مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی گونه های قارچی تولید کننده فیتاز های خارج سلولی از آبهای ساحلی دریای خزر به روش ITS- PCR

راضیه ساداتی*[1]، امین برقی[2]

[1]باشگاه پژوهشگران جوان، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران
[2]باشگاه پژوهشگران جوان، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: دریاچه خزر یکی از ارزشمندترین اکوسیستم های جهان و دارای تنوع بالایی از گونه های مختلف قارچی با قابلیت تولید آنزیم می باشد. فیتازها با کاربردهای گسترده در صنایع از مهمترین آنزیم ها به شمار می آیند. فیتاز با هیدرولیز فیتیک اسید و آزاد کردن فسفات غیر آلی مشکلات عمده ایجاد شده در جیره غذایی حیوانات را از بین می برد. هدف از انجام این مطالعه جدا سازی و شناسایی گونه های قارچی تولید کننده فیتاز خارج سلولی از آب های سواحل دریاچه خزر بود.

روش بررسی: نمونه های آب از سواحل غرب مازندران در فصل بهار سال ۹۰ جمع آوری گردید. نمونه ها روی محیط پوتیتو دکستروز آگار کشت شد و پس از جداسازی، مجدداً ایزوله ها روی محیط PSM آگار برای شناسایی ایزوله های تولید کننده فیتاز کشت شد. پس از استخراج DNA ایزوله های قارچی تولید کننده فیتاز از طریق تکثیر ITS-۵.۸S rDNA و تعیین توالی شناسایی شد.

یافته ها: ۶ گونه قارچی تولید کننده فیتاز خارج سلولی از آبهای ساحلی دریای خزر شناسایی گردید. از میان آنها سه گونه قارچی *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* و *Penicillium olsonii* فعالیت فیتازی بالاتری را نشان دادند. همچنین دو گونه جدید *Discostroma tricellulare* و *Cladosporium gossypiicola* به ترتیب با accession number JF۸۱۱۹۱۳ و JF۸۱۱۹۱۲ در GenBank مورد تائید و ثبت قرار گرفت.

نتیجه گیری: به هرحال تمامی این ۶ گونه قارچی جدا شده در حقیقت جزء پاتوژنهای گیاهی هستند که از محیط به دریا راه یافته اند و به احتمال زیاد دارای فعالیت فیتازی مناسب بر روی فیتات فسفرهای گیاهی هستند. با توجه به آلودگی دریای خزر به مقادیر قابل توجهی از فیتیک اسید و اثر مهاری آنها در زنجیره غذایی حیوانات، می توان با تولید آنزیم فیتاز آلودگی های زیست محیطی را به حداقل کاهش داد.

کلمات کلیدی: قارچ های دریایی، فیتاز، سواحل دریای خزر

مقدمه

امروزه نقش زیستی آنزیم ها در بهبود کیفیت محصولات غذایی، دارویی و بهداشتی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. فیتاز از جمله آنزیم های پر کاربرد در صنایع می باشد. فیتات یا فیتیک اسید که یکی از منابع فسفر گیاهی به شمار می رود در اصل یک فاکتور ضد تغذیه ای است چرا که دارای اثرات منفی بر قابلیت هضم پروتئین به خصوص در حیوانات تک معده ای می باشد (۵). فیتات فسفر به مقدار زیاد در حیوانات تک معده ای وجود دارد ولی به علت کمبود آنزیم های تجزیه کننده، این ماده به عنوان منبع فسفر مورد استفاده قرار نمی گیرد. از سوی دیگر فسفر هضم نشده با عبور از دستگاه گوارش حیوانات، مشکلات آلودگی محیط زیست و آبهای سطحی را ایجاد می کند. از این رو استفاده از آنزیم فیتاز در جیره غذایی این حیوانات حائز اهمیت است. فیتازها زیر خانواده ای از فسفاتازها هستند که فیتیک اسید را به اجزا کوچکتر مونو، دی، تترا و پنتا فسفات،

آدرس نویسنده مسئول : باشگاه پژوهشگران جوان، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران
Email ::razisadati@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۱۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۷

تجزیه می کنند. همچنین این آنزیم ها با خنثی کردن اثر منفی فیتات بر روی پروتئین و مواد مغذی موجود در جیره حیوانات تک معده ای، میزان جذب فسفر را افزایش می دهند (۱۹و۲۰). فیتاز ها دارای کاربردهای بالقوه در زمینه های دیگر نیز می باشد، اگرچه ارزش زیاد تجاری آنها به طور عمده در صنایع غذایی و تغذیه ای می باشد. گونه های مختلفی از میکروارگانیسم های دریایی از جمله باکتری، مخمر و قارچ ها دارای توانایی تولید آنزیم فیتاز می باشند (۶و۱۴).تحقیقات اخیر نشان داده اند که تولید فیتاز میکروبی از نظر اقتصادی بسیار قابل توجه بوده و در صنعت کاربرد بسیاری دارد (۱۰). امروزه قارچ ها با داشتن سیستم آنزیمی کارامد، در تجزیه زیستی ترکیبات نامطلوبی از جمله پساب های صنعتی و کشاورزی، مواد شوینده و روغن های مختلف و تبدیل آنها به محصولات قابل استفاده و بی ضرر، بسیار پر اهمیت جلوه می کنند. قارچ های مختلفی از جمله *Aspergillus*، *Penicillium*، *Mucor* و *Rhizopus* از گونه های متداول برای تولیدات تجاری فیتاز خارج سلولی به شمار می آیند (۱۵). دریای خزر یکی از مهمترین اکوسیستم های آبی جهان می باشد. پساب‌های خانگی، کشاورزی و صنعتی از مهم‌ترین منابع آلوده کننده آن می باشند، به طوریکه میزان آلودگی بزرگترین دریاچه جهان همچنان رو به افزایش بوده و اکنون به مرز آلودگی میکروبی رسیده است. مکمل معدنی فسفر هنگامی که وارد آب رودخانه ها، دریاچه ها و سایر اجسام آبی می شود، مواد مغذی بیشتری در اختیار جلبک ها قرار می گیرد که در نتیجه آن جلبک ها به صورت توده ای در سطح آبها رشد کرده و با کاهش اکسیژن آب و مرگ حیوانات دریایی، مشکل زیست محیطی یوتریفیکاسیون را ایجاد می کنند. با توجه به این مشکلات، کاربردهای قابل توجهی در آنزیم های تجزیه کننده فیتات (فیتازها) وجود دارد، و بدین وسیله می توان توانایی فیتیک اسید را در چلاته کردن یونهای فلزی ، مهار آنزیم ها و تشکیل کمپلکس با پروتئینها را از بین می برد. این مطالعه با هدف جداسازی و تعیین گونه قارچهای دریایی تولید کننده فیتاز از آبهای ساحلی دریای خزر به روش ITS-PCR Sequencing برای اولین بار در این منطقه صورت گرفت تا با شناسایی این قارچها بتوان برای تولید انبوه فیتاز صنعتی از آنها بهره گرفت.

روش بررسی

جداسازی قارچ ها

از فروردین تا خرداد ۱۳۹۰ جمع آوری نمونه های آب در لوله های شیشه ای استریل، از نقاط مختلف سواحل غربی دریای خزر (رامسر، شیرود، تنکابن، نشتارود) و از عمق تقریبی ۳۰ سانتی متری انجام گرفت (شکل ۱). پس از تهیه سریال رقت ، ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به طور مستقیم بر روی محیط PDA[1] (Merck) کشت داده شده و نمونه ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۸°C نگهداری شدند (۵).

تعیین فعالیت فیتازی قارچها

برای تعیین فعالیت فیتازی قارچ ها از محیط PSM[2] (۰.۲٪) ۲٪ glucose, (۰.۴٪) Calcium phytate, (۰.۰۵٪) $CaCl_2$, (۰.۰۰۱٪) $MnSO_4H_2O$, KCl, Agar, (۰.۰۵٪) $MgSO_4.7H_2O$, (۰.۵٪) NH_4NO_3, (۰.۰۰۱٪) $FeSO_4.7H_2O$, (۱.۵٪) (w/v)) استفاده گردید (۷). بطوریکه ابتدا ایزوله های قارچی بر روی محیط PSM کشت داده شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰°C انکوبه گردید، سپس قارچ های تولید کننده فیتاز با تولید هاله شفاف در اطراف کلنی های قارچی شناسایی شدند. نسبت هاله شفاف به قطر کلنی قارچی (H/C) برای هر ایزوله تعیین گردید. H/C بیانگر اندازه هاله هیدرولیز ایجاد شده بر روی PSM (H)، نسبت به سایز کلنی (C) می باشد به طوریکه افزایش نسبت H/C نشان دهنده میزان تراوش لیپاز است(۱۲).

