

ВЕТХ – ОПРЕДЕЛЯНЕ НА β -КАРОТЕН ОТ БИОМАСА НА ЩАМ *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁

С. Димитрова¹, Л. Луканов¹, К. Павлова²

¹ Медицински университет-Пловдив, катедра „Химия и биохимия“

² Институт по Микробиология – БАН,
секция „Микробен биосинтез и биотехнологии“

ABSTRACT

The psichrofile strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁ (from a soil sample of Antarctica) was grown with and without light. Third experiment was provided with addition of β -carotene preliminary fermentation in dark. A HPLC method for the quantification of β -carotene produced by strain was developed.

Keywords: Sporobolomyces salmonicolor AL₁, β -каротен, HPLC

УВОД

Каротеноидите се съдържат в много растителни и животински източници. Те притежават висока биологична активност, поради което са обект на задълбочени изследвания. Посредством антиоксидантните си свойства те предотвратяват атеросклероза, катаракта, множествена склероза – заболявания, предизвикани от действието на свободни радикали [1]. Съединенията още са туморно инхибиращи агенти [2], а също предпазват кожата от преждевременно стареене под влияние на ултравиолетовите лъчи [3].

Каротеноидите не се синтезират в организма, поради което е необходимо да се набавят чрез храната. През последните години се повиши интересът към възможностите за получаване на подходящи оцветители на база каротеноиди с биологическа стойност, които могат да се използват като хранителни и фуражни добавки. Те се продуцират от пигментообразуващи микроорганизми и за получаването им се прилагат биотехнологични решения. В литературата има съобщения за биосинтез на каротеноиди от дрожди, принадлежащи към различни родове щамове *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus* [4, 5, 6].

Известно е, че метаболитния потенциал на дрождите е свързан с получаване на ензими, витамини, полизахариди, липиди, органични киселини и

каротеноиди [7]. Продуцирането на последните позволява дрождевите биомаси да се използват като каротеноидно-протеинов комплекс към фуражи и екстрахиране на каротеноиди за хранителни добавки.

В състава на биомасата от пигментообразуващи дрожди се съдържат каротеноидите – β -каротен, торулен, торулародин и тяхното количество варира в широки граници в зависимост от щам-продуцента и условията на култивиране [8, 4, 5].

Основен метод за анализ на каротеноиди, съдържащи се в растителни, животински и микробиални обекти е ВЕТХ. Агун и James [9] описват метод за едновременно анализиране на ретиноиди, каротеноиди и токофероли извлечени от серум и тъкани на човек и плъх, а също и от домати, спанак, папая и манго. Те използват Microsorb-MV колона и C_{18} предколона, PDA детектор. Елуирането е градиентно с подвижна фаза съдържаща (А) метанол : вода : амониев ацетат и (В) метанол : дихлорметан. Осем каротеноида, сред които β -каротен са идентифицирани от Lee и колектив [10] в портокалов сок. Те използват колона C_{30} , PDA детектор и градиентно елуиране с подвижна фаза (А) ацетонитрил-метанол, (В) метилтретбутилетиер и (С) вода. ВЕТХ анализ на каротеноиди от биомаси на пет вида *Rhodotorula* предлагат Squina и колектив [11]. Davoli и колектив [8] изследват количествата продуцирани β -каротен, торулен и торулародин от червени дрожди *Rhodotorula* и *Sporobolomyces* с колона LiChrospher 100 RP-18 и подвижна фаза вода-ацетон.

Целта на настоящото изследване е количествено определяне на β -каротен от дрождеви биомаси на пигментообразуващия щам *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁, култивирани при различни условия.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Микроорганизъм

Щам *Sp. salmonicolor* AL₁ е изолиран от почвена проба от остров Ливингстон – Антарктида и е селектиран като продуцент на полизахарида глюкоманан [12]. Идентифициран е съгласно критериите в определителя на Kurtzman & Fell [13] и е регистриран в Национална Банка за Промислени Микроорганизми и Клетъчни Култури.

