P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2014 ,(8), (2) :23-30

دراسة الظروف المثلى لانتاج انزيم البروتييز من بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من حالات مرضية مختلفة.

محمد خير الله محمود*، احمد محمد تركي، احمد عبد الجبار سليمان*****

* دائرة صحة الانبار – قسم الصحة العامة
**جامعة الانبار – كلية العلوم- قسم علوم الحياة
*** جامعة الانبار – مركز دراسات الصحراء

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: 2013/00/00
تاريخ القبول: 2014/5/6
تاريخ النشر: / / 2022
DOI: 10.37652/juaps.2014.123974

الكلمات المفتاحية:
Pseudomonas aeruginosa،
انزيم البروتييز،
فعالية الانزيم.

الخلاصة:

اختبرت 15 عزلة بكتيرية من الـ *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مصادر مرضية مختلفة شملت (4 عزلات من الاذن و3 عزلات من الجروح وعزلة واحدة من القشع و3 عزلات من الادرار و3 عزلات من الحروق وعزلة من سائل النخاع الشوكي) لمعرفة كفائتها في انتاج انزيم البروتييز باستخدام الاوساط الصلبة والسائلة في مرحلتي الغربلة الاولية والثانوية واختيرت العزلة المحلية P5 المعزولة من الحروق كونها الافضل في انتاج الانزيم . وتم تعيين الظروف المثلى لانتاج الانزيم وذلك بتحديد درجة الحرارة المثلى والرقم الهيدروجيني الامثل وفترة الحضن وتحديد الوسط الزرعي الامثل واظهرت النتائج ان الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم هو (8) ودرجة الحرارة هي (35)م˚ وسجلت فترة حضن 36 ساعة افضل فترة لانتاج الانزيم وكان وسط مرق تربتك الصويا افضل وسط لانتاج الانزيم.

المقدمة:-

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من المسببات المرضية الانتهازية Opportunistic pathogens التي نادرا ما تسبب المرض في الأشخاص الأصحاء لكنها تشكل خطرا حقيقيا على المرضى الراقدين في المستشفيات وبشكل خاص مرضى السرطان والمصابين بالحروق ومرضى نقص المناعة وزراعة الاعضاء فهي واحد من أهم الأنواع البكتيرية المسببة لما يعرف بالإصابة المكتسبة (Nosocomial Infection)[1] تعتمد قابلية *Ps.aeruginosa* في غزوها للأنسجة على إنتاج انزيمات وذيفانات خارج خلوية مثل انزيم البروتييز وهناك نوعان من انزيمات البروتييز Proteases ذات العلاقة بالضراوة اللذان يساعدان في عملية الغزو وهما انزيما (Elastase) والـ(Alkaline protease)[2].

حيث يعمل انزيم Alkaline protease على زيادة مستوى الضراوة من خلال توفير عوامل النمو الغذائية الأساسية لهذه البكتريا مسببا ضررا للأنسجة وتنخرا جلديا [3]، كما تلعب البروتييزات دورا اساسيا في امراضية الاحياء المجهرية اذ تؤدي انزيمات البروتييز الحامضية الخارج خلوية دورا مهما في تحليل جدار الخلايا من خلال تحلـــيل متعدد الببتـيد[4] كما يستخدم إنزيم البروتييز في مجالات تطبيقية مختلفة إذ يستخدم الإنزيم في مجالات طبية وصناعية وغذائية[5].

انزيمات البروتيز هي الإنزيمات التي تحفز تفاعلات التحلل المائي التي تحطم جزيئات البروتين الى ببتيدات وأحماض أمينية أذ يحفز تحليل الأصرة الببتيدية للبروتينات في مواقع مختلفة وتحت ظروف مختلفة وتشكل 60% من الإنزيمات الكلية الأخـرى[6] وتوجد إنزيمات البروتييز بكثرة في الطبيعة وفي مصادر مختلفة وأكدت الدراسات وجود هذه الإنزيمات في النباتات والحيوانات وفي الأحياء المجهرية المختلفة وتعد الأحياء المجهرية من المصادر الجيدة لانتاج إنزيمات البروتييز ومن هذه الأحياء البكتريا والأكيتوماسيتات والأعفان والخمائـر [7]يعمل إنزيم

* Corresponding author at: College of Science, University of Anbar
E-mail address:

البروتييز على التحطيم المباشر لانسجة المضيف او تحطيمها بصورة غير مباشرة من خـــلال تاثيره على الجهـــاز المناعي للمضيف [8]وهذه الانزيمات لها اهمية كبيرة و متنوعة في العمليات البايولوجية و منها تنظيم العمليات الايضـية ، التعبير الجيني ، تحوير الانزيمات ، الامراضية و تحليل جزيئات البروتينات الكبيرة الى جزيـــئات اصغر لغرض الانتقال والأيض[9] اشارت الدراسات إلى أن بكتريا *Ps.aeruginosa* تنتج عدة انواع من البروتيزات مثـــل إلاستـــيز (Elastase) والبروتييـــز القاعـــدي (Alkaline protease) وانزيـــم بروتييـــز Las A ([11,12]) وتكون هذه الانزيمات من النوع المفرزة خارج الخلايا .هدفت هذه الدراسة الى عزل وتشخيص بكتريا*Ps. aeruginosa* من إصابات مرضية مختلفة تشمل (أخماج الاذن الوسطى و الحروق و الجروح و أخماج المسالك البولية وسائل النخاع الشوكي)، استخلاص وتنقية انزيم البروتيز، دراسة تاثير بعض العوامل على قدرة انتاج بكتريا *Ps.aeruginosa* لانزيم البروتيز القاعدي.

