مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره اول (پیاپی ۶)، بهار ۱۳۸۹
صفحات ۳۹-۳۱

Original Article

بررسی فعالیت آنزیم انورتاز در مخمرهای جدا شده از خاک شور

ساره صالحی*[1]، دکتر احمدعلی پوربابایی[2]، علی رضایی[1]

[1]کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، [2]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: تنوع زیستی مخمرها در محیط‌های افراطی و کاربرد آن‌ها در صنایع غذایی توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. هدف از این پژوهش، جداسازی مخمرها از خاک شور و بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن‌ها به منظور یافتن جدایه برتر از نظر فعالیت آنزیم انورتاز بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش فعالیت سینتیکی انورتاز در ۲۷ سویه مخمری نمک دوست و تحمل کننده نمک جدا شده از خاک شور مناطق قم و اراک، مورد بررسی قرار گرفت.پس از جمع آوری نمونه خاک، کشت به روش پورپلیت در محیط YPD Agar حاوی ۵ درصد نمک انجام شد. از ۲۷سویه مخمری، ۲ سویه نمک دوست و ۶ سویه تحمل کننده نمک دارای فعالیت انورتازی برای انتخاب سویه برتر مطالعه شدند.

یافته ها: سنجش فعالیت انورتاز با روش گلوکز اکسیداز نشان داد که سویه G5 میزان آنزیم بیشتری تولید می‌نماید. فعالیت بهینه آنزیم سویه برتر در pH ۴/۵ و دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد وجود داشت. با بررسی تاثیر نمک‌های مختلف، بیشترین فعالیت آنزیمی در محیط حاوی کلرید سدیم ۱/۷mM مشاهده شد. یون‌های فلزی Na^{+} و Mg^{2+} و Ca^{2+} (به صورت کلرید و با غلظت ۵mM) تاثیر افزاینده‌ای در فعالیت آنزیم داشتند. میزان km آنزیم برای قند ساکاروز ۲۰mM بود. میزان پایداری آنزیم در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد یک ساعت بود و در این مدت کاهشی در فعالیت آنزیم مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که سویه G5 توانایی تولید آنزیم انورتاز در غلظت‌های مختلف نمک را دارد.

واژگان کلیدی: انورتاز، صنایع غذایی، مخمرهای نمک دوست، مخمرهای تحمل کننده نمک

دریافت مقاله: آذر ۸۸ پذیرش برای چاپ: اسفند ۸۸

مقدمه

میکروارگانیسم‌های نمک دوست نسبی دارای توانایی‌های زیادی برای وارد شدن در دنیای بیوتکنولوژی هستند. این میکروارگانیسم‌ها علاوه بر تولید بسیاری از ترکیبات محافظ اسمزی، دارای ویژگی‌های فیزیولوژیک مناسبی هستند که آن‌ها را از جنبه‌های تجاری و صنعتی ارزشمند کرده است. یکی از ویژگی‌های مهم، رشد در تراکم‌های بالای نمک است و این مساله خطر آلودگی فرآیند را در تولید آنزیم کاهش می‌دهد. مخمرهای نمک دوست قابلیت رشد در آزمایشگاه بر روی ۱۷٪ نمک و اندکی بیشتر را دارند، اما مخمرهای تحمل کننده نمک هم درمحیط‌های

*) آدرس برای مکاتبه: قم، خیابان ۱۵ خرداد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۸۳۴۸۵۲۶۷
پست الکترونیک: sarehsalehi.p@gmail.com

فاقد نمک و هم در غلظت‌های بالاتر از ۳۰ درصد نمک قادر به رشد هستند. ویژگی ارزشمند دیگر، رشد سریع و نیاز غذایی ساده آن‌ها است. آنزیم انورتاز (بتا فروکتو فورانوزیداز) متعلق به خانواده گلیکوهیدرولازها است و شامل بیش از ۳۷۰ نوع آنزیم با منشا میکروبی یا گیاهی می‌باشد. این آنزیم هیدرولیز ساکاروز را کاتالیز کرده و مخلوطی از D-گلوکز و D-فروکتوز را تولید می‌کند که باعث افزایش میزان شیرینی و هم‌چنین برطرف شدن بلورزایی ساکاروز در محصولات غذایی می‌گردد. آنزیم انورتاز درصنایع غذایی به خصوص صنعت شیرینی‌سازی و صنایع دارویی کاربرد فراوان دارد (۱ و ۲). در بین میکروارگانیسم‌ها: *Sacharomyces cervisae*، *Candida utilis*، *Termomyces lanugirosus*، *Penicillium chrisogenum*، *Pichia anomala*، *Schizosaccharomyces pombe*، *Kluyveromyces fragilis* و *Rhodotorula glutinis* به طور وسیعی مطالعه شده اند (۸-۳).

اکثر انورتازهای به دست آمده از منابع مختلف، pH بهینه در ناحیه اسیدی و در محدوده بین ۶-۴/۵ دارند. بررسی منحنی pH و اثر آن در فعالیت آنزیم به صورت سیگموئیدی است. اما شکل منحنی و موقعیت نقطه ماکزیمم آن متفاوت می‌باشد و بستگی به منبع آنزیم دارد. میزان غیرفعال شدن آنزیم درمحدوده‌های پایین‌تر pH معمولا بیشتر است. هم‌چنین انورتازها برحسب منابع شان پایداری حرارتی و دمای بهینه متفاوتی را نشان می‌دهند. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که معمولا انورتازهای حاصل از منابع گیاهی پایداری حرارتی پایین‌تری نسبت به منابع میکروبی دارند (۳).

در این پژوهش با توجه به اهمیت آنزیم انورتاز و بی خطر بودن سلول‌های مخمر از نظر سلامتی، جداسازی مخمرهای نمک دوست تولیدکننده انورتاز از خاک شور و فعالیت آنزیمی آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

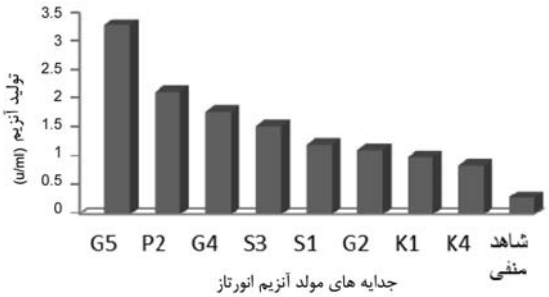
الف) نمونه برداری و جداسازی مخمرها: از خاک های مناطق کوه سفید (S)، قمرود (G)، یزدان شهر (Y)، پردیسان (P) در قم و کویر میقان (K) در اراک باکنار زدن ۲-۱ سانتی‌متر خاک در عمق ۱۰-۵ سانتی‌متری نمونه برداری انجام شد. سپس یک گرم از خاک الک شده به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی منتقل و پس از هم‌زدن با شیکر، رقت‌های متوالی در شرایط استریل تا 10^{-9} تهیه شد. کشت به روش پورپلیت با استفاده ار محیط کشت Yeast extract Pepton D-glucose Agar حاوی ۵٪ نمک انجام شد و سپس ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند (۹). شناسایی مخمرها طبق روش Barnett و براساس ویژگی‌های مورفولوژی و متابولیسمی (بیوشیمیایی) انجام گرفت (۱۰).

ب) کشت در محیط کشت نهایی تولید آنزیم (*Production culture*): محیط کشت تولید آنزیم حاوی کلرید سدیم ۵ درصد، عصاره مخمر ۲ میلی‌گرم، نیترات آمونیوم ۸ میلی‌گرم، فسفات پتاسیم ۱۶ میلی‌گرم، گلوکز ۴ میلی‌گرم و سولفات منیزیم ۲ میلی‌گرم، همگی به ازای ۱۰۰ml آب مقطر بود (۱۱). ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری با کدورت نیم مک‌فارلند به ۵۰ml از محیط کشت تولید در فلاسک‌های ۲۵۰ml تلقیح گردیدند و در گرم‌خانه شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور ۱۵۰rpm قرار گرفتند و از نظر تولید آنزیم انورتاز در فواصل زمانی معین بررسی شدند. در هر مورد میزان تولید با شاهد منفی مقایسه شد تا سویه برتر انتخاب گردد.

ج) تهیه محلول آنزیمی از هر سویه: پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری، محلول رویی حاوی آنزیم با استفاده از سانتریفوژ در ۴۰۰۰rpm، به مدت ۱۰ دقیقه از رسوب جدا شد.

د) تهیه محلول سوبسترایی: به منظور تهیه محلول ۰/۱۲۵ مولار ساکاروز به عنوان سوبسترا، ۴/۲۷ گرم ساکاروز را در یک بالن ۱۰۰ml ریخته و به حجم رسانده شد.

ه) سنجش فعالیت نسبی آنزیم: در یک لوله آزمایش ۰/۱ ml از محلول سوبسترا ریخته و سپس ۰/۹ ml از مایع رویی محیط کشت



شکل ۱: بررسی میزان تولید آنزیم انورتاز در سویه‌های مولد آنزیم.

