

## تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم اللايسوزايم من البكتريا المحبة للحرارة *Bacillus stearothermophilus*

انسام رحيم محمود عيسى صالح مهدي صفاء عبد الرحيم محمود

وزارة العلوم والتكنولوجيا / دائرة البحوث الزراعية – مركز التقانات الاحيائية والغذائية

بغداد – العراق

### الخلاصة

انزيم اللايسوزايم ذي اهمية كبيرة لجسم الانسان لانه يلعب دورا مهما في الجهاز المناعي حيث يعمل كمضاد حيوي طبيعي لحماية جسم الانسان من الاصابة بالبكتيرية الممرضة. هدف البحث الى تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم اللايسوزايم بواسطة البكتريا المحبة للحرارة *Bacillus stearothermophilus* من خلال اصابتها بالعائثي والذي عزل من التربة لهذا الغرض. حيث ان الاصابة بالعائثي تحفز الخلية البكتيرية على انتاج الانزيم ومن ثم تحلل الخلية لاطلاق العائثي بعد تكاثره داخل الخلية.

اظهرت النتائج الاحصائية ان الفعالية القصوى للعائثي في مهاجمة الخلايا البكتيرية ونتاج الانزيم كانت في النصف ساعة الاولى من فترة الحضان. بينما كانت أفضل درجة حرارة له بمدى تراوح بين 55-60 م° وكانت اعلى فعالية للعائثي المعزول من التربة في محافظة بغداد بالمقارنة مع المناطق الاخرى من العراق وجد اقصى انتاج للانزيم عند استعمال المرق المغذي كوسط زرع. وبقيمة دالة حمضية 7.2 مقارنة مع اوساط اخرى.  
الكلمات المفتاحية: لايسوزايم، باسلس ستيروثيرموفلس والعائثي.

## Determination of Optimum Conditions for Lysozyme Production by Thermophilic Bacteria, *Bacillus stearothermophilus*

Ansam Raheem Mahmoud Issa Salih Mahdi Saffa Abd AL Raheem

Ministry of Science and Technology / Agricultural Research Directorate-  
Food and Biotechnology Center.

Baghdad – Iraq

E\_mail: [ansambio95@gmail.com](mailto:ansambio95@gmail.com)

### Abstract

Lysozyme enzyme is of great importance to the human body because it plays an important role in the immune system as it acts as a natural antibiotic to protect the human body from pathogenic bacterial infection. The aim of this research is to determine the optimal conditions for producing lysozyme by the thermophilic bacteria *Bacillus stearothermophilus*. Infected bacterial phage was isolated from local soil. Infection with the phage stimulate bacterial cell to produce lysozyme then lyses cell wall and release a new phage generation. The statistics results showed that the maximum phage activity in attacking bacterial cell and producing lysozyme at the first 30 minutes of incubation period at a temperature of (55– 60) °C. The best phage isolate was from Baghdad soil in comparison with another region of Iraq. Maximum lysozyme production was found when using the nutrient broth medium in comparison with another media at a pH of (7.2).

**Key Words:** lysozyme, *Bacillus stearothermophilus* and Bacteriophage.

## المقدمة

والمكونة للسبورات في مختلف الظروف المحيطة والبيئية وغير الاعتيادية حيث توجد السبورات بشكلها الكامن وتعيش هذه البكتريا اما منفردة او بشكل سلاسل وتنمو هذه البكتريا بدرجات حرارة تتراوح بين 30-75 م° (Class وأخرون 1986).

