مقایسه روشهای استخراج پیگمان (کاروتنوئید) از مخمر *Sporobolomyces ruberrimus H 110*

سید هادی رضوی[1] – کرامت اله رضایی [1] – ایوان مارک [2]

تاریخ دریافت : ۸۴/۵/۲۶

چکیده

دراین تحقیق، استخراج کاروتنوئید ها از یک سوش مخمرجدید *Sporobolomyces ruberrimus* H110 توسط روشهای مختلف فیزیکی و شیمیایی مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است. استفاده ار غلظت های مختلف اسید کلرید ریک (۰/۲ و ۰/۵ نرمال) در دو حرارت $55^{\circ}C$ و $75^{\circ}C$ و همچنین استفاده از حلال DMSO جزء روش های استخراج شیمیایی استفاده شده در این مطالعه بودند. اعمال روش سونیکاسیون و سایشی با استفاده از گلوله های ریز شیشه ای از روشهای فیزیکی استخراج در این پژوهش بوده است. در بین تمامی روش های بکار رفته شده، روش استفاده ازحلال شیمیایی DMSO و روش سایشی جزء موثرترین روشهای اعمال شده بودند که از نظر مقایسه، روش سایشی با استفاده از دستگاه سایشی گلوله ای دارای راندمانی حدود ۳۰٪ بالاتر از روش DMSO بود. از دیگر مزایای این روش، عدم استفاده از حلال های سمی آلی و در نتیجه بهداشتی بودن محصول استخراج شده می باشد.

واژه‌های کلیدی : استخراج، پیگمان، کاروتنوئیدها، *Sporobolomyces ruberrimus*، DMSO، Bead beater

۱– مقدمه

از آنجایی که تولید کاروتنوئیدها به روش های بیوتکنولوژی روز بروز رو به گسترش می باشد و از طرفی توسعه این روش ها خود مرهون بهبود و توسعه روشهای پایین دست(Down stream) از جمله استخراج متابولیتهای میکروبی درون سلولی است، لذا پرداختن به این امر از جایگاه و اهمیت بسیار مهمی در صنعت بر خوردار می باشد. به عبارتی تو لید بدون توسعه یک روش بهینه استخراج، عملا کار بیهوده ای است. یکی از مشکلاتی که امروزه در ارتباط با تولید کاروتنوئید ها بخصوص توسط مخمرها وجود دارد استخراج و جداسازی پیگمان تولیدی است . این امر بخاطر وجود ترکیبات پلی ساکاریدی از قبیل بتا گلوکان در دیواره سلولی این میکروارگانیسمها است که عمل استخراج را بر خلاف باکتریها دچار مشکل می سازد (۷و ۲). بنا بر این لازم است در کنار تکنیک های بالا دست (Up stream) به اینگونه روش ها توجه اساسی شود. در بین مخمرهای مولد پیگمان می توان به مخمر *Phaffia rhodozyma* اشاره نمود که تا کنون محققان رو شهای متعددی را برای استخراج آن ارائه نموده اند(۱) که می توان از جمله به روشی که توسط سد ماک و همکاران او ارائه شده اشاره نمود(۶). در این روش از یک حلال شیمیایی (DMSO) استفاده شده است که بهترین راندمان استخراج را درمدت زمان کم داده است. در حال حاضر در اکثر نقاط دنیا از همین روش برای استخراج کارتنوئید استفاده میگردد(۸ و ۷ و ۶ و ۵). اما از مهمترین مشکلات این حلال سمی بودن آن است که کارخانه های مولد پیگمان توسط این مخمر را دچار مشکلات فراوانی کرده است به نحوی که محققان در تلاش هستند تا بتوانند روشهای کم خطر تری را شناسایی و جایگزین این روش نمایند. طبیعی است که کاهش هزینه های تولید نیز مطلب مهم دیگری است

۱ – اعضاء هیات علمی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی بیوسیستم کشاورزی، دانشگاه تهران . srazavi@ut.ac.ir پست الکترونیکی :

۲ – عضو هیات علمی دانشگاه مهندسی شیمی دانشگاه INPL ، نانسی، فرانسه

که همواره باید مد نظر قرارگیرد. در این تحقیق با توجه به جدا سازی و ایزولاسیون یک مخمر مولد پیگمان که توسط محقق انجام گرفته بود (۵) لازم بود تا در ابتدا بهترین روش استخراج برای آن مشخص شود تا بتوان کارهای بعدی از جمله مطالعات تحقیقاتی سینتیکی را بر روی این مخمر انجام داد. لازم به ذکر است از آنجایی که هیچگونه تحقیقاتی در دنیا بر روی این سوش انجا م نگرفته لذا این تحقیق اولین مطالعه بر روی این سوش در ارتباط با روش های استخراج می باشد. در این تحقیق روش های مختلف شیمیایی که شامل بکار گیری غلظت های مختلف اسید کلرید ریک یا DMSO و فیزیکی (استفاده از تکنیک سونیکاسیون و دستگاه سایشی گلوله ای[1] و نهایتا راندمان و تاثیر روش های اعمال شده بر روی مخمر *Sporobolomyces ruberrimus* H110 مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

