

دارای رتبه علمی - پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

بیان ژن فیتاز گونه های باسیلوس جدا شده از خاک به روش ملکولی

چکیده

زمینه و هدف: شناسایی و به کارگیری فیتاز جدا شده از میکروارگانیسم های موجود در خاک، اهمیت زیادی در تولید این آنزیم به منظور استفاده تجاری در صنایع مختلف دارد. این مطالعه به منظور شناسایی گونه های باسیلوس تولید کننده آنزیم فیتاز و جداسازی ژن تولید کننده این آنزیم صورت گرفت.

روش بررسی: نمونه برداری از خاک های مختلف مناطق کوهستانی شهرستان تنکابن انجام شد. جداسازی اولیه باسیلوس در محیط غنی *Bacillus Medium Agar* صورت پذیرفت. بعد از جداسازی باکتری ها و استخراج ژنوم باکتری، با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن تولید کننده آنزیم شناسایی شده و نسخه های زیادی از این ژن با روش PCR تکثیر شد. با استفاده از بررسی های تکمیلی از جمله SDS-PAGE و سنجش فعالیت آنزیمی اندازه این پروتئین و شرایط بهینه تولید آن ارزیابی گردید.

یافته ها: از ۴۰ نمونه خاکی که مورد آزمایش قرار گرفتند یک باکتری ترشح کننده آنزیم فیتاز جداسازی شد و این باکتری مورد توالی یابی قرار گرفت و گونه باسیلوس سوبتلیس سویه اس تی آر تشخیص داده شد. اندازه پروتئین فیتاز تولید شده از این ژن در حدود ۴۵ کیلو دالتون بوده و فعالیت آنزیم در دمای ۵۵ درجه در حدود ۱/ در طول موج ۴۱۵ نانومتر به دست آمد. ژن فیتاز با اندازه حدود ۱۲۰۰bp تکثیر صورت گرفت.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه میکروارگانیسم های تولید کننده آنزیم فیتاز در شرایط محیطی طبیعی آنزیم را در مقادیر محدود و با کارایی و کیفیتی در سطوح میکروارگانیسم تولید می کنند، بنابراین شناسایی و جداسازی باسیل های تولید کننده فیتاز و تخلیص این پروتئین از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد.

واژه های کلیدی: باسیلوس سوبتلیس، فیتاز، SDS-PAGE، فعالیت آنزیمی، واکنش زنجیره ای پلیمرازی

علی ناظمی

استادیار ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، ایران

نرگس واثقی

کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، ایران

محمدرضا خاتمی نژاد

دکتری تخصصی میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، ایران

آیت نصرالهی عمران

دانشیار گروه میکروب، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، ایران

محمد اسکندری

کارشناس ارشد رشته سلولی ملکولی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

نویسنده مسئول: نرگس واثقی

پست الکترونیک: NVasegi@yahoo.com

تلفن: ۰۹۳۹۰۳۲۶۱۴۴

آدرس: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، ایران

دریافت: ۹۱/۴/۲۸

ویرایش پایانی: ۹۲/۶/۸

پذیرش: ۹۲/۶/۱۳

آدرس مقاله:

ناظمی ع، واثقی ن، خاتمی نژاد م، نصرالهی عمران آ، اسکندری ع " بیان ژن فیتاز گونه های باسیلوس جدا شده از خاک به روش ملکولی " مجله علوم آزمایشگاهی، ویژه نامه باکتری شناسی زمستان ۱۳۹۲ دوره هفتم (شماره ۵): ۲۳-۲۸

مقدمه

آسپرژیلوس دیده می شود. آسپرژیلوس نایجر فعالترین تولید کننده فیتاز قارچی است. قطعه اصلی ژن فیتاز شامل یک *ORF* است از ۳۳۰ اسید آمینه که با توالی های پپتیدی شخصی از N-ترمینال و توالی پپتیدی درونی مرتبط اند (۷،۴). وزن ملکولی پروتئین فیتاز ۴۱/۹ کیلو دالتون می باشد. هیچ یک از فیتازهای باسیلی دارای ساختار *RHGXRXP* نبوده که در واقع توالی است که در ناحیه فعال فیتازها به طور قابل توجهی حفظ و ذخیره شده است (۴۵). یکی از منابع خوب تولید فیتاز، باکتری *Bacillus subtilis* می باشد که از مزایای استفاده از آن این است که باکتری یک باکتری گرم مثبت فاقد غشای سلولی خارجی بوده بنابراین می تواند پروتئین های همسان را به خصوص در طی فاز رشد لگاریتمی مستقیماً در محیط کشت وارد نماید. گونه های باسیلی با تراکم سلولی بالا در منابع نیتروژن و کربن سریعاً رشد می کنند. بیشتر باسیل ها بیماری زا نبوده و قابلیت تخمیر سازی نیز در آنها به طور قابل توجهی دیده شده است. وزن ملکولی فیتاز با بیان زیاد در *B. subtilis* حدود ۴۵ کیلو دالتون می باشد (۷،۶). هدف از انجام این طرح جداسازی این ژن از باکتری *Bacillus subtilis* و تعیین توالی این ژن و بررسی فعالیت آنزیمی و تعیین وزن این ملکولی آن بود.

روش بررسی

از مناطق کوهستانی شهرستان تنکابن ۴۰ نمونه تهیه گردید. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه مقداری از خاک را در لوله های حاوی محلول نمکی (۰/۹٪) برای حفظ شرایط اسمزی اضافه کرده سپس خوب مخلوط شده و در بن ماری ۹۵°C گرمخانه گذاری شد. در مرحله بعدی لوله ها به منظور جدا سازی مایع فوقانی حاوی باکتری ها سانتریفیوژ گردید. سپس رقت های مختلف تا رقت ۱۰^{-۸} جهت استفاده در مرحله کشت به وسیله محلول نمکی آماده گردید. مقداری از سوسپانسیون های میکروبی را در محیط *Luria Bertany Agar* به صورت سفره ای کشت داده شد و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری

بیش از ۹۰ درصد اراضی زراعی دنیا به کشت انواع حبوبات، غلات و دانه های روغنی اختصاص یافته است. این محصولات منبع مهمی از مواد غذایی مورد نیاز برای حیوانات به شمار می روند. یکی از عناصر و ترکیبات مهم سازنده این نوع محصولات اسیدفیتیک می باشد. این ماده نوعی از ترکیب ذخیره ای فسفات بوده که بیش از ۸۰ درصد کل فسفر موجود در غلات و حبوبات را تشکیل می دهد. اسید فیتیک در ترکیب ذخیره شده ای از میو-اینوزیتول نیز می باشد که نوعی عامل مهم رشد به شمار می رود (۱). در شرایط فیزیولوژیکی اسیدفیتیک مواد معدنی ضروری همچون کلسیم، منیزیم، آهن و روی را حذف می کند. بنابراین، اسیدفیتیک ترکیب و عنصری ضد تغذیه ای (که ارزش مواد غذایی را خنثی می سازد) در مواد غذایی گیاهی است. نشخوارکنندگان اسیدفیتیک را از طریق فعال شدن فیتازها جذب و هضم می کنند که این عمل توسط فیتازهای موجود در باکتری های روده این جانوران انجام می شود. حیواناتی که دارای یک معده هستند، همچون خوک، طیور و ماهی به شکل ضعیفی از فسفر فیتات استفاده می کنند زیرا فاقد فیتازهای موجود در دستگاه معده- روده ای خود هستند. تشکیل کمپلکس های معدنی با فیتات، نامحلول بوده و در دستگاه روده ای مانع جذب مواد معدنی می شود. اسیدفیتیک علاوه بر ترکیب شدن با مواد معدنی و پروتئین ها، با آنزیم هایی همچون تریپسین، پپسین، آلفا-آمیلازوبتا- گالاکتوزیداز در ارتباط بوده که در نتیجه کارکرد این آنزیم های گوارشی را کاهش می دهد. انجمن نامگذاری آنزیمی واحد بین المللی بیوشیمی، دو نوع فیتاز را معرفی کرده است: فیتاز-۳ (۳، ۱، ۳۸، EC) و فیتاز-۶ (۳، ۱، ۳، ۲۶، EC). فیتاز-۳ ویژه میکرو ارگانسیم ها و فیتاز-۶ نیز ویژه گیاهان است (۳). حداکثر عملکرد آنزیم در $pH 7/5-7/0$ در دمای مطلوب ۵۰°C مشاهده گردید. آنزیم از طریق افزودن یک میلی مولار Al^{+3} ، Cu^{+2} ، Ba^{+2} ، Zn^{+2} و *EDTA* متوقف و غیرفعال می شود. عملکرد فیتاز میکروبی اغلب در قارچ و به خصوص در گونه های

سلامت (NIH) انجام شد. (۱۰،۹). برای شناسایی پروتئین فیتاز ابتدا باکتری را در محیط *P.S.M. Broth* کشت داده و سپس سانتریفیوژ گردید. فاز رویی که حاوی پروتئین ترشحی بود را به آرامی جدا کرده و به ارلن استریل منتقل کرده و ارلن را روی همزن مغناطیسی قرار داده شد محلول رسوب دهی (محلول استون اشباع) را به آرامی و به صورت قطره قطره تا میزان ۸۰ درصد محتویات ارلن اضافه کرده و آن را در یخچال قرار داده تا ۲ فاز تشکیل شود سپس آن را مخلوط کرده در سانتریفیوژ یخچال دار قرار داده تا پروتئین فیتاز رسوب کند. سوپ روئی را دور ریخته سپس به رسوب محلول *Tris HCL* ۲۰ میلی مولار با pH 8 را اضافه کرده به خوبی مخلوط کردیم (۱۱). برای رنگ آمیزی پروتئین از کیت رنگ آمیزی فرمنتاز (Cat.No.R0891) استفاده گردید. برای ارزیابی اندازه قطعات پروتئین بر روی ژل از protein ladder شرکت فرمنتاز (Cat.No.S0431) استفاده شد. برای الکتروفورز این منظور از روش SDS-PAGE استفاده شد. غلظت ژل قسمت جداکننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده ۴ درصد بود. الکتروفورز پروتئین مورد نظر روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE طی مدت ۶ ساعت در ولتاژ ۱۲۰ و میلی آمپر ۳۰ انجام گرفت. رنگ آمیزی ژل با استفاده از کماسی بلو انجام گردید. برای بررسی فعالیت آنزیمی منبع آنزیمی و سوبسترا را در بن ماری ۵۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. از محلول فوقانی یک میلی لیتر را با ۲ میلی لیتر سوبسترا را مخلوط کرده و در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶۵ دقیقه قرار داده شد. سپس ۱ ml از مخلوط را با ۵ ml محلول رنگ زدا خوب مخلوط کرده و پس از سانتریفیوژ میزان جذب فاز رویی را در طول موج ۴۱۵ nm خوانده شد. محلول بافر فعالیت آنزیمی: ۳۰/۰۲ گرم $Na_2CO_3 \cdot 3H_2O$ و ۰/۱۴۷ گرم $CaCl_2 \cdot H_2O$ که در ۹۰۰ میلی لیتر آب حل و با اسید استیک ۰/۱۰۰٪ pH را به ۵/۵ رسانده و حجم را با آب به ۱ لیتر رسید. محلول سوبسترا فعالیت آنزیمی: ۸/۴۰ گرم از سدیم فیتات را در ۹۰۰ میلی لیتر محلول بافر حل کرده و با اسید استیک

