

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

محمد عمر محي الدين

حميد عبود جبر

جاسم محمد عوده

قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية

كلية الزراعة - جامعة بغداد

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 للكاريون وبتركيز 3% و مزيج خلاصة الخميرة وكبريتات الامونيوم وبنسبة 1:1 وبتركيز 0.4 % كمصدر للنيتروجين وبرقم هيدروجيني ابتدائي 6 وبمدة حضانة 28 ساعة على درجة 35 م ° حيث بلغت فعالية الانزيم تحت هذه الظروف 1.58 وحدة /مل وبفعالية نوعية مقدارها 6.07 وحدة /ملغم.

المقدمة:

يعد أنزيم الانفرتيز (E.C 3.2.1.26) β -D-Fructofuranoside fractohydrolase من الانزيمات المهمة لاستخداماته الواسعة وعادة ما ينتج من مختلف المصادر فقد انتج (15) من خميرة *Sacharomyces cervisiae* بينما نقي الانزيم من *Candida albicans* (12) واستخرج الانفرتيز من عفن *Aspergillus niger* (8) وأشار 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 نقي (4) انزيم الانفرتيز .

دراسة الظروف المثلى لإنتاج الانفريز من عزلة محلية من *Candida*

spp

محمد عمر محي الدين ، حميد عبود جبر ، جاسم محمد عوده

يقوم انزيم الانفريز 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 الغريلة الاولية وانتج الانزيم بنفس الوسط بدون المادة المصلبة الاكر وبحجم لقاح 10×10^6 خلية/مل من الوسط.

إنتاج الإنزيم: استخدمت طريقة المزارع المغمورة باستخدام الحاضنة الهزازة لإنتاج الإنزيم وفصلت الكتلة الحيوية عن الوسط بالنبذ المركزي المبرد بسرعة $4000 \times g$ مدة 30 دقيقة بدرجة 4°C . 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 الدارئ واضيف لها كمية من التولوين (Toluene) بحيث يكون التركيز النهائي 2% وحضن مدة 24 ساعة بالحاضنة الهزازة بحرارة 30°C وبسرعة 150 دورة / دقيقة بعدها فصلت بقايا الخلايا بالنبذ المركزي المبرد بسرعة $4000 \times g$ ولمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4°C 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 و برقم هيدروجيني 6.

قياس الفعالية:

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

spp

محمد عمر محي الدين ، حميد عبود جبر ، جاسم محمد عوده

استخدم 5,3- ثنائي نايتروسالسيالك (DNSA) 3,5 dinitrodalicylic acid 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 الأنبيب 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 الذي اعد لهذا 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: أتبعنا 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 الكربوني: اجريت هذه التجربة بطريقة مشابهة لما مذكور في طريقة التنمية واختبر تأثير مصادر كاربون مختلفة في الانتاج تمثلت بالكلوكوز والسكروز والانيبولين 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 تراوح 4-7 وبفارق درجة واحدة لتحديد الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لانتاج الانزيم مع مراعاة نتائج الخطوات السابقة .

تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم:

دراسة الظروف المثلى لإنتاج الانفريز من عزلة محلية من *Candida*

spp

محمد عمر محي الدين ، حميد عبود جبر ، جاسم محمد عوده

حضان وسط الانتاج بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين 20-45 ويفارق 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:

الغريبة الاولى والثانوية : اجريت عملية الغريبة الاولى الموضحة نتائجها في جدول (1) على وسط (SYA) الحاوي على السكروز كمصدر وحيد للكاريون فتبين ان خمس عزلات تميزت بكثافة نمو عالية مقارنة مع العزلات الاخرى. ادخلت العزلات الخمس الى المرحلة الثانية من الغريبة (جدول 2) على نفس الوسط بدون الاكر فتبين أن العزلة التي رمز لها C5 كانت اكفاً تلك العزلات حيث كانت الفعالية والفعالية النوعية للانزيم المنتج 1.44 وحدة /مل و 5.21 وحدة/ملغ على التوالي. عليه اختيرت هذه العزلة لإكمال البحث.

جدول(1) الغريبة الاولى للخمائر قيد الدراسة من حيث قدرتها على النمو في وسط SYA

الحاوي على السكروز مصدراً وحيداً للكاريون

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

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

محمد عمر محي الدين ، حميد عبود جبر ، جاسم محمد عوده

جدول (2) غربة العزلات على اساس انتاجيتها من انزيم الانفريز 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 الكربوني الأمثل للانتاج:

وجد أن أفضل مصدر كربوني لتنمية العزلة *Candida spp* لانتاج انزيم الانفريز هو باستخدام الرافينوز مقارنةً بالكلوكوز والسكروز والانولين 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 الانولين 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 الانفريز من *Saccharomyces cerivesiae* تحققت باستخدام الرافينوز كمصدر للكربون ، فيما وجد (3) ان الكلسرول افضل من الكلوكوز كمصدر للكربون لانزيم الانفريز المنتج من *Candida utilis* 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 الانفريز من *Streptomyces sp*

تحديد مصدر النتروجين الأمثل لانتاج الانزيم:

اختيرت عدد من المصادر العضوية واللاعضوية ومزيجهما لدراسة تأثيرها على انتاج الانفريز 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/ملغ على التوالي (الشكل 2). ثم خلاصة الخميرة فالبيتون واخيرا كبريتات الامونيوم ويعزى تفوق الانتاج بهذا المزيج الى أن الأول يعد مصدراً للنتروجين فضلاً

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

محمد عمر محي الدين ، حميد عبود جبر ، جاسم محمد عوده

عن كونه مصدراً لفيتامينات مجموعة B والتي تعد ضرورية لنمو الأحياء المجهرية فضلاً عن كونها عوامل مراقبة Co-factor للعديد من الإنزيمات 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 مقارنة لما توصل اليه (11) حيث استخدم خلاصة الخميرة بتركيز 0.60% مع كبريتات الأمونيوم وبتركيز 0.1% في إنتاج إنزيم الإنفرتيز من *Saccharomyces cerevisiae*. على ان خلاصة الخميرة وحدها تعد مصدراً جيداً للنتروجين عند إنتاج الإنزيم من *Aspergillus flavus* (14) فيما كانت نترات الصوديوم هي مصدر النتروجين لإنتاج الإنزيم من *Streptomyces sp* (6) فيما استخدم آخرون (7) خليطاً من خلاصة الخميرة مع خلاصة الشعير والبيتون لإنتاج الإنزيم من *Leucosporidium antarcticum*

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم:

أعطت العزلة قيد الدراسة أعلى إنتاجية للإنزيم على أساس الفعالية والفعالية النوعية عند الرقم الهيدروجيني 6 حيث بلغت 1.51 وحدة/مل و 5.84 وحدة/ملغم على التوالي. وأنخفض إنتاج الإنزيم تدريجياً وبكلا الاتجاهين عن الرقم 6 (الشكل 3).

ويعد تحديد الرقم الهيدروجيني الابتدائي لوسط الإنتاج عاملاً مهماً لإنتاج الإنزيمات الميكروبية وفي فعالية هذه الإنزيمات لكونها تتأثر بشكل مباشر بتركيز أيونات الهيدروجين لوسط الإنتاج ووسط التفاعل والنتائج التي تم التوصل إليها مقارنة لما استخدمه (7) حيث كان الرقم الهيدروجيني الابتدائي 6.5 لإنتاج الإنفرتيز من *Leucosporidium antarcticum*. بينما كان الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط الذي استخدمه الباحث (10) هو 4.5 لإنتاج الإنزيم من *S.cerevisiae*. فيما وجد (13) ان الرقم الهيدروجيني الابتدائي 5.6 هو الأفضل لإنتاج الإنزيم من نفس الخميرة السابقة.

تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم:

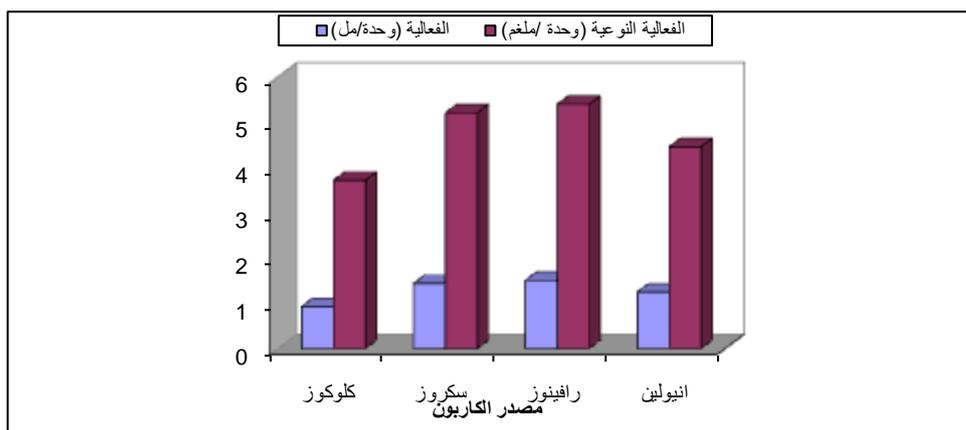
بينت الدراسة ان الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم من العزلة قيد الدراسة 35 م° حيث بلغت الفعالية والفعالية النوعية 1.58 وحدة/مل و 6.07 وحدة/ملغم على الترتيب وأنخفضت فعالية الإنزيم في درجات الحرارة الأخرى (الشكل 4) وتختلف درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم باختلاف الخميرة فقد اعتمد (2) درجة حرارة 30 م° عند إنتاج الإنزيم من *Candida utilis* كذلك كانت

