جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم علوم الأغذية

أمثلة ظروف انتاج إنزيم الانفرتاز من بعض السلالات المعزولة محليا لخميرة الخباز

Optimizing the Production parameters of Invertase Enzyme from locally isolated Strains of *Saccharomyces cerevisiae*

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية (قسم علوم الأغذية)

إعداد:

م . روضه مثلا

إشراف:

د. صباح يازجي — أستاذ في قسم علوم الأغذية — كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق

د. أنور الحاج علي — أستاذ في قسم علوم الأغذية — كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق

2012

Damascus University
College of Agriculture
Department of Food Science

Optimizing the Production parameters of Invertase Enzyme from locally isolated Strains of *Saccharomyces cerevisiae*

A THESIS
Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of MASTER Of Food Science Section

Prepared by

Raoda Mathla

Supervisor

Dr. Sabah Yazgi
Prof. Of Food Science
Faculty of Agriculture
Damascus University

Dr. Anwar Alhaj Ali
Prof. Of Food Science
Faculty of Agriculture
Damascus University

2012

الفهرس

	المحتويات	رقم الصفحة
1	دراسة مرجعية	
1-1	المقدمة	1
1-2-	سكر المحول	2
1-3-	الانفرتاز	3
1-4-	الكائنات الحية المنتجة للانفرتاز	6
1-4-1-	لمحة عن الخمائر (Yeasts)	6
1-4-1-1	الصفات العامة للخمائر	6
1-4-1-2	تركيب خلية الخميرة	7
1-4-1-3	تكاثر الخمائر	9
1-4-1-4	العوامل البيئية (الطبيعية – الكيميائية) المؤثرة على نمو الخمائر	10
1-4-1-6	تصنيف الخمائر	11
1-4-2	الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*	13
1-4-2-1	المتطلبات الغذائية	14
1-4-2-2	أهمية خميرة الخباز	14
1-4-2-3	التطبيقات البيوتكنولوجية للخميرة الخباز	15
1-4-2-4	أشكال الانفرتاز في الخميرة	16
1-4-2-5	تأثير العوامل المحيطة في أنتاج الانفرتاز من الـ *Saccharomyces cerevisiae*	16
1-4-2-6	تصنيف الخميرة مخبرياً	20

	تحديد الصفات الفيزيولوجية بشرائح API	20	
5-1	استخلاص الإنزيمات الداخلية و الخارجية من خلايا الخميرة	21	
1-5-1	طرائق تخريب الجدر الخلوية للخميرة	21	
1-1-5-1	الطرائق الميكانيكية	21	
2-1-5-1	الطرائق غير الميكانيكية	22	
2-5-1	فصل المادة الجافة	22	
1-2-5-1	الترشيح	22	
2-2-5-1	الطرد المركزي	22	
6-1	تقدير فعالية الإنزيم	23	
1-6-1	فعالية الانفرتاز : Invertase activity	25	
2	هدف البحث	28	
3	مواد البحث و طرائقه	29	
1-3	جمع العينات	30	
2-3	الكيماويات (البيئات المستخدمة , الكواشف , الأدوات و المواد الكيماوية, الأجهزة المستخدمة)	31	
3-3	طرائق البحث	32	
1-3-3	عزل الخمائر وتشخيصها	32	
1-1-3-3	العزل	32	
2-1-3-3	التشخيص	33	
	تشخيص الخمائر بطريقة شرائح API	33	
2-3-3	تحضير الخميرة لإنتاج الأنزيم	33	
3-3-3	طرائق التحليل	34	
1-3-3-3	قياس كتلة الخلية الجافة	34	

2-3-3-3	تقدير فعالية الانفرتاز	34
4-3-3	أمثلة ظروف إنتاج الانفرتاز	35
1-4-3-3	درجة الحرارة	35
2-4-3-3	التهوية	35
3-4-3-3	تركيز السكروز	35
4-4-3-3	الpH	35
5-4-3-3	مدة التحضين	36
6-4-3-3	مصدر الأزوت المستخدم .	36
5-3-3	التحليل الإحصائي	36
4	النتائج و المناقشة	39
1-4	الخمائر الناتجة	40
2-4	غربلة العزلات	42
3-4	أمثلة ظروف إنتاج الانفرتاز	45
1-3-4	تأثير درجة الحرارة في إنتاج الانفرتاز	54
2-3-4	تأثير الpH في إنتاج الانفرتاز	55
3-3-4	تأثير التهوية في إنتاج الانفرتاز	56
4-3-4	تأثير تركيز السكروز في إنتاج الانفرتاز	57
5-3-4	تأثير مدة التحضين في إنتاج الانفرتاز	58
6-3-4	تأثير مصدر الأزوت المستخدم في إنتاج الانفرتاز.	58
5	الاستنتاجات و التوصيات	60
6	المراجع	63

قائمة الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1	حلمهة السكروز الى غلوكوز و فركتوز بوجود الانفرتاز	4
2	التفاعل الأساسي للانفرتاز	4
3	مكونات خلية الخميرة	9
4	التغير اللوني الحاصل من ارجاع الـ 3,5-dinitrosalicylic acid	26
5	معادلة ارجاع الـ DNS	26
6	منحني قياسي للفعالية الإنزيمية للانفرتاز	42
7	الظروف المثالية لفعالية الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة	53
8	تأثير درجة الحرارة في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة	55
9	تأثير درجة الـ pH في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة	56
10	تأثير سرعة التهوية في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة	56
11	تأثير تركيز السكروز في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة	57
12	تأثير مدة التحضين في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة	58
13	تأثير تركيز اليوريا في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة	59

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
1	بعض الفطور و الخمائر المنتجة للانفرتاز	6
2	التصنيف العلمي لـ *S.cerevisiae* حسب (Wikipedia,2009)	13
3	السكاكرالموجودة في شريحة الAPI الخاصة بالخمائر	20
4	أهم الطرائق المستخدمة في تحطيم جدر خلايا الخميرة	21
5	مصادر ونوع العينات التي عزلت منها الخمائر	30
6	الأجهزة المستخدمة في البحث مع الشركات المصنعة لها	32
7	تراكيز المواد المستخدمة لتحضير المنحني القياسي	34
8	تصميم التجربة Response Surface Mehology(RSM)	37
9	نتائج تشخيص الخمائر باستخدام شرائحAPI و السكريات التي تستقلبها كل خميرة.	40
10	مصادر العينات الحاوية على خميرة الـ *S.cerevisiae* ومكان وجودها	41
11	فعالية الانزيم الداخلي و الخارجي و الكتلة الحيوية الجافة	43
12	نتائج أمثلة ظروف عمل الانفرتاز للعزلة *S.cerevisiae*	46
13	التحليل الاحصائي لتأثير العوامل المدروسة في فعالية الانفرتاز الخارجي	47
14	تحليل التباين لفعالية الانفرتاز الخارجي	48
15	التحليل الاحصائي لتأثير العوامل المدروسة في فعالية الانفرتاز الداخلي	49
16	تحليل التباين لفعالية الانفرتاز الداخلي	50
17	التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات الستة المدروسة في الكتلة الخلوية الجافة	51
18	تحليل التباين للكتلة الخلوية الجافة	52

الملخص

جمعت 30 عينة من مواد سكرية من محافظات سورية (طرطوس , دمشق , حمص) مختلفة لعزل و تشخيص الخمائر فيزيولوجياً باستخدام تقنية الـ API , أظهرت النتائج وجود7 عزلات من *Saccharomyces cerevisiae* . تمت غربلة هذه العزلات المصنّفة حسب نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي الناتج عن كل منها , حيث قدرت فعالية الانفرتاز باستخدام جهاز الطيفي الضوئي عند طول موجة 540nm . فبينت النتائج تباين السلالات المدروسة في فعالية الانفرتاز الناتج عنها حيث كان النشاط الإنزيمي للأنفرتاز الخارجي و الداخلي و كتلة الخلية الجافة الناتجين عن السلالة *Saccharomyces cerevisiae 1* الأعلى لذلك استخدمت هذه العزلة لأمثلة ظروف عمل الانفرتاز داخلياً و خارجياً و إنتاج الكتلة الحيوية باستخدام التصميم الاحصائيResponse Surface Methodology فكانت درجة حرارة و رقم الحموضة و سرعة التهوية و تركيز السكروز و مدة التحضين و اليوريا المثلى على التوالي : 30°م و pH = 5 و 300 د/د و 30 غ/ل و 3أيام و 0.2غ/ل . و كان تأثير درجة الحرارة ودرجة الـ pH وسرعة التهوية معنوي في فعالية الانفرتاز الخارجي و كل من الـ pH و تركيز السكروز و اليوريا في فعالية الانفرتاز الداخلي و الكتلة الخلوية الجافة بالإضافة إلى بعض العلاقات المتداخلة المعنوية بين المتغيرات المدروسة وبين فعالية الانفرتاز الخارجي و الداخلي و الكتلة الخلوية الجافة .

ABSTRACT

Thirty randomized samples of sugar materials were collected from different places (Tartous, Damascus, Homs) in Syria for isolation and identification yeasts . These yeasts were classified morphologically according to Barnett's and physiologically by API technique . Results showed that the isolated materials contained 7 isolated Yeasts from *Saccharomyces cerevisiae* . These isolated yeasts were screened to investigate the activity of internal and external invertase and dry cell mass produced by them by using spectrophotometer at 540nm . The results showed that there were differences in the ability of yeasts to was found the produce invertase activity . *Saccharomyces cerevisiae 1* best yeast for activity of external and internal invertase and dry cell mass .Then the culture conditions of Invertase activity were optimized using statistical design Response Surface Methodology (RSM). The optimum temperature , pH , aeration speed, sucorose concentration , incubation time ,urea were :30°C, 5, 300 rpm, 30 g\l , 3 days and 0.2 g\l respectively .The results of optimization showed that the effect of temperature, pH and aeration speed on external invertase activity and the effect of pH , sucorose concentration and urea on internal invertase activity and dry cell mass were significant , and there were significant interaction effects of some parameters on external and internal invertase activity and dry cell mass.

1- الدراسة المرجعية
Literature review

1- 1- المقدمة Introduction:

الأنزيمات عبارة عن وسائط عضوية ذات طبيعة بروتينية تتميز بقوة تنشيطية وساطية عالية وتقوم بتسريع كثيراً من التفاعلات الكيميائية الحيوية و كذلك عمليات التبادل المختلفة في ظروف أو شروط الخلايا الحية ، تُصنع فقط في الخلايا الحية و تُستخدم داخل الخلايا و خارجها ، و قد انتشر استخدامها على نطاق واسع في الصناعات الغذائية ، و هي كوسائط لا تؤثر على ثابت التوازن ولا على تغيرات الطاقة الحرة للتفاعل ، و لكنها تُسرع التفاعلات الكيميائية بتخفيضها لطاقة التنشيط المطلوبة في بداية التفاعل (~~Bugg, 2004~~الباقوني, 2002) .

تمتلك الأنزيمات خواص متعددة أهمها الفعالية العالية حيث تسرع الأنزيمات التفاعلات الحيوية بشكل كبير , التخصص العالي الدقيق في تسيير التفاعلات الحيوية ، فمثلاً أنزيم السُكراز يفكك السكروز فقط و لا يؤثر على السكريات الثنائية الأخرى كاللاكتوز و المالتوز ، أي إن تأثير الأنزيمات موجه لتحطيم أو تفكيك رابطة كيميائية محددة تماماً , و أيضا عدم الثباتية ضد تأثير تغيرات العوامل المختلفة مثل pH الوسط ، درجة الحرارة ، تفاعلات الأكسدة و الإرجاع وذلك لوجود الشوائب الغريبة حتى و لو كانت بكميات قليلة (الباقوني , 2002) . لم توضح الطبيعة البروتينية للإنزيمات بشكل كافي إلى أن حضّر العالم Sumner بلورات من إنزيم اليورياز و بين أنها بروتين . و بعد ذلك تم بلورة أكثر من 150 إنزيم و عزل أكثر من 1000 بدرجات نقاوة مختلفة. وهذا ليس بكثير عندما تعلم أنه حتى الأحياء الدقيقة مثل *E.Coli* تملك حوالي 3000 بروتين مختلف بينما يصل العدد في خلايا الحيوانات الراقية للملايين (Sumner and Howell, 1935).

كانت تستخلص الإنزيمات في الماضي من النباتات والحيوانات إلا أن إنتاجها بواسطة الكائنات الدقيقة يزداد بسرعة كبيرة و ذلك لسهولة عزلها , وتحسين إنتاجها إما عن طريق التعامل مع جيناتها أو البيئة التي تنمو بها , كذلك عند إنتاج الإنزيمات بواسطة الكائنات الدقيقة عادة ما يكون زمن التخمر قصيرا والوسط الغذائي غير مكلف (Aehle, 2007).

تحتل تكنولوجيا الأنزيمات دوراً هاماً في مجال التصنيع الغذائي في الوقت الحاضر ، حيث توصل الباحثون في هذا المجال إلى إجراء الكثير من التطبيقات الصناعية كرفع كفاءة العمل في بعض الصناعات الغذائية ,تحسين المواصفات الحسية للمنتجات النهائية , تصنيع منتجات جديدة, التخصص العالي الدقيق , و ضبط الكثير من العمليات في الصناعات الغذائية و من الأمثلة على ذلك : أنزيم الاميلاز ينتجه فطر *Aspergillus* ويستعمل في صناعة الغراء وصابون الملابس , إنزيم البروتياز وينتجه الفطر *Aspergillus* ويستعمل في صناعة المنظفات والحبر والغراء والجبن وتطرية اللحم وتنظيف الجروح , إنزيم ستربتوكاياناز وتنتجه البكتيريا

Formatted: Font: (Default) Cambria, 16 pt, Bold, Complex Script Font: Times New Roman, 16 pt, Bold, Kern at 16 pt

Formatted: Font: (Default) Cambria, 16 pt, Bold, Complex Script Font: Times New Roman, 16 pt, Bold, Kern at 16 pt

Formatted: Font: Cambria, 16 pt, Bold, Complex Script Font: 16 pt, Bold, Kern at 16 pt

Formatted: Font: 16 pt, Complex Script Font: Times New Roman, 16 pt

Formatted: Font: Italic, Complex Script Font: Italic

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

Streptococcus يستعمل كعقار مذيب للخثرة الدموية , إنزيم المنفحة (الرينين) وتنتجه بكتيريا *E.coli* المهندسة وراثياً ويستعمل هذا الإنزيم في تصنيع الجبن و إنزيم الانفرتاز و تنتجه *Saccharomyces cerevisiae* و يستخدم إنزيم الانفرتاز تقليديا في إنتاج سكر المحول المستخدم في صناعة السكاكر و المواد الحافظة و في إنتاج حمض اللاكتيك و الايتانول من تخمير مولاس قصب السكر (Aehle, 2007)

و تأتي أهمية السكر المحولأنفرت من احتوائه على فركتوز و غلوكوز بنسب متساوية تقريباً و هو مطلوب أكثر من الغلوكوز النقي كمحلي للأغذية و المشروبات لأن الفركتوز أكثر حلاوة من الغلوكوز (Aehle, 2007).

يعتبر السكروز من أكثر المحليات الطبيعية شيوعاً حيث يستخلص من مصادر عديدة مثل الشوندر السكري و قصب السكري بدون أي تعديل ، يتألف الشوندر السكري من 75% ماء و 16-18% سكروز و 5-6% ألياف شوندر و2-3% مكونات أخرى. يتم استخلاص السكروز من الشوندر بالمعالجة الميكانيكية بدون أي تأثير إنزيمي . يمكن استخدام نشاء الرز أو الذرة و لكن بعد حلمهة النشاء إلى غلوكوز قبل استعماله كمادة محلية . بلغ إنتاج السكر الكلي العالمي في عام 1996-1997 حوالي 113,5 مليون طن و زادت هذه الكمية 30 مليون خلال الـ 10 سنوات الأخيرة (Aehle, 2007) .

1-2- السكر الانفرتمحول:

يحضر السكر المحول سكر الأنفرت من حلمهة السكروز كلياً أو جزئياً إلى غلوكوز (يسمى أيضا ديكستروز) و فركتوز (ليفيولوز) و الذي يتم بتعريضه السكروز لحمض أو لحرارة . يمكن أن يتحول السكروز في شراب سكر الانفرت كليا أو جزئيا . إن مصطلح الانفرت نشأ من تأثير مقياس الاستقطاب المستخدم لتحليل محاليل السكروز(Shankar and Kotwal, 2009).

يستخدم السكر المحول في تعتبر صناعة الخبز و المشروبات و الفواكه المعلبة والحلويات و الألبان هي المستهلك الأساسي لسكر الانفرت , بالياإضافة إلى استخدام شراب عالي الفركتوز في العديد من الصناعات الغذائية الأخرى مثل المربيات و الهلام (الجيليه) .

يعتبر الفركتوز (يعرف أيضا بسكر الفاكهة) السكر الطبيعي الأكثر حلاوة و يوجد في الفواكه و الخضار و العسل , يستجيب الجسم للفركتوز بطريقة مختلفة عن الغلوكوز و السكروز و هو أكثر إشباعا و أحلى بـ 1,8 مرة من السكروز مما يجعله مفيد في الأغذية و المشروبات للمهتمين بالصحة , كما أنه مثالي لأغذية مرضى السكري لأن تأثيره منخفض جداً في غلوكوز الدم و في إفراز الأنسولين (Shankar and Kotwal, 2009).

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

يملك السكر المحولانفرت خواص تفيد في صناعة الأغذية , الحلاوة (السكر المحول -سكر الانفرت أحلى بـ 50% من السكروز) حيث يزيد الوسط الأنفرت المحول (مكون من 50% سكر نقي 50% سكر محولأنفرت) الحلاوة 20% عند المقارنة مع السكر النقي أو الأنفرت النقي وهذه الحلاوة الزائدة تفيد في صناعة المشروبات بنكهة الفواكه حيث تقلل استخدام المحليات الكربوهيدراتية بنسبة 20% إذا تم استخدامها بدل من استبدال السكر العادي بوسط أنفرت. يشار - أحياناً يشار إلى السكر الأنفرت المحول كعسل اصطناعي لأنه يملك التركيب و الخواص نفسها تقريباً.

يستخدم في الدول المتقدمة سكر ال السكر المحولأنفرت أو الشراب المحول الفركتوز المركز كمحلي في صناعة الحلويات و المشروبات و صناعات أخرى و ذلك لفوائدها المميزة كالطعم و النكهة و التركيب . أما في الدول النامية وبسبب قلة المعلومات المتوفرة عن فوائده وقلة الإنتاجه ة و كونو ارتفاع سعره سكر الأنفرت أعلى قليلاً من سعر مقارنة بالسكر العادي لذا فهو قليل الاستخدام فالطلب عليه متعلق بسهولة إتاحته . يعتبر سكر الأنفرت الإنزيمي مُحلي صديق للصحة بالمطلق (يستخدم الانفرتاز لحلمهة السكروز إلى غلوكوز و فركتوزو

من التطبيقات الهامة للسكر المحول لسكر الانفرت هي- (Uma *et al*,2010)[a] :

- الخبز , الكعك , المعجنات :للون قشرة أفضل و لب أطرى وفعالية خميرة أسرع .
- البسكويت: تركيب أفضل و طعم أطيب.
- العسل: لتغذية النحل و يمزج مع العسل, يحد من الفعالية البكتيرية, بديل جيد و نقي كيميائيا للعسل.
- الشوكولا, الحليب المكثف ,المربى ,الجيليه .....الخ
- الصناعات الدوائية : يستخدم لشراب السعال ويعتبر الغلوكوز الفركتوز سوائل رئيسية للحقن الوريدي
- المشروبات بما فيها المشروبات الغازية
- أغذية الأطفال

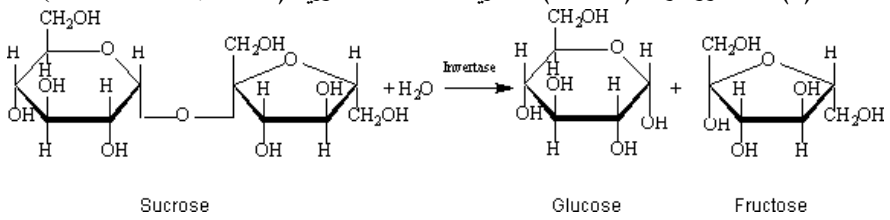
1-3- الانفرتاز :

يعد الانفرتاز من الإنزيمات التي عرفت باكراً و درست موسعاً , فلقد عمل Berthelot عام 1860على تنقية الإنزيم المحلمه للسكروز من الخميرة واسماه enzyme ferment inversif بسبب القلب الحاصل بالدورة الضوئية عند حلمهة السكروز. أطلق عليه فيما بعد

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

أسماء عديدة مثل Invertase, Sucrase, Saccharase, Sucrose glycosidase و مؤخراً fructofuranosidase (EC3.2.1.26) ~~ß= . كما شرحت فعالية الانفرتاز في الخمائر, الفطور, بكتريا عديدة, نباتات و الحيوانات الراقية (Sumner and Howell, 1935).~~

يحفز الانفرتاز حلمهة السكروز إلى غلوكوز و فركتوز (السكر ~~الانفرت~~ المحول) كما يبين الشكل (1) , الايزوميرات (مماكبات) للسكريات الثلاثية الكيتوزية (Aranda *et al*, 2006)



الشكل (1) : حلمهة السكروز الى غلوكوز و فركتوز بوجود الانفرتاز .

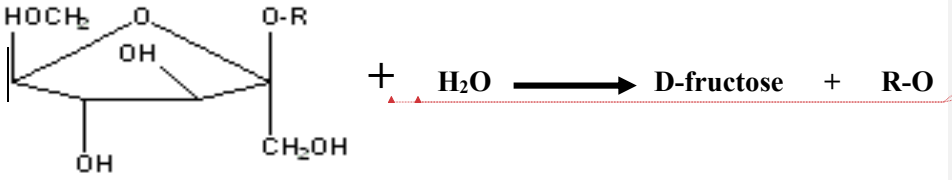
يفكك الانفرتاز الروابط β,1-2 الغلوكوزيدية بين جزيئاتD–α غلوكوز وD–β فركتوز للسكروز . (Barlikova *et al*, 1991) كما ~~انه~~ أنه يحلمه ß– فركتوزات مثل الرافينوز إلى سكريات بسيطة. ~~يعتبر السكروز أفضل مصدر للكربون للإنتاج الحيوي لإتاحة الغلوكوز للخميرة . (Nakano *et al*, 2004)~~

إن التفاعل الأساسي للانفرتاز هو حلمهة نهايات الـ β-fructofuranosides الطرفية غير المرجعة في الـ β- fructofuranosides كما في الشكل (2) .

يمكن لإنزيم α–D– غلوكوزيداز المنفصل من وحدة الغلوكوز الطرفية أن يحفز هذا التفاعل أيضا , كذلك يمكن للسكروز أن يتحلمه بسهولة نسبياً في بيئة حمضية بدون مساعدة الانفرتاز إلا أن الغلة تكون منخفضة جداً والمفتاح للإنتاج المستمر للسكر ~~الانفرت~~المحول المركز هو إنزيم نوعي ~~باستخدام خلايا خمائر مثبتة في قوالب لاعضوية غير ذوابة~~كالانفرتاز (Aranda *et al*,2006).

~~يوجد الانفرتاز ضمن مستنبت الخميرة نفسها بأكثر من شكل فمثلا الانفرتاز الداخلي وزنه الجزيئي 135000 دالتون بينما الوزن الجزيئي للانفرتاز الخارجي 270000 دالتون.وعلى عكس معظم الإنزيمات يوجد الانفرتاز وبفعالية عالية نسبياً في مجال واسع من الحموضة (pH 5,5 3,5 والمثالي بحدود 4,5) وتصل فعالية الإنزيم حدها الأعظمي عند الدرجة 55 مْ . إن قيم ميكاليس ومنتن لمعظم الإنزيمات بين 2 5-mM , و قيمة ميكاليس و منتن للإنزيم الحر نموذجيا بحدود 30mM. إن~~ يعد استخدام الانفرتاز محدود نسبياً بسبب وجود بعض الإنزيمات مثل

الغلوكوز ايزوميراز الذي يستخدم في تحويل الغلوكوز إلى فركتوز وهو أرخص من الانفرتاز و لكن لأسباب تتعلق بالصحة والذوق يتطلب استخدام الانفرتاز النقي جداً في صناعة الأغذية (Aranda *et al*,2006).



الشكل(2): التفاعل الأساسي للانفرتاز

~~يعتبر الانفرتاز الذي يحلمه السكروز ذو أهمية بالغة في الوقت الحاضر بسبب تطبيقاته البيوتكنولوجية المتنوعة في صناعة الحلويات , المشروبات , المخبوزات و التركيبات الدوائية الأخرى , كما~~

يدخل الانفرتاز في الصناعات الغذائية مثل صناعة الحلويات , المشروبات , المخبوزات و في العديد من التركيبات الدوائية حيث يفضل الفركتوز على السكروز لأن الأول أكثر حلاوة و لا يتبلور بسهولة و خاصة في تحضير المربيات والسكاكر (Aranda *et al*,2006; Shankar and Kotwal, 2009 ; Uma *et al*,2010[b])

و من الأمثلة على ~~للانفرتاز الانفرتاز~~ التطبيقات التجارية ~~واسعة تشملهي~~ إنتاج الحلويات المغطاة بالشوكولا والمحتوية على الحشوات الطرية حيث تصنع هذه الحشوات بإضافة كمية قليلة جداً من الانفرتاز إلى السكروز (حوالي 100U\kg ,0,3ppm (و/و) المتبلور و الدقيق , فعند هذا المستوى المنخفض من الإنزيم تكون حلمهة السكروز بطيئة مما يسمح ببقاء اللب صلب فترة كافية تسمح بتغطيته بالشوكولا بشكل كامل , خلال بضعة أيام أو أسابيع يتحلمه السكروز والزيادة بالانحلالية تجعل الحشوة طرية أو سائلة و ذلك حسب محتواها من الماء (Brink, 2008) .

كما يستخدم الانفرتاز في الصناعات الدوائية مثل الحبوب المساعدة على الهضم, حليب البودرة للأطفال و أغذية الأطفال الأخرى , و له استخدام في تخمير مولاس قصب السكر إلى ايتانول وكمانع لتبلور المولاس المركز, في صناعة العسل الصناعي ، في صناعة الأعلاف وغذاء نحل العسل (~~في الصناعات الدوائية مثل الحبوب المساعدة على الهضم, حليب البودرة للأطفال و أغذية الأطفال الأخرى~~ Weber and Roitsch 2000; Sanchez *et al*,2001).

يمكن إنتاج السكر المحول ~~(أنفرت)~~ الذي يستخدم في صناعة الأغذية على نطاق واسع مثل المشروبات و الحلويات بطريقة كيميائية (باستخدام الحمض كمحفز) و التي تعتبر غير

Formatted: Italian (Italy)

Formatted: Italian (Italy)

Formatted: Justified, Don't adjust space between Latin and Asian text, Don't adjust space between Asian text and

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

اقتصادية و ذلك بسبب انخفاض كفاءة التحويل (65-70%) و استهلاك طاقة كبيرة و ارتفاع المحتوى من الرماد كما انه يؤدي إلى إدخال ملوثات بسبب صعوبة ضبط الظروف خلال عملية الحلمهة و إضافة لكونهو غير مرغوب بالمنتجات لامتلاكه ميزة عدم التحلية . حالياً تفضل الطريقة البيوكيميائية (الإنزيمية) لأنها تؤدي لمنتجات أقل تلوناً و ملوحةً ولا تنتج بولميرات كناتج ثانوي (Bergamasco *et al*, 2000; Akgol *et al*, 2001; Sanchez *et al*, 2001; Bayramolu *et al*, 2003) إلا أن الحلمهة الإنزيمية أغلى من الحمضية بسبب ارتفاع ثمن الانفرتاز , ولخفض تكلفة المنتج النهائي اعتبر تطبيق الانفرتاز المجمد حل مناسب و للإنزيم المجمد مزايا عديدة حيث يمكن إعادة استخدامه عدة مرات و يبقى محافظ على فعاليته , يقي التجميد فعالية الإنزيم من الظروف غير الملائمة . يمكن فصل و إنعاش الإنزيم بسهولة حيث يمكن استخدامه في نظام مستمر لإنتاج الشراب المحول من محلول السكروز , كما يخفض تطبيق الإنزيم المجمد من تكاليف العملية (Mansour and Dawoud, 2003; Hseih *et al*, 2000 ; Agkol *et al*, 2001 ;Abdellah *et al*, 1992) .

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

1-4- الكائنات الحية المنتجة للانفرتاز:

يوجد الانفرتاز في نباتات عديدة و بأشكال متعددة (Obenland *et al,* 1993) حيث تحوي جذور و ساق الجزر على الانفرتاز غير المنحل في جدرها الخلوية كما يوجد الانفرتاز المنحل في السيتوبلاسم (Unger *et al* , 1992) , أما انفرتاز العنب فيوجد بالشكلين المنحل و المرتبط (المقيد) (Porntaveewat *et al* ,1994). تشكل الكائنات الحية الدقيقة مجال واسع لإنتاج الانفرتاز حيث تستخدم السكروز كمصدر غذائي لها. تنتج العديد من الأحياء الدقيقة الانفرتاز كما هو موضح في الجدول التالي .

الجدول(1):بعض الفطور و الخمائر المنتجة للانفرتاز

الخمائر المنتجة للانفرتاز	الفطور المنتجة للانفرتاز
Candida utilis	*Fusarium oxysporium*
Saccharomyces cerevisiae	*Phytophthora meganosperma*
Schizosaccharomyces pombe	*Aspergillus niger*
Schwanniomyces occidentalis	*Neurospora crassa*
Saccharomyces carlsbergensis	

إلا أن الإنتاج التجاري له يعتمد على سلالات الخمائر *Saccharomyces cerevisiae*

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

. (Silveira *et al*, 2000[a]; Herwig *et al,* 2001; Belcarz *et al*, 2002.)

Formatted: French (France)

1-4-1- لمحة عن الخمائر (Yeasts):

تتبع الخمائر Yeasts الفطريات Fungi أساساً لكنها تدرس في قسم منفصل لأهميتها الخاصة و هي عبارة عن فطريات وحيدة الخلية لا تكوّن ميسيليوم مثل الفطريات الأخرى و إنما توجد كخلايا مفردة .

1-4-1-1- الصفات العامة للخمائر:

الخمائر عبارة عن كائنات وحيدة الخلية، ولا تكوّن خيوطاً إلا في حالات خاصة. تتكاثر معظمها خضرياً بالتبرعم Budding ولكن قليلاً منها يتكاثر بالانقسام الثنائي البسيط ,لخلية الخميرة شكل كروي أو بيضوي وقد تكون بشكل ثمرة الليمون أو اسطوانية أو مستطيلة. تستطيل بعض أنواع خلايا الخمائر مكونة جسماً خيطياً حقيقياً أو غير حقيقي.

تكوّن الخمائر ذات المشيجة على البيئات " الأوساط الزرعية " الصلبة نمواً يشبه الفطريات يصعب غالباً تمييزه عن فطريات العفن ، أما الخمائر وحيدة الخلية النموذجية فإنها تكوّن مستعمرات تشبه كثيراً المستعمرات التي تكوّنها البكتيريا .

تنمو الخمائر الغشائية Film yeasts على البيئات أو الأوساط الغذائية السائلة على السطح وتبقى عادة في هذا الوضع حتى ينكسر الغشاء أو يغوص عندما يثقل وزنه , وهناك خمائر أخرى تسمى بالخمائر السطحية أو القمية Top yeasts تتجمع خلاياها في كتل تطفو بفعل ارتباط فقاعات الغاز CO2 بجدار خلايا الخميرة ويدفع بها إلى ارتفاع قريب من سطح السائل المتخمر , أما النوع الثالث من الخمائر يعرف بالخمائر القاعية "خمائر القعر Bottom yeasts حيث تنفصل البراعم المتكونة عن بعضها البعض وتسقط في قاع السائل المتخمر ، ويكون معظم نتاجها هو الكحول الإيتيلي " الايتانول " مع جزء قليل من غاز ثاني أكسيد الكربون Co_2 ، وتشمل هذه الخمائر معظم الخمائر المستخدمة في الصناعة ، فالجنس *Saccharomyces* يمثل الخمائر التي تنتج الكحول الإيتيلي ، حيث تستخدم بعض سلالات الخميرة *S. cerevisiae* ذات الخلايا الدائرية في صناعة البيرة ، في حين تستخدم سلالات أخرى من الخميرة *S. cerevisiae var. ellipsoideus* ذات الخلايا البيضاوية في صناعة النبيذ .

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

تقوم الخمائر الغشائية بوجه عام بأكسدة الأغذية العضوية مثل: السكريات و الكحولات و الحموض العضوية منتجة منها غاز ثاني أكسيد الكربون Co_2 و مؤدية إلى بعض التغيير في المواد الغذائية من ناحية الطعم والرائحة والشكل وتسمى مثل هذه الخمائر بالخمائر الكاذبة False yeasts و أحياناً يطلق عليها الخمائر الوحشية Wild yeasts , أما الخمائر القاعية والسطحية فإنها عادة تخمر الأغذية الكربوهيدراتية منتجة غاز ثاني أكسيد الكربون Co_2 وكميات متفاوتة من الكحول الإيتيلي , فالخمائر المخمرة(السطحية و القاعية) فهي ذات أهمية كبيرة في صناعة الخبز والمشروبات الكحولية والإنتاج الصناعي للكحول الإيتيلي ويطلق عليها اسم الخمائر الحقيقية True yeasts (صادق ,2004).

1-4-1-2- تركيب خلية الخميرة (Wikipedia, 2009):

الخمائر عبارة عن مجموعة كبيرة غير متجانسة من الكائنات الحية الدقيقة ، وعدد قليل منها صغير الحجم لا تزيد بحجمها عن حجم البكتيريا.

1-الجدار الخلوي :

يحيط بالخلية جدار خلوي يحدد شكلها , يحمي السيتوبلاسم Cytoplasm من المؤثرات الخارجية , ويسمح بمرور بعض المواد دون غيرها , وقد يكون الجدار الخلوي رقيقاً لا يتميز إلى طبقات ، أو قد يكون سميكاً متميزاً إلى ثلاث طبقات. وتختلف هذه الطبقات عن بعضها بالتركيب الكيميائي .

و تتألف الطبقات الثلاث كما يلي :

أ- الطبقة الخارجية Outer stratum :وتتكون أساساً من المانان Mannan"yeast gum" مع كميات محدودة من الكيتين Chitin .

ب- الطبقة الوسطى Middle stratum : تتكون من الغلوكان Glucan "yeast cellulose ".

جـ - الطبقة الداخلية Inner stratum : وتتكون من مواد بروتينية وتبقى محيطة بالغشاء السيتوبلاسمي .

2- الغشاء السيتوبلاسمي :

و هو جدار رقيق يلي الجدار الخلوي ويتكون أساساً من البروتينات الدهنية Lipoprotein ، وهو غشاء شبه نفوذ ينظم مرور المواد الغذائية الذائبة بالبيئة وخروج نواتج عمليات الإستقلاب الخلوي.

3- الشبكة الإندوبلاسمية :

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

توجد الشبكة الإندوبلاسمية في السيتوبلاسما ، وهي تشبه تلك الموجودة في الخلايا النباتية والحيوانية ، وترجع أهميتها لكونها تلعب دوراً هاماً في عملية التبرعم .

4- الحبيبات الدهنية :

توجد في السيتوبلاسما و تحتوي بعض أنواع الخمائر على نسبة عالية من المواد الدهنية تصل إلى 50 % من الوزن الجاف و تستخدم بعضها في إنتاج المواد الدهنية . و تختلف كمية المواد الدهنية باختلاف ظروف التنمية.

5- الفجوة :

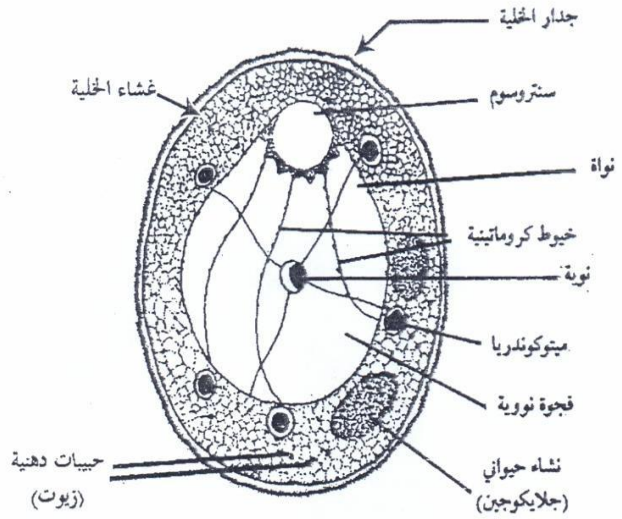
تتوضع في داخل خلية الخميرة فجوة كبيرة يوجد عند احد أطرافها جسم صغير كثيف وهو النواة , وتظهر الفجوة كجزء شفاف عند فحصها بالمجهر الضوئي , وتشغل جزء كبير من الخلية . وقد توجد فجوة واحدة كبيرة أو عدة فجوات صغيرة ذات حجم متماثل. وتحتوي الفجوة على مواد دهنية (لبيدات) و فوسفات , كما أنها تحتوي على إنزيمات الحلمهة (التحلل المائي) مثل أنزيمات البروتياز وأنزيمات الاستيراز , وإذا ما تحررت هذه الإنزيمات من الفجوة إلى السيتوبلاسما نتيجة لتعرض الخلايا لظروف غير مناسبة (مثل ارتفاع درجة الحرارة إلى 50°c) فإنها تسبب تحليل الحموض النووية والبروتينات الكربوهيدرات وتسمى هذه العملية بالتحلل الذاتي Autolysis .

6- الجسيمات الكوندرية (الميتوكوندريا) :

هي جسيمات في السيتوبلاسما وتعطيها المظهر الحبيبي . وتحتوي على أنزيمات الأكسدة و الإرجاع ويتراوح عددها بالخلية بين (4-24) موزعة قريبا من الغشاء السيتوبلاسمي .

7- النواة :

يطلق عليها البعض المواد النووية وهي محاطة بغشاء نووي مثقب وتتوضع ملامسة للفجوة , ولكن أثناء التبرعم فإنها تكون موجودة بين الفجوة والبرعم المتكون , حيث تنقسم النواة بالاستطالة إلى نواتين تتحرك إحداهما إلى البرعم و تظل الأخرى في الخلية الأم .



Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

الشكل (3) : مكونات خلية الخميرة

1-4-1-3- تكاثر الخمائر حسب (كشتعاري و صادق , 2005) :

1-التكاثر الخضري (اللاجنسي) :

1- التبرعم (البرعمة) : وهو الطريقة الأكثر شيوعا لتكاثر الخمائر خضريا (لاجنسيا) , حيث يبرز بعض بروتوبلازما الخلية خارج الجدار (يتكون نتوء أو تمدد في الخلية الأصلية) , ثم لا يلبث أن ينمو البرعم و يصبح مماثلا للخلية الأم ثم ينفصل عن الخلية الأم .

2- الانقسام الثنائي البسيط :ويشبه عملية الانقسام البسيط في البكتيريا , حيث تستطيل خلية الخميرة قليلا ثم يجري الانقسام النووي , وتنقسم الخلية إلى خليتين كل منهما تحوي نواة وسيتوبلاسما .

3- الأبواغ الكلاميدية : في المزارع القديمة تكون خلايا بعض الخمائر جدران سميكة و تصبح ممتلئة بالمادة الغذائية . ثم تذهب في طور من السكون الظاهري , وتسمى هذه الأبواغ الكلاميدية وهي أكثر مقاومة للجفاف من خلايا الخميرة الخضرية , وعندما تتوفر الظروف المناسبة فان هذه الأبواغ تنبت مكونة خلية خضرية واحدة جديدة بدون تكاثر .

4- الأبواغ المتبرعمة : تكوِن بعض الخمائر المكونة للمشيجة (الخمائر التي باستطاعتها تكوين الميسيليوم) أبواغ بيضاوية أو كروية في نهاية الهيفا شبيهة بالبراعم .

5- أبواغ مفصلية : وهي نوع ثالث من الأبواغ اللاجنسية تكونها الخمائر المكونة للمشيجة والتي تنتج بتكسير إحدى الهيفات المقسمة .

2-التكاثر الجنسي:

يبدو أن جميع الخمائر التي تكون أبواغ زقية (أبواغ أسكية) تتكاثر بالطرائق الجنسية , ويوجد نوعان أساسيان للخمائر المكونة للأبواغ الزقية :

1- خمائر خلاياها الخضرية أحادية الكروموزومات (أحادية الصيغة الصبغية): وتسمى Haploid (نصف عدد الكروموزومات التي توجد في الأبواغ الجنسية) . وتتكون الأبواغ الجنسية عند اتحاد (تزاوج) خليتين, وتبقى الأبواغ ثنائية الكروموزومات داخل الزق (كيس أسكي) إلى أن تنقسم عند الإنبات لتكون خلايا خضرية أحادية الكروموزومات .

2- خمائر خلاياها الخضرية ثنائية الكروموزومات (ثنائية الصيغة الصبغية Diploid)

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

: عندما يحدث الانقسام النووي داخل الخلية تتكون نويات تحتوي على نصف عدد الكروموزومات العادي . ثم تحاط هذه النويات بجدران وتبقى داخل جدار خلية الأم وتسمى حينئذ بالزق (كيس زقي) . وهذه الأبواغ أحادية الكروموزومات التي تصبح – عندما تبرز من الزق – خلايا خضرية ، وفي بعض الحالات ينتفخ الزق وتنطلق منه الأبواغ الأحادية التي تتحد فيما بينها مكونة لخلايا خضرية ثنائية الكروموزومات . يعتبر هذا النوع الأكثر شيوعاً بين الخمائر ذات الأهمية الاقتصادية مثل : *Saccharomyces cerevisiae*

1-4-1-4- العوامل البيئية (الطبيعية– الكيميائية) المؤثرة على نمو الخمائر (Brink, 2008) :

يتأثر نمو الخمائر و تكاثرها بعدة عوامل كما هو الحال في فطريات العفن , فالرطوبة , درجة الحرارة , الأوكسجين , الضغط الحلولي , نوع الغذاء والمواد المانعة للنمو كلها عوامل لها أثر كبير على نمو وتكاثر الخمائر .

1- درجة الحرارة :

تنمو الخمائر جيداً بدرجات حرارة معتدلة تتراوح بين (25-35 °c). وهذا لا يمنع من نمو بعض الأنواع الأخرى بدرجات حرارة متفاوتة تتراوح بين الصفر و درجة 37 °c .

2- الحموضة (pH):

تتمكن خلايا الخميرة من النمو في بيئة (وسط) حامضية . وقد وجد أن درجة الحموضة المثلى لنمو الخمائر تقع في المجال (4-4,5) رغم أن بعضها يمكنه أن ينمو في المجال (3-7)

3- التهوية :

يمكن تصنيف الخمائر حسب احتياجها من الأوكسجين إلى نوعين :

قسم منها ينمو و يتكاثر بوجود الأوكسجين يطلق عليه هوائي , و القسم الآخر ينمو و يتكاثر بغيابه و يطلق عليه لاهوائي. و الخمائر منها ما هو هوائي إجباري مثل الجنس *Cryptococcus* وتسمى الخمائر المؤكسدة Oxidative yeasts أو لاهوائي اختياري Facultative anaerobea مثل الجنس *Saccharomyces* الذي تستطيع أنواعه تحليل السكريات تحت ظروف هوائية أو لاهوائية .وتسمى عملية تحليل السكريات تحت ظروف لاهوائية التخمر Fermentation ويطلق على هذه الخمائر اسم الخمائر المخمرة .

4- متطلبات الخمائر الغذائية :

تعتبر تغذية الخمائر من أهم الموضوعات لاسيما تلك السلالات المهمة صناعياً وقد أدى التغير في تركيب البيئات الصناعية (معروفة التركيب) إلى معرفة أهمية المواد الغذائية في نمو وتكاثر هذه الكائنات الحية الدقيقة , إن الخمائر كائنات حية دقيقة غيرية التغذية (غير ذاتية)

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

Heterotrophic أي أنها تحصل على الطاقة اللازمة لها من تحليل المواد العضوية و هي تحتاج إلى مواد أساسية لابد من توافرها للحصول على النمو المثالي مثل الكربون و الأزوت (النتروجين) وبعض الأملاح وعوامل النمو , تستخدم الخمائر الكربون العضوي كمصدر للكربون, وتفضل الخمائر السكريات مثل سكر الغلوكوز (سكر العنب) والسكروز (سكر القصب) و الفركتوز (سكر الفواكه) , وأنواع قليلة جداً من الخمائر يمكنها تحليل بعض المواد العضوية المعقدة مثل النشاء .أما بالنسبة لمصدر الأزوت (النتروجين) فتستخدم الخمائر المصادر غير العضوية مثل كبريتات الأمونيوم .

1-4-1-6- تصنيف الخمائر:

قسمت الخمائر إلى:

1-الخمائر الزقية : وهي الخمائر القادرة على تكوين أبواغ زقية داخل الزق و أهم الأجناس التابعة لها *Saccharomyces* - *Schizosaccharomyces*

2- الخمائر الدعامية :

3- خمائر *Sporobolomycetaceae* : تشكل هذه الخمائر أبواغ بالستية تشبه الأبواغ الدعامية لكنها أبواغ لاجنسية

4- خمائر *Cryptoccaceae* : تتبع الفطريات الناقصة لأنها غير قادرة على تشكيل أبواغ جنسية و لا أبواغ بالستية و أهم أجناسها *Candida*

- **الخمائر الزقية (الأسكية)** ***Class: Ascomycetes***

~~*Subclass: iascomycetidae*~~

تعتبر حلقة اتصال بين الفطريات الدنيا والفطريات الزقية الراقية , بسيطة مجهريه الشكل , الأكياس الزقية Asci فيها عارية , لاتكون ثمار زقية , لا توجد الخيوط الزقية المخصبة, معظم أفرادها تعيش مترممة والقليل منها متطفل , تتضمن 50 جنس و250 نوع موزعة على ثلاث رتب :

1-*Order: Endomycetales*
2- Order: Taphrinales
3- Order: Protomycetales

Order: Endomycetales

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

معظم أفرادها وحيدة الخلية والقليل منها يكون ميسيليوم , تعيش مترممة في المحاليل السكرية أو على الثمار ويندر وجودها في التربة والبعض الآخر يعيش متطفل على النباتات والحيوانات , خلال التكاثر الجنسي يتم الاندماج البلازمي ثم الاندماج النووي بين خليتين خضريتين أو حافظتين مشيجيتين أو بين بوغتين زقيتين وتتكون اللاقحة التي تكون فيما بعد الكيس الاسكي وقد يتكون الكيس الاسكي مباشرة من الخلية المفردة بالتوالد البكري ، الأكياس الأسكية عارية حيث لا تكون الثمار الزقية , تضم حوالي 45 جنس يتبعها 150 نوع موزعين في ست فصائل ذات خصائص مميزة لكل فصيلة.

Family: Saccahromycetaceae

خصائصها

الخمائر الحقيقة ***True Yeast*** , تتكون من خلايا منفردة *Unicellular* أو في سلاسل مكونة غزل فطري كاذب *Pseudomycelium* , تنتشر في المواد الغذائية ورحيق الأزهار وإفرازات الأشجار كما توجد في التربة, تعيش إما مترممة أو متكافلة أو متطفلة على النبات أو الإنسان أو الحيوانات , تتكاثر بالتبرعم سواء كانت وحيدة الخلية أو خيطية , في حالة الخلية المفردة يظهر موضع الاتصال على الخلية الأم ندبة البرعم *Bud scar* يقابلها في الخلية الجديدة ندبة الميلاد *Birth scar* عدد ندبات التبرعم يدل على عدد مرات الانقسام , في حالة الخمائر المكونة مغزل فطري كاذب *Pseudomycelium* تتكون أبواغ متبرعمة *Blastospores* , ينتج عن التكاثر الجنسي تكون كيس زقي واحد *Ascus* وليس مجموعة من الأكياس الزقية *Asci*,تختلف الأبواغ الزقية (الأسكية) في الشكل حسب الأنواع فهناك أبواغ قبعية و أبواغ مستديرة أو إبرية

الجنس *Saccharomyces*

يعتبر هذا الجنس من أهم الأجناس التابعة لفصيلة *Saccharomycetaceae* , يتبعه حوالي 41 نوع تستخدم الصفات الفيزيولوجية للتمييز بينها و أشهرها *Saccharomyces cerevisiae* , أنواع هذا الجنس لا تحتوي على ميسيليوم , تكون خلايا فردية مستديرة أو بيضية حيث تتصل ببعضها مكونة سلاسل من الخلايا مكونة الغزل الفطري الكاذب.

Formatted: Font: (Default) Calibri, 14 pt, Complex Script Font: Simplified Arabic, 14 pt

1-4-2- الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*

الجدول (2) : التصنيف العلمي لـ *S.cerevisiae* حسب (Wikipedia,2009)

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

Kingdom:	***Fungi***
Phylum:	***Ascomycota***
Subphylum:	***Saccharomycotina***
Class:	***Saccharomycetes***
Order:	***Saccharomycetales***
Family:	***Saccharomycetaceae***
Genus:	***Saccharomyces***
Species:	***S. cerevisiae***

إن كلمة *Saccharomyces* مشتقة من اليونانية و التي تعني خميرة السكر أو فطر السكر و Myco تعني الفطر و *cerevisiae* كلمة لاتينية تعني البيرة , كما إن هنالك تسميات أخرى لهذه الخميرة مثل Brewer's yeast- Ale yeast – Top fermenting yeast - Baker's yeast -_ Budding -yeast ~~(Barry,1982)~~ .

عزلت هذه الخميرة لأول مرة من قشور ثمار العنب على شكل غشاء رقيق و هي من الخمائر المتبرعمة خلاياها دائرية إلى بيضوية (قطرها 5-10 ميكرون) . يوجد شكلين لخلايا الخميرة: الأول أحادي الصيغة الصبغية وتكون دورة حياتها وانقساماتها بسيطة , ولكن سرعان ما تموت عندما تتعرض لظروف غير مناسبة , والثاني ثنائي الصيغة الصبغية تكون دورة حياتها بسيطة من حيث الانقسام والنمو , ولكن تنقسم وتشكل أبواغ أحادية والتي تنطلق بدورها لتندمج و تشكل خلايا ثنائية عند الظروف القاسية

. (Volk and Galbraith, 2002)

1-4-2-1- المتطلبات الغذائية:

- كل سلالات الـ *Saccharomyces cerevi~~s~~iae* يمكنها النمو هوائياً على الغلوكوز و المالتوز و التريليوز وتفشل بالنمو على اللاكتوز والسليبيوز و تتوقف قدرة الخميرة على استخدام السكريات المختلفة حسب ظروف التهوية فبعض السلالات لا يمكنها النمو لا هوائيا على السكروز والتريليوز (Madigan and Martinko, 2006)
- كل السلالات قادرة على استخدام الأمونيا واليوريا كمصدر وحيد للنتروجين, ولكنها غير قادرة على استخدام النترات لعدم قدرتها على اختزالها إلى أيون الأمونيوم. يمكن أن تستخدم أيضا معظم الحموض الامينية و بعض الببتيدات كمصدر للنتروجين (الليسين, غليسين, هيستيدين, سيستيئين لا تستخدم بسهولة) (Madigan and Martinko, 2006) .
- لا تفرز الـ *Saccharomyces cerevi~~s~~iae* البروتياز لذا لا يتم استقلاب البروتين خارج الخلية.

Formatted: Right

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

– إن معظم العناصر المعدنية تدخل في تركيب خلايا الخميرة أو تؤثر في نشاطها الأنزيمي ، و من أهم العناصر المعدنية والعناصر النادرة في عملية النمو الفوسفور , الكبريت , الصوديوم , البوتاسيوم , الكالسيوم , المغنزيوم , الليثيوم , البروم , الفلور ,الألمينوم المنغنيز , الحديد , الكوبالت , اليود , الزنك , النحاس . تقوم خميرة الخبز بإنتاج الفيتامينات ا B1 , B2 , B5 , D.أما الفيتامينات :B3 , B8 , B9 , B12 فتحتاجها الخميرة بكميات قليلة و يؤدي فيتامين H دوراً مهماً في تفاعلات تبادل الكربوهيدرات والمواد الدسمة والحموض النووية (Jorgensen *et al* , 2002) .

1-4-2-2- أهمية خميرة الخباز:

تعتبرال *S. cerevi**s**eiae* كائن حي نموذجي في أبحاث علم الأحياء و خاصة في الدراسات الوراثية وذلك لأنها :

1- كائن حي وحيد الخلية, صغير مع فترة تكاثر قصيرة (1,5-2 ساعة عند حرارة 30 مْ) , سهولة تنميته , هذا كله يسمح بالإنتاج السريع و بحفظ العينات بتكاليف منخفضة .

