مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره چهارم (پیاپی ۲۹) زمستان ۱۳۹۵
صفحات ۳۲۵-۳۱۵

Original Article

بهینه سازی شرایط کشت به منظور تولید آنزیم فیتاز توسط باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* جدا شده از خاک

مریم پرهام فر*[۱]، حمید ابطحی[۲]، میلاد پرهام فر[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، [۲] دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی، [۳] کارشناس ارشد، دانشگاه اسن-دویسبرگ، دانشکده شیمی.

چکیده

سابقه و هدف: فیتات منبع مهم فسفات در دانه‌های گیاهی می‌باشد. فیتات اثرات ضد تغذیه‌ای قوی در انسان و حیوانات (دام، طیور، ماهی‌ها) دارد. آنزیم فیتاز یک زیرگروه از فسفاتازها می‌باشد که هیدرولیز فیتات را کاتالیز می‌کند. فیتاز میکروبی، پتانسیل کاربرد بیوتکنولوژیکی در زمینه‌های مختلف مانند کشاورزی، تغذیه انسان و حیوانات دارد. این مطالعه با هدف بهینه‌سازی شرایط تولید فیتاز توسط باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* جدا شده از خاک صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از خاک آلوده به فضولات دامداری در شهر اراک نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها در محیط اختصاصی PSM به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس کشت داده شدند. غربالگری باکتری مولد فیتاز روی محیط PSM براساس وجود هاله شفاف انجام شد. بهترین گونه توسط آزمون بیوشیمیایی و مورفولوژیکی شناسایی گردید. میزان تولید آنزیم و فعالیت حل‌کنندگی فسفات در حضور گستره های pH مختلف و ٤ نوع محیط کشت (NBRIP, PVK, PSM, NBRIY دارای فیتات به عنوان تنها منبع فسفات) بررسی گردید.

یافته ها: در این مطالعه حداکثر تولید آنزیم در باکتری‌های جدا شده در محیط PSM در ٤٨-٣٦ بعد از گرمخانه‌گذاری مشاهده شد. باکتری 12S مولد فیتاز به عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* شناسایی گردید. بر اساس نتایج، pH بهینه تولید فیتاز در محیط PSM معادل ۷ بود. بررسی میزان تولید آنزیم در حضور محیط‌های مختلف نشان داد که محیط PVK واجد فیتات، مناسب‌ترین محیط می‌باشد.

نتیجه‌گیری: باکتری *باسیلوس سابتیلس* جدا شده، فرصتی برای معرفی فیتاز جدید برای کاربرد در صنایع غذایی و محیطی فراهم می‌کند. همچنین از محیط PVK می‌توان به عنوان یک محیط موثر برای غربالگری باکتری مولد فیتاز و تولید آنزیم استفاده نمود.

واژگان کلیدی: فیتات، فیتاز باکتریایی، *باسیلوس سوبتیلس*، بهینه‌سازی.

دریافت مقاله: مرداد ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۵

مقدمه

فیتات یا هگزا فسفات اینوزیتول در سراسر طبیعت وجود دارد. فیتیک اسید یا فیتات منبع مهم فسفات در ترکیبات دانه‌ها و بیشتر غذاهای گیاهی به ویژه غلات می‌باشد. این ترکیب، مخلوطی از نمک‌های منیزیم-کلسیم اینوزیتول هگزافسفریک‌اسید بوده که با عنوان فیتیک اسید شناخته شده است (۱). فیتیک اسید دارای اثر ضد تغذیه‌ای می‌باشد و این اثر به دلیل ساختار مولکولی غیر معمول آن است. فیتیک اسید ظرفیت اتصال قوی داشته و به طور موثر اتصال‌های مونو-دی و تری والانت با کاتیون‌ها می‌دهد که مخلوط آنها به شکل کمپلکس‌های غیرمحلول می‌باشند (۲).

تشکیل کمپلکس فیتات معدنی غیر محلول در مجرای گوارشی حیوانات از جذب مواد معدنی ممانعت کرده و باعث کاهش

*) آدرس برای مکاتبه: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی.
تلفن: ۰۹۱۸۳۶۳۲۲۳۱ پست الکترونیک: mary_parhamfar@yahoo.com

مواد معدنی ضروری مانند کلسیم، منیزیم، پتاسیم و مس در بدن جاندار می‌شود (۳ و ٤). همچنین فیتیک اسید با تشکیل کمپلکس با پروتئین با آنزیم‌هایی مانند تریپسین، پپسین، آلفا-آمیلاز و گالاکتوزیداز واکنش داده و باعث کاهش فعالیت این آنزیم‌های گوارشی مهم و حلالیت پروتئین می‌گردد (۵).

فیتازها یک زیر گروه از فسفاتازها یا فسفریک مونواستر هیدرولازها هستند که قادر به هیدرولیز فیتات می‌باشند. این دسته از آنزیم‌های هیدرولیز کننده قادر به رها سازی فسفات به صورت مرحله‌ای از فیتات می‌باشند و حداقل یک گروه فسفات را از این ماده آزاد می‌نمایند.

از هیدرولیز کامل فیتات، یک مولکول اینوزیتول و ٦ مولکول فسفات معدنی حاصل می‌شود. فیتاز در بعضی میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها وجود دارد و این موجودات توانایی تجزیه فیتات و استفاده از فسفر حاصل از هیدرولیز آن را دارند. اما فیتاز در سطح بسیار پایینی در مجرای گوارشی حیوانات تک معده ای (مانند ماکیان، خوک و ماهی‌ها) وجود دارد. بنابراین این حیوانات از مشکلات ضد تغذیه‌ای مربوط به فیتات غیرقابل هضم رنج می‌برند و فیتات توسط آنها به محیط دفع می‌شود. به همین دلیل فسفات معدنی به غذای آنها افزوده می‌شود تا فسفات مورد نیاز آنها را تامین کند که این موضوع باعث افزایش هزینه‌ها می‌گردد (۵).

