ISSN: 1991-8941

إنتاج أنزيم البروتيز من عزلات بكتيريا الزوائف الزنجارية وتنقيتة ودراسة بعض خصائصة

ظافر فخري عبدالقادر فراس جمال ابراهيم
جامعة الانبار – كلية التربية للعلوم الصرفة

الخلاصة

نفذت هذه الدراسة لغرض عزل وتشخيص البكتريا المحللة للبروتين والمنتجة لانزيم البروتيز وتشخيصها من بعض العينات السريرية للمرضى المراجعين لمستشفيات مدينة الرمادي ، وتحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز وتنقيته ودراسة خصائص الإنزيم والظروف المثلى لعمله. واستعمل للعزل اوساط زرعية مثل وسط اكار الماكونكي ووسط الجكليت اكار واكار الدم ووسط الجيلاتين الصلب فضلا عن الفحوصات المورفولوجية والكيموحيوية ، واختبرت قابلية العزلات على انتاج انزيم البروتيز باستعمال وسط الجيلاتين الصلب ووسط مسحوق قرون الاغنام ووسط مسحوق كوالح الذرة وتميزت العزلات بقدرتها على انتاج انزيم البروتيز مع وجود اختلاف في كفاءة هذه العزلات ، انتخبت العزلة المحلية *p. aeruginosa* المعزولة من الحروق لأنها الاكفأ في انتاج الانزيم. واختبرت كفأتها في مقاومة المضادات الحيوية ، واظهرت العزلة مقاومة لأغلب المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة ، ولاسيما مضادات البيتا لاكتام والتتراسايكلينات ومجموعة الامينوكلايكوسيد ، الا انها كانت حساسة لمضاد الببراسلين . وحددت الظروف المثلى لإنتاج انزيم البروتيز ، اذ كان الوسط الزرعي مسحوق قرون الاغنام ، ذو الاس الهيدروجيني (7) ، والملقح بـ (1×10^6) خلية / مللتر مع الحضن لمدة (24) ساعة في (32) مْ هي افضل الظروف لإنتاج الانزيم . وأظهرت الخطوات المتسلسلة تنقية إنزيم البروتيز المنتج من العزلة المحلية *P. aeruginosa* بالترسيب بملح كبريتات الامونيوم بنسبة إشباع تراوحت بين(80- 20%) وان النسبة 60% هي الأفضل في الترسيب إذ أعطت فعالية نوعية قدرها 32.03 وحدة/ملغم بعدد مرات تنقية 1.60 مرة وحصيلة إنزيمية33.69%، وأدى إمرار المحلول الإنزيمي على عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose إلى زيادة نقاوة الإنزيم إذ ارتفعت الفعالية النوعية إلى 57.68 وحدة/ملغم وعدد مرات تنقية إلى 2.89مرة وبحصيلة إنزيمية 35%. جمعت الأجزاء التي أظهرت فعالية إنزيمية عالية وأخضعت لعملية الفصل بطريقة الترشيح الهلامي بعمود هلام Sephadex-G200أعطت هذه الخطوة فعالية نوعية 34.87وحدة/ملغم وعدد مرات تنقية 1.74 مرة وحصيلة إنزيمية مقدارها 32.16%.وبينت نتائج توصيف الإنزيم ان الرقم الهيدروجيني الأمثل ودرجة الحرارة المثلى لفعاليته بلغت 6.5 و 45 م على التوالي، وأعطى الإنزيم أعلى فعالية إنزيمية عند حضنه عند الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة أعلاه.

كلمات مفتاحية : انزيم البروتيز_ بكتريا الزائفة الزنجارية _ انتاج وتنقية الانزيم

المقدمة

تحتل صناعة الإنزيمات الميكروبية مكاناً بارزاً في عالم الأحياء المجهرية الصناعية وقد وصلت هذه الصناعة إلى مستوى رفيع في كثير من بلدان العالم المتقدمة. وهنالك عدة اعتبارات يجب مراعاتها لضمان نجاح إنتاج الإنزيمات بوساطة الأحياء المجهرية فمثلا يجب توافر بيئة غذائية مناسبة لنمو الكائن المجهري لإفراز الإنزيم والوصول بهِ إلى أفضل الظروف وان يتوافر كائن مجهري لهُ قدرة عالية على انتاج الإنزيم، ومن المفضل ان يحتوي المستحضر الإنزيمي ذو الأصل الميكروبي على الإنزيم المعني منفرداً أو مع وجود كمية قليلة جدا من الإنزيمات الأخرى المصاحبة له لان وجودها ربما يسبب بعض المتاعب عند استعمال الإنزيم في المجال التطبيقي (1).

يعد إنزيم البروتيز من الإنزيمات ذات الانتشار الواسع في الطبيعة والذي يحفز تفاعلات التحلل المائي التي تحطم جزيئات البروتين الى ببتيدات وأحماض أمينية إذ يحفز تحليل الأصرة الببتيدية للبروتينات في مواقع مختلفة وتحت ظروف مختلفة (2). وتوجد إنزيمات البروتييز بكثرة في الطبيعة وفي مصادر مختلفة، وتعد الأحياء المجهرية المتمثلة بالبكتريا والفطريات والخمائر من أهم المصادر المنتجة للإنزيمات المحللة للبروتينات وذلك لإمكانية السيطرة على إنتاجها من خلال سهولة السيطرة على البيئة التي تنمو فيها وسهولة تطوير إنتاجها بوساطة تقنيات الهندسة الوراثية فضلاً عن مقدرتها على النمو السريع في الأوساط الغذائية الرخيصة(2) ،كذلك كما وتعد بعض الإنزيمات الميكروبية أكثر استقراراً من مثيلتها الإنزيمات المستخلصة من النباتات والحيوانات، كذلك فان إنتاجها يكون أكثر سهولةً وأكثر أماناً (3).

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت خلال الدراسة (70) عينة سريرية من مختبرات مستشفى الرمادي التعليمي العام ومستشفى الرمادي التعليمي للنسائية والاطفال وكانت هذه العزلات من عدة حالات (جروح ،حروق ،ادرار

،خروج) وبعد عملية الجمع نميت هذه العينات على بعض الاوساط الزرعية مثل وسط الماكونكي اكار والجكليت اكار واكار الدم ويتم حضنها لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ ولوحظ بعدها حالات النمو ومن ثم اخذت هذه العزلات وحفظت في انابيب حاوية على وسط المرق المغذي مضاف اليه الكليسرين ووضعت في الثلاجة لحين الاستخدام .

