دانشکده کشاورزی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد در رشته‌ی مهندسی علوم و صنایع غذایی- تکنولوژی مواد غذایی

شناسایی میکروارگانیسم های تولید کننده فیتاز از منابع طبیعی و تعیین ویژگی آنزیم های تولید شده

به وسیله‌ی

لیلا منجذب مرودشتی

اساتید راهنما

دکتر محمد هادی اسکندری

دکتر شهرام شکرفروش

بسم الله الرحمن الرحيم
الحمد لله رب العالمين الرحمن الرحيم مالك يوم الدين
اهدنا الصراط المستقيم صراط الذين
انعمت عليهم غير المغضوب عليهم
ولا الضالين

بـه نام خـدا

اظهارنامـــه

اینجانب لیلا منجذب مرودشتی دانشجـــوی رشتـــه‌ی مهندسی علوم و صنایع غذایی گـرایش تکنولـوژی مـواد غـذایی ، دانشکده کشاورزی اظهار می‌کنم که این پایان نامه حاصل پژوهش خودم بوده و در جاهایی که از منابع دیگران اسـتفاده کرده‌ام، نشانی دقیق و مشخصات کامل آن را نوشته‌ام. همچنین اظهار می‌کنم که تحقیق و موضوع پایان نامـه‌ام تکـراری نیست و تعهد می‌نمایم که بدون مجوز دانشگاه دستاوردهای آن را منتشر ننموده و یا در اختیـار غیـر قـرار نـدهم. کلیـه حقوق این اثر مطابق با آیین‌نامه مالکیت فکری و معنوی متعلق به دانشگاه شیراز است.

نام و نام خانوادگی: لیلا منجذب مرودشتی

تاریخ و امضاء: 1391/6/30

به نام خدا

شناسایی میکروارگانیسم‌های تولید کننده فیتاز از منابع طبیعی و تعیین ویژگی آنزیم‌های تولید شده

به کوشش

لیلا منجذب مرودشتی

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه شیراز به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

علوم و صنایع غذایی – گرایش تکنولوژی مواد غذایی

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی کمیته پایان نامه، با درجه‌ی:

دکتر محمد هادی اسکندری، استادیار بخش علوم و صنایع غذایی (استاد راهنما) .....

دکتر شهرام شکرفروش، استاد گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی (استاد راهنما) .....

دکتر سعید حسین زاده، استاد گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی .....

دکتر مرضیه موسوی نسب، دانشیار بخش علوم و صنایع غذایی.....

شهریور ماه 1391

تقدیم به:

مهربان فرشتگانی که لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست

تقدیم به وجود مهربان پدر و مادرم

تقدیم به:

استادان ارجمندم دکتر محمد هادی اسکندری و دکتر شهرام شکر فروش، که وجودشان مظهر مهر و محبت و بیانشان دریای معرفت است.

سپاسگزاری

الهی تو میدانی که عاجزم از شکر، تو به جای من شکر کن خود را، که شکر آن است و بس. در زیر این طاق بلند، آموختن و معرفت طلبی کیمیایی بود که در بهترین روزگار جوانیم بر من ارزانی شد و چنان است که نبض خاطرم همه لحظه به پاس شکر خواهد تپید و لطف بی‌دریغ و منشت را سپاس می‌گویم.

اکنون که به لطف پروردگار انجام و نگارش این پایان نامه به اتمام رسیده است به پاس حق‌شناسی لازم می‌دانم که مراتب قدردانی و تشکر را از اساتید راهنمای بسیار ارجمند و فرزانه‌ام جناب آقای دکتر محمد هادی اسکندری و دکتر شهرام شکرفروش که در تمام طول مدت انجام این مطالعه حضور ایشان پشتوانه و دلگرمی مؤثری برای بنده بودند و همچنین بخاطر زحمت‌ها و راهنمایی‌های بی دریغشان سپاسگزاری نمایم.

از راهنمایی‌های ارزنده استاد مشاور عزیزم جناب آقای دکتر سعید حسین زاده که گره‌های کور این رساله به سر انگشت دانش و تدبیر ایشان گشوده می گشت خالصانه سپاسگزارم. از سر کار خانم دکتر مرضیه موسوی نسب دیگر استاد مشاور این رساله که با دقت نظر و راهنمایی‌های بسیار مفیدشان نقش مؤثری در انجام نیکوی این پژوهش ایفا نمودند، صمیمانه تشکر می نمایم.

از پدر و مادرم که همواره در تمامی مراحل زندگی بهترین دوستم بودند و با هر کلام و رفتارشان زندگی با عشق را به من آموختند صمیمانه سپاسگزارم.

