عزل وغربلة وتشخيص خميرة *Kluyveromyces marxianus* AY2 المنتجة لانزيم الانيولينيز

محمد عمر محي الدين

جاسم محمد عودة

جامعة بغداد/ كلية الزراعة

المستخلص

تم الحصول على ٤١ عزلة من الخمائر من مصادر مختلفة وأخضعت لمجموعة من اختبارات الغربلة الأولية والثانوية لإنتقاء العزلة الأكفأ في إنتاج أنزيم الانيولينيز وقد تبين أن العزلة التي رمز لها IY2 كانت أكفأ تلك العزلات . أظهرت فحوص التشخيص التي اجريت إن هذه العزلة تعود إلى *Kluyveromyces marxianus*

المقدمة

يعمل انزيم الانيولينيز inulinase على كسر الاصرة الكلايكوسيدية من نوع (1- 2) بين وحدات الفركتوز في الانيولين والسكريات الاخرى المشابه بنوع الاصرة ويعرف علميا D-glucopyranosyl-[-D-fructofuranosyl]$_{(n-1)}$-D-fructofuranosides وهناك اكثر من ٣٠٠٠٠ نبات يحوي على الانيولين (6) الاّ أن أشهر النباتات التي تحوي على نسبة عالية من الأنيولين هي نبات الهندباء chicory وخرشوف القدس أو ما يعرف محليا بنبات الألمازة Jerusalem artichoke .(15). عزل أول مرة على يد العالم الألماني Rose عام ١٨٠٤ م من نبات *Inula helenum* ومنه اكتسب التسمية بالأنيولين, وتتألف الجزيئة الواحدة منه من سلسلة من وحدات الفركتوز (ما بين ٢ الى ٦٠ وحدة) ، تنتهي بوحدة كلوكوز طرفية (12) كما ان الانيولينيز له القدرة على كسر الاصرة الكلايكوسيدية نوع (6- 2) الموجودة في اغلب الفركتونات كما في الليفان ونظراً لوفرة الانيولين في الطبيعة إذ يعد المخزون الرئيسي الثاني بعد النشا في النباتات

لذلك فان أنزيم الانيولينيز يوجد في عدد من الاحياء مثل الفطريات والبكتريا فضلاً عن النباتات غير أن الأنزيم ينتج تجارياً من العفن *A. niger* ومن الخميرة *K. marxianus* (*14*, ٧) والأنتاج التجاري للأنزيمات غالبا ما يعتمد على المصادر الميكروبية وذلك لوفرة الأنتاج الذي يتحقق من مصادر أولية رخيصة وقصر مدة الحضانة وسهولة الأستخلاص (١٦) . هدفت دراستنا هذة الحصول على عزلة محلية من الخمائر المنتجة للانزيم بوفرة , وتشخيص العزلة .

مواد وطرائق العمل

مصادر العزلات : تم الحصول على عدد من العزلات من الخمائر المنتجة للانيولينيز، عزلت من فواكه وخضر مختلفة (ألمازة و الثوم و البصل والهندباء البرية والكراث والتين والموز) ومن اللبن المصنع محليا من أسواق بغداد، مع عدد آخر من العزلات الجاهزة من قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة ومن كلية العلوم جامعة بغداد. تمت تنقية هذه العزلات وإختبار قدرتها على إنتاج الأنزيم كما موضح في الفقرات الآتية.

الأوساط الزرعية

حضرت جميع الأوساط الزرعية حسب تعليمات الشركة المجهزة في الماء المقطر وعقمت بالمؤصدة بدرجة ١٢١°م وضغط ١٥ باوند / انج^{٢} مدة ١٥ دقيقة. باستثناء الحالات المؤشر إزاءها.

وسط آكآر دكستروز- البطاطا Potato- dextrose agar (PDA)

حضر بأذابة ٣٩ غم من الوسط في ١٠٠٠ من الماء المقطر وحسب الطريقة الموصى بها من الشركة المنتجة (Oxoid) وأضيف لها ٢٥٠ ملغم كلورامفينكول.

وسط Inulin yeast extract peptone agar (IYPA)

وحضر بأذابة ٢٠ غم من الانيولين و٥ غم من خلاصة الخميرة و٥ غم من الببتون و١٥ غم من الآكار في ١٠٠٠ مل من الماء المقطر وأستخدم في الغربلة الأولية.

وسط سابورود- دكستروز Sabouraud dextrose agar (SDA)

وحضر بإذابة 6.5 غم من الوسط في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مل.عدل الرقم الهيدروجيني إلى 5.6 باستخدام حامض HCl بتركيز ٠,١ مولاري وعقم بالمؤصدة. وبحسب تعليمات الشركة المصنعة (Hi-Media/India) وأستعمل الوسط في تنمية وتنقية العزلات.

العزل : تمت تهيئة عينات الفواكة والخضر بتقطيعها أولاً وبتعليق ١٠ غم منها في ٩٠ مل من ماء الببتون ومزجها بصورة جيدة، ثم حضر منها عدد من التخافيف العشرية. تمت تهيئة عدد من الاطباق من الوسط الزرعي (PDA) و(SDA) . وخططت عليها وبابرة التلقيح، مسحات أخذت من التخافيف العشرية للعينات. وحضنت في درجة الحرارة ٢٥مْ مدة تراوحت بين ٤٨-٧٢ ساعة. التقطت عدد من مستعمرات الخمائر النامية في هذه الأطباق ونقلت الى أطباق جديدة تحوي الأوساط نفسها بهدف تنقيتها، مع تسميتها بالعزلات وإعتماد رموز تشير إليها والى مصادرها. كررت العملية لعدة مراتٍ إمعاناً في التنقية مع فحص العزلات تحت المجهر بين حين وآخر للتأكد من خلوها من الملوثات (11).