به آن افزوده شد. pH مخلوط واکنش با اضافه نمودن اسید کلریدریک، ۰/۱ N به ۴/۵ رسانده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. برای متوقف کردن واکنش، به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد و سپس ۱ ml آب مقطر به آن اضافه گردید (۱۲). میزان فعالیت آنزیم براساس میزان گلوکز آزاد شده حاصل از هیدرولیز آنزیمی انورتاز سنجیده شد. برای اندازه گیری مقدار قند حاصل، از روش گلوکز اکسیداز مطابق دستور العمل کیت تشخیص مقدار گلوکز شرکت پارس آزمون از روش فتومتریک استفاده شد. پس از مخلوط نمودن محلول سوبسترا و مایع رویی محیط کشت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید و حداکثر در مدت ۶۰ دقیقه جذب نوری استاندارد و نمونه‌ها در برابر شاهد اندازه‌گیری شد. شدت رنگ قرمز حاصل از واکنش که متناسب با غلظت قند در محلول نمونه است توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ nm اندازه‌گیری شد. برای بیان فعالیت آنزیمی بر حسب درصد عدد حاصل از جذب نوری در عدد ۱۰۰ ضرب شد. در این روش یک واحد آنزیمی (unit) برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند در مدت یک دقیقه یک میلی‌مول گلوکز را از هیدرولیز ساکاروز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تولید نماید (۱۳). با این روش سویه برتر شناسایی و G5 نام‌گذاری شد.

و) تاثیر میزان نمک بر فعالیت آنزیم انورتاز در سویه *G5*: تاثیر غلظت‌های مختلف نمک‌های کلرید سدیم از ۰/۶ تا ۳/۴ میلی‌مولار و غلظت‌های مختلف سولفات سدیم و فسفات سدیم از ۰/۲ تا ۱/۴ بر حسب میلی‌مولار در فعالیت آنزیم بررسی شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰nm، با شاهد منفی مقایسه گردید.

ز) تاثیر غلظت سوبسترا بر میزان فعالیت آنزیم انورتاز در سویه *G5*: به منظور بررسی اثر غلظت سوبسترا بر روی فعالیت آنزیم انورتاز لازم است تا در ابتدا غلظت‌های مورد نظر از این سوبسترا تهیه شود و نتایج هر تست با شاهد منفی مقایسه گردد. غلظت‌های انتخابی برای این آزمون: ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ میلی مولار بودند. محلول آنزیمی به‌دست آمده از کشت سویه G5 در محیط بهینه برای تولید آنزیم با سانتریفوژ تهیه گردید. اثر غلظت سوبسترا بر اساس قند گلوکز حاصل از هیدرولیز ساکاروز در pH ۴/۵ و درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تعیین شد. سپس با توجه به تعریف واحد آنزیمی فعالیت آنزیم در هر غلظت محاسبه و نمودار آن ترسیم گردید.

ح) تاثیر دما بر میزان فعالیت آنزیم انورتاز درسویه *G5*: محدوده دمایی تولید آنزیم در ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. زمان واکنش میان آنزیم و سوبسترا، بر اساس مناسب‌ترین زمان تاثیر آنزیم روی سوبسترا، ۱۵ دقیقه در نظر گرفته شد. از مقایسه شاهد منفی در هر کدام از دماها با نمونه‌های مورد بررسی میزان خطای آزمایش کاهش داده شد.

ط) تاثیر *pH* بر میزان فعالیت آنزیم انورتاز در سویه*G5*: اثر pH بر فعالیت آنزیم در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از بافرهای استات (۰/۱M) و فسفات (۰/۱M) در محدوده pH ۳ تا ۸/۵ بررسی شد. محلول سوبسترایی در بافرهای تهیه شده در محدوده‌های مختلف pH آماده گردید. پس از مخلوط نمودن سوبسترا و محلول آنزیمی گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس آنزیم غیرفعال و با روش گلوکزاکسیداز میزان فعالیت آنزیم در دامنه‌های مختلف pH سنجیده شد و با نمونه‌های شاهد منفی برای هر pH مقایسه شد. با توجه به میزان گلوکز تولید شده و نمودار استاندارد میزان فعالیت آنزیم در pH مورد بررسی مشخص گردید.

ی) پایداری حرارتی آنزیم انورتاز در سویه *G5*: پایداری حرارتی آنزیم در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در pH ۴/۵ و سوبسترای ساکاروز ۰/۱۲۵ مولار در بازه زمانی صفر تا ۷۰ دقیقه مورد آزمایش قرار گرفت. سپس ترسیم نمودار براساس میزان جذب در طول موج ۵۴۰nm انجام شد.

ک) تاثیر یون‌های فلزی مختلف بر فعالیت آنزیم انورتاز در سویه*G5*: تاثیر یون‌های کلرید سدیم، کلرید منیزیم، کلرید کلسیم، کلرید روی، کلرید پتاسیم و کلرید مس در غلظت 5mM در تولید آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی مواد مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

جدول ۱: صفات بیوشیمیایی مخمرهای جدا شده از خاک شور.

