الفعالية البايولوجية وفعالية مثبط البروتييز للمستخلص المائي للعدس (*Lens culinaris*) ضد بعض الانواع البكتيرية

خلود عبد الاله الخفاجي* ***سلمان عبود حمود**** ***سحر غازي عمران****
منال عبد اللطيف حسن* ***هشام جميل ياسين**** ***عبود حيون**** ***سهيلة غفوري علي****

استلام البحث 20، كانون الاول، 2012
قبول النشر 11، اذار، 2014

الخلاصة:
تم الكشف عن بعض المواد الفعالة بايولوجيا في المستخلص المائي للعدس ووجد احتواءه على الفينول والتانين والصابونين والراتنج وخلوه من الستيرويد والفلافون والتربين و أوضحت النتائج ان المستخلص وبتركيز 5% و10% يعمل وبصورة كبيرة على تثبيط نمو النوع البكتيري *Psedumonas aeruginosa* ويليه الانواع *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis* وتأثيره قليل على نمو الانواع *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhimurium* ولجميع تراكيز المستخلص المستعملة. تم التحري عن فعالية انزيمات البروتييز الخارجية في الانواع قيد الدراسة وان هذه الانزيمات تثبط وبصورة كاملة عند معاملتها مع المستخلص المائي للعدس بينما لوحظ اختلاف في النسب المئوية لتثبيط انزيمات البروتييز الداخلية.

الكلمات المفتاحية: نبات العدس، مستخلص مائي، مواد فعالة بايولوجيا، مثبطات انزيمات البروتييز

المقدمة:

تنتج الانواع البكتيرية جميعها انزيمات البروتييز مختلفة الانواع لتشمل انزيمات البروتييز السيرينية والمعدنية والاسبارتاكية والحامضية (serene proteases, asparatic proteases, metaloprotease and acid proteases) وغيرها وتلعب تلك الانزيمات ادوارا مهمة ومختلفة في تنظيم فعالية البكتريا وتكوين السبورات وحركة البكتريا وظاهرة الانتشار swarming كما هو الحال في بكتريا *B. subtilis* [1، 2] وتساعد البكتريا تلك الانزيمات البكتريا في عملية تغذيتها من خلال تحطيمها للبروتينات وحصولها على الغذاء وتعد العديد من هذه الانزيمات عوامل ضراوة لبعض الانواع البكتيرية الممرضة مثل *E. coli* و *P. aeruginosa* [3، 4، 5، 6]. كما تساهم انزيمات البروتييز داخلية الانتاج في تنظيم تحطيم البروتينات وتنظيم عمليات نمو الخلايا [7].

وتفرز انزيمات البروتييز البكتيرية باشكال مختلفة بعضها الى خارج الخلايا كما هو الحال في الانواع المختلفة لاجناس البكتريا الموجبة لملون كرام مثل *Bacillus* و *Staphylococcus* وبعض انزيمات بروتييز خاصة تفرزها البكتريا السالبة لملون كرام واشكال من الانزيمات المرتبطة بالاغشية الخلوية للبكتريا السالبة لملون كرام كما هو الحال مع انزيم protease VII المنتج من قبل بعض عزلات *E. coli* [8]. وتنتج بعض العزلات البكتيرية انواع متعددة بعضها داخلي وبعضها متصل الى الاغشية الخلوية وبعضها تفرزه الى خارج الخلية في ان واحد كما هو الحال مع بكتريا *E. Coli* حيث تنتج بعض العزلات الملوثة للحليب والمسببة لاصابات التهاب ضرع الابقار انواع مختلفة من انزيمات البروتييز والجلاتينيز[9]. و يعد تواجد انزيمات البروتييز الداخلية والخارجية من المشاكل المهمة عند انتاج انزيمات مختلفة من الاحياء المجهرية حيث تعمل على تحطيم المنتج [2]. وبالمقابل تنتج معظم انواع الاحياء موادا تثبط فعالية انزيمات البروتييز بانواعها وبالاخص النباتات في انتاجها الكبير والمتعدد لانواع المثبطات و تساهم تلك المثبطات في السيطرة على انزيمات البروتيز بانواعها الخارجية والداخلية وتنظيم فعاليتها وتحد من امراضية الاحياء الممرضة المعتمدة على انزيمات البروتيز في ضراوتها. فقد استطاع Kim وجماعته [10] تنقية مثبطات البروتيز من البطاطا ودرس تأثيرها المضاد للبكتريا والفطريات مثل *Candida albicans* و*Rhizoctonia solani* واشار Kim وجماعته [11] الى تشجيعه لاستعمال مثل هذه المثبطات في علاج الاصابات البكتيرية والفطرية وذلك لزيادة وتطور مقاومة الاحياء المجهرية للمضادات الحيوية التقليدية المستعملة في العلاج فقد اشار Babay[12] الى تطور مقاومة بكتريا *Salmonella* للجيل المطور من مضادات البيتا لاكتام. هدف البحث الحالي الى التحري عن بعض المواد ذات الفعالية البايولوجية (متعدد الفينولات والصابونيات والتانين والستيرويد والتربين والراتنج والفلافونين) في المستخلص المائي البارد للعدس وتحديد فعاليته البايولوجية ضد الانواع البكتيرية *E.*