حفظ العزلات وادامتها :

تمت تنمية العزلات المنقاة من الخطوة السابقة والعزلات الأخرى الجاهزة بتخطيطها على الوسط PDA والوسط (SDA) بهيئة ممالات (Slants) وحضنها بدرجة الحرارة ٣٠ مْ لمدة ٤٨ ساعة، ثم حفظت في الثلاجة. نشطت المزارع شهريا بعدة مكررات طيلة مدة الدراسة.

الغربلة الأولية (شبه الكمية)

أستخدم وسط IYPA وذلك بتخطيط العزلات عليه وحضن الاطباق بدرجات الحرارة (٢٥ و٣٠ و٣٥) مْ مع متابعة يومية لمدة ٧٢ ساعة لإنتخاب الاكفأ منها في النمو وإستهلاك الانيولين مصدراً للكاربون، من خلال كثافة النمو التي قدرت نظرياً وأشير لها بعدد من علامة (+) تتناسب ما مقدار النمو الحاصل .

الغربلة الثانوية (الكمية)

المواد والمحاليل

وسط (Inulin yeast extract- Peptone broth (IYP

وحضر بإذابة ٢ غم من الانيولين مع ٥ غم من خلاصة الخميرة و٥ غم من الببتون في ١٠٠٠ مل من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني على ٥ ثم عقم بالمؤصدة.

وسط Glucose yeast extract peptone water (GYP)

وحضر بإذابة ٢٠ غم من الكلوكوز و٥ غم من خلاصة الخميرة و٥ غم من الببتون في ١٠٠٠ مل من الماء المقطر وإستخدم في تحضير اللقاح.

المحلول الدارئ : حضر دارىء فوسفات الصوديوم بتركيز ٠,٠٥ مولار برقم هيدروجيني ٦.

تحضير اللقاح

نقلت مسحة كثيفة من عزلات الخمائر كلاً على حده من وسط IYPA وزرعت في ٥٠ مل من الوسط GYP وحضنت في حاضنة هزازة على سرعة ١٥٠ دورة/دقيقة في ٣٠ مْ مدة٢٤ ساعة. ثم حسب عدد الخلايا لكل مللتر من هذه المزرعة بوساطة شريحة Hemocytometer. أجريت التخافيف اللازمة منها للحصول على التركيز المطلوب من اللقاح.

إنتاج الأنزيم

أستخدمت طريقة المزارع المغمورة لإنتاج الأنزيم، إذ لقحت دوارق زجاجية سعة ٣٠٠ مل حاوية على ١٠٠ مل من الوسط IYP بالرقم الهيدروجيني ٥ بـــ (٥) مل من اللقاح بحيث يوفر ١٠٦ خلية / مل من الوسط، وحضنت في حاضنة هزازة في ٣٠ مْ مدة ٢٤ ساعة وبسرعة ١٥٠ دورة / دقيقة. ثم فصلت الكتلة الحيوية عن الوسط بالنبذ المركزي المبرد على سرعة 4000×g مدة 30 دقيقة بدرجة ٤مْ. أهمل الراسب وعُدّ الراشح المستخلص الخام للأنزيم.

محلول المادة الأساس : حضر هذا المحلول بتركيز ٣% بإذابة ٣ غم من الانيولين في كمية قليلة من محلول الخلات الداريء برقم هدروجيني ٥ وبتركيز ٠,٢ مولاري في دورق حجمي سعة ١٠٠ مل وأكمل الحجم إلى العلامة بالمحلول الدارئ نفسه، وأستخدم مادة أساس لتقدير الفعالية.

تقدير فعالية الإنزيم

أتبعت الطريقة المذكورة من (13) في تقدير فعالية الأنزيم بطريقة كاشف حامض ٥,٣ ثنائي نايترو سالسيلك (DNSA) إذ أضيف ٠,١ مل من المستخلص الأنزيمي إلى ٠,٩ مل من محلول المادة الأساس في حمام مائي بحرارة ٣٠ْ م وأستمر التفاعل مدة ١٠ دقائق، بعد ذلك أضيف ١ مل من (DNSA) ثم وضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي مدة ١٠ دقائق. بردت مباشرة بالماء. أضيف ١٠ مل الماء المقطر وقيست الامتصاصية على ٥٤٠ نانوميتر وبالرجوع إلى المنحنى القياسي للفركتوز تم أستخراج السكريات

المختزلة والمتحررة بفعل الأنزيم على المادة الأساس (الانيولين) ومنها تم تقدير فعالية الإنزيم:

عرفت وحدة الفعالية (Unit):- بأنها كمية الإنزيم التي تحرر ١ مايكرومول من الفركتوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

تقدير تركيز البروتين :أتبعت طريقة (5) في تقدير البروتين وباستخدام محلول ألبومين المصل البقري (Bovine Serum Albumin) وصبغة (G-250 brilliant blue Commassie) في اعداد المنحى القياسي وقدرت تركيز البروتين في النماذج بنقل ٠,١ مل من المحلول الأنزيمي إلى ١ مل من الصبغة ومزجت جيدا وتركت ٥ دقائق بحرارة الغرفة وقيست الإمتصاصية على ٥٩٥ نانوميتر. قدر تركيز البروتين إعتمادا على المنحنى القياسي الذي تم إعداده كما في الفقرة المذكورة آنفاً. أما محلول الكفء (البلانك) فحضر بالخطوات نفسها، بإستثناء إستخدام الماء المقطر بدلا من المحلول الأنزيمي .