المواد وطرائق العمل :-

تم جمع نماذج من حالات مرضية مختلفة وبواقع 15 عزلة موزعة بالشكل التالي 4 عزلات من التهابات الاذن و3 عزلات من الجروح وعزلة واحدة من القشع و3 عزلات من الادرار و3 عزلات من الحروق وعزلة واحدة من سائل النخاع الشوكي تم زرع جميع المسحات للعينات على الأوساط الزرعية لغرض تنمية وتشخيص بكتريا Pseudomonas aeruginosa وحضنت في 37 مْ لمدة 24 ساعة ثم اجري اختباري Catalase و Oxidase للمستعمرات المتوقعة، بعدها تم إجراء الفحوصات الكيميائية. [12]

استخلاص انزيم البروتيز القاعدي الخام:-

استخدم وسط مرق تربتك صويا Trypticase soy broth في هذه الخطوة حيث وزع الوسط بحجم 20 مليلترآ في دوارق بحجم 100 مليلتر. وتم تلقيح الدوارق بلقاح بكتيري بعمر 18 ساعة بحجم 0.2 مليلتر لكل دورق وتمت الحضانة في حاضنة هزازة 130 دورة/ الدقيقة عند درجة حرارة 35 م° لمدة 24 ساعة. وبعد مدة الحضانة تم عمل النبذ المركزي المبرد للمزروع البكتيري 3500 دورة عند درجة حرارة 4 م° لمدة 30 دقيقة. وعد الطافي البكتيري انزيما خام [13]

تقدير تركيز البروتين:-

اتبعت طريقة [14] لتقدير البروتين وباستخدام منحنى قياسي لبروتين البومين المصل البقري. وتم تقدير تركيز البروتين باضافة 0.1 مليلتر من المستخلص الانزيمي و 0.1 مليلتر من كل تراكيز البومين المصل البقري وبواقع ثلاث مكررات الى انابيب الاختبار واضيف لكل منها 5 مليلترات من محلول صبغة كوماسي الزرقاء G250 وبعد الرج تركت دقيقتين وتمت قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 595 نانومتر. واستعمل دارئ الفوسفات في المحلول الكفأ (Blank) وتم حساب تركيز البروتين في المستخلص بالرجوع الى المنحنى القياسي لبروتين البومين المصل البقري المستحصل من رسم العلاقة بين تراكيز الالبومين وقيم الامتصاصية كما وتم حساب الفعالية النوعية للانزيم (Specific Activity) بالاعتماد على تركيز وفعالية الانزيم وعلى وفق المعادلة الواردة في[15]

قياس فعالية انزيم البروتيزالقاعدي:-

تم قياس فعالية الانزيم بالاعتماد على الطريقة الموصوفة من قبـــل[16] holt *et al* حيث تم اضافة 0.1 مليلتر من الانزيم الخام الى 1 مليلتر من محلول الكازئين (0.5%) ذي الاس الهيدروجيني 8 و1.9 مليلتر من دارئ Tris-HCL بتركيز 0.2 مولر واس هيدروجيني 8 عند درجة حرارة 35 م لمدة 30 دقيقة وتم ايقاف التفاعل باضافة 2 مليلتر من TCA بتركيز 5% . كما حضر المحلول الكفأ بالخطوات نفسها ولكن بدون اضافة الانزيم الخام بعد ذلك تم النبذ المركزي المبرد لكلا محلولي التفاعل والكفأ 3500 دورة لمدة 30 دقيقة. وعينت كمية الناتج المتكون والذائب بـTCA بوساطة قياس الامتصاصية للطافي عند الطول الموجي 280 نانومتر. حيث تعرف وحدة الفعالية للانزيم بانها كمية الانزيم التي تعطي زيادة 0.001 في الامتصاصية (280) نانومتر لكل دقيقة تحت الظروف القياسية.

تعيين الظروف المثلى لانتاج البروتييز

تحديد الوسط الزرعي الامثل لانتاج انزيم البروتييز :-

اختبرت اربعة اوساط زرعية لغرض تحديد الوسط الزرعي الامثل لانتاج انزيم البروتييز من العزلة المحلية p5 وهي وسط الكازين السائل Casein broth ، وسط الكازين الملحي السائل Salt Casein broth، وسط Van Gundy (VG) Medium، وسط تربتك صويا بروث (TSB) . لقحت كل هذه الأوساط الزرعية وحضنت في حاضنة هزازة بسرعة (130دوره / دقيقة ودرجة حرارة 35م ° ولمدة 24 ساعة) نبذت المزارع البكتيرية بعد انتهاء مدة الحضن ثم قدرت فعالية الانزيم وتركيز البروتين في الرائق.

تأثير درجة الحرارة في انتاج الانزيم: -

لقح وسط الانتاج (مرق تربتك صويا) وحضن بدرجات حرارة مختلفة وهي (20، 25، 30، 35، 40، 45)م° لمدة (24) ساعة ثم نبذ الوسط بسرعة (3500) دورة / دقيقة لمدة (30) دقيقة وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في المحاليل الانزيمية لكل درجة حرارية .

الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم:-

حضر وسط الانتاج (وسط مرق تربتك صويا) بارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين (4-9) ونظم الرقم الهيدروجيني باستخدام محلول 1 مولار هيدروكسيد الصوديوم ومحلول (0.25) مولار حامض الهيدروكلوريك لقح الوسط باضافة 1 مل من المزروع البكتيري وحضن الوسط بدرجة حرارة (37) م° لمدة (24) ساعة ثم نبذ بسرعة (3500) دورة / دقيقة لمدة (30) دقيقة وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في المحلول الانزيمي.

تأثير مدة الحضن في انتاج الانزيم: -

لقح وسط الانتاج بالعزلة المنتخبة بعمر (24) ساعة وحضنت في درجة حرارة (35)°م لمدد زمنية مختلفة هي (12و24و36و48و60و72) ساعة ، ثم نبذ الوسط بسرعة (3500) دورة / دقيقة لمدة (30) دقيقة وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في المحلول الانزيمي لكل معاملة.

النتائج والمناقشة:-

أظهرت الصفات الزرعية لمستعمرات بكتريا الزوائف الزنجارية النامية على اوساط الاغار المغذي والماكونكي اغار بكونها مستعمرات دائرية مسطحة معتمة ذات حافات منتظمة كما أتصف سطحها العلوي بتموجات ذات رائحة أشبه برائحة التفاح التالف أضافة إلى ظهور مستعمراتها على وسط ماكونكي شاحبة اللون وليس لها القدرة على تخمير سكر اللاكتوز الموجود في الوسط . وأظهر الفحص المجهري لبكتريا *Ps. aeruginosa* أنها عصيات سالبة لملون كرام بشكل سلاسل قصيرة غير مكونة للأبواغ . أما نتائج الاختبارات الكيموحيوية فأن العزلات جميعها لم تتمكن من تخمير سكر اللاكتوز كما كانت جميع العزلات موجبة لكل من أنزيمي الكتاليز والأوكسديزوقد تم التحري عن قدرة العزلات على انتاج انزيم البروتيز القاعدي وذلك باستخدام وسط اغار الحليب الفرز (Skim milk Agar) وتباينت عزلات بكتريا *Ps. aeruginosa* التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة والبالغ عددها (15) عزلة في قدرتها على تحليل البروتين واظهرت النتائج امتلاك جميع العزلات فعالية انتاج البروتيز بنسبة 100% نتيجة تكون مناطق تحلل متباينة القطر حول المستعمرات النامية على وسط اغار حليب الفرز وبناءا على نتائج الاذابة تلك اوضحت وجود اختلافات في قابلية العزلات على انتاج البروتيز مع تباين في قيم اقطار منطقة التحلل المتكونة حول المستعمرات النامية اذ تراوحت اقطار الاذابة مابين (16 – 21) ملم وتميزت العزلة المحلية P5 المعزولة من الحروق بكونها اكفأ العزلات المنتجة للبروتيز من خلال مقدار الاذابة في الوسط والذي بلغ (21) ملم .

اختبار العزلة المحلية P5 في انتاج انزيم البروتيز باستعمال الوسط السائل :-

اختبرت قابلية عزلة بكتريا p5 المحلية التي اعطت اكبر قطر منطقة اذابة في وسط اغار الحليب الفرز باستخدام وسط التربتك صويا السائل TSB وتم زرع هذه العزلة على وسط مرق تربتك صويا واظهرت

العزلة المزروعة قدرة على انتاج انزيم البروتيز وبعدها تم قياس تركيز البروتين المنتج من هذه العزلة باستخدام طريقة Bradford [13]وبالرجوع الى المنحنى القياسي لالبومين المصل البقري . حيث بلغ تركيز البروتين 0.310 ملغم/مليلتر وبلغت الفعالية النوعية للانزيم (89) وحدة / ملغم بروتين.

استخلاص وتنقية انزيم البروتيز القاعدي :-

استخلص انزيم البروتيز القاعدي من العزلة المحلية p5 لانها العزلة الاكثر فعالية في انتاج الانزيم. وذلك بتنميتها على وسط مرق تربتك الصويا (Tryptic Soya Broth) عند درجة حرارة 35 م˚ لمدة 24 ساعة في حاضنة هزازة وبعدها تم النبذ المركزي المبرد للمزروع البكتيري عند درجة حرارة 4 م˚ لمدة 20 دقيقة للحصول على المستخلص الانزيمي الخام البكتيري والذي بلغ تركيز البروتين فيه (0.310) مليغرام / مليلتر واظهر فعالية انزيمية (27.6) وحدة / مليلتر وفعالية نوعية (89.0) وحدة/ ملغم بروتين وباستخدام كبريتات الامونيوم وبنسبة اشباع 80% تم ترسيب بروتين انزيم البروتيز القاعدي وتم تقدير الفعالية الانزيمية له بعد اجراء الديلزة حيث لوحظ ارتفاع في الفعالية الانزيمية اذ بلغت (135.3) وحدة / مليلتر كما وارتفعت قيمة الفعالية النوعية حيث بلغت (201) وحدة / مليغرام بروتين جدول (1) . وتم وضع المحلول الانزيمي الناتج من الديلزة على عمود المبادل الايوني (DEAE-Cellulose) وتم

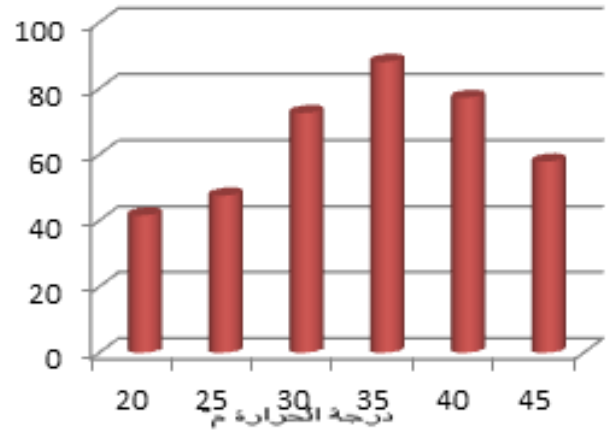
الاسترداد باستخدام دارئ Tris-HCl ذي الاس الهيدروجيني 8 وبتركيز 0.2 مولر وبتدرج ملحي خطي (0.1-0.5) مولر كلوريد الصوديوم ولوحظ ظهور اكثر من قمة بروتينية شكل (1) عند قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 280 نانومتروبينت النتائج ظهور الفعالية الانزيمية في الاجزاء (11-15) كما لوحظ حصول زيادة في الفعالية النوعية اذ بلغت 933.3 وحدة / ملغم بروتين مع زيادة في عدد مرات التنقية الى 10.4 مرة وبنسبة استرداد 15.2% للفعاليةالانزيميةوكان تركيز كلوريد الصوديوم اللازم لاسترداد الانزيم مساوياً الى 0.1 مولر.

وقد بين Segal[14]ان أفضل نسبة تشبع لاستخلاص الإنزيم من بكتريا *Ps. aeruginosa* بلغت (80%) وتختلف نسبة التشبع بكبريتات الامونيوم باختلاف البكتريا وتعتبر طريقة الترسيب بكبريتات الامونيوم من الطرق المهمة من اجل إزالة البروتينات الخارج خلوية عن طريق ترسيبها بواسطة كبريتات الامونيوم و تعتمد على أساس معادلة الشحنات على سطح البروتين و تكوين معقد قليل الذوبان[18]. تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه [19] عندما قاما بتنقية الانزيم من نوع البكتريا نفسها باستعمال عمود DEAE-Cellulose وكذلك تتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه [20] عندما قامت بتنقية الانزيم بطريقة التبادل الايوني باستخدام DEAE-Cellulose حيث حصلت على خمس قمم بروتينية ظهرت الفعالية الانزيمية في القمة الاولى منها.