تصاب هذه البكتريا بالعائيات التي تعمل على تحفيزها انتاج انزيم اللايسوزايم، حيث يوجه العائى الخلية لانتاج انزيم اللايسوزايم والذي يحطم جدار الخلية البكتيرية فتنتج الخلية نتيجة لدخول الماء وتنفجر مطلقة دقائق الفاجات الجديدة وتنقل هذه الفاج جزء من (DNA) البكتيريا الى بكتيريا اخرى عندما تصيبها فيما يسمى الانتقال الفيروسي (Vincent, 2003) (Yong واخرون 2008). ان الانزيمات تمارس تأثيرها المميت وذلك بهضمها لطبقة الببتيدوكلايكان في مناطق محددة وتشكيل ثقب في جدار الخلية وبما ان الضغط الاوزموزي داخل الخلية البكتيرية يساوي ما يقارب ثلاثة اضعاف الضغط الجوي فانه يؤدي الى قذف الغشاء السايبتوبلازمي للخارج وفي النهاية يحدث تحلل منخفض التوتر (Hypotonic Lyses) (Gabriel, 2013) و(Callewaer, 2008) وبشكل عام بإمكان مقدار من الانزيم الحال (نانوغرام الى مايكرو غرام) في الملمتر الواحد قتل او تعقيم 107 مل من المعلق البكتيري في ثوان وتعتبر هذه الطريقة في قتل البكتريا بواسطة الانزيمات الحالة بفعل العائى اسرع وأفضل طريقة ولم تكتشف حتى الان اي طريقة اخرى اسرع منها. وتعتبر هذه الطريقة تنويجا لملايين السنين من التطور للبكتريا والعائى (Wang, 2000).

يهدف البحث الحالي الى ايجاد الظروف المثلى لتنمية البكتريا المحبة للحرارة والمعزولة من التربة المحلية وتحفيزها بالعائى لإنتاج انزيم اللايسوزايم وبكفاءة اقل من انتاجه عالميا.

## المواد وطرائق العمل

## العزلة البكتيرية المستخدمة

استخدمت البكتريا المحبة للحرارة *Bacillus stearothermophilus* المشخصة مسبقا في عزل

اكتشف انزيم اللايسوزايم من قبل العالم الاسكتلندي ألكسندر فيلمنك عام 1921 وهو عبارة عن انزيم ينتمي الى مجموعة الانزيمات الحالة (Hydrolases Enzymes) ويوصف علميا (N-acetylhexosaminidase) ويصنف (Muramidase) ويحتمل التصنيف (Ec.3.2.1.17) ينتشر اللايسوزايم بشكل واسع في الطبيعة وخاصة في بياض البيض والافرازات الجسمية كالدموع واللعاب والاعشية المخاطية وحليب الام وخلايا الدم البيضاء (Leucocytes) فضلا عن الاحياء المجهرية والفايروسات والعائيات والحشرات والنباتات. (عبد الرحمن, 2006). يتميز انزيم اللايسوزايم بخواص تثبيطية لانواع مختلفة من الاحياء المجهرية حيث يستخدم كمادة حافظة طبيعية في صناعة الاغذية وكمضاد حيوي طبيعي ويعتبر انزيم اللايسوزايم اول انزيم عرف تسلسل الحوامض الامينية (Amino Acids). اذ يتالف من سلسلة ببتيدية واحدة حاوية على 129 حامض اميني واعتمادا على ذلك فقد صنفت انواع متميزة على اساس تتابع الحوامض الامينية والاوزان الجزيئية والفعالية التحفيزية والخواص الانزيمية والتفاعلات الصناعية (عبد الرحمن, 2009) و(Ito, 1981).

يعمل انزيم اللايسوزايم على شق الاصرة الرابطة بين (N-acetylmuramic Acid) (NAM) و(N-acetylglucosamine) (NAG) وقد وجد هذا الشكل التركيبي لوحدة الببتيدوكلايكان في بعض جدران الخلايا البكتيرية ويتسبب هذا الانزيم في تحلل خلايا البكتريا وبذلك يساعد في حماية الجسم بصورة عامة من البكتريا (Noreddin, 2008). يمكن البكتريا *Bacillus stearothermophilus* النمو بدرجات حرارة عالية تصل الى 65 م° او أكثر احيانا لمدة 18 ساعة وتتواجد هذه البكتريا المحبة للحرارة

الضوئي، وذلك بعد تصفير الجهاز Blank لوسط الزرعي بدون البكتريا وعلى طول موجي 450 نانوميتر (عبد الرحمن, 2006).

### 3-أفضل درجة حرارة للنمو

تمت تنمية البكتريا المعرضة للعائثي وبدرجات حرارة مختلفة وعلى التوالي (60,45,37) م° وبعد مرور فترة تتراوح بين 5-6 ساعات اخذت عدة قراءات وعلى طول موجي 450 نانوميتر وبفاصل زمني نصف ساعة بين قراءة واخرى (عبد الرحمن, 2009).

### 4-أفضل وسط لمغذي

تمت المقارنة بين وسطي لورياالصلب (Luria Agar) ووسط المرق المغذي الصلب (Nutrient Agar) في قابليتهما على النمو البكتيري الأفضل لانتاج انزيم اللايسوزايم. وزرعت الاطباق بنفس الظروف من درجة حرارة 60 م° دالة حمضية 7.2 وفترة حضانة للبكتريا 4 ساعات.

### النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج عزل العائثي البكتيري ان أفضل تربة لاختيار العائثي كانت في بغداد (ا) تليها كربلاء (ب) ثم النماذج من محافظة الأنبار (ج) ومن خلال ملاحظة مناطق التحلل البكتيري في اطباق الزرع وقياس مساحة نصف قطر دائرة التحلل ظهرت منطقة التحلل البكتيري بصورة واضحة وبقطر وصل الى 30 ملم من نموذج التربة لمدينة بغداد مقارنة مع منطقة تحلل غير كاملة وغير واضحة وبقطر 20 ملم نتجت عن معاملة البكتريا بعالق التربة لمحافظة كربلاء اما نموذج محافظة الانبار (ج) فلم يظهر اي تأثير للعائثي ولم تلحظ اي منطقة تحلل واضحة وكما في شكل (1).

اجريت عدة تجارب لقياس الوقت اللازم لأفضل فعالية لأنزيم اللايسوزايم والتي بينت وجود فعالية للعائثي في تحفيز الانزيم خلال النصف ساعة الاولى ثم تنتهي فعاليته شكل (2) وقد يعزى ذلك الى تداخل عاملين يؤثران في معدل عمل الانزيم (اي ارتفاع عمله ثم انخفاضه بعد فترة من الزمن وبدرجة حرارة معينة)

العائثيات من التربة وتمت تنمية العزلات النقية تحت درجة حرارة 60 م° لمدة 18 ساعة كما تم تحديد شكل البكتريا ووجود السبورات وموقعها من الخلية الام (الخفاجي, 2009).

### عزل المعلق البكتيري

اخذ 1غم من سطح التربة ومن مناطق مختلفة (بغداد، الانبار وكربلاء) ومن مناطق معرضة للحرارة أكثر من غيرها وعلقت في 9 مل ماء مقطر في انبوبة اختبار. وضع انبوب الاختبار الحاوي على المعلق اعلاه في حمام مائي بدرجة حرارة 80 م° ولمدة 10 دقائق وذلك للتخلص من الخلايا الخضرية للحياء المجهرية من الانواع الاخرى. ثم نبذ المعلق اعلاه في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق لغرض فصل الراشح عن الراسب في انبوبة الاختبار. رشح المعلق بواسطة المرشح الدقيق (Millipore Filter) بحجم 0.45 مايكروليتر للحصول على العائثي فقط. وتم وضع الراشح (العائثي) على طبق الوسط الزرعي الحاوي على البكتريا وذلك في مناطق محددة من الطبق وتركه لفترة وجيزة وذلك ليتم امتصاصه من قبل الوسط الزرعي ثم وضع في حاضنة بدرجة حرارة 60 م° لمدة 6 ساعات ومراقبة مناطق التحلل للبكتريا. (الخفاجي, 2009) و(Grady, 1966).

### تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم اللايسوزايم

#### 1-أفضل منطقة عزل للعائثي

اخذت عدة نماذج مختلفة من الترب لغرض عزل العائثي من عدة محافظات مختلفة وهي بغداد والانبار وكربلاء. وعزل العائثي منها وعوملت البكتريا مع كل نموذج على حدة ولنفس ظروف التنمية من درجة حرارة ووسط زرعي.

#### 2-الوقت الامثل لنمو البكتريا

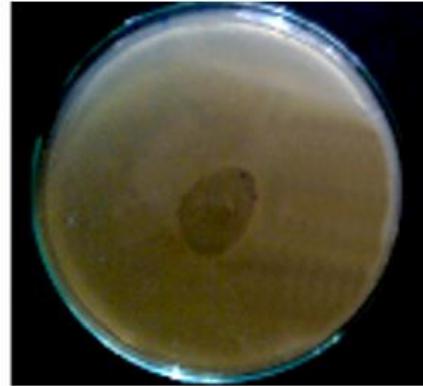
حدد الوقت الامثل للنمو وذلك بتنمية البكتريا على الوسط الزرعي ولمدة 6 ساعات، وعرضت للعائثي واخذت قراءات متعددة وعلى فترات متساوية، لمدة نصف ساعة بين قراءة واخرى بواسطة جهاز المطياف

بفعل الحرارة وهذا يتفق مع البحوث المنشورة سابقا في هذا المجال كما اشار الى ذلك كل من العالمين (2008 ,Yong) و(2006 ,Ing-Nang).

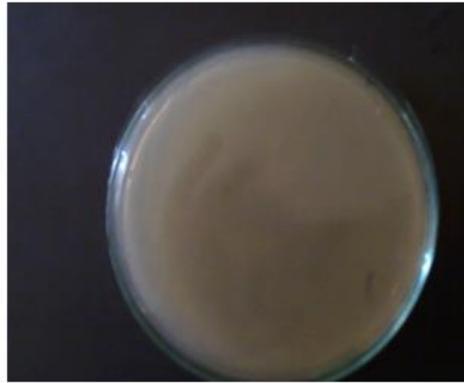
اولهما زيادة الطاقة الحركية لكل من الانزيم, مادة التفاعل substrate والآخر زيادة فرصة التصادم بين الانزيم ومادة التفاعل كنتيجة لزيادة معدل حركتهما



ب- نموذج كربلاء

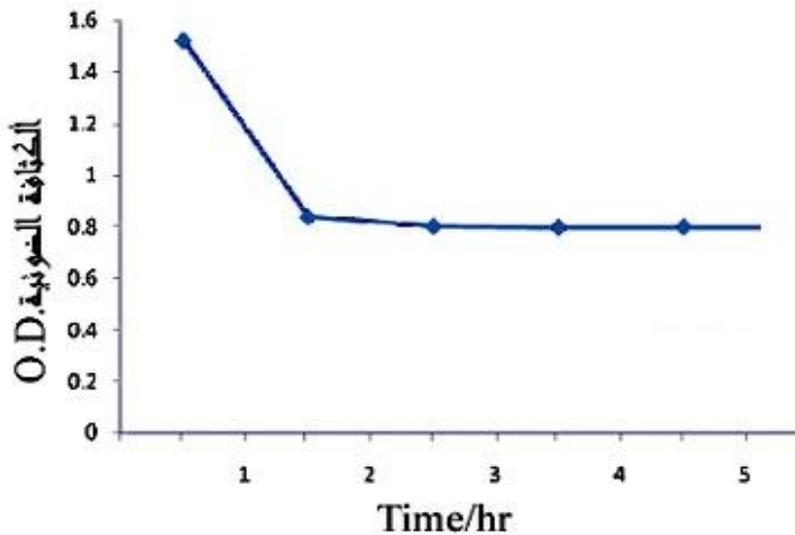


أ- نموذج بغداد

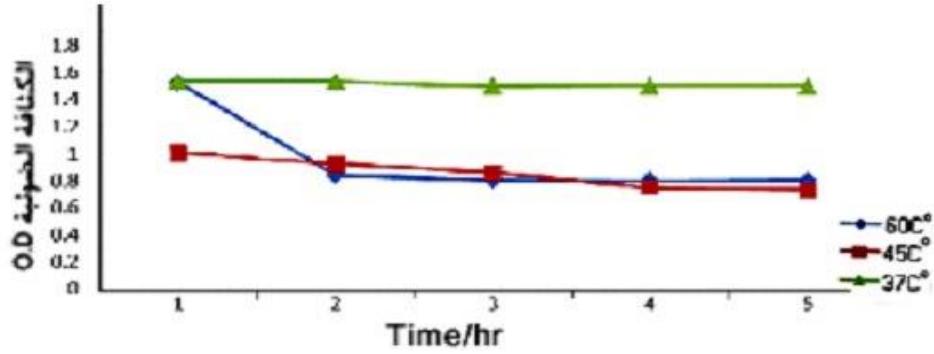


ج- نموذج الإنبار

شكل (1) مناطق التحلل البكتيري بفعل العاثي المعزول من نماذج ترب محلية مختلفة



شكل (2) تأثير الوقت في فعالية البكتريا المحبة للحرارة المصابة بالعاثي البكتيري على انتاج انزيم اللايسوزايم



شكل (3) تأثير درجات الحرارة في فعالية البكتريا المحبة للحرارة بعد اصابتها بالعائي البكتيري على انتاج الانزيم اللايسوزايم

#### الوسط المغذي الأفضل

بينت نتائج تجربة المفاضلة بين وسطي المرق المغذي الصلب ووسط لوريا المغذي الصلب ان منطقة التحلل تكون أكبر وأكثر وضوحا عند استخدام وسط المرق المغذي لنمو البكتريا فكانت مساحة نصف قطر دائرة التحلل 30 ملم بالمقارنة مع الوسط لوريا المغذي والتي كانت بقطر اقل من 20 ملم وكذلك اقل من حيث كثافة النمو البكتيري ووضوح منطقة التحلل وكما موضح في شكل (4).

#### الوسط المغذي الأفضل

بينت نتائج تجربة المفاضلة بين وسطي المرق المغذي الصلب ووسط لوريا المغذي الصلب ان منطقة التحلل تكون أكبر وأكثر وضوحا عند استخدام وسط المرق المغذي لنمو البكتريا فكانت مساحة نصف قطر دائرة التحلل 30 ملم بالمقارنة مع الوسط لوريا المغذي والتي كانت بقطر اقل من 20 ملم وكذلك اقل من حيث كثافة النمو البكتيري ووضوح منطقة التحلل وكما موضح في شكل (4).

#### الاستنتاج والتوصيات

من خلال النتائج المبينة في البحث اعلاه وبعد استكمال التجارب الاخرى المطلوبة يمكن انتاج انزيم اللايسوزايم صناعيا بواسطة الاحياء المجهرية المعرضة للإصابة بالعائي والموجود في التربة المحلية وبكلفة اقل من انتاجه صناعيا من بياض البيض والذي يعتبر مادة غذائية مهمة.

بينت نتائج تأثير درجة الحرارة في فعالية ونمو البكتريا في انتاج انزيم اللايسوزايم الى زيادة فعالية العائي عند زيادة درجة الحرارة لتصل أقصاها عند درجة حرارة 60 م° حيث سجل اعلى قيمة لها، وبعد 60 دقيقة انخفضت وبشكل تدريجي مع الوقت حتى ينتهي تأثير العائي بعد فترة من الزمن وتعد هذه الدرجة الحرارية التي احتفظ بها الانزيم بكامل فعاليته هي درجة الحرارة المثلى لعمل الانزيم (Wang, 2008). وجد ان فعالية العائي في تحفيز انتاج الانزيم تتخفف عند درجة حرارة 45 م° بشكل ملحوظ وبفترة زمنية اقل، اما في درجة حرارة 37 م° فلم يلحظ اي تأثير للعائي على المزروع البكتيري وكما موضح في شكل (3).

