

استخلاص مثبط التربسين من بعض أفراد العائلة البقولية وتحديد الظروف المثلى لاستخلاص المثبط من بذور العدس *Lens culinaris*

خلود عبد الإله الخفاجي سحر غازي عمران عادل سعدي سلمان
ميعاد عدنان عبد الرزاق سلمان عبود حمود عبود حنون

الملخص

هدف البحث الحالي إلى التقييس الكمي لمثبطات التربسين (أموذجا لأحد أنواع مثبطات البروتيز) من المستخلصات المائية الباردة لبعض أنواع العائلة البقولية (العدس والماش والفاصولياء وفول الصويا والحمص واللوبياء الحمراء والبقلاء) وتحديد صفات المستخلص الأفضل في الإنتاج، اخذين في الاعتبار الرقم الهيدروجيني وتركيز المخاليل الدائرية ودرجة الحرارة المثلى ومدة الاستخلاص الأفضل. بينت النتائج المستحصلة تفوق مستخلص العدس يليه الحمص ثم الفاصوليا ثم اللوبياء الحمراء ثم فول الصويا في عدد وحدات مثبط التربسين قيد الدراسة. أوضحت نتائج تحديد أفضل محلول داريء لاستخلاص مثبط البروتيز من العدس أن استعمال محلول الفوسفات الداري ذي رقم الهيدروجين 6 وتركيز 150 ملي مولاري تفوق على التراكيز الأخرى في عدد وحدات مثبط أنزيم التربسين المستخلص. كما وجد تقارباً في عدد وحدات المثبط المستحصلة عند استخدام درجة حرارة 37م أو درجة حرارة 8م في الاستخلاص وتبين أن أفضل وقت استخلاص كان بنقع مطحون بذور العدس لمدة 18 ساعة.

المقدمة

تنتشر أنزيمات البروتيز ومثبطاتها المتخصصة بصورة واسعة في مملكة الحيوانات والنباتات والأحياء المجهرية وتؤدي كلاهما عملاً مهماً في تنظيم العديد من العمليات البيولوجية، كما تعمل المثبطات على تنظيم فعالية أنزيمات البروتيز في مسالكها الايضية (3، 13). تحوي النباتات بصورة عامة على العديد من مثبطات البروتيز السيرينية التي تحوي حامض السيرين الاميني في موقع فعالية الأنزيم وتصل إلى 12 عائلة (22)، وتحت إصابة النباتات بالمرضات والجروح وتعرضها إلى المواد الكيميائية على إنتاج كميات أكبر من مثبطات البروتيز مشيراً إلى أن لها عملاً أساسياً في دفاع النبات مانحة إياه مناعة واسعة ضد الإصابة بالحشرات والمرضات ومقاومة الظروف البيئية (13، 16، 21).

تشتهر أفراد عائلة البقوليات بمحتواها العالي من البروتينات وكلفتها القليلة إذ يعتمد جزءاً كبيراً من شعوب العالم على البقوليات في غذائهم رغم احتواء البقوليات على العديد من المواد المضادة للتغذية *antinutritional factor* التي من أهمها مثبطات أنزيمات التربسين والكيومتربسين (10، 22) وقد تم تشخيص مجموعتين من هذه المثبطات في نباتات العائلة البقولية أحدهما كبير الحجم ذي مجموعة فعالة واحدة تعمل على تثبيط أنزيم التربسين أو الكيموتربسين ومجموعة أخرى صغيرة الحجم تملك مجموعتين فعاليتين تعملان على تثبيط التربسين والكيومتربسين أو تعملان كلاهما على تثبيط التربسين (3) وتمكن Rao وجماعته (14) من تنقية ودراسة خواص مثبط التربسين من نبات *Vigna unguiculata* وشخص Caccialupi وجماعته (3) مجموعتين من أنواع المثبطات في العدس أحدهما ذي موقعين للفعالية تثبط تربسين/تربسين والأخر من مجموعة مثبطات التربسين/ كيموتربسين وله فعالية بايولوجية في تحوير فعالية HT29 cell خارج الخلية. لجأت العديد من الدراسات والبحوث إلى استغلال والاستفادة من مثبطات البروتيز في العديد من المجالات منها الاستعمال الطبي كمضادات للفيروسات والأورام واستخدامها في محاليل

استخلاص البروتين والأنزيمات من خلال أضافتها إلى محاليل الاستخلاص لتقليل تحطم البروتين والأنزيمات بواسطة الأنزيمات المحللة الخارجية والداخلية المنتجة من قبل الخلايا (7، 8، 18).

