تولید و خالص سازی فیتاز اسیدی و قلیایی از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و باکتری های نوترکیب *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سابتلیس* با هدف دستیابی به یک ترکیب مفید در جیره طیور

مهدی کسرایی[۱*]، ریحانه سریری[۲]، علیرضا حسابی نامقی[۳]، محمدرضا نصیری[۴] و احمد آسوده[۴،۵]

[۱] ایران، رشت، دانشگاه گیلان، پردیس دانشگاهی، گروه زیست شناسی

[۲] ایران، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۳] ایران، مشهد، سازمان آموزش، تحقیقات و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، بخش تحقیقات علوم دامی

[۴] ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، پژوهشکده فناوری زیستی، گروه تحقیقاتی پروتئین های نوترکیب

[۵] ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه شیمی

تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۴

چکیده

بمنظور افزایش قابلیت دسترسی فسفر و سایر مواد معدنی در جیره طیور و تک معده ای ها و کاهش آلودگی محیطی، این پژوهش با هدف تولید آنزیم فیتاز جهت هضم فیتات در مجرای گوارشی طیور انجام گرفت. بدین منظور، فیتاز قارچ *آسپرژیلوس نایجر* روی محیط کشت PSM و فیتازهای *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سابتلیس* با استفاده از فن آوری DNA نوترکیب تولید شدند. آنزیم ها با استفاده از ستون کرماتوگرافی نیکل سفارز(Ni-NTA) و Q- سفارز خالص سازی شده و با استفاده از الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) ، وزن ملکولی آنزیم ها بترتیب برای فیتاز قلیایی *باسیلوس سابتلیس* (PhyC)، فیتاز *اشرشیا کلی* (appA) و فیتاز قارچی *آسپرژیلوس نایجر* (PhyA) حدود۴۲، ۴۴ و ۶۶ کیلو دالتون تخمین زده شد. فعالیت فیتاز برای PhyC، appA و PhyA بترتیب ۵۴/۸۱، ۳۵/۴۹ و ۲۹/۳۳ (U/ml) تعیین شدند. با مقایسه پارامترهای کنتیکی نشان داده شد که آنزیم PhyC می تواند در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد فعال و دارای پایداری حرارتی باشد، درحالیکه آنزیم appA دارای بهترین دامنه فعالیت و راندمان آنزیمی با pH حدود ۴ تا ۴/۵ در لوله گوارشی می باشد. در این خصوص، بیشترین میل ترکیبی آنزیم به سوبسترا با Km برابر ۰/۰۹ میلی مولار برای آنزیم فیتاز اسیدی *اشرشیا کلی*(appA) رخ می دهد. طبق نتایج بدست آمده، ترکیب مناسبی از این آنزیم ها می تواند کارایی قابل قبولی برای هیدرولیز فیتات در مجرای گوارشی پرندگان داشته باشد.

واژه های کلیدی: فیتاز، اسید فیتیک، تولید نوترکیب، مجرای گوارشی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۳۸۴۰۳۷۴۰، پست الکترونیکی: mk.jahad@yahoo.com

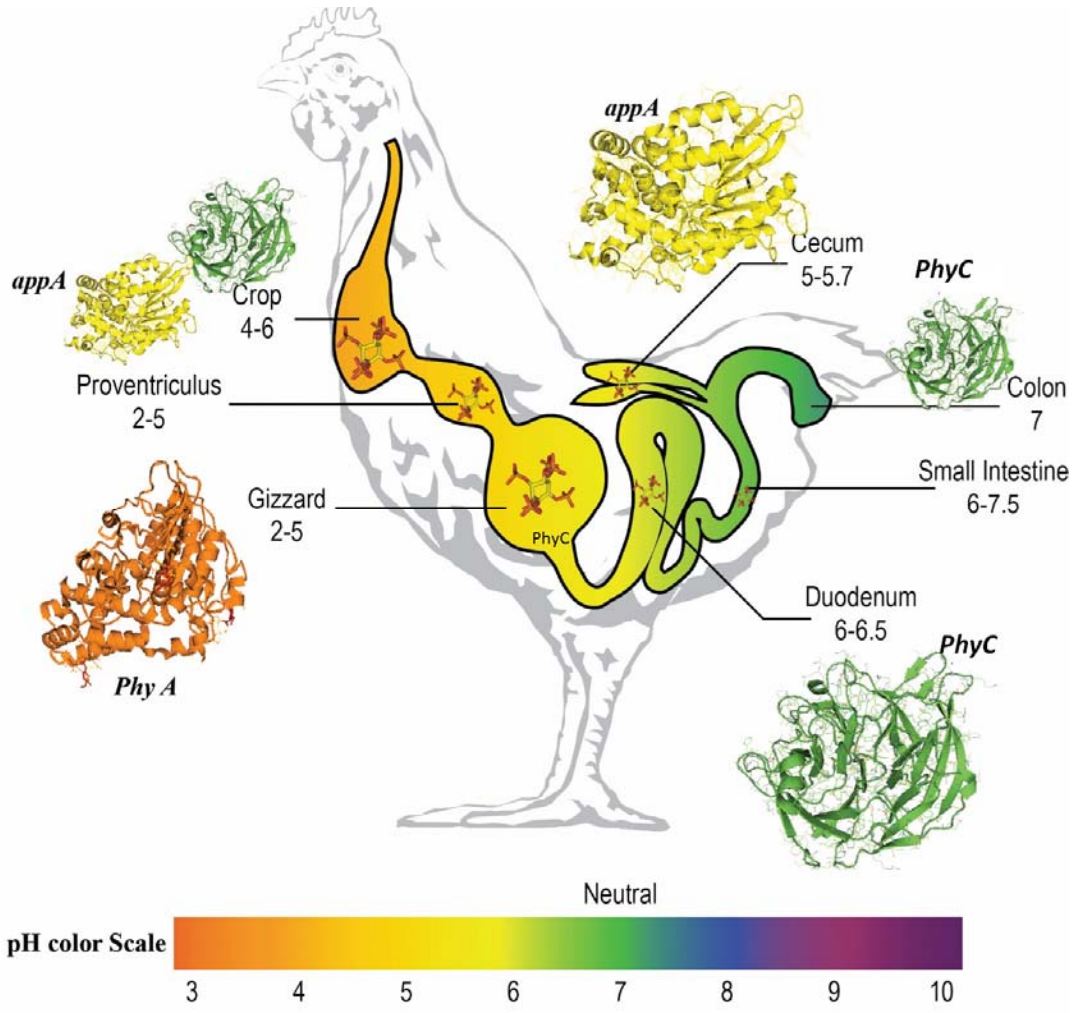
مقدمه

اسید فیتیک بخش اصلی دانه های گیاهی را شامل شده که یک تا سه درصد وزن برخی غلات و دانه های روغنی را در بر می گیرد (۸). سطوح فسفر فیتاته در خوراک دام و طیور متفاوت هستند که بطور معمول بترتیب ۷۲ و ۶۰

درصد کل فسفر دانه ذرت و کنجاله سویا را شامل می شود. تنها ۱/۳ درصد کل فسفر موجود در بیشتر علوفه ها بطورکارآمد توسط دام های اهلی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۹). ساختار غیرمعمول اسید فیتیک موجب شده تا شش گروه فسفر در اسید فیتیک حامل ۱۲ بار منفی باشند. بنابراین، باندهای یگانه، دوگانه و سه گانه می تواند به شکل موثری بین اسید فیتیک و کاتیون ها تشکیل شود و درنتیجه محصول ایجاد شده نامحلول خواهد بود (۲۳). کمپلکس های فیتات و مواد معدنی، که غالبا در pH فیزیولوژیک نامحلول هستند می توانند با جذب مواد معدنی ضروری در روده و کاهش قابلیت جذب مواد معدنی نقش نامطلوبی ایفا نمایند (۱۵). جذب تغذیه ای کاتیون های مهم نظیر کلسیم، منیزیم، روی و آهن و برخی پروتئین ها توسط فیتات می تواند سوء تغذیه را با تاثیر بر میزان هضم و رسوب شوندگی شان تحریک نماید (۲۶). اسید فیتیک و میو اینوزیتول پنتوز فسفات می توانند موجب غیرفعال شدن برخی آنزیم های گوارشی از قبیل آلفا آمیلاز، تریپسین، اسید فسفاتاز و تیروزنازشوند (۱۲). علاوه بر این، فیتات می تواند به نشاسته، پروتئین و لیپیدها متصل شده که کاهش دهنده ظرفیت هضمی و بازدارنده میزان جذب می باشد (۳). فیتازها گروهی از فسفاتازهای ضروری برای شروع تفکیک فسفر از فیتات می باشند (۱۷). درحیوانات تک معده ای نظیر پرندگان، ماهی ها و همچنین انسان بدلیل عدم فعالیت یا پایین بودن سطوح فعالیت آنزیم های تجزیه کننده فیتات، این ترکیب در دستگاه گوارشی متابولیزه نمی گردد (۱۰). درنتیجه، مقادیر مازاد فیتات غیر قابل هضم از طریق مدفوع دفع شده و همراه با فسفر غیرآلی تجزیه شده توسط میکروب های خاک به زمین های کشاورزی راه یافته و باعث آلودگی آب های مجاور و زمین های کشاورزی می گردد (۲۰). طی یک تحقیق نشان داده شد که استفاده از آنزیم فیتاز در جیره پرندگان و خوک موجب کاهش ۵۰ درصدی فسفر مدفوع و افزایش جذب مواد معدنی موجود در جیره می شود (۶).

بهرحال ، pH دستگاه گوارش پرندگان محدوده وسیعی را در بر می گیرد و بطور بالقوه ای روی ثبات و فعالیت آنزیم های برون سلولی و نهایتا میزان آزادسازی مواد مغذی و جذب شان توسط پرندگان تاثیرگذار خواهد بود. از این رو ترکیب آنزیم های فیتاز با عملکرد کلی آن در مجرای گوارشی می تواند جالب توجه باشد (شکل ۱).

فیتاز دارای توزیع گسترده ای در بافت های حیوانی، گیاهان و میکروارگانیسم ها می باشد. طبق تحقیقات، فیتاز میکروبی در مقایسه با سایر فیتازها دارای قابلیت بالاتری جهت حداکثر عملکرد با تکنیک های بیوتکنولوژی می باشد. هرچند، فیتاز از سویه های مختلف باکتریایی، مخمر و قارچ استخراج می گردد، تولید صنعتی فیتاز تنها مبتنی بر آنزیم تولید شده توسط قارچ *آسپرژیلوس* بویژه سویه نایجر (E.C.3.1.3.8) می باشد (۲۹). فیتاز تولید شده توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* از خانواده هیستیدین اسید فسفاتاز است که شامل توالی حفاظت شده آمینواسیدی RHGXRXP در جایگاه فعال آنزیم می باشد. این نوع فیتاز درpH ۴/۵ تا ۵/۶ حداکثر فعالیت خود را دارد. همچنین نشان داده شده است که پتانسیل بالای فیتازهای نسل جدید نظیر فیتاز *اشرشیاکلی* مهندسی شده (Phyzyme XP) می تواند منجر به کاهش زیادی در فسفر معدنی جیره، انرژی و اسیدهای آمینه گردد (۲۲). این تحقیق همچنین در ایران بمنظور تولید فیتاز نوترکیب باکتریایی و تولید فیتاز طبیعی قارچی انجام شده است. غربالگری، کلونینگ و حداکثر بیان ژنی فیتاز باسیلوس سابتلیس در میزبان اشرشیاکلی گزارش شده است (۴ و۵). بمنظور دسترسی به ترکیبی ایده آل از آنزیم های اسیدی و قلیایی برای جیره طیور، تحقیق فعلی به مطالعه تاثیر آنزیمی فیتاز تولید شده در *آسپرژیلوس نایجر*، *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سابتلیس* کمک خواهد نمود. بدین منظور، تولید فیتاز باکتریایی با استفاده از تکنولوژی نوترکیب انجام شد، درحالی که تولید فیتاز قارچی از *آسپرژیلوس نایجر* در مقیاس گسترده ای از محیط طبیعی استخراج گردید.



شکل ۱- میزان pH مجرای گوارشی و آنزیم های فیتاز مورد نیاز در هر بخش

مواد و روشها

محیط کشت، پلاسمید و سویه باکتریایی: محیط های کشت PDA (عصاره سیب زمینی، دکستروز و آگار) و LB (عصاره مخمر، تریپتون و کلرید سدیم) از شرکت آلمانی مرک خریداری شدند. سه نمونه *آسپرژیلوس* از خاک مزرعه ذرت دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و جداسازی شدند. تهیه و آماده سازی پلاسمید نوترکیب شامل ژن های appA و PhyC با توجه به تحقیق و آزمایشات نصیری و آرین نژاد (۵) بدست آمد.

مطالعه مقادیر تولید فیتاز آسپرژیلوس: بدین منظور محیط PSM (شامل: ۱/۵ درصد گلوکز، نیم درصد سولفات آمونیوم ، ۰/۰۵ درصد کلرید پتاسیم، ۰/۰۱ درصد سولفات منیزیوم، ۰/۰۱ کلرید سدیم، ۰/۰۱ درصد کلرید کلسیم، ۰/۰۰۱ درصد سولفات آهن، ۰/۰۰۱ درصد سولفات منگنز، نیم درصد فیتات سدیم و ۱/۵ درصد آگار در pH برابر ۵/۶) تهیه و کلونی قارچ به آن انتقال یافت و نمونه ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد برای ۲ تا ۵ روز انکوبه شدند. سپس با سانتریفوژ (۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm) قارچ ها از محیط کشت حذف شدند. مایع رویی بدست آمده با افزایش تدریجی آمونیوم سولفات در غلظت های ۰-۲۰٪،

۲۰-۳۰٪، ۳۰-۴۰٪، ۴۰-۵۰٪، ۵۰-۶۰٪، ۶۰-۷۰٪، ۷۰-۸۰٪ اشباع رسوب داده شد. در هر مرحله رسوب دهی، سانتریفوژ با g × ۲۴۰۰۰ بمدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. رسوب بدست آمده از هر مرحله در بافر mM ۵۰ استات سدیم با pH برابر ۵/۵ حل شده، سپس در مقابل بافر mM ۱۰ استات سدیم (pH=۵/۵) بمدت ۲۴ ساعت دیالیز شدند. محلول آنزیمی بدست آمده بعد از دیالیز به ستون تعویض آنیونی Q- سفارز متعادل شده با بافر mM ۵۰ استات سدیم (pH=۵/۵) انتقال داده شد. سپس ستون با شش غلظت مختلف NaCl (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۱، ۲، ۳ مولار) در بافر mM ۵۰ استات سدیم (pH=۵/۵) شستشو داده شد. محلول خروجی از ستون به میکروتیوپ های ۲ میلی لیتری انتقال داده شده و فعالیت هر یک در nm ۷۰۰ اندازه گیری شد. نمونه های دارای فعالیت با یکدیگر جمع شدند و بعد از دیالیز مطابق روش توضیح داده شده بمنظور تفکیک با SDS-PAGE در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تمامی مراحل تخلیص در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت.

تولید فیتاز PhyC و appA در اشرشیاکلی (DE3) B121: درتحقیقی که بروی مخمر پیکیا پاستوریس بعنوان ابزار آزمایشگاهی مناسب جهت تولید پروتئین های نوترکیب صورت گرفت. نتیجه ی حاصل نشان داد که این مخمر نسبت به سایر میزبانها، سیستم ترشحی مناسبی (درون سلولی و برون سلولی) با محیط کشت ارزان و همچنین امکان دستکاری ژنتیکی برای دستیابی بمقادیر بالایی از پروتئین های نوترکیب با ساختار درست بشمار می رود(۱). در تحقیق اخیر پلاسمید pET21 شامل PhyC و appA تولید کننده آنزیم نوترکیب برگرفته از تحقیق آرین نژاد و همکاران (۴) می باشد. بطور خلاصه، پلاسمید نوترکیب به *اشرشیاکلی* BL21 (DE3) ترانسفورم گردید و ۰/۵ میلی مولار از محلول ایزوپروپیل بتا دی تیوگالاکتوزید یا IPTG بمنظور القای بیان پروتئین افزوده شد. دو لیتر از سلول های القائی جمع آوری شد و بدنبال آن لیز سلولی و خالص سازی روی ستون مرتبط با $Ni2^{+}$ -NTA انجام گرفت (Bio-Rad, CA, USA). همه مراحل خالص سازی در دمای ۴ درجه سانتی گراد طبق دستورالعمل های فراهم شده توسط Novagen USA انجام شد.

تعیین فعالیت فیتاز : نمونه ها برای اندازه گیری فعالیت فیتاز از طریق انکوباسیون ۱۵۰ میکرولیتر پروتئین تغلیظ شده (mg/ml ۰/۱) با ۶۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (۰/۲ درصد وزن حجمی فیتات سدیم، Sigma, St Louis, MO, USA در ۰/۱ مولار بافر استات سدیم، با pH برابر ۵) بمدت ۳۷ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد مورد ارزیابی قرار گرفتند. ۷۵۰ میکرولیتر از محلول ۵ درصد (وزن حجمی) تری کلرواستیک برای متوقف کردن واکنش افزوده گردید. ۶ میلی لیتر از واکنشگر رنگی مولیبدات آمونیوم (با وزن حجمی ۱/۵ درصد)، محلول اسید سولفوریک ۵/۵ درصد (v/v)، و سولفات فروس ۲/۷ درصد (بر اساس وزن حجمی) به ۱/۵ میلی لیتر از محلول نمونه افزوده گردید. تولید فسفومولیبدن در طول موج ۷۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. نتایج با یک منحنی استاندارد تهیه شده با فسفات معدنی (KH2PO4) مقایسه شد. یک واحد فعالیت آنزیمی بصورت مقدار آنزیم هیدرولیز کننده یک میکرو مول فسفات در هر دقیقه تحت شرایط آزمایشگاهی تعیین گردید.

مطالعات کینتیکی: فعالیت ویژه و ثابت میکائلیس منتن (Km) فیتاز با استفاده از منحنی لینویور- برگ تعیین شد. فسفات های مختلف معدنی نظیر فیتات سدیم، فسفات پی نیتروفنیل، فسفات دهیدروژن پتاسیم، فسفات دهیدروژن سدیم، فسفات آمونیوم و اسید فسفریک در تحقیق فعلی با غلظت ۱۵ میلی مولار استفاده شدند.

آنالیز آماری: داده های آزمایشی بصورت میانگین های خطای معیار تعریف شدند (±SEM). داده ها با استفاده از روش های ANOVA آنالیز آماری شدند. آنالیزهای

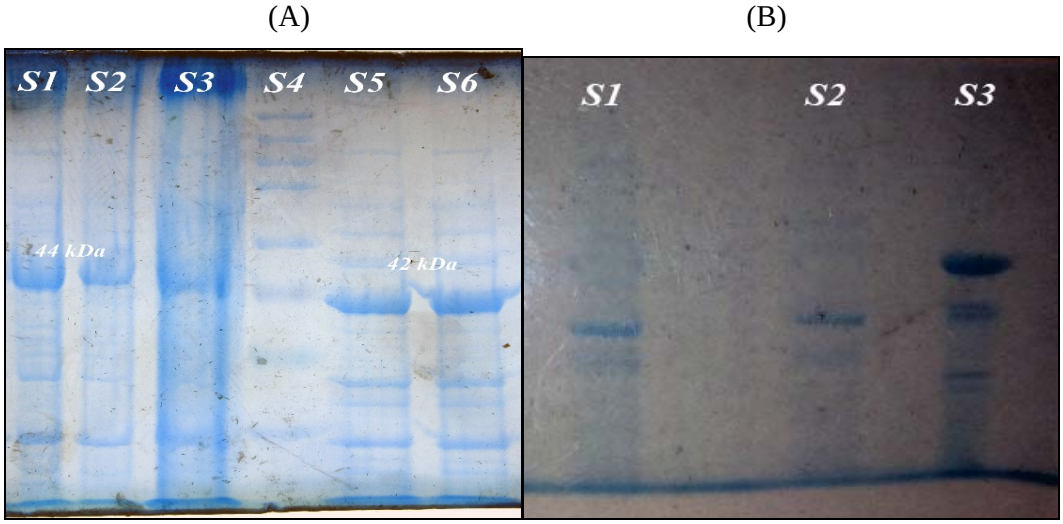
رگرسیون خطی برای ایجاد مدل های رگرسیون جهت برآورد فعالیت فیتاز مبتنی بر مقادیر مختلف دما و pH استفاده شدند، درحالی که آنالیزهای رگرسیون غیرخطی برای برآورد مقدار فسفر آزاد شده از فسفات های مختلف معدنی استفاده شدند. تفاوت ها بلحاظ آماری در سطح معنی داری (P< ۰/۰۵) مدنظر قرار گرفتند.

نتایج و بحث

شناسایی آسپرژیلوس مولد فیتاز: سه جدایه *آسپرژیلوس نایجر* قادر به هیدرولیز فیتات سدیم بعنوان سوبسترا در محیط PSM و تولید نواحی شفاف ایجاد شده شدند (شکل ۲). محققین از فیتین و گلوکز بعنوان منبع منحصر به فرد کربن جهت بررسی تولید فیتاز Pseudomonas استفاده کردند. آنها نشان دادند که هر چه ضخامت ناحیه هاله شفاف تر باشد، فعالیت فیتاز بالاتر خواهد بود (۱۱). بنابراین، بمنظور انتخاب بهترین ژن مولد فیتاز مابین این ۵ ایزوله، نمونه ایجاد کننده بزرگترین ناحیه هاله حول خود بعنوان نمونه اصلی برای ایزوله نمودن ژن فیتاز *آسپرژیلوس نایجر* مورد آزمایش قرار گرفت. بطوریکه این نمونه جهت پس از استخراج DNA و PCR جهت تعیین توالی به شرکت ماکروزن کره ارسال شد.

شکل ۲- تشکیل نواحی هاله حول *آسپرژیلوس نایجر* مولد فیتاز، ناحیه شفاف نشانگر فعالیت فیتازی می باشد.

تولید فیتاز باکتریایی: طبق تحقیقی که جهت تولید آنزیم فیتاز با استفاده از باکتری باسیلوس جدا شده ازرسوبات بستر دریای مازندران صورت گرفت. نشان داده شد که عصاره سبوس برنج (بعنوان سوبسترا) می تواند با سطح تولید فیتاز بالاترجایگزین سدیم فیتات خالص شود (۲). در این پژوهش فیتاز نوترکیب با استفاده از IPTG بعنوان القاگر تولید شد (شکل۳). وزن مولکولی پروتئین فیتاز بترتیب مقادیر ۴۲ و ۴۴ کیلو دالتون برای PhyC و aapA بود. همچنین، درمورد فیتاز PhyC وزن مولکولی ۶۶ کیلو دالتون روی ژل الکتروفورز پلی اکریل امید تشخیص داده شد. تخلیص پروتئین PhyC و aapA توسط ستون Ni^{+} و ستون Q-سفارز (شکل ۳) انجام گردید. غلظت پروتئین حدود ۷/۹۷، ۴/۷۶ و ۳/۵۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای PhyC، appA و PhyA بترتیب تخمین زده شد. محققین زیادی روی تولید فیتاز به نتایج مشابهی دست یافتند (۱۴،۲۰و۲۷).



شکل۳- آنالیز SDS-PAGE مربوط به PhyA، appA و PhyC. (A). آنالیز مربوط به appA (S1 و S2)، PhyC (S5 و S6) و استاندارد پروتئینی (S3) (B): آنالیز خالص سازی جزئی پروتئین PhyC (S1) ، appA (S2) و PhyA (S3). الکتروفورز مطابق روش لاملی انجام گرفت.

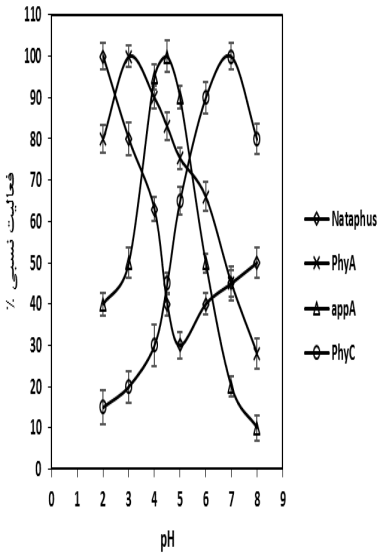
خصوصیات فیتاز : فعالیت فیتاز با استفاده از فیتات سدیم بعنوان سوبسترا اندازه گیری شد. یک واحد فیتاز بصورت مقدار فعالیتی تعیین گردید که یک میکرومول فسفر معدنی را از فیتات سدیم در هر دقیقه در pH بهینه برای هر آنزیم در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد آزاد نماید. خصوصیات آنزیم ها در جدول۱ خلاصه شد. فعالیت فیتازی PhyA، aapA و PhyC بترتیب ۲۹/۳۳، ۳۵/۴۹ و ۵۴/۸۱ واحد آنزیمی بین المللی در میلی لیتر تعیین گردید. سایر پارامترهای سینتیکی آنزیم ها نیز در جدول ۱ آورده شده است. با توجه به شکل۴ (B) دمای بهینه PhyA، PhyC و aapA بترتیب ۵۵، ۶۰ و ۵۰ درجه سانتی گراد بدست آمد. همان طور که مشاهده می شود PhyC نسبت به آنزیم های دیگر در محدوده وسیع تری از دما فعال می باشد طوری که در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد تقریبا ۵۰٪ فعالیت آنزیم PhyC کاهش می یابد در حالیکه دو آنزیم دیگر در این دما غیرفعال می باشند. با توجه به شکل ۴ (A) مشاهده می شود که PhyC در محدوده ۸-۶ pH دارای بیش از ۸۰٪ فعالیت ماکزیمم خود می باشد، appA در محدوده ۵-۴ pH بیش از ۹۰٪ فعالیت ماکزیمم خود را دارند و PhyA در محدوده ۴,۵-۲ pH بیش از ۸۰٪ فعالیت ماکزیمم خود را دارا می باشد. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده می شود که ترکیب فیتازها (PhyA، appA و PhyC) حذف فسفر از فیتات را در همه قسمت های مسیر دستگاه گوارش ممکن می سازد.

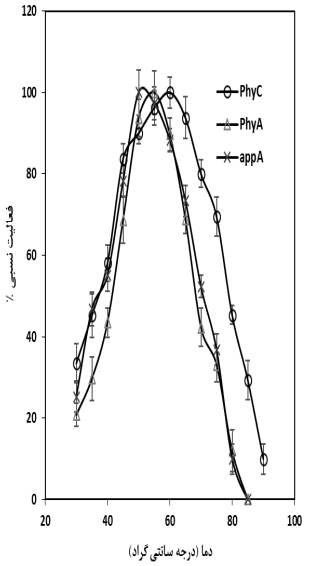
گزارشات گذشته قابلیت میکروارگانیسم های جدا شده از قارچ و باکتری برای تولید فیتاز را نشان دادند (۲۴). اما در مطالعه اخیر از طریق بهینه نمودن شرایط محیطی، قابلیت تولید فیتاز با راندمان بالا میسر شد. مطالعات قبلی نشان داد که آنزیم فیتاز برون سلولی تولید شده از باکتری *باسیلوس سابتلیس* (natto) با pH بهینه ۶/۵ و Km برابر ۰/۵ میلی مولار می تواند حداکثر فعالیت ویژه آنزیمی برابر ۹ واحد بین المللی به ازای هر میلی گرم داشته باشد (۲۵). همچنین، آنزیم فیتاز تولید شده از باکتری های *باسیلوس سابتلیس* با pH بهینه حدود ۷ و Km برابر ۰/۰۵ میلی مولار، فعالیت ویژه آنزیمی ۱۵ واحد بین المللی در هر میلی گرم را نتیجه داد (۱۵)، که این نتایج با نتایج فعلی مطابقت داشت.

جدول ۱- نتایج اندازه گیری فعالیت آنزیم های فیتاز تولیدی و تعیین pH بهینه

ردیف	نوع آنزیم	فعالیت فیتازی (U/ ml)	غلظت پروتیئن (mg / ml)	فعالیت ویژه (U/ mg)	pH بهینه	Km (mM)
۱	فیتازقلیایی *باسیلوس سابتلیس*	۵۴/۸۱	۷/۹۷	۶/۹۳	۶/۵-۷	۰/۰۸
۲	فیتازاسیدی *اشرشیاکلی*	۳۵/۴۹	۴/۷۶	۷/۴۵	۴/۴-۵	۰/۰۹
۳	فیتازقارچی *آسپرژیلوس نایجر*	۲۹/۳۳	۳/۵۵	۸/۲۶	۲/۵-۳	۰/۱

آنزیم فیتاز تولید شده پری پلاسمیک از باکتری *اکولای* با pH بهینه ۴/۵ و Km حدود ۰/۱۳ میلی مولار، فعالیت ویژه آنزیمی ۱۸۰۰ واحد بین المللی در هر میلی گرم را نشان داد (۹). این نتیجه با نتایج حاصل از این پژوهش شباهت دارد، تنها اختلاف در فعالیت ویژه آنزیمی می باشد که دلیل آن هم احتمالا وجود ناخالصی های پروتئینی در نمونه سنجش شده ما می باشد. آنزیم فیتاز تولید شده از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* با pH بهینه ۲/۵ و Km حدود ۰/۶ میلی مولار، حداکثر فعالیت ویژه آنزیمی برابر ۱۰۰ واحد بین المللی در هر میلی گرم را داشت (۲۷). این نتایج تقریبا با نتایج پژوهش اخیر همخوانی داشت.





شکل ۴- (A) اثر pH روی فعالیت آنزیمی، اثر pH با استفاده از فیتات سدیم بعنوان سوبسترا در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. محلول های بافر استفاده شده عبارتند از: ۱۰۰ mM استات سدیم (۶-۲ =pH) و Tris-HCl (۷-۹ =pH). (B) اثر دما روی فعالیت آنزیمی، اثر دما در محدوده (۹۰-۳۷ درجه سانتی گراد) با استفاده از فیتات سدیم بعنوان سوبسترا برای هر آنزیم در pH بهینه اندازه گیری شد.

نتیجه گیری کلی

اخیرا، افزایش تقاضا برای تولید پروتئین، تولیدکنندگان را ترغیب نموده تا از هیدرولیز آنزیمی در تغذیه حیوانات بمنظور بهبود راندمان خوراک مصرفی استفاده نمایند. از بین این روش ها، ترکیب آنزیم ها باعث ایجاد بیشترین ثبات و فعالیت آنزیمی در دستگاه گوارش پرندگان شد. براساس نتایج این پژوهش، فیتاز اسیدی یا *آسپرژیلوس نایجر* (PhyA)، *فیتاز اکولای* (appA) و فیتاز قلیایی

باسیلوس سابتلیس (PhyC) می توانند در کل دستگاه گوارش فعال باشند. بعلاوه یافته های این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیمی و دیگر خصوصیات بیوشیمیایی آنزیمهای تولیدی داخلی طبیعی قارچی (PhyA) و نوترکیب باکتریایی (PhyC , appA) کاملاً متفاوت می باشد. لذا این تفاوت می تواند بعنوان نقطه عطفی برای ترکیب این آنزیم ها در جیره طیور استفاده شود.

تشکر و قدردانی

در پایان از پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد و آقای دکترمحمدرضا نصیری عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد که در تهیه پروتئین های نوترکیب همکاری داشته اند صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱-الیاسی گرچی، ز.، امیری یکتا، ا.، حسنی، س. وصنعتی، م. ح. ۱۳۹۴. مجله پژوهشهای سلولی و ملکولی. پیکاپاستوریس؛ ابزارآزمایشگاهی مناسب برای تولید پروتئین های نوترکیب.۲۸(۲).۱۵۴-۱۷۷.

۲-محسنی، م.، قربانزاده، ف.وسیدعلیپور، ب.۱۳۹۶.مجله پژوهشهای سلولی و ملکولی.تولید فیتاز ازعصاره سبوس برنج به کمک سویه های باسیلوس جدا شده از رسوبات بستر دریای مازندران. ۳۰(۴). ۴۷۶-۴۸۷.

3-Aaron A, Greiner PR, Selinger LB (2009). Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by a protein tyrosine phosphatase-like inositol polyphosphatase from *Megasphaeraelsdenii*. *ApplMicrobiolBiotechnol, 82: 95–103.*

4-Ariannejad H, Nassiri MR, Aslaminejad A, Tahmoorespour M, Valizadeh R, Asoodeh A, Ghovvati S (2012). Cloning, nucleotide characterization and modeling expression of phytase gene PhyC from *Bacillus subtilis*. Journal of Agriculture Biotechnology. (4): 19-33.

5-Ariannejad H, Nassiri MR, Aslaminejad A, Asoodeh A, Dehghani H (2014). Cloning, Characterization and Overexpression of Thermostable myo-inositol hexakisphosphate From *Bacillus subtilis* ATCC12711 in *Escherichia coli*. Journal of agriculture biotechnology.(5): 130-146.

6-Cromwell GL, Coffey RD (1991). P - a key essential nutrient, yet a possible major pollutant - its central role in animal nutrition, p. 133. InT. P. Lyons (ed.), Biotechnology in the feed industry. Proceedings ,Alltech 7th Annual Symposium. Alltech Technical Publications ,Nicholasville, Ky.

7-González M, Brito N, González C (2012). High abundance of Serine/Threonine-rich regions predicted to be hyper-O-glycosylated in the secretory proteins coded by eight fungal genomes. BMC Microbiology. 12:213

8-Graf E, Empson K, Eaton JW (1987). Phytic acid. A natural antioxidant. *J. Biol.Chem., 262: 11647-11651.*

9-Greiner R, Konietzny U, Jany KD (1993). Purification and characterization of two APases from *Escherichia coli*. Archives of Biochemistry and Biophysics 303: 107–113.

10-Han Y, Lei XG (1999). Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillusniger* phytase (phyA) in *Pichiapastoris*. Arch BiochemBiophys 364:83–90.

11-Hosseinkhani B, Emtiazi G, Nahvi I (2009). Analysis of phytase producing bacteria (Pseudomona ssp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production. African Journal of Biotechnology, (17): 4229-4232

12-Howson, SJ, Davis RP (1983). Production of phytase-hydrolysing enzyme by some fungi. Enzyme and Microbial Technology 5, pp.377-382.

13-Jin J, Lee YK, Wickes BL (2004). Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillusfumigatus* and Other *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(9), 4293–4296. doi:10.1128/JCM.42.9.4293-4296.2004

14-Jin J, Lee YK, Wickes BL (2004). Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillusfu*migatus and Other Aspergillus Species. Journal of Clinical Microbiology, 42(9), 4293–4296.

15-Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J (1998). Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning, and Sequencing of a Novel Phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology, 2079–2085.*

16-Kim, T., Mullaney, E. J., Porres, J. M., Roneker, K. R., Crowe, S., Rice, S., Ko, T., Ullah, A. H., Daly, C. B., Welch, R., … Lei, X. G. (2006). Shifting the pH profile of Aspergillus niger PhyA phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness as an animal feed additive. Applied and environmental microbiology, 72(6), 4397-403.

17-Kumar V, Singh G, Sangwan P, Verma AK, Agrawal S (2014). Cloning, Sequencing, and In Silico Analysis of -Propeller Phytase Bacillus licheniformis Strain PB-13. Biotechnology Research International, 1–11.

18-Lehmann M, Lopez-Ulibarri R, Loch C, Viarouge, C, Wyss M, van Loon AP (2000). Exchanging the active site between phytases for altering the functional properties of the enzyme. Protein Sci.9, 1866-1872.

19-Liu QQ, Li QF, Jiang L, Zhang DJ, Wang HM, Gu MH, Yao QH (2006). Transgenic expression of the recombinant phytase in rice (*oryza sativa*). *Rice science, 13 (2): 79-84.*

20-Mullaney EJ, Daly CB, Ullah AH (2000). Advances in phytase research. *Adv. Appl. Microbiol., 47: 157-199.*

21-Nassiri MR, Ariannejad H (2015). Comparative Analysis of Peripheral Alkaline Phytase Protein Structures Expressed in *E. coli.* Reports of Biochemistry and Molecular Biology Journal. (Accepted).

22-Pal Roy, M., Mazumdar, D., Dutta, S., Saha, S. P., & Ghosh, S. (2016). Cloning and Expression of Phytase appA Gene from Shigella sp. CD2 in Pichia pastoris and Comparison of Properties with Recombinant Enzyme Expressed in E. coli. PloS one, 11(1), e0145745. doi:10.1371/journal.pone.0145745

23-Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK (1989). Phytates in cereals and legumes. Boca Raton, CRC Press, Inc.

24-Selvamohan T, Ramadas V, Rejibeula M. Optimization of Phytase Production by *Pseudomonas sp.* Isolated from Poultry Faces. Int Journal Modern Engineering Research 2012; 2(3): 1326-1330.

25-Shimizu M (1992). Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto).N-77. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 56: 1266・1269

26-Van Hartingsveldt W, van Zeijl CMJ, Harteveld GM, Gouka RJ, Suukerbuyk MEG, Luiten R GM, van Paridon PA, Selten GCM, Veenstra AE, van Gorcom RFM, van den Hondel AMJJ (1993). Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillusniger*. Gene 127:87-94.

27-Vats P, Banerjee UC (2005). Biochemical characterization of exteracellular phytase (myoinositol hexakisphosphate phosphohydrolase). from a hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van Teighem. Journal Indian Microbiology and Biotechnology 32: 141-147.

28-Wang, Y., Ye, X., Ding, G., & Xu, F. (2013). Overexpression of phyA and appA genes improves soil organic phosphorus utilisation and seed phytase activity in Brassica napus. PloS one, 8(4), e60801.

29-Xuan NT, Hang MT, Thanh VN (2009). Cloning and over Expression of an *Aspergillusniger* XP Phytase Gene (phyA) in *Pichiapastoris*. *Engineering and Technology, 56: 750-753.*

Production and Purification of Acid and Alkaline Phytase from Native *Aspergillus Niger Fungi*, Recombinant *Escherichia Coli* and *Bacillus Subtilis Bacterias* Aiming a Beneficial Combination for Poultry Diet

Kasraei M.[1], Sariri R.[2], Hesabi Namaghi A.[3], Nasiri M.[4] and Asoodeh A.[4,5]

[1] Dept. of Biology, University of Campus2, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran.

[3] Dept. of Animal Science Research, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Khorasan Razavi Province, Agricultural Research , Education and Extention Organization, Mashhad, I.R. of Iran.

[4] Recombinant Proteins Research Group, The Research Institute Of Biotechnology,Ferdowsi University Of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

[5] Dept. of Chemistry, Faculty of Science,Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

Abstract

In order to increase the availability of phosphorus and other minerals in the diet of birds and monogastrics and reduce environmental pollution this reasearch was aimed to produce phytase. This was designed to produce a suitable enzyme for digestion of phytate in the gastrointestinal tract of birds. For this propose, *Aspergillus niger* phytase was produced on PSM media and *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* phytases with using recombinant DNA technology. The enzymes were purified by Q-Sepharose and Ni-NTA chromatography column and, using SDS-PAGE, their molecular weights were estimated 42 kDa, 44 kDa and 66 kDa for *PhyC* (Alkaline Phytase), *appA* (Escherichia coli Phytase) and *PhyA* (Acid Phytase) *respectively*. The phytase activity for *PhyC*, *appA* and *PhyA* were determined 54.81, 35.49 and 29.33 U/ml, respectively. Comapring their kinetics parameters, it was shown that *PhyC* enzyme can be active in 90 ^{0}C and had thermostability while *appA* enzyme had best rang of activity in pH of 4-4.5 and efficient enzyme in gastrointestinal tract and *appA* had maximum affinity to substrate by km 0.09±0.03. According to the results, a suitable combination of these enzymes could be efficient enough to hydrolyse phytate in gastrointestinal tract of birds.

Key words: Phytase, Phytic acid, Recombinant Production, gastrointestinal tract