إنتاج أنزيم Glucose - 6 - Phosphate Dehydrogenase (G6PD) من عزلة محلية لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* Sc1

2-العزل والغربلة والتشخيص

محمد عبد الرزاق الصوفي* حميد مجيد العبيدي**

الملخص

تضمنت الدراسة الحصول على (9) عزلات من الخمائر المنتجة لأنزيم Glucose -6 - Phosphate Dehydrogenase (G6PD) من الفواكه المعروضة في الأسواق المحلية. أجريت لها عمليات التنقية والغربلة (الأولية والثانوية) لانتخاب افضل عزلة في إنتاج الأنزيم، وأخضعت العزلة المنتخبة (Sc1) لمجموعة من الاختبارات التشخيصية لتحديد جنس هذه الخميرة ونوعها والتي أظهرت أنها تعود لخميرة *Saccharomyces cerevisiae*، وجرى حفظها لاستخدامها في دراسات لاحقة لانتاج الأنزيم ودراسة خصائصه و إمكانية استخدامه في بعض المجالات التطبيقية.

المقدمة

تعود خميرة *Saccharomyces cerevisiae* الى صنف Ascomycetes ورتبة Endomycetales وعائلة Saccharomycetaceae جنس Saccharomyces نوع cerevisiae (14)، ويعد الشكل المظهري لمستعمرة الخميرة النامية على الأوساط الصلبة من أهم الخواص المميزة للتعرف على جنس الخميرة المنتقاة من خلال ملاحظة شكل المستعمرة وطبيعة نموها، إذ تتميز خميرة *Saccharomyces cerevisiae* بتكوينها مستعمرات ذات لون كريمي وقوام لزج تظهر بشكل محدب ذي حافات منتظمة (15)، ولا يعطي الشكل المظهري جزماً قاطعاً بنوع الكائن، إذ يجب أن تجرى الفحوص المجهرية للتأكد منها بشكل قاطع، فقد تظهر بعض الخمائر تشابهاً في شكل المستعمرة الخارجي إلا انه يمكن تمييزها بوساطة الفحوص المجهرية من خلال قياس حجم الخلايا وملاحظة الشكل المميز لها، لذا فان الفحوص المظهرية يمكن من خلالها التعرف على الجنس الخاص بالخميرة دون نوعها (8،24)، ولا يمكن اعتماد الفحوص المظهرية كأساس ثابت لتحديد نوع الخميرة المراد الحصول عليها، لذا تجرى الفحوص الفسيولوجية والكيميوحيوية، التي تشكل مع الفحوص المظهرية مفاتيح تشخيصية لتحديد جنس ونوع الخميرة (14،26)، وتعد فحوص تمثيل مركبات الكربون والنتروجين من أهم الفحوص التي تجرى لهذا الغرض، ويعد اختبار تمثيل وتخمير السكريات أحد الفحوص الأساس التي يحصل من خلالها استخدام أنواع عدة من هذه السكريات مثل الكلوكوز والكالاكتوز والمالتوز والسكروز واللاكتوز والرافينوز والتريهالوز والزايلوز (2)، و أحيانا قد لا يعطي أحد الاختبارات دليلاً قاطعاً في تحديد نوع الخميرة.

ونظرا الى وجود اختلافات جوهرية بين أجناس وأنواع الخمائر يمكن من خلالها التفريق فيما بينها، أنتجت بعض العدد التشخيصية والمتوفرة بصورة تجارية، لاجل تشخيص بعض الأنواع المهمة من الخمائر مثل عدة Analytical Profile Index (API) Strips والمجهزة من شركة Bio Merieux الفرنسية (3)، لذا فقد هدفت هذه الدراسة إلى عزل خميرة *Saccharomyces cerevisiae* من بعض أنواع الفواكه المعروضة في الأسواق المحلية لانتاج أنزيم Glucose -6- Phosphate Dehydrogenase (G6PD) نظراً الى ما يملكه من أهمية عظيمة في مجال

جزء من اطروحة دكتوراه للباحث الأول.

* مركز بحوث السوق وحماية المستهلك-جامعة بغداد، بغداد، العراق.

كلية الزراعة-جامعة الكوفة- النجف، العراق.

التحليلات الطبية والمختبرية واستخدامه في عدد واسع من طرائق التقدير الكمي وتحضير العدد التشخيصية ثم تشخيصها على مستوى الجنس والنوع واستخدامها في تحضير المصل المضاد ثم مقارنة وجود العلاقة المناعية بينها وبين خميرة الخبز التجارية.