استخلصت مشطات البروتين من مختلف الخلايا باستعمال الاستخلاص المائي البارد إذ قام **Jayalakshmi** (5)، **Kapur** وجماعته (6) باستخدام بذور الحمص المطحونة والبقلاء *Vigna radiata* ومحلول الترس الداريء ذي الرقم الهيدروجيني 8 و8.5 لاستخلاص مشبط البروتين منهما بينما قام **Kim** وجماعته (8) باستخلاص مشبط الترسين- كيموتربسين من البطاطا باستخدام محلول الترس الداريء ذي الرقم الهيدروجيني 7.2.

وتختلف أفراد عائلة البقوليات في إنتاجها الكمي لمشبط البروتين. لذا هدفت الدراسة الحالية إلى التقييس الكمي لمشبط الترسين (أنموذجاً لمشطات البروتين) المستخلص مائياً من بعض أنواع العائلة البقولية *leguminaceae* المتوفرة محلياً وتحديد الظروف المثلى من حيث الرقم الهيدروجيني وتركيز المحلول الداريء ودرجة الحرارة والوقت اللازم للاستخلاص للحصول على الإنتاج الكمي الأعلى.

المواد وطرائق البحث

بذور البقوليات المستخدمة

استعملت بذور كل من العدس والبقلاء والفاصوليا والماش وفول الصويا واللوبياء الحمراء والحمص والمتوفرة في الأسواق المحلية.

تحضير محلول أنزيم الترسين

حضر أنزيم الترسين البقري (σ) بتركيز 5 ملغم/مل بواسطة محلول كلوريد الكالسيوم ذي التركيز 20 ملي مولاري.

تحضير الكازين

استعمل كازين الحليب النقي الخالي من الفيتامينات والدهون كمادة أساس لعمل أنزيم الترسين وحضر الكازين بإذابة غرام واحد منه في 100 مليلتر من محلول الفوسفات الداريء ذي الرقم الهيدروجيني 7.5 وتركيز 200 ملي مولاري.

قياس فعالية أنزيم الترسين وحساب عدد وحداته

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل **Hagihara** (4) إذ مزج 0.2 مليلتر من محلول أنزيم الترسين مع حجم مماثل من محلول الفوسفات الداريء ذي الرقم الهيدروجيني 7.5 وترك لمدة 10 دقائق بدرجة 25م ثم أضيف إليه 1.6مل من محلول الكازين وحضن بدرجة 37م لمدة 10دقائق. أوقف تفاعل الأنزيم بإضافة 3 مل من محلول 5% ثلاثي كلوريد حامض الخليك (TCA) وترك المزيج لمدة 10دقائق. نبذ مركزياً بسرعة 7000دورة/دقيقة وتمت قراءة الراشح عند الطول الموجي 275نانومتر بعد تصفير جهاز المطياف الضوئي (نوع Japan/Shimadzu) على أنموذج السيطرة الخاص بالأنزيم. وتعرف الوحدة الواحدة للأنزيم بأنها الزيادة الحاصلة في الامتصاصية وبمقدار 0.001 في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف القياس.

استخلاص مشبط الترسين

اعتمدت طريقة الاستخلاص الموصوفة من قبل الجميلي (1) مع بعض التحوير حيث وزن 250 غراماً من مسحوق كل من بذور العدس والماش والفاصولياء وفول الصويا والحمص واللوبياء الحمراء والبقلاء وأضيف إلى لتر من الماء المقطر ووضع في الحاضنة الهزازة وبدرجة 37 °م ولمدة 18 ساعة، نبذ مركزياً بسرعة 7000 دورة/ دقيقة ولمدة 10 دقائق واستعمل الراشح لقياس فعالية مشبط الترسين المستخلص والنسبة المئوية لتثبيط أنزيم الترسين.

