

بهینه‌سازی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فیتاز جدایه K46b به روش سطح پاسخ

کریم راکی سلیمی^{۱*}، مریم هاشمی^۲، محمد صفری^۱

۱ دانشجوی دکتری و استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲ عضو هیئت علمی بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۱۲)

چکیده

آنزیم‌های فیتاز در گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و برخی بافت‌های جانوری شناسایی شده‌اند که قابلیت دفسفریلاسیون مرحله‌ای فیتات؛ فراوان‌ترین اینوزیتول فسفات در طبیعت را دارند. در این تحقیق تعداد ۶۸ ایزوله میکروبی که از منابع مختلف جداسازی شدند برای انتخاب بهترین جدایه تولید کننده آنزیم فیتاز، به روش غوطه‌وری غربال شدند. نتایج نشان داد که جدایه K46b بیشترین مقدار فعالیت آنزیم فیتاز (۱/۹۵۲ U/mL) را در بین ایزوله‌های میکروبی داشت. در مرحله بعد، فعالیت کاتالیتیکی جدایه K46b در شرایط مختلف دما، pH و غلظت فیتات سدیم به روش سطح پاسخ بهینه‌سازی شد. بهینه‌سازی موجب افزایش ۱۳۷٪ در فعالیت آنزیم فیتاز جدایه K46b در مقایسه با محیط کشت پایه در شرایط بهینه (دمای ۵۶/۵ °C، pH ۷/۳ و ۲/۰۵ میلی مولار فیتات سدیم) شد. همچنین آنزیم فیتاز جدایه K46b حدود ۶۰-۷۳٪ از فعالیت بیشینه خود را در محدوده وسیعی از دما (۶۸-۴۷ °C)، pH (۸-۶) و فیتات سدیم (۲/۵-۱/۶ میلی مولار) نشان داد. بنابراین آنزیم فیتاز جدایه K46b می‌تواند کاربردهای بالقوه‌ای در اسید فیتیک زدایی مواد غذایی مانند انواع غلات و کنجاله‌های آنها در صنایع غذایی و خوراک حیوانات، صنایع آبزی‌پروری و رفع آلودگی‌های محیط زیستی ناشی از اسید فیتیک داشته باشد.

کلید واژه‌گان: آنزیم فیتاز، تخمیر غوطه‌وری، فعالیت کاتالیتیکی، بهینه‌سازی، روش سطح پاسخ

*مسئول مکاتبات: salimi_1998@yahoo.com

۱- مقدمه

گونه‌های آسپرژیلوس متمرکز می‌باشند [۷، ۸]. اما بدلیل اختصاصیت زیاد به سوبسترا^۱، پایداری حرارتی بالا، پروفیل گسترده pH و مقاومت به پروتئولیز، فیتازهای باسیلوس جایگزین‌های بالقوه‌ای برای انواع آنزیم فیتاز قارچی می‌باشند [۱۳]. تعداد زیادی از فیتازهای باسیلوس از منابع مختلفی جداسازی و مشخصات شیمیایی آنها تعیین شده است [۱۴-۲۰]. در حال حاضر یک نوع آنزیم فیتاز منفرد به‌عنوان آنزیم فیتاز ایده‌آل وجود ندارد و بنابراین تلاش گسترده و مداومی برای جداسازی سویه‌های باکتری که تولید کننده فیتازهای جدید و کارآمد می‌باشند، وجود دارد [۲]. در این تحقیق تعداد ۶۸ جدایه میکروبی که از منابع مختلف جداسازی شده بودند برای انتخاب بهترین جدایه تولید کننده آنزیم فیتاز به روش تخمیر غوطه‌وری غربال و شرایط بهینه فعالیت آنزیم فیتاز جدایه منتخب به روش سطح پاسخ^۶ بهینه‌سازی و تعیین شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مایه تلقیح

در ابتدا جدایه‌های میکروبی بر روی محیط کشت جامد استریل (گرم بر لیتر: محیط کشت نوترینت برات ۸، عصاره مخمر ۱، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۱، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۰/۲۵، گلوکز ۰/۴، سولفات منیزیم ۰/۱۲ و آگار ۱۸) کشت و در دمای ۳۰ °C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. مایه تلقیح به‌وسیله انتقال یک لوپ از کشت تازه به فالکون ۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت نوترینت برات استریل و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C و ۱۷۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۴ ساعت، تهیه شد [۲۱].

۲-۲- انتخاب مناسب‌ترین جدایه تولید کننده

آنزیم فیتاز

از روش کشت غوطه‌وری برای بررسی و غربال‌گری ۶۸ جدایه میکروبی موجود در بانک میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران برای انتخاب جدایه با بالاترین میزان تولید

اسید فیتیک^۱ یا نمک آن که فیتات^۲ نامیده می‌شود، شکل اصلی ذخیره فسفات در غلات، حبوبات و دانه‌های روغنی می‌باشد که ۱-۱/۵٪ از وزن و ۸۰-۶۰٪ از کل فسفر آنها را تشکیل می‌دهد [۱، ۲]. فیتات بعنوان یک عامل ضدتغذیه‌ای محسوب می‌شود زیرا که دارای ساختار با بار منفی بسیار زیاد بوده و توانایی زیادی برای اتصال و کلاته کردن املاح مانند کلسیم، منیزیم، روی و آهن دارد. همچنین می‌تواند تحت شرایط مختلف اسیدی و قلیایی با پروتئین‌ها، کمپلکس تشکیل دهد و با تغییر ساختار پروتئین موجب کاهش فعالیت آنزیمی، حلالیت پروتئین و هضم‌پذیری در دستگاه گوارش شود [۳، ۴]. فسفر موجود در فیتات به مقدار خیلی کمی توسط حیوانات تک معده‌ای مانند خوک، طیور و ماهیان به‌دلیل فعالیت بسیار کم یا نبود آنزیم فیتاز در لوله گوارشی خود، جذب می‌شود. خوراک حیوانات عمدتاً از منابع گیاهی تامین می‌شود که غنی از فیتات هستند ولی آنها نمی‌توانند از فسفر فیتات استفاده کنند. بنابراین به همراه مدفوع از بدن آنها خارج شده و ایجاد مشکلات متعدد زیست محیطی بویژه در مناطقی که کشاورزی و دامپروری صنعتی وجود دارد، می‌شود [۵-۸].

