

بهینه سازی تولید آنزیم فیتاز در باسیلوس پانتاتنیکوس

محبوبه خزائی^۱، احمد علی پوربابایی^{۱*}، سید علی رضایی^۱

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

مسئول مکاتبات @yahoo.com

چکیده

فیتازها گروه ویژه ای از فسفاتازها می باشند که هیدرولیز مرحله به مرحله فسفات را از مولکول فیتات انجام می دهند، فیتات منبع اصلی ذخیره فسفات در دانه گیاهان می باشد. این دسته از آنزیم ها در بین گیاهان ریزسازواره ها و حیوانات پراکندگی و گستردگی دارند. هدف از این پژوهش بهینه سازی تولید آنزیم فیتاز در باسیلوس پانتاتنیکوس می باشد. شرایط بهینه از نظر دما، pH، دور شیکر، منبع کربن، منبع نیتروژن، منبع فسفر، غلظت نمک های مختلف، غلظت های مختلف NaCl و فلزات سنگین بررسی شد که باسیلوس پانتاتنیکوس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، pH = ۷/۵، دور شیکر ۱۵۰ rpm، منبع کربن گلوکز، منبع نیتروژن آمونیوم نترات، منبع فسفر کلسیم فیتات، نمک سدیم کلرید، ۱۰٪ NaCl و در حضور فلز کلرید کادمیوم بیشترین میزان تولید آنزیم را دارا بود. بهینه سازی میزان فعالیت آنزیم از نظر دما، pH، غلظت سوبسترا، غلظت نمک انجام شد که در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد، pH = 9، غلظت سوبسترا ۱۰۵۰ میکرولیتر و غلظت ۰٪ سدیم کلرید بیشترین میزان فعالیت آنزیم مشاهده شد.

واژه های کلیدی: بهینه سازی، جنس باسیلوس، آنزیم فیتاز

مقدمه

نزدیک به یک قرن از تحقیق بر روی فیتاز بعد از کشف آن توسط *suzuki* می گذرد (۱). فیتازها گروه ویژه ای از فسفاتازها یا فسفریک مونواستر هیدرولازها به حساب می آیند که قادر به هیدرولیز فیتات می باشند و حداقل یک گروه فسفات را از این ماده آزاد می نمایند (۲). این دسته از آنزیم ها در طبیعت گسترده هستند و فعالیت فیتازی در گیاهان، جانوران و ریزسازواره ها گزارش شده است (۳). در طول دو دهه گذشته فیتازها در حیطه های تغذیه، حفاظت از محیط زیست و بیوتکنولوژی مورد توجه دانشمندان و حافظان محیط زیست قرار گرفته اند. این دسته از آنزیم های هیدرولیز کننده قادر به رها سازی فسفات به صورت مرحله ای از فیتات بوده که منبع اصلی ذخیره فسفر در دانه گیاهان می باشد و معمولاً در جیره

غذایی حیوانات مورد استفاده قرار می گیرند (۴). به خاطر این که حیوانات تک معده ای از قبیل خوک ها ، پرندگان و ماهی ها (همچنین انسان) فاقد آنزیم فیتاز در سیستم گوارشی خود بوده یا فعالیت فیتازی آن ها بسیار پایین می باشد ، قادر به استفاده از فسفر موجود در ساختار فیتات نمی باشند . بنابراین ، برای تأمین فسفر لازم است که فسفر به شکل معدنی و قابل جذب به غذای آن ها اضافه شود (۵). استفاده از فسفر معدنی که غالباً به اشکال مونوکلسیم فسفات و دی کلسیم فسفات می باشد همراه با مشکلاتی خواهد بود . اولاً علاوه بر هزینه بالای این عنصر و تخلیص آن ، منابع محدود و تجدید ناپذیری دارد ، به طوری که منابع فسفات بر روی کره خاکی با ۵۰ سال آینده تخلیه خواهد شد (۶،۷). فیتازها براساس ویژگی های بیوشیمیایی و هم ردیفی توالی اسید آمینه، در ۴ گروه اصلی هیستیدین اسید فسفاتاز، بتا پروپیلر فیتاز، سیستئین فسفاتاز و اسید فسفاتاز بنفش قابل تقسیم بندی می باشند (۸). *ELSORA* و همکاران در سال ۲۰۰۲ در کشور آلمان چندین سویه از باسیلوس که که متعلق به *Bacillus subtilis* و *Bacillus Amyloliquefaciense* بودند از خاک های زراعی جدا کردند. *Bacillus Amyloliquefaciense* هایی شناسایی شدند که قادر به کاهش فیتاز خارج سلولی (*myo inositol Hexakisphosphat*) می باشد. بیشترین فعالیت فیتاز خارج سلولی در سویه *FZB45* تشخیص داده شد. علاوه بر این رشد نهال ذرت در حضور فیتاز خالص و عدم وجود آب تصفیه شده در محیط کشت انجام شد. این آزمایشات ژنتیکی و بیوشیمیایی باعث ارائه ی شواهد قوی شد که نشان دهنده ی این بود که فعالیت در فیتاز در *Bacillus Amyloliquefaciense* برای تحریک رشد گیاه که در شرایط کمبود فسفات است مهم می باشد (۹).

مواد و روش کار

بهینه سازی تولید آنزیم

بهینه سازی شرایط فیزیکی بیوشیمیایی

در این مرحله شرایط فیزیکی بیوشیمیایی تولید آنزیم از جمله دما ، pH و دور شیکر بهینه سازی شد .

تعیین pH بهینه برای تولید آنزیم

ابتدا ۴ ارلن ۱۰۰ میلی لیتر انتخاب کرده محیط *PSM* مایع ساخته به اندازه ۵۰ میلی لیتر داخل هر ارلن ریخته سپس pH محیط تنظیم شد . در pH های مختلف مثل ۵/۵، ۶/۵، ۷/۵ و ۹ . بعد نمونه ها را که به صورت کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بودند را به محیط تلقیح کرده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته بعد از ۷۲ ساعت جذب نمونه ها را با استفاده از روش *Ferrous sulfate-molybdenum blue method* میزان تولید فسفر در محیط سنجیده شد و جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد.(۳).

تعیین دمای بهینه برای تولید آنزیم

ابتدا ۴ ارلن ۱۰۰ میلی لیتر انتخاب کرده محیط *PSM* مایع ساخته به اندازه ۵۰ میلی لیتر داخل هر ارلن ریخته سپس *pH* محیط را روی ۵/۵ تنظیم کرده و بعد نمونه ها را که به صورت کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بودند را به محیط تلقیح کرده و در دماهای مختلف مثل : ۲۵، ۳۰، ۳۷، ۴۲ درجه سانتی گراد گذاشته بعد از ۷۲ ساعت جذب نمونه ها را در طول موج ۷۰۰ نانومتر به روش *Ferrous sulfate-molybdenum blue method* میزان تولید فسفر در محیط سنجیده شد (۳).

تعیین دور شیکر بهینه برای تولید آنزیم

ابتدا ۴ ارلن ۱۰۰ میلی لیتر انتخاب کرده محیط *PSM* مایع ساخته به اندازه ۵۰ میلی لیتر داخل هر ارلن ریخته سپس *pH* محیط روی ۷/۵ تنظیم شد. بعد نمونه ها را که به صورت کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بودند را به محیط تلقیح کرده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با دور های مختلف مثل ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ گذاشته پس از مدت ۷۲ ساعت با روش *Ferrous sulfate-molybdenum blue method* سنجش میزان تولید آنزیم انجام گرفت (۳).

بهینه سازی منابع موجود در محیط کشت

منابع آلی و معدنی موجود در محیط کشت از جمله منبع نیتروژن و منبع کربن مورد آزمایش قرار گرفت.

بررسی اثر منابع کربن مختلف بر تولید آنزیم

ابتدا ۴ ارلن ۱۰۰ میلی لیتر انتخاب کرده محیط *PSM* مایع ساخته به اندازه ۵۰ میلی لیتر داخل هر ارلن ریخته با این تفاوت که در هر ارلن منبع کربن را تغییر داده منابع کربنی که مورد آزمایش قرار گرفت شامل : گلوکز، فروکتوز، ساکارز، مالتوز بودند سپس *pH* محیط روی ۷/۵ تنظیم شد. بعد نمونه ها را که به صورت کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بودند را به محیط تلقیح کرده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته بعد از ۷۲ ساعت جذب نمونه ها را با روش *Ferrous sulfate-molybdenum blue method* سنجیده شد (۳).

بررسی اثر منابع نیتروژن مختلف بر تولید آنزیم

ابتدا ۴ ارلن ۱۰۰ میلی لیتر انتخاب کرده محیط *PSM* مایع ساخته به اندازه ۵۰ میلی لیتر داخل هر ارلن ریخته با این تفاوت که در هر ارلن منبع نیتروژن را تغییر داده سپس *pH* محیط روی ۷/۵ تنظیم شد. بعد نمونه ها را که به صورت

کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بودند را به محیط تلقیح کرده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته بعد از ۷۲ ساعت جذب نمونه ها را در طول موج ۷۰۰ نانومتر سنجیده شد (۳).

بررسی اثر فلزات سنگین مختلف بر تولید آنزیم

ابتدا ۴ ارلن ۱۰۰ میلی لیتر انتخاب کرده محیط *PSM* مایع ساخته به اندازه ۵۰ میلی لیتر داخل هر ارلن ریخته با این تفاوت که در هر ارلن فلزات سنگین متفاوتی مثل : کادمیم ، باریم ، سلنیت ، کلرید کبالت اضافه شد سپس *pH* محیط روی ۷/۵ تنظیم شد . بعد نمونه ها را که به صورت کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بودند را به محیط تلقیح کرده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته بعد از ۷۲ ساعت جذب نمونه ها را به روش *Ferrous sulfate-molybdenum blue method* سنجیده شد (۳).

بررسی اثر منابع فسفر مختلف بر تولید آنزیم

ابتدا ۴ ارلن ۱۰۰ میلی لیتر انتخاب کرده محیط *PSM* مایع ساخته به اندازه ۵۰ میلی لیتر داخل هر ارلن ریخته با این تفاوت که در هر ارلن منبع فسفر را تغییر داده منابع فسفری که مورد آزمایش قرار گرفت سپس *pH* محیط روی ۷/۵ تنظیم شد . بعد نمونه ها را که به صورت کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بودند را به محیط تلقیح کرده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته بعد از ۷۲ ساعت جذب نمونه ها را با روش *Ferrous sulfate-molybdenum blue method* سنجیده شد (۳).

بررسی اثر نمک های مختلف بر تولید آنزیم

ابتدا ۵ ارلن ۱۰۰ میلی لیتر انتخاب کرده محیط *PSM* مایع ساخته به اندازه ۵۰ میلی لیتر داخل هر ارلن ریخته با این تفاوت که در هر ارلن از نمک های مختلف استفاده کرده نمک های مختلفی که مورد آزمایش قرار گرفت شامل : *NaCl* ، *kcl* ، *Mgcl2* ، *FeSo4* ، *Mgso4* بودند سپس *pH* محیط روی ۷/۵ تنظیم شد . بعد نمونه ها را که به صورت کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بودند را به محیط تلقیح کرده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته بعد از ۷۲ ساعت جذب نمونه ها را با روش *Ferrous sulfate-molybdenum blue method* سنجیده شد (۳).

بررسی اثر غلظت های مختلف نمک *NaCl* بر تولید آنزیم

ابتدا ۴ ارلن ۱۰۰ میلی لیتر انتخاب کرده محیط *PSM* مایع ساخته به اندازه ۵۰ میلی لیتر داخل هر ارلن ریخته با این تفاوت که در هر ارلن غلظت نمک را تغییر داده غلظت هایی که مورد آزمایش قرار گرفت شامل: ۰٪، ۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪ بودند سپس *pH* محیط روی ۷/۵ تنظیم شد. بعد نمونه ها را که به صورت کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بودند را به محیط تلقیح کرده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته بعد از ۷۲ ساعت جذب نمونه ها با روش *Ferrous sulfate-molybdenum blue method* سنجیده شد (۳).

بهینه سازی شرایط فعالیت آنزیم

فاکتورهای موثر بر فعالیت آنزیم، دما، *pH*، غلظت سوبسترا و غلظت نمک است.

تاثیر دما بر روی فعالیت آنزیم

برای سنجش اثر دما بر روی میزان فعالیت آنزیم دماهای مختلف از جمله دمای ۴۰ °C، ۵۰ °C، ۶۰ °C، ۷۰ °C، ۸۰ °C، ۹۰ °C تست می شود. گرماگذاری لوله های حاوی سوبسترا و آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در بین ماری قرار داده شد تا واکنش بین آنزیم و سوبسترا انجام شود سپس ۱ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید افزوده شد تا واکنش قطع شود. بعد از افزودن معرف ها جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده می شود و میزان فسفر آزاد شده در محیط سنجش شد (۳).

تاثیر *pH* بر روی فعالیت آنزیم

pH های مختلف در لوله های حاوی سوبسترا و آنزیم مورد سنجش قرار گرفت. از جمله *pH* های مورد آزمایش ۵/۵، ۶/۵، ۷/۵، ۸/۵ و ۹ بودند که میزان فسفر آزاد شده در محیط سنجیده شد.

برای سنجش اثر *pH* بر روی فعالیت آنزیم، لوله های حاوی سوبسترا و آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در بین ماری قرار داده شد تا واکنش بین آنزیم و سوبسترا انجام شود سپس ۱ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید افزوده شد تا واکنش قطع شود. بعد از افزودن معرف ها جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده می شود و میزان فسفر آزاد شده در محیط سنجش شد (۳).

تاثیر غلظت سوبسترا بر روی فعالیت آنزیم

غلظت های مختلفی از سوبسترا در لوله های آزمایش تهیه شده سپس با محلول حاوی آنزیم ترکیب می شود سپس گرماگذاری به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری انجام می گیرد تا واکنش بین آنزیم و سوبسترا انجام شود سپس ۱ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید افزوده شد تا واکنش قطع شود . بعد از افزودن معرف ها جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده می شود و میزان فسفر آزاد شده در محیط سنجش شد(۳) .

تاثیر غلظت های مختلف نمک NaCl بر روی فعالیت آنزیم

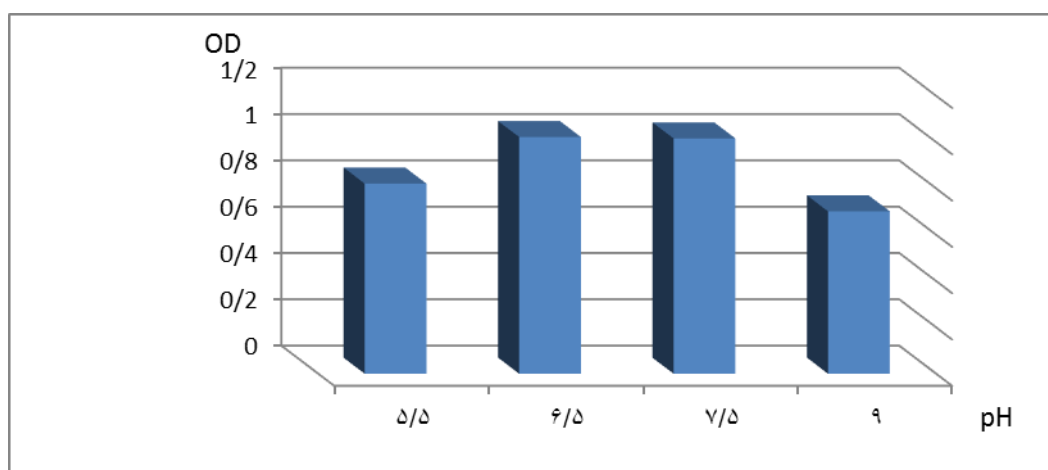
غلظت های مختلفی از نمک NaCl در لوله های آزمایش تهیه شده سپس با محلول حاوی آنزیم و سوبسترا ترکیب می شود سپس گرماگذاری به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری انجام می گیرد تا واکنش بین آنزیم و سوبسترا انجام شود سپس ۱ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید افزوده شد تا واکنش قطع شود . بعد از افزودن معرف ها جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد و میزان فسفر آزاد شده در محیط سنجش شد(۳) .

نتایج و بحث

بهینه سازی تولید آنزیم

تعیین pH بهینه برای تولید آنزیم

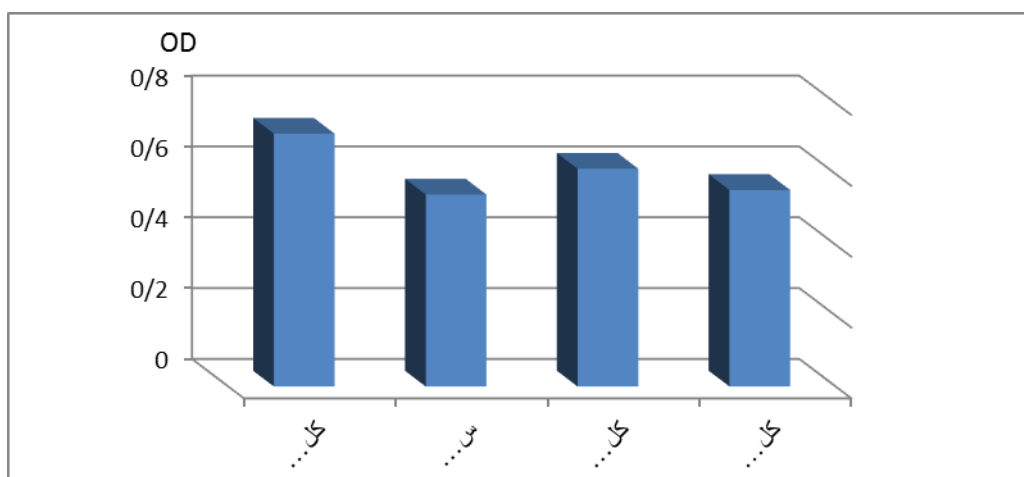
بر اساس آزمایشات صورت گرفته pH های مختلف ۵/۵ ، ۶/۵ ، ۷/۵ ، ۹ مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نمودار شماره (۱) در $pH=7.5$ بیشترین میزان تولید آنزیم و در $pH=9$ کمترین میزان تولید آنزیم مشاهده شد که همان طور که در نمودار مشاهده می شود تقریباً اختلاف زیادی با هم دارند .



نمودار (۱) بهینه سازی pH

تعیین اثر فلزات سنگین بر تولید آنزیم

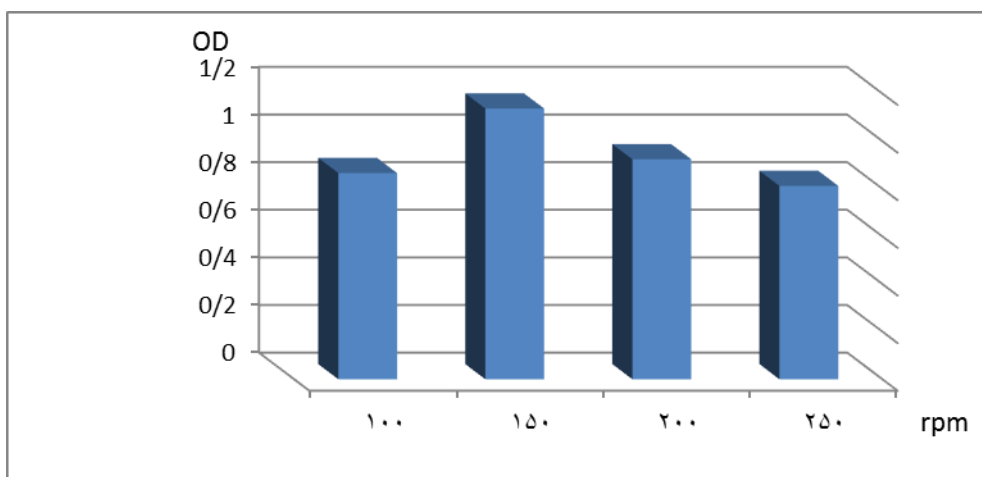
بر اساس آزمایشات صورت گرفته اثر فلزات مختلف مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نمودار شماره (۲) کلرید کادمیم بیشترین میزان تولید آنزیم را دارا بود. و بعد آن کلرید باریم، کلرید کبالت و سلنیت سدیم بودند.



نمودار (۲) تأثیر فلزات سنگین بر تولید آنزیم

تعیین دور شیکر بهینه برای تولید آنزیم

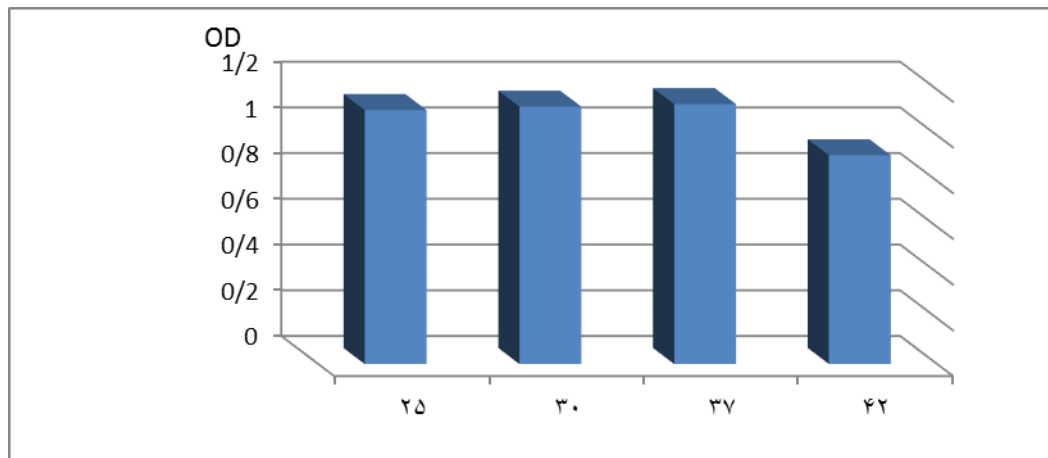
بر اساس آزمایشات صورت گرفته دور های مختلف شیکر مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نمودار شماره (۳) در دور 150 rpm بیشترین میزان تولید آنزیم و در دور ۲۵۰ کمترین میزان تولید آنزیم مشاهده شد.



نمودار (۳) بهینه سازی دور شیکر

تعیین دمای بهینه برای تولید آنزیم

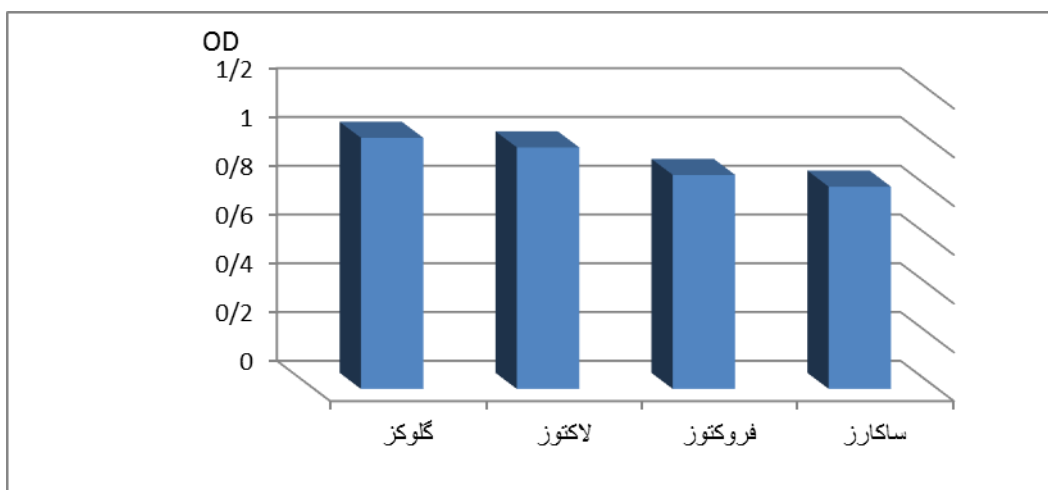
بر اساس آزمایشات صورت گرفته دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نمودار شماره (۴) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بیشترین میزان تولید آنزیم و در ۴۲ درجه سانتی گراد کمترین میزان تولید آنزیم مشاهده شد و همچنین در دماهای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد میزان تولید آنزیم به تدریج افزایش یافت.



نمودار (۴) بهینه سازی دما

تعیین منبع کربن بهینه برای تولید آنزیم

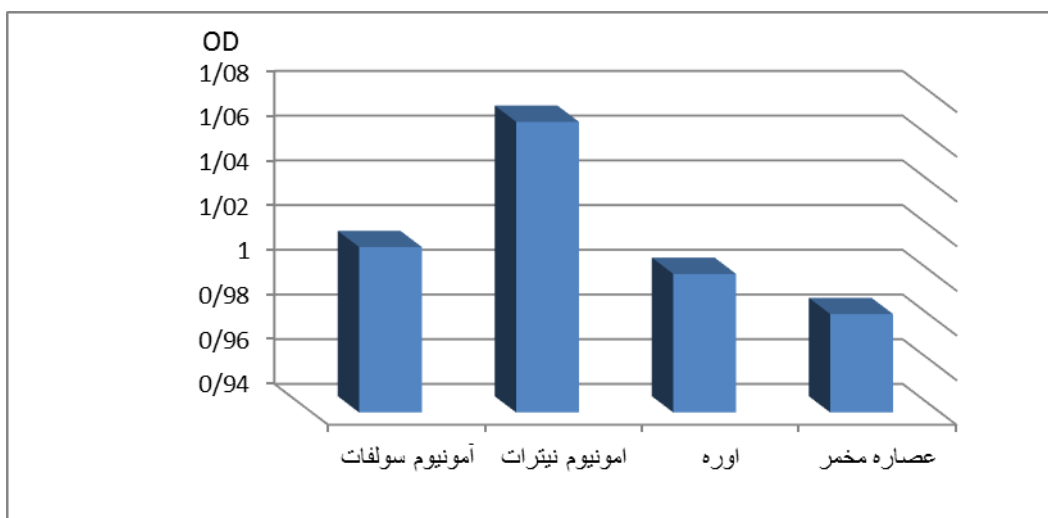
بر اساس آزمایشات صورت گرفته منابع مختلف کربن مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نمودار شماره (۵) گلوکز بیشترین میزان تولید آنزیم را دارا بود سپس به ترتیب لاکتوز، فروکتوز و ساکارز بودند.



نمودار (۵) بهینه سازی منبع کربن

تعیین منبع نیتروژن بهینه برای تولید آنزیم

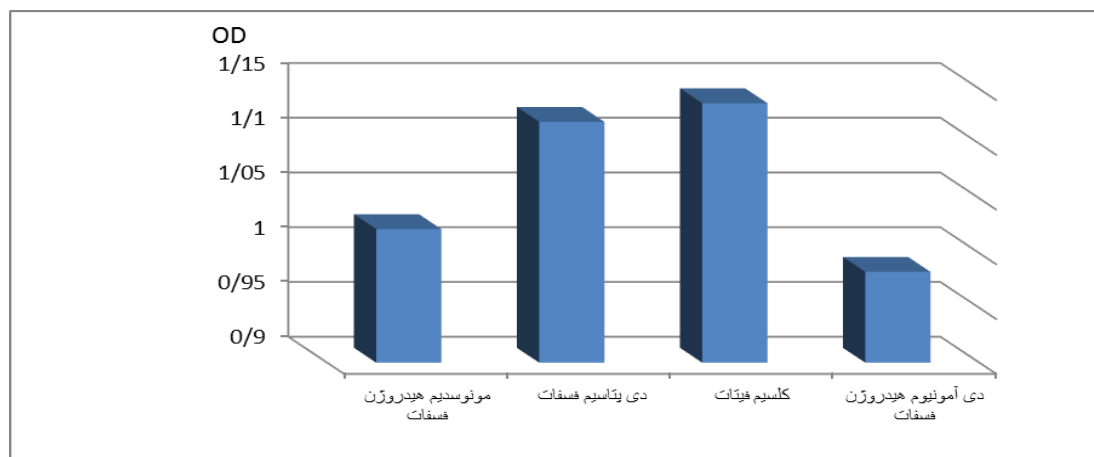
بر اساس آزمایشات صورت گرفته منابع مختلف نیتروژن مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نمودار شماره (۶) آمونیوم نیترات بیشترین میزان تولید آنزیم را دارا بود که بعد از آن آمونیوم سولفات ، اوره و در آخر عصاره مخمر بودند .



نمودار (۶) بهینه سازی منبع نیتروژن

تعیین منبع فسفر بهینه برای تولید آنزیم

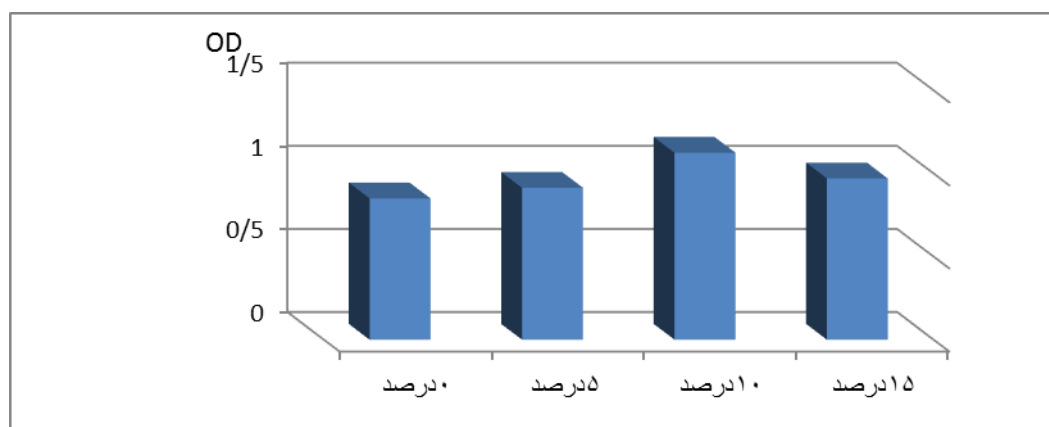
بر اساس آزمایشات صورت گرفته منابع مختلف فسفر مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نمودار شماره (۷) کلسیم فیتات بیشترین میزان تولید آنزیم و بعد از آن به ترتیب دی پتاسیم فسفات ، مونوسدیم هیدروژن فسفات ، دی آمونیوم هیدروژن فسفات دارا بودند .



نمودار (۷) بهینه سازی منبع فسفر

تعیین غلظت NaCl بهینه برای تولید آنزیم

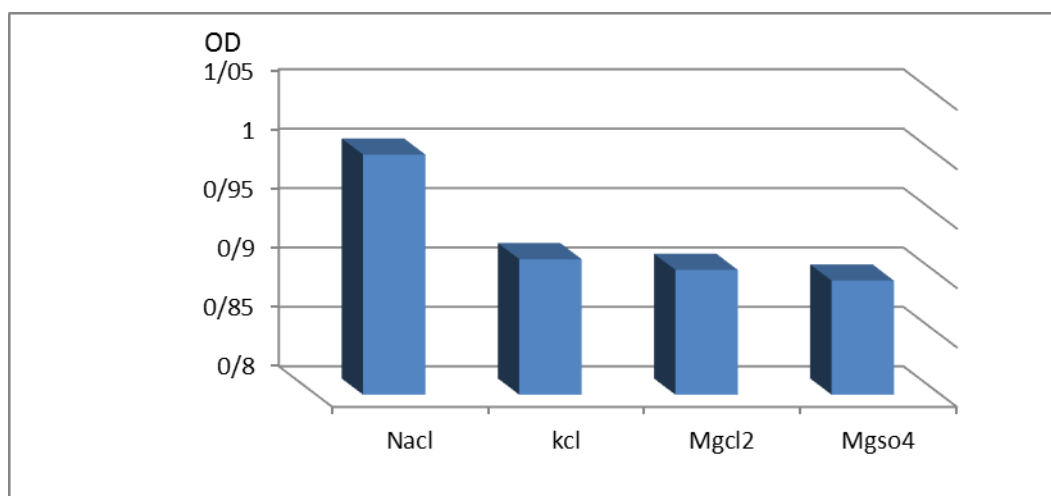
بر اساس آزمایشات صورت گرفته غلظت های مختلف NaCl بررسی قرار گرفت که با توجه به نمودار شماره (۸) در غلظت ۱۰ درصد بیشترین میزان تولید آنزیم مشاهده شد . و در ۰ و ۵ درصد به تدریج میزان تولید آنزیم افزایش یافته و مجدداً در غلظت ۱۵ درصد میزان تولید آنزیم کاهش یافت .



نمودار (۸) بهینه سازی غلظت NaCl

تعیین اثر نمک های مختلف بر تولید آنزیم

بر اساس آزمایشات صورت گرفته اثر نمک های مختلف مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نمودار شماره (۹) در حضور NaCl بیشترین میزان تولید آنزیم مشاهده شد و در حضور Mgso4 کمترین میزان تولید آنزیم مشاهده شد .



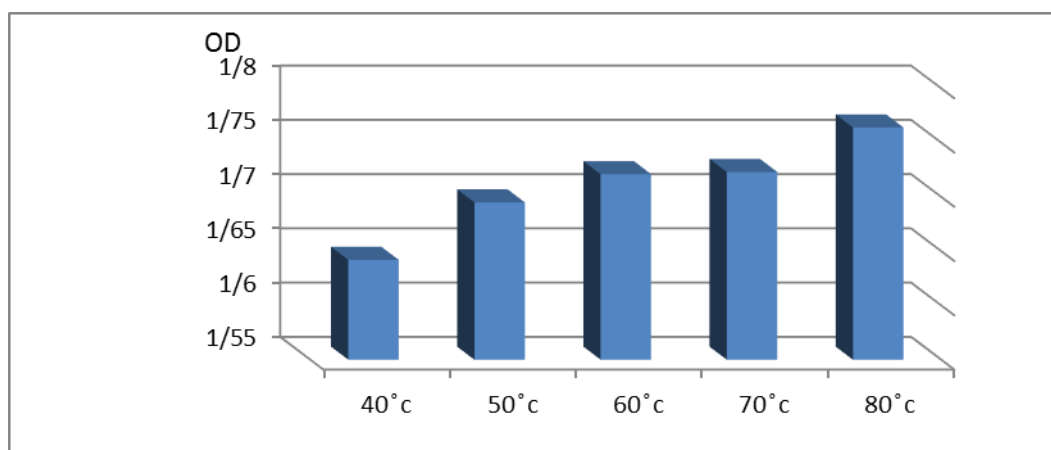
نمودار (۹) تأثیر نمک های مختلف بر تولید آنزیم

سنجش و بهینه سازی فعالیت آنزیم

سنجش فعالیت آنزیم در شرایط آزمایش انجام گرفته که میزان آنزیم تولیدی برابر با 4unit/ppm بود .

تعیین دمای بهینه در فعالیت آنزیم

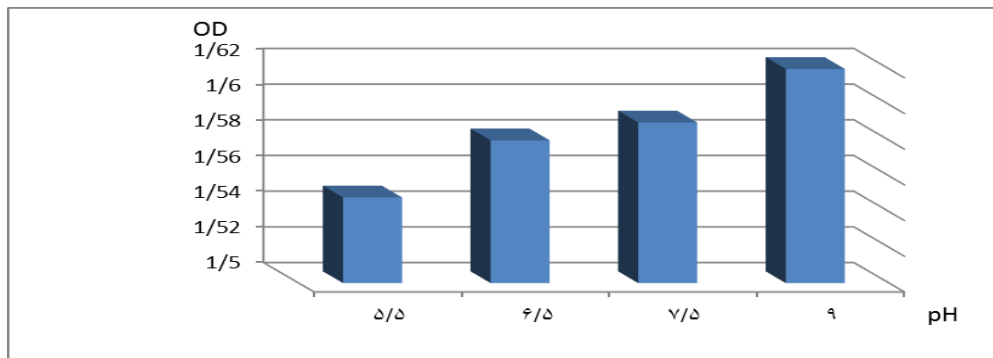
بر اساس آزمایشات انجام شده اثر دماهای مختلف بررسی شد که در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد بیشترین میزان فعالیت با 5.7unit/ppm مشاهده شد .



نمودار (۱۰) اثر دما بر فعالیت آنزیم

اثر pH بر فعالیت آنزیم

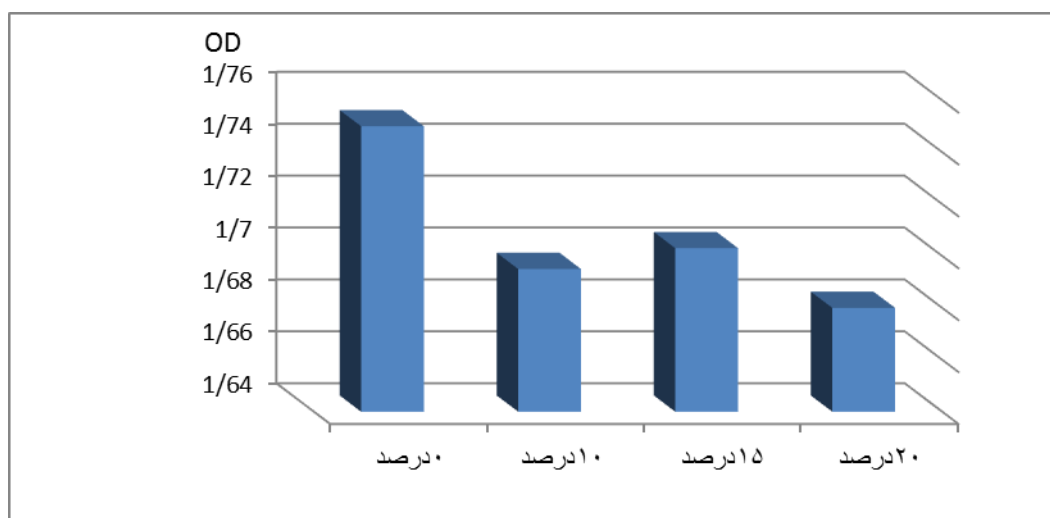
بر اساس آزمایشات انجام گرفته ، pH های مختلف بررسی شد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در $pH = 9$ برابر با 5 unit/ppm بود .



نمودار (۱۱) اثر pH های مختلف بر فعالیت آنزیم

تعیین غلظت نمک NaCl بهینه در فعالیت آنزیم

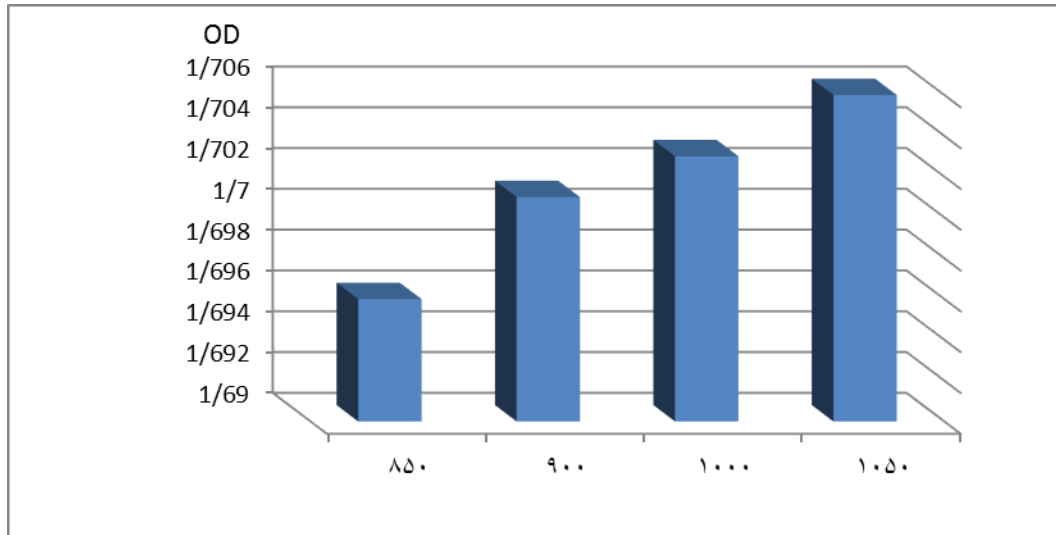
بر اساس آزمایشات انجام گرفته ، غلظت های مختلف نمک بررسی شد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت 0% با 5.5 unit/ppm مشاهده شد



نمودار (۱۲) اثر غلظت های مختلف نمک بر فعالیت آنزیم

تعیین غلظت سوبسترای بهینه در فعالیت آنزیم

بر اساس آزمایشات انجام گرفته ، غلظت های مختلف سوبسترا بررسی شد . بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۱۰۵۰ میکرولیتر برابر با 5.5 Unit/ppm بود .



نمودار (۱۳) اثر غلظت های مختلف سوبسترا بر فعالیت آنزیم

Richardson و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی جداسازی باکتری های تولید کننده ی آنزیم فیتاز و بهینه سازی تولید آنزیم کار کردند. آنها ۳۲ نمونه باکتری تولید کننده را جدا کردند که با استفاده از محیط *PSM* توانستند یکی از این سویه ها را به عنوان بهترین تولید کننده معرفی کنند. هاله شفافه که این سویه در محیط کشت ایجاد کرده است قطری برابر با ۳۹ سانتی متر دارد. این افراد سویه ی جدا شده را با سیلوس سوبتیلیس معرفی کردند. این باکتری $378 U/ml$ فعالیت آنزیمی دارد (۱۰). *Yaho MZ* و همکاران در سال ۲۰۱۲ در کشور چین آنزیم فیتاز را که قادر به آزاد سازی فسفات از فیتات می باشد را جدا سازی کردند. یکی از اشکال عمده ی فسفات در خوراک دام با منشأ گیاهی به صورت فسفر می باشد. آنزیم فیتاز به طور گسترده در تغذیه ی حیوانات به منظور بهبود تغذیه و کاهش آلودگی فسفر در فضولات حیوانی استفاده می شود (۱۲). *Lei XG* و همکاران در سال ۲۰۰۱ در کشور آمریکا آنزیم فیتاز را به عنوان مکمل برای بهبود تغذیه و به منظور کاهش آلودگی فسفر از فضولات حیوانات به رژیم غذایی آنها اضافه کردند (۸).

منابع

1. ElSORra E, Idriss, Oliwia Makarewicz, Abdelazim Farouk, Kristin Rosner, Ralf Greiner, Helmut Bochow, Thomas Richter, Rainer Borriss, Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect, phytase activity, 17 Jan 2002, D-10115, 117
2. Greiner R (2004). Purification and properties of a phytate -degrading enzyme from *Pantoea. agglomerans*. *Protein Journal* 23:567-576
3. Haefner S, Knietsch A, Scholten E, Braun J, Lohscheidt M, Zelder O (2005). Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*68:588–597
4. Kerovuo, J., et al., *Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*, 1998. **64**(6): p. 2079-2085.
5. Lei GX, Stahl CH (2001). Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 474-481
6. Lei GX, Poress JM (2003). Phytase enzyology, applications, and biotechnology *Biotechnology Letters* 25:1787-1794
7. Lei GX, Poress JM (2003). Phytase enzyology, applications, and biotechnology
8. Lei XG, Stahl CH, Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection, cornell, Nov 2001, 474-81
9. Reddy NR, PiersonMD, Sathe SK, Salunkhe DK (1989).Phytases in Cereals and Legumes Boca Raton, FL: CRC Press
10. . Richardson, Alan E, Hadobas, Paul A, Hayes, Julie E, Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate, *ACPF*, 2012, 641-649
11. Suzuki U, Yoshimura K, Takaishi M (1907). Ueberein enzym phytase das anhydrooxymethilen diphosphorosaure spaltet. *Bulletin of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University* 7:503–512

12. Yao MZ, Zhang YH, Lu WL, Hu MQ, Wang W, Liang AH, Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications, 25 Nov 2011