۲- مواد و روشها

۲-۱- میکروارگانیسم

در تمام مدت تحقیق، سوش *Sporobolomyces ruberrimus* H110 بر روی محیط کشت جامد شیبدارYM که حاوی پپتون (۵/۰ گرم در لیتر)، گلوکز(۱۰/۰ گرم در لیتر)، عصاره مخمر (۳/۰ گرم در لیتر)، عصاره مالت (۳/۰ گرم در لیتر) و آگار (۱۵/۰ گرم در لیتر) در دمای ۴ °C نگهداری شد. به منظور قراردادن میکروارگانیسم ها در وضعیت فیزیولوژیکی مناسب، هر ۲۰ روز یکبار نمونه ها به کشت های تازه منتقل شدند.

۲-۲- کشت میکروارگانیسم

محیط پیش کشت[2] در یک فلاسک ارلن مایر ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۵۰میلی لیتر محیط کشت (مشابه بالا) و بر روی یک شیکر با ۲۱۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت و در درجه حرارت ۲۳ °C تهیه گردید. pH محیط کشت قبل از انجام استریلیزاسیون روی ۶ تثبیت شد. ۱۵۰ میلی لیتر از محیط پیش کشت به عنوان مایه تلقیح در یک بیوراکتور ۳ لیتری با ۱/۵ لیتر محیط کشت متشکل از ۲۰/۰ گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$، ۳۰/۰ گرم در لیتر گلوکز، ۰/۵ گرم در لیتر پپتون، ۱/۰ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۲/۰ گرم درلیتر Na_2HPO_4، ۱/۵ گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$ و ۴/۰ گرم در لیتر KH_2PO_4 منتقل شد. قبل از استریلیزاسیون، pH محیط با محلول های ۲/۰ مولار هیدروکسید پتاسیم و ۶۲/۵٪ (w/w) اسید فسفریک نیز روی ۶ تنظیم شد. بعد از تلقیح، درجه حرارت، pH و سرعت همزن به ترتیب در ۲۳ °C، ۶/۰ و ۳۰۰ دور در دقیقه ثابت نگهداشته شد. در طول فرایند تخمیر، در حالی که مقدار اکسیژن محلول در سطح ۵۰٪ ثابت نگهداشته شده بود (از طریق کنترل سرعت جریان هوا)، این محلول با سرعت ۹۰۰-۳۰۰ دوردر دقیقه به هم زده شد. به منظور جلوگیری از ایجاد کف طی عمل تخمیر، از ماده Biospumex 153 (Biosoph, Peronne, France) استفاده شد.

۳- روشهای شیمیایی استخراج پیگمان

۲-۳-۱- استخراج مستقیم با اتانول

در این تحقیق، ابتدا امکان استخراج و جمع آوری پیگمان های درون سلولی توسط حلال اتانول تنها به عنوان یک تکنیک ساده مورد بررسی قرار گرفت. در این روش، دو سری آزمایش در دماهای ۵۵ °C و ۷۵°C انجام گرفت که برای انجام هر آزمایش ۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی سلولهای مخمر (۲۵ گرم) با سرم فیزیولوژیکی شستشو شده و مقدار ۱۰ میلی لیتر اتانول بطور مجزا به سلولهای مخمر اضافه و در مدت زمان های مختلف (۱، ۲، ۳، ۴، ۸، ۱۲، ۱۸،

1- Bead Beater
2- Preculture

۲۴، ۳۰ و۳۶ ساعت) گرمخانه گذاری شد. پس از سپری شدن زمان های مذکور، سلول ها به مدت ۵ دقیقه ورتکس گردید و سپس به منظور جدا سازی سلول ها از حلال حاوی پیگمان، نمونه ها سانتریفوژ شدند (۴۵۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C).

پس از صاف کردن با فیلترهای مقاوم به حلال، جذب رنگ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (Waters, Milford) در طول موج ۴۸۸ نانومتر اندازه گیری شد.

