دراسة الظروف المثلى لإنتاج الانفرتيز من عزلة محلية من *Candida spp*

محمد عمر محي الدين
حميد عبود جبر
جاسم محمد عوده
جامعة بغداد / كلية الزراعة

المستخلص

اجريت عملية غربلة اولية على عدد من الخمائر المعزولة من مصادر مختلفة من حيث قدرتها على انتاج انزيم الانفرتيز فتبين ان خمس عزلات منها تعود الى جنس Candida تميزت بقابليتها على انتاج الانزيم ، ووجد العزلة التي رمز لها C5 كانت أكفا تلك العزلات . درست الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم وبطريقة المزارع المغمورة من هذه العزلة . تبين أن أعلى انتاجية تحققت باستخدام الرافينوز كصدر للكاربون وبتركيز 3% و مزيج خلاصة الخميرة وكبريتات الامونيوم وبنسبة 1:1 وبتركيز 0.4 % كمصدر للنتروجين وبرقم هيدروجيني ابتدائي 6 وبمدة حضن 28 ساعة على درجة 35 م° حيث بلغت فعالية الانزيم تحت هذه الظروف 1.58 وحدة /مل وبفعالية نوعية مقدارها 6.07 وحدة /ملغم.

المقدمـة:

يعد أنزيم الانفرتيز (β-D-Fructofuranoside fractohydrolase (E.C 3.2.1.26 من الانزيمات المهمة لاستخداماته الواسعة وعادة ما ينتج من مختلف المصادر فقد انتج (15) من خميرة *Sacharomyces cerivisiae* *بينما نقى الانزيم من* *Candida albicans (12)* واستخرج الانفرتيز *من عفن Aspergillus niger* (8) واشار الى وجوده في العديد من الاحياء المجهرية ، كما يتواجد الانزيم في عدد من النباتات فقد وجد (16) الانفرتيز في الطماطة وقام (5) باستخراج الانزيم من البطاطا الحلوة ، ومن الاجاص نقى (4) انزيم الانفرتيز .

يقوم انزيم الانفرتيز بكسر الاصرة الكلايكوسيدية بين الكلوكوز والفركتوز في السكروز والسكريات المماثلة له مثل الرافينوز والفيرسبسكوز وغيرها ولذلك يستخدم في العديد من الصناعات الغذائية

مثل صناعة الحلويات والشكولاتة وفي تحليل السكروز الموجود في المولاس لتسهيل نمو الاحياء المجهرية عند استعماله كمادة اولية في بعض التخمرات الصناعية .

هدفت الدراسة الحالية الى : الحصول على عزلة محلية من خميرة Candida منتجة للانزيم بوفره وتحديد الظروف المثلى لانتاجه من حيث مصدر الكاربون و النتروجين ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني الابتدائي ومدة التخمير.

طريقة العمل

مصادر العزلات: تم الحصول على 9 عزلات من خميرة Candida من مصادر مختلفة. إذ تم الحصول على خمس منها من مختبرات كلية التربية ابن الهيثم وثلاث من مختبرات كلية العلوم وواحدة من كلية الزراعة رمز لها ب C1 الى C9 .

الوسط الغذائي: استخدم وسط السكروز و خلاصة الخميرة و الاكر (Sucrose Yeast Agar) في تنمية العزلات وتنشيطها في اطباق بتري وفي الغربلة الاولية وانتج الانزيم بنفس الوسط بدون المادة المصلبة الاكر وبحجم لقاح $10x1^6$ خلية/مل من الوسط.

إنتاج الإنزيم: استخدمت طريقة المزارع المغمورة باستخدام الحاضنة الهزازة لانتاج الإنزيم وفصلت الكتلة الحيوية عن الوسط بالنبذ المركزي المبرد بسرعة 4000xg مدة 30 دقيقة بدرجة 4° م . غسلت الخلايا ثلاث مرات بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2 مولاري ذي الرقم الهيدروجيني 6 ونبذت مركزيا في الظروف المذكورة انفا ثم علقت بنفس المحلول الدارىء واضيف لها كمية من التولوين (Toluene) بحيث يكون التركيز النهائي 2% وحضن مدة24 ساعة بالحاضنة الهزازة بحرارة 30° م وبسرعة 150 دورة / دقيقة بعدها فصلت بقايا الخلايا بالنبذ المركزي المبرد بسرعة 4000xg ولمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4° م واعتبر الراشح المتبقي المستخلص الإنزيمي الخام.

