مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 2، شماره 2، پاییز و زمستان 1389)

فیتازها: از دیدگاه آنزیم شناسی، ویژگی‌های مولکولی، بیوشیمیایی و کاربردها

محمدرضا ساریخانی[1*]، محمدعلی ملبوبی[2]

[1] استادیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

[2] دانشیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: 1389/11/19، تاریخ پذیرش: 1390/06/27

چکیده

فیتازها گروه ویژه‌ای 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 ولی از این میان فیتازهای میکروبی امیدبخش بوده و مورد توجه می‌باشند. آنزیم فیتاز به جیره غذایی حیوانات تک معده‌ای از قبیل خوک، پرندگان و ماهی‌ها به منظور افزایش جذب فسفات موجود در جیره غذایی و همچنین کاهش آلودگی فسفات در محیط اضافه می‌شود. نزدیک به 20 سال پیش اولین محصول فیتاز تجاری وارد بازار شد. فیتازها براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و همردیفی توالی اسیدآمینه، در چهار گروه اصلی هیستیدین اسید فسفاتاز، بتا پروپلر فیتاز، سیستئین فسفاتاز و اسید فسفاتاز بنفش قابل تقسیم بندی می‌باشند. به طور معمول، فیتازها همانند یک آنزیم تک واحدی با وزن مولکولی 40 تا 100 کیلودالتون عمل می‌کنند. تا به حال دو گروه عمده از فیتازها یعنی فیتازهای اسیدی با pH بهینه حوالی 5 و فیتازهای قلیایی با pH بهینه 8 شناسایی شده است، با این حال اغلب فیتازها دارای pH و دمای بهینه 6-4/5 و °C 60-45 هستند. برخی از فیتازها دارای اثرگذاری بر محدوده وسیعی از سوبستراها هستند و فیتات عاری از فلز را هیدرولیز می‌کنند و در مقابل برخی بر تعداد کمی‌آز سوبستراها تاثیرگذار بوده و به صورت خاص فیتات کلسیم را هیدرولیز می‌نماید. فیتازها از نظر تعداد گروه‌های فسفاتی که می‌توانند رها سازند متفاوت بوده و معمولاً قادرند 3 تا 5 گروه فسفات از مولکول فیتات را آزاد نمایند. این مقاله مروری بر آنزیم شناسی، کاربرد فیتازها و ویژگی‌های بیوشیمیایی و آنزیمی‌آنها خواهد داشت.

واژه های کلیدی: *جیره غذایی حیوانات، فسفر، فیتات، فیتاز*

* نویسنده مسئول: محمد رضا ساریخانی تلفن: 09173512394 E. Mail: rsarikhani@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

نزدیک به یک قرن از تحقیق بر روی فیتاز، بعد از کشف آن توسط Suzuki *et al* (1907) می‌گذرد. 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 (Haefner *et al*., 2005). این دسته از آنزیم‌ها در طبیعت گسترده هستند و فعالیت فیتازی در گیاهان، جانوران و ریزسازواره‌ها گزارش شده است (Greiner and Konietzny, 2006).

در طول دو دهه گذشته فیتازها در حیطه‌های تغذیه، حفاظت از محیط زیست و بیوتکنولوژی مورد توجه دانشمندان و حافظان محیط زیست قرار گرفته‌اند. این دسته از آنزیم‌های هیدرولیزکننده 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 (Reddy *et al*., 1982). به خاطر این که حیوانات تک معده‌ای[1] از قبیل خوک ها، پرندگان و ماهی ها (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 تامین فسفر لازم است که فسفر به شکل معدنی و قابل جذب به غذای آنها اضافه شود (Lei and Stahl, 2001; Lei and Porres, 2003). 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[2] دارد، به طوریکه منابع فسفات بر روی کره خاکی تا 50 سال آینده تخلیه خواهند شد (Lei *et al*., 2007). ثانیاً رها سازی آن در محیط، به ویژه در اکوسیستم‌های آبی و مناطقی که واحدهای پرورش دام زیاد است مخاطرات زیست محیطی و آلودگی محیط (رشد جلبکها)[3] را به دنبال خواهد داشت. ثالثاً فیتات به عنوان یک عامل ضد تغذیه‌ای[4] نیز شناخته می‌شود. زیرا می‌تواند از طریق کلات نمودن کاتیون‌های فلزی دو ظرفیتی از قبیل Ca^{2+}، Mg^{2+}، Zn^{2+} و Fe^{2+} با تشکیل کلات‌های نامحلول از دسترسی آن برای موجود زنده بکاهد (Afinah *et al*., 2010; Lei and Stahl, 2001)، همین ویژگی آن در مورد ویتامین‌ها و پروتئین‌ها و اسیدآمینه‌ها نیز صادق بوده و با تشکیل کمپلکس‌های نامحلول آن‌ها را از دسترس میزبانان خود خارج می‌سازد. همچنین فیتات ممکن است در هضم چربی‌ها و نشاسته اختلال ایجاد نماید (Cao *et al*., 2007). بدون شک افزایش توجه عمومی به مسایل محیطی، بهبود تغذیه دام و سلامت انسان باعث توجه به توسعه

1- Simple-stomached

2- Non-renewable
3- Eutrophication
4- Anti-nutritional

Archive of SID

www.SID.ir

بیوتکنولوژی فیتازها و کاربرد آنها در حیطه‌های مربوطه شده است. به طوری که افزودن آن‌ها در جیره غذایی دام[1] و در نظر گرفتن سایر عوامل تغذیه‌ای تا 50 درصد می‌تواند در بهبود جذب فسفر کمک نماید (Lei *et al*. 1993 a, b). بنابراین به دلایل اقتصادی و محیطی، فیتازها و از جمله فیتازهای میکروبی مورد توجه و علاقه می‌باشند. اولین فیتاز تجاری تولید شده به وسیله ریزسازواره‌های اصلاح شده در اواسط سال 1991 وارد بازار شد (Greiner and Konietzny, 2006; Cao *et al*., 2007). فروش سالانه فیتازها، به عنوان ماده افزودنی به جیره غذایی دام 500 میلیون دلار برآورد شده است (Vats and Banerjee, 2004). اخیراً استفاده از آنها در غذای انسان[2] به منظور افزایش فراهمی زیستی عناصر معدنی در نتیجه کاهش فیتات غذاها نیز مورد توجه واقع شده است گر چه تا کنون برای کاربرد در غذای انسان وارد بازار نشده است (Greiner and Konietzny, 2006).

فیتات

اسید فیتک اولین بار در سال 1872 به وسیله پففر کشف شد (Dvorakova, 1998)، فرمول مولکولی آن $C_6H_{18}O_{24}P_6$ و وزن مولکولی آن 659/86 می‌باشد و نمک‌های آن به نام فیتات شناخته می‌شوند و فیتات کلسیم/منیزیم به نام فیتین[3] مشهور می‌باشد (Mullaney and Ullah, 2005; Vohra and Satyanarayana, 2003). فیتات‌ها از جمله اشکال فسفر آلی می‌باشند که در حدود 50 تا80 درصد فسفر موجود در بقایای گیاهی را به خود اختصاص می‌دهند (Vohra and Satyanarayana, 2003; Haefner *et al*., 2005). اسید فیتیک 1 تا 5 درصد وزنی دانه غلات، دانه‌های روغنی و دانه‌های لگوم‌ها را به خود اختصاص می‌دهد (Vohra and Satyanarayana, 2003). اسید فیتیک با توجه به pH محیط و غلظت کاتیون‌ها می‌تواند پروتون جذب کند[4] یا پروتون از دست بدهد که به ترتیب در pH اسیدی و قلیایی این اتفاق می‌افتد و باعث پیدایش بار مثبت و منفی در مولکول فیتات شده و فیتات عاری از فلز و فیتات همراه با کاتیون فلزی را ایجاد می‌نماید (Oh *et al*., 2004). فیتات در خلال جوانه زنی بذور به وسیله آنزیم فیتاز تجزیه می‌شود و فسفات و مواد معدنی را برای جوانه‌های در حال رشد فراهم می‌کند (Reddy *et al*., 1982).

فیتازها

گروه‌بندی فسفاتازهای باکتریایی بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی و بیوفیزیکی آنزیم از قبیل pH بهینه (اسیدی، خنثی یا بازی)، پروفیل سوبسترایی (ویژه یا غیر ویژه برای یک سوبسترای خاص)، وزن مولکولی (وزن مولکولی بالا در مقابل پایین) انجام شده است. یکی از مشهورترین و کاربردی‌ترین آنها، آنزیم (*myo*-inositol hexakisphosphate

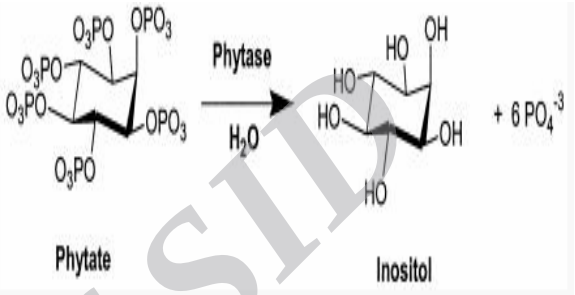
1- Feed application
2- Food application
3- Phytin

4- Protonation

Archive of SID

www.SID.ir

phosphohydrolase) می‌باشد که قادر به هیدرولیز اسید فیتیک (*myo*-inositol hexakisphosphate) به فسفات معدنی و مایواینوزیتول فسفات است (شکل 1). فیتازها به گروهی از آنزیم‌ها اطلاق می‌شود که حداقل یک گروه فسفات از مولکول فیتات را جدا نماید (Haefner *et al*., 2005).



شکل 1- هیدرولیز مولکول فیتات توسط آنزیم فیتاز.

Figure 1- Hydrolysis of phytate molecule by phytase enzyme.

کمیته نامگذاری آنزیم اتحادیه بین المللی بیوشیمی[1] سه گروه از آنزیم‌های فیتاز به نام‌های 3-فیتاز (EC 3.1.3.8)، 6-فیتاز (EC 3.1.3.26) و 5-فیتاز (EC 3.1.3.72) را با توجه به شماره کربن حلقه اینوزیتول که گروه فسفات آن توسط آنزیم برداشته می‌شود ارائه داده است. مطالعات ژنتیکی فیتازها در سال 1984 شروع شد. اولین و شاید بهترین فیتاز شناخته شده فیتاز Phy A مربوط به *A.niger* است، که به وسیله یک قطعه kb 1/4 رمز می‌شود و وزن مولکولی آن 80kDa می‌باشد (Ehrlich *et al*., 1993). همچنین تعدادی از ژن‌های رمزکننده فیتاز از قارچ، گیاهان و باکتری‌ها همسانه‌سازی شده‌اند (Haefner *et al*., 2005).

