



## بررسی فعالیت آنزیم انورتاز در مخمرهای جدا شده از خاک شور

ساره صالحی<sup>۱\*</sup>، دکتر احمدعلی پوربابایی<sup>۲</sup>، علی رضایی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، آستادیار، 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 سینتیک انورتاز در ۲۷ سویه مخمری نمک دوست و تحمل‌کننده نمک جدا شده از خاک شور مناطق قم و اراک، مورد بررسی قرار گرفت. پس از جمع‌آوری نمونه خاک، کشت به روش پورپلیت در محیط YPD Agar حاوی ۵ درصد نمک انجام شد. از ۲۷ سویه مخمری، ۲ سویه نمک دوست و ۶ سویه تحمل‌کننده نمک دارای فعالیت انورتازی برای انتخاب سویه برتر مطالعه شدند.

یافته‌ها: 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  $Ca^{2+}$  و  $Mg^{2+}$  و  $Na^{+}$  (به صورت کلرید و با غلظت ۵mM) تاثیر افزایش‌دهی 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.

نتیجه‌گیری: 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 تحمل‌کننده نمک

پذیرش برای چاپ: اسفند ۸۸

دریافت مقاله: آذر ۸۸

### مقدمه

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 تحمل‌کننده نمک هم در محیط‌های

میکروارگانیسم‌های نمک دوست نسبی دارای توانایی‌های زیادی برای وارد شدن در دنیای بیوتکنولوژی هستند. این میکروارگانیسم‌ها علاوه بر تولید بسیاری از ترکیبات محافظ

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

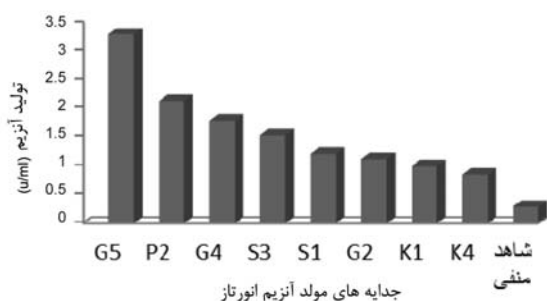
الک شده به لوله حاوی ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی منتقل و پس از هم زدن با شیکر، رقت های متوالی در شرایط استریل تا  $10^{-9}$  تهیه شد. کشت به روش پورپلیت با استفاده از محیط کشت Yeast extract Pepton D-glucose Agar حاوی ۵٪ نمک انجام شد و سپس ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند (۹). شناسایی مخمرها طبق روش Barnett و براساس ویژگی های 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 میلی گرم، نترات آمونیوم ۸ میلی گرم، فسفات پتاسیم ۱۶ میلی گرم، گلوکز ۴ میلی گرم و سولفات منیزیم ۲ میلی گرم، همگی به ازای ۱۰۰ ml آب مقطر بود (۱۱). ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری با کدورت نیم مک فارلند به ۵۰ ml از محیط کشت تولید در فلاسک های ۲۵۰ ml تلقیح گردیدند و در گرم خانه شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور ۱۵۰ rpm 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 سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ rpm، به مدت ۱۰ دقیقه از رسوب جدا شد.

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

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



شکل ۱: بررسی میزان تولید آنزیم انورتاز در سویه های مولد آنزیم.