از طرفی فضولات حیوانات، آلودگی فسفر می‌دهد و این فسفر وارد آب شده و سبب یوتریفیکاسیون آب‌های سطحی و در نتیجه افزایش رشد جلبک‌ها، کمبود اکسیژن، مرگ ماهی‌ها و آبزیان می‌گردد (٦). مکمل فیتاز غذایی با منشا میکروبی با تجزیه فیتات، اثر ممانعتی جذب مواد معدنی توسط آن را برطرف نموده و از تشکیل این کمپلکس‌ها جلوگیری می‌کند و با افزایش جذب فسفات از عناصر غذایی باعث جلوگیری از دفع فسفات و در نتیجه کاهش آلودگی محیط می‌شود (۵ و ۷).

علاوه بر این، هان (Hahn) گزارش کرد که آنزیم فیتاز، تاثیر مثبتی بر روی قابلیت هضم پروتئین، وزن حیوان، جذب غذایی، نسبت غذا به محصول، انرژی متابولیزه، بقای فسفر، نیتروژن و کلسیم دارد (۸).

علاوه بر مواردی که از کاربردهای فیتاز اشاره گردید، می‌توان از فیتاز در صنایع داروسازی (در درمان بیماری‌های آلزایمر، کاهش کلسترول و جلوگیری از تشکیل سنگ کلیه)، صنایع تهیه نان، کاغذسازی، جهت تولید ایزومرهای مایواینوزیتول فسفات برای مطالعات سینتیک شیمیایی و فیزیولوژیکی، اصلاح خاک و در افزایش رشد گیاهان استفاده کرد (۹).

بنابراین فیتاز پتانسیل وسیعی در کاربردهای بیوتکنولوژیکی دارد و مشکلات بسیاری هم در زمینه سلامتی و هم محیط زیست برطرف می کند (۵). اما براساس نوع کاربرد، فیتاز تجاری باید دارای یک سری معیارهای کیفی باشد. در نهایت یک فیتاز ارزش رقابتی نخواهد داشت اگر تولید بالا و خالص با یک سیستم نسبتا ارزان نداشته باشد. به همین دلیل تلاش برای جداسازی فیتازهای میکروبی با خواص آنزیمی بهتر و از طریق روش های موثرتر جهت کاربرد صنعتی امری ضروری است.

ساسریخا (Sasirekha) و همکاران باکتری *سودوموناس آئروژینوسا* P6 (*Pseudomonas aeruginosa* p6) مولد آنزیم فیتاز با فعالیت ویژه مناسب از خاک جداسازی کردند (۱۰).

میتال (Mittal) و همکاران گونه‌ای از باکتری *کلبسیلا* (*Klebsiella* sp.) (جداسازی شده از خاک مرغداری) را گزارش کردند که قادر به تولید فیتاز اسیدی و ترموفیلیک بود (۱۱). در مطالعه دیگری که با استفاده از ٦ نوع محیط کشت مختلف انجام گرفت، در حدود ۳۰ گونه باکتری تولید کننده فیتاز از خاک جداسازی شد (۱۲).

علاوه بر این، فیاضی حسینی (Fayazi Hosseini) و همکاران (۱۳)، ابراهیمیان (Ebrahimian) و همکاران (١٤) و حسین خانی (Hosseinkhani) و همکاران (۱۵) باکتری تولید کننده فیتاز را به ترتیب از ریزوسفر گندم، منابع محیطی متنوع، خاک و فضولات ماکیان جداسازی نمودند. همچنین در پژوهش دیگری به منظور جداسازی باکتری مولد فیتاز مقاوم به دما و اسید از چشمه آب گرم واقع در استان کرمان، نمونه برداری صورت گرفت (١٦).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری های بومی

مولد فیتاز، معرفی محیط‌های موثرتر جهت غربالگری، افزایش تولید آنزیم و فعالیت حل کنندگی فسفات بود.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه برداری: برای جداسازی باکتری مولد آنزیم فیتاز از خاک آلوده به فضولات دامداری در شهرستان اراک واقع در استان مرکزی، نمونه برداری صورت گرفت. تعداد ۵ نمونه خاک در شرایط استریل از قسمت‌های مختلف خاک اطراف محوطه دامداری جمع‌آوری گردید. نمونه برداری از عمق ۱۰ سانتیمتری خاک انجام شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند و به میزان ۱ گرم از نمونه خاک به ۱۰ میلی‌لیتر محلول سالین ۰/۹ درصد اضافه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون در محیط غربالگری باکتری مولد فیتاز PSM (Phytase Screening Medium) به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شد (۱۰). محیط PSM واجد فیتات به عنوان تنها منبع فسفات می‌باشد. ترکیبات محیط PSM شامل: گلوکز (۱۵ گرم در لیتر)، سولفات آمونیوم (۵ گرم در لیتر)، فیتات سدیم (سیگما) (۵ گرم در لیتر)، کلرید کلسیم (۰/۱ گرم در لیتر)، سولفات منیزیم (۰/۱ گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۰/۱گرم در لیتر)، کلرید پتاسیم (۰/۵ گرم در لیتر) ، سولفات منگنز (۰/۰۱ گرم در لیتر)، سولفات آهن (۰/۰۱ گرم در لیتر)، آگار (۱۵ گرم در لیتر) با pH ٦/٥-٧ بود (١٦). وجود هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری در محیط اختصاصی PSM، نشان دهنده تولید آنزیم فیتاز خارج سلولی و تجزیه فیتات موجود در محیط می باشد (٦). بنابراین کلنی‌هایی که هاله شفافی در اطراف آنها مشاهده گردید، خالص‌سازی و در محیط PSM کشت مجدد داده شدند. در این بررسی ۵ باکتری تجزیه کننده فیتات که از لحاظ مورفولوژی کلنی و میکروسکوپی با هم تفاوت داشتند، شناسایی گردیدند (این باکتری‌ها 8S، 12S، 16S، 25S و 34S نامیده شدند). سپس به منظور تعیین فعالیت آنزیمی، این باکتری‌ها در محیط مایع PSM کشت داده و به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و ۲۰۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شدند (۱۵).

ب) اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی: در این بررسی از روش تغییر یافته مولیبدات–بلو استفاده شد. در این روش پس از ٢٤ ساعت از محیط مایع PSM واجد باکتری‌های رشد یافته به میزان ۱ میلی‌لیتر برداشته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلیسیوس و ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس روماند به عنوان آنزیم (۰/۱ میلی‌لیتر)، با سوبسترا (فیتات سدیم) (۰/۳ میلی‌لیتر) در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شد. پس از این مدت، واکنش با افزودن (۰/٤ میلی‌لیتر) تری کلرواستیک اسید ۵ درصد (TCA) متوقف گردید. سپس معرف رنگی (مخلوط مقدارهای مولیبدات آمونیوم (۱/۵ درصد) در اسید سولفوریک (۵/۵ درصد) و محلول سولفات آهن (۲/۷ درصد)) به میزان (۰/٤ میلی‌لیتر) به نمونه‌ها افزوده گردید. بعد از اینکه نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند، تمامی ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و ٤۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شدند. اندازه‌گیری جذب نمونه و کنترل در طول موج ۷۰۰ نانومتر توسط دستگاه UV اسپکتروفتومتر برای تعیین فعالیت آنزیمی صورت گرفت. با استفاده از کنترل استاندارد، دستگاه صفر شده و اختلاف جذب نمونه و کنترل، نشان دهنده فسفر آزاد شده بود (۱۷).

در این مورد یک واحد فعالیت آنزیمی، مقدار آنزیمی است که ۱ میکرومول فسفات را در هر دقیقه، تحت شرایط سنجش آزاد کند. فعالیت ویژه به صورت واحد فعالیت آنزیمی در هر میلی‌گرم پروتئین بیان می‌شود (۱۸). شرایط استاندارد شامل: ۵ pH، دمای ۳۷ درجه سلیسیوس و غلظت سوبسترا (فیتات سدیم) ۰/۰۰۵ مول بر لیتر می‌باشد.

ج) بررسی میزان حل کنندگی فسفات در زمان‌های مختلف گرمخانه گذاری: برای تعیین بهترین زمان فعالیت حل‌کنندگی فسفات از ۵ نوع باکتری دارای هاله در محیط PSM استفاده گردید. این باکتری‌ها در محیط PSM در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و ۲۰۰ دور در دقیقه کشت داده شدند و به مدت ٤ روز با روش مولیبدات–بلو فعالیت حل کنندگی آنها اندازه‌گیری شد. بازه زمانی که در آن بیشترین غلظت فسفات آزاد در محیط

حاصل گردید، به عنوان زمان بهینه فعالیت در نظر گرفته شد. همچنین بر اساس میزان فعالیت در محیط جامد و محیط مایع، باکتری که دارای بیشترین میزان فعالیت بود برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد.

د) شناسایی باکتری مولد آنزیم فیتاز: در مرحله بعد بهترین باکتری تولید کننده فیتاز از لحاظ میکروسکوپی و مورفولوژی کلنی بررسی شد. همچنین این باکتری از نظر واکنش‌های بیوشیمیایی مانند آزمون تخمیر قند، احیای نیترات، هیدرولیز نشاسته، تولید اندول، اکسیداز، کاتالاز، MR/VP، اوره‌از، حرکت و ... نیز بررسی و جنس آن شناسایی گردید (۱۹).

ه) منحنی رشد: برای این منظور، میزان ۵۰۰ میکرولیتر از استوک باکتری تولید کننده آنزیم فیتاز به محیط PSM (با حجم ۵۰ میلی‌لیتر) برده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۲۰۰ دور در دقیقه کشت داده شد. سپس تا ٤٠ ساعت بعد از کشت هر ۲ ساعت یکبار، ۵۰۰ میکرولیتر از محیط واجد باکتری رشد یافته برداشته و جذب آن در طول موج ٦٠٠ نانومتر اندازه‌گیری شد و منحنی رشد در بازه زمانی ۸۰ ساعت، تعیین گردید. با استفاده از منحنی رشد و تعیین بهترین بازه زمانی تولید فیتاز، می‌توان فاز تولید آنزیم را در باکتری مورد نظر مشخص کرد.

و) تاثیر pH محیط بر حل شدن فسفات: برای بررسی تاثیر pH محیط، باکتری جداسازی شده در محیط PSM با چهار نوع pH متفاوت (۳، ۵، ۷ و ۹) و به مدت ۳ روز کشت داده و سنجش فسفات آزاد شده در محیط صورت گرفت. باید توجه داشت که رشد باکتری و تولید متابولیت‌های میکروبی موجب تغییر pH اولیه محیط کشت می‌شود. بنابراین در این مورد از بررسی، میزان اسیدیته محیط در مدت ۳ روز متغیر می‌باشد.

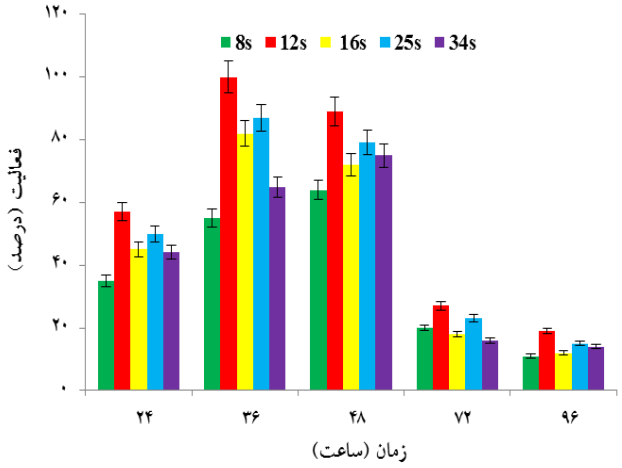
ز) معرفی محیط برتر دارای ویژگی حل‌کنندگی فسفات: بر اساس مطالعات مختلف، شرایط مختلف محیطی به ویژه پیچیدگی محیط کشت و ماهیت و غلظت منبع کربن، نیتروژن و انرژی از عوامل مورد توجه هم در میزان و سرعت رشد باکتری و هم تولید محصولات میکروبی می‌باشد (۵ و ۲۰). بنابراین تصور می‌شود، منبع کربن، نیتروژن و غلظت‌های یونی مختلف می‌توانند بر روی میزان حل کنندگی فسفات و تولید فیتاز نیز موثر باشند. به همین منظور در این بررسی از ٤ نوع محیط کشت مختلف جهت مقایسه و معرفی محیط کشت بهینه استفاده گردید. علاوه بر محیط PSM (مشابه آزمایشات قبلی)، از محیط‌های مورد استفاده برای غربالگری باکتری‌های حل کننده فسفات معدنی (PSB) استفاده گردید. با این تفاوت که فیتات سدیم (فسفر آلی) به همان میزان مورد استفاده در محیط PSM (۰/۵ درصد)، جایگزین تری کلسیم فسفات (فسفات معدنی) در این محیط ها گردید (سایر ترکیبات اصلی این محیط‌ها بدون تغییر باقی ماند).

این محیط‌ها شامل محیط PVK (Pikovskaya)، محیط NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) و NBRIY (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium devoid of yeast extract) بودند (جدول ۱) (۲۱).

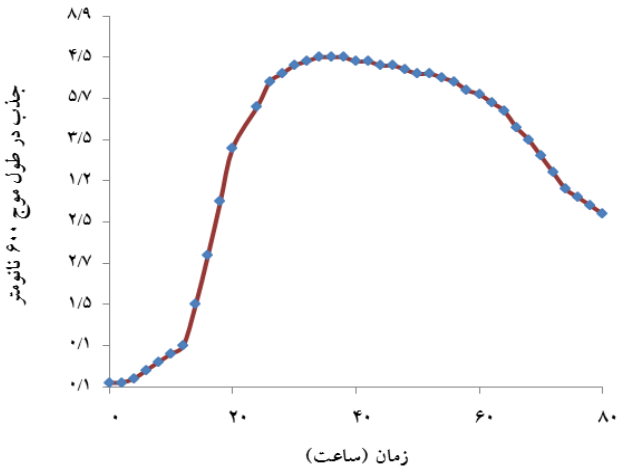
شایان یادآوری است که تمامی محیط‌ها دارای اسیدیته یکسان (pH ۷) بودند. باکتری انتخاب شده در مراحل قبلی، در ابتدا در محیط نوترینت براث به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد و سپس به میزان یکسان (۱ میلی‌لیتر) به همه محیط‌های مورد بررسی انتقال داده شد (۵ درصد محیط). سایر شرایط آزمایش در هر ٤ محیط یکسان در نظر گرفته شد. بعد از ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت میزان فسفات آزاد شده در محیط سنجش گردید.

جدول ۱: ترکیبات محیط های کشت متفاوت به منظور تولید آنزیم فیتاز توسط جدایه باکتری.

محیط کشت / ترکیبات(٪)	PSM	PVK	NBRIP	NBRIY
گلوکز	۱/۵	۱	۱	۱
سولفات آمونیوم	۰/۵	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۵
فیتات سدیم	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
عصاره مخمر	–	۰/۱	–	–
کلرید سدیم	۰/۰۱	۰/۰۲	–	۰/۰۲
کلرید پتاسیم	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲
کلرید کلسیم	۰/۱	–	–	–
سولفات منیزیم ۷ آبه	۰/۱	۰/۰۱	۰/۰۲۵	۰/۰۱
سولفات منگنز	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۲	–	۰/۰۰۰۲
سولفات آهن ۷ آبه	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۲	–	۰/۰۰۰۲
کلرید منگنز ۶ آبه	–	۰/۰۵	–	–



نمودار ۱: زمان بهینه تولید فیتاز در باکتری های مختلف.



نمودار ۲: منحنی رشد باکتری 12S در محیط اختصاصی PSM.

همچنین جذب سوسپانسیون هر محیط کشت به طور جداگانه به عنوان کنترل نیز اندازه‌گیری شد. در نهایت جذب هر نمونه با در نظر گرفتن جذب کنترل تعیین شد.

یافته‌ها

الف) غربالگری و بررسی زمان بهینه تولید فیتاز در باکتری‌های مختلف: بهترین زمان تولید آنزیم در ۵ نوع باکتری مولد فیتاز غربالگری شده در محیط اختصاصی PSM، بررسی شد. بر اساس نتایج اگرچه بین میزان فعالیت حل کنندگی باکتری‌ها، تفاوت وجود داشت. اما تمامی باکتری‌ها در بازه زمانی ۴۸-۳۶ ساعت بیشترین میزان تولید آنزیم را نشان دادند و بعد از ۷۲ ساعت به طور قابل توجهی این میزان کاهش یافت.

