قياس فعالية الإنفرتاز في عزلات خمائر من مواد سكرية محلية مختلفة

روضه مثلا[1] و صباح يازجي[2] وأنور الحاج علي[2]

الملخّص

جُمعت 30 عينة من مواد سكرية من محافظات سورية (طرطوس، ودمشق، وحمص) مختلفة لعزل الخمائر فيزيولوجياً وتشخيصها باستخدام تقنية الـ API، أظهرت النتائج وجود17 عزلة توزعت على 3 أجناس و7 أنواع من الخمائر صنفت على الشكل الآتي: عزلة واحدة من كل من *Geotrichum capitatum*، *Candida krusei*، *C.zeylanoides*، *C. fumata*، *C. guilliermondi* وأربع عزلات من *C. lusitaniae* وسبعة من*Saccharomyces cerevisiae*. غُربلتْ هذه الخمائر المصنّفة بحسب نشاط الإنفرتاز الداخلي والخارجي الناتج عن كل منها باستخدام جهاز الطيفي الضوئي عند طول موجة 540nm. بيّنت النتائج تباين السلالات المدروسة في فعالية الإنفرتاز الناتج عنها إذْ كان النشاط الإنزيمي للأنفرتاز الخارجي الناتج عن السلالتين *C. Lusitaniae*-2 و*Saccharomyces cerevisiae* -4 الأعلى في حين كان الإنفرتاز الداخلي للسلالة *C. Lusitaniae1* الأكثر نشاطاً.

الكلمات المفتاحية: إنزيم الإنفرتاز، مواد سكرية، خمائر، فعالية إنزيمية، *Saccharomyces cerevisiae*.

[1] طالبة ماجستير، [2] أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، ص. ب. 30621، جامعة دمشق، سورية.

Measuring the effectiveness of invertase activity in isolated yeasts from local sugary materials

Mathla, R.[1] S. Yazaji [2] and A. Alhaj Ali [2]

Abstract

Thirty randomized samples of sugar materials were collected from different places (Tartous, Damascus, Homs) in Syria for isolation and identification of some yeasts. These yeasts were classified physiologically by API technique to identify the species of Yeasts found in these materials. Results showed that the isolated materials contained 17 isolated yeasts distributed in 3 genus and 7 species and named as follows: One isolated yeast from *Geotrichum capitatum, Candida krusei,Candida guilliermondi, Candida fumata* and *Candida zeylanoides* and 4 isolated yeasts from *Candida lusitaniae* and 7 isolated yeasts from *Saccharomyces cerevisiae*. The classified yeasts were screened to investigate the activity of internal and external invertase produced by them using spectrophotometer at 540 nm. The results showed that there were differences in the ability of yeasts to produce invertase enzyme. *Candida Lusitaniae-2* and *Saccharomyces cerevisiae-4* were found the best yeasts for production of external invertase, whereas *Candida Lusitaniae1* was the best for internal invertase.

Keywords: Invertase, Sugar materials, Yeasts, Enzyme activity, *Saccharomyces cerevisiae*

[1] Msc. student ,[2] Professor, Food Sci. Dep., Fac. Agric., P. O.Box.30621, Damascus Univ., Syria.

المقدمة

تعدُّ الإنزيمات وسائط عضوية ذات طبيعة بروتينية تتميز بقوة تنشيطية وساطية عالية وتقوم بتسريع كثير من التفاعلات الكيميائية الحيوية، وكذلك عمليات التبادل المختلفة في ظروف الخلايا الحية أو شروطها، تُصنع الإنزيمات فقط في الخلايا الحية وتبقى داخل الخلايا أو تطرح خارجها. انتشر استخدامها على نطاق واسع في مجال الصناعات الغذائية، وهي كوسائط لا تؤثر في ثابت التوازن ولا في تغيّرات الطاقة الحرة للتفاعل، ولكنها تُسرع التفاعلات الكيميائية بتخفيض طاقة التنشيط المطلوبة في بداية التفاعل (Schallmey وزملاؤه، 2004). تمتلك الإنزيمات خواص متعددة أهمها الفعالية العالية إذْ تسرع الإنزيمات التفاعلات الحيوية بشكل كبير والتخصص العالي الدقيق في رعاية التفاعلات الحيوية، فمثلاً أنزيم السُكراز (الإنفرتاز) يفكك السكروز فقط ولا يؤثر في السكريات الثنائية الأخرى كاللاكتوز والمالتوز، أي إن تأثير الإنزيمات موجه لتفكيك رابطة كيميائية محددة تماماً، وتتأثر الإنزيمات بتغيرات عوامل مختلفة مثل pH الوسط ودرجة الحرارة وتفاعلات الأكسدة والإرجاع، وكذلك وجود الشوائب الغريبة حتى ولو كانت بكميات قليلة (الباقوني، 2002).

