تولید فیتاز از عصاره سبوس برنج به کمک سویه‌های *باسیلوس* جداشده از رسوبات بستر دریای مازندران

مجتبی محسنی[1*]، فاطمه قربانزاده[1] و باقر سیدعلیپور[2]

[1] **بابلسر، دانشگاه مازندران، گروه میکروبیولوژی**

[2] **بابلسر، دانشگاه مازندران، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی**

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۴

چکیده

فیتیک اسید فرم اصلی ذخیره‌ای فسفر است که برای حیوانات تک معده نظیر ماکیان و ماهی و حتی انسان قابل هضم نیست. آنزیم فیتاز با تجزیه فیتیک اسید موجود در محصولات گیاهی، دسترسی فسفر را افزایش می‌دهد. هدف از این تحقیق بررسی تولید فیتاز توسط سویه‌های *باسیلوس* جداشده از رسوبات بستر دریای مازندران با استفاده از عصاره سبوس برنج به عنوان منبع غنی و ارزان قیمت فیتات بود. با تیمار حرارتی نمونه‌های رسوب بستر دریا، جدایه‌های *باسیلوس* تولید کننده فیتاز توسط محیط کشت PSM آگار غربالگری شدند. همچنین پس از سنجش کمی آنزیم فیتاز به روش آمونیوم مولیبدات، تولید فیتاز جدایه‌ها در محیط کشت مایع MGE حاوی عصاره سبوس برنج بررسی شد. نتایج غربالگری ۴۰ جدایه نشان داد که چهار جدایه MGH2، MGH3، MGH4 و MGH7 با هاله شفاف در اطراف کلنی، بیشترین توانایی تولید فیتاز را داشتند. بررسی مشخصات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی نشان داد که تمام جدایه‌های منتخب متعلق به جنس *باسیلوس* بودند. حفظ هاله شفاف پس از رنگ آمیزی با آمونیوم مولیبدات، نشان داد که تمام جدایه‌های منتخب توانایی تولید فیتاز را داشتند. همچنین نتایج سنجش کمی تولید فیتاز توسط جدایه‌ها نشان داد که بیشترین و کمترین مقدار تولید فیتاز به ترتیب مربوط به جدایه MGH4 با ۱۰,۵۸ $U\ ml^{-1}$ و جدایه MGH3 با ۹,۳۴ $U\ ml^{-1}$ بود. نتایج تولید فیتاز با استفاده از عصاره سبوس برنج در محیط رشد مایع MGE، افزایش۵۵ تا ۶۰ درصدی نسبت به محیط رشد مایع PSM را نشان داد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره سبوس برنج می‌تواند به عنوان سوبسترای مناسب و مقرون به صرفه با سطح تولید فیتاز بالا در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: فیتاز، عصاره سبوس برنج، *باسیلوس*، دریای مازندران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۹۷ ، پست الکترونیکی: M.Mohseni@umz.ac.ir

مقدمه

فیتاز (میواینوزیتول هگزاکیس فسفات فسفوهیدرولاز) یک طبقه خاص از آنزیم‌های فسفاتاز است که قادر به تجزیه فیتیک اسید به منوفسفات‌های معدنی و مشتقات میو-اینوزیتول با فسفات کمتر می‌باشد (۳۱). فیتیک اسید عمده‌ترین فرم ذخیره‌ای فسفر در غلات، حبوبات و دانه‌های روغنی محسوب می‌شود. این ماده در اجزاء مختلف برنج توزیع شده است و در جوانه و اندوسپرم به ترتیب با مقادیر ۷,۶ و ۱,۲ گرم در هر ۱۰۰ گرم متمرکز شده است. سبوس برنج شامل پوسته، آلورون (Aleurone) و جوانه، دارای غلظت بالایی از فیتیک اسید بسته به شرایط کشت در محدوده ۶,۰۹-۵,۹۴ گرم در هر ۱۰۰ گرم می‌باشد (۴). اما فیتیک اسید به عنوان فرم غنی از فسفات برای حیوانات تک معده مثل ماکیان، خوک، ماهی و حتی انسان غیر قابل دسترس می‌باشد و این حیوانات به دلیل

نداشتن سطح مناسبی از آنزیم‌های تجزیه کننده فیتیک اسید در دستگاه گوارش نمی‌توانند از فسفر موجود در فیتیک اسید استفاده کنند (۱۹). فیتیک اسید در ساختار خود دارای بار منفی زیادی بوده که به طور موثر به مواد معدنی نظیر کلسیم، روی، آهن، منیزیم و مس متصل می‌شود و جذب آنها را در روده حیوانات کاهش می‌دهد (۱۵، ۲۳). از دیگر اثرات ضد تغذیه‌ای فیتیک اسید، اتصال به پروتئین‌ها می‌باشد و بر حلالیت پروتئین اثر منفی می‌گذارد (۲۶). فیتیک اسید علاوه بر اتصال به مواد معدنی و پروتئین‌ها، موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌گردد و هضم ناکارآمد را به دنبال خواهد داشت (۱۵). عدم تجزیه فیتیک اسید چرخه فسفر را دچار اختلال می‌کند و با آزاد شدن فیتیک اسید اضافه به محیط زیست و ورود به آب با پدیده یوتریفیکاسیون و به دنبال آن با مشکل کمبود اکسیژن و مرگ موجودات آبزی مواجه می‌شویم (۳۲).

فیتاز در صنایع غذایی به عنوان مکمل غذایی دام و طیور و تا حدی ماهی استفاده می‌شود (۲۱). همچنین فیتاز در صنایع داروسازی (۲۰)، صنعت کاغذسازی (۲۲)، اصلاح خاک و افزایش دسترسی فسفر (۱۱) و تولید پراکسیدازهای نیمه سنتزی (۳۳) کاربرد دارد.