2- قدرتها على التكيف مع الظروف المختلفة من خلال:

- قدرتها على النمو هوائياً والتخمر اللاهوائي , كما يمكنها الحياة في البيئة قليلة الأكسجين لفترة من الزمن .
- قدرتها على التكاثر الجنسي واللاجنسي .
- قدرتها على التحول (أحادية و ثنائية الصبغيات) سهّل إنتاج سلالات قوية وراثياً (إما بإضافة أو حذف جينات بواسطة التحسين الوراثي) .
- التركيب الخلوي معقد كالنباتات و الحيوانات (حقيقيات النوى) و لكن مع انخفاض في نسبة الـ DNA غير المشفر الذي يربك الباحثين في الكائنات الراقية (Volk and Galbraith, 2002; Osley and Norris, 2007) .
- الأبحاث على هذه الخميرة ذات فائدة اقتصادية حيث تستخدم في الصناعة كالبيرة, النبيذ, تخمير الخبز...الخ (Stella *et al*,2007) .

1-4-2-3- التطبيقات البيوتكنولوجية لخميرة الخباز :

إن أقدم تطبيق بيوتكنولوجي للأحياء الدقيقة هو إنتاج الخبز و البيرة و النبيذ بواسطة خمائر الـ*Saccharomyces* حيث وجدت هذه الكائنات في أرغفة خبز قديمة مصرية تعود

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

للألف السادس قبل الميلاد , بينما أظهرت الدلائل الأثرية إن نوع من النبيذ كان يستهلك في الصين قبل الألف السابع قبل الميلاد (McGovern *et al*,2004) . بالإضافة إلى التطبيقات القديمة للأحياء الدقيقة مثل خمائر الـ *Saccharomyces* تعتبر اليوم أساسية لإنتاج المواد الكيماوية الدقيقة (Van Maris *et al*, 2006).

يحدث تفاعل تخمر السكر بوساطة الـ *Saccharomyces cerevisiae* كالتالي :

غلوكوز + ماء ⟵ ايتانول + ثاني أكسيد الكربون

عند صناعة الخبز يكون CO_2 هو الناتج الأكثر أهمية حيث ينطلق الغاز ويرتفع الخبز , أما الكحول الإيتيلي الناتج يتبخر بسرعة عند الخَبز . وعند صناعة البيرة والنبيذ يكون الكحول هو الناتج الأهم ومع ذلك فان CO_2 يستخدم في صناعة البيرة والشمبانيا لتشكيل الفقاعات و الرغوة المحببة(Volk and Galbraith, 2002) .

يستخدم النوع نفسه *Saccharomyces cerevisiae* في كلا العمليتين ولكن باستخدام سلالات مختلفة . عادة ما تنتقى سلالات صناعة الخبز لإنتاج الكثير من CO_2 والقليل جداً من الكحول, بينما يتطلب ~~يحدث العكس في انتقاء سلالة~~ إنتاج المشروبات الكحولية سلالات خاصة بها(~~Stolc and~~ Madigan and Martinko, 2006;) .

~~ربما اكتشف هذا التخمر وأعيد اكتشافه مرات عديدة وأنتج أنواع مختلفة ومتباينة من الأغذية المختمرة و بالإضافة إلى تنوع هائل بالمشروبات الكحولية.~~

تعتبر الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* هي الكائن الحي الدقيق المختار لإنتاج الانفرتاز بسبب قدرتها العالية على تخمير السكروز , و قابليتها العالية جداً لإفراز الانفرتاز لذا استخدمت في إنتاجه

(Vrabel *et al*, 2003; Silveira *et al*, 2000[b] ; Shafiq *et al*, 2005). إن الانفرتاز الناتج من هذه الخميرة هو غليكوإنزيم يحوي على N- and O-linked mannoses بنسبة40/1

.(Gomez *et al*, 2000)

1-4-2-4- أشكال الانفرتاز في الخميرة:

معظم يوجد الانفرتاز في خلايا الخميرة ~~خارجي~~ (خارج الغشاء السيتوبلاسمي) , و كمية قليلة منه تقع داخل الغشاء و ليس من السهل وصول الركيزة إليه. قد يوجد الانفرتاز بالشكلين في *Saccharomyces* ssp. : الانفرتاز الصغير الداخلي(غليكان إنزيم وهو non-glycosylate)

Formatted: Right

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

وزنه الجزيئي 135,000 Daltons بينما الكبير (مانوبروتين) وزنه الجزيئي 270,000 Daltons. يحوي 50%مانوز و 3%غلوكوزامين وزناً .(Hun Yi, 1997; Li *et al*, 1998)

يتركز الغلوكوبروتين في جزء~~حجم~~ صغير من الفراغ الموجود بين الغشاء السيتوبلاسمي و الجدار الخلوي الخارجي حيث يقوم الانفرتاز بوظيفة بيولوجية هامة بتقسيم السكروز خارج الخلية إلى سكريات أحادية يمكن أن تعبر إلى السيتوبلاسم أما في حال غياب الانفرتاز ستجد الخميرة صعوبة في استخدام السكروز كمصدر للطاقة (Timerman, 2010) .

1-4-2-5- تأثير العوامل المحيطة في إنتاج الانفرتاز من الـ *Saccharomyces cerevi~~s~~eiae* :

يرتبط نمو خميرة الخباز كغيرها من الأحياء الدقيقة بظروف الوسط من حرارة و حموضة و تهوية و توفر المواد الغذائية اللازمة لنموها , بالإضافة إلى أن بعض العوامل الخاصة بإنتاج الانفرتاز كوجود الركيزة في الوسط , تركيزها ,مدة التحضين ..... الخ . إن إنتاج الانفرتاز سلوك دوري متزامن مع دورة التبرعم حيث تزداد فعالية الانفرتاز خلال تطور البرعم و عند نضج البرعم وانشطار الخلية (Rouwenhorst *et al*, 1991) .

أ- درجة الحرارة : تصنف خميرة الخبز بكافة سلالاتها من الأحياء الدقيقة المحبة للحرارة المتوسطة ، ويعد المجال 30-29 °c الأمثل للنشاط الأعظمي للخلايا ، وتتناسب سرعة النمو طرداً مع درجة الحرارة في المجال 36-20 °c ، وعكساً في المجال الأعلى من 36 °c وتتوقف عند الدرجة 40°c وتموت نهائياً في المجال50-45°c (Shafiq *et al*, 2004) .

تعتبر درجة الحرارة من العوامل الحرجة التي تؤثر في نشاط الانفرتاز ~~فعندما كانت درجة حرارة وسط التخمير 25 °م وصلت فعالية الانفرتاز الكلي إلى 10,20 u\ml .~~ تم الحصول على النشاط الأعظمي للانفرتاز عند 30 °c و كانت كتلة الخلية الجافة 5,68 ملغ/مل وأدت زيادة درجة حرارة التحضين إلى انخفاض ملحوظ في نشاط الانفرتاز و السبب هو التعطيل الحراري لخلايا الخميرة و بالتالي للإنزيم بالإضافة إلى أنه عند درجات الحرارة العالية ينخفض محتوى الرطوبة لوسط التخمير عن المستوى المطلوب لإنتاج الإنزيم من الخميرة. عند حرارة أقل من 25°c كان نشاط الإنزيم ضعيف وذلك لأن الحرارة هذه غير مناسبة لنمو الخميرة (Shafiq *et al*, 2004) . توصل العالمان(Ikram and Mukhtar, 2006) إلى نفس النتيجة تقريباً حيث تم الحصول على النشاط الأعظمي للانفرتاز (16.10u/ml) عندما كانت درجة حرارة

Formatted: Italian (Italy)

Formatted: Right

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

التحضين 30°c كذلك كانت الكتلة الحيوية الجافة 5,68mg/ml. أدت الزيادة في درجة حرارة التحضين إلى انخفاض في فعالية الإنزيم ويعود السبب إلى التعطيل الحراري لخلايا الخميرة و للانزيم (Nam *et al* ,1997).وكذلك أدت الحرارة العالية إلى خفض المحتوى المائي لوسط التخمير الذي يعتبر ضرورياً لإنتاج الانفرتاز وهذا ينسجم مع نتائج دراسات سابقة اظهرت ان درجة الحرارة 30°c مثالية لعمل الانفرتاز (Vrabel *et al*, 2003; Abrahao-Neto *et al.* 1996). سجلت درجة الحرارة المثالية لفعالية الانفرتاز القابل للانحلال حسب (Migneault I *et al.,* 2004 حوالي 40°c. أما حسب (Vitolo *et al*, 1995)كانت الحرارة المناسبة لخلايا الخميرة لعمل الانفرتاز 30°c .

ب- التهوية : تصنف خميرة الخباز بأنها لاهوائية اختيارياً

تهدف عملية التهوية إلى:

- تأمين الأكسجين باستمرار إلى خلايا الخميرة التي تسبح في الوسط المغذي ، وقد دلت التجارب العملية على أن أي خللٍ في نظام التهوية ينعكس انعكاساً حاداً على سير عملية النمو ومن ثم ينعكس على المردود والنوعية .
- طرح ثاني أكسيد الكربون المتشكل خارج الوسط .
- التخليط والتدوير الذي يحقق تجانساً مستمراً وتوزعاً للمواد المغذية في الوسط
- المحافظة على خلايا الخميرة معلقة في الوسط ، وضمان عدم ترسبها في القاع .

يتضح مما سبق أن كمية الكتلة الحيوية للخمائر اللاهوائية الاختيارية تتعلق بكمية الأكسجين المنحل في الوسط (صادق ,2004).

إن نقص كمية الأكسجين المنحل يدفع الخلايا إلى ممارسة نشاطها اللاهوائي، أي أن كمية الأكسجين المنحل تؤدي دور العامل المحدد لنمو الأحياء الدقيقة ، ليس فقط من حيث تركيز الكتلة الحيوية بل ومن حيث نسبة الخلايا الحية ضمن هذه الكتلة ، وقد ثبت عمليا أن الأكسجين يؤدي أدواراً متعددة وأساسية ، فمثلا عند زيادة الضغط الجزيئي للأكسجين في الوسط تزداد كمية الميتاكوندريا في خلايا الخمائر وتنخفض كمية الأنزيمات المتشكلة وخصوصا أنزيمات حلقة كريبس ، وكنتيجة لتغير نسبة الأكسجين المنحل في الوسط المغذي تتغير سرعة النمو وقيمة ثابت الإشباع عند الأحياء الدقيقة الهوائية والأحياء الدقيقة اللاهوائية الاختيارية وتنخفض نسبة الحموض الطيارة في الوسط (صادق ,2004) .

ت- تركيز السكروز في الوسط : يلعب تركيز السكر الأولي دور هام في تحديد الكمية الناتجة من الإنزيم و السكر الناتج بعد الحلمهة بواسطة *Saccharomyces cerevisiae* (Haq *et al* ,2002) . بما أن السكروز هو الركيزة التي يعمل عليها الانفرتاز لذا فان وجوده في الوسط بالتركيز المناسب ضروري لحث الخميرة على إنتاج هذا الإنزيم. كان النشاط المثالي

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

من الانفرتاز (15,83u/ml) لسلالة *S.cerevi~~e~~siae* المستخدمة من قبل (Haq *et al* , 2002) في الوسط الحاوي على 15 غ/ل سكروز. أدت الزيادة في تركيز السكر إلى انخفاض تدريجي في نشاط الإنزيم و ذلك ربما يعود إلى التبرعم المتكرر للخلايا والتي تنتج وسطاً لزجاً وكمية أقل من السكر وبالتالي يجعل العملية غير اقتصادية و كذلك أدى التركيز المنخفض من السكر إلى نشاط أقل للإنزيم نظراً لتراكم السكريات الأحادية الناتجة عن الحلمهة والتي سببت بدورها منع وجود الانفرتاز. بحث العالمان (Ikram and Mukhtar, 2006) تأثير تركيز السكر في الوسط المغذي في معدل النمو والكتلة الحيوية عند التخمير المستمر لـ *S.~~cerevisiae~~ cerevisiae* و وجدا أن زيادة محتوى السكر في الوسط يخفض معدل النمو النوعي والكتلة الحيوية الناتجة للخميرة . و حسب (Vitolo *et al*,1995) تم الحصول على أعلى فعالية للأنزيم عند تركيز للسكروز 30 غ/ل حيث سبب ارتفاع تركيز السكروز أكثر من 30غ/ل زيادة استهلاك السكر و كتلة الخلية الجافة ولا يترافق مع زيادة في إنتاج الانفرتاز و السبب هو توليد تركيز عالي من سكر المحول في البيئة أدى لمنع الانفرتاز من إنتاج الغلوكوز , وعند تركيز السكروز أقل من 30 غ/ل كان نشاط الانفرتاز أقل من المثالي لأنه و بما أن السكروز مصدر للكربون بالبيئة فالتركيز المنخفض حد من نمو الخميرة و بالتالي انخفاض في إنتاج و فعالية الانفرتاز (Myers *et al*, 1997).

ث – الـ pH : يعد مجال الحموضة pH 5.5 - 4.5 هو الأمثل لنمو خلايا الخميرة ، وتعد خميرة الخبز من الأحياء الدقيقة القادرة على تحمل المجال الحمضي 3.5 - 3 إلا أن معدل نموها ينخفض(Vitolo *et al*,1995) . يؤدي التذبذب في درجة الـ pH إلى وقف النمو بسبب تأثير هذا التذبذب في نشاط الأنزيمات وفي انتقال المواد المغذية عبر الجدار الخلوي وفي النشاط التنفسي (Vitolo *et al,* 1995). تم الحصول على نشاط أعظمي للانفرتاز عند الـ pH الأولي 6 في بيئة التخمير كذلك كتلة الخلية الجافة و استهلاك السكر(Herwig *et al*, 2001, Belcarz *et al*, 2002) هذا يعني أنه على الرغم من أن النمو كان أفضل عند pH =5,5 و لكن عند الـ pH الأولي 6 هو الأفضل بالنسبة لعمل الانفرتاز.

تؤدي القيم الكبيرة لـ pH عادة إلى ضياع في فعالية أغلب الإنزيمات , لكن هناك قيمة الأفضل لـ pH لكل إنزيم يكون عندها الإنزيم أكثر فعالية تعرف هذه النقطة بالـ pH المثالي . اعتبر الـ pH المثالي للانفرتاز هو 4 حسب (Bakir and Burcu,2008) فعند هذه القيمة يحتفظ الانفرتاز بشكله ثلاثي الأبعاد دون أن يفقد طبيعته . عند قيم pH (11,9,7,2) يتعطل الموقع الفعال للانفرتاز و يفقد التركيب الحلزوني التفافه الأمر الذي يؤدي إلى فقدان الانفرتاز لفعاليته

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

(Bakir and Burcu,2008). بينت دراسات أخرى أن قيمة الـpH الأفضل لخلايا الخميرة لإنتاج الانفرتاز 5 (Vitolo *et al*, 1995).

ج- مدة التحضين : تعتبر مدة التحضين المناسبة هامة جداً و حرجة للنشاط الأعظمي للانفرتاز حيث بلغ ذروته عند 48 ساعة تحضين و ذلك بسبب معدلات النمو و الإنتاج النوعية التي تحقق غلة إنزيم أعلى . إلا أن زيادة مدة التحضين لا تؤدي لزيادة في فعالية الانفرتاز و ذلك يعود لانخفاض كمية النتروجين المتاح في بيئة التخمير و تقدم الخميرة بالعمر بإضافة إلى المثبطات المنتجة من قبل الخميرة نفسها و إنتاج البروتياز خلال طور الموت (Ikram *et al* ,2005) .

أما في التجربة التي قام بها (Herwig *et al*,2001) فقد بدأ إنتاج الإنزيم بعد طور التأقلم بـ 8 سا و وصل حده الأعظمي في بداية طور السكون بعد ذلك تراجعت فعالية الانفرتاز بسبب انخفاض الغذاء المتاح في الوسط أو انتهاء الكربون المحفز.

د-مصدر الأزوت المستخدم : لمصادر الأزوت و تركيزها تأثير بالغ على نشاط الإنزيم و ذلك لإظهار استقلاب السكروز استجابة فيزيولوجية نوعية لوجود مصادر الأزوت(Silveira *et al*, 2000[b]). إن تطبيق مصدر الأزوت (الببتون ومستخلص الخميرة) المناسب مهم جداً للنشاط المثالي للانفرتاز , أما عند استخدام اليوريا كمصدر للأزوت في البيئة كانت كتلة الخلية الجافة الناتجة أقل (0,77غ/ل) و لكن فعالية الانفرتاز كانت أعظمية و السبب يعود إلى التأثير الإيجابي لكل من اليورياز و الانفرتاز على إفراز الأخر في البيئة (Egorov *et al*, 2000) . لوحظت فعالية الانفرتاز العظمى(88.03 U/ml) و كتلة الخلية الجافة الناتجة 1,02غ/ل عندما كان تركيز اليوريا0.2 غ/ل, لكن تركيز اليوريا الأقل لم يكن كافياً لإنتاج اليورياز بالكمية الكافية لتشجيع إنتاج الانفرتاز و كذلك لم يحقق المطلوب من الأزوت للخميرة لذا كانت فعالية الإنزيم أقل. كما أن تركيز اليوريا الأعلى من المثالي أنتج انفرتاز أقل بسبب تأثيره المغير في الغشاء الخلوي للخميرة (Pitombo *et al*, 1994; Lopes and Sola Penna 2001) .

1-4-2-6- تصنيف الخميرة مخبرياً:

- تحديد الصفات الفيزيولوجية للخمائر باستخدام شرائح API :

تعمل هذه التقنية على مبدأ الاختبارات البيوكيميائية لتمييز معظم الخمائر الهامة حسب قدرة كل منها على استقلاب السكريات الموجودة في الشرائح و هي تتكون من شرائح بحيث و تستخدم شريحة واحدة لتشخيص نوع واحد من الخمائر و غالباً لا تحتاج إلى اختبارات إضافية فدقتها تصل لأكثر من 90% , تحوي الشريحة على 19 سكر مختلف و هي حسب الجدول (3) :

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

الجدول(3): السكاكرالموجودة في شريحة الAPI الخاصة بالخمائر

الرمز	السكر
GLU	D- Glucose
GLY	Glycerol
2KG	2 Keto – Gluconate
ARA	L – Arabinose
XYL	D- Xylose
ADO	Adonito
XLT	Xylitol
GAL	D- Galactose
INO	Inosisitol
SOR	D- Sorbitol
MDG	Methyl-a D –Glucopyranoside
NAG	N- Acetyl-Glucosamine
CEL	D- Cellobiose
LAC	D- Lactose
MAL	D- Maltose
SAC	D- Sucrose
TRE	D-Trehalose
MLZ	D- Melezitose
RAF	D- Raffinose

تتوضع هذه السكاكر في حفر خاصة , عند معاملتها بمعلق الخميرة (خلايا الخميرة ضمن السائل المرافق للشرائح) و بعد التحضين لفترة محددة تبدي الحفر تبدلات لونية طفيفة حسب قدرة الخميرة على تمثيل السكريات و بناءاً على هذه التغيرات و بواسطة الملحق المرافق يتم تمييز الخميرة المدروسة (Covadonga *et al*. 2002)

1-5-استخلاص الإنزيمات الخارجية والداخلية من خلايا الخميرة :

1-5-1- طرائق تخريب الجدر الخلوية للخميرة (Aehle, 2007) :

يتم تخريب الجدر الخلوية لاستخلاص الأنزيمات الداخلية من الخلية و ذلك بطرائق عديدة نذكر منها

الجدول (4): أهم الطرائق المستخدمة في تحطيم جدر خلايا الخميرة .

طرائق ميكانيكية	طرائق غير ميكانيكية

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

ضغط عالي الطحن أمواج فوق صوتية	تجفيف (بالتجميد أو بالمذيب العضوي) تحليل 1-فيزيائياً : التجميد ,الصدمة التنافذية 2-كيميائياً: المنظفات, المضادات الحيوية 3- إنزيمياً : الإنزيمات مثل الليسوزيم , المضادات الحيوية

1-5-1-1- الطرائق الميكانيكية :

- الضغط العالي: يعتبر تطبيق ضغط عالي على الخلايا لتمزيقها من أكثر الطرق شيوعاً حيث يضغط معلق الخلية خلال صمام و يصطدم بحلقة تصادمية . تتمزق الخلايا بتأثير قوى القص و بتخفيف الضغط الآني و قد تحدث الحرارة و قوى القص تعطيل جزئي للإنزيم الناتج بسبب الحرارة المتولدة لذا يجب تأمين التبريد المكافئ .
- الطحن: إن الطحن الرطب للخلايا بطاحونة عالية السرعة هو طريقة أخرى فعالة في قلقلة الخلية حيث تستخدم لهذا الغرض كرات زجاجية بقطر 0,1 -2 ملم , و كفاءة هذه الطريقة تعتمد على هندسة النظام المحرك حيث يعطي الترتيب المتماثل للأقراص الدائرية نتائج أفضل من الترتيب العادي غير المتماثل والذي يتضمن بدوره مقاييس مثالية مثل معدل التحريك , عدد و حجم الكرات الزجاجية , تركيز الخلية و درجة الحرارة .
- **الأمواج فوق الصوتية:** إن تحطّيم جدر خلايا الخميرة باستخدام الأمواج فوق الصوتية بقوة 40 واط خلال 30 ثانية مع تكرار المعاملة عدة مرات لتأمين التحطيم الكلي ، و إجراء عملية الطرد المركزي لمدة 20 دقيقة بعدها أدى إلى الحصول على الرشاحة الحاوية على الأنزيم (Song and Jacques, 1997). تستخدم الأشعة فوق الصوتية بالمخبر , تخرب الخلية بهذه الطريقة باستخدام قوى القص و عمل فجوات فيها , يجب الحفاظ على درجة الحرارة المثالية بالتبريد لان هذه العملية تولد حرارة .

1-5-1-2- الطرائق غير الميكانيكية (Aehle, 2007):

تخلخل الخلايا عادة بالتحليل الكيميائي , التحليل الحراري , و التحليل الإنزيمي . يعتبر تجفيف الكائنات الحية الدقيقة و تحضير مساحيق الأسيتون أو غيرها من المذيبات العضوية هي طريقة أساسية لتخريب الجدار الخلوي و التي تسمح بالاستخلاص اللاحق لمحتويات الخلية.

1-5-2- فصل المادة الجافة :

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

يتم فصل الإنزيمات الخارجية و الداخلية من الخلية و الأجزاء الخلوية على التوالي اعتماداً على الاختلاف البسيط بين كثافة الخلية و وسط التخمر. يستخدم الترشيح المستمر في الصناعة .اليوم تم رفع كفاءة الطاردات المركزية لفصل الخلايا والأجزاء الخلوية في عملية مستمرة

1-5-2-1- الترشيح: هناك نماذج عديدة للمرشحات منها:

– مرشحات الضغط : يستخدم ضغط الفلتر (فلتر صحن , فلتر حجرة) لترشيح الحجوم الصغيرة و إزالة الرواسب المتشكلة أثناء التنقية و هذه الطريقة مناسبة جداً للترشيح لمحاليل الإنزيمات ألا أن قدرتها على الاحتفاظ بالمادة الصلبة محدودة .

- مرشحات الفراغية : يعتبر طريقة اختيارية لأن المادة العضوية تضغط بسهولة . يستخدم المرشح الفراغي الدوار في الترشيح المستمر للأحجام الكبيرة.

1-5-2-2- الطرد المركزي: يعتمد مدى التطبيق على حجم الجزيئات و المحتوى الصلب و مثال على الطاردات المركزية المستخدمة المثقلات على شكل لفيفة و التي تعمل بقوى طرد منخفضة و تستعمل لفصل الخلايا الكبيرة أو رواسب البروتين حيث تفرغ المادة الصلبة من الشحنات باستمرار من خلال حركة حامل اللولب بسعة دوران متباينة.

1-6- تقدير فعالية الإنزيم :

تحفز الإنزيمات تفاعلات خلوية محددة لذلك تعرف كمية الإنزيم الموجودة بأنها الكمية التي تزيد معدل التفاعل تحت مجموعة من الشروط المحددة تماماً . و عادةً ما يعبر عن كمية الإنزيم بمصطلح "International Enzyme Units" حيث تعرف "1-enzyme unit" بأنها كمية الإنزيم اللازمة لاستهلاك 1.00 µmole من مادة التفاعل في الدقيقة أو لإنتاج 1.00 µmole من المنتج في الدقيقة , لأن الواحدات المستعملة لوصف معدلات فعالية الإنزيم µmole/min تختلف عن الوحدات التقليدية المستخدمة لوصف معدلات التفاعل الكيماوي 1.00 µmole/ml/min , تحسب وحدات الإنزيم ببساطة بضرب التغير في التركيز الملاحظ في المحلول بحجمه (مل)(Timeman, 2010)

يعبر عن النشاط الإنزيمي بوحدات كيفية مثل: التغير في الامتصاص, زيادة المجموعات المنتجة, كمية الركيزة المتحولة معبراً عنها بالميليغرام أو الميليمول. وترتبط هذه المقاييس بوحدات زمن مختلفة مثل 1 دقيقة, 30 دقيقة, أو 1 ساعة.

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

ولتحقيق قيمة معيارية لكل إنزيم وضعت الوحدة الدولية U عام 1961 من قبل لجنة الإنزيمات في الاتحاد الدولي للكيمياء الحيوية لتحديد نشاط الإنزيم تحت ظروف قياسية ومثالية وتعبر هذه الوحدة عن نشاط الإنزيم الذي يحفز تحول 1 ميكرومول من الركيزة كل دقيقة(Bergmeyer *et al* , 1985). وقاعدة عامة يجب أن تحدد درجة الحرارة لكل تجربة لأن تفاعلات التحفيز الإنزيمي تتضاعف بزيادة درجة الحرارة 10ْم ضمن المجال 0-40ْم لذلك يجب تحديد درجة الحرارة التي يتم عندها القياس (Bergmeyer , 1983) .و لكن لا يمكن قياس كمية الركيزة المستهلكة أو المواد الناتجة في العديد من التفاعلات الإنزيمية لذلك قد يستحيل التعبيرعن النشاط الإنزيمي بالوحدات الدولية .

لذا يمكن أن تحدد نشاط الإنزيمات بمؤشرات أخرى كتحليل الحمض النووي أو دمج نكليوتيدات إليه ويعبر عنها بالميكروغرام, نانومول, وحدات امتصاص أو عدد الأزواج الأساسية. وللحصول على نتائج علمية يتم اختيار أوقات زمنية مختلفة مثل 1-10-30 أو 60 دقيقة كمراجع (Aehle, 2007).

1-الامتصاص الضوئي:

وهو عبارة عن تقنية بسيطة أجهزتها غير مكلفة وهي من الطرق المفضلة و السريعة لاختبار الإنزيمات وذلك عندما تكون الركيزة أو منتجات التفاعل مواد ملونة أو تستطيع امتصاص الضوء فوق البنفسجي وتتم باستخدام جهاز Spectrophotometer .

