# Isolation and identification of phytase-producing strains from soil samples and optimization of production parameters

**Masoud Mohammadi**
M.Sc. student of Microbiology, Basic Science Department, Islamic Azad University, Rasht, Iran, mohammadim539@gmail.com
**Mehrdad Azin***
Associate Professor of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran, azin@irost.ir
**Mahsa Sedighi**
Ph D of Chemical engineering, Amir Kabir University, Tehran, Iran, m_sedighi@aut.ac.ir

## Abstract

**Introduction:** Phytase can be used as a feed additive to catalyze the hydrolytic degradation of phytate as the major storage form of natural phosphorus. Phytase is produced by a wide range of bacteria, fungi and yeasts. Isolation and identification of phytase-producing strains from soil, is of great interest for commercial application in different industries. The aim of the current study was the isolation and identification of phytase-producing strains from soil samples and optimizing the enzyme production.

**Materials and methods:** For isolation and identification of phytase-producing strains, soil samples were collected from farms near Qazvin. Diluted samples were spread onto PSM solid media and production of the clear zones about the colonies gave a visual indication of phytase production. The selection of the best phytase-producing strain was performed by measuring the enzyme activity in the liquid medium. The selected strain was identified by slide-culture technique and the effect of carbon source (phytate and wheat bran), pH and time of incubation were also investigated for optimal enzyme production.

**Results:** In this study, a *Penicillium* sp. was isolated from a soil sample near Qazvin and was selected as the best phytase-producing strain. The maximum phytase activity (171 U/ml) was obtained in the medium containing % 2 (w/v) phytate, at pH 5, after 72 h of incubation. By using wheat bran as the source of carbon and phytate, the maximum phytase activity, which was 61.7 U/mL, was produced at pH 7 and after the same time of incubation.

**Discussion and conclusion:** *Penicillium* sp. isolated from a soil sample near Qazvin, was able to produce highly active phytase in optimized environmental conditions, which could be a suitable candidate for commercial production of phytase to be used as complement in poultry feeding industries.

**Key words:** Phytase, *Penicillium* sp., Optimization, Phytate, Enzymatic activity

* Corresponding author
**Received:** August 20, 2016 / **Accepted:** May 2, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحه ۱۱۸- ۱۰۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۳۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۲

# جداسازی و شناسایی سویه‌های بومی مولد فیتاز و بهینه‌سازی تولید آنزیم در آنها

**مسعود محمدی:** کارشناس ارشد زیست‌شناسی- میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، ایران mohammadim539@gmail.com
**مهرداد آذین*:** دانشیار بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، azin@irost.ir
**مهسا صدیقی:** دکتری مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه امیرکبیر، ایران، m_sedighi@aut.ac.ir

## چکیده

**مقدمه:** فیتاز، افزودنی مهم تغذیه‌ای برای افزایش دسترسی به فسفر است. منابع میکروبی شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها از بهترین منابع تولیدکننده فیتاز هستند. شناسایی و به‌کارگیری فیتاز جداشده از ریزموجودات موجود در خاک، اهمیت زیادی در تولید این آنزیم برای استفاده تجاری در صنایع مختلف دارد. هدف مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی سویه‌های مولد فیتاز از خاک و بهینه‌سازی تولید آنزیم در آنها است.

**مواد و روش‌ها:** برای جداسازی و شناسایی سویه‌های مولد فیتاز، ابتدا از خاک مزارع کشاورزی و مرغداری‌های اطراف قزوین نمونه‌برداری شد. سپس سویه‌های مولد فیتاز با استفاده از محیط PSM و از طریق مشاهده هاله شفاف جداسازی شدند. سویه برتر از طریق سنجش آنزیمی در محیط مایع انتخاب و با روش اسلاید-کالچر در حد جنس شناسایی شد. سپس اثر متغیرهایی مانند منبع کربن، اسیدیته و مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری بر تولید آنزیم بررسی شد.

**نتایج:** قارچ پنی‌سیلیوم، سویه برتر مولد آنزیم فیتاز، از خاک مزارع کشاورزی اطراف شهر قزوین جداسازی و شناسایی شد. در محیط حاوی سبوس گندم، بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در اسیدیته ۷ و مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری ۷۲ ساعت، ۶۱/۷U/ml بود. با بهینه‌سازی محیط کشت، فعالیت فیتازی در محیط حاوی (w/v) ۲ درصد فیتات‌سدیم، اسیدیته ۵ و مدت زمان ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری به ۱۷۱U/ml افزایش یافت.

**بحث و نتیجه‌گیری:** قارچ پنی‌سیلیوم جداشده از خاک مزارع کشاورزی اطراف قزوین، توانایی تولید مقادیر زیادی آنزیم فیتاز را در شرایط بهینه محیطی دارد و به منظور تولید تجاری این آنزیم برای مصرف‌های صنایع مختلف درخور توجه است.

**واژه‌های کلیدی:** فیتاز، پنی‌سیلیوم، بهینه‌سازی، فیتات، فعالیت آنزیمی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

## مقدمه

استفاده از آنزیم‌ها برای بهبود کیفیت محصولات غذایی، دارویی و بهداشتی همواره درخور توجه بوده است. فیتازها ازجمله آنزیم‌های پرکاربرد صنعتی و زیرخانواده‌ای از فسفاتازها هستند که فیتیک‌اسید را به اجزای کوچکتر مونو، دی، تترا و پنتا فسفات تجزیه می کنند. فیتیک‌اسید یا فیتات، حدود ۱ تا ۲ درصد وزن دانه‌ها و ۶۰ تا ۹۰ درصد کل فسفر دانه‌های گیاهی ازجمله غلات و حبوبات را تشکیل می‌دهد. در حیوانات تک‌معده‌ای مانند خوک، پرندگان و ماهی‌ها، به علت فقدان آنزیم فیتاز، فسفات آلی فیتیک‌اسید جذب‌شدنی نیست و فسفر هضم‌نشده با عبور از دستگاه گوارش حیوانات سبب آلودگی محیط زیست و آب‌های سطحی می‌شود. همچنین، فیتات با کلاته کردن فسفر، کلسیم، آهن و روی، جذب این مواد را کاهش می‌دهد و دارای آثار منفی بر قابلیت هضم پروتئین است (۱ و ۲). اضافه کردن فسفر به شکل معدنی به جیره غذایی نیز مشکلات بسیاری مانند هزینه زیاد این عنصر، مخاطرات زیست‌محیطی، منابع محدود و تجزیه‌ناپذیری آن را در پی خواهد داشت و بنابراین، استفاده از آنزیم فیتاز در جیره غذایی این حیوانات اهمیت دارد. همچنین، فیتازها در حفظ محیط زیست (به سبب کاهش فسفر دفعی و جلوگیری از تشکیل توده‌های جلبکی مضر)، آبزی پروری (به سبب افزایش دسترسی ماهیان به فسفر موجود در غذاهای گیاهی) و کشاورزی (به سبب افزایش فسفر در دسترس برای گیاهان و افزایش رشد آنها) کاربرد دارد (۳ و ۴).

فیتازها، رهاسازی فسفات از فیتات را به‌شکل مرحله‌ای انجام می‌دهند. این آنزیم‌ها در طبیعت گسترده هستند و فعالیت فیتازی در گیاهان، جانوران و ریزموجودات گزارش شده است (۲ و ۵). پژوهش های اخیر نشان داده‌اند که تولید فیتاز میکروبی از نظر اقتصادی به صرفه و دارای مصرف‌های بسیاری در صنعت است. فیتازهای میکروبی از قارچ‌ها، مخمرها، باکتری‌ها و پروتوزوئرها جداسازی شده‌اند (۶). قارچ‌های مختلفی از جمله *آسپرژیلوس*[1]، *پنی‌سیلیوم*[2]، *موکور*[3] و *رایزوپوس*[4] از گونه‌های متداول برای تولید فیتاز خارج سلولی هستند (۷).

شناسایی و به‌کارگیری فیتاز جداشده از ریزموجودات خاک، اهمیت بسیاری در تولید این آنزیم برای استفاده تجاری در صنایع مختلف دارد. مطالعه حاضر با هدف جداسازی سویه‌های مولد فیتاز از خاک مزارع کشاورزی و مرغداری های اطراف شهر قزوین انجام شد تا سویه‌ها شناسایی و برای تولید نیمه‌صنعتی و صنعتی فیتاز استفاده شوند. همچنین متغیرهای محیطی نظیر اسیدیته، زمان گرم‌خانه گذاری، نوع منبع کربن (فیتات‌سدیم و سبوس گندم)، نوع منبع ازت (سولفات آمونیوم و نیترات‌آمونیوم) و غلظت منبع کربن برای بهینه‌سازی میزان آنزیم تولیدشده بررسی شدند.

## مواد و روش‌ها

**نمونه‌برداری:** برای جداسازی ریزموجودات تولیدکننده فیتاز، حدود ۱۰ نمونه از خاک مزارع کشاورزی و ۵ نمونه از خاک مرغداری‌های اطراف شهر قزوین تهیه و در ظروف شیشه ای استریل به آزمایشگاه منتقل شدند.

**جداسازی و شناسایی سویه های مولد فیتاز:** برای جداسازی میکروارگانیسم های تولید کننده فیتاز از محیط PSM با ترکیب ۰/۴ گرم فیتات‌سدیم، ۲ گرم گلوکز، ۰/۲ گرم $CaCl_2$، ۰/۵ گرم $NH_4NO_3$، ۰/۰۵ گرم

$MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۱ گرم $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۱ گرم $MnSO_4.4H_2O$ و ۱/۵ گرم آگار (۷) استفاده شد (مقادیر بر حسب گرم بر صد میلی‌لیتر هستند). اسیدیته محیط حدود ۷ تنظیم و محیط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. سپس محیط کشت زیر هود لمینار و کنار شعله به داخل پلیت ها منتقل و اجازه داده شد تا محیط سرد شود. برای اطمینان از آلوده‌نبودن محیط کشت، پلیت‌ها ۲۴ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند.

برای جداسازی سویه‌های مدنظر از نمونه‌های خاک، ابتدا نمونه‌ها به نسبت ۱:۱۰ داخل آب مقطر استریل ریخته و خوب مخلوط شدند تا ریزموجودات در آب شناور و دیگر اجزا ته‌نشین شوند. پس از تهیه رقت سریالی از مایع شفاف رویی، ۱۰ میکرولیتر از هر رقت برای تلقیح به داخل پلیت‌ها برداشته شد. تلقیح در شرایط استریل (زیر هود لمینار و کنار شعله) انجام شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم خانه‌گذاری و هر روز بررسی شدند. سویه‌های تولید کننده فیتاز با ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی ها شناسایی شدند و هر چه نسبت قطر این هاله به قطر کلنی بزرگ‌تر، میزان ترشح آنزیم فیتاز نیز بیشتر بود (۸).

