جداسازی باسیلوس‌های نمک دوست نسبی تولیدکننده آنزیم فیتاز از خاک‌های زراعی استان قم

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

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۹)

چکیده

فیتازها گروه ویژه ای ازفسفاتازها می‌باشند که هیدرولیز مرحله به مرحله فسفات را از مولکول فیتات انجام می‌دهند، فیتات منبع اصلی ذخیره فسفات در دانه گیاهان می‌باشد. این دسته ازآنزیم‌ها دربین گیاهان ریزسازواره‌ها وحیوانات پراکندگی وگستردگی دارند. ازمیان آنها فیتازهای میکروبی مورد توجه می‌باشند. آنزیم فیتاز به جیره غذایی حیوانات تک معده ای وهمچنین کاهش آلودگی فسفات در محیط اضافه می‌شود. جداسازی آنزیم فیتاز از میکروارگانیسم‌ها 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 ازمناطق زراعی اطراف استان قم جمع آوری و نمونه‌های 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. نمونه‌های تولیدکننده آنزیم بیشتر درمزارع ذرت وجود داشت و *B. Pantothenticus* بیشترین میزان تولید آنزیم ۴ Unit/ppm را دارا بود.

کلیدواژگان

آنزیم فیتاز، جنس باسیلوس، خاک زراعی.

* نویسنده مسئول، رایانامه: ahmadalipb@gmail.com

مقدمه

نزدیک به یک قرن از تحقیق بر روی فیتاز بعد از کشف آن توسط *suzuki* می‌گذرد (۱). فیتازها گروه ویژه ای از فسفاتازها یا فسفریک مونواستر هیدرولازها به حساب می‌آیند که قادر به هیدرولیز فیتات می‌باشند و حداقل یک گروه فسفات را از این ماده آزاد می‌نمایند (۲). این دسته از آنزیم‌ها در طبیعت گسترده هستند و فعالیت فیتازی در گیاهان، جانوران و ریزسازواره‌ها گزارش شده است (۳). در طول دو دهه گذشته فیتازها در حیطه‌های تغذیه، حفاظت از محیط زیست و بیوتکنولوژی مورد توجه دانشمندان و حافظان محیط زیست قرار گرفته اند. این دسته از آنزیم‌های هیدرولیز کننده قادر به رها سازی فسفات به صورت مرحله ای از فیتات بوده که منبع اصلی ذخیره فسفر در دانه گیاهان می‌باشد و معمولاً در جیره غذایی حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴). به خاطر این که حیوانات تک معده ای از قبیل خوک‌ها، پرندگان و ماهی‌ها (همچنین انسان) فاقد آنزیم فیتاز در سیستم گوارشی خود بوده یا فعالیت فیتازی آن‌ها بسیار پایین می‌باشد، 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 آن‌ها اضافه شود (۵). استفاده از فسفر معدنی که غالباً به اشکال مونوکلسیم فسفات و دی کلسیم فسفات می‌باشد 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 (۷، ۶). فیتازها براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی وهم ردیفی توالی اسید آمینه، در۴ گروه اصلی هیستیدین اسیدفسفاتاز، بتا پروپلر فیتاز، سیستئین فسفاتاز واسید فسفاتاز بنفش قابل تقسیم بندی می‌باشند (۸). ELSORA و همکاران در سال در سال ۲۰۰۲ درکشور آلمان چندین سویه از باسیلوس که که متعلق به Bacillus subtilis و Bacillus Amyloliquefaciense بودند ازخاک‌های زراعی جدا کردند. Bacillus Amyloliquefaciensehایی شناسایی شدند که قادر به کاهش فیتاز خارج سلولی (myo inositoHexakisphosphat) می‌باشد. بیشترین فعالیت فیتاز خارج سلولی در سویه‌ی FZB45 تشخیص داده شد. علاوه براین رشد نهال ذرت درحضور فیتاز خالص و عدم وجود آب تصفیه شده درمحیط کشت انجام شد. این آزمایشات ژنتیکی و بیوشیمیایی باعث ارائه ی شواهد قویی 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 باغ‌های میوه از جمله این مناطق بودند.

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

نگه داری نمونه‌ها

نمونه‌های خاک جمع آوری شده باید تا زمان انجام آزمایش در کیسه‌های زیپ دار و در یخچال در دمای ۴Ċ نگه داری شد(۱).

شرایط انجام آزمایش

برای شروع آزمایش خاک‌ها در شریط استریل با الک‌هایی با قطر منافذ ۲-۳ میلی متر الک شد تا ذرات درشت و سنگ ریزه‌های آن حذف شود. ۱ گرم خاک به ۱۰cc آب مقطر و۱cc توئین۸۰ (۱٪) اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگه داری شد تا میکروب‌ها از ذرات خاک راحت تر جدا شوند (۱).

تهیه رقت متوالی

از نمونه‌ها رقت متوالی تهیه شد به این صورت که لوله حاوی ۱ گرم خاک و توئین۸۰ 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 نمونه‌ها محیط مناسب برای رشد باسیلوس بود. که معمولا نوترین آگار*N. A* ( ) است. که پس از ساخت محیط و اتوکلاو کردن آن در دمای ۱۲۱Ċ 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 محیط‌ها به مدت ۳ روز در انکوباتور در دمای ۳۷ċ گرماگذاری شد.

سپس از کلنی‌هایی که مشکوک به باسیلوس بودند (کلنی‌هایی دارای اشکال متنوع، کناره ناصاف، دارای مرکز برآمده، کرم روشن) برداشته رنگ آمیزی گرم انجام شد آن‌هایی که باسیل گرم مثبت بودند رنگ آمیزی اسپور انجام گرفت تا اطمینان حاصل شد که باسیلوس می‌باشند (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 می‌کند.

ترکیب این محیط به این صورت است:

0. 5 g/L; ،5. 0 g/L; MgSO4 ،Ca-phytate
،0. 1 g/L; MnSO4 ،3. 0 g/L; CaCl2 ،(NH4)2SO4
0. 1 g/L; ،10 g/L; FeSO4 ،0. 01 g/L; glucose
20 g/L. pH= 5. 5 ،agar

جداسازی باسیلوس‌های مولد فیتاز

کلنی‌های 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 آن‌ها هاله شفاف ظاهر می‌شد (۲).

باسیلوس‌های تولید کننده فیتاز در محیط کشت اسلنت *N. A* در فریزر نگه داری شد..

کشت در محیط مایع

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

ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰cc محیط کشت مایع اتوکلاو شده برای تلقیح باسیلوس استفاده شد. **و بعد نمونه‌ها 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 می‌دهد اتوکلاو

نشد. ارلن‌ها به مدت ۳ روز در انکوباتور شیکردار در دمای۳۷ć و دور 150 rpm گرماگذاری شدند. بعد از این مدت تولید آنزیم و تولید فسفر معدنی و میزان آن‌ها 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. دراین روش یک سری معرف‌ها 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 محیط‌هایی با میزان فسفر متفاوت متغیر بود (۲).

روش تهیه محلول اولسن

محلول اولسن متشکل از یک سری معرف‌ها 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 کیت‌های 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 دور۶۰۰۰ به مدت۲۰ 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).

تست‌های شناسایی جدایه برتر

تست‌های بیوشیمیایی مربوطه

تست‌های 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 سیترات، MR VP، INM(۳).

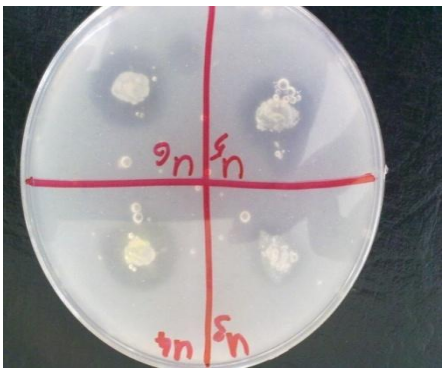
نتایج و بحث

آنزیم فیتاز به طور متوالی فسفر را از فیتیک اسید آزاد می‌کند. فیتاز ویژگی ضد تغذیه ای فیتیک اسید را کاهش می‌دهد، حیوانات تک معده ای به دلیل کمبود این آنزیم در سیستم گوارشی خود، فیتیک اسیدی که در ترکیب غذایی آنها وجود دارد را دفع می‌کند. در شرایط نرمال فیزیولوژیک، فیتات مواد معدنی ضروری مثل آهن، منیزیوم، منگنز، مس و مولیبدات را کیلاته می‌کند. 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 جدایه‌ها بود. جدایه *B* بیشترین قطر هاله *mm* ۵ 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 جدایه‌های مختلف در جدول (۱) آمده است. طبق نتایج تستهای بیوشیمیایی جدول۲ این جدایه به باکتری*B. Pantothenticus* شباهت داشت.

جدول ۱- قطر هاله و میزان تولید آنزیم

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 ۲- تست‌های بیوشیمیایی تشخیص باسیلوس

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

Richardson و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی جداسازی باکتری‌های 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 سویه‌ها 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 $^{U}/_{ml}$ ۳۷۸ فعالیت آنزیمی دارد(۱۰). Yaho MZ و همکاران در سال ۲۰۱۲ درکشور چین آنزیم فیتاز را که قادر به آزاد سازی فسفات از فیتات می‌باشد را جدا سازی کردند. یکی از اشکال عمده‌ی فسفات در خوراک دام با منشأ 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(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

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

$$\mathrm{TP} = \frac{0.048}{0.076} \times 6 = 3.7\,{}^{gr}/_{dl}$$

میزان پروتئین موجود در محیط حاوی آنزیم برابر با $3.7\,{}^{gr}/_{dl}$ می‌باشد

منابع و مآخذ

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 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. *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.