تحقیقی

دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

بیان ژن فیتاز گونه های باسیلوس جداشده از خاک به روش ملکولی

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: ۰۹۳۹۰۳۲۶۱٤٤

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

دریافت:۹۱/٤/۲۸
ویرایش پایانی:۹۲/٦/۸
پذیرش:۹۲/٦/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: *شناسایی و به کارگیری فیتاز جداشده ازمیکروارگانیسم‌های 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 باکتری‌ها 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 ازجمله SDS-PAGE وسنجش فعالیت آنزیمی اندازه این پروتئین وشرایط 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 فیتازدرشرایط محیطی طبیعی آنزیم را در مقادیر محدود و با کارائی و کیفیتی در سطوح میکروارگانیسم تولید می کنند، بنابراین شناسایی وجداسازی 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*

آدرس مقاله:
ناظمی ع، واثقی ن، خاتمی نژاد م، نصرالهی عمران آ، اسکندری ع" بیان ژن فیتاز گونه های باسیلوس جداشده از خاک به روش ملکولی " مجله علوم آزمایشگاهی، ویژه نامه باکتری شناسی ۱۳۹۲ ، دوره هفتم(شماره۵) :۲۳-۲۸

مقدمه

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 موادغذایی 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 موادمعدنی و پروتئین ها، با آنزیم هایی همچون تریپسین، پپسین، آلفا-آمیلازو بتا- 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 (۳۸ ، ۱ ، ۳ *EC*) و فیتاز -۶ (۲۶ ، ۳ ، ۱ ، ۳ *EC*). فیتاز-۳ ویژه میکرو ارگانیسم ها و فیتاز-۶ نیز ویژه گیاهان است(۳). حداکثر عملکرد آنزیم در *pH* ۷/۰-۷/۵ در دمای مطلوب ۵۰°C مشاهده گردید. آنزیم از طریق افزودن یک میلی مولار Zn^{+2}، Ba^{+2}، Cu^{+2}، Al^{+3} و *EDTA* متوقف و غیرفعال می شود. عملکرد فیتاز میکروبی اغلب در قارچ و به خصوص در گونه های آسپرژیلوس دیده می شود. *آسپرژیلوس نایجر* فعال‌ترین تولید کننده فیتاز قارچی است. قطعه اصلی ژن فیتاز شامل یک *ORF* است از ۳۳۰ اسید امینه که با توالی های پپتیدی شخصی از N-ترمینال وتوالی 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 کند. 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* وزن حدود ۴۵کیلو دالتون می باشد(۷،۶). هدف از انجام این طرح جداسازی این ژن از باکتری *Bacillus subtilis* و تعیین توالی این ژن وبررسی فعالیت آنزیمی وتعیین وزن این ملکولی آن بود.

روش بررسی

از مناطق کوهستانی شهرستان تنکابن ۴۰ نمونه تهیه گردید. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه مقداری از خاک را در لوله‌های حاوی محلول نمکی (۰/۹٪) برای حفظ شرایط اسمزی اضافه کرده سپس خوب مخلوط شده و در بن‌ماری ۹۵°c گرمخانه گذاری شد. درمرحله بعدی لوله‌ها به منظور جدا سازی مایع فوقانی حاوی باکتری‌ها سانتریفیوژ گردید. سپس رقت‌های مختلف تا رقت 10^{-8} جهت استفاده در مرحله کشت به وسیله محلول نمکی آماده گردید. مقداری از سوسپانسیون‌های میکروبی را در محیط-Luria Bertany Agar به صورت سفره ای کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°c گرمخانه گذاری

گردید. سپس از کلونی ها گسترشی تهیه شده و پس از رنگ آمیزی گرم و شناسایی باسیل های گرم مثبت، باکتری‌ها را روی محیط *Bacillus Medium Agar* به صورت ۵ قسمتی کشت داده تا کلنی‌های تک ایجاد شود. برای غنی‌سازی باکتری‌ها کلنی های 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. کلنی‌ها را در مرکز پلیت کشت و در ۳۷°c به مدت ۴۸-۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شد. در صورتی که باکتری بتواند اسید فیتیک موجود در محیط را تجزیه کند هاله‌ای که بیانگر تولید فیتاز می باشد ایجاد می گردد. باکتری‌هایی که تولید فیتاز آن‌ها 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 ایرانcat.No: DN8115C) 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 ناحیه‌ای 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 آنلاین BLAST در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) واقع در کتابخانه ملی پزشکی در موسسه ملی سلامت (NIH) انجام شد.(۱۰،۹). برای شناسائی 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 رسوب‌دهی (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 یخچال‌دار 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 ۱۲درصد و ژل متراکم کننده ۴ درصد بود. الکتروفورز پروتئین مورد نظر روی ژل *SDS-PAGE٪۱۲* طی مدت ۶ ساعت در ولتاژ ۱۲۰ و میلی آمپر۳۰ انجام گرفت. رنگ‌آمیزی 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 *ml* ۱ از مخلوط را با *ml* ۰/۵ محلول رنگ زدا خوب مخلوط کرده و پس از سانتریفیوژ میزان جذب فاز رویی را در طول موج *nm* ۴۱۵ خوانده شد. محلول بافر فعالیت آنزیمی: ۳۰/۰۲ گرم $NaC_2H_3O_2.3H_2O$ و ۰/۱۴۷ گرم $CaCl_2H_2O$ که در ۹۰۰ میلی لیتر آب حل و با اسید استیک 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 ۱۰۰درصد 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 میلی لیتر 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 میلی لیتر آب و در دمای ۶۵ درجه حل کرده و به تدریج ۲۰ میلی لیتر محلول اسید نیتریک افزوده و پس از سرد شدن با آب به حجم ۱ لیتر می‌رسانیم. محلول متوقف کننده: ۲۵۰ میلی لیتر از محلول هپتامولیبدات را با ۲۵۰ میلی لیتر محلول آمونیوم وندات اضافه و به تدریج به آن ۱۶۵ میلی لیتر اسید نیتریک ۶۵ درصد اضافه و با آب مقطر به حجم ۱ لیتر می‌رسانیم.

برای بررسی اثرات دما بر فعالیت آنزیم شرایط دمائی 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).

یافته ها

نتایج حاصل از ارزیابی کیفی با حضور باند bp ۱۲۰۰ صحت واکنش را تائید کرد. نتیجه ردیف سازی محصول تکثیر 16 srDNA با استفاده از نرم افزار BLAST، نشان داد که باکتری مورد نظر ۹۹ درصد گونه باسیلوس سوبتیلیس سویه str می باشد. نتایج به دست آمده از بررسی توالی ها، 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 وجود نداشت به عنوان شاهد منفی استفاده شد. بیشترین قطر هاله در دمای 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 میلی متر تجاوز نکرد. بیشترین قطر هاله در محدوده PH ۵-۷/۵ مشاهده شد که هاله شفافی به قطری حدود ۵-۱۰ میلی مترپس از گذشت ۴۸ ساعت دوره انکوباسیون مشاهده شد. در PH پایین تر از ۵ هیچ گونه فعالیتی مشاهده نشد و در PH بالاتر رشد چشم گیری صورت نگرفت.

بحث

در این پژوهش از تعداد ۴۰ نمونه خاک که از مناطق مختلف غرب استان مازندران جمع آوری شده بودند تنها یک مورد از گونه های باسیلوس های جدا شده ژن فیتاز را دارا بوده که به میزان زیادی با سایر تحقیقات همخوانی دارد. اگرچه مقبولیت هرنوع فیتاز جدیدی که وارد بازار می شود به عوامل های متعددی بستگی دارد، حداقل سه خصوصیت مهم بیولوژیکی برای یک فیتاز ایده آل ضروری به نظر می رسد اول اثربخشی بر روی آزادسازی فیتات-P در لوله گوارشی، دوم مقاومت در برابر گرمادیدن طی فرآیندهای آماده سازی و نگه داری،سوم هزینه کم برای تولید. توانایی هر فیتاز معین برای هیدرولیز فیتات-P در لوله گوارشی توسط خواص آنزیمی آن تعیین می شود. 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 ودر مقابل آن فیتاز باسیلوس سوبتیلیس توسط اسید فیتیک در محیط کشت القا می شود. در این مطالعه نیز فیتاز باسیلوس سوبتیلیس توسط اسید فیتیک در محیط کشت القا شد. Saghai Maroof و

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 سوبتیلیس* استفاده شد و فیتاز را در محیط حاوی *e, D-glocose ,D-manos 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 ۱۰۰درصد فعال است. تثبیت‌پذیری 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 تقریبا ثابت خواهد بود. در مطالعه انجام شده توسط ما دمای مطلوب فیتاز گونه باسیلوس جدا شده ۵۵ درجه سانتی گراد وبه مدت ۶۵ دقیقه بوده که این نشان دهنده پایداری نسبتا خوب این آنزیم نسبت به دمای بالا است. که با نتایج حاصل از تحقیق *wyss* و همکاران مطابقت داشت. تثبیت‌پذیری آنزیم مورد مطالعه ما در معرض *Cacl2* به طور قا بل توجهی کاهش یافت که با نتایج *Wyss* و همکاران مشابه بود. در این مطالعه نیز با روش های مشابه موفق به جداسازی و خالص‌سازی و سازمان‌بندی و کلونینگ ژن فیتاز از *باسیلوس سوبتیلیس* زیرگونه *STR* شدیم. در مورد بسیاری از ارگانیسم‌ها نواحی شفاف در اطراف کلنی‌های باکتری ها در محیط کشت دیده می‌شود. اما تعداد اندکی از آنها قادر به تولید فیتاز هستند، به این معنی که بسیاری از گونه‌ها که مورد آزمایش اولیه قرار می گیرند فاقد چنین قابلیتی بوده و در واقع تشخیص مثبت در آنها غلط بوده این نوع تشخیص اشتباه را می توان به دلیل اسیدهایی دانست که در نتیجه متابولیسم باکتری تولید شده و سبب حذف کلسیم رسوبی یا سدیم فیتات می شوند. Xuenging Wang و همکاران در سال ۲۰۰۳ اثبات کردند که آنزیم به مدت یکسال در ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد و عملکردآن 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* ۵/۵-۷/۲فعالیت آن ثابت بود اما در *pH* ۳،۲و۴ عملکرد آنزیم متوقف شده بود. در دمای ۲۵ درجه فعالیت آنزیم به مدت ۱۵ ساعت *pH* ۳و۵ ثابت بود اما در *pH* ۲ عملکرد آن تا ۲۰درصد 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 و۵/۵ -PH قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد فعالیت آنزیم مشاهده شد. ولی در *pH* ۲، ۳ و۴ هیچ گونه فعالیتی مشاهده نشد و در ۷/۲و۶ PH و درجه حرارت ۳۷ درجه فعالیت آنزیم تقریبا 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 Xuenging Wang مشابه بود. مطلوب‌ترین شرایط برای تولید آنزیم PH = ۵/۵ 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 سوبتیلیس* 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.

Kerovuo وهمکاران در سال ۲۰۰۰ وزن ملکولی پروتئین فیتاز را بر اساس نتایج حاصل ازSDS-PAGE درحدود ۴۵ کیلو دالتون را بیان کردند که در این مطالعه نیز در این محدوده مشاهده شد.

نتیجه گیری

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

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 دراجرای 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*. Appleid 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 charactrization and gene cloning*. Bankok, 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 electrophoresis of proteins* .Nature. 1970; 227(5259): 680-5.

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 andSequence 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 Encodingthe 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.

Original Article

Expression of *Bacillus* Species Isolated Phytase Gene from Soil by PCR Method

Nazemi, A. (PhD)
Assistant professor of Genetics, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Vaseghi, N. (MSc)
MSc of Microbiology, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Khataminejad, MR. (PhD)
PhD of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Nasrollahi Omran, A. (PhD)
Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Eskandari, M. (MSc)
MSc of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Gilan University, Rasht, Iran

Corresponding Author: Vaseghi, N.

Email: NVasegi@ yahoo. Com

Received: 18 Jul 2012
Revised: 30 Aug 2013
Accepted: 4 Sep 2013

Abstract

Background and Objective: Recognizing and using of isolated phytase in the soil microorganisms are paramount importance to produce the Phytase enzyme utilized commercially in different industries. This study was conducted to recognize different bacillus species which are Phytase producers and detection of the gene that can produce this enzyme.

Material and Methods: Soil samples were gathered through different parts of mountainous areas. The early isolation of bacillus was carried out in Bacillus Medium Agar. After isolating the bacteria and genome extraction, the responsible gene of enzyme producer recognized and amplified by PCR method. The size of this protein and the optimal production situation in supplemental exploitation such as SDS-PAGE and the enzymatic activity of its size were evaluated.

Results: Of 40 samples, one bacterium secreting Phytase enzyme was isolated. This bacterium was sequenced and recognized Bacillus Sobtlis species that is classified in STR Genus. The size of protein phytase produced by this gene was about 45 KD and the enzyme activity at 55 degrees was measured about 5.65 in wavelength of 415 NM. The phytase gene with the size of 1200 bp was propagated.

Conclusion: the microorganisms, in natural conditions, produce Phytase enzyme in limited amount and with the quality appropriate to microorganisms. Thus, isolating the bacilli producing Phytase enzyme and purifying this protein are highly significant.

Key words: Bacillus Subtilis; Phytase; SDS-PAGE; Enzymatic Activity; Polymerization Chain Reaction

This paper should be cited as: Nazemi A, Vaseghi N, Khataminejad MR, Nasrollahi Omran A, Eskandari M. [Expression of Bacillus Species Isolated Phytase Gene from Soil by PCR Method]. MLJ. 2014; 7(Suppl.5):23-28 [Article in Persian]