تشخيص العزلة

الأوساط الزرعية : تم إستخدام عدد من الأوساط الزرعية في إختبارات تشخيص العزلة وضبط الرقم الهيدروجيني لكل وسط بإستخدام محلول HCl بتركيز ٠,١ مولار أو محلول NaOH بتركيز ٠,١ مولار حسب الرقم الهيدروجيني المطلوب، حيث حضرت مختبريا حسب تعليمات الشركة المجهزة وعقمت بالمؤصدة أو بالترشيح باستخدام مرشحات غشائية بفتحات قطرها ٠,٤٥ مايكروميتر.

١-**وسط (Glucose yeast extract peptone water (GYP**: وحضر بإذابة ٢ غم من الكلوكوز و٠,٥ غم من خلاصة الخميرة و٠,٥ غم من الببتون في ١٠٠ مل من الماء المقطر (Kreger-Van Rij, 1984) .

٢-**وسط (Glucose yeast extract peptone agar (GYP agar** : وحضر بالمواد والكميات المذكورة في الوسط (GYP) مع أضافة ٢% آكار

٣-**وسط (Yeast- malt extract agar (YM agar**: وحضر بإذابة ٠,٧٥غم من خلاصة الخميرة و ٠,٧٥غم من خلاصة المالت و١,٢٥ غم من البيتون و ٠,٢٥ غم من الكلوكوز في ٢٥٠ مل من الماء المقطر برقم هيدروجيني تراوح بين (٥-٦) (9).

٤-**وسط MC-Clary's Acetate agar:** وحضر بإذابة ٠,١ غم من الكلوكوز و٠,١٨ غم من كلوريد البوتاسيوم و ٠,٢٥ غم من خلاصة الخميرة و ٠,٨٢ غم من خلات الصوديوم الثلاثية و ١,٥ غم من الآكار في ١٠٠ مل من الماء المقطر (9).

٥- **وسط Corn Meal agar:** وحضر بإذابة ١٢,٥ غم من طحين الذرة الصفراء في ٣٠٠ مل من الماء المقطر وسخن في حمام مائي بدرجة حرارة ٦٠ مْ لمدة ساعة، ثم أخضع المحلول الناتج لعملية ترشيح عبر ورق واتمان رقم واحد. أكمل الراشح الى ٣٠٠ مل بالماء المقطر وأضيف إليه ٣,٨ غم من الآكار، وعقم بالمؤصدة (9).

٦-**وسط تخمير السكريات Sugar Fermentation medium :** وحضر بإذابة ٠,٥٤ غم من خلاصة الخميرة و ٠,٢٥ غم من الببتون و ٠,٢٥ من محلول ١,٦% بروموثايمول الأزرق Bromo thymol blue في ١٠٠ مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى ٦. وزع الوسط بواقع ٥ مل في أنابيب إختبار تحوي أنبوبة درهم Durham tube مقلوبة. عقم الوسط وأضيف إليه المحاليل السكرية المذكورة أدناه بتركيز ٢% ، عدا الرافينوز إذ أضيف بتركيز ٤% وبواقع ٢,٥ مل لكل أنبوبة كلاً على أنفراد. علما أن السكريات عقمت مسبقا بالترشيح عبر مرشحات غشائية بفتحات قطرها ٠,٤٥ مايكروميتر. وشملت: الكلوكوز والكالاكتوز والسكروز والمالتوز والسيلوبايوز والتريهالوز واللاكتوز والرافينوز والنشأ الذائب والانيولين والفا- مثيل -د- كلوكوسايد.

٧-**وسط إستهلاك الكاربون Carbon assimilation medium :** حضر بإذابة ٦,٧ غم من Bacto-Yeast Nitrogen base المجهز من شركة (Difco) في ١٠٠مل من الماء المقطر وعقم بالترشيح. ثم وزع بواقع ٠,٥ مل في أنابيب إختبار تحوي من ٤,٥ مل من المحاليل المائية لأحد مصادر الكاربون المذكورة أدناه والمحضرة بتركيز ٠,٥ %، (عدا الرافينوز إذ حضر بتركيز ١%)، والمعقمة بالترشيح أيضاً. ومصادر الكاربون هي:

١- السكرية: وإستملت على السكروز والكالكتوز والكلوكوز والسوربتول والسلوبايوز والمالتوز واللاكتوز والتريهالوز والنشأ والرافينوز والآربينوز والانيولين والزايلوز.

٢- الكحولات (ايثانول ومانتول وكلسرول)

٣- الأحماض العضوية (الستريك والسكسينيك)
٤- الكلايكوسيدات (الفا مثيل د-كلوكوساید)

٨-**وسط إستهلاك النتروجين Nitrogen assimilation medium** :وحضر بإذابة ١١,٧ غم من Bacto-Yeast Carbon base مجهز من شركة Difco في ١٠٠ مل من الماء المقطر، وعقم بالترشيح، ثم وزع في أنابيب إختبار وبواقع ٠,٥ مل ويحتوي كل منها على ٤,٥ مل من مصادر النتروجين المختلفة التي جهزت بإذابة ٠,٠٢٦ غم من نتريت الصوديوم و ٠,٧٨ غم من نترات البوتاسيوم في ٩٠ مل من الماء المقطر وعقم بالترشيح أيضاً.

٩-**وسط Sodium chloride tolerance medium** : وحضر بإذابة ١ غم من الببتون مع ٢ غم من الكلوكوز وأضيف لها كلوريد الصوديوم بتراكيز صفر – ٢٠% في ١٠٠ مل من الماء المقطر، ووزعت بواقع ٥ مل لكل أنبوبة من أنابيب الإختبار. وأستخدمت لدراسة قابلية الخميرة على مقاومة الملح (١٠)

١٠- **وسط Vitamin-Free medium**:تم تحضير الوسط بإذابة ١٦,٧ غم من Bacto Vitamin-Free Yeast base في ١٠٠ مل من الماء المقطر، ووزع في أنابيب إختبار بواقع ٠,٥ مل وعقم بالترشيح وكل انبوبة تحوي ٥,٤ مل من الماء المقطر المعقم (٩).

١١- **وسط 50% Glucose-Yeast extract agar** :حضر بإضافة ٠,٥ غم من خلاصة الخميرة مع ٥٠ غم من الكلوكوز واضيف لها ٣ غم من الآكار واكمل الحجم الى ١٠٠ مل بالماء المقطر ووزع في أنابيب وبواقع ٥ مل لكل أنبوبة وعقم بالمؤصدة مدة ١٠ دقائق، وتركت الانابيب مائلة لغرض التصلب (10).

١٢-**وسط Glucose-Calcium Carbonate agar** : حضر بإذابة ٥ غم من الكلوكوز و٠,٥ غم من كاربونات الكالسيوم و٠,٥ غم من خلاصة الخميرة مع ٢ غم من الآكار في ١٠٠ مل من الماء المقطر (9).

١٣-**وسط Christensen's Urea agar** : وحضر بإذابة ٠,١ غم من الكلوكوز و٠,١ غم من الببتون ٠,٢ غم من فوسفات البوتاسيوم الثنائية و٠,٥ غم من كلوريد الصوديوم و٠,٠٠١٢ غم من أحمر الفينول في كمية من الماء المقطر. وعدل الرقم الهيدروجيني الى ٦,٨ وأضيف له ٢ غم من الأكار وأكمل الحجم الى ١٠٠ مل . ووزع

في أنابيب إختباربواقع ٤,٥ مل وعقم بالمؤصدة ثم اضيف لكل أنبوبة ٠,٥ مل من محلول ٢٠% يوريا معقمة بالترشيح مسبقاً، تركت الأنابيب بصورة مائلة لغرض تصلب الوسط (9).

١٤-**وسط Malt extract gelatin** :وحضر بإذابة ١٢ غم من الجيلاتين مع ١٠ غم من خلاصة المالت في ١٠٠ مل ماء مقطر ووزعت في أنابيب وعقمت وتركت لتتصلب بشكل عمودي (10)

١٥-**وسط Cycloheximid (Actidione) resistance** :**محلول أ:** حضر بإذابة ١٠ ملغم من المضاد الحياتي Actidione في ٩٠ مل ماء مقطر وعقم بالترشيح عبرمرشحات غشائية بفتحات قطرها ٠,٤٥ مايكروميتر.

محلول ب: حضر بإذابة ٦,٧ غم من Yeast Nitrogen Base و ١ غم من الكلوكوز في ١٠٠ مل من الماء المقطر المعقم، وعقم بالترشيح بالطريقة التي وردت آنفاً.

مزج ٤,٥ مل من محلول أ مع ٠,٥ مل من المحلول ب في أنابيب إختبار معقمة .

أ- **الإختبارات الفسلجية والكيموحيوية Physiological and biochemical tests**

١-تخمر الكاربوهيدرات Fermentation of carbohydrates

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط إستهلاك تخمير السكريات (٦) بعالق خلايا الخميرة بعمر ٤٨ ساعة وحضنت بدرجة حرارة ٢٥مْ مدة ١٤ يوماً مع ملاحظة تغير اللون الى الاصفر وتجمع الغاز في أنبوبة درهم دلالة على حصول التخمر وإيجابية الفحص.

٢-تمثيل مركبات النتروجين Assimilation of nitrogen compounds

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط (٨) بعالق الخميرة وحضنت بدرجة حرارة ٢٥مْ مدة ٧ أيام . عُدّت الأنابيب الحاوية على نمو كثيف مقارنة مع الوسط الخالي من المصادر النتروجينية دلالة على إيجابية الفحص.