فیتاز به طور گسترده در گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌های مختلف توزیع شده است (۱۲). اتحادیه بین المللی بیوشیمی بر اساس موقعیت پیوند استری حلقه اینوزیتول که در آن دفسفریلاسیون آغاز می‌شود، دو نوع فیتاز تحت عنوان ۳-فیتاز (EC.3.1.3.8) و ۶-فیتاز (EC3.1.3.26) را معرفی کرده است (۱۴). به طور کلی آنزیم فیتازهای میکروبی در مقایسه با فیتازهای با منشاء گیاهی در محدوده بیشتری از pH و دماهای بالاتر فعالیت دارند. pH و دمای بهینه فیتازهای گیاهی ۵- ۴/۵ و ۵۵-۳۸ درجه سانتی‌گراد می باشد (۲۹). فیتازهای میکروبی به طور فعال توسط بسیاری از قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید می‌شود. بیشترین تولیدکنندگان فیتاز قارچی متعلق به *آسپرژیلوس نایجر* است (۱۰). از منابع باکتریایی تولیدکننده فیتاز، گونه‌های *آئروباکتر*، *سودوموناس*، *باسیلوس*، *کلبسیلا*، *شیگلا*، *انتروباکتر* و *اشریشیا* گزارش شده است (۲۷). گونه‌های *باسیلوس* از تولیدکنندگان بالقوه انواع آنزیم‌ها می‌باشند که دارای ویژگی‌هایی چون مقاومت به حرارت، فعالیت آنزیمی در طیف گسترده‌ای از pH، مقاومت به پروتئولیز در برابر آنزیم‌های گوارشی و تولید فیتاز خارج سلولی می‌باشند. هدف از پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی سویه‌های *باسیلوس* تولید کننده فیتاز از رسوبات بستر دریای مازندران و همچنین توانایی آنها در تولید فیتاز از عصاره سبوس برنج به عنوان منبع غنی و ارزان قیمت فیتیک اسید بود.

مواد و روشها

نمونه برداری و جداسازی باکتری‌ها: برای جداسازی باکتری‌ها، نمونه‌هایی از رسوبات بستر دهانه رودخانه‌های خط ساحلی دریای مازندران جمع‌آوری شد و در ظروف نمونه گیری استریل به آزمایشگاه منتقل شد. به منظور جداسازی سویه‌های *باسیلوس* و حذف باکتری‌های فاقد اندوسپور، نمونه‌ها در حمام آب گرم ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تیمار حرارتی شدند (۳، ۲۵). پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها در سرم فیزیولوژی (۰,۹ درصد سدیم کلرید)، از رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-5} در محیط کشت مایع LB براث غنی شده با ۹,۲ گرم بر لیتر سدیم فیتات، تلقیح شد و در گرمخانه شیکردار ۳۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۸۰ دور در دقیقه، به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. سپس کشت‌های غنی شده به سطح محیط کشت نوترین آگار (مرک، آلمان) تلقیح شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد (۸، ۱۷).

غربالگری و شناسایی جدایه‌های تولید کننده فیتاز: پس از تهیه کشت خالص، کلنی‌های مجزا در محیط کشت Phytase screening agar (PSM آگار) (شامل ۱۰ گرم گلوکز، ۴ گرم سدیم فیتات، ۲ گرم کلسیم کلرید ۲ آبه، ۵

گرم آمونیوم نیترات، ۰٫۵ گرم پتاسیم کلرید، ۰٫۵ گرم منیزیم سولفات ۷ آبه، ۰٫۱ گرم منگنز سولفات، ۰٫۱ گرم فرو سولفات ۷ آبه، ۱۵ گرم آگار در لیتر آب دیونیزه) به صورت نقطه‌ای کشت داده شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. هاله شفاف ایجاد شده اطراف کلنی باکتری نشان‌دهنده تولید فیتاز توسط باکتری می‌باشد. جدایه‌ها با هاله شفاف، برای شناسایی و بررسی توانایی تولید فیتاز انتخاب شدند.

مشخصات مورفولوژی و فیزیولوژی جدایه‌های تولید کننده فیتاز بررسی شد. به این منظور مرفولوژی سلول‌ها، واکنش گرم و ایجاد اندوسپور جدایه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین مشخصات فیزیولوژی جدایه‌ها به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی شامل فعالیت کاتالازی و اکسیدازی، مصرف گلوکز از مسیر تخمیر بوتاندیول (وژزپروسکوئر)، توانایی مصرف سیترات، هیدرولیز نشاسته و ژلاتین، تولید سولفید هیدروژن، تولید اندول، حرکت باکتری و تحمل ۶٫۵ درصد نمک بر اساس جداول شناسایی باکتری‌ها در کتاب سیستماتیک باکتری شناسی بِرگی بررسی شد. تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد. جدایه‌های باکتریایی تا انجام مراحل بعدی آزمایش، در گلیسرول ۱۵ درصد و دمای ۸۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تشخیص کیفی جدایه‌های تولید کننده فیتاز: با تجزیه سدیم فیتات توسط فیتاز تولید شده باکتری در محیط کشت، هاله شفاف اطراف کلنی مشاهده می‌شود. ممکن است این هاله شفاف، ناشی از تولید اسید باشد لذا برای تایید تولید فیتاز توسط باکتری‌های تولید کننده فیتاز، از روش رنگ‌آمیزی افتراقی استفاده شد. این روش شامل غوطه‌ور کردن سطح پلیت محیط رشد جدایه‌های منتخب با کلرید کبالت دو درصد به مدت ۵ دقیقه است. سپس محلول کلرید کبالت از سطح پلیت حذف شد و معرف رنگ‌آمیزی تازه شامل حجم مساوی از محلول ۶٫۲۵ درصدی آمونیوم مولیبدات (w/v) و محلول ۰٫۴۲ درصدی آمونیوم وانادات (w/v) افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. حفظ هاله شفاف در اطراف کلنی، نشانه تجزیه سدیم فیتات توسط فیتاز باکتریایی است (۲).

رشد جدایه‌ها و سنجش کمی تولید آنزیم فیتاز: جدایه‌های تولید کننده فیتاز در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت PSM براث تلقیح شدند و در گرمخانه شیکردار ۳۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۸۰ دور در دقیقه، به مدت ۹۶ ساعت گرماگذاری شدند. همچنین برای بررسی رشد جدایه‌ها، جذب نوری محیط‌های رشد به مدت ۹۶ ساعت، در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (۱۶).

