen, 1995). Ook het 'n studie deur Bajguz en Czerpak (1996) bewys dat die

groeitempo van *Chlorella vulgaris* ('n alg) dramaties versnel word na brassinosteroïed (spesifiek brassinolied) behandeling.

Brassinolied (BL), kastasteroon (CS) en 6-deoksikastasteroon (6-deoksiCS) is van die bekendste BRs wat uit plante geïsoleer is en almal behoort aan die C₂₈-BRs met 'n 24 α -metielgroep. Daar is onlangs ontdek dat hierdie genoemde BRs van kampesterol biosintese afkomstig is (Fujioka en Sakurai, 1997; Sakurai en Fujioka, 1997; Yokota *et al.*, 1997). Van die genoemde BRs is BL biologies die aktiefste, word as die belangrikste BR geag en speel ook 'n deurslaggewende rol by hormoonregulering van plante (Sakurai *et al.*, 1999). Die verwantskap tussen BRs en ander planthormone word tans intensief ondersoek. Yopp *et al.* (1981) het sterk sinergistiese interaksies tussen BRs en ouksiene in 'n studie met boontjie hipokotiele opgemerk asook dat die werking van BRs in die plant deur natuurlike ouksiene in die plant gereguleer word. Sinergisme tussen BRs en ouksiene is ook in etileen produksie bevestig (Arecta *et al.*, 1988). Beide genoemde hormone verhoog koleoptielverlenging, varsmassa van bogrondse dele en etileenproduksie. Brassinosteroïede kan egter nie as ouksiene, gibberelliene of sitokiniene geklassifiseer word nie (Mandava, 1988). Brassinosteroïede het die vermoë om plantweefsel se sensitiwiteit vir ouksiene te verhoog en endogene hormoonvlakke te beïnvloed. Clouse *et al.* (1992) het bewys dat ouksiene (IAA) en BRs op die vlak van geenuitdrukking verskil.

Brassinosteroïede toon duidelike ooreenkomste in hul chemiese struktuur met ekdisteroïede wat in insekte voorkom alhoewel BRs uitsluitlik in plante (Richter en Adam, 1991) aangetref word. Hoe die ontvangs en transduksie van BRs seine in die plant geskied is nog onseker. Daar is nog nie duidelikheid oor die spesifieke ligging van die reseptor waaraan die BRs bind nie en of die reseptor intrasellulêr soos by dierlike steroïede of membraangebonde voorkom nie. Li en Chory (1997) het 'n membraan reseptor voorgestel, maar of die brassino-reseptor binding direk of deur

bindingsproteïene gefasiliteer word is onseker. Daar moet egter ook 'n spesifieke meganisme vir BRs bestaan om selmembrane te kan infiltreer, want as gevolg van hul sterk hidrofiliese sykettings kan hulle selmembrane nie op dieselfde manier as ander plantsterole binnedring nie (Sasse, 1994).

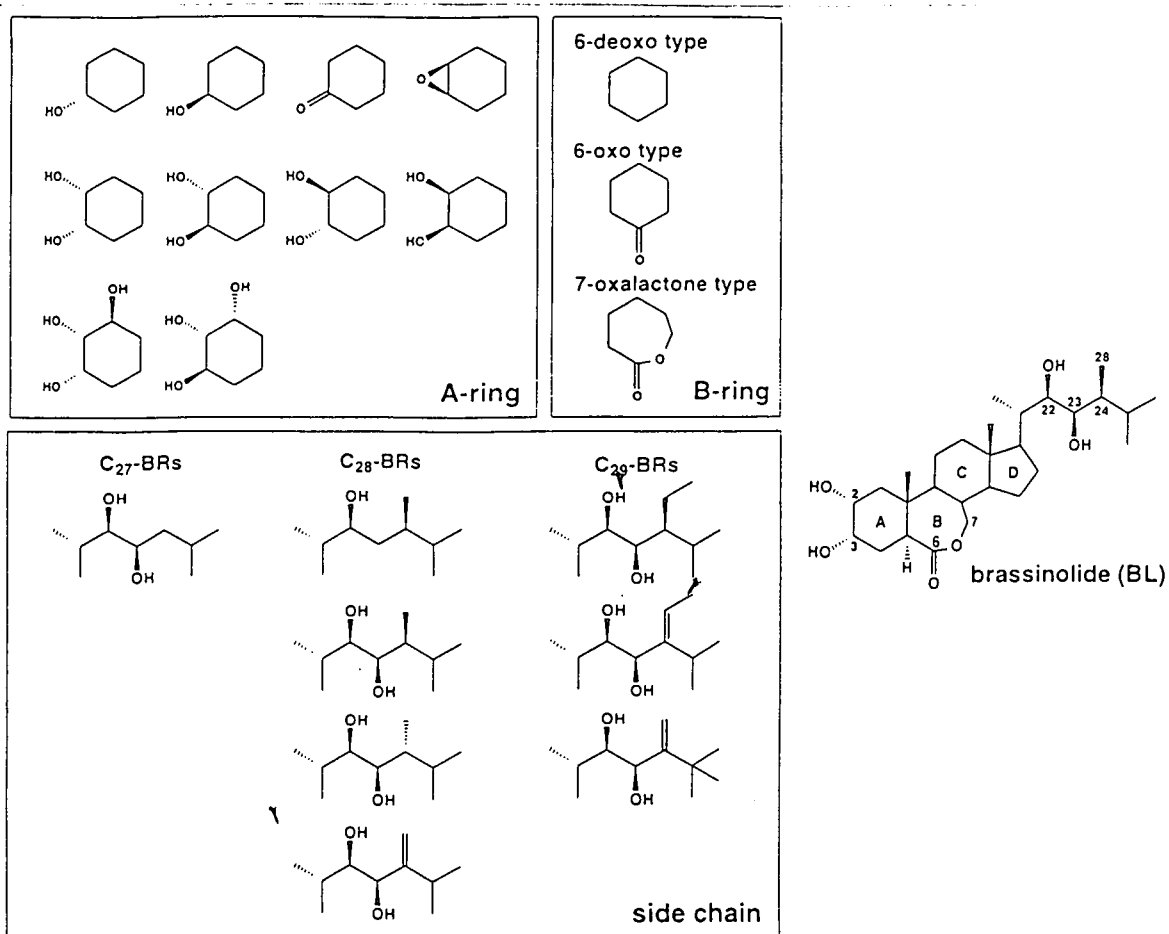
Saadkieming en die algemene groei van die jong saailing word na behandeling van die saad met BRs gestimuleer. 'n Verhoogte vrugbaarheid by vrugtebome met die toediening van BRs tydens blomvorming word meegebring deurdat blomvorming geïnduseer word. Studies het bewys dat BRs die plant se opname van mikro- en makroelemente vanuit die grond voordelig beïnvloed (Ronsch en Voigt, 1996). In moerbeie is byvoorbeeld gevind dat hoë konsentrasies natrium en fosfate vanuit die grond opgeneem word na behandeling met BRs. Daar is egter ook 'n kontrasterende verslag uitgebring waar beweer word dat laer konsentrasies magnesium, kalium en kalsium deur die plant opgeneem word na BR toediening (Kuno, 1997). Ook voorkom die BRs wat aan die plant toegedien word dat blomme en vrugte afval. In 'n ander studie is opgemerk dat rys-, mielies- en hawerblomme, wat gewoonlik nie in natuurlike toestande in die veld vrugte vorm nie, wel na die toediening van BRs vrugte gevorm het en sodoende word 'n verhoogde oesopbrengs teweeggebring. Brassinosteroïede word sterk deur omgewingstoestande beïnvloed en in die natuurlike omgewing is die groei van plante soms baie ongelyk wat die bespuiting van plante met BRs bemoeilik (Sakurai *et al.*, 1999).

Brassinolied (BL), epibrasinolied en 28-homobrassinolied was voor 1990 die gewildste BRs vir gewasbespuiting. 'n Nadeel van genoemde BRs in die natuurlike omgewing, is dat hulle vir 'n kort periode aktiwiteit toon. Die soeke na 'n ekwivalent met 'n langwerkende invloed was suksesvol en staan as TS 303 bekend; 'n ekwivalent van homobrassinolied. 'n Ander, naamlik TNZ 303, wat 'n kombinasie produk tussen TS 303 en PDJ ('n jasmonien ekwivalent) is, is ook al gevind. Die behandeling van hawersaad, aartappels en suikerbeet met TNZ het 'n verhoogde oesopbrengs sowel

as weerstand teen verskeie strestoestande, soos droogte weerstand (Shen *et al.*, 1990; Sairam 1994), souttoleransie (Takematsu en Takeuchi, 1989; Sasse *et al.*, 1995) swam weerstand (Adam *et al.*, 1991) en ook weerstand teen insekte (Richter en Koolman, 1991) by gewasse getoon.

Na die ontdekking van die eerste BRs, naamlik brassinolied (BL), is daar 40 BRs en 4 BRs verwante komponente gekarakteriseer en geïdentifiseer. Die bekende BRs en verwante komponente is vanuit 44 verskillende plantspesies, wat 37 angiosperme (9 monokotiele en 28 dikotiele), 5 gimnosperme en 1 alg insluit, geïsoleer. Van al die plante wat vir BRs teenwoordigheid getoets is, het *Phaseolus vulgaris* die meeste en grootste spektrum BRs, naamlik 22 BRs en 2 BR verwante komponente ingesluit. *Cupressus arizonica* (9 BRs), *Catharanthus roseus* (8 BRs), *Arabidopsis thaliana* (7 BRs), *Lilium longiflorum* (5 BRs en 2 BR verwante), *Oryza sativa* (6 BRs) en vele ander is positief vir BRs teenwoordigheid getoets (Sakurai *et al.*, 1999). Die spesie *Gypsophilla perfoliate* is die enigste van die familie Caryophyllaceae waarin 'n BRs (24-EpiBL) tot dusver gevind is (Schmidt *et al.*, 1996). Verskeie spesies van die familie Fabaceae is positief vir BRs teenwoordigheid getoets, maar slegs een is verwant aan die spesie wat in hierdie studie ondersoek is, naamlik *Cassia tora*, wat 5 BRs naamlik brassinolied (BL), kastasteroon (CS) en tifersterol (TY) en 28-norCS bevat en wat vanuit onvolwasse sade geïsoleer is (Park *et al.*, 1994).

Verskillende dele van die plant naamlik stuifmeel, sade, blare, wortels en blomme bevat BRs. Dit is dus opmerklik dat BRs wydverspreid voorkom in die planteryk en die biosintese van BRs is nie beperk tot 'n spesifieke plantorgaan nie (Fujioka en Sakurai, 1997). Die hoogste konsentrasie BRs word in stuifmeel en onvolwasse sade aangetref, byvoorbeeld die stuifmeel van *Helianthus annuus* bevat meer as 100 ng BL per gram vars massa (Schmidt *et al.*, 1997). In vergelyking met stuifmeel en onvolwasse sade bevat ander plantdele slegs nano- of subnanogram hoeveelhede BRs (Sakurai *et al.*, 1999).



Figuur 2.1: Algemene A- en B-ringstrukture van Brassinosteroïede (Sakurai *et al.*, 1999)

As daar na die diverse strukturele chemiese variasie van die A-ring, B-ring en sykettings van BRs (Figuur 2.1; Sakurai *et al.*, 1999) gekyk word is dit moontlik dat daar meer as 'n honderd verskillende BRs in die planteryk teenwoordig kan wees. Daar word verwag om in die toekoms nog BRs en BR verwante komponente te ontdek (Sakurai *et al.*, 1999). Die verdere soeke na onbekende BRs in plante en hul fisiologiese en biochemiese rol in plante, bly steeds 'n uitdaging en dit het dan ook aanleiding gegee tot hierdie studie.

2.8 'n Kommersiële biostimulant met brassinosteroïede as biokatalities aktiewe komponente

Die Kommersiële biostimulant wat as een van die kontroles in hierdie studie gedien het, naamlik ComCat[®], is deur 'n Duitse maatskappy, Maxiplant, uit natuurlike plante geproduseer. ComCat[®] is 'n unieke mengsel van natuurlike bestanddele en biostimulante geïsoleer uit twaalf verskillende Europese plante se saadmateriaal. Laasgenoemde plante is op grond van hul positiewe stimulerende effek op ander plante se groei en ontwikkeling geselekteer. Die geselekteerde plante word onder gekontroleerde toestande gegroei, geoes en gedroog en daarna verwerk om 'n sekere konsentrasie natuurlike biostimulante te lewer wat dan in die natuur gebruik kan word om groentes, blomplante en landbougewasse se groei en ontwikkeling te manipuleer (Technical Data Sheet, 2002).

Laasgenoemde proses is reeds vir eeue deur die tuinier gedoen, wanneer kompos vervaardig is, deur ou plantmateriaal te laat verrot en dit dan later in grond, waarin nuwe saailinge geplant is, as bemesting te gebruik. In die vorm van ComCat[®] is hierdie natuurlike groei stimuleerders in 'n gekonsentreerde vorm verpak om biologies gesonder plante te lewer. ComCat[®] vervang nie kunsmis of organiese bemesting nie, maar stimuleer die plant om die voedingstowwe wat verskaf word meer effektief te benut (Technical Data Sheet, 2002). Die vervaardigers maak ook daarop aanspraak dat ComCat[®] die weerstand van gewasse teen siektes verhoog deur die PR- ("pathogenesis-related")- proteïene (chitinase, β -1,3-glukanase en peroksidase) se produksie te induseer (Schnabl *et al.*, 2001).

Die aktiewe komponente wat uit ComCat[®] geïsoleer is, en wat waarskynlik vir die biokatalitiese aktiwiteit verantwoordelik is, is twee brassinosteroïede (BR's) naamlik 24-epi-kastasteroon en 24-epi-sekasteroon (Schnabl *et al.*, 2001). In rysplante wat met BR's bespuit is, het indoolasynsuur vlakke afgeneem terwyl absissiensuur vlakke toegeneem het. Laasgenoemde fitohormone is onder

andere betrokke by die translokering van fotosintaat in plante asook die ophoping daarvan in sade, wat die gemete oesopbrengsverhogings in landbougewasse na bespuiting met ComCat[®] kan verklaar (Schnabl *et al.*, 2001). Dit is ook bekend dat BR's die weerstand van plante teen patogeenaanval kan verhoog (Schabdach *et al.*, 1995, Khripach *et al.*, 1999; Memelink *et al.*, 2001; Schnabl *et al.*, 2001). Hierdie biostimulerende meganismes werk waarskynlik in kombinasie om 'n meer produktiewe, gesonder en sterker gewas te lewer (Technical Data Sheet, 2002).

ComCat[®] word in die vorm van 'n watersuspensie as saadbehandeling of blaarbespuiting toegedien en word deur die blare of wortels van die behandelde plante opgeneem. Die toedieningskonsentrasies van ComCat[®] is besonder laag, die produk is ekologies vriendelik en word reeds kommersieel in verskeie lande, waaronder Duitsland, Italië, Frankryk en Spanje, as as biostimulant in die tuinbou industrie bemark. Die landboukundige weergawe van die produk word reeds in drie lande bemark. Oesopbrengsresultate van verskeie groentesoorte en ander kontantgewasse het deurgaans betekenisvolle verhogings in fitomassa van die oesbare produkte opgelewer (Technical Data Sheet, 2002).

In hoofstuk 3 word algemene Materiaal en Metodes wat van toepassing is op meer as een hoofstuk, uiteengesit. In hoofstuk 4 word die sifting ("screening") van saadsuspensies vir biokatalitiese aktiwiteit beskryf. Die chromatografiese semi-suiwering van die aktiewe saad ru-ekstrak word in hoofstuk 5 bespreek, terwyl die suiwering van die aktiewe biokatalitiese bestanddeel uit *A. erioloba* en die identifisering daarvan met behulp van kleurreagense asook kernmagnetiese resonans spektroskopie in hoofstuk 6 uiteengesit word. Resultate word in hoofstuk 7 in die algemeen en oorsigtelik bespreek en die literatuur waarna in hierdie studie verwys is, word aan die einde gelys.

Hoofstuk 3

Algemene materiaal en metodes

3.1 Inleiding

In hierdie gedeelte word slegs daardie metodes beskryf wat van toepassing is op meer as een hoofstuk. Metodes en eksperimentele prosedures wat van toepassing is op 'n spesifieke hoofstuk sal in daardie hoofstuk behandel word.

3.2 Materiaal

3.2.1. Plantmateriaal

Sade van twee spesies van die familie Fabaceae, naamlik *Acacia erioloba* en *Acacia karroo* asook twee spesies van die familie Caryophyllaceae, naamlik *Dianthus basuticus* en *Pollichia campestris* is in verskillende streke van die Vrystaat en Noord-Kaap versamel. *A. erioloba* sade is in Postmasburg en ook naby Bloemhof, beide dorpe in die Noord-Kaap, gedurende April 2000 versamel. Sade van *A. karroo* is in die Bainsvlei omgewing, 40 km vanaf Bloemfontein in Maart 2000 versamel. *D. basuticus* sade is verkry van Spitskop-kwekery, Bloemfontein terwyl *P. campestris* sade gedurende Februarie 2000 in die Bloemfontein Nasionale Botaniese Tuin versamel is. Cress-sade (Bromslaai), wat gebruik was om die effek van ekstrakte op saadkieming en saailinggroei te toets, is vanaf Agraforum, Duitsland verkry. Cress-sade is in biotoetse gebruik vanweë hulle vermoë om binne 24 uur te ontkiem asook die hoë groeitempo van die saailinge. Alle sade is by 25 °C gestoor.

3.2.2 Ander materiaal

Chemikalieë van die suiwerste beskikbare graad is vanaf Merck, Duitsland aangekoop naamlik chloroform, dichlorometaan, dietieleter, etanol, etielasetaat, heksaan, metanol en swaelsuur. Bakkersgis en ComCat[®] (kommersiële biostimulant) is vanaf Agraforum, Duitsland verkry.

3.3 Metodes

3.3.1 Behandeling van saadmateriaal

'n Bepaalde massa saad van die onderskeie plante is met behulp van 'n Retsch SM 2000 meule, toegerus met 'n fyn sif, gemaal. Die relatief growwe poeier is daarna oorgedra na 'n elektroniese stamper en vysel waarmee dit tot 'n fyn poeier gemaal is vir 'n periode van 30 minute. Die poeier is vervolgens met 100% etanol (ETOH) benat en oornag gelaat om te verdamp. Hierdie proses is twee maal herhaal waarna die poeier gedeeltelik wateroplosbaar was. Die wateroplosbare poeier is tydens sekere saadbehandelings aangewend en daar word deurgaans hierna as saadsuspensies verwys. Saadsuspensies van die vier plantspesies wat in hierdie studie ingesluit is, is aanvanklik vir biokatalitiese aktiwiteit getoets om die spesies met die hoogste potensiaal te identifiseer (sien 3.3.2).

3.3.2 Biotoetse

3.3.2.1 Biotoets 1: Effek van saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle

Verskeie konsentrasies (0.05; 0.5; 5 en 50 mg L⁻¹) van die saadsuspensies is voorberei terwyl dieselfde konsentrasies ComCat[®] (kommersiële biostimulant; Agraforum, Duitsland) as kontrole 1 gebruik is. Gedistilleerde water is as kontrole 2 gebruik. Vyf gram glukose is by elke oplossing gevoeg om as voedingsmedium vir die gisselle te dien. Bakkersgis (0.8g) is in die rondebol

gedeelte van 'n gekalibreerde respirometer (Figuur 3.1) gevoeg. Vervolgens is 70 ml van die verskillende saadsuspensies en die kontrole behandelings (water en ComCat®) afsonderlik en versigtig by die gis gevoeg deur die respirometer skuins te hou sodat alle lug verplaas is. Daarna is die apparaat in 'n waterbad by 29 °C geplaas en die respirasietempo van gisselle in terme van CO₂ afgifte per cm³ is elke 30 minute oor 'n 2.5 uur periode genoteer.



Figuur 3.1: Respirometer wat gebruik is om die effek van saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle te bepaal.

3.3.2.2 Biotoets 2: Effek van saadsuspensies op die ontkieming van

Cress-sade en gevolglike saailinggroei

Twee velle kiemingspapier (30 x 30 cm) is gebruik om die % kieming van Cress-sade en saailinggroei asook die effek van saadsuspensies daarop te toets. Op die eerste vel kiemingspapier is 'n podloodlyn 10 cm van bo getrek. Twintig Cress-sade is op hierdie lyn geplaas en min of meer egalig gespaseer. 'n Tweede vel kiemingspapier is bo-oor die sade geplaas, met gedistilleerde water (kontrole) of met die verskillende konsentrasies saadsuspensies of saadekstrakte soos in 3.3.2 genoem, benat en longitudinaal opgerol. Die opgerolde dubbelvel kiemingspapier met die sade, is regop in 1 L Erlenmeyerflesse, wat 200 ml van die verskillende konsentrasies saadsuspensies of saadekstrakte bevat het, geplaas. Na 24 h, 48 h, 72 h en 96 h periodes is die % ontkieming by 25 °C bepaal. Die koleoptiellengtes en wortellengtes is ook oor dieselfde tydintervalle gemeet om die effek van verskillende saadsuspensies en saadekstrakte op saailinggroei te monitor.

Ten einde die aktiewe komponent(e) verantwoordelik vir die biokatalitiese eienskap in saadsuspensies te isoleer, is eers 'n ru-saadekstrak (sien 3.3.3) voorberei wat later verder gefraksioneer is (sien hoofstukke 5 en 6).

3.3.3 Voorbereiding van ru- saadekstrakte

Sade is tot 'n fyn poeier verwerk (sien 3.3) en 2,3 Kg van elke saad tipe is in tien gelyke dele verdeel en metanol (100%) is teen 2 ml per gram saadmateriaal bygevoeg en oornag op 'n skudmasjien geskud. Die metanoliese ekstrakte is onder vakuüm deur 'n enkele Whatman No.1 filtreerpapier gefiltreer met behulp van 'n Buchner trechter wat op 'n dikwandige Erlenmeyer fles gemonteer en aan 'n vakuümpomp gekoppel was. Die proses is minstens vier keer herhaal of totdat 'n helder filtraat sigbaar was. Die oortollige metanol is verwyder deur van vakuüm distillasie by 40 °C met behulp van 'n Buchi Rotavapor (Bibby Sterilin LTD, Engeland), toegerus met 'n verkoelde Liebig

kondensator, gebruik te maak. Vervolgens is die ru-ekstrak met behulp van 'n vakuumdroër by – 140 °C gedroog en in 'n vrieskas by –20 °C geberg vir latere gebruik. Die droë massa (g) ru-materiaal wat na ekstrahering en droging herwin is, is telkens genoteer.

Hoofstuk 4

Sifting (“screening”) van wateroplosbare gemaalde sade

vir moontlike biokatalitiese aktiwiteit.

4.1 Inleiding

In hoofstuk 1 is reeds verwys na die vermoë van sekere plante om veranderende of ongunstige omgewingstoestande, wat biotiese stremming insluit, oor die kort termyn te oorleef terwyl ander nie oor dieselfde vermoë beskik nie. Die voor die hand liggende verklaring hiervoor is dat die meer weerstandbiedende plante geneties beter aangepas is as die gevoelige plante om veranderende omgewingsdruk te trotseer. Die waarskynlikheid is egter genoem dat geneties aangepaste weerstandbiedendheid van ‘n plant met ‘n unieke samestelling sekondêre metaboliete verband kan hou. Die sekondêre metaboliete hier ter sprake is waarskynlik verder uniek vanweë hulle biokatalitiese eienskappe of dan die besondere vermoë om die metabolisme van die betrokke plant te reguleer of te manipuleer ten tye van omgewingsdruk en op hierdie wyse oorlewing, of selfs net ‘n normale lewensiklus, te verseker.

‘n Biokatalis word tradisioneel geïdentifiseer as ‘n verbinding wat die tempo van ‘n chemiese reaksie verhoog deur die aktiveringsenergie wat nodig is om die reaksie te begin, te verlaag en hierdie definisie het direk betrekking op die meganisme waarvolgens ensieme chemiese reaksies beheer (Mathews en van Holde, 1996). Hierteenoor is hormone ook in plante werkzaam wat per definisie op ‘n spesifieke plek gesintetiseer word maar na ‘n ander plek getranslokeer word waar dit teen lae konsentrasies meewerk om groei, ontwikkeling of metabolisme te reguleer (Bielecki *et al.*, 1974). Metaboliete of voedingstowwe openbaar nie hormonale aksie nie, maar beïnvloed metabolisme direk as substrate of indirek as induseerders of inhibeerders. In der waarheid is dit baie moeilik om die term “planthormoon” duidelik te definieer en daarom word die term “plant

groeireguleerders” verkies. Laasgenoemde term verwys na beide sintetiese en natuurlike komponente wat groei-, ontwikkelings- of metaboliese reaksies in plante reguleer (Bidwell, 1979). Die term “biokatalis” en “biokatalitiese aktiwiteit” word dus in hierdie monografie gebruik om te verwys na onbekende komponente wat groei, ontwikkeling of metabolisme in die plant reguleer. Eers wanneer die komponent bo alle twyfel geïdentifiseer is, kan die terminologie aangepas word.

Vanweë ‘n persoonlike mededeling (Maxiplant, Duitsland) dat Europese plante uit die families Fabaceae en Caryophyllaceae wel oor hierdie biokatalitiese eienskappe beskik, is besluit om twee Suid-Afrikaanse spesies uit elk van hierdie twee families hiervoor te toets. Saadsuspensies van *Acacia karroo* en *Acacia erioloba* (Fabaceae) asook *Dianthus basuticus* en *Pollichia campestris* (Caryophyllaceae) is aan biotoetse onderwerp om vir biokatalitiese eienskappe te toets.

In hierdie hoofstuk is van twee verskillende biotoetse gebruik gemaak om die moontlike biokatalitiese aktiwiteit in die saad van genoemde plantspesies te identifiseer en te kwantifiseer. Met behulp van die eerste biotoets is vasgestel of saadsuspensies van verskillende plantspesies instaat was om die respirasietempo van ‘n monokultuur gisselle (bakkersgis) te beïnvloed. Met behulp van die tweede biotoets is die stimulerende of inhiberende invloed van saadsuspensies op die ontkieming van Cress-sade asook saailinggroei, in terme van wortel- en koleoptielverlenging, ondersoek.

