Isolation of extracellular phytase producing *Bacillus* species from local soil samples

عزل بعض انواع بكتريا *Bacillus* spp المنتجة لانزيم الفايتيز الخارجي من نماذج لترب محلية

خلود عبد الاله محمد [1] وعمار محمد جواد[2] و عبد القادر هادي علوان[1] وصفاء عبد الرحيم محمود[1]
(1)قسم الاحياء المجهرية التطبيقية/ مركز التقانات الغذائية والاحيائية/ دائرة البحوث الزراعية / وزارة العلوم والتكنولوجيا, (2) قسم تصنيع وحفظ الاغذية

الخلاصة:

تعد الفايتات (phytate) احد المواد المضادة للتغذية والمتواجدة بكثرة في مختلف النباتات حيث يؤدي وجودها في الاغذية الى سحب العديد من العناصر التغذوية لها تاثير ضار على بعض البروتينات كما تعد الفايتات مخزن لعنصر الفسفور في النباتات. هدف البحث الحالي الى عزل بكتريا *Bacillus* من نماذج الترب المحلية والتحري عن انتاجها لانزيم الفايتيز الخارجي ومدى تأثير الانزيم على هضم الفايتات المستخلصة من مصادر نباتية مختلفة. تم عزل 25 عزلة بكتيرية تعود لجنس *Bacillus* لها القدرة على هضم الفايتات في وسط التحري Pikovaskaya agar بدليل ظهور هالة شفافة حول النمو البكتيري وقد شملت نماذج التربة التي عزلت البكتريامنها, ترب لمناطق زراعية لمحافظات بغداد وكربلاء وبابل والبصرة والعمارة والسليمانية . وجد ان خمس عزلات بكتيرية لها القدرة على تحليل الفايتات المستخلصة من نخالة الحنطة والشعير وسحالة الرز والحمص والماش والهرطمان والفاصوليا بينما تفاوتت قابلية العزلات الاخرى على هضم المصادر المختلفة من الفايتات. قدرت الفعالية الانزيمية لراشح مزارع خمس عزلات منتخبة باستخدام فايتات الصوديوم وفي محاليل دارئة ذات ارقام هيدروجينية مختلفة لتقدير الفعالية الانزيمية للفايتيز الخارجي للعزلتين *Bacillus* KP9.1 و *Bacillus* KA7 بعدد وحدات وصلت الى 23 و 22.7 وحدة/ مل على التتابع في محلول داريء ذي الرقم الهيدروجيني 6 وتفاوتت فعالية الانزيم بين العزلات في الارقام الهيدروجينية الاخرى بينما انعدمت فعالية انزيم الفايتيز في الرقم الهيدروجيني7 ولجميع العزلات المنتخبة.

كلمات دالة: بكتريا *Bacillus*, انزيم الفايتيز, تحديد فعالية, ارقام هيدروجينية

Abstract:

Phytate is considered as one of the antinutritional factors exist mainly in different plants; it chelates many nutrition factors and denaturing many proteins. Recent research dealed with the isolation of extracellular phytase producing *Bacillus* species from local soil samples; the effect of phytase on different sources of phytate. Twenty five bacterial isolates of *Bacillus* species produced extracellular phytase on pikovaskaya agar or phytase screening medium(PSM). The clear zone around bacterial growth indicated for enzyme production. Soil samples were collected from many agricultural region includes Baghdad, Karballa, Babylon, Basrah, Emarah and al- Sulaimania. Five bacterial isolates had the ability to digest phytate extracted from different sources such as wheat bran, barly, rice bran, chick bea, mung bean, grass bea and phasolias. Other bacterial isolates could digest some of phytate sources. Extracellular phytase activity were determined at different pHs buffer for five chosen isolates using sodium phytate. Enzyme activity reached to 23 and 22.7 unit/ml for *Bacillus* KP9.1 and *Bacillus* KA7 at pH 6 buffer; different activities were seen for other isolates at pHs used. No activity detected at the pH7 for all tested isolates.

Key words: Bacillus, phytate enzyme, unit, pH

المقدمة

تحتوي النباتات على العديد من المواد المضادة او المحددة للتغذية antinutritional factors والتي تقلل من القيمة الغذائية للنبات المستهلك. ويعد حامض الفايتك احد تلك العوامل بالرغم من احتوائه على ست مجاميع فوسفاتية مرتبطة بالانوسيتول وهو المعروف Inositol 6-P الا انه وبسبب احتوائه على شحنة سالبة عالية يعمل كمادة مخلبية للعديد من العناصر ذات الشحنة الموجبة مثل الحديد والكالسيوم والزنك ويؤدي وجوده الى دنترة العديد من البروتينات الغذائية مرسبا اياها ويقلل من عملية هضمها وبالتالي من الاستفادة منها (1) ويختلف تركيز حامض الفايتك في النباتات بصورة كبيرة اعتمادا على عدد من العوامل منها ظروف الزراعة واضافة المخصبات الفوسفاتية او العضوية وعمر النبات وطرق الحصاد والتصنيع ووسائل فحص وتحديد تركيز الفايتات. لذا لجأ العديد من الباحثين الى العمل على تقليل تركيزه في النبات بوسائل عدة منها الطهو والتعريض الى حرارة عالية وتطوير اصناف نباتية ذات محتوى قليل من حامض الفايتك وعملية انبات البذور والنقع والتخمير (2) كما وتوجد انزيمات متخصصة بهضم حامض الفايتك وهي انزيمات الفايتيز تنتج في النباتات نفسها ولكن بكميات قليلة وقد يتعرض البعض منها الى التحلل خلال اطوار نمو النبات كما ان الحيوانات ثنائية المعدة تتمكن من انتاجها وتحليل حامض الفايتك مما يقلل من مشكلة وجوده في عليقة هذه الحيوانات وتبرز مشاكل التغذية في الاطعمة الحاوية على هذه المركبات في الانسان والحيوانات مفردة المعدة مثل الطيور والخنازير والاسماك (3و1) والتي لا تمتلك انزيمات الفايتيز الذاتية ويمكن تقليل تركيز حامض الفايتك في الاغذية والعلائق الحيوانية باستعمال انزيمات الفايتيز وهي تملك فعالية تمكنها من البدء بتحرير واحدة او اكثر من مجاميع الفوسفات من فايتين الاغذية وقد شخص انتاج هذه الانزيمات اضافة للنبات والحيوانات في العديد من الاحياء المجهرية مثل البكتريا والفطريات والخمائر (4و6و5). ويعد الجنس *Bacillus* احد الاجناس البكتيرية المستخدمة بكثرة في انتاج الانزيمات وذلك لما تملكه من خواص مناسبة في استخدامها في التقنيات الحيوية حيث انها تنتج الانزيمات الى خارج الخلية وتكون السبورات التي تقاوم الظروف البيئية الصعبة وتملك انواع عديدة تتفاوت ظروف نموها من حيث درجات حرارة النمو والارقام الهيدروجينية والمواد الكربونية التي تستطيع استغلالها. وقد عزلت ونقيت انزيمات الفايتيز الخارجية من النوع *B. subtilis* ولاول مرة من قبل Powar وJagannathan (5) واستطاع Elsorra وجماعته (7) من استخلاص انزيمات الفايتيز من النوع *B. amyloliquefaciens* وتحديد مدى اهميتها في زيادة نمو النبات وتمكن Acuna وجماعته (8) من عزل بكتريا *Bacillus* من مناطق جذرية لنباتات مختلفة واستطاع من تحديد انتاجيتها لانزيمات الفايتيز . لذا هدفت الدراسة الحالية الى عزل انواع لجنس ال *Bacillus* ذات قابلية على انتاج انزيم الفايتيز من مناطق زراعية مختلفة وتحديد قابلية العزلات على تحليل الفايتات المستخلص من بذور نباتات عديدة والتي تدخل في تحضير العلائق الحيوانية كما هدفت الدراسة الى تحديد العزلات الكفوءة في الاوساط السائلة وقياس فعاليتها الانزيمية في تحليل فايتات الصوديوم.

المواد وطرائق العمل:

نماذج التربة:

تم جمع 50 نموذج تربة لمناطق مختلفة لمحافظات بغداد, كربلاء, البصرة, العمارة, السليمانية واختلفت مناطق اخذ العينات حيث جمع 20 نموذج تربة من المناطق المحيطة بجذور نباتات مختلفة وكان 30 نموذج تربة من ترب حقلية سطحية او قريبة من السطح. وضعت النماذج في اكياس بلاستيكية ونقلت الى المختبر.

عزل البكتريا المنتجة لانزيم الفايتيز:

حضر عالق التربة بوزن 10 غرام من التربة وعلقت في 100 مل ماء مقطر معقم وحضنت في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة المختبر لمدة ساعتين. وضعت عوالق التربة في حمام مائي بدرجة 80 ْم لمدة نصف ساعة للتخلص من الخلايا الخضرية المرافقة لسبورات بكتريا *Bacillus*. تم سحب 10 مل من معلق التربة واضيف الى 100 مل من الوسط الابتدائي لعزل البكتريا المنتجة للفايتيز(5% من نخالة الحنطة المحضرة في الماء المقطر) وحضنت بدرجة 30 م بحاضنة هزازة بسرعة 120 دورة/ دقيقة ولمدة 18 ساعة. تم تخطيط 0.1 مل من المزروع الابتدائي على وسط التحري عن الفايتيز PSM (15 غم من كلوكوز, 0.5 غم من $(NH_4)_2SO_4$,0.05 غم من KCl, 0.01 غم من كل من $MgSO_4$و NaCl و$CaCl_2.2H_2O$, 0.001 من كل من $FeSO_4$ و$MnSO_4$ و 20 غم من الاكار اذيبت المكونات في لتر من الماء المقطر, ضبط الرقم الهيدروجيني الى 6.8 واضيف مستخلص فايتات الصوديوم والمحضرة من 10غرام ماش) حضنت الاطباق بدرجة 30م لمدة 18-72 ساعة اختيرت المستعمرات المكونة لهالة شفافة حولها وزرعت على وسط المرق المغذي الصلب لغرض تنميتها وتكثيرها ودراسة صفاتها (4).

استخلاص فايتات الصوديوم من بعض النباتات:

تم استخلاص فايتات الصوديوم من عدد من الحبوب والبقوليات شملت نخالة الحنطة والحنطة ونخالة الرز والرز والشعير والهرطمان والماش والباقلاء والحمص اعتمادا على (9) مع بعض التحوير باتباع طريقة موحدة للاستخلاص حيث اخذ 1 غرام من كل نموذج نبات واضيف اليه 6 مل من حامض الكبريتيك وحضن مع الرج لمدة ساعتين ليترك 18 ساعة بدرجة 8 ْم ثم نقل الى الهزاز بدرجة حرارة المختبر لمدة ساعتين ورشح واخذ الرائق وعدل رقمه الهيدروجيني الى 6.5 ليتم اضافته الى وسط PSM وعقمت الاوساط بالموصدة.

التحري عن كفاءة عزلات *Bacillus* في تحليل فايتات الصوديوم المستخلصة من مصادر نباتية مختلفة:

تمت زراعة العزلات البكتيرية والتي اظهرت فعالية انزيم الفايتيز على اوساط التحري والمحتوية على مستخلص فايتات الصوديوم من المصادر المذكورة سابقا وحضنت الاطباق بدرجة 30م لمدة 18-72 ساعة ثم لوحظ تكون هالات شفافة حول النمو البكتيري.

انتاج انزيم الفايتيز الخارجي من عزلات بكتريا *Bacillus*

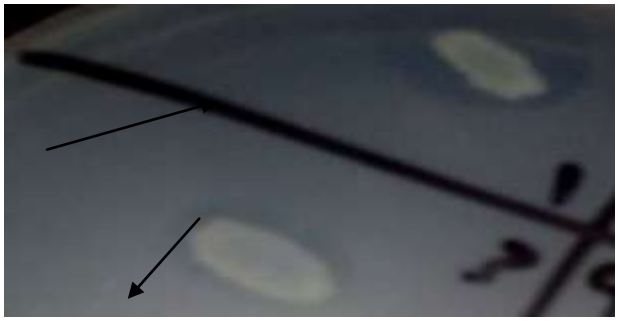
انتخبت خمس عزلات بكتيرية لتنميتها على الوسط السائل ومقارنة انتاج انزيم الفايتيز الخارجي اعتمادا على قياس فعالية انزيم الفايتيز وتحديد عدد وحداته المنتجة وكالاتي:

زرعت العزلات KA7 و KA10 و KP9.1 و KP9.2 و KP9.5 على وسط PSM السائل وحضنت المزارع بدرجة 30م لمدة 72 ساعة واستخدمت الحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة/ دقيقة. نبذت المزارع البكتيرية مركزيا بسرعة 5000 دورة/ دقيقة ولمدة 15 دقيقة وجمع راشح المزارع البكتيرية لتقدير فعالية انزيم الفايتيز الخارجي, مزج 0.1 مل من راشح المزرعة البكتيرية مع 0.9 مل من 2 ملي مولاري من فايتات الصوديوم (شركة BDH) والمحضرة بواسطة محلول اسيتات الصوديوم الداريء ذي الرقم الهيدروجيني 5.5 وحضن التفاعل بدرجة 30م ولمدة نصف ساعة (5) ثم قدر الفسفور المتحرر بطريقة المولبيديوم وحامض الاسكوربيك حيث مزج 1 مل من مزيج التفاعل مع 3مل من حامض الكبريتيك بتركيز 1.5 عياري مع 0.4 مل من المولبيديوم بتركيز 10% و0.4 مل من حامض الاسكوربيك بتركيز 0.5% واكمل الحجم الى 10 بالماء المقطر وترك المزيج لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة25 ْم ويعد تطور اللون الازرق دليل على وجود الفسفور والذي حدد تركيزه باستخدام منحني قياسي لتراكيز متدرجة من KH2PO4 والمعاملة بالمولبيديوم وحامض الاسكوربيك واخذت قراءة الامتصاص عند الطول الموجي 660 نانوميتر (9).

وتعرف الوحدة الواحدة من االنزيم الفايتيز بانها كمية الانزيم التي تحرر مايكرومول واحد من الفسفور اللاعضوي في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف القياس

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج التحري عن انزيمات الفايتيز من عزلات بكتريا *Bacillus* ان 35 عزلة بكتيرية منتجة لانزيم الفايتيز بدليل ظهور هالات حول مستعمراتها النامية على وسط التحري عن انزيم الفايتيز (شكل1).



شكل (1): انتاج انزيمات الفايتيز على وسط التحري PSM من قبل عزلات لبكتريا *Bacillus*

واختلفت مواقع التربة المعزولة منها البكتريا المنتجة للانزيم حيث عزلت 17 عزلة بكتيرية من 8 نماذج تربة محيطة بجذور نباتات مختلفة وعزلت 8 عزلات بكتيرية من 5 نماذج تربة سطحية لمناطق زراعية وخلت النماذج الاخرى من بكتريا *Bacillus* المنتجة لانزيم الفايتيز.

اعتمدت الطريقة الحالية في عزل البكتريا المنتجة لانزيم الفايتيز اغناء وسط التنمية الابتدائي بنخالة الحنطة والحاوية على حامض الفايتك وهي طريقة اغنائية تنشط الجينات المسؤولة عن انتاج الانزيم وذلك يتوافق مع ما اشار اليه (10) من وجود فروقات في عزل بكتريا *B. subtilis* المنتجة لانزيم الفايتيز عند استخدامه وسط مدعم بالفايتات على شكل نخالة الحنطة وبين الاوساط الخالية منه.

يحتوي جنس *Bacillus* على انواع متعددة تملك صفات مختلفة تمكنها من العيش والتكاثر في بيئاتها المختلفة وتكون هذه البكتريا سبورات داخلية مختلفة الشكل والموقع من الخلية الام ذات مقاومة شديدة للعوامل الخارجية تمكنها من العيش لفترات طويلة في بيئات متطرفة من حيث الحرارة والارقام الهيدروجينية وغيرها من العوامل الفيزياوية الاخرى. تنتج عزلات بكتريا *Bacillus* انزيمات خارج خلوية مختلفة من ضمنها انزيمات تحلل البروتين والنشاء والدهون وغيرها من المواد المعقدة الموجودة في الطبيعة (11). تطرح الى التربة العديد من المخلفات النباتية وتحتوي تلك المخلفات على الفايتات بصورة كبيرة ويؤدي وجود الفايتات في التربة الى تحفيز جينات الانزيمات المسؤولة عن انتاج انزيم الفايتيز والذي تؤدي فعاليته الى انتاج الانوسيتول وجزيئات الفوسفات. وقد استطاع Powar و Jagannathan (5) من عزل وتشخيص بكتريا *B. subtilis* منتجة لانزيمات الفايتيز وعمل Sarsan وBhumi (13) على عزل الجين المسؤول عن انتاج الفايتيز من *B. subtilis* وهندسته وراثيا في *الخميرة Pichia pastoris*.

ان وجود عزلات مختلفة لبكتريا *Bacillus* في مواقع مختلفة من التربة سطحية او محيطة بالجذر يتوافق مع ما اشار اليه (13و8) من عزله لبكتريا *Bacillus* منتجة لانزيمات الفايتيز من تربة محيطة بجذور نباتات مختلفة.
اظهرت عزلات بكتريا *Bacillus* المنتجة لانزيم الفايتيز قابلية مختلفة على تحليل فايتات الصوديوم والمستخلص من مصادر نباتية مختلفة حيث استطاعت خمسة عزلات بكتيرية من تحليل فايتات الصوديوم المستخلصة من المصادر النباتية قيد الدراسة جميعا واختلفت قابلية العزلات الاخرى في التحليل ويوضح جدول (1) مصادر فايتات الصوديوم المستخلصة وقابلية العزلات البكتيرية على تحليلها.

جدول (1):التحري عن انتاج انزيمات الفايتيز من عزلات بكتريا *Bacillus* على بعض مستخلصات فايتات الصوديوم من بعض النباتات

النبات المستخدم	KA1	KA2	KA5	KA6	KA7	KA8	KA9	KA10	KP1.4	KP1.5	KP1.6	KP3.2	KP3.3	KP3.3	KP3.6	KP4.1	KP4.6	Kp4.3	KP8.2	KP8.3	KP8.5	Kp8.6	Kp9.1	KP9.2	KP9.5	KP9.6
حنطة	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+
شعير	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
رز	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++	-	+	+	+	-
نخالة حنطة	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+
سحالة رز	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
فاصوليا	+	-	-	-	+	-	-	+	_	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
حمص	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
ماش	++	-	-	++	+	-	-	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هرطمان	+++	+	+++	+++	+++++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

يلاحظ من الجدول السابق ان جميع العزلات محللة لفايتات الصوديوم المستخلص من الهرطمان ياتي بعده الماش وان 19 من العزلات منتجة لانزيمات الفايتيز والمحللة لنخالة الحنطة و7 عزلات محللة لفايتات الصوديوم من سحالة الرز وهذا يتوافق مع ما اشار اليه (14و15) من ان نخالة الحنطة وسحالة الرز تعد من اكثر مخلفات النبات والتي تحلل بواسطة الفايتيز الخارجي المنتج من قبل الاحياء المجهرية. كما اشار (16و14) الى ان وجود الفسفور غير العضوي يعمل كعامل كابح للجينات المسؤولة عن انتاج الفايتيز الخارجي حيث يعتمد انتاج الفايتيز على مدى تركيز الفسفور غير العضوي في المخلفات النباتية المستعملة في انتاج هذه الانزيمات حيث علل ان وجود الفايتات غير الذائبة في النبات تكون مصدرا غير متاح لعنصر الفسفور على العكس من فايتات الصوديوم والتي تتحلل بسهولة لاعطاء مجاميع الفسفور. وقد تكون لطريقة استخلاص فايتات الصوديوم من نماذج بذور النبات قيد

الدراسة تأثير على كمية وكفاءة الاستخلاص حيث اعتمدت طريقة موحدة للاستخلاص وقد يرافق فايتات الصوديوم بعض الشوائب الاخرى نتيجة الاستخلاص.
واوضحت نتائج قياس الفعالية لانزيم الفايتيز الخارجي لراشح المزارع البكتيرية للعزلات KA7,KA10, KP9.1,KP9.2,KP9.5 اختلاف الفعالية الانزيمية بين العزلات وعند قيم الارقام الهيدروجينية المختلفة وبدرجة حرارة 30 م حيث تبين ان افضل فعالية للعزلتين KP9.1 و KA7 هي عند الرقم الهيدروجيني 6 حيث وصلت الفعالية الى 23 و 22.33 وحدة/ مل على التوالي وكما هو واضح في جدول (2).

جدول (2): فعالية انزيمات الفايتيز لعدد من عزلات بكتريا *Bacillus* في ارقام هيدروجينية مختلفة

العزلات البكتيرية	الفعالية الانزيمية (وحدة/مل) في ارقام هيدروجينية مختلفة				
	pH5	pH5.5	pH6	pH7	pH7.5
KA7	-	6	22.33	-	-
KA10	1.7	6.9	2.9	-	0.8
KP9.1	-	6.26	23	-	-
KP9.2	-	7.3	3.1	-	3.03
KP9.5	-	6.3	2.9	-	1.9

تظهر انزيمات الفايتيز من مصادر انتاجها المختلفة فعاليتها في ارقام هيدروجينية مختلفة حيث تعمل بعضها في ارقام هيدروجينية حامضية ويعمل البعض الاخر في ارقام هيدروجينية قاعدية, وذلك يتوافق مع ما اشار اليه Acuna وجماعته (8) من ان اقصى فعالية لانزيم الفايتيز في العزلة البكتيرية *Bacillus* sp MQH-19 هي في ارقام هيدروجينية اعلى من 5 بينما عزلة بكتريا *Paenibacillus* sp SPT-03 تظهر اعلى فعالية انزيمية في ارقام هيدروجينية اقل من 5. كما ان الفايتات تكون بشكل ذائب وميسر للتحلل بواسطة الفايتيز في الارقام الهيدروجينية الحامضية دون المتعادلة حيث يحصل ترسيب للفايتات الموجودة في الغذاء وهذا يعلل انعدام الفعالية الانزيمية في رقم هيدروجيني 7.
يتضح مما تقدم امكانية انتاج انزيمات الفايتيز من بعض عزلات بكتريا *Bacillus* المعزولة من الترب المحلية وامكانية استعمالها في تحليل الفايتات الموجودة في بذور النباتات ومخلفاتها لتحسين العلائق الحيوانية والمنتجات الغذائية .

References

1- Gibson, RS.; Bailey, KB;Gibbs, M.; Ferguson, EL.(2010). A review of phytate, iron, zinc, and calcium concentrations in plant-based complementary foods used in low-income countries and implications for bioavailability.Food Nutr Bull. 31(2):S134-146.
2- Coulibaly, A.; Kouakou, B. and Chen, J.(2011). Phytic acid in cereal grains: structure, healthy or harmful ways to reduce phytic acid in cereal grains and their effects on nutritional quality. American J. plant nutrition and fertilization technology, 1: 1-22.
3- James D. , Amararatne ., Zhi Lu, Dapeng L. (2007). Application of microbial phytase in fish feed. Enzyme and Microbial Technology 40 (2007) 497–507
4- Sasirekha, B.; Beedashree, T.; Champa, KL. (2012). Optimization and purification of extracellular phytase from Pseudomonas aeruginosa P6. European J. experimental Biology, 2(1): 95-104.
5- Powar, V. K. and Jagannathan, V.(1982). Purification and properities of phytate specific phosphatase from Bacillus subtilis. J. Bac. 151(3): 1102-1108.
6- Vihnudas, J.; Jojula, M.; Singaracharya, MA. (2012). A culturing of fungi for phytase production by solid state from different sources. Curr . World Environ. 7(1): 187- 190.
7- Elsorra E. I., Oliwia M., Abdelazim F.;Kristin R.r, Ralf G., Helmut B.Thomas R. and Rainer B..(2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect**.**, **148**, 2097–2109.
8- Acuna, J.J.; Jorquera, M.A.; Martinez, O. A.; Menezes- Blackburn, D.; Marschner, P.; Greiner, R. and Mora, M.L.(2011). Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. J. Soil Sci. Plant Nutr. 11(3): 1-12.

9- Kwanyuen, P. and Burton, Joe, w. (2005). A simple and rapid procedure for phytate determination in soybeans and soy products. JAOCS. 82(2): 81- 85.
10- Kerovuo, J. Lauraeus, M.; Nurminen, P.; Kalkinen, N. and Apajalahti, J.(1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*.
11- Schallmey, M.; Singh, A. and Ward, Owen, P. (2004). Development in the use of Bacillus species for industrial production. Can. J. Microbiology, 50: 1- 17.
12- Sarsan Sreedevi; and Bhumi Narsimha Reddy2.(2012). Expression of a *Bacillus* Phytase C Gene in *Pichia pastoris* and Properties of the Recombinant Enzyme. *Appl. Environ. Microbiol. August 2010 vol. 76 no. 16 5601-5608*.
13- S. Sreedevi and B.N. Reddy. (2012). ISOLATION, SCREENING AND OPTIMIZATION OF PHYTASE PRODUCTION FROM NEWLY ISOLATED *BACILLUS* SP.C43. **IJPBS . 2(2): 218-231**
14- Martha, G-O.; Lili, R. B.; J Gerardo C. T.; Juan, A.G. and Jose,M. V.(2010). **Substrate optimization for phytase production from newly isolated *Bacillus subtilis.*** World Journal of Science and Technology, 2(7):08-13