

Polosuchá kultivácia vláknitých húb čeľade *Mucoraceae* a biotechnologická produkcia mikrobiálnych lipidov s obsahom polynenasýtených mastných kyselín

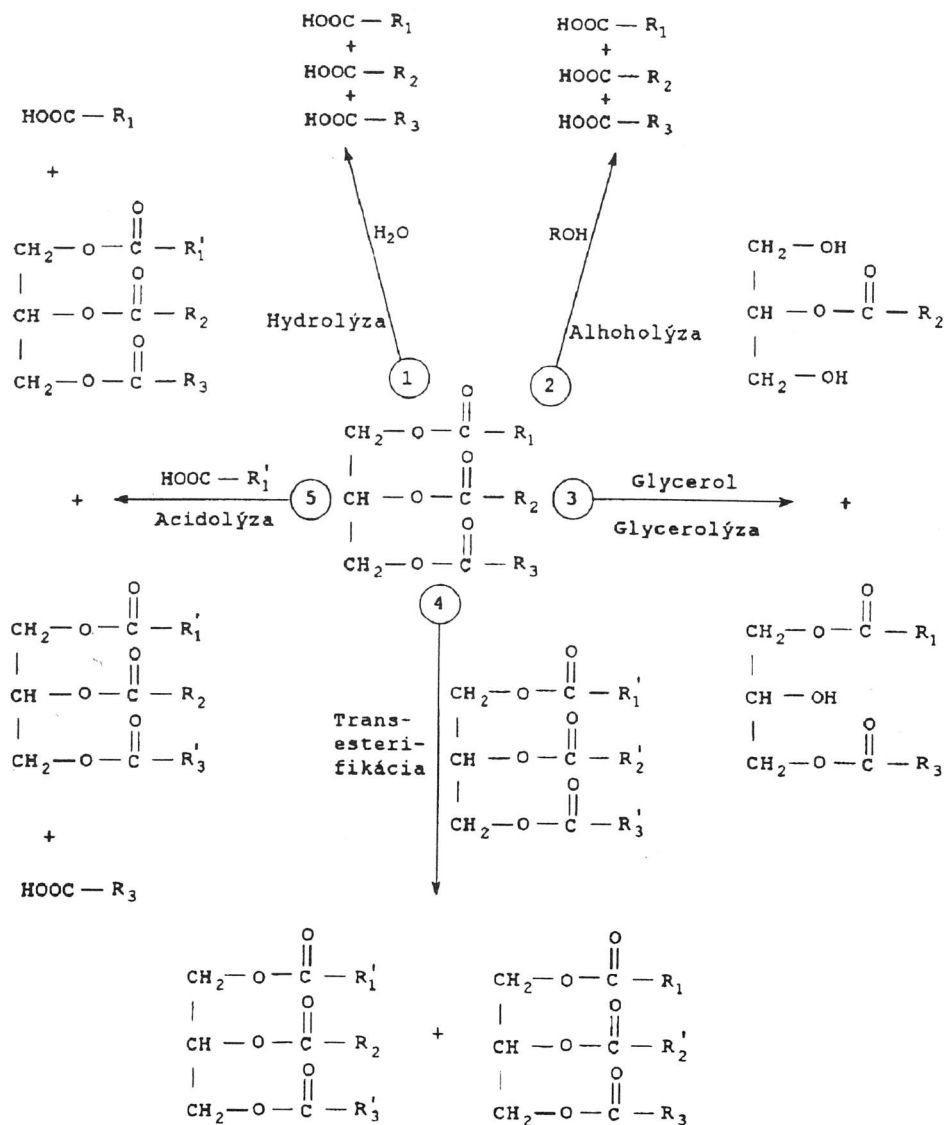
DUŠAN SLUGEŇ

Súhrn. Článok podáva prehľad biotechnologických možností spracovania lipidov, pričom sa zameriava na štruktúrne zastúpenie mastných kyselín v syntetizovanom mikrobiálnom lipide. Polosuchá kultivácia vláknitých húb čeľade *Mucoraceae* je prezentovaná z pohľadu obohatenia fermentovaného materiálu dieteticky cennými polynenasýtenými mastnými kyselinami. Výsledný obsah polynenasýtených kyselín závisí na použitom kmeni. Počas polosuhej kultivácie na cereálnych substrátoch vzrastá obsah kyseliny γ -linolénovej na 18,6 % celkových mastných kyselín pre kmeň *Monierella isabelina* M14 a kyseliny arachidónovej na viac než 50 % pre kmeň *Mortierella alpina* CCM 185. Obsah polynenasýtených mastných kyselín vo fermentovanom substráte závisí na podiele sacharidického materiálu v celkovom substráte a podmienkach kultivácie.

Tuky a oleje sú vo svete produkované v rozsahu približne 6×10^7 ton ročne; významný podiel z celkovej produkcie (viac než 2×10^6 ton ročne) [1] je spracovaný hydrolýzou, alkoholýzou a glycerolýzou - Obr.1. Produkty všetkých troch reakcií sú široko využívané v potravinárskom priemysle, a to buď priamo, alebo ako poloprodukty pre výrobu emulzifikátorov, aróm, atď. Podmienky používané v komerčných procesoch využívajú teploty 240 - 260 °C a vysoké tlaky, alkoholýza sa uskutočňuje za miernejších podmienok. Ak oleje obsahujú vysoký podiel nenasýtených mastných kyselín, po chemickom spracovaní si vyžadujú náročnú purifikáciu redestiláciou. Chemickým spracovaním prichádzame o biologicky najcennejší podiel lipidického materiálu - polynenasýtené mastné kyseliny.

Koncom osemdesiatych rokov významné svetové firmy patentovali procesy enzýmovej hydrolýzy, transesterifikácie a syntézy liposacharidov, najmä pre použitie ako emulzifikátory. Dnes reálne bežia komerčné procesy výroby mastných kyselín, enzýmovo modifikovaných lecitínov i ďalších povrchovo aktívnych látok pripravených za účasti enzýmov, trans- a interesterifikácia

Ing. Dušan Slugeň, Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.



Obr. 1. Biotransformácie tukov a olejov.
 Rn , Rn' - zvyšky mastných kyselín, ROH - alkohol (najčastejšie metanol).
 Fig. 1. Biotransformation of fats and oils.
 Rn , Rn' - fatty acids ends, ROH - alcohol (mostly methanol).

masla, medicínálnych preparátov na báze obohatenia stredneretazcovými masnými kyselinami pre pacientov s oslabenou činnosťou pankreasu[1].

Obzvlášť intenzívny záujem je venovaný enzýmovej katalýze v mikrovodnom prostredí s cieľom prípravy širokej palety esterov masných kyselín a sacharidov. Rozmach tohoto sledovania bol umožnený úspechom firmy Novo-Nordisk v oblasti génových manipulácií. Prenesením génov mikrobiálnych lipáz do dlhodobozvládnutého producenta *Aspergillus oryzae* s riadenou expresiou proteínov sa získali kmene, ktoré dnes dosahujú viac než 2 % hmotnostných katalyticky účinnej látky v kultivačnom médiu [2]. Takto pripravené klonované lipázy sú dostatočne lacné pre použitie do prácich práškov a čistiacich prostriedkov.

Východiskom a tradičnou metódou prípravy hydrolytických enzýmov, vrátane lipáz, sú polosuché kultivácie vláknitých húb. Na rozdiel od amyláz, produkovaných najmä rodom *Aspergillus* a široko využívaných v potravinárskom priemysle, vlastnosti enzýmov a celková lipolytická aktivita je lepšia u rodov *Rhizopus* a *Penicillium*. Východiskom priemyselnej produkcie lipolytických enzýmov v minulosti boli kmene *Rhizopus oryzae* a *Rhizomucor miehei*. Dnes sa lipolytické enzýmy používajú pri frakcionácii a obohacovaní rybích olejov s vysokým podielom nenasýtených lipidov pre farmaceutické aplikácie [3-5].

Biotechnologické možnosti, mimo enzýmových transformácií lipidov, sa pri mikrobiálnej produkcii lipidov obmedzujú na dva procesy:

1. Náhrada kakaového masla

Ceny kakaových bôbov prežívajú v súčasnosti hlbokú depresiu. V Austrálii bol vyvinutý postup kultivácie kvasiniek rodu *Candida* sp. so zložením mikrobiálneho lipidu temer identickým s kakaovým maslom [6]. Napriek tomu, že pôvodnú východiskovú hranicu rentability za tonu mikrobiálneho lipidu sa podarilo znížiť štvornásobne - na 2000 US\$ za tonu, dnes je tento proces cenovo nekompetitívny. Dôvodom je nízka cena pravého kakaového tuku a postupy interesterifikácie spodnej frakcie palmového oleja s lojom, či inými nasýtenými tukmi, a to tak chemickou, ako i enzýmovou cestou poskytujúce širokú paletu náhrad od masla - po kakaové maslo. Nakoľko nie je dosiahnuté presné zastúpenie masných kyselín, vlastnosti margarínov a náhrad kakaového masla sa len blížia vlastnostiam svojich prírodných konkurentov. Margaríny majú zníženú teplotu mäknutia, no maslu nemôžu nutrične konkurovať ani po vitamínizácii, nakoľko v nich absentujú niektoré nenasýtené masné kyseliny. V prípade náhrad kakaového masla je dôležitý rýchly zlom teploty topenia tuku v ústach, ktorý je opäť bežnými postupmi len veľmi obtiažne dosiahnuteľný. Postupy vychádzajúce z ekvivalentnej zmesi masných kyselín (izolovaných alebo vo forme lipidu) sú chemickou cestou neuskutočniteľné.

2. Polynenasýtené mastné kyseliny

O význame polynenasýtených mastných kyselín v ľudskej výžive nieto dnes sporov, mechanizmus ich účinku v prevencii kardiovaskulárnych ochorení, liečby zápalových procesov a realizácii imunitnej odpovede si vyžiada ešte pomerne dlhý čas skúmania. Nakoľko sú prekurzormi biologicky významných látok, prostaglandínov a eikozanoidov, majú vplyv na našu humorálnu sústavu i na procesy starnutia. Relatívne malé zmeny v potravinovom príjme vyvolávajú významné zmeny v krvnom obraze a zápalovom procese. Naš organizmus si nevie syntetizovať v dostatočnom množstve polynenasýtené mastné kyseliny, najmä ω -6 radu (napr. kyselina γ -linolénová, dihomo- γ -linolénová). Prekurzormi sú rastlinné oleje s vysokým obsahom kyseliny linolovej, v ktorých je prítomná len kyselina γ -linolénová. Zdrojom vyšších polynenasýtených mastných kyselín ω -3 radu sú živočíšne tuky, mlieko a maslo - kyselina arachidónová a výrobky s vysokým podielom rybieho oleja - kyselina eikozapentaénová a dokozahexaénová. Pre nízku oxidačnú stabilitu sa rybie oleje hydrogenujú, rybie konzervy obsahujú väčšinu lipidov vo forme rastlinných olejov. Fyziologický účinok závisí spravidla nielen na pomere nasýtených a nenasýtených mastných kyselín, ale i pomere ω 6 : ω 3 lipidov, veku a záťaži organizmu. V našej výžive je príjem polynenasýtených lipidov spravidla nedostatočný napriek vysokej konzumácii živočíšnych tukov.

Bohatými zdrojmi cenných polynenasýtených kyselín sú semená niektorých rastlín („Evening primrose“, borák lekársky, čierne ríbezle); pre obmedzené výnosy je cena lipidu bohatého kyselinou γ -linolénovou z rastlinných zdrojov vysoká; riasy a ich konzumenti - rybí olej - obsahujú vyššie polynenasýtené kyseliny.

Mikrobiálny lipid s obsahom polynenasýtených mastných kyselín

Väľa druhov mikroorganizmov je schopných akumulovať vo svojom lipide stopové množstvá i biologicky cenných mastných kyselín. Žiaľ, okrem rias, siníc a lišajníkov, z vláknitých húb sú schopné dosiahnuť významný podiel polynenasýtených mastných kyselín len zástupcovia čeľade *Mucoraceae*. Tržný potenciál farmaceutických preparátov viedol k vysokému záujmu o kultiváciu vláknitých húb rodu *Rhizopus* a *Mucor* pre účely získania mikrobiálneho dietetického lipidu, no pre obmedzenú výťažnosť produktu v porovnaní s nákladmi a problémy s izoláciou, purifikáciou a stabilizáciou získaného lipidu obmedzili tento výskum len do poloprevádzkovej úrovne [7]. Dnes možno o izolácii mikrobiálneho lipidu z uvedených mikroorganizmov uvažovať iba ako o spracovaní odpadového mycélia z iných výrob na podporu rentability základného procesu, napr. kyseliny L-mliečnej [8], alebo spojením oboch

procesov súčasne (náhrada kakaového masla so zvýšeným podielom kyseliny γ -linolénovej) [9].

Komerčne úspešnejšou sa ukázala kultivácia kmeňov *Mortierella isabelina* a najmä *Mortierella alpina* a série jej mutantov s vyšším podielom lipidu v biomase, vyššou objemovou produktivitou biomasy pri kultivácii na jednoduchých sacharidických pôdach [10].

Polosuchá kultivácia vláknitých húb čeľade *Mucoraceae*

Polosuchá kultivácia vláknitých húb čeľade *Mucoraceae* je známa ako proces prípravy fermentovaných potravín pod názvom „tempe“ a „tapé“. U oboch sa časom vyvinul postup, kde za neaseptických podmienok je dosiahnutá biocenóza s dominanciou vláknitej huby pri absencii nežiadúcich mikroorganizmov.

Tempe proces znamená fermentáciu sóje vláknitými hubami rodu *Rhizopus*. Efektom fermentácie je texturácia substrátu do podoby kompaktného koláča, a zároveň čiastočná enzymatická hydrolýza biopolymérov zvyšujúca stráviteľnosť a redukujúca obsah antinutritívnych látok [11].

Tapé proces využíva kultúry rodov *Rhizopus* a *Amylomyces* v kombinácii s kvasinkami rodov *Saccharomycopsis* a *Saccharomyces* na prípravu sladkokyslého mierne alkoholického produktu z ryže [12].

Výhodou polosuchých kultivácií vláknitých húb čeľade *Mucoraceae* je súčasne zníženie obsahu antinutritívnych látok - najmä kyseliny fytoovej a flatulencie spôsobujúcich oligosacharidov [13,14], charakteristických pre olejninu a strukoviny s vysokým podielom lipidu. Deklarované zníženie obsahu glukozinolátov v práci Baua [15] je, na rozdiel od prezentácie autormi, dôsledkom viac sterilizácie než polosuhej fermentácie.

Zmeny v štruktúre lipidov počas polosuhej kultivácie

Herring a kol. [16] konštatujú, že štruktúra mastných kyselín v lipide z tempe zodpovedá lipidu sóje s miernym znížením obsahu kyseliny linolovej a α -linolénovej v prospech kyseliny olejovej a poklesom indexu nenasýtenosti. Po prvýkrát je spomínaná kyselina γ -linolénová, ktorej obsah v tempe pripravenom za optimálnych podmienok nepresahuje 0,8 % všetkých mastných kyselín. Mikrobiálnou fermentáciou sa znižuje celkový obsah lipidu v sóji v závislosti na použitom mikroorganizme, teplote a dĺžke kultivácie. Po trojdňovej kultivácii klesá na menej ako polovicu východiskového množstva [17].

Zistili sme, že mikroorganizmy čeľade *Mucoraceae* sú schopné akumulovať lipid s vysokým obsahom nutrične cenných polynenasýtených mastných kyselín, pokiaľ je lipid syntetizovaný *de novo*. V režime polosuhej kultivácie je syntéza mikrobiálneho lipidu závislá na podiele sacharidov v substráte.

Ak sacharidy sú dostupné iba v obmedzenom množstve, ako je tomu u prípravy tempe, kmene rodu *Rhizopus* účinne využívajú lipidy pre svoj rast. Vnútro bunkový lipid preberá štruktúru mastných kyselín blízku východiskovému substrátu, pričom dochádza k miernemu poklesu indexu nenasýtenosti. Naopak, zástupcovia rodu *Mortierella* sú schopní zvyšovať nenasýtenosť svojho lipidu činnosťou desaturáz produkujúc polynenasýtené mastné kyseliny ω -3 radu. Zároveň dochádza k reštrukturalizácii lipidu smerom k nárastu podielu dlhoreťazcových mastných polynenasýtených kyselín. Použijúc repkové výlisky, alebo kombináciu repkových výliskov a krúпов alebo múky z cereálií sme dosiahli výťažnosť kyseliny arachidónovej 3 % hm. východiskového substrátu po 14 dňovej polosuchej kultivácii.

Na substrátoch s vysokým podielom sacharidov, kultivácia na prose alebo jačmenných krúпов, dochádza k syntéze mastných kyselín ω -6 i ω -3 radu. Obsah kyseliny γ -linolénovej v mikrobiálnom lipide je pre testované kmene v rozsahu 3 - 11 % celkových mastných kyselín, u *Mortierella isabelina* M14 sme dosiahli podiel a 18,6 %. Pre kmene rodu *Mortierella* je zároveň vyšší výťažok mikrobiálneho lipidu 12 - 15 % hmotnosti východiskového substrátu. Výhodou mikroorganizmov rodu *Rhizopus oligosporus* je ich rýchly rast (20 - 40 hodín) a známe aplikácie v oblasti fermentovaných potravín, kde celkovo nižšia produktivita je vyvážená potenciálnou priamou konzumáciou. Kmene rodov *Thamnidium* a *Cunninghamella* si vyžadujú dĺžku kultivácie 6 - 7 dní, čo umožní získať fermentovaný materiál s obsahom 0,5 - 1 % hmotnostného kyseliny γ -linolénovej. Kmene rodu *Mortierella* po 13 dňovej kultivácii naprodukurujú 1 - 2 % kyseliny γ -linolénovej [18].

Mortierella alpina CCM 185 poskytne po polosuchej kultivácii na cereálnych materiáloch v závislosti na dĺžke kultivácie, substráte a podmienkach 9 až 36 mg kyseliny arachidónovej na gram sušiny východiskového substrátu, pričom kyselina arachidónová tvorí viac než 50 % celkových mastných kyselín [19].

Zvýšenie produkcie polynenasýtených mastných kyselín polosuchou kultiváciou vláknitých húb možno dosiahnuť:

- a) predĺžením kultivácie,
- b) znížením kultivačnej teploty na 20 - 25 °C,
- c) kombináciou a) a b) - 14 dňová kultivácia a skladovanie 7 dní pri teplotách 5 - 10 °C,
- d) prídavkom exogénneho lipidu k škrobnatému substrátu, či už vo forme drte (sója), výliskov olejní (repkové výlisky), alebo priamo oleja a produktov jeho spracovania (mastné kyseliny, metylestery mastných kyselín),
- e) optimalizáciou vlhkosti, režimu tepelnej úpravy substrátu, režimu aerácie a odvodu metabolického tepla.

Všetky uvedené možnosti boli experimentálne overené a sú patentovo chránené [20].

Bol rozpracovaný postup dvojfázovej polosuchej kultivácie spracovania sóje, repkových výliskov, mláta a cereálnych materiálov, ktorý čaká na realizátora. Polosuchá kultivácia vláknitých húb čeľade *Mucoraceae* je nádejnou cestou spracovania obmedzene využiteľných cenných zdrojov proteínu rastlinného pôvodu. Napriek svojim úskaliam, v procese dochádza k významnému zníženiu obsahu nielen antinutritívnych látok, ale i k zvýšeniu stráviteľnosti čiastočnou hydrolyzou biopolymérov a k obohateniu fermentovaného materiálu dieteticky hodnotným mikrobiálnym lipidom obsahujúcim esenciálne polynenasýtené mastné kyseliny.

Produkt polosuchej kultivácie je možné, po tepelnej úprave a hygienickom posúdení, použiť buď priamo ako dietetický doplnok normálnej potravy ľudí (hospodárskych zvierat), alebo izolovaný lipid použiť nepriamo pre účely vitaminizácie rastlinných olejov a prípravu majonéz a dressingov.

Literatúra

1. VULFSON, E.V.: Enzymatic synthesis of food ingredients in low-water media. *Trends in Food Sci. & Technol.* 4, 7, 1993, s. 209-215.
2. CHRISTENSEN, T.: *Aspergillus oryzae* as a host for production of industrial enzymes. The genus *Aspergillus*, Ed.: Powell, K.A., Plenum Press, New York, 1994, s. 251-259.
3. YAMANE, T. - SUZUKI, T. - HOSHINO, T.: Increasing n-3 polyunsaturated fatty acid content of fish oil by temperature control of lipase-catalyzed acidolysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70, 12, 1993, s. 1285-1287.
4. ADACHI, A. - OKUMURA, K. - OTA, Y. - MANKURA, M.: Acidolysis of sardine oil by lipase to concentrate eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in glycerides. *J. Ferm. Bioeng.* 75, 4, 1993, s. 259-264.
5. TANAKA, Y. - HIRANO, J. - FUNADA, T.: Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oil with *Candida cylindracea* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 12, 1992, s. 1210-1214.
6. RATLEDGE, C.: Microbial lipids: commercial realities or academic curiosities. In: *Industrial Applications of single cell oils*, Eds.: Kyle, D.J. & Ratledge, C., Champaign, IL: American Oil Chemists Society, 1992, s. 1-15.
7. HANSON, L. - DOSTÁLEK, M. - SORENBY, B.: Production of gamma-linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* in fed-batch and continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 3, 1989, s. 223-227.
8. ROSENBERG, M. - KRISTOFÍKOVÁ, L. - PROKSA, B. - MAGDOLEN, P.: The formation of polyols and fatty acids during L-lactic acid fermentation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Lett.* 14, 1, 1992, s. 45-48.
9. ROUX, M.P. - KOCK, J.L.F. - BOTHA, J.C. - PREEZ, J.C. - WELLS, G.V. - BOTES, P.J.: *Mucor* - a source of cocoa butter and gammalinolenic acid. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 1994, s. 417-422.
10. RATLEDGE, C.: Single cell oils - have they a biotechnological future? *Trends in Biochemistry, II*, 1993, s. 278-284.
11. NOUT, M.J.R. - ROMBOUTS, F.M.: Recent developments in tempe research. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 1990, s. 609-633.
12. MERICAN, Z. - QUEE-LEE, Y.: In: *Industrialization of indigenous fermented foods*, Ed.: Steinkraus, K.H., Marcel Dekker, New York 1989, s. 169-190.

13. SLUGENĎ,D.: Antinutritívne látky vo výliskoch olejnin a možnosti ich odstránenia. In: Aditívne látky v poživatinách. Zborník VI. celoštátnej konferencie 20. a 21. apríla v Nitre, Slovenská chemická spoločnosť SAV Bratislava, 1993, s. 173-176.
14. SLUGENĎ,D.: Redukcia obsahu fytátov polosuchou fermentáciou vláknitých húb rodu *Rhizopus*. In: Aditívne látky v poživatinách. Zborník VI. celoštátnej konferencie 20. a 21. apríla v Nitre, Slovenská chemická spoločnosť SAV, Bratislava, 1993, s. 177-181.
15. BAU,H.M. - VILLAUME,CH. - LIN,C.F. - EVRARD,J. - QUMENER,B.- NICOLAS,J.P. - MÉJEAN,L.: Effect of a solid-state fermentation using *Rhizopus oligosporus* sp. T-3 on elimination of antinutritional substances and modification of biochemical constituents of defatted rapeseed meal. *J. Sci. Food Agric.* 65, 1994, s. 315-322.
16. HERRING,L. - BISPING,B. - REHM,H.J.: Patterns and fermentation of fatty acids at tempe fermentation by several strains of *Rhizopus* sp. *Fat. Sci. Technol.* 93, 1991, s. 303-308.
17. REU,J.C. - RAMDARAS,D. - ROMBOUTS,F.M. - NOUT,M.J.R.: Changes in soya bean lipids during tempe fermentation. *Food Chemistry*, 50, 1994, s. 171-175.
18. SLUGENĎ,D. - STREĎANSKÝ,M. - STREĎANSKÁ,S. - GREGO,J. - ČERTÍK,M.: Spôsob dietetickej úpravy cereálnych substrátov polosuchou fermentáciou. In: Zborník Laboralim 94.
19. STREĎANSKÁ,S. - SLUGENĎ,D. - STREĎANSKÝ,M. - GREGO,J.: Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* grown on solid substrates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 1993, s. 511-513.
20. SLUGENĎ,D. - STREĎANSKÝ,M. - STREĎANSKÁ,S. - GREGO,J. - ČERTÍK,M.: Spôsob dietetickej úpravy cereálnych substrátov polosuchou fermentáciou. Patent ČR 279 043, 1994.

Do redakcie došlo 28.12.1994.

Semi-dry cultivation of fibrous fungi of *Mucoraceae* family and biotechnological production of microbial lipids containing polyunsaturated fatty acids

DUŠAN SLUGENĎ

Summary. The article provides an overview of biotechnological options for lipids processing, whereby it focuses on structural abundance of fatty acids in synthesised microbial lipid. Semi-dry cultivation of filamentous fungi of *Mucoraceae* family is presented from the point of view of fortification of fermented material by dietary-valuable polyunsaturated fatty acids. Resultant content of polyunsaturated acids depends on utilized strain. During semi-dry cultivation on cereal substrates, with *Mortierella isabelina* M14 strain the amount of γ -linolenic acid has been increased to 18.6 % and with *Mortierella alpina* CCM 185 strain the amount of arachidonic acid has been raised to more than 50 % of total fatty acids content. Content of polyunsaturated fatty acids in fermented substrate is dependent on the portion of saccharide material in the whole substrate as well as on the conditions of cultivation.