



ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

تقویت تولید فیتاز از یک سوش جدید پروبیوتیک Bacillus Subtilis P6

چکیده

یک شیوه بهینه سازی کلاسیک و آماری منسجم که دربرگیرنده ترکیب طراحی Placket-Burman یا PBD و طراحی کامپوزیت مرکزی (CCD) برای افزایش بازده فیتاز بکار گرفته شده است. PBD برای ارزیابی اثر 9 متغیر راجع به تولید فیتاز از سوش پروبیوتیک B. subtilis و سه متغیر معنی دار آماری به نامهای گلوکز، عصاره گوشت گاو و فسفات پتاسیم برای مطالعات بهینه سازی بیشتر انتخاب گردید. میزان پنج متغیر برای ماکزیمم تولید فیتاز توسط یک CCD تعیین گردید. مقادیر بهینه برای عوامل از طریق روش شناسی سطح پاسخ RSM به صورت ذیل تعیین گردید: 6.59 gl-1 گلوکز، 6 gl-1 عصاره گوشت گاو، و 2.75 gl-1 پتاسیم فسفات به ترتیب. تولید فیتاز از 2.74 EUml-1 به 46.76 EUml-1 بهبود یافته است یک افزایش 17 برابری را در فعالیت بعد از بهینه سازی نشان داده است.

کلیدواژه ها: فیتاز، پروبیوتیک، بهینه سازی کلاسیک، طراحی Plackett-Burman، بهینه سازی سطح پاسخ.

TarjomeFa.Com مقدمه

آگاهی رو به رشد رژیم غذایی و سلامتی باعث افزایش تقاضای روزافزون محصولات غذایی حمایت گر سلامتی سواى فراهم آوری تغذیه پایه شده است. از شش دهه قبلتر، تعداد زیادی آنتی بیوتیک ها در علوفه دامی اضافه گردید تا رشد، کارایی و حفاظت آنها را در برابر میکروارگانسیم های بیماریزا بهبود بخشد.

ولیکن مقاومت آنتی بیوتیکی امروزه یک مسئله سلامت عمومی شده است. میکروفلور معدی رودی نقش مفیدی را در سلامت و تغذیه حیوانات ایفا می کند و پروبیوتیک ها، میکروارگانسیم های زنده به حفظ میکروفلور روده کمک می کنند. پروبیوتیک ها قویا به عنوان راه دیگری برای غذای حیوانات توصیه می شوند. اخیرا، مقدار زیادی توجه به ارزش اصیل گونه های باکتریایی به عنوان پروبیوتیک های چندکاره مبدول داشته شده است، که انواع انزیم های خارج سلولی را برای تقویت قابلیت هضم علوفه و نیز بسیاری ترکیبات آنتی میکروبی برای بهبود

عملکرد حیوانی ترشح می کنند. در میان اینها فیتاز یک موقعیت کلیدی دارد. فیتات یک مخزن فسفات طبیعی در علوفه دامی مبتنی بر گیاهان بوده و به عنوان عامل ضدتغذیه در روده حیوانات و انسانها با محدودسازی جذب پروتئین ها، کربوهیدرات ها، اسید آمینه ها و فلزاتی مانند روی، آهن، کلسیم و منیزیم عمل می کند. ولیکن برای رفع نیازهای فسفر، رژیم غذایی حیوانات تک معدی با فسفر آلی غنی سازی می شود که باعث ترشح مقدار زیادی فسفر در فضولات بدن می شود که منجر به آلودگی محیط زیستی و چندین مسئله سلامت انسان می شود. فیتاز (ميو-اینوزیتول هگزاکیزفسفات فسفوهیدرولاز، E.C.3.1.3.8 یا E.C.3.1.3.26) گروهی از آنزیم ها هستند که فیتات را به اینوزیتول فسفات، ميو-اینوزیتول و فسفات غیرآلی هیدرولیز می کنند. امروزه، فیتاز استخراجی از قارچ ها (برندهای P/L Finase[®]، SSF، Allzyme[®]، Nautophos[®]) به شکل مکمل علوفه دامی در بازار فروخته می شود؛ از سوی دیگر چندین گونه باکتریایی به عنوان پروبیوتیک ها استفاده شده اند.

ولیکن تا به امروز، سوشهای پروبیوتیک تولیدکننده فیتاز در بازار در اختیار قرار نگرفته اند. ولیکن، یک سوش پروبیوتیک با فعالیت فیتازی می تواند عملکرد دوبرابری را انجام بدهد و باعث تقویت بهره وری بازده حیوانات بشود. همزمان می توانند باز باعث کاهش مسائل محیط زیستی در اثر فیتات هضم نشده بشوند که محصول فرعی اصلی فضولات انسانی و حیوانی و دام می باشد. با اینحساب، از چند سال اخیر این حیطه یک مسئله سلامت عمومی اصلی شده است و علاقه متخصصان سلامت و تحقیقات را در کل دنیا جلب کرده است. یکی از سنگ بناهای اصلی در بیوتکنولوژی امروز همان بهینه سازی شرایط پرورش و کشت برای تقویت بهره وری است. غربالگری و ارزیابی الزامات تغذیه ای میکروارگانیسم ها یک مرحله مهم در هر گونه توسعه پروسه زیستی است.

مطالعات بهینه سازی که شامل شیوه یک عامل در هر زمان می باشد، خسته کننده است و تمایل دارد که تعامل میان فاکتورها را نادیده بگیرد و ممکن است منجر به تفسیر اشتباه نتایج بشود. برعکس، راهکارهای آماری ترجیح داده شده و پرسودتر بوده و خطا را در تعیین اثرات پارامترها در یک حالت اقتصادی کاهش می دهد. تکنیک تجربی یک روش بهینه سازی معمولی است که راهکارهای یک فاکتور در هر زمان را بکار می گیرد که ساده و آسان است و اثر فردی مولفه های مختلف را توضیح می دهد. متأسفانه، پرکار و ملال آور بوده و نمی تواند تعاملات میان فاکتورها را توضیح بدهد. بهینه سازی آماری یک ابزار اثبات شده برای غلبه بر محدودیت

های تک عاملی در یک روش زمانی است. این روش یک تکنیک کارآمدتری است چرا که می تواند داده های آماری را با یک تعداد نسبتاً کمی از آزمایشات ارائه بدهد.

در تلاش قبلی مان، ما سوش پروبیوتیک تولیدکننده فیتاز احتمالی Bacillus subtilis P6 را از محیط غیربومی جداسازی کردیم. با در نظرگیری پتانسیل و ظرفیت بالای فیتاز برای استفاده به عنوان مکمل علوفه دامی و چشم انداز آتی آن در زمینه علوفه دامی و تغذیه انسان، ارزیابی حاضر از اینرو با هدف دستیابی به بهبود کارایی در تولید فیتاز از طریق راهکار بهینه سازی آماری و کلاسیک متوالی از سوش پروبیوتیک Bacillus subtilis P6 انجام شده است که تایید می کند آیا این سوش می تواند به یک نوع جدید افزودنی علوفه دامی برای غذا و تغذیه حیوانی در آینده تبدیل شود یا خیر.