شناسایی میکروسکوپی قارچ ها

برای تشخیص اولیه نمونه های قارچی، از مشاهده مستقیم نمونه ها استفاده شد. در آزمایش میکروسکوپی، پس از رنگ آمیزی نمونه ها با لاکتوفنل کاتن بلو[3]، مشاهده اسلایدها زیر میکروسکوپ انجام شد (۳).

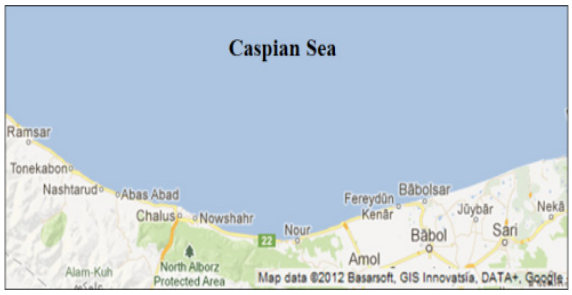
استخراج DNA قارچی

استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش Lian و همکارانش

۱ Potato-dextrose-agar
۲ Phytase specific medium agar
۳ Lactophenol Cotton Blue

انجام شد (۱۱). به طور خلاصه ابتدا ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (۱۰۰ mM NaCl, ۲۵ mM EDTA, ۲۰۰mM Tris-HCl, ۰.۵٪ SDS) با ۵۰ میلی گرم میسلیوم قارچی مخلوط شد. پس از انکوباسیون در ۶۵°C به مدت ۱ ساعت، ۳۵۰ میکرولیتر بافر CTAB

([w/v] ۵٪ CTAB, ۱۰۰ mM Tris-HCl pH ۸.۰, ۱.۴ M NaCl) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۶۵°C انکوبه شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل/ کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱، v/v) را به میکروتیوب اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. سپس هم حجم فاز رویی مخلوط کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (۲۴:۱، v/v) اضافه و سانتریفوژ شد.



شکل ۱- محل های موردمطالعه برای جمع آوری نمونه های آب از سواحل دریای خزر

پس از انتقال فاز رویی به میکروتیوب جدید، حجم مساوی از ایزوپروپانول اضافه و در حداکثر دور ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب DNA را با الکل ۷۰٪ شستشو داده و پس از خشک شدن ۵۰ میکرولیتر بافر TE به رسوب DNA اضافه و تا انجام PCR در فریزر ۲۰- ذخیره گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

برای شناسایی گونه قارچ های جداسازی شده از پرایمرهای ITS۱ (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) و ITS۴ (TCC GCT TAT TGA TAT GC) استفاده گردید (۶). واکنش PCRدر حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA ، ۳ میلی مولار $MgCl_2$، ۵ میکرولیتر بافر x۱۰، ۲۰۰ میکرو مول dNTPs، ۲۵ پیکو مول از هر پرایمر و ۲/۵ واحدTaq DNA polymerase (Cinagen, Tehran, Iran) انجام شد. برنامه عبارتند از ۵ دقیقه دمای دناتوراسیون اولیه در ۹۵°C و ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵°C ، ۱ دقیقه در ۵۵°C و ۱ دقیقه در ۷۲°C و سپس ۶ دقیقه تکثیر نهایی در ۷۲°C انجام شد. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند.

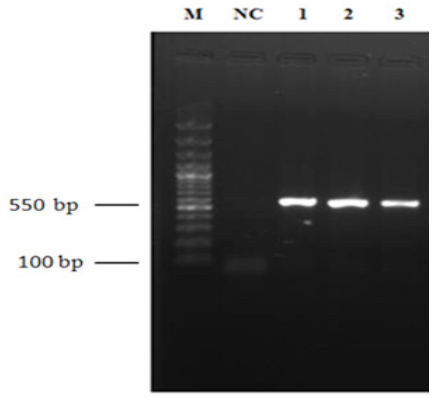
بررسی توالی ژنی

برای شناسایی گونه های قارچی قطعه تکثیری به طول ۵۵۰ bp تعیین توالی(Macrogen, Korea) شدند. توالی به دست آمده با استفاده از[۴] BLAST با سایر توالی های ژنی موجود در بانک ژن[۵] NCBI مورد بررسی و ردیف سازی قرار گرفت (۱).

نتایج

غربالگری قارچ های تولید کننده فیتاز خارج سلولی

از مجموع نمونه های جمع آوری شده از آبهای سواحل دریاچه خزر (رامسر، شیرود، تنکابن، نشتارود)، تنها ۶ گونه قارچی با قابلیت تولید فیتاز خارج سلولی جداسازی شدند. از آنجایی که هدف اصلی در این مطالعه جداسازی گونه های قارچی تولید کننده فیتاز خارج سلولی می باشد، لذا شناسایی میکروسکوپی سایر گونه های قارچی که فاقد توانایی تولید فیتاز بودند صورت نگرفت.



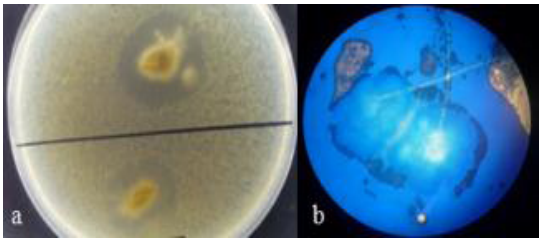
شکل ۲- محصول PCR ۵۵۰ bp. ردیف های ۳-۱ گونه های قارچی جداسازی شده. NC: کنترل منفی . M: نشانگر اندازه (bp (Fermentas) ۱۰۰-۳۰۰۰).

برای شناسایی اولیه و سنجش فعالیت آنزیمی، کلنی های قارچی رشد یافته بر روی محیط PDA ، بر روی محیط PSM انتقال داده شدند. سپس گونه های قارچی که پس از طی مدت انکوباسیون دارای هاله شفاف و عدم رشد در اطراف کلنی ها بودند، برای آزمایشات مولکولی انتخاب شدند. اندازه قطر هاله ها بر اساس H/C (نسبت قطر هاله به کلنی)، در شرایط بهینه

۴ Basic Local Alignment Search Tool

۵ National Centre for Biotechnology Information

(pH=۷ و دمای ۳۰ °C) از ۲/۵ تا ۵/۵ میلی متر ارزیابی شد. همچنین شناسایی میکروسکوپی این گونه ها نیز با استفاده از رنگ آمیزی لاکتوفنل صورت گرفت. گونه های قارچی که پس از انجام PCR و Sequensing شناسایی شدند شامل *Aspergillus flavus* ، *Aspergillus ochraceus* ، *Penicillium olsonii* ، *Penicillium digitatum* ، *Discostroma tricellulare* و *Cladosporium gossypiicola* بودند (شکل ۲). از میان ۶ گونه قارچی جدا شده ، گونه های *Aspergillus ochraceus* ، *Aspergillus flavus* و *Penicillium olsonii* با قطر هاله ۵/۵، ۵/۵ و ۴/۵ میلی متر به ترتیب دارای میزان تولید فیتاز بیشتری نسبت به سایر گونه ها بودند (شکل ۳).



شکل ۳. a - تولید هاله شفاف توسط گونه *Aspergillus ochraceus* بر روی محیط PSM . b - شناسایی میکروسکوپی گونه *Aspergillus ochraceus* بر اساس شکل مورفولوژیک (۴۰۰ x).

اندازه های مربوط به هاله ایجاد شده در سایر گونه های قارچی نیز در جدول شماره ۱ آمده است. در این مطالعه نتایج BLAST نشان داد که دو گونه *Discostroma tricellulare* و *Cladosporium gossypiicola* نسبت به سایر گونه های مشابه جداسازی شده دارای ۹۹٪ شباهت در توالی های نوکلئوتیدی می باشند. این ۲ گونه قارچی به ترتیب با accession number JF۸۱۱۹۱۳ و JF۸۱۱۹۱۲ در GenBank مورد تائید و ثبت قرار گرفت.

گونه های قارچی جداسازی شده از سواحل دریای خزر	قطر هاله بر اساس H/C
Discostroma tricellulare	۲/۵ mm
Cladosporium gossypiicola	۲/۵ mm
Penicillium digitatum	۳/۵ mm
Penicillium olsonii	۴/۵ mm
Aspergillus flavus	۵/۵ mm
Aspergillus ochraceus	۵/۵ mm

