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

1- عزل وتشخيص البكتريا *Pseudomonas fluorescens* وتحديد الظروف المثلى لانتاج إنزيم البروتييز.

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

تم التحري عن وجود عزلات عدة تعود للبكتريا *Pseudomonas fluorescens* العائدة إلى مجموعة البكتريا المتحملة للبرودة (Psychrotrophic bacteria) في عينات الجبن الطري المنتج في معمل ألبان كلية الزراعة – جامعة بغداد. إمتلكت 24 عزلة من هذه العزلات القابلية على التحلل البروتيني ، وجرى تشخيصها من خلال دراسة الصفات المزرعية والمظهرية والكيميوحيوية ، كما تم تأكيد التشخيص بجهاز Vitek 2 compact system . بعدها أختيرت العزلات الخمس الأكفأ لإجراء التحري الكمي عن انزيم البروتييز ، وفيه تميزت العزلة ISH *P. fluorescens* إذ بلغت الفعالية النوعية 117.8 وحدة/ملغم بروتين ، لذا إنتخبت هذه العزلة لإنتاج الإنزيم.

تبين ان الظروف المثلى لإنتاج البروتييز من العزلة ISH *P. fluorescens* هي إستعمال الوسط الغذائي Minimal salts medium المدعم بالحليب الفرز بنسبة 1% ، ورقم هيدروجيني 8 بدرجة حرارة 15م مدة 96 ساعة وحجم لقاح 1 x 10^7 و ت م / مل بإستعمال الحاضنة الهزازة بسرعة 125 دورة / دقيقة .

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

المقدمة

يتم تداول الحليب الخام بإستعمال الخزن المبرد في الحقل وفي أثناء النقل ، فضلاً عن خزنه مدة إضافية في المعمل قبل التصنيع ، وعلى الرغم من أن الخزن المبرد يحد من سرعة نمو الأحياء المجهرية إلا أنه في الوقت نفسه يشجع نمو مجموعة البكتريا المتحملة للبرودة (Psychrotrophs) ويشكل ظرفاً ملائماً لتكاثرها وسرعان ما تصبح هي السائدة .

من المعروف ان أغلب أنواع هذه المجموعة من البكتريا لايعد من البكتريا المرضية ، ولاتقاوم عملية البسترة أو المعاملات الحرارية الأخرى ، إلا أن خطورتها تكمن في إفرازها إنزيمات خارج خلوية ثابتة تجاه الحرارة العالية ، تعمل على تحليل مكونات الحليب ، ولاسيما الإنزيمات المحللة للبروتين (Proteases) والإنزيمات المحللة للدهن (Lipases) ، الأمر الذي يؤدي إلى تلف الحليب ومنتجاته في أثناء التصنيع والخزن (Cempirkova و Mikulova ، 2009) .

يمثل جنس *Pseudomonas* نسبة لا تزيد عن 10% من الأحياء المجهرية في الحليب الطازج المحلوب حديثاً ، إلا أنه أهم أجناس مجموعة البكتريا المتحملة للبرودة لسيادته على الأحياء المجهرية المسببة للتلف في الحليب ومنتجاته . وتعد *P. fluorescens* النوع البكتيري المثالي المسبب للمشاكل في مجال صناعة الألبان (Vyletelova و Hanus ، 2000) . تهدف هذه الدراسة الى عزل البكتريا *Pseudomonas fluorescens* من نماذج من الجبن الطري العراقي وتشخيصها وفقاً لطرائق التشخيص المعروفة وتحديد الظروف المثلى لإنتاج البروتييز من العزلة أعلاه.

تاريخ تسلم البحث 16 / 7 / 2014 .
تاريخ قبول النشر 8 / 3 / 2015 .
البحث جزء من اطروحة دكتوراه للباحث الاول.
http://www.agriculmag.uodiyala.edu.iq/

المواد وطرائق البحث

عزلت البكتريا من الجبن الطري المنتج في معمل الألبان التابع لقسم علوم الأغذية - كلية الزراعة – جامعة بغداد ، خلال المدة مابين شباط – حزيران 2012 .

حددت ظروف عملية العزل لتشكل ضغوطاً إنتخابية تسهل عملية العزل وإختصار الخطوات وصولاً للكائن المجهري المطلوب ، إذ وضعت نماذج الجبن الطري بدرجة حرارة 7م مدة 7 أيام بهدف تغليب البكتريا المطلوبة لتصبح هي السائدة على حساب الأنواع البكتيرية الأخرى ، كما أختير الوسط الغذائي CVA الحاوي على مادة Crystal violet المثبطة لنمو البكتريا الموجبة لتصبيغ غرام ليقتصر النمو على مجموعة بكتريا Psychrotrophic السالبة لتصبيغ غرام ومنها البكتريا *Pseudomonas fluorescens* (Harrigan و McCance ، 1976) .

حددت مستعمرة منفردة نامية على الوسط أعلاه ، واخذ جزء منها وفحص عن قابلية الإصطباغ بتصبيغ غرام مع ملاحظة شكل الخلايا تحت المجهر ، في حالة كون الخلايا عصوية سالبة لتصبيغ غرام ، اخذ جزء اخر من المستعمرة نفسها واجري له إختبار الأوكسيديز ، في حالة كون النتيجة موجبة فان هذا يعد إحتمالاً بأن المستعمرة تابعة لجنس *Pseudomonas* (سيلي وفان ديمارك ، 1989) .

نقل جزء اخر من المستعمرة نفسها الى الوسط ACC الحاوي على المضادات الحيوية Ampicillin و Chloramphenicol و Cyclohexamide ، إذ إن هذا الوسط يسمح فقط بنمو أفراد المجموعة المتألقة (Fluorescent group) التابعة لجنس *Pseudomonas* (Palleroni ، 2004) .

شخصت البكتريا من خلال تحديد الخصائص الشكلية والمزرعية واجراء الفحوص الكيميوحيوية اللازمة باتباع المفاتيح التصنيفية الواردة في Harrigan و McCance (1976) ؛ Stolp وGgadkari (1981) ؛ Palleroni (2004) .

تم التحري النوعي عن قابلية العزلات البكتيرية على انتاج البروتييز وفق ماورد في Harrigan وMac Cance (1976) ، واختبرت العزلة الأكفأ في انتاج البروتييز باتباع الطريقة الموصوفة من Mu واخرون (2009) . قدر تركيز البروتين وفقا للطريقة التي اوردها Bradford (1976) ، وقيست الفعالية الإنزيمية وفقا للطريقة التي اوردها Sharma واخرون (2006) ، وذلك بوضع 1.8 مل من محلول مادة التفاعل (1% كازين) في انبوبة اختبار تركت في حمام مائي بدرجة حرارة 35 م مدة 5 دقائق قبل اضافة 0.2 مل من محلول الإنزيم ، ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 35 م مدة 30 دقيقة ، واوقف التفاعل باضافة 3 مل من محلول Trichloroacetic acid (TCA) بتركيز 5% ، وحضر المحلول الأكفا بالخطوات نفسها ماعدا اضافة الإنزيم بعد اضافة محلول TCA ، ثم اجري النبذ المركزي عند 3500xg مدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4م . عينت كمية الناتج المتكون الذائب في TCA بوساطة قياس الإمتصاصية للطافي عند الطول الموجي 280 نانومتر ، إذ عرفت وحدة الفعالية للإنزيم على انها كمية الإنزيم التي تعطي زيادة 0.001 في الإمتصاصية عند طول موجي 280 نانومتر لكل دقيقة تحت ظروف التجربة ، وتعيين فعالية البروتييز بإستعمال المعادلة الآتية :

فعالية البروتييز (وحدة/مل) = الإمتصاصية عند 280 نانومتر / 0.001 x 30 x 0.2

إذ ان :

0.001 : ثابت من تعريف وحدة الإنزيم

30 : مدة التفاعل (دقيقة)

0.2 : حجم المحلول الإنزيمي (مل)

النتائج والمناقشة

تشخيص البكتريا ***Pseudomonas fluorescens*** **:** درست الصفات المظهرية للبكتريا المعزولة ، إذ تميزت عند فحصها تحت المجهر بكونها خلايا عصوية ، سالبة لتصبيغ غرام ، مفردة أو مزدوجة ، غير مكونة للأبواغ ، متحركة (بإستعمال فحص القطرة المعلقة) ، وكما موضح في الجدول (1) . تتفق هذه

النتـائج مـع مـاذكره Palleroni (2004) حـول الصـفات المظهريـة لبكتريـا *Pseudomonas fluorescens*

الجدول 1 . بعض الصفات الشكلية لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* المعزولة من الجبن الطري المنتج في معمل البان قسم علوم الاغذية ـ كلية الزراعة ـ جامعة بغداد .

الصفة	الملاحظات
قابلية الإصطباغ بتصبيغ غرام	-
شكل الخلايا	عصوية مستقيمة
تجمع الخلايا	غالبيتها مفردة وبعضها مزدوج
الحركة	+
إنتاج الأبواغ	-
الصبغة المقاومة للحامض (Acid fast stain)	-

اظهرت المستعمرات النامية على الوسط المغذي الصلب (NA) شكلاً دائرياً (Circular) وسطح ناعم (Smooth) لماع (Glistening) مرتفع بشكل محدب (Convex) وحافة مستعمرة كاملة (Entire) ، فضلاً عن وجود رائحة غير مرغوبة . وعند تنمية العزلات في الوسط المغذي السائل (NB) إتخذ نموها شكلاً حلقياً في اعلى الوسط ، وهذا دليل اولي على أن العزلات هوائية .

نميت البكتريا المعزولة على الوسط King B لإبراز صفة التألق ، إذ تمتاز البكتريا *P. fluorescens* بإنتاجها لصبغات متألقة (خضراء مصفرة) منتشرة في الوسط . اتفقت هذه النتائج مع ماذكره Stolp وGgadkari (1981) ؛ Palleroni (2004) حول الصفات المزرعية لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* .

اجريت للعزلات النقية إختبارات اضافية بإستعمال بعض الاوساط الغذائية الصلبة وكما موضح في الجدول (2) ، وتتشابه هذه الصفات مع ماذكره Stolp وGgadkari (1981) .

الجدول 2. الصفات المزرعية لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* عند نموها على بعض الأوساط الصلبة .

الوسط الغذائي	الملاحظات
Brolacin agar	مستعمرات خضراء – مزرقة
Citrimide agar	مستعمرات متألقة
MacConkey agar	مستعمرات عديمة اللون
GSP agar	مستعمرات كبيرة بنفسجية - مزرقة

اجريت ايضاً بعض الفحوص الكيميوحيوية الضرورية للتفريق بين أنواع جنس *Pseudomonas* للإقتصار على العزلات التي تعود للنوع *Pseudomonas fluorescens* (الجدول 3) ، وكانت النتائج مشابعة لماذكره Stolp وGgadkari (1981) .

الجدول 3 . بعض الفحوص الكيميوحيوية الضرورية للتفريق بين أنواع جنس *Pseudomonas*

الفحص	الملاحظات	الفحص	الملاحظات
الأوكسيديز	+	التحلل المائي للنشأ	-
الكاتاليز	+	التحلل المائي للجيلاتين	+
الإندول	-	النمو في درجة حرارة 4 م	+
إنتاج الأمونيا من الأرجنين	+	النمو في درجة حرارة 41 م	-

(+) : الفحص موجب ، (-) : الفحص سالب

التحري النوعي عن قابلية العزلات على إنتاج البروتييز : اجري إختبار نوعي للكشف عن افضل عزلة في تحليل البروتين من بين عزلات *P. fluorescens* ، وذلك بتنميتها على الوسط Milk agar ، ثم قياس قطر المنطقة الشفافة حول المستعمرات النامية.

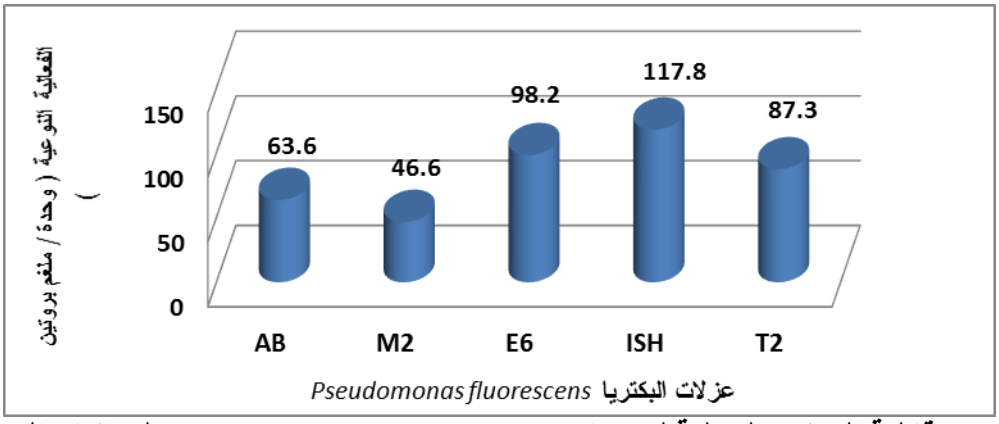
دلت النتائج على إختلاف قابلية العزلات على إنتاج إنزيم البروتييز مع أنها تنتمي الى نوع واحد ، إذ يتضح من الجدول (4) أن العزلة *P. fluorescens* ISH كانت الأعلى مقدرة على تحليل البروتين ، إذ بلغ قطر المنطقة الشفافة حول المستعمرة 4.2 ملم ، تلتها العزلات E6 و T2 و AB و M2 إذ بلغت اقطار المناطق الشفافة 3.4 و 3.3 و 3.1 و 3.0 ملم على الترتيب ، لذا أختيرت هذه العزلات لإجراء إختبار العزلة الأكفأ في إنتاج الإنزيم بطريقة المزارع المغمورة .

الجدول 4 . قابلية العزلات المحلية لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* المعزولة من الجبن الطري العراقي على تحليل البروتينات بإستعمال الوسط Milk agar.

العزلة	قطر منطقة التحلل (ملم)		العزلة	قطر منطقة التحلل (ملم)
A1	1.3		C1	0.7
AB	3.1		FG	1.3
B4	1.7		H5	0.5
M2	3.0		R4	0.9
T7	1.3		Y1	2.1
K4	1.7		Z1	1.9
E6	3.4		L5	0.9
ISH	4.2		U8	0.7
T2	3.3		SC	1.0
R8	0.9		MN	0.8
S8	1.8		J6	2.1
H7	0.8		G2	2.2

اختبار العزلة الأكفأ في إنتاج البروتييز : أختيرت عزلات *P. fluorescens* التي اعطت اعلى نسبة تحلل على الوسط الصلب Milk agar وهي العزلات ISH و E6 و T2 و AB و M2 لأجل تحديد العزلة الأكفأ في إنتاج البروتييز في المزارع المغمورة ، إذ تم إستعمال الوسط الموصوف من Mu واخرون (2009) والمتكون من المرق المغذي (NB) المدعم بـ 1% حليب فرز.

تميزت العزلة *P. fluorescens* ISH بإنتاجها العالي لإنزيم البروتييز مقارنة بالعزلات الأخرى ، إذ بلغت الفعالية النوعية للإنزيم المنتج منها 117.8 وحدة/ملغم بروتين ، في حين بلغت الفعالية النوعية 98.2 و 87.3 و 63.6 و 46.6 وحدة/ملغم بروتين لإنزيم البروتيز المنتج من العزلات E6 و T2 و AB و M2 على الترتيب ، وكما موضح الشكل (1) . وبناءاً على النتائج أعلاه أختيرت العزلة *P. fluorescens* ISH لتجري عليها الفحوص اللاحقة المتعلقة بالتشخيص.



الشكل 1 . قابلية العزلات المحلية لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* على إنتاج البروتييز بطريقة المزارع المغمورة بإستعمال المرق المغذي (NB) المدعم بـ 1% حليب فرز.

دراسة الصفات الكيميوحيوية: يبين الجدول (5) نتائج الفحوص الكيموحيوية للعزلة *Pseudomonas fluorescens* ISH ، إذ كانت النتائج مطابقة لما ورد في المراجع التشخيصية Harrigan و McCance (1976) ؛ Stolp و Ggadkari (1981) ؛ Palleroni (2004) ، ومنها إتضح أن العزلة تعود الى الطراز الأحيائي الأول (Biovar I) وفق تقسيم Stanier واخرون (1966) الذي قسم افراد هذا النوع الى خمسة طرز أحيائية على أساس الإختلاف في الصفات الثلاث (إنتاج الليفان من السكروز وعملية Dentrification وإنتاج الصبغات غير المتألقة) ، وأعتمد هذا التقسيم في المرجع العلمي Bergey's Manual (Buchanan و Gibbons،1974 ؛ Palleroni ، 1984 ؛ Holt واخرون ، 1994 ؛ Palleroni ، 2004). اتفقت نتائج الفحوص الكيموحيوية للطراز الأحيائي الأول لبكتريا *P.fluorescens* مع ماذكره Palleroni (2004) .

الجدول 5 . بعض الصفات الكيموحيوية لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* ISH المعزولة من الجبن الطري العراقي المنتج في معمل البان قسم علوم الاغذية – كلية الزراعة – جامعة بغداد.