آنزیم‌های فیتاز^۳ (EC 3.1.3.8 و EC 3.1.3.26) (میوانوزیتول (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶) هگزاکیس فسفات فسفوایدرولازها^۴) گروهی از آنزیم‌ها می‌باشند که به‌طور متوالی گروه‌های فسفات را از اسید فیتیک هیدرولیز کرده و مشتقات میو-اینوزیتول با فسفات کمتر و فسفات غیرآلی تولید می‌کنند. فیتازها در منابع مختلفی مانند میکروارگانیسم‌ها، بافت‌های جانوری و گیاهان یافت می‌شوند [۹]. محققان زیادی نشان داده‌اند که فیتازهای میکروبی برای تولید صنعتی آنزیم فیتاز بسیار مناسب می‌باشند. اگرچه سویه‌های مختلف باکتریایی [۱۰]، مخمر [۱۱] و کپک [۱۲] برای تولید آنزیم فیتاز جداسازی و بررسی شده‌اند اما در حال حاضر تولید تجاری آنزیم فیتاز برای خوراک دام بر روی فیتازهای قارچی

1. Phytic acid
2. Phytate
3. Phytases
4. myo-inositol (1,2,3,4,5,6) hexakisphosphate phosphohydrolases

5. Strict substrate specificity
6. Response surface methodology (RSM)

بر دقیقه در دمای محیط سانتیفریوز می‌شوند. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع روماند را به چاهک‌های میکروپلیت منتقل کرده (۲ تکرار) و شدت جذب رنگ زرد تولید شده در طول موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری می‌شود. غلظت فسفات غیرآلی در هر نمونه با قرار دادن مقدار جذب نوری در معادله منحنی استاندارد فسفات غیرآلی محاسبه می‌شود. فعالیت آنزیم فیتاز برحسب واحد بر میلی لیتر (U/mL) گزارش شده است. هر واحد فعالیت آنزیم فیتاز برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند طی مدت زمان یک دقیقه در شرایط آزمایش یک میکرومول سوبسترا را به محصول تبدیل کند.

۲-۵- تعیین کمی فعالیت آنزیم فیتاز

جدایه‌های منتخب

از بین ۶۸ جدایه میکروبی، دو جدایه K46b و H16h که در مقایسه با نمونه‌های دیگر بیشترین مقدار تولید آنزیم فیتاز را داشتند، غربال شدند. برای انتخاب بهترین جدایه، فعالیت آنزیم فیتاز دو جدایه غربال شده در دماها (۵۰ °C و ۶۵)، pHها (۵/۵، ۷ و ۸/۵) و مدت زمان‌های مختلف انجام واکنش آنزیمی (۳۰ و ۶۰ دقیقه) بررسی شد (جدول ۳).

۲-۶- بهینه‌سازی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فیتاز

جدایه K46b به روش سطح پاسخ

از طرح مرکب مرکزی^۱ که از کاربردی‌ترین طراحی‌های روش سطح پاسخ می‌باشد، برای بهینه‌سازی تاثیر عوامل دما، pH و غلظت سوبسترا بر فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فیتاز جدایه K46b متشکل از ۲۰ آزمایش، شامل شش تکرار نقطه مرکزی برای تعیین خطای آزمایشی استفاده گردید (جدول ۴). متغیرهای مستقل و مقدار آنها در جدول ۱ آورده شده است.

آنزیم فیتاز استفاده شد. جدایه‌های مذکور از مزارع سیب‌زمینی (خراسان، زنجان، فارس و تهران)، گندم (خراسان، زنجان، اصفهان، فارس و تهران) و برنج (گیلان، گلستان و مازندران) و باغات میوه سیب، بادام و زردآلو (اصفهان، خراسان، تهران، زنجان و کرمان) جداسازی شده بودند (جدول ۲). از ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت تولید آنزیم فیتاز (گرم بر لیتر: فیتات سدیم ۰/۱، دکسترین ۱۲، عصاره مخمر ۴، عصاره گوشت ۳ و سولفات منیزیم ۰/۳) که بوسیله ۲٪ مایه تلقیح کشت داده شدند، برای تولید آنزیم فیتاز استفاده شد. pH اولیه محیط کشت قبل از اتوکلاو کردن (دمای °C ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه) بر روی ۷/۵-۸ تنظیم شد. قبل از تلقیح تا مقدار نهایی ۰/۰۱٪ از محلول استریل شده کلرید کلسیم به محیط کشت تولید آنزیم فیتاز اضافه و پس از تلقیح، ارلن‌ها در دمای °C ۳۰ و ۱۷۰ دور بر دقیقه به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

۲-۳- استخراج و نگهداری آنزیم فیتاز

پس از اتمام گرمخانه‌گذاری، محیط کشت تخمیر شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای °C ۴ با ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتیفریوز شد. بخش شفاف روماند عاری از سلول بعنوان منبع آنزیم فیتاز خام استفاده شد. همچنین مایع روماند تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در دمای °C ۲۰ نگهداری شد.

۲-۴- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فیتاز

فعالیت آنزیم فیتاز براساس میزان فسفات غیرآلی آزاد شده طی واکنش آنزیم فیتاز بر روی فیتات سدیم به‌عنوان سوبسترا با استفاده از روش مولیبدات آمونیوم اندازه‌گیری شد [۲۲]. به‌طور خلاصه، در ابتدا ۴۰۰ میکرولیتر سوبسترای فیتات سدیم (محلول فیتات سدیم ۱/۵ میلی مولار در بافر تریس - اسید کلریدریک ۱۰۰ میلی مولار) را در میکروتیوب اضافه کرده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای °C ۵۰ در بن ماری قرار داده می‌شود. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از معرف رنگی (مخلوطی از مولیبدات آمونیوم ۱۰٪، وانادات آمونیوم ۰/۲۴٪ و اسید نیتریک ۶۵٪) که به‌ترتیب به نسبت ۱/۵، ۱/۵ و ۱ با هم مخلوط می‌شوند، به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور

جدول ۱ متغیرهای مستقل و سطوح مختلف آنها

سطوح مختلف متغیرها				نماد	عامل
-α	-۱	۰	+۱		
۴۰	۴۷	۵۷/۵	۶۸	X_1	دما (°C)
۵/۵	۶/۳	۷/۵	۸/۷	X_2	pH
۰/۵	۱	۱/۷۵	۲/۵	X_3	غلظت فیتات سدیم (mM)

۳- نتایج و بحث

۳-۱- انتخاب مناسب‌ترین جدایه تولید کننده

آنزیم فیتاز

نتایج بررسی و غربال‌گری ۶۸ جدایه میکروبی با استفاده از روش تخمیر غوطه‌وری در دمای ۳۰ °C در جدول ۲ آورده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده در مقایسه با سایر جدایه‌ها، دو جدایه H16h و K46b به ترتیب ۱/۵۶۲ U/mL و ۱/۹۵۲ بیشترین مقدار تولید آنزیم فیتاز را داشتند. سریدوی و ردی (۲۰۱۳) و سینگ و همکاران (۲۰۱۳) نیز از روش تخمیر غوطه‌وری برای انتخاب بهترین جدایه تولید کننده آنزیم فیتاز از منابع مختلف استفاده کردند [۲۳-۲۵]. برای انتخاب بهترین جدایه از بین آنها، فعالیت آنزیم فیتاز تولید شده در شرایط مختلف دما، pH و مدت زمان واکنش بررسی شد که نتایج آن در جدول ۳ نشان داده است. جدایه K46b در دماها و pHهای مختلف فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به جدایه H16h نشان داد و بنابراین برای ادامه تحقیق انتخاب شد. همچنین با توجه به این‌که در روش‌های اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فیتاز مدت زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه در نظر گرفته می‌شود، بررسی‌های اولیه نشان داد که مدت زمان ۳۰ دقیقه برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فیتاز جدایه K46b مناسب‌تر است و بنابراین در اندازه‌گیری‌های بعدی مدت زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد.

سه متغیر مستقل در پنج سطح و یک متغیر وابسته (پاسخ) در نظر گرفته شد. متغیرهای مستقل شامل دما (X_1)، pH (X_2) و غلظت فیتات سدیم (X_3) و فعالیت آنزیم فیتاز بعنوان پاسخ (Y) در نظر گرفته شد. نتایج آزمایش براساس معادله چند جمله‌ای درجه دوم زیر تحلیل می‌شود:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{j < i} \beta_{ij} X_i X_j$$

که در آن β_0 ، β_j ، β_{ij} و β_{ii} به ترتیب ضرایب‌های همبستگی برای عرض از مبدا، خطی، مربعی (درجه دوم) و متقابل می‌باشد و X_i و X_j متغیرهای مستقل کد شده می‌باشند. تجزیه و تحلیل واریانس، ضرایب‌های همبستگی و منحنی‌های سطح پاسخ و کنتور توسط نرم‌افزار (Design Expert Version 7.1, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) محاسبه و رسم می‌شود. مقدار آلفا ۱/۶۸ و همچنین برای رسم منحنی‌های سطح پاسخ و کنتور، سومین متغیر مستقل بصورت ثابت و مقدار آن در نقطه مرکزی در نظر گرفته شد.

۲-۷- تایید صحت مدل فعالیت کاتالیتیکی

آنزیم فیتاز به روش سطح پاسخ

پس از تعیین شرایط بهینه فعالیت آنزیم فیتاز جدایه K46b، برای تعیین صحت مدل بدست آمده، فعالیت آنزیم فیتاز در شرایط مختلف دما، pH و غلظت فیتات سدیم شامل نقطه بهینه براساس مدل پیش بینی شده توسط نرم افزار تعیین شد (جدول ۷).

جدول ۲ نتایج غربالگری ۶۸ جدایه میکروبی براساس مقدار تولید آنزیم فیتاز

شماره	نام جدایه	فعالیت فیتاز (U/mL)	شماره	نام جدایه	فعالیت فیتاز (U/mL)	شماره	نام جدایه	فعالیت فیتاز (U/mL)
۱	A14h	۰/۰۰۰	۲۴	H4b	۰/۱۳۶	۴۷	T34b	۰/۱۸۰
۲	k27k88	۰/۲۸۸	۲۵	B11h	۰/۱۴۳	۴۸	T39d	۰/۱۴۲
۳	k43L	۰/۳۸۳	۲۶	b17d	۰/۱۹۵	۴۹	D3b	۰/۳۱۴
۴	c2d	۰/۰۰۰	۲۷	b5b	۰/۲۱۳	۵۰	D16d	۰/۲۱۸
۵	h13h	۰/۲۸۰	۲۸	b8b	۰/۲۴۰	۵۱	D19b	۰/۲۱۵
۶	s7e	۰/۰۰۰	۲۹	B12b	۰/۰۰۰	۵۲	D4G	۰/۱۵۲
۷	k47d	۰/۰۰۰	۳۰	B16b	۰/۰۰۰	۵۳	D19h	۰/۳۳۲
۸	T31d	۰/۱۶۱	۳۱	h14h	۰/۰۰۰	۵۴	T41a	۰/۷۴۵
۹	s2d	۰/۱۶۳	۳۲	b14b"	۰/۲۰۳	۵۵	T37a	۰/۱۸۹
۱۰	T28d	۰/۰۰۰	۳۳	H14d	۰/۲۵۵	۵۶	T26b	۰/۱۳۳
۱۱	k36p88	۰/۱۸۸	۳۴	K49b	۰/۰۰۰	۵۷	T38a	۰/۰۰۰
۱۲	s2f	۰/۱۲۷	۳۵	K30b	۰/۰۰۰	۵۸	H13f	۰/۱۳۲
۱۳	g43d	۰/۱۸۶	۳۶	K36b	۰/۰۰۰	۵۹	H16h	۱/۵۶۲
۱۴	T39f	۰/۱۵۷	۳۷	K40b	۰/۱۷۴	۶۰	H14d	۰/۲۴۴
۱۵	T40d	۰/۱۲۳	۳۸	K32L	۰/۰۰۰	۶۱	W	۰/۲۰۹
۱۶	Y*	۰/۱۷۷	۳۹	g19b	۰/۴۷۵	۶۲	K46b	۱/۹۵۲
۱۷	B4b	۰/۱۲۴	۴۰	g6L	۰/۲۷۸	۶۳	D7b	۰/۱۳۲
۱۸	B5d	۰/۰۰۰	۴۱	A14h	۰/۰۰۰	۶۴	D3d	۰/۱۶۲
۱۹	H10L	۰/۰۰۰	۴۲	A60d	۰/۵۰۲	۶۵	S7h	۰/۱۷۸
۲۰	B11d	۰/۰۰۰	۴۳	A42s	۰/۲۲۹	۶۶	S1d	۰/۲۲۴
۲۱	B8a	۰/۰۰۰	۴۴	T4b	۰/۰۰۰	۶۷	S1b	۰/۲۴۰
۲۲	B17e	۰/۰۰۰	۴۵	T11d	۰/۰۰۰	۶۸	S5d	۰/۲۱۱
۲۳	B9h	۰/۱۷۴	۴۶	T374a	۰/۰۰۰			

جدول ۳ نتایج تعیین کمی فعالیت آنزیم فیتاز جدایه‌های منتخب

نام جدایه	pH	دما (°C)	زمان (دقیقه)	فعالیت فیتاز (U/mL)
K46b	۵/۵	۵۰	۶۰	۱/۵۳۳
	۷			۲/۳۴۱
	۸/۵			۲/۳۲۰
H16h	۷	۶۵	۶۰	۳/۰۵۶
	۵/۵			۰/۸۷۴
	۷			۱/۴۰۲
K46b	۸/۵	۵۵	۶۰	۱/۱۷۱
	۷			۱/۱۰۰
	۷			۲/۲۷۳
				۱/۹۵۲

۳-۲- بهینه‌سازی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فیتاز جدایه K46b به روش سطح پاسخ

نتایج آزمایش‌های مرحله بهینه‌سازی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فیتاز جدایه K46b به روش سطح پاسخ در جدول ۴ نشان داده شده است. هدف از انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی، بدست آوردن یک مدل ریاضی برای پیش‌بینی رفتار فرآیند می‌باشد [۲۶]. با توجه به نتایج جدول ۴، بیشترین و کمترین مقدار فعالیت فیتاز برابر با ۰/۳۵۱ و ۴/۵۹۱ U/mL می‌باشد که به ترتیب در آزمایش‌های شماره ۱۸ و ۴ بدست آمد. با مقایسه مقدار فعالیت آنزیم فیتاز در آزمایش‌های شماره ۴ و ۹ می‌توان به اهمیت انتخاب pH مناسب و این‌که فعالیت آنزیم فیتاز جدایه K46b به شدت در pH قلیایی ۹/۵ کاهش می‌یابد که احتمالاً به دلیل رسوب کلسیم و فیتات سدیم است، پی برد [۲۷].

همچنین با مقایسه مقدار فعالیت آنزیم فیتاز در آزمایش‌های شماره ۹ و ۱۸ مشخص می‌شود که آنزیم فیتاز حدود ۴۰٪ از فعالیت خود را در pH اسیدی ۵/۵ حفظ کرده و فیتات سدیم را تجزیه می‌کند. نتایج مقدار فعالیت آنزیم فیتاز در آزمایش‌های شماره ۵ و ۶ نشان‌دهنده تاثیر منفی دماهای بالا (۷۵ °C) بر فعالیت فیتاز جدایه K46b است. همچنین با مقایسه مقدار فعالیت فیتاز در آزمایش‌های شماره ۱۳ و ۱۴ و نقاط مرکزی (آزمایش‌های شماره ۱، ۶، ۱۱، ۱۵، ۱۶، ۱۸) تاثیر منفی افزایش بیش از حد غلظت فیتات سدیم بر فعالیت فیتاز باسیلوس سابیلیس K46b مشخص می‌گردد. نتایج بدست آمده اهمیت انتخاب شرایط مناسب برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فیتاز و مناسب بودن آنزیم فیتاز باسیلوس سابیلیس K46b برای هیدرولیز فیتات در روده کوچک و انواع ماهیان دارای pH قلیایی را نشان می‌دهد [۱۴، ۲۸، ۲۹]. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس برای مدل بهینه‌سازی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فیتاز جدایه K46b در جدول ۵ نشان داده شده است. با توجه به مقادیر F -value و P -value بدست

آمده، می‌توان گفت که مدل بدست آمده بسیار معنی‌دار است. $(P < 0.01)$ براساس تجزیه و تحلیل واریانس، معادله زیر برای پیش‌بینی فعالیت فیتاز جدایه K46b توسط نرم افزار Design Expert پیشنهاد شد:

$$Y = 4.35 - 0.23X_1 - 0.48X_2 + 0.54X_3 + 0.12X_4X_5 - 0.12X_1X_3 + 0.17X_1X_4 - 1.12X_1^2 - 1.14X_2^2 - 0.64X_3^2 + 0.31X_4X_5 - 0.27X_4^2X_5 - 0.77X_4^2X_5 - 0.048X_4X_5^2$$

متغیرهای مستقل شامل دما (X_1)، pH (X_2) و غلظت فیتات سدیم (X_3) و فعالیت آنزیم فیتاز به‌عنوان پاسخ (Y) در نظر گرفته شد. مقدار عددی ضریب تعیین (R^2) نشان‌دهنده میزان انحراف داده‌ها از مدل رگرسیون می‌باشد و بنابراین مدل پیشنهادی بخوبی می‌تواند ۹۹/۷۹٪ تغییرات بین شرایط مختلف اندازه‌گیری فعالیت آنزیم و مقدار فعالیت آنزیم فیتاز جدایه K46b را نشان داده و پیش‌بینی کند. مقدار عددی ضریب تعیین تطبیقی ($Adj-R^2$) ۰/۹۹۳۲ بود که نشان‌دهنده بسیار معنی‌دار بودن مدل است. جدول ۶ ضریب‌های رگرسیون و مقادیر معنی‌دار بودن (P -value) را برای مدل رگرسیون نشان می‌دهد. همانطور که از جدول ۶ مشخص است تمام اثرات خطی، درجه دوم و درجه سوم متغیرهای مستقل معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.01$). همچنین اثرات متقابل دما-pH، دما-غلظت فیتات سدیم و pH-غلظت فیتات سدیم نیز در سطح ۹۵٪ معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$). ضریب‌های رگرسیون مثبت و منفی به ترتیب موجب افزایش و کاهش پاسخ (مقدار فعالیت آنزیم فیتاز جدایه K46b) می‌شود. شکل ۱ تاثیر سطوح مختلف دما و pH بر فعالیت آنزیم فیتاز جدایه K46b در شرایط غلظت فیتات سدیم ثابت را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود نمودار کنتور فعالیت آنزیم فیتاز به‌صورت ماکزیمم ساده و شکل سطح پاسخ آن بصورت پیک می‌باشد [۳۰]. بنابراین بیشترین مقدار فعالیت آنزیم فیتاز در بالای پیک بدست می‌آید و هرچه به سمت پائین پیک حرکت کنیم، فعالیت آنزیم فیتاز کاهش می‌یابد. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم فیتاز در محدوده دمای ۵۷/۵-۵۵ °C و pH ۷/۵-۷ بدست می‌آید.

جدول ۴ طرح مرکب مرکزی و نتایج بهینه‌سازی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فیتاز جدایه K46b

فعالیت فیتاز (U/mL)	متغیرهای مستقل			آزمایش
	غلظت فیتات سدیم (mM)	pH	دما (°C)	
۴/۳۶۸	۱/۷۵	۷/۵	۵۷/۵	۱
۰/۴۰۹	۱	۸/۷	۶۷/۹	۲
۰/۶۰۶	۲/۵	۸/۷	۴۷/۱	۳
۰/۳۵۱	۱/۷۵	۹/۵	۵۷/۵	۴
۰/۸۲۰	۱/۷۵	۷/۵	۷۵	۵
۴/۲۲۳	۱/۷۵	۷/۵	۵۷/۵	۶
۰/۹۶۲	۲/۵	۶/۳	۶۷/۹	۷
۰/۶۵۸	۲/۵	۸/۷	۶۷/۹	۸
۱/۹۵۵	۱/۷۵	۵/۵	۵۷/۵	۹
۱/۱۰۶	۱	۸/۷	۴۷/۱	۱۰
۴/۳۳۲	۱/۷۵	۷/۵	۵۷/۵	۱۱
۲/۶۲۷	۱	۶/۳	۶۷/۹	۱۲
۱/۶۵۴	۰/۵	۷/۵	۵۷/۵	۱۳
۳/۴۷۹	۳	۷/۵	۵۷/۵	۱۴
۴/۲۰۷	۱/۷۵	۷/۵	۵۷/۵	۱۵
۴/۳۷۰	۱/۷۵	۷/۵	۵۷/۵	۱۶
۲/۶۳۲	۲/۵	۶/۳	۴۷/۱	۱۷
۴/۵۹۱	۱/۷۵	۷/۵	۵۷/۵	۱۸
۲/۵۶۰	۱	۶/۳	۴۷/۱	۱۹
۱/۶۰۳	۱/۷۵	۷/۵	۴۰	۲۰

جدول ۵ نتایج تجزیه و تحلیل واریانس برای مدل بهینه‌سازی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فیتاز جدایه K46b

P	F	درجه آزادی	میانگین مربعات	مجموع مربعات	منبع
		۱۳	۳/۵۵	۴۶/۱۱	مدل
<۰/۰۰۰۱	۲۱۴/۴۵	۶	۰/۰۱۷	۰/۰۹۹	باقیمانده
		۱۹	-	۴۶/۲۱	کل

$$R^2 = 0.9979, \text{Adj } R^2 = 0.9932, \text{Adeq Precision} = 37.346$$

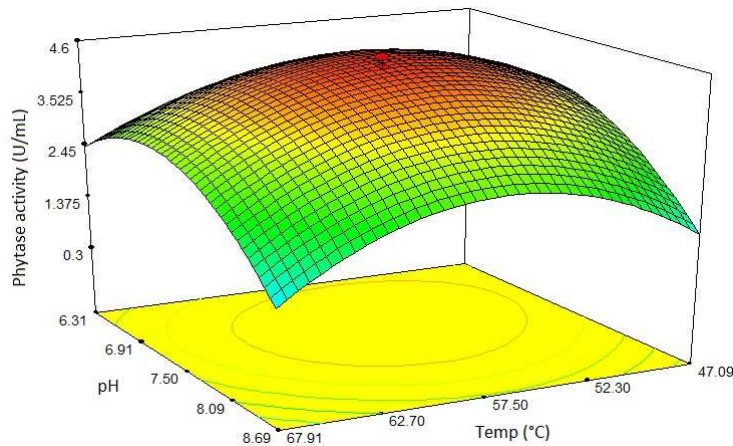
بالا تا حدود ۲ میلی مولار افزایش می‌یابد ولی افزایش بیشتر آن تاثیر منفی بر فعالیت آنزیم فیتاز دارد. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم فیتاز در محدوده دمایی ۵۵-۵۷/۵ °C و محدود غلظت فیتات سدیم ۱/۷۵-۲/۱۲ میلی مولار بدست می‌آید.

تاثیر سطوح مختلف دما و غلظت فیتات سدیم بر فعالیت آنزیم فیتاز جدایه K46b در شرایط pH ثابت در شکل ۲ نشان داده شده است که نمودار کتور فعالیت آنزیم فیتاز به صورت ماکزیمم ساده و شکل سطح پاسخ آن بصورت پیک می‌باشد. همچنین مشاهده می‌شود که فعالیت آنزیم فیتاز در غلظت‌های

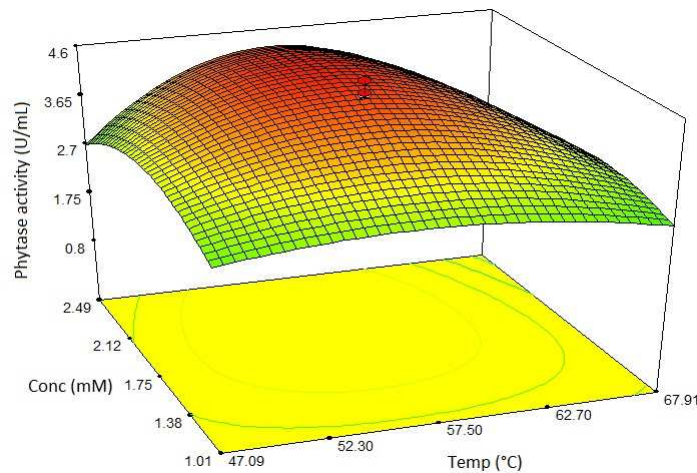
جدول ۶ ضریب‌های رگرسیون و مقادیر معنی‌دار بودن آنها برای مدل بهینه‌سازی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فیتاز جدایه K46b

منبع	ضریب	P value
β_0	۴/۳۵	-
β_1	-۰/۲۳	*۰/۰۰۵۱
β_2	-۰/۴۸	*۰/۰۰۰۱
β_3	۰/۵۴	*<۰/۰۰۰۱
β_{12}	۰/۱۲	* * ۰/۰۳۸۹
β_{13}	-۰/۱۲	* * ۰/۰۳۴۸
β_{23}	۰/۱۷	* * ۰/۰۱۰۲
β_1^2	-۱/۱۲	* < ۰/۰۰۰۱
β_2^2	-۱/۱۴	* < ۰/۰۰۰۱
β_3^2	-۰/۶۴	* < ۰/۰۰۰۱
β_{123}	۰/۳۱	* ۰/۰۰۰۵
$\beta_1^2\beta_2$	-۰/۲۷	* ۰/۰۰۸۳
$\beta_1^2\beta_3$	-۰/۷۷	* < ۰/۰۰۰۱
$\beta_1\beta_2^2$	-۰/۰۴۸	۰/۵۲۰۴

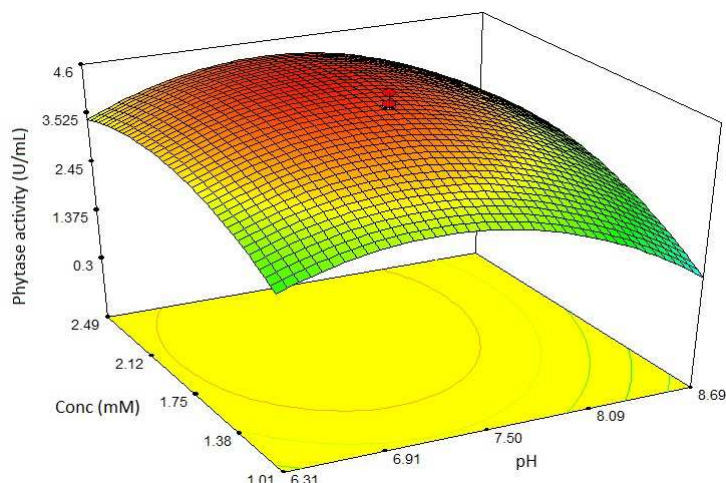
* معنی‌دار در سطح $P < 0.01$ و ** معنی‌دار در سطح $P < 0.05$



شکل ۱ نمودار سطح پاسخ تاثیر متقابل دما و pH بر فعالیت آنزیم فیتاز جدایه K46b



شکل ۲ نمودار سطح پاسخ تاثیر متقابل دما و غلظت فیتات سدیم بر فعالیت آنزیم فیتاز جدایه K46b



شکل ۳ نمودار سطح پاسخ تاثیر متقابل pH و غلظت فیتات سدیم بر فعالیت آنزیم فیتاز جدایه K46b

طرح آزمایشی می‌باشد که در آن پاسخ می‌تواند بیشینه، کمینه یا در محدوده آزمایش، ثابت باشد. در این مرحله هدف یافتن شرایط اندازه‌گیری فعالیت فیتاز به‌گونه‌ای است که در آن فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فیتاز جدایه K46b بیشینه باشد. نتایج تایید صحت مدل فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فیتاز جدایه K46b به روش سطح پاسخ در شرایط مختلف شامل نقطه بهینه که توسط ابزار بهینه‌سازی موجود در نرم افزار پیش‌بینی شده در جدول ۷ نشان داده شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که تطابق خوبی بین مقادیر فعالیت فیتاز واقعی و پیش‌بینی شده توسط مدل وجود دارد و بنابراین مدل به‌خوبی تایید شد. بنابراین فعالیت آنزیم فیتاز تحت شرایط بهینه (دمای $56/5^{\circ}\text{C}$ ، افزایش یافت که در مقایسه با شرایط اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فیتاز تحت شرایط غیر بهینه $13/7\%$ بهبود را نشان می‌دهد.

تاثیر سطوح مختلف pH و غلظت فیتات سدیم بر فعالیت آنزیم فیتاز جدایه K46b در شرایط دما ثابت در شکل ۳ نشان داده شده است. نمودار کنتور فعالیت آنزیم فیتاز به‌صورت ماکزیمم ساده و شکل سطح پاسخ آن بصورت پیک می‌باشد. مشاهده می‌شود که فعالیت آنزیم فیتاز در غلظت‌های بالا تا حدود ۲ میلی مولار افزایش می‌یابد ولی افزایش بیشتر آن تاثیر منفی بر فعالیت آنزیم فیتاز دارد. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم فیتاز در محدوده و $7/5-7$ pH و محدود غلظت فیتات سدیم $1/75-2/12$ میلی مولار بدست می‌آید. همچنین سطوح پاسخ نشان دادند که آنزیم فیتاز در گستره وسیعی از دماها (47°C - 68)، pHها ($6/3-8/0$) و فیتات سدیم ($1/4-2/5$ میلی مولار) فعالیت مناسبی ($60-73\%$ از فعالیت بیشینه) از خود نشان می‌دهد.

هدف از بهینه‌سازی سطح پاسخ یافتن نقطه بهینه در فضای

جدول ۷ نتایج تایید صحت مدل فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فیتاز جدایه K46b به روش سطح پاسخ

آزمایش	دما ($^{\circ}\text{C}$)	pH	غلظت فیتات سدیم (mM)	فعالیت فیتاز واقعی ^۱ (U/mL)	فعالیت فیتاز پیش‌بینی شده ^۲ (U/mL)
۱	۵۰	۶/۵	۱/۵	۳/۳۳۷	۳/۵۸۶
۲	۶۰	۷	۱	۳/۶۳۱	۳/۲۰۳
۳	۴۵	۶	۲	۲/۵۲۲	۲/۴۵۴
۴ (نقطه بهینه)	۵۶/۵	۷/۳	۲/۰۵	۴/۶۲۷	۴/۶۶۱

1. Actual phytase activity
2. Predicted phytase activity

- [2] Bhavsar K, Khire J.M. 2014. Current research and future perspectives of phytase bioprocessing. RSC Advances, 4: 26677-26691.
- [3] Roohani N, Hurrell R, Wegmueller R, Schulin, R. 2012. Zinc and phytic acid in major foods consumed by a rural and a suburban population in central Iran. Journal of Food Composition and Analysis, 28: 8-15.
- [4] Kumar V, Sinha A.K, Makkar H.P.S, Becker K. 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Food Chemistry, 120: 945-959.
- [5] Lei X.G, Weaver J.D, Mullaney E, Ullah A.H, Azain M.J. 2013. Phytase, a new life for an "old" enzyme. Annual Review of Animal Biosciences, 1: 283-309.
- [6] Kumar V, Sinha A.K, Makkar H.P.S, De Boek G, Becker K. 2012. Phytate and phytase in fish nutrition. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 96: 335-364.
- [7] Selle P.H, Ravindran, V. 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. Livestock Science, 113: 99-122.
- [8] Selle P.H, Ravindran V. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. Animal Feed Science and Technology, 135: 1-41.
- [9] Yao M.Z, Zhang Y.H, Lu W.L, Hu M.Q, Wang W, Liang A.H. 2012. Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. Journal of Applied Microbiology, 112: 1-14.
- [10] Jorquera M, Martinez O, Maruyama F, Marschner P, de la Luz M.M. 2007. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. Microbes and Environments/JSME, 23: 182-191.
- [11] Kaur P, Kunze G, Satyanarayana T. 2007. Yeast phytases: present scenario and future perspectives. Critical Reviews in Biotechnology, 27: 93-109.
- [12] Yin Q, Zheng Q, Kang X. 2007. Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism. Animal Feed Science and Technology, 132: 341-350.
- [13] Fu S, Sun J, Qian L, Li Z. 2008. *Bacillus* phytases: present scenario and future perspectives. Applied Biochemistry and Biotechnology, 151: 1-8.
- [14] Reddy C, Achary V.M.M, Mana M, Singh J, Kaul T, Reddy M. 2015. Isolation and Molecular Characterization of

شناخت خصوصیات آنزیم‌های فیتاز به‌ویژه برای کاربردهای صنعتی آنها از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا که فیتازهای جداسازی شده از منابع مختلف خصوصیات مختلفی دارند [۹]. نتایج این تحقیق مشابه با تحقیقات قبلی در مورد آنزیم‌های فیتاز *باسیلوس ساتبیلیس*، *باسیلوس گونه KHU-10* و فیتاز نو ترکیب *rePhyCm* می‌باشد [۲۰، ۳۲، ۳۳]. اما گولاتی و همکاران (۲۰۰۷)، التوخی و همکاران (۲۰۱۳)، برجی و همکاران (۲۰۱۴) و نونال و همکاران (۲۰۰۸) نتایج متفاوتی را برای آنزیم‌های فیتاز *باسیلوس لاولاکتیکوس*، *باسیلوس ساتبیلیس MJA*، *باسیلوس لیچنیفورمیس ATCC 14580 (PhyL)* و سویه‌های مختلف *باسیلوس* گزارش کردند [۱۵، ۳۴-۳۶].

نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش غلظت فیتات سدیم تا حدود ۲/۱ میلی مولار تاثیر مثبتی بر فعالیت آنزیم فیتاز دارد در حالی که در مقادیر بالاتر تاثیر بازدارندگی از خود نشان داد که مشابه با نتایج بدست آمده برای آنزیم‌های فیتاز باکتری *شیگلا* گونه *CD2* و *قارچ شیروفیلوم کومن* می‌باشد [۳۷، ۳۸].

۴- نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق تعدادی از جدایه‌های میکروبی که از منابع مختلف جداسازی شدند از نظر تولید بیشترین مقدار آنزیم فیتاز به روش تخمیر غوطه‌وری بررسی شد. نتایج نشان داد که جدایه *K46b* یک نوع آنزیم فیتاز قلیایی که دارای *pH* بهینه در محدوده قلیایی می‌باشد، تولید می‌کند. بهینه‌سازی شرایط کاتالیتیکی نشان داد که عوامل *pH* و غلظت سوبسترا تاثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم فیتاز دارند و بنابراین یافتن شرایط بهینه اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فیتاز از اهمیت زیادی برخوردار است. پس از بهینه‌سازی، فعالیت آنزیم فیتاز تا $4/591 \text{ U/mL}$ افزایش یابد که در مقایسه با مقدار اولیه در محیط کشت پایه $1/952 \text{ U/mL}$ حدود ۱۳۵٪ افزایش نشان داد.

۵- منابع

- [1] Singh B, Satyanarayana T. 2014. Fungal phytases: characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 99: 646-660.

- [23] Sreedevi S, Reddy B. 2013. Screening for efficient phytase producing bacterial strains from different soils. *International Journal of Biosciences*, 3: 76-85.
- [24] Singh N.K, Joshi D.K, Gupta R.K. 2013. Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6: e6419.
- [25] Das P, Ghosh K. 2013. Evaluation of phytase-producing ability by a fish gut bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. *Journal of Biological Sciences*, 13: 691-700.
- [26] Haaland P.D. 1990. *Biotechnology Experimental Design. Statistical Design and Analysis of Industrial Experiments*, 109: 73.
- [27] Powar V.K, Jagannathan V. 1982. Purification and properties of phytase-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 151: 1102-1108.
- [28] Igbasan F, Männer K, Miksch G, Borriss R, Farouk A, Simon O. 2000. Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins. *Archives of Animal Nutrition*, 53: 353-373.
- [29] Simon O, Igbasan F. 2002. In vitro properties of phytases from various microbial origins. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 813-822.
- [30] Myers R, Montgomery D. 2002. *Response Surface Methodology*, John Wiley and Sons, Inc, USA.
- [31] Li R, Zhao J, Sun C, Lu W, Guo C, Xiao K, 2010. Biochemical properties, molecular characterizations, functions, and application perspectives of phytases. *Frontiers of Agriculture in China*, 4: 195-209.
- [32] Choi Y.M, Suh H.J, Kim J.M. 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry*, 20: 287-292.
- [33] 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*, 64: 2079-2085.
- [34] El-Toukhy N.M, Youssef A. S, Mikhail M.G. 2013. Isolation, purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* MJA. *African Journal of Biotechnology*, 12: 2957-2967.
- [35] Gulati H, Chadha B, Saini H. 2007. Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus* Thermostable Phytase from *Bacillus subtilis* (BSPHyARRMK33). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175: 3058-3067.
- [15] Borgi M.A, Boudebouze S, Aghajari N, Szukala F, Pons N, Maguin E, Rhimi M. 2014. The attractive recombinant phytase from *Bacillus licheniformis*: biochemical and molecular characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 5937-47.
- [16] Yao M.Z, Lu W.L, Chen T.G, Wang W, Fu Y.J, Yang B.S, Liang A.H. 2013. Effect of metals ions on thermostable alkaline phytase from *Bacillus subtilis* YCJS isolated from soybean rhizosphere soil. *Annals of Microbiology*, 1-9.
- [17] Roy T, Banerjee G, Dan S.K, Ray A.K. 2013. Optimization of fermentation conditions for phytase production by two strains of *Bacillus licheniformis* (LF1 and LH1) isolated from the intestine of Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). *Proceedings of the Zoological Society*, 66: 27-35.
- [18] Shim J.H, and Oh B.C. 2012. Characterization and application of calcium-dependent β -Propeller phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 7532-7537.
- [19] Kammoun R, Farhat A, Chouayekh H, Bouchaala K, Bejar S. 2012. Phytase production by *Bacillus subtilis* US417 in submerged and solid state fermentations. *Annals of Microbiology*, 2012. 62: 155-164.
- [20] Wang Q, Fu S.J, Sun J.Y, Weng X.Y. 2011. Characterization of a thermostable alkaline phytase from *Bacillus licheniformis* ZJ-6 in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 1247-1253.
- [21] Hashemi M, Razavi S.H, Shojaosadati S.A, Mousavi S.M, Khajeh K, Safari M. 2010. Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110: 333-337.
- [22] Engelen A. J, Heeft, F. C, Randsdorp, Peter H. G, Somers Wim A.C, Schaefer J, van der Vat B.J.C. 2001. Determination of phytase activity in feed by a colorimetric enzymatic method: collaborative interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 84: 629-633.

- for the production of phytase from *Schizophyllum commune*: studies of its optimization, profile of fermentation parameters, characterization and stability. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35: 1067-1079.
- [38] Roy M. P, Poddar M, Singh K.K, Ghosh S. 2012. Purification, characterization and properties of phytase from *Shigella* sp. CD2. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 49: 266-271.
- laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34: 91-98.
- [36] Nuñal S. N, Serrano Jr A.E, Seraspe E.B, Maeda H. 2008. Biochemical properties of extracellular phytases from *Bacillus* spp. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University, Special Issue*, 49-55.
- [37] Salmon D.N.X, Piva L.C, Binati R.L, Rodrigues C, de Souza Vandenberghe L.P, Soccol C. R, Spier M.R. 2012. A bioprocess

Optimization of catalytic activity of phytase from isolate K46b using response surface methodology

Rocky-Salimi, K. ^{1*}, Hashemi, M. ², Safari, M. ¹

1. Ph.D. Student and Professor, Department of Food Science, Engineering and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran .
2. Staff Member of Microbial Biotechnology and Biosafety Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

(Received: 94/6/7 Accepted: 94/9/12)

Phytases (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis phospho-hydrolase), found in plants, animal tissues and microorganisms, are a group of phosphatases capable of hydrolyzing phytic acid, the most abundant inositol phosphate in nature, to *myo*-inositol and inorganic phosphates. In this study, 68 microbial isolates from different sources were screened using submerged fermentation for the best phytase production. The results showed that isolate K46b had the highest phytase production (1.952 U/mL) among other isolates. Subsequently, the catalytic activity of phytase enzyme of isolate K46b at different conditions of temperature, pH and sodium phytate concentration was optimized using response surface methodology (RSM). Under optimum conditions i.e. 56.5 °C, pH 7.30 and 2.05 mM sodium phytate, the phytase activity increased to 4.627 U/mL which compared to the screening step, it showed a 137% increase. Moreover, the phytase showed 60-73% of its optimum activity in wide ranges of temperature (47-68 °C), pH (6.3-8.0) and sodium phytate (1.04-2.50 mM). It can be concluded that isolate K46b phytase has potential applications in dephytinization of food ingredients such as cereals and meals in food and animal feed industries, aquaculture and combating phosphorous pollution in the environment.

Key words: Phytase enzyme, Submerged fermentation, Catalytic Activity, Optimization, Response surface methodology.

* Corresponding Author E-Mail Address: salimi_1998@yahoo.com