

ЕКСТРАКЦИЯ НА ЛИПИДНИ КОМПОНЕНТИ ОТ БИОМАСА НА ПСИХРОФИЛНИ ДРОЖДИ

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

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

**Институт по Микробиология – БАН,
Лаборатория по приложни биотехнологии

ABSTRACT

A method for the extraction of β -carotene, coenzyme Q_{10} and ergosterol from biomass of psychrophilic yeast strains was described. The investigation substances were derived from the *Sporobolomyces salmonicolor* AL_1 and *Cryptococcus laurentii* AS_{58} biomass with n-hexan:acetone at a ratio of 1:1 at room temperature after two repeated extraction. This combination of solvents was better for simultaneously extraction of mentioned substances than each of n-hexan, acetone, CH_3OH , i-PrOH, EtOH and CH_2Cl_2 .

Key words: *Sp. salmonicolor* AL_1 , *Cr. laurentii* AS_{58} , Coenzyme Q_{10} , β -carotene, ergosterol

УВОД

Липидни компоненти са липоразтворимите витамини А, D, Е, К, коензим Q_{10} (CoQ_{10}) и стеролите. Те участват в състава на мембранните

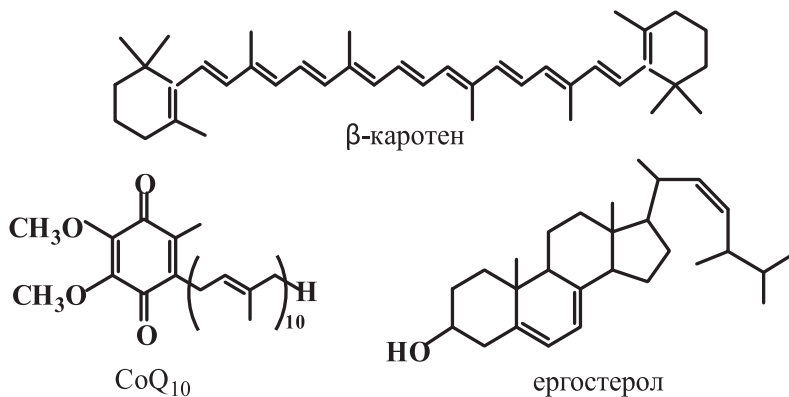
липиди заедно с висшите мастни киселини, триацилглицеролите, фосфолипидите и сфинголипидите.

Растения и микроорганизми синтезират предимно каротеноиди от тетраерпенов тип, най-широко разпространен от които е β -каротенът-прекурсор на витамин А. Съдържа се в жълто и оранжево оцветени плодове и зеленчуци (1, 2). Продуцира се и от гъби, бактерии, алги, дрожди (3, 4). Той е известен антиоксидант, който намалява клетъчни или тъканни увреждания, предизвикани от свободни радикали (6, 7, 8). Използва се в хранителната и фуражната промишленост като оцветител на хранителни продукти и аквакултури (5).

В човешкия организъм и в клетките на някои микроорганизми (бактерии-*Agrobacterium*, *Rhodobacter*; *Paracoccus* и дрожди-*Candida*, *Rhodotorula*, *Saitoella*) се синтезира CoQ_{10} (9). Той участва в митохондриалната дихателна верига. Основен компонент е в АТФ-генериращия стадий на процеса на окислителното фосфорилиране и антиоксидант, предотвратяващ липидното пероксидиране (10).

Стеролите по произход биват зоо-, фито – и микостероли. Представяват едновалентни полициклични алкохоли от клас стероиди. В дрождите преобладава главно ергостерол, който се използва като източник за получаването на витамин D_2 и суровина за синтез на стероидни хормонални препарати (11, 12).

Дрожди от родовете *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* имат способността да продуцират тези биологичноактивни вещества (11, 13, 16), структурите на които са показани на фиг. 1.



