عزل وتحديد هوية بكتيريا منتجة لإنزيم الفايتاز من تربة سورية

رفان عبد الهادي[1] و أمل كورية[2] و بسام البلعة[3]

الملخّص

يعمل إنزيم الفايتاز على تفكيك حمض الفايتيك الى فوسفات أحادية لا عضوية وحلقة أينوسيتول متعددة الفوسفات، فغدا بذلك إنزيماً صنعياً هاماً وهدفاً للعديد من الأبحاث، ومنه هدفت هذه الدراسة إلى عزل بكتريا منتجة لإنزيم الفايتاز من عينات تربة متنوعة جمعت من مناطق مختلفة في ريف دمشق.حيث تم عزل15 عزلة بكترية منتجة لإنزيم الفايتاز بطريقة الطبق الصلب الحاوي على وسط الكشف عن فعالية الإنزيم، تبعه إجراء غربلة ثانوية لأفضل ثلاث عزلات في الوسط السائل لإنتاج الإنزيم. أظهرت نتائج الاختبارات المورفولوجية والحيوية الكيميائية (API 50 CH) أنّ العزلةC4 كانت الأكثر كفاءة في إنتاج الإنزيم وقد تمّ توصيفها، وتحديد هويتها وعرفت على أنها *Bacillussubtilis*.

الكلمات المفتاحية: فايتاز، فايتات الصوديوم، *Bacillussubtilis*.

(1) طالبة ماجستير، (2) أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.
(3) باحث، هيئة الطاقة الذرية، دمشق، سورية.

Isolation and identification of phytase producing bacteria from Syrian soil

Rafan, A.[(1)], A. Korieh[(2)] and B. Albalaa[(3)]

Abstract

Phytases are enzymes hydrolyzing phytic acid to less phosphorylated myo-inositol derivatives, releasing inorganic phosphate. Phytase has become an important industrial enzyme and is the object of extensive research. The objective of the present study was to isolate a potential phytase producing bacterial strains from soil samples of Damascus countryside in Syria. The phytase producing bacteria were primarily screened using PSM (phytase screening medium) plates, containing selectable media. Further; secondary screening had been done using LPSM media. From the (15) bacterial isolates, the isolate (C4) with high potential for phytase production was selected and identified by microscopic and traditional biochemical tests followedby (API 50 CH) system as *Bacillus subtilis*.

Keywords: Phytase, Sodium Phytate, *Bacillus subtilis*.

[(1)] MS student, [(2)] Prof. Food Sci. Dept. Fac. Agric., Damascus University, Syria.
[(3)] Post Dr.Researcher, Atomic Energy Commission of Syria.

المقدمة

يعد إنزيم الفايتاز من أهم الإنزيمات وهو إنزيم واسع الانتشار في الطبيعة (Pandey وزملاؤه، 2001)، حيث يوجد في الأحياء الدقيقة كالبكترياً والفطور والخميرة والأوليات كما يوجد في الخلايا النباتية للبذور وحبوب الطلع وبنسب أقل في خلايا الجذور (Konietzny وGreiner، 2002) لتأمين الفوسفور والأينوسيتول والمعادن الضرورية لنمو النبات وتطوره، أما في النسج الحيوانية فالمجترات تفرز الفايتاز في حين لا تفرزه أحاديات المعدة كالدواجن، الخنزير والأسماك، كما لا يفرزه الإنسان أيضاً.

يعمل إنزيم الفايتاز على ركيزة تدعى الفايتين، وهو ملح الصوديوم لحمض الفايتيك ($C_6H_6O_{24}P_6$) الذي تم عزله من بذور عديد من النباتات لأول مرة من قبل العالم Hartig عام (1855) ليصار فيما بعد إلى تحديد تركيبه الكيميائي المميز (Tran، 2010) باعتماد النمط المقترح من قبل Neuberg (1908) وAnderson (1914) هذا وتوجد أعلى نسبة لحمض الفايتيك في الحبوب وخاصة الذرة وفي البقول وخاصة البازلاء وفي البذور الزيتية وخاصة بذور السمسم واليقطين والكتان مشكلاً %(5-1) من الوزن الكلي لهذه الأغذية (Tuyet وزملاؤه، 2004) ومختزناً (85-75) من كمية الفوسفور فيها،علماً بأن الجزيئة الواحدة من حمض الفايتيك تحوي نسبة % (28.2) من الفوسفور (Hidvegi وLasztity، 2003). ويعد دور حمض الفايتيك كمكون في نقل الإشارات الخلوية وفي نظم نقل الفوسفات، أحد أهم وظائفه الفيزيولوجية في النسج النباتية والحيوانية (Almedia، 2010). ومن جهة أخرى يعد حمض الفايتيك مضاداً غذائياً Antinutrient لأنه يسلك في مجال واسع من رقم الحموضة سلوك أيون عالي الشحنة السالبة (Greiner وزملاؤه، 2006) مالكاً بذلك ألفة عالية للمركبات موجبة الشحنة، فيعمل على تشكيل معقدات مع الشوارد المعدنية والعناصر النادرة مانعاً إياها من الامتصاص في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوانات أحاديات المعدة (Coulibaly وزملاؤه، 2011) كما ويعمل على تشكيل معقدات مع كثير من الإنزيمات التي تقوم بعملية الهضم مثل الببسين، التربسين، ألفا أميلاز والبيتا غالاكتوزيداز مؤدياً لخفض فعاليتها (Singh وزملاؤه، 2011)، ومع النشاء أيضاً.

يقوم إنزيم الفايتاز بتفكيك حمض فايتيك إلى فوسفات أحادية لا عضوية وحلقة أينوسيتول متعددة الفوسفات مؤدياً لتحطيم المعقد الغذائي (Mullaney وزملاؤه، 2003) بحيث تصبح مكوناته من المعادن والعناصر النادرة والبروتينات والنشاء متاحة للامتصاص الهضمي في الحيوانات أحاديات المعدة والإنسان، هذا ويذكر أن حلقة الأينوسيتول المتحررة من التفاعل السابق تتصف بالعديد من التطبيقات الصيدلانية (Sigh وSatyanarayana، 2010) فيمكن أن تستخدم كمسكنات للألم وكعلاج للعديد من

الأمراض كالتهاب المفاصل والربو.هذا وتم تصنيف إنزيم الفايتاز بحسب لجنة تسمية الإنزيمات في الاتحاد الدولي للكيمياء الحيوية اعتماداً على موقع بدأ نزع مجموعة الفوسفات من جزيئة حمض الفايتيك إلى الصفينphytase (3-5) الموجود بالأحياء الدقيقة وphytase- (4-6) الموجود بالنبات، ويمتاز الصف الأول وهو المجموعة الأوسع بقدرته على إتمام نزع كافة مجموعات الفوسفات من جزيئة حمض الفايتيك مقارنة بالصف الثاني (Tran، 2010).ولإنزيم الفايتاز تطبيقات مهمة في عديد من المجالات الإنتاجية حيث تفيد إضافة إنزيم الفايتاز إلى علف أحاديات المعدة في تعزيز إتاحة الفوسفور والمعادن النادرة مثل (Cu، Mn، Zn، Fe) مما يؤدي إلى دعم النمو الطبيعي لهذه لحيوانات وضبط كمية الفوسفور المطروحة في مخلفاتها مما يساهم في التخفيف من تلوث البيئة باعتبار الفوسفور هو العامل الأكثر تلويثاً لها (Musapuor وزملاؤه، 2006). أما في مجال تغذية الإنسان فتؤدي إضافة هذا الإنزيم لغذاء الإنسان لرفع القيمة الغذائية للأغذية الآتية من مصدر نباتي (الحبوب والبقول) عن طريق تحسين إتاحة المعادن وهضم البروتين في أثناء عملية تفكيك الفايتين فيها إما خلال عمليات الهضم في الجهاز الهضمي أو خلال عمليات التصنيع الغذائي (MeorHussin وزملاؤه، 2009)،علماً بأن لإنزيم الفايتاز أهمية استثنائية في مجال الأغذية الوظيفية نظراً لاكتشاف قدرة الجنس *Bifidobacterium* على تفكيك حمض الفايتيك (Afinah وزملاؤه، 2010). ونذكر أخيراً أن أحد المجالات الصناعية المهمة لاستخدام الفايتاز هي استعماله كعامل حيوي في تفكيك حمض الفايتيك خلال عمليات تصنيع الورق، حيث يعد أحد عوامل التكنولوجيا النظيفة في إنتاج الورق بدلاً من استخدام الحموض المعدنية القاسية المؤدية لإنتاج مواد تصنيع وسيطة مسرطنة وسامة (Kerovuo، 2000).

ونظراً لأهمية التطبيقات الحالية والكامنة لإنزيم الفايتاز (Haefner وزملاؤه، 2005)، فقد هدف هذا العمل إلى عزل بكتريا منتجة لإنزيم الفايتاز من عينات مختلفة من التربة السورية مع تحديد هوية العزلة البكترية الأكثر كفاءة في إنتاج الإنزيم.

مواد البحث وطرائقه

تم جمع 30 عينة تربة متنوعة من مناطق مختلفة في ريف دمشق وحفظت في أكياس بلاستيكية بدرجة حرارة 4°س. تم تحضير معلق من كل عينة تربة باضافة 1غ تربة الى 10مل من الماء المقطر المعقم ومزجت جيداً وحضنت في حمام مائي بدرجة 30 °س لمدة ساعة، ثم تم تحضير سلسلة من التخفيفات لكل معلق من التركيز (10^{-2}) إلى التركيز (10^{-6}) وزرع 3 ميكروليتر من كل تخفيف على وسط مغذي صلب (AgarLB) وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37°س لمدة 24 ساعة لاختيار تخفيف الزراعة الأمثل من كل عينة (Hosseinkhani وزملاؤه، 2007).

ثم زرع 100 ميكروليتر من التخفيف الأمثل لكل عينة تربة على طبق بتري يحوي الوسط الانتقائي للكشف عن فعالية إنزيم الفايتاز والمكون من:

Glucose (1.5)%, (NH4)2SO4 (0.5)%, MgSO4.7H2O (0.01)%, KCL (0.05)%, NaCl (0.01) %, CaCl2.2H2O (0.01)%, FeSO4 (0.001)%, MnSO4 (0.001)%, Sodium Phytate (0.5)%, (1.5) % agar.

حيث ضبط رقم pH الوسط إلى 7 وعقم بواسطة الأوتوغلاف بدرجة حرارة 121°س لمدة 15 دقيقة (Shamna وزملاؤه، 2012). وتم تحضين الأطباق بدرجة حرارة 37°س لمدة ثلاثة أيام تم خلالها تحري الهالات الشفافة المتكونة حول المستعمرات البكتيرية والتي تعد مؤشراً لإنتاج المستعمرة لإنزيم الفايتاز كونها ناتجة عن تفكيك الإنزيم للركيزة (فايتات الصوديوم)، زرعت المستعمرات المختلفة عن بعضها بالشكل على وسط مغذي صلب (AgarLB) بالظروف السابقة نفسها، وحفظت العزلات النقية في وسط مغذي (BrothLB) يحتوي 40% غليسيرول في الدرجة 20-°س، ثم أعيد زرع هذه العزلات على أطباق تحوي الوسط الانتقائي للإنزيم مع التحضين بدرجة حرارة 37°س لمدة ثلاثة أيام بهدف قياس قطر الهالة (Z) وقطر المستعمرة (C) بدقة لحساب كفاءة الحلمهة الإنزيمية لكل عزلة حسب المعادلة (Z-C/C) وتم اختيار العزلات الأفضل كفاءة (R5-C2-C4) لإجراء الغربلة الثانوية.

لُقّح معلق بكتيري 10^6 خلية/مل لكل من العزلات المختارة (R5-C2-C4) حدد بحسب المعامل البكتيري بدلالة (OD~600nm) في دورق سعة 100 مل يحتوي 30 مل من الوسط السائل لإنتاج إنزيم الفايتاز (نفس تركيب الوسط الصلب دون إضافة آغار) وحضنت الدوارق في حاضنة متحركة بسرعة 200 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 37°س ولمدة 72 ساعة (Mukesh Kumar وزملاؤه، 2011). تم الحصول على الطافي الحاوي على الإنزيم بثفيل الوسط بسرعة 4000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4°س، وعُدّت مستخلصاً للإنزيم (Gulati وزملاؤه، 2007). ولقياس فعالية إنزيم الفايتاز اعتمدت طريقة (Heinonen و Lahti، 1981) والتي تعتمد على تحضين الإنزيم مع الركيزة ثم إيقاف التفاعل باستخدام (TCA) ثم إضافة الكاشف الملون (مولبيدات الأمونيوم وكبريتات الحديد) وقياس كمية الفوسفور اللاعضوية الناتجة عن تفكيك الإنزيم للركيزة بدلالة (OD~700nm) بمكررين للتجربة.

وعرفت وحدة الفعالية لإنزيم الفايتاز بكمية الإنزيم القادرة على تحرير (1unit.mol) من الفوسفات اللاعضوية في الدقيقة في 1 مل في شروط التجربة.

واختيرت العزلة الأفضل كفاءة بإنتاج الإنزيم لإجراء اختبارات تحديد الهوية بهدف الدراسة اللاحقة لخصائص الإنزيم الذي تفرزه هذه العزلة (Sigh وزملاؤه، 2013). حيث درست الاختبارات الشكلية والحيوية الكيميائية للعزلة (C4) بحسب Bergey للتصنيف البكتيري للوصول إلى جنس العزلة وباستخدام نظام (API 50 CH) لتحديد نوعها.

النتائج والمناقشة

عزل وغربلة البكتريا المنتجة لإنزيم الفايتاز من التربة:

عزلت البكتريا المنتجة لإنزيم الفايتاز في هذه الدراسة من ترب متنوعة (تربة محيطة بجذر البقوليات- تربة حظائر المجترات- تربة المداجن) في ريف دمشق باستخدام طريقة الطبق الصلب. وقد أظهرت 15 عزلة بكتيرية القدرة على إنتاج إنزيم الفايتاز حيث أعطت هالات واضحة على الطبق والتي كان منها 9 عزلات من التربة المزروعة بالبقوليات وأشير لها بالرمز (R1-R9) و4 عزلات من تربة حظائر المجترات وأشير لها بالرمز (C1-C4) وعزلتان من تربة المداجن والتي أشير لها بالرمز (P1-P2). وبعد أن أعيدت زراعة كافة العزلات بطريقة الطبق الصلب من جديد تم قياس قطر المستعمرة (C) وقطر الهالة (Z) لكل منها وحسبت كفاءة الحلمهة لها (الجدول 1) فتراوحت بين % (50-5)، حيث أبدت العزلة (C4) أفضل كفاءة 50% (الشكل 1).

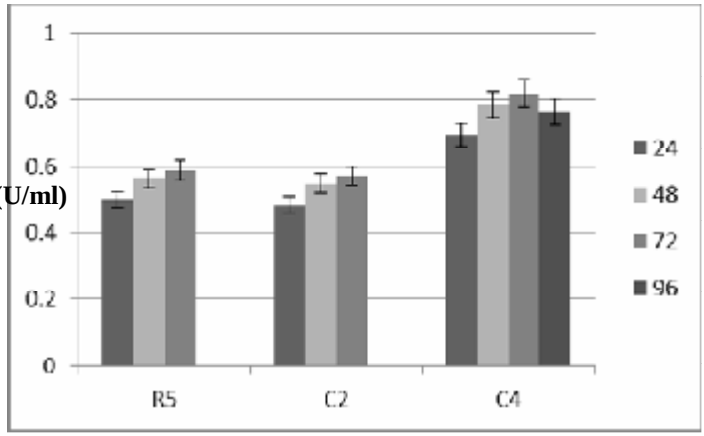
الجدول (1) كفاءة الحلمهة عند العزلات البكترية المعزولة من التربة السورية والمنتجة لإنزيم الفايتاز.

رقم العزلة	C (mm)قطر المستعمرة	Z (mm)قطر الهالة	كفاءة الحلمهة (%)
R1	4.0	4.2	5
R2	2.3	2.7	17
R3	3.0	4.0	33
R4	3.0	3.3	10
R5	1.4	1.9	36
R6	2.6	3.4	31
R7	2.9	3.4	17
R8	2.2	2.7	23
R9	2.6	3.2	23
C1	3.1	3.3	6
C2	2.0	2.7	35
C3	1.8	2.3	28
C4	1.6	2.4	50
P1	8.0	9.0	13
P2	5.0	6.0	20

الشكل (1) الهالة المتشكلة حول العزلة (C4) على الوسط الصلب PSM.

وهذا يتوافق مع الدراسات (Konietzny وGreiner، 2004) التي أكدت قدرة عديد من الأجناس البكترية مثل*Bacillus,Lactobacillus, Escherichia coli, Pseudomonas* على إنتاج إنزيم الفايتاز.

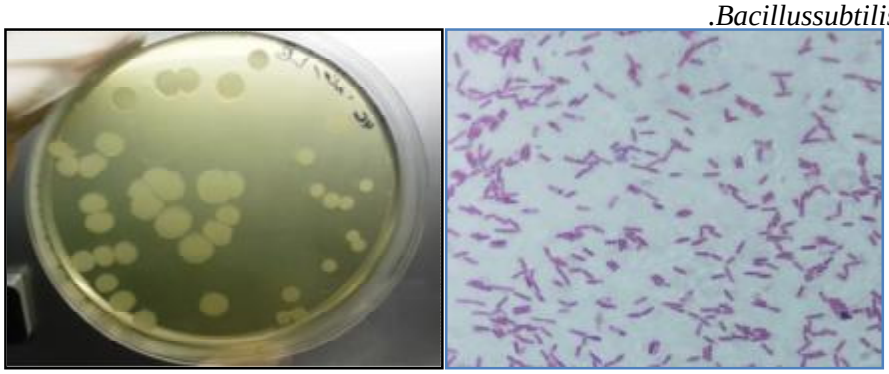
اختيرت العزلات (R5-C2-C4) ذات أفضل كفاءة حلمهة على الطبق الصلب PSM ليجرى عليها الغربلة الثانوية في الوسط السائل لإنتاج الإنزيم LPSM في شروط ثابتة من درجة الحرارة 37 °س ورقم pH (7) وزمن تحضين 72 ساعة (Vats وBanerjee، 2004). فأبدت العزلة (C4) أعلى فعالية إنزيمية 0.818 وحدة إنزيمية/مل (الشكل 2) واختيرت بالتالي لإجراء اختبارات تحديد الهوية بهدف الدراسة اللاحقة لخصائص الإنزيم الذي تفرزه هذه العزلة. ولأن زمن التحضين هو العامل الأهم عند أمثلة شروط إنتاج الإنزيم تمت دراسة تأثير استمرار التحضين بنفس الشروط للعزلة المختارة (C4) فوجد بأنها تحقق أعلى فعالية إنزيمية لها في زمن التحضين 72 ساعة ويعود انخفاض الفعالية الإنزيمية بعدها عند زمن التحضين 96 ساعة إلى تخرب الطبيعة البروتينية للإنزيم بحيث يصبح الإنزيم غير قادر على تحفيز التفاعل الكيميائي. وهذا يتوافق مع دراسات Noorbatcha وزملاؤه (2009) وTahir وزملاؤه (2010).



الشكل (2) مقارنة كفاءة العزلات (R5-C2-C4) في انتاج انزيم الفايتاز بالوسط السائلLPSM.

تحديد هوية العزلة البكترية المنتخبة(C4):

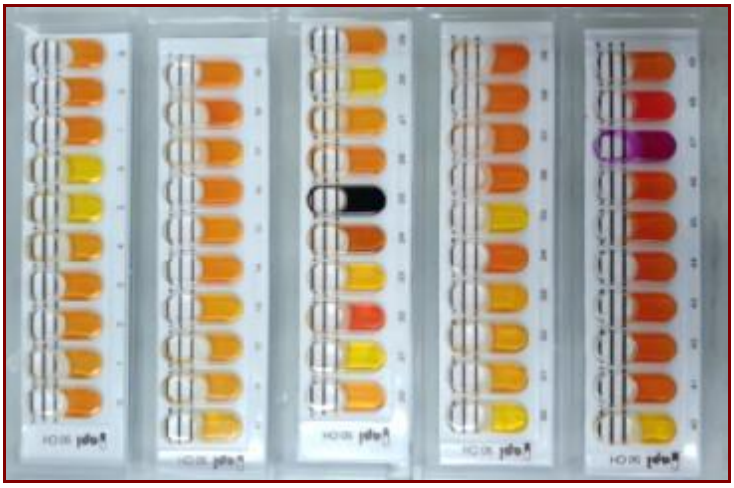
صنفت العزلة (C4) اعتماداً على تصنيف Bergey لتحديد جنسها (Krieg وزملاؤه، 1984) الجنس *Bacillus* وباستخدام نظام (API 50 CH) أنها من النوع *Bacillussubtilis*.



الشكل (3) A يوضح شكل المستعمرة للعزلة (C4)و B يوضح شكل خلايا العزلة (C4) بصبغ غرام بعد تحضينها في (LB Agar) بدرجة حرارة (37) °س لمدة (24) ساعة.

الجدول (2) نتائج الاختبارات الشكلية والحيوية للعزلة(C4).

الاختبار	النتيجة	الاختبار	النتيجة	الاختبار	النتيجة	الاختبار	النتيجة
الشكل	عصوية	الحركة	متحركة	إرجاع النترات	+	تخمير اللاكتوز	+
الأبواغ	متبوغة	اختبار الكاتالاز	+	غاز H2S	+	تخمير الغلوكوز	+
هوائية	+	اختبار الأوكسيداز	+	اختبار الإندول	-	اختبار اليوريا	+



الشكل (4) نتائج تحديد هوية العزلة (C4)باستخدم نظام (API 50 CH).

الجدول (3) نتائج تحديد هوية العزلة (C4) باستخدم نظام (API 50 CH).

1.GLY	+	8.ADO	-	15.RHA	-	22.NAG	-	29.LAC	-	36.AMD	+	42.DFUC	-
2.ERY	-	9.MDX	-	46.DUL	-	23.AMY	±	30.MEL	+	37.GLYG	+	43.LFUC	-
3.DARA	-	10.GAL	-	17.INO	+	24.ARB	±	31.SAC	+	38.XLT	-	44.DARL	-
4.LARA	+	11.GLU	+	18.MAN	+	25.ESC	+	32.TRU	+	39.GEN	-	45.LARL	-
5.RIB	+	12.FRU	+	19.SOR	-	26.SAL	±	33.INU	+	40.TRU	-	46.GNT	-
6.DXYL	+	13.MNE	-	20.MDM	-	27.CEL	±	34.MLZ	-	41.LYX	-	47.2KG	-
7.LXYL	-	14.SBE	-	21.MDG	±	28.MAL	±	35.RAF	+	42.TAG	-	49.5KG	-

Terms:GLY: Glycerol, ERY: Erythritol, DARA: D-Arabinose, LARA: L-Arabinose, RIB: D-Ribose, DXYL: D-Xylose, LXYL: D-Xylose, ADO: D-Adonitol, MDX: Methyl-ßD-Xylopyranoside, GAL:D-Galactose, GLU:D-Glucose, FRU: D-Fructose, MNE: D-Mannose, SBE: L-Sorbose, RHA:L-Rhamnose, DUL: Dulcitol, INO: Inositol, MAN: D-Mannitol, SOR: D-Sorbitol, MDM: Methyl-αD-Mannopyranoside, MDG: Methyl-αD-Glucopyranoside, NAG: N-Acetyl Glucosamine, AMY: Amygdalin, ARB: Arbutin, ESC: Esculin ferric citrate, SAL: SALicin, CEL: D-Cellobiose, MAL: D-Maltose, LAC: D-Lactose (bovine origin), MEL:D-Melibiose, SAC: D-Saccharose (sucrose), TRE: D-Trehalose, INU: Inulin, MLZ: D-Melezitose, RAF:D-Raffinose, AMD: Amidon (starch), GLYG: Glycogen, XLT: Xylitol, GEN: Gentiobiose, TUR: D-Turanose, LYX: D-Lyxose, TAG: D-Tagatose, DFUC: D-Fucose, LFUC: L-Fucose, DARL: D-Arabitol, LARL: L-Arabitol, GNT: Potassium Gluconate, 2KG: Potassium 2-Ketogluconate, 5KG: Potassium 5-Ketogluconate.

تتوافق هذه النتائج مع العديد من الدراسات التي أثبتت امتياز النوع *Bacillus subtilis* بقدرته على إنتاج العديد من الإنزيمات الهامة صناعياً خارج الخلية البكترية ومنها إنـــزيم الفايتاز (Konietzny و Greiner، 2004) وبالتالي أهمية الحصول على عزلات بكتريـــة محلية قادرة على إنتاج إنزيم الفايتاز لتعزيز القيمة الغذائية للأغذية النباتيـــة المـــستهلكة بكثرة في سورية (الحبوب والبقول) وزيادة مردود الأعلاف للحيوانات من جهة، ولتعزيز انتاجه على المستوى التجاري محلياً مما يغني عن استيراده بتكلفة مرتفعـــة مـــن جهـــة أخرى.

الاستنتاجات

تم عزل 15 عزلة بكتيرية منتجة لانزيم الفايتاز من مـــصادر متنوعـــة مـــن التربـــة السورية وتم تحديد هوية العزلة (C4) الأكثر كفاءة في إنتاج الإنزيم في الوسط الـــصلب PSM وفي الوسط السائل LPSM بواسطة الاختبارات المورفولوجية والحيوية الكيميائية على أنها *Bacillus subtilis*. يقترح في دراسات لاحقة أمثلة ظروف إنتاج هذا الإنـــزيم وتوصيفه بعد تنقيته، وعزل المورثة المسؤولة عن إنتاجه وتنسيلها. علماً بأنه من المفيـــد تنقية حلقة الأينوسيتول المتحررة من التفاعل الذي يقوده الإنزيم لأهميتها الصيدلانية.

References

Afinah, S., A. M. Yazid, M. H. Anis Shobirinand M. Shuhaimi. 2010. Phytase: Application in food industry. International Food Research Journal., 17:13-21.

Almedia, F. N. 2010. Effects of microbial phytase on the standardized total tract digestibility of phosphorus in soybean meal, corn, and corn co-products. Master Thesis, University of Illinois, Urbana,Champaign., 1: 4-18.

Coulibaly, A., B. Kouakou and J. Chen. 2011. Phytic acid in cereal grains: Structure, healthy or harmful ways to reduce phytic acid in cereal grains and their effect on nutritional quality. American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology. 1:1-22.

Greiner, R., U. Konietzny and D. K. Jany. 2006. Phytate- an undesirable constituent of plant-based foods. J. fürErnährungsmedizin., 8:18-28.

Gulati, H. K., B. S. Chadha and H. S. Saini. 2007. Production and phyttase characterization of the rmostable from Bacillus leavolacticus isolated from rhizosphere soil. J IndMicrobiol Biotechnol. 34:91-98.

Haefner, S., A. Knietsch, E. Scholten, J. Braun, M. Lohscheidt and O. Zelder. 2005. Biotechnological production and applications of phytases. Appl Microbial Biotechnol. 68: 588-597.

Heinonen, J. K., and R. J. Lahti. 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. Analytical Biochem. 113:313-317.

Hidvegi, M., and R. Lasztity. 2003. Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins. Periodica polytechnic ser.chem.eng., 46:59-64.

Hosseinkhani, B., G. Emtiaziand I. Nahvi. 2007. Analysis of phytase producing bacteria (Pseudomonas sp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production. African Journal of Biotechnology. 8:4229-4232.

Kerovuo, J. 2000. A Novel phytase from Bacillus, characterization and production of the enzyme. Master Thesis, Faculty of Science of the University of Helsinki,Finland., 1 (12-14): 28-29.

Konietzny, U., and R. Greiner. 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). International Journal of Food Science and Technology., 37:791-812.

Konietzny, U., and R. Greiner. 2004. Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. Brazilian Journal of Microbiology., 35: 11-18.

Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins Co.,Baltimore., 1:1-8.

MeorHussin, A. S., A. Faroukand R. Greiner. 2009. Potential phytate-degrading enzyme producing bacteria isolated from Malaysian maize plantation. African Journal ofBiotechnology., 8:3540-3546.

Mukesh Kumar, D. J., M. D. Balakumaran, P. T. Kalaichelvan, A. Pandey, A. Singh and R. B. Raja. 2011. Isolation, production & application of extracellular Phytase by Serratiamarcescens. ASIAN J. EXP. BIOL. SCI.,2: 663-666.

Mullaney, E. J., and AH. J. Ullah. 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 312:179-184.

Musapuor, A., M. Afsharmanesh and H. M. Shahrbabak.2006. Use of microbial phytase for decrease of pollutant due to environmental poultry excreta phosphorus. International Journal of Agriculture & Biology. 8:35-37.

Noorbatcha, I. A., N. Samsudin and H. M. Salleh. 2009. Modification and characterization of phytases. International Conference On Chemical & Bioprocess Engineering. 1: 34-35.

Pandey,A.,G. Szakacs,C. R. Soccol, J. A. Rodriguez-Leonand V. T. Soccol. 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. Bioresource Technology. 77:203-214.

Shamna, K. S., KC. P. Rajamanikandan, D. J. Mukesh Kumar, M. D. Balakumaran and P. T. Kalaichelvan. 2012. Extracellular production of phytases by a native Bacillus subtilis strain. Annals of Biological Research. 3:979-987.

Singh, B., and T. Satyanarayana. 2010. Application of phytase. Journal of scientific & Industrial Research. 69:411-414.

Singh, B.,G. Kunze, and T. Satyanarayana. 2011. Developments in biochemical aspects and biotechnological applications of microbial phytases. Biotechnology and Molecular Biology Review., 6:69-87.

Singh, N. K., D. K. Joshiand R. K. Gupta. 2013. Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters. Jundishapur Journal of Microbiology., 6:6419.

Tahir, A., B. Mateen, S. Saeedand H. Uslu. 2010. Studies on the production of commercially important phytase from decaying organic soil. Micrologia Aplicada International. 22: 51-57.

Tran, T. T. 2010. Thermostable phytase from a Bacillus sp. heterologous production, mutation, characterization and assay development. Doctoral Thesis, Department of Biotechnology Lund University,Sweden. 1: 17.

Tuyet, T. T., N. D. Longand H. Q. Khanh. 2004. Production of phytase by Aspergillus niger NRRL 363. Journal of Agricultural Sciences and Technology. 4:28-32.

Vats, p., and U. C. Banerjee. 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (Myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. Enzyme and Microbial Technology. 35:3-14.

Received	**2014/12/23**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2015/04/22**	**قبول البحث للنشر**