

فیتازها: از دیدگاه آنزیم شناسی، ویژگی های مولکولی، بیوشیمیایی و کاربردها

محمد رضا ساریخانی^{1*}، محمد علی ملبوبی²

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 پراکنده و گسترده‌گی 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 اسید آمینه، در چهار گروه اصلی هیستیدین اسید فسفاتاز، بتا پروپیلر فیتاز، سیستمین فسفاتاز و اسید فسفاتاز بنفش قابل تقسیم بندی می‌باشند. به طور معمول، فیتازها همانند یک آنزیم تک واحدی با وزن مولکولی 40 تا 100 کیلو دالتون 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 4/5-6 و 45-60 °C 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 کمی از 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 آنزیمی آنها خواهد داشت.

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

مقدمه

نزدیک به یک قرن از تحقیق بر روی فیتاز، بعد از کشف آن توسط Suzuki *et al* (1907) می‌گذرد. فیتازها گروه ویژه‌ای از فسفات‌ها 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 معده‌ای¹ از قبیل خوک‌ها، پرندگان و ماهی‌ها (همچنین انسان) فاقد آنزیم فیتاز در سیستم گوارشی خود بوده یا فعالیت فیتازی آنها بسیار پایین می‌باشد، قادر به استفاده از فسفر موجود در ساختار فیتات نمی‌باشند. بنابراین، برای 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 ناپذیری² 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 تغذیه‌ای⁴ 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 اسیدآمینها 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

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

1- Simple-stomached

(2005; Vohra and Satyanarayana, 2003).
 فیتات‌ها از جمله اشکال فسفر آلی می‌باشند که در حدود 50 تا 80 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 کند⁴ 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 سوبسترای (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

بیوتکنولوژی فیتازها و کاربرد آنها در حیطة‌های مربوطه شده است. به طوری که افزودن آنها در جیره غذایی دام¹ 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 انسان² به منظور افزایش فراهمی زیستی عناصر معدنی در نتیجه کاهش فیتات غذاها نیز مورد توجه واقع شده است گرچه تا کنون برای کاربرد در غذای انسان وارد بازار نشده است (Greiner and Konietzny, 2006).

فیتات

اسید فیتیک 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 فیتین³ مشهور می‌باشد (Mullaney and Ullah, 2006).

1- Feed application
 2- Food application
 3- Phytin

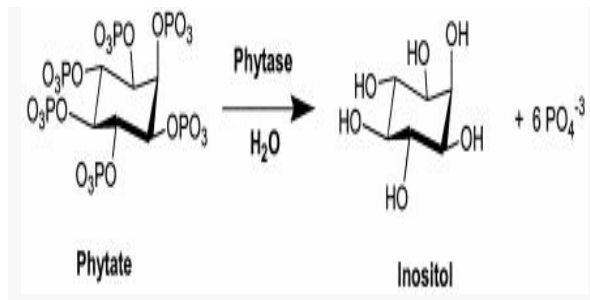
4- Protonation

قارچ، گیاهان و باکتری‌ها همسانه‌سازی شده‌اند (Haefner et al., 2005).

منابع میکروبی فیتاز

فیتازها از قارچها، مخمرها، باکتریها و پروتوزاها 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 تولیدکننده‌های فیتاز برون سلولی (phyA) است. فیتازهایی قارچی و مخمیری بیشتر از نوع 3- فیتاز بوده و گلیکوزیله 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 گرم منفی (نظیر *E. coli*، *Klebsiella*، *Pseudomonas*) و باکتریهای گرم مثبت (نظیر *Bacillus*) شناسایی شده است. اسیدفسفاتاز/ فیتاز (ژن‌های *app A* و *app A2*) از باکتری *E. coli* جداسازی و مورد شناسایی قرار

می‌باشد که قادر به هیدرولیز اسید فیتیک (*phosphohydrolyase myo-inositol hexakisphosphate*) به فسفات معدنی و مایوانوزیتول 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.

کمیت نامگذاری آنزیم اتحادیه بین المللی بیوشیمی¹ 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 1/4 kb رمز می‌شود و وزن مولکولی آن 80kDa می‌باشد (Ehrlich et al., 1993). همچنین تعدادی از ژن‌های رمزکننده فیتاز از

1-Enzyme Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry

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 فیتاز² و انتقال آن به سویه‌های بیانی باکتریایی از قبیل *E. coli* (BL21, DE3) یا مخمیری مانند *Pichia pastoris* می‌باشد. با این توضیح مشخص است که واژه آنزیم درون سلولی یا برون سلولی مربوط به فیتازهای طبیعی³ می‌باشد.

منابع غیر میکروبی فیتازها

علاوه بر ریزسازواره‌ها که منبع خوبی برای تولید فیتاز به شمار می‌روند، فیتازها با منشأ 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 مغزدارها⁴ 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

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; Pandey 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 مطالعه‌ای اقدام به ارائه روشی برای جداسازی ژن‌های رمزکننده فسفاتاز باکتریایی نمودند و در ادامه کتابخانه ژنومی *Pseudomonas putida* سویه P13 را در محیط Sperber به‌علاوه BCIP غربالگری نمودند، آنها به کار بردن این روش غربالگری عملکردی موفق به جداسازی دو ژن رمزکننده فسفاتاز و فیتاز شدند که با فسفاتازهای شناخته شده فعلی هیچ گونه مشابهتی نداشتند (Sarikhani et al., 2011). حضور فیتاز در پروتوزاهایی مانند *Shewanella* و *Paramecium tetraurelia* به اثبات رسیده و در برخی از موارد به دلیل قابلیت فعالیت آنها در دماهای پایین استفاده از آنها در اکوسیستم‌های آبی¹ (یا در

2- Recombinant phytase

3- Native phytase

4- Nut

1- Aquaculture

به هنگام جوانه زدن فعالیت فیتازی افزایش سریعی نشان می دهد (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 kcat (mM S ⁻¹)	فعالیت ویژه Specific activity U/mg	مرجع Reference
<i>Pantoea agglomerans</i>	پری پلاسمیک Periplasmic	42	4.5	60	0.340 21	23	Greiner, 2004
<i>Aerobacter aerogenes</i>	nd	nd	4-5	70	0.135 nd	nd	Greaves <i>et al.</i> , 1967
<i>Bacillus subtilis</i>	برون سلولی Extracellular	42	7	55	0.050 5.5	15	Kerovou <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus subtilis</i>	nd	36.5	7	55	0.040 nd	nd	Power & Jagannathan, 1982
<i>Bacillus subtilis</i> (natto).	برون سلولی Extracellular	38	6.5	60	0.500 nd	9	Shimizu, 1992
<i>B. laevolacticus</i>	nd	41,45	7	70	0.526 nd	12.3	Gulati <i>et al.</i> , 2007
<i>B. amyloliquefaciens</i>	nd	44	7.5	70	nd nd	20	Kim <i>et al.</i> , 1998
<i>B. subtilis</i> 168	برون سلولی Extracellular	44	5.5-6	55	nd nd	36.9	Tye <i>et al.</i> , 2002
<i>B. licheniformis</i>	برون سلولی Extracellular	47	5-7	65	nd nd	23.6	Tye <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus sp. PH01</i>	برون سلولی Extracellular	30	6	65	nd nd	nd	Popanich <i>et al.</i> , 2003
<i>Kelbsiella sp.</i>	متصل به دیواره Membrane	42	5	50	0.280	100	Sajidan <i>et al.</i> , 2004
<i>K. terrigena</i>	درون سلولی Intracellular	40	5	58	0.300 180	204	Greiner <i>et al.</i> , 1997
<i>K. oxytoca</i>	متصل به دیواره Membrane	40	5,6	55	nd nd	nd	Jareonkitmongkol <i>et al.</i> , 1997
<i>K. aerogenes</i>	nd	700	4.5-5.2	60	0.110 nd	nd	Tambe <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas syringae</i>	درون سلولی Intracellular	45	5.5	40	0.380 nd	769	Cho <i>et al.</i> , 2003, 2005
<i>Pseudomonas sp.</i>	برون سلولی Extracellular	nd	5	40	0.016 nd	nd	Irvine & Cosgrove, 1971
<i>Pseudomonas sp</i>	nd	nd	nd	nd	nd nd	1	Richardson & Hadobas, 1997
<i>Yersinia intermedia</i>	nd	45	4.5	55	0.125 nd	3960	Huang <i>et al.</i> , 2006
<i>Obesambacterium proteus</i>	nd	45	4.9	45	0.340 nd	435	Zinin <i>et al.</i> , 2004
<i>Citrobacter brakii</i>	nd	47	4	50	0.460 nd	3457	Kim <i>et al.</i> , 2003
<i>Lactobacillus sanfrancesis</i>	nd	50	4	45	nd nd	nd	De Angelis <i>et al.</i> , 2003

