

جداسازی باسیلوس های نمک دوست نسبی تولید کننده آنزیم فیتاز از خاک های زراعی استان قم

محبوبه خزائی^۱، احمد علی پوربابایی*^۱، سید علی رضایی^۱، علی جوادی^۱، ناصر کلهر^۱

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

مسئول مکاتبات: ahmadalipb@gmail.com

چکیده

فیتازها گروه ویژه ای از فسفاتازها می باشند که هیدرولیز مرحله به مرحله فسفات را از مولکول فیتات انجام می دهند، فیتات منبع اصلی ذخیره فسفات در دانه گیاهان می باشد. این دسته از آنزیم ها در بین گیاهان ریزسازواره ها و حیوانات پراکنندگی و گستردگی دارند. ازمیان آنها فیتاز های میکروبی مورد توجه می باشند. آنزیم فیتاز به جیره غذایی حیوانات تک معده ای و همچنین 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 میباشد. ۴۰ نمونه خاک از مناطق زراعی اطراف استان قم جمع آوری و نمونه های مثبت از نظر تولید آنزیم 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 در مزارع ذرت وجود داشت و *B. Pantothenicus* بیشترین میزان تولید آنزیم ۴ Unit/ppm را دارا بود.

واژه های کلیدی: جنس باسیلوس، آنزیم فیتاز، خاک زراعی

مقدمه

نزدیک به یک قرن از تحقیق بر روی فیتاز بعد از کشف آن توسط *suzuki* می گذرد (۱). فیتازها گروه ویژه ای از فسفاتازها یا فسفریک مونواستر هیدرولازها به حساب می آیند که قادر به هیدرولیز فیتات می باشند و حداقل یک گروه فسفات را از این ماده آزاد می نمایند (۲). این دسته از آنزیم ها در طبیعت گسترده هستند و فعالیت فیتازی در گیاهان، جانوران و ریزسازواره ها گزارش شده است (۳). در طول دو دهه گذشته فیتازها در حیطه های تغذیه، حفاظت از محیط زیست و بیوتکنولوژی مورد توجه دانشمندان و حافظان محیط زیست قرار گرفته اند. 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 . بنابراین ، برای تأمین فسفر لازم است که فسفر به شکل معدنی و قابل جذب به غذای آن ها اضافه شود (۵). استفاده از فسفر معدنی که غالباً به اشکال مونوکلسیم فسفات و دی کلسیم فسفات می باشد همراه با مشکلاتی خواهد بود . اولاً علاوه بر هزینه بالای این عنصر و تخلیص آن ، منابع محدود و تجدید ناپذیری دارد ، به طوری که منابع فسفات بر روی کره خاکی با ۵۰ سال آینده تخلیه خواهد شد (۶،۷). فیتازها براساس ویژگی های بیوشیمیایی و هم ردیفی توالی اسید آمینه، در ۴ گروه اصلی هیستیدین اسیدفسفاتاز، بتا پروپیلر فیتاز، سیستئین فسفاتاز و اسید فسفاتاز بنفش قابل تقسیم بندی می باشند (۸). *ELSORA* و همکاران در سال ۲۰۰۲ در کشور آلمان چندین سویه از باسیلوس که که متعلق به *Bacillus subtilis* و *Bacillus Amyloliquefaciense* بودند از خاک های زراعی جدا کردند. *Bacillus Amyloliquefaciense* هایی شناسایی شدند که قادر به کاهش فیتاز خارج سلولی (myo inositolHexakisphosphat) می باشد. بیشترین فعالیت فیتاز خارج سلولی در سویه ی FZB45 تشخیص داده شد. علاوه براین رشد نهال ذرت در حضور فیتاز خالص و عدم وجود آب تصفیه شده در محیط کشت انجام شد. این آزمایشات ژنتیکی و بیوشیمیایی باعث ارائه ی شواهد قوی شد که نشان دهنده ی این بود که فعالیت در فیتاز در *Bacillus Amyloliquefaciense* برای تحریک رشد گیاه که در شرایط کمبود فسفات است مهم می باشد (۹).

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 و جو و ذرت و باغ های میوه از جمله این مناطق بودند .

برای انجام این کار باید ۵ سانتی متر از خاک سطحی که حاوی موادی مثل قسمت های پوسیده ی گیاه و یا فوضولات و کود است کنار زده شد و از منطقه ی عمقی تر که احتمال وجود میکروب در آن بیشتر بود نمونه برداری شد (۱).

نگه داری نمونه ها

نمونه های خاک جمع آوری شده باید تا زمان انجام آزمایش در کیسه های زیپ دار و در یخچال در دمای ۴°C نگه داری شد (۱) .

شرایط انجام آزمایش

برای شروع آزمایش خاک ها در شرایط استریل با الک هایی با قطر منافذ ۲-۳ میلی متر الک شد تا ذرات درشت و سنگ ریزه های آن حذف شود. ۱ گرم خاک به ۱۰^{cc} آب مقطر و ۱^{cc} توئین ۸۰ (۱٪) اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگه داری شد تا میکروب ها از ذرات خاک راحت تر جدا شوند (۱).

تهیه رقت متوالی

از نمونه ها رقت متوالی تهیه شد به این صورت که لوله حاوی ۱ گرم خاک و توئین ۸۰ رقت شماره ۱ محسوب شد از این لوله ۱ میلی لیتر برداشت شده و به لوله بعدی که حاوی ۹ میلی لیتر آب مقطر بود افزوده شد. به همین ترتیب این کار تا لوله ۴ انجام گرفت و رقت چهارم برای تلقیح به محیط کشت استفاده شد (۱).

تلقیح نمونه :

محیط کشت مورد استفاده برای تلقیح نمونه ها محیط مناسب برای رشد باسیلوس بود. که معمولاً نوترین آگار (N.A) است. که پس از ساخت محیط و اتوکلاو کردن آن در دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ دقیقه،

پس از سرد شدن محیط، ۱ میلی لیتر از خاک رقیق شده به صورت پور پلیت به محیط کشت اضافه شد. پس از بسته شدن محیط ها به مدت ۳ روز در انکوباتور در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد.

سپس از کلنی هایی که مشکوک به باسیلوس بودند (کلنی هایی دارای اشکال متنوع، کناره ناصاف، دارای مرکز برآمده، کرم روشن) برداشته رنگ آمیزی گرم انجام شد آن هایی که باسیل گرم مثبت بودند رنگ آمیزی اسپور انجام گرفت تا اطمینان حاصل شد که باسیلوس می باشند (۱).

ساخت محیط کشت جامد اختصاصی

محیط کشت سنتتیک جامد به نام *PSM*

(*Phytase Screening Medium*) است. این محیط حاوی اسید فیتیک بود. کلسیم فیتات موجود در این محیط توسط فیتاز باکتریایی تجزیه شده و ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی باسیلوس می کند.

ترکیب این محیط به این صورت است :

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

جداسازی باسیلوس های مولد فیتاز

کلنی های تک موجود در محیط کشت *N.A* به محیط *PSM* وارد شدند . سپس به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد . اگر باکتری تولید کننده آنزیم بود در این محیط اطراف کلنی آن ها هاله شفاف ظاهر می شد (۲).
باسیلوس هاس تولید کننده فیتاز در محیط کشت اسلنت *N.A* در فریزر نگه داری شد..

کشت در محیط مایع

علاوه بر کشت باسیلوس ها در محیط جامد تلقیح باسیلوس ها در محیط *PSM* مایع هم انجام شد . این کار به منظور جداسازی باسیلوس هایی بود که تولید کننده فیتاز هستند اما در محیط جامد هاله شفاف تولید نمی کنند .

ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰CC محیط کشت مایع اتوکلاو شده برای تلقیح باسیلوس استفاده شد . و بعد نمونه ها را به محیط تلقیح کرده سپس میزان مورد نیاز از کلسیم فیتات با استفاده از فیلتر سرنگی استریل و به محیط افزوده شد چون کلسیم فیتات در معرض اتوکلاو تغییر ماهیت می دهد اتوکلاو نشد . ارلن ها به مدت ۳ روز در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷C و دور 150 rpm گرماگذاری شدند . بعد از این مدت تولید آنزیم و تولید فسفر معدنی و میزان آن ها مورد سنجش قرار گرفت (۲).

میزان تلقیح

میزان تلقیح در هر ارلن به اندازه کدورت ۰/۵ مک فارلند بود .

سنجش فسفر معدنی تولید شده

اگر در محیط مایع فسفر معدنی تولید شده بود نشان دهنده وجود آنزیم فیتاز بود .

سنجش فسفر با روش اولسن انجام گرفت . در این 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 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 (۲).

روش تهیه محلول اولسن

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 (۲) .

روش انجام آزمایش اولسن برای سنجش فسفر

محلول معرف به ۰/۵ میلی لیتر نمونه تست که شامل محیط کشت فیلتر شده با فیلتر سرنگی بود اضافه شد سپس با ورتکس مخلوط و ۰/۴ میلی لیتر اسید سیتریک ۱ مولار به ترکیب فوق اضافه و با ورتکس ترکیب شد و جذب آن در ۳۹۰-۴۲۰ نانومتر خوانده شد (۲) .

سنجش Total protein

برای این کار از کیت های آماده سنجش پروتئین که بر مبنای روش بیوره است استفاده شد .

این روش برای اطمینان از وجود آنزیم که نوعی پروتئین است انجام شد .

ابتدا ۱ میلی لیتر از محیط کشت مورد استفاده را سانتریفوژ کرده با دور ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سپس محلول رویی که حاوی آنزیم است برای سنجش میزان پروتئین موجود در محیط استفاده شد .

نمونه را با استاندارد موجود در کیت مقایسه کرده و با استفاده از فرمول میزان پروتئین موجود در نمونه محاسبه شد (۵).

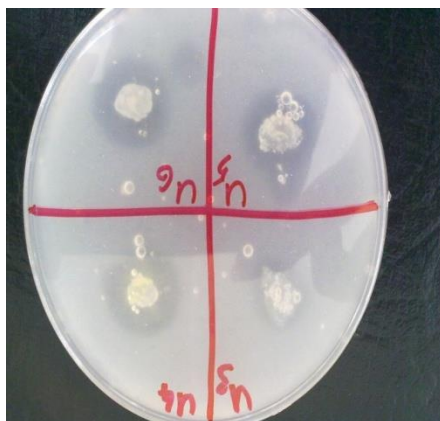
تست های شناسایی جدایه برتر

تست های بیوشیمیایی مربوطه

تست های از جمله : تست ژلاتیناز ، کاتالاز ، رشد در نمک ۶/۵ درصد ، رشد در محیط نشاسته ، تولید اسید از قند گلوکز ، تولید اسید از قند مانیتول ، تولید اسید از ساکارز ، تست سترات ، MR VP ، INM (۳).

نتایج و بحث

آنزیم فیتاز به طور متوالی فسفر را از فیتیک اسید آزاد می کند. فیتاز ویژگی ضد تغذیه ای فیتیک اسید را کاهش می دهد، حیوانات تک معده ای به دلیل کمبود این آنزیم در سیستم گوارشی خود، فیتیک اسیدی که در ترکیب غذایی آنها وجود دارد را دفع می کند. در شرایط نرمال فیزیولوژیک، فیتات مواد معدنی ضروری مثل آهن، منیزیوم، منگنز، مس و مولیبدات را کیلاته می کند. ۵ 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 B به عنوان جدایه برتر انتخاب شد که حاکی از توانایی بالای این جدایه در تولید فیتاز در میان سایر جدایه ها بود. جدایه B بیشترین قطر هاله ۵ mm را در محیط جامد PSM تولید کرد. (شکل ۱) 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 تستهای بیوشیمیایی جدول ۲ این جدایه به باکتری *B. Pantothenicus* شباهت داشت.



| نام نمونه | قطر هاله (میلی متر) | مقدار جذب در ۳۹۰ نانومتر |
|-----------|---------------------|--------------------------|
| A | ۴ | ۰/۶۰۴ |
| B | ۵ | ۱/۱۳۷ |
| C | ۳ | ۰/۴۴۲ |
| D | ۱ | ۰/۱۵۶ |
| E | ۳ | ۰/۳۶۵ |

شکل ۱. تست غربالگری باسیلوس دارای آنزیم فیتاز

جدول ۱. قطر هاله و میزان تولید آنزیم

| نام تست | نتیجه |
|-----------------|---------|
| اسپور | + |
| موقعیت اسپور | انتهایی |
| رشد در نمک ۸٪ | + |
| رشد در نمک ۱۰٪ | + |
| هیدرولیز نشاسته | + |
| گاز از گلوکز | - |
| سیترات | - |
| اندول | - |
| MR | - |
| VP | - |

جدول ۲. تست های بیوشیمیایی تشخیص باسیلوس

Richardson و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی جداسازی باکتری های تولید کننده ی آنزیم فیتاز و بهینه سازی تولید آنزیم کار کردند. آنها ۳۲ نمونه باکتری تولید کننده را جدا کردند که با استفاده از محیط *PSM* توانستند یکی از این سویه ها را به عنوان بهترین تولید کننده معرفی کنند. هاله شفافی که این سویه در محیط کشت ایجاد کرده است قطری برابر با ۳۹ سانتی متر دارد. این افراد سویه ی جدا شده را باسیلوس سوبتیلیس معرفی کردند. این باکتری 378 U/ml فعالیت آنزیمی دارد (۱۰). *Yaho MZ* و همکاران در سال ۲۰۱۲ در کشور چین آنزیم فیتاز را که قادر به آزاد سازی فسفات از فیتات می باشد را جدا سازی کردند. یکی از اشکال عمده ی فسفات در خوراک دام با منشأ گیاهی به صورت فسفر می باشد. آنزیم فیتاز به طور گسترده در تغذیه ی حیوانات به منظور بهبود تغذیه و کاهش آلودگی فسفر در فضولات حیوانی استفاده می شود (۱۲). *Lei XG*

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.

اندازه گیری Total protein

$$TP = \frac{A \text{ Sample}}{A \text{ Standard}} \times 6 \text{ (gr / dl)}$$

$$TP = \frac{0.048}{0.076} \times 6 = 3.7 \text{ gr / dl}$$

میزان پروتئین موجود در محیط حاوی آنزیم برابر با 3.7 gr / dl می باشد

منابع

1. ElSORRA E, Idriss, Oliwia Makarewicz, Abdelazim Farouk, Kristin Rosner, Ralf Greiner, Helmut Bochow, Thomas Richter, Rainer Borriss, Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect, phytase activity, 17 Jan 2002, D-10115, 117
2. Greiner R (2004). Purification and properties of a phytate -degrading enzyme from *Pantoea. 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 Biotechnology 68:588–597

4. Kerovuo, J., et al., *Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from Bacillus subtilis*. Applied and environmental microbiology, 1998. **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 GX, Poress JM (2003). Phytase enzyology, applications, and biotechnology
8. Lei XG, Stahl CH, Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection, cornell, Nov 2001, 474-81
9. Reddy NR, PiersonMD, Sathe SK, Salunkhe DK (1989).Phytases in Cereals and Legumes Boca Raton, FL: CRC Press
10. . Richardson, Alan E, Hadobas, Paul A, Hayes, Julie E, Extracellular secretion of Aspergillus phytase from Arabidopsis roots enables plants to obtain phosphorus from phytate, ACPFG, 2012, 641-649
11. 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
12. Yao MZ, Zhang YH, Lu WL, Hu MQ, Wang W, Liang AH, Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications, 25 Nov 2011