Bogenoemde twee biotoetse is om spesifieke redes gekies. In die geval waar die respirasietempo van ‘n monokultuur gisselle wel beïnvloed word, bestaan die moontlikheid dat (a) ‘n metaboliese reguleerder teenwoordig kan wees, (b) die effek stimulerend van aard kan wees of (c) dat die effek inhiberend van aard kan wees. Die tweede biotoets is gebruik om juis, aan die hand van

saadontkieming en saailinggroei, vas te stel of die biokatalitiese effek van die ekstrakte stimulerend of inhibierend was.

ComCat[®], 'n kommersiële biostimulant, is saam met water as kontroles gebruik. In die vervaardigingsproses van ComCat[®] word die effek op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle as 'n metode van kwaliteitskontrole gebruik (persoonlike mededeling, Agraforum, Duitsland). 'n Water kontrole is gebruik om die normale respirasietempo van gisselle te onderskei van die tempo onder invloed van die standaard biostimulant, ComCat[®], asook om die moontlike effek van saadsuspensies van die vier plantspesies wat bestudeer is te identifiseer.

4.2 Materiaal en metodes

4.2.1 Materiaal

Bakkersgis gebruik tydens die uitvoering van respirasietoetse en ook Cress-sade wat vir ontkiemingstoetse gebruik is, asook die kommersiële biostimulant, ComCat[®], is verskaf deur Agraforum, Duitsland. Alle organiese oplosmiddels gebruik (sien 3.2.2), was van die suiwerste graad beskikbaar en verskaf deur Merck (Duitsland).

4.2.2 Metodes

4.2.2.1 Voorbereiding van saadsuspensies

Sien hoofstuk 3 (3.3.1)

4.2.2.2 *Biotoets 1*: Die effek van saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle

Sien hoofstuk 3 (3.3.2.1)

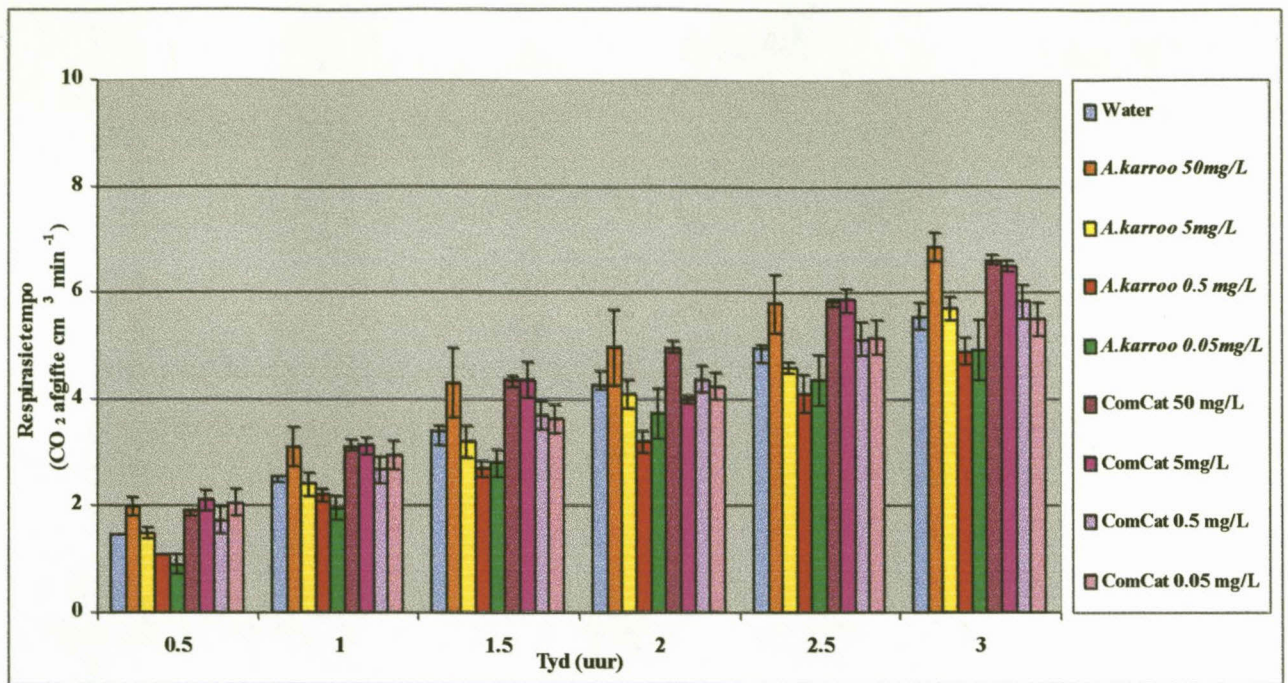
4.2.2.3 Biotoets 2: Effek van saadsuspensies op die ontkieming van Cress-sade en gevolglike saailinggroei

Sien hoofstuk 3 (3.3.2.2)

4.3 Resultate

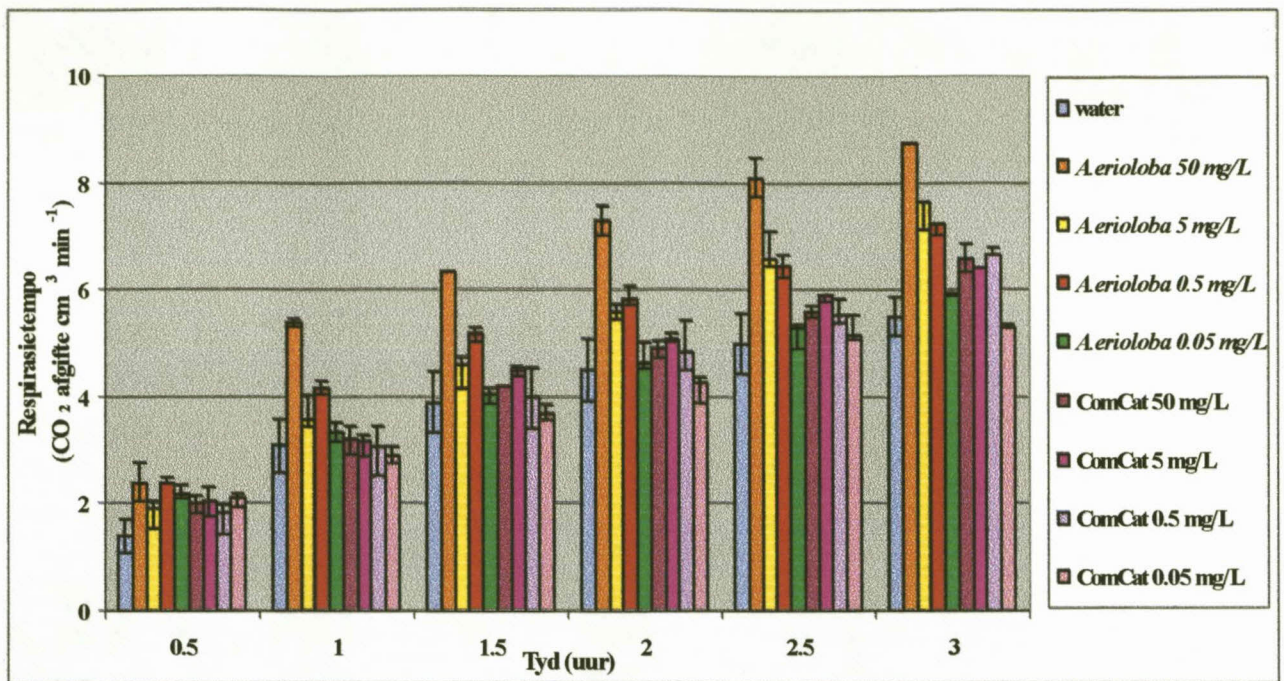
4.3.1 Effek van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle.

In vergelyking met die waterkontrolle het 'n saadsuspensie van *A. karroo*, teen 'n konsentrasie van 50 mg L⁻¹, die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle (*Saccharomyces cerviseae*) met ongeveer 21% na 'n periode van 3 uur verhoog (Figuur 4.1). Hierdie verhoogde respirasietempo is reeds na die eerste halfuur interval opgemerk en het dieselfde tendens as die 50 mg L⁻¹ ComCat[®] oplossing getoon. ComCat[®] teen 5 mg L⁻¹ het 'n soortgelyke verhoging in die respirasietempo van gisselle teweeggebring. Konsentrasies laer as 50 mg L⁻¹ vir *A. karroo* saadsuspensies en laer as 5 mg L⁻¹ vir ComCat[®] het, in vergelyking met die waterkontrolle, tot geen verhoging in die respirasietempo van gisselle bygedra nie.



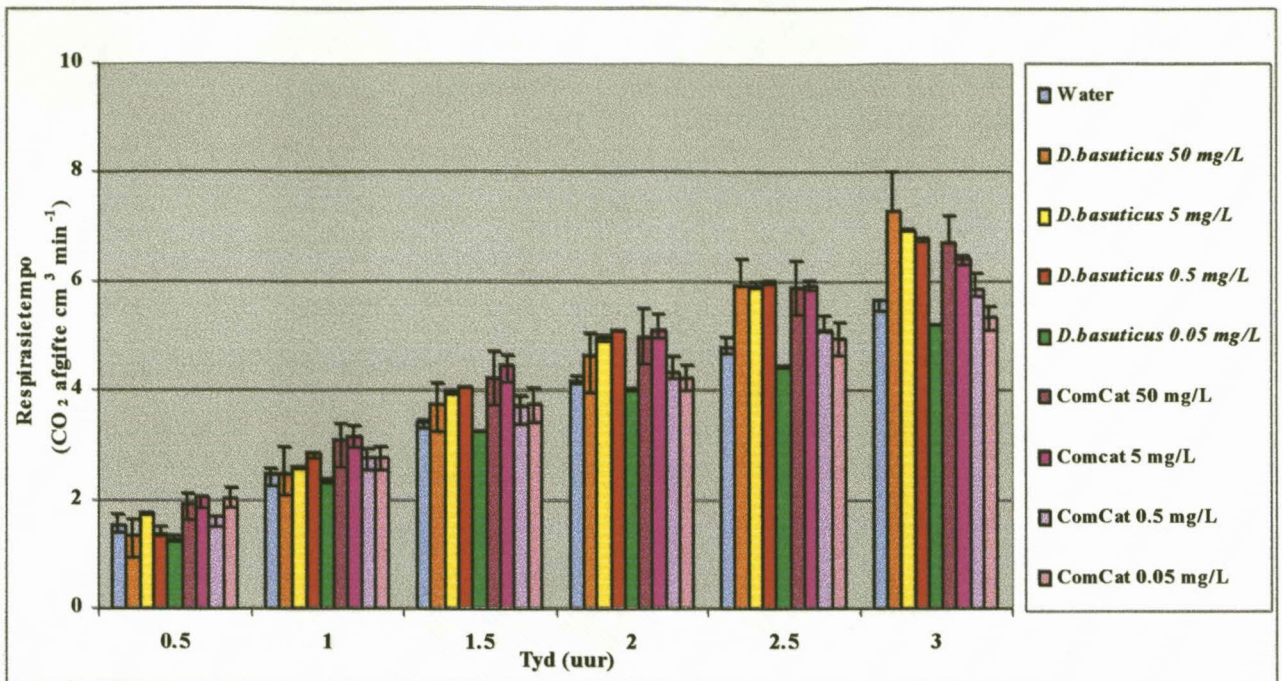
Figuur 4.1: Die effek van verskillende konsentrasies *Acacia karroo* saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur *Saccharomyces cerevisiae* selle. ComCat[®] en water het as kontroles gedien.

Die resultate in figuur 4.2 illustreer dat al vier konsentrasies *A. erioloba* saadsuspensies (0.05, 0.5, 5 en 50 mg L⁻¹) die respirasietempo van gisselle merkbaar beter as die waterkontrole gestimuleer het. Die hoogste drie konsentrasies (0.5, 5 en 50 mg L⁻¹) van die *A. erioloba* saadsuspensies se stimulerings effek op die respirasietempo van gisselle was ook merkbaar hoër as die stimulasie wat met die hoogste konsentrasie ComCat[®] verkry is. Die 50 mg L⁻¹ konsentrasie van die *A. erioloba* saadsuspensie het deurgaans die grootste stimulerings effek op gisselrespirasie gehad en ook die effek van *A. karroo* saadsuspensies (Figuur 4.1) oorskry.



Figuur 4.2: Die effek van verskillende konsentrasies *Acacia erioloba* saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur *Saccharomyces cerevisiae* selle. ComCat[®] en water het as kontroles gedien.

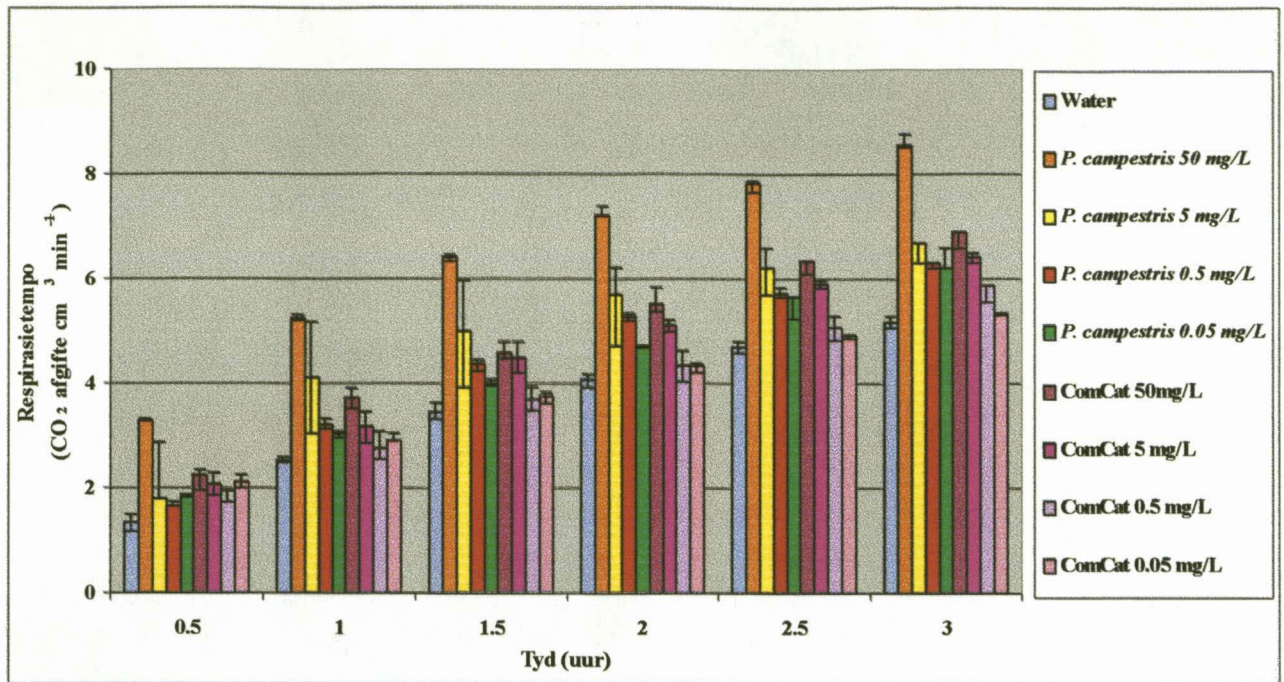
Gedurende die eerste uur het die *D. basuticus* saadsuspensie weinig effek op die respirasietempo van gisselle gehad in vergelyking met beide die water en ComCat[®] kontroles (Figuur 4.3). Na een uur het die hoogste drie konsentrasies (0.5, 5 en 50 mg L⁻¹) van hierdie ekstrak wel 'n metaboliese stimulerings effek getoon wat goed met die stimulerings effek van ComCat[®] vergelyk het. Die invloed van die *D. basuticus* saadsuspensie was egter nie so prominent as die van *A. karroo* en veral nie soos die van die *A. erioloba* saadsuspensie nie.



Figuur 4.3: Die effek van verskillende konsentrasies *Dianthus basuticus* saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur *Saccharomyces cerevisiae* selle. ComCat[®] en water het as kontroles gedien.

Die resultate in figuur 4.4 dui daarop dat al vier konsentrasies (0.05; 0.5; 5 en 50 mg L⁻¹)

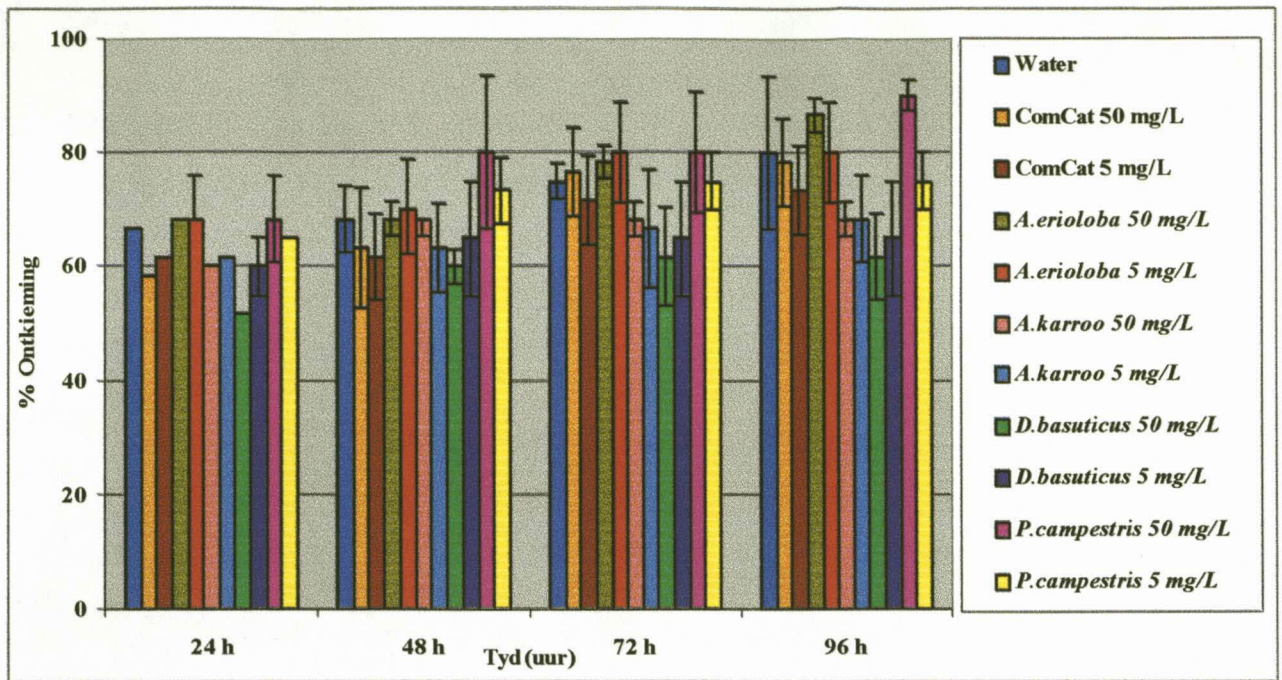
P. campestris saadsuspensies, in vergelyking met die waterkontrolle, deurgaans 'n groter stimulerende effek op die respirasietempo van *Saccharomyces cerevisiae* selle gehad het. Veral die 50 mg L⁻¹ konsentrasie van hierdie saadsuspensie se effek op die respirasietempo van gisselle was merkbaar hoër as die van dieselfde konsentrasie ComCat[®] en het goed vergelyk met die reaksie wat met die *A. erioloba* (Figuur 4.2) saadsuspensie teen dieselfde konsentrasie verkry is.



Figuur 4.4: Die effek van verskillende konsentrasies *Pollichia campestris* saadsuspensies op die respirasietempo van 'n monokultuur *Saccharomyces cerevisiae* selle. ComCat[®] en water het as kontroles gedien.

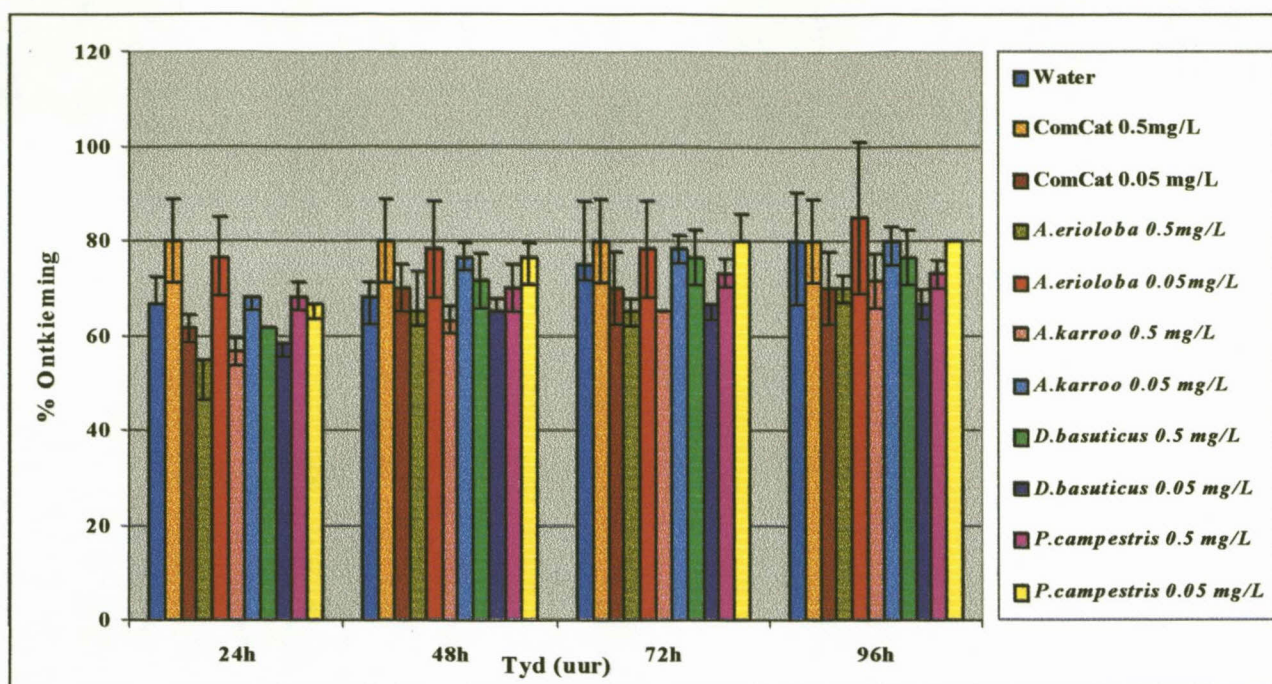
4.3.2 Effek van saadsuspensies op die ontkieming van Cress-saad.

Die resultate in figuur 4.5A illustreer dat die 50 mg L⁻¹ saadsuspensies van beide *A. erioloba* en *P. campestris* reeds na 24 uur en deurgaans oor al die tydintervalle die ontkieming van Cress-saad, in vergelyking met beide die water en ComCat[®] kontroles, gestimuleer het. Dit is interessant om daarop te let dat dit juis hierdie twee saadsuspensies was wat ook die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle (Figure 4.2 en 4.4) gestimuleer het. Beide die konsentrasies (5 en 50 mg L⁻¹) van beide die *A. karroo* en *D. basuticus* saadsuspensies het 'n inhiberende effek op die ontkieming van Cress-saad getoon. ComCat[®] het ook teen 5 en 50 mg L⁻¹ 'n inhiberende effek op die kieming van Cress-sade gehad.



Figuur 4.5A: Die effek van 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies van vier verskillende plantspesies op die ontkieming van Cress-sade. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien.

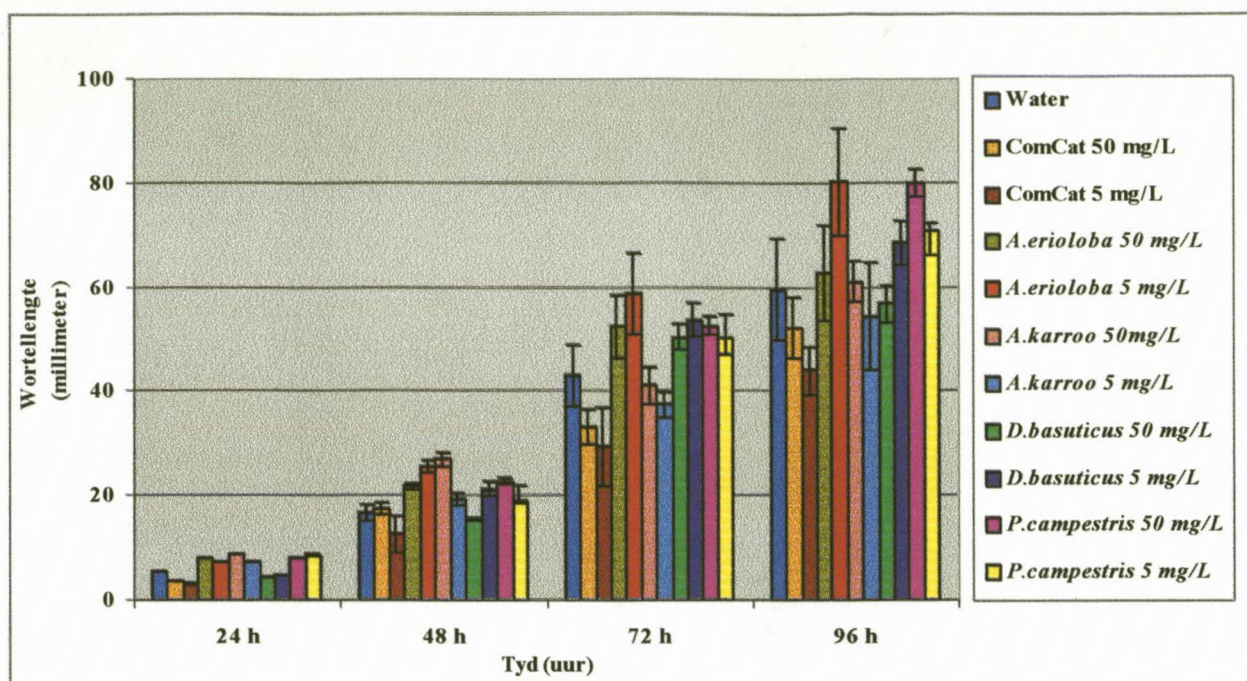
Geen betekenisvolle stimulerende effek op die ontkieming van Cress-sade is waargeneem nie (Figuur 4.5 B). Maar 'n effense stimulasie na 96 h inkubasie deur die 50 mg L⁻¹ *Acacia erioloba* ekstrak verdien vermeld te word. In die meeste gevalle was die effek van hierdie hoë konsentrasies saadsuspensies eerder inhuberend van aard.



Figuur 4.5B: Die effek van 0.5 en 0.05 mg L⁻¹ konsentrasies van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies van vier verskillende plantspesies op die ontkieming van Cress-sade. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien.

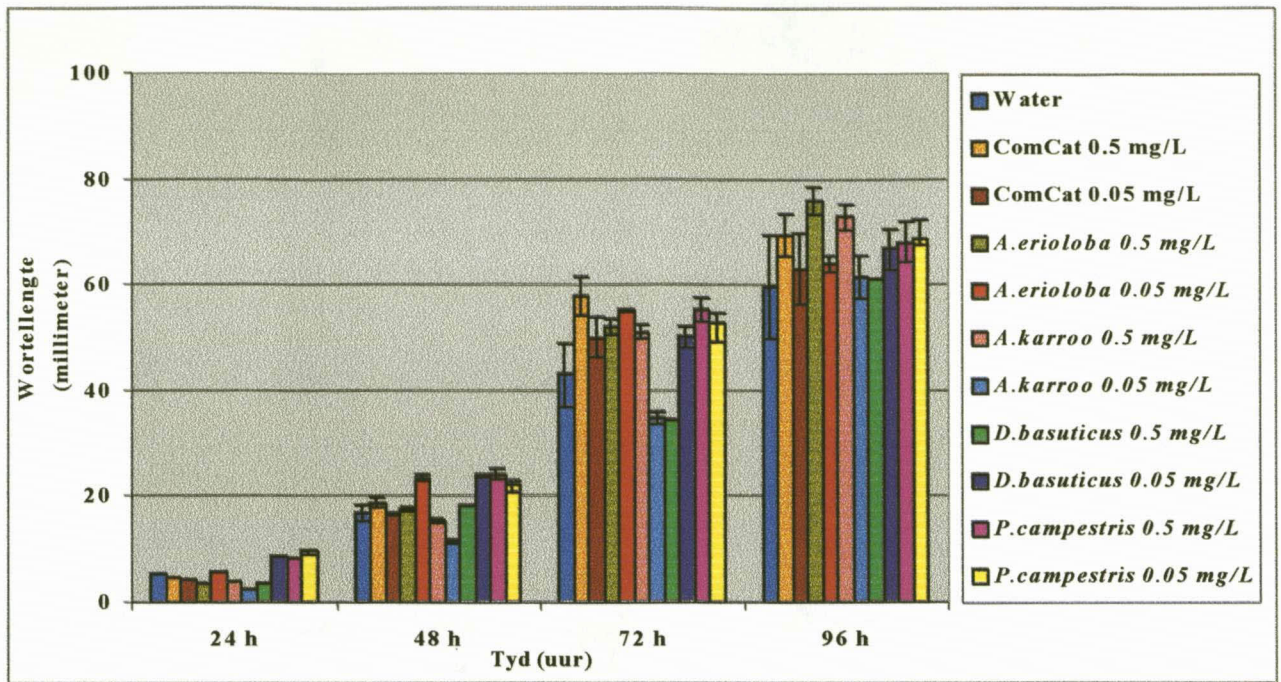
4.3.3 Effek van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies op wortelgroei in jong Cress-saailinge

Na 96 uur inkubering het die *A. erioloba* (5 mg L⁻¹) en die *P. campestris* (50 mg L⁻¹) saadsuspensies wortelgroei in Cress-saailinge merkbaar gestimuleer in vergelyking met beide die water en ComCat[®] kontroles (Figuur 4.6 A). Die stimulerende effek was reeds na 48 uur inkubering duidelik. Alhoewel die *D. basuticus* saadsuspensie (5 mg L⁻¹) nie wortelgroei in Cress-saailinge so duidelik soos eersgenoemde twee plante se saadsuspensies gestimuleer het nie, het dit tog van beide kontroles verskil. Die ComCat[®] standaard het teen 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies eerder 'n inhiberende as stimulerende effek op wortelgroei in Cress-saailinge getoon.



Figuur 4.6A: Die effek van 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies van vier verskillende plantspesies op wortelgroei in Cress-saailinge. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien.

Tot en met 72 uur inkubering het die ComCat[®] kontrole, teen 'n konsentrasie van 0.5 mg L⁻¹ (optimum konsentrasie volgens die vervaardigers, Agraforum, Duitsland) wortelgroei in Cress-saailinge die beste gestimuleer (Figuur 4.6 B). Na 96 uur inkubering het beide die *A. erioloba* en *A. karroo* saadsuspensies (0.5 mg L⁻¹) egter 'n hoër wortelgroei-stimulering as die ComCat[®] kontrole getoon. Die *P.campestris* saadsuspensie (0.05 en 0.5 mg L⁻¹) het in vergelyking met die waterkontrole, slegs 'n effense stimulering in wortelgroei van Cress-saailinge getoon.

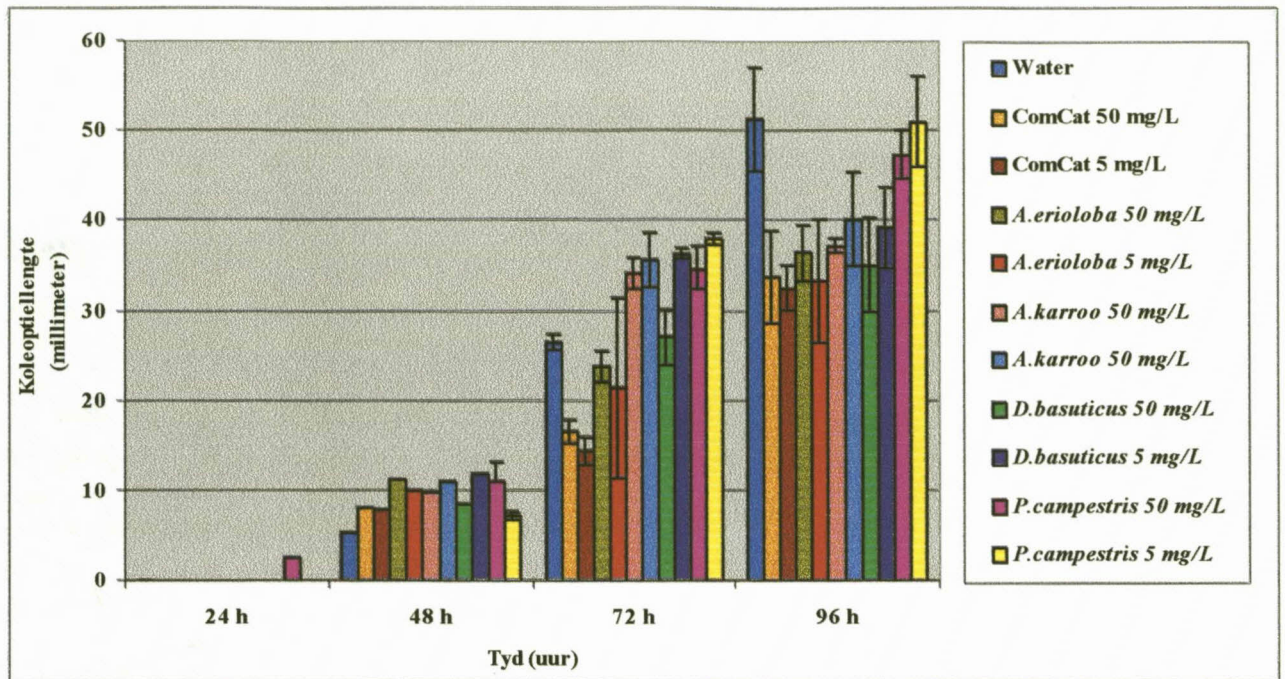


Figuur 4.6B: Die effek van 0.05 en 0.5 mg L⁻¹ konsentrasies van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies van vier verskillende plantspesies op wortelgroei in Cresssaailinge. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien.

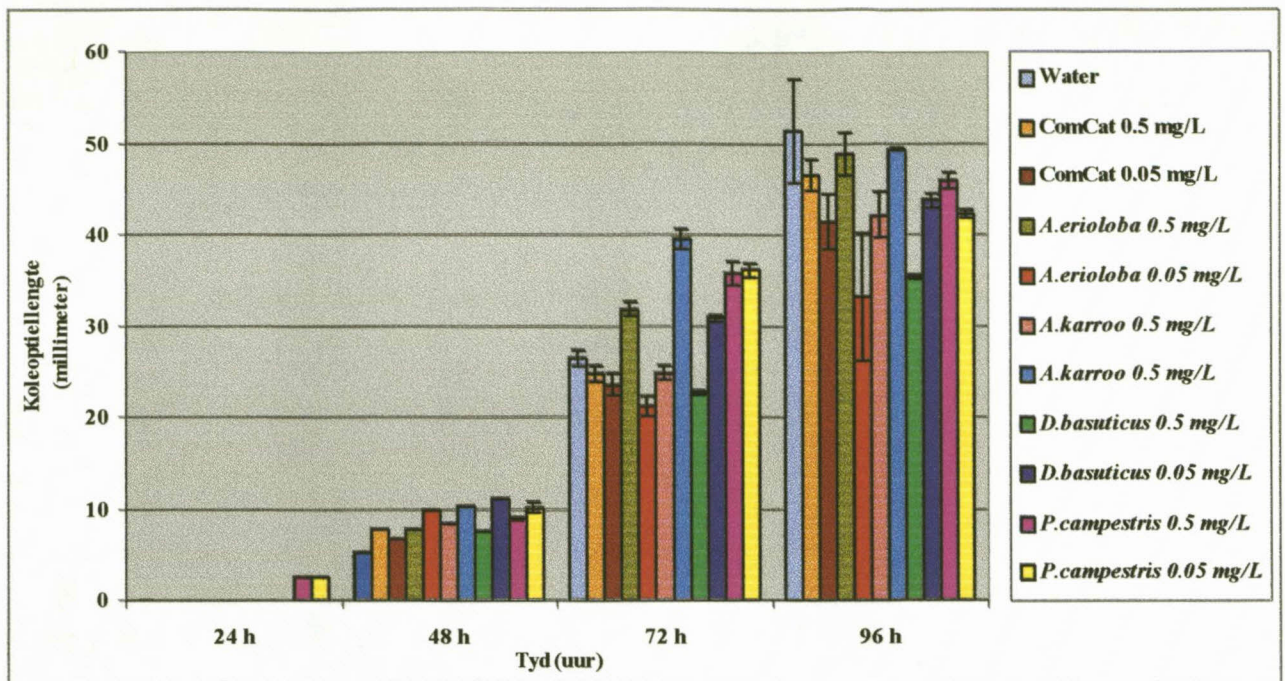
4.3.4 Effek van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies op koleoptielgroei in jong Cresssaailinge.

Die resultate in figuur 4.7 A dui daarop dat beide die 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies van die *P. campestris* saadsuspensie oor die eerste 72 uur inkuberingsperiode 'n stimulerende effek op koleoptielgroei in Cresssaailinge gehad het. 'n Soortgelyke stimulerings effek is ook oor hierdie tydinterval vir die *A. karroo* (5 en 50 mg L⁻¹) en *D. basuticus* (5 mg L⁻¹) saadsuspensies waargeneem. Na 96 uur inkubering was hierdie effek egter nie meer duidelik nie aangesien nie een van die saadsuspensies beter as die water kontrole gevaar het nie. Beide ComCat[®] en die *A. erioloba* saadsuspensie het 'n inhiberingseffek op koleoptielgroei teen die toegediende

konsentrasies getoon. Presies dieselfde tendens is vir die laer konsentrasies (0.05 en 0.5 mg L⁻¹) van die vier plantspesies se saadsuspensies waargeneem (Figuur 4.7 B).



Figuur 4.7A: Die effek van 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies van vier verskillende plantspesies op die koleoptielgroei van *Cress*-saailinge. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien.



Figuur 4.7B: Die effek van 0.05 en 0.5 mg L⁻¹ konsentrasies van gemaalde, etanol behandelde saadsuspensies van vier verskillende plantspesies op die koleoptielgroei van Cress-saailinge. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien.

4.4 Bespreking

Die doel van die aanvanklike sifting (“screening”) prosedure, aan die hand van twee biotoetse, was om vas te stel of daar enige biokatalitiese aktiwiteit in die saadsuspensies van die vier plantspesies voorgekom het. ‘n Verdere doel was om ‘n voorlopige protokol vir die verdere verloop van hierdie studie te vestig deur die aandag slegs op die plantspesie met die hoogste biokatalitiese potensiaal te vestig.

Die respirasietempo van bakkersgis, met glukose as voedingsmedium, is in die teenwoordigheid van verskillende konsentrasies saadsuspensies van elk van die vier plantspesies gemeet. In die geval van die *A. karroo* saadsuspensies was slegs die 50 mg L⁻¹ konsentrasie instaat om die respirasietempo van gis bokant die van die waterkontrolle te verhoog en het goed met die ComCat[®]

kontrole vergelyk. Al vier konsentrasies (0.05; 0.5; 5 en 50 mg L⁻¹) van die *A. erioloba* saadsuspensie het egter die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle betekenisvol verhoog met die hoogste konsentrasie (50 mg L⁻¹) duidelik die doeltreffendste. Die *A. erioloba* saadsuspensie se stimulerende effek op die respirasietempo van die gisselle was ook betekenisvol hoër as die van die ComCat[®] kontrole. Hierdie was dan ook 'n vroeë aanduiding dat die *A. erioloba* saadsuspensie 'n besondere potensiaal om die metabolisme van lewende selle te manipuleer, getoon het. Alhoewel *A. karroo* en *A. erioloba* aan dieselfde familie behoort, was dit duidelik dat die saadsuspensies van verskillende spesies verskillende reaksies by 'n monokultuur gisselle ontlok het.

Van die twee spesies wat aan die familie Caryophyllaceae behoort, het die saadsuspensie van *P. campestris* duidelik die grootste stimulerende effek op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle getoon en selfs die stimulerende effek van die ComCat[®] standaard oorskry. Ten spyte hiervan het die *D. basuticus* saadsuspensie ook die stimulerende effek van die ComCat[®] kontrole op die respirasie van gisselle oorskry. Waar die effek van die *P. campestris* saadsuspensie reeds na 30 minute inkubering duidelik was, was die effek van *D. basuticus* eers na 2 uur inkubering duidelik waarneembaar. Laasgenoemde dui daarop dat die stimulerings-effekte van die twee saadsuspensies van verskillende spesies uit dieselfde familie waarskynlik langs die weg van verskillende meganismes geskied. Hieroor kan egter alleen uitsluitel verkry word as die meganismes van respirasiestimulering indringend ondersoek word, maar val buite die bestek van hierdie studie. Wat wel in hoofstuk 6 onderneem word, is om die aktiewe bestanddeel (dele) verantwoordelik vir die biokatalitiese effek uit die plant wat die hoogste potensiaal toon te isoleer, te suiwer en te identifiseer.

Volgens Dennis en Turpin (1990) kan verhoging van die respirasietempo in 'n organisme onder die invloed van 'n plantekstrak egter eenvoudig verband hou met die beskikbaarstelling van 'n hoër

konsentrasie van een of meer respiratoriese ensieme. Laasgenoemde word egter in hierdie geval voorlopig oor die hoof gesien aangesien die saadsuspensies met 'n oormaat etanol behandel is, ten einde die gemaalde saadmateriaal meer wateroplosbaar te maak, en etanol bekend is om proteiene te denatureer (Crawford, 1977). Wat egter op hierdie stadium van belang is, is dat dit uit die respirasiestudies met 'n monokultuur gisselle duidelik geword het dat die saadsuspensies van *A. erioloba* (Fabaceae) en *P. campestris* (Caryophyllaceae) die grootste potensiaal as biokatalitiese agente toon en wel ten opsigte van die manipulerings van metabolisme. Hierdie potensiaal is vervolgens verder ondersoek aan die hand van die invloed wat saadsuspensies op saadontkieming van Cress-sade asook saailinggroei het.

Saadsuspensies van *A. erioloba* en *P. campestris* het min effek op die ontkieming van Cress-saad getoon, maar het ongetwyfeld beide 'n merkbare stimulerende effek op wortelgroei in Cress-saailinge uitgeoefen. Die vestiging van 'n sterk wortelstelsel is vir enige plant essensieel, maar meer nog vir eenjarige kontantgewasse wat in landboukundige perspektief oor 'n kort groeiseisoen in produksie moet kom. 'n Sterk wortelstelsel hou ook verband met optimale vegetatiewe groei en 'n finale oesopbrengs (Sonnevald en Herbers, 2001). In hierdie lig is die aanduiding dat die saadsuspensies van genoemde 2 plantspesies 'n positiewe effek op wortelgroei uitoefen, insiggewend.

'n Interessante waarneming was dat nie een van die saadsuspensies van die twee hoë potensiaal toetsplante, *A. erioloba* en *P. campestris*, 'n betekenisvolle stimulerende effek op die bogrondse groei (koleoptiel) van Cress-saailinge gehad het nie. Hierdie word egter in 'n positiewe lig gesien aangesien vroeë vegetatiewe groei van die bogrondse dele as ongewens beskou word vanweë die negatiewe effek wat dit op latere oesopbrengs kan hê (Boiffin *et al.*, 2001). Hierdie aspek is vroeg

reeds vir stikstofbemesting, wat dieselfde ongewenste vroeë groei van bogrondse vegetatiewe plantdele kan stimuleer wanneer te vroeg toegedien, uitgepluis (Boiffin *et al.*, 2001).

Opsommend blyk dit dat saadsuspensies van *A. erioloba* en *P. campestris* verdere ondersoek, met betrekking tot hulle biokatalitiese potensiaal, waardig is. Weens die feit dat *P. campestris* moeilik bekombaar is en nie in genoegsame hoeveelhede versamel kon word vir verdere studie nie, is besluit om 'n saadsuspensie van *A. erioloba* verder te fraksioneer met die oog daarop om die aktiewe bestanddeel (-dele), verantwoordelik vir die biokatalitiese eienskap van die plant, te isoleer en te identifiseer (hoofstuk 5).

Hoofstuk 5

Aktiwiteitsgerigte fraksionering van 'n *Acacia erioloba*

ru-saadekstrak

5.1 Inleiding

Chromatografie op verskillende wyses toegepas, is steeds die doeltreffendste tegniek vir die isolering en suiwing van biomolekules. Alle tipes chromatografie berus ook op dieselfde beginsel naamlik dat 'n mengsel biomolekules toegelaat word om in interaksie met twee fisies afsonderlike entiteite, 'n mobiele- en 'n stasionêre fase, te verkeer en komponente versprei dan tussen die twee fases. Die verspreiding van die komponente tussen die twee fases is afhanklik van die balans van aantrekkingskragte wat daar tussen die opgeloste stof se molekules en die molekules van elke fase bestaan. Afhange van die affiniteit wat die spesifieke molekule vir mekaar het, sal dit meer of minder tyd in 'n spesifieke fase spandeer. Molekules wat 'n swak affiniteit vir die stasionêre fase toon spandeer meer tyd in die mobiele fase, word sodoende vinniger uit die sisteem verwyder en op hierdie wyse volg die skeiding van molekules. Die algemene proses van beweging van 'n opgeloste stof deur 'n chromatografiese sisteem word na verwys as "ontwikkeling" (Afeyan *et. al.*, 1990). Tydens die fraksioneringsproses is 'n metode nodig om tred te hou met die posisionering van 'n spesifieke aktiewe bestanddeel in die geskeide fraksies, in hierdie geval komponente met biokatalitiese aktiwiteit, en hierna word verwys as "aktiwiteitsgerigte fraksionering" (Cannell, 1998).

In hierdie studie is van vloeistof-vloeistof ekstraksie, as die eerste stap van 'n suiweringsproses vir moontlike biokatalitiese komponente uit 'n *A. erioloba* ru-saadekstrak, gebruik gemaak. In hoofsaak is die tegniek gekies omdat die metode (1) nie beperk word deur die vlugtigheid van die monster nie, (2) nie temperatuur afhanklik is soos die geval is met ander chromatografiese metodes,

byvoorbeeld gas- chromatografie, nie, (3) ideaal is vir die skeiding van makromolekules en (4) omdat die herwinning van die oorspronklike monster, maklik is en kwantitatief kan geskied (Snyder en Kirkland, 1979).

Aangesien die metanoliese ru-ekstrak van *A. erioloba* saad die hoogste biokatalitiese aktiwiteit getoon het in vergelyking met ander plantspesies wat getoets is (hoofstuk 4), is voortgegaan om die ru-ekstrak in semi-gesuiwerde fraksies chromatografies te fraksioneer. Die fraksies se biokatalitiese potensiaal is vervolgens geïdentifiseer deur 'n konsentrasiereeks aan biotoetse (sien 3.3.2) te onderwerp omdat optimale biokatalitiese aktiwiteit konsentrasie-spesifiek is. Verder sal die optimum konsentrasie vir 'n ru-ekstrak nie noodwendig dieselfde sal wees as dié vir semi-gesuiwerde fraksies of suiwer molekules nie.

5.2 Materiaal en Metodes

5.2.1 Materiaal

Alle organiese oplosmiddels gebruik (sien 3.2.2), was van die suiwerste graad beskikbaar en verskaf deur Merck (Duitsland).

5.2.2 Metodes

5.2.2.1 Voorbereiding van die ru-ekstrak

Sien 3.3.3

5.2.2.2 Fraksionering van 'n *A. erioloba* ru-saadekstrak met behulp van vloeistof-vloeistof ekstraksie

'n Ru-ekstrak is verkry deur gemaalde sade met 100% metanol te ekstraheer (sien 3.3.3) en die metanol daarna deur vakuumbdestillasie te verwyder. Die oorblywende ekstrak is verder gedroog

(sien 3.3.3) en die ru-poeier wat verkry is, is gefraksioneer deur middel van vloeistof-vloeistof ekstraksie.

Vloeistof-vloeistof ekstrahering van die ru-ekstrakte is met behulp van 'n skeitregter uitgevoer ten einde polêre en nie-polêre komponente van mekaar te skei. Die organiese oplosmiddels wat vir hierdie doel gebruik is, is in volgorde van stygende dielektriese konstante (DC) waardes aangewend. DC-waardes is 'n goeie aanduiding van die polariteit van organiese oplosmiddels (Quellette, 1992).

Twintig gram van die ru-poeier, verkry na metanol afdamping en droging, is in 'n skeitregter geplaas en om die beurt in 'n 2:1 verhouding (2 ml oplosmiddel per gram ru-poeier) met heksaan (DC= 1.9), dietieleter (DC= 4.3), etielasetaat (DC= 6.0) en dichlormetaan (DC= 8.9) vir 15 minute gefraksioneer deur in elke geval die oplosmiddel tien maal te vervang. Elke fraksie is afsonderlik onder vakuum gedistilleer met 'n Buchi Rotavapor by 40 °C tot droog. Na droging is die spesifieke fraksie wat herwin is se massa bepaal en by -20 °C geberg vir latere gebruik.

Deur gebruik te maak van dunlaag chromatografie (TLC; sien 5.2.2.3) is die suksesvolle skeiding van die vloeistof-vloeistof ekstraksie proses getoets deur die TLC-profiel van die onderskeie fraksies te vergelyk. Fraksies met biokatalitiese potensiaal is geïdentifiseer deur die verskillende biotoetse (sien 3.2.1 en 3.2.2) uit te voer. Slegs die biokatalities aktiewe fraksies is verder met behulp van kolom- en preparatiewe dunlaagchromatografie gesuiwer (hoofstuk 6).

5.2.2.3 Kwalitatiewe dunlaag chromatografie (K-TLC)

Aluminium plate, bedek met fluoresserende Silika 60 (F 150/LS 254; 0.1 mm), is vir K-TLC skeiding van komponente in die vloeistof-vloeistof ekstraksie fraksies gebruik. Ten minste 10 µg

van elke fraksie is met behulp van 'n kapillêre buis op die basislyn van die TLC-plaat aangebring. Chloroform: metanol (50:50) is as die mobiele fase gebruik om die TLC-plate te ontwikkel in 'n vooraf gekondisioneerde ontwikkelingsstelsel.

