

สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไฟเตสจากยีสต์อีพีไฟต์ *Rhodotorula mucilaginosa* ZML2-31 และสมบัติในการปลดปล่อยฟอสเฟต
Optimal Conditions for Phytase Activity from Epiphytic Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* ZML2-31 and Their Properties for Phosphate Liberation

รัฐดา จันทร์กัลน์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศศิธร จินตามรกฏ

หน่วยวิจัยเทคโนโลยีทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

สาวิตรี ลิมทอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ruthada Chanklan*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University

Sasitorn Jindamorakot

Bioresource Technology Unit, National center for Genetic Engineering and Biotechnology,

Thailand Science Park

Savitree Limtong

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University

Received: November 3, 2019 ; Accepted: July 29, 2021

บทคัดย่อ

ยีสต์อีพีไฟต์ ZML2-31 ที่แยกจากผิวใบข้าวโพดมีกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่หลั่งออกนอกเซลล์ 46.88 ± 0.49 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมของไฟเตสที่จับกับเซลล์ 31.25 ± 0.98 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร LMM ที่เติมโซเดียมไฟเตทเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ พีเอชที่เหมาะสมและอุณหภูมิที่เหมาะสมของครูดไฟเตส คือ พีเอช 4.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ กิจกรรมการทำงานของไฟเตสที่เหลืออยู่มีค่าสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส ในเวลา 2 ชั่วโมง อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่มีผลต่อความเสถียรของไฟเตส คือ การเก็บครูดไฟเตสไว้ที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ภายหลังจากเวลา 18 วัน ยังคงรักษากิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสไว้ได้สูงกว่า 75

เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกิจกรรมเริ่มต้น การเติมกรดฟอสเฟตลงในถั่วเหลืองและถั่วลูกไก่ช่วยเพิ่มการปลดปล่อยฟอสเฟตอินทรีย์ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 26S rRNA ของโดเมน D1/D2 แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท ZML2-31 มีความใกล้เคียงกับ *Rhodotorula mucilaginosa* โดยมีลำดับเบสที่เหมือนกันถึง 99 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ : ฟอสเฟต; ฟอสเฟต; ผิวกาแฟ; ยีสต์อีฟไฟต์; *Rhodotorula mucilaginosa*

Abstract

Epiphytic yeast ZML2-31, isolated from corn phylloplane, exhibited high activity of 46.88 U/mL extracellular and 31.25 U/mL cell bound phytase when grown on LMM supplemented with 0.5 % Na-phytate at 24 and 48 h of cultivation, respectively. The optimal pH and temperature of crude phytase were pH 4.0 and 40°C, respectively. The residual phytase activities were more than 80% at 30-60 °C for 2 h. Storage stability of phytase was retained more than 75% of the initial activity after 18 days at storage temperature □ 30 °C. Addition of crude phytase to soybean and chickpea significantly enhanced inorganic phosphate liberation compared with control. Sequence analysis of D1/D2 domain of 26S rRNA gene revealed that the isolate ZML2-31 was highly related to *Rhodotorula mucilaginosa* with sequence identity of 99%.

Keywords: phytase; phytate; phylloplane; epiphytic yeast; *Rhodotorula mucilaginosa*

1. บทนำ

กรดไฟติก (Phytic acid) หรือ *myo*-inositol hexakisphosphate เป็นแหล่งของธาตุฟอสฟอรัสและน้ำตาลอินอซิทอล (inositol) ที่สะสมในเมล็ดธัญพืชเพื่อรักษาสมดุลเกลือแร่ของเมล็ด กรดไฟติกมีสมบัติเป็นสารคีเลต (chelate) สามารถจับกับแร่ธาตุประจุบวกกลายเป็นโครงสร้างโมเลกุลเชิงซ้อนได้เป็นไฟเตท (Phytate) และถูกเก็บสะสมไว้ในแวคิวโอลที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ด (Aleurone layer) (Dvorakova *et al.*, 1998) กรดไฟติกมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต เช่น Inositol hexaphosphate (IP6) ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลสื่อสัญญาณระหว่างเซลล์ ควบคุมการแบ่งเซลล์ กระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ รวมถึงการซ่อมแซมสาร

พันธุกรรมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ใน *Saccharomyces cerevisiae* จะใช้ Inositol triphosphate (IP3) เป็นโมเลกุลสื่อสัญญาณในการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและการสื่อสัญญาณแคลเซียมภายในเซลล์ (Shamsuddin and Bose, 2012 และ Robinson *et al.*, 1996) กรดไฟติกมีสมบัติเป็นสารต้านโภชนา (anti-nutritional factor) นอกจากจะจับกับแร่ธาตุต่าง ๆ แล้วยังจับกับโปรตีนอีกด้วย ส่งผลทำให้ร่างกายดูดซึมแร่ธาตุต่าง ๆ รวมถึงการใช้โปรตีนและกรดอะมิโนได้ลดลง (Maga, 1982) สัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เนื่องจากขาดเอนไซม์สำคัญคือเอนไซม์ไฟเตส (Phytase) ไฟเตทจึงถูกขับออกมาพร้อมกับมูลสัตว์ที่จะก่อให้เกิดปัญหาต่อ

สิ่งแวดล้อมตามมาเมื่อปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำ (Jongbloed *et al.*, 1992)

ไฟเตส (*myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase* EC 3.1.3.8 และ EC 3.1.3.26) เป็นเอนไซม์กลุ่มฟอสฟาเตสที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการสลายพันธะฟอสโฟโมโนเอสเทอร์ของกรดไฟติก ปลดปล่อยฟอสเฟตอินทรีย์และ น้ำตาลอินอซีทอลออกมา (Mullaney and Ullah, 2003) ไฟเตสพบได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ การเติมไฟเตสเพิ่มลงไปให้อาหารสัตว์จะช่วยเพิ่มปริมาณธาตุฟอสฟอรัสที่ร่างกายสามารถดูดซึมนำไปใช้ได้ และลดปริมาณฟอสฟอรัสที่ถูกขับออกมาพร้อมกับมูลสัตว์ ไฟเตสจากจุลินทรีย์ถูกเสริมลงในอาหารสัตว์ต่าง ๆ เช่น อาหารไก่กระตัง อาหารลูกสุกรหย่านม และอาหารปลานิล เป็นต้น ในปริมาณตั้งแต่ 500-3000 FTU ต่อกิโลกรัม (Broch *et al.*, 2018; Ingelmann *et al.*, 2019 ; Li *et al.*, 2020; Mesina *et al.*, 2019 และ Maas *et al.*, 2018) สัตว์แต่ละชนิดจะมีระดับพีเอชในทางเดินอาหารแตกต่างกันไป เช่น กระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้นของลูกสุกรหย่านมมีค่าพีเอชระหว่าง 3.5-5.5 ส่วนสัตว์ปีกบริเวณอุ้งพักอาหาร (crop) มีค่าพีเอชระหว่าง 5.2-5.8 และที่บริเวณกระเพาะจริง (proventriculus) มีค่าพีเอชประมาณ 2.8 และบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นของ ปลาการ์ปซึ่งเป็นปลาที่ไม่มีกระเพาะอาหาร มีค่าพีเอชระหว่าง 6.17-7.73 (Li *et al.*, 2015 และ Pires *et al.*, 2019) การประยุกต์ใช้ไฟเตสจากจุลินทรีย์เพื่อเสริมลงในอาหารสัตว์ต้องพิจารณาว่าไฟเตสที่เสริมลงไปสามารถเกิดกิจกรรมทำงานในระดับพีเอชของทางเดินอาหารสัตว์ได้หรือไม่ ดังนั้นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไฟเตสจึงเป็นสิ่งจำเป็น ไฟเตสยังถูกพบได้ที่ใบพืชสีเขียวซึ่งจะมีไฟเตสอยู่ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ (Alkarawi and Zotz, 2014) บริเวณผิวใบพืช (phylloplane) เป็นแหล่งที่พบจุลินทรีย์อีพิ

ไฟต์ (epiphytic microorganisms) หลากหลายชนิด รวมถึงยีสต์ การเจริญเติบโตและดำรงชีวิตของยีสต์บนผิวใบพืชในสภาพแวดล้อมที่มีสารอาหารและแร่ธาตุต่ำนั้น นอกจากความต้องการใช้คาร์โบไฮเดรตที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสงที่พืชขับออกมาเป็นแหล่งคาร์บอนและความต้องการใช้นิโตรเจนที่ได้จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (*N₂ fixing bacteria*) ที่อยู่บริเวณผิวใบพืชเป็นธาตุอาหารหลักแล้ว ยีสต์ก็ต้องการธาตุฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการเจริญ การสร้างพลังงาน รวมถึงนำไปสังเคราะห์เป็นกรดนิวคลีอิกด้วยเช่นกัน (Whipps *et al.*, 2008; Miyamoto *et al.*, 2004) ดังนั้นยีสต์ที่เจริญบนผิวใบที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีธาตุฟอสฟอรัสต่ำ อาจมีการสร้างเอนไซม์ไฟเตสออกมาย่อยสลายไฟเตสที่สะสมในใบพืช เพื่อนำฟอสฟอรัสไปใช้ในการเจริญของยีสต์ ยีสต์อีพิไฟต์ที่ดำรงชีวิตอยู่บนต้นพืชก่อคุณประโยชน์ต่อพืชหลายประการ เช่น ป้องกันจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช หรือป้องกันแมลงด้วยชีววิธี เช่น การสร้างสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ การสร้างสารปฏิชีวนะ (McCormack *et al.*, 1994) รวมถึงการสร้างฮอร์โมนออกซินที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และยังเป็นแหล่งของเอนไซม์หลายชนิด (Limtong *et al.*, 2014) และมีรายงานถึงยีสต์หลากหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้ (Vohra and Satyanarayana, 2001; Olstorpe *et al.*, 2009 และ Yu *et al.*, 2015) งานวิจัยนี้เป็นการแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไฟเตสและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ รวมถึงศึกษาการปลดปล่อยฟอสเฟตอินทรีย์จากถั่วเหลืองและถั่วลูกไก่ เพื่อประเมินศักยภาพของเอนไซม์ไฟเตสที่ยีสต์อีพิไฟต์ผลิตได้ และระบุชนิดยีสต์ ZML2-31 ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

2. วิธีการ

2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

ยีสต์ไอโซเลท ZML2-31 สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ใช้ในการศึกษานี้ แยกได้จากผิวใบข้าวโพดโดยวิธีการชะตัวอย่างและเกลี่ยบนบนอาหารแข็ง YM (yeast extract-malt extract agar) พีเอช 5.0 ที่เติมคลอแรมเฟนิคอลและเติมโซเดียมโพธิโอเนตที่อุณหภูมิห้อง และเก็บรักษายีสต์ที่ได้ไว้ในสารละลายกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การเพาะเลี้ยงและการเตรียมครูดเอ็นไซม์

ครูดเอ็นไซม์เตรียมโดยการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหาร LMM (Liquid minimal medium) ที่ประกอบด้วย (เปอร์เซ็นต์) กลูโคส 1.5, NH_4NO_3 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, KCl 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 และเติมโซเดียมไฟเตท (Na-phytate) 0.5 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้กัลลาเชื้อเริ่มต้นเมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวัดการเจริญโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 600 นาโนเมตร บั่นเหวี่ยงเก็บส่วนใสด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเก็บส่วนใสนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่หลังออกนอกเซลล์ ส่วนตะกอนเซลล์นำมาล้างด้วยบัฟเฟอร์ อะซิเตทปลอดเชื้อ 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.0 ซ้ำ 2 ครั้ง และแขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่จับกับเซลล์ เก็บรักษาครูดเอ็นไซม์ไว้ใช้ในการศึกษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสโดยวิธีการดัดแปลงจาก (Olstorpe *et al.*, 2009) โดยบ่มส่วนผสมที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ที่มีโซเดียมไฟเตทเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมหครูดเอ็นไซม์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด เติมหครูดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ตรวจวัดปริมาณฟอสเฟต โดยวิธีการดัดแปลงจาก Heinonen and Lahti (1981) โดยเติมน้ำสารละลายกรดโมลิบเดท 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0 ถึง 100.0 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ไฟเตส คือเอนไซม์ที่ปลดปล่อยฟอสเฟตอินทรีย์ 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะการทดลองที่ศึกษา

2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมไฟเตส

2.4.1 การศึกษาสภาวะพีเอชที่เหมาะสมของกิจกรรมไฟเตส

ศึกษาสภาวะพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไฟเตสตามวิธีที่อธิบายในข้อ 2.3 โดยวิเคราะห์กิจกรรมไฟเตสที่บ่มในบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ คือ บัฟเฟอร์อะซิเตท (Acetate buffer) พีเอช 3.0-6.0 บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (Phosphate buffer) พีเอช 6.0-8.0 และบัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Glycine-NaOH buffer) พีเอช 9.0-10.0 ที่มีโซเดียมไฟเตท 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ

2.4.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของกิจกรรมไฟเตส

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไฟเตสตามวิธีที่อธิบายในข้อ 2.3 โดยวิเคราะห์กิจกรรมไฟเตสในบัพเฟอร์ชนิดที่มีพีเอชที่เหมาะสมที่มีโซเดียมไฟเตท 0.2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25.0 30.0 40.0 50.0 60.0 และ 70.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นาน 15 นาที โดยทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ

2.5 การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ไฟเตส

2.5.1 อุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรต่อกิจกรรมการทำงานของไฟเตส

ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส โดยบ่มครูดไฟเตสในบัพเฟอร์ชนิดที่มีพีเอชที่เหมาะสมที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 30.0 40.0 50.0 60.0 และ 70.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ตามระยะเวลาต่าง ๆ ที่กำหนด ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ นำมาวิเคราะห์กิจกรรมของไฟเตสที่คงอยู่

2.5.2 อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ไฟเตส

ศึกษาอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่มีผลต่อความเสถียรของไฟเตส โดยเก็บรักษาครูดเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 0.0 4.0 10.0 30.0 และ 40.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด วิเคราะห์กิจกรรมของไฟเตสที่คงอยู่

2.6 ศึกษาการปลดปล่อยฟอสเฟตอินทรีย์จากเมล็ดถั่ว

การศึกษานี้ผู้วิจัยเลือกใช้เมล็ดถั่วเหลือง ตราไรท์พิช และเมล็ดถั่วลูกไก่ สายพันธุ์กาบูลี

(Chickpea, Kabuli type) ตรามายซ้อยส์ โดยเลือกเมล็ดถั่วที่ไม่มีรอยแมลงและไม่มีเชื้อราปนเปื้อน นำมาบดแล้วร่อนผ่านตะแกรกร่อน 250 mesh แขนงลอยรัฐพีช 1.0 กรัม ในบัพเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0 ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันไอน้ำ เมื่อตัวอย่างเย็นลงถึงอุณหภูมิห้องจึงเติมครูดเอนไซม์ปลอดเชื้อที่ปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของไฟเตสเท่ากับ 7 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ในส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ปรับปริมาตรรวมเป็น 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับโดยทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 10 40 และ 70 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปิเปตส่วนใสปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ตรวจวัดปริมาณฟอสเฟต โดยวิธีการดัดแปลงจาก Heinonen and Lahti (1981) นำไปวิเคราะห์ฟอสเฟตอินทรีย์ที่ปลดปล่อยออกมาที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมครูดเอนไซม์

2.7 การระบุชนิดยีนส์โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

การจัดจำแนกยีนส์ไอโซเลท ZML2-31 ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลใช้บริการการจัดจำแนกจากบริษัท Macrogen (Korea) ผ่านทาง บริษัท กิบทไทย จำกัด โดยใช้ไพรเมอร์ LROR 5' (ACC CGC TGA ACT TAA GC) 3' และไพรเมอร์ LR7 5' (TAC TAC CAC CAA GAT CT) 3' ในการเพิ่มชิ้นส่วนบริเวณลำดับเบสบริเวณ 26S rRNA

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BLASTN 2.9.0 และนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันจากฐานข้อมูล NCBI database โดยใช้ mutiple alignment-program CLUSTAL_W และสร้าง Phylogenetic

tree ตาม Kimura's two parameter system (Kimura, 1980) ด้วยวิธี Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0.26 ประเมินความเชื่อถือของ phylogenetic tree โดยการทดสอบทางสถิติด้วย bootstrap method ซึ่งมีการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

เอนไซม์ไฟเตสที่ยีสต์ไอโซเลท ZML2-31 ผลิตขึ้นมีทั้งไฟเตสที่จับอยู่กับเซลล์และไฟเตสที่หลั่งออกนอกเซลล์ แสดงดัง Figure 1 โดยจะมีไฟเตสที่หลั่งออกนอกเซลล์สูงสุดเท่ากับ 46.88 ± 0.49 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีไฟเตสที่จับอยู่กับเซลล์สูงถึง 31.25 ± 0.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง การผลิตไฟเตสจะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง ส่วนการเจริญของ ZML2-31 จะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามค่าการเจริญของยีสต์มีความสัมพันธ์สอดคล้องกับชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ เนื่องจากอาหาร LMM ที่ใช้เพาะเลี้ยงจัดเป็น minimal medium จึงให้ค่าค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเพียง 0.73 แม้เพาะเลี้ยงนานถึง 72 ชั่วโมง ยีสต์หลากหลายสปีชีส์ เช่น *Arxula adenivorans*, *Candida bombi*, *C. lambi*, *Cryptococcus laurentii*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Z. priorinus*, *Williopsis saturnus*, *Schizosaccharomyces octosporus* และ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถผลิตไฟเตสได้ทั้งชนิดที่อยู่ภายในเซลล์ชนิดที่จับอยู่กับเซลล์ และชนิดที่หลั่งออกนอกเซลล์ (Sano *et al.*, 1999; Vohra and Satyanarayana, 2001; Olstorpe *et al.*, 2009; Pable *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015 และ Chaud *et al.*, 2016) ใน

การศึกษานี้ยีสต์ไอโซเลท ZML2-31 ผลิตไฟเตสที่หลั่งออกนอกเซลล์ได้

ปริมาณสูงในเวลาระยะเวลาสั้นกว่าไฟเตสที่จับอยู่กับเซลล์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ครูดเอนไซม์ที่เตรียมได้จากส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ LMM ที่เติมโซเดียมไฟเตทที่เพาะเลี้ยง ZML2-31 ตลอดงานวิจัยนี้

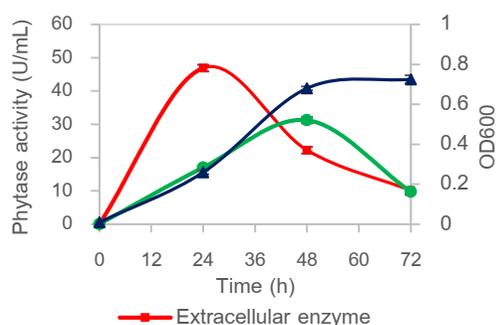


Figure 1 Activity of crude extracellular and cell bound-phytase and growth of isolate ZML2-31 grown on LMM supplemented 0.5% Na-phytate on 200 rpm rotary shaker, at 30°C.

3.2 สภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมไฟเตส

อิทธิพลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมไฟเตสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ แสดงดัง Figure 2 (Upper) ครูดไฟเตสของ ZML2-31 มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อปรับในบัฟเฟอร์อะซิเตท พีเอช 4.0 โดยให้ค่ากิจกรรมไฟเตสสูงสุดเท่ากับ 61.11 ± 3.52 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ที่พีเอช 5.0 มีค่ากิจกรรม 51.74 ± 2.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็นค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ที่เหลืออยู่เท่ากับ 84.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมไฟเตส แสดงดัง Figure 2 (Lower) ครูดไฟเตสมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อปรับในบัฟเฟอร์อะซิเตท พีเอช 4.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยให้ค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 67.01 ± 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่ 30

องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 59.03 ± 0.00 ยูนิต์ต่อ มิลลิลิตร คิดเป็นค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ที่เหลืออยู่เท่ากับ 88.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

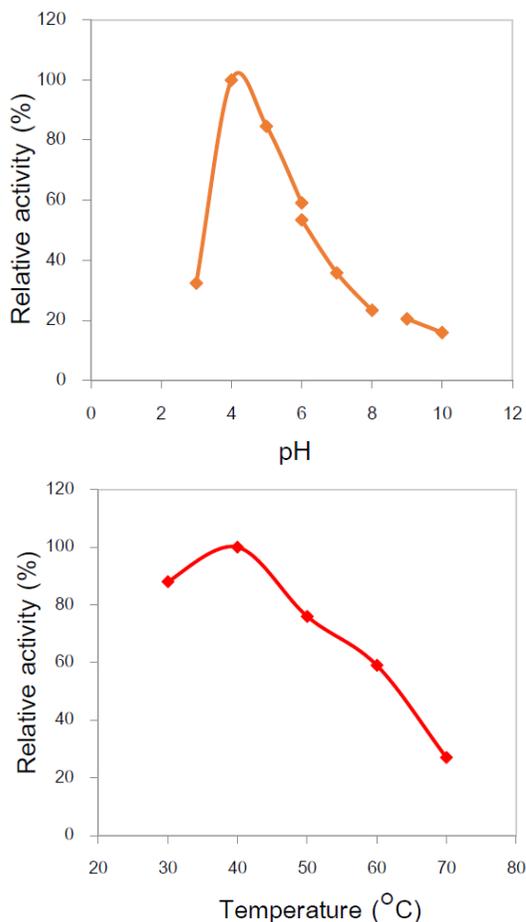


Figure 2 Optimum pH of phytase from ZML2-31 (Left), the influence of pH on phytase activity was determined at 30°C using 20 mM of different buffers. And optimum temperature of phytase (Right), the influence of temperature on phytase activity was determined after 15 min incubation at different temperatures at pH 4.0.

สภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมของครูดไฟเตส ZML2-31 คือ พีเอช 4.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับสภาวะที่เหมาะสมของ

กิจกรรมไฟเตสที่ผลิตโดยยีสต์สปีชีส์อื่น ๆ ที่มีพีเอชที่เหมาะสมระหว่าง 4.0 ถึง 5.0 และ ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 75 เซลเซียส เช่น ไฟเตสจาก *Cryptococcus laurentii* AL27 คือ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Pavlova et al., 2008) ในขณะที่ *C. laurentii* ABO510 คือ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส (Staden et al., 2007) ไฟเตสของ *Rhodotorula mucilaginosa* JMUY14 ที่จากแยกตะกอนในทะเลลึกทวีปแอนตาร์กติค คือ ที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Yu et al., 2015) ไฟเตสของ *Pichia anomala* ที่แยกจากตาดอกต้นพุไฟ (*Woodfordia fruticosa*) คือ ที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Vohra and Satyanarayana, 2001) ไฟเตสของ *Kodamea ohmeri* BG3 ที่แยกจากทางเดินอาหารปลาทะเล *Hexagrammes otakii* คือ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (Li et al., 2008) และจาก *Arxula adenivorans* คือ ที่พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส (Sano et al., 1999) อุณหภูมิที่เหมาะสมของครูดไฟเตส ZML2-31 คือ 40 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับกับ *C. laurentii* AL27 ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่ต่ำกว่ายีสต์อื่น ๆ อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส คือ ที่ 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส ครูดไฟเตส ZML2-31 ยังคงค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ได้ถึง 76.0 59.0 และ 36.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3.3 อุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของ เอนไซม์ไฟเตส

ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรต่อกิจกรรมการทำงานของไฟเตสในบัฟเฟอร์อะซิเตท แสดงดัง Figure 3 (Upper) พบว่า ครูดไฟเตสมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงกว่าค่ากิจกรรมเริ่มต้นภายหลังการบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์อะซิเตทที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ นาน 1 ชั่วโมง และมีค่ากิจกรรมไฟเตสสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส

โดยมีค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นจาก 46.88 ± 0.49 เป็น 74.23 ± 0.33 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และภายหลังการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง กิจกรรมการทำงานของไฟเตสที่เหลืออยู่มีค่าสูงใกล้เคียงกับค่ากิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น และยังคงค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิเดียวกันภายหลังการบ่มนาน 2 ชั่วโมง กิจกรรมของไฟเตสมีแนวโน้มลดลงเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยเป็นตัวลดพลังงานกระตุ้น อุณหภูมิมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ การเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยเพิ่มพลังงานให้แก่โมเลกุล ซับสเตรตให้อยู่ใน transition state ทำให้จับกับ active site ของเอนไซม์ และเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่ทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปหรือเสียหาย จะทำให้ไม่สามารถจับซับสเตรตได้อีกส่วนการเก็บครูดไฟเตสไว้ที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 วัน ยังคงรักษากิจกรรมเอนไซม์ไว้ได้สูงกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ Figure 3 (Lower) เมื่อเทียบกับกิจกรรมเริ่มต้น และการเก็บครูดไฟเตสไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน จะมีกิจกรรมเอนไซม์เหลือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกิจกรรมเริ่มต้น

ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Yu *et al.*, 2015) ที่รายงานว่าไฟเตสจากยีสต์ *R. mucilaginosa* JMUY14 ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส ความเสถียรของกิจกรรมไฟเตสลดลงเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาเพิ่มขึ้น และสอดคล้องกับรายงานของ (Staden *et al.*, 2007) ที่รายงานว่าความเสถียรของไฟเตสจาก *C. laurentii* ABO510 ลดลงเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาเพิ่มขึ้น

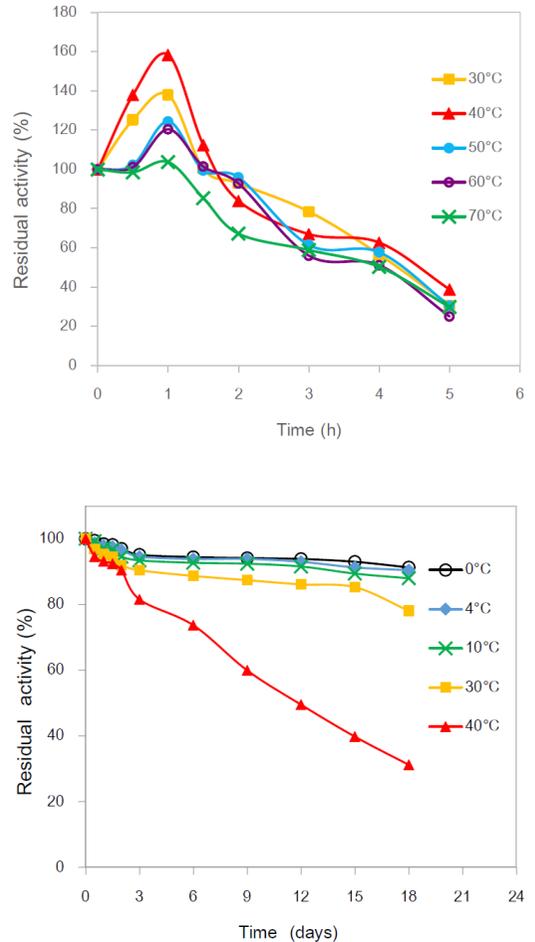


Figure 3 Thermostability (Left) and storage stability (Right) of phytase from ZML2-31. For determination of thermostability, the residual activity of phytase was measured after pre-incubation for time interval at different temperatures at pH 4.0. For storage stability, was determined by monitoring residual enzymatic activity after storage crude enzyme for various periods at various temperatures.

3.4 การปลดปล่อยฟอสเฟตอินทรีย์จากเมล็ดถั่ว

การปลดปล่อยฟอสเฟตอินทรีย์จากถั่วลูกไก่และถั่วเหลืองด้วยครูดไฟเตส ZML2-31 ในหลอดทดลองแสดงดัง Figure 4 จะเห็นได้ว่าชุดทดสอบที่เติมครูดไฟเตสจะมีฟอสเฟตที่ปลดปล่อยสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมครูดไฟเตส และปริมาณฟอสเฟตที่ปลดปล่อยออกมามีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น โดยจะให้ฟอสเฟตเท่ากับ 28.65 ± 0.29 และ 35.47 ± 0.22 ไมโครโมล เมื่อบ่มถั่วลูกไก่และถั่วเหลืองในบัฟเฟอร์อะซิเตทพีเอช 4.0 ที่มีครูดไฟเตส ที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 100 นาที และปลดปล่อยฟอสเฟตได้สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมครูดไฟเตสได้ถึง 2.0-2.9 เท่า ที่สภาวะเดียวกัน ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานที่ใช้ครูดไฟเตสจากยีสต์ *Z. bisporus*, *Z. priorinous*, *W. saturnus*, *S. octosporus* และไฟเตสจากรา *Aspergillus niger* NCIM563 ในการเร่งการปลดปล่อยฟอสเฟตอินทรีย์จากเมล็ดธัญพืชรวมถึงถั่วต่างๆ ที่ใช้เป็นอาหารมนุษย์และสัตว์ (Pable et al., 2014 และ Shah et al., 2009) อย่างไรก็ตาม ฟอสเฟตอินทรีย์อิสระที่ปลดปล่อยจากถั่วเหลืองมีปริมาณสูงกว่าที่ปลดปล่อยจากถั่วลูกไก่ อาจเนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อซับสเตรตที่แตกต่างกัน อีกทั้งเมล็ดถั่วเหลืองมีปริมาณกรดฟอสฟอริกซึ่งเป็นซับสเตรตของไฟเตสสูงถึง 36.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ส่วนถั่วลูกไทมักมีกรดฟอสฟอริกเพียง 9.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังรายงานของ (Chitra et al., 1995)

3.5 การระบุชนิดของยีสต์

ยีสต์อีพีไฟต์ ZML2-31 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง YM จะปรากฏโคโลนี่เป็นสีชมพูอมส้ม โคลอนี้กลมมน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว มีลักษณะเป็นเมือก การระบุชนิดของยีสต์อีพีไฟต์ ZML2-31 ด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

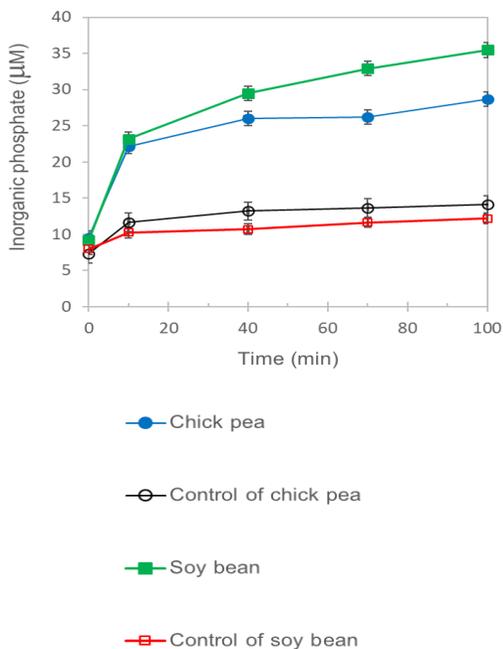


Figure 4 Inorganic phosphate liberation from chick pea and soy bean after the treatment of crude cell-free phytase at 40°C in 20 mM acetate buffer (pH 5.0). Results are expressed as the mean \pm SD of replicated thrice measurements ($n=3$).

โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26S rRNA บริเวณโดเมน D1/D2 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท ZML2-31 มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ Accession number ใน GenBank คือ *Rhodotorula mucilaginosa* DQ832198.1 ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ จึงระบุได้ว่ายีสต์ไอโซเลท ZML2-31 ที่ผลิตไฟเตสได้ก็คือ *R. mucilaginosa* ZML2-31 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26S rRNA ของยีสต์แสดงดัง Figure 5 *R. mucilaginosa* เป็นยีสต์ในไฟลัม Basidiomycota พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้าง

สารเมตาบอไลต์ รวมถึงเอนไซม์ไฟเตส เช่น มีรายงานการแยก *R. mucilaginosa* JMUY14 และ *R. mucilaginosa* L7 จากตะกอนในทะเลลึกทวีปแอนตาร์กติกา ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตไฟเตสได้ (Yu *et al.*, 2015 และ Chaud *et al.*, 2016) งานวิจัยของ (Limtong *et al.*, 2014) ที่แยก *R. mucilaginosa* DMKU-RK354 ได้จากผิวใบอ้อย และงานวิจัยของ (Xin *et al.*, 2009) ที่แยก *R. mucilaginosa* PDT2 ที่สามารถสร้างกรดอินโดลอะซิติก (indole-3-acetic acid) ได้จากต้นฝ้ายสีดำ (*Populus trichocarpa*)

และรายงานการใช้ *R. mucilaginosa* ที่แยกจากผิวกลีบดอกที่ร่วมกับการใช้กรดไฟติกความเข้มข้นที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเน่าและลดการสร้างสารพิษพาทูลิน (Patulin) ที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium expansum* ในผลแอปเปิ้ลโดยวิธีชีวภาพ (Yang *et al.*, 2015) ที่อาจบ่งบอกได้ว่า *R. mucilaginosa* และเอนไซม์จาก *R. mucilaginosa* มีความปลอดภัยเพียงพอในการนำมาใช้กับมนุษย์และสัตว์

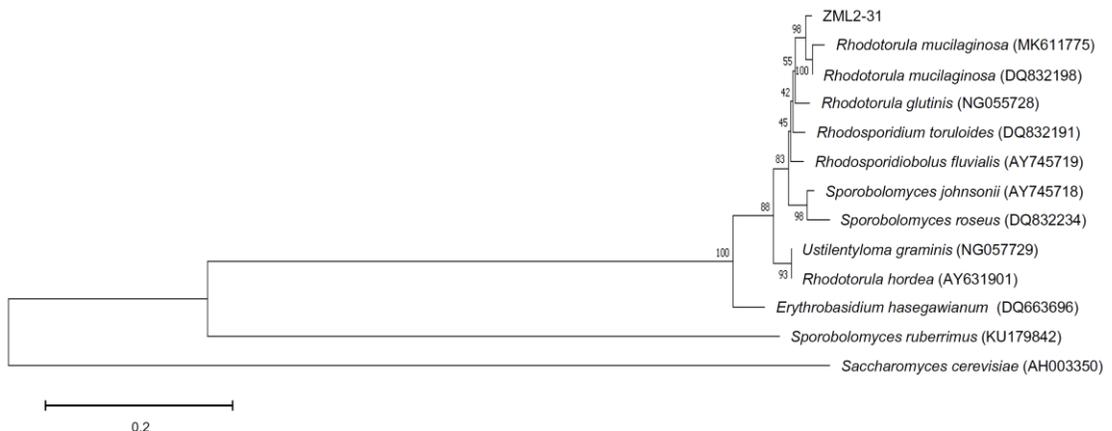


Figure 5 Phylogeny of yeasts based on the D1/D2 domains of the LSU rRNA gene.

4. สรุป

เอนไซม์ไฟเตสที่ *Rhodotorula mucilaginosa* ZML2-31 สร้างขึ้นมีทั้งชนิดที่จับกับเซลล์และที่หลั่งออกนอกเซลล์ เครูดเอนไซม์ไฟเตสที่หลั่งออกนอกเซลล์ของ *R. mucilaginosa* ZML2-31 มีศักยภาพในการปลดปล่อยฟอสเฟตอินทรีย์จากถั่วเหลืองและถั่วลูกไก่ ได้ดีที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จึงอาจนำเอนไซม์ไฟเตสจาก *R. mucilaginosa* ZML2-31 มาประยุกต์ใช้ในการเสริมลงในอาหารสัตว์ปีกหรืออาหารสำหรับลูกสุกรหย่านมได้

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยทั่วไป มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2556 ขอขอบคุณกลุ่มวิสาหกิจชุมชนข้าวโพดบดหมัก บ้านศรีสวัสดิ์ จ.ลพบุรี ที่อนุเคราะห์ให้ผู้วิจัยเข้าเก็บตัวอย่าง

6. References

Alkarawi, H. H., Zotz, G., 2014, Phytic acid in green leaves, *Plant Biol.* 16:697–701.

- Broch, J. , Nunes, R. V. , Eyng, C. , Pesti, G. M. , de Souza, C. , Sangalli, G. G. , Fascina, V. and Teixeira, L. , 2018, High level of dietary phytase improves broiler performance. *Anim. Feed Sci. Technol.* 244: 56-65.
- Chaud, L. C. , Lario, L. D. , Bonuqli-Santos, R. C. , Sette, L. D. , Pessoa Junior, A. and Felipe, M. D. , 2016, Improvement in extracellular protease production by the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7, N. *Biotechnol.* 33: 807-814.
- Chitra, U. , Vimala, V. , Singh, U. and Geervani, P. , 1995, Variability in phytic acid content and protein digestibility of grain legumes, *Plant Foods Hum. Nutr.* 47: 163-172.
- Dvorakova, J. , 1998, Phytase: sources, preparation and exploitation, *Folia Microbiol.* 43: 323-338.
- Felsenstein, J. , 1985, Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, *Evolution.* 39:783-791.
- Heinonen, J.K. and Lahti, R.J. , 1981, A new convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase, *Anal. Biochem.* 113: 313-317.
- Ingelmann, C. J. , Witzig, M. , Möhring, J. , Schollenberger, M. , Kühn, I. and Rodehutschord, M. , 2019, Phytate degradation and phosphorus digestibility in broilers and turkeys fed different corn sources with or without added phytase, *Poult. Sci.* 98: 912–922.
- Jongbloed, A.W., Mroz, Z. and Memme, P.A., 1992, The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus, and phytic acid in different sections of the alimentary tract, *J. Anim. Sci.* 70: 1159-1168.
- Kimura, M. , 1980, A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Li, Y.D. , Awati, A. , Schulze, H. and Partridge, G. , 2015, Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors, *J. Sci. Food. Agric.* 95: 878–896.
- Li, X., Chi, Z., Lui, Z. Yan, K. and Li, H., 2008, Phytase production by a marine yeast

- Kodamaea ohmeri* BG3, Appl. Biochem. Biotechnol. 149: 183-193.
- Li, Y. D., Villca, B., Sewalt, V., de Kreijl, A., Marchal, L., Velayudhan, D. E., Sorg, R. A., Christensen, T., Mejdal, R., Nikolaev, I., Pricelius, S., Kim, H. S., Haaning, S., Sørensen, J. F. and Lizardo, R., 2020, Functionality of a next generation biosynthetic bacterial 6- phytase in enhancing phosphorus availability to weaned piglets fed a corn-soybean meal-based diet without added inorganic phosphate, Anim. Nutr. 6: 24-30.
- Limtong, S., Kaewwichian, R., Yongmanitchai, W. and Kawasaki, H., 2014, Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugar cane in Thailand and their capability to produce indole- 3- acetic acid, World J. Microbiol. Biotechnol. 30: 1785-1796.
- Maas, R. M., Verdegem, M. C. J., Li, Y. D. and Schrama, J. W., 2018, The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia, Aquaculture. 487: 7-14.
- Maga, J. A., 1982, Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis, J. Agric. Food Chem. 30: 1-9.
- McCormack, P.J., Wildman, H.G. and Jeffries, P., 1994, Production of antibacterial compounds by phylloplane- inhabiting yeasts and yeastlike fungi, Appl. Environ. Microbiol. 60: 927-931.
- Mesina, V. G. R., Lagos, L. V., Sulabo, R. C., Walk, C. L. and Stein, H. H., 2019, Effects of microbial phytase on mucin synthesis, gastric protein hydrolysis, and degradation of phytate along the gastrointestinal tract of growing pigs, J. Anim. Sci. 97: 756–767.
- Miyamoto, T., Kawahara, M. and Minamisawa, K., 2004, Novel endophytic nitrogen- fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis, Appl. Environ. Microbiol. 70: 6580-6586.
- Mullaney, E. J. and Ullah, A. H. J., 2003, The term phytase comprises several different classes of enzymes, Biochem. Biophys. Res. Commun. 132: 179-184.
- Olstorpe, M., Schnörrer, J. and Passoth, V., 2009, Screening of yeast strains for phytase activity, FEMS Yeast Res. 9: 478-488.
- Pable, A., Gujar, P. and Khire, J. M., 2014, Selection of phytase producing yeast strains for improved mineral mobilization

- and dephytinization of chickpea flour, J. Food Biochem. 38: 18-27.
- Pavlova, K., Gargova, S., Hristozova, T. and Tankova, Z., 2008, Phytase from Antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL27, Folia Microbiol. 53: 29-34.
- Pires, E. B. E., de Freitas, A. J., Souza F. F., Salgado, R. L., Guimarães, V. M., Pereira, F. A. and Eller, M. R., 2019, Production of fungal phytases from agroindustrial byproducts for pig diets, Sci. Rep. 9:9256. Published online 2019 Jun25. Doi.org/10.1038/s41598-019-45720-z
- Robinson, K. S., Wheals, A. E., Rose, A. H. and Dickinson, J. R., 1996, Unusual inositol triphosphate metabolism in yeast, Microbiol. 142: 1333-1334.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987, The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
- Sano, K., Fukuhara, H. and Nakamura, Y., 1999, Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*, Biotechnol. Lett. 21: 33-38.
- Shah, P., Bhaysar, K., Soni, S. K. and Khire, J. M., 2009, Strain improvement and up scaling of phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation conditions, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36:373-380.
- Shamsuddin, A. and Bose, S., 2012, IP6 (Inositol Hexaphosphate) as a signaling molecule, Curr. Signal Transduc. Ther. 7: 289-304.
- Staden, J. V., Haan, R.D., Van Zyl, W., Botha, A. and Viljoen-Bloom, M., 2007, Phytase activity in *Cryptococcus laurentii* ABO 510, FEMS Yeast. 7: 442-448.
- Vohra, A. and Satyanarayna, T., 2001, Phytase production by the yeast, *Pichia anomala*, Biotechnol. Lett. 23: 551-554.
- Whipps, J. M., Hand, P., Pink D. and Bending, G. D., 2008, Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype, J. Appl. Microbiol. 105: 1744-1755.
- Xin, G., Glawe, D. and Doty, S. L., 2009, Characterization of three endophytic, indole- 3- acetic acid- producing yeasts occurring in *Populus* trees, Mycol. Res. 113: 973-980.
- Yang, Q., Zhang, H., Zhang, X., Zheng, X. and Qian, J., 2015, Phytic acid enhances biocontrol activity of *Rhodotorula mucilaginosa* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apples, Front. Microbiol. 6: 1296. Published online 2015 Nov23. Doi:10.3389/fmicb.2015.01296

Yu, P. , Wang, X. T. and Liu, J. W. , 2015,
Purification and characterization of a
novel cold- adapted phytase from

Rhodotorula mucilaginosa strain JMUY14
isolated from Antarctic, J. Basic Microbiol.
55: 1029-1039.