

## Vplyv zloženia prírodných substrátov na produkciu kyseliny arachidónovej štyrmi kmeňmi rodu *Mucoraceae*

SILVIA STREĎANSKÁ - JÁN ŠAJBIDOR

Súhrn. Testovali sme niektoré prírodné substráty s možnosťou nahradenia drahých syntetických médií používaných na produkciu fungálnych lipidov. Z rodov *Rhizopus* a *Mortierella* boli vybrané kmene schopné produkovať kyselinu arachidónovú (20:4). Na pôdach s vysokým obsahom dusíka sme zistili dobrý rast mycélia s vysokým podielom lipidu (max. 33,1 %) obsahujúceho až 38 % kyseliny olejovej (18:1). Na médiách s vysokým obsahom uhlíka (s výnimkou zemiakovo-dextrózového) bol rast biomasy a akumulácia lipidu nižšia, ale množstvo kyseliny linolovej (18:2), linolénovej (18:3) a arachidónovej sa zvýšilo na úkor kyseliny olejovej (18:1).

Polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA), hlavne kyseliny  $\gamma$ -linolénová (18:3, GLA), dihomogamma-linolénová (20:3, DGLA), arachidónová (20:4, ARA) pôsobia vo vyšších organizmoch ako prekursor látk so špecifickými biologickými účinkami, eikozanoidov [1,2,3]. Určitá, biologicky individuálna hladina PUFA je nevyhnutná pre normálny rast a vývoj jedinca [2,3], preto je potrebné ich príjem zabezpečiť potravou alebo liekmi. Oleje niektorých rastlín (slnečnica, podzemnica olejná, sója) obsahujú PUFA len v malých množstvách [4]. Okrem rias [5] sú perspektívnym zdrojom PUFA aj nižšie vlákňité huby. Predovšetkým rody *Enthomophthorales* [6] a *Mucorales* [7,8,9] sú schopné ich akumulovať v pomerne vysokých koncentráciách.

Drahé syntetické médiá vhodné pre základné výskumné štúdie nenachádzajú uplatnenie v poloprevádzkových a prevádzkových rozmeroch. Z eko-

---

Ing. Silvia Stred'anská, Výskumný ústav gerontológie, Malacky, Ing. Ján Šajbidor, CSc., Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

nomických dôvodov je zaujímavé ich nahradenie lacnými prírodnými substrátmi, resp. odpadmi alebo vedľajšími produktami potravinárskych výrobní, pri zachovaní výťažnosti finálneho produktu.

V práci sme sledovali produkciu PUFA niektorými kmeňmi rodu *Rhizopus* a *Mortierella* na niekoľkých dostupných prírodných médiách. Hlavným kritériom posudzovania substrátov bol výťažok niektorej PUFA v  $\text{mg.l}^{-1}$  produkovanej za štandardných podmienok.

## Materiál a metódy

Kmene *Mortierella alpina* CCF 185, *Mortierella elongata* CCF 217, *Mortierella parvispora* CCF 191, *Rhizopus arrhizus* CCF 1502 sme získali zo Zbierky kultúr vláknitých húb (CCF, Katedra botaniky, Prírodovedecká fakulta Univerzita Karlova, Praha).

### Príprava pôd

*zemiaková:*

200 g zemiakov, 1 l destilovanej vody (d.v.)

*zemiakovo-sacharózová:*

0,5 l zemiakovej pôdy, 20 g sacharózy, 0,5 l d.v.

*sladinová:*

120 g sladového výťažku, 0,75 l d.v., pomocou sacharometra riedime ďalšou d. v. na hustotu 8 %.

*kukuričný výluh:*

15 g CSL (corn-steep), 30 g glukózy, 1 l d.v.

Upravili sme pH na hodnotu 6,5 a vysterilizovali pri  $121^{\circ}\text{C}$  20 min. 180 ml média sme inokulovali 20 ml vitálneho mycélia (200 mg sušiny) a kultivovali v 500 ml bankách na rotačnej trepačke 7 dní pri  $28^{\circ}\text{C}$ .