جدایه‌ها	G2	G4	G5	S1	S3	P2	K1	K4
تخمیر D-گلوکز	+	-	-	-	-	-	+	+
تخمیر D-گالاکتوز	-	-	-	-	-	-	-	-
تخمیر مالتوز	-	-	-	-	-	-	-	-
تخمیر لاکتوز	-	-	-	-	-	-	-	-
تخمیر ساکاروز	-	-	-	-	-	-	-	-
تخمیر رافینوز	-	-	-	-	-	-	-	-
تخمیر سلوبیوز	-	-	-	-	-	-	-	-
تخمیر اینولین	-	-	-	-	-	-	-	-
تخمیر نشاسته	-	-	-	-	-	-	-	-
رشد در D-گلوکز	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در D-گالاکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در آرابینوز	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در رامانوز	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در مالتوز	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در لاکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در ساکاروز	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در سلوبیوز	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در اینولین	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در نشاسته	+	+	-	-	-	-	-	+
رشد در مانیتول	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در سیترات	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در رافینوز	-	+	+	-	-	-	-	-
رشد در لیزین	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در نیترات	-	-	-	-	-	+	-	-
رشد در نیتریت	-	-	-	+	-	-	-	+
رشد در 25ºC	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در 30ºC	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در 35ºC	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در 40ºC	+	+	+	+	+	-	-	-
رشد در سیکلوهگزین ۰/۰۱٪	-	-	+	+	+	+	+	+
رشد در سیکلوهگزین ۰/۱٪	-	-	-	+	+	+	-	-
رشد در گلوکز ۵۰٪	+	+	+	+	+	-	-	-
هیدرولیز اوره	-	+	+	-	+	-	+	+

نتایج

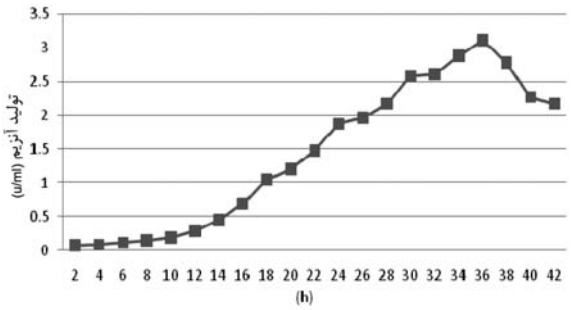
از ۲۷ سویه مخمر نمک دوست و تحمل‌کننده نمک جدا شده از خاک‌های شور (۱۱ سویه نمک دوست و ۱۶ سویه تحمل‌کننده نمک) ۸ سویه توانایی تولید آنزیم انورتاز را داشتند. شناسایی نسبی جدایه‌های مولد انورتاز بر اساس خصوصیات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و بیوشیمیایی انجام شد (جدول ۱).

در بررسی تولید آنزیم انورتاز به روش گلوکز اکسیداز، مخمر سویه G5 در مقایسه با شاهد منفی، بیشترین میزان گلوکز را از هیدرولیز ساکاروز تولید نمود (شکل ۱). در سویه G5 تا ۳۶ ساعت پس از گرم‌خانه‌گذاری تولید آنزیم ادامه داشت و پس از آن میزان تولید آنزیم کاهش داشت. این امر می‌تواند به علت کاهش میزان سوبسترا در محیط باشد (شکل ۲). در مقایسه با شاهد فاقد نمک، در غلظت ۱/۷mM از کلرید سدیم سویه G5 بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان داد. اما با افزایش غلظت نمک میزان فعالیت آنزیم کاهش داشت (شکل ۳).

در بررسی غلظت‌های مختلف فسفات سدیم و سولفات سدیم در فعالیت آنزیم انورتاز سویه G5 مشخص شد که در غلظت ۰/۲ mM از فسفات سدیم و غلظت ۰/۶ mM از سولفات سدیم بیشترین فعالیت آنزیمی حدود ۷۰٪ را دارد و با افزایش غلظت هر دو نمک از فعالیت آنزیمی کاسته می‌شود (شکل‌های ۴ و ۵). به طور کلی در بین نمک‌ها، کلرید سدیم ۱/۷ mM موجب افزایش فعالیت آنزیم انورتاز درسویه G5 می‌شود.

Km غلظتی از سوبسترا است که در آن فعالیت آنزیم نسبت به حداکثر، به نصف سرعت کاهش یابد. مطابق شکل ۶ میزان Km، برابر ۲۰ mM محاسبه گردید.

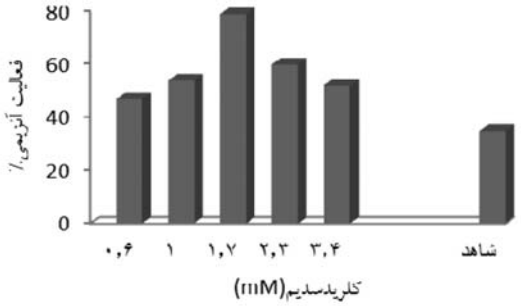
تغییرات فعالیت آنزیم نسبت به درجه حرارت در دامنه



شکل ۲: زمان بهینه گرم‌خانه گذاری برای تولید آنزیم انورتاز توسط جدایه G5.

حرارتی ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد چشمگیر نبود و در این محدوده آنزیم بیشترین فعالیت را داشت. درجه حرارت بهینه برای فعالیت آنزیم ۶۵ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۷).

تاثیر pH بر روی فعالیت آنزیم در درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از بافرهای استات و فسفات در دامنه pH، ۳ تا ۸/۵ اندازه‌گیری شد (شکل ۸). همان طور که ملاحظه می شود، منحنی فعالیت آنزیم سیگموئیدی شکل است و آنزیم در pH ۴/۵ بیشترین فعالیت را از خود نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که با افزایش pH از فعالیت آنزیم کاسته می‌شود (شکل ۸). کاهش فعالیت آنزیم در زمان‌های ۵ تا ۶۰ دقیقه ناچیز بود اما پس از گذشت۷۰ دقیقه کاهش ناگهانی در فعالیت آنزیم مشاهده گردید (شکل ۹). هم‌چنین نتایج نشان داد که یون سدیم باعث افزایش فعالیت آنزیم انورتاز (۸۰٪) و یون روی اثر مهاری(۲۰٪) در فعالیت آنزیم دارد (شکل ۱۰).



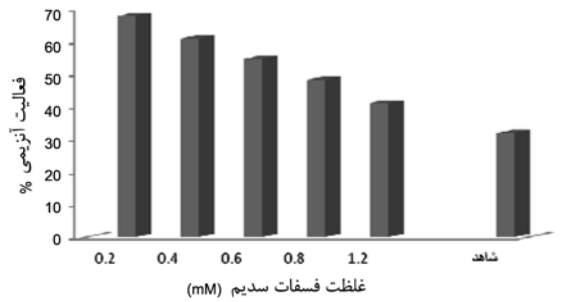
شکل ۳: تاثیر غلظت‌های کلریدسدیم در فعالیت آنزیم انورتاز سویه G5.

بحث

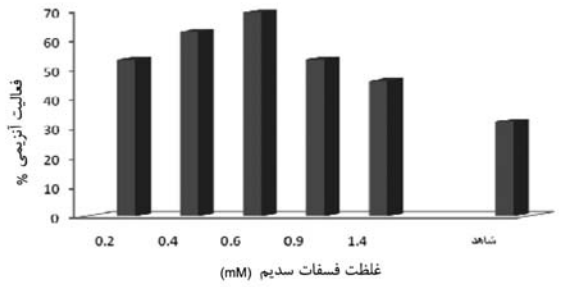
در این پژوهش ما برای اولین بار در کشور فعالیت سینتیکی آنزیم انورتاز در مخمرهای جدا شده از خاک‌شور را مورد بررسی قرار دادیم.

روبیو (Rubio) و همکارانش در سال ۲۰۰۲ با بررسی تاثیر یون‌های فلزی به صورت کلراید و با غلظت ۵ mM در مخمر *R. glutinis* نشان دادند که یون‌های Mg^{2+} و Ca^{2+} و pH، ۴/۵ بیشترین تاثیر را بر میزان فعالیت آنزیم انورتاز دارند (۱۴) اما در مطالعه حاضر در حضور Na^{+} و Ca^{2+} و در همان pH بیشترین فعالیت آنزیم مشاهده گردید. هم‌چنین آنزیم انورتاز در مخمر یاد شده در محدوده‌ی حرارتی ۲۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد دارای فعالیت بود و حداکثر فعالیت آن در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و میزان *Km*، ۲۲ mm گزارش گردید. در صورتی که در این تحقیق آنزیم سویه G5 در ۶۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین فعالیت (حدود ۱۰۰٪) را داشت و میزان *Km*، ۲۰mm بود.

