نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۵، زمستان ۱۳۹۸
ص‌ص: ۱۸۵~۲۰۴

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

- **نرگس 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 وابتدا بر روی محیط‌سابورو دکستروز آگار به مدت ۵ روز در انکوباتور و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه گذاری شدند. سپس به‌منظور 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 گونه ها انتخاب شدند. بهترین محیط غربالگری و حداکثر فعالیت آنزیمی در۵/۵ =pH 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 فوزاریم اگزیسپروم 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. نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی کاملا منطبق با نتایج شناسایی مولکولی بودند.

واژه‌های کلیدی: فیتاز، قارچ، جداسازی، فوزاریم اگزیسپروم، آسپرژیلوس 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 Vaseji[1], Seyed Abdollah Hosseini[2], Nahid Mojgani[3]
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 Fusariumoxysporum 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

فسفر دومین ماده معدنی فراوان در بدن حیوانات است. تغذیه طیور بر اساس تامین میزان دقیق فسفر مورد نیاز پرنده می باشد. اسید فایتیک یا میواینوزیتول هگزاکیس(IP6) در همه جای طبیعت یافت می‌شود و اصلی‌ترین ذخیره فسفر در دانه گیاهان می‌باشد و می‌توان آن‌را 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 می دهند(Brinch و همکاران،۲۰۰۲). فیتازها گروه ویژه‌ای از فسفاتازها یا فسفریک مونواستر هیدرولازها به حساب می‌آیند ، تحمل حرارتی بالائی دارند(Jorquera و همکاران، ۲۰۱۸) و قادر به هیدرولیز فیتات بوده و حداقل یک گروه فسفات را از این ماده آزاد می نمایند (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 می باشد و هم موجب کاهش دفع فسفر به میزان ۳۰ تا ۵۰ درصد به ازاء اضافه کردن ۵۰۰ تا

۱۰۰۰ واحد آنزیم فیتاز می‌گردد. این میزان برای جایگزینی با ۱ گرم فسفات معدنی در جیره غذایی دام استفاده می شود (Lei and Poress, 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 سال۲۰۵۰ میلادی به بیش از ۹ میلیارد و چهار صد میلیون نفرمی رسد. 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 محدودیت ها و چالش‌هایی درگیر است. از سوی دیگر، استفاده بیش از حد از سموم، کود های 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 نهاده-های تولید از قبیل آب، خاک، موادآلی و معدنی و ...،کاملا ضروری است که در این راستا علوم و فن‌آوری های نوین نظیر بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک می توانند راه حل مناسبی برای کاهش آلودگی منابع طبیعی، افزایش و بازدهی تولید، کاهش هزینه ها 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 تک معده‌ای‌ها برای تولید این آنزیم، استفاده از مکمل‌های آنزیمی در خوراک بخصوص تک معده‌ای‌ها بسیار مورد استقبال تولید کننده ها قرار گرفته است به-طوری‌که 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 کشور، سالانه بالغ بر ۶ میلیون تن خوراک مصرف می گردد. تمامی آنزیم فیتاز مورد استفاده در این صنعت وارداتی بوده و سالیانه مبالغ هنگفتی ارز از کشور خارج می شود. لذا انجام طرحی در زمینه بررسی امکان تولید فیتاز میکروبی در داخل کشور ضروری است. یکی از منابع تولید آنزیم فیتاز قارچ ها هستند که سهم بالایی را در تولید آنزیم مصرفی در صنعت دارند. لذا این پروژه با هدف جداسازی و شناسایی قارچ های تولید کننده فیتاز انجام شده است.

مواد و روش ها

نمونه‌گیری و جداسازی قارچ‌ها

نمونه‌های محیطی مورد استفاده شامل۲ نمونه خاک، ۴ نمونه خاک اطراف ریشه گیاهان تیره لگومینوز(Singh et 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 آسپرژیلوس تهیه شده از موسسه رازی بودند. برای تهیه نمونه، از عمق ۴-۳ سانتی‌متری خاک پس از زدودن ضایعات ریشه و سنگ‌ریزه‌ها و الک خاک با الک یک میلی‌متری، نمونه‌ها درون ظروف مخصوص جمع آوری شدند و طبق روش Ocampo و همکاران(۲۰۱۲)، رقیق سازی نمونه ها 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[1] (محیط کشت عمومی قارچی) تلقیح شد و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای بدست آوردن کلنی

[1]- Saburad Dextrose Agar

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 نمونه ها 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 (Nikkon 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 فیلتر۰/۲ 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 ریخته شد و رسوبات با آب مقطر استریل رقیق شدند. ۱۰۰۰ ماکرولیتر که طبق رفرنس تقریبا برابر $۱۰^۷ \times ۲$ اسپور در هر میلی‌متر است به‌عنوان مایع تلقیح برای کشت استفاده شد(Lee و همکاران، ۲۰۰۵) . محیط‌های کشت شده به مدت ۵-۳ روز در انکوباتور با درجه حرارت ۳۰^{o} c قرار داده شدند.