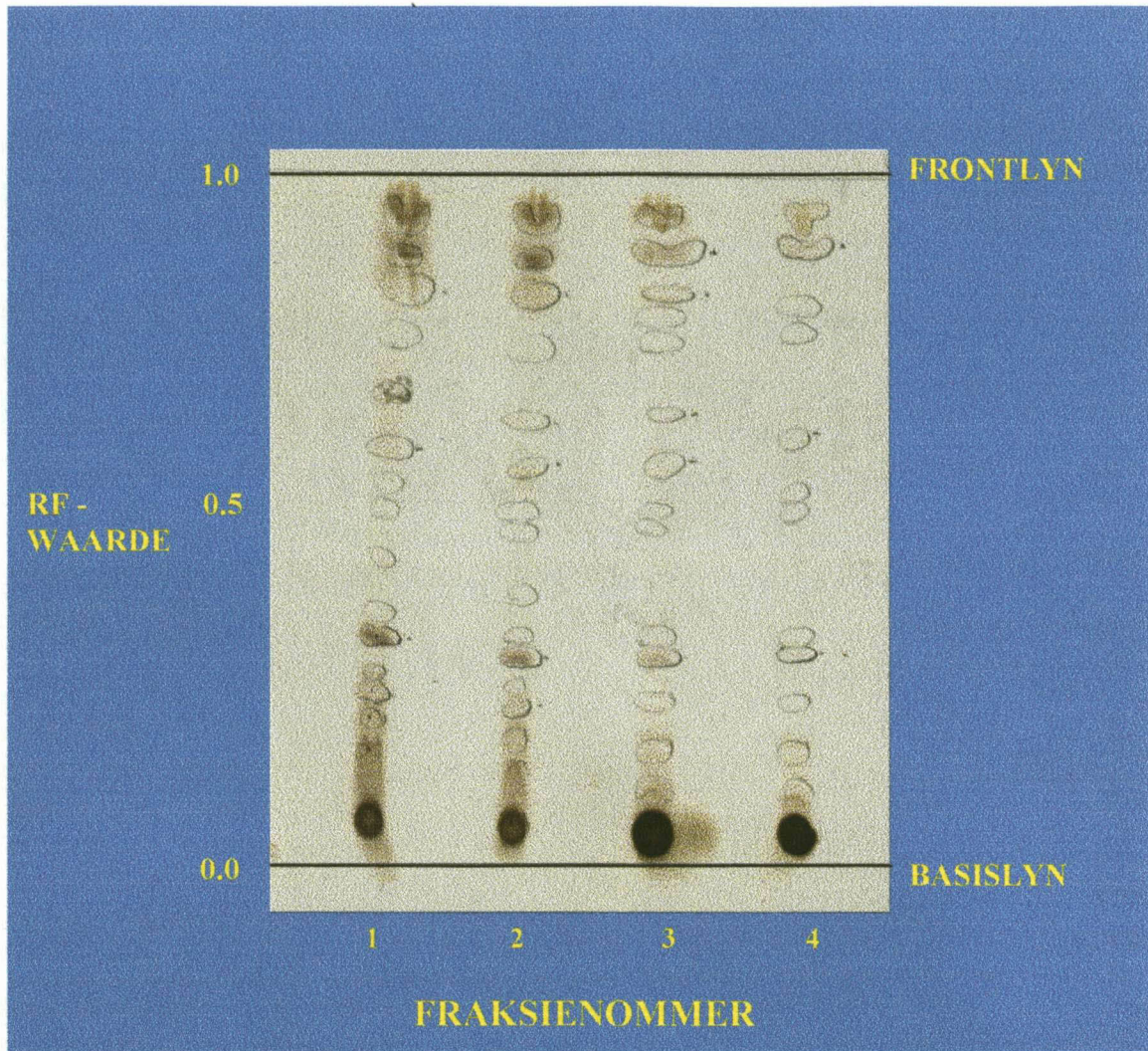
Nadat skeiding van die komponente op die TLC-plate voltooi is, is die frontlyn duidelik gemerk en die plate gedroog deur warm lug met behulp van 'n haardroër daaroor te blaas. Vervolgens is die plate met 10% (v/v) etanoliese swaelsuur (H_2SO_4) benat en vir 5 minute in 'n oond by $100\text{ }^\circ\text{C}$ ontwikkel. Bruin kolle wat as gevolg van die reaksie met swaelsuur ontwikkel het, het 'n profiel gelaat wat, tesame met berekende RF-waardes, gebruik is om die verskillende fraksies te karakteriseer.

5.2.2.4 Biotoetse

Al vier die vloeistof-vloeistof ekstraksie fraksies is vir biokatalitiese aktiwiteit getoets deur die effek van 'n konsentrasiereeks op die ontkieming van Cress-sade sowel as op wortel- en koleoptielgroeï van die saailinge oor 'n 96 uur periode te meet (sien 3.2.2). Die doel hiermee was om die biokatalitiese aktiewe vloeistof-vloeistof fraksie(s) te identifiseer met die oog op verdere suiwering en identifisering van die aktiewe bestanddeel(dele).

5.3 Resultate

5.3.1 TLC profiel van komponente teenwoordig in 'n *Acacia erioloba* ru-saadekstrak wat met behulp van 'n vloeistof-vloeistof ekstraksie prosedure gefraksioneer is.



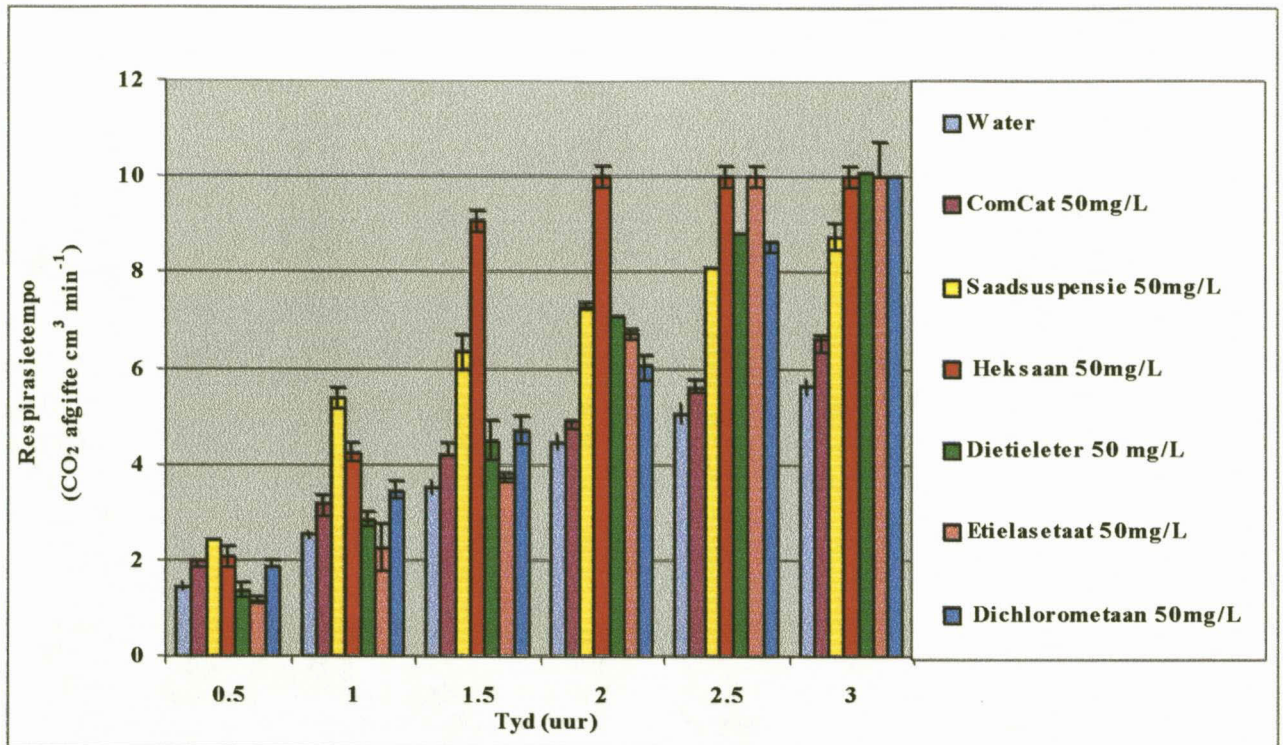
PLAAT 5.1: Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in die ru-ekstrak van *Acacia erioloba* sade wat met behulp van 'n vloeistof-vloeistof ekstraksie prosedure gefraksioneer is deur van organiese oplosmiddels in volgorde van stygende polariteit [1 = Heksaan (DC = 1.9); 2 = Dietieleter (DC = 4.3); 3 = Etilasetaat (DC = 6.0); 4 = Dichlormetaan (DC = 8.9)] gebruik te maak. Mobiele fase: Chloroform:Metanol (50:50). Stasionêre fase : Silikagel 60. Die plaat is ontwikkel met 10 % etanoliese H_2SO_4 by 100 °C

Volgens die TLC-profiel (plaat 5.1) blyk dit dat daar heelwat ooreenstemmende komponente deur die verskillende organiese oplosmiddels verwyder was ofskoon die ru-saadekstrak herhaaldelik en afsonderlik met elk van die oplosmiddels geskud is. Hieruit wil dit op die oog af voorkom asof die meerderheid komponente in die ru- saadekstrak van *A. erioloba* nie groot verskille in polariteit getoon het nie. Verskille in R_f-waardes (Tabel 5.1) wys egter daarop dat daar ten minste 25 unieke komponente of groepe komponente tussen die 4 organiese oplosmiddels versprei is. Die feit dat daar ook redelike ooreenkomste in die R_f-waardes van die komponente in verskillende oplosmiddels voorgekom het kan daarop dui dat fraksionering van die droë ru-poeier nie volledig of perfek was nie. Derhalwe is fraksies onderskei deur middel van biotoetse (sien 3.2.1 en 3.2.2) ten einde vas te stel in watter organiese fraksies die hoogste biokatalitiese aktiwiteit voorgekom het.

Tabel 5.1 Rf-waardes van komponente in 'n metanoliese ru-saadekstrak van *Acacia erioloba* wat met behulp van vloeistof-vloeistof ekstraksie gefraksioneer is

Heksaan	Dietieleter	Etielasetaat	Dichlorometaan
-	-	-	0,062
0,100	0,100	0,098	-
-	-	-	0,125
0,156	0,156	0,155	-
-	0,188	-	-
0,200	-	-	0,200
-	0,225	0,225	-
0,237	-	-	-
-	0,275	0,275	0,275
0,287	-	-	-
0,320	0,300	-	0,320
-	0,372	-	-
0,412	-	-	-
-	0,462	0,475	-
0,487	-	-	-
0,500	-	0,500	-
-	-	0,625	0,600
0,675	0,675	-	-
0,750	-	0,750	0,762
-	-	0,787	-
0,825	-	0,837	0,825
0,875	0,875	0,887	-
0,925	-	-	0,912
-	0,950	0,950	0,950
-	-	0,999	-

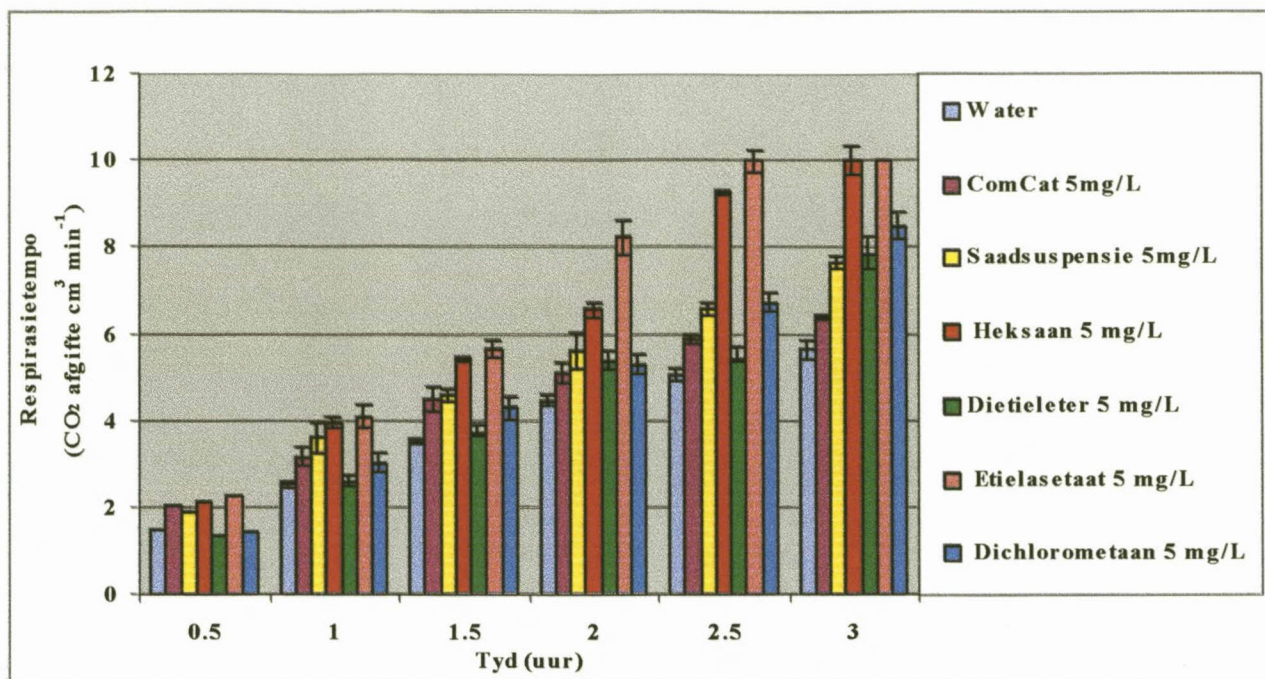
5.3.2 Effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *Acacia erioloba* sade op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle



Figuur 5.1 : Die effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle (*Saccharomyces cerviseae*) toegedien teen 'n konsentrasie van 50 mg L⁻¹. Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasie van 50 mg L⁻¹, het as kontroles gedien.

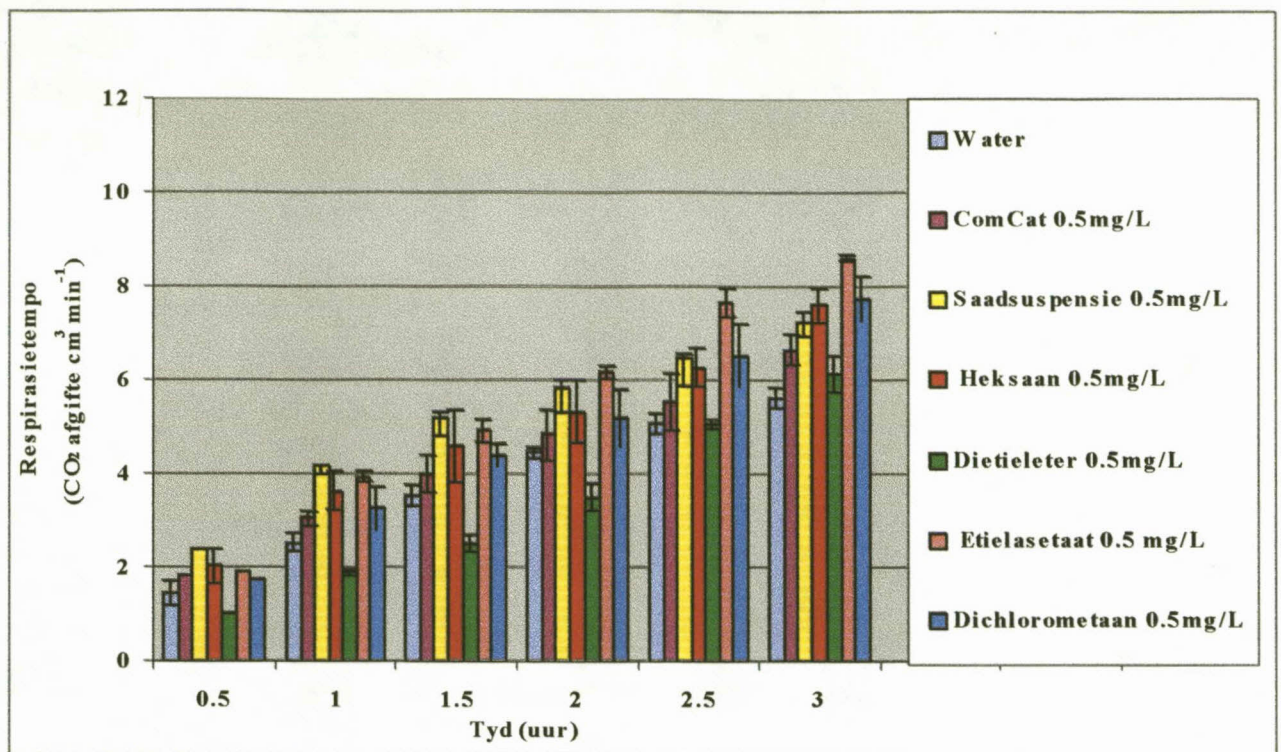
In vergelyking met die water, ComCat[®] en *A. erioloba* saadsuspensie kontroles het al vier vloeistof-vloeistof ekstraksie fraksies, teen 'n konsentrasie van 50 mg L⁻¹, die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle oor 'n periode van 3 uur verhoog. Die hekasaan fraksie gevolg deur

etielasetaat, het egter 'n beter resultaat oor 'n korter tydskuur as die ander fraksies opgelewer (Figuur 5.1).



Figuur 5.2: Die effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle (*Saccharomyces cerevisiae*) toegedien teen 'n konsentrasie van 5 mg L^{-1} . Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasie van 5 mg L^{-1} , het as kontroles gedien.

Die resultate in figuur 5.2 illustreer dat beide die heksaan en etielasetaat fraksies, teen 'n laer konsentrasie van 5 mg L^{-1} die respirasietempo van gisselle bokant die vlak van dié van die drie kontroles gestimuleer het. Die stimulerende effek van die etielasetaat fraksie was egter aanvanklik effens meer oor die eerste twee uur en die 5 mg L^{-1} konsentrasie was ook meer effektief as die 50 mg L^{-1} konsentrasie met betrekking tot die stimulering van die respirasietempo van die gisselle.



Figuur 5.3: Die effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van

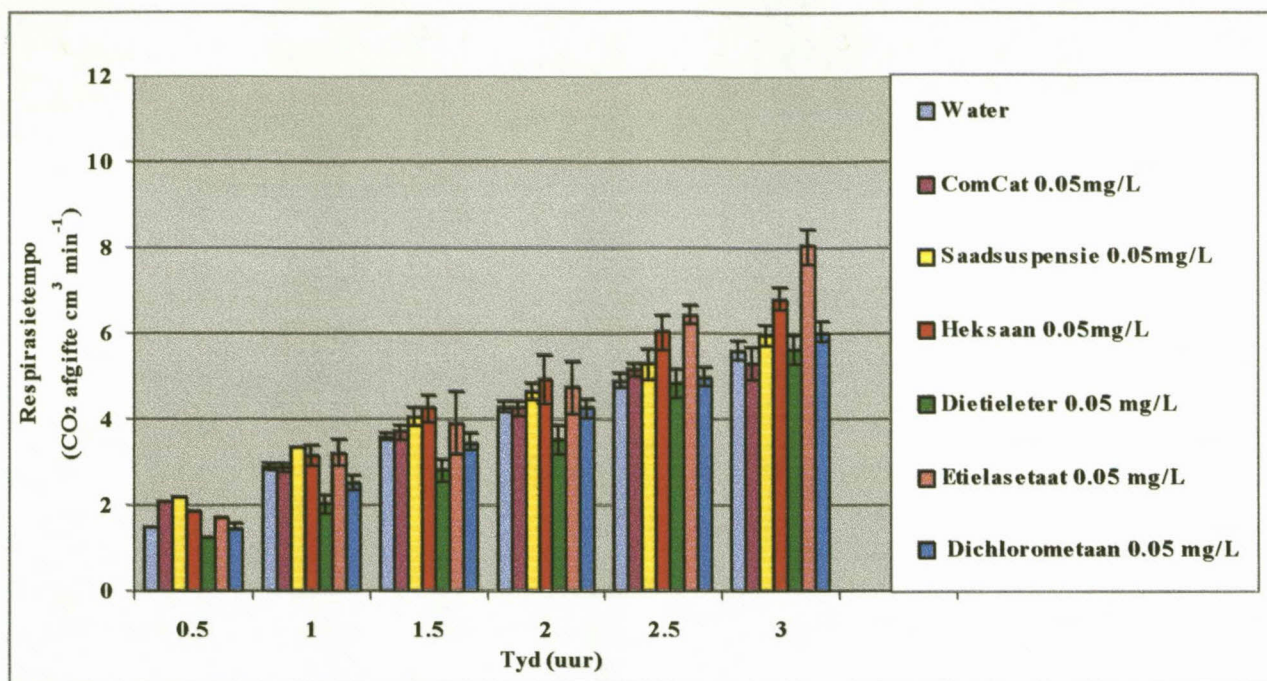
***A. erioloba* sade op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle**

(*Saccharomyces cerevisiae*) toegedien teen 'n konsentrasie van 0.5 mg L⁻¹.

Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen

dieselfde konsentrasie van 0.5 mg L⁻¹, het as kontroles gedien.

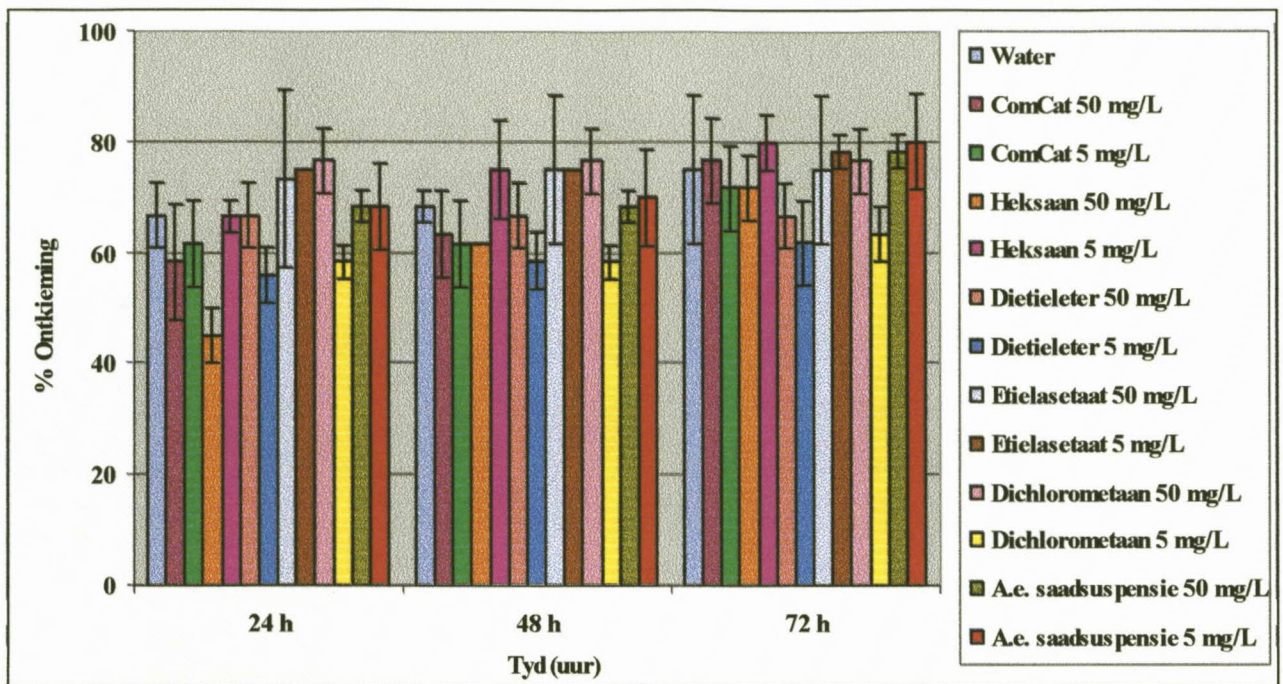
Teen 'n konsentrasie van 0.5 mg L⁻¹ het die etielasetaat fraksie die duidelikste stimulerende effek op die respirasietempo van gisselle (*Saccharomyces cerevisiae*) getoon in vergelyking met die ander fraksies en die drie kontrole behandelings (Figuur 5.3). Presies dieselfde tendens is ook vir die 0.05 mg L⁻¹ konsentrasie van die etielasetaat fraksie (Figuur 5.4) waargeneem.



Figuur 5.4: Die effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van

A. erioloba sade op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle (*Saccharomyces cerviseae*) toegedien teen 'n konsentrasie van 0.05 mg L⁻¹. Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasie van 0.05 mg L⁻¹, het as kontroles gedien.

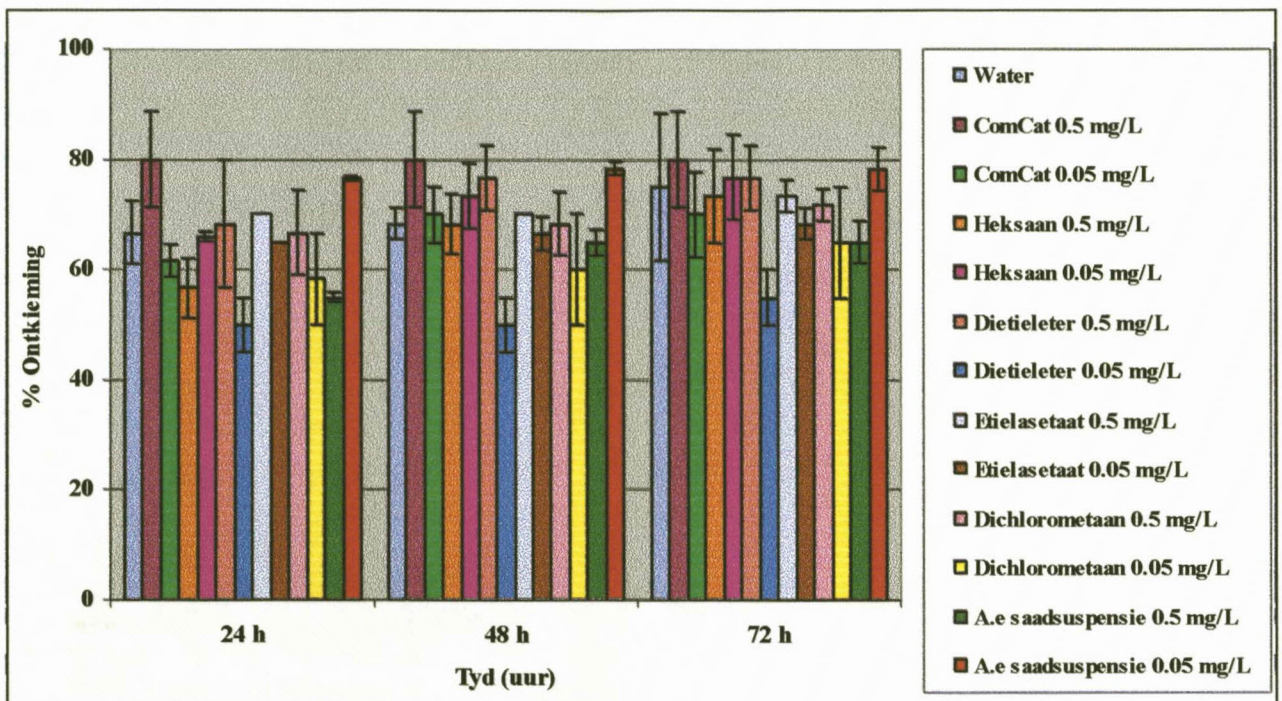
5.3.3 Effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *Acacia erioloba* sade op die ontkieming van Cress-saad



Figuur 5.5 A: Die effek van 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies van vier verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op die ontkieming van Cress-saad. Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasies, het as kontroles gedien.

