

Změny lipidů při frakcionaci kvasničné biomasy

683.25 579
664.3

Ing. VLADIMÍR ŠILLINGER, Ing. FRANTIŠEK MACHEK a Ing. Simona ČIŽINSKÁ, Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Klíčová slova: fosfolipidy, fosfatidy, lyzofosfatidylcholin, fosfatidylcholin, konverze fosfatidů na lyzoderiváty, extrakce lipidů, dezintegrace, frakcionace biomasy, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*

Úvod

Při komplexním využívání kvasničné biomasy se vychází ze suspenze kvasinek, která se podrobí mechanické dezintegraci, načež se v homogenátu, po odseparování buněčných stěn, odstraňují nukleové kyseliny působením intracelulární nukleasy a zvýšené teploty při optimálním pH [1]. Extrakce lipidického podílu probíhá zde tedy po oddělení buněčných stěn a působení vyšší teploty.

Možnost získávání lipidického podílu byla řešena již dříve, avšak vycházelo se pouze z jedné frakce. Podle AO č. 223007 [2] lze provádět několikastupňovou extrakci izolované kvasničné bílkoviny (o suché hmotnosti asi 18 % hmot.) rozpouštědlem mísitelným s vodou. Protože se současně extrahovaná bílkovina dehydratuje, probíhá tak každá následující extrakce v prostředí o vyšší koncentraci extrakčního činidla a tím je umožněno rozdělení jednotlivých složek lipidického podílu do různých extrakčních stupňů již během extrakce.

Složky lipidického podílu tvoří i biologicky cenné steroly a fosfolipidy. Zvláště o posledně jmenované rostě zájem pro jejich příznivé fyziologické vlastnosti a otevírají se nové možnosti aplikace nejen v potravinářském (chléb, bílé pečivo, rostlinné tuky, mléčné výrobky), ale i ve farmaceutickém průmyslu [3].

Při studiu lipidického podílu z kvasinek jsme zjistili, že u fosfolipidů extrahovaných podle citovaného AO č. 161299 [1] se zvyšují jejich lyzované formy, což je z hlediska dietetického či terapeutického nežádoucí. Vyšší obsah lyzofosfatidů signalizuje vyšší stupeň štěpení fosfatidů, při kterém se současně uvolňují volné mastné kyseliny a ty zase mohou inhibičně ovlivňovat metabolické procesy určitých enzymových systémů v organismu [4].

Je známo [5], že v přírodních lecithinech, jako např. v sojovém, slunečnicovém, řepkovém, bavlníkovém, vaječném, nečiní lyzoforma více než 10 % obsahu přítomného fosfatidylcholinu či fosfatidylethanolaminu. Podobně je tomu i v živočišných tkáních: drůbeží maso 2,01 %, vepřové 5,71 %, rybí 1,70 %, rybí tuk 4,98 %.

Vzhledem k poměrně příznivému složení kvasničných lipidů především se stanoviska vysokého obsahu fosfolipidů jako potencionálního zdroje nenasycených mastných kyselin, zabývali jsme se podrobnější analýzou lipidické složky v kvasinkách. Poměr lyzofosfatidylcholinu (LPC) ku fosfatidylcholinu (PC) v kvasinkách nepřesahuje 10 % [7]. Kvasinky pěstované anaerobně dosahují až 27,2 % [8]; výjimku tvoří lipofilní kvasinky, kde u *Rhodotorula glutinis* uvádí Yoon [9] podle podmínek kultivace hodnoty 100 LPC:PC v rozmezí 55 až 174 %.

Materiál a metody

1. Pro práci byly použity pekařské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* trenčínské proveniencce.

2. Chromatografická stanovení na tenké vrstvě s plamenoionizační detekcí byla prováděna na přístroji Iatroscan TH 10 (Iatron Labs. Tokyo) s použitím silikagelových tyčinek Chromarods S II. Tyčinka délky 100 mm byla detekována za 25 s, což odpovídá detekční rychlosti 4 mm · s⁻¹. Průtok vzduchu detektorem byl 35 ml · s⁻¹, průtok vodíku 30 ml · s⁻¹. Analogický signál z detektoru byl vyhodnocován graficky integrátorem Spectrophysic 4100.

3. Analýza neutrálních lipidů: každý vzorek byl rozpuštěn ve směsi chloroform:methanol (2:1) a 1 μl byl nanášen na tyčinku. Vyvíjecí kamera byla saturována 20 min, tyčinky byly před použitím aktivovány průcho-dem ionizačním plamenem. Vzorky byly vyvíjeny soustavou n-hexan: diethylether: kyselina mravenčí (54:6:0:8) při 22–25 °C po dobu 25 minut. Systém byl vyvíjen do

výšky 100 mm. Po vysušení byla provedena detekce v ionizačním plameni postupem podle odst. 2).

4. Analýza fosfolipidů: směs lipidů byla separována použitím směsi chloroform:methanol:voda (45:26:2:5) při 22 až 25 °C po dobu 45 minut. Chromatogram byl vyvíjen do výšky 100 mm [10].

Výsledky a diskuse

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byly podrobeny mechanické dezintegraci, popř. i denukleinizaci s extrakcí tukového podílu. Extrahovali jsme Folchovým činidlem, tj. směsí chloroform a methanol v poměru 2:1, popř. s kyselou doextrakcí. Výsledky jsou uvedeny v tab. 1. Extrakce I je čtyřnásobná extrakce Folchovým činidlem, extrakce II je dvojnásobná extrakce Folchovým činidlem a jednou směsí chloroform:methanol:HCl (200:100:1). Pro názornější představení je součet hodnot nalezených fosfatidů vyjádřen jako PL = 100 %.

Tabulka 1. Obsah lipidů v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* podrobených dezintegraci, denukleinizaci a extrakci získaného proteinu

	% hmot. celkového extraktu	Obsah lipidů v % celkovém extraktu					
		NL	PE	PC	SPH	LPC	PI (PS)
Extrakce I pro PL = 100 %	5,9	62,50	2,70	13,01	1,73	20,05	0,34
Extrakce II pro PL = 100 %	3,6	63,31	1,20	13,76	1,79	19,94	0,91
	—	—	3,27	37,50	4,88	54,35	nestanovenou

NL = neutrální lipidy
PE = fosfatidylethanolamin
PC = fosfatidylcholin
SPH = sfingomyelin
LPC = lyzofosfatidylcholin
PI = fosfatidylinositol
PS = fosfatidylserin
PL = celkové fosfolipidy

Ukázalo se, že kyselá extrakce je méně vhodná právě pro fosfolipidy. Je patrné, že lyzovaná forma fosfatidylcholinu tvoří jedenapůlnásobek výchozích fosfatidů. Také zde použijeme procentního vyjádření hodnoty 100 LPC:PC a porovnáme s výsledkem extrakce lipidického podílu z homogenátu kvasinek po dezintegraci. Z tab. 2 je zřejmé, že jde téměř o dvacetinásobně zvýšené hodnoty 100 LPC:PC.

Tabulka 2. Poměrné množství lyzofosfatidylcholinu ku fosfatidylcholinu v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*

	100 LPC : PC
Kvasinky po dezintegraci	8,4 %
Kvasinky po dezintegraci, oddělení buněčných stěn a denukleinizaci	154,1 %

Z nalezených hodnot vyplývá, že udržování kvasničné cytoplazmy při teplotách přes 50 °C po dobu 60 až 120 minut podmiňuje vznik lyzoderivátů a tím se snižuje dietetická i terapeutická hodnota izolovaných fosfolipidů, jejichž prahová koncentrace v neupravených buňkách kvasinek, tzn. hned po dezintegraci, je < 10 % a tedy v souladu s hodnotami přírodních zdrojů fosfolipidů (soja, ryby, maso, vejce). Vzhledem k tomu, že již v dezintegrované biomase je dobře přístupný lipidický podíl, navrhli jsme jeho získávání přímo z kvasničné

homogenátu, čímž se jednak lépe využije energie vynaložená na dezintegraci, jednak se zvýší i výtěžnost postupu, protože se extrahuje z veškeré buněčné hmoty. Opodstatnění této změny také dokládá skutečnost, že fosfolipidy se považují za hlavní strukturální komponent kvasničných membrán.

Tabulka 3. Závislost poměru 100 LPC : PC na kultivační teplotě kvasinek *Candida utilis*

Kultivační teplota kvasinek	29 °C	34 °C	39 °C
100 PLC : PC	6,8 %	10,3 %	47,0 %

Zjistili jsme také, že stupeň konverze fosfatidylcholinu na lyzoderivát ovlivňuje i kultivační teplota kvasinek. Provedli jsme desetihodinové jednorázové kultivace *Candidy utilis* při různých teplotách a v získaných kvasinkách stanovili hodnotu 100 LPC:PC. Výsledkem je zjištění, že lyzoderivátu fosfatidylcholinu přibývá se zvyšující se kultivační teplotou kvasinek.

Závěr

Je nesporně výhodné vycházet při izolaci fosfolipidů v rámci frakcionace kvasničné biomasy z kvasinek bohatých na lipidický podíl. Ten lze ovlivnit složením substrátu či hodnotami růstové rychlosti, přenosu kyslíku nebo kultivační teploty. Otevřenou otázkou zůstává, zda a jak tyto důležité technologické parametry ovlivní poměr LPC:PC, protože nestačí pouze připravit kvasinky s vysokým obsahem fosfolipidů, nýbrž i s vhodným složením fosfatidů, tj. s minimem jejich lyzoderivátů.

Lektorovala prof. ing. G. Basařová, DrSc.

Literatura

- [1] FENCL Z., MACHEK F. a ŠILLINGER V.: AO č. 161299, 1974.
- [2] MACHEK F., BĚHALOVÁ B., FENCL Z., BERAN K. a ŠILLINGER V.: AO č. 223007, 1983.
- [3] HRIVNÁK D., KUŽELA L., MÁLKOVÁ J., MUSIL J., RANNÝ M., VIŠEK V. a WOLF A.: Hypercholesterolemie a hyperlipoproteinemie — možnost jejich ovlivnění složkami potravy. Vydala Univerzita Karlova, Praha 1982.
- [4] BELLA J.: kandidátská práce. Lékařská fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava 1985.
- [5] WEIHRAUCH J. L. and SON Y. S.: JAOCS, 60, 1983, 1971—1978.
- [6] OHSHIMA T., WADA S. and KOIZUM Ch.: Bull. Jap. Soc. Scien. Fish., 49, 1975, 123—130.
- [7] RATTRAY J. B., SCHIBECI A., and KIDBYEY D. K.: Bacteriological REVIEWS 39, 1975, 198—231.
- [8] LETTERS R. and SNELL B. K.: J. Chem. Soc. 1963, 5127—5130.

- [9] YOON S. H. and RHEE J. S.: JAOCS 60, 1983, 1281—1286.
- [10] MAREŠ P., SEDLÁČEK J., RANNÝ M. and SKOŘEPA J.: Journal of Chromatography, 275, 1983, 295—305.

Šillinger, V. - Machek, F. - Čížinská, S.: Změny lipidů při frakcionaci kvasničné biomasy. Kvas. prům. 32, 1986, č. 7—8, s. 190—191.

V práci se porovnává poměr mezi fosfatidylcholinem a lyzofosfatidylcholinem v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* jednak po dezintegraci, jednak po dezintegraci s denukleinizací. Na základě toho je navržen způsob snížení fosfolipidických lyzoderivátů v lipidickém extraktu v rámci technologického procesu komplexního využívání kvasničných buněk.

Шиллингер, В., Махек, Ф., Чижинска, С.: Изменения липидов при фракционировании дрожжевой биомассы. Квас. прум. 32, 1986, № 7—8, стр. 190—191.

V работе сравнивается соотношение между фосфатидилхолином и лизофосфатидилхолином в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* как после дезинтеграции, так и после дезинтеграции с денуклеинизацией. На основе того предложен способ понижения фосфолипидных лизо-дериватов в липидном экстракте в рамках технологического процесса комплексного использования дрожжевых клеток.

Šillinger, V. - Machek, F. - Čížinská, S.: Changes of Lipids During the Yeast Biomass Fractionation. Kvas. prům. 32, 1986, No. 7—8, pp. 190—191.

A ratio between phosphatidylcholin and lysophosphatidylcholin in the yeast *Saccharomyces* is compared, both after the disintegration and after the disintegration followed by the reduction of the nucleic acids content. In the consideration of this there is proposed a way of the lowering of the phospholipidic lysoderivates content in the extract of lipids, which may be applied in the course of a technological process of the complex utilization of the yeast cells.

Šillinger, V. - Machek, F. - Čížinská, S.: Lipidänderungen während der Fraktionierung der Hefebiomasse. Kvas. prům. 32, 1986, Nr. 7—8, S. 190—191.

In der Arbeit wird das Verhältniss zwischen dem Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* — einerseits nach der Desintegration, andererseits nach der Desintegration mit dem Abbau der Nukleinsäuren — verglichen. Auf diesem Grunde wird eine Weise der Herabsetzung der Lysophospholipidderivaten, im Rahmen des technologischen Prozesses der Komplexausnützung der Hefezellen, entworfen.