2. Условия на култивиране и получаване на биомаси

Хранителната среда за синтез на полимера и натрупване на биомаса от щам-продуцента съдържа в (%): захароза – 4.0, $(NH_4)_2SO_4$ – 0.25, KH_2PO_4 – 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.05, NaCl – 0.01, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0.01 и дрождев екстракт – 0.1. Началното рН на средата е 5,3. Ферментацията се провежда в Ерленмайерови колби от 50 ml при 22⁰C в продължение на 96 часа на ротационна клатачка при 220 rpm. Получени са три биомаси: биомаса 1 е синтезирана в присъствие на светлина, биомаса 2 – в отсъствие, биомаса 3 е синтезирана на тъмно с предварително прибавяне на 2 μ g/ml β -каротен в хранителната среда. Следва центрофугиране при 6000xg в продължение на 30 min. Културалната течност се

утаява за получаване на глюкоманан, а получената биомаса се пречиства и изсушава по стандартна процедура.

3. Определяне на β -каротена

Екстракцията на β -каротена се провежда със смес от хексан и ацетон в съотношение 1:1. За целта се претеглят по 0,010g съответно от биомаси 1, 2 и 3, добавят се 2 ml екстракционна смес, прехвърлят се в центрофужна епруветка. Разбъркват се 2 min на Vortex, след което се центрофугират 10 min при 3000 грм. Супернатантът се отлива в дестилационна колба, а твърдият остатък се обработва повторно по същия начин. Двата екстракта се обединяват и разтворителите се изпаряват при 50⁰C под вакуум. Полученият остатък се разтваря в 1ml от подвижна фаза А, филтрува се през микрофилтър (0,20 μ m) и се инжектира в хроматографа.

Анализирана е културалната течност на биомаса 3, към която предварително беше прибавен β -каротен. Същата се екстрахира с 10ml хексан преди и след ферментация.

Определянето се извърши с BETX – система (Varian Pro Star) с UV детектор. Използвана е колона Omni Spher5 C₁₈ (250x4,6 mm x 1,4), подвижна фаза – (А) метанол : n-хексан : изопропанол (70:25:5) и (В) ацетонитрил в градиентен режим от 30А:70В до 90А:10В и скорост на потока 1,1 ml/min. Детекцията се извърши при 450 nm. Количественото определяне става по метода на стандартната права построена по 7 разтвора с концентрации 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2 μ g/ml чист β -каротен. Като елуенти са използвани метанол, n-хексан, изопропанол, ацетонитрил суперградиент (Labskan Ltd), а β -каротен е доставен от Sigma.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

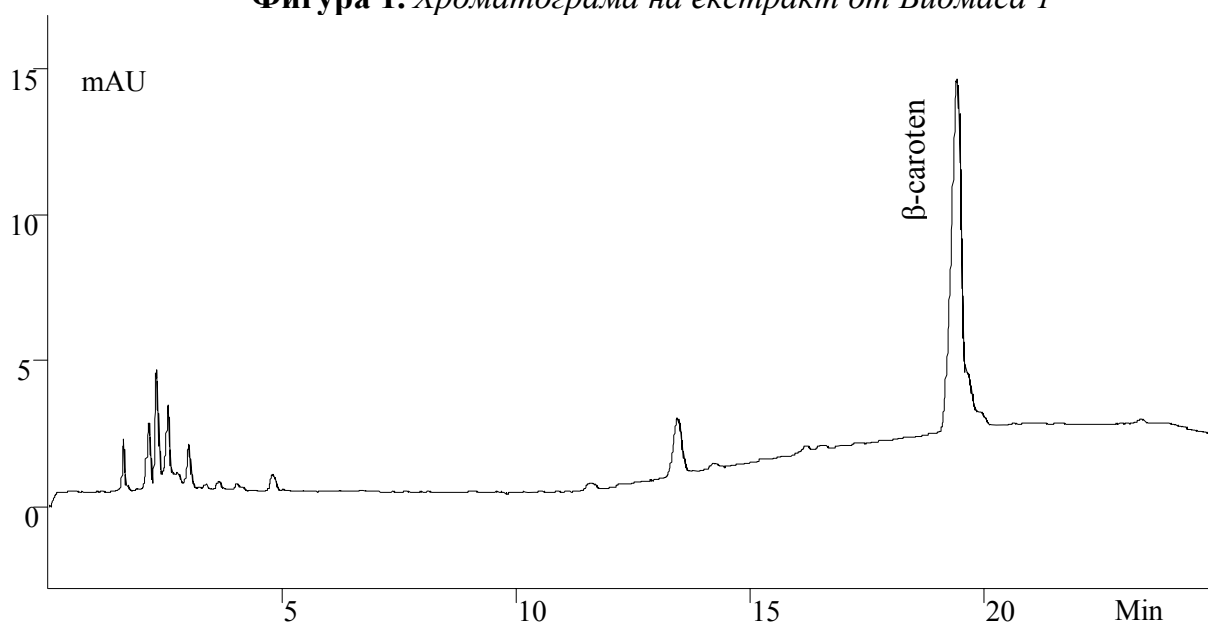
До настоящия момент биомасата, която се натрупва от щам *Sp. salmonicolor*AL₁ при синтеза на полизахарида глюкоманан не е изследвана за наличие на каротеноиди. Първите наши изследвания показаха, че при подходяща хранителна среда и различни условия на култивиране щамът натрупва каротеноидна биомаса, съдържаща различни количества β -каротен. Установено е, че в културалната течност след ферментацията не се съдържа β -каротен. Резултатите от проведените изследвания са отразени в табл. 1 и 2, а данните за хроматографския анализ са показани на фиг. 1 и 2.

