

3.3 Визначення біологічно активних речовин в каротинвмісних біотехнологічних зразках

Каратиноїди, так само як і ізомери каротину, належать до полієнових природних красячих речовин. Їх молекули побудовані за аналогічним з каротином структурним принципом - цикли або псевдоцикли, з'єднані аліфатичним групуванням із ізопренових залишків. Відносяться до класу тетратерпенів, вуглеродний скелет яких побудований з чотирьох C5-ізопренових фрагментів. Між каротином і каратиноїдами існує, можливо, також і певний генетичний зв'язок. Бета-каротин синтезують представники ряду мікрогрибів, наприклад гетероталічні гриби *Blakeslea trispora*. В Австралії здійснюється випуск β - каротину з біомаси морських водоростей *Dunaliella salina* [319-323]. Ефективний метод промислового отримання β -каротину розроблено з використанням мікрогриба *Blakeslea trispora* [319-320].

В роботі досліджувався кількісний і якісний склад біологічно активних речовин у промислових зразках каротинвміщучої висушеної біомаси мікрогриба "*Blakeslea trispora*" під назвами «Бетарост», «Бетарост з ліпідами» і в кристалічному синтетичному каротині, отриманих з застосуванням методів біотехнології.

Методи дослідження

У зразках висушеної біомаси визначили: склад і кількість вмісту жирних кислот (C12-C24) з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ); вміст загальних ліпідів по Фолчу, тригліцеридів методом ТСХ; білків (метод Кьельдаля) и амінокислотний склад - на амінокислотному аналізаторі; визначали вміст убіхінону; токоферолу; стеролів; фосфоліпідів; вітаміну В12; каротиноїдів. В мікробіологічному каротині визначали розподіл жирів за фракціями: моно-, ді- і тригліцериди (метод ТШХ); ізомери каротиноїдів (ТШХ), наявність жирних кислот (ВЕРХ), кількість вмісту каротиноїдів у кристалічному каротині – з використанням ультраспектроскопії [324-329]. В

деяких випадках проводили порівняння показників з біоактивними речовинами у висушеній біомасі мікрогриба "*Blakeslea trispora*".

В отриманих зразках каротинвмісних продуктів «Бетарост» та «Бетарост з ліпідами» визначили: білки та амінокислотний склад (табл.1, рис.1).

Таблиця 1

Амінокислотний аналіз зразка "Бетарост з ліпідами"

Амінокислоти	Кількість Мк/моль	Кількість Мг	% по Мк/моль	% по мг	№ аміно кислоти
Лізін	5,7120	0,8340	7,07	8,24	1
Гістидін	1,6477	0,2554	2,04	2,52	2
Аргінін	2,2313	0,3882	2,76	3,84	3
Асп.кисл.	12,1360	1,6141	15,02	15,94	4
Треонін	4,1650	0,4956	5,15	4,90	5
Серін	4,7207	0,4957	5,84	4,90	6
Глут.кисл.	13,5284	1,9887	16,74	19,65	7
Пролін	0,8500	0,0978	1,05	0,97	8
Гліцин	8,1693	0,6127	10,11	6,05	9
Аланін	8,9953	0,8006	11,13	7,91	10
Цистин	0,1587	0,0190	0,20	0,19	11
Валін	3,3915	0,3968	4,20	3,92	12
Метіонін	0,3846	0,0573	0,48	0,57	13
Ізолейцин	3,6349	0,4762	4,50	4,70	14
Лейцин	7,8149	1,0238	9,67	10,11	15
Тіроксин	1,7952	0,3249	2,22	3,21	16
Фенилаланін	1,4677	0,2422	1,82	2,39	17
Сума	80,8031	10,1229			

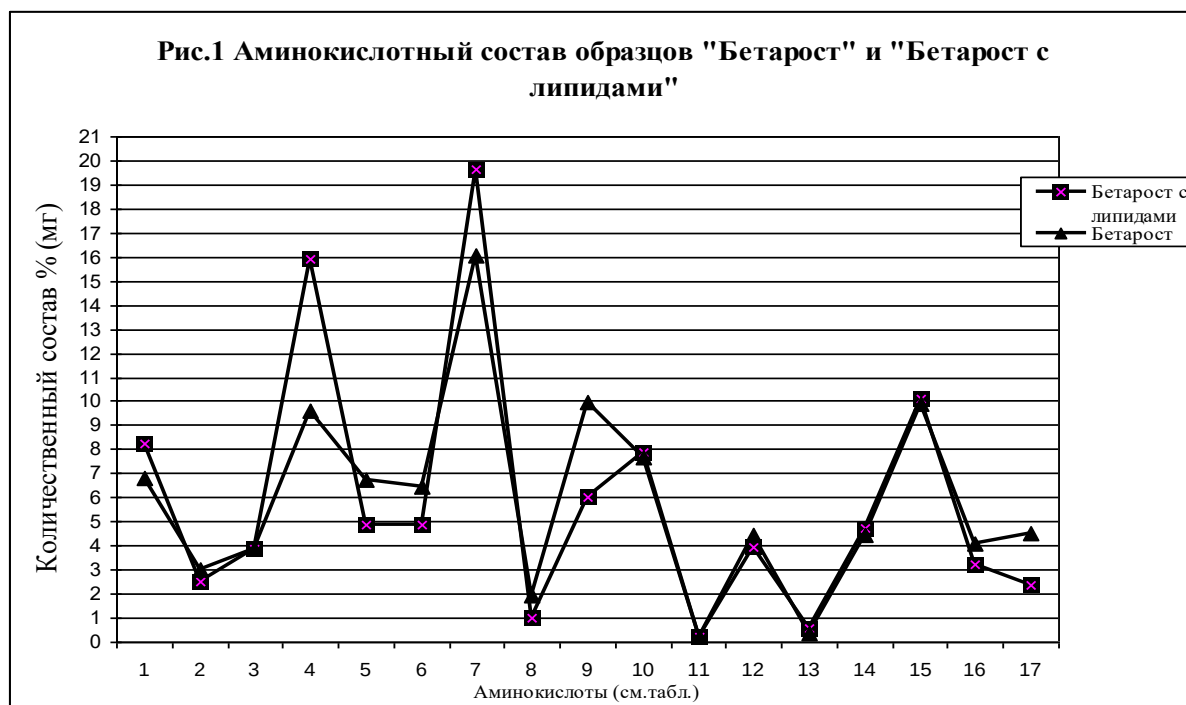
Таблиця 2

Амінокислотний склад зразка "Бетарост"

Аминокислота	Кількість Мк/моль	Кількість Мг	% по Мк/моль	% по мг	№ Кислоти
Лізін	2,5031	0,3655	5,64	6,79	1
Гістидін	1,0491	0,1626	2,36	3,02	2
Аргінн	1,1900	0,2071	2,68	3,84	3
Асп.кисл.	3,9009	0,5188	8,79	9,63	4
Треонін	3,0494	0,3629	6,87	6,74	5
Серин	3,3000	0,3465	7,43	6,43	6
Глут.кисл.	5,8811	0,8645	13,25	16,05	7
Пролін	0,8925	0,1026	2,01	1,91	8
Гліцин	7,1318	0,5349	16,07	9,93	9
Аланін	4,6278	0,4119	10,42	7,65	10
Цистін	0,0824	0,0099	0,19	0,18	11
Валін	2,0580	0,2408	4,64	4,47	12
Метіонін	0,1382	0,0206	0,31	0,38	13

Продовження табл. 2

Изолейцин	1,8234	0,2389	4,11	4,44	14
Лейцин	4,0576	0,5315	9,14	9,87	15
Тіросин	1,2272	0,2221	2,76	4,12	16
Фенилаланін	1,4806	0,2443	3,34	4,54	17
Сума	44,3931	5,3853	-	-	-



Як видно в представлених в таблиці 1, 2 та рис.1 вміст деяких амінокислот був майже вдвоє вище в зразку "Бетарост з ліпідами". Відмічено статистично достовірне збільшення вмісту глютамінової та аспарагінової кислот, лізину, аланіну та лейцину. Відповідно і зміст білка в цих зразках був вище.

Вміст каротину, вітаміну E і убіхінону

Досліджували вміст каротину, вітаміну E і убіхінону в представлених трьох зразках: №1 – «Бетарост з ліпідами», №2 – «Бетарост», №3- біомаса мікрогриби *Blakeslea trispora*. Навіски (від 2 до 250 мг для підбору умов) зразки омивали спиртовим розчином їдкою калію, екстрагували діетиловим ефіром. Екстракти промивали водою до нейтральних значень рН, висушували безводним сірчаноокислим натрієм, фільтрували й упарювали на роторному випарювачі. Неоміяєму фракцію (сухі залишки) розчиняли в бензолі. В екстрактах

неомиленої речовини одночасно розділяли і визначали каротин, убіхінон і вітамін Е.

Вміст каротину визначали за допомогою методу прямого спектрофотометрування в бензолі при довжині хвилі 456 нм на СФ-26. Вміст каротину розраховували на 100г навіски вихідного зразка. Вміст вітаміну Е та убіхінона в аліквотах сумарної неомиленої речовини досліджуваних зразків визначали після двох послідовних хроматографій: адсорбційної (препаративної) тонкошарової хроматографії на силікагелі марки ЛС 5/40 мк в системі гексан:ефір (70:30) і аналітичної хроматографії на імпрегнованих (5% гексадекана в легкому петролейному ефірі, фракція 40-600) пластинках Silufol uv 254 в системі ацетон:вода (90:10). В якості свідків використовували стандарти Q9, Q10 і α -токоферол («Серва»).

Вміст убіхінону визначали після хроматографічного розподілу компонентів неомилених фракцій зразків на СФ-26 при 275 нм в етанолі за різницею екстинцій окисленої та відновленої форми через 15 хв після додавання в пробу 0,02 мл 2,5% водного розчину боргідриду натрію. Вміст вітаміну Е визначали після хроматографічного розподілу компонентів неомилених фракцій зразків за реакцією Еммері-Енгеля на ФЕК при 520нм.

Результати: Спектрофотометричне визначення показало, що в кожному зразку присутні крім β -каротину інші каротиноїди (ізомери каротину α та γ). Результати досліджень за вмістом каротину представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Вміст каротиноїдів в зразках Бетароста та біомаси мікрогриба

№	Найменування зразка	Вміст каротиноїдів (г/100 г)
1	Бетарост с ліпідами	0,62
2	Бетарост	0,84
3	Біомаса мікрогриба	1,13

Результати хроматографічної очистки зразків, при яких завжди спостерігаються більші порції каротину (порядку 50% і більше), показали, що всі проби містять фракції каротиноїдів, одна з яких спектрофотометрично і за стандартом ідентифікована як β -каротин. Результати багатьох численних досліджень (обрали від 1 до 10 мг зразків на ТШХ) показали, що представлені зразки (№1-№3) не містять Q9, Q10 і вітаміну E, тобто при цьому методі отримання зразків досліджених біологічно активних вітамінів не збереглося. Визначення каротиноїдів за допомогою приладу спектрофотометра HP8453 (рис.2) дало наступні показники: вміст каротиноїдів у зразку «Бетарост з ліпідами» становив 678мг%, а вміст каротиноїдів у зразку «Бетарост» – 1378мг%.

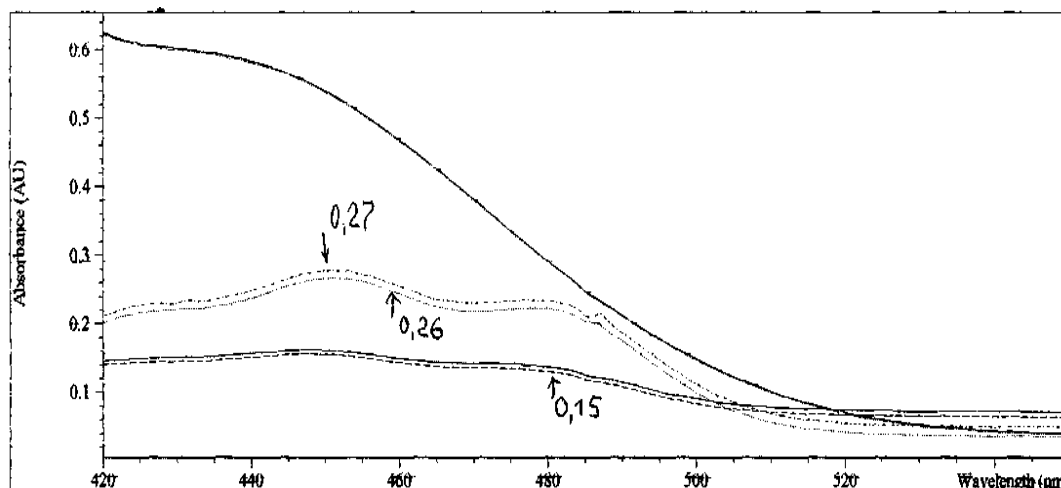


Рис 2 .Вміст каротиноїдів в біомасі "Бетарост" (1) та "Бетарост з ліпідами"(2).

Навіску біомаси (м) вносили в 100мл гептану, 1мл. екстракту переносили в суміш (100мл.) гексан:спирт (1:1). Визначення каротиноїдів проводили на спектрофотометрі HP8453 (Хьюленд Раккард, США). Вміст каротиноїдів в зразку «Бетарост» (№ 1) складав 1378мг%, в «Бета рост з ліпідами» -617мг%. Вміст вітаміну B12 визначали мікробіологічним методом з використанням індикаторної культури *Escherichia coli* ВКМ 113-2. Метод описано в 1 «Експериментальная витаминология» під редакцією Ю.Н.Островского, Минск, «Наука и техника» 1979. – с.452-458, 2) «Методы экспериментальной микологии» під редакцією В.І.Білай. Киев «Наукова думка». –1982. –с.261-268. Для вивільнення вітаміну із зв'язаної форми з білком проводили гідроліз

цианістим натрієм при рН-4,5. Навіску препарату брали по 50 і 100 мг із розрахунку можливого вмісту вітамінів у зразку.

У гідролізатах можлива присутність метіоніну, до нього чутливий штам E.coli 113-2, тому проводився контрольний аналіз руйнування вітаміну лужним гідролізом. У ряд пробирок з досліджуваною середою з культурою E.coli 113-2 (по 2 мл) внесли 0,1 мл гідролізату, а також 0,1 мл розведеного вітаміну B12, приготовленого для калібровної кривої, контроль – середовище з культурою. Зразки інкубували при 36 ± 10^0 С протягом 24 годин. Інтенсивність росту тест-культури в зразках і стандартних розведеннях вітамінів вимірюють на ФЕК при довжині хвилі 540 нм, в кювете 3 мм. Розрахунок вмісту вітамінів проводять за стандартом калібровної кривої для вітаміну B12 (табл.4).

Таблиця 4

 Показники вітаміну B₁₂

№	Зразок	B ₁₂	Метіонін
1	Бетарост с ліпідами	0;0.	0;0
2	Бетарост	0,001;0	0;0

Сама маленька концентрація вітаміну в середньому 0,0000078 мкг на мл має показання на ФЕК 0,01. Тому отримані дані свідчать про відсутність у зразках вітаміну B12.

Визначення стеролів в зразках біомасі "Бетароста"

Ціль цього дослідження: визначити наявність стеролів у зразках. Були поставлені задачі: - отримати неомилені фракції (НФ) зразків Бетароста з ліпідами, Бетароста і біомаси мікрогрибів для більш повного і загального як якісного так і кількісного визначення 3-β-гідроксистеролів;

-застосувати методи адсорбційної та роздільної хроматографії в тонкому слої для отримання індивідуальних зон 3-β-гідроксистеролів;

-визначити вміст 3-β-гідроксистеролів спектро-фотометричним методом.

Омилення зразків проводили за методом [319] з використанням петролейного ефіру (40-600°C) як екстрагуючого агента. Видалення розчинника

проводиться у вакуумі при температурі 30-350°C. Визначення неомиленої фракції проводили гравіметричним методом. Для якісного і кількісного визначення

3- β -гідроксістеролів використано метод тонкошарової хроматографії [320, 321]. Локалізацію досліджуваних речовин визначали за стандартами: ергостеролом, холестеролом, фукостеролом, β -сітостеролом, 4-холестен-3-оном. Додатковим стандартом був попередник стеролів – сквален. Кількісне визначення проводили методом кольорових хімічних реакцій з використанням спектрофотометричних вимірювань [322, 323]. Отримані дані наведені в таблиці 5. Розрахунок зроблено на 1 г маси досліджуваних зразків, або в % від неомиленої фракції.

Таблиця 5

Вміст стеролів в зразках "Бетарост" та "Бетарост с ліпідами"

Зразок, №	НФ, % від біомаси	Сквален, % от НФ	Некаротиноїдна фракція, %	β -сітостерол, % от НФ
1- Бетарост з ліпідами	10,89	67,50	1,71	0,15
2 -Бетарост	14,41	9,06	1,95	0,36
3 Біомас. гриба	12,73	6,39	2,38	0,31

Компоненти неомиленої фракції були розділені на каротиноїдну фракцію; фракцію, яка містить тільки сквален і некаротиноїдну фракцію, яка містить стероли і стероїди. Необхідно було визначити, що зі стеролів у зразках присутній β -сітостерол, а в зразку №3 знайдено стероїд, у якому можлива присутня окислена 3- β -ОН-група. Виникає думка, що β -сітостерол і сквален належать тій основі (середі), на якій отримано препарат.

Визначення фосфоліпідів

Визначення фосфоліпідів проводили загальноприйнятим методом мокрого спалювання з використанням спектрофотометра HP8453 (фірма Хьюнед Паккард, США) за ГОСТ 7824-80 (рис. 3)

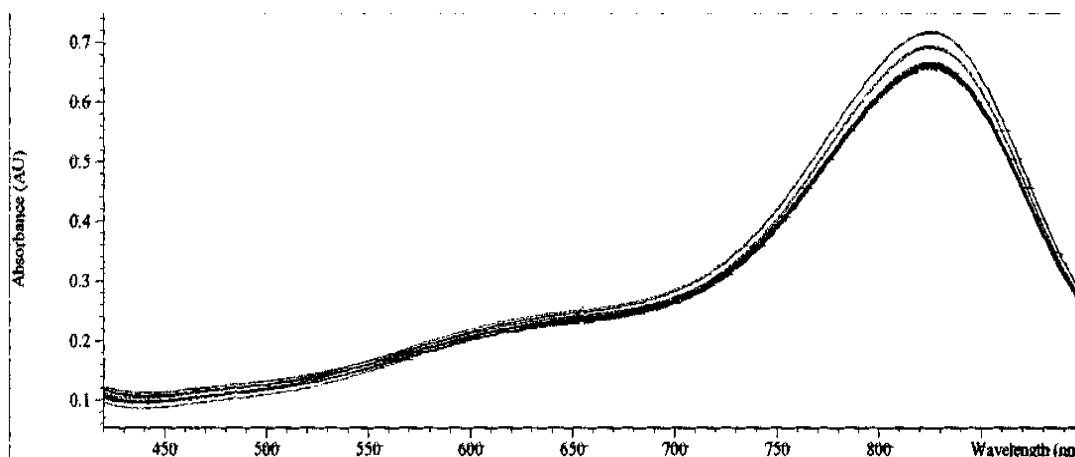


Рис. 3 Вміст фосфоліпідів в зразках "Бетарост", "Бетарост с липидами" та біомаси мікрогриба.

Кількісний вміст фосфоліпідів при перерахунку на лецитин становив: у зразках «Бетароста» -252мг або 0,11%, а у зразках «Бета росту з ліпідами» - 250,4мг або 0,12%. Як бачимо на рис. 2 вміст фосфоліпідів у біомасі всіх трьох зразків практично не відрізняється один від одного, що не суперечить теоретичним положенням про розподіл мікроелементів (по фосфору) у рослинному зразку даного походження.

Визначення жирно-кислотного складу "Бетарост" та "Бетарост ліпідами"

Визначення жирнокислотного складу представлених зразків біомас проводили з використанням методу вискоєфективної рідинної хроматографії на приладі Shimadzu GL-14B з комп'ютерною обробкою отриманих даних (табл.6).

Таблица 6

Жирно-кислотный склад біомаси мікрогриба "Бетарост "

Назва кислоти	«Бетарост»
C _{14:0} мірістинова	-
C _{16:0} пальмітинова	8,6863
C _{16:1} пальмітолеїнова	0,8374
C _{18:0} стеаринова	4,6951
C _{18:1} олеїнова	22,8737
C _{18:2} лінолева	60,0688

Продовження табл. 6

C _{18:3} ліноленова	1,2093
C _{20:1} гадолеїнова	0,421
C _{22:0} бегенова	1,2085

Таблиця 7

Жирно-кислотний склад біомаси мікрогриба "Бетарост с ліпідами"

Назва кислоти	«Бетарост с ліпідами»
C _{14:0} мірістинова	0,8329
C _{16:0} пальмітинова	9,639
C _{16:1} пальмітолеїнова	-
C _{18:0} стеаринова	4,5401
C _{18:1} олеїнова	21,9478
C _{18:2} линолева	58,7434
C _{18:3} линоленова	3,2643
C _{20:1} гадолеїнова	-
C _{22:0} бегенова	1,0325

Визначення біологічно активних речовин у кристалічному каротині.

В отриманих зразках кристалічного каротину №1,2 та 3 необхідно було визначити зразковий склад компонентів, які входили в 2-7% в 93-98% каротині кристалічному. Визначення каротиноїдів (рис.4) проводили на спектрофотометрі фірми HP8453 (фірма Хьюлед Паккард, США).

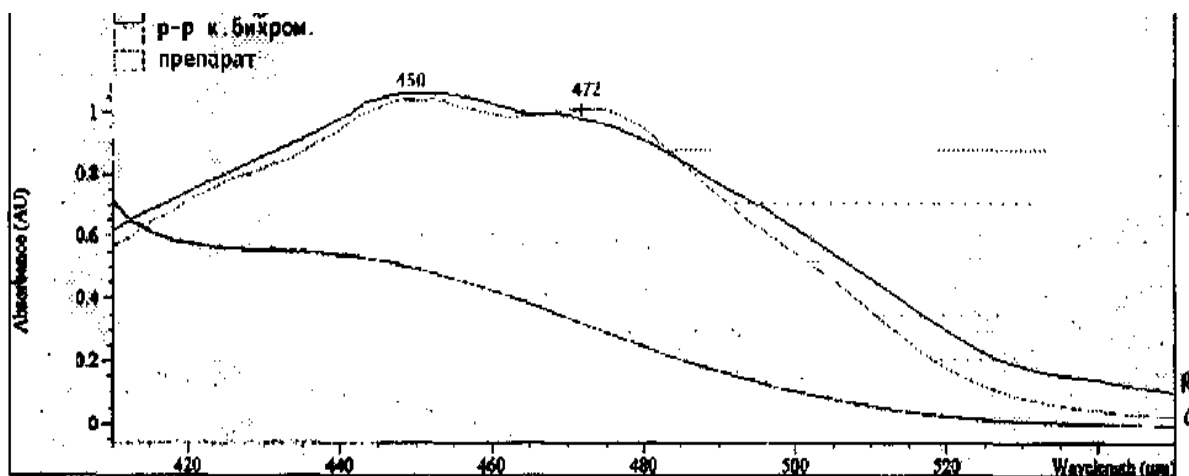


Рис. 4 Вміст каротиноїдів в кристалічному каротині

Навіску кристалічного каротину (m) вносили в 100мл гептана, 1мл. екстракта переносили в суміш (100мл.) гексан:спирт (1:1). Визначення каротиноїдів проводили на спектрофотометрі HP8453 (Хьюленд Раккард, США). Вміст каротиноїдів у зразку (№ 1) склав 81,069%, а в зразку №2-98,722% (рис.5). Визначали моно- і тригліцериди, жирні кислоти, стеріни, ізомери каротиноїдів із застосуванням хроматографічних методів (метод ТШХ в системах: гексан-етилловий спирт, гексан-ацетон, гексан-метилетилкетон, гексан-діетилловий ефір і метод ВЕРХ), УФ спектроскопіювання (спектрофотометр HP8453, фірма Хьюленд Паккард, США). каротиноидов проводили на спектрофотометре HP8453 (Хьюленд Раккард, США).

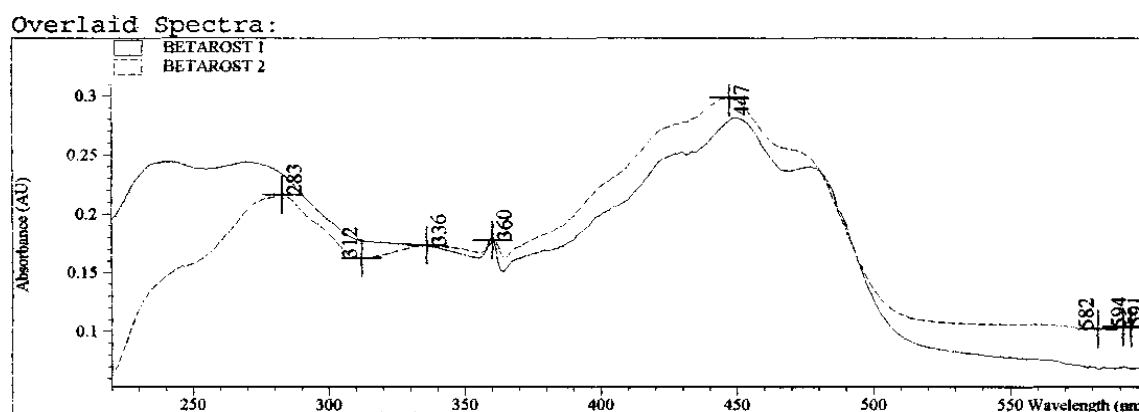


Рис. 5 Ультрафіолетові спектри каротину кристалічного: зразки 1 та 2

На рис. 4 спектр каротину кристалічного №1 (до 300 нм) вище, ніж зразка №2, що може свідчити про наявність у зразку №1 більшої кількості ненасичених зв'язків (тобто про можливу присутність у зразку окислених форм кристалічного каротину). Визначення моно-, ди- та тригліцеридів дало негативний результат, жирні кислоти, що визначаються методами ВЕРХ, не виявлено.

Вміст біологічно активних речовин (БАВ) в біомасі мікрогриба
«*Blakeslea trispora*»

Досліджені БАВ	Бетарост з ліпідами	Бетарост	Біомаса мікрогриба
Каротиноїди, мг,	620	840	1130
Вітамін В ₁₂	-		-
Неомилена фракція (НФ), % от біомаси	10,89	14,41	12,73
Загальні ліпіди, %	19,5	18,6	20,3
Убіхінони, мг% (ацетон- гексан 1:9)	0,1	0,08	0,12
Убіхінони (Укстракція етанолом)	-	-	-
Токофероли (Е)	-	-	-
Сквален, % от НФ 1-ні зразки,	67,50	9,06	6,39
β - сітостерол, % от НФ	0,15	0,36	0,31
Білок, % від біомаси	2,29	0,828	Не визнач.
Фосфоліпід в перерахунку на лецитин	246,9 0,12%	252,0 0,11%	Не визнач.

При поділі кристалічного каротину на фракції методом ТШХ було виявлено, що крім ізомерів α і γ каротиноїдів у кристалічному каротині була присутня і незначна кількість окисленої форми каротиноїдів, що з теоретичних міркувань цілком закономірно.

При застосуванні інших систем (гексан : етиловий спирт, гексан : діетиловий ефір), не було досягнуто поділу каротиноїдів.

Таким чином, отримані дані можна подати в узагальнюючій таблиці 8. Високий вміст біологічно активних речовин у біомасі «Біорост» та «Біорост з ліпідами» дає підставу для їх застосування не тільки в сільському господарстві, а й парфумерно-косметичній та харчовій промисловості.

Таким чином проведені дослідження каротинвмісних препаратів «Бетарост» та «Бетарост з ліпідами» визначає в них значну кількість біологічно активних сполук, що дає підставу для їх застосування в різних галузях промисловості.