۲-۳-۲- بکارگیری غلظت های مختلف اسید کلرید ریک به عنوان یک مرحله مقدماتی در استخراج با اتانول

به منظور تخریب دیواره سلولی و تسهیل عمل استخراج، ۱۰/۰ میلی لیتر اسید کلرید ریک (۰/۲ و ۰/۵ نرمال) به همراه ۵/۰ میلی لیتر از محیط کشت دردو دمای ۵۵ °C و ۷۵°C بکار گرفته شد. بدین ترتیب که پس از شستشوی سلول ها با سرم فیزیولوژیک و بکارگیری اسید، نمونه ها مطابق روش ذکر شده در بخش ۲-۳-۱ استخراج گشته و اندازه گیری شدند.

۲-۳-۳- استخراج با اتانول پس از یک مرحله مقدماتی بکارگیری حلال DMSO

روش شیمیایی دیگری که در این تحقیق بکار گرفته شد، استفاده از حلال **DMSO** می باشد که مانند اسید کلریدریک جهت تخریب دیواره سلول و تسهیل خروج پیگمان بکار گرفته شد. بعد از شستشوی سلول ها با سرم فیزیولوژیک، حجم مشخصی (۰/۵، ۱/۰، ۱/۵، ۲/۰، ۲/۵، ۳/۰، ۳/۵، ۴/۰، ۴/۵، ۵/۰، ۵/۵ و ۶/۰ میلی لیتر) از حلال آلی **DMSO** که قبلا تا دمای ۵۵°C گرم شده بود به سلول های مخمر اضافه کرده و سپس مقدار ۰/۱ میلی لیتر محلول فسفات سدیم ۰/۰۱ مولار و ۵/۰ میلی لیتر اتر نفت به منظور استخراج پیگمان اضافه شد. بعد از عمل همزدن و سانتریفوژ (۴۵۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C)، حلال حاوی پیگمان در یک دستگاه تحت خلا گردان خارج گردید و مقدار ۱۰ میلی لیتر اتانول به آن اضافه و جذب پیگمان استخراج شده توسط اسپکتروفتو متری در طول موج ۴۸۸ نانومتر قرائت شد. به منظور تعیین حداکثر قدرت استخراج پیگمان، آزمایش دیگری با بکارگیری ۵ میلی لیتر **DMSO** و مقادیر مختلف سلول خشک (۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ میلی گرم) در محیط کشت مطابق روش شرح داده شده در بخش ۲-۳-۱، انجام گرفته و مورد اندازه گیری قرار گرفت.

۲-٤- استخراج با روشهای فیزیکی

۲-٤-۱- استخراج با بکارگیری سونیکاسیون

در این روش مطابق آزمایش های قبلی مقدار ۵ میلی لیتر محیط کشت برداشته شده و پس از شستشو، سلول ها در دمای۶۰°C به مدت ۱۲ ساعت خشک شدند. سپس مقدار ۵ میلی لیتر اتانول به داخل یک ظرف کوچک شیشه ای حاوی سلول اضافه و به داخل ذرات ریز یخ در داخل دستگاه سونیکاتور انتقال داده شدند(Labo-Moderne 40 KHz). به منظور جلوگیری از افزایش درجه حرارت سلول ها، عمل سونیکاسیون بصورت ده سیکل ۳۰ ثانیه ای و به فواصل زمانی یک دقیقه انجام گرفت. پس از سونیکاسیون، سوسپانسیون بدست آمده به شدت به هم زده شد ومطابق دستورالعمل ۲-۳-۱، نمونه ها استخراج و مورد اندازه گیری قرار گرفتند.

۲-٤-۲- استخراج پیگمان با استفاده از دستگاه سایشی گلوله ای

۲۵ میلی گرم از سلول های مخمر پس از عمل سانتر یفوژ، شستشو شده (مطابق روشهای پیشین) و پس از خشک کردن در داخل ۱۰ میلی لیتر اتانول به حالت سوسپانسیون در آمد ند. سپس سلول های مخمر تحت عمل سایش بسیار بالا به همراه ۱۰٪ گلوله های ریز شیشه ای (قطر ۰/۴۵ تا ۰/۵۰ میلی متر) در داخل دستگاه سایشی گلوله ای قرار گرفتند. عمل سایش در دمای ۲۰°C- و به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت و سپس سلول های متا ثر از سایش توسط سانتریفوژ جدا سازی و مجددا به داخل ۱۰ میلی لیتر اتانول منتقل شدند. عمل استخراج پیگمان تا زمانی که تمامی سلول ها بی رنگ شدند تکرار گردید و سپس رنگ استخراجی اندازه گیری شد.

به منظور مقایسه درصد استخراج با DMSO و استفاده از روش فیزیکی با دستگاه سایشی گلوله ای و در جهت تعیین رابطه بین جذب در ۴۸۸ نانومتر (پیگمان استخراج شده) و مقدار توده سلولی (میلی گرم سلول خشک) هما نند روش قبلی مقادیر ۲ تا ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت که حاوی ۱۰ تا ۵۰ میلی گرم سلول خشک بود با این روش مورد بررسی قرار گرفت.

۲- ۵- روش تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. مقایسه روش های استخراج پیگمان با استفاده از روش آماری تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ها توسط آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) [1] در سطح ۹۵٪ مورد بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج وبحث

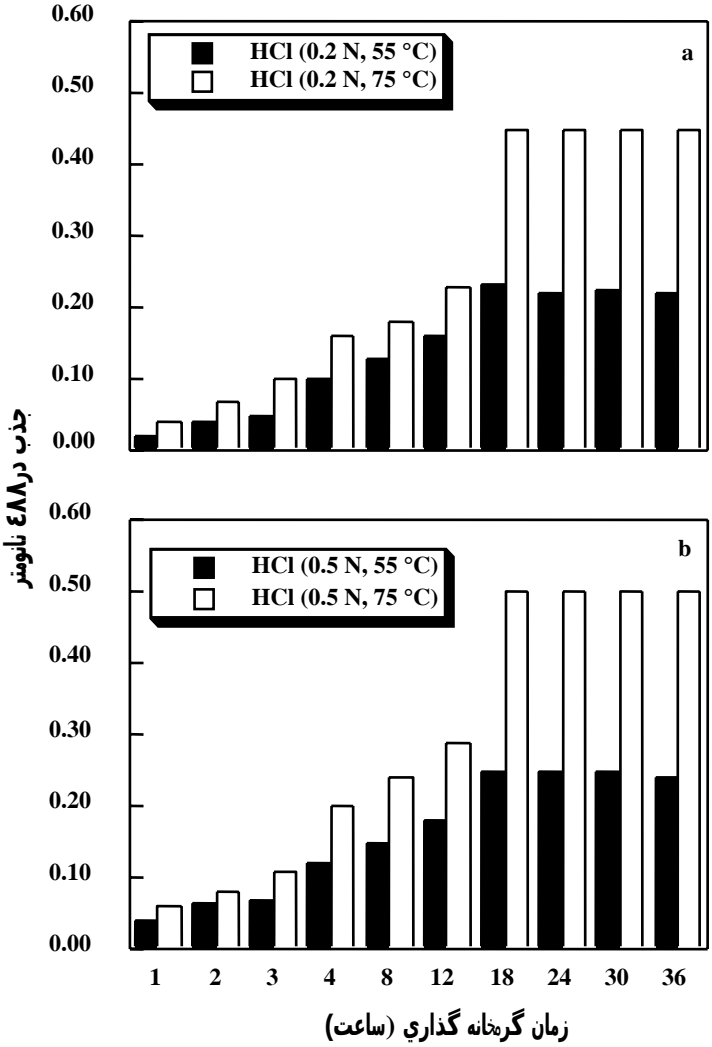
۳-۱- استخراج مستقیم با حلال (اتانول)

امکان بکارگیری الکل به تنهایی بدون استفاده از روش های تکمیلی دیگر به منظور استخراج بررسی گردید. صرف نظر از درجه حرارت بکارگرفته شده، زمان گرمخانه گذاری اثرمعنی داری بر روی میزان استخراج پیگمان ندارد بطوریکه در هر دو درجه حرارت بیشترین مقدار پیگمان بعد از ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری بدست می آید. همچنین، نقش دما در مقدار استخراج بسیار ضعیف بود بطوریکه مقدار جذب نمونه های استخراج شده در دو دمای ۵۵ °C و ۷۵ °C به ترتیب ۰/۱۶۵ و ۰/۱۷۵ به دست آمد که اختلاف آنها معنی دار نیست.

۳-۲- غلظت های مختلف اسید کلرید ریک به عنوان یک مرحله مقدماتی در استخراج با اتانول

اثر تخریب کنندگی دیواره سلولی با استفاده از دو غلظت اسید کلرید ریک (۰/۲ و ۰/۵ نرمال) به منظور استخراج پیگمان در دو درجه حرارت مختلف در زمان های مختلف گرمخانه گذاری مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت (شکل ۱). با افزایش زمان گرمخانه گذاری، میزان استخراج نیز افزایش یافته و نهایتا پس از ۱۸ ساعت به بیشترین مقدار خود رسید که این زمان برای هر دو غلظت اسید یکسان بود. اما در مقایسه با روش قبل (بدون حضور اسید) میزان استخراج افزایش نشان می دهد ولی اثرغلظت برمیزان استخراج معنی دار نیست. در حالی که درجه حرارت در کنار فاکتور اسید یک اثر کاملا معنی دار بر روی میزان استخراج داشت و در ۷۵°C حدودا دو برابر گردید.