Alhoewel nie een van die *A. erioloba* vloeistof-vloeistof ekstraksie saadfraksies teen konsentrasies van 5 of 50 mg L⁻¹ die ontkieming van Cress-saad merkbaar beïnvloed het nie, het beide die heksaan en etielasetaat fraksies, teen laer konsentrasies tog 'n effense stimulerende effek getoon (Figuur 5.5 A). Behalwe vir die 50 mg L⁻¹ dichlorometaan fraksie, het die ander behandelings eerder 'n inhiberende effek op die ontkieming van Cress-saad gehad.

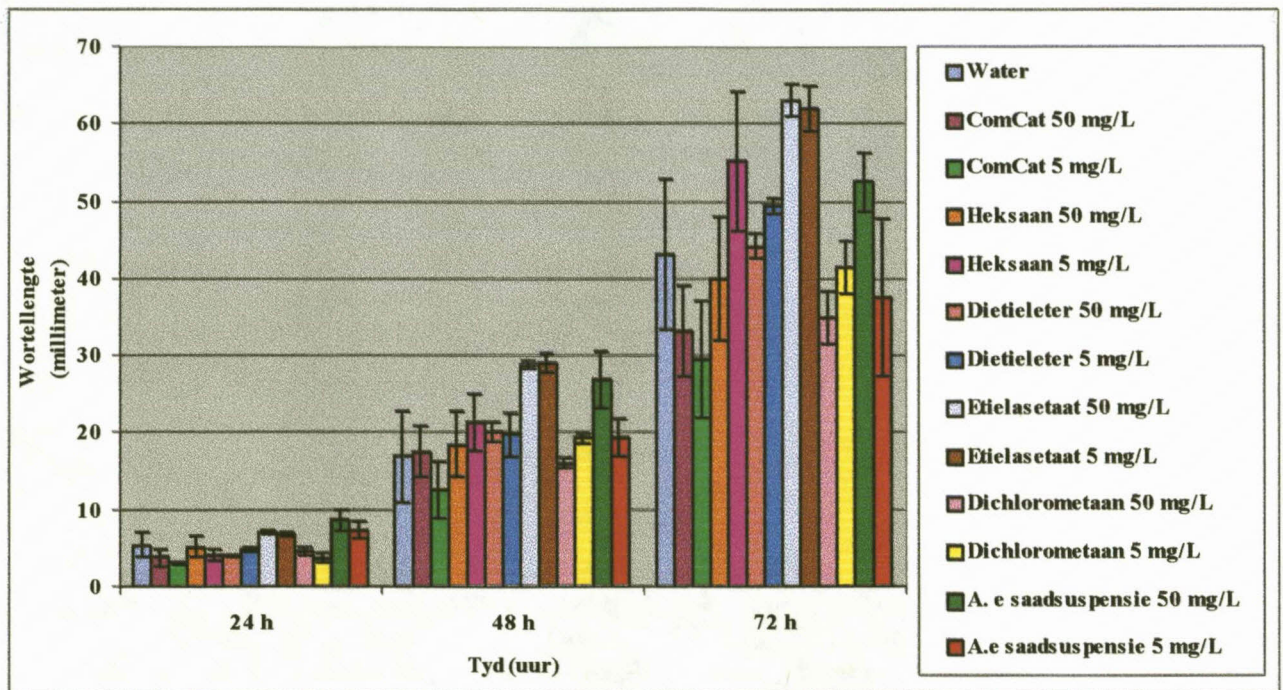
Teen 'n konsentrasie van 0.5 mg L^{-1} was dit slegs die ComCat[®] en teen 'n konsentrasie van 0.05 mg L^{-1} slegs die *A. erioloba* saadsuspensie (0.05 mg L^{-1}) behandelings wat die ontkieming van Cress-sade gestimuleer het (Figuur 5.5 B). Alle ander behandelings het teen hierdie laer konsentrasies geen stimulerende effek of eerder 'n inhiberende effek op die ontkieming van Cress-saad gehad. Hieruit blyk dit dat saadkieming van Cress-sade as biotoets nie sensitief genoeg is om betekenisvol tussen fraksies te onderskei nie. Vervolgens is die effek van die saadfraksies op saailinggroei gevolg.



Figuur 5.5 B: Die effek van 0.05 en 0.5 mg L^{-1} konsentrasies van vier verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op die ontkieming van Cress-saad. Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie teen dieselfde konsentrasies, het as kontroles gedien.

5.3.4 Effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *Acacia erioloba* sade op die wortelgroei van jong Cress-saailinge

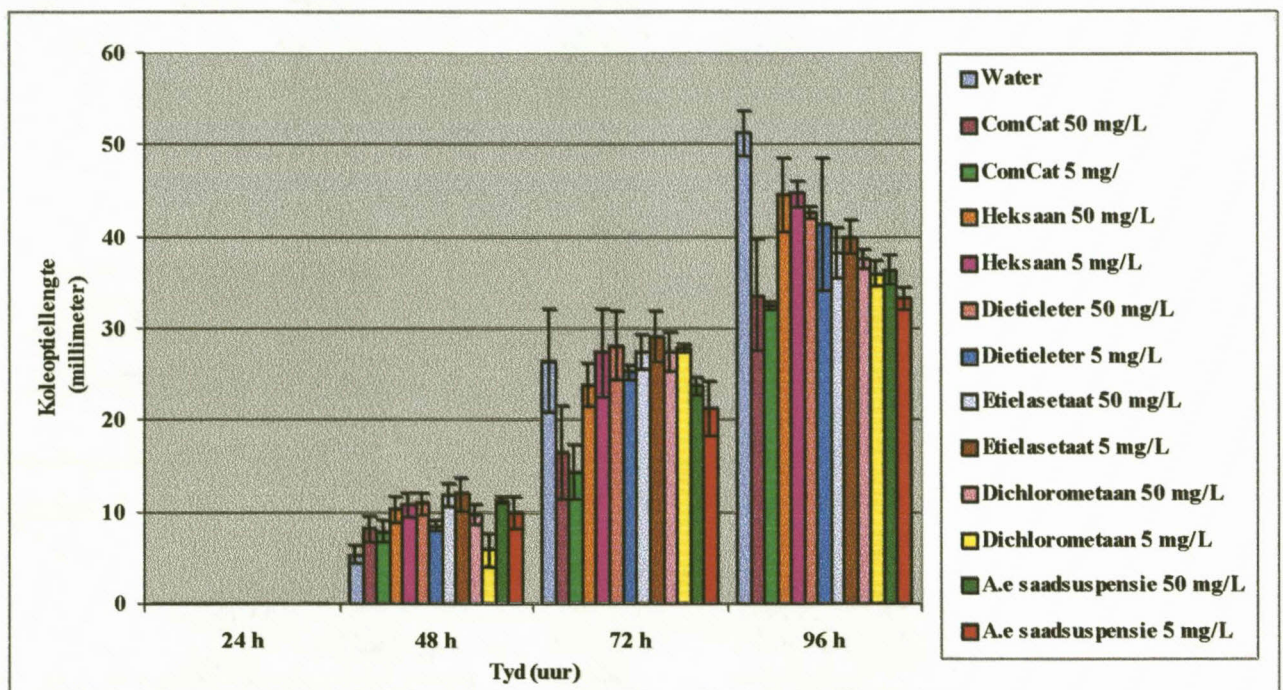
Resultate in figuur 5.6 illustreer dat beide die heksaan (5 mg L^{-1}) en die etielasetaat (5 en 50 mg L^{-1}) vloeistof-vloeistof ekstraksie fraksies na 72 uur inkubering die wortelgroei in Cress-saailinge merkbaar gestimuleer het in vergelyking met die drie kontrole behandelings (water, ComCat[®] en die *A. erioloba* saadsuspensie) asook die ander semi-gesuiwerde fraksies. Die stimulerende effek van die etielasetaat fraksies was reeds na 24 uur inkubering die duidelikste.



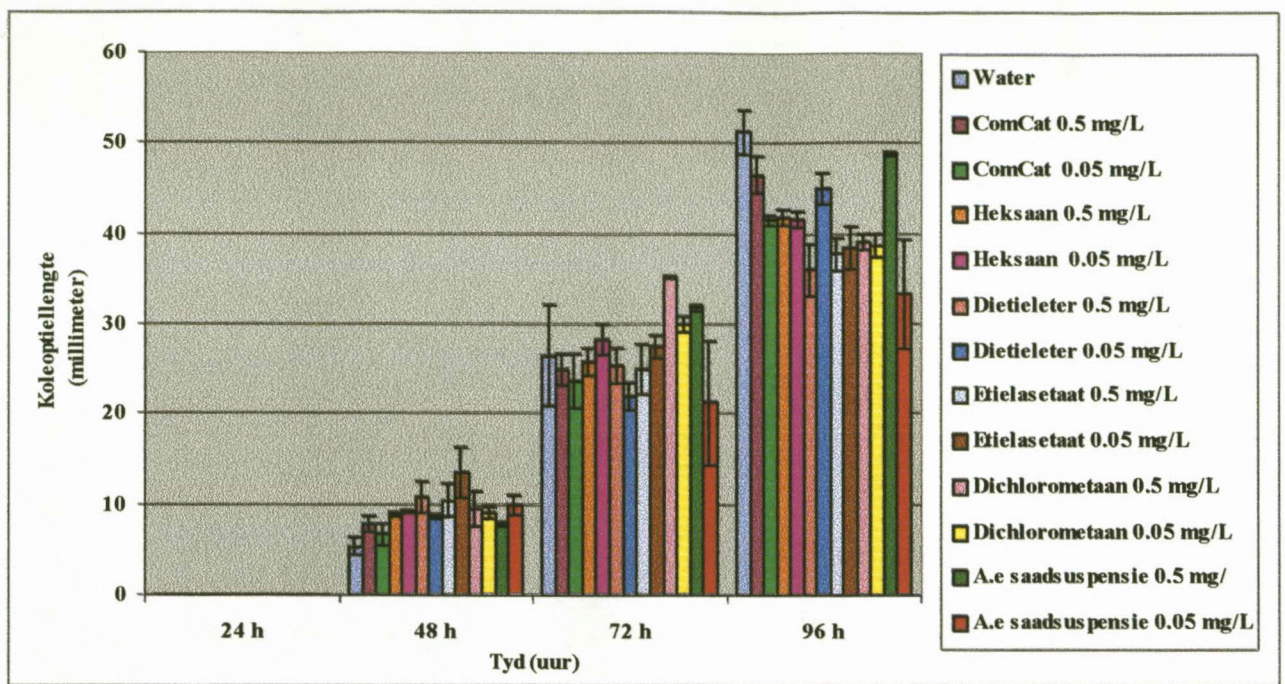
Figuur 5.6 : Die effek van 5 en 50 mg L^{-1} konsentrasies van vier verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op wortelgroei in Cress-saailinge. Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasies, het as kontroles gedien.

5.3.5 Effek van verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *Acacia erioloba* sade op die koleoptielgroeï van jong Cress-saailinge

Die resultate in figure 5.7 A en 5.7 B dui daarop dat, in vergelyking met die water kontrole, nie een van die behandelings 'n stimulerende effek op die koleoptielgroeï van Cress-saailinge gehad het nie. In die meeste gevalle kon die effek na 96 uur inkubering eerder as inhiberend geïnterpreteer word. Hieruit is dit duidelik dat koleoptielgroeï by Cress-sade nie as 'n betroubare bio-toets vir biokatalitiese eienskappe gereken kan word nie.



Figuur 5.7 A: Die effek van 5 en 50 mg L⁻¹ konsentrasies van vier verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies van *A. erioloba* sade op koleoptielgroeï van Cress-saailinge. Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie, teen dieselfde konsentrasies, het as kontroles gedien.



Figuur 5.7 B: Die effek van 0.05 en 0.5 mg L⁻¹ konsentrasies van vier verskillende vloeistof-vloeistof ekstraksies *A. erioloba* sade op koleoptielgroei van *Cress*-saailinge. Water, ComCat[®] en die oorspronklike *A. erioloba* saadsuspensie teen dieselfde konsentrasies, het as kontroles gedien.

5.4 Bespreking

Die TLC profiele van die vier semi-gesuiwerde vloeistof-vloeistof ekstraksies van die metanoliese ru-saadekstrak van *Acacia erioloba* het op die oog af groot ooreenkomste getoon wat daarop kan dui dat die gekose organiese oplosmiddels nie genoegsaam van mekaar verskil het ten opsigte van hulle DC-waardes om tussen die verskillende organiese oplosbare komponente te diskrimineer nie. Maar, van die 14 komponente in die heksaan fraksie en die 13 in die etielasetaat fraksie het die RF-waardes van slegs 5 komponente ooreengestem. Alhoewel selfs hierdie ooreenstemming moeilik is om te verklaar, kan dit verband hou met die feit dat die droë ru-materiaal gefraksioneer is en dat die

oplosbaarheid of gebrek daaraan aanleiding kon gegee het tot 'n oorloop tussen fraksies. Nietemin is met behulp van biotoetse duidelik tussen aktiewe en minder aktiewe fraksies onderskei.

Aktiwiteitsgerigte vloeistof-vloeistof ekstraksie fraksionering van die ru *A. erioloba* ru-saadekstrak het daarop gewys dat die meeste biokatalitiese aktiwiteit in die heksaan en etielasetaat fraksies gesetel was. Veral twee van die drie biotoetse, naamlik die stimulerende effek op die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle asook op die wortelgroei van Cress-saailinge het laasgenoemde bevestig. In beide gevalle was dit die heksaan fraksie, maar veral die etielasetaat fraksie, wat merkbare stimulering teweeggebring het en wat hierdie twee fraksies van die kontroles en ander behandelings onderskei het.

Alhoewel verskillende konsentrasies van die aktiewe fraksies verskillende grade van reaksie uitgelok het, was dit veral die laer etielasetaat konsentrasies (0.05 en 0.5 mg L⁻¹) wat telkens die hoogste mate van stimulering bewerkstellig het. Dit was veral waar vir die stimulering van die respirasietempo in 'n monokultuur gisselle en vir wortelontwikkeling van Cress-saailinge. Laasgenoemde was veral merkwaardig in die lig van die feit dat Cress-saad blykbaar nie baie sensitief is vir sintetiese groeistimulante nie (Leubner-Metzger, 2001). Ontkieming van Cress-saad was byvoorbeeld glad nie deur enige van die semi-gesuiwerde *A. erioloba* saadfraksies geaffekteer nie terwyl koleoptielgroei in alle gevalle eerder geinhibeer as gestimuleer is.

Dit is waarskynlik 'n positiewe eienskap dat koleoptielgroei nie gestimuleer word nie, maar eerder wortelgroei, aangesien voortydige bogrondse vegetatiewe groei ongewens is (Boiffin *et al.*, 2001). In bemestingsprogramme, veral ten opsigte van stikstofvoeding, is byvoorbeeld vasgestel dat dit nie wenslik is om vroeë bogrondse vegetatiewe groei te stimuleer nie aangesien dit 'n negatiewe effek op die finale oesopbrengs kan hê.

Opsommend kan genoem word dat dit telkens die heksaan en etielasetaat vloeistof-vloeistof ekstraksie fraksies van 'n *A. erioloba* ru-saadekstrak was in twee van die drie biotoetse biokatalitiese aktiwiteit getoon het. Aangesien die semi-gesuiwerde biokatalitiese aktiewe etielasetaat fraksie vanuit 'n *A. erioloba* ru-saadekstrak telkens teen die laagste konsentrasie die opvallendste stimulerende effek getoon het, is besluit om slegs hierdie fraksie verder te suiwer. In hoofstuk 6 word verslag gedoen oor die isolering, kolom- en dunlaagchromatografiese suiwering asook die identifisering van die aktiewe biokatalitiese komponent (e).

Hoofstuk 6

Isolering, suiwering en identifisering van 'n biokatalities aktiewe komponent uit die etielasetaat fraksie van 'n

A. erioloba saadekstrak

6.1 Inleiding

Met behulp van 'n vloeistof-vloeistof ekstraksie prosedure is 'n biokatalities aktiewe semi-gesuiwerde etielasetaat fraksie van *A. erioloba* saad bekom (Hoofstuk 5). In hierdie hoofstuk word die verdere fraksionering en suiwering van aktiewe komponente in hierdie fraksie bespreek. Die bioaktiewe etielasetaat fraksie is deur middel van kolomchromatografie verder gefraksioneer (Neher, 1964) en slegs daardie fraksies wat biokatalitiese aktiwiteit getoon het is voorts met behulp van preparatiewe dunlaagchromatografie (TLC) verder gesuiwer. Van al die verskillende chromatografiese metodes wat tans toegepas kan word, word TLC verkies omdat (1) die uitslag van analyses vinnig is, (2) 'n TLC profiel ook semi-kwantitatiewe inligting oor belangrike komponente in 'n middel kan verskaf wat reeds iets sê van die kwaliteit van 'n oplossing of middel, (3) TLC 'n chromatografiese "vingerafdruk" van die betrokke middel wat getoets word voorsien wat dit moontlik maak om die identiteit en suiwerheid van oplossings te monitor en (4) omdat TLC 'n doeltreffende skeidingsprosedure is wat gebruik kan word om verskillende kombinasies van middels te analiseer (Wagner en Blatt, 1996).

Die uitsluitlike doel met die prosedure wat gevolg is, was om by wyse van aktiwiteitsgerigte suiwering die komponent(e) verantwoordelik vir die biokatalitiese eienskap, in 'n suiwer genoeg vorm te bekom sodat die struktuurformule(s) van die komponent(e) deur middel van kernmagnetiese resonans (KMR) spektroskopie ontsyfer kon word. Laasgenoemde is belangrik vir

opvolgstudies om die meganisme(s) van werking te ontsyfer asook met die oog op fitotoksiteitstudies wat enige beoogde produkontwikkelingsaksies moet ondersteun.

6.2 Materiaal en Metodes

6.2.1 Materiaal

Alle organiese oplosmiddels gebruik was van die suiwerste graad beskikbaar en is, soos die pakkingsmateriaal vir kolomchromatografie (Kieselgel 60; partikelgrootte 0.063 - 0.200 mm; 70 – 230 mesh ASTM) asook die aluminium dunlaag chromatografie plate (silikagel 60 F 254; 20 x 20 cm), verskaf deur Merck (Duitsland). Preparatiewe dunlaag chromatografie plate (silikagel + indikator, 1 mm, G 1510 / LS 254; 20 x 20 cm) is aangekoop van Schleicher en Schuell (Duitsland) of Sigma (Duitsland).

6.2.2 Metodes

6.2.2.1 Kolomchromatografiese fraksionering van die aktiewe etielasetaat fraksie.

Slegs die bioaktiewe etielasetaat fraksie, wat met behulp van die vloeistof-vloeistof ekstraksie prosedure (5.2.2.2) bekom is, is verder kolomchromatografies gesuiwer. Silikagel 60 is as stasionêre fase gebruik en laasgenoemde is voorberei deur 150 cm³ van die mobiele fase (Chloroform:MeOH: 50:50) by 50 g silikapoeier te voeg om 'n pasta te verkry. Die pasta is na 'n glaskolom (30 x 2 cm), wat op 'n kolfstaander gemonteer is, oorgedra en toegelaat om te stabiliseer en te kondisioneer deur tien bedvolumes van die mobiele fase deur die oop kolom sisteem te laat vloei. Honderd milligram van die bioaktiewe etielasetaat saadfraksie, opgelos in 1 ml loopvloeistof (chloroform:metanol), is met behulp van 'n pipet versigtig op die oppervlak van die stasionêre fase geplaas. Komponente is toegelaat om te skei deur chloroform: metanol (50:50) as mobiele fase te gebruik.

Die eluaat se vloeitempo van $0.714 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ is deur gravitasie bepaal, maar die volume fraksies wat verlang is (5 cm^3), is gereguleer deur 'n Gilson (model FC-203 B; USA) fraksieversamelaar. TLC-profiel (sien 5.1.2.3) is van elke derde kolomfraksie verkry en fraksies waarvan die TLC-profiel ooreengestem het, is bymekaar gevoeg. Die gekombineerde kolomfraksies is ingedamp en bio-toets is daarop uitgevoer om vas te stel in watter fraksies die biokatalitiese aktiwiteit geleë was. Slegs die aktiewe kolomfraksies is verder gesuiwer.

6.2.2.2 Preparatiewe dunlaag chromatografiese (P-TLC) suiwing van komponente in die bioaktiewe gekombineerde kolomfraksies

Dieselfde prosedure soos in 5.1.2.3 uiteengesit is ook hier gebruik, behalwe dat daar van $20 \times 20 \text{ cm}$ glasplate, bedek met 1 mm Silika Gel 60 fluoresserende indikator, gebruik gemaak is. Nie meer as 50 mg van die semi-gesuiwerde fraksies is in 'n band op die basislyn aangebring nie. Dieselfde mobiele fase as wat vir K-TLC gebruik was, is ook vir P-TLC gebruik (sien 5.1.2.3).

Die posisies van komponente, na ontwikkeling van die plate, is deur middel van fluoresserende UV-licht (254 of 365 nm) vasgestel en met 'n potlood gemerk. Elk van die komponente is afsonderlik van die plate afgeskraap en na skoon eppendorfbuisies oorgedra. Etanol is as oplosmiddel gebruik om komponente met RF-waardes hoër as 0.5 en metanol vir komponente met RF-waardes laer as 0.5 op te los (Quellette, 1992). Silika Gel is verwyder deur die mengsels teen $12\,000 \text{ g}$ vir 5 minute te sentrifugeer en die supernatante is na skoon eppendorfbuisies oorgedra. Die supernatant, wat gesuiwerde molekules kon bevat, is na afdamping vir bioaktiwiteit getoets (sien 3.2). Voorts is die komponente ook deur middel van verskillende kleurreagense minstens op die vlak van die groep chemikalieë waaraan hulle behoort geïdentifiseer (sien 6.2.2.3).

Deur van biotoets 2 (sien 3.2.2) gebruik te maak, is elk van die 13 semi-gesuiwerde gekombineerde kolomfraksies vir biokatalitiese aktiwiteit getoets. Slegs twee van die fraksies (bane 4 en 6) was biokatalities aktief. K-TLC skeidings van elk van hierdie fraksies of groep komponente (bane 4 en 6) is uitgevoer ten einde die suiwerheid van elk te bepaal. Chloroform:Metanol (70:30) is as mobiele fase gebruik. Na die afsonderlike skeiding van die genoemde aktiewe komponente of groep komponente op K-TLC plate, is elk volgens 'n standaardmetode met 10% metanoliese H_2SO_4 gekleur, maar ook met behulp van standaard kleurreagense ten einde die groepe chemikalieë waaraan verbindings behoort het te identifiseer. Komponente wat in enkel gekonsentreerde kolle voorgekom het is vir suiwerheid getoets deur 'n verdunningsreeks van elk op 'n K-TLC plaat te skei en deur van 'n verskeidenheid mobiele fases gebruik te maak. Op hierdie wyse is vasgestel dat fraksie 4 uit slegs een suiwer komponent bestaan het en vervolgens is die struktuur daarvan by wyse van kernmagnetiese resonans (KMR) spektroskopie ontsyfer (sien 6.1.2.5).

Verdunningsreekse van komponent 4, geskei by wyse van K-TLC, deur van verskillende mobiele fases gebruik te maak, het aan die lig gebring dat kolomchromatografie fraksie 6 uit ses komponente saamgestel was. Hierdie 6 komponente is met behulp van P-TLC gesuiwer maar, was in sulke klein hoeveelhede teenwoordig dat dit onmoontlik was om vir biokatalitiese aktiwiteit te toets of om KMR ontledings uit te voer. 'n Poging is wel aangewend om die chemiese groepe waaraan hierdie 6 komponente behoort het deur middel van standaard kleurreaksies te toets (sien 6.2.2.3).

6.2.2.3 Identifisering van die groepe chemikalieë waaraan gesuiwerde komponente behoort

Standaard kleurreagense is gebruik om, na K-TLC-skeiding (sien bylae) van biokatalities aktiewe komponente, direk op die TLC plate vas te stel aan watter bekende chemiese groepe verbindings behoort het.

a) Alkaloïde

Die meeste plantalkaloïede is derivate van tersiêre amiene, terwyl ander primêre of sekondêre stikstof in hulle struktuur bevat. Die basiese struktuur van individuele alkaloïede varieer egter aansienlik, afhangende van die tipe stikstof teenwoordig, en beïnvloed dus die kleurreaksie en fluoressensie van die onderskeie komponente (Waterman en Mole, 1994). Onder UV-lig en by 254 nm vind daar blussing van sommige alkaloïede, nl. indole, puriene asook tropiene plaas, terwyl die meeste alkaloïde blou, blou-groen of violet onder UV-lig by 365 nm fluoresseer.

Dragendorff se reagens (sien bylae) word algemeen gebruik vir die identifisering van alkaloïede in plantekstrakte (Wagner en Bladt, 1996). In sigbare lig kleur alkaloïede bruin of oranje-bruin na behandeling met Dragendorff se reagens gevolg deur 10% etanoliese swaelsuur.

b) Antraseen derivate

Kenmerkende Komponente van hierdie groep is antrakinson, antranole en antrone terwyl die meeste antraseen-derivate egter as O-glikosiedes in plante teenwoordig is (Waterman en Mole, 1994). Afhangende van die tipe komponente teenwoordig, toon die meeste blussing onder UV-lig by 254 nm terwyl hulle geel of rooi-bruin onder UV-lig by 365 nm fluoresseer.

Vyf persent etanoliese kaliumhidroksied (KOH) is as kleurreagens gebruik. Nadat die TLC-plaat hiermee behandel is kleur antraknone normaalweg rooi in sigbare lig en fluoresseer in dieselfde kleur onder UV-lig by 365 nm. Hierteenoor fluoresseer antrone en antranole geel na behandeling met 5% etanoliese KOH en kan in sigbare lig ook as geel kolle waargeneem word (Wagner en Bladt, 1996).

c) Terpenoïede (“Bitter drugs”)

Verteenwoordigers van hierdie groep word beskou as gemodifiseerde of gepolimeriseerde isopreen residue. Die isopreen eenheid besit verskillende addisionele groepe, verskil in die vlakke van onversadiging en het oop of geslote ringstrukture. Onder hierdie groep ressorteer ook derivate van monoterpene, diterpene en triterpene. Afhangende van die tipe struktuur en skelet van die molekule kan blussing onder UV-lig by 254 nm waargeneem word, terwyl daar geen kenmerkende fluoressensie by 365 nm voorkom nie (Wagner en Bladt, 1996).