برای دیدن هاله‌ها با وضوح بیشتر و حذف نتایج کاذب مثبت[۳] 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 مولیبدات 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 داردکه 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 ۱ساعت و در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو کرده و

2- Phytase Screening Media
3- False positive
[4]- Wheat Bran Extract

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. مقدار۵۰ میلی لیتراز محیط کشت مایع PSM در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری 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[5] شماره یک صاف گردید و ۱۰ میلی لیتر از محلول صاف شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر از مایع بالائی محلول‌های سانتریفیوژ شده همراه با ۸۰۰ میکرولیتر 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 میلی لیتراسید تری‌کلرواستیک ۱۰٪ درون لوله‌های آزمایش ریخته شد و به‌خوبی تکان داده شد. سپس ۵ /۰میلی لیتر از محلول از هر لوله جدا و در لوله‌هایی که حاوی محلول استون، آمونیوم مولیبدات ۱۰ میلی‌مولار و اسید سولفوریک ۵ نرمال به‌ترتیب از راست به چپ با نسبت‌های ۱:۱:۲ است، ریخته و به‌خوبی تکان داده شدند. مواد شیمیائی مورد استفاده از شرکت Merckآلمان تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر[6] (ساخت شرکت بیو رد[7] کشور فرانسه) در طول موج ۴۱۵ نانومتر مقدار جذب خوانده شد (Sasirekha و همکاران،۲۰۱۲; 1983 , Howson). برای به‌دست آوردن بهینه فعالیت آنزیمی در بهترین pH ، نمونه‌های انتخاب شده در pHهای ۵-۵/۵-۶ و ۷ در دو محیط کشت PSM C-G و عصاره سبوس گندم مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به تعداد بالای نمونه‌ها، نبود امکان تست تمام آن ها در محیط‌های مختلف و با توجه به تولید آنزیم فیتاز در خانواده آسپرژیلوس، تعدادی از نمونه‌های متعلق به این خانواده برای غربالگری در محیط‌های Aتا H در چند pH مختلف بررسی شدند. برای به‌دست 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 حاوی۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت سابورو دکستروز براث، کشت داده شدند. این ارلن‌ها در pH=۷ ودماهای۲۰-۳۰-۴۰ 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.

[5]- Whatman
[6]- Spectrophotometr
[7] Bio-Rad

Its1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
Its4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

محصول PCR با استفاده از دستگاه ژنتیک آنالایزر(USA. 3730/3730xl DNA Analyzers)توالی یابی شد. نتایج حاصله با استفاده از سایت NCBI [8]در قسمت BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به و توالی‌های موجود در سایت اقدام به شناسایی نژاد و گونه قارچ‌ها گردید(میزان شباهت و نمره داده شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI برای هر دو قارچ آسپرژیلوس نایجر و فوزاریوم اگزیسپروم،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 قارچ‌های جداسازی شده با پرایمرهای Its1,Its4 انجام شد، با این تفاوت که به‌جای استفاده از DNA استخراجی، مستقیما از بافت استفاده و در زمان صرفه‌جویی شد. بهترین زمان برای استفاده از بافت قارچ ۵- ۴ روز پس از کشت است(Mirhendi و همکاران،۲۰۰۷ ; Anna Lau و همکاران،۲۰۰۸) . به‌وسیله نوک سمپلر حدود۱ میلی متر مکعب از کلونی برداشته و به‌عنوان نمونه DNA جهت کلونی PCR استفاده شد.

تجزیه آماری

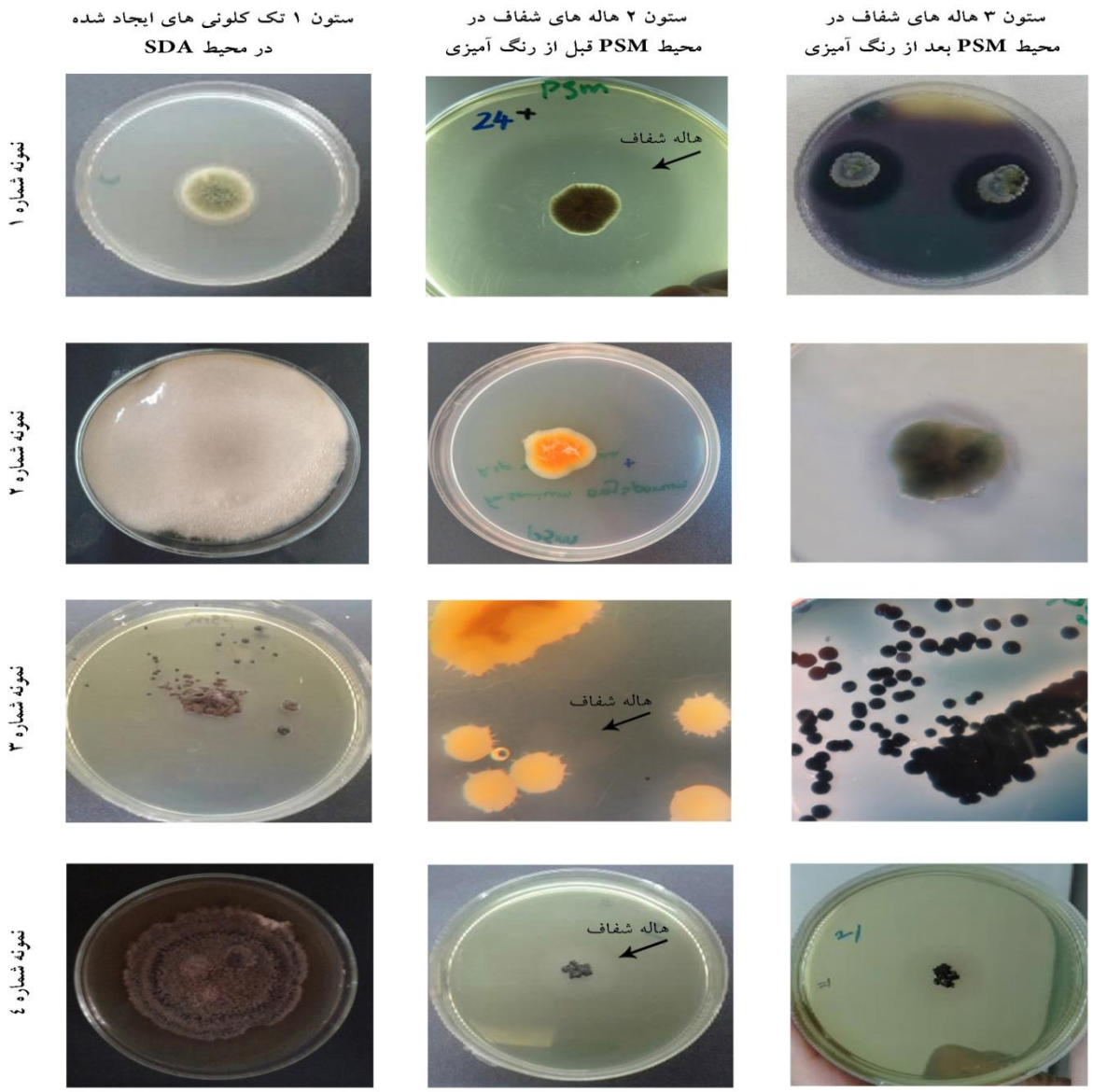
نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 15.0)ارزیابی شدند.

نتایج

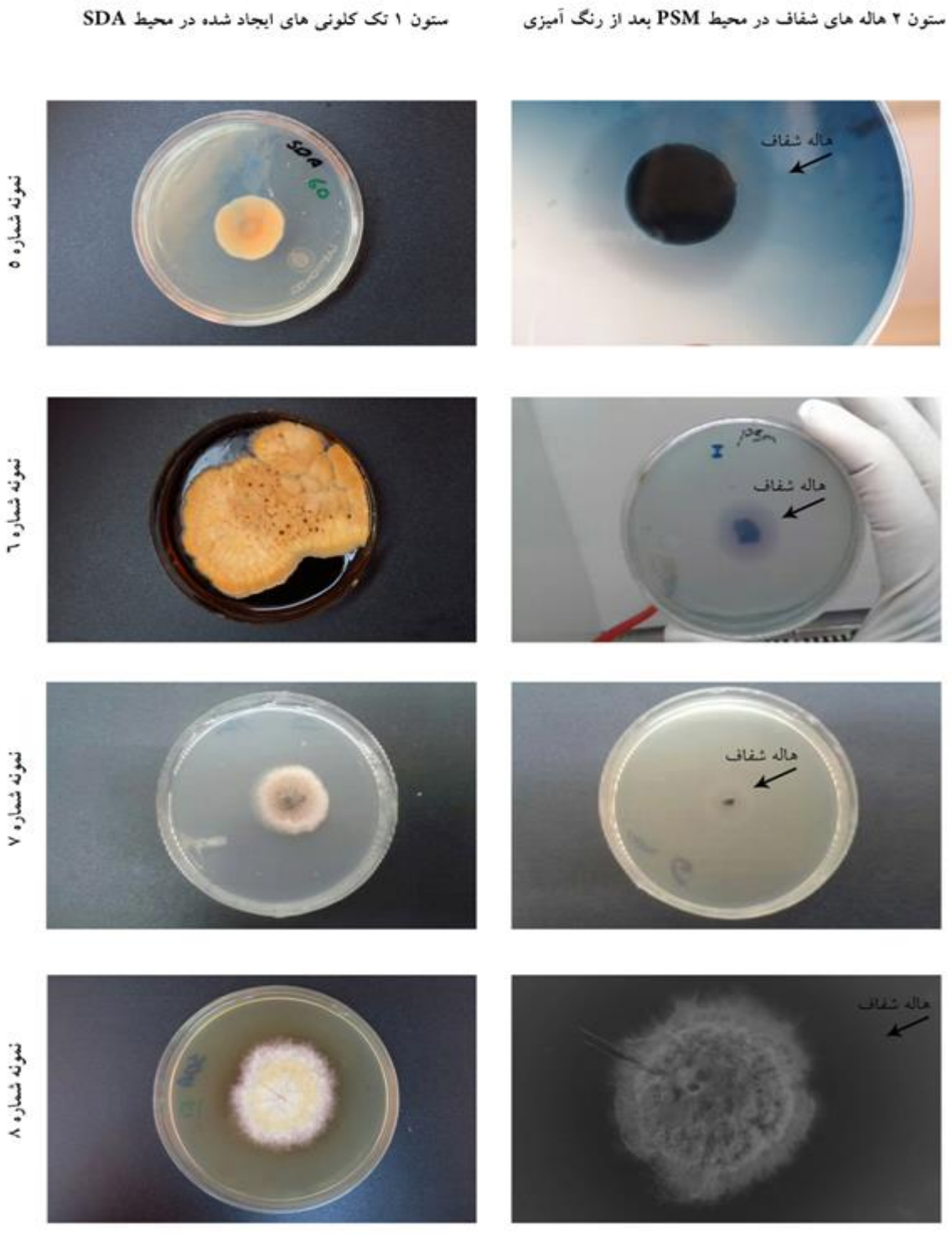
تک کلنی‌های جدا شده از منابع مختلف

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

[8] - National Center for Biotechnology Information



شکل ۱- ستون ۱: تک کلنی های جداسازی شده. ستون ۲: هاله های شفاف قبل از رنگ آمیزی. ستون۳: هاله ها بعد از رنگ آمیزی با کلرید کبالت و آمونیوم مولیبدات و آمونیوم وانادات

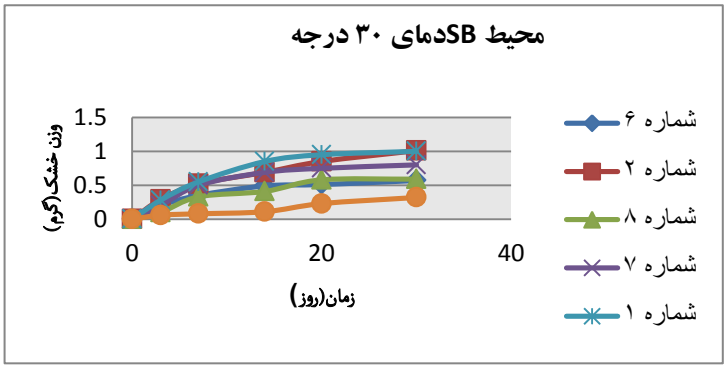


شکل ۲- ستون ۱: تک کلنی های جداسازی شده. ستون ۲: هاله ها بعد از رنگ آمیزی با کلرید کبالت و آمونیوم مولیبدات و آمونیوم وانادات

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 فیتات نسبت به کلسیم فیتات در مقابل کلرید کبالت در مرحله رنگ آمیزی محیط C به عنوان محیط غربالگری فیتاز انتخاب شد.

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 SDAو PSM درون انکوباتور شیکردار با ۱۲۰دور در دقیقه بود. نتایج نشان دهنده مقدار رشد بیشتر در محیط سابورو دکستروز براوث و مناسب تر بودن این محیط برای رشد نمونه‌های انتخاب شده بود. میانگین رشد قارچ‌ها دراین محیط برابر ۰/۴۸۳گرم بود که در نمودار ۱ نشان داده شده است.



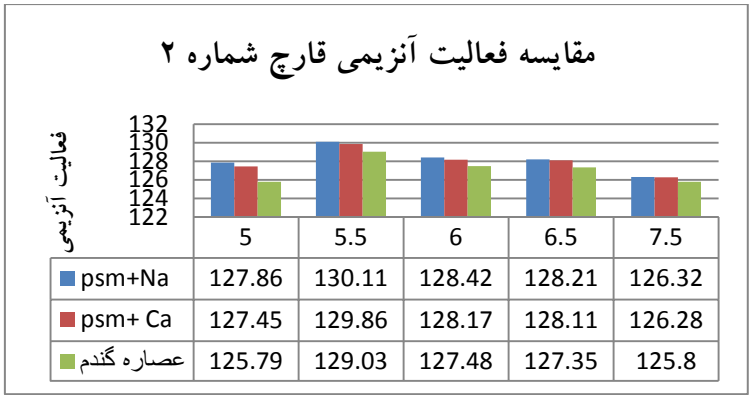
نمودار ۱- مقدار وزن خشک قارچ‌ها بر حسب زمان در محیط سابورو دکستروزبراوث در دمای ۳۰درجه سانتی‌گراد

بیشترین مقدار رشد قارچ ها مربوط به محیط سابورو دکستروز براوث در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود که نتایج فوق مرتبط با تحقیقات لی و همکاران(۲۰۰۵)، گراگوا و همکاران (۱۹۹۷) و وهرا و همکاران (۲۰۰۳) بود. شایان ذکر است اندازه گیری 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 تقریبا 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 به‌دست آوردن فعالیت آنزیمی اقدام به مقایسه غلظت فسفر نمونه‌ها با منحنی استاندارد فسفر شد.

اثر pH و محیط‌های کشت مختلف بر فعالیت آنزیمی

مقایسه فعالیت فیتازی در محیط PSM با سدیم(محیط PSM،(C با کلسیم (محیط D) و عصاره سبوس گندم برای قارچ های شماره ۱ – ۲ – ۶ – ۷ و 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 PSM،(C با کلسیم (محیط G)و عصاره سبوس گندم در pHهای ۵/۵-۶-۶/۵-۷/۵ در دمای ۳۰ درجه در روز پنجم، ارائه شده است.

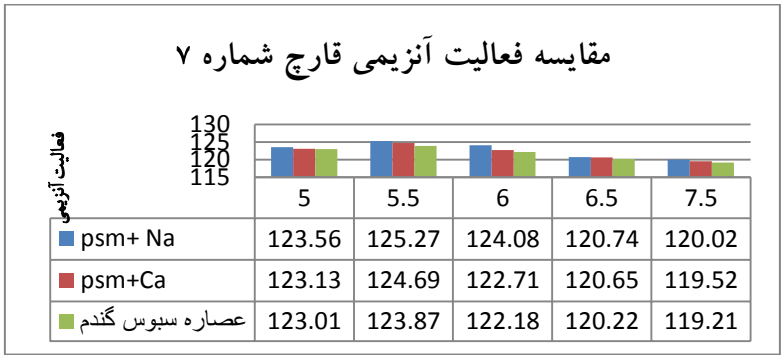


نمودار۲- فعالیت آنزیمی قارچ شماره ۲ در محیط‌ها و pH های مختلف

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

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

نمونه شماره ۲ در pH= ۵/۵ و در محیط کشت PSM + Na بیشترین فعالیت آنزیمی(۱۳۰/۱۱واحد آنزیمی) را از خود نشان داد و کمترین فعالیت آنزیمی (۱۲۵/۸واحد آنزیمی) به دست آمده در محیط کشت عصاره سبوس گندم با pH=۷/۵ ثبت گردید (نمودار۲ و جدول ۱).



نمودار۳- فعالیت آنزیمی قارچ شماره۷ در محیط ها و pH های مختلف

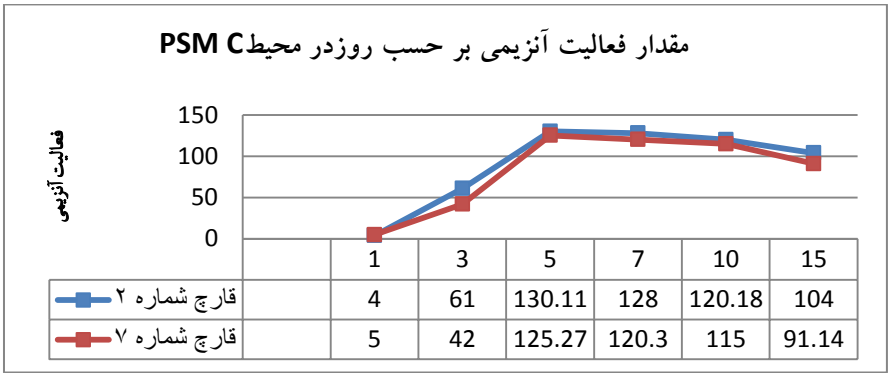
جدول ۲- میانگین فعالیت آنزیمی قارچ شماره ۷ در محیط‌ها و pH های مختلف ± انحراف معیار

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

نمونه شماره ۷ در pH= ۵/۵ و در محیط کشت PSM + Na بیشترین فعالیت آنزیمی(۱۲۵/۲۷واحد 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 (نمودار۳ و جدول ۲).

اثر زمان بر فعالیت آنزیمی

در تولید صنعتی یکی از مهمترین پارامترها برای ارزیابی روند تولید، توجیه اقتصادی وبه 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 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 نمونه های شماره ۲ و ۷ که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بودند (نمودار۴ و جدول ۳).



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

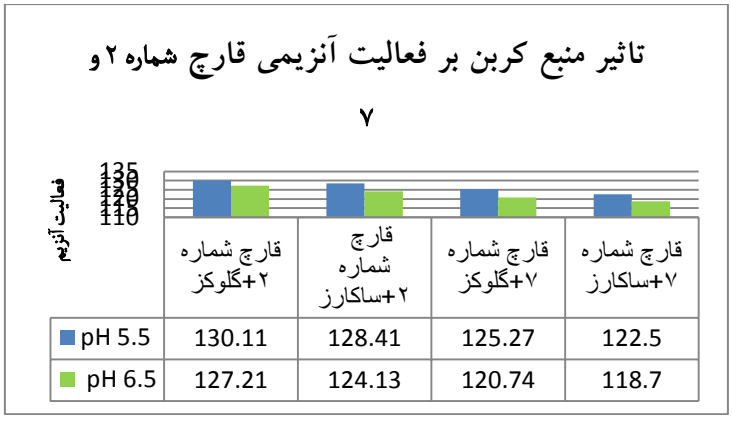
جدول۳- میانگین سنجش آنزیمی قارچ های شماره ۲ و ۷ در محیط (C) PSM در واحد روز± انحراف معیار

	۱روز	۳روز	۵روز	۷روز	۱۰روز	۱۵روز
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 می یابد.

تاثیر منبع کربن روی فعالیت آنزیمی

کربوهیدرات به عنوان منبع تهیه انرژی جزء اصلی و ضروری هر محیط کشت است. قندها معمولی‌ترین کربوهیدرات‌های مورد استفاده در محیط کشت می باشند. در این راستا، تاثیر قند مونوساکارید (گلوکز) و قند دی ساکارید (ساکارز) بر فعالیت آنزیمی نمونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت(نمودار۵).



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

جدول ٤- میانگین تاثیر منبع کربن بر فعالیت آنزیمی در pHهای ۵ و ۵/۵ ± انحراف معیار

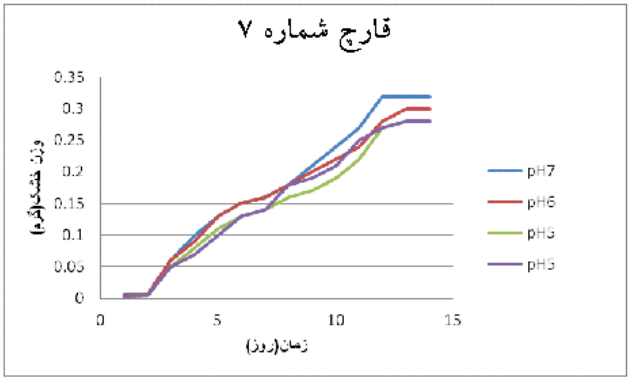
	قارچ۲ +گلوکز	قارچ۲ +ساکارز	قارچ۷ +گلوکز	قارچ۷ +ساکارز
pH ۵/۵	۱۳۰/۱۱±۰/۷۳	۱۲۸/۴۱±۰/۰۵	۱۲۵/۲۷±۰/۵۲	۱۲۲/۵±۰/۷۱
pH ۶/۵	۱۲۷/۲۱±۰/۱۶	۱۲۴/۱۳±۰/۵۳	۱۲۰/۷۴±۰/۸۵۱	۱۱۸/۷±۰/۰۷

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 قارچ ها

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.

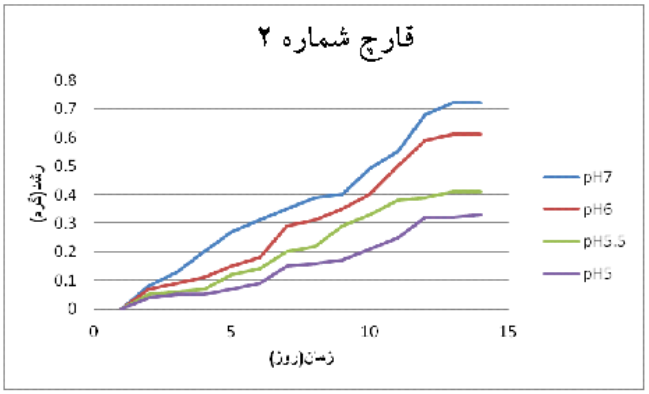
نمودار۶ نشان دهنده مقایسه رشد قارچ شماره ۷ در pH های ۵ - ۵/۵ -۶ و ۷ است.



نمودار ۶- مقایسه وزن خشک قارچ شماره ۷ در pH های متفاوت

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 قارچ شماره ۷ است، بیشترین مقدار رشد مربوط به pH=۷ در روز ۱۴با عدد۰/۳۲ بود. نکته قابل تامل در مورد این قارچ، میانگین

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 تغییر محسوسی در مقدار رشد قارچ مشاهده نشد.



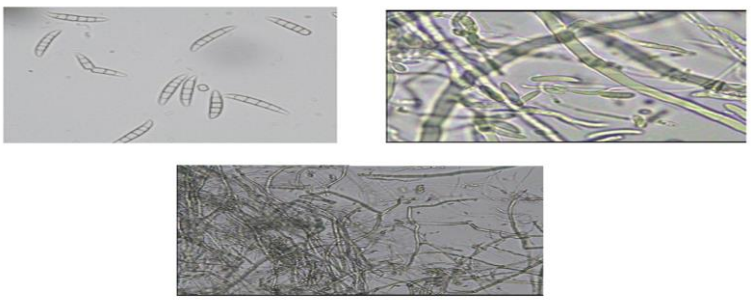
نمودار۷- مقایسه وزن خشک قارچ شماره ۲ در pH های متفاوت

نمودار ۷ نشان دهنده بیشینه رشد در طول ۱۴ روز در pHهای ۵ - ۵/۵-۶/۵ و ۷ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای قارچ شماره ۲ است و بیشترین مقدار رشد مربوط به PH = ۷ در روز ۱۴با عدد۰/۷۲ بود. با توجه به نمودار، سریع‌ترین بازه زمانی برای رشد در۷ =pH از روز نهم تا دوازدهم است.

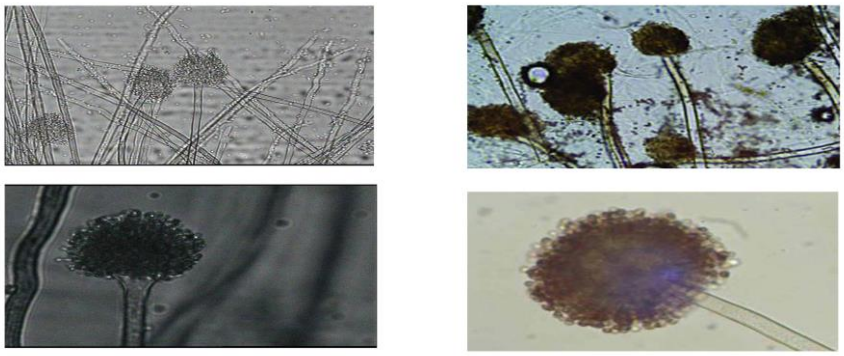
بررسی‌های مورفولوژیکی و شناسایی اولیه قارچ ها

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 میسلیوم‌های هوایی سفید رنگ تا کرم، رنگ پشت پلیت نیز کرم رنگ است.

میکروکنیدی‌ها فراوان، تک سلولی، تخم مرغی و قلوه‌ای هستند. قارچ، فیالیدهای منفرد و کوتاه در روی ریسه‌های هوایی تولید می کند. ماکروکنیدی ها، داسی شکل تا کمی کشیده بودند و اغلب دارای سه تا پنج جدار عرضی نازک می باشند. سلول انتهایی ماکروکنیدی نوک تیز و کمی خمیده و سلول پایه آن پاشنه‌ای شکل می باشد. این گونه پراکنش جهانی داشته و یک گونه توکسین زا می باشد (Nelson و همکاران،۱۹۸۳). با توجه به تطابق‌های صورت گرفته، قارچ شماره۲ فوزاریوم اگزیسپروم و قارچ شماره ۷ آسپرژیلوس نایجر تشخیص داده شد. هر دو این نمونه ها از خاک اطراف ریشه گیاهان تیره لگومینوز جدا شده بودند.



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

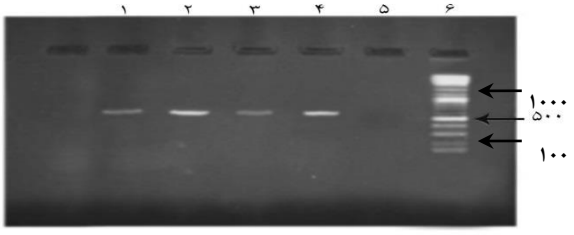


شکل ۴- تصاویر میکروسکوپی قارچ شماره ۷(آسپرژیلوس نایجر)

PCR نمونه‌ها

با توجه به میزان فعالیت آنزیمی، نمونه‌های ۲ و ۷ برای انجام واکنش PCR و با استفاده از پرایمر عمومی Its_1 و Its_4 انتخاب شدند(شکل ۵). معمول‌ترین روش برای بررسی محصولات PCR، روش ژل الکتروفورز است که از طریق رنگ آمیزی با رنگ اتیدیوم بروماید قا

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.



شکل ۵- چاهک۱: محصول کلنی PCR قارچ شماره ۲، چاهک ۲:محصول PCR قارچ شماره ۲، چاهک۳: محصول کلنی PCR قارچ شماره ۷، ۴: محصول PCR قارچ شماره ۷، چاهک ۵:کنترل منفی ، چاهک۶: سایز مارکر

شناسایی مولکولی

پس از بررسی نتایج حاصل از توالی یابی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ژنتیک آنالایزر در پایگاه طلاعاتی NCBI در قسمت BLAST ، نمونه‌های قارچی شماره ۲ و ۷ که قبلا شناسایی مورفولوژیکی شده بودند مورد تائید قرار گرفتند. نمونه‌ها به شرح زیر معرفی شدند (جدول۵).

جدول ۵- نمونه های تائید شده از نظر مولکولی

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

بحث و نتیجه‌گیری

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 به‌دلیل 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 به‌کمک محلول کبالت کلراید، آمونیوم مولیبدات و آمونیوم وانادات رنگ‌آمیزی شدند. علت استفاده از این روش را می توان این‌گونه 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 می‌کند (Bae و همکاران،۱۹۹۹). درصورتی‌که ایجاد هاله اولیه تنها به دلیل تولید اسید در محیط باشد، به‌دلیل عدم وجود گروه‌های هیدروکسیل آزاد، کبالت کلراید هیچ پیوندی در محیط برقرار نخواهد کرد و آزاد باقی می‌ماند. آمونیوم مولیبدات و آمونیوم وانادات به کبالت کلراید متصل شده و در نهایت از محیط خارج می‌شوند.

همان‌طور 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 به‌همراه 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 می‌شود. به‌علاوه بعد از اضافه کردن سدیم فیتات، pH محیط مجددا کاهش می یابد) و اشتباه در محاسبه فعالیت آنزیمی می‌شود. نتایج به‌دست آمده ازگزارش محققان نیزمشابه نتایج این تحقیق بوده و این نظر را تایید می‌کند (Bae و همکاران،۱۹۹۹).

سنجش آنزیمی

محیط‌هایC وG 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 pH =۶ برای قارچ شماره ۱ و pH =۶/۵ برای قارچ شماره۲ ،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 به‌جای سدیم فیتات استفاده می شود.

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

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 به‌طوری‌که 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، نشان‌دهنده نقش مهم حفاظتی یون کلسیم دو بار مثبت در برابر صدمات ناشی از حرارت می باشد(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 محیط‌کشت عصاره سبوس‌گندم (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. به‌نظر می‌رسد سبوس گندم با ۰/۹۲ 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 به‌دست 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 قارچ ها است. به‌همین ترتیب، نمونه شماره ۸ با کمترین 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 تک‌معده، توانایی تحمل pH اسیدی و مقاومت به حرارت برای آماده‌سازی و پلت کردن دان مورد استفاده در صنعت طیور است.

در تحقیقی با شناسایی واریته Asp.L117 و خالص‌سازی فیتاز آن، موفق به تولید آنزیمی با پایداری و مقاومت دمایی بسیار بالا و حداکثر عملکرد در pH = ۵/۵ 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 درحالی‌است 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 اگزیسپروم و ۱۲۵/۲۷ واحد در نانوگرم برای قارچ آسپرژیلوس 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 نسبتا 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 تولیدکننده 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

قارچ فوزاریم مربوط به pH= ۷ است؛ ولی با توجه به هدف طرح که تولید آنزیم فیتاز است، pH = ۵/۵ که مناسب ترین pH برای فعالیت فیتاز است پیشنهاد میگردد. با توجه به نمودار۴، کاهش فعالیت آنزیمی در روز پنجم شروع می‌شود و به‌تدریج افزایش می‌یابد. در این pH تا روز ششم شیب نمودار قابل قبول و در روز هفتم، روند رشدی کاهش می‌یابد. با توجه به نمودار، به‌نظر می‌رسد روز هفتم بهترین زمان برای انجام مراحل خالص‌سازی آنزیم برای قارچ فوزاریم اگزیسپروم باشد. در مورد قارچ آسپرژیلوس نایجر ، رشد قارچ در تمام pH ها تفاوت چندانی ندارد و به‌نظر 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 Its_1 و Its_4 استفاده شد که از خصوصیات مثبت آن می‌توان به استفاده از لوازم و مواد ساده بدون نیاز به پروسه‌های طولانی را نام برد.

میرهندی در سال ۲۰۰۷،کلونی PCR را سریع‌ترین روش برای تست‌های تشخیصی مخمر اعلام کرد. نکته قابل توجه این است که کلونی که برداشته می‌شود، حتی‌المقدور کمترین مقدار باشد؛ چون هر چه مقدار کلونی زیاد باشد، تجمع DNA بالا رفته و در نتیجه پرایمرها نمی‌توانند انیلینگ 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.

استفاده صنعتی ازقارچ فوزاریم اگزیسپروم

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 هوازی قارچ فوزاریوم ونئوناتوم روی سوبسترای کربوهیدراتی بررسی شده و توانایی تولید محصول حاوی تقریبا ۴۲٪ پروتئین خام در شرایط آزمایشگاهی ارائه گردیده است (آهنگی زهرا و همکاران، ۱۳۸۵). همچنین، تولید نانوذرات نقره به‌صورت برون‌سلولی با قطر حداکثر ۲۰ نانومتر به‌وسیله قارچ فوزاریوم اگزیسپروم در غلظت۱۰-۳ مولار در شرایط آزمایشگاهی گزارش شد(سجادی گلشید وهمکاران،۱۳۸۸).

لازم به ذکر است، تا به حال گزارشات کمی مبنی بر استفاده از قارچ فوزاریوم اگزیسپروم برای تولید فیتاز ثبت شده است ولی با توجه به بیماری زایی کمتر نسبت به سایر قارچ‌های تولید کننده فیتاز (که معمولا جزو خانواده آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم هستند و اکثرا آلرژن و حساسیت زا برای انسان و دام می باشند) 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 به‌نظر می‌رسد که باید با انجام سایر آزمایشات و بررسی‌های بیشتر، صحت این موضوع تایید شود.

استفاده‌های صنعتی از قارچ آسپرژیلوس 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 واریته‌ای 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 میکروارگانیسم های همزیست گیاه چای،

آسپرژیلوس نایجر است. این قارچ با تولید خارج سلولی سلولاز موجب تجزیه و تخمیر برگ‌های چای در حین مرحله فرآوری می شود. اثرات معنی دار استفاده از سلولاز تولید شده توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر در زمان فراوری و تخمیر چای در کارخانه در رابطه با تیافلاوین، تیاروبیجین، رنگ و طعم و عطر، و شفافیت و سایر خصوصیات کیفی نیزگزارش شده است(Murugesan و همکاران،۲۰۰۲).

نتیجه گیری

در این تحقیق، بهترین قارچهای مولد فیتاز از نمونه خاک اطراف ریشه گیاهان تیره لگومینوز جداسازی شدند. قارچ‌های فوزاریوم اگزیسپروم 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 اگزیسپوروم 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 اگزیسپوروم در مقیاس آزمایشگاهی. نشریه دنیای میکروب ها. دوره ۲، شماره ۱.

Anna, l., 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.

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.

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.

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.

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 enzyology, 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 properies 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 subtilist. *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.