يعود سبب ذلك الى التنشيط الذي يحصل للعائي في انتاج الانزيم عند انخفاض درجة الحرارة نتيجة كسر للعديد من الاواصر الهيدروجينية الضعيفة وبالتالي تغير التركيب الثلاثي للانزيم فيفقد قوته الحفزية وقد يحدث مسخ له ويفقد فعاليته بالكامل. (عبد الرحمن, 2009) و(Parkink, 1993). تشير البحوث الى ان السمة المشتركة لانزيم اللايسوزايم سواء المستخلص من الحيوانات كبيض الدجاج والنباتات كزهرة القرنبيط ونبات الديباج او المنتجة من الاحياء المجهرية تتمثل في كونها غالبا ما تكون فعالة في درجات الحرارة العالية نسبيا وغالبا ما تتميز الانزيمات التي لها درجات حرارية مثلى عالية بشتاتها الحراري العالي (Audy وآخرون, 1988).



ب - وسط المرق المغذي الصلب.



ا - وسط لوريا المغذي الصلب

شكل (4) مناطق تحلل البكتريا بفعل العاثي على وسط المرق المغذي الصلب مقارنة بوسط لوريا الصلب.

**Grady, F.;** Snders and Leon Campbell, L. (1966). Characterization of Thermophilic Bacteriophage for *Bacillus stearothermophilus*. J. Bacteriol. 91(1),340-8.

**ItO, K.A.** (1981). Thermophilic Organisms in Food Spoilage: Sulfide Spoilage Anaerobes. Journal of Food Protection. 44(2),157-163.

**Ing-Nang, W.** (2006). Lysis Timming and Bacteriophage Fitness. Genetics Society of America. DOI, 10.1534/Genetics.105.045922.

**Noreddine, B.** (2008). Antimicrobial Activity of Lysozyme with Special Relevance to Milk. African Journal of Biotechnology. 725(25), 4856-4867.

**Parkink, L.** (1993). Environmental Effects on Enzymes Activity. In T. Nagodawithana and G. Reed. Enzyme in Food Processing. Academic Press, Inc, New York, USA.273.

**Vincent, A.** and Fischetti (2003). Using Phage Lytic Enzyme to Kill Pathogenic Bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 52(6), 967- 973.

**Wang.** Ing-Nang; David, L.; Smith and Young, R.y. (2000) The Protein Clocks of Bacteriophage Infections. Annu. Rev. Microbiol. 54,799–825.

**Yongping Shao** and Ing-Nang Wang (2008). Bacteriophage Adsorption Rate and Optimal Lysis Time. Genetics Society of America, DOI: 10.1534/genetics.108.090100.

#### المصادر

**الخفاجي, سوسن مصطفى** (2006). فصل وتنقية وتوصيف جزئي للايسوزايم من عصارة نبات الديباج. مجلة العلوم الزراعية العراقية - (2)37, 97-104.

**عبد الرحمن, سوسن مصطفى** (2009). فصل وتنقية وتوصيف جزئي للايسوزايم من زهرة القرنابيط. مجلة العلوم الزراعية العراقية - (2)40, 11-119.

**Audy, P.;** Trudel, J., and Asselin, A. (1988). Purification and Characterization of a Lysozyme from Wheat Germ. Plant Science, 58(1), 43-50.

**Callewaert, L.;** Aertsen, A.; Deckers, D.; Vanoirbeek, K. G.; Vanderkelen, L.; Van Herreweghe, J. M. and Michiels, C. W. (2008). A New Family of Lysozyme Inhibitors Contributing to Lysozyme Tolerance in Gram-negative Bacteria. PLoS Pathog, 4(3), e1000019.

**Clas, D.** and Berkely, R.C.W. (1986). Genus Bacillus in Bergeys Manual of Systematic Bacteriology .2 ed. (Death, p.h.) PLoSPathog. 7,4(3), e1000019.doi: 10.1371/Journal.ppat. 1000019.

**Fischetti, V. A.** (2008). Bacteriophage Lysing as Effective Antibacterials: Curr Opin Microbiol. 11(5), 393–400.

**Gabriel, J.;** Mitchell; Wiesenfeld, K; Nelson, D.C. and Weitz, J.S. (2013). Critical Cell Wall Whole Size for Lyses in Gram-positive Bacteria, J. R. Soc. Interface.10(80), 1-5.