2- مقياس الفلورة Fluorometry : يستعمل مقياس الفلورة نادراً لتقدير نشاط الأنزيمات الخام أو المنقاة بسبب حساسيته العالية, وهو يسمح بفحص كميات صغيرة من الإنزيمات التي تعتمد على NAD و NADP ولتحسين حساسية الجهاز يجب تعريض المادة لحزم صغيرة من الإشعاع فوق البنفسجي بالإضافة إلى استعمال مرشحات انتقائية. وتعد حساسية هذا الجهاز أعلى بألف مرة من الامتصاص الضوئي حيث يمكنها تحديد تراكيز تصل لدرجة ميكروغرام/ اللتر.

3- مقياس السطوع Luminometry: تؤدي بعض التفاعلات الإنزيمية إلى انطلاق عدد من الفوتونات وبالتالي يمكن استعمال مقياس السطوع لقياس هذه الفوتونات

4- المقياس الإشعاعي : عند استخدم المواد الموسومة بمادة مشعة بالإمكان تحديد نشاط بعض الأنزيمات بدقة عالية وبينت بعض التقارير أن كمية المواد المشعة التي تحتاجها ضمن الحد المنظم بالقانون.

5- مقياس التوصيل: يمكن أن تقاس كل التفاعلات الأنزيمية التي تؤدي إلى تغيير في قابلية التحرك الأيونية بمقياس التوصيل .

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

6- مقياس الحرارة: تطلق معظم التفاعلات الأنزيمية الحرارة لذلك تطور الاهتمام بطرائق قياس الحرارة .

7- مقياس الاستقطاب: نادراً ما يستخدم مقياس الاستقطاب لأنه معقد وغير ملائم لكنه مطلوب في تعيين النشاط المحفز لـ الميوتاروز (E.c.5.1.3.3) الذي يحفز التوازن بين α وβ غلوكوز

8- مقياس الضغط: يعد مقياس الضغط أحد الطرق التقليدية في الكيمياء الحيوية ولكنه لم يعد يستخدَم لتحليل الأنزيمات استخدم سابقاًَ في تحديد النشاط المحفِز للغلوكوز أكسيداز و الأرجيناز وأنزيمات أخرى .

9- مقياس اللزوجة: لم يعد يستخدم مقياس اللزوجة في تحليل الأنزيمات إلى حد ما حيث يحدث تغيير للزوجة عبر الوقت .

10- مقياس الكثافة: يمكن أن يستخدَم مقياس الكثافة لتحليل أنزيمات مختلفة ويقاس النقص في امتصاصية المحلول عند طول موجة 450nm وحرارة 25مْ.

تعد مقاييس التوصيل والجهد والاستقطاب الأفضل للكشف عن الأنزيمات مقارنة مع المقياس الضوئي لأنها تسمح للتفاعل أن يتم بشكل مباشر دون الحاجة إلى مؤشرات إضافية للأنزيمات والكوأنزيمات أو لمواد ثانوية .

11- الرحلان الكهربائي : هو أداة أساسية لتعيين النشاط المحفز للنكلياز وخاصة الاندونكلياز ويُستخدَم أيضاً لبعض الأنزيمات الهامة في الهندسة الوراثية مثل ميتلاز دنا.

إن تقييد الأنزيمات يحفز انقسامات خاصة للدنا. مثال:(اشيرشيا كولي phage دنا) والتي تعد أساس نموذجي في الهندسة الوراثية. تقسم الدنا إلى أجزاء صغيرة ذات أطوال محددة وبسبب الشحنات السالبة المتماثلة لكل زوج من الأسس فيمكن عزلها وفقاً للطول.

1-6-1- فعالية الانفرتاز: Invertase activity

عرفت وحدة الإنزيم الواحدة بأنها كمية الإنزيم التي تحلمه 1µmol من السكر في الدقيقة عند حرارة 20 °c و pH 4.5 أو أنها كمية الإنزيم التي تحرر واحد ملغ من ال-سكر الانفرت محول في 5 د عند حرارة 20°c و pH 4.5 (Sumner and Howell ,1935) . أما العالم (Timeman,2010) عرفها على أنها كمية الإنزيم التي تحلمه 1µmole من السكروز في الدقيقة او التي تنتج 1-µmole من سكر المحول في الدقيقة تحت ظروف محددة للتفاعل . بما أن معدلات تفاعل الإنزيم يمكن أن تتغير تغيراً هاماً مع التغيرات البسيطة في درجة الحرارة و pH و تركيز الركيزة لذا يجب تحديد و بدقة قيم هذه الظروف الثلاثة عند التقدير , و التقدير

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Complex Script Font: Times New Roman
Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Complex Script Font: Times New Roman
Formatted: Font:
Formatted: Font: No underline
Formatted: Font: No underline
Formatted: Font: (Default) Times New Roman, No underline, Complex Script Font: Times New Roman
Formatted: Font: (Default) Times New Roman, No underline, Complex Script Font: Times New Roman
Formatted: Font: (Default) Times New Roman, No underline, Complex Script Font: Times New Roman
Formatted: Font: No underline
Formatted: Font: (Default) Times New Roman, No underline, Complex Script Font: Times New Roman
Formatted: Font: (Default) Times New Roman, No underline, Complex Script Font: Times New Roman
Formatted: Font:
Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

~~الدقيق للانفرتاز يتم عند pH مثالي 4,8 و حرارة 40 ْم و تركيز السكروز الأولي (ثابت ميكاليس 5mM سكروز) (Timeman, 2010) .~~

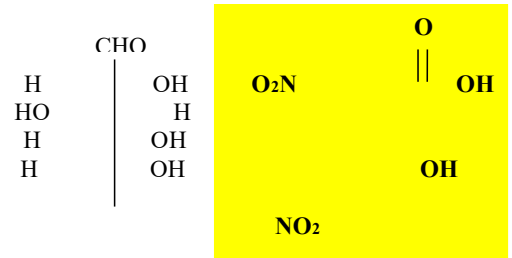
~~بما~~ أن إن كلاً من مادة التفاعل و منتجات تفاعل الانفرتاز غير ملونة لذا ~~يتلى~~ يتبع هذا التفاعل باستخدام السكريات الأحادية الناتجة من التفاعل ~~للإرجاع في~~ إرجاع محلول ~~اللاحق للمحلول الأصفر~~ ~~للـ~~ الـ 3, 5-dinitrosalicylate (DNS) الأصفر إلى محلول برتقالي اللون من 3-amino-5-nitrosalicylate الذي يكتشف باستخدام السبكتروفوتومتر عند طول موجة 540nm(Tasun *et al*,1970) و تلخص طريقة تقدير فعالية الانفرتاز بالخطوات التالية حسب(Timeman, 2010) :

1. تحفيز الانفرتاز لحلمهة السكروز و يتم ذلك بإضافة الإنزيم إلى مزيج من السكروز و الاسيتات الموقي (Acetate buffer) عند حرارة و pH محددين حيث يستمر تفاعل الانفرتاز لمدة5 دقائق وفق التفاعل التالي :

Sucrose + H2O ⟶ (الانفرتاز) D-Glucose + D-Fructose

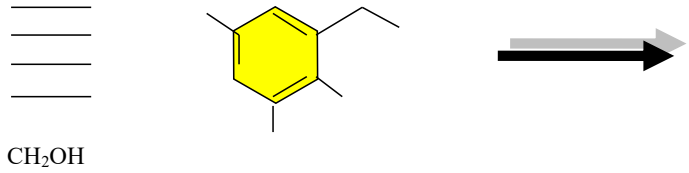
2. تغيير طبيعة الإنزيم و تفاعل الـ DNS : بعد نهاية التفاعل يتم إفقاد الانفرتاز طبيعته بإضافة محلول الـ DNS و وضع الأنابيب في حمام مائي مغلي مدة 5 دقائق عندها يقوم الغلوكوز الناتج عن التفاعل بإرجاع اللون الأصفر الساطع لـ 3,5- dinitrosalicylic acid إلى اللون البرتقالي داكن من محلول 3-amino-5-nitrosalicylate كما هو واضح في الشكل (4) ثم تبرد الأنابيب بماء الصنبور .

3. حساب الامتصاصية و تقدير فعالية الإنزيم : يتم ذلك باستخدام جهاز السبيكتروفوتوميتر الذي يقرأ امتصاصية المحلول عند طول موجة 540nm بالمقارنة مع الشاهد الذي يعامل نفس المعاملة تماماً باستبدال الإنزيم بالماء . و بالإسقاط إلى المنحنى القياسي (أو باستخدام معادلة المنحني) نحصل على تركيز الغلوكوز الموافق و بالتالي فعالية الإنزيم.



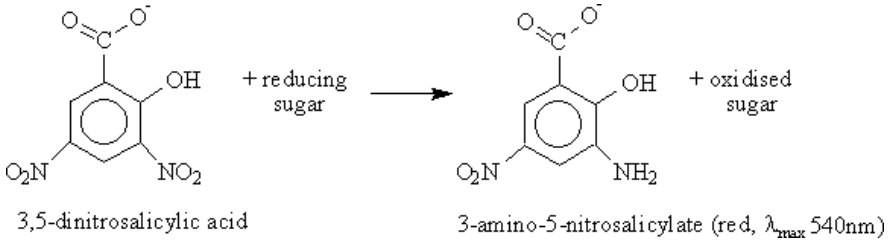
Formatted: Justified, Adjust space between Latin and Asian text, Adjust space between Asian text and numbers

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right



الشكل(4) التغير اللوني الحاصل من ارجاع الـ 3,5-dinitrosalicylic acid

إلى 3-amino- 5-Nitrosalicylate



الشكل(5) : معادلة ارجاع الـ DNS

يستخدم جهاز الطيفي الضوئي عند طول موجة 540nm (Ikram and Sikander 2007).

يعد قياس الطيف الضوئي إحدى أهم التقنيات المستخدمة في قياس تركيز مركب بقراءة الامتصاص الضوئي عند طول موجة معين. يعتمد التحليل الطيفي الضوئي على امتصاص

المحاليل للاشعة الضوئية التي تقاس بالميليميكرون و تسمى أحيانا بالنانومتر . إذا مرت حزمة ضوئية ذات طول موجة معينة في محلول له القدرة على امتصاص ذلك الضوء فإن كمية الضوء الممتصة تتناسب طرداً مع الجزيئات التي تعترض مسار الضوء أي إنها تتناسب طرداً مع تركيز المحلول (سمينة و محمد, 1996) .

تلافياً للخطأ الناجم عن تناثر الضوء أو انعكاسه , يقاس الامتصاص الضوئي لعينة شاهد تحوي على جميع المحاليل المستعملة ما عدا المادة المدروسة (الانفرتاز) , و يقاس الامتصاص بعد تعيير صفر الجهاز على الشاهد(سمينة و محمد, 1996).

أما فعالية الانفرتاز النوعية تعرف بأنها عدد وحدات الإنزيم الموجودة في 1 غ من وزن الخلية الجافة(U/g) (Abrahão-Neto *et al*, 1996) .

2- هدف البحث :

مما سبق و نظرا لأهمية إنزيم الانفرتاز خاصة و أنه يعتبر من المواد المضافة للأغذية , فإننا نهدف من بحثنا هذا إنتاج إنزيم الانفرتاز من سلالات خميرة معزولة محلياً لمعرفة قدرتها على إنتاج هذا الإنزيم و انتقاء السلالة الأكثر قدرة على الإنتاج و أمثلة ظروف عمل الانفرتاز من درجة الحرارة, التهوية , تركيز السكروز , الـpH , مدة التحضين و مصدر الازوت المستخدم .

~~2- هدف البحث :~~

Formatted: Font: 20 pt, Bold, Complex Script Font: 20 pt, Bold

Formatted: Font: 20 pt, Bold, Complex Script Font: 20 pt, Bold

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

3- مواد البحث و طرائقه

Materials and Methods:

Formatted: Font: 22 pt, Complex Script Font: 22 pt

Formatted: Font: 22 pt, Complex Script Font: 22 pt

Formatted: Font: 22 pt, Complex Script Font: 22 pt

Formatted: Font: 22 pt, Complex Script Font: 22 pt

Formatted: Font: 22 pt, Bold, Complex Script Font: 22 pt, Bold

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

الجزء العملي

مواد البحث و طرائقه

3-1- جمع العينات : جمعت 30 عينة (عشوائياً و من ثلاث محافظات و هي حمص , دمشق , طرطوس) من مواد غذائية سكرية (صلبة , شبه سائلة , سائلة) مثل التمر – تين مجفف – ملبن – زبيب – عنب طازج – مربيات متنوعة – دبس عنب – مخلفات معمل السكر – عصائر منزلية مختلفة . حضر محلول السكروز تركيزه 25% و عقم بالطريقة التاندلية (وضع الدورق الحاوي على محلول السكروز في حمام مائي حرارته 95-100°c لمدة 30 دقيقة و بعدها ترك الدورق في درجة حرارة المخبر لليوم التالي حيث كررت العملية ثلاث مرات بمعدل مرة كل يوم) . نقل جزء من كل عينة بواسطة ملقط معقم في غرفة العزل إلى دورق يحوي 25 مل من محلول السكروز السابق و حضنت الدوارق في الحاضنة على حرارة 30 °c مدة 3 أيام سحبت بعدها من الحاضنة لإجراء عملية العزل و الغربلة عليها لاحقاً في مخابر

Formatted: Font: 25 pt, Complex Script Font: 25 pt

Formatted: Font: 17 pt, Complex Script Font: 17 pt

Formatted: Font: 17 pt, Complex Script Font: 17 pt

Formatted: Font: 17 pt, Complex Script Font: 17 pt

Formatted: Font: 17 pt, Complex Script Font: 17 pt

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

الهيئة العامة للتقانة الحيوية و مخابر علوم الأغذية في كلية الزراعة في جامعة دمشق كما هو موضح بالجدول(5).

~~جمعت 30 عينة (عشوائياً و من محافظات مختلفة كحمص و دمشق و طرطوس) من مواد غذائية سكرية (صلبة , نصف سائلة , سائلة) مثل التمر – تين مجفف – ملبن – زبيب – عنب طازج – مربيات متنوعة – دبس عنب – مشروبات و عصائر منزلية مختلفة . ووضعت في محلول سكري 25% (حضر و عقم مسبقاً) لإجراء عملية العزل و الغربلة عليها لاحقاً في مخابرالهيئة العامة للتقانة الحيوية و مخابر علوم الأغذية في كلية الزراعة في جامعة دمشق كما هو موضح بالجدول(6).~~

جدول (5): مصادر ونوع العينات التي عزلت منها الخمائر.

نوع العينة	المحافظة		
	حمص	دمشق	طرطوس
تمر	1	-	-
تين مجفف	1	-	-
مربى تين	1	-	-
مربى مشمش	2	1	1
زبيب	2	1	1
ملبن	1	-	-
عصير فواكه	1	1	1
دبس عنب	1	1	1
مربى تفاح	-	1	-
عنب	1	1	1
مربى كرز	-	1	-
مخلفات معمل السكر	-	1	-
فواكه مجففة	1	1	1
تين	1	1	1
مجموع العينات	13	10	7

3-2- الكيماويات(البيئات, الكواشف, الأدوات والمواد الكيماوية والأجهزة) المستخدمة :

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

– البيئات :

– بيئة دكستروز البطاطا أغار (PDA) لعزل الخمائر وهي بيئة جاهزة حيث تم حل 39 غ بيئة في لتر ماء مقطر و ضبط رقم الحموضة pH عند 5 وعقمت عند درجة حرارة 121°c لمدة 20 دقيقة .

– بيئة أغار مستخلص المولت(بيئة جاهزة) و استخدمت هذه البيئة لتنشيط خلايا الخميرة على أطباق بيتري قبل تشخيصها باستخدام شرائح الـ API حيث تعتبر هذه البيئة الأنسب لتنقية الخمائر .

– بيئة Yeast Extract Peptone Sucrose Agar (YEPSA) حسب(Ikram *et al*,2005) استخدمت هذه البيئة لحفظ الخمائر المدروسة لحين تحضير البادئ المستخدم لإنتاج الانفرتاز , حضرت هذه البيئة من مستخلص الخميرة 3 غ/ ل , ببتون5غ/ل , سكروز 20غ/ل و آغار 20 غ/ل ولها pH 6 وأغلقت الدوارق بسدادات قطنية و عقمت بالاوتوكلاف عند ضغط 103,5بار و حرارة 121°c لمدة 15دقيقة , و بردت إلى درجة حرارة الغرفة.

– بيئة التخمير لإنتاج الانفرتاز بتقنية الدوارق الهزازة و حضرت هذه البيئة من مستخلص الخميرة 3 غ/ ل , ببتون5غ/ل , سكروز 30غ/ل و ضبط رقم الـ pH عند 6 وأغلقت الدوارق بسدادات قطنية و عقمت بالاوتوكلاف عند ضغط 103,5بار و حرارة 121 C° لمدة 15دقيقة , و بردت إلى درجة حرارة الغرفة (Ikram *et al*, 2005).

– DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid): حضر الكاشف بوضع 30غ من بوتاسيوم صوديوم طرطرات تتراهيدرات في أنبوب 1ل و أضيف أيضاً 16غ NaOH و 500مل ماء و تحل بالتسخين الخفيف و عندما يصبح المحلول جاهز يتم إضافة و ببطء 10غ من DNS وعند اكتمال الذوبان يكمل الحجم إلى 1 ل من الماء ثم يعبأ الكاشف بزجاجات معتمة(Kadambini ,2006)

– معايرة الإنزيم : يعاير محلول الانفرتاز بـ 2 ml. من حجم تفاعل مكون من 1ml من الإنزيم و 1ml من 1%سكروز 0,3M و 0,5ml من أسيتات الصوديوم الموقي 0,05M (pH 4.2).تقدر كمية السكر المختزل بالـ DNS(2010,Talekar *et al*,).

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

~~– بيئة ديكستروز البطاطا أغار لتنمية الخميرة: و تتركب من 4 غ من بودرة البطاطا و 20 غ ديكستروز و 15 غ أغار في لتر ماء مقطر و تضبط درجة الحموضة على5 pH و المعقمة في درجة 121°c مدة 20 دقيقة .~~

~~– بيئة أغار مستخلص المولت : مستخلص المولت 13 غ/ ل , دكستران 2.5 غ , جيلا تين , ببتون 5 غ/ ل , و أغار 15غ/ل~~

~~(Ikram ,*et al*.2005) حسب(YEPSA) yeast extract peptone sucrose agar بيئة –~~

~~حيث : تتألف البيئة من مستخلص الخميرة 3 غ/ ل , ببتون 5 غ/ل , سكروز 20غ/ل , و آغار 20 غ/ل و pH 6 حيث تغلق الدوارق بسدادات قطنية و تعقم بالاوتوكلاف عند ضغط 103,5بار و حرارة 121°م لمدة 15دقيقة , و تبرد إلى درجة حرارة الغرفة.~~

~~– بيئة التخمير وإنتاج الانفرتاز: : تتألف البيئة من مستخلص الخميرة 3 غ/ ل , ببتون 5 غ/ل , سكروز 30غ/ل و pH 6 حيث تغلق الدوارق بسدادات قطنية و تعقم بالاوتوكلاف عند ضغط 103,5بار و حرارة 121°م لمدة 15دقيقة , و تبرد إلى درجة حرارة الغرفة.~~

~~– (3, 5-Dinitrosalycyclic acid)DNS): تم تحضير الكاشف بوضع 30غ من بوتاسيوم صوديوم طرطرات تتراهيدرات في أنبوب 1ل و يضاف أيضاً16غ NaOH و 500مل ماء و تحل بالتسخين الخفيف و عندما يصبح المحلول جاهز يتم إضافة و ببطء 10غ من DNS و يكمل الحجم إلى 1 ل من الماء ثم يعبأ الكاشف بزجاجات معتمة(Kadambini ,2006)~~

~~– معايرة الإنزيم : يعاير محلول الانفرتاز بـ2 ml من حجم تفاعل مكون من 1ml من الإنزيم و 1ml من 1% سكروز 0,3M و 0,5ml من أسيتات الصوديوم الموقي (pH 4.2) 0,05M.تقدر كمية السكر المختزل بال DNS(Talekar *et al*,2010).~~

– الأدوات و الأجهزة :

الجدول (6): الأجهزة المستخدمة في البحث مع الشركات المصنعة لها

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

الجهاز	الشركة المصنعة
غرفة العزل	JS-Research.Inc-(Korea)
حاضنة عادية	JS-Research.Inc- (Korea)
حاضنة هزازة	New Brunswick Scientific-(USA)
مثقلة طرد مركزي	Androa GmbH.co.KG-(Germany)
– مقياس الpH	Precisa Industument AG
جهاز الطيفي الضوئي	Mecasys.co-(Korea)
جهاز قياس العكارة	Bio MERIEUX ITALIAS.P.A-(Italy)
ميزان حساس	Kern &Sohn Gmbh Balingen-(Germany)
الأوتوكلاف	JSR-(Korea)
مسخن بمحرك مغناطيسي	VELP(SCIENTIFICA)
حمام مائي	Memmert GmbH.co.KG-(Germany)
ماصة كهربائية	LABORGERATE
الAPI و ملحقاتها	Bio Merieux- (Italy)

Formatted: Italian (Italy)

Formatted: German (Germany)

3-3- طرائق البحث :

3-3-1-عزل الخمائر وتشخيصها :

3-3-1-1- العزل:

عزلت الأحياء الدقيقة النامية بزراعتها في أطباق بيتري حاوية على بيئة ديكستروز البطاطا PDA بطريقة التخطيط أو بالزراعة بعد التخفيف و حضنت كل الأطباق على حرارة 25°c لمدة 48 ساعة ليتم تصنيفها و تشخيصها.

~~حضر 1لتر من محلول سكري 25% ووزع هذا المحلول على دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل50 مل لكل دورق وعقمت بالطريقة التاندلية (وضعت الدوارق في حمام مائي 95 ْم لمدة 30 دقيقة على مدى 3 أيام) , نقلت كمية من العينات إلى الدوارق الحاوية على المحلول السكري ضمن ظروف عقيمة و~~

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

~~رقمت الدوارق بما يتناسب مع أرقام العينات و حضنت في الحاضنة لأسبوع على حرارة 25 مْ.~~

~~بعد انتهاء مدة التحضين عزلت الخمائر النامية على بيئة ديكستروز البطاطا PDA بطريقة التخطيط على طبق بيتري حاوي PDA أو بالزراعة بعد التخفيف و حضنت كل الأطباق على حرارة 25 مْ. فحصت الأطباق وحددت الخمائر النامية بتمييزها عن بعضها حسب خصائص الشكل والحجم واللون, ومن ثم عزلت الخمائر النامية بطريقة التخطيط على الآغار المائل لبيئة ديكستروز البطاطا وحضّنت على درجة حرارة 25 مْ لمدة 48 ساعة ليتم تصنيفها و تشخيصها.~~

3-3-1-2- التشخيص:

- **تشخيص الخمائر باستخدام شرائح API** : وضع 5 مل من الماء المقطّر في العلبة البلاستيكية ذات الحفر وذلك من أجل خلق جو رطب . فتحت أمبولة suspension medium ذات الـ 5 مل وتم التخلص من 3 مل و الإبقاء على 2 مل عن طريق ماصة ميكرومترية , ثم أخذ جزء من مستعمرة خميرة نشيطة بعمر 24 ساعة و بواسطة إبرة التلقيح و وضعت ضمن الأمبولة (2مل) و بعد الرج أخذ منها 100 ميكروليتر وضعت ضمن الأمبولة الأخرى (تحوي على 7مل c medium) ورجّت بشكل جيد ثم أخذ 100 ميكروليتر من الأمبولة الأخيرة و وضعت في حفر الشريحة الحاوية على السكاكر بحيث تملأ كل حفرة بـ 100 ميكروليتر و أغلقت الشريحة بغطائها الخاص ووضعت في الحاضنة لمدة 48-72 ساعة , أخذت النتائج ودوّنت الأرقام في دفتر الشيكات وجرت مقارنة تسلسل الأرقام بدليل الـ API الملحق للتعرف على جنس و نوع الخميرة المختبرة .

~~: تم باستخدام شرائح API وفق الخطوات التالية :~~

~~1- لقحت الأنابيب الزجاجية الحاوي كل منها على 5 مل من suspension medium(بعد الإبقاء على 2 مل منه فقط) بواسطة الإبرة اللاقحة و ضمن ظروف عقيمة بمزارع بعمر 24 ساعة والمنماة على بيئة أغار مستخلص المولت في أطباق بيتري, بحيث لا تزيد درجة العكارة عن 2.~~

Formatted: Font: 18 pt, Bold, Complex Script Font: 18 pt, Bold, (Complex) Arabic (Syria)

Formatted: Font: 18 pt, Bold, Complex Script Font: 18 pt, Bold

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

~~2- نقل 100 µL من الأنبوب الأول (الملقح بالخميرة) بواسطة ماصة إلى الأنبوب الأخر الذي يحوي 7 مل وترج جيداً .~~

~~3- ملئت الحفر الموجودة في شريحة الـ API الحاوية على السكاكر, بحيث تملأ كل حفرة بـ 100 µL من الأنبوب الثاني (7مل + الخميرة)~~

~~4- تم توزيع ماء مقطّر في حفر الصينية البلاستيكية وذلك لتأمين الرطوبة اللازمة .~~

~~5- وضعت الشريحة ضمن الصينية و تغلق الشريحة بغطائها الخاص وتوضع في الحاضنة لمدة 24 إلى 72 ساعة .~~

~~6- سجلت النتائج و الأرقام الناتجة و قورنت مع الأرقام في دفتر الشيكات للتعرف على جنس ونوع الخميرة المختبرة .~~

3-3-2- تحضير الخميرة لإنتاج الأنزيم :

~~غربلة العزلات :~~

وزعت بيئة التخمير في دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 25 مل في كل دورق ثم عقمت بالأتوغلاف (121°c مدة 15 دقيقة) و بعد التبريد لقحت الدوارق بالخمائر النامية على بيئة (YEPSA) بعمر 2-3 يوم و حضنت بحاضنة دورانية هزازة عند درجة حرارة 30 °c لمدة 24 ساعة و بمعدل رج 200 دورة/ د (Ikram *et al*,2005) استخدمت هذه الدوارق لاحقاً كبادئ لإنتاج الأنزيم . ولإنتاج الانفرتاز نقل 1مل من البادئ إلى دوارق مخروطية تحوي 25 مل من بيئة التخمير المعقمة و حضنت الدوارق بحاضنة دورانية هزازة عند درجة حرارة 30°c لمدة 48 ساعة و بمعدل رج 200 دورة/ د(Ikram *et al*,2005) . بعد انتهاء مدة التحضين تم نقل مرق التخمير إلى أنابيب طرد مركزي موزونة (لتحديد وزن الخميرة الجافة) و باستخدام الطرد المركزي(بمعدل 5000 دورة لمدة 7 دقائق) و تم فصل خلايا الخميرة المترسبة في الأسفل عن الإنزيم الخارجي (Ikram and Sikander, 2007) .

Formatted ...
Formatted: Right
Formatted: Font: (Default) +Simplified-Arabic, 14 pt, Complex Script Font: Simplified Arabic, 14 pt
Formatted ...
Formatted: Right
Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

~~حضر البادئ من مزارع مائلة للـ *Saccharomyces cerevisiae* المنماة على بيئة (YEPSA) بعمر 2-3 أيام و ذلك بنقل جزء من النموات بواسطة الإبرة اللاقحة إلى دوارق مخروطية سعة 250مل تحوي 25 مل من بيئة التخمير المعقمة , ثم حضنت الدوارق بحاضنة دورانية هزازة عند درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة و بمعدل رج 200 دورة/ د(Ikram *et al*,2005) .~~

~~ولإنتاج إنزيم الانفرتاز تم نقل 1مل من البادئ إلى الدوارق مخروطية سعة 250مل تحوي 25 مل من بيئة التخمير المعقمة و حضنت الدوارق بحاضنة دورانية هزازة عند درجة حرارة 30°م لمدة 48 ساعة و بمعدل رج 200 دورة/ د(Ikram *et al*,2005) . بعد انتهاء مدة التحضين تم نقل مرق التخمير إلى أنابيب طرد مركزي موزونة و باستخدام الطرد المركزي تم فصل خلايا الخميرة المترسبة في الأسفل عن الإنزيم الخارجي .~~

3-3-3- طرائق التحليل :

3-3-3-1- كتلة الخلية الجافة :

حددت كتلة الخلية الجافة للخميرة بالطرد المركزي(5000 دورة/دقيقة و لمدة 7 دقائق) لمرق التخمير باستخدام أنابيب طرد مركزي موزونة ثم غسلت الخلايا بالماء المقطر ثلاث مرات و جففت الأنابيب بالفرن على حرارة 105 °c لمدة ساعتين (حتى ثبات الوزن).

3-3-3-2- فعالية الانفرتاز:

1-تحضير المنحنى القياسي (Standard curve) :

حضرت محاليل قياسية من سكر الغلوكوز (وهو السكر الأحادي الناتج عن تحلّل السكروز) كما في الجدول رقم (7) :

الجدول (7) : تراكيز المواد المستخدمة لتحضير المنحني القياسي.

Formatted: Font: (Default) +Simplified-Arabic, 14 pt, Complex Script Font: Simplified Arabic, 14 pt, (Complex) Arabic (Syria)

Formatted: Right, Tab stops: 12.34 cm, Right

Formatted: Font: (Default) +Simplified-Arabic, 14 pt, Complex Script Font: Simplified Arabic, 14 pt

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

العينة	غلوكوز 0,004M (مل)	ماء (مل)	DNS (مل)
1	0	1	1
2	0,2	0,8	1
3	0,4	0,6	1
4	0,6	0,4	1
5	0,8	0,2	1
6	1	0	1

مزجت المكونات المذكورة في الجدول السابق مع بعضها ووضعت في حمام مائي يغلي مدة 5 دقائق و بردت بتيار مائي جاري مدة 2-3 دقائق ثم مددت الأنابيب بـ 5 مل ماء مقطر وقيست الامتصاصية لكل تركيز من التراكيز السابقة بغرض الحصول على منحنى قياسي يمثّل محور السينات نسبة الغلوكوز مغ /مل ومحور العينات لقيم الامتصاص الضوئي وقيست الفعالية الأنزيمية على أساس كمية السكر الأحادي الناتج ملغ غلوكوز خلال 5 دقائق ضمن الظروف القياسية .

2 – تقدير فعالية الإنزيم الخارجي: لتحديد الفعالية الإنزيمية أضيف 0,5 مل acetate buffer (0,05M) pH 4,7 و 1مل سكروز (0,3M) إلى أنابيب اختبار فردية , حضنت هذه الأنابيب تحضين أولي عند 35 °c لمدة 5 د , ثم أضيف 1مل من المحلول الإنزيمي إلى الأنابيب و تابع التحضين لـ 5 دقائق أخرى ووضع مزيج التفاعل في حمام مائي يغلي مدة 5 د لإيقاف التفاعل و إبطال فعالية الإنزيم و برد إلى درجة حرارة الغرفة (عومل الشاهد نفس المعاملة مع استبدال المحلول الإنزيمي بماء مقطر) , تم إضافة 2 مل من الـDNS إلى مزيج التفاعل و وضعت الأنابيب في الماء المغلي مدة 5 د حيث يلاحظ تغير لون الأنابيب من الأصفر إلى البرتقالي كما في الشكل (4) , و بعد التبريد إلى 20°c كمل الحجم إلى 10مل و استخدم جهاز الطيفي الضوئي عند طول موجة 540nm (Ikram and Sikander, 2007).

3–استخلاص الإنزيم الداخلي باستخدام الطريقة الكيميائية :

أضيف 0,4 مل كلوروفورم لكل 1 غ خميرة وخلط المزيج جيداً وترك لفترة 30 إلى 60 دقيقة بعدها أضيف 0,4 مل ماء معقم لكل 1 غ من الخميرة وضبط الـ pH بين6.2 إلى 7وترك المزيج لمدة 24 ساعة في الحاضنة الهزازة على درجة حرارة 30 مْ ، بعدها أجريت عملية طرد مركزي على سرعة 5000 دورة/ د لمدة 7 دقائق وأخذت الرشاحة الحاوية على الأنزيم الداخلي . (Sonia and Castillo 1979)

4– تقدير فعالية الإنزيم الداخلي:

قدرت فعالية الإنزيم الداخلي تماماً كما في الإنزيم الخارجي.

Formatted: Font: (Default) +Simplified-Arabic, 14 pt, Complex Script Font: Simplified Arabic, 14 pt

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

3-3-4- أمثلة ظروف عمل إنزيم الانفرتاز:

تشمل هذه الظروف درجة الحرارة, التهوية , تركيز السكروز , الـpH , مدة التحضين , مصدر الأزوت المستخدم

3-3-4-1- درجة الحرارة :Temperature

اختبر سلوك الانفرتاز من السلالات المعزولة لـ *Saccharomyces cerevisiae* لـ عند درجات مختلفة من الحرارة 20°c-25-30-35-40

3-3-4-2- التهوية:Aeration

أنتج الانفرتاز بتقنية الدوارق الهزازة حيث استخدمت دوارق مخروطية حضنت بحاضنة دورانية هزازة بمعدل رج '100-150-200-250-300د/د

3-3-4-3- تركيز السكروز:Sucrose concentration

استخدامت عدة تراكيز من السكروز 20- 25- 30- 35- 40غ/ل

3-3-4-4- الـ pH الأولي :Initial pH

حددت الفعالية الإنزيمية عند درجات مختلفة من الـ pH الأولي في بيئة التخمير وهي 4 - 4,5 - 5 - 5,5 - 6 و استخدم الـ pH meter لضبط الـ pH

3-3-4-5- مدة التحضين: Incubation period

قدرت مدة التحضين المثالية لعمل الانفرتاز بتحضين الدوارق لفترات مختلفة 1- 2- 3- 4- 5 يوم

3-3-4-6- مصادر الأزوت العضوي: Organic nitrogen sources

استخدمت اليوريا كمصدر الأزوت في البيئة عند تراكيز 0,1 -0,15- 0,2- 0,25- 0,3(غ/ل)

3-3-5 – دراسة العوامل الحركية و التحليل الإحصائي :

~~تم تحديد العوامل الحركية لوسط التخمير من قبل(Pirt, 1975) , كما حدد العالمان(Snedecor and Cochrane, 1980) الطريقة لمقارنة تأثيرات المعاملة.~~

~~ي~~أجري التحليل الإحصائي بتصميم التجارب المتقدم Response Surface Methodology باستخدام برنامج MINITAP OPTIMIZATION METHOD للمعاملات الخمسة و

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

الظروف الستة بثلاث مكررات لكل منها لحساب التباين و المتوسطات و الفروق المعنوية من أجل تحديد الظروف المثلى لعمل الإنزيم . درس كل متغير عند 3 مستويات (-1 , 0 ,+1) كما هو مبين في الجدول (8)

درجة الحرارة : 40, 30, 20°c

الـpH : 4 -5- 6

مدة التحضين : 1-3- 5 يوم

التهوية : 100-200-300 د/د

تركيز السكروز : 20 -30- 40 غ/ل

تركيز اليوريا : 0,1- 0,2- 0,3 غ/ل

الجدول (8) : تصميم التجربة Response Surface Methodology(RSM)

Blocks	Temperature	pH	Aeration speed	Sucrose%	Incubation time	Urea	Enzyme activity
1	20	4	100	20	1	60	
1	40	4	100	20	1	60	
1	20	6	100	20	1	60	
1	40	6	100	20	1	60	
1	20	4	300	20	1	60	
1	40	4	300	20	1	60	
1	20	6	300	20	1	60	
1	40	6	300	20	1	60	
1	20	4	100	40	1	60	
1	40	4	100	40	1	60	
1	20	6	100	40	1	60	
1	40	6	100	40	1	60	
1	20	4	300	40	1	60	
1	40	4	300	40	1	60	
1	20	6	300	40	1	60	
1	40	6	300	40	1	60	
1	20	4	100	20	5	60	
1	40	4	100	20	5	60	
1	20	6	100	20	5	60	

46656

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

1	40	6	100	20	5	60	
1	20	4	300	20	5	60	
1	40	4	300	20	5	60	
1	20	6	300	20	5	60	
1	40	6	300	20	5	60	
1	20	4	100	40	5	60	
1	40	4	100	40	5	60	
1	20	6	100	40	5	60	
1	40	6	100	40	5	60	
1	20	4	300	40	5	60	
1	40	4	300	40	5	60	
1	20	6	300	40	5	60	
1	40	6	300	40	5	60	
1	20	4	100	20	1	100	
1	40	4	100	20	1	100	
1	20	6	100	20	1	100	
1	40	6	100	20	1	100	
1	20	4	300	20	1	100	
1	40	4	300	20	1	100	
1	20	6	300	20	1	100	
1	40	6	300	20	1	100	
1	20	4	100	40	1	100	
1	40	4	100	40	1	100	
1	20	6	100	40	1	100	
1	40	6	100	40	1	100	
1	20	4	300	40	1	100	
1	40	4	300	40	1	100	
1	20	6	300	40	1	100	
1	40	6	300	40	1	100	
1	20	4	100	20	5	100	
1	40	4	100	20	5	100	
1	20	6	100	20	5	100	
1	40	6	100	20	5	100	
1	20	4	300	20	5	100	
1	40	4	300	20	5	100	
1	20	6	300	20	5	100	
1	40	6	300	20	5	100	
1	20	4	100	40	5	100	
1	40	4	100	40	5	100	
1	20	6	100	40	5	100	
1	40	6	100	40	5	100	
1	20	4	300	40	5	100	
1	40	4	300	40	5	100	
1	20	6	300	40	5	100	
1	40	6	300	40	5	100	
1	30	5	200	30	3	80	
1	30	5	200	30	3	80	
1	30	5	200	30	3	80	
1	30	5	200	30	3	80	
1	30	5	200	30	3	80	
1	30	5	200	30	3	80	
1	30	5	200	30	3	80	

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

1	30	5	200	30	3	80	
2	20	5	200	30	3	80	
2	40	5	200	30	3	80	
2	30	4	200	30	3	80	
2	30	6	200	30	3	80	
2	30	5	100	30	3	80	
2	30	5	300	30	3	80	
2	30	5	200	20	3	80	
2	30	5	200	40	3	80	
2	30	5	200	30	1	80	
2	30	5	200	30	5	80	
2	30	5	200	30	3	60	
2	30	5	200	30	3	100	
2	30	5	200	30	3	80	
2	30	5	200	30	3	80	
2	30	5	200	30	3	80	
2	30	5	200	30	3	80	
2	30	5	200	30	3	80	
2	30	5	200	30	3	80	

4- النتائج و المناقشة

Results &Discussion

Formatted: Font: 22 pt, Bold, Complex Script Font: Simplified Arabic, 22 pt, Bold

Formatted: Space After: 10 pt, Don't add space between paragraphs of the same style, Line spacing: Multiple 1.15 li, Outline numbered + Level: 1 + Numbering Style: 1, 2, 3, … + Start at: 3 + Alignment: Right + Aligned at: 0 cm + Indent at: 2.33 cm

Formatted: Font: 22.5 pt, Complex Script Font: 22.5 pt

Formatted: Font: 18 pt, Bold, Complex Script Font: 18 pt, Bold

Formatted: Left, Left-to-right, Indent: Before: 2.12 cm

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

النتائج و المناقشة

4-1- الخمائر الناتجة :

شخصت كافة الخمائر المعزولة من العينات (30) المذكورة و كانت نتائج التشخيص حسب شرائح الـ API كما يبين الجدول (9) ثلاث أجناس هي *Geotrichum* , *Candida* و *Saccharomyces* توزعت على 7 أنواع هي *Geotrichum capitatum* , , *Candida famata*, *Candida krusei* *Candida lusitaniae* , *Candida zeylanoidese*, *C. Glabrata* و *Saccharomyces cerevisiae*

أما بالنسبة لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* فلقد كان عدد عزلاتها 7 و هي موضوع البحث , استبعدت العزلات التي لم تظهر فيها نموات ظاهرية و كذلك العينات الملوثة بالفطور و أبواغها . و قد تميزت المستعمرات الإيجابية و النامية بالأطباق باللون الأبيض الكريستالي مشرشة الحواف أحياناً و متفاوتة الأقطار

الجدول(9) : نتائج تشخيص الخمائر باستخدام شرائحAPI و السكريات التي تستقلبها الخمائر

Formatted: Font: 22 pt, Bold, Complex Script Font: Simplified Arabic, 22 pt, Bold

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

عدد العزلات	أنواع السكاكر / نوع الخميرة	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF
1	*Gotrichum capitatum*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	*Candida krusei*	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–
4	*Candida lusitaniae*	+	+	+	-	–	+	–	+	–	+	–	+	+	–	+	+	+	+	–
1	*Candida famata*	+	–	+	–	–	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
1	*Candida zeylanoidese*	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–
7	*Saccharomyces cerevisiae*	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	+
1	*C. glabrata*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	-	–	–	-	+	-	–

الجدول(10): مصادر العينات الحاوية على خميرة الـ *Saccharomyces cerevisiae* و مكان وجودها.

عزلة الخميرة	عدد العينات ومصادرها	
S. cerevisiae1	1	زبيب1– حمص
S. cerevisiae2	1	مربى مشمش1– حمص
S. cerevisiae3	1	تمر–حمص
S. cerevisiae4	1	مربى مشمش– دمشق
S.cerevisiae5	1	مخلفات معمل الخميرة– حمص
S. cerevisiae6	1	مربى مشمش– طرطوس
S. cerevisiae7	1	مربى كرز – دمشق
العدد الكلي للسلالات	7	

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

كما يبين الجدول (10) إن أغلب العزلات ظهرت في محافظة حمص (أربع عزلات من أصل سبعة) و هي *Saccharomyces cerevisiae*1,2,3,5 و التي وجدت في عينات الزبيب و مربى مشمش و التمر و مخلفات معمل الخميرة على التوالي, تلتها محافظة دمشق التي حوت عينتين مأخوذتين منها و هما مربى المشمش و مربى الكرز على العزلتين *Saccharomyces cerevisiae* 4,7 على التوالي في حين ظهرت عزلة واحدة فقط في عينة مربى المشمش المأخوذة من محافظة طرطوس. كما نلاحظ من هذا الجدول تكرر ظهور الخميرة في عينات مربى المشمش حيث ظهرت بثلاث عينات من عينات مربى المشمش الأربعة المستخدمة في التجربة وأما عينات الزبيب الأربعة المستخدمة فلم تظهر فيها إلا عزلة واحدة فقط , كما ظهرت الخميرة في عينات مربى الكرز و مخلفات معمل الخميرة و التمر و هذا يتوافق مع العالم (Ikram *et al*, 2005) الذي عزل خميرة *Saccharomyces cerevisiae* التي استخدمها في إنتاج الانفرتاز من عينات من التمر.

4-2- غربلة العزلات:

تم تحضير منحنى قياسي لمحاليل قياسية من الغلوكوز حسب الجدول(7) و قيست الأمتصاصية عند طول الموجة 540nm كما هو موضح في الشكل (6) و حسبت الفعالية الإنزيمية من المعادلة

$$Abc = 4.963 * C$$
$$R_{sq} = 0.993$$

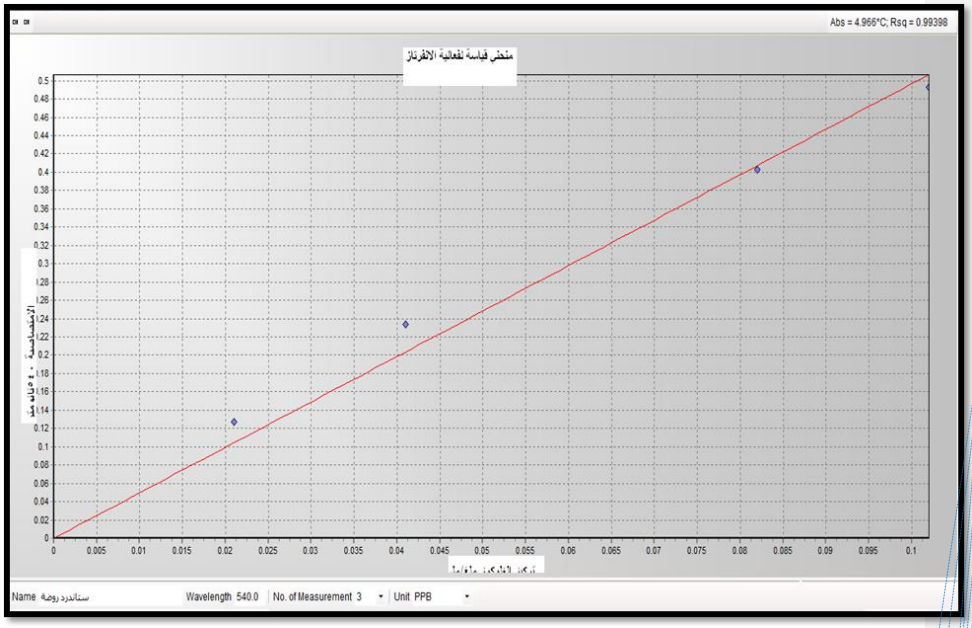
حيث :

Abs: الأمتصاصية

C : تركيز الغلوكوز (ملغ/مل) .

و منه $$C = Abc/4.963$$

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right



الشكل(6):منحني قياسي للفعالية الإنزيمية للانفرتاز

وتقدّر الفعالية الأنزيمية بوحدة مغ / مل وتحوّل إلى وحدة ميكرو مول / مل (وهي الوحدة المستعملة لقياس الفعالية عالمياً) وذلك باستخدام الوزن الجزيئي للغلوكوز :

1(ميكرومول / مل) = 1(مغ /مل) / 0.18

(U/ml) = (m g /ml) / 0.1

الجدول(11): أنتاج فعالية الانفرتاز الخارجي و الداخلي والكتلة الحيوية للعزلات الناتجة.

العزلة	كتلة الخلية الجافة غ/ل	فعالية الانفرتاز الخارجي u\ml	فعالية الانفرتاز الداخلي u/ml	فعالية الانفرتاز الكلي
S. cerevisi	26 38.2	6.36	5.92	12.28
S. cerevisi	3818	4.46	2.24	6.7
S. cerevisi	3616.4	5.38	5.08	10.46
S. cerevisi	3313.6	5.86	5.88	11.74
S.cerevisi	426.8	6.24	4.96	11.2
S. cerevisi	4222	6.08	4.64	10.72
S. cerevisia	4020.4	4.76	5.64	10.4

Formatted: Justified
Formatted: Right
Formatted: Strong, Font: 12 pt, Complex Script Font: Times New Roman, 12 pt
Formatted: Strong, Font: 11 pt, Complex Script Font: Times New Roman, 11 pt, (Complex) Arabic (Saudi Arabia)
Formatted: Strong, Font: 12 pt, Complex Script Font: Times New Roman, 12 pt
Formatted: Strong, Font: 12 pt, Complex Script Font: Times New Roman, 12 pt
Formatted: Strong, Font: 12 pt, Complex Script Font: 12 pt
Formatted: Strong, Font: 14 pt, Complex Script Font: 14 pt, (Complex) Arabic (Saudi Arabia)
Formatted: Strong, (Complex) Arabic (Saudi Arabia)
Formatted: Left-to-right
Formatted: Normal
Formatted: Normal, Justified
Formatted Table
Formatted: Strong, Font: 11 pt, Complex Script Font: Times New Roman, 11 pt, (Complex) Arabic (Syria)
Formatted: Strong, Font: 12 pt, Complex Script Font: Times New Roman, 12 pt, (Complex) Arabic (Saudi Arabia)
Formatted: Strong, Font: 12 pt, Complex Script Font: Times New Roman, 12 pt
Formatted: Strong, Font: 11 pt, Not Bold, Complex Script Font: Times New Roman, 11 pt, Not Bold
Formatted: Strong, Font: 12 pt, Complex Script Font: 12 pt
Formatted: Strong, Font: 11 pt, Complex Script Font: 11 pt, (Complex) Arabic (Saudi Arabia)
Formatted: Justified
Formatted: Justified
Formatted: Justified
Formatted: Justified
Formatted: Justified
Formatted: Justified
Formatted: (Complex) Arabic (Syria)
Formatted: (Complex) Arabic (Syria)
Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

يظهر الجدول (11) تباين في إنتاج الكتلة الخلوية الجافة للعزلات المدروسة حيث حققت العزلة *S.cerevisiae5* و *S. cerevisiae1* أعلى إنتاجية (~~8.~~426 غ/ل) في حين كانت العزلة *S. cerevisiae4* الأقل إنتاجاً (~~33~~13.6 غ/ل) أما باقي العزلات فكانت على الترتيب *S. cerevisiae6*,*S. cerevisiae7* , *S. cerevisiae2*, ~~*S. cerevisiae1*,~~ ~~*cerevisiae3*~~إنتاجية22 ,*cerevisiae3* ~~42~~إنتاجية ~~36~~16.4 , ~~38~~18 , ~~38.2,~~ ~~40~~20.4 , ~~33~~غ/ل على التوالي . كما يظهر الجدول (11) الكفاءة الأنزيمية للانفرتاز الناتج منإفرازية ل العزلات السبعة المدروسة لإنزيم الانفرتاز داخلياً و خارجياً حيث نلاحظ أن العزلة *S. cerevisiae1* كانت الاكفأ في إنتاجالنشاط الأنزيمي ~~ا~~للانفرتاز الخارجي و الداخلي (6.36 u/ml ~~0.212~~للخارجي و 5.92 ~~0.532~~ للداخلي) بينما كانت العزلة *S. cerevisiae2* الأقل كفاءة في إنتاج فعالية الانفرتاز الناتج عنها داخلياً و خارجياً (4.46~~0.041~~u/ml للخارجي و 2.24 ~~0.201~~u/ml للداخلي) و تدرجت إنتاجية فعالية الانفرتاز لباقي العزلات بين هذه القيم فمن حيث الانفرتاز الخارجي جاءت العزلة *S.cerevisiae5* في المرتبة الثانية تلتها *S.cerevisiae6* ثم السلالة *S.cerevisiae4* ثم *S.cerevisiae3* و *S.cerevisiae7* . أما ترتيب العزلات من حيث إفراز فعالية الانفرتاز الداخلي فكانت كما يلي *S.cerevisiae4* , *S.cerevisiae7*,*S.cerevisiae3*, *S.cerevisiae5* , *S.cerevisiae6* بإن~~0.417~~ على التوالي.

كما يظهر الجدول السابق أن فعالية الانفرتاز الخارجي أعلى نسبياً من فعالية الانفرتاز الداخلي في أغلب العزلات باستثناء العزلة *S. cerevisiae7* التي كانت فعالية الانفرتاز الداخلي U/ml5.64 أعلى من الخارجي u/ml 4.76 و العزلة *S. cerevisiae4* التي كانت الفعالية متقاربة جداً للانفرتاز الخارجي و الداخلي(u/ml 5.88 ,5.86) .

تراوحت الفعالية الكلية للانفرتاز في العزلات المدروسة بين (6.7,12.28 u/ml) .

~~وهذا يتوافق مع ما توصل إليهدرس العلماء~~ (Ikram *et al*, 2005) في الباكستان ~~عندما درسوا~~ فعالية الانفرتاز و إنتاج كتلة الخلية الجافة في خمس سلالات ~~مختلفة من~~ خميرة الـ *Saccharomyces cerevisiae* (GCA-I, GCA-II, GCA-III, GCA-IV and GCA-V) معزولة من خمس أنواع مختلفة من التمور (باكستاني و إيراني و تمور عربية) ~~و~~ حيث أظهرت السلالات المدروسة تباين في فعالية الانفرتاز لهذه السلالات تراوحت بين 59.61- ~~U/mg 42.02 و في الكتلة الخلية~~ جافة و حققت السلالة GCA-II تفوقاً عن باقي السلالات في فعالية الانفرتاز و كانت الكتلة الخلوية الجافة لهذه السلالة 1.02غ/ل~~.~~ . حيث

Formatted: Font: 14 pt, Complex Script Font: 14 pt

Formatted: Font: 14 pt, Complex Script Font: 14 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 14 pt, Complex Script Font: Times New Roman, 14 pt

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

نلاحظ وجود فرق كبير في كفاءة هذه السلالة و كفاءة السلالات المحلية في إنتاج الكتلة الخلوية .

كما بينت الدراسة التي أجراها (Shafiq *et al*, 2002) في لاهور في الباكستان على السلالة *Saccharomyces cerevisiae* GCB-K5 أن الفعالية الأنزيمية للانفرتاز بلغت 8.74U/ml و كانت وزن الكتلة الخلوية الجافة 5.20 غ/ل (6 pH و درجة الحرارة 30 °م و سرعة تهوية 200 د/د و تركيز سكروز 30غ/ل و مدة تحضين 48 ساعة) و بالمقارنة مع نتائجنا نجد أن السلالة *S. cerevisiae* GCB-K5 أكفأ في فعالية الانفرتاز الناتج عنها من السلالة *S.cerevisiae*1 إلا أن إنتاج الكتلة الجافة للسلالة للأخيرة كان أعلى .

بما أن العزلة *S.cerevisiae*1 حققت ~~اعلى إنتاجية~~تفوقاً على باقي العزلات في فعالية ~~لا~~لانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة فقد اختيرت لإجراء الأمثلة عليها لاحقاً لتحديد الظروف المثلى لإنتاج الانفرتاز .

~~3-4-4-3~~ -3-4 أمثلة ظروف إنتاج الانفرتاز:

عند إجراء الأمثلة تم الحصول على الجدول التالي:

الجدول (12) : نتائج أمثلة ظروف عمل الانفرتاز للعزلة *S.cerevisiae* ~~(تغيير الفواصل في الجداول)~~

Formatted: Font: Not Italic, Complex Script Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic, Complex Script Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic, Complex Script Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic, Complex Script Font: Not Italic, (Complex) Arabic (Syria)

Formatted: Indent: Before: 0 cm

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

درجة الحرارة ċc	درجة pH	التهوية د/د	تركيز السكروز g/l	مدة التحضين (اليوم)	اليوريا g/l	فعالية الانفرتاز الخارجي	فعالية الانفرتاز الداخلي	الفعالية الكلية u/ml	الخلوية g/l
20	4	100	20	1	0.1	3.76	3.54	7.3	24
40	4	100	20	1	0.1	2.52	2.86	5.38	21.6
20	6	100	20	1	0.1	3.04	5.36	8.4	23.6
40	6	100	20	1	0.1	1.54	4.08	5.62	23.2
20	4	300	20	1	0.1	5.76	5.12	10.88	6.8
40	4	300	20	1	0.1	2.56	3.32	5.88	11.2
20	6	300	20	1	0.1	7.12	3.92	11.04	2.8
40	6	300	20	1	0.1	2	7.44	9.44	8.8
20	4	100	40	1	0.1	6.54	5.34	11.88	24.8
40	4	100	40	1	0.1	1.88	4.84	6.72	34.8
20	6	100	40	1	0.1	6.62	4.02	10.64	24.4
40	6	100	40	1	0.1	1.54	3.48	5.02	33.6
20	4	300	40	1	0.1	4.32	4.78	9.1	18.8
40	4	300	40	1	0.1	4.72	0.58	5.3	16
20	6	300	40	1	0.1	5.56	5.78	11.34	17.6
40	6	300	40	1	0.1	8.74	2.24	10.98	11.6
20	4	100	20	5	0.1	1.16	3.66	4.82	29.2
40	4	100	20	5	0.1	2.18	2.96	5.14	24
20	6	100	20	5	0.1	4.14	3.58	7.72	30
40	6	100	20	5	0.1	2.34	3.06	5.4	18.4
20	4	300	20	5	0.1	2.64	4.06	6.7	21.2
40	4	300	20	5	0.1	2.32	2.68	5	15.6
20	6	300	20	5	0.1	3.58	6.06	9.64	26.8
40	6	300	20	5	0.1	1.24	0.22	1.46	30.4
20	4	100	40	5	0.1	5.48	2.28	7.76	34
40	4	100	40	5	0.1	5.08	4.65	9.73	18.8
20	6	100	40	5	0.1	6.72	4.1	10.82	32.8
40	6	100	40	5	0.1	7.14	12.24	19.38	16.8
20	4	300	40	5	0.1	0.7	11.6	12.3	18
40	4	300	40	5	0.1	9.66	2.44	12.1	15.6
20	6	300	40	5	0.1	1.14	9.96	11.1	23
40	6	300	40	5	0.1	2.1	2.88	4.98	14
20	4	100	20	1	0.3	2.28	1.56	3.84	15.2
40	4	100	20	1	0.3	3.14	5.78	8.92	22.8
20	6	100	20	1	0.3	3.6	0.22	3.82	23.6
40	6	100	20	1	0.3	3.54	7.22	10.76	25.6
20	4	300	20	1	0.3	6.48	5.9	12.38	9.2
40	4	300	20	1	0.3	3.76	2.68	6.44	12.8
20	6	300	20	1	0.3	7.88	5.62	13.5	20
40	6	300	20	1	0.3	8.44	1.88	10.32	9.6
20	4	100	40	1	0.3	8.64	4.44	13.08	13.6
40	4	100	40	1	0.3	1.86	8.76	10.62	16.4
20	6	100	40	1	0.3	4.64	5.34	9.94	26.4
40	6	100	40	1	0.3	2.52	12.2	14.72	17.2
20	4	300	40	1	0.3	2.94	5.98	8.92	15.6
40	4	300	40	1	0.3	3.88	3.06	6.94	8
20	6	300	40	1	0.3	3.32	5.54	8.86	13.6
40	6	300	40	1	0.3	4.18	2.8	6.98	14

20	4	100	20	5	0.3	4.24	2.78	7.02	25.6
40	4	100	20	5	0.3	7.38	2.82	10.2	23.2
20	6	100	20	5	0.3	4.26	3.08	7.34	30.8
40	6	100	20	5	0.3	7.88	1.22	9.1	18.4
20	4	300	20	5	0.3	2.64	2.42	5.06	26.4
40	4	300	20	5	0.3	1.98	1.14	3.12	24
20	6	300	20	5	0.3	3.32	5.98	9.3	27.2
40	6	300	20	5	0.3	2.74	1.16	3.9	25.2
20	4	100	40	5	0.3	4.4	4.42	8.82	26
40	4	100	40	5	0.3	6.46	5.62	12.08	23.2
20	6	100	40	5	0.3	6.62	4.6	11.22	20.4
40	6	100	40	5	0.3	5.06	5.22	10.28	19.6
20	4	300	40	5	0.3	2.54	3.56	6.1	26.4
40	4	300	40	5	0.3	1.66	2.68	4.34	18
20	6	300	40	5	0.3	2.96	4.26	7.22	20.4
40	6	300	40	5	0.3	2.28	3.14	5.42	16
30	5	200	30	3	0.2	5.62	5.56	11.18	26
30	5	200	30	3	0.2	6.8	4.84	11.64	32.8
30	5	200	30	3	0.2	6.12	5.44	11.56	27.6
30	5	200	30	3	0.2	6.12	6.56	12.68	27.2
30	5	200	30	3	0.2	6.38	4.62	11	22
30	5	200	30	3	0.2	5.14	4.84	9.98	23.8
30	5	200	30	3	0.2	6.9	5.42	12.32	21.6
30	5	200	30	3	0.2	6.12	6.44	12.56	17.2
20	5	200	30	3	0.2	1.2	2.86	4.06	19
40	5	200	30	3	0.2	2.12	4.76	6.88	16.2
30	4	200	30	3	0.2	3.46	7.16	10.62	11.6
30	6	200	30	3	0.2	1.2	6.12	7.32	10.6
30	5	100	30	3	0.2	1.54	9.36	10.9	14.4
30	5	300	30	3	0.2	5.94	2.4	8.34	13.6
30	5	200	20	3	0.2	5.24	4.2	9.44	13.8
30	5	200	40	3	0.2	5.64	5.72	11.36	14.4
30	5	200	30	1	0.2	7.22	4.64	11.86	15.8
30	5	200	30	5	0.2	6.22	4.5	10.72	15.8
30	5	200	30	3	0.1	5.06	5.34	10.4	14.2
30	5	200	30	3	0.3	3.56	3.08	6.64	14.2
30	5	200	30	3	0.2	6.02	4.24	10.26	14.2
30	5	200	30	3	0.2	5.88	4.92	10.8	14.2
30	5	200	30	3	0.2	7.12	5.78	12.9	14.2
30	5	200	30	3	0.2	6.96	5.78	12.74	14.2
30	5	200	30	3	0.2	7.44	4.66	12.1	14.2
30	5	200	30	3	0.2	6.28	5.16	11.44	14.2

~~Temperature °c~~	~~pH~~	~~Aeration peed v/v~~	~~Sucrose g/l~~	~~Incubation Time(Day)~~	~~Urea g/l~~		1.88~~External Enzyme Activity~~	1.77~~Internal Enzyme Activity~~	
~~20~~	~~4~~	~~100~~	~~20~~	~~1~~	~~0,1~~		1.26~~0,338~~	1.43~~0,319~~	
~~40~~	~~4~~	~~100~~	~~20~~	~~1~~	~~0,1~~		1.52~~0,227~~	2.68~~0,258~~	
~~20~~	~~6~~	~~100~~	~~20~~	~~1~~	~~0,1~~		0.77~~0,273~~	2.04~~0,482~~	
~~40~~	~~6~~	~~100~~	~~20~~	~~1~~	~~0,1~~		3.88~~0,138~~	2.56~~0,368~~	
~~20~~	~~4~~	~~300~~	~~20~~	~~1~~	~~0,1~~		1.28~~0,699~~	1.66~~0,460~~	
~~40~~	~~4~~	~~300~~	~~20~~	~~1~~	~~0,1~~		3.56~~0,231~~	1.96~~0,299~~	

Formatted ...

	20	6	300	20	1	0,1		1.000,640	3.720,352	2,8
	40	6	300	20	1	0,1		3.270,180	3.320,670	8,8
	20	4	100	40	1	0,1		0.940,588	2.420,598	24,8
	40	4	100	40	1	0,1		3.310,170	2.010,436	34,8
	20	6	100	40	1	0,1		0.770,596	1.740,361	24,4
	40	6	100	40	1	0,1		2.160,138	2.390,314	33,6
	20	4	300	40	1	0,1		2.360,389	0.290,430	18,8
	40	4	300	40	1	0,1		2.780,424	2.890,052	16
	20	6	300	40	1	0,1		4.370,501	1.120,521	17,6
	40	6	300	40	1	0,1		0.580,786	11.830,201	11,6
	20	4	100	20	5	0,1		1.090,105	1.482,129	39,2
	40	4	100	20	5	0,1		2.070,196	4.290,267	24
	20	6	100	20	5	0,1		1.170,372	1.530,773	30
	40	6	100	20	5	0,1		1.320,210	2.030,275	18,4
	20	4	300	20	5	0,1		1.160,238	1.340,366	41,2
	40	4	300	20	5	0,1		1.790,209	3.030,242	15,6
	20	6	300	20	5	0,1		0.620,323	0.110,546	36,8
	40	6	300	20	5	0,1		2.740,112	9.140,02	30,4
	20	4	100	40	5	0,1		2.940,494	3.341,645	34
	40	4	100	40	5	0,1		3.360,530	8.050,601	18,8
	20	6	100	40	5	0,1		3.570,604	6.121,449	32,8
	40	6	100	40	5	0,1		0.350,642	5.801.101	16,8
	20	4	300	40	5	0,1		4.830,063	1.221,044	18
	40	4	300	40	5	0,1		0.570,870	4.980,220	15,6
	20	6	300	40	5	0,1		1.050,102	1.440,897	23
	40	6	300	40	5	0,1		1.140,189	0.780,260	14
	20	4	100	20	1	0,3		1.570,205	2.890,141	15,2
	40	4	100	20	1	0,3		1.800,283	0.110,521	22,8
	20	6	100	20	1	0,3		1.770,324	3.610,019	23,6
	40	6	100	20	1	0,3		3.240,319	2.950,650	25,6
	20	4	300	20	1	0,3		1.880,583	1.340,531	9,2
	40	4	300	20	1	0,3		3.940,339	2.810,242	12,8
	20	6	300	20	1	0,3		4.220,71	0.940,506	2
	40	6	300	20	1	0,3		4.320,760	2.220,170	9,6
	20	4	100	40	1	0,3		0.930,777	4.380,399	13,6
	40	4	100	40	1	0,3		6.320,167	2.670,789	16,4
	20	6	100	40	1	0,3		1.261,138	6.100,480	26,4
	40	6	100	40	1	0,3		1.470,226	2.991,098	17,2
	20	4	300	40	1	0,3		5.940.264	1.530,539	15,6
	40	4	300	40	1	0,3		1.661,070	2.770,276	8
	20	6	300	40	1	0,3		6.090,299	1.400,499	13,6
	40	6	300	40	1	0,3		2.121,097	6.390,252	14
	20	4	100	20	5	0,3		3.690,382	3.411,150	35,6
	40	4	100	20	5	0,3		2.130,665	6.540,614	23,2
	20	6	100	20	5	0,3		3.940,384	3.611,177	30,8
	40	6	100	20	5	0,3		1.320,709	5.210,649	18,4
	20	4	300	20	5	0,3		0.990,238	0.570,937	36,4
	40	4	300	20	5	0,3		1.660,178	2.990,103	24
	20	6	300	20	5	0,3		1.370,299	0.580,538	37,2
	40	6	300	20	5	0,3		2.200,247	7.210,105	25,2
	20	4	100	40	5	0,3		3.230,396	2.811,298	46
	40	4	100	40	5	0,3		3.310,581	7.300,505	23,2

	20	6	100	40	5	0,3		3.530,596	7.611,314	40,4
	40	6	100	40	5	0,3		1.270,635	1.781,369	19,6
	20	4	300	40	5	0,3		0.830,228	1.340,320	66,4
	40	4	300	40	5	0,3		1.480,150	2.130,242	18
	20	6	300	40	5	0,3		1.140,266	1.570,383	40,4
	40	6	300	40	5	0,3		1.810,205	0.280,282	16
	30	5	200	30	3	0,2		1.400,325	2.420,051	6

	P	T	SE Coef	Coef	Term	
	30	5	200	30	3	0,2		0.060,252	2.720,436	12,8
	30	5	200	30	3	0,2		0.060,010	3.280,49	17,6
	30	5	200	30	3	0,2		1.190,01	0.310,59	07,2
	30	5	200	30	3	0,2		1.570,215	2.420,055	22
	30	5	200	30	3	0,2		1.450,282	2.710,435	18,8
	30	5	200	30	3	0,2		0.560,261	3.220,488	17,6
	30	5	200	30	3	0,2		0.600,10	1.430,58	27,2
	20	5	200	30	3	0,2		1.060,108	2.380,258	34
	40	5	200	30	3	0,2		1.730,191	3.580,428	29,2
	30	4	200	30	3	0,2		0.600,312	3.060,645	21,6
	30	6	200	30	3	0,2		0.770,108	6.680,55	10,6
	30	5	100	30	3	0,2		5.970,138	1.201,203	28,4
	30	5	300	30	3	0,2		0.621,074	0.100,216	25,6
	30	5	200	20	3	0,2		1.820,112	0.860,018	20,8
	30	5	200	40	3	0,2		3.610,327	2.320,155	16,4
	30	5	200	30	1	0,2		0.110,649	0.250,418	20,8
	30	5	200	30	5	0,2		1.530,020	1.670,045	24,8
	30	5	200	30	3	0,1		1.780,275	0.540,3	13,4
	30	5	200	30	3	0,3		2.010,320	0.120,097	2,4
	30	5	200	30	3	0,2		1.440,362	2.460,022	10
	30	5	200	30	3	0,2		0.560,260	2.890,442	14,4
	30	5	200	30	3	0,2		0.280,101	2.890,52	5,4
	30	5	200	30	3	0,2		1.720,05	2.330,521	20,4
	30	5	200	30	3	0,2		1.140,310	2.580,420	12,8
	30	5	200	30	3	0,2		1.880,206	1.770,465	14,4

التحليل الاحصائي للنتائج :

دراسة تأثير العوامل المدروسة في فعالية الانفرتاز الخارجي :

جدول (13) : التحليل الاحصائي لتأثير العوامل المدروسة في فعالية الانفرتاز الخارجي

0.01	0.232	92600.1	21437	الثابت
0.43	-0.795	0	0	Block
0.02	0.9	22.4	20.1	درجة الحرارة
0.04	0.934	22.4	20.9	الـPH
0.05	-0.663	22.4	-14.8	سرعة التهوية
0.035	-0.624	22.4	-14	تركيز السكروز
0.105	-0.751	22.4	-16.8	مدة التحضين
0.818	0.231	46416.1	10735.6	اليوريا
0.045	-0.787	0.1	-0.1	(درجة الحرارة)^2
0.02	-0.371	0.1	-0.1	^{2}(pH)
0.022	2.353	0.1	0.3	(سرعة التهوية) ^{2}
0.821	-0.305	0.1	0	(تركيز السكروز)^2
0.439	0.486	0.1	0.1	(مدة التحضين)^2
0.818	0.231	5816.6	1344.1	2(اليوريا)
0.029	-0.634	0	0	درجة الحرارة*الـPh
0.106	1.639	0	0	درجة الحرارة*سرعة التهوية
0.035	0.942	0	0	درجة الحرارة*تركيز السكروز
0.019	1.676	0	0	درجة الحرارة *مدة التحضين
0.372	0.9	5.6	5	درجة الحرارة *اليوريا
0.715	-0.366	0	0	الـPH * سرعة التهوية
0.009	-0.014	0	0	الـPH*تركيز السكروز
0.043	-0.557	0	0	الـPH*مدة التحضين
0.355	0.933	5.6	5.2	الـPH*اليوريا
0.218	-1.244	0	0	سرعة التهوية *تركيز السكروز
0.231	-3.706	0	-0.1	سرعة التهوية *مدة التحضين
0.51	-0.663	5.6	-3.7	سرعة التهوية *اليوريا
0.049	-0.389	0	0	تركيز السكروز*مدة التحضين
0.533	-0.627	5.6	-3.5	تركيز السكروز *اليوريا
0.457	-0.749	5.6	-4.2	مدة التحضين*اليوريا

Commented [u1]:

Formatted: Left, Indent: First line: 0 cm, Line spacing: single

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

يبين الجدول (13) التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات الست المدروسة في فعالية الانفرتاز الخارجي (Temperature X_1 و pH X_2 و Aeration speed X_3 و Sucrose X_4 و x_5 و Incubation time و Urea X_6

أهم ما يميز هذا الجدول هو وجود علاقة قطع مكافئ لتأثير كلاً من درجة الحرارة ودرجة الـ pH

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	21437	92600.1	0.232	0.01
Block	0	0	-0.795	0.43
Temperature	20.1	22.4	0.9	0.02
pH	20.9	22.4	0.934	0.04
Aeration Speed	-14.8	22.4	-0.663	0.05
Sucrose	-14	22.4	-0.624	0.035
Incubation time	-16.8	22.4	-0.751	0.105
Urea	10735.6	46416.1	0.231	0.818
Temperature*Temperature	-0.1	0.1	-0.787	0.045
pH* Ph	-0.1	0.1	-0.371	0.02
Aeration speed*Aeration speed	0.3	0.1	2.353	0.022
Sucrose*Sucrose	0	0.1	-0.305	0.821
Incubation time*Incubation time	0.1	0.1	0.486	0.439
Urea*Urea	1344.1	5816.6	0.231	0.818
Temperature*Ph	0	0	-0.634	0.029
Temperature*Aeration speed	0	0	1.639	0.106
Temperature*Sucrose	0	0	0.942	0.035
Temperature*Incubation time	0	0	1.676	0.019
Temperature*Urea	5	5.6	0.9	0.372
pH*Aeration speed	0	0	-0.366	0.715
pH*Sucrose	0	0	-0.014	0.009
pH*Incubation time	0	0	-0.557	0.043
pH*Urea	5.2	5.6	0.933	0.355
Aeration speed*Sucrose	0	0	-1.244	0.218
Aeration speed*Incubation time	-0.1	0	-3.706	0.231
Aeration speed*Urea	-3.7	5.6	-0.663	0.51
Sucrose*Incubation time	0	0	-0.389	0.049
Sucrose*Urea	-3.5	5.6	-0.627	0.533
Incubation time*Urea	-4.2	5.6	-0.749	0.457

Formatted: Left

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

وسرعة التهوية في فعالية الانفرتاز الخارجي، بينما كانت العلاقة خطية بين فعالية الأنزيم ونسبة السكروز، أما مدة التحضين ونسبة اليوريا لم تبدي أي تأثير معنوي في فعالية الأنزيم. كما يبين الجدول وجود بعض التأثيرات المتبادلة المعنوية بين العوامل المدروسة.

بالإضافة الى ذلك، ربطت العوامل المدروسة بفعالية أنزيم الأنفرتاز الخارجي من خلال معادلة انحدار معنوية (جدول 1414) كما يلي :

$$Y1= 21437+ 20.1X_1 + 20.9X_2 -14.8\ X_3 -14X_4 -16.8\ X5+ 10735.6X_6 -0.1^2\ X_1 - 0.1^2X_2 + 0.3^2X_3+ 0.1^2X_5 +1344.1^2X_6 + 5\ X_1*X_6 + 5.2X_2*X_6 - 0.1\ X_3*X_5 - 3.7\ X_3*X_6 \& -3.5\ X_4*X_6 - 4.2\ X_5*X_6$$

.

الجدول (14) : تحليل التباين لفعالية الانفرتاز الخارجي

المصدر	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Blocks	1	0.1805	0.03176	0.03176	0.63	0.43
الانحدار	27	2.679	2.67897	0.09922	1.97	0.014
الخطي	6	0.7266	0.1573	0.02622	0.52	0.01
المربع	6	0.6582	0.65819	0.1097	2.18	0.04
المتداخل	15	1.2942	1.29422	0.08628	1.72	0.021
الخطأ المتبقي	61	3.0673	3.06734	0.05028		
Lack-of-Fit	49	2.8858	2.88581	0.05889	3.89	0.17
الخطأ الصافي	12	0.1815	0.18153	0.01513		
المجموع	89	5.9268				

-دراسة تأثير العوامل المدروسة في فعالية الانفرتاز الداخلي احصائياً:

الجدول (15) : التحليل الاحصائي لتأثير العوامل المدروسة في فعالية الانفرتاز الداخلي

Formatted: English (United Kingdom)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-85849.7	105153	-0.816	0.417
Block	0	0	0.412	0.682
Temperature	55	25	2.166	0.334
PH	20.7	25	0.815	0.041
Aeration speed	-18.3	25	-0.72	0.031
Sucrose	-3.8	25	-0.151	0.01
Incubation time	-22.8	25	-0.898	0.403
Urea	-43032.4	52708	-0.816	0.021
Temperature*Temperature	0	0	0.059	0.823
pH*pH	0.3	0	1.6	0.05
Aeration speed*Aeration speed	0.4	0	2.278	0.076
Sucrose*Sucrose	-0.2	0	-1.495	0.014
Incubation time*Incubation time	-0.1	0	-0.617	0.814
Urea*Urea	-5392.5	6605	-0.816	0.017
Temperature*pH	0.1	0	2.025	0.047
Temperature*Aeration speed	0	0	-0.645	0.521
Temperature*Sucrose	0	0	0.39	0.698
Temperature*Incubation time	-0.1	0	-4.452	0.88
Temperature*Urea	13.8	6	2.172	0.084
pH*Aeration speed	0	0	-0.152	0.88
pH*Sucrose	0	0	1.309	0.006
pH*Incubation time	0	0	-0.588	0.559

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

~~pH*Urea~~	~~5.2~~	~~6~~	~~0.815~~	~~0.018~~
~~Aeration speed*Sucrose~~	~~-0.1~~	~~0~~	~~-1.784~~	~~0.079~~
~~Aeration speed*Incubation time~~	~~-0.1~~	~~0~~	~~-4.211~~	~~0.12~~
~~Aeration speed*Urea~~	~~-4.5~~	~~6~~	~~-0.713~~	~~0.479~~
~~Sucrose*Incubation time~~	~~0~~	~~0~~	~~0.875~~	~~0.385~~
~~Sucrose*Urea~~	~~-1~~	~~6~~	~~-0.153~~	~~0.009~~
~~Incubation time*Urea~~	~~-5.7~~	~~6~~	~~-0.903~~	~~0.037~~

P	T	SE Coef	Coef	Term
0.417	-0.816	105153	-85849.7	الثابت
0.682	0.412	0	0	Block
0.334	2.166	25	55	درجة الحرارة
0.041	0.815	25	20.7	الـPh
0.031	-0.72	25	-18.3	سرعة التهوية
0.01	-0.151	25	-3.8	تركيز السكروز
0.403	-0.898	25	-22.8	مدة التحضين
0.021	-0.816	52708	-43032.4	اليوريا
0.823	0.059	0	0	(درجة الحرارة)^2
0.05	1.6	0	0.3	(درجة الـ pH)^2
0.076	2.278	0	0.4	(سرعة التهوية) ^{2}
0.014	-1.495	0	-0.2	(تركيز السكروز)^2
0.814	-0.617	0	-0.1	(مدة التحضين)^2
0.017	-0.816	6605	-5392.5	(اليوريا)2
0.047	2.025	0	0.1	درجة الحرارة*الـPH
0.521	-0.645	0	0	درجة الحرارة*سرعة التهوية
0.698	0.39	0	0	درجة الحرارة*تركيز السكروز
0.88	-4.452	0	-0.1	درجة الحرارة *مدة التحضين
0.084	2.172	6	13.8	درجة الحرارة *اليوريا
0.88	-0.152	0	0	الـPH * سرعة التهوية
0.006	1.309	0	0	الـPH*تركيز السكروز
0.559	-0.588	0	0	الـPH*مدة التحضين
0.018	0.815	6	5.2	الـPH*اليوريا
0.079	-1.784	0	-0.1	سرعة التهوية *تركيز السكروز
0.12	-4.211	0	-0.1	سرعة التهوية *مدة التحضين
0.479	-0.713	6	-4.5	سرعة التهوية *اليوريا
0.385	0.875	0	0	تركيز السكروز*مدة التحضين
0.009	-0.153	6	-1	تركيز السكروز *اليوريا
0.037	-0.903	6	-5.7	مدة التحضين*اليوريا

Commented [u2]:

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

(يرجى مناقشة النتائج كما في السابقيبين الجدول (15) التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات الستة المدروسة منفردة في فعالية الانفرتاز الداخلي حيث نلاحظ أن قيمة *p* لكل من الـ **pH** و سرعة التهوية و تركيز السكروز و اليوريا أقل من 0.05 ($0.05>p$) و بالتالي كان تأثير هذه المتغيرات معنوي خطي في فعالية الانفرتاز الداخلي في حين كانت قيمة *p* لكل من درجة الحرارة و مدة التحضين أصغر من 0.05 و بالتالي تأثير هذه العوامل غير معنوي .

- التحليل الاحصائي لمربع المتغيرات الستة حيث كانت قيمة *p* لمربع الـ **pH** و تركيز السكروز و اليوريا أصغر من 0.05 ($0.05>p$) هذا يعني أن تأثير هذه العوامل معنوي في فعالية الانفرتاز الداخلي و علاقة بين مربع هذه المتغيرات مع فعالية الانفرتاز الداخلي بشكل قطع مكافئ بينما كان تأثير مربع باقي المتغيرات غير معنوي ($0.05<p$) في فعالية الانفرتاز الداخلي .

- التحليل الاحصائي للعوامل المرتبطة (15 علاقة تداخل) حيث نلاحظ من الجدول أن علاقة الـ pH مع تركيز السكروز و مع اليوريا و علاقة السكروز مع اليوريا و علاقة مدة التحضين مع اليوريا كانت معنوية في تأثيرها في فعالية الانفرتاز الداخلي , بينما كانت باقي العلاقات غير معنوية($0.05>p$) في تأثيرها في نشاط الأنزيم .

و حسب الجدول (15) تكتب المعادلة كما يلي :

$$Y2 = -85849.7 + 55X_1 + 20.7\,X_2 - 18.3\,X_3 - 3.8\,X_4 - 22.8\,X_5 - 43032.4\,X_6 + 0.3^2\,X_2 + 0.4^2\,X_3 - 0.4^2\,X_4 - 0.1^2\,X_5 - 5392.5^2\,X_6 + 0.1\,X_1 * X_2 - 0.1\,X_1 * X_5 + 13.8\,X_1 * X_6 + 5.2\,X_2 * X_6 - 0.1\,X_3 * X_4 - 0.1\,X_3 * X_5 - 4.5\,X_3 * X_6 - X_4 * X_6 - 5.7\,X_5 * X_6 .$$

Formatted: Indent: Before: 0 cm, Line spacing: single, Don't adjust space between Latin and Asian text, Don't adjust space between Asian text and numbers

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

تحليل التباين لفعالية الانفرتاز الداخلي :

يبين الجدول (16) أن متغير واحد على الأقل من المتغيرات المدروسة المفردة (**Linear**) ذو تأثير معنوي في فعالية الانفرتاز الداخلي (p<0.05) , و متغير مربع (**Square**) واحد على الأقل له تأثير معنوي و كذلك وجود علاقة ارتباط (**Interaction**) واحدة على الأقل معنوية .

(**Lack-of-Fit**) : يدل على التغير الناتج عن عدم صحة المعادلة , نرى من الجدول (1-15)

Estimated Regression Coefficients for Internal Enzyme activity

الجدول (15) : التحليل الاحصائي لتأثير العوامل المدروسة في فعالية الانفرتاز الداخلي

نلاحظ من الجدول (15) أن تأثير سرعة التهوية معنوي خطي في فعالية الانفرتاز الداخلي (p<0.05) و كانت علاقة كل من الـ **pH** و تركيز السكروز و اليوريا مع فعالية الانفرتاز الداخلي علاقة قطع مكافئ و نلاحظ أيضاً من الجدول أن علاقة الـ pH مع تركيز السكروز و مع اليوريا و علاقة السكروز مع اليوريا و علاقة مدة التحضين مع اليوريا كانت معنوية في تأثيرها في فعالية الانفرتاز الداخلي , بينما كانت باقي العلاقات غير معنوية (p<0.05) .

و حسب الجدول (15) تكتب المعادلة كما يلي :

$$Y2 = -85849.7 + 55X_1 + 20.7\,X_2 - 18.3\,X_3 - 3.8\,X_4 - 22.8\,X_5 - 43032.4\,X_6 + 0.3^2\,X_2 + 0.4^2\,X_3 - 0.4^2\,X_4 - 0.1^2\,X_5 - 5392.5^2\,X_6 + 0.1\,X_1 * X_2 - 0.1\,X_1 * X_5 + 13.8\,X_1 * X_6 + 5.2\,X_2 * X_6 - 0.1\,X_3 * X_4 - 0.1\,X_3 * X_5 - 4.5\,X_3 * X_6 - X_4 * X_6 - 5.7\,X_5 * X_6$$

الجدول (16) : تحليل التباين لفعالية الانفرتاز الداخلي

المصدر	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Blocks	1	0.4194	0.011	0.011	0.17	0.682
الانحدار	27	9.358	9.35798	0.34659	5.35	0
الخطي	6	4.9999	0.47791	0.07965	1.23	0.034

Formatted: Right
Formatted: English (United States)
Formatted: Right
Formatted: French (France)
Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

المربع	6	0.793	0.79298	0.13216	2.04	0.04
المتداخل	15	3.5651	3.56511	0.23767	3.67	0
الخطأ المتبقي	61	3.9553	3.95531	0.06484		

P	T	SE Coef	Coef	Term
0.730	-0.346	2670007	-924662	الثابت

Lack-of-Fit	49	3.45	3.45002	0.07041	1.67	0.167
الخطأ الصافي	12	0.5053	0.50529	0.04211		
المجموع	89	13.7327				

دراسة تأثير المتغيرات في الكتلة الخلوية الجافة احصائياً :

الجدول (17) : التحليل الاحصائي لتأثير العوامل المدروسة في الكتلة الخلوية الجافة

Formatted: Font: (Default) Simplified Arabic, Complex Script Font: Simplified Arabic

Formatted: Right, Tab stops: Not at 2.29 cm + 17.19 cm

Formatted: Font: (Default) Simplified Arabic, Complex Script Font: Simplified Arabic

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

0.427	-0.799	1	-1	**Block**
0.011	-1.456	645	-939	**درجة الحرارة**
0.05	-0.191	645	-123	**الـPH**
0.082	1.662	645	1072	**سرعة التهوية**
0.035	0.894	645	577	**تركيز السكروز**
0.005	2.912	645	1878	**مدة التحضين**
0	-0.346	1338349	-463620	**اليوريا**
0. 371	2.134	4	9	**(درجة الحرارة)^2**
0.026	-0.490	4	-2	**(درجة الـ pH)^2**
0.428	0.798	4	3	**(سرعة التهوية) ^{2}**
0.038	-0.967	4	-4	**(تركيز السكروز)^2**
0.071	0.035	4	0	**(مدة التحضين)^2**
0.030	-0.347	167713	-58113	**(اليوريا)2**
0.491	0.692	1	1	**درجة الحرارة*الـPH**
0.588	-0.545	1	-0	**درجة الحرارة*سرعة التهوية**
0.115	-1.597	1	-1	**درجة الحرارة*تركيز السكروز**
0.437	-5.649	1	-5	**درجة الحرارة *مدة التحضين**
0.152	-1.450	162	-234	**درجة الحرارة *اليوريا**
0.726	-0.352	1	-0	**الـPH * سرعة التهوية**
0.044	-0.197	1	-0	**الـPH*تركيز السكروز**
0.292	-1.063	1	-1	**الـPH*مدة التحضين**
0.05	-0.189	162	-31	**الـPH*اليوريا**
0.893	-0.135	1	-0	**سرعة التهوية *تركيز السكروز**
0.230	3.855	1	3	**سرعة التهوية *مدة التحضين**
0.101	1.666	162	269	**سرعة التهوية *اليوريا**
0.098	-1.682	1	-1	**تركيز السكروز*مدة التحضين**
0.037	0.893	162	144	**تركيز السكروز *اليوريا**
0.235	2.904	162	469	**مدة التحضين*اليوريا**

Commented [u3]:

Formatted: Font: (Default) Simplified Arabic, Complex Script Font: Simplified Arabic

Formatted: Font: (Default) Simplified Arabic, Complex Script Font: Simplified Arabic

Formatted: Indent: Before: -0.09 cm, Adjust space between Latin and Asian text, Adjust space between Asian text and numbers

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

~~Estimated Regression Coefficients for Dry Ce~~ يبين الجدول (17) ~~التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات الستة المدروسة في الكتلة الخلوية الجافة و نلاحظ~~ أن ~~قيمة~~ *p* ~~لكل من~~ علاقة درجة الحرارة ~~و الـ pH و تركيز السكروز~~ و مدة التحضين ~~و اليوريا أقل من~~

~~0.05 (0.05>p) و بالتالي كان تأثير هذه المتغيرات في~~ مع الكتلة الحيوية الجافة علاقة معنوية خطية في حين كانت علاقة الـ **pH** و تركيز السكروز و اليوريا مع الكتلة الخلوية الجافة بشكل قطع مكافئ , بينما لم يكن لتغير سرعة التهوية أي تأثير ملحوظ في إنتاج الكتلة الجاف , نلاحظ من الجدول أن علاقة الـ **pH** مع السكروز و مع اليوريا و علاقة السكروز مع اليوريا كانت معنوية في تأثيرها في الكتلة الخلوية الجافة بينما كانت باقي العلاقات غير معنوية.~~بينما كان تأثير سرعة التهوية غير معنوي (0.05<p).~~

~~- التحليل الاحصائي لمربع المتغيرات الستة حيث كانت قيمة p لمربع كل من و الـ **pH** و تركيز السكروز و اليوريا أقل من 0.05 (0.05>p) و بالتالي كان تأثير هذه المتغيرات في الكتلة الخلوية الجافة معنوي و العلاقة بين مربع هذه المتغيرات مع الكتلة الخلوية الجافة بشكل قطع مكافئ بينما نجد أن قيمة p لكل من مربع درجة الحرارة و سرعة التهوية و مدة التحضين أكبر من 0.05 (0.05<p) أي أن تأثير مربع هذه المتغيرات في الكتلة الخلوية الجافة غير معنوي و العلاقة ليست علاقة قطع مكافئ .~~

~~- التحليل الاحصائي للمتغيرات المتداخلة (15 علاقة) نلاحظ من الجدول أن علاقة الـ **pH** مع السكروز و مع اليوريا و علاقة السكروز مع اليوريا كانت معنوية في تأثيرها في الكتلة الخلوية الجافة بينما كانت باقي العلاقات غير معنوية.~~

و حسب الجدول (17–18) تكتب ~~ال~~معادلة الانحدار المعنوية كما يلي :

$$Y3 = -924662 - 939X_1 - 123X_2 + 1072X_3 + 577X_4 + 1878X_5 - 463620X_6 + 9^2X_1 - 2^2X_2 + 3^2X_3 - 4^2X_4 - 58113^2X_6 + X_1 * X_2 - X_1 * X_4 - 5X_1 * X_5 - 234X_1 * X_6 - X_2 * X_5 - 31X_2 * X_6 + 3X_3 * X_5 + 269X_3 * X_6 - X_4 * X_5 + 144X_4 * X_6 + 469X_5 * X_6 .$$

~~الجدول (17) التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات الستة المدروسة في الكتلة الخلوية الجافة~~

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Complex Script Font: Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Simplified Arabic, Complex Script Font: Simplified Arabic

Formatted: Font: (Default) Simplified Arabic, Complex Script Font: Simplified Arabic

Formatted: Font: (Default) Simplified Arabic, Complex Script Font: Simplified Arabic

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Complex Script Font: Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Simplified Arabic, Complex Script Font: Simplified Arabic

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-924662	2670007	-0.346	0.730
Block	-1	1	-0.799	0.427
Temperature	-939	645	-1.456	0.011
pH	-123	645	-0.191	0.05
Aeration speed	1072	645	1.662	0.082
Sucrose	577	645	0.894	0.035
Incubation time	1878	645	2.912	0.005
Urea	-463620	1338349	-0.346	0
Temperature*Temperature	9	4	2.134	0. 371
pH*pH	-2	4	-0.490	0.026
Aeration speed*Aeration speed	3	4	0.798	0.428
Sucrose*Sucrose	-4	4	-0.967	0.038
Incubation time*Incubation time	0	4	0.035	0.071
Urea*Urea	-58113	167713	-0.347	0.030
Temperature*pH	1	1	0.692	0.491
Temperature*Aeration speed	-0	1	-0.545	0.588
Temperature*Sucrose	-1	1	-1.597	0.115
Temperature*Incubation time	-5	1	-5.649	0.437
Temperature*Urea	-234	162	-1.450	0.152
pH*Aeration speed	-0	1	-0.352	0.726

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

pH*Sucrose	-0	1	-0.197	0.044
pH*Incubation time	-1	1	-1.063	0.292
pH*Urea	-31	162	-0.189	0.05
Aeration speed*Sucrose	-0	1	-0.135	0.893
Aeration speed*Incubation time	3	1	3.855	0.230
Aeration speed*Urea	269	162	1.666	0.101
Sucrose*Incubation time	-1	1	-1.682	0.098
Sucrose*Urea	144	162	0.893	0.037
Incubation time*Urea	469	162	2.904	0.235

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

Formatted: French (France)

تحليل التباين للكتلة الخلوية الجافة

Formatted: Indent: Before: 0 cm

Formatted: French (France)

Formatted: Right

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

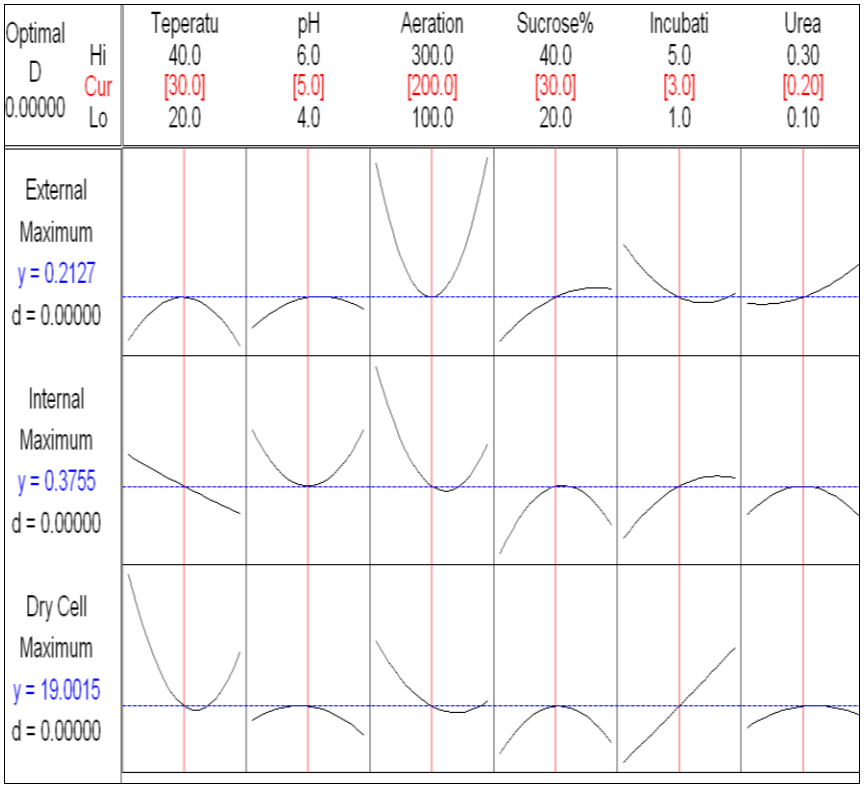
~~نلاحظ من الجدول (18) أن متغير واحد على الأقل من المتغيرات المدروسة المفردة (Linear) ذو تأثير معنوي في الكتلة الخلوية الجافة (p<0.05) , و متغير مربع (Square) واحد على الأقل له تأثير معنوي (p<0.05) و كذلك وجود علاقة ارتباط (Interaction) واحدة على الأقل معنوية (p<0.05) .~~

~~Lack-of-Fit : يدل على التغير الناتج عن عدم صحة المعادلة , نرى من الجدول (14) أن (p<0.05) .....~~

الجدول (18) : تحليل التباين للكتلة الخلوية الجافة

المصدر	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Blocks	1	45.37	26.71	26.71	0.64	0.427
الانحدار	27	6804.48	6804.48	252.02	6.03	0
الخطي	6	3553.33	598.6	99.77	2.39	0.039
المربع	6	392.32	392.32	65.39	1.56	0.013
المتداخل	15	2858.83	2858.83	190.59	4.56	0
الخطأ المتبقي	61	2550.14	2550.14	41.81		
Lack-of-Fit	49	2134.99	2134.99	43.57	1.26	0.346
الخطأ الصافي	12	415.15	415.15	34.6		
المجموع	89	9399.99				

Formatted: French (France)
Formatted: Right
Formatted: Right
Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right



Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

الشكل(7) :الظروف المثالية لفعالية الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة

~~-1-3-4~~

~~-2-3-4~~

~~-1-3-4-3-3-4~~ -1-3-4 تأثير درجة الحرارة في فعالية الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية:

تمت عملية الأمثلة عند درجات الحرارة العليا 40° c و الوسطى 30°c و الدنيا 20° , فكانت نتائج الأمثلة كما يبين الشكل (8) أن درجة الحرارة المثالية لفعالية الانفرتاز الداخلي و الخارجي و للكتلة الخلوية الجافة كانت 30°c حيث بلغت فعالية الانفرتاز الخارجي u/ml 7.12 و وصلت في الانفرتاز الداخلي إلى 5.78u/ml و كانت كتلة الخلية الجافة 32.8غ/ل(عند pH5 و سرعة تهوية 200 د/د و تركيز سكروز 30غ/ل و مدة تحضين 3أيام و يوريا 0.2غ/ل).

نلاحظ من الجداول (17,15,13) و من الشكل (8) أن تأثير درجة الحرارة في فعالية الانفرتاز الخارجي كان معنوياً في حين لم يظهر لها هذا التأثير في فعالية الانفرتاز الداخلي و في الكتلة الحيوية وعند زيادة درجة حرارة التحضين أدى إلى انخفاض ملحوظ في إنتاج الانفرتاز و السبب هو التعطيل الحراري لخلايا الخميرة و بالتالي للإنزيم بالإضافة إلى أنه عند درجات الحرارة العالية ينخفض محتوى الرطوبة لوسط التخمير عن المستوى المطلوب لإنتاج الإنزيم من الخميرة.

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

تتوافق نتائجنا مع ما توصل إليه (Shafiq *et al*, 2004) الذين حصولوا على إنتاج أعظمي للانفرتاز عند 30° c .

كما تتوافق نتائجنا مع نتائج العالمان (Ikram and Mukhtar,2006) في أن الإنتاج الأعظمي للانفرتاز تحقق عندما كانت درجة حرارة التحضين 30° c كذلك كانت الكتلة الحيوية الجافة أعلى ما يمكن .

تنسجم هذه النتائج مع نتائج دراسات سابقة أظهرت أن درجة الحرارة 30°c مثالية لإنتاج الانفرتاز(Vrabel *et al*, 2003; Abrahao-Neto *et al.* 1996) و كذلك مع نتائج (Vitolo *et al*, 1995) الذي بينت دراسته أن درجة الحرارة المناسبة لخلايا الخميرة لإنتاج الانفرتاز 30°c .

اختلفت درجة الحرارة المثلى الناتجة من دراستنا مع تلك التي توصل إليها(Migneault I *et al.,* 2004) عند دراستهم تأثير درجة الحرارة في فعالية الأنفرتاز حيث سجلت درجة الحرارة المثالية لفعالية الانفرتاز حوالي 40°c و قد يعزى سبب الاختلاف في النتائج إلى الاختلاف في السلالات المدروسة و مصادرها .

درجة الحرارة العظمى 40°c درجة الحرارة المثلى 30°c درجة الحرارة الدنيا 20°c تأثير درجة الحرارة في ←	كتلة الخلية الجافة	فعالية الانفرتاز الداخلي	فعالية الانفرتاز الخارجي

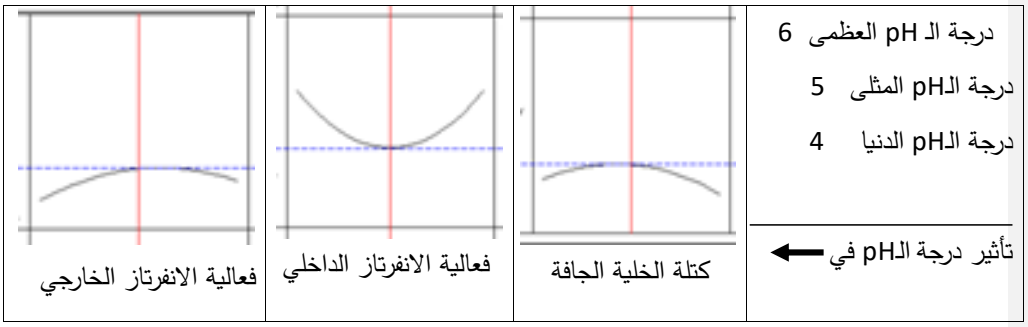
Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

الشكل (8) : تأثير درجة الحرارة في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة

4-3-2- تأثير الـ pH في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة :

تتميز الأنزيمات بعدم ثباتيتها تجاه التغير في حموضة الوسط فعادة ما تؤدي القيم الكبيرة للـ pH إلى ضياع في فعالية أغلب الإنزيمات , لكن هناك قيمة الأفضل للـ pH لكل إنزيم يكون عندها الإنزيم أكثر فعالية تعرف هذه النقطة بالـ pH المثالي و يعتبر تحديد هذه النقطة مهم جداً للوصول بالأنزيم إلى أعلى نشاط لذا تمت دراسة فعالية الانفرتاز عند درجات مختلفة من الحموضة(4-5-6) للحصول على فعالية عظمى للانفرتاز (داخلياً و خارجياً) كذلك إنتاج أعظمي للكتلة الخلوية الجافة و تحقق ذلك عند الـ pH 5 كما يبين الشكل (9) حيث نلاحظ أن تأثير الـ pH في كل من فعالية الانفرتاز الخارجي و الداخلي و في الكتلة الحيوية الجافة معنوي . تتوافق النتيجة المتحصل عليها مع (Vitolo *et al*, 1995) .

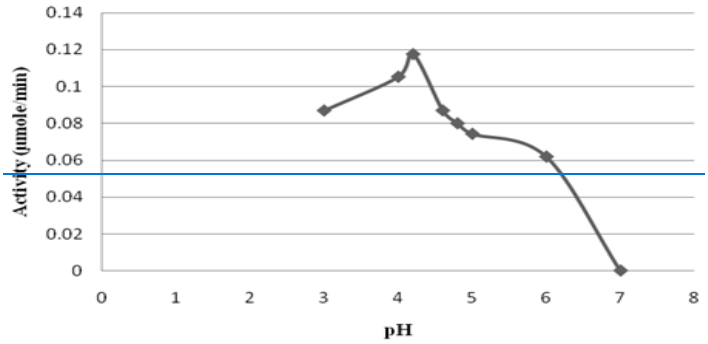
توصل العلماء (Herwig *et al*, 2001, Belcarz *et al*, 2002) إلى نتيجة مغايرة من حيث النشاط الأعظمي للانفرتاز حيث كان الـ pH المثالي 6 و لكن كانت النتيجة متقاربة نسبياً فيما يتعلق بالكتلة الخلية الجافة حيث حصلوا على أفضل إنتاج للكتلة الحيوية عند pH 5,5 .



الشكل (9) : تأثير درجة الـ pH في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة

4-3-3-

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right



~~الشكل (7) : تأثير قيمة الـpH في فعالية الانفرتاز المنحل حسب (Bakir *et al*, 2008)~~

تأثير التهوية في فعالية الانفرتاز و الإنتاج الخلوي

~~4-5-3 تأثير التهوية في إنتاج الإنفرتاز :~~

~~4-5-4~~ استخدمت سرعات مختلفة (السرعة العليا 300د/د و الوسطى 200د/د و الدنيا 100د/د) للحاضنة الهزازة عند تحضين دوارق التخمير لتحديد سرعة التهوية المثالية لعمل الانفرتاز و لإنتاج الكتلة الخلوية فكانت السرعة المثالية 200 د/د كما يوضح الشكل (10) .

كان تأثير سرعة التهوية معنوي في فعالية الانفرتاز الخارجي(p< 0.05) بينما كان غير معنوي في فعالية الانفرتاز الداخلي و كتلة الخلية الجافة (p> 0.05) .

توافقت نتيجتنا مع نتائج العلماء (Ikram *et al*, 2005) عند دراستهم فعالية الانفرتاز من السلالة GCA-II *Saccharomyces cerevisiae* في الباكستان حيث حققت هذه السلالة أعلى فعالية أنزيمية و أعلى كتلة خلوية عند سرعة تهوية 200د/د . كما توافقت نتائجنا مع نتائج الدراسة التي أجراها (Shafiq *et al*, 2002)

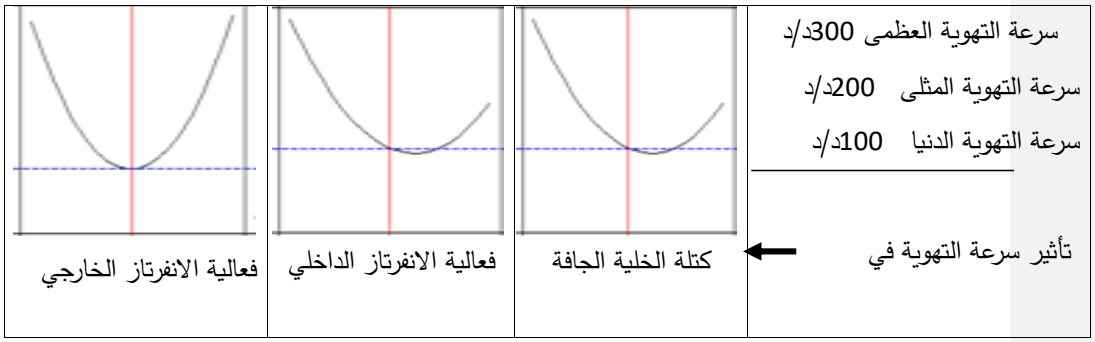
Formatted: Justified, Indent: Before: 1.27 cm

Formatted: Justified, Indent: Before: 0.09 cm, Line spacing: single, No bullets or numbering

Formatted: Justified, Line spacing: single

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Not Italic, Complex Script Font: Not Italic

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right



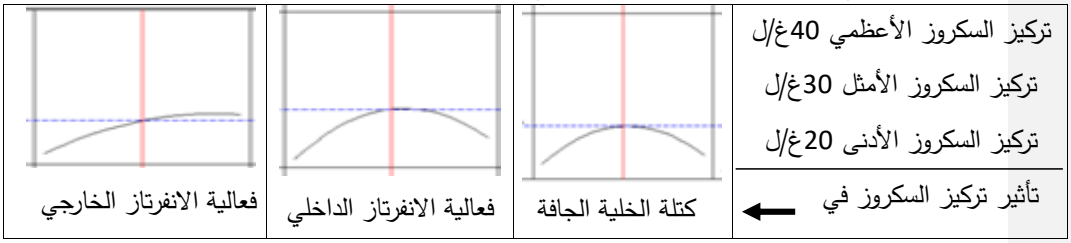
الشكل (10) : تأثير سرعة التهوية في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة

~~4-3-4=4=4=3~~ تأثير تركيز السكروز في فعالية الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الجافة :

إن السكروز هي الركيزة التي يعمل عليها الانفرتاز لذا فان وجوده في الوسط بالتركيز المناسب ضروري لحث الخميرة على إنتاج هذا الإنزيم . استخدمت تراكيز متنوعة من السكروز (التركيز الأعلى 40 غ/ل و الأدنى 20 غ/ل و التركيز 30 غ/ل)عند دراسة الشروط المثلى لنشاط الانفرتاز داخلياً و خارجياً و لإنتاج الكتلة الخلوية الجافة و ذلك لتحديد التركيز الأفضل فكان التركيز 20 غ/ل هو الأمثل فعالية الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الجافة و كان تأثيره معنوي في فعالية الانفرتاز الداخلي و الكتلة الجافة بينما لم يكن معنوي في فعالية الانفرتاز الخارجي كما هو واضح في الشكل (11) . تتوافق النتيجة المتحصل عليها مع نتيجة (Vitolo *et al*,1995) حيث حصلوا على أعلى فعالية للأنزيم عند تركيز للسكروز 30 غ/ل , سبب ارتفاع تركيز السكروز أكثر من 30غ/ل زيادة استهلاك السكر و لم يترافق مع زيادة في فعالية الانفرتاز و السبب هو توليد تركيز عالي من السكر المحول في البيئة أدى لمنع الخميرة من إنتاج الانفرتاز بسبب توفر الغلوكوز , و كان نشاط الانفرتاز أقل من المثالي عند تركيز للسكروز أقل من 30 غ/ل لأنه و بما أن السكروز مصدر للكربون بالبيئة فالتركيز المنخفض منه تحد من النمو المناسب للخميرة و بالتالي انخفاض في إنتاج الانفرتاز و في إنتاج الكتلة الخلوية الجافة , كما أدت الزيادة في تركيز السكر إلى انخفاض تدريجي في تشكيل الإنزيم و ذلك ربما يعود إلى التبرعم المتكرر للخلايا والتي تنتج وسطاً لزجاً وكمية أقل من السكر وبالتالي يجعل العملية غير اقتصادية كما أدى التركيز المنخفض من السكر إلى إنتاج أقل للإنزيم نظراً لتراكم السكريات الأحادية الناتجة عن الحلمهة والتي سببت بدورها منع وجود الانفرتاز. توافقت

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

هذه النتيجة مع (Ikram and Mukhtar, 2006) في المجال نفسه و تبين لهم أن زيادة محتوى السكر في الوسط يخفض معدل النمو النوعي والكتلة الحيوية الناتجة للخميرة.

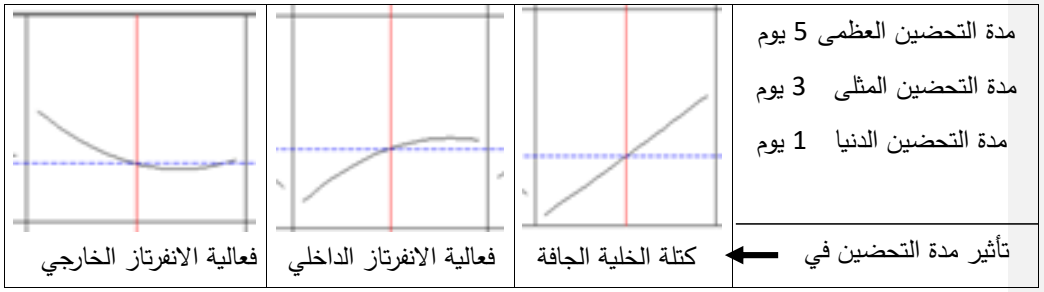


الشكل(11): تأثير تركيز السكروز في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة

~~3-4-5-4-3-~~ تأثير مدة التحضين في فعالية الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الجافة :

إن مدة التحضين المناسبة هامة و حرجة لإنتاج أعظمي للإنزيم و تكمن أهميتها من تأثيرها في نمو الخميرة , يظهر الشكل (12) فترات التحضين المستخدمة في الأمثلة (1-3-5 يوم) و كانت فترة التحضين المثلى التي حقق عندها الانفرتاز(الداخلي و الخارجي) أعلى فعالية له و الخميرة أنتجت أكبر كتلة لها هي عندما تم تحضين دوارق التخمير في الحاضنة الهزازة مدة 3 أيام و كانت علاقة فترة التحضين بفعالية الانفرتاز الخارجي و الداخلي و الكتلة الخلوية الجافة غير معنوية ($0.05<p$) حسب الجداول (13-15-17) والشكل (12) , إلا أن زيادة مدة التحضين لا تؤدي لزيادة في إنتاج الانفرتاز و ذلك يعود لانخفاض كمية النتروجين المتاح في بيئة التخمير و تقدم الخميرة بالعمر بالإضافة للمثبطات المنتجة من قبل الخميرة نفسها .

لا تتوافق هذه النتيجة مع الدراسة التي أجراها العالم (Ikram,2005) الذي قدر الفعالية الأنزيمية للانفرتاز على فترات مختلفة (8-72سا) و بلغ نشاط الانفرتاز ذروته عند 48 ساعة تحضين و ذلك يعود السلالة المستخدمة و إلى طريقة إنتاج الأنزيم .



Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

الشكل(12): تأثير مدة التحضين في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة

~~6-3-4=6-4-3~~ 6-3-4 تأثير مصدر الأزوت المستخدم في فعالية الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الجافة:

استخمت ثلاث تراكيز من اليوريا في عملية الأمثلة (تركيز اليوريا الأعظمي 0.3 غ/ل , تركيز اليوريا الأوسط 0.2غ/ل وتركيز اليوريا الأدنى 0.1غ/ل) . أظهرت الدراسة و حسب الشكل (13) أن تركيز اليوريا المثالي لنشاط كل من الانفرتاز الخارجي و الداخلي و للكتلة الحيوية هو 0.2 غ/ل و كان تأثير اليوريا في فعالية الانفرتاز الداخلي و في إنتاج كتلة الخلية الجافة معنوي (p<0.05) في حين كان تأثيرها في فعالية الانفرتاز الخارجي غير معنوي (p>0.05) .

توافقت نتيجتنا مع نتائج (Lopes and Sola Penna, 2001) اللذان وجدا من خلال دراسة النشاط الأنزيمي للانفرتاز من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* أن فعالية الانفرتاز العظمى تحققت عندما كان تركيز اليوريا 0.2 غ/ل و كانت كتلة الخلية الجافة أعلى ما يمكن و لكن تركيز اليوريا الأقل لم يكن كافيا لإنتاج اليورياز بالكمية الكافية لتشجيع إنتاج الانفرتاز , و كذلك لم يحقق المطلوب من الأزوت للخميرة لذا كانت غلة الإنزيم اقل . كما أن تركيز اليوريا الأعلى من المثالي أنتج انفرتاز اقل بسبب تأثيره المغير في الغشاء الخلوي للخميرة , ينسجم ذلك مع ما توصل إليه (Pitombo *et al*, 1994) عندما استخدام اليوريا كمصدر الأزوت في بيئة التخمير لإنتاج الانفرتاز و تحقق الإنتاج الأعظمي للانفرتاز عند التركيز 0.2 غ/ل .

			تركيز اليوريا الأعظمي 0.3 غ/ل تركيز اليوريا الأمثل 0.2غ/ل تركيز اليوريا الأدنى 0.1غ/ل تأثير تركيز اليوريا في
فعالية الانفرتاز الخارجي	فعالية الانفرتاز الداخلي	كتلة الخلية الجافة	←

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

الشكل(13): تأثير تركيز اليوريا في نشاط الانفرتاز الداخلي و الخارجي و الكتلة الخلوية الجافة

5- الاستنتاجات و التوصيات

Conclusion & Recommendations =4

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 22 pt, Complex Script Font: Times New Roman, 22 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, Complex Script Font: Times New Roman

Formatted: Right, Indent: Before: 1.56 cm, No bullets or numbering

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

- الاستنتاجات :

–تميزت معظم العينات (المواد السكرية) المحلية من ثلاثة محافظات باحتوائها على الخمائر .

–أظهرت نتائج التشخيص باستخدام شرائح الـ API وجود ثلاث أجناس أساسية (*Geotrichum* ,*Candida* و *Saccharomyces*) توزعت على 7 أنواع هي *Geotrichum capitatum* , *Candida zeylanoidese*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae* , *Candida Glabrata* و *Saccharomyces cerevisiae*

–كان عدد عزلات خميرة *Saccharomyces cerevisiae* 7 عزلات وجدت في المواد الغذائية زبيب1– حمص ,مربى مشمش1– حمص , تمر–حمص, مربى المشمش– دمشق , مخلفات معمل الخميرة– حمص ,مربى المشمش– طرطوس ,مربى كرز – دمشق .

– تميزت العزلة *Saccharomyces cerevisiae1* المعزولة من عينة الزبيب (حمص) بأعلى فعالية أنزيمية للانفرتاز الخارجي 6.36 u/ml و الداخلي 5.92 u/ml .

–كما حققت هذه العزلة مع العزلة *S. cerevisiae5* تفوقاً على باقي العزلات بالكتلة الخلوية الجافة الناتجة عنها 26غ/ل.

– تفوق الانزيم الخارجي على الداخلي من حيث الفعالية في جميع العزلات المدروسة باستثناء العزلة *Saccharomyces cerevisiae7* التي كانت فعالية الانفرتاز الداخلي أعلى من الخارجي .

– بينت نتائج الأمثلة اظروف المثالية لفعالية الانفرتاز الداخلي و الخارجي و للكتلة الخلوية الجافة كانت واحدة

– أظهرت النتائج بأن درجة الحرارة المثالية 20°م و كان تأثيرها في فعالية الانفرتاز الخارجي مباشر و معنوي بينما لم تؤثر في فعالية الانفرتاز الداخلي و الكتلة الخلوية الجافة

– كان pH 5 و تناسبت فعالية الانفرتاز الخارجي و الانفرتاز الداخلي و الكتلة الجافة بشكل طردي و إيجابي مع زيادة درجة الـpH حتى الدرجة 5 (الحموضة المثالية).

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

–كانت سرعة التهوية المثالية 200 د/د و كان تأثيرها معنوي في فعالية الانفرتاز الخارجي و غير معنوي في فعالية الانفرتاز الداخلي و الكتلة الخلوية الجافة

– بينت نتائج الأمثلة أن تركيز السكروز المثالي هو 30 غ/ل حيث أثّر تركيز السكروز بشكل مباشر و طردي في فعالية الانفرتاز الداخلي و الكتلة الجافة و لكن لم تتأثر الفعالية الأنزيمية للانفرتاز الخارجي بشكل كبير بذلك .

– كانت مدة التحضين و اليوريا المثالية لنشاط الانفرتاز كانت على الترتيب كما يلي : 3أيام و 0.2غ/ل , كان تأثير اليوريا مشابه لتأثير السكروز في حين لم تؤثر فترة التحضين في الفعالية الأنزيمية (داخلياً و خارجياً) و في إنتاج الكتلة الخلوية بشكل ملحوظ .

التوصيات :

إن الانفرتاز إنزيم هام صناعياً و يزداد الطلب عليه مع ازدياد إنتاج الغذاء في الأسواق العالمية و خاصة في صناعة الحلويات . إن استخدام الانفرتاز ما يزال محدود بعض الشيء و ذلك يعود إلى ارتفاع ثمن استيراده , لذا فإننا نوصي بـ :

- مقارنة الفعالية الأنزيمية للانفرتاز الناتج من العزلة المحلية *Saccharomyces cerevisiae1* التي أعطت أعلى فعالية أنزيمية مع السلالات المستوردة ضمن نفس ظروف الدراسة لمعرفة الجدوى الفعلية من هذه الدراسة .
- متابعة الدراسة و العمل على تنقية الانفرتاز من السلالة المحلية *Saccharomyces cerevisiae1* هامة جداً لجعله متاح للاستخدام في تطوير الصناعات المحلية و خاصة صناعة الحلويات و الأدوية و الحد من استيراده .
- العمل على التحسين الوراثي لهذه السلالة فيما يتعلق بزيادة إنتاج الانفرتاز و بالتالي زيادة كفاءته التطبيقية مما يؤدي للتقليل من استيراده بشكل كبير و ما يوفره ذلك من تكاليف الاستيراد على الإقتصاد الوطني .

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

5- الخاتمة:

إن الانفرتاز إنزيم هام صناعيا . و يزداد الطلب عليه مع ازدياد الأسواق العالمية لإنتاج الغذاء خاصة في صناعة الحلويات . إن استخدام الانفرتاز ما يزال محدود بعض الشيء و ذلك يعود إلى ارتفاع ثمنه , لذا فان أمثلة عملية إنتاجه هامة جدا لجعله أكثر اقتصاديا و عمليا . هذه الدراسة ركزت على أمثلة معايير التغذية و ظروف الزراعة (درجة الحرارة , التهوية , مدة التحضين, الـ السكروز ,و استخدام اليوريا كمصدر إضافي للازوت. , تركيز pH

Formatted: Font: (Default) Calibri, (Complex) Arabic (Syria)

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

6- المراجع

~~العربية و الأجنبية:~~ *References*

Formatted: Font: 20 pt, Complex Script Font: 20 pt

Formatted: Left

المراجع العربية و الأجنبية :

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

- الباقوني, محمد رياض(2002)- **كيمياء الأغذية (الجزء النظري)** - منشورات جامعة البعث .

- سمينة, غياث مصباح و محمد, محمد عبد الرحمن (1996) - **الكيمياء الحيوية (الجزء العملي)** - منشورات جامعة دمشق .

- صادق, شريف حسن (2004) **الأحياء الدقيقة الصناعية (الجزء النظري)**- منشورات جامعة البعث, الجزء النظري.

- كشتعاري , محمود و صادق , شريف حسن (2005)- **علم الأحياء الدقيقة (الجزء النظري)** - كلية الهندسة الكيميائية والبترولية - منشورات جامعة البعث .

- محمد , سميعة خليل (2008) - **الإنزيمات** - جامعة بغداد .

~~FHSU BIOCHEMISTRY LABORATORY SERIES , 2010,ENZYMES , KINETICS OF INVERTASE, Lab 521~~

Abdellah, H.A., Baker, T.M., Abou, S.L.A., and El-Iraqi, S.M.,1992, Characteristics of Invertase immobilized on three different types of supports. Food Chemistry, 43: 369-375.

Abrahao-Neto, J., Infanti, P., and Vitolo, M.,(a) 1996, Hexokinase production from *S. cerevisiae*. Culture conditions. Appl. Biochem. Biotechnol,57-58: 407-412.

Abrahão-Neto, J., Infanti, P., and Vitolo, M.,(b)1996, Influence of pH , temperature an dissolved oxygen concentration on the productio of glucose 6-phosphate dehydrogenase and invertase by *Saccharomyces cerevisiae* , Dept of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil, 14 (1).

Aehle, W., 2007, Enzymes in Industry ,Production and Applications, The Netherlands, 1,2,3: 1-78.

Akgol, S., Kaçar, Y., Denizli, A., and Arica, M.Y., 2001, Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. Food Chemistry, 74: 281-288.

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

Aranda, C., Robledo, A., Loera, O., Juan, C., Esquivel, C., Rodrigueq, R., and Aguillar, C. N., 2006, Fungal invertase expression in soild state fermentation, Food Technol. Biotechnol, 44: 229-233.

Bakir, U., and Burcu, S.A., 2008, Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates, Process Biochemistry, 43: 125-131.

Barlikova, A., Svorc, J., and Miertus, S., 1991, Invertase for inverted syrup production and sugar determination. Anal, Chim. Acta, 247: 83-87.

Barnett, J. A., 2003, Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research, Microbiology , 149 : 3 557-567.

Bayramolu, G., Akgol, S., Bulut, A., Denizli, A., and Yakup, A.M., 2003, Covalent immobilization of inverase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in acontinous flow system. Biochemical Engineering Journal, 14:117-126.

Belcarz, A., Ginalska, G., Lobarsewski, J., and Penel, C., 2002, The novel non-glycosylatedinvertase from Candida utilis (the properties and the conditions of production and purification), Biochimica et Biophysica Acta 1594, 40–53.

Bergamasco, R., Bassetti, F.J., Moraes, F.F., and Zanin, G.M., 2000, Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 17: 873-880.

Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J., Graβl(eds.), M., 1985, Methods of Enzymatic Analysis, Boehringer Mannheim ,Biochemicals for Molecular Biology: 83.

Bergmeyer, H. U., 1983, Methods in Enzymatic Analysis, Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 2: 166–167; 4 : 189–195.

Brink, J. V., 2008 , Dynamic response of *Saccharomyces cerevisiae* to fermentative growth conditions, Technical University of Delft.

Covadonga R., Arias , K., Lorrie , M. , and Renee , M. ,2002,Yeast

Formatted: German (Germany)

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

species associated with orange juice : Evaluation of different identification methods . Applied and Environmental Microbiology Journal . 68 : 1955- 1961 .

Dearaujo, T.L., and Kitahata, S., 2004,Transfructosylation of thiol group by beta-fructofuranosidases. Biosci. Biotechnol, 64: 1472-1476.

Egorov, S.N., Semenova, I.N., and Maksimov, V.N., 2000, Mutual effect of invertase and acid phosphatase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on their secretion into culture media. Mikrobiologiia , 69: 34–37.

Gomez, S.J.R., Augur, C., and Viniegra-Gozalez, G., 2000, Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. Biotechnology Letters, 22: 1255–1258.

Haq, I., Kiran, S., Sikander, A.,and Qadeer, M.A., 2002, Production of enzyme invertase by *Saccharomyces cerevisiae*, Indus Journal of Plant Sciences, 1(1): 5-8

Herwig, C., Doerries, C., Marison, I., and Stockar, U., 2001, Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, 76:247–58.

Hsieh, H.J., Liu, P.C., and Liao, W.J., 2000, Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability, Biotechnology Letters, 22: 459-464.

Hun Yi, S.,1997, Biotechnological and Molecular Biological Studies on the Invertase from Alkalophilic and The rmophilic *Bacillus sp*. TA-11. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirementfor, the Degree of Master of Science, Graduate School, Paichai University.

Ikram, H., and Sikander, A., 2007, Kinetics Of Invertase Production By *Saccharomyces cerevisiae* In Batch Culture, Institute of Industrial Biotechnology, GC University, Lahore, Pakistan.

Ikram, Haq., and Mukhtar, H.,2006, Kinetics of Invertase Synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* in Synthetic Medium, Proceedings of the

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

1st International Conference on Natural Resources Engineering & Technology, Putrajaya, Malaysia, 138-145.

Ikram, H., Mirza, A., and Sikander, A ., 2005, Effect of cultivation conditions on invertase production by hyperproducing *Saccharomyces cerevisiae* isolates , World Journal of Microbiology & Biotechnology 21:487– 492.

Jorgensen, B ., Valnegri, L., Cigalino, G., 2002 , , Effect of Different Mineral Nutrients on *Saccharomyces cerevisiae* growth , Molecular and Cellular Biology .Biological Sciences., La Crosse, 5: 342-350.

Kadambini, G., 2006, Process Optimization for the Production of Ethanol Via fermentation ,Dissertation of Masters of Science In Biotechnology, Department of Epartment of Biotechnology & Env. Sciences, Thapar Institute of Engg. & Techology,Deemed University.

Li, S., Yang, H.P., and Zhou, H.M., 1998, Inactivation and conformational changes of yeast invertase during unfolding in urea and guanidinium chloride solutions. J. Pept. Res, 51: 45–8.

Lopes, D.H.J., and Sola-Penna, M., 2001, Urea increases tolerance of yeast inorganic pyrophosphatase activity to ethanol: the other side of urea interaction with proteins. Archives of Biochemistry and Biophysics ,394: 61–66.

Madigan, M., Martinko, J, M., 2006, Biology of Microorganisms. 11th ed, 1. Upple Saddle River, NJ: Pearson Education.

Mansour, E.H., and Dawoud, F.M., 2003, Immobilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an absorption procedure. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83: 446-450.

McGovern, P., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.,and Moreau , R., 2004,Fermented beverages of pre- and proto-historic China, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 17593-17598.

Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., and Waldron, K.C., 2004, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

proteins, and application to enzyme cross-linking. Biotechniques, 37: 790-802.

Myers, D.K., Lawlor, D.T., and Attfield, P.V., 1997, Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*, Applied and Environmental Microbiology, 63: 145–150.

Nam, S.W., Shin D.H., and Kim, Y.H., 1997, Effect oculture conditions on expression and secretion of inulinase and invertases in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*,Sanop,Misaengmul. Hakhoechi., 25(3): 258-265.

Obenland, D., Simmen, U., Boller, T., and Wiemken, A., 1993, Purification and characterization of three soluble invertase from Barley leaves, Plant Physiol,101: 1331-1339.

Osley, M.A.,and Norris, D., 2007,The Two Gene Pairs Encoding H2A and H2B Play Different Roles in the *Saccharomyces Cerevisiae* Life Cycle, Molecular and Cellular Biology .Biological Sciences. Illumina. Murphy Library, La Crosse, 7: 3473-3481.

Pitombo, R.N.M., Spring, C., Passos, R.F., Tonato, M., and Vitole, M., 1994, Effect of moisture content on invertase activity of freeze-dried *Saccharomyces cerevisiae* , Cytobiology , 31: 383–392.

Porntaveewat, W., Takayanagi, T., and Yokotsuka , K., 1994, Purification and properties of Invertase from Muscat Bailey A grapes. J. Ferment. Bioeng ,78: 288-292.

Rouwenhorst, R.J., van der Baan, A.A., Scheffers, W.A. and Van Dijken, J.P, 1991, Production and localization of beta-fructosidase in asynchronous and synchronous chemostat cultures of yeasts, Environ , 57: 557-562.

Sanchez, M.P., Huidobro, J.F., Mato, I., Munigategui, S., and. Sancho, M.T., 2001, Evolution of invertase activity in honey over two years, Food Chem , 49: 416- 422.

Shafiq, K ., Sikander, A., and Ikram, H., 2005, Nitrogen regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Invertase, Role of the URE 2 gene. Appl. Biochem. Biotechnol, 84: 247-254.

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

Shafiq, K ., Sikander, A., and Ikram, H., 2004, Temperature Optima for Invertase Secretion by Yeast in Synthetic Medium,Biotechnology Centre, Botany Department , G.C. University, Lahore-Pakistan , 2: 21-23.

Shafiq, K ., Sikander, A., and Ikram, H., 2002, Effect of Different Mineral Nutrients on Invertase Production by *Saccharomyces cerevisiae* GCB-K5 , Biotechnology Reserch Laboratories , Botany Department , G.C. University, Lahore-Pakistan , 1: 40-44.

Shankar, V., and Kotwal, S.M., 2009, Immobilized invertase, Biotechnology Advances, 27: 311-322.

Silveira, M.C., Oliveira, E.M., Carvajal, E., and Bon, E.P., (a) 2000, Nitrogen regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Invertase, Role of the URE2 gene. Applied Biochemistry and Biotechnology ,84:86, 247:254.

Silveira, M.C., Oliveira, E.M., Carvajal, E., and Bon, E.P.,(b) 2000, Effect of different mineral nutrients on invertase production bmy Saccharomyces cerevisiae GCB-k5. Biotechnology, 1: 40-44.

Song , D.D., and Jacques , N.A.,1997, Cell disruption of *Escherichia coli* By glass bead stirring for the recovery of recombinant proteins, Analytical Biochemistry , 248 :300-301 .

Sonia , A., and Castillo , F.J, 1979 , Production of lactase by *Candida Pseudotropicalis* grown in whey . Applied and Environmental Microbiology . **37** : 1201 – 1205 .

Stella, A.V., Paratte, R., Valnegri, L., Cigalino, G., Soncini, G., Chevaux , E., Dell'orto, V., and Savoini, G., 2007, Effect of Administration of Live *Saccharomyces cerevisiae* on Milk Production , Milk Composition, Blood Metabolites, and Faecal Flora in Early Lactating Dairy Goats. Small Ruminant Research Murphy Library, La Crosse, 67: 7-13.

Stolc, V., and Reinsch, S., 2007, *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strain, National Aeronautics and Space Administration.

Sumner, J.B., and Howell, S.F., 1935, A method for determination of saccharase activity, Journal of Biological Chemistry ,108: 51–54.

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

Talekar, S., Ghodake, V., Kate, A., Samant, N., Kumar, C., and Gadagkar, S., 2010, Preparation and Characterization of Cross-linked Enzyme Aggregates of *Saccharomyces cerevisiae* Invertase, Department of Biotechnology Engineering, KIT's College Of Engineering, Kolhapur.

Tasun, K., Chose, P., and Ghen, K., 1970, Sugar determination of DNS method, Biotechnology and Bioengineering ,12: 921.

Timerman, A. P.,2010, The Isolation of Invertase from Baker's Yeast – An Introduction to Protein Purification Strategies, *University of Wisconsin-Stevens Point,USA,*2:29-52

Unger, C., Hofsteenge, J., and Sturm, A., 1992, Purification and characterization of a soluble –fructofuranosidase from Daucus carota, Eur. J. Biochem: 204, 915-921.

Uma, D.,Gomathi, C.,Muthulakshmi and Gopalakrishnan, V.K.,(a) 2010, Production, purification and characterization of Invertase by *Aspergillus flavus* using fruit peel waste as substrate. Department of Biochemistry,Karpagam University,Coimbatore India, 641- 021.

Uma, C., Gomathi, D., Muthulakshmi, C., and Gopalakrishnan, V.K.,(b) 2010, Optimization and characterization of invertase by *Aspergillus fumigatus* using fruit peel waste as substrate, Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, Department of Biochemistry, Karpagam University, Coimbatore- 641 021 India, 1 :94

van Maris, A., Abbott, D., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., and Luttik, M., 2006, Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*, current status. Antonie Van Leeuwenhoek, 90: 391-418.

Vitolo, M., Duranti, M.A., and Pellegrim, M.B., 1995, Effect of pH, aeration and sucrose feeding on invertase activity of intact *Saccharomyces cerevisiae* cells grown in sugarcane black strap molasses, Biomedical and Life Sciences Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,15: 75–79.

Volk, T., and Galbraith, A., 2002,This month's fungus is *Saccharomyces cerevisiae* , the bakers' and brewers' yeast , University of Wisconsin-La Crosse.

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right

Vrabel, P., Polakovic, M., Stefuca, V., and Bales, V, 2003, Analysis of mechanisms and kinetics of thermal inactivation of enzymes: evaluation of multi temperature data applied to inactivation of yeast invertase. Enzyme & Microbial Technol, 20: 348-354.

Weber, H., and Roitsch, T., 2000, Invertases and life beyond sucrose cleavage, Trends in Plant Sciences, 5: 47–48.

Wikipedia, *Saccharomyces cerevisiae*, the free encyclopedia ,2009.

Formatted: Justified

Formatted: Left, Left-to-right, Don't adjust space between Latin and Asian text, Don't adjust space between Asian text and numbers

Formatted: Right, Tab stops: 7.22 cm, Right