

## ЛИПИДЕН ПРОФИЛ НА БИОМАСА ОТ ЩАМ *SPOROBOLOMYCES SALMONICOLOR AL<sub>1</sub>*

С. Димитрова\*, К. Павлова\*\*, Л. Луканов\*

\*Медицински университет – Пловдив, Фармацевтичен факултет,  
катедра „Химия и биохимия“

\*\*Институт по Микробиология – БАН,  
секция „Микробен биосинтез и биотехнологии“

### ABSTRACT

The composition of lipids and other lipophilic compounds as  $\alpha$ -tocopherol, ergosterol,  $\beta$ -carotene, coenzyme Q<sub>10</sub> from biomass of psychrophilic yeast strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL<sub>1</sub> was studied. The strain was cultivated under different conditions – at 6°C on malt slant agar for 14 days and at 22°C for 120 hours in batch fermentation carried out in a laboratory bioreactor.

The influence of different grow conditions on synthesized quantities of biologically active substances and production of biomass was determined.

*Key words: Sporobolomyces salmonicolor AL<sub>1</sub>, Coenzyme Q<sub>10</sub>,  $\beta$ -carotene*

### УВОД

Много микроорганизми (алги, бактерии, плесени и дрожди) синтезират мазнини по време на нормалния клетъчен метаболизъм. Особен интерес обаче представляват онези микроорганизми, чиито клетки едновременно с преимуществено синтезираните ненаситени мастни киселини продуцират и Коензим Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>). Поради това от биомасата с еднократна екстракция може да се получи евтин продукт, който да съдържа и двата компонента и директно да бъде използван като фуражна добавка (1, 2).

Предлагат се много търговски продукти, които са сбор от липиди и природни антиоксиданти като хранителни добавки. Състава, чистотата и източника на получаване на всеки от компонентите може да бъде много различен и трябва да бъде строго контролиран, за да се гарантира желаните ефект. Не са много съобщенията в литературата за микроорганизми, които да продуцират едновременно CoQ<sub>10</sub>, полиненаситени мастни киселини и каротеноиди – вещества с добре позната физиологична активност (3,4,5). Rick Y. (6) патентова процедура за култивиране на дрождевия щам *Yarrowia lipolytica* и получаване на споменатите вещества от неговата биомаса.

Въз основа на досегашните ни изследвания върху синтеза на биологично-активни вещества от психрофилни дрожди се оформи целта на настоящата работа – определяне на липиди и съпътстващи ги вещества в биомасата на щам *Sporobolomyces salmonicolor* AL<sub>1</sub>, култивиран при различни условия.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Микроорганизъм

Щам *Sp. salmonicolor* AL<sub>1</sub> е изолиран от почвена проба от остров Ливингстон – Антарктида и е селектиран като продуцент на полизахарида глюкоманан (7).

### 2. Хранителни среди и условия на култивиране

#### 2.1. Повърхностно култивиране при температура 6°C.

Повърхностното култивиране се провежда на твърда хранителна среда със състав (g/L): малцов екстракт – 20.0 и агар – 20.0 в петрита. Стерилните петрита се посяват с 1ml суспензия от изследваните дрожди. Култивирането се извършва в хладилна камера при температура 6°C в продължение на 14 дни.

#### 2.2. Дълбочинно култивиране при температура 22°C.

Ферментационната среда съдържа, (g/L) – захароза – 40, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.5, NaCl – 0.1, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0.01, дрождев екстракт – 1.0. Началната стойност на рН е 5.3 и средата е стерилизирана при 112 °C за 30 min. Дълбочинното култивиране се провежда в 7 литров лабораторен био-реактор (Sartorius) с работен обем от 5L и протича при аерационен поток от 0.5 v/v/m и разбъркване 400 rpm при 22°C в продължение на 120 часа.

След завършване на ферментацията биомасата се центрофугира, двукратно се промива с дестилирана вода и се изсушава чрез лиофилизация.

### 3. Екстракция и анализ на ергостерол, β-каротен и CoQ<sub>10</sub>.

Екстракцията на ергостерол, β-каротен и CoQ<sub>10</sub> се извършва по методика, описана в предишно изследване (8).

