تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم الكايتينيز من خميرة *Saccharomyces cerevisiae*

ميس عماد احمد* شذى سلمان حسن*

استلام البحث 15، حزيران، 2009
قبول النشر 28،كانون الاول ، 2009

الخلاصة:

تم الحصول على 5 عزلات من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* ودرست قدرة العزلات على انتاج الكايتينيز، واظهرت نتائج الغربلة الكمية ان العزلة *Saccharomyces cerevisiae S4* هي الاغزر انتاجا حيث بلغت الفعالية النوعية 1.9 وحدة/ملغم بروتين.
زرعت الخميرة في اوساط تخمر صلبة وسائلة استخدمت فيها مواد نباتية مختلفة (مضافا اليها الكايتين)، اما الاوساط السائلة فقد احتوت على بعض الاملاح فضلا عن مواد نتروجينية مختلفة.
تمت دراسة الظروف المثلى لانتاج انزيم الكايتينيز من درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني، ومدة الحضانة، وتركيز الكايتين. بينت النتائج ان اعلى فعالية نوعية كانت عند الوسط السائل الحاوي على الجيلاتين مصدرا نتروجيني عند 30ْم وعند الرقم الهيدروجيني 6، و1% من الكايتين الغروي.

الكلمات المفتاحية: انزيم الكايتنيز، خميرة ، *Saccharomyces cerevisiae*

المقدمة:

يعد انزيم الكايتينيز من انزيمات التحلل المائي (E.C.3.2.1.14) وينتج من كثير من الكائنات الحية مثل البكتريا، والخمائر، والفطريات، والقشريات. تقسم هذه الانزيمات على وفق طبيعة عملها وتكسرها للاواصر الى: الكايتينيز الداخلي endochitinase حيث يعمل على تكسير الاواصر الكلايكوسدية لسلاسل الكايتين، والكايتينيز الخارجي exochitinase الذي يكسر الاواصر الطرفية للسلاسل محررا وحدات السكر الثنائي GLeNAe [2,1].
اشارت الدراسات ان الكايتينيز المنتج من خميرة ال *Saccharomyces cerevisiae* يتجمع في الفسحة البلازمية البينية periplasmic space ويعتقد ان له دور في عملية انقسام خلايا الخميرة [3].
ان اول من درس توصيف الكايتينيز في خميرة *Saccharomyces cerevisiae* هو الباحث Correa [4] حيث عين تسلسل الاحماض الامينية للانزيم واشار الى ان البروتين يحوي على اواصر وتحوي على سيرسن/وثريونين وعلى مجموعة كاربوكسيل. ومعظم الانزيم ينتج ويفرز من قبل الخلايا في وسط التنمية. يتأثر انتاج الانزيم بعوامل عديدة منها: مكونات الوسط الزرعي ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وغيرها كما تتاثر فعالية الانزيم بالظروف المحيطة من درجة الحرارة والايونات والرقم الهيدروجيني. واستعملت الانزيمات المحللة للكايتين لانتاج السكر N-acetyl glucose amine ولهذه المركبات اهمية في انتاج مواد كيمياوية وعقاقير طبية فضلا عن استعماله في صناعة المنتجات الغذائية.
لقد حظي الكايتينيز المنتج من البكتريا والفطريات باهمية كبيرة في تحليل هياكل الحشرات وازالتها من البيئة فضلا عن المجالات الطبية والعلاجية مثل استخدامها في علاج الامراض الفطرية (Antifungal drug) [5].

المواد وطرائق العمل:

تم الحصول على 5 عزلات جاهزة من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* من نماذج خميرة الخبز من الاسواق المحلية، واجريت بعض الاختبارات والفحوصات التشخيصية لهذه السلالات وتضمنت:
صفات المزرعة: درست صفات المزرعة لعزلات الخميرة لتنميتها على وسط YEPD الصلب وحضنها بدرجة 30ْم لمدة 48 ساعة ولوحظ شكل المستعمرات ولونها وقوامها وارتفاعها ورائحتها وغيرها من الصفات للتأكد من تشخيصها [6].
الفحص المجهري: اجري الفحص المجهري لملاحظة اشكال الخلايا وتجمعاتها وطرق تكاثرها بمزج جزء من المستعمرات مع قطرة من صبغة المثيل الازرق على شريحة زجاجية ثم وضع عليها غطاء الشريحة وفحصت بالمجهر بقوة تكبير (40 X).

* كلية العلوم / قسم علوم الحياة

الاوساط المستخدمة في انتاج الكايتينيز:

1- الاوساط السائلة المستعملة لتنمية الخميرة وانتاج الانزيم [7]: استعمل الوسط السائل الحاوي على المكونات الاساسية الاتية مع تغيير المصدر النيتروجيني باذابة 0.5 غم NaCl و 1غم MgSo4 و0.5 غم yeast extract و 0.5% Colloidal chitin و 1غم K2HSO4 و0.5 غم Trypton في 100 مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 6 وعقم الوسط بالموصدة.

حضرت الاوساط من المكونات المذكورة مع استبدال التربتون بمصادر نيتروجينية مختلفة هي: كازايين وببتون وجيلاتين وبالتركيز نفسه 0.5%.

2- وسط خلاصة الخميرة والببتون والدكستروز (YEPD) [8] يحتوي الوسط على المكونات الاتية: باذابة 20 غم كلوكوز و10غم yeast extract و20 غم Trypton في الماء المقطر واكمل الحجم الى لتر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 5 وعقم بالموصدة حيث استخدم هذا الوسط في تنشيط وتشخيص وتنمية عزلات الخميرة.

3- اوساط التخمر الصلبة:

حضرت الاوساط بوزن 15غم من كل من نخالة الحنطة والذرة الصفراء المطحونة كلا على حدة واضيف اليها 50 مليلتر من الماء المقطر لترطيب الوسط مع اضافة 1% من الكايتين الغروي، ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 6، عقمت الاوساط بالموصدة لمدة ربع ساعة.

استخلاص الانزيم: تم استخلاص الانزيم من المزارع السائلة بعد نبذ المزرعة بسرعة 4500 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة، اخذ الرائق الذي يمثل الانزيم الخام وقدرت فعالية الانزيم وتركيز البروتين وحسبت الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم بروتين). اتبعت طريقة [9] لتقدير الانزيم وطريقة [10]لتقدير البروتين.

دراسة العوامل المؤثرة في انتاج الكايتينيز:

1- مدة الحضانة:

نشطت الخميرة المنتجة ثم لقح وسط (YEPD) السائل المحتوي على 0.5% من الكايتين و 2 مليلتر من عالق الخميرة. حضنت المزارع السائلة بدرجة 30°م لمدة زمنية تراوحت بين (3-7) ايام، فصلت الخلايا بنبذها بجاز النبذ المركزي بسرعة 4500 دورة بالدقيقة لمدة ربع ساعة لكل مدة حضانة ثم قيست الفعالية الانزيمة وتركيز البروتين في الرائق المتكون على التوالي.

2- تأثير درجة الحرارة في انتاج الكايتينيز:

نشطت الخميرة بزرعها في وسط المرق السائل YEPD وحضنت بدرجة 30°م لمدة 18 ساعة. لقح وسط الانتاج السائل ب 2 مليلتر من عالق الخميرة وحضنت بدرجات حرارية مختلفة (20 و25 و30 و35)°م لمدة 6 ايام ثم استخلص الانزيم من المزرعة بعد نبذها وقيست الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين.

3- تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج الكايتينيز:

نشطت الخميرة في الوسط السائل وحضنت بدرجة 30°م لمدة 18 ساعة. لقح وسط الانتاج السائل المحضر بارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين 4-10 ب2 مليلتر من عالق الخميرة ثم حضنت بدرجة 30°م لمدة 6 ايام. رسبت الخلايا وقيست الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين وحسبت الفعالية النوعية في الرائق

4- تأثير تركيز الكايتين:

حضر وسط الانتاج بتراكيز مختلفة من الكايتين تراوحت من (0.5-1.5) % ثم لقح ب2 مليلتر من لقاح الخميرة وحضن بدرجة 30°م لمدة 6 ايام. فصلت الخلايا بالنبذ المركزي وقيست الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في الرائق المتكون.

النتائج والمناقشة:

تباينت سلالات الخميرة الخمسة في قدرتها على انتاج الكايتينيز في الاوساط الصلبة واظهرت ايضا تفاوتا في الانتاج في وسط الكايتين السائل جدول (1). بينت النتائج ان انتاجية الانزيم من هذه السلالات تتراوح بين 1- 1.9 وحدة /ملغم بروتين وتميزت سلالة الخميرة *Saccharomyces cerevisiae S4* بانتاجية اعلى من غيرها ربما تعود الى نشاط الجينات المسؤلة عن تشفير الانزيم. وجد ان خميرة *Kluyveromyces lactis* قد انتجت 0.9 وحدة /ملغم بروتين في وسط الكايتين السائل عند حضنها بدرجة 28°م لمدة 7 ايام [11].

اشارت نتائج دراسات اخرى الى اختلاف الانتاج من الانواع والسلالات المختلفة مثلا سلالة بكتريا *Enterobacter aerogenes* التي انتجت الانزيم بفعالية 2.8 وحدة/ ملغم بروتين [12] عند

زرعها في وسط الكايتين السائل وحضنها بدرجة 30°م لمدة 3 ايام.

جدول (1) انتاج انزيم الكايتينيز من خميرة *Saccharomyces cerevisiae*

رمز العزلة	الفعالية النوعية وحدة / ملغم بروتين
S1	1
S2	1.2
S3	1.4
S4	1.9
S5	1.6

A- انتاج الانزيم في اوساط التخمر السائلة لسلالة S4

استعملت اوساط سائلة تحتوي مصادر نتروجينية مختلفة في انتاج الكايتنيز بينت النتائج الموضحة في الشكل (1) ان اعلى فعالية نوعية كانت في الوسط الحاوي على الجيلاتين وبلغت 4.1 وحدة/ملغم بروتين. واظهرت اوطأ انتاجية في الوسط الحاوي على التريبتون وكانت 0.94 وحدة/ملغم بروتين.

يتضح من النتائج ان اضافة الجيلاتيين الى الوسط يدعم نمو الخميرة وانتاج الانزيم بشكل افضل من بقية المصادر النتروجينية المستعملة وهو من المواد المشجعة للنمو التي يحتاجها الكائن. وتتلائم هذة النتائج مع نتائج دراسة اخرى استهدفت انتاج الكايتنيز من بكتريا *Enterobacter Spp* استخدم فيها الوسط الحاوي على الجيلاتين وبلغت الفعالية النوعية 3.9 وحدة/ملغم بروتين[13] . وتتفق هذه النتائج مع مذكرة[14] الذي اثبت وجود فعالية واضحة للانزيم في وسط الجيلاتين لبكتريا *Serratia marcescenase*.

B- انتاج الانزيم في اوساط التخمر الصلبة :

استعمل اثنان من اوساط التخمر الصلبة حضرت من مواد نباتية او مخلفاتها لمعرفة مدى ملائمتها لانتاج الكايتنيز من العزلة *Saccharomyces cerevisiae S4* حيث احتوت هذه الاوساط على الكايتين بنسبة 1%. وقد اعطى وسط الذرة انتاجية اعلى قياسا بوسط النخالة شكل (2) وقد يرجع السبب الى احتوائه مواد كربوهيدراتية وبروتينية ملائمة لنمو الكائن وانتاج الانزيم حيث تحتوي بذور الذرة الداخلة في تكوين الوسط على 7-9 بروتين خام و2% الياف النشأ وسكر فضلا عن عوامل النمو الاخرى [15].

استخدمت تخمرات المواد الصلبة في هذه الدراسة لانتاج الانزيم لجوانب اهمها ملائمتها للنمو وكونها مواد طبيعية غنية بمتطلبات النمو مثل: الكربوهيدرات والبروتينات فضلا عن انها مواد متوافرة بكلف مناسبة ويمكن استعمالها لانتاج الانزيم بنطاق واسع.

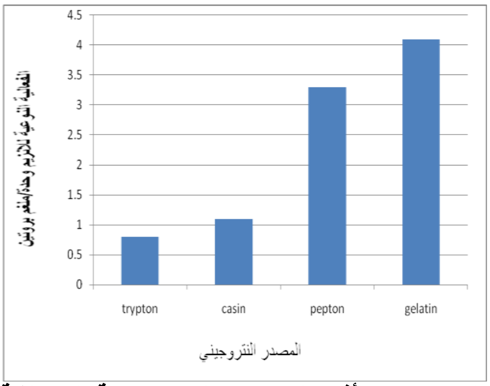
استخدمت التخمرات الصلبة لانتاج العديد من الانزيمات والمواد المفيدة في الصناعات الغذائية مثل انتاج انزيم الامليز من فطر *Aspergillus niger* عند تنميتها على اوساط التخمر الصلبة شملت نخالة الحنطة والذرة الصفراء [16].

الظروف المثلى لانتاج الكايتنيز :

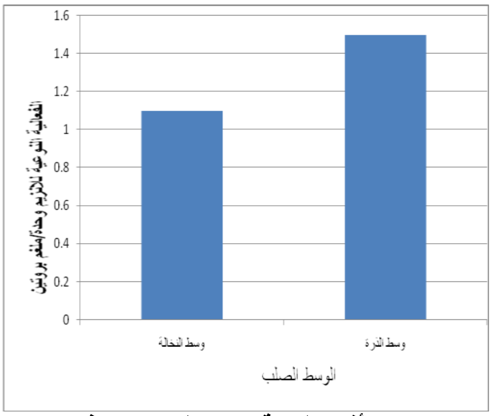
1- **درجة الحرارة:** بعد ان حضنت الاوساط الملقحة بالعزلة *Saccharomyces cerevisiae S4* بدرجات مختلفة تراوحت بين 25 -35 مْ. بينت النتائج ان درجة الحرارة الافضل لانتاج الكايتنيز تكون عند 30مْ شكل (3) وبلغت الفعالية النوعية للانزيم في هذه الدرجة 1.5 وحدة/ملغم بروتين وبدأت الفعالية بالانخفاض مع ارتفاع درجة الحرارة. تتفق هذة النتائج مع ماجاء به [17] بانتاج الكايتنيز من بكتريا *Enterobacter Spp* حيث كانت 30مْ وفعالية نوعية للانزيم بلغت 1.2وحدة/ ملغم بروتين. حيث ان لدرجة الحرارة تأثيرا مهما في انتاج وتركيب الانزيمات وارتفاع درجة الحرارة عن الحد المعين قد يؤدي الى موت الكائن وتوقف انتاج الانزيم وتغير تركيب الانزيم وتثبيط عمله [18].
2- **الرقم الهيدروجيني:** لوحظ عند تنمية عزلة *Saccharomyces cerevisiae S4* في وسط السائل بأرقام هيدروجينية مختلفة شكل (4) ان الرقم الهيدروجيني 6 كان الافضل لانتاج الانزيم واعطى انتاجية مقدارها 1.4 وحدة/ملغم بروتين وكان افضل من بقية الارقام الهيدروجينية بينما كان الرقم الهيدروجيني الافضل لانتاج الكايتنيز من *Bacillus cereus* هو 7 [19]. في حين ان الرقم الهيدروجيني الافضل لانتاج الانزيم من *Pseudomonas aeruginosa* كان 5.5 [20].
3- **مدة الحضانة:** تمت متابعة انتاج الكايتينيز من العزلة اثناء مدة حضانة تراوحت بين 1-4 ايام. اظهرت نتائج ان اعلى انتاجية للانزيم كانت في اليوم الثالث من الحضانة وبلغت 1.8 وحدة/ ملغم بروتين شكل (5)، وبدأت نقل عند اليوم الرابع بينما كانت اعلى فعالية للانزيم من البكتريا الخيطية *Streptomyces spp.* في اليوم الثاني

عشر وبلغت الفعالية النوعية 1.1 وحدة / ملغم بروتين [21]. بينما ان انزيم الكايتينيز من بكتريا *Enterobacter Spp.* تصل اعلى انتاجية في طور الثبات بعد 3 ايام من الحضانة وكانت 4.5 وحدة /ملغم بروتين [6].

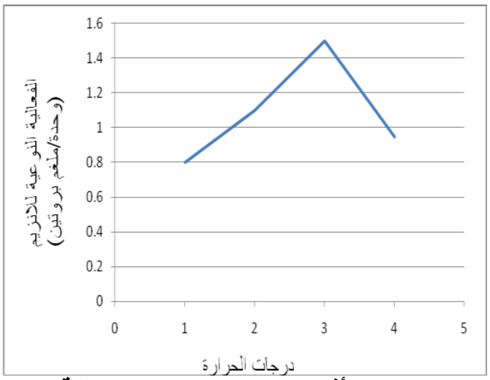
4- **تركيز الكايتين:** درس تأثير تركيز الكايتين لانتاج الانزيم من بكتريا *Saccharomyces cerevisiae S4* ولوحظ ان اعلى فعالية نوعية للانزيم هي 1.9 وحدة /ملغم بروتين شكل (6) عند وجود 2% من الكايتين الغروي في الوسط ثم تناقصت تدريجيا عند زيادة تركيز الكايتين الى 0.6 وحدة/ملغم بروتين عند تركيز 1.5 وحدة /ملغم بروتين وهذا ما اكدته دراسة اخرى لانتاج الكايتينيز من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* [22] بينما اشارت دراسة اخرى ان الانتاج الامثل للانزيم من *Bacillus cereus* تكون عند تركيز 0.5% من الكايتين [23]



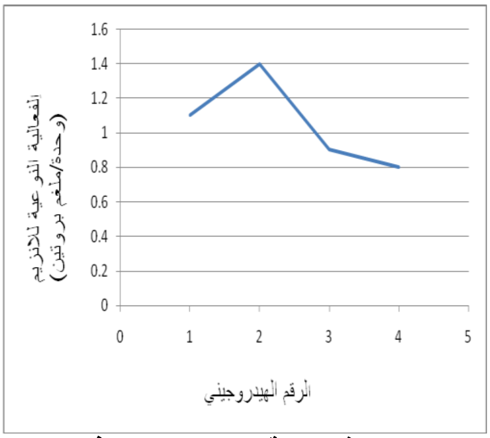
شكل (1): تأثير المصادر النتروجينية المختلفة على انتاج الكايتينيز من سلالة خميرة *Saccharomyces cerevisiae S4*.



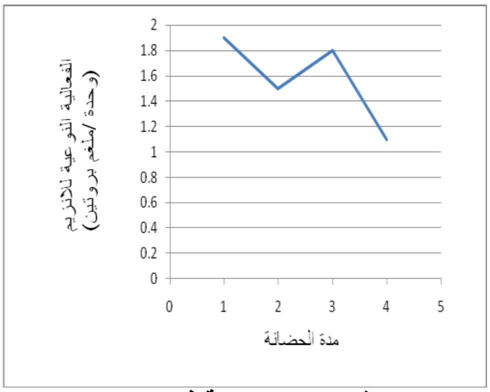
شكل (2): تأثير طبيعة الوسط الصلب في انتاج انتاج الكايتينيز من خميرة *Saccharomyces cerevisiae S4*.



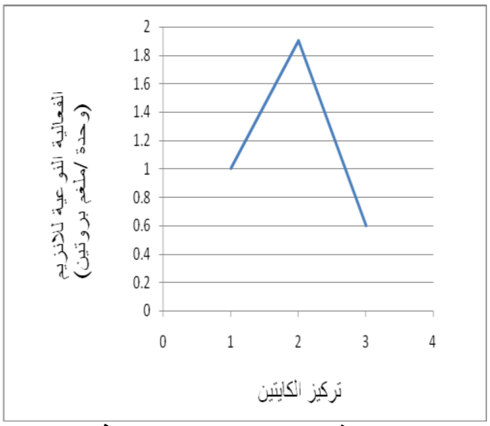
شكل (3): تأثير درجات حرارة مختلفة (20-35) مْ في انتاج الكايتينيز من خميرة *Saccharomyces cerevisiae S4*.



شكل (4) تاثير الرقم الهيدروجيني في انتاج الكايتينيز المنقى جزئيا من الخميرة



شكل (5) تاثير مدة الحضانة في انتاج الكايتينيز من الخميرة



شكل (6) تاثير تركيز الكايتين في انتاج الكايتينيز من الخميرة

المصادر:

1. Fekacuruz, J; Hidago, A; Lova, J.M.; Beniterz, T; Pintor-Toro,J and Liobell, A. 1992. Isolation and characterization of the three chitinase from Trichoderma barzianum. Eur. J. Biochem 206(4) :859-867.
2. Robbins, P.W.; Albright, C. and Benfield, B. 1988. Cloning and expression of *Streptomyces plicatus* chitinase in *Escherichia coli*. J.Biol.Chem. 263 (7):443-447.
3. Zlatkovic, D.; Jakovlige, D.; Zekovic, D. and Varvic, M.M. 2003. A glucan from active dry baker’s yeast (Saccharomyces cerevisiae): A chemical and investigation of the structure. J.serb. chem. soc. 68(11):805-809.
4. Handric, L.W. 2002. Production of beta-glucan-mannan preparation by autolysis of cell under certain PH, temperature and time condition united state patent No. 644(12) :211-218.
5. Sakai, K.; Uchiyama, T.; Matahira, Y. and Nango, F. 1991. Immobilization of chitinolytic enzymes and continues production of N-acytylglucoasamine with immobilized enzyme. J. Ferment. Bioengin. 72(3):168-172.
6. Daihya, N; Rupinder, T; Ram, P.T. and Gurinda, S.H. 2005. Chitinase from *Enterobacter spp.*, its purification, characterization and reaction pattern. Electronic J. Biotech. 8 (5) :0717-3458.
7. Benhamous, N.; Gagne, S; Quere, D.L. and Degbi 2002. Bacterial mediated induced resistance in cucumber beneficial effect of the endophytic beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymutnica* on the protection against infection by *Pythium ultimum.* Phytopanol. 90 (1) ;45-56.
8. Magnelli, P.; Cipollic, J.F and Abeijon, C .2002. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and b-1,6-glucan find structure. A.Biochem. 301 (8) ;136-150.
9. Boller,T,and Mauch,F and Vgelu 1988. Chitinase from *Phaseolusvulguris*, leaves, Meth, Enzymol, vol;161,pp. 479-484. Wood, W.A and Kellogy S.T(eds).Academic press
10. Lowry,O.H ; Roseberousgh ,N.T, Farr,A.L and Randall ,R.J.C .1951. protein measurement with the fold phenol reagent , J.Biol.511(3):231_240
11. Pleban,S ;Chernin ,L .and Chet ,I .1997 Chitinolytic enzymes of an endophytic strain of Bacillus cereus Lettersin Applied Microbiology . September, vol; 4(2). 284-288.
12. Tanaka, T.T, Fukui, and T, Imanaka. 2000. Different cleavage speciftes of the dul catalytic domains in chitinase from hyperthermophilic archaeon *Therococcus kodakaransis.* J.Biol.chem. 276(11) :3562-3565.
13. Karreman, R.J; Dague, E.; Gaborland, F; Quiles, F; Duval, J; and Lindsey, G.G 2006. the stress

19. Naja, G; Mustin, C. and Volesky, B. 2005. A high resolution; a new approach to studying binding site of microbial biosorbent. Water Research 39 (9):579-588.

20. Folders, J.; Tommassen, L.; and Bitter, W. 2002. Identification of chitin binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa* J. Bacterol. 182(8) :1257-1263.

21. Wang, D.; Cooney, C.; Demain, A; Dunil Humphrey, A. and Lilly, M. 1979. Fermantation and enzme technology. John Wiley, Inc. Canada.

22. Van Aalten, D; Synstad, M; Brurbeg, B; Hough ,E; Rilse B; Eijsink, V and Wierenga, R.K. 2000. Structure of two domain chitotyiosidase from *Serratia marcescenase.* J. Bacterol. 255 (10):201-209

23. Mabuchi, N; Hashizume , Janel Araki, Y. 2002. Characterization of the chitinase exerctization of chitinase excreted by *Bacillus cerus.* Can.J.Microbiol, 46(7): 370-375.

response protein increase the flexibility of yeast. Biochim. Biopys. Acts. 1436 (2):239-246.

14. Vaage-Kolstad, G; Horn, S.J; VanAalten, D.; Sysntad, B; and E.jsint, V. 2005. The non catalytic chitin binding portion from *Serratia marcescens* essential for chitin degradation. J.Biol.Chem, 280 (1); 28492-28497.

15. Acourene, S; Khalid, A; Bacha, A; Tama, M. and Taleb, B. 2007. Optimization of bakery teast production cultivated O musts of dated. J. Appl.Sci.Res., 3(10):964-971.

16. David, J. 2004. Fungal cell wall chitinase glucanase. Microbiol, 150 (11):2029-2035.

17. Levin, D. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae.* Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69(2): 262-291.

18. Green, A. 2005. Production of chitilytic enzyme by *Serratia marcescens* using various chitinase. J. Chem. Technol. Biotechnol. 80 (7):28-34.

Detection of the Typical Condition of chitinase Production from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae S4*

Miaes Emad Ahmad* ***Shatha Salman Hassan****

*College of science, Baghdad University.

Abstract:

Five *Saccharomyces cerevisiae* isolated from the ability of chitinase production from the isolates were studied.

Quantitative screening appeared that *Saccharomyces cerevisiae* S4 was the highest chitinase producer specific activity 1.9 unit/mg protein. The yeast was culture in liquid and solid state fermentation media (SSF). Different plant obstanases were used for (SSF) with the chitine, while liquid media contained chitine with the diffrented nitrogen source. The favorable condition for chitinase producers were incubated at 30 ºC at pH 6 and 1% colloidal chitine.