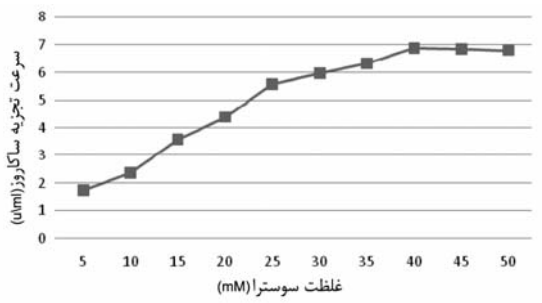
Kalpana و همکاران در سال ۲۰۰۴ اظهار داشتند که *Cladosporium sphaerospermum* تحمل کننده نمک



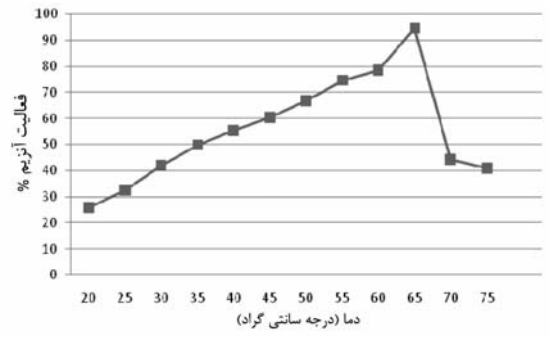
شکل ۴: تاثیر غلظت‌های فسفات سدیم در فعالیت آنزیم انورتاز سویه G5.



شکل ۵: تاثیر غلظت‌های سولفات سدیم در فعالیت آنزیم انورتاز جدایه G5.



شکل ۶: تعیین *Km* برای سویه G5.

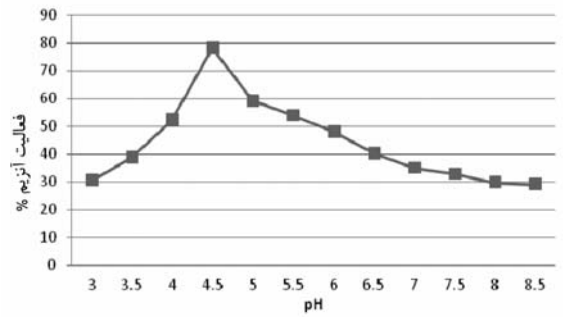


شکل ۷: تاثیر دما بر فعالیت آنزیم انورتاز سویه G5.

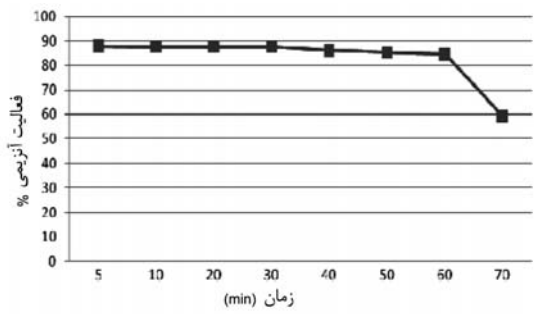
بوده و در محیط کشت حاوی گلوکز و ساکاروز و نشاسته به عنوان منبع کربن دارای فعالیت انورتازی می‌باشد. فعالیت انورتاز خارج سلولی در حضور غلظت mM ۲ کلرید سدیم افزایش داشت که مشابه با نتایج این پژوهش می‌باشد (۱۵).

مونا (Mona) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که حداکثر فعالیت آنزیم انورتاز حاصل از *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 در pH ۶ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. آنزیم جدا شده از این سویه بیشترین تاثیر در سوبسترای ساکاروز داشت و میزان *Km* آن ۶۰mM گزارش گردید (۱۶). پایداری حرارتی آنزیم در محدوده دمایی ۷۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید و نتایج نشان داد که آنزیم در ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت فعالیت خودش را حفظ می‌کند اما در ۵۰ درجه سانتی‌گراد حدود ۸۵٪ فعالیت آنزیم باقی می‌ماند و در دمای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد (۱۶). به نظر می‌رسد پایداری حرارتی آنزیم همانند نتایج کویروگا (Quiroga) و همکارانش در سال ۱۹۹۵ و پایین‌تر از میزانی است که روبیو (Rubio) و همکارانش در سال ۲۰۰۲ در *R. glutinis* گزارش کردند. محققین دیگر پایداری آنزیم انورتاز را در ۶۰ درجه سانتی‌گراد در آسپرژیلوس نایجر و ساکارومایسس سرویزیه نشان دادند (۱۸ و ۱۹). این در حالی است که سویه G5 در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت ۸۵٪ فعالیت آنزیمی خودش را حفظ می‌کند و فعالیت آنزیم در ۷۰ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد.

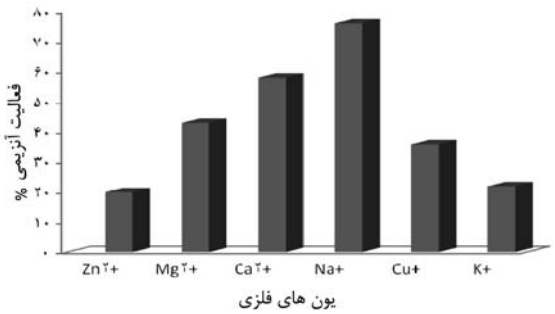
پژوهش‌های تورکات (Turgut) و همکاران در سال ۲۰۰۶ درمورد بررسی فعالیت انورتاز در سویه‌های مخمری که در معرض تنش اسمزی شدید قرار گرفتند نشان داد که سویه‌های مخمری حساس به تنش اسمزی غلظت ۰/۴ مولار NaCl را در محیط کشت تحمل می‌کنند. اما افزایش غلظت NaCl از ۰/۴ مولار تا ۱ مولار منجر به کاهش تدریجی فعالیت انورتاز در سویه‌های مخمری می‌شود. تغییرات اسمزی شدید (۱-۰/۸ M) NaCl، فعالیت آنزیم را در سویه‌های مخمری به شدت کاهش می‌دهد. مخمرها در NaCl، با غلظت ۱/۴ مولار در محیط کشت YPD هیچ‌گونه رشدی از خودشان نشان نمی‌دهند (۱۱). در پژوهش



شکل ۸: تاثیر pH بر فعالیت آنزیم انورتاز سویه G5.



شکل ۹: پایداری حرارتی آنزیم انورتاز جدایه G5.



شکل ۱۰: تاثیر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم انورتاز سویه G5.

حاضر اثبات شد که سویه مخمری G5 در محیط کشت YPD، حاوی کلرید سدیم ۳M دارای رشد می‌باشد و فعالیت انورتاز در غلظت ۱/۷mM از NaCl افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد.

گویتریز (Gutierrez) و همکارانش در سال ۲۰۰۹ با مطالعه بر روی *Rhodotorula dairenensis* اظهار داشتند که آنزیم انورتاز حاصل از این مخمر قادر است گلوکز را از منابع کربنی مانند ساکاروز، ۱ـکتوز، نیستوز، رافینوز و اینولین آزاد سازد، اما روی لاکتوز و مالتوز فعالیتی نشان نمی‌دهد (۲۰). میزان *Km* آنزیم *R. dairenensis* با سوبسترای ساکاروز ۱/۲ mM گزارش شده است که شبیه *Km*، *C. utilis* می‌باشد (۱/۲ mM) (۴) و کم‌تر از میزان *Km* آنزیمی است که از مخمرهایی مانند *Xanthophllomyces dendrorhous* (۴mM) و یا *Debaryomyces occidentalis* (۴/۹mM) گزارش شده (۱ و ۲۱) و در *R. glutinis* ۲۲۷ mM می‌باشد (۱۲).

میزان Km سویه G5 دراین بررسی ۲۰mM گزارش شد که از *R. glutinis* کم‌تر و از بقیه مخمرهای نامبرده بیشتر می‌باشد. بهترین pH برای فعالیت آنزیم انورتاز مخمر مورد مطالعه ۴/۵ و بهینه دمای فعالیت آن از *R. dairenesis* بیشتر (۶۵ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد.

نتایج حاصل از این پژوهش و سایر مطالعات نشان می‌دهد که pH بهینه برای فعالیت انورتاز با توجه به میکروارگانیسم تولید کننده آن متفاوت می‌باشد و دمای بهینه برای فرآیند هیدرولیز با توجه به شرایط آزمون و منبع تولید آنزیم در محدوده ۷۳-۴۲ درجه سانتی‌گراد می‌تواند موثر باشد.

نتیجه گیری

انورتاز آنزیم مهمی در صنایع غذایی است و با توجه به تک سلولی بودن و کفایت ایمنی زیستی آن‌ها به دلیل درصد کم‌تر اسیدهای هسته‌ای در مقایسه با باکتری‌ها می‌توانند پتانسیل کاربردی بیشتری را داشته باشند. از این رو ارزیابی میزان تولید آنزیم در مقیاس صنعتی و مطالعه کاربردی آنزیم در صنایع غذایی، شناسایی ژن مولد آنزیم انورتاز و مقایسه با ژن ایزوآنزیم‌های قبلی و هم‌چنین تخلیص آنزیم و بررسی ساختار مولکولی آنزیم پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از زحمات مسئولین آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم به دلیل حمایت‌های اجرایی کمال سپاسگزاری را دارند.

References

1. Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, Henrissat B. The three dimensional structure of invertase (β-fructosidase) from *Thermotoga maritime* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. J Chem. 2004; 279:18910-18913.
2. Ashokkumar B, Kayalvizhi N, Gunasekaran P. Optimization of media for β-fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. Biochem. 2001; 37:331-338.
3. Vitolo M, Duranti A. Effect of pH, aeration and sucrose feeding on the invertase activity of intact *S. cerevisiae* cells grown in sugarcane blackstrap molasses. J Indust Microbiol. 2008; 15:75-79.
4. Belcarz A., The novel nonβglycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). Biochimi Biophys Acta. 2004; 1594:40-53.
5. Chaudhuri A, Maheswari A. Novel invertase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: it requirement of protein for activation. Arch Biochem Biophys. 1996; 327:98-106.
6. Moreno Y, Sanchez L, Rodriguez J. Purification and characterizationof the invertase from *Schizosaccharomyces pombe*. Biochem. 1990; 67:697-702.
7. Rodriguez J, Perez T. Characterization of the invertase from *Pichia anomala*. Biochem. 1995; 30:235-239.
8. Workman D. Purification and properties of the fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Microbiol. 1983; 160:87-91.
9. Moneke S. Physiological properties of yeast cell grown in the culture supplementation media. Agric. Biol.Chem. 1985; 39:1025-1031.
10. Barnett J. Yeast: Characteristics and identification .2nd ed. Cambridge university. 1990; 1-80.
11. Tulay T, Sezai T. Analysis of the effects of hyperosmotic stress on the derepression of invertase activities and the growth of different baker's yeast strains. Turk. J. Biol. 2002; 26:155-161.
12. Chengchan E. Recovery of yeast invertase from ethanol fermantation broth. Biotechnol. 2008; 14(7):561-576.
13. Rubio M, Navarro A. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. Phytochem. 2002; 61:605-609.
14. Rubio M, Maldonado, M. Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. Curr. Microbiol. 1995; 31:80-83.
15. Karlekar K, Parekh T, Chhatpar HS. Salt mediated changes in some enzymes of carbohydrate metabolism inhalotolerant *Cladosporium sphaerospermum*. J. Biosci. 2004; 3(4):197-201.
16. Mona M. Rashad R. Production, purification and characterization of extracellular invertase from *Saccharomyses cerevisiae* NRRL Y-12632 by solid-state fermentation of red carrot residue. Microbiol. 2009; 3(3):1910-1919.
17. Quiroga E, Vattuone A. Purification and characterization of the invertase in yeast. Biochem. 1995; 35:281-289.
18. Rashad M, Mahmoud M. Purification and characterization of extra and intracellular β-fructofuranosidase from *Saccharomyces cerevisiae* growing on Eichhornia crassipes leaf extract. Microbiol; 2006; 102:157-166.
19. Nguyen Q, Rezessy M. Purification and some properties invertase in yeast. Bichem. 2005; 59:248-257.
20. Gutierrez A. Biochemical characterization of a β-fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis* with transfructosylating activity. Biotechnol. 2009; 35:79-98.
21. Linde D, Macias I. Characterization of a β-fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylatin activity. Biochem. 2007; 11:354-369.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 1, May 2010

Evaluation of invertase activity in Yeasts isolated from saline soil

Sareh Salehi[1], Ahmadali pourbabaei[2], Ali rezaei[1]

[1]M.Sc. Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Abstract

Background and objective: Biodiversity of yeasts in extreme habitats and applications in food industry attract many of researchers. The aim of this study was evaluation of invertase activity in isolated yeasts from saline soil.

Material and Methods: In this study, kinetic activity of invertase from 27 halophilic and halotolerant yeast strains isolated from salin soil of Qom and Arak were evaluated. After collection of soil samples, the yeasts were cultured on YPD Agar containing 5% salt. Out of 27 yeast strains, 2 halophilic and 6 halotolerant strains with invertase activity were assessed for selection of best strain.

Results: Assessment of invertase activity according to the Glucose Oxidase assay showed that the enzyme productivity of G5 strain is more powerful than other isolates. The optimum enzyme activity was obtained at 65°C and pH 4.5. The highest enzymatic activity was observed in the medium containing 1.7mM sodium chloride. Na^+, Mg^{2+} and Ca^{2+} ions (all chlorides and 5mM concentration) have stimulation effect on enzyme's activity. The Km of enzyme for sucrose was 20 mM. Thermal stability of enzyme in 65°C was one hour and decrease of activity is not observed.

Conclusion: According to the results of this study, G5 strain has able to produce invertase in different concentrations of different salts.

Keywords: Invertase, Food industries, Halophilic yeasts, Halotolerant yeasts

Correspondence to: Sareh Salehi
E-mail: sarehsalehi.p@gmail.com
Tel: +989183485267
Journal of Microbial World 2010 3(1): 31-39