المواد وطرائق البحث

العزل والغربلة

استخدمت انواع عدة من الفواكه التالفة المعروضة في الاسواق المحلية في مدينة بغداد–العراق لعزل الخميرة منها، اذ وضع **1** غم من مصادر العزل المنتخبة في انبوبة اختبار تحتوي على **10** مللتر من ماء الببتون بتركيز **0.1%** وخلطت باستخدام المازج **Vortex**، بعدها اجريت تخافيف عشرية متسلسلة للعينات بماء الببتون ونشر **0.1** مللتر من التخافيف المناسبة على سطح الوسط (**PDA**) **Potato - dextrose agar** في اطباق بتري معقمة وحضنت بدرجة حرارة **25** م لمدة **48** ساعة، ثم التقطت مستعمرات الخميرة النامية بصورة منفردة بوساطة حلقة المالئ **Loop** وخططت على سطح الوسط (**PDA**) في اطباق بتري جديدة، كررت العملية لمرات عدة بهدف الحصول على عزلات نقية والتأكد من نقاوتها باستخدام الفحص المجهري، ثم خططت عزلات الخمائر على الوسط (**YEPDA**) **Yeast extract pepton dextrose agar** وحضنت بدرجات حرارة **20** ،**25** ،**30** ،**35** و**40** م مع متابعة النمو لمدة **72** ساعة لانتخاب العزلة الاكفأ على النمو وتحديد درجة الحرارة المثالية.

حفظ العزلات وادامتها

خططت العزلات المنقاة على الوسط (**PDA**) بهيئة اوساط صلبة مائلة **Slants** وحضنت بدرجة حرارة **25** م لمدة **48** ساعة، ثم حفظت في الثلاجة (**7** ±**2**) °م ونشطت المزارع شهريا بمكررات عدة لكل عزلة طيلة مدة البحث.

الخميرة التجارية

استخدمت خميرة تجارية نوع بكمايا والمتوفرة في الاسواق العراقية، اذ جرت تنقيتها بشكل كامل للحصول على عزلة نقية ثم حفظت.

تحضير اللقاح

اخذت مسحة بقدر حلقة المالئ من مستعمرات الخميرة النامية في الوسط الصلب (**PDA**) ونقلت الى الوسط السائل (**YEPDB**) **Yeast extract pepton dextrose broth**، بعدها حضن الوسط بالحاضنة الهزازة بدرجة حرارة **30** م لمدة **24** ساعة بسرعة مقدارها **125** دورة / دقيقة، ثم حسب عدد الخلايا باستخدام شريحة **Hemocytometer** ومن ثم اجريت التخافيف اللازمة للحصول على الحجم المطلوب من اللقاح (خلية / مللتر) (**6**).

تشخيص العزلة بالاعتماد على الخواص المظهرية والمزرعية

اجريت اختبارات عدة لتحديد خواص العزلة المظهرية والمزرعية، اذ درست باستخدام الوسط الصلب **YEPDA** وذلك بتلقيح الوسط بعالق خلايا الخميرة بالتخطيط والحضن بدرجة حرارة **30** م لمدة **48** ساعة ثم فحص حجم الخلايا مجهرياً وجرى حساب حجم ما لايقل عن **20** خلية باستخدام شريحة **Stage Micrometer** وملاحظة شكل المستعمرات وطبيعة النمو (**14**).

تشخيص العزلة بالاعتماد على الخواص الفسلجية والكيموحيوية

تخمر الكربوهيدرات

لقحت الانابيب الحاوية على الوسط وسط (**YEPDB**) بعالق خلايا الخميرة وحضنت بدرجة حرارة **30** م لمدة **48** ساعة مع ملاحظة تجمع الغاز في انبوبة درهم والذي يعطي دلالة ايجابية لقدرة العزلة على النمو وتخمير الكربوهيدرات (**17**).

تمثيل مركبات الكربون

لقحت الانابيب الحاوية على وسط تمثيل مركبات الكربون المحضر من وسط **Yeast Nitrogen Base** بعالق خلايا الخميرة وحضنت بدرجة حرارة **30** م لمدة **48** ساعة واستدل على قدرة العزلة على النمو وتمثيل مركبات الكربون في الوسط من خلال استخدام ورقة بيضاء مخططة وذلك بوضعها خلف الانابيب، اذ يعد الفحص موجباً في حالة عدم تمييز الخطوط وبعكسه يعد الفحص سالباً في حالة القدرة على تمييز الخطوط (**17**).