٣-تمثيل مركبات الكربون (Assimilation of Carbon compounds)

لقحت الخميرة لأنابيب حاوية على وسط إستهلاك الكاربون (٧) وحضنت في ٢٥مْ مدة ٧ ايام واستدل على قدرة العزلة على تمثيل مصادر الكربون في الوسط باستخدام ورقة بيضاء مخططة بالحبر بمسافة ٣/٤ ملم بوضعها خلف الانابيب وعد الفحص موجبا في حالة عدم تميز الخطوط وبعكسه فان النتيجة عدت سالبة، اعيد فحص الانابيب بعد مرور ٢١ يوما (9)

٤-النمو في وسط خال من الفيتامينات Growth in vitamin-free medium

أضيف الوسط (١٠) الى أنابيب إختبار ولقحت بالخميرة وحضنت بحرارة ٢٥ م° مدة سبعة أيام ثم لقحت أنابيب أخرى تحوي الوسط نفسه بابرة تلقيح من النمو للوسط السابق ولوحظ النمو من عدمه (9)

٥-النمو في اوساط ذات ضغوط أزموزية عالية Growth on medium of high osmotic pressure

١- أوساط عالية التركيزمن السكريات: لقحت انابيب من الوسط 50% Glucose-Yeast extract agar (١١) حضنت بدرجة حرارة ٢٥ م° مدة ٢١ يوماً ، وعدت النتيجة موجبة بتكون عكارة واضحة دلالة على كثافة النمو.

٢- تحمل كلوريد الصوديوم : لقحت أنابيب من الوسط Sodium chloride tolerance medium (٩) بالخميرة وحضنت على ٢٥ م° مدة ثلاثة أيام، وأعت النتيجة موجبة بوجود عكارة في الوسط دلالة على النمو (١٠)

٦-إنتاج الحامض من الكلوكوز Acid production from glucose

لقحت الأطباق الحاوية على الوسط Glucose-Calcium Carbonate agar (١٢) بالخميرة بطريقة التخطيط وحضنت بحرارة ٢٥ م° مدة ٧٢ ساعة، وعُدّ ظهور مناطق رائقة حول مستعمرات الخميرة دلالة على إنتاج الحامض وإيجابية الفحص.

٧-إنتاج الاستر Ester production

لقحت الأطباق الحاوية على الوسط YM agar (٣)بالخميرة وحضنت الأطباق في درجة حرارة ٣٠ م° مدة ٤٨ ساعة، وتم الإستدلال على إنتاج الاستر من الرائحة المميزة له.

٨-تحليل اليوريا Urea Hydrolysis

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط (١٣) Christensen's Urea agar

بالخميرة وحضنت بحرارة ٢٥ م° ، وتمت مراقبة النمو من اليوم التالي للحضن حتى اليوم الخامس إذ عُدّ الإختبار موجبا عند ظهور النمو مع تغير لون الوسط إلى الوردي الغامق.

٩-إختبار تكوين مركبات خارج خلوية (مركبات الاميلويد)

Production of extracellular; amyloid compounds (starch test)

أضيفت قطرات من Lugol's iodine solution (حضر باذابة ٢غم يوديد البوتاسيوم و١غم من اليود في ٣٠٠مل من الماء المقطر) الى الأنابيب الحاوية على مركبات الكاربون(٣) (بعد ٢١ يوماً من الاختبار) وأستدل على النتيجة الموجبة بتغير اللون الى ألازرق او الاخضر (9)

١٠-إسالة الجلاتين Gelatin liquefication

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط الجيلاتين Malt extract gelatin (١٤) بالخميرة وباسلوب الطعن وحضنت في درجة حرارة ٢٥ م° مع متابعة يومية حتى اليوم الرابع والعشرون لملاحظة تحلل الوسط، وعُدّ التحلل حاصلاً عند بقاء الوسط سائلاً بعد وضعه في الثلاجة لمدة ساعة واحدة. (١٠)

ب-الخواص المظهرية Morphological characteristics

لتحديد الخواص المظهرية أجريت مجموعة من الإختبارات للعزل وكآلاتي:

١-الخلايا باستخدام شريحة Micrometer Stage. وباستخدام الوسطين GYP (١) و GYPشكل الخلايا والتكاثر الخضري بإستخدام المجهر الضوئي الإعتيادي، وتم قياس أبعاد agar (٢) حيث لقحت الخلايا وتم الحضن بدرجة حرارة ٢٥ مْ لثلاثة أيام. وأعيد الفحص بعد ٤ أسابيع للأوساط نفسها بعد تركها بدرجة حرارة الغرفة (9)

٢-تكوين الغزول الفطرية: تم هذا الإختبار بطريقة Dalmau plat technique إذ صب الوسط Corn meal agar (٥) في الاطباق وتركت لتجف ثم لقحت بطريقة التخطيط من جانبي الوسط بالخميرة وتمت تغطية المركز بغاء زجاجي بعد تعقيمة (Cover slips) وحضنت بدرجة حرارة ٢٥ مْ مدة سبعة ايام بعد ذلك تفحص بالعدسة الشيئية الصغرى ١٠x (9).

٣-تكوين الأبواغ الكيسية: لقح وسط YM agar (٣) بالخميرة وحضنت في درجة حرارة ٢٥ مْ مدة ٣-٤٠ يوماً ,بعدها فحصت قدرة الخلايا على تكوين الابواغ الكيسية وذلك بتحضير شريحة زجاجية ونقل لها جزء من مزرعة الخميرة واضيف لها عدد من القطرات من صبغة الملكات الاخضر لمدة ٣٠-٦٠ ثانية , بعدها عرضت للهب لحد التبخر لمدة ٣-٤ دقيقة , ثم ازيلت الصبغة الزائدة بالماء واضيفت لها صبغة السفرانيين بتركيز ٠,٥% لمدة ٣٠ ثانية . حيث تتصبغ السبورات الكيسية باللون الاخضر المزرق بينما تكون الخلايا الخضرية حمراء اللون (9).

