

Profil Pengekspresan Gen Mengekod delta 6 dan delta 12-Asid Lemak Desaturase *Cunninghamella bainieri* semasa Biosintesis Asid Gamma-Linolenik

(Expression Profiles of delta 6 and delta 12-Fatty Acid Desaturase Encoding Genes

Cunninghamella bainieri during Gamma-Linolenic Acid Biosynthesis)

NOOR ADILA ABDUL KARIM, ZAMRI ZAINAL, AIDIL ABDUL HAMID, FARAH DIBA ABU BAKAR
& ABDUL MUNIR ABDUL MURAD*

ABSTRAK

Delta 6-asid lemak desaturase dan delta 12-asid lemak desaturase merupakan enzim yang diperlukan bagi langkah desaturasi semasa proses biosintesis asid gamma-linolenik (GLA) oleh kulat oleaginus. Objektif kajian ini ialah untuk menganalisis profil pengekspresan gen mengekod enzim delta 6-asid lemak desaturase (des6) dan delta 12-asid lemak desaturase (des12) kulat oleaginus Cunninghamella bainieri semasa penghasilan GLA. Jujukan gen separa bersaiz 1372 pb bagi des6 dan 1008 pb bagi des12 telah dipencil daripada C. bainieri. Analisis pengekspresan gen menggunakan kaedah tindak balas berantai polimerase kuantitatif masa sebenar (RT-qPCR) menunjukkan perubahan kadar pengekspresan des6 adalah lebih tinggi berbanding kadar pengekspresan des12 semasa penghasilan GLA. Pengekspresan des6 adalah tertinggi selepas 24 jam dikultur dalam medium penghasilan GLA. Namun, kadar pengekspresannya menurun hingga jam ke-96 pertumbuhan tetapi meningkat semula pada jam ke-120. Bagi des12, kadar pengekspresannya adalah lebih sekata dengan pengekspresan tertinggi dikesan pada jam ke-120. Analisis penghasilan GLA menunjukkan jumlah GLA dalam sel berkolerasi dengan kadar pengekspresan des6. Hasil kajian mencadangkan bahawa aras pengekspresan des6 adalah penting dalam menentukan aras GLA dalam C. bainieri.

Kata kunci: Asid gamma-linolenik; Cunninghamella bainieri; delta 6-asid lemak desaturase; delta 12-asid lemak desaturase; kulat oleaginus

ABSTRACT

Delta 6-fatty acid desaturase and delta12-fatty acid desaturase are enzymes required for the desaturation steps during gamma-linolenic acid (GLA) biosynthesis in oleaginous fungi. The objectives of this study were to analyse the expression profiles of genes which encode for the delta 6-fatty acid desaturase (des6) and delta 12-fatty acid desaturase (des12) from an oleaginous fungus, Cunninghamella bainieri, during GLA production. Partial gene sequences with the size of 1372 bp for des6 and 1008 bp for des12, were isolated from C. Bainieri. Gene expression analyses via real-time quantitative PCR (RT-qPCR) indicate that the changes in the expression profile of des6 is higher during GLA production as compared to the expression profile of des12. The expression of des6 is the highest after 24 h of growth in the GLA-inducing medium. However, its expression showed a decreasing pattern until 96 h of growth but increased at 120 h. The expression profile of des12 is more consistent with the highest expression levels detected at 120 h of growth. GLA production analysis showed that the amount of GLA in the cell is correlated with the expression of des6. The results of this study suggested that the expression of des6 plays an important role in determining GLA production in C. bainieri.

Keywords: Cunninghamella bainieri; delta 6-fatty acid desaturase; delta 12-fatty acid desaturase; gamma linolenic acid; oleaginous fungi

PENGENALAN

Asid gamma-linolenik (GLA) merupakan asid lemak poli tak tepu (PUFA) yang memainkan peranan penting dalam metabolisme sel. GLA (C18:3) merupakan perantara bagi penghasilan prostaglandin, iaitu molekul penting dalam mengawal aktiviti fisiologi organisma (Conti et al. 2001). Selain itu, GLA merupakan prekursor kepada eikosanoid yang merupakan molekul isyarat yang terlibat dalam fungsi reproduksi, tindak balas pertahanan dan pengawalan tekanan darah (Sakuradani & Shimizu 2003). Oleh kerana manusia dan haiwan tidak mampu menghasilkan GLA,

maka makanan yang mengandungi GLA perlu diambil bagi membekalkan kandungan GLA yang mencukupi.

Sumber utama GLA adalah minyak bunga *evening primrose* (*Oenothera biennis*) dengan kandungan GLA sebanyak 8-10% daripada kandungan keseluruhan minyak, minyak biji benih borago (*Borago officinalis*) menghasilkan 24-25% GLA dan minyak daripada anggur hitam (*Ribes nigrum*) menghasilkan 16-17% GLA (Gunstone 1992). Namun begitu bekalan GLA daripada sumber tumbuhan adalah terhad disebabkan oleh penanaman yang mengikut musim, keperluan kawasan penanaman yang

luas, jangka masa yang lama untuk penuaian hasil dan persaingan tanah subur dengan tanaman makanan yang lain. Oleh itu, para penyelidik mula memberi perhatian kepada penggunaan mikroorganisma sebagai sumber GLA alternatif (Ratledge & Wynn 2002). Mikroorganisma menunjukkan potensi yang baik sebagai penghasil PUFA memandangkan kadar pertumbuhannya yang cepat, tidak dipengaruhi oleh faktor perubahan cuaca atau musim, kaedah pengkulturan yang mudah dan mampu menghasilkan GLA setanding tumbuhan (Certik & Shimizu 1999). Beberapa kajian telah menunjukkan kulat oleaginus daripada genera *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizophus* dan *Cunninghamella* berupaya untuk menghasilkan GLA dalam peratusan yang tinggi (Conti et al. 2001; Dyal & Narine 2005; Jang et al. 2005; Manikan et al. 2013; Murad et al. 2011; Wei et al. 2004).

Proses biosintesis GLA berlaku melalui tapak jalan penghasilan asid lemak dalam mikroorganisma penghasil PUFA dan melibatkan enzim asid lemak desaturase yang merupakan enzim pengikat membran. Beberapa enzim desaturase seperti enzim delta 9-asid lemak desaturase, delta 12-asid lemak desaturase dan delta 6-asid lemak desaturase menjadi fokus utama dalam kajian terhadap biosintesis asid lemak C18. Enzim delta 9-asid lemak desaturase berperanan membentuk ikatan ganda dua pada rantai asid lemak mono tak tepu (C18:0) untuk membentuk asid oleik (C18:1). Enzim delta 12-asid lemak desaturase menukarkan asid oleik (C18:1) kepada asid linoleik (C18:2) manakala enzim delta 6-asid lemak desaturase menukarkan asid linoleik (C18:2) kepada GLA (C18:3) (Certik & Shimizu 1999).

Murad et al. (2011) telah melaporkan bahawa kulat *Cunninghamella bainieri* merupakan kulat oleaginus yang menghasilkan lipid sehingga 38.64% daripada berat keringnya. Daripada jumlah tersebut, sebanyak 11.06% daripada keseluruhan lipid terdiri daripada GLA. Kajian tersebut juga menunjukkan bahawa peratusan GLA di dalam *C. bainieri* mempamerkan aras yang berbeza pada tempoh pertumbuhan yang berbeza. Ini mencadangkan bahawa terdapat tindak balas pengawalaturan semasa penghasilan GLA dalam *C. bainieri*. Untuk memahami mekanisme pengaruh dan perencatan penghasilan GLA di dalam *C. bainieri*, aktiviti enzim desaturase yang terlibat dalam langkah desaturasi asid lemak perlu dicirikan. Namun begitu, analisis pada peringkat protein adalah sukar dijalankan kerana enzim tersebut merupakan enzim pengikat membran dan tidak dapat dipencil dengan mudah. Oleh itu, dalam kajian ini, analisis pengekspresan gen mengekod enzim tersebut dijalankan. Sebanyak dua gen, masing-masing mengekod delta 6-asid lemak desaturase dan delta 12-asid lemak desaturase, telah dipencil dan analisis pengekspresan kedua-dua gen semasa penghasilan GLA oleh *C. bainieri* telah dijalankan. Maklumat yang diperoleh dijangka dapat memberi gambaran tentang tindak balas pengawalaturan transkripsi yang berlaku semasa penghasilan GLA oleh *C. bainieri*.

BAHAN DAN KAEDAH

PERTUMBUHAN KULAT

Kultur stok *C. bainieri* dihidupkan di atas medium agar kentang dekstrosa (PDA) dengan suhu eraman 30°C dan disubkultur setiap bulan. Sebanyak 2×10^7 spora/mL diinokulat ke dalam 200 mL medium penghasil GLA iaitu medium terhad nitrogen (Kendrick & Ratledge 1992; Muhid et al. 2012) dan dihidupkan pada 30°C dengan goncangan 250 psm selama 6 hari. Miselium kulat dituai pada jam ke-12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 dan 168 dan disejuk beku menggunakan nitrogen cecair sebelum disimpan pada -80°C sehingga digunakan untuk pemencilan DNA genom, RNA jumlah dan pencirian asid lemak.

PEMENCILAN DAN ANALISIS JUJUKAN SEPARA *DES6* DAN *DES12*

DNA genom *C. bainieri* diekstrak menggunakan kaedah yang dibangunkan oleh Noor Adila et al. (2007). Pencetus degenerasi bagi memencil jujukan separa *des6* dan *des12* melalui tindak balas berantai polimerase (PCR) dibina berdasarkan jujukan terpulihara *Des6* dan *Des12* beberapa kulat terdekat. Bagi pemencilan *des6*, analisis penajajaran dilakukan terhadap jujukan *Des6* daripada *Mortierella alpina*, *Mortierella isabellina*, *Rhizophus* sp., *Pythium irregulare* dan *Mucor rouxii* manakala bagi *des12*, jujukan *Des12* daripada *Mucor circinelloides*, *M. rouxii*, *M. aplina*, *Umbelopsis isabellina* dan *Aspergillus nidulans* telah digunakan. Jujukan pencetus yang dibina ditunjukkan dalam Jadual 1. Tindak balas PCR bagi memencil jujukan separa *des6* melibatkan penyahaslian awal pada 95°C selama 5 min, diikuti dengan penyahaslian pada 95°C selama 20 s, penyepuhan pada 56°C selama 30 s dan pemanjangan pada 72°C selama 1 min untuk 29 kitaran. Kitaran pemanjangan terakhir dilakukan pada suhu 72°C selama 10 min. Kitar bagi tindak balas PCR untuk memencil *des12* adalah sama seperti amplifikasi jujukan *des6*, kecuali kitar penyepuhan dijalankan pada suhu 42°C. Seterusnya jujukan separa bagi kedua-dua gen diligasi ke dalam vektor pengklonan pGEM®-T Easy (Promega, USA) dan dijujuk menggunakan pencetus universal T7 dan SP6 (Jadual 1). Jujukan tambahan bagi kedua-dua gen dipencil dengan kaedah pengamplifikasian cepat pada hujung-hujung cDNA menggunakan SMART™ RACE cDNA Amplification kit (Clontect, USA). Berdasarkan kepada jujukan separa gen *des6* dan *des12*, pencetus 5' dan 3' RACE iaitu D6 5'A1, D12 5'A1 dan D12 3'A1 telah dibina (Jadual 1). Produk PCR yang diperoleh ditulen dan diligasi ke dalam vektor pengklonan dan dijujuk. Pemencilan jujukan DNA yang tidak diketahui juga dilakukan menggunakan kaedah DNA Walking (SeeGene, Korea). Produk PCR diligasi ke dalam vektor pengklonan pGEM®-T Easy dan dijujuk secara penjujukan berautomasi. Perisian seperti BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) dan program InterProscan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) digunakan untuk menganalisis jujukan DNA dan asid amino yang diperoleh.

