Determinarea conþinutului de vitamine hidrosolubile ºi a capacitãþii antioxidante a unor extracte de drojdii cu potenþial probiotic

EUGENIA TEODOR[1]*, CAMELIA BÎRSAN[1], DIANA SMARANDACHE[2], RAMONA PENU[1],GABRIEL LUCIAN RADU[3]

[1] Institutul de ªtiinþe Biologice, Centrul de Bioanalizã,, Spl. Independentei., Nr. 296, 060031, Bucharest , România

[2]Universitatea Bucureºti, Facultatea de Biologie, Aleea Portocalilor, Nr. 1-3, 060101, Bucureºti, România

[3]Universitatea Politehnica Bucureºti,Facultatea deChimie Aplicatã ºi ªtiinþa Materialelor, Str. Polizu, Nr. 1-7, 011061, Bucureºti, România

Yeast strains selected from dairies and identified like Issatchenkia orientalis, Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces marxianus and Trichosporon beigelii species were analyzed intra- and extra-cellular for hydrosoluble vitamins content and anti-scavenger effect. The methods used were high performance liquid chromatography-reverse phase, for simultaneously determination of vitamins C, B1, B2, B3, B6 and B12, and electrochemical and spectrometric analysis for antioxidant activity. The content of vitamins (especially ascorbic acid) and anti-scavenger effect of yeast extracts recommend them as potential probiotic products.

Keywords: HPLC, antioxidant activity, hydrosoluble vitamins, yeasts

În ultimii ani termenul de probiotic se foloseºte pentru a defini "microorganisme vii care administrate în doze adecvate îmbunãtãþesc starea de sãnãtate a gazdei" [1]. În grupul produselor probiotice sunt incluse pe lângã bacterii lactice ºi drojdii ºi o serie de enzime (lactoperoxidaza, gluconaza etc.). Un loc aparte în aceastã categorie îl ocupã genurile de drojdii întâlnite in produsele lactate ce pot fi folosite în astfel de preparate probiotice (Kluyveromyces marxianus, Kluyveromyces lactis, Saccharomyces boulardii, Saccharomyces cerevisiae, Issatchenkia orientalis etc.).

S-a constatat cã drojdiile prezintã unele avantaje faþã de bacterii în utilizarea lor ca microorganisme recombinate cu rol de probiotic: sunt uºor de cultivat, sunt primele eucariote cu genom complet secvenþiat (Saccharomyces cerevisiae), în celula de drojdie pot avea loc modificãri necesare pentru expresia unor proteine (ex: proteolizã, glicozilare), nu sunt sensibile la antibioticele cele mai frecvent utilizate (ex: penicilina), prezintã "in vitro" o ratã mai mare de supravieþuire în stomac ºi intestinul subþire [2].

Eficacitatea acþiunii probioticelor poate fi potenþatã prin selectarea de noi tulpini microbiene, testarea potenþialului lor biotehnologic, manipularea geneticã în sensul potenþãrii caracterelor utile, precum ºi combinarea a cât mai multor tulpini [3].

Datoritã rolului important în nutriþie ºi instabilitãþii relative a vitaminelor [4], analiza calitativã ºi cantitativã este un obiectiv important pentru producãtorii ºi procesatorii de alimente. Cromatografia de lichide de înaltã performanþã (HPLC) este tehnicã analiticã preferatã pentru determinarea vitaminelor rezolvând multe dintre probleme analitice complexe ce apar la analiza unor probe reale [5,6] ºi se poate aplica dupã extracþia analiþilor þintã în fazã solidã (SPE) [7].

