عزل وتنقية وتوصيف انزيم البروتييز المنتج من البكتريا *Pseudomonas fluorescens* ISH ودراسة دوره في تدهور نوعية الجبن الطري العراقي

2- استخلاص وتنقية وتوصيف انزيم البروتييز المنتج من البكتريا *P. fluorescens* ودراسة تأثيره في بروتينات الحليب .

زياد طارق السدرة * **عامر محمد علي صالح **** **غازي منعم عزيز *****

* مدرس- كلية الزراعة – جامعة ديالى - ziadsedrah@gmail.com
** استاذ - كلية الزراعة – جامعة بغداد - Salih1943@yahoo.com
*** استاذ - كلية العلوم – جامعة بغداد- Ghazi_m56@yahoo.com

المستخلص

نقي الإنزيم المنتج من البكتريا *Pseudomonas fluorescens* ISH بالترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 30 – 80 % ، وكروماتوغرافيا التبادل الأيوني بإستعمال المبادل DEAE-Sepharose والترشيح الهلامي على عمود Sephacryl S-200 ، وأمكن الحصول على عدد مرات تنقية 18.5 مرة وحصيلة إنزيمية مقدارها 32.8 % . وبلغ الوزن الجزيئي للانزيم 47.2 كيلو دالتون ، وبلغ الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية والثبات 8.0 و 7.5 على الترتيب ، وكانت درجة الحرارة المثلى للفعالية 40م ، وإحتفظ الإنزيم بكامل فعاليته عند حضنه 10 دقائق بدرجات حرارة تراوحت بين 30- 40 م . تبين ان البروتييز قيد الدراسة هو من مجموعة البروتييزات المعدنية (Metalloproteases) ، إذ فقد الإنزيم فعاليته تماماً عند إستعمال المادة الكلابية EDTA . كما تبين احتواء الإنزيم على نسبة عالية من الحوامض الأمينية الكارهة للماء والبرولين والسستئين ، وتبين ان الانزيم يمتلك الفة عالية للبيتاكازين مقارنة مع كازينات الحليب الاخرى.

الكلمات المفتاحية : *P.fluorescens*، Psychrotrophic bacteria ، انزيم البروتييز ، الجبن الطري.

المقدمة

يمثل جنس *Pseudomonas* نسبة لا تزيد عن 10% من الأحياء المجهرية في الحليب الطازج المحلوب حديثاً . وتعد *P. fluorescens* النوع الرئيس المسبب للمشاكل في مجال صناعة الألبان لكونها تنتج إنزيم البروتييز المقاوم للحرارة العالية الذي يحلل الكازينات مسبباً المرارة وحصول النسجة اللزجة في الأجبان الطرية ذات المحتوى الرطوبي 55-80% (Vyletelova و Hanus ، 2000) .

تعد البروتييزات (Proteases) من الإنزيمات الهاضمةالتي تحفز التحلل المائي للبروتينات ، اذ تعمل على تكسير البروتينات إلى ببتيدات وحوامض امينية ، وهي تمتلك أهمية خاصة كونها تؤدي ادواراً فسيولوجية وتطبيقات صناعية مهمة ، وتوجد في الكائنات الحية المختلفة كالنباتات والحيوانات والأحياء المجهرية (Bayoumi و Bahobil ، 2011) .

لم تدرس البروتييزات المنتجة من البكتريا *P. fluorescens* الملوثة للحليب الخام المعد لصناعة الجبن الطري في العراق بصورة مفصلة ، من حيث ظروف إنتاجها وطرائق تنقيتها وتوصيفها وطبيعة تركيبها ودراسة تأثيراتها في بروتينات الحليب ، لذا أجريت هذه الدراسة في محاولة لبيان الجوانب أعلاه بغية تنقية وتوصيف انزيم البروتييز المنتج من العزلة المحلية *Pseudomonas fluorescens* ودراسة تركيبه وتحديد دور هذا الإنزيم في تدهور نوعية الجبن الطري العراقي .

تاريخ تسلم البحث 16 / 7 / 2014 .
تاريخ قبول النشر 24 / 12 / 2014 .
البحث جزء من اطروحة دكتوراه للباحث الاول.
http://www.agriculmag.uodiyala.edu.iq/

المواد وطرائق البحث

إستخلاص إنزيم البروتييز :
أنتج إنزيم البروتييز من العزلة المحلية للبكتريا *Pseudomonas fluorescens* ISH بإستعمال الوسط التركيبي Minimal salts medium المدعم بـ 1% حليب فرز والملقح بـ 10^7 و ت م /مل بعد مدة حضن 96 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة 125 دورة / دقيقة ودرجة حرارة 15م . وتم التخلص من الخلايا البكتيرية بالطرد المركزي بسرعة 10000 xg لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4م.
تنقية إنزيم البروتييز : ركز المستخلص الإنزيمي الخام بإستعمال كبريتات الأمونيوم الصلبة ، وبغية اعتماد نسبة اشباع مثلى للترسيب فقد أختبرت نسب اشباع متدرجة بين 20 – 90 % ، وتم التحري عن الفعالية الإنزيمية في الراسب البروتيني . جرت بعدها خطوة تنقية بإستعمال كروموتوغرافيا التبادل الايوني بوساطة المبادل DEAE-Sepharose وكذلك باستعمال الترشيح الهلامي بوساطة المرشح الهلاميSephacryl S-200 ، وعينت نقاوة الإنزيم بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الأكريل امايدبوجود العوامل الماسخة(SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ، ثم جرى تعيين الوزن الجزيئي للإنزيم بطريقة الترشيح الهلامي وفقاً للطريقة الموصوفة منLaemmli(1970). ، وعين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم وثباته ودرجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيموالثبات الحراري للإنزيم وتأثير الأيونات الفلزية والكواشف في فعالية الإنزيم وفقا لما ورد في (Bisswanger2008) ، كذلك جرى تحديد تركيب الإنزيم من الحوامض الأمينية باتباع الطريقة التي وصفها Devaraj و Manjunatha (1999) ودراسة تأثير الانزيم في بروتينات الحليب باستعمال الطريقة الموصوفة من Mitchell و Marshall (1989) .

النتائج والمناقشة

بلغت الفعالية النوعية للإنزيم في راشح المزرعة 233.4 وحدة/ملغم بروتين ، جرى بعده تركيز المستخلص الإنزيمي الخام بإستعمال كبريتات الأمونيوم الصلبة ، وبعد التحري عن الفعالية الإنزيمية في الراسب البروتيني عينت نسب الإشباع 30 – 80 % لإجراء عملية الترسيب للمستخلص الخام لإنزيم البروتييز المنتج من *P.fluorescens* ISH . وقد أعطت خطوة التنقية هذه فعالية نوعية مقدارها 911.6 وحدة/ملغم بروتينبعدد مرات تنقية 3.9مرة وحصيلة إنزيمية بلغت 78.1% (الجدول 1) .

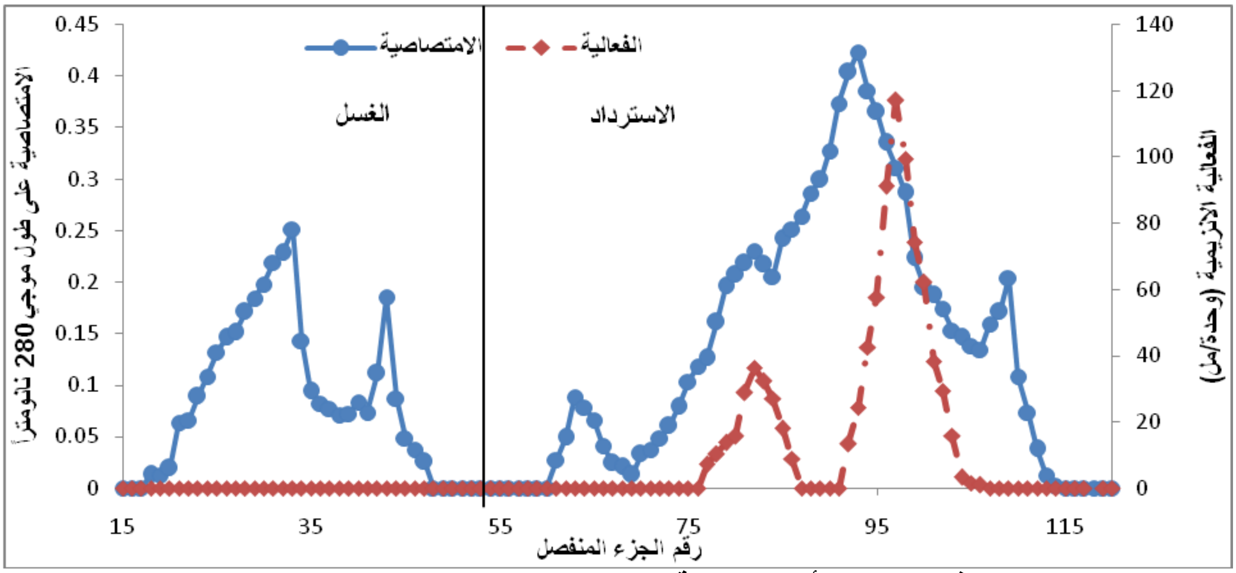
الجدول 1 . خطوات تنقية إنزيم البروتييز المنتج من العزلة المحلية لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* ISH .

خطوة التنقية	الحجم (مل)	الفعالية الإنزيمية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الإنزيمية %
المستخلص الإنزيمي الخام	100	63.50	0.272	233.4	6350	1.0	100.0
الترسيب بإستعمال كبريتات الأمونيوم 30 – 80 %	10	495.90	0.544	911.6	4959	3.9	78.1
التبادل الأيوني DEAE-Sepharose	25	2.79	0.040	2317.5	2317	9.9	36.5
الترشيح الهلامي Sephacryl S-200	15	138.80	0.032	4337.5	2082	18.6	32.8

حدث الترسيب في هذه الخطوة نتيجة لقيام كبريتات الأمونيوم بمعادلة الشحنات الموجودة على سطح الإنزيم ، فضلاً عن الإخلال (Disruption) بطبقة الماء المحيطة بـه مما يؤدي إلى تقليل ذائبيته ومن ثم ترسيبه (Whitaker، 1972).

تعد الإنزيمات الناتجة من خطوة الترسيب بكبريتات الأمونيوم إنزيمات منقاة جزئيا وذلك لتداخل مديات ذوبان البروتينات المختلفة ، ولغرض تنقية الإنزيم فقد تم إمراره بعد اجراء عملية التنافذ الغشائي على عمود التبادل الأيوني السالب DEAE-Sepharose الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار برقم هيدروجيني 7.0 .

أظهـرت هـذه الخطـوة وجـود قمـم بروتينيـة عـدة فـي كـل مـن أجـزاء الغسـل (Wash) والإسترداد (Elution) وامتلكت قمتان بروتينيتان فعالية إنزيمية في الأجزاء المستردة بالتدرج الملحي 0 – 1 مولار من ملح كلوريدالصوديوم (شكل 1) .



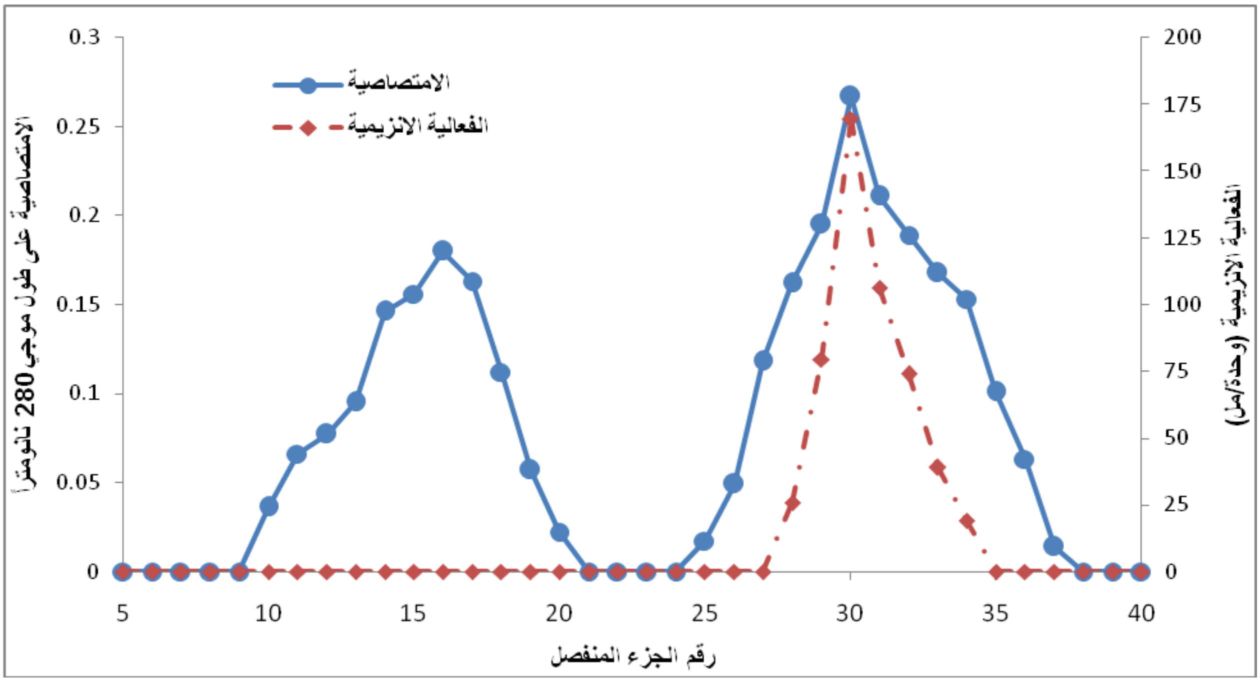
الشكل 1 . كروماتوكرافي التبادل الأيوني لتنقية إنزيم البروتييز المنتج من البكتريا *Pseudomonas fluorescens* ISH المعزولة من الجبن الطري العراقي ، بإستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-Sepharose(2.2×20 سم) ، تمت الموازنة بإستعمال محلول الفوسفات الدارئ بتركيز 0.05 مولار ورقم هيدروجيني 7.0 ، واستردت الأجزاء المرتبطة بالمبادل بمحلول الموازنة نفسه والمحتوي على تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم بين 0-1 مولار وبسرعة جريان 20 مل /ساعة وبواقع 2.5 مل للجزء الواحد

نظر الى وجود اكثر من قمة إنزيمية مفصولة ، فقد أختيرت قمة إنزيمية رئيسة واحدة في جزء الإسترداد لأجل تكملة خطوات التنقية والتوصيف اللاحقة، وقد اعتمدت القمة المتمثلة في الأنابيب (92-103) . بلغت الفعالية النوعية بعد خطوة التنقية بإستعمال المبادل الأيوني السالب2317.5 وحدة/ملغم بروتين فيما بلغ عدد مرات التنقية9.9 مرة والحصيلة الإنزيمية 36.5 % .

أن القمم البروتينية التي لم ترتبط بالمبادل الأيوني السالب وخرجت في جزء الغسل تعود إلى بروتينات تحمل محصلة شحنة موجبة منعتها من الإرتباط بالمبادل الأيوني المشابه لها بالشحنة ، اما البروتينات التي تحمل على سطحها شحنات مخالفة لشحنة المبادل فانها ترتبط بالمبادل بقوة تعتمد على صافي شحنتها ، وقد يكون الإرتباط شديداً وبذلك يحتاج الى زيادة تركيز الملح في دارئ الإسترداد للمساعدة على فصل مثل هذه البروتينات.

استكملت عملية تنقية محلول الإنزيم (بعد تركيزه بمادة السكروز) بإستعمال طريقة الترشيح الهلامي بعمود Sephacryl S-200، إذ تمت موازنة العمود والإسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار وبرقم هيدروجيني 7.0 المحتوي على 0.2 مولار كلوريد الصوديوم .

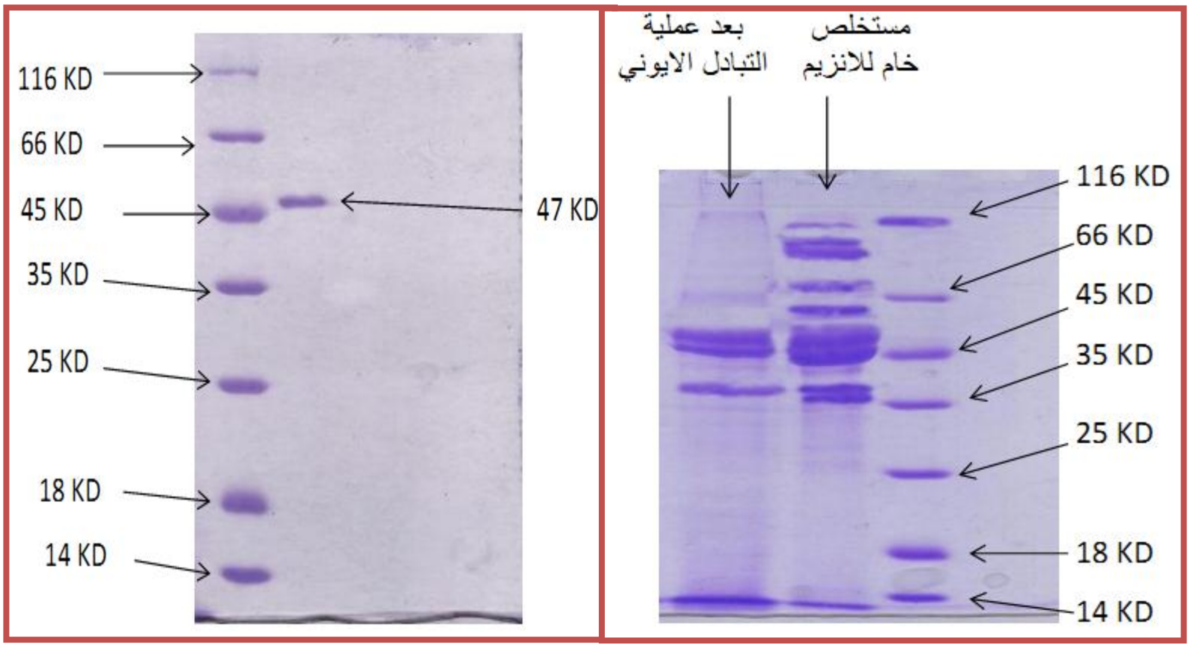
يلاحظ من الشكل 2 إنفصال قمتين للبروتين عند متابعة الإمتصاصية على طول موجي 280 نانومتر مع ظهور قمة واحدة للفعالية تركزت في قمة البروتين الثانية محصورة في الأجزاء 28 -34 ، إذ اظهرت هذه الأجزاء فعالية نوعية مقدارها 4337.5وحدة/ملغم بروتين وعدد مرات تنقية18.6 مرة وحصيلة إنزيمية 32.8 % .
إن خطوة التنقية بإستعمال الترشيح الهلامي كانت موفقة في إعطاء قمتي بروتين وقمة فعالية واحدة متطابقة مع قمة البروتين الثانية ، وهو أحد أدلة نقاوة الإنزيم (Whitaker، 1972).



الشكل 2 . كروماتوكرافي الترشيح الهلامي في عمود Sephacryl S-200بابعاد 1.8 x 100 سم لتنقية إنزيم البروتييز المنتج من البكتريا ISH *Pseudomonas fluorescens* المعزولة من الجبن الطري العراقي ، تمت الموازنة والإسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار وبرقم هيدروجيني 7.0 والمحتوي على 0.2 مولار كلوريد الصوديوم بسرعة جريان 12 مل/ساعة بواقع 2 مل للجزء الواحد.

فحص نقاوة الإنزيم بوساطة الترحيل الكهربائي

تمتلك خطوة فحص نقاوة الإنزيم أهمية كبيرة في تحديد كفاية خطوات التنقية ، إذ من الضروري إجراؤها قبل توصيف الإنزيم لأن وجود مواد أخرى غالباً ما يؤدي إلى إعطاء نتائج غير دقيقة ، وقد إستعملت أساليب عدة في فحص نقاوة الإنزيممنها الترحيل الكهربائي .
أجري الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الأكريل امايد بوجود العوامل الماسخة للبروتين ، ويبين الشكل(3 – أ) نتائج عملية الترحيل الكهربائي للمستخلص الإنزيمي الخام والمستخلص الإنزيمي بعد عملية التبادل الأيوني ، اما الشكل (3 – ب) فيمثل نتائج عملية الترحيل الكهربائي للجزء المتحصل عليه بعد خطوة الترشيح الهلامي، إذ يلاحظ ظهور حزمة بروتينية مفردة ، وهو دليل على نقاوة الإنزيم ، كما يعد هذا مؤشراً على كفاية عمليات التنقية الهادفة للتخلص من كل البروتينات المرافقة للإنزيم في المستخلص الخام .
تعتمد حركة البروتينات في هلام متعدد الأكريل آمايد بوجود العوامل الماسخة على الوزن الجزيئي فقط لهذه البروتينات ، إذ يتناسب مقدار حركتها عكسياً مع اوزانها الجزيئية ،اما في حالة غياب العوامل الماسخة فسيكون للشحنة دور مهم في حركة البروتينات ، الأمر الذي قد يؤدي الى اعطاء نتائج خاطئة أحياناً لتشابه أو تقارب محصلة الشحنة لبعض البروتينات (Lass، 1998).

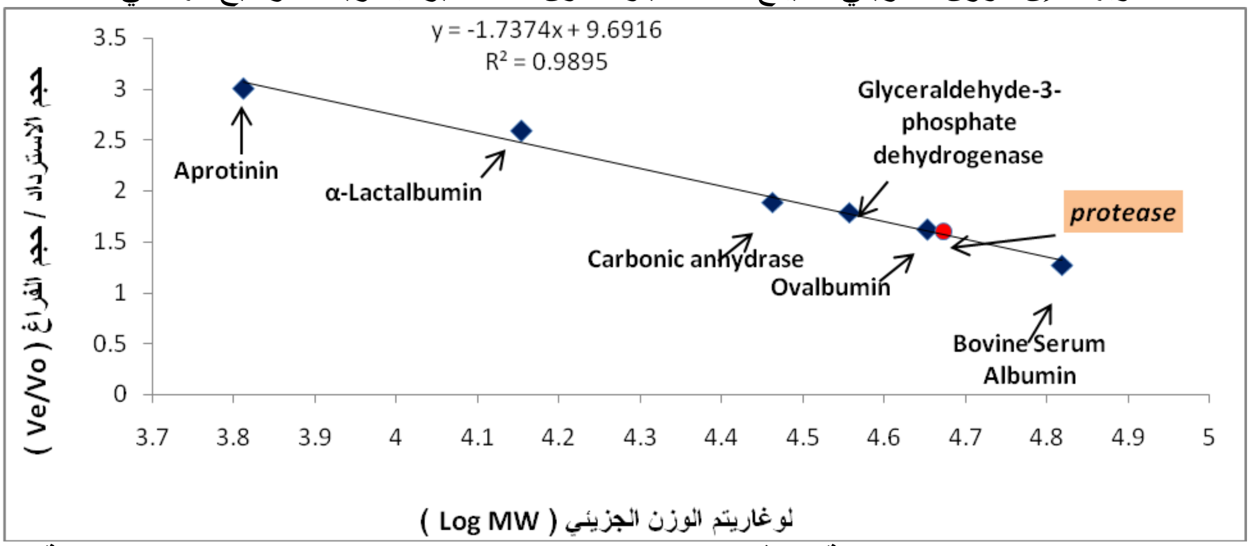


(ب) (أ)

الشكل 3 . الترحيل الكهربائي لإنزيم البروتييز المنتج من العزلة *P. fluorescens* ISH في هلام متعدد الأكريل امايد بوجود العوامل الماسخة للبروتين ، (أ) المستخلص الخام وبعد عملية التبادل الأيوني ، (ب) بعد عملية الترشيح الهلامي .

تقدير الوزن الجزيئي بطريقة الترشيح الهلامي

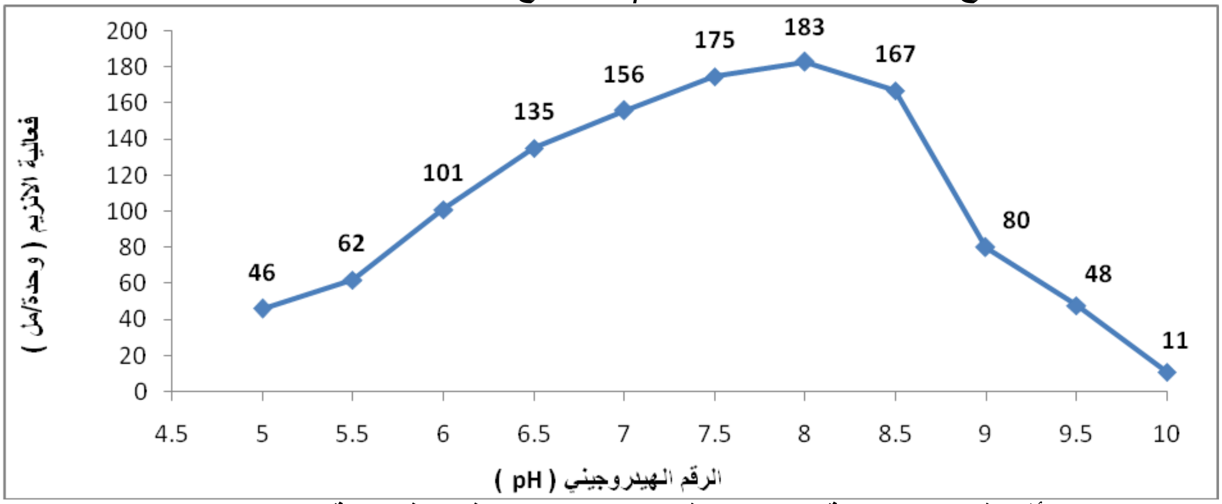
إستعمل عمود Sephacryl S-200 في تعيين حجم الإسترداد لصبغة الدكستران الأزرق لكونه يمثل حجم الفراغ (Void Volume -Vo-) ، كما تم تعيين حجوم إسترداد البروتينات القياسية المستخدمة (Elution Volume -Ve-) . حسبت نسبة حجم الإسترداد إلى حجم الفراغ (Ve/Vo)لكل بروتين ، ثم رسمت العلاقة بين نسبة حجم الإسترداد إلى حجم الفراغ للبروتينات القياسية ولوغاريتم الوزن ألجزيئي لها (الشكل 4) ، ومنه يتضح أن لوغاريتم الوزن الجزيئي للإنزيم قد بلغ 4.674 ، وبهذا فإن الوزن الجزيئي له يبلغ 47.2 كيلو دالتون عند تقديره بطريقة الترشيح الهلامي .



الشكل 4 . المنحنى القياسي ومعادلة التوقع لتقدير الوزن الجزيئي لإنزيم البروتييز المنتج من العزلة *Pseudomonas fluorescens* ISH بطريقة الترشيح الهلامي في عمود Sephacryl S-200.

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم

درس تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية البروتييز المنقى قيد الدراسة عند أرقام هيدروجينية 5 – 10 وبفارق نصف درجة ، إذ يظهر الشكل 5أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم كان 8.0 ، فقد بلغت الفعالية الإنزيمية 183 وحدة/مل ، بينما شهدت الفعالية الإنزيمية إنخفاضاً عند الأرقام الهيدروجينية الحامضية 5 – 6 والقاعدية 9 – 10 ، وبذلك يمكن الإستنتاج أن البروتييز المنتج من العزلة *P. fluorescens* ISH هو من مجموعة البروتييزات القاعدية التي تظهر اقصى فعالية لها في المحيط القاعدي ، وهي بذلك تشترك مع بروتييزات اخرى منتجة من اجناس وانواع مختلفة من الأحياء المجهرية ، إذ كان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية البروتييز المنتج من 114 *P. fluorescens* بين 8.0 – 8.5 (Hamamoto واخرون ، 1994) ، ووجدMu واخرون (2009) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية البروتييز المنتج من Rm12 *P. fluorescens* قد بلغ 7.5 .



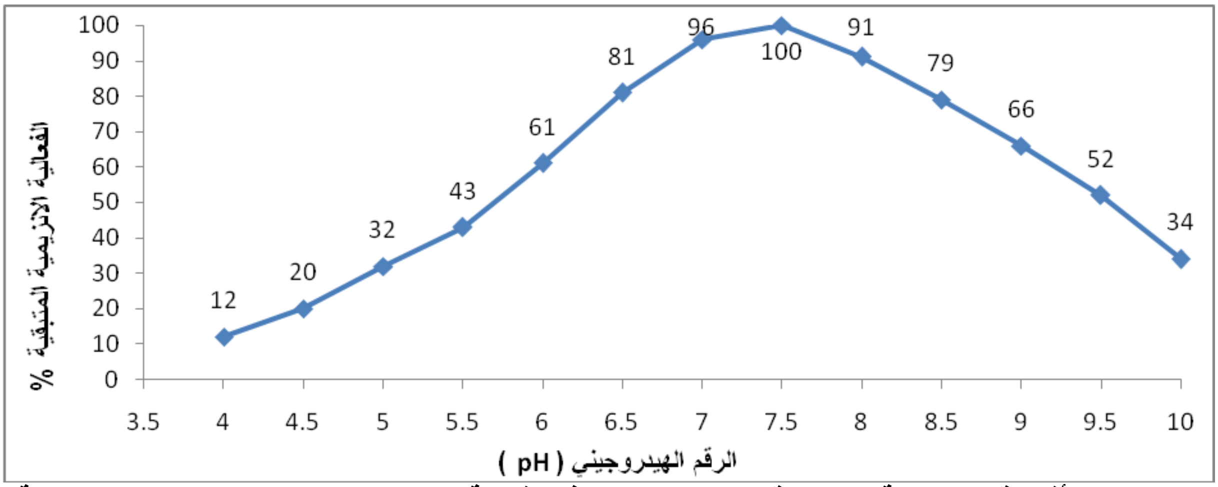
الشكل 5 . تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني في فعالية البروتييز المنتج من العزلة ISH*Pseudomonas fluorescens* بإستعمال الكازين بوصفه مادة أساس

تعاني الإنزيمات من تغيرات في الهيئة (Conformation) عند تغير الرقم الهيدروجيني بسبب تغير شحنات المجموعات الجانبية للحوامض الأمينية الداخلة في تركيب الإنزيم ، وانه عند وضع الإنزيم في محاليل ذات ارقام هيدروجينية متطرفة بعيدة عن نقطة التعادل الكهربائي له تزداد التنافرات الألكتروستاتيكية بين الشحنات المتشابهة ما يؤدي الى فتح الإلتفاف ، كما أن المجموعات القابلة للتأين الموجودة في الموقع الفعال للإنزيم يجب أن تكون بشكل أيوني ملائم للحفاظ على هيئة الموقع الفعال والإرتباط مع المادة الأساس وتحفيز التفاعل (Murray واخرون ، 2000) .