المادة الأساس: حضر بإذابة 5 غم من السكروز في 100 مل من محلول الخلات الدارئ وبتركيز 0.2 مولاري وبرقم هيدروجيني 6.

قياس الفعالية:

استخدم 5,3- ثنائي نايتروسالسيالك 3,5 dinitrodalicylic acid (DNSA) وحسب الطريقة الموصوفة في(17) لتقدير السكريات الاحادية الناتج عن التحلل الانزيمي وذلك باضافة 0.1 مل من المستخلص الانزيمي الى 0.9 مل من المادة الأساس ذي الرقم الهيدروجيني 6 ، وبدرجة حرارة

35 م° وأستمر التفاعل 10 دقائق ثم اضيف 1 مل من (DNSA) ووضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي لمدة 10 دقائق ثم بردت مباشرة وأضيف لها 10 مل ماء مقطر وقيست الامتصاصية على طول موجي 540 نانوميتر وبالرجوع للمنحنى القياسي للفركتوز الدي اعد لهدا الغرض تم استخراج السكريات المختزلة المتحررة من قبل الانزيم بتحليل المادة الأساس (السكروز).

عرفت وحدة الفعالية : بأنها كمية الانزيم التي تحرر 1 مايكرومول من السكريات المختزلة من السكروز في دقيقة واحدة تحت ظروف التجربة.

تقدير البروتين: أتبعت طريقة Bradford (1) في تقدير البروتين وباستخدام محلول البومين المصل البقري Bovine serum albumin BSA في أعداد المنحنى القياسي وقدرت تراكيز البروتين في النماذج بنقل 0.1 مل من المحلول الانزيمي الى 1 مل من كاشف البروتين (صبغة الكوماسي الزرقاء) ومزجت وتركت 5 دقائق بحرارة 25 م° وقيس الامتصاصية على 595 نانوميتر وقدر تركيز البروتين بالرجوع الى المنحنى القياسي.

تعيين الظروف المثلى لانتاج الانفرتيز:

تحديد المصدر الكاربوني: اجريت هذه التجربة بطريقة مشابهة لما مذكور في طريقة التنمية واختبر تأثير مصادر كاربون مختلفة في الانتاج تمثلت بالكلوكوز والسكروز والانيولين الرافينوز وكلها أضيفت بتركيز 3%.

تحديد المصدر النتروجيني:

استخدمت أربع مصادر للنتروجين تمثلت كبريتات الامونيوم ،الببتون ،خلاصة الخميرة ومزيج خلاصة الخميرة وكبريتات الامونيوم بنسبة 1:1 وأضيفت المصادر المذكورة بتركيز 0.4% الى الوسط .

تحديد الرقم الهيدروجيني:

حضر الوسط الغذائي بارقام هيدروجينية تراوح4-7 وبفارق درجة واحدة لتحديد الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لانتاج الانزيم مع مراعاة نتائج الخطوات السابقة .

تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم:

حضن وسط الانتاج بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين 20-45 وبفارق 5 درجات حرارية لتحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم مع الاخذ بعين الاعتبار الظروف المثلى التي تم التوصل اليها من التجارب السابقة .

تحديد زمن التخمر الامثل لانتاج الانزيم:

تمت متابعة انتاج الانزيم في مدد زمنية مختلفة تراوحت بين (20–36) ساعة بفارق 4 ساعات وتحت الظروف المثلى للانتاج من التجارب السابقة .

النتائج والمناقشة:

الغربلةالاولية والثانوية : اجريت عملية الغربلة الاولية الموضحة نتائجها في جدول (1) على وسط (SYA) الحاوي على السكروز كمصدر وحيد للكاربون فتبين ان خمس عزلات تميزت بكثافة نمو عالية مقارنة مع العزلات الاخرى. ادخلت العزلات الخمس الى المرحلة الثانية من الغربلة (جدول 2) على نفس الوسط بدون الاكر فتبين أن العزلة التي رمز لها C5 كانت اكفأ تلك العزلات حيث كانت الفعالية والفعالية النوعية للانزيم المنتج 1.44وحدة /مل و5.21 وحدة/ملغ على التوالي. عليه اختيرت هذه العزلة لإكمال البحث.