Vanillien in swaelsuur (sien bylae) is as kleurreagens gebruik. Na behandeling van die plaat met vanillien is dit in 'n oond geplaas by 100°C vir 10 min. Onder UV-lig by 365 nm fluoresseer komponente wat aan hierdie groep behoort rooi-violet, bruin-rooi, blou-groen, blou-grys of rooi-grys afhangende van die tipe struktuur van die molekule (Smith, 1976).

d) Kardiale glikosiede

Hierdie groep bevat steroïed glikosiedes wat spesifiek die ritme van die hartspier beïnvloed en vandaar die naam kardiale glikosiedes (Waterman en Mole, 1994). Kardiale glikosiedes toon baie swak blussing by 254 nm UV-lig en geen fluoressensie by 365 nm nie.

Kedde se reagens (sien bylae) is gebruik vir die waarneming van die γ -laktoonring in kardiaale glikosiedes. Tydens kontak met die kleurreagens toon komponente 'n pienk of blou-violet kleur in sigbare lig. Die kleur verdwyn na 'n paar minute, maar word herwin deur die plaat weer met Kedde se reagens te bespuit (Wagner en Bladt, 1996).

e) Fenole

Vir die identifisering van alle fenoliese verbindings word 'n ammonium vandaatanisidien oplossing (sien bylae) gebruik (Wagner en Bladt, 1996). Na behandeling toon fenole 'n variasie van kleurreaksies, naamlik blou of pers, maar meestal 'n duidelike blou-violet kleur teen 'n pienk agtergrond (Haslam, 1989).

f) Flavonoïede

Dit is die grootste groep natuurlike fenole en het 'n kenmerkende flavonoïed C_{15} nukleus. Die variasie in die struktuur van flavonoïede hang af van die kondensasie van die asetaat eenhede of is 'n produk van fenolbiosintese. Die meeste van die komponente is teenwoordig as mono- of diglikosiedes (Smith, 1976). Alle flavonoïede toon ligte blussing by 365 nm UV-lig wat verdiep na behandeling met 'n kleurreagens soos natuurlike produk-polietileenglikol (NP/PEG; Wagner en Bladt, 1996).

Die NP/PEG reagens (sien bylae) word normaalweg gebruik vir die identifisering van flavonoïede. Op grond van hul chemiese struktuur word flavonoïede egter in twee groepe geklassifiseer naamlik flavone en flavanole, wat verskillende kleurreaksies met hierdie reagens toon. Flavanole

fluoresseer gewoonlik in verskillende skakerings van oranje-geel of geel-groen by 365 nm UV-lig terwyl flavone helder oranje of geel-groen fluoresseer.

g) Steroïede

Algemene steroïede word gewoonlik geïdentifiseer deur die K-TLC plaat waarop die suiwer komponente geskei is te bespuit met 'n 2 % ysterchloried (FeCl_3) oplossing. Die plaat word daarna vir 5 min by 100 °C gelaat. Blou kolle in sigbare lig dui die teenwoordigheid van steroïede aan.

6.2.2.4 Kernmagnetiese resonans spektroskopie (KMR)

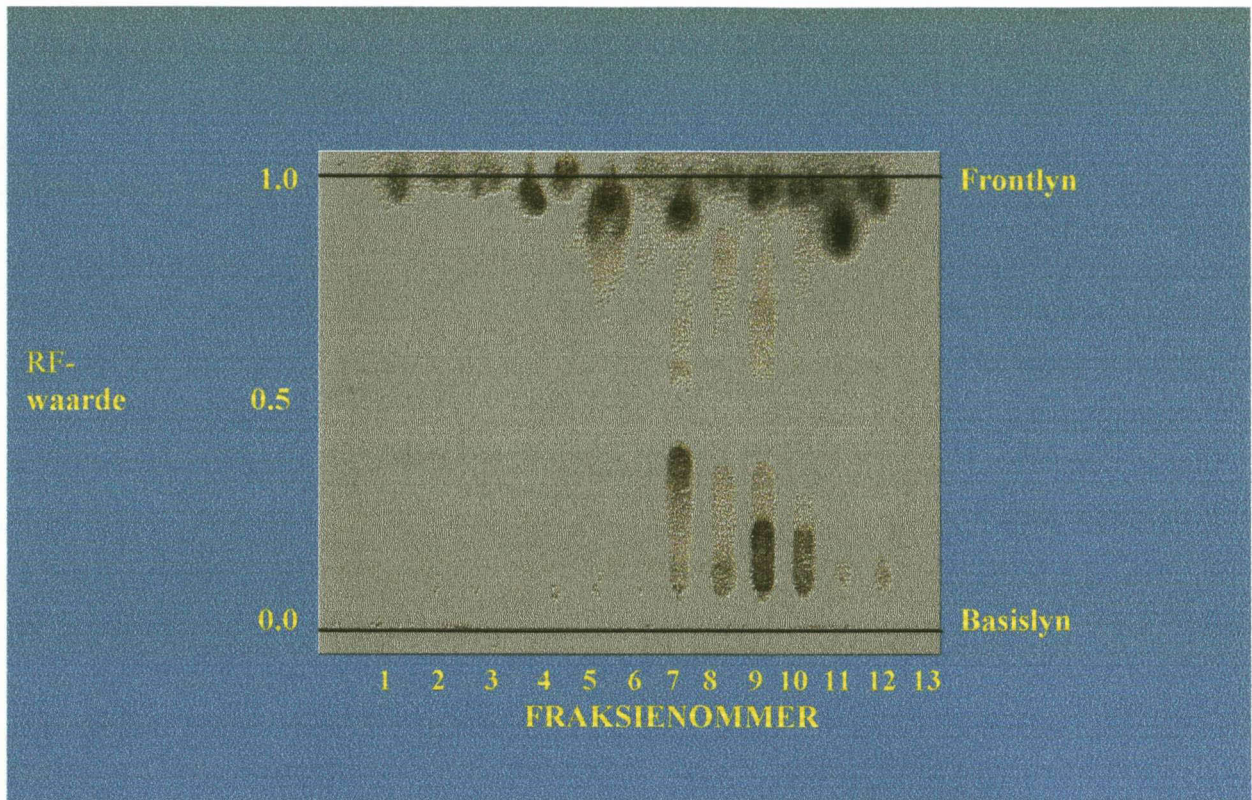
KMR-spektra is met 'n AVANCE DPX300 Bruker spektrometer in asetoon afgeneem. Tetrametielsilaan (TMS) is as interne standaard gebruik en chemiese verskuiwings is deurgaans as dele per miljoen (ppm) op die δ -skaal aangedui, terwyl koppelingskonstantes (J) in Hertz (Hz) akkuraat tot 0,2 Hz uitgedruk word. Spektra is by 298 K afgeneem. Daar is van multiplet (m) as sein multiplisiteit gebruik gemaak.

6.2.2.5 Biotoetse

Ontkieming van Cress-sade en die daaropvolgende saailinggroei is in die teenwoordigheid van al 13 semi- gesuiwerde kolomfraksies van die etielasetaat ekstraksie (sien 3.1.2), teen 'n konsentrasie van $50 \mu\text{g L}^{-1}$, getoets ten einde vas te stel in watter fraksie die biokatalitiese aktiwiteit geleë was.

6.3 Resultate

6.3.1 TLC-profiel van komponente in gekombineerde semi-gesuiwerde kolomchromatografie fraksies van 'n *Acacia erioloba* etielasetaat ekstrak



PLAAT 6.1: Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in 'n etielasetaat fraksie van *A. erioloba* wat vooraf met behulp van vloeistof-vloeistof fraksionering van die saadekstrak bekom is en verder kolomchromatografies geskei is. (1-13 = gekombineerde kolomfraksies). Mobiele fase: Chloroform : Metanol (50:50). Stationêre fase: Silikagel 60. Die plaat is ontwikkel met 10 % etanoliese H_2SO_4 .

Plaat 6.1 illustreer dat fraksies 1 tot 5 asook fraksies 12 en 13 relatief suiwer met behulp van kolomchromatografiese fraksionering herwin is in die sin dat enkel asook relatief klein kolle op die plaat gekonsentreer het. Fraksies 6 tot 11 was duidelik uit meer as een komponent saamgestel en

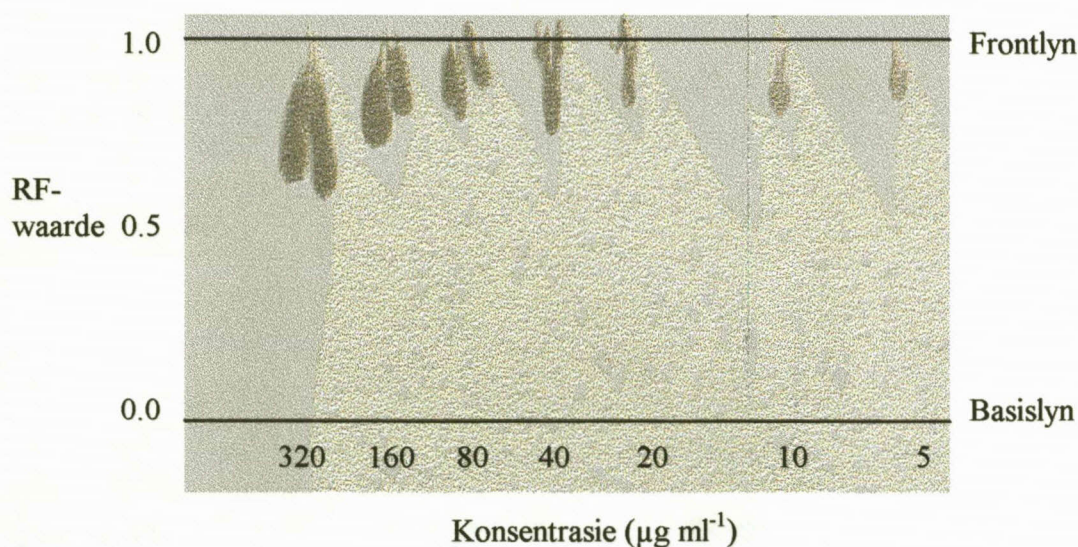
nie suiwer nie. Ten einde vas te stel waar die biokatalitiese aktiwiteit geleë was, is al 13 kolomchromatografie fraksies aan biotoetse onderwerp. Aangesien persentasie kieming en wortelgroei voorheen as die sensitiefste biotoetse geïdentifiseer is (Hoofstuk 4), is hierdie twee toetse gebruik om die bio-aktiewe kolomchromatografie fraksie te identifiseer.

TABEL 6.1 Persentasie kieming en wortelgroei van Cress-saailinge na 96 h inkubering by 25 °C in die teenwoordigheid van 50 µg L⁻¹ van elk van die gekombineerde kolomchromatografie fraksies van 'n semi-gesuiwerde *A. erioloba* etielasetaat ekstrak (plaat 6.1).

FRAKSIE	% KIEMING	WORTELLENGTE (mm)
Water (kontrole 1)	70 ±10.4	58.87 ±4.61
ComCat (kontrole 2)	75 ±7.63	60.22 ±6.25
1	70 ±5.36	52.16 ±2.42
2	70 ±4.66	58.40 ±2.05
3	85 ±4.32	54.08 ±1.89
4	80 ±2.88	69.46 ± 0.96
5	65 ±3.12	60.30 ±1.22
6	80 ±3.12	69.41 ±0.82
7	75 ±3.75	54.52 ±0.65
8	80 ±2.73	53.32 ±1.20
9	50 ±3.30	54.50 ±1.12
10	60 ±3.12	55.64 ±1.05
11	80 ±3.30	57.76 ±2.72
12	70 ±3.30	59.72 ±1.53
13	60 ±3.52	39.92 ±1.32

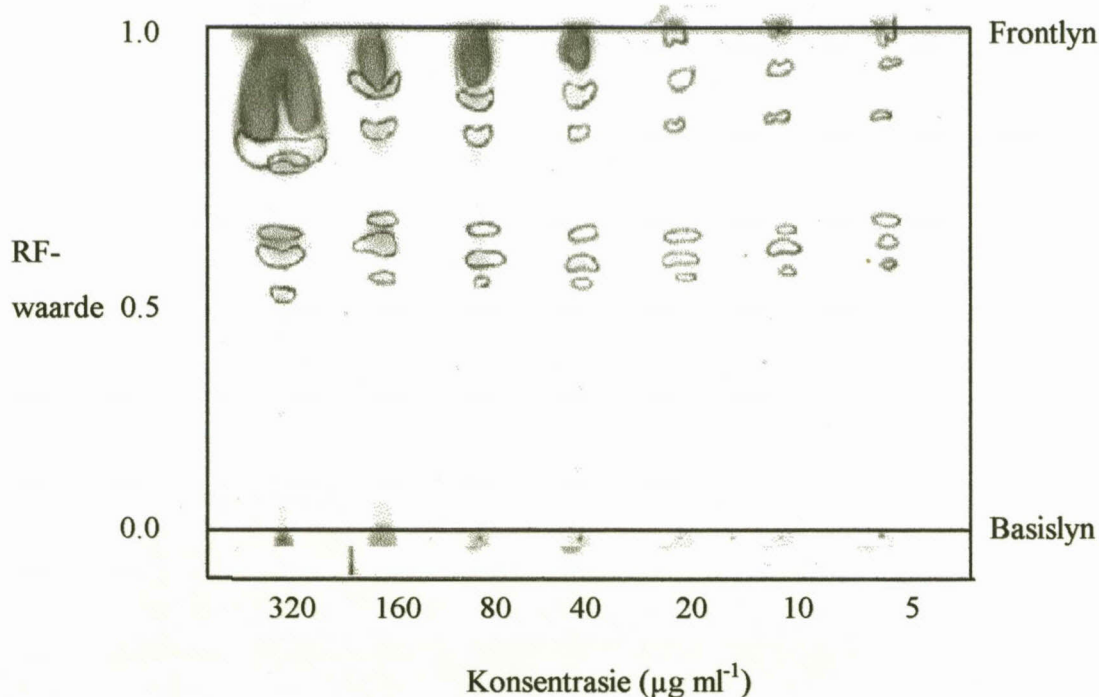
Twee biokatalities aktiewe kolomchromatografie fraksies (bane 4 en 6; plaat 6.1), wat beide ontkieming van *Cress-sade* en wortelgroeï in die saailinge bevorder het (Tabel 6.1), is geïdentifiseer. Uit die 2,68 Kg *A. erioloba* sade wat oorspronklik geëkstraheer is, is slegs 133,68 mg in fraksie 4 en 38,20 mg in fraksie 6 herwin. Van die dertien fraksies is slegs fraksies 4 en 6 verder gesuiwer.

Die semi-gesuiwerde aktiewe kolomchromatografiese fraksies 4 en 6 is vir suiwerheid getoets deur K-TLC skeidings met 'n konsentrasiereeks en ook met behulp van verskeie mobiele fases, naamlik Chloroform : Metanol (50:50), Chloroform : Metanol (70:30) en Chloroform : Metanol (30:70). Slegs een komponent is in fraksie 4 op hierdie wyse waargeneem wat op suiwerheid dui (Plaat 6.2).



PLAAT 6.2: K-TLC skeiding van 'n konsentrasiereeks van fraksie 4 ten einde die graad van suiwerheid van die fraksie te toets. Chloroform : Metanol (70:30) is as mobiele fase gebruik. Die plaat is ontwikkel met 10 % etanoliese H_2SO_4 .

Fraksie 6 het uit ten minste 6 komponente bestaan (Plaat 6.3; van bo na onder genommer). Die herwinning van die 6 komponente met behulp van preparatiewe dunlaagchromatografie was egter so laag dat dit nie moontlik was om verdere biotoetse daarop uit te voer nie. Die beskikbare materiaal is dus slegs gebruik om met behulp van kleurreagense (Wagner en Blatt, 1996) vas te stel aan watter chemiese groepe die komponente behoort het (Tabel 6.2).



PLAAT 6.3: K-TLC skeiding van 'n konsentrasiereeks van fraksie 6 ten einde die graad van suiwerheid van die fraksie te toets. Chloroform : Metanol (70:30) is as mobiele fase gebruik.. Die plaat is ontwikkel met 10 % etanoliese H₂ SO₄.

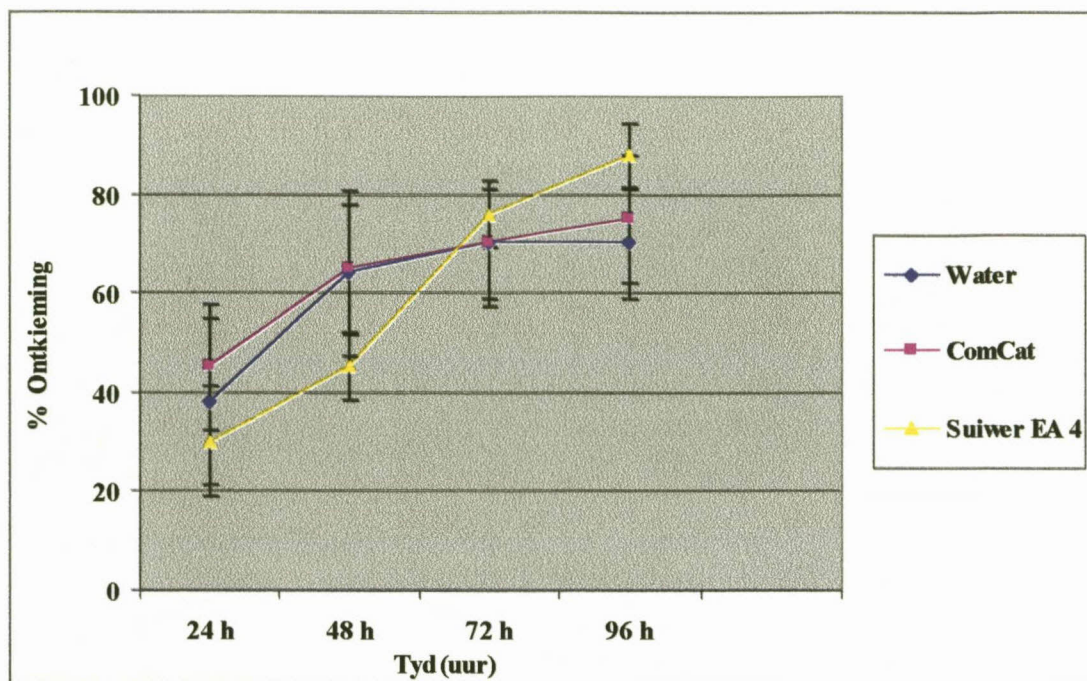
Komponent 4 was egter in genoegsame hoeveelhede herwin om biotoetse, chemiese toetse sowel as kernmagnetiese resonans spektroskopie (KMR) daarop uit te voer. Die resultate in tabel 6.2

illustreer dat fraksie 4 positief getoets het vir antrone, alkaloiëde en algemene steroïede met behulp van kleurreagense (Wagner en Bladt, 1996). Sensitiewe toetse om tussen hierdie drie groepe sekondêre produkte te onderskei kon nie in die literatuur gevind word nie. Derhalwe is van KMR spektroskopie gebruik gemaak (sien 6.3.3). Vanweë die lae herwinning van die ses komponente in fraksie 6, kon deur middel van kleurreagense hoogstens vasgestel word aan watter chemiese groepe elk behoort het. Vier chemiese groepe (alkaloiëde, antrone, terpenoïede en koumariene) is deur hierdie ses komponente verteenwoordig (Tabel 6.2).

TABEL 6.2: Identifisering van die groepe chemikalieë waaraan komponente wat uit 'n etielasetaat fraksie van *Acacia erioloba* geïsoleer en gesuiwer is behoort deur van kleurreagense (Wagner en Bladt, 1996) gebruik te maak.

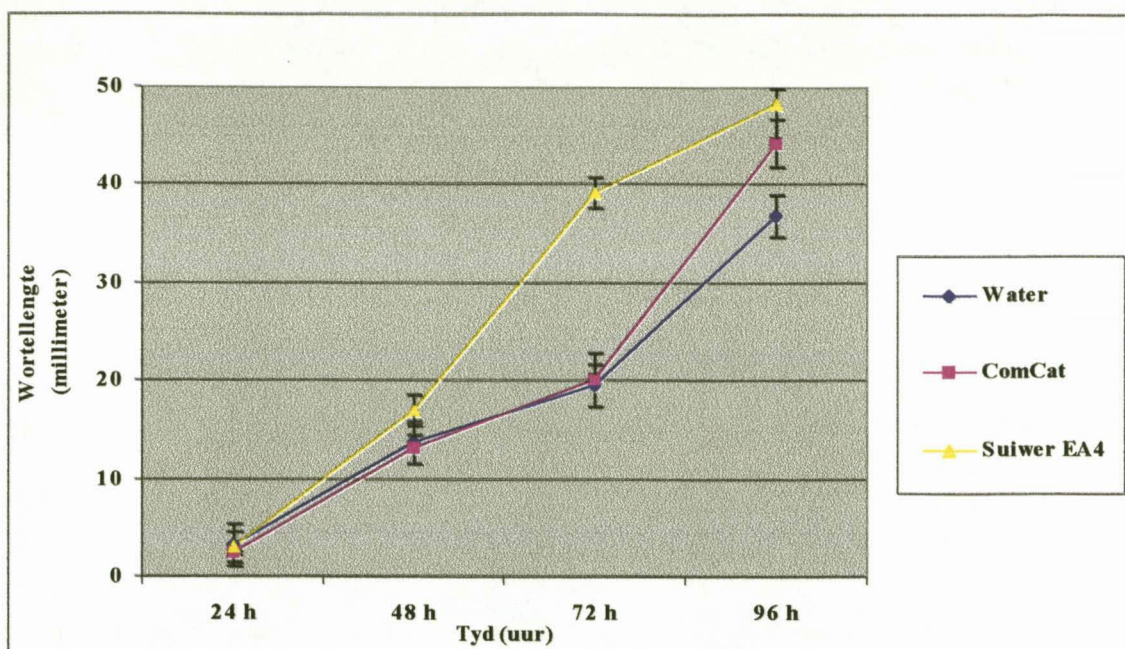
Fraksienommer	RF-waarde	Kleur fluoressensie (365 nm)	Klas van sekondêre produk
4	0.78	Geel Violet Blou	Antrone Alkaloiëde Algemene steroïede
6.1	0.95	Geel Violet	Antrone Alkaloiëde
6.2	0.89	Violet	Alkaloiëde
6.3	0.81	Lig grys	Terpenoïed
6.4	0.64	Ligblou	Koumarien
6.5	0.58	Bruin	Terpenoïed
6.6	0.51	Violet	Alkaloiëde

6.3.2 Biotoetse uitgevoer met gesuiwerde komponent 4 ten einde biokatalitiese aktiwiteit te bevestig



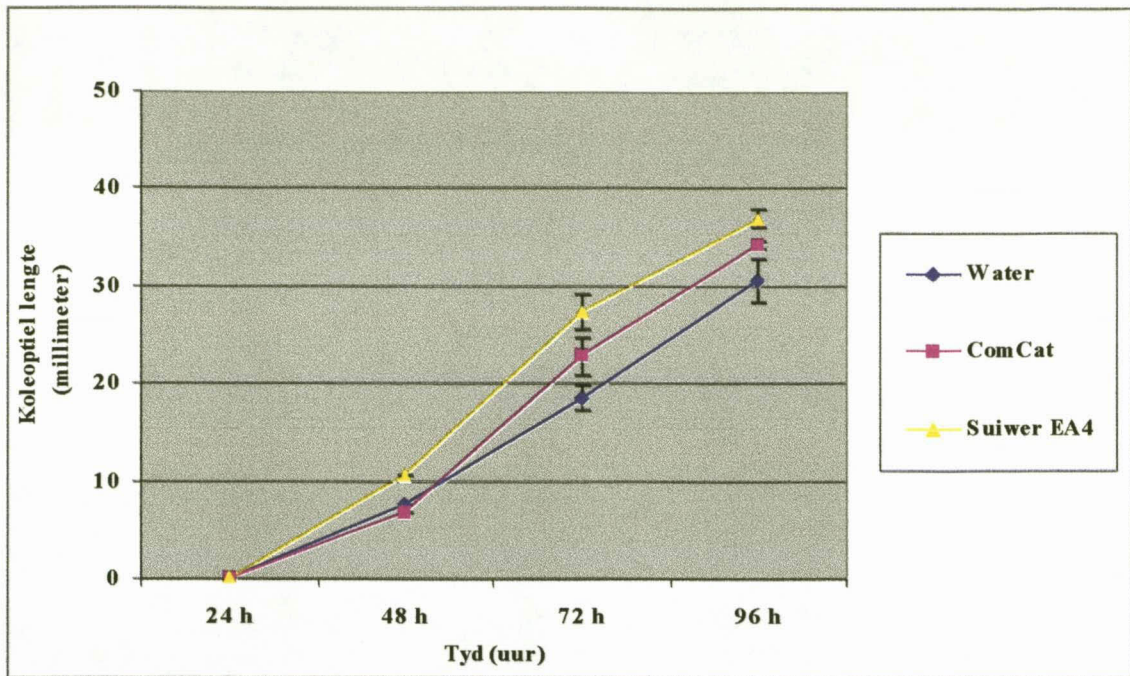
Figuur 6.1: Die effek van komponent 4 wat uit sade van *Acacia erioloba* geïsoleer en gesuiwer is op die ontkieming van Cress-sade oor 'n tydperk van 96 uur teen 'n konsentrasie van $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien

Die kommersiële biostimulant, ComCat[®] het geen invloed op die ontkieming van Cress-saad gehad nie (Figuur 6.1). Hierteenoor het die komponent wat uit 'n etielasetaat fraksie van *Acacia erioloba* sade gesuiwer is (komponent 4), benewens die aanvanklike inhiberende invloed, die ontkieming van Cress-sade na 96 h inkubering merkbaar gestimuleer (Figuur 6.1).



