

Mikrobiologiczna synteza biologicznie aktywnych lipidów

Jacek Leman

Instytut Biotechnologii Żywności
Akademia Rolniczo-Techniczna
Olsztyn

1. Wprowadzenie

W grupie kwasów polienowych niektóre spośród nich są konieczne do prawidłowego i normalnego funkcjonowania organizmu, stąd mają one szczególne znaczenie w żywieniu człowieka. Ważne żywieniowo kwasy polienowe (PUFA) reprezentują dwie odrębne rodziny n-6 i n-3 różniące się pozycją wiązania podwójnego, najbliższego terminalnej grupie metylowej, strukturą i metabolizmem oraz funkcjami i skutkami działania (tab. 1). Są m.in. niezbędnymi składnikami tkanek, warunkują prawidłowy transport lipidów w ustroju, a będąc prekursorami prostaglandyn i ich pochodnych obniżają lipidowe wskaźniki krwi oraz zapobiegają powstawaniu zakrzepów i miażdżycy (1).

Kwasy tłuszczowe z rodziny n-6 charakteryzują się większą aktywnością biologiczną w porównaniu z kwasami należącymi do rodziny n-3 w związku z czym niektórzy autorzy (2, 3) nie zaliczali tych ostatnich do kwasów niezbędnych. Ostatnie wyniki badań (4, 5, 6) dowodzą jednak, że kwas α -linolenowy i inne kwasy z rodziny n-3 mają właściwości kwasów niezbędnych.

2. Występowanie polienowych kwasów tłuszczowych w przyrodzie i ich biosynteza

Kwas linolowy (9,12-cis-oktadekadienowy, 18 : 2 n-6) i kwas α -linolenowy (9, 12, 15-cis-oktadekatrienowy, 18 : 3 n-3) reprezentujące dwie podstawowe rodziny kwasów polienowych n-6 i n-3, są syntetyzowane *de novo* w roślinach wyższych. Kwas linolowy stanowi około 50% kwasów tłuszczowych ogółem w oleju kukurydzy, nasion słonecznika, bawełny i soi oraz ponad 70% w oleju krokosza; kwas α -linolenowy stanowi ponad 50% kwasów tłuszczowych oleju lnianego i perilla. W takich roślinach jak *Oenothera biennis* (wiesiołek dwuletni) i *O. lamarckiana* (wiesiołek lamarckiana) jest preferowana desaturacja kwasu linolowego do kwasu γ -linolenowego (6, 9, 12-cis-oktadekatrienowy, 18 : 3 n-6), którego udział wynosi 10% kwasów tłuszczowych ogółem w oleju z tych nasion (9). Wbudowanie dalszych dwóch jednostek węglowych do kwa-

sów polienowych C-18 prowadzi do utworzenia kwasów polienowych C-20, często występujących w mchach (10), algach (11), protozoa (12), niektórych grzybach (13-15) i bakteriach bytujących w morzach (16).

TABELA 1

ŹRÓDŁA, NIEKTÓRE FUNKCJE BIOLOGICZNE ORAZ DZIAŁANIE NATURALNIE WYSTĘPUJĄCYCH KWASÓW POLIENOWYCH (PUFA) (7, 8, 9)

Rodzina kwasów tłuszczowych i jej przedstawiciele	Główne źródła dietetyczne	Funkcja/efekt
n-6 kwas linolowy 9, 12-cis-18:2	większość olejów roślinnych	niezbędny dla organizmu w ilości 45 mg/kg masy/dzień, składnik acyloglukoceramidów, prekursor kwasu arachidonowego (AA), hipolipidemiczny, zwiększa „płynność” błon komórkowych
kwas γ -linolenowy 6, 9, 12-cis-18:3	brak	prekursor kwasu AA oraz kwasu eikozatrienowego
kwas dihomog γ -linolenowy 8, 11, 14-cis-20:3	brak	prekursor prostaglandyn serii 1 (PGE ₁)
kwas arachidonowy 5, 8, 11, 14-cis-20:4	mięso, wątroba, mózg	prekursor prostaglandyn serii 2, główny składnik większości fosfolipidów błon komórkowych, zwiększa „płynność” błon komórkowych
kwas dokozapentaenowy 4, 7, 10, 13, 16-cis-22:5	brak	często występuje w tkankach pozbawionych PUFA z rodziny n-3
n-3 kwas α -linolenowy 9, 12, 15-cis-18:3	niektóre oleje roślinne (sojowy, lniany), warzywa liściaste	hipolipidemiczny, wpływa na „płynność” błon komórkowych, redukuje syntezę eikozanoidów
kwas eikozapentaenowy 5, 8, 11, 14, 17-cis-20:5	ryby, skorupiaki, algi	prekursor prostaglandyn serii 3 (PGE ₃) i tromboksanów, hipolipidemiczny, redukuje syntezę kwasu AA i eikozanoidów, antyagregacyjny
kwas dokozahexaenowy 4, 7, 10, 13, 16, 19-cis-22:6	ryby, algi, skorupiaki	hipolipidemiczny, niezbędny w funkcjonowaniu procesów widzenia i błon komórek nerwowych (neuronów), redukuje syntezę kwasu AA
n-9 kwas oleinowy 9-cis-18:1	tłuszcze zwierzęce i roślinne	hipolipidemiczny, hipocholesterolemiczny, prekursor kwasu eikozatrienowego
kwas eikozatrienowy 5, 8, 11-cis-20:3	brak	nieznane
n-7 kwas palmitoleinowy 7-cis-16:1	brak	zapobiega apopleksji

Organizmy ssaków nie wytwarzają enzymów katalizujących reakcję tworzenia w łańcuchach kwasów tłuszczowych wiązań podwójnych położonych dalej niż przy 9 węglu. Z tego powodu ssaki, w tym również człowiek nie potrafią syntetyzować *de novo* kwasu linolowego i α -linolenowego, w związku z czym kwasy te muszą być dostarczane z pożywieniem. Natomiast, większość ssaków jest wyposażona w systemy enzymatyczne, które umożliwiają przebudowę tych kwasów, związaną z uwodornieniem cząsteczki z jednoczesnym wydłużeniem łańcucha węglowego od strony karboksylowego końca. Tego rodzaju przemiany mogą zachodzić wyłącznie w obrębie tej samej rodziny, tj. n-6 lub n-3. W ten sposób powstają kwasy nienasycone o wydłużonym łańcuchu, takie jak: γ -linolenowy, dihomog γ -linolenowy (8, 11, 14-cis-eikozatrienowy, 20:3 n-6), arachidonowy (5, 8, 11, 14-cis-eikozatetraenowy, 20:4 n-6), eikozapentaenowy (5, 8, 11, 14, 17-cis-eikozapentaenowy, 20:5 n-3, EPA), dokozaheksaenowy (4, 7, 10, 13, 16, 19-cis-dokozaheksaenowy, 22:6 n-3, DHA) (9).

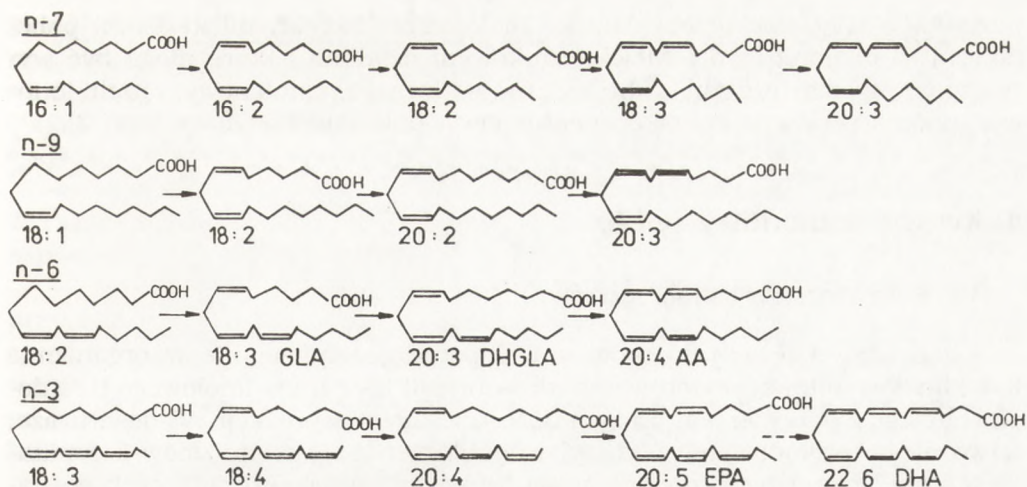
Przykłady występowania głównych kwasów polienowych w przyrodzie podano w tab. 1.