تمثيل مركبات النتروجين

لقحت الانابيب الحاوية على وسط تمثيل مركبات النتروجين المحضر من وسط **Yeast Carbon Base** بعالق خلايا الخميرة وحضنت بدرجة حرارة **30** م لمدة **72** ساعة ويكون الاستدلال على ايجابية الفحص من خلال مقارنة كثافة النمو الحاصلة في الوسط الحاوي على المصادر النتروجينية مع الوسط الخالي منها (**17**).

النمو في وسط خال من الفيتامينات

لقحت الانابيب الحاوية على الوسط الخالي من الفيتامينات **Vitamin - free medium Yeast Base** بعالق خلايا الخميرة وحضنت بدرجة حرارة **30** م لمدة **72** ساعة، ثم لقحت انابيب اخرى حاوية على الوسط المذكور سابقاً بعالق خلايا الخميرة من الوسط الاول وحضنت تحت الظروف نفسها وكان الاستدلال على ايجابية الفحص من خلال قدرة العزلة على النمو بغياب مصدر الفيتامين الخارجي من خلال مقارنتها بمعاملة السيطرة (**17**).

انتاج الحامض

لقحت الانابيب الحاوية على الوسط **Glucose - Calicium Carbonate agar** بعالق خلايا الخميرة بطريقة التخطيط وحضنت بدرجة حرارة **30** م لمدة **72** ساعة، وكان الاستدلال على ايجابية الفحص هو ظهور مناطق رائقة شفافة حول مستعمرات الخميرة النامية جراء تكون الحامض من الكلوكوز وتحول الوسط المضبب الى رائق (**17**).

انتاج الامونيا من اليوريا

لقحت الانابيب الحاوية على الوسط **Christensen's Urea agar** بعالق خلايا الخميرة وحضنت بدرجة حرارة **30** م لمدة **5** ايام، وكان الاستدلال على ايجابية الفحص هو تحول لون الوسط الى وردي غامق دلالة على انتاج الامونيا (**17**).

انتاج الاستر

لقحت الاطباق الحاوية على الوسط **Yeast - Malt extract agar** بعالق خلايا الخميرة بطريقة التخطيط وحضنت بدرجة حرارة **30** م لمدة **48** ساعة، وكان الاستدلال على ايجابية الفحص من خلال تكون رائحة الاستر المميزة بفعل خلات الاثيل المتكونة (**17**).

مقاومة السايكلوهكسمايد

لقحت الانابيب الحاوية على وسط مقاومة السايكلوهكسمايد بعالق خلايا الخميرة وحضنت بدرجة حرارة **30** م لمدة **3** اسابيع بمراقبة النمو اسبوعياً وكان الاستدلال على ايجابية الفحص هو حدوث النمو، اذ تعد الخلايا حساسة جداً للمضاد الحياتي في حالة عدم حدوث نمو خلال مدة الحضن (**10**).

النمو بدرجات حرارة مختلفة

لقحت الاطباق الحاوية على الوسط **Yeast - Malt extract agar** بعالق خلايا الخميرة وحضنت بدرجات حرارة مختلفة بلغت **25** و**30** و**35** و**40** م لمدة **72** ساعة مع ملاحظة كثافة النمو الحاصلة (**17**).

النمو في اوساط حاوية على تراكيز عالية من السكر

لقحت الانابيب الحاوية على وسطي **Glucose - yeast extract agar (50 & 60)% (W / W)** بعالق خلايا الخميرة بطريقة التخطيط وحضنت بدرجة حرارة **25** م لمدة **4** اسابيع، واستدل على ايجابية الفحص من خلال كثافة النمو الحاصلة على سطح الوسط (**19**).

اختبار تحمل كلوريد الصوديوم

لقحت الانابيب الحاوية على الوسط **Sodium chloride tolerance medium** بعالق خلايا الخميرة وحضنت بدرجة حرارة **25** م لمدة **72** ساعة وتم الاستدلال على ايجابية الفحص بتكون العكارة في الوسط نتيجة لنمو الخلايا مقارنة مع معامل السيطرة الخالية من الملح، ويعرف التركيز المحدد للنمو بأنه اقل تركيز من كلوريد الصوديوم الذي لايظهر عنده النمو بصورة واضحة، بينما يعد التركيز الاقل منه اعلى تركيز تتحمله الخميرة لكي تنمو (**19**).