Þinând seama cã drojdiile biosintetizeazã un complex de vitamine (concentraþii diferite în vitaminele C, B2, B3, B6, B12) este utilã ºi evaluarea proprietãþilor de tip "radical – scavenger" ale acestor produse. Pentru evaluarea acestor proprietãþi sunt posibile mai multe variante însã douã metode, ambele bazate pe determinarea indirectã a potenþialei capacitãþi de eliminare a radicalilor liberi, conduc la rezultate exprimate în raport cu capacitatea antiradicalicã manifestatã de un compus de referinþã, Trolox-ul, faþã de acelaºi tip de radicali liberi. Experimental au fost utilizaþi doi radicali liberi, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) care este un radical liber cu viaþã lungã, ºi $ABTS^{\cdot+}$, radical cation format în urma reacþiei ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] cu persulfatul de potasiu [8,9].

Partea experimentalã

Toþi reactivii utilizaþi au fost de puritate analiticã sau pentru uz cromatografic: vitamina B1(Sigma), vitamina B2 (Merck), vitamina B3 (Sigma), vitamina B6 (Sigma), vitamina B12 (Merck), acid folic (Sigma), vitamina C (Sigma), DPPH (Sigma), ABTS (Sigma), persulfat de potasiu (Merk), clorurã de potasiu (Sigma) ºi toþi ceilalþi reactivi, metanolul (Ridel-de Haen, CHROMASOLV), acid acetic (Fluka), acidul heptansulfonic (Sigma), acidul clorhidric, HCl (Merck), acetonã ºi toluen,. Apa distilatã a fost obþinutã utilizând un sistem de purificare a apei, Elix 3 (Millipore).

Soluþiile stoc au avut concentraþiile de 3 mmol L^{-1} vitamina B1, 2,6 mmol L^{-1} vitamina B2, 0,13 mmol L^{-1} vitamina B3, 4,8 mmol L^{-1} vitamina B6, 0,74 mmol L^{-1} vitamina B12, 2,2 mmol L^{-1}, acid folic, 5 mmol L^{-1} vitamina C ºi au fost stocate între experimente la întuneric, la temperaturã redusã (+ 4^0C).

Tulpini de drojdii utilizate, condiþii de cultivare ºi de pregãtire a probelor

Au fost luate in studiu cinci tulpini de drojdii izolate si purificate anterior din produse lactate (brânzã, caº, lapte) provenite din diverse zone geografice ale þãrii. Tulpinile au fost denumite convenþional BC, LC, BF,Ri, CS, ºi LF. Studiile anterioare au sugerat apartenenþa lor la speciile Issatchenkia orientalis, Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces marxianus ºi Trichosporon beigelii putându-se realiza o încadrare taxonomicã preliminarã a tulpinilor [10].

Tulpinile de drojdii au fost cultivate timp de 18 h în 20 mL mediu YPG lichid (1% peptonã, 1% extract de drojdii, 2% glucozã), la 28^0C, cu agitare 150 rpm. După centrifugarea culturilor de drojdii (15 min la 10000 rpm) supernatantul a fost transferat în recipiente sterile ºi a fost pãstrat la +4^0C.

Sedimentul obþinut în urma centrifugãrii a fost resuspendat în 1 mL de amestec de Tris 25 mmol L^{-1} ; EDTA 10 mmol L^{-1}; glucoza 50 mmol L^{-1}, *p*H=8,0 cu liticazã (Sigma) în concentraþie finalã 1mg/mL ºi incubat 3 ore la 37^0C pentru obþinerea hidrolizatului celular.

* *email: dida@dbio.ro; Tel.: (+40) 021 223 90 70*

Determinarea concentrației vitaminelor a fost realizată atât în supernatante (vitamine eliberate extracelular în timpul dezvoltării) cât și în hidrolizatele celulare (vitamine intracelulare).

Extracția în fază solidă (SPE) a fost realizată cu cartușe C18 (300 mg) [7]. Cartușele au fost activate cu metanol și apoi echilibrate cu apa acidifiată cu HCl 0,05 mol L^{-1} (*p*H 4,2), după care s-a aplicat proba (0,25 mL). Spălarea s-a făcut cu apă acidifiată pentru îndepărtarea altor componente din extract, iar extracția vitaminelor s-a realizat cu metanol (0,25 mL). Probele astfel purificate au fost analizate imediat prin cromatografie în strat subțire (TLC) și cromatografie de lichide (HPLC).

