

جداسازی و شناسائی قارچ‌های مولد آنزیم فیتاز به منظور استخراج و استفاده آنزیم در خوراک دام و طیور

- **فرگس واسجی** (نویسنده مسئول)
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج-ایران
- **سید عبدالله حسینی**
دانشیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج-ایران.
- **ناهید مژگانی**
دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج-ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۷

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۴۶۶۴۴۳۶

Email: n_vaseji@asri.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2019.121918.1703

چکیده

در مطالعه حاضر، قارچ‌های بومی تولید کننده فیتاز از خاک و دیگر نمونه‌های محیطی (شامل خاک اطراف ریشه گیاهان تیره لگومینوز، فضولات گاو و بز، بستر مرغ، ورمی کمپوست، خاک معدن فسفر معدنی، آب فاضلاب، گیاهان و میوه‌های آلوده شده به قارچ و نمونه‌های قارچی تهیه شده از موسسه رازی (کنترل)، جداسازی و ابتدا بر روی محیط‌سازور دکتروز آگار به مدت ۵ روز در انکوباتور و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه گذاری شدند. سپس به منظور شناسایی و جداسازی قارچ‌هایی که توانایی تولید آنزیم فیتاز را داشتند، از محیط کشت غربالگری فیتاز (PSM) استفاده گردید. خصوصیات مورفولوژیکی سویه‌های قارچی با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند. نمونه‌هایی که تولید هاله شفاف کرده بودند برای سنجش میزان فعالیت آنزیمی فیتاز بر مبنای آزاد شدن یک نانومول فسفر در مدت یک دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس میزان تولید آنزیم و مقدار بیومس تولیدی، تعدادی از گونه‌ها انتخاب شدند. بهترین محیط غربالگری و حداکثر فعالیت آنزیمی در $pH=5/5$ و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ثبت گردید. در پایان برای شناسایی کامل سویه‌های قارچ، روش توالی یابی با دستگاه ژنتیک آنالایزر مورد استفاده قرار گرفت. قارچ‌های فوزاریوم اگزیسپروم با ۱۳۰/۱۱ واحد آنزیمی و اسپرژیلوس نایجر با ۱۲۵/۲۷ واحد آنزیمی با بیشترین مقدار تولید فیتاز شناسایی و محدوده روز پنجم تا هفتم برای مرحله استخراج و خالص سازی به عنوان بهترین زمان معرفی شدند. نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی کاملاً منطبق با نتایج شناسایی مولکولی بودند.

واژه‌های کلیدی: فیتاز، قارچ، جداسازی، فوزاریوم اگزیسپروم، اسپرژیلوس نایجر

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 125 pp: 185-204

Isolation and identification of phytase producing fungi for extraction and use of enzymes in animal feed and poultry

By: Narges Vaseji¹, Seyed Abdollah Hosseini², Nahid Mojgani³

1 Member of scientific board, Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agriculture Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

2 Member of scientific board, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agriculture Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

3 Member of scientific board, Dept. of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Received: May 2018

Accepted: February 2019

In the present study, native fungi producing phytase from soil and other environmental samples (Includes: soil around the root of leguminous plants, Cows and goats excrement, Chicken floor, Vermicompost, Mineral phosphorus mine, Sewage water, Plants and fruits infected with fungi and Samples prepared from research centers of the country) were isolated and incubated for 5 days at 28 °C on SDA (Saburad Dextrose Agar). Then a phytase screening medium (PSM) was used to identify and isolate fungi capable of producing phytase enzyme. Morphological characteristics of fungal strains were studied using optical microscopy. Samples which produced clear halo were chosen for enzymatic activity assay based on the release of a phosphorus nanomol in one minute. Based on the amount of enzyme and amount of biomass production, were evaluated by the respective isolates. The optimum pH and temperature for maximum production of enzyme through the selected isolates were 5.5 and 30 °C, respectively. Finally, the isolates were identified as *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus Niger* using Genetic analyzer system. The maximum amount of enzyme production was recorded as 130.11 and 125.27 enzymatic units for *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus Niger*, respectively. The results showed that from five to seven days during enzyme culture are the most suitable time for enzyme extraction and purification. The results of morphological studies were completely consistent with the molecular identification results.

Key words: Phytase, Fungi, Isolation, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus Niger*.

مقدمه

مونواستر هیدرولازها به حساب می‌آیند، تحمل حرارتی بالایی دارند (Jorquera و همکاران، ۲۰۱۸) و قادر به هیدرولیز فیتات بوده و حداقل یک گروه فسفات را از این ماده آزاد می‌نمایند (Haefner و همکاران، ۲۰۰۵) این دسته از آنزیم‌ها در طبیعت گسترده هستند و فعالیت فیتازی در گیاهان، جانوران و ریزسازواره‌ها گزارش شده است (Greiner and Konietzny, 2006). استفاده از فیتاز میکروبی هم از نظر اقتصادی در جیره طیور به صرفه می‌باشد و هم موجب کاهش دفع فسفر به میزان ۳۰ تا ۵۰ درصد به ازاء اضافه کردن ۵۰۰ تا

فسفر دومین ماده معدنی فراوان در بدن حیوانات است. تغذیه طیور بر اساس تامین میزان دقیق فسفر مورد نیاز پرند می‌باشد. اسید فایتیک یا میواینوزیتول هگزاکسیس (IP6) در همه جای طبیعت یافت می‌شود و اصلی‌ترین ذخیره فسفر در دانه گیاهان می‌باشد و می‌توان آن را تا بیش از هشتاد درصد فسفر گیاه به حساب آورد. مابقی فسفر موجود در گیاه را فسفر غیر آلی محلول و فسفر سلولی (فسفر باند شده با اسید نوکلئیک، پروتئین فسفریله شده، فسفولیپیدها و قندهای فسفردار) تشکیل می‌دهند (Brinch و همکاران، ۲۰۰۲). فیتازها گروه ویژه‌ای از فسفاتازها یا فسفریک

کشور، سالانه بالغ بر ۶ میلیون تن خوراک مصرف می‌گردد. تمامی آنزیم فیتاز مورد استفاده در این صنعت وارداتی بوده و سالیانه مبالغ هنگفتی ارز از کشور خارج می‌شود. لذا انجام طرحی در زمینه بررسی امکان تولید فیتاز میکروبی در داخل کشور ضروری است. یکی از منابع تولید آنزیم فیتاز قارچ‌ها هستند که سهم بالایی را در تولید آنزیم مصرفی در صنعت دارند. لذا این پروژه با هدف جداسازی و شناسایی قارچ‌های تولیدکننده فیتاز انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی قارچ‌ها

نمونه‌های محیطی مورد استفاده شامل ۲ نمونه خاک، ۴ نمونه خاک اطراف ریشه گیاهان تیره لگومینوز (Singh et al و همکاران، ۲۰۱۳)، ۲ نمونه فضولات گاو و بز (Sreedevi and Reddy, 2013)، ۲ نمونه بستر مرغ (Sasirekha و همکاران، ۲۰۱۲)، ۱ نمونه ورمی کمپوست، ۲ نمونه خاک معدن فسفر معدنی، ۳ نمونه آب فاضلاب، ۱ نمونه گیاهان و میوه‌های آلوده شده به قارچ و ۲ نمونه قارچ اسپرژیلوس تهیه شده از موسسه رازی بودند. برای تهیه نمونه، از عمق ۳-۴ سانتی‌متری خاک پس از زدودن ضایعات ریشه و سنگ‌ریزه‌ها و الک خاک با الک یک میلی‌متری، نمونه‌ها درون ظروف مخصوص جمع‌آوری شدند و طبق روش Ocampo و همکاران (۲۰۱۲)، رقیق‌سازی نمونه‌ها انجام گرفت. برای اطمینان از عدم رشد باکتری‌ها، میزان ۵۰ میلی‌گرم از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به نمونه‌ها اضافه شد.

۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت در محیط‌های کشت SDA^۱ (محیط کشت عمومی قارچی) تلقیح شد و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای بدست آوردن کلنی

۱۰۰۰ واحد آنزیم فیتاز می‌گردد. این میزان برای جایگزینی با ۱ گرم فسفات معدنی در جیره غذایی دام استفاده می‌شود (Lei and Pores, 2003). افزودن فیتاز به خوراک دام، جذب فیتات را افزایش داده و آلودگی خاک را کاهش می‌دهد (Neira-Vielma و همکاران، ۲۰۱۷). تخمین زده شده جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ میلادی به بیش از ۹ میلیارد و چهار صد میلیون نفر می‌رسد. افزایش بیش از حد جمعیت، افزایش درخواست محصولات کشاورزی، کمبود مواد غذایی و در نهایت افزایش قیمت آن‌ها را به دنبال خواهد داشت. با توجه به محدودیت منابع تولید و مواد اولیه، افزایش تولید با محدودیت‌ها و چالش‌هایی درگیر است. از سوی دیگر، استفاده بیش از حد از سموم، کودهای شیمیایی و ... سبب آلودگی بیش از حد زیست کره و به خطر افتادن حیات بشر و سایر موجودات زنده شده است. از این رو استفاده بهینه از نهاده‌های تولید از قبیل آب، خاک، مواد آلی و معدنی و ...، کاملاً ضروری است که در این راستا علوم و فن‌آوری‌های نوین نظیر بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک می‌توانند راه حل مناسبی برای کاهش آلودگی منابع طبیعی، افزایش و بازدهی تولید، کاهش هزینه‌ها و در نهایت کاهش قیمت باشند. با توجه به درصد بالای فسفر فیتاتی در غلات و استفاده از غلات به عنوان منبع اصلی در تغذیه طیور، همچنین عدم توانایی تکمیل معده‌ای‌ها برای تولید این آنزیم، استفاده از مکمل‌های آنزیمی در خوراک بخصوص تکمیل معده‌ای‌ها بسیار مورد استقبال تولیدکننده‌ها قرار گرفته است به طوری که به عنوان مثال، ارزش اقتصادی فروش آنزیم فیتاز در دنیا مبلغی بالغ بر ۵۰۰ میلیون دلار برآورد شده است (Vatsa and Banerjee, 2004). در کشور ما بیشترین سرمایه‌گذاری بعد از صنعت نفت به صنعت طیور اختصاص یافته است و امروزه تولید گوشت مرغ و تخم مرغ سالانه در کشور به ترتیب حدود ۲ میلیون تن و ۹۰۰ هزار تن است. با توجه به ضریب تبدیل حدود ۲ در

