

## بهینه سازی تولید فیتاز توسط جدایه جدید *Bacillus sp.* سوش EBD 9-1 با

### استفاده از طراحی آزمایشی آماری

#### چکیده

در این مطالعه طراحی کامپوزیت مرکزی رو به مرکز FCCCD در روش سطح پاسخ RSM بکار گرفته شد تا رابطه میان متغیرهای تست شده یعنی pH و درجه حرارت و rpm و دوره انکوباسیون و تولید فیتاز توسط جدایه تازه به نام *Bacillus sp.* EBD 9-1 توضیح داده شود. این طراحی با انتخاب pH، درجه حرارت، rpm و دوره انکوباسیون به عنوان فاکتورهای مدل بکار گرفته شد و برای دستیابی به حداکثر بازده، تعامل این فاکتورها از طریق روش RSM مطالعه و بررسی گردید. یک مدل درجه دوم رده دوم و روش سطح پاسخ نشان داد که شرایط بهینه برای تولید فیتاز برابر با pH به اندازه 8.0، درجه حرارت به اندازه 38.13°C، rpm به اندازه 113.64 و دوره انکوباسیون به مدت 45 ساعت بوده است. تحت این شرایط، مشخص گردید که فعالیت فیتاز حدود 228 Uml<sup>-1</sup> می باشد.

**کلیدواژه ها:** فیتاز، بهینه سازی، باسیلوس، روش سطح پاسخ، طراحی کامپوزیت مرکزی رو به مرکز.

TarjomeFa.Com

#### مقدمه

بخش اصلی علوفه دامی برای ماکیان ها برگرفته از گیاهانی مانند گندم، ذرت، و یونجه می باشد. تا 80 درصد از فسفر غلات به اسید فیتیک باند شده است که شکل نمکی آن فیتات می باشد. فسفات باند شده ارگانیک در اسید فیتیک توسط دام تک معدی مانند خوک، ماکیان ها و ماهی به دلیل کمبود فیتاز تحت متابولیسم قرار نمی گیرد و در نتیجه در مسائل آلودگی فسفوری در نواحی تولید دام فشرده نقش دارد. و همچنین فیتات یک جز تشکیل دهنده آنتی نوترینت در غذا و علوفه گیاهی می باشد، چون باعث تشکیل کمپلکس هایی با پروتئین ها، اسیدهای آمینه و انواع یونهای فلزی مانند کلسیم، منیزیم، آهن و روی می گردد. به دلیل این مشکلات، علاقه زیادی به انزیم تجزیه کننده فیتات وجود دارد. این مسائل مهمه می تواند با هیدرولیز فیتات با استفاده از

انزیم فیتاز مرتفع شود. و از اینرو، فسفر فیتات می تواند مجددا توسط حیوان بعد از هیدرولیز اینوزیتول و فسفات غیرآلی بازجذب گردد. فیتازها یکی از انزیم های اصلی و مهم برای تغذیه، حفاظت محیط زیستی و سلامت انسان طی دو دهه اخیر می باشند. فیتازها (E.C.3.1.3.8 اینوزیتول هگزا فسفات فسفو هیدرولاز) به طور متوالی گروه های اورتوفسفات را از هسته اینوزیتول فیتات یا اسید فیتیک که شکل شیمیایی عمده فسفر در گیاهان می باشد (حدود 60 الی 90 درصد) جدا می کنند. این انزیم ها از قارچ ها، مخمر، باکتریها و پروتوزوا جداسازی شده اند. فیتازهای باکتریایی و باکتریهای تولیدکننده فیتاز نیز کاربردهای بیوتکنولوژیکی احتمالی آنها هستند. بویژه باکتریهای *Bacillus sp.*، *E. coli*، *Pseudomonas sp.*، *Citrobacter spl* بهترین جایگزین برای تولید آنزیم می باشند. فیتازهای باسیلوس تحت مطالعه زیادی به دلیل قابلیت زیاد این انزیم ها قرار گرفته اند که دارای مشخصات منحصر به فرد، عملی بودن تولید انبوه برای بازار و قابلیت استفاده در علوفه دام می باشند. با این حساب، فیتاز دارای اهمیت صنعتی زیادی است و یک علاقه مداوم به جداسازی سوش میکروبی جدید تولیدکننده فیتاز و بهینه سازی این انزیم وجود دارد. فیتاز به عنوان افزودنی علوفه دام در امریکا از سال 1996 بازاریابی می شود و تا نزدیکی قرن بیستم، فروش سالیانه فیتاز به عنوان یک افزودنی خوراک دام حدود 500 میلیون دلار امریکا بوده است. این انزیم از اینرو دارای کاربردهای احتمالی در خوراک دام و صنایع غذایی بوده است.

روش سطح پاسخ یا RSM در فرایند بیوتکنولوژیکی اهمیت زیادی را به دلیل بهینه سازی تولید انزیم ها کسب کرده است. روش RSM که شامل طراحی های فاکتوریال و آنالیز رگرسیون می باشد، به ارزیابی فاکتورهای موثر و ساخت مدل‌هایی برای تعیین تعامل و انتخاب شرایط بهینه متغیرها برای یک پاسخ مطلوب چاره ساز است. در مقایسه با روشهای مرسوم برای بهینه سازی، روش RSM یک روش زمان بر و کار بر است که شامل اساسا طراحی کامپوزیت مرکزی CCD، طراحی جعبه Behnken یا BBD می باشد. روش RSM به طور موفقیت آمیزی برای بهینه سازی تولید بسیاری محصولات از جمله انزیم، انتی بیوتیک و سوخت زیستی بکار رفته است. سری آزمایشاتی انجام گردید تا میزان متغیرهای مهم اثرگذار بر تولید انزیم را در این مقاله تعیین کند. بعلاوه RSM برای بهینه سازی پارامترهایی (pH، درجه حرارت، rpm و دوره انکوباسیون) برای تولید فیتاز توسط جدایه جدید *Bacillus sp. EBD 9-1* در مطالعه کنونی استفاده نشده است.

## مواد و روشها

### سوش باکتریایی

میکروارگانیسم استفاده شده از خاک جداسازی گردید. این میکروارگانیسم به عنوان Bacillus sp. EBD 9-1 طبق آنالیز ریخت شناسی و بیوشیمیایی شناسایی گردید.

### کشت و محیط کشت

محیط کشت انزیم حاوی ( $\text{wv}^{-1}\%$ ) بوده است: دکستروز 0.5، پپتون 1، عصاره مخمر 0.5،  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1،  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1، سدیم فیتات 0.1 (محیط کشت TS). محیط کشت در درجه حرارت 120 درجه سانتیگراد برای مدت 20 دقیقه اتوکلاو گردید. پیش کشت در محیط کشت LB برای مدت 18 ساعت تحت کشت قرار گرفت. بعد کشت های یک شب مانده دارای OD(600): 0.3 به میزان 1 درصد به محیط کشت تولید انزیم تلقیح گردید (به میزان 150 ml در فلاسک های ارلن مایر 500ml). در پایان دوره رشد، محیط کشت سانتریفوژ گردید (سرعت دور 3461 xg، ده دقیقه) و لایه های رویی برای تعیین فعالیت فیتاز استفاده گردید.

### سنجش فعالیت فیتاز

فعالیت فیتاز طبق یک روش فعالیت انزیم بهینه سازی شده تعیین شده است. واکنش روی 0.1 ml از محلول انزیم با 0.9 ml از محلول سدیم فیتات 2 mM در بافر Tris-HCl ی 0.1 M (با pH برابر با 7.0) در 37 درجه سانتیگراد برای مدت 10 دقیقه انجام گردید و بعد واکنش با افزودن 0.75 ml از تریکلرواستیک اسید متوقف گردید. فسفات آزادسازی شده در 700 nm بعد از افزودن 1.5 ml از معرف رنگ اندازه گیری گردید که به طور تازه قبل از استفاده با ترکیب چهار حجم از محلول آمونیوم مولیبدات 2.5% در اسیدسولفوریک 5.5% و یک حجم از محلول سولفات فروی 2.5% تهیه گردیده است. یک واحد فعالیت فیتازی به شکل آزادسازی 1  $\mu\text{mol}$  از فسفات در هر دقیقه تحت شرایط سنجش تعریف گردید.

یک منحنی کالیبراسیون فسفات با افزودن محلول های فسفات استاندارد به اندازه 0-100  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  بدون فیتاز افزوده شده تحت همان شرایط طبق توضیحات فوق تهیه گردید.

بهینه سازی پارامترهای فیزیکی برای روش RSM

روش RSM که توسط Box & Wilson در سال 1951 ابداع گردید منجر به شروع دوره ای شد که آنرا دوره دوم متون طراحی آزمایشی می نامند. در این زمینه، آزمایشات طراحی شده اولین بار در صنعت شیمیایی برای فرایند ساخت محصول در امریکا در دهه 50 میلادی بکار بسته شده است. روش RSM یک مجموعه تکنیک های ریاضی و آماری است که برای مدل سازی، تحلیل و بهینه سازی متغیر پاسخ مفید می باشد. روش RSM می تواند در انواع زمینه ها مانند علوم بیولوژیک و بالینی، فیزیک، علوم مهندسی، علوم غذایی و علوم اجتماعی بکار بسته شود.

در مورد یک محصول، فرایند یا سیستم که دربرگیرنده پاسخ  $y$  می باشد که بستگی به متغیرهای ورودی قابل کنترل  $X_1, X_2, \dots, X_k$  دارد، رابطه میان آنها را می توان به شکل ذیل نشان داد:

$$y = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + \varepsilon \quad (1)$$

تابع پاسخ حقیقی نامعلوم  $f$  می تواند پیچیده باشد و  $\varepsilon$  نمایانگر منابع دیگر تنوع پذیری در معادله 1 می باشد (معادله 1). فرض شده است که به عنوان عبارت خطای آماری شامل خطای اندازه گیری پاسخ، سایر منابع خطا در فرایند یا سیستم  $\varepsilon$  دارای یک توزیع نرمال با میانگین صفر و واریانس  $\sigma^2$  می باشند. رابطه میان پاسخ و متغیرهای ورودی را می توان به شکل چندجمله ای تعریف نمود یا به شکل یک تابع خطی مدل سازی کرد.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad (2)$$

در معادله 2 (Eq. 2)،  $\beta_i$  نشان دهنده اثر خطی،  $\beta_{ij}$  نشان دهنده اثر تعامل خطی و  $\beta_{ii}$  نشان دهنده اثر درجه دوم می باشد.

سه مقدار pH، درجه حرارت،  $r[m]$  و دوره انکوباسیون مختلف در آزمایشات استفاده گردید و فاکتورها در جدول 1 آمده است

جدول 1- دامنه و میزان آزمایشی فاکتورها

Table 1. Experimental range and levels of the factors.

Factors	Range of levels					
	Low		Central		High	
	Actual	Coded	Actual	Coded	Actual	Coded
pH	6	-1	7	0	8	1
Temperature (°C)	35	-1	40	0	45	1
rpm	50	-1	100	0	150	1
Incubation period (h)	35	-1	40	0	45	1

فاکتورهای در نظر گرفته شده که برای تولید فیتاز موثر بودند تحت عنوان pH، درجه حرارت، rpm و دوره انکوباسیون تعیین گردیدند. در این مطالعه، F<sub>CCCD</sub> استفاده گردید و تعداد کل 31 آزمون تحقیقاتی با انواع مختلف ترکیبات میزان فاکتورها اجرا گردیده است. طرح کلی آزمایشی کار و مقادیر پاسخ مشاهده شده و پیشگویی شده در جدول 2 نشان داده شده است.

جدول 2- طراحی کامپوزیت مرکزی CCD و پاسخ های مشاهده شده-پیشگویی شده

Table 2. Central composite design (CCD) and observed – predicted responses.

Run	Factors				Response (U/ml)	
	pH	Temperature (°C)	rpm	Incubation period (h)	Observed	Predicted
1	8	45	150	35	67.990	82.660
2	7	40	100	45	186.620	182.580
3	8	35	150	35	96.900	94.620
4	6	45	50	35	59.880	51.770
5	7	35	100	40	86.110	107.630
6	6	45	50	45	117.370	116.210
7	6	35	150	45	206.590	199.320
8	6	35	150	35	79.400	75.190
9	8	35	50	35	58.390	35.290
10	6	35	50	35	32.720	47.670
11	7	40	100	40	106.000	122.800
12	7	40	100	40	116.000	122.800
13	7	45	100	40	88.270	74.220
14	7	40	150	40	100.760	91.160
15	8	45	50	35	86.150	89.990
16	7	40	100	40	116.000	122.800
17	7	40	100	40	126.000	122.800
18	8	35	150	45	193.780	203.450
19	8	40	100	40	161.470	167.420
20	7	40	100	40	126.000	122.800
21	8	45	50	45	133.340	139.130
22	6	35	50	45	184.150	171.050
23	7	40	100	35	84.430	95.940
24	7	40	100	40	136.000	122.800
25	8	45	150	45	150.940	132.550
26	7	40	50	40	63.620	80.690
27	6	40	100	40	144.730	146.250
28	6	45	150	35	19.890	12.620
29	6	45	150	45	53.140	77.810
30	7	40	100	40	156.000	122.800
31	8	35	50	45	139.520	143.360

## نتایج

### تحلیل آماری و مدل سازی سطح پاسخ

رابطه بین تولید فیتاز و فاکتورهای فیزیکی با یک معادله چندجمله ای بیان گردید. تولید فیتاز به عنوان پاسخ پذیرفته شد. رابطه ریاضی فاکتورها و پاسخ با معادله چندجمله ای درجه دوم محاسبه گردید.

$$Y = 122.80 + 10.59A - 16.70B + 5.24C + 43.32D + 34.00A^2 - 31.90B^2 - 36.90C^2 + 16.50D^2 + 12.65AB + 7.95AC - 3.83AD - 16.67BC - 0.1473BD + 0.19CD \quad (3)$$

که در آن Y برابر با تولید فیتاز، A برابر با pH و B برابر با درجه حرارت، C برابر با rpm و D برابر با دوره انکوباسیون می باشد. طبق نتایج آماری محاسبه شده برای مدل تخمین زده شده برای تولید فیتاز، pH، درجه حرارت و دوره انکوباسیون عبارات مدل معنی دار آماری بودند ( $p < 0.05$ ). مشاهده گردید که مهمترین عامل در زمینه تولید فیتاز همان متغیر دوره انکوباسیون و درجه حرارت و pH است که در پی آن می آید، درحالیکه متغیر rpm دارای اثر معنی داری روی تولید فیتاز نیست. ضریب همبستگی تعیین به صورت 0.8523 برای تولید فیتاز محاسبه گردید. این امر نشان می دهد که 85.23% کل تنوع برای تولید فیتاز توسط عوامل و تعامل توضیح داده شده است.

وقتی یافته های تحلیل واریانس (ANOVA) در جدول 3 آنالیز گردید، مشاهده می شود که مدل تخمین زده شده از لحاظ تولید فیتاز معنی دار بوده است ( $p < 0.05$ ). بعلاوه، فقدان ارزشهای برازش که معنی داری را بدست آورد ( $p < 0.05$ ) نشان می دهد که مدل درجه دوم کافی بوده است.

جدول 3- تحلیل واریانس آنوا برای مدل درجه دوم

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for quadratic model.

Source	DF	Seq SS	Adj MS	F	P
Regression	14	62491.4	4463.67	13.36	0.000
Linear	4	41305.8	2106.68	6.31	0.003
Square	4	9459.2	2364.81	7.08	0.002
Interaction	6	11726.4	1954.4	5.85	0.002
Residual Error	16	5345.0	334.06		
Lack-of-Fit	10	3745.0	374.5	1.4	0.351
Pure Error	6	1600.0	266.67		
Total	30	67836.4			

نمودار سطحی نشان دهنده اثر متغیر pH و درجه حرارت، pH و دوره انکوباسیون، درجه حرارت و دوره انکوباسیون برای تولید فیتاز می باشد که در شکل 1 نشان داده شده است. با رجوع به شکل 1a، تولید فیتاز دارای مقادیر حداکثر در ناحیه ای است که دارای بالاترین مقدار pH و درجه حرارت می باشد. با اشاره به شکل 1b، تولید فیتاز دارای مقادیر حداکثر در ناحیه ای است که دارای بالاترین دوره انکوباسیون و بالاترین و پایین ترین pH می باشد. با اشاره به نمودار 1c، تولید فیتاز دارای حداکثر مقادیر در ناحیه ای است که در آن بالاترین دوره انکوباسیون و مقادیر میانه درجه حرارت را دارد.

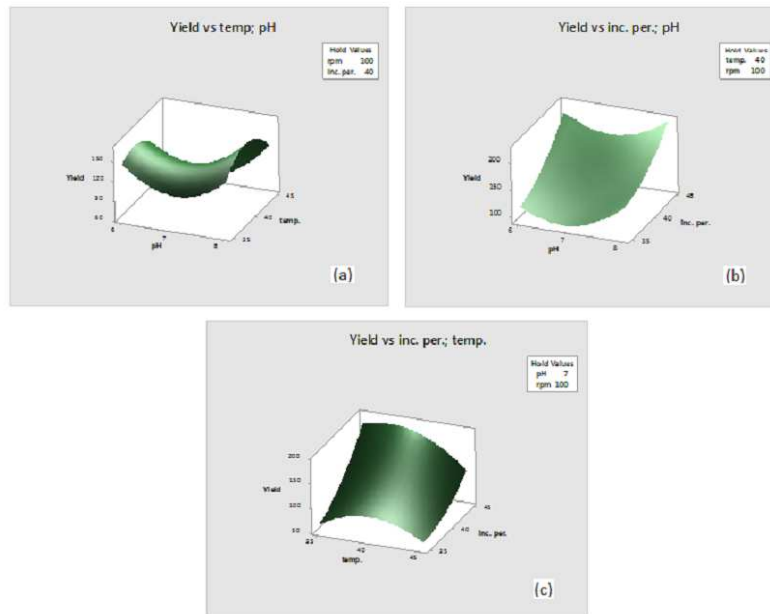


Figure 1. Surface plots of yield.

### شکل 1-منحنی سطحی بازده

مقادیر پاسخ مشاهده شده و پیشگویی شده را می توان در شکل 2 دید. نیز شکل 2 نشان می دهد که در مقادیر پیشگویی شده تولید فیتاز در فاصله 95 درصد اطمینان خیلی نزدیک به مقادیر مشاهده شده آزمایش بوده است. از اینرو، مشاهده گردید که عملکرد تخمین مدل کاملا خوب بوده است. در عین حال، این نتیجه به شکل معرف و شاخص خوبی برآزش مدل تخمین زده شده قبول شده است.

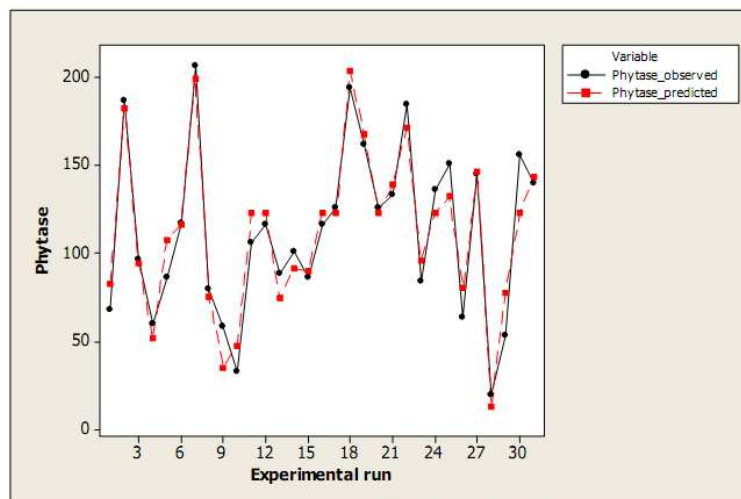


Figure 2. Plot of observed and predicted values for phytase.

### شکل 2-منحنی مقادیر مشاهده شده و پیشگویی شده برای فیتاز



بعلاوه، ضریب همبستگی بالا و معنی دار ( $r=0.960$ ;  $p=0.000$ ) بین مقادیر مشاهده شده و تخمین زده شده نشان داده است که مدل تخمین زده شده روایی داشته و یک نقطه بهینه دارد. در نتیجه بهینه سازی، مقدار ماکزیمم بدست آمده تولید فیتاز برابر با  $228 \text{ Uml}^{-1}$  بوده است. برای این فعالیت آنزیم، شرایط مناسب برابر با این مقادیر بوده است: pH 8.0, 38.13 °C, 113.64 rpm and 45h.

عوامل فیزیکی که بر تولید فیتاز توسط سوشهای *Bacillus sp.* اثر می گذارد توسط RSM مطالعه گردیده است. این مطالعه گزارشی است که نشان دهنده پارامترها و اثرات آن روی تولید فیتاز برای کسب بهترین مدل بهینه سازی شده با استفاده از RSM می باشد.

نتایج هر دوی ما محققان و سایر محققان نشان داده است که الزامات تغذیه ای و فیزیکی میکروارگانیسم از یکدیگر متفاوت است و از اینرو مستلزم بهینه سازی برای هر میکروارگانیسم می باشد.

## بحث

در متون گزارش گردیده است که اعمال اثرات معنی دار روی تولید فیتاز از جمله کربن و منابع نیتروژن، میزان تلقیح و سن تلقیح توسط RSM می باشد.

برخی محققان گزارشاتی با میکروارگانیسم های مختلف داشته اند، و نشان داده اند که بهینه pH و درجه حرارت مشخص گردید که برابر با 4.0-4.7 و 28-35 درجه سانتیگراد برای قارچ ها (NSF-7) و (NSF-9) به ترتیب بوده است. بهینه شرایط عملیاتی برای تولید فیتاز توسط باکتری *Enterobacter sakazakii* ASUIA279 در درجه حرارت 37 درجه سانتیگراد، pH اولیه 7.0، سبوس برنج 15 درصد، سرعت هم زدن بوده است. آنزیم تجزیه کننده فیتات که توسط *Aspergillus niger* NRRL 3135، *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 و *Aspergillus terreus* تولید شده است توسط هم زدن در 270 rpm انجام گردید.

RSM منجر به یک افزایش 1.09 برابری در تولید فیتاز در مقایسه با محیط کشت غیربهینه سازی شده گردید ( $210 \text{ Uml}^{-1}$ ). نتایج مشابهی توسط Awad و همکارانش در 2011 نشان داده شده، فعالیت فیتاز در *Penicillium funiculosum* NRC467 افزایش 1.02 برابری داشته است. از سوی دیگر، Ries & Macedo در سال 2011 نشان دادند که فعالیت فیتازی بدست آمده در محیط کشت غیربهینه سازی شده برابر با  $0.06 \text{ Uml}^{-1}$  بعد از 24 ساعت تخمیر توسط *S. cerevisiae* بوده است. بعد از بهینه سازی ترکیب محیط



کشت و شرایط تخمیر، فعالیت فیتاز در پاسخ به سدیم فیتاز تقریباً ده برابر بالاتر ( $0.62 \text{ Uml}^{-1}$ ) بوده است. همچنین در سایر مطالعات گزارش گردیده است که بعد از بهینه سازی آماری، فعالیت فیتاز به اندازه 1.75 برابر در کشت *P. anomala* در محیط کشت سنتتیک، به اندازه 1.7 برابر در کشت *Aspergillus ficuum*، به اندازه 1.3 برابر در *Rhizomucor pusillus*، 3.73 برابر در *Sporotrichum thermophile* و 1.8 برابری در *M. racemosus* افزایش یافته است.

کار کنونی نشان دهنده عملی بودن استفاده از ابزار طراحی تجربی برای بهینه سازی پارامترهای فیزیکی برای تولید فیتاز می باشد. طبق مدل تولید فیتاز، مشاهده گردید که پارامترهای pH، درجه حرارت و متغیرهای دوره انکوباسیون موثر بوده است درحالیکه متغیر rpm موثر نیست. در حالیکه pH و دوره انکوباسیون به نحو مثبتی روی تولید فیتاز اثر گذاشته است، درجه حرارت اثری منفی دارد. مشخص گردید که مهمترین عامل همان دوره انکوباسیون روی تولید فیتاز بوده است و گفته شده است که این سوش تازه جداسازی شده *Bacillus sp. EBD* 9-1 دارای کاربردهای احتمالی برای کاهش فیتات در علوفه دامی بوده است.

## REFERENCES

- Adeola O (1999) Nutrient management procedures to enhance environmental conditions: an introduction *Journal of animal science* 77:427-429
- Bogar B, Szakacs G, Linden JC, Pandey A, Tengerdy RP (2003a) Optimization of phytase production by solid substrate fermentation *J Ind Microbiol and Biotechnol* 30:183-189
- Bogar B, Szakacs G, Pandey A, Abdulhameed S, Linden JC, Tengerdy RP (2003b) Production of Phytase by *Mucor racemosus* in Solid-State Fermentation *Biotechnology Progress* 19:312-319
- Chadha BS, Hameet G, Mandeep M, Saini HS, Singh N (2004) Phytase production by the thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus* *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20:105-109
- Choi Y, Suh H, Kim J (2001) Purification and Properties of Extracellular Phytase from *Bacillus sp.* KHU-10 *J Protein Chem* 20:287-292
- Common FH (1989) Biological availability of phosphorus for pigs. *Nature* 143:370-380
- Cotlet M, Bahrim G-E (2011) Optimization of Cold-Adapted Amylases and Protease Production by Psychrotrophic *Streptomyces* 4 *Alga Using Response Surface Methodology*. *Turkish Journal of Biochemistry* 36:83-92
- Dahiya S, Singh N, Rana JS (2009) Optimization of growth parameters of phytase producing fungus using RSM *Journal of Scientific & Industrial Research* 68:955-959
- Demirkan E, Baygin E, Usta A (2014) Screening of phytate hydrolysis *Bacillus sp.* isolated from soil and optimization of the certain nutritional and physical parameters on the production of phytase *Turk J Biochem* 39 206-214
- Farouk A-E, Greiner R, Hussin ASM (2012) Optimization of cultivation conditions for the production of phytate-degrading enzymes by *Enterobacter sakazakii* ASULA279 isolated from Malaysian maize root. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 3:1-9
- Jonquera M MO, Maniyama F, Marschner P, de la Luz Mora M. (2008 ) Current and Future Biotechnological Applications of Bacterial Phytases and Phytase-Producing Bacteria. *Microbes and Environments* 23: 182-191
- Krishna C, Nokes SE (2001) Predicting vegetative inoculum performance to maximize phytase production in solid-state fermentation using response surface methodology. *J Ind Microbiol Biotechnol* 26:161-170
- Lan GQ, Abdullah N, Jalaludin S, Ho YW (2002) Optimization of carbon and nitrogen sources for phytase production by *Mitsuokella jalaludinii*, a new rumen bacterial species *Letters in Applied Microbiology* 35:157-161
- Lei X, Pories J, Mullaney E, Brinch-Pedersen H (2007) Phytase: Source, Structure and Application. In: Polaina J, MacCabe A (eds) *Industrial Enzymes*. Springer Netherlands, pp 505-529.
- Montgomery DC (2001) *Introduction to Statistical Quality Control*. John Wiley & Sons, Inc, New York
- Myers RH, Montgomery DC (2002) *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. John Wiley & Sons, Inc, New York
- Pallauf J, Rimbach, G. (1997) Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Arch Tierernahr* 50:301-319.
- Park YJ (2001) Expression, characterization, and antifungal activity of phytase from *Bacillus subtilis* TS16-111. PhD Thesis, Faculty of the Graduate school of Seoul National University, Korea
- Rao DECS, Rao KV, Reddy VD (2008) Cloning and expression of *Bacillus* phytase gene (phy) in *Escherichia coli* and recovery of active enzyme from the inclusion bodies. *Journal of Applied Microbiology* 105:1128-1137
- Shieh TR, Ware JH (1968) Survey of Microorganisms for the Production of Extracellular Phytase *Appl Microbiol* 16:1348-1351
- Simell M, Turunen M, Piironen J, Vaara T (1989) Feed and food applications of phytase. Lecture at 3rd Meet. *Industrial Applications of Enzymes*, Barcelona, Spain

- Singh B, Satyanarayana T (2008) Improved phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in submerged fermentation due to statistical optimization *Bioresource Technology* 99:824-830
- Singh B, Satyanarayana T (2010) Applications of phytase of thermophilic mould, *Sporotrichum thermophile*: A review *Journal of Scientific and Industrial Research* 69:411-414
- Sunitha K, Kim Y-O, Lee J-K, Oh T-K (2000) Statistical optimization of seed and induction conditions to enhance phytase production by recombinant *Escherichia coli* *Biochemical Engineering Journal* 5:51-56
- Uhlirg H (1998) *Industrial enzymes and their applications*, Wiley, New York
- Vans P, Banerjee UC (2004) Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview *Enzyme and Microbial Technology* 35: 3-14
- Vohta A, Satyanarayana T (2002) Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala* *Process Biochemistry* 37:999-1004
- Wodzinski R, Ullah, AH. (1996) Phytase *Adv Appl Microbiol* 42:263-302
- Zhong J, Zhang X, Ren Y, Yang J, Tan H, Zhou J (2014) Optimization of *Bacillus subtilis* cell growth effecting jean-peptide production in fed batch fermentation using central composite design *Electronic Journal of Biotechnology* 17:132-136

ترجمه فا



TarjomeFa.Com

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