

تأثير درجة الحرارة على طرز البروتينات في بكتريا *Lactococcus lactis*

خلف جاسم محمد ليث مصلح نجيب ثامر يوسف مطر
جامعة الانبار - كلية العلوم

تاريخ الاستلام: ٢٠١٠/١٠/١٤ تاريخ القبول: ٢٠١١/٢/٩

الخلاصه

عزلت البكتريا *Lactococcus lactis* من عينة حليب ماشيه وشخصت اعتمادا على خصائصها الزرعيه على وسط *Man Rogosa Sharp* وخصائصها المجهرية وتفاعلاتها الكيموحيوية . اسفرت الفحوصات التشخيصيه الزرعيه عن كون البكتريا ذات مستعمرات صغيره ذات حافات ملساء بيضاء اللون على الوسط *Man Rogosa Sharp* واطهرت الفحوصات المجهرية عن كون البكتريا كروية الشكل موجبه لصبغة كرام واثبتت التفاعلات الكيموحيوية عن كونها سالبيه لاختبار الكاتاليز والاكسديز . لدراسة تأثير درجة الحرارة على المحتوى البروتيني للبكتريا نميت البكتريا عند ثلاث درجات حراريه 28°C , 37°C , 45°C ثم عزلت البروتينات عند كل معاملة حراريه ورحلت كهربائيا على هلام متعدد الاكربيل امايد واسفرت عملية الترحيل عن ظهور حزمه بروتينيه اضافيه عند درجة حرارة 37°C فضلا عن البروتينات التي احتوت عليها خلية البكتريا .

كلمات مفتاحيه : درجة الحرارة ، البروتينات ، *Lactococcus lactis*

المقدمه

تؤثر درجة حرارة الزرع على الفعاليات الحيويه في الخليه والتي لها درجه حراريه دنيا ومثلى وعليا وان المدى الحراري الذي يكون فيه النمو على افضله وبالسرعه القصوى يسمى بالمدى الحراري الافضل (optimum range) . لقد وجد ان درجة الحرارة الفضلى للنمو هي بضعة درجات اعلى من الدرجات الفضلى وان الابتعاد في كلي الاتجاهين عن هذا المدى الحراري يؤدي الى نقصان سرعه النمو حيث يكون النقص بدرجه محسوسه جدا عند رفع درجات الحرارة عن الفضلى وبدرجه اقل عند خفض درجة الحرارة [1] ان الحد الحراري الاقصى للنمو يعتمد ويتحدد بنوع الانزيمات او مدى تاثر البروتينات داخل الخليه بالحراره وان هذه الدرجات تكون عادة فوق الدرجات الفضلى والتي يحدث فيها نمو لذلك الكائن اما الحد الحراري الادنى فهو الدرجات الحراريه الاوطا والتي يحدث فيها نمو وتتحدد هذه الدرجه بانجماد الماء وتركيز المواد المذابه فيه . ان هذه الدرجات الحراريه الثلاث الدنيا والفضلى والقصى تسمى درجات

الحراره الرئيسيه (cardinal temperature) تختلف لكل كائن مجهري باختلاف المواد الغذائيه في الوسط الزرعى وباختلاف حاله الفيزيائيه له [2] . تتحدد درجات الحراره الفضلى لنمو الاحياء المجهرية بمدى تاثر جميع نفاعلات الخليه التي تشترك فيها الانزيمات . ان الانخفاض السريع في سرعه النمو عند رفع درجات الحراره اكثر من الفضلى ياتي نتيجة لفقدان طبيعه الانزيم (Denaturation) الذي يسيطر على سرعه النمو وربما انزيمات اخرى ايضا [3] . ان البروتينات هي المكونات الاساسيه للتركيب الخلوي ولوظيفته حيث انها تؤلف %85 من الوزن الجاف للخلايا . يحتوي البروتين على القواعد العضويه للماده الاوليه وهي كاربون وهيدروجين واوكسجين ونيروجين وكبريت وتتكون جزئيه البروتين من سلسله طويله من الاحماض الامينيه المرتبطه مع بعضها باصره ببتيديه [4]