همزمان با بررسی رشد جدایه‌ها، تولید فیتاز جدایه‌ها نیز در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت سنجیده شد. برای استخراج آنزیم خام فیتاز، محیط رشد جدایه‌ها در g ۱۰۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی حاوی آنزیم خارج سلولی فیتاز، به لوله آزمایش تمیز منتقل شد (۱۸). سنجش کمی تولید فیتاز با روش رنگ‌سنجی آمونیوم مولیبدات ارائه شده توسط Engelen و همکاران انجام شد (۹). این روش بر مبنای تخمین میزان فسفات تولید شده با فعالیت آنزیم فیتاز است. مخلوط واکنش شامل ۲ میلی لیتر نمونه آنزیم خام استخراج شده از محیط رشد جدایه‌ها و ۴ میلی لیتر از محلول سوبسترای سدیم فیتات ۰٫۴ درصد است. واکنش در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۵ دقیقه انجام شد. سپس با افزودن ۴ میلی لیتر معرف رنگی آمونیوم مولیبدات تازه، واکنش متوقف شد. این معرف با مخلوط کردن ۲۵ میلی لیتر محلول آمونیوم مولیبدات و ۲۵ میلی لیتر محلول آمونیوم وانادات به همراه افزودن کم کم ۱۶٫۵ میلی لیتر نیتریک اسید ۶۵ درصد تهیه شد. سپس معرف تا دمای اتاق سرد شد و حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. محلول آمونیوم مولیبدات با حل کردن ۱۰ گرم آمونیوم هپتا مولیبدات ۴ آبه در ۹۰ میلی لیتر آب مقطر

همراه با حرارت و افزودن یک میلی لیتر آمونیاک ۲۵ درصد و سپس رساندن حجم محلول به ۱۰۰ میلی لیتر تهیه شد. همچنین برای تهیه محلول آمونیوم وانادات، مقدار ۱۰ گرم آمونیوم هپتا مولیبدات ۴ آبه در ۹۰ میلی لیتر آب مقطر همراه با حرارت حل شد. سپس حجم یک میلی لیتر آمونیاک ۲۵ درصد اضافه شد و حجم نهایی محلول به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. رنگی که از فعالیت فیتاز به دست می‌آید با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد حاوی ۲ میلی لیتر سوپرناتانت محیط کشت استریل پس از سانتریفوژ کردن در g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، 4 میلی لیتر محلول سوبسترا و ۴ میلی لیتر معرف رنگی آمونیوم مولیبدات است. یک واحد آنزیمی معادل مقدار آنزیمی است که یک میکرومول از فسفات غیرآلی را در یک دقیقه آزاد می‌کند. واحد فیتاز تولید شده با استفاده از معادله منحنی استاندارد هیدروژن منو پتاسیم فسفات محاسبه شد (۹). برای محاسبه فعالیت آنزیم فیتاز، مقدار فسفات آزاد شده برحسب میکرومول در زمان واکنش (به مدت ۶۵ دقیقه) محاسبه شد. سپس مقدار فسفات تولید شده به کمک رابطه زیر برای یک دقیقه محاسبه و مطابق تعریف واحد آنزیمی به صورت مقدار فعالیت آنزیمی (بر حسب $U\ ml^{-1}$) گزارش شد (۳۰).

فعالیت آنزیمی = $\mu mol\ of\ product \times min^{-1}$

بررسی تولید فیتاز جدایه‌ها در محیط کشت حاوی عصاره سبوس برنج: به منظور بررسی تولید فیتاز از عصاره سبوس برنج به عنوان منبع فیتیک اسید، از محیط کشت MGE براث استفاده شد. این محیط کشت بر پایه PSM براث تهیه شد و عصاره سبوس برنج جایگزین سدیم فیتات شد. برای تهیه عصاره سبوس برنج ۱۰ گرم سبوس برنج با ۱۰۰ میلی لیتر آب مخلوط شد و پس از ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، صاف شد (۲۸). جدایه‌ها در محیط کشت MGE براث تلقیح شد و در گرمخانه شیکردار ۳۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۸۰ دور در دقیقه، به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. سپس آنزیم خام فیتاز استخراج شد و میزان فیتاز تولید شده محاسبه شد. تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد.

نتایج

جداسازی سویه‌های باسیلوس: به منظور جداسازی باکتری‌های اسپوردار، نمونه‌های جمع‌آوری شده از رسوبات بستر دریای مازندران، تیمار حرارتی شدند و رقت‌های تهیه شده در محیط کشت مایع LB غنی شده با سدیم فیتات تلقیح شد. پس از رشد باکتری‌ها در محیط کشت نوترین آگار، تعداد ۴۰ جدایه با ظاهر کلنی متفاوت جداسازی شد.

غربالگری و شناسایی جدایه‌های تولید کننده فیتاز: غربالگری جدایه‌های *باسیلوس* تولید کننده فیتاز از میان باسیل‌های جدا شده، با کشت کلنی‌های مجزا به صورت نقطه‌ای در محیط کشت PSM آگار انجام شد. جدایه‌های تولیدکننده فیتاز با تجزیه آنزیمی سدیم فیتات، هاله شفاف در اطراف کلنی ایجاد می‌کنند. نتایج غربالگری ۴۰ جدایه نشان داد که تعداد ۷ جدایه توانایی تولید فیتاز را داشتند. از این میان تعداد چهار جدایه به اسامی MGH2، MGH3، MGH4 و MGH7 با بیشترین قطر هاله شفاف برای ادامه مطالعات انتخاب شدند (شکل ۱).

نتایج مشخصات مورفولوژیکی جدایه‌های منتخب تولید کننده فیتاز نشان داد همه جدایه‌ها میله‌ای شکل، گرم مثبت و واجد اندوسپور بودند. نتایج بررسی صفات فیزیولوژیکی جدایه‌ها به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول ۱ خلاصه شده است. این نتایج نشان داد که همه جدایه‌های منتخب توانایی تولید کاتالاز، هیدرولیز نشاسته و ژلاتین و همچنین توانایی حرکت داشتند.

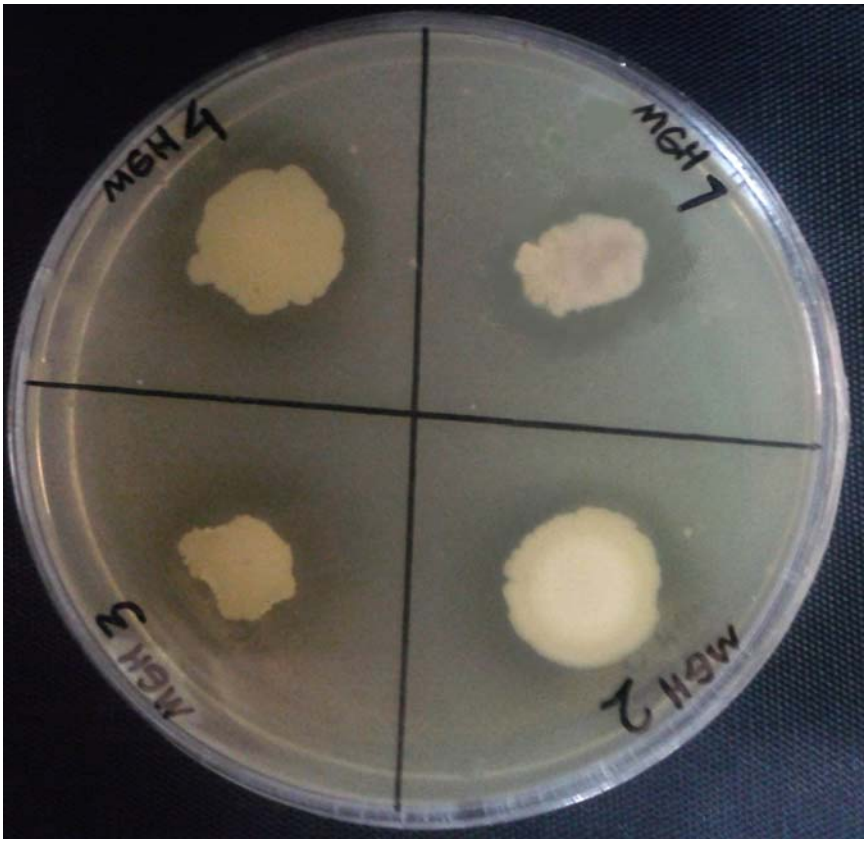
شکل ۱- هاله شفاف نشان دهنده تولید فیتاز در اطراف کلنی جدایه‌های منتخب در محیط کشت PSM آگار پس از سه روز گرمخانه گذاری در ۳۵ درجه سانتی‌گراد.

جدایه‌های MGH2 و MGH4 قادر به مصرف سیترات به عنوان تنها منبع کربن بودند. همه جدایه‌ها به جز جدایه MGH4 قادر به رشد در محیط کشت حاوی ۶٫۵ درصد سدیم کلرید بودند. اما هیچکدام از جدایه‌ها قادر به تولید سولفید هیدروژن و تولید اندول نبودند. یافته‌های صفات مورفولوژیکی و همچنین نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی بر اساس جداول شناسایی باکتری‌ها در کتاب سیستماتیک باکتری شناسی بِرگی نشان داد که همه جدایه‌های منتخب متعلق به جنس *باسیلوس* بودند.

جدول ۱- مشخصات مرفولوژی و فیزیولوژی جدایه‌های منتخب تولید کننده فیتاز به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی.

جدایه	مرفولوژی، واکنش گرم	اندوسپور	آزمون‌های بیوشیمیایی									
			کاتالاز	اکسیداز	VP	اندول	H_2S	ژلاتیناز	آمیلاز	سیترات	حرکت	تحمل نمک ۶٫۵ درصد
MGH2	میله‌ای، گرم مثبت	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+
MGH3	میله‌ای، گرم مثبت	+	+	−	−	−	−	+	+	−	+	+
MGH4	میله‌ای، گرم مثبت	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+	−
MGH7	میله‌ای، گرم مثبت	+	+	+	+	−	−	+	+	−	+	+

بررسی کیفی فعالیت فیتازی جدایه‌ها: مطالعه فعالیت فیتازی جدایه‌های تجزیه کننده فیتات با روش رنگ‌آمیزی افتراقی انجام شد. جدایه‌های تجزیه کننده فیتات با محلول رنگی آمونیوم مولیبدات واکنش داده و تجزیه فیتات به صورت هاله شفاف در اطراف کلنی نمایان می‌شود. در این روش تولید فیتاز از تولید اسید که نتیجه کاذب تولید فیتاز است، افتراق داده می‌شود. نتایج نشان داد که همه جدایه‌های منتخب در اثر واکنش محلول آمونیوم مولیبدات با فسفات آزاد شده از سدیم فیتات ناشی از تولید فیتاز، هاله شفاف را حفظ کردند (شکل ۲).

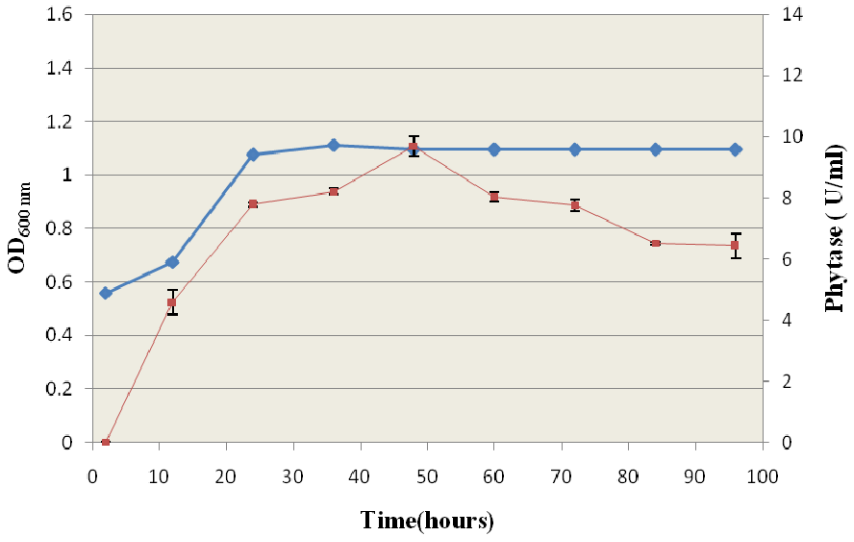


شکل ۲- هاله شفاف پایدار در اطراف کلنی ناشی از تجزیه فیتات توسط جدایه‌های تولید کننده فیتاز به روش رنگ‌آمیزی با محلول رنگی آمونیوم مولیبدات.

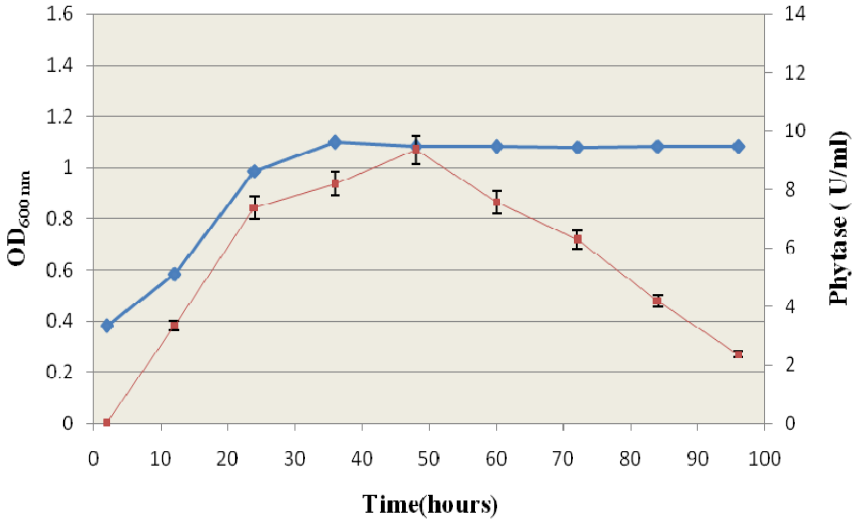
رشد جدایه‌ها و سنجش کمی تولید آنزیم فیتاز: رشد و تولید فیتاز جدایه‌های منتخب با تلقیح در محیط کشت PSM براث، به مدت ۹۶ ساعت اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از تولید کمی فیتاز، همزمان با رشد جدایه‌های منتخب در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج تولید آنزیم فیتاز بر حسب واحد آنزیم نشان داد که جدایه‌های منتخب پس از ۴۸ ساعت رشد در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، بیشینه آنزیم فیتاز در حدود ۱۰ $U\ ml^{-1}$ تولید کردند. بیشترین تولید فیتاز مربوط به جدایه MGH4 و به مقدار $۱۰,۵۸ml^{-1}$ بود. در حالیکه جدایه MGH3 با تولید $U\ ml^{-1}$ ۹,۳۴ کمترین فیتاز را تولید کرد.

بررسی تولید فیتاز توسط جدایه‌ها از عصاره سبوس برنج: نتایج تولید فیتاز جدایه‌های منتخب در محیط کشت مایع MGE حاوی عصاره سبوس برنج به عنوان منبع فیتیک اسید نشان داد که در شرایط یکسان، تولید فیتاز در این محیط رشد نسبت به محیط کشت مایع PSM حاوی سدیم فیتات خالص به عنوان منبع فیتیک اسید، بین ۵۵,۵۹ تا ۵۹,۷۰ درصد افزایش یافت.

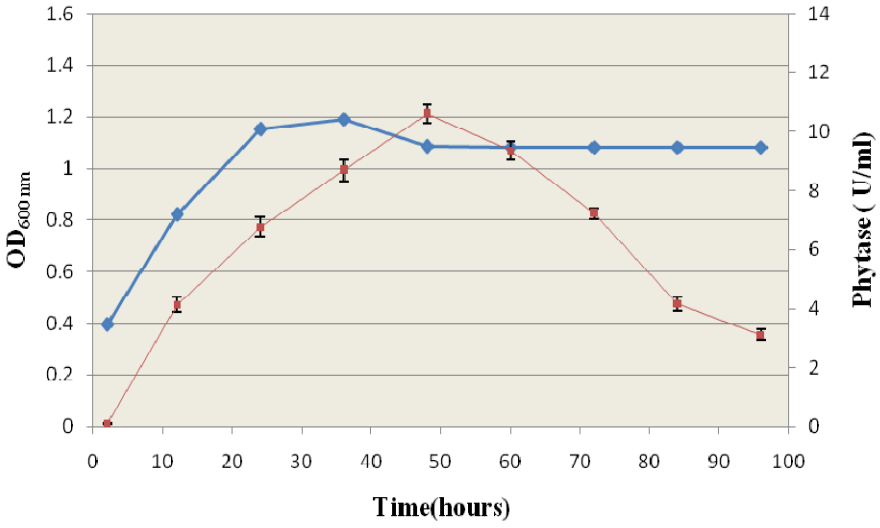
الف)


OD600 nm
Phytase (U/ml)
Time(hours)

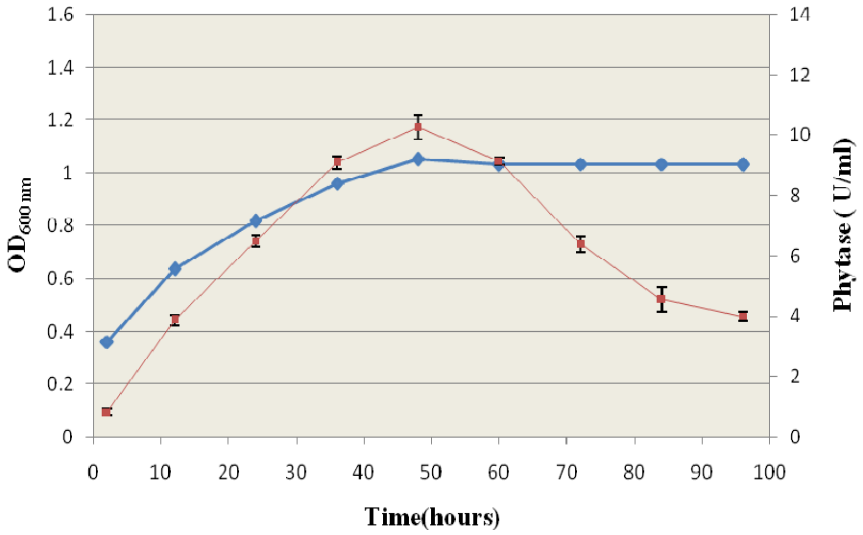
ب)


OD600 nm
Phytase (U/ml)
Time(hours)

ج)


OD600 nm
Phytase (U/ml)
Time(hours)

د)



شکل ۳- تولید فیتاز (■) همزمان با مقدار رشد (◆) جدایه‌های MGH2 (الف)، MGH3 (ب)، MGH4 (ج) و MGH7 (د) در محیط کشت مایع PSM و دمای گرمخانه گذاری ۳۵ درجه سانتی‌گراد. داده‌ها نمایانگر میانگین نتایج سه بار تکرار ± انحراف معیار اند (n=۳).

درصد تولید آنزیم فیتاز در محیط‌های رشد مایع PSM و MGE در جدول ۲ مقایسه شده است. نتایج نشان داد کمترین تولید فیتاز (۹,۳۴ U ml^{-1}) توسط جدایه MGH3 در محیط کشت مایع PSM تولید شد در حالیکه بیشترین تولید فیتاز (۱۷,۷۲ U ml^{-1}) توسط جدایه MGH4 در محیط کشت مایع MGE تولید شد.

جدول ۲- تاثیر منبع فیتات بر تولید فیتاز (U ml^{-1}) توسط سویه‌های *باسیلوس*.جدا شده از رسوبات دریای مازندران.

جدایه	PSM براث	MGE براث	درصد افزایش تولید فیتاز
MGH2	۹,۶۹	۱۶,۵۸	۵۸,۴۴
MGH3	۹,۳۴	۱۶,۸۰	۵۵,۵۹
MGH4	۱۰,۵۸	۱۷,۷۲	۵۹,۷۰
MGH7	۱۰,۲۸	۱۷,۶۴	۵۸,۲۷

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه با رشد و توسعه صنایع غذایی، استفاده از انواع آنزیم‌ها به عنوان مکمل در خوراک دام و طیور و حتی انسان افزایش یافته است. پرهزینه بودن تولید صنعتی فسفر و همچنین آلودگی‌های ناشی از فسفر دفع شده از فضولات حیوانات و نیز ورود آن به آب‌های زیرزمینی، ضرورت استفاده از آنزیم فیتاز به عنوان مکمل غذایی را تایید می‌کند. تحقیقات اخیر نشان داد که فیتازهای میکروبی در بسیاری از برنامه‌های بیوتکنولوژی کاربرد دارند (۶).

به کارگیری فیتاز میکروبی در صنایع خوراک، به عنوان یک روش کاربردی و موفقیت آمیز در بهبود مصرف فسفر فیتاته توسط حیوانات تک معده و همچنین کاهش فسفر دفعی در فضولات حیوان معرفی شده است (۲۴). فیتاز ایده آل باید توانایی آزادسازی فسفر در pHهای مختلف دستگاه گوارش را داشته باشد و در برابر حرارت طی فرآوری خوراک غیر فعال نشود، همچنین تولید و ذخیره آن ارزان باشد (۲۹).

*باسیلوس*ها از منابع مهم باکتریایی تولیدکننده فیتاز به شمار می‌روند. جنس *باسیلوس*، متعلق به خانواده باسیلاسه، به واسطه تولید اندوسپور قادر به گسترش در انواع زیستگاه‌ها می‌باشد (۱). آنزیم‌های تولید شده توسط گونه‌های *باسیلوس* به دلیل مقاومت دمایی و تحمل پهنه گسترده‌ای از pH، در مقایسه با دیگر آنزیم‌های میکروبی از جذابیت زیادی برای مطالعه برخوردارند. زیستگاه دریایی با پوشش ۷۰ درصد از سطح کره زمین، زیستگاه قابل ملاحظه‌ای از انواع باکتری‌ها می‌باشد که شرایط سخت محیطی مانند

شرایط نامتعادل دمایی، فشار و نمک را تحمل می‌کنند (۳۴). از این رو باکتری‌های دریایی به عنوان منابع بالقوه تولیدکننده انواع آنزیم‌ها مورد توجه قرار گرفتند. در این پژوهش برای اولین بار *باسیلوس*‌های تولید کننده فیتاز از رسوبات دریای مازندران جداسازی شد و فعالیت آنزیمی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه ۴۰ جدایه از رسوبات بستر دریای مازندران در سواحل شهرستان بابلسر به روش کومار و همکاران بر اساس مقاومت اندوسپورها به تیمار حرارتی جدا شدند (۱۹). پس از غربالگری جدایه‌ها به روش کشت روی محیط کشت PSM آگار، از میان ۴۰ جدایه تعداد ۷ جدایه توانایی ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی و تولید آنزیم فیتاز را نشان دادند و ۴ جدایه با بیشترین قطر هاله شفاف برای ادامه مطالعات انتخاب شدند. ایملدا و همکاران در سال ۲۰۰۷ موفق شدند از رسوبات سواحل مانگرو هند، ۵ سویه *باسیلوس* جداسازی کنند که دارای فعالیت فیتازی بودند (۱۳). در تحقیقی دیگر ۳۲ جدایه تولید کننده فیتاز از خاک اطراف مزارع پرورش حیوانات جداسازی شد که یک جدایه با بیشترین تولید فیتاز به جنس *باسیلوس سوبتیلیس* تعلق داشت (۳۱). دمیرکان و همکاران طی مطالعات انجام شده در سال ۲۰۱۴، تعداد ۲۳۶ باکتری جداشده از خاک را متعلق به جنس *باسیلوس* اعلام کردند. سپس طی رشد در محیط کشت PSM آگار غربالگری نمودند و ۳۰ جدایه *باسیلوس* را با توانایی تولید فیتاز گزارش کردند (۷).

برای تشخیص سریع جدایه‌های تولید کننده فیتاز، از روش رنگ‌آمیزی افتراقی با آمونیوم مولیبدات استفاده می‌شود. البته ممکن است هاله شفاف اطراف کلنی ناشی از تولید اسید باشد. در این روش طی واکنش محلول آمونیوم مولیبدات با فسفات آزاد شده از تجزیه سدیم فیتات، هاله شفاف ناشی از تولید فیتاز باقی می‌ماند. اما هاله شفاف ناشی از تولید اسید، از بین می‌رود (۲). یانک و همکاران در سال ۱۹۹۸ برای غربالگری باکترهای بی‌هوازی شکمبه حیوانات با فعالیت فیتازی از این روش استفاده نمودند (۳۵). در پژوهش حاضر نیز هر ۴ جدایه منتخب با هاله شفاف، پس از رنگ‌آمیزی افتراقی به عنوان تولیدکنندگان فیتاز تعیین شدند.

سنجش کمی تولید فیتاز بر مبنای تخمین مقدار فسفات آزادشده از تجزیه سدیم فیتات با روش رنگ‌سنجی انجام گرفت. آنزیم فیتاز تولیدشده توسط جدایه‌ها، خارج سلولی می‌باشد در نتیجه برای استخراج آنزیم نیاز به شکستن دیواره سلولی باکتری‌ها نیست و به صورت خام از محیط رشد جدایه‌ها، استخراج شد. بر اساس این روش، با در اختیار قرار دادن سدیم فیتات برای فیتاز تولیدشده توسط جدایه‌ها، فسفات معدنی آزاد می‌گردد. پس از طی شدن زمان واکنش، مقدار فسفات معدنی آزادشده توسط محلول رنگی آمونیوم مولیبدات سنجیده شد. به صورتی که اسید موجود در ترکیبات محلول رنگی آمونیوم مولیبدات موجب دناتوره شدن آنزیم شده و فعالیت آن را متوقف می‌کند و فسفات معدنی آزادشده با محلول واکنش رنگی ایجاد می‌کند. جذب نوری حاصل از واکنش رنگی از مقایسه شاهد و نمونه مورد آزمایش بدست آمد و با استفاده از معادله منحنی استاندارد، یون فسفات به مقدار فسفات معادل تبدیل گردید و مقدار فسفات تولید شده برحسب میکرومول در زمان واکنش محاسبه گردید. طی پژوهشی در سال ۲۰۱۵، مقدار تولید آنزیم فیتاز خام خارج سلولی *باسیلوس لیکنیفورمیس* جدا شده از دستگاه گوارش ماهی $۱,۰۵\ U\ mg^{-1}$ و مقدار تولید آنزیم فیتاز خالص، $U\ mg^{-1}$ ۳۷,۴۵ گزارش شد (۵). در این پژوهش نتایج حاصل از سنجش کمی فیتاز نشان داد که بیشترین تولید فیتاز با سوبسترای سدیم فیتات متعلق به جدایه MGH4، $U\ ml^{-1}$ ۱۰,۵۸ و بیشترین تولید فیتاز با سوبسترای سبوس برنج توسط همین جدایه، $۱۷,۷۲\ U\ ml^{-1}$ بود. این نتایج افزایش حدود ۶۰- ۵۵ درصدی تولید فیتاز از عصاره سبوس برنج نسبت به سدیم فیتات در شرایط یکسان توسط جدایه‌های *باسیلوس* جدا شده از رسوبات دریای مازندران را تایید

می‌کند. در پژوهشی مشابه، پوپانیچ و همکاران در سال ۲۰۰۳ از باکتری‌های خاکزی، تولید فیتاز مقاوم به حرارت و اسید را گزارش کردند. نتایج این پژوهش در مقایسه با پژوهش حاضر مقدار تولید پایین‌تری از فیتاز را نشان داد به طوری که بیشینه تولید فیتاز با سوبسترای سدیم فیتات، ۱,۲۰ U ml^{-1} و با سوبسترای سبوس برنج، ۹,۲۰ U ml^{-1} بود (۲۸).

سبوس برنج یک محصول فرعی صنعت برنج و غنی از فیتیک اسید می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره سبوس برنج می‌تواند با سطح تولید فیتاز بالاتر، جایگزین سدیم فیتات خالص شود. به علاوه می‌توان سبوس برنج را به دلیل دارا بودن پروتئین‌ها و مواد معدنی محرک رشد میکروارگانیسم‌ها در مقایسه با سدیم فیتات خالص، به عنوان سوبسترای مناسب و مقرون به صرفه در نظر گرفت. همچنین با توجه به کشت وسیع برنج در شهرها و روستاهای ساحلی در شمال کشور و ارتباطات آبی مزارع با رودهایی که به دریای مازندران می‌ریزند، انتظار می‌رود سواحل دریای مازندران دارای تنوع میکروبی گسترده‌ای از نظر تولید آنزیم فیتاز باشد. بنابراین تحقیقات بیشتر برای جستجو و جداسازی انواع میکروارگانیسم‌های بومی تولید کننده فیتاز از سواحل دریای مازندران و نیز استفاده از سبوس برنج به عنوان سوبسترای ارزان قیمت در تولید صنعتی فیتاز پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L., & Olmedo, G. 2010. Understanding the evolutionary relationships and major traits of Bacillus through comparative genomics. *Journal of BMC Genomics, 11(1),* 332-339.

2. Bae, H. D., Yanke, L. J., Cheng, K. J., & Selinger, L. B. 1999. A novel staining method for detecting phytase activity. *Journal of Microbiological Methods, 39(1),* 17-22.

3. Beric, T., Kojic, M., Stankovic, S., Topisirovic, L., Degrassi, G., Myers, M., Venturi, V., Fira, D., 2012. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Journal of Food Technology and Biotechnology 50(1), 25-31.*

4. Canan, C., Cruz, F. T. L., Delaroza, F., Casagrande, R., Sarmento, C. P. M., Shimokomaki, M., & Ida, E. I. 2011. Studies on the extraction and purification of phytic acid from rice bran. *Journal of food composition and analysis*, *24*(7), 1057-1063.

5. Dan, S. K., Nandi, A., Banerjee, G., Ghosh, P., & Ray, A. K. 2015. Purification and Characterization of Extracellular Phytase from Bacillus licheniformis Isolated from Fish Gut. *Journal of Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 85(3),* 751-758.

6. Dan, S. K. & Ray, A. K. 2014. Characterization and identification of phytase-producing bacteria isolated from the gastrointestinal tract of four freshwater teleosts. *Journal of Annals of Microbiology, 64(1),* 297-306.

7. Demirkan, E., Baygin, E., Usta, A., 2014. Screening of phytate hydrolysis *Bacillus* sp. isolated from soil and optimization of the certain nutritional and physical parameters on the production of phytase. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi 39(2), 206-214.*

8. El-Toukhy, N. M., Youssef, A. S., & Mikhail, M. G. 2013. Isolation, purification and characterization of phytase from Bacillus subtilis MJA. *African Journal of Biotech, 12(20),* 2957-2967.

9. Engelen, A.J., van der Heeft, F.C., Randsdorp, P.H., Smit, E.L., 1993. Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of AOAC International 77(3), 760-764.*

10. Gargova, S., Sariyska, M., 2003. Effect of culture conditions on the biosynthesis of *Aspergillus niger* phytase and acid phosphatase. *Journal of Enzyme and Microbial Technology 32(2), 231-235.*

11. Gerke, J., 2015. Phytate (inositol hexakisphosphate) in soil and phosphate acquisition from inositol phosphates by higher plants. A review. *Journal of Plants 4(2), 253-266.*

12. Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., Zelder, O., 2005. Biotechnological production and applications of phytases. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 68(5), 588-597.*

13. Imelda, J. & Paulraj, R. 2007. Isolation and characterization of phytase producing Bacillus strains from mangrove ecosystem. *Journal of the Marine Biological Association of India, 49(2),* 177-182.

14. IUB (1979). *Enzyme nomenclature, 1978: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry on the nomenclature and classification of enzymes*. Academic Press.

15. Kerovuo, J. 2000. A novel phytase from Bacillus: characterization and production of the enzyme. PhD Thesis. University of Helsinki. Finland.

16. Kim, S., Cheong, Y., Seo, D., Hur, J., Heo, J., & Cho, J. 2007. Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (Bacillus spp.). *Journal of Water Science & Technology, 55(1-2),* 105-111.

17. Kumar, V., Singh, P., Jorquera, M.A., Sangwan, P., Kumar, P., Verma, A.K., Agrawal, S., 2013. Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (Brassica juncea). *World Journal of Microbiology and Biotechnology 29(8), 1361-1369.*

18. Kumar, D., Rajesh, S., Balashanmugam, P., Rebecca, L. J., & Kalaichelvan, P. T. 2013. Screening, Optimization and Application of Extracellular Phytase from Bacillus Megaterium Isolated from Poultry Waste. *Journal of Modern Biotechnology, 2(2),* 46-52.

19. Kumar, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. 2012. Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Journal of Microbiological Research, 167(8),* 493-499.

20. Laumen, K. & Ghisalba, O. 1994. Preparative-scale Chemo-enzymatic Synthesis of Optically Pure d-myo–Inositol-1-phosphate. *Journal of Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 58(11),* 2046-2049.

21. Lei, X. G. & Porres, J. s. M. 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Journal of Biotechnology Letters, 25(21),* 1787-1794.

22. Liu, B. L., Rafiq, A., Tzeng, Y. M., & Rob, A. 1998. The induction and characterization of phytase and beyond. *Journal of Enzyme and Microbial Technology, 22(5),* 415-424.

23. Lyberg, K. 2006. *Phosphorus in pig diets.*(vol,2006. No 13).

24. Maenz, D. D., Engele-Schaan, C. M., Newkirk, R. W., & Classen, H. L. 1999. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Journal of Animal Feed Science and Technology, 81(3),* 177-192.

25. Mohseni, M., Norouzi, H., Hamedi, J., & Roohi, A. 2013. Screening of antibacterial producing actinomycetes from sediments of the Caspian Sea. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine, 2(6)*, 64-71.

26. Mukesh, P., Suma, S., Singaracharya, M. A., & Lakshmipathi, V. 2004. Isolation of phytate-hydrolysing microbial strains from traditional waste water of rice fermentation and liquid cattle feeds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20(5),* 531-534.

27. Mukhametzyanova, A. D., Akhmetova, A. I., & Sharipova, M. R. 2012. Microorganisms as phytase producers. *Journal of Microbiology, 81(3),* 267-275.

28.Popanich, S., Klomsiri, C., Dharmsthiti, S., 2003. Thermo-acido-tolerant phytase production from a soil bacterium in a medium containing rice bran and soybean meal extract. *Journal of Bioresource Technology 87(3),* 295-298.

29. Sarikhani, M., & Malboobi, M. A. 2010. Phytase enzymology, molecular and biochemical characteristic and applications. *Journal of Agricultural Biotechnology, 2(2),* 13-40.

30. Selvamohan, T., Ramadas, V., & Rejibeula, M. (2012). Optimization of phytase production by Pseudomonas Sp. Isolated from poultry faces. *International Journal of Modern Engineering Research*, *2*, 1326-1330.

31. Singh, N. K., Joshi, D. K., & Gupta, R. K. 2013. Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters. *Jundishapur Journal of Microbiol, 6(5),* e6419.

32. Tran, T. T. 2010. *Thermostable Phytase from a Bacillus sp.: Heterologous Production, Mutation, Characterization and Assay Development.* PhD Thesis. Lund University. Sweden.

33. Vohra, A. & Satyanarayana, T. 2003. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Journal of Critical Reviews in Biotechnology, 23(1),* 29-60.

34. Vijayan, N., Sagadevan, E., Arumugam, P., Hussain, A. J., & Jayaprakashvel, M. 2012. Screening of Marine bacteria for multiple Biotechnological applications. *Journal of Academical Industrial Reseach, 1(6),* 348-354.

35. Yanke, L. J., Bae, H. D., Selinger, L. B., & Cheng, K. J. 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Journal of Microbiology, 144(6),* 1565-1573.

Phytase production from rice bran extract using *Bacillus* spp. isolated from sediments of the Caspian Sea

Mohseni M.[1], Ghorbanzadeh F.[1] and Seyedalipour B.[2]

[1] Microbiology Dept., University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

[2] Molecular and Cell Biology Dept., University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

Abstract

Phytic acid is the main phosphorus storage form that is not digestible for monogastric animals such as poultry, fish and even humans. Phytase breaks down phytic acids that are found in vegetable products and increases the availability of phosphorus. The aim of this study was to produce phytase from rice bran extract as a rich and inexpensive source of phytic acid using *Bacillus* spp. isolated from sediments of the Caspian Sea. Using thermal treatment of the sediment samples, phytase producing *Bacillus* isolates were screened on PSM agar. In addition, after a quantitative assay of phytase production using the ammonium molybdate method, phytase production of the isolates was investigated in the MGE broth containing rice bran extract. Screening results of 40 isolates demonstrated that the four isolates MGH2, MGH3, MGH4 and MGH7 showed high levels of phytase production with a clear halo zone forming around the colony. Morphological and physiological characteristics indicated that all of the selected isolates belong to *Bacillus*. Maintaining a clear halo zone, after staining with ammonium molybdate, confirmed the production of phytase in all selected isolates. In addition, the results of the quantitative assay of phytase production in the isolates showed that maximum and minimum phytase production relate to MGH4 with 10.58 U ml^{-1} and MGH3 with 9.34 U ml^{-1}, respectively. When the production of phytase in MGE broth and PSM broth were compared with one another, a 55-60 percent increase in phytase production was examined in the MGE broth. The results of present study indicated that rice bran extract can be considered as a suitable and affordable substrate with high levels of phytase production.

Key words: Phytase, rice bran extract, *Bacillus,* Caspian Sea