^۱- Saburad Dextrose Agar

ریخته شد و رسوبات با آب مقطر استریل رقیق شدند. ۱۰۰۰ ماکرولیتر که طبق رفرنس تقریباً برابر $10^7 \times 2$ اسپور در هر میلی‌متر است به‌عنوان مایع تلقیح برای کشت استفاده شد (Lee و همکاران، ۲۰۰۵). محیط‌های کشت شده به مدت ۳-۵ روز در انکوباتور با درجه حرارت 30°C قرار داده شدند.

برای دیدن هاله‌ها با وضوح بیشتر و حذف نتایج کاذب مثبت^۲ اقدام به رنگ‌آمیزی نمونه‌ها شد. برای این منظور ظروف با محلول کلرید کبالت ۲٪ برای مدت ۵ دقیقه پوشانیده شدند. سپس محلول کلرید کبالت با محلول آمونیوم مولبیدات ۶/۲۵٪ و آمونیوم وانادات ۰/۴۲٪ (Merck - آلمان) به نسبت مساوی جایگزین گردید (De angelis, 2003; Bae و همکاران، ۱۹۹۹; Yanke و همکاران، ۱۹۹۹). این روش رنگ‌آمیزی به دیدن راحت‌تر هاله‌ها کمک می‌کند و نشان می‌دهد که هاله‌های ایجاد شده در اثر تولید آنزیم فیتاز و تجزیه فیتات موجود در محیط است، زیرا این احتمال وجود دارد که هاله‌های ایجاد شده در پلیت‌ها به دلیل ایجاد اسید و تغییرات pH در پلیت باشد.

تک کلون‌هایی که در محیط‌های کشت ایجاد هاله کرده بودند برای آزمایشات بعدی از سایرین جدا شدند.

سنجش فعالیت آنزیمی و مشخص کردن فسفر آزاد شده
یک واحد آنزیمی مقدار آنزیمی است که برای آزاد شدن یک نانومول فسفر در مدت یک دقیقه لازم است.

(Sasirekha و همکاران، ۲۰۱۲). برای مشخص کردن فعالیت آنزیمی قارچ‌ها از دو محیط کشت مایع اختصاصی غربالگری فیتاز PSM F و محیط مایع عصاره سبوس گندم^۴ استفاده شد. برای تهیه عصاره سبوس گندم ۱ کیلوگرم از سبوس را در ۱۰ لیتر آب به مدت ۱ ساعت و در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو کرده و

خالص، از هر نمونه کشت مجدد انجام شد و در انکوباتور با شرایط یاد شده قرار گرفتند. در پایان ۵۴ نمونه کلنی خالص از قارچ‌های مورد مطالعه بدست آمد. اکثر قارچ‌های مولد فیتاز از خاکها و بخصوص خاک اطراف ریشه گیاهان تیره لگومینوز جداسازی شدند. از سایر نمونه‌ها قارچ مولد فیتاز جدا نشد.

شناسایی مورفولوژیکی قارچ‌ها

شناسایی اولیه قارچ‌ها با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی و ظاهر کلنی‌ها و تهیه اسلاید از نمونه‌های جداسازی شده در مرحله غربالگری به وسیله میکروسکوپ نوری (Nikon K, Japan) مجهز به دوربین دیجیتال صورت گرفت. برای تهیه اسلایدهای دائم از لاکتوفنل و آب برای قارچ‌های دارای رنگ‌ریزه و از متیلن بلو و انیلین بلو برای قارچ‌های فاقد رنگ‌ریزه استفاده شد. لامل روی نمونه‌ها، با لاک ناخن بی‌رنگ ثابت گردید. تصاویر قارچ‌ها با کلیدهای شناسایی قارچ مقایسه و شناسایی اولیه قارچ‌ها انجام گرفت (Gontia-mishra و همکاران، ۲۰۱۳).

شناسایی قارچ‌های تولیدکننده فیتاز

به‌منظور شناسایی و جداسازی قارچ‌هایی که توانایی تولید آنزیم فیتاز را داشتند، از هشت نوع محیط کشت اختصاصی به نام محیط کشت غربالگری فیتاز^۲ (PSM) استفاده گردید. در تمامی این محیط‌های کشت، کلسیم فیتات و سدیم فیتات بعد از اتوکلاو کردن محیط کشت از طریق فیلتر ۰/۲ میکرون میلی پور به محیط اضافه شدند.

(Sasirekha; Khan and Ghosh, 2012) و همکاران، ۲۰۱۲; Ocampo و همکاران، ۲۰۱۲)

جهت بررسی قارچ‌های دارای اسپور، محیط کشت مایع حاوی قارچ با دور ۳۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. لایه رویی دور

2- Phytase Screening Media

3- False positive

4- Wheat Bran Extract

قرار گرفتند. با توجه به تعداد بالای نمونه‌ها، نبود امکان تست تمام آن‌ها در محیط‌های مختلف و با توجه به تولید آنزیم فیتاز در خانواده آسپرژیلوس، تعدادی از نمونه‌های متعلق به این خانواده برای غربالگری در محیط‌های A تا H در چند pH مختلف بررسی شدند. برای به دست آوردن زمان بیشترین فعالیت آنزیمی، قارچ‌ها در محیط PSM (C) کشت و درون انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ RPM به مدت ۷ روز گرمخانه گذاری شدند.

اندازه‌گیری بیومس

همه تک کلون‌های قارچی مولد فیتاز، جهت اندازه‌گیری بیومس، در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت سابورو دکستروز براث، کشت داده شدند. این ارلن‌ها در pH=۷ و دماهای ۲۰-۳۰-۴۰ درجه، به مدت ۳-۷-۱۴-۲۰-۳۰ روز، در انکوباتور شیکردار قرار داده شدند. بیومس به عنوان وزن قارچ در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع تعریف شد (Lee و همکاران، ۲۰۰۵). این مرحله برای قارچ‌های ۱-۲-۳-۶-۷-۸ انجام شد. نمونه ۵ به دلیل ماهیت مخمری و نمونه ۴ به دلیل عدم رشد مناسب در محیط‌ها از آزمایش حذف شدند.

شناسایی مولکولی قارچ‌ها

برای شناسایی مولکولی قارچ‌ها، ابتدا DNA استخراج گردید. سپس، واکنش در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر با کمک دستگاه ترموسایکل ساخت شرکت Bio-Rad انجام شد. توالی پرایمرهای (شرکت سیناژن) زیر مورد استفاده قرار گرفت.

سپس این محلول از صافی عبور داده شد (Powar و همکاران، ۱۹۸۲).

تک کلنی‌های خالص انتخاب شده برای سنجش میزان فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند. مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع PSM در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. تک کلنی‌های منتخب، در این محیط‌ها کشت داده شده و به مدت ۵ روز در انکوباتور شیکردار با دور ۲۲۰-۲۰۰ در دقیقه و درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از این مدت، محلول‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن^۵ شماره یک صاف گردید و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول صاف شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر از مایع بالایی محلول‌های سانتریفیوژ شده همراه با ۸۰۰ میکرو لیتر از بافر استات pH=۵/۵ که محتوی ۰/۲ مولار سدیم فیتات بود در لوله‌های آزمایش ریخته شدند و به مدت یک ساعت در انکوباتور با درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از یک ساعت، ۱ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک ۱۰٪ درون لوله‌های آزمایش ریخته شد و به خوبی تکان داده شد. سپس ۵/۰ میلی‌لیتر از محلول از هر لوله جدا و در لوله‌هایی که حاوی محلول استون، آمونیوم مولیبدات ۱۰ میلی‌مولار و اسید سولفوریک ۵ نرمال به ترتیب از راست به چپ با نسبت‌های ۱:۱:۲ است، ریخته و به خوبی تکان داده شدند. مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت Merck آلمان تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر^۶ (ساخت شرکت بیو رد^۷ کشور فرانسه) در طول موج ۴۱۵ نانومتر مقدار جذب خوانده شد (Sasirekha و همکاران، ۲۰۱۲؛ 1983 , Howson). برای به دست آوردن بهینه فعالیت آنزیمی در بهترین pH، نمونه‌های انتخاب شده در pH ۵-۵/۵-۶ و ۷ در دو محیط کشت PSM C-G و عصاره سبوس گندم مورد ارزیابی

⁵- Whatman

⁶- Spectrophotometr

⁷ Bio-Rad

Its1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
Its4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

تجزیه آماری

نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 15.0) ارزیابی شدند.

