การคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของราและยีสต์ผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะปริมาณสูงจากแหล่งดินอุทยานแห่งชาติน้ำตกภูซางและมหาวิทยาลัยพะเยา

Selection and Characterization of Fungi and Yeasts for Highly Producing Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) from Soil Sources, Phu Sang National Park and Phayao University

สุภาพร ภัสสร[1*] และ วนิดา แซ่จึง[1]
Supaporn Passorn[1*] and Wanida Saejung[1]

บทคัดย่อ

การคัดเลือกราและยีสต์ที่มีความสามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวปริมาณสูง โดยเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติน้ำตกภูซาง และมหาวิทยาลัยพะเยา นำมาแยกราและยีสต์ด้วยวิธี Warcup's soil-plate และเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน และจัดจำแนกชนิดโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ Internal transcribed spacer ของ rDNA จากฐานข้อมูล NCBI พบว่า รา *Aspergillus flavus* UP-F35 และ ยีสต์ *Meyerozyma caribbica* PC-Y8 สามารถผลิตกรดไขมันได้มากกว่า 40% ของน้ำหนักแห้ง

คำสำคัญ: กรดไขมันไม่อิ่มตัว จุลินทรีย์โอลิเอจินัส อุทยานแห่งชาติน้ำตกภูซาง

Received: 28 January 2020; Accepted: 22 May 2020

[1] สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา รหัสไปรษณีย์ 56000
[1] Department of Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao Province 56000
* Correspondence to E-mail: supaporn.pa@up.ac.th

Abstract

Screening for high polyunsaturated fatty acid producing fungi and yeasts were performed soil sampling isolation from Phu-sang National park and University of Phayao. Isolation method was based on Warcup's soil-plate method. The isolates were cultured on Potato dextrose Agar (PDA). The amount of lipid contents was determined in fungal and yeast isolates. Their species were identified using nucleotide sequences comparison of internal transcribed spacer region (ITS) of the rDNA to the NCBI database. The result showed that *Aspergillus flavus* UP-F35 and *Meyerozyma caribbica* PC-Y8 produced amount of fatty acids more than 40% of dry weight.

Keywords: Polyunsaturated fatty acid, oleaginous microorganism, Phu Sang national park

คำนำ

การบริโภคน้ำมันที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะคู่ (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) ประกอบด้วยกลุ่มโอเมก้า 3 และ 6 มีส่วนในการป้องกันบรรเทาหรือรักษาโรคบางชนิดได้ เช่น ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดได้ การยับยั้งการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย (Ristic-Medic et al., 2013; Ruxton et al., 2004) และส่งเสริมพัฒนาการทำงานของระบบประสาทและภูมิคุ้มกันของทารก โดยกรดไขมันหลายพันธะคู่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มกรดไขมันจำเป็นที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ได้ ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อสภาวะการบริโภคไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย เช่น รายงานการสำรวจจากประชากรเฉพาะในกลุ่มผู้สูงอายุ สตรีมีครรภ์และเด็กจาก 17 ประเทศในทวีปยุโรป พบว่าการบริโภคกรดไขมันไม่อิ่มตัว (PUFAs) น้อยกว่าค่าเฉลี่ยที่แนะนำโดยองค์การอนามัยโลก (Sioen et al., 2017) ปัจจุบันกรดไขมันไม่อิ่มกลุ่มโอเมก้า 3 และ 6 จึงเป็นที่นิยมสำหรับผู้บริโภคอาหารเสริมสุขภาพ ส่งผลต่อความต้องการผลิตเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย ในทางอุตสาหกรรมการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะคู่กลุ่มโอเมก้า 3 และ 6 ได้มาจากแหล่งวัตถุดิบทางการเกษตร โดยการสกัดและแยกองค์ประกอบกรดไขมัน ไม่อิ่มตัวจำเป็นมาจากทั้งส่วนของน้ำมันพืช และน้ำมันจากปลาทะเล แต่ยังคงมีข้อจำกัดหลายด้านในการผลิตจากแหล่งเหล่านี้ เช่น ผลผลิตขึ้นอยู่กับฤดูกาล และภูมิศาสตร์ ทำให้มีปริมาณกรดไขมันจำเป็นไม่คงที่ในแต่ละช่วงเวลาและทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันปลาเข้มข้นมีกลิ่นคาวที่ไม่พึงประสงค์และปริมาณคลอเรสเตอรอลที่สูงยากแก่การกำจัดออก (Armstrong et al., 1994) รวมถึงปัญหามลภาวะที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบันทำให้ต้องคำนึงถึงการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งวัตถุดิบจากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น (Bellou et al., 2016) จากสาเหตุเหล่านี้จึงมีการค้นคว้าเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์และศึกษาคุณสมบัติของจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตกรดไขมันจำเป็นที่ต้องการในทางอุตสาหกรรม เช่น การผลิตกรดแกมม่าลิโนเลนิค ในระดับอุตสาหกรรมในประเทศอังกฤษ และญี่ปุ่น (Certik and Shimizu, 1999; Ratledge, 2004; Adrio and Demain, 2003) ส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ศึกษาการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวจำเป็นมักเป็นราอยู่ในอันดับ Mucorales ที่พบตามดินทั่วไป เช่น Mucor sp. และ Mortierella sp. หรือกลุ่ม marine microorganism พวก *Crypthecodinium cohnii* และ *Schizochytrium* spp. (Sijtsma and de Swaaf, 2004) ในกระบวนการผลิตกรดไขมันจำเป็นจากแหล่งจุลินทรีย์ยังมีข้อดีหลายประการ คือ การเติบโตที่รวดเร็วของจุลินทรีย์ การใช้ระยะเวลาของการผลิตสั้นกว่า และ ไม่ต้องอาศัยพื้นที่จำนวนมากเหมือนการปลูกพืชน้ำมัน อีกทั้งปัญหาด้านน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมที่มีราคาเพิ่มสูงขึ้น จึงมีความสนใจที่จะหาแหล่งพลังงานทดแทนในรูปแบบของน้ำมันที่ได้จากจุลินทรีย์ (microbial diesel) ซึ่งมีการค้นคว้าวิจัยอย่างแพร่หลายในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ผลิต

กรดไขมันได้สูง (oleaginous microorganism) โดยเฉพาะราและยีสต์เพื่อที่จะเป็นตัวเลือกหนึ่งของแหล่งพลังงานใหม่ในอนาคต (Ochsenreither et al., 2016) ในปัจจุบันการใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์ของจุลินทรีย์หรือการควบคุมให้มีการพัฒนาผลผลิตที่สูงขึ้นโดยใช้เทคโนโลยีการผลิตในถังหมัก (fermentation technology) เป็นสิ่งที่สามารถทำได้ง่ายในจุลินทรีย์ (Adrio and Demain, 2003) การใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวจำเป็นมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในต่างประเทศ และจากการศึกษาและพัฒนาปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีอย่างต่อเนื่องนั้น นำไปสู่การผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวจำเป็นเหล่านี้ทางอุตสาหกรรม ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่มาของการศึกษาครั้งนี้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มราและยีสต์ที่มีการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวจำเป็นปริมาณสูงจากแหล่งดินธรรมชาติ ในจังหวัดพะเยา รวบรวมเป็นข้อมูลความหลากหลายของราและยีสต์ในกลุ่ม oleaginous fungi จากดินในบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา และเขตวนอุทยานน้ำตกภูซาง (น้ำตกอุ่น) จังหวัดพะเยา

วิธีการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างดินโดยวิธีการแบบ composite sample จากพื้นที่ป่าชื้นในเขตป่ารอบบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา และเขตวนอุทยานน้ำตกภูซาง (น้ำตกอุ่น) จังหวัดพะเยา คัดแยกราและยีสต์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Warcup's soil-plate method (Warcup, 1950) เลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) นำตัวอย่างดินจำนวน 0.005 กรัม ผสมกับอาหาร PDA เทลงในจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสังเกตเห็นโคโลนีของราและยีสต์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นถ่ายแยกแต่ละโคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ คัดเลือกยีสต์ที่มีปริมาณไขมันสะสมสูงในเบื้องต้น โดยนำยีสต์โคโลนีเดี่ยวมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันใส่สีย้อม Nile red ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดสารผสมจำนวน 15 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ส่องดูลักษณะของยีสต์ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ ที่ค่า Excitation maximum ในช่วง 458-530 นาโนเมตร และ ที่ค่า Emission maximum ในช่วง 525-605 นาโนเมตร (Greenspan et al., 1985)

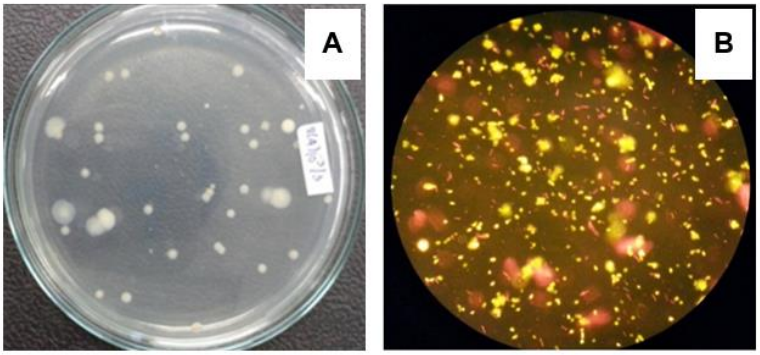
2. จัดจำแนก และตรวจสอบสายพันธุ์ยีสต์และราโดยวิเคราะห์ดีเอนเอในบริเวณ ITS โดยสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยน้ำยาสกัด DNAzol นำดีเอ็นเอมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ตามวิธีการของ White et al. (White et al., 1990) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสดังนี้ ITS 1 – 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' และ ITS 4 – 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' นำ PCR Product ที่ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท SolGent (SolGent Co., Ltd., South korea) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ที่ได้ไปวิเคราะห์ความเหมือนเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรมblastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) และระบุแทกซอนของยีสต์และราโดยใช้เกณฑ์ระดับความเหมือนไม่น้อยกว่า 97% (% similarity cut-off) ในการระบุจีนัสและสปีชีส์ (Blaalid et al., 2013)

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ เลี้ยงเซลล์ยีสต์และสปอร์ราลงในอาหารเหลว YM broth และ PDB เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความ 150 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บเซลล์ โดยวิธีกรอง อบเซลล์ให้แห้งก่อนนำมาสกัดไขมัน เตรียมกรดไขมันให้อยู่ในรูปอนุพันธ์เมทิลเอสเตอร์ดัดแปลงจากวิธี direct-transmethylation (Lepage and Roy, 1986) และวิเคราะห์องค์ประกอบและสัดส่วนของกรดไขมันโดย gas chromatography (GC) เครื่อง GC-17A (Shimadzu Ltd., Tokyo) และใช้คอลัมน์ capillary ยาว 30 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร มีก๊าซไนโตรเจนเป็นตัวพาที่อุณหภูมิคอลัมน์ 205 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่จุดฉีดสาร (injector) 250 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิตัวตรวจวัด (detector) 260 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัววัดชนิด flame Ionization Detector (FID) การคำนวณค่า % สัดส่วนของกรดไขมันแต่ละชนิดต่อกรดไขมันทั้งหมด และปริมาณกรดไขมันทั้งหมดต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ผลการวิจัยและวิจารณ์

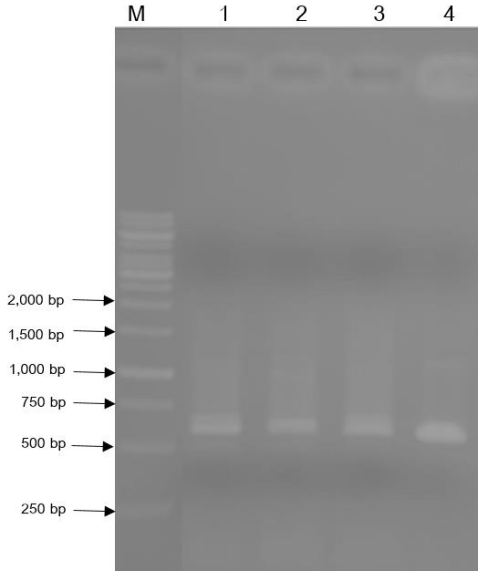
จากการสังเกตการณ์เจริญเติบโตของราและยีสต์ที่คัดแยกได้จากดินในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง บนอาหาร

สูตร Potato dextrose agar (PDA) พบว่า รามีการเจริญของเส้นใย 2 ลักษณะคือเส้นใยสีน้ำตาล และเส้นใยสีขาว มีสปอร์ ส่วนลักษณะยีสต์มีโคโลนีสีขาวขุ่น จากนั้นจึงนำยีสต์มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่เติมกรด tartaric acid ความเข้มข้น 10% w/v เพื่อคัดแยกยีสต์ นำยีสต์ที่คัดแยกได้ตรวจสอบปริมาณสะสมเม็ดไขมันในเซลล์ โดยการย้อมสี Nile red ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบแสง Fluorescence ที่กำลังขยาย 40x ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1. คัดเลือกยีสต์บนอาหาร PDA ที่เติมกรด tartaric acid ความเข้มข้น 10% w/v (A) ยีสต์ไอโซเลท PC-Y15 ย้อมสี Nile red จากกล้องจุลทรรศน์ ระบบแสง Fluorescence ที่กำลังขยาย 40x (B)

การศึกษาพบว่ามียีสต์ที่คาดว่าจะผลิตไขมันปริมาณสูงจำนวน 8 ไอโซเลท โดยแยกจากบริเวณน้ำตกภูซาง 7 ไอโซเลท คือ PC-Y1, PC-Y8, PC-Y11, PC-Y12, PC-Y13, PC-Y14 และ PC-Y15 แยกจากดินในบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา 1 ไอโซเลท คือ UP-Y140 ส่วนของราแยกได้จากดินในบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา จำนวน 5 ไอโซเลท คือ UP-F16, UP-F35, UP-F65, UP-F86 และ UP-F101 และเมื่อนำมาจัดจำแนก และตรวจสอบสายพันธุ์ยีสต์และราโดยวิเคราะห์ดีเอนเอในบริเวณ ITS จากขั้นตอนการทำ PCR และตรวจสอบด้วยวิธี Gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอมีขนาดอยู่ระหว่าง 500-700 คู่เบส (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2. Gel Electrophoresis บริเวณ ITS ของ genomic DNA เมื่อเปรียบเทียบด้วย 1 kb ladder Marker จะพบว่า lane 1, 2, 3 และ 4 คือ UP-F101, UP-F86, UP-F65 และ UP-F16 ตามลำดับ

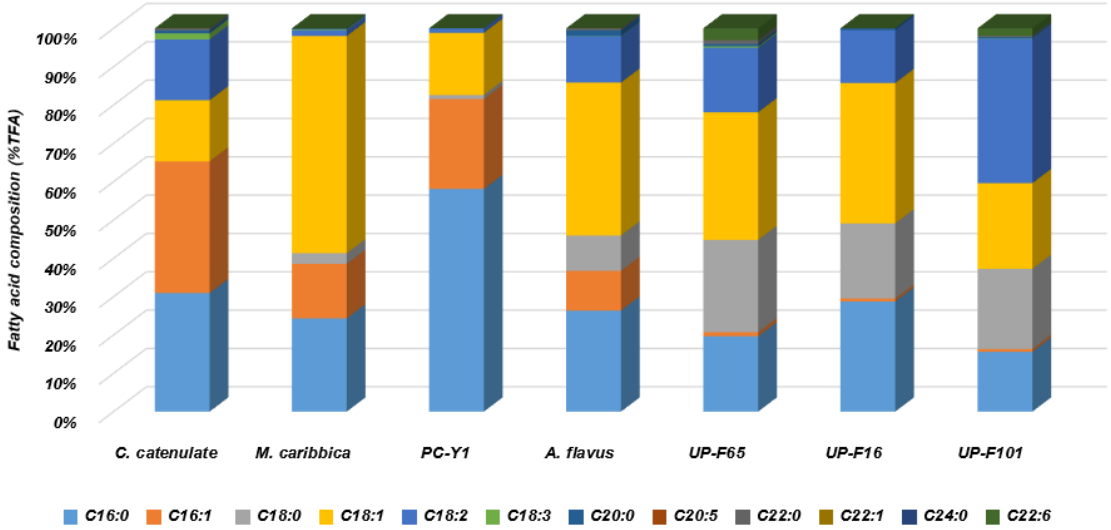
ตารางที่ 1. ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอนเอบริเวณ ITS กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn

Isolate	%Identities	ชนิดของจุลินทรีย์	GenBank no.
UP-Y140	100%	*Candida catenulate*	KX034376.1
PC-Y1	97%	*Kazachstania africana*	KY103621.1
PC-Y8	100%	*Meyerozyma caribbica*	KM676452.1
PC-Y11	100%	*Meyerozyma caribbica*	MG976725.1
PC-Y12	100%	*Meyerozyma caribbica*	MG976725.1
PC-Y13	100%	*Meyerozyma caribbica*	KF728794.1
PC-Y14	100%	*Meyerozyma caribbica*	MK592829.1
PC-Y15	98%	*Meyerozyma caribbica*	KC556809.1
UP-F16	88%	*Aspergillus flavus*	LN482581.1
UP-F35	100%	*Aspergillus flavus*	MH244421.1
UP-F65	90%	*Earliella scabrosa*	KR706167.1
UP-F86	100%	*Aspergillus flavus*	MK299130.1
UP-F101	76%	*Lentinus squarrosulus*	LC068796.1

การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ที่ได้จากราและยีสต์ทั้ง 13 ไอโซเลท เพื่อระบุชนิดโดยวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (ตารางที่ 1) พบว่า ยีสต์ไอโซเลท PC-Y8, PC-Y11, PC-Y12, PC-Y13, PC-Y14 และ PC-Y15 มีลำดับ นิวคลีไทด์ที่มีความเหมือน 98 -100% เทียบกับ *Meyerozyma caribbica* และยีสต์ไอโซเลท UP-Y140 มีลำดับนิวคลีไทด์ที่มีความเหมือน 100% เทียบกับ *Candida catenulate* ในส่วนของราไอโซเลท UP-F35 และ UP-86 มีลำดับนิวคลีไทด์ที่มีความเหมือน 100% เทียบกับ *Aspergillus flavus* ในส่วนยีสต์ ไอโซเลท PC-Y1 และราไอโซเลท UP-F16, UP-F65 และ UP-F101 ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ชัดเจน เนื่องจากลำดับนิวคลีไทด์ที่มีความเหมือนต่ำกว่า 97% การคัดแยกราและยีสต์จากตัวอย่างดินในเขตจังหวัดพะเยา จากอุทยานแห่งชาติภูซาง และมหาวิทยาลัยพะเยา พบจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราและแบคทีเรีย ส่วนในกลุ่มยีสต์มีจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยทั่วไปความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินมักพบปริมาณมากในบริเวณรอบรากของต้นไม้ ดังเช่นที่มีรายงานการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินที่อยู่รอบรากต้นปาล์มในภาคใต้ 5 จังหวัดของประเทศไทย โดยพบรากลุ่ม *Aspergillus* spp. มากที่สุด (ชวิศา และ ชนินันท์, 2559)

หลังจากระบุชนิดของยีสต์และราที่ไอโซเลทได้แล้วจึงนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสมเพื่อสกัดกรดไขมันและวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดของยีสต์จำนวน 3 ไอโซเลท คือ *C. catenulate*, *M. caribbica* (PC-Y8), และ PC-Y1 พบว่า มีปริมาณไขมันทั้งหมดเท่ากับ 37.47±1.36, 51.36±3.95, และ 33.15±0.51% โดยน้ำหนักแห้ง และ จากราจำนวน 4 ไอโซเลท คือ *A. flavus* (UP-F35), UP-F65, UP-F16 และ UP-F101 โดยพบปริมาณไขมันทั้งหมดเท่ากับ 44.83±2.47, 39.50±0.89, 34.85±0.48 และ 15.61±0.89% โดยน้ำหนักแห้ง จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่ายีสต์ *M. caribbica* (PC-Y8) สามารถผลิตกรดไขมันทั้งหมดได้สูงสุด และรองลงมา คือ *A. flavus* (UP-F35) เมื่อวิเคราะห์ชนิดขององค์ประกอบกรดไขมันในเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 3 พบว่า ยีสต์และราที่แยกได้มีองค์ประกอบหลักเป็นกรดไขมันปริมาณสูงที่มีความยาวของคาร์บอนอะตอมขนาด C16 และ C18 อะตอม โดยมีส่วนประกอบของกรดไขมันที่มีคาร์บอนสายยาวตั้งแต่ C20 มีปริมาณน้อยมากไม่ถึง 1% และพบว่าราและยีสต์ที่มีปริมาณกรดไขมันโอลิอิก (C18:1) สูงสุดเมื่อเทียบกับกรดไขมันชนิดอื่น ๆ คือ *M. caribbica* PC-Y8 (56.67%), *A. flavus* UP-F35 (39.86%), UP-F65 (33.30%) และ UP-F16 (36.62%) ในขณะที่ยีสต์ *C. catenulate* พบกรดปาลมิโตเลอิกสูงสุด (C16:1)

ปริมาณ 34.38% ยีสต์ไอโซเลท PC-Y1 พบกรด ปาลมิติกสูงสุด (C16:0) ปริมาณ 58.07% และ ราไอโซเลท UP-F101 พบกรดลิโนเลอิกสูงสุด (C18:2) ปริมาณ 37.70%



ภาพที่ 3. ปริมาณสัดส่วนของกรดไขมันที่พบในไขมันทั้งหมด (Proportion of fatty acid: % of TFA) ของไอโซเลทยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM และไอโซเลทราที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

ในการศึกษาครั้งนี้พบ *A. flavus* UP-F35 ผลิดกรดไขมันได้ในปริมาณสูง โดยองค์ประกอบของกรดไขมันหลักเป็นกลุ่มของคาร์บอน C18 อะตอม ประกอบด้วยกรดสเตียริก (C18:0) กรดโอลิอิก (C18:1) และกรดลิโนลิอิก (C18:2) นอกจากทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบพื้นฐานของโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน (structural role) แล้วยังทำหน้าที่ควบคุมกระบวนสร้างโคโลนี (seed colonization) และไมโคทอกซิน (mycotoxin) ของราในกลุ่มนี้ *Aspergillus* spp. (Calvo et al., 1999) ในส่วนของยีสต์ *M. caribbica* ที่พบได้จากการคัดเลือกครั้งนี้ถูกจัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตไขมันในเซลล์ได้อยู่ในกลุ่ม oleaginous yeast ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไบโอดีเซล (Polburee et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบการรายงานว่ามีศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์ด้านการควบคุมการเน่าเสียของผักและผลไม้ในทางธรรมชาติ (biological control) (Aguirre-Güitrón et al., 2018) และสามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิด isoflavone aglycone ยีสต์ชนิดนี้สามารถแยกได้จากอาหารหมักทำให้เกิดกลิ่นรสในอาหาร (Romi et al., 2014) อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจสอบสายพันธุ์ของยีสต์และราที่แยกได้ให้ชัดเจนอีกครั้งก่อนนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกจุลินทรีย์ oleaginous fungi ที่ได้จากพื้นที่ป่าชื้นในเขตรอบบริเวณ มหาวิทยาลัยพะเยา และเขตวนอุทยานน้ำตกภูซาง (น้ำตกอุ่น) จังหวัดพะเยา ค้นพบทั้งกลุ่มยีสต์และราที่มีการสะสมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะสูง อย่างไรก็ตามการนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมยังคงต้องมีการศึกษาเชิงลึก ทั้งทางด้านการเพาะเลี้ยง และความปลอดภัยทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มเติม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยพะเยา ประจำปี 2556 (สัญญาเลขที่ 020056208002) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ชวิศา ทองรัตน์ และ ชนินันท์ พรสุริยา. 2559. ความหลากหลายของจุลินทรีย์จากดินบริเวณรอบรากปาล์มน้ำมันในภาคใต้ของประเทศไทย. แก่นเกษตร. 44 (ฉบับพิเศษ 1), 930-935.

Adrio, J. L. and Demain, A. L. 2003. Fungal biotechnology, International Microbiology. 6(3), 191 -199.

Aguirre-Güitrón, L., M. Calderón-Santoyo, R.I. Ortiz-Basurto, P.U. Bautista-Rosales, and J.A. Ragazzo-Sánchez. 2018. Optimisation of the spray drying process of formulating the post-harvest biocontrol agent Meyerozyma caribbica. Biocontrol Science and Technology. 28(6), 574–590.

Armstrong, S.G., S.G. Wyllie, and D.N. Leach. 1994. Effects of season and location of catch on the fatty acid compositions of some Australian fish species. Food Chemistry. 51(3), 295–305.

Bellou, S., I.-E. Triantaphyllidou, D. Aggeli, A.M. Elazzazy, M.N. Baeshen, and G. Aggelis. 2016. Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. Current Opinion in Biotechnology. 37, 24–35.

Blaalid, R., S. Kumar, R.H. Nilsson, K. Abarenkov, P.M. Kirk, and H. Kauserud. 2013. ITS 1 versus ITS 2 as DNA metabarcodes for fungi. Molecular Ecology Resources. 13(2), 218–224.

Calvo, A.M., L.L. Hinze, H.W. Gardner, and N.P. Keller. 1999. Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp. Applied and Environmental Microbiology. 65(8), 3668–3673.

Certik, M., and S. Shimizu. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. Journal of Bioscience and Bioengineering. 87(1), 1–14.

Greenspan, P., E.P. Mayer, and S.D. Fowler. 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. The Journal of Cell Biology. 100(3), 965–973.

Lepage, G., and C.C. Roy. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. Journal of Lipid Research. 27(1), 114–120.

Ochsenreither, K., C. Glück, T. Stressler, L. Fischer, and C. Syldatk. 2016. Production strategies and applications of microbial single cell oils. Frontiers in Microbiology. 7, 1539.

Polburee, P., W. Yongmanitchai, N. Lertwattanasakul, T. Ohashi, K. Fujiyama, and S. Limtong. 2015. Characterization of oleaginous yeasts accumulating high levels of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel-derived crude glycerol. Fungal Biology. 119(12), 1194–1204.

Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochimie. 86(11), 807–815.

Ristić-Medić, D., V. Vučić, M. Takić, I. Karadžić, and M. Glibetić. 2013. Polyunsaturated fatty acids in health and disease. Journal of the Serbian Chemical Society. 78(9), 1269–1289.

Romi, W., S. Keisam, G. Ahmed, and K. Jeyaram. 2014. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction

fingerprinting. BMC Microbiology. 14(1), 52.

Ruxton, C.H.S., S.C. Reed, M.J.A. Simpson, and K.J. Millington. 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. Journal of Human Nutrition and Dietetics. 17(5), 449–459.

Sijtsma, L., and M.E. de Swaaf. 2004. Biotechnological production and applications of the ω-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. Applied Microbiology and Biotechnology. 64(2), 146–153.

Sioen, I., L. van Lieshout, A. Eilander, M. Fleith, S. Lohner, A. Szommer, C. Petisca, S. Eussen, S. Forsyth, P.C. Calder and R. P. Mensink. 2017. Systematic review on N-3 and N-6 polyunsaturated fatty acid intake in European countries in light of the current recommendations-Focus on specific population groups. Annals of Nutrition and Metabolism. 70(1), 39–50.

Warcup, J.H. 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. Nature. 166(4211), 117–118.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press.