*وزارة العلوم والتكنولوجيا/ دائرة البحوث الزراعية/ مركز التقانات الاحيائية وتكنولوجيا الغذاء
**وزارة العلوم والتكنولوجيا/مركز البيئة/ قسم سلامة الاغذية

coli و*P. aeruginosa* و*Sal.typhimurium* و*S. aureus* و *B. subtilis* وقياس فعالية مثبط البروتيز وقدرته على تثبيط انزيمات البروتييزات الخارجية والداخلية للانواع البكتيرية قيد الدراسة وتحديد النسب المئوية لفعاليتها المتبقية.

المواد وطرائق العمل:

البذور المستعملة

استعملت بذور العدس(*Lens culinaris*) برتقالية اللون والمتوفرة في الاسواق المحلية لاستخلاص مثبط البروتييز.

الاستخلاص المائي البارد للعدس

وزن 250 غرام من مسحوق بذور العدس واضيف الى لتر من محلول الفوسفات الداريء ذي التركيز 150 مليمولار والرقم الهيدروجيني 6.5 ووضع في الحاضنة الهزازة وبدرجة 37 °م ولمدة 18 ساعة. نبذ مركزيا بسرعة 7000 دورة/ دقيقة ولمدة 10 دقائق[13].

التحري عن المواد الفعالة بايولوجيا

اعتمدت بعض الاختبارات اللونية في تحديد المركبات ذات الفعالية البايولوجية في عينة البحث حيث تم الكشف عن الفينول والصابونين والتانين والراتنج والفلافون والتربين والستيرويد في المستخلص المائي البارد للعدس [14].

البكتريا المستخدمة والتحري عن الفعالية البايولوجية

تم التحري عن الفعالية البايولوجية للمستخلص المائي للعدس ضد الانواع البكتيرية الموجبة لملون كرام والتي تعود للانواع *S. aureus* و*B. subtilis* والانواع السالبة لملون كرام والتي شملت *E. coli* و *S.typhimurium* و *P. Aeruginosa* والمتوفرة في مختبرات مركز البيئة قسم سلامة الاغذية.

تم تحضير المزارع البكتيرية بتلقيح وسط لوريا برتاني السائل (1% تريبتون و0.5% مستخلص خميرة و1% ملح الطعام النقي) بمستعمرة مفردة نقية من الانواع البكتيرية قيد الدراسة وحضنت بدرجة 37°م بالحاضنة الهزازة وبسرعة 120 دورة/ دقيقة ولمدة 18ساعة لتستخدم في تلقيح الوسط الصلب لغرض التحري عن الفعالية البايولوجية للمستخلص المائي البارد للعدس.

اضيف المستخلص المائي للعدس وبتراكيز 1% و5% و10% الى وسط اكار المرق المغذي ونميت عليه العزلات البكتيرية قيد العمل لمدة 18 ساعة وقيست اقطار نمو المستعمرات البكتيرية وقورنت مع اقطار نمو المزروع الخال من المستخلص.

التحري عن انتاج انزيمات البروتييز

زرعت الانواع البكتيرية قيد الدراسة جميعها على وسط المرق المغذي الصلب الحاوي على 1% كازائين الحليب المنزوع الدهن والخال من الفيتامينات والمعادن وحضنت بدرجة 37° م ولمدة 18-72 ساعة ويعد ظهور هالة تحلل الكازائين حول المزروع البكتيري دلالة على انتاجها لانزيمات البروتييز.

استخلاص انزيمات البروتييز من الانواع البكتيرية

زرعت الانواع البكتيرية في وسط تريبتك سويا السائل tryptic soy broth وحضنت بدرجة 37م° في حاضنة هزازة بسرعة 120 دورة/ دقيقة ولمدة 18 ساعة ، نبذت المزارع بسرعة 5000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق واعتمد راشح البكتريا كمستخلص خام لانزيمات البروتييز الخارجية [15].