نتایج

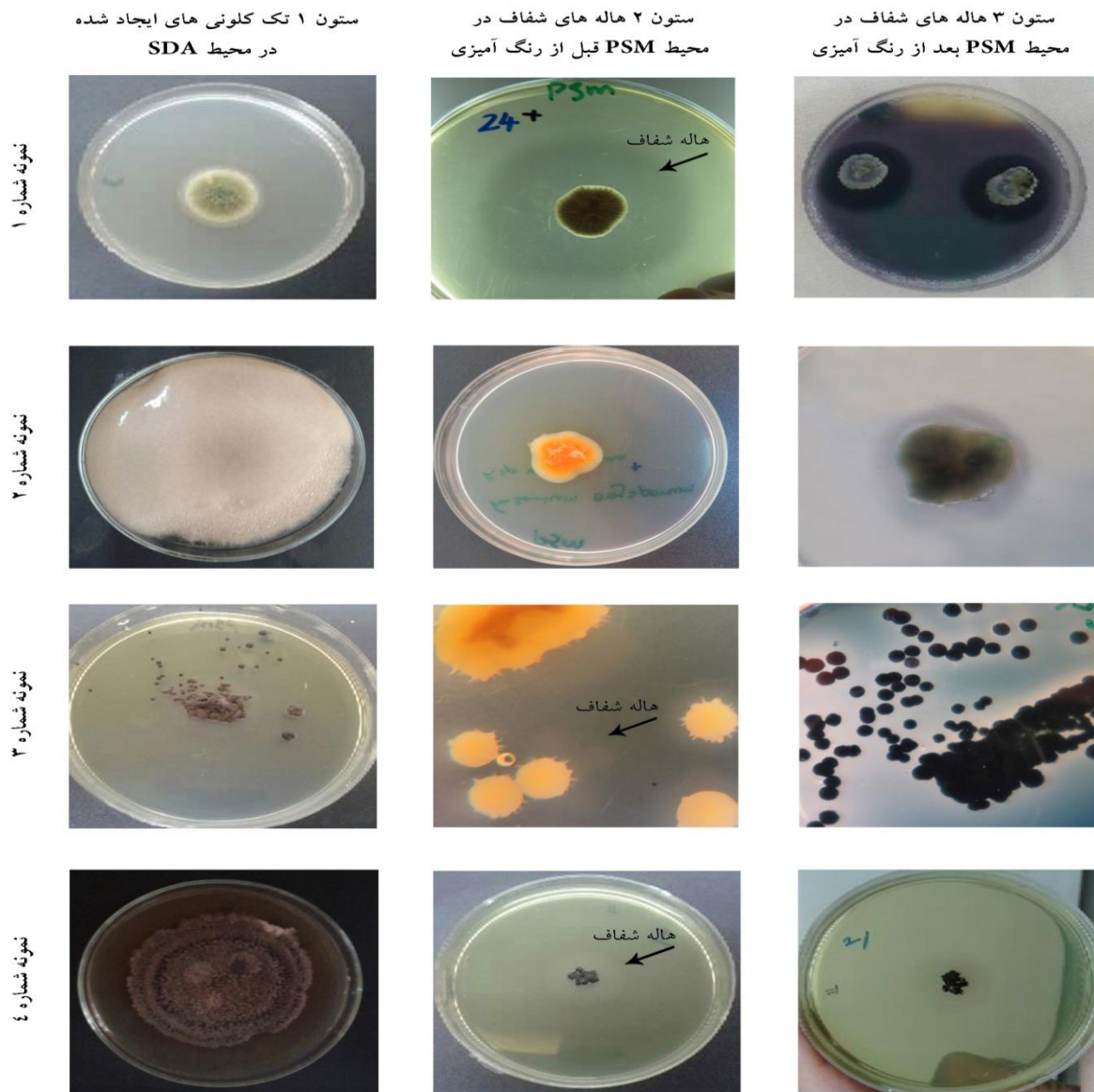
تک کلنی های جدا شده از منابع مختلف

از میان نمونه های جداسازی شده پس از رنگ آمیزی با محلول امونیوم وانادات، امونیوم مولیبدات و کلرید کبالت، تعداد ۸ نمونه ایجاد هاله شفاف کردند (شکل های ۱ و ۲).

محصول PCR با استفاده از دستگاه ژنتیک آنالایزر (USA). 3730/3730xl DNA Analyzers) توالی یابی شد. نتایج حاصله با استفاده از سایت NCBI^۸ در قسمت BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به و توالی های موجود در سایت اقدام به شناسایی نژاد و گونه قارچ ها گردید (میزان شباهت و نمره داده شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI برای هر دو قارچ اسپرژیلوس نایجر و فوزاریوم اگریسپروم، ۱۰۰٪ بود).

کلونی PCR

کلونی PCR روشی جدید برای تامین DNA ژنومی از بافت برای PCR است (Mirhendi و همکاران، ۲۰۰۷) که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. انجام کلونی PCR مستقیم از بافت قارچ های جداسازی شده با پرایمرهای Its1, Its4 انجام شد، با این تفاوت که به جای استفاده از DNA استخراجی، مستقیماً از بافت استفاده و در زمان صرفه جویی شد. بهترین زمان برای استفاده از بافت قارچ ۵-۴ روز پس از کشت است (Mirhendi و همکاران، ۲۰۰۷؛ Anna Lau و همکاران، ۲۰۰۸). به وسیله نوک سمپلر حدود ۱ میلی متر مکعب از کلونی برداشته و به عنوان نمونه DNA جهت کلونی PCR استفاده شد.

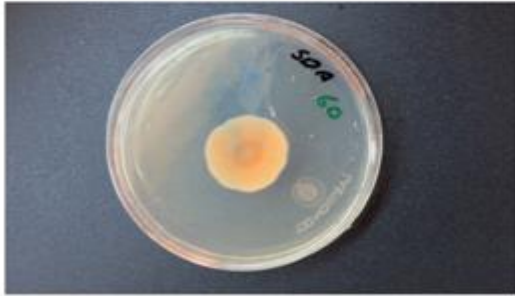


شکل ۱- ستون ۱: تک کلنی های جداسازی شده. ستون ۲: هاله های شفاف قبل از رنگ آمیزی. ستون ۳: هاله ها بعد از رنگ آمیزی با کلرید کبالت و آمونیوم مولیبدات و آمونیوم وانادات

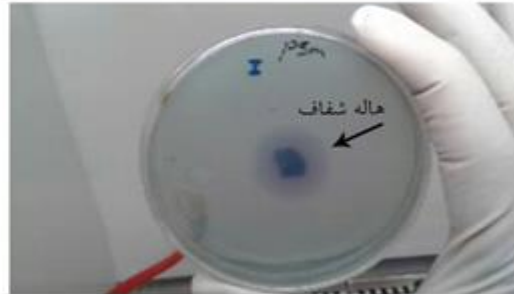
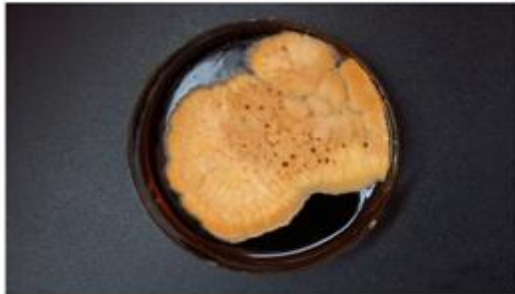
ستون ۱ تک کلونی های ایجاد شده در محیط SDA

ستون ۲ هاله های شفاف در محیط PSM بعد از رنگ آمیزی

نمونه شماره ۵



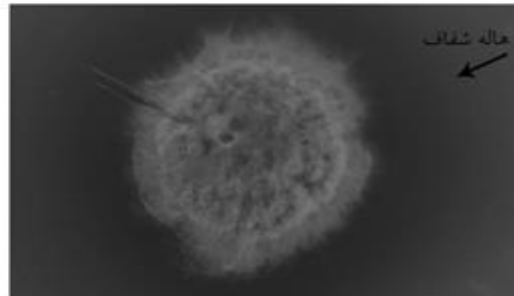
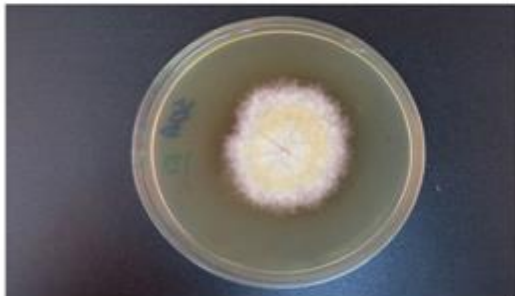
نمونه شماره ۶



نمونه شماره ۷



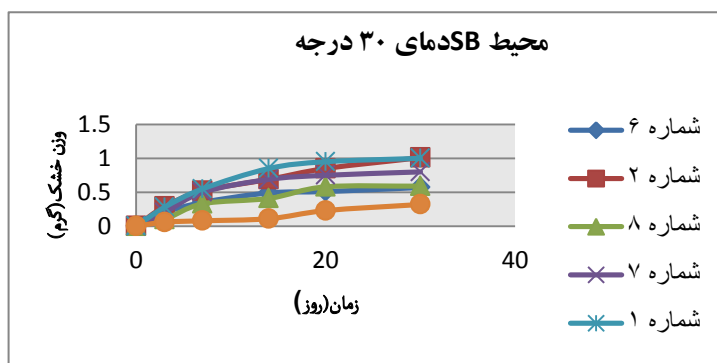
نمونه شماره ۸



شکل ۲- ستون ۱: تک کلنی های جداسازی شده. ستون ۲: هاله ها بعد از رنگ آمیزی با کلرید کبالت و آمونیوم مولیبدات و آمونیوم وانادات

اندازه‌گیری بیومس قارچ‌ها

با توجه به تعریف مقدار وزن خشک قارچ‌ها شاخصی از رشد قارچ در نظر گرفته شد. بیشترین مقدار رشد قارچ‌ها در محیط‌های SDA و PSM درون انکوباتور شیکردار با ۱۲۰ دور در دقیقه بود. نتایج نشان دهنده مقدار رشد بیشتر در محیط سابورو دکستروز براوٹ و مناسب تر بودن این محیط برای رشد نمونه‌های انتخاب شده بود. میانگین رشد قارچ‌ها در این محیط برابر ۰/۴۸۳ گرم بود که در نمودار ۱ نشان داده شده است.