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

Konietzny and Greiner, 2002; Greiner and Konietzny, 2006). این در حالی است که کارایی زیستی فیتازهای غلات در مقایسه با فیتازهای میکروبی (قارچی) تنها 40 درصد می باشد (Haefner *et al.*, 2005). منبع حیوانی یا بافت های حیوانی¹ یکی دیگر از منابع فیتاز

فیتاز ترشح شده از ریشه گیاهان بیشتر برای رهاسازی فسفات از منابع آلی فسفر در خاک موثر واقع می شود. بیشترین فعالیت فیتازی در غلاتی چون چاودار، جو و گندم (U/Kg) 7000-100) گزارش شده است و معمولاً لگوم ها و گیاهان دانه روغنی تا 10 برابر فعالیت فیتازی (U/Kg) 0-450) کمتری دارند

1- Animal tissue

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 (40-55 در مقابل 80-120 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 44-60 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

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 LPI1 and LPI2) نیز گزارش شده است.

ویژگی‌های بیوشیمیایی و مولکولی فیتازها

1- وزن مولکولی

بیشتر فیتازها پروتئین‌های تک واحدی¹ هستند با این حال برخی از آنها دارای چندین زیرواحد می‌باشند به عنوان نمونه فیتاز (Phy B) با منشا *A. niger* که 4 واحدی² است یا 4 زیرواحد دارد. وزن مولکولی این آنزیم بسیار متغیر بوده و بین 38-100 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

1- Monomeric
2- Tetramer

مربوط به *A. fumigatus* می باشد که قرار دادن آنزیم به مدت 20 دقیقه در دمای 90 درجه سانتیگراد تنها 10 درصد از فعالیت اولیه آن را می کاهد (Pasamontes et al., 1997). در مورد فیتازها با این که pH بهینه لحاظ می شود ولیکن وقتی این آنزیم در معرض pH های دیگر قرار می گیرد آنزیم پایداری خود را حفظ کرده و فعالیت آن قابل برگشت می باشد. حساسیت فیتازها به دما بیشتر بوده و در دماهای بالا وقتی واسرشته می شوند به حالت اول خود باز نمی گردند. 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 می آیند (Vohra and Satyanarayana, 2003).

3- واکنش به سوبسترای خاص

ویژه بودن نسبت به یک سوبسترا¹ و سازگاری² به یک سوبسترای خاص از ویژگی های مهم فیتازها به حساب می آید به طوری که BPP در مقایسه با HAP ها بر محدوده بسیار کوچکی از سوبستراها اثر می گذارند و بر سایر سوبستراها فعالیت آنزیمی نشان نمی دهند. جدیداً ساختار کریستالی³ فیتاز با منشاء *B. amyloliquefaciens* نشان داده است که جایگاه فعال دارای بار منفی، محیط الکتروستاتیکی مناسبی را برای کمپلکس دارای بار مثبت کلسیم-

(Satyanarayana, 2003). دمای بهینه فیتاز قارچی بین 50-60 درجه سانتیگراد می باشد این در حالی است که فیتازهای مخمیری دارای دمای بهینه بالاتر از 60 تا 75 درجه سانتیگراد می باشند (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 آنزیم های فیتاز این است که اگر چه اغلب میکروارگانسیم ها مزوفیل می باشند ولی آنزیم فیتاز آنها دارای بهینه دمایی ترموفیل می باشد (Vohra and Satyanarayana, 2003). برای استفاده فیتاز در جیره غذایی دام پایداری آن به دماهای بالا (تحمل دمای 80-100 درجه سانتیگراد) یکی از ویژگی های بارز می باشد. فیتازهای قلیایی با منشا باسیلوسی کاملاً در دماهای بالا از محدوده 80-95 درجه سانتیگراد پایداری دارند (Kim et al., 1998; Choi et al., 2001). در حالی که سایر فیتازها در دمای بالای 60 درجه سانتیگراد غیر فعال می شوند. 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 38-55 می باشد (Lei et al., 2007). فعالیت ویژه و تحمل به دمای بالای فیتازهای گیاهی نیز در مقایسه با فیتازهای میکروبی کمتر می باشد. مقاومترین فیتاز شناخته شده به دماهای بالا که تا کنون گزارش شده است

1- Substrate specificity

2- Affinity

3- Crystal structure

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

6- رفتار فیتازها در حضور یونها و معرف های مختلف

فیتازهای مختلف از نظر نیاز به یونها برای فعالیت خود رفتار متفاوتی نشان می دهند. 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-

فیتات فراهم می کند (Ha et al., 2000; Oh et al., 2004). در *E. coli* ساختار کریستالی فیتاز نشان می دهد که تمام گروه های فسفات مولکول فیتات با پاکت¹ 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 1 و 6- دی فسفات فراهم می کند (Oh et al., 2004).

4- فعالیت ویژه

فعالیت ویژه طبق تعریف به مقداری از آنزیم گفته می شود 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 می باشد 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 می شود (Anonymous, 2010; Anonymous, 2009). فعالیت ویژه یکی از عوامل کلیدی در کاربردی بودن آنزیم در بعد تجاری می باشد. 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

1- Pocket

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. subtilis* و *amyloliquefaciens* در حضور این ماده هیچ گونه کاهش فعالیت 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 ولفرامات² نیز به عنوان بازدارندگان آنزیم فیتاز شناخته می‌شوند (Konietzny and Greiner, 2002).

گروه بندی 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 تقسیم بندیهای مختلف در رابطه با فیتازها مشاهده شود. برخی از آنها بر اساس مکان استقرار و عمل این آنزیم می‌باشد. به عنوان نمونه برخی

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 فعال¹ 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

2- Wolframate

1- Active conformation

حاکم بر آن فعال باشد، غالب تحقیقات بر روی فسفات‌های اسیدی متمرکز است.

در یک تقسیم‌بندی دیگر، فیتازها را براساس این که کدام گروه از فسفات ابتدا توسط آنزیم از فیتات برداشته می‌شود نام‌گذاری 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 فسفات‌های برداشته شده از مولکول فیتات می‌باشند. فیتازهای میکروبی به ویژه نمونه قارچی *A. niger* و باسیلوس‌ها 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 دائمی¹ و القایی² تفکیک می‌کنند (Vohra and Satyanaryana, 2003). شیعه و همکاران مشاهده کردند که تولید فیتاز برون سلولی قارچی در غلظت‌های پایین فسفات معدنی³ در محیط رشد القاء می‌شود، برخلاف فیتاز قارچی، فیتاز *B. subtilis* در حضور فیتات القاء می‌شود همچنین این آنزیم در حضور عصاره

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 گرم منفی درون سلولی بوده در حالی که فیتازهای باکتری‌های گرم 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 گرم 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 (3/3-4) با فعالیت نسبی 80 درصد فعال می‌باشد (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

1- Constitutive
2- Inducible
3- Pi starvation

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 اسید آمینه هیستیدین در دو منطقه حفاظت شده از توالی آنها می‌باشد و در pH اسیدی فعالیت دارند. یکی توالی حفاظت شده RHGXRXP که نزدیک انتهای 1N و دیگری HD که نزدیک به انتهای 2C می‌باشد (Van Etten, 1982). بار مثبت آرژنین در موتیف RHGXRXP مسئول تشخیص و درگیر شدن با بار منفی گروه‌های فسفات می‌باشد و HD 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 فسفومونواسترها 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.

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 بی‌هوایی 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 RHGXRXP در جایگاه فعال آنزیم می‌باشد که در بین همه اعضا این گروه حفظ شده است (Oh et al., 2004).

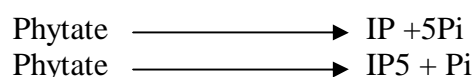
1- N-terminus
2- C-terminus

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 و PhyC تقسیم‌بندی کردند:

گروه **PhyA** شامل آنزیم‌هایی برون سلولی با 465 و 469 آمینواسید از *A. niger*، *A. Emericella nidulans*، *A. terrus*، *fumigatus* 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 *Saccharomyces cerevisiae*، *A. niger* و *Schizosaccharomyces pombe* است. دارای 453-479 آمینواسید با وزن مولکولی 48-50 کیلوالتون می‌باشند و در صورت گلیکوزیله شدن وزن مولکولی آنها با روش SDS-PAGE تا 65 کیلوالتون تخمین زده شده است. این فیتازها دارای pH بهینه یعنی 2/5 هستند و در pH 5 فاقد

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 پروکاریوت‌ها 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 بر تعداد 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 مونوفسفات¹ 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).



1- myo-inositol monophosphate

تسهیل می‌کند. فقدان توالی موتیف³ RHGXRXRP در این گروه باعث شده است که این گروه را عضوی از گروه فیتازهای HAP ندانند (Kim et al., 1998; Shin et al., 2001;). دو ویژگی بارز این گروه فعالیت وابسته به فلز⁴ و افزایش پایداری آنها در حضور کاتیون فلزی است (Lei and Porres, 2001; Shin et al., 2007; Lei et al., 2003). دو جزء در سازوکار کاتالیتیکی BPP ها درگیر می‌باشد، یکی جایگاه تمایل جذبی⁵ که سوبسترا را جذب می‌کند و دیگری جزء مجاور آن که مکان برش⁶ 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 تری فسفات به عنوان ماده نهایی عمل هیدرولیز آنزیم فیتاز محسوب می‌شود. با توجه به pH بهینه فعالیت، این گروه به

فعالیت هستند. از مهمترین عضو این گروه فیتاز *A. niger* می‌باشد که به شکل 4 واحدی¹ 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 آمینو اسید 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 پره‌ای² 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

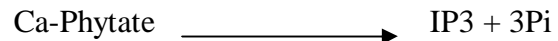
3- Sequence motif
4- Metal-mediated
5- Affinity site
6- Cleavage site

1- Tetrameric
2- Propeller

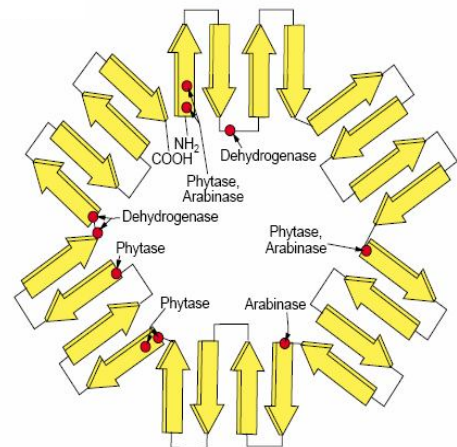
ج- اسید فسفاتاز بنفش (PAP)

این گروه از متالوآنزیم‌ها یا متالوفسفوآسترازها² در برخی از گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و جانوران وجود دارند. همه اعضای این خانواده دارای هفت اسیدآمین (D, Y, N, H, H, H) پیوند یابنده³ 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 Mullaney and H. در آنها حفظ شده است (Ullah, 2005; Olczak *et al.*, 2003) و این اسیدهای آمینه در پنج موتیف حفاظت شده (DxG/GDx₂Y/GNH(E,D) /Vx₂H/GHxH) قرار دارند. PAPهای جانوری دارای مرکز دو هسته‌ای فلزی⁴ می‌باشد که از دو آهن تشکیل شده است در حالی که در PAPهای گیاهی یکی از آهن‌ها با یون Zn²⁺ یا Mn²⁺ جایگزین شده است. مرکز دو هسته فلزی به صورت - Fe(III) Me(II) می‌باشد که در آن Me می‌تواند Fe²⁺، Mn²⁺ یا Zn²⁺ باشد. در گیاهان دو گروه از PAPها قابل تشخیص‌اند، PAPهای کوچک که به صورت مونومر هستند با وزن مولکولی حدود 35 کیلودالتون و PAPهای 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 اعضای این خانواده در گیاهان سویا و برنج گزارش شده

نام فیتازهای قلیایی¹ هم شناخته می‌شوند (Oh *et al.*, 2004).



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 55-70 درجه سانتیگراد و 7-8 می‌باشد. این گروه بر روی سوبستراهای معمول HAPها قدرت هیدرولیز کمی داشته 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).

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

1- Alkaline phytases

فیتات می‌باشد. جایگاه فعال این آنزیم لویی¹ 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. ruminantium* 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

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 بذره‌های گیاهان شاید در فرایند جوانه‌زنی آنها کارآمدتر باشد (Mullaney and Ullah, 2005).

د- سیستمین 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 ruminantium* 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 50-55 درجه سانتیگراد و 4-5/5 می‌باشد. کاتیون سرب اثر افزایش‌دهنده 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 سیستمین 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

1- Loop

شده برای آنزیم کاربردی بسیار گران بوده و نمی‌توان در جیره غذایی استفاده نمود (Nelson *et al.*, 1968). جیره غذایی طیور 2/5 g/Kg 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 750 U/Kg 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 840 FTU/Kg معادل 1 g/Kg 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 جیره 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