Фигура 1. Структури на β -каротен, CoQ_{10} и ергостерол

В литературата са посочени редица методи за екстракция на тези вещества от различни обекти, например каротеноиди от растителни (14) или биологични (15) проби, каротеноиди и CoQ_{10} от биомаса на микроорганизми (16) или каротеноиди и ергостерол от промишлени дрожди (11). Като екстрагенти са цитирани ацетон, n-хексан, метанол, i-пропанол, етанол, дихлорметан, диметилсулфоксид или комбинация от тях (17). Методите за екстракция на биологичноактивни вещества от биомаса на микроорганизми се осъществява след завършване на ферментационния процес и отделянето ѝ от супернатанта, изсушаване и следваща екстракция с различни разтворители в зависимост от това кое от веществата се цели да бъде извлечено максимално. Могат да се варират и условията на екстракция: време, температура, предварително третиране на ферментационната среда и др. (18).

Целта на настоящата работа е да се изследва комбинация от разтворители, която позволява най-пълно, бързо и едновременно екстрахиране на β -каротен, CoQ_{10} и ергостерол от биомасата на психрофилни дрожди.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Микроорганизми, хранителна среда и условия на култивиране

Щамовете *Sp. salmonicolor* AL₁ и *Cr. laurentii* AS₃₈ са изолирани от почвени проби от територията на българската база на остров Ливингстон – Антарктида.

Ферментационната среда съдържа, (g/L) – захароза – 40, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.5, KH_2PO_4 – 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, NaCl – 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 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 биореактор (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.

2. Екстракция и HPLC – анализ на ергостерол, β -каротен и CoQ_{10}

Към 20mg много добре стрита лиофилизирана биомаса се прибавят 2 ml от всеки от разтворителите n-хексан, ацетон, дихлорметан,

i-пропанол, етанол, метанол и комбинация от n-хексан/ацетон в съотношение 1:1 и се разбърква на Vortex 2 min, след което се центрофугира 5 min при 3000 g. Течната фаза се отделя и се изпарява под вакуум. Температурата е съответно 50°C за хексановия, ацетоновия, метаноловия и дихлорметановия и 70°C за етаноловия и изопропаноловия екстракти. По този начин се провеждат три последователни екстракции. Полученият сух остатък се разтваря в 1ml подвижна фаза и се анализира по HPLC-метод, описан в предишна публикация (19).

3. Статистически анализ

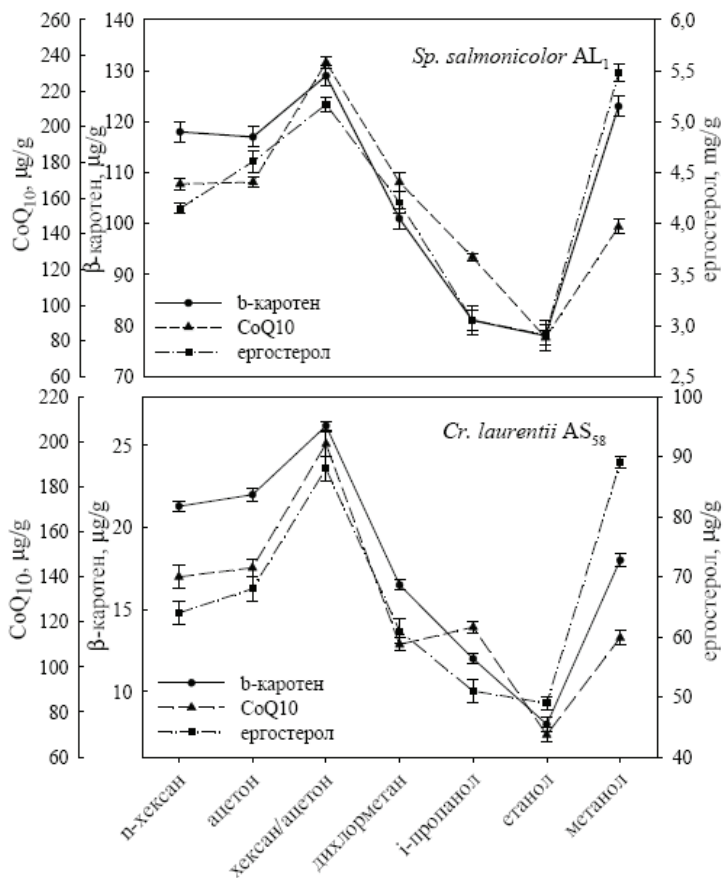
Статистическата обработка на резултатите е направена с SPSS (ver.11), при ниво на значимост $\alpha < 0.05$. Използван е вариационен анализ (ANOVA) като сравнението между групите е направено с теста на Tukey-Kramer. Резултатите са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Използвани са биомаси на *Sp. salmonicolor* AL₁, селектиран като активен продуцент на екзополisahарид със значимо приложение в козметичната промишленост (20) и на *Cr. laurentii* AS₅₈ – проучван за синтез на биологичноактивни вещества (19).