تعيين الظروف المثلى لانتاج انزيم البروتيز من بكتريا *Ps. aeruginosa*

درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم :-

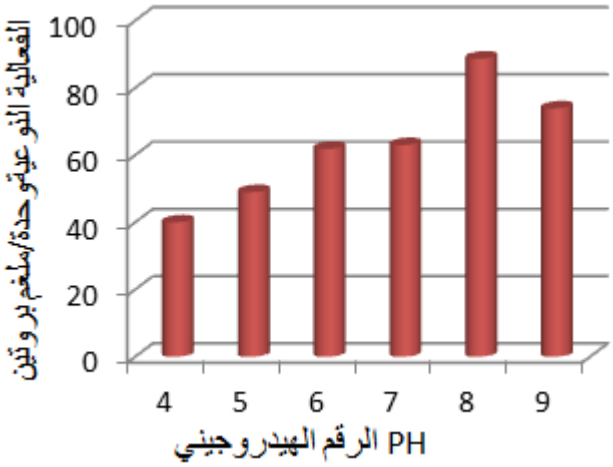
لوحظ ارتفاع الفعالية النوعية للانزيم مع ارتفاع درجة الحرارة حتى وصلت اعلى فعالية نوعية عند درجة حرارة (35)م˚ اذ بلغت 88.1 وحدة/ملغم بروتين ثم انخفضت الفعالية النوعية انخفاضا واضحا مع ارتفاع درجة الحرارة وصولا الى (45)م˚ لتبلغ 57.9 وحدة/ملغم بروتين شكل (2) ان انخفاض الفعالية النوعية للبروتيز المنتج ربما يعود الى عدم ملائمة درجة الحرارة لنمو البكتريا وانتاج الانزيم اذ ان لدرجة الحرارة تاثيرا مهما في انتاج الانزيم من الكائنات المجهرية عن طريق تاثيره في ذائبية الاوكسجين بالوسط الغذائي والطاقة الحركية للجزيئات وسرعة التفاعلات الانزيمية في الخلية حيث ينعكس ذلك سلبا او ايجابا في انتاج الانزيم[21]. وجاءت هذه النتيجة مقاربة مع نتائج كل من [22,13] اللذين بينوا إن أفضل درجة حرارة لإنتاج إنزيم البروتييز من بكتريا *Ps. aeruginosa* كانت (37) م °. في حين اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع [23] التي بينت إن أفضل درجة حرارة لإنتاج إنزيم البروتييز من بكتريا *Ps. aeruginosa* كانت عند درجة حرارة (35) م ° إذ بلغت الفعالية النوعية (84.94) وحدة / ملغم بروتين . حيث تعد درجة الحرارة من العوامل المهمة التي توثر في النمو و الفعاليات الايضية للإحياء المجهرية .



شكل (1) تاثير درجة الحرارة في معدلات انتاج انزيم البروتيزمن العزلة P5

الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج إنزيم البروتييز :

أظهرت النتائج ان انتاج الانزيم بدا يزداد بازدياد الرقم الهيدروجيني حتى بلغت اعلى فعالية نوعية للانزيم عند الرقم الهيدروجيني 8 بعدها انخفضت عند الرقم الهيدروجيني 9 وكما يظهر بالشكل (3) إذ بلغت الفعالية النوعية (88.7) وحدة /ملغم بروتين عند الرقم الهيدروجيني (8) بعدها انخفضت عند رقم هيدروجيني (9) حيث بلغت (73.9) وحدة /ملغم بروتين وهذا ما يؤكد ان نمو هذه البكتريا وانتاج الانزيم منها يكون في ارقام هيدروجينية قاعية و جاءت هذه النتائج متفقة مع [13] الذي بين إن أعلى إنتاجية لإنزيم البروتييز المعزول من بكتريا *Ps. aeruginosa* كان عند رقم هيدروجيني (8) في حين بين [24] ان أعلى إنتاجية لإنزيم البروتييز المعزول من بكتريا *Ps. aeruginosa* كان عند رقم هيدروجيني (8.3) وأشارت الدراسات إلى إن الارتفاع أو الانخفاض في الأرقام الهيدروجينية ضمن الحدود المثلى لفعالية الإنزيم يؤدي إلى حدوث مسخ غير عكسي للإنزيم مما يودي إلى تغيير في الموقع الفعال و فقدان الفعالية الإنزيمية [25] فضلا عن تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج الإنزيمات و المحافظة عليها خلال النمو إذ يؤثر على الأحماض الامينية المكونة للإنزيم والمسؤولة عن التركيب البنائي للإنزيم [26,27] وكذلك يؤثر الرقم الهيدروجيني في انتاج الانزيمات من خلال دوره في تحديد صفات الوسط الغذائي لذائبية المواد الغذائية وانتقالها وتاينها وتركيز البيكاربونات المتكونة من ذوبان ثاني اوكسيد الكاربون وتاثيره في سعة الداريء وبالتالي ينعكس على نمو الكائن الحي وانتاجه للانزيمات. [21]