منابع میکروبی فیتاز

فیتازها از قارچها، مخمرها، باکتریها و پروتوزواها جداسازی شده‌اند. فعالیت فیتازی میکروبی اغلب در قارچ‌ها به ویژه در گونه *آسپرژیلوس* شناسایی شده است. Shieh and War (1968) بیش از 2000 ریزسازواره جداسازی شده از خاک را به منظور تولید فیتاز غربال کردند. اغلب جدایه‌های مثبت دارای فعالیت فیتازی درون سلولی بودند. فعالیت فیتازی برون سلولی فقط در 30 جدایه مشاهده شد که همه آنها مربوط به قارچ‌های رشته‌ای می‌شدند. گونه *A. niger* یکی از بهترین تولید کننده‌های فیتاز برون سلولی (phyA) است. فیتازهایی قارچی و مخمری بیشتر از نوع 3- فیتاز بوده وگلیکوزیله شده می‌باشند که در برخی موارد تا 35 درصد وزن مولکولی آنها را تشکیل می‌دهند. فیتازهای باکتریایی مانند فیتاز *E. coli* (AppA/A2) غیر گلیکوزیله هستند. این فیتاز در مقایسه با فیتاز قارچی به دلیل pH بهینه اسیدی، مقاومت به پپسین و فعالیت ویژه بالا نسبت به فیتات در رهاسازی فسفر از جیره غذایی خوک و طیور موثرتر است (Lei *et al*., 2007). فیتازها در باکتریهای گِرم منفی (نظیر *E.coli*، *Pseudomonas*، *Klebsiella*) و باکتریهای گِرم مثبت (نظیر *Bacillus*) شناسایی شده است. اسیدفسفاتاز/ فیتاز (ژن‌های *app* A و *app* A2) از باکتری *E. coli* جداسازی و مورد شناسایی قرار

1-Enzyme Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry

Archive of SID

www.SID.ir

گرفته‌اند. دو وظیفه‌ای بودن این آنزیم‌ها، آنها را برای انحلال فسفر آلی خاک جذاب نموده است (Greiner *et al.*, 1993). ژن‌های رمزکننده فیتاز با pH بهینه خنثی اخیراً از باکتری‌های *B. subtilis* و *B. licheniformis* همسانه‌سازی شده‌اند (Kerovou *et al.*, 1998; Tye *et al.*, 2002). ژن‌های رمزکننده فیتاز پایدار در برابر گرما (*phy*) از *Bacillus sp.* DS11 و از *B. subtilis* VTT E-68013 همسانه‌سازی شده‌اند (Rodriguez *et al.*, 2006; Konietzny and Greiner, 2004; Pandy *et al.*, 2001). جداسازی و توالی‌یابی ژن *phyA* از کتابخانه ژنومی *Obesumbacterium proteus* نیز گزارش شده است (Zinin *et al.*, 2004). Sarikhani *et al* (2010) در مطالعه ای اقدام به ارائه روشی برای جداسازی ژن‌های رمز کننده فسفاتاز باکتریایی نمودند و در ادامه کتابخانه ژنومی *Pseudomonas putida* سویه P13 را در محیط Sperber بعلاوه BCIP غربالگری نمودند، آنها به به کار بردن این روش غربالگردی عملکردی موفق به جداسازی دو ژن رمز کننده فسفاتاز و فیتاز شدند که با فسفاتازهای شناخته شده فعلی هیچ گونه مشابهتی نداشتند (Sarikhani *et al.*, 2011). حضور فیتاز در پروتوزاهایی مانند *Paramecium tetraurelia* و *Shewanella oneidensis* به اثبات رسیده و در برخی از موارد به دلیل قابلیت فعالیت آنها در دماهای پایین استفاده از آنها در اکوسیستم‌های آبی[1](یا در پرورش ماهی) مناسب به نظر می‌رسد (Lei *et al.*, 2007). در جدول 1 اطلاعات فیتازهای مختلف آورده شده است. ذکر این نکته ضروری می‌باشد که در مطالعات انجام گرفته بر روی منابع مختلف فیتازی، برخی از مطالعات بر روی ریزسازواره بومی و بدون همسانه‌سازی ژن رمزکننده فیتاز بوده است و برخی به همراه همسانه‌سازی ژن رمزکننده فیتاز[2] و انتقال آن به سویه‌های بیانی باکتریایی از قبیل *E. coli* (BL21, DE3) یا مخمری مانند *Pichia pastoris* می‌باشد. با این توضیح مشخص است که واژه آنزیم درون سلولی یا برون سلولی مربوط به فیتازهای طبیعی[3] می‌باشد.

منابع غیر میکروبی فیتازها

علاوه بر ریزسازواره‌ها که منبع خوبی برای تولید فیتاز به شمار می‌روند، فیتازها با منشاء گیاهی و حیوانی هم وجود دارند. فیتاز دارای گستردگی خوبی در سلسله گیاهان است و فیتاز از غلات (نظیر گندم، ذرت، جو، برنج و ...) و حبوبات و سایر گیاهان جداسازی و مورد بررسی قرار گرفته است. آنزیم‌های فیتاز اغلب در بذر و دانه گرده گیاهان عالی از قبیل غلات، لگوم‌ها، دانه‌های روغنی و مغزدارها[4] بوده و به میزان کمتر در ریشه گیاهان وجود دارد (Reddy *et al.*, 1982, 1989). فعالیت فیتازی در موقع جوانه زدن بذر و دانه گرده به کار می‌آید. در بذر گیاهان

1- Aquaculture

2- Recombinant phytase
3- Native phytase
4- Nut

Archive of SID

www.SID.ir

بـه هنگـام جوانـه زدن فعالیـت فیتـازی افـزایش سریعی نشان می‌دهد (Dvorakova, 1998).

جدول 1- فهرستی از ریزسازواره‌های تولید کننده فیتاز و ویژگی‌های آنزیمی فیتازهای آنها.

Table 1- A list of phytase producing microorganisms and characteristics of their phytases

ریزسازواره Microorganism	مکان آنزیم Location of Enzyme	وزن مولکولی Molecular weight (kD)	pH بهینه Optimal pH	دمای بهینه Optimal Temperature (°c)	Km (mM)	kcat (S^{-1})	فعالیت ویژه Specific activity U/mg	مرجع Refrence
Pantoea agglomerans	پری‌پلاسمیک Periplasmic	42	4.5	60	0.340	21	23	Greiner, 2004
Aerobacter aerogenes	nd	nd	4-5	70	0.135	nd	nd	Greaves *et al*., 1967
Bacillus subtilis	برون سلولی Extracellular	42	7	55	0.050	5.5	15	Kerovou *et al*.,1998
Bacillus subtilis	nd	36.5	7	55	0.040	nd	nd	Power & Jagannathan, 1982
Bacillus subtilis (natto).	برون سلولی Extracellular	38	6.5	60	0.500	nd	9	Shimizu, 1992
B. laevolacticus	nd	41,45	7	70	0.526	nd	12.3	Gulati *et al*., 2007
B. amyloliquefaciens	nd	44	7.5	70	nd	nd	20	Kim *et al*., 1998
B. subtilis 168	برون سلولی Extracellular	44	5.5-6	55	nd	nd	36.9	Tye *et al*., 2002
B. licheniformis	برون سلولی Extracellular	47	5-7	65	nd	nd	23.6	Tye *et al*., 2002
Bacillus sp. PH01	برون سلولی Extracellular	30	6	65	nd	nd	nd	Popanich *et al*., 2003
Kelbsiella sp.	متصل به دیواره Membrane	42	5	50	0.280		100	Sajidan *et al*., 2004
K. terrigena	درون سلولی Intracellular	40	5	58	0.300	180	204	Greiner *et al*., 1997
K. oxytoca	متصل به دیواره Membrane	40	5,6	55	nd	nd	nd	Jareonkitmongkol *et al*.,1997
K. aerogenes	nd	700	4.5-5.2	60	0.110	nd	nd	Tambe *et al*., 1994
Pseudomonas syringae	درون سلولی Intracellular	45	5.5	40	0.380	nd	769	Cho *et al*., 2003,2005
Pseudomonas sp.	برون سلولی Extracellular	nd	5	40	0.016	nd	nd	Irvine & Cosgrove, 1971
Pseudomonas sp	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1	Richardson&Hadobas,1997
Yersinia intermedia	nd	45	4.5	55	0.125	nd	3960	Huang *et al*., 2006
Obesambacterium proteus	nd	45	4.9	45	0.340	nd	435	Zinin *et al*., 2004
Citrobacter brakii	nd	47	4	50	0.460	nd	3457	Kim *et al*., 2003
Lactobacillus sanfrancesis	nd	50	4	45	nd	nd	nd	De Angelis *et al*., 2003

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول 1- فهرستی از ریزسازواره‌های تولید کننده فیتاز و ویژگی‌های آنزیمی فیتازهای آنها.

ریزسازواره Microorganism	مکان آنزیم Location of Enzyme	وزن مولکولی Molecular weight (kD)	pH بهینه Optimal pH	دمای بهینه Optimal Temperature (◦c)	Km (mM)	kcat (S^{-1})	فعالیت ویژه Specific activity U/mg	مرجع Refrence
Escherichia coli	پری‌پلاسمیک Periplasmic	42	4.5	55	0.130	1744	1800	Greiner *et al*., 1993
Selemonas ruminantium	nd	46	4-5.5	55	nd	nd	nd	Yanke *et al*., 1999
Candida krusei	متصل به دیواره Membrane	nd	2.5,5.5	40	0.030	nd	nd	Quan *et al*., 2001
Schwanniomyces castellii	nd	490	4.4	77	0.038	nd	418[*1]	Segueilha *et al*., 1992
Pichia anomala	nd	64	4	60	0.200	nd	nd	Vohra & Satyanarayana, 2002
Aspergillus niger	برون سلولی Extracellular	66	2.5	55	0.606	nd	100	Vats& Banerjee, 2005
.(*A. Ficuum* (phyA	nd	85	2.5,5	58	0.027	nd	nd	Ullah & Gibson, 1987
.(*A. Ficuum* (phyB	nd	68	2.5	63	0.103	nd	nd	Ehrlich *et al*., 1993
A. oryzae	nd	120	5.5	50	0.330	nd	11	Shimizu, 1993
A. fumigatus	nd	85-100	5	58	0.010	114	23	Ullah *et al*., 2000
A. terreus	nd	214	5-5.5	70	0.011	nd	142	Wyss *et al*., 1999
A. niger	nd	65-48	nd	nd	0.005	nd	103	Wyss *et al*., 1999
A. nidulans	nd	78	5.5	55	nd	nd	nd	Wyss *et al*.,1999
Peniophora lycii	nd	72	5.5	58	nd	nd	1080	Cao *et al*., 2007
Thermomyces lanuginosus	برون سلولی Extracellular	51	6	65	0.11	nd	110	Berka *et al*., 1998
Rhizopus oligosporus	برون سلولی Extracellular	124	5	65	0.01	51	22	Casey& Walsh, 2004
Pseudomonas putida P13	nd	27	5	60	0.237		281	Sarikhani *et al*., 2011
Pseudomonas putida P13	nd	50	5	60	0.192		20	Sarikhani *et al*., 2012

nd: (Not determined) اندازه گیری نشده است

[*1]: همه اندازه گیری ها در دمای c◦ 37 بوده است به جز این مورد که در دمایc◦ 70 می‌باشد.