الفحص	البكتريا قيد الدراسة	Stolp و Ggadkari (1981)	Palleroni (2004)
إختزال النترات	-	-	-
إنتاج صبغة الفلورسين المتألقة	+	+	+
إنتاج صبغة البايوسيانين	-	-	-
إنتاج الليفان من السكروز	+	+	+
فحص حليب اللتموس	تخثر مع إختزال اللون	n	n
التحلل المائي لبروتينات الحليب	+	n	n
تحليل Tributyrin	+	+	n
تحليل Tween 80	+	+	+
التحلل المائي للبسثين	+	+	+
تحليل Butter Fat	+	+	n
إنتاج H_2S	-	-	n
إنتاج الأمونيا من البيتون	+	n	n
إنتاج الأمونيا من اليوريا	+	+	n
إختبار أحمر المثيل	-	-	n
إختبار فوكس - بروسكاور	-	-	n
فحص الأكسدة-التخمر للكلوكوز	مؤكسدة	مؤكسدة	n
استهلاك السترات مصدراً وحيداً للكاربون	+	+	+
إنتاج الصبغات غير المتألقة المنتشرة	-	-	-
إنتاج الصبغات غير المتألقة وغير المنتشرة	-	-	-

n : الفحص غير مدروس ، (+) : الفحص موجب ، (-) : الفحص سالب

قابلية إستهلاك بعض المواد الكربوهيدراتية والحوامض الأمينية

يبين جدول (6) قابلية العزلة ISH *P. fluorescens* على إستهلاك بعض المواد الكربوهيدراتية والحوامض الأمينية بإستعمال الوسط الغذائي Basal synthetic وسطاً أساسياً مضاف اليه المواد المختبرة كلاً على حدة ، واستدل على مقدرة العزلة المدروسة على إستهلاك المواد الكربوهيدراتية المبينة في الجدول ادناه من خلال نموها في الوسط المذكور وتغييرها لون الوسط الى الأصفر نتيجة لإنتاجها الحامض الذي يؤدي الى خفض الرقم الهيدروجيني للوسط ومن ثم تغير لونه ، واستدل على مقدرة العزلة المدروسة في إستهلاك الحوامض الأمينية من خلال تغير لون الوسط الى الأخضر المزرق

الجدول 6 . قابلية إستهلاك بعض المواد الكربوهيدراتية والحوامض الأمينية من البكتريا *Pseudomonas fluorescens* ISH المعزولة من الجبن الطري العراقي المنتج في معمل البان قسم علوم الاغذية – كلية الزراعة – جامعة بغداد .

المادة	نتيجة الفحص	المادة	نتيجة الفحص
Cellobiose	-	L-Alanine	+
Creatin	-	L-Arabinose	+
D-Alanine	+	L-Arginine	+
D-Arabinose	-	L-Lysine	+
D-Fructose	+	L-Threonine	-
D-Galactose	+	L-Tryptophan	-
D-Mannose	+	L-Valine	+
D-Ribose	+	Maltose	-
D-Tryptophan	+	Mannitol	+
D-Xylose	+	Starch	-
Glycine	-	Sucrose	+
Lactose	-	Trehalose	+

تعيين الظروف المثلى لإنتاج البروتيز من العزلة ISH *P. fluorescens*

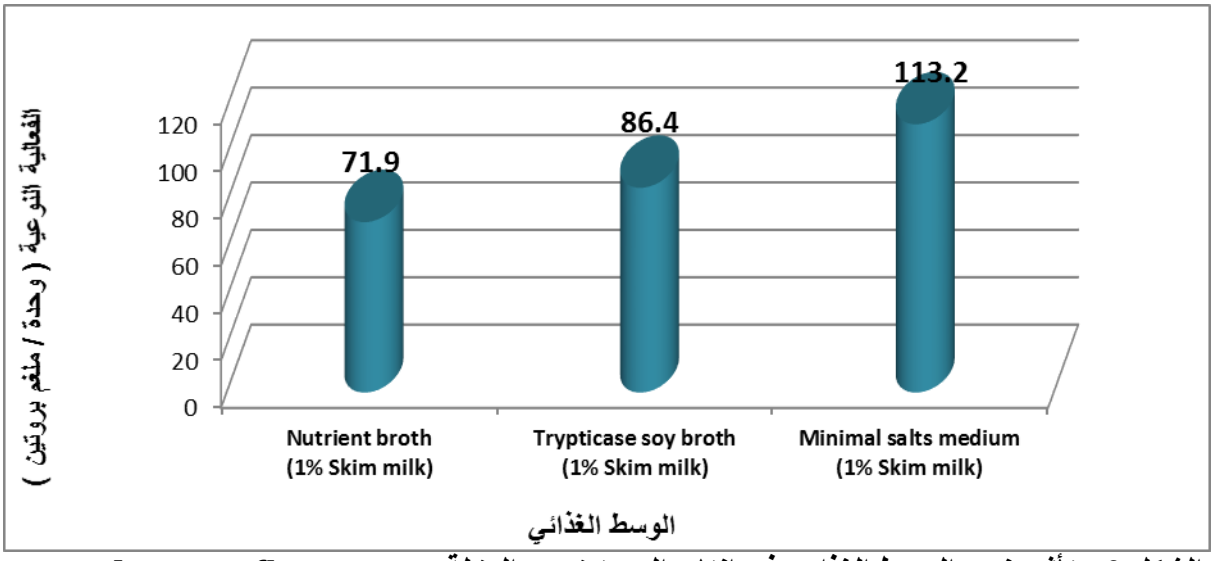
تحديد الوسط الغذائي الأفضل : أختبرت ثلاثة أوساط غذائية مختلفة التركيب لتحديد الأفضل من بينها لإنتاج البروتيز من العزلة ISH *Pseudomonas fluorescens* ، إذ يتبين من الشكل (2) أفضلية واضحة للوسط الغذائي Minimal salts medium المدعم بـ 1% حليب فرز على بقية الأوساط الغذائية المستخدمة ، إذ بلغت الفعالية النوعية لإنزيم البروتيز المنتج من العزلة المحلية قيد الدراسة في هذا الوسط 113.2 وحدة/ملغم بروتين ، بينما بلغت الفعالية النوعية 86.4 و 71.9 وحدة/ملغم بروتين للأوساط Trypticase soy broth المدعم بـ 1% حليب فرز و Nutrient broth المدعم بـ 1% حليب فرز على الترتيب .

إن لكل كائن مجهري متطلباته التغذوية الخاصة ، وعليه لايوجد وسط غذائي بعينه يستعمل في إنتاج البروتييزات ، لذلك من الأهمية بمكان تكييف وسط الإنتاج بما يلائم متطلبات الكائن المنتج (Tari واخرون ، 2006)

يحتاج إنتاج إنزيم البروتيز الخارجي الى وجود مادة حاثة (Inducer) في وسط الإنتاج ، ويعد الحليب الفرز من أهم هذه المواد (Mckellar و Cholette ، 1984) .

إن تفوق الوسط الغذائي Minimal salts medium يعود الى إحتوائه على المواد الضرورية لإنتاج البروتييزات الخارج خلوية من البكتريا *P. fluorescens* وأهمها الحليب الفرز (Nicodeme واخرون ، 2005) . وكذلك خلوه من من الكلوكوز المعروف بكبحه لانتاج البروتييزات المايكروبية

(Pillai واخـــرون ، 2011) . كمـــا ان وجـــود $MgSO_4$ و K_2HPO_4 و KH_2PO_4 تـــدعم إنتـــاج البروتييـزات الخـارج خلويـة فـي بعـض أنـواع الأحيـاء المجهريـة ، وقـد ثبـت أن إنتـاج البروتييـزات المايكروبية يتأثر بوجود الأيونـات المعدنيـة إذ أن للأيونـات الموجبـة تـأثيراً داعمـا لفعاليـة وثبـات الإنـزيم (Karan واخرون ، 2011).

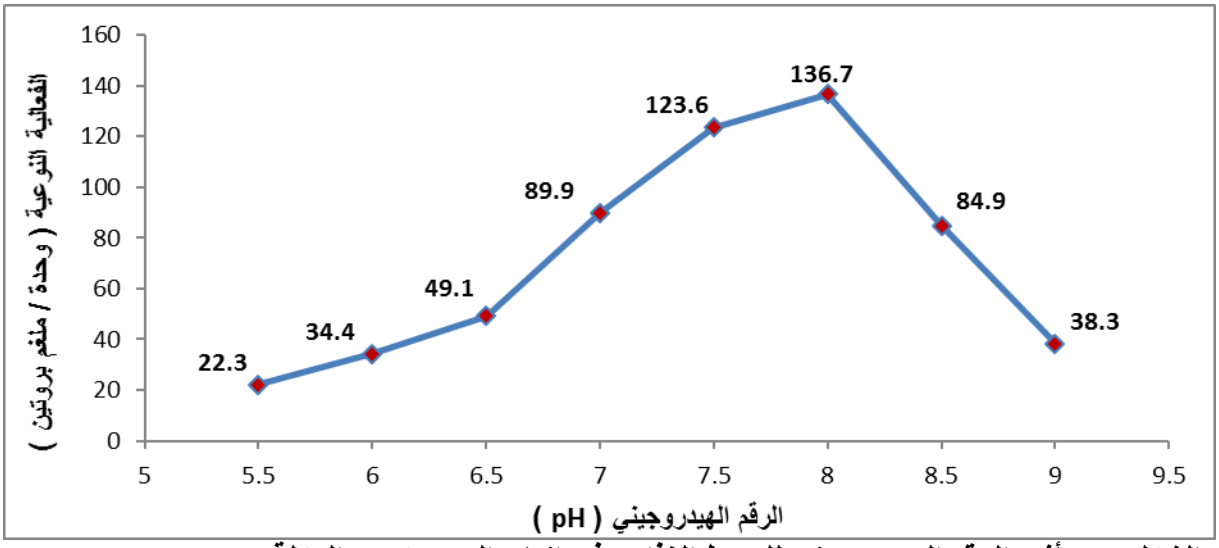


الشكل 2 . تأثير نوع الوسط الغذائي في إنتاج البروتيز من العزلة *Pseudomonas fluorescens* ISH

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنتاج : يتضح من الشكل (3) إنخفاض إنتاجية الإنزيم عند القيم الحامضية من الرقم الهيدروجيني ، إذ بلغت الفعاليـة النوعيـة 22.3 و 34.4 وحدة/ملغم بروتين عند قيم الـرقم الهيـدروجيني 5.5 و 6 علـى الترتيـب ، ثـم بـدأت الإنتاجيـة بالإزديـاد وصـولاً الـى قـيم الـرقم الهيدروجيني المتعادلة والقاعدية القريبة من التعادل ، إذ سجلت أعلى فعالية نوعية للإنزيم وهي 136.7 وحدة/ملغم بروتين عند الرقم الهيدروجيني 8 ، لتعود الى الإنخفاض مع زيادة قاعدية الوسط لتبلغ 38.3 وحدة/ملغم بـروتين عنـد الـرقم الهيدروجيني 9 ، وبذلك يكون الـرقم الهيدروجيني 8 هـو الأمثل لإنتـاج البروتييز من العزلة ISH *P. fluorescens* .

يؤدي الرقم الهيدروجيني للوسط دوراً مهماً في إنتاج الأحياء المجهرية للبروتييزات الخـارج خلويـة ، إذ تبرز أهميته من خلال تأثيره في ذائبية مكونات الوسط الغذائي وفي إتجاه سير الفعاليات الأيضية ، وذلك لعلاقته بمدى جاهزيـة المغذيات فـي وسط النمو او لتـأثيره المباشر فـي إنتقال المكونـات خـلال الأغشـية الخلوية (Haddar واخرون ، 2010) .

تتفق هذه النتـائج مع ماوجده Kohlmann واخرون (1991) عند توصيف إنزيم البروتييز الخـارج خلـوي المنتج من M3/6 *P. fluorescens* ، إذ كـان مدى الـرقم الهيدروجيني الأمثل للفعاليـة بين 7.5 – 8.5 ، مـع قيمـة مثلـى تبلـغ 8 ، فـي حين وجد Mu واخرون (2009) أن الـرقم الهيـدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنتج من Rm12 *P. fluorescens* قد بلغ 7.5 .

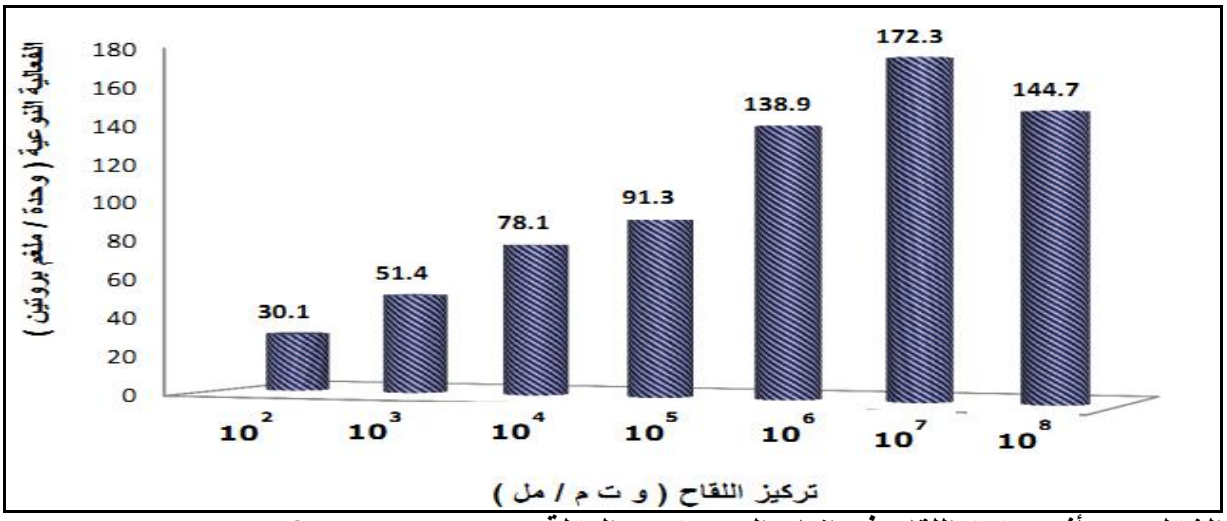


الشكل 3 . تأثير الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي في إنتاج البروتيز من العزلة *Pseudomonas fluorescens* ISH

تحديد درجة الحرارة المثلى للإنتاج : أختبرت قابلية العزلة *Pseudomonas fluorescens* ISH على إنتاج الإنزيم بتنميتها بدرجات مختلفة بين 5 – 35 م ، على الوسط الغذائي Minimal salts medium الحاوي على 1% حليب فرز المحضر بالرقم الهيدروجيني الأمثل البالغ 8 .يتضح من الشكل (4) أن العزلة اعطت فعالية نوعية للإنزيم قدرها 57.7 وحدة/ملغم بروتين عند درجة حرارة 5م ، وازدادت الفعالية النوعية بزيادة درجة الحرارة لتبلغ اقصى قيمها وهي 171.7 وحدة/ملغم بروتين عند درجة حرارة 15م ، ثم تعود لتنخفض بعدها مع زيادة درجة الحرارة حتى في درجة الحرارة المثلى لنمو هذه البكتريا وهي 25م إذ بلغت عندها الفعالية النوعية 103.2 وحدة/ملغم بروتين ، وهو تأكيد لماتوصل اليه Agarwal واخرون (2004) من أن درجة الحرارة المثلى لنمو الكائن المجهري قد لا تكون دائماً هي المثلى لإنتاج الإنزيمات حتى بين سلالات النوع الواحد ، واستمرت بعدها الفعالية النوعية بالإنخفاض لتصل الى 13.8 وحدة/ملغم بروتين في درجة حرارة 35م ، وهذا يتفق مع ماذكره Ikram-Ul-Haq و Umber (2006) من أن للحرارة العالية تاثيرات مدمرة في إنتاج البروتييزات . يعزى تأثير درجة الحرارة في إنتاج الإنزيمات الى تأثيرها في نمو الكائن المجهري والفعاليات الأيضية للخلية ، فضلاً عن تأثيرها في ذائبية الأوكسجين في الوسط الغذائي والطاقة الحركية للجزيئات وتغيير الخواص الفيزيائية للغشاء الخلوي (Vijay واخرون ، 2010). تتفق هذه النتائج مع ماذكره Gugi واخرون (1991) في أن افضل إنتاج للبروتييزات من البكتريا *P. fluorescens* يكون بين 15 – 18م ، اي اقل من درجة الحرارة المثلى للنمو

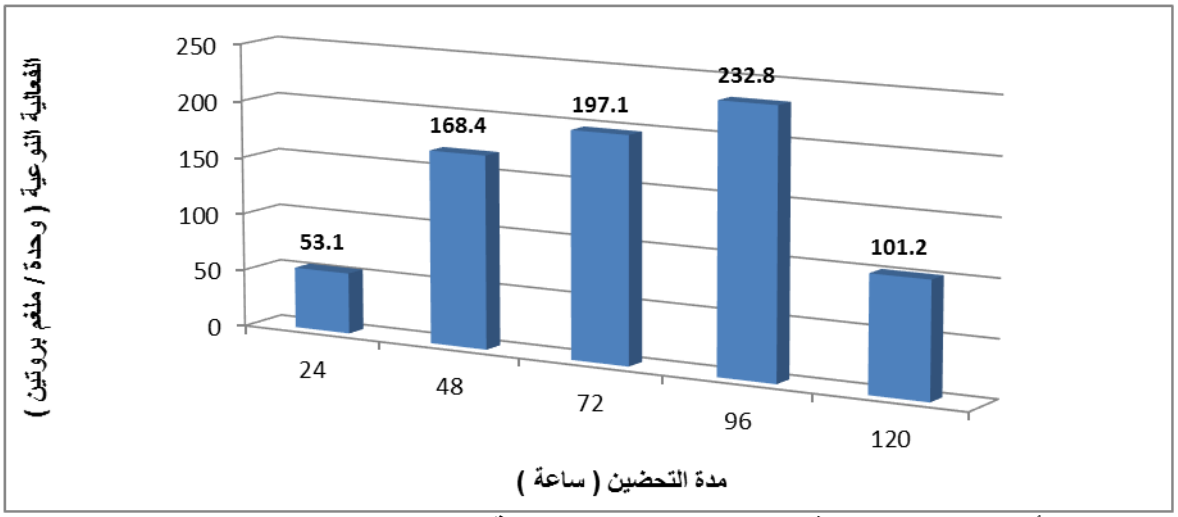
الشكل 4 . تأثير درجة الحرارة في إنتاج البروتيز من العزلة *Pseudomonas fluorescens* ISH .

تحديد تركيز اللقاح الأمثل للإنتاج : يبين الشكل (5) وجود زيادة تدريجية في إنتاج البروتييز بزيادة اعداد الخلايا في اللقاح المضاف الى الوسط الغذائي ، إذ بلغت الفعالية النوعية 30.1 وحدة/ملغم بروتين عند إستعمال لقاح بتركيز 10^2 وت م / مل ، وازدادت الفعالية النوعية للإنزيم مع زيادة تركيز اللقاح لتبلغ اقصى قيمة لها عند تركيز 10^7 و ت م / مل إذ بلغت 172.3 وحدة/ملغم بروتين ، لتعود بعدها وتنخفض مع زيادة تركيز اللقاح لتبلغ 144.7 وحدة/ملغم بروتين عند إستعمال تركيز لقاح 10^8 و ت م / مل . إن إنخفاض الفعالية النوعية للإنزيم بإستعمال تركيز قليل من اللقاح يعود الى أن عدد الخلايا لايكفي لإنتاج كميات كبيرة من الإنزيم ، أما إنخفاض الفعالية النوعية للإنزيم بزيادة تركيز اللقاح المستعمل عن الحد الأمثل فيمكن أن يعزى الى التزاحم الشديد للخلايا وتنافسها على المواد الغذائية في الوسط وتغير الرقم الهيدروجيني للوسط تبعاً لذلك (Ross واخرون ، 1990) .



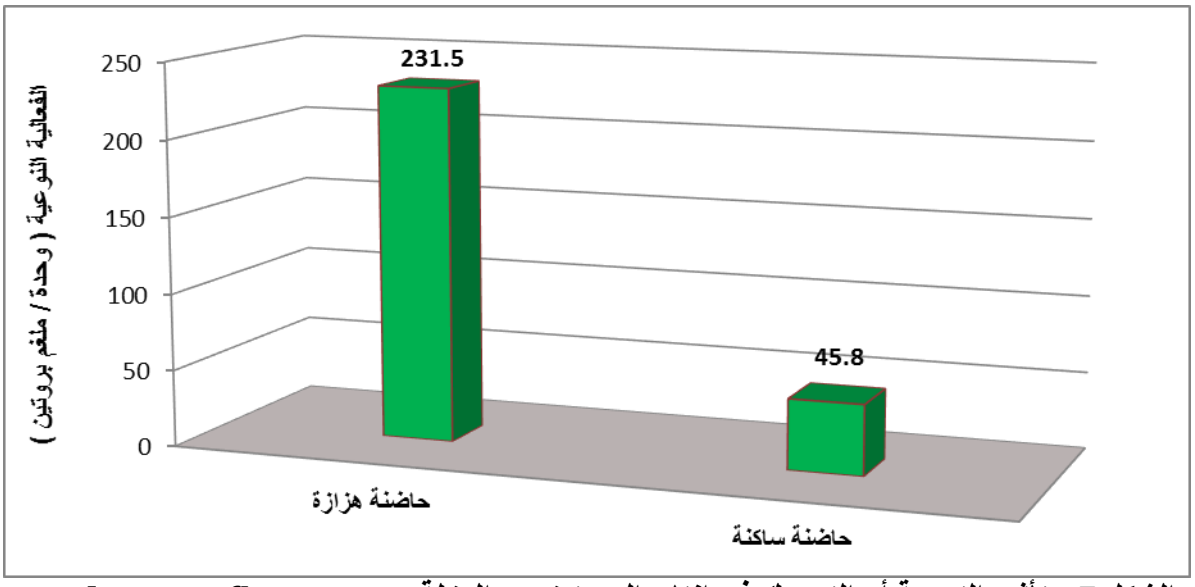
الشكل 5 . تأثير تركيز اللقاح في إنتاج البروتيز من العزلة ISH *Pseudomonas fluorescens* .

تحديد مدة التحضين المثلى للإنتاج : تم متابعة إنتاج البروتييز من العزلة المحلية *Pseudomonas fluorescens* ISH عبر مدد تحضين مختلفة ، إذ يتضح من ملاحظة الشكل (6) تزايد الفعالية النوعية للإنزيم المنتج مع زيادة مدة التحضين إذ بلغت 53.1 وحدة/ملغم بروتين ، لتصل اقصى مستوياتها عند 232.8 وحدة/ملغم بروتين بعد مرور 96 ساعة من التحضين بدرجة حرارة 15م ، لتعود وتنخفض بعده مع زيادة المدة عن هذا الحد لتصل الى 101.2 وحدة/ملغم بروتين بعد 120 ساعة من التحضين .



الشكل 6 . تأثير مدة التحضين في إنتاج البروتيز من العزلة ISH *Pseudomonas fluorescens* .

يمكن أن يعزى إنخفاض الفعالية النوعية بزيادة مدة التحضين الى التحلل الذاتي للخلايا واطلاق محتوياتها الى الوسط وحدوث هضم ذاتي للإنزيم او بسبب تغير الظروف المزرعية بفعل نواتج العمليات الأيضية المتكونة مع إستمرار نمو البكتريا الأمر الذي ينعكس سلباً على الإنتاج (Lazazzera ، 2000) .
تتفق هذه النتيجة مع ماذكره Gugi واخرون (1991) من أن مدة تحضين 96 ساعة كانت هي الأفضل لإنتاج البروتييز من *Pseudomonas fluorescens* ، وهو الأمر الذي اكده Mu واخرون (2009) من أن افضل إنتاجية للإنزيم من البكتريا *Pseudomonas fluorescens* Rm12 كانت بعد مدة تحضين 96 ساعة .
تاثير عملية التهوية في إنتاج الإنزيم : يظهر الشكل (7) أن إنتاج إنزيم البروتييز من العزلة المحلية لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* ISH كانت 231.5 وحدة/ملغم بروتين عند إستعمال الحاضنة الهزازة بسرعة 125 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 15م بعد مرور 96 ساعة من التحضين ، وهي افضل بكثير مقارنة بإستعمال الحاضنة الساكنة بنفس الظروف أعلاه إذ بلغت الفعالية النوعية 45.8 وحدة/ملغم بروتين.
تعزى النتائج أعلاه الى دور عملية التحريك في توفير الأوكسجين الذائب ومجانسة مكونات الوسط وتوزيع المادة الأساس في وسط التنمية ، وعلى العموم تنتج إنزيمات البروتييز في ظروف هوائية (Nadeem واخرون ، 2009) ، إذ يتاثر إنتاج البروتييزات الخارج خلوية في الأحياء المجهرية الهوائية بتوفر الأوكسجين المذاب في الوسط الذي يمتلك تاثيرات مختلفة على تكوين المنتج خلال التخمرات الهوائية وذلك لتأثيره في المسارات الأيضية للأحياء المجهرية المنتجة (Potumarthi واخرون ، 2007).