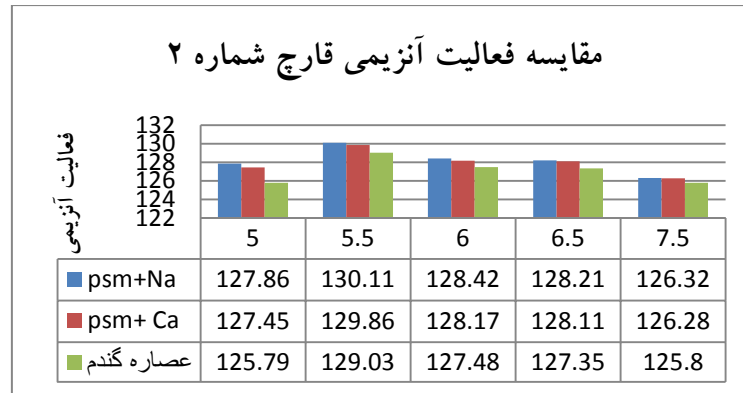
نمودار ۱- مقدار وزن خشک قارچ‌ها بر حسب زمان در محیط سابورو دکستروز براوٹ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد

اثر pH و محیط‌های کشت مختلف بر فعالیت آنزیمی

مقایسه فعالیت فیتازی در محیط PSM با سدیم (محیط C)، PSM با کلسیم (محیط D) و عصاره سبوس گندم برای قارچ‌های شماره ۱-۲-۶-۷-۸ در دمای ۳۰ درجه سانتی-گراد با ۱۲۰ RPM پس از پنج روز قرار گرفتن درون انکوباتور در نمودار ۲ نشان داده شده است. همچنین، نتایج حاصل از مقدار فعالیت فیتازی برای قارچ‌های شماره ۲ و ۷ که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بودند (جدا شده از خاک اطراف ریشه گیاهان تیره لگومینوز) در محیط PSM با سدیم (محیط C)، PSM با کلسیم (محیط G) و عصاره سبوس گندم در pH های ۷/۵-۶/۵-۶-۵/۵ در دمای ۳۰ درجه در روز پنجم، ارائه شده است.

در نهایت محیط کشت G,C با تغییر pH از ۵/۵ به ۷ و تبدیل گلوکز به دی ساکارز بهترین و شفاف ترین هاله را در بین سایر نمونه‌ها نشان دادند. با توجه به قیمت بالای مواد مورد استفاده در محیط G و دریافت نتیجه مطلوب در هر دو محیط، همچنین واکنش رنگی بسیار متفاوت سدیم فیتاز نسبت به کلسیم فیتاز در مقابل کلرید کبالت در مرحله رنگ آمیزی محیط C به عنوان محیط غربالگری فیتاز انتخاب شد.

بیشترین مقدار رشد قارچ‌ها مربوط به محیط سابورو دکستروز براوٹ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود که نتایج فوق مرتبط با تحقیقات لی و همکاران (۲۰۰۵)، گراگوا و همکاران (۱۹۹۷) و هرا و همکاران (۲۰۰۳) بود. شایان ذکر است اندازه‌گیری برای دمای ۴۰ درجه با توجه به نتایج حاصله و به دلیل تبخیر محیط پس از روز ۲۰ متوقف شد. نمودار رشدی قارچ‌ها در دمای ۴۰ درجه تقریباً به صورت خطی بود. با توجه به نمودار (۱) تا روز ۲۰، نمودار رشد قارچ‌ها از شیب قابل توجهی برخوردار بود ولی از روز ۲۰ به بعد شیب نمودار رشد به طور محسوسی کاهش یافت. نمونه‌های ۱-۲-۶-۷-۸ برای سنجش آنزیمی مورد ارزیابی تست فسفر قرار گرفتند. نمونه شماره ۳ به دلیل فعالیت بسیار پائین از آزمایش حذف شد. برای به دست آوردن فعالیت آنزیمی اقدام به مقایسه غلظت فسفر نمونه‌ها با منحنی استاندارد فسفر شد.



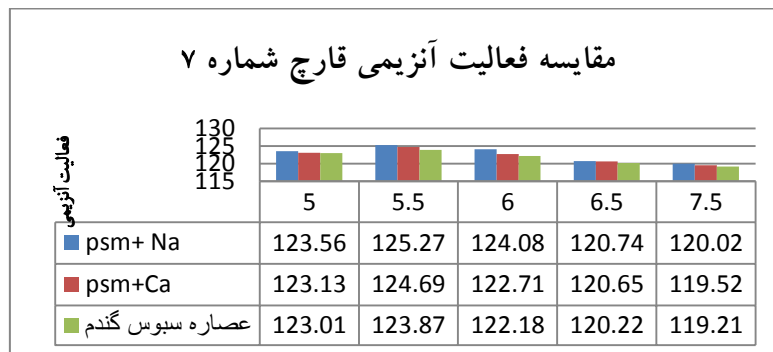
نمودار ۲- فعالیت آنزیمی قارچ شماره ۲ در محیط‌ها و pH های مختلف

جدول ۱- میانگین فعالیت آنزیمی قارچ شماره ۲ در محیط‌ها و pH های مختلف \pm انحراف معیار

	pH ۵	pH ۵/۵	pH ۶	pH ۶/۵	pH ۷/۵
PSM+ Na	۱۲۷/۸۶ \pm ۲/۸۶	۱۳۰/۷۴ \pm ۳/۱۰۳۳	۱۲۸/۴۲ \pm ۲/۶۴	۱۲۸/۲۱ \pm ۱/۷۳۲	۱۲۶/۳۲ \pm ۲
PSM+ ca	۱۲۷/۴۵ \pm ۰/۴۵	۱۲۹/۸۶ \pm ۱	۱۲۸/۱۷۳ \pm ۱/۰۴۵	۱۲۵/۱۲۶۷ \pm ۰/۵۲	۱۲۶/۲۸ \pm ۰/۴
عصاره گندم	۱۲۵/۷۹ \pm ۰/۵۳	۱۲۹/۰۳۶ \pm ۰/۶۱	۱۲۷/۴۸ \pm ۰/۶	۱۲۷/۳۶ \pm ۱/۱۹	۱۲۵/۸ \pm ۰/۲

محیط کشت عصاره سبوس گندم با pH=۷/۵ ثبت گردید (نمودار ۲ و جدول ۱).

نمونه شماره ۲ در pH= ۵/۵ و در محیط کشت PSM + Na بیشترین فعالیت آنزیمی (۱۳۰/۱۱ واحد آنزیمی) را از خود نشان داد و کمترین فعالیت آنزیمی (۱۲۵/۸ واحد آنزیمی) به دست آمده در



نمودار ۳- فعالیت آنزیمی قارچ شماره ۷ در محیط‌ها و pH های مختلف

جدول ۲- میانگین فعالیت آنزیمی قارچ شماره ۷ در محیط‌ها و pH های مختلف \pm انحراف معیار

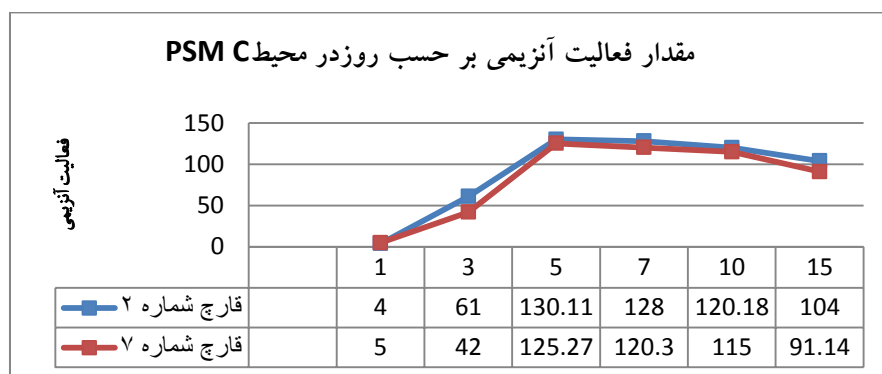
	pH ۵	pH ۵/۵	pH ۶	pH ۶/۵	pH ۷/۵
PSM+ Na	۱۲۳/۵۶ \pm ۰/۵۲	۱۲۵/۲۷ \pm ۰/۳۸	۱۲۴/۰۸ \pm ۰/۰۸	۱۲۰/۷۴ \pm ۰/۵۶	۱۲۰/۰۲ \pm ۰/۰۱
PSM+ ca	۱۲۳/۱۳ \pm ۰/۱۰	۱۲۴/۶۸۷ \pm ۰/۱۸	۱۲۲/۷۱ \pm ۰/۵۴	۱۲۰/۶۵ \pm ۰/۰۴	۱۱۹/۵۲ \pm ۰/۴۴
عصاره گندم	۱۲۳/۰۱ \pm ۰/۰۰۵	۱۲۳/۸۷ \pm ۰/۱۸	۱۲۲/۱۸ \pm ۰/۱۴	۱۲۰/۲۲ \pm ۰/۰۵	۱۱۹/۲۱ \pm ۰/۶۱

نمونه شماره ۷ در pH= ۵/۵ و در محیط کشت PSM + Na بیشترین فعالیت آنزیمی (۱۲۵/۲۷ واحد آنزیمی) را از خود نشان داد و کمترین فعالیت آنزیمی (۱۱۹/۲۱ واحد آنزیمی) به دست آمده در محیط کشت عصاره سبوس گندم با pH= ۷/۵ ثبت گردید (نمودار ۳ و جدول ۲).

اثر زمان بر فعالیت آنزیمی

بدانیم چه زمانی مناسب‌ترین و بهترین زمان برای استفاده از هزینه‌های صورت گرفته است. این امر، دلیلی بر شناسایی زمان بیشترین فعالیت آنزیمی پس از کشت نمونه‌ها است. به این ترتیب نمونه‌های شماره ۲ و ۷ که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بودند (نمودار ۴ و جدول ۳).

در تولید صنعتی یکی از مهمترین پارامترها برای ارزیابی روند تولید، توجیه اقتصادی و به عبارت ساده‌تر مقرون به صرفه و اقتصادی بودن تولید است. زمان، یکی از مهمترین فاکتورها در این مورد است. به این معنی که با توجه به هزینه‌های تمام شده باید



نمودار ۴- سنجش آنزیمی قارچ‌های شماره ۲ و ۷ در محیط PSM (C) در واحد روز

جدول ۳- میانگین سنجش آنزیمی قارچ‌های شماره ۲ و ۷ در محیط PSM (C) در واحد روز \pm انحراف معیار

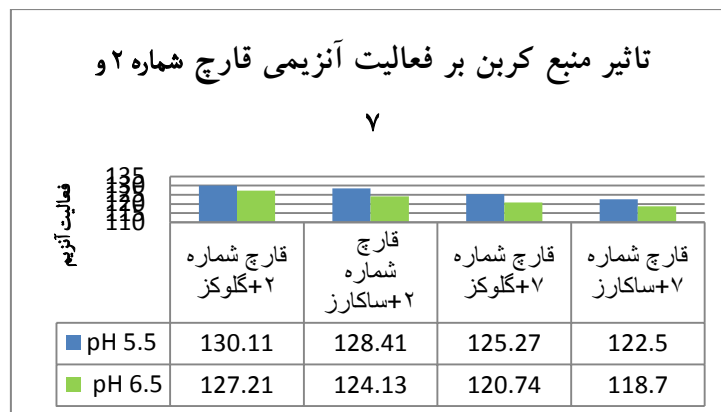
	روز ۱	روز ۳	روز ۵	روز ۷	روز ۱۰	روز ۱۵
قارچ شماره ۲	۴±۰/۵	۶۱±۰/۱۲	۱۳۰/۱۱±۰/۷۱۵۰۰۶	۱۲۸±۰/۲	۱۲۰/۱۸±۰/۰۵	۱۰۴±۰/۲۱
قارچ شماره ۷	۵±۰/۰۱	۴۲±۰/۲۳	۱۲۵/۲۷±۰/۰۵	۱۲۰/۳±۰/۴۸	۱۱۵±۰/۲	۹۱/۱۴±۰/۰۸

با توجه به نمودار، بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی مربوط به روز پنجم با ۱۳۰/۱۱ (واحد آنزیمی) است و از روز پنجم به بعد فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد.

تأثیر منبع کربن روی فعالیت آنزیمی

مونوساکارید (گلوکز) و قند دی ساکارید (ساکارز) بر فعالیت آنزیمی نمونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت (نمودار ۵).

کربوهیدرات به عنوان منبع تهیه انرژی جزء اصلی و ضروری هر محیط کشت است. قندها معمولی‌ترین کربوهیدرات‌های مورد استفاده در محیط کشت می‌باشند. در این راستا، تأثیر قند



نمودار ۵- تاثیر منبع کربن بر فعالیت آنزیمی در pHهای ۵/۵ و ۶/۵

جدول ۴- میانگین تاثیر منبع کربن بر فعالیت آنزیمی در pHهای ۵ و ۵/۵ ± انحراف معیار

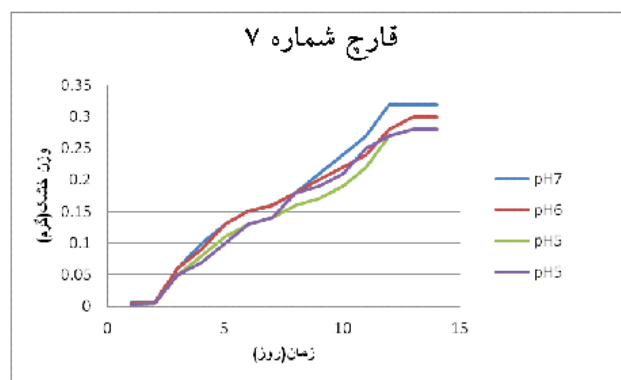
	قارچ ۲+گلوکز	قارچ ۲+ساکارز	قارچ ۷+گلوکز	قارچ ۷+ساکارز
pH ۵/۵	۱۳۰/۱۱±۰/۷۳	۱۲۸/۴۱±۰/۱۰۵	۱۲۵/۲۷±۰/۵۲	۱۲۲/۵±۰/۷۱
pH ۶/۵	۱۲۷/۲۱±۰/۱۶	۱۲۴/۱۳±۰/۵۳	۱۲۰/۷۴±۰/۸۵۱	۱۱۸/۷±۰/۰۷

در کلیه نمونه‌ها، فعالیت آنزیمی محاسبه شده نشان داد که میزان فعالیت آنزیمی در محیط‌های کشت حاوی گلوکز بیشتر از محیط‌های کشت حاوی ساکارز بوده است و قارچ شماره ۲ دارای فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به قارچ شماره ۷ دارد.

اثر pH بر رشد قارچ‌ها

نمودار ۶ نشان دهنده مقایسه رشد قارچ شماره ۷ در pHهای ۵ - ۵/۵ و ۶ - ۷ است.

pH از مهم‌ترین و تاثیرگذارترین فاکتورهای فیزیکی - شیمیایی موجود در محیط‌های کشت می باشد. pH محیط کشت بر قابلیت حل شدن مواد غذایی، در دسترس بودن عناصر موثر است.



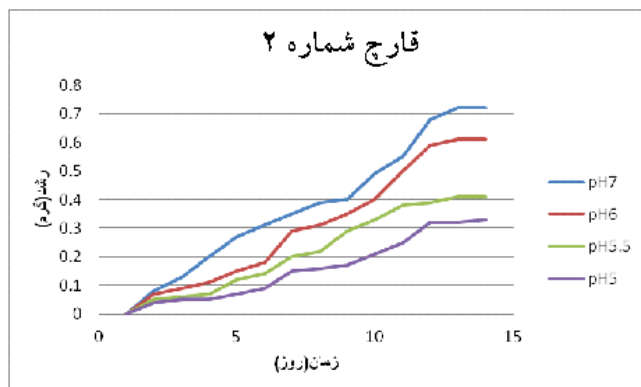
نمودار ۶- مقایسه وزن خشک قارچ شماره ۷ در pHهای متفاوت

قارچ شماره ۷ است، بیشترین مقدار رشد مربوط به pH=۷ در روز ۱۴ با عدد ۰/۳۲ بود. نکته قابل تامل در مورد این قارچ، میانگین

با توجه به نمودار که نشان دهنده بیشینه رشد در طول ۱۴ روز در pHهای ۵ - ۵/۵ - ۶/۵ و ۷ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای

تغییر محسوسی در مقدار رشد قارچ مشاهده نشد.

رشد بالا در هر چهار pH بود. لازم به ذکر است، اندازه‌گیری تا روز ۱۴ صورت گرفت زیرا به دلیل اتمام مواد غذایی محیط کشت



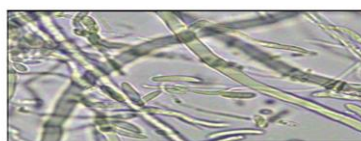
نمودار ۷- مقایسه وزن خشک قارچ شماره ۲ در pH های متفاوت

میکروکنیدی‌ها فراوان، تک سلولی، تخم مرغی و قلوهای هستند. قارچ، فیالیدهای منفرد و کوتاه در روی ریشه‌های هوایی تولید می‌کند. ماکروکنیدی‌ها، داسی شکل تا کمی کشیده بودند و اغلب دارای سه تا پنج جدار عرضی نازک می‌باشند. سلول انتهایی ماکروکنیدی نوک تیز و کمی خمیده و سلول پایه آن پاشنه‌ای شکل می‌باشد. این گونه پراکنش جهانی داشته و یک گونه توکسین زا می‌باشد (Nelson و همکاران، ۱۹۸۳). با توجه به تطابق‌های صورت گرفته، قارچ شماره ۲ فوزاریوم آگریسپروم و قارچ شماره ۷ اسپرژیلوس نایجر تشخیص داده شد. هر دو این نمونه‌ها از خاک اطراف ریشه گیاهان تیره لگومینوز جدا شده بودند.

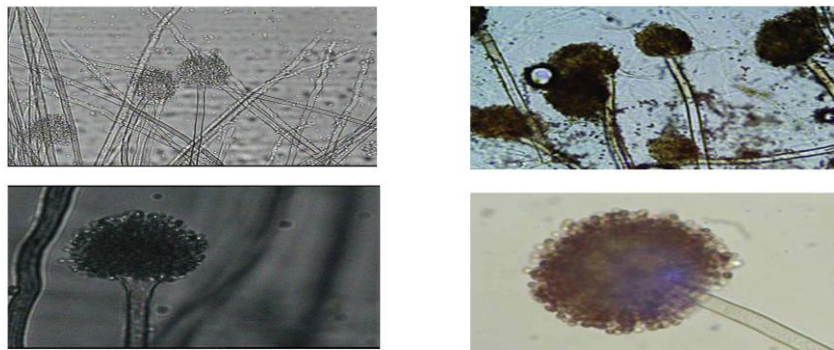
نمودار ۷ نشان دهنده بیشینه رشد در طول ۱۴ روز در pH های ۵ - ۷ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای قارچ شماره ۲ است و بیشترین مقدار رشد مربوط به $\text{PH} = 7$ در روز ۱۴ با عدد ۰/۷۲ بود. با توجه به نمودار، سریع‌ترین بازه زمانی برای رشد در $\text{pH} = 7$ از روز نهم تا دوازدهم است.

بررسی‌های مورفولوژیکی و شناسایی اولیه قارچ‌ها

شناسایی جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ظاهری از قبیل شکل کلنی و ماکروکنیدیوم صورت گرفت. این قارچ در محیط کشت‌های مختلف ظاهری متفاوت دارد. کلنی‌ها رشد سریع دارند، کرک مانند تا پنبه ای هستند با میسلیم‌های هوایی سفید رنگ تا کرم، رنگ پشت پلِت نیز کرم رنگ است.



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپی قارچ شماره ۲ (فوزاریوم آگریسپروم)

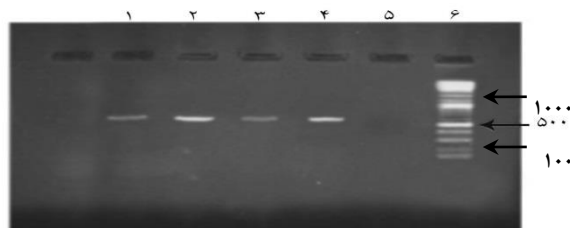


شکل ۴- تصاویر میکروسکوپی قارچ شماره ۷ (آسپرژیلوس نایجر)

PCR نمونه‌ها

سیستم PCR و تائید قطعی جواب از نمونه کنترل منفی که فاقد DNA الگو و سایز مارکراست، استفاده شد. باند ۵۹۷bp حاصل از PCR نمونه‌های ۲ و ۷ با قطعه Its مورد نظر مطابقت داشت.

با توجه به میزان فعالیت آنزیمی، نمونه‌های ۲ و ۷ برای انجام واکنش PCR و با استفاده از پرایمر عمومی Its₁ و Its₄ انتخاب شدند (شکل ۵). معمول‌ترین روش برای بررسی محصولات PCR، روش ژل الکتروفورز است که از طریق رنگ آمیزی با رنگ اتیدیوم بروماید قابل



شکل ۵- چاهک ۱: محصول کلنی PCR شماره ۲، چاهک ۲: محصول PCR شماره ۲، چاهک ۳: محصول کلنی PCR قارچ شماره ۷، چاهک ۴: محصول PCR شماره ۷، چاهک ۵: کنترل منفی، چاهک ۶: سایز مارکر

شناسایی مولکولی

مورفولوژیکی شده بودند مورد تائید قرار گرفتند. نمونه‌ها به شرح زیر معرفی شدند (جدول ۵).

پس از بررسی نتایج حاصل از توالی یابی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ژنتیک آنالایزر در پایگاه اطلاعاتی NCBI در قسمت BLAST، نمونه‌های قارچی شماره ۲ و ۷ که قبلاً شناسایی

جدول ۵- نمونه های تأیید شده از نظر مولکولی

میزان شباهت و نمره داده شده در پایگاه NCBI	بیشترین امتیاز داده شده در BLAST	شماره دسترسی در بانک ژن	شناسایی مورفولوژیکی	نمونه قارچی
۱۰۳۱/۱۰۳۱ (%۱۰۰)	Fusarium oxysporum isolate SaCS12	HM210092.1	فوزاریوم	نمونه شماره ۲
۱۰۸۱/۱۰۸۱ (%۱۰۰)	Aspergillus niger JC-A3	HQ285563	آسپرژیلوس	نمونه شماره ۷

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق ۵۴ عدد نمونه پس از تهیه لام و بررسی‌های میکروسکوپی اولیه انتخاب و جهت بررسی تولید فیتاز آنالیز گردیدند.

اسیدی شدن محیط به دلیل وجود اسید فایتیک در اثر اضافه کردن نمک های فایتین به محیط ممکن است منجر به تولید هاله‌های دروغین شود و این امر به نوبه خود ممکن است منجر به سردرگمی و اشتباه در جداسازی و انتخاب قارچ‌های تولید کننده فیتاز گردد. برای ایجاد وضوح بیشتر در هاله‌ها و حذف نتایج دروغین مثبت، نمونه‌ها به کمک محلول کبالت کلراید، آمونیوم مولیبدات و آمونیوم وانادات رنگ آمیزی شدند. علت استفاده از این روش را می توان این گونه توضیح داد که فیتاز تولید شده توسط میکروارگانیسم در محیط کشت از طریق هیدرولیز پیوندهای o-p باعث جداسازی ارتوفسفات و ایجاد گروه یا گروه‌های هیدروکسیل آزاد می شود. محلول کبالت کلراید به گروه‌های هیدروکسیل آزاد متصل می شود، سپس آمونیوم مولیبدات و آمونیوم وانادات نیز به کبالت کلراید باند شده با گروه‌های هیدروکسیل آزاد متصل می شود و هاله‌های شفاف تولید می کند (Bae و همکاران، ۱۹۹۹). در صورتی که ایجاد هاله اولیه تنها به دلیل تولید اسید در محیط باشد، به دلیل عدم وجود گروه‌های هیدروکسیل آزاد، کبالت کلراید هیچ پیوندی در محیط برقرار نخواهد کرد و آزاد باقی می ماند. آمونیوم مولیبدات و آمونیوم وانادات به کبالت کلراید متصل شده و در نهایت از محیط خارج می شوند.

همان طور که بیان شد، در تمامی محیط های کشت کلسیم فیتات و یا سدیم فیتات بعد از اتوکلاو کردن محیط کشت از طریق فیلتر

میلی پور ۰/۱ میکرون به محیط کشت اضافه شد. در صورت اتوکلاو اسید فایتیک به همراه محیط کشت، فشار و دمای بالای اتوکلاو باعث آزاد شدن ارتو فسفات در محیط و در نتیجه تغییر در pH (اتوکلاو کردن محیط کشت باعث کاهش pH محیط تا اندازه ۰/۲ می شود. به علاوه بعد از اضافه کردن سدیم فیتات، pH محیط مجددا کاهش می یابد) و اشتباه در محاسبه فعالیت آنزیمی می شود. نتایج به دست آمده از گزارش محققان نیز مشابه نتایج این تحقیق بوده و این نظر را تایید می کند (Bae و همکاران، ۱۹۹۹).

سنجش آنزیمی

محیط‌های C و G برای سنجش آنزیمی انتخاب شدند. تنها تفاوت آن‌ها اختلاف pH، منبع کربن مورد استفاده و CaCl_2 در محیط C و KCl در محیط G بود. با توجه به منابع مختلف، pH مناسب برای حداکثر فعالیت آنزیمی فیتاز، ۵/۵ است (Gunashree, Lee ; 2006 و همکاران، ۲۰۰۵). در تمام نمونه‌ها، در این تحقیق، بیشترین فعالیت فیتازی مطابق گزارشات سایر محققان، در محیط C که حاوی سدیم فیتات بود مشاهده شد. به جز $\text{pH} = 6$ برای قارچ شماره ۱ و $\text{pH} = 6/5$ برای قارچ شماره ۲، که در محیط G حاوی کلسیم فیتات، حداکثر فعالیت فیتازی آن ثبت شد. یون کلسیم همواره نقش بسزایی در بررسی فعالیت فیتازی داشته است تا جایی که با توجه به اختلاف قیمت بسیار زیاد آن نسبت به سدیم فیتات در بسیاری از مطالعات فیتازی خصوصا مطالعات باکتریایی، از کلسیم فیتات به جای سدیم فیتات استفاده می شود.

برینچ - پدرسون و همکاران (۲۰۰۲)، در تحقیقی که بر روی فیتاز دانه گرده انجام دادند اظهار داشتند که حضور یون کلسیم باعث

میزان رشد و شفافیت هاله دارای کمترین میزان تولید نیز هست. این نتایج منطبق بر یافته‌های تحقیقاتی گروهی از محققان است (Sasirekha و همکاران، ۲۰۱۲). این محققان با بررسی میزان رشد هاله‌ها در باکتری‌های تولید کننده فیتاز رابطه مستقیمی با میزان رشد هاله و تولید فیتاز گزارش کردند.

اگر چه میزان تولید آنزیم فیتاز فاکتور موثری برای جداسازی ریزسازواره‌ها است؛ ولی نکته قابل تامل، با توجه به محل و نوع مصرف آنزیم فیتاز در بدن موجودات تک‌معدده، توانایی تحمل pH اسیدی و مقاومت به حرارت برای آماده‌سازی و پلت کردن دان مورد استفاده در صنعت طیور است.

در تحقیقی با شناسایی وارته Asp.L117 و خالص‌سازی فیتاز آن، موفق به تولید آنزیمی با پایداری و مقاومت دمایی بسیار بالا و حداکثر عملکرد در $pH = 5/5$ شدند (Lee و همکاران، ۲۰۰۵). طبق گزارش آن‌ها، این آنزیم پس از ۶ ماه نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد با ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۱۰۰ درجه، ۸۰٪ از فعالیت خود را حفظ می‌کند. این درحالی است که اکثر آنزیم‌های تولیدی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به بالا با کاهش چشمگیر عملکرد مواجه هستند (Gonita Mishra و همکاران، ۲۰۱۳).

همان‌طور که اشاره شده، حداکثر فعالیت آنزیمی در روز پنجم با ۱۳۰/۱۱ واحد در نانوگرم برای قارچ فوزاریم اگریسپروم و ۱۲۵/۲۷ واحد در نانوگرم برای قارچ اسپریژیلوس نایجر ثبت شد. از روز پنجم تا روز دهم، روند کاهشی فعالیت آنزیمی را مشاهده نموده و از روز دهم تا پانزدهم این روند کاهشی با شیب نسبتاً زیادی ادامه یافت. یافته‌های محققان پیشین نیز موید این امر است (Costello و همکاران، ۱۹۷۶؛ Lee و همکاران، ۲۰۰۵).

به‌عنوان مثال، در گونه‌های Asp.CFR39 و Asp.CFR40 از قارچ‌های تولید کننده فیتاز که توسط گانشری (۲۰۰۶) بررسی شد، این روند کاهشی مشاهده شده است. این پژوهشگر محدوده بین روزهای ۷ تا ۱۰ را به‌عنوان حداکثر میزان تولید فیتاز برای قارچ‌های مورد بررسی معرفی کرد (Gunashree, 2006).

با توجه به جدول مقایسه رشد در pH های متفاوت، بیشترین رشد

آزادسازی فسفر معدنی می‌شود (Brinch-Pedersen و همکاران، ۲۰۰۲). گروهی دیگر از محققین گزارش کردند که یون کلسیم محیط مناسبی برای اتصال فیتات به فیتاز آماده می‌کند. همچنین، کلسیم دارای نقش حفاظتی برای آنزیم فیتاز است به طوری که با گذشت ۱۰ دقیقه از گرمخانه گذاری آنزیم در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد در حضور $CaCl_2$ ، ۵۰٪ از فعالیت اولیه آنزیم باقی مانده است (OH و همکاران، ۲۰۰۴). این امر، نشان - دهنده نقش مهم حفاظتی یون کلسیم دو بار مثبت در برابر صدمات ناشی از حرارت می‌باشد (Lee و همکاران، ۲۰۰۵).

تغییر منبع کربن از ساکارز به دی‌گلوکز را می‌توان با داده‌های بیوشیمیایی توجیه کرد. ساکارز جزء دی‌ساکاریدهای غیر احیاء کننده، متشکل از یک مولکول گلوکز و یک مولکول فروکتوز است. تمام قندهای چندجزئی برای تبدیل به انرژی باید به گلوکز تبدیل شوند. علت رشد بهتر و افزایش عملکرد قارچ‌های جداسازی شده در تحقیق حاضر نیز صرفه‌جویی در مصرف انرژی و استفاده مستقیم از قند دی‌گلوکز برای قارچ‌ها است.

بر خلاف گزارش ارائه شده توسط گروهی از محققین، مبنی بر افزایش تولید فیتاز در محیط کشت عصاره سبوس گندم (Kerovou, 2000)، این ادعا در مورد قارچ‌های تولید کننده فیتاز در این پژوهش مورد تایید نبوده و حداکثر تولید در محیط کشت PSM+Na مشاهده شد. به نظر می‌رسد سبوس گندم با ۹۲٪ فسفر فیتاتی که برابر با ۷۱٪ از کل فسفر موجود در آن است (Chung, 2002)، محیط مناسبی از نظر سوبسترای آنزیم فیتاز برای افزایش تولید فیتاز و رشد قارچ‌ها باشد. ولی مطالعات حاضر نشان دادند که این محیط فاقد سایر مواد مغذی برای رشد قارچ‌هاست.

تاثیر دما و pH و زمان بر فعالیت آنزیمی

طبق نتایج به دست آمده، بیشترین میزان رشد هاله مربوط به نمونه شماره ۱ است و با مقایسه آن با نمودارهای سنجش آنزیمی، می‌توان به این نتیجه رسید که قطر هاله تحت تاثیر میزان آنزیم تولیدی قارچ‌ها است. به همین ترتیب، نمونه شماره ۸ با کمترین

استفاده صنعتی از قارچ فوزاریوم اگزوسپروم

با توجه به قدرت رشد و مقاومت قابل قبول این قارچ نسبت به pH و دما، از این خانواده قارچی برای تولید پروتئین استفاده شده است. در گزارشی، تولید مایکوپروتئین یا پروتئین قارچی با تخمیر هوای قارچ فوزاریوم و نئوناتوم روی سوبسترای کربوهیدراتی بررسی شده و توانایی تولید محصول حاوی تقریباً ۴۲٪ پروتئین خام در شرایط آزمایشگاهی ارائه گردیده است (آهنگی زهرا و همکاران، ۱۳۸۵). همچنین، تولید نانوذرات نقره به صورت برون‌سلولی با قطر حداکثر ۲۰ نانومتر به وسیله قارچ فوزاریوم اگزوسپروم در غلظت ۱۰-۳ مولار در شرایط آزمایشگاهی گزارش شد (سجادی گلشید و همکاران، ۱۳۸۸).

لازم به ذکر است، تا به حال گزارشات کمی مبنی بر استفاده از قارچ فوزاریوم اگزوسپروم برای تولید فیتاز ثبت شده است ولی با توجه به بیماری زایی کمتر نسبت به سایر قارچ‌های تولید کننده فیتاز (که معمولاً جزو خانواده اسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم هستند و اکثراً آلرژن و حساسیت‌زا برای انسان و دام می‌باشند) و قدرت رشد در pHهای اسیدی، وجود بیومس قابل قبول و نیز استفاده صنعتی، قابل توجه بوده و استفاده از این قارچ برای تولید فیتاز منطقی به نظر می‌رسد که باید با انجام سایر آزمایشات و بررسی‌های بیشتر، صحت این موضوع تایید شود.

استفاده‌های صنعتی از قارچ اسپرژیلوس نایجر

با توجه به قدرت رشد و توانایی بسیار بالا در تولید مثل این قارچ و تحمل بالای شرایط محیطی از جمله دما و pH و نیاز به مواد غذایی محدود، استفاده صنعتی از این قارچ بسیار مورد توجه قرار گرفت. به طوری که گروهی از محققین، با استفاده از ضایعات کشاورزی موفق به تولید اسید سیتریک با روش تخمیر در بستر جامد شدند. میزان اسید سیتریک تولیدی توسط وارته‌ای از قارچ *A. niger* برابر با ۴۷ گرم به ازاء یک کیلوگرم کاه گندم خشک گزارش شد (Shankaranand و همکاران، ۱۹۹۴).

تولید آنزیم سلولاز نیز از دیگر استفاده‌های صنعتی این قارچ است. یکی از مهمترین میکروارگانیزم‌های همزیست گیاه چای،

قارچ فوزاریوم مربوط به $pH=7$ است؛ ولی با توجه به هدف طرح که تولید آنزیم فیتاز است، $pH=5/5$ که مناسب‌ترین pH برای فعالیت فیتاز است پیشنهاد میگردد. با توجه به نمودار ۴، کاهش فعالیت آنزیمی در روز پنجم شروع می‌شود و به تدریج افزایش می‌یابد. در این pH تا روز ششم شیب نمودار قابل قبول و در روز هفتم، روند رشدی کاهش می‌یابد. با توجه به نمودار، به نظر می‌رسد روز هفتم بهترین زمان برای انجام مراحل خالص‌سازی آنزیم برای قارچ فوزاریوم اگزوسپروم باشد. در مورد قارچ اسپرژیلوس نایجر، رشد قارچ در تمام pHها تفاوت چندانی ندارد و به نظر می‌رسد این قارچ توانایی بالایی در تحمل pH داشته باشد؛ ولی با توجه به خصوصیات آنزیمی فیتاز می‌توان محدوده بین روزهای ۵ تا ۱۰ را برای مراحل خالص‌سازی معرفی کرد که البته این امر نیاز به تحقیقات بیشتر و انجام مرحله خالص‌سازی و سنجش آنزیمی دارد (Khan and Ghosh, 2012).

مقایسه محصول PCR و کلونی PCR

در این پژوهش، علاوه بر PCR معمولی جهت بهینه‌سازی، از کلونی PCR با پرایمرهای عمومی *Its1* و *Its4* استفاده شد که از خصوصیات مثبت آن می‌توان به استفاده از لوازم و مواد ساده بدون نیاز به پروسه‌های طولانی را نام برد.

میرهنندی در سال ۲۰۰۷، کلونی PCR را سریع‌ترین روش برای تست‌های تشخیصی مخمر اعلام کرد. نکته قابل توجه این است که کلونی که برداشته می‌شود، حتی المقدور کمترین مقدار باشد؛ چون هر چه مقدار کلونی زیاد باشد، تجمع DNA بالا رفته و در نتیجه پرایمرها نمی‌توانند اینلینگ مناسبی داشته باشند و در نتیجه باند شفافی مشاهده نمی‌شود (Mirhendi و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین کلونی PCR در باکتری (Layton و همکاران، ۲۰۰۶)، ویروس، رتروویروس‌ها (Michaud و همکاران، ۲۰۰۷) و خون (Bu, 2008)، قابلیت اجرا شدن دارد.

- Bijender, S.(2012). Production of phytate-hydrolyzing enzymes by thermophilic moulds. *African Journal of Biotechnology*. 11, 59. DOI= <http://dx.doi.org/10.5897/ajb12.695>.
- Brinch-Pedersen, H., Sørensen, L. and Holm, P.(2002). Engineering crop plants getting a handle on phosphate. *Trend in Plant Science-Cell*. 7, 3, 118-125.
- Bu, Y., Huang, H., Zhou, G.(2008). Direct polymerase chain reaction (PCR) from human whole blood and filter-paper-dried blood by using a PCR buffer with a higher pH. *Analytical Biochemistry (Mosc.)* 375, 370-372.
- Costello, A., Glonek, J.R. and Myers, T.C. (1976 .)Phosphorus-31 nuclear magneticresonance – pH titration of hexaphosphate (phytic acid). In *Proceedings of the Inositol Phosphates: Their Chemistry, Biochemistry and Physiology* (Elsevier, New York), 156-171.
- Chung, T. K.(2002). How to get the best out of phytase. *Feed Mix*. 10, 5, 27-29.
- De angelis, M.(2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology*. 87, 3, 259-270. DOI= [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00072-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00072-2).
- Gargova, S., Roshkova, Z. and Vancheva, G.(1997). Screening of fungi for phytase production. *Biotechnology Techniques*. 11, 4 (April), 221–224.
- Gonita-Mishra, I., Deshmukh, D., Tripathi, N., Bardiya-Bhurat, K., Taniwai, K. and Tiwari, S.(2013). Isolation, morphological and molecular characterization of phytate-hydrolysing fungi by 18S rDNA sequence analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44, 1, 317-323.

آسپرژیلوس نایجر است. این قارچ با تولید خارج سلولی سلولاز موجب تجزیه و تخمیر برگ‌های چای در حین مرحله فرآوری می‌شود. اثرات معنی‌دار استفاده از سلولاز تولید شده توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر در زمان فراوری و تخمیر چای در کارخانه در رابطه با تیافلایوین، تیاریوجین، رنگ و طعم و عطر، و شفافیت و سایر خصوصیات کیفی نیز گزارش شده است (Murugesan و همکاران، ۲۰۰۲).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، بهترین قارچ‌های مولد فیتاز از نمونه خاک اطراف ریشه گیاهان تیره لگومینوز جداسازی شدند. قارچ‌های فوزاریوم اگریسپروم با ۱۳۰/۱۱ واحد آنزیمی و آسپرژیلوس نایجر با ۱۲۵/۲۷ واحد آنزیمی با بیشترین مقدار تولید فیتاز شناسایی و محدوده روز پنجم تا هفتم برای مرحله استخراج و خالص‌سازی به عنوان بهترین زمان معرفی شدند.

منابع

- آهنگی، ز. شجاع ساداتی، س.ع. نیکوپور، ه. (1385). تولید پروتئین قارچی با استفاده از فوزاریوم اگریسپروم PTCC 5115. *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*. دوره ۱، شماره ۲.
- سجادی، گ. شجاعی، ا. فاضلی، م. امینی، ج. جمالی فر، ح. (1388). تولید برون سلولی نانوذرات نقره به وسیله قارچ فوزاریوم اگریسپروم در مقیاس آزمایشگاهی. *نشریه دنیای میکروب‌ها*. دوره ۲، شماره ۱.
- Anna, I., Tania, C., Okcha, L. and Keiyh, S. (2008). Colony Multiplex-Tandem PCR for Rapid, Accurate Identification of [10] Fungal Cultures. *J Clin Microbiol.* (46): 4058-4060.
- Bae , H.D., Yanke, L.J., Cheng , K. J. and SELINGER, L.B.(1999). A novel staining method for detecting phytase activity. *Journal of Microbiological Methods.* (39): 17-22.

- Greiner, R. and Konietzny, U.(2006). Phytase for Food Application. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 2 (March), 124-140.
- Gunashree, B.S.(2006). Studies on the production and characterization of phytate degrading enzymes in *Aspergillus Niger*. In *Food Microbiology Department*. MYSORE, 243.
- Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun. J., Lohscheidt, M. and O, Z.(2005). Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology Advances.* 68, 588-597.
- Howson ,S.J. and Davis, R.P.(1983). Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme and Microbial Technology.* 5, 5, 377-382. DOI= [http://dx.doi.org/10.1016_0141-0229\(83\)90012-1](http://dx.doi.org/10.1016_0141-0229(83)90012-1).
- Jorquera, MA., Gabler, S., Inostroza, NG., Acuña, JJ., Campos, MA., Menezes-Blackburn D., Greiner, R.(2018). Screening and Characterization of Phytases from Bacteria Isolated from Chilean Hydrothermal Environments. *Microb Ecol.* 75(2):387-399.
- Khan, A. and Ghosh, K.(2012). Characterization and Identification of Gut-Associated Phytase-Producing Bacteria in Some Freshwater Fish Cultured in Ponds. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 42, 1, 37-45. DOI= <http://dx.doi.org/10.3750/aip2011.42.1.05>.
- Kerovuo, J., Ruovinen, J. and Hatzack, F. (2000). Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism. *Biochemical Journal* 352, 623-628.
- Layton, A., Mckayl , L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R. and Sayler, G. (2006). Development of Bacteroides 16S rRNA Gene TaqMan-Based Real- Time PCR Assays for Estimation of Total, Human and Bovine Fecal Pollution in Water. *applied and environmental Microbiology Reports.* 72, 4214-4224.
- Lee, D. H., Choi , S. U. and Hwng, Y. I.(2005). Culture Conditions and Characterizations of a New Phytase-Producing Fungal Isolate, *Aspergillus sp. L117*. *Mycobiology* .33, 4 (November), 223-229.
- Lei, G. and Poress, J.(2003). Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters.* 25, 1787-1794
- Michaud, V., Gil, P., Kwiatek, O., Prome, S., Dixon, L. and Romero,L.(2007). Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR. *Journal of Virological Methods (Orlando).* 146, 257-265.
- Mirhendi, H., Diba, K., Rezaei, A., Jalalizand, N., Hosseinpur, L. and Khodadadi, H.(2007). Colony PCR Is a Rapid and Sensitive Method for DNA Amplification in Yeasts. *Iranian Journal of Public Health Monograph.* 36, 40-44.
- Murugesan, G., Angayarkanni, J. and Swaminathan, K. (2002). Effect of tea fungal enzymes on the quality of black tea. *Food Chemistry.* 79, 407-411.
- Nelson, T.S., Shieh, T.R., Wodzinski, R.J. and Ware, J.H.(1983).The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poultry Science.* 47, 1842-1848.
- Neira-Vielma, AA., Aguilar, CN., Ilyina, A., Contreras-Esquivel, JC., Carneiro-da-Cunha, MDG, Michelena-Álvarez G, Martínez-Hernández, JL.(2017). Purification and biochemical characterization of an *Aspergillus niger* phytase produced by solid-state fermentation using triticale residues as substrate. *Biotechnol Rep (Amst).* 15;17:49-54
- Ocampo, M.B., Patiño, L.F.C., Marin, M.M., Salazar, M.Y. and Gutierrez , P.A.S. (2012). Isolation and Characterization of Potential Phytase-Producing Fungi from Environmental Samples of Antioquia (Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín.* 65, 1, 6291-6303.

- Oh, B., Choi, W., Park, S., Kim, Y. and Oh, T. (2004). Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology Advances*. 63, 362-372
- Powar, V.K. and Jagannathan, V. (1982). Purification and Properties of Phytate-Specific Phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 151, 3 (September), 1102-1108.
- Sasirekha, B., Bedashree, T. and Champa, K.L. (2012). Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6. *European Journal of Experimental Biology*. 2, 95-104.
- Shankaranand, V.S. and Lonsane, B.K. (1994). Coffee husk: an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid state fermentation system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10, 165-168.
- Singh, N.K., Joshi, D.K. and Gupta, R.K. (2013). Isolation of Phytase Producing Bacteria and Optimization of Phytase Production Parameters. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 6, 5. DOI= <http://dx.doi.org/10.5812/jjm.6419>.
- Sreedevi, S. and Reddy, B.N. (2013). Purification and Biochemical Characterization of Phytase from newly isolated *Bacillus subtilis* C43. *Advanced BioTech*. 12, 8 (February), 1-6.
- Vatsa, P. and Banerjee, U.C. (2004). Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases). *Enzyme and Microbial Technology*. 35, 1 (6 July), 3-14. DOI= <http://dx.doi.org/10.1016>.
- Vohra, A. and Satyanarayana, T. (2003). Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 23, 29-60.
- Yanke, L.J., Selinger, L.B. and Cheng, K.J. (1999). Phytase activity of *Selenomonas ruminantium*: a preliminary characterization. *Letters in Applied Microbiology*. 29(April), 20-25.