Figuur 6.2: Die effek van komponent 4 wat uit sade van *Acacia erioloba* geïsoleer en gesuiwer is op die wortelgroei van Cress-saailinge oor 'n tydperk van 96 uur teen 'n konsentrasie van $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien

Die resultate in figuur 6.2 illustreer dat komponent 4, reeds na 48 h inkubering 'n stimulerende invloed op die wortelgroei van Cress-saailinge gehad het. Wortelgroei in die teenwoordigheid van hierdie gesuiwerde komponent het tweevoudig toegeneem oor die volgende 24 h en was na 96 h inkubasie steeds 33 % hoër as dié van die waterkontrole. Die stimulerende effek van die kommersiële biostimulant, ComCat[®], op wortelgroei van Cress-saailinge was ooglopend stadiger as dié van hierdie gesuiwerde komponent uit *A. erioloba* sade.

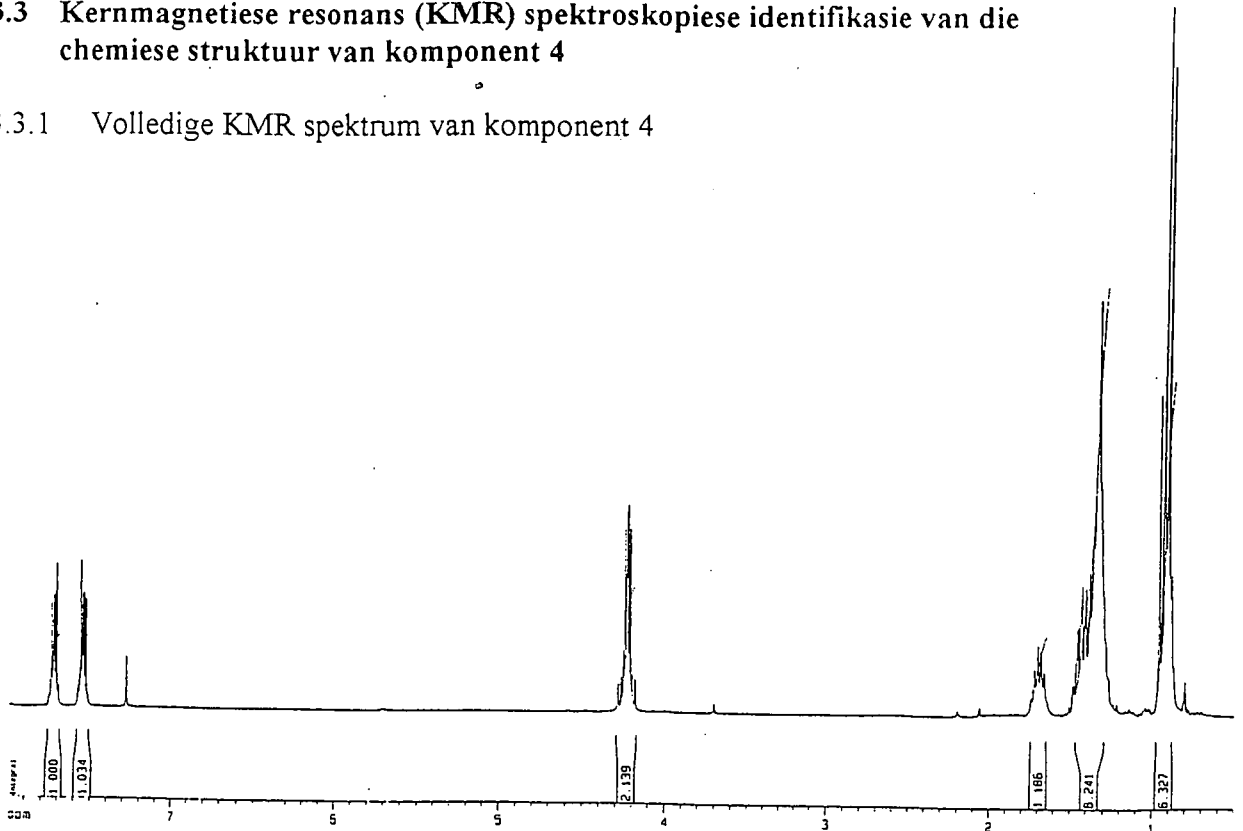


Figuur 6.3: Die effek van komponent 4 wat uit sade van *Acacia erioloba* geïsoleer en gesuiwer is op die koleoptielgroei van Cress-saailinge oor 'n tydperk van 96 uur teen 'n konsentrasie van $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Water en ComCat[®] het as kontroles gedien.

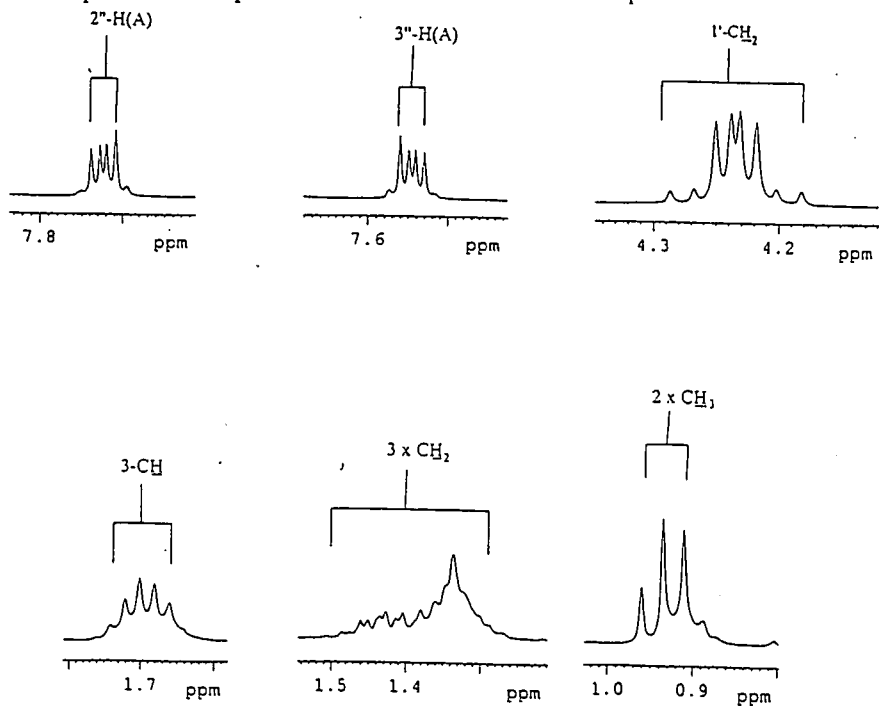
Alhoewel koleoptielgroei van Cress-saailinge oor 'n 96 h inkubasiëperiode deur beide komponent 4 en die kommersiële biostimulant ComCat[®] gestimuleer is (figuur 6.3.), was die effek minder as in die geval van wortelgroei (figuur 6.2). Nietemin het hierdie biotoets, tesame met die vorige twee, sterk daarop gedui dat die gesuiwerde komponent (komponent 4) oor biokatalitiese eienskappe beskik en vegetatiewe groei van Cress-saailinge stimuleer.

6.3.3 Kernmagnetiese resonans (KMR) spektroskopiese identifikasie van die chemiese struktuur van komponent 4

6.3.3.1 Volledige KMR spektrum van komponent 4



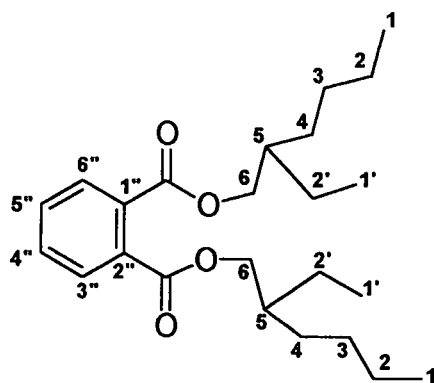
6.3.3.2 Gedetailleerde profiele in spesifieke areas van die KMR spektrum



6.3.3.3 Interpretasie van spektra

Die ^1H KMR spektrum $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ was H-4'' en 6'', δ 7.67, m; H-5'' en 4'', δ 7.77, m vir die benseen ring, H-6, δ 4.21, k, $J = 3$ Hz; H-5, δ 1.7, m; H-4, 3, 2 en 2', δ 1.40, m; H-1 en 1', δ 0.95, m vir die alifatiese kettings. Uit hierdie interpretasie is komponent 4 as 2-etielheksieftalaat geïdentifiseer (Sien 6.3.3.2).

6.3.3.4 Chemiese struktuur en naam van die gesuiwerde komponent 4



2- etielheksieftalaat

6.4 Bespreking

Dertien semi-gesuiwerde fraksies is met behulp van kolomchromatografie uit 'n etielasetaat vloeistof-vloeistof ekstraksie van *A. erioloba* sade bekom en elk se biokatalitiese aktiwiteit is bepaal. Slegs twee van hierdie kolomchromatografie fraksies (4 en 6) het positief vir biokatalitiese aktiwiteit getoets deur die ontkieming van Cress-sade asook saailinggroeï te stimuleer. Verdere suiwering van hierdie twee fraksies, met behulp van preparatiewe dunlaagchromatografie (P-TLC), het aan die lig gebring dat fraksie 4 slegs een suiwer komponent bevat het, maar dat fraksie 6 uit ses komponente saamgestel was.

Die ses komponente in fraksie 6 is wel suksesvol met behulp van preparatiewe dunlaagchromatografie gesuiwer deur van verskillende mobiele fases gebruik te maak. Die herwinning van die ses komponente was egter so laag dat slegs identifisering van die chemiese groepe waaraan elk behoort het moontlik was. Slegs mikrogram hoeveelhede is nodig om deur middel van kwalitatiewe dunlaagchromatografie en spesifieke kleurreagense (sien bylae) chemiese groepe te identifiseer terwyl ten minste 15 milligram van elk nodig is vir kernmagnetiese resonans spektroskopie analise van die chemiese struktuur. Drie van die ses komponente in fraksie 6 het positief getoets vir alkaloiëde, twee vir terpenoiëde en een vir koumariene. Dit word aanbeveel dat 'n groot hoeveelheid *A. erioloba* saad in 'n opvolgstudie gebruik word ten einde ook die komponente in fraksie 6 te identifiseer.

TLC-skeiding van die etielasetaat fraksies en kleuring van die plate met behulp van verskillende kleurreagense het daarop gedui dat komponent 4 moontlik 'n antroon, alkaloiëde of steroïed kon wees. Hierdie onsekerheid dui op die onspesifisiteit van die kleurtoetse. Fraksie 4 was egter in genoegsame hoeveelheid beskikbaar om 'n KMR-spektroskopiese analise te kon uitvoer en met behulp van hierdie tegniek is vasgestel dat komponent 4 'n samestelling van etielheksiel en

futaalsuur, naamlik 2-etielheksielftalaat, is. Aangesien dit, volgens 'n literatuurstudie, maar die tweede keer is dat 2-etielheksielftalaat uit plantmateriaal geïsoleer is (vorige keer uit die bas van *Guibourtia coleosperma*; ongepubliseerde resultate), bestaan daar groot onsekerheid oor die groep natuurlike komponente waaraan dit verwant is of behoort. Die feit dat die molekule positief toets vir antrone, alkaloiëde en steroïede help nie veel om bo enige twyfel die komponent te klassifiseer nie, maar is tog 'n aanduiding van die weg waarlangs groeidentifikasie in 'n suiwer chemiese opvolgondersoek moet geskied. Nietemin bevestig hierdie studie dat 2-etielheksielftalaat wel in plantmateriaal voorkom.

'n Sintetiese produk word lank reeds vervaardig. Geen bewyse uit die literatuur kon egter gevind word wat daarop dui dat 2-etielheksielftalaat al op plante getoets is nie. Verskeie toetse is wel op diere uitgevoer en is gevind dat die komponent 'n baie lae toksiteit vir diere het maar wel 'n effek op testosteroon vlakke het (Lutz, 1986). Ander simptome wat by diere opgemerk is na toediening van 2-etielheksielftalaat was verlaging in bloeddruk, liggaamsgewig, hemoglobien en eritrosiet vlakke. Dit stimuleer ook peroksisoom- en selvermeerdering in die liggaam (Calley *et al*, 1966), wat moontlik die biokatalitiese effek op saailinggroei by plante mag verklaar.

Eienskappe van 2-etielheksielftalaat is verder dat dit slegs in lae konsentrasies ($0.3-0.5 \text{ mg L}^{-1}$) wateroplosbaar is by $20 - 25 \text{ }^\circ\text{C}$, mengbaar met die meeste organiese oplosmiddels is en soos vetsure, hoogs lipofilies is. As die reeds bestaande sintetiese produk dieselfde effek as die komponent geïsoleer uit *A. erioloba* op ander plante het, kan dit sterk daarop dui dat 2-etielheksielftalaat, in sy natuurlike vorm, onder veldtoestande getoets moet word ten einde die potensiaal daarvan as natuurlike biokatalitiese agent, op 'n verskeidenheid van gewasse, vas te stel. Die uitslag hiervan kan bepalend wees vir die oorweging om die aktiewe komponent in sy

natuurlike of gesintetiseerde vorm as 'n produk, wat in die landbou toegepas kan word, te ontwikkel.

In die lig van laasgenoemde opmerking kan wel uit hierdie studie afgelei word dat 2-etielheksielftalaat, teen 'n relatiewe lae konsentrasie van $50 \mu\text{g L}^{-1}$, onder laboratorium toestande genoegsame potensiaal as biokatalitiese agent getoon het om 'n opvolgstudie onder veldtoestande te regverdig. Veral die stimulering van wortelgroei moet as belangrik beskou word weens die indirekte effek wat dit op die benutting van bemestingstowwe, vegetatiewe groei en moontlik oesopbrengs mag uitoefen. Die invloed van 2-etielheksielftalaat op die oesopbrengs van verskillende gewasse sal 'n belangrike parameter wees om die toepassingspotensiaal in die landboupraktyk te evalueer.

Hoofstuk 7

Algemene Bespreking

Die hoofdoel van hierdie studie was om die biokatalities aktiewe status van twee Suid-Afrikaanse plantfamilies, Caryophyllaceae en Fabaceae, te bepaal en indien moontlik die aktiewe bestanddeel (dele) verantwoordelik vir die aktiwiteit te identifiseer. Twee spesies uit elk van bogenoemde families naamlik *Acacia erioloba* en *Acacia karroo* uit die Fabaceae en *Dianthus basuticus* asook *Pollichia campestris* uit die Caryophyllaceae, is in hierdie studie ingesluit.

Sifting ("screening") vir biokatalitiese aktiwiteit, deur van twee biotoetse gebruik te maak, het aan die lig gebring dat saadsuspensies van *A. erioloba* en *P. campestris* biokatalities die aktiefste was terwyl die *A. erioloba* saadsuspensie (50 mg L^{-1}) selfs meer effektief was as dieselfde konsentrasie ComCat[®] (kommersiële biostimulant; Agraforum; Duitsland)) kontrole met betrekking tot die verhoging van die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle. Hierdie waarneming is bevestig deurdat die *A. erioloba* saadsuspensie ook die wortelgroei van Cress-saailinge die meeste gestimuleer het.

Nie een van die vier plantspesies se saadsuspensies het die ontkieming van Cress-saad noemenswaardig bo dié van die ComCat[®] of die water kontrole verhoog nie. *A. erioloba* saadsuspensies het egter die beste stimulerende effek op die wortelgroei van Cress-saailinge, toegedien teen beide hoë (50 en 5 mg L^{-1}) en laer (0.5 en 0.05 mg L^{-1}) konsentrasies, getoon. Die *A. erioloba* (5 mg L^{-1}) en *P. campestris* (50 mg L^{-1}) saadsuspensies het elk die wortelgroei van Cress-saailinge met 35% verhoog in vergelyking met dieselfde konsentrasies ComCat[®]. Ook die optimum (0.5 mg L^{-1}) konsentrasie vir ComCat[®] (Agraforum, Duitsland) se stimulerende effek op wortelgroei is na 96 uur inkubering deur dieselfde konsentrasie *A. erioloba* saadsuspensie geklop.

Soos in die geval van die ComCat[®] kontrole het die *A. erioloba* saadsuspensie geen stimulerende effek op die koleoptielgroeï van Cress-saailinge getoon nie. Laasgenoemde word egter in 'n positiewe lig gesien aangesien die vroeë stimulering van bogrondse groei die oesopbrengs later nadelig kan beïnvloed (Boiffin *et al.*, 2001).

Alhoewel *P. campestris* ook biokatalitiese aktiwiteit getoon het is besluit om in hierdie studie slegs die biokatalitiese aktiewe *A. erioloba* saadsuspensie verder te ondersoek aangesien *P. campestris* moeilik bekombaar was in voldoende hoeveelhede en baie saadmateriaal nodig is vir die uiteindelijke isolering van aktiewe komponente.

'n Metanoliese ru-ekstrak is vanaf die fyngemaalde *A. erioloba* sade voorberei. Hierdie ru-saadekstrak is gefraksioneer met behulp van 'n vloeistof-vloeistof ekstraksie prosedure deur van verskillende organiese oplosmiddels met toenemende polariteit gebruik te maak. Beide die heksaan asook die etielasetaat fraksies, wat so bekom is, het biokatalitiese potensiaal getoon. Beide fraksies het wortelgroeï van Cress-saailinge sterk gestimuleer en ook die ontkieming van Cress-sade in 'n mindere mate. Daarteenoor het beide genoemde fraksies 'n effense inhiberende effek op koleoptielgroeï getoon. Aangesien die etielasetaat fraksie meer konstant en ook ten opsigte van al die biotoetse meer konsekwent as die heksaanfraksie was, is besluit om slegs eersgenoemde fraksie verder te suiwer met die oog op isolering van die aktiewe komponent(e).

Die komponente in die aktiewe etielasetaat fraksie is kolomchromatografies suksesvol geskei deur van chloroform : metanol (50:50) as mobiele fase gebruik te maak. Ses en negentig kolomfraksies is uit die kolom versamel. 'n Kwalitatiewe dunlaagchromatografiese (K-TLC) plaat is met elke derde kolomfraksie uitgevoer en die fraksies wat min of meer identiese K-TLC profiele getoon het, is gekombineer. Dertien gekombineerde kolomfraksies is op hierdie wyse verkry en die standaard

biotoetse is op elk uitgevoer. Slegs kolomfraksies 4 en 6 was biokatalities aktief gemeet aan die stimulerende effek wat beide op die kieming van Cress-sade, wortelgroei in saailinge asook die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle uitgeoefen het.

'n K-TLC profiel van fraksie 4 het, met die ontwikkeling van slegs een gekleurde kol na behandeling met 10 % (v/v) etanoliese swaelsuur, daarop gedui dat die fraksie moontlik slegs een komponent bevat het. Om die suiwerheid van die komponent te bevestig, is verskeie ander mobiele fases in 'n K-TLC sisteem gebruik om verdere skeiding van moontlike komponente, met Rf-waardes wat min verskil, aan te help. Konsentrasiereeks van fraksie 4 is ook in 'n K-TLC sisteem gebruik om die suiwerheid van die moontlike enkele komponent verder te toets. In alle gevalle het slegs een kol onder UV-lig (365 nm) gefluoresseer en kon net een gekleurde kol met swaelsuurkleuring waargeneem word, wat op suiwerheid gedui het. Hierdie gesuiwerde komponent is weer aan bioetse onderwerp, teen 'n konsentrasie van $50 \mu\text{g L}^{-1}$, en is die biokatalitiese aktiwiteit daarvan bevestig.

Fraksie 6 was egter nie suiwer nie. Met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie is 6 komponente uit hierdie fraksie geïsoleer, maar die herwinning van elke komponent was te min (< 6 mg) om bioetse op afsonderlike komponente uit te voer of om struktuurformules deur middel van KMR spektroskopie te ontsyfer. Gevolglik is die 6 komponente slegs met behulp van kleurreaksies (Wagner en Blatt, 1996) as 3 alkaloiëdes, 2 terpenoiëdes en 'n koumarien geïdentifiseer. Dit word aanbeveel dat 'n groter massa *A. erioloba* saad in 'n opvolgstudie geëkstraheer word ten einde vas te stel watter van hierdie 6 komponente biokatalities aktief is asook om die aktiewe komponent(e) te identifiseer.

Met behulp van KMR spektroskopie is die enkel gesuiwerde komponent in fraksie 4 as 2-etielheksielftalaat geïdentifiseer. Ten spyte van 'n uitgebreide literatuurstudie kon nie vasgestel word aan watter chemiese groep verbindings 2-etielheksielftalaat behoort nie. Vanweë die lipofiliese geaardheid van die molekule toon dit egter ooreenstemming met vetsure (Woodward *et al.*, 1986). Deur natuurlike seleksie het plante die vermoë ontwikkel om hulself teen predatore te beskerm deur onder andere toksiese sekondêre metaboliete in sade te akkumuleer. Laasgenoemde sluit ook gemodifiseerde vetsure in wat in sekere sade as energiebron geberg word (Seigler, 1998). Dit is bekend dat *A. erioloba* sade wel toksies kan wees vir diere wanneer te veel daarvan ingeneem word en kan dit dalk verband hou met die voorkoms van 2-etielheksielftalaat in die sade. Sommige vetsure induseer selvermeerdering in die parenchium van boontjie peule en ander is betrokke by groeibewegings en allelopatie (Seigler, 1998). Laasgenoemde kan as verklaring dien vir die stimulasie van groei onder die invloed van 2-etielheksielftalaat wat by Cress-saailinge opgemerk is.

Dit is interessant dat, in dieselfde tydperk waarin hierdie studie uitgevoer is, is 'n komponent met die identiese KMR profiel van 2-etielheksielftalaat uit die bas van *Guibourtia coleosperma* geïsoleer (Persoonlike mededeling; Departement Chemie; UVS). Wat dit merkwaardig maak is dat dit slegs die tweede keer is dat 2-etielheksielftalaat uit plante geïsoleer is. Beide *G. coleosperma* en *A. erioloba* behoort aan die familie Fabaceae (Zomlefer, 1994), bereik 'n hoogte van tussen 15-20 m, besit 'n peul vir 'n vrug en is baie stadige groeiers. *A. erioloba* behoort egter aan die subfamilie Mimosoideae terwyl *G. coleosperma* aan die Caesalpinioideae subfamilie behoort. *G. coleosperma* word nie in Suid-Afrika aangetref nie, maar groei, soos *A. erioloba*, in sanderige woestyngebiede. Beide spesies word egter in Namibië, Botswana, Angola, Zambië en Zimbabwe aangetref (Zomlefer, 1994; Leonard, 2000).

In Suid-Afrika word *A. erioloba* nog nie werklik vir sy medisinale waarde gebruik nie, maar word in Angola en op die St. Thomas eilande lank reeds medisinaal aangewend (Watt en Breyer-Brandwijk, 1962). Medisinaal stem *A. erioloba* en *G. coleosperma* ook baie ooreen. Konkoksies van beide plante word in die behandeling van veluitslag, velinfeksies en diarree gebruik (Watt en Breyer-Brandwijk, 1962; Leonard, 2000). Dit blyk dus of daar sterk morfologiese en biochemiese ooreenkomste tussen die twee spesies, waaruit die biokatalities aktiewe komponent 2-etielheksielftalaat geïsoleer is, bestaan.

Alhoewel 2-etielheksielftalaat, nou met huiwering, vir die eerste keer uit plante verkry is, is die komponent reeds in 1933 gepatenteer as 'n sintetiese produk. Die sintetiese komponent word op grootskaal vervaardig en word as 'n bestanddeel in plaagdoders en verskeie kosmetiese produkte gebruik. Dit word ook in die vervaardiging van verskeie plastiekprodukte gebruik om buigsamheid aan plastiek te verskaf (Internet, . [http://www.nsc.org/library/chemical/di\(2eth.htm\)](http://www.nsc.org/library/chemical/di(2eth.htm))).

Geen inligting oor toetse wat op plante met hierdie komponent uitgevoer is kon in die literatuur gevind word nie, maar verskeie studies is al op proefdiere uitgevoer.

Daar is gevind dat 2-etielheksielftalaat, toegedien aan rotte teen konsentrasies van 2,9 g/kg, vinnig gehidroliseer word deur lipases (Daniel en Bratt, 1974). Die *in vitro* plasmaproteïen bindingsvermoë van dié komponent is ook uitstekend (Sjöberg *et al.*, 1985). Die metabolisme van 2-etielheksielftalaat blyk om baie kompleks te wees en word nog nie ten volle verstaan nie. Laasgenoemde begin in die pankreas waar di-etielheksielftalaat (DEHP) gehidroliseer word deur lipases na mono-etielheksielftalaat (MEHP). MEHP word verder in die lewerselle gemetaboliseer na verskeie ander metaboliete waaronder 85 % ω -1-koolstof oksidasie produkte. Die etiel-syketting word ook in lewerselle geoksideer (Lhuguenot *et al.*, 1985). Lhuguenot *et al.* (1985) het ook voorgestel dat ω -oksidase 'n produk lewer wat verder deur β -oksidase in die peroksisome van

diere gemetaboliseer word. Dieselfde resultate as laasgenoemde is in 'n studie op mense gevind (Shoita en Nishimura, 1982).

Verskeie studies is ook uitgevoer om die biochemiese effek van DEHP op diere te bepaal. Onder andere is die effek van 2-etielheksieftalaat op selvermeerdering ondersoek. Daar is in verskeie studies gevind dat DEHP selvermeerdering en veral peroksisoom vermeerdering induseer. DEHP, en ander middels wat laasgenoemde veroorsaak word dan ook as lewerkarsinogene geklassifiseer. Daar bestaan 'n duidelike korrelasie tussen die middel se vermoë om peroksisoomvermeerdering te induseer en dié se lewerkarsinogeniese eienskappe (Reddy *et al.*, 1986). Laasgenoemde teorie impliseer dat 'n vinnige toename in selgroeï, soos deur DEHP geïnduseer, aanleiding kan gee tot 'n spontane mutasie met kanker as gevolg, alhoewel dit nog nie op mense bewys kon word nie (Bridges, 1985).

In vitro studies het daarop gewys dat DEHP die respirasietempo in muise versnel. Bewyse is ook gevind dat DEHP instaat is om die biosintese van cholesterol in plasma te inhibeer (Yanagita *et al.*, 1978). Genetiese aanduidings is verder dat DEHP, *in vitro*, 'n effek op die genoom kan hê, maar dat sy metaboliete geen kovalente interaksie met DNA het nie (Lutz, 1986). Alhoewel geen inligting oor 2-etielheksieftalaat op plante in die literatuur gevind is nie, is 'n aanverwante komponent, naamlik 2-n-propielpentieftalaat, reeds in 1979 in Indië as 'n natuurlike produk uit plante geïsoleer (Manandhar, 1979) wat bevestig dat hierdie tipe verbindings wel in plante voorkom.

As die effek van DEHP op die fisiologie van diere in ag geneem word, terwyl soortgelyk wortelgroeï stimulering by Cress-saailinge en respirasietempo verhoging by gisselle opgemerk is, kan dit sterk daarop dui dat die effek van 2-etielheksieftalaat by plante en diereenders kan wees.

Genoeg aanduidings bestaan dat hierdie werk opgevolg moet word deur die effek van 'n saadsuspensie, 'n ru-ekstrak, 'n semi-gesuiwerde aktiewe fraksie en die suiwer 2-etielheksielftalaat molekule, wat uit *A. erioloba* saad geïsoleer is, onder veldtoestande op landbougewasse te toets. Die hipotese wat getoets moet word is of *A. erioloba* 'n komponent of komponente bevat wat deur verhoging van respirasietempo en deur stimulering van wortelgroei die potensiaal besit om in die landboupraktyk as biostimulant op landbougewasse toegepas te word. Oesopbrengs, as parameter, moet nie in hierdie studie uitgesluit word nie.

In die lig van die sukses wat reeds met natuurlike biostimulante soos ComCat[®] behaal is, asook die resultate wat in hierdie studie bekom is, blyk dit dat die potensiaal bestaan om 'n soortgelyke produk uit Suid-Afrikaanse plante, wat *A. erioloba* heel moontlik kan insluit, te vervaardig. Die toepassingspotensiaal van so 'n produk in die hortologiese en landbousektore sal in 'n opvolgstudie onder glashuis- en veldtoestande ondersoek moet word. Hierbenewens sal dit ook nodig wees om die meganisme van werking, in geval waar die toepassingspotensiaal bevestig kan word, te ontsyfer.

Bylae

(a) Kleurreagense (sien hoofstuk 6)

(1) Dragendorff se reagens

Oplossing A: Los 0.85 g bismut nitraat op in 10 ml ysasynsuur en 40 ml water verhit en filtreer indien nodig.

Oplossing B: Los 8 g kaliumjodied op in 30 ml water.

Meng twee oplossings in 'n 1:1 verhouding vermeng.

Kleurreagens: 1 ml van die oplossing word gemeng met 2 ml ysasynsuur en 10 ml water

Deteksie: alkaloïede

(2) Kedde se reagens

Vyf ml van 3 % etanoliese 3,5-dinitrobensoësuur word gemeng met 5 ml 2M NaOH. Moet vars voorberei word. Nadat plaat gekleur is met reagens moet dit vir 5-10 min by 100°C verhit word en onder sigbare lig waargeneem word.

Deteksie: Kardiale glikosiedes

(3) Natuurlike produk-polietileen glikolreagens (NP/PEG)

Plaat word gespuit met 1 % metanoliese difenielboorsuur- β -etielaminoester gevolg deur 5 % etanoliese polietileen glikol-4000. Nadat die plaat gespuit is moet dit onder UV-365 waargeneem word

Deteksie: flavanoïede

(4) Kaliumhidroksied (KOH)

Vyf % etanoliese kaliumhidroksied word opgemaak en daarna op TLC plaat gespuit.. Die plaat moet onder UV-365 nm of in sigbare lig waargeneem word.

Deteksie: Antraknone (rooi in sigbare lig), antrone (geel – UV-365nm) en koumariene (blou – UV-365).

(5) Swaelsuur (H₂SO₄)

Tien % etanoliese H₂SO₄ of gekonsentreerde H₂SO₄ word gebruik om plaat te bespuit. Plaat word dan verhit vir 3-5 min by 100°C en waargeneem onder sigbare lig.

Deteksie: kardiaale glikosiedes; ligniene.

(6) Vanillien-swaelsuur (VS)

Oplossing A: 1% etanoliese vanillien.

Oplossing B: 10 % etanoliese swaelsuur.

Die K-TLC plaat met met geskeide komponente word bespuit met 10 ml van oplossing A, dadelik opgevolg met oplossing B. Na verhitting by 110°C vir 5-10 min word plaat geëvalueer onder sigbare lig.

Deteksie: essensiële olies (terpenoiede ens.)

(7) Ammonium vanadaat – anisidien

Oplossing A: Versadigde waterige ammonium vanadaat

Oplossing B: Los 0.5 g p-anisidien op in 2 ml fosforsuur en verdun met etanol tot 100 ml en filtreer. Spuit plaat eers met oplossing A en terwyl plaat nog nat is spuit met oplossing B. Verhit by 80°C vir 5 min. Plaat word gelaat om droog te word en onder sigbare lig geëvalueer.

Deteksie: Enige komponente met basiese fenoliese struktuur

(b) Dielektriese konstantes

Chemiese formule	Oplossing	Dielektriese konstante DC
C_6H_{14}	n-Heksaan	1,9
$C_4H_{10}O$	Dietieleter	4,3
$C_4H_8O_2$	Etielasetaat	6,02
CH_2Cl_2	Dichlormetaan	8,9
C_2H_6O	Etanol	24,30
CH_4O	Metanol	32,63

BEDANKINGS

Ek wil net die volgende persone bedank vir hulle hulp:

'n Spesiale dank aan *Prof J.C. Pretorius* wat opgetree het as studieleier,

Dr. G.P. Potgieter as medestudieleier,

Die NRF vir finansiële hulp vir hierdie studie,

Elmarie van der Watt vir tegniese advies, hulp en raad met praktiese probleme

Prof E.V. Brandt en *Dr. I. Kamara* van die Departement Chemie UVS vir KMR analises.

Dan net laastens vir my man vir sy geduld, liefde en bystand deur hierdie jaar en ook so my ouers en broer vir hul belangstelling.

Bo alles my Almagtige Vader vir leiding, wysheid, moed, geduld en krag wat Hy aan my deur hierdie tyd geskenk het.

Anél du Plessis

OPSOMMING

In die suide van Duitsland is opgemerk dat spesies van die families Fabaceae en Caryophyllaceae 'n onbekende omgewingkatastrofe oorleef het terwyl dit nie die geval was met plantspesies van ander families nie (Hüster, Persoonlike mededeling). Saadsuspensies van enkele spesies uit hierdie twee families, wat op landbou gewasse gespuit is, het beide die vegetatiewe groei en oesopbrengs van die gewasse positief beïnvloed. Dit het die rasionaal laat ontstaan om saad van Suid-Afrikaanse spesies uit hierdie twee families ook vir hierdie biokatalitiese eienskap te toets. Die saad van twee spesies uit elk van die genoemde families naamlik *Acacia karroo* en *Acacia erioloba* uit die familie Fabaceae en *Pollichia campestris* en *Dianthus basuticus* uit die familie Caryophyllaceae, is vir soortgelyke eienskap ondersoek.

Betreklik min inligting oor die chemiese samestelling van die vier gekose plantspesies en niks oor hulle biokatalitiese aktiwiteit kon in die literatuur opgespoor word nie. In die studie wat gevolg het is merkbaar biokatalitiese aktiwiteit in 'n saadsuspensie van *Acacia erioloba* (Fabaceae), bevestig deurdat dit veral die respirasietempo van 'n monokultuur gisselle en die wortelgroei van Cresssaailinge betekenisvol gestimuleer het. Aktiwiteitsgerigte vloeistof-vloeistof ekstraksie van die *A. erioloba* saadsuspensie het aan die lig gebring dat die meeste van die biokatalitiese aktiwiteit in die etielasetaatfraksie geleë was. Verdere kolomchromatografiese fraksionering van die etielasetaatfraksie het dertien gekombineerde kolomfraksies opgelewer waarvan twee biokatalities aktief was.

Aktiwiteitsgerigte preparatiewe dunlaagchromatografiese suiwering van komponente in een van laasgenoemde twee fraksies het een biokatalities aktiewe komponent opgelewer wat deur middel van kernmagnetiese resonans (KMR) spektroskopie struktureel ontsyfer is en as 2-etielheksielftalaat geïdentifiseer is. Uit die tweede kolomchromatografie fraksie is 6 komponente geïsoleer maar hulle was in sulke klein hoeveelhede herwin dat KMR analise daarop nie moontlik was nie. Met behulp

van kleurreagense is egter vasgestel dat drie van die ses alkaloiëde, twee terpenoïede en een 'n koumarien was. Dit word aanbeveel dat 'n poging in 'n opvolgstudie aangewend word om die aktiewe komponente uit hierdie groep te identifiseer deur aanvanklik heelwat meer saadmateriaal te ekstraheer.

SLEUTELWOORDE: Fabaceae, Caryophyllaceae, *Acacia erioloba*, biokatalitiese aktiwiteit, respirasietempo, saailinggroei, 2-etielheksielftalaat

SUMMARY

In the south of Germany it was observed that species of the families Fabaceae and Caryophyllaceae survived an unknown environmental catastrophe while this was not the case with plant species from other families (Hüster, Personal observation). Seed suspensions of some species belonging to these two families were applied to agricultural crops as foliar sprays, improving both the vegetative growth and yield of the crops. This supplied the rationale to test the seeds of South African species from these two families for its biocatalytic properties. Seeds of two species from each of the mentioned families namely *Acacia karroo* and *Acacia erioloba* from the family Fabaceae as well as *Pollichia campestris* and *Dianthus basuticus* from the family Caryophyllaceae, were subsequently screened for similar biocatalytic properties.

Not much information on the chemical composition of these four plant species and nothing at all about their biocatalytic activity could be found in literature. In the study that followed biocatalytic activity was confirmed in a seed suspension of *Acacia erioloba* (Fabaceae) as it increased the respiration rate of a monoculture yeast cells as well as root growth of Cress-seedlings markedly.

Activity directed liquid-liquid extraction of the *A. erioloba* seed suspension revealed that most of the biocatalytic activity was present in the ethyl acetate fraction. Further column chromatographic fractionation of the ethyl acetate fraction produced 13 combined column fractions of which two were active. Activity directed preparative thinlayer chromatographic purification of compounds in one of these fractions produced one active compound that was identified as 2-ethylhexylphtalate by means of nuclear magnetic resonans (NMR) spectroscopy. From the second column chromatography fraction six compounds were isolated but in such small amounts that NMR analysis was not possible. By means of colour reagents it was, however, established that three of the six compounds were alkaloids, two were terpenoides and one a coumarin. It is recommended

that active components in this group should be identified in a follow-up study by initially extracting much more seed material.

KEYWORDS: Fabaceae, Caryophyllaceae, *Acacia erioloba*, biocatalytic activity, respiration rate, seedling growth, 2-ethylhexylphtalate

Verwysings

- Adam, G., Marquardt, V. en Vorbrodt, H.M. 1991. Aspects of synthesis and bioactivity of brassinosteroids. *American Chemical Society* 474: 74-85.
- Afolayan, A.J. en Meyer, J.J.M. 1997. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology* 57: 177-181.
- Afeyan, N., Fulton, S., Gordon, N., Mazsaroff, I., Varady, L. en Regnier, F. 1990. Perfusion Chromatography: An Approach to Purifying Biomolecules. *Biotechnology* 8 (3): 203-206.
- Allen, O.N. en Allen, E.K. 1981. *The Leguminosae*. Wisconsin Publication. USA.
- Arecta, R.N., Bachman, J.M. en Mandava, N.B. 1988. Effects of indole-3-acetic acid and brassinosteroid on ethylene biosynthesis in etiolated mung bean hypocotyls segments. *Journal of Plant Physiology* 133: 430-435.
- Bajguz, A. en Czerpak, R. 1996. Effect of brassinosteroids on growth and proton extrusion in the alga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Plant Growth Regulation* 15: 153-156.
- Bell, E.A. 1980. The possible significance of secondary compounds in plants. In: *Secondary Plant Products*. Encyclopedia of Plant Physiology Vol 8: Springer Verslag.
- Bennett, A.B., Smith, G.M. en Nichols, B.G. 1987. Regulation of climacteric respiration in ripening avocado fruit. *Plant Physiology* 83: 973-976.
- Bielecki, R.L., Ferguson, A.R. en Creswell, M.M. 1974. *Mechanisms of Regulation of Plant Growth*. Royal Society of New Zealand. Wellington. New Zealand.
- Bidwell, R.G.S. 1979. *Plant Physiology*. Macmillan Publishing Co. New York.
- Boiffin, J., Malezieux, E. en Pichard, D. 2001. Cropping Systems for the future. In: *Crop*

Science: Progress and prospects. Nösberger, J., Geiger, H.H. en Struik, P.C. (Eds.).
CABI Publishers. UK.

Bridges, J.W. 1985. Frontiers in biochemical toxicology. *TIPS* 6: 11-15.

Brum, G., Mckane, L. en Karp, G. 1994. Biology exploring life. Wiley en Sons Inc. New York.

Bruneton, J. 1995. Pharmacognosy, Phytochemistry and Medicinal Plants. Lavoisier Publishers.
New York.

Calley, D., Autian, J. en Guess, W.L. 1966. Toxicology of a series of phthalate esters. *Journal of
Pharmacology Science* 55: 158-162.

Cannell, R.J.P. 1998. How to approach the isolation of a natural product. From: Methods in
Biotechnology Vol 4: Natural Products Isolation (Ed) R.J.P. Cannell. Human Press
Inc. Totowa. New Jersey.

Cao, H. en Chen, S. 1995. Brassinosteroid-induced rice lamina joint inclination and its relation to
indole-3-acetic acid and ethylene. *Plant Growth Regulation* 16: 189-196.

Clouse, S.D., Langford, M. en McMorris, T.C. 1992. Effect of brassinolide on gene expression in
elongating soybean epicotyls. *Plant Physiology* 100: 1377-1383.

Clouse, S.D. 1996. Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth
and development. *Plant Journal* 10: 1-8.

Crawford, R.M.M. 1977. Tolerance of anoxia and ethanol metabolism in germinating seeds. *New
Phytologist* 19: 511-517.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia
University Press. New York.

Daniel, J.W. en Bratt, H. 1974. The absorption metabolism and tissue distribution of di (2-
ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicology* 2: 51-65.

- Dennis, D.T. en Turpin, D.H. 1990. *Plant Physiology, biochemistry and molecular biology*. Longman Singapore Publishers. Canada.
- Di (2-ethylhexyl) Phthalate Chemical Backgrounder. [http://www.nsc.org/library/chemical/di\(2-eth.htm](http://www.nsc.org/library/chemical/di(2-eth.htm).
- Dyer, R.A. 1963. *Flora of Southern Africa Vol I*. National Botanical Institute. Pretoria.
- Elisabetsky, E. en Posey, D.A. 1994. Ethnopharmacological search for antiviral compounds: treatment of gastrointestinal disorders by Kayapo medical specialists. *Ciba Foundation Symposium* **185**.
- Fujioka, S. en Sakurai, A. 1997. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Plant Physiology* **100**: 710.
- Grant, T. en Grant, R. 1998. *Sappi tree spotting in highveld and Drakensberg*. Jacana Publishers. Johannesburg.
- Harborne, J.B. 1994. *Phytochemistry of the Leguminosae*. Chapman en Hall. London.
- Haslam, E. 1989. Secondary metabolism: Fact or fiction. *Natural Product Reports* **3**: 217-249.
- Hedden, P., Macmillan, J. en Phinney, B.O. 1978. *Plant Physiology* **29**: 149-192.
- Hostettman, K. en Wolfender, J.L. 1997. The search for biologically active secondary metabolites. *Pesticide Science* **51 (4)**: 471-482.
- Hill, T.A. 1980. *Endogenous plant growth substances*. Edward Arnold Publishers. London.
- Khripach, V.A., Zhabinskii, V.N. en de Groot, A.E. 1999. *Brassinosteroids- A New Class of Plant Hormones*. Academic Press. San Diego.
- Kim, K.U., Kwon, S.T. en Shim, D.H. 1993. Effects of herbicide safener on rice sprouted

seedlings for machine transplanting in Korea. *Acta Phytopathology Entomol Hung* 28: 2-4.

Krizek, D.T. en Mandava, N.B. 1983. Influence of spectral quality on the growth response of intact bean plants to brassinosteroid, a growth-promoting steroidal lactone. I. Stem elongation and morphogenesis. *Plant Physiology* 57: 317-323.

Krogmann, D.W. 1973. The biochemistry of green plants. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs. New Jersey.

Kuno, K. 1997. Effects of plant growth steroid brassinolide, on dry-weight and nutrient translocation in mulberry shoots. *Journal of Sericultural Science Japan* 66: 57-58.

Leonard, J. 2000. *Guibourtia coleosperma* Benth. :Large false mopane.
http://www.sigridleger.de/book/plants/pl_057.html.

Leubner-Metzger, G. 2001. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta* 231: 758-763.

Lhuguenot, J.C., Mitchell, A.M., Milner, G., Lock, E.A. en Elcombe, C.R. 1985. The metabolism of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) in rats: in vivo and in vitro dose and time dependency of metabolism. *Toxicology* 80: 11-22.

Li, J. en Chory, J. 1997. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90: 929-938.

Lutz, W.K. 1986. Investigation of the potential for binding of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) to rat liver DNA in vivo. *Environmental Health Perspectives* 65: 267-269.

Manandhar, J. 1979. Isolation of Natural Product from *Cryptocarya amygdalina*. *Indian Journal of Chemistry. Section B*, 17: 411-414.

Mandava, N.B. 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual Review of Plant*

- Mathews, C.K. en van Holde, K.E. 1996. *Biochemistry*. Benjamin / Cummings Publishing. Canada.
- Mauseth, J.D. 1991. *Botany: An introduction to plant biology*. Saunders College Publishing. Chile.
- Memelink, J., Verpoorte, R. en Kijne, J.W. 2001. *Trends in Plant Science*. Volume 6. Elsevier Science Limited.
- Meudt, W.J., Thompson, M.J. en Bennett, H.W. 1983. Investigations on the mechanism of the brassinosteroid response. III. *Proceedings of the Plant Growth Regulation Society of America* 10: 312-318.
- Neher, R. 1964. *Steroid Chromatography*. Elsevier Publishing Company. London.
- Nigg, H.N. en Seigler, D. 1992. *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture*. Plenum Press. New York.
- Palmer, E. en Pitman, N. 1961. *Trees of South Africa*. Balkema Publishers. Cape Town.
- Park, K.H., Park, J.D. en Hyun, K.H. 1994. Brassinosteroids and monoglycerides in immature seeds of *Cassia tora* as the active principles in rice lamina inclination bioassay. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 58: 1343-1344.
- Quellette, R.J. 1992. *Introduction to general, Organic, and Biological Chemistry* Third edition. Macmillan publishing Company. New York.
- Rabe, T. en van Staden, J. 1997. Screening of *Plectranthus* species for antimicrobial activity. *South African Journal of Botany* 64: 62-65.
- Ramirez, J.A., Gros, E.G. en Galagorsky, L.R. 2000. Effects on bioactivity due to C-5 heteroatom substituents on synthetic 28-Homobrassinosteroid analogs. *Tetrahedron* 56: 6171-6180.

- Raven, P.H., Ray, F.E en Eichhorn, S.E. 1992. *Biology of plants*. Worth Publishers. New York.
- Reddy, J.K., Reddy, M.K., Lalwani, N.D. en Rao, M.S. 1986. Comparison of hepatic peroxisome proliferative effect and its implication for hepatocarcinogenicity of phthalate esters, di (2-ethylhexyl) phthalate, and di (2-ethylhexyl) adipate with a hypolipidemic drug. *Environmental Health Perspectives* **65**: 317-327.
- Richter, K. en Adam, G. 1991. Neurodepressing effect of brassinosteroids in the Cockroach *Periplaneta Americana*. *Naturwissenschaften* **78**: 138-139.
- Richter, K. en Koolman, J. 1991. Antiecdysteroid effects of brassinosteroids in insects. In: *Brassinosteroids; Chemistry, Bioactivity and application*. *American Chemical Society Symposium series* **477**: 265-278.
- Rizvi, S.J.H en Rizvi, V. 1992. *Allelopathy: Basic and applied aspects*. Chapman en Hall. New York.
- Roberts, J.A. en Hooley, R. 1988. *Plant growth regulators*. Chapman en Hall. New York.
- Ronsch, H.A. en Voigt, B. 1996. Retardation of needle chlorosis by brassinosteroids in magnesium-deficient seedlings of Norway spruce. *Proceedings of the Plant Growth Regulation Society of America* **23**: 62.
- Ross, J.H. 1979. *A conspectus of the African Acacia species*. Botanical Research institute. Pretoria.
- Roth, U., Friebe, A. en Schnabl, H. 2000. Resistance Induction in Plants by a Brassinosteroid-Containing Extract of *Lychnis viscaria* L. *Zeitschrift für Naturforschung* **54 c**: 34-41.
- Sairam, R.K. 1994. Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varieties. *Plant Growth Regulator* **13**: 147-159.
- Sakurai, A. en Fujioka, S. 1997. Studies on biosynthesis of brassinosteroids. *Bioscience*

Biotechnology Biochemistry **61**: 757-762.

Sakurai, A., Yokota, T. en Clouse, S.D. 1999. Brassinosteroids. Steroidal Plant Hormones. Springer Verslag. Tokyo.

Salisbury, F.B. en Ross, C.W. 1992. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company. California.

Sasse, J.M. 1994. Brassinosteroids and roots. *Plant Growth Regulator* **21**: 228-232.

Sasse, J.M., Smith, R. en Hudson, I. 1995. Effects of 24-epibrassinolide on germination of seeds of *Eucalyptus camaldulensis* in saline conditions. *Proceeding of the Plant Growth Regulation Society of America* **22**: 136-141.

Schabdach, H., Johne, S., Steiner, U. en Seifert, K. 1995. Plant disease resistance inducing activity of 7-oxo- and 7-hydroxysterols. *Zeitschrift für Naturforschung* **50 c**: 257-262.

Schmidt, J., Bohme, F. en Adams, G. 1996. 24-Epibrassinolide from *Gypsophila perfoliata*. **51 c**: *Zeitschrift für Naturforschung* 897-899.

Schmidt, J., Altmann, T. en Adams, G. 1997. Brassinosteroids from seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **45**: 1325-1327.

Schnabl, H., Roth, U. en Friebe, A. 2001. Brassinosteroid-induced stress tolerances of plants. *Phytochemistry* **5**: 169-183.

Seigler, D.S. 1998. Plant secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers. Massachusetts. USA.

Shen, X.Y., Dai, J.Y. en Hu, A.C. 1990. Studies on physiological effects of brassinolide on drought resistance in maize. *Journal of Shenyang Agricultural University* **21**: 191-195.

Shiota, K. en Nishimura, H. 1982. Tetratogenicity of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-

- butyl phthalate (DBP) in mice. *Environmental Health Perspectives* **45**: 65-70.
- Sjöberg, P., Bondesson, U., Kjellen, L., Lindquist, N.G., Montin, G. en Plöen, L. 1985. Kinetics of di (2-ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and effect on testis. *Acta Pharmacological Toxicology* **56**: 30-37.
- Smith, N. 1999. Guide to the Acacias of Southern Africa. Briza Publications. Pretoria.
- Smith, P.M. 1976. The chemotaxonomy of plants. Edward Arnold (Publishers) Limited. London.
- Snyder, L.R. en Kirkland, J.J. 1979. Introduction to modern liquid chromatography. John Wiley en Sons, Inc. New York.
- Sonnewald, U. en Herbers, K. 2001. Plant Biotechnology: Methodes, Goals and Achievements. In: Crop Science: Progress and prospects. Nösberger, J., Geiger, H.H. en Struik, P.C. (Eds.). CABI Publishers. UK.
- Stowe, B.B., Stodola, F.A., Hayashi, T. en Brain, P.W. 1961. The early history of gibberellin research. In: Plant Growth Regulation Ed. Iowa State University Press. Ames. Iowa.
- Takematsu, T. en Takeuchi, Y. 1989. Effects of brassinosteroids on growth and yields of crops. *Proceedings of the Japan Academy (series B)* **65**: 149-152.
- Technical Data Sheet. 2002. Wingro Inc. New Jersey. USA.
- Ting, I.P. 1982. Plant Physiology. Addison-Wesley Publishers. Phillipines.
- Van der Schijff, H.P. 1985. Algemene plantkunde. Van Schaik. Pretoria.
- Van Wyk, B. en Gericke, N. 2000. A guide to useful plants of South Africa. Briza Publications. Pretoria.
- Vincent, J.M. 1982. Nitrogen fixation in legumes. Academic Press. Sydney.

- Wagner, H. en Bladt, S. 1996. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Springer. New York.
- Waterman, P.G. en Mole, S. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications. London.
- Watt, J.M. en Breyer-Brandwijk, M.G. 1962. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. Livingstone.London.
- Wiley, G. en Chichester, H. 1994. Ethnobotany and the search for new drugs. Ciba-Geigi Limited. London.
- Woodward, K.N., Smith, A.M., Mariscotti, S.P. en Tomlinson, N.J. 1986. Review of the toxicity of the esters of o-phthalic acid, Toxicity Review 14, 183 p. Health and Safety Executive. London.
- Yanagita, T., Kobayashi, K. en Enomoto, N. 1978. Accumulation of hepatic phospholipids in rats fed di (2-ethylhexyl) phthalate. *Biochemistry Pharmacology* **28**: 2283-2288.
- Yokota, T., Nomura, T. en Nakayama, M. 1997. Identification of brassinosteroids that appear to be derived from campesterol and cholesterol in tamato shoots. *Plant Cell Physiology* **38**: 1291-1294.
- Yopp, J.H., Mandava, N.B. en Sasse, J.M. 1981. Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. I: Activity in selected auxin bioassays. *Plant Physiology* **53**: 445-452.
- Zomlefer, W.B. 1994. Guide to flowering plant families. Chapel Hill. London.

B.O.V.S. BIBLIOTEK