فعالية بعض المستخلصات الكحولية للمركبات الفينولية لأوراق السدر وسعف النخيل في تثبيط نمو الفطرين *Mucor sp* , *Aspergillus niger* ونشاط أنزيم ألفا–أميليز المفرز منهما

حميد عوده عبد* هادي مهدي عبود* صبري جثير عبود**

* وزارة العلوم والتكنلوجيا / دائرة البحوث الزراعية

**كلية الزراعة / جامعة بغداد

بغداد-العراق

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لاختبار قابلية فعالية نوعين من المستخلصات الكحولية للمركبات الفينولية لأوراق نباتات (السدر والسعف) بثلاثة تراكيز 500، 1000، 2000 مايكرغرام / مل في تثبيط نمو الفطرين *A.niger* و *Mucor* sp. من خلال كبح افراز انزيم ألفا –اميليز. اظهرت النتائج ان كلا النوعين من المستخلصات الكحولية للمركبات الفينولية الكحوليه لها قابلية تثبيطية أتجاه نمو الفطرين *A. niger* و *Mucor* sp. والانزيم المفرز منهما اذ حقق مستخلص اوراق السدر اعلى نسبة تثبيط لنمو فطر *Mucor sp.* والتي بلغت 31.70% مقارنة بمستخلص اوراق سعف النخيل اذ بلغت 30.86%. عند التركيز 2000 مايكروغرام / مل و 18.30%و 16.31% على التوالي بالنسبة لفطر *A. niger* على اساس الوزن كما جاءت النتيجة مماثلة لما كان في نتائج الفعالية الانزيمية حيث اعطى السدر اعلى نسبة تثبيط عند تركيز 2000 مايكروغرام / مل والتي بلغت 30.74% في حين سجل مستخلص اوراق سعف النخيل 28.12% لفطر *Mucor* sp. و 14.54% لمستخلص اوراق السدر و 12.22% لأوراق سعف النخيل لفطر *A.niger* عند نفس التركيز.

الكلمات المفتاحية: الاميليز، *Aspergillus niger* ، *Mucor sp.* ، سعف النخيل والسدر.

Effectiveness of Some Phenolic Alcohol Extracts of the leaves of the *Zizphus spina –Christi L.* and of the *Phoenix dactylifera* in Inhibition of *Aspergillus niger* and *Mucor sp*. Growth and Activity of Alpha Amylase Secreted from Them.

Hameed Auda Abed* Hadi Mahdi Abood* Sabri Chither Abood**

* Ministry of Science & Technology / Directorate of Agricultural Research

** University of Baghdad / College of Agriculture

Baghdad-Iraq

E_mail: hameedabeed@yahoo.com

Abstract

This study was carried out to evaluate the efficacy of Phenolic compounds from alcoholic extract of two types of plant leaves (*Ziziphus spina-christi & Phoenix dactylifera*), with three concentrations 500, 1000, 2000 ppm., to inhibit the fungus growth (*Asprgillus niger* and *Mucor sp*) by inhibiting the amylase enzyme secretion. The results showed that the two types of Phenolic alcohol extracts have the potential to inhibit the growth of fungus (*Aspergillus niger* and *Mucor* sp.) and the enzyme secretion from them. Sider leaf extract achieved the highest inhibition for the growth of *Mucor sp* which was 31.70% compared with palm leaf extract 30.86% at the concentration 2000 ppm. While 18.30% and16.31% respectively for *Aspergillus niger* depending up on weight basis. The results were similar to the results of the enzymatic efficacy .The extract of sider gave the highest inhibition rate at 2000 ppm concentration which was 30.74% .The extract of palm leaves gave 28.12% for *Mucor sp.* and 14.54% and 12.22% for palm for *A. niger* at the same concentration.

Key Words: Amylase Enzyme, *Aspergillus niger*, *Mucor* sp., Sider and Palm.