انتاج مضاد لعزلة الخميرة

استخدم في هذه التجربة ارنبان حصل عليهما من الاسواق المحلية، ومزج **1** مللتر من عالق خلايا الخميرة بتركيز 10^6**x1** خلية/مللتر مع **1** مللتر من مساعد فروبند التام **Freund's Complete Adjuvant** المجهز من شركة **Sigma**، بعدها حقن الخليط المستحلب في مناطق عدة من عضلة باطن الفخذ، وبعد مرور **21** يوماً على هذه الجرعة اعطيت جرعة منشطة اخرى للارانب وذلك بمزج **1** مللتر من عالق خلايا الخميرة بالتركيز ذاته مع **1** مللتر من مساعد فروبند غير التام **Freund's Incomplete Adjuvant** المجهز من شركة **Sigma**، وجرى حقن المستحلب في مواضع عدة من جلد ظهر الحيوان **Intradermally** (**4**).

فصل مصل الارانب

سحبت نماذج الدم من الارانب بعد مرور **10** ايام على الحقنة الاخيرة. وجرى تحضير المصل وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل **Garvey** وجماعته (**11**).

فحص الانتشار المناعي المزدوج

استخدمت الطريقة التي قام بوصفها **Johnston** و **Thorpe** (**16**) لقياس فعالية المصل المحضر.

النتائج والمناقشة

العزل والغربلة

اكملت الدراسة باستخدام الفواكه التالفة من الأسواق المحلية، وتم الحصول على **9** عزلات من الخمائر أخضعت لعمليات تنقية متعددة على الوسط الصلب (**PDA**) لحين التأكد من نقاوتها مجهرياً.

عرضت العزلات المستحصل عليها إلى الغربلة الأولية باستخدام الوسط الصلب (YEPDA)، إذ حضنت العزلات المنماة على هذا الوسط بدرجات حرارة 25، 30، 35، 40م لتحديد العزلات التي تمتلك كثافة نمو عالية، ويشير جدول 1 إلى تميز العزلات Sc1 وSc2 وSc3 وSc4 وSc5 من خلال ملاحظة كثافة النمو على الوسط المستخدم باختلاف درجة حرارة الحضن.

تشكل عمليات العزل والغربلة الخطوة الأساسية لتحديد كفاءة العزلات على النمو، إذ تعد عملية اختيار مصادر العزل من أهم الخطوات الواجب مراعاتها لغرض الحصول على العزلات المطلوبة، بينما تعد عملية الغربلة الأولية مفتاحاً مهماً لغرض التفريق بين العزلات في قدرتها على النمو في أوساط غذائية معتمدة، إضافة إلى الحصول على عزلة ذات نقاوة عالية جداً نتيجة تعريضها لخطوات عدة تهدف إلى التخلص من كل ما يثير الشك بجنس هذه العزلة (3،26).

تباينت مصادر العزل المعتمدة للحصول على خميرة *Saccharomyces cerevisiae*، إلا إن اغلب الدراسات اشارت إلى عزل الخميرة من الفواكه التالفة، فقد أشار كل من Lodder (19)؛ Kreger-van Rij (17)؛ Martini وMartini (20)؛ Walker (26) الى امكانية عزل الخميرة من الفواكه.

جدول 1: الغربلة الأولية لعزلات الخمائر المحلية المنتخبة

مصدر العزلة	رمز العزلة	كثافة النمو*				
		20م	25م	30م	35م	40م
برتقال	Sc1	+	++++	+++++	++++	+
لالنكي	Sc2	+	+++	++++	+++	+
تفاح	Sc3	+	+++	+++++	+++	+
نارنج	Sc4	+	++	++++	++	+
رمان	Sc5	+	++	++++	++	+
كيوي	Sc6	+	+	++	+	−
طماطة	Sc7	+	+	++	+	−
فراولة	Sc8	+	+	++	++	+
كريب فروت	Sc9	+	++	++	+	−

* (−): عدم وجود نمو

* (+): وجود نمو وعدد العلامات يتناسب طردياً مع كثافة النمو

تشخيص العزلة Sc1:

اجريت العديد من الاختبارات لغرض تشخيص العزلة المنتخبة (Sc1) المأخوذة من مرحلتي الغربلة الاولية والثانوية، وقد اشتملت هذه الاختبارات على الخواص المظهرية والمزرعية، الخواص الفسلجية والاختبارات الكيميوحيوية اضافة إلى اختبار الخواص المصلية، وقد أظهرت النتائج المستحصل عليها (جدول 2)، انتماء العزلة (Sc1) لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* نتيجة تطابق النتائج المستحصل عليها مع عدد من المصادر العلمية (المتعلقة بالمفاتيح التشخيصية) (3،20،26).

الخواص المزرعية

أظهرت العزلة (**Sc1**) مستعمرات ذات شكل دائري بلون ابيض مائل إلى الكريمي الباهت عند تنميتها على الأوساط الصلبة (**PDA**) و(**YEPDA**) وبدت بشكل محدب ذات حافات منتظمة وقواماً كريمياً (لزج) بلغ متوسط حجمها **1 - 2** مليمتر عند تنميتها بدرجة حرارة **30** م لمدة **24** ساعة.