Таблица 1. Съдържание на β -каротен в биомаса, синтезирана от щам *Sp. salmonicolor*AL₁ при различни условия

Биомаси	β -каротен, μ g/g с.в.
Биомаса 1	146
Биомаса 2	371
Биомаса 3	1067

Резултатите от табл. 1 показват, че определеното количество β -каротен в биомаса 1 е 2,5 пъти по-малко отколкото в биомаса 2, която е синтезирана на тъмно. Чувствителната разлика в количеството на каротена в двете биомаси, култивирани при различни условия, се дължи на действието на светлината, която подтиква синтеза му. Най-високо количество β -каротен е синтезирано в биомаса 3, което е 3 пъти повече отколкото в биомаса 2. Прибавянето на незначително количество β -каротен към хранителната среда преди ферментацията и протичането ѝ на тъмно са причина за стимулиране на неговия синтез.

Фигура 1. Хроматограма на екстракт от Биомаса 1

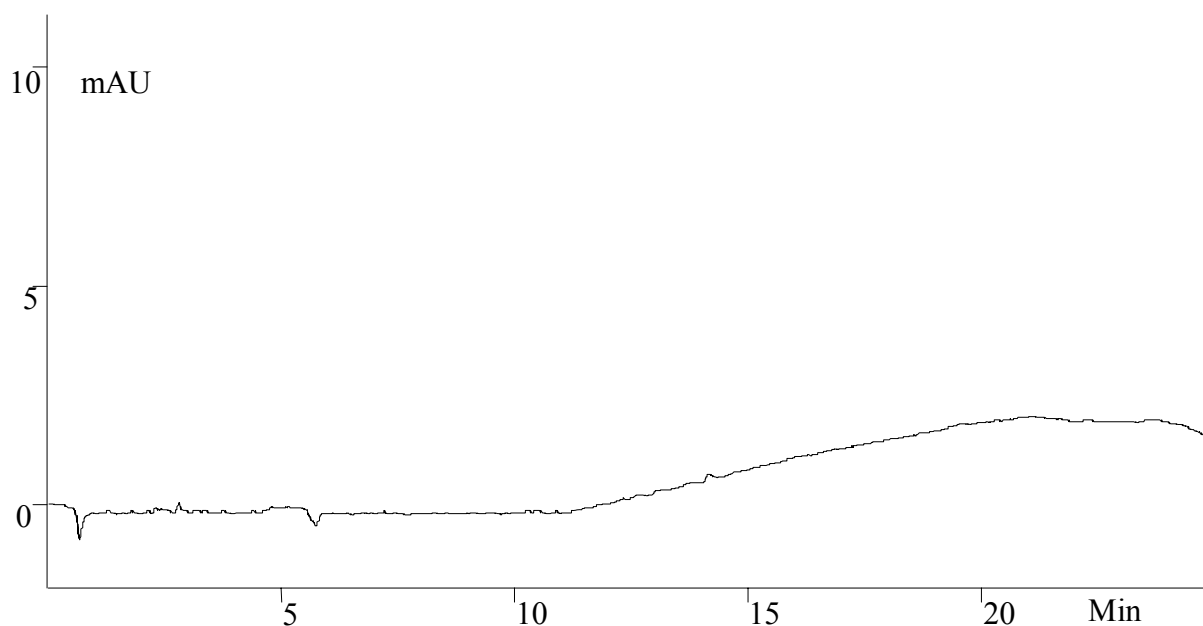


В табл. 2 е посочено количеството β -каротен, екстрахиран от хранителната среда преди ферментацията и културалната течност след ферментацията. Измереното количество β -каротен преди протичане на ферментационния процес съвпада с предварително вложеното, докато след ферментацията наличие на β -каротен не се наблюдава. Полученият резултат съвпада с направения извод, че прибавянето на β -каротен в хранителната среда стимулира неговия синтез и се явява индуктор при метаболизма на клетката.

Таблица 2. Количество β -каротен, μg в 1 ml културална течност

	β -каротен, $\mu\text{g/ml}$
Хранителна среда+щам+ β -каротен – преди ферментация	2
Културална течност – след ферментация	0

Фигура 2. Хроматограма на екстракт от културална течност на Биомаса 3



От фиг. 1 се вижда присъствието на β -каротен (детектиран при 450 nm) в екстракта от биомаса 1, а фиг. 2 показва, че същият отсъства в екстракта от културалната течност след ферментация. Данните говорят, че каротеноиди (по-специално β -каротен), продуцирани от *Sporobolomyces salmonicolor*AL₁ се натрупват единствено в неговата биомаса като и прибавеният β -каротен е усвоен от клетката. Културалната течност се използва за получаване на биополимера глюкоманан.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Edge, D.J. McGarvey, T.G. Truscott, The carotenoids as anti-oxidants – a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41, 1997, 189-200