جمع راسب البكتريا واضيف اليه محلول التكسير الداريء ذي الرقم الهيدروجيني 7.2 المحور (10 ملي مولاري من tris و50 ملي مولاري من NaCl و10% كليسيرول) وبنسبة 1 غرام: 5 مل محلول التكسير الداريء[16]. كسرت الخلايا تحت ظروف مبردة باستعمال الامواج فوق الصوتية باستخدام جهاز التكسير soni prep فحصت معلقات البكتريا تحت المجهر للتأكد من اكتمال عملية التكسير للخلايا. نبذ معلق الخلايا المكسرة مركزيا بسرعة 7000 دورة/ دقيقة ولمدة 15 دقيقة واعتمد الراشح كمستخلص خام للانزيمات الداخلية واستعمل في تقدير فعالية انزيمات البروتييز الداخلية.

تقدير فعالية انزيم التربسين

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Hagihara [17] في تقدير فعالية التربسين باستخدام الكازائين كمادة اساس، وتعرف الوحدة الواحدة للانزيم بانها الزيادة الحاصلة في الامتصاصية عند الطول الموجي 275 نانوميتر وبمقدار 0.001 في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف القياس.

تقدير فعالية مثبط التربسين

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل الخفاجي واخرون[13] في تقدير فعالية مثبط التربسين وتعرف وحدة المثبط الواحدة بانها كمية المثبط التي تسبب انخفاض في قراءات فعالية انزيم التربسين المقاسة وبمقدار 0.001 عند قياس امتصاصية الطيف الضوئي عند الطول الموجي 275 نانومتر في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف القياس وقيست النسبة المئوية لتثبيط انزيم التربسين من خلال قياس الفعالية المتبقية لانزيم التربسين.

تقدير فعالية انزيمات البروتييز الخارجية والداخلية

قدرت فعالية انزيمات البروتييز الخارجية والداخلية للانواع البكتيرية المدروسة باعتماد المستخلصات الخام لراشح المزارع البكتيرية وراشح البكتريا المكسرة وكما هو مذكور في تقدير فعالية التربسين.

تحديد قابلية مستخلص العدس في تثبيط انزيمات البروتييز البكتيرية

مزج حجم من المستخلصات الخام لانزيمات البروتييز الخارجية اوالداخلية مع حجم مماثل من المستخلص المائي للعدس وترك لمدة 10 دقائق بدرجة 25 °م واستعمل المزيج في تقدير الفعالية المتبقية لانزيمات البروتييز الخارجية والداخلية والنسب المئوية لتثبيطها.

النتائج والمناقشة:

أوضح الكشف عن المواد الفعالة بايولوجيا احتواء المستخلص المائي للعدس على بعض المواد ذات الفعالية البايولوجية ومنها التانين كما هو واضح في جدول (1) وقد يكون لطريقة الاستخلاص ومحاليلها دور رئيسي في استخلاص العديد من المواد ذات الفعالية البايولوجية حيث اشار [18] الى دور النقع في استخلاص الصابونيات من الحمص وبين [19] المواد المضادة للتغذية في الفاصوليا. كما وجد [20] احتواء مستخلص العدس على التانين واشار الى تأثيراته البايولوجية المهمة.

جدول (1): التحري عن المواد الفعالة بايولوجيا في المستخلص المائي للعدس

نوع المادة	نتيجة الاختبار
الفينولات	+
التانينات	+
الصابونيات	+
الراتنجات	+
الفلافونيات	-
التربينات	-
الستيرويدات	-