مواد و روش اجرا

مواد شیمیایی

فیتیک اسید به عنوان یک نمک دودکاسدیم از شرکت مواد شیمیایی Sigma Chemical Co. (در سنت لوییس ایالت میسوری امریکا) خریداری گردید. همه مواد شیمیایی و محیط کشت ها محصولات شرکت مرک می باشند (شهر Darmstadt آلمان). همه معرف ها درجه تحلیلی داشتند.

سوش باکتریایی و تهیه تلقیح آن

سوش باکتریایی پروبیوتیک تولیدکننده فیتاز Bacillus subtilis P6 (شماره دستیابی NCBI برابر با KL872821) از مرکز مجموعه کشت باکتریایی (شماره BGCC#2393) در دانشگاه Rani Durgavati شهر Jabalpur هند کسب گردید که در اصل از خاک مرغی جداسازی و شناسایی شده بود. این سوش روی محیط کشت اسلنت مورب آگار Luria Bertani یا LB (pH 7) و نگهداری گردید و در 4 درجه سانتیگراد ذخیره سازی شد. تلقیح دانه ای با افزودن یک کلنی منفرد با کشت باکتریایی 8 ساعته با انتقال به شکل گندزدایی شده به 20 میلی لیتر از محیط کشت غربالگری فیتاز پیش اتوکلاوی (PSM) بروث حاوی مواد ذیل در هر گرم لیتر:

10g glucose; 2g CaCl₂; 5g NH₄NO₃; 0.5g KCl; 0.5g MgSO₄.7H₂O, 0.01g FeSO₄.7H₂O, 0.01g MnSO₄.H₂O, 4.0g sodium phytate (pH 6.0)

در فلاسک ارلن مایر تهیه گردید که در 37 درجه سانتیگراد در یک انکوباتور با تکنهای لرزشی برای مدت 20 ساعت در دور 150 rpm انکوبه گردید. تلقیح 2.5% ی $(A_{600} = 0.6-0.8)$ این محیط کشت که به شکل تلقیح اولیه و اصلی استفاده گردیده است.

بهینه سازی پارامترهای تخمیر با روش یک عامل در هر زمان

بهینه سازی پارامترهای فیزیکی

اثر زمان دسته ای

برای بررسی اثر زمان دسته ای، تلقیح 2.4% به میزان 100 ml از بروث PSM و بعد از یک فاصله زمانی 12، 16، 20، 24، 28، 32، 36، 40، 44، 48، و 52 ساعت فعالیت انزیمی برآورد گردید.

اثر سن و اندازه تلقیح

اثر سن تلقیح (4 و 8 و 12 و 16 و 20 و 24 و 28 و 32 و 36 ساعت) و اندازه تلقیح (0.5، 1، 1.5، 2، 2.5، 3، 3.5 و 4% نسبت v/v) روی تولید فیتاز مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت.

اثر pH و درجه حرارت

اثر pH روی تولید فیتاز با تنظیم pH ی محیط کشت PSM در دامنه 3 الی 7 مطالعه گردید. برای مطالعه اثر درجه حرارت روی تولید فیتاز، سوش تست امکان رشد در درجه حرارت مختلف (20، 25، 30، 35، 40، 45، 50 و 55 درجه سانتیگراد) در مجموعه محیط کشت PSM بروث در pH بهینه برای دوره بهینه و فعالیت فیتازی مورد بررسی قرار گرفت.

بهینه سازی پارامترهای تغذیه ای

اثر منابع کربن و منابع نیتروژن

اثر منابع کربن مختلف روی تولید فیتاز توسط جانشینی مالتوز، سوکروز، لاکتوز، گزیلوز، رامینوز و گلیسرول (1 درصد) به طور جداگانه در محل گلوکز (کنترل) در محیط کشت حداقل ارزیابی گردید. باز، اثر انواع منابع نیتروژن روی تولید فیتاز تحت pH بهینه، درجه حرارت و منبع کربن با جانشینی نیترات امونیوم (0.5%) با

عصاره مالت، عصاره گوشت گاو، عصاره مخمر و سولفات آمونیوم به طور جداگانه در محیط کشت PSM بروث مورد بررسی قرار گرفت.

اثر فسفات غیر آلی

اثر نمک های فسفات مختلف (0.4%) شامل کلسیم فیتات، پتاسیم فسفات، سدیم دی هیدروژن فسفات و پتاسیم دی هیدروژن فسفات روی تولید فیتاز مطالعه شد.

بهینه سازی آماری

غربالگری متغیرهای مهم با طراحی Plackett-Burman (یا روش PBD)

براساس آزمایش تک فاکتوری برای تولید فیتاز، یعنی یک متغیر از هر یک از دوره انکوباسیون، pH و درجه حرارت و دو تا از هر یک از منابع کربن، نیتروژن و فسفات که مشخص گردید اثر مثبتی روی تولید فیتاز دارد به طور آماری غربالگری گردید تا پارامترهای حیاتی برای افزایش تولید فیتاز با استفاده از PBD شناسایی شود.

جداول 1 و 2 نشان دهنده متغیرها و سطح آنها بود که در طراحی آزمایشی استفاده گردید که با استفاده از نرم افزار Design Expert نسخه 9.0.2 ساخته شده بود (شرکت Stat-Ease, Inc. شهر مینه پولیس امریکا). هر متغیر در دو سطح مختلف مطالعه گردید در سطح بالا (+1) و یک سطح پایین (-1). همه آزمایشات سه مرتبه انجام گرفت و متوسط تولید فیتاز به عنوان پاسخ در نظر گرفته شد.

داده های بدست آمده از طراحی Plackett Burman یا PBD روی تولید فیتاز در معرض تحلیل واریانسی ANOVA قرار گرفت و نرم افزار آماری Design Expert 9.0.2 از شرکت Stat-Ease, Inc. شهر مینه پولیس امریکا برای تحلیل طراحی آزمایشی استفاده گردید.

بهینه سازی با روش سطح پاسخ یا RSM

براساس تحلیل نتایج PBD سه متغیر شامل گلوکز، عصاره گوشت گاو و پتاسیم فسفات برای بهینه سازی بیشتر با روش سطح پاسخ با استفاده از طراحی کامپوزیت مرکزی CCD انتخاب گردید. هر فاکتور در طراحی در پنج سطح مختلف ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$) مطالعه گردید (جدول 3). یک مجموعه شامل 20 آزمایش انجام گردید.