بحث

براساس نتایج این مطالعه اغلب گونه های جدا شده از آب های سواحل خزر *Aspergillus* و *Penicillium* بوده و از سلسله *Ascomycota* می باشند. سلسله *Ascomycota*، شامل متنوع ترین و فراوان ترین قارچ های دریایی اجباری و اختیاری می باشد (۱۷). این گونه ها از قارچ های اختیاری ساکن در آبهای ساحلی هستند که احتمالاً توسط عوامل مختلف محیطی به دریا راه پیدا کرده اند. طبق مطالعات Salvo و Damare جنس های *Penicilium*، *Aspergillus* و *Cladosporium* از فراوان ترین گونه های قارچی در محیط های آبی هستند (۱۶و۲). با اینکه زیستگاه اصلی این قارچ ها به طور معمول در خاک است، آنها پس از سازگاری با شرایط و فشار هیدرواستاتیک بالای موجود در آب دریا توانایی رشد و بقا را در محیط های آبی پیدا می کنند (۳). در اکوسیستم بسته ای مانند دریاچه خزر با ویژگی غلظت نمک وکمبود مواد مغذی، قارچ های دریایی می توانند با توانایی ایجاد تغییر و تبدیل در ساختار اولیه پروتئین منابع مناسبی برای جداسازی و تولید آنزیم فیتاز باشند. آنزیم فیتاز، قابلیت هضم و دسترسی فسفر را از منابع گیاهی، برای طیور فراهم می کند به همین دلیل منابع معدنی فسفر که باید به جیره غذایی اضافه شود کاهش می یابد.

بیشتر مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته است بر اساس جداسازی قارچ های تولیدکننده فیتاز از خاک های مناطق مختلف می باشد از جمله مطلعه Shieh و Ware که بیش از ۲۰۰۰ میکروارگانیسم تولید کننده فیتاز از خاک جداسازی کردند که اکثریت آنها قادر به تولید فیتاز داخل سلولی بودند و تنها گروه تولید کننده فیتاز خارج سلولی قارچ های متعلق به جنس *Aspergillus*, *Penicillum* و *Mucor* بودند (۱۸). Lee و همکارانش در سال ۲۰۰۵ با استفاده از محیط PSM و ایجاد هاله شفاف بر روی آن، موفق به جداسازی سویه جدیدی از *Aspergillus* به نام *Aspergillus* sp. L۱۱۷ از خاک شدند که در pH =۵ و دمای ۳۰°C توانایی تولید بیشترین میزان فیتاز خارج سلولی را دارا بود (۹). استفاده از محیط کشت های غنی نیز در جداسازی و رشد بهینه قارچ های تولید کننده فیتاز نقش بسزایی دارد. در مطالعه ای که Kumari و همکارانش با عنوان جداسازی قارچ های تولید کننده فیتاز و بهینه کردن پارامترهای تولید انجام دادند، از سه محیط کشت مختلف برای جداسازی و غربالگری قارچ ها استفاده کردند. ۱۷

گونه قارچی جدا شده در این مطالعه بیشترین میزان تولید آنزیم را در محیط کشت حاوی فیتات کلسیم (۰/۵٪) به عنوان منبع کربن، $(NH_4)_2SO_4$ (۰/۱٪) به عنوان منبع نیتروژن و Tween-۸۰ (۰v/v/۵٪) به عنوان سورفکتانت در pH =۶ و دمای ۳۰°C نشان دادند (۸). لازم به ذکر است که در تحقیق حاضر نیز از فیتات کلسیم به عنوان منبع کربن در تهیه محیط PSM استفاده گردید. در مطالعه مشابهی در سال ۲۰۱۰ Marlida و همکارانش ۳۴ گونه قارچی را از برگها و ریشه گیاه سویا جداسازی کردند. سنجش تجزیه فیتیک اسید در این قارچ ها بر اساس سایز هاله شفاف مشخص گردید. از بین ۳۴ گونه، تنها ۲ گونه قارچی (Phy۲ و Phy۴) هاله شفاف عدم رشد را به ترتیب با قطر ۳-۴ و ۵ < میلی متر نشان دادند (۱۳). همچنین نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعه حاضر نشان می دهد که گونه های مختلف قارچی، در تجزیه فیتیک اسید و تولید آنزیم فیتاز توانایی متفاوتی دارند (۱۳). به طوریکه در مطالعه حاضر دیده می شود قطر هاله در دو گونه *Aspergillus ochraceus* و *Aspergillus flavu* ، ۵/۵ میلی متر و در *Penicillium olsonii* ۴/۵ میلی متر اندازه گیری شد. با این حال در اکثر مطالعات انجام شده دمای بهینه برای تولید بیشترین میزان آنزیم فیتاز ، ۳۰°C و pH بهینه بین ۵ تا ۷ متغیر می باشد.