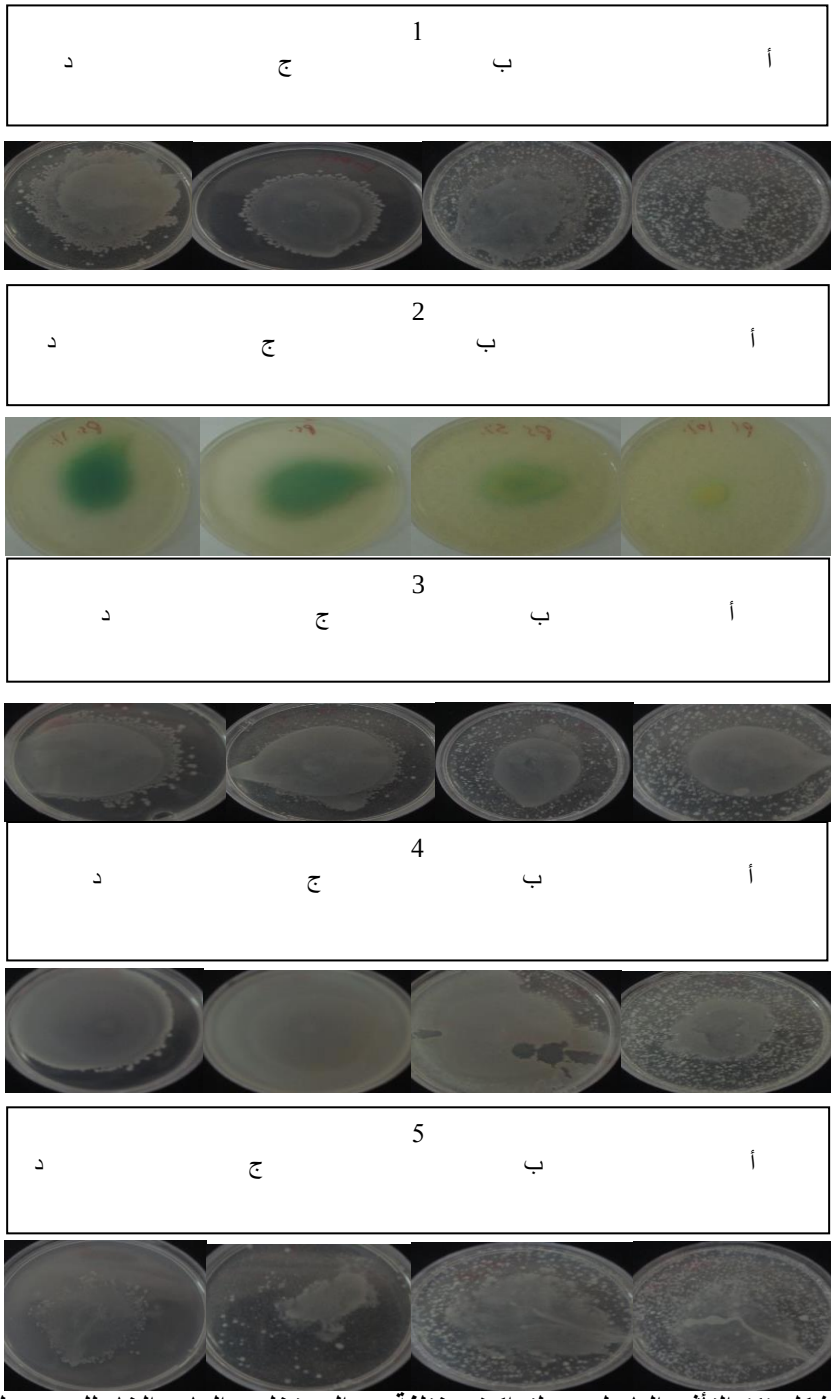
+= فحص ايجابي، -= فحص سالب

وقد بين التحري عن الفعالية البايولوجية لتراكيز 1% و5% و10% من المستخلص المائي الخام للعدس اختلاف فعاليته لتثبيط النمو باختلاف التراكيز المضافة من المستخلص المائي للعدس. حيث لم يلاحظ تثبيط لنمو الانواع البكتيرية قيد الدراسة جميعها عند تركيز 1% وانخفاض قليل في نمو الانواع *P.aeruginosa* و*B. Subtilis* عند استعمال تركيز 5% مستخلص مائي للعدس بينما سجلت اقطار النمو انخفاض كبير وصل الى اكثر من 75% قلة في نمو النوع *P. aeruginosa* عند تركيز 10%. واوضح قياس اقطار النمو اختلافا واضحا عن نمو السيطرة في تراكيز 5% و10% مستخلص مائي للعدس وقد انخفض نمو النوع *P. aeruginosa* بما يقارب اكثر من ثلاث مرات اقل من نمو مزروع السيطرة يليه النوع *E. coli* و *B. subtilis* وكما هو واضح في جدول (2).

جدول (2) التاثير البايولوجي لتراكيز مختلفة للمستخلص المائي للعدس على اقطار نمو بعض الانواع البكتيرية

نوع البكتريا	قطر نمو السيطرة (سم)	قطر النمو البكتيري(سم) 1%	نسبة الانخفاض %	قطر النمو البكتيري(سم) 5%	نسبة الانخفاض %	قطر النموالبكتيري (سم) 10%	نسبة الانخفاض %
E.coli	6	5	16.6	4.6	23	2.5	58.3
P. aeruginosa	5	4.5	10	3	36	1.5	70
Sal. typhimurium	4.8	4.5	6.25	4	16.6	4.6	4.1
B. subtilis	7	5.7	25.7	6	14.2	4	42.8
S. aureus	4.2	4	4.8	4.5	0	3.4	19.1