استخلصت الإنزيمات في الماضي من النباتات والحيوانات إلا أن إنتاجها بواسطة الكائنات الحية الدقيقة ازداد د بسرعة كبيرة وذلك لسهولة عزلها، وتحسين إنتاجها إمَّا عن طريق التعامل مع جيناتها أو مع البيئة التي تنمو فيها، وهي غير مكلفة (Aehle، 2007).

يعدُّ الإنفرتاز من الإنزيمات التي عرفت في وقت مبكر بخاصيتها في حلمهه السكروز. وقد تمت تنقيته من قبل Berthelot عام 1860 من الخميرة وأسماه Enzyme ferment inversif بسبب الانقلاب الضوئي عند حلمهة السكروز. وفيما بعد أطلق عليه أسماء عديدة مثل Invertase, Sucrase, Saccharase, وfructofuranosidase -ß وأعطي التصنيف EC3,2,1,26 بحسب التصنيف العالمي للأنزيمات. وتوجد فعالية للانفرتاز في الخمائر والفطور والبكتريا والنباتات والحيوانات الراقية (Sumner وHowell، 1935). ويبلغ الوزن الجزيئي لهذا الإنزيم 260,000 دالتون. حيث يفكك الإنفرتاز الروابط α-1 ,4 الغلوكوزيدية بين جزيئات α-D غلوكوز وβ-D فركتوز للسكروز (Nakano وزملاؤه، 2004).

تعد التطبيقات البيوتكنولوجية المتنوعة للانفرتاز مهمة في صناعة الحلويات والمشروبات والخبيز والصناعات الدوائية، إذْ يفضل الفركتوز على السكروز بسبب حلاوته العالية ولا يتبلور بسهولة وخاصة في تحضير المربيات والحلويات (Shankar وKotwal، 2009؛ Uma وزملاؤه، 2010) وفي تخمير مولاس قصب السكر إلى ايتانول (Weber وRoitsch، 2000).

تشكل الكائنات الحية الدقيقة مجالاً واسعاً لإنتاج الإنفرتاز إذْ تستخدم السكروز بوصفه مصدراً غذائياً لها. وتنتج العديد من الأحياء الدقيقة الإنفرتاز مثل *Neurospora crassa, Candida utilis, Fusarium oxysporium, Phytophthora meganosperma, Aspergillus niger, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, and Schwanniomyces occidentalis*. إلا أن الإنتاج التجاري له يعتمد على سلالات الخمائر *Saccharomyces cerevisiae* أو *Saccharomyces carlsbergensis* (Herwig وزملاؤه، 2001؛ Belcarz وزملاؤه، 2002).

توجد الخمائر في التربة وأمعاء الحيوانات وعلى سطح ثمار الفواكه وفي العصائر الطبيعية. وقد حدَّد Hatcher وزملاؤه (2000) أنواع الخمائر الموجودة في عصير البرتقال الطبيعي بتسعة أنواع مختلفة، وكان السائد فيها *S. cerevisiae*. أمَّا العصير المتخمر من سكر القصب فقد وجد ثلاثة أنواع وهي: *S. carlsbergensis var. alcoholophila, S.cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe* (El-Tabey Shehata، 1959).

تعدُّ خميرة *S. cerevisiae* الكائن الحي الدقيق المختار لإنتاج الإنفرتاز بسبب قدرتها العالية على تخمير السكروز، وقابليتها العالية جداً لإفراز الإنفرتاز، (Vrabel وزملاؤه، 2003؛ Shafiq وزملاؤه، 2005). والإنفرتاز الناتج من هذه الخميرة هو غليكوانزيم يحتوي على نسبة40/1 .N-and O-linked mannoses (Mormeno وزملاؤه، 1989) ويفرز معظمه في خلايا الخميرة خارجياً، وكمية قليلة منه تبقى داخل الغشاء الخلوي ويصعب وصول السكروز إليه (Santiago gasc و Lampen، 1968).

عزلت الخميرة أول مرة من غلاف ثمار العنب على شكل غشاء رقيق، وهي من الخمائر المتبرعمة، خلاياها دائرية أو بيضاوية قطرها يراوح بين 5-10 ميكرونا. وهي تتبع عائلة *Saccharomycetaceae* (Volk و Galbraith، 2002).

تنمو معظم الخمائر هوائياً وتتوقف قدرة الخميرة على استخدام السكريات المختلفة بحسب ظروف التهوية، وبعض السلالات لا تخمر السكروز والتريالوز لا هوائياً (Madigan و Martinko، 2006). ومن ثمَّ يتأثر نشاطها كغيرها من الأحياء الدقيقة بظروف الوسط من حرارة وحموضة وتهوية وتوفر المواد الغذائية اللازمة لنموها، بالإضافة إلى بعض العوامل الخاصة بإنتاج الإنفرتاز كوجود الركيزة في الوسط ومدى تركيزها ومدة التحضين. وصنفت خميرة الخباز بسلالاتها كلّها من الأحياء الدقيقة المحبة للحرارة المتوسطة، ويعد المجال 29-30ْ م الأمثل المقابل للنشاط الأعظمي للخلايا (Migneault وزملاؤه، 2004). وتعدُّ خميرة الخباز لاهوائية اختياريا بحسب Myers وزملاؤه (1997) يعدُّ مجال الحموضة pH = 4.5-5.5 هو الأمثل لنمو خلايا الخميرة وهي قادرة على تحمل المجال الحمضي pH= 3-3.5 إلا أن معدل نموها ينخفض

(Herwig وزملاؤه، 2001). كما يؤثر مصدر الآزوت وتركيزه في نشاط الخميرة، ومن ثمَّ يؤثر في إفراز الإنفرتاز (Silveira وزملاؤه، 2000) فسلالات *Saccharomyces cerevisiae* كلّها قادرة على استخدام الأمونيا واليوريا كمصدر للنتروجين ولكنها غير قادرة على استخدام النترات لعدم قدرتها على اختزالها إلى أيون الأمونيوم، كما تستخدم أيضاً معظم الحموض الأمينية وبعض الببتيدات كمصدر للنتروجين بسهولة (Madigan وMartinko، 2006).

ونظراً إلى ندرة البحوث المحلية المتعلقة بإنتاج الإنفرتاز في سورية سواء من *Saccharomyces cerevisiae* أو من غيرها من الخمائر وتطبيقاته الصناعية فقد تركز هدف البحث إلى عزل الخمائر الموجودة في مواد سكرية محلية وتشخيصها، والتحري عن قدرة الخمائر المعزولة على إنتاج أنزيم الإنفرتاز الداخلي والخارجي، ومقارنة قدرة هذه الخمائر على إنتاج الإنفرتاز من خلال معرفة نشاط الأنزيم في العزلات الناتجة.

مواد البحث و طرائقه

جمع العينات ومصادرها: جمعت 30 عينة (عشوائياً من ثلاث محافظات وهي حمص ودمشق وطرطوس) من مواد غذائية سكرية (صلبة، وشبه سائلة، وسائلة) مثل التمر والتين مجفف والملبن والزبيب والعنب طازج والمربيات المتنوعة ودبس العنب والمشروبات والعصائر المنزلية المختلفة. حضر محلول السكروز تركيزه 25% وعقم بالطريقة التاندلية (وضع الدورق الحاوي على محلول السكروز في حمام مائي حرارته 95-100 ْم مدة 30 دقيقة، وبعدها ترك الدورق في درجة حرارة المخبر لليوم التالي حيث كررت العملية ثلاث مرات بمعدل مرة كل يوم). نقل جزء من كل عينة بواسطة ملقط معقم في غرفة العزل إلى دورق يحوي 25مل من محلول السكروز السابق، وحضنت الدوارق في الحاضنة على حرارة 30 ºس مدة 3 أيام، سحبت بعدها من الحاضنة لإجراء عملية العزل والغربلة عليها لاحقاً في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية ومخابر علوم الأغذية في كلية الزراعة في جامعة دمشق (الجدول1).

البيئات والكواشف المستخدمة: استخدمت بيئة دكستروز البطاطا آغار (PDA) لعزل الخمائر، وهي تتركب من 4 غ من مسحوق البطاطا و20 غ دكستروز و15 غ آغار في لتر ماء مقطر، وضبط رقم الحموضة pH عند 5 وعقمت في درجة حرارة 121ْس مدة 20 دقيقة.واستخدمت بيئة آغار مستخلص المولت (بيئة جاهزة) التي تتكون من مستخلص المولت 13 غ/ل ودكستران 2.5 غ وجيلاتين ببتون 5 غ/ ل وأغار 15غ/ل، لتنشيط خلايا الخميرة على أطباق بيتري قبل تشخيصها باستخدام شرائح الـ API إذ تعدُّ هذه البيئة مناسبة لتنقية الخمائر.

الجدول (1) مصادر العينات التي عزلت منها الخمائر ونوعها.

نوع العينة	المحافظة		
	حمص	دمشق	طرطوس
تمر	1	-	-
تين مجفف	1	-	-
مربى تين	1	-	-
مربى مشمش	2	1	1
زبيب	2	1	1
ملبن	1	-	-
عصير فواكه	1	1	1
دبس عنب	1	1	1
مربى تفاح	-	1	-
عنب	1	1	1
مربى كرز	-	1	-
مخلفات معمل السكر	-	1	-
فواكه مجففة	1	1	1
تين	1	1	1
مجموع العينات	13	10	7

بيئة Yeast Extract Peptone Sucrose Agar(YEPSA) بحسب Ikram وزملاؤه (2005): استخدمت هذه البيئة لحفظ الخمائر المدروسة إلى حين تحضير البادئ المستخدم لإنتاج الإنفرتاز، حُضّرت هذه البيئة من مستخلص الخميرة 3 غ/ ل، ببتون 5غ/ل، سكروز 20غ/ل وآغار 20 غ/ل ولها pH 6، وأغلقت الدوارق بسدادات قطنية وعقمت بالاوتوكلاف عند ضغط 103.5بار وحرارة 121˚س مدة 15دقيقة، وبردت إلى درجة حرارة الغرفة. وحُضرت بيئة التخمير لإنتاج الإنفرتاز بتقنية الدوارق الهزازة من مستخلص الخميرة 3 غ/ل، ببتون5غ/ل، سكروز 30غ/ل وضبط رقم الـ pH عند 6، وأغلقت الدوارق بسدادات قطنية وعقمت بالاوتوكلاف عند ضغط 103.5 بار وحرارة 121˚C مدة 15دقيقة، بردت إلى درجة حرارة الغرفة. وحضر الكاشف DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid) بوضع 30غ من بوتاسيوم صوديوم طرطرات تتراهيدرات في أنبوب 1ل، وأضيف أيضاً 16غ NaOH و500 مل ماء وحُلّت بالتسخين الخفيف، وعندما أصبح المحلول جاهزاً أُضيف ببطء 10غ من DNS وعند اكتمال الذوبان يكمل الحجم إلى 1 ل من الماء عُبّئ الكاشف بزجاجات معتمة (Kadambini، 2006).

عزل الخمائر وتشخيصها: عزلت الخمائر النامية على بيئة دكستروز البطاطا PDA بطريقة التخطيط على أطباق بيتري الحاوية PDA أو بالزراعة بعد التخفيف، حضنت الأطباق كلّها في حرارة 25˚س. فحصت الأطباق وحددت الخمائر النامية بتمييزها عن

بعضها بحسب خصائص الشكل والحجم واللون، وشُخّصت باستخدام شرائح API (Bio Merieux) التي تعتمد على قدرة الخمائر على تخمير 20 نوع من السكاكر الموجودة في شريحة حيث وُزّع 5 مل من الماء المقطّر في العلبة البلاستيكية ذات الحفر؛ وذلك من أجل خلق جو رطب. فتحت أمبولة suspension medium ذات الـ 5 مل وجرى التخلص من 3 مل والإبقاء على 2مل عن طريق ميكروبيبيت، ثم أُخذَ جزء من مستعمرة الخميرة بواسطة إبرة التلقيح وذلك بعد تنشيط الخميرة مدة 24 ساعة، وضعت الخميرة ضمن الأمبولة وأخذ منها 100 ميكروليتر بعد المزج الجيد، ووضعت ضمن أمبولة أخرى c medium حاوية على 7مل ورجّت، ثم أخذ 100 ميكروليتر من الأمبولة الحاوية على السكاكر بحيث تملأ كل حفرة بـ 100 ميكروليتر، وملئت الحفر الموجودة في شريحة الـ API من الوسط ثم غلقت الشريحة بغطائها ووضعت في الحاضنة مدة 48-72 ساعة، أخذت النتائج ودوّنت الأرقام في دفتر الشيكات وجرت مقارنة تسلسل الأرقام بدليل الـ API الملحق لتعرّف جنس الخميرة المختبرة ونوعها.

تحضير الخميرة لإنتاج الأنزيم: وُزّعت بيئة التخمير في دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 25 مل في كل دورق، ثم عُقّمت بالأتوغلاف (121 ºس مدة 15 دقيقة) وبعد التبريد لقحت الدوارق بالخمائر النامية على بيئة (YEPSA) بعمر 2-3 أيام، ثم حضنت الدوارق بحاضنة دورانية هزازة عند درجة حرارة 30°C مدة 24 ساعة وبمعدل رج 200 دورة/ د (Ikram وزملاؤه، 2005). ولإنتاج إنزيم الإنفرتاز نقل 1مل من الوسط الناتج من المعاملة السابقة إلى دوارق مخروطية سعة 250مل تحوي 25 مل من بيئة التخمير المعقمة، وحضنت الدوارق بحاضنة دورانية هزازة عند درجة حرارة 30°س مدة 48 ساعة وبمعدل رج 200 دورة/د. بعد انتهاء مدة التحضين نُقل مرق التخمير إلى أنابيب طرد مركزي موزونة (لتحديد وزن الخميرة الجافة) وباستخدام الطرد المركزي (بمعدل 5000 دورة مدة 7 دقائق) فُصلت خلايا الخميرة المترسبة في الأسفل عن الإنزيم الخارجي (Ikram وSikander، 2007).

تقدير فعالية الإنفرتاز: عرفت فعالية الإنفرتاز بأنها كمية الأنزيم التي تؤدي إلى إنتاج واحد مغ من السكر المحول (غلوكوز وفركتوز) في 5 دقائق عند حرارة 20°س وpH4.5، تقدر عادة فعالية الأنزيم لكل من الإنفرتاز الداخلي والخارجي بطريقة الـ DNS (Tasun وزملاؤه، 1970).

تقدير فعالية الأنزيم الخارجي: لتحديد الفعالية الإنزيمية أُضيف 0.5 مل pH 4,7 acetate buffer (0,05M) و1مل سكروز (0.3M) إلى أنابيب اختبار فردية، حضنت هذه الأنابيب تحضيناً أولياً عند 35 °م مدة 5 د، ثم أضيف 1مل من الإنزيم إلى الأنابيب وتابع التحضين لـ 5 دقائق أخرى ووضع مزيج التفاعل في حمام مائي يغلي مدة 5 د لإيقاف التفاعل وإبطال فعالية الإنزيم وبرد إلى درجة حرارة الغرفة (عومل الشاهد المعاملة

نفسها مع استبدال المحلول الإنزيمي بماء مقطر)، أُضيف 2 مل من كاشف الـــDNS إلى مزيج التفاعل، ووضعت الأنابيب في الماء المغلي مدة 5 د إذْ لوحظ تغيّر لون الأنابيـــب من الأصفر إلى البرتقالي، وبعد التبريد إلى 20 °م كمل الحجم إلى 10مل واستخدم جهاز الطيفي الضوئي عند طول موجة 540nm (Ikram و Sikander، 2007).

استخلاص الأنزيم الداخلي باستخدام الطريقة الكيميائية: أضيف 0.4 مل كلوروفورم إلى كلّ 1 غ خميرة، وخلط المزيج جيداً وترك مدة 30 إلى 60 دقيقة بعدها أضـــيف 0.4 مل ماءً معقماً لكل 1 غ من الخميرة، وضبط الـ pH بين 6.2 إلى 7، وترك المزيج مـــدة 24 ساعة في الحاضنة الهزازة على درجة حرارة C°30، بعدها أجريت عمليـــة طـــرد مركزي على سرعة 8500 دورة/ د مدة 5 دقائق، وأخذت الرشاحة الحاوية على الأنزيم الداخلي (Sonia و Castillo، 1979). وقدرت فعاليته كما هي واردة فـــي الـــسابق فـــي الأنزيم الخارجي.

أُجـــري التحليـــل الإحـــصائي بتـــصميم التجـــارب المتقـــدم Response Surface Methodology لحساب التباين والمتوسطات والفروق المعنوية.

النتائج والمناقشة

عزل الخمائر وتشخيصها: عُزلتْ 17 عزلة من الخمائر الموجـــودة فـــي العينـــات المدروسة بعد زراعتها على وسط دكستروز البطاطا، واستبعدت العزلات التي لم تظهر فيها نموات ظاهرية وكذلك العينات الملوثة بالفطور وأبواغها. وقد تميّزت المـــستعمرات الإيجابية والنامية بالأطباق باللون الأبيض الكريستالي مشرشة الحافات أحيانـــاً ومتفاوتـــة الأقطار. وعند تشخيصها باستخدام شرائح API تبـــين أنهـــا توزعـــت علـــى 7 أنـــواع (الجدول2).