ج-الخواص المزرعية Cultural characteristics :وشملت ما يأتي:

١-النمو على الوسط السائل: وضع الوسط GYP water (١) في دوارق ولقح بالخميرة قيد الدراسة وحضنت لمدة ثلاثة أيام بحرارة ٢٥مْ مع متابعة التغيرات الحاصلة التي تتعلق بطبيعة النمو في الوسط الزرعي (9).

٢-النمو على الوسط الصلب : تم تلقيح اطباق حاوية على الوسطين GYP agar (2) و YM agar (٣) بالخميرة وحضنت على وفق الظروف المشار اليها في الفقرة السابقة ومتابعة النمو يومياً وملاحظة حواف المستعمرة وكرر الفحص بعد ترك العزلة ٤ اسابيع في حرارة الغرفة (9) .

النتائج والمناقشة *Results & Discussion*

العزل والغربلة: أجريت عملية العزل بأضافة المضاد الحيوي الكلورامفينكول Chloramphenicol الى وسط العزل وخفض رقمه الهيدروجيني، بغية ممارسة ضغطٍ انتخابي من خلال توفير ظروف ملائمة أكثر لنمو الخميرة من جهة، ولمنع نمو طيفٍ واسعٍ من البكتريا بفعل المضاد المذكور، الذي يمتلك فعالية عالية تجاه البكتريا من خلال تثبيطه لأنزيم Peptidyl transferase والذي يشارك في إستطالة السلسلة الببتيدية في الرايبوسوم البكتيري وبالتالي يمنع تخليق البروتينات الضرورية للفعاليات الحيوية (8) .

بعد الحصول على ٤١عزلة من الخمائر من مصادر متنوعة ومختلفة وتنقيتها من خلال تكرار نقل المستعمرات عدة مرات على أوساط متخصصة، والتأكد من نقاوتها مجهريا، أخضعت ٢٢ عزلة الى عملية الغربلة الأولية من خلال تنميتها في وسط IYPA الذي يشكل الأنيولين مصدراً رئيساً للكاربون فيه، وفي ثلاث درجات حرارة مختلفة هي ٢٥ و ٣٠ و٣٥ مْ ، ومقارنة كثافة نموها في هذا الوسط ، وكما موضح في الجدول (١)، إذ يلاحظ وجود تباين في قابلية العزلات للنمو في الوسط بين ضعيف ومتوسط وجيد وحسب علامات (+) الموجودة إزاءها. وتبين أن خمس عزلات منها وهي , FY2 , AY12 AY8 , AY5 , AY2 تميزت بقدرتها على النمو بكثافة عالية في وبدرجات حرارة الثلاثة ، مقارنة مع العزلات الأخرى، مما يعني أنها أكثر قدرة على الاستفادة من الانيولين ، مصدراً للكاربون في الوسط ، وذلك لقدرتها على تحليل هذا المصدر بوساطة أنزيم الانيولينيز والاستفادة من السكريات المتحررة في عملية البناء وتوفير الطاقة. أختيرت العزلات الخمسة هذه ، للمرحلة التالية من عملية الغربلة، والتي جرت فيها تنمية

العزلات في وسط الإنتاج المتمثل بـ IYP السائل وبدرجة حرارة ٣٠مْ مدة ٢٤ ساعة. ثم فصلت الخلايا بالطرد المركزي ١٠٠٠٠ g مدة ١٥ دقيقة . وقدرت فعالية أنزيم الانيولينيز في راشح وسط الإنتاج والذي عدّ المستخلص الخام للأنزيم .

جدول (١) الغربلة الأولية لعزلات الخمائر المنتجة للانيولينيز من خلال كثافة نموها على وسط IYPA الحاوي على الانيولين مصدراً للكاربون في درجات حرارة مختلفة

ت	رمز العزلة	مصدر العزل	كثافة النمو *		
			٢٥مْ	٣٠مْ	٣٥مْ
1	AY1	فاكهة	++	+	+
2	AY2	خضر	+ +++	+ + ++	+ ++
3	AY3	فاكهة	+ +	+	+
4	AY4	خضر	+	+ +	+
5	AY5	خضر	+ + +	+ + + +	+ +
6	AY6	خضر	+ +	+	±
7	AY7	خضر	+	+ +	+
8	AY8	خضر	+ +	+ +	+++
9	AY9	اللبن المحلي	+	+ +	+
10	AY10	اللبن المحلي	+	+	+
11	AY11	اللبن المحلي	+	+ +	+
12	AY12	اللبن المحلي	+++	++	+++
13	AY13	اللبن المحلي	+	+	+
14	AY14	اللبن المحلي	++	+	+
15	FY1	قسم علوم الاغذية	++	+	+
16	FY2	قسم علوم الاغذية	++	+++	++
17	FY3	قسم علوم الاغذية	++	+	+
18	FY4	قسم علوم الاغذية	+	+	+
19	UY1	جامعة بغداد كلية العلوم	+	+	+
20	UY2	جامعة بغداد كلية العلوم	+	++	+
21	UY3	جامعة بغداد كلية العلوم	+	+	+
22	UY4	جامعة بغداد كلية العلوم	++	+	±

*علامة (+) تشير إلى وجود النمو وعدد العلامات يتناسب مع كثافة النمو

ويوضح الجدول (٢) فعالية أنزيم الانيولينيز للعزلات الخمسة المنقاة من المرحلة الأولى من عملية الغربلة، إذ يتبين أن فعالية الأنزيم للعزلة AY2 تميزت بإنتاجيتها العالية للأنزيم مقارنة مع العزلات الاربعة الأخرى، إذ بلغت إنتاجيتها ٢,٥٦ وحدة / مل مقابل ١,٩١ و ٢,٠٨ و ١,١٣ وحدة/ مل للعزلات AY5 , AY8 , AY12 على التوالي. عليه أختيرت العزلة AY2 لتكملة الدراسة عليها. حاول مختلف الباحثين عزل أحياء مجهرية منتجة للانيولينيز ودراسة الظروف المثلى للانتاج. فقد عزل الظويهري (١) ٦٠ عزلة من الاعفان ومن مصادر مختلفة، ومررها بغربلة اولية وثانوية، ولاحظ أن العزلة المرقمة ٢٢ تعطي أفضل إنتاجية للانيولينيز بلغت ٨٠ وحدة / ملغم، وأثبتت فحوص التشخيص انها تعود الى الفطر . *Aspergillus niger* . كما حصلت (٢) على ثلاثين عزلة من الأعفان من مصادر متنوعة، وبعد غربلتها لتحديد أفضلها في إنتاج الأنيولينيز، تبين أن واحدة منها وهي العزلة *Aspergillusniger* AN20 اكفأ تلك العزلات من إذ كثافة النمو في وسط حاوي على الانيولين مصدراً للكاربون. كذلك حصل القرغولي (٤) على ٦٦ عزلة من الفطريا، وبعد الغربلة تبين أن العزلة ٤٩ *Aspergillus oryzae* كانت أفضل من غيرها في إنتاج الأنيولينيز وبفعالية أنزيمية بلغت ٠,١١ وحدة /مل . ووجد عيسى وآخرون (٣)، أن العزلة *Rhizopus Spp* RC-2 هي أفضل من بين ٥٠ عزلة من الاعفان قارن فيما بينها من إذ قدرتها على النمو في وسط يحوي الانيولين مصدراً للكاربون وبطريقة تخمرات الحالة الصلبة .

جدول (٢): الغربلة الثانوية لعزلات الخمائر المنتخبة من المرحلة الاولى بمقارنة قدرتها على انتاج الانيولينيز

العزلة	فعالية أنزيم الانيولينيز (وحدة / مل)
AY2	2.56
AY5	1.91
AY8	2.08
AY12	1.13
FY2	1.84

تشخيص العزلة :

أخضعت العزلة AY2 المنتخبة من مرحلتي الغربلة الأولية والثانوية لمجموعة من الاختبارات المظهرية والمزرعية فضلا عن الاختبارات الفسلجية والكيميائية الحيوية

الموضحة نتائجها في الجدول (٣) والتي أظهرت انتماء العزلة المذكورة إلى الخميرة*Kluyveromyces marxianus* بمقارنة نتائج هذه الاختبارات مع ما ورد في المراجع العلمية الخاصة بتشخيص الخمائر (9).

الخواص المظهرية

أظهرت الفحوص المجهرية لخلايا العزلة في التشخيص بأنها بيضوية إلى دائرية او اسطوانية تبلغ أقطارها (٣-٥)× (٣-٨) مايكروميتر.

الخواص المزرعية

تميزت العزلة بتكوينها مستعمرات إتسمت بشكلها الدائري في الغالب ولونها الأبيض المائل إلى الكريمي الباهت في معظم الأوساط الصلبة التي أستخدمت خلال الدراسة ونمو منتشر وحافات غير منتظمة وتكوين أبواغ كيسية وغزول كاذبة. ولوحظ تجمع الخلايا على صورة راسب في قعر الاوساط السائلة في الدوارق.

الخواص الفسلجية والاختبارات الكيميائية الحيوية : أظهرت فحوص التخميرأن العزلة تمتلك قدرة تخمير عدد من السكريات (الجدول: ٣). كما تبين أنها غير قادرة على تمثيل نتريت الصوديوم ونتريت البوتاسيوم مما يعني عدم قدرة العزلة قيد الدراسة على إنتاج الأنزيم المختزل للنترات. وتميزت بقدرتها على النمو بمدى من درجات الحرارة ولاسيما في درجات الحرارة المعتدلة (٢٥- ٣٠)م°.

إن الاختبارات المذكورة آنفاً تشير إلى أن العزلة تعود إلى الخميرة *Kluyveromyces marxianus* بدلالة ما تتوفر في المراجع العلمية من معلومات عن الخواص الفسلجية والكيميائية الحيوية والخواص المظهرية المجهرية والمزرعية عن هذه الخميرة (9) التي رمزت لها في هذه الدراسة بـــ AY2.

جدول (٣) الخواص الفسلجية والكيميائية الحيوية للخميرة قيد الدراسة.