**شناسایی میکروسکوپی سویه ها:** از مشاهده مستقیم نمونه‌ها برای تشخیص اولیه سویه‌ها و در آزمایش میکروسکوپی، از روش اسلاید کالچر و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با لاکتوفنل کاتن‌بلو برای شناسایی نمونه‌های قارچی در حد جنس استفاده شد (۹).

**سنجش آنزیمی و شناسایی سویه برتر:** برای شناسایی سویه برتر، جدایه‌ها در محیط مایع کشت شدند تا جدایه‌ای مشخص شود که فیتاز بیشتری تولید می‌کند. در مرحله بعد، سویه برتر برای بهینه‌سازی تولید آنزیم بررسی شد. محیط کشت مایع (محیط کشت ۱) استفاده‌شده حاوی ۰/۸ گرم نشاسته ذرت، ۳ گرم گلوکز، ۰/۸۶ گرم $NH_4NO_3$، ۰/۰۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۵ گرم KCl، ۰/۰۱ گرم $MnSO_4.4H_2O$، ۰/۰۱ گرم $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۱۷ گرم $K_2HPO_4$ (۶) بود (مقادیر بر حسب گرم برصد میلی لیتر هستند). اسیدیته محیط حدود ۵/۵ تنظیم و محیط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. کلنی‌های رشدکرده جدایه‌ها روی محیط آگاردار در آب مقطر استریل به‌شکل سوسپاسیون در آمدند و در شرایط استریل، به میزان ۰/۵ میلی لیتر به محیط‌کشت مایع تلقیح شدند. تمام آزمایش‌ها در شیکرانکوباتور، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۵۰ دور بر دقیقه انجام و سه بار تکرار شدند. پس از ۷۲ ساعت، سنجش آنزیمی برای انتخاب سویه برتر انجام شد؛ به این منظور، مایه تخمیری به فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و بی‌درنگ، قسمت شفاف فاز روماند برای سنجش آنزیم استفاده شد.

**بهینه‌سازی تولید آنزیم فیتاز:** برای بهینه‌سازی تولید آنزیم فیتاز در سویه برتر انتخابی، اثر دو منبع جداگانه فیتات‌سدیم و سبوس گندم در اسیدیته‌های ۵، ۷ و ۸ مطالعه شد تا چنانچه سبوس گندم بتواند منبع ارزان‌قیمت فیتات گیاهی در تولید آنزیم باشد، جایگزین فیتات‌سدیم شود. در محیط حاوی فیتات (محیط ۲) به جای ۳ گرم گلوکز (در محیط ۱)، ۰/۵ گرم فیتات‌سدیم و ۲/۵ گرم گلوکز استفاده شد. به محیط‌های حاوی سبوس گندم (محیط ۳)، به‌جای ۰/۸ گرم نشاسته ذرت و ۳ گرم گلوکز (در محیط ۱)، ۳ گرم سبوس گندم و ۰/۵ گرم گلوکز اضافه شد (جدول ۱). سایر مواد و املاح بدون تغییر به هر سه محیط افزوده شدند و اسیدیته محیط‌ها با سود و کلریدریک‌اسید ۱ نرمال تنظیم شد.

پس از انتخاب منبع فیتات، در آزمایش های بعدی اثر سه متغیر مقدار فیتات، اسیدیته و مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری در سطوحی که در جدول ۲ نشان داده شده‌اند، طی "طراحی آزمایش عاملی غیر متوازن[5]" بررسی شد. تحلیل نتایج با روش GLM[6] و نرم‌افزار Minitab Ver. 17 (Minitab Inc. USA) انجام شد.

جدول ۱- منابع کربنی در سه محیط کشت به‌کاررفته در تولید فیتاز

| محیط ۱ | محیط ۲ | محیط ۳ |
|---|---|---|
| ۰/۸ گرم نشاسته ذرت<br>۳ گرم گلوکز | ۰/۵ گرم فیتات سدیم<br>۲/۵ گرم گلوکز | ۳ گرم سبوس گندم<br>۰/۵ گرم گلوکز |

جدول ۲- متغیرهای مستقل و سطوح مدنظر به‌کاررفته برای بهینه‌سازی مقدار فیتات‌سدیم

| شماره متغیر | متغیر | سطوح متغیرها | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | سطح ۱ | سطح ۲ | سطح ۳ | سطح ۴ |
| ۱ | فیتات‌سدیم (گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) | ۰ | ۰/۵ | ۱ | ۲ |
| ۲ | اسیدیته | ۵ | ۷ | ۸ | |
| ۳ | مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری (ساعت) | ۴۸ | ۷۲ | ۱۲۰ | |

