

# تولید و خالص‌سازی فیتاز اسیدی و قلیایی از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و باکتری‌های نوترکیب *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سابتلیس* با هدف دستیابی به یک ترکیب مفید در جیره طیور



مهدی کسرای<sup>۱\*</sup>، ریحانه سریری<sup>۲</sup>، علیرضا حسایی نامقی<sup>۳</sup>، محمدرضا نصیری<sup>۴</sup> و احمد آسوده<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> ایران، رشت، دانشگاه گیلان، پردیس دانشگاهی، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> ایران، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

<sup>۳</sup> ایران، مشهد، سازمان آموزش، تحقیقات و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، بخش تحقیقات علوم دامی

<sup>۴</sup> ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، پژوهشکده فناوری زیستی، گروه تحقیقاتی پروتئین‌های نوترکیب

<sup>۵</sup> ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه شیمی

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

## چکیده

بمنظور افزایش قابلیت دسترسی فسفر و سایر مواد معدنی در جیره طیور و تک‌معدنی‌ها و کاهش آلودگی محیطی، این پژوهش با هدف تولید آنزیم فیتاز جهت هضم فیتات در مجرای گوارشی طیور انجام گرفت. بدین منظور، فیتاز قارچ *آسپرژیلوس نایجر* روی محیط کشت PSM و فیتازهای *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سابتلیس* با استفاده از فن‌آوری DNA نوترکیب تولید شدند. آنزیم‌ها با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل سفارز (Ni-NTA) -Q- سفارز خالص‌سازی شده و با استفاده از الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE)، وزن ملکولی آنزیم‌ها بترتیب برای فیتاز قلیایی *باسیلوس سابتلیس* (PhyC)، فیتاز *اشرشیاکلی* (appA) و فیتاز قارچی *آسپرژیلوس نایجر* (PhyA) حدود ۴۲، ۴۴ و ۶۶ کیلو دالتون تخمین زده شد. فعالیت فیتاز برای PhyC، appA، و PhyA بترتیب ۵۴/۸۱، ۳۵/۴۹ و ۲۹/۳۳ (U/ml) تعیین شدند. با مقایسه پارامترهای کنتیکی نشان داده شد که آنزیم PhyC می‌تواند در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد فعال و دارای پایداری حرارتی باشد، درحالی‌که آنزیم appA دارای بهترین دامنه فعالیت و راندمان آنزیمی با pH حدود ۴ تا ۴/۵ در لوله گوارشی می‌باشد. در این خصوص، بیشترین میل ترکیبی آنزیم به سوبسترا با Km برابر ۰/۰۹ میلی‌مولار برای آنزیم فیتاز اسیدی *اشرشیاکلی* (appA) رخ می‌دهد. طبق نتایج بدست آمده، ترکیب مناسبی از این آنزیم‌ها می‌تواند کارایی قابل‌قبولی برای هیدرولیز فیتات در مجرای گوارشی پرندگان داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: فیتاز، اسید فیتیک، تولید نوترکیب، مجرای گوارشی