می‌شود تا فراهمی فسفر و عناصر معدنی، آمینواسیدها و انرژی را بهبود بخشد. به خدمت گرفتن آنزیم‌های فیتاز در سال 1990 به دنبال جرایمی سنگینی 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 Bio-Feed، Natuphos، Finase، Allzyme و (جدول 2) از منابع میکروبی تولیدکننده فیتاز که غالب آن از قارچ *آسپرژیلوس* می‌باشد تولید و مورد استفاده قرار گرفته‌اند و توانسته‌اند 25 تا 50 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 غذایی¹ 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

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. cerevisia* و *Pichia pastoris*) می‌توان اقدام به تولید فیتاز نوترکیب نمود (Lei and Porres, 2003). علی‌رغم 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 پیام‌رسانی غشایی² و در تحرک کلسیم از بخش ذخیره درون سلولی بافت‌های حیوانی و گیاهی دارد. کاربردهای ویژه اینوزیتول‌های فسفات در درمان

پروبیوتیک¹ ارایه داده است، میکروارگانیزم‌های 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 بی‌خطر برای انسان از قبیل *Sachromyces*، *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* که سالم

2- Transmembrane signaling

1- Probiotic

گلیسریدها کاربرد دارند (Afinah *et al.*, 2010; Greiner and Konietzny, 2006).

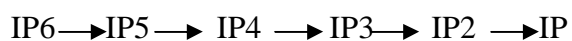
د- صنعت پالپ³ و کاغذ

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 آنزیمی اسید فیتیک مواد جانبی شدیداً سمی و سرطانزا تولید نخواهد شد. بنابراین استفاده از فیتاز در این صنعت موافق و سازگار با محیط⁴ خواهد بود (Kerovuo, 2000).

و- اصلاح‌کننده خاک⁵

در مکان‌های خاص اسیدفیتیک و مشتقات آن ممکن است بیشتر از 50 درصد کل سفر آلی در خاک را شامل شود. بنابراین استفاده از آنزیم فیتاز به صورت غیر مستقیم از طریق موجودات تولیدکننده 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 رمزکننده 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

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 مایواینوزیتول‌هاست، 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).



تعداد و توزیع گروههای فسفات بر روی حلقه مایواینوزیتول تعیین‌کننده اثر متابولیکی¹ 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 عنوان پیام رسان ثانویه درون سلولی² نقش مهمی را ایفا می‌کند (Greiner and Konietzny, 2006). اسید فیتیک و مواد حد واسطه اینوزیتول‌ها در درمان بیماریهای پارکینسون، آلزایمر، MS و کاهش کلسترول و تری

3- Pulp

4- Environmentally friendly

5- Soil amendment

1- Metabolic effect

2- Interacellular second messenger

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

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 کلئیدهای 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 RHGXRP 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

است (Lei et al., 2007). به نظر می‌رسد در انتقال ژن فیتاز به گیاهان، ژن‌های فیتاز بسیار خاص و ویژه مثل ژن فیتاز باسیلوس نامزد مناسبتری باشد زیرا فیتازی با محدوده عمل وسیع بر سوبستراهای مختلف ممکن است در مسیره‌های متابولیکی سلولهای گیاهی اختلال 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	کشور تولید 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	<i>A. awamori</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	Finase
Alko Biotechnology	فنلاند Finland	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>	SP, TP, SF
Alltech	آمریکا USA	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	Allzyme phytase
BASF	آلمان Germany	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	Natuphos
BioZyme	آمریکا USA	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>	AMAFERM
DSM/Novo Nordisk	آمریکا USA	<i>P. lycii</i>	<i>A. oryzae</i>	Bio-Feed Phytase
Fermic	مکزیک Mexico	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>	Phyzyme
Finnfeeds International	فنلاند Finland	<i>A. awamori</i>	<i>T. reesei</i>	Avizyme
Genencor International	آمریکا USA	<i>P. simplicissimum</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	ROVABIO
Roal	فنلاند Finland	<i>A. awamori</i>	<i>T. reesei</i>	Finase
Novozymes	دانمارک Denmark	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>	Ronozyme (Roxazyme).
Diversa/Syngenta		<i>E. coli</i>		Quantum
Cenzyme		<i>fungi</i>		Cenzyme

منابع

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

- 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.

- 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. *Industrial 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.

- 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 properties 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., Mraak, 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.
- Rodriguez 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 Industrial 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.

- 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 properties 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: 1266-1269.
- 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 diphosphorosaure 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 extracellular 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. *Enzyme 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.

- 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 APMG (1999). Biochemical characterization of fungal APases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Applied Environmental 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 phosphatases 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-propeller phytase, cystein phosphatase and purple 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