P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) **مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة** Open Access
2017,11 (3) :26-35

انتاج الذيفان القاتل بوساطة خميرة *Debryomyces hansenii* DSMZ70238 وأختبار فعاليته تجاه خط الخلايا السرطانية L20B

وجدان حميد عبدالرزاق * جمال عبدالرحمن ابراهيم* صفاء الدين احمد شنتر **

*جامعة الانبار – كلية التربية للعلوم الصرفة

**جامعة بغداد – كلية العلوم للبنات

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2017/6/14
تاريخ القبول: / /
تاريخ النشر: 22/ 6 / 2018
DOI: 10.37652/juaps.2017.145233

الكلمات المفتاحية:

خميرة *D. hansenii*،
الخلايا السرطانية،
الفعالية السمية،
الذيفان القاتل.

الخلاصة:

اجريت هذه الدراسة للكشف عن قابلية خميرة *Debryomyces hanseni* DSMZ70238 على انتاج الذيفان القاتل Killer toxin وتحديد الظروف المثلى للأنتاج فضلاً عن دراسة السمية القاتلة للذيفان تجاه خط الخلايا السرطانية L20B، وقد تضمنت الظروف المثلى التي تم دراسة تأثيرها في معدلات نمو الخميرة وقابليتها على زيادة انتاج الذيفان القتل كل من تراكيز مختلفة من ملح الطعام وسكر الكلوكوز وتراكيز مختلفة من الرقم الهيدروجيني فضلاً عن درجات حرارة مختلفة. اظهرت تجربة انتاج الذيفان بواسطة الخميرة قدرتها على انتاج ذيفان قاتل يقارب وزنه الجزيئي 22 كيلو دالتون وتم الكشف عنه بواسطة استخدام تقنية الترحيل الكهربائي عبر هلام اكريل أمياد بنسبة 12%، اما بالنسبة للظروف المثلى للنمو ولأنتاج الذيفان القاتل اظهرت النتائج ان 8% من ملح الطعام NaCl والرقم الهيدروجيني pH 4.5 و درجة الحرارة 25 م°وتركيز 10% من سكر الكلكوز هي الافضل للنمو وكذلك أنتاج الذيفان القاتل. وللكشف عن السمية القاتلة للذيفان تجاه الخلايا السرطانية قيد الدراسة استخدام الذيفان المركز والمنقى بصورة جزئية والمنتج بكافة ظروف النمو المستخدمة في الدراسة، اظهرت نتائج هذه التجربة ان للذيفان القاتل سمية قاتلة للخلايا السرطانية بلغت اعلى نسبها عند تركيز ملح NaCl 8% وكانت 47.61 %، وعند الرقم الهيدروجيني pH 4.5 بلغت النسبة المئوية للقتل 23.07% في حين بلغت النسبة المئوية للقتل 21.53 % عند درجة الحرارة 25 م° و47.30 % عند تركيز 10% من سكر الكلوكوز.

المقدمة:

تعتبر خميرة *D. hansenii* من الخمائر الشائعة الانتشار في الطبيعية، كما لوحظ تواجدها بشكل كبير في الاغذية التي تتميز بأنها ذات مستويات عالية من الملوحة وخصوصاً انواع الاجبان المختلفة (1, 2) وسبب ذلك هو قابليتها على النمو بشكل جيد بوجود تراكيز ملحية عالية (2,3) تتميز هذه الخميرة ايضاً بقدرتها على النمو في بيئات ذات مستويات منخفضة من الرقم الهيدروجيني (حامضية) ونشاط مائي منخفض (4)، ومن صفاتها الاخرى قدرتها على استهلاك حامض اللاكتيك و السترك (5)، الكثير من الدراسات السابقة اثبتت وجود هذه الخميرة في القناة الهضمية (6,7)، كما تمتاز بإمتلاكها القابلية على انتاج الانزيمات المحللة للدهون والبروتينات ومن خلالها تستطيع ايض بروتينات الحليب والدهون فضلاً عن مساهمتها في انضاج الاجبان (8).

* Corresponding author at: Continuous Education Center, Mustansiriyah University, , Baghdad, Iraq;

تعد خميرة *D. hansenii* من الخمائر نصف– الزقية وتتميز بكونها غير متجانسة، تكون احادية وتتكاثر خضرياً بواسطة التبرعم، وجنسيا بواسطة اقتران الكميتات التكاثرية (9) حيث يكون الاختلاف بين السلالات نفسها ولوحظ ذلك في قابليتها الايضية في استهلاك مصادر الكربون تحديداً. وهي من الانواع التي تمتلك القابلية على النمو في انواع بيئية مختلفة وخصوصاً المتطرفة منها وعلى سبيل المثال تواجدها ونموها في بئيات ذات تراكيز ملحية (ملح كلوريد الصوديوم NaCl) عالية ومنها البيئات البحرية (10). تتميز بعض الخمائر أن لها القابلية على انتاج انواع معينة من الذيفانات القاتلة يطلق عليها عادة بروتينات قاتلة او ذيفانات فطرية (Mycocins or Mycotoxin) أذ تتميز هذا الانواع من الذيفانات أن لها تأثير قاتل تجاه عدة انواع الخمائر وكذلك الفطريات والبكتريا والتي تعتبر حساسة لهذه الذيفانات (11)، الفعالية القاتلة لذيفانات للخمائر تم تسجيلها في اكثر من 100 نوع من الخمائر والتي تعود الى اكثر من 20 جنساً، انتاج الذيفانات القاتلة عرف منذ مدد طويلة من خلال عمليات صناعة النبيذ والتخمرات المختلفة (12,13). ومن خلال دراسات موسعة تبين ان الذيفانات القاتلة هي عبارة عن بروتينات سكرية في طبيعتها الكيميائية وتتميز بكونها فعالة ونشطة في درجات واطئة من الرقم الهيدروجيني pH (11). من هذه الخمائر المنتجة للسموم القاتلة خميرة *D. hansenii* (14,15) والتي لم تؤشر على انها ممرضة للانسان على الرغم من تواجدها في قناة الجهاز الهضمي للانسان (7). اجريت الكثير من الدراسات والبحوث العلمية التي تضمن الكشف عن قابلية هذه الخميرة في انتاج الذيفانات القاتلة وماهية تأثيرها القاتل والمثبط تجاه الانواع الاخرى من الخمائر والفطريات الممرضة للأنسان ومنها خميرة *C. albicans* (16)، ومنها الدراسة التي اجريت من قبل (17) أذ تم عزل وتنقية السموم القاتلة والمنتجة من قبل الخميرة اعلاه وتم اختبار فعاليتها القاتلة والمثبطة تجاه بعض الخمائر منها خميرة *C. albicans* وبعض الانواع الفطرية الممرضة والمسببة لتلوث الاغذية والتي تم عزلها من بعض انواع الجبن. وفي دراسة منفصلة استخدمت فيها خمائر عديدة لغرض استخدام السموم المنتجة من قبلها في تثبيط نمو بكتريا *Staphylococcus aureus* ومن هذه الخمائر هي خميرة *D. hansenii* وتبين من خلال هذه الدراسة ان للذيفانات المنتجة من هذه الخميرة فعلا تضادياً مثبطاً تجاه البكتريا قيد الدراسة مقارنة بأنواع الخمائر الاخرى (18). الخمائر التي تنتج الذيفانات القاتلة تم اكشافها قبل اكثر من 44 عاماً، وتعلب دوراً حيوياً مهماً في الحماية الذاتية بواسطة قتل الانواع الاخرى من الممرضات، ومن جانب اخرتمتلك الذيفانات المنتجة بواسطة الخمائر القاتلة دوراً مهماً في تثبيط وكبح نمو خلايا حقيقة النواة (19) تبين ان الذيفانات المنتجة بواسطة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* من الممكن ان تستحث الموت المبرمج Apoptosis بعد ان يتم التهامها بواسطة خلايا البعلم الكبير، وبين (20،21) ان راشح النمو المنتج بواسطة خميرة *Pseudozyma* spp. و *Barnettozyma* spp. له سمية قاتلة وبشكل كبير للخلايا السرطانية متمثلة بـ cell line hepatoma و HepG2 اكثر من الخلايا الطبيعية. من خلال الدراسات التي اجريت في هذا الحقل تبين ان هناك الكثير من انواع الذيفانات التي تنتج بواسطة الخمائر المختلفة ويختلف الوزن الجزيئي للذيفان من خميرة الى اخرى وحسب نوع الخميرة ومناطق عزلها، ففي الدراسة التي اجريت من قبل (14) تم تشخيص وتحديد الذيفان القاتل والمنتج بواسطة خميرة *D. hansenii* وتبين ان البرويتن القاتل والمنتج من قبل الخميرة اعلاه ذو وزن جزيئي واطىء يقارب الـ 23 كيلو دالتون كما جاء في الدراسة الحالية ويتم انتاجه بواسطة التشفير من قبل الجينات الكروموسومية، في حين الكثير من الدراسات اشارات الى انه لحد الان لم يتم تحديد الوزن الجزيئي للذيفان المنتج بواسطة هذه الخميرة (25; 26,14). وهدفت الدراسة الحالية الى اختبار فعالية العزلة القياسية *D. hansenii* DSMZ70238 على انتاج الذيفان القاتل وكذلك الظروف المثلى للأنتاج فضلاً عن اختبار الفعل القاتل للذيفان المنتج تجاه خط الخلايا السرطانية L20B.

المواد وطرائق العمل:

انتاج الذيفان القاتل الخام

اتبعت طريقة (22) لغرض انتاج الذيفان القاتل بواسطة خميرة *D. hansenii* DSMZ70238 والتي تم شرائها من المركز الالماني للعزلات الميكروبية (The Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) وذلك عن طريق حقن وسط (Yeast Extract 10 g, Peptone 20 g,

YEPD (Dextrose 20 g, Agar 20 g) بلقاح الخميرة وبحجم 10^6 خلية مل$^{-1}$ وذلك بأستخدام دوارق زجاجية سعة 250 مل تحوي 150 مل من الوسط اعلاه لكل دورق، حضنت الدورارق الزجاجية عند درجة حرارة 25 م° لمدة 72 ساعة، وبعد ذلك وزعت العينات في انابيب بلاستيكية حجم 10 مل لغرض فصل الخميرة باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد تمت عملية الفصل لمدة 15 دقيقة بسرعة 6000 دورة دقيقة$^{-1}$. رشحت العينات بواسطة Millipore filter unint بقطر (0.45) مايكروميتر، بعد ذلك تم اضافة الكليسيرول الى الراشح ليكون تركيزه 15%، تم تركيز الراشح وتنقيته بصورة جزئية بإستخدام انابيب Vivaspin Concentrator tube ذات حجم 5-kDa بأستخدام جهاز الطرد المركز المبرد لمدة 10 دقائق بسرعة 6000 دورة دقيقة$^{-1}$ في كل مرة بعدها أضيفت كمية من الراشح تساوي كمية المادة المراد التخلص منها والتي يتم ازالتها بواسطة انابيب الترشيح، استمر ذلك لغاية تركيز كامل كمية المزروع الاصلي وبذلك ليعتبر راشح خام حاوي على الذيفان المركز والمنقى بصورة جزئية. تم الكشف عن وجود الذيفان القاتل في راشح الخميرة والذي من المفترض ان يتكون من بروتينات سكرية، بواسطة ترحيل البروتين اعتمادا على الوزن الجزيئي باستخدام هلام الاكريلامايد SDS PEAG وبتركيز 12% وذلك وفقا لما ذكره (23).

اختبار الظروف المثلى لإنتاج الذيفان

انجزت هذه التجارب في مختبرات الاحياء المجهرية الخاصة بقسم علوم الحياة/كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد خلال شهري اب وايلول من العام 2016، لدراسة الظروف لمثلى للنمو وأنتاج الذيفان القاتل بواسطة الخميرة قيد الدراسة تم اعتماد الطريقة المستخدمة من قبل (Wang *et al.,* 2012) إذ حضر وسط YEPD السائل بحجم 150 مل في دوراق زجاجية ذات سعة 250 مل ولقح بمستعمرة نقية من خميرة *D. hansenii*، ومن ثم تركت في الحاضنة الهزازة لمدة (24) ساعة عند درجة حرارة (25) م° وسرعة (100 دورة دقيقة$^{-1}$) للحصول على مزارع ذات كثافة ضوئية (OD_{600} =0.1).

1- لدراسة تأثير تراكيز مختلفة من ملح الطعام NaCl في نمو الخميرة وقابليتها على أنتاج الذيفان القاتل تم تعقيم وسط YEPD السائل بحجم 150 مل في دوارق زجاجية ذات سعة 250 مل بتراكيز مختلفة من ملح الطعام NaCl اشتملت على التراكيز (2،4،6،8 %)، ثم اضافة اللقاح بحجم 1 مل لكل دورق يكون فيه تركيزخلايا الخميرة هو 10^6 خلية مل$^{-1}$، تم قياس منحنى النمو للخميرة اذ أخذت القراءات من لحظة إضافة اللقاح وبمعدل قراءة لكل ساعتين ولحين انتهاء مدة الحضن بجهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 600 نانوميتر، بعدها تم فصل الوسط الزراعي الملقح بجهاز الطرد المركزي بسرعة (6000 دورة الدقيقة$^{-1}$) ولمدة 15 دقيقة، وتم بعدها ترشيح السائل بواسطة مرشحات Millipore filter units بقطر (0.45) مايكروميتر وأضيف إليه الكليسرول بنسبة 15% وتم تنقية وتركيز الراشح بصورة جزئية بواسطة انابيب الترشيح المسماة Vivaspin Concentrator tube بحجم 5-kDa، وبذلك يعتبر راشح خام حاوي على الذيفان بصورة مركزة ومنقى بصورة جزيئية، استخدم الراشح الناتج كذيفان قاتل مركز لاختبار سميته تجاه خط الخلايا السرطانية L20B المستخدمة في الدراسة وتحديد التركيز الأفضل من ملح الطعام NaCl لغرض انتاج الذيفان القاتل.

2- لدراسة تأثير تراكيز مختلفة من الرقم الهيدروجيني pH في نمو الخميرة وقابليتها على أنتاج الذيفان القاتل تم تعقيم وسط YEPD السائل بحجم 150 مل في دوارق زجاجية ذات سعة 250 مل وحضر بتراكيز مختلفة من الرقم الهيدروجيني اشتملت على (4.5,5.5,6.5,7) من ثم تم اتباع باقي الخطوات العملية كما هو في الفقرة رقم (1) وبعد ذلك استخدم الراشح الناتج كذيفان مركز لاختبار فعاليته تجاه خط الخلايا السرطانية المستخدمة في الدراسة وتحديد الرقم الهيدروجيني الأفضل لغرض انتاج الذيفان القاتل.

3- لدراسة تأثير درجات حرارة مختلفة في نمو الخميرة وقابليتها على أنتاج الذيفان القاتل تم تعقيم وسط YEPD السائل بحجم 150 مل في دوارق زجاجية ذات سعة 250 مل وحضنت بدرجات حرارة مختلفة اشتملت على (15,20,25,30) م° من ثم تم اتباع باقي الخطوات العملية كما هو في الفقرة رقم (1) وبعد ذلك استخدم الراشح الناتج كذيفان مركز لاختبار فعاليته تجاه خط الخلايا السرطانية المستخدمة في الدراسة وتحديد درجة الحرارة المثلى لغرض انتاج الذيفان القاتل.

4- لدراسة تأثير تراكيز مختلفة من سكر الكلوكوز في نمو الخميرة وقابليتها على أنتاج الذيفان القاتل تم تعقيم وسط YEPD السائل بحجم 150 مل في دوارق زجاجية ذات سعة 250 مل وجهز بتراكيز مختلفة من سكر الكلوكوز اشتملت على (2,4,6,8,10)%، بعد ذلك تم اتباع باقي الخطوات العملية كما هو في الفقرة رقم (1) وبعد ذلك استخدم الراشح الناتج كذيفان مركز لاختبار فعاليته تجاه خط الخلايا السرطانية المستخدمة في الدراسة وتحديد الرتكيز الامثل من سكر الكلوكوز لغرض انتاج الذيفان القاتل.

اختبار فعالية الذيفان القاتل المنتج بواسطة خميرة *D.hansenii* تجاه الخلايا السرطانية

كافة التجارب الخاصة بهذا الجزء من الدراسة تم اختبارها خلال شهري تشرين الاول والثاني من العام 2016 في مختبرات وحدة الزراعة النسيجية التابعة لمركز التقنيات الاحيائية في جامعة النهرين، تم تنمية الخلايا السرطانية في وسط RPMI-1640 الحاوي على 10% من المصل البقري والمضادات الحيوية البنسلين بتركيز (100UI/ml) – والستربتومايسيين (100 mg/ml). السمية الخلوية للذيفان المنتج بواسطة الخميرة تم اختبار سميته تجاه الخلايا السرطانية وفق (24) واجريت التجربة للذيفان المنتج بجميع ظروف النمو السابقة من خلال اضافة الذيفان الى وسط RPMI-1640 ومن ثم تم تنمية الخلايا في الدوراق الزجاجية الحاوية على وسط النمو بدرجة حرارة 37 م و 5% CO2، 95% رطوبة. جمعت الخلايا وتم معاملتها بمحلول معاملة الزرع النسيجي حجم 1 سم^3 بمحلول التريسين / فرسين بعد تفريغ الوسط الزرعي القديم وتحريك القنينة برفق، ثم حضنت في الحاضنة عند درجة حرارة 37 م° مدة 1-5 دقيقة , ثم اضيف له 20 من مل وسط النمو المحضر (RPMI-1640) بعدها تم مزج عالق الخلايا جيدا وثم نقل 0.2 مل بعد كل مزجة جديدة الى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذي القعر المسطح Microtiter plate for tissue culture. بعد مرور 24 ساعة اخرج الطبق من الحاضنة واضيف اليه محلول صبغة MTT , (MTT day) dimethylthiazoy] -2,5-diphenylterazolium bromide -(5)] لجميع الحفر الحاوية على الخلايا بمقدار 50 ميكرو ليتر لكل حفرة. اعيد الطبق مرة ثانية الى الحاضنة ليحضن مدة 3-4 ساعة, وبعدها اخرج الطبق وازيلت الخلايا الميتة اذ ان الخلايا الحية تأخذ الصبغة اما الميتة فلا تأخذها ثم تعامل بمحلول DMSO قرأت النتائج باستعمال جهازالـ ELISA عند طول موجي 492 نانومتر. تم حساب نسبة التنشيط لكل تركيز بتطبيق المعادلة التالية:

النسبة المئوية للتثبيط لكل تركيز بتطبيق المعادلة 100 *A/B-A=RI%

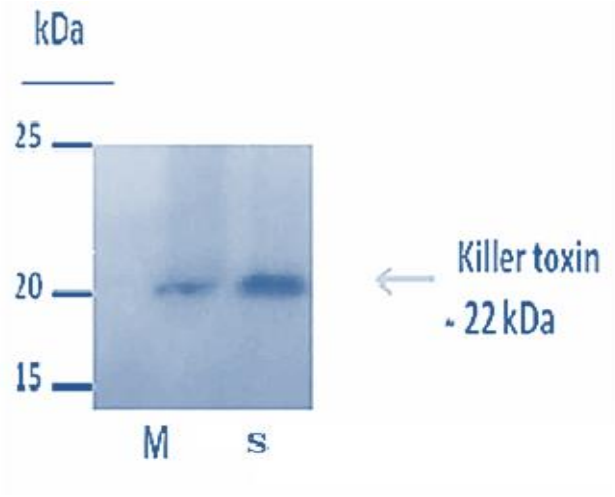
اذ A= Control B=Test

التحليل الاحصائي: تم تحليل النتائج احصائياً بأستعمال البرنامج الاحصائي SAS(2012) وتم استخدام الاختبار Duncan's test(1955) لمقارنة الفروق المعنوية بين المعاملات المختلفة وتأثير العوامل المختلفة في انتاج الذيفان القاتل وتأثيره القاتل.

النتائج والمناقشة:

تحديد الوزن الجزيئي

اظهرت نتائج عملية الترحيل الكهربائي لراشح مزرعة الخميرة قيد الدراسة والمركزة بالطريقة المذكورة في المواد وطرق العمل وباستخدام هلام الاكريلامايد SDS PEAG وبتركيز 12% وجود حزمة غامقة اللون من الذيفان القاتل كما موضح في الشكل (1) وعند مقارنتها بالحزم الخاصة بالبروتين القياسي (Ladder protein) تبين ان الوزن الجزيئي لهذه الحزمة هو ما يقارب 22 كليودالتون أذ يظهر حزمة واحدة فقط مما يدل على نقاوة الراشح المركز من بين انواع البروتينات الاخرى.



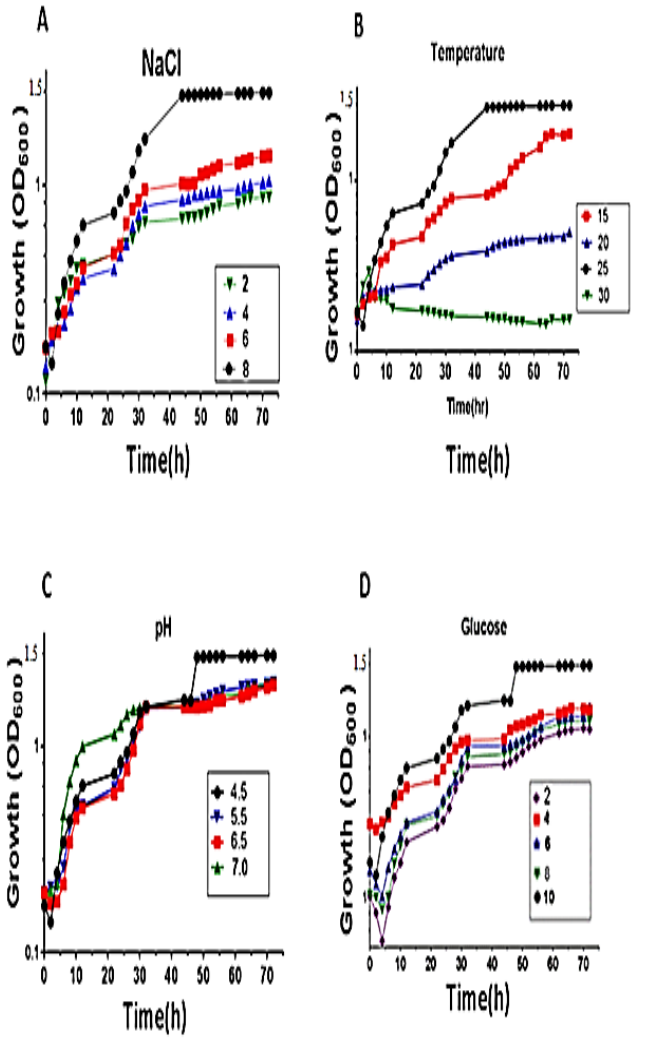
شكل(1): الترحيل الكهربائي للذيفان المنتج بواسطة خميرة *D. hansenii* DSMZ70238 المركز والمنقى جزئياً بأستخدام هلام الأكريلامايد12% (SDS-PAEG) يبين الخط M البروتينات القياسية ويبين S

(Sample)الذيفان المنتج المركز تحت ظروف النمو القياسية. حزمة الذيفان المركز والمنقى جزئياً مشار لها بالسهم.

تحديد الظروف المثلى للنمو وانتاج الذيفان من خميرة *D. hansenii*

تم دراسة تأثير عوامل مختلفة في انتاج الذيفان ومعدل نمو خلايا الخميرة وذلك من خلال قياس العكورة للوسط باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer، إذ تم تحديد تأثير تراكيز مختلفة من ملح NaCl وهي (4, 6 , 8%) مع ابقاء كافة العوامل الاخرى ثابتة كما هي في الوسط الزرعي دون تغيير ولوحظ (شكل 2–A) ان معدلات النمو كانت افضل ما يكون عند التراكيز الملحية العالية (6 , 8%) عند درجة حرارة 25م ° وبلغ اعلى معدل نمو لخلايا الخميرة 1.5 بعد فترة حضانة اكثر من 50 ساعة.