فاقد نمک و هم در غلظت های بالاتر از ۳۰ درصد نمک قادر به رشد هستند. ویژگی ارزشمند دیگر، رشد سریع و نیاز غذایی ساده آن ها است. آنزیم انورتاز (بتا فروکتوز فورانوزیداز) متعلق به خانواده گلیکوهیدرولازها است و شامل بیش از ۳۷۰ نوع آنزیم با منشا میکروبی یا گیاهی می باشد. این آنزیم هیدرولیز ساکاروز را کاتالیز کرده و مخلوطی از D-گلوکز و D-فروکتوز را تولید می کند که باعث افزایش میزان شیرینی و هم چنین برطرف شدن بلورزایی ساکاروز در محصولات غذایی می گردد. آنزیم انورتاز در صنایع غذایی به خصوص صنعت شیرینی سازی و صنایع دارویی کاربرد فراوان دارد (۱ و ۲). در بین میکروارگانسیم ها: *Sacharomyces cerevisiae*, *Termomyces lanuginosus*, *Candida utilis*, *Pichia anomala*, *Penicillium chrisogenum*, *Kluyveromyces fragilis*, *Schizosaccharomyces pombe* و *Rhodotorula glutinis* به طور وسیعی مطالعه شده اند (۳-۸). 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 می باشد و بستگی به منبع آنزیم دارد. میزان غیرفعال شدن آنزیم در محدوده های پایین تر pH معمولا بیشتر است. هم چنین انورتازها برحسب منابع شان پایداری حرارتی و دمای بهینه متفاوتی را نشان می دهند. بررسی های انجام شده نشان می دهند که معمولا انورتازهای حاصل از منابع گیاهی پایداری حرارتی پایین تری نسبت به منابع میکروبی دارند (۳). در این پژوهش با توجه به اهمیت آنزیم انورتاز و بی خطر بودن سلول های مخمر از نظر سلامتی، جداسازی مخمرهای نمک دوست تولیدکننده انورتاز از خاک شور و فعالیت آنزیمی آن ها مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش ها

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 ۱-۲ سانتی متر خاک در عمق ۵-۱۰ سانتی متری نمونه برداری انجام شد. سپس یک گرم از خاک

ساکاروز در pH ۴/۵ و درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی گراد 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 در سویه G5: محدوده دمایی تولید آنزیم در ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰ و ۷۵ درجه سانتی گراد بررسی شد. زمان واکنش میان آنزیم و سوبسترا، بر اساس مناسب ترین زمان تاثیر آنزیم روی سوبسترا، ۱۵ دقیقه در نظر گرفته شد. از مقایسه شاهد منفی در هر کدام از دماها با نمونه های 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 سانتی گراد با استفاده از بافرهای استات (۰/۱M) و فسفات (۰/۱M) در محدوده pH ۳ تا ۸/۵ بررسی شد. محلول سوبسترای در بافرهای تهیه شده در محدوده های مختلف pH آماده گردید. پس از مخلوط نمودن سوبسترا و محلول آنزیمی گرم خانه گذاری به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی گراد صورت گرفت. سپس آنزیم غیرفعال و با روش گلوکز اکسیداز میزان فعالیت آنزیم در دامنه های مختلف pH سنجیده شد و با نمونه های 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 سانتی گراد 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 یون های فلزی مختلف بر فعالیت آنزیم انورتاز در سویه G5: تاثیر یون های کلرید سدیم، کلرید منیزیم، کلرید کلسیم، کلرید روی، کلرید پتاسیم و کلرید مس در غلظت ۵mM در تولید آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی مواد مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

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 سانتی گراد گرم خانه گذاری 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 سانتی گراد گرما گذاری گردید و حداکثر در مدت ۶۰ دقیقه جذب نوری استاندارد و نمونه ها در برابر شاهد اندازه گیری شد. شدت رنگ قرمز حاصل از واکنش که متناسب با غلظت قند در محلول نمونه است توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ nm اندازه گیری 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 میلی مول گلوکز را از هیدرولیز ساکاروز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تولید نماید (۱۳). با این روش سویه برتر شناسایی و G5 نام گذاری شد.

و) تاثیر میزان نمک بر فعالیت آنزیم انورتاز در سویه G5: تاثیر غلظت های مختلف نمک های کلرید سدیم از ۰/۶ تا ۳/۴ میلی مولار و غلظت های مختلف سولفات سدیم و فسفات سدیم از ۰/۲ تا ۱/۴ بر حسب میلی مولار در فعالیت آنزیم بررسی شد. جذب نوری نمونه ها 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 غلظت های مورد نظر از این سوبسترا تهیه شود و نتایج هر تست با شاهد منفی مقایسه گردد. غلظت های انتخابی برای این آزمون: ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ میلی مولار بودند. محلول آنزیمی به دست 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

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

K4	K1	P2	S3	S1	G5	G4	G2	جدایه‌ها
+	+	-	-	-	-	-	+	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 سترات
-	-	-	-	-	+	+	-	رشد در رافینوز
+	+	+	+	+	+	+	+	رشد در لیزین
-	-	+	-	-	-	-	-	رشد در نیترات
+	-	-	-	-	-	-	-	رشد در نیتريت
+	+	+	+	+	+	+	+	رشد در 25°C
+	+	+	+	+	+	+	+	رشد در 30°C
+	+	+	+	+	+	+	+	رشد در 35°C
-	-	-	+	+	+	+	+	رشد در 40°C
+	+	+	+	+	+	-	-	رشد در سیکلوهگترین ۰/۰۱٪
-	-	+	+	+	-	-	-	رشد در سیکلوهگترین ۰/۱٪
-	-	-	+	+	+	+	+	رشد در گلوکز ۵۰٪
+	+	-	+	-	+	+	-	هیدرولیز آوره

## نتایج

آنزیمی را نشان داد. اما با افزایش غلظت نمک میزان فعالیت آنزیم کاهش داشت (شکل ۳).

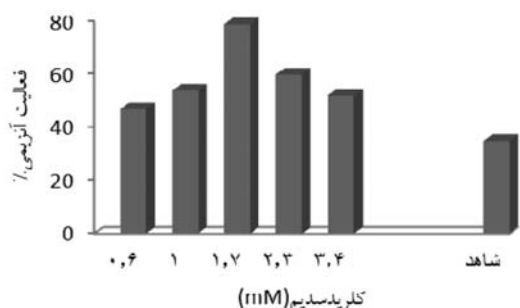
در بررسی غلظت‌های مختلف فسفات سدیم و سولفات سدیم در فعالیت آنزیم انورتاز سویه G5 مشخص شد که در غلظت ۰/۲ mM از فسفات سدیم و غلظت ۰/۶ mM از سولفات سدیم بیشترین فعالیت آنزیمی حدود ۷۰٪ را دارد و با افزایش غلظت هر دو نمک از فعالیت آنزیمی کاسته می‌شود (شکل‌های ۴ و ۵). به طور کلی در بین نمک‌ها، کلرید سدیم ۱/۷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

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

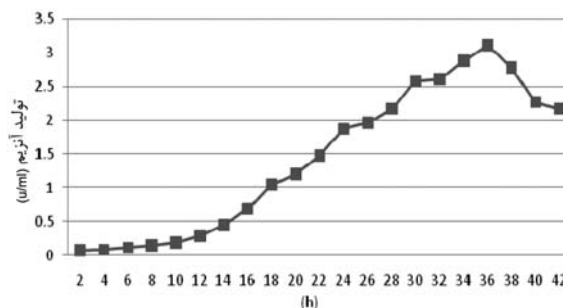
تغییرات فعالیت آنزیم نسبت به درجه حرارت در دامنه

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 ۱/۷ mM از کلرید سدیم سویه G5 بیشترین فعالیت



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



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

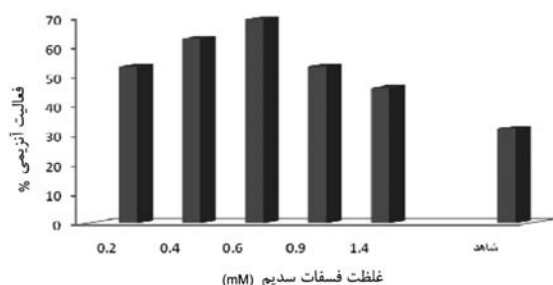
### بحث

در این پژوهش ما برای اولین بار در کشور فعالیت سینتیک آنزیم انورتاز در مخمرهای جدا شده از خاک شور 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  $Ca^{2+}$ ، 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  $K_m$ ، 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  $K_m$ ، ۲۰mm بود.

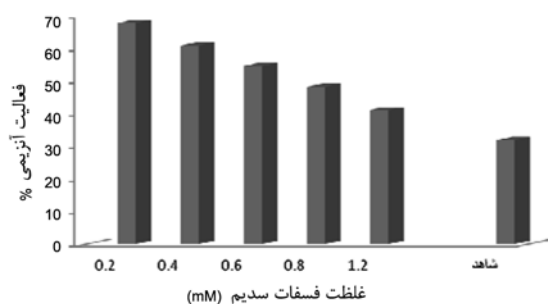
*Kalpana* و همکاران در سال ۲۰۰۴ اظهار داشتند که *Cladosporium sphaerospermum* تحمل‌کننده نمک

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).

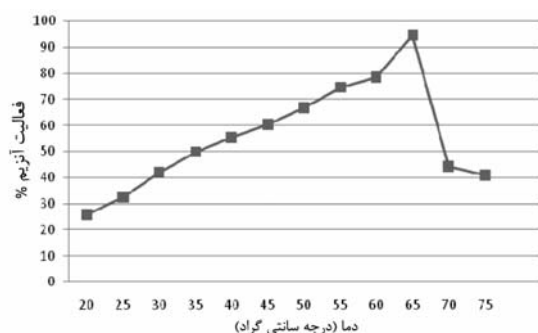
تاثیر pH بر روی فعالیت آنزیم در درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از بافرهای استات و فسفات در دامنه pH ۳ تا ۸/۵ اندازه‌گیری شد (شکل ۸). همان‌طور که ملاحظه می‌شود، منحنی فعالیت آنزیم سیگموئیدی شکل است و آنزیم در pH ۴/۵ بیشترین فعالیت را از خود نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که با افزایش pH از فعالیت آنزیم کاسته می‌شود (شکل ۸). کاهش فعالیت آنزیم در زمان‌های ۵ تا ۶۰ دقیقه ناچیز بود اما پس از گذشت ۷۰ 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 مهار (۲۰٪) در فعالیت آنزیم دارد (شکل ۱۰).



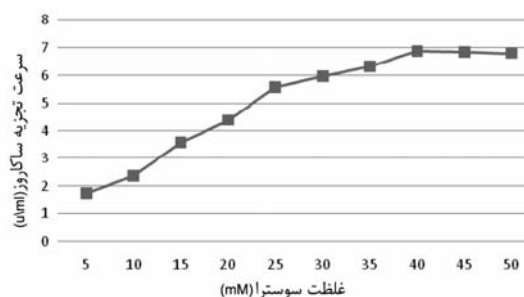
شکل ۵: تاثیر غلظت‌های سولفات سدیم در فعالیت آنزیم انورتاز جدایه G5.



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



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



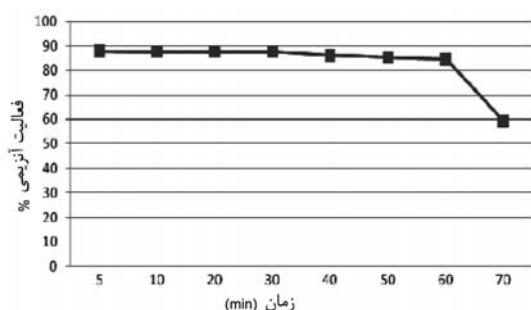
شکل ۶: تعیین Km برای سویه G5.

۲۰۰۲ در *R. glutinis* گزارش کردند. محققین دیگر پایداری آنزیم انورتاز را در ۶۰ درجه سانتی گراد در اسپرژیلوس 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 می کند و فعالیت آنزیم در ۷۰ درجه سانتی گراد کاهش می یابد.

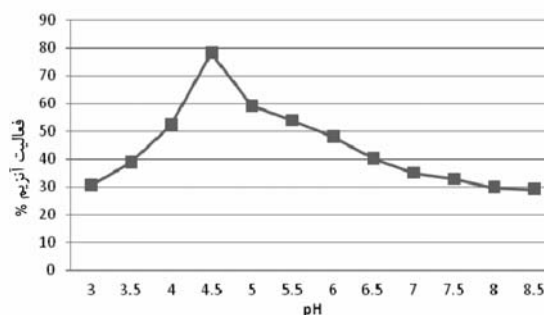
پژوهش های تورکات (Turgut) و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مورد بررسی فعالیت انورتاز در سویه های مخمري که در معرض تنش اسمزی شدید قرار گرفتند نشان داد که سویه های مخمري حساس به تنش اسمزی غلظت ۰/۴ مولار NaCl را در محیط کشت تحمل می کنند. اما افزایش غلظت NaCl از ۰/۴ مولار تا ۱ مولار منجر به کاهش تدریجی فعالیت انورتاز در سویه های مخمري می شود. تغییرات اسمزی شدید (۱-۰/۸ M NaCl)، فعالیت آنزیم را در سویه های مخمري به شدت کاهش می دهد. مخمرها در NaCl، با غلظت ۱/۴ مولار در محیط کشت YPD هیچ گونه رشدی از خودشان نشان نمی دهند (۱۱). در پژوهش

بوده و در محیط کشت حاوی گلوکز و ساکاروز و نشاسته به عنوان منبع کربن دارای فعالیت انورتازی می باشد. فعالیت انورتاز خارج سلولی در حضور غلظت ۲ mM کلرید سدیم افزایش داشت که مشابه با نتایج این پژوهش می باشد (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 سانتی گراد می باشد. آنزیم جدا شده از این سویه بیشترین تاثیر در سوبسترای ساکاروز داشت و میزان Km آن ۶۰ mM گزارش گردید (۱۶). پایداری حرارتی آنزیم در محدوده دمایی ۷۰-۲۰ درجه سانتی گراد بررسی گردید و نتایج نشان داد که آنزیم در ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت فعالیت خودش را حفظ می کند اما در ۵۰ درجه سانتی گراد حدود ۸۵٪ فعالیت آنزیم باقی می ماند و در دمای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی گراد فعالیت آنزیم کاهش می یابد (۱۶). به نظر می رسد پایداری حرارتی آنزیم همانند نتایج کویروگا (Quiroga) و همکارانش در سال ۱۹۹۵ و پایین تر از میزانی است که روبیو (Rubio) و همکارانش در سال



شکل ۹: پایداری حرارتی آنزیم انورتاز جدایه G5.



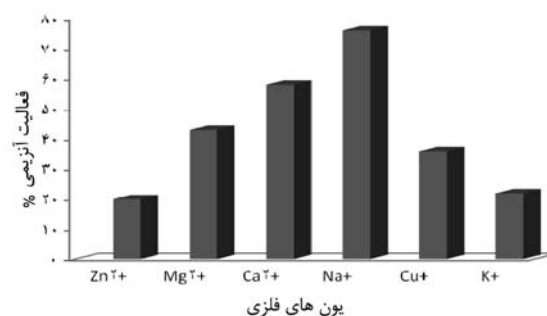
شکل ۸: تاثیر pH بر فعالیت آنزیم انورتاز سویه G5.

## 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.



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

حاضر اثبات شد که سویه مخمري G5 در محیط کشت YPD، حاوی کلرید سدیم ۳M دارای رشد می‌باشد و فعالیت انورتاز در غلظت ۱/۷mM NaCl از افزایش معنی داری نشان می‌دهد. گویتیریز (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، ۱-کتوز، 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 *Xanthophyllomyces 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 در این 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. dairenensis* 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 ۴۲-۷۳ درجه سانتی‌گراد می‌تواند موثر باشد.

## References

1. Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, Henrissat B. The three dimensional structure of invertase ( $\beta$ -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  $\beta$ -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 non $\beta$ glycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). Biochim 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 characterization of 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 fermentation 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 in halotolerant *Cladosporium sphaerospermum*. J. Biosci. 2004; 3(4):197-201.
16. Mona M, Rashad R. Production, purification and characterization of extracellular invertase from *Saccharomyces 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  $\beta$ -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  $\beta$ -fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis* with trans-fructosylating activity. Biotechnol. 2009; 35:79-98.
21. Linde D, Macias I. Characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with trans-fructosylatin activity. Biochem. 2007; 11:354-369.





## Evaluation of invertase activity in Yeasts isolated from saline soil

Sareh Salehi<sup>1</sup>, Ahmadali pourbabaei<sup>2</sup>, Ali rezaei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>M.Sc. Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

<sup>2</sup>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 saline 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<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> 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