1- Least Significance Difference

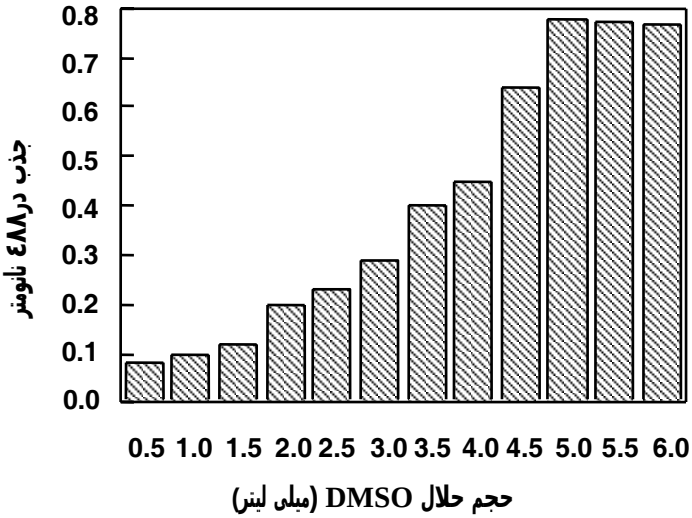


شکل ۱ - اثر زمان گرمخانه گذاری و دما بر استخراج پیگمان از مخمر*Sporobolomyces ruberrimus* H110 با استفاده از اسید کلرید ریک a) ۰/۲ نرمال اسید و b) ۰/۵ نرمال اسید

- در دمای ثابت، اثر غلظت اسید کلرید ریک تنها در زمان های ۱ تا ۳ ساعت از شروع گرمخانه گذاری بر روی میزان استخراج پیگمان معنی دار بود (در سطح ۹۵٪).
- در هر غلظت از اسید کلریدریک، به جز ساعت دوم از شکل (b) اثر دما معنی دار بود (در سطح ۹۵٪).

۳-۳- استخراج با اتانول پس از یک مرحله مقدماتی بکارگیری حلال DMSO

در این قسمت از حلال آلی DMSO که در حال حاضر بمنظور استخراج پیگمان خصوصا برای مخمر *Phaffia rhodozyma* به کارگرفته میشود استفاده شد. برای اولین بار سدماک وهمکارانش(۶) این ماده را برای استخراج آستاگزانتین مورد استفاده قرار دادند. نتایج حاصل از بکارگیری حجم های مختلف حلال DMSO بر روی میزان استخراج پیگمان در شکل ۲، نشان داده شده است. در این روش بر خلاف روش های قبلی طولانی ترین زمان استخراج حدودا ۱۵ دقیقه می باشد که در مقایسه با دو روش ذکر شده در بالا، زمان استخراج بطور قابل ملاحظه ای کاهش یافته که این مهم به تنهایی وجه تمایز عمده این روش را آشکار می سازد. از دیگر مزایای این روش دستیا بی به بیشترین مقدارپیگمان در مقایسه با روش های پیشین می باشد بطوریکه با بکارگیری مقدار ۵ میلی لیتر حلال DMSO مقدار جذب در ۴۸۸ نانومتر به ۰/۷۸می رسید (شکل شماره ۲). این رقم در مقایسه با روش استخراج با اتانول تنها که دارای جذب حدود ۰/۲۲ (پس از ۱۲ ساعت گرمخانه گذاری) و روش استخراج با پیش-تخریب اسید کلریدریک که در غلظت ۰/۵نرمال و دمای ۷۵°C دارای جذب حداکثر ۰/۵۰ بود به مقدار قابل توجهی افزایش نشان داد و ضمنا محو شدن کامل رنگ قرمز از سلول های مخمر این موضوع را تایید کرد. نمودار تغییرات میزان جذب به روش مذکور با مقدار ماده خشک سلولی در شکل شماره ۳a، رسم گردیده است. مطابق این نمودار، یک رابطه خطی بین میزان جذب و مقدار ماده خشک سلول تا سقف حدود ۳۵ میلی گرم سلول مخمر مشاهده می گردد که البته پس از این میزان مقادیر استخراج شده سبب برهم کنش آنها و انحراف از رابطه خطی می گردد که این موضوع با رقیق سازی های انجام گرفته تایید گردید.



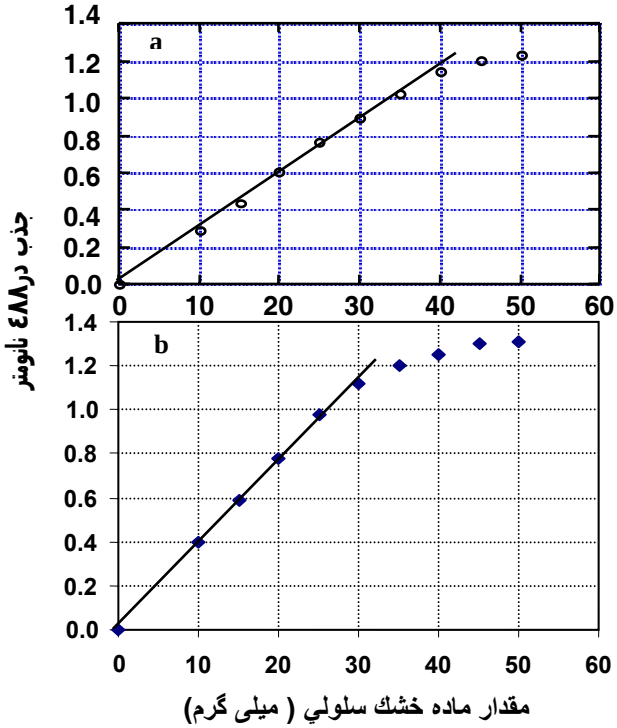
شکل ۲ – اثرحجم حلال DMSO بر روی میزان استخراج کاروتنوئیدها با به کار گیری ۲۵ میلی گرم مخمر *Sporobolomyces ruberrimus* H110 با استفاده از روش اسپکتروفتومتری.

۳-٤- استخراج با استفاده از روش سونیکاسیون

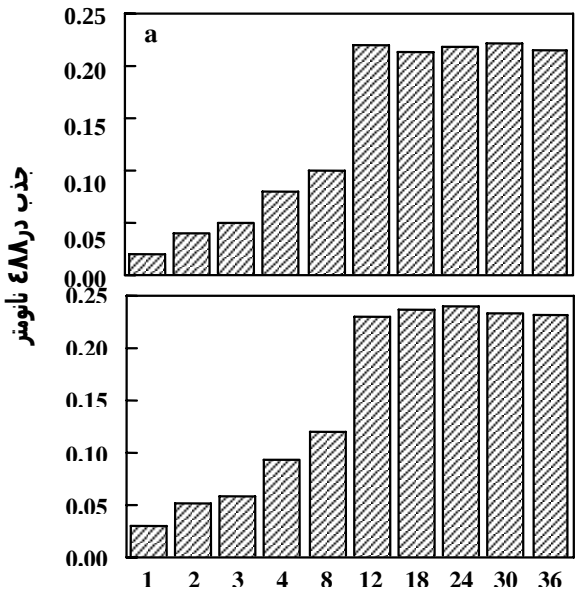
در اینجا، از روش فیزیکی سونیکاسیون به منظور استخراج پیگمان استفاده گردید که نتایج در شکل شماره ۴، نشان داده شده است. در اثر گرمخانه گذاری در هر کدام از دو دمای ۵۵ °C و ۷۵°C میزان استخراج پیگمان با عمل سونیکاسیون افزایش یافته و بیشترین مقدار پیگمان بعد از مدت ۱۲ ساعت بدست آمد و افزایش دما از ۵۵ °C به ۷۵°C تاثیر معنی داری بر میزان کاروتنوئید استخراج شده نداشت بطوریکه در هر دو دما جذب حدود ۰/۲۲ بدست آمد. همچنین، در مقایسه با روش استفاده از DMSO، زمان استخراج بمراتب طولانی تر (۱۲ ساعت در مقایسه با ۱۵ دقیقه) و راندمان استخراج نیز پایین تر بود (حدود ۳۰٪).

۳-۵- استخراج با استفاده از روش مکانیکی سایشی گلوله ای

بعد از تخریب دیواره سلولی توسط دستگاه سایشی گلوله ای، جذب کاروتنوئید استخراجی به مقدار قابل توجهی افزایش یافته و به ۰/۹۵ در ۴۸۸ نانومتر رسید. در این روش نیز، سلول های مخمر پس از عمل استخراج کاملا بی رنگ گردید که بیانگر یک استخراج نسبتا کامل می باشد. استخراج با این روش فیزیکی سریع بوده وظرف مدت ۲۰ دقیقه تکمیل گردید. این روش استخراج در مقایسه با روش استخراج توسط حلال DMSO که در آن در مدت کمتر از ۱۵ دقیقه جذب محلول استخراج شده به حدود ۰/۸ رسید، بهتر می باشد بخصوص که از یک حلال شیمیایی خطرناک نیز استفاده نمی گردد. نمودار تغییرات میزان جذب نمونه های استخراج شده با روش مکانیکی سایشی گلوله ای با میزان سلول های خشک در شکل ۳b، نشان داده شده است. تا نزدیک جذب ۱/۱ که مربوط به ۳۰ گرم سلول خشک می باشد، این تغییرات خطی است و با نتایج به دست آمده از روش DMSO نیز مطابقت دارد. اما، در روش DMSO این جذب از مقدار ۳۵ میلی گرم نمونه بدست آمده بود که نشان دهنده از دست رفتن مقداری پیگمان در روش شیمیایی (DMSO) میباشد زیرا در اثر استفاده از حلال شیمیایی مقداری از پیگمان در داخل حلال حل می شود که در روش استخراج مایع جدا سازی این مقدار تقریبا غیر ممکن می باشد.



شکل ۳ - ارزیابی رابطه بین جذب پیگمان استخراج شده و مقدار سلول مخمر بکار برده شده با استفاده از ۵/۰ میلی لیتر حلال DMSO (a) و با استفاده ازروش سایشی (b)



شکل ۴ - اثر زمان گرمخانه گذاری بر روی استخراج پیگمان توسط روش سونیکاسیون در دو دمای مختلف a) ۵۵°C و b) ۷۵°C

٤- نتیجه گیری

پس از انجام کلیه روش های شیمیایی استخراج پیگمان از سلول های خشک، نتایج نشان داد با توجه به استحکام دیواره سلولی مخمر *Sporobolomyces ruberrimus* H110، کاربرد مستقیم یک حلال آلی به تنهایی نمی تواند مفید باشد و عملا استخراج میسر نمی گردد. در مرحله بعد که شامل بکارگیری یک اسید معدنی (اسید کلرید ریک) بود راندمان استخراج به میزان ۵۰٪ پایین تر بود. در روش شیمیایی با استفاده از DMSO راندمان استخراج به میزان ۸۰٪ افزایش یافت و بنابر این، این روش می تواند بطور موثری به منظور استخراج پیگمان بکار رود. از دیگر محاسن این روش اجرای سریع و انجام همزمانی چندین نمونه بود. اما متاسفانه به دلیل سمیت بسیار بالای این حلال، در صورت باقیماندن مقادیر بسیار اندک در نمونه کاروتنوئید، خطرات فاحشی را بدنبال خواهد داشت. قابل ذکر است که بالا بودن بسیار بالای نقطه جوش این حلال، عملا جداسازی آن را حتی در صورت استفاده از دستگاه تقطیر در خلا بسیار مشکل و طولانی می نماید. از دیگر معضلاتی که با استفاده از این حلال پیش می آید و بسیار قابل توجه می باشد انحلال مقادیر نسبتا بالای کاروتنوئید (۲۰٪) در این حلال است که عملا جداسازی این مقدار میسر نخواهد بود.

اولین روش فیزیکی بکار گرفته شده در این مطالعه یعنی سونیکاسیون نیز ضمن داشتن راندمان پایین (حدود ۲۵٪)، مستلزم صرف وقت بسیار زیادی بود. اما، روش سایشی (فیزیکی) با استفاده از گلوله های ریز شیشه ای در دور بسیار بالا، بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، موثر ترین روش جهت استخراج کاروتنوئید از سوش *Sporobolomyces ruberrimus* H110 می باشد. طبق نتایج بدست آمده تمامی سوش های تیمار شده توسط این روش پس از عمل استخراج کاملا بی رنگ گردیدند که این موضوع نیز تاثیر بالای این روش را آشکار م سازد. از آنجا که در این روش، هیچ ماده

شیمیا یی به منظور تخریب دیواره سلولی مخمرها مورد استفاده قرار نمی گیرد لذا از جنبه های بهداشتی دارای ارزش بسیار بالایی است، در عین حال هم از سرعت بسیار بالایی نیز برخوردار است ودر مدت زمان بسیار اندک (حدود ۲۰ دقیقه) می توان کل پیگمان موجود را استخراج نمود. بنابراین، با توجه به موارد مذکور و ضمنا اقتصادی بودن آن، این روش بطور قطع می تواند یکی از بهترین و موثرترین روش ها برای استخراج پیگمان از مخمر *Sporobolomyces ruberrimus* H110 محسوب می گردد. در جدول شماره ۱، نتایج کلیه روش های مورد استفاده در این تحقیق با یکدیگر مقایسه گردیده اند.

جدول ۱- مقایسه روشهای اعمال شده بمنظور استخراج کاروتنوئیدها از مخمر *Sporobolomyces ruberrimus* H110

شماره آزمایش	روش آزمایش: فیزیکی	روش آزمایش: شیمیایی	حلال استخراج	درجه حرارت گرمخانه گذاری (°C)	زمان گرمخانه گذاری (ساعت)	حداکثر جذب[1] (λ=۴۸۸ nm)	درصد استخراج	میزان نسبی رنگی سلول پس از استخراج
۱		-	اتانول	۵۵	۱۸	۰/۱۷	۱۷	+
۲		-	اتانول	۷۵	۱۸	۰/۱۹	۱۹	+
۳		**HCl (0.2 N)**	اتانول	۵۵	۱۸	۰/۲۳	۲۴	+
۴		**HCl (0.2 N)**	اتانول	۷۵	۱۸	۰/۴۵	۴۶	++
۵		**HCl (0.5 N)**	اتانول	۵۵	۱۸	۰/۲۵	۲۵	+
۶		**HCl (0.5 N)**	اتانول	۷۵	۱۸	۰/۵۰	۵۱	++
۷		**DMSO**	اتانول	دمای محیط	-	۰/۷۸	۸۰[2]	+++
۸	سونیکاسیون		اتانول	۵۵	۱۲	۰/۲۲	۲۲	+
۹	سونیکاسیون		اتانول	۷۵	۱۲	۰/۲۴	۲۵	+
۱۰	روش سایشی[3]		اتانول	دمای محیط	-	۰/۹۸	۱۰۰	+++

[1] مقدار جذب میانگین حداقل سه تکرار میباشد.

[2] کاهش جذب بخاطر از دست رفتن حدود ۲۰٪ پیگمان در اثر استخراج مایع مایع

[3] آزمایش شماره ۱۰ به عنوان مرجع در تمامی آزمایشات در نظر گرفته شده است.

+++ بیرنگ شدن کامل سلولها، ++ وجود اندکی رنگ در سلولها، + رنگین بودن سلولها پس از استخراج.

۵- منابع

1- An, G. H., D. B, Schuman. and E. A, Johnson. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. Applied and Environmental Microbiology, 55: 116-124.

2- Biswas, S. K., K, Yokoyama., K, Nishimura. and M, Miyaji. 2001. Molecular phytogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 1191-1199.

3- Kusdiyantini, E., P, Gaudin., G, Goma. and P, J, Blanc. 1998. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. Biotechnology Letters 20: 929-934.

4- Martin, A. M., C. L, Lu. and T. R, Patel. 1993. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. Journal of Fermentation and Bioengineering ,76: 321-325.

5- Razavi, H. and I, Marc. Isolation of a new strain of *Sporobolomyces ruberrimus* for the production of carotenoids, using technical glycerol as carbon source. 11th European Congress on Biotechnology, Basel, Switzerland. August 24-29, 2003.

6- Sedmak, J. J., D. K, Weerasinghe. and S. O, Jolly. 1990. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma.* Biotechnology Techniques, 4: 107-112.

7- Takashima, M., M., Hamamoto. and T., Nakase. 2000. Taxonomic significance of fructose in the class urediniomycetes: Distribution of fructose in cell wall and phylogeny of urediniomycetous yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 23: 63-70.

8- Vazquez, M., V, Santos. and J. C, Parajo. 1997. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 19: 263-268.

9- Yamane, Y., K, Higashida., Y, Nakashima., T, Kakizono. and N, Nishio. 1997. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. Biotechnology Letters, 19: 1109-1111.

Comparison of pigment (carotenoid) extraction methods from *Sporobolomyces ruberrimus* H110

H. Razavi[1]*, K. Rezaei[1] and M. Ivan[2]

Abstract

In this study, the extraction of carotenoids from a new strain of yeast (*Sporobolomyces ruberrimus* H110) by different chemical and physical methods was investigated. For chemical pretreatment methods, HCl at two different concentrations (0.2 and 0.5 N) and two different temperatures (55 and 75°C), and DMSO solvent (also at two different temperatures, 55 and 75°C) were used. Sonication and bead beater were applied as physical methods. Results showed that the highest pigment extraction level (~100%) obtained by using bead beater. The second best method was the pretreatment by DMSO. Compared to chemical solvents used in this study, the use of a bead beater for the extraction of pigments is the best approach to avoid the toxicity risk(s) involved in the extraction process by DMSO.

Key Words: Extraction, Pigment, Carotenoids, *Sporobolomyces ruberrimus, DMSO, Bead Beater*

* corresponding author: E-mail: srazavi@ ut.ac.ir
1- Dept. Food Sci. Technology. Faculty of Biosystem Engineering. Tehran University, Karaj. Iran.
2- Department of Chemical Engineering, INPL University, Nancy, France.