

بهینه‌سازی تولید آنزیم فیتاز در باسیلوس پانتاتینیکوس

محبوبه خزائی، احمد علی پوربابایی*، سید علی رضایی

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۲۵)

چکیده

فیتازها گروه ویژه ای از فسفاتازها می‌باشند که هیدرولیز مرحله به مرحله فسفات را از مولکول فیتات انجام می‌دهند، فیتات منبع اصلی ذخیره فسفات در دانه گیاهان می‌باشد. این دسته از آنزیم‌ها در بین گیاهان ریزسازواره‌ها و حیوانات پراکندگی و گستردگی دارند. هدف از این پژوهش بهینه‌سازی تولید آنزیم فیتاز در باسیلوس پانتاتینیکوس می‌باشد. شرایط بهینه از نظر دما، pH، دور شیکر، منبع کربن، منبع نیتروژن، منبع فسفر، غلظت نمک‌های مختلف، غلظت‌های مختلف NaCl و فلزات سنگین بررسی شد که باسیلوس پانتاتینیکوس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، pH = ۷/۵، دور شیکر ۱۵۰ rpm، منبع کربن گلوکز، منبع نیتروژن آمونیوم نیترات، منبع فسفر کلسیم فیتات، نمک سدیم کلرید، ۱۰٪ NaCl و در حضور فلز کلرید کادمیوم بیشترین میزان تولید آنزیم را دارا بود. بهینه‌سازی میزان فعالیت آنزیم از نظر دما، pH، غلظت سوپسترا، غلظت نمک انجام شد که در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد، pH = 9، غلظت سوپسترا ۱۰۵۰ میکرولیتر و غلظت ۰٪ سدیم کلرید بیشترین میزان فعالیت آنزیم مشاهده شد.

کلیدواژگان

آنزیم فیتاز، بهینه‌سازی، جنس باسیلوس.



مقدمه

نزدیک به یک قرن از تحقیق بر روی فیتاز بعد از کشف آن توسط *suzuki* می‌گذرد (۱). فیتازها گروه ویژه‌ای از فسفاتازها یا فسفریک مونواستر هیدرولازها به حساب می‌آیند که قادر به هیدرولیز فیتات می‌باشند و حداقل یک گروه فسفات را از این ماده آزاد می‌نمایند (۲). این دسته از آنزیم‌ها در طبیعت گسترده هستند و فعالیت فیتازی در گیاهان، جانوران و ریزسازواره‌ها گزارش شده است (۳). در طول دو دهه گذشته فیتازها در حیطة‌های تغذیه، حفاظت از محیط زیست و بیوتکنولوژی مورد توجه دانشمندان و حافظان محیط زیست قرار گرفته‌اند. این دسته از آنزیم‌های هیدرولیز کننده قادر به رها سازی فسفات به صورت مرحله‌ای از فیتات بوده که منبع اصلی ذخیره فسفر در دانه گیاهان می‌باشد و معمولاً در جیره غذایی حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴). به خاطر این که حیوانات تک معده‌ای از قبیل خوک‌ها، پرندگان و ماهی‌ها (همچنین انسان) فاقد آنزیم فیتاز در سیستم گوارشی خود بوده یا فعالیت فیتازی آن‌ها بسیار پایین می‌باشد، قادر به استفاده از فسفر موجود در ساختار فیتات نمی‌باشند. بنابراین، برای تأمین فسفر لازم است که فسفر به شکل معدنی و قابل جذب به غذای آن‌ها اضافه شود (۵). استفاده از فسفر معدنی که غالباً به اشکال مونوکلسیم فسفات و دی کلسیم فسفات می‌باشد 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 ویژگی‌های بیوشیمیایی وهم ردیفی توالی اسید آمینه، در ۴ گروه اصلی هیستیدین اسیدفسفاتاز، بتا پروپلر فیتاز، سیستمین فسفاتاز و اسید فسفاتاز بنفش قابل

تقسیم‌بندی می‌باشند (۸). ELSORA و همکاران در سال ۲۰۰۲ در کشور آلمان چندین سویه از باسیلوس که متعلق به *Bacillus subtilis* و *Bacillus Amyloliquefaciense* بودند از خاک‌های زراعی جدا کردند. *Bacillus Amyloliquefaciense*‌هایی شناسایی شدند که قادر به کاهش فیتاز خارج سلولی (*myo inositol Hexakisphosphat*) می‌باشد. 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 می‌باشد (۹).