تخمير الكاربوهيدرات	
كلوكوز (+)	كالاكتوز (+)
انيولين (+)	لاكتوز (+)
سكروز (+)	رافينوز (+)
سيلوبايوز (-)	تريهالوز (-)
مالتوز (-)	نشا ذائب(-)
الفا-مثيل-د-كلوكوسايد (-)	
تمثيل مركبات الكاربون	
كلوكوز (+)	كالاكتوز (+)

كليسيرول (+)	تريهالوز (−)
سكروز (+)	لاكتوز (+)
مالتوز (−)	انيولين (+)
نشا ذائب(−)	رافينوز (+)
سيلوبايوز (+)	الفا−مثيل−د−كلوكوساید (−)
ل−ارابينوز (+)	مانتول(+)
زايلوز (+)	ل−سوربوز(−)
ايثانول (+)	
الحوامض العضوية	
حامض السترك(−)	حامض السكسينك (+)
تمثيل مركبات النتروجين	
نتريت الصوديوم (−)	نتريت البوتاسيوم (−)
الخواص الفسلجية	
.إنتاج الحامض (−)	
إنتاج الامونيا من اليوريا (−)	
إنتاج الاستر (+)	
النمو في وسط خالٍ من الفيتامينات (+)	
تكوين مركبات خارج خلوية (مركبات الأميلويد) (−)	
النمو في اوساط ذات ضغوط ازموزية عالية ا −النمو في ٥٠% كلوكوز (+) ب − النمو في ١٠% كلوريد الصوديوم (+)	
إسالة الجيلاتين (−)	
مقاومة السايكلوهكساميد (+)	
النمو في درجات حرارة مختلفة	
٢٥ْم (+)	٤٢ْم (±)
٣٠ْم (+)	٤٥ْم(−)
٣٧ْم (+)	٤٨ْم(−)

(+) فحص موجب (−) فحص سالب (±) فحص موجب ضعيف

المصادر

١- الظويهري, ناجح هاشم كاظم (٢٠١١) انتاج وتنقية وتوصيف الانيولينيز من الفطر *Aspergillus niger* المعزول محليا. اطروحة دكتوراه ,كلية الزراعة −جامعة البصرة.

٢- عبد الامير, زينب وليد(٢٠٠٨).أنتاج وتوصيف إنزيم الانيولينيز المنتج من العفن *Aspergillus niger* بواسطة تخمرات الحالة الصلبة . أطروحة دكتوراه, كلية العلوم −جامعة بغداد

٣- عيسى, قيس مجيد , الجبوري منى حمودي, هاشم عبد الكريم .(٢٠١٤). انتاج انزيم الانيولينيز من الفطر *Rhizopusoryzae* RC-2 بواسطة تخمرات الحالة الصلبة . مجلة مركز بحوث التقنية الحيوية ٨.(٤):٤٦−٥٥.

٤- القرغولي, أسراء عبيد جياد (٢٠١٢) إنتاج الانيولينيزات من العزلة الفطرية *Aspergillus oryzae* المحلية بواسطة تخمرات الحالة الصلبة . رسالة ماجستير ,كلية الزراعة −جامعة بغداد.

5- 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.
6- Dan close. (2015). Expression of the *Aspergillus niger* InuA gene in *Sacharomyces cerevisiae* permits growth on the plant storage carbohydrate inulin at low enzymatic concentrations.J. of Biotech. (6):1-13.
7- El Attar, and Noha.A. (2003). Studies On Possible Activation Of Microbial Inulinase Production Using Gamma Radiation Under Solid State Fermentation.Doctorate thesis,Pharmaceutical Sciences,Cairo University.
8- Falagas, M.E. ; Grammatikos, A.P. and Michalopoulos, A.(2008).Potential of Old-Generation Antibiotics to Address Current Need New Antibiotics. Expert Review of Anti Infective Therapy 6 (5): 593–600.
9- Kreger-Van Rij, N. J. W. (1984).The Yeasts,a Taxonomic study.North Holland Pub.Co.
10- Lodder, J; Amsterdam. (1970). The yeasta taxanmic study North Holland Pub.Co.Amesterdam.
11- Saber, W.I. A ; El-Naggar, N.E. (2009). Optimization of Fermenation Condition for the Biosynthesis of Inulinase by the New Source; *Aspergillus* and hydrolysis of some Inulin Containing Agro-Wastes. Biotechnology 8 (4) : 425-433.
12- Schutz, K.; Muks,E.; Carle, R.; and Schieber, A . (2006). Separation and quantification of inulin in selected artichoke (Cynara scolymus L.) cultivars and dandelion (Taraxacum officinale WEB. ex WIGG.) roots by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Biomed Chromatogr. 20: 1295-1303.
13- Singh, R.S. and Saini, G. K.(2013).Production of inulinase from eaw Dahlia inulin by *Kluyveromyces marxianus* .J of Scien & Industrial Reseerch. (72): 603-610.
14- Souza, C.M. ; Queiroz, M.A. ; Santos, M. J. Massa, D.M. ; Nascimento, J.P. and Laranjeira, D. (2003). Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower Hellanthus annus *L. Rhizosphere* according to their capacity to hydrolyse inulin. Braz. J. Microbiol. 34: 273-280.
15- Stolzenburg, K. (2005). Jerusalem artichokes-raw material for inulin and fructose production. Zuckerindustrie 130:193-200.
16- Treichel, H. ; Oliveira, D.; Lerin, L. ; Astolfi, V.; Mazutti, M. A.; Luccio, M.D. And Oliveira, V. (2012).A review on the production and partial characterization of microbial inulinases.Global. J.Biochem, 3 (7):-13.

Isolating and screening and diagnostic *Kluyveromyces marxianus* AY2 producing of the inulinase enzyme

Mohammed O Muhya addin Jasm M Awda
Food science \ college of agriculture \ university of baghdad

Abstract

41 isolates were taken from yeasts of from various sources and subjected to the first and second screening process to select the highest productive of the inulinase enzyme. It has been found that isolates AY2 had the highest productivity of the enzyme. The diagnoustic tests revealed that it belongs to the *Kluyveromyces marxianus* AY2.