На фиг. 2 са показани количествата екстрахирани ергостерол, β -каротен и CoQ₁₀ с помощта на различни разтворители от биомасите. Установи се, че всеки от тях екстрахира в различна степен изследваните вещества в зависимост от тяхната природа.

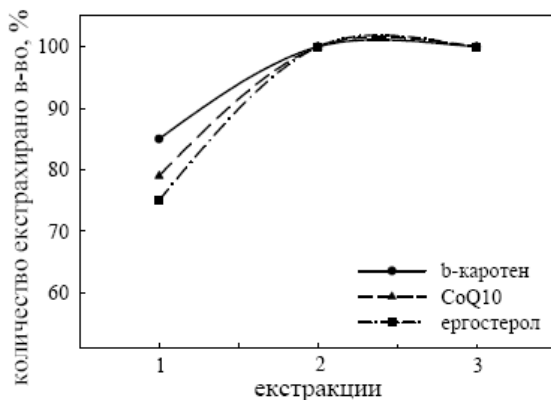
Максимално извличане на β -каротен се постига с комбинацията n-хексан/ацетон в съотношение 1:1 съответно 129.2 \pm 7.3 μ g/g суха биомаса за *Sp. salmonicolor* AL₁ и 26.2 \pm 0.9 μ g/g за *Cr. laurentii* AS₅₈. Подобни стойности се получават при екстракция с метанол (123.0 \pm 6.9 μ g/g и 18.3 \pm 0.7 μ g/g) и най-ниски с етанол. Комбинацията n-хексан/ацетон екстрахира в най-голяма степен и CoQ₁₀ съответно 236.1 \pm 12.1 μ g/g и 198.6 \pm 9.3 μ g/g. Ергостерол се екстрахира еднакво с метанол и n-хексан/ацетон – 5.4 \pm 0.2 mg/g и 5.2 \pm 0.2mg/g от биомасата на *Sp. salmonicolor* AL₁ и 89.0 \pm 5.1 μ g/g и 88.0 \pm 4.9 μ g/g от биомасата на *Cr. laurentii* AS₅₈. Всеки от разтворителите n-хексан и ацетон приблизително в еднаква степен екстрахират и трите вещества, но заедно в съотношение 1:1 дават много по-добър резултат. Незадоволителни резултати се получават при екстракция с дихлорметан, i-пропанол и етанол.



Фигура 2. Количества β -каротен, CoQ_{10} и ергостерол, получени при екстракция с различни разтворители

Проведени бяха три последователни екстракции за по-пълно извличане на веществата. На фиг. 3 е дадена степента на екстракция на β -каротен, CoQ_{10} и ергостерол от биомаса на *Sp. salmonicolor* AL₁ с п-хексан/ацетон 1:1. При първата се постига екстракция от 85% на β -каротен или 109.7 $\mu\text{g/g}$, 79% на CoQ_{10} или 186.4 $\mu\text{g/g}$ и 75% на ергостерол или 3.9 mg/g. При втората се получават съответно 129.2

$\mu\text{g/g}$, $236.1 \mu\text{g/g}$ и 5.2 mg/g , които стойности се потвърждават и при третата екстракция. Следователно двукратна екстракция е достатъчна за максималното извличане на изследваните вещества.