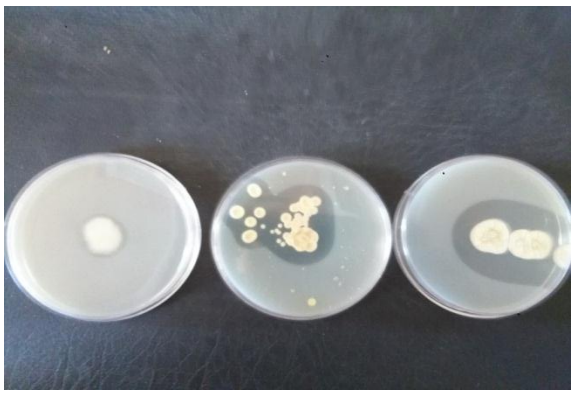
**روش‌های اندازه‌گیری:** برای شناسایی جنس نمونه‌های قارچی از روش اسلاید کالچر استفاده شد (۹). در این روش، لوله‌ای نعلی‌شکل (U-form) در پلیت شیشه‌ای استریل قرار داده شد تا مانع از تماس لام با کف پلیت شود. چون قارچ‌ها در شرایط مرطوب رشد بهتری دارند، مقداری (۵ تا ۸ میلی‌لیتر) آب استریل کف پلیت ریخته شد. سپس یک قطره از محیط کشت حاوی آگار روی لام استریل درون پلیت ریخته شد و با آنس استریل، مقداری از کلنی تازه به محیط کشت منتقل و پلیت ۲۴ساعت گرم‌خانه گذاری شد. پس از رشد و تثبیت نمونه، لامل برداشته شد و روی لام استریلی قرار گرفت که از پیش روی آن یک تا دو قطره لاکتوفنل کاتن بلو ریخته شده بود. برای نگهداری بهتر، اطراف لامل با لاک ناخن بسته و زیر میکروسکوپ بررسی شد.

برای سنجش آنزیم فیتاز، ۵۰۰ میکرولیتر آنزیم خام استخراجی که ۱۰ برابر رقیق شده بود با ۲۵۰ میکرولیتر بافر استات‌سدیم ۰/۲ مولار و ۲۵۰ میکرولیتر فیتات‌سدیم ۱۵ میلی‌مولار مخلوط و ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. واکنش با افزودن ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۵ درصد پایان یافت. ۰/۵ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل با ۴ میلی‌لیتر مخلوط سولفوریک‌اسید ۵ نرمال، مولیبدات‌آمونیوم ۱۰ میلی‌مولار و استون (به نسبت ۲:۱:۱ با هم مخلوط شده بودند) و ۰/۴ میلی‌لیتر سیتریک‌اسید ۱ مولار مخلوط و جذب در ۴۰۰ نانومتر خوانده شد. طبق تعریف، هر واحد فیتاز برابر است با مقدار آنزیمی که ۱ میکرومول فسفر معدنی را در هر دقیقه آزاد کند. میزان آنزیم تولیدشده با استفاده از منحنی استاندارد فسفر مشخص شد (۱۰).

## نتایج

**جداسازی و شناسایی سویه‌های مولد فیتاز:** از ۱۵ نمونه کشت‌شده روی محیط PSM، فقط سه نمونه پس از ۷۲ ساعت، رشد و هاله شفاف تولید کردند و در روزهای ۵ و ۶ تشکیل هاله شفاف کاملاً مشهود بود (شکل ۱).

شکل ۱- تولید هاله شفاف در ۳ نمونه کشت‌شده روی محیط PSM



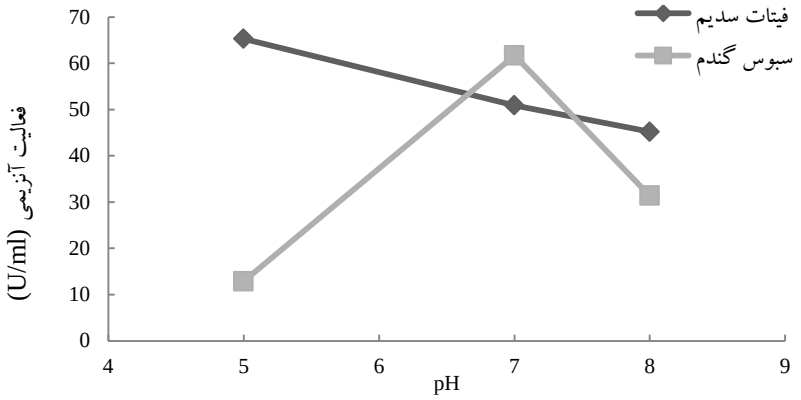
با بررسی و مشاهده اولیه سویه‌های جداسازی‌شده مشخص شد که هر سه سویه از گونه‌های قارچی هستند. همان‌طور که گفته شد هرچه نسبت قطر هاله شفاف به قطر کلنی بزرگ‌تر باشد، میزان ترشح آنزیم فیتاز بیشتر است. با اندازه‌گیری قطر هاله شفاف نسبت به قطر کلنی، نمونه دارای فعالیت فیتازی بیشتر انتخاب شد؛ این اندازه در نمونه انتخابی، ۵ میلی‌متر و در دو نمونه دیگر ۲/۵ تا ۴ میلی‌متر بود. از روش رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو (روش اسلایدکالچر) برای تشخیص جنس قارچ جدا شده استفاده و مشخص شد که سویه قارچی برتر به جنس *پنی‌سیلیوم* تعلق دارد.

تاکنون، بیشتر مطالعه‌های انجام‌شده درباره جداسازی قارچ‌های تولیدکننده فیتاز از خاک مناطق مختلف هستند. شی و ویر[۷]، بیش از ۲۰۰۰ نوع ریزموجود تولید کننده فیتاز را از خاک جداسازی کردند که بیشتر آنها فیتاز داخل سلولی تولید می‌کردند و تنها گروه تولیدکننده فیتاز خارج سلولی، قارچ‌های متعلق به جنس *آسپرژیلوس*، *پنی‌سیلیوم* و *موکور* بودند (۶).

لی[۸] و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از محیط PSM و ایجاد هاله شفاف روی این محیط موفق شدند گونه‌ای از *آسپرژیلوس* را جداسازی کنند که بیشترین میزان فیتاز خارج سلولی را در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۵ داشت (۱۱). گوپتا و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ موفق شدند با استفاده از همین محیط کشت، سویه‌ای از آسپرژیلوس نایجر را جدا کنند که تا ۳۹/۲ واحد آنزیم به ازای هر گرم وزن خشک تولید می‌کرد (۱۲).

**تأیید برتری سویه منتخب:** به منظور بررسی بیشتر و بهتر فعالیت فیتازی نمونه‌ها برای شناسایی سویه برتر، غربالگری ثانویه در محیط مایع انجام شد تا سویه برتر از طریق سنجش میزان فیتاز تولیدشده مشخص شود. نتایج نشان دادند همان‌طور که قارچ پنی‌سیلیوم نسبت قطر هاله به کلنی بیشتری داشت، از نظر تولید آنزیم نیز فعالیت فیتازی بیشتری در مقایسه با دو سویه دیگر از خود نشان داد. فعالیت فیتازی مشاهده‌شده در قارچ *پنی‌سیلیوم* ۳۲/۸U/ml و در دو جدایه دیگر ۱۱/۲U/ml و ۲۸/۹ بود.

**بهینه‌سازی شرایط کشت و تولید آنزیم:** برای بهینه‌سازی تولید فیتاز در سویه برتر، ابتدا مقایسه‌ای بین سه محیط ۱، ۲ و ۳ انجام شد که به‌ترتیب فاقد فیتات، حاوی فیتات‌سدیم، و حاوی سبوس گندم به‌عنوان منبع فیتات گیاهی بودند. منبع کربن در محیط ۱ نشاسته و گلوکز، در محیط ۲ فیتات‌سدیم و گلوکز و در محیط ۳ سبوس گندم و کمی گلوکز بود (جدول ۱).




شکل ۲- مقایسه تولید فیتاز در حضور فیتات‌سدیم و سبوس گندم در اسیدیته‌های مختلف

مطابق شکل ۲، بیشترین تولید آنزیم در محیط دارای فیتات در اسیدیته ۵ رخ داده و با افزایش اسیدیته، از مقدار تولید کاسته شده است. کمترین میزان تولید آنزیم در محیط حاوی سبوس گندم در اسیدیته ۵ بوده و در اسیدیته ۷ به بیشترین مقدار خود رسیده و دوباره از آن کاسته شده است.

سبوس گندم جزو ضایعات کشاورزی و دارای مقادیر شایان توجهی فیتیک‌اسید است. این ماده نسبت به فیتات‌سدیم یا کلسیم که بسیار گران‌قیمت هستند، منبعی ارزان، در دسترس و جایگزین مناسبی برای فیتات‌سدیم است. فسفر در سبوس گندم به‌تدریج آزاد و بنابراین، مانع ایجاد بازدارندگی بر سیستم سلولی می‌شود.

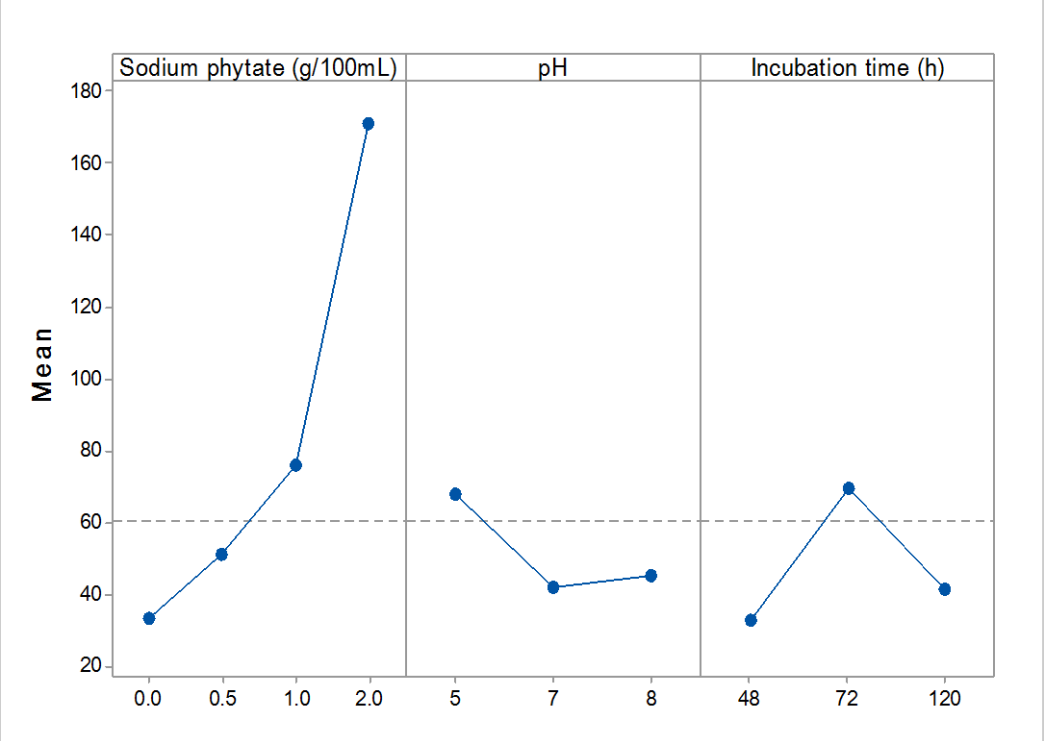
اثر سه فاکتور مختلف مقدار فیتات‌سدیم، اسیدیته و مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری بر محیط‌کشت بررسی شد. نتایج نشان دادند که وجود فیتات در محیط بر فعالیت آنزیمی فیتاز اثر مستقیم دارد و افزایش آن، سبب تولید آنزیم بیشتر می‌شود. فعالیت فیتازی در محیط حاوی فیتات‌سدیم (۰/۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)، ۶۵/۳ U/ml اندازه‌گیری شد در حالی که این مقدار در محیط فاقد فیتات، ۴۷/۳ U/ml بود. همچنین با افزایش میزان فیتات سدیم، میزان فعالیت آنزیمی فیتاز افزایش یافت و در حضور (w/v) ۲ درصد فیتات‌سدیم، به ۱۷۱ واحد در هر میلی‌لیتر محیط‌کشت رسید. مطابق شکل ۳ که آثار اصلی سه فاکتور یادشده را نشان می‌دهد، بیشترین آنزیم پس از ۷۲ ساعت تولید شد و پس از آن، کاهش یافت. بهینه بودن اسیدیته ۵ برای تولید آنزیم در این آزمایش نیز اثبات شد.

آنالیز واریانس نتایج نشان می‌دهد (جدول ۳) که از میان سه فاکتور بررسی‌شده، تنها فیتات‌سدیم روی پاسخ تأثیر معنادار داشته است ($P\leq0.05$).

جدول ۳- آنالیز واریانس برای فعالیت آنزیمی

| Source | DF | Seq SS | Adj SS | Adj MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sodium phytate | ۳ | ۱۵۰۴۹/۶ | ۱۰۰۲۵/۶ | ۳۳۴۱/۹ | ۳۸/۲۴ | ۰/۰۲۶ |
| pH | ۲ | ۵۰/۳ | ۴۰۴/۶ | ۲۰۲/۳ | ۲/۳۱ | ۰/۳۰۲ |
| Incubation time | ۲ | ۸۰۹/۷ | ۸۰۹/۷ | ۴۰۴/۹ | ۴/۶۳ | ۰/۱۷۸ |
| Error | ۲ | ۱۷۴/۸ | ۱۷۴/۸ | ۸۷/۴ | | |
| Total | ۹ | ۱۶۰۸۴/۴ | | | | |

S= 9.34889 R-Sq= 98.91% R-Sq (adj) = 95.11%



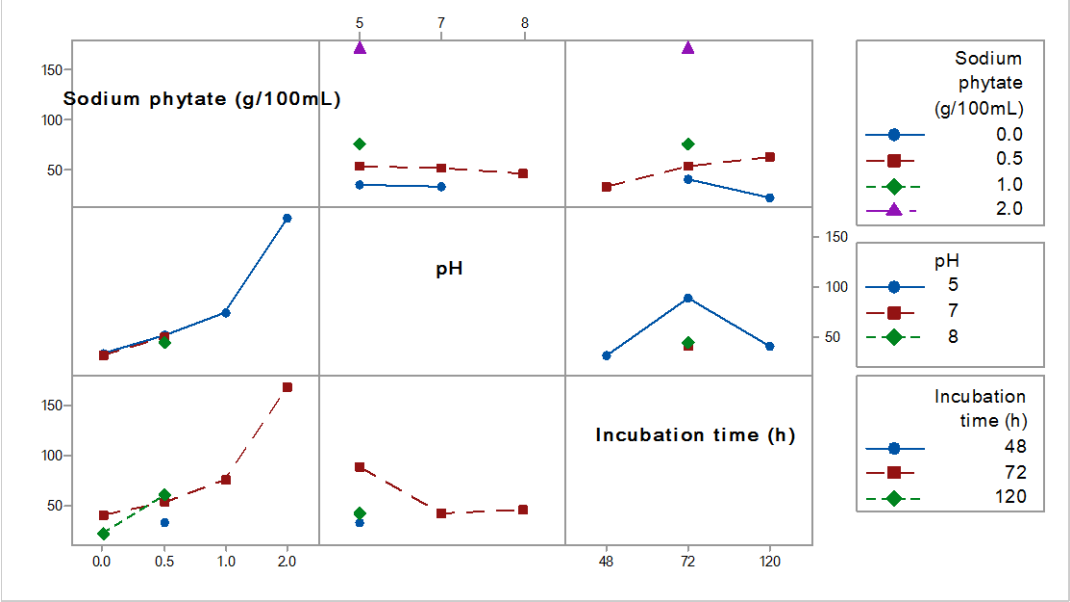

شکل ۳- آثار اصلی فاکتورها روی فعالیت فیتاز

فاکتورهای بررسی شده، تداخل کمی روی یکدیگر نشان دادند که در بررسی شکل ۴ نمایان می‌شود.

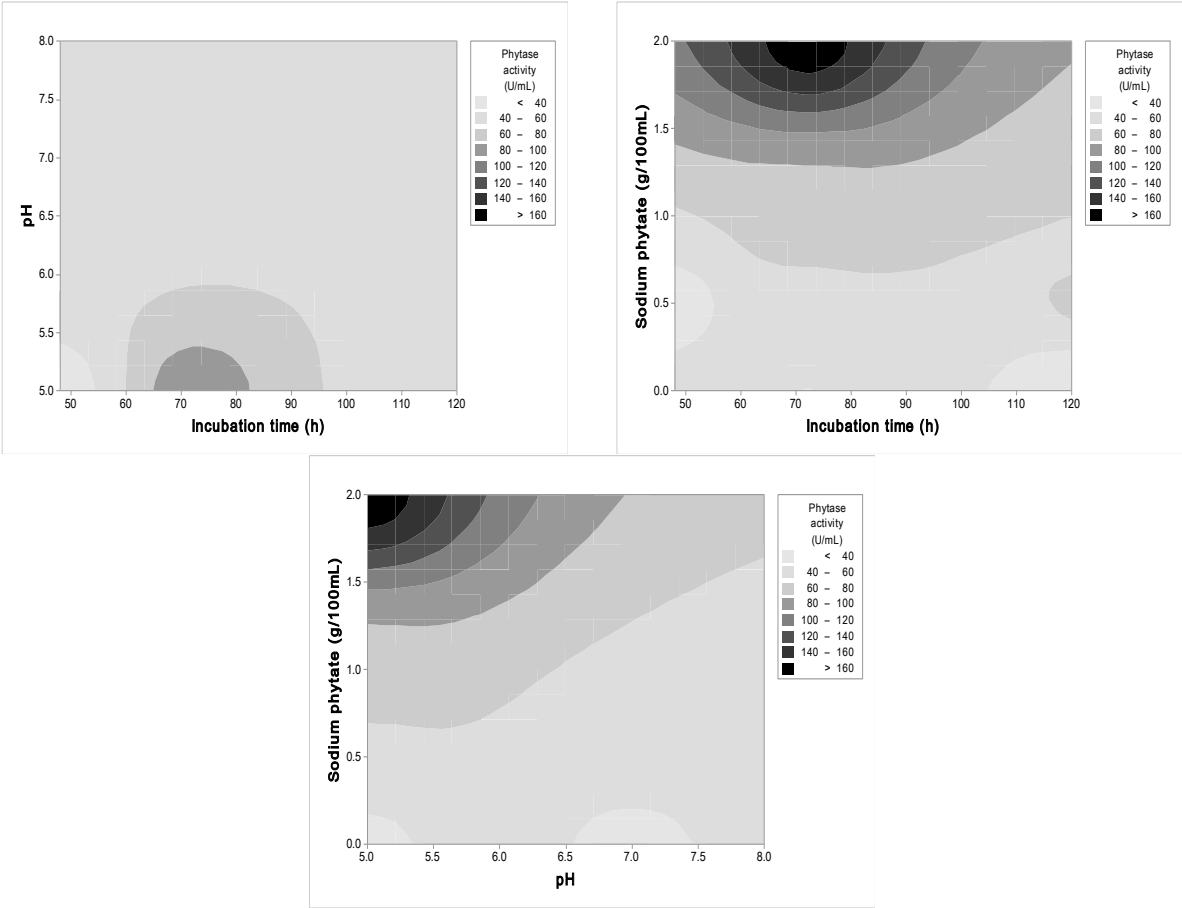
همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می شود، اسیدیته ۵ برای تولید آنزیم مناسب‌تر از اسیدیته‌های بیشتر است. این نتیجه با پژوهشی تطابق دارد که بادامچی[۹] و همکاران برای بهینه‌سازی تولید فیتاز با استفاده از *آسپرژیلوس فیکوم*[۱۰] به روش سطح پاسخ انجام دادند (۱۳). گارگوا[۱۱] و همکاران در مطالعه‌ای درباره تولید فیتاز توسط گونه‌ای از جنس *آسپرژیلوس*، بیشترین فعالیت فیتازی را در اسیدیته ۵ مشاهده کردند (۱۴). اسیدیته‌های اسیدی (۳ تا ۵)، برای تولید آنزیم فیتاز مناسب‌تر هستند.

بیشترین میزان فعالیت آنزیمی نیز پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد (شکل ۳ و ۵). قارچ *پنی‌سیلیوم* تا ۷۲ ساعت فعالیت فیتازی زیاد خود را حفظ می کند و پس از آن، محیط پر از کنیدیوسپورهای قارچ و رنگ محیط کدر می‌شود، اسپورها روی سطح شناور می‌شوند و حتی به جداره فلاسک شیشه‌ای می‌چسبند.

گارگوا و همکاران، بیشترین میزان فیتازی که گونه ای از *آسپرژیلوس* پس از ۱۹۲ ساعت تولید می کند را ۶۲/۵ $nkat/cm^3$ گزارش کردند (این مقدار تقریباً معادل ۳/۷ U/ml است) (۱۴). در پژوهش حاضر، سویه جداشده، آنزیمی با فعالیت بسیار بیشتر را در مدت زمان کوتاه‌تر تولید کرد (۱۷۱ U/ml در ۷۲ ساعت) که برتری سویه جداشده را نشان می‌دهد.




شکل ۴- اثر تداخل فاکتورها در یکدیگر




شکل ۵- نمودارهای کنتور درباره اثر دوبه‌دوی فاکتورها روی تولید فیتاز

## بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به مشکلات ناشی از حضور فیتات در دستگاه گوارش جانوران تک معده‌ای، پرهزینه بودن تولید فسفر به روش صنعتی و همچنین آلودگی‌های ناشی از استفاده فسفر به‌عنوان مکمل‌های دامی و مشکلات زیست‌محیطی دیگر، استفاده از آنزیمی مناسب نظیر فیتاز به‌عنوان مکمل در جیره غذایی این حیوانات ضروری است.

یکی از روش‌های تولید این آنزیم در مقیاس صنعتی که امروزه متداول شده، استفاده از قارچ هایی است که فعالیت فیتازی مناسبی دارند. در پژوهش حاضر، قارچ *پنی‌سیلیوم* مولد فیتاز از خاک مزارع کشاورزی جداسازی و شناسایی شد. آزمایش‌های انجام‌شده برای بهینه‌سازی تولید آنزیم فیتاز در این سویه نشان دادند که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در محیط حاوی ۲ گرم (در ۱۰۰ میلی‌لیتر) فیتات‌سدیم، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، اسیدیته ۵ و مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری ۷۲ ساعت، میزان ۱۷۱ U/ml است. درباره استفاده از سبوس گندم، منبع ارزان‌قیمت فیتات برای تولید فیتاز (۱۵)، بیشترین مقدار آنزیم تولیدشده ۶۱/۷ U/ml بود که در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۷ و مدت زمان گرم خانه‌گذاری ۷۲ ساعت مشاهده شد. اطلاعات ارائه شده در مقاله حاضر، نتایج ابتدایی جداسازی و بهینه‌سازی اولیه تولید آنزیمی هستند و پژوهش‌های بیشتر درباره آن مانند شناسایی مولکولی ریزموجودات مولد، بررسی وجودنداشتن مایکوتوکسین‌ها در آن، افزایش سطح تولید، تغییرهای فراتر در ترکیب محیط‌کشت قارچ و ایجاد موتاسیون در سویه مدنظر برای جداسازی موتان‌های پرتولید لازم هستند.

## References


(1) Sadati R., Barghi A. Isoaltion and identification of extracellular phytase-producing fungal in coastal waters of the Caspian Sea by ITS-PCR. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal* 2014; 4(14): 59-64.

(2) Lei GX., Poress JM. Phytase enzymology, applications and biotechnology. *Biotechnology Letters* 2013; 25: 1787-1794.

(3) Cao L., Wang W., Yang C., Yang Y., Diana J., Yakupitiyage A., et al. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology* 2007; 40: 497-507.

(4) Lei GX., Ku PK., Miller ER., Yokoyama MT., Ullrey DE. Supplementing corn-soybean meal diets with microbial phytase maximizes phytate phosphorus utilization by weanling pigs. *Journal of Animal Science* 1993; 71: 3368-3375.

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

(6) Shieh TR., Ware JH. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Applied Microbiology* 1968; 16: 1348-1351.

(7) Pandey A., Szakacs G., Soccol CR., Rodriguez-lion JA., Soccol VT. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology* 2001; 77: 203-214.

(8) Mafakher L., Mirbagheri M., Darvishi F., Nahvi I., Zarkesh-Esfahani H., Emtiazi G. Isoaltion of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. *New Biotechnology* 2010; 27: 337-340.

(9) Das S., Lyla PS., Ajmall Khan S. Filamentous fungal population and species diversity from the continental slope of Bay of Bengal, India. *Acta Oecologica* 2009; 35: 269-279.

(10) Heinonen JK., Lahti RJ. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal Biochemistry* 1981; 113: 313-317.

(11) Lee DH., Choi SU., Hwang Y. Culture conditions and characterizations of a new phytase-producing fungal isolate, *Aspergillus* sp. L117. *Journal of Mycobiology* 2005; 33: 223-229.

(12) Kumari MP., Kumar MS., Rao GN. Isoaltion of phytase producing fungi and optimization of production parameters. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences* 2011; 2: 161-176.

(13) Badamchi M., Hamidi-Esfahani Z., Abbasi S. Optimization of phytase production by *Aspergillus ficuum* in submerged fermentation using response surface methodology. *Iranian Journal of Food Science and Technology* 2014; 11(44): 155-162.

(14) Gargova S., Roshkova Z., Vancheva G. Screening of fungi for phytase production. *Biotechnology Techniques* 1997; 11(4): 221-224.

(15) Stevenson L., Philips F., O'Sullivan K., Walton J. Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2012; 63(8): 1001-1013.

---

[1]- *Aspergillus*
[2]- *Penicillium*
[3]- *Mucor*
[4]- *Rhizopus*
[5]- Unbalanced Factorial Design
[6]- General Linear MANOVA
[7]- Shieh and Ware
[8]- Lee
[9]- Badamchi
[10]- *Aspergillus ficum*
[11]- Gargova