

PENGASINGAN STRAIN BARU KULAT DARI TANAH DI MALAYSIA UNTUK PENGHASILAN ASID γ -LINOLENIK (GLA)

A. A. HAMID¹, W. M. W. YUSOF², R. M. ILLIAS³ & K. NADARAJAH*

Abstrak. Kajian telah dijalankan untuk mendapatkan strain baru kulat yang menghasilkan GLA hasil penyaringan 21 pencilan yang diperolehi dari tanah hutan simpan di sekitar negeri Selangor dan Negeri Sembilan. Sebanyak 5 pencilan kulat daripada 21 pencilan yang diperolehi telah dikenalpasti menghasilkan asid γ -linolenik (GLA) (18:3, n-6) iaitu SK8, SK22, 2A1, DR dan K3, yang menghasilkan 6%, 7.6%, 6.9%, 5.4% dan 13.5% GLA daripada asid lemak total masing-masing. Kelima-lima pencilan tersebut juga didapati menghasilkan peratusan lipid yang berbeza, iaitu 30%, 20%, 32%, 30% dan 8% lipid total (w/w, biojisim), masing-masing. Pencilan K3 mempunyai kandungan GLA yang setara dengan kandungan GLA dalam minyak 'Evening Primrose' yang dihasilkan secara komersial pada masa kini, iaitu 8%-12% GLA dari asid lemak total. Pencilan 2A1 menunjukkan penghasilan GLA tertinggi (0.0096g GLA/g glukosa) berbanding SKA, SK22, DR dan K3, yang menghasilkan 0.0032, 0.0039, 0.007 dan 0.0025g, GLA/g glukosa, masing-masing. Perbezaan profil asid lemak bagi keseluruhan 21 pencilan juga dibincangkan.

Kata kunci: Oleaginous, kulat, γ linolenic, asid lemak poli-tidak-tepu.

Abstract. In our studies, 21 filamentous fungi were isolated from soil obtained from various sites of forest reserves in Selangor and Negeri Sembilan. Five isolates (SK8, SK22, 2A1, DR and K3) were found to produced γ linolenic acid (GLA) (18:3, n-6) at 6%, 7.6%, 6.9%, 5.4% and 13.5% of their respective total fatty acids with lipid contents of 30%, 20%, 32%, 30% and 8% (w/w, biomass), respectively. The GLA content of K3 is comparable to that of the commercially available 'Evening Primrose' with GLA comprising of 8%-12% of its total fatty acids. The difference in the fatty acid profiles from all 21 isolates is discussed here.

Key words: Oleaginous, fungi γ linolenic, polyunsaturated fatty acids.

1.0 PENGENALAN

Penghasilan asid lemak poli-tidak-tepu (ALPT) telah menarik minat para pengusaha industri sejak potensi pengambilan bahan ini di dalam diet dikenalpasti, lebih-lebih lagi ALPT dari w-3 [asid eikosapentaenoik (EPA) dan asid dokosaheksaenoik (DHA)] dan siri w-6 [asid γ -linolenik (GLA) serta asid arakidonik (ARA)]. GLA telah diguna-

^{1,2&3} Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi Selangor Darul Ehsan, Malaysia. Tel: 03-89293246, e-mail: aidilah@pkriscc.ukm.my, Fax: 03-89252698

* Jabatan Kejuruteraan Bioproses, Fakulti Kejuruteraan Kimia dan Sumber Asli, Universiti Teknologi Malaysia, 81310 Skudai, Johor Darul Takzim, Malaysia.

kan lebih daripada 30 tahun di United Kingdom dan dipreskripsi sebagai penawar penyakit ekzema [1], skizofrenia [2] dan sindrom premenstrual [3]. ARA dan EPA juga merupakan pelopor di dalam pembentukan eikosanoid seperti prostaglandin, leukotrin dan tromboksan dalam haiwan [4]. Pengambilan kedua-dua bahan ini di dalam diet juga telah disarankan di dalam pencegahan penyakit jantung.

Penghasilan ALPT daripada mikrob ['Single Cell Oil' (SCO)] telah dikenalpasti sebagai salah satu cara penghasilan asid lemak secara komersial. Kulat oleaginus berupaya menghasilkan sehingga 85% lipid (yang mengandungi ALPT) daripada berat keringnya [5]. *Mucor circinelloides* sebagai contohnya telah digunakan dengan jayanya dalam penghasilan GLA di United Kingdom manakala *Mortierella isabellina* pula digunakan di Jepun [5]. Walau bagaimanapun, kajian tentang kewujudan kulat-kulat berfilamen yang berpotensi untuk digunakan bagi penghasilan ALPT belum dijalankan di Malaysia. Justeru itu, penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan strain baru kulat oleaginus dari tanah di beberapa lokasi hutan simpanan di Malaysia yang berpotensi menghasilkan ALPT. Seterusnya, pengenalpastian profil asid lemak untuk setiap pencilan juga dilakukan.

2.0 BAHAN DAN KAEDAH

Kulat dipencilkan daripada sampel tanah yang diperolehi dari beberapa lokasi di Hutan Simpan Mantin (Negeri Sembilan), Hutan Simpan UKM (Bangi) dan Hutan Simpan Sungai Tekala (Kajang). Sampel-sampel tanah diinokulatkan secara terus ke atas agar Rose Bengal-Kloramfenikol (RBK) dan dieram sehingga 4 hari pada 30°C. Koloni-koloni kulat berbeza yang terhasil dipindahkan ke piring agar RBK dan diulang eraman seperti di atas. Proses diulang sehingga kultur tulen terhasil. Kulat-kulat dibezakan berdasarkan perbezaan morfologi koloni, tekstur dan warna miselium, spora dan tepian koloni. Semua kultur disimpan pada 4°C sebagai kultur stok di dalam agar condong.

Setiap pencilan kulat dikulturkan dalam medium cecair terhad-nitrogen [6] seperti di bawah (g/L);

Glukosa, 30; ammonium tartarat, 2; KH_2PO_4 , 7; Na_2HPO_4 , 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5; ekstrak yis, 1.5; CaCl_2 , 0.1; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0001; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.0001; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0001; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.0001.

Kelalang 1L yang mengandungi 500 ml medium diinokulatkan dengan 5% (v/v) kultur benih yang telah dikulturkan selama 72 jam di dalam medium yang sama dan dieram selama 120 j. Pengkulturan dilakukan pada 30°C dengan kadar goncangan 250 rpm. Sebanyak 20 ml sampel diperolehi dari setiap kelalang pada selang masa 24 jam dan diasai kandungan glukosa, biojisim dan ammonium sementara pemerolehan sampel untuk analisis lipid dilakukan pada akhir eksperimen. Kesemua analisis dilakukan seperti yang telah diterangkan oleh Wynn [7].

Analisis profil asid lemak dilakukan dengan menyuntik ester metil asid lemak yang dihasilkan dengan sodium metoksida kepada kromatografi gas kapilari [Shimadzu GC17A]. Kolum sepanjang 30 m (HP23) berdiameter 0.32 μm digunakan di mana suhu penyuntik dan pengesan ditetapkan pada 260°C dan 300°C, masing-masing. Puncak-puncak yang terhasil dikenalpasti dengan perbandingan terhadap ester metil asid lemak piawai (Sigma, #189-19).

3.0 HASIL DAN PERBINCANGAN

Sebanyak 21 pencilan kulat telah berjaya dipencil di mana kesemuanya menunjukkan profil kandungan asid lemak yang serupa iaitu amaun surih (<2%) 8:0, <5% 12:0 dan 14:0, >10% 16:0, 18:1 dan 18:2 (Jadual 1). 81% daripada 21 pencilan yang diperolehi menghasilkan lipid dengan kandungan 18:0 melebihi 10% daripada asid lemak total. Perbandingan dibuat dengan kajian lepas [8] di mana didapati kulat-kulat di bawah divisi Myxomycota, subdivisi Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina dan Deuteromycotina menghasilkan lipid yang mempunyai profil asid lemak yang serupa kecuali hanya 20% daripada keseluruhan 96 kulat yang dikaji dari subdivisi-subdivisi tersebut mempunyai lipid dengan kandungan 18:0 yang lebih daripada 10% (daripada asid lemak total).

Pencilan SK12 dan K6 didapati memaparkan profil asid lemak yang berbeza dengan yang lain dengan mengandungi 12:0 yang tinggi, iaitu 15% dan 10% (daripada asid lemak total), masing-masing. Penemuan ini berbeza berbanding dengan laporan awal [8] di mana majoriti kulat-kulat di bawah kesemua subdivisi menunjukkan peratusan 12:0 yang rendah (kurang daripada 3% daripada asid lemak total). Perbezaan ini mungkin kerana kedua-dua kulat tersebut (SK12 dan K6) mempunyai sistem regulasi penyahtepuan asid lemak yang berbeza. Seperti organisma lain, kulat juga mempunyai sistem penyahtepuan yang melibatkan aktiviti enzim-enzim desaturase yang masing-masing bertindak terhadap asid lemak yang spesifik [9]. Perbezaan di dalam regulasi dan aktiviti setiap enzim tersebut akan menghasilkan lipid dengan kandungan asid lemak yang berbeza.

Setiap pencilan juga didapati memaparkan keupayaan penghasilan lipid yang berbeza apabila dikulturkan di dalam medium cecair terhad-nitrogen (Jadual 1) iaitu di antara 3% hingga 30% lipid (w/w, biojisim). Penghasilan lipid yang melebihi 20% (w/w, biojisim) diperolehi dari pencilan 1B1, 2A1, K4, SK3, SK8 dan SK22 di mana masing-masing menghasilkan lipid pada kadar 40%, 32%, 30%, 27%, 31%, 30% dan 20%. Ini bermakna 33% daripada keseluruhan pencilan adalah oleaginus.

Keseluruhan 21 pencilan kulat juga menunjukkan kadar penggunaan sumber nitrogen (Jadual 2) yang berbeza. Sebahagian besar pencilan menggunakan keseluruhan sumber nitrogen pada awal tempoh pertumbuhan (16 – 48 jam) manakala terdapat pula pencilan-pencilan kulat yang menggunakan keseluruhan sumber nitrogen dengan kadar yang lebih perlahan (1B4, 2B1, 2B2, K6, SK4, SK12 dan SK24).

Jadual 1 Profil asid lemak dan kandungan lipid pencilan-pencilan kulat. Setiap pencilan kulat dipertumbuhkan selama 120 jam dengan goncangan pada 250 rpm pada suhu 30°C

Pencilan	8 : 0	Asid lemak (% dari asid lemak total)								Lipid (% w/w, biojisim)
		10 : 0	12 : 0	14 : 0	16 : 0	18 : 0	18 : 1	18 : 2	18 : 3	
SK3	1.3	2.6	2.4	2.1	20.2	16.3	44.8	9.2	NIL	31
SK4	NIL	1.3	1.3	tr	27.1	7.2	43.7	19.4	NIL	7.4
SK6	NIL	NIL	0.2	0.4	22.3	8.5	58.4	10.2	NIL	15
SK7	1.4	2.9	3.1	ND	20.7	11.3	28.4	30.8	NIL	19
SK8	tr	tr	tr	0.6	12.4	23.6	47.4	7.3	6	30
SK12	NIL	15	15.8	tr	20.6	26.1	22.5	NIL	NIL	3.8
SK13	2.3	3.8	3.6	tr	25	12.5	26.4	26.5	NIL	12.1
SK14	3.6	2.9	5.5	tr	23.5	13	34.2	14.2	NIL	3
SK22	1.2	1.9	2.1	2.1	20.4	11.4	43.4	4.6	7.6	20
SK24	1.2	2	1.9	2.2	22.6	8.9	38.1	21.9	NIL	4.5
2A1	tr	tr	tr	tr	17	12.7	54	9.7	6.9	32
DR	NIL	NIL	tr	1.6	21	14.5	46.7	7.6	5.4	30
1A	tr	tr	tr	tr	35.6	6.2	39.8	18.5	NIL	15
1B1	NIL	5.3	ND	0.5	27.4	12.3	28.1	22.3	NIL	40
1B2	tr	tr	2.6	tr	19.6	12.9	32.2	32.6	NIL	4.5
K1	NIL	NIL	0.2	0.5	24.2	14.5	38.4	22	NIL	8
K2	NIL	NIL	NIL	NIL	20.2	22.4	42.4	14.9	NIL	16
K3	tr	tr	tr	tr	17.1	12.1	46.8	10.5	13.5	8.3
K4	NIL	NIL	NIL	NIL	21.7	18	18.1	29.3	NIL	27
K5	tr	tr	tr	tr	22.2	17.1	48.1	12.6	NIL	19
K6	NIL	NIL	10.4	8.5	17.6	22	35.4	6.1	NIL	6

tr : amaun surih
NIL : tidak hadir

Jadual 2 Perbandingan penghasilan biojisim, lipid dan GLA bagi pencilan-pencilan kulat

Kulat	Biojisim (g/l)	T_{A(j)}	G_A (g/l)	Y_B (g/g) glukosa terguna)	Y_L (g/g) glukosa terguna)	Y_{GLA} (g/g) glukosa terguna)	C_{GLA} (g/l)
SK3	8.42	48	9.36	0.41	0.13	NIL	NIL
SK4	9.66	72	0	0.32	0.02	NIL	NIL
SK6	6.5	48	3.3	0.24	0.036	NIL	NIL
SK7	7.9	48	4.1	0.3	0.06	NIL	NIL
SK8	4.8	60	3.3	0.18	0.053	0.0032	0.09
SK12	8.59	72	5.46	0.35	0.01	NIL	NIL
SK13	10.0	40	0	0.33	0.04	NIL	NIL
SK14	12.12	48	0	0.4	0.01	NIL	NIL
SK22	7.54	48	0.699	0.26	0.05	0.0039	0.11
SK24	9.04	72	0.525	0.31	0.01	NIL	NIL
2A1	12.90	40	0	0.43	0.14	0.0096	0.29
DR	12.8	15	0.4	0.43	0.13	0.007	0.2
1A	5.9	24	5.33	0.24	0.04	NIL	NIL
1B1	6	24	5.3	0.24	0.097	NIL	NIL
1B2	6.4	72	8.72	0.3	0.01	NIL	NIL
K1	9.78	64	0	0.33	0.03	NIL	NIL
K2	5.31	48	0	0.18	0.03	NIL	NIL
K3	5.2	48	7.566	0.23	0.018	0.0025	0.056
K4	9.86	48	0	0.33	0.09	NIL	NIL
K5	12	24	0	0.4	0.07	NIL	NIL
K6	10.22	>96	8.615	0.48	0.03	NIL	NIL

T_A: masa kehabisan ammonium tartarat

G_A: kepekatan glukosa akhir

Y_B: Penghasilan biojisim

Y_L: Penghasilan lipid

Y_{GLA}: Penghasilan GLA

C_{GLA}: Kepekatan GLA

Kesemua kultur yang menghasilkan lebih daripada 20% lipid (w/w, biojisim) (SK3, SK8, SK22, 2A1, DR, 1B1 dan K4) menunjukkan berlakunya kehabisan sumber nitrogen di dalam medium sebagai faktor penting di dalam memulakan tapakjalan sintesis lipid di dalam mikroorganisma oleaginus. Penghasilan lipid yang melebihi 20% (w/w, biojisim) hanya akan terjana sekiranya keadaan ini wujud di awal fasa eraman [5].

Daripada kesemua pencilan yang didapati, hanya 5 pencilan sahaja yang dikesan menghasilkan GLA, iaitu SK8, SK22, 2A1, DR, dan K3, dengan penghasilan 6%, 7.6%, 6.9%, 5.4% dan 13.5% daripada asid lemak total masing-masing. Kelima-lima pencilan tersebut yang menunjukkan penghasilan lipid yang berbeza, iaitu 30%, 20%, 32%, 30% dan 8% lipid total (w/w, biojisim), masing-masing. Kandungan GLA bagi pencilan K3 adalah setara dengan kandungan GLA di dalam minyak 'Evening Primrose', yang mengandungi 8%-12% GLA dari asid lemak total, yang digunakan pada masa ini secara komersil [5]. Walau bagaimanapun, nilai tersebut lebih rendah daripada yang dilaporkan di dalam *Mucor circinelloides*, yang menghasilkan 15%-18% GLA dari asid lemak total [5]. Tiada asid α -linolenik (18:3, n-3) dikesan di dalam kelima-lima kulat yang mana asid lemak ini dilaporkan hadir didalam hampir kesemua minyak dari biji tumbuhan, yis dan kulat [5].

Kesemua pencilan menunjukkan pertumbuhan yang baik di dalam medium yang digunakan di mana penghasilan biojisim yang tertinggi ditunjukkan oleh pencilan K6 iaitu 0.48 g/g glukosa (Jadual 2). Pencilan 2A1 pula menunjukkan penghasilan lipid yang tertinggi, iaitu 0.14 g/g glukosa. Antara kelima-lima pencilan yang menghasilkan GLA pula, 2A1 menunjukkan nilai yang tertinggi bagi penghasilan GLA (0.0096 g/g glukosa) dan lipid (0.14 g/g glukosa) (Jadual 2).

4.0 KESIMPULAN

Kelima-lima pencilan kulat yang menghasilkan GLA khususnya K3, adalah sesuai untuk ditingkatkan tahap penghasilannya. Pencilan 2A1 menunjukkan penghasilan lipid dan GLA yang tertinggi, iaitu (0.14 dan 0.0096 g/g glukosa, masing-masing). Kesemua pencilan yang dikaji secara amnya menunjukkan persamaan dari segi profil asid lemak kecuali SK12, yang menunjukkan penghasilan 10:0 dan 12:0 yang tinggi (15%) dan tiada 18:2 dapat dikesan, sementara K6 pula mempunyai peratusan 12:0 yang tinggi (10.4%).

5.0 PENGHARGAAN

Pengarang mengucapkan ribuan terima kasih kepada Universiti Kebangsaan Malaysia yang telah memperuntukkan geran penyelidikan UKM B/3/99 dan juga Kementerian Kewangan [geran IRPA (02-09-09-0109)]. Penghargaan juga diberikan kepada ahli Kumpulan Bioteknologi Industri (KBTI) UKM khususnya yang terlibat dalam kajian ini.

RUJUKAN

- [1] Ratledge, C. 1987. Lipid Biotechnology: A Wonderland for Microbial Physiologist. *JAACS*. 64: 1647 – 1656.
- [2] Horrobin, D. F. 1979. Schizofrenia: Reconciliation of the Dopamine, Prostaglandin and Opioid Concepts and the Role of Pineal. *The Lancet*. 1: 529 – 531.
- [3] Jantti, J., E. Seppala, H. Vapaatalo dan H. Isomaki. 1989. Evening Primrose Oil and Olivein Treatment of Rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol*. 8: 238 – 244.
- [4] Yamada, H., S. Shimizu, Y. Shimen, H. Kawashima dan K. Akimoto. 1989. Biotechnological Processes for Production of Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Dispersion Sci. Technol*. 10: 561 – 579.
- [5] Ratledge, C. 1997. Microbial Lipids. Dalam *Biotechnology*. 7: 133 – 197. Germany:VCH.
- [6] Kendrick, A. and C. Ratledge. 1992. Desaturation of Polyunsaturated Fatty Acids in *Mucor circinelloides* and the Involvement of the Novel Membrane-bound Malic Enzyme. *Eur. J. of Biochem*. 209: 667 – 673.
- [7] Wynn, J. P., A. A. Hamid and C. Ratledge. 1999. The Role of Malic Enzyme in the Regulation of Lipid Accumulation in Filamentous Fungi. *Microbiology*. 145: 1911 – 1917.
- [8] Shaw, R. 1966. The Polyunsaturated Fatty Acids of Microorganisms. *Adv. Lipid Res*. 4: 107 – 174.
- [9] Ratledge, C. 1993. Single cell oils – Have They a Biotechnological Future? *Trends in Biotechnology*. 11: 278 – 284.