Фигура 3. Степен на екстракция на β -каротен, CoQ_{10} и ергостерол от биомаса на *Sp. salmonicolor* AL_1 с *n*-хексан/ацетон 1:1

Проучването е финансирано по проект ДТК 02/46, Фонд, „Научни изследвания“ МОНТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sass-Kiss A., Kiss J., Milotay P., Kerek M., Toth-Markus M. (2005) Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*, 38, 1023–1029
2. Melerndez-Marturnez A., Vicario I., Heredia F. (2007) Provitamin A carotenoids and ascorbic acid contents of the different types of orange juices marketed in Spain. *Food Chemistry*, 101 177–184
3. Ben-Amotz A. (1998) Case study: *Dunaliella* algal-derived β -carotene. *Phytochemicals*, 113–128
4. Aksu Z., Eren A. (2005) Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as carbon source. *Process Biochemistry*, 40, 2985–2991
5. Frengova G., Beshkova D. (2009) Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia* yeasts of biotechnological importance. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 163–180
6. Henneckens C. (1997) β -carotene supplementation and cancer prevention. *Nutrition*, 13, 697–699.
7. Wang X. (1994) Absorption and metabolism of β -carotene. *J. Am. Coll. Nutr.*, 13, 314–325.
8. Edge R., McGarvey D., Truscott T. (1997) The carotenoids as antioxidants – a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41, 189–200
9. Kawamukai M. (2009) Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q₁₀ by yeasts and other organisms. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 53, 217–226
10. Frederick L., Crane D. (2001) Biochemical Functions of Coenzyme Q₁₀. *Journal of the American College of Nutrition*, 20, 591–598
11. Marova I., Crarnecka M., Halienova A., Breierova E., Koci R. (2010) Production of carotenoid/ergosterol-supplemented biomass by red yeast *Rhodotorula glutinis* grown under external stress. *Food Technol Biotechnol* 48, 56-61
12. Tuller G., Nemeč T., Hrastnik C., Daum G. (January 1999) Lipid composition of subcellular membranes of an FY 1679 derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Lipid Analysis-Intermediate Report, S. cerevisiae* – EUROFAN 2 – Node N4

13. Dimitrova S., Pavlova K., Lukanov L., Savova I. (2008) Chemical composition of lipids and other lipophilic compounds from antarctic yeasts strains. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 61, 481–486
14. Hui Xu, Li Jia (2009) Capillary liquid chromatographic analysis of fat-soluble vitamins and β -carotene in combination with in-tube solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography B*, 877, 13–16
15. Qing Su, Rowley K., Balazs N. (2002) Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B*, 781, 393 – 418
16. Yurkov A., Vustin M., Tyaglov B., Maksimova I., Sineokiy S. (2008) Pigmented basidiomycetous yeasts are a promising source of carotenoids and Ubiquinone Q₁₀. *Microbiology*, 77, 1–6
17. Rodriguez-Amaya D. B. (2001) A guide to carotenoid analysis in foods. International Life Science Institute Press, Washington
18. Roukas T., Mantzouridou F. (2001) An improved method for extraction of β -carotene from *Blakeslea trispora*. *Appl Biochem Biotechnol*, 90, 37 – 45
19. Dimitrova S., Pavlova K., Lukanov L., Zagorchev P. (2010) Synthesis of Coenzyme Q₁₀ and β -carotene by yeasts isolated from Antarctic soil and lichen in response to ultraviolet and visible radiations. *Appl Biochem Biotechnol*, 162, 795–804
20. Kuncheva M., Pavlova K., Panchev I., Dobрева S. (2007) Emulsifying power of mannan and glucomannan produced by yeasts. *Int J Cosmetic Science*, 29, 377–384