ولوحظ كذلك ظهور مستعمرات صغيرة الحجم منتشرة حول النمو الاعتيادي في كل من تركيزي 5% و10% مستخلص مائي للعدس ولجميع الانواع قيد الدراسة عدا نمو النوع *p. aeruginosa* وكما هو واضح في شكل(1). يلاحظ من النتائج اختلاف قابلية المسخلص المائي للعدس في تثبيط نمو الانواع البكتيرية قيد الدراسة وقد يعزى تأثيره الكبير على نمو بكتريا *P. aeruginosa* و *E. coli* الى ان تلك العزلات تعود الى مجموعة الاحياء المجهرية السالبة لملون غرام والتي تحتوي على جدران خلوية قليلة السمك من الببتيدوكلايكان والذي يعد حاجزا دفاعيا للبكتريا وقد تمتلك مثل تلك العزلات البكتيرية لعدد من عوامل النقل والتي تساهم في نقل المواد من خارج الخلية الى داخلها كما اشار لذلك [21] وقد يكون لاحتواء مستخلص العدس على مواد التانين ذات التأثير البايولوجي المضاد للبكتريا وذلك يتوافق مع جاء به [22] حيث اشار الى ان التانين له فعالية مضادة للبكتريا وقد وجد [23] ان التانين المستخلص من نبات *Jasminum* اظهر فعالية شديدة ضد النوع البكتيري *Sal.typhi* وفعالية جيدة ضد الانواع *S. albus* و *Proteus mirabilis* وكشف[24] عن احتواء المستخلصات المائية لنبات الالموند almond الهندي على كمية كبيرة من التانين ووجد قابليته في تثبيط نمو بعض الانواع البكتيرية المرضية مثل *Aeromonas hydrophila* المعزولة من الاسماك وقد يعزى التاثير المضاد للبكتريا ان التانين في المستخلص له تركيب كيميائي فينولي يعمل على دنترة البروتينات الخلوية مغيرا الشكل التركيبي الثلاثي وكذلك طبيعته الحامضية الضعيفة والتي تعمل على تغيير ظروف تنمية البكتريا وقد يعمل على الارتباط مع انزيمات البروتييز واللايبيز والاميليز ذات الاهمية مانعا عملها وذلك يتفق مع ما وجده [20] من ان التانين المستخلص من العدس يعمل على تثبيط انزيمات البروتييز والاميليز. كما اشارت النتائج الى قلة تاثر النوع *S. typhimurium* ولجميع التراكيز المستخدمة على الرغم من كونه يعود الى مجموعة البكتريا السالبة لملون غرام. وقد يعزى السبب الى امتلاك هذا النوع الى عوامل وراثية تمنحه مقاومة للعديد من المواد الطبيعية والمضادات الحيوية المستخدمة في العلاج حيث اشارت العديد من البحوث الى العوامل الوراثية خارج الكروموسوم ودورها في منح المقاومة للعديد من المواد المصنعة والطبيعية[25].



شكل (1) التأثير البايولوجي لتراكيز مختلفة من المستخلص المائي الخام للعدس على نمو عدد من الانواع البكتيرية

1- نوع *E.coli*، 2- نوع *P. aeruginosa*، 3- نوع *S. typhimurium*، 4- نوع *B. subtilis*، 5- نوع *Staph. Aureus* (ا= سيطرة، ب= تركيز 1%مستخلص عدس،ج= تركيز 5%مستخلص عدس،د= 10% مستخلص عدس)

بينت نتائج التحري النوعي لانزيمات البروتييز على وسط الكازائين انتاج العزلات البكتيرية العائدة للانواع البكتيرية *E. coli* و*P. aeruginosa* و*Sal.typhimurium* و*S. aureus* و *B. subtilis* انزيمات بروتييز وبفعالية انزيمية مختلفة بدليل ظهور هالة تحلل بروتين الكازايين حول النمو البكتيري كما هو واضح في الشكل (2) الذي يمثل بكتريا *B. subtilis* .

شكل (2) التحري عن انتاج انزيمات البروتييز في بكتريا *B. subtilis*.

تعتمد قابلية انتاج الاحياء المجهرية المختلفة لانزيمات البروتييز على عدد من العوامل منها المجموعة التي يعود لها النوع فقد عرف عن الانواع البكتيرية الموجبة لملون غرام انتاجها لانزيمات البروتييز الى خارج الخلية بينما تنتج الانواع البكتيرية السالبة لملون غرام اغلب انزيمات البروتييز بشكل مرتبط مع الاغشية الخلوية اوالى داخل الخلية نفسها وقد تنتج انواع اخرى الى خارج الخلية كما هو الحال مع انزيمات من بكتريا *E. coli* وانزيمات من بكتريا *P. aeruginosa* كما اشار لذلك كل من [9,3,2] .
واوضح قياس الفعالية الكمي لانزيمات البروتييز الخارجية اختلاف انتاج العزلات البكتيرية من انزيمات البروتييز بعد 18 ساعة حضن كما هو في جدول (3).