گردید. سپس از کلونی ها گسترشی تهیه شده و پس از رنگ آمیزی گرم و شناسایی باسیل های گرم مثبت، باکتری ها را روی محیط *Bacillus Medium Agar* به صورت ۵ قسمتی کشت داده تا کلنی های تک ایجاد شود. برای غنی سازی باکتری ها کلنی های تک را در محیط *Bacillus Medium broth* کشت داده شد. برای بررسی وجود ژن فیتاز از محیط اختصاصی PSM (*phytase screening medium*) استفاده گردید. کلنی ها را در مرکز پلیت کشت و در $37^\circ C$ به مدت ۴۸-۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شد. در صورتی که باکتری بتواند اسید فیتیک موجود در محیط را تجزیه کند هاله ای که بیانگر تولید فیتاز می باشد ایجاد می گردد. باکتری هایی که تولید فیتاز آن ها مثبت شده را مجدد در *Bacillus medium. Broth* به منظور استخراج DNA کشت داده شد (۴). استخراج DNA با استفاده از دو روش فنل-کلروفرم و کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن ایران DN8115C: cat.No) انجام شد. به منظور تکثیر ژن فیتاز، برای توالی حفاظت شده این ژن پرایمر جدیدی طراحی شد (۸). برای صحت وجود ژن فیتاز پرایمری طراحی شد که ناحیه ۱۲۰۰ نوکلئوتیدی را در بر گرفته و شامل نواحی پروموتوری، بالادست، پائین دست این ژن باشد (۴). تکثیر ژن مورد نظر در شرایط بهینه انجام گرفت (۹،۸). برای بررسی و شناسایی باکتری از روش ملکولی *16srDNA* استفاده شد. برای این کار از پرایمر اختصاصی که بر اساس ناحیه ای از *16srRNA* طراحی شده استفاده شد. پس از تکثیر هر دو قطعه ژن فیتاز و *16srDNA* آنالیز کیفی و کمی انجام شد. آنالیز کیفی به کمک ژل آگارز و سیستم الکتروفورزی انجام شد و بقیه محصول واکنش پلیمرازی *16srDNA* به همراه محصول تکثیر ژن فیتاز جهت تعیین توالی به شرکت *macro gene* (کره جنوبی) ارسال شد. ارزیابی کیفیت داده های توالی DNA با استفاده از برنامه Chromas و سپس با استفاده از برنامه آنالیز BLAST در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) واقع در کتابخانه ملی پزشکی در موسسه ملی

۳۵-۴۰ درجه سانتی گراد با هاله شفافی به قطر حدود ۱۰ میلی‌متر بود پس از ۴۸ ساعت بود، در دیگر دماها قطر هاله‌ها از ۲-۴ میلی‌متر تجاوز نکرد. بیشترین قطر هاله در

محدوده PH ۵-۷/۵ مشاهده شد که هاله شفافی به قطری حدود ۵-۱۰ میلی‌متر پس از گذشت ۴۸ ساعت دوره انکوباسیون مشاهده شد. در PH پایین تر از ۵ هیچ گونه فعالیت مشاهده نشد و در PH بالاتر رشد چشم‌گیری صورت نگرفت.

بحث

در این پژوهش از تعداد ۴۰ نمونه خاک که از مناطق مختلف غرب استان مازندران جمع‌آوری شده بودند تنها یک مورد از گونه‌های باسیلوس‌های جدا شده ژن فیتاز را دارا بوده که به میزان زیادی با سایر تحقیقات همخوانی دارد. اگرچه مقبولیت هر نوع فیتاز جدیدی که وارد بازار می‌شود به عوامل‌های متعددی بستگی دارد، حداقل سه خصوصیت مهم بیولوژیکی برای یک فیتاز ایده‌آل ضروری به نظر می‌رسد اول اثربخشی بر روی آزادسازی فیتات-P در لوله گوارشی، دوم مقاومت در برابر گرمادیدن طی فرآیندهای آماده‌سازی و نگه‌داری، سوم هزینه کم برای تولید. توانایی هر فیتاز معین برای هیدرولیز فیتات-P در لوله گوارشی توسط خواص آنزیمی آن تعیین می‌شود. به علت اینکه مکان مناسب برای فعالیت فیتاز مکمل غذایی معده می‌باشد، فیتازی مناسب است که در محیط اسیدی بیشترین فعالیت را داشته باشد و همچنین به پپسین بسیار مقاوم باشد (۱۴). اما نکته مهم این است که یک فیتاز خاص ممکن است برای تمام گونه‌ها و موقعیت‌ها مناسب نباشد. Shieh و همکاران در سال ۱۹۶۸ اثبات کردند تولید فیتاز خارج سلولی قارچ در شرایط محدودیت فسفات غیر آلی در محیط رشد القا خواهد شد و در مقابل آن فیتاز باسیلوس سوبتیلیس توسط اسید فیتیک در محیط کشت القا می‌شود. در این مطالعه نیز فیتاز باسیلوس سوبتیلیس توسط اسید فیتیک در محیط کشت القا شد. Saghai Maroof و

۱۰۰ درصد pH را به ۵/۵ رسانده و حجم را با محلول بافر به ۱ لیتر رسانده شد. محلول اسید نیتریک فعالیت آنزیمی: ۷۰ میلی‌لیتر از اسید نیتریک به تدریج به ۱۳۰ میلی‌لیتر آب اضافه شد. محلول آمونیوم هپتا مولیبدات: ۱۰۰ گرم هپتامولیبدات را در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب حل کرده و ۱۰ میلی‌لیتر آمونیوم ۲۵ درصد اضافه و حجم را با آب به ۱ لیتر می‌رسانیم. محلول آمونیوم وندات: ۲/۳۵ گرم آمونیوم وندات در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب و در دمای ۶۵ درجه حل کرده و به تدریج ۲۰ میلی‌لیتر محلول اسید نیتریک افزوده و پس از سرد شدن با آب به حجم ۱ لیتر می‌رسانیم. محلول متوقف کننده: ۲۵۰ میلی‌لیتر از محلول هپتامولیبدات را با ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول آمونیوم وندات اضافه و به تدریج به آن ۱۶۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۶۵ درصد اضافه و با آب مقطر به حجم ۱ لیتر می‌رسانیم.

برای بررسی اثرات دما بر فعالیت آنزیم شرایط دمایی در ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ سانتیگراد به عنوان دماهای آزمایش انتخاب شدند که بر اساس قطر هاله در محیط اختصاصی بررسی شد. برای هر دما آزمایش سه بار تکرار شد (۱۱). ثبات و پایداری فیتاز در مقادیر مختلف pH بین ۲-۸ مورد بررسی قرار گرفت. pH توسط HCL خالص و NaOH خالص تنظیم شد. نتایج بر اساس قطر هاله در محیط اختصاصی بررسی شد. هر pH سه بار تکرار شد. (۱۳).

یافته‌ها

نتایج حاصل از ارزیابی کیفی با حضور باندها ۱۲۰۰ bp صحت واکنش را تأیید کرد. نتیجه ردیف‌سازی محصول تکثیر 16 srDNA با استفاده از نرم‌افزار BLAST، نشان داد که باکتری مورد نظر ۹۹ درصد گونه باسیلوس سوبتیلیس سویه str می‌باشد. نتایج به دست آمده از بررسی توالی‌ها، صحت وجود ژن فیتاز را تأیید کرد. از باکتری که در محیط کشت آن اسید فیتیک اضافه نشده بود و در نتیجه سوبسترائی برای تولید آنزیم فیتاز وجود نداشت به عنوان شاهد منفی استفاده شد. بیشترین قطر هاله در دمای

اسیدهای دانست که در نتیجه متابولیسم باکتری تولید شده و سبب حذف کلسیم رسوبی یا سدیم فیتات می شوند. Xuening Wang و همکاران در سال ۲۰۰۳ اثبات کردند که آنزیم به مدت یکسال در ۴ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری شد و عملکرد آن هر سه ماه یکبار بررسی گردید. اثبات شد که عملکرد آنزیم اصلاً از بین نرفته است. زمانی که آنزیم در دمای ۳۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. در pH ۷/۲-۵/۵ فعالیت آن ثابت بود اما در pH ۳،۲ و ۴ عملکرد آنزیم متوقف شده بود. در دمای ۲۵ درجه فعالیت آنزیم به مدت ۱۵ ساعت pH ۳ و ۵ ثابت بود اما در pH ۲ عملکرد آن تا ۲۰ درصد کاهش یافت و در pH بیش از ۶ کل عملکرد آنزیم متوقف شده یافته نشان می دهند که این آنزیم که در pH و دمای نسبتاً کم ثابت و فعال می باشد. در این مطالعه نیز آنزیم بعد از یک سال نگهداری در یخچال فعالیت خود را حفظ کرده و زمانی که در دمای ۳۷ درجه و pH ۵/۵- قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد فعالیت آنزیم مشاهده شد. ولی در pH ۳، ۲ و ۴ هیچ گونه فعالیتی مشاهده نشد و در pH ۶ و ۷/۲ و درجه حرارت ۳۷ درجه فعالیت آنزیم تقریباً ۵۰ درصد کاهش یافت (بر اساس قطر هاله مشاهده شده) ولی در pH ۶-۷/۲ و دمای بالاتر از ۳۷ درجه فعالیت آنزیم به کلی از بین رفت که با نتایج Xuening Wang مشابه بود. مطلوب ترین شرایط برای تولید آنزیم $pH = 5/5$ و دمای ۳۷ درجه است. که این مطالعه نیز آن را به وضوح تایید می کند. بیش از ۱۰ ژن فیتاز وجود دارند و تقریباً همه آنها شناخته شده و معتبر هستند توالی ژن فیتاز مورد تحقیق ما دارای ۱۲۰۰ نوکلئوتید است و دارای شباهت ۹۹ درصد با ژن فیتاز باسیلوس سویتیلیس موجود در بانک ژن NCBI بود. KIM و همکاران در سال ۲۰۰۵ برای خالص سازی آنزیم و تعیین وزن ملکولی این پروتئین توسط SDS-PAGE از سولفات آمونیاک اشباع استفاده کردند ولی در مطالعه صورت گرفته توسط ما سولفات آمونیاک موثر واقع نشد و ما از استون اشباع استفاده کردیم و نتیجه مطلوب مشاهده شد. Kerovuو همکاران در سال ۲۰۰۰ وزن ملکولی پروتئین

همکاران در سال ۲۰۰۹ از فیتات به عنوان منبع خالصی از فیتاز برای جداسازی گونه باسیلوس *DS 11* استفاده کردند. آنها فیتاز را در محیط حاوی سبوس گندم و هیدرولیزات کازئین و نمک های معدنی تولید کردند و حداکثر عملکرد فیتاز پس از ۲۴ ساعت کشت سلولی مشخص شد. در مطالعه انجام شده توسط ما نیز از فیتات به عنوان منبع خالصی از فسفات برای جداسازی باسیلوس سویتیلیس استفاده شد و فیتاز را در محیط حاوی *e, D-glucose, D- kcl, Cacl2, (NH4)2so4, Mgso4 7H2o* تولید شد و عملکرد فیتاز پس از گذشت ۴۸ ساعت مشخص شد. Wyss و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثبات کردند فیتاز مربوط به گونه باسیلوس *DS11* دارای دمای مطلوب ۷۰ درجه بوده که بیشتر از دمای مطلوب مربوط به دیگر فیتازها بوده و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد تا ۱۰۰ درصد فعال است. تثبیت پذیری آنزیمی فیتاز گونه باسیلوس *DS11* در محیط فاقد *Cacl2* و دمای بیش از ۵۰ درجه سانتیگراد به طور قابل توجهی کاهش یافته بود در صورتیکه در معرض این ماده در دمای بیش از ۹۰ درجه تقریباً ثابت خواهد بود. در مطالعه انجام شده توسط ما دمای مطلوب فیتاز گونه باسیلوس جدا شده ۵۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۶۵ دقیقه بوده که این نشان دهنده پایداری نسبتاً خوب این آنزیم نسبت به دمای بالا است. که با نتایج حاصل از تحقیق Wyss و همکاران مطابقت داشت. تثبیت پذیری آنزیم مورد مطالعه ما در معرض *Cacl2* به طور قابل توجهی کاهش یافت که با نتایج Wyss و همکاران مشابه بود. در این مطالعه نیز با روش های مشابه موفق به جداسازی و خالص سازی و سازمان بندی و کلونینگ ژن فیتاز از باسیلوس سویتیلیس زیرگونه *STR* شدیم. در مورد بسیاری از ارگانیسیم ها نواحی شفاف در اطراف کلنی های باکتری ها در محیط کشت دیده می شود. اما تعداد اندکی از آنها قادر به تولید فیتاز هستند، به این معنی که بسیاری از گونه ها که مورد آزمایش اولیه قرار می گیرند فاقد چنین قابلیت بوده و در واقع تشخیص مثبت در آنها غلط بوده این نوع تشخیص اشتباه را می توان به دلیل

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن بود. بخش عمده هزینه های مالی این طرح توسط دانشجو و قسمت کمی نیز توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن تأمین شده است. نویسندگان مراتب احترام و قدردانی خود را نسبت به کلیه همکاران و کارکنان آزمایشگاه میکروب شناسی و ملکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به دلیل همکاری در اجرای این تحقیق اعلام می دارند.

References

1. Idriss E, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H, et al. *Extracellular phytase activity of Bacillus amyloliquefaciens FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect*. Microbiology. 2002; 148(7): 2097-2109.
2. Nagashima T, Tange T, and Anazawa H. *Dephosphorylation of Phytate by Using the Aspergillus niger Phytase with a High Affinity for Phytate*. Appl and environmental microbiology. 1999; 65(10): 4682-84.
3. Kim TW, Lei XG. *An improved method for a rapid determination of phytase activity in animal feed*. J Anim Sci. 2005; 83(5):1062-1067.
4. wang X. *Phytase studies: producer screening enzyme purification and characterization and gene cloning*. Bangkok, mahidol university. 2003.
5. Kerovuo J, Rouvinen J, Hatzack F. *Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by Bacillus phytase: indication of a novel reaction mechanism*. Biochem J. 2000; 352(3): 623-628.
6. Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J. *Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning, and Sequencing of a Novel Phytase from Bacillus subtilis*. Appl, Environ, Microbial. 1998; 64(6): 2079-2085.
7. Lim BL, Yeung P, Cheng C, Hill JE. *Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria*. ISME J. 2007; 1(4): 321-30.
8. Laemmli Uk. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, SDS-page*

فیتاز را بر اساس نتایج حاصل از SDS-PAGE در حدود ۴۵ کیلو دالتون را بیان کردند که در این مطالعه نیز در این محدوده مشاهده شد.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه میکروارگانسیم های تولید کننده آنزیم فیتاز در شرایط محیطی طبیعی آنزیم را در مقادیر محدود و با کارایی و کیفیتی در سطوح میکروارگانسیم تولید می کنند، بنابراین شناسایی وجداسازی باسیل های تولید کننده فیتاز و تخلیص این پروتئین از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد.

9. Sambrook j. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. 1982-2012.
10. Wang X, Upatham S, Panbangred W, Isarangkul D, Summpunn P, Wiyakrutta S, et al. *Purification, Characterization, Gene Cloning and Sequence Analysis of a Phytase from Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae XY-5*. ScienceAsia. 2004; 30: 383-390.
11. Zou LK, Wang HN, Pan X, Xie T, Wu Q, Xie ZW, et al. *Design and Expression of a Synthetic phyC Gene Encoding the Neutral Phytase in Pichia pastoris*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2006; 38(11): 803-811.
12. Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Rémy R, Fimbel R, Oesterhelt G, et al. *Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties*. Applied and Environmental Microbiology . 1999; 65(2): 359-66.
13. Shieh TR, Ware JH. *Survey of microorganism for the production of extracellular phytase*. Applied microbiology. 1968; 16(9): 1348-51.
14. Guerrero-Olazarán M, Rodríguez-Blanco L, Carreon-Treviño JG, Gallegos-López JA, Viader-Salvadó JM. *Expression of a Bacillus Phytase C Gene in Pichia pastoris and Properties of the Recombinant Enzyme*. Applied and Environmental Microbiology. 2010; 76(16): 5601-5608.