TLC s-a realizat pe plăci Alugram SIL G/UV_{254} (Macherey-Nagel), sistemul de eluție fiind acetonă/metanol/toluen (1:2:8) cu vizualizare UV la 254 nm [11].

Determinările de cromatografie au fost realizate utilizând un sistem HPLC Jasco cu următoarele componente: pompa Jasco PU-1580 Intelligent HPLC Pump, coloană Kromasil/100-5 C_{18} (5 μm, 250 mm x 4,6 mm), degasor Jasco DG-2080-54 4-Line Degasser, sistem de gradient Jasco LG-1580-02 Ternary Gradient Unit, detector Jasco UV-1575 Intelligent UV/Vis Detector, software Borwin, la temperatura camerei. Faza mobilă a fost filtrată printr-o membrană TEKNOKROMA PTFE 0,22 μm și sonicată cu ajutorul unei băi de ultrasunete TRANSSONIC 460/H pentru eliminarea aerului dizolvat în soluție. Probele înainte de injectare au fost filtrate prin celule de ultra filtrare Millex Syringe Driven Filter Unit, 0,22 μm (Millipore).

Probele au fost analizate imediat după SPE prin HPLC, pornind de la un procedeu anterior ce folosește în faza mobilă agenți ion-pairing [12]. Câte 20 μL de probă au fost injectați în sistemul HPLC cu detector UV-Vis fixat la 270 nm. Faza mobilă a constat din componenta A: 5 mmol L^{-1} acid heptansulfonic în metanol și componenta B: 1% acid acetic, într-un raport de 30:70. Debitul fazei mobile, după optimizare, a fost de 1 mL/min. Metoda permite separarea și cuantificarea simultană a vitaminelor B1, B2, B3, B6, B12, C și a acidului folic.

Activitate antioxidantă

Metodele utilizate au fost:

- determinarea spectrometricã a scãderii maximului de absorbție de la 734 nm a radicalului cationic $ABTS^{\cdot+}$ în prezența compușilor cu presupus efect de eliminare de radicali liberi [8].
- determinarea electrochimicã a scãderii peak-ului anodic al DPPH de la 740 ± mV vs Ag/AgCl în prezența compușilor cu presupus efect de eliminare de radicali liberi [9].

Determinãrile electrochimice au fost realizate pe un sistem Model 273 A (EG&G, Princeton Applied Research), utilizând o celulã electrochimicã cu trei electrozi (electrod de lucru electrodul de cãrbune sticlos, electrodul de referințã Ag/AgCl, contraelectrodul fir de Pt).

Determinãrile spectrometrice au fost realizate utilizand un spectrometru Jasco V 530.

Rezultatele au fost calculate utilizând relația (1):

$$TEAC_{proba} = C_{Trolox} xf \frac{S_{proba} - S_{martor}}{S_{Trolox} - S_{proba}} \quad (1)$$

unde:

C_{Trolox} este concentrația Trolox-ului în celula de masurã,
f - factorul de diluție,
S_{proba} - semnalul analitic mãsurat pentru proba,
S_{Trolox} – semnalul analitic mãsurat pentru Trolox,
S_{martor} – semnalul analitic mãsurat utilizând volumul echivalent de solvent.

Rezultate și discuții

Experimentele efectuate au condus la stabilirea unei metode de determinare simultanã prin HPLC în regim izocratic, fazã inversã cu detecție UV a vitaminei C și a 6 vitamine B, cu urmãtorii timpi de retenție $t_{R, vit.C}$ = 2,7 min., $t_{R, vit.B3}$ = 3,8 min., $t_{R, vit.B12}$ = 5,2 min., $t_{R, acid.folic}$ ≈ 8 min., $t_{R, vit.B6}$ = 9,6 min., $t_{R, vit.B2}$ = 11,1 min. și respectiv $t_{R, vit.B1}$ ≈ 35 min. Metoda este simplã, permite separarea și determinarea cu o rezoluție bunã în cca 30 min (fig. 1) a compușilor de interes. Au fost stabilite caracteristicile de performanțã ale

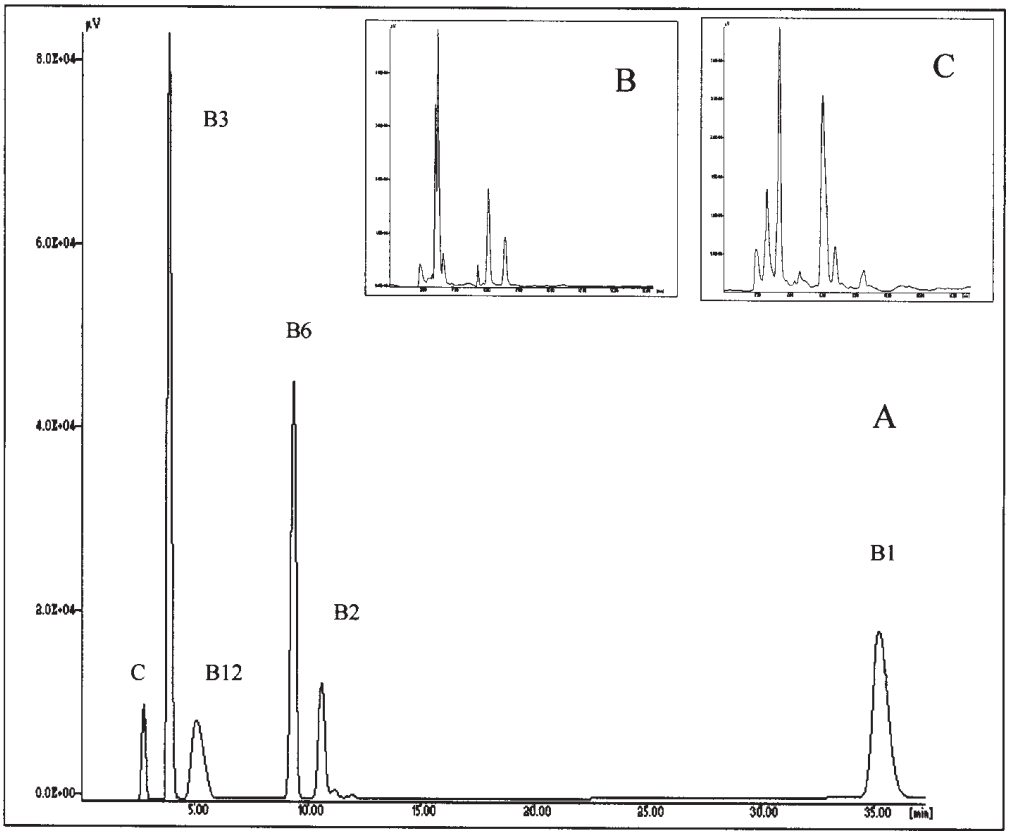

Fig. 1. Cromatogramele înregistrate pentru amestecul de vitamine standard (A), proba R-BC hidrolizat (B) si respectiv proba R-LF supernatant (C) (coloanã Kromasil C18, 5 μm, 25mm . 0,46 mm, debit de 1 mL/min)

Tabelul 1
CARACTERISTICILE DE PERFORMANÞÃ ALE METODEI CROMATOGRAFICE HPLC ELABORATÃ ªI OPTIMIZATÃ PENTRU ANALIZA VITAMINELOR HIDROSOLUBILE DIN EXTRACTELE DE DROJDII

Compus	Ecuaţia curbei de etalonare	R	Domeniul de liniaritate a răspunsului (mol L^{-1})	LD (mol L^{-1})	LoD (mol L^{-1})
Vitamina C	A=2E+09xCmolL^{-1}-1E+06	0,9957	$7x10^{-4}$–$2,8x10^{-3}$	$5,02x10^{-4}$	$5x10^{-4}$
Vitamina B_6	A=4E+09xCmolL^{-1}-24434	0,9994	$4,8x10^{-5}$–$6,8x10^{-4}$	$6,7x10^{-6}$	$6,3x10^{-6}$
Vitamina B_2	A=5E+10xCmolL^{-1}-91135	0,9952	$2,6x10^{-6}$–$3,7x10^{-5}$	$1,83x10^{-6}$	$1,82x10^{-6}$
Vitamina B_{12}	A =1E+10xCmolL^{-1}-17792	0,9989	$7,4x10^{-6}$–$1x10^{-4}$	$2,6x10^{-6}$	$2x10^{-6}$
Vitamina B_3	A=3E+09x CmolL^{-1}-7749,9	0,9993	$8,1x10^{-5}$–$1,1x10^{-3}$	$7x10^{-6}$	$3,9x10^{-6}$

metodei, rezultatele obþinute fiind prezentate în tabelul 1. Pentru trasarea curbelor de calibrare măsurările au fost realizate în triplicat ºi folosirea a 7 concentraþii. Limita de detecþie (LoD) a fost calculată ca 3 . S/Z, iar limita de determinare (LD) ca fiind 10 . S/Z. Se observă că se obþine o limită de detecţie de ordinul micromolar. Analiza calitativă s-a realizat prin compararea timpilor de reţenţie a peak-ului caracteristic fiecărui standard cu timpii de reţenţie atribuibili compuºilor de interes din probe.

Cromatogramele obţinute pentru probele analizate au indicat prezenţa în toate tulpinile în special a vitaminei C, cantităţi mai mici, dar nu neglijabile, de vitamina B2, B3 ºi B6. Vitamina B12 s-a identificat într-o singură tulpină, R-BC, iar vitamina B1 nu a fost detectată în nici una din probe. Vitamina C s-a putut evidenţia ºi prin TLC, dar celelalte vitamine B nu s-au evidenţiat în probe datorită concentraţiei scăzute (fig. 2).

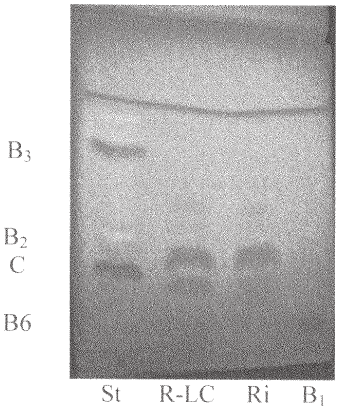

Fig.2 Cromatograma (TLC) a probei R-LC (supernatant) ºi Ri (hidrolizat) obţinută pe plăci SIL G-25 UV254 ºi vizualizare cu lampă UV la 254 nm

Conţinutul de vitamine hidrosolubile este diferit în probele analizate. S-a evidenţiat o cantitate destul de mare de vitamina C (între 2,7± 0,06 . 10^{-3} mol L^{-1} ºi 11,6±0,011 . 10^{-3} mol L^{-1}) ºi cantităţi variabile de vitamina B6, B3 ºi B2 (tabelul 2). În general, conţinutul intracelular de vitamine este mai mare decât în mediul de cultură. Eficienţa diferitelor tulpini de drojdii de a biosintetiza vitamine se încadrează în limite asemănătoare, doar tulpina R-BF prezintă un conţinut mai redus de vitamine, iar tulpina Ri prezintă cel mai ridicat nivel de acid ascorbic, dar intracelular nu s-au detectat ºi alte vitamine din complexul B.

Conţinutul ridicat de vitamina C din probe a permis ºi evaluarea capacităţii antioxidante a extractelor respective, cunoscând faptul că tulpinile obiºnuite de drojdii biosintetizează acid eritroascorbic în loc de acid ascorbic [13].

Au fost utilizate cele două tipuri de radicali liberi deoarece metoda utilizând DPPH prezintă o caracteristică de selectivitate faţă de cea care cuantifică efectul de tip "radical –scavenger" în raport cu ABTS radical cation. Selectivitatea DPPH se manifestă prin reactivitatea deosebită faţă de polifenolii cu nuclee condensate, în sensul că reacţionează numai cu polifenoli care prezintă o delocalizare maximă a electronilor ºi care prezintă cel puţin o grupare OH fenolică grefată, pe când reacţia de stingere a radicalului liber $ABTS^{\cdot+}$ este dată de toţi compuºii prezumtiv antioxidanţi.

Acest fenomen de selectivitate este evident în cazul probelor de supernatant R-CS, R-LC ºi Ri. Pentru aceste probe conţinutul de vitamina C este relativ acelaºi (cca 3 . 10^{-3} mol L^{-1}), pe când conţinutul în riboflavină si de piridoxină sunt diferite. Aceasta face ca activitatea antioxidantă exprimată în echivalent Trolox în raport cu radicalul liber DPPH sa fie mai mare pentru proba R-CS ($TEAC_{probaR-CS}$ = 5,844 μmol echivalent Trolox) care are un conţinut de riboflavină maxim, în raport cu probele R-LC ($TEAC_{probaR-LC}$ = 3,621 μmol echivalent Trolox) ºi Ri ($TEAC_{probaRi}$ = 3,652 μmol echivalent Trolox). În cazul în care activitatea este exprimată faţă de radicalul liber $ABTS^{\cdot+}$ eficienţa de "radical scavenger" maximă este manifestată tot de proba R-CS, ($TEAC_{probaR-CS}$ = 73,896 μmol echivalent Trolox) faţă de probele R-LC ($TEAC_{probaR-LC}$ = 9,5695 μmol echivalent Trolox) si Ri ($TEAC_{probaRi}$ = 23,2116 μmol echivalent Trolox) care are un conţinut total de vitamine maxim. Nu trebuie omis faptul ca activitatea antiradicalică nu este o marime aditivă, ca urmare se poate spune că activitatea maximă este înregistrată pentru produsul care poate prezenta delocalizarea electronică maximă ºi nu neapărat pentru cel care are un conţinut total de vitamine ridicat.

În cazul probelor hidrolizate (intracelular) conţinutul maxim de vitamina C din proba Ri conduce la o activitate ($TEAC_{probaRi}$ =17,9363 mmol echivalent Trolox), probele cu relativ acelaºi conţinut de vitamina C ºi conţinuturi asemănătoare de riboflavină ºi piridoxină manifestând aceeaºi eficacitate antiradicalică (ex. $TEAC_{probaR-BC}$ =13,2298 μmol echivalent Trolox; $TEAC_{probaR-LC}$ =13,9048 μmol echivalent Trolox).

Tabelul 2

CONÞINUTUL DE VITAMINE HIDROSOLUBILE ÎN SUPERNATANT (EXTRACELULAR) ºI HIDROLIZATELE (INTRACELULAR) TULPINILOR DE DROJDII ANALIZATE DETERMINAT PRIN HPLC (VALOARE MEDIE ± DEVIAÞIA STANDARD)

Proba (tulpina)	Vit C (Valoarea medie ± SD, 10^{-3} mol L^{-1})	Vit B_2 (Valoarea medie ± SD, 10^{-6} mol L^{-1})	Vit B_3 (Valoarea medie ± SD, 10^{-6} mol L^{-1})	Vit B_6 (Valoarea medie ± SD, 10^{-4} mol L^{-1})	Vit B_{12} (Valoarea medie ± SD, 10^{-6} mol L^{-1})
R-BC supernatant	2,9 ±0,89	0	7,1±0,2	0,88±0,063	2.9±0,21
R-BC celular	7,5±0,025	3,3±0,26	1,7±0,11	5,3±0,2	3,3±0,447
R-LF supernatant	2,8±0,024	3±0,2	117±27,9	5,4±0,18	0
R-LF celular	5,4±0,041	2,2±0,31	33±2,61	2,8±0,19	0
RC supernatant	2,7± 0,06	2,9±0,03	58±0,4	4,3±0,58	0
RC celular	5,9±0,042	0	32±1,1	4,9±0,11	0
R-CS supernatant	3,1±0,005	6,8±0,78	10±0,88	1,1±0,015	0
R-CS celular	8,7±0,03	7,1±0,89	0	1,3±0,18	0
R-LC supernatant	2,9±0,013	0	4,8±0,14	0,82±0,006	0
R-LC celular	7,7±0,036	2,8±0,13	5,5±0,2	6,5±0,32	0
R-BF supernatant	3±0,013	0	6,8±0,85	0	0
R-BF celular	5,5±0,007	0	6,1±0,1	0	0
Ri supernatant	3 ±0,009	2,2±0,08	5,6±0,18	1,6±0,08	0
Ri celular	11,6±0,011	0	0	0	0

Concluzii

Studiul efectuat a permis caracterizarea unor extracte de tulpini de drojdii prin identificarea ºi determinarea conþinutului în vitamine hidrosolubile (C, B2, B3, B6, B12) în vederea folosirii lor în scop probiotic. Prezenþa în cantitãþi relativ ridicate a acidului ascorbic, un antioxidant recunoscut, în probele analizate explicã capacitatea antioxidantã a respectivelor extracte. S-a evidenþiat cã toate probele analizate prezintã activitate anti-radicalicã, un efect ce amplificã calitãþile generale ale extractelor analizate ºi implicit a tulpinilor de drojdii selecþionate. Metoda cromatograficã HPLC adaptatã ºi optimizatã a permis determinarea vitaminelor hidrosolubile la sensibilitãþi de micromolar. Utilizarea SPE a condus la îmbunãtãþirea performanþelor analitice ale metodei cromatografice.

Mulþumiri: Cercetãrile au fost desfãºurate în cadrul proiectului CEEX-Biotech 9/2005. Mulþumim d-nei dr. Simona Liþescu pentru asistenþã la interpretarea activitãþii antioxidante.

Bibliografie

1. REID, G., JASS J., SEBULSKY, T.M., MCCORMICK, J.K., Clinical Microbiology Reviews, **16**, nr. 4, 2003, p. 658
2. BLANQUET, S., MAROL-BONNIN, S., BEYSSAC, E., POMPON, D., RENAU,D M., ALRIC, M., Trends in Biotechnology **19**, 2001, p.393
3. BOMBA, A., NEMCOVA ,R., MUDRONOVA, D., GUBA, P., Trends in Food Science and Technology **13**, 2002, p121
4. OTTAWAY, P. B., The Technology of Vitamins in Food, Chapman and Hall, New York, 1993
5. MORENO, P., SALVADO, V., J. Chromatogr. A, **870**, 2000, p. 207
6. DE LEENHEER, A. P., LAMBERT ,W. E., DE UYTER, M. G., (Eds) Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins, 2nd edn, Chromatographic Science Series, Vol. 30, Marcel Dekker, New York, 1985
7. CHO, C. M., KO, J. H., CHEONG, W. J., Talanta, **51,** 2000, p. 799
8. BENZIE, I., STRAIN, J. J, Anal. Biochem., **239**, 1996, p. 70
9. LIÞESCU, S., RADU, G.L., Eur. Food Res. And technol. Part A, 2000, **211**, p. 218
10. GHINDEA, R., CSUTAK, O., VASSU, T., STOICA, I., IFTIME, O., SASARMAN, E., NOHIT A-M., SMARANDACHE D., FOLOGEA D., SOARE S., TRASCA, C., Roum. Biotech. Lett., **8**, 2003, p. 1247
11. PONDER, E. L., FRIED, B., SHERMA ,J., Acta Chrom., **14**, 2004, p. 70
12. KHOR, S. C., TEE, E. S., Mal J Nutr **2,** 1996, p. 49
13. SAUER, M., BRANDUARD,I P., VALLI M., PORRO, D., Appl. Environ. Microb.**70**, 2004, p. 6086

Intrat în redacþie: 15.02.2007