اتفقت هذه النتائج مع ما أشار إليه **Mathews** و**Webb** (**21**) ان خميرة ***Saccharomyces cerevisiae*** تظهر في الأوساط الزرعية الصلبة بشكل مستعمرات ذات لون ابيض مائل إلى الكريمي وسطح محدب تمتلك قواماً لزجاً، و أوضح **Watson Gross** (**13**) أن مستعمرات خميرة ***Saccharomyces cerevisiae*** تظهر في الأوساط الصلبة بأشكال دائرية، بيضاء أو كريمية اللون، ذات حافات منتظمة وسطح محدب، كما بين **Fernando** وجماعته (**9**) أن خميرة ***Saccharomyces cerevisiae*** تتميز بتكوينها مستعمرات تتسم بشكلها الدائري في الغالب ولونها الأبيض المائل إلى الكريمي الباهت في معظم الأوساط الصلبة المستخدمة لتنميتها كما تمتلك حافات منتظمة وتظهر بشكل محدب عند تنميتها بدرجة حرارة **25** م لمدة **24** ساعة.

الخواص المظهرية

بينت الفحوص المجهرية لعزلة الخميرة (**Sc1**) المنماة في الوسط السائل (**YEPDB**) إن الخلايا تمتلك أشكالاً بيضوية، دائرية يبلغ حجمها **4 - 6** مايكرومتر طولا و**2.5 - 4.5** مايكرومتر عرضا ذات نواة واضحة يحتوي بعضها على براعم في اكثر من طرف من الخلية.

أشارت المصادر العلمية إلى امتلاك خميرة ***Saccharomyces cerevisiae*** لهذه الخواص، فقد ذكر **Chen** وجماعته (**5**) أن حجوم خلايا الخمائر تتباين حسب عمر الخلية، إذ يبلغ طول خلية الخميرة الصغيرة **2 - 3** مايكرومتر في حين يصل طول الخلايا الكبيرة إلى **20 - 50** مايكرومتر بينما يتراوح عرض الخلايا بين **1 – 10** مايكرومتر ، وبين **Boekhout** و **Kurtzman** (**3**) أن خميرة ***Saccharomyces cerevisiae*** تمتلك أشكالاً بيضوية أو دائرية عند رؤيتها تحت المجهر، وقد اتفقت النتائج مع ما أشار إليه **Duboc** وجماعته (**8**) من أن الخلايا الخضرية لخميرة ***Saccharomyces cerevisiae*** تظهر تحت المجهر بشكل بيضوي إلى دائري ويبلغ طولها **2 - 3** مايكرومتر وعرضها **1.5-2.5** مايكرومتر متجمعة بشكل يشبه خلايا النحل، وبين **Worthylake** وجماعته (**27**) أن خميرة ***Saccharomyces cerevisiae*** تظهر تحت المجهر بأشكال بيضوية إلى دائرية ذات أقطار تبلغ **3 – 6** مايكرمتر طول و **6 – 8** مايكرومتر عرض وتحوي على نواة واضحة وفجوة واحدة كبيرة تشغل معظم أجزاء الخلية إضافة إلى وجود براعم في اكثر من طرف من الخلية في بعض الأحيان.

الخواص الفسلجية و الاختبارات الكيميوحيوية

أخضعت عزلة الخميرة (**Sc1**) إلى مجموعة من الاختبارات التأكيدية للتأكد من ان تلك العزلة تمثل خميرة ***Saccharomyces cerevisiae*** (جدول 2) اعتماد على قدرتها في تخمير وتمثيل مصادر الكربون المختلفة وتمثيل مركبات النتروجين وقدرتها على إنتاج الحامض وتكوين رائحة الاستر المميزة وإمكانيتها في تحليل اليوريا واستهلاك النترات إضافة إلى عدم قدرتها على النمو في تراكيز منخفضة من المضاد الحيوي **Cyclohexamide** وقدرتها على النمو بدرجات حرارة منخفضة وقابليتها على تحمل ضغوط ازموزية مختلفة (**2،3،17،19،20،26**).