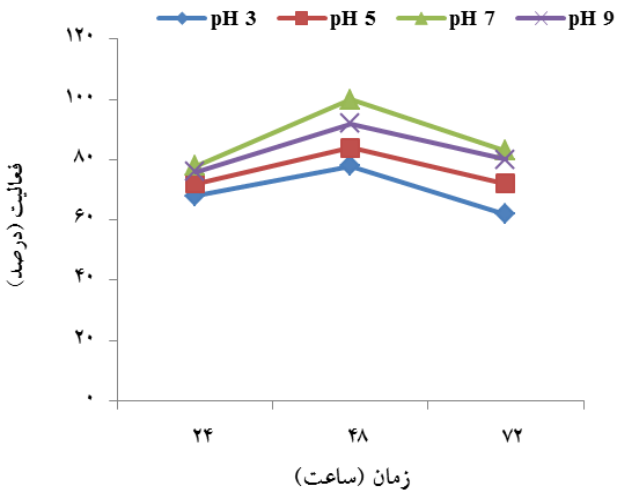
باکتری‌های 12S، 16S، 25S بهترین تولید و فعالیت آنزیم را در ۳۶ ساعت بعد از کشت نشان دادند. در حالی که زمان بهینه تولید فیتاز در باکتری‌های 8S و 34S در ۴۸ ساعت بعد از کشت آشکار گردید. اگرچه پس از ۲۴ ساعت وجود فسفات آزاد در محیط توسط باکتری‌ها مشاهده شد که بیانگر تولید آنزیم می‌باشد، اما پس از ۱۲ ساعت این میزان به طور چشمگیری افزایش یافت (نمودار ۱).

همچنین در این بررسی برای تعیین محیط کشت بهینه جهت تولید فیتاز و سایر مطالعات بعدی، باکتری 12S که دارای فعالیت بالا هم در محیط جامد (بر اساس ایجاد هاله) و هم در محیط مایع بود، انتخاب شد.

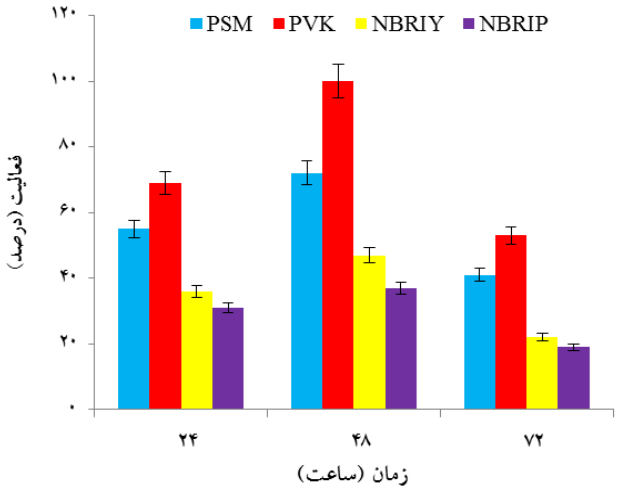
ب) شناسایی باکتری مولد آنزیم فیتاز: پس از ارزیابی میکروسکوپی و رنگ آمیزی گرم، بررسی مورفولوژی کلنی و آزمون‌های بیوشیمیایی، باکتری جداسازی شده به عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) شناسایی شد.

ج) منحنی رشد: در بررسی منحنی رشد باکتری 12S در محیط اختصاصی (PSM) در طول موج ۶۰۰ نانومتر مشاهده شد. این باکتری پس از فاز تاخیر (در حدود ۱۰ ساعت) وارد فاز لگاریتمی شد و تقریباً تا ۳۰ ساعت بعد از کشت، در این فاز بود. پس از فاز سکون، باکتری در حدود ۶۰ ساعت بعد از کشت وارد فاز مرگ شد (نمودار ۲). با در نظر گرفتن زمان سنتز آنزیم در طی زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری و تطابق آن با منحنی رشد باکتری می‌توان نتیجه گرفت که تولید آنزیم فیتاز در باکتری 12S در فاز سکون صورت گرفته است (زمان بهینه تولید آنزیم، ۳۶ ساعت بعد از کشت مشاهده شد).

د) تاثیر pH محیط بر حل شدن فسفات: جهت بررسی تاثیر pH محیط، با استفاده از روش مولیبدات بلو، باکتری 12S بعد از ۲۴ ساعت در هر ۴ نوع محیط PSM با pH متفاوت (۳، ۵، ۷ و ۹) دارای فعالیت حل کنندگی تقریبا یکسان بود اما بعد از ۴۸ ساعت در محیط با pH ۷، بیشترین فعالیت مشاهده شد. به طور کلی با کاهش pH در محیط، میزان تولید آنزیم کاهش یافت و در همه‌ی محیط‌ها بعد از ۷۲ ساعت، فعالیت



نمودار ۳: تاثیر pH محیط بر تولید آنزیم فیتاز در باکتری 12S.



نمودار ٤: تعیین میزان تولید آنزیم فیتاز توسط باکتری 12S در محیط های مختلف.

حل کنندگی فسفات کاهش داشت (نمودار ۳). بنابراین باکتری 12S در محیط دارای شرایط خنثی واجد بیشترین تولید آنزیم بود.

ه) معرفی محیط برتر به منظور تولید آنزیم فیتاز توسط باکتری 12S: برای تعیین تاثیر نوع و غلظت منابع نیتروژن و کربن و ترکیبات یونی بر روی تولید آنزیم و حل کنندگی فسفات آلی توسط باکتری از چهار محیط کشت استفاده شد. با توجه به داده‌های حاصل، می‌توان نتیجه گرفت که محیط PVK بسیار کاراتر از محیط های مورد بررسی دیگر در این آزمایش بود (نمودار ٤). پس از آن محیط PSM دارای کارایی مناسب بود و با اختلاف قابل توجهی، دو محیط NBRIP و NBRIY، تقریبا مشابه بودند.

بحث

در باکتری‌های مولد فیتاز بررسی شده در این مطالعه، بهترین زمان تولید آنزیم و فعالیت حل کنندگی فسفات را می‌توان بازه زمانی ٤٨-٣٦ در نظر گرفت. بر اساس داده‌های حاصل از منحنی رشد باکتری، تولید آنزیم فیتاز در فاز سکون صورت گرفته بود. همچنین میزان فعالیت حل کنندگی بعد از ۷۲ ساعت به طور چشمگیری، کاهش یافت.

در مطالعه ساسیرخا (Sasirekha) و همکاران بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوسا* P6 جدا شده از خاک، بعد از ٢٤ ساعت بیشترین فعالیت آنزیمی گزارش شد و پس از این مدت، تولید آنزیم به شدت کاهش یافت (۱۰). در حالی که در مطالعه حسین خانی (Hosseinkhani) و همکاران، ۷۲ ساعت بعد از کشت به عنوان بهترین زمان تولید فیتاز توسط یکی از گونه‌های باکتری *سودوموناس* جداسازی شده از فضولات ماکیان، گزارش شد (۱۵).

همچنین اسریرامولو (Sreeramulu) و همکاران، ۱۹ سویه باکتری تولید کننده اسید لاکتیک را از جنس *لاکتوباسیلوس* و *استرپتوکوکوس* برای تولید فیتاز خارج سلولی ارزیابی کردند. بالاترین میزان فعالیت آنزیم در محیط تخمیری مشاهده گردید و بیشترین مقدار فیتاز توسط *لاکتوباسیلوس آمیلووروس* (*Lactobacillus amylovorus*) در محیط PSM بعد از ۷۲ ساعت کشت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بدست آمد (۲۲). بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که زمان بهینه تولید فیتاز در میکروارگانیسم‌های مختلف، متنوع می‌باشد. همچنین علاوه بر نوع باکتری ممکن است نوع محیط کشت هم بر روی زمان فعالیت تاثیر داشته باشد. البته این موضوع نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

در میان باکتری‌های سنتز کننده آنزیم فیتاز، باکتری 12S که به عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* شناسایی شد برای مطالعات بعدی انتخاب گردید. زیرا این باکتری در هر دو محیط جامد و مایع اختصاصی دارای فعالیت آنزیمی قابل توجهی بود. بر اساس

مطالعات مختلف، فاکتورهایی از قبیل نوع و غلظت منبع کربن، فسفات، نیتروژن، ترکیبات یونی و pH محیط کشت از عوامل تاثیرگذار بر روی سرعت، میزان رشد و تولید محصولات میکروبی می‌باشند. بنابراین تعیین موثرترین محیط کشت به منظور غربالگری، افزایش تولید آنزیم و فعالیت حل کنندگی فسفات دارای اهمیت بسیاری است (۵ و ۲۰).

در این بررسی باکتری 12S بیشترین میزان تولید و فعالیت فیتاز در محیط PSM را در pH ۷ دارا بود. در مطالعات دیگری نیز pH بهینه جهت رشد میکروارگانیسم و تولید آنزیم در شرایط خنثی (pH ٦/٥) گزارش شد که مشابه با نتایج به دست آمده در این پژوهش بود (۱۸ و ۲۳). تصور می‌شود که دلیل کاهش رشد و تولید آنزیم در شرایط اسیدی به دلیل تولید محصولات سمی مانند اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم می‌باشد.

البته با افزایش pH نیز فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد که تصور می‌شود، افزایش pH بر روی بار اسیدآمینه‌های موجود در جایگاه فعال اثر می‌گذارد. بنابراین دیگر آنزیم قادر به تشکیل کمپلکس سوبسترا–آنزیم نمی‌باشد (۱۰). البته با توجه به اینکه که فیتازها بر اساس pH بهینه فعالیت به دو گروه فیتازهای اسیدی (در محدوده ٦–۳/٥ pH فعال هستند) و قلیایی (در محدوده ۸–٦ فعال هستند) تقسیم می‌شوند (٢٤). بنابراین pH بهینه جهت تولید و فعالیت آنزیم‌های فیتاز حاصل از باکتری های مختلف، تنوع زیادی دارند.

به عنوان نمونه، در پژوهشی که توسط میتال (Mittal) و همکاران صورت گرفت، pH بهینه آنزیم فیتاز از باکتری *کلبسیلا* در محدوده اسیدی ۵/۵–۳/۵ بود (۱۱). علاوه بر این، فیتازهای حاصل دو گونه از *سراشیا* (*Serratia*) و *انتروباکتر* (*Enterobacter*) در محدوده pH ۸–۳ فعال و پایدار بودند (۲۵). همچنین در این مطالعه، محیط PVK دارای فیتات سدیم (فسفات آلی) به عنوان تنها منبع فسفات بسیار کاراتر از محیط‌های مورد بررسی دیگر بود. این محیط از لحاظ غلظت ترکیبات یونی و وجود عصاره مخمر با سایر محیط‌های به کار رفته، تفاوت داشت که به نظر می‌رسد از عوامل تاثیرگذار در رشد باکتری و تولید فیتاز بود.

به طور کلی غلظت‌های یونی مختلف بر روی میزان حل کنندگی فسفات آلی موثر می‌باشند. به طوری که در پژوهشی بر روی باکتری‌های مولد فیتاز جدا شده از چشمه آب گرم مشاهده شد که در غلظت مشخصی از یون‌های KCl، NaCl و $FeSO_4$، تولید آنزیم و حل کنندگی فسفات افزایش یافت (١٦).

از طرفی ترکیبات نیتروژن آلی دارای اهمیت بالایی در بهینه‌سازی سنتز آنزیم فیتاز هستند. به عنوان نمونه ترکیبات نیتروژن آلی مانند پپتون و عصاره مخمر به شکل وسیعی برای تولید فیتاز در *آئروباکتر آئروژنس* (*Aerobacter aerogenes*) و *کلبسیلا آئروژنس* (*Klebsiella aerogenes*) به کار رفته بود (٢٦). گرینر (Griener) و همکارانش در بررسی سویه‌های *اشریشیاکلی* (*E. coli*) و گونه‌های *باسیلوس* جدا شده از خاک در اطراف ریشه گیاهان حبوبات مشاهده کردند که سطح بالایی از فیتاز خارج سلولی در محیط واجد مالتوز، عصاره گوشت و پپتون حاصل گردید (١٧).

همچنین کیم (Kim) و همکاران گزارش کردند که افزودن ۰/۰۱ درصد از عصاره مخمر به محیط، باعث افزایش حل کنندگی فسفات در *Pseudomonas* sp. 2 می شود (٢٧). در مطالعه دیگری که از ٦ نوع محیط کشت مختلف استفاده گردید (شامل LB، LB تغییر یافته، PFE، PFE تغییر یافته، PMM و PMM تغییر یافته)، تقریبا ۳۰ گونه غربالگری شده از خاک، افزایش فعالیت آنزیم را در حالتی که ۱٪ سبوس برنج به محیط کشت افزوده شد، نشان دادند. همچنین همه گونه‌ها، بهترین تولید آنزیم را در محیط LB تغییر یافته داشتند که دارای منبع نیتروژن تریپتون و عصاره مخمر همراه با سبوس برنج به عنوان منبع فسفات بود (١٢).

البته داده‌های حاصل از مطالعه شخارنایوتیال (Shekhar Nautiyal) با نتایج حاصل از این پژوهش تفاوت داشت. او گزارش کرد که عصاره مخمر و سولفات آمونیوم از ترکیبات غیرضروری در محیط کشت هستند و در نبود هر دو آنها، توانایی حل کنندگی فسفات معدنی (تری کلسیم فسفات) توسط باکتری *Pseudomonas* sp. 2، افزایش می‌یابد. به همین دلیل از محیط NBRIY که بدون عصاره مخمر بود،

استفاده کرد. همچنین او گزارش کرد که ترکیبات مختلف یونی با غلظت‌های متفاوت بر روی توانایی حل کنندگی فسفات موثر هستند. بنابراین محیط NBRIP به کار برد که در افزایش توانایی حل کنندگی فسفات معدنی از دو محیط PVK و NBRIY، موثرتر بود (۲۱).

بر اساس نتایج حاصل از مطالعات مختلف به نظر می‌رسد که تاثیر نوع محیط کشت با سویه تولید کننده و سایر شرایط مرتبط است و تعیین محیط بهینه جهت تولید آنزیم فیتاز به مطالعه گسترده‌تر در میکروارگانیسم‌های بیشتری نیاز دارد.

نتیجه‌گیری

با وجود مصرف وسیع آنزیم فیتاز در صنایع مختلف (به ویژه صنعت غذایی دام و طیور و آبزیان) و عدم تولید این آنزیم با معیارهای تجاری مناسب در داخل کشور، تلاش برای جداسازی و تهیه فیتاز بومی با منشا میکروبی اهمیت قابل توجهی دارد. باکتری جداسازی شده در این پژوهش، توانایی چشمگیری در حل کنندگی فسفات آلی داشت که باعث کاربردهای گسترده‌تر این باکتری می‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده محیط کشت PVK دارای فیتات سدیم (فسفات آلی) به عنوان تنها منبع فسفات نیز بسیار موثرتر از محیط‌های دیگر بود.

به طور کلی تهیه و استفاده از محیط کشت مناسب به منظور بهینه سازی تولید آنزیم و افزایش میزان حل کنندگی فسفات آلی از موضوعات مهم می‌باشد که در آینده می‌تواند در کاهش هزینه‌های تولید آنزیم و میزان و سرعت رشد میکروارگانیسم‌ها، تاثیرگذار باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که قابلیت محیط‌های کشت متنوع با ترکیبات متفاوت در میکروارگانیسم‌های دیگر مولد آنزیم، بیشتر مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Brinch-Pedersen H, Dahl-Sørensen L, Holm PB. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. Plant Sci. 2002; 7(3): 118-120.
2. Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK. Phytates is cereals and legumes. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 1989; pp: 345-349.
3. Rousseau X, Létourneau-Montminy MP, Même N, Magnin M, Nys Y, Narcy A. Phosphorus utilization in finishing broiler chickens: effects of dietary calcium and microbial phytase. Poult Sci. 2012; 91: 2829-2837.
4. Sreedevi S, Reddy BN. Identification of phytase producing bacteria C43 isolated from cattle shed soil samples of Hydrabad, A.P. Helix. 2013; 1: 238-242.
5. Vohra A, Satyanarayana T. Phytases: microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. Crit Rev Biotech. 2003; 23(1): 29-60.
6. Sreedevi S, Reddy BN. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* C43. Adv. Bio Tech. 2013; 12(8): 1-6.
7. Kies AK, De Jonge LH, Kemme PA, Jongbloed AW. Interaction between protein, phytate and microbial phytase. In vitro studies. J Agric Food Chem. 2006; 54: 1753-1758.

8. Hahn-Didde D, Purdum ES. The effects of an enzyme complex in moderate and low nutrient-dense diets with dried distillers grains with solubles in laying hens. J Appl Poult Res. 2014; 23 (1): 23-33.

9. Singha B, Satyanarayanab T. Phytases from thermophilic molds: Their production, characteristics and multifarious applications. Process Biochem. 2011; 46(7): 1391-1398.

10. Sasirekha B, Bedashree T, Champa KL. Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6. Euro J Exp Bio. 2012; 2(1): 95-104.

11. Mittal A, Singh G, Goyal V, Yadav A, Aneja KR, Gautam SK, Aggarwal NK. Isolation and biochemical characterization of acido-thermophilic extracellular phytase producing bacterial strain for potential application in poultry feed. Jundishapur J Microbiol. 2011; 4(4): 273-282.

12. Meor Hussin AS, Farouk AE, Greiner R, Salleh HM, Ismail AF. Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from Malaysian soil. World J Microbiol Biotechnol. 2007; 23: 1653-1660.

13. Fayazi Hosseini N, Fooladi J, Kiarostami K. Isolation of phytase-producing bacteria from rhizospher of Iranian wheat. Iran J Public Health. 2014; 43(2): 49. [In Persian]

14. Ebrahimian M, Motamedi H, Shafie M. 2013. Isolation and characterization of phytase producing bacteria from environmental sources. MS.c. thesis. Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz. [In Persian]

15. Hosseinkhani B, Emtiazi G, Nahvi I. Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas* sp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production. Afr J Biotechnol. 2009; 8(17): 4229-4232.

16. Parhamfar M, Badoei-Dalfard A, Khaleghi M, Hassanshahian M. Purification and characterization of an acidic, thermophilic phytase from a newly isolated *Geobacillus stearothermophilus* strain DM12. Progress Biological Sci. 2015; 5(1): 61-73.

17. Greiner R, Konietzny U, Jany, KLD. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli.* Arch Biochem Biophys. 1993; 303: 107-113.

18. Aziz G, Nawaz M, Anjum AA, Yaqub T, Ahmed MD, Nazir J, Khan SU, Aziz K. Isolation and characterization of phytase producing bacterial isolates from soil. J Anim Plant Sci. 2015; 25(3): 771-776.

19. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MS, USA, 1994.

20. Parhamfar M, Badoei-Dalfard A, Khaleghi M, Hassanshahian M. Isolation of phosphatase-producing phosphate solubilizing bacteria from Loriya hot spring: Investigation of phosphate solubilizing in the presence of different parameters. Biological J Microorganism. 2014; 3(9): 75-88. [In Persian]

21. Shekhar Nautiyal C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol Lett. 1999; 170(1): 265-270.

22. Sreeramulu G, Srinivasa DS, Nnd K, Joseph R. *Lactobacillus amylovorus* as a phytase

producer in submerged culture. Lett Appl Micb. 1996; 23(6): 385-388.

23. Kumar D, Rajesh S, Balashanmugam P, Jeyanthi Rebecca L, Kalaichelvan PT. Screening, optimization and application of extracellular phytase from *Bacillus megaterium* isolated from poultry waste. J Modern Biotechnol. 2013; 2(2): 46-52.

24. Oh BC, Choi WC, Park S, Kim YO, Oh TK. Biochemical properies and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. Appl Microbiol Biotechnol. 2004; 63: 362-372.

25. Kalsi HK, Singh R, Singh Dhaliwal H, Kumar V. Phytases from *Enterobacter* and *Serratia* species with desirable characteristics for food and feed applications. 3 Biotechnol. 2016; 6(1): 64.

26. Jareonkitmongkol S, Ohya M, Watanabe R, Takagi H, Nakamori S. Partial purification of phytase from a soil isolate bacterium, *Klebsiella oxytoca M3*. J Ferment Bioeng. 1997; 83(4): 393-394.

27. Kim HW, Kim YO, Lee JH, Kim KK, Kim YJ. Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. Biotechnol Lett. 2003; 25: 1231-1234.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 4, January 2017

Original Article

Optimization of culture conditions for the production of phytase enzyme by *Bacillus subtilis* soil isolates

Maryam Parhamfar[1], Hamid Abtahi[2], Milad Parhamfar[3]

[1]MS.c., Molecular and Medicine Research Center, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
[3]MS.c., Faculty of Chemistry, Duissburg-Essen University, Essen, Germany.

Abstract

Background & Objectives: Phytate is the primary storage form of phosphorus in plant seeds. It has an anti-nutritive effect in both human and animals. Phytase is a subgroup of phosphatases which catalyzes the hydrolysis of phytate. Microbial phytases have potential biotechnological application in various fields, such as agriculture, human and animal foods. This study was aimed to investigate the optimal conditions for the production of phytase by *Bacillus subtilis* isolated from the soil.

Materials & Methods: Samples were collected from Arak area, where the soil was contaminated with animal faces. Samples were incubated in PSM medium at 30 ºC for 48 hours. The screening of phytase - producing bacteria on PSM media was performed based on the formation of the clear halo. The most suitable bacterial strain was identified according to its biochemical and morphological characteristics. The level of enzyme production and phosphate- solubilising activity of this strain was assessed in different pH range, and on various media types including PSM, PVK, NBRIP, as well as NBRIY.

Results: In this study, maximum enzyme production by the bacterial isolates has been observed following 36-48h incubation in PSM medium. 12S phytase- producing bacterial strain was identified as *Bacillus subtilis*. Our results showed that the optimum pH for phytase production in PSM medium is pH of 7. Furthermore, investigating different media, phytate- containing PVK was recognised as the most appropriate medium for enzyme production.

Conclusion: *B. Subtilise* isolate can provide an opportunity to introduce new phytase to food as well as environmental industries. Moreover, PVK can be used as an effective medium to produce phytase enzyme and to screen phytase- producing bacterial starins.

Keywords: Phytate, Bacterial phytase, *Bacillus subtilis*, Optimization.

Correspondence to: Maryam Parhamfar

Tel: +98 9183632231

E-mail: mary_parhamfar@yahoo.com

Journal of Microbial World 2017, 9(4): 315-325.