Odfiltrované a destilovanou vodou premyté mycélium sme použili na extrakciu lipidu metódou podľa Folcha [10]. Voľné mastné kyseliny sme esterifikovali podľa Christophersona a Glassa [11] a stanovili plynovou chromatografiou (CHRÓM 5, LP Praha) [12].

## Výsledky a diskusia

Použité kmene boli vybraté podľa ich schopnosti produkovať ARA [13]. Zo získaných hodnôt (tab.1 a 2) vyplýva, že množstvo biomasy a výťažok lipidu bol najvyšší na pôdach s vysokým obsahom dusíka, sladinovej a CSL (corn-steepovej). Zo zemiakových pôd bohatých na využiteľný dusík je s nimi porovnateľné len zemiakovo-dextrózové médium (maximálny výťažok celkového lipidu  $2,3 \text{ g.l}^{-1}$  kmeňom *M.alpina*). Moreton [14] a Ratledge [15] vo svojich prácach popisujú pozitívny vplyv dusíka na rast biomasy a jeho limitácie na akumuláciu zásobného lipidu. Na zvyšných dvoch typoch zemiakových pôd kmene rástli slabo s malým obsahom lipidu v myceliu, pravdepodobne v dôsledku nízkej aktivity ich invertázy, resp.  $\alpha$ -amylázy.

Pre kultiváciu testovaných kmeňov na sladinovej a CSL (corn-steepovej) pôde bol typický vysoký obsah 18:1 (okolo 50 % z celkových mastných kyselín). Mastné kyseliny s vyšším stupňom nenasýtenosti, najmä ARA, sú zastúpené vo veľmi malých množstvách. U *R.arrhizus*, *M.parvispora*, *M.elongata* a *M.alpina* bol detegovaný vyšší obsah kyseliny linolovej, GLA a ARA. Lipid s vysokým percentom ARA (34,0 a 31,3 %) sme dosiahli kultiváciou *M.alpina* na zemiakovej a zemiakovo-sacharózovej pôde. Maximálny výťažok ARA ( $0,45 \text{ g.l}^{-1}$ ) sme získali na zemiakovo-dextrózovom médiu, hoci podiel ARA v lipide bol v porovnaní s predchádzajúcimi pôdami nižší. Získané údaje potvrdzujú značnú desaturázovú a elongázovú aktivitu testovaných mikroorganizmov, ktorá bola do určitej miery potlačená použitím pôd s vysokým obsahom dusíka.

Z výsledkov je zrejmé, že najlepším producentom ARA je *M.alpina* a najvhodnejším substrátom porovnateľným napr. s Czapek-Doxovým médiom ( $400 \text{ mg.l}^{-1}$  ARA) je zemiakovo-dextrózová pôda ( $450 \text{ mg.l}^{-1}$  ARA).

### Zoznam skratiek

ARA	kyselina arachidónová
DGLA	kyselina dihomog- $\gamma$ -linolénová
GLA	kyselina $\gamma$ -linolénová
PUFA	polynenasýtené mastné kyseliny
TFA	celkové mastné kyseliny
CSL	kukuričný výluh
d.v.	destilovaná voda

Tabuľka 1. Rast, akumulácia lipidu, produkcia ARA testovanými kmeňmi  
na rôznych prírodných substrátoch

Table 1. Growth, lipid accumulation, ARA production by tested strains  
on different natural substrates

Kmeň <sup>1</sup>	Biomasa <sup>2</sup>	Lipid <sup>3</sup>		pH	ARA	
	[g/l]	[g/l]	[%]		[mg/l]	[g/g DCW4]
CORN-STEEPOVÁ PÔDA <sup>5</sup>						
<i>R.arrhizus</i>	10,1	1,3	12,8	4,4	8,0	0,7
<i>M.parvisora</i>	9,9	2,2	23,2	6,6	29,0	3,0
<i>M.elongata</i>	10,2	2,1	20,6	6,1	37,8	3,7
<i>M.alpina</i>	8,3	1,5	18,9	5,1	36,0	4,3
SLADINOVÁ PÔDA <sup>6</sup>						
<i>R.arrhizus</i>	7,2	1,4	18,7	3,2	4,1	0,6
<i>M.parvisora</i>	5,3	1,3	23,5	2,9	18,5	3,5
<i>M.elongata</i>	6,3	1,9	29,8	3,5	7,1	1,1
<i>M.alpina</i>	4,6	1,5	33,1	3,6	16,9	3,7
ZEMIAKOVÁ PÔDA <sup>7</sup>						
<i>R.arrhizus</i>	3,2	0,3	8,4	8,2	2,9	8,1
<i>M.parvisora</i>	0,7	0,1	9,2	7,6	1,5	2,1
<i>M.elongata</i>	2,0	0,2	8,4	8,3	34,3	16,9
<i>M.alpina</i>	3,1	0,4	13,8	7,7	140,9	45,5
ZEMIAKOVO-SACHARÓZOVÁ PÔDA <sup>8</sup>						
<i>R.arrhizus</i>	1,2	0,1	8,3	5,1	1,4	1,2
<i>M.parvisora</i>	1,0	0,1	10,0	6,0	3,4	3,5
<i>M.elongata</i>	1,6	0,1	6,2	6,4	7,7	4,9
<i>M.alpina</i>	2,8	0,3	10,7	7,9	81,7	29,1
ZEMIAKOVO-DEXTRÓZOVÁ PÔDA <sup>9</sup>						
<i>R.arrhizus</i>	9,9	2,0	20,0	5,9	62,4	6,3
<i>M.parvisora</i>	2,3	0,4	18,7	6,1	3,3	1,4
<i>M.elongata</i>	6,1	1,4	22,3	6,5	213,2	34,9
<i>M.alpina</i>	8,5	2,3	27,1	4,4	450,2	53,0

1 - Strain, 2 - Biomass, 3 - Lipid, 4 - DCW - dry cell weight, 5 - Corn-steep medium, 6 - Wort medium, 7 - Potato medium, 8 - Potato-saccharose medium, 9 - Potato-dextrose medium.

Tabuľka 2. Zloženie mastných kyselín testovaných kmeňov na rôznych prírodných substrátoch  
Table 2. Fatty acid composition of tested strains grown on different natural substrates

Kmeň <sup>1</sup>	Zloženie mastných kyselín <sup>2</sup>						
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
<b>CORN-STEEPOVÁ PÔDA<sup>3</sup></b>							
<i>R.arrhizus</i>	28,3	0,9	15,3	48,5	4,9	1,3	0,8
<i>M.parvisora</i>	23,4	2,3	8,1	56,7	5,8	2,0	1,7
<i>M.elongata</i>	19,5	1,9	9,2	49,3	13,7	4,0	2,4
<i>M.alpina</i>	20,1	3,5	9,4	49,2	11,8	3,1	3,2
<b>SLADINOVÁ PÔDA<sup>4</sup></b>							
<i>R.arrhizus</i>	19,2	2,7	9,8	50,4	12,9	4,6	0,4
<i>M.parvisora</i>	16,6	2,5	8,7	46,8	11,5	6,6	1,9
<i>M.elongata</i>	21,3	1,9	9,1	54,8	8,1	3,8	0,5
<i>M.alpina</i>	18,9	1,7	11,0	44,4	17,2	5,3	1,5
<b>ZEMIAKOVÁ PÔDA<sup>5</sup></b>							
<i>R.arrhizus</i>	17,7	1,8	10,7	29,0	27,6	11,9	1,5
<i>M.parvisora</i>	15,4	4,2	8,3	25,7	25,9	17,7	2,8
<i>M.elongata</i>	11,0	9,5	4,9	21,3	14,4	12,0	26,9
<i>M.alpina</i>	16,6	1,2	3,2	13,7	19,0	3,7	45,1
<b>ZEMIAKOVO-SACHARÓZOVÁ PÔDA<sup>6</sup></b>							
<i>R.arrhizus</i>	19,4	1,1	7,5	26,8	31,2	12,1	1,9
<i>M.parvisora</i>	20,1	2,3	10,4	30,4	21,9	9,7	5,2
<i>M.elongata</i>	22,6	5,6	2,4	38,7	10,7	1,8	7,9
<i>M.alpina</i>	9,7	4,2	5,4	17,6	17,4	3,8	41,8
<b>ZEMIAKOVO-DEXTRÓZOVÁ PÔDA<sup>7</sup></b>							
<i>R.arrhizus</i>	17,8	2,4	12,2	30,5	18,9	15,4	2,9
<i>M.parvisora</i>	14,8	6,5	13,3	29,8	16,6	14,3	4,7
<i>M.elongata</i>	18,2	7,1	14,6	25,8	14,1	10,9	9,3
<i>M.alpina</i>	18,2	3,5	6,0	30,5	10,6	4,2	27,0

1 - Strain, 2 - Fatty acid composition, 3 - Corn-steep medium, 4 - Wort medium, 5 - Potato medium, 6 - Potato-saccharose medium, 7 - Potato-dextrose medium.

## Literatúra

1. DAS, U.N. - HORROBIN, D.F. - PHILL, B.CH. - BEGIN, M.E., Nutrition, 4, 1988, s.337.
2. VAPAATALO, H. - PARANTAINEN, J.J., J. Med. Biol., 56, 1978, s.163.
3. UOTILA, P. - VAPAATALO, H., Ann. Clin. Res., 16, 1984, s.226.
4. RATLEDGE, C. - BOULTON, C.A., Comprehensive Biotechnol., 3, 1985, s.983.
5. KANAZAWA, A. - TESHIMA, S.I. - KAZUO, O., Comp. Biochem. Physiol., 63, 1979, s.295.
6. POPOVA, N.I.-BECHTEREVA, M.N.-DAVIDOVA, E.G., Mikrobiologja, 55, 1986, s. 901.
7. SHINMEN, Y. - SHIMIZU, S. - AKIMOTO, K. - KAWASHIMA, H. - YAMADA, H., Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 1989, s.11.
8. RATLEDGE, C., Biotechnology aspects of lipids, 17, 1989, s.1139.
9. YAMADA, H. - SHIMIZU, S. - SHINMEN, Y., Agric. Biol. Chem., 51, 1987, s.785.
10. FOLCH, J. - LESS, M. - SLOANE-STANLEY, G.H., J. Biol. Chem., 226, 1957, s.1289.
11. CHRISTOPHERSON, E.W.-GLASS, R.Z., J. Dairy Sci., 52, 1969, s. 1289.
12. ŠAJBIDOR, J., Bulletin potr. výsk., 28, 1989, s.297.
13. STREĎANSKÁ, S. - ŠAJBIDOR, J., Folia Microbiol., v tlači.
14. MORETON, R.S., Single Cell Oil, Veľká Británia, 1988, s.1.
15. RATLEDGE, C., Single Cell Oil, Veľká Británia, 1988, s.33.

Do redakcie došlo 5.12.1992.

### **Influence of natural substrate composition on arachidonic acid production by strains of *Mucoraceae* line**

#### Summary

We tested some natural substrates with the possibility of replacement of expensive sythetic media used for fungal lipids production. From *Rhizopus* and *Mortierella* genera strains have been choosen that are able to produce arachidonic acid (20:4). On soils with high nitrogen content we discovered good growth of mycelia with high proportion of lipid containing to the amount of 38 % of oleic acid (18:1). The biomass growth and accumulation of lipid was lower on high carbon level medium, but linoleic acid (18:2) and linolenic acid (18:3) level has increased to the detriment of 18:1.