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

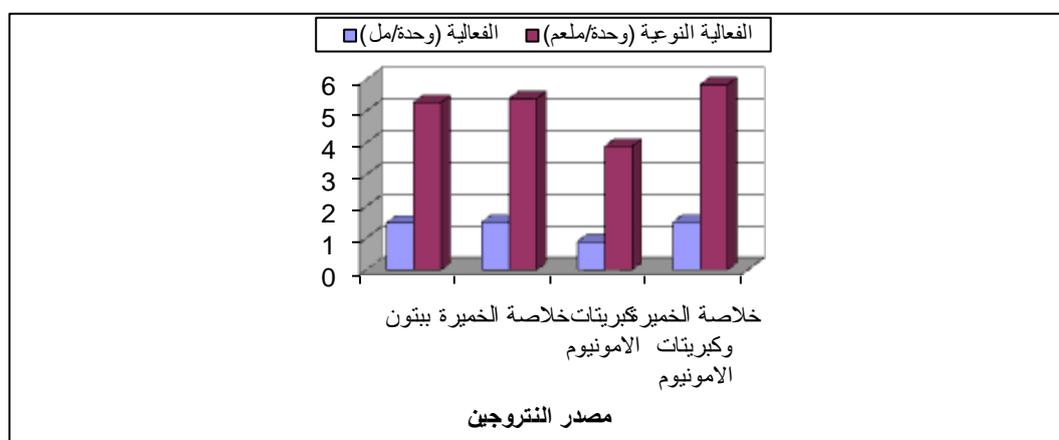
محمد عمر محي الدين ، حميد عبود جبر ، جاسم محمد عوده

درجة الحرارة 30 م° هي الدرجة التي انتج بها (9) الأنزيم من *S.cerevisiae* و اشار (10) الى ان الحرارة المناسبة لانتاج الأنزيم هي 33 م° من الخميرة نفسها فيما وجد (6) ان درجة الحرارة 37 م° تعد الانسب لانتاج الأنزيم من *Streptomyces sp*.

تحديد زمن التخمر الأمثل لإنتاج الإنزيم: تمت متابعة انتاج انزيم الانفرتيز بفترات مختلفة ولوحظ زيادة الفعالية والفعالية النوعية للأنزيم 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 المدة 28 ساعة هي المدة المثلى لانتاج الأنزيم وقد أختار الباحثون مدد زمنية مختلفة لحضن الاحياء المجهرية لانتاج الأنزيم فقد استخدم (6) مدة 24 ساعة لانتاج الانفرتيز من *Streptomyces sp*. بينما كانت مدة الحضن 30 ساعة لانتاج الأنزيم من *Candida utilis* من قبل الاخرين (3)



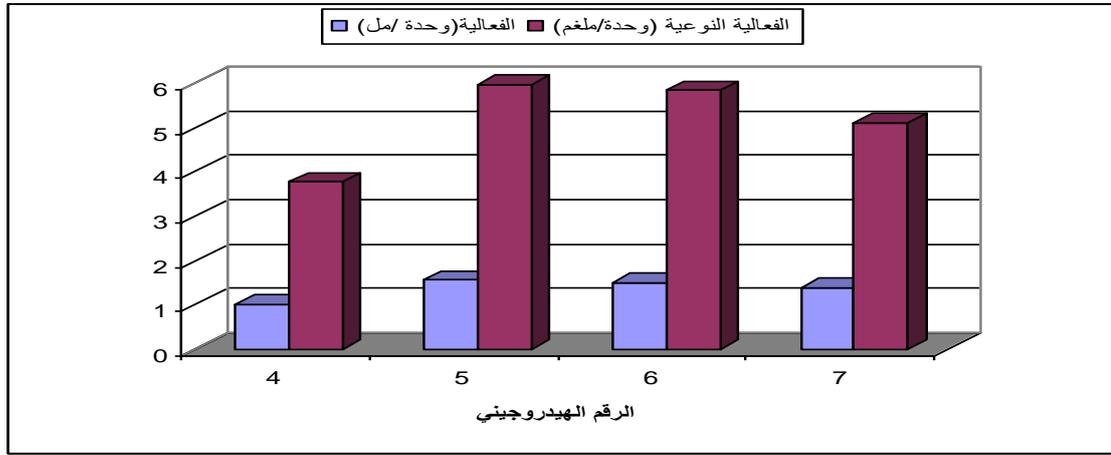
شكل (1) تأثير نوع مصدر الكربون في إنتاج إنزيم الإنفرتيز من *Candida spp*



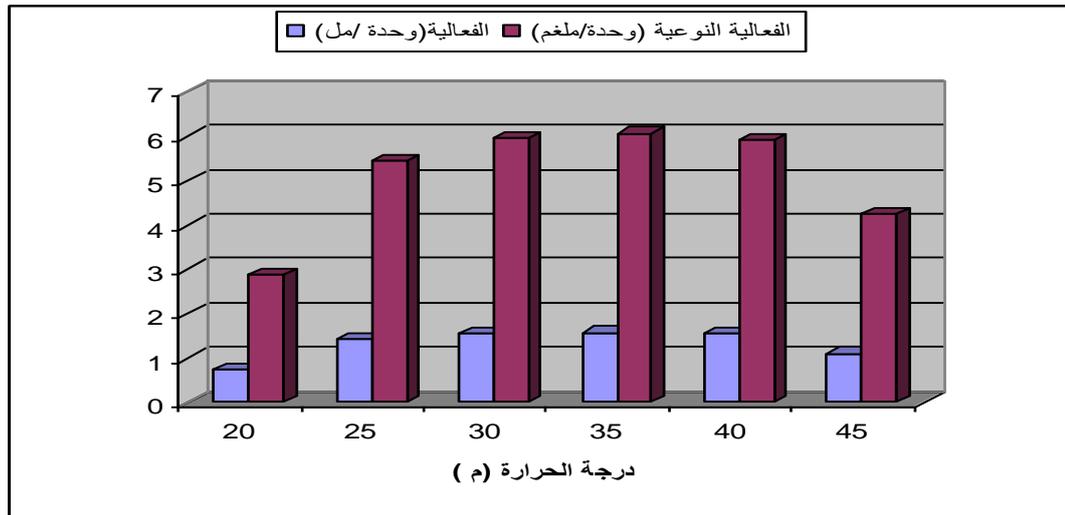
شكل (2) تأثير مصدر النتروجين في إنتاج إنزيم الإنفرتيز من *Candida spp*

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

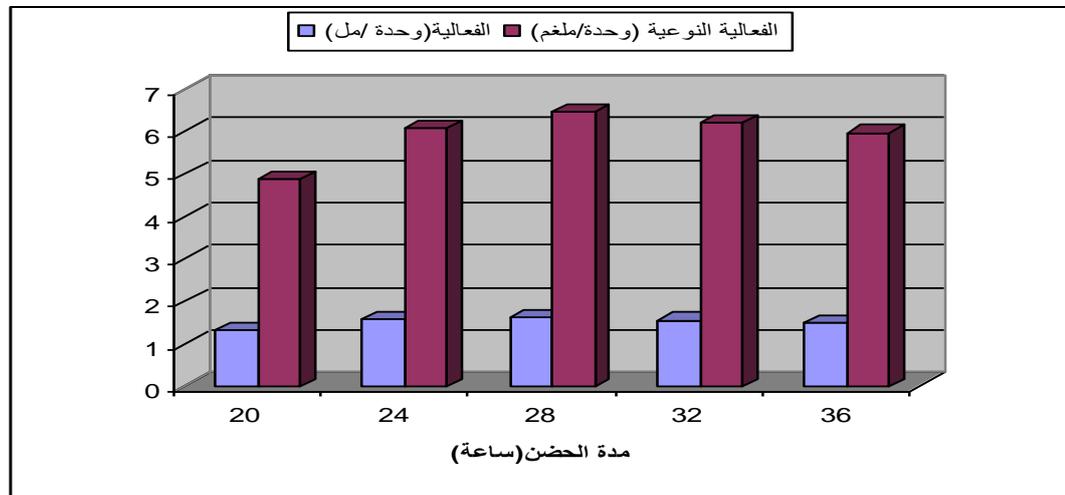
محمد عمر محي الدين ، حميد عبود جبر ، جاسم محمد عوده



شكل (3) الرقم الهيدروجيني الأمثل في إنتاج إنزيم الإنفرتيز من *Candida spp*



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



المصادر

- 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 Biotechnology*.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.
- 10- Neto, J.A.; Infanti, P. and Vitolo, M. (1997) . Influence of pH , 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. and Trimble, 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 lycezinase (beta-fructofuranosidase) aglycosylated 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 raffinose 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.