2. Onogi N, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Fukutomi Y, Moriwaki H, Muto Y, Kojima S. Antiproliferative effect of carotenoids on human colon cancer cells without conversion to retinoic acid. *Nutr Cancer*. 1998;32(1):20-4.
3. E. A. Offord, J. Gautier, O. Avanti, C. Scaletta, F. Runge, K. Kramer, and L. A. Applegate, Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnolic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 32, No. 12, pp. 1293–1303, 2002.
4. Bizzini P. and A. Martini. 1999. Production of carotenoids by strains *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technology* 71, 41-44.
5. Bizzini P., L. Rubinstein, A. Martini. 2001. Production of yeast carotenoids by using agro-industrial by-products. *Agro-Food-Industry Hi-Tech* November /December, 7-10.

6. Tinoi T.N., R.L. Kakariyathann, R.L. Deming. 2005. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mungbean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, 40, 7 2552-2557.
7. Demain A.L., H. Phaff, C. Kurtzman; *The Yeasts, a Taxonomic Study*, C.P. Kurtzman, J.W. Fell; Academic Press, London, 1998, 13-19.
8. П. Даволи, В. А. Мирау, Р. В. С. Вебер, Каротиноиды и жирные кислоты в красных дрожжах *Sporobolomyces roseus* и *Rhodotorula glutinis*, *Прикладная биохимия и микробиология*, 2004, т.40, 4, 460-465.
9. Arun B. Barua, James A. Olson, Reversed-phase gradient high-performance liquid chromatographic procedure for simultaneous analysis of very polar to nonpolar retinoids, carotenoids and tocopherols in animal and plant samples, *Journal of Chromatography B*, 707 (1998) 69–79.
10. H.S. Lee, W.S. Castle, G.A. Coates, High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA, *Journal of Chromatography A*, 913 (2001) 371–377.
11. Squina F., A. Mercadante. 2003. HPLC analysis of carotenoids from five *Rhodotorula* strains. *Journal of pharmaceutical sciences*. 39,3, 309–318.
12. Pavlova, K., L. Koleva, M. Kratchanova, I. Panchev. Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast. *World J. Microbiol. & Biotechnol.* 20, 435-439, 2004.
13. Kurtzman C.P., J.W. Fell. 1998. *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4th ed. Elsevier Scientific Publisher, Amsterdam (Netherlands).