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم

يتبين من الشكل 6أن افضل ثباتية للإنزيم كانت في أرقام هيدروجينية بين 7.0 – 8.0 اي المتعادل الى القاعدي الضعيف ، إذ إحتفظ بما مقداره 91 – 100% من فعاليته

تقع هذه النتائج ضمن مدى الأرقام الهيدروجينية الذي حدده Mu واخرون (2009) لثباتية إنزيم البروتييز المنتج من Rm12 *P. fluorescens* والذي كان بين 6.0 – 9.0 ، كما وجد Illakkiam واخرون (2013) أن إنزيم البروتييز المنتج من *P. aeruginosa* قد إحتفظ بحدود 80% من فعاليته في مدى رقم هيدروجيني 5.0 – 9.0 ، اما إنزيم البروتييز المنتج من AT *p. putida* فقد إحتفظ بحدود 80% من فعاليته في مدى رقم هيدروجيني 7.0 – 9.0 (Vijayaraghavan واخرون ، 2014) .

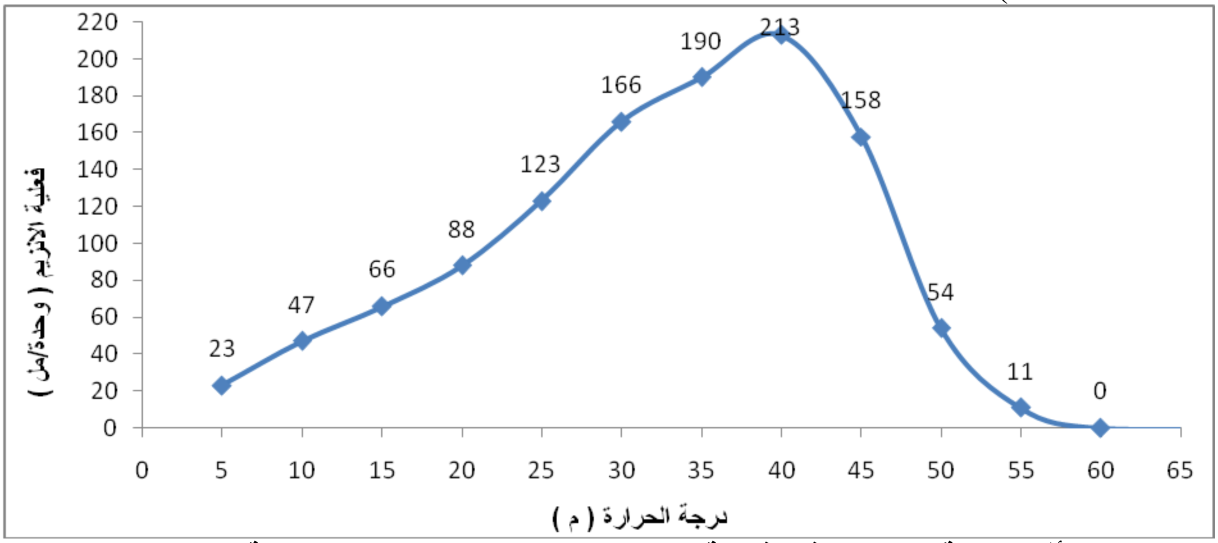


الشكل 6 . تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني في ثباتية البروتييز القاعدي المنتج من العزلة *Pseudomonas fluorescens* ISH بعد الحضن مدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 35م .

يعود إنخفاض فعالية البروتييز في الأرقام الهيدروجينية الحامضية غير المتطرفة إلى تأثير حموضة الوسط في تركيب الإنزيم وتأين المجموعات الموجودة في الموقع الفعال (Segel ، 1976) ، اما إنخفاض ثباتية الإنزيم عند القيم الحامضية والقاعدية المتطرفة فيحصل نتيجة مسخ (Denaturation) لاعكسي لجزيئة الإنزيم بسبب التغير الكبير الذي يطرأ على شحنات السلاسل الجانبية القابلة للتأين ، الأمر الذي يؤدي الى تحطيم (Disruption) التركيب الثلاثي لجزيئة الإنزيم لينشأ بدلاً منه تركيب أكثر عشوائية وتغيراً في الموقع الفعال وبالتالي فقدان الفعالية (Palmer ، 1985) .

تحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم

يلاحظ في الشكل 7 حدوث زيادة في الفعالية الإنزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة ، لتصل أقصى فعالية وهي 213 وحدة/مل عند درجة حرارة 40م التي تمثل درجة الحرارة المثلى للفعالية . تدهورت فعالية البروتييز في درجة حرارة 50م لتبلغ 54 وحدة/مل وهو مايشكل 25% من الفعالية القصوى ، ثم وصلت الى 5% فقط من الفعالية القصوى عند درجة حرارة 55م ليفقد الإنزيم فعاليته عند 60م ، ويعزى هذا الى ظاهرة التحلل الذاتي (Self-digestion) للإنزيم التي تبلغ اشدها غالباً في درجات حرارة بين 50 – 65م والتي تعاني منها اغلب البروتييزات المنتجة من مجموعة البكتريا المتحملة للبرودة (Mu واخرون ، 2009) .



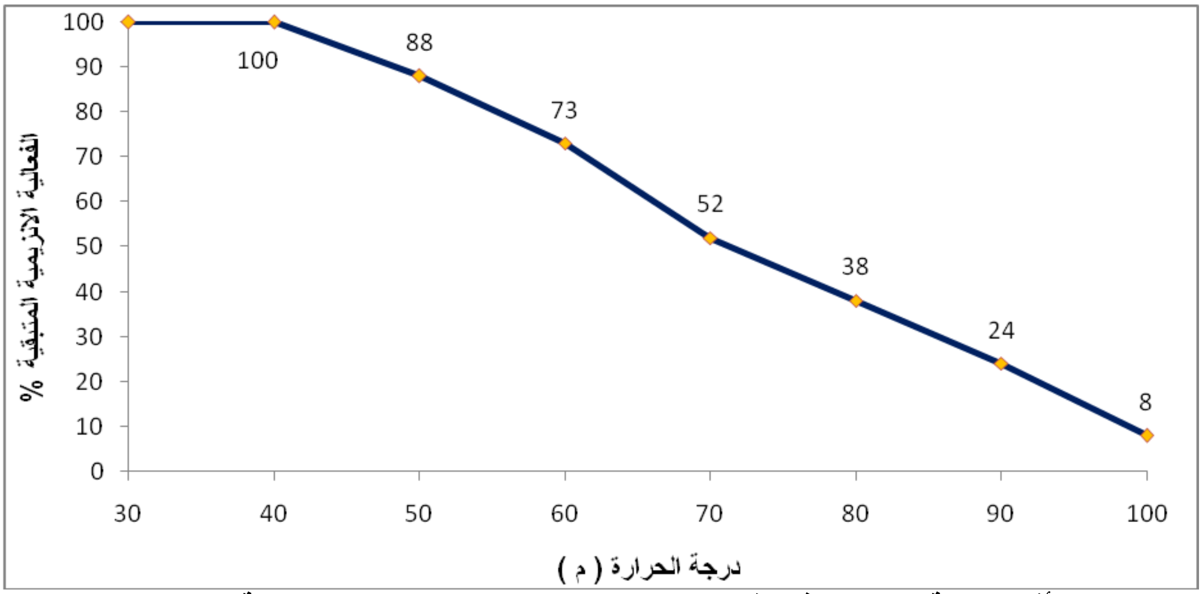
الشكل 7 . تأثير درجة الحرارة في فعالية البروتييز القاعدي المنتج من العزلة *Pseudomonas fluorescens* ISH بإستعمال الكازين مادة أساس في رقم هيدروجيني 7.5 .

إن ازدياد الفعالية الإنزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة يعود الى زيادة الطاقة الحركية (Kinetic energy) لكل من الإنزيم والمادة الأساسية ، الأمر الذي يترتب عليه زيادة فرص التصادم بينهما (Segel، 1976) ، اما بعد تجاوز درجة الحرارة المثلى فسيحدث كسر للأواصر الهيدروجينية ما يؤثر في تركيب الإنزيم ، ثم يفقد الإنزيم قدرته على الإحتفاظ بتركيبه متكاملاً مع ارتفاع درجة الحرارة ليفقد فعاليته تدريجياً ، وقد يحدث إنهيار (Collapse) لتركيب الإنزيم وفقدانه لخواصه الطبيعية(Murray واخرون ، 2000) .

تحديد الثبات الحراري للإنزيم

حضن الإنزيم بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين 30 – 100 م مدة 10 دقيقة ، واظهرت النتائج إحتفاظ إنزيم البروتييز المنتج من العزلة *Pseudomonas fluorescens* ISH بفعاليته كاملة بعد حضنه بدرجات حرارة 30 -40م ، وانخفضت بعدها الفعالية تدريجياً مع ارتفاع درجة الحرارة ، إلا أن الإنزيم لم يفقد فعاليته تماماً وانما احتفظ بجزء منها حتى في درجة حرارة 100م إذ إحتفظ بما مقداره 8% من فعاليته (الشكل 8) .

تدل النتائج أعلاه على أن البروتييز القاعدي قيد الدراسة هو من الإنزيمات المقاومة للحرارة (Heat-stable) ، وبذلك تبرز أهميته كأحد الإنزيمات المهمة في صناعة الألبان ، إذ لا يتأثر كثيراً بالمعاملات الحرارية المستعملة كالبسترة إذ إحتفظ بحوالي 50% من فعاليته بعد حضنه بدرجة حرارة 70م ، لذا يعزى اليها معظم التحلل البروتيني الحاصل في منتجات الألبان ولاسيما الأجبان .



الشكل 8 . تأثير درجة الحرارة في ثبات البروتييز القاعدي المنتج من العزلة *Pseudomonas fluorescens* ISH ، حضن الإنزيم بدرجات حرارية مختلفة مدة 10 دقيقة ، ثم قدرت الفعالية الإنزيمية بإستعمال الكازين مادة أساس .

تحديد تأثير الأيونات الفلزية وبعض المواد الكيميائية في فعالية الإنزيم

يوضح الجدول2 تأثير بعض المواد الكيميائية في فعالية البروتييز المنتج من العزلة *P. fluorescens* ISH ، إذ لم يتأثر الإنزيم بالمثبط Pepstatin A المتخصص بتثبيط البروتييزات الأسبارتية (Aspartic acid proteases) وإحتفظ بكامل فعاليته ، ما يدل على أن الإنزيم قيد الدراسة لا ينتمي إلى هذه المجموعة من البروتييزات ، كذلك لم يلاحظ أي تأثير للمثبط aprotinin و PMSFومثبط فول الصويا (SBTI) في الفعالية الإنزيمية ، وهذه المواد هي مثبطات متخصصة بالبروتييزات السيرينية ، ما يقود إلى الإستنتاج أن الإنزيم لاينتمي الى مجموعة البروتييزات السيرينية

(Serine proteases) ، كما لم يلاحظ أي تأثير لمادة E64 وهي من مثبطات البروتييزات السيستينية (Cysteine proteases) في فعالية الإنزيم ، ما يدل على أنه لا يعود إلى هذه المجموعة من البروتييزات أدى إستعمال المادة EDTA بتركيز 1 ملي مولار (وهي من المواد الكلابية - Chelating agents) الى فقدان الإنزيم 92% من فعاليته ، ثم ليفقد فعاليته بالكامل عند زيادة التركيز الى 5 ملي مولار ، ما يؤكد إنتماء الإنزيم الى مجموعة البروتييزات المعدنية (Metalloproteases) التي يشكل فيها أحد الأيونات المعدنية جزءاً أساسياً من الموقع الفعال للإنزيم ، إذ تتميز المواد الكلابية بتكوينها مركبات معقدة مع الأيونات الموجودة في جزيئة الإنزيم ومن ثم تثبيطه .

ذكر Koka و Weimer (2000) أن 1,10-Phenanthroline هي مادة كلابية متخصصة بالإرتباط بالزنك ، لذلك أختبر تأثيرها على البروتييز قيد الدراسة ، إذ إستعملت بتركيز 1 ملي مولار ، وقد ادت الى التثبيط الكامل للإنزيم وهو دليل على وجود الزنك في الموقع الفعال ، وبناءاً على هذه المعطيات فإن الإنزيم يمكن أن يصنف من مجموعة البروتييزات المعدنية الحاوية على الزنك في موقعها الفعال (zinc metalloprotease) ، وتجدر الإشارة الى أنه من المعتاد أن يكون للكالسيوم دور مهم في فعالية وتثبيت التركيب في هذا النوع من الإنزيمات (Schokker ، 1997) .

يبين الجدول 2 ايضاً تأثير بعض الأيونات الفلزية في فعالية البروتييز القاعدي المنتج من العزلة *P. fluorescens* ISH ، ومنه يتضح دور الكالسيوم في زيادة الفعالية الإنزيمية ، إذ ازدادت الفعالية الإنزيم 11% عند معاملة الإنزيم بتركيز 5 ملي مولار من ايونات الكالسيوم .

الجدول 2 . تأثير بعض المواد الكيميائية في فعالية إنزيم البروتييز القاعدي المنتج من العزلة *P. fluorescens* ISH

ت	المادة الكيميائية	التركيز	الفعالية المتبقية %
1	Pepstatin A	1mM	100
2	Aprotinin	10 µM	100
3	PMSF	5 mM	100
4	Soy Bean Trypsin Inhibitor	0.1 mg/ml	100
5	E 64	5 mM	100
6	EDTA	1 mM 5 mM	8 0
7	1,10-Phenanthroline	1 mM	0
8	$CaCl_2$	1mM mM5	100 110
9	$CoCl_2$	1mM mM5	100 94
10	$MnCl_2$	1mM mM5	100 97
11	$HgCl_2$	1mM mM5	34 0
12	$CuCl_2$	1mM mM5	64 19
13	$AgCl_2$	1mM mM5	86 74
14	$ZnCl_2$	1mM mM5	89 79
15	$NiCl_2$	1mM mM5	83 72

فسر Vordouw واخرون (1976) دور الكالسيوم في زيادة الفعالية الإنزيمية من خلال دوره في تثبيت تركيب جزيئة الإنزيم ومنعه للتغيرات التركيبية (conformational changes) فيها ، من خلال دوره في تقوية الإرتباطات الأيونية ضمن تركيب الإنزيم ، كما ذكر Nadeem واخرون (2009) أن للكالسيوم دوراً هاماً في حماية الإنزيم من تغير الهيئة (المسخ) والمحافظة على التوزيع الفراغي للموقع الفعال في درجات الحرارة العالية . إن دور الكالسيوم في زيادة الثباتية الحرارية والفعالية التحللية للإنزيم يتفق مع ماذكره Ghorbel واخرون (2003) . لم تؤثر ايونات الكوبلت والمنغنيز في فعالية البروتييز كثيراً ، إذ إحتفظ الإنزيم بفعاليته عند معاملته بتركيز 1 ملي مولار، في حين فقد الإنزيم 6% و 3% من فعاليته عند معاملته بتركيز 5 ملي مولار من ايونات الكوبلت والمنغنيز على الترتيب .

لوحظ إنخفاض كبير في فعالية الإنزيم عند معاملته بأيونات الزئبق ، إذ فقد الإنزيم 57% من فعاليته عند معاملته بتركيز 1 ملي مولار ، ليفقد فعاليته تماماً عند زيادة تركيز ايونات الزئبق الى 5 ملي مولار . وكان للنحاس تأثير مشابه تقريباً للزئبق ، إذ ادى إستعماله بتركيز 1 ملي مولار الى فقدان الإنزيم 36% من فعاليته ، اما زيادة تركيز ايون النحاس الى 5 ملي مولار فقد ادى الى فقدان الإنزيم 81% من فعاليته . أما أيونات الفضة والزنك والنيكل فقد كان تأثيرها متوسطاً في فعالية الإنزيم ، إذ فقد الإنزيم 14 و11 و 17% من فعاليته عند معاملته بتركيز 1 ملي مولار من الأيونات أعلاه على الترتيب ، وازداد الفقدان في الفعالية ليصل الى 26 و 21 و28% عند زيادة التركيز الى 5 ملي مولار لأيونات الفضة والزنك والنيكل على الترتيب. تدل النتائج أعلاه على أن للأيونات المعدنية تأثيراً في فعالية الإنزيم يختلف بإختلاف أنواعها وتراكيزها ، وغالباً مايزداد تأثير الأيونات مع زيادة تركيزها ، ويمكن أن يعزى ذلك الى تكوين معقدات مع المجموعات الجانبية للحوامض الأمينية الداخلة في تركيب الإنزيم سواء الموجودة في الموقع الفعال اوبالقرب منه ، او الموجودة في مواقع اخرى ويمكن أن تؤدي الى إعاقة ارتباط الإنزيم بالمادة الأساس ، كما إن بعض أيونات المعادن الثقيلة تمتلك تأثير المثبط اللاتنافسي للإنزيم (Mahler و Cordes ، 1991)

تركيب الإنزيم من الحوامض الأمينية

تعد عملية التعرف على الحوامض الأمينية الداخلة في تركيب الإنزيم خطوة مهمة لأجل تفسير بعض الخصائص التي يتميز بها الإنزيم .

يوضح الجدول 3 النسبة المئوية لكل حامض اميني في تركيب إنزيم البروتييز القاعدي المنتج من العزلة *P. fluorescens* ISH ، مع الإشارة الى أن عدم ظهور الحامض الأميني التربتوفان في الجدول يعود الى تحطمه اثناء الهضم الحامضي عند اعداد الأنموذج للتحليل. اظهرت النتائج إحتواء الإنزيم على نسبة عالية من الحوامض الأمينية الكارهة للماء وهي الألانين والفالين والليوسين والأيزوليوسين والبرولين والفنيل الانين والمثيونين وبما يشكل 37.6 % من مجموع الحوامض الأمينية ، وهو ما يضفي الثبات على التركيب المنطوي للإنزيم لكون هذه الحوامض الأمينية عاملاً أساساً في اضفاء الثبات على التراكيب المنطوية للبروتينات . يشكل البرولين 14.4% من الحوامض الأمينية الداخلة في تركيب الإنزيم ، ومن المعروف أن structural entropy لهذا الحامض الأميني اقل من باقي الحوامض الأمينية ، لذا فمن السهل أن يسبب إنطواء للسلسلة البروتينية ، كما أنه يحتاج الى طاقة اكبر لفتح الإنطواء (Watanabe واخرون ، 1994).

إن أهم صفات البروتييز قيد الدراسة هو إحتواؤه على نسبة عالية من الحامض الأميني السستئين والتي بلغت 6.8% ، وبالتالي إحتمالية وجود الجسور الكبريتية بنسبة عالية ، الأمر الذي يمكن أن يعد أحد أسباب الثباتية الحرارية لهذا الإنزيم .

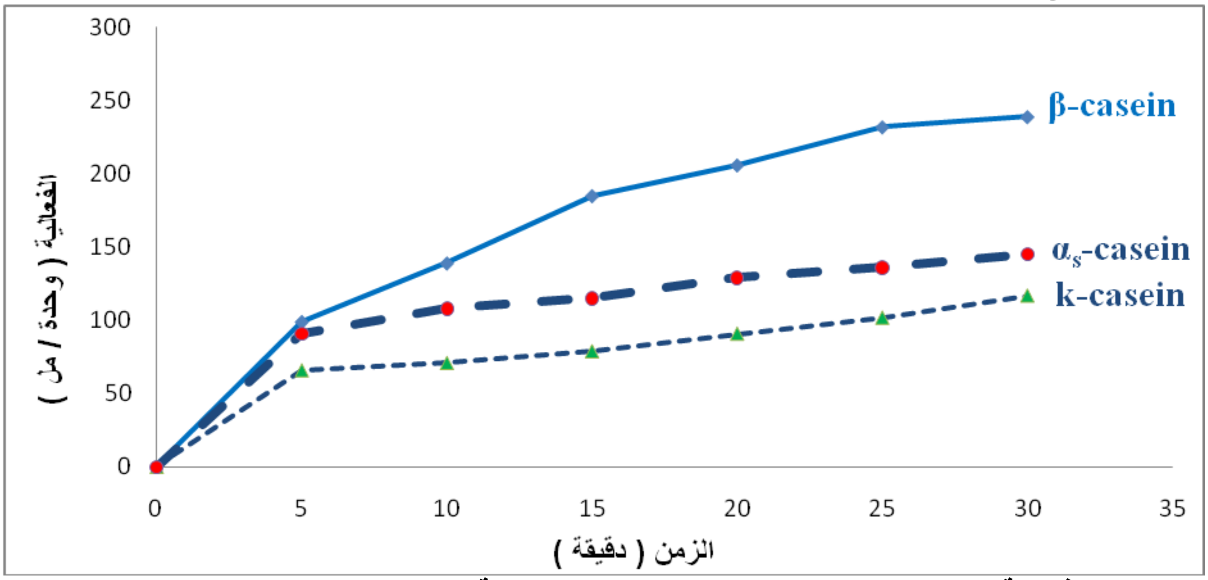
شكلت الحوامض الأمينية المنخفضة الوزن الجزيئي (الكلايسين والألانين) مايقارب 20% من مجموع الحوامض الأمينية الداخلة في تركيب الإنزيم ، وأن المحتوى العالي لهذا النوع من الحوامض الأمينية قد يكون أحد أسباب تمتع الإنزيم بصفة الثبات الحراري ، لأنها ذات مجموعات جانبية صغيرة ما يقلل عائق الفراغية (steric hindrance) معطياً مرونة تركيبية (structural flexibility) للإنزيم (Malik و Mathur ، 1984) .

الجدول 3 : النسبة المئوية للحوامض الأمينية الداخلة في تركيب إنزيم البروتييز القاعدي المنتج من العزلة *P. fluorescens* ISH

الحامض الأميني	النسبة المئوية (%)
الألانين (Ala)	8.1
الأرجنين (Arg)	2.1
حامض الأسبارتيك والأسبارتين (Asx)	8.2
السستئين (Cys)	6.8
حامض الكلوتاميك والكلوتامين (Glx)	13.1
الكلايسين (Gly)	11.6
الهستدين (His)	4.0
الأيزوليوسين (Ile)	2.7
الليوسين (Leu)	4.2
اللايسين (Lys)	3.9
الميثيونين (Met)	2.2
الفنيل الانين (Phe)	2.1
البرولين (Pro)	14.4
السيرين (Ser)	5.2
الثريونين (Thr)	3.2
التايروسين (Tyr)	3.9
الفالين (Val)	3.9

تأثير البروتييز في بروتينات الحليب

يظهر الشكل 9 فعالية إنزيم البروتييز القاعدي المنتج من العزلة المحلية *P. fluorescens* ISH تجاه كازينات الحليب α_s و β و k ، ومنه يلاحظ الألفة العالية للإنزيم تجاه β-casein إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 99 و 139 و 185 و 206 و 232 و 239 وحدة/مل بعد مرور 5 و 10 و 15 و 20 و 25 و 30 دقيقة على الترتيب .



الشكل 9 . فعالية إنزيم البروتييز القاعدي المنتج من العزلة *P. fluorescens* ISH تجاه كازينات الحليب α_s و β و k المحضرة بتركيز 5 ملغم/مل لكل منها في محلول الفوسفات الدارئ 0.05 M و pH 7.5 ، بإستعمال 100 مايكرولتر إنزيم/مل بدرجة حرارة 40 م .

يتبين من الشكل ايضاً تقارب قيم فعالية الإنزيم تجاه α_s-casein و k-casein ، إذ بلغت 91 و 108 و 115 و 129 و 136 و 145 وحدة / مل تجاه α_s-casein ، كما بلغت 66 و 71 و 79 و 91 و 102 و 117 وحدة / مل تجاه k-casein بعد مرور 5 و 10 و 15 و 20 و 25 و 30 دقيقة على الترتيب.

إن الألفة العالية للبروتييز القاعدي قيد الدراسة تجاه β-casein يمكن أن تعزى الى إحتواء هذا الكازين على نسبة اعلى من الأواصر الببتيدية الحساسة لفعل الإنزيم بالمقارنة مع الكازينات الأخرى ، كما أن الإختلافات في الهيئة التركيبية (Conformational differences) لهذا الكازين عن الكازينات الأخرى يمكن أن تعطي تفسيراً اخرَ ، إذ يتميز αs-casein بتداخل جزيئاته مع بعضها لذلك لاتوجد بصورة جزيئات أحادية (Monomer) بل تتجمع مع بعضها البعض وتترابط بأواصر هيدروجينية وأواصر غير قطبية وغيرها ، كما يتميز هذا الكازين باحتوائه على نسبة عالية من الحامض الأميني البرولين تمنع تكوين الهيئة الحلزونية المنتظمة . من جهة اخرى فإن إحتواء k-casein على الأواصر ثنائية الكبريت يمكن أن يعطيه تركيباً اكثر ثباتاً تجاه فعل الإنزيم (McSweeney و Fox ، 2009) .

تتفق النتائج مع ماذكره Mitchell و Marshall (1989) حول الألفة العالية التي أبداها البروتييز المقاوم للحرارة المنتج من البكتريا *P. fluorescens* P27 تجاه β-casein مقارنة مع αs-casein و k-casein . في حين اكد Gebre-Egziabher واخرون (1980) أن البروتييز المنتج من *pseudomonas* كان اكثر فعالية تجاه β-casein و k-casein بالمقارنة مع فعاليته تجاه αs-casein.

المصادر

Bayoumi, R.A. and A.S.Bahobil.2011. Production of thermoalkaliphilic proteaseby*Shewanella putrefaciens*-EGKSA21 under optimal conditions forapplication in biodetergent technology. *J. Basic Appl.Sci. Res*. 1: 95-107.

Bisswanger, H. 2008. Enzyme Kinetics: Principles and Methods. 2nd ed. wiley. Germany.

Devaraj, V.R. andN.H.Manjunatha.1999. Purification and characterization of a proteinase inhibitor from field bean, Dolichos lablab perpureus. *J. Protein Chem*. 18. 47–54.

Gebre-Egziabher,A.;E.S. Humbertand G. Blankenagel.1980. Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes. *J. Food Prot*. 43:709–712.

Ghorbel, B.; A. Sellami-Kamounand M.Nasri.2003. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme Microbial Technol*. 32:5. 513-518.

Hamamoto, T.; M. Kaneda; K. Horikoshi and T. Kudo.1994. Characterization of a protease from a psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens* 114. *Appl. Environ. Microbiol*. 60:10. 3878-3880.

Illakkiam, D.; N. Anuj; P. Ponraj; M. Shankar; J. Rajendhran and P. Gunasekaran.2013. Proteolytic enzyme mediated antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* against *Macrophominaphaseolina*. *Indian J. Experimental Biology*. 51: 1024-1031.

Koka, R. and B.C. Weimer. 2000. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. *J. Applied Microbiology*. 89: 280-288.

Laemmli, U.K.1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*Nature*. 22: 827-835.

Lass, T.1998.Electrophoresis in gels. In: protein purification. (Janson, J. C. and Ryden, L. eds.). 463 - 495.

Mahler, H. R. andE.H. Cordes. 1991. Biological Chemistry. 2nd ed. Harper and Row. New York.

Malik, R.K. and D. K. Mathur.1984. Purification andcharacterization of a heat-stable protease from *Pseudomonas* sp. B-25. *J. Dairy Sci*. 67: 522-530.

McSweeney,P. L.and P. F. Fox. 2009. Advanced Dairy Chemistry. 3rded.Springer.

Mitchell, S. L. and R. T. Marshall.1989. Properties of heat-stable proteases of *pseudomonas fluorescens*: characterization and hydrolysis of milk proteins. *J. Dairy Sci*. 72: 864-874.

Mu, Z.; M. Duand Y. Bai.2009. Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas fluorescens* Rm12 from raw milk. *Eur. Food Res. Technol*. 228: 725–734.

Murray, R. k.; H. K. Granner; P. A. Mayes and V. W. Rodwell.2000. Harper's Biochemistry. 25th ed. Appleton and Lange.

Nadeem, M.; J. I. Qazi and S. Baig.2009. Effect of aeration and agitation rates onalkaline protease production by *Bacilluslicheniformis* UV-9mutant. *Turkish J. Biochemistry*. 34: 89-96.

Palmer, T.1985. Understanding Enzymes.2nd ed. Ellis Harwood Limited.

Schokker, E. P. 1997. Kinetics of Heat Inactivation of the Extracellular Proteinase From *Pseudomonas fluorescens* 22F. Ph.D. thesis.University of Wageningen.Wageningen. Netherlands.

Segel, I. H. 1976. Biochemical Calculation.Jon Wiley and Sons.Inc. New York.

Vijayaraghavan, P.; S. Saranya and S. G. Vincent.2014. Cow Dung substrate for the potential production of alkaline proteases by *pseudomonas putida* AT in solid-state fermentation. *Chinese J. Biology*. 14: 1-7.

Vordouw, G.; C. Milo and R. S. Roche.1976. The role of bound calcium ions in thermostable proteolytic enzymes. Separation of intrinsic and calcium ions contribution to the kinetic thermal stability.*Biochemistry*. 15: 3716–3723.

Vyletelova, M. and O. Hanus.2000. Effect of contamination by *Pseudomonas fluorescens* on principal components and technological parameters of pasteurized milk during storage. *Czech J. Food Sci*. 18: 224–234.

Watanabe, K.; T. Masuda; H. Ohashi; H. Mihara and Y. Suzuki.1994. Multiple Proline Substitutions Cumulatively Thermostabilize*Bacillus Cereus* ATCC7064 Oligo-1,6-Glucosidase. *Eur. J. Biochem*. 226: 277–283.

Whitaker, J. R.1972. Principles of Enzymology for the Food Science. Marcel Dekker, Inc. New York.

EXTRACTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE OF *Pseudomonas fluorescens* ISH AND IT'S ROLE IN DETERIORATION OF IRAQI SOFT CHEESE
2- EXTRACTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE OF *P. fluorescens* ISHAND EFFECT OF IT ON MILK PROTEINS

ZIAD T. SEDRAH * AMER M.A. SALIH ** GHAZI M. AZIZ ***

*** Collage of Agriculture _ Diyala University- ziadsedrah@gmail.com.**
**** Collage of Agriculture_Baghdad University_ Salih1943@yahoo.com.**
***** Collage of Sciences_Baghdad University_ Ghazi_m56@yahoo.com.**

ABSTRACT

The enzyme was purified by 30-80% saturation of ammonium sulphate precipitation, ion exchange chromatography on DEAE-Sepharose column and by gel filtration on Sephacryl S-200, with 18.5 fold and 32.8% recovery.

The results of the enzyme characterization showed that it'sestimated molecular weight was 47.2 kD. The optimum pH of activity was 8.0 and it'soptimum pH of stability was 7.5. The optimum temperature for the activity was 40^{O}C, and the enzyme was retained its original activity after incubation for 10 minutes at temperatures ranging from 30-40 ^{O}C.

The protease was metalloprotease because it was affected by the chelating agent EDTA.

The protease showed high affinity toward β-casein, compared with its activity towards αs-casein and k-casein.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens***,** Psychrotrophic bacteria, proteases, soft cheese.