تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم الجيلاتينيز من العزلة المحلية لبكتريا B91 *Enterococcus faecalis*

Determination of the optimum conditions for Gelatinase production from local isolate *Enterococcus faecalis* B91

سحر ارحيم حسين غازي منعم عزيز
كلية العلوم / جامعة بغداد
Sahar I. Hussien Ghazi M. Aziz
College of Science/ University of Baghdad

الخلاصة

تم الحصول على 70عزلة محلية تعود لبكتريا المكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة شملتها الدراسة وعلى النحو الاتي : 29 عزلة من عينات الادرار ، 22 عزلة من عينات البراز ، 9 عزلات من عينات الدم ، عزلة واحدة من المهبل ، عزلتان من مسحات القشع ، **عزلة واحدة من سائل الجنب ، عزلة من سائل الخلب ، 5 عزلات من مسحات الجروح** . تميزت 7 **عزلات** بقابليتها على انتاج الانزيم **،** وذلك بقدرتها على اسالة وسط الجيلاتين شبه الصلب وتحويله الى الحالة السائلة ، وتكوينها هالة شفافة حول المستعمرة البكتيرية بعد تغطية الطبق بكاشف فرازير **، ثم انتخبت العزلة** المحلية *Enterococcus faecalis* B91 كونها الاغزر انتاجا للانزيم بفعالية نوعية 18 **وحدة** / ملغم بروتين **باستعمال الوسط الغذائي السائل** Yeast extract gelatin . حددت الظروف المثلى لانتاج الانزيم من العزلة B91 ، وكان الفركتوز هو الافضل بوصفه مصدرا كاربونيا بتركيز2.5 % **،** والجيلاتين عاملا محفزا لانتاج الانزيم بتركيز 1% ، وبعدد خلايا لقاح 1×10^{9} cfu/ml عند رقم هيدروجيني ابتدائي مقداره 7 **، ثم الحضن لمدة 24ساعة بدرجة حرارة** 40 م بالحاضنة الهزازة **بسرعة** 150 **دورة** / دقيقة .

Abstract

A total of 70 isolates belonged to *Enterococcus faecalis* collected from different clinical sources : (29 urine sample, 22 stool sample, 9 blood sample, 1 vagina sample, 2 sputum sample, 1 pleural fluid sample, 1 peritoneal fluid sample and 5 wounds sample). Seven isolates were able to produce gelatinase since they were able to liquefied the gelatin medium and clear zone were observed around the bacterial growth after floating the plate with freizer's reagent. *Enterococcus faecalis* B91 was higher producer of gelatinase in submerged culture by using Yeast extract gelatin Medium. Optimization study revealed that fructose was the best carbon source at 2.5% and 1% gelatin as inducible source to production the enzyme and inoculum size 1x10^{9} cfu/ml at initial pH7, incubated for 24 hours at 40°C by using shaking incubator at 150 rpm.

المقدمة

يعد انزيم الجيلاتينيز من الانزيمات الخارج خلوية المحللة للبروتين والحاوية على الزنك في تركيبها ، ويكون من **نوع** Endopeptidase والمشابه لـ Elastase المنتج من بكتريا *Pseudomonas* ، وينتج هذا الانزيم بكميات كبيرة من بكتريا *Enterococcus faecalis* المعزولة من المرضى والذين يعانون بالدرجة الاولى من التهاب **شغاف القلب** Endocarditis او الذين يعانون من تجرثم الدم Bacterimia **وتعفن الدم** Septicemia او السحايا Meningitis واحيانا من اصابات الاطفال حديثي الولادة حيث يمكن ان يسبب موت 10% منهم [1] .
يختلف الوزن الجزيئي لهذا الانزيم باختلاف نوع الكائن الحي او باختلاف مكان العزل ضمن المصدر نفسه ، ويعد انزيم External Gelatinase (Gel E) عامل ضراوة لبكتريا *Enterococcus faecalis* حيث يعمل على تحليل Antimicrobial peptide التي تلعب دورا رئيسا في المراحل المبكرة من الاصابات الميكروبية . ويترسخ دور Gel E في تحليل المتمم C3a ويثبط عملية استساغة **البلعمة** (Inhibition Opsonization) [2] . تمتاز عائلة الجيلاتينيز بقدرتهاعلى هضم احد مكونات ECM **على الأقل** ، وتحتاج

إلى وجود ايون الزنك لتكون فعاله في الـpH الفسلجي اذ انها تفرز بشكل انزيمات خاملة Zymogens وتنشط خارج الخلايا الا انها تثبط بالعوامل المخلبيه المعدنيه (Metal Chelators) وبمثبطاتها الطبيعية في النسيج (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) (TIMPs) . وتنتج عائلة هذه الانزيمات بالدرجة الاولى من بكتريا *Enterococcus faecalis* واجناس بكتيرية اخرى مثل: *Psendomonas* sp. ، *E.coli* والانواع الشائعة لجنس Bacillus مثل: *B.gelatine* ، *B.cereus* ، *B.coagulanus* ، *B.fumarioli* ، *B.amyloliquifaciens* ، *B.licheniformis* ، *B.subtilus* ، *B.sonorenis* ، *B.thermoamylovarans* وجنس *Anoxybacillus* مثل : *Ano.flavithermus* ، *Brevibacillus agari* ، *Brevibacillus borstelensis* ، *Proteus providans* فضلا عن خميرة *Cryptococcus neformans* وان اغلب هذه الانواع لها خصائص مرضية . كذلك يمكن عزل الانزيم من السوائل الجسمية لحشرة *Galleria mellonella* [3] . يستعمل انزيم الجيلاتينز في التقانات الصناعية التي تشمل ازالة بقايا الحشرات الميتة والطبقات اللزجة من الياف الحرير الطبيعي واكسابه اللمعان والنعومة وتنظيف العدسات اللاصقة وصناعة الافلام الفوتوغرافية (Photographic films) ومركبات الغسيل والمنظفات الحيوية (Biodetergents) ومعاملة الفضلات الثقيلة ودباغة الجلود [4] .

نظرا لندرة الدراسات المحلية المتعلقة بانتاج هذا الانزيم من البكتريا ولاهميته الكبيرة في المجالات الطبية والبحثية فقد هدفت الدراسة الى ما ياتي:عزل المكورات المعوية البرازية *E.faecalis* من مصادر سريرية مختلفة ثم تشخيصها عن طريق دراسة الخصائص والصفات الزرعية والاختبارات الكيموحيوية الخاصة بهذا النوع البكتيري ، غربلة تلك العزلات للتحري عن قابليتها على انتاج انزيم الجيلاتينيز وانتقاء العزلة الاكفأ في انتاجه وتحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم الجيلاتينيز باستخدام الاوساط السائلة .

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص بكتريا *Enterococcus faecalis*

جمعت (185) عينة سريرية مختلفة من المرضى المراجعين لمستشفى الكاظمية التعليمي للفترة (28 تشرين الاول- 15 كانون الاول) للعام 2007 وتم اعتماد الفحوصات المجهرية والكيموحيوية لتثبيت الصفات الزرعية للمستعمرات لتشخيصها حتى الجنس والنوع وفقا للاختبارات الواردة في [5].

اختبار قدرة العزلات البكتيرية على انتاج الجيلاتينيز

اختبرت العزلات العائدة لجنس *E. faecalis* من حيث قابليتها على انتاج الجيلاتينيز بتنميتها على وسط الجيلاتين شبه الصلب والذي يحتوي على الجيلاتين بتركيز 30% [6] ، حيث تم زرعها بطريقة الطعنة وحضنها لمدة (24- 48) ساعة ، بعدها وضعت الانابيب في بدرجة حرارة 4 م لملاحظة تسيل الجيلاتين ، كذلك اختبرت قابلية هذه العزلات المحلية على انتاج الانزيم بتنمية العزلات المحلية قيد الدراسة على وسط انتاج الجيلاتينيز الصلب (Gelatin agar) الحاوي على الجيلاتين 3% والببتون0.5% ومستخلص الخميرة 0.3% (الغني بالنتروجين) ثم حضنها لمدة 24ساعة بدرجة حرارة 37م . كما تم التحري عن قابلية العزلات الاكثر كفاءة في انتاج الانزيم باستخدام الوسط السائل ، وذلك بتنميتها على وسط Yeast Extract Gelatin Medium الموصوف من قبل [7]

تقدير فعالية انزيم الجيلاتينيز وتركيز البروتين

قدرت فعالية انزيم الجيلاتينيز في المحاليل الناتجة بعد فصل الخلايا البكتيرية وفق الطريقة الموصوفة من قبل [8] التي تعتمد على تحلل الجيلاتين (مادة التفاعل المحضرة بتركيز 1% في دارئ الفوسفات) الى الببتيدات والاحماض الامينية المكونة له بفعل الانزيم ، تعرف وحدة الفعالية الانزيمية (وحدة) على انها كمية الانزيم اللازمة لزيادة الامتصاصية بمقدار0.01 بالدقيقة الواحدة تحت الظروف القياسية . اماطريقة تقدير البروتين فقد قدرت وفق الطريقة الموصوفة من قبل [9] بالاعتماد على المنحنى القياسي لالبومين المصل البقري واستعمال صبغة الكوملسي الزرقاء G-250 عند طول موجي 595 نانوميتر .

تحديد الظروف المثلى لانتاج الجيلاتينيز

تعيين المصدر الكاربوني الامثل لانتاج الجيلاتينيز

درست مصادر كاربونية مختلفة مثل المالتوز ، والكلوكوز ، وعصير التمر (حُسب التركيز على اساس المواد الصلبة للسكريات الذائبة %) ، والسكروز ، واللاكتوز ، والفركتوز لتعيين المصدر الكاربوني الامثل لانتاج

الجيلاتينيز من العزلـة المحليـة *E. faecalis* B91 ، فضلا عن ذلك تم تعيين التركيز الامثل للمصدر الكاربوني المنتخب باضافته الى الوسط وبتراكيز مختلفة هي (0 ، 1 ، 1.5 ،2 ، 2.5 ، 3 ، 3.5 ، 4) % ، وتم استخلاص الانزيم وقياس فعاليته وتركيز البروتين .

تاثير تراكيز مختلفة من الجيلاتين في انتاج الانزيم

اختبرت تـراكيز مختلفة من الجيلاتين (0 ،0.5 ،1 ،1.5 ،2 ، 2.5 3) % لتعيين التركيز الامثل من الجيلاتين المحفز لانتاج الجيلاتينيز في الوسط الغذائي الانتاجي من العزلة المحلية لبكتريـا *E. faecalis* .

تعيين مدة الحضانة المثلى لانتاج الجيلاتينيز

تم متابعة انتاج الجيلاتينيز من العزلة المحلية لبكتريا *E. faecalis* B91 بمدد زمنية مختلفة هي :(24 ، 36 ، 48 ،60 ، 72 ، 84 ، 96) ساعة لتحديد مدة الحضانة المثلى لانتاج الجيلاتينيز من العزلة المحلية لبكتريا *E. faecalis* B91 .

تحديد تركيز اللقاح الامثل للانتاج

لقح الوسط الغذائي الانتاجي بتراكيز مختلفة من اللقاح البكتيري للعزلة المحلية المنتخبة تراوحت بيـن(10^9 – 10^2) خلية / مليلتر ، باضافة اللقاح بنسبة 2% من كل تركيز وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة لتحديـد التركيـز الامثل من اللقـاح البكتيـري لانتـاج الجيلاتينيـز من العزلة المحلية لبكتريا *E. faecalis* B91 .

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل

حضن الوسط الانتاجي للجيلاتينيز بارقام هيدروجينية تراوحت بين (4.5 - 9) وبفارق 0.5 بين درجة واخرى كلا على انفراد لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الجيلاتينيز .

تحديد درجة الحرارة المثلى

حضن الوسط الغذائي لانتاج الجيلاتينيز بدرجات حرارة مختلفـة شملت (25 ، 30 ، 35 ، 37 ، 40 ، 45 ، 50) م لمدة 24 ساعة كلا على انفراد لتحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الجيلاتينيز من لعزلة المحلية لبكتريـا B91 *E. faecalis* .

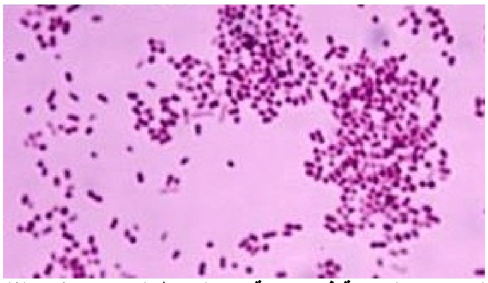
النتائج والمناقشة

جمعت (185) عينة سريرية من مناطق مختلفة من جسم المرضى المراجعين لمستشفى الكاظمية التعليمي شملت 71 عينة من الادرار ، 52 عينة من البراز، 23 عينة من الدم ، 2 عينة من مسحات المهبل ، 7 عينات من القشع ، 5 عينات من مسحات الاذن ، 6 عينات من سائل الجنب Pleural fluid ، عينة واحدة من سائل الخلب Peritoneal fluid ، 4 عينات من السائل الشوكي C.S.F ، 8 عينات من مسحات الجروح Wound swab ، عينة واحدة من قيح خلايا ملتهبة ، 5 عينات من مسحات البلعوم Throat swab ، وتم تشخيص 70 عزلة محلية تعود لبكتريا *E.faecalis* المعزولة من البراز ومصادر سريرية مختلفة شملتها الدراسة وعلى النحو الاتي: 29 عزلة من عينات الادرار جمعت من اشخاص مصابين بالتهابات السبيل البولي ، و22 عزلة من عينات البراز جمعت من أشخاص يعانون من التهاب الامعاء ، 9 عزلات من عينات الدم ماخذوة من اشخاص يعانون من تجرثم الدم ، عزلة واحدة مأخوذة من اناث يشكين من التهابات المهبل ، 2 عزلات من مسحات القشع لاشخاص يعانون من التهاب رئوي ، عزلة واحدة من سائل الجنب Pleural fluid لاشخاص يعانون من التهاب سائل الجنب ، عزلة من سائل الخلب لاشخاص يعانون من التهاب غشاء الخلب ، 5 عزلات من مسحات الجروح .

شخصت العزلات النامية على الاوساط الانتقائية استنادا الى الفحوصات المجهرية والكيموحيوية ويمثل جدول (1) نتائج الاختبارات الكيموحيوية لعزلات *E.faecalis* والتي يمكن تلخيصها :

اظهر فحص الشريحة شكل (1) ، ان اغلب خلايا المستعمرات العائدة الى جنس المكورات المعوية البرازية والنامية على وسط نقيع القلب والدماغ مع ازايد الصوديوم قد ظهرت بشكل مكورات مفردة بيضية متطاولة احيانا او على شكل ازواج في احيان اخرى او تظهر بشكل سلاسل قصيرة وموجبة لملون غرام وغير مكونة للابواغ [5] ، واظهرت النتائج في جدول (1) ان العزلات جميعها قد اعطت فحصا سالبا لانزيمي الكتاليز والاوكسيديز والقدرة على النمو بدرجات حرارة (10 ، 45) م حيث تعد صفة مميزة لهذا الجنس عن الاجناس الاخرى الموجبة لملون غرام ورقم هيدروجيني قاعدي 9.6 ، وتحمل الملوحة العالية التي تصل الى 6.5% كلوريد الصوديوم وهذه التفاعلات الكيموحيوية تمثل المفتاح التشخيصي لجنس المكورات المعوية التي تميزها من بقية المسبحيات التابعة للمجموعة المستضدية D التي ليس لها القدرة على النمو في مثل هذه الظروف ، بينما كانت مستعمراتها سوداء معتمة عند تنميتها على وسط اكار الاسكيولين Esculin agar ، حيث تمتلك المكورات

المعوية القابلية في تحليل الاسكيولين الى كلوكوز واسكيولتين Esculetin بفعل انزيم Esculinase مما يؤدي الى تغيير لون الوسط من الاصفر الى الاسود نتيجة لتكوين معقد بين مادة Esculetin مع الحديد في مركب Ferric ammonium citrate ، كان للعزلات النامية جميعاًعلى الوسط اعلاه القابلية على النمو بتركيز 40% من أملاح الصفراء نتيجة لقابليتها على مقاومة هذه الاملاح ، وأظهرت النتائج اعلاه عائدية 133 **عزلة لجنس** المكورات المعوية ، كذلك تم تشخيص عزلات المكورات المعوية إلى مستوى النوع بدلالة الاختبارات الكيموحيوية الثلاثة أدناه التي تستعمل لتميز نـوع المكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* **عن** بقية الأنواع الأخرى التابعة لهـذا الجنـس فقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية في جدول (1) القدرة العالية لبكتريا *E.faecalis* على اختزال الكثير من المركبات ، حيث تميزت 70 عزلة ذات قابلية عالية على اختزال صبغة ازرق المثيلين بتركيز0.1 % فـي وسط الحليب الفرز Skim Milk وتحويل الوسط إلى الحالة المختـزلة نتيجـة افرازها إنزيم Reductase ، والنمو بتركيـز 0.04% من أملاح تلوريت البوتاسيوم فقد دل نمو المستعمرات على هذا الوسط على مقاومتها لهذه الأملاح وقدرتها على اختزال Tellurite **إلى** Tellurium حيث ظهـرت المستعمرات بلـون **لسود ، واختـزل مـادة** Triphenyl tetrazolium chloride بتركيز 0.01% بدلالـة اللـون الاحمر القرمزي للمستعمرات بسبب قدرتها على اختزال مركبات التترازوليوم إلى **مركب احمر** (Red formazon) . ظهرت جميع عزلات المكورات المعوية البرازية فحصا موجبا لاختبار **الفوكس بروسكاور وانتاج** Acetyl methyl carbinol ، والقابلية على تحليل الارجنين وانتاج الامونيا وثاني اوكسيد الكاربون و Ornithine بسبب افـراز انزيـم Arginine hydrolase وتخمير بايروفيت الصوديوم وانتاج حامض ، حيث تعد بكتريا *E. faecalis* الوحيدة من الصنف الذي تنتمي اليه مخمرة للبايروفيت ، وتميزت العزلات بعدم قدرتها على انتاج كبريتيد الهيدروجين والصبغات ومتحركة مما يميزهـا من الأنواع الأكثر تواجداً معها مثل *E.gallinarium* **(متحركة ومنتجة للصبغة)** . اما فيما يخص المصادر الكاربونية فقد كانت جميع العزلات مخمرة للرايبوز والمانتول والسوربيتول واللاكتوز والكلوكوز والسكروز والمالتوز وقد أظهرت تباينا في قدرتها على تخمر سكري الارابينوز والزايلوز ، وهذا الاختلاف قد يعزى إلى أن بعض العزلات ربما تمتلك بعض الخواص والصفات الفسيولوجية التي تجعلها مختلفة بعض الشيء عن صفاتها الأصلية .