همه متغیرها در یک ارزش کدگذاری شده مرکزی که به شکل صفر در نظر گرفته شده بود (جدول 4) اتخاذ گردید. مقدار پاسخ (Y) در هر آزمایش متوسط فعالیت فیتازی سه تایی بوده است. سپس یک معادله چندجمله

ای درجه دوم با داده ها توسط عملیات رگرسیون چندگانه برازش گردید. نتایج آزمایشی RSM از طریق عملیات رگرسیون سطح پاسخ با استفاده از معادله چندجمله ای درجه دوم ذیل تحت برازش قرار گرفت:

$$Y_i = \beta_0 + \sum_i \beta_i X_i + \sum_{ii} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{ij} \beta_{ij} X_i X_j$$

که در آن Y_i پاسخ پیشگویی شده، $X_i X_j$ متغیرهای مستقل، β_0 مانع است، β_i ضریب همبستگی خطی است، β_{ii} ضریب همبستگی درجه دوم است، و β_{ij} عوامل تعامل هستند.

روایی سازی مدل آزمایشی

مدل آماری با بردن تولید فیتاز تحت شرایط بهینه که با مدل در میزان فلاسک های شیک پیشگویی شده بود، روایی سازی گردید و فعالیت فیتاز تعیین شد.

سنجش فیتاز

فعالیت فیتاز تحت شرایط اسیدی طبق روش Greiner در سال 2004 سنجیده شد. یک واحد از فعالیت فیتاز EU بنا به تعریف مقدار آنزیمی است که میزان $1 \mu\text{M}$ را از فسفات غیرآلی در هر دقیقه تحت شرایط سنجش استاندارد آزادسازی می کند.

نتایج و بحث

TarjomeFa.Com بهینه سازی با استفاده از شیوه کلاسیک

امروز، محققان اطراف دنیا توجه زیادی به ایجاد مقاومت ضد میکروبی و انتقال ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی از مجموعه میکروفلور حیوان به انسان مبدول داشته اند. از سوی دیگر، افزایش آلودگی در مجموعه های آب شیرین مانند انفجار رشد جلبک و ائوتروفیکاسیون از موضوع مورد توجه و بحث بسیار هستند. در این زمینه، سوشهای پروبیوتیک تولیدکننده فیتاز می توانند یک راه حل ممکن برای مسائل فوق الذکر باشند. در ارتباطات حاضر، ما بهینه سازی تولید را از سوش پروبیوتیک Bacillus subtilis P6 گزارش می کنیم.

نتایج شیوه یک عامل در هر زمان برای بهینه سازی تولید فیتاز آشکار کرد که تولید فیتاز بعد از 44 ساعت انکوباسیون رخ داد (شکل 1). کاهش در تولید فیتاز بعد از 44 ساعت می تواند به دلیل تولید توده زیستی

افزایش یافته باشد که می تواند منجر به تخلیه نوترینت ها یا تولید متابولیت های سمی باشد که بر سنتز آنزیم اثر می گذارد.

در گزارشات قبلی بازده فیتاز ماکزیمم در عرض 56 ساعت الی 72 ساعت از *Bacillus sp.* ، *Pseudomonas sp.*، *Klebsiella sp.* ثبت گردید. این امر نشان می دهد که *B. subtilis P6* می تواند مقدار زیادی فیتاز را درون یک دوره کوتاه تولید کند. این خصوصیات باعث می شود که *B. subtilis P6* برای تولید فیتاز در مقیاس تجاری یک کاندیدای نویدبخش بشود. ماکزیمم تولید فیتاز با 20 ساعت تلقیح (درصد حجمی 2.5% v.v) (شکل 2 و 3) مشاهده گردید ولیکن با افزایش در سن و اندازه ماده تلقیح کاهش یافت، که می تواند به دلیل افزایش رقابت برای جذب نوترینت و مصرف زیاده از حد نوترینت های ایجاد کننده عدم تعادل نوترینت بشود درحالیکه غلظت های پایین تر نمی تواند برای تولید آنزیم ماکزیمم کافی باشد.

در مطالعه حاضر، تولید بهینه فیتاز توسط *B. subtilis P6* در pH برابر 5.5 بوده است (شکل 4). یک pH بالاتر از سطح بهینه می تواند با ترکیب اسید آمینه آنزیم تداخل کند و فعالیت آنرا کاهش دهد. تا حد زیادی، باکتریها یک pH حدود 5 الی 7 را برای بهترین رشد و تولید فیتاز ترجیح می دهند. فعالیت در مقادیر pH اندکی اسیدی تا قلیایی می تواند فیتازهای *Bacillus* را مناسب برای مکمل علوفه دام برای حیوانات تک معدی دارای مقادیر pH معدی به اندازه 5.5-7.0 بنماید.

ماکزیمم تولید فیتاز در 37 درجه سانتیگراد مشاهده گردید و تولید آنزیم با افزایش بیشتر در درجه حرارت کاهش یافت (شکل 5). درجه حرارت بهینه برای تولید اغلب فیتازها از 30 تا 80 درجه سانتیگراد متغیر است. با در نظرگیری این یافته ها، می توان به قطع یقین این فرضیه را مطرح کرد که آنزیم باسیلوس در این مطالعه می تواند فعالیت های تجزیه فیتات بهینه را در درجه حرارت بدن حیوانات تک معدی مانند قو، ماکیان، ماهی و غیره انجام بدهد.

تولید فیتاز ماکزیمم در حضور گلوکز (12.23 IU/ml) و عصاره مخمر (16.78 IU/ml) ثبت گردید (شکل 6 و 7). این کار ممکن است به دلیل این حقیقت باشد که گلوکز به عنوان انرژی خوب و ماده تثبیت کننده غشایی عمل می کند و عصاره مخمر بهترین منبع ویتامین است که برای رشد و تکامل سلول مورد نیاز است. گلوکز به عنوان تثبیت کننده غشاهای لیزوزومی شناخته شده است. به موجب آن کاهش رهایی پروتئاز را به همراه دارد.

در سالهای اخیر گلوکز و سوکروز برای *B. subtilis* DR6، سوکروز برای *B. laevolacticus* و سبوس گندم برای *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 به عنوان بهترین منبع کربن گزارش گردید درحالیکه $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ، عصاره مخمر به عنوان بهترین منابع نیتروژن برای تولید فیتاز گزارش گردیدند. از اینرو، در مقایسه با مشاهدات قبلتر، فیتاز تولیدی *B. subtilis* P6 می تواند با هزینه پایینی تولید بشود. نتیجه مطالعه حاضر نشان داده است که بیان فیتاز توسط *B. subtilis* P6 می تواند با وجود پتاسیم فسفات (شکل 8) شبیه سازی بشود هر چند افزودن پتاسیم فسفات غیرآلی در محیط کشت بر تولید فیتاز توسط *B. laevolacticus* اثری نداشت. ظرفیت بافرسازی فسفات می تواند یک اثر مثبتی را روی سنتز فیتاز داشته باشد.

