جداسازی و بهینه سازی قارچ های تولید کننده آنزیم فیتاز از خاک های زراعی استان قم

نجمه شعبانی،*[1]احمد علی پوربابایی،[1]سید علی رضایی

[1] گروه میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد قم

مسئول مکاتبات:Ahmadalipb @gmail.com

چکیده

فیتازها گروه ویژه ای از فسفاتازها می باشند که هیدرولیز مرحله به مرحله فسفات رااز مولکول فیتات انجام می دهند،فیتات منبع اصلی ذخیره فسفات در دانه گیاهان می باشد.این دسته ازآنزیم هادربین گیاهان، میکروارگانیسم ها وحیوانات پراکندگی وگستردگی دارند.ازمیان آنها فیتاز های میکروبی مورد توجه می باشند.آنزیم فیتاز به جیره غذایی حیوانات تک معده ای وهمچنین به منظور کاهش آلودگی فسفات در محیط اضافه می شود.جداسازی آنزیم فیتاز از میکروارگانیسم ها به دلیل مقرون به صرفه تر بودن آن نسبت به تهیه این آنزیم به روش سنتتیک و صنعتی از اهداف تحقیق می باشد. ۴۰ نمونه خاک ازمناطق زراعی اطراف استان قم جمع آوری و نمونه های مثبت ازنظر تولیدآنزیم جداسازی شد که جداسازی اولیه در محیط جامد PSM صورت گرفت و سپس سنجش میزان تولید آنزیم در محیط مایع به روش اولسن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. نمونه های تولیدکننده آنزیم بیشتر درمزارع ذرت وجود داشت و آسپرژیلوس نایژر بیشترین میزان تولید آنزیم را دارا بود .

واژه های کلیدی: آنزیم فیتاز ، خاک زراعی، فیتات

مقدمه

نزدیک به یک قرن از تحقیق بر روی فیتاز بعد از کشف آن توسط *suzuki* می گذرد (10). فیتاز ها گروه ویژه ای از فسفاتاز ها یا فسفریک مونواستر هیدرولاز ها به حساب می آیند که قادر به هیدرولیز فیتات می باشند و حداقل یک گروه فسفات را از این ماده آزاد می نمایند (۲). فیتیک اسید یا IP6, myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihydrogen phosphate) یک ترکیب طبیعی است که می تواند روی ساختار و ویژگی مواد غذایی اثر بگذارد . فیتیک اسید یک کربوهیدرات حلقوی ساده است با گروه های فسفات متصل به هر کربن . این دسته از آنزیم ها در طبیعت گسترده

هستند،فعالیت فیتازی در گیاهان ، جانوران و میکروارگانیسم ها گزارش شده است (۳). این دسته از آنزیم های هیدرولیز کننده قادر به رها سازی فسفات به صورت مرحله ای از فیتات بوده که منبع اصلی ذخیره فسفر در دانه گیاهان می باشد و معمولاً در جیره غذایی حیوانات مورد استفاده قرار می گیرند (۴). به خاطر این که حیوانات تک معده ای از قبیل خوک ها ، پرندگان و ماهی ها (همچنین انسان) فاقد آنزیم فیتاز در سیستم گوارشی خود بوده یا فعالیت فیتازی آن ها بسیار پایین می باشد ، قادر به استفاده از فسفر موجود در ساختار فیتات نمی باشند .فیتازها براساس ویژگی های بیوشیمیایی وهم ردیفی توالی اسید آمینه،در۴ گروه اصلی هیستیدین اسیدفسفاتاز،بتا پروپلر فیتاز،سیستئین فسفاتاز واسید فسفاتاز بنفش قابل تقسیم بندی می باشند (7).

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه

در ابتدا ۴۰ نمونه خاک در شرایط استریل از مناطق مختلف زراعی استان قم جمع آوری شد . مناطق زیر کشت گندم ، جو ، ذرت و باغ های میوه از جمله این مناطق بودند. برای انجام این کار ۵ سانتی متر از خاک سطحی که حاوی موادی مثل قسمت های پوسیده ی گیاه ویا فوضولات وکود است کنار زده شد و از منطقه ی عمقی تر که احتمال وجود میکروب در آن بیشتر بود نمونه برداری شد.نمونه های خاک جمع آوری شده تا زمان انجام آزمایش در کیسه های زیپ دار و در یخچال در دمای ۴Ċ نگه داری شد .

شرایط انجام آزمایش

برای شروع آزمایش خاک ها در شریط استریل با الک هایی با قطر منافذ ۲-۳ میلی متر الک شد تا ذرات درشت و سنگ ریزه های آن حذف شدند. ۱ گرم خاک به ۱۰^{cc} آب مقطر و۱^{cc} توئین۸۰ (۰,۰۱٪) اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگه داری شد تا میکروب ها از ذرات خاک راحت تر جدا شوند.

غربالگری قارچ های مولد آنزیم فیتاز

از نمونه ها رقت متوالی تهیه کرده به این صورت که لوله حاوی ۱ گرم خاک و توئین۸۰ رقت شماره ۱ محسوب می شد و از این لوله ۱ میلی لیتر برداشته شده و به لوله بعدی که حاوی ۹ میلی لیتر آب مقطر است افزوده شد. به همین ترتیب این کار تا لوله ۴ انجام گرفت و از رقت چهارم به میزان ۱ میلی لیتر برای تلقیح به محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار (PDA)استفاده شد.پس از رشد قارچ ها در دمای ۳۰ċ به مدت ۳روز کلنی های تک قارچی وارد محیط اسلنت PDA شدند. سپس قارچ ها در محیط کشت (*Phytase Screening Medium*(*PSM* حاوی: Ca-phytate,5.0 g/L; MgSO4, 0.5 g/L;

(NH4)2SO4, 3.0 g/L; CaCl2, 0.1 g/L MnSO4,0.01 g/L; glucose, 10 g/L; FeSO4, 0.1 g/L; agar, 20 g/L. pH= 5.5

تلقیح شدند.حجم تلقیح به این صورت است که از کشت اسلنت ۵ روزه آنها میزان ۲۰ سی سی آب مقطر و ۱ سی سی توئین۸۰(۰,۰۱٪) اضافه کرده و با آنس سوزنی در شرایط استریل در سطح کلنی خراش ایجاد کرده تا اسپور ها وارد فاز مایع شوند.هر میلی لیتر از این مایع حدودا حاوی ۱۰۷عدد اسپور است.پلیتها به مدت ۳روز در دمای ۳۰ċ گرماگذاری شدند.هاله شفاف اطراف کلنی نشان دهنده تولید فیتاز است(۱).

سنجش فسفر معدنی تولید شده :

ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع اتوکلاو شده برای تلقیح قارچ استفاده شد، نمونه ها به محیط تلقیح شد سپس میزان مورد نیاز از کلسیم فیتات با استفاده از فیلتر سرنگی استریل و به محیط افزوده شد. ارلن ها به مدت ۳ روز در انکوباتور شیکردار در دمای۳۰ċ و دور ۱۵۰rpm گرماگذاری شدند. بعد از این مدت تولید آنزیم و تولید فسفر معدنی و میزان آن ها سنجیده شد . اگر در محیط مایع فسفر معدنی وجود داشت نشان دهنده وجود آنزیم فیتاز بود(۱).

روش اولسن جهت سنجش فسفر

دراین روش یک سری معرف ها برای تشخیص وجود فسفر معدنی در محیط استفاده شد.۰/۵ میلی لیتر نمونه محیط مورد آزمایش با معرف ترکیب شده و جذب رنگ زرد ایجاد شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طیف ۳۹۰-۴۲۰ نانومتر خوانده شد.شدت رنگ زرد در محیط هایی با میزان فسفر متفاوت متغیر بود. محلول اولسن متشکل از یک سری معرف ها بود به این صورت که آمونیوم مولیبدات ۱۰ میلی مولار، اسید سولفوریک ۵ نرمال و استون به نسبت ۱:۱:۲ ترکیب شد و در نهایت اسید سیتریک ۱ مولار به میزان ۰/۴ میلی لیتر افزوده شد .محلول معرف به ۰/۵ میلی لیتر نمونه تست که شامل محیط کشت فیلتر شده با کاغذواتمن شماره۱ بود اضافه شد سپس با ورتکس مخلوط شد و ۰/۴ میلی لیتر اسید سیتریک ۱ مولار به ترکیب فوق اضافه شد و با ورتکس ترکیب شده و جذب آن در ۳۹۰-۴۲۰ نانومتر خوانده شد .میزان فسفر با استفاده ار منحنی استاندارد بدست آمد(۱).

رسم منحنی استاندارد :

برای رسم منحنی استاندارد از یک ترکیب فسفر دار مثل مونوسدیم هیدروژن فسفات استفاده می شود.۱۰ میلی لیتر آب مقطر به همراه غلظت های مختلف و مشخص (10ppm,9ppm,8ppm,7ppm,6ppm,5ppm,4ppm,3ppm,

2ppm, 1ppm) مونوسدیم هیدروژن فسفات ترکیب می شود و در هر یک از غلظت ها جذب آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۳۹۰ نانومتر خوانده می شود. با استفاده از این نمودار می توان میزان فسفر تولید شده در نمونه تست را مشخص کرد.یک واحد تولید آنزیم،برابر با مقدار آنزیمی است که یک میلی مول فسفات را در یک دقیقه در دمای ۳۷ċ آزاد می کند.

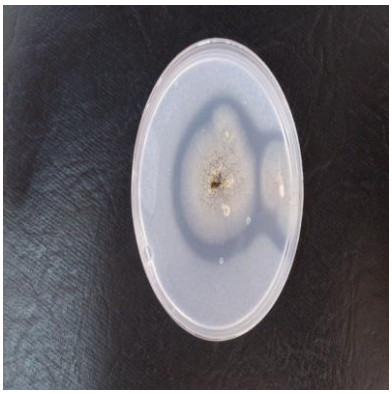
بهینه سازی تولید آنزیم

برای این کار ،منابع آلی و معدنی موجود در محیط کشت از جمله منبع نیتروژن و کربن مختلف مورد آزمایش قرار گرفت.همچنین شرایط فیزیکو شیمیایی محیط از جمله دما،دور شیکر و pH متغیر شدند.منابع کربن مورد آزمایش ،گلوکز، فروکتوز، لاکتوز و ساکاروز است.منابع نیتروژن هم آمونیوم نیترات ،آمونیوم سولفات، اوره و عصاره مخمر است.دماهای ۳۷ċ،۳۰ċ،۲۸ċ،۲۵ċ تست شدند.تولید آنزیم در pHهای ۴،۵،۵ ،۶،۵ ، ۸ هم سنجش شد.دورهای 100rpm,150rpm,200rpmو200rpm سنجش شدند.

نتایج و بحث

آنزیم فیتاز به طور متوالی فسفر را از فیتیک اسید آزاد می کند.۷ جدایه مولد آنزیم که قادر به تولید فیتاز و ایجاد هاله در محیط جامد بودند به روش اولسن در محیط مایع مورد سنجش قرار گرفته شد . بر این اساس جدایه A به عنوان جدایه برتر انتخاب شد که حاکی از توانایی بالای این جدایه در تولید فیتاز در میان سایر جدایه ها بود. جدایه A بیشترین قطر هاله mm 6 را در محیط جامد PSM تولید کرد. (شکل۱)که ناشی از بیشترین میزان تولید آنزیم توسط این جدایه بود. میزان تولید آنزیم و قطر هاله توسط جدایه های مختلف در جدول (۱) آمده است .طبق نتایج حاصل از بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه برتر به عنوان آسپرزیلوس نایژر معرفی شد.باتوجه به بهینه سازی شرایط تولید آنزیم،بهترین دما۳۰ċمعرفی شد وبهترین pHبرای تولید آنزیمpH=6.5 و دور شیکر بهینه 150rpmبررسی شد،علاوه براین مناسب ترین منبع کربن برای تولید آنزیم گلوکز شناخته شد،همچنین بهترین منبع نیتروژن آمونیوم نیترات معرفی شد.

ردیف	نام جدایه	قطر هاله (mm)
۱	A	6
۲	B	2
۳	C	1
۴	D	2.5
۵	E	1.5
۶	F	3
۷	G	2.5



جدول ۱. قطر هاله و میزان تولید آنزیم

شکل۱. تست غربالگری قارچ دارای آنزیم فیتاز

pH	جذب نوری(390nm)	تولید آنزیم (unit/ppm)
۴	۰۹۱	۲,۲۵
۵,۵	۱,۱۲	۳
۶,۵	۱,۱	۳,۵
۸	۰,۹۸	۲,۵

جدول ۲. PHبهینه تولید آنزیم

دور شیکر	جذب نوری(390nm)	تولید آنزیم(unit/ppm)
۱۰۰	۱,۰۱۳	۳,۲۵
۱۵۰	۱,۲	۳,۵
۲۰۰	۰,۹۲	۳
۲۵۰	۰,۹۱	۲,۵

جدول ۳.دور شیکر بهینه تولید آنزیم

دما (ċ)	جذب نوری (۳۹۰nm)	تولید آنزیم (unit/ppm)
۲۵	۰,۷۴	۲
۲۸	۰,۷۸	۲,۲۵
۳۰	۱,۲۷	۳,۵
۳۷	۰,۹	۲,۹

جدول ۴.دمای بهینه

منبع کربن	جذب نوری (390nm)	تولید آنزیم (unit/ppm)
گلوکز	۱,۱	۳,۵
لاکتوز	۰,۹۰	۲,۷۵
فروکتوز	۰,۸۱	۲,۲۵
ساکاروز	۰,۷۷	۲,۲۰

جدول ۵.منبع کربن بهینه

منبع نیتروژن	جذب نوری (390nm)	تولید آنزیم (unit/ppm)
امونیوم سولفات	۱,۰۲	۳
آمونیوم نیترات	۱,۱۲	۳,۴۵
اوره	۱,۰۷	۳,۲۵
عصاره مخمر	۰,۹۷	۲,۸

جدول ۶.منبع نیتروژن بهینه

Sonia Dahiya و همکاران در سال 2009 جداسازی و بهینه سازی فاکتور های رشد قارچ را انجام دادند.جداسازی میکروارگانیسم ها از خاک های حاوی کود ،بقایای گیاهی و ریشه گیاهان غنی از فیتات انجام گرفت.بیش از ۱۱ نوع قارچ جداسازی شد که ۲ سویه از آنها تولید کننده ی فیتاز خارج سلولی بودند.برای بهینه سازی از متدی به نام RSM یا Response surface methodology استفاده کردند (9). Yaho MZ و همکاران در سال ۲۰۱۲ درکشور چین آنزیم فیتاز را که قادر به آزاد سازی فسفات از فیتات می باشد را جدا سازی کردند (11) .یکی از اشکال عمده‌ی فسفات در خوراک دام با منشأء گیاهی به صورت فسفر می‌باشد. آنزیم فیتاز به طور گسترده در تغذیه‌ی حیوانات به منظور بهبود تغذیه و کاهش آلودگی فسفر در فضولات حیوانی استفاده می‌شود(11). Lei GX و همکاران در سال ۲۰۰۱ در کشور آمریکا آنزیم فیتاز را به عنوان مکمل برای بهبود تغذیه و به منظور کاهش آلودگی فسفر از فضولات حیوانات به رژیم غذایی آنها اضافه کردند (5,6).

منابع

1. Elsorra E. Idriss, Oliwia Makarewicz, Abdelazim Farouk, Kristin Rosner, Ralf Greiner, Helmut Bochow, Thomas Richter, Rainer Borriss ,(2002*). Extracellular phytase activity of Bacillus amyloliquefaciens FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect, phytase activity*, , D-10115, 117

2. Greiner R (2004*). Purification and properties of a phytate -degrading enzyme from Panteoa. agglomerans.* Protein Journal 23:567-576

3. Haefner S, Knietsch A, Scholten E, Braun J, Lohscheidt M, Zelder O (2005).

Biotechnological production and applications of phytases. Applied Microbiology and

Biotechnology68:588–597

4**.** Kerovuo, J. et al.,(1998) .*Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from Bacillus subtilis.* Applied and environmental microbiology ,. 64(6): p. 2079-2085.

5. Lei GX, Stahl CH (2001). *Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 474-481

6. Lei GX, Poress JM (2003). *Phytase enzyology, applications, and biotechnology*

Botechnology Letters 25:1787-1794

7. Lei XG, Stahl CH,(2001) . *Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection,* cornell, 474-81

8. Richardson, Alan E, Hadobas, Paul A, Hayes, Julie E, (2012) .*Extracellular secretion of Aspergillus phytase from Arabidopsis roots enables plants to obtain phosphorus from phytate*, ACPFG, 641-649

9.Sonia D , Namita S (2009).*Optimization of growth parameters of phytase producing fungus using RSM* . Department of Bio & Nano Technology

10. Suzuki U, Yoshimura K, Takaishi M (1907*). Ueberein enzym phytase das anhydro-oxymethilen diphosphorusaure spaltet. Bulletin of the College of Agriculture,* Tokyo Imperial University 7:503–512

11. Yao MZ, Zhang YH, Lu WL, Hu MQ, Wang W, Liang AH,(٢٠١١) . *Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications,*