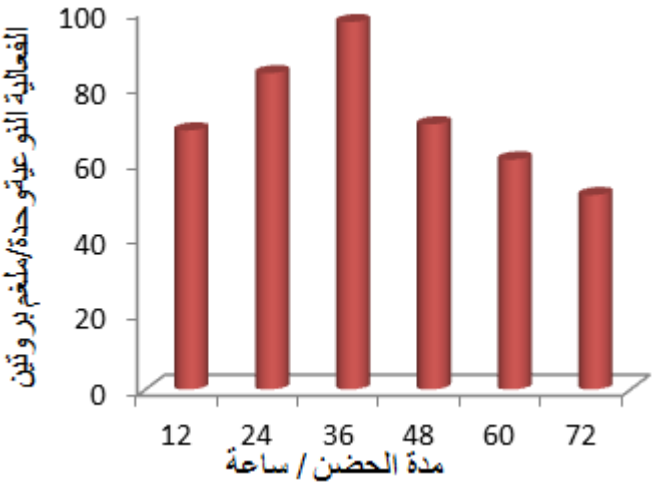


شكل (2) تاثير درجة الحموضة في معدلات انتاج انزيم البروتيز من العزلة p5

مدة الحضن المثلى لإنتاج الإنزيم:-

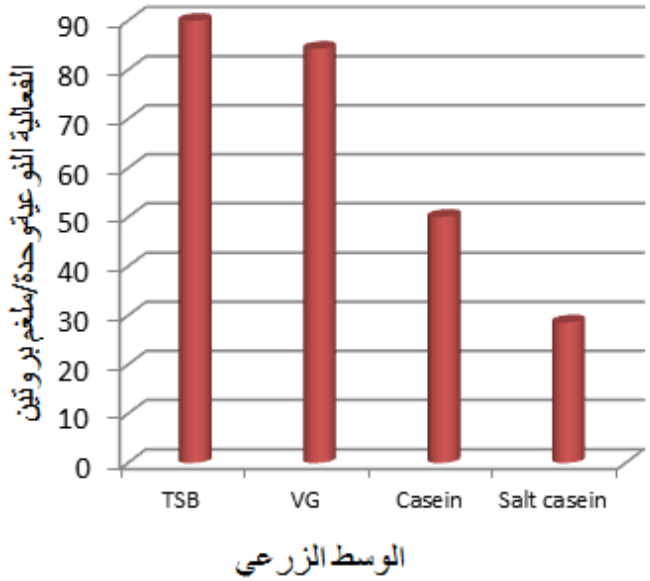
تم متابعة انتاج انزيم البروتيز من العزلة البكتيرية قيد الدراسة من خلال مدد حضن مختلفة (12و 24و 36 و 48 و 60 و72) ساعة . واظهرت النتائج الموضحة في شكل (4) ان انزيم البروتيز يبدا انتاجه في الساعات الاولى من الحضن اذ بلغت الفعالية النوعية له (68.4) وحدة /ملغم بروتين بعد مرور 12 ساعة من الحضن في درجة حرارة 35م° فضلا عن ذلك ظهرت زيادة تدريجية في انتاج البروتيز بزيادة مدة الحضن اذ وصلت الفعالية النوعية الى اقصاها خلال 36 ساعة حيث بلغت (97) وحدة /ملغم بروتين بعدها انخفضت الفعالية النوعية بزيادة مدة الحضن حتى وصلت الى (51.3) وحدة /ملغم بروتين بعد حضن 72 ساعة يمكن ان يعزى انخفاض الفعالية النوعية بزيادة مدد الحضن الى نفاذ المادة الغذائية من الوسط الزرعي ودخول البكتريا في طور الثبات ثم طور الموت اذ تتحلل الخلايا وتطلق مجموعة من المركبات التي قد تؤثر في فعالية الانزيم كما قد يعود سبب انخفاض الفعالية النوعية إلى التأثيرات السلبية المحتملة للنواتج الايضية المتكونة مع استمرار نمو البكتريا بمرور الزمن إذ ينعكس ذلك سلبا على الإنزيم وقد يحصل هضم ذاتي للإنزيم [28] وأشار [29] الى إن أفضل مدة حضن كانت (16) ساعة لإنتاج إنزيم البروتييز من بكتريا *Ps. aeruginosa* . وبين [22] إن أفضل مدة حضن كانت (18) ساعة لإنتاج إنزيم البروتييز من بكتريا *Ps. aeruginosa* و باستخدام حاضنة هزازة . ذكر في دراسات اخرى ان فعالية الانزيم لهذه البكتريا تبدأ بالظهور بمستوى منخفض بعد التلقيح مباشرة وان البكتريا

تدخل مرحلة النمو اللوغارتمي بعد ساعتين ثم تدخل طور الثبوت بعد (16) ساعة اثناء ذلك تبدأ فعالية الانزيم بالزيادة سيما بعد (18) ساعة من بدء النمو إذ تستمر الزيادة خلال طور الثبوت و لكن استمرار الحضن حتى (48) ساعة في درجة (35) م˚ يؤدي الى انخفاض فعالية الانزيم الى مستوى متدني مشيرا الى احتمالية تعرض الانزيم الى التحلل الذاتي(Autolysis).[28,30]