جاءت هذه النتائج متفقة مع ما أشارت إليه المصادر المعتمدة في تصنيف الخمائر إضافة إلى البحوث الخاصة بخميرة ***Saccharomyces cerevisiae***، فقد أشار **Boekout** و**Kurtzman** (**3**) إلى قدرة الخميرة على استهلاك سكر التريهالوز بسبب امتلاكها لأنزيم **Trehalase** وأوضح **Worthylake** وجماعته (**27**) أن بإمكان

الخميرة استهلاك حامض السكسينك وكبريتات الأمونيوم، وبين **Duboc** وجماعته (**8**) أن الخميرة تستطيع تحليل كبريتات الأمونيوم وفوسفات الأمونيوم الأحادية، وأشار **Alepuz** وجماعته (**1**) الى أن للخميرة القدرة على استهلاك سكريات الرافينوز والسكروز والكلوكوز والكالاكتوز، بينما بين **Ciani** وجماعته (**7**) أن للخميرة إمكانية استهلاك الكليسيرول في وسط النمو واتفق معه **Grauslund** وجماعته (**12**) في امتلاك امتلاك الخميرة لأنزيم **Glycerokinase** الذي بوساطته تستطيع هذه الكحولات السكرية دخول غشاء البلازما بوساطة آلية الانتشار المنفعل **Passive diffusion** أو بوساطة آلية الانتشار الميسر **Facilitated diffusion** خلال قناة البروتين (**Fps1p**) الموجودة في الغشاء البلازمي، وبين المصدر ذاته قدرة الخميرة على استهلاك الكحول الاثيلي، و أكد ذلك **Nett** وجماعته (**23**) في إشارته إلى قدرة الخميرة على استهلاك الكحول الاثيلي، وبين **Krems** وجماعته (**18**) أن للخميرة القدرة على إنتاج الحامض من الكلوكوز و إنتاج الاستر وعدم قدرتها في إنتاج الأمونيا من اليوريا، و أوضح **Thomas** وجماعته (**25**) أن الخميرة تستطيع استهلاك حامض الخليك وحامض اللاكتيك، و أشار **Neto** وجماعته (**22**) إلى عدم نمو الخميرة بوجود تركيز **1** ملغم من المضاد الحيوي **Cyclohexamide**.

جدول **2**: الخواص الفسلجية والكيميوحيوية لخميرة ***Saccharomyces cerevisiae* Sc1**

1	تخمر وتمثيل مركبات الكربون							
أ	السكريات							**Saccharides**
	كلوكوز	(+)	مالتوز	(+)	نشأ ذائب	(−)	انيولين	(+)
	سكروز	(+)	فركتوز	(+)	سيلوبايوز	(−)	تريهالوز	(+)
	لاكتوز	(−)	كالاكتوز	(+)	ملييايوز	(−)	رافينوز	(+)
ب	الحوامض العضوية							**Organic acids**
	حامض الخليك	(+)	حامض اللاكتيك	(+)	حامض التارتاريك	(+)	حامض السكسنيك	(+)
جـ	الكحولات							**Alcohols**
	الكحول الاثيلي	(+)	د.مانيتول	(+)	كليسيرول	(−)	د.سوربيتول	(+)
2	تمثيل مركبات النتروجين							
	نترات البوتاسيوم	(−)	ببتون	(+)	فوسفات الامونيوم			(+)
	نتريت الصوديوم	(−)	كبريتات الامونيوم	(+)	بيكاربونات الصوديوم			(+)
3	النمو في وسط خال من الفيتامينات		(−)	**Growth in vitamin free medium**				
4	انتاج الحامض من الكلوكوز		(+)	**Acid production**				
5	انتاج الامونيا من اليوريا		(−)	**Amonia production from urea**				
6	انتاج الاستر		(+)	**Ester production**				
7	مقاومة السايكلوهكسمايد		(−)	**Cyclohexamide resistance**				
8	النمو بدرجات حرارية مختلفة							
	25C°	(±)	**30C°**	(++)	**35C°**	(+)	**40C°**	(±)
9	النمو في اوساط ذات ظغوط ازموزية عالية							
أ	النمو في الاوساط السكرية							
	النمو في (**40**%) كلوكوز		(+)	النمو في (**60**%) كلوكوز				(−)
	النمو في (**50**%) كلوكوز		(±)					
ب	النمو في الاوساط الملحية							
	النمو في (**5**%) كلوريد الصوديوم		(+)	النمو في (**10**%) كلوريد الصوديوم				(−)
	النمو في (**7.5**%) كلوريد الصوديوم		(±)					

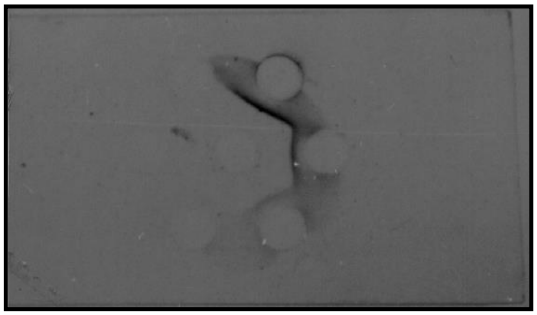
*(−): عدم وجود نمو.
**(±): نمو ضعيف.
***(+): وجود نمو وعدد العلامات يتناسب طردياً مع كثافة النمو.