عزل البكتيريا المحللة للبروتين

لغرض عزل البكتريا المحللة للبروتين والمنتجة لأنزيم البروتيز زرعت ونميت جميع العزلات التي حصلنا عليها في مراحل العزل الاولية على وسط الجيلاتين الصلب وبطريقة التخطيط على الوسط الزرعي الصلب وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24ساعة بعدها لوحظ النمو على الاطباق اذ نمت الغالبية العظمى من العزلات على هذا الوسط . أعيدت تنقية العزلات – Sub Culturing للتأكد من أنها محللة للبروتين بزراعتها على الوسط نفسه اعلاه داخل دائرة قطرها 1 سم في المركز(وسط الطبق) وحضنت بدرجة حرارة (37) مْ ولمدة 24 ساعة .وكشف بعدها عن صفة تحلل البروتين بقياس قطر نمو المستعمرات وباستعمال كاشف فريزر، ان تكون هالة شفافة حول المستعمرة بعد اضافة الكاشف وتركه بضعة دقائق ثم سكبه ، يدل على مقدرة البكتريا المدروسة على تحلل البروتين وانتاج انزيم البروتيز ، وقطر الهالة يعبر عن مدى فعالية البكتريا على انتاج هذا الانزيم . ثم انتخبت العزلة البكتيرية الاكفأ في تحلل البروتين لاستخدامها في التجارب اللاحقة.

انتخاب أكفأ عزلة بكتيريا منتجة لإنزيم البروتيز على الأوساط المحلية الصلبة وأفضل مصدر نتروجيني محلي .

لتحديد أكفأ عزلة بكتيريا منتجة لإنزيم البروتيز وأفضل مصدر نتروجيني محلي للبكتيريا المنتجة للإنزيم، فقد استعمل مصدران بروتينيان محليان هما مسحوق قرون الاغنام ومسحوق كوالح الذرة ، إذ حضرت من خلال تجفيف كل منها عند درجة حرارة 70 مْ لمدة 48 ساعة في الفرن الكهربائي ثم طحنت ونخلت بمنخل سعة ثقوبه 40 مايكرون. مزج كل من هذين المصدرين المحليين مع مكونات الوسط وعقمت ومن ثم صب الوسط في اطباق وبواقع ثلاثة مكررات لكل مصدر . زرعت العزلة تحت الدراسة على هذه الاوساط بطريقة زراعة دائرة قطرها 1 سم في مركز الطبق وحضنت بدرجة حرارة (37)مْ ولمدة 48 ساعة .

تشخيص العزلة المنتخبة

أجريت تشخيص العزلة التي اختيرت كأفضل عزلة بكتيرية محللة للبروتين اعتمادا على عدد من المراجع العلمية (4) ; (9) وقد اشتملت فحوصات التشخيص على ملاحظة المواصفات الزرعية والمجهرية ونتائج الاختبارات الكيموحيوية والتي بينت ان هذه العزلة تحمل صفات بكتريا *P. aeruginosa*

فحص الحساسية للمضادات الحيوية .

استعملت طريقة الاقراص الورقية وكما وردت في (5). وكالاتي :-

- نقلت عدد من المستعمرات البكتيرية النقية المنماة على وسط الاكار المغذي والمحضونة بـ (37) درجة مئوية لمدة ساعة الى (5) مل من محلول الملح الفسلجي لتهيئة عالق بكتيري ذي عكوره مساوية تقريبا لعكورة محلول ثابت العكرة القياسي .
- نشرت خلايا العالق البكتيري على وسط اكار مولر – هنتون باستعمال مسحة قطنية معقمة ، غمرت بالعالق البكتيري ثم ضغطت على جوانب الانبوبة للتخلص من المحلول الفائض ونشرت بعدها المسحة بعدة اتجاهات وبشكل متجانس .
- تركت الاطباق لمدة (30) دقيقة بدرجة حرارة الغرفة بعدها وزعت اقراص المضادات الحيوية على سطح الاطباق وتركت مسافة (22) ملم بين قرص واخر و(24) ملم عن حافة الطبق .
- حضنت الاطباق في (37) م لمدة (24) ساعة ، وسجلت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط بالملم حول كل قرص ثم قورنت بالجداول العالمية للمعدلات القياسية لاقطار مناطق التثبيط للمضادات الحيوية (6) .

تحديد الظروف المثلى لإنتاج الانزيم .

تحديد الوسط الزرعي الامثل لانتاج انزيم البروتيز .

استعمل الوسط الحاوي على مسحوق قرون الاغنام والذي تبين أنه أفضل مصدر نتروجيني محلي لإنتاج إنزيم البروتيز في الوسط الصلب لتحديد العوامل المؤثرة في إنتاج الإنزيم في الوسط السائل، باستعمال دوارق مخروطية سعة 250 مللتر وضع في كل منها 100 مللتر من الوسط وعقمت في المؤصدة . لقحت الاوساط في الدوارق بعد تبريدها بالعزلة *P. aeruginosa* والتي انتخبت كأكفأ عزلة منتجة للإنزيم وحضنت في الحاضنة الهزازة بسرعة 150دورة /دقيقة باستعمال معايير مختلفة شملت درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والمصادر النيتروجينية وتركيزها وظروف التهوية ومدد الحضن .

تحديد تركيز اللقاح الامثل لانتاج انزيم البروتيز

اتبعت الخطوات الاتية لتحديد تركيز اللقاح الامثل وهي :

- لقح وسط المرق المغذي بالعزلة *P. aeruginosa* ، وحضن في (37) مْ لمدة (18) ساعة .
- قيست الامتصاصية للمزروع البكتيري على طول موجي (600) نانوميتر .
- حضرت سلسلة تخافيف عشرية للمزروع ، ونشر (0.1) مل من كل تخفيف على سطح وسط الاكار المغذي وحضن عند (37) مْ لمدة (24) ساعة وحسبت عدد الخلايا في المليلتر الواحد ، ثم حضر لقاح منه بتركيز (10^{3}–10^{8}) خلية /مل .

