P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2011 ,(5), (1) :01-04

(*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة

Open Access

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

خلف جاسم محمد ليث مصلح نجيب ثامر يوسف مطر

جامعة الانبار – كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2010/10/14
تاريخ القبول: 2011/2/9
تاريخ النشر: 14/ 6 / 2012
DOI: 10.37652/juaps.2011.15469

الكلمات المفتاحية:

درجة الحرارة ،
البروتينات ،
Lactococcus lactis.

الخلاصة:

عزلت البكتريا Lactococscu lactis من عينة حليب ماشيه وشخصت اعتمادا على خصائصها الزرعيه على وسط Man Rogosa Sharp وخصائصها المجهريه وتفاعلاتها الكيموحيويه0 اسفرت الفحوصات التشخيصية الزرعيه عن كون البكتريا ذات مستعمرات صغيره ذات حافات ملساء بيضاء اللون على الوسط Man Rogosa Sharp واظهرت الفحوصات المجهرية عن كون البكتريا كروية الشكل موجبه لصبغة كرام واثبتت التفاعلات الكيموحيويه عن كونها سالبه لاختبار الكاتاليز والاوكسديز. لدراسة تاثير درجة الحراره على المحتوى البروتيني للبكتريا نميت البكنريا عند ثلاث درجات حراريه 37oC،45oC ، 28oC ثم عزلت البروتينات عند كل معامله حراريه ورحلت كهربائيا على هلام متعدد الاكريل امايد واسفرت عملية الترحيل عن ظهور حزمه بروتينيه اضافيه عند درجة حرارة 37o C فضلا عن البروتينات التي احتوت عليها خلية البكتريا.

المقدمة:

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)0 لقد وجد ان درجة الحراره الفضلى للنمو هي بضعة درجات اعلى من الدرجات الفضلى وان الابتعاد في كلي الاتجاهين عن هذا المدى الحراري يؤدي الى نقصان سرعة النمو حبث يكون النفص بدرجه محسوسه جدا عند رفع درجات الحراره عن الفضلى وبدرجه اقل عند خفض درجة الحراره [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 والقصوى تسمى درجات الحراره الرئيسه (cardinal temperature) وهي تختلف لكل كائن مجهري باختلاف المواد الغذائيه في الوسط الزرعي وباختلاف الحاله الفيزيائيه له[2].

تتحدد درجات الحراره الفضلى لنمو الاحياء المجهريه بمدى تاثر جميع نفاعلات الخليه التي تشترك فبها الانزيمات. ان الانخفاض السريع في سرعة النمو عند رفع درجات الحراره اكثر من الفضلى ياتي نتيجة لفقدان طبيعة الانزيم (Denaturation) الذي يسيطر على سرعة النمو وربما انزيمات اخرى ايضا [3].

ان البروتينات هي المكونات الاساسيه للتركيب الخلوي ولوظيفته حيث انها تؤلف 85% من الوزن الجاف للخلايا0 يحتوي البروتين على القواعد العضويه للماده الاوليه وهي كاربون وهيدروجين واوكسجين ونتروجين وكبريت وتتكون جزيئة البروتين من سلسله طويله من الاحماض الامينيه المرتبطه مع بعضها باصره ببتيديه [4].

تقسم البروتينات الى قسمين رئيسيين هما البروتينات البسيطه والتي تنتج عند تحللها احماض امينيه اليفه والبروتينات المقترنه والتي تنتج عند تحللها احماض امينيه اليفه فضلا عن مركبات عضويه اخرى مثل البروتينات النوويه مثل بروتين الكروموسوم والبروتين الرايبوسومي، والبروتينات اللبيديه 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

* Corresponding author at: Anbar University - College of Science;
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5859-6212 .Mobil:777777
E-mail address:

اعتمادا على خصائصها الزرعيه والمكرسكوبيه وتفاعلاتها الكيموحيويه [5].

عزل البروتينات :عزلت البروتينات اعتمادا على الطريقه الموصوفه من قبل Mechael and Arnold [6] حيث نميت الخلايا عند ثلاث درجات حراريه هي 280C، 37oC،450C ورسبت الخلايا بعملية النبذ المركزي ثم غسلت الخلايا وعلقت بحجم معين من المحلول (10 mM Tris-HCl (pH 7.9 ، TM، 5mM MgCl2) حللت جدر الخلايا باستخدام الموجات فوق الصوتيه عند قوة صدمه مقدارها 7 عدة مرات وبزمن 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: هييء هلام الفصل بتركيز 15% بمزج 4. 16 مل من محلول اكريل امايد بتركيز (30%) (150 gm acrylamide، 4 gm bis 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 لفتره وجيزه لحين بلمرة الهلام. هييء 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 التبلمر0 مزج المحلول الحاوي على البروتين مع محلول داريء العينه (4 ml Glycerole، 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 غمرفي محلول تصبيغ البروتينات المرشح باوراق الترشيح (200 ml Me ،Coomasie Brilliant Blue –R 250 100 ml Acetic acid،thanol في 200 مل ماء مقطر) لاظهار 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 صغيره بيضاء اللون ذات ذات حواف ملساء(صوره 1) واظهرت الفحوصات المجهريه والكيموحيويه على انها بكتريا كرويه موجبه لصبغة كرام وسالبه لاختباري الكاتاليز والاوكسديزومنتجه لحامض اللبنيك ونخثرحليب وسط اللتموس.

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

المناقشة

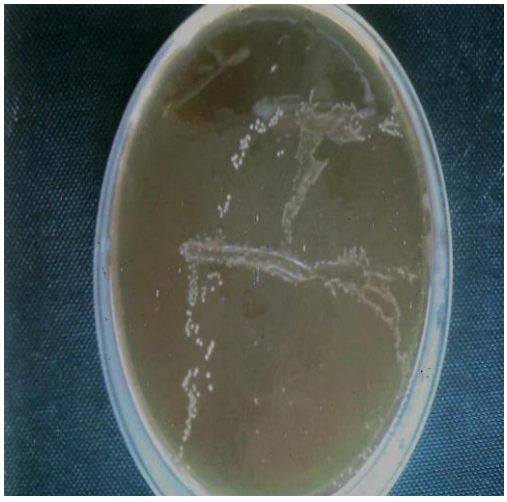
عزل وتشخيص البكتريا: تقوم البكتريا بالتفاعلات الكيموحيويه من اجل تحرير الطاقه اللازمه للتفاعلات التخليقيه التي تجري داخل الكائنات الحيه مثل عمليات تخليق البروتينات حيث يتم فيها هدم المركبات الايضيه الناتجه عن تلك التفاعلات واستغلال الطاقه بشكل مباشر او غير مباشر عن طريق خزنها في مركبات خازنه للطاقه مثل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

عزل البروتينات: تتمكن البكتريا من العيش والنمو في بيئات تختلف فيما بينها فيزياويا وكيمياويا وهذا يعني ان 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 الظاهريه ضمن الخصائص الكيمياويه الحيويه [8].

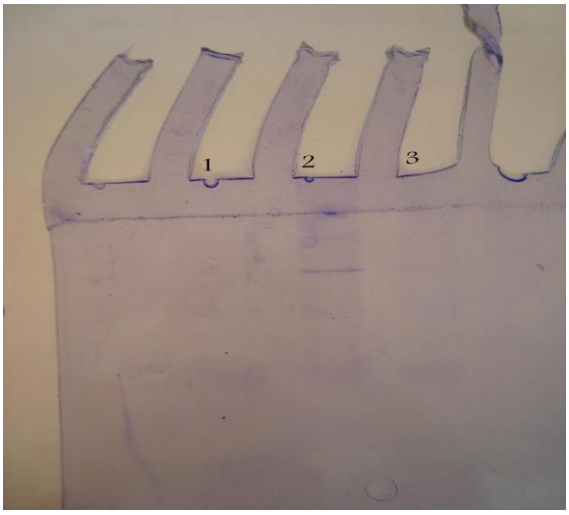
تصنف البروتينات ومن بينها اليكنريوسينات المنتجه من قبل بكتريا حامض اللبنيك الى جزيئات ببتيديه غير متماثله تشمل lantibioticsl وببتيدات صغيره مقاومه للحراره وبروتينات كبيره غير مقاومه للحراره [9]. لا يقتصر انتاج البروتينات المتاثره بالحراره على بكتريا حامص اللبنيك فقد تمكن Michael and Arnold من استخلاص 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 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 بسهوله وهي لاتذوب في محاليل مائيه وتكون خاليه من الدهون عادة مثل البروتينات التنفسيه [10]. تعتبردرجة الحراره احدى العوامل الرئيسيه المهمه للكائنات المجهريه حيث ان المدى الحراري المناسب لنمو الكائن المجهري يتحدد بواسطة قدرة الكائن على تحمل الحراره والتاثيرات الفيزيائيه مثل المسخ والتغير بمعدل التفاعلات الكيميائيه [11].

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



صوره 1 : البكتريا *Lactococcus lactis* على وسط MRS



صوره 2 : الترحيل الكهربائي لبروتينات بكتريا Lactococcus lactisعلى هلام متعدد الاكريل امايد % 15 عند شدة تيار 30 ملي امبير لمدة 4 ساعات 0
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

المصادر

[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،

lantibiotic produsedby Lactococcus lactis IFPL 105 . Jourrnal of applied microbiology، pp 249 – 360 .

[10]- نجيب، ليث مصلح، (2007) . 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 temperatureon 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.

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،(2000) . بايولوجية الخليه . الطبعه الثانيه . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة الموصل . دار الكتب للطباعه 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 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

.

EFFECT OF TEMPERATURE ON THE PROTEIN PATTERN OF THE LACTOCOCCUS LACTIS

LAITH . M . NAJEEB AND THAMER . Y . MUTAR،KHALAF . J . MOHAMMED

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.