شكل (3) تاثير مدة الحضن في معدلات انتاج انزيم البروتيز من العزلة p5

الوسط الأمثل لإنتاج البروتييز:- لتحديد الوسط الزرعي الملائم في انتاج البروتيز من قبل العزلة المحلية المنتخبة اختبرت اربعة اوساط زرعية مختلفة في محتواها من المصادر الكربونية والنتروجينية. تشير النتائج الموضحة في شكل (5) الى تميز الوسط الغذائي تربتك صويا السائل (TSB) في انتاج البروتيز عن الاوساط السائلة الاخرى اذ بلغت الفعالية النوعية (90) وحدة / ملغم بروتين) ثم جاء الوسط (VG) الذي بلغت الفعالية النوعية له (84.3) وحدة/ملغم بروتين وجاء بعده الوسط (casein) الذي بلغت الفعالية النوعية له (50.1) وحدة / ملغم بروتين وأخيرا جاء الوسط Salt casein broth إذ كانت الفعالية النوعية (28.6) وحدة/ملغم بروتين. ويعزى تباين إنتاج البروتييز من قبل العزلات إلى الاختلاف في مكونات الوسط الزرعي واحتوائه على الكاربوهدرات والمركبات البروتينية و الأملاح وغيرها من المواد التي تساعد على زيادة الإنتاج فإذا كانت المواد بسيطة يمكن استغلالها بسهولة في الوسط واذا كانت المواد معقده يصعب استغلالها[31] . وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسات [13, 22] الذين بينوا إن أفضل وسط لإنتاج إنزيم البروتييز من بكتريا *Ps. aeruginosa* كان وسط تربتك صويا السائل في حين لم تتفق هذه النتائج مع دراسة الشويخ [32] التي بينت إن أفضل وسط لإنتاج إنزيم البروتييز من بكتريا *Ps. aeruginosa* كان وسط Luria broth .



شكل (4) تاثير نوع الوسط الزرعي في معدلات انتاج انزيم البروتيز من العزلة p5

المصادر:

1. Katsuhiro Fuse, Shigern Fujimura, Toshiaki Kikuchi, Kazunovi Gomi, Yasuhiro Iida, Toshihiro Nukiwa, Akira Watanabe (2013). Reduction of virulence factor pyocyanin production in multidrug, resistance pseudomonas aeruginosa. J. infect chemother (2013) 19:82-88.
2. Wu, H., Song, Z.,Givskov, M.,Doring, G.,Worlitzsch, D.,Mathee, K., Rygaard, J. and Hiby, N. (2001). Pseudomonas aeruginosa Mutation in IasI and rhII quorum sensing systems result in milder chronic lung infection . Microbiology., J.General Microbiology .147:1105-1113.
3. Qarah, S. (2004). Pseudomonas aeruginosa. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
4. P. H. Thibodean, M. B. Butter Worth (2013). Protease, cystic fibrosis and the epithelial sodium channel (E NaC). Cell Tissue Res. (2013) 351: 309-323.

15. Segel، I. H. (1975). Biochemical calculations. John Wiley and Sons. New York, Chichester, Toronto, Singapore.
16. Sharma, J.; Singh, A.; Kumar, R. & Mittal, A. (2006). Partial purification of an alkaline protease from Aspergillus oryzae AWT20 and its enhanced stabilization in entrapped ca-alginate beads. Int. J. Microbiol. 2 (2): 98-106.
17. Holt، TG. Krieg،NR. Sneath، PH. Staley، JT. & Williams، ST. (1994) . Bergey,s Manual of Deter minative bacteriology . 9th ed. U.S.A .
18. Wilderman, P.J.; Vasil, A.I.; Johnson, Z.; Wilson, M.J.; Cunliffe, H.E.; Lamont, I.L. & Vasil, M.L. (2001). Characterization of an endoprotease (Prpl) encoded bya Pvds- regulated gene in Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun.69 (9): 5385-5394.
19. Wretlind, B. & Wadstrom, T. (1977). Purification and properties of a protease with elastase activity from Pseudomonas aeruginosa . J. General. Microbiol. 103: 319-327.
20. كاظم،شيماء اسماعيل (2004) .دراسة فطريات الجلود وقابلية بعضها على انتاج انزيم البروتيز .رسالة ماجستير –كلية العلوم البنات – جامعة بغداد.
21. Bull, A. I. and Bushnell, M.E. (1976). Environmental control of fungal growth. In : The filamental Fungi. (eds. Smith, I.E. and Berry, D.E.) Vol. 2, PP. 1-26. Edward Arnold, London.
22. Vessillier، S. ; Delolme، F. ; Bernillon، J. ; Saulnier، J. and Wallach، J. (2001) . Hydrolysis of glycine – containing elastin pentapeptides by Las A، a Metalloelastase from Pseudomonas aeruginosa . Eur . J. Biochem. 268 : 1049-1057 .
23. AL-Douri, S.S. (2003). Characteristics of alkaline protease produced by Pseudomonas aeruginosa .M.Sc. thesis, Al-Nahrain University. Baghdad . Iraq .
24. Coin, D.; Louis, D.; Bernillon, J.; Guinand, M. and Wallach, J. (1997). LasA, alkaline protease and elastase in clinical strains of Pseudomonas aeruginosa : quantification by immunochemical methods.FEMS Immun. Med. Microbiol. 18 (3): 175-184.
25. Chaia، A.A. ; Giovanni –De-Simone، S. ; Petinate، S. D. ; Lima، A.C. ; Branquinha، M. H. and Vermelho، A. B. (2000) . Identification and properties of two extracellular proteases from Brevundimonas diminuta . Brazilian Journal of Microbiology . 31 : 25-29 .
5. Serralheiro، M. and Freire، A. (2002) . Teaching of Biotechnology in the Biochemistry course . Electronic Journal of Biotechnology . 5(3) : 0717-3458 .
6. Nunes, A.S. & Martins, M.L.L. (2001). Isolation,properties and kinetics of growth of a thermophilic Bacillus. Braz. J. Microbiol., 32: 271-275.
7. Charles,P.;Devanathan,V.;Anbu,P.;Ponnuswamy,M. N.;Kalaichelv,P. T.&Kihur,B.(2008).Purification,Characterizationandc rystallization of an extracellular alkaline protease from Aspergillus nidulans HA-10.J.Ind.Microbio..48:347-352.
8. Kooi,C.;Corbett,C.R.and Sokl,P.A.(2005).Functional analysis of the Burkholderia cenocepacia Zmp A metaloprotease.J.Bacteriol 187(13):4421-4429.
9. Rao, M. B. ; Tanksale, M. A.; Chatge, M. S. and Deshpande, V. V. (1998). Molecular and Biotechnological aspects of Microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (3): 597 -635 .
10. Engel,L.S.;Hill,J.M.Caballero,A.R.;Green,L.C.andO' Callaghon,R. J.(1998).Protease IV،a unique extracellular protease and virulence factor from Pseudomonas aeuginosa .J.Biol.Chem.273:16792-16797.
11. Ogino, H.; Watanabe, F.; Yamada،M .; Nakagawa, S.; Hirose, T.; Noguchi،A.; Yasuda, M. and Ishikawa, H.(1999).Purification and characterization of organic solvent –stable protease from organic solvent–tolerant Pseudomonas aeruginosa PST-01.J. Biosci. Bioeng. 87:61-68.
12. Baron،E.F.; and Fingold,S.M.(1990) .Baily and Scott Diagnostic Microbiology C.V. Mosby Company، st .ious .Batihore،Philadelphia Tornoto.
13. Barequet، I.S.; Simon, G.J.; Safrin, M.; Ohman, D. and Kessler, E. (2004). Pseudomonas aeruginosa LasA protease in treatment experimental staphylococcal keratitis. Anti. Agent Chemther. 48 (5): 1681-1687.
14. Bradford،M.M. (1976). Arapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Anal. biochem. 72: 248-254.