المقدمة

باتت مشكلة تلوث الاغذية وبالذات محاصيل الحبوب سواء في الحقل او عند الخزن بفعل الأحياء المجهرية، من اهم الاعباء التي يعاني منها كل من الفلاح والمستهلك، حيث تتسبب بخسائر مادية ضخمة بالإضافة الى المشاكل الصحية وبالذات في الجهاز العصبي، الكلى، والكبد (Madigum وآخرون، 2006). شخصت العديد من الاغذية الملوثة بالأحياء المجهرية مسببة تغييرات غير مرغوب فيها تصل الى حد تلفها (Reena و Priyanka، 2014) كما وقد وجد بان الأحياء المجهرية المرافقة للأغذية من اهم اسباب الوفيات في البلدان النامية والتي تؤدي الى هلاك ما يقارب 1.8 مليون نسمة سنويا (Faruque، 2012) ومن بين اهم تلك الأحياء الملوثة هي الفطريات العائدة لجنس *Aspergillus sp.* و *Fusarium sp.* (Bankole، 1997) واجناس (*Rhizopus sp.* و *Mucor sp.* و *Penicillium sp.* وغيرها) والتي تعد من الانواع الفطرية المصاحبة للأغذية المخزونة (Juckett وآخرون، 2008)، ومن هنا دعت الحاجة الى ايجاد طرائق لحفظ الاغذية ومنها تلك التي تعود الى زمن بعيد مثل التجفيف والتمليح والتدخين والبسترة الا انها لم تكن كافية، فظهرت بعدها طرائق اكثر تطورا منها التشعيع، ولكن سرعان ما بدأت مخاوف بالظهور من وجود مواد مسرطنة بسبب هذه الطرائق (Peter و BØgh-SØrensen، 2003) ولذا كان من الضروري التفكير بطرق بديله تكون امنة وفعالة في حفظ الاغذية ومن اهم تلك الطرق هو استعمال المستخلصات النباتية كمضافات طبيعية لحفظ الاغذية. لقد ظهر أستعمال هذه الطريقة حديثا ولكن أستخدامها أمسى في تزايد مستمر لفعاليتها لما لوحظ في حفظ الاغذية من التلوث (Martini وآخرون، 2004 و Sinha و Bhatnag، 1998) وقد جاءت العديد من الدراسات في هذا الخصوص منها دراسة Reena و Priyanka (2014) باستخدام مستخلصات من الحمضيات Citrus ضد فطريات *Mucor sp.* و *Rhizopus sp.*، ومستخلصات نبات البرغنية Bergenia ضد اجناس *Aspergillus sp.* و *Fusarium sp.* و *Alternaria sp.*.

بناء على ماتقدم اجريت هذه الدراسة لتقييم فعالية كفاءة المستخلصات الكحولية لاوراق السدر و سعف النخيل في تثبيط نمو وفعالية الفطرين *Mucor sp.* *.,A.niger*

المواد وطرائق العمل

استعملت في هذه التجربه اوراق السدر وسعف النخيل اذ طحنت الأوراق الكاملة Whole leaves بعد تجفيفها على درجة حرارة 40م° باستخدام مطحنة كهربائية مختبريةMicro Plant Grinding حتى الحصول على مسحوق ناعم وبعدها نخل بمنخل قياس 0.5 ملم ثم وضعت في اكياس من البولي أثيلين محكمة الغلق ووضعت تحت التجميد (درجة حرارة −7م°) لحين الأستعمال.

العزلات الفطرية *Aspergillus* و *Mucor sp.*

حصل على عزلتي الفطرين اعلاه من مختبر المبيدات الفطرية/ دائرة البحوث الزراعيه/وزارة العلوم والتكنلوجيا، نشطت العزلات على وسط (Potato Dextrose Agar) وحضنت الاطباق في درجة حرارة 26±2م° لمدة اسبوع.

الاوساط المستعملة

Czapek dox medium المحور

حضر الوسط بحسب الطريقة التي اوجدها Narasimha وآخرون (2006) $NaNo_3$ 2gm, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5gm, K_2HPO_4 1gm, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01g وحور KCL 0.5g باضافة 2غم من starch بدل مصدر الكاربون الاصلي في الوسط واستخدم لتنمية العزلات الفطرية لمعرفة قابليتها على النمو وانتاج انزيم الاميليز.

استخلاص الفينولات للمستخلص الكحولي

اتبعت الطريقة المستخدمة من قبل Gomathi وآخرون (2012) وذلك باستخلاص 100 غم من مسحوق الاوراق باستعمال 500 مل من الكحول الاثيلي حيث وضعت في دورق حجمي سعة 1000 مل ووضعت في حمام مائي هزاز على درجة حرارة الغرفة لمدة 72 ساعة. ثم عمل طرد مركزي 8000 دورة / دقيقة. رشح المزيج باستعمال ورق ترشيح Whatman No.1 ثم كررت العملية على الراسب باستخدام 500 مل من الكحول الاثيلي لمدة 72 ساعة، ثم تم عمل طرد مركزي 8000 دورة / دقيقة ثم رشح من خلال ورق ترشيح Whatman No.1 جمع الراشحان وبخر المذيب باستعمال المبخر الدوار تحت التفريغ على حرارة 40 م° وبعد التجفيف تم جمع ووزن (لحساب كمية الحصيلة) النموذج وحفظ بالتجميد في عبوات محكمة ومعتمه.

اختبار فعالية المستخلصات التثبيطية ضد الفطرين *Mucor sp.* و*A. niger*

قدرت الفعالية التثبيطية للمستخلصات اتجاه نمو الفطرين حسب الطريقة التي اوجدها Balouiri وآخرون (2016) حيث حضر 750 مل من الوسط الزرعي المحور (الزابك) **Czapek dox medium** ووزع على دوارق حجمية بواقع 20 مل ثم عقمت الدوارق بدرجة حرارة 121 م° وضغط واحد بار لمدة 20 دقيقة بعدها برد الوسط على درجة حرارة الغرفة اضيفت اليه المستخلصات بتراكيز 0، 500، 1000و2000 مايكروغرام / مل بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز من المستخلصات ثم لقحت الاوساط بقرص ذو قطر 7ملم من مزرعة الفطر بعمر اسبوع لكل منها وحضنت الدوارق بعد التلقيح على درجة حرارة 26 م° في حاضنة هزازة لمدة أسبوع ثم رشحت العينات باستخدام ورق الترشيح Whatman No.1 بعد ذلك جففت اوراق الترشيح مع الجزء المترسب عليها على درجة حرارة الغرفة، ثم قيس الوزن الجاف لكل نموذج وحفظ الراشح في الثلاجة لحين قياس تثبيط فعالية الأنزيم بواسطة المستخلصات بالطريقة الطيفية وحسبت النسبة المئوية للتثبيط على اساس الوزن الجاف.

تقدير الفعالية التثبيطية لانزيم α –amylase المفرز من الفطرين *Mucor sp.* و*A. niger* بالطريقة االطيفية

اتبعت الطريقة التي أقترحها (Jyothi وآخرون، 2011) بأستعمال دارىء حامض الخليك ذو رقم هيدروجيني 6، ملح روشل(15غم ترترات صوديوم – بوتاسيوم في 100 مل ماء)، محلول كاشف 3، 5 ثنائي نترو حامض السالسيلك DNSA) المحضر حسب الطريقة التي أقترحها (Whitaker و Bernard، 1972) وذلك بإذابة 1غم من كاشف (DNSA) في 50 مل ماء مقطر ثم يضاف 20 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 2 مولاري لغرض الاذابة ثم اضيف 30 غم من محلول ملح روشل (ترترات الصوديوم–بوتاسيوم) وبشكل تدريجي مع الخلط المستمر لحين الإذابة وأكمل الحجم الى 100 مل بواسطة الماء المقطر مزج المحلول وحفظ في قنينة معتمة لحين الاستعمال بوجود صبغة الكوماسي الزرقاء G–250 و محلول النشا الذائب بتركيز 1%. وحسبت النسبة المئوية للتثبيط باستعمال المعادلة التالية:

الوزن الجاف لمعاملة السيطرة – الوزن الجاف لمعاملة المستخلص

% للتثبيط = ــ X 100

الوزن الجاف لمعاملة السيطرة

النتائج والمناقشة

الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية بدلالة الوزن الجاف

قدرت الفعالية التثبيطية بدلالة نتائج الوزن الجاف للفطرين *Aspergillus niger* و *Mucor sp.* لكل من المستخلصات النباتية لأوراق السدر وسعف النخيل واظهرت نتائج الجدول (1) فعالية المستخلصات الكحولية للمركبات الفينوليه لأوراق السدر وسعف النخيل وامتلاك المستخلص الكحولي لأوراق السدر فعالية تثبيطية اعلى من مستخلص السعف اذ بلغت 31.7% و 30.68% على التوالي عند التركيز 2000 مايكروغرام / مل لفطر *Mucor sp.* و 18.30% و 16.31% على التوالي لفطر *A. niger* بتركيز 2000 مايكروغرام / مل ويظهر من الجدول بأن النسبة المئوية للتثبيط تزداد بزيادة تركيز المستخلص حيث ان اساس عملية التثبيط يعود الى ان جميع المركبات الفينوليه اظهرت قدرتها على تكوين اواصر هيدروجينيه مع الموقع الفعال للانزيم(Pereanez, *et al* ., 2011) لمستخلصات اوراق السدر وسعف النخيل كما اوضحت النتائج فروقات في تثبيط الفطر *A.niger* و –*Mucor sp* عند استخدام المستخلصات مقارنة بمعاملة السيطرة كان أفضلها باستخدام مستخلص السدر بتركيز 2000 مايكروغرام / مل في تثبيط الفطر *Mucor sp.* حيث بلغت اعلى نسبة تثبيط 31.70% كما بلغت اعلى نسبة تثبيط لفطر *A. niger* 16.31% عن استخدام مستخلص سعف النخيل بتركيز 2000 مايكروغرام / مل. ان قدرة المستخلصات النباتية على تثبيط نمو العديد من الاحياء المجهرية (فطريات، بكتريا، خمائر) تعزى لوجود العديد من االمركبات الفعالة منها المركبات متعددة الفينول (الفلافونيدات والكومارينات) وغيرها (Tepe وآخرون، 2005)، هناك العديد من البحوث التي اظهرت فاعلية هذه المواد لكبح نمو الاحياء المجهرية وبالذات تلك المسببة لتلف الأغذية (Ogbunugafor وآخرون، 2008)، كما بينت هذه الدراسات ان كثير من المواد الطبيعية مثل المستخلصات النباتية اختبرت للحد من نمو الاحياء المجهرية ومنها الفطريات (Devkatt وآخرون، 2005) لأنها مستساغة من الناس وخالية من الاثار الضارة للبيئة، علاوة على انخفاض تكلفتها والتي تكاد تكون معدومة مقارنة بالمواد الاصطناعية (Reena و Priyanka، 2014) جاءت هذه النتائج مقاربة لما قام به Sadiq واخرون (2013)، حيث اظهر مستخلص أوراق السدر فعاليه ثبيطيه ضد نوعين من الفطريات هي *A. niger* و *A. falvus* . كما قام Adamu وآخرون (2006) باستخدام مستخلص نبات السدر لتثبيط فطريات *Trychophyton rubrum* و *Trychophyton mentagraphytes* و *Microsporum canis* و *A. fumigatus* حيث بلغت نسبة التثبيط 60% مقارنة بمعاملة السيطرة.

جدول (1) الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي للمركبات الفينوليه لأوراق السدر وسعف النخيل ضد نمو الفطرين *Aspergillus niger* و *Mucor sp.* على اساس الوزن

الفطر	التركيز مايكروغرام/مل	النسبة المئوية للتثبيط %	
		السدر	السعف
Mucor sp.	500	27.98	26.30
	1000	28.44	28.33
	2000	31.70	30.68
Niger	500	12.00	10.34
	1000	14.01	13.32
	2000	18.30	16.31

الفعالية التثبيطية بدلالة الفعالية الانزيمية

قيست الفعالية الانزيمية بدلالة قياس الفعالية التثبيطية للمستخلصات بعد ترشيحها وتنقيتها من الفطرين *A. niger* و *Mucor sp.* او اي جزيئات صلبة اخرى باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer).

يوضح جدول (2) نتائج التأثير التثبيطي عند استعمال ثلاثة تراكيز 500، 1000 و 2000 مايكروغرام / مل من المستخلصات الكحوليه للمركبات الفينوليه لأوراق نبات السدر وسعف النخيل لنشاط انزيم α–amylase المفرز من الفطرين *A. niger* و *Mucor sp.* اذ لوحظ ان التأثير الثبيطي اعتمد على تركيز المستخلص ومصدر انزيم الاميليز، حيث سجل المستخلص الكحولي لأوراق السدر وسعف النخيل نسب تثبيط مختلفة وبواقع 30.74 و 28.12% على التوالي عند استخدامها بتركيز 2000 مايكروغرام / مل. كذلك يبين الجدول ازدياد نسب التثبيط بزيادة تركيز المستخلصات اذ بلغت 26.82، 28.20، و 30.74% عند تراكيز 500، 1000، 2000 مايكروغرام / مل بالنسبة لفطر *Mucor sp.* و 12.25، 14.08، 14.54% عند نفس التراكيز السابقة بالنسبة لفطر *A. niger*، حيث ان اساس عملية التثبيط يعود الى المركبات الفينولية والتي لها القدرة على تكوين اواصر هيدورجينية مع الموقع الفعال للأنزيم (Pereanez وآخرون، 2011).

تقاربت نتائج هذه الدراسة مع ماوجده Stoilova وآخرون (2017) عند دراستهم لفعالية التثبيط للمستخلص الكحولي والتي كانت 70% لنبات السدر عند تركيز 0.666 مغلم / مل اذ بلغت قوة التثبيط 39.10% على اساس الامتصاصية. ان تباين قيم الفعالية التثبيطية بين المستخلصات الكحولية وبين المستخلص الكحولي لنفس النبات، يعزى الى عدة عوامل منها نوع وطبيعة المذيب وتركيز وطبيعة المركبات الفينولية الموجودة في النبات (Buricova وآخرون، 2007 و Samidha وآخرون، 2014)، وذكر Lo Piparo وآخرون (2008) ان تثبيط فعالية الانزيم تعتمد على الاواصر الهيدروجينية بين مجاميع OH للفينولات المتعددة والجزء الحفزي في الموقع الفعال. كذلك يعزى التباين في نسب التثبيط الى اختلاف عدد ومواقع مجاميع الهيدروكسيل OH في المركبات الفينولية (Knjjiro وآخرون، 2006).

جدول (2) الفعالية التثبيطية للمستخلصات الفينولية لأوراق السدر وسعف النخيل لأنزيم α-amylase المفرز من قبل الفطرين *Aspergillus niger* و *Mucor sp.*

الاستنتاجات

سجل المستخلص الكحولي لاوراق نبات السدر

الفطر	التركيز مايكروغرام/مل	النسبة المئوية للتثبيط %	
		السدر	السعف
Mucor sp.	500	26.82	23.70
	1000	28.20	26.53
	2000	30.74	28.12
A. Niger	500	12.25	7.04
	1000	14.08	10.18
	2000	14.54	12.22

اعلى نسبة تثبيط لنمو الفطرين ***Aspergillus niger*** و ***Mucor sp.*** مقارنة باوراق السعف على اساس الوزن الجاف. كما جاءت النتيجة مماثلة في حالة استعمال طريقة قياس الفعالية الانزيمية.

References

Adamu, H.; M. Abayeh O. J. NNE; U. Ibok and E. K. Samuel. (2006) Antifungal Activity of Extracts of Some Cassia, Detarium and Ziziphus Species Against Dermatophytes. Natural Products Radiance. 5(5), 357 – 360.

Balouiri, M.; S. Moulay and K. I. Saad. (2016) Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 6, 71 – 79.

Bankole, S. A. (1997) Effect of Essential Oil From Two Nigerian Medicinal Plants (*Azadirachta indica* and *Morinda lucida*) on Growth and Aflatoxin B1 Production in Maize Grain by a Toxigenic A. Flavus. Lett. Appl. Microbiol. 24,190 – 192.

Buricova, L.; M. Andjelkovic; A. Cermakova; M. N. Lund; M. S. Hviid and L. H. Skibsted. (2007) The Combined Effect of Antioxidants and Modified Atmosphere Packaging on Protein and Lipid Oxidation in Beef Patties During Chill Storage Meat. Sci. 76(2),226 – 233.

Devkatte, A.; G. Zore, and S. Karuppayil. (2005) Potential of Plant Oils as Inhibitors of Candida Albicans Growth. Federation of European Microbiological Societies Yeast Research. 5, 867 – 873.

Faruque, S. M. (2012) Food Borne and Waterborne Bacterial Pathogens: Epidemiology, Evolution and Molecular Biology. Caister Academic Press. ISBN 978-1- 908230-06-5.

Gomathi, D.; K. Manokaran and U. Chandrasekar. (2012) In Vitro A-Glucosidase Inhibitory Effects of Ethanolic Extract of *Evolvulus alsinoides* (L). International Research Journal of Pharmacy. ISSN . 2230-8407.

Jyothi,K. S. N.; P. Hemalathr and S. Calla. (2011) Evaluation of Alpha Amylase Inhibitory Potentioal of Three Medicinally Important Traditional Wild Food Plant of India. International Journal of Green Pharmacy. 95 – 99.

Juckett, G.; G. Bardwell; B. McClane and S. Brown. (2008) The Microbiology of Salt Rising Bread. W. V. Med. J. 104: 26 – 27.

Kenjiro, T.; M. Yuji; T. Kouta and M. Tomoko. (2006) Inhibition of α-Glucosidase and α-Amylase by Flavonids. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 52,149 – 153.

Lo Piparo, E.; H. Scheib; N. Frei; G. Williamson and C. J. Chou. (2008) Flavonids for Controlling Search Digestion, Structural Requirement for Inhibiting Humall α-Amylase. J. of Medical Chemistry 5, 3555 – 3561.

Madigan, M. T.; J. M. Martinko Brock. (2006) Biology of Microorganisms. 11th ed. Pearson Education International, USA.

Martini, N. D.; D. R. P. Katerere and J. N. Eloff. (2004) Biological Activity of Five Antibacterial Flavonoids From *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). J. Ethnopharmacol. 93, 207 – 212.

Narasimha, G.; A. Sridevi; V. Buddolla; M. Subhosh and B. R. R. Chandra (2006) Nutrient Effects on Production of Cellulolytic Enzymes by *Aspergillus niger*. Afr. J. Biotechnol. 5(5),472 – 476

Ogbunugafor, H. A.; V. I. Okochi; J. Okpuzor and P. Emeka. (2008) Tolerance and Antiplasmodial Screening of Ritchea Longipedicellata in Plasmodium Berghei. Biokemistri. 20(1), 23 – 27.

Pereanez, J. A.; V. Nuez; A. C. Patin; M. Londono and J. G. Quintan. (2011) Inhibitory Effects of Plant Phenolic Compound on Enzymatic and Cytoxin Activities Induced by a Snake Venom Phospholipase Az Vitae, Revisit, DEla Faclted DE Quimica pharmaceutical. 18(3), 295 – 304.

Peter Z. and Lief BØgh-SØrensen (2003) Food and Preservation Techniques. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.

Reena M.; and Priyanka. (2014) Plant Extract as Natural Food Preservative Against Spoilage Fungi From Processed Food. Plant Pathology and Microbiology Laboratory. Department of Botany. Patna University. Patna-800005, India. Int. J. C. Microbiol, App. Sci. 3(8), 91 – 98.

Samidha, K.; K. Vrushali and P. Vijaya. (2014) Estimation of Phenolic Content, Flavonoid Content, Antioxidant and Alpha Amylase Inhibitory Activity of Marketed Polyherbal Formulation. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 4(9), 61 – 65.

Sadiq, I. S.; S. M. Dangoggo; L. G. Hassan and S. B. Manga. (2013) Bioactive Isolation and Antifungal Screening of Leaf and Bark of *Diosypyros mespiliformis* and *Ziziphus spina-christi*. J. of Tar. & Nat. Medicines. 2(2), 104 – 117.

Sinha, K. K. and D. Bhatnagar. (1998) Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. New York / Basel / Hong Kong: Marcel Dekker, Inc.

Stoilova, I.; D. Trifonova; A. Marchev; V. Stanchev; G. Angelova and A. Krastanov. (2017) Phytochemical Constituents and Vitro Anti – Diabetic Properties of *Ziziphus Jujuba* (Rhamnaceae) Fruits. Int. J. of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 9(2), 150 – 158.

Tepe, B.; D. Daferera; A. Sokmen; M. Sokmen and M. Polissiou. (2005) Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils and Various Extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). Food Chem. 90: 333 – 340.

Whitaker, J. R.; & Bernard, R. A.; (1972). Experiment for introduction to Enzymology. The Wiber Press Davis.