جدول(1) الغربلة الاولية للخمائر قيد الدراسة من حيث قدرتها على النمو في وسط SYA الحاوي على السكروز مصدراً وحيداً للكاربون

ت	رمز العزلة	كثافة النمو
1	C1	++++
2	C2	+++++
3	C3	+++
4	C4	+++
5	C5	+++++
6	C6	+
7	C7	++
8	C8	++
9	C9	+

علامة + تشير لكثافة النمو وعدد العلامات يتناسب مع كثافة النمو

جدول(2) غربلة العزلات على اساس انتاجيتها من انزيم الانفرتيز في وسط سكروز و خلاصة الخميرة بتقديرالفعالية في المستخلص الانزيمي الخام.

رمز العزلة	الفعالية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغ/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)
C_1	1.29	0.27	4.75
C_2	1.31	0.26	5.02
C_3	0.92	0.22	4.16
C_4	0.87	0.21	3.97
C_5	1.44	0.27	5.21

تحديد المصدر الكاربوني الأمثل للانتاج:

وجد أن أفضل مصدر كاربوني لتنمية العزلة *Candida spp* لانتاج انزيم الانفرتيز هو باستخدام الرافينوز مقارنةً بالكلوكوز والسكروز والانيولين وكما موضح في شكل 1 . رغم ان الفرق ضئيل بينة وبين السكروز حيث بلغت الفعالية والفعالية النوعية 1.51 وحدة/مل و 5.40 وحدة/ملغ على التوالي يليه السكروز ثم الانيولين وأخيراً الكلوكوز ويمكن الاستنتاج من هذه التجربة أن الانزيم من النوع المستحث ويتحفز انتاجه بفعل الرافينوز بالدرجة الأساس.

وهذا يتفق مع ما حصل عليه (2) فقد وجد ان اعلى فعالية لانتاج انزيم الانفرتيز من *Saccharomyces cerivesiae* تحققت باستخدام الرافينوز كمصدر للكاربون ، فيما وجد (3) ان الكلسرول افضل من الكلوكوز كمصدر للكاربون لانزيم الانفرتيز المنتج من *Candida utils* بينما استخدم (7) الكلوكوز عند انتاج الانزيم من *Leucosporidium antarcticum* *فيما اشار (9)* الى استخدام السكروز لانتاج الانزيم من خميرة *S.cerevisiae* كذلك استخدم (6)السكروز لانتاج الانفرتيز من *Streptomyces sp*

تحديد مصدر النتروجين الأمثل لانتاج الانزيم:

اختيرت عدد من المصادر العضوية واللاعضوية ومزيجهما لدرسة تأثيرها على انتاج الانفرتييز من العزلة قيد الدراسة وأضيفت جميع المصادر بتركيز 0.4% فوجد أن أفضل تلك المصادر يتمثل بمزيج خلاصة الخميرة وكبريتات الامونيوم إذ بلغت الفعالية والفعالية النوعية 1.51 واحدة/مل و 5.84 وحدة/ملغم على التوالي(الشكل2).ثم خلاصة الخميرة فالببتون واخيرا كبريتات الامونيوم ويعزى تفوق الانتاج بهذا المزيج الى أن الأول يعد مصدراً للنتروجين فضلاً