Хроматографското определяне се провежда на HPLC система Varian ProStar с PDA детектор. Използва се колона Microsorb-MV C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm). Подвижната фаза включва метанол, n-хексан, i-пропанол при съотношение 70:25:5 v/v (A) и ацетонитрил (B) в градиентен режим от 30A:70B до 90A:10B, а скоростта на потока е 1 ml/min. Всички разтворители са доставени от Labscan (Ireland). Ергостеролът се детектира при 282 nm, β-каротенът при 450 nm, а CoQ<sub>10</sub> при 270 nm.

Идентификацията на веществата се извършва по времената на задържане на стандартите ергостерол, β-каротен и CoQ<sub>10</sub> (Sigma). Количественото определяне се осъществява по метода на абсолютната калибровка. За обработка на

данните е използван софтуер Star Chromatography Workstation Version 6.30 (build 5).

#### 4. Екстракция и определяне на количеството липиди.

Липидите се екстрахират в апарат на Соксле с *n*-хексан в продължение на 8 часа. След изпаряване на разтворителя на ротационен вакуумизпарител екстрактът се претегля.

Мастнокиселинният състав на триацилглицеролите се определя чрез капилярна газхроматография на техните метилови естери (9) на GC-система Pye Unicam 304, снабдена с пламъчно-йонизационен детектор и 30 m капилярна колона Innowax (Scotia Pharmaceuticals Ltd). Преестерификацията на триацилглицеролите до метилови естери е извършена по методика на Metcalfe L. и Wang. C. (10).

Фосфолипидите се екстрахират от дрождевата биомаса с  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1) по стандартна процедура, а фосфолипидните компоненти се разделят чрез двупосочна тънкослойна хроматография на Silica gel 60 G "Merck" (11). Количественото им определяне става спектрофотометрично при 700 nm (12). Токофероловият състав се определя директно в липидната фракция (13) на HPLC система "Merck-Hitachi" с флуоресцентен детектор "Merck-Hitachi" F-1050, колона с размери 250x4 mm с неподвижна твърда фаза "Nucleosil" Si 50-5 и подвижна фаза *n*-хексан : диоксан (96:4) (Merck), със скорост 1 ml/min.

#### 5. Статистически анализ

Статистическата обработка на резултатите е направена с SPSS (ver.11), при ниво на значимост  $\alpha < 0.05$ . Използван е вариационен анализ (ANOVA) като сравнението между групите е направено с теста на Tukey-Kramer. Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  стандартно отклонение.

### РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При култивирането на щам *Sp. salmonicolorAL<sub>1</sub>* за биосинтез на екзополisahариди биомасата се явява страничен продукт. Тя представлява интерес като носител на биологичноактивни вещества и е обект на нашето изследване. По този начин се използват възможностите на щама за екзо- и ендогенно продуциране на вещества с изразена физиологична активност.

Щамът е култивиран дълбочинно и повърхностно, на различни среди и температури, за да се проследи влиянието на тези фактори върху липидния му профил.

При култивиране на щам *Sp. salmonicolorAL<sub>1</sub>* на твърда среда, което се провежда при 6°C, общото липидно съдържание е приблизително два пъти по-високо в сравнение с дълбочинното при 22°C (табл. 1). Това потвърждава факта, че оцеляването на психрофилните дрожди при екстремално ниски температури е свързано с натрупване на липиди и въглехидрати за сметка на подтискане синтеза на протеини и нуклеинови киселини (14).

Анализът на мастнокиселинния състав на триацилглицеролите в липидната фракция показва, че ненаситените киселини преобладават в двата случая. При повърхностното култивиране те са 65.2%. При дълбочинното са 58.0%, от които 57.7% се падат на олеиновата, а от палмитоолеиновата и линоловата се детек-

тират следи и вероятно това се дължи на по-високата температура, при която се е развивал щама (15).

**Таблица 1.** Съдържание на липиди и липидни компоненти в биомаса от щам *Sp. salmonicolorAL<sub>1</sub>*, култивиран при различни условия

Вещества \ Начин на култивиране	Повърхностно	Дълбочинно
<b>Липиди</b> в суха биомаса, %	6.5±0.1	3.8±0.1
<b>Фосфолипиди</b> в суха биомаса, mg/g	5.9±0.3	2.1±0.1
Ергостерол в суха биомаса, mg/g	10.1±0.5	6.9±0.3
α-токоферол в суха биомаса, μg/g	4.3±0.2	-
β-каротен в суха биомаса, μg/g	89.9±4.3	68.4±3.5
Коензим Q <sub>10</sub> в суха биомаса, μg/g	107.6±8.8	292.0±12.5
<b>Мастни киселини*</b> , % (W/V) ± 0.1		
Миристинова (C <sub>14:0</sub> )	2.1	2.0
Палмитинова (C <sub>16:0</sub> )	30.2	33.0
Палмитоолеинова (C <sub>16:1</sub> )	2.3	следи
Маргаринаова (C <sub>17:0</sub> )	0.1	0.2
Стеаринова (C <sub>18:0</sub> )	2.2	6.4
Олеинова (C <sub>18:1</sub> )	59.8	57.7
Линолова (C <sub>18:2</sub> )	2.3	следи
Линоленова (C <sub>18:3</sub> )	0.8	0.3
Арахинова (C <sub>20:0</sub> )	0.2	0.4
Ненаситени мастни киселини	65.2	58.0
<b>Фосфолипиди**</b> , % (W/V) ± 0.1		
Фосфатидилхолин	48.4	26.6
Фосфатидилетаноламин	26.4	25.0
Фосфатидни киселини	5.5	14.1
Лизофосфатидилхолин	7.7	15.6
Лизофосфатидилетаноламин	7.6	7.8
Дифосфатидилглицерол	2.2	6.3
Фосфатидилсерин	2.2	4.6

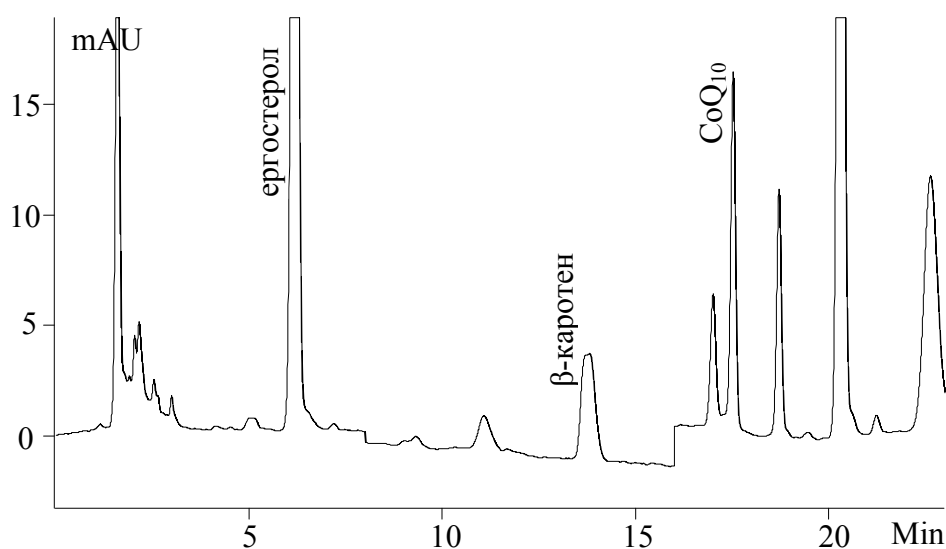
\* – в липидната фракция ; \*\* – във фосфолипидната фракция

Резултатите са осреднени от три стойности.

Фосфолипидното съдържание в биомасата, получена при ниска температура и повърхностно култивиране е 3 пъти повече в сравнение с тази, получена при по-висока температура и дълбочинно. Същата закономерност се наблюдава и относно количеството ергостерол, което е 1.5 пъти повече. Това е следствие

от по-високото общо липидно съдържание в биомасата на повърхностно култивирувания щам.

Микроорганизмите, които синтезират в по-голяма степен ненаситени мастни киселини са си изградили механизъм за защита от окислението им чрез биосинтез на протективни вещества като токофероли, каротеноиди, CoQ<sub>10</sub> (6). Изследваният от нас щам *Sp. salmonicolor AL<sub>1</sub>* притежава тази способност. На фиг.1 е показана хроматограма на екстракт от биомасата му с детектирани ергостерол,  $\beta$ -каротен и CoQ<sub>10</sub>. Един от критериите за идентификация на дрожди според определителя на Kurtzman и Fell (16) е присъствие на CoQ<sub>10</sub> в биомасата им.



**Фигура 1.** Хроматограма на екстракт от биомаса на *Sp. salmonicolor AL<sub>1</sub>*

Количеството CoQ<sub>10</sub> в биомасата на дълбочинно култивирувания щам е 2.6 пъти повече от това получено при повърхностното му култивиране, докато при  $\beta$ -каротена е обратно.  $\alpha$ -токоферол се открива в минимално количество единствено в биомасата на повърхностно култивирувания щам. Следователно не само температурата е фактор за натрупването на дадено вещество, а и достъпът на кислород по време на ферментацията. Според тази закономерност могат да бъдат подбрани такива условия за развитие на щама, при които да се получи биомаса, богата на желаните компоненти.

В заключение, тъй като споменатите вещества са липорастворими, при екстракция с неполярна разтворител може да се получи микробно масло богато на антиоксиданти, което да намери приложение в козметиката или като хранителна добавка.

Изследването е финансирано по проект ДТК 02/46, Фонд „Научни изследвания“ към МОН.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Burja A., Radianingtyas H., A. Windust, Barrow C. (2006) Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 1161-1169
2. Armenta R., Burja A., Radianingtyas H., Barrow C. (2006) Critical Assessment of Various Techniques for the Extraction of Carotenoids and Co-enzyme Q<sub>10</sub> from the *Thraustochytrid* Strain ONC-T18, *J. Agric, Food Chem.*, 54, 9752-9758
3. Turunen M., Olsson J., Dallner G. (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1660, 171-199
4. Shimokawa, H., (2001) Beneficial effects of eicosapentaenoic acid on endothelial vasodilator function in animals and humans. *World Rev. Nutr. Diet*, 88:100-108
5. Dutta D., Chaudhuri U., Chakraborty R. (2005) Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *Afr J. Biotech.*, 4, 1510-1520
6. Rick W. Ye USPC: 2009/424941
7. Pavlova K., Koleva L., Kratchanova M., Panchev I. (2004) Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast. *World J. Microbiol. & Biototechnology*. 20, 435-439,
8. Dimitrova S., Pavlova K., Lukanov L., Zagorchev P. (2010) Synthesis of Coenzyme Q<sub>10</sub> and  $\beta$ -carotene by yeasts isolated from Antarctic soil and lichen in response to ultraviolet and visible radiations, *Appl Biochem Biotechnol*, 162, 795-804
9. ISO 5509 (2000): Animal and vegetable fats and oils. Determination of fatty acid methyl esters by gas chromatographic method.
10. Metcalfe L., Wang. C. (1981) *J. Chromatogr. Sci.*, 19, 530-534
11. Schneiter R., Daum G. (2005) Extraction of yeast lipids. Analysis of yeast lipids. *Methods in Molecular Biology*, 313, Yeast protocols: Second Ed., 41-46, 75-84
12. Beshkov M., Ivanova L. (1972) Determination of phospholipids in lipid mixtures. *Sci. Works of High Inst. Food and Flavour Ind.*, Plovdiv, 20, 231-234
13. ISO9936 (1997): Determination of tocopherols and tocotrienols by HPLC method.
14. Koleva L., Pavlova K., M. Zlatanov (2003-2004) Effect of temperature and sodium chloride on the biomass and fatty acid composition of Antarctic Yeast strain *Spocobolomyces roseus* AL<sub>8</sub>. , Bulgarian Antarctic Research, *Life Sciences*, 4
15. Chattopadhyay M. (2006) Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *J. Biosci.* , 31, 157-165
16. Kurtzman C., Fell J. (1998) *The Yeasts: A Taxsonomic Study*, 4<sup>th</sup> and Elsevier Scientific Publisher, Amsterdam (Netherlands)