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

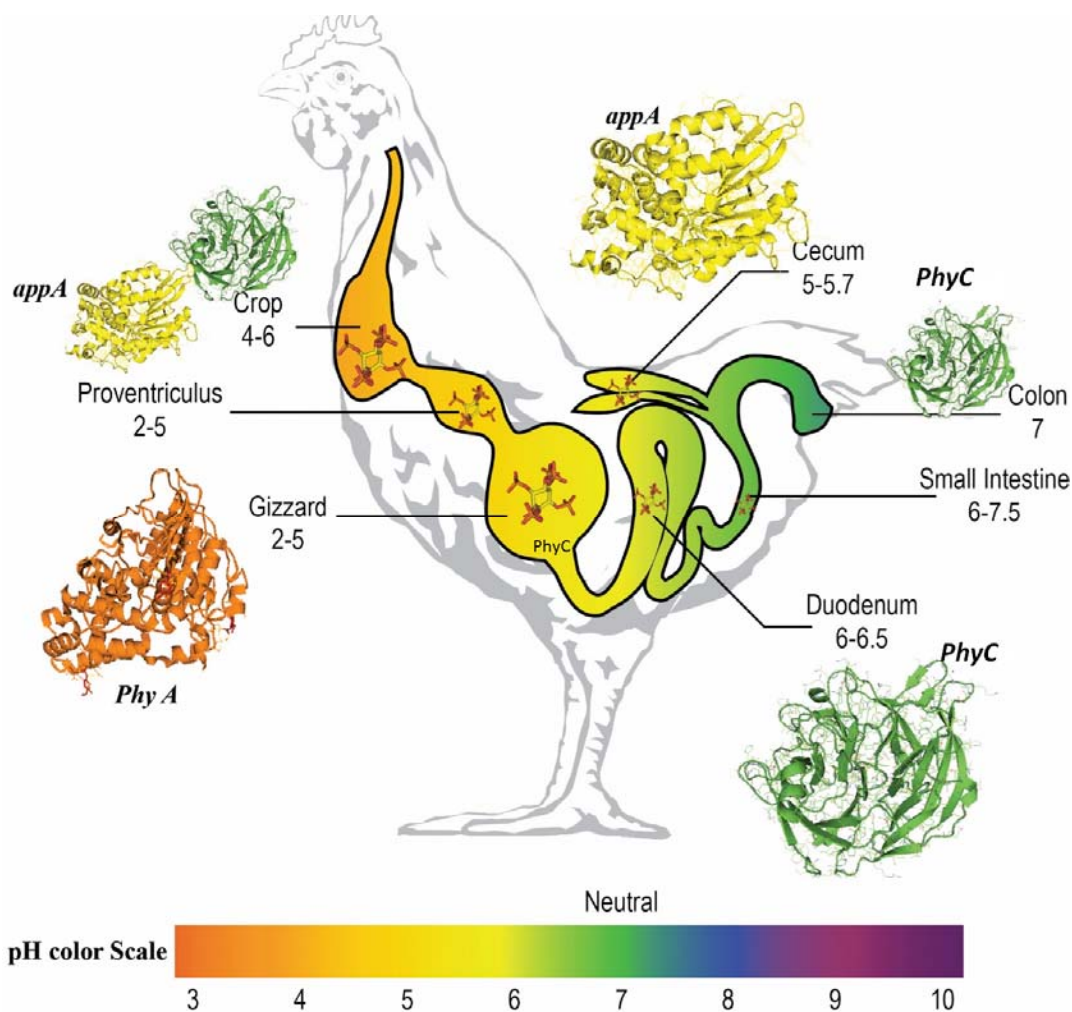
## مقدمه

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

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

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

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



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

### مواد و روشها

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

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

خالص سازی روی ستون مرتبط با  $Ni^{2+}$ -NTA انجام گرفت (Bio-Rad, CA, USA). همه مراحل خالص سازی در دمای ۴ درجه سانتی گراد طبق دستورالعمل های فراهم شده توسط Novagen USA انجام شد.

**تعیین فعالیت فیتاز:** نمونه ها برای اندازه گیری فعالیت فیتاز از طریق انکوئبایسیون ۱۵۰ میکرولیتر پروتئین تغلیظ شده (۰/۱ mg/ml) با ۶۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (۰/۲ درصد وزن حجمی فیتات سدیم، Sigma, St Louis, MO, USA در ۰/۱ مولار بافر استات سدیم، با pH برابر ۵) بمدت ۳۷ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد مورد ارزیابی قرار گرفتند. ۷۵۰ میکرولیتر از محلول ۵ درصد (وزن حجمی) تری کلرواستیک برای متوقف کردن واکنش افزوده گردید. ۶ میلی لیتر از واکنشگر رنگی مولبیدات آمونیوم (با وزن حجمی ۱/۵ درصد)، محلول اسید سولفوریک ۵/۵ درصد (۷/۷)، و سولفات فروس ۲/۷ درصد (بر اساس وزن حجمی) به ۱/۵ میلی لیتر از محلول نمونه افزوده گردید. تولید فسفومولیدن در طول موج ۷۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. نتایج با یک منحنی استاندارد تهیه شده با فسفات معدنی (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) مقایسه شد. یک واحد فعالیت آنزیمی بصورت مقدار آنزیم هیدرولیز کننده یک میکرو مول فسفات در هر دقیقه تحت شرایط آزمایشگاهی تعیین گردید.

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

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

۲۰-۳۰٪، ۳۰-۴۰٪، ۴۰-۵۰٪، ۵۰-۶۰٪، ۶۰-۷۰٪، ۷۰-۷۰٪، ۸۰٪ اشباع رسوب داده شد. در هر مرحله رسوب دهی، سانتریفوژ با  $g \times 24000$  بمدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. رسوب بدست آمده از هر مرحله در بافر ۵۰ mM استات سدیم با pH برابر ۵/۵ حل شده، سپس در مقابل بافر ۵۰ mM استات سدیم (pH=۵/۵) بمدت ۲۴ ساعت دیالیز شدند. محلول آنزیمی بدست آمده بعد از دیالیز به ستون تعویض آنیونی Q- سفارز متعادل شده با بافر ۵۰ mM استات سدیم (pH=۵/۵) انتقال داده شد. سپس ستون با شش غلظت مختلف NaCl (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۱، ۲، ۳ مولار) در بافر ۵۰ mM استات سدیم (pH=۵/۵) شستشو داده شد. محلول خروجی از ستون به میکروتیوپ های ۲ میلی لیتری انتقال داده شده و فعالیت هر یک در ۷۰۰ nm اندازه گیری شد. نمونه های دارای فعالیت با یکدیگر جمع شدند و بعد از دیالیز مطابق روش توضیح داده شده بمنظور تفکیک با SDS-PAGE در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تمامی مراحل تخلیص در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت.

**تولید فیتاز PhyC و appA در اشرشیاکلی (DE3) B121:** در تحقیقی که بروی مخمر پیکیا پاستوریس بعنوان ابزار آزمایشگاهی مناسب جهت تولید پروتئین های نوترکیب صورت گرفت. نتیجه ی حاصل نشان داد که این مخمر نسبت به سایر میزبانها، سیستم ترشحی مناسبی (درون سلولی و برون سلولی) با محیط کشت ارزان و همچنین امکان دستکاری ژنتیکی برای دستیابی بمقادیر بالایی از پروتئین های نوترکیب با ساختار درست بشمار می رود (۱). در تحقیق اخیر پلاسمید pET21 شامل PhyC و appA تولید کننده آنزیم نوترکیب برگرفته از تحقیق آراین نژاد و همکاران (۴) می باشد. بطور خلاصه، پلاسمید نوترکیب به اشرشیاکلی BL21 (DE3) ترانسفورم گردید و ۰/۵ میلی مولار از محلول ایزوپروپیل بتا دی تیوگلاکتوزید یا IPTG بمنظور القای بیان پروتئین افزوده شد. دو لیتر از سلول های القائی جمع آوری شد و بدنال آن لیز سلولی و

۲). محققین از فیتین و گلوکز بعنوان منبع منحصر به فرد کربن جهت بررسی تولید فیتاز *Pseudomonas* استفاده کردند. آنها نشان دادند که هر چه ضخامت ناحیه هاله شفاف تر باشد، فعالیت فیتاز بالاتر خواهد بود (۱۱). بنابراین، بمنظور انتخاب بهترین ژن مولد فیتاز مابین این ۵ ایزوله، نمونه ایجاد کننده بزرگترین ناحیه هاله حول خود بعنوان نمونه اصلی برای ایزوله نمودن ژن فیتاز *آسپیریلوس نایجر* مورد آزمایش قرار گرفت. بطوریکه این نمونه جهت پس از استخراج DNA و PCR جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد.