مواد و روش کار

بهبود سازی تولید آنزیم

بهبود سازی شرایط فیزیکیوشیمیایی

در این مرحله شرایط فیزیکیوشیمیایی تولید آنزیم از جمله دما، *pH* و دور شیکر بهبودی 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 نمونه‌ها 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 نمونه‌ها 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 نمونه‌ها 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 نمونه‌ها 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 نمونه‌ها 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 دوره‌های 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).

بهینه‌سازی 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 نمونه‌ها 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 نمونه‌ها 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 نمونه‌ها 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 نمونه‌ها 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 نمونه‌ها 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 نمونه‌ها 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



بهینه‌سازی شرایط فعالیت آنزیم

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

تأثیر 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 می‌شود. گرماگذاری لوله‌های حاوی سوبسترا و آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در بن 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 معرف‌ها جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده می‌شود و میزان فسفر آزاد شده در محیط سنجش شد (۳).

تأثیر pH بر روی فعالیت آنزیم

pHهای مختلف در لوله‌های حاوی سوبسترا و آنزیم مورد سنجش قرار گرفت. از جمله pHهای 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، لوله‌های حاوی سوبسترا و آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در بن 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 معرف‌ها جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده می‌شود و میزان فسفر آزاد شده در محیط سنجش شد (۳).

تأثیر غلظت سوبسترا بر روی فعالیت آنزیم

غلظت‌های مختلفی از سوبسترا در لوله‌های آزمایش تهیه شده سپس با محلول حاوی آنزیم ترکیب می‌شود سپس گرماگذاری به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری انجام می‌گیرد تا واکنش بین آنزیم و سوبسترا انجام شود سپس ۱ میلی لیتر تری کلرو

تغییر داده منابع فسفری که مورد آزمایش قرار گرفت سپس pH محیط روی ۷/۵ تنظیم شد. بعد نمونه‌ها 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 نمونه‌ها را با روش *Ferrous sulfate-molybdenum blue method* سنجیده شد (۳).

بررسی اثر نمک‌های 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 نمک‌های مختلف استفاده کرده نمک‌های مختلفی که مورد آزمایش قرار گرفت شامل: *NaCl*، *Mgso4*، *FeSo4*، *Mgcl2* بودند سپس pH محیط روی ۷/۵ تنظیم شد. بعد نمونه‌ها 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 نمونه‌ها را با روش *Ferrous sulfate-molybdenum blue method* سنجیده شد (۳).

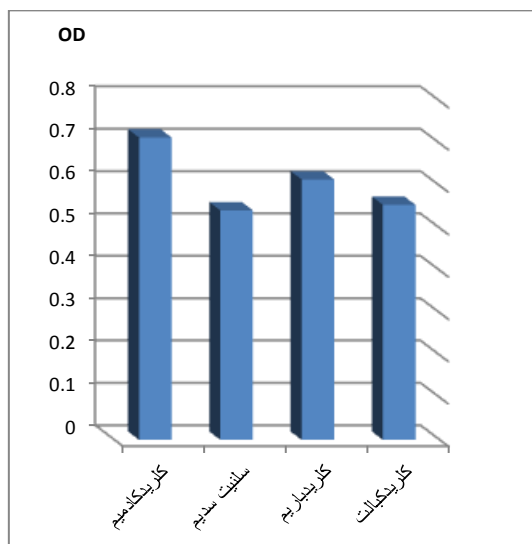
بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک Nacl بر تولید آنزیم

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 غلظت‌هایی که مورد آزمایش قرار گرفت شامل: ۰٪، ۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪ بودند سپس pH محیط روی ۷/۵ تنظیم شد. بعد نمونه‌ها 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 نمونه‌ها با روش *Ferrous sulfate-molybdenum blue method* سنجیده شد (۳).



تعیین اثر فلزات سنگین بر تولید آنزیم

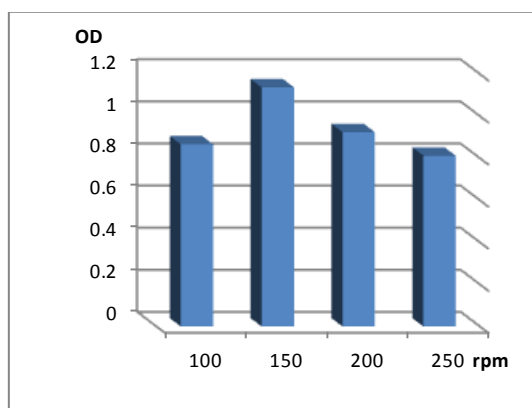
بر اساس آزمایشات صورت گرفته اثر فلزات مختلف مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به شکل (۲) کلرید کادمیم بیشترین میزان تولید آنزیم را دارا بود. و بعد آن کلرید باریم، کلرید کبالت و سلیت سدیم بودند.



شکل ۲- تأثیر فلزات سنگین بر تولید آنزیم

تعیین دور شیکر بهینه برای تولید آنزیم

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



شکل ۳- بهینه سازی دور شیکر

استیک اسید افزوده شد تا واکنش قطع شود. بعد از افزودن معرفها جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده می‌شود و میزان فسفر آزاد شده در محیط سنجش شد (۳).

تأثیر غلظت‌های مختلف نمک NaCl بر روی فعالیت آنزیم

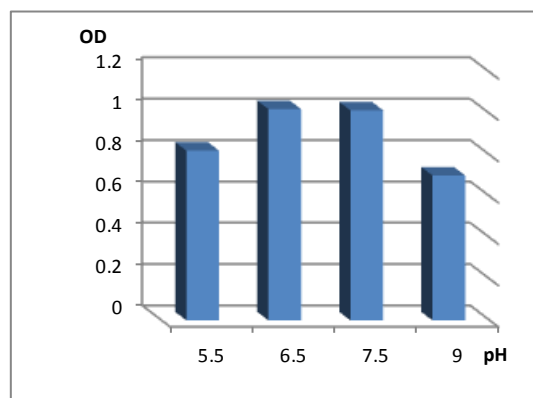
غلظت‌های مختلفی از نمک NaCl در لوله‌های آزمایش تهیه شده سپس با محلول حاوی آنزیم و سوبسترا ترکیب می‌شود سپس گرماگذاری به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری انجام می‌گیرد تا واکنش بین آنزیم و سوبسترا انجام شود سپس ۱ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید افزوده شد تا واکنش قطع شود. بعد از افزودن معرفها جذب در ۷۰۰ نانومتر 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 pHهای مختلف ۵/۵، ۶/۵، ۷/۵، ۹ مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به شکل (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 می‌شود تقریباً اختلاف زیادی با هم دارند.

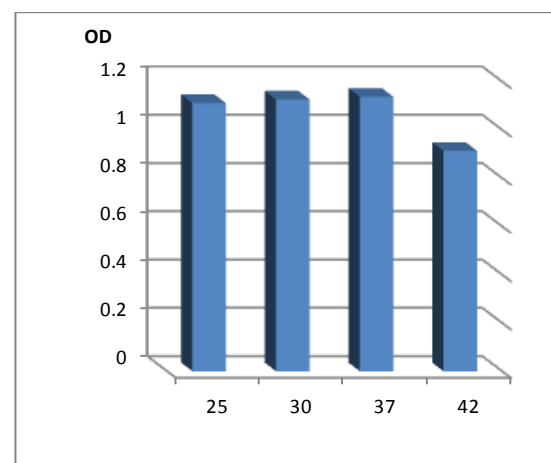


شکل ۱- بهینه سازی pH



تعیین دمای بهینه برای تولید آنزیم

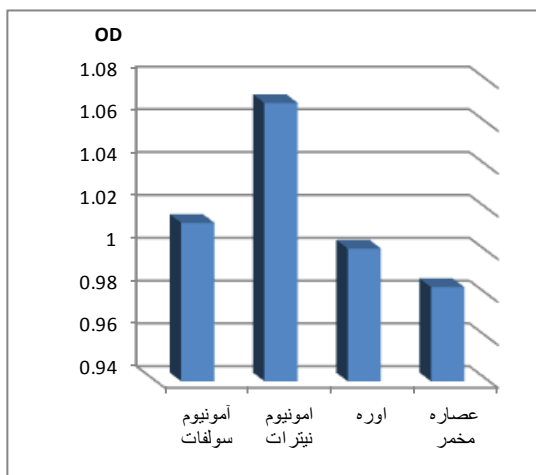
بر اساس آزمایشات صورت گرفته دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به شکل (۴) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بیشترین میزان تولید آنزیم و در ۴۲ درجه سانتی گراد کمترین میزان تولید آنزیم مشاهده شد و همچنین در دماهای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد میزان تولید آنزیم به تدریج افزایش یافت.



شکل ۴- بهینه سازی دما

تعیین منبع نیتروژن بهینه برای تولید آنزیم

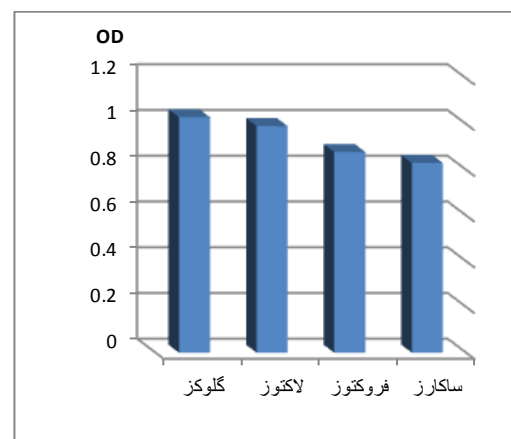
بر اساس آزمایشات صورت گرفته منابع مختلف نیتروژن مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به شکل (۶) آمونیوم نیترات بیشترین میزان تولید آنزیم را دارا بود که بعد از آن آمونیوم سولفات، اوره و در آخر عصاره مخمر بودند.



شکل ۶- بهینه سازی منبع نیتروژن

تعیین منبع کربن بهینه برای تولید آنزیم

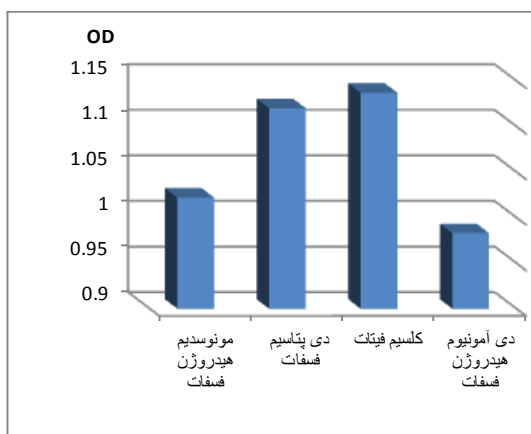
بر اساس آزمایشات صورت گرفته منابع مختلف کربن مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به شکل (۵) گلوکز بیشترین میزان تولید آنزیم را دارا بود سپس به ترتیب لاکتوز، فروکتوز و ساکارز بودند.



شکل ۵- بهینه سازی منبع کربن

تعیین منبع فسفر بهینه برای تولید آنزیم

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

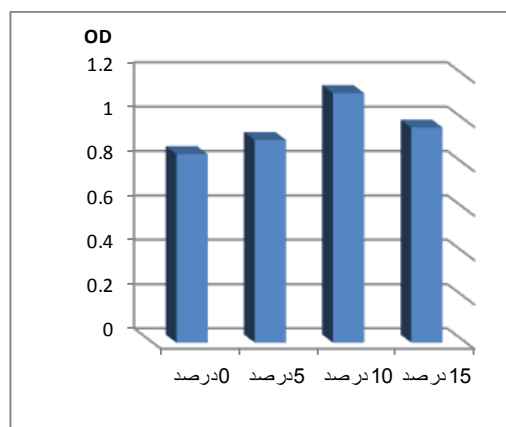


شکل ۷- بهینه سازی منبع فسفر



تعیین غلظت NaCl بهینه برای تولید آنزیم

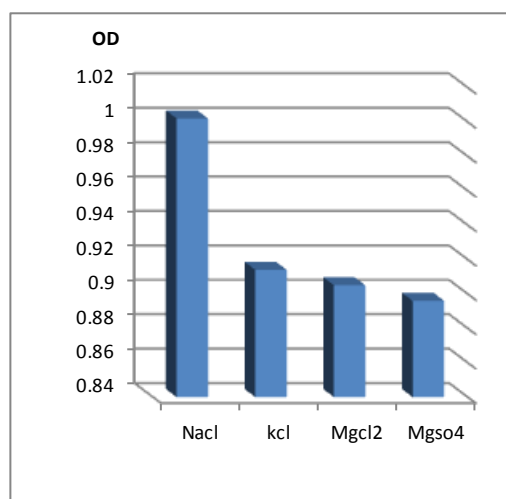
بر اساس آزمایشات صورت گرفته غلظت‌های مختلف NaCl بررسی قرار گرفت که با توجه به شکل (۸) در غلظت ۱۰ درصد بیشترین میزان تولید آنزیم مشاهده شد. و در ۰ و ۵ درصد به تدریج میزان تولید آنزیم افزایش یافته و مجدداً در غلظت ۱۵ درصد میزان تولید آنزیم کاهش یافت.



شکل ۸- بهینه سازی غلظت NaCl

تعیین اثر نمک‌های مختلف بر تولید آنزیم

بر اساس آزمایشات صورت گرفته اثر نمک‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به شکل (۹) در حضور NaCl بیشترین میزان تولید آنزیم مشاهده شد و در حضور $MgSO_4$ کمترین میزان تولید آنزیم مشاهده شد.



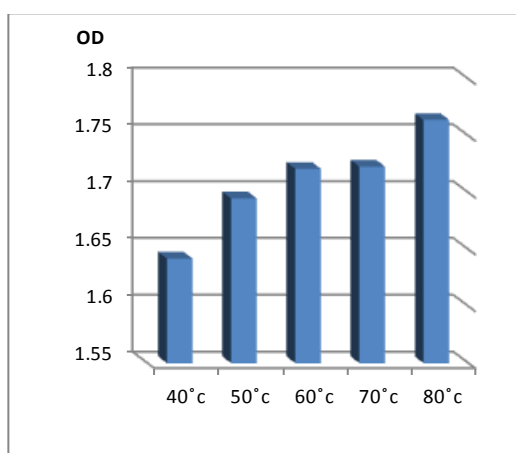
شکل ۹- تأثیر نمک‌های مختلف بر تولید آنزیم

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

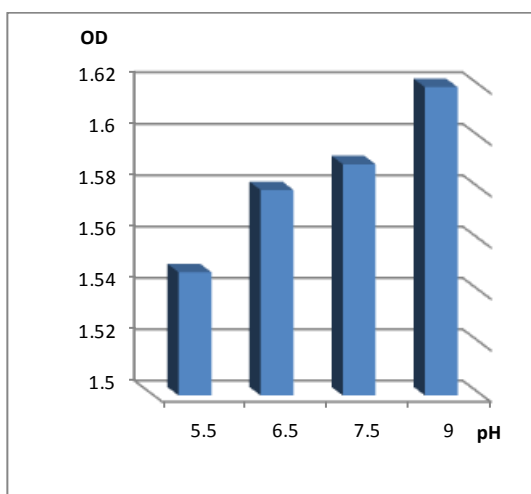
بر اساس آزمایشات انجام شده اثر دماهای مختلف بررسی شد که در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد بیشترین میزان فعالیت با 5.7unit/ppm مشاهده شد.



شکل ۱۰- اثر دما بر فعالیت آنزیم

اثر pH بر فعالیت آنزیم

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



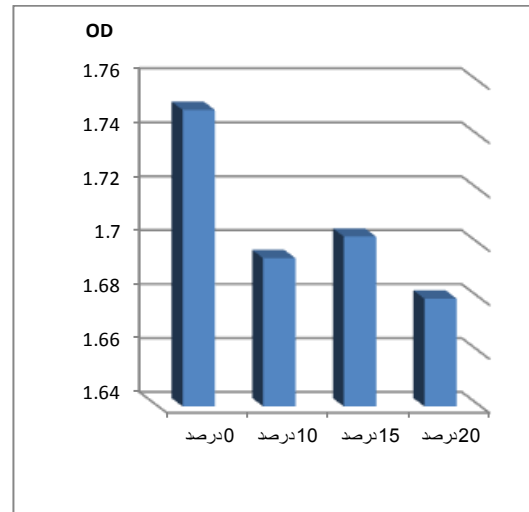
شکل ۱۱- اثر pHهای مختلف بر فعالیت آنزیم



Richardson و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی جداسازی باکتری‌های 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 سویه‌ها را به عنوان بهترین تولید کننده معرفی کنند. هاله شفافی که این سویه در محیط کشت ایجاد کرده است قطری برابر با ۳۹ سانتی متر دارد. این افراد سویه ی جدا شده را باسیلوس سوبتیلیس معرفی کردند. این باکتری U/ml ۳۷۸ 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 می‌باشد را جدا سازی کردند. یکی از اشکال عمده‌ی فسفات در خوراک دام با منشأ گیاهی به صورت فسفر می‌باشد. آنزیم فیتاز به طور گسترده در تغذیه‌ی حیوانات به منظور بهبود تغذیه و کاهش آلودگی فسفر در فضولات حیوانی استفاده می‌شود (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).

تعیین غلظت نمک NaCl بهینه در فعالیت آنزیم

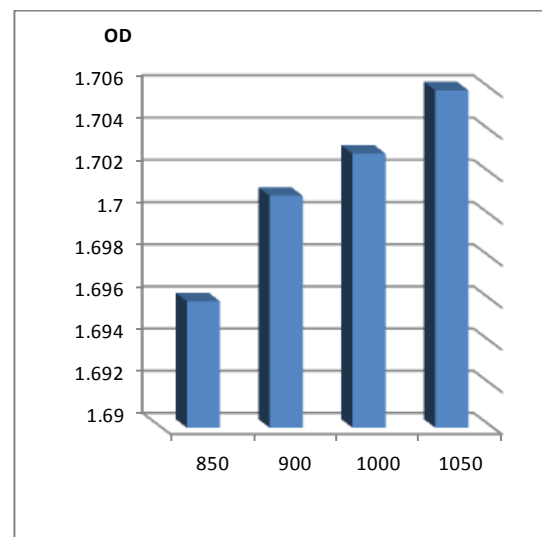
بر اساس آزمایشات انجام گرفته، غلظت‌های مختلف نمک بررسی شد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۰٪ با 5.5 unit/ppm مشاهده شد.



شکل ۱۲- اثر غلظت‌های مختلف نمک بر فعالیت آنزیم

تعیین غلظت سوبسترای بهینه در فعالیت آنزیم

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



شکل ۱۳- اثر غلظت‌های مختلف سوبسترا بر فعالیت آنزیم



منابع و مأخذ

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, Knietzsch 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, Poreess JM (2003). Phytase enzyology, applications, and biotechnology *Biotechnology Letters* 25:1787-1794.
7. Lei GX, Poreess 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 anhydro-oxymethilen diphosphorusaure 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.