با توجه به نقش آنزیم فیتاز در بهبود جیره غذایی حیوانات و رفع آلودگی های زیست محیطی ناشی از تجمع فسفر، مطالعات گسترده در جهت شناسایی و غربالگری قارچ های تجزیه کننده فیتیک اسید ضروری می باشد.

تشکر و قدردانی

از زحمات جناب آقای دکتر قانع (مدیر پژوهش واحد تنکابن) و جناب آقای دکتر حشمتی پور (معاون دانشکده علوم زیستی واحد تنکابن) کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

(1) Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. Gen- Bank Nucleic Acids Research.2006 ; 34: 16-20.
(2) Damare S, Raghukumar C, Raghukumar S. Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin. Deep-Sea Research, 2006; 53: 14-27.
(3) Das S, Lyla PS, Ajmal Khan S. Filamentous fungal population and species diversity from the continental slope of Bay of Bengal, India. Acta Oecologica, 2009; 35: 269-279.
(4) Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alio JL. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. J Clinic Microbiol, 2001; 39: 2873-2879.
(5) Hossain MA, Jauncey K. The effects of varying dietary phytic acid,calcium and magnesium levels on the nutrition of common carp. Fish Nutr, 1993; 8: 705-715.
(6) Jorquera M, Martinez O, Maruyama F, Marschiner P, Mora M D L L. Current and future biotechnology applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. Microb and Environ, 2008; 23: 182-191.
(7) Kerovuo J, Lauraues M, Nurmlnen P, Kalkkinen N, Apajalahti J. Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from Bacillus subtilis. Appli Environ Microbiol, 1998; 64: 2079-2085.
(8) Kumari MP, Kumar MS, Rao GN. Isolation of Phytase Producing Fungi and Optimization of Production Parameters. Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences, 2011; 2: 161-176.
(9) Lee DH, Choi SU, Hwang Y. Culture Conditions and Characterizations of a New Phytase-Producing Fungal Isolate, *Aspergillus* sp. L117. J Mycobiol, 2005; 33: 223-229.
(10) Lei XG, Porres J M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. Biotechnol Letters, 2003; 25: 1787-1794.
(11) Lian B, Zang JP, Hou WG, Yuan Sh, Smith DL. PCR-based sensitive detection of the edible fungus Boletus edulis from rDNA ITS sequences. J Electro Biotechnol, 2008; 11: 1-8.
(12) Mafakher L, Mirbagheri M, Darvishi F, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Emtiazi G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. New Biotechnol, 2010; 27: 337-340.
(13) Marlida Y, Delfita R, Gusmanizar N, Ciptaan G. Identification Characterization and Production of Phytase from Endophytic Fungi. World Academy of Science, Engineering and Technology, 2010; 41: 1043-1046.
(14) Noureddini H, Dang J. Degradation of phytase in Distillers' grains and gluten feed by Aspergillus niger phytase. Appli Biochem and Biotechnol, 2008; 8: 362-5.
(15) Pandey A, Szakacs G, Soccol CR, Rodriguez-leon JA, Soccol VT. Production, purification and properties of microbial phytases. Biores Technol, 2001; 77: 203-214.
(16) Salvo VS, Gallizia I, Moreno M, Fabiano M. Fungal communities in PAH-impacted sediments of Genoa-Voltri Harbour. Pollut.Bull, 2008; 50, 553-559.
(17) Shearer CA, Descals E, Kohlmeyer B, Kohlmeyer J, Marvanova L, Padgett D, Porter D, Raja HA, Schmit JP, Thorton HA, Voglymayr H. Fungal biodiversity in aquatic habitats. Biodiv and Cons, 2007; 16: 49-67.
(18) Shieh TR, Ware JH. Survey of microorganisms from the production of extracellular phytase. Appli Microbiol. 1968; 169: 1348-1351.
(19) Vats P, Bhushan B, Banerjee UC. Studies on the dephosphorylation of phytic acid in livestock feed using phytase from Aspergillus niger van Teighem. Biores Technol, 2009; 100: 287-291.
(20) Xiong AS, Yao QH, Peng RH, Li X, Fan HQ, Guo MJ, Zhang SL. Isolation, Characterization, and Molecular Cloning of the cDNA Encoding a Novel Phytase from Aspergillus niger 113 and High Expression in Pichia pastoris. J Biochem and Mol Bio, 2004; 37: 282-291.