فیتاز ترشح شده از ریشه گیاهان بیشتر برای رهاسازی فسفات از منابع آلی فسفر در خاک موثر واقع می‌شود. بیشترین فعالیت فیتازی در غلاتی چون چاودار، جو و گندم (U/Kg 7000 -100) گزارش شده است و معمولاً لگوم‌ها و گیاهان دانه روغنی تا 10 برابر فعالیت فیتازی (U/Kg 450-0) کمتری دارند (Konietzny and Greiner, 2002; Greiner and Konietzny, 2006). این در حالی است که کارآیی زیستی فیتازهای غلات در مقایسه با فیتازهای میکروبی (قارچی) تنها 40 درصد می‌باشد (Haefner *et al*., 2005). منبع حیوانی یا بافت های حیوانی[1] یکی دیگر از منابع فیتاز

1- Animal tissue

Archive of SID

www.SID.ir

می‌باشد و در ترشحات روده‌ای موش، خرگوش، انسان و غیره گزارش شده است. فیتاز همچنین در جانوران با سیستم گوارشی ساده نیز وجود دارد ولی نقش قابل توجهی در تجزیه فیتات بازی نمی‌کند (Kerovuo, 2000; Konietzny and Greiner, 2002). اغلب فیتازهای گیاهی از نوع HAP می‌باشند گرچه PAP ها هم در بین آنها مشاهده می‌شود. این دسته از فیتازها از نوع 6-فیتاز می‌باشند هر چند که در بین آنها 3- فیتاز مانند (Lupin LPl1 and LPl2) نیز گزارش شده است.

ویژگی‌های بیوشیمیایی و مولکولی فیتازها

1- وزن مولکولی

بیشتر فیتازها پروتئین‌های تک واحدی[1] هستند با این حال برخی از آنها دارای چندین زیرواحد می‌باشند به عنوان نمونه فیتاز (Phy B) با منشا *A. niger* که 4 واحدی[2] است یا 4 زیرواحد دارد. وزن مولکولی این آنزیم بسیار متغیر بوده و بین 100-38 کیلودالتون تغییر می‌کند. در مقایسه با فیتازهای پروکاریوتی فیتازهای قارچی و مخمری (یوکاریوتی) به دلیل گلیکوزیله شدن (اضافه شدن قند) دارای وزن مولکولی بالاتری هستند که در برخی موارد تا 35 درصد وزن مولکولی آنها را تشکیل می‌دهد. در برخی موارد افزوده شدن قند به آنزیم هیچ تاثیری بر فعالیت ویژه و پایداری آنزیم در دماهای بالا نداشته است (Wyss *et al.*, 1999). در صورتی که در منابع دیگر به تغییر خصوصیات بیوشیمیایی، پایداری آنزیم و نقطه ایزوالکتریک اشاره شده است (Konietzny and Greiner, 2002). اساساً به خاطر تفاوت در گلیکوزیله شدن، میانگین وزن مولکولی فیتازهای باکتریایی کوچکتر از فیتازهای قارچی (55-40 در مقابل 120-80 کیلودالتون) است (Choi *et al.*, 2001; Golovan *et al.*, 2000; Kerovuo *et al.*, 1998). افزوده شدن قند به ساختار آنزیم باعث افزایش وزن مولکولی می‌شود. وزن مولکولی فیتازهای گیاهی جدا شده از ذرت، گندم و جو بین 47 تا 76 کیلودالتون است (Konietzny and Greiner, 2002). دو نمونه متفاوت از فیتازها با اندازه کاملاً متفاوت در *K. aerogenes* گزارش شده است که یکی از آنها با اندازه 700 کیلودالتون (بزرگترین) به صورت آنزیم طبیعی و دیگری با اندازه بسیار کوچک (کوچکترین) که احتمالاً بخشی از یک آنزیم طبیعی است ولی دارای فعالیت کامل می‌باشد (Tambe *et al.*, 1994).

2- دما و pH بهینه

اغلب فیتازها دارای دمای بهینه 60-44 درجه سانتیگراد هستند. اما فیتازهایی با دمای بهینه خارج از این محدوده نیز جداسازی شده‌اند. به طور مثال فیتازهای *A. fumigatus* و *B. amyloliquefaciens* دارای دمای بهینه 70 درجه سانتیگراد می‌باشند، در حالی که فیتاز *Aerobacter aerogenes* دارای دمای بهینه 25 درجه سانتیگراد می‌باشد (Vohra and

1- Monomeric
2- Tetramer

Archive of SID

www.SID.ir

Satyanaryana, 2003). دمای بهینه فیتاز قارچی بین 60-50 درجه سانتیگراد می‌باشد این در حالی است که فیتازهای مخمری دارای دمای بهینه بالاتر از 60 تا 75 درجه سانتیگراد می‌باشند (Lei *et al.*, 2007). عموماً فیتازهای گیاهی در مقایسه با فیتازهای میکروبی دارای دمای بهینه پایین تری هستند و در این میان فیتاز مربوط به غلات دارای کمترین دمای بهینه اند (Konietzny and Greiner, 2002). نکته قابل تامل در مورد دمای بهینه آنزیم‌های فیتاز این است که اگر چه اغلب میکروارگانیسم ها مزوفیل می‌باشند ولی آنزیم فیتاز آنها دارای بهینه دمایی ترموفیل می‌باشد (Vohra and Satyanarayana, 2003). برای استفاده فیتاز در جیره غذایی دام پایداری آن به دماهای بالا (تحمل دمای 100-80 درجه سانتیگراد) یکی از ویژگی‌های بارز می‌باشد. فیتازهای قلیایی با منشا باسیلوسی کاملاً در دماهای بالا از محدوده 95-80 درجه سانتیگراد پایدارند (Kim *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2001). در حالی که سایر فیتازها در دمای بالای 60 درجه سانتیگراد غیر فعال می‌شوند. به طور کلی آنزیم فیتاز با منشاء میکروبی در مقایسه با فیتازهای گیاهی در محدوده بیشتری از pH و دماهای بالا فعالیت دارند. pH و دمای بهینه فیتازهای گیاهی 6-4/5 و 55-38 می‌باشد (Lei *et al.*, 2007). فعالیت ویژه و تحمل به دمای بالای فیتازهای گیاهی نیز در مقایسه با فیتازهای میکروبی کمتر می‌باشد. مقاومترین فیتاز شناخته شده به دماهای بالا که تا کنون گزارش شده است مربوط به *A. fumigatus* می‌باشد که قرار دادن آنزیم به مدت 20 دقیقه در دمای 90 درجه سانتیگراد تنها 10 درصد از فعالیت اولیه آن را می‌کاهد (Pasamontes *et al.*, 1997). در مورد فیتازها با این که pH بهینه لحاظ می‌شود ولیکن وقتی این آنزیم در معرض pH های دیگر قرار می‌گیرد آنزیم پایداری خود را حفظ کرده و فعالیت آن قابل برگشت می‌باشد. حساسیت فیتازها به دما بیشتر بوده و در دماهای بالا وقتی واسرشته می‌شوند به حالت اول خود باز نمی‌گردند. اما در این میان برخی از فیتازها به عنوان نمونه *A. fumigatus* بعد از واسرشتگی دوباره کنفورماسیون فعال خود را باز یافته و به شکل آنزیم طبیعی اولیه در می‌آیند (Vohra and Satyanarayana, 2003).

3- واکنش به سوبسترای خاص

ویژه بودن نسبت به یک سوبسترا[1] و سازگاری[2] به یک سوبسترای خاص از ویژگی‌های مهم فیتازها به حساب می‌آید به طوری که BPP در مقایسه با HAP ها بر محدوده بسیار کوچکی از سوبستراها اثر می‌گذارند و بر سایر سوبستراها فعالیت آنزیمی‌نشان نمی‌دهند. جدیداً ساختار کریستالی[3] فیتاز با منشاء *B. amyloliquefaciens* نشان داده است که جایگاه فعال دارای بار منفی، محیط الکتروستاتیکی مناسبی را برای کمپلکس دارای بار مثبت کلسیم-

1- Substrate specificity
2- Affinity
3- Crystal structure

Archive of SID

www.SID.ir

فیتات فراهم می‌کند (Ha *et al*., 2000; Oh *et al*., 2004). در *E. coli* ساختار کریستالی فیتاز نشان می‌دهد که تمام گروه‌های فسفات مولکول فیتات با پاکت[1] جایگاه فعال دارای بار منفی واکنش دارند و جایگاه فعال بزرگ این آنزیم شرایط را برای هیدرولیز سایر استرهای فسفات از قبیل pNPP، AMP، ATP، گلوکز 6- فسفات و فروکتوز 1و 6-دی فسفات فراهم می‌کند (Oh *et al*., 2004).

4- فعالیت ویژه

فعالیت ویژه طبق تعریف به مقداری از آنزیم گفته می‌شود که در دمای 37 درجه سانتیگراد و pH (5 یا 5/5) قادر به آزادسازی 1 میکرومول فسفات معدنی از سوبسترای فیتات سدیم (5 میلی مولار) باشد (Greiner, 2004). طبیعی است که این تعریف در رابطه با فیتازهای اسیدی صادق می‌باشد که در این pH فعالیت دارند و در مورد فیتازهای قلیایی pH بایستی در محدوده 7 رعایت شود. برای نشان دادن فعالیت ویژه از واحدهای U/mg، U/g و U/kg استفاده شده است. در صورت کسر عباراتی چون FTU، PPU، FTY نیز استفاده می‌شود (Anonymous, 2010; Anonymous, 2009). فعالیت ویژه یکی از عوامل کلیدی در کاربردی بودن آنزیم در بعد تجاری می‌باشد. فعالیت ویژه فیتازهای شناخته شده تا کنون از کمتر از 10 U/mg تا بیشتر از 1000 U/mg گزارش شده است به شکلی که بیشترین مقدار آن در *Yersinia intermedia*، *Citrobacter braakii* و *Peniophora lycii* مشاهده شده است. بیشترین فعالیت ویژه گزارش شده مربوط به *Yersinia intermedia* به میزان 3960 U/mg و *Citrobacter braakii* به مقدار 3457 U/mg بوده است. فعالیت ویژه فیتازها گیاهی از 43 U/mg تا 636 گزارش شده است (Lei *et al*., 2007).

5- ثابت های بیوشیمیایی

مقادیر Km فیتازها از 10-650µM گزارش شده است و kcat آنها از کمتر از 10 تا $1744S^{-1}$ می‌باشد. بیشترین مقادیر kcat/Km، که بیانگر بازده کاتالیتیک آنزیم است مربوط به *E. coli* و *Citrobacter brakii* می‌باشد و به ترتیب برابر $1/03 \times 10^7$ $m^{-1}s^{-1}$ و $1/34\times 10^7 m^{-1}s^{-1}$ است (Konietzny and Greiner, 2002; 2004). از نظر سینتیک تفاوت زیادی در بین فیتازهای گیاهی هست به شکلی که Km از 30µM تا 300 و kcat از $43\ S^{-1}$ تا 704 متغیر می‌باشد (Lei *et al*., 2007).

6- رفتار فیتازها در حضور یون‌ها و معرف‌های مختلف

فیتازهای مختلف از نظر نیاز به یون‌ها برای فعالیت خود رفتار متفاوتی نشان می‌دهند. ولی دلیل اثر بازدارندگی برخی از این یون‌ها بر روی فعالیت آنزیم را مربوط به اتصال یون به آنزیم یا تشکیل کمپلکس نسبتاً نامحلول یون-

1- Pocket

Archive of SID

www.SID.ir

فیتات می‌توان دانست. ولی به هر حال ظهور رسوب به هنگام افزودن Fe^{2+} یا Fe^{3+} به مخلوط سنجش، این نظریه را تقویت می‌بخشد که کاهش غلظت سوبسترای فعال به دلیل تشکیل کمپلکس کم محلول یون- فیتات می‌باشد (Konietzny *et al.*, 1995). فعالیت اغلب آنزیم‌های تجزیه کننده فیتات که تا کنون شناسایی شده‌اند در حضور یون‌های روی و مس متوقف می‌شود (Konietzny and Greiner, 2002). در اغلب فیتازها به (جز فیتازهای BPP) حضور یون‌ها در غلظت 5 میلی مولار معمولاً باعث کاهش یا توقف فعالیت آنزیم می‌شود. به جز آنزیم فیتاز *A. fumigatus* که در حضور EDTA فعالیتش تا 50 درصد افزایش می‌یابد، EDTA اثر چندانی بر روی سایر فیتازهای اسیدی ندارد (Wyss *et al.*, 1999). این در حالی است که فعالیت فیتازهای قلیایی، به عنوان نمونه فیتاز *Bacillus* sp. DS11 شدیداً در حضور EDTA متوقف می‌شود (Kim *et al.*, 1998; Kerovou *et al.*, 1998) و این بیانگر آن است که یون فلزی برای فعالیت بهینه این گروه از آنزیم‌ها ضروری است. فعالیت آنزیمی فیتازهای جنس *باسیلوس* به یون Ca^{2+} وابسته است و می‌توان نتیجه‌گیری نمود که آنزیم یون را برای کونفورمیشن فعال[1] خود نیاز دارد (Kerovou *et al.*, 2000).

فلوراید به عنوان یک بازدارنده شناخته شده در مورد اسید فسفاتازها، همچنین اثر بازدارنده رقابتی بر روی چندین فیتاز اسیدی باکتریایی، قارچی و گیاهی دارد. غلظت‌های بازدارنده از یون فلوراید در محدوده 0/1 تا 0/5 میلی مولار گزارش شده است. در مقابل، آنزیم‌های قلیایی تجزیه کننده فیتات از *B. amyloliquefaciens* و *B. subtilis* در حضور این ماده هیچ گونه کاهش فعالیتی از خود نشان ندادند (Konietzny and Greiner, 2002). علاوه بر محصول حاصل از هیدرولیز فیتات یعنی یون فسفات، فیتات نیز می‌تواند اثر بازدارنده بر روی فعالیت آنزیم داشته باشد. غلظت بازدارنده سوبسترا با توجه به نوع فیتاز بین 300 µM (فیتاز ذرت) تا 20mM (فیتاز سویا) گزارش شده است. یون‌های مولیبدات، وانادات و ولفرامات[2] نیز به عنوان بازدارندگان آنزیم فیتاز شناخته می‌شوند (Konietzny and Greiner, 2002).

گروه‌بندی فیتازها

فیتات بایستی توسط آنزیم فیتاز شکسته شود تا منابع فسفر آن برای گیاهان، باکتری‌ها و جانوران قابل استفاده باشد. تمرکز بر روی ویژگی‌ها و خصوصیات فیتازهای شناسایی شده تا به حال این نکته را بر ما روشن می‌کند که طبیعت تنها یک سازوکار برای رهاسازی گروه‌های فسفات در همه موجودات قرار نداده است (Mullaney and Ullah, 2005). ممکن است تقسیم‌بندیهای مختلف در رابطه با فیتازها مشاهد شود. برخی از آنها بر اساس مکان استقرار و عمل این آنزیم می‌باشد. به عنوان نمونه برخی

1- Active conformation

2- Wolframate

Archive of SID

www.SID.ir

از فیتازها، فیتاز برون سلولی بوده که غالباً در قارچ‌ها و باکتری‌های جنس *Bacillus* و *Enterobacter* دیده می‌شوند. برخی از فیتازها درون سلولی بوده و برخی هم متصل به دیواره سلولی هستند که از این گروه می‌توان فیتاز *E. coli* و *Kelbsiella* را نام برد. معمولاً فیتازهای باکتری‌های گِرَم منفی درون سلولی بوده در حالی که فیتازهای باکتری‌های گِرَم مثبت و قارچ‌ها برون سلولی هستند (Kim *et al.*, 1998; Konietzny and Greiner, 2002; Shimizu, 1992; Oh *et al.*, 2004; Vohra and Satyanaryana, 2003). مطالعات نشان داده که سویه‌های *A. niger* بهترین تولیدکنندگان فیتاز برون سلولی هستند.

فیتازها را بر اساس pH بهینه فعالیت نیز به دو گروه کلی فیتازهای اسیدی و قلیایی تقسیم‌بندی می‌کنند. از گروه اول می‌توان به فیتازهای قارچی و گروه باکتری‌های گِرَم منفی اشاره کرد که در pH های اسیدی (3/5 تا 6) فعالند. باکتری‌های جنس *Bacillus* معمولاً فیتازهای قلیایی دارند (Vohra and Satyanaryana, 2003; Oh *et al.*, 2004). تقریباً همه فیتازها یک pH بهینه مشخص دارند اما فیتاز *A. fumigatus* یک استثناء است که در محدوده وسیعی از pH (7/3-4) با فعالیت نسبی 80 درصد فعال می‌باشد (Greiner and Konietzny, 2006; Lei and stahl, 2001). با توجه به نقش فیتازها در تغذیه دام و اینکه این آنزیم بایستی درون سیستم گوارشی با pH اسیدی حاکم بر آن فعال باشد، غالب تحقیقات بر روی فسفاتازهای اسیدی متمرکز است.

در یک تقسیم‌بندی دیگر، فیتازها را براساس این که کدام گروه از فسفات ابتدا توسط آنزیم از فیتات برداشته می‌شود نام گذاری می‌کنند. به طور مثال، 3- فیتاز 5- فیتاز یا 6- فیتاز که به ترتیب بیانگر آن است که فسفات شماره 3، 5 و فسفات شماره 6 اولین فسفات های برداشته شده از مولکول فیتات می‌باشند. فیتازهای میکروبی به ویژه نمونه قارچی *A. niger* و باسیلوس ها اغلب گروه فسفات را از روی کربن شماره 1 یا 3 حلقه اینوزیتول برمی‌دارند و جزء 3- فیتازها به حساب می‌آیند اما فیتازهای گیاهی از نوع 6- فیتازند. البته باید در نظر داشت که فیتاز *E. coli* و فیتازهای قارچی بازیدیومیست‌ها (*Peniophora lycii*) استثناست و از نوع 6- فیتازند (Vohra and Satyanaryana, 2003; Cao *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2004; Vats and Banerjee, 2004; Lei and Porres, 2003).

از نظر الگوی بیان، فیتازهای طبیعی را به فیتازهای دایمی[1] و القایی[2] تفکیک می‌کنند (Vohra and Satyanaryana, 2003). شیعه و همکاران مشاهده کردند که تولید فیتاز برون سلولی قارچی در غلظت‌های پایین فسفات معدنی[3] در محیط رشد القاء می‌شود، برخلاف فیتاز قارچی، فیتاز *B. subtilis* در حضور فیتات القاء می‌شود همچنین این آنزیم در حضور عصاره

1- Constitutive
2- Inducible
3- Pi starvation

Archive of SID

www.SID.ir

آرد گندم نیز که حاوی فیتات می‌باشد القا می‌گردد (به نقل از Kerovuo, 2000). در حالی که در *E. coli* وقتی رشد باکتری وارد مرحله سکون یا توقف می‌شود و شرایط بی هوازی حاکم می‌شود تولید آنزیم فیتاز طبیعی تحریک می‌شود (Konietzny and Greiner, 2002). مشاهده رفتار افزایش تولید فیتاز در نمونه‌های میکروبی مختلف در انتهای دوره رشد این نظریه را تقویت می‌کند که محدودیت انرژی و کربن در اواخر دوره رشد تولید آنزیم را زیاد می‌کند.

تا کنون چهار گروه مختلف فیتاز بر اساس توالی ژن‌ها و مناطق حفاظت شده، ساختمان سه بعدی، سازوکارهای واکنش و ویژگی‌های آنزیمی شناخته شده است. چهار گروه عبارتند از Histidine Acid Phosphatase (HAP)، B-Propeller Phytase (BPP)، Cystein Phosphatase (CP) و Purple Acid Phosphatase (PAP) (Mullaney and Ullah, 2005; Tang *et al.*, 2006). ویژگی‌های بیوشیمیایی فیتازهای شناخته شده از منابع مختلف در جدول 1 خلاصه شده است.

الف- هیستیدین اسید فسفاتاز (HAP)

اغلب فیتازهای باکتریایی، قارچی و گیاهی متعلق به این گروه می‌باشند (Oh *et al.*, 2004) و بیشتر مطالعات بر روی فیتازها به این گروه تعلق دارد. موتیف R**H**GXRXP در جایگاه فعال آنزیم می‌باشد که در بین همه اعضا این گروه حفظ شده است (Oh *et al.*, 2004).

فیتازهای متعلق به گروه هیستیدین اسید فسفاتازها آنهایی هستند که گستردگی بیشتری داشته و بیشتر مورد استفاده بوده‌اند. این گروه در بین گیاهان، جانوران و ریزسازواره‌ها پراکندگی دارند (Wodzinki and Ullah, 1996). دلیل نامگذاری هیستیدین اسید فسفاتازها به خاطر وجود اسیدآمینه هیستیدین در دو منطقه حفاظت شده از توالی آنها می‌باشد و در pH اسیدی فعالیت دارند. یکی توالی حفاظت شده R**H**GXRXP که نزدیک انتهای N^1 و دیگری **H**D که نزدیک به انتهای C^2 می‌باشد (Van Etten, 1982). بار مثبت آرژنین در موتیف R**H**GXRXP مسئول تشخیص و درگیر شدن با بار منفی گروه‌های فسفات می‌باشد و **H**D دهنده پروتون برای گروه ترک کننده سوبسترا است (Vohra and Satyanaryana, 2003). با آرایش مناسب اسیدهای آمینه، نحوه قرارگیری دو موتیف فوق‌الذکر به صورتی خواهد بود که یک جایگاه فعال را تشکیل می‌دهد که می‌تواند در یک واکنش دو مرحله‌ای فسفومنواسترها را هیدرولیز نماید. مولکول فیتات شدیداً دارای بار منفی است و برای اینکه با جایگاه فعال آنزیم درگیر شود این جایگاه در pH اسیدی دارای بار مثبت خواهد بود تا بتواند فیتات را هیدرولیز نماید (Lei *et al.*, 2007). بر خلاف BPP، HAPها قادر به هیدرولیز کمپلکس فلز-فیتات به خاطر دافعه بین بار مثبت جایگاه فعال و بار مثبت کمپلکس فیتات-فلز نمی‌باشند.

1- N-terminus
2- C-terminus

Archive of SID

www.SID.ir

فیتازهای این گروه به جز در توالی‌هایی که مربوط به جایگاه فعال آنزیم می‌باشد تشابه چندانی با هم ندارند. فیتاز *E. coli* از جمله HAP یا HAPhy شناخته شده در بین پروکاریوت ها می‌باشد (Greiner *et al.*, 1993). از جمله فیتازهای یوکاریوتی این گروه می‌توان به فیتاز *A. niger* اشاره کرد (Vats and Banerjee, 2005). اغلب فیتازهای قارچی مطالعه شده مربوط به دو گونه *A. niger* و *A. fumigatum* می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که دو زیرگروه از HAPhy وجود دارد، زیرگروهی که برتعداد زیادی از سوبستراها اثر داشته اما فعالیت ویژه اندکی بر روی اسیدفیتیک دارد، در مقابل زیرگروه دیگر فعالیت ویژه بالایی در حضور اسید فیتیک داشته اما بر تعداد کمتری از سوبستراها تاثیرگذار می‌باشد. این دسته از آنزیم‌ها توانایی جداسازی 5 گروه فسفات متصل به فیتات را دارند و ماده نهایی حاصل هیدرولیز این گروه از آنزیم‌ها اینوزیتول مونوفسفات[1] می‌باشد (Oh *et al.*, 2004). غالب فیتازهای شناخته شده تا کنون قادر به رهاسازی 3 یا 5 گروه فسفات از مولکول فیتات می‌باشند، این در حالی است که اخیراً برخی از فیتازها از باکتریها جداسازی شده‌اند که تنها یک گروه از فسفات را آزاد می‌کنند (Greiner, 2004).

Phytate ⟶ IP +5Pi
Phytate ⟶ IP5 + Pi

Oh *et al* (2004) گروه HAP را بر اساس مشابهت توالی آمینواسیدی و خصوصیات بیوشیمیایی از قبیل pH و ویژگی آزادسازی اولین فسفر فیتات (position-specificity of phytate hydrolysis) به 3 زیرگروه PhyA، PhyB وPhyC تقسیم‌بندی کردند:

گروه **PhyA** شامل آنزیم‌هایی برون سلولی با 465 و 469 آمینواسید از *A. niger*، *A. fumigatus*، *A. terrus*، *Emericella nidulans* و *Myceliophthora thermophila* و *Talaromyces thermophilus* می‌باشد. این فیتازها دارای دو pH بهینه فعالیت یعنی 2/5 و 5 و دمای بهینه 55-60 درجه سانتیگراد هستند و بین دو نقطه pH فعالیت آنزیم افت پیدا می‌کند. این گروه از فیتازها در شرایط غیرگلیکوزیله دارای وزن مولکولی 48-50 kDa و در صورت گلیکوزیله شدن دارای وزن مولکولی 128kDa-62 می‌باشند که از طریق SDS-PAGE مشخص شده است. این گروه جزء 3-فیتازها می‌باشند (Vohra and Satyanaryana, 2003; Oh *et al.*, 2004).

گروه **PhyB** دربرگیرنده فیتازهای برون سلولی از *A. niger*، *Saccharomyces cervisiae* و *Schizosaccharomyces pombe* است. دارای 453-479 آمینواسید با وزن مولکولی 50-48 کیلودالتون می‌باشند و در صورت گیکوزیله شدن وزن مولکولی آنها با روش SDS-PAGE تا 65 کیلودالتون تخمین زده شده است. این فیتازها دارای pH بهینه یعنی 2/5 هستند و در pH 5 فاقد

1- *myo*-inositol monophosphate

Archive of SID

www.SID.ir

فعالیت هستند. از مهمترین عضو این گروه فیتاز *A. niger* می‌باشد که به شکل 4 واحدی[1] می‌باشد بر خلاف اغلب فیتازها که تک واحدی هستند. گروه B فیتازها همانند گروه A بر دامنه وسیعی از سوبستراها اثر گذاشته و دمای بهینه فعالیت آن 55-60 درجه سانتیگراد بوده و از نوع آنزیم 3- فیتاز هستند (Vohra and Satyanaryana, 2003; Oh *et al.*, 2004).

گروه **PhyC** دربرگیرنده فیتازهای درون سلولی با 354-439 آمینواسید و با وزن مولکولی 42-45 کیلودالتون هستند. این گروه از آنزیم‌ها در *E. coli*، موش و انسان (اسیدفسفاتازهای پروستاتیک) گزارش شده است. دمای بهینه فعالیت آن 40-60 درجه سانتیگراد و pH بهینه آن 5-6 می‌باشد. این گروه هم بر تعداد زیادی از ترکیبات فسفریله اثرگذار بوده و بر خلاف دو گروه قبلی که 3- فیتاز هستند، نوع آنزیم آن 6- فیتاز می‌باشد (Oh *et al.*, 2004).

ب- بتا پروپلر فیتاز (BPP)

دلیل این نام ساختار سه بعدی مولکول‌های این دسته است که یک شکل پره‌ای[2] با شش تیغه را نشان می‌دهد (شکل 2). این گروه از فیتازها در جنس *Bacillus* از باکتری‌ها و برخی از گیاهان مشاهده شده است و گروهی از فیتازها را شامل می‌شود که برای فعالیت و پایداری خود به کلسیم (Ca^{2+}) نیاز دارند. زیرا یون کلسیم اتصال فیتات به آنزیم را با ایجاد محیط الکتروستاتیک مساعد تسهیل می‌کند. فقدان توالی موتیف[3] RHGXRXP در این گروه باعث شده است که این گروه را عضوی از گروه فیتازهای HAP ندانند (Kim *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 2001; Ha *et al.*, 2000). دو ویژگی بارز این گروه فعالیت وابسته به فلز[4] و افزایش پایداری آنها در حضور کاتیون فلزی است (Lei and Porres, 2003; Lei *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2001).

دو جزء در سازوکار کاتالیتیکی BPP ها درگیر می‌باشد، یکی جایگاه تمایل جذبی[5] که سوبسترا را جذب می‌کند و دیگری جزء مجاور آن که مکان برش[6] در هیدرولیز گروه فسفات می‌باشد. به این ترتیب دو مولکول فسفات در مجاورت هم یکی در جایگاه تمایل جذبی و دیگری در جایگاه هیدرولیز قرار می‌گیرد و تنها یکی از آنها از سوبسترا برداشته می‌شود. به این خاطر این آنزیم‌ها تنها 3 گروه فسفات از 6 گروه فسفات مولکول فیتات را آزاد می‌کنند (Lei *et al.*, 2007). BPPها از نظر pH بهینه، در محدوده خنثی یا بازی فعالیت دارند و بر تعداد محدودی از سوبستراها اثر می‌گذارند. آنها برای فعالیت خود کلسیم نیاز داشته و تنها 3 فسفات از 6 فسفات موجود در مولکول فیتات را آزاد می‌کند. در نتیجه، اینوزیتول تری‌فسفات به عنوان ماده نهایی عمل هیدرولیز آنزیم فیتاز محسوب می‌شود. با توجه به pH بهینه فعالیت، این گروه به

1- Tetrameric
2- Propeller

3- Sequence motif
4- Metal-mediated
5- Affinity site
6- Cleavage site

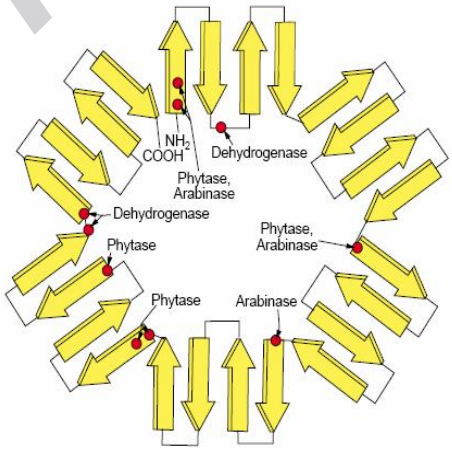
Archive of SID

www.SID.ir

نام فیتازهای قلیایی[1] هم شناخته می‌شوند (Oh *et al.*, 2004).

Ca-Phytate ⟶ IP3 + 3Pi

Oh *et al* (2004) گروه BPP را با نام **PhyD** در مقاله خود مورد بحث قرار داده‌اند. این فیتازها پروتئین‌های برون سلولی را شامل می‌شوند که وزن مولکولی تقریبی آنها 42 کیلو دالتون می‌باشد. دما و pH بهینه آنها به ترتیب 70-55 درجه سانتیگراد و 8-7 می‌باشد. این گروه بر روی سوبستراهای معمول HAPها قدرت هیدرولیز کمی‌داشته و بر فیتات کلسیم (و نه فیتات تنها) اثرگذار بوده و از نوع آنزیم‌های 3-فیتاز می‌باشند.



شکل 2- نمایشی از ساختار مولکولی بتا پروپلر فیتازها (Ha *et al.*, 2000).

Figure 2- Molecular structure of BPP (Ha *et al.*, 2000).

1- Alkaline phytases

ج- اسید فسفاتاز بنفش (PAP)

این گروه از متالوآنزیم‌ها یا متالوفسفواسترازها[2] در برخی از گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و جانوران وجود دارند. همه اعضای این خانواده دارای هفت اسیدآمینه (D, D, Y, N, H, H, H) پیوند یابنده[3] با فلز در یک آرایش خاص می‌باشند. نتیجه همردیفی توالی آمینواسیدهای پروتئین‌های فیتازی این گروه نشان می‌دهد که موتیف DXG..GDXXY..GNH(E,D))VXXH..GHX H. در آنها حفظ شده است (Mullaney and Ullah, 2005; Olczak *et al.*, 2003) و این اسیدهای آمینه در پنج موتیف حفاظت شده (**D**xG/G**D**x$_2$**Y**/G**NH**(E,D) /Vx$_2$**H**/G**H**xH) قرار دارند. PAPهای جانوری دارای مرکز دو هسته‌ای فلزی[4] می‌باشد که از دو آهن تشکیل شده است در حالی که در PAPهای گیاهی یکی از آهن‌ها با یون Zn^{2+} یا Mn^{2+} جایگزین شده است. مرکز دو هسته فلزی به صورت Fe(III) - Me(II) می‌باشد که در آن Me می‌تواند Fe^{2+}، Mn^{2+} یا Zn^{2+} باشد. در گیاهان دو گروه از PAPها قابل تشخیص‌اند، PAPهای کوچک که به صورت مونومر هستند با وزن مولکولی حدود 35 کیلودالتون وPAPهای بزرگ که به صورت دایمر هستند و هر جزء وزن مولکولی 55 کیلو دالتون دارد (Olczak *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2007). فعالیت فیتازی برای برخی از اعضاء این خانواده در گیاهان سویا و برنج گزارش شده

2- Metallophosphoesterase
3- Metal-liganding
4- Binuclear metallic center

Archive of SID
www.SID.ir

است و بررسی فیتاز موجود در جوانه‌های در حال رشد بذور سویا (*GmPhy*) نشان داد که فعالیت ویژه آن در مقایسه با فیتازهای قارچی پایین‌تر است و هیدرولیز آهسته و متعادل فیتات در بذرهای گیاهان شاید در فرایند جوانه‌زنی آنها کارامدتر باشد (Mullaney and Ullah, 2005).

د- سیستئین فسفاتاز (CP)

فرض بر این است که حضور میکروارگانیسم در سیستم گوارشی نشخوارکنندگان باید دلیلی بر توانایی استفاده آنها از فیتات باشد و این در حالی است که تک معده‌ایها قادر به این امر نیستند. اخیراً گروه دیگری از فیتازها از باکتری بی‌هوازی روده‌ای به نام *Selenomonas ruminntium* گزارش شده است (Tang *et al*., 2006; Lei *et al*., 2007; Mullaney and Ullah, 2005). دما و pH بهینه برای فعالیت این آنزیم تک واحدی با وزن 46 کیلودالتون به ترتیب 55-50 درجه سانتیگراد و 5/5-4 می‌باشد. کاتیون سرب اثر افزاینده بر فعالیت این آنزیم داشته در حالی که کاتیون‌های Fe^{2+}، Fe^{3+}، Hg^{2+} و Zn^{2+} به شدت اثر بازدارنده بر فعالیت آنزیم دارند. مطالعات همردیفی توالی این ژن، تشابه آن را با سیستئین فسفاتاز نشان می‌دهد. مشابهت توالی آن با توالی جایگاه فعال پروتئین تیروزین فسفاتاز (PTP)، یعنی موتیف HCXXGXXR(T/S) می‌باشد. این آنزیم همانند HAPها قادر به جداسازی 5 گروه فسفات از فیتات می‌باشد. جایگاه فعال این آنزیم لوپی[1] را تشکیل می‌دهد که همانند پاکت PTPها محلی برای اتصال سوبسترا عمل می‌کند. عمق این پاکت بسیار مهم می‌باشد زیرا واکنش به سوبستراهای مختلف به آن مربوط می‌شود. پاکت پهن و عمیق CPhy باکتری *S. ruminntium* در مقایسه با PTP و همچنین حضور محیط الکتروستاتیک مناسب باعث می‌شود تا این فیتاز بر سوبسترای فیتات و دیگر ترکیبات فسفریله موثر واقع شود (Lei *et al*., 2007).

کاربرد فیتازها

الف- در تغذیه دام و جیره غذایی

جانوران تک معده‌ای از قبیل خوک، طیور و ماهی به دلیل فقدان فیتاز در داخل سیستم گوارشی خود قادر به استفاده از فیتات موجود در جیره غذایی خود نمی‌باشند. بنابراین برای تامین فسفات معدنی مورد نیاز آنزیم فیتاز به جیره آنها افزوده می‌شود. به نظر می‌رسد که میکروفلور تولیدکننده فیتاز در روده بزرگ آنها واقع شده که با فرض آزادسازی فسفات هم چندان قابلیت جذب در این مکان برای آن فراهم نمی‌شود. باید در نظر داشت که فیتات به خاطر قابلیت داشتن 12 بار منفی در مولکول خود می‌تواند کاتیون‌های فلزی مختلف و همچنین پروتئین‌ها را با توجه به pI آنها جذب نموده و بدین صورت در انحلال و جذب آنها اختلال ایجاد نماید. بدین خاطر فیتاز در جیره غذایی این گروه از جانوران تلفیق

1- Loop

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شود تا فراهمی فسفر و عناصر معدنی، آمینواسیدها و انرژی را بهبود بخشد. به خدمت گرفتن آنزیم‌های فیتاز در سال 1990 به دنبال جرایمی‌سنگینی که برای تولیدکنندگان و پرورش دهندگان خوک و طیور در نتیجه آلودگی فسفات در مناطقی که تولید گسترده‌ای داشتند، آغاز شد. در این رابطه گروهی از فیتازها با نام تجاری Finase، Natuphos، Allzyme و Bio-Feed (جدول 2) از منابع میکروبی تولیدکننده فیتاز که غالب آن از قارچ *آسپرژیلوس* می‌باشد تولید و مورد استفاده قرار گرفته‌اند و توانسته‌اند 25 تا50 درصد هدر رفت فسفر را کاهش دهند (Haefner *et al*., 2005; Kerovuo, 2000; Vohra and Satyanarayana, 2003; Selle *et al*., 2002; Selle and Ravindran, 2007). فیتازهایی که به جیره غذایی طیور و آبزیان اضافه می‌شوند باید دارای فعالیت ویژه بالا، موثر بر سوبستراهای مختلف، فعال در محدوده وسیعی از pH، پایداری خوب در زمان نگهداری و انجام فرایند تهیه‌سازی جیره غذایی[1] باشند که معمولاً دمای این فرایند بین 65 تا 90 درجه سانتیگراد متغیر می‌باشد و به منظور حذف آلودگیهای *Salmonella* انجام می‌گیرد (Konietzny and Greiner, 2002; Lei *et al*., 2007).

اولین آزمایش در این زمینه به بیش از 40 سال پیش برمی‌گردد، زمانی که نلسون و همکارانش در آزمایش مقدماتی خود فیتاز استخراجی از *A. ficcum* را در جیره غذایی به کار بردند و اینگونه نتیجه گرفتند که هزینه تمام شده برای آنزیم کاربردی بسیار گران بوده و نمی‌توان در جیره غذایی استفده نمود (Nelson *et al*., 1968). جیره غذایی طیور g/Kg 2/5 تا 4 فسفر به شکل فیتات دارا می‌باشد. نکته قابل توجه آن است که زمان کم حضور فیتات در سیستم گوارشی پرندگان و همچنین محدودیت pH حاکم در سیستم گوارشی آنها، اجازه تجزیه کامل را به آن نخواهد داد و فیتازهای افزودنی تنها قادر به تجزیه 35 درصد فیتات خواهند بود (Selle and Ravindarn, 2007). در خوکها استفاده از فیتاز به میزان U/Kg 750 به همراه ذرت فراهمی فسفر را از 18 درصد تا 56 درصد افزایش داد این در حالی بود که موقع افزودن به گندم میزان افزایش 62 تا 74 درصد و در مورد چاودار 52 تا 67 درصد گزارش شده است (Lei *et al*., 2007). ارزش معادل فسفر برای فیتاز استفاده شده گر چه متغیر است و به سن دام، نوع خوراک و غیره بستگی دارد ولی به صورت تقریب FTU/Kg 840 معادل g/Kg 1 فسفر می‌باشد (Selle and Ravindarn, 2007). آزمایشات متعدد مزرعه ای و آزمایشگاهی نشان داده است که استفاده از 500 تا 1000 واحد آنزیم فیتاز می‌تواند جایگزین 1 گرم فسفات معدنی در جیر ه غذایی دام شود و ضایعات فسفر کل را 30 تا 50 درصد کاهش دهد (Lei and Porres, 2003). علاوه بر استفاده مستقیم آنزیم فیتاز، میکروب تولید کننده فیتاز را نیز به شکل پروبیوتیک می‌توان به جیره غذایی اضافه نمود. بر اساس تعریفی که FAO/WHO برای واژه

1- Pelleting

Archive of SID

www.SID.ir

پروبیوتیک[1] ارایه داده است، میکروارگانیسم های زنده‌ای را شامل می‌شود که وقتی به مقدار کافی استفاده می‌شوند مزیت‌هایی برای سلامتی میزبان خود به دنبال دارند. ریزسازواره‌های تولیدکننده فیتاز به شرط اینکه اثرات بیماریزایی بر روی میزبان خود نداشته باشند می‌توانند مستقیماً به جیره غذایی اضافه شوند و به عنوان پروبیوتیک استفاده شوند (Afinah *et al.*, 2010).

ب- کاربرد غذایی و تغذیه انسان

تا کنون هیچ محصول فیتاز به منظور کاربرد و استفاده در بخش تغذیه‌ای انسان وارد بازار نشده است. در غذاهای تهیه شده از غلات و حبوبات که میزان بالایی از فیتات را به همراه خود دارند، مصرف روزانه فیتات‌ها ممکن است تا 4/5 گرم برسد، اسید فیتیک نقش بازدارنده خود را در جذب عناصر معدنی از قبیل آهن، روی، مس، کلسیم، منگنز و منیزیم بازی کرده و کمبود آهن در زنان باردار و گیاهخواران در کشورهای در حال توسعه شایع است و شاهد کمبود روی و آهن ناشی از زیادی فیتات در جیره غذایی هستیم. بخشی از اثرات منفی حضور فیتات در جیره غذایی بدون حضور فیتاز در قسمت فوق آورده شده است (Haefner *et al.*, 2005; Kerovuo, 2000; Lei and Porres, 2003; Greiner and Konietzny, 2006; Vohra and Satyanarayana, 2003). ریزسازواره‌های بی خطر برای انسان از قبیل *Sachromyces*، *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* که سالم بودن محصولات جانبی آنها از مدتها قبل برای دام و انسان مشخص شده است می‌تواند در کاهش میزان فیتات غذای انسان کاربرد داشته باشد ولی فعالیت فیتازی بالا از هیچ یک از آنها مشاهده نشده است. در صورت مشاهده چنین موردی می‌توان آنزیم حاصل را بدون خالص سازی مستقیماً در جیره غذایی انسان استفاده کرد (Greiner and Konietzny, 2006). همچنین برای رفع مشکل فعالیت فیتازی پایین سویه‌های نامبرده از طریق انتقال ژن فیتاز از سایر منابع میکروبی به این سویه‌ها (از قبیل *S. cervisia* و *Pichia pastoris*) می‌توان اقدام به تولید فیتاز نوترکیب نمود (Lei and Porres, 2003). علی رغم بهبود فراهمی زیستی عناصر معدنی و ریزمغذی‌ها، افزودن فیتاز در خلال تهیه مواد غذایی (مثلاً پخت نان) بر کیفیت و عملکرد آن و بهینه شدن از نظر اقتصادی تاثیرگذار است. ذکر این نکته ضروری است که فیتات در کنار مضراتش دارای مزایایی از قبیل جلوگیری از تشکیل سنگ کلیه، بیماریهای قلبی و سرطان می‌باشد (Greiner and Konietzny, 2006).

ج- تهیه مایواینوزیتول فسفات‌ها

مایواینوزیتول (مونو، دی، تری و تترا) فسفات نقش اساسی در فرایند پیام رسانی غشایی[2] و در تحرک کلسیم از بخش ذخیره درون سلولی بافت‌های حیوانی و گیاهی دارد. کاربردهای ویژه اینوزیتول‌های فسفات در درمان

1- Probiotic

2- Transmembrane signaling

Archive of SID

www.SID.ir

بیماری‌ها مانند اثر بازدارنده آن در مقابل عفونت‌های رتروویروسی، بیماریهای تنفسی از قبیل آسم و کاهش بیماریهای قلبی و سرطان و منافع مشابه برای سلامت انسان باعث شده که این گروه از مواد مورد توجه قرار بگیرند (Shamsuddin, 2002). راه معمول تولید این دسته از مواد، استفاده از روش‌های شیمیایی می‌باشد که این روش همراه با مشکلاتی بوده و تحت دماها و فشارهای خیلی بالا رخ می‌دهد. یکی از روش‌های جایگزین، استفاده از آنزیم فیتاز برای تهیه مایواینوزیتول‌ها ست، زیرا در فرایند هیدرولیز فیتات تجزیه مرحله به مرحله آن رخ می‌دهد و شکل ساده هیدرولیز مرحله‌ای آن به صورت زیر خواهد بود (Haefner *et al.*, 2005; Kerovuo, 2000; Vohra and Satyanarayana, 2003; Konietzny and Greiner, 2002).

IP6 ⟶ IP5 ⟶ IP4 ⟶ IP3 ⟶ IP2 ⟶ IP

تعداد و توزیع گروههای فسفات بر روی حلقه مایواینوزیتول تعیین‌کننده اثر متابولیکی[1] آنها خواهد بود. برخی از این ترکیبات به ویژه D-myo-inositol (1,4,5) triphosphate و D-myo- inositol (1,3,4,5) tetrakisphosphate به عنوان پیام رسان ثانویه درون سلولی[2] نقش مهمی را ایفا می‌کند (Greiner and Konietzny, 2006). اسید فیتیک و مواد حد واسط اینوزیتول‌ها در درمان بیماریهای پارکینسون، آلزایمر، MS و کاهش کلسترول و تری گلیسریدها کاربرد دارند (Afinah *et al.*, 2010; Greiner and Konietzny, 2006).

د- صنعت پالپ[3] و کاغذ

برداشت یا حذف اسید فیتیک در صنعت کاغذ ممکن است مهم باشد. یک آنزیم فیتاز مقاوم به دماهای بالا می‌تواند یک عامل زیستی تازه در تخریب اسید فیتیک باشد. در نتیجه تجزیه آنزیمی‌اسید فیتیک مواد جانبی شدیداً سمی و سرطانزا تولید نخواهد شد. بنابراین استفاده از فیتاز در این صنعت موافق و سازگار با محیط[4] خواهد بود (Kerovuo, 2000).

و- اصلاح‌کننده خاک[5]

در مکان‌های خاص اسیدفیتیک و مشتقات آن ممکن است بیشتر از 50 درصد کل فسفر آلی در خاک را شامل شود. بنابراین استفاده از آنزیم فیتاز به صورت غیر مستقیم از طریق موجودات تولید کننده آن برای رهاسازی فسفات از منبع فیتات و بهبود تغذیه فسفری مد نظر می‌باشد. استفاده از ریزسازواره‌های توانمند در تولید فیتاز یا گیاهان تراریخته حاوی ژن رمز کننده فیتاز بخشی از تحقیقات در این زمینه را به خود اختصاص داده‌اند. استفاده از فیتاز در خاک زیر کشت ذرت، تحریک رشد محصول را در نتیجه تجزیه فیتات به همراه داشت (Vohra and Satyanarayana, 2003). این در حالی است که

1- Metabolic effect
2- Interacellular second messenger

3- Pulp
4- Environmentally friendly
5- Soil amendment

Archive of SID

www.SID.ir

جورج و همکارانش رفتار آنزیم فیتاز برون سلولی *A. niger* در گیاه تراریخت *Arabidopsis thaliana* را تحت شرایط خاک مورد بررسی قرار داده و به غیرفعال شدن این آنزیم در اثر جذب سطحی شدن توسط کلوئیدهای خاک اشاره داشتند (Bunemann, 2008).

ه- تولید پراکسیدازها

یکی از کاربردهای فیتازها تولید پراکسیدازهای نیمه سنتتیک می‌باشد. محققان دریافته اند که HAPها با توالی جایگاه فعال RHGXRXP زمانی که یون وانادات به داخل جایگاه فعال آنها تلفیق می‌شود به عنوان پراکسیداز عمل می‌کنند (Vohra and Satyanarayana, 2003).

دورنمای تحقیقات

مهندسی پروتئین راهی برای بهینه نمودن آنزیم‌ها با توجه به نیاز ما می‌باشد. با مهندسی پروتئین می‌توان دامنه فعالیت آنزیم در محدوده بیشتری از pH، پایداری آنزیم به دماهای بالا و فعالیت ویژه آن را تغییر داد. یکی از راه های بهینه نمودن فیتازها برای مصارف کاربردی استفاده از مهندسی پروتئین برای بالا بردن فعالیت ویژه یا بالا بردن تحمل دمایی آن است. در این راستا با استفاده از مقایسه توالی 13 گونه قارچی، آنزیم فیتاز مصنوعی طراحی شد که دارای تحمل دمایی 15-26 درجه سانتیگراد بیشتر نسبت به توالی های قبلی بود (Lehmann *et al.*, 2000 a, b). از آنجا که مکان اصلی اثرگذاری فیتاز بر روی فیتات معده (pH خوک 5-2 و طیور 5-4) می‌باشد و pH حاکم بر آن اسیدی است، برخی از مطالعات بر روی تغییر pH بهینه فعالیت آنزیم فیتاز، از طریق اصلاح یونیزه شدن گروههایی که مستقیماً در کاتالیز درگیرند، جایگزینی اسیدآمینه‌ای که در جایگاه فعال حضور دارد به شیوه پیوندهای هیدروژنی یا پل های نمکی متمرکز شده است (Lei *et al.*, 2007; Tomschy *et al.*, 2002). مقاومت فیتاز به پروتئازها جنبه دیگری از مطالعات بهینه سازی فیتازها برای مصارف تجاری است. به طور مثال فیتاز *A. niger* در مقایسه با فیتاز *E.coli* به پپسین حساستر می‌باشد. مقایسه چهار فیتاز قارچی با فیتاز *E. coli* و فیتاز *B. subtilis* نشان داد که فیتازهای قارچی به پانکراتین و پپسین حساسند در حالی که فیتاز *E. coli* در حضور هر دو پایدار بود اما فیتاز *B. Subtilis* فقط به پانکراتین مقاومت نشان داد (Lei *et al.*, 2007).

ایجاد گیاهان و حیوانات تراریخته که دارای ژن رمزکننده فیتاز می‌باشند به عنوان یکی از راه حل‌های پیش روی محققان برای غلبه بر مشکل تامین فسفات مورد نیاز آنها از منابع فسفات آلی و به ویژه فیتات می‌باشد. در این رهگذر تولید خوک تراریخته با نام EnviroPig که با قابلیت بیان بالای فیتاز باکتری *E. coli* (appA) در بزاق دهان حیوان می‌باشد کاهش فسفر در مدفوع را تا 75 درصد نشان داده است. تولید گیاهان تراریخته سویا، تنباکو، برنج و ... گزارش شده

Archive of SID

www.SID.ir

است (Lei *et al*., 2007). بـه نظـر مـی‌رسـد در انتقال ژن فیتاز به گیاهـان، ژن‌هـای فیتـاز بـسیار خـاص و ویـژه مثـل ژن فیتـاز *باسـیلوس* نـامزد مناسبتری باشد زیـرا فیتـازی بـا محـدوده عمـل وسیع بر سوبستراهای مختلـف ممکـن اسـت در مسیرهای متـابولیکی سـلولهای گیـاهی اخـتلال ایجاد نماید (Konietzny and Greiner, 2004).

جدول 2- فیتازهای میکروبی تجاری شده (Cao *et al*., 2007; Vohra and Satyanarayana, 2003; Pandy *et al*., 2001; Greiner and Konietzny, 2006).

Table 2- Some commercial microbial phytases (Cao et al., 2007; Vohra and Satyanarayana, 2003; Pandy et al., 2001; Greiner and Konietzny, 2006).

نام شرکت Company	کـشور تولیـد کننده Producer country	منبع فیتاز Source of phytase	سویه تولیدی Strain of Microorganism in phytase production	نام تجاری فیتاز Commercial brand of phytase
AB Enzymes	آلمان Germany	*A. awamori*	*Trichoderma reesei*	Finase
Alko Biotechnology	فنلاند Finland	*A. oryzae*	*A. oryzae*	SP, TP, SF
Alltech	آمریکا USA	*A. niger*	*A. niger*	Allzyme phytase
BASF	آلمان Germany	*A. niger*	*A. niger*	Natuphos
BioZyme	آمریکا USA	*A. oryzae*	*A. oryzae*	AMAFERM
DSM/Novo Nordisk	آمریکا USA	*P. lycii*	*A. oryzae*	Bio-Feed Phytase
Fermic	مکزیک Mexico	*A. oryzae*	*A. oryzae*	Phyzyme
Finnfeeds International	فنلاند Finland	*A. awamori*	*T. reesei*	Avizyme
Genencor International	آمریکا USA	*P. simplicissimum*	*Penicillium funiculosum*	ROVABIO
Roal	فنلاند Finland	*A. awamori*	*T. reesei*	Finase
Novozymes	دانمارک Denmark	*A. oryzae*	*A. oryzae*	Ronozyme (Roxazyme).
Diversa/Syngenta		*E. coli*		Quantum
Cenzone		*fungi*		Cenzyme

منابع

Afinah S, Yazid AM, Anis Shobirin MH, Shuhaimi M (2010). Phytase: application in food industry. International Food Research Journal 17: 13-21.

Archive of SID

www.SID.ir

Anonymous (2009). Safety and efficacy of the product Ronozyme® NP (6-phytase). for use as feed additive for poultry, weaned piglets and pigs for fattening (Scientific Opinion). The EFSA Journal 1: 1-20.

Anonymous (2010). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Natuphos® (3-phytase). for minor avian species (quails, pheasants, partridges, guinea fowl, geese, pigeons, ostriches, peacocks, flamingos). and ornamental birds (Scientific Opinion). EFSA Journal 8: 1427.

Berka RM, Rey MW, Brown KM, Byun T, Klotz AV (1998). Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus.* Applied Environmental Microbiology 64: 4423–4427.

Bunemann EK (2008). Enzyme additions as a tool to assess the potential bioavailability of organically bound nutrients. Soil Biology and Biochemistry 40: 2116-2129.

Casey A, Walsh G (2004). Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. Journal of Biotechnology 110: 313-322.

Cao L, Wang W, Yang C, Yang Y, Diana J, Yakupitiyage A, Luo Z, Dapeng L (2007). Application of microbial phytase in fish feed. Enzyme and Microbial Technology 40: 497-507.

Cho J, Lee C, Kang S, Lee J, Lee H, Bok J, Woo J, Moon Y, Choi Y (2005). Molecular cloning of a phytase gene (phy M). from *Pseudomonas syringae* MOK1. Current Microbiology 51: 11–15.

Cho JS, Lee CW, Kang SH, Lee JC, Bok JD, Moon YS, Lee HG, Kim SC, Choi YJ (2003). Purification and Characterization of a Phytase from *Pseudomonas syringae* MOK1. Current Microbiology 47: 290–294.

Choi YM, Suh HJ, Kim JM (2001). Purification and Properties of Extracellular Phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. Journal of Protein Chemistry 20: 287–292.

De Angelis M, Gallo G, Corbo MR, McSweeney PLH, Faccia M, Giovine M, Gobbetti M (2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. International Journal of Food Microbiology 87: 259–270.

Dvorakova AJ (1998). Phytase: sources, preparation and exploitation. Folia Microbiology 43: 323–338.

Ehrlich KC, Montalbano BG, Mullaney EJ, Dischinger HCJ, Ullah AH J (1993). Identification and cloning of a second phytase gene (phy B). from *Aspergillus niger (ficuum).* Biochemistry and Biophysic Research Community 195: 53–57.

Golovan S, Wang G, Zhang J, Forsberg CW (2000). Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme which exhibits both phytase and acid phosphatase activities. Canadian Journal of Microbiology 46: 59–71.

Greaves MP, Anderson G Webley DM (1967). The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. Biochim. Biophys. Acta 132: 412-418.

Greiner R, Konietzny U (2006). Phytase for Food Application. Food Technology and Biotechnology 44: 125–140.

Greiner R (2004). Purification and properties of a phytate-degrading enzyme from *Panteoa agglomerans*. Protein Journal 23: 567-576.

Greiner R, Haller E, Konietzny U, Jany KD (1997). Purification and characterization of a phytase from *Kelbsiella terrigena.* Archives of Biochemistry and Biophysics 341: 201–206.

Greiner R, Konietzny U, Jany KD (1993). Purification and characterization of two APases from *Escherichia coli.* Archives of Biochemistry and Biophysics 303: 107–113.

Gulati HK, Chadha BS, Saini HS (2007). Production and characterization of thermostable alkaline phytase from Bacillus laevolactitus isolated from rhizosphere soil. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34: 91-98.

Archive of SID

www.SID.ir

Ha NC, Oh BC, Shin S, Kim HJ, Oh TK, Kim YO, Choi KY, Oh BH (2000). Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. Nature. Struct. Biol. 7: 147–153.

Haefner S, Knietsch A, Scholten E, Braun J, Lohscheidt M, Zelder O (2005). Biotechnological production and applications of phytases. Applied Microbiology and Biotechnology 68: 588–597.

Huang H, Luo H, Yang P, Meng K, Wang Y, Yuan T, Bai Y, Yao B (2006). A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia*. Biochemical and Biophysical Research Communications 350: 884–889.

Irving GCJ, Cosgrove DJ (1971). Inositol phosphate phosphatase of microbiological origin. Some properties of a partially purified bacterial (*Pseudomonas* SP.). phytase. Australian Journal of Biological Sciences 24: 547–557.

Jareonkitmongkol S, Ohya M, Watanbe R, Takagi H, Nakamori S (1997). Partial purification from a soil isolates bacterium, *Klebsiella oxytoca* MO-3. Journal of ferment. Bioeng. 83: 393-394.

Kerovuo J (2000). A novel phytase from *Bacillus* Characterization and production of the enzyme. PhD thesis.

Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology 64: 2079-2085.

Kim HW, Kim YO, Lee JH, Kim KK, Kim YJ (2003). Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. Biotechnology Letter 25: 1231–1234.

Kim OK, Lee JK, Kim HK, Yu JH, Oh TK (1998). Cloning of the thermostable phytase gene (phy). from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letter 162: 185–191.

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

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

Konietzny U, Greiner R, Jany KD (1995). Purification and characterization of a phytase from oat spelt. Journal of Food Biochemistry 18: 165-183.

Lehmann M, Kostrewa D, Wyss M, Brugger R, D'Arcy A, Pasamontes L, van Loon APGM (2000a). From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. Protein Engineering 13: 49–57.

Lehmann M, Lopez-Ulibarri R, Loch C, Viarouge C, Wyss M van Loon APGM (2000b). Exchanging the active site between phytases for altering the functional properties of the enzyme. Protein Science 9: 1866–1872.

Lei GX, Stahl CH (2001). Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. Applied Microbiology and Biotechnology 57: 474-481.

Lei GX, Poress JM (2003). Phytase enzyology, applications, and biotechnology. Biotechnology Letters 25: 1787-1794.

Lei GX, Porres JM, Mullaney EJ, Brinch-Pedersen H (2007). Phytase: Source, structure and application. Industerial enzymes 505-529.

Lei GX, Ku PK, Miller ER, Yokoyama MT, Ullrey DE (1993a). Supplementing corn-soybean meal diets with microbial phytase maximizes phytate phosphorus utilization by weanling pigs. Journal of Animal Science. 71: 3368–3375.

Archive of SID

www.SID.ir

Lei GX, Ku PK, Miller ER, Ullrey DE, Yokoyama MT (1993b). Supplemental microbial phytase improves bioavailability of dietary zinc to weanling pigs. Journal of Nutrition 123: 1117–1123.

Mullaney EJ, Ullah A (2005). Phytases: attributes, catalytic mechanisms and applications. *In* Proceedings of the Bouyoucos Conference: Inositol Phosphates in the Soil–Plant–Animal System, Sun Valley, Idaho, USA, 21–24 August 2005. Edited by B. L. Turner, A. E. Richardson, and E. J. Mullaney. 17–18.

Nelson TS, Shieh TR, Wodzinski RJ, Ware JH (1968). The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. Poult. Sci. 47: 1842-1848.

Oh BC, Choi WC, Park S, Kim YO, Oh TK (2004). Biochemical properies and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. Applied Microbiology and Biotechnology 63: 362-372.

Olczak M, Morawieka B, Watorek W (2003). Plant purple acid phosphatases- genes, structures and biological function. Acta Biochimica Polonica 50: 1245-1256.

Pandy A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Current Science 77: 149-162.

Pandey A, Szakacs G, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA, Soccol VT (2001). Production, purification and properties of microbial phytases. Bioresource Technology 77: 203-214.

Pasamontes L, Haiker M, Henriquez-Huecas M, Mitchell DB, van Loon APGM (1997). Cloning of the phytase from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. Biochim. Biophys. Acta. 1353: 217–223.

Popanish S, Klomsiri C, Dharmsthiti S (2003). Thermo-acid-tolerant phytase production from a soil bacterium in a medium containing rice bran and soybean meal extract. Bioresource Technology 87: 295-298.

Powar VK, Jagannathan V (1982). Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 151: 1102–1108.

Quan CS, Zhang LH, Wang YJ, Ohta YY (2001). Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast. Candida krusei.J. Biosci. Bioeng. 92: 154–160.

Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK (1989). Phytases in Cereals and Legumes. Boca Raton, FL: CRC Press.

Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK (1982). Phytates in legumes and cereals. In: Chichester, C. O., Mrak, E. M., and Stewart, G. F. (Eds.)., Advances in Food Chemistry, Academic Press, New York, 1–92.

Richardson AE, Hadobas PA (1997). Soil isolates of *Pseudomonas* sp. that utilize inositol phosphates. Canadian Journal of Microbiology 43: 509-516.

Rodrıguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant and Soil 287: 15–21.

Sarikhani MR, Malboobi MA, Aliasgharzad N, Greiner R, Bambai B (2012). Isolation, cloning and characterisation of a novel phytase gene from *Pseudomonas putida* strain P13. 4th International Congress Eurosoil, Soil science for the benefit of mankind and environment, 2-6 July, Bari, Italy.

Sarikhani MR, Malboobi MA, Aliasgharzad N, Greiner R, Bambai B (2011). Cloning and characterization of a new phosphatase gene from *Pseudomonas putida* strain P13. 4th International Conference on Environmental Industerial and Applied Microbiology, 14-16 September, Malaga, Spain.

Sarikhani MR, Malboobi MA, Aliasgharzad N, Greiner R, Yakhchali B (2010). Functional screening of phosphatase-encoding genes from bacterial sources. Iranian Journal of Biotechnology 8: 275-279.

Archive of SID

www.SID.ir

Sajidan A, Farouk A, Greiner R, Jungblut P, Müller EC, Borriss R (2004). Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium *Klebsiella* sp. ASR1. Applied Microbiology Biotechnology 65: 110–118.

Selle PH, Ravindran V, Caldwell RA, Bryden WL (2002). Phytate and phytase: consequences for protein utilization. Nutrition Research Reviews 13: 255-278.

Selle PH, Ravindran V (2007). Microbial phytase in poultry nutrition. Animal Feed Science and Technology 135: 1-41.

Sequeilha L, Lambrechts C, Boze H, Moulin G, Galzy P (1992). Purification and porperties of the phytase from *Schwanniomyces castelii*. Journal of Fermentation and Bioengineering 74: 7-11.

Shamsuddin AM (2002). Anti-cancer function of phytic acid .International Journal of Food Science & Technology 37: 769 – 782.

Shieh TR, Ware JH (1968). Survey of microorganisms for the production of the production of extracellular phytase. Applied Microbiology 16: 1348-1351.

Shimizu M (1992). Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto). N-77. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 56: 1266̄1269.

Shimizu M (1993). Purification and characterization of phytase and acid phosphatase from *Aspergillus oryzae* K1. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 57: 1364-1365.

Shin S, Ha NC, Oh BC, Oh TK, Oh BH (2001). Enzyme mechanism and catalytic property of b-propeller phytase. Structure 9: 851-858.

Suzuki U, Yoshimura K, Takaishi M (1907). Ueberein enzym phytase das anhydro-oxy-methilen diphosphorusaure spaltet. Bulletin of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University 7: 503–512.

Tambe SM, Kaklij GS, Kelkar SM, Parekh LJ (1994). 2 distinct molecular-forms of phytase from *Klebsiella-aerogenes* evidence for unusually small active enzyme peptide. Journal of Fermentation and Bioengineering 77: 23-27.

Tang J, Leung A, Leung C, Lim BL (2006). Hydrolysis of precipitated phytate by three distinct families of phytase. Soil Biology and Biochemistry 38: 1316-1324.

Tomschy A, Brugger R, Lehmann M, Svendsen A, Vogel K, Kostrewa D, Lassen SF, Burger D, Kronenberger A, van Loon APGM, Pasamontes L Wyss M (2002). Engineering of phytase for improved activity at low pH. Applied Environmental Microbiology 68: 1907–1913.

Tye AJ, Siu FK, Leung TYC, Lim BL (2002). Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B.subtilis* 168 and *B.Lcheniformis*. Applied Microbiology and Biotechnology 59: 190-197.

Ullah AHJ, Sethumadhavan K, Lei XG, Mullaney EJ (2000). Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* Phytase (phyA). Biochem. Biophys. Res. Commun. 275: 279-285.

Ullah AHJ, Gibson DM (1987). Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8). from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: Purification and characterization. Prep. Biochemistry. 17: 83-91.

Van Etten RL (1982). Human prostatic acid phosphatase: a histidine phosphatase. Ann. N. Y. Acad. Sci. 390: 27–51.

Vats P, Banerjee UC (2005). Biochemical characterization of exteracellular phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase). from a hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van Teighem. Journal Indian Microbiology and Biotechnology 32: 141-147.

Vats P, Banerjee UC (2004). Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases).; an overview. Enzye and Micorbial Technology 35: 3-14.

Vohra A, Satyanarayana T (2003). Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. Critical Reviews in Biotechnology 23: 29-60.

Archive of SID

www.SID.ir

Vohra A, Satyanarayana T (2002). Purification and characterization of a thermostable and acidstable phytase from *Pichia anomala*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 18: 687–691.

Wodzinski RJ, Ullah AHJ (1996). Phytase. Advance of Applied Microbiology 42: 263–302.

Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Remy R, Fimbel R, Oesterhelt G, Lehmann M, van Loon APGM (1999). Biochemical characterization of fungal APases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases).: catalytic properties. Applied Environtal Microbiology 65: 367-373.

Yanke LJ, Selinger LB, Cheng KJ (1999). Phytase activity of *Selenomonas ruminantium*: a preliminary characterization. Lett. Appl. Microbiol. 29: 20–25.

Zinin NV, Serkina AV, Gelfand MS, Shevelev AB, Sineoky SP (2004). Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus*. FEMS Microbiology Letter 236: 283–290.

Phytases: enzymology, molecular and biochemical characteristic and applications

Sarikhani M.R.[1*], Malboobi M.A.[2]

[1] Assistant Professor of Department of Soil Science, College of Agriculture, University of Tabriz
[2] Associate Professor of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

Abstract:

Phytases are a special class of phosphatses that catalyze the step-wise release of phosphate from phytate, the principle storage form of phosphate in plant seeds. These enzymes have a wide distribution in plants, microorganisms and in some animal tissues; however, microbial sources are more promising for the production. They are added to animal feedstuff to reduce phosphate pollution in the environment, since monogastric animals such as pigs, poultry and fish are unable to metabolize phytate. The first commercial phytase product became available on the market around 20 years ago. Based on biochemical properties and amino acid sequence alignment, phytases can be categorized into four major classes, histidine acid phosphatase, b-propller phytase, cystein phosphatase and purpule acid phosphatase. In general, phytases behave like a monomeric enzyme with molecular masses between 40 and 100 kDa. Up to now two main types of phytases have been identified based on optimal pH for activity; acid phytases with a pH optimum around 5 and alkaline phytases with a pH optimum around 8. Most of identified phytases depending upon the source of origin they have generally pH and temperature optima around 4.5-6 and 45-60 °C .Some of phytases show broad substrate specificity and hydrolyzes metal-free phytate, in contrast some of them exhibit strict substrate specificity for the calcium-phytate. Phytases are different according to the number of released phosphate groups from phytate and in general they have capability to release 3 to 5 phosphate groups. This article reviews enzymology, application and biochemical and catalytic characteristic of microbial phytases.

Keywords: *animal feedstuff, phosphorus, phytase, phytate*

[*] Corresponding Author: Sarikhani M.R. Tel: 09173512394 Email: rsarikhani@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir