

การคัดแยกราชั้นต่ำที่ผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากใบไม้

Screening of lower fungi for unsaturated fatty acid production from leaves

นิรมล สากยวงศ์¹ สุทามาศ ขจิรัมย์¹ สายันห์ สมฤทธิ์ผล² และ พนิดา อุณะกุล^{2*}

Niramol Sakayawong¹, Sutamat Khajeeram¹, Sayanh Somrithipol² and Panida Unakol^{2*}

¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

คลองหลวง ปทุมธานี 12120

²ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

คลองหลวง ปทุมธานี 12120

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Center, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

²BIOTEC, National Science and Technology Development Agency, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

* Corresponding author: panidau@biotec.or.th

บทคัดย่อ

คัดแยกราชั้นต่ำจำนวน 10 ไอโซเลตจากใบไม้ตามแหล่งธรรมชาติ 26 แหล่งในประเทศไทย พบว่าสามารถผลิตกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 14-20 อะตอมได้ จึงคัดเลือก 4 ไอโซเลต ที่สร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็นในปริมาณสูง ได้แก่ ราไอโซเลต PB2001 และ PB2002 ผลิตกรดไขมัน γ -linolenic acid 10.70% และ 11.28% ตามลำดับ ราไอโซเลต FAO001 ผลิตกรดไขมัน arachidonic acid 12.48% และ ราไอโซเลต PLL31 ผลิตกรดไขมัน arachidonic acid 4.26% และ eicosapentaenoic acid 4.24% ตามลำดับ จากการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของราไอโซเลต PB2001 และ PB2002 พบโครงสร้าง sporangium รูปร่างกลมเกิดอยู่ที่ปลายก้าน sporangiophore ซึ่งคาดว่าจะ

จะอยู่ในสกุล *Mucor* ราไอโซเลต FAO001 และ PLL31 พบเส้นใยสีขาวเจริญเป็นแนวราบคล้ายกลีบดอกไม้ว คาดว่าน่าจะอยู่ในสกุล *Pythium* เมื่อนำเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลต มาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA (SSU), 28S rRNA (LSU) และบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสกับข้อมูลลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank พบว่าราไอโซเลต PB2001 และ PB2002 มีลำดับ ITS และ LSU คล้ายคลึงกับราในสกุล *Mucor* ถึง 99% ข้อมูลลำดับเบสที่บริเวณ ITS, SSU และ LSU ของราไอโซเลต FAO001 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อราในสกุล *Pythium* 93%, 91% และ 93% ตามลำดับ ส่วนข้อมูลลำดับเบสที่บริเวณ ITS และ SSU ของราไอโซเลต PLL31 มีความคล้ายคลึงกับสกุล *Pythium* 97% และ 95% ตามลำดับ

Abstract

Ten isolates of lower fungi that were able to produce C14-C20 fatty acids were isolated from leaves of 26 natural sources in Thailand. Four isolates that could highly synthesize long-chain essential unsaturated fatty acids were selected. Isolates PB2001 and PB2002 produced γ -linolenic acid 10.70% and 11.28%, respectively; isolate FAO001 produced arachidonic acid 12.48%; and isolate PLL31 produced arachidonic and eicosapentaenoic acids 4.64% and 4.24%, respectively. Morphological studies of isolates PB2001 and PB2002 found globular shape of sporangium on top of sporangiophore, which could be expected for the genus *Mucor*. Isolates FAO001 and PLL31 showed white and flat colony and flower-like growth, which could be expected for the genus *Pythium*. DNA extraction and PCR amplification of 18S rRNA (SSU) and 28S rRNA (LSU) genes and ITS region of the 4 isolates reviewed partial sequences of ITS, SSU and LSU. The comparison of ITS and LSU sequences to the GenBank database indicated that isolates PB2001 and PB2002 were similar to *Mucor* sp. up to 99%. The ITS, SSU, and LSU sequences of isolate FAO001 were similar to *Pythium* sp. at 93%, 91%, and 93%, respectively. The analysis for ITS and SSU sequences of isolate PLL31 were similar to *Pythium* sp. 97% and 95%, respectively.

คำสำคัญ: ราชั้นต่ำ กรดไขมันไม่อิ่มตัว อาร์เอ็นเอไรโบโซม

Keywords: lower fungi, unsaturated fatty acid, ribosomal RNA (rRNA)

บทนำ

กรดไขมันไม่อิ่มตัวคือกรดไขมันสายตรงที่มี

พันธะคู่ ซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็นต่อร่างกาย ต้องได้รับจากการบริโภคอาหาร การเพิ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวเข้าไปในอาหารและยา มีประโยชน์ต่อหัวใจ สามารถป้องกันความผิดปกติของหลอดเลือด มะเร็ง การอักเสบ และยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ eicosanoid ด้วย (Dong and Walker, 2008) ในธรรมชาติพบ arachidonic acid (ARA, C20:4 n-6) ในตัวของสัตว์และไข่แดงของไข่ไก่ ซึ่งมีปริมาณน้อย นอกจากนี้ยังพบ eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 n-3) ในน้ำมันจากปลาทะเล แต่น้ำมันปลาทะเลมีความแพง และอาจมีการสะสมของปรอท (Dong and Walker, 2008) นอกจากนี้ยังพบการสร้าง EPA และ ARA โดยราสกุล *Mortierella* และ *Pythium* ราทั้งสองสกุลสามารถผลิตกรดไขมันอิ่มตัวนี้ได้ โดยเลี้ยงด้วยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน มีหลายประเทศที่นำราทั้งสองสกุลมาใช้ผลิต EPA และ ARA ในระดับอุตสาหกรรม โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมน้ำมันที่ได้จากเมล็ดพืชเพื่อใช้เป็นตัวส่งเสริมให้สร้าง EPA และ ARA เพิ่มขึ้น (Dong and Walker, 2008) อีกทั้งยังสามารถผลิต γ -linolenic acid (GLA, C18:3 n-6) และ ARA ในปริมาณที่สูง (Certik and Shimizu, 1999) สำหรับแหล่งของ docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) ส่วนใหญ่มาจากน้ำมันปลาทะเล และมักพบการปนเปื้อน polychlorinated biphenyls (PCBs), dioxin และโลหะหนักต่างๆ โดยสารเหล่านี้มักสะสมอยู่ที่ตับและอวัยวะต่างๆ ของปลา ทางสหรัฐอเมริกาจึงไม่อนุญาตให้เติมน้ำมันปลาลงในอาหารเด็กทารก (Ratlidge, 2004) ในปัจจุบันมีการเติม DHA และ polyunsaturated fatty acids (PUFAs) อื่นๆ ลงไปในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องสำอาง เช่น ขนมปัง เนยแข็ง และนมเปรี้ยว (Ward and Singh, 2005) ดังนั้นการหาแหล่งทางเลือกใหม่สำหรับผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวจึงเป็นที่น่าสนใจ จากการศึกษาพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิต PUFAs เช่น สาหร่าย แบคทีเรีย และรา เป็นต้น โดยเฉพาะราชั้นต่ำ

ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมง่ายและเจริญเติบโตได้ดี ตัวอย่างเช่นราใน Order Mucorales สามารถสะสม EPA และ ARA ได้ (Yongmanitchai and Ward, 1989; Stinson *et al.* 1991; Zhu *et al.* 2003) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อคัดแยกราชั้นต่ำจากใบไม้ในแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย ที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว เพื่อนำไปสู่การค้นพบแหล่งของสารอาหารที่มีคุณค่าต่อทั้งมนุษย์และสัตว์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การคัดแยกราชั้นต่ำจากใบไม้

เก็บตัวอย่างใบไม้จากป่าชายเลนหรือชายทะเล ตัดใบไม้เป็นชิ้นขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผสมเพนนิซิลินและสเตรปโตมัยซินปริมาณ 0.01% 3 ครั้ง นำใบไม้ 4-5 ชิ้น วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose peptone yeast extract (GPY: 0.1% yeast extract, 0.1% peptone, 1% glucose, 1.5% agar และ 1.6% sea salt) ส่วนตัวอย่างใบไม้ที่เก็บมาจากแหล่งน้ำจืดใช้ potato dextrose agar (PDA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แยกราชั้นต่ำภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยสังเกตจากเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้น แล้วนำราชั้นต่ำที่คัดแยกได้ไปเลี้ยงในอาหารใหม่ต่อไปจนได้เชื้อบริสุทธิ์

การเพาะเลี้ยงราชั้นต่ำและการเก็บเซลล์

เมื่อราเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ประมาณ 3-5 วัน ตัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราเจริญขนาด 1.5×1.5 เซนติเมตร สับให้ละเอียดใส่ลงไปในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) และ GPY ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นนำมารองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ล้างเส้นใยที่อยู่บนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วนำมาทำแห้งเยือกแข็งเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำเซลล์แห้งที่

ได้มาสกัดและวิเคราะห์กรดไขมัน

การสกัดและวิเคราะห์กรดไขมัน

ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ประมาณ 50 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดสกัด เติมสารมาตรฐาน heptadecanoic acid (C17:0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และกรดซัลฟูริก 4% ในเมทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้จนเย็นเติมน้ำกลั่น และเฮกเซนอย่างละ 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไป วิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันด้วยเครื่อง gas chromatography (GC) โดยใช้คอลัมน์ Omega wax™ 250 การตรวจสอบพีคจะขึ้นอยู่กับเวลาที่สัมพันธ์กับสารมาตรฐาน fatty acid methyl ester การวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันทำได้โดยการเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และคำนวณเปอร์เซ็นต์ (w/w) ของกรดไขมัน

การศึกษาข้อมูลลำดับเบสของยีน 18S rRNA (SSU), 28S rRNA (LSU) และบริเวณ ITS

การสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจากวิธีของ O' Donnell *et al.*, 1997) ใส่ตัวอย่างเซลล์แห้งของราประมาณ 1 ใน 4 ส่วน ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม lysis buffer (Tris HCl 10 มิลลิลิตร 1M EDTA 50 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 1.16 กรัม ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดไปวางใน heat block ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติม phenol:chloroform:isoamylalcohol (24:25:1) ลงไป 1 เท่าของสารละลาย พลิกหลอดไปมาเบาๆ 20 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิมอีก 10 นาที ถ้าสารละลายยังขุ่นให้เติม chloroform:isoamylalcohol

(1:1) ลงไป 1 เท่าของตัวอย่าง เพื่อสกัดอีกครั้ง ดูด ส่วนใสให้หลอดไมโครพิพม์ใหม่เติมแอมโมเนียมอะซิเตดปริมาณครึ่งหนึ่งของส่วนใสเติมเอทานอลสัมบูรณ์ ปริมาตรเท่ากัน พลิกหลอดไปมาเบาๆ 1 ครั้ง เก็บ หลอดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างด้วยเอทานอล 75% ทำให้แห้งโดยผึ่งไว้ 1 คืน ละลายดีเอ็นเอด้วย Elution buffer NE (MACHEY-NAGEL GmbH & Co.KG, Germany) 20-40 ไมโครลิตร

การเพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA (SSU), 28S rRNA (LSU) และบริเวณ ITS โดยเทคนิคพีซีอาร์
การเพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA (SSU), 28S rRNA (LSU) และบริเวณ ITS ใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ ได้แก่ ยีน 18S rRNA ใช้คู่ไพรเมอร์ NS1 (5' GTA GTC ATA TGG TTG TCT C 3') กับ NS6 (5' GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC 3') ยีน 28S rRNA ใช้ คู่ไพรเมอร์ JS1 (5' CGC TGA ACT TAA GCA TAT 3') กับ JS8 (5' CAT CCA TTT TCA GGG CTA 3') และ บริเวณ ITS ใช้คู่ไพรเมอร์ NS5 (5' AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G 3') และ ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') ในปฏิกิริยา พีซีอาร์ทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10xbuffer 35.2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 5 ไมโครลิตร, 1 mM dNTP 1.5 ไมโครลิตร, ฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สไพรเมอร์ (10 μM) อย่างละ 4 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ 1.5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 20-100 นาโนกรัม) ddH₂O 0.3 ไมโครลิตร และ Taq DNA polymerase (Fermentas, Canada) 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ รอบที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที รอบที่ 2-33 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และรอบสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยวิธีเจลอิเล็กโทร

โฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1%

การศึกษาข้อมูลลำดับเบส นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ของราแต่ละไอโซเลต ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จ PCR clean-up: Nucleo spin extract II (MACHEY-NAGEL GmbH & Co.KG, Germany) ส่งผลิตภัณฑ์พี ซีอาร์ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen (Korea) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาเข้าคู่และ ประกอบกันโดยใช้โปรแกรม Bio edit V.7.0.5 (Hall, 1999) นำลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank เพื่อหาความคล้ายคลึง (similarity) ของยีน 18S rRNA (SSU), 28S rRNA (LSU) และบริเวณ ITS

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากตัวอย่างใบไม้ที่เก็บมาจากแหล่งธรรมชาติ ในประเทศไทยทั้งหมด 26 แหล่ง คัดแยกราชั้นต่ำที่ ผลิตรกรไฉมันไม่มั่วตัวได้ 10 ไอโซเลต (Table 1) จากนั้นคัดเลือกรากชั้นต่ำที่ผลิตรกรไฉมันไม่มั่วตัวที่ เป็นกรดไฉมันที่จำเ็น และเป็นกรดไฉมันไม่มั่วตัวสาย ยาว 4 ไอโซเลต ได้แก่ ราไอโซเลต FA0001 ที่คัดแยก ได้จากตัวอย่างใบไม้ที่เก็บมาจาก เกาะท่าไร่ จ. นครศรีธรรมราชพบว่าการสร้างกรดไฉมันจำเ็นคือ linoleic acid (C18:2) 12.38% eicosatrienoic acid (C20:3) 7.00% และ arachidonic acid (C20:4) 12.48% แต่ไม่พบกรดไฉมัน eicosapentaenoic acid ราไอโซ เลต PLL31 ซึ่งคัดแยกจากใบไม้ที่ อ. พระสมุทรเจดีย์ จ. สมุทรปราการ สามารถผลิตรกรดไฉมัน arachidonic acid (C20:4 n-6) ได้ 4.64% และเป็นเพียงไอโซเลต เดียวที่พบกรดไฉมัน eicosapentaenoic acid (C20:5n3) 4.24% ส่วนราไอโซเลต PB2001 และ PB2002 แยก ได้จากใบไม้ที่เก็บจาก อ. ปากบารา จ. สตูล ผลิตร กรดไฉมัน γ-linolenic acid (C18:3 n-6) ได้ 10.70% และ 11.28% ตามลำดับ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เมื่อเลี้ยงรากชั้นต่ำประมาณ 7-10 วัน ราไอโซเลต FA0001 และ PLL31 พบเส้นใยสีขาว ลักษณะ เส้นใยเจริญเป็นแนวราบไปกับอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการ

เจริญไม่สม่ำเสมอ ทำให้เกิดลักษณะของเส้นใยซ้อนกันคล้ายกับกลีบดอกไม้ม (Figure 1a และ 1b) จากการศึกษาข้อมูลลำดับเบสของยีน 18S rRNA (SSU), 28S rRNA (LSU) และบริเวณ ITS พบว่าราไอโซเลต FAO001 มีลำดับเบสบริเวณ SSU, ITS และ LSU ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับราในสกุล *Pythium* 91%, 93% และ 91% ตามลำดับ และราไอโซเลต PLL31 มีลำดับเบสที่บริเวณ SSU และ ITS ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับราในสกุล *Pythium* 95% และ 98% ตามลำดับ (Table 2) รา *Pythium* จัดอยู่ในกลุ่ม Oomycetes (Moreau et al., 1998) สายพันธุ์ที่มีรายงานการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัว ได้แก่ *P. irregulare* (Gandhi and Weete, 1991) *P. ultimum* (Stinson et al., 1991) และ *P. acanthicum* (Singh and Ward, 1998) ซึ่งสามารถสร้างกรดไขมันชนิดต่างๆ ได้แก่ ARA, EPA และ docosapentaenoic acid (DPA; C22:5) ซึ่งรา *P. ultimum* สามารถสร้างกรดไขมัน EPA ได้ 3.4% (Certik and Shimizu, 1999) รา *P. irregulare* สร้างกรดไขมัน ARA ได้ 8.2% (Walker et al., 1999) และ สามารถสกัดกรดไขมัน DPA 2.2% ได้จาก *P. acanthicum* (Singh and Ward, 1998) สำหรับรา *Pythium* ที่คัดแยกได้นั้น สามารถสร้างทั้ง ARA และ EPA ได้เช่นกัน โดยสามารถสร้าง ARA และ EPA ในปริมาณ 4-12% และ 4% ตามลำดับ

ราไอโซเลต PB2001 คัดแยกจากใบไม้ที่เก็บจาก อ. ปากบารา จ. สตูล พบกรดไขมัน linoleic acid (C18:2) 8.59% และ γ -linolenic acid (C18:3 n-6) 10.70% แต่ไม่พบกรดไขมัน arachidonic acid และ eicosapentaenoic acid ส่วนราไอโซเลต PB2002 คัดแยกจากใบไม้ที่เก็บจาก อ. ปากบารา จ. สตูล มีกรดไขมัน linoleic acid (C18:2) 11% และ γ -linolenic acid (C18:3 n-6) 11.28% ซึ่งลักษณะเส้นใยของราไอโซเลต PB2001 และ PB2002 ที่เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3-5 วัน มีสีขาวคล้ายกัน และลักษณะเส้นใยเจริญขึ้นฟูสูง มีการเจริญอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสร้างสปอร์เมื่อรา

เจริญได้ประมาณ 3-4 วัน โดย มีลักษณะของ sporangium รูปร่างกลม เกิดอยู่ที่ปลายก้านของ sporangiophore เส้นใยไม่มีผนังกัน (non-septate hyphae) ไม่มี rhizoid เมื่อเส้นใยเริ่มแก่มีการสร้างผนังกัน (septum) ตรงบริเวณที่มีการสร้างสปอร์ (Figure 1c และ 1d) และจากการศึกษาข้อมูลลำดับเบสที่บริเวณ ITS และ LSU ของราไอโซเลต PB2001 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับรา ในสกุล *Mucor* 99% และ 99% ตามลำดับ และเมื่อศึกษาข้อมูลลำดับเบสที่บริเวณ ITS และ LSU ของราไอโซเลต PB2002 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับรา ในสกุล *Mucor* 99% และ 82% ตามลำดับ (Table 2) รา *Mucor* จัดอยู่ใน Order Mucorales (Singh et al., 2008) มีรายงานว่าราในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Mortierella*, *Mucor* และ *Cunninghamella* สามารถผลิต γ -linolenic acid (GLA) ได้ในปริมาณสูง 7-11% (Certik et al., 1997, Conti et al., 2001, Xian et al., 2003) ปัจจุบันมีการนำราชนิดนี้มาผลิตเป็น single cell oil ในทางการค้า เช่น บริษัท JE Sturge ประเทศอังกฤษ ผลิต GLA จากรา *Mucor circinelloides* ซึ่งราชนิดนี้สามารถผลิต GLA ได้ 15% ของกรดไขมันทั้งหมด (Ward and Singh, 2005) ในขณะที่รา *Mucor* ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยครั้งนี้สามารถสร้าง GLA ได้สูงถึง 10-11% ทั้งๆ ที่ยังไม่ได้ปรับสภาพในการผลิต ถ้าหากได้มีการปรับสภาพให้เหมาะสม เช่น ภาวะการเลี้ยงและอาหารเลี้ยงเชื้อ น่าจะให้ผลของการสกัดไขมันสูงขึ้นหรือได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์ที่ใช้ในทางการค้า

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกราชั้นต่ำที่มีสมบัติสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากใบไม้แหล่งต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 26 แหล่ง พบราชั้นต่ำจำนวน 10 ไอโซเลต จึงเลือกไอโซเลตที่สามารถสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม ω -3 คือ eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5 n-3) และกลุ่ม ω -6 คือ γ -linolenic acid (GLA; C18:3 n-6) และ arachidonic acid (ARA; C20:4 n-6) จำนวน 4 ไอ

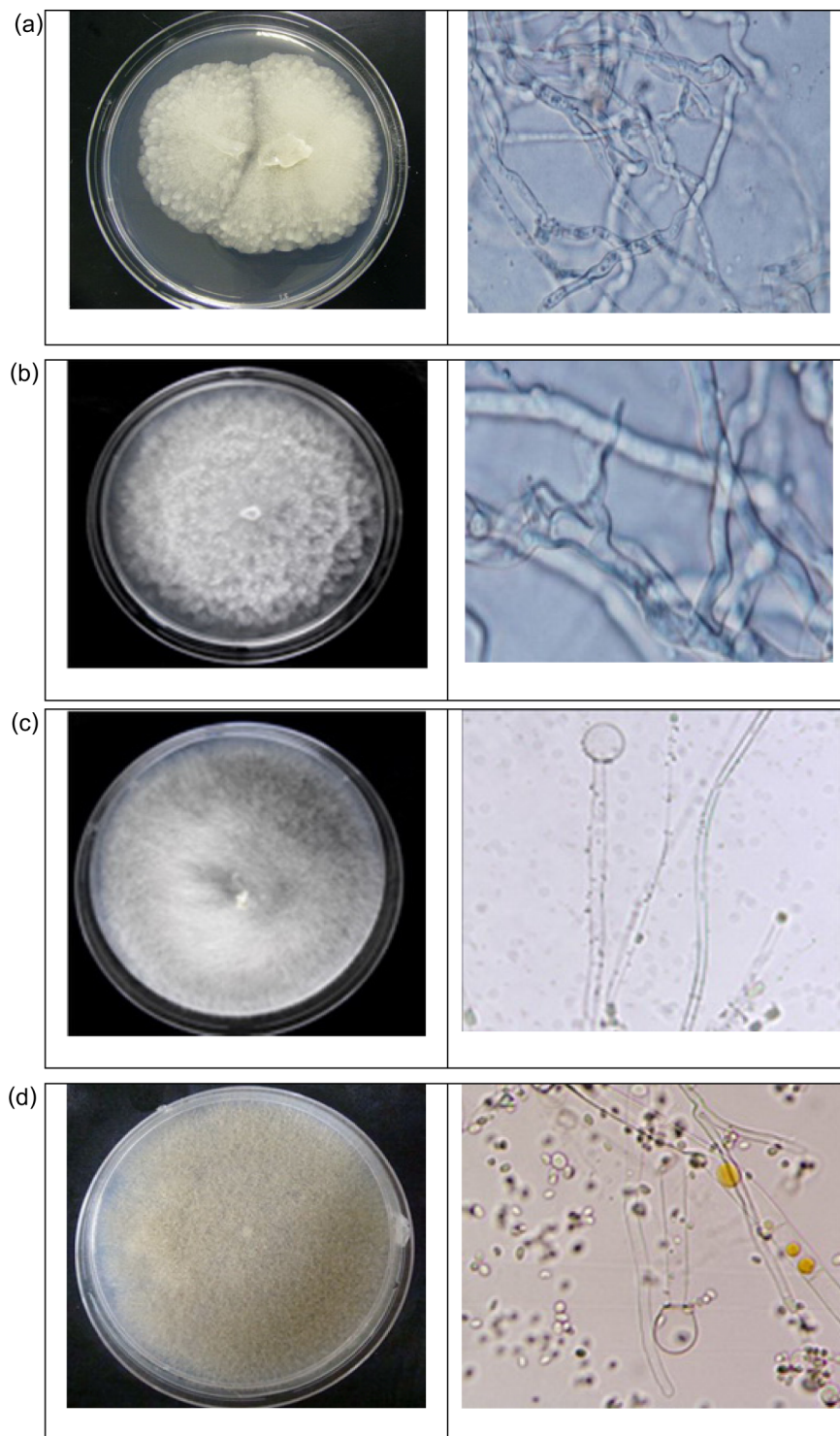


Figure 1 Colony morphology and fungal hyphae of isolate FAO001 (a), PLL31 (b), PB2001 (c) and PB2002 (d) appearance under microscope 200X magnification.

Table 2 Percentage of similarity and base sequences of four fungal isolates.

Isolate no.	Region	Genbank accession no.	Closest species	Similarity (%)	Size (bp)
FAO 001	ITS	EF418925.1	<i>Pythium helicoides</i> CBS 286.31	93	843
		EF418924.1	<i>Pythium ostracodes</i> CBS 768.73	93	843
	SSU	EF418925.1	<i>Pythium helicoides</i> CBS 286.31	91	1348
		AY742756.1	<i>Pythium splendens</i>	91	1348
	LSU	AY598637.1	<i>Pythium insidiosum</i> CBS 574.85	91	1442
		AY598661.1	<i>Pythium mastophorum</i> CBS 375.72	90	1442
PLL 31	ITS	AB217668.1	<i>Pythium pyrilobum</i> IFO32560	97	1430
		AY742755.1	<i>Pythium aphanidermatum</i>	98	1430
	SSU	AY742755.1	<i>Pythium aphanidermatum</i>	95	829
		AF442497.1	<i>Pythium insidiosum</i>	94	829
PB 2001	ITS	EU793999.1	<i>Mucor</i> sp. EIM-10	99	1200
		AF548078.1	<i>Mucor plumbeus</i> UPSC 1492	99	1200
	LSU	EU195421.1	<i>Mucor racemosus</i> PTCC 5305	99	1277
	SSU	AY213710.1	<i>Mucor circinelloides</i> UWFP 1079	99	1277
PB 2002	ITS	AF113429.1	<i>Mucor indicus</i>	99	1196
		AY054699.1	<i>Mucor indicus</i> SDM-13	99	1196
	LSU	AF113469.1	<i>Mucor indicus</i> NRRL28634	82	1562
		AF113466.1	<i>Mucor amphibiorum</i> NRRL28633 28S	83	1562

โหลเตด ได้แก ไรไอลโหลเตด FAO001, PB2001, PB2002 และ PLL31 พบวไรไอลโหลเตด FAO001 และ PLL31 ซึ่สร้งกรดไจมนัไม้อัมตัว ARA และ EPA เป็นไร ในสกุล *Pythium* โดยระบุได้จากลักษณะสัณฐานวิทยา ที่บ่งชี้ และค่าเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงของลำดับ เบสบริเวณ ITS และ LSU ส่วนไรไอลโหลเตด PB2001 และ PB2002 สามารถสร้งกรดไจมนัไม้อัมตัว GLA ได้ เป็นไรในสกุล *Mucor* โดยระบุได้จากลักษณะ สัณฐานวิทยาที่บ่งชี้ และค่าเปอร์เซนต์ความ คล้ายคลึงของลำดับเบสบริเวณ ITS, SSU และ LSU

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นคุณค่าของไร ซันด้าที่พบในประเทศไทย ในการสร้งกรดไจมนัไม้อัมตัว ซึ่เป็นสารที่มีคุณค่าสูงและมีความจำเป็นต่อ มนุษย์และสัตว์ อย่างไรก็ตามการพัฒนาสัณภาพของ

ไรซันด้าเหล่านัเพื่อให้เป็นแหล่งของกรดไจมนัไม้อัมตัว มูลค่าสูง จำเป็นต้องศึกษาภาวะที่เหมาสมทั้งภาวะ แวดล้อม และอาหารที่เหมาต่อการเจริญและการ สร้งผลิตภันท์ รวมทั้งกระบวนการผลิตในระดับถ้ง หมักเพื่อพัฒนาไปสู่อุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณนัรัฐฉนิ บุญยัีน ผู้ช่วยนักรวญ และคุณจาวรรณ เชื้อสีหรมชัย เจ้านัที่ประจำ หอ้งปฏิบัติการ Phylogenetic ศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) สำนักรงาน พัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนจาก ศช. สวทช.

เอกสารอ้างอิง

- Certik, M., Balteszova, L. and Sajbidor, J. 1997. Lipid formation and gamma-linolenic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil. *Lett Appl Microbiol* 25: 101-105.
- Certik, M. and Shimizu, S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J Biosci Bioeng* 87: 1-14.
- Conti, E., Stredansky, M., Stredansky, S. and Zanetti, F. 2001. Gamma-linolenic acid production by solid-state culture of Mucorales strains on cereals. *Biores Technol* 76: 283-286.
- Dong, M. and Walker, T.H. 2008. Addition of polyunsaturated fatty acids to canola oil by fungal conversion. *Enzyme Microb Tech* 42: 514-520.
- Gandhi, S.R. and Weete, J.D. 1991. Production of the polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by the fungus *Pythium ultimum*. *J Gen Microbiol* 137: 1825-1830.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp*. Ser. 41: 95-98.
- Moreau, R., Young, D.H., Danis, P.O., Powell, J.M., Quinn, C.J., Beshah, K., Slawacki, R.A. and Dilliplane, R.L. 1998. Identification of ceramide-phosphorylethanolamine in Oomycete plant pathogens: *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, and *Phytophthora capsici*. *Lipids* 33: 307-317.
- O' Donnell, K., Cigelnik, E., Weber, N.S. and Trappe, J.M. 1997. Phylogentic relationships among ascomycetous truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia* 89: 48-65.
- Ratledge, C. 2004. Single cell oils-a coming of age. *Lipid Tech* 16: 34-41.
- Singh, A. and Ward, O.P. 1998. Docosapentaenoic acid (C22:5, w-3) production by *Pythium acanthicum*. *J Ind Microbiol* 20: 187-191.
- Singh, O.V., Pandey, G. and Jain, R.K. 2008. *Diversity of Microbes and Cryptogams*. Capital Offset Press, New Delhi, India.
- Stinson, E.E., Kvoczak, R. and Kurantz, M.J. 1991. Effect of cultural conditions on production of eicosapentaenoic acid by *Pythium irregulare*. *J Ind Microbiol* 8: 171-178.
- Ward, O.P. and Singh, A. 2005. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Proc Biochem* 40: 3627-3652.
- Walker, T.H., Cochran, H.D. and Hulbert, G.J. 1999. Supercritical carbon dioxide extraction of lipids from *Pythium irregulare*. *J Am Oil Chem Soc* 76: 595-602.
- Xian, M., Nie, J., Meng, Q., Liu, J. and Zhen, K. 2003. Production of gamma-linolenic acid by disrupted mycelia of *Mortierella isabellina*. *Lett Appl Microbiol* 36: 182-185.
- Yongmanitchai, W. and Ward, O.P. 1989. Omega-3 fatty acids: alternative source of production. *Proc Biochem* 24: 117-125.
- Zhu, M., Yu, L. and Wu, Y. 2003. An inexpensive medium for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 75-79.