الشكل 7 . تأثير التهوية أو التحريك في إنتاج البروتيز من العزلة *Pseudomonas fluorescens* ISH

المصادر

سيلي ، هـ . و . ، وفان ديمارك ، ب . ج . 1989 . الكائنات الدقيقة عمليا . ترجمة عبد الحافظ ، ع . م . ، ومبارك ، م . ص . م . ، ومحمود ، س . ع . ت . ، الدار العربية للنشر والتوزيع ، القاهرة .

Agrawal, D., P. Patidar, T. Banerjee and S. Patil. 2004. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*. 39. 977-981.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248–254.

Buchanan, R. E. and M. E. Gibbons. 1974. Bergey's Munual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams and Wilkins compression. Baltimore, Maryland.

Cempirkova, R. and M. Mikulova. 2009. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's milk. *Czech J. Animal Sci*. 54: 65-73.

Gugi, B., N. Orange, F. Hellio, J. F. Burini, C. Guillou, F. Leriche and J. F. Guespin-Michel. 1991. Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriology*. 173:12. 3814-3820.

Haddar, A., N. Fakhfakh-Zouari, N. Hmidet, F. Frikha, M. Nasri and A. S. Kamoun. 2010. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. *J. Bioscience and Bioeng*. 110: 288-294.

Harrigan, W.F. and M. E. McCance. 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press. London. New York.

Holt, J. G., N. R. Krieg, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins. Baltimore. Maryland. U.S.A.

Ikram-Ul-Haq, M. H. and H. Umber. 2006. Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions. *J. Agriculture and Social Sci*. 2: 1813–2235.

Karan, R., S. P. Singh, S. Kapoor and S. K. Khare. 2011. A novel organic solvent tolerant protease from a newly isolated *Geomicrobium* sp. EMB2 (MTCC 10310): production optimization by response surface methodology. *New Biotechnology*. 28: 136-145.

Kohlmann, K. L., S. S. Nielsen and M. R. Ladisch. 1991. Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. *J. Dairy Sci*. 74: 4125-4136.

Lazazzera, B. A. 2000. Quorum sensing and starvation signals for entry into the stationary phase. *Current Opinion in Microbiology*. 3:177-182.

Mckellar, R. C. and H. Cholette. 1984. Synthesis of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* under conditions of limiting carbon, nitrogen, and phosphate. *Appl. Environ. Microbiol*. 47: 1224-1227.

Mu, Z.; M. Du and 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.

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

Nicodeme, M., J. Grill, G. Humbert and J. Gaillard. 2005. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. *J. Appl. Microbiol*. 99: 641–648.

Palleroni, N. J. 2004. *Pseudomonas*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T. and Garrity, G. M. eds.). Springer. New York. pp. 323–379.

Palleroni, N. J. 1984. Family I: *Pseudomonadaceae*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Krieg, N. R. and Holt, J. G. eds.). Williams and Wilkins. Baltimore.

Pillai, P., S. Mandge and G. Archana. 2011. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13. *Process Biochemistry*. 46: 1110-1117.

Potumarthi, R., S. Chi. and A. Jetty. 2007. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. *Biochemical Engineering J*. 34:185-192.

Ross, I. K., F. DeBerandis, G. E. Emerson, A. Casson and P. A. Sullivan. 1990. The secreted aspartic proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of proteinase-deficient mutant. *J. Gen. Microbiol*. 136: 687-694.

Sharma, J., A. Singh, R. Kumar and A. Mittal. 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.

Stanier, Y., N. J. Palleroni and M. Doudoroft. 1966. The aerobic *Pseudomonas*: Taxonomic studay. *J. Gen. Microbiol*. 43: 159- 271.

Stolp, H. and D. Ggadkari. 1981. Nonpathogenic members of the genus *Pseudomonas*. In: The Prokaryotes. (Starr, M. P.; H. Stolp; H. G. Truper and H.G. Schlegel eds.). Springer-Varlage. Berlin. Heidelberg. New York.

Tari, C., H. Genckal and F. Tokatl. 2006. Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry*. 41: 659–665.

Vijay A., S. Hemapriya, J. Selvin and S. Kiran. 2010. Production and optimization of haloalkaliphilic protease by an extremophile *Halobacterium* sp. Js1, isolated from thalassohaline environment. *Global J. Biotechnology and Biochemistry*. 5: 44-49.

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.

EXTRACTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE OF *Pseudomonas fluorescens* ISH AND IT'S ROLE IN DETERIORATION OF IRAQI SOFT CHEESE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Pseudomonas fluorescens* AND DETERMINATION OF OPTIMUM CONDITIONS OF PROTEASE PRODUCTION

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 presence of psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* was investigated in samples of Iraqi soft cheese that produced in the dairy plant of the department of food science, college of Agriculture, University of Baghdad, Iraq.

Depending on the cultural, morphological and biochemical tests and proteolysis, 24 isolates were diagnosed as proteolytic bacteria. The diagnosis was confirmed by Vitek 2 compact system.

The most efficient 5 isolates were used to quantitative investigate protease production capability. The local isolate *P. fluorescens* ISH was the best in enzyme production (117.8 units/mg protein), and thus it was used in the current study to produce the enzyme by submerged cultures.

The optimum conditions for protease production were the use of minimal salts medium with 1% skim milk and pH 8 at a 15^{O}C for 96 hours and the inoculum size was 1 x 10^{7} using shaking incubator at 125rpm of speed.

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