چـکیـده

شنـاسایـی میـکروارگـانیـسم‌هـای تولیـد کنـنده فیـتاز از منـابع طـبیعی و تعـیین ویـژگی آنـزیم‌هـای تولیـد شـده

بـه کوشـش

لـیلا منـجـذب مرودشـتی

فیتیک اسید، ماده‌ای ضد تغذیه‌ای است که در دانه غلات و حبوبات یافت می‌شود. این ماده از جذب عناصر معدنی و پروتئین‌ها در روده جلوگیری کرده و ارزش غذایی ماده مصرف شده را به شدت کاهش می‌دهد. بنابراین استفاده از روش‌هایی برای کاهش و حذف این ماده راهی در جهت احیای ارزش غذایی حبوبات وغلات به شمار می‌آید. آنزیم فیتاز با هیدرولیز فیتیک‌اسید این کار را به نحوی انجام می‌دهد که کمترین اثر نامطلوب بر روی ماده غذایی وارد گردد. بدین منظور این تحقیق با اهداف زیر انجام شد:

- جداسازی باکتری‌ها و قارچ‌های موجود در طبیعت با توان تولید فیتاز و شناسایی ایـن میکروارگانیسم‌ها تا سطح زیر گونه با استفاده از تکنیک‌های مولکولی 16s-rDNA
- بررسی میزان فیتاز تولید شده توسط این میکروارگانیسم ها
- ارزیابی ویژگی‌های آنزیم تولیدی

در این پژوهش از 24 منبع طبیعی مختلف که حضور میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنزیم فیتاز در آن‌ها محتمل بود استفاده گردید. به منظور جداسازی این میکروارگانیسم‌ها از محیط کشت PSM (Phytase Screen Medium) استفاده گردید. در ادامه تلاش شد با استفاده از روش Phytase assay میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط هر گونه را اندازه‌گیری کرده

و بهترین میکروارگانیسم را برای ادامه آزمایشات انتخاب شدند. اثر تیمارهای مختلف از جمله pH و دما را بر روی فعالیت آنزیمی این میکروارگانیسم‌ها مورد بررسی قرار گرفت، که در نهایت هر کدام از آن‌ها در شرایط بهینه خاصی بیشترین فعالیت آنزیمی را از خود نشان دادند.

این میکروارگانیسم‌ها با استفاده از آزمون‌های شناسایی شدند و چون امکان شناسایی صد در صد این میکروارگانیسم ها با استفاده از ویژگی‌های ژنوتیپی وجود نداشت از توالی ژن 16s-rDNA به منظور شناسایی دقیق جدایه‌ها استفاده شد. با استفاده از آزمون PCR و بکارگیری یک جفت پرایمر قطعه‌ای از این ژن با 1200 جفت باز تکثیر شد. 8 عدد از جدایه ها جنس های مختلف *Bacillus* ها (3 عدد *Bacillus licheniformis*، 2 عدد *Bacillus pumilus* ، یک عدد *Bacillus coagulans*، یک عدد *Bacillus clausii*، یک عدد *Bacillus cereus strain JBE0005* و یک عدد *Bacillus circulans*) ، 2 عدد از آن مربوط به جنس های *Aeromonas* (یک عدد*Aeromonas salmonicida* و یک عدد *Aeromonas veronii*)، یک عدد *Micrococcus varians*، یک عدد *Enterobacter asburiae*، یک عدد *Brevibacillus laterosporus* و یک عدد *Staphylococcus xylosus* شناسایی شدند، در نهایت نیز درجه حرارت و *pH* بهینه فعالیت آنزیم فیتاز تولید شده توسط این ایزوله ها تعیین گردید.

ایزوله های قارچی با استفاده از روش مورفولوژی شناسایی شدند و 6 عدد از بهترین ایزوله ها (از نظر تولید آنزیم فیتاز) را با استفاده از روش مولکولی نیز مورد شناسایی قرار گرفتند; که بر ایـن اساس 5 عـدد از جدایه ها مربوط به جنس های مختلف *Aspergillus* (از جمـله *A. niger* و *A. oryza*) ، 5 عدد مـربـوط به جنس *Penicillium* (*P. p. commune* ، *P. chrysogenum* و ...) ، 3 عدد *Fusarium* sp. ، 2 عدد *Rhysopus* sp.، 2 عدد *Cladosporium* sp. ، یک عدد *Paecilomyces variotii* ، یک عدد *Theromyces* sp. شناسایی شدند.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

1-1-معرفی 2

1-2- فـیتـاز 4

1-3- فیتیک‌اسید و مواد معدنی 5

1-4- فیتیک‌اسید و غذا 6

1-5- کاربردهای آنزیم فیتاز 7

1-6- تولید نان 10

1-7- هیدرولیز فیتات‌های نامحلول 10

1-8- ترغیب رشد گیاهی 10

فصل دوم

سابقه‌ی تحقیق 12

فصل سوم:مواد و روش ها

3-1- مواد و وسایل مورد استفاده 16
3-2- وسایل مورد نیاز 17
3-3- محیط‌های کشت 18
3-4- روش کار 19
3-4-1- نمونه‌گیری از خاک 19
3-4-2- نمونه‌گیری از منابع غذایی 19
3-4-3- نمونه‌گیری از منابع گیاهی 19
3-5- قارچ‌ها 19
3-5-1- خالص سازی قارچ‌ها 19
3-5-2- نگهداری قارچ‌ها 20
3-5-2-1- کشت روی محیط کشت مورب درون لوله 20
3-5-3- شناسایی قارچ‌ها 20
3-5-3-1- شناسایی ریخت شناسی قارچ‌ها 20
3-6- جداسازی باکتری‌های تولید کننده آنزیم فیتاز 21
3-6-1- جداسازی باکتری‌ها 21
3-6-2- نگهداری ایزوله های باکتری 21
3-6-3- بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی باکتری‌ها 22
3-6-3-1- آزمون کاتالاز 23
3-6-3-2- آزمون اکسیداز 23
3-6-3-3- رنگ آمیزی گرم 23

3-6-3-4- رنگ آمیزی اسپور 24
3-6-4- بررسی ویژگی های فنوتیپی ایزوله ها 24
3-6-4-1- توانایی تولید گاز از گلوکز 24
3-6-4-2- رشد در دماهای مختلف..... 24
3-6-4-3- رشد در غلظت‌های مختلف نمک..... 25
3-6-4-4- رشد در pHهای مختلف..... 25
3-6-4-5- تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف 25
3-6-4-6- بررسی رشد در محیط بی‌هوازی..... 26
3-6-4-7- تست سیترات..... 26
3-6-4-8- تست نیترات..... 27
3-6-4-9- تست هیدرولیز کازئین..... 27
3-6-4-10- تست هیدرولیز ژلاتین..... 27
3-6-4-11- تست هیدرولیز نشاسته..... 28
3-6-4-12- تست هیدرولیز لستین 28
3-6-4-13- تست تحرک 28
3-6-4-14- تست MR-VP..... 29
3-6-5- شناسایی مولکولی باکتری‌ها..... 30
3-6-5-1- استخراج DNA 30
3-6-5-1-1- استخراج DNA به روش فنل و کلروفرم 30
3-6-5-1-2- روش جوشاندن..... 31

3-6-5-2- 1انجام واکنش زنجیره پلی مراز 31
3-6-5-2-2- الکترو فورز محصولات واکنش زنجیره پلی مراز 33
3-6-5-2-3- تکرار PCR 33
3-6-5-2-4- خالص سازی محصولات PCR 34
3-7- تشخیص میکروارگانیسم‌های تولید کننده فیتاز 35
3-7-1- روش نیمه کمی 35
3-7-2- روش کمی 36
3-8- تعیین فعالیت آنزیم فیتاز تولید شده 36
3-9- تعیین ویژگی‌های آنزیم تولید شده: 36

فصل چهارم: نتایج و بحث

4-1- میکروارگانیسم‌های ایزوله شده‌ی تولید کننده آنزیم فیتاز 39
4-1-1- قارچ‌های تولید کننده آنزیم فیتاز 39
4-1-1-1- نتایج شناسایی قارچ‌ها با استفاده از روش مورفولوژیکی 39
4-1-1-2- تولید آنزیم فیتاز توسط قارچ‌ها 39
4-1-1-2-1- بررسی تشکیل هاله در محیط PSM 40
4-1-1-2-2- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در محیط مایع 42
4-1-2- باکتری‌های تولید کننده آنزیم فیتاز 45
4-1-2-1- بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی باکتری‌های ایزوله شده 46
4-1-2-1-1- نتایج حاصل از بررسی گرم باکتریها 46

4-1-2-1-2- نتایج حاصل از بررسی اسپور در باکتریها..... 46
4-1-2-1-3- نتایج حاصل از آزمون کاتالاز و اکسیداز..... 46
4-1-2-1-4- بررسی تولید گاز از گلوکز..... 49
4-1-2-1-5- بررسی توانایی تخمیر قندهای مختلف..... 49
4-1-2-1-6- بررسی توانایی رشد در دماهای مختلف..... 49
4-1-2-1-7- بررسی توانایی رشد در غلظت‌های مختلف نمک..... 49
4-1-2-1-7- سایر نتایج حاصل از آزمون های فیزیکوشیمیایی ایزوله ها..... 52
4-1-2-2- بررسی ویژگی‌های ژنوتیپی..... 57
4-1-3- بررسی ویژگی‌های آنزیم تولید شده‌ی هر باکتری..... 60
4-1-3-1- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Bacillus clausii strain XJU-4*..... 60
4-1-3-2- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Staphylococcus xylosus strain B36*..... 61
4-1-3-3- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Bacillus cereus strain JBE0005*..... 62
4-1-3-4- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری*Micrococcus varians*.. 62
4-1-3-5- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Enterobacter asburiae strain PS2*..... 63
4-1-3-6- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Bacillus licheniformis strain NRRL B-642*..... 64
4-1-3-7- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Bacillus pumilus strain VKK-4NL*..... 65

4-1-3-1-8- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Bacillus licheniformis strain LMG 6934* 66

4-1-3-1-9- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Aeromonas veronii strain A.096A* 67

4-1-3-1-10- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Bacillus licheniformis strain DSM 1913* 68

4-1-3-1-11- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Bacillus pumilus strain DKS1* 69

4-1-3-1-12- اپتیمم دما و *pH* فعالیه آنزیم تولیدی توسط باکتری *Brevibacillus laterosporus strain: NBRC 15654* 70

4-1-3-1-13- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Bacillus circulans strain IHB B* 71

4-1-3-1-14- اپتیمم دما و *pH* فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Bacillus coagulans strain JCM2257* 72

4-1-3-1-15- اپتیمم دما و pH فعالیت آنزیم تولیدی توسط باکتری *Aeromonas salmonicida strain YTU8* 73

فصل پنجم: نتیجه گیری کلی و پیشنهادات

5-1- نتیجه گیری 78

5-2- پیشنهادات 81

فهرست منابع

منابع و ماخذ.....82

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول 1-1- میزان فیتیک اسید موجود در غذاها، حبوبات و محصولات غله‌ای (اندازه‌گیری شده با HPLC) 4

جدول 3-1: غلظت و حجم مواد مورد استفاده در Master Mix 32

جدول 3-2: ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت PSM 35

جدول 4-1: نتایج حاصل از شناسایی قارچها و قطر هاله‌های تشکیل شده توسط هر ایزوله... 41

جدول 4-2: فعالیت آنزیم فیتاز تولید شده توسط ایزوله های قارچی در محیط Lb و PSM . 44

جدول 4-3: نتایج حاصل از بررسی گرم، اسپور، ویژگی های مورفولوژیکی، تست های کاتالاز و اکسیداز ایزوله های باکتریایی 47

جدول 4-4: نتایج مربوط به توانایی مصرف قندهای مختلف و تولید گاز از گلوکز توسط ایزوله‌ها 50

جدول 4-5: نتایج مربوط به توانایی رشد ایزوله های باکتریایی در دماهای مختلف 51

جدول 4-6: نتایج مربوط به توانایی رشد ایزوله های باکتریایی در غلظتهای مختلف نمک 52

جدول 4-7: نتایج مربوط به توانایی ایزوله های باکتریایی در استفاده از سیترات، احیا و تولید گاز از نیترات و آزمون تحرک 53

جدول 4-8: نتایج مربوط به توانایی ایزوله های باکتریایی در هیدرولیز لستین، ژلاتین و نشاسته و تست MR-VP 54

جدول 4-9: نتایج مربوط به توانایی رشد ایزوله های باکتریایی در محیط هایی با pH مختلف 55

جدول 4-10: نتایج حاصل از شناسایی ایزوله های از طریق داده های موجود در بانک ژنوم .. 58

فهرست شکل‌ها

عنوان ..... صفحه

شکل 1-1: ساختار شیمیایی فیتیک اسید..... 3

شکل 2-1: کاربردهای فیتاز میکروبی..... 9

شکل 4-1: نمایی از هاله اطراف پرگنه‌های قارچی در محیط PSM..... 40

شکل 4-2: تشکیل هاله اطراف خط رشد باکتری‌ها..... 45

شکل4-3: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری*Bacillus clausii strain XJU-4*..... 61

شکل 4-4: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری*Staphylococcus xylosus strain B36*..... 61

شکل 4-5: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری*Bacillus cereus strain JBE0005*..... 62

شکل 4-6: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری*Micrococcus varians*..... 63

شکل4-7: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری*Enterobacter asburiae strain PS2*..... 64

شکل4-8: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری *Bacillus licheniformis strain NRRL B-642*..... 65

شکل 4-9: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری *Bacillus pumilus strain VKK-4NL* 65

شکل 4-10: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری *Bacillus licheniformis strain LMG 6934* 66

شکل4-11: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری *Aeromonas veronii strain A.096A* 67

شکل 4-12: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری *Bacillus licheniformis strain DSM 1913* 68

شکل 4-13: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری *Bacillus pumilus strain DKS1* 69

شکل4-14: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری *Brevibacillus laterosporus strain: NBRC 15654* 70

شکل 4-15: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری *Bacillus circulans strain IHB B* 71

شکل4-16: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری *Bacillus coagulans strain JCM2257* 72

شکل4-17: ارزیابی تاثیر تغییرات دما (الف) و اسیدیته (ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط باکتری *Aeromonas salmonicida strain YTU8* 73

فصل اول