جدول (1) خطوات تنقية انزيم البروتيز من العزلة *Ps. Aeruginosa*

خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية الإنزيمية (وحدة / مل)	الفعالية الكلية (وحدة)	تركيز البروتين (ملغم / مل)	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم بروتين)	عدد مرات التنقية	الحصيلة %الإنزيمية
المستخلص الخام	500	27.6	13800	0.310	89.0	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم مع الديلزة	15	135.3	2029.5	0.673	201	2.25	14.7
Ion-exchange chromatography DE-AE cellulose	10	210	2100	0.225	933.3	10.4	15.2

26. Ward,O.P.(1983).Proteinases in Microbial Enzymes and Biotechnology (ed:WM . Fogarty). Applied Science Publishers. England .
27. Fullbrook،P.D.(1983) . Practical limits and prospects .IN.Industrial enzymology. The application of enzymes .T.Godfery and J.Reichelt,eds. The Natural press .London.
28. Chuweihua, L.U. C. (2001). Purification of protease from Aeromonas and using as Immunization factor. J. of Nanjing Agricultural University.(3) : 65-68.
29. Vessillier، S. ; Bernillon، J. ; Saulnier، J. and Wallach، J.(1997).Capillary electrophoresis in the assay of the hydrolysis of glycine–containing peptides by a protease from Pseudomonas aeruginosa . Journal of Chromatography A . 776 : 133-137 .
30. Jewell, S.N.(2000).Purification and characterization of novel protease from Burkholderia strain 2.2 N. Master thesis submitted to the department af Biology, State University, Blacksburg, VA.
31. Milazo، F.H. and Dehsle، G. J. (1984) . IgG protease in G-ve bacteria isolate from human urinary tract infection . Immune. 43 : 11-13 .
32. الشويخ ، رنا مجاهد عبد الله .(2006). انتاج وتوصيف Protease من بكتريا Pseudomonas aeruginosa المعزولة من حالات مرضية وعلاقته ببعض مضادات الحياة . أطروحة دكتوراه. كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .

STUDY OF OPTIMUM CONDITIONS FOR PROTEASE ENZYME PRODUCTION BY PSEUDOMONAS AERUGINOSA ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL SOURCES.

MOHAMMED KH. MAHMUOD AHMED M. TURKEY AHMED A. SULAIMAN

ABSTRACT:-

Fifteen isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical sources (4 from ear, 3 from wounds, one from sputum, 3 from urine, 3 from burns, and one isolates from cerebral spinal fluid), these isolates were tested to know its efficiency to produce protease in liquid and solid medium in primary and secondary screening stages. Isolate marked as P5 obtained from burns infection was more efficient one in protease production. The optimum(temperature, pH,incubation period, and culture medium) for enzyme production were determined and the result showed that pH 8، temperature 35 °C، incubation period 36 hrs were optimal conditions and tryptic soy broth medium for protease production.