رگرسیون خطی برای ایجاد مدل های رگرسیون جهت برآورد فعالیت فیتاز مبتنی بر مقادیر مختلف دما و pH استفاده شدند، درحالی که آنالیزهای رگرسیون غیرخطی برای برآورد مقدار فسفر آزاد شده از فسفات های مختلف معدنی استفاده شدند. تفاوت ها بلحاظ آماری در سطح معنی داری ( $P < 0/05$ ) مدنظر قرار گرفتند.

## نتایج و بحث

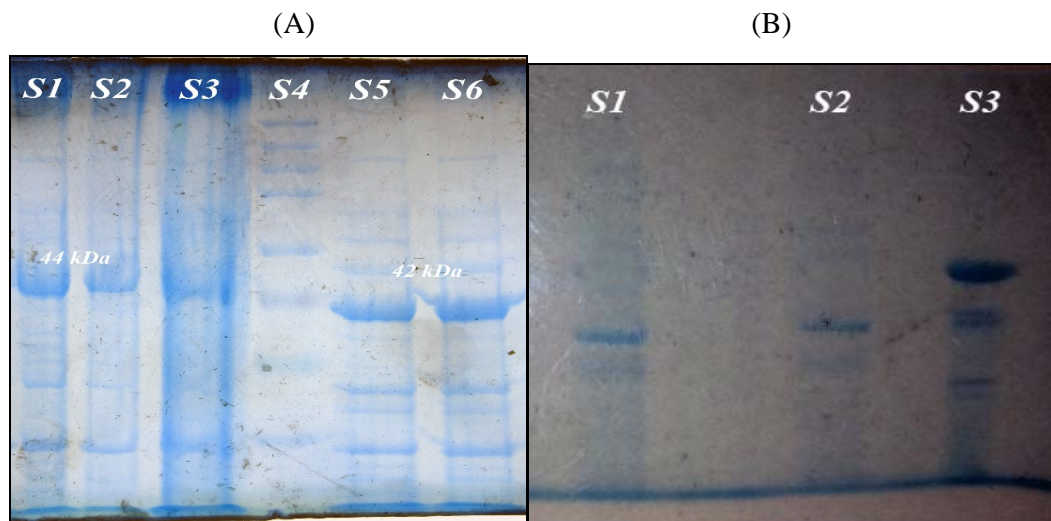
شناسایی *آسپیریلوس مولد فیتاز*: سه جدایه *آسپیریلوس نایجر* قادر به هیدرولیز فیتات سدیم بعنوان سوبسترا در محیط PSM و تولید نواحی شفاف ایجاد شده شدند (شکل



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

بود. همچنین، درمورد فیتاز PhyC وزن مولکولی ۶۶ کیلو دالتون روی ژل الکتروفورز پلی اکریل امید تشخیص داده شد. تخلیص پروتئین PhyC و aapA توسط ستون  $Ni^{+}$  و ستون Q-سفاز (شکل ۳) انجام گردید. غلظت پروتئین حدود ۷/۹۷، ۴/۷۶ و ۳/۵۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای PhyC، appA و PhyA بترتیب تخمین زده شد. محققین زیادی روی تولید فیتاز به نتایج مشابهی دست یافتند (۱۴، ۲۰، ۲۷).

تولید فیتاز باکتریایی: طبق تحقیقی که جهت تولید آنزیم فیتاز با استفاده از باکتری باسیلوس جدا شده از سبوبات بستر دریای مازندران صورت گرفت. نشان داده شد که عصاره سبوس برنج (بعنوان سوبسترا) می تواند با سطح تولید فیتاز بالاتر جایگزین سدیم فیتات خالص شود (۲). در این پژوهش فیتاز نوترکیب با استفاده از IPTG بعنوان القاگر تولید شد (شکل ۳). وزن مولکولی پروتئین فیتاز بترتیب مقادیر ۴۲ و ۴۴ کیلو دالتون برای PhyC و aapA



شکل ۳- آنالیز SDS-PAGE مربوط به PhyA، appA، PhyC و (A). آنالیز مربوط به appA (S1 و S2)، PhyC (S3 و S5 و S6) و استاندارد پروتئینی (S3) (B): آنالیز خالص سازی جزئی پروتئین PhyC (S1)، appA (S2) و PhyA (S3). الکتروفورز مطابق روش لاملی انجام گرفت.

دارند و PhyA در محدوده ۴٫۵-۲ pH بیش از ۸۰٪ فعالیت ماکزیمم خود را دارا می باشد. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده می شود که ترکیب فیتازها (PhyA، appA و PhyC) حذف فسفر از فیتات را در همه قسمت های مسیر دستگاه گوارش ممکن می سازد.

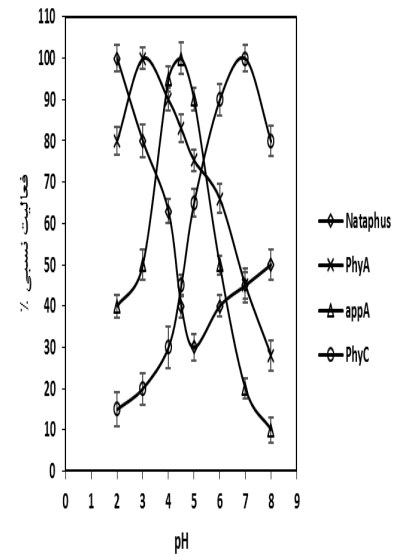
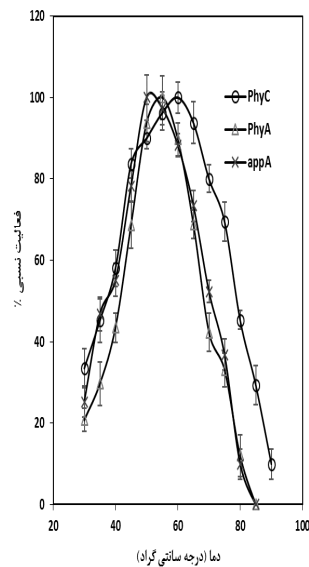
گزارشات گذشته قابلیت میکروارگانسیم های جدا شده از قارچ و باکتری برای تولید فیتاز را نشان دادند (۲۴). اما در مطالعه اخیر از طریق بهینه نمودن شرایط محیطی، قابلیت تولید فیتاز با راندمان بالا میسر شد. مطالعات قبلی نشان داد که آنزیم فیتاز برون سلولی تولید شده از باکتری باسیلوس ساتیلیس (natto) با pH بهینه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

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

جدول ۱- نتایج اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های فیتاز تولیدی و تعیین pH بهینه

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

نمونه سنجش شده ما می‌باشد. آنزیم فیتاز تولید شده از قارچ آسپرژیلوس نایجر با pH بهینه ۲/۵ و Km حدود ۰/۶ میلی مولار، حداکثر فعالیت ویژه آنزیمی برابر ۱۰۰ واحد بین المللی در هر میلی گرم را داشت (۲۷). این نتایج تقریباً با نتایج پژوهش اخیر همخوانی داشت.



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

بین این روش‌ها، ترکیب آنزیم‌ها باعث ایجاد بیشترین ثبات و فعالیت آنزیمی در دستگاه گوارش پرندگان شد. براساس نتایج این پژوهش، فیتاز اسیدی یا آسپرژیلوس نایجر (PhyA)، فیتاز اکولای (appA) و فیتاز قلیایی

### نتیجه‌گیری کلی

اخیراً، افزایش تقاضا برای تولید پروتئین، تولیدکنندگان را ترغیب نموده تا از هیدرولیز آنزیمی در تغذیه حیوانات بمنظور بهبود راندمان خوراک مصرفی استفاده نمایند. از

## تشکر و قدردانی

در پایان از پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد و آقای دکتر محمدرضا نصیری عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد که در تهیه پروتئین‌های نوترکیب همکاری داشته‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

باسیلوس سابتلیس (PhyC) می‌تواند در کل دستگاه گوارش فعال باشند. بعلاوه یافته‌های این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیمی و دیگر خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم‌های تولیدی داخلی طبیعی قارچی (PhyA) و نوترکیب باکتریایی (PhyC, appA) کاملاً متفاوت می‌باشد. لذا این تفاوت می‌تواند بعنوان نقطه عطفی برای ترکیب این آنزیم‌ها در جیره طیور استفاده شود.

## منابع

- ۱-الیاسی گرچی، ز، امیری یکتا، ا، حسنی، س. و صنعتی، م. ح. ۱۳۹۴. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. پیکاپاستوریس؛ ابزار آزمایشگاهی مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب. ۲۸(۲): ۱۵۴-۱۷۷.
- ۲-محسنی، م، قربانزاده، ف. وسیدعلیپور، ب. ۱۳۹۶. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. تولید فیتاز از عصاره سبوس برنج به کمک سویه‌های باسیلوس جدا شده از رسوبات بستر دریای مازندران. ۳۰(۴): ۴۷۶-۴۸۷.
- 3-Aaron A, Greiner PR, Selinger LB (2009). Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by a protein tyrosine phosphatase-like inositol polyphosphatase from *Megasphaera elsdenii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82: 95-103.
- 4-Ariannejad H, Nassiri MR, Aslaminejad A, Tahmoospour M, Valizadeh R, Asoodeh A, Ghovvati S (2012). Cloning, nucleotide characterization and modeling expression of phytase gene PhyC from *Bacillus subtilis*. *Journal of Agriculture Biotechnology*. (4): 19-33.
- 5-Ariannejad H, Nassiri MR, Aslaminejad A, Asoodeh A, Dehghani H (2014). Cloning, Characterization and Overexpression of Thermostable myo-inositol hexakisphosphate From *Bacillus subtilis* ATCC12711 in *Escherichia coli*. *Journal of agriculture biotechnology*. (5): 130-146.
- 6-Cromwell GL, Coffey RD (1991). P - a key essential nutrient, yet a possible major pollutant - its central role in animal nutrition, p. 133. In T. P. Lyons (ed.), *Biotechnology in the feed industry*. Proceedings, Alltech 7th Annual Symposium. Alltech Technical Publications, Nicholasville, Ky.
- 7-González M, Brito N, González C (2012). High abundance of Serine/Threonine-rich regions predicted to be hyper-O-glycosylated in the secretory proteins coded by eight fungal genomes. *BMC Microbiology*. 12:213
- 8-Graf E, Empson K, Eaton JW (1987). Phytic acid. A natural antioxidant. *J. Biol. Chem.*, 262: 11647-11651.
- 9-Greiner R, Konietzny U, Jany KD (1993). Purification and characterization of two APases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303: 107-113.
- 10-Han Y, Lei XG (1999). Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* 364:83-90.
- 11-Hosseinkhani B, Emtiazi G, Nahvi I (2009). Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas* spp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, (17): 4229-4232
- 12-Howson, SJ, Davis RP (1983). Production of phytase-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 5, pp.377-382.
- 13-Jin J, Lee YK, Wickes BL (2004). Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 4293-4296. doi:10.1128/JCM.42.9.4293-4296.2004
- 14-Jin J, Lee YK, Wickes BL (2004). Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 4293-4296.



- 15-Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J (1998). Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning, and Sequencing of a Novel Phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2079-2085.
- 16-Kim, T., Mullaney, E. J., Porres, J. M., Roneker, K. R., Crowe, S., Rice, S., Ko, T., Ullah, A. H., Daly, C. B., Welch, R., ... Lei, X. G. (2006). Shifting the pH profile of *Aspergillus niger* PhyA phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness as an animal feed additive. *Applied and environmental microbiology*, 72(6), 4397-403.
- 17-Kumar V, Singh G, Sangwan P, Verma AK, Agrawal S (2014). Cloning, Sequencing, and In Silico Analysis of -Propeller Phytase *Bacillus licheniformis* Strain PB-13. *Biotechnology Research International*, 1-11.
- 18-Lehmann M, Lopez-Ulibarri R, Loch C, Viarouge, C, Wyss M, van Loon AP (2000). Exchanging the active site between phytases for altering the functional properties of the enzyme. *Protein Sci.* 9, 1866-1872.
- 19-Liu QQ, Li QF, Jiang L, Zhang DJ, Wang HM, Gu MH, Yao QH (2006). Transgenic expression of the recombinant phytase in rice (*oryza sativa*). *Rice science*, 13 (2): 79-84.
- 20-Mullaney EJ, Daly CB, Ullah AH (2000). Advances in phytase research. *Adv. Appl. Microbiol.*, 47: 157-199.
- 21-Nassiri MR, Ariannejad H (2015). Comparative Analysis of Peripheral Alkaline Phytase Protein Structures Expressed in *E. coli*. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology Journal*. (Accepted).
- 22-Pal Roy, M., Mazumdar, D., Dutta, S., Saha, S. P., & Ghosh, S. (2016). Cloning and Expression of Phytase appA Gene from *Shigella* sp. CD2 in *Pichia pastoris* and Comparison of Properties with Recombinant Enzyme Expressed in *E. coli*. *PloS one*, 11(1), e0145745. doi:10.1371/journal.pone.0145745
- 23-Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK (1989). *Phytates in cereals and legumes*. Boca Raton, CRC Press, Inc.
- 24-Selvamohan T, Ramadas V, Rejibeula M. Optimization of Phytase Production by *Pseudomonas sp.* Isolated from Poultry Faces. *Int Journal Modern Engineering Research* 2012; 2(3): 1326-1330.
- 25-Shimizu M (1992). Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto).N-77. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56: 1266 • 1269
- 26-Van Hartingsveldt W, van Zeijl CMJ, Harteveld GM, Gouka RJ, Suukerbuyk MEG, Luiten R GM, van Paridon PA, Selten GCM, Veenstra AE, van Gorcom RFM, van den Hondel AMJJ (1993). Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*. *Gene* 127:87-94.
- 27-Vats P, Banerjee UC (2005). Biochemical characterization of extracellular phytase (myoinositol hexakisphosphate phosphohydrolase). from a hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van Teighem. *Journal Indian Microbiology and Biotechnology* 32: 141-147.
- 28-Wang, Y., Ye, X., Ding, G., & Xu, F. (2013). Overexpression of phyA and appA genes improves soil organic phosphorus utilisation and seed phytase activity in *Brassica napus*. *PloS one*, 8(4), e60801.
- 29-Xuan NT, Hang MT, Thanh VN (2009). Cloning and over Expression of an *Aspergillus niger* XP Phytase Gene (phyA) in *Pichiapastoris*. *Engineering and Technology*, 56: 750-753.

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

Kasraei M.<sup>1</sup>, Sariri R.<sup>2</sup>, Hesabi Namaghi A.<sup>3</sup>, Nasiri M.<sup>4</sup> and Asoodeh A.<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Biology, University of Campus2, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran.

<sup>3</sup> Dept. of Animal Science Research, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Khorasan Razavi Province, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Mashhad, I.R. of Iran.

<sup>4</sup> Recombinant Proteins Research Group, The Research Institute Of Biotechnology, Ferdowsi University Of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

<sup>5</sup> Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

### Abstract

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

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