جدول (3) فعالية انزيمات البروتييز الخارجية لعدد من الانواع البكتيرية

نوع البكتريا	فعالية البروتييز الخارجية (وحدة/ مل)
E. coli	148
P. aeruginosa	239
Sal. typhimurium	236
B .subtilis	50
S. aureus	160

(الحضن لمدة 18 ساعة وبدرجة 37 °م و150 دورة/ دقيقة)

وتراوح الانتاج بين 239 وحدة/ مل لبكتريا *P. aeruginosa*. و50 وحدة/ مل لبكتريا *B. subtilis* وقد يعزى سبب ذلك الاختلاف في الانتاجية الى عدد من العوامل منها قابلية النوع البكتيري نفسه على الانتاج وتعدد انواع الانزيمات المفرزة من النوع الواحد والى اختلاف قابلية الانتاج اعتمادا على مكونات الوسط الزرعي حيث تسيطر عدد من العوامل على انتاج انزيمات البروتييز منها تغذوية مثل الاحماض الامينية والسكريات والاملاح وفيزياوية ومنها الرقم الهيدروجيني والتهوية والوقت اللازم للتنمية كذلك كما قد يعود الاختلاف في الانتاج الى حاجة الانواع الممرضة الى تنشيطها داخل الخلايا التي تصيبها لتحفيز انتاج بعض عوامل الضراوة والتي منها انزيمات البروتييز وقد اشارت بعض الدراسات الى تاثير مثل تلك العوامل على انتاج انزيمات البروتييز[4 و7و15]. وقد يعود سبب انخفاض انتاج بكتريا *B. subtilis* لانزيمات البروتييز الخارجية انها تنتج اكبر كمية من تلك الانزيمات عند طور الثبات وعند تكوينها السبورات حيث اشار Sumantha [2] الى علاقة انتاج البروتييزات مع اطوار نمو البكتريا وتكوينها للسبورات.
قيست فعالية مثبط التربسين في المستخلص المائي للعدس لتكون 489 وحدة مثبط/ مل عند ظروف الاستخلاص وقد بينت نتائج معاملة مستخلصات انزيمات البروتييز الخارجية لعدد من الانواع البكتيرية مع المستخلص الخام للعدس تثبيط كامل لهذه الانزيمات و النسبة المئوية للتثبيط 100% لكافة المستخلصات كما هو مبين في الجدول (4). يحتوي العدس على العديد من المواد التي تعمل على تثبيط الانزيمات بصورة عامة وعلى مثبطات البروتييز بصورة خاصة وشخص [26] مجموعتين من انواع المثبطات في العدس.

جدول (4) النسب المئوية لتثبيط انزيمات البروتييز الخارجية لبعض الانواع البكتيرية بوساطة المستخلص الخام للعدس

نوع البكتريا	الفعالية المتبقية (وحدة/مل)	النسبة المئوية للتثبيط%
E.coli	0	100
P. aeruginosa	0	100
Sal. typhimurium	0	100
B. subtilis	0	100
S. aureus	0	100
E.coli	0	100
P. aeruginosa	0	100
Sal. typhimurium	0	100
B. subtilis	0	100
S. aureus	0	100

وبينت النتائج اختلاف فعالية انزيم البروتييز الداخلية بين الانواع البكتيرية المدروسة وكذلك اختلاف نسب تثبيط هذه الانزيمات بعد معاملتها بمستخلص العدس (جدول 5)

جدول (5) النسب المئوية لتثبيط انزيمات البروتييز الداخلية لبعض الانواع البكتيرية بوساطة المستخلص المائي للعدس

نوع البكتريا	عدد وحدات البروتييز الداخلية (وحدة/مل)	فعالية البروتييز الداخلية المتبقية (وحدة/مل)	النسبة المئوية للتثبيط%
E. coli	105	48.3	54
P.aeruginosa	203	109.6	46
Sal. Typhimurium	50	50	0
B.subtilis	50	0	100
S. aureus	50	50	0

يلاحظ من جدول (5) ان اعلى فعالية لانزيمات البروتييز الداخلية تعود لبكتريا *P. aeruginosa* حيث وصل عدد وحدات الانزيم الى 203 وحدة/ مل يليها بكتريا *E. coli* ووصلت الفعالية الى 105 وحدة/ مل وان اقل فعالية تعود لكل من *Sal. typhimurium* و*B.subtilis* و*S. aureus* حيث قدرت فعالية انزيم البروتييز الداخلي لتكون 50 وحدة/ مل وقد يكون سبب ذلك الاختلاف الى فعالية وحيوية البكتريا في الوسط السائل المستخدم في تنمية البكتريا حيث تنطلق العديد من انزيمات البروتييز الداخلية لغرض تنظيم مسارات النمو وكسر العديد من الانزيمات الاولية غير الفعالة لجعلها فعالة مثل الانزيمات الحالة للدم والعديد من السموم [4 ،28] ولوحظ ان اعلى نسبة تثبيط تعود لبكتريا *B. subtilis* حيث قدرت 100% وقد يعود ذلك الى انخفاض فعالية انزيمات البروتييز الداخلية ليعمل المثبط في المستخلص المائي للعدس من التثبيط الكامل له تليها *E. coli* وقدرت 54% ثم *P. aeruginosa* لتكون 46% وانعدم تثبيط انزيم البروتييز الداخلي لبكتريا *Sal. typhimurium* و *S. aureus*قد يعزى سبب ذلك الى اختلاف انزيمات البروتييز الداخلية وانها خليط من الانزيمات التي تحتاج الى مثبطات مختلفة تعمل على الارتباط مع تلك الانزيمات. مما تقدم يمكن استخدام المستخلص المائي للعدس من تثبيط انزيمات البروتييزات الخارجية لكل من بكتريا *E.coli* و *P.aeruginosa* و *Sal. typhimurium* و*B. subtilis* و*S. aures*. اوضحت النتائج اعلاه ان المستخلص المائي للعدس يعمل وبصورة كبيرة على تثبيط نمو النوع البكتيري *P .aeruginosa* يليها النوع *E. coli* من خلال الفعالية البايولوجية للتانين الموجود في المستخلص جنبا الى جنب مع فعالية مثبط البروتييزمما يفتح الباب لتطوير المستخلصات النباتية لتكون بديلا عن المضادات الحيوية التقليدية.

المصادر:

1- Connelly, M. B.; Young, G. M. and Sloma, A.(2004). Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 186(13): 4159-4167.

2- Sumantha, A.; Larroche, C. and Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. Food Technol. Biotechnol., 44(2): 211-220.

3- Bentzman, S.; Polette, M.; Zahm, J-M.; Hinnrasky,J.; Kileztky, C.; Bajolet, O.; Klossek, J-M.; Filloux, A.; Lazdunski, A. and Puchelle, E. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing gover activation of epithelial matrix metalloproteinase- 2. Lab Investigation, 80: 209- 219.

4- Twining, S. S. Kirschner, S. E. Mahnke, L. A. and Frank, D. W. (1993). Effect of *Psedumonas aeruginosa* Elastase, Alkaline protease, and exotoxin A on corenal proteinases. Investigation Ophthalmogy and Visual Science, 34(9): 2699- 2712.

5- Engel, L. S.; Hill, J. M.; Caballero, A. R.; Green, L. C. and OCallaghan, R. J.(1998). Protease IV, a unique extracelluar protease and virulence factor in *Psedumonas aeruginosa*. The Jornal of Biological Chemistry, 273(27): 16792- 16797.

6- Lazdunski, A. M. (1989). Peptidases and proteases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. FEMS Microbiol. Reviews, 63: 265-276.

7- Takaya, A.; Tomoyasu, T.; Tokumitsu, A.; Morioka, M. and Tomoko, Y.(2002). The ATP-dependent Lon protease of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium regulates

invasion and expression of genrs carried on *Salmonella* pathogenicity island 1. J. Bacteriol., 184(1): 224-232.

8- Sugimura, K. and Nishihara, T. (1988). Purification, characterization, and primary structure of *Escherichia coli* protease VII with specificity for paired basic residues: identity of protease VII and OmpT. J. Bacteriol., 170(12): 5625- 2632.

9- Haddadi, K.; Moussaoui, F.; Hebia, I.; Laurent, F. and Le Roux, Y.(2005). *Escherichia coli* proteolytic activity in milk and casein breakdown. Reprod. Nutr. Dev., 45: 485- 496.

10- Kim, J- Y.; Seong- Cheol, P.; Mi-Hyun, K.; Hak- Tai, L.; Yoonkyung, P. and Kyung- Soo, H.(2005). Antimicrobial activity studies on a trypsin- chemotrypsin protease inhibitor obtained from potato. Biochemical and Biophysical Research Communication, 330: 921- 927.

11- Kim, J- Y.; Park, S-C.; Hwang, I.; Cheong, H.; Nah, J- W.; Hahm, K- S. and Park, Y.(2009). Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. Int. J. Mol. Sci., 10: 2860- 2872.

12- Babay, H.(2002). Detection of extended- spectrum β- lactamases in members of the family enterobacteriaceae at a teaching hospital, Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia. Saudi Med. J., 23(2): 186- 190.

13-الخفاجي، خلود عبد الاله وسحر غازي عمران و عادل سعدي سلمان و ميعاد عدنان عبد الرزاق و سلمان عبود حمود وعبود حيون. (2011). استخلاص مثبط التربسين من بعض افراد العائلة البقولية وتحديد الظروف المثلى لاستخلاص المثبط من بذور العدس (*Lens culinaris*). مجلة الزراعة العراقية البحثية(عدد خاص)، مجلد 16(4).

14-الزبيدي، لبيب أحمد كاظم .(2005). الفعالية التثبيطية لمستخلصات قلف نبات القرفة(الدارسين) ضد بعض الأحياء الدقيقة لاستخدامها في حفظ اللحم المفروم. رسالة ماجستير، معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا، جامعة بغداد.

15- Jensen, S. E.; Fecycz, I. T. and Campbell, J. N. (1980). Nutritional factors controlling exocellular protease production by *Psedumonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 144 (2): 844-847.

16- Catterall , J.F. and Welker , N. E. (1977). Isolation and properties of a thermostable restriction Endonuclease (EndoR .*Bst* 1503). J. Bacteriol ., 129(2) : 1110-1120 .

17- Hagihara, B.(1960). "Kosoken-Kyuho". Vol. 2, ed by S. Asakura, Syoten, Tokyo,P. 237.

18- Ruiz, R. G.; Keith R.P.; A. Eddie Arthur; Malcolm E. R., Michael J. C. R. andRoger G. F.(1996).Effect of Soaking and Cooking on the Saponin Content and Composition of Chickpeas (*Cicerarietinum*) and Lentils (*Lens culinaris*). *J. Agric. Food Chem.*, *44*(6): 1526–1530

19-Muzquiz, M.; Carmen, B.; Gemma, A.; Mercedes, M. .P and Carmen, C.(1999). The investigation of antinutritional factors in Phaseolus vulgaris. Environmental and varietal differences. Biotechnol. Agron. Soc. Envirion. 3(4): 210-216.

20-Validar, A. N.; Lourenco, E. J. and Silva, M. A.(1997). Effect of lentil tannins on albumine hydrolysis by trypsin. Cienciae Tecnologia de Alimentos, 17(3): 208-212.

21-Van, D. C. and Iglew, K. BH.(1998). Cell to Cell signaling and *pseudomonas aeruginosa* infection. Emerging infectious disease, 4(4): 551-560

22-Chung, KT.; Lu, Z. and Chou, MW. (1998). Mechanisms of inhibition of tannic acid and related compound on the growth of intestinal bacteria . Food and Chemical toxicology, 36(12): 1053- 1060.

23-Priya J. and Patric Raja, D.(2008). Anti- bacterial activity studies of *Jasminum grandiflorum* and *Jasminum sambac* . Ethnobotancial leaflets, 12: 481- 483.

Sonnante, G. (2008). Characterization of a Bowman- Birk inhibitor from lentil: expression and antitumeral propreties**.** Proceedings of the 52nd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, Padova, Italy – 14/17.

27-Guzman- Verri, C.; Chaves- Olarte, E. Garacia, F.; Arvidson, S. and Moreno, E. (2001). In Vivo Proteolytic degradation of the *Escherichia coli* acyltransferase HlyC. The J. of Biological Chemistry, 276(20): 16660-16666.

24-Nantarika, C. and Nongnut Assa, W.K. (2008). The in vitro antibacterial activity and ornamental fish toxicity of the water extract of Indian Almond leaves (*Terminalia catappa* Linn). KKUvet J. 18(1): 36- 44.

25- Leverstein-van Hall M. A; Blok H. E. M.; Donders A. R. T; Paauw A. and Fluit A. C. (2003). Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. J Infect Dis 187: 251–259.

26- Caccialupi, P., Cecil. R., Siciliano, R.A., Clemente, A, Pignone, D. and

Biological activity and protease inhibitor from watery extract of lentil (*Lens culinaris*) against some bacterial species

Khulood A.Al-Khafaji ***Salman A. Hammood*****
Sahar G.Omran* ***Manal A.Hassan**** ***Husham J.Yaseen*****
Abood H.* ***Suhaila G. Ali*****

*Genetic Engineering and Food Bio. Center, Agricultural and Food Technology Directorate, Ministry of Science and Technology, Baghdad, Iraq
** Food Safety Center, Ministry of Science and Technology, Baghdad, Iraq

Abstract:

Biological activity substances was investigated in watery extract of lentil which found to contain phenols, tannin, saponins and resins while, flavons, terpens and steroids were not exist in the extract details explained that 5%, 10% of lentil extract largly inhibited the growth of *Psedumonas aeruginosa* then *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The growth of both *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* were slightly affected by all extract concentration. Extracellular protease were screened in all bacterial species under study. Complete inhibition was achieved for extracellular protease while different percentage of protease inhibition were seen for intracellular proteases.