التشخيص المصلي

فحص عيارية المصل المضاد لعزلة الخميرة

يبين شكل (1) فحص الانتشار المناعي المزدوج Double Immune Diffusion test لعزلة الخميرة و المصل المضاد لها بعد حقن الحيوانات بعزلة الخميرة وانتهاء مدة الحقن، إذ تم تقدير عيارية المصل التي تمثل أعلى تخفيف يصله المصل دون حدوث نتيجة سالبة و الذي يدعى بالمعيار Titer وقد بلغت عيارية المصل المضاد لعزلة الخميرة 8/1.

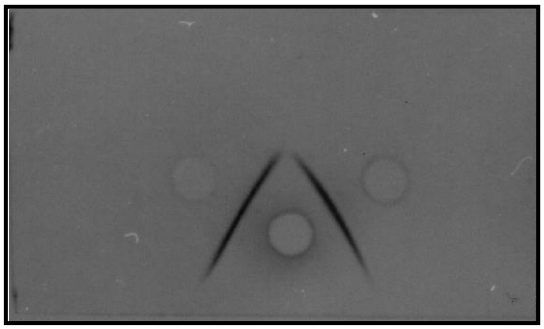
للاحياء المجهرية صفة استضدادية Immunogenicity لامتلاكها وزناُ جزيئياً عالياً وحملها محددات مستضدية متعددة (3)، وتعرف المستضدات Antigens بصورة عامة بأنها مادة بروتينية لها قابلية تحفيز الجهاز المناعي و إنتاج الأجسام المضادة Antibodies لها عند حقنها في مضيف ملائم وتتفاعل معها بسلوك ملحوظ (4).



شكل 1: فحص الانتشار المناعي المزدوج لتقدير عيارية المصل المضاد لعزلة الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* Sc1.

العلاقة المناعية بين عزلة الخميرة والخميرة التجارية مع المصل المضاد

استخدم فحص الانتشار المناعي المزدوج Double Immune Diffusion test لعزلة الخميرة المحلية والخميرة التجارية المنقاة مع المصل المضاد لعزلة الخميرة المحلية شكل (2) وذلك للكشف عن العلاقة المناعية بين العزلة المحلية والخميرة التجارية مع المصل المضاد، إذ يلاحظ وجود تفاعل مناعي مشترك Cross reaction بين النموذجين مع ذلك المصل وهذا يشير إلى امتلاك خميرة *Saccharomyces cerevisiae* Sc1 المحددات المستضدية لنفسها على الرغم من اختلاف مصدر العزل والبيئة التي تعيش فيها.



شكل 2: اختبار الانتشار المناعي المزدوج لبيان العلاقة المناعية بين عزلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* Sc1 وخميرة الخبز التجارية.

المصادر

1- **Alepuz, P. M.; D. Matheos; K. W. Cunningham and F. Estruch. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* Ran GTP-binding protein Msn5p Is involved in different signal transduction pathways. Genetics, 153:1219-1231.**

2- **Barnett, J. A. (1992). The taxonomy of the genus Saccharomyces Meyen ex Reess: a short review for non-taxonomists. Yeast, 8:1-23.**

3- **Boekhout, T. and C. P. Kurtzman (1996). Principles and Methods used in yeast classification and an overview of currently accepted yeast genera. In Nonconvertional Yeast in Biotechnology. A Handbook (ed. K. Wolf). Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.**

4- **Bona, C. A. and F. A. Bonilla (1996). Textbook of Immunology. Harwood Academic Publishers, Amsterdam-Netherlands.**

5- **Chen, D. C.; B. D. Wang; P. Y. Chou and T. T. Kuo (2000). Asparagine as a nitrogen source for improving the secretion of mouse α-amylase in *Saccharomyces cerevisiae* protease a deficient strains. Yeast, 16:207-217.**

6- **Chen, D. C.; B. C.Yang and T. T. Kuo (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. Curr. Genet, 21:83-84.**

7- **Ciani, M.; L. Ferraro and F. Fatichenti (2000). Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. Enzyme and Microbial Tec., 27(9):698-703.**