أظهرت النتائج ان لدرجة الحرارة تأثير واضح في معدلات النمو (شكل 2–B) اذ وصل معدل النمو الى اكثر من 1.5 في درجة الحرارة 25 م ° في حين لم تستطع الخميرة من النمو في درجة حرارة 30 م °بعد 3 ايام. واوضحت النتائج ان معدلالت النمو لم تظهر ارتفاعا واضحا تحت درجات الحرارة 15 و 20م °مقارنة مع 25 م°، في حين، لم يتأثر معدل النمو بارتفاع او انخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي لخميرة *D. hansenii* (شكل 2–C) اذ وصلت معدلات النمو الى اكثر من 1.5 تحت قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني. يعد الكلوكوز من مصادر الكاربون المهمة في الايض الحيوي لخميرة *D. hansenii*، قابلية استهلاك الكلوكوز تختلف باختلاف الاحياء وتعتمد على كميات الكلوكوز المتوفرة في الوسط. اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان ازدياد تركيز الكلوكوز في الوسط الزرعي يقلل من معدلات النمو. كما هو موضح في الشكل(2–D) فعند تركيز 10% كان معدل النمو للخميرة بطيئاً وصل الى 1.0 بعد 72 ساعة مقارنة مع السيطرة التي بلغ معدل النمو الى اكثر من 1.5 بعد 72 ساعة. فضلا عن ذلك، ان معدل النمو للخميرة عند توفر تراكيز متوسطة من الكلوكوز(4،6%) انخفض قليلا عن معدلاته الطبيعية ليصل في النهاية الى 1.0 بعد 72 ساعة حضانة، وعليه فقد اعتمد الظروف المثلى المحددة في هذا الجزء من الدراسة وهي اضافة ملح الطعام NaCl بتركيز (8%) ودرجة حرارة حضن هي (25 م °) بأستخدام الكلوكوز في الوسط بتركيز (8%) وبرقم هيدروجيني 4.5 لغرض تنمية الخميرة بغية انتاج الذيفان واستخدامه في التجارب اللاحقة.



شكل (2): معدلات نمو خميرة *D. hansenii* بعد فترة حضانة 72 ساعة من تنميتها في وسط YEPD السائل. A– معدلات النمو بوجود تراكيز مختلفة من ملح الطعام NaCl . B– معدلات نمو الخميرة عند تنميتها بدرجات حرارة مختلفة. C– معدلات نمو الخميرة بارقام هيدروجينية مختلفة (pH). D– معدلات نمو الخميرة بوجود تراكيز مختلفة من سكر الكلوكوز.

ان الزيادة في معدلات نمو الخميرة *D. hansenii* تتأثر بوجود تراكيز مرتفعة من ملح الطعام NaCl في بيئة النمو وتبين من خلال الدراسات ان هذه الخميرة يمكنها النمو في اوساط زرعية مجهزة بتراكيز

ملحية تصل الى 25% ولوحظ ان معدلات النمو تزداد بزيادة تركيز ملح الطعام في وسط النمو، وقد عزلت هذه الخميرة من مياه البحار والمحيطات التي يكون فيها تركيز الملح مرتفع، وتم تصنيفها الى انها متوسطة التحمل للملوحة والنمو الامثل لها يكون عند تراكيز ملحية تراوحت بين 3-5%، تعد هذه الصفة ذات فوائد مهمة في مجالات التطبيقات الحيوية لأنها تتيح للخميرة انتاج مواد مهمة تستخدم في مجالات عدة تكون شبه معقمة وذات كميات وتراكيز مرتفعة كما هو الحال في قطاع الاغذية الزراعية، يعزى قابلية هذه الخميرة الى تحمل تراكيز ملحية مرتفعة الى انتاج وتجميع مواد مثل الكليسرول والاربانيتول arabinitol التي تتجمع في جدار الخلية وتساعدها في قابلية التحمل للتراكيز المرتفعة من الملح، وهذه الصفة اي صفة تحمل الملوحة تجعل الخلية تنتج كميات كبيرة من الذيفان بسبب حصول اجهاد او ضغط Stressعلى خلية الخميرة نتيجة للتراكيز العالية من الملح مما يجعلها تنتج كميات كبيرة من منتجات الايض الثانوي ومنها الذيفانات القاتلة (2،15).

اما بالنسبة لدرجة الحرارة فقد اثبتت الدراسات ان درجة الحرارة المثلى لنمو هذه الخميرة تراوحت بين 20-25 م ° ، وقد اوضح (2) ان افضل نمو لهذه الخميرة وكذلك اعلى انتاج من الذيفانات القاتلة كان عند درجة حرارة تراوحت بين 20-30 م ° وهذه النتائج جاءت مطابقة لما تم التوصل اليه من ان درجة الحرارة المثلى للنمو هي 25 م °. من خلال الدراسات السابقة التي تم من خلالها دراسة الظروف المثلى للنمو وكذلك انتاج الذيفانات القاتلة بواسطة هذه الخميرة قيد الدراسة تبين ان معدلات النمو تتأثر كثيراً بالرقم الهيدروجيني للوسط الذي تنمو فيه وان الرقم الهيدروجيني pH الامثل هو 4.5 (15،14،2) ولوحظ من خلال النتائج التي حصلنا عليها في هذه الدراسة انها متوافقة مع ما ذكر في هذه الدراسات.

ومن الصفات العامة لهذه الخميرة بالاضافة الى قدرتها على النمو بصورة جيدة في تراكيز ملحية عالية هو قابليتها على النمو بتراكيز عالية من السكر تصل الى اكثر من 5% فضلاً عن قدرتها على استهلاك مدى واسع من مصادر الكاربون ومنها سكر الكلوكوز، وقد لوحظ ان معدلات نمو الخميرة هذه تزداد بوجود سكر الكلوكوز مقترناً بوجود تراكيز ملحية عالية من ملح الطعام NaCl، ويمكن تفسير ذلك على انه من خلال ذلك يتم الحفاظ على الضغط الاوزموزي للخلية ضمن الوسط الذي تعيش فيه بواسطة اندماج كل من الصوديوم مع الكليسرول ويتم ذلك من خلال عملية النقل الفعال على جانبي الغشاء الخلوي ومن خلال الالية المعروفة بـ Sodium-glycerol co-transport mechanism. وايضا واحدة من الصفات التي تمتلكها هذه الخميرة من اجل تحمل تراكيز عالية من سكر الكلوكوز والنمو بشكل جيد هو امتلاكها للأنزيمات المعروفة بـ-ß glucosidasesوهذه الخاصية لها اثر مهم في عملية انتاج العصائر الطبيعية ذات النكهات المرغوبة وكذلك التخمرات فضلاً عن ان وجود تراكيز عالية من سكر الكلوكوز تسبب اجهاد او ضغط على الخلية مما يجعلها تنتج كميات متزايدة من مركبات الايض الثانوي ومنها الذيفانات القاتلة(2).

اختبار فعالية للذيفان القاتل المنتج بواسطة خميرة *D.hansenii* تجاه الخلايا السرطانية (L-20B):

اجريت هذه التجربة لمعرفة سمية الذيفان القاتل المنتج بواسطة خميرة *D. hansenii* والذي تم ترشيحه وتركيزه تجاه خط من الخطوط السرطانية والمسمى L20B أذ تم بأستخدام الذيفان المنتج تحت جميع الظروف المثلى المثبتة في هذه الدراسة، فقد اظهرت النتائج الموضحة في الجدول (1) وجود تأثيراً معنوياً متبايناً في التأثير السمي تجاه هذا الخط من الخلايا السرطانية أذ كان الذيفان المنتج بوجود تركيز ملح 8% اكثر معنوية في التأثير السمي والقاتل للخلايا السرطانية وبلغت النسبة المئوية للقتل مستويات عالية وصلت الى 47.61 % في حين بلغت النسبة المئوية للقتل 46.3 عند تركيز ملح 6%، فيما بلغت 44.19 و 44.46 عند انتاج الذيفان القاتل في وسط نمو مجهز بتركيز ملح NaCl 2 و4% مقارنة بمعاملة السيطرة

وأوضحت نتائج تجربة انتاج الذيفان القاتل بأستخدام وسط انتاج بارقام هيدروجينية مختلفة كما في الجدول (2) تباينا واضحا في السمية القاتلة تجاه الخلايا السرطانية المستخدمة في الدراسة وكانت نسب القتل اقل مقارنة بتأثير تراكيز ملح NaCl حيث كان التأثير ذو معنوية عالية تحت مستوى احتمالية$P<0.01$ وبلغت اعلى نسبة قتل عند الرقم

الهيدروجيني 4.5 حيث بلغت 23.07 % فيما كانت اقل نسبة قتل عند الرقم الهيدروجيني 7.0 وبلغت 0.0 % .

جدول رقم (1) تأثير الذيفان المنتج بواسطة خميرة *D. hansenii* في تراكيز NaCl مختلفة وفعاليته القاتلة تجاه خط الخلايا السرطانية L20B

الذيفان المنتج عند تركيز % NaCl	النسبة المئوية للتثبيط (%) ± الخطاء القياسي
2	44.19±0.57a
4	44.46±1.52a
6	46.3±0.88b
8	47.61±1.20a
Control	0.0±0.0c
Level of sig.	**
* (P<0.05), ** (P<0.01). الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تشير الى وجود فروق معنوية بين المتوسطات	

جدول رقم (2) تأثير الذيفان المنتج بواسطة خميرة *D. hansenii* في ارقام هيدروجينية مختلفة وفعاليته القاتلة تجاه خط الخلايا السرطانية L20B

الذيفان المنتج عند الرقم الهيدروجيني pH	النسبة المئوية للتثبيط ± الخطاء القياسي (%)
4.5	23.07±0.8a
5.5	16.92±0.18b
6.5	5.03±0.23bc
7.0	0.0±0.0c
Control	0.0±0.0c
Level of sig.	**
* (P<0.05), ** (P<0.01). الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تشير الى وجود فروق معنوية بين المتوسطات	

اما بالنسبة لتأثير الذيفان المنتج في درجات حرارة مختلفة على خط الخلايا السرطانية وكما مبين في الجدول (3) لوحظ ان الذيفان المنتج بدرجة حرارة 25 م° هوالأكثر معنوية في التأثيرتحت مستوى احتمالية P<0.01 اذ بلغت نسبة القتل اوالسمية للخلايا السرطانية 21.53 % وبلغت نسبة القتل 17.30 % للذيفان المنتج عند درجة الحرارة 20 م° في حين لم يكن هناك تأثير معنوي واضح بالنسبة للذيفان المنتج عند ردجة الحرارة 15 م° اذ بلغت نسبة القتل 3.34% فيما لم يكن هناك اي نسبة تثبيط للذيفان المنتج عند درجة الحرارة 30 م°.

جدول رقم (3) تأثير الذيفان المنتج بواسطة خميرة *D. hansenii* في درجات حرارة مختلفة وفعاليته القاتلة تجاه خط الخلايا السرطانية L20B

الذيفان المنتج عند درجة الحرارة (م°)	الخطاء القياسي±النسبة المئوية للتثبيط (%)
15	3.34±0.14bc
20	17.30±0.67b
25	21.53±0.8ab
30	0.0±0.0c
Control	0.0±0.0c
Level of sig.	**
* (P<0.05), ** (P<0.01). الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تشير الى وجود فروق معنوية بين المتوسطات	

يظهر الجدول (4) ان الذيفان المنتج بزيادة تركيز سكر الكلوكوز المضاف الى وسط انتاجه يؤدي الى حصول زيادة معنوية واضحه في نسبة القتل والسمية تجاه الخلايا السرطانية قيد الدراسة وكانت هذه الزيادة تتناسب طردياً مع زيادة تركيز السكر حيث بلغت النسبة المئوية للقتل 35.43 للذيفان المنتج عند التركيز 4 % لسكر الكلكوز و 38.42 % للذيفان المنتج عند التركيز 6 % في حين بلغت نسبة القتل للخلايا السرطانية 43.92 % للذيفان المنتج عند التركيز 8% وبلغت 47.30 للذيفان المنتج عند تركيز 10 % من سكر الكلوكوز.

جدول رقم (4) تأثير الذيفان المنتج بواسطة خميرة *D. hansenii* في تراكيز مختلفة من الكلوكوز وفعاليته القاتلة تجاه خط الخلايا السرطانية L−20B

الذيفان المنتج عند تركيز السكر %	النسبة المئوية للتثبيط (%) ± الخطاء القياسي
4	35.43±0.66ab
6	38.4.2±0.87a
8	43.92±1.51b
10	47.30±0.67d
Control	0.0±0.0c
Level of sig.	**
* (P<0.05), ** (P<0.01). الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تشير الى وجود فروق معنوية بين المتوسطات	

من خلال الدراسات التي اجريت في هذا المجال تبين ان هناك الكثير من انواع الذيفانات التي تنتج بواسطة الخمائر المختلفة ويختلف الوزن الجزيئي للذيفان من خميرة الى اخرى وحسب نوع الخميرة ومناطق عزلها، ففي الدراسة التي اجريت من قبل (14)، تم تشخيص وتحديد الذيفان القاتل والمنتج بواسطة خميرة *D. hansenii* وتبين ان البروتين القاتل والمنتج من قبل الخميرة اعلاه ذو وزن جزيئي واطىء يقارب 23 كيلو دالتون كما جاء في الدراسة الحالية، في حين الكثير من الدراسات اشارات الى انه لحد الان لم يتم تحديد الوزن الجزيئي للذيفان المنتج بواسطة هذه الخميرة (14،25،26)، ومن خلال نتائج الدراسة الحالية تبين ان الزيادة في تراكيز ملح الطعام NaCl وكذلك سكر الكلوكوز سوف تؤدي الى حصول اجهاد على خلايا الخميرة مما يؤدي الى قيامها بإنتاج كميات اكبر من مركبات الايض الثانوي Secondary metabolites ومنها الذيفانات القاتلة وهو ما يعزى لها من قابلية متزايدة في قتل الخلايا السرطانية بزيادة التراكيز الموجودة في وسط نمو الخميرة(27،2).اما بالنسبة لظروف انتاج الذيفان القاتل الاخرى من درجة حرارة ورقم هيدروجيني pH فقد تبين من دراسات (2،14) الظروف المثلى لعمل وبقاء الذيفان بشكل فعال هو درجة حرارة تتراوح ما بين 20-30 م° ورقم هيدروجيني 4.5 وهذا يتوافق مع ما تم التوصل اليه من ان افضل درجة حرارة لإنتاج الذيفان القاتل هي 25 م° ورقم هيدروجيني 4.5 وعندها بلغت النسبة المئوي لقتل الخلايا السرطانية أعلى ما يمكن. ان الدراسات التي اجريت ضمن هذا المجال تعد قليلة مقارنة بالدراسات الاخرى التي تضمن اجراء بعض التطبيقات الطبية والصيدلانية للذيفانات القاتلة المنتج من قبل العديد من الخمائر ولاسيما استخدامها كعوامل قاتلة للخمائر والبكتريا الممرضة وغير المرغوب فيها، يمكن ان يعزى سبب قابلية الذيفانات القاتلة في قتل وتثبيط نمو الخلايا السرطانية الى قابليتها على استحثاث الموت المبرمج للخلايا السرطانية (Cancer-cell apoptosis) بعد ان يتم التهامها بطريقة البعلمة من قبل الخلايا السرطانية(28)، جاءت النتائج المستحصلة في دراستنا الحالية متوافقة مع ما توصلوا اليه (29) أذ استخدموا في دراستهم 2 نوع من خمائر *Pseudozyma* spp. و3 انواع من خميرة *Barnettozyma* spp. وتبين ان الرواشح المركزة والتي تحوي الذيفانات المنتجة من قبل هذه الخمائر لها فعل قاتل وسمي قوي تجاه خط الخلايا السرطانية HepG2، كما جاءت النتائج متوافقة مع دراسة (19) فقد استخدموا خميرة *S. cerevisiae* في حث الموت المبرمج لخلايا سرطان الثدي في الانسان (MCF-7 and ZR-75-1) وتمت التجربة خارج الجسم الحي*InVitro* وتبين من نتائج هذه الدراسة وجود سمية قاتلة وقوية للخميرة القاتلة تجاه هذه الخلايا السرطانية.

المصادر:

1. Banjara, N.; Suhr, M.J.and Hallen-Adams, H.E. (2015). Diversity of Yeast and Molds Species from a Variety of Cheese Types. Curr Microbiol 70(6):792–800. doi: 10.1007Ls00284-015-0790-1
2. Breuer, U. and Harms, H. (2006). Debaryomyces hansenii-an extremophilic yeast with biotechnologil potential. Yeast. 23 (6): 415-437. Doi:10.1002LYea.1374. PMID 16652409.
3. Prista, C.; Loureiro-Dias, M. C.; Montiel, V.; Garcia, R. and Ramos, J. (2005). Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. FEMS Yeast Res. 5(8): 693–701.
4. Capece, A. and Romano, P. (2009). "Pecorino di filiano" cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii*. Int. J. Food Microbiol. 30. and Viljoen, B.C., (2003). Yeasts as adjunct starters in matured cheddar cheese. Int.J. Food Microbiol. 86, 131–140.
5. Ferreira, A.D., Viljoen, B.C., (2003). Yeasts as adjunct starters in matured cheddar cheese. Int.J. Food Microbiol. 86, 131–140.
6. Hallen-Adams, H.E., Kachman, S.D., Kim, J., Legge, R.M., Martínez, I., (2015). Fungi inhabiting the healthy human gastrointestinal tract: a diverse and dynamic community. Fungal Ecol. 15, 9–17.
7. Desnos-Ollivier, M., Ragon, M., Robert, M., Raoux, D., Gantier, J.C.and Dromer, F. (2008). *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (Candida guilliermondii). J. Clin. Microbiol. 46, 3237–3242.
8. Roostita, R. and Fleet, G. H. (1996). The occurrence and growth of yeasts in camembert and blue-veined cheeses. Int. J. Food Microbiol. 28(3), 393-404.

19. Ghoneum, M. and Gollapudi, S. (2004). Induction of apoptosis in breast cancer cells by *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, *in vitro*. Anticancer Res.
20. Schmitt, M. J. and Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: Lethality and self-protection. Nat. Rev. Microbiol. 4:212-221.
21. Hu, R. Y., Lee, C. F., Chou, H-C. (2012). *Pseudozyma* spp. and *Barnettozyma* spp. effectively kill cancer cells in vitro. Genomic Med. Bio-markers Health Sci. 4, 61-64.
22. Wang, X. X.; Chi, Z.; Peng, Y.; Wang, X. H.; Ru, S. G. and Chi, Z. M. (2012) Purification, characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. Microbiol. Res. 167(9):558–563. doi: 10.1016/j.micres.2011. 12.001
23. Walker, J. M. (2002). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. The Protein Protocols Handbook, seconded: Humana. Press. pp. 61- 67.
24. Freshney, R. I. (2010). Database of misidentified cell lines. Int. J. Cancer. 126(1): 302.
25. Lui, G-L.; Chi, Z.; Wang, C-Y.; Zhi-peng, W.; Li, Y. and Zhen-Ming, C. (2013). Yeast Killer toxin, molecular mechanisms of their action and their application. Crit. Rev. Biotechnol. 35(2): 222–234 Doi:10.3109/07388551.2013.833582.
26. Marquina, D. A. ; Santos, A. and Peinado, J. M. (2002). Biology of killer yeasts. Int. Microbiol. 5: 65–71.
27. Nakase, T.; Suzuki, M.; Phaff, H.J.; Kurtzman, C.P. (1998.) Debaryomyces Lodder & Kreger-van Rij Nom. Cons. In The Yeasts — A Taxonomic Study, Kurtzman CP, Fell JW (eds). Elsevier: Amsterdam; 157–173.
28. Kromer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P; (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenculture committee on cell death. Cell Death Differ. 16:3-11.
29. Hu, RY.; Lee CF.; You, YC. And Chou, HC. (2013). Analysis of cancer cell death in hepatoma cell line after the treatment of lethal culture extract from *Taiwan Barnettozyma* spp. *Biomark. Gen. Med.* 5(3):92–95.
9. Johnson, E. A., and Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast biotechnology. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell and T. Boekhout (Eds.), The yeasts: A taxonomic study (Fifth ed., pp. 26). Amsterdam: Elsevier.
10. Norkrans, B. (1969). The sodium and potassium contents of yeasts differing in halotolerance, at various NaCl concentrations in the media. Antonie Van Leeuwenhoek 35, Suppl-2.
11. Schmitt, M. J., and Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: From molecular biology to application. FEMS Microbiol. Rev. 26(3): 257–276. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6445(02)00099-2.
12. Bevan, E.A. and Mitchell, D.J. (1979). The killer system in yeast. In: Lemke, P.A. (Ed.), Viruses and Plasmids in Fungi. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, pp. 161–199.
13. Santos, A., Navascués, E., Bravo, E., Marquina, D., (2011). Ustilago maydis killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast Brettanomyces bruxellensis. Int. J. Food Microbiol. 145, 147–154.
14. Santos, A.; Marquina, D., Barroso, J. and Peinado, J. M. (2002). (1-›6)-Beta-D-glucan as the cell wall binding site for Debaryomyces hansenii killer toxin. Lett. Appl. Microbiol. 34, 95–99.
15. Marquina, D.; Barroso, J.; Santos, A. and Peinado, J. M. (2001). Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. Microbiol. Res. 156(4): 387-391. doi:10.1078/0944-5013-00117
16. Middelbeek, E.J., Hermans, J.M.H., Stumm, C. and Muytjens, H.L. (1980). High incidence of sensitivity to yeast killer toxins among *Candida* and *Torulopsis* isolates of human origin. Antimicrob. Agents Chemother. 17, 350–354.
17. Banjara, N.; Suhr, M. J. and Hallen-Adams H. E. (2016). A killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic Candida yeast. Int. J. Food Microbiol. 222: 23-29.
18. Dabrowska I. V., Tkachenko K. S., Podgorsky V. S. and Fomina M. O. (2015). Anti-Staphylococci activity of yeast isolates affected by pH of experimental medium. Factors of experimental evolution of organisms UDC, 179-182.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2017,11 (3) :26-35

Production of killer toxin from DSMZ70238 *Debaryomyces hansenii* and test the effectiveness against cancer cell line L20B.

Wijdan H. Abdul-Razzak Jamal A. Ibraheem Safa-Ulddin A. Shanter

Abstract

This study was conducted to detect the ability of yeast *Debryomyces hansenii* DSMZ70238 to produce the killer toxin and testing the optimal conditions for production rather than studying the cytotoxicity toward the cancer cell line L20B. The optimal conditions studied for their effect on yeast growth rates and their ability to increased production of killer toxin included different concentrations of NaCl salt, glucose, different concentrations of pH as well as different temperatures. The results showed that the killer yeast had the ability to produce the killer toxin in the molecular weight of 22 KDa were detected by the using of 12% SDS Polyacryelamide Gel, The optimal conditions of the production was studied and the killing activity of this toxin was determined towards microbes used in the present study, The results showed 8% of salts, pH 4.5, Temperature 25 °C and 10 % from carbon source (glucose) are the best conditions for production and the killing activity. To detect the killing activity of killer toxin toward the cancer cells, The cytotoxicity test of the killer toxin was investigated against the cell line (L20B), by using the partially purified concentrated killer toxin produced under optimal conditions, The results of this experiment showed the killer toxin has a lethal effect of cancer cells, which reached the highest percentage at 8% salts concentration and it was 47.61% and at pH 4.5 reached 23.07%, while the percentage of killing was 21.53% at 25°C and 47.30% at 10% of glucose concentration.