- لقح (50) مل من وسط الانتاج الامثل بإضافة (0.5) مل من كل تركيز وحضنت في (37) مْ في حاضنة هزازة ولمدة (24) ساعة وبسرعة (150) هزة / دقيقة .
- نبذ المزروع البكتيري ، وقدرت فعالية الانزيم وتركيز البروتين في راشح المزرعة .

تأثير الرقم الهيدروجيني :

عدل الرقم الهيدروجيني لوسط النمو باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 1 مولاري ومحلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 1 مولاري للحصول على كل من الارقام الهيدروجينية الآتية (5.0 و5.5 و6.0 و 6.5 و 7.0 و 7.5 و 8.0) لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج الإنزيم في الوسط السائل للعزلة المراد دراستها ، ثم قدرت الفعالية الإنزيمية وثبت الرقم الهيدروجيني الأمثل للمراحل اللاحقة.

استخلاص الانزيم .

استخلص انزيم البروتيز المنتج بواسطة العزلة المنتخبة وباتباع الظروف المثلى للإنتاج كما يأتي :

- لقح وسط الانتاج باضافة (1%) من التركيز الامثل للعزلة الكفوءة ،وحضن في (37) مْ في الحاضنة الهزازة (150 دورة / دقيقة) لمدة (24) ساعة .
- نبذ المزروع البكتيري بمنبذة مبردة بسرعة (8000 دورة/ دقيقة) لمدة (20) دقيقة .
- جمع الراشح في قناني معقمة وقدرت له الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين

تنقية الانزيم .

تمت تنقية الانزيم بطريقة تضمنت الترسيب بكبريتات الامونيوم ثم استخدم المبادل الايوني السالب DEAE– Cellulose تلى ذلك الترشيح بهلام Sephadex G– 200

توصيف إنزيم البروتيز المنقى جزئياً .

درست بعض صفات انزيم البروتيز المنقى جزئيا وهي :

تعيين تأثير الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم .

حضرت مادة التفاعل في محاليل دارئة مختلفة الرقم الهيدروجيني وباستعمال المحلول المنظم Tris–HCl بتركيز 0.2 مولاري ، حضرت محاليل بأرقام هيدروجينية 6.0 و6.5 و7.0 و7.5 و8.0 و8.5 و9.0 بعدها قدرت فعالية الإنزيم لكل رقم هيدروجيني ثم ثبت الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية.

تعيين تأثير درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم .

قدرت فعالية الإنزيم المنقى جزئياً عند درجات حرارة مختلفة تراوحت بين (28–44) مْ ولمدة حضن (60) دقيقة وعند الرقم الهيدروجيني الأمثل ثم ثبتت درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم.

النتائج والمناقشة

عزل البكتيريا المحللة للبروتين

زرعت العينات على اوساط زرعية مختلفة منها وسط الاكار المغذي ووسط اكار الماكونكي ووسط اكار الدم ووسط الجوكليت اكار ووسط الجيلاتين الصلب كمرحلة اولية في التشخيص اذ من مجموع (70) عينة سريرية نمت (19) عزلة تفاوتت من حيث قابلية النمو وقطر التحلل للوسط الذي نمت عليه

كفاءة العزلات البكتيرية المنتخبة في إنتاج إنزيم البروتيز .

أظهر النتائج ان العزلتين ذات الرمز المحلي S2 و B1 افضل العزلات المحللة للبروتين والمنتجة لإنزيم البروتيز إذ تراوح قطر المنطقة الشفافة لهذه العزلات البكتيرية على التوالي (3 , 3.5) سم صورة (1 و2) ، وحصل على 17 عزلة بكتيريا ذات كفاءة ضعيفة في تحليلها للبروتين ذات قطر (0.5) سم، واهملت بقية العزلات لأنها لم تعطِ اي قطر للتحلل . اختيرت العزلة ذات الكفاءة العالية في تحليل البروتين وإنتاج انزيم البروتيز وهي العزلة ذات الرمز المحلي B1 لأجراء الدراسة عليها.

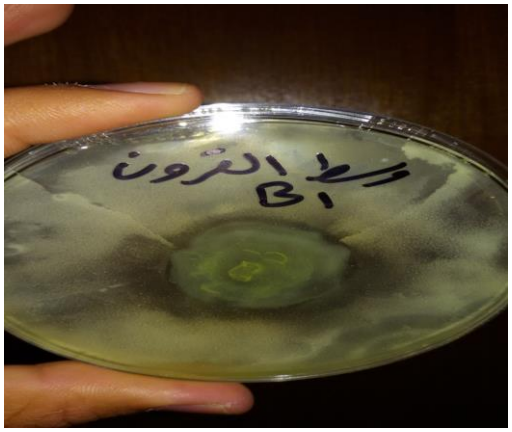
صورة رقم (1) تبين قطر المنطقة الشفافة للعزلة المحلية S2 على وسط الجيلاتين الصلب

صورة رقم (2) تبين قطر المنطقة الشفافة للعزلة المحلية **B1** ***P. aeruginosa*** على وسط الجيلاتين الصلب

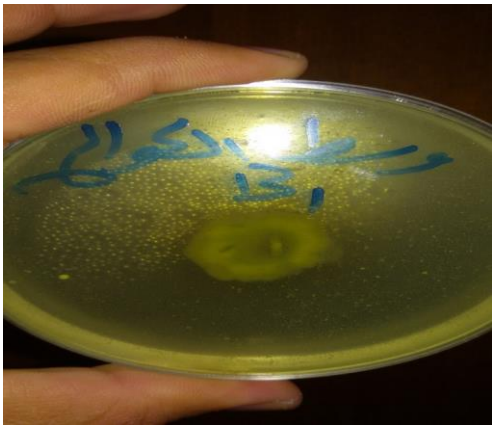
غربلة العزلات في الاوساط الصلبة حسب المصدر النتروجيني : اظهرت النتائج وجود اختلاف في قابلية العزلة المنتخبة في انتاج الانزيم وتحليل المصدر النتروجيني بحسب نوع المصدر المحلي المستعمل ، وكان أفضل مصدر نتروجيني هو مسحوق قرون الأغنام الذي اعطى اعلى معدل قطر تحلل المنطقة الشفافة للعزلة البكتيرية إذ بلغ (3.5) سم صورة رقم3 (A،B) .

التشخيص:

أظهرت نتائج الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية للعزلة البكتيريا المنتخبة واعتمادا على Holt *et.al.,* (1994) ان العزلة التي أعطت الرمز المحلي B1 أنها تحمل صفات بكتريا *P. aeruginosa* جدول (1) و(2):



صورة رقم (3) – A– تبين قطر المنطقة الشفافة للعزلة المحلية *P. aeruginosa* B1 على وسط مسحوق قرون الاغنام الصلب



صورة رقم (3)–B– تبين قطر المنطقة الشفافة للعزلة المحلية *P. aeruginosa* B1 على وسط مسحوق كوالح الذرة

جدول (1) المواصفات الزرعية والمجهرية للعزلة البكتيرية المنتخبة (B1) *P. aeruginosa*

العزلة	طبيعة المستعمرات على الوسط الصلب المغذي						شكل الخلية	تجمع الخلايا	استجابتها لصبغة كرام
	الشكل	اللون	القوام	الحافة	الشفافية	الارتفاع			
***Pseudomonas aeruginosa* (B1)**	دائري	اخضر	جاف	منتظمة	معتمة	مسطحة	عصوية	مفردة	سالبة

جدول(2) الاختبارات الكيموحيوية للعزلة المنتخبة (B1) *P. aeruginosa*

العزلة نوع الاختبار	***Pseudomonas aeruginosa* (B1)**
Oxidase production	+
Catalase production	+
Methyl red	–
Voges- Proskaouer	–
Simmon Citrate	+
Motility	+
Lactose fermentation	–
Gelatinase production	+
Urease production	+
Hymolysis	**β**
Motility	+
Airation	**هوائية إجبارية**
انتاج H2s	+

(β) : تحلل كامل للدم ، (+): نتيجة موجبة ، (–) : نتيجة سالبة

حساسية البكتريا تجاه المضادات الحيوية .

اختبرت حساسية البكتريا لعدد من المضادات الحيوية المتوافرة محليا والشائعة الاستعمال في علاج بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* . أظهرت نتائج جدول (3) ان عزلات بكتريا *P. aeruginsa* كانت مقاومة لعدد كبير من المضادات الحيوية الا انها كانت حساسة جدا للمضاد الحيوي Piperacillin .

جدول (3)اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية لبكتريا *P. aeruginosa* .

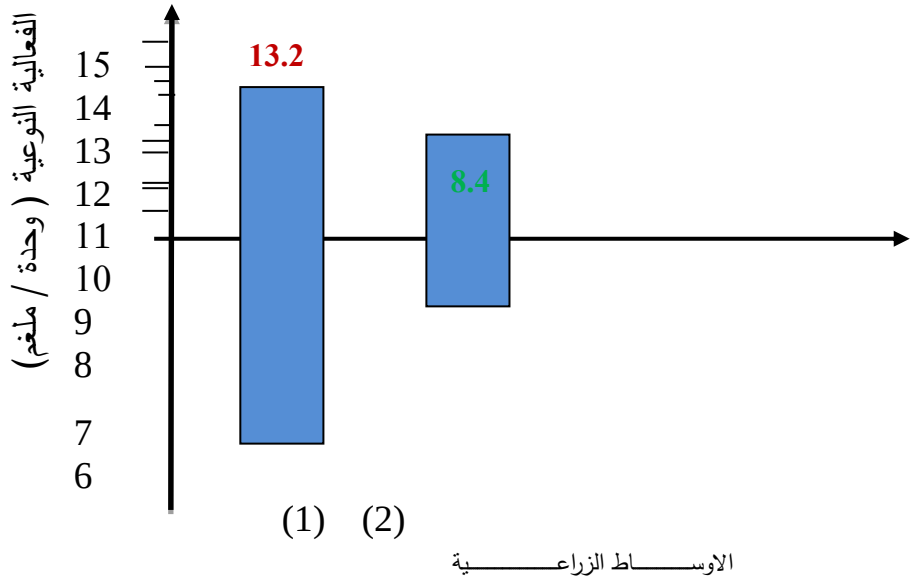
المجموعة	المضادات الحيوية وتركيزها بالمايكروغرام/قرص	استجابة العزلة B1	قطر التثبيط
β-lactam	Ampicillin AM(10U)	**R**	**----**
	(Amoxicillin AX 25)	**R**	**----**
	Oxacillin OX(1)	**R**	**----**
	Cefotaxime CF(10)	**R**	**----**
	Ceftazidime CAZ(30)	**S**	**2cm**
	Piperacillin Pi(10)	**S**	**3.2cm**
Aminoglycoside	Tobramycin TB(10)	**S**	**2cm**
Tetracyclines	Tetracycline TE(30)	**R**	**----**
Miscellaneous	Chloramphenicol C(30)	**R**	**----**
	Ticarcillin TCC(30)	**S**	**1.5cm**
Quinolones	Nalidixic Acid NA(30)	**R**	**----**
	Ciprofloxacine CIP(5)	**S**	**2.8cm**

الرموز : R : مقاومة (Resistance) ، S : حساسة (Sensitive) .

تعيين الظروف المثلى لإنتاج انزيم البروتيز .

تحديد الوسط الزرعي الامثل لإنتاج انزيم البروتيز .

استعمل في الدراسة الحالية نوعان من الاوساط الزرعية (وسط مسحوق قرون الاغنام ووسط مسحوق كوالح الذرة). وبينت النتائج في شكل (1) ان وسط مسحوق قرون الاغنام يتميز بأعلى انتاجية وبفعالية نوعية بلغت (13.2) وحدة / ملغم ، تلاه وسط مسحوق كوالح الذرة بفعالية نوعية بلغت (8.4) وحدة / ملغم .ان الاختلاف في انتاج الانزيم في الاوساط الزرعية المختلفة يمكن ان يعزى الى محتوى الوسط من المواد العضوية والمعدنية المتنوعة في الوسط الغذائي والتي تؤثر في انخفاض انتاج الانزيم أو زيادته ، فضلا عن تأثيرها في فعاليته وثباتيته (7) . اشارت عدد من الدراسات الى استعمال اوساط زرعية مختلفة لإنتاج الانزيم ، فلقد استعمل وسط مسحوق قرون الاغنام من قبل (8) وقد اعطى اعلى انتاجية وبفعالية نوعية بلغت (14.6) وحدة / ملغم، وهذا يتفق مع الدراسة الحالية اذ اعطى وسط مسحوق قرون الاغنام اعلى انتاجية .



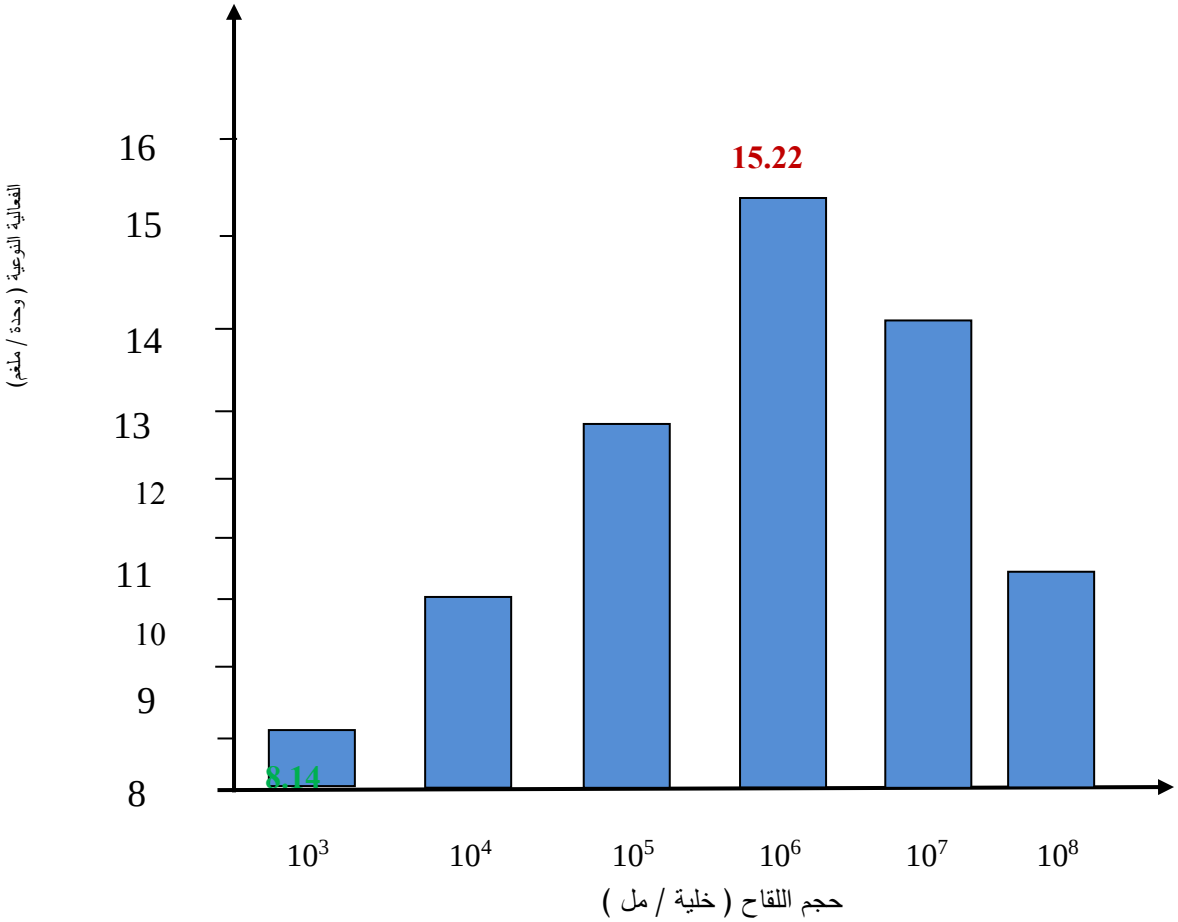
شكل(1) تحديد الوسط الزرعي الامثل لإنتاج انزيم البروتيز من بكتريا*P. aeruginosa*

1-وسط مسحوق قرون الاغنام

2- وسط مسحوق كوالح الذرة

تحديد تركيز اللقاح الامثل لإنتاج انزيم البروتيز .

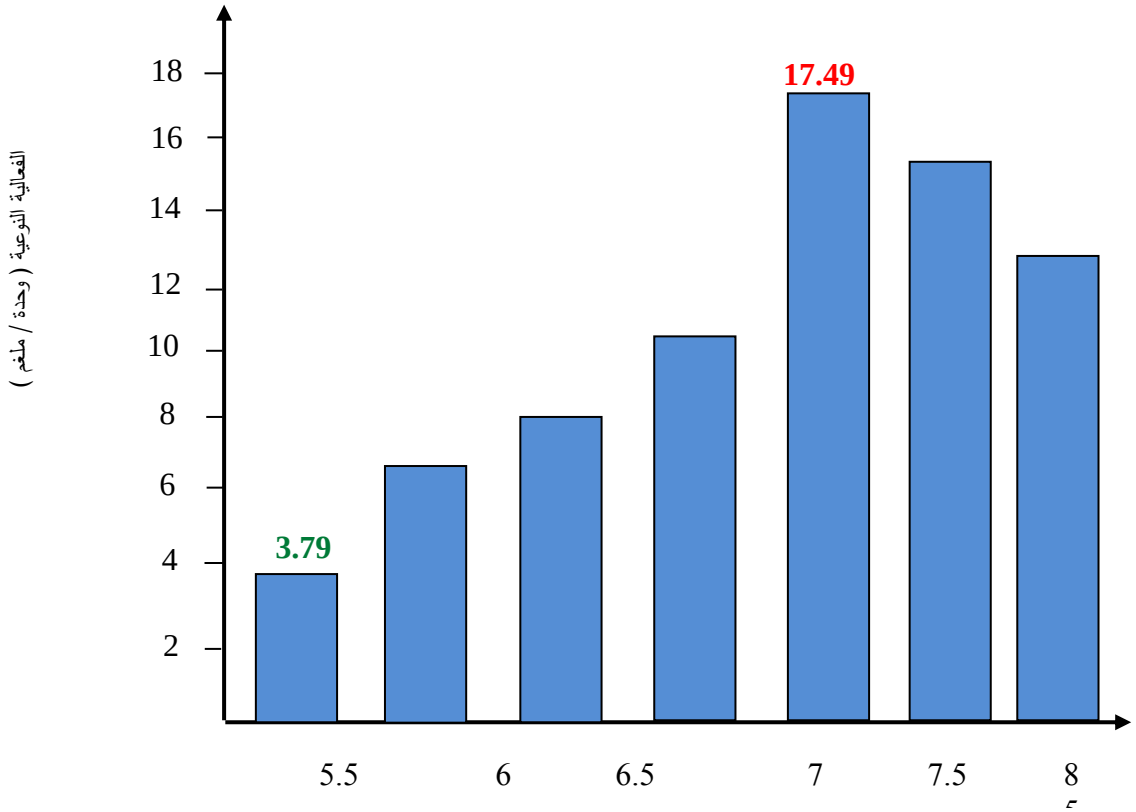
اظهرت النتائج زيادة تدريجية في انتاج انزيم البروتيز من العزلة المحلية لبكتريا*P. aeruginosa* مع زيادة تركيز اللقاح البكتيري شكل(2) ، اذ ازدادت الفعالية النوعية للأنزيم بزيادة تركيز اللقاح ، اما التركيز الامثل فكان (1×10^{6}) خلية/مل اذ اعطى فعالية نوعية بلغت (15.22) وحدة / ملم لتنخفض هذه الفعالية الى(14.38) وحدة / ملم ، عند زيادة الخلايا البكتيرية الى 1×10^{7} (1) خلية/ مل ،كما بينت النتائج ان تلقيح الوسط بـ (1×10^{3}) خلية / مل قد اعطت اقل فعالية نوعية والتي بلغت (8.14) وحدة / ملغم .قد يعزى هذا الاختلاف الى انه في التراكيز القليلة يكون استهلاك البكتريا لمكونات الوسط لغرض النمو والانقسام بدرجة اساس مما يؤدي الى التأثير سلبا في انتاج الانزيم ، ومع زيادة اللقاح ووصول النمو الى قمة الطور اللوغاريتمي تبدأ البكتريا بإنتاج الانزيم كعامل مساعد يسهم في ادامة حياتها من التغيرات الحاصلة في المزرعة(9) ، اما زيادة حجم اللقاح اكثر من الحد المناسب فانه يؤدي الى حدوث حالة تنافس على مكونات الوسط الغذائي فضلا عن زيادة النواتج الثانوية للخلايا والتي قد تؤدي الى موتها ومن ثم انخفاض الانتاج (10) .



شكل (2) تحديد تركيز اللقاح الامثل لانتاج انزيم البروتيز من بكتريا *P. aeruginosa*

تحديد الاس الهيدروجيني الامثل لإنتاج انزيم البروتيز .

حدد الاس الهيدروجيني الامثل لإنتاج انزيم البروتيز من العزلة *P. aeruginosa* باستعمال الوسط الزرعي الانتاجي (مسحوق قرون الاغنام) بقيم من الاس الهيدروجيني تراوحت بين (5-8) وبتدرج مقداره نصف درجة ، وأظهرت النتائج ان اعلى انتاج للإنزيم كان عند الاس الهيدروجيني (7) الشكل (4) ، اذ بلغت الفعالية النوعية (17.49) وحدة / ملغم ، وانخفضت لتصبح (14.25) وحدة /ملغم و (12.33) وحدة / ملغم ، عند اس هيدروجيني و(7.5 و 8) على التوالي .اما الانتاج الاقل للإنزيم كان عند الاس الهيدروجيني (5) إذ بلغت الفعالية النوعية (3.79) وحدة /ملغم . يؤثر الاس الهيدروجيني في انتاج الانزيم عن طريق تأثيره في ذائبية المواد في الوسط الزرعي المستخدم وانتقاله وتأينه، والتي تنعكس على نمو الكائن المجهري وانتاجه للأنزيمات المختلفة (11) .



شكل (4) تحديد الاس الهيدروجيني الامثل لإنتاج انزيم البروتيز من بكتريا *P. aeruginosa*

استخلاص وتنقية انزيم البروتيز .

تم انتاج انزيم البروتيز من العزلة المحلية *P. aeruginosa* على وفق الظروف المثلى التي حددت في الفقرة السابقة بوسط مسحوق قرون الاغنام ذي الاس الهيدروجيني (7) وبدرجة حرارة (32) مْ لمدة حضن (24) ساعة ، بعدها استخلص الانزيم الخام بالنبذ المركزي وحددت الفعالية له والتي وجد انها مساوية الى (19.93) وحدة/ملغم جدول (5) .اجريت بعد ذلك عملية تنقية الانزيم على وفق الخطوات الاتية :

الترسيب بكبريتات الامونيوم .

استعملت كبريتات الامونيوم في الترسيب للتخلص من نسبة كبيرة من الماء والبروتينات الاخرى لزيادة تركيز الانزيم ، ورفعت نسبة الاشباع تدريجيا الى (60%) وهذه النسبة من الاشباع استعملها عدد من الباحثين في تنقية الانزيم من بكتريا *P. aeruginosa* والتي اعتمدت كبرتوكول لترسيبه من راشح مزرعة هذه البكتريا (12) . اظهرت نتائج جدول (5) بعد الترسيب بكبريتات الامونيوم زيادة في تركيز البروتين وزيادة في الفعالية النوعية لتصبح (32.03) وحدة / ملغم ، بعدد مرات تنقية (1.60) وبحصيلة انزيمية (33.69%) .

كروماتوغرافيا التبادل الايوني لإنزيم البروتيز.

مرر محلول البروتين الناتج من عملية الترسيب في عمود المبادل الايوني DEAE-Cellulose كمرحلة ثانية ، وحسبت الفعالية النوعية والتي بلغت (57.68) وحدة / ملغم بعدد مرات تنقية (2.89) وحصيلة انزيمية بلغت (35.00%) .

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لإنزيم البروتيز .

مررت الاجزاء الفعالة الناتجة بعد تركيزها من خلال الترشيح الهلامي كمرحلة اخيرة في عملية التنقية باستعمال هلام Sephadex – G200 ، واظهرت الى ان الفعالية النوعية للمحلول الانزيمي (34.87) وحدة / ملغم بعدد مرات تنقية (1.74) وحصيلة انزيمية (32.16%) .

جدول (5) تنقية إنزيم االبروتيز المنتج من العزلة البكتيريا المحلية *P. aeruginosa* B1

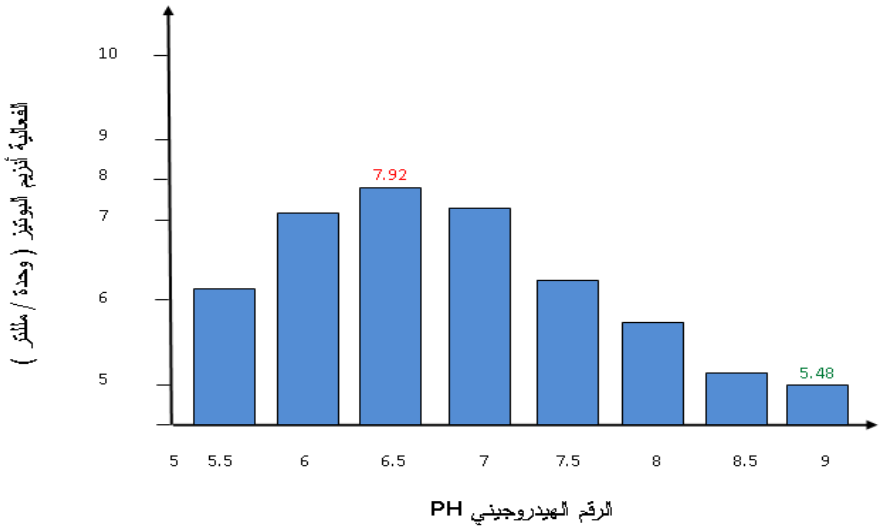
خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية الأنزيمية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/مل)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية (مرة)	الحصيلة %
المستخلص الأنزيمي الخام	100	12.36	0.62	19.93	12.36	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم (20-80%)	60	8.33	0.26	32.03	41.65	1.60	33.69
التبادل الايوني بعمود DEAE-Cellulose	30	14.42	0.25	57.68	43.26	2.89	35.00
الترشيح الهلامي بعمودSephadex G200	20	19.88	0.57	34.87	39.76	1.74	32.16

توصيف إنزيم البروتيز المنقى جزئياً .

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم .

درس تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الإنزيم المنتج و المنقى من العزلة المحلية *P. aeruginosa* بمدى من الاس الهيدروجيني تراوح بين (5-9) وبتدرج مقداره نصف درجة باستعمال المحلول المنظم Tris-HCl بتركيز 0.2 مولاري. أظهرت النتائج الموضحة في شكل (5) ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية انزيم البروتيز المنتج من العزلة المحلية *P. aeruginosa*- B1 هو 6.5 إذ بلغت الفعالية الإنزيمية (7.92) وحدة / مللتر. ولوحظ ايضا ان فعالية في الاسس الهيدروجينية (6 و7) قريبة جدا من الفعالية في الاس الهيدروجيني (6.5) ، اذ بلغت (7.14و7.26) وحدة / مللتر على التوالي ،فيما انخفضت الفعالية عند قيم من الاسس الهيدروجينية القاعدية والحامضية ، اذ بلغت الفعالية النوعية (6.12) وحدة / مللتر عند اس هيدروجيني (5.5) و(5.48) وحدة/ مللتر عند اس هيدروجيني (9).تتفق هذه النتائج مع ما ذكر في الدراسات والبحوث المتعلقة بالأنزيم لبكتريا *P. aeruginosa* اذ ذكر ان الاس الهيدروجيني الامثل للانزيم يبلغ (6) (13) ، وذكرت (14) ان الاس الهيدروجيني الامثل للفعالية يكون بين (6 و7) .

ان تغير الاس الهيدروجيني يحدث تحويرات في شكل البروتينات ومنها الانزيمات ، اذ تتغير شحنات المجاميع الطرفية البعيدة من مواضع ارتباط المادة الاساس بالأنزيم وفي كثير من الاحيان يؤدي ذلك الى تفكك الانزيم الى وحدات بروتينية ومن ثم يفقد فعاليته (15) من جانب اخر تتأثر المادة الاساس ، لاحتوائها على مجاميع قابلة للتأين مما يؤثر في ارتباطها بالأنزيم (16) .