بهینه سازی آماری

شیوه عملی برای بهینه سازی پروسه راهی اسان است و می تواند بهبود چندبرابری را در فرایند طبق بسیاری موارد نشان داده شده حاصل کند. در مطالعه حاضر، یک PBD برای غربالگری مهمترین اجزای محقق کشت و شرایط کشت تاثیرگذار بر تولید فیتاز بکار گرفته شد. جدول 5 PBD را برای 9 متغیر انتخابی و پاسخ مربوطه را نشان می دهد. جدول پارتو نشان دهنده ترتیب اهمیت متغیرهای اثرگذار بر تولید فیتاز می باشد (شکل 9). جدول 6 نشان دهنده اثر هر متغیر در کنار ضریب همبستگی مربوطه یعنی P-value و t-value می باشد. براساس تحلیل رگرسیون، طبق شواهد مشخص گردید که گلوکز، عصاره گوشت گاو و پتاسیم فسفات، فاکتورهای سیگنال مثبت هستند. در صورتیکه pH، درجه حرارت، دوره انکوباسیون، مالتوز، عصاره مخمر و KH_2PO_4 بر پاسخ در سطح منفی معنی داری اثر گذاشت. یک مقدار P-value کمتر از 0.05 نشان می دهد که عبارت های مدل معنی دار است. تست F برای ANOVA نشان داد که گلوکز (0.0009)، عصاره گوشت گاو (0.0003) و پتاسیم فسفات (<0.0001) فاکتورهایی بودند که به طور معنی داری بر تولید انزیم برای *B. subtilis* P6 اثر گذاشته است. معادله نهایی از لحاظ فاکتورهای کدگذاری شده برای فیتاز *B. subtilis* P6 که از طریق PBD بدست آمده است به شکل ذیل ارائه می شود:

$$Y_{B. subtilis \text{ phytase}} = + 30.82 + 1.70 * D + 0.50 * F - 1.98 * G + 5.65 * J$$

که در آن D یعنی گلوکز، F یعنی عصاره مخمر، G عصاره گوشت گاو، J فسفات پتاسیم.

جدول 1- متغیرهای آزمایشی در میزان مختلف برای تولید فیتاز با استفاده از طراحی Plackett-Burman

Table.1 Experimental variables at different levels for phytase production using Plackett-Burman design

| Variable | Units | Symbol | Coded levels | |
|---------------------------------|-------------------|--------|--------------|-----------|
| | | | Low (-1) | High (+1) |
| pH | pH | A | 5.5 | 6.0 |
| Temperature | °C | B | 37 | 45 |
| Incubation period | h | C | 72 | 96 |
| Glucose | g l ⁻¹ | D | 10 | 15 |
| Maltose | g l ⁻¹ | E | 10 | 15 |
| Yeast extract | g l ⁻¹ | F | 2 | 5 |
| Beef extract | g l ⁻¹ | G | 2 | 5 |
| Potassium di hydrogen phosphate | g l ⁻¹ | H | 1 | 4 |
| Potassium phosphate | g l ⁻¹ | J | 1 | 4 |

جدول 2- ماتریس طراحی Plackett-Burman Design برای 12 دور اجرای تولید فیتاز

Table.2 Plackett-Burman Design Matrix of 12 run for phytase production

| Run Order | Experimental values | | | | | | | | | | |
|-----------|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | J | K | L |
| 1 | -1.000 | -0.231 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | -1.000 |
| 2 | -1.000 | -0.231 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | 1.000 |
| 3 | 1.000 | -0.231 | 1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 |
| 4 | 1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 5 | -1.000 | -0.231 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 6 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 |
| 7 | 1.000 | -0.231 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | 1.000 | -1.000 |
| 8 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 |
| 9 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | -1.000 | -1.000 |
| 10 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 11 | -1.000 | -1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 |
| 12 | 1.000 | -0.231 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | 1.000 |

جدول 3- متغیرهای تجربی در میزانهای مختلف برای تولید فیتاز با استفاده از طراحی کامپوزیت مرکزی

Table.3 Experimental variables at different levels for phytase production using Central Composite design

| Variables | Units | Symbol | Coded values | | | | |
|---------------------|-------|--------|--------------|-----|------|----|---------|
| | | | -1.682 | -1 | 0 | +1 | +1.682 |
| Glucose | g/l | A | 6.59104 | 10 | 15 | 15 | 23.409 |
| Beef extract | g/l | B | -0.727171 | 2 | 6 | 10 | 12.7272 |
| Potassium phosphate | g/l | C | -1.03403 | 0.5 | 2.75 | 5 | 6.53403 |

جدول 4- ماتریس طراحی کامپوزیت مرکزی برای 20 دور اجرای تولید فیتاز

Table.4 Central composite design matrix of 20 run for phytase production

| Run order | Experimental values | | |
|-----------|---------------------|--------|--------|
| | A | B | C |
| 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | 0.000 | -1.682 | 0.000 |
| 3 | -1.682 | 0.000 | 0.000 |
| 4 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 5 | 0.000 | 0.000 | 1.682 |
| 6 | -1.000 | -1.000 | -1.000 |
| 7 | -1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 8 | 0.000 | 0.000 | -1.682 |
| 9 | 1.000 | -1.000 | -1.000 |
| 10 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 11 | -1.000 | 1.000 | -1.000 |
| 12 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 13 | 1.000 | 1.000 | -1.000 |
| 14 | -1.000 | -1.000 | 1.000 |
| 15 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 16 | 0.000 | 1.682 | 0.000 |
| 17 | 1.682 | 0.000 | 0.000 |
| 18 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 19 | 1.000 | -1.000 | 1.000 |
| 20 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

جدول 5- طراحی Plackett-Burman Design برای بهینه سازی تولید فیتاز

Table.5 Plackett-Burman design for optimization of phytase production

| Run Order | Experimental values | | | | | | | | | | | Phytase activity (EU ml ⁻¹) | |
|-----------|---------------------|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|------------------------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | Y _{Experimental} | Y _{Predicted} |
| 1 | -1 | -0.231 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 35.59 | 35.69 |
| 2 | -1 | -0.231 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 22.06 | 21.98 |
| 3 | 1 | -0.231 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 32.27 | 32.29 |
| 4 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 20.59 | 20.99 |
| 5 | -1 | -0.231 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 27.36 | 28.36 |
| 6 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 26.01 | 24.95 |
| 7 | 1 | -0.231 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 29.56 | 29.35 |
| 8 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 40.11 | 39.66 |
| 9 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 25.43 | 25.38 |
| 10 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 37.07 | 36.68 |
| 11 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 38.46 | 37.25 |
| 12 | 1 | -0.231 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 35.31 | 37.25 |

A: pH; B: Temperature; C: Incubation period; D: Glucose; E: Maltose; F: Yeast extract; G: Beef extract; H: Potassium di hydrogen phosphate; I: Potassium phosphate; J&K: Dummy variables

جدول 6- تحلیل آماری شرایط کشت برای تولید فیتاز توسط طراحی Plackett-Burman Design

Table.6 Statistical analysis of culture conditions for phytase production by Plackett-Burman design

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | Coefficient | Standard error | F-value | P>F (P-value) |
|------------------------|----------------|----|-------------|-------------|----------------|---------|---------------|
| Model | 467.98 | 4 | 117.00 | 30.82 | 0.31 | 103.56 | < 0.0001 |
| D-Glucose | 34.75 | 1 | 34.75 | 1.70 | 0.31 | 30.76 | 0.0009 |
| F-Yeast extract | 2.96 | 1 | 2.96 | 0.50 | 0.31 | 2.62 | 0.1495 |
| G-Beef extract | 47.20 | 1 | 47.20 | -1.98 | 0.31 | 41.78 | 0.0003 |
| J- Potassium phosphate | 383.07 | 1 | 383.07 | 5.65 | 0.31 | 339.08 | < 0.0001 |
| Residual | 7.91 | 7 | 1.13 | | | | |
| Cor Total | 475.89 | 11 | | | | | |

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case D, G and J are significant model terms. The Model F-value of 103.56 implies the model is significant.

جدول 7- طراحی کامپوزیت مرکزی (CCD) فاکتورها در سطوح کدگذاری شده با فعالیت فیتازی به عنوان پاسخ

Table.7 Central composite design (CCD) of factors in coded levels with Phytase activity as response

| Run no. | Glucose (A) $g l^{-1}$ | Beef extract (B) $g l^{-1}$ | Potassium phosphate (C) g/l | Phytase activity (EU ml^{-1}) | |
|---------|------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------|
| | | | | $Y_{Experimental}$ | $Y_{Predicted}$ |
| 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 34.09 | 35.47 |
| 2 | 0.000 | -1.682 | 0.000 | 36.85 | 35.93 |
| 3 | -1.682 | 0.000 | 0.000 | 21.67 | 21.40 |
| 4 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 36.94 | 35.47 |
| 5 | 0.000 | 0.000 | 1.682 | 29.93 | 29.50 |
| 6 | -1.000 | -1.000 | -1.000 | 33.68 | 34.28 |
| 7 | -1.000 | 1.000 | 1.000 | 24.67 | 24.85 |
| 8 | 0.000 | 0.000 | -1.682 | 35.89 | 35.92 |
| 9 | 1.000 | -1.000 | -1.000 | 42.68 | 42.78 |
| 10 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 35.98 | 35.47 |
| 11 | -1.000 | 1.000 | -1.000 | 28.71 | 28.26 |
| 12 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 35.78 | 35.47 |
| 13 | 1.000 | 1.000 | -1.000 | 40.03 | 39.96 |
| 14 | -1.000 | -1.000 | 1.000 | 19.89 | 20.24 |
| 15 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 34.85 | 35.47 |
| 16 | 0.000 | 1.682 | 0.000 | 36.91 | 37.43 |
| 17 | 1.682 | 0.000 | 0.000 | 46.76 | 46.63 |
| 18 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 46.67 | 46.35 |
| 19 | 1.000 | -1.000 | 1.000 | 37.81 | 38.54 |
| 20 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 35.13 | 35.47 |

جدول 8- آنالیز واریانس ANOVA برای مدل درجه دوم سطح پاسخ برای تولید فیتاز

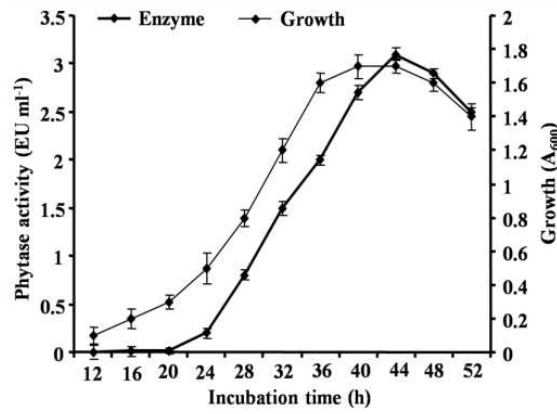
Table.8 Analysis of Variance (ANOVA) for response surface quadratic model for the Production of phytase

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F | |
|-----------------------|----------------|----|-------------|---------|------------------|-----------------|
| Model | 951.46 | 9 | 105.72 | 137.39 | < 0.0001 | Significant |
| A-Glucose | 768.34 | 1 | 768.34 | 998.55 | < 0.0001 | |
| B-Beef extract | 2.74 | 1 | 2.74 | 3.57 | 0.0883 | |
| C-Potassium phosphate | 49.82 | 1 | 49.82 | 64.74 | < 0.0001 | |
| AB | 5.12 | 1 | 5.12 | 6.65 | 0.0274 | |
| AC | 48.02 | 1 | 48.02 | 62.41 | < 0.0001 | |
| BC | 56.50 | 1 | 56.50 | 73.43 | < 0.0001 | |
| A ² | 3.83 | 1 | 3.83 | 4.97 | 0.0499 | |
| B ² | 2.63 | 1 | 2.63 | 3.42 | 0.0943 | |
| C ² | 13.74 | 1 | 13.74 | 17.86 | 0.0018 | |
| Residual | 7.69 | 10 | 0.77 | | | |
| Lack of Fit | 2.77 | 5 | 0.55 | 0.56 | 0.7278 | not significant |
| Pure Error | 4.92 | 5 | 0.98 | | | |
| Cor Total | 959.16 | 19 | | | | |

df: degree of freedom; R²: 0.9920; Adj R²: 0.9848; Adeq precision: 42.544; C.V. %: 2.52; AB, AC and BC represents the interaction effects of variables A, B and C; A², B² and C² are the squared effects of the variables.

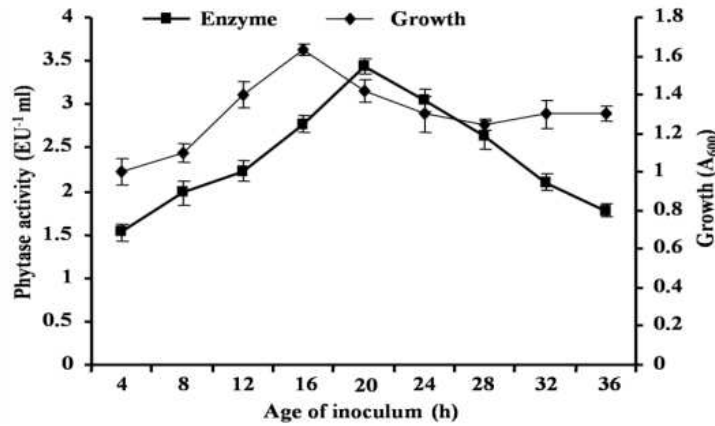
شکل 1- اثر زمان انکوباسیون روی تولید فیتاز

Fig.1 Effect of incubation time on phytase production



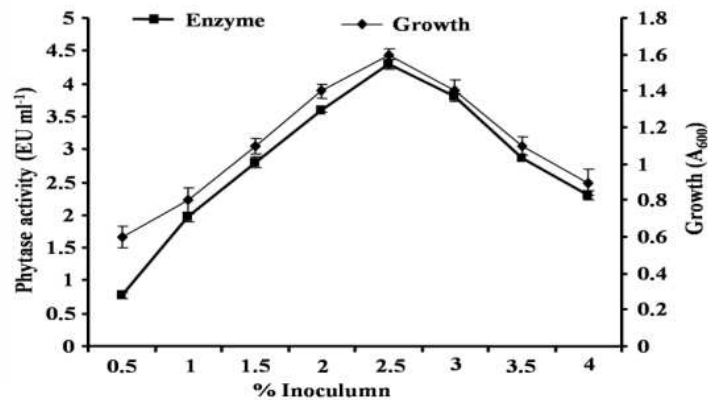
شکل 2- اثر سن تلقیح روی تولید فیتاز

Fig.2 Effect of inoculum age on phytase production

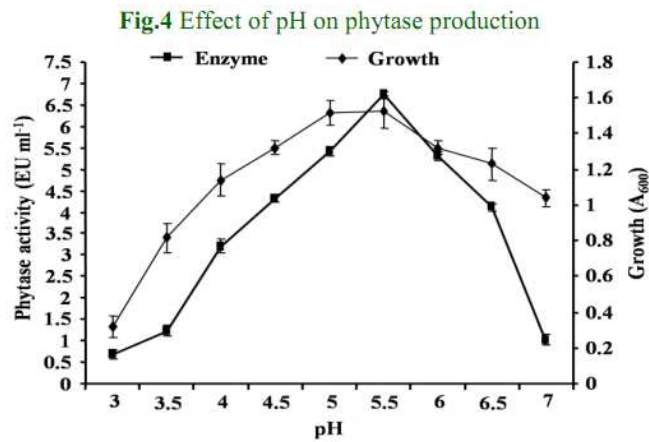


شکل 3- اثر غلظت تلقیح روی تولید فیتاز

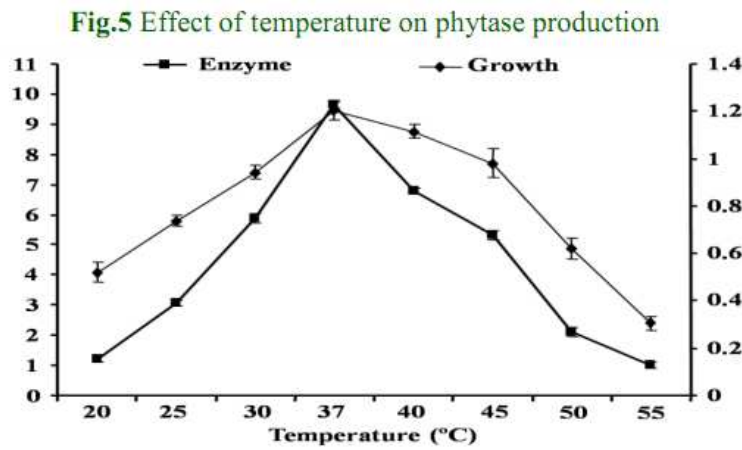
Fig.3 Effect of inoculum concentration on phytase production



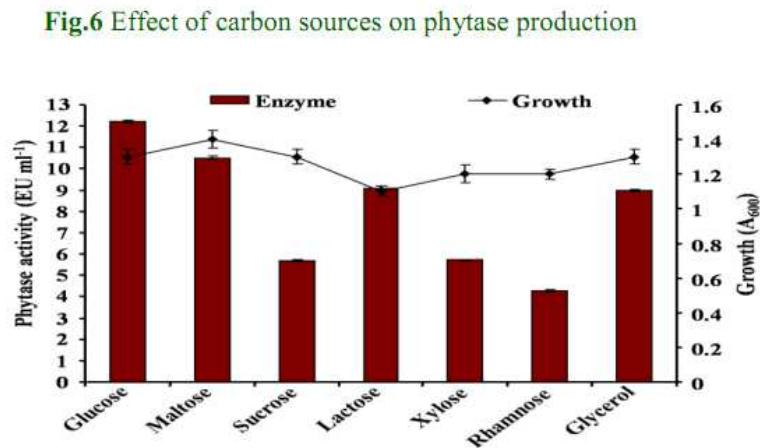
شکل 4- اثر pH روی تولید فیتاز



شکل 5- اثر درجه حرارت روی تولید فیتاز

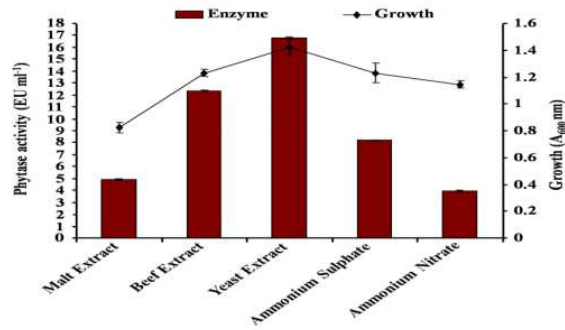


شکل 6- اثر منبع کربن روی تولید فیتاز



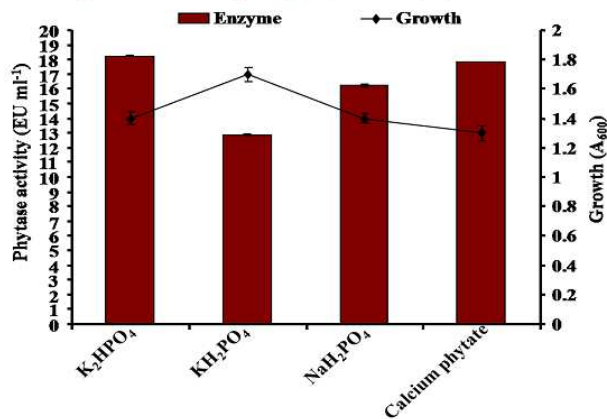
شکل 7- اثر منابع نیتروژن روی تولید فیتاز

Fig.7 Effect of nitrogen sources on phytase production



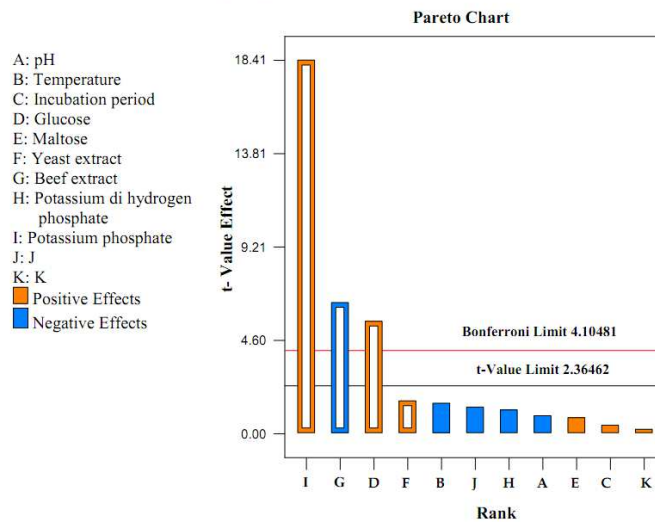
شکل 8- اثر فسفات غیرآلی روی تولید فیتاز

Fig.8 Effect of inorganic phosphates on phytase production



شکل 9- نمودار پارتو که نشان دهنده عوامل معنی دار اثرگذار بر تولید فیتاز از سوش *B. subtilis* P6

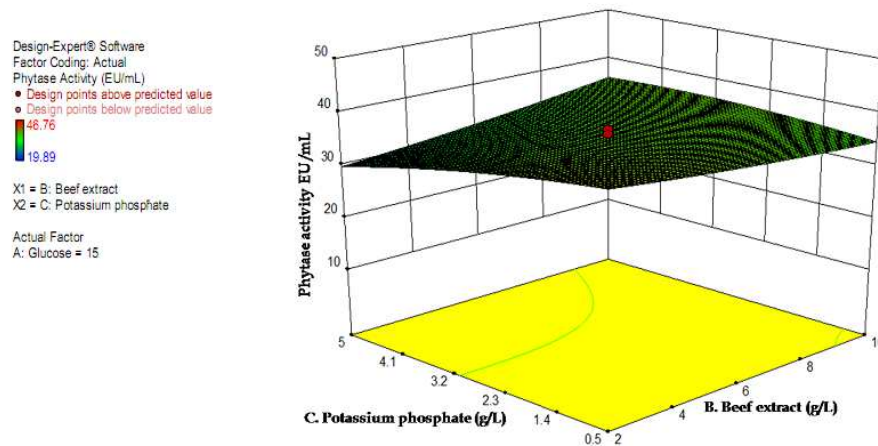
Fig.9 Pareto chart representing the significant factors that influenced Phytase production from *B. subtilis* P6



شکل 10-منحنی سطح پاسخ نشان دهنده اثر عصاره گاو و فسفات پتاسیم روی تولید فیتاز از سوش B.

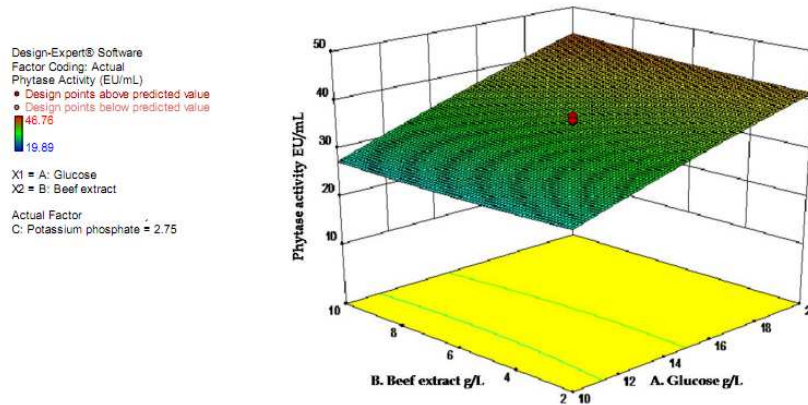
subtilis P6

Fig.10 Response Surface Curve showing the effect of beef extract and potassium phosphate on Phytase production from *B. subtilis* P6



شکل 11-منحنی سطح پاسخ نشان دهنده اثر عصاره گاو و گلوکز روی تولید فیتاز از سوش B. subtilis P6

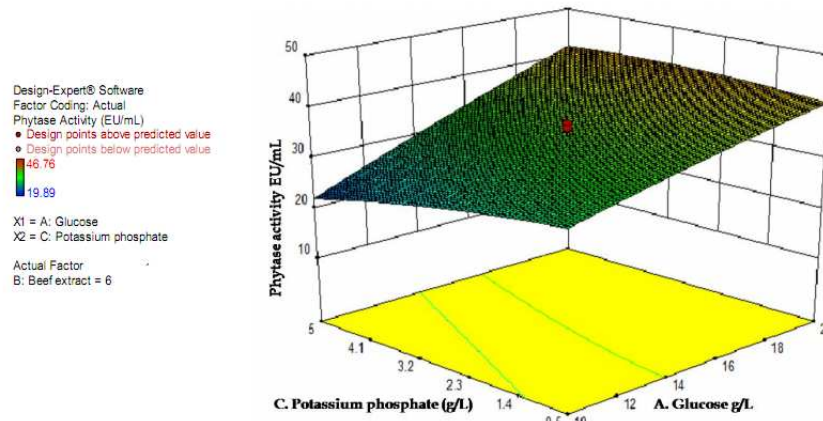
Fig.11 Response Surface Curve showing the effect of beef extract and glucose on Phytase production from *B. subtilis* P6



شکل 12-منحنی سطح پاسخ نشان دهنده اثر فسفات پتاسیم و گلوکز روی تولید فیتاز از سوش B. subtilis

P6

Fig.12 Response Surface Curve showing the effect of potassium phosphate and glucose on Phytase production from *B. subtilis* P6



بهینه سازی توسط روش سطح پاسخ

مشخص گردید که آزمایش طراحی کامپوزیت مرکزی خیلی کارآمد است که نشان دهنده غلظت های بهینه عوامل منفرد در میان عوامل گوناگون می باشد. میانگین پاسخ های پیشگویی شده و مشاهده شده در جدول 7 آمده است. ضرایب همبستگی رگرسیون محاسبه شدند (جدول 8) و داده های تجربی به یک معادله چندجمله ای درجه دوم برازش گردیدند. تعامل معنی داری میان گلوکز و عصاره گوشت گاو و نیز فسفات پتاسیم و گلوکز (شکل 10 الی 12) پیدا شد که نشان دهنده اهمیت آن در تولید فیتاز است. منحنی سطح حاکی از آنست که افزایش در عصاره گاو و فسفات پتاسیم بیش از مقدار مرکزی منجر به افزایش ثابت در تولید انزیم می شود. ولیکن تولید فیتاز همواره با افزایش در غلظت گلوکز افزایش یافت. برای سوش *B. subtilis* P6، مشخص گردید که گلوکز و عصاره گاو نسبت به فسفات پتاسیم موثرتر می باشند. نتایج بدست آمده از آزمایشات طراحی کامپوزیت مرکزی به معادله چندجمله ای درجه دوم برازش یافت که توضیح دهنده وابستگی تولید فیتاز توسط *B. subtilis* P6 روی اجزای محیط کشت می باشد:

$$Y_{B. subtilis P6 \text{ phytase}} = + 35.47 + 7.50 * A + 0.45 * B - 1.91 * C + 0.80 * AB + 2.45 * AC + 2.66 * BC - 0.52 * A^2 + 0.43 * B^2 - 0.98 * C^2$$

این مدل یک افزایش 17 برابری را در تولید انزیم روی محیط کشت غیربهینه سازی شده با ماکزیمم تولید فیتاز به اندازه 46.76 U ml^{-1} بعد از 44 ساعت انکوباسیون پیشگویی کرده است. یک یافته جالب مشاهده شده در مطالعه حاضر تولید فیتاز در یک غلظت بالای کلی فسفر بوده است. این امر می تواند به دلیل این حقیقت باشد که حضور K_2HPO_4 به عنوان یک بافر برای pH محیط کشت عمل می کند.

روایی این مدل

تایید روایی مدل، سه سنجش تحت شرایط پیشگویی شده توسط نرم افزار RSM به عنوان گلوکز (23.4 g/l)، عصاره گاو (6 g/l) و فسفات پتاسیم (2.5 g/l) انجام گردید. مقدار فیتاز تخمین زده شده برابر با 46.63 g/l بوده است و مقدار فیتاز آزمایشی برابر با 46.76 g/l می باشد که نشان دهنده کارایی مدل برای پیشگویی تولید فیتاز می باشد.

ما بهینه سازی تولید فیتاز را از سوش پروبیوتیک *B. subtilis* P6 گزارش کرده ایم. سوش *B. subtilis* P6 با فعالیت فیتازی می تواند جایگزین افزودن فیتاز تجاری شود و عملکرد پروبیوتیکی آن می تواند مجموعه میکروبی روده را تنظیم کند و می تواند جایگزین کاربرد آنتی بیوتیکی شود. در نتیجه، قابلیت هضم نوترینتی، ایمنی و تولید حیوانی را می توان به شیوه مقرون به صرفه ای افزایش داد. چون، بهینه سازی پارامترهای فرایند منجر به یک افزایش قابل ملاحظه ای در تولید فیتاز شده است. بهینه سازی سطح پاسخ با استفاده از CCD یک افزایش 17 برابری را در تولید فیتاز در مقایسه با محیط کشت غیربهینه سازی شده بدست می دهد. از اینرو، *B. subtilis* P6 می تواند به عنوان مکمل ایده آلی در غذا و علوفه دامی بکار گرفته شود. ولیکن، برای استفاده از نقش احتمالی آن از لحاظ تغذیه و موارد فیزیولوژیک، تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.

References

- Dash, S.S., Gummadi, S.N. 2007. Enhanced biodegradation of caffeine by *Pseudomonas* sp. using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 36: 288-293.
- Demirkan, E., Baygin, E., Usta, A. 2014. Screening of phytate hydrolysis *Bacillus* sp. isolated from soil and optimization of the certain nutritional and physical parameters on the production of phytase. *Turk. J. Biochem.* 39(2): 206-214.
- Esakkiraj, P., Immanuel, G., Sowmya, S.M., Iyapparaj, P. and Palavesam A. 2009. Evaluation of protease producing ability of fish gut isolate *Bacillus cereus* for aqua feed. *J. Food Biopro. Technol.* 2: 383-390.
- Haros, M., Carlsson, N.G., Almgren, A., Larsson-Alminger, M., Sandberg, A.S., Andlid T. 2009. Phytate degradation by human gut isolated *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and its probiotic potential. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 7-14.
- Hosseinkhani, B., Emtiazi, G., Nahvi, I. 2009. Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas* sp.) from poultry feces and optimization of this enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.* 8(17): 4229-4232.
- Idriss, E.E., Makarewicz, M., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T. and Borriss, R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiol.* 148: 2097-2109.
- Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Maschener, P., Greiner, R., Fernandez, M.T., Romero, D., Menezes-Blackburn, D., de la Mora, M. 2011. Identification of beta - propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* Spp., from rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75: 163-172.
- Kammoun, R., Farhat, A., Chouayekh, H., Bouchaala, K., Bejar, S. 2012. Phytase production by *Bacillus subtilis* US417 in submerged and solid state fermentations. *Annals. Microbiol.* 62: 155-164.
- Lan, G.Q., Abdullah, N., Jalaludin, S., Ho, Y.W. 2002. Culture conditions influencing phytase production of *Mitsuokella jalaludinii*, a new bacterial species from the rumen of cattle. *J. Appl. Microbiol.* 93: 668-674.
- Lee, J., Park, I., Choi, Y. and Cho, J. 2012. *Bacillus* strains as feed additives: *in vitro* evaluation of its potential probiotic properties. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 25: 577-585.
- Mittal, A., Singh, G., Goyal, V., Yadav, A., Aggarwal, N.K. 2012. Production of phytase by acido-thermophilic strain of *Klebsiella* sp. using orange peel flour under submerged fermentation. *Inno. Romanian Food Biotechnol.* 10: 18-27.
- Rani, R., Arora, S., Kumar, S., Ghosh, S. 2013. Optimization of medium components for the production of phytase by *R. oryzae* using statistical approaches. *J. Bioremed. Biodeg.* S: 18: 1-6.
- Reid, G., Friendship, R. 2002. Alternatives to antibiotic use; probiotics for the gut. *Anim. Biotechnol.* 13: 97-112.
- Roopesh, K., Ramachandran, S., Nampoothiri, K.M., Szakacs, G., Pandey, A. 2006. Comparison of phytase production on wheat bran and oil cakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Biores. Technol.* 97: 506-511.
- Sabu, A., Sarita, S., Pandey, A., Bogar, B., Szakacs, G., Soccol, C.R. 2002. Solid-State fermentation for production of phytase by *Rhizopus oligosporus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102-103.
- Sasirekha, B., Bedashree, T., Champa, K.L. 2012. Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6. *European J. Exp. Biol.* 2(1): 95-104.
- Shamna, K.S., Rajamanikandan, K.C.P., Mukesh Kumar, D.J., Balakumaran, M.D., Kalaihelvan, P.T. 2012. Extracellular production of phytase by a native *Bacillus subtilis* strain. *Ann. Biol. Res.* 3(2): 979-987.
- Sharma, A. Trivedi, S. 2015. Evaluation of *in vitro* probiotic potential of phytase producing bacterial strain as a new probiotic candidate. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50(2): 507-514.
- Sharma, P., Tomar, S.K., Goswami, P., Sangwan, V., Singh, R. 2014. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Res Int.* 57: 176-195.
- Singh, N.K., Joshi, D.K., Gupta, R.K. 2013. Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase producing parameters. *J. Microbiol.* 6(5): 1-6.
- Vohra, A., Satyanarayana, T. 2003. Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 23: 29-60.
- Wang, X., Upatham, S., Panbangred, W.A., Isaramkul, D., Sumpunn, P., Wiyakrutta, S., Vootisom, V.M. 2004. Purification, characterization, gene cloning and sequence analysis of a phytase from *Klebsiella pneumoniae*, sub spp. *Pneumoniae* XY5. *Sci. Asia* 30: 383-390.
- Wilson, K., Walker, J. 2000. Practical Biochemistry, Principles and techniques, 5th edition. Cambridge University Press, UK.

arjomeera.com

برای خرید فرمت ورد این ترجمه، بدون واتر مارک، اینجا کلیک نمایید.

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

لیست مقالات ترجمه شده ✓

لیست مقالات ترجمه شده رایگان ✓

لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI ✓

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی