

## Vplyv rastlinných extraktov na obsah lipidu a zloženie mastných kyselín vláknitej huby *Mortierella alpina*

LAI MAI HUONG - JÁN ŠAJBIDOR

**SÚHRN.** Sledovali sme vplyv acetónových extraktov niektorých korenín na rast, obsah lipidu a profil mastných kyselín u vláknitej huby *Mortierella alpina*. Prítomnosť extraktov spôsobila pokles nenasýtenosti lipidu a výrazné zníženie obsahu kyseliny arachidónovej. Výťažok z *Curcuma longa* podporoval hromadenie kyseliny dihomu- $\gamma$ -linolénovej v mycéliu. Vplyv rastlinných extraktov na rast mikroorganizmu bol pomerne malý.

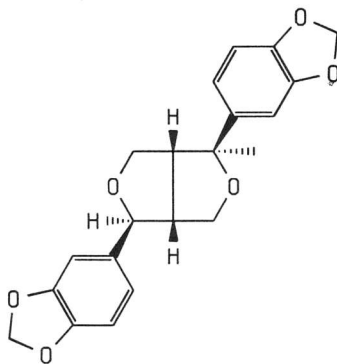
Lipidy predstavujú významnú súčasť ľudskej výživy. Niektoré štruktúry obsahujú esenciálne nenasýtené mastné kyseliny (MK), ktoré sú v ľudskej výžive nenahraditeľné a ich nedostatok spôsobuje vážne metabolické poruchy.

Nenasýtené MK stoja na počiatku metabolickej dráhy biosyntézy takých zlúčenín ako sú prostaglandíny, leukotriény, tromboxány a pod. Je známa priama súvislosť medzi poruchami metabolizmu MK na bunkovej úrovni a rozvojom niektorých ochorení ako napr. reumatická artritída, zapalové procesy, cievne alebo nádorové ochorenia [1,2,3]. Keďže rozšírenie esenciálnych MK v rastlinnej a živočíšnej ríši je obmedzené a dopyt farmaceutického priemyslu sa zvýšil, vyvstala potreba ich lacného a obnoviteľného zdroja. Z prírody boli izolované vláknité huby, riasy, baktérie a kvasinky schopné syntetizovať celé spektrum polyénov. Praktické využitie však našli iba mikromycéty a z nich najmä rody *Mucor* a *Mortierella*. V súčasnosti je veľa poznatkov o mikrobiálnych producentoch kyseliny  $\gamma$ -linolénovej (GLA) a arachidónovej (ARA). Menej je však informácií o zdrojoch kyseliny dihomu- $\gamma$ -linolénovej (DGLA), ktorá sa v ľudskom organizme transformuje na dôležitú skupinu eikozanoidov [4].

Vláknitá huba *Mortierella alpina* je schopná vo svojom mycéliu hromadiť až 30 % lipidu, ktorý obsahuje ako majoritnú zložku ARA. Keďže DGLA je biochemickým prekursorom ARA, hľadajú sa selektívne inhibítory  $\Delta 5$ -desaturázy, enzýmu, ktorého inaktivácia blokuje konverziu DGLA na ARA. Bolo zistené, že výťažok zo sezamového oleja obsahujúci sezamín (obr. 1.),

---

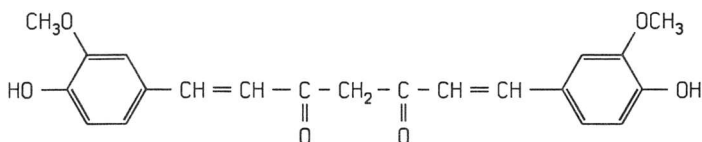
Ing. Lai Mai Huong, Doc. Ing. Ján Šajbidor, CSc., Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.



OBR. 1. Chemická štruktúra sezamínu.  
FIG. 1. Chemical structure of sesamine.

episezamín, sezaminol a sezamolín zvyšuje obsah intracelulárnej DGLA vo fungálnom lipide [5,6,7]. Uvedené štruktúry sú nekompetitívnymi inhibítormi, pričom nebol zistený ich vplyv na  $\Delta 6$ -,  $\Delta 9$ -,  $\Delta 12$ - mikrobiálne a živočíšne desaturázy.

Podobne aj alkoholový extrakt *Curcuma longa* inhibuje desaturáciu mastných kyselín *Mortierella alpina*, pričom v mycéliu narastá obsah DGLA na úkor ARA [8]. Po podrobnejšej analýze sa zistilo, že aktívnym inhibítorom je kurkumín (obr. 2.). Experimenty s čistou látkou potvrdili inhibíciu  $\Delta 5$ -desaturázy *M. alpina*, a len 10 %-né zníženie aktivity  $\Delta 6$ -desaturázy mastných kyselín vo frakcii potkanej pečene.



OBR. 2. Chemická štruktúra kurkumínu.  
FIG. 2. Chemical structure of curcumin.

V našej práci sme testovali vplyv acetónových extraktov piatich vybraných rastlín na zloženie mastných kyselín najmä s cieľom zvýšenia obsahu DGLA u kmeňa *Mortierella alpina* CCF 185, akumulujúceho kyselinu arachidónovú.

## Materiál a metódy

### Príprava rastlinných extraktov

1 gram suchej hmoty rastliny (sušina 97 %) sme extrahovali 10 ml acetónu 24 hodín pri laboratórnej teplote. Potom sme extrakt odfiltrovali a extrakciu zopakovali s rovnakým množstvom acetónu za tých istých podmienok. Spojené

acetónové extrakty sme opatrne odparili, odvážili a rozpustili v acetóne na 10 %-ný roztok.

Na extrakciu sme použili tieto rastliny:

kurkuma dlhá	<i>Curcuma longa</i>
borievka obyčajná	<i>Juniperus communis</i>
nové korenie	<i>Pimenta officinalis</i>
rasca lúčna	<i>Carum carvi</i>
koriander siaty	<i>Coriandrum sativum</i>

#### Kultivácia mikroorganizmu

Na testovanie vplyvu rastlinných extraktov sme použili vláknitú hubu *Mortierella alpina* CCF 185 zo zbierky mikroorganizmov Katedry botaniky Prírodovedeckej fakulty Karlovej univerzity v Prahe. Kultúru sme inokulovali vegetatívnym mycéliom do 100 ml kvapalného média v 500 ml bankách.

Zloženie média:

glukóza	30 g
kvasničný extrakt	5 g
NaNO <sub>3</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	1,3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g
vodovodná voda	do 1 litra

Sterilizované v autokláve počas 20 minút pri 120 kPa.

Do kultivačného média boli pridané rastlinné extrakty v piaty deň po inokulácii (0,1 g odparku extraktu rozpusteného v 1 ml acetónu do 100 ml média). V kontrolnom experimente bez extraktu bol do média pridaný 1 ml acetónu. Kmeň bol za uvedených podmienok kultivovaný 12 dní pri teplote 28 °C na závesnej rotačnej trepačke (180 ot.min<sup>-1</sup>).

#### Izolácia a analýza lipidu

Po skončení kultivácie bolo mycélium odfiltrované, premyté 250 ml deionizovanej vody a sušené pri 65 °C 10 hodín. Odvážená biomasa bola extrahovaná zmesou chloroformu a metanolu postupom podľa Folcha a kol. [9]. Pripravené metylestery [10] boli analyzované plynovou chromatografiou [11]. Na kvantifikáciu obsahu mastných kyselín bola ako vnútorný štandard použitá kyselina heptadekánová. Index nenasýtenosti lipidu (I.U) bol vypočítaný podľa vzťahu [12]:

$$I.U = \frac{\sum \% \text{ monoénov} + 2 \sum \% \text{ diénov} + 3 \sum \% \text{ triénov} + 4 \sum \% \text{ tetraénov}}{100 \%}$$

## Výsledky a diskusia

Vplyv acetónových extraktov na rast, obsah a zloženie lipidu *Mortierella alpina* dokumentuje tab. 1. Z výsledkov vyplýva, že extrakty iba málo znížili výťažnosť biomasy (s výnimkou extraktu borievky obyčajnej), ktorá sa pohybovala v rozsahu 10-12 g suchého mycélia získaného z 1 litra fermentačného média. Obsah lipidu, ktorý tvoril približne 30 % z celkovej hmotnosti biomasy sa vplyvom extraktov menil v rozsahu 1,9 g.l<sup>-1</sup> (borievka) až 4,2 g.l<sup>-1</sup> (koriander). Pokles, resp. nárast obsahu biomasy a lipidu súvisí pravdepodobne s prítomnosťou inhibítorov, alebo aktivátorov rastu a lipogenézy, ktoré extrakty obsahujú a zasluhoval by si podrobnejšie štúdium. Nás však zaujímal predovšetkým vplyv na profil mastných kyselín a výťažnosť kyseliny dihomog- $\gamma$ -linolénovej.

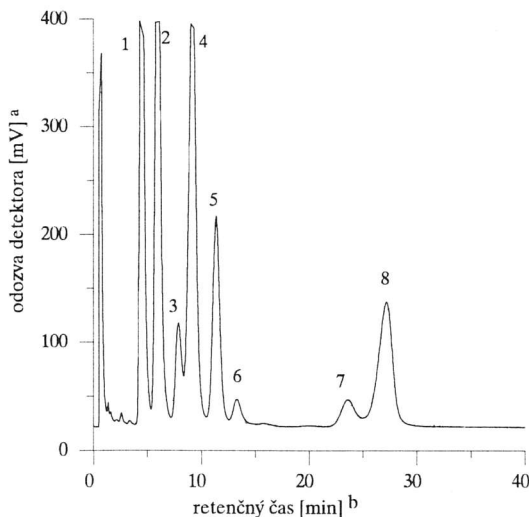
V celkovom lipide *Mortierella alpina* sme kvantifikovali tieto mastné kyseliny: kyselina palmitová (16:0), stearová (18:0), olejová (18:1), linolová (18:2),  $\gamma$ -linolénová (18:3), dihomog- $\gamma$ -linolénová (20:3), arachidónová (20:4). Ako vnútorný štandard sme používali kyselinu heptadekánovú (17:0) (obr. 3.).

TABULKA 1. Vplyv acetónového extraktu niektorých korenín na výťažnosť biomasy, obsah lipidu a zloženie mastných kyselín vláknitej huby *Mortierella alpina* submerzne kultivovanej v semisyntetickom kvapalnom médiu.

TABLE 1. The influence of acetone extract of some condiments on biomass, lipid content and fatty acid composition of filamentous fungus *Mortierella alpina* cultivated submerged in semisynthetic liquid medium.

Vzorka <sup>1</sup>	Biomasa <sup>2</sup> [g.l <sup>-1</sup> ]	Lipidy <sup>3</sup> [g.l <sup>-1</sup> ]	Mastné kyseliny <sup>4</sup> [% , mg.l <sup>-1</sup> ]							I.U <sup>5</sup>
			16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:3	20:4	
kontrola <sup>6</sup>	11,1	3,3	14,8	2,9	11,2	11,9	1,4	0,7	57,1	2,7
			341,9	67,0	258,7	274,9	32,3	16,2	1319,0	
kurkuma dlhá ( <i>Curcuma longa</i> ) <sup>7</sup>	10,1	3,2	25,8	5,8	30,0	13,5	2,1	3,4	16,5	1,4
			586,2	131,8	681,6	306,7	47,7	77,2	374,9	
borievka obyčajná ( <i>Juniperus communis</i> ) <sup>8</sup>	7,3	1,9	21,0	8,4	25,3	15,2	2,0	0,9	24,1	1,6
			275,3	110,1	331,7	199,3	26,2	11,8	315,9	
nové korenie ( <i>Pimenta officinalis</i> ) <sup>9</sup>	11,4	3,1	22,8	5,7	30,0	18,4	1,9	1,1	17,6	1,5
			538,6	151,6	678,9	416,4	43,0	24,9	398,3	
rasca lúčna ( <i>Carum carvi</i> ) <sup>10</sup>	11,5	3,1	12,7	3,2	21,6	14,0	2,0	0,5	43,4	2,3
			310,0	72,4	511,4	316,8	45,3	11,3	982,1	
koriander siaty ( <i>Coriandrum sativum</i> ) <sup>11</sup>	11,8	4,2	19,0	3,7	21,8	12,7	1,6	0,8	37,9	2,0
			554,4	130,3	604,3	352,0	44,3	22,2	1050,6	

1 - sample, 2 - biomass, 3 - lipids, 4 - fatty acids, 5 - index of unsaturation, 6 - control, 7 - turmeric, 8 - juniper, 9 - pimenta, 10 - caraway, 11 - coriander.



OBR. 3. GC analýza profilu mastných kyselín *Mortierella alpina* kultivovanej v prítomnosti extraktu *Curcuma longa*.

FIG. 3. GC analysis of the fatty acid profile from *Mortierella alpina* cultivated in the presence of the extract from *Curcuma longa*.

a - detector response [mV], b - retention time [min]. 1 - 16:0, 2 - 17:0 vnútorný štandard (internal standard), 3 - 18:0, 4 - 18:1, 5 - 18:2, 6 - 18:3, 7 - 20:3, 8 - 20:4.

Vo vzorke bez rastlinného extraktu bola majoritnou kyselinou polynenasýtená kyselina arachidónová, ktorej relatívny obsah predstavoval 57,1 % z celkového množstva mastných kyselín, čo v absolútnom vyjadrení predstavuje výťažok viac ako 1300 mg tejto kyseliny z 1 litra fermentačného média. Obsah ostatných kyselín v mycéliu vzorky bez extraktu postupne klesal v poradí 20:4 > 16:0 > 18:2 > 18:1 > 18:0 > 18:3 > 20:3. Index nenasýtenosti lipidu bol 2,7, čo je veľmi vysoká hodnota. Ako je zrejmé z tab. 1., prítomnosť extraktov spôsobila prudký pokles obsahu 20:4, ktorý sa znížil u kurkumy na menej ako štvrtinu a u nového korenia na 30 % pôvodného množstva. Zníženie nenasýtenosti bolo sprevádzané najmä nárastom podielu nasýtených (16:0, 18:0) a mononenasýtených (18:1) mastných kyselín. Ak by sme posudzovali účinok rastlinných výťažkov na desaturáciu MK, potom vplyv extraktov klesá v poradí: kurkuma > nové korenie > borievka > koriander > rasca. Naše výsledky potvrdili zistenie Shimizu a kol. [8], že extrakt *Curcuma longa*, významne znižuje obsah 20:4 v celkovom lipide *M. alpina*, pričom sa hromadí DGLA. Jej relatívny obsah bol stanovený na 3,4 % z celkového množstva mastných kyselín (77,2 mg.l<sup>-1</sup>). Analýza ostatných vzoriek ukázala koncentračné rozpätie od 0,5 do 1,1 %, čo je vzhľadom na presnosť GC analýzy v rámci chyby použitej metódy. Z uvedených zistení vyplynuli nasledovné závery:

1. Testované rastlinné extrakty málo ovplyvňovali rast mycélia *Mortierella alpina* s výnimkou extraktu *Juniperus communis*.

2. V porovnaní s kontrolou, pri použití extraktu borievky bolo zistené zníženie obsahu intracelulárneho lipidu a jeho zvýšenie pri aplikácii výťažku z koriandra.
3. Významný bol vplyv extraktov na zloženie mastných kyselín. Znížila sa najmä biosyntéza 20:4, pričom pokles jej obsahu bol sprevádzaný znížením indexu nenасыtenosti celkového lipidu.
4. Použitie acetónového extraktu *Curcuma longa* zvýšilo obsah DGLA oproti kontrole 5-násobne, čo svedčí o prítomnosti inhibítora  $\Delta 5$ -desaturázy.

## Literatúra

1. SAMUELSSON, B.: Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reaction and inflammation. *Science*, 220, 1983, s. 568.
2. CROZIER-WILLI, G. - FLEITH, M. - BUCHANAN, M.: Black currant lipids in inhibition of cellular adhesion by lipid composition modulation. *Eur. Pat.* 374,591, 1990, 15 s.
3. SAUER, L. A. - DAUCHY, R. T.: The effect of omega-6 and omega-3 fatty acids on  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation in hepatoma 7288 CTC perfused in situ. *Brit. J. Canc.*, 66, 1992, s. 297.
4. SHIMIZU, S. - JAREONKITMONGKOL, S.: *Mortierella species*: Production of  $\text{C}_{20}$  polyunsaturated fatty acids. *Biotech. Agric. Forestry*, 33, 1995, s. 308.
5. SHIMIZU, S. - AKIMOTO, K. - KAWASHIMA, H. - SHINMEN, Y. - YAMADA, H.: Production of dihomono- $\gamma$ -linolenic acid by *Mortierella alpina* 1S-4. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 66, 1989, s. 237.
6. KATSUZAKI, H. - KAWAKISHI, S. - OSAWA, T.: Sesaminol glucosides in sesame seeds. *Phytochemistry*, 35, 1994, s. 773.
7. KAMALELDIN, A. - APPELQVIST, L. A.: Variation in fatty acid composition of the different acyl lipids in seed oils from four sesamum species. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 71, 1994, s. 135.
8. SHIMIZU, S. - JAREONKITMONGKOL, S. - KAWASHIMA, H. - AKIMOTO, K. - YAMADA, H.: Inhibitory effect of curcumin on fatty acid desaturation in *Mortierella alpina* 1S-4 and rat liver microsomes. *Lipids*, 27, 1992, s. 509.
9. FOLCH, J. - LEES, M. - SLOANE-STANLEY, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. biol. Chem.*, 226, 1957, s. 497.
10. CHRISTOPHERSON, S. W. - GLASS, R. L.: Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in a nonalcoholic solution. *J. Dairy Sci.*, 52, 1969, s. 1289.
11. ŠAJBIDOR, J. - ČERTÍK, M. - GREGO, J.: Lipid analysis of baker's yeasts. *J. Chromatogr.*, 665, 1994, s. 191.
12. KATES, M. - BAXTER, R. M.: Lipid composition of mesophilic and psychrophilic yeasts (*Candida species*) as influenced by environmental temperature. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 40, 1962, s. 1213.

Do redakcie došlo 30.10.1996.

**The influence of plant extracts on lipid content  
and fatty acid composition of filamentous fungus *Mortierella alpina***

LAI MAI HUONG - JÁN ŠAJBIDOR

**SUMMARY.** The influence of acetone extracts from some condiments on growth, lipid content and fatty acid composition of filamentous fungus *Mortierella alpina* was studied. The presence of extracts caused the decrease of lipid unsaturation and considerable reduction of the arachidonic acid amount. The extract from *Curcuma longa* promoted accumulation of dihomono- $\gamma$ -linolenic acid in mycelium. The influence of plant extracts on growth was relatively small.