الجدول (2) نتائج تشخيص الخمائر باستخدام شرائح API والسكريات التي تستقلبها كل خميرة.

أنواع السكاكر / نوع الخميرة	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF
Gotrichum capitatum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Candia krusei	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Candid lusitaniae	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
Candia Fumata	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Candida.zeylanoides e	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Saccharomyces cerevisiae	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
C. glabrata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

يبيّن الجدول (3) نسبة وجود الخمائر في العينات المدروسة، إذْ يلاحظ أن خميرة *Saccharomyces cerevisiae* هي الأكثر انتشاراً في المواد السكرية المحلية في محافظات حمص، ودمشق و طرطوس وبنسبة بلغت 41%، يليها في المرتبة الثانية خميرة *Candida lusitaniae* وبنسبة 23 %، في حين كانت خمائر *Geotrichum capitatum* و *C. guilliermondi* و *C. zeylanoides* و *C. krusei* و *C. fumata* و *C.glabrata* موزعة بنسب متساوية بلغت 6% من مجموع الخمائر الكلية، توافقت نتائج التشخيص مع Patrignani وزملاؤه (2009) في تجربتهم إذْ عزلوا خميرة *Saccharomyces cerevisiae* من عينة مربى المشمش، وكذلك مع Ikram وزملاؤه (2005) الذين قاموا بعزل سلالات من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* من خمس عينات مختلفة من التمر. كما يبيّن الجدول (3) أنَّ محافظة حمص ضمت أغلب الأنواع (6 أنواع من الخمائر) تليها محافظة دمشق بأربعة أنواع، وأخيراً محافظة طرطوس التي حوت على نوعين فقط.

الجدول (3) نسبة وجود الخمائر في العينات المدروسة

نوع الخميرة	عدد العينات ومصادرها وعدد العزلات		نسبة وجود الخميرة
Geotrichum capitatum	1	دمشق	% 6
Candida krusei	1	حمص	%6
Candida lusitaniae	4	حمص – دمشق- طرطوس	% 23
Candida fumata	1	دمشق	% 6
C.zeylanoides	1	حمص	% 6
C.glabrata	1	حمص	% 6
C. guilliermondi	1	حمص	% 6
Saccharomyces cerevisiae	7	حمص- دمشق- طرطوس	%41
العدد الكلي للسلالات	17		% 100

تقدير فعالية الإنفرتاز الخارجي للخمائر المعزولة: يوضّح الجدول (4) فعالية الإنفرتاز الخارجي (كمية الغلوكوز الناتجة (مغ/مل) خلال 5 دقائق) حيث تظهر السلالات المدروسة تبايناً كبيراً في قدرتها على إنتاج الإنفرتاز الخارجي، ومن ثمَّ فعالية الأنزيم الناتج عنها.

ولوحظ أن السلالتين *C.lusitaniae2* و *S.cerevisiae4* حققتا تفوقاً ملحوظاً على بقية السلالات في إنتاجها للانفرتاز، ويظهر ذلك واضحاً من فعالية الأنزيم (تركيز الغلوكوز الناتج) حيث بلغ 0.806 مغ/مل. في حين كانت السلالة *Candida krusei* الأقل إنتاجاً للانفرتاز إذْ بلغ تركيز الغلوكوز 0.001 مغ/مل، وهذا يتوافق مع Herwig وزملاؤه، (2001) في تباين أنواع الخمائر في فعالية الإنفرتاز الذي تنتجه كل منها.

فعالية الإنفرتاز الداخلي للخمائر المعزولة: يوضّح الجدول (5) فعالية الإنفرتاز الداخلي. إذْ تظهر السلالات المدروسة تبايناً كبيراً في قدرتها على إنتاج الإنفرتاز الداخلي، ومن ثمَّ فعالية الأنزيم الناتج عنها. تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Ikram وزملاؤه (2005) حيث تباينت سلالات *S.cerevisiae* الناتجة في نشاط الإنفرتاز الناتج عنها.

الجدول (4) فعالية إنزيم الإنفرتاز الخارجي للخمائر المعزولة، وترتيب السلالات بحسب نشاط كل منها في إنتاج الإنفرتاز.

السلالة	تركيز الغلوكوز الناتج (مغ/مل)	ترتيب السلالات
Candida krusei	0.001	17
C.lusitaniae1	0.024	11
Saccharomyces cerevisiae1	0.406	7
C.fumata	0.031	13
S.cerevisiae2	0.007	15
S.cerevisiae3	0.023	12
C.lusitaniae2	0.806	1
S.cerevisiae4	0.806	1
C. guilliermondi	0.499	6
C.lusitaniae3	0.050	10
Geotrichum capitatum	0.085	9
C.zeylanoides	0.665	5
S.cerevisiae5	0.167	8
C.glabrata	0.806	3
S.cerevisiae6	0.001	16
C.lusitaniae4	0.745	4
S.cerevisiae7	0.021	14

كما يتضح من الجدول (5) أن هناك اختلافاً واضحاً في قدرة السلالات المدروسة على إنتاج الإنفرتاز الداخلي. ووجد أن النوع *C.lusitaniae1* جاء في المرتبة الأولى في إنتاجه الإنفرتاز الداخلي إذْ بلغ تركيز الغلوكوز 0.23 مغ/مل، في حين حصلت السلالتان *S.cerevisiae3* و*S.cerevisiae6* على المرتبة الدنيا في إنتاج الإنفرتاز إذْ بلغ تركيز الغلوكوز 0.0004 مغ/مل.

الجدول (5) فعالية الإنفرتاز الداخلي الناتج عن الخمائر المدروسة، وترتيب السلالات بحسب نشاط كل منها في إنتاج الإنفرتاز الداخلي.

السلالة	تركيز الغلوكوز الناتج (مغ/مل)	ترتيب السلالات
Candida krusei	0.019	8
C.lusitaniae1	0.23	1
Saccharomyces cerevisiae1	0.146	2
C.fumata	0.003	12
S.cerevisiae2	0.003	12
S.cerevisiae3	0.0004	14
C.lusitaniae2	0.089	5
S.cerevisiae4	0.099	4
C. guilliermondi	0.103	3
C.lusitaniae3	0.059	6
Geotrichum capitatum	0.001	13
C.zeylanoides	0.005	11
S.cerevisiae5	0.008	10
C.glabrata	0.021	7
S.cerevisiae6	0.0004	14
C.lusitaniae4	0.059	6
S.cerevisiae7	0.017	9

واستنتج أنّ النوع *Saccharomyces cerevisiae* هو الأكثر انتشاراً بنسبة بلغت 41 %، يليها في المرتبة الثانية خميرة *Candida lusitaniae* وبنسبة 23 %، في حين كانت خمائر *Geotrichum capitatum* و *C. guilliermondi* و *C.zeylanoides* و *C. krusei* و *C.fumata* و *C.glabrata* موزعة بنسب متساوية بلغت 6% من مجموع الخمائر الكلية. وتميّزت بقدرتها على إنتاج الإنفرتاز الداخلي والخارجي مع وجود تباين في كفاءتها على إفرازه. وحقّق النوع *C.lusitaniae2* (المعزولة من عينة الزبيب من محافظة حمص) والنوع *S.cereviciae* (المعزول من عينة مربى المشمش من محافظة دمشق) تفوقاً في إنتاج الإنفرتاز الخارجي، والسلالة *C.lusitaniae1* (المعزولة من عينة دبس العنب من محافظة حمص) تفوقاً في إنتاجها للانفرتاز الداخلي.

واقترح بضرورة دراسة شروط إفراز أنزيم الإنفرتاز المثالية من النوع الأكثر إنتاجاً، والعمل على تنقية أنزيم الإنفرتاز الذي عُزل من السلالات المحلية القادرة على إنتاجه، والتوجه نحو استخدام الإنفرتاز في الصناعات الغذائية والدوائية، وتأكيد على إنتاج أنزيم الإنفرتاز من سلالات الخمائر المحلية تجارياً؛ مما يقلل من استيراده.

References المراجع

الباقوني، محمد رياض. 2002. كيمياء الأغذية (الجزء النظري)، منشورات جامعة البعث.

Aehle, W. 2007. Enzymes in industry, production and applications, Third, Completely Revised Edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Netherland, Pp: 4-25.

Belcarz, A., G. Ginalska, J. Lobarsewski and C. Penel. 2002. The novel non-glycosylated invertase from Candida utilis the properties and the conditions of production and purification, Biochim. Biophys. Acta, 1594: 40–53.

EL-Tabey Shehata, A. M. 1959. Yeasts isolated from sugar cane and Its Juice during the production of aguardente de Cana. Dep. General Bio., Univ. Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. by

Ikram, H., A. Mirza and A. Sikander. 2005. Effect of cultivation conditions on invertase production hyper producing Saccharomyces cerevisiae isolates, W. J. Microbio. and Biotechno., 21:487–492.

Ikram, H and A. Sikander. 2007. Kinetics of invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* in Batch Culture, Institute of Industrial Biotechnology, GC Univ., Lahore, Pakistan.

Hatcher, W. S. Jr., M. E. Parish, J. L. Weihe, D. F. Splittstoesser and B. B. Woodward. 2000. Fruit beverages, InIn F. P. Downes and K. Ito (ed.), Methods for microbial examination of food. American Public Health Association, Washington, D.C. Pp: 565-568

Herwig, C., C. Doerries, I. Marison and U. Stockar. 2001. Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotech.Bioengin.,76:247–58.

Kadambini, G., 2006, Process optimization for the production of ethanol via fermentation. Dissertation of Masters of Science in Biotechnology, Deemed University.

Madigan, M. and J. M. Martinko. 2006. Biology of microorganisms. 11th ed. Vol. 1.Upple Saddle River, NJ: Pearson Education.

Migneault, I., C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, and K. C. Waldron. 2004. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme cross-linking. Biotechniques, 37: 790-802.

Mormeno, S., J. Zueco, M. Iranzo and R. Sentandreu. 1989. O-linked mannose composition of secreted invertase of *Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Microbial Lett, 48: 271–4.

Myers, D.K., D. T. Lawlor and P. V. Attfield. 1997, Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*, Applied and Environmental Microbiology, 63: 145–150.

Nakano, H., H. Murakami, M. Shizuma, T. Kiso, T. L. Dearaujo and S. Kitahata. 2004. Trans- fructosylation of thiol group by beta-fructofuranosidases, Biosci. Biotechnol, 64: 1472-1476.

Patrignani, F., L. Vannini, S. Leroy, S. Kamdem,R. Lanciotti and E. Guerzoni. 2009. Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices, Intern. J. Food Microbio., 136 : 26–31.

Santiago Gasc, N. and O. Lampen. 1968. Purification of the Internal Invertase of Yeast, The J.Bio. Chemistry, 243

Schallmey, M. A. Singh and O. Ward. 2004. Development in the use of Bacillus species for industrial production.Can. J. Microbial, 50:1-17.

Shafiq, K., S. Ali, andI. Haq. 2005. Nitrogen regulation of Saccharomyces cerevisiae Invertase, Role of the URE 2 gene. Appl. Biochem. Biotechnol., 84: 247-254.

Shankar, V. and S. M. Kotwal. 2009, Immobilized invertase, Biotechnol. Advances, 27: 311-322.

Silveira, M.C., E. M. Oliveira, E. Carvajal and E. P. Bon. 2000. Nitrogen regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Invertase, Role of the URE2 gene. Applied Biochem. Biotechn, 86: 247:254.

Sonia, A., and F. J. Castillo. 1979. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. Applied and Environ. Microbio., 37:1201–1205 .

Sumner, J. B., and S. F. Howell. 1935. A method for determination of saccharase activity, J. Bio. Chemistry, 108: 51–54.

Tasun, K., P. Chose and K. Ghen. 1970. Sugar determination of DNS method, Biotechno. Bioengin., 12: 921.

Uma, D., C. Gomathi Muthulakshmi and V. K. Gopalakrishnan. 2010. Production, purification and characterization of invertase by aspergillus flavus using fruit peel waste as substrate. Dep. Biochem., Karpagam Univ., Coimbatore India, 641- 021.

Volk, T. and A. Galbraith. 2002. This month's fungus is *Saccharomyces cerevisiae*, the bakers' and brewers' yeast , Univ. Wisconsin-La Crosse.

Vrabel, P., M. Polakovic, V. Stefuca and V. Bales. 2003. Analysis of mechanisms and kinetics of thermal inactivation of enzymes: Evaluation of multi temperature data applied to inactivation of yeast invertase. Enzyme and Microbial Technol., 20: 348-354.

Weber, H., and T. Roitsch. 2000, Invertases and life beyond sucrose cleavage, Trends in Plant Sci., 5: 47–48.

Received	**2012/04/03**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2012/07/18**	**قبول البحث للنشر**