JADUAL 1. Pencetus oligonukleotida yang digunakan dalam kajian ini

Nama Pencetus	Fungsi	Jujukan
D6F	Pencetus degenerasi kehadapan untuk amplifikasi jujukan separa <i>des6</i>	5'-TGG TGG AAR RAY AAI CAY AAY RYI CAY CA-'3
D6R	Pencetus degenerasi kebelakang untuk amplifikasi jujukan separa <i>des6</i>	5'-GGR AAI ARR TGR TGI WCI RYY TGR TA-'3
D12F	Pencetus degenerasi kehadapan untuk amplifikasi jujukan separa <i>des12</i>	5'-TGG GTI YTI GSI CAY GAR TGY GGI CA-'3
D12R	Pencetus degenerasi kebelakang untuk amplifikasi jujukan separa <i>des12</i>	5'-TGI GGI ARI KTI GGR TCI GTR TGY TG-'3
D6 5'A1	Pencetus untuk amplifikasi hujung 5' bagi jujukan <i>des6</i> dalam RACE PCR	5'-TGG AAC CAA TCT AAC CAT TCA GGG C-'3
D12 5'A1	Pencetus untuk amplifikasi hujung 5' bagi <i>des12</i> dalam RACE PCR	5'-GAG GGT GGG ATC GGT GTG CT-'3
D12 3'A1	Pencetus untuk amplifikasi hujung 3' bagi <i>des12</i> dalam RACE PCR	5'-ATA CCA AGG ACG AGT TTG CGG AGA A-'3
RTD6F	Pencetus kehadapan bagi gen <i>des6</i> untuk RT-qPCR	5'-TAT GGT GCT TTA CTT TCT TAC TTA-3'
RTD6R	Pencetus kebelakang bagi gen <i>des6</i> untuk RT-qPCR	5'-ACC ATT CAG GGC ACC ATA CA-3'
D12'4FRT	Pencetus kehadapan bagi gen <i>des12</i> untuk RT-qPCR	5'-CTT GAT GGT GCC TTA TTT CTC G-3'
D12'4RRT	Pencetus kebelakang bagi gen <i>des12</i> untuk RT-qPCR	5'-GTT GAC CAG TGG CAT TAG TAG C-3'
18S FRT	Pencetus kehadapan bagi gen mengekod 18S rDNA untuk RT-qPCR	5'-GCA AAT CAG AAT GCT CAA AGT AGG-3'
18S RRT	Pencetus kebelakang bagi gen mengekod 18S rDNA untuk RT-qPCR	5'-CTT TCG CAG TTG TTT GTC TTC G-3'
T7	Jujukan universal T7	
SP6	Jujukan Universal SP6	

I = Inosina R = a/g Y = c/t W = a/t S = g/c K = g/t

PENGEKSTRAKAN LIPID KULAT DAN ANALISIS ASID LEMAK
Sebanyak 10^5 spora/mL diinokulasi ke dalam medium pertumbuhan dan dieram pada suhu 30°C selama 6 hari. Pengeskrakan lipid daripada miselium dilakukan menggunakan kaedah Folch et al. (1957). Sampel lipid yang diperoleh dihantar ke Jabatan Koko, Malaysia untuk dianalisis kandungan asid lemak menggunakan kaedah kromatografi gas.

ANALISIS PENGEKSPRESAN *DES6* DAN *DES12*

RNA jumlah dipencil menggunakan kit TriReagent (Invitrogen, USA) dan ditulen menggunakan kit RNeasy Mini (Qiagen, USA). Pencetus spesifik dibina berdasarkan kepada jujukan separa bagi kedua-dua gen, sementara pencetus spesifik yang dibina bagi gen untuk proses normalisasi iaitu gen yang mengekod 18S rDNA diperoleh daripada kajian terdahulu (Murad et al. 2011) (Jadual 2). Analisis penentuan keefisienan PCR dilakukan dengan menyediakan lengkung piawai bagi pencetus yang mengamplifikasi *des6*, *des12* dan gen mengekod 18S rDNA. Tindak balas amplifikasi PCR masa sebenar (RT-PCR) dijalankan menggunakan mesin PCR, iQcycler (BioRad,

USA). Nilai keefisienan PCR diperoleh secara terus daripada perisian GeneX (BioRad, USA).

HASIL DAN PERBINCANGAN

PEMENCILAN DAN PENCIRIAN JUJUKAN *DES6* DAN *DES12* C. BAINIERI

Pencetus degenerasi yang dibina berdasarkan jujukan terpulihara asid amino *Des6* dan *Des12* beberapa spesies kulat telah berjaya mengamplifikasi fragmen DNA bersaiz sekitar 560 dan 620 pb, masing-masing bagi jujukan *des6* dan *des12*. Kedua-dua produk PCR telah diklon dan dijujuk. Analisis BLASTX menunjukkan jujukan separa *Des6* mempunyai persamaan sebanyak 72% dengan jujukan $\Delta 6$ -asid lemak desaturase *M. rouxii* (AAG36959.1) manakala jujukan separa bagi *Des12* memberikan persamaan sebanyak 69% dengan jujukan $\Delta 12$ -asid lemak desaturase *Candida albicans* (EAL03493.1).

Jujukan penuh bagi hujung 5' dan 3' untuk gen *des6* dan *des12* dijana dengan menggunakan teknik pengamplifikasian cepat hujung cDNA (RACE) dan DNA Walking. Pencetus gen spesifik telah direka berdasarkan

1 ATGCCACCTTATACAGAGACTATCTTGGAAAGCAAGTCTCCCATCTTCTGAAAAAGTAAGG
 M P P Y T E T I L E A S L P S S E K V R 20
 61 CAGAATAGCATTACTAAAGAAGTATTTGAAACGCGCGTTAAACAAGGGGAAGCTTTATTT
 Q N S I T K E V F E T R V K Q G E A L F 40
 121 ATTTTGGATAACAAAGTATACAAAGTTGATGATTTTCATTGACAAACATCCAGGTGGTCA
 I F D N K V Y K V D D F I D K H P G G S 60
 181 ATTGCTATTAACATGGTGTGGACATGATGTTACTGATGAAATTAGATCTATGCATCCA
 I A I K H G V G H D V T D E I R S M H P 80
 241 GCAAAAGTATATAACTATTTGATGAAAAATATTATATTGGTGAATATATGCCTCCTGAA
 A K V Y N Y L M K K Y Y I G E Y M P P E 100
 301 ACCAGCTTATCAGCAGTAACAACTGATTTATCAAAAATCCAACATGAACAACACTTAGAA
 T S L S A V T T D L S K I Q H E Q H L E 120
 361 GCTAAAATACAAGCAGGCTGGGGGGGGGTCGTATTAGTGTAGAAGCTTTTGGATGAAGCT
 A K I Q A G W G G G R I S V E A F D E A 140
 421 ATTTTGAATTAATGATGCTCCCCAAAAGAAGTACCAAGTTAAATTAAGGCTACT
 I L E L N D A P Q K E L D Q V K L K A T 160
 481 TTTAGAGTGGATGATAAAATCATGAGACAAAAATATCAAGCTTTAGAAGAAGATATGAAA
 F R V D D K I M R Q K Y Q A L E E D M K 180
 541 CAAAGAGGATTATTTGAATGTAATTATTATCGTTATTATAAAGAATGTTGTAGATATATT
 Q R G L F E C N Y Y R Y Y K E C C R Y I 200
 601 TTATTATTATATGTGTCTTTATGGTTTGTCTTTACGTGGTACAGTGTATTTCATTATTTA
 L L L Y V S L W F A L R G T V F I H Y L 220
 661 TTTAGCGCAATTTGTATGGCAGGATTTTGGCATCAATTAGTATTTACAGCTCATGATGCT
 F S A I C M A G F W H Q L V F T A H D A 240
 721 GGGCATAATGGTATCACTGAAAAGTAGAAGTAGATCATGCTATTGGTGTCTTATTGCT
 G H N G I T G K V E V D H A I G V L I A 260
 781 GATTTTATTGGTGGTTTATCTCTAGGTTGGTGGAAAGACAATCACAATGTACATCATATT
 D F I G G L S L G W W K D N H N V H H I 280
 841 GTTACCAATGACCCTGAACATGATCCAGATATTCAACATGTTCCTTTTTTAGCTATATCT
 V T N D P E H D P D I Q H V P F L A I S 300
 901 ACACGATTCTTTGAAAACCTTTATTCAAGTTACTATGGTTCGTATTATGAAAATGGATAGA
 T R F F E N L Y S S Y Y G R I M K M D R 320
 961 ATGGCTGAATTTTTCATTTCTAAACAACACCATTATATTACCTTGTTTTGGCTTTTGGT
 M A E F F I S K Q H H L Y Y L V L A F G 340
 1021 AGATTTAATTTACATGTTTTATCTTTTCAGTATTTACTTAATTCAAAAAACAAAAAGG
 R F N L H V L S F Q Y L L N S K K T K R 360
 1081 ACACCTACTTTAGAATGGTGTGGTATTTTTTTCTCTTTTGGTGGTATGGTGGCTTTACTT
 T P T L E W C G I F F F F C W Y G A L L 380
 1141 TCTTACTTACCTTCTTGGCCTATTCGGTTGATGTATATCATTAGTTCTTATATGTTAACA
 S Y L P S W P I R L M Y I I S S Y M L T 400
 1201 TTTCCATTACATGTTCCAGATCACTTTATCTCATTTTGGTATGTCTACTGACATTATTGAA
 F P L H V Q I T L S H F G M S T D I I E 420
 1261 AATGAACCGTTCCTGCAAAAATGTTAAGAAGTACTATGGATGTATGTTGCCCTGAATGG
 N E P F P A K M L R T T M D V C C P E W 440
 1321 TTAGATTGGTTCCATGGTGGTTTACAATACCAAGCCGACCACCATCTCTTC
 L D W F H G G L Q Y Q A D H H L F 457

RAJAH 1. Jujukan nukleotida bersama jujukan asid amino yang dijangkakan bagi gen *des6 C. bainieri*. Bilangan nukleotida dinyatakan di bahagian kiri manakala bilangan asid amino dinyatakan di bahagian kanan. Nukleotida bergaris di bawah menunjukkan kawasan domain sitokrom b5 manakala nukleotida bergaris dua di bawah menunjukkan kawasan kotak histidina terpulihara

jujukan separa yang telah diperolehi. Bagi jujukan *des6*, hanya amplifikasi menggunakan kaedah DNA Walking pada hujung 5' telah memberikan produk PCR. Tindak balas 5'-RACE juga telah memberikan produk PCR namun tiada maklumat tambahan diperolehi selepas jujukan tersebut diujuk. Bagi jujukan *des12*, amplifikasi hujung 3' menggunakan RACE telah menghasilkan produk PCR manakala amplifikasi pada hujung 5' serta kaedah DNA Walking gagal menghasilkan sebarang produk PCR. Maklumat jujukan yang diperolehi telah digabung dengan jujukan yang diperolehi daripada langkah sebelumnya. Gabungan jujukan yang diperolehi telah berjaya memencil 1372 pb jujukan *des6* (Rajah 1) dan 1008 pb jujukan *des12* (Rajah 2). Kedua-dua jujukan nukleotida tersebut seterusnya dilakukan analisis BLASTX dan didapati kedua-dua jujukan tidak mempunyai jujukan intron. Analisis jujukan asid amino jangkaan yang dikodkan oleh kedua-dua gen menunjukkan bahawa kodon permulaan bagi jujukan nukleotida *des6* ialah metionin (Rajah 1) yang dikodkan oleh kodon ATG manakala bagi jujukan *des12* pula, kodon TGA mengekod kodon penamat (Rajah 2). Analisis Blastp terhadap jujukan Des6 dan Des12 masing-masing menunjukkan bahawa ia mempunyai 50% identiti dengan jujukan Des6 *M. rouxii* dan 52% identiti dengan jujukan Des12 *Aspergillus clavatus*.

Analisis pengenalanpastian domain telah mengenal pasti domain terpulihara yang dikenali sebagai kotak histidina hadir pada Des6 dan Des12 *C. bainieri*. Kotak histidina pada umumnya merupakan jujukan asid amino HXXXH, HXXXH dan QXXXH dan merupakan domain pengikat membran (Sayanova et al. 2000). Motif ini hadir pada kedudukan asid amino ke 239-242, 275-279 dan 451-455 untuk Des6 dan pada kedudukan ke 24-28, 61-65 dan 246-250 bagi Des12. Motif kotak histidina seperti ini juga telah dijumpai di dalam jujukan desaturase bagi *M. alpina* (Sakuradani et al. 1999), *S. kluyveri* (Watanabe et al. 2004) dan *R. arrhizus* (Wei et al. 2004). Bagi mengenal pasti peranan motif kotak histidina terhadap fungsi Des6, Sayanova et al. (2000) telah menggantikan asid amino glutamina (residu pertama yang terdapat pada motif kotak histidina ketiga) dengan asid amino isoleusina atau histidina melalui kaedah mutagenesis terarah tapak. Hasil kajian tersebut mendapati bahawa aktiviti enzim ini telah direncat. Perencatan Des6 akibat daripada mutasi tersebut telah menyebabkan tiada berlakunya pengumpulan asid lemak linoleik dan asid lemak linolenik. Hasil tersebut membuktikan bahawa kotak histidina adalah penting di dalam tindak balas katalisis enzim desaturase. Seterusnya, kajian yang dilakukan oleh Khandake et al. (2009) pula melaporkan bahawa kehadiran tiga motif kotak histidina pada enzim desaturase adalah penting sebagai penerima ion besi bagi membolehkan pembentukan poket katalisis pada permukaan antara membran dan sitoplasma.

Selain daripada itu, analisis domain telah mengenal pasti kehadiran domain pengikat sitokrom b5 pada jujukan Des6 tetapi tidak dikesan pada Des12. Sakuradani et al. (1999) telah melaporkan bahawa domain ini tidak terdapat

di dalam jujukan gen yang mengekod enzim $\Delta 12$ -asid lemak desaturase. Domain sitokrom b5 pada Des6 telah dikenal pasti pada asid amino ke-56 hingga asid amino ke-59 (HPGG). Interaksi antara domain HPGG dengan sitokrom b5 telah dilaporkan dalam *Caenorhabditis elegans* (Napier et al. 1998). Domain ini terlibat dalam sistem pengangkutan elektron dan berperanan sebagai penderma elektron dalam tindak balas pengoksidaan/penurunan (Sayanova et al. 1997). Kajian mutagenesis terhadap jujukan bagi domain sitokrom b5 dalam *B. officinalis* telah menyebabkan enzim $\Delta 6$ -asid lemak desaturase tidak berfungsi (Sayanova et al. 2000). Pengenalpastian kesemua domain terpulihara bagi jujukan Des6 dan Des12 mencadangkan kedua-dua jujukan yang telah dipencil dalam kajian ini mengekod Des6 dan Des12 kulat *C. bainieri*. Walaupun analisis jujukan menunjukkan jujukan penuh bagi kedua-dua gen gagal diperolehi, namun panjang jujukan yang diperolehi adalah mencukupi bagi membina pencetus yang sesuai untuk kajian pengekspressan gen menggunakan kaedah RT-qPCR. Ini kerana untuk kaedah RT-qPCR, hanya sebahagian kecil jujukan gen yang perlu diamplifikasi iaitu sekitar 50-150 pb bagi membolehkan tindak balas PCR berlaku dengan efisien (Bustin et al. 2009; Chan et al. 2014).

PENENTUAN PROFIL ASID LEMAK DALAM LIPID

Penentuan profil asid lemak dilakukan terhadap lipid yang diekstrak daripada miselium yang dikultur dalam medium pengaruh penghasilan GLA bertujuan untuk mengenal pasti aras asid oleik (18:1), asid linoleik (C18:2) dan GLA (C18:3). Des12 menambah ikatan ganda dua pada asid oleik untuk menghasilkan asid linoleik manakala Des6 menukarkan asid linoleik kepada GLA. Rajah 3 menunjukkan corak penghasilan ketiga-tiga asid lemak tersebut yang terkandung di dalam lipid jumlah bagi *C. bainieri* dalam tempoh pertumbuhan yang berbeza. Peratusan tertinggi yang telah dapat diukur bagi asid lemak tersebut ialah 41.63% bagi C18:1 (pada jam ke-24), 18.75% bagi C18:2 (pada jam ke-168) dan 15.64% bagi GLA (pada jam ke-12). Pemerhatian ini mencadangkan C18:1 merupakan komponen asid lemak utama yang hadir di dalam lipid jumlah *C. bainieri* dan diikuti dengan C18:2 dan GLA. Menurut Hansson dan Donstalek (1988), aras asid oleik yang tinggi ini adalah kerana ia merupakan asid lemak utama yang dihasilkan untuk tujuan simpanan. Rajah 3 menunjukkan aras GLA yang paling tinggi telah dikesan pada 12 jam pertumbuhan iaitu sebanyak 15.64%. Selepas jam ke-12 eraman, aras GLA mulai menurun. Tempoh tersebut didapati berkolerasi dengan tempoh yang melibatkan percambahan spora dan pembentukan tiub germa serta penghasilan miselium muda (data tidak ditunjukkan). Pemerhatian tersebut mencadangkan bahawa kulat *C. bainieri* menghasilkan GLA dengan tinggi pada peringkat permulaan pertumbuhannya iaitu semasa penghasilan tiub germa dan miselium muda. Pemerhatian yang sama direkod bagi penghasilan GLA oleh *Mucor rouxii* (Khunyoshiyeng et al. 2002).

```

1      GAATTGGGCCCACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGG
      E L G P T S H A P G R H G G R G N S I W      20
61     GTGCTGGCGCATGAATGCGGGCACGGAGCGTTTCTCGGACTTCCAGAACGTCAACGACTTT
      V L A H E C G H G A F S D F Q N V N D F      40
121    ATTGGCTGGGTTCTTCACTCGTACTTGATGGTGCCTTATTTCTCGTGGAACTACTCGCAC
      I G W V L H S Y L M V P Y F S W K Y S H      60
181    TCCAAGCACCACAAAGGCTACCGGACACTTGACAAGAGACATGGTTTTCTGTACCTTATACC
      S K H H K A T G H L T R D M V F V P Y T      80
241    AAGGACGAGTTTGC GGAGAAGCACGGTGTTC AACGTGGCGGAAATTATGGAAGAGTCT
      K D E F A E K H G V S N V A E I M E E S      100
301    CCAATTTGGACTTTACTGGTTTTAATTTTTCAACAATTGGGAGGATTGCAA ACTTACTTG
      P I W T L L V L I F Q Q L G G L Q T Y L      120
361    GCTACTAATGCCACTGGTCAACCTTACCCTGGGTTGTCGTGGCTCGCTAAATCGCACTAT
      A T N A T G Q P Y P G L S W L A K S H Y      140
421    GCTCCAAGCTCACCTGTATTTGACCCTCATCAATACTGGTTTATTGTGTGTGTCGGATATC
      A P S S P V F D P H Q Y W F I V L S D I      160
481    GGTATCTTGACTACATTGACGGTAGTTTACCAATGGTACAAAACTTTGGCGCTTTCAAC
      G I L T T L T V V Y Q W Y K N F G A F N      180
541    ATGTTTGTCAATTGGTTCATGCCATGGTGTGGGGAACCACTGGCTTGTTCGTCACT
      M F V N W F M P W L W V N H W L V F V T      200
601    TTTTTCAGCATACTGACCCTTCCATGCCCCATTACAAGGACACTGAATGGACATTTGCT
      F L Q H T D P S M P H Y K D T E W T F A      220
661    CGTGGAGCCGCTGCTACCATCGACCGGAATTTGGCTTTGTGGCCAACGCATTTCCAT
      R G A A A T I D R N F G F V G Q R I F H      240
721    GATATTATCGAAACCCACGTTTTACATCACTACGTGTCGGGATTCCATTTTACAATGCT
      D I I E T H V L H H Y V S R I P F Y N A      260
781    CGGGAGGCTACTGATGCCATCAAAAAGGTGATGGGTTCCGCACTACCGTTACGAAGGAGAG
      R E A T D A I K K V M G S H Y R Y E G E      280
841    TCCATGTGGTACTCATTATGGAAGGTGATGCGCATGTGCCAGTATGTTGATGACGATAAC
      S M W Y S L W K V M R M C Q Y V D D D N      300
901    GTGAACGGCGTCATGATGTTTAGAAACGTGAACGGACTTTGA
      V N G V M M F R N V N G L -      313

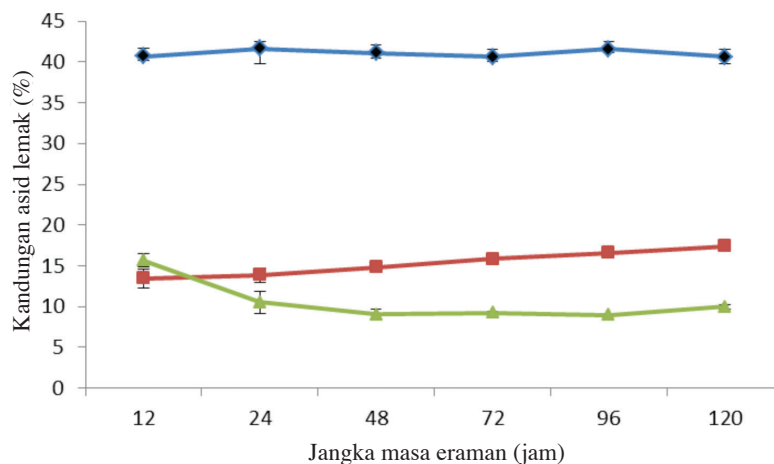
```

RAJAH 2. Jujukan nukleotida bersama jujukan asid amino yang dijangkakan bagi gen *des12 C. bainieri*. Bilangan nukleotida dinyatakan di bahagian kiri manakala bilangan asid amino dinyatakan di bahagian kanan. Nukleotida bergaris dua di bawah menunjukkan kawasan kotak histidina terpolihara

ANALISIS PENGEKSPRESAN *DES6* DAN *DES12*

Kajian terhadap pengekspresan *des6* dan *des12* melibatkan kaedah RT-qPCR. Kaedah ini berkesan dan sangat sensitif dalam menentukan tahap pengekspresan sesuatu gen dalam keadaan tertentu walaupun di dalam kuantiti yang sangat rendah (Pfaffl 2001). Rajah 4 menunjukkan tahap pengekspresan bagi *des6* pada jangka masa pertumbuhan miselium yang berbeza. Berdasarkan carta tersebut, jam ke-24 menunjukkan tahap pengekspresan *des6* yang paling tinggi berbanding jam yang lain iaitu kira-kira 100 kali ganda berbanding dengan jam ke-96. Tahap pengekspresan transkrip gen ini semakin berkurang hingga menjadi paling rendah pada jam ke-96. Pada jam ke-120, aras

transkrip gen ini telah menunjukkan sedikit peningkatan iaitu sebanyak lapan kali ganda berbanding jam ke-96. Aras transkrip *des6* didapati paling tinggi pada jam ke-24 pertumbuhan miselium di dalam medium pertumbuhan. Keadaan ini mungkin berkaitan dengan kepentingan GLA yang diperlukan pada peringkat awal pertumbuhan iaitu ketika percambahan spora menjadi tiub germa. Berdasarkan analisis lipid yang telah dilakukan, aras GLA yang diperoleh daripada kajian ini iaitu pada jam ke-24 pertumbuhan adalah sebanyak 10.53% (per lipid jumlah). Seterusnya, penghasilan GLA mulai menurun hingga menjadi paling rendah pada jam ke-96 eraman dan seterusnya mulai meningkat semula pada jam ke-120. Hasil daripada analisis

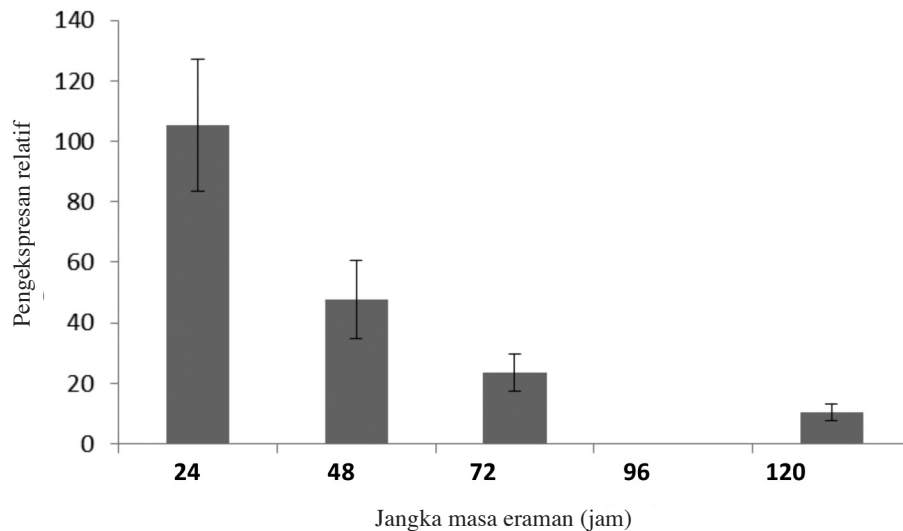


RAJAH 3. Kandungan asid lemak (%) utama di dalam lipid jumlah yang dihasilkan oleh *C. bairieri* terhadap perubahan jangka masa eraman (jam) miselium di dalam medium pengkulturan. Setiap titik mewakili nilai purata bagi tiga replikasi. Asid oleik (18:1) = (◆), Asid linoleik (18:2) = (■) dan Asid γ -linolenik (18:3) = (▲)

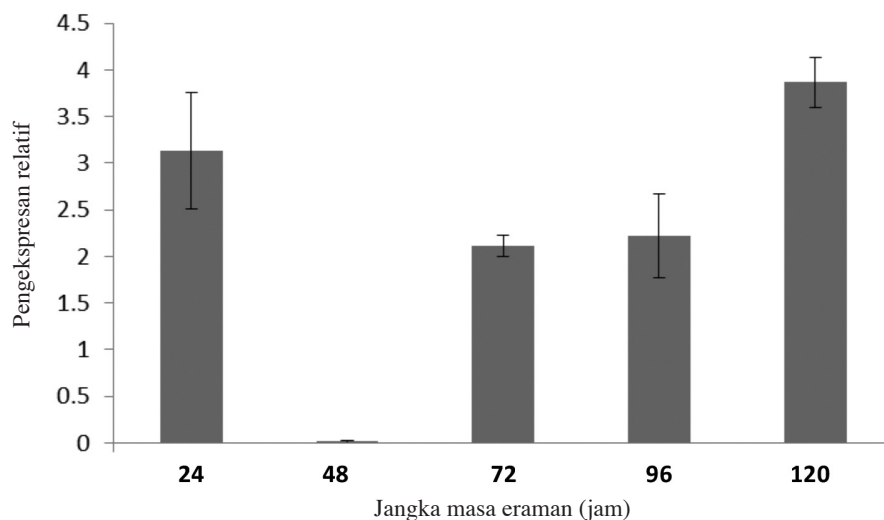
lipid ini telah menyokong data yang diperoleh dalam analisis pengekspresan *des6*. Terdapat korelasi antara aras pengekspresan gen *des6* dan produk yang dihasilkan oleh *Des6* iaitu GLA. Kajian yang dilakukan oleh Khunyoshyeng et al. (2002) mendapati bahawa transkrip mRNA bagi gen mengekod $\Delta 6$ -asid lemak desaturase bagi *M. rouxii* juga menunjukkan aras yang tinggi ketika percambahan spora. Ini menunjukkan gen mengekod enzim $\Delta 6$ -asid lemak desaturase diaktifkan pada kadar yang tinggi pada permulaan pengkulturan bagi membolehkan GLA disintesis untuk digunakan pada permulaan pembentukan tiub germa. Pemerhatian daripada analisis ini ialah terdapatnya kaitan antara kadar pengekspresan gen *des6* dengan produk yang dihasilkan daripada tindak balas enzim $\Delta 6$ -asid lemak desaturase iaitu GLA. Didapati pada peringkat awal pengkulturan, tahap pengekspresan gen *des6* adalah tinggi dan semakin menurun hingga jam ke-96 eraman. Peningkatan dan penurunan aras pengekspresan gen *des6* mempunyai kaitan dengan penghasilan GLA yang tinggi pada peringkat awal pengkulturan dan semakin berkurangan hingga jam ke-96 eraman. Oleh itu, berdasarkan data tahap pengekspresan gen *des6*, berkemungkinan penghasilan GLA dalam sel boleh ditingkatkan dengan mengekspreskan gen ini pada tahap yang lebih tinggi dengan menggunakan promoter konstitutif yang tidak dikawal atur oleh media pertumbuhan. Penggunaan promoter konstitutif dalam membantu meningkatkan tahap pengekspresan gen telah dilaporkan oleh Qiu et al. (2002) dan kajian tersebut mendapati pengekspresan gen *des6* daripada biji benih borago di bawah kawalan promoter 35S CMV telah menunjukkan peningkatan penghasilan GLA (melebihi 20% daripada asid lemak jumlah) pada tisu vegetatif pokok tembakau.

Rajah 5 menunjukkan tahap pengekspresan bagi *des12* pada setiap hari pertumbuhan miselium. Berdasarkan carta tersebut, jam ke-120 menunjukkan aras transkrip

des12 yang paling tinggi berbanding jam-jam yang lain. Cerapan ini berbeza dengan pengekspresan *des6* iaitu pada jam ke-24 merupakan masa yang menunjukkan tahap pengekspresan *des6* yang tertinggi. Namun begitu, corak pengekspresan *des12* pada kesemua jam eraman tidak menunjukkan perbezaan yang ketara. Ini kerana aras pengekspresannya hanya berbeza 2 hingga 3.5 kali ganda sahaja. Keadaan ini berbeza dengan *des6* yang menunjukkan perbezaan 100 kali ganda pada jam ke-24 berbanding jam ke-96 eraman. Ini menunjukkan bahawa pengekspresan *des12* mempunyai julat perbezaan yang kecil jika dibandingkan dengan pengekspresan *des6*. Walau bagaimanapun, Rajah 5 menunjukkan tahap pengekspresan *des12* menurun daripada jam ke-24 kepada jam ke-48 dan kemudiannya menunjukkan peningkatan pada jam ke-72 dan ke-96 dan tertinggi pada jam ke-120. Peningkatan tahap pengekspresan *des12* dikatakan mempunyai kaitan dengan peningkatan asid linoleik (C18:2) dan keperluan untuk menghasilkan GLA (Sakai & Kajiwaru 2005). Penghasilan GLA yang tinggi pada awal pertumbuhan kulit memerlukan kehadiran prekursoranya iaitu asid linoleik yang tinggi. Penghasilan asid linoleik memerlukan aktiviti pengekspresan *des12* yang aktif dengan enzim $\Delta 12$ -desaturase yang disintesis berperanan mendesaturasikan asid oleik (C18:1) kepada asid linoleik (C18:2). Namun begitu, aras asid linoleik yang dikesan di dalam sel (Rajah 3) adalah rendah pada 24 jam dan tidak sejajar dengan corak pengekspresan *des12*. Berkemungkinan besar pada awal pertumbuhan asid linoleik akan ditukar dengan pantas ke GLA kerana pada waktu ini, sel memerlukan GLA bagi pembentukan tiub germa. Kesimpulan daripada analisis pengekspresan gen *des12* menunjukkan ia mempunyai kaitan dengan penghasilan asid linoleik dalam sel dan pengekspresannya adalah konsisten bagi setiap jangka masa eraman dan tidak terdapat perbezaan aras pengekspresan yang ketara.



RAJAH 4. Profil pengekspresan *des6* bagi *C. bainieri* relatif kepada tahap pengekspresan gen tersebut pada jam ke-96 eraman



RAJAH 5. Profil pengekspresan gen *des12* bagi *C. bainieri* relatif kepada tahap pengekspresan gen tersebut pada jam ke-48 pertumbuhan miselium

KESIMPULAN

Analisis pengekspresan gen mendapati aras pengekspresan *des6* dan *des12* mempunyai kaitan dengan penghasilan produk yang disintesis oleh enzim yang dikodkannya. Bagi *des6*, ia diekspres pada tahap yang tinggi iaitu pada hari pertama pengkulturan dan keadaan ini berpadanan dengan aras penghasilan GLA (C18:3) yang tinggi pada hari pertama. Bagi *des12* pula, ia mempunyai tahap pengekspresan yang konsisten iaitu tidak mempunyai perbezaan ketara antara setiap sampel. Keadaan ini juga berpadanan dengan hasil yang menunjukkan bahawa asid linoleik (C18:2) iaitu produk daripada tindakan enzim $\Delta 12$ -asid lemak desaturase telah dihasilkan pada kadar yang konsisten. Hasil kajian ini menunjukkan bahawa gen *des6* adalah sasaran yang ideal untuk diekspreskan secara berlebihan di bawah kawalan promoter konstitutif dengan

transkrip gen *des6* mungkin dapat dihasilkan dengan kadar yang tinggi. Ini akan dapat memberikan hasil GLA yang lebih banyak di samping menjimatkan masa serta kos terutamanya bagi tujuan komersil.

PENGHARGAAN

Penyelidikan ini telah dibiayai oleh geran IRPA 09-02-02-001 BTK/TD/001 dari Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi, Malaysia dan UKM-DLP-2012-019 dari Universiti Kebangsaan Malaysia.

RUJUKAN

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. & Wittwer, C.T. 2009. The MIQE

- Guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55(4): 611-622.
- Certik, M. & Shimizu, S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87(1): 1-14.
- Chan, P.L., Rose, R.J., Murad, A.M.A., Zainal, Z., Low, E.L., Ooi, L.C., Ooi, S.E., Yahya, S. & Singh, R. 2014. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in oil palm elite planting materials propagated by tissue culture. *PLOS One* 9(6): e99774.
- Conti, E., Stredansky, M., Stredanska, S. & Zanetti, F. 2001. γ -Linolenic acid production by solid-state fermentation of *Mucorales* strains on cereals. *Bioresource Technology* 76: 283-286.
- Dyal, S. & Narine, S.S. 2005. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Research International* 38(4): 445-467.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.
- Gunstone, F.D. 1992. Gamma linolenic acid-occurrence and physical and chemical properties. *Progress Lipid Research* 31: 145-161.
- Hansson, L. & Dostalek, M. 1988. Effect of culture conditions on mycelial growth and production of γ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 28: 240-246.
- Jang, H.D., Lin, Y.Y. & Yang, S.S. 2005. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. *Bioresource Technology* 96: 1633-1644.
- Kendrick, A. & Ratledge, C. 1992. Desaturation of polyunsaturated fatty acids in *Mucor circinelloides* and the involvement of a novel membrane-bound malic enzyme. *European Journal of Biochemistry* 209: 667-673.
- Khandake, R.M., Ranjekar, P.K. & Harsulkar, A.M. 2009. Cloning of a novel omega-6-desaturase from Flax (*Linum usitatissimum* L.) and its functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biotechnology* 42: 168-174.
- Khunyoshyeng, S., Cheevadhanarak, S., Rachdawong, S. & Tanticharoen, M. 2002. Differential expression of desaturase and changes in fatty acid composition during sporangiospores germination and development in *Mucor rouxii*. *Fungal Genetics and Biology* 37: 13-21.
- Manikan, V., Kalil, M.S., Omar, O., Kader, A.J.A. & Hamid, A.A. 2013. Effects of Mg^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} and Cu^{2+} ions on lipid accumulation by *Cunninghamella bainieri* 2A1. *Sains Malaysiana* 43(3): 443-449.
- Muhid, F., Kader, A.J.A., Yusoff, W.M.W., Omar, O. & Hamid, A.A. 2012. Pembangunan inokulum untuk penghasilan lipid dan asid gamma linolenik (GLA) oleh *Cunninghamella bainieri* 2A1. *Sains Malaysiana* 41(4): 431-437.
- Murad, A.M.A., Karim, N.A.A., Hashim, N.H.F., Adnan, A.M., Zainal, Z., Hamid, A.A. & Bakar, F.D.A. 2011. Identification and characterisation of an oleaginous fungus producing high g-linolenic acid. *The Internet Journal of Microbiology* 9(2): 1-4.
- Napier, J.A., Hey, S.J., Lacey, D.J. & Shewry, P.R. 1998. Identification of a *Caenorhabditis elegans* $\Delta 6$ -fatty acid desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal* 330: 611-614.
- Noor Adila, A.K., Farah Diba, A.B., Zamri Z., Wan Mohtar, W.Y., Aidil, A.H., Mahadi, N.M. & Murad, A.M.A. 2007. Comparison of methods for isolating high quality DNA and RNA from an oleaginous fungus *Cunninghamella bainieri* strain 2a1. *Malaysian Journal of Microbiology* 3(1): 7-13.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.
- Qiu, X., Hong, H.P., Datla, N., MacKenzie, S.L., Taylor, D.C. & Thomas, T.L. 2002. Expression of borage $\Delta 6$ -desaturase in *Saccharomyces cerevisiae* and oilseed crops. *Canadian Journal of Botany* 80: 42-49.
- Ratledge, C. & Wynn, J.P. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganism. *Advances in Applied Microbiology* 51: 1-50.
- Sakai, H. & Kajiwara, S. 2005. Cloning and functional characterization of a $\Delta 12$ fatty acid desaturase gene from the basidiomycetes *Lentinula edodes*. *Molecular General Genomics* 273: 336-341.
- Sakuradani, E. & Shimizu, S. 2003. Gene cloning and functional analysis of a second $\Delta 6$ -fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry* 67(4): 704-711.
- Sakuradani, E., Kobayashi, M. & Shimizu, S. 1999. Identification of a $\Delta 12$ -fatty desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*. *European Journal Biochemistry* 261: 812-820.
- Sayanova, O., Beaudoin, F., Libisch, B., Shewry, P. & Napier, J. 2000. Mutagenesis of the borage $\Delta 6$ fatty acid desaturase. *Biochemical Society Transaction* 28: 636-638.
- Sayanova, O., Smith, M.A., Lapinskas, P., Stobart, A.K., Dobson, G., Christie, W.W., Shewry, P.R. & Napier, J.A. 1997. Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of $\Delta 6$ -desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 4211-4216.
- Watanabe, K., Oura, T., Sakai, H. & Kajiwara, S. 2004. Yeast $\Delta 12$ -fatty desaturase: Gene cloning, expression and function. *Biosciences Biotechnology Biochemical* 68(3): 721-727.
- Wei, D., Li, M., Zhang, X., Ren, Y. & Xing, L. 2004. Identification and characterization of a novel $\Delta 12$ fatty acid desaturase gene from *Rhizopus arrhizus*. *FEBS Letters* 573: 45-50.

Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor Darul Ehsan
Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: munir@ukm.edu.my

Diserahkan: 29 November 2015

Diterima: 10 Mac 2016