



ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

# فیتاز از باکتری *Weissella halotolerans*: تخلیص، مشخصات جزئی و

## اثر برخی فلزات

### چکیده

در این مطالعه، فیتاز در سه مرحله ساده شامل رسوب سولفات آمونیم، تبادل آنیون و کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل از *Weissella halotolerans* تخلیص گردید. این آنزیم با فعالیت مخصوص 227.73 EU/mg و بهبود 6.52% بدست آمد. جرم مولکولی این آنزیم به اندازه 41.52 kDa بود. بهینه pH و درجه حرارت مطلوب برای آنزیم به ترتیب به ترتیب 6.0 و 50 درجه سانتیگراد بود. بعلاوه، اثرات یونهای فلزی روی آنزیم بررسی شد. یون های  $Ag^+$ ،  $Zn^{2+}$ ،  $Fe^{2+}$ ،  $Cr^{2+}$  مهار فیتاز را به ترتیب با 21.86، 25.63، 32.82 و 90.43% انجام دادند در صورتیکه یون های  $Co^{2+}$ ،  $Cu^{2+}$ ،  $Pb^{2+}$ ،  $Cd^{2+}$  و  $Mn^{2+}$  باعث افزایش فعالیت آنزیم شدند.

### مقدمه

اسید فیتیک (میواینوزیتول هگزاکیس فسفات) یک ترکیب متداول غذاهای گیاهی است و از 1 تا 5 درصد وزنی ذرت بوداده خوردنی، گرده گل، و روغن فندق و دانه ها تشکیل شده است. این ماده یک شکل آلی فسفر می باشد که 60 تا 90 درصد کل محتوای فسفر را تشکیل می دهد و نقش ضد عفونی کننده ای دارد. گرچه آنها در بسیاری عملکردهای فیزیولوژیکی، به ویژه در جوانه زنی دانه مهم هستند، فیتاتها تنها به عنوان ترکیبات ضد تغذیه ای در نظر گرفته می شوند چون نشاسته و پروتئین ها را بهم متصل می کنند. فیتازها هضم پروتئین را تحت تاثیر قرار می دهند و با پروتئین ها واکنش می دهند و حتی فعالیت آنزیم های گوارشی را مهار می کنند. آنها همچنین دارای اثر شلات سازی قوی روی عناصر معدنی دوظرفیتی شامل  $Ca^{2+}$ ،  $Mg^{2+}$ ،  $Zn^{2+}$  و  $Fe^{2+}$  می باشند. گرچه یک شلات کننده قوی آهن و روی در غذاهای گیاهی می باشد، در نتیجه اینکه فیتات یک واسطه برای این فلزات می باشد، در واقع به عنوان آنتی اکسیدانی عمل می کند که فرم های رادیکال آزادشان را کاهش می دهد. تجزیه موثر اسید فیتیک از طریق تجزیه آنزیمی و نیز غیر آنزیمی بدست می آید. تجزیه آنزیمی با استفاده از فیتازی بدست می آید که مشتق از انواع قارچ و باکتری هاست. هیدرولیز غیر آنزیمی

طی فراوری مواد غذایی یا حذف فیزیکی فیتات از دانه های گیاهی غنی از فیتات برای کاهش میزان فیتات در محصولات غذایی نهایی استفاده می شود.

فیتاز (میو-اینوزیتول هگزاکسیس فسفات فسفوهدرولاز E.C.3.1.3.8) پیوندهای مونواستری فسفری را در اسید فیتیک و فیتات تجزیه می شکند. این امر منجر به یک سری رهایی فسفات استر از اینوزیتول می شود؛ از اینرو، این ماده پذیرش سریع جهانی را به عنوان یک افزودنی غذایی و خوراک دام بدست آورد. در دو دهه گذشته، توجه دانشمندان و کارآفرینان را برای تغذیه، حفاظت از محیط زیست و سایر کاربردهای بیوتکنولوژی جلب کرده است. فیتات ها دارای کاربردهای بسیاری در محلولهای میواینوزیتول فسفات دارند. بعلاوه، آنها به عنوان پیش سازها و بهبود دهنده های خاک در نیمه سنتز پراکسیدازها در صنعت کاغذسازی و در رشد گیاه استفاده می شوند. نیز در کنار کاربردشان در آبی پروری، کاربرد های مهمی در تغذیه انسان دارند. از اینرو، فیتازها به عنوان مواد غذایی و افزودنی های خوراکی به طور گسترده ای استفاده می شوند و برای کاهش آلودگی فسفر در خوراک دام استفاده می شوند.

با توجه به ثبات در دمای بالا، اختصاصی بودن سوبسترای فیتات، مقاومت به پروتئولیز و مشخصات pH وسیع، فیتازهای باکتری مزیت قابل توجهی نسبت به فیتاز های قارچی دارند. بنابراین، تخلیص و تعیین مشخصات فیتازها، که ثبات حرارتی دارند و در pH خنثی فعالند، دارای کاربردهای صنعتی مهمی هستند. در این مطالعه، فیتاز از باکتری های اسید لاکتیک به نام *Weissella halotolerans* در سه مرحله شامل رسوب سولفات آمونیم، کروماتوگرافی تبادل آنیونی Q-Sepharose و ستون فیتراسیون ژل Sephadex G-100 تخلیص گردید. خواص مشخصه آنزیم تعیین شد و اثرات یونهای فلزی روی فعالیت آنزیم بررسی گردید.

## مواد و روشها

### مواد شیمیایی

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از نوع درجه معرف بودند و از شرکت مواد شیمیایی سیگما (شهر سنت لوئیس میسوری) و شرکت مرک میلی پور (شهر Darmstadt در FRG) خریداری گردید.

### روش های میکروبیولوژیکی

### جداسازی میکروارگانیسم های باکتریایی

محیط کشت های MRS استاندارد (برند Rogosa, Man و Sharpe) بروث و آگار MRS برای جداسازی استفاده شد. پس از اینکه رقت هایی از منابع مختلف تهیه شد، آنها به محیط کشت آگار MRS تلقیح شدند. روشهای پلیت ریختنی و گسترده استفاده گردید و جدا سازی ها سه مرتبه انجام گردید. میکروارگانیسم ها در دمای 33-37 درجه سانتیگراد انکوبه شدند و کلنی های حاصله آنها مجدداً تلقیح گردید تا کشت خالص بدست آید.

### محافظت از کشت باکتریایی

مقدار یک لوپ باکتری از کشت خالص 24 ساعته گرفته شد و به لوله های اپندورف حاوی 500 میکرولیتر از گلیسرول 30 درصد و 500 میکرولیتر محیط کشت بروث LB (برند Luria-Berani) منتقل گردید (که با افزودن 10 گرم تریپتون، 10 گرم NaCl و 5 گرم عصاره مخمر به 1 لیتر dH<sub>2</sub>O تهیه گردید) و برچسب گذاری شد. سپس، آنها را در یک همزن مخلوط کرده و برای استفاده در آینده در دمای منهای 80 درجه سانتیگراد ذخیره شدند. بعداً، باکتری هایی که بر روی آگار MRS رشد کرده بودند، به محیط کشت بروث MRS تهیه شده (برند تجاری Oxoid) منتقل شدند تا انتقالشان به محیط کشت مایع انجام گیرد و برای انکوباسیون در دمای 33-35 درجه سانتیگراد به مدت 7 روز باقی ماندند.

### تعیین برخی خصوصیات ژنتیکی سویه ها

برای تعیین توالی DNA، نواحی 16S rDNA با روش PCR تقویت سازی گردید. آمپلی کون های نتیجه شده به شرکت Macrogen Inc. برای کسب خدمات مربوطه ارسال گردید.

الف) جداسازی DNA ژنومی سویه ها: کشت جوان سویه ها برای جداسازی DNA ژنومی آماده گردید. جداسازی DNA از باکتری هایی که با سانتریفوژ کشت های جوان رسوب داده شد، بر اساس روش کار انجام گردید.

ب) تقویت ژن 16S rRNA با روش PCR: منطقه ای که 16S rRNA را سنتز می کند که برای سیستماتیک باکتری ها ارزشمند است، به عنوان منطقه هدف انتخاب شد و با استفاده از پرایمرهای معمول [27F (forward 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), 1492R (reverse 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')] تحت شرایط آزمایشگاهی *in vitro* تکثیر گردید.

ج) تعیین توالی پایه ژن 16r RNA و مقایسه آن با توالی ها در پایگاه داده GenBank: تجزیه و تحلیل تعیین توالی پایه ژن های 16S rDNA تکثیر شده توسط PCR با آنالیزورهای توالی خودکار انجام شد (تجزیه توالی خودکار در شرکت Macrogen تحت قراردادی انجام شد). توالی های منتج 16S rDNA با توالی های باکتریایی ثبت شده در پایگاه داده GenBank (وب سایت <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi> به نام آنالیز BLAST) مقایسه گردید. میزان تشابه توالی ها براساس این مقایسه تعیین گردید و شماره دستیابی آنها در GenBank ثبت گردید.

### تخلیص فیتناز

#### رسوب سولفات آمونیوم

کل فرایند تخلیص در دمای بالای 4 درجه سانتیگراد انجام شد مگر این که ذکر گردد. پس از رشد 7 روزه باکتری *Weissella halotolerans*، فیتناز بدست آمده از *Weissella halotolerans* به مدت 30 دقیقه در دور 24000xg سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، سوپرناتانت پس از سانتریفوژسازی و بتدریج با سولفات آمونیوم جامد به ترتیب در اشباعیت های 0-20٪، 20-30٪، 30-40٪، 40-50٪، 50-60٪، 60-70٪ و اشباع 70-80٪ رسوب داده شد. در طی هر رسوب، سانتریفوژ به مدت 20 دقیقه در دور 24000xg انجام گردید. پلت در بافر سدیم استات 50 mM با pH برابر با 5.5 حل گردید. نمونه بدست آمده با رسوب سولفات آمونیوم به یک کیسه دیالیز منتقل شد و طبق بافر دیالیز (سدیم استات 10 mM با pH برابر با 5.5) دیالیز گردید.

#### کروماتوگرافی تبادل آنیونی Q-Sepharose

محلول آنزیم که پس از دیالیز به دست آمده، به ستون تبادل آنیونی Q-Sepharose وارد گردید که با بافر سدیم استات 50 mM با pH برابر با 5.5 متعادلسازی گردید. رقیق سازی گرادیانی با استفاده از 0-1 M NaCl انجام گردید. سرعت جریان ستون در حد 15 mL/h تنظیم گردید و رقیق سازی ها به لوله های دارای حجم 3mL منتقل گردید. فعالیت هر رقت در 700 نانومتر تعیین گردید. لوله هایی که فعالیت را نشان دادند با یکدیگر ترکیب شدند.

## کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل Sephadex G-100

محللول آنزیم حاصل از ستون Q-Sepharose در ستون Sephadex G-100 وارد شد که با بافر سدیم استات 50 mM با pH برابر با 5.5 متعادلسازی گردید. ستون فیلتراسیون ژل Sephadex G-100 طبق مطالعات قبلی مان تهیه گردید. سپس، رقت های 1 میلی لیتری به لوله منتقل شد. فعالیت هر نوع رقت سازی در 700 نانومتر تعیین گردید.

### تعیین فعالیت فیتاز

فعالیت فیتاز طبق مطالعه انجام شده توسط Zou و همکارانش انجام گردید. نمونه های حاوی فیتاز (0.1 mL) در دمای 50 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه انکوبه شدند بعد از اینکه 0.25 mL از سدیم فیتات (حل شده در 100mmol/L از سدیم استات در pH برابر با 5.5) اضافه گردید. پس از هیدرولیز، تری کلرواستیک اسید (TCA) با نسبت 10 w/v درصد اضافه شد و واکنش خاتمه یافت. فسفات معدنی که از فیتات سدیم آزاد شد، با افزودن مولیبدات آمونیوم، اسید سولفوریک و سولفات آهن، به روش کالری سنجی تعیین گردید. پس از 15 دقیقه واکنش، نمونه روی نمونه کور در 700 نانومتر رنگ بری کننده اندازه گیری شد. واحد فیتاز به صورت فعالیتی تعریف گردید که 1 $\mu$ mol فسفر معدنی در هر دقیقه از سدیم فیتات آزاد می شود.

### تعیین پروتئین

غلظت پروتئین طبق روش برادفورد با رنگ آمیزی با رنگ آبی Coomassie Brilliant Blue G-250 و با استفاده از آلبومین سرم گاوی طبق استاندارد اندازه گیری گردید.

### آنالیز SDS-PAGE

پس از تخلیص آنزیم، درجه خلوص آنزیم طبق روش Laemmli با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید سولفات دودسیل سدیم نوع 3 الی 8 درصدی (SDS-PAGE) کنترل گردید. فرایند الکتروفورز بر اساس مقالات قبلی مان انجام شد. ژل با روش رنگ آمیزی نقره رنگ آمیزی شده و پس از رنگ زدایی از آن عکس گرفته شد.

بررسی بهینه pH و pH ثابت

در مطالعه بهینه pH، فعالیت آنزیم با استفاده از محلولهای بافری سدیم استات 100mM (با pH برابر با 2 الی 6)، تریس-HCl (با pH برابر با 7 الی 9) و سدیم کربنات (با pH برابر با 10 الی 12) و مقدار pHی که در آن

انزیم فعالیت حداکثری را نشان داد، تعیین گردید. در مطالعه pH ثابت، انزیم در محلولهای بافری قبلی نگهداری شد و فعالیت آن هر 12 ساعت یک بار برای مدت 4 روز اندازه گیری گردید.

### مطالعات بهینه درجه حرارت و ثبات درجه حرارت

درجه حرارت با استفاده از فیتات سدیم به شکل جداگانه بین 10 و 90 درجه سانتیگراد بررسی گردید. برای تعیین قابلیت ثبات درجه حرارت، انزیم در هر دامنه درجه حرارت برای مدت 3 ساعت نگهداری شد و در فواصل 30 دقیقه ای اندازه گیری گردید.

### اثرات یونهای فلزی روی فعالیت انزیم

اثرات یونهای فلزی روی فیتاز با افزودن یونهای فلزی  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ag^{+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  با غلظت نهایی 1mM و 2mM و اندازه گیری فعالیت انزیم تعیین گردید. نمونه ای که حاوی یونهای فلزی نبود به عنوان نمونه شاهد استفاده گردید.

### نتایج

#### جداسازی سوش *Weissella halotolerans* از محصولات غذایی تخمیری و شناسایی آن

باکتری ها از منابع مختلف جداسازی گردیدند. مطالعات شناسایی پس از کشت باکتری های جداسازی شده روی MRS agar با تلقیح پلیت ضربه ای انجام گردید. جداسازی DNA برای شناسایی انجام شد. محصول PCR نتیجه شده به شرکت Macrogen ارسال شد. باکتری ها طبق شباهت توالی 99% (NR\_040812.1) شناسایی شدند. کشت جوان آن به شکل کشت مادر بدست آمد و ذخیره سازی گردید. تست کاتالاز و رنگ آمیزی گرم سوش های فیتاز مثبت برای شناسایی سوشها تحت عنوان *Weissella halotolerans* انجام گردید.

### نتایج تخلیص سازی

همانطور که در جدول 1 خلاصه سازی شده است، تخلیص فیتاز در سه مرحله ساده شامل رسوب سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی تبادل آنیونی Q-Sepharose و کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل Sephadex G-100 انجام گردید. پس از رسوب آمونیم سولفات، تقریباً 25% کل پروتئین حذف گردید. پس از Q-Sepharose،

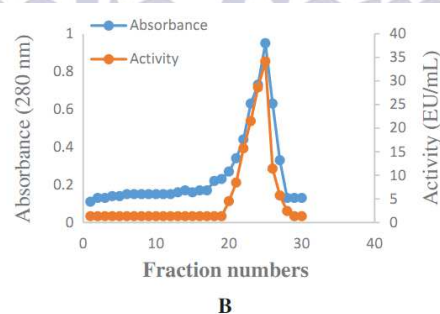
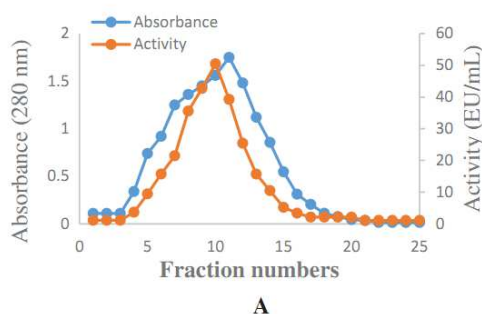
حذف حدود 77٪ پروتئین کل بدست آمد. این آنزیم 11.38 برابر با فعالیت ویژه 227.73 EU/mg و بازیابی 6.52٪ تخلیص گردید.

شکل 1 مشخصات رقت کروماتوگرافی ستونی تبادل آنیونی Q-Sepharose و کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل Sephadex G-100 را نشان می دهد. همانطور که در شکل Fig. 1A دیده می شود، لوله هایی که فعالیت فیتاز را نشان داده اند با یکدیگر ترکیب شده و به ستون Sephadex G-100 وارد شدند که آخرین مرحله تخلیص بود. همانطور که در شکل Fig. 1B دیده می شود، لوله های بین 20 و 28 بیشترین فعالیت فیتاز را در مقایسه با لوله های دیگر نشان دادند. آنزیم تخلیص شده یک باند واحد را نشان داد. جرم مولکولی آنزیم به اندازه 41.52 kDa تعیین گردید (شکل 4).

### جدول 1-مراحل تخلیص برای فیتاز از باکتری *Weissella halotolerans*

Table 1. Purification steps for phytase from *Weissella halotolerans*.

Purification step	Activity (EU/mL)	Volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total protein (EU)	Total activity (mg)	Specific activity (EU/mg)	Recovery (%)	Purification fold
Crude extract	104.71	25	5.23	130.75	2617.75	20.02	100	1
Ammonium sulfate precipitation (0-80%)	78.14	25	2.71	67.75	1953.5	28.83	74.63	1.44
Q-Sepharose anion exchange chromatography	50.46	12	1.17	14.04	605.52	43.13	23.13	2.15
Sephadex G-100 gel filtration chromatography	34.16	5	0.15	0.75	170.8	227.73	6.52	11.38



شکل 1 (a) مشخصات رقت کروماتوگرافی تبادل آنیونی Q-Sepharose. ستون تبادل آنیونی-Q-Sepharose با بفر سدیم استات 50 mM با pH برابر با 5.5 متعادلسازی گردید. رقت گرادیانی با استفاده از 0-1 M NaCl انجام شد. (b) مشخصات رقت کروماتوگرافی ستون فیلتراسیون ژل تبادل آنیونی Sephadex G-100. ژل Sephadex G-100 با بفر سدیم استات 50 mM با pH برابر با 5.5 متعادلسازی گردید. رقت های بدست آمده در ستون Q-Sepharose به ستون Sephadex G-100 برای تخلیص بکار گرفته شد.

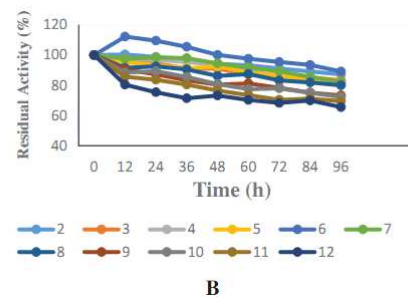
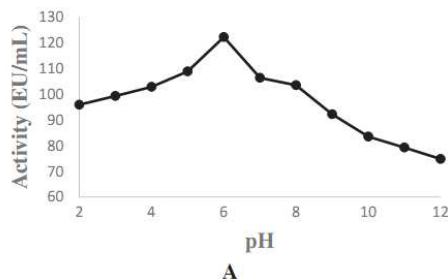


## اثر pH و درجه حرارت روی فعالیت و قابلیت ثبات فیتاز

باکتری *Weissella halotolerans* بیشترین فعالیت فیتاز را در pH 6 نشان داد (شکل 2A Fig.). فعالیت آنزیم تغییر معنی داری را بین pH 2 و 8 نشان نداد و قابلیت ثبات خود را حفظ کرد (شکل 2B Fig.). در این محدوده، تقریباً 20٪ فعالیت خود را از دست داد. این نتیجه مشابه نتایج حاصل از فیتاز *E.coli* ATCC 33965 بود. این نتیجه نشان داد که آنزیم خالص سازی شده فیتاز اسیدی بوده است. این ویژگی به آنزیم امکان فعالیت را در معده (pH 2.0-4.5) می بخشد و برای کاربرد آنزیم به عنوان خوراک دام قابل توجه است. دمای بهینه برای اکثر فیتازها بین 33 تا 37 درجه سانتیگراد متغیر می باشد. دمای مطلوب برای فیتاز تخلیص شده از باکتری *Weissella halotolerans* برابر با 50 درجه سانتیگراد بود (شکل 3A Fig.). قابلیت ثبات درجه حرارت نشان داد که آنزیم پس از نگهداری در دمای 10-90 درجه سانتیگراد برای 3 ساعت فعالیت خود را حفظ کرده است (شکل 3B Fig.). این نتیجه نشان داد که فیتاز تخلیص شده از *Weissella halotolerans* دارای ثبات حرارتی بوده و می تواند در صنایع غذایی ترجیح داده شود.

## اثرات یونهای فلزی روی فعالیت فیتازی

اثرات فلزات بر روی فیتاز در جدول 2 نشان داده شده است. این نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم در حضور  $Ag^+$ ،  $Zn^{2+}$ ،  $Cr^{2+}$  و  $Fe^{2+}$  به ترتیب 21.86، 25.63، 32.82 و 90.43 درصد بود، در حالیکه افزایشی را در حضور  $Co^{2+}$ ،  $Cu^{2+}$ ،  $Pb^{2+}$ ،  $Cd^{2+}$  و  $Mn^{2+}$  نشان می داد. فعالیت آنزیم در غلظتهای 1 و 5 mM یونهای  $Mg^{2+}$  و  $Ca^{2+}$  تغییر معنی داری نشان نداد. این نتیجه نشان داد که آنزیم در حضور کمپلکس فیتیک اسید با یونهای  $Mg^{2+}$  و  $Ca^{2+}$  فعالیت خود را حفظ کرده است.



شکل 2) مطالعات قابلیت ثبات pH بهینه با استفاده از محلول بافر سدیم استات (100 mM) (pH 2.0-6.0)،

Tris-HCl

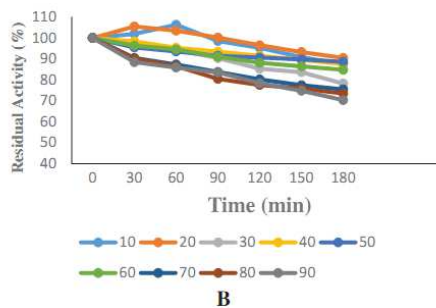
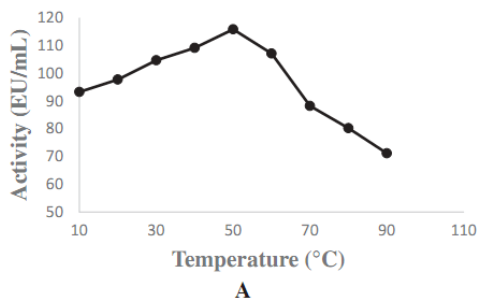
(pH 7.0-9.0) و کربنات سدیم (pH 10.0-12.0) انجام شد. (a) مشخصات بهینه pH برای فیتاز تخلیص شده. (b) مطالعه قابلیت ثبات pH برای فیتاز تخلیص شده.

### بحث

فیتازها تجزیه تدریجی فسفات را از اسید فیتیک یا هیدرولیز فیتات به شکل استرهای فسفات اینوزیتول تجزیه شده و فسفات معدنی کاتالیز می کنند. فیتازها معمولا وزن مولکولی 40-100 kDa دارند و به عنوان پروتئین های مونومر شناخته می شوند. آنها دارای اختصاصی بودن سوپسترای وسیعی هستند و PH و درجه حرارت بهینه آنها معمولا بین به ترتیب 4.5-6.0 و 60 درجه سانتیگراد می باشد. بنا به گزارشات فیتاز در گیاهان، بافت های حیوانی و میکروارگانیسم ها یافت می شود. بسیاری از محققان فیتاز میکروبی را برای تولید تجاری نویدبخش یافتند.

در این مطالعه، فیتاز به سادگی از باکتری های اسید لاکتیکی *Weissella halotolerans* تخلیص گردیده و اثرات برخی فلزات روی فعالیتش بررسی شد. در سایر مطالعات، فیتاز از منابع مختلف تخلیص شده و تعیین مشخصات گردیدند تا خواص بیوشیمیایی آن مشخص شود و کاربرد احتمالی آن در صنعت را مورد بررسی قرار می دهد. فیتاز در 11.38 برابر با فعالیت مخصوص 227.73 EU/mg تخلیص گردید و جرم مولار آنزیم در مطالعه حاضر به اندازه 41.52 kDa بدست آمد.

همانند مطالعه مان، Boukhris و همکاران فیتاز را به طور جزئی از *Bacillus amyloliquefaciens* US573 در 6 برابر با فعالیت ویژه 27 EU/mg و بازیابی 52 درصدی تخلیص کردند و جرم مولکولی هم برابر با 42kDa بود. همچنین، Escobin-Mopera و همکارانش فیتاز را از باکتری *Klebsiella pneumonia* 9-3B در 241 بار و با بازیابی 1.81% در چهار مرحله با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم و ستونهای HiPrep SPFF، HiPrep QXL و Superdex 75 تخلیص کردند و جرم مولار آنزیم برابر 45 kDa بود. در مطالعه دیگری، Parhamfar و همکاران فیتاز را از باکتری *Geobacillus stearothermophilus* DM12 در 57.2 برابر و با فعالیت ویژه 71.5 EU/mg با استفاده از همان روش استفاده شده در این مطالعه تخلیص کردند و جرم مولکولی این آنزیم را برابر با 28 kDa تعیین کردند.



شکل 3- قابلیت ثبات بهینه و دما بین 10 و 90 درجه سانتیگراد تعیین شد و فیتات سدیم به عنوان یک سوبسترا مورد استفاده قرار گرفت. (a) مشخصات درجه حرارت بهینه برای فیتاز تخلیص سازی شده و (b) مطالعه قابلیت ثبات درجه حرارت برای فیتاز تخلیص شده.

جرم مولکولی آنزیم تخلص شده از باکتری *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 برابر با 50 kDa بود. Roy و همکاران جرم مولکولی آنزیم تخلیص شده از *Shigella sp.* CD2 را برابر با 43 kDa تعیین کردند. از لحاظ جرم مولکولی، یافته های ما با نتایج گزارش شده در متون علمی سازگار است. همانطور که بخوبی شناخته شده است، تصفیه آنزیم یک فرایند دشوار است. آنزیمها مستعد تغییر شرایط هستند؛ بنابراین وجود آنزیم ها بسته به مولکول سوبسترا تحت تأثیر آنزیم تعیین می شود یعنی محصولی که پس از واکنش یا دیگر پارامترهای پیش ساز برای واکنش آنزیم رخ می دهد. عوامل موثر بر فعالیت آنزیم عبارتند از: غلظت آنزیم، غلظت سوبسترا، درجه حرارت، pH، اثرات آلوستریک، قدرت یونی و حضور بازدارنده ها و فعال کننده ها.

هر آنزیم دارای حداکثر pH است که طی آن فعالیتش بهینه می باشد. بالاتر از این مقدار pH، ساختار سه بعدی آنزیم تخریب می شود و فعالیتش کاهش می یابد. در این مطالعه، مقدار pH بهینه فیتاز تخلیص شده برابر با 6.0 و pH پایدار آن بین 2 و 8 بوده است. در متون علمی، مطالعات پیشین در مورد فیتاز مقادیر مختلفی از مطالعه مان را برای pH بهینه و pH پایدار یافته اند. حداکثر فعالیت 5.5 برای فیتاز خارج سلولی *L. plantarum* یافت شد، در حالیکه فیتاز (داخل سلولی) *L. sanfranciscensis* CB1 دارای حداکثر فعالیت در pH 4.0 بود.

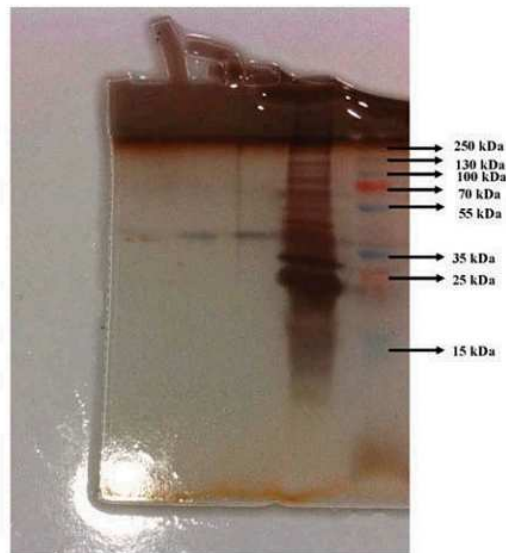
مقدار pH بهینه فیتاز داخل سلولی جدا سازی شده از باکتری *Lactobacillus fermentum* DSM 20052

*Lactobacillus casei* 40W برابر با 6.5 بود؛ فعالیت فیتاز جداسازی شده از *Lactobacillus casei* به مقدار حداکثر خود در دو مقدار مختلف pH به صورت 5.5 و 7.0 بود؛ مقدار pH بهینه فیتاز جدا شده از *L. plantarum* JBPRS و *plantarum* W42 برابر با 6.0-6.5 بوده است. بهینه pH فیتاز جداسازی شده از *L. plantarum* 110 برابر با 7.5 بوده است. آقای In و همکارانش همکاران گزارش کردند که مقدار pH بهینه فیتاز جداسازی شده از *Pseudomonas fragi* Y9451 برابر با 4.5 بوده و مقدار pH باثبات آن در دامنه 4.0-6.0 بوده است. آقایان kim و همکارانش تعیین کردند که pH ی که تحت آن فیتاز استخراجی از *Citrobacter braakii* YH-15 بیشترین فعالیت را نشان می دهد برابر با 4.0 بوده است.

جدول 2- اثرات یونهای فلزی روی فیتاز تخلیص شده از باکتری *Weissella halotolerans*

Table 2. The effects of metal ions on phytase purified from *Weissella halotolerans*.

Metal ion	Final concentration in reaction mix (mM)	Phytase activity (%)
Ca <sup>2+</sup>	1.00	96.630
	5.00	93.060
Co <sup>2+</sup>	1.00	97.420
	5.00	103.17
Ni <sup>2+</sup>	1.00	94.250
	5.00	84.330
Cu <sup>2+</sup>	1.00	96.030
	5.00	113.69
Hg <sup>2+</sup>	1.00	89.360
	5.00	86.650
Mg <sup>2+</sup>	1.00	93.650
	5.00	95.040
Pb <sup>2+</sup>	1.00	106.94
	5.00	110.91
Zn <sup>2+</sup>	1.00	85.040
	5.00	74.370
Cr <sup>2+</sup>	1.00	90.470
	5.00	67.180
Cd <sup>2+</sup>	1.00	106.15
	5.00	111.11
Mn <sup>2+</sup>	1.00	97.060
	5.00	109.33
Ag <sup>+</sup>	1.00	82.140
	5.00	78.140
Fe <sup>2+</sup>	1.00	17.660
	5.00	9.5700



شکل 4- باندهای 1، 2 و 3 همان آنزیم فیتاز روی SDS-PAGE هستند. این باندها رسوب سولفات آمونیم در محلول آنزیم فیتاز و پروتئینهای استاندارد در چاهک پنجم و ششم می باشند. روش الکتروفورز طبق عملیات Laemmli انجام شد.

## ترجمه فا

درجه حرارت بهینه برای فعالیت فیتاز به اندازه 50 درجه سانتیگراد تعیین گردید. در این مطالعه، این نتیجه شباهتی را با فیتاز استخراجی از *Aspergillus japonicus* BCC18313 (TR86)، *A. niger* BCC18081 و *E. parvum* BCC17694 (TR170) نشان داده است. گرچه دمای مطلوب فیتاز بدست آمده از انتروباکتر همانند فیتاز به دست آمده در این مطالعه ما بود، ولی در pH خنثی هم فعالیتی را نشان داد. Seo و همکاران تعیین کردند که درجه حرارت فعالیت مطلوب فیتاز جدا سازی شده از *Aeromonas sp.* LIK 1-5 برابر با 50 درجه سانتیگراد بود و فعالیت بطور معنی داری در دمای 60 درجه سانتیگراد کاهش یافت. Kim و همکاران تعیین کردند که درجه حرارت فعالیت بهینه فیتاز جداسازی شده از *Citrobacter braakii* YH-15 برابر با 50 درجه سانتیگراد بود و فعالیت بطور معنی داری در 55 درجه سانتیگراد کاهش یافت.

در مطالعه قابلیت ثبات درجه حرارت برای فیتاز تخلیص شده، گرچه آنزیم در معرض درجه حرارت هایی بین 10 تا 90 درجه سانتیگراد به مدت 3 ساعت بود، فعالیتش را تا تقریباً 25 درصد از دست داد. قابلیت ثبات حرارتی می تواند به عنوان یک معیار مهم قابلیت استفاده از فیتاز در کاربردهای صنعتی نگریسته شود. مشابه

یافته های ما، در مطالعه دیگری، مشخص شد که فیتاز مشتق از *L. sanfranciscensis* CB1 حدود 70 درصد از فعالیتش را حتی در دمای 70 درجه سانتیگراد حفظ کرده است.

برای فعالیت کاتالیزوری، 75٪ همه آنزیم های شناخته شده به یون های فلزی نیاز دارند. یونهای فلزی به شدت بر فعالیت آنزیم از طریق مسیرهای گوناگون اثر می گذارند. با دادن و دریافت کردن الکترون ها، آنها به شکل الکتروفیل ها یا نوکلئوفیل ها فعال می شوند، می توانند اثر نوروفیل ها را برای جلوگیری از واکنش های جانبی نامطلوب سرکوب کنند، می توانند آنزیم ها و سوبستراها را از طریق پیوندهای هماهنگ گردآوری کرده و به راحتی ساختارهای فعال کاتالیزوری آنزیم ها را تثبیت کنند. تأثیر یونهای فلزی روی فیتاز بستگی به گونه میکروبی، زنجیره و ظرفیت تولید فیتاز دارد.

بررسی اثرات یونهای فلزی روی فیتاز با افزودن یونهای فلزی با غلظت های نهایی 1 و 5 mM نشان داد که فعالیت فیتاز در حضور یونهای  $Ag^+$ ،  $Zn^{2+}$ ،  $Cr^{2+}$  و  $Fe^{2+}$  کاهش می یابد و در حضور یونهای  $Co^{2+}$ ،  $Cu^{2+}$ ،  $Pb^{2+}$ ،  $Cd^{2+}$  و یون  $Mn^{2+}$  افزایش می یابد. آقایان Yu و Chen درباره اثرات یون های  $Cu^{2+}$ ،  $Co^{2+}$ ،  $Mn^{2+}$ ،  $Ba^{2+}$ ،  $Zn^{2+}$  و  $Ni^{2+}$  روی فیتاز تخلیص شده از *Bacillus nealsonii* zj0702 بررسی کردند و گزارش دادند که یونهای  $Co^{2+}$ ،  $Ba^{2+}$ ،  $Zn^{2+}$ ،  $Ni^{2+}$  در غلظتهای 5 mM خود به شدت آنزیم را مهار کرده اند.

آقایان Roy و همکاران دریافتند که افزودن  $Fe^{2+}$ ،  $Zn^{2+}$  و  $Cu^{2+}$  به فیتاز ازسوش *Shigella sp.* فعالیت آنزیم را به ترتیب تا 65، 72 و 82 درصد کاهش داده است، در حالیکه  $Ca^{2+}$ ،  $Mn^{2+}$ ،  $Mg^{2+}$  و  $Co^{2+}$  فعالیت آنزیم را افزایش داد. فیتاز استخراجی از *A. niger* و *A. japonicas* BCC18313 از  $Cu^{2+}$  و  $Zn^{2+}$  توسط BCC18081 مهار شد، در حالیکه فیتاز استخراجی از *Selenomonas ruminantium* JY35 توسط یون های  $Zn^{2+}$ ،  $Cu^{2+}$ ،  $Fe^{2+}$  و  $Hg^{2+}$  مهار گردید.

نتایج ما نشان داد که یون های  $Ag^+$ ،  $Zn^{2+}$  و  $Fe^{2+}$  بطور معنی داری آنزیم را مهار کرده اند. نتایج مشابهی را می توان در متون علمی مربوطه پیدا نمود. یک خصوصیت مشابه در فیتاز استخراجی از *Klebsiella oxytoca* MO-3 مشاهده گردید. اثر مهاری یونهای فلزی  $Fe^{2+}$ ،  $Zn^{2+}$  و  $Ag^+$  ممکن است ناشی از کاهش قابلیت استفاده از فیتات بوسیله باندسازی به آنزیم و تشکیل کمپلکسهای فلزی فیتات با حلالیت ضعیف باشد. بعلاوه،



یون فلزی  $CO_2+$  فعالیت آنزیم را افزایش داد. این نتیجه مشابه نتایج حاصل از فیتاز از *Klebsiella pneumonia* می باشد.

در این مطالعه، فیتاز تخلیص سازی شده از *Weissella halotolerans* تعیین مشخصات گردید. در نتیجه فنآوری در حال پیشرفت آنزیم، تنوع کاربرد آنزیم و ارزش اقتصادی قابل ملاحظه و بالای آنزیم ها، مطالعات بیوتکنولوژی روی آنزیم های صنعتی اهمیت بیشتری را کسب کرده است. یافته های ما نشان می دهد که فیتاز تخلیص سازی شده در صنعت می تواند مورد استفاده قرار گیرد و ارزش اقتصادی آن می تواند به یمن خصوصیات مشخصه اش مورد استفاده قرار گیرد.

## References

1. Vohra, A.; Satyanarayana, T. Phytases: Microbial Sources, Production, Purification and Potential Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Biotechnology* **2003**, *23* (1), 29–60. doi:10.1080/713609297
2. Singh, B.; Kunze, G.; Satyanarayana, T. Developments in Biochemical Aspects Andbiotechnological Applications of Microbial Phytases. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* **2011**, *6* (3), 69–87.
3. Singh, N. K.; Joshi, D. K.; Gupta, R. K. Isolation of Phytase Producing Bacteria Andoptimization of Phytase Production Parameters. *Jundishapur Journal of Microbiology* **2013**, *6*, 6419. doi:10.5812/jjm.6419
4. Lei, X. G.; Porres, J. M. Phytase Enzymology. Applications, and Biotechnology. *Biotechnology Letters* **2003**, *25*, 1787–1794.
5. Greiner, R.; Farouk, A.; Carlsson, N.; Konietzny, U. Myo-Inositolphosphate Isomers Generated by the Action of a Phytase from a Malaysian Wastewater Bacterium. *The Protein Journal* **2007**, *26*, 577–584. doi:10.1007/s10930-007-9100-5
6. Haros, M.; Bielecka, M.; Honke, J.; Sanz, Y. Myo-Inositolhexakisphosphate Degradation by *Bifidobacterium Infantis* ATCC15697. *International Journal of Food Microbiology* **2007**, *117*, 76–84. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.021
7. Yi, Z.; Kornegay, E. T.; Ravindran, V.; Denbow, D. M. Improving Phytate Phosphorus Availability in Corn and Soybean Meal for Broilers Using Microbial Phytase and Calculation of Phosphorus Equivalency Values for Phytase. *Poultry Science* **1996**, *75* (2), 240–249. doi:10.3382/ps.0750240
8. Da Silva, L. G.; Trugo, L. C.; Da Costa, T. S.; Couri, S. Low Phytate Lupin Flour Based Biomass Obtained by Fermentation with a Mutant of *Aspergillus Niger*. *Process Biochemistry* **2005**, *40* (2), 951–954. doi:10.1016/j.procbio.2004.02.016
9. Vohra, A.; Satyanarayana, T. Phytase Production by the Yeast, *Pichiaanomala*. *Biotechnology Letters* **2001**, *23* (7), 551–554. doi:10.1023/A:1010314114053
10. Vohra, A.; Rastogi, S. K.; Satyanarayana, T. Amelioration in Growth and Phosphorus Assimilation of Poultry Birds Using Cell-Bound Phytase of *Pichia Anomala*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2006**, *22* (6), 553–558. doi:10.1007/s11274-005-9070-8
11. Yoo, G. Y.; Wang, X. J.; Choi, S. Y.; Han, K.; Kang, J. C.; Bai, S. C. Dietary Microbial Phytase Increased the Phosphorus Digestibility in Juvenile Korean Rock Fish *Sebastes Schlegeli* Fed Diets Containing Soybean Meal. *Aquaculture* **2005**, *243*, 315–322. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.10.025
12. Konietzny, U.; Greiner, R. Bacterial Phytase: Potential Application, in Vivo Function and Regulation of Its Synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology* **2004**, *35*, 11–18. doi:10.1590/S1517-83822004000100002
13. Bischoff, K. M.; Rooney, A. P.; Li, X. L.; Liu, S.; Hughes, R. Purification and Characterization of a Family 5 Endoglucanase from a Moderately Thermophilic Strain of *Bacillus Licheniformis*. *Biotechnology Letters* **2006**, *28*, 1761–1765. doi:10.1007/s10529-006-9153-0
14. Adiguzel, A.; Ozkan, H.; Baris, O.; Gulluce, M.; Sahin, F. Identification and Characterization of Thermophilic Bacteria Isolated from Hot Springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods* **2009**, *79*, 321–328. doi:10.1016/j.mimet.2009.09.026

15. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **1990**, *215*, 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
16. Beydemir, Ş.; Demir, Y. Antiepileptic Drugs: Impacts on Human Serum Paraoxonase-1. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **2016**, e21889. doi:10.1002/jbt.21889
17. Kırıcı, M.; Kırıcı, M.; Demir, Y.; Beydemir, Ş.; Atamanalp, M. The Effect of Al<sup>3+</sup> and Hg<sup>2+</sup> on Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Capoeta umbra Kidney. *Applied Ecology and Environmental Research* **2016**, *14* (2), 253–264. doi:10.15666/aer/1402\_253264
18. Alim, Z.; Beydemir, Ş. Some Anticancer Agents Act on Human Serum Paraoxonase-1 to Reduce Its Activity. *Chemical Biology & Drug Design* **2016**, *88* (2), 188–196. doi:10.1111/cbdd.12746
19. Zou, L. K.; Wang, H. N.; Pan, X.; Tian, G. B.; Xie, Z. W.; Wu, Q.; Chen, H.; Yang, Z. R. Expression, Purification and Characterization of a phyAm-phyCs Fusion Phytase. *Journal of Zhejiang University Science B* **2008**, *9*, 536–545. doi:10.1631/jzus.B0720006
20. Bradford, M. M. A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248–251. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
21. Laemmli, D. K.; Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–683. doi:10.1038/227680a0
22. Demir, Y.; Beydemir, Ş. Purification, Refolding, and Characterization of Recombinant Human Paraoxonase-1. *Turkish Journal of Chemistry* **2015**, *39* (4), 764–776. doi:10.3906/kim-1501-51
23. Sarıbuga, E.; Nadaroglu, H.; Dikbas, N.; Senol, M.; Cetin, B. Purification, Characterization of Phytase Enzyme from *Lactobacillus Plantarum* Bacteria and Determination of Its Kinetic Properties. *African Journal of Biotechnology* **2014**, *13* (23), 2373–2378. doi:10.5897/AJB2014.13821
24. Golovan, S.; Wang, G.; Zhang, J.; Forsberg, C.; Characterization and over Production of the *Escherichia coli* 365 appA Encoded Bifunctional Enzyme that Exhibits Both Phytase and Acid Phosphatase Activity. *Canadian Journal of Microbiology* **2000**, *46*, 59–71. doi:10.1139/cjm-46-1-59
25. Hara, A.; Ebina, S.; Kondo, A.; Funaguma, T.; A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agricultural and Biological Chemistry* **1985**, *49*, 3539–3544.
26. Pandey, A.; Szakacs, G.; Soccol, C. R.; Rodriguez-Leon, J. A.; Soccol, V. T. Production, Purification and Properties of Microbial Phytases. *Bioresource Technology* **2001**, *7*, 203–214. doi:10.1016/S0960-8524(00)00139-5
27. Yao, M. Z.; Zhang, Y. H.; Lu, W. L.; Hu, M. Q.; Wang, W.; Liang, A. H. Phytases: Crystal Structures, Protein Engineering and Potential Biotechnological Applications. *Journal of Applied Microbiology* **2012**, *112* (1), 1–14. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05181.x
28. Boukhris, I.; Farhat-Khemakhem, A.; Blibech, M.; Bouchaala, K.; Chouayekh, H. Characterization of an Extremely Salt-Tolerant and Thermostable Phytase from *Bacillus Amyloliquefaciens* US573. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, *80*, 581–587. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.07.014
29. Escobin-Mopera, L.; Ohtani, M.; Sekiguchi, S.; Sone, T.; Abe, A.; Tanaka, M.; Meevootisom, V.; Asano, K. Purification and Characterization of Phytase from *Klebsiella Pneumoniae* 9-3B. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2012**, *113* (5), 562–567. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.12.010
30. Parhamfar, M.; Badoei-Dalfard, A.; Khaleghi, M.; Hassanshahian, M. Purification and Characterization of an Acidic, Thermophilic Phytase from a Newly Isolated *Geobacillus Stearothermophilus* Strain DM12. *Program in Biological Sciences* **2015**, *5* (1), 61–73.
31. De Angelis, M.; Gallo, G.; Corbo, M. R.; McSweeney, P. L.; Faccia, M.; Giovine, M.; Gobetti, M. Phytase Activity in Sourdough Lactic Acid Bacteria: Purification and Characterization of a Phytase from *Lactobacillus Sanfranciscensis* CBI. *International Journal of Food Microbiology* **2003**, *87* (3), 259–270. doi:10.1016/S0168-1605(03)00072-2
32. Roy, M. P.; Poddar, M.; Singh, K. K.; Ghosh, S. Purification, Characterization and Properties of Phytase from *Shigella* Sp. CD2. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **2012**, *49* (4), 266–271.
33. Zamudio, M.; Gonzales, A.; Medina, J. A. *Lactobacillus Plantarum* Phytase Activity Is Due to Non-Specific Acid Phosphatase. *Letters in Applied Microbiology* **2001**, *32*, 181–184. doi:10.1046/j.1472-765x.2001.00890.x
34. Haros, M.; Bielecka, M.; Honke, J., et al. Phytate-Degrading Activity in Lactic Acid Bacteria. *Polish Journal of Food And Nutrition Sciences* **2008**, *58*, 33–40.
35. In, M. J.; Jang, E. S.; Kim, Y. J.; Oh, N. S. Purification and Properties of an Extracellular Acid Phytase from *Pseudomonas Fragi* Y9451. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2004**, *14* (5), 1004–1008.
36. Kim, H. W.; Kim, Y. O.; Lee, J. H.; Kim, K. K.; Kim, Y. J. Isolation and Characterization of a Phytase with Improved Properties from *Citrobacter Braakii*. *Biotechnology Letters* **2003**, *15*, 1231–1234. doi:10.1023/A:1025020309596
37. Fugthong, A.; Boonyapakorn, K.; Sornlek, W.; Tanapongpipat, S.; Eurwilaichitr, L.; Pootanakit, K. Biochemical Characterization and in Vitro Digestibility Assay of *Eupenicillium Parvum* (BCC17694) Phytase Expressed in *Pichia Pastoris*. *Protein Expression and Purification* **2010**, *70*, 60–67. doi:10.1016/j.pep.2009.10.001
38. Promdonkoy, P.; Tang, K.; Sornlake, W.; Harmpicharnchai, P.; Kobayashi, R. S.; Ruanglek, V.; Upathanpreecha, T.; Vesaratchavest, M.; Eurwilaichitr, L.; Tanapongpipat, S. Expression and Characterization of *Aspergillus* Thermostable Phytases in *Pichia Pastoris*. *FEMS Microbiology Letters* **2009**, *290*, 18–24. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01399.x
39. Seo, M. J.; Kim, J. N.; Cho, E. A.; Park, H.; Choi, H. J.; Pyun, Y. R. Purification and Characterization of a Novel Extracellular Alkaline Phytase from *Aeromonas* Sp. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2005**, *15* (4), 745–748.



40. Bajaj, B. K.; Manhas, K. Production and Characterization of Xylanase from *Bacillus Licheniformis* P11(C) with Potential for Fruit Juice and Bakery Industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2012**, *1* (4), 330-337. doi:10.1016/j.bcab.2012.07.003
41. Hayek, S. A.; Shahbazi, A.; Worku, M.; Ibrahim, S. A. Enzymatic Activity of *Lactobacillus reuteri* Grown in a Sweet Potato Based Medium with the Addition of Metal Ions. *Springer Plus* **2013**, *2*, 465. doi:10.1186/2193-1801-2-465
42. Yu, P.; Chen, Y. Purification and Characterization of a Novel Neutral and Heat-Tolerant Phytase from a Newly Isolated Strain *Bacillus Nealonii* ZJ0702. *BMC Biotechnology* **2013**, *13* (78), 1-7. doi:10.1186/1472-6750-13-78
43. Yanke, L. J.; Selinger, L.; Cheng, K. Phytase Activity of *Selenomonas Ruminantium*; A Preliminary Characterization. *Letters in Applied Microbiology* **1999**, *29*, 20-25. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00568.x
44. Jareonkitmongol, S.; Ohya, M.; Watanabe, R.; Takagi, H.; Nakamori, S. Partial Purification of Phytase from Soil Isolate Bacterium *Klebsiella Oxytoca* MO-3. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1997**, *83*, 393-394. doi:10.1016/S0922-338X(97)80149-3
45. Wang, X.; Upatham, S.; Panbangred, W.; Isarangul, D.; Summpunn, P.; Wiyakrutta, S.; Meevootisom, V. Purification, Characterization, Gene Cloning and Sequencing Analysis of a Phytase from *Klebsiella pneumoniae* Subsp. *Pneumoniae* XY-5. *Science Asia* **2004**, *30*, 383-390. doi:10.2306/scienceasia1513-1874.2004.30.383

ترجمه فا



TarjomeFa.Com

برای خرید فرمت ورد این ترجمه، بدون واتر مارک، اینجا کلیک نمائید.



این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

لیست مقالات ترجمه شده ✓

لیست مقالات ترجمه شده رایگان ✓

لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI ✓

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی