انجمن علوم دامی ایران

دانشگاه کردستان

هشتمین کنگره علوم دامی ایران

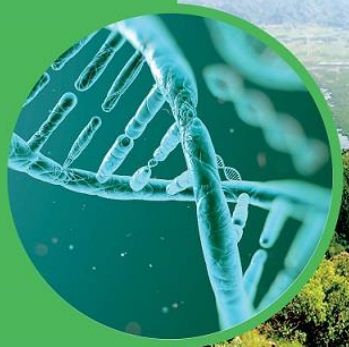
۶ و ۷ شهریور ماه ۱۳۹۷ - دانشگاه کردستان

8th Iranian Animal Science Congress

28-29 August 2018 - University of Kurdistan

محورهای کنگره

- ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور
- تغذیه دام و طیور
- فیزیولوژی دام و طیور
- بهداشت و بیماری‌های دام و طیور
- مدیریت و پرورش دام و طیور
- پرورش زنبور عسل و کرم ابریشم



مهلت ارسال مقالات
۱۳۹۷/۰۳/۱۵

کردستان، سنندج، بلوار پاسداران، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی

as8c@uok.ac.ir conf.uok.ac.ir/as8c ۰۸۷-۳۳۶۶۸۵۱۲ / ۰۹۱۰۹۸۶۲۵۸۱

بررسی فعالیت فیتازی باکتری‌های بی هوازی شکمبه در شرایط برون تنی

لیلا نکوئی [۱]، رضا مجیدزاده هروی [۲*]، سید علیرضا وکیلی [۳]
۱.دانشجوی کارشناسی‌ارشد، بخش علوم دام، دانشگاه فردوسی مشهد
۲.استادیار، بخش علوم دام، دانشگاه فردوسی مشهد
۳.دانشیار، بخش علوم دام، دانشگاه فردوسی مشهد
ایمیل نویسنده مسئول:rmajidzadeh@um.ac.ir

چکیده

هدف از این آزمایش بررسی توانایی باکتری های شکمبه برای تجزیه فیتات و همچنین بررسی اثر دوعامل، نوع بافر و pH بر میزان فعالیت فیتازی آنها در شرایط آزمایشگاهی بود. فیتات شکل اصلی ذخیره سازی فسفر در گیاهان می‌باشد که برای حیوان تک معده ای قابل استفاده نمی‌باشد. شکمبه نشخوارکنندگان منبع غنی از باکتری هایی است که توانایی تولید آنزیم فیتاز را دارند این آنزیم می تواند سبب تجزیه فیتات گیاهی شود. برای شناسایی باکتری‌هایی با توانایی تولیدفیتاز، مایع شکمبه را پس از جمع آوری صاف نموده و روی محیط کشت مخصوص باکتری‌های شکمبه حاوی سدیم فیتات بصورت بی هوازی در دمای ۳۹درجه رشد داده شد. سپس رنگ آمیزی به روش آمونیوم مولیبدات در محیط‌های حاوی سدیم فیتات صورت گرفت و توانایی تولید آنزیم فیتاز روی محیط کشت اختصاصی تعیین شد. همچنین فعالیت آنزیمی فیتاز در باکتری‌های تولید کننده این آنزیم در pH های مختلف و در سه نوع بافر تعیین شد. از میان ۴۰ باکتری جدا شده تعداد ۲۲کلنی توانایی تولید فیتاز را داشتند که بصورت هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها مشخص گردید. با اندازه گیری فعالیت آنزیمی این ۲۲ کلنی، ۶ گونه R1,R2,R3,R4,R5,R6 را که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بودند انتخاب شدند. حداکثر فعالیت آنزیمی برای اغلب آنها در pH اسیدی و در دو بافر گلیسین و استات تعیین شد. با توجه به فعالیت فیتازی سویه‌های منتخب در pH های ۴/۵ و ۵/۵ استفاده از این باکتری‌ها به صورت مکمل‌های میکروبی در خوراک دام های تک معده ای پیشنهاد می شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های شکمبه ، فعالیت آنزیمی، فیتات، فیتاز

مقدمه

اسید فیتیک و متابولیت های آن نقش مهمی در فرایندهای فیزیولوژیکی یوکاریوتی دارندکه از جمله آن ترمیم DNA، کنترل انتقال عروق و تکثیر سلولی می‌باشد.(Conway and Miller. 2007) فیتاز هیدرولیز فیتات به فسفات معدنی، اینوزیتول و منواینوزیتول را تسریع می‌کند و متعلق به خانواده اسید هیستیدین فسفاتاز است (Pasamontes. et al.,1997.). این فرایند موجب افزایش کیفیت مواد مغذی غنی از اسید فایتیک در صنایع غذایی و خوراک با افزایش قابلیت زیست پذیری آنزیم، اسید فسفریک و مواد معدنی برای انسان و حیوانات تک معده ای می شود (Pandey. et al.,2001)تا کنون مشخص شده که محیط زیست سطح بالایی از تنوع زیستی میکروبی رانشان می دهد؛با این حال، تنها بخش کوچکی از آن شناخته شده است.(Prosser,. 2015) فیتاز در گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم ها وجود دارد (Fu et. al.,2008). تحقیقات نشان داده که فیتازهای میکروبی بیشترین احتمال برای تولید فیتازهای مورد استفاده در مقیاس تجاری برای برنامه های کاربردی بیوتکنولوژی هستند (Sapna and Singh. 2016). حیوانات نشخوارکننده می توانند اسید فیتیک را به عنوان منبع فسفر استفاده کنند زیرا باکتری هایی که در شکمبه آنها زندگی می کنند به خوبی تولید کننده انواع مختلف فیتاز هستند (Markiewicz., 2013) . از این رو نشخوارکنندگان با توجه به میزان باکتریهای تولیدکننده فیتاز در شکمبه، برای استفاده از فیتاز توانایی ویژه ای دارند(Raun et. al., 1956).اغلب پژوهش ها در مورد آنزیم فیتاز از منابع قارچی و باکتریهایی مانند *ایکولای* و *باسیلوس* های بدست آمده از خاک مانند *باسیلوس سابتلیس* می باشد و کمتر به منابعی مانند باکتری های شکمبه نشخوارکنندگان توجه شده است. از این رو هدف از انجام این

آزمایش جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده فیتات از شکمبه نشخوارکنندگان و بررسی کنتیک آنزیم فیتاز تولید شده از این باکتری ها می باشد.

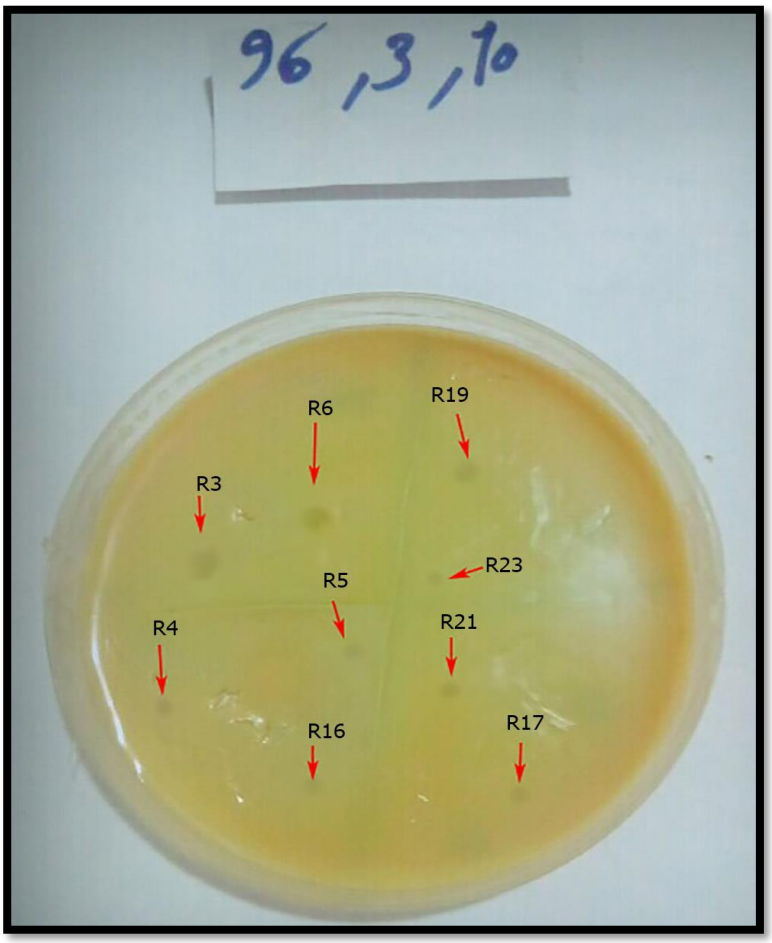
مواد و روش ها

جداسازی باکتری ها از مایع شکمبه گاو نر نژاد هولشتاین با جیره ای شامل ۶۰ درصد علوفه و ۴۰ درصد کنسانتره انجام گرفت. به این منظور مایع شکمبه تازه پس از جمع آوری صاف شد و رقت های سریال از آن ساخته شد سپس کشت بی هوازی باکتری ها با استفاده از تکنیک (Bryant and Burkey.,1953) انجام گرفت. از آنجا که اکثر باکتری هایی که دارای فعالیت فیتازی هستند در گروه باکتری های پرتئولتیک و آمیلولتیک قرار دارند در این مرحله از آزمایش برای جداسازی باکتریها دارای فعالیت فیتازی از محیط کشت Abou Akkada (and Blackburn.,1963) برای رشد باکتریهای پروتئولتیک و از محیط کشت (Kurihara et.al.,1968) برای رشد باکتر های آمیلولتیک استفاده شد.

به منظور سنجش فعالیت فیتازی باکتری ها جدا سازی شده از محیط های آمیلولتیک و پروتئولتیک، این باکتری ها در محیط کشت عمومی که حاوی ۰/۵ درصد سدیم فیتات بود کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت کلنی های رشد کرده و سپس کلنی‌های موجود روی محیط کشت را شسته و سطح پلیت با محلول کلرید کبالت ۲٪ پوشانده شد. بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق محلول کلرید کبالت با محلول تازه ساخته شده آمونیوم مولیبدات و آمونیوم وانادات (محلول حاوی ۶/۲۵ ٪ آمونیوم مولیبدات و۰/۴۲٪ آمونیوم وانادات)جایگزین شد. بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، محلول از سطح پلیت ها برداشته شد و ناحیه شفاف روی پلیت مورد بازنگری قرار گرفت که نشان دهنده فعالیت فیتازی کلنی استقرار یافته بود (yanke et.al., 1998). در این آزمایش فعالیت آنزیم فیتاز جداسازی شده از باکتری های شکمبه و یک باکتری نوترکیب به عنوان کنترل مثبت به روش (yin et.al.,2007) اندازه گیری شد. کنتیک آنزیمی در محلول رویی هر کدام از باکتری های شناسایی شده تعیین شد. برای این منظور فعالیت آنزیمی این باکتری‌ها مطابق روش (Thuy et. al.،2011) انجام گرفت. pH ایده‌آل برای فعالیت آنزیم فیتاز با تعیین میزان فعالیت در pH های۳/۵ تا۷/۵ در سه بافر گلایسین-HCL ، استات سدیم و سیترات تعیین شد. فعالیت یک واحد آنزیمی برابر یک میکرو مول در دقیقه تعریف شد. آنالیز اعداد با استفاده از طرح کاملا تصادفی انجام و آزمون دانکن برای مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی باکتری های مختلف در هر pH انجام شد.

نتایج و بحث

تعداد ۴۰ کلنی ازباکتریهای شکمبه پس از کشت در محیطهای آمیلولتیک و پرتئولتیک جدا سازی شدند. برای جداسازی باکتریهای تولید کننده فیتاز، نتایج کشت مایع شکمبه نشان داد که تعداد ۲۲ کلنی توانایی تولید فیتاز را داشتند که با شماره های R1 الی R22 شماره گذاری شدند. باکتریهای تولیدکننده آنزیم فیتاز با تجزیه سدیم فیتات محیط کشت، هاله شفاف در اطراف کلنیها ایجاد میکنند.(شکل ۱). بر اساس میزان فعالیت فیتازی ،۶ گونه باکتری که بیشترین فعالیت را نشان دادند برای اندازه گیری کنتیک آنزیمی انتخاب شدند.



شکل۱- کشت مایع شکمبه در محیط بریانت و بارکی (۱۹۵۳). هاله شفاف ناشی از تجزیه سدیم فیتات در اطراف کلنی ها نشاندهنده فعالیت فیتازی است.

فعالیت آنزیمی بدست آمده از ۶ گونه انتخاب شده درسه بافر مختلف نشان میدهد که فعالیت آنزیم در دو بافرگلیسین و استات بیشتر از بافر سیترات میباشد ..در بافرگلیسین فیتازباکتری‌های R1،R2وR6 بیشترین فعالیت را نشان دادند و آنزیم باکتری‌های R3،R4وR5 در بافر استات بیشترین فعالیت را نشان دادند. آنزیم باکتری شاهد نیز دربافر گلیسین حداکثر فعالیت را داشت . Yanke .et. al (1999) در جداسازی فیتاز *سلنوموناس رومینانتیوم* ازبافر گلیسین استفاده کردند. Lan et.al (2011)در استخراج فیتاز *میتسوکلا* بافر استات را مورداستفاده قرار دادند.

جدول ۱- اندازه گیری فعالیت فیتازی ۶ کلنی انتخاب شده در بافر های متفاوت تحت pHهای مختلف (u/ml) ، فعالیت یک واحد آنزیمی برابر یک میکرو مول در دقیقه فسفر آزاد شده تعریف می شود

	استات					گلیسین					سیترات					MSE	p-value
	۳,۵	۴,۵	۵,۵	۶,۵	۷,۵	۳,۵	۴,۵	۵,۵	۶,۵	۷,۵	۳,۵	۴,۵	۵,۵	۶,۵	۷,۵		
R1	۱۳,۶۶۵	۱۴,۶۳۰	۱۶,۷۶۸	۱۵,۷۶۸	۱۴,۷۹۰	۲۱,۱۷۳	۲۳,۰۵۸	۲۳,۰۳۶۷	۹,۶۵۵	۷,۲۵۶	۱۴,۴۳۱	۸,۴۵۵	۱۲,۹۷۷	۲۰,۱۱۳	۱۵,۳۷۸	۳,۴۶۱	۰,۰۳۷۴
R2	۱۲,۵۵۵	۱۴,۰۶۴	۱۵,۷۸۳	۱۵,۴۲۵	۱۵,۱۰۸	۲۱,۲۰۵	۲۶,۱۶۹	۲۶,۰۸۴	۶,۵۴	۹,۶۷	۱۶,۴۲۴	۱۱,۲۱۲	۱۷,۸۹۳	۱۸,۸۴۸	۱۸,۲۲۷	۳,۰۰۵	۰,۰۰۷۱
R3	۱۳,۰۴۶	۱۴,۱۹۱	۱۴,۸۳۴	۱۴,۸۱۳	۱۴,۱۱۷	۲۳,۹۷۶	۲۳,۳۹۴	۲۳,۰۶۳	۷,۵۶۲	۸,۲۴۵	۱۴,۵۹۸	۱۶,۱۱۳	۲۳,۰۵۹	۲۱,۶۵۰	۱۳,۴۶۲	۳,۱۶۲	۰,۰۲۹۵
R4	۱۳,۲۹۳	۱۳,۶۴۲	۱۵,۷۶۹	۱۳,۳۸۸	۱۵,۲۰۲	۱۹,۳۲۷	۲۲,۰۹۲	۲۳,۳۴۰	۹,۴۰۱	۹,۹۴۵	۱۸,۲۸۰	۱۶,۸۰۲	۱۸,۲۹۵	۲۴,۷۴۱	۱۶,۱۵۱	۳,۵۳۲	۰,۱۴۸۴
R5	۱۳,۶۰۵	۱۳,۷۳۷	۱۴,۲۳۶	۱۴,۶۹۳	۱۳,۹۳۲	۱۷,۳۳۱	۲۴,۹۵۸	۲۵,۴۵۴	۱۱,۴۱۶	۱۱,۷۴۰	۲۸,۰۲۹	۱۶,۱۸۹	۱۸,۶۳۶	۲۰,۴۰۸	۱۶,۲۶۵	۳,۶۳۶	۰,۱۴۱۹
R6	۱۶,۲۶۵	۱۳,۱۶۵	۱۲,۵۰۹	۱۵,۰۶۸	۱۴,۵۶۷	۲۳,۸۸۰	۲۶,۰۶۳	۲۳,۳۹۴	۶,۴۸۵	۱۰,۴۰۹	۱۷,۴۳۱	۱۵,۴۹۲	۱۵,۴۳۹	۱۹,۸۹۳	۲۰,۴۳۱	۲,۹۹۲	۰,۰۲۰۰
R7	۱۳,۰۲۷	۱۳,۳۴۵	۱۳,۲۲۷	۱۲,۷۴۹	۱۲,۴۵۸	۲۴,۵۲۵	۲۴,۹۹۰	۲۸,۰۲۱	۱۸,۹۵۷	۹,۷۷۸	۱۵,۹۹۹	۱۷,۸۱۰	۲۳,۳۰۲	۱۷,۸۸۶	۱۵,۸۴۰	۲,۸۳۵	۰,۱۵۳

فعالیت آنزیم بدست آمده از ۶ گونه انتخاب شده در پنج pHمختلف نشان میدهد که: کلنی های R3،R2،R1 در pH ۵/۵ ، کلنیR4در pH ۶/۵، کلنی R5 در ۳/۵، کلنی R6 در ۴/۵ و کلنی R7 یا بعبارتی کلنی شاهد در ۵/۵ بیشترین فعالیت فیتازی را نشان دادند. بیشترین فعالیت فیتازی در باکتریهای بی هوازی شکمبه ای مورد آزمایش در pH اسیدی مشابه با pH محتویات معده مشاهده شد. فعالیت آنزیم بدست آمده از ۶ گونه انتخاب شده در pH های مختلف نشان میدهد که درpH های۴/۵و ۵/۵ در اکثر باکتریهای انتخاب شده فعالیت آنزیمی افزایش می یابد. از آنجا که سدیم فیتات در محیط اسیدی از شرایط کیلات خارج می شود و بصورت محلول در می آید بهترین محیط برای تجزیه آن در شرایط اسیدی معده و ابتدای دوازدهه می باشد. بنابراین استفاده از آنزیم هایی که در شرایط اسیدی

فعالیت می کنند ارجح است. این نتایج نشان میدهد که باکتریهای منتخب این آزمایش دارای فعالیت فیتازی در شرایط اسیدی هستند مانند فیتاز جداشده از *کلبسیلا پنومونیا 9-3B*،*لاکتو باسیلوس سانفرنسیسنس CB1*،*ایکولای*،*سلنومونا رمینانتیوم و پسودوموناس* که به ترتیب در ۴/۵-۴،۴/۴،۴،۵ و ۵/۵ فعالیت دارند.(Escobin et.al. 2012، De Angelis et. al. 2003، Greiner et. al. 1993، Yanke et. al. , Irving 1971. et. al 1999). از آن جهت که شکمبه یکی از منابع غنی گونه های باکتریایی با فعالیت ها ی بالقوه آنزیمی است می توان پس از بررسی میزان فعالیت آنزیمی ازاین سویه ها برای تولید آنزیم فیتاز استفاده کرد.

منابع

Al-Asheh,S. and Duvnjak,Z . 1995. The effect of phosphate concentration on phytase production and the reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during a solid-state fermentation process. Applied Microbiology and Biotechnology, 43:25-30.

Common , F.H. 1989. Biological availability of phosphorus for pigs. Nature ,143, 370–380

Conway, S.J. and Miller, G.J. 2007. Biology-enabling inositol phosphates, phosphatidy linositol phosphates and derivatives. Nat Prod Rep, 24 (4): 687–707.

De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M.R., McSweeney, P.L.H., Facciae, M., Giovine, M.and Gobbetti, 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, 259–270.

Escobin-Mopera, L., Ohtani, M., Sekiguchi, S., Sone, S., Abe, A., Tanaka, M., Meevootisom, V.and Asano, K. 2012.Purification and Characterization of Phytase from Klebsiella Pneumoniae 9-3B. Journal of Bioscience and Bioengineering, 113(5), 562–567.

Fu, D.W., Huang, H.Q., Luo, H.Y., Wang, Y.R., Yang, P.L., Meng, K., Bai, Y.G., Wu, N.F. and Yao, B. 2008. A Highly pH Stable Phytase from Yersinia Kristeensenii: Cloning, Expression, and Characterization. Enzyme and Microbiol Technology, 42(6), 499–505.

Irving, G.C.J and Cosgrove, D.J. 1971. Inositol Phosphate Phosphatases of Microbiological Origin: Some Properties of a Partially Purified Bacterial (Pseudomonas sp.) Phytase. Australian Journal of Biological Sciences,24, 547–557.

Konietzny, U.and Greiner, R. 2004. Bacterial phytase: potential application, invitro function and regulation of its synthesis. . Brazilian Journal of Microbiology. 35:11-18 .

Lan G.Q Abdullahi, N Jalaludini,S. and Ho ,Y. W . 2011. Purification and characterization of a phytase from *Mitsuokella jalaludinii*, a bovine rumen bacterium. African Journal of Biotechnology Vol. 10(59), pp. 12766-12776. ISSN 1684–5315.

Markiewicz, L.h. , Honke, J., Haros, M., Świątecka, D. and Wróblewska, B. 2013. Diet shapes the ability of human intestinal microbiota to degrade phytate – in vitro studies. Journal of Applied Microbiology. 115 (1): 247–259.

Pandey , A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A. and Soccol, V.T. 2001. Production, Purification and Properties of Microbial Phytases. Bioresource Technology, 77, 203–214.

Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M.and Loon A.P.G.M. 1997.Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 63: 1696-1700,.

Prosser, J.I. 2015**.** Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of 'omics' in soil microbial ecology. *Nat. Rev. Microbiol., 13*, 439–446.

Raun, A., Cheng, E. and Burroughs, W. 1956. Phytate phosphorus hydrolysisand availability to rumen microorganisms. J. Agri. Food Chem., 4: 869-871.

Reddy N.R., Sathe S.K. and Salunkh, D.K. 1982. Phytates in legumes and cereals. In: Chichester, C.O., Mrak, E. M. Stewart, G.F. (Eds.), Advances in Food Chemistry, Academic Press, New York, pp. 1–92.

Sapna, J.J. and Singh, B. 2016. Characteristics and Biotechnological Applications of Bacterial Phytases. ProcessBiochemistry, 51, 159–169.

Thuy Thi Tran., Rajni Hatti-Kaul., S□ren Dalsgaard., Shukun Yu.2011. A simple and fast kinetic assay for phytases using phytic acid–protein complex as substrate. Analytical Biochemistry 410 :177–184.

Yanke, L.J., Selinger, L.B.and Cheng, K.J. 1999. Phytase Activity of Selenomonas Ruminantium: A Preliminary Characterization. Letters in Applied Microbiology, 29, 20–25.

Study of phytase activity of rumen anaerobic bacteria in vitro

Leila. Nekooee [1], Reza. Majidzadeh Heravi[2] , Ali reza. Vakili [3]
1. MSc Student, University Ferdowsi of Mashhad
2.Assistant Professor, Animal science Department, Ferdowsi University of Mashhad
3. Associate Professor, Animal science Department, University Ferdowsi of Mashhad

Abstract

The aim of this experiment was to identify and determine the ability of rumen bacteria to degrade plant phytate and to investigate the effect of buffer type and pH factors on their phytase activity in vitro.
Phytate is the main form storage of phosphorus in plants, which is not usable for monogastric animals and even human.Ruminants are a rich source of bacteria, including bacteria that can produce phytase enzymes that can be used to degrade phytase in the monogastric gut. To identify bacteria with the ability to produce phytase, the ruminal fluid was plated after collection, and was grown on an anaerobic culture medium containing sodium phytate at 39 ° C.Ammonium molybdate was used to stain medium plate and the ability to produce phytase enzyme was determined on a specific culture medium.The activity of the enzymes of selected bacteria was measured at different pH and in three different buffers. Of the 40 bacteria isolated, 22 colonies had the ability to produce phytase, which was identified as a clear zone around colonies.By measuring the enzymatic activity of these 22 colonies, 6 species of R1, R2, R3, R4, R5, R6, which had the highest enzymatic activity, were selected.The maximum enzyme activity for most of them was in acidic pH, and in glycine and acetate, respectively.Regarding to phytase activity of selected strains at pH 4.5 and 5.5, the use of these bacteria as microbial supplements in monogastric animal feed is recommended.

Keyword: enzyme activity, phytase, phytate, rumen bacteria.