قياس عدد وحدات مشبط الترسين

مزج 0.2 مليلتر من محلول أنزيم الترسين مع حجم مماثل من محلول المشبط المستخلص وترك لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 25 م ثم أضيف إليه 1.6 مل من محلول الكازين وحضن بدرجة 37 م لمدة 10 دقائق وأكملت الخطوات اللاحقة كما هو موجود في الفقرة السابقة لتقدير الفعالية. وتعرف وحدة المشبط الواحدة بأنها كمية المشبط التي تسبب انخفاضاً في قراءات فعالية أنزيم الترسين المقاسة وبمقدار 0.001 عند قياس امتصاصية الطيف الضوئي عند الطول الموجي 275 نانومتر في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف القياس (1، 25).

قيست النسبة المئوية لتثبيط أنزيم الترسين من خلال قياس الفعالية المتبقية لأنزيم الترسين وكما يأتي :

الفعالية المتبقية لأنزيم الترسين = فعالية الترسين - فعالية المشبط

النسبة المئوية للفعالية المتبقية للترسين = فعالية الترسين المتبقية × 100% ÷ فعالية الترسين

النسبة المئوية لتثبيط أنزيم الترسين = 100 - النسبة المئوية لفعالية أنزيم الترسين المتبقية

تحديد الظروف المثلى لاستخلاص مشبط الترسين

تحديد الرقم الهيدروجيني الأفضل للاستخلاص من بذور العدس

استعملت محاليل دائرة بتركيز 200 ملي مولاري للأرقام الهيدروجينية 5-8 وبواقع اختلاف رقم هيدروجيني بين رقم هيدروجيني وآخر لاستخلاص مشبط الترسين من بذور العدس وقورنت عدد وحدات المشبط والنسبة المئوية للتثبيط مع الاستخلاص بالماء المقطر.

تحديد تركيز داريء الاستخلاص

استعمل الرقم الهيدروجيني الأمثل للاستخلاص وبتراكيز مختلفة للداريء تراوحت بين 50-200 ملي مولاري وبواقع 50 ملي مولاري بين تركيز وآخر.

تحديد درجة حرارة الاستخلاص

تم استعمال درجتين مختلفتين للحرارة لاستخلاص مشبط الترسين من بذور العدس إذ نقع مسحوق العدس بدرجة 37 م ودرجة حرارة الثلاجة 8 م ولمدة 18 ساعة.

تحديد وقت الاستخلاص

تمت المفاضلة بين مدتين زمنيتين لاستخلاص مشبط الترسين إذ نقع مسحوق العدس بداريء الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 6 وتركيز 150 ملي مولاري ولمدة 18 ساعة و24 ساعة (1).

النتائج والمناقشة

تعتمد كمية مثبط التريسين المستخلص من مختلف أفراد العائلة البقولية على نوع النبات وظروف الاستخلاص وقد أوضح حساب عدد وحدات مثبط التريسين تباين عدد الوحدات المستخلصة بالماء البارد من مسحوق بذور كل من العدس والماش والفاصولياء وفول الصويا والحمص واللوبيا الحمراء وسجلت أعلى إنتاجية لبذور العدس إذ بلغت عدد وحدات المثبط 489 وحدة/مل ونسبة مئوية لتثبيط أنزيم التريسين بلغت 94% مقارنة مع مسحوق بذور فول الصويا الذي أعطى أقل إنتاجية بلغت 38 وحدة/مل ونسبة تثبيط بلغت 7.2% وقد كانت النسبة المئوية لتثبيط أنزيم التريسين متشابهة لكل من الفاصولياء واللوبياء الحمراء ومتقاربان مع الحمص ويوضح جدول (1) عدد وحدات مثبط التريسين والنسب المئوية للتثبيط من مستخلصات مائية باردة لبذور العدس والماش والفاصولياء وفول الصويا والحمص واللوبيا الحمراء.

جدول 1: فعالية مثبط التريسين والنسب المئوية لتثبيط أنزيم التريسين% بوجود المستخلصات المائية الباردة لبعض

أفراد العائلة البقولية

النبات	عدد وحدات مثبط التريسين (وحدة/مل)	النسبة المئوية لتثبيط أنزيم التريسين
العدس	489	94
الماش	79	15
الفاصولياء	230	44
فول الصويا	38	7.2
الحمص	270	51
اللوبياء الحمراء	225	43
الباقلاء	130	24.6

ظروف الاستخلاص المستخدمة: نقع مسحوق البقوليات في الماء المقطر مع الرج لمدة 18 ساعة وبدرجة حرارة 37 م.

يلاحظ من جدول (1) اختلاف عدد وحدات المثبط المستخلصة والنسب المئوية لتثبيط أنزيم التريسين المعامل بالمستخلصات المائية للبذور المختلفة، وقد يعزى سبب ذلك إلى العديد من العوامل منها اختلاف كميات وأنواع مثبطات البروتين في المستخلصات المائية الباردة لمساحيق البذور المختلفة المستعملة قيد الدراسة وهذا يتوافق مع ما أشار إليه Caccialupi وجماعته (3) إذ شخص نوعين مختلفين من المثبطات في العدس. وقد عزل Weder و Kahelyss (23) ثلاثة وعشرون متناظر لمثبطات البروتين من العدس سوري المنشأ ونقيت أربعة منها لتشابه المثبطات المعروفة في العدس وقد صنف Weder (22) المثبطات في البقوليات ووضعها في مجاميع وصلت إلى 12 مجموعة مثبط. وكذلك تؤثر طرائق الاستخلاص بصورة كبيرة في عدد وحدات مثبط التريسين المقاسة منها فاعلية طريقة الاستخلاص كما أشار إليه Sanz وجماعته (17). ووجد Pouvreau وجماعته (12) إن مثبط البروتين يمثل 20-50% من البروتينات الذاتية في الماء الموجودة في البطاطا ومنها استخلاص بعض العوامل الأخرى المرافقة لمثبط التريسين التي تؤثر في فعالية أنزيم التريسين منها الصابونيات والتانينات ومتعدد الفينولات وحامض الفاييت إذ يحصل نضوح هذه المركبات أثناء عمليات النقع والاستخلاص وهذا يتفق مع ما أشار إليه Abusin وجماعته (2)، Muzquiz وجماعته (10)، Ruiz وجماعته (15)، Urbano وجماعته (19) إلى إن هذه المواد تعمل معقدات مع البروتينات وأنزيمات البروتين والاميليز مانعة عملها. وأكد Validar وجماعته (20) إلى علاقة مركبات التانين المستخلصة من بذور العدس في التأثير على قابلية أنزيم التريسين في هضم الألبومين. كما قد تؤثر الظروف الخارجية التي يتعرض لها النبات قبل حصاده وإلى طرائق الحصاد المتبعة في إنتاج النبات لمثبط التريسين حيث بين Pisulewska و Pisulewski (11) إن

عمليات الحصاد لها تأثير في النسب المئوية لنتاج مثبت الترسين في بذور العدس و **chikling vetch** و **pea** وفول الصويا. ووجد **Weder (22)** إن حقن بعض المواد الكيميائية في النبات وتحت ظروف ضوئية له تأثير إيجابي أو سلبي في ناتج مثبت البروتين المستخلص. تختلف الدراسة الحالية مع ما أشار إليه العديد من احتواء فول الصويا على نسبة عالية من مثبت الترسين إذ يحضر منه مركز المثبط وقد يعود سبب ذلك إلى اعتماد الاستخلاص الكحولي والترسيب بالأسيتون من قبل **David و Wu (24)** بعد إزالة الجزء الدهني منه بواسطة الهكسان.