البروتين مع محلول داريء العينه (, 4 ml Glycerole)
 (0.2 Tris (pH 6.7)) في 1 مل من الماء المقطر)
 بنسبة 1 : 1 ثم نقلت 50 مايكروليتر منه الى اخاديد الهلام
 في اللوح الزجاجي المثبت في جهاز الترحيل الكهربائي ،
 عبيء المستودعين بمحلول داريء ترس كلايسين لغاية تغطية
 المحلول سطح النماذج ثم ربطت الدائره الكهربائيه ونظم التيار
 عند شدة 30 ملي امبير لمدة 4 ساعات بعدها استخرج
 الهلام من اللوح الزجاجي وغمر في محلول حامض الخليك
 ثلاثي الكلور لمدة ساعتين ثم غمر في محلول تصبغ
 البروتينات المرشح باوراق الترشيح
 Coomassie Brilliant Blue –R 250 , 200 ml)
 Me thanol , 100 ml Acetic acid في 200 مل
 ماء مقطر) لاطهار الحزم البروتينيه . ازيلت الصبغه بغمر
 الهلام في المحلول المزيل للصبغه (250 ml
 methanol , 70 ml acetic acid في 680 مل
 ماء مقطر) وحفظ الهلام في محلول حامض الخليك 5%
 لحين تصويره [7] .

النتائج

عزل وتشخيص البكتريا :اسفرت عملية زرع
 البكتريا على وسط MRS عن ظهور مستعمرات صغيرة
 بيضاء اللون ذات حواف ملساء(صورة 1) واطهرت
 الفحوصات المجهرية والكيموحيوية على انها بكتريا كرويه
 موجبه لصبغة كرام وسالبه لاختباري الكاتاليز
 والاكسيدزومنتجه لحامض اللبنيك ونخرحليب وسط اللتموس

عزل البروتينات: اسفرت عملية الترحيل الكهربائي
 على هلام متعدد الاكريل امايد عن ظهور حزمين من
 البروتين عند درجة حرارة 28 C , 45 C و ظهور حزمه
 اضافيه عند درجة حرارة 37 C
 (صوره 2)

المنافشة

عزل وتشخيص البكتريا: تقوم البكتريا بالتفاعلات
 الكيموحيوية من اجل تحرير الطاقه اللازمه للتفاعلات
 التخليقيه التي تجري داخل الكائنات الحيه مثل عمليات تخليق
 البروتينات حيث يتم فيها هدم المركبات الايضيه الناتجه عن
 تلك التفاعلات واستغلال الطاقه بشكل مباشر او غير مباشر
 عن طريق خزنها في مركبات خازنه للطاقه مثل ATP
 واستخدامها لاحقا في عمليات تخليقيه اخرى [8]

عزل البروتينات: تتمكن البكتريا من العيش والنمو
 في بيئات تختلف فيما بينها فزيواويا وكيميواويا وهذا يعني ان

تقسم البروتينات الى قسمين رئيسيين هما
 البروتينات البسيطة والتي تنتج عند تحللها احماض امينيه
 اليغه والبروتينات المقترنه والتي تنتج عند تحللها احماض
 امينيه اليغه فضلا عن مركبات عضويه اخرى مثل البروتينات
 النويه مثل بروتين الكروموسوم والبروتين الريبوسومي ،
 والبروتينات الليديه والبروتينات السكريه فضلا عن البروتينات
 التنفسيه [4]

المواد وطرق العمل

عزل وتشخيص البكتريا :عزلت البكتريا من عينة
 حليب ماشيه باستخدام الوسط MRS عند درجة حرارة
 28oC وشخصت اعتمادا على خصائصها الزرعيه
 والمركسوبيه وتفاعلاتها الكيموحيويه [5] .

عزل البروتينات :عزلت البروتينات اعتمادا على
 الطريقه الموصوفه من قبل [6] Mechael and Arnold
 حيث نميت الخلايا عند ثلاث درجات حراريه هي , 450C
 280C , 37oC ورسبت الخلايا بعملية النبذ المركزي ثم
 غسلت الخلايا وعلقت بحجم معين من المحلول (10 TM
 mM Tris-HCl (pH 7.9) , 5mM MgCl2)
 حلت جذرالخلايا باستخدام الموجات فوق الصوتيه
 عند قوة صدمه مقدارها 7 عدة مرات ويزمن مقداره 30
 ثانيه بين كل صدمه واخرى ونبذ العالق مركزيا لمدة 10
 دقائق بسرعة 13800 g عند درجة حراره 40C اهمل
 الراسب ورحل الراشح كهربائيا على هلام متعدد الاكريل امايد
 [6] .

الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريل امايد:
 هبيء هلام الفصل بتركيز 15% بمزج 16.4 مل من
 محلول اكريل امايد بتركيز (30%) (150 gm)
 4 gm bis acrylamide , acrylamide في 500 مل
 من الماء المقطر) مع 6.4 مل من داريء ترس واضيف
 اليه 45 مايكروليتر من N,N,N,N Tetra Methyl
 Ethylene Diamine(TEMED) واكمل الحجم الى
 33.3 مل من الماء المقطر ثم اضيف 10 مايكروليتر
 من محلول برسلفات الامونيوم . مزج المحلول جيدا ثم
 صب في الالواح الزجاجيه على ارتفاع 8 سم من قاعدة
 اللوح واضيف الماء المقطر وترك لفته وجيزه لحين بلمرة
 الهلام . هبيء هلام الرص 5% بمزج 1.8 مل من
 محلول اكريل امايد 30% مع 3.8 مل من داريء ترس
 واضيف اليه 60 مايكروليتر من TEMED و 150
 مايكروليتر من برسلفات الامونيوم 1.5% ثم اكمل الحجم
 الى 150 مل بالماء المقطر . مزج المحلول بهدوء ثم صب
 فوق هلام الفصل في اللوح الزجاجي بعد ان ازيل الماء
 المقطر وترك لحين التلمر . مزج المحلول الحاوي على

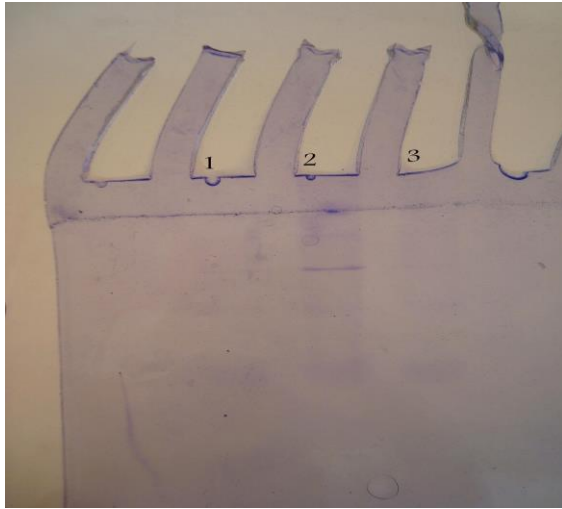
اكثر من 70 % من انواع البروتينات وتتطلب طريقه معقده لعزلها وهي لا تذوب في الماء وتحتاج الى وجود المطهرات لكي تبقى بحاله غير متجمعه مثل الانزيمات المرتبطه بالغشاء والمستضدات والمستقبلات . اما النوع الثاني من البروتينات فهي البروتينات المحيطيه Peripheral (proteins) والتي يمكن عزلها بسهولة وهي لاتذوب في محاليل مائيه وتكون خاليه من الدهون عادة مثل البروتينات التنفسيه [10] . تعتبر درجة الحرارة احدى العوامل الرئيسييه المهمه للكائنات المجهرية حيث ان المدى الحراري المناسب لنمو الكائن المجهرية يتحدد بواسطة قدرة الكائن على تحمل الحرارة والتاثيرات الفيزيائيه مثل المسخ والتغير بمعدل التفاعلات الكيمائيه [11] .

اثبتت دراسات حديثه [12] ان درجة الحرارة من العوامل الملفته للنظر التي تؤثر على حجم وشكل الكائن المجهرية فقد يتخذ الكائن تحت تاثيرالحرارة الشكل الخيطي او يكون هناك زياده في الحجم كما تؤثر على القدره على الانقسام بسبب اقضاء البلازميدات [13] التي تحمل جينات يعزى اليها مقدرة الكائن على الانقسام الثنائي او نقطة اصل تضاعف البلازميدات (origion of replication) [14] .

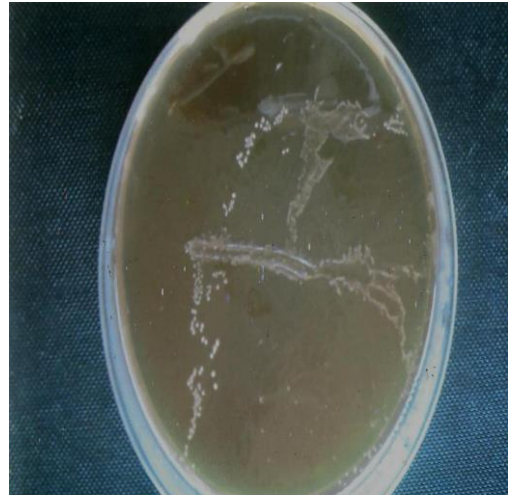
البكتريا تحتاج الى انواع مختلفه وجديده من الانزيمات لكي تستطيع التالف مع تلك الظروف ، وبمعنى اخر ان البكتريا التي تنمو تحت ظرف معين لا تصنع او تنتج جميع الانزيمات التي تستطيع صنعها ، وعند تغيير ذلك الظرف يتوجب على البكتريا نفسها ان تخلق انزيمات اخرى او اضافيه . ان حث تكوين الانزيمات يعد مثالا على التغيير في الخصائص الظاهرية ضمن الخصائص الكيمياويه الحيويه [8] .

تصنف البروتينات ومن بينها اليكثريوسينات المنتجه من قبل بكتريا حامض اللبنك الى جزئيات ببتيديه غير متماثله تشمل *lantibiotics* وبيبتيدات صغيره مقاومه للحرارة وبروتينات كبيره غير مقاومه للحرارة [9] . لا يقتصر انتاج البروتينات المتاثره بالحرارة على بكتريا حامص اللبنك فقد تمكن Michael and Arnold من استخلاص بروتينات صدمه حراريه بحجم 60 كيلو دالتون من بكتريا *Legionell pneumophila* [6] .

تمثل البروتينات المكونات الاساسيه لاغلب الاغشيه البايولوجيه فهي تلعب دورا مهما ليس فقط في التركيب الميكانيكي للغشاء ولكن ايضا كناقلات (Carriers) او قنوات للنقل . تصنف البروتينات الى نوعين رئيسيين هما البروتينات المتداخله (Integral proteins) وتمثل



صوره 2 : الترحيل الكهربائي لبروتينات بكتريا *Lactococcus lactis* على هلام متعدد الاكريل امايد % 15 عند شدة تيار 30 ملي امبير لمدة 4 ساعات .
المسار 1 : البروتينات المعزوله من البكتريا عند درجة حرارة 280 C
المسار 2 : البروتينات المعزوله من البكتريا عند درجة حرارة 370 C
المسار 3 : البروتينات المعزوله من البكتريا عند درجة حرارة 450 C



صوره 1 : البكتريا *Lactococcus lactis* على وسط MRS

- cloning (a laboratory manual) .Cold spring harbor laboratory .
- [8]- Gottschalk ,G . , (1978) .Bacterial metabolism . Springer ,New York .
- [9]- Martinez-Cuesta , M . C . , Buist , G . Kok , J . ,Hauge , H . H . , Nissen – Meyer , J . , Pelaez ,C . , and Requena , T . , (2000) . Biologecal and molecular characterization of a two – peptide lantibiotic prodused by Lactococcus lactis IFPL 105 . Journal of applied microbiology , pp 249 – 360 .
- [10]- نجيب ، ليث مصلح ، (٢٠٠٧) . انتاج البكتريوسينات من بكتريا حامض اللبنيك ودراسة بعض خواصها . اطروحة حة دكتوراه . كلية العلوم . جامعة الانبار .
- [11] – Shehata,T.E. and Marr,A.G.(1975) . Effect of temperature on the size of Escherichia coli cells. Journal of bacteriology, vol. 124, No.2, PP857-862 .
- [12] – Usajewicz, I. and Nalepa,B. (2006) .Survival of Escherichia coli O157: H7 in milk exposed to high temperature and high pressure . Food Technol. Biotechnol. 44 (1) : 33-39 .
- [13] – Trevors ,J.T.(1986). Plasmid curing in bacteria. FEMS Microbiology Reviews 32 : 149-157 .
- [14] – Klockgether,J.,Reva,O.,Larbig,K.,and Tummler ,B. (2003). Sequence analysis of the mobile genome island PKLC 102 of Pseudomonas aeruginosa . J of Bacteriol. 186 (2) : 518-534
- [1]-Dean , A.C.R.,Pirt,S.J. and Tempest, D.W.(Edits) . (1972) . Environmental control of cell synthesis and function .New York ; Academic press .
- [2]- Soeder , C . and Stengbe , E . (1974) .Physico chemical factors affecting metabolism and growth rate .In bacterial monograph ; Alegal physiology and biochemistry Ed . W . D . P .Stewart , Vol . 10 , pp 714 – 740 . London , Black well scientific publication
- [3]- Monod , J . (1949) . The growth of bacterial cultures. Ann. REV . Microbiol . 3 , 371 – 394 ,As presented in : Bench – mark papers . in microbiology ; microbial grdwth . (1974) . Ed . P . S . Dawsen ,Vol 8 .Pennsylvania . Dowden , Hutchinson and Ross Stroudsburg .
- [4]عزيز ،جبرائيل برصوم ،(٢٠٠٠) . بايولوجية الخلية . الطبعه الثانيه . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة الموصل . دار الكتب للطباعة والنشر . الموصل .
- [5]- Fields , M . L . (1982) . Fundamentals of food microbiology . AVI publishing company . Inc .
- [6]- Lema ,M . W . ,and Brown ,A(1995) . Legionella pneumophila has two 60 Kilo Dalton heat –shock protein . Current microbiology Vol .31 , pp 332 – 335 .
- [7]- Maniatis , T . ,Fritsch ,E .F. ,and Sambrook ,J . (1982) .Molecular

EFFECT OF TEMPERATURE ON THE PROTEIN PATTERN OF THE LACTOCOCCUS LACTIS

KHALAF . J . MOHAMMED , LAITH . M . NAJEEB AND THAMER . Y . MUTAR
E.mail: scianb@yahoo.com

ABSTRACT :The bacterium Lactococcus lactis was isolated from cattle milk sample and diagnosed according to cultural , microscopical and confirmed by certain biochemical tests . The cultural diagnosed tests resulted in to that ,the colonies were small , smoth edges and white colonies on the Man Rogosa Sharp medium . The microscopic characters appeared , that the bacterium was gram positive cocci and the biochemical reactions ensured ,the bacterium was negative to catalase and oxidase tests . To study the effect of temperature on bacterial protein composition, the bacterium was grownat three temperature treatment ,28 oC , 37 oC , and 45 oC then the protein was isolated at each treatment and elecrophoresed on the poly acrylamide gel .The electrophoresis appeared further protein band at 37 oC in addition to other bacterial protein components.