عن كونه مصدرا" لفيتامينات مجموعة B والتي تعد ضرورية لنمو الأحياء المجهرية فضلاً عن كونها عوامل مرافقة Co-factor للعديد من الانزيمات المهمة في مسارات التخليق الحيوي. أما الثاني فيحفز تكوين متطلبات النمو من هذه العوامل حسب الحاجة وتختلف الدراسات في تحديد أفضلية المصدر النتروجيني للأحياء المجهرية والنتيجة مقاربة لما توصل الية (11) حيث استخدم خلاصة الخميرة بتركيز 0.60% مع كبريتات الأمونيوم وبتركيز 0.1% في إنتاج إنزيم الانفرتيز من *Saccharomyces cerevisiae*. على ان خلاصة الخميرة وحدها تعد مصدرا" جيد للنتروجين عند انتاج الانزيم من *Aspergillus flavus (14) فيما* كانت نترات الصوديوم هي مصدر النتروجين لانتاج الانزيم من *Streptomyces sp* (6) فيما استخدم اخرون (7) خليطا" من خلاصة الخميرة مع خلاصة الشعير والببتون لانتاج الانزيم من *Leucosporidium antarcticum*

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم:

أعطت العزلة قيد الدراسة أعلى انتاجية للانزيم على اساس الفعالية والفعالية النوعية عند الرقم الهيدروجيني 6 حيث بلغت 1.51 وحدة/مل و 5.84وحدة/ملغم على التوالي. وأنخفض انتاج الانزيم تدريجياً وبكلا الاتجاهين عن الرقم 6 (الشكل 3).

ويعد تحديد الرقم الهيدروجيني الابتدائي لوسط الانتاج عاملاً مهماً لانتاج الانزيمات الميكروبية وفي فعالية هذه الانزيمات لكونها تتأثر بشكل مباشر بتركيز أيونات الهيدروجين لوسط الانتاج ووسط التفاعل والنتائج التي تم التوصل اليها مقاربة لما استخدمه(7) حيث كان الرقم الهيدروجيني الابتدائي 6.5 لانتاج الانفرتيز من *Leucosporidium antarcticum* .

بينما كان الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط الدي استخدمه الباحث (10) هو4.5 لانتاج الانزيم من *S.cerevisiae* . فيما وجد (13) ان الرقم الهيدروجيني الابتدائي5.6 هو الافضل لانتاج الانزم من نفس الخميرة السابقة.

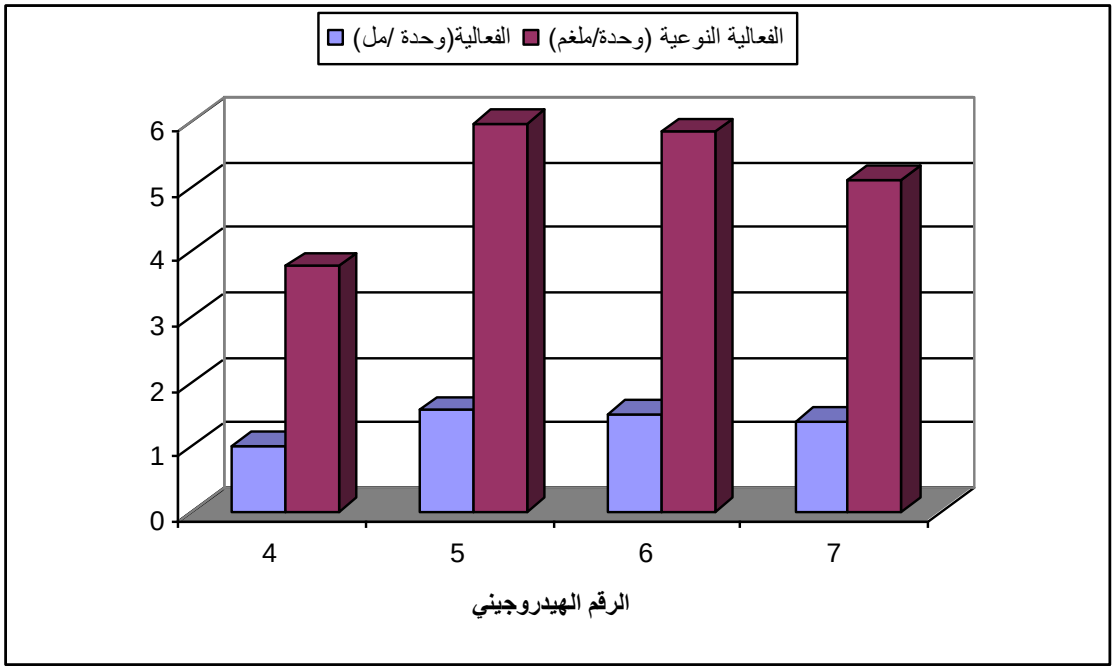
تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم:

بينت الدراسة ان الحرارة المثلى لانتاج الانزيم من العزلة قيد الدراسة 35 م° حيث بلغت الفعالية والفعالية النوعية 1.58 وحدة/مل و 6.07 وحدة/ملغم على الترتيب وأنخفضت فعالية الانزيم في درجات الحرارة الأخرى (الشكل 4)وتختلف درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم باختلاف الخميرة فقد اعتمد (2) درجة حرارة 30 م° عند انتاج الانزيم من *Candida utilis* كذلك كانت درجة الحرارة 30 م°هي الدرجة التي انتج بها (9) الانزيم من *S.cerevisiae* واشار (10)

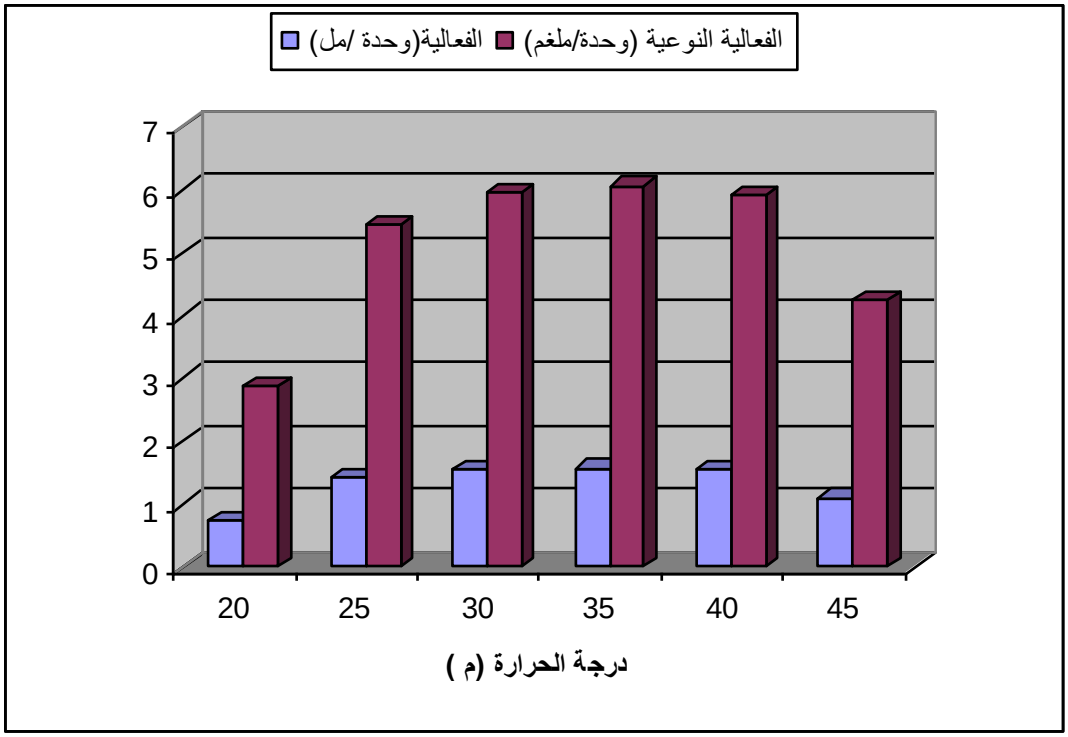
الى ان الحرارة المناسبة لانتاج الانزيم هي 33 م° من الخميرة نفسها فيما وجد (6) ان درجة الحرارة 37 م° تعد الانسب لانتاج الانزيم من *Streptomyces sp*.

تحديد زمن التخمر الأمثل لإنتاج الإنزيم:تمت متابعة انتاج انزيم الانفرتيز بفترات مختلفة ولوحظ زيادة الفعالية والفعالية النوعية للانزيم المنتج من العزلة قيد الدراسة مدة 28 ساعة إذ بلغت 1.58 وحدة/مل و 6.07 وحدة/ملغم وانخفضت الفعالية والفعالية النوعية بعد هذه المدة (شكل 5) عليه اعتبرت المدة28 ساعة هي المدة المثلى لانتاج الانزيم وقد أختار الباحثون مدد زمنية مختلفة لحضن الاحياء المجهرية لانتاج الانزيم فقد استخدم (6) مدة 24 ساعة لانتاج الانفرتيز من *Streptomyces sp*. بينماكانت مدة الحضن30ساعة لانتاج الانزيم من *Candida utilis* *من قبل الاخرين* (3)

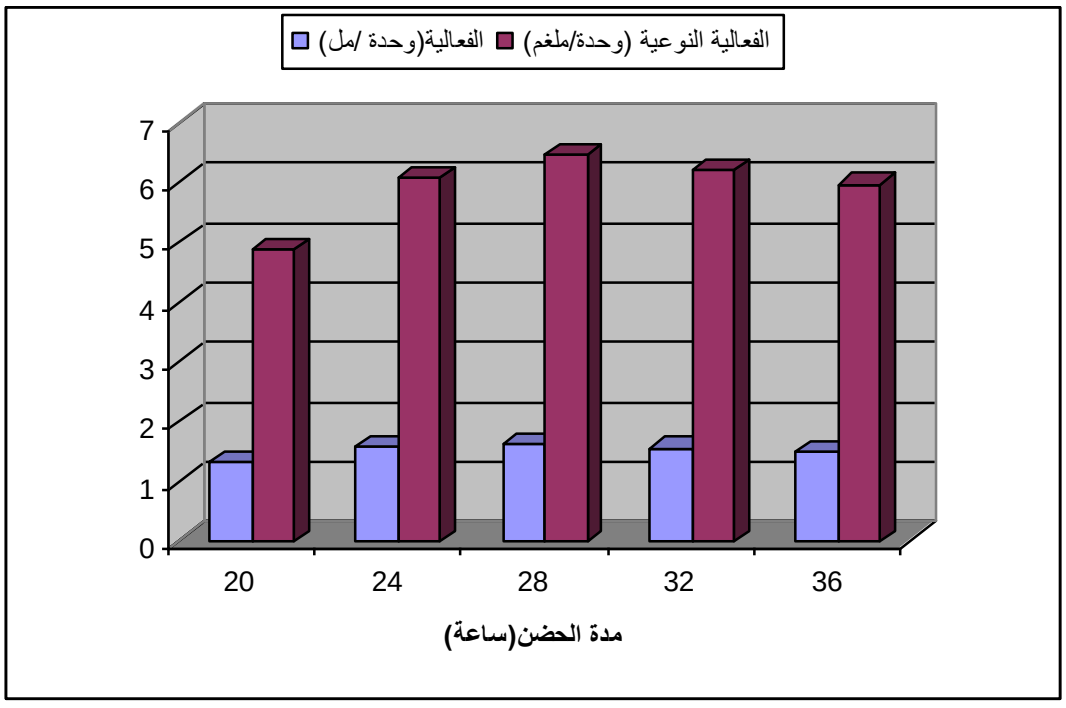
شكل (2) تاثير مصدر النتروجين في إنتاج إنزيم الانفرتيز من *Candida spp*



شكل (3) الرقم الهيدروجيني الامثل في إنتاج إنزيم الانفرتيز من *Candida spp*



شكل (4) درجة الحرارة المثلى في إنتاج إنزيم الانفرتيز من *Candida spp*



شكل (5) مدة الحضن المثلى في إنتاج إنزيم الانفرتيز من *Candida spp*

المصـادر

1-Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principles of protein dye binding. Analytical. Bioch. 72: 248-254.

2 - Chu, F.K. and Maley, F. (1980).The effect of glucose on the synthesis and glycosilation of the polypeptide moiety of yeast external invertase . J.of Biol. Chem. 255(10): 6392-6397 .

3-Francisco. P .; Luis .R. And Joaquin D .(1997).Purification And Charicterization Of Invertase From Candida utilis Comparision With Yeast Invertase .J .Of Biotechnoligy.53:67-74.

4-Hashizume, H.; Tanase, K.; Shiratak, K.; Mori, H. and Yamaki, S. (2003) Purification and Characterization of two soluble acid Invertase isozymes from Japanese fruit . Phytochemistry. 63(2):125-129.

5-Huany, W.; Wang, A; Wang, L.(2003). Expression and Characterization of sweet potato Invertase in *Pichia pastoris* . J.Agric.Food Chem . 51(5):1494-1499.

6-Kaur .n. And Sharma . A. (2005). Production , Optimization And Characterization Of Extracellular Invertase By Actinomycete Strain . J.of Sci . Ind. Res .64:515-519.

7-Marianna.T.; Marzana. P. And Stuart.p.(2005). Invertase And Glucosidase Production By The Endemic Antarctic M arine Y east *Leucosporidium Antarcticum* .Pol Polar Res 26 (2):125-136.

8- Matrai, T. ; Mayer, S.; Kokai, S .and Salamon, I. (2000) .Invertase production of common storage molds in food and feed grains and *Aspergillus fumigatus* .Int J.Food Microbial. 61(2): 187-191.

9-Mona .M. : Rashad And Mohamed. U. (2009). Production ,Purification And Characterization Of Extracellular Invertase From Saccharomyces Cerevisiae NRRL Y – 12632 By Solid –State Fermentation. Aust . J .Basic And Appl. Sic . 3(3):1910-1919.
Neto, J.A.; Infanti, P. and Vitolo, M. (1997) . Influence of pH.

10- Temperature and dissolved oxygen concentration on the production of glucose 6 phosphate dehydrogenase and invertase by *Saccharomyces cerevisiae* Brazilian. J. Chem. Engin. 14:89-94.

11-Pyun, Y.R.; Jo, J.S.; Park, J.W.and Shin, H.H.(1999).Effect of oxygen on invertase expression in continuous culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Micro. Biotech. 51: 334-339 .

12-Roig, P. and Gozalbo, D.(2002) . Candida albicans UB13 and UB14 promoter regions confer differential regulation of invertase production to Saccharomyces cerevisiae cell in reponse to stress currents Micro 40:1-10.

13-Tanaka, H.; Kamogawa,T.; aoyagi, H.; Kato, I. and Nakajima, R. (2000). Invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* . Protoplasts immobilized in strontium alginate gel beads. J. Bioscience and Bioengineering 89(5):498-500 .

14-Uma.C.; Gomathi.D and Gopalakrishnan .K. (2010). Production ,Purification And Characterization Of Invertase Py *Aspergillus flavus.* Advan .Biol .Res. 4(1):31-36.

15-Verostek, M.F.Lubowski,C. andTrimble, R.B.(2000).Selective organic precipitation / extraction of released glycans following large-scale enzymatic glycoprotiens . Anal. Biochem. 278(2): 111-122.

16-Westphal, S. kolarich ,D. and Foetisch, K.(2003). Molecular characterization and allergenic activity of lycez (beta-fructofuranosidase) aglycosy-lated allergenic of tomato . Eur.J.Biochem . 270(6):1327-1337.

17- Whitaker, J.R. 1972. Principles Of Enzymology For The Food Science. Mercel Dekker. Inc. New York. USA.

STUDYING OF THE OPTIMUM CONDITIONS FOR INVERTASE PRODUCTION FROM A LOCAL ISOLATE OF *Candida spp*

Mohammed O. Muhyaddin , , Hameed Abood Jabur ,
Jasim Mohammed Awda
Depart. of Food Sci. and Biotechnology
University Of Baghdad

ABSTRACT

Numbers of yeast isolates from different sources were subjected to primary screening to recognize which one of them having the ability for invertase production . Five of them which related to Candida can produce invertase . The isolate which was designated C5 was highest producer among them and identified as *Candida spp*.. Results showed that the optimum condition for production of the enzyme from this isolate by submerged culture was achieved using a media containing rafinose as a carbon source with concentration of 3% and a mixture of yeast extract : ammonium sulfate 1:1 with 0.4 % concentration as nitrogen source. The initial pH was 6 . The duration and temperature of incubation were 28h and 35 C° respectively. The enzyme activity of invertase under these conditions was 1.58 unit /ml with a specific activity of 6.07 unit/mg.