شكل (1) :صورة مجهرية لبكتريا المكورات المعوية في مسحة من الوسط الزرعي نقيع القلب الدماغ مع ازايد الصوديوم مصبوغة بصبغة غرام

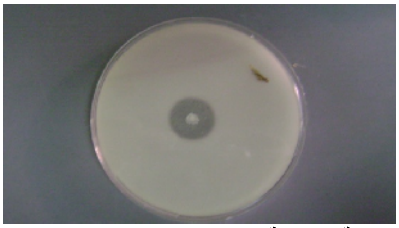
جدول(1) : نتائج الاختبارات الكيموحيوية لعزلات المكورات المعوية البرازية *E. faecalis*

ت	الاختبار	النتيجة	ت	الاختبار	النتيجة
1	اختبار انزيم الكاتاليز	-	14	**انتاج غاز** H_2S	-
2	اختبار انزيم الاوكسيديز	-	15	**اختبار إنتاج الصبغات**	-
3	النمو في اس هيدروجيني 9.6	+	16	الحركة على الوسط شبه الصلب	+
4	النمو بتركيز 6.5% كلوريد الصوديوم	+	17	تخمر السكريات	
5	**النمو بدرجات حرارة** (10، 45م^o)	+	A	**كلوكوز**	+
6	تحلل الاسكيولين	+	B	رايبوز	+
7	**النمو في** 40% **املاح الصفراء**	+	C	**سوربتول**	+
8	**النمو في** 0.1% ازرق المثيلين	+	D	**مالتوز**	+
9	**النمو في** 0.01% كلوريد التترازوليم	+	E	ارابينوز	+/ –
10	**النمو في** 0.04% تلوريت البوتاسيوم	+	F	**سكروز**	+
11	**اختبار الفوكس- بروسكاور**	+	G	زايلوز	+/ –
12	تحلل الآرجنين	+	H	**مانتول**	+
13	تخمر البايروفيت	+			

(+): الاختبار موجب ، (-): الاختبار سالب ، (+/-):الاختبار جزئي

التحري عن قابلية العزلات المحلية لبكتريا *E. faecalis* على انتاج انزيم الجيلاتينيز

اظهرت 7 عزلات فقط قد (شملت 4 عزلات فقط ذات الرمـوز S32، S27، S16، S2 المعزولة من البراز ، عزلة واحدة U66 من ادرار مريض يعاني من التهاب السبيل البولي ، وعزلة واحدة B91 من دم مريض يعانـي من تجرثم الدم وعزلة واحدة P.F من سائل الخلب المعزولة من مريض يعاني من التهـاب غشـاء الخلـب Peritonitis) ان لهـا القابلية على اسالـة الجيلاتين الموجـود في وسط الجيلاتين شبه الصلب بفعل انزيـم الجيلاتينيـز . كذلك اظهرت نفس العزلات السبعة قابليتها على تحليل الجيلاتين في وسط انتاج الجيلاتينيز الصلب (Gelatin agar) اعتماداً على ظهور الهالـة الشفافة حول المستعمرة النامية بعد اضافـة كاشف فرازيـر وتم قياس قطـر التحلل لكل عزلة شكل (2) وجدول (2) .



شكل(2) :قابلية العزلة المحليـة *E.faecalis* S27 على انتاج الجيلاتينيز بعد تنميتها على الوسط الصلب Gelatin agar بدرجة 37م ولمدة 24ساعة

جدول(2) :الغربلة شبه الكمية لعزلات *E .faecalis* المحلية المنتجة لانزيم الجيلاتينيزعلى الوسط الغذائي الصلب Gelatin agar بدرجة 37م لمدة 24 ساعة موزعة حسب مصادر عزلها المختلفة

مصدر العزل	عدد العينات الموجبةالحاوية على البكتريا	عدد العينات الموجبة المنتجة للانزيم	رمز العزلات المنتجة للانزيم	قطر منطقة التحلل (ملم)	النسبة المئوية للعزلات (%)
الادرار	29	1	U66	15	14.29
البراز	22	4	S32 , S27, S16, S2	12 ، 19، 10، 7	57.14
الدم	9	1	B91	9	14.29
سائل الخلب	1	1	P.F	16	14.29
القشع	2	0	0	0	0
سائل الجنب	1	0	0	0	0
المهبل	1	0	0	0	0
الجروح	5	0	0	0	0
المجموع	70	7	0	0	100.01

اختيار العزلة الاكفا في انتاج الجيلاتينيز في الوسط السائل

انتخبت 7 عزلات من مرحلة الغربلة شبه الكمية التي انتجت هالة شفافة على وسط انتاج الجيلاتينيز الصلب بقطر(7- 19) ملم خلال 24 ساعة ولها القدرة على اسالة الجيلاتين في وسط اسالة الجيلاتين شبه الصلب خلال (24- 48) ساعة ، لتحديد العزلة الاكفأ في انتاج الانزيم باستخدام الوسط السائل ، وتشير النتائج المبينة في جدول (3) ان العزلة المحليـة *E.faecalis* B91 تميزت بانتاجها العالي للانزيم قياساً بباقي العزلات اذ بلغت الفعالية النوعية للانزيم 18 وحدة/ملغم بروتين بينما تراوحت الفعالية النوعية لبقية العزلات بين (1- 8) وحدة/ملغم بروتين ، وبالاعتماد على هذه النتائج اختيرت هذه العزلة لتكون مصدرا لانتاج الانزيم في النتائج اللاحقة . كذلك لوحظ من خلال النتائج المستحصلة ان العزلة *E.faecalis* U66 قد اتصفت بضعف قابليتها على انتاج الانزيم اذ بلغت الفعالية النوعية لها 1 وحدة / ملغم بروتين وقد يعزى هذا التباين في انتاج الانزيم بين افراد النوع الواحد الى التباين الوراثي لها ونوع العزلات ومصادر العزل ومدى قابليتها على احداث المرض فضلا عن طبيعة الاصابة وظروف التنمية كمكونات الوسط الغذائي ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والتهوية والتحريك التي ساعدت على قابلية العزلة *E.faecalis* B91 لانتاج الانزيم في الوسط السائل .

جدول(3): الغربلة الكمية لعزلات *E.faecalis* المنتجة لانزيم الجيلاتينيز في الوسط الغذائي السائل **Yeast Extract Gelatin Medium** بدرجة حرارة 37 لمدة 24ساعة

رمز العزلة	الفعالية النوعية(وحدة/ملغم بروتين)
S2	**8**
S16	**2**
S27	**5**
S32	**8**
U66	**1**
B91	**18**
P.F	**6**

تحديد الظروف المثلى لانتاج الجيلاتينيز

المصدر الكاربوني الامثل لانتاج الجيلاتينيز

اختبرت ستة مصادر للكاربون في تنمية العزلة المحلية ودراسة تأثيرها في انتاج انزيم الجيلاتينيز تمثلت بالكلوكوز، الفركتوز ، السكروز ، المالتوز ، اللاكتوز ، عصير التمر بتركيز 2% ، وبينت النتائج ان سكر الفركتوز افضل مصدر كاربوني في انتاج الجيلاتينيز ، اذ بلغت الفعالية النوعية 15 وحدة / ملغم بروتين يليه السكروز والمالتوز بفعالية نوعية 13 وحدة / ملغم بروتين ويليه الكلوكوز بفعالية نوعية 7.5 وحدة / ملغم بروتين ، ثم اللاكتوز وعصير التمر بفعالية نوعية 7 وحدة / ملغم بروتين كما هوموضح في شكل (2) . ويعد سكر الفركتوز من السكريات البسيطة ذات الجاهزية العالية ومن السهولة نفاذها الى داخل الخلية اذ يعمل كمحفز لنمو الكائن المجهري ومصدراً للطاقة . لقد اختلفت المصادر الكربونية المستعملة في انتاج الجيلاتينيز باختلاف نوع الوسط الانتاجي المستخدم وباختلاف نوع الكائن المجهري فقد استعمل [10] سكر الكلوكوز في وسط تنمية بكتريا *E.faecalis* لتحفيز تلك البكتريا على انتاج انزيم الجيلاتينيز ، كذلك فان اضافة الكليسرول بدلا من السكروز للوسط يعزز من قابلية بكتريا *Micrococcus luteus* في انتاج انزيم الجيلاتينيز[7] . اضيف سكرالفركتوزالى الوسط الانتاجي بتراكيز مختلفة بوصفه مصدراً كاربونياً لانتاج الجيلاتينيز من العزلة المحلية *E.faecalis* B91 لبيان تأثيره في انتاج الانزيم شكل (3) . لوحظ انخفاض في الفعالية النوعية عند التركيزي(1،2)% ، اذ لم تتجاوز الفعالية النوعية للانزيم 12 وحدة / ملغم بروتين ، مع زيادة تدريجية بلغت حوالي 17 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 2.5 % ثم بدأت بالانخفاض لتصل الى 4 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 4 %.

يلعب المصدر الكربوني دورا مهما في تجهيز الطاقة التي يحتاجها الكائن الحي في النمو والتكاثر والانتاج ، ويمكن ان يعزى انخفاض انتاجية الانزيم عند التراكيز المنخفضة من الفركتوز الى عدم كفاية هذه التراكيز من السكر في نمو البكتريا وتحفيزها على انتاج الانزيم . وقد يعود انخفاض الانتاجية عند التراكيز العالية من السكر الى تغير حامضية الوسط الغذائي وانخفاضها بسبب نواتج الايض الخلوي اثناء مدة التخمير [11] .

تاثير تراكيز مختلفة من الجيلاتين في انتاج الانزيم

لوحظ انخفاض في الفعالية النوعية عند المعاملة المحتوية على 0.5% من الجيلاتين والمعاملة الخالية من الجيلاتين (0%)شكل (4) ، حيث لم تتجاوز الفعالية النوعية للانزيم عن 11 وحدة / ملغم بروتين ، ووصلت حوالي 17 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 1% ثم بدأت بالانخفاض مع زيادة تركيز الجيلاتين لتصل الى 6 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 3% ، وقد يُعزى هذا الانخفاض في الفعالية مع زيادة تركيز المادة الاساس الى التأثير التثبيطي للاحماض الامينية الناتجة من هضم الجيلايتن على انتاج الانزيم [12] .

توضح هذه النتائج ان انتاجية الجيلاتينيز تتحدد بمكونات الوسط الزرعي اذ اظهرت انتاجية عالية عند تزويد الوسط الزرعي بالمصدر النتروجيني الجيلاتين بتركيز 1% بثبات تركيز المصدرين النتروجينيين البپتون بتركيز 2% وذلك لكونه المادة الاساس التي يعمل عليها الانزيم ، ومستخلص الخميرة 0.5% ، ويؤدي التباين في تراكيز المواد المجهزة للوسط الزرعي دوراً مهماً في انتاجية الجيلاتينيز من قبل الاحياء المجهرية .

تحديد مدة الحضن المثلى لانتاج الجيلاتينيز

تم متابعة انتاج انزيم الجيلاتينيز من العزلة *E. faecalis* B91 في مدد زمنية مختلفة شملت (24، 36، 48، 60، 72، 84، 96) ساعة ، اظهرت النتائج ان افضل انتاج للانزيم كان بعد 24ساعة من الحضن اذ كانت الفعالية النوعية للانزيم 19.8 وحدة / ملغم بروتين شكل (5) بعدها اخذت الانتاجية بالانخفاض بزيادة مدة

الحضن عن 24ساعة . مما يشير الى ان مدة الحضن المثلى لانتاج الانزيم هي 24 ساعة ، كانت هذه النتيجة مقاربة [2] الذي بين ان مدة الحضانة اللازمة لبكتريا *E.faecalis* المعزولة من هيمولمف الحشرات والمنتجة لانزيم الجيلاتينيزهي 20ساعة . تشير بعض الدراسات الى أن انزيم الجيلاتينيز ينتج في الطور اللوغارتمي للكائن الحي وتزداد سرعة الانتاجية بزيادة سرعة النمو اللوغارتمي ليصل اقصاه في طور الثبات ، ثم يبدأ بالانخفاض عند طور الهلاك . ان الانخفاض في الفعالية الانزيمية عند اطالة مدة الحضن اكثر من 24ساعة يمكن ان يعزى الى قلة المحتوى الغذائي في الوسط الزرعي مع تراكم مواد الايض المختلفة والناتجة من نمو البكتريا اضافة الى انتاج بعض المواد المثبطة لنمو الخلايا في الوسط الغذائي ، او بسبب حدوث هضم ذاتي للانزيم او تثبيط بوساطة النواتج النهائية الذي ينعكس سلبا على فعالية الانزيم [13] .

تعيين اللقاح الأمثل لانتاج الجيلاتينيز

لوحظ زيادة تدريجية في انتاج الجيلاتينيز مع زيادة اعداد الخلايا في كمية اللقاح المضاف الى الوسط الزرعي حيث بلغت اعلى انتاجية عند اضافة 1×10^{9} خلية / مليلتر اذ بلغت الفعالية النوعية للانزيم 24 وحدة / مليغرام بروتين شكل (6) .

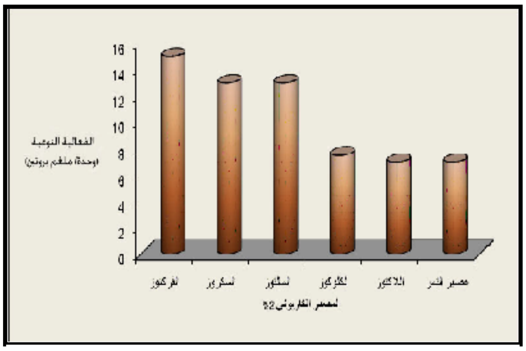
كما بينت النتائج ان تلقيح الوسط الغذائي باعداد قليلة من الخلايا ($10^{1} - 10^{5}$) خلية / مليلتر قد تكون غير كافية لزيادة الكتلة الحيوية والانتاج العالي للانزيم اذ تستهلك الوسط للنمو والانقسام ، في حين ان زيادة تركيز اللقاح ضمن الحدود المثلى يؤدي الى استغلال امثل لمكونات الوسط الغذائي وتحفيز الخلايا على الانتاج العالي للانزيم [14] واشارت دراسات اخرى الى ان الزيادة العالية لتركيز اللقاح عند الحدود المثلى قد يؤثر سلباً في انتاج الانزيم بسبب حالة التنافس لهذه الاعداد الكبيرة من الخلايا على تمثيل العناصر الغذائية الاساسية في الوسط وانعكاس ذلك على انتاجية الانزيم ، فضلاً عن تغيير الظروف المزرعية التي تشمل قلة المواد الغذائية في الوسط وتغير الرقم الهيدروجيني فضلا عن امكانية انتاجها وافرازها مواد سامة او مثبطة للنمو مما يؤثر سلبا في قدرة انتاج الانزيم من قبل الاحياء المجهرية [15] .

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الجيلاتينيز

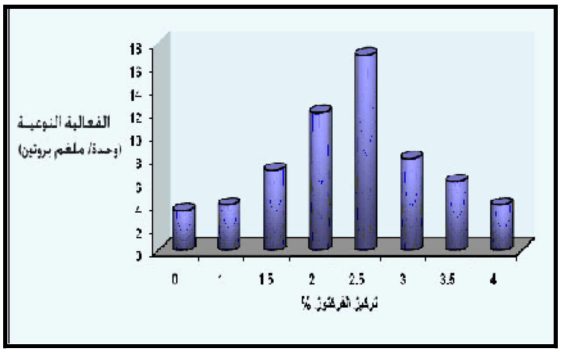
اظهرت النتائج انخفاض في انتاجية الانزيم عند القيم المتطرفة من الرقم الهيدروجيني الحامضية والقاعدية شكل (7) حيث فقدت الفعالية النوعية للانزيم عند قيم الرقم الهيدروجيني (4.5 ، 8 ، 8.5 ، 9) ، وازدادت تدريجياً عند الرقم الهيدروجيني 5 ، 5.5 حيث بلغت الفعالية (7 ، 8) وحدة / ملغم بروتين على التوالي حتى بلغت اقصاها عند الرقم الهيدروجيني المتعادل اذ بلغت الفعالية النوعية 20 وحدة / ملغم بروتين 7 . مما يشير الى الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الجيلاتينيز من العزلة المحلية قيد الدراسة هو 7 شكل (7) . ويأتي تاثير الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي الى دوره في ذائبية المركبات في الوسط فضلا عن تأثيره في الفعاليات الايضية للكائن الحي وتأين و ثباتية المركبات الحيوية خلال عمليات التخمير ومن ثم تاثيره في نمو البكتريا وانتاج الانزيم ، وتذكر العديد من الدراسات الى ضرورة السيطرة ومتابعة الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي لاجل الحصول على انتاجية مثلى للمواد المفرزة من الاحياء المجهرية فضلا عن المحافظة على فعاليتها وثباتها ، ان اعلى انتاج لمعظم الانزيمات الخارج – خلويه يكون في الارقام الهيدروجينية المثلى للنمو مع بعض الاستثناءات التي يكون فيها الرقم الهيدروجيني الامثل للنمو يختلف قليلا عن قيمه في انتاج الانزيم [16] .

تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الجيلاتينيز

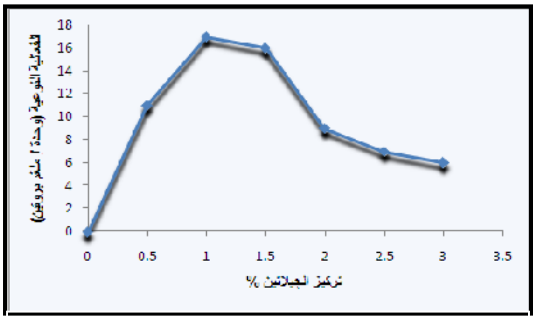
درس تأثير درجات حرارية مختلفة شملت (25، 30 ،35، 37، 40، 45، 50) م في انتاج الجيلاتينيز من العزلة المحلية *E. faecalis* B91 ، وبينت النتائج الموضحة في شكل (8) زيادة انتاج الانزيم بازدياد درجة الحرارة حيث بلغت اقصاها عند 40م ، اذ بلغت الفعالية النوعية 30 وحدة / ملغم بروتين ، بعدها انخفضت الانتاجية عند ارتفاع درجة الحرارة عن 40م . وقد وضح [17] ان درجة الحرارة المثلى لانتاج انزيم الجيلاتينيز من بكتريا *E.faecalis* هي 40م ، كذلك [18] ان درجة الحرارة المثلى لانتاج انزيم الجيلاتينيز من بكتريا *E. faecium* هي 40م . يتأثر انتاج الجيلاتينيز بتغير درجة حرارة الوسط الزرعي في اثناء الحضن ، اذ ينخفض انتاج الانزيم من بكتريا *Streptococcus pyogenes* عند ارتفاع درجة الحرارة عن 37م او انخفاضها و تمثل هذه الدرجة درجة الحرارة المثلى للانتاج [19] ، كذلك اشار [20] بان انتاج انزيم الجيلاتينيز يثبط في درجات الحرارة المنخفضة . ان لدرجة الحرارة تأثيراً مهماً في انتاج الانزيم من الاحياء المجهرية عن طريق تأثيرها في ذائبية الاوكسجين بالوسط الغذائي والطاقة الحركية للجزيئات وسرعة التفاعلات الانزيمية في الخلية وينعكس ذلك سلباً او ايجاباً في انتاج الانزيم .



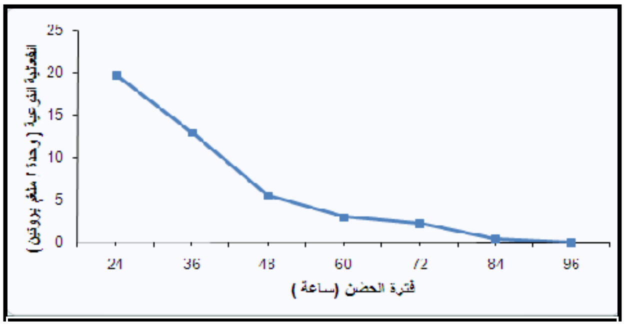
شكـل (2): تاثير مصـــادر كاربونيه مختلفه فـــي انتـــاج الجيلاتينيز مــن العزلـــة المحليـــة *E.faecalis* B91 في الوسط الغذائي **Yeast Extract Gelatin** بدرجه حرارة 37 م



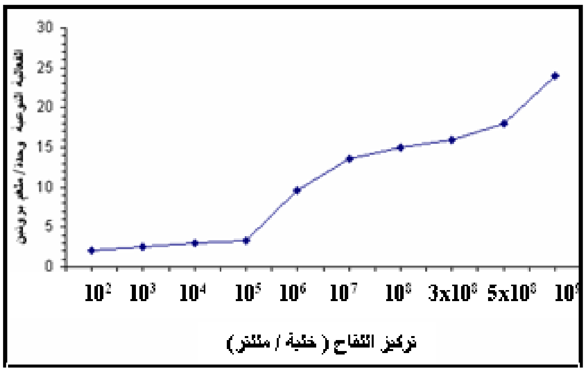
شكل(3): تاثيـــر تراكيز مختلفـــه من الفركتوز فيانتـــاج الجيلاتينيز من العزلـــة المحليه *E.faecalis* B91 في الوسط الغذائي **Yeast Extract Gelatin** بدرجه حرارة 37 م



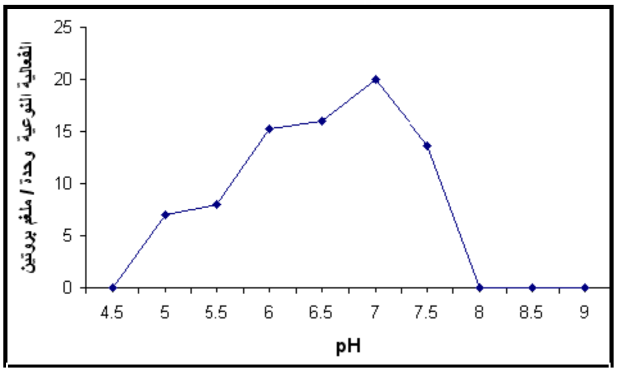
شكـل(4): تحديـــد تركيـــز الجيلاتين الامثـــل لانتـــاج الجيلاتينيز مـــن العزلـــة المحليـــة B91 *E.faecalis* في الوسط الغذائي **Yeast Extract Gelatin**بدرجه حرارة 37 م



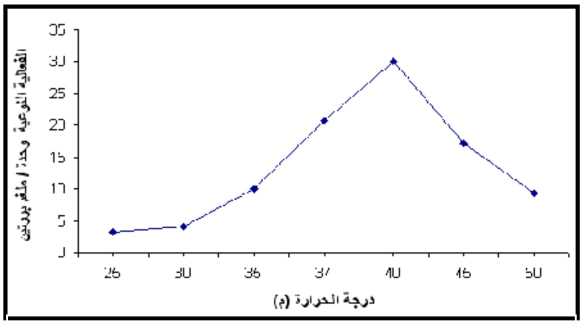
شكل (5): تاثير مدد الحضن المختلفه في انتاج الجيلاتينيز من العزله المحليه B91 *E.faecalis* في الوسط الغذائي **Yeast Extract Gelatin** بدرجه حرارة 37 م



شكل(6): تاثير تراكيز مختلفه من اللقاح (10^2 10^9) خلية / مللتر في انتاج الجيلاتينيز مـــن العزله المحليـــة B91 *E.faecalis* في الوســـط الغذائـــي**Yeast Extract Gelatin** بدرجـــه حرارة 37م



شكل (7): تاثير قيم مختلفه من الرقم الهيدروجيني (4.5 9) في انتاج الجيلاتينيز من العزلـــة المحليهB91 *E.faecalis* في الوســـط الغذائي **Yeast Extract Gelatin** بدرجـــه حرارة 37م



شكل(8): تاثير درجه الحرارة في انتاج الجيلاتينيز من العزله المحليه *E.faecalis* B91في الوســـط الغذائي **Yeast Extract Gelatin**

Refrences

1. Athanassiadou, F., Kourti, M., Tragiannidis, A., Makadou, A. and Papageorgiou, T. (2008). *Enterococcus faecalis* : an anusual cause of meningitis in a child with non-hodgkin lymphpma. Turk. J. pediat., 50:86-88.
2. Park, S.Y., Kim, K.M., Lee, J.H. and Seo, S.J. (2007). Extracellular gelatinase of *enterococcus faecalis* destroy a system in insect hemolymph & human serum. Infect. Immun., 75(4):1861-1869.
3. Fujishige, A., Smith, K.R., Silen, J.L. and Agard, D.A. (1992). Correct folding of a-lytic protease is required for its extracellular secretion from *Escherichia coli*. J. Cell Biol., 118: 33-42.
4. Banerjee, V.C., Sani, R. K., Azmi, W. and Soni, R. (1999). Termostable alkaliner protease from *Bacillus brevis* and its characterization as laundry detergent additive. Process Biochem., 5(1): 213-219 .
5. Macfaddin, J.F.(2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria (3rd ed). Lippincott,William and Wilkins, USA.
6. De Clerck, E., Vanhoutte, T., Hebb, T., Geerinck, J., Devos, J., De Vos, P. (2004). Isolation, Characterization, & Identification of bacterial contaminant in semifinal gelatin extracts. Appl. Environ. Microbiol., 70(6) : 3664-3672 .
7. Vermelho, A. B., Leal Mirelles, M. N., Lopes, A., Petinate, S. D. G., Chaia, A. A. and Branquinha, M. H. (1996). Detaction of extracellular proteases from microorganism on agar plate. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 91(6).
8. Brock, F.M., Forsberg,C .W., and Buchanan, S.G. (1982). Proteolytic activity of rumen microorganism & effect of protease inhibitose. Appl. Enviro. Microbiol. 44:561-569.
9. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
10. Slanetz,L.W. and Bartley,C.H. (1957). J .Bactriol. 74:591.
11. Cohen, J. O. (1969). Effect culture medium composition and pH on the production of M protein and proteinase by group A streptococci. J. Bacteriol., 99: 737 – 744.
12. White, T. C. and Agabia, N. (1995). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. Isoenzyme pattern is determined by cell type and levels are determined by enviromental factors. J. Bacteriol., 177(18): 5215-5221.
13. Suntornsuk, W., Tongjunl, J., Onnim, P., Oyama, H., Ratanakanochai, K., Kusamran, T. and Oda, K. (2005). Purification & characterization of keratinase from a thermotolerant feather –degrading bacterium. World J. Microbiol. Biotech. 21:1111-1117.
14. Wright, J. S., Jin, R. and Ivovick, R.P. (2005). Transient interence with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. Proc. Notion. Acad. Sci. USA. 102: 1691 – 1696.
15. 15. Abdullah, A. L., Tengerdy, R. P. and Murphy, U. G. (1985). Optimization of solid substrat fermemtation of wheat straw. Biotechnol. Bioeng. 27: 20-27.
16. Volesky, B. and Luong, L. (1985). Microbiol enzymes. Production, purification and isolation. Critical Rev. Biotechnol., 2: 119– 146.

17. Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., Jackson-Hall, M. C. and Hiott, L. M. (2005). Effect of media, temperature and culture conditions on the species population and antibiotic resistance of enterococci from broiler chickens. Appl. Microbiol., 41:262-268.

18. Beckmann, L., Vahjen, W. O. and Simon, D. R. (2000). Isolation of an 1, 3-1, 4-β-glucan degrading *Enterococcus faecium* strain from the intestinal tract of chicken and partial characterization of its novel 1, 3-1, 4 - β –glucanase. 40(6):303-310.

19. Lukomski, S. , Sreevatsan , S. , Amberg , C. , Reichard , W., Woischnik , M., Podbielskl , A. T. and Musser , J. M. (1997) . Inactivation of *Staohylococcus pyogenes* extracellular cysteine protease significantly decreases mouse letnality of serotype M3 and M49 strains . J. Clin . Invest ., 99 : 2574 – 2580 .

20. Hynes, W. L. & Tagg, T. R. (1986). Protienase-related broad spectrum inhibitory activity among group A streptococci. J. Med. Microbiol., 22: 257-264.