8- **Duboc, P.; L. G. C. Pereira and U. V. Stockar (1997). Identification and control of oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during transient growth using calorimetric measurements. Biotechnology and Bioengineering, 57 (5): 610-619.**

9- **Fernando, L. H.; H. S. P. Daniel; Z. I. T. Nilson; O. C. Carla; P. JR. Adalberto; D. H. Brian; M. James and F. Mark (2001). Overexpression of glucose -6- phosphate dehydrogenase in genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. Applid Biochemistry and Bio., 91 (93):161-169.**

10- **Frazier, W. C. (1985). Food Microbiology. Hill Book Co, New York.**

11- **Garvey, J. S.; N. E. Cremer and D. H. Sussdorf (1977). Methods in Immunology. 3rd ed. W. A. Banjamin, Inc. London.**

12- **Grauslund, M.; J. M. Lopes and B. Ronnow (1999). Expression of GUT!, Which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and Ino4p and the negative regulator Opi1p in a carbon source-dependent fashion. Nucleic Acids Res., 27 (22):4391-4398.**

13- **Gross, C. and K. Watson (1996). Heat shock protein synthesis and trehalose accumulation are not required for induced thermotolerance in derepressed *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 220:766-772.**

14- **Harold, F. M. (1995). From Morphogenes to Morphogenesis. Microbiology (UK), 141:2765-2778.**

15- **Johnston, E. A. and A. Gil-Hwan (1991). Astaxanthin from microbial sources. Critical Reviews in Bio., 11:297-326.**

16- **Johnston, A. and R. Thorpe (1987). Immunochemistry in Practice. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, London, England.**

17- **Kreger-van Rij, N. J. W. (1984). "The Yeasts, a Taxanomic Study". North Holland Pub. Co. Amsterdam.**

18- Krems, B.; C. Charizanis and K. D. Entian (1995). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress. Curr. Genet., 27(5):427-434.
19- Lodder, J. (1970). "The Yeasts, a Taxanomic Study". North Holland Pub. Co. Amsterdam.
20- Martini, V. A. and A. Martini. (1993). A Taxonomic key for Genus *Saccharomyces cerevisiae*. Systematic and Applied Microbiology, 16:113-119.
21- Mathews, T. M. and C. Webb. (1991). Culture systems. In Saccharomyces. (eds M. F. Tuite and S. G. Oliver). Plenum Press. New York, 249-282.
22- Neto, J. A.; P. Infanti and M. Vitolo (1997). Influence of pH, temperature and dissolved oxygen concentration on the production of glucose -6-phosphate dehydrogenase and invertase by *Saccharomyces cerevisiae*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 14(1):89-94.
23- Nett, J. H.; J. Kessl; T. Wenz and L. B. Trumpower (2001). The AUG start codon of the *Saccharomyces cerevisiae* NF S1gen can by substituted for by UUG without increased initiation of translation at downstream codons. Eur. J. Biochem., 268:5209-5214.
24- Rojas, A. P. and V. Vondrejs (1995). Tumors on colonies of rad 6 mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. Folia Microbiologica, 31:205-219.
25- Thomas, H.; O. Margitta and. S. Peter (2001). Novel typer of glucose -6-phosphate isomerase in the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus. Journal of Bacteriology,138(III):3428-3446.
26- Walker, G. M. (1999). Yeast Physiology and Biotechnology. 3rd ed. John. Wiley and Sons, Inc. New York.
27- Worthylake, D. K.; S. Prakash; L. Prakash and C. P. Hill. (1998). Crystal Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Ubiquitin-conjugating Enzyme Rad 6 at 2.6 Aº Resolution. The Jour0.0nal of Biological Chemistry, 273(11): 6271-6276.

PRODUCTION OF GLUCOSE -6- PHOSPHATE DEHYDROGENASE FROM LOCALLY ISOLATED YEAST *Saccharomyces cerevisiae* SC1
2- ISOLATION, SCREENING AND IDENTIFICATION

M. A. Al – Soufi* **H. M. Al – Obiday****

ABSTRACT

Nine isolates of yeasts were selected for their ability to produce Glucose – 6– Phosphate Dehydrogenase (G6PD), then subjected to primary and secondary screening process to elect the highest productive isolate of G6PD and was disgnated as (Sc1). The diagnostic tests revealed that the isdate belongs to the *Saccharomyces cerevisiae* Sc1. This isolate was kept for further investigations to produce enzyme and utilized in some applications.

Part of Ph.D. thesis of the first author

*** Center for Market Res., and Consumer Protection- Univ. of Baghdad-Baghdad, Iraq.**
****College of Agric.- Univ. of Koufa- Najaf, Iraq.**