Biosynteza kwasu linolowego i α -linolenowego w roślinach wyższych i niższych, a także w niektórych mikroorganizmach odbywa się *via* pospolite kwasy tłuszczowe C-18 (stearynowy, oleinowy) syntetyzowane z fragmentów octanu powstających podczas katabolizmu węglowodanów. W wyniku postępującej elongacji łańcucha i desaturacji, przebiegającej w kierunku karboksylowego końca cząsteczki kwasu, powstają kwasy tłuszczowe z rodziny n-6 i n-3, tj. posiadające odpowiednio 6 i 3 węgle za ostatnim podwójnym wiązaniem w cząsteczce. Kluczowym ogniwem ograniczającym konwersję kwasu linolowego do arachidonowego, a także α -linolenowego do eikozapentaenowego, jest enzym Δ 6-desaturaza. W pierwszym etapie biosyntezy kwasów polienowych, po desaturacji kwasu linolowego lub α -linolenowego w pozycji Δ -6 powstają kwasy: γ -linolenowy lub 6, 9, 12, 15-cis-oktadecatetraenowy (18:4 n-3), a po elongacji łańcucha kwasy C-20, tj. kwas dihomog γ -linolenowy (DHGLA) i 8, 11, 14, 17-cis-eikozatetraenowy (20:4 n-3). Po desaturacji kwasu DHGLA w pozycji Δ -5 powstaje kwas arachidonowy, będący końcowym produktem szlaku n-6. Z kolei, po desaturacji w pozycji Δ -5 kwasu 20:4 z rodziny n-3 powstaje kwas EPA, który po elongacji łańcucha i desaturacji jest przekształcany do kwasu DHA, będącego na ogół końcowym produktem tego szlaku (rys. 1).

3. Otrzymywanie polienowych kwasów tłuszczowych

Konwencjonalne źródła lipidów o względnie wysokiej zawartości polienowych kwasów C-18 (γ -linolenowy) i C-20, np. nasiona wiesiołka dwuletniego, tkanki zwierzęce, olej ryb i alg są mało satysfakcjonujące pod względem wydajności produkcyjnej (9, 17).

Lepszym źródłem lipidów w tym kwasów polienowych mogą być mikroorganizmy m.in. ze względu na nadzwyczaj dużą szybkość wzrostu w prostych



Rys. 1. Szlaki biosyntezy polienowych kwasów tłuszczowych z rodziny: n-7 (palmitooleinowy), n-9 (oleinowy), n-6 (linolowy), n-3 (α -linolenowy) (9); GLA — kwas γ -linolenowy; DHGLA — kwas dihomog γ -linolenowy; AA — kwas arachidonowy; EPA — kwas eikozapentaenowy; DHA — kwas dokozaheksaenowy.

TABELA 2
GRZYBY STOSOWANE DO PRODUKCJI POLIENOWYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH (9)

Organizm	Główny wytwarzany PUFA*	Zawartość kwasu w lipidach (% masowy)	Uwagi
<i>Mucor javanicus</i>	GLA	18	handlowy organizm produkcyjny
<i>Mucor isabellina</i>	GLA	8	
<i>Mortierella alpina</i>	DHGLA	23	pożywka uzupełniona olejem sezamowym
	AA	79	wzrost w stałym podłożu
	EPA	20	wzrost w temp. 12°C
<i>Entomorphthora exitalis</i>	AA	27	
<i>Saprolegnia parasitica</i>	AA	10	
	EPA	20	
<i>Thraustochytrium aureum</i>	EPA	6	grzyb morski
	DHA	34	

* GLA kwas γ -linolenowy, DHGLA kwas dihomog γ -linolenowy, AA kwas arachidonowy, EPA kwas eikozapentaenowy, DHA kwas dokozaheksaenowy.

pożywkach i łatwość przetwarzania. Biologicznie aktywnymi kwasami polienowymi o różnorodnym i wielokierunkowym działaniu, które mogą być wytwarzane przez syntezę mikrobiologiczną są kwasy: γ -linolenowy, arachidonowy, dihomo- γ -linolenowy, eikozapentaenowy, dokozaheksaenowy (tab. 2).

4. Kwas γ -linolenowy (GLA)

4.1. Rola kwasu w ustroju ssaków

Kwas GLA należący do rodziny n-6 powstaje endogennie w organizmie ludzkim w wyniku odwodorowania (desaturacji) kwasu cis-linolowego (LA) dostarczonego z pożywieniem. Enzym uczestniczący w tej reakcji, $\Delta 6$ -desaturaza, łatwo ulega uszkodzeniom pod wpływem starzenia się organizmów i wynikających stąd różnych nieprawidłowości funkcjonowania, prowadzących do narastania objawów miażdżycowych (1, 18). Różnorodność objawów wywołanych niewydolnością $\Delta 6$ -desaturazy jest wynikiem zmniejszonej ilości głównych metabolitów kwasu LA — metabolitów bezpośrednich: kwasu GLA, kwasu dihomo- γ -linolenowego (DHGLA) i prostaglandyny E_1 (PGE_1) oraz metabolitów desaturacji kwasu DHGLA, tj. kwasu adrenowego i arachidonowego (AA), z którego powstają m.in. prostacyklina i tromboksan, związki o zasadniczym znaczeniu w etiopatogenezie miażdżycy (18). Zaburzenia w wytwarzaniu tych metabolitów są obserwowane w wielu jednostkach chorobowych, w tym układu nerwowego, np. w stwardnieniu rozsianym (SM), schizofrenii, chorobie Alzheimera.

Stałe lub okresowe stosowanie surowców zawierających GLA może przynieść korzystne efekty zdrowotne w przypadkach, w których:

— uzupełnia brak metabolicznego GLA, powstający prawdopodobnie wskutek wady genetycznej związanej z brakiem genu kodującego $\Delta 6$ -desaturazę i konwersję LA do GLA,

— uzupełnia ilość metabolicznego GLA, zabezpieczającą dzienne zapotrzebowanie organizmu,

— działa leczniczo w różnych schorzeniach.

W schorzeniach takich jak neuropatia cukrzycowa, stwardnienie rozsiane, schizofrenia, choroba Alzheimera, demencja, alkoholizm przewlekły, nadpobudliwość nerwowa i syndrom zmęczenia po infekcji wirusowej obserwuje się zmniejszony poziom NNKT, szczególnie kwasu GLA, w błonach komórkowych neuronów i w krwinkach czerwonych. Brak tych związków lub ich niski poziom zakłóca przewodnictwo nerwowe na etapie utrwalania neurotransmiterów (substancji chemicznych przekazujących impulsy nerwowe) w synapsach (między zakończeniami neuronów). Stwierdza się, że membrany neuronów w warunkach deficytu GLA „przeciekają” i nie przekazują bodźców lub przekazują je z opóźnieniem do centralnego układu nerwowego, co ma poważne konsekwencje obserwowane np. w stwardnieniu rozsianym. Zmiany błon krwinek czerwonych pod wpływem zmniejszonej podaży metabolitów $\Delta 6$ -de-

saturacji (GLA i DHGLA) obejmują usztywnienie, utratę elastyczności i zdolności do oddawania tlenu w naczyniach włosowatych, skutkiem czego jest niedotlenienie np. tkanki mózgowej (18).

Na przebieg procesów metabolicznych kwasu LA alkohol wpływa w trojaki sposób (19):

— wzmacnia „ucieczkę” kwasu cis-linolowego z tkanek organizmu, nawet w razie prawidłowej jego podaży z pożywieniem, co automatycznie zwiększa zapotrzebowanie organizmu na ten kwas i jego metabolity, szczególnie GLA;

— hamuje konwersję kwasu LA do kwasu GLA zachodzącą w organizmie przy udziale 6-desaturazy. W fazie „ostrego picia” czyli po bezpośrednim spożyciu wysokich dawek alkoholu jest obserwowane co prawda obniżenie poziomu LA w tkankach, jednak w przewlekłym alkoholizmie, a nawet długo po okresie odwykowym, obserwuje się obniżenie normalnego poziomu metabolitów kwasu LA, tj. kwasów GLA, DHGLA i prostaglandyny E₁ (PGE₁);

— w pierwszym okresie picia wzmacnia konwersję kwasu DHGLA do prostaglandyny E₁ (PGE₁) z czym jest związane nawet podwyższenie poziomu PGE₁ w tkance mózgowej pijących przejawiające się „dobrym nastrojem”. Spadek zawartości PGE₁ w mózgu następuje po dłuższym oddziaływaniu alkoholu na organizm.

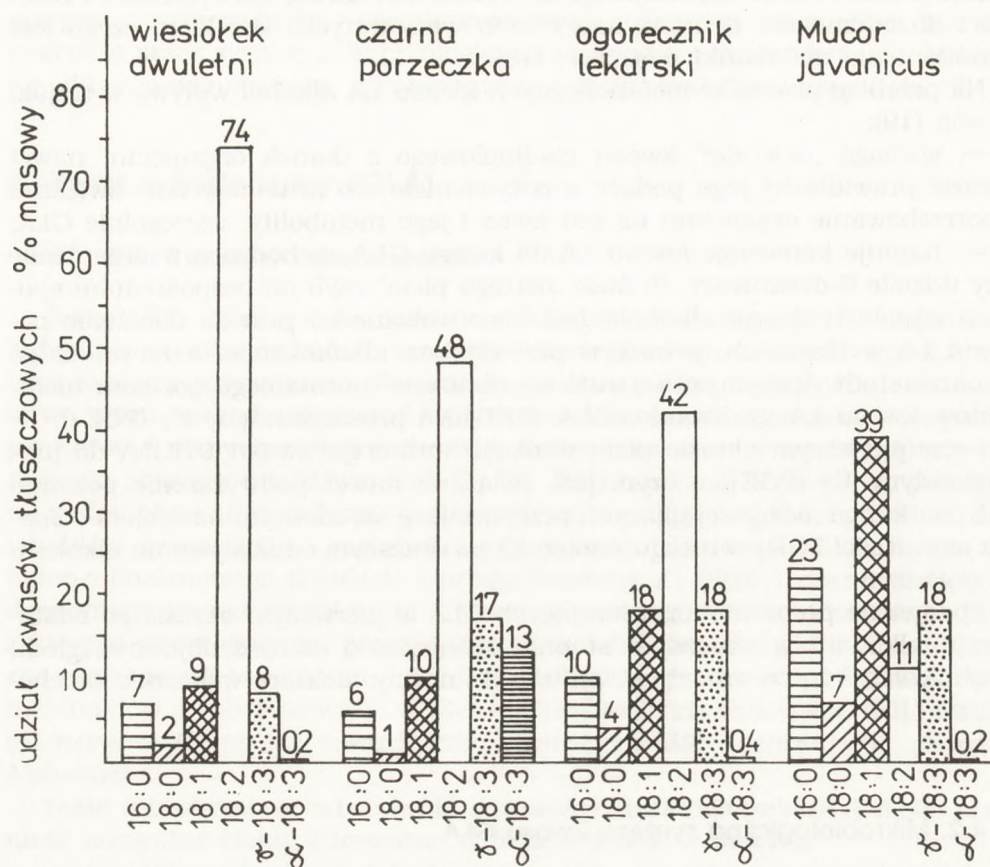
Podawanie preparatów zawierających GLA w pierwszym okresie po odstawieniu alkoholu w znacznym stopniu zmniejszało ostrość objawów „głodu alkoholowego” i przywracało stopniowo do normy niektóre wskaźniki biochemiczne (19).

4.2. Mikrobiologiczna synteza kwasu GLA

Podstawowym źródłem kwasu GLA jest do tej pory olej z wiesiołka dwuletniego, w którym zawartość jego wynosi 8 – 9%. Wiele grzybów z rodziny *Mucorales* wytwarza olej o większej zawartości kwasu GLA, choć trzeba zaznaczyć, że wydajność jego produkcji przez mikroorganizmy jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości kwasu GLA.

Zawartość kwasu GLA w olejach roślinnych i w oleju z grzybni *Mucor javanicus* przedstawiono na rys. 2. Ocenę biotechnologicznej przydatności grzybów z rodziny *Mucorales* do wytwarzania GLA w warunkach sprzyjających jego syntezie przeprowadzono zgodnie z programem skринingu przedstawionym w tab. 3.

Handlową produkcję oleju zawierającego kwas GLA podjęto w 1985 r. w firmie J&E Sturge, Selby, North Yorkshire (Wielka Brytania) z udziałem szczepu *Mucor javanicus* (tab. 4), a następnie w firmie IDEMITZU Corp. (Japonia) z udziałem *Mortierella isabellina*. W drugim przypadku ekstrahowany olej zawierał tylko 10% kwasu GLA (20). Charakterystykę dostępnego w obrocie handlowym biooleju o wysokiej zawartości kwasu γ -linolenowego przedstawiono w tab. 4.



Rys. 2. Udział podstawowych kwasów tłuszczowych w różnych olejach i tłuszczach zawierających kwas γ -linolenowy (17).

Wysoka cena powszechnie dotychczas stosowanych handlowych preparatów wiesiołka dwuletniego, w granicach od 75 do 150 DM/kg sprawia, że biotechnologiczna produkcja kwasu GLA jest konkurencyjna w stosunku do surowca roślinnego. Jej zaletą jest również niska zawartość kwasu linolowego w oleju z mikroorganizmów, co ułatwia otrzymywanie wysokiej czystości preparatu kwasu GLA.

Postęp w mikrobiologicznej syntezie GLA zaznaczył się wprowadzeniem immobilizacji komórek na porowatych nośnikach (21).

TABELA 3

PROGRAM SELEKCYJNY SZCZEPÓW MUCORALES WYTWARZAJĄCYCH KWAS γ -LINOLENOWY (17)A. Selekcja wstępna (\approx 300 organizmów)

namnażanie w hodowli wstrząsanej w pożywce o wysokim stosunku C:N

wybór 80 szczepów do namnażania w hodowli wstępnej (1 l)

badane wskaźniki: szybkość wzrostu, całkowita zawartość lipidów, % udział GLA w ogólnej zawartości kwasów tłuszczowych, wydajność wzrostu

wybór 25 organizmów

B. Skala laboratoryjna (fermentor 4 l)

hodowle 25 organizmów

badanie produktywności, g GLA/l · h

czynniki selekcyjne: stężenie substratu, źródło azotu, pH, temperatura

wybór 3 organizmów

C. Skala przemysłowa

namnażanie każdego organizmu w fermentorze o pojemności do 15 m³, optymalizacja ekstrakcji oleju, charakterystyka każdego organizmu obejmująca zagadnienia przetwarzaniawybór organizmu produkcyjnego: *Mucor javanicus*

TABELA 4

CHARAKTERYSTYKA HANDLOWEGO BIOOLEJU O DUŻEJ ZAWARTOŚCI KWASU γ -LINOLENOWEGO (17)

Organizm produkujący:	olej
<i>Mucor javanicus</i>	wygląd: jasnozielony, czysty
producent:	gęstość względna: 0,92 w temp. 20°C
J&E. Sturge, Selby	liczba nadtlenkowa: \leq 3
N. York, Wielka Brytania	temperatura topnienia: 12 - 14°C
skala produkcji:	przeciwutleniacz: witamina E
220 m ³	zawartość wolnych kwasów tłuszczowych: < 1%
zawartość oleju w komórce:	skład kwasów tłuszczowych
20 - 25% (masowy)	14:0 1,0 - 1,5%
	16:0 22 - 25%
	16:1 0,5 - 1,5%
	18:0 5 - 8%
	18:1 31 - 41%
	18:2 10 - 12%
	γ -18:3 15 - 18%

5. Kwas arachidonowy (AA)

5.1. Rola kwasu w ustroju ssaków

Produkt metabolizmu kwasu linolowego — kwas arachidonowy ulega pod wpływem cyklooksygenazy przemianom do prostanoidów, a pod wpływem lipooksygenazy do leukotrienów i lipoksyn (7, 8). Odkrycie tych związków i ich silnego działania w stężeniach nano- i pikomolarnych pozwoliło na wyjaśnienie wpływu NNKT diety na rozwój tkanki nerwowej u wcześniaków, niemowląt i dzieci (22, 23) oraz na określenie optymalnego poziomu i proporcji eikozanoidów (24) i leukotrienów — ważnych bioregulatorów spełniających w organizmie różnorodne funkcje (25).

5.2. Mikrobiologiczna synteza kwasu AA

W wyniku postępowania selekcyjnego dużej liczby szczepów z rodziny *Mortierella* oraz wstępnej oceny biotechnologicznej przydatności wyselekcjonowano do produkcji kwasu AA trzy szczepy *M. alpina*: 1S – 4, 20 – 17, 1 – 83 (rys. 3). Zastosowanie dodatkowych czynników selekcjonujących wzmogło aktywność metaboliczną szczepu *M. alpina* 1S – 4 dzięki czemu zwiększono wydajność kwasu AA do około 3g/l podczas 10-dniowej hodowli w fermentorze o poj. 2000 l, w temp. 28°C i przy okresowym żywieniu glukozą (9).

Technologia oczyszczonego oleju zawierającego m.in. kwas palmitynowy (7,0%), stearynowy (2,8%), oleinowy (6,6%), linolowy (5,9%), γ -linolenowy (3,9%), dihomo- γ -linolenowy (3,9%) i arachidonowy (67,4%) obejmuje następujące etapy (rys.4):

- oddzielenie grzybni od pożywki przez filtrację,
- suszenie grzybni,
- rozdrabnianie w młynie kulowym,
- ekstrakcję lipidów n-heksanem,
- usuwanie nierozpuszczalnego materiału przez wirowanie,
- odbarwianie i deodoryzację z węglem aktywnym,
- zagęszczanie.

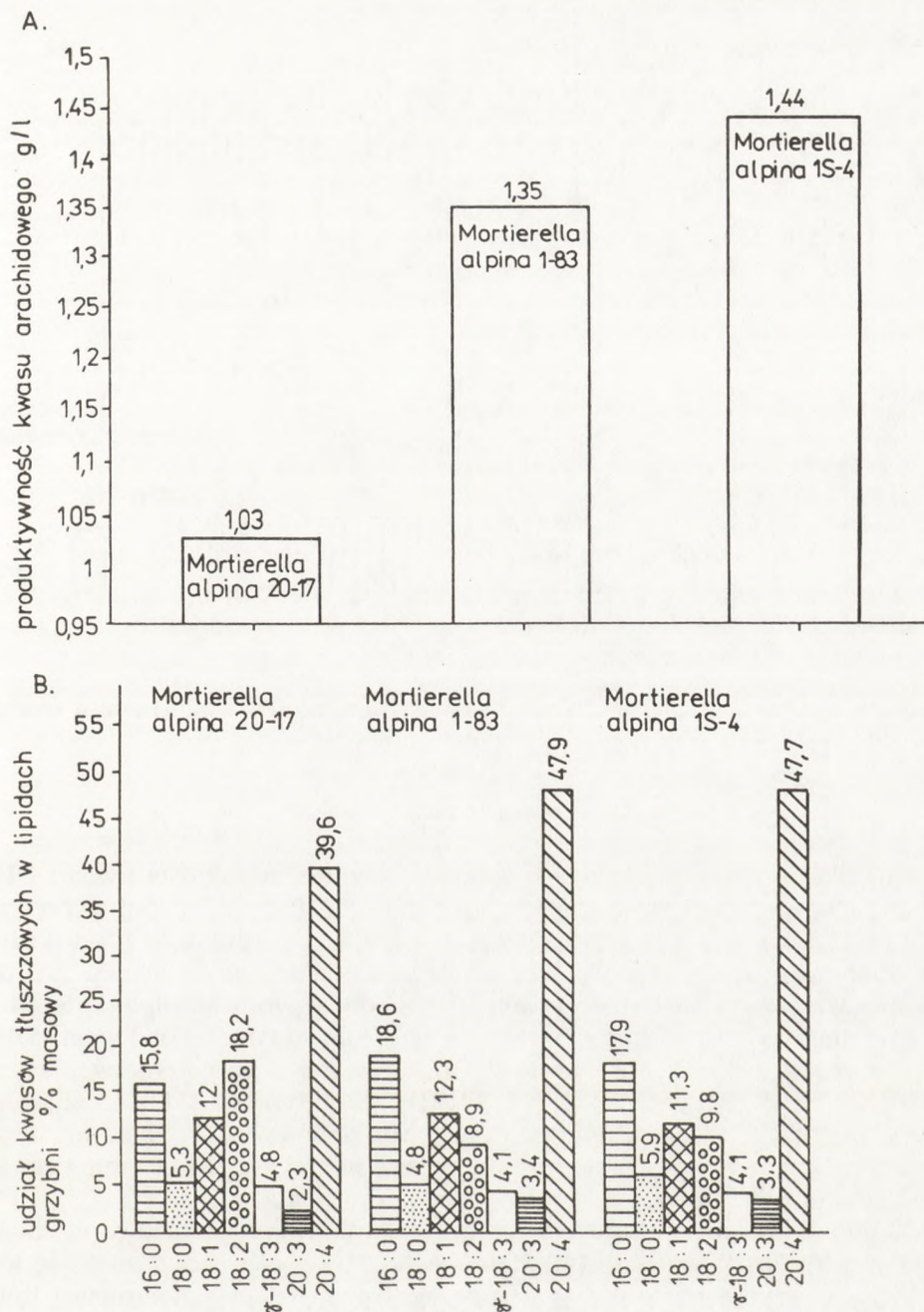
6. Kwas dihomo- γ -linolenowy (DHGLA)

6.1. Rola kwasu DHGLA w ustroju ssaków

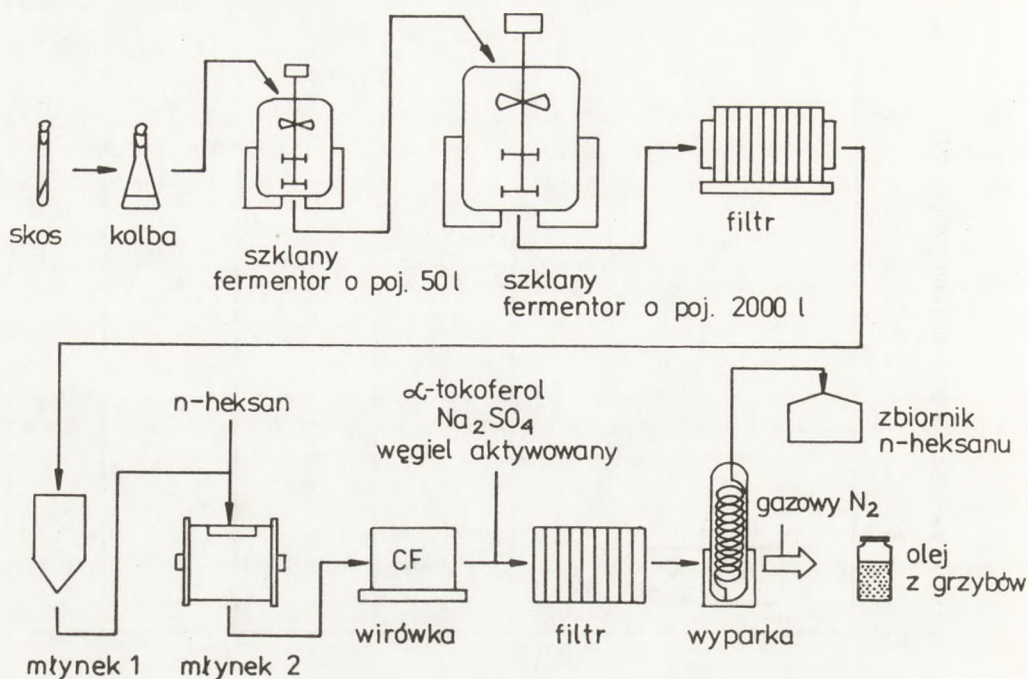
Z kwasu DHGLA powstają eikozanoidy cykliczne monoenowe, np. PGE₁ i TxA₁, które są ważnymi sygnalizatorami biologicznymi wpływającymi na funkcje komórek i ich współdziałanie (7, 8).

6.2. Synteza mikrobiologiczna kwasu DHGLA

Kwas DHGLA jest prekursorem kwasu AA na szlaku n-6 (rys. 1) w związku z czym większość grzybów nitkowatych, wytwarzających kwas AA akumuluje



Rys. 3. Porównanie produktywności kwasu arachidonowego grzybów z rodzaju *Mortierella* (A) oraz skład kwasów tłuszczowych ich grzybni (B) (9). Warunki hodowli: pożywka GY (glukoza 2%, ekstrakt drożdżowy 1%), pH 6,0, temperatura 28°C, czas 6 dni.



Rys. 4. Schemat otrzymywania biooleju z grzybów o wysokiej zawartości kwasu arachidonowego (9).

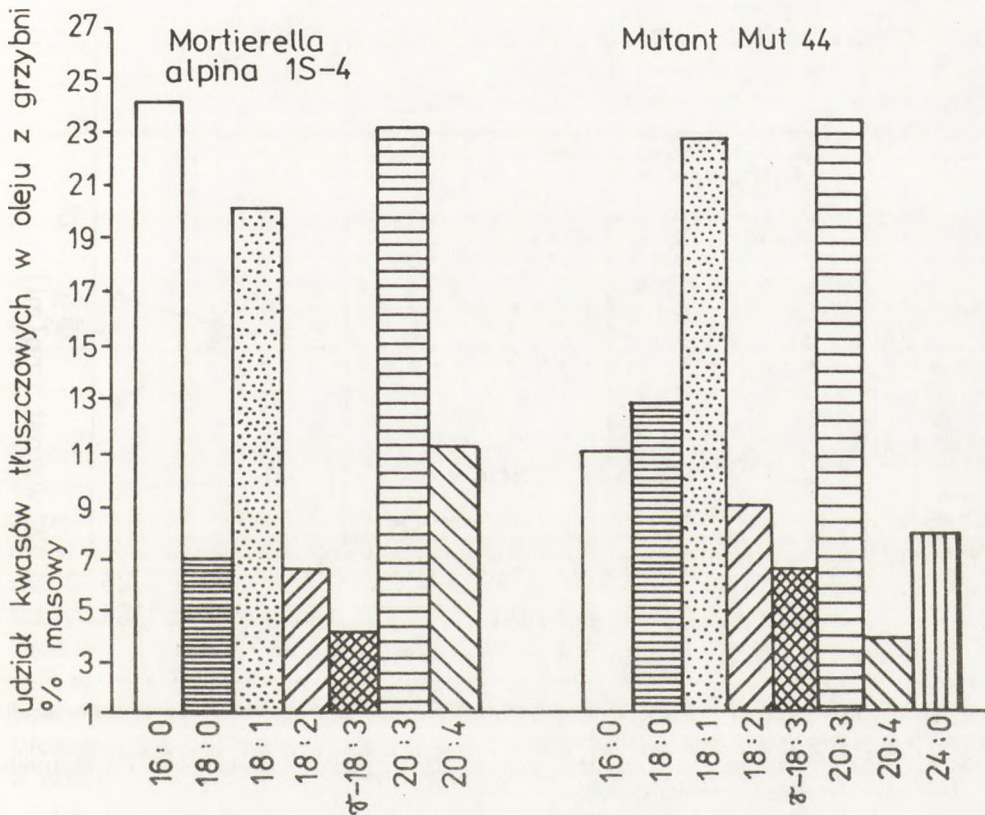
w warunkach sprzyjających jego syntezie również małe ilości kwasu DHGLA (9, 14, 15). Stosunek zawartości kwasów DHGLA i AA w grzybni wynosi około 0,2. Pod wpływem oleju sezamowego zawierającego inhibitory $\Delta 5$ -desaturazy, zachodzi specyficzna represja konwersji kwasu DHGLA do kwasu AA, dzięki czemu zwiększono zawartość kwasu DHGLA w grzybni *M. alpina* 1S - 4 (26). W optymalnych warunkach uzyskano tym sposobem 2,17g kwasu DHGLA z 1 l pożywki, przy składzie kwasów tłuszczowych oleju przedstawiającym się następująco: DHGLA 23,1%, AA 11,2%, palmitynowy 24,1%, stearynowy 7,0%, oleinowy 20,1%, linolowy 6,6%, γ -linolenowy 4,1% (rys. 5). Jednak, hodowle *M. alpina* 1S - 4 w pożywce uzupełnionej olejem sezamowym sprawiła trudności (27).

Bardziej wydajnym i łatwiejszym rozwiązaniem jest zastosowanie mutantu tego szczepu o nazwie Mut 44 z defektywną $\Delta 5$ -desaturazą. Większość kwasu DHGLA w grzybni mutantu występuje we frakcji triacyloglicerolowej lipidów, w której stanowi on 18,3%, podczas gdy kwas AA 8,0%. Interesującym zjawiskiem jest znacznie mniejszy udział kwasu DHGLA (0,3 - 7,2%) niż kwasu AA (7,8 - 12,1%) we frakcji fosfolipidów, szczególnie w fosfatydylocholinie (odpowiednio 0,3 i 7,8%). W powiązaniu z obserwacjami Pugha i Katesa (29)

wykazującymi możliwość bezpośredniej konwersji związanego z fosfatydylocholiną kwasu DHGLA do kwasu AA, jest stawiana hipoteza o istnieniu więcej niż jednego szlaku konwersji kwasu DHGLA do kwasu AA. W pierwszym, substratem byłby acylokoenzym A, a w drugim fosfolipidy. Przypuszcza się, że jeden z tych szlaków, prawdopodobnie pierwszy z wymienionych, jest defektywny u mutantu (28).

W hodowli węgłnej Mut 44 prowadzonej w 10 l fermentorze w optymalnych warunkach (temp. 28°C, pH 6,0, pożywka GY: 2% glukozy, 1% ekstraktu drożdżowego) w czasie 6 dni uzyskano 3,2 g DHGLA/l pożywki. Skład głównych kwasów tłuszczowych grzybni *M. alpina* 1S-4 i jego mutantu porównano na rys. 5. Stosunek udziału kwasów DHGLA i AA osiągał około 6 po 3 dniach hodowli i pozostawał na prawie nie zmienionym poziomie do końca biosyntezy (28).

Wpływ różnych czynników na wytwarzanie kwasu DHGLA przez mutantu szczepu *M. alpina* 1S-4 przedstawiono na rys. 6, 7, 8.

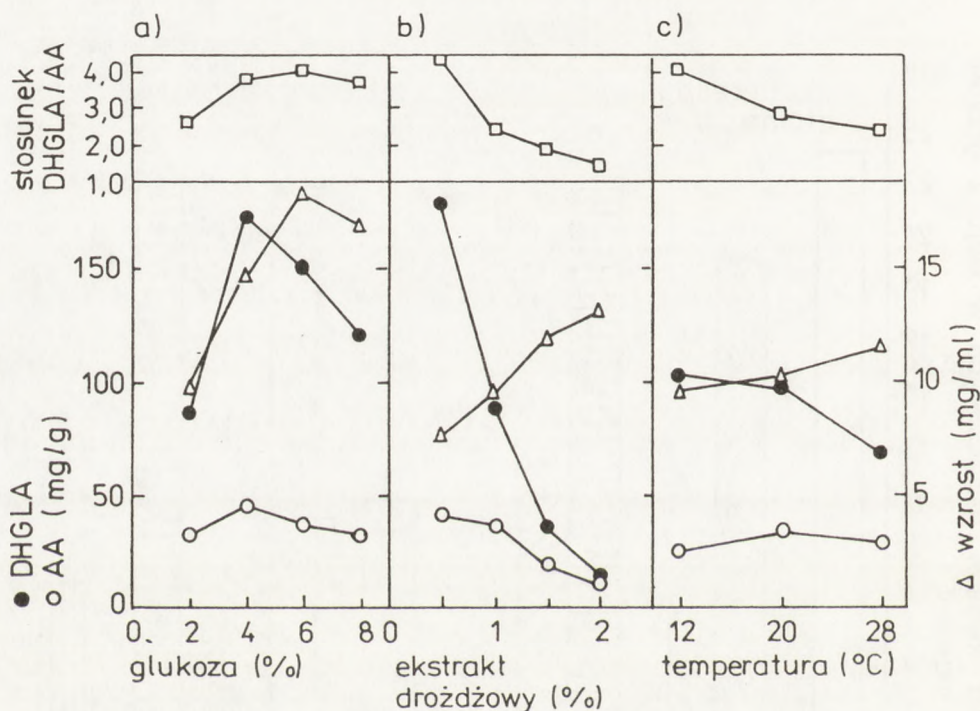


Rys. 5. Porównanie składu kwasów tłuszczowych w oleju z grzybni *Mortierella alpina* 1S-4 i jego mutantu Mut 44 (9,28).

7. Kwas eikozapentaenowy (EPA)

7.1. Rola kwasu w ustroju ssaków

Kwas EPA jest polienowym kwasem tłuszczowym o potencjalnym znaczeniu farmaceutycznym, który daje początek formowaniu trzeciej serii prostanoidów: prostacykliny PGI_3 i tromboksanu TxA_3 , charakteryzujących się odmiennym działaniem w porównaniu z pochodnymi kwasów rodziny n-6 (1, 30, 31). Związki te uczestniczą w mechanizmie krzepliwości krwi, podczas którego działając antyagregacyjnie istotnie ją obniżają, zapobiegając tym samym zachorowalności na chorobę wieńcową (CHD). Przedłużenie czasu krwawienia i zmniejszenie agregacji płytek krwi stwierdza się po podaniu 2 - 20g kwasu EPA/osobę/dzień (32). Pod wpływem tego kwasu obniża się zawartość triacylogliceroli w osoczu krwi w stopniu prawdopodobnie przewyższającym dzia-

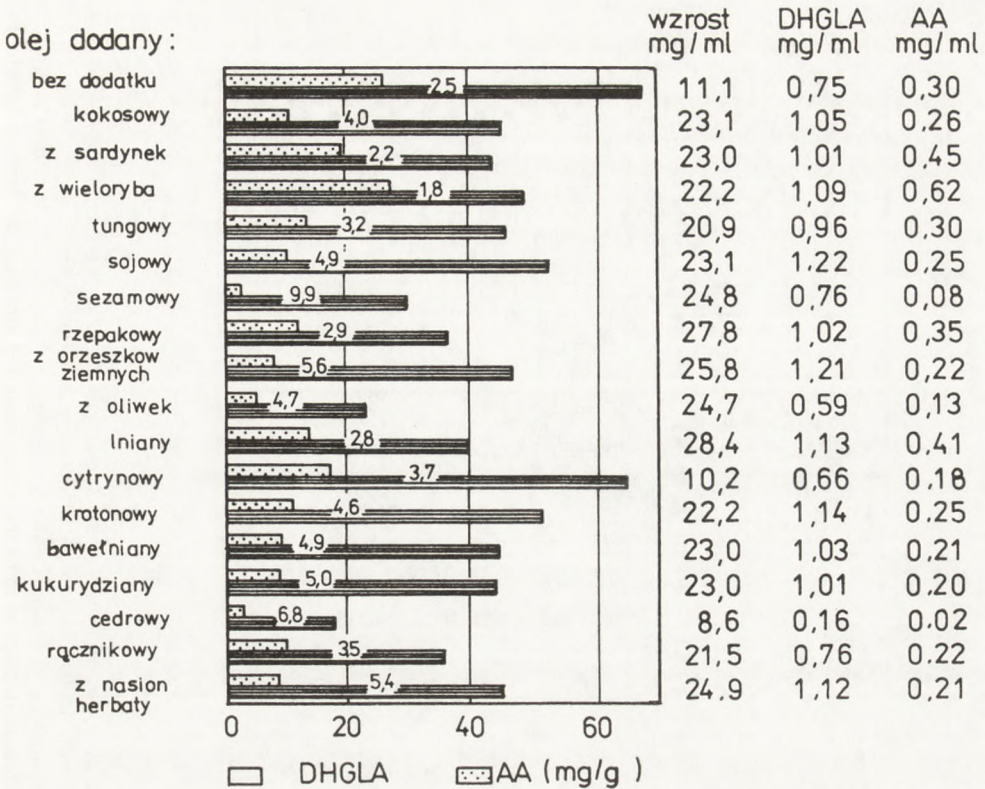


Rys. 6. Wpływ stężenia glukozy i ekstraktu drożdżowego oraz temperatury wzrostu *Mortierella alpina* 1S-4 na biosyntezę kwasu DHGLA (28):

a) hodowla prowadzona w temp. 28°C przez 7 dni w pożywce zawierającej 1% ekstraktu drożdżowego i wskazane stężenia glukozy;

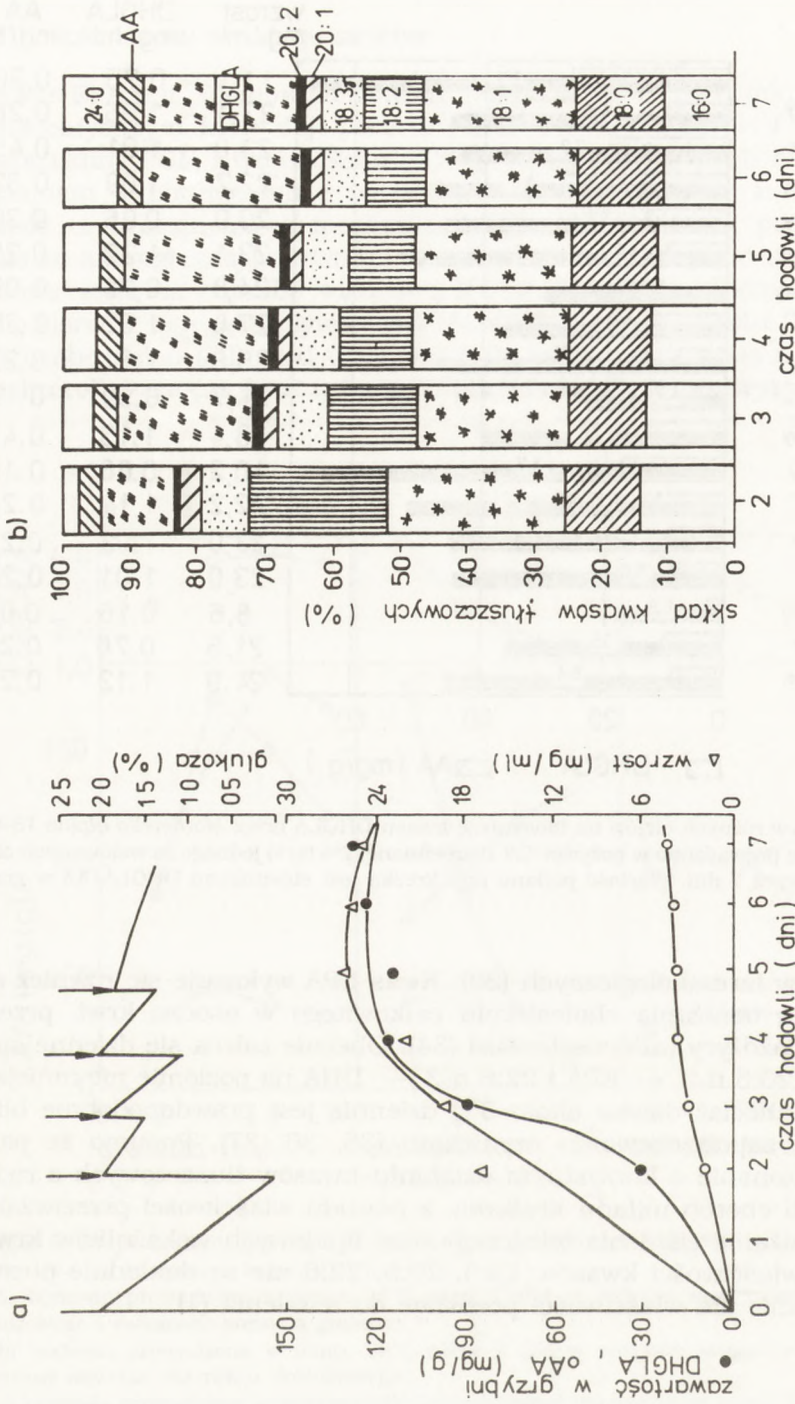
b) hodowla prowadzona w temp. 28°C przez 7 dni w pożywce zawierającej 2% glukozy i wskazane stężenia ekstraktu drożdżowego;

c) hodowla prowadzona w pożywce GY we wskazanej temperaturze przez 7 dni.



Rys. 7. Wpływ różnych olejów na biosyntezę kwasu DHGLA przez *Mortierella alpina* 1S-4 Mut 44 (28). Hodowlę prowadzono w pożywce GY uzupełnionej 2% (v/v) jednego ze wskazanych olejów, w temp. 28°C przez 7 dni. Wartość podana nad kreską jest stosunkiem DHGLA/AA w grzybni.

łanie środków farmakologicznych (33). Kwas EPA wykazuje się również dużą skutecznością obniżania cholesterolu całkowitego w osoczu krwi, przez co zapobiega miażdżycy (*atherosclerosis*) (34). Obecnie zaleca się dzienne spożycie kwasów: 20:5 n-3 — EPA i 22:6 n-3 — DHA na poziomie nie mniejszym niż 2–3 g, chociaż dawka około 5 g dziennie jest prawdopodobnie bliższa faktycznemu zapotrzebowaniu organizmu (35, 36, 37). Pomimo że panuje zgodne przekonanie o korzystnym działaniu kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 w terapii chorób układu krążenia, z powodu właściwości przeciwzakrzepowych, obniżania ciśnienia tętniczego oraz lipidowych wskaźników krwi, to biologiczne właściwości kwasów 18:3, 20:5, 22:6 nie są dokładnie poznane, a zróżnicowanie ich właściwości pozostaje do ustalenia (1).



Rys. 8. Biosynteza kwasu DHGLA przez *Moritella alpina* 1S-4 Mut-44 w optymalnych warunkach (28). Zaszczep inkubowano w 100 ml pożywki GY w temp. 28°C przez 3 dni, a następnie wprowadzano do 10 l szklanego fermentora (Able Ltd. Tokyo, Japan) zawierającego 4 l pożywki GY uzupełnionej 0,05% (v/v) oleju sojowego i 0,05% adekanolu (Asahi Denka Industries, Tokyo, Japan). Warunki hodowli: temp. 28°C, napowietrzanie 1 obj./obj./min; mieszanie 300 rpm. Glukozę dodano w momencie oznaczonego strzałką (a). Zmiany składu kwasów tłuszczowych grzybni w czasie wzrostu przedstawiono w części (b).

8. Mikrobiologiczna synteza kwasu EPA

8.1. Biosynteza szlakiem n-6

Niektóre grzyby z rodzaju *Mortierella*, np. *M. alpina* 20 – 17 i *M. hygrophila* IFO 5941, wytwarzające kwas AA, podczas namnażania w niskich temperaturach akumulują duże ilości kwasu EPA w grzybni (38, 39). Niska temperatura warunkuje wydajną biosyntezę tego kwasu, gdyż tylko wtedy następuje aktywacja enzymu(ów), uczestniczących w jego tworzeniu, przez przypuszczalnie bezpośrednią desaturację metylowego końca kwasu AA (rys. 9) (15). Obecność w grzybni polienowych kwasów tłuszczowych z rodziny n-6, tj. GLA, DHGLA i AA sugeruje, że mogą być one prekursorami kwasu EPA (rodzina n-3).

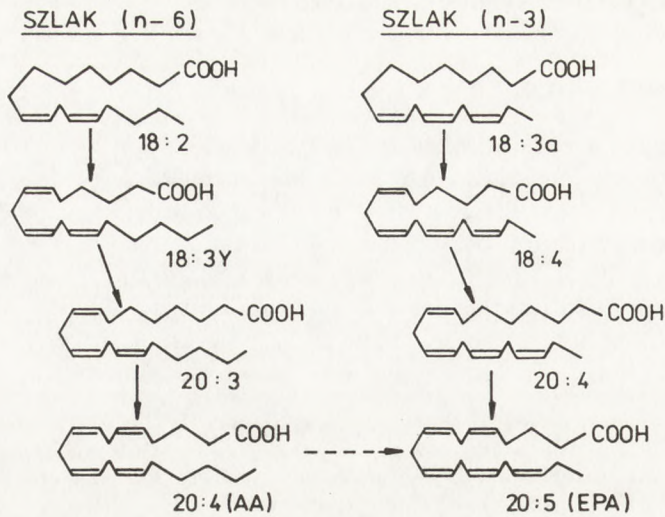
Czynnikami decydującymi o wydajności biosyntezy są: źródło węgla i azotu, temperatura, pH, dożywianie glukozą (38).

W hodowli *M. alpina* 20 – 17 w pożywce GY (2% glukozy, 1% ekstraktu drożdżowego) uzupełnionej baktepeptonem w ilości 0,5% w optymalnych warunkach (pH 6,0, temp. 12°C, czas 11 dni, dodatek glukozy w ilości 1% po 7 i 9 dniach) uzyskiwano kwas EPA w ilości 0,49 g/l pożywki.

W praktyce hodowle w niskiej temperaturze są niekorzystne ze względu na małą szybkość wzrostu grzybów i duże nakłady energetyczne, związane z utrzymaniem niskiej temperatury. Podwyższenie temperatury w niektórych okresach trwania hodowli — w połączeniu z uzupełnianiem glukozą w miarę jej zużywania — jest jednym z możliwych rozwiązań w zakresie zwiększenia wydajności grzybni o wysokiej zawartości kwasu EPA, umożliwiającym jednocześnie skrócenie czasu biosyntezy.

8.2. Biosynteza szlakiem n-3

W organizmie ssaków dostarczony z dietą kwas α -linolenowy (α -18:3; 9, 12, 15 — 18:3; 18:3 n-3) ulega konwersji szlakiem n-3 do kwasu EPA poprzez kolejne reakcje desaturacji i elongacji (40). Ten mechanizm biotransformacji może być zrealizowany przez grzyby z rodzaju *Mortierella*, o predyspozycjach do akumulacji kwasu AA, które również wytwarzają kwas EPA podczas wzrostu w temp. 28°C w pożywkach wzbogaconych w olej lniany lub sojowy, będących źródłem kwasu α -linolenowego, którego grzyby *Mortierella* nie syntetyzują. Duże predyspozycje do biosyntezy kwasu EPA w tych warunkach wykazuje szczególnie szczep *M. alpina* 20 – 17 (41). W dotychczasowych badaniach nad biotransformacją w grzybach *Mortierella* ustalono, że w pożywce z dużą zawartością glukozy zachodzi intensywne wytwarzanie kwasu AA przy towarzyszącej temu represji syntezy kwasu EPA, podczas gdy w pożywce z dużą zawartością kwasu α -linolenowego ma miejsce intensywne wytwarzanie kwasu EPA z równoczesną represją syntezy kwasu AA (15, 38). Z glukozy powstaje kwas linolowy (18:2 n-6), który jest prekursorem kwasu



Rys. 9. Szlaki biosyntezy kwasu arachidonowego i eikozapentaenowego (15):
 18:2, kwas linolowy;
 18:3 α , kwas α -linolenowy;
 18:3 γ (GLA), kwas γ -linolenowy;
 18:4, kwas 6,9,12,15-oktadecatetraenowy;
 20:3 (DHGLA), kwas dihomo- γ -linolenowy;
 20:4, kwas 8,11,14,17-eikozatetraenowy; 20:4 (AA), kwas arachidonowy;
 20:5 (EPA), kwas eikozapentaenowy.

AA, co wyjaśniałoby akumulację tego kwasu w pożywce z glukozą. Jednak, w razie obecności kwasu α -linolenowego zachodzi jego transformacja do kwasu EPA. W związku z tym jest stawiana hipoteza o istnieniu oprócz szlaku n-6 biosyntezy EPA, zależnego od temperatury, również szlaku n-3 od niej niezależnego, w którym zachodziłyby kolejno trzy reakcje: 6-desaturacji kwasu α -linolenowego do kwasu oktadecatetraenowego (18:4 n-3), elongacji do kwasu eikozatetraenowego (20:4 n-3) i Δ 5-desaturacji kwasu eikozatetraenowego do kwasu EPA (rys. 9.).

Wydaje się również, że zarówno kwas AA jak i kwas α -linolenowy mogą być substratami enzymatycznie katalizowanej reakcji Δ 6-desaturacji, a warunki środowiskowe decydowałyby o wynikach współzawodnictwa substratowego i kierunku przemiany. Wydajność biosyntezy kwasu EPA można zwiększyć 1,6-krotnie przez zastosowanie „dojrzewania” grzybni po 6-dniowej hodowli *M. alpina* 20 – 17, polegającego na przetrzymaniu grzybni przez kolejnych 7 dni w temp. 28°C. Takiej zawartości kwasu EPA w pożywce nie uzyskiwano w wyniku przedłużenia czasu hodowli (41). Biotransformacja kwasu α -linolenowego wprowadzonego do pożywki jest interesującym, biotechnologicznym kierunkiem pozyskiwania kwasu EPA z wielu łatwo dostępnych naturalnych olejów zawierających kwas α -linolenowy. Możliwość przeprowadzenia

biosyntezy w temperaturze 20 – 30° C, szybki i wydajny wzrost grzyba, duża wydajność biosyntezy kwasu EPA — 1,35 g/l (2,8 razy większa w porównaniu z wydajnością w niskich temperaturach) oraz niskie nakłady energetyczne są zaletami tego kierunku (41).

9. Uwagi końcowe

W opracowaniu wskazano na możliwości w zakresie praktycznego wykorzystania biotechnologii do pozyskiwania metabolitów o działaniu biomedycznym. Niektóre grzyby mogą być nowym, alternatywnym źródłem polienowych kwasów tłuszczowych ze względu na dużą szybkość wzrostu w prostych pożywkach, wysoką wydajność metabolitu o lepszych cechach sensorycznych w porównaniu np. z olejem pozyskiwanym z ryb. W daleko zaawansowanych badaniach dokonano m.in. selekcji grzybów o dużych predyspozycjach do biosyntezy kwasu GLA; określenia optymalnych warunków biosyntezy w hodowli wglębnej w dużej skali; selekcji grzybów wytwarzających polienowe kwasy tłuszczowe C-20; określenia optymalnych warunków selektywnej akumulacji kwasu AA, DHGLA i EPA przez wyselekcjonowane grzyby.

Biotechnologiczne pozyskiwanie kwasów PUFA gwarantuje produkcję oleju lub kwasów tłuszczowych o wysokiej czystości z przeznaczeniem na cele dietetyczne i/lub farmaceutyczne. Dokonujący się jednocześnie postęp w zakresie projektowania bioreaktorów (fermentorów) stwarza nadzieje na szybkie upowszechnienie przemysłowej biosyntezy omówionych w pracy polienowych kwasów tłuszczowych.

Literatura

1. Ziemiański Ś., Budzyńska-Topolowska J., (1991), *Tłuszcze pożywienia i lipidy ustrojowe*, PWN, Warszawa .
2. Holman R. T., (1958), *Nutr. Rev.*, 16, 33 – 42.
3. Thompson H. J., (1962), *Nature*, 194, 973 – 975.
4. Holman R. T., Johnson S. B., Hatch T. F., (1982), *Am. J. Clin. Nutr.*, 35, 617 – 628.
5. Jacotot B., (1985), *Cah. Nutr.*, 20, 143 – 151.
6. Lands W. E. M., (1986), *Nutr. Rev.*, 44, 189 – 195.
7. Kinsella J. E., (1988), *Food Technol.*, 42, 10, 124 – 145.
8. Baryłko-Pikielna N., Osucha A., (1991), *Przem. Spoż.*, XLV, 4, 88 – 91.
9. Yamada H., Shimizu S., Shinmen Y., Kawashima H., Akimoto K., (1988), *Production of functional lipids by biotechnology. Proceedings of the 1988 Nara Workshop on Functional Fats and Lipids*, 33 – 53, October 4 – 6, Nara, Japan.
10. Hartmann E., Beutelmann P., Vandekerckhove O., Euler R., Kohn G., (1986), *FEBS Lett.*, 198, 51 – 55.
11. Seto A., Wang H. L., Hesseltine C. W., (1984), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 892 – 894.
12. Erwin J., Bloch K., (1964), *Science*, 143, 1006 – 1012.
13. Gellermann J. L., Schlenk H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 573, 23 – 30.
14. Yamada H., Shimizu S., Shinmen Y., (1987), *Agric. Biol. Chem.*, 51, 785 – 790.
15. Shimizu S., Shinmen Y., Kawashima H., Akimoto K., Yamada H., (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150, 335 – 341.

16. Yazawa K., Araki K., Okazaki N., Watanabe K., Ishikawa C., Inoue A., Numao N., Kondo K., (1988), *J. Biochem.*, 103, 5 - 7.
17. Ratledge C., (1991), *Acta Biotechnol.*, 11, 5, 429 - 438.
18. Lamer-Zarawska E., (1992), *Wiad. Ziel.*, 2, 1 - 3.
19. Lamer-Zarawska E., (1992), *Wiad. Ziel.*, 3, 1 - 2.
20. Ratledge C., (1989), in: *Microbial Lipids*, 2, eds.: Ratledge C., Wilkinson S. G., London, Academic Press, 567 - 668.
21. Fukuda H., Morikawa H., (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 15 - 20.
22. Bourre J. M., Pascal G., Durand G., (1989), Essential fatty acids and brain development and function, *Proceedings of the 14th International Congress of Nutrition*, (20 - 25.08), Seul, Korea, 97.
23. Inhis S. M., Hrboticky N., Foote K. D., (1989), Essential fatty acids in the infant., *Proceedings of the 14th International Congress of Nutrition*, (20 - 25.08.), Seul, Korea, 102.
24. Dupont J., (1989), Essential fatty acids and eicosanoids, *Proceedings of the 14th International Congress of Nutrition*, (20 - 25.08.), Seul, Korea, 107.
25. Park S., Seyama Y., Shimizu T., (1989), Leukotrienes a family of bioregulators derived from essential fatty acids, *Proceedings of the 14th International Congress of Nutrition*, (20 - 25.08.), Seul, Korea, 111.
26. Shimizu S., Akimoto K., Kawashima H., Shinmen Y., Yamada H., (1989), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66, 237 - 241.
27. Shimizu S., Akimoto K., Shinmen Y., Kawashima H., Yamada H., (1991), *Lipids*, 26, 512 - 516.
28. Jareonkitmongkol S., Kawashima H., Shirasaka N., Shimizu S., Yamada H., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 7, 2196 - 2200.
29. Pugh E. L., Kates M., (1977), *J. Biol. Chem.*, 252, 68 - 73.
30. Dyerberg J., (1986), *Nutr. Rev.*, 44, 125 - 132.
31. Needleman P., Raz A., Minkes M., Ferrendelli J. A., Sprecher H., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 944 - 951.
32. Lec T. H., Hoovez R. L., Williams J., et al., (1985), *N. Engl. J. Med.*, 312, 1217 - 1222.
33. Nestel P. J., (1987), *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 1161 - 1165.
34. Ziemiański Ś., Panczenko-Kresowska B., Wielgus-Serafińska E., (1987), *Nutr. Inter.*, 3, 2, 104 - 108.
35. Bronsgeest-Schonte H. C., Van Gent C. N., Luten J. B., Ruiter A., (1981), *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 1752 - 1757.
36. Sanders T. A. B., Sullivan D. R., Receve J., Thompson G. R., (1985), *Artherosclerosis*, 5, 459 - 463.
37. Simons L. A., Hickie J. B., Bala Subramanian S., (1985), *Artherosclerosis*, 54, 75 - 80.
38. Shimizu S., Kawashima H., Shinmen Y., Akimoto K., Yamada H., (1988), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 1455 - 1459.
39. Yamada H., Shimizu S., Shinmen Y., Kawashima H., Akimoto K., (1987), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64, 1254 - 1258.
40. Fulco A. J., (1974), *Annu. Rev. Biochem.*, 43, 215 - 220.
41. Shimizu S., Kawashima H., Akimoto K., Shinmen Y., Yamada H., (1989), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66, 343 - 347.

Microbial synthesis of biologically active lipids

Summary

A significance of biologically active polyunsaturated fatty acids γ -linolenic, arachidonic, dihomo- γ -linolenic, eicosapentaenoic) in mammals and the reasons for their metabolic disturbances were reviewed. Fungi utilization in biosynthesis of bio/medically active fatty acids was pointed out and the presently used technologies as well as the forthcoming trends were shortly announced.

key words:

biologically active polyunsaturated fatty acids, γ -linolenic acid, arachidonic acid, dihomo- γ -linolenic acid, eicosapentaenoic acid, n-3 route, n-6 route, microbial synthesis.

Adres dla korespondencji:

Jacek Leman, Instytut Biotechnologii Żywności, Akademia Rolniczo-Techniczna, pl. Cieszyński 1 bl. 45, 10 - 719 Olsztyn-5.