اعتمدت طريقة الاستخلاص قيد الدراسة مبدئياً على نقع مسحوق كل من العدس والماش والفاصولياء وفول الصويا والحمص واللوبياء الحمراء والبقلاء في الماء المقطر ولمدة 18 ساعة وبدرجة 37 م مع الرج وذلك لملائمة الطحن الأنواع البقولية المستعملة جميعها في الدراسة ومساهمة الرج في مجانسة المسحوق مع الماء المقطر أو محلول الاستخلاص وتلك الطريقة تختلف عن العديد من الباحثين في اعتمادهم عملية النقع ثم المجانسة من خلال استعمال المجانس أو الخلاط التي قد تكون ملائمة للأجزاء النباتية الرخوة أو غير الصلبة كما أشار إليه كل من الجميلي (1)، **Jayalakshmi** وجماعته (5)، **Kapur** وجماعته (6)، **Kim** وجماعته (8).

اتجهت الدراسة الحالية نحو تحديد ظروف الاستخلاص الأمثل لمثبط الترسين من بذور العدس وذلك لأنه أعطى أعلى نسبة مئوية لتثبيت إنزيم الترسين. إذ تشير النتائج إلى اختلاف وحدات مثبت الترسين المستخلصة باختلاف الأرقام الهيدروجينية ومقارنة مع استعمال الماء المقطر في الاستخلاص. وجد عند قياس الرقم الهيدروجيني لمستخلص العدس بالماء المقطر لوحده إن رقمه الهيدروجيني قد انخفض من 7.6 ليصل إلى 5.4 ويلاحظ إن نسبته المئوية للتثبيت متقاربة مع استعمال داريء الخلات ذي الرقم الهيدروجيني 5 بينما أعطى استعمال محلول داريء ذي رقم هيدروجيني 6 افضل النتائج إذ وصلت النسبة المئوية لتثبيت إنزيم الترسين إلى 89.2 يتبعه الرقم الهيدروجيني 8 مقارنة مع الرقم الهيدروجيني 7 الذي أعطى اقل نسبة مئوية للتثبيت وصلت إلى 23.4 وبين جدول (2) عدد وحدات المثبط المستخلصة عند الأرقام الهيدروجينية المختلفة وكذلك النسب المئوية للتثبيت.

جدول 2: فعالية مثبت إنزيم الترسين والنسب المئوية للتثبيت عند الاستخلاص بأرقام هيدروجينية مختلفة

رقم الهيدروجين ونوع وسط الاستخلاص	فعالية مثبت الترسين (وحدة/مل)	النسبة المئوية للتثبيت
ماء مقطر (7.8)	87	60.7
محلول الخلات الداريء (5)	91	63.5
محلول الفوسفات الداريء (6)	128	89.2
محلول الفوسفات الداريء (7)	33.5	23.4
محلول الترس الداريء (8)	117.5	81.9

(ظروف الاستخلاص المستخدمة: نقع مسحوق العدس مع الرج لمدة 18 ساعة وبدرجة حرارة 37م في محاليل الاستخلاص)

قد يعزى اختلاف عدد وحدات المثبط المستخلصة والنسب المئوية للاستخلاص إلى تأثير بعض الأرقام الهيدروجينية في التركيب الجزيئي لبروتين المثبط الحاوي على الجسور ثنائية الكبريت إذ أشار **Laskowski** و **Kato (9)**، **Qi** وجماعته (13) إلى التركيب البروتيني لمثبطات البروتين وحتوائها على عدد من الجسور ثنائية الكبريت يختلف عددها باختلاف المثبطات وتعمل على المحافظة على التركيب ثلاثي الأبعاد لبروتين المثبط وتقيه من العوامل الخارجية المحللة. كما قد تعمل الأرقام الهيدروجينية المختلفة على التأثير في المواقع الفعالة لبروتين المثبط من حيث تغيير حالتها الأيونية أو شكلها مما يؤثر في ارتباطها وتثبيتها للإنزيم الذي تعمل عليه، إذ أشار **Caccialupi** وجماعته (3) إلى احتواء مثبت بروتين مستخلص من بذور العدس على موقعين للفعالية احدهما يتفاعل و يثبط الترسين والآخر يعمل على تثبيت الكيموترسين. بالإضافة لما تقدم قد تعمل الأرقام الهيدروجينية المختلفة على المساهمة في

استخلاص وفعالية بعض المواد الإضافية الأخرى مثل متعدد الفينول والثانين وحمض الفاييت التي تؤثر في عمل إنزيم الترسين جنباً إلى جنب مع مثبط البروتين و ذلك يتوافق مع ما جاء به **Validar** وجماعته (20).

استعملت تراكيز متدرجة 50-200 ملي مولاري من داريء الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 6 لتحديد التركيز الأمثل من داريء الاستخلاص وبينت نتائج النسب المثوية للتثبيط انعدام عدد وحدات المثبط عند الاستخلاص بتركيز محلول داريء 50 ملي مولاري، وقد يعزى ذلك إلى انخفاض قابلية ذلك التركيز إلى استخلاص المثبط من خلاياه وانخفاض عدد وحدات المثبط المستخلصة وبتأثيرها بمواد أخرى مثل الصابونين والثانين الناضحة إلى محلول الاستخلاص أدى إلى انعدام فعاليتها كما وجد أن التركيز 150ملي مولاري هو الأفضل في الاستخلاص مقارنة مع التراكيز الأخرى (جدول3).

جدول 3: فعالية مثبط الترسين والنسب المثوية للتثبيط عند الاستخلاص بتراكيز مختلفة من داريء الفوسفات ذي

الرقم الهيدروجيني 6

لون المستخلص	النسبة المثوية للتثبيط	فعالية المثبط (وحدة/مل)	تركيز الداريء ملي مولار (داريء فوسفات pH6)
اصفر مع راسب	0	0	50
اصفر مع راسب	82.2	76.5	100
برتقالي فاتح بدون راسب	97.8	91	150
برتقالي غامق بدون راسب	86.5	80.5	200

(ظروف الاستخلاص: نقع مسحوق العدس مع الرج بواسطة داريء الفوسفات ذي رقم الهيدروجين 6 لمدة 18 ساعة وبدرجة 37م)

ولوحظ كذلك تدرج في لون المستخلص تراوحت بين الأصفر الحاوي على بعض الرواسب إلى البرتقالي الغامق، وقد يعود ذلك إلى استخلاص مواد ملونة من الخلايا إذ اشتهر العدس باحتوائه على ألوان احدها اللون البرتقالي العائد لصبغة الكاروتين.

استخدمت درجتان حراريتان للاستخلاص لتوفر أجهزتها في معظم المختبرات، ووجد إن استخدام درجة حرارة 37م لاستخلاص مثبط الترسين من مسحوق العدس المنقوع لمدة 18 ساعة بمحلول داريء ذي رقم هيدروجيني 6 وتركيز 150 ملي مولاري ذات كفاءة مقارنة لحضن المسحوق بدرجة 8م وباستخدام الظروف ذاتها في الاستخلاص جدول (4). وبين القياس الكمي لعدد وحدات المثبط استخلاص 93وحدة مثبط ترسين عند استعمال 37م مقارنة مع 90 وحدة مثبط عند استعمال درجة 8م وقد يعزى سبب ذلك إلى أن كلا الدرجتين مناسبة وكافية للاستخلاص مع الحفاظ على التركيب الثلاثي لبروتين المثبط. كما أوضحت النتائج كفاءة استخلاص مثبط الترسين باستخدام درجة 37م أو درجة 8م باستعمال أجهزة الحضن والثلاجات المتوفرة في معظم المختبرات دون الحاجة إلى أجهزة تبريد.

جدول 4: فعالية مثبط الترسين والنسب المثوية للتثبيط عند الاستخلاص بدرجتين مختلفتين للحرارة

النسبة المثوية للتثبيط	فعالية المثبط (وحدة/مل)	درجة الحرارة (متوي)
90	90	درجة الحرارة 8 م
93	93	درجة الحرارة 37 م

(ظروف الاستخلاص: نقع مسحوق العدس مع الرج بواسطة داريء الفوسفات ذي الرقم الهيدروجين 6 لمدة 18 ساعة)

وبينت نتائج استخلاص مثبط الترسين انخفاض عدد وحدات مثبط الترسين والنسبة المثوية للتثبيط عند نقع مسحوق العدس لمدة 24 ساعة مقارنة مع نقه لمدة 18ساعة إذ كان عدد وحدات المثبط 100وحدة/مل ونسبة تثبيط

وصلت إلى 100% عند الحضان لمدة 18 ساعة لتتخفف وتصل إلى 35 وحدة مثبت وبنسبة تثبيط مئوية 34% فقط بعد 24 ساعة كما هو مدرج في جدول (5) وهذا يختلف مع الجميلي (1) الذي نفع بذور الهراطمان لمدة 24 ساعة عند استخلاصه لمثبط التربسين منها. وقد يعزى سبب ذلك إلى تأثير مواد الصابونيات والثانينات وحامض الفاييت الناضجة في محلول المستخلص وتأثيرها السلبي في التركيب الثلاثي لبروتين المثبط إذ قد تعمل مثل هذه المواد على الارتباط وتغيير شكل المثبط أو ترسيبه مانعة عمله.

جدول 5: فعالية مثبط التربسين والنسب المئوية للتثبيط باختلاف مدد الاستخلاص

النسبة المئوية للتثبيط	فعالية المثبط (وحدة/مل)	وقت الاستخلاص (ساعة)
100	100	الاستخلاص لمدة 18 ساعة
34	35	الاستخلاص لمدة 24 ساعة

(ظروف الاستخلاص: نفع مسحوق العدس مع الرج بواسطة داريء الفوسفات ذي رقم الهيدروجين 6 ولمدة وبدرجة 37م)

المصادر

- 1- الجميلي، عصام فاضل. تنقية بعض البروتينات الفعالة الحيوية في بذور الهراطمان (*Lathyrus sativus*). (1999). مجلة أبحاث التقانات الحيوية، 1 (1): 371-382.
- 2- Abusin, S. A. E.; B. H. Amro and E. B. Elfadil (2009). Nutritional evaluation of cooked faba bean (*Vicia faba* L.) and white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. Australian J. of Basic and Applied Sciences, 3(3): 2484-2490.
- 3- Caccialupi, P.; R. Cecil.; R.A., Siciliano; A. Clemente; D. Pignone. and G. Sonnante (2008). Characterization of a Bowman- Birk inhibitor from lentil: expression and antitumeral properties. Proceedings of the 52nd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, Padova, Italy, 14-17.
- 4- Hagihara, B. (1960). "Kosoken-Kyuhō". Vol. 2, ed by S. Asakura. Syoten, Tokyo, p. 237.
- 5- Jayalakshmi, S.K.; S. Raju; S. Usha Rani; V.I. Benagi and K. Sreeramulu. (2009). *Trichoderma harzianum* L1 as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceri. Australian J. of Crop Science, 3(1): 44- 52.
- 6- Kapur, R.; L.T.W. Anna and A.W. Karl (1989). Isolation and partial characterization of a subtilisin inhibitor from the mung bean (*Vigna radiata*). Plant Physiol., 91:106-112.
- 7- Kennedy, A. R. (1998). The bowman- birk inhibitor from soybeans as anticarcinogenic agent. American J. Clin. Nutr., 68(suppl):1406S- 1412S.
- 8- Kim, J.Y.; P. Seong- Cheol; K. Mi-Hyun; L. Hak-Tai; P. Yoonkyung and H. Kyung-Soo (2005). Antimicrobial activity studies on a trypsin-chemotrypsin protease inhibitor obtained from potato. Biochemical and Biophysical Research Communication, 330: 921- 927.
- 9- Laskowski, M. Jr. and I. Kato (1980). Protein inhibitors of proteinases. Ann. Rev. Bioch., 49: 593-626.

- 10- Muzquiz, M.; B. Carmen; A. Gemma; M. P. Mercedes and C. Carmen (1999). The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus vulgaris*. Environmental and varietal differences. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 3(4): 210-216.
- 11- Pisulewska, E. and P. M. Pisulewski (2000). Trypsin inhibitor activity of legume seeds (peas, chickling vetch, lentil and soya beans) as effected by the technique of harvest. *Animal Feed Science Technology*, 86(3):261-265.
- 12- Pouvreau, L.; H. Gruppen; S.R. Piersma; L. A. M. Van den Brock; G.M. van Koningsveld and A.G.J. Voragen (2001). Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2864-2874.
- 13- Qi, R. F.; S. Zhan-Wu and H. Cheng-Wu (2005). Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Act., Biochemica et Biophysica Sinica*, 37(5):283-292.
- 14- Rao, K. N.; S.S. Hegde; R. J. Lewis and C.G. Suresh (1999). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a Bowman-birk inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Acta Crystallographica Section D*, 55(11): 1920- 1922.
- 15- Ruiz, R. G.; R. P. Keith; A. Eddie Arthur; E.R. Malcolm; J.C.R. Michael and G.F. Roger (1996). Effect of Soaking and Cooking on the Saponin Content and Composition of Chickpeas (*Cicer arietinum*) and Lentils (*Lens culinaris*). *J. Agric. Food Chem.*, 44 (6): 1526–1530.
- 16- Ryan, C.A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defences against insects and pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol*, 28: 425-449.
- 17- Sanz, M. A.; B. Inmaculada; S. Isabel; M. Angeles; F. Juana; V.V. Concepcion and H. Amelia (2001). Nutritional evaluation of ethanol - extracted lentil floor. *Agricultural and Food Chemistry*, 49(4):1854-1860.
- 18- Shaoyun, W.; J. Lin; M. Ye; T. B. Ng; P. Rao; X. Ye (2006). Isolation and characterisation of a novelmung bean protease inhibitor antipathogenic and anti- proleferative activities. *Peptides*, 27(12): 3129-3136.
- 19- Urbano, G.; A. Pilar; G.V. Elena; F. Slawomir; M. P. Jesus; F. Juana; V. V. Concepcion and L-J. Maria (2003). Nutritional evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) protein diets after mild hydrothermal treatment and with and without added phytase. *J. Agric. Food Chem.*, 51:2415-2420.
- 20- Validar, A. N.; E. J. Lourenco and M. A. Silva (1997).Effect of lentil tannins on albumine hydrolysis by trypsin. *Cienciae Tecnologia de Alimentos*, 7(3).
- 21- Watanabe, T. and K. Noriaki (1983). The change in leaf protease and protease inhibitor activities after supplying various chemicals. *Biologia Plantarum*, 25(2):100- 109.
- 22- Weder, J. K. P. (1985). Chemistry of legume protease inhibitors and their use in taxonomy. *Plant Foods for Human Nutrition*, 35:183- 194.
- 23- Weder, J. K. P. and R. Kahelyss (1998). Isolation and characterisation of four trypsin-chymotrypsin inhibitors from lentil. *J. Sci. Food. Agric.*, 78(3): 429- 434.

- 24- Wu, Y.V. and J. S. David (1994). Conformation of Bowman-Birk inhibitor. *Agric. Food Chem.*, 42(10): 2136-2138.
- 25- Ye, X.Y.; T. B. Ng and P.F. Rao (2001). A Bowman-birk type trypsin-chemotrypsin inhibitor from broad beans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(1): 91-96.

THE EXTRACTIN OF TRYPSIN INHIBITOR FROM SOME MEMBERS OF *leguminaceae* FAMILY AND DETERMINATION OF OPTIMUM EXTRACTION CONDITIONS FOR LENTIL SEED *Lens culinaris*

**K. A. A. Al- Khafaji S. G. Omran A. S. Salman
M. A. Adulrazak S. A. Hmoud A. Hayoon**

ABSTRACT

Resent research aimed to quantitative determination of trypsin inhibitors (as a sample of protease inhibitor) in a cold aqueous extract of some of legumenaceae family members being (lentil, mung bean, chickea bean, jack bean, soy bean, red bean and faba bean) and to identify the best extract regarding the kind of legume, extraction period, temperature, pH and ionic strength of extraction solution. The obtained results showed that the lentil extract gave the highest units of trypsin inhibitor followed by chickea pean, jack bean, red bean and finally soya bean. It has been noticed that the phosphate buffer (pH 6,150mMione)was the best extraction solution as compared to the other solutions. Moreover, extraction at 37°C and 8°C resulted in comparable units of try sin inhibitor. On the respect to extraction period, the trypsin inhibitor unit, after 18 hour was higher than 24 hr.