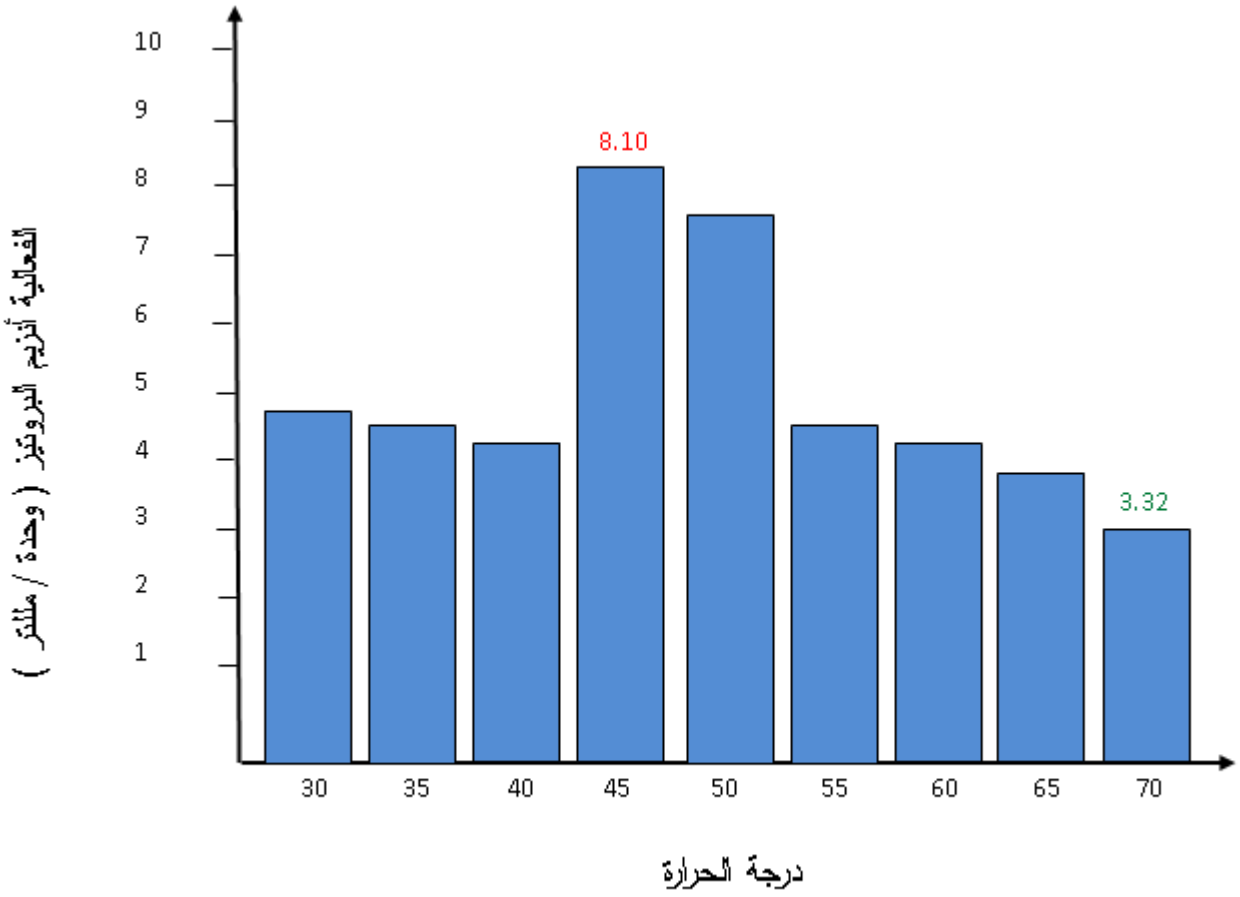


شكل (5) الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم البروتيز من بكتريا *p. aeruginosa*

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم .

درس تأثير فعالية انزيم البروتيز المنقى بأجراء التفاعل الانزيمي في درجات حرارة مختلفة تراوحت بين (20–70) مْ ، يلاحظ من الشكل (6) ازدياد الفعالية الانزيمية حتى بلغت اقصاها (8.10) وحدة / مللتر عند درجة حرارة (45) مْ و(7.38) وحدة/ مللتر في درجة حرارة (50) مْ ، لتنخفض الى (4.64) وحدة / مللتر في درجة (55) مْ ، واستمرت بالانخفاض لتصبح (3.32) وحدة/ مللتر في درجة حرارة (70) مْ .اشارت الدراسات الى ان افضل فعالية لأنزيم البروتيز تكون عند درجات حرارية بمدى (45–50) مْ ، ولكن افضل درجة حرارية له عند (32) مْ وتنخفض هذه الفعالية بارتفاع درجة الحرارة عن هذا المدى ، وفعالية الانزيم تفقد كليا في درجات الحرارة العالية كالتسخين بدرجة(95–100) مْ لمدة (15) دقيقة (17)

يؤدي ارتفاع درجة الحرارة الى زيادة سرعة التفاعلات الانزيمية بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات المتفاعلة وبذلك تصبح الطاقة الحركية للأنزيم تفوق الطاقة لكسر الاواصر الهيدروجينية التي تحافظ على التركيب الثالثي والثانوي للأنزيم ، ويحصل عند هذه الدرجة الحرارية مسخ للانزيم يرافقه فقدان سريع للفعالية التحفيزية (18) .



شكل (6) درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم البروتيز من بكتريا *p. aeruginosa*

المصادر

1. Atlase,R.M. ;(1995). Principles of microbiology 1ST ed. Mosby year Book , Inc .
2. Baron ,E.J. and Finedgold , S.M. (1990). Diagnostic microbiology . 8th ed . Mosby –Year – Book . Inc. Missouri . USA.
3. Bull, A. T. and Bushnell, M. E. (1976) Environmental control of fungal growth.

In the filamentous fungi. (eds. J. E. Smith and D. R. Berry). Edward Arnold. London. vol. 2: 1-26.

4. Chiesa ,C. ;Labrossi , P.H.and Aronoff , S.C.(1986).Decreased baseline β-Lactamase production and indelibility associated with increassed Piperacillin susceptibility of Pseudomonas cepacia isolated from chilidren with cystic fibrosis . Pediatric Res .20: 1174-1177.
5. Cooper, M. ; Tavankar, G.R. and Williams, H.D. (2003). Regulation of expression of the cyanid-insenstive terminal oxidase in Pseudomonas aeruginosa. Microbiol. Vol. 149(5) : 1275-1284.
6. Corbett , C . R . ; Burtnick , M . N. ;Kooi , C . ; Woods , D.E and Sokol , P.A. (2002).Cloning of Burkholderia cepacia metaloprotase gene CMS.Poster I.
7. Djmal,CH.;Ali,T. and Nelly,C.(2009). Acid Protease Production by Isolated Species of Penicillium. European J. Sci.,3: 469-477.
8. Hachem, R.Y. ; Chemaly, R.F. L Ahmar, C.A. (2007) . Colistin is effective in treatment of infection caused by multidrugresistant Pseudomonas aeruginosa in cancer patients. Antimicrob. Agent Chemother. Vol. 51(6) : 1905-1911.
9. Holt, J.G.; Kreig, N.R.; Sneath, P.H.A.; Stanely, J.T. and Williams, S.T. (eds) (1994). Bergery's manual of determinative bacteriology , 9th edition, Williams and Wilkins, USA-P. 532-553.
10. Hooper,D.C.(1999) . Mode of action of fluoroquinolones . 58(2): 6-20.
11. Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial application, current opinion in plant biology. Vol. 7:1-9.
12. Laurance,D.R. ;Bennet , P.N.and Baron, M.J.(1997).Clinical pharmacology. 8th-ed. Churchill- livingstone , London .
13. Lee, K. H. ; Park, K. K.; Park, H. S. and Lee, J. B. (1987) Isolation, Purification and characterization of keratinolytic proteinase from Microsporum cains. Yonsei Med. J.; 28(2): 131-138
14. MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
15. Mckevitt,A.I.;Bajaksouzian,S.;Klinger,J.D .and Woods, D.E.(1989).Purification and Characterization of an extracellular protase from Pseudomonas cepacia .Infect .Immun .57(3):771-778.
16. Meyer, J.M.; Hohnadel, D.and Halle, F.(1989).Cepabactin from Pseudomoanas aeruginosa ,a new type of siderophore. J.Gen. Microbiol. 135:1479-1487.
17. NCCLs: National Committee for Clinical Laboratory standerds (1997). Performance standerds for antimicrobial disk susceptibility tess.Approved standard M2-A6.National committee for clinical Laboratory standerds , Wagne, Pa.
18. Nunes, A.S. & Martins, M.L.L. (2001) . Isolation,